

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00915

## 斜带石斑鱼 GtHRs 在卵巢发育过程中的表达模式

胡雪松<sup>1,2</sup>, 刘晓春<sup>1</sup>, 张勇<sup>1</sup>, 李水生<sup>1</sup>, 陈华谱<sup>1</sup>, 林浩然<sup>1</sup>

1. 中山大学 有害生物控制与资源利用国家重点实验室; 水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275;
2. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070

**摘要:** 对斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 卵巢进行组织学分析, 根据卵母细胞的发育阶段将卵巢发育划分为 7 个时期(I-VII), 检测斜带石斑鱼不同发育时期卵巢中两种促性腺激素受体(gonadotropin receptors, GtHRs), 即卵泡刺激素受体(follicle-stimulating hormone receptor, FSHR)和促黄体素受体(luteinizing hormone receptor, LHR)的 mRNA 水平, 同步分析下游卵巢型芳香化酶基因(Cyp19a)的表达模式。实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 结果显示, FSHR 的 mRNA 水平在 I、II 时期的卵巢中较低, 在 III 时期开始上调, 在 IV、V 时期显著升高, 在 VI 时期显著下降。相比之下, LHR 的转录水平在卵巢发育早期(I-IV)表达较低, 在 V 时期开始有所升高, 在 VI 时期达到峰值。卵巢内 Cyp19a 的 mRNA 在 I-III 时期保持较低水平, 在 IV、V 时期的表达显著增强, 在 VI 时期表达明显减弱。在卵巢发育过程中, Cyp19a 的整体表达模式与 FSHR 较为相似。上述结果表明, 斜带石斑鱼 FSHR 和 LHR 均参与了卵巢发育的调控, 但在不同发育时期功能不同。在卵巢发育过程中, FSHR 可能是介导 Cyp19a 正调控的主要因素。本研究旨在阐明斜带石斑鱼 GtH/GtHR 信号系统在生殖调控过程中的作用提供基础依据。

**关键词:** 斜带石斑鱼; 促性腺激素受体; 卵巢型芳香化酶基因; 卵巢发育

中图分类号: Q959

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)06-0915-08

脊椎动物垂体前叶分泌的促性腺激素(gonadotropins, GtHs)包含卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)和促黄体素(luteinizing hormone receptor, LH)。GtHs 为异二聚体结构, 包含一个共同的  $\alpha$  亚基和一个激素特异性的  $\beta$  亚基<sup>[1]</sup>。两个亚基为不同的基因所编码, 其中  $\beta$  亚基决定着激素的生物学活性和特异性。GtHs 与位于性腺表面的促性腺激素受体(gonadotropin receptors, GtHRs), 分别为 FSHR 和 LHR 结合, 启动下游信号通路, 从而激活与性类固醇生成相关的酶或蛋白, 诱导性激素合成, 进而调控配子发生<sup>[2]</sup>。

在鲑科鱼中的研究表明, FSH 主要在性腺发

育早期起调控作用, 而 LH 主要参与配子成熟和排出<sup>[3]</sup>。然而, 一些学者在多种一年多次产卵的鱼类中发现, FSH $\beta$  和 LH $\beta$  在生殖周期中的表达变化与其在鲑科鱼中的报道存在很大差异, 并各具特点<sup>[4-11]</sup>。例如, 真鲷(*Pagrus major*) LH $\beta$  转录本在两性配子发生到排出始终保持较高水平, 相比而言, FSH $\beta$  mRNA 水平随精巢发育逐步升高, 但在卵巢发育过程中则始终维持在较低状态<sup>[8, 11]</sup>。牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 两种 GtH $\beta$ s 的转录水平均随卵巢发育逐渐升高, 并在成熟阶段达到峰值<sup>[6]</sup>。这些结果表明 GtHs 在硬骨鱼生殖调控中的功能存在种属特异性, 且带有一定的复杂性和多

收稿日期: 2012-02-21; 修订日期: 2012-04-20.

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(200903046); 广东省科技计划项目(2009B020308001, 2010B090400551, 2011B020307009); 广东省海洋渔业科技推广专项 (A200800H01, A200900H01).

作者简介: 胡雪松(1977-), 男, 博士, 主要从事鱼类生理和育种研究. E-mail: cedarhu@fishbreeding.org

通信作者: 林浩然, 教授, 中国工程院院士, 主要从事鱼类生理学研究. E-mail: lsslhr@mail.sysu.edu.cn

样性。

GtHs 的作用是通过结合 GtHRs 实现的, 因而对 GtHRs 进行研究有助于阐明 GtHs 的功能。迄今, 在多种硬骨鱼性腺中已克隆到两种 GtHRs<sup>[12-27]</sup>, 但有关 GtHRs 在卵巢发育过程中的表达研究仍很有限, 已有的报道多集中于雌雄异体鱼类<sup>[19-21, 28]</sup>, 相关研究在雌雄同体雌性先熟的鱼类中尚属空白。

斜带石斑鱼属鲈形目(Perciformes), 鲷科(Serranidae), 石斑鱼亚科(Epinephelinae), 石斑鱼属(*Epinephelus*), 是中国南方及东南亚国家的重要海水经济鱼类。斜带石斑鱼是雌雄同体雌性先熟鱼类, 在自然条件下雌鱼大约在 7 龄发生性逆转, 其调控机制仍不清楚。以往的研究证明, 斜带石斑鱼卵巢型芳香化酶基因(Cyp19a)表达的关闭所引起的 17 $\beta$ -雌二醇(Estradio-17 $\beta$ , E<sub>2</sub>)浓度下降是人工诱导性逆转过程中的重要事件<sup>[29-30]</sup>。最近, 我们从斜带石斑鱼性腺中克隆了两种 GtHRs, 分析了二者在 17 $\alpha$ -甲基睾酮(17 $\alpha$ -methyltestosterone, MT)埋植诱导性逆转过程中的表达变化, 发现两个 GtH/GtHR 信号系统可能在性类固醇调控方面具有不同作用<sup>[27]</sup>。本研究在卵巢发育过程中分析两种 GtHRs 的时间表达模式, 同步检测下游 Cyp19a 的表达水平, 旨在深入了解斜带石斑鱼 GtH/GtHR 信号系统在性腺发育和性逆转过程中的作用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及样本采集

斜带石斑鱼样本均取自广东省大亚湾水产试验中心, 采用车间循环水养殖, 每日投喂 2 次, 水温为 24~29℃。不同发育时期的卵巢样本于 2008 年 10 月至 2009 年 8 月期间收集, 实验鱼的年龄为 2~26 个月。实验鱼先用 MS-222 麻醉, 随后称重, 测量体长, 迅速取下一小块卵巢中间部分组织, 置于液氮速冻, 存放于 -80℃ 超低温冰箱备用。同时用波恩氏液固定小块相应位置的卵巢组织, 进行组织学鉴定以确认发育时期和状态。用于取样的所有解剖器械和玻璃器皿均经 180℃ 烘

烤 3 h, 用于存放样本的 1.5 mL 离心管均用 DEPC 处理, 并高温高压灭菌。

### 1.2 组织学分析

将固定好的性腺样本用石蜡包埋, 切片厚度为 7  $\mu$ m, 苏木精-伊红染色, 在光学显微镜下判断性腺发育时期并拍照。

### 1.3 总 RNA 提取

将卵巢样本按发育时期归类, 统一提取总 RNA, 提取方法参照 Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, USA)说明书。取 1  $\mu$ g 总 RNA 上样于 1%琼脂糖凝胶电泳, 以确定 RNA 的完整性, 要求 28S 条带亮度是 18S 的两倍。测定样本 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 值以确定 RNA 浓度及纯度, OD<sub>260/280</sub> 值在 1.8~2.0 之间。

### 1.4 cDNA 第一条链合成

分别取 1  $\mu$ g 总 RNA 样本, 用 DNA 酶(RNase-free DNase I, Fermentas, USA)于 37℃ 处理 30 min, 以去除基因组 DNA; 接着在各样本中加入 1  $\mu$ L 10 mmol/L EDTA(Fermentas, USA), 于 65℃ 处理 10 min 以灭活 DNA 酶; 最后参照 ReverTra Ace 反转录试剂盒(Toyobo, Japan)说明书合成 cDNA 第一条链。反应体系: 处理过的 RNA 11  $\mu$ L, 5 $\times$  Reaction buffer 4  $\mu$ L, 2 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L, dT 1  $\mu$ L, RNase Inhibitor 1  $\mu$ L, ReverTra Ace 1  $\mu$ L。反应条件: 42℃ 20 min, 99℃ 5 min, 4℃ 5 min。

### 1.5 引物合成

本研究 Real-time PCR 所用引物全部由上海英骏公司合成, 其中 FSHR、LHR 及 18S 引物参考已发表的文献<sup>[27]</sup>, Cyp19a 引物根据 GenBank (AY510711)中提供的序列设计。引物序列分别为 FSHR 上游: 5'-CGAGGCTGACCCTTACTTCC-3', 下游: 5'-GATCCAG ATGAGGACCCGTA-3'; LHR 上游: 5'-GGACATTGCAGGCTTCAGTT-3', 下游: 5'-CAAGGTGGCACATGAGGAAG-3'; 18S 上游: 5'-CCTGAGAAACGGCTACCACAT-CC-3', 下游: 5'-AGCAACTTTAGTATACGCTATTGGAG-3'; Cyp19a 上游: GGCATGA ACAAGAGAGGCATC, 下游: CTGTGTGGCGGAGACACTGAC。

### 1.6 质粒标准品制备及实时荧光定量 PCR

首先以卵巢 cDNA 为模板, 利用以上引物分

别进行 PCR 扩增, 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验特异性; 随后将含有目的及内参基因片断的质粒按  $10^{-1}$  到  $10^{-8}$  依次进行梯度稀释。分别以上述引物进行 PCR 扩增, 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验稀释效果。PCR 反应为 20  $\mu$ L 体系, 分别包括: 去离子水 13  $\mu$ L,  $10\times$ Taq buffer 2  $\mu$ L,  $MgCl_2$  1.6  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 0.4  $\mu$ L, 上下游引物(10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L)0.1  $\mu$ L, 质粒模板 1  $\mu$ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 30 cycles 94 $^{\circ}$ C, 15 s; 56 $^{\circ}$ C, 15 s; 72 $^{\circ}$ C, 20 s。用于实时荧光定量 PCR 的各待测样品和标准样品均在 Roche Light Cycler 480 real-time PCR system(USA)反应。反应体系参照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (TAKARA, Japan)试剂盒说明书准备, 具体为: SYBR<sup>®</sup> Green Realltime PCR Master Mix 5  $\mu$ L, 上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.2  $\mu$ L, 模板 0.5  $\mu$ L, 去离子水 4.1  $\mu$ L。

反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 40 cycles 95 $^{\circ}$ C, 10 s; 56 $^{\circ}$ C, 15 s; 72 $^{\circ}$ C, 20 s。进行 2 个额外的循环从 60 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C 进行荧光值读取并分析溶解曲线。

### 1.7 数据分析

用于定量 PCR 分析的所有数据均用平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SE)表示。使用 GraphPad prism 5.0 软件中的 Tukey's multiple range test 进行显著性差异分析, 当  $P<0.05$  时表示存在显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 斜带石斑鱼卵巢发育时期的划分

根据卵母细胞发育阶段将卵巢发育共划分为 7 个时期(I - VII)。I: 卵巢内可见大量性原细胞(gonium, G)和少量的初级生长阶段的卵母细胞(primary-growth stage oocyte, O1)(图 1A); II: 卵巢内可见大量 O1(图 1B); III: 卵巢内开始出现少量

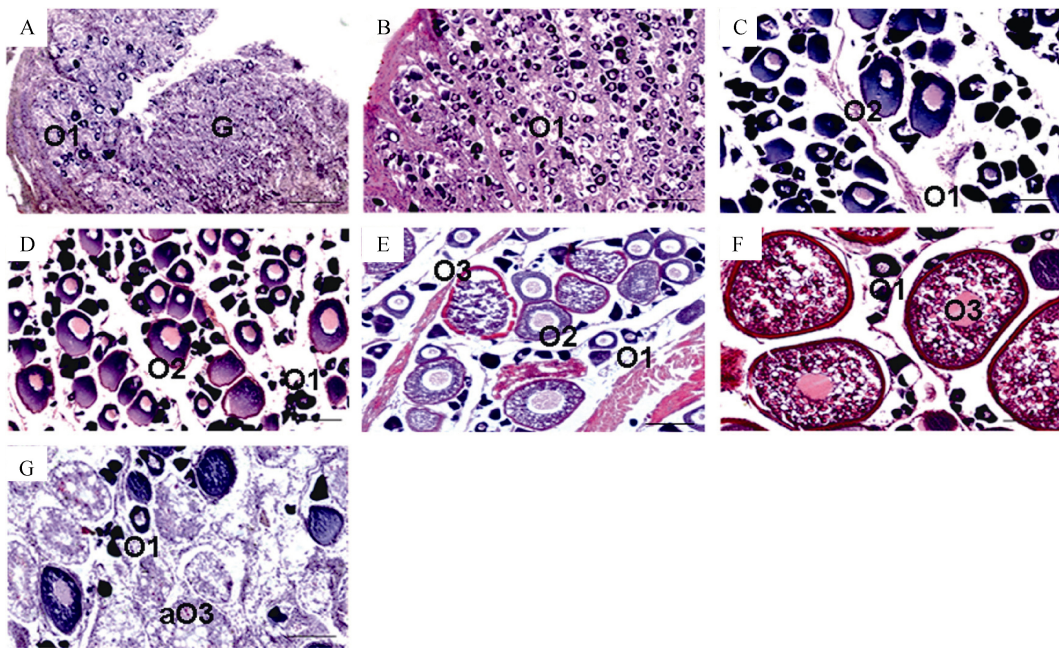


图 1 斜带石斑鱼卵巢发育不同时期 (I - VII) 的性腺组织切片图

A, 卵巢内可见大量性原细胞(G)及少量初级生长阶段卵母细胞(O1)(I); B, 卵巢内可见大量 O1 (II); C, 卵巢内出现少量皮质小泡阶段卵母细胞(O2)(III); D, 卵巢内可见大量 O2 (IV); E, 卵巢内出现少量卵黄生成阶段卵母细胞(O3)(V); F, 卵巢内可见大量 O3 (VI); G, 卵巢内可见大量退化的卵黄生成阶段的卵母细胞(aO3)(VII)。G, 性原细胞; O1, 初级生长阶段卵母细胞; O2, 皮质小泡阶段卵母细胞; O3, 卵黄生成阶段卵母细胞; aO3, 退化的卵黄生成阶段卵母细胞。标尺表示 200  $\mu$ m。

Fig.1 Photomicrograph showing the different phases of the ovary development in the orange-spotted grouper

A, phase-I with the numerous goniums and a few primary-growth stage oocytes; B, phase-II with the numerous primary-growth stage oocytes; C, phase-III with a few cortical-alveolus stage oocytes; D, phase-IV with numerous cortical-alveolus stage oocytes; E, phase-V with a few vitellogenic stage oocytes; F, phase-VI with numerous vitellogenic stage oocytes; G, phase-VII with numerous atretic vitellogenic stage oocytes. G, gonium; O1, primary-growth stage oocyte; O2, cortical-alveolus stage oocyte; O3, vitellogenic stage oocyte; aO3, atretic vitellogenic stage oocyte. Scale bar=200 $\mu$ m.

皮质小泡阶段卵母细胞(cortical-alveolus stage oocyte, O2)(图 1C); IV: 卵巢内可见大量 O2(图 1D); V: 卵巢内开始出现少量卵黄生成阶段卵母细胞(vitellogenic stage oocyte, O3)(图 1E); VI: 卵巢内可见大量 O3(图 1F); VII: 卵巢内出现大量退化的卵黄生成阶段卵母细胞(atretic vitellogenic stage oocyte, aO3)(图 1G)。

### 2.2 FSHR、LHR 及 Cyp19a 在卵巢发育不同时期的表达

利用 FSHR、LHR、Cyp19a 及 18S 引物能有效地从斜带石斑鱼卵巢 cDNA 模板中扩增出特异性目的条带, 每对引物在 5 个样本中的扩增结果具有良好的重复性(图 2A)。以 FSHR 为例, 不同浓度质粒模板对应的扩增条带显示出良好的梯度效果, 标准曲线及扩增效率和误差均符合要求(图 2B); 融解曲线质量良好, 无非特异性扩增(图 2C)。我们利用上述建立的荧光定量检测方法对斜带石斑鱼卵巢发育不同时期的样本中 FSHR、LHR 及 Cyp19a 的表达模式进行了分析。FSHR 的 mRNA 水平在 I、II 时期的卵巢中较低, 在 III 时期开始上调, 在 IV、V 时期显著升高, 在 VI、VII 时期显著下降(图 3A)。相比之下, LHR 的转录水平在卵巢发育早期(I-IV)表达较低, 从 V 时期开始有所升高, 在 VI 时期达到峰值, 在 VII 时期显著下降(图 3B)。卵巢中 Cyp19a 的 mRNA 在 I-III 时期保持较低水平, 在 IV、V 时期的表达显著增强, 在 VI、VII 时期表达显著减弱(图 4)。在卵巢发育过程中, Cyp19a 的整体表达模式与 FSHR 较为相似。

### 3 讨论

斜带石斑鱼早期性别均分化为雌性, 其性腺属于不同步发育型。在性腺分化和发育过程中, 学者们曾利用组织学方法详细描述过卵巢和卵母细胞的形态学变化<sup>[31-32]</sup>。对斜带石斑鱼卵巢发育过程中存在的几种主要卵细胞有一致的观点, 即包含性原细胞、初级生长阶段卵母细胞、皮质小泡阶段卵母细胞、卵黄生成阶段卵母细胞、退化的卵母细胞。在休眠期, 卵巢中主要包含初级生

长阶段卵母细胞。在发育期, 卵母细胞中慢慢出现皮质小泡, 此时在组织学上能分辨出双层滤泡

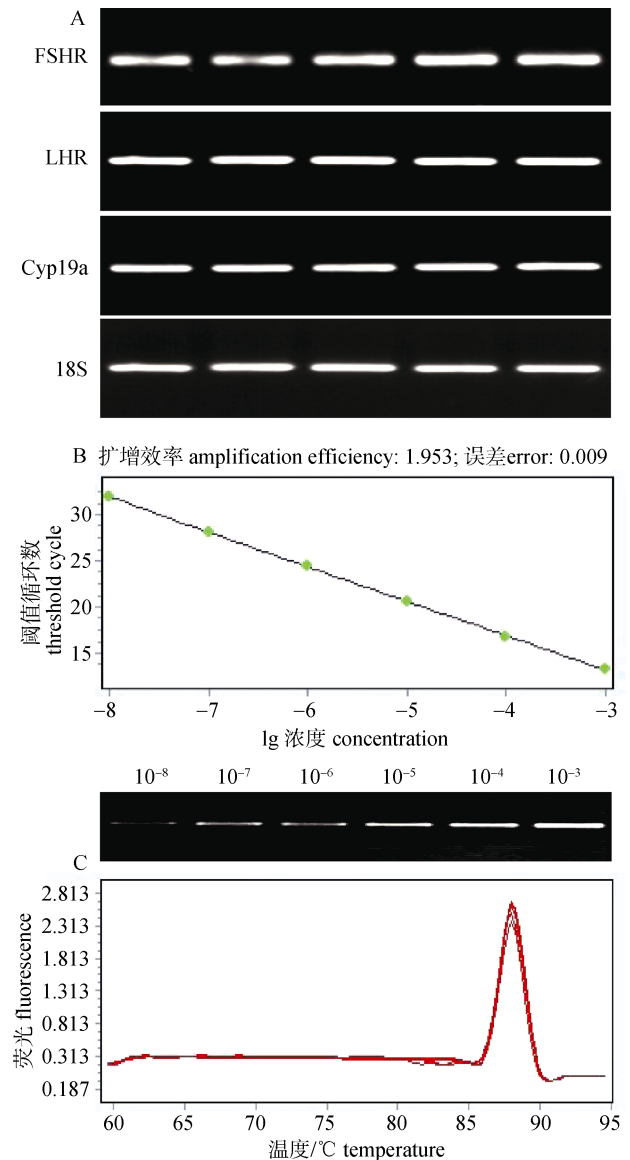


图 2 斜带石斑鱼 FSHR、LHR、Cyp19a 和 18S 的定量分析方法建立

利用卵巢 cDNA 模板能特异性扩增目的和内参基因, 且 PCR 反应在 5 个样本中具有重复性(A).FSHR 标准曲线的建立及质粒浓度梯度的 PCR 验证(B). FSHR 融解曲线进一步证实 PCR 反应的特异性(C).

Fig. 2 Validation of a Real-time PCR for FSHR, LHR, Cyp19a and 18S in the orange-spotted grouper. All target and reference genes could be amplified specifically by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from each ovary cDNA samples, and the results were repeatable on five samples (A). A standard curve for real-time PCR of FSHR and PCR confirmation from plasmid templates with different concentrations are shown in (B). The specific amplification of FSHR was further verified by the melting curve with one peak (C).

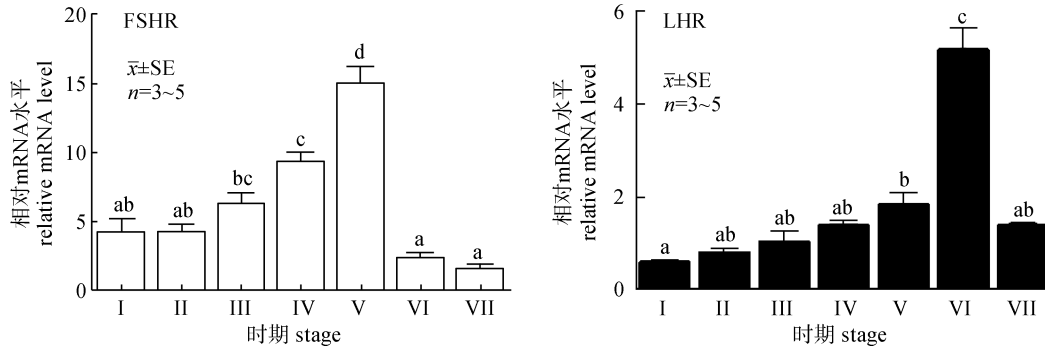


图 3 斜带石斑鱼 FSHR(A)和 LHR(B)在卵巢发育不同时期的相对表达水平

18S 为内参基因, 不同柱上字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ).

Fig. 3 Levels of mRNA expression for FSHR (A) and LHR (B) during ovary development in orange-spotted grouper. 18S is used as the reference gene. Bars with different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

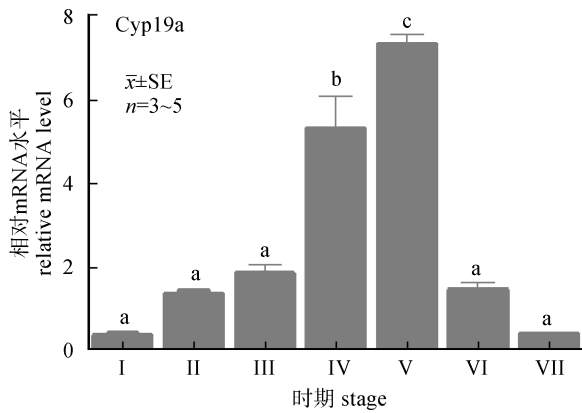


图 4 斜带石斑鱼 Cyp19a 在卵巢发育不同时期的相对表达水平

18S 为内参基因, 不同柱上字母表示不同发育时期的差异显著 ( $P<0.05$ ).

Fig. 4 Levels of mRNA expression for Cyp19a during ovary development in orange-spotted grouper. 18S is used as the reference gene. Bars with different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

膜, 接着卵黄开始生成并逐渐累积, 直至卵母细胞成熟。在整个发育期, 卵巢中可能同时包含着 2 种以上不同发育阶段的卵母细胞。在本研究中, 我们根据卵母细胞的发育阶段对卵巢发育时期进行了划分。不同时期的划分依据是: 将不同发育阶段卵母细胞的出现定为一个时期; 将相应阶段卵母细胞占据较大比例, 且在下一阶段卵母细胞出现之前定为一个时期。该划分办法能保证对处于发育期的卵巢组织学切片结果进行相对稳定和准确的判断。

斜带石斑鱼 FSHR 的转录水平在卵母细胞由

初级生长阶段向成熟阶段发育过程中显著升高, 在成熟阶段剧烈下降, 表明 FSHR 主要在卵母细胞成熟前的发育过程中发挥调控作用, 但并不参与排卵过程。在同为鲈形目的舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)中发现, FSHR 强烈表达于卵黄生成前和早期卵黄生成阶段的卵母细胞, 但并不表达于成熟卵母细胞<sup>[21]</sup>, 这与本研究结果相符。然而, 斑马鱼(*Danio rerio*)FSHR 的表达仅在卵母细胞进入卵黄生成阶段才开始上调<sup>[19]</sup>, 说明 FSHR 在不同鱼类卵母细胞发育过程中的作用存在差异, 这可能与种间不同的生活环境和繁殖特性有关。与 FSHR 相比, LHR 的转录本在卵母细胞早期发育阶段的水平较低, 在卵母细胞进入卵黄生成阶段有所升高, 在卵母细胞成熟阶段达到峰值, 这与斑马鱼 LHR 的表达方式相似<sup>[19]</sup>, 但与鲑科鱼 LHR 只在成熟卵母细胞中表达的报道是不同的<sup>[28]</sup>。由于对卵黄生成中期阶段的卵巢组织学鉴定存在一定困难, 本研究未对该阶段进行划分, 有必要在今后的研究中继续积累样本, 以检测目的基因在整个卵黄生成阶段的表达规律。性腺中 FSHR 和 LHR 的表达必然与其配体 FSH 和 LH 的水平密切相关, 在斜带石斑鱼的近缘物种赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)中的研究发现, FSH 和 LH 的蛋白水平在卵巢休眠期(卵巢仅包含初级生长阶段卵母细胞), 处于较低水平, 在卵巢发育期(卵巢包含大量皮质小泡阶段和少量卵黄生成早期阶段卵母细胞)均显著上调<sup>[10]</sup>。两个配体在赤点石斑

鱼卵巢发育过程中的蛋白表达模式,符合我们在斜带石斑鱼中针对 FSHR 和 LHR 检测到的结果。看上去 FSH/FSHR 信号在石斑鱼卵巢发育过程中的作用与其在鲑科鱼中的报道较为相似,即主要参与卵黄生成前和卵黄生成早期卵母细胞的发育;但 LH/LHR 信号则同时对卵黄生成和成熟阶段卵母细胞的发育具有调控作用。

哺乳动物 FSH 和 LH 能特异性结合各自的受体(FSHR 和 LHR),从而启动下游信号通路<sup>[33]</sup>。但硬骨鱼 GtHs 和 GtHRs 结合的特异性却相对较弱,例如银鲑(*Oncorhynchus kisutch*)<sup>[28]</sup>和革胡子鲶(*Clarias gariepinus*)<sup>[34]</sup>的 FSHR 均可同时结合 FSH 和 LH。目前尚未见斜带石斑鱼 GtHs 和 GtHRs 结合方式的报道。但有研究发现,对卵巢发育早期的斜带石斑鱼在体注射重组 FSH 和 LH 均能刺激 Cyp19a 的表达及 E<sub>2</sub> 分泌<sup>[35-36]</sup>,结合本研究结果可推测,在卵巢发育早期,FSHR 可能同时结合 FSH 和 LH,从而介导两个配体的调控作用。在卵黄生成早期,随着 FSHR 和 LHR 的表达上调,Cyp19a 的表达也明显增强,说明 FSHR 和 LHR 可能均介导了 Cyp19a 的激活,进而提高血浆 E<sub>2</sub> 水平,以促进肝合成和分泌卵黄蛋白原。在卵母细胞成熟阶段,LHR 的表达达到峰值,而 FSHR 和 Cyp19a 的表达均显著下调,这可能存在以下三方面原因: Cyp19a 主要受 FSH/FSHR 信号的调控,当失去该信号刺激后,引起表达下降;存在与哺乳动物相似的机制,即 LH 能通过 LHR/cAMP/PKA 信号刺激 Cyp19a 表达,但同时激活 LHR/PLC/IP<sub>3</sub> 或 PKC 信号路径来抑制 Cyp19a 的转录并降解已生成的 Cyp19a mRNA<sup>[37-38]</sup>;存在其他机制使 Cyp19a 的表达暂时逃脱了 LH/LHR 信号的刺激,以抑制 E<sub>2</sub> 的产生,阻止 E<sub>2</sub> 对排卵前 LH 的负反馈作用。在 MT 诱导的斜带石斑鱼性逆转过程中,我们提出 FSH $\beta$  和 FSHR 表达下调可能是 Cyp19a 表达关闭的重要原因。在本研究中,斜带石斑鱼 Cyp19a 与 FSHR 在卵巢发育过程中同样具有相似的表达模式,因此推测 FSH/FSHR 信号是调控 Cyp19a 的主要路径。

综上所述,斜带石斑鱼 FSHR 和 LHR 均参与

了卵巢发育过程,但在不同发育时期的分工不同。FSHR 主要介导卵黄生成前及卵黄生成早期卵母细胞发育的调控,而 LHR 则主要在卵黄生成及成熟阶段卵母细胞中发挥调控作用。在卵巢发育过程中,FSHR 可能是介导 Cyp19a 正调控的主要因素。

#### 参考文献:

- [1] Pierce J G, Parsons T F. Glycoprotein hormones: structure and function[J]. *Annu Rev Biochem*, 1981, 50: 465-495.
- [2] Gharib S, Wierman M, Shupnik M, et al. Molecular biology of the pituitary gonadotropins[J]. *Endocr Rev*, 1990, 11 (1): 177-199.
- [3] Levavi-Sivan B, Bogerd J, Mananos E L, et al. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2009, 165 (3): 412-437.
- [4] Sohn Y C, Yoshiura Y, Kobayashi M, et al. Seasonal Changes in mRNA Levels of Gonadotropin and Thyrotropin Subunits in the Goldfish, *Carassius auratus*[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1999, 113 (3): 436-444.
- [5] Hassin S, Claire M, Holland H, et al. Early maturity in the male striped bass, *Morone saxatilis*: follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone gene expression and their regulation by gonadotropin-releasing hormone analogue and testosterone[J]. *Biol Reprod*, 2000, 63 (6): 1691-1697.
- [6] Kajimura S, Yoshiura Y, Suzuki M, et al. cDNA cloning of two gonadotropin beta subunits (GTH-Ibeta and IIbeta) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2001, 122 (2): 117-129.
- [7] Mateos J, Ma anós E, Martínez-Rodríguez G, et al. Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (alpha, FSHbeta, and LHbeta) and their expression during the reproductive cycle[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, 133 (2): 216-232.
- [8] Gen K, Okuzawa K, Senthilkumaran B, et al. Unique expression of gonadotropin-I and -II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation[J]. *Biol Reprod*, 2000, 63 (1): 308-319.
- [9] So W K, Kwok H F, Ge W. Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits—their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity[J]. *Biol Reprod*, 2005, 72 (6): 1382-1396.

- [10] Li C J, Zhou L, Wang Y, et al. Molecular and expression characterization of three gonadotropin subunits common  $\alpha$ , FSH $\beta$  and LH $\beta$  in groupers[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2005, 233 (1-2): 33-46.
- [11] Gen K, Yamaguchi S, Okuzawa K, et al. Physiological roles of FSH and LH in red seabream, *Pagrus major*[J]. *Fish Physiol Biochem*, 2003, 28 (1): 77-80.
- [12] Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y, et al. Cloning, functional characterization, and expression of a gonadotropin receptor cDNA in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*)[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999a, 263 (2): 584-590.
- [13] Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y, et al. The duality of fish gonadotropin receptors: cloning and functional characterization of a second gonadotropin receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*)[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999b, 265 (2): 366-371.
- [14] Maugars G, Schmitz M. Molecular cloning and characterization of FSH and LH receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2006, 149 (1): 108-117.
- [15] Kumar R S, Ijiri S, Trant J M. Molecular biology of channel catfish gonadotropin receptors: 1. Cloning of a functional luteinizing hormone receptor and preovulatory induction of gene expression[J]. *Biol Reprod*, 2001a, 64 (3): 1010-1018.
- [16] Kumar R S, Ijiri S, Trant J M. Molecular biology of the channel catfish gonadotropin receptors: 2. Complementary DNA cloning, functional expression, and seasonal gene expression of the follicle-stimulating hormone receptor[J]. *Biol Reprod*, 2001b, 65 (3): 710-717.
- [17] Vischer H F, Bogerd J. Cloning and functional characterization of a gonadal luteinizing hormone receptor complementary DNA from the African catfish (*Clarias gariepinus*)[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68 (1): 262-271.
- [18] Laan M, Richmond H, He C, et al. Zebrafish as a model for vertebrate reproduction: characterization of the first functional zebrafish (*Danio rerio*) gonadotropin receptor[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2002, 125 (3): 349-364.
- [19] Kwok H F, So W K, Wang Y, et al. Zebrafish gonadotropins and their receptors: I. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors—evidence for their distinct functions in follicle development[J]. *Biol Reprod*, 2005, 72 (6): 1370-1381.
- [20] Rahman M A, Ohta K, Yamaguchi A, et al. Gonadotropins, gonadotropin receptors and their expressions during sexual maturation in yellowtail, a carangid fish[J]. *Fish Physiol Biochem*, 2003, 28 (1): 81-83.
- [21] Rocha A, Gomez A, Zanuy S, et al. Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis, and functional activity[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2007, 272 (1-2): 63-76.
- [22] Jeng S R, Yueh W S, Chen G R, et al. Differential expression and regulation of gonadotropins and their receptors in the Japanese eel, *Anguilla japonica*[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2007, 154 (1-3): 161-173.
- [23] Kobayashi T, Andersen O. The gonadotropin receptors FSH-R and LH-R of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), 1: Isolation of multiple transcripts encoding full-length and truncated variants of FSH-R[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, 156 (3): 584-594.
- [24] An K W, Lee K Y, Yun S G, et al. Molecular characterization of gonadotropin subunits and gonadotropin receptors in black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*: effects of estradiol-17 $\beta$  on mRNA expression profiles[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2009, 152 (2): 177-188.
- [25] Bogerd J, Blomenrohr M, Andersson E, et al. Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*)[J]. *Biol Reprod*, 2001, 64 (6): 1633-1643.
- [26] Takahiro S, Miranda L A, Okuma K, et al. Molecular cloning and expression analysis of Fshr and Lhr in relation to Fshb and Lhb subunits during the period of temperature-dependent sex Determination in pejerrey *Odontesthes bonariensis*[J]. *Mol Reprod Dev*, 2010, 77: 521-532.
- [27] Hu X S, Liu X C, Zhang H F, et al. Expression profiles of gonadotropins and their receptors during 17 $\alpha$ -methyltestosterone implantation induced sex change in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Mol Reprod Dev*, 2011, 78 (6): 376-390.
- [28] Miwa S, Yan L, Swanson P. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by in vitro ligand autoradiography[J]. *Biol Reprod*, 1994, 50 (3): 629-642.
- [29] Zhang Y, Zhang W, Zhang L, et al. Two distinct cytochrome P450 aromatases in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): cDNA cloning and differential mRNA expression[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004, 92 (1-2): 39-50.
- [30] Zhang W, Zhang Y, Zhang L, et al. The mRNA expression of P450 aromatase, gonadotropin beta-subunits and FTZ-F1 in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) during

- 17alpha-methyltestosterone-induced precocious sex change [J]. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74 (6): 665–673.
- [31] 赵会宏, 刘晓春, 刘付永忠, 等. 斜带石斑鱼雌鱼卵巢发育与血清性类固醇激素的生殖周期变化[J]. *中山大学学报*, 2003, 42 (6): 56–63.
- [32] Liu M, de Mitcheson Y. Gonad development during sexual differentiation in hatchery-produced orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) and humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) (Pisces: Serranidae, Epinephelinae)[J]. *Aquaculture*, 2009, 287 (1-2): 191–202.
- [33] Bogerd. Ligand-selective determinants in gonadotropin receptors[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2007, 260-262: 144–152.
- [34] Bogerd. Selective ligand-binding determinants in catfish and human gonadotropin receptors[J]. *Fish Physiol Biochem*, 2005, 31(2-3): 247–254.
- [35] Cui M, Li W S, Liu W, et al. Production of recombinant orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) luteinizing hormone in insect cells by the baculovirus expression system and its biological effect[J]. *Biol Reprod*, 2007, 76(1): 74–84.
- [36] 崔森. 利用杆状病毒在昆虫细胞内表达斜带石斑鱼促性腺激素及其生物活性研究[D]. 广州: 中山大学, 2006: 119–174.
- [37] Fitzpatrick SL, Carlone DL, Robker RL, et al. Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge[J]. *Steroids*, 1997, 62 (1): 197–206.
- [38] Multiple signal transduction pathways regulate ovarian steroidogenesis[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2002, 3(1): 33–46.

## Expression profiles of gonadotropin receptors during ovary development in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)

HU Xuesong<sup>1,2</sup>, LIU Xiaochun<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>, LI Shuisheng<sup>1</sup>, CHEN Huapu<sup>1</sup>, LIN Haoran<sup>1</sup>

1. State Key Laboratory of Biocontrol, Institute of Aquatic Economic Animals and the Guangdong Province Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China;  
2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China

**Abstract:** The pituitary gonadotropins (GtHs), follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) regulate steroidogenesis and gametogenesis by binding to their respective gonadotropin receptors (FSHR and LHR) in vertebrates. In this research, the ovary development of the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) was first divided into seven phases (phase I to phase VII) according to the histological characteristics of oocytes, and the temporal expression patterns of FSHR and LHR were further detected in parallel with the expression profiles of a downstream factor (Cyp19a) during different developmental phases of the ovary. Quantitative real-time PCR determined the abundance of FSHR was at a relatively low level within phase I and phase II, then elevated gradually in phase III, significantly increased in phase IV and phase V, and remarkably decreased in phase VI. Contrastingly, the transcripts of LHR remained at a low level during early development of the ovary (phase I–phase IV), but were stimulated at the beginning of phase V and peaked in phase VI. The transcriptional levels of Cyp19a were very low in the ovary from phase I to phase III, but significantly increased in phase IV and phase V, and then sharply decreased in phase VI. Generally, Cyp19a had a similar expression profile with FSHR. In summary, our results suggest that both FSHR and LHR are involved in the regulation of ovary development, but two receptors may play distinct roles in the different development phases of the ovary. FSHR may be the major activator of Cyp19a transcription. This investigation contributes to elucidate the actions of GtH/GtHR signal systems in reproductive regulation in the orange-spotted grouper.

**Key words:** orange-spotted grouper; gonadotropin receptor (GtHR); Cyp19a; ovary development

**Corresponding author:** LIN Haoran. E-mail: lsslhr@mail.sysu.edu.cn