

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01219

IGF-I 及其受体基因在牙鲆胚胎发育过程中的表达图式

张俊玲, 施志仪, 程琦, 翟万营

上海海洋大学, 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306

摘要: 胰岛素样生长因子-I(insulin-like growth factor I, IGF-I)是脊椎动物生长发育的重要调控因子, 其生物学功能主要通过与其特异的膜受体(IGF-I receptor, IGF-IR)结合而调节。因此, IGF-I及其受体表达特征的分析对于阐述IGF系统调控的发育过程具有重要的意义。本研究采用荧光实时 PCR 方法, 以不同发育时期的牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)胚胎为材料, 分析了胰岛素样生长因子-I(IGF-I)及其两种受体基因在鱼类胚胎发育过程中的表达图式。结果显示, 牙鲆 IGF-I、IGF-IR-1 和 IGF-IR-2 基因均有母源转录本, 且各基因的表达在胚胎发育的不同阶段具有明显的发育性变化。IGF-I 基因在早期胚胎发育阶段仅有少量的 mRNA 存在, 而合子基因的表达在晶体出现至出膜前阶段逐步增加。两种 IGF-I 受体基因则展现出迥然不同的表达时序。IGF-IR-1 基因在受精卵、卵裂及囊胚期的早期胚胎发育中有相对较少的转录本, 至原肠期其合子基因强烈表达, 且在神经胚、晶体出现、心跳和出膜前各阶段均有高量的表达; 相反, IGF-IR-2 基因在受精卵至原肠期的早期胚胎中有丰富的转录本, 但合子基因的表达在后期胚胎形成中却相对降低, 暗示了二者可能在调节牙鲆胚胎发育中起着不同的作用。

关键词: 牙鲆; IGF-I; IGF-I 受体; 胚胎发育; 表达图式

中图分类号: S91

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)06-1219-07

胰岛素样生长因子-I(insulin-like growth factor I, IGF-I)是一种进化上高度保守、结构上与胰岛素原同源的单链多肽, 在脊椎动物的胚胎发育和出生后生长中发挥着重要作用。与哺乳类一样, IGF-I mRNA 主要由成体鱼类肝脏合成, 其他大部分肝外组织如心脏、肾、脾、肠、生殖腺、鳃和脑等都有 IGF-I 的表达^[1]。IGF-I 主要通过与其靶组织上的膜受体结合, 激活细胞内特定的信号转导通路从而发挥其生物学作用。因而 IGF-I 受体(IGF-I receptor, IGF-IR)被认为是 IGF 信号的关键调节子, 其表达水平直接体现了 IGF-I 的组织敏感性。与哺乳类不同, 在绝大多数鱼类中发现有两种不同的 IGF-I 受体, 即 IGF-IR-1 和 IGF-IR-2, 二者分别由两个不同的基因编码, 这可能是由于在鱼类进化过程中经历了至少一次全

基因组倍增。两种 IGF-IR mRNAs 在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、平鲷(*Sparus aurata*) 和斑马鱼(*Danio rerio*)等多种硬骨鱼类成体组织中广泛地表达^[2-5], 支持了 IGF-I 通过内分泌、旁分泌或自分泌的方式发挥多重功能的可能。近年来, IGF-I 及其受体基因的序列不断被克隆, 但关于其在鱼类早期发育中的生理意义阐述仍十分有限。

牙鲆是一种非常重要的海水增殖鱼类, 也是目前研究鲽形目鱼类变态发育的良好模型。经过仔鱼期间的变态, 其外形、体位、肌纤维结构、血细胞形态、食性和生活方式等都发生了巨大的变化, 这种变态发育被认为是组织器官结构在胚胎期间确立后, 通过增殖、分化与凋亡等细胞行为进行重新塑造的胚后“二次发育”过程^[6-7]。最

收稿日期: 2011-04-28; 修订日期: 2011-06-30.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172392); 上海市重点学科水生生物学建设项目(S30701); 上海海洋大学博士启动基金资助项目.

作者简介: 张俊玲(1975-), 女, 讲师, 研究方向为鱼类发育生物学及遗传育种. E-mail: jlzhang@shou.edu.cn

通信作者: 施志仪, 教授, 博士生导师, 主要从事细胞分子生物学及水生生物分子遗传学等研究. E-mail: zyshi@shou.edu.cn

近, 我们已建立了 IGF 系统在牙鲈仔鱼变态期间的时空表达谱, 发现其 mRNAs 表达呈现明显的发育性变化^[8]。因此, 本研究利用荧光实时 PCR 方法进一步分析了 *IGF-I* 及两种不同受体基因在牙鲈胚胎发育进程中的表达图式, 旨在为阐述 IGF 系统在鲈鱼类早期发育和后期生长中的生理功能积累更多的资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料于 2009 年 4 月在中国水产科学研究院北戴河中心实验站采集。亲鱼为该站人工养殖的牙鲈, 产卵水温约 15℃。在牙鲈产卵期进行人工挤卵, 干法受精, 孵化水温为 15~16℃, 盐度为 30.5。首先在奥林巴斯显微镜下观察胚胎发育情况并拍照, 从受精卵至出膜前共 8 个不同时间点取材^[9], 每个时间点平行取 3 个样, 每个样各取 20 枚胚胎。采集样品先用 DEPC(Sigma 公司)水冲洗干净, 在 RNastore(天根公司)中 4℃放置 2 d 以去除内源的 RNase, 然后置于-80℃保存备用。

1.2 RNA 提取与反转录

取上述各期样品, 按照 Invitrogen 公司试剂盒方法提取总 RNA。所有 RNA 样品均用 DNase I(Qiagen 公司)处理 30 min, 以除去少量的基因组 DNA 污染。然后进行 1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 28S 和 18S 两条带清晰可见; 用紫外分光光度法测 RNA 样品的 OD 值和浓度, OD_{260/280} 值均在 1.90~2.05 之间。所有 RNA 样品各取 500 ng, 按

照 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis kit(TaKaRa 公司)说明合成 cDNA 第一条链。

1.3 实时 PCR

PCR 引物采用 Primer 5.0 设计, 选择扩增效率高的引物对用于实时 PCR, 序列见表 1。为了检测两个 *IGF-I* 受体基因的扩增特异性, 将 *IGF-IR-1* 和 *IGF-IR-2* 的普通 PCR 产物纯化, 分别连接到 pMD-19 载体(TaKaRa 公司), 转化、挑选阳性克隆后抽提质粒, 然后以质粒为模板, 分别用 *IGF-IR-1* 和 *IGF-IR-2* 的引物进行 PCR 扩增, 由此确认引物是否存在非特异性退火。

首先制备目的基因和内参基因的标准曲线。PCR 反应在 iCycler PCR 仪(Bio-Rad 公司)上执行, 反应总体积为 25 μL, 包括 10 倍梯度稀释的样品 cDNA 2 μL, 400 nmol/L 基因特异性上下游引物, 12.5 μL SYBR® Premix Ex Taq™(TaKaRa 公司)。其中 *IGF-I* 和内参 β -actin 基因采用两步法 PCR, 反应条件为: 95 预变性 4 min; 随后 95 解链 10 s; 60 退火并延伸 30 s, 共 40 个循环; 随后进行融解曲线的扩增。*IGF-IR-1* 和 *IGF-IR-2* 基因采用三步法 PCR, 60 退火 15 s; 然后进行 72 延伸 30 s, 其他步骤与上述相同。标准曲线显示相关系数均大于 0.99, 相应的扩增效率(*E*)均高于 0.95, 并且目标基因和内参基因的 *M* 值相差小于 0.1。

随后进行不同时间点样品中各目的基因的实时 PCR 反应, 反应体系和条件同上, 实验设 3 次重复。内参基因 β -actin 的实时 PCR 检测也被平行执行。

表 1 实时 PCR 所用引物序列
Tab.1 Primer sequences for real-time PCR

引物 primer	序列 sequence	片段长度/bp fragment length
IGF-I-f	5'- TGTAAGCGAGTAAATGTATCTGTG- 3'	147
IGF-I-r	5'- GGCATAAGGGATCTATGTTGAG- 3'	
IGF-IR-1-f	5'- TGGGTGAGGTAAGAAATGAC- 3'	123
IGF-IR-1-r	5'- CCAAATGCTTTAGCAGGTT- 3'	
IGF-IR-2-f	5'- GAGGAACTGCCCGCTAT- 3'	118
IGF-IR-2-r	5'- GAGGGTTTGCCGTCTGGT- 3'	
β -actin-f	5'- GGAAATCGTGCGTGACATTAAG- 3'	155
β -actin-r	5'- CCTCTGGACAACGGAACCTCT- 3'	

1.4 数据处理和统计分析

数据处理时以受精卵组作为实验的对照组, 不同时间点各目的基因的 mRNA 相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[10] 计算, 其数值用平均值 \pm 标准误 ($\bar{x}\pm SE$)表示, $n=3$ 。统计分析采用 One-way 方差分析, 使用 SAS 软件中 Duncan's Multiple Range Test 比较各基因相对表达水平在不同时间点的差异, 当 $P<0.05$ 时接受差异显著。

2 结果与分析

2.1 牙鲈胚胎的发育图谱

为研究 *IGF-I* 及受体基因的表达与鱼类胚胎发育间的相互关系, 本研究观察了在水温 $15\sim 16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下牙鲈胚胎生成中的几个重要时期 (图 1)。牙鲈受精卵 (图 1 A) 在受精 30 min 后形成胚盘, 并开始均等分裂; 图 1 B 受精后 5 h 25 min, 胚胎经过多次卵裂, 细胞数量增加, 呈桑葚状; 图 1 C 受精后 11 h 5 min, 囊胚隆起明显, 胚盘呈帽状盖在卵黄上; 图 1 D 受精后 21 h 45 min, 胚盘外包至整个胚体 $3/5$, 发育进入原肠中期; 图 1 E 受精后 29 h, 胚盘几乎包被整个胚胎, 形成了较清晰的胚体锥形, 头突出现, 随后在头的两侧突出一对视囊, 此期为神经胚期; 图 1 F 受精后 45 h 50 min, 视囊内晶状体出现; 图 1 G 受精后 59 h, 胚体包卵黄

囊 $2/3$ 左右, 心脏开始有规律搏动, 进入心跳期; 图 1 H 受精后 69 h 40 min, 出膜前期, 胚体绕卵黄 1 周左右, 尾尖指向头端, 胚体不断摆动, 即将出膜。

2.2 PCR 引物的特异性鉴定

图 2 中 1~4 是以出膜前胚胎 cDNA 为模板, 各目的基因和内参 β -actin 基因的普通 PCR 扩增产物, 结果显示与预期片段大小一致。图 2 中 9~10 是以 *IGF-IR-1* 质粒为模板, 11~12 以 *IGF-IR-2* 质粒为模板的 PCR 扩增结果, 表明所采用的 *IGF-I* 受体引物对在 *IGF-IR-1* 和 *IGF-IR-2* 之间无非特异性扩增。其中 5~8 和 13~16 为阴性对照。

2.3 牙鲈 *IGF-I* 基因在胚胎发育过程中的表达

Real-time PCR 检测 (图 3) 显示, 牙鲈 *IGF-I* 基因在受精卵中存在微量的 mRNA, 在卵裂、囊胚、原肠及神经胚的早期胚胎发育阶段一直保持较低的 mRNA 水平, 其在晶体出现期开始强烈表达, 且表达量逐步增加, 至出膜前阶段其 mRNA 水平达到刚受精时的 164.9 倍 ($P<0.05$)。

2.4 牙鲈 *IGF-IR-1* 和 *IGF-IR-2* 基因在胚胎发育过程中的表达

在牙鲈受精卵至出膜前的胚胎发育各个阶段都检测到了 *IGF-I* 两种受体基因的转录本, 但二者展现出了截然不同的表达图式 (图 4)。*IGF-IR-1*

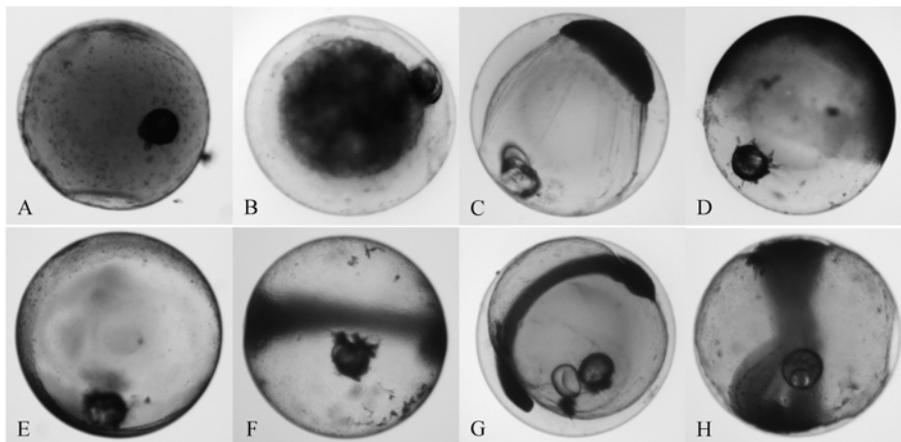


图 1 牙鲈胚胎发育 (水温 $15\sim 16\text{ }^{\circ}\text{C}$)

A: 受精卵; B: 卵裂期; C: 囊胚期; D: 原肠期; E: 神经胚期; F: 晶体出现期; G: 心跳期; H: 出膜前期。

Fig.1 Embryonic development of *P. olivaceus* ($15\sim 16\text{ }^{\circ}\text{C}$)

A: fertilized egg; B: cleavage stage; C: blastula stage; D: gastrula stage; E: nerula embryos; F: eye len formation stage; G: heart beating stage; H: prehatching stage.

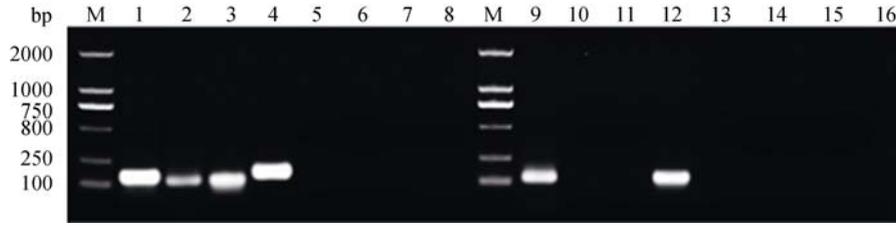


图 2 引物特异性的鉴定

1~4 是以出膜前胚胎 cDNA 为模板, 各基因的普通 PCR 产物; 其中, 1. *IGF-I*; 2. *IGF-IR-1*; 3. *IGF-IR-2*; 4. β -actin; 5~8 分别是 1~4 的阴性对照; 9、10 分别是以 *IGF-IR-1* 质粒为模板, *IGF-IR-1* 和 *IGF-IR-2* 基因的普通 PCR 结果; 11、12 分别是以 *IGF-IR-2* 质粒为模板, *IGF-IR-1* 和 *IGF-IR-2* 基因的普通 PCR 结果; 13~16 分别是 9~12 的阴性对照; M: DNA 标准.

Fig.2 Identification of the primer specificity

1-4 indicate PCR products using cDNA from prehatching embryos as templates; 1. *IGF-I*; 2. *IGF-IR-1*; 3. *IGF-IR-2*; 4. β -actin; 5-8 indicate the negative controls of 1-4; 9 and 10 indicate PCR results of the *IGF-IR-1* and *IGF-IR-2* using *IGF-IR-1* plasmid as templates, respectively; 11 and 12 indicate PCR results of the *IGF-IR-1* and *IGF-IR-2* using *IGF-IR-2* plasmid as templates, respectively; 13-16 indicate the negative controls of 9-12; M. DNA marker.

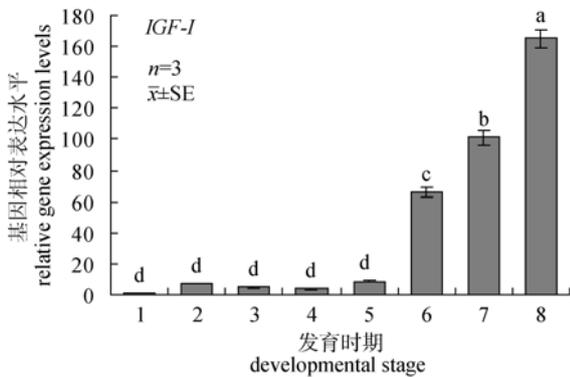


图 3 *IGF-I* 基因在牙鲈胚胎发育中的相对表达水平

1. 受精卵; 2. 卵裂期; 3. 囊胚期; 4. 原肠期; 5. 神经胚期; 6. 晶体出现期; 7. 心跳期; 8. 出膜前期. 字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 3 Relative expression levels of *IGF-I* gene during embryonic development of *P. olivaceus*

1. fertilized egg; 2. cleavage stage; 3. blastula stage; 4. gastrula stage; 5. nerula embryos; 6. eye len formation stage; 7. heart beating stage; 8. prehatching stage. Different letter indicate significant difference ($P < 0.05$).

基因在受精卵、卵裂和囊胚阶段仅有相对较低水平的 mRNA, 从原肠期开始大量表达, 至出膜前各阶段均保持较高的表达水平, 是受精卵中的 5.9 倍 ($P < 0.05$). 与此相反, *IGF-IR-2* 基因在受精卵中有丰富的 mRNA, 至原肠期阶段仍有相当高水平的转录本, 但从神经胚期开始明显下调, 在晚期胚胎发育中保持相对较低的表达水平.

3 讨论

与在哺乳动物中相似, 较多的研究已经表明

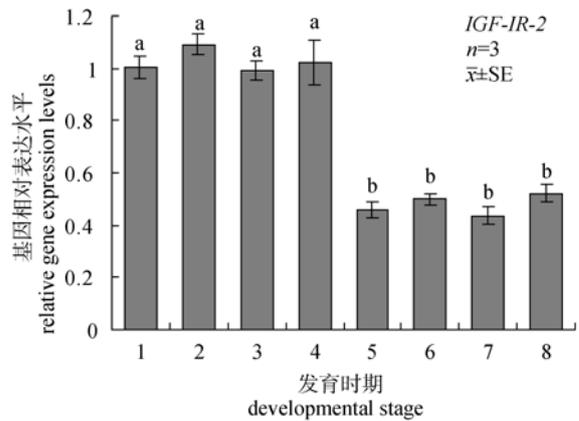
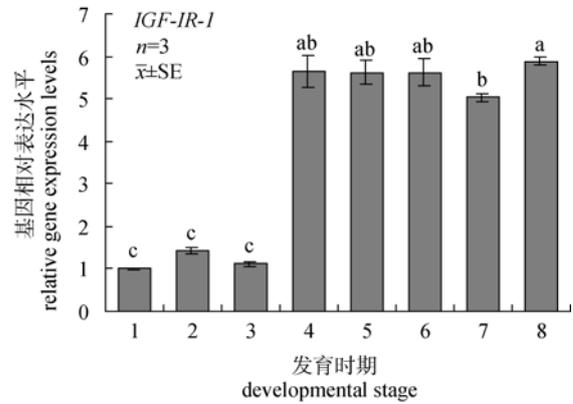


图 4 *IGF-IR-1* 和 *IGF-IR-2* 基因在牙鲈胚胎发育中的相对表达水平

1. 受精卵; 2. 卵裂期; 3. 囊胚期; 4. 原肠期; 5. 神经胚期; 6. 晶体出现期; 7. 心跳期; 8. 出膜前期. 字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 4 Relative expression levels of *IGF-IR-1* and *IGF-IR-2* genes during embryonic development of *P. olivaceus*

1. fertilized egg; 2. cleavage stage; 3. blastula stage; 4. gastrula stage; 5. nerula embryos; 6. eye len formation stage; 7. heart beating stage; 8. prehatching stage. Different letter indicate significant difference ($P < 0.05$).

IGF-I 主要在鱼类的胚后及成年期发挥作用介导生长激素(GH)的促生长效应。除促生长外, *IGF-I* 还在鱼类营养代谢、生殖、渗透压调节及免疫等多种生理过程中具有重要意义^[11-12]。但是, 目前关于 *IGF-I* 在鱼类早期胚胎发育和生长中的基础生物学研究却相对较少。在本研究中, 采用高度灵敏的荧光实时 PCR 方法检测了在水温 15 ~ 16℃ 条件下, 牙鲈 *IGF-I* 及其受体基因在胚胎不同发育阶段的表达, 结果表明各个基因的转录本在从受精卵至出膜前的整个胚胎发育期间均是广泛存在的。尽管 Ayson 等^[13]报道, 在河鲮(*Siganus guttatus*)中, *IGF-I* 基因仅仅在孵化后仔鱼中表达, 而在胚胎期间未检测到其转录本, 但先前的几个研究表明, 在平鲷、虹鳟和普通鲤(*Cyprinus carpio*)的胚胎和仔鱼中都检测到了 *IGF-I* 及其受体基因的表达^[4, 14-15]。此外, 在平鲷和虹鳟的未受精卵中也发现了 *IGF-I* 基因的转录本^[4, 14]。Peterson 等^[16]发现, *IGF-I* 基因在沟鲈(*Ictalurus punctatus*)和杂交鲈 (*Ictalurus punctatus* × *I. furcatus*)的胚胎发育和早期仔鱼阶段均有表达。在鱼类中, 合子基因的表达最早始于中囊胚转换期, 一般在第十次卵裂左右, 此时细胞分裂的同步性丧失, 细胞获得一定的运动能力。胚胎早期发育基因的启动表达对细胞命运的决定起着至关重要的作用。本研究中, 牙鲈 *IGF-I* 及两种受体基因均有母源转录本, 且合子基因的表达变化具有较明显的时期特异性, 暗示了 *IGF-I* 及其受体在牙鲈的胚胎发育中可能具有重要的调控作用。

研究表明, 鱼类肝 *IGF-I* 表达是依赖于 GH 的^[17-18]。非常有趣的是, *IGF-I* 对牙鲈胚胎阶段的生长发育调控可能独立于 GH, 这是因为在牙鲈中 GH 在仔鱼孵化后才开始产生, 比 *IGF-I* 的转录起始晚。同样, 在中国重要的养殖鱼类黄河鲤 (*Cyprinus carpio* L.) 中发现, *IGF-I* 基因于受精后 23 h 即开始转录, 但 GH 基因直到仔鱼孵出的第 1 天才开始转录^[19]。另有研究认为, 肝外组织产生的 *IGF-I* 不受 GH 的影响^[20]。另一方面, 在斑马鱼中, 基于基因功能缺失和获得的实验表明, IGF 信号对于早期胚胎的背-前轴建立是至关重

要的^[21]。在本研究中, 牙鲈 *IGF-I* 基因在从受精开始至神经胚期的早期胚胎发育阶段仅有相对较低水平的转录本, 而合子基因的表达在晶体出现至出膜前的晚期阶段迅速上调, 似乎表明 *IGF-I* 在牙鲈胚胎期间组织器官的后期形成和生长中发挥着更为重要的作用。

一般认为, *IGF-I* 作为有丝分裂原促进细胞增殖和分化的作用是通过与 *IGF-I* 受体结合实现的, *IGF-IR* 的表达水平则直接体现了 *IGF-I* 的组织敏感性。因而, 为了进一步阐述 *IGF-I* 调节的牙鲈胚胎发育过程, 本研究还分析了它的两种不同受体基因 *IGF-IR-1* 和 *IGF-IR-2* 在不同发育时期的牙鲈胚胎中的表达, 结果表明二者在牙鲈胚胎发育过程中展现出迥然不同的表达图式。牙鲈 *IGF-IR-2* 基因在受精卵中存在相当丰富的母源 mRNA, 随着胚胎发育的进行, 母源 mRNA 开始降解, 其合子基因在神经胚至出膜前阶段具有相对较低的表达。与此相反的是, 牙鲈 *IGF-IR-1* 基因在胚胎发育的早期仅有少量的转录本存在, 在原肠作用开始后的胚胎发育阶段其合子基因开始强烈表达。这两种受体基因不同的时序表达图式说明它们在调节牙鲈胚胎发育和生长中有不同的作用。类似地, 斑马鱼 *IGF-IR-1* 和 *IGF-IR-2* 基因的转录本在 16 细胞期至孵化后仔鱼广泛地存在, 且二者呈现出与本研究较为一致的表达模式^[5]。在虹鳟中有两种不同的 *IGF-I* 受体, 定名为 *IGF-IRa* 和 *IGF-IRb*。研究表明, 虹鳟 *IGF-IRa* 基因的转录本在卵裂期未被检测到, 卵裂期之后基因表达启动, 其 mRNA 水平逐渐增加, 而 *IGF-IRb* 基因在卵裂期即有转录本存在, 原肠期后其 mRNA 水平则明显降低^[14]。如图 1 所示, 在牙鲈胚胎发育的早期主要是细胞的分裂、运动和迁移, 此时 *IGF-IR-2* 基因有大量的转录本存在, 如果能翻译成蛋白将会增强 *IGF-I* 的组织敏感性; 进入神经胚期, 细胞开始形态功能上的分化, 随之而来的是组织器官的发生与形成, 胚胎体积的增大, 在出膜前发育成完整的个体, 这时 *IGF-IR-1* mRNA 水平的上调可能是对 *IGF-IR-2* mRNA 水平降低的一种补偿。因而, 我们推测 *IGF-IR-2* 可能主要

在牙鲈胚胎细胞的分裂和迁移中发挥作用, 而 *IGF-IR-1* 主要在胚胎细胞分化和后期细胞增殖中起更加重要的作用, 甚或二者在牙鲈胚胎发生的不同阶段进行着功能上的互补。

事实上, 由于基因组复制而产生的两个相似的基因在生物进化中也倾向于发生基因功能上的变化^[22]。Chauvigne 等^[23]发现, *IGF-IRa* mRNA 在禁食的虹鳟中表达增加, 在喂食后表达水平下降; 而 *IGF-IRb* mRNA 水平则没有变化。这些发现说明, 两种 *IGF-I* 受体在调节鱼类发育和生长中可能具有不同的作用, 但它们在鱼类发育不同阶段及不同组织中的广泛表达似乎又增加了区分它们的功能作用的难度。因而, 仍需要进一步的基因敲除(或敲降)或过表达研究才能更清楚地揭示 *IGF-I* 及其受体在鱼类早期发育和生长中的生理意义及其机制。

综上所述, 牙鲈 *IGF-I* 及其两种受体基因的转录本在胚胎发育的整个过程中广泛地存在, 且各基因的表达具有明显的发育性变化, 这些结果为进一步研究 IGF 系统在鲈鳟鱼类早期发育和生长中的生理功能提供了很有意义的理论指导。

参考文献:

- [1] Caelers A, Berishvili G, Meli M L, et al. Establishment of a real-time RT-PCR for the determination of absolute amounts of IGF-I and IGF-II gene expression in liver and extrahepatic sites of the tilapia [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2004, 137(2): 196–204.
- [2] Nakao N, Tanaka M, Higashimoto Y, et al. Molecular cloning, identification and characterization of four distinct receptor subtypes subtypes for insulin and IGF-I in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *J Endocrinol*, 2002, 173(2): 365–375.
- [3] Greene M W, Chen T T. Characterization of teleost insulin receptor family members. II. Developmental expression of insulin-like growth factor type I receptor messenger RNAs in rainbow trout [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1999, 115(2): 270–281.
- [4] Perrot V, Moiseeva E B, Gozes Y, et al. Ontogeny of the insulin-like growth factor system (IGF-I, IGF-II, and IGF-1R) in gilthead seabream (*Sparus aurata*): expression and cellular localization [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1999, 116(3): 445–460.
- [5] 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.
- [6] 张俊玲, 施志仪. 牙鲈早期阶段的变态发育及其机制[J]. *上海海洋大学学报*, 2003, 12(4): 348–352.
- [7] 张俊玲, 施志仪, 程琦, 等. 牙鲈变态中两种 *HSP90* 基因的不同表达及其与甲状腺激素的关系[J]. *水产学报*, 2010, 34(10): 1478–1485.
- [8] 张俊玲, 施志仪, 付元帅, 等. 牙鲈变态中 *IGF-I* 基因表达及甲状腺激素对其的调节作用[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(2): 355–359.
- [9] 刘海金, 王常安, 朱晓琛, 等. 牙鲈单倍体、三倍体、雌核发育二倍体和普通二倍体胚胎发育的比较[J]. *大连水产学院学报*, 2008, 23(3): 161–167.
- [10] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [11] Reinecke M, Björnsson B Th, Dickhoff W W, et al. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2005, 142(1-2): 20–24.
- [12] Wood A W, Duan C, Bern G A. Insulin-like growth factor signaling in fish [J]. *Int Rev Cytol*, 2005, 243: 215–285.
- [13] 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]. *Gen Comp Endocrinol*, 2002, 126(2): 165–174.
- [14] Greene M W, Chen T T. Quantitation of IGF-I, IGF-II, and multiple insulin receptor family member messenger RNAs during embryonic development in rainbow trout [J]. *Mol Reprod Dev*, 1999, 54(4): 348–361.
- [15] Tse M C L, Vong Q P, Cheng C H K, et al. PCR-cloning and gene expression studies in common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor-II [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1575(1-3): 63–74.
- [16] Peterson B C, Bosworth B G, Bilodeau A L. Differential gene expression of IGF-I, IGF-II, and toll-like receptors 3 and 5 during embryogenesis in hybrid (channel × blue) and channel catfish [J]. *Comp Biochem Physiol, Part A*, 2005, 141 (1): 42–47.
- [17] Cao Q P, Duguay S J, Plisetskaya E, et al. Nucleotide se-

- quence and growth hormone regulated expression of salmon insulin-like growth factor I mRNA [J]. *Mol Endocrinol*, 1989, 3(12): 2005–2010.
- [18] Duan C, Duguay S J, Plisetskaya E M. Insulin-like growth factor I (IGF-1) mRNA expression in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*: tissue distribution and effects of growth hormone/prolactin family peptides[J]. *Fish Physiol Biochem*, 1993, 11(1-6): 371–379.
- [19] 卢月娇, 胡炜, 朱作言. 鲤鱼发育早期 HPG 轴和 GH/IGF 轴相关因子的转录起始分析[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(6): 1126–1131.
- [20] Duan C, Duguay S J, Swanson P, et al. Tissue-specific expression of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acids in salmonids: developmental, hormonal, and nutritional regulation [C]. In: Davey K G, Peter R E, Tobe S S (eds), *Perspectives in Comparative Endocrinology*, NRC of Canada, Ottawa, 1994: 365–372.
- [21] Eivers E, McCarthy K, Glynn C, et al. Insulin-like growth factor (IGF) signaling is required for early dorso-anterior development of the zebrafish embryo [J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(10): 1131–1140.
- [22] Shimeld S M. Gene function, gene networks and the fate of duplicated genes [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 1999, 10(5): 549–553.
- [23] Chauvigne F, Gabillard J C, Weil C, et al. Effect of refeeding on IGFI, IGFI, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, 132(2): 209–215.

Expression patterns of *IGF-I* and its receptor genes during embryonic development of Japanese flounder

ZHANG Junling, SHI Zhiyi, CHENG Qi, ZHAI Wanying

Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Insulin-like growth factor I (IGF-I) is an important regulator of growth and development in vertebrates, and its biological actions are mediated by binding to membrane-specific IGF-I receptors (IGF-IRs). Therefore, the analysis of *IGF-I* and *IGF-IR* expression can help to further elucidate the role for IGF in the regulation of developmental processes. In this study, the expression patterns of *IGF-I* and its receptor genes during the embryonic development of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) were analyzed by fluorescent real-time PCR using embryos at different developmental stages. We observed that maternal transcripts of *IGF-I*, *IGF-IR-1* and *IGF-IR-2* were present in early embryos and that their expression is developmentally regulated at different embryonic stages. A few *IGF-I* mRNAs are detected in early embryos, and the zygotic *IGF-I* transcripts are gradually increased from the eye lens formation stage to the pre-hatching stage. *IGF-IR-1* and *IGF-IR-2* exhibit distinct temporal expression patterns during embryonic development. *IGF-IR-1* has fewer transcripts than *IGF-IR-2*, and these appear at the fertilized egg, cleavage and blastula stages. The zygotic *IGF-IR-1* transcripts are abundantly expressed at the gastrula stages and maintain a high level at the neurula, eye lens formation, heart beating and pre-hatching stages. By contrast, the considerable transcripts of *IGF-IR-2* are detected as early as the fertilized egg through to the gastrula stage, but the zygotic *IGF-IR-2* transcripts decrease significantly following embryogenesis. This indicates that the two IGF-I receptors might play different functional roles during embryonic development of Japanese flounder.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *IGF-I*; *IGF-I* receptors; embryonic development; expression patterns

Corresponding author: SHI Zhiyi. E-mail: zyshi@shou.edu.cn