

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00174

雌雄半滑舌鲷脑垂体基因表达差异研究

柳淑芳¹, 马骞^{1,2}, 马慧^{1,3}, 孙中之¹, 柳学周¹, 庄志猛¹

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东省渔业资源与生态环境重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 厦门大学 海洋环境学院, 福建 厦门 361005;

3. 大连海洋大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023

摘要: 为研究半滑舌鲷雌雄个体大小和生长速度差异悬殊的分子机理, 采集来自同一亲本、同一发育阶段的半滑舌鲷雄鱼和雌鱼脑垂体, 分别与 Affymetrix 的斑马鱼基因芯片杂交, 筛选差异表达基因。芯片杂交结果显示二者共有 1 051 个基因检测到明显的杂交信号, 其中上调基因 486 个, 下调基因 561 个。进一步比较雄鱼和雌鱼杂交信号的比值(Ratio 值), 有 39 个基因的 Ratio 值小于 0.6 或大于 1.5, 其中 *sh3gl1b*、*meis2.1*、*acta1*、*Noxa*、*slc25a5* 这 5 种上调基因和 *colla2*、*klf7*、*acta2* 这 3 种下调基因可能与半滑舌鲷雌雄生长差异相关。这一结果为深入研究半滑舌鲷雌雄性别分化与生长调控机制提供了新思路。

关键词: 半滑舌鲷; 生长二态性; 脑垂体; 基因芯片; 差异表达基因

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)01-0174-08

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)隶属于鲽形目(Pleuronectiformes)、鲷亚目(Soleoidei)、舌鲷科(Cynoglossidae), 为东北亚特有名贵冷温性海水鱼类, 具有活动范围小、营养等级低、适应性强、个体大、生长快等优良性状, 是一种理想的近海增养殖对象^[1]。同龄半滑舌鲷雌雄个体大小和生长速度差异极为悬殊, 雌鱼生长快、个体大, 而雄鱼性成熟时体长约为雌鱼的二分之一^[1-2]。半滑舌鲷这种典型的生长表型的性别二态性(sexual size dimorphism, SSD), 为研究雌雄个体发育差异悬殊的成因提供了理想模型。

鱼类脑垂体在生长发育、物质代谢和生殖中起着十分重要的调节作用^[3-4]。本研究针对半滑舌鲷的特殊发育模式, 尝试采用基因芯片技术对其脑垂体的基因表达谱进行研究, 以期筛选出与半滑舌鲷性别决定和生长调控相关的差异表达基因, 为这一名贵海水鱼类的苗种培育和增养殖业发展奠定理论基础, 同时为进一步研究鱼类两性生长

二态性的调控机制提供新的研究思路。

1 材料和方法

1.1 半滑舌鲷脑垂体样品来源

本研究所用半滑舌鲷(*C. semilaevis*)采自青岛市忠海水产有限公司, 健康雌雄个体来自同一亲本, 分别采集 1 龄(性别分化后)、2 龄(性成熟前)、3 龄(性成熟后)的雌鱼和雄鱼各 1 尾, 取其脑垂体组织, 置于液氮中保存备用。

1.2 总 RNA 提取

将组织样品匀浆后, 采用 Trizol 方法提取总 RNA, 用分光光度计分析 RNA 浓度和纯度, 合格后保存于-80℃。为了获得更多的半滑舌鲷脑垂体基因表达信息, 将雌、雄 3 个发育阶段的 RNA 样品分别混合, 最终得到雌、雄两组 RNA 混合样品, 再与 Affymetrix 斑马鱼基因芯片杂交。

1.3 基因芯片杂交

所用基因芯片为美国 Affymetrix 公司的斑马

收稿日期: 2011-05-08; 修订日期: 2011-06-20.

基金项目: 国家自然科学基金(30871913); 山东省泰山学者工程专项(2009.03-2014.02).

作者简介: 柳淑芳(1975-), 女, 副研究员, 从事海洋分子生态学研究. E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

通信作者: 庄志猛, 研究员. E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn

鱼 cDNA 基因芯片(Zebrafish Genome Array, Part#900487), 由北京博奥生物芯片有限公司提供。该芯片含有斑马鱼 15 617 个基因的 cDNA 或 EST 片段。采用 Affymetrix-one cycle cDNA synthesis Kit 合成第一和第二单链 cDNA, 用 Genchip IVT Labeling Kit 完成 cDNA 的转录合成和 Biotin 荧光标记, 然后根据芯片操作手册进行杂交。

1.4 芯片扫描和数据处理分析

经杂交洗涤后的基因芯片采用 Affymetrix 418 Array Scanner 进行扫描分析, 所获数据应用 Affymetrix GCOS 软件进行数据处理和分析。半滑舌鲷雄鱼和雌鱼脑垂体中基因表达按照雄/雌信号强度(Ratio 值)分别进行分析, Ratio 值大于 1 的为上调基因, 小于 1 的为下调基因。采用 Molecule Annotation System(MAS3.0)软件对挑选出的差异表达基因进行 Pathway 和 Go 统计分析。

2 结果与分析

2.1 芯片杂交结果

半滑舌鲷雌鱼和雄鱼脑垂体 cDNA 分别与斑马鱼的 cDNA 基因芯片进行芯片杂交, 结果显示, 二者均能与斑马鱼 cDNA 基因芯片呈现明显的杂交反应效果。斑马鱼芯片上的 15 617 个探针中, 雌性半滑舌鲷有 432 个呈现明确的杂交信号, 占总探针数的 2.8%; 雄性半滑舌鲷组有 530 个呈现明确的杂交信号, 占总探针数的 3.4%。将两块杂交芯片合并统计, 共有 1 051 个探针有明显或疑似杂交信号, 其余 14 566 个基因探针则没有明显的杂交信号。这些杂交信号结果详见表 1。

2.2 基因表达谱分布

利用北京博奥生物芯片有限公司的 MAS 软

件分析表达基因的 Ratio 值(雄/雌)发现, 其中上调基因 490 个, 下调基因 561 个, 而且这些表达基因的 Ratio 值呈现正态分布, 即 Ratio 值越高越远离 1, 表达基因的数目越多, Ratio 值越远离 1, 表达基因的数目越少。根据置信区间 95%的统计学要求, Ratio 值大于 1.5 和小于 0.6 的基因具有较高的差异性, 通过筛选雄、雌鱼半滑舌鲷的杂交结果, 只有 19 个上调基因的 Ratio 值大于 1.5, 20 个下调基因的 Ratio 值小于 0.6(图 1)。

2.3 半滑舌鲷雄/雌差异表达基因谱

利用 Pathway 软件对有杂交信号的 1 051 个基因进行了初步功能分类, 可分为 73 类(Clusters), 其中核糖体(Ribosome)代谢相关基因最多, 包括 39 个基因; 其次是泛素介导的蛋白质降解(ubiquitin mediated proteolysis)(13)、细胞周期(cell cycle)(12)、氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)(12)、MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway)(10)、钙离子信号通道(Wnt signaling pathway)(9)等生理过程相关基因, 另外还发现 2 种雄激素和雌激素代谢(androgen and estrogen metabolism)相关表达基因(*hsd3b1* 和 *cyp19a1b*)。

进一步用 Pathway 和 Go 软件对 19 个半滑舌鲷脑垂体表达上调基因(ratio>1.5)和 20 个表达下调基因(ratio<0.6)进行分析, 发现有 11 个上调基因和 11 个下调基因为已知功能基因, 其余 17 个基因功能未知(表 2)。这 22 个已知功能基因包括 3 种细胞内分泌和调控类蛋白基因(*snap25a*, *Syt1*, *syntaxin 1b*), 3 种核糖体蛋白基因(*rpl11*, *rps20*, *rps7*)、2 种泛素相关基因(*arih2*, *sumo2*)、2 种肌动蛋白基因(*acta1*, *acta2*)、2 种细胞生长周期相关基因(*Noxa*, *slc25a5*)以及其余 10 种基因(*klf7*, *NKX2-8*,

表 1 半滑舌鲷雄鱼和雌鱼脑垂体样品与斑马鱼基因芯片杂交的结果
Tab. 1 The hybridization results of female and male *Cynoglossus semilaevis* by using Affymetrix zebrafish microarray

探针类型 type of probe	雌性 female		雄性 male		合计 total	
	数目 number	百分率/% percentage	数目 number	百分率/% percentage	数目 number	百分率/% percentage
有杂交信号 positive probes	432	2.8	530	3.4	1051	6.7
信号不确定 doubtful probes	193	1.2	165	1.1		
无杂交信号 negative probes	14992	96.0	14922	95.5	14566	93.3
总探针 total probes	15617		15617		15617	

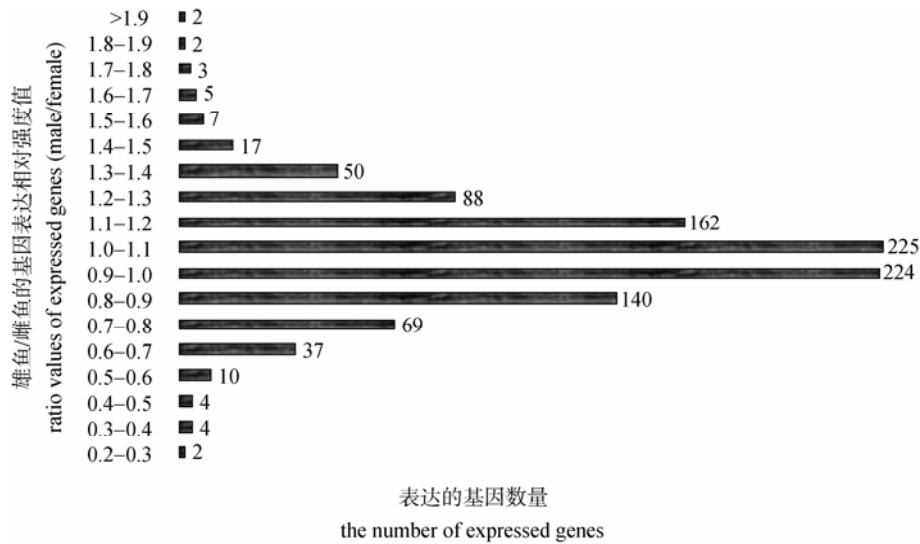


图 1 半滑舌鲷雄鱼和雌鱼表达基因 Ratio 值(雄/雌)的分布图

Fig.1 Distribution of ratio values(male/female) of *Cynoglossus semilaevis* for expressed genes

crygm2d, *meis2.1*, *nktr*, *colla2*, *GPR173*, *rgs12*, *sh3gl1b*, *Fam65c*。

3 讨论

3.1 斑马鱼 cDNA 基因芯片在鱼类基因表达分析中的应用

目前,硬骨鱼类中的斑马鱼 cDNA 基因芯片(Aflymatrix)已经开始商业化应用,且异源 cDNA 芯片杂交和应用已在其他研究中有所尝试。Renn 等^[5]采用非洲丽鱼(*Astatotilapia burtoni*)大脑 cDNA 片段的基因芯片成功地检测了 8 种不同鱼类的基因表达。Wang 等^[6]用人的 Affymetrix 芯片来研究猴子、猩猩等基因表达模式。张建社等^[7]用斑马鱼 cDNA 芯片检测鳊(*Siniperca chuatsi*)和鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)肌肉组织基因表达谱。本研究由于半滑舌鲷与斑马鱼在系统进化地位上存在一定差异,导致检测出的基因数目受到一定程度的限制,但半滑舌鲷脑垂体 cDNA 与斑马鱼 cDNA 基因芯片的异源杂交仍能清晰地显示出雌雄两种性别脑垂体基因表达谱差异,为后续相关基因研究奠定了基础,同时也证明应用 Affymetrix 斑马鱼芯片研究半滑舌鲷基因表达是有效和可行的。

3.2 与半滑舌鲷生长二态性相关的表达上调基因在半滑舌鲷脑垂体中表达的 19 个上调基因

中,目前对其中 11 个基因的功能了解较多(表 2)。进一步分析发现 *sh3gl1b*、*meis2.1*、*slc25a5*、*Noxa* 和 *acta1* 这 5 种上调基因可能与个体的生长有关。雌鱼 *sh3gl1b* 基因和 *meis2.1* 基因分别是雄鱼的 3.8(165.07/43.74)和 3.7 倍(531.52/144.4),这两种基因都具有促进细胞增殖与分化的作用,*sh3gl1b* 基因的体外表达能增加细胞的增殖能力^[8],从而参与细胞增殖与分化的调控^[9];*meis* 基因是细胞增殖的潜在调控子,在发育过程中能促进细胞增殖,抑制细胞分化,拮抗 BMP 信号^[10-11]。雌鱼 *slc25a5* 和 *Noxa* 基因的表达量均为雄鱼的 1.7 倍(670.11/395.96, 12.87/7.54),前者的主要功能是结合腺嘌呤转运蛋白,在线粒体运输中起重要作用,能在增殖性细胞中高度表达,表达受到抑制会导致细胞的生长抑制^[12-13];后者亦定位于线粒体,在诱导细胞凋亡中起重要作用^[14]。另外半滑舌鲷雌鱼 *acta1* 的表达量为雄鱼的 1.7 倍。从这些基因已知的生物学功能上分析,这些基因表达越活跃,细胞增殖生长就越快,其个体生长发育相应越快。

3.3 与半滑舌鲷生长二态性相关的表达下调基因在半滑舌鲷脑垂体中表达的 20 个上调基因中,目前只对 11 个基因有所了解(表 2),其中 *COL1A2*、*acta2*、*KLF7* 等 3 种下调基因可能与个

体的生长有关。雄鱼 *COL1A2* 的表达量仅是雌鱼表达量的 0.359 倍, 而 COL 是多种结缔组织的主要成分, 维持着组织和器官的结构完整, 并与早期发育、器官形成、细胞间连接、细胞趋化、血小板凝集以及膜的通透性等功能密切相关。分子生物学研究证明, I 型胶原的 *COL1A1* 及 *COL1A2* 基因存在约 200 种突变, 这种突变容易引起胶原基因相关的疾病, 如身材矮小、成骨不全、软骨发育不良等疾病^[15]。雄鱼 *klf7* 的表达量高于雌鱼 1.5 倍, *klf7* 基因广泛存在, 与脂肪的形成密切相关, 在细胞发育和分化过程中起重要作用, *klf7* 的大量表达可抑制脂肪形成, 抑制脂肪细胞内脂联素的表达^[16], 导致动物个体脂肪含量减少, 个体变小。值得关注的是, 雄鱼 *acta- α 2* 表达量是雌鱼的 1.802 倍, 这与 *acta1* 的表达正好相反, 由于 *acta1* 对应于骨骼肌型肌动蛋白, 而 *acta2* 对应于血管平滑肌型^[17], 这种差异是否与二者的功能相关尚有待于进一步研究。

3.4 其他差异表达基因与半滑舌鲷生长发育的关系

在比较分析中还发现 *snap25a*、*Syt 1*、*syntaxin 1b*、*rpl11*、*rps20*、*rps7*、*Fam65c*、*ARIADNE*、*SUMO2*、*Crystallin*、*GPR173*、*nkx2.8*、*rgs12* 等基因在雌雄鱼之间呈现明显的差异表达。尽管已经了解和发现了这些基因在人类或其他动物体内的作用和功能, 如 *nkx2.8* 与肺的发育和成熟相关^[18], *rgs12* 能够促进和/或维持动物的肌肉和神经分化^[19-20], *snap25a*、*Syt 1* 和 *syntaxin1b* 和细胞分泌和调控密切相关^[21-22], *NKTR* 基因促进 NK 细胞与靶抗原的结合^[23-24], *SUMO* 与蛋白连接后增强蛋白质分子的稳定性或者调节其亚细胞定位^[25], *ARIADNE* 蛋白具有泛素缀合酶的活性^[26]等, 但是半滑舌鲷的相关研究尚属空白。更让人不解的是, 除了 *nkx2.8* 和 *rgs12* 基因以外, 其余基因的表达量均是雄鱼高于雌鱼, 这些基因与半滑舌鲷生长发育的关系均有待进一步研究。

4 展望

生物的每一种生理过程都需要多个基因的共同参与。本研究利用基因芯片技术发现了一些可

能或潜在的与个体生长差异相关的基因。从上述分析可以看出, 雌鱼的 *sh3gl1b*、*meis2.14*、*COL1A2*、*slc25a5*、*Noxa* 等基因的表达量明显高于雄鱼。这些基因表达量高, 则细胞的活性增强、细胞增殖加快、细胞分化受到抑制, 否则就会出现细胞活性降低、细胞的生长受到抑制、细胞形态变小、甚至个体身材矮小等。因此, 这些基因的表达水平高低与半滑舌鲷雌雄个体大小和生长速度差异悬殊的现象密切相关, 它们在半滑舌鲷体内的具体生物学功能及基因之间的相互作用关系有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布[J]. 海洋水产研究, 1988(9): 10-98.
- [2] 倪海儿, 龚启祥, 董瞻远. 短吻舌鲷个体生殖力和雌雄性状差异的研究[J]. 浙江水产学院学报, 1989, 8(1): 9-11.
- [3] Chapman S C, Sawitzke A L, Campbell D S, et al. A three-dimensional atlas of pituitary gland development in the zebrafish[J]. J Comp Neurol, 2005, 487(4): 428-440.
- [4] 谢碧文, 王志坚, 张耀光. 鱼类垂体发育研究进展[J]. 水生生物学报, 2008, 32(1): 102-108.
- [5] Renn S C P, Aubin-Horth N, Hofmann H A. Biologically meaningful expression profiling across species using heterologous hybridization to a cDNA microarray[J]. BMC Genomics, 2004, 5: 42.
- [6] Wang Z, Lewis M G, Nau M E, et al. Identification and utilization of inter-species conserved (ISC) probesets on Affymetrix human GeneChip platforms for the optimization of the assessment of expression patterns in non human primate (NHP) samples[J]. BMC Bioinform, 2004, 26(5): 165.
- [7] 张建社, 夏新界, 褚武英, 等. 鳊鱼和鲢鱼肌肉组织基因表达谱[J]. 水生生物学报, 2009, 33(1): 46-53.
- [8] Le H Y, Zhang Y, Liu H, et al. EENA promotes myeloid proliferation through stimulating ERK1/2 phosphorylation in zebrafish[J]. J Biol Chem, 2008, 25: 17652-17661.
- [9] Garrington T P, Johnson G L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways[J]. Curr Opin Cell Biol, 1999, 11: 211-218.
- [10] Maeda R, Mood K, Jones T, et al. XMEIS1, a protooncogene involved in specifying neural crest fate in *Xenopus* embryos[J]. Oncogene, 2001(20): 1329-1342.
- [11] Biemar F, Devos N, Martial J A, et al. Cloning and expres-

- sion of the TALE superclass homeobox Meis2 gene during zebrafish embryonic development[J]. *Mechan Dev*, 2001, 109: 427–431.
- [12] Palmieri F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications[J]. *Pflugers Arch*, 2004, 447: 689–709.
- [13] Jang J Y, Choi Y, Jeon Y K, et al. Suppression of adenine nucleotide translocase-2 by vector-based siRNA in human breast cancer cells induces apoptosis and inhibits tumor growth *in vitro* and *in vivo*[J]. *Breast Cancer Res*, 2008, 10: 11.
- [14] Yakovlev A G, Di Giovanni S, Wang G, et al. BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (27): 28367–28374.
- [15] 孟祥宁, 薛雅丽, 傅松滨. COL1A2 基因多态性的研究进展[J], *国外医学遗传学分册*, 2002, 25(5): 310–313.
- [16] Zobel D P, Andreasen C H, Burgdorf K S, et al. Variation in the gene encoding Krüppel-like factor 7 influences body fat: studies of 14818 Danes [J]. *Eur J Endocrinol*, 2009, 160: 603–609.
- [17] Vandekerckhove J, Weber K. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequences of the amino-terminal tryptic peptide[J]. *J Mol Biol*, 1978; 126: 783–802.
- [18] Reecy J M, Yamada M, Cummings K, et al. Chicken Nkx-2.8: A novel homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and pharyngeal pouch-2 and -3 endoderm[J]. *Dev Biol*, 1997, 188: 295–311.
- [19] Richman R W, Strock J, Hains M D, et al. RGS12 interacts with the SNARE-binding region of the Cav2.2 calcium channel[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(2): 1521–1528.
- [20] Willard M D, Willard F S, Li X, et al. Selective role for RGS12 as a Ras/Raf/MEK scaffold in nerve growth factor-mediated differentiation[J]. *EMBO J*, 2007, 26(8): 2029–2040.
- [21] 杨帆. Synaptotagmin 蛋白的基本机制及在细胞分泌中的作用[J], *现代生物医学进展*, 2009, 9(1): 150–152.
- [22] Tafoya L C, Shuttleworth C W, Yanagawa Y, et al. The role of the t-SNARE SNAP-25 in action potential-dependent calcium signaling and expression in GABAergic and glutamatergic neurons[J]. *BMC Neurosci*, 2008, 9: 105–122.
- [23] Rinfret A, Anderson S K. IL-2 regulates the expression of the NK-TR gene via an alternate RNA splicing mechanism[J]. *Mol Immunol*, 1993, 30(14): 1307–1313.
- [24] Simons-Evelyn M, Young H A, Anderson S K. Characterization of the mouse Nktr gene and promoter[J]. *Genomics*, 1997, 40(1): 94–100.
- [25] Verger A, Perdomo G, Crossley M. Modification with SUMO A role in transcriptional regulation[J]. *Eur Mol Biol Org*, 2003, 4(2): 137–142.
- [26] Aguileraa M, Oliverosa M, Martínez-Padrón M, et al. Ariadne-1: A vital drosophila gene is required in development and defines a new conserved family of RING-finger proteins miguel aguileraa[J]. *Genetics*, 2000, 155: 1231–1244.

Differential gene expression profiles between the pituitaries of female and male half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

LIU Shufang¹, MA Qian^{1,2}, MA Hui^{1,3}, SUN Zhongzhi¹, LIU Xuezhou¹, ZHUANG Zhimeng¹

1. Key Laboratory for Fishery Resources and Ecological Environment of Shandong, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
3. College of Life Science and Technology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: The half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) is an important marine flatfish with significant potential for aquaculture in China. This species exhibits a typical sexual dimorphism in which males grow significantly slower and smaller than females. Thus, there is little economic benefit to culturing males. To improve our understanding of this sex-associated dimorphic growth phenomenon, we screened differentially expressed genes from the pituitary tissues of female and male half-smooth tongue sole using the Affymetrix zebrafish microarray. A total of 486 genes were up-regulated and 561 genes were down-regulated. Based on standards for the relative strength of the difference (i.e., a ratio of the male to female hybridization signals of >1.5 or <0.6), we identified 39 differentially expressed genes, including *meis2.1*, *colla2*, *sh3gl1b*, *acta1*, *slc25a5*, *lf7*, and *acta2*. Our results provide a foundation for investigating the molecular mechanisms controlling differential growth among the sexes.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; sexual size dimorphism; pituitary, microarray; gene expression profiles

Corresponding author: ZHUANG Zhimeng. E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn