

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15151

中国大鲵生长激素受体的克隆与表达分析

胡乔木^{1,2}, 田海峰¹, 孟彦¹, 肖汉兵¹

1. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;

2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081

摘要: 利用中国大鲵(*Andrias davidianus*)性腺转录组测序获得的生长激素受体(GHR)基因部分序列, 克隆获得基因全长 2992 bp, 开放阅读框 1812 bp, 编码 604 个氨基酸, 该蛋白具有高度保守的 FGEFS 基序与 BOX 框。系统进化分析结果显示, 中国大鲵 GHR 氨基酸序列与两栖类非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)同源性最高, 蜥形纲锦龟(*Chrysemys picta bellii*)次之, 哺乳类水牛(*Bubalus bubalis*)和鱼类半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)最低。实时定量 PCR 结果表明, GHR 基因在肝中表达最高, 肌肉、垂体、肾、性腺中的表达量次之, 其他各组织表达量较低。在精巢发育早期 GHR 表达较高, 随后表达量逐渐降低, 在卵巢中表达量随时间增长而增加; 17 α -甲基睾丸酮(MT)与芳香化酶抑制剂来曲唑(LE)短暂处理后 GHR 基因在脑与卵巢中表达量发生变化, MT 处理后, 脑与卵巢中 GHR 表达量增加, LE 处理后脑与卵巢中表达量降低。研究表明, GHR 基因在大鲵性腺发育中可能发挥作用, 且 MT 与 LE 可能通过不同的途径调节 GHR 基因的表达。

关键词: 中国大鲵; 生长激素受体(GHR); 克隆; 表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)02-0297-10

中国大鲵(*Andrias davidianus*)又名娃娃鱼, 分类上属于两栖纲(Amphibia)、有尾目(Vrodtele)、隐鳃鲵科(Cryptobranchidae)、大鲵属(*Andrias*)^[1], 野生大鲵是中国 II 级重点保护有尾两栖类动物和全球现存两栖类中体形最大, 寿命最长的古老动物^[2], 并且其具有较高的营养价值。野生大鲵在中国陕西、云南、四川、湖北、云南等多省有分布, 但是自 20 世纪 80 年代以来, 由于人类的捕杀, 野生大鲵种群数量锐减, 因此人工繁殖的成功为该物种的保护提供了一种有效途径, 同时大鲵养殖业也应运而生, 并逐渐向规模化、集约化发展, 成为一项新型养殖业。在养殖中为增加大鲵产量, 对大鲵生长与繁育的研究显得尤为重要。近年来, 有学者报道 GH-IGF 轴上基因不仅参与动物体生长, 而且在性腺发育中也发挥重要作用^[3-5]。因此,

从 GH-IGF 轴分析大鲵生长与繁育的分子机制越来越受到学者关注。

目前关于大鲵的研究多集中于抗病基因的克隆与表达分析^[6-8], 而对与生长、繁育相关基因的报道较少, 仅见于 Yang 等^[9]克隆了大鲵生长激素(growth hormone, GH)基因并对其不同组织表达进行分析。生长激素(growth hormone, GH)是调节动物生长发育等代谢过程的一种重要内分泌因子, 能促进生物体生长、促进组织生长发育、性腺发育成熟、提高鱼类渗透压调节等作用。生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)处于 GH-GHR-IGFs 轴上, 通过介导 GH 来调控 IGFs 的表达, 从而产生一系列的生理效应。迄今, 在人(*Homo sapiens*)^[10]、小鼠(*Mus musculus*)^[11]、牛(*Bos taurus*)^[12]等哺乳动物中均克隆了 GHR 基因 cDNA

收稿日期: 2015-04-13; 修订日期: 2015-07-06.

基金项目: 农业部公益性行业科研专项经费项目(201203086-03); 中央级公益性科研院所基本科研业务费资助项目(2015JBFM40).

作者简介: 胡乔木(1984-), 男, 博士, 主要从事水产养殖研究. E-mail: hqmu@yfi.ac.cn

通信作者: 肖汉兵, 研究员, 主要从事水产养殖研究. E-mail: xhb@yfi.ac.cn

序列。在鱼类现已克隆了黄鳍鲷(*Sparus latus*)^[13]、黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)^[14]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[15]等 20 多种鱼的 *GHR* 基因, 并对其表达模式进行了分析研究。有研究表明, *GHR* 基因的缺失或是变异可能导致生物体生长发育等模式的变异。例如, 性连锁矮小鸡的生长迟缓症就是因为 *GHR* 基因异常^[16], 且发现在矮小鸡中 *GHR* 基因表达水平显著性高于正常鸡^[17]。此外, 雌雄生长具有二态性的鱼类中, *GHR* 基因在雌雄性腺中的表达具有显著性差异且在性腺发育中发挥重要作用^[3, 18-19], 在鸡性腺发育中也发挥重要作用^[20]。因此推测 *GHR* 基因可能在性腺发育及雌雄生长二态性中发挥重要作用。本文以雌雄生长具有二态性的大鲢为研究对象, 克隆获得 *GHR* 基因全长序列, 分析不同组织、不同发育时期性腺以及 MT 和 LE 处理后性腺中 *GHR* 基因的表达变化, 试图了解该基因在大鲢性腺发育中的作用, 为深入开展大鲢繁殖生物学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 中国大鲢取自浙江永强农业有限公司, 分别采集 1 年龄(50 g)、2 年龄(240 g)、3 年龄(519 g)、4 年龄(1135 g)、5 年龄(2280 g)、6 年龄(3700 g)雌雄大鲢性腺各 3 组及 1 年龄大鲢 3 尾分别取各组织(性腺, 脑, 皮, 胃, 肝, 肠, 肾, 脾, 肌肉, 心脏, 肺, 垂体)取出后迅速投入液氮中, 后转入-80℃低温冰箱中保存, 用于 RNA 提取。

1.1.2 试剂及设备 RNA 提取试剂 TRIzol (Ambion); SYBR ExScript RT-PCR Kit (TaKaRa); *Tap* 酶、PrimeScript 反转录试剂盒、PMD18-T 载体购自大连宝生物(TaKaRa)公司; SMARTTM RACE cDNA Amplification kit (Clontech); 17 α -甲基睾酮(MT)、芳香化酶抑制剂来曲唑(LE)购置与大连美仑生物技术有限; 荧光定量 PCR 反应在 ABI-7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司)上进行。

1.2 MT 和 LE 处理大鲢幼鱼

MT 与 LE 经无水乙醇溶解至 20 mg/mL, 然后植物油稀释至 2 mg/mL。取 1 年龄幼鲢为实验材料, 腹腔注射 MT、LE 的量为 10 mg/kg, 对照组注射无水乙醇与植物油的混合液。注射后 12 h、24 h、36 h、48 h、72 h、96 h 取实验幼鲢(每次取 3 尾雌性幼鲢)脑与性腺组织, 迅速置于液氮中, 后转入-80℃低温冰箱中保存, 用于 RNA 提取。

1.3 RNA 提取与反转录

取 40 mg 组织于液氮中充分研磨, 按照 TRIzol Reagent 说明书提取总 RNA。DEPC 水溶解总 RNA 后, 用紫外分光光度计测定 RNA 在 260 nm 与 280 nm 的 OD 值, 并进行琼脂糖检测 RNA 完整性。将质量浓度较好的总 RNA 用反转录试剂盒(TaKaRa)将 RNA 反转录成 cDNA, -20℃保存备用。

1.4 *GHR* 基因全长克隆

根据本实验室大鲢转录组测序数据库中筛选出 *GHR* 基因部分序列, 设计引物 GHR-A/S (表 1)对转录组里获得的部分序列进行克隆验证。在验证无误的 *GHR* 基因部分序列上设计 5'-RACE 与 3'-RACE 特异引物 GHR-5'GSP/GHR-3'GSP(表 1)。按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification kit 说明书上的操作构建 5'-RACE-Ready cDNA, 和 3'-RACE-Ready cDNA 库, 进行特异性 PCR 扩增, 反应程序为 94℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 25 个循环; 72℃ 10 min。特异性目的条带切胶回收、克隆、测序。

1.5 *GHR* 基因序列分析

将克隆测序后序列用 Vector NTI Advance 10 软件进行序列拼接, 用 NCBI 数据库中在线软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>; www.ncbi.nlm.nih.gov/structure)预测 ORF 区与保守区; 分别用在线软件(<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>; www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)预测蛋白分子量和信号肽; 利用 ClustalX 1.8 和 Mega 4.0 构建分子系统进化树。

表 1 引物及序列
Tab. 1 primers and sequences in the study

引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	用途 utilization
GHR-S	GCCACCACCTTCTGCTGACA	序列验证 sequence confirmation
GHR-A	TCCTCATTAAGCTCTGCTGCA	序列验证 sequence confirmation
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE 扩增 RACE amplification
GHR-5'GSP	CATGCGGACGGCATCTTACTCGCATTTTC	5'端特异扩增 5' RACE amplification
GHR-3'GSP	GGAAGACTTCTCCTTTCCCCAGGGCAGA	3'端特异扩增 3' RACE amplification
GHR-S1	TGAAATGCGAGTAAGATGCCGT	定量 PCR Real time PCR
GHR-A1	TGCTCCACCAAAATGTCCCAA	定量 PCR Real time PCR
β -Actin-F	GGTTATGCCCTGCCTCACG	内参 internal reference
β -Actin-R	ATTTCCTTTTCGGCTGTGG	内参 internal reference

1.6 实时荧光定量 PCR

利用以制备好的 cDNA 为模板, 以 β -actin 为内参基因(序列见表 1), 每个组织 3 个个体重复 3 次。采用 TaKaRa 公司的 SYBR ExScript RT-PCR Kit, 20 μ L 的反应体系: 10 μ L SYBR Premix Ex Taq (2 $\times$), 0.4 μ L GHR-S1, 0.4 μ L GHR-A1, 1 μ L cDNA 和 0.4 μ L ROX reference dye。在 ABI 7500 Real-time PCR 仪(Applied Biosystems, USA)上进行荧光定量 PCR 反应。所得数据用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差下(One-Way ANOVA), Duncan's 法进行多重比较分析, 当 $P<0.05$ 时认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 大鲵 *GHR* 基因全长 cDNA 克隆及序列分析

对大鲵转录组数据库中筛选的部分序列设计引物, 根据验证无误的 *GHR* 部分序列设计 RACE 引物(表 1), 进行扩增, 分别获得 5'-RACE 918 bp 和 3'-RACE 1291 bp 的特异片段。克隆测序后, 利用序列拼接软件将 5'-RACE、3'-RACE 和已知的部分序列进行拼接, 获得全长为 2992 bp 的 *GHR* cDNA 序列。ORF 区预测结果为 1812 bp, 编码 604 个氨基酸, 3'UTR 为 299 bp, 5'UTR 为 881 bp, 并将序列提交至 NCBI 数据库(Accession number: KR030090)。推导的氨基酸序列在 NCBI 库中比对, 结果显示与两栖类的相似性在 99%, 与蜥形纲(爬行与鸟类)的相似性在 89%~100%, 与哺乳类和鱼类相似性较低。对大鲵 *GHR* 基因进行生物信息学

分析, 结果显示该基因具有高度保守的 FGEFS (211aa~215aa)基序, 296 个氨基酸的生长激素受体结合蛋白区(287aa~582aa)以及两个保守的 Box (图 1)。另外, 还具有 19 个氨基酸的信号肽序列 (1aa~19aa)以及蛋白分子量 68.21 kD 等特征。

2.2 序列比对及进化树分析

将大鲵 *GHR* 基因氨基酸序列与 GenBank 中已报道的部分两爬类动物相应序列进行比较分析。从图中可以看出大鲵、非洲蟾蜍、锦龟和绿海龟结构基本一致, 都具有 19 个氨基酸的信号肽 (图 2), 与具有 621 个氨基酸的热带蟾蜍不同。以鱼类 *GHR* 氨基酸序列为外类群, 在大鲵 *GHR* 氨基酸序列与 GenBank 中已知物种的氨基酸序列进行比对分析基础上, 使用 Mega 6.0 软件构建大鲵与其他物种间分子系统进化树(图 3)。从图中可见, 大鲵与非洲蟾蜍等聚为单独一支, 爬行类与鸟类聚为一支, 再与哺育类聚为另一支。该结果基本符合一般的进化规律。

2.3 *GHR* 基因在组织与不同时期性腺中表达分析

根据设计的特异性引物, 利用实时荧光定量 PCR 技术, 对大鲵 13 个组织进行组织表达分析, 结果如图 4 所示, *GHR* 基因在各组织中都有表达, 在肝中表达量最高, 在肌肉、垂体、精巢、肾、脑等组织中表达相对较高, 其他各组织低表达。不同发育时期性腺中的表达如图 5 所示, 在卵巢中 *GHR* 基因表达是随卵巢成熟表达量逐渐增加; 在精巢中, 发育早期表达量较高, 随精巢成熟表达量逐渐降低。

```

ATGGGAGAGGGAGTGGGATCTCTCACTCTGGCTGTGGCAATCTGACAGCTCCGATCGGCGAGA 65
CATGGGAGGAGGAGGAGGTGGTTGCCGCTGCTGCTGATTTCAGCCAGATTGCTTGGGAGAGGAGTGGGCTCTGCA 143
GCTGTTGCCGAGCGGAGAGCTGTTCTGCTCTCTGGGATTTCAAAACACTATCTCACCAGCGCTGAAAGAGCGCCT 221
CCCAAGAAATGGTAATGACCGTAAGCTGCATTACAGCAAGCCACTGCATTTGAACATCAGTAAGAAGGTGCAGGAGGA 299
ATGGCGTTTTGGCTGCTCTGTTTACTTTGGCTCTGGCTGCAGTAATGTTTCTCTTTTACAAGTGGGCTCTTCC 377
M A F W L L L F T L A L V C S N V S L F T S E V S S 26
GGAGAACCTGGATTGATTGAGATCGCCAGACCAAGAAACCTTTACATGCTTGTGGACCTATGGGATTTTCACAAC 455
G E P G F D C R S P D Q E T F T C L W T Y G D F H N 52
TTGACGGCCATGTAATTTGATGTATATGTTAAGGAAAGATATGATATGGCGAGAATGCTCTGATTATAAATCTGCT 533
L T G H V N L M Y M L R K D M I W R E C P D Y K S A 78
GGTGAATAAGTTGTTACTTCAACTCATCATACCAATATTTGGACAGAATATGTCTTAAGCTTGAACATGAGAAC 611
G E N S C Y F N S S Y T N I W T E Y C L K L E H E N 104
ACCACACTTCATGAAAAATGTAATATGTTGAAGACATAGTAAACCTTATCCACCCATTGGCCTCACTGGACCTTG 689
T T L H E K C I N V E D I V K P Y P P I G L N W T L 130
ATGAATTCAGTCTAACATGTATCTACGCGGACATTGAGTAACATGGCAGCCACCACCTTCTGCTGACATTAAGAAA 767
M N F S L T C I Y A D I R V T W Q P P P S A D I K K 156
GGATGGATTACGCTTATATGAACCTCAGTTCAAGAAAGTGAATGCAACCAATTTGGACACAGATGGATCCTGTATTT 845
G W I T L I Y E L Q F K E V N A T I W T Q M D P V F 182
GTAACAGTCCTTCCAGTTTACTCATTGAAGATAGAAAAAGACTATGAAATGCGAGTAAGATGCCGTCGCCATGCTTCT 923
V T V L P V Y S L K I E K D Y E M R V R C R P H A S 208
GGTTCCTTTGGAGAAATTTAGCGAAACACTCTATGTATCTTTTGCCGATTTTATGTAGTTCAAGATCATGATGAACCG 1001
G S F G E F S E T L Y V S F A D F Y V V Q D H D E P 234
AAGTTCCTTTGGCTGTTTTTGTCTCTTTGGGACATTGGTGGAGCAGTAGTACTACTTCTGATTCTATTCTCTAAG 1079
K F P W L F F V I F G T F G G A V V L L L I L F S K 260
CAAAAGAGGATAAAGATGCTGATTCTTCTCCGGTTCCAGTGCCGAAGATAAAGGGAATTTGATCCGAACTGATAAAG 1157
Q K R I K M L I L P P V P V P K I K G I D P E L I K 286
AAAGGAAACTTGATGAAGTGAACCTCTATCTAGCTGTATGAGAGCTATAAACACACAGATGTATAATGATGACTCT 1235
K G K L D E V N S I L A C H E S Y K P Q M Y N D D S 312
TGGTCCGAGTTTATGAACTGGACATGGATGACCCCTGATGAAAAAAGTGAAGGATTAGATACAGACAGACTTTTAGCT 1313
W V E F I E L D M D D P D E K T E G L D T D R L L A 338
GAGGACCATCTAAAGTCTAAGTCTTGGTGTAAAGGATGATGATTCTGGAAGAGCTAGTGTGTGAACAGATATC 1391
E D H L K S N C L G V K D D D S G R A S C C E P D I 364
CCTGAGACAGATTTCAAGTGAAGTATCATGTGATGGAACCTCAGATATAGTTCAGTCACAAAAGTTAAGTGAAGT 1469
P E T D F S V S D T C D G T S D I V Q S Q K L S E N 390
GAAGATCTGATGTGCTTGACAGAAAGAAATGATGAATCGCTGTCAAGTTCTAATGCTCCAACAGCAACAGCTA 1547
E D L M C L D Q K E N D E S L S S S N A P T S K Q L 416
AGCAGCATGATGAAGTCTGATGATATGAAATCAAGTCCGTTGTTAATTTGTGAATGGAAAAAGTAGCCCCCTTTC 1625
S S M M K S D D M K S S P L L I C G M E K G S P P F 442
AATATGAGATGAGTAACCTGAGTTCAAGACAAACATGGACTTTTACGCATTGGTCAAGTATATACACCAGCAGGA 1703
N M Q M S N L S S K T N M D F Y A L V S D I T P A G 468
AGACTTCTCTTTCCCGAGGCGAGAAAAACAGATCGAAATGAATATTGACAGAGAGATATTCTACAGCGCCACCT 1781
R L L L S P G Q K N K I E N E Y C R E I F L Q R Q P 494
ATCTTCAACATGGACAGTGCCTATATTTGTGAGTCAGATGCAGTAACATTCTGTCCGATCTTCAAGTGAACAGGAA 1859
I F N M D S A Y I C E S D A V T F C P V S S S E Q E 520
GAGCCACATGTGACGAGAGCTTAAATGAGGATGCCTATTTAATACAGAAAGCCTTACCCTAATGCTATGAGTTCT 1937
E P H V Q Q S F N E D A Y F N T E S L T T N A M S S 546
GGTGAAGCAGATGGAGGCTTAGCGCCGAGATGCCTGTCCAGAGTATACATCTATCCATATAATAAATCTCTCAG 2015
G E A D G G S S A E M P V P E Y T S I H I I N S P Q 572
AGCATGTGCTCAATGCTGCTGTGCTGCCAGAGAAAGATTTTATGCATCATGTGGCTATATGACCCAGACCAAGTG 2093
S M V L N A A V L P E K D F I A S C G Y M T P D Q 598
AACAAAGTCATGCCATAGATGTTTGTCTATGTACGTAATTTTAAATGGCATGGATTAGCTTGGGCTGTGTGCT 2171
N K V M P * 604
TAAACCAAAACATGTATACAGTGTGTTGTTGTTTACATCTTGTGTAACGTTTAAAGCTTTTATCTGAAATGTTGA 2249
TACATGTTAAAAAGTTAATCACACTATTCTAAAAATGAAGTATAGTTTAAAGAGCTGTCTCGGAGAATGTTTAACTA 2327
GTGACTGTTCAAGTTACTGTTAAGCTTCAATTTGTGACATTAAGGGCTTATTTACAAAGCGATTGTTCAAGACACA 2405
TATTGGCAGAACGGTTTCTAAATAGTATGTAATATCCTTAGCATTGAATAACTATGTTTAAATGTAATCAGGTTTTT 2483
TTGAAAAAAGATGAATTCAGGTGGTTTGCATTTTAAAGAAATATACAGCAATGAATCCAGTATTCTGTATGTCAG 2561
TAGCTGGGAGGTACATGAATGTAGTTACTTACAGTAGGTGAAAGGGTAGCTTGGGCAAGAAGAACATCTATTTTGAC 2639
TTAATAGTTAAGATATTTTAACTTTAGACTTAAAGCATGAATATTTTATAATACACTACAAGCTATACAATTTAA 2717
ATAACAAGATCCCTCTTGAATGTAGTTGATAAAATTTTAAAGAGCTGGGTTTTGCTTTAGTCATTCAACTCAACAA 2795
AATAAATACAGATGGTTTTCTACAGAGACAATTTTACCTCCTTACATACATAGAAAGTTATACAATTTCCGAAT 2873
TGTAATAACTACCATTATCACACATGTACTTCTAGCCCCGTATATATTAGCATTTCCAGGGTTTTGAAAGCCG 2951
CATTCGAATTAACAAAAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 2992

```

图 1 中国大鲵 *GHR* 基因 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

灰色区域为生长激素受体蛋白结合区; 方框: box1 与 box2; 单下划线: 信号肽; 双下划线: FGEFS 基序。

Fig. 1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *GHR* from Chinese giant salamander

The gray area indicates growth hormone receptor protein binding domain; BOX: box1 and box2; single underline: signal peptide; Double underline: FGEFS motif.

大鲵 <i>Andrias davidianus</i>	-----MAFWLLLTALVCSNVSLFTSEVSSGEP-GFDCRSPDQETFTCLWYGDPHNLT--GHVNLMYLRKDMIWRECPDYKSAGENSICYF	85
锦龟 <i>Chrysemys picta bellii</i>	-----MDLRQLLLILALVCANDSISTSEVILGRPQIITCRSPQETFSCHWTDKDFHNLTPGTQVLLYMRNDEWKECPDYVTAGENSICYF	88
海龟 <i>Chelonia mydas</i>	-----MDLRQLLLILALVHANDSISTSEVILGRPQIITCRSPQETFSCHWTDKDFHNLTPGTQVLLYMRNDEWKECPDYVTAGENSICYF	88
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	-----MAYWLFVTVILLYIDGSTAATDVSLGKPRIITCRSPQETITCYWTNGEFRNLSLGLLKLQYKKKEANWTDCPDITITGGENSICYF	88
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	MLSSGAICRAQPTGGPRGMAYWLFWAIAILLCIDGSTAAADVSHGRPRIITCRSPQETITCYWTNGEFRNLSLGLLKLQYKKKEANWTDCPDITITGGENSICYF	106
大鲵 <i>Andrias davidianus</i>	NSSYTIWITEYCLKEHENTTLEHKCINVEDIVKPYPIGLNWTLMNFSLTICYADIRVTWQPPPSADIKKGWITLIEYQFKEVNATIWQMDPVFVTVLPVYSL	191
锦龟 <i>Chrysemys picta bellii</i>	NTSYTSIWITYCVKLKKDEVLEKCFSDVEIVQDPFVGLNWTLMNFSLTICYADIRVTWQPPPSADIKKGWITLIEYQFKEVNATIWQMDPVFVTVLPVYSL	194
海龟 <i>Chelonia mydas</i>	NTSYTSIWITYCVKLKKDEVLEKCFSDVEIVQDPFVGLNWTLMNFSLTICYADIRVTWQPPPSADIKKGWITLIEYQFKEVNATIWQMDPVFVTVLPVYSL	194
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	SKTYTSIWVSCTKLVSDETFDDYCFSDVDDIVEPDPFVALNWTVLNLSLTRMRDILQLSWEPFPPSADVSSGWSLEYEVHKEANESQWTILDQVQTKYLPVYAL	194
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	SKTYTSIWVSCTKLVSDETFDDYCFSDVDDIVEPDPFVALNWTVLNLSLTRMRDILQLSWEPFPPSADVSSGWSLEYEVHKEANESQWTILDQVQTKYLPVYAL	212
大鲵 <i>Andrias davidianus</i>	KIEKDYEMVRRCRPHASGSFGEFSETLYVSFADFYVQDHDEPKFPPVFFVIFGTGGAVVLLLLILFSKQKRKMLILPPVPVPKIKGIDPELIKKGKLDVNSIL	297
锦龟 <i>Chrysemys picta bellii</i>	KLGRDYETIRVRSRQASEKFGFSEALYVSLSSISSVLCNEEIEFPWLLVIVFGTGLIVVMFLILFSKHRLKMLILPPVPAPKIKGIDPDLKKKGLDEVNSIL	300
海龟 <i>Chelonia mydas</i>	KLGRDYETIRVRSRQASEKFGFSEALYVSLSSISSVLCNEEIEFPWLLVIVFGTGLIVVMFLILFSKHRLKMLILPPVPAPKIKGIDPDLKKKGLDEVNSIL	300
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	KTGKDYFARVRCOLSNKFGFSDVLIPLS---ILPEPDLDPVPLFLIIIGLFGLMLVFIILVFKKKRLKMIILPPVPVPKIKGIDPDLORGLDEVNSIL	297
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	KTGKDYFARVRCOLSNKFGFSDVLIPLS---ILPEPDLDPVPLFLIIIGLFGLMLVFIILVFKKKRLKMIILPPVPVPKIKGIDPDLORGLDEVNSIL	315
大鲵 <i>Andrias davidianus</i>	ACHESYKPYQMYNDSDWVEFIELDDDDPEKTEGLTDRLLAEHDHLSKN-CLGVKDDDSGRASCCEPDIPETDPSVSDTCDGTSDIVQSKLSEN-EDLMCLDQKEN	401
锦龟 <i>Chrysemys picta bellii</i>	ASHDSYKPYQLYNDSDWVEFIELDDDDPEKTEGLTDRLLAEHDHLSKN-CLGVKDDDSGRASCCEPDIPETDPSVSDTCDGTSDIVQSKLSEN-EDLMCLDQKEN	406
海龟 <i>Chelonia mydas</i>	ASHDSYKPYQLYNDSDWVEFIELDDDDPEKTEGLTDRLLAEHDHLSKN-CLGVKDDDSGRASCCEPDIPETDPSVSDTCDGTSDIVQSKLSEN-EDLMCLDQKEN	406
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	ACHDHYKQLYNDSDWVEFIELDDDDPEKTEGLTDRLLAEHDHLSKN-CLGVKDDDSGRASCCEPDIPETDPSVSDTCDGTSDIVQSKLSEN-EDLMCLDQKEN	403
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	ACHDHYKQLYNDSDWVEFIELDDDDPEKTEGLTDRLLAEHDHLSKN-CLGVKDDDSGRASCCEPDIPETDPSVSDTCDGTSDIVQSKLSEN-EDLMCLDQKEN	421
大鲵 <i>Andrias davidianus</i>	DESLSSNAPTSKQLSSMMKSSDDMKSSPPLICGMEKSGSPFFNMQMSNLSKNTMDFYALVSDITPAGRLLLSPGQKNIENEYCR--EIFLQRPQIFNMDSAYIC	504
锦龟 <i>Chrysemys picta bellii</i>	DESHASSADPTIQENTNIQSEDNQSKFPFADSIESTSPFVPTQLSNQSSVANIDFYAQVSDITPAGSVLSPGQNTKTRTQDAYTEPAIQCFNFTMDNAYFC	512
海龟 <i>Chelonia mydas</i>	DESHASSADPTIQENTNIQSEDNQSKFPFADSIESTSPFVPTQLSNQSSVANIDFYAQVSDITPAGSVLSPGQNTKTRTQDAYTEPAIQCFNFTMDNAYFC	512
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	SVSPNTNVSVPNTEDGSP--KPEAEKTCPPAVSENPTSLPVSAPISKMRAPSMDFYALVSDITPAGRLLLSPGQRMKNENEEN--OTVIOHPANLNPDSPIYIC	504
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	SVSPNTNVSVPNTEDGSP--KPEAEKTCPPAVSENPTSLPVSAPISKMRAPSMDFYALVSDITPAGRLLLSPGQRMKNENEEN--OTVIOHPANLNPDSPIYIC	522
大鲵 <i>Andrias davidianus</i>	ESDAVTFCPVSSSEOEPPHVO-OSFNEDAYPNTESLTNTAAMSSEAD-GGSSAEMPVPEYTSIHIINSPOSMVLNAALVPE--KDFIASCGYMTPOVNVKMP-	603
锦龟 <i>Chrysemys picta bellii</i>	EADVKKCIATPHDAVEPHVQEQSFNEDVYFTTESLTNTAAMSSEAD-GGSSAEMPVPEYTSIHIINSPOSMVLNAALVPE--KDFIASCGYMTPOVNVKMP-	615
海龟 <i>Chelonia mydas</i>	EADVKKCIATPHDAVEPHVQEQSFNEDVYFTTESLTNTAAMSSEAD-GGSSAEMPVPEYTSIHIINSPOSMVLNAALVPE--KDFIASCGYMTPOVNVKMP-	615
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	ESAVTAFCAASKPRDTEASVK-PNVIDDYFTTESLTNPENMF-CFAEKASSYDMFVSDYTSVHIINSFQNLVLTNTVLPD--KEFLFPCGYMTPOVNVKMP-	603
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	ESAVTAFCAASKPRDTEASVK-PNVIDDYFTTESLTNPENMF-CFAEKASSYDMFVSDYTSVHIINSFQNLVLTNTVLPD--KEFLFPCGYMTPOVNVKMP-	621

图 2 大鲵 GHR 与部分两栖爬行类动物 GHR 氨基酸序列比对结果

方框表示信号肽序列。

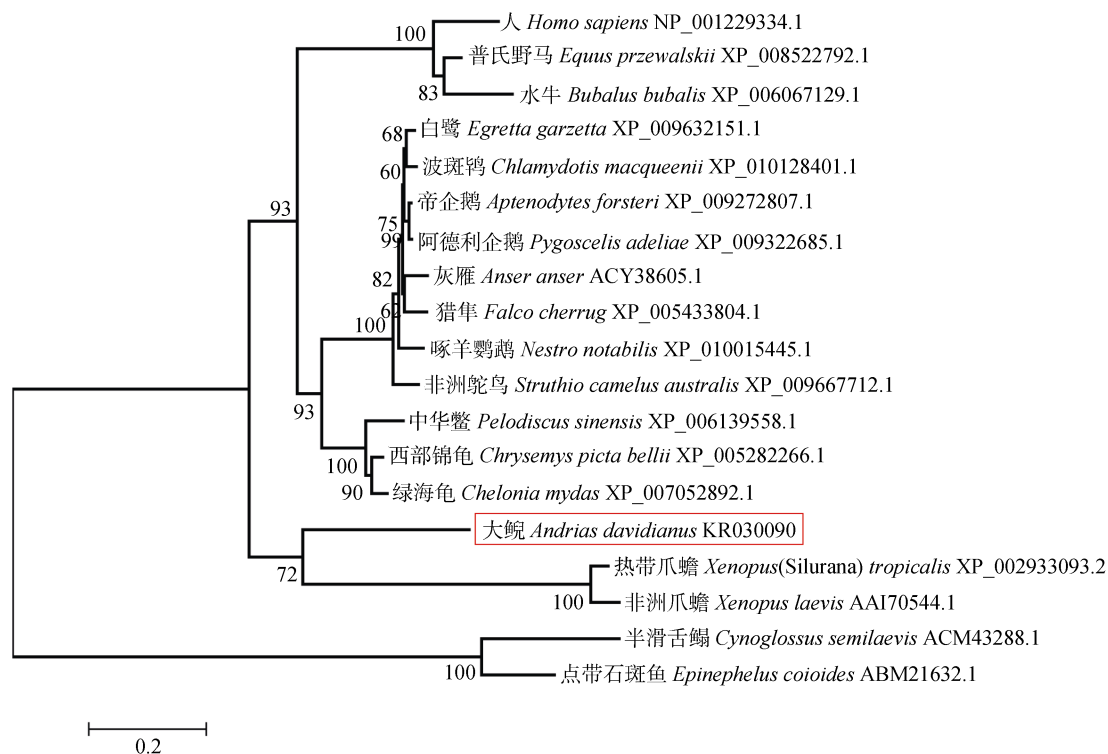
Fig. 2 Alignment of deduced amino acids of GHR from Chinese giant salamander and other amphibians and reptiles
The square frame indicates the signal peptide.

图 3 脊椎动物 GHR 氨基酸序列 NJ 系统进化树

Fig. 3 NJ phylogenetic tree analysis based on amino acid sequences of GHR from different vertebrates

2.4 MT 与 LE 短暂处理后卵巢中 *GHR* 表达模式分析

注射 MT 后, *GHR* 基因在脑与性腺中表达量都升高, 且与对照组表达量存在显著差异 ($P < 0.05$)。卵巢中 12 h 时在表达量最高, 随后随时间增加而降

低, 至 96 h 时恢复处理前水平(图 6 A); 脑中 12 h 表达量最高, 至 96 h 表达量降低, 但还是显著高于处理前水平 ($P < 0.05$) (图 6B)。注射 LE 后, 卵巢与脑中 *GHR* 基因的表达量都有显著性降 ($P < 0.05$); 卵巢中 12 h 和 24 h 表达量最低, 随后表达量

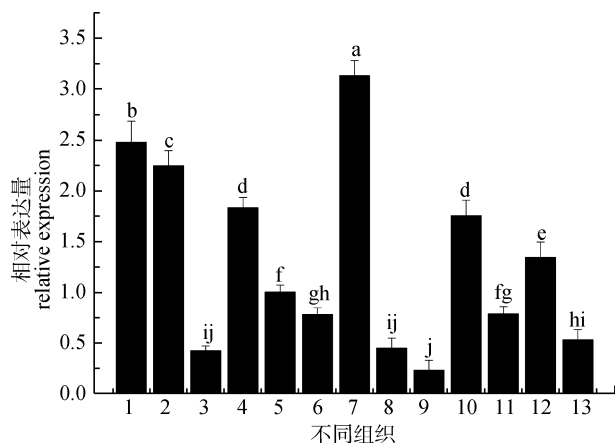


图 4 *GHR* 基因在大鲵不同组织中的表达

柱上不同字母表示各组间差异显著 ($P<0.05$).

1: 肌肉, 2: 垂体, 3: 心脏, 4: 肾, 5: 肠, 6: 胃, 7: 肝, 8: 肺, 9: 脾, 10: 精巢, 11: 卵巢, 12: 脑, 13: 皮.

Fig. 4 Expressions of *GHR* gene in different tissues of salamander 1: muscle, 2: hypophysis, 3: heart, 4: kidney, 5: intestine, 6: stomach, 7: liver, 8: lung, 9: spleen, 10: testis, 11: oophoron, 12: brain, 13: skin. Values with different letters mean significant difference ($P<0.05$).

逐渐增加, 至 96 h 表达量与处理前仍有显著性差异 ($P<0.05$) (图 6C); 脑中 *GHR* 基因表达量随时间

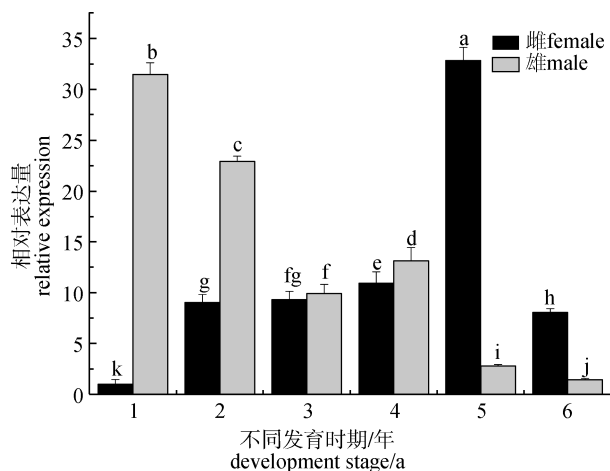


图 5 *GHR* 基因在大鲵不同发育时期性腺中的表达

柱上不同字母表示各组间差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 5 Expression patterns of *GHR* gene in gonads of male and female salamander during different post-embryonic stages Values with different letters mean significant difference ($P<0.05$).

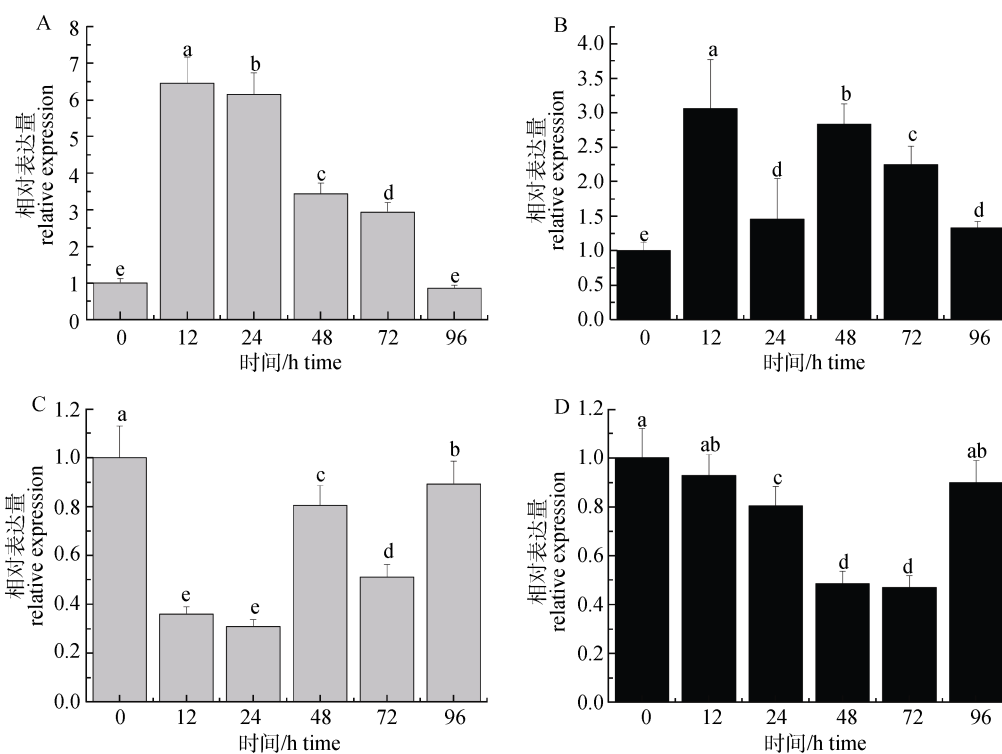


图 6 MT 与 LE 短暂处理大鲵卵巢后 *GHR* 基因表达模式分析

A: MT 处理对大鲵卵巢 *GHR* 表达量影响; B: MT 处理对大鲵脑 *GHR* 表达量影响; C: LE 处理对大鲵卵巢 *GHR* 表达量影响; D: LE 处理对大鲵脑 *GHR* 表达量影响. 柱上不同字母表示不同时间组差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 6 Expression pattern of *GHR* in ovary after MT and LE transiently treatment

A: Effect of *GHR* expression after MT treated in ovary; B: Effect of *GHR* expression after MT treated in brain; C: Effect of *GHR* expression after LE treated in ovary; D: Effect of *GHR* expression after LE treated in brain. Values with different letters mean significant difference ($P<0.05$).

而降低, 至 48 h 和 72 h 表达量最低, 随后表达量恢复处理前水平(图 6D)。

3 讨论

GH 在脊椎动物中发挥重要的生理功能, 包括调控体细胞生长与分化, 海水适应与免疫以及性腺发育与成熟^[5, 21-22]。GH 的各种功能是与靶细胞膜上 GHR 启动的, 为能更好了解 GH 在中国大鲵中的调控机制, 我们克隆了 GHR 基因全长 cDNA 序列, 根据克隆的全长 cDNA, 推导其编码 603 个氨基酸, 包括 19 个氨基酸的信号肽序列, 296 个氨基酸的 GHBP 结合区, 保守的 FGEFS 结构模块以及 BOX 区。以鱼类为外类群的分子系统进化树分析结果显示, 中国大鲵与非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)和热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)聚为一支, 哺乳类、鸟类和爬行类聚为另一支, 该结果表明在两栖类中 GHR 基因的进化缓慢, 各类群之间没有很大的差别。

本实验研究了 GHR 基因在不同组织与不同发育时期性腺中 mRNA 的表达情况, 结果显示, GHR 基因在各组织中都有表达, 其中肝表达量最高, 肌肉、垂体、精巢、脑等组织表达次之, 其他各组织表达较低, 在大鼠中研究结果也显示 GHR 基因在肝中丰度最大, 肾、脑、睾丸次之^[23]; 对 GHR 基因在鸡各组织细胞中的检查结果表明, GHR 基因首先在肝组织细胞中表达, 然后在肠、肾、睾丸、卵巢等组织中也有表达, 但在雌雄性腺中表达无差异^[24]; 对鱼类中 GHR 基因表达模式分析表明, 大鲵 GHR 基因在各组织中的分布与大部分鱼类中的表达模式较为一致^[14, 19, 25-26], 表明 GHR 基因具有组织表达模式特异性。然而, GHR 基因在组织中的表达也受季节的影响, 秋季 GHR 基因在肝与性腺中的表达明显高于其他各季节^[27]。前期研究结果显示大鲵生长激素基因在大鲵垂体中特异表达^[9], GH 基因的这种特异表达模式在其他类群中也有报道, 鱼类中报道较多, 例如点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[28], 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[29]等。动物的生长发育依赖于下丘脑-垂体-靶器官通路来完成, 而垂体分

泌的生长激素, 通过靶细胞表面的生长激素受体对生长发育进行调节。每个生长激素分子与两个受体分子结合导致受体二聚化, 产生大量的信息分子, 激活目的基因转录^[30]。

不同发育时期性腺中表达结果显示, GHR 基因在精巢发育早期表达较高, 随精巢发育不断成熟表达量逐渐降低; 卵巢中表达量则是随卵巢发育成熟表达量逐渐增加。在罗非鱼研究中也表明, GHR 基因在卵巢发育过程中发挥作用, 表达量随卵巢成熟不断增加; 在精巢发育早期表达量较高, 随精巢成熟表达量降低^[3]。在莫桑比克罗非鱼研究中发现, GHR 基因在未成熟卵巢中表达较成熟卵巢中显著高^[31], 与尼罗罗非鱼中研究结果完全不同。推测出现这种不同结果的原因可能是两种罗非鱼取样时成熟卵巢所处发育阶段不同, 不同发育阶段卵泡在成熟卵巢中都能找到^[32]。因此, 卵巢中 GHR 的表达水平可能受到卵泡发育阶段不同所影响。在之前的报道中发现 GHR 基因在虹鳟未成熟精巢中表达较高, 随后逐渐下降^[5]。众所周知, 在精子发生过程中支持细胞不断减少^[33], 然而, 支持细胞上富集有较多的 GH 蛋白结合位点, 而在生殖细胞上没有, 所以综上推测, GHR 基因在精子发生过程中发挥重要的生物作用。

外源性激素和芳香化酶抑制剂能有效诱导雌雄异体鱼类及两栖类发生性转化^[34-37], 而在性转化过程中性别相关基因有明显的升高或是降低。将非洲爪蟾幼体暴露于芳香化酶抑制剂, 可使其发生性反转^[38]; 将雌性牛蛙(*Rana catesbeiana*)蝌蚪用芳香化酶抑制剂处理 3 个月后, 雌性牛蛙性反转为生理雄性牛蛙^[39]。雄激素诱导两栖类性反转也有较多报道, 如用雄激素处理非洲爪蟾能使雌性爪蟾雄性化^[40]; 甲基睾丸酮定量混合到人工配合饲料中投喂仔鲵, 至性腺分化完成后, 性比分析结果显示, 雄性化大鲵比例高至 96%^[41], 表明遗传雌性大鲵能在甲基睾丸酮的诱导下发生性反转。然而, 性激素和芳香化酶抑制剂对 GH-GHR-IGFs 轴上基因是否也能产生影响, 本研究通过 1 龄大鲵注射 MT 与 LE 后, 不同时间点检测 GHR 基因在脑与性腺中的表达量变化, 表明

MT 处理后卵巢与脑中 *GHR* 基因表达量增加, LE 处理后卵巢与脑中表达量减少, 推测 MT 与 LE 在诱导性反转过程中作用机制可能不同。以往的研究显示, MT 能调控 GH-GHR-IGFs 轴上基因, 且在体外培养组织中 MT 能增加肝等多个组织中 *GHR* 基因的表达量^[42], 与本文中研究结果较为一致。另外, 在体外研究中还发现 LE 通过磷脂酰肌醇 3-激酶抑制 IGF-IR 基因的表达^[43], IGF-IR 又为 IGF 的受体, 所以推测 LE 可能也抑制 *GHR* 的表达。用 LE 浸泡处理青鳉雌性受精卵或成鱼, 可抑制芳香化酶的表达, 影响卵黄蛋白原在卵母细胞中的合成与积累, 抑制卵子的发生^[44], 然而 *GH* 与 *GHR* 基因在卵黄发生与卵巢发育中又发挥重要作用^[4]。因此, MT 与 LE 短暂处理影响 *GHR* 基因在脑与卵巢中的表达, 且能产生不同的表达模式, 但关于其作用机制尚不清楚, 需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Yan N, Zhu B C, Xiang X J. Cloning and sequence analysing of three Sox genes HMG-box in wild *Andrias davidianus*[J]. Journal of Biology, 2010, 27(6): 5–9. [闫楠, 朱必才, 相学军. 野生中国大鲵 Sox 基因的克隆与序列分析[J]. 生物学杂志, 2010, 27(6): 5–9.]
- [2] Ye C Y, Fei L, Hu S Q. Rare and Economic Amphibians of China[M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 1993: 64–69. [叶昌媛, 费梁, 胡淑琴. 中国珍稀及经济两栖动物[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1993: 64–69.]
- [3] Ma X L, Liu X C, Zhang Y, et al. Two growth hormone receptors in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Molecular characterization, tissue distribution and expression profiles in the gonad during the reproductive cycle[J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2007, 147: 325–339.
- [4] Gomez J M, Mourot B, Fostier A, et al. Growth hormone receptors in ovary and liver during gametogenesis in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. J Reprod Fertil, 1999, 115(2): 275–285.
- [5] Gomez J M, Loir M, Le Gac F. Growth hormone receptors in testis and liver during the spermatogenic cycle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Biol Reprod, 1998, 58(2): 483–491.
- [6] Huang L L, Fan Y D, Zhou Y, et al. Cloning, sequence analysis and expression profiles of Toll-like receptor 7 from Chinese giant salamander *Andrias davidianus*[J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2015, 184: 52–57.
- [7] Zhu R, Chen Z Y, Wang J, et al. Extensive diversification of MHC in Chinese giant salamanders *Andrias davidianus* (Anda-MHC) reveals novel splice variants[J]. Dev Comp Immunol, 2014, 42(2): 311–322.
- [8] Wang L, Yang H, Li F, et al. Molecular characterization, tissue distribution and functional analysis of macrophage migration inhibitory factor protein (MIF) in Chinese giant salamanders *Andrias davidianus*[J]. Dev Comp Immunol, 2013, 39(3): 161–168.
- [9] Yang L P, Meng Z L, Liu Y, et al. Growth hormone and prolactin in *Andrias davidianus*: cDNA cloning, tissue distribution and phylogenetic analysis[J]. Gen Comp Endocrinol, 2010, 165(2): 177–180.
- [10] Venter J C, Adams M D, Myers E W, et al. The sequence of the human genome[J]. Science, 2001, 291(5507): 1304–1351.
- [11] Mural R J, Adams M D, Myers E W, et al. A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome[J]. Science, 2002, 296(5573): 1661–1671.
- [12] Hauser S D, McGrath M F, Collier R J, et al. Cloning and in vivo expression of bovine growth hormone receptor mRNA[J]. Mol Cell Endocrinol, 1990, 72(3): 187–200.
- [13] Ma X L, Leng T T, Liu Q Z, et al. cDNAs cloning and tissues expression of two growth hormone receptors in yellow-fin bream *Sparus latus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2011, 6(42): 830–838. [马细兰, 冷婷婷, 刘启智, 等. 黄鳍鲷(*Sparus latus*)两种生长激素受体的 cDNA 克隆及组织表达分析[J]. 海洋与湖沼, 2011, 6(42): 830–838.]
- [14] Tse D L, Tse M C, Chan C B, et al. Seabream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full-length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1625: 64–67.
- [15] Walock C N, Kittilson J D, Sheridan M A. Characterization of a novel growth hormone receptor-encoding cDNA in rainbow trout and regulation of its expression by nutritional state[J]. Gene, 2014, 533(1): 286–294.
- [16] Agarwal S K, Cogburn L A, Burnside J. Dysfunctional growth hormone receptor in a strain of sex-linked dwarf chicken: evidence for a mutation in the intracellular domain[J]. J Endocrinol, 1994, 142(3): 427–434.
- [17] Wu G Q, Zheng J X, Yang N. Expression profiling of GH, GHR, and IGF-1 genes in sex-linked dwarf chickens[J]. Hereditas, 2007, 29(8): 989–994. [吴桂琴, 郑江霞, 杨宁. 伴性矮小型鸡 GH、GHR 和 IGF-1 基因的表达变化[J]. 遗传, 2007, 29 (8): 989–994.]

- [18] Phumyu N, Boonanuntanasarn S, Jangprai A, et al. Pubertal effects of 17 α -methyltestosterone on GH-IGF-related genes of the hypothalamic-pituitary-liver-gonadal axis and other biological parameters in male, female and sex-reversed Nile tilapia[J]. Gen Comp Endocrinol, 2012, 177(2): 278–292.
- [19] Filby A L, Tyler C R. Cloning and characterization of cDNAs for hormones and/or receptors of growth hormone, insulin-like growth factor-I, thyroid hormone, and corticosteroid and the gender-, tissue-, and developmental-specific expression of their mRNA transcripts in fathead minnow (*Pimephales promelas*)[J]. Gen Comp Endocrinol, 2007, 150(1): 151–163.
- [20] Hrabia A, Paczoska-Eliasiewicz H E, Berghman L R, et al. Expression and localization of growth hormone and its receptors in the chicken ovary during sexual maturation[J]. Cell Tissue Res, 2008, 332(2): 317–328.
- [21] Björnsson B T. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance[J]. Fish Physiol Biochem, 1997, 17(1): 9–24.
- [22] Yada T. Growth hormone and fish immune system[J]. Gen Comp Endocrinol, 2007, 52: 353–358.
- [23] Jiang S L, Xu J, Xu Q F. Tissue specific expression and regulation of animal growth hormone receptor gene[J]. Feed Research, 2006(4): 21–23. [姜树林, 徐金, 胥清富. 动物生长激素受体基因组织特异性表达及其调控[J]. 饲料研究, 2006(4): 21–23.]
- [24] Li N, Chen Y F. Individual developmental expression of chicken growth hormone receptor gene[J]. Progress in Natural Science, 1996, 6(1): 75–79. [李宁, 陈永福. 鸡生长激素受体基因的个体发育性表达研究[J]. 自然科学进展, 1996, 6(1): 75–79.]
- [25] Liao Z Y, Wu M J, Chen X L. Molecular cloning and functional analysis of Chinese sturgeon growth hormone receptor[J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2009, 39(11): 1069–1079. [廖志勇, 吴明江, 陈晓丽. 中华鲟生长激素受体的分子克隆和功能分析[J]. 中国科学: C 辑, 生命科学, 2009, 39(11): 1069–1079.]
- [26] Saera-Vila A, Caldach-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]. Gen Comp Endocrinol, 2005, 142(1–2): 193–203.
- [27] Deng L, Zhang W M, Lin H R, et al. Seasonal variations of serum growth hormone levels and growth hormone receptors in *Sparus macorcephalus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 3(25): 203–208. [邓利, 张为民, 林浩然, 等. 黑鲮生长激素及其受体的季节变化[J]. 水产学报, 2001, 3(25): 203–208.]
- [28] Li W S, Chen D, Wong A O L, et al. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. Gen Comp Endocrinol, 2005, 144(1): 78–79.
- [29] Ma X L, Zhang Y, Huang W R, et al. cDNA cloning of growth hormone, growth hormone receptor and the different expression between male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. Acta Zoologica Sinica, 2006, 52(5): 924–933. [马细兰, 张勇, 黄卫人, 等. 尼罗罗非鱼生长激素及其受体的 cDNA 克隆与 mRNA 表达的雌雄差异[J]. 动物学报, 2006, 52(5): 924–933.]
- [30] Chen B D, Li Q H, Li L H, et al. Expression of growth hormone and growth hormone receptor gene[J]. China Animal Husbandry and Veterinary, 2007, 34 (11): 52–54. [陈宝定, 李琦华, 李丽红, 等. 生长激素与生长激素受体基因的表达[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(11): 52–54.]
- [31] Kajimura S, Kawaguchi N, Kaneko T, et al. Identification of the growth hormone receptor in an advanced teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) with special reference to its distinct expression pattern in the ovary[J]. J Endocrinol, 2004, 181(1): 65–76.
- [32] Smith C J, Haley S R. Steroid profiles of the female tilapia (*Oreochromis mossambicus*), and correlation with oocyte growth and mouthbrooding behavior[J]. Gen Comp Endocrinol, 1988, 69: 88–98.
- [33] Billard R. A quantitative analysis of spermatogenesis in the trout (*Salmo trutta fario*)[J]. Cell Tissue Res, 1983, 230: 495–502.
- [34] Al-ablani S A, Phelps R P. Sex reversal in black crappie *Pomoxis nigromaculatus*: effect of oral administration of 17 α -methyltestosterone on two age classes[J]. Aquaculture, 1997, 158(1): 155–165.
- [35] Feist G, Yeoh C G, Fitzpatrick M S, et al. The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione[J]. Aquaculture, 1995, 131(1–2): 145–152.
- [36] Olmstead A W, Kosian P A, Korte J J, et al. Sex reversal of the amphibian, *Xenopus tropicalis*, following larval exposure to an aromatase inhibitor[J]. Aquat Toxicol, 2009, 91(2): 143–150.
- [37] Liu Z, Wu F, Jiao B, et al. Molecular cloning of doublesex and mab-3-related transcription factor 1, forkhead transcription factor gene 2, and two types of cytochrome P450 aromatase in Southern catfish and their possible roles in sex differentiation[J]. J Endocrinol, 2007, 194: 223–241.
- [38] Miyata S, Kubo T. In vitro effects of estradiol and aro-

- matase inhibitor treatment on sex differentiation in *Xenopus laevis* gonads[J]. Gen Comp Endocrinol, 2000, 119: 105–111.
- [39] Yu N W, Hsu C Y, Ku H H, et al. Gonadal differentiation and secretions of estradiol and testosterone of the ovaries of *Rana catesbeiana* tadpoles treated with 4-hydroxyandrostenedione[J]. J Exp Zool, 1993, 265: 252–257.
- [40] Chang C Y, Witschi E. Genic control and hormonal reversal of sex differentiation in *Xenopus*[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1956, 93: 140–144.
- [41] Yang G R, Jin L C. A preliminary report on the sex control of Chinese giant salamander *Andrias davidianus*[J]. Freshwater Fisheries, 1990(2): 9–10. [杨干荣, 金立成. 大鲵性别控制试验初报[J]. 淡水渔业, 1990(2): 9–10.]
- [42] Norbeck L A, Sheridan M A. An *in vitro* model for evaluating peripheral regulation of growth in fish: effects of 17 β -estradiol and testosterone on the expression of growth hormone receptors, insulin-like growth factors, and insulin-like growth factor type 1 receptors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Gen Comp Endocrinol, 2011, 173(2): 270–280.
- [43] Lisztwan J, Pornon A, Chen B, et al. The aromatase inhibitor letrozole and inhibitors of insulin-like growth factor I receptor synergistically induce apoptosis in *in vitro* models of estrogen-dependent breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(4): R56.
- [44] Sun L W, Zha J M, Spear P A, et al. Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults[J]. Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol, 2007, 145(4): 533–541.

Cloning and expression of the growth hormone receptor gene from the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus*

HU Qiaomu^{1,2}, Tian Haifeng¹, Meng Yan¹, Xiao Hanbing¹

1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: The growth hormone receptor (*GHR*) cDNA was isolated and characterized in Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*), based on a partial sequence from the transcriptome database. The full-length cDNA was 2992 bp, containing an open reading frame of 1812bp that encoded a deduced protein of 604 amino acids with one conserved FGEFS domain and two BOX domains. System evolution analysis showed that Chinese salamander *GHR* had the highest similarity with the *GHR* proteins from amphibians *Xenopus laevis*, followed by sauropsida (*Chrysemys picta bellii*), and the lowest with mammals (*Bubalus bubalis*) and fish (*Cynoglossus semilaevis*). The expression pattern of *GHR* in different tissues was evaluated. Its expression level was the highest in the liver, followed by the muscle, pituitary gland, kidney and gonads; its expression was very low in other tissues. The expression level of *GHR* in the testis was higher at the early stage, and then decreased as the testes developed. However, the expression level increased as the ovary developed. Furthermore, transient treatment with 17 α -Methyltestosterone (MT) and letrozole (LE) had different effects on the expression of *GHR*. The expression level of *GHR* in the brain and ovary was increased by MT treatment but decreased by LE treatment. Our results indicated that *GHR* may play an important role in gonadal development, and was affected differently by MT and LE treatment.

Key words: *Andrias davidianus*; growth hormone receptor (*GHR*); cloning; expression

Corresponding author: XIAO Hanbing. E-mail: xhb@yfi.ac.cn