

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18276

生长轴对半滑舌鳎早期生长发育的调控作用

张雅星^{1,2,3}, 王滨^{2,3}, 柳学周^{2,3}, 徐永江^{2,3}, 史宝^{2,3}, 姜燕^{2,3}, 崔爱君^{1,2,3}

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 为深入了解生长轴(GH/IGF axis)对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)生长发育的调控作用, 采用定量 PCR 方法研究了 GH/IGF 轴 5 个关键生长因子(GH、GHR1、GHR2、IGF-I、IGF-II)在配子、胚胎发育和仔稚幼鱼生长过程中的差异表达调控特性。结果显示, 这 5 个生长因子都具有亲本遗传的特性, 除 GH 外, 精子中其他 4 个生长因子转录表达水平均显著高于卵子。在胚胎发育阶段, GH mRNA 在胚胎发育各时期均有表达, 且在细胞分裂初期和孵化期表达水平较高。GHR1 和 GHR2 mRNA 在胚胎发育各时期呈现相似的表达水平变化趋势, 除囊胚期和原肠胚期外, GHR1 mRNA 的表达量均高于 GHR2。IGF-I 和 IGF-II mRNA 在胚胎发育各时期均表达, IGF-I 在孵化期表达水平最高, IGF-II 在胚体下包 2/3 期和孵化期表达水平最高。除 64 细胞期和 128 细胞期外, IGF-II mRNA 的表达量均显著高于 IGF-I ($P<0.05$)。在仔稚幼鱼生长阶段, GH mRNA 表达水平从孵化后 3 d 开始显著升高, 到 6 d 时达峰值。GHR1 mRNA 表达水平自 6 d 开始显著升高($P<0.05$), 到 30 d 达峰值。GHR2 mRNA 在 3 d、20 d、25 d、30 d 和 60 d 均处于显著高表达水平($P<0.05$)。IGF-I mRNA 在 3 d 表达水平最高, IGF-II mRNA 从 6 d 开始显著上调表达, 并保持较高表达水平至 45 d, IGF-II mRNA 表达量均显著高于 IGF-I ($P<0.05$)。偏相关分析发现: 这 5 个生长因子通过正向协同或负向拮抗作用在半滑舌鳎胚胎发育和仔稚幼鱼生长过程中共同起调控作用。研究结果为深入了解 GH/IGF 轴对鱼类生长调控机制积累了新的素材。

关键词: 半滑舌鳎; GH/IGF 轴; 胚胎发育; 仔稚幼鱼发育

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)02-0287-09

鱼类的生长主要是通过 GH/IGF-I 轴的调控来实现的。生长轴的关键内分泌因子如生长激素(GH)及受体(GHR)、胰岛素样生长因子(IGF-I 和 IGF-II)等在调控机体的生长、生殖、代谢和能量平衡等方面起着重要的生理作用。GH/IGF-I 轴发挥生理作用的通路为生长激素(growth hormone, GH)自垂体释放至循环系统, 到达肝后通过与其受体结合作用刺激 IGF-I 分泌和表达, 从而进一步促进细胞分裂、增殖和生长^[1]。GH 通过与靶组织细胞膜上特定的 GHR 结合发挥其生物学效应^[2]。

对哺乳动物的研究表明, IGF-I 和 IGF-II 是胚胎发育和生长调控的重要调节因子, 其中 IGF-I 主要在出生后及成年期发挥作用, 而 IGF-II 则在胚胎发育过程中起重要调控作用。

关于生长轴对硬骨鱼类生长调控的作用及机制的研究报道较多, 主要集中在生长轴对生长、营养、免疫应答的调控作用及机制等方面^[3-4]。在早期生长发育调控研究方面, Perrot 等^[5]对金头鲷(*Sparus aurata*)的研究证明, 在未受精卵、胚胎发育和仔稚幼鱼早期发育过程中, 鱼类未受精卵子

收稿日期: 2018-08-16; 修订日期: 2018-09-19.

基金项目: 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项(2017YFE104400); 国家自然科学基金项目(31502145); 国家海水鱼产业技术体系项目(CARS-47); 农业部“一带一路”沿线热带国家水产养殖科技合作项目。

作者简介: 张雅星(1993-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为鱼类生长调控机制. E-mail: 15003805828@163.com

通信作者: 徐永江, 副研究员, 主要研究方向为水产养殖与设施渔业. E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

中存在的 IGF-I 和 IGF-II mRNA 来自于母源传递, 另外 IGF-I 和 IGF-II 可能在其早期生长发育过程中起到一定的调控作用。对斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)的研究发现, GH 对胚胎发育和仔稚幼鱼生长起重要调控作用, 特别是在变态发育阶段^[6]。研究还发现, GHR 在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)胚胎发育过程中起着重要的调控作用^[7]。这些研究结果显示, GH/IGF 轴在硬骨鱼类早期生长发育过程中起着重要的生理调控作用。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)为中国鲆鲽类三大主导养殖鱼类之一, 2003 年伴随着自然产卵和苗种培育技术的突破, 养殖业迅速发展, 目前年产量达 5000 t 左右^[8]。近年来, 养殖生产中受精卵的获取主要依赖于人工催产亲鱼获得配子人工授精的方式, 但胚胎孵化过程中时常发生胚胎发育迟滞甚至死亡的现象。同时, 苗种培育过程中经常出现早期生长缓慢及成活率低等情况。由于其内在调控机制尚不清楚, 因此尚未建立有效的控制技术, 从而制约了半滑舌鲷养殖产业的健康发展。鉴于生长轴在鱼类生长发育、新陈代谢等生理过程中的重要调控作用, 有必要从生长内分泌调控角度探索半滑舌鲷早期生长发育阶段生理调控的内在机制, 从而为优质受精卵获取和苗种培育技术提供理论依据。但迄今为止, 人们对于 GH/IGF 系统在半滑舌鲷早期生长发育过程中的表达调控模式及其作用尚未明了。因此, 有必要尽快开展相关研究, 以期为深入认识 GH/IGF-I 轴对鲆鲽鱼类胚胎和仔稚幼鱼早期生长发育过程的表达调控作用提供新的研究思路和素材。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用半滑舌鲷配子、胚胎和苗种样品取自青岛某养殖场。受精卵来自人工培育亲鱼成熟后采集精液和卵子人工干法受精所得。使用的雌性亲鱼年龄为 3 龄(全长 41~55 cm, 体重 1450~1920 g), 雄性亲鱼年龄为 2 龄(全长 18~35 cm, 体重 147~410 g), 亲鱼在人工温光调控下性腺发育成熟。采取挤压腹部的方法获得成熟亲鱼的精液和卵子,

检测卵质和精子活力。采集部分精液和卵子样品于液氮中保存。胚胎发育和仔稚幼鱼生长发育阶段的划分参照万瑞景等^[9]的标准。

胚胎样品采集: 受精卵孵化过程中, 采集 2 细胞、4 细胞、8 细胞、16 细胞、32 细胞、64 细胞、128 细胞、桑葚胚、囊胚、原肠胚、胚体下包 1/2、胚体下包 2/3、孵化期等不同发育时期的胚胎样品。

仔稚幼鱼样品采集: 胚胎孵化出膜后, 在 1 d、3 d、6 d、10 d、15 d、20 d、25 d、30 d、45 d、60 d、95 d 分别采集仔稚幼鱼样品。样品采集后迅速于液氮中保存, 带回实验室用于总 RNA 提取。30 d 前苗种整体研磨用于 RNA 提取, 45 d 后苗种剪取头部和内脏部位用于 RNA 提取。

1.2 总 RNA 提取和第一链 cDNA 合成

利用 RNAiso Plus (TaKaRa, 日本)提取样品总 RNA, 通过 NanoDrop 2000C 分光光度计(Thermo, 美国)测定 RNA 的纯度和浓度, 以 1%琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 完整性。使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)合成第一链 cDNA。将反转录产物于-20℃保存备用。

参照 NCBI 数据库中半滑舌鲷 GH (GenBank Accession No. FJ608663)、GHR1 (GenBank Accession No. FJ608664)、GHR2 (GenBank Accession No. HQ334197)、IGF-I (GenBank Accession No. HQ334201)、IGF-II (GenBank Accession No. FJ608668)和 18S rRNA 的基因序列(GenBank Accession No. GQ426786)设计各目的基因的特异性定量 PCR 引物(表 1)。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测

使用 SYBR Premix Ex Taq™II (TaKaRa, 日本)试剂盒以胚胎和仔稚幼鱼早期发育不同阶段样品 cDNA 为模板进行基因定量表达分析, 18S 为内参基因。PCR 反应体系为 20 μL, 包括 10 μL 2×SYBR®Premix ExTaq™II、0.8 μL 上下游引物(引物浓度均为 10 μmol/L)、1 μL 稀释的 cDNA 模板以及 7.4 μL 无菌水, 利用 Mastercycler ep realplex Real-time PCR 仪(Eppendorf, 德国)进行荧光定量检测。每个样品 3 个平行, 采用两步 PCR 法: 95℃

表 1 定量 PCR 引物序列
Tab. 1 Primers sequences used for quantitative Real-Time PCR

引物名称 primer name	引物序列 (5'-3') primer sequence	目的片段 target sequence	扩增长度/bp amplicon size	T _m /℃
GH-RT-F	GTTATAGACCAGCGGCGTTTC	GH	151	55
GH-RT-R	CAGGGTTGCAGAAGTCTTGATG			
GHR1-RT-F	AGATGTTGAAGAAAGGGAAGTTGG	GHR1	213	54
GHR1-RT-R	GGTTGATAGGTTGGGGCAGA			
GHR2-RT-F	CGTCACTTGAAGATGTGCCCCA	GHR2	159	59
GHR2-RT-R	CAAGAGGAGATTTTTTGTGATGAA			
IGF1-RT-F	GTATCTCCTGTAGCCACACCCCTCT	IGF-I	137	55
IGF1-RT-R	GCCTCTCTCTCCACACACAAACT			
IGF2-RT-F	AAGGTTTCCAAATACGAGGTGTG	IGF-II	129	55
IGF2-RT-R	GATTGCCTGCTCCTGTGCT			
18S-F	GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	18S rRNA	107	60
18S-R	AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC			

30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 20 s, 共 40 个循环, 反应结束后进行熔解曲线分析。所有目的和参考基因的标准曲线相关系数(r^2)和扩增效率(E): $0.99 < r^2 < 0.999$, $0.9 < E < 1.1$ 。基因相对表达量参照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算^[10], 结果以平均值±标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。

1.4 数据统计分析

对 GH、GHR1、GHR2、IGF-I、IGF-II 的 mRNA 表达水平分别进行单因素方差分析(one-way ANOVA)与 Duncan 多重比较, 统计早期生长发育阶段不同时期各因子 mRNA 表达水平的差异显著性。利用相关性分析法分别分析胚胎发育和仔稚幼鱼阶段各生长因子 mRNA 表达水平之间的相关性。利用 SPSS 22.0 软件(IBM, 美国)进行统计分析, 设置差异显著性水平 P 为 0.05, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著, 当 $P < 0.01$ 时则认为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 生长因子在配子和胚胎发育过程中的表达调控特性

在精子、卵子和不同胚胎发育时期均可检测到 GH mRNA 表达, 且在未受精卵中表达量显著高于精子($P < 0.05$) (图 1), 表明 GH 具有亲体遗传的特性。在卵裂初期 GH mRNA 有较高表达水平, 其后处于相对低表达水平。自原肠胚期至孵化期, GH mRNA 表达水平逐渐升高, 至孵化期又达到较高水平。

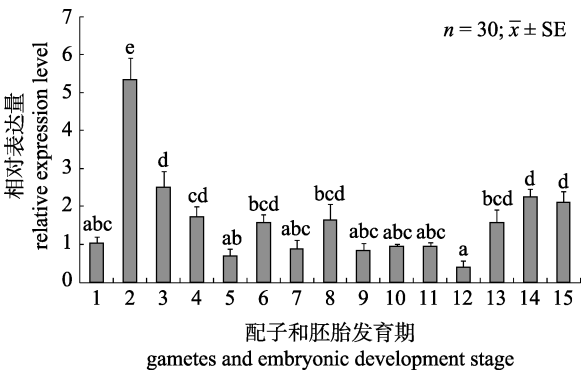


图 1 半滑舌鳎胚胎发育不同时期 GH mRNA 的表达水平变化
1: 精子; 2: 未受精卵; 3: 2 细胞期; 4: 4 细胞期; 5: 8 细胞期; 6: 16 细胞期; 7: 32 细胞期; 8: 64 细胞期; 9: 128 细胞期; 10: 桑葚胚期; 11: 囊胚期; 12: 原肠胚期; 13: 胚体下包 1/2 期; 14: 胚体下包 2/3 期; 15: 孵化期; 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 以精子 GH mRNA 表达量为标准 1.
Fig. 1 Expression levels of GH mRNA in different embryonic stages of *Cynoglossus semilaevis*
1: sperm; 2: unfertilized egg; 3: 2-cell stage; 4: 4-cell stage; 5: 8-cell stage; 6: 16-cell stage; 7: 32-cell stage; 8: 64-cell stage; 9: 128-cell stage; 10: morula stage; 11: blastula stage; 12: gastrula stage; 13: embryo encircle 1/2 of yolk sac; 14: embryo encircle 2/3 of yolk sac; 15: hatching stage; different letters indicated significant differences ($P < 0.05$); the relative abundance of 1 is set arbitrarily for the GH mRNA expression level in the sperm.

GHR1 和 GHR2 的 mRNA 在精子和卵子中都检测到表达, 且精子中 GHR mRNA 的表达水平显著高于卵子。GHR1 和 GHR2 mRNA 在胚胎发育各个时期均可检测到表达, 其中 GHR1 mRNA 表达水平在桑葚胚期突然显著升高, 其后又显著

下降,再自胚体下包 1/2 期开始显著升高,胚体下包 2/3 期表达量最高($P<0.05$),在孵化期仍保持较高表达水平($P<0.05$)。GHR2 mRNA 自囊胚期开始显著升高,后表达水平持续升高,在胚体下包 2/3 期达到峰值,其后又显著下降但仍保持较高表达水平($P<0.05$) (图 2)。除囊胚和原肠胚期外, GHR1 mRNA 的表达量均高于 GHR2 ($P<0.05$)。

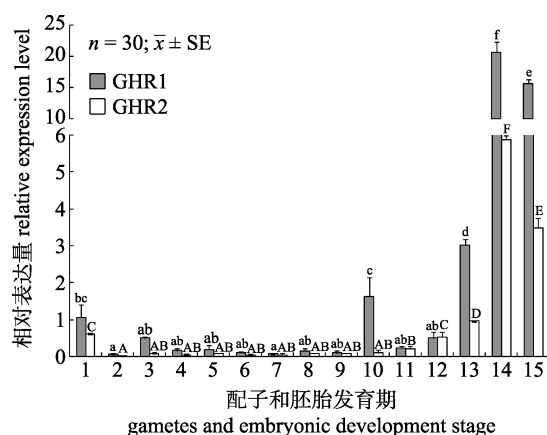


图 2 半滑舌鲷胚胎发育不同时期 GHR1 和 GHR2 mRNA 的表达水平变化

1: 精子; 2: 未受精卵; 3: 2 细胞期; 4: 4 细胞期; 5: 8 细胞期; 6: 16 细胞期; 7: 32 细胞期; 8: 64 细胞期; 9: 128 细胞期; 10: 桑葚胚期; 11: 囊胚期; 12: 原肠胚期; 13: 胚体下包 1/2 期; 14: 胚体下包 2/3 期; 15: 孵化期; 不同字母表示差异显著($P<0.05$); 以精子 GHR1 mRNA 表达量为标准 1。

Fig. 2 Expression levels of GHR1 and GHR2 mRNA in different embryonic stages of *Cynoglossus semilaevis*
1: sperm; 2: unfertilized egg; 3: 2-cell stage; 4: 4-cell stage; 5: 8-cell stage; 6: 16-cell stage; 7: 32-cell stage; 8: 64-cell stage; 9: 128-cell stage; 10: morula stage; 11: blastula stage; 12: gastrula stage; 13: embryo encircle 1/2 of yolk sac; 14: embryo encircle 2/3 of yolk sac; 15: hatching stage; different letters indicated significant differences ($P<0.05$); the relative abundance of 1 is set arbitrarily for the GHR1 mRNA expression level in the sperm.

IGF-I 和 IGF-II mRNA 在精子和卵子中均有表达,其中 IGF-I mRNA 在精子和卵子中表达水平无显著差异,而 IGF-II 在卵子中显著高表达($P<0.05$)。IGF-I mRNA 在胚胎发育期均有表达,在 64 细胞期、128 细胞期、胚体下包 2/3 期和孵化期显著高表达($P<0.05$); IGF-II 在卵裂初期(2 细胞期)显著高表达,而在 4 细胞期至桑葚胚期间保持较低表达水平,其后在囊胚期开始上调表达,至胚体下包 2/3 期和孵化期表达水平达峰值

($P<0.05$) (图 3)。除 64 细胞期和 128 细胞期外, IGF-II mRNA 的表达量均显著高于 IGF-I ($P<0.05$)。

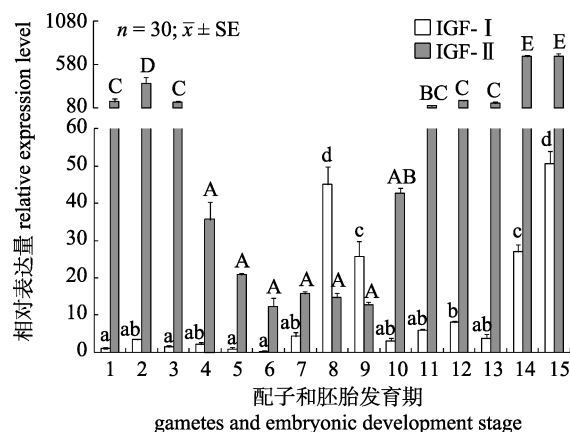


图 3 半滑舌鲷胚胎发育不同时期 IGF-I 和 IGF-II mRNA 的表达水平变化

1: 精子; 2: 未受精卵; 3: 2 细胞期; 4: 4 细胞期; 5: 8 细胞期; 6: 16 细胞期; 7: 32 细胞期; 8: 64 细胞期; 9: 128 细胞期; 10: 桑葚胚期; 11: 囊胚期; 12: 原肠胚期; 13: 胚体下包 1/2 期; 14: 胚体下包 2/3 期; 15: 孵化期; 不同字母表示差异显著($P<0.05$); 以精子 IGF-I mRNA 表达量为标准 1。

Fig. 3 Expression levels of IGF-I and IGF-II mRNAs in different embryonic stages of *Cynoglossus semilaevis*
1: sperm; 2: unfertilized egg; 3: 2-cell stage; 4: 4-cell stage; 5: 8-cell stage; 6: 16-cell stage; 7: 32-cell stage; 8: 64-cell stage; 9: 128-cell stage; 10: morula stage; 11: blastula stage; 12: gastrula stage; 13: embryo encircle 1/2 of yolk sac; 14: embryo encircle 2/3 of yolk sac; 15: hatching stage; different letters indicated significant differences ($P<0.05$); the relative abundance of 1 is set arbitrarily for the IGF-I mRNA expression level in the sperm.

2.2 生长因子在仔稚幼鱼发育时期的表达调控特性

在仔稚幼鱼发育时期, GH mRNA 表达水平从孵化后 3 d 开始显著升高($P<0.05$),到 6 d 达峰值($P<0.05$),随后又显著下降,并在 20 d 和 30 d 保持较高表达水平,在 60 d 后又显著降低($P<0.05$) (图 4)。

GHR1 mRNA 表达水平自 6 d 仔鱼开始显著升高,并在 20 d 有显著上调表达直至 30 d ($P<0.05$),随后又显著下降($P<0.05$)并保持至 95 d。GHR2 mRNA 在 3 d 突然显著上调表达,其后逐渐降低至 15 d 低表达水平($P<0.05$),在 20 d 至 30 d、60 d 均都处于显著高表达水平($P<0.05$) (图 5)。除 3 d、30 d、45 d、60 d 和 95 d 外, GHR1 mRNA 表

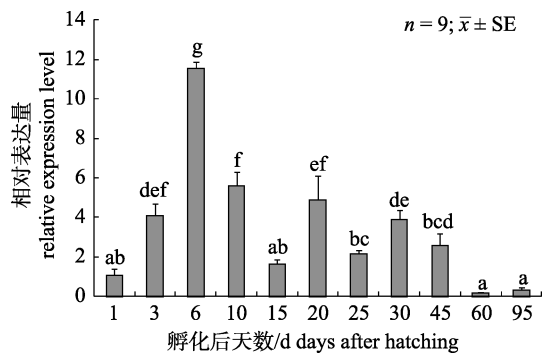


图 4 半滑舌鲷仔稚鱼发育时期 GH mRNA 的表达水平变化
不同字母表示差异显著($P<0.05$); 以孵化后 1 d GH mRNA 表达量为标准 1.

Fig. 4 Expression levels of GH mRNA in larval and juvenile development stages of *Cynoglossus semilaevis*. Different letters indicated significant differences ($P<0.05$); the relative abundance of 1 is set arbitrarily for the GH mRNA expression level at the 1 d after hatching.

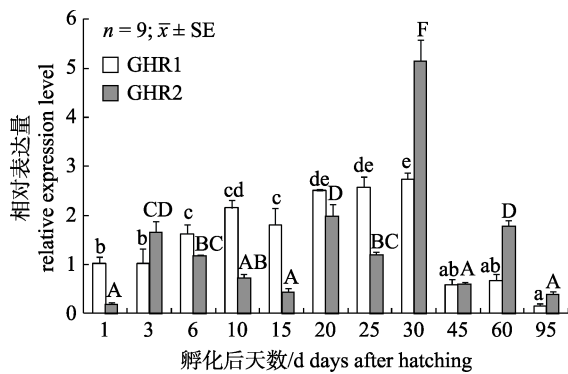


图 5 半滑舌鲷仔稚鱼发育时期 GHR1 和 GHR2 mRNA 的表达水平变化
不同字母表示差异显著($P<0.05$); 以孵化后 1 d GHR1 mRNA 表达量为标准 1.

Fig. 5 Expression levels of GHR1 and GHR2 mRNA in larval and juvenile development stages of *Cynoglossus semilaevis*. Different letters indicated significant differences ($P<0.05$); the relative abundance of 1 is set arbitrarily for the GHR1 mRNA expression level at the 1 d after hatching.

达量均显著高于 GHR2 ($P<0.05$).

IGF-I mRNA 在 3 d 仔鱼中表达水平最高 ($P<0.05$), 其他发育期均处于低表达水平, 但无显著性差异。IGF-II mRNA 从 6 d 开始显著上调表达, 并都保持较高表达水平至 45 d ($P<0.05$), 60 d 之后表达水平降低并保持至 95 d ($P<0.05$) (图 6)。在整个仔稚鱼发育期间, IGF-II mRNA 表达量均极显著高于 IGF-I ($P<0.01$)。

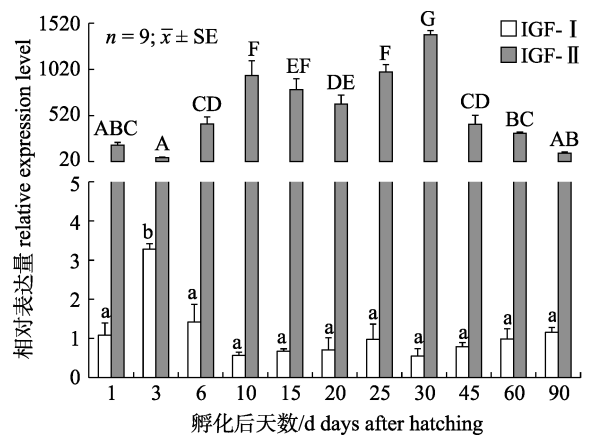


图 6 半滑舌鲷仔稚鱼发育时期 IGF-I 和 IGF-II mRNA 的表达水平变化
不同字母表示差异显著($P<0.05$); 以孵化后 1 d IGF-I mRNA 表达量为标准 1.

Fig. 6 Expression levels of IGF-I and IGF-II mRNA in larval and juvenile development stages of *Cynoglossus semilaevis*. Different letters indicated significant differences ($P<0.05$); the relative abundance of 1 is set arbitrarily for the IGF-I mRNA expression level at the 1 d after hatching.

2.3 相关性分析

对半滑舌鲷胚胎发育和仔稚鱼发育不同时期 GH、GHR1、GHR2、IGF-I、IGF-II 的 mRNA 表达水平进行偏相关性分析(表 2): 在胚胎发育阶段, 除 GHR2 与 IGF-I mRNA 表达水平间无显著相关性外, GH、GHR1 ($P<0.01$)、GHR2 ($P<0.01$) 和 IGF-I ($P<0.05$)、IGF-II ($P<0.01$) mRNA 表达水平之间互相呈显著或极显著正相关关系, 表明这几个生长因子通过正向协同作用在胚胎发育过程中共同起调控作用。

表 2 生长轴关键因子在半滑舌鲷胚胎发育时期 mRNA 表达水平的偏相关性分析

Tab. 2 Correlation analysis of mRNA levels of growth related genes in embryonic development stage of *Cynoglossus semilaevis*

指标 index	GH	GHR1	GHR2	IGF-I	IGF-II
GH	1.000	0.459**	0.421**	0.321*	0.637**
GHR1		1.000	0.939**	0.325*	0.845**
GHR2			1.000	0.279	0.836**
IGF-I				1.000	0.316*
IGF-II					1.000

注: *表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$).

Note: * indicates significant differences ($P<0.05$); ** indicates highly significant differences ($P<0.01$).

在仔稚幼鱼生长发育阶段, GHR2 mRNA 表达水平和 GH ($P<0.05$)、GHR1 ($P<0.01$) mRNA 表达水平呈显著正相关关系。IGF-I mRNA 表达水平和 GHR1 mRNA 表达水平呈显著负相关关系 ($P<0.01$), 与 GHR2 mRNA 表达水平呈负相关关系。IGF-II mRNA 表达水平与 GHR1、GHR2 mRNA 表达水平呈显著正相关关系 ($P<0.01$), 与 IGF-I mRNA 表达水平呈显著负相关关系 ($P<0.01$) (表 3)。

表 3 生长轴关键因子在半滑舌鲷仔稚幼鱼发育时期 mRNA 表达水平的偏相关性分析

Tab. 3 Correlation analysis of mRNA levels of growth related genes in larval and juvenile development stages of *Cynoglossus semilaevis*

指标 index	GH	GHR1	GHR2	IGF-I	IGF-II
GH	1.000	0.273	0.352*	0.027	0.176
GHR1		1.000	0.521**	-0.426**	0.824**
GHR2			1.000	-0.019	0.498**
IGF-I				1.000	-0.534**
IGF-II					1.000

注: *表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$)。
Note: * indicates significant differences ($P<0.05$); ** indicates highly significant differences ($P<0.01$).

3 讨论

本研究揭示了 GH/IGF 轴 5 个关键生长因子 (GH、GHR1、GHR2、IGF-I、IGF-II) 在半滑舌鲷胚胎发育和仔稚幼鱼生长过程中的差异调控表达特性, 为深入探究生长轴对鱼类生长发育的调控机制积累了新的资料。

众所周知, GH 通过促进细胞分裂、分化和扩增等方式在生长和发育过程中起着重要的作用^[11]。在本研究中, GH mRNA 在未受精的卵子中表达水平显著高于精子, 表明其同时具有母源和父源遗传特性。对虹鳟和斜带石斑鱼的研究结果也表明, 未受精卵子中检测到 GH mRNA 的表达^[6, 12], 表明其具有母源传递的特性。本研究发现 GH mRNA 在整个胚胎发育时期都有表达, 且在卵裂初期和孵化期都有相对较高表达, 表明其对胚胎卵裂和后期器官发育可能具有重要的生理调控作用, 类似的结果在虹鳟中也有报道^[12]。以往研究

表明, 有些鱼类 GH 在胚胎发育中未检测到表达, 如星突江鲮(*Platichthys stellatus*)^[13]、金头鲷^[14]、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)^[15]等, 表明 GH 在胚胎发育阶段的表达调控具有种的特异性。

许多硬骨鱼类包括半滑舌鲷存在两种形式的 GHR (GHR1 和 GHR2), 研究表明它们具有类似的基因结构和不同的时空表达模式及生理功能^[16-18]。半滑舌鲷 GHR1 和 GHR2 都具有母源和父源遗传的特性, 且在精子中呈现显著高表达, 提示其可能受父本遗传的影响较大。本研究显示, GHR1 在桑葚胚期、胚体期、孵化期具有显著高表达, 而 GHR2 自原肠胚期开始显著高表达, 表明 GHR1 和 GHR2 在器官发育和孵化破膜过程中具有重要的调控作用。此外, 在胚胎的大多数发育阶段, GHR1 mRNA 表达水平显著高于 GHR2, 这与 Ma 等^[18]的研究结果类似, 一种可能的解释是在胚胎发育阶段 GH 功能的实现主要是由 GHR1 介导实现的, 而 GHR2 作为 GHR1 的补体来共同完成 GHR 的功能调节。另外, GH mRNA 表达水平与 GHR1 和 GHR2 mRNA 表达水平之间呈显著正相关关系, 表明其可能通过正向协同方式共同参与胚胎发育过程的调控, 这为深入认识生长轴调控早期生长发育的机制研究积累了新的基础资料。

IGF-I 和 IGF-II mRNA 在半滑舌鲷精子、卵子中都具有表达, 表达 IGF-I 和 IGF-II 都具有父源和母源传递的特性。在胚胎发育阶段各个时期均检测到表达, 且在胚胎发育过程中除 64 细胞和 128 细胞期外, IGF-II mRNA 的表达量均显著高于 IGF-I, 这种普遍表达模式与金头鲷^[5]、虹鳟^[19]和斑马鱼(*Danio rerio*)^[20]的研究结果一致, 提示在半滑舌鲷胚胎发育过程中 IGF-II 可能比 IGF-I 具有更重要的影响^[21], 这些结果对于优质亲鱼培育方案制定、良种选育性状值优选策略等具有重要的提示意义。IGF-I 和 IGF-II mRNA 从配子至胚体下包 1/2 期时仅有相对较低的转录水平, 而在之后至出膜前的晚期胚胎发育阶段迅速上调, 特别是胚体下包 2/3 期和孵化期表达量都显著升高, 且本研究结果显示 IGF-I 和 IGF-II mRNA 表达水平呈显著正相关关系, 表明 IGF-I 和 IGF-II 以正向协同的方式作用于半滑舌鲷胚胎发育调控过程,

并且在半滑舌鳎胚胎发育后期肌节、眼囊等组织器官和色素发育中都发挥着十分重要的作用,这与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的研究结果是一致的^[22]。另外本研究中 GH 和 IGF-I mRNA 表达水平呈显著正相关关系,表明 GH 与 IGF-I 在半滑舌鳎早期生长发育过程中通过正向的级联效应起调控作用,这与 Ma 等^[23-24]对半滑舌鳎的研究结论一致。

对大西洋鲑(*Salmo salar*)^[25]和黄鳍鲷(*Sparus latus*)^[26]的研究显示, GH 能够增加食欲,加速蛋白质合成,提高饲料转化率,促进鱼类生长。在半滑舌鳎仔稚幼鱼生长发育时期, GH mRNA 在 6 d 时表达水平最高,此时正是仔鱼开口摄食轮虫的阶段,即由内源性营养阶段进入外源性营养,表明了 GH 可能参与了早期内外源营养转换的调控过程。已知半滑舌鳎苗种在 45 d 后完全营底栖生活,本研究发现 GH mRNA 在 60 d 和 95 d 表达水平显著下降,但 IGF-I 和 IGF-II mRNA 一直处于高表达状态,提示可能在底栖生活后生长轴的调控作用主要是由 IGF 介导,相关验证有待于下一步深入研究。

Hildahl 等^[2]在研究大西洋庸鲈(*Hippoglossus hippoglossus*)时发现在变态前阶段和变态开始阶段 GHR 转录水平最高。在本研究结果中,半滑舌鳎 GHR1 和 GHR2 均在 20 d 到 30 d 变态阶段的转录水平最高,其他阶段的表达水平相对较低,提示 GH/IGF 系统对变态成功可能具有重要的意义。在整个仔稚幼鱼生长发育阶段,同期 GHR1 和 GHR2 mRNA 呈现差异表达特性,且呈显著正相关关系,可能与这两种 GHR 在不同生长阶段介导 GH 生理功能过程中的协同调节密切相关^[16]。

IGF-I 和 IGF-II mRNA 在半滑舌鳎仔稚幼鱼生长发育各时期均检测到表达,这种表达模式与金头鲷^[5]和河豚(*Siganus guttatus*)^[27]的研究结果一致。此外,本研究结果显示 IGF-I 和 IGF-II mRNA 表达水平存在显著负相关关系,而且其分别在 3 d 和 30 d 转录水平最高,表明同其他硬骨鱼类类似,半滑舌鳎 IGF-I 和 IGF-II 在仔稚幼鱼生长阶段可以以负向反馈调节的方式共同起调控作用,同时在开口期、变态期相关生理功能中扮

演重要的角色^[28]。另外,还发现 IGF-II mRNA 表达水平均显著高于 IGF-I,推测在半滑舌鳎仔稚幼鱼中起主要调控作用的是 IGF-II,而不是 IGF-I,这与星突江鲈^[13]的研究结果是一致的。而张俊玲等^[22]对牙鲆变态期的研究发现,IGF-I 在早期生长发育阶段的表达水平高于 IGF-II,这种差异表达模式推测是物种差异性造成的。这些研究结果对于亲鱼培育、苗种培育和良种选育性状参数筛选等研发工作都具有良好的指导意义。

综上所述,在半滑舌鳎胚胎发育和仔稚幼鱼早期生长过程中, GH/IGF 轴同时正向协同或负向反馈共同起重要的调控作用,但其行使功能的信号通路及机制还有待进一步探究。

参考文献:

- [1] Reinecke M, Björnsson B T, Dickhoff W W, et al. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: Where we are and where to go[J]. General and Comparative Endocrinology, 2005, 142(1-2): 20-24.
- [2] Hildahl J, Sweeney G, Galay-Burgos M, et al. Cloning of Atlantic halibut growth hormone receptor genes and quantitative gene expression during metamorphosis[J]. General and Comparative Endocrinology, 2007, 151(2): 143-152.
- [3] Liu Z L. Studies on key genes along grow axis from *Cynoglossus semilaevis* Günther: in vitro recombinant expression and roles in growth and reproduction regulation[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [刘芝亮. 半滑舌鳎生长轴关键基因的重组表达及对生长与生殖的调控机制研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [4] Zhao J L. Study on SNP and DNA methylation of genes involved in GH/IGF-I axis correlated to the growth of male half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014. [赵君丽. 雄性半滑舌鳎 GH/IGF-I 轴相关基因 SNP 和 DNA 甲基化与生长的相关性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.]
- [5] Perrot V, Moiseeva E B, Gozes Y, et al. Ontogeny of the insulin-like growth factor system (IGF-I, IGF-II, and IGF-IR) in gilthead seabream (*Sparus aurata*): Expression and cellular localization[J]. General and Comparative Endocrinology, 1999, 116(3): 445-460.
- [6] Li W S, Chen D, Wong A O, et al. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. General and Comparative Endocrinology, 2005, 144(1): 78-89.
- [7] Malkuch H, Walock C, Kittilson J D, et al. Differential expression of preprosomatostatin- and somatostatin receptor-

- encoding mRNAs in association with the growth hormone-insulin-like growth factor system during embryonic development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 159(2-3): 136-142.
- [8] Tang D D, Guan C T. 70 billion production value of marine fish faces development opportunities[J]. Ocean and Fishery·Aquatic Frontiers, 2017(9). [唐东东, 关长涛. 700 亿产值海水鱼面临发展机遇[J]. 海洋与渔业·水产前沿, 2017(9).]
- [9] Wan R J, Jiang Y W, Zhuang Z M. Morphological and developmental characters at the early stages of the tonguefish *Cynoglossus semilaevis*[J]. Acta Zoologica Sinica, 2004, 50(1): 91-102. [万瑞景, 姜言伟, 庄志猛. 半滑舌鲷早期形态及发育特征[J]. 动物学报, 2004, 50(1): 91-102.]
- [10] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [11] Miandare H K, Farahmand H, Akbarzadeh A, et al. Developmental transcription of genes putatively associated with growth in two sturgeon species of different growth rate[J]. General and Comparative Endocrinology, 2013, 182: 41-47.
- [12] Gabillard J C, Duval H, Cauty C, et al. Differential expression of the two GH genes during embryonic development of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in relation with the IGFs system[J]. Molecular Reproduction and Development, 2003, 64: 32-40.
- [13] Zang K. Studies on physiological function and in vitro recombinant expression of growth hormone and insulin-like growth factors from *Platichthys stellatus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014. [臧坤. 星突江鲽生长激素和胰岛素样生长因子的生理功能及体外重组研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.]
- [14] Funkenstein B, Cohen I. Ontogeny of growth hormone protein and mRNA in the gilthead sea bream *Sparus aurata*[J]. Growth Regulation, 1996, 6(1): 16-21.
- [15] Ozaki Y, Fukada H, Tanaka H, et al. Expression of growth hormone family and growth hormone receptor during early development in the Japanese eel (*Anguilla japonica*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 145(1): 27-34.
- [16] Saera-Vila A, Calduch-Giner J A, Pérez-Sánchez J. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. General and Comparative Endocrinology, 2005, 142(1-2): 193-203.
- [17] Jiao B, Huang X, Chan C B, et al. The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2006, 36(1): 23-40.
- [18] Ma Q, Liu S F, Zhuang Z M, et al. The co-existence of two growth hormone receptors and their differential expression profiles between female and male tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Gene, 2012, 511(2): 341-352.
- [19] Greene M W, Chen T T. Temporal expression pattern of insulin-like growth factor mRNA during embryonic development in a teleost, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Molecular Marine Biology & Biotechnology, 1997, 6(2): 144-151.
- [20] Maures T, Chan S J, Xu B, et al. Structural, biochemical, and expression analysis of two distinct insulin-like growth factor I receptors and their ligands in zebrafish[J]. Endocrinology, 2002, 143(5): 1858-1871.
- [21] Thissen J P, Ketelslegers J M, Underwood L E. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors[J]. Endocrine Reviews, 1994, 15(1): 80-101.
- [22] Zhang J L, Shi Z Y, Cheng Q, et al. Expression patterns of IGF-I and its receptor genes during embryonic development of Japanese flounder[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(6): 1219-1225. [张俊玲, 施志仪, 程琦, 等. IGF-I 及其受体基因在牙鲆胚胎发育过程中的表达图式[J]. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1219-1225.]
- [23] Ma Q, Liu S F, Zhuang Z M, et al. Genomic structure, polymorphism and expression analysis of the growth hormone (GH) gene in female and male Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Gene, 2012, 493(1): 92-104.
- [24] Ma Q, Liu S F, Zhuang Z M, et al. Molecular cloning, expression analysis of insulin-like growth factor I (IGF-I) gene and IGF-I serum concentration in female and male Tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 160(4): 208-214.
- [25] Björnsson B T. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1997, 17(1-6): 9-24.
- [26] Zhang D C, Jiang S G. Molecular cloning and sequence analysis of growth hormone cDNA from *Acanthopagrus latus*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2002, 22(4): 62-65. [张殿昌, 江世贵. 黄鳍鲷生长激素 cDNA 的分子克隆和序列分析[J]. 广东海洋大学学报, 2002, 22(4): 62-65.]
- [27] Ayson F G, De Jesus E G, Moriyama S, et al. Differential expression of insulin-like growth factor I and II mRNAs during embryogenesis and early larval development in rabbitfish, *Siganus guttatus*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2002, 126(2): 165-174.
- [28] Duan C M. Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish[J]. The Journal of Nutrition, 1998, 128(2): 306S-314S.

Physiological role of the growth axis in embryonic development and early growth of *Cynoglossus semilaevis*

ZHANG Yaxing^{1,2,3}, WANG Bin^{2,3}, LIU Xuezhou^{2,3}, XU Yongjiang^{2,3}, SHI Bao^{2,3},
JIANG Yan^{2,3}, CUI Aijun^{1,2,3}

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China

Abstract: In order to understand the physiological role of the growth axis (GH/IGF axis) in embryonic development and early growth of *Cynoglossus semilaevis*, a quantitative PCR method was used to study the differential expression patterns of five key growth factors (GH, GHR1, GHR2, IGF-I, and IGF-II) along the growth axis during early life stages. The results showed that these five growth factors could all be genetically inherited from parents, and they all exhibited significantly higher paternal expression levels, except for GH. GH mRNA was detected in all embryonic development stages, but the highest expression level was observed at the 2-cell stage and hatching stage. GHR1 and GHR2 mRNA levels showed similar expression patterns during embryonic development stages, and there were significantly higher expression levels of GHR1 mRNA than that of GHR2 during all embryonic development stages, except in the morula and gastrula stages. IGF-I and IGF-II mRNA were both detected during all embryonic development stages, and the highest expression level of IGF-I mRNA was observed at the hatching stage. IGF-II mRNA levels peaked at the embryo encircling 2/3 of yolk sac and hatching stages. During the larval and juvenile development stages, GH mRNA expression level increased significantly from 3 d post hatching and peaked at 6 d. The GHR1 mRNA expression level increased significantly from 6 d and reached the maximum level at 30 d. GHR2 mRNA level significantly increased at 3 d, then gradually decreased to a lower expression level at 15 d, but then showed a significantly higher level from 20 d to 30 d, and also at 60 d. The expression level of IGF-I mRNA was the highest in 3 d larvae, and for IGF-II mRNA, there was significantly increased expression from 6 d, which was maintained at a high level until 45 d. The IGF-II mRNA level was significantly higher than that of IGF-I during the larval and juvenile stages. Correlation analysis showed that these growth factors play positive synergistic or negative antagonistic regulatory roles in the embryonic development and early growth stages. The results showed that the GH/IGF axis plays an important physiological role in regulating the embryonic development and early growth of *Cynoglossus semilaevis*, and provide new clues and materials for better understanding the role of the GH/IGF axis in fish growth.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; GH/IGF axis; embryonic development; larval and juvenile growth

Corresponding author: XU Yongjiang. E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn