

黄颡鱼 *LRH-1* 基因的分离和表达

唐永凯, 俞菊华, 徐跑, 李建林

(中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081)

摘要: 肝受体类似物 (Liver receptor homolog-1, *LRH-1*) 是核受体家族 Ftz-F1 中一个亚家族成员, 由于其在哺乳类卵巢中的高表达而被认为在卵巢类固醇合成的调控中起着一定的作用。本研究使用 RT-PCR、RACE 法分离到了黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 肝受体类似物基因 (*LRH-1*) 以及一个无活性的 *LRH-1'* cDNA。*LRH-1* cDNA 全长 1 945 bp, 包括 5' 非翻译区 207 bp, 3' 非翻译区 238 bp, 开放阅读框 1 500 bp, 编码 500 个氨基酸, 推算的蛋白分子量为 57.19 kD。*LRH-1'* 全长 1 663 bp, 5' 非翻译区 283 bp, 3' 非翻译区 330 bp, 开放阅读框 1 050 bp, 编码 350 个氨基酸, 推算的蛋白分子量为 39.7 kD。与 *LRH-1* 相比, *LRH-1'* 缺少存在于基因 5' 端的锌指结构和 3' 端起转录激活作用的 AF-2 基序。不同动物 *LRH-1* 氨基酸序列比对结果表明, 黄颡鱼 *LRH-1* 和其他动物的 *LRH-1* 相似性为 79% ~ 85%, 和其他动物的类固醇生成因子 (SF-1) 相似性为 59% ~ 66%。系统发育树显示, Ftz-F1 分为两大支, 一支包括鱼类 SF-1; 另一支又有 2 个分支, 分别包含其他动物的 SF-1 和所有动物的 *LRH-1*, 在 *LRH-1* 分支中鱼类 *LRH-1* 单独为一小支。以 β -actin 为内标的荧光实时定量 RT-PCR 结果显示, *LRH-1* 在雌、雄黄颡鱼脑、肝、肾、性腺均有表达, 以肝脏的表达量为最高, 雌鱼各组织的表达量均比雄鱼高, 其中肝脏和性腺差异明显 ($P < 0.05$); 在卵巢的不同发育阶段, 该基因的表达量也不尽相同, III 期卵巢表达量最高, 明显高于 V 期 ($P < 0.05$), V 期又明显高于 II、IV 和 VI 期 ($P < 0.05$); 注射催产素促黄体释放激素类似物 (LRH-A) 12 h 后, *LRH-1* 在脑的表达量没明显变化, 在肝脏和肾脏的表达量明显增加, 而在卵巢的表达量明显下降。[中国水产科学, 2009, 16(5): 649-659]

关键词: 黄颡鱼; 肝受体类似物; 系统发育; 实时定量 RT-PCR; 表达模式

中图分类号: S91

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)05-0649-11

Ftz-F1 属于核受体超家族成员, 是激活果蝇早期胚胎形成阶段分割基因 (*Ftz*) 转录因子的同源异形盒 (Homeobox) [1-2]。根据其作用和表达模式, *Ftz-F1* 基因分为 2 个亚家族, 其中一个包括类固醇生成因子基因 (*SF-1*) 或称肾上腺 4 结合蛋白基因 (Adrenal 4 binding protein, *Ad4BP*), 另一个包含肝受体类似物基因 (Liver receptor homolog-1, *LRH-1*) [3-4]。

LRH-1 在发育、胆固醇反向运输、胆汁酸动态平衡和类固醇生成中起着主要的作用。在成体哺乳类, *LRH-1* 的表达主要局限在内胚层起源的组织, 如肝脏、胰和肠等, 根据其作用被称为肝内核受体 (Nuclear receptor, NR) [3,5-7]。近期在哺乳动物猪、

鼠、人等研究中发现, *LRH-1* 在卵巢高表达, 暗示着 *LRH-1* 参与了卵巢类固醇生成的调控 [8-14]。对哺乳类的研究表明, *LRH-1* 的表达局限在各发育阶段卵巢的滤泡粒细胞和黄体细胞, 而类固醇生成因子 1 (Steroidogenic factor-1, *SF-1*) 基因主要在膜细胞和间质细胞中表达, 在粒细胞中的表达量较低, 在黄体细胞中没有表达 [10-12]; *LRH-1* 在怀孕期的表达明显受诱导, 但 *SF-1* 在妊娠期间的表达减少 [10-11]。*LRH-1* 在卵巢中的阶段特异性表达, 提示它在卵泡和黄体形成中具有调控作用。有关鱼类 *LRH-1* 基因的研究, 仅见在斑马鱼 (*Danio rerio*) [15-16]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) [17]、青鳉 (*Oryzias latipes*) 等鱼中分离到了

收稿日期: 2008-06-17; 修订日期: 2009-05-08.

基金项目: 国家 973 计划项目 (2004CB117401); 江苏省自然科学基金项目 (BK2006029)。

作者简介: 唐永凯 (1978-), 男, 助理研究员, 主要从事鱼类遗传育种研究. E-mail: tangyk@ffrc.cn

通讯作者: 徐跑 (1963-), 男, 研究员, 专业方向为遗传育种. E-mail: xup@ffrc.cn

LRH-1 cDNA,但对于该基因的表达研究较少^[16]。本研究分离了黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)的*LRH-1* cDNA,结合GenBank中Ftz-F1的序列资料,对Ftz-F1的系统发育进行了较为全面的分析;测定了*LRH-1*在雌、雄黄颡鱼脑、肝、肾和性腺中的表达,及其在卵巢发育各阶段的表达量;同时还研究了催产素促黄体释放激素类似物(LRH-A)对卵巢*LRH-1*的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 黄颡鱼体质量50~100 g,购自无锡中桥菜场,用于分离*LRH-1* cDNA。各卵巢发育期雌鱼均取3尾,Ⅱ期鱼为隔年繁殖的鱼苗养殖到第二年繁殖季节,体质量为13.5~15.6 g,性腺指数为0.4~0.51;Ⅲ期鱼体质量28.2~43.0 g,性腺指数为1.56~4.07;Ⅳ期鱼体质量50.5~64.0 g,性腺指数为12.87~17.5,挤不出卵粒;Ⅴ期鱼体质量37.5~69.0 g,性腺指数为7.3~14.37,轻压腹部卵粒自动流出;Ⅵ期鱼体质量33.8~49.8 g,性腺指数3.5~5.9,卵巢已退化;注射LRH-A的鱼性腺处于Ⅳ期,体质量为45.5~54.9 g,性腺指数为18.0~20.9,LRH-A的剂量为4 μg/kg,但注射后12 h,未产卵。雄鱼性腺发育处于Ⅳ~Ⅴ期,体质量18.5~58 g。

1.1.2 试剂 Trizol Reagent购自Promega; M-MLV、RNase H、TdT酶、*Taq*酶、3' RACE试剂盒、Premix Ex *Taq*TM (Perfect Real time)、DNase I购自Takara; 胶回收试剂盒、PCR液回收试剂盒、PMD18-T载体、连接酶购自上海生工生物工程技术有限公司; 大肠杆菌JM109为本实验室保存。

1.1.3 RNA 取新鲜肝组织50~100 mg,用Trizol Reagent抽提总RNA。使用紫外分光光度计测定RNA的浓度,并根据OD₂₆₀/OD₂₈₀值判断RNA的质量,一般1.9~2.0符合要求。用于实时定量RT-PCR的RNA再使用去除RNase的DNase I处理,然后,用酚-仿抽提,以除去RNA中污染的DNA。

1.1.4 引物 根据已发表的LRH-1氨基酸保守区序列特点,使用CodeHop^[18]设计兼并引物,用于分离

和扩增黄颡鱼*LRH-1*的部分序列。然后使用RACE法分离基因的3'和5'端。具体引物序列、扩增反应温度以及在该基因中的位置见表1。根据分离出的序列,在靠近3'端设计特异性扩增*LRH-1*的RT-PCR引物,以 β -actin为内标进行定量表达分析,根据现有鱼类如斑马鱼(BC067566)、黄鳝(AY647143)、罗非鱼(AB037865)、鸡(L08165)以及黑斑青河鲀(CR692262)等的 β -actin序列,经比对后,选择这几个动物共有的序列作为 β -actin的扩增引物。表1中提供的位置为在斑马鱼 β -actin(BC067566)中的位置。所有引物由上海申能博彩生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 黄颡鱼*LRH-1*基因的分离 保守片段的分离:取肝脏总RNA 5 μg,以dT-Ap [5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATC C(T)₁₆-3']为引物,根据M-MLV使用说明进行逆转录(RT)反应,然后用10% RT液,使用兼并引物P₁和P₂扩增*LRH-1*的部分片段。PCR产物用1.0%的琼脂糖凝胶电泳分离,切胶,使用胶回收试剂盒回收,克隆到PMD18-T载体,送上海申能博彩生物有限公司测序。根据此序列设计特异的3' RACE和5' RACE引物,分离基因的3'和5'端序列。

3'端的分离:上述RT反应液用3' RACE第一个引物P₃和锚定引物AP (5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATC)进行扩增,用第2个引物P₄和AP进行套式PCR,产物经电泳切胶回收、克隆、送测序。

5'端的分离:5' RACE原理参考Frohman等^[19]。取5 μg总RNA,用5' RACE第1个引物P₆进行RT反应,然后使用RNase H(Takara)降解RT反应液中的mRNA,后使用PCR液回收试剂盒去除多余的引物、dNTP、酶等,然后使用TdT酶在cDNA 3'端加poly(A),反应结束再用PCR液回收试剂盒纯化加了poly(A)尾的cDNA模板。然后,使用dT-Ap和第2个引物P₇进行第1次PCR,再使用AP和5' RACE第3个引物P₈进行套式PCR扩增。产物经电泳、切胶回收、克隆、送测序。

1.2.2 序列分析 用软件DNATools5.1进行序列分析,序列比对和构建*Ftz-F1*的系统发育树使用ClustalW1.8.1的NJ模式^[20]。

表1 实验所使用的引物
Tab. 1 Primers used in the experiment

引物 Primer	编号 Code	序列 Sequence	退火温度/℃ <i>T_m</i>	位点/nt Position
兼并引物	P ₁	5'-CGGAACAAGTTCGGCCCNATGTAYAA-3';	58	562-587
Degenerate primers	P ₂	5'-TGCAGCATCTCGATCAGCARRTTRTRCA-3';	58	1694-1666
3' RACE-PCR	P ₃	5'-AACAACTCCTGAGTCGGGC-3';	55	1357-1376/1085-1104
	P ₄	5'-TGCTGGAGAGTGTTCAGGAGC-3';	54	1490-1510/1238-1218
	P ₅	5'-GCTGCGGCTGCCTGAGAT-3';	58	1584-1601
	P ₆	RT: 5'-GGGGCTGCGGTCATAGTC-3';	42	831-814/559-542
5' RACE-PCR	P ₇	TAP: 5'-CCTTGAAGCCGAGTGGA-3';	52	733-716/561-544
	P ₈	AP: 5'-GATAGTGAGGTCAGCGGAGC-3';	58	696-676/424-404
	P ₉	5'-GTCCGTCATTAGCGCGTT-3';	55	157-175
连接分析引物 Primers for ligation analysis	P ₁₀	5'-CTGGATGAGATGTGTCCCGTG-3';	55	313-333
	P ₁₁	5'-TAGAGGGGACGATGTGTGGG-3';	54.5	1387-1368
	P ₁₂	5'-TCGCCGTTCAAGTGTGTTGTAGT-3';	54	1658-1637
Real time PCR for <i>LRH-1</i>	P ₁₃	5'-CAGGAGCAGGTGAACGCAG-3';	60	1504-1522
	P ₁₄	5'-TCGCCGTTCAAGTGTGTTGTAG-3';	60	1658-1638
Real time PCR for <i>β-actin</i>	P ₁₅	5'-ACTTCGAGCAGGAGAT-3';	60	735-750
	P ₁₆	5'-ACAGTGTGGCATACAG-3'.	60	963-947

注: *LRH-1* RACE引物的位点表示为 *LRH-1/LRH-1'*, 其中 R=A+G; N=A+T+C+G; Y=C+T.
Note: The primer position is showed as *LRH-1/LRH-1'* for RACE. R=A+G; N=A+T+C+G; Y=C+T.

1.2.3 实时定量PCR 采用SYBR Green I嵌合荧光法,在Bio-Rad Mini-Opticon定量PCR仪上,根据Premix Ex Taq™说明书进行定量RT-PCR。使用β-actin为内参,对所加cDNA模板量进行均一化。另外,用5 μg RNA在20 μL的体积中进行RT反应,然后取原液和稀释5倍、10倍、100倍、500倍的cDNA模板各2 μL在20 μL体系中进行定量PCR,制作标准曲线和标准方程,比较*LRH-1*和β-actin的扩增效率,确定是否符合 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[21],计算基因相对表达量*LRH-1* mRNA/β-actin mRNA,确定*LRH-1*的表达水平。

1.2.4 数据处理 实验数据采用SPSS统计软件中的*t*检验以及ANOVA方差分析和Duncan氏多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 *LRH-1*基因的分离以及测序

兼并引物P₁和P₂扩增到1 133 bp左右的条带,经Blast比对后发现该序列和*LRH-1*相似性较高。根据该片段设计了3' RACE引物,结果得到长度为400 bp

和450 bp的2个片段,根据400 bp的cDNA翻译的氨基酸链具有AF-2结构域。使用5' RACE引物扩增也得到了2个长度为450 bp和700 bp左右条带,测序结果表明,根据700 bp片段翻译成的氨基酸具有锌指结构。为了确定它们是如何拼接的,根据有无锌指结构和AF-2结构域,设计2对引物,使其相互配对在肝cDNA中扩增。结果表明,有锌指结构域的5'端片段和有AF-2结构域的3'端片段能够进行拼接,从而获得了黄颡鱼*LRH-1* (EU860284) 全长cDNA 1 945 bp,包括5'非翻译区207 bp,3'非翻译区238 bp,阅读框1 500 bp,编码500个氨基酸,计算的蛋白分子量为57.19 kD (图1); 不含锌指结构的5'端片段和无AF-2基序的3'端片段能拼接上,获得了黄颡鱼*LRH-1'* (EU860285) cDNA,其全长1 663 bp,5'非翻译区283 bp,3'非翻译区330 bp,阅读框1 050 bp,编码350个氨基酸,计算的蛋白分子量为39.7 kD。两个cDNA序列5'端和3'端相差较大,但*LRH-1*中的590~1 590 nt和*LRH-1'*中的318~1 318 nt序列完全一致,而且均在翻译区内,翻

<i>LRH-1</i>	CGAGGCGAGCGAGGCGCGTGGCGCATGTGAAGAGATGCGGGCTATCCGTTACGCACAGTG	60
<i>LRH-1'</i>	-----	0
<i>LRH-1</i>	CACATTCAACCCTAAAGCTCTGACAACCCAGAACTAGTGAAAGAAAAAGTATAGAAAAAT	120
<i>LRH-1'</i>	-----	0
<i>LRH-1</i>	GATTAAGTTCTTAATTTATTAATAAAAAAATAACAACAAACACTGAAGAGTGCGTATTT	180
<i>LRH-1'</i>	-----	0
<i>LRH-1</i>	TTCAACAAATAACTGATCCAGTTTGCTATGTCTTCGAGTTCTGAGGGAGAAGAAGGACAA	240
<i>LRH-1'</i>	-----AAGACAA	7
	* * * * *	
<i>LRH-1</i>	AGTGACTCCTGTGAAGATGTGCTATGTTTAGCCCTCAGTTTAAAAATGATGGACTACTCC	300
<i>LRH-1'</i>	ATTAATGCAT-----CGTGTCTATG---GGAACTTCGTACATA-CAGTACAATAAGAG	56
	* *	
<i>LRH-1</i>	TACGATGAAGACCTGGATGAGATGTGTCCCGTGTGTGGAGACAAAGTATCCGGATATCAC	360
<i>LRH-1'</i>	AATAATAAGGCCTGCTGTGACTCACGTAGCCCTGGAGAAGGTGTTTATAGAAGCTTCAT	116
	* *	
<i>LRH-1</i>	TACGGCCTGCTCACCTGTGAGAGCTGCAAGGGCTTCTTCAAGCGCACCGTGCAGAACAAAC	420
<i>LRH-1'</i>	CTCATAACGTTGTGCTTCAGTACCTACAGGCGCTT-TACAGGTCCGTCATTAGCGGCGTT	175
	* *	
<i>LRH-1</i>	AAGC-GCTACACATGTAT-TGAGAACCAGAGCTGTCAGATAGAC-AAGACACAGCGTAAG	477
<i>LRH-1'</i>	AAACAGCTGGTTAAGCATGCGTGAGCCATCGCGCTCAGTGAGAGGAAGAGAGAAGAGGGA	235
	* *	
<i>LRH-1</i>	CGCTGCCCTTACTGCCGCTTCCAGAAGTGCCTCAACGTCGCGCATGAAGCTGGAAGCTGTG	537
<i>LRH-1'</i>	AGAAGCTGTGATTTACTTTGCTG-----GTCTC-----TGAGG---AACAGCAGTG	278
	* *	
<i>LRH-1</i>	AGGGCGGACCGCATGCGCGGTGGTCAAAACAAGTTTGGCCCATGTACAAGCGGACCGCT	597
<i>LRH-1'</i>	GGTGGATGCCTCAGGCTCTGCT-----CAAGTT---CTCA-ACACAGG-GGGACCGT	325
	* *	
<i>LRH-1</i>	 GCTGTTGCTGCGGCTGCC	1595
<i>LRH-1'</i>	 GCTGTTGCCGCGGACCCA	1319

<i>LRH-1</i>	TGAGATCCGCGCCATCAGCCTGCAGGCCGAGGAATATCTGTACTACAAACACCTGAACGG	1655
<i>LRH-1'</i>	TA---CAGTGTGTTAAAGCCG-AAGCAGTACACTGGCTCCA---AAGATGACCCACACAT	1376
	* *	
<i>LRH-1</i>	CGACGTTCCCTGCAACAACCTGCTTATTGAGATGCTGCATGCAAAACGAGCTTGAACCAA	1715
<i>LRH-1'</i>	CGTCCCCTCTATCAACAATAAGCGCATCGTCG-GCTGTGTCTGTGAGGAGGACAACACAG	1435
	* *	
<i>LRH-1</i>	ACATT-TCTGAATC-AACACAATGCACACACTGCTCCCAGACAACAATCTTCCAGTCCAG	1773
<i>LRH-1'</i>	CCATCGTGTGGTTCTGGCTGCATGAAGGAGAACCTCAACGCTGTCCATCCTGCGGCTC-G	1494
	* *	
<i>LRH-1</i>	CATCATTAGCAGCCACAGCATTGCAGAACATGCACTCAGATGCC-TCCACATGCCGGTGC	1832
<i>LRH-1'</i>	CACTACAACTTGTTCTCTCATGACCTTCCT---CATTGAGACTCTGTAACATACAGCTCT	1552
	* *	
<i>LRH-1</i>	TGTGCTTAACTGCATGGTTCATGTTGTTTCAGTGAATGATTTGGGCCAAAAC---AGA	1888
<i>LRH-1'</i>	GTTTTTTTCCCATGTTAATTAACATAACAAATATAACTGCTGCAGTTAGAACTCTTACA	1612
	* *	
<i>LRH-1</i>	GAAGAAGATGTCAATAAACACTTTTTGGTTGAGGGGAATGCACTCAGCCCTGATCC	1945
<i>LRH-1'</i>	GTACCAAGTGTATGTAACAGCAGTTAAGCCGAATA-AATAATTTAAACCTTT-----	1663
	* *	

图1 黄颡鱼 *LRH-1* 和 *LRH-1'* cDNA 序列的比较
*代表相同的碱基; ...代表省略的碱基

Fig. 1 Comparison of *LRH-1* and *LRH-1'* cDNA sequences in *Pelteobagrus fulvidraco*
* represents identical bases; ... represents base not printed

译的氨基酸具有Hinge结构域以及部分LBD结构域, 其他区域的cDNA序列相差较大。*LRH-1*中的5'端322~522 nt以及3'端1 675~1 692 nt分别翻译成具有锌指结构和具有AF-2结构域的氨基酸, 而*LRH-1'*翻译区的蛋白则无锌指结构和AF-2结构域(图2)。

2.2 黄颡鱼Ftz-F1氨基酸序列的同源性分析

使用CLUSTAL W (1.81)对黄颡鱼LRH-1和其他鱼类和动物的Ftz-F1氨基酸序列进行比对, 包括青鳉LRH-1 (ABA01329)和SF-1 (BAA32394)、斑马鱼LRH-1 (NP_571538)和SF-1 (NP_571869)、虹鳟LRH-1 (BAE71417)和SF-1 (AAW83490)、鸡LRH-1 (NP_990409)和SF-1 (BAA76713)、人(*Homo sapiens*)的LRH-1 (NP_995582)和SF-1 (NP_004950)以及非洲鲶(*Clarias gariepinus*)

SF-1 A(AAG49004)和SF-1 B(AAG49005)。结果表明, 黄颡鱼LRH-1和其他动物LRH-1的相似性为79%~85%, 和其他动物SF-1的相似性为59%~66%。比较各结构域之间的相似性, 发现处于C区的Ftz-F1盒以及C端E区的AF-2基序在LRH-1和SF-1中均非常保守, 在所分析的脊椎动物中相似性大于97%; 处于D区的配体结合结构域(Ligand-binding domain)在LRH-1和SF-1之间相似性较差, 为61%~69%, 但在LRH-1和SF-1之内则保守性很高, 达90%以上, 这说明这2个基因的调控存在着差异。另外, A/B区的长度LRH-1明显比SF-1长, 而且, A/B区的长度在不同动物中不完全一致。图2直观地比较了Ftz-F1各分区的相似性。

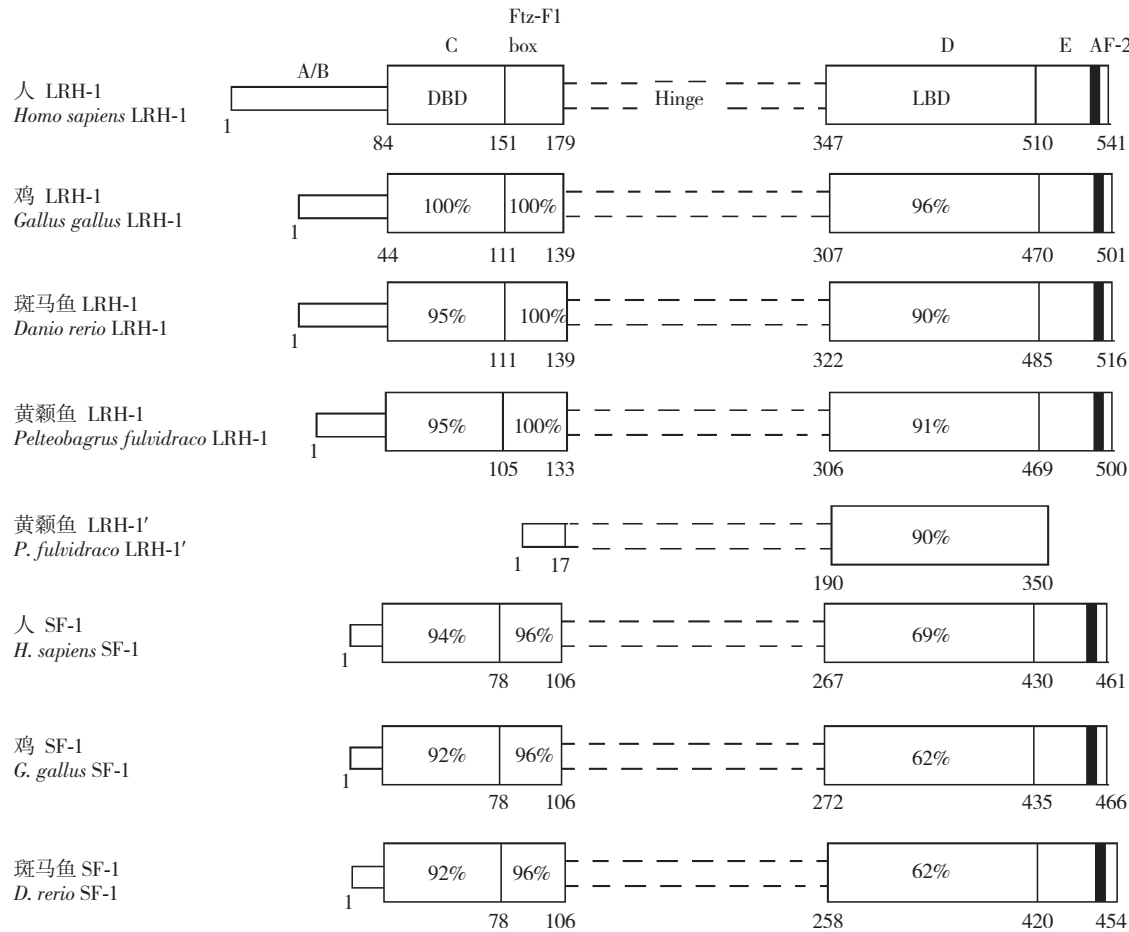


图2 不同物种Ftz-F1各结构域的序列相似性比较
图中百分比为相对于人LRH-1各结构域序列的相似性, 数字为各结构域氨基酸位点.

Fig. 2 Comparison of Ftz-F1 sequence of various species on various domains
Identities of different domains compared with human LRH-1 are given as percentage. Amino acids' positions are shown as numbers.

2.3 Ftz-F1的系统发育树

根据本研究分离的黄颡鱼 *LRH-1* cDNA 翻译的氨基酸序列以及在蛋白库或基因库中已报道的其他动物的相关序列,使用 Clustal W (1.81) 在 NJ 模式下构建 Ftz-F1 的系统发育树(图3)。由系统发育树可见,果蝇 Ftz-F1 和所有脊椎动物 Ftz-F1 的关系最远,以果

蝇 Ftz-F1 作为外群可见, Ftz-F1 明显地分为两大支,一支为硬骨鱼类的 SF-1; 另外一支则有两个分支,其中一支为爬行类、鸟类、哺乳类的 SF-1, 另一分支为 LRH-1, 在该分支有硬骨鱼类和其他动物 LRH-1 两个小支。

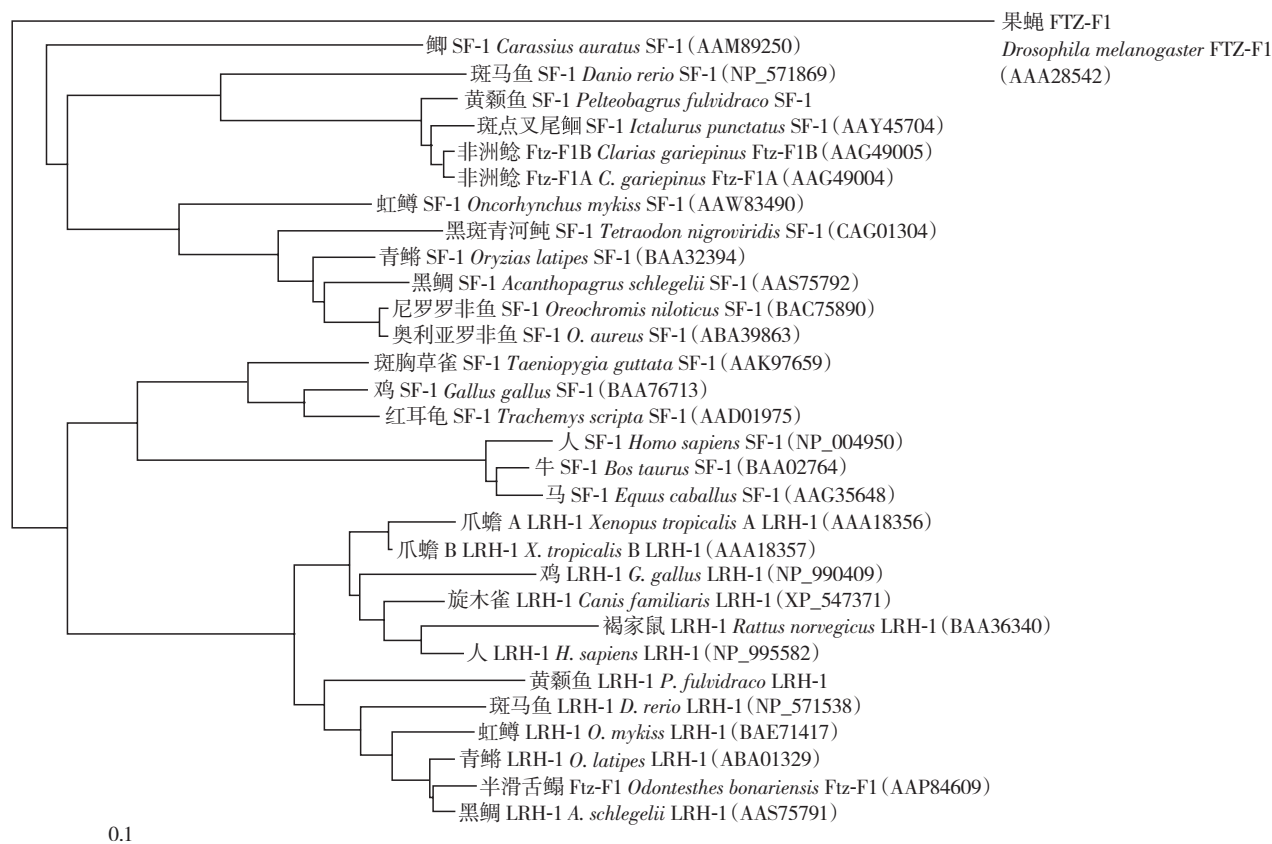


图3 使用 Clustal W 构建的 Ftz-F1 系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of vertebrate Ftz-F1 proteins constructed by Clustal W method

2.4 黄颡鱼 *LRH-1* 基因的表达

2.4.1 *LRH-1* 和 β -actin 扩增效率的分析 取 RT 反应原液、 $\times 5$ 、 $\times 10$ 、 $\times 50$ 、 $\times 100$ 、 $\times 500$ 的 RT 倍数稀释液,共 6 个模板浓度。取 2 μ L 各浓度的 RT 液作模板,以 *LRH-1*、 β -actin 的引物分别进行实时定量 PCR 反应,制备标准曲线。设原液中相应基因的拷贝数为 100 000,则得到 *LRH-1* 的标准方程为 $y = -0.273\ 7x + 8.90$,相关系数为 0.978; β -actin 的标准方程是 $y = -0.281\ 4x + 9.27$,相关系数为 0.994,其中 y

为模板浓度以 10 为底的对数, x 代表 C_t 值。从上面 2 个方程的斜率,可知 *LRH-1*、 β -actin 的扩增效率分别为 87.58% 和 91.16%,基本相同。因此使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。

2.4.2 *LRH-1* 在雌雄黄颡鱼组织中的表达 使用 RT-PCR 对黄颡鱼 *LRH-1* 的组织表达进行分析。结果表明, *LRH-1* 在雌黄颡鱼脑(包括端脑、下丘脑和脑垂体)、肝、肾和性腺均有表达(图4)。 *LRH-1* 在雌鱼肝脏表达量最丰富,基本上是脑的 11 倍;而在肾脏的

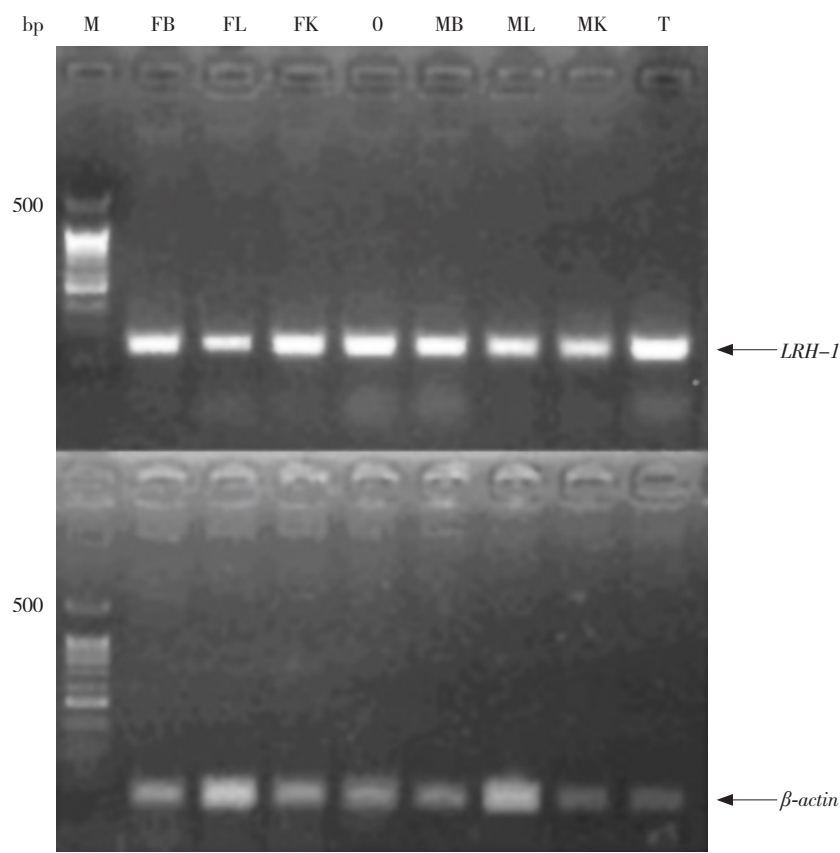


图4 *LRH-1*在雌、雄黄颡鱼各组织中的表达
FB: 雌鱼脑; FL: 雌鱼肝; FK: 雌鱼肾; O: 卵巢; MB: 雄鱼脑; ML: 雄鱼肝; MK: 雄鱼肾; T: 精巢
Fig. 4 Expression of *LRH-1* in different tissues of female and male *Pelteobagrus fulvidraco*
FB: female brain; FL: female liver; FK: female kidney; O: ovary; MB: male brain; ML: male liver; MK: male kidney; T: testis

表达量只是脑的19%左右; 卵巢中的表达量为脑的55%。雄鱼各组织的表达量也是在肝脏最丰富, 在脑、肾和精巢表达量较低。雌鱼各组织的表达量均比雄鱼相同组织的表达量高, 其中, 肝脏和性腺差异显著 ($P < 0.05$), 详见图5。

2.4.3 *LRH-1*在卵巢不同发育阶段的表达量 分别测定卵巢处于Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ期的黄颡鱼卵巢*LRH-1*的表达水平(每发育期取3尾鱼)。结果表明, Ⅲ期、Ⅴ期卵巢*LRH-1*的表达量明显高于其他各期 ($P < 0.05$), Ⅲ期是Ⅱ的23倍, Ⅴ期是Ⅱ期的16倍, Ⅳ期和Ⅵ期表达量则大约只有Ⅱ期的80%和6%(图6)。

2.4.4 *LRH-A*对*LRH-1*表达的调控 对卵巢处于Ⅳ期的雌性黄颡鱼注射催产素LRH-A, 12 h后取脑、肝、肾、卵巢组织, 测定*LRH-1*的表达量。结果表明, 脑中

*LRH-1*的表达量没有显著变化, 肝脏和肾脏则有明显增加, 而卵巢的表达量则明显降低 ($P < 0.05$) (图7)。

3 讨论

3.1 *LRH-1*的保守性

本研究分离到的黄颡鱼*LRH-1* cDNA 及其翻译的氨基酸序列和其他动物的*LRH-1*相比有着比较高的相似性, 说明是*Ftz-F1*的同源基因, 并且该基因在进化中是比较保守的。从*LRH-1*各结构区域的相似程度可知, *LRH-1*结构中的DBD、Ftz-F1和LDB保守性很高, 反映了这些结构所受选择压力大, 对该基因的功能至关重要。另外, 本实验过程中还分离到了一个较短的*LRH-1'*, 该序列缺少DNA结合结构域、Ftz-F1盒以及位于C端的起转录激活作用的AF-2基序。类似的短缺*LRH-1*在人、爪蟾和斑马鱼等动物中也存

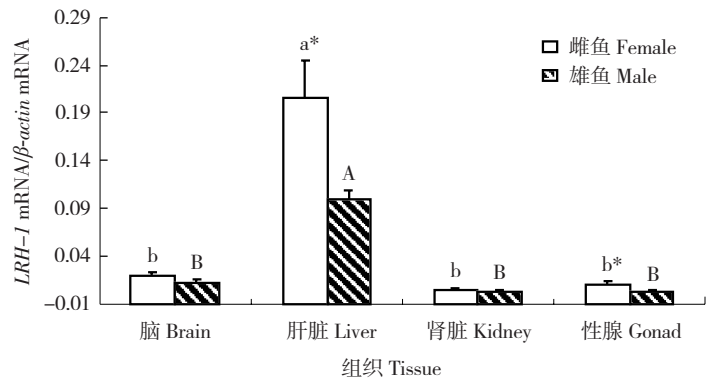


图5 LRH-1在雌、雄黄颡鱼各组织的表达量

不同大、小写字母分别表示LRH-1在雌鱼、雄鱼不同组织中表达量差异显著($P < 0.05$); *表示LRH-1在同一组织内雌雄间表达量差异显著.

Fig. 5 Expression levels of LRH-1 in female and male *Pelteobagrus fulvidraco*

Different capital and small letters donate significant differences of LRH-1 expression among different tissues in male and female *Pelteobagrus fulvidraco* respectively ($P < 0.05$). * donate significant differences of LRH-1 between male and females *P. fulvidraco* expression in the same tissue.

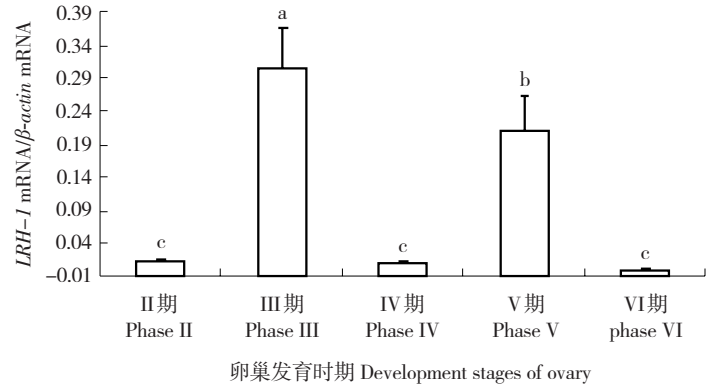


图6 LRH-1在黄颡鱼卵巢发育各阶段的表达量

不同字母表示LRH-1表达量在雌鱼不同发育期存在显著差异($P < 0.05$).

Fig. 6 Expression levels of LRH-1 in ovary with different development stages

Different letters donate significant differences of LRH-1 expression among different development stages ($P < 0.05$).

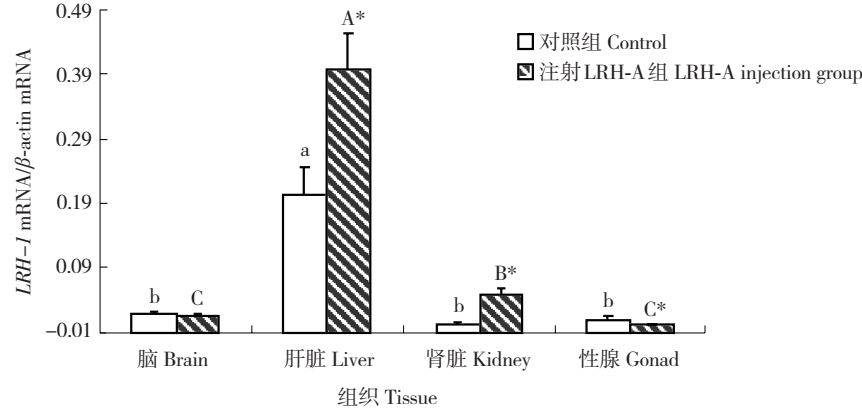


图7 注射LRH-A后雌鱼卵巢LRH-1的表达量

不同大、小写字母分别表示注射LRH-A组和对照组的LRH-1表达量在不同组织中差异显著($P < 0.05$); *表示同一组织内对照组和注射LRH-A组的LRH-1表达量差异显著($P < 0.05$).

Fig.7 The expression levels of LRH-1 in ovary of *Pelteobagrus fulvidraco* after LRH-A injection

Different capital and small letters donate significant differences of LRH-1 expression among different tissues in LRH-A injection group and control group ($P < 0.05$); * donates significant differences of LRH-1 expression in the same tissue between LRH-A injection group and control ($P < 0.05$).

在^[22-24],并且,研究表明这一短缺的 *LRH-1* 没有转录激活活性,据此推测黄颡鱼 *LRH-1'* 也无活性。*LRH-1'* 除了缺少上述结构域外,其他序列和 *LRH-1* 完全一致,因此,推测很可能是由同一基因经过不同转录切割方式得到的,考虑到在较多物种个体内都存在这一短缺形式,推测这种切割方式也存在着保守性。

从本研究构建的 Ftz-F1 系统发育树可见,鱼的 SF-1 和 LRH-1 属于两个大分支,说明这两个基因很早就分化了,可能是由于进化早期整个基因组复制引起的,而人等其他动物的 SF-1 和 LRH-1 属于同一大支中稍后分化的两支,说明他们的分化比鱼的要晚,也许是由于功能需要基因组的某个部分复制而产生的。至今,还没有证据表明在人 SF-1 一支存在鱼的另一个 SF-1,斑马鱼中分离到了 3 个不同的 Ftz-F1,但系统树分析也没有一个属于人等动物的 SF-1 分支。

3.2 *LRH-1* 的表达和调控

本实验结果表明,黄颡鱼 *LRH-1* 在雌雄成鱼脑、肝、肾和性腺中都有表达,但在肝脏的表达量最高,精巢和肾中表达量相对较低,这与哺乳类的研究结果类似^[7-8,13]。在卵巢中的表达量明显与卵巢发育阶段相关,在卵黄开始形成的 III 期和 V 期卵巢中该基因表达量很高,而卵巢退化后该基因的表达量明显下降,其作用可能与哺乳类 *LRH-1* 具有调控卵泡和黄体形成的作用一致^[10-12],但结果显示 IV 期卵巢 *LRH-1* 的表达量明显比 III 期和 V 期低,这可能是 *LRH-1* 诱导的基因反馈抑制 IV 期卵巢 *LRH-1* 的表达。*LRH-1* 在卵巢不同阶段的表达量可能和其他相关基因调控的类固醇激素含量变化有关,如鲑鳟卵母细胞临近成熟和排卵时,血液中雌二醇含量降低,紧接着 17α -雌二醇, 20β -雌二醇的含量在排卵时迅速增加,而对鲤的研究表明血液中雌二醇含量在排卵过程中都很低,产卵后明显降低^[25],激素含量在排卵期的剧烈变化是多种基因相互促进或抵制的结果。有关鱼类 *LRH-1* 表达和性类固醇激素之间的相互关系还有待进一步研究。

在哺乳类中, SF-1 和 LRH-1 通过与类固醇合成酶

基因如 *P450_{scc}*、*CYP11B1*、*CYP21*、*P450_{arom}* 的启动子结合,激活这些酶基因的本底转录和部分通过 cAMP 途径来增加转录表达水平,增加性激素的合成^[26-27]。在鱼类中, LRH-A 刺激鱼类 GtH 的释放, GtH 诱导卵母细胞合成性类固醇激素^[25]。给卵巢发育处于 IV 期的黄颡鱼肌肉注射 LRH-A 后,脑中 *LRH-1* 的表达量没有明显变化,肝脏、肾脏 *LRH-1* 的表达量稍有增加,这说明 LRH-A 可间接诱导肝脏、肾脏 *LRH-1* 的表达。但在卵巢 *LRH-1* 的表达量反而有所下降,这可能与卵母细胞中类固醇激素含量较高有关,反馈抑制 *LRH-1* 在卵巢的表达。

参考文献:

- [1] Lavorgna G, Ueda H, Clos J, et al. A steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of *fushi tarazu* [J]. Science, 1991, 252: 848-851.
- [2] Ueda H, Sonoda S, Brown J L, et al. A sequence-specific DNA-binding protein that activates *fushi tarazu* segmentation gene expression [J]. Genes Dev, 1990, 4: 624-635.
- [3] Galarneau L, Pare J F, Allard D, et al. The $\alpha 1$ -fetoprotein locus is activated by a nuclear receptor of the drosophila FTZ-F1 family [J]. Mol Cell Biol, 1996, 16: 3 853-3 865.
- [4] Nitta M, Ku S, Brown C, et al. CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 6 660-6 665.
- [5] Becker-Andre M, Andre E, DeLamarter J F. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 194: 1 371-1 379.
- [6] Li M, Xie Y H, Kong Y Y, et al. Cloning and characterization of a novel human hepatocyte transcription factor, hB1F, which binds and activates enhancer II of hepatitis B virus [J]. J Biol Chem, 1998, 273: 29 022-29 031.
- [7] Wang Z N, Bassett M, Rainey W E. Liver receptor homologue-1 is expressed in the adrenal and can regulate transcription of 11 β -hydroxylase [J]. J Mol Endocrinol, 2001, 27: 255-258.
- [8] Boerboom D, Pilon N, Behdjani R, et al. Expression and regulation of transcripts encoding two members of the NR5A nuclear receptor subfamily of orphan nuclear receptors, steroidogenic factor-1 and NR5A2, in equine ovarian cells during the ovulatory process [J]. Endocrinology, 2000, 141: 4 647-4 656.

- [9] Schoonjans K, Annicotte J S, Huby T, et al. Liver receptor homolog 1 controls the expression of the scavenger receptor class B type I [J]. EMBO Rep, 2002, 3: 1 181–1 187.
- [10] Hinshelwood M M, Repa J J, Shelton J M, et al. Expression of LRH-1 and SF-1 in the mouse ovary: localization in different cell types correlates with differing function [J]. Mol Cell Endocrinol, 2003, 207: 39–45.
- [11] Liu D L, Liu W Z, Li Q L, et al. Expression and functional analysis of liver receptor homologue 1 as a potential steroidogenic factor in rat ovary [J]. Biol Reprod, 2003, 69: 508–517.
- [12] Falender A E, Lanz R, Malenfant D, et al. Differential expression of steroidogenic factor-1 and FTF/LRH-1 in the rodent ovary [J]. Endocrinology, 2003, 144: 3 598–3 610.
- [13] Sirianni R, Seely J B, Attia G, et al. Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates transcription of genes encoding steroidogenic enzymes [J]. J Endocrinol, 2002, 174: R13–R17.
- [14] Kim J W, Havelock J C, Carr B R, et al. The orphan nuclear receptor, liver receptor homolog-1, regulates cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 enzyme in human granulosa cells [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90 (3): 1 678–1 685.
- [15] von Hofsten J, Olsson P E. Zebrafish sex determination and differentiation: Involvement of FTZ-F1 genes [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2005, 3: 63.
- [16] Hofsten J, Jones I, Karlsson J, et al. Developmental Expression Patterns of FTZ-F1 Homologues in Zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Gen Comp Endocrinol, 2001, 121: 146–155.
- [17] Ito M, Matsuda A, Yumoto K, et al. cDNA cloning of a new member of FTZ-F1 subfamily from a rainbow trout [J]. Biochem Biophys Acta, 1998, 1395: 271–274.
- [18] Rose T M, Schultz E R, Henikoff J G, et al. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly-related sequences [J]. Nucl Acids Res, 1998, 26 (7): 1 628–1 635.
- [19] Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 8 998–9 002.
- [20] Thompson J D, Higgins D G, Gibson J F. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucl Acids Res, 1994, 22: 4 673–4 680.
- [21] 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: 402–408.
- [22] Zhang C K, Lin W, Cai Y N, et al. Characterization of the genomic structure and tissue-specific promoter of the human nuclear receptor NR5A2 (hB1F) gene [J]. Gene, 2001, 273: 239–249.
- [23] Ellinger-Ziegelbauer H, Hihi A K, Laudet V, et al. FTZ-F1-related orphan receptors in *Xenopus laevis*: transcriptional regulators differentially expressed during early embryogenesis [J]. Mol Cell Biol, 1994, 14: 2 786–2 797.
- [24] Lin W, Wang H W, Sum C, et al. Zebrafish ftz-f1 gene has two promoters, is alternatively spliced, and is expressed in digestive organs [J]. Biochem J, 2000, 348: 439–446.
- [25] 林浩然. 鱼类生理学 [M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1999: 191–195.
- [26] Morohashi K, Honda S, Inomata Y, et al. A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s [J]. J Biol Chem, 1992, 267: 17 913–17 919.
- [27] Rice D A, Mouw A R, Bogerd A M, et al. A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes [J]. Mol Endocrinol, 1991, 5: 1 552–1 561.

Isolation and expression pattern of *LRH-1* in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)

TANG Yong-kai, YU Ju-hua, XU Pao, LI Jian-lin

(Key Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Liver receptor homolog-1 (LRH-1) is an orphan member of the Ftz-F1 subfamily of nuclear receptors. *LRH-1* is highly expressed in ovary and so it is thought to be involved in the regulation of steroidogenesis in ovary. Here we isolated *LRH-1* cDNA and inactive *LRH-1'* cDNA in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) using RT-PCR and RACE method. The yellow catfish *LRH-1* cDNA (1 945 bp) had a 207 bp 5'-untranslated region (UTR), a 238 bp 3' UTR and a 1 500 bp open reading frame, which encoded a 500-amino-acid residues protein with deduced molecular weight of 57.19 kD. However, *LRH-1'* was 1 663 bp with 283 bp 5' UTR, 330 bp 3' UTR and a 1 050 bp open reading frame, which encoded a 350-amino-acid residues protein with deduced molecular weight of 39.7 kD. Compared with *LRH-1*, *LRH-1'* were absent of zinc-fingers and AF-2 motif. The alignment results of LRH-1's amino acid sequences indicated the similarity was from 79% to 85% between yellow catfish LRH-1 and other vertebrate animals' counterparts, and was from 59% to 66% between yellow catfish LRH-1 and other animals' steroidogenic factor-1 (SF-1), another member of Ftz-F1 subfamily. Using Clustal W, we constructed the phylogenetic tree of the Ftz-F1 which showed two main branches. All teleost SF-1 clustered into one branches, and the other branches bifurcated into two clear sub ones, one of which contained other animals' SF-1 and the other contained two smaller groups of all teleost's LRH-1 and other animals' LRH-1, respectively. Real-time RT-PCR with β -actin as internal control was used to explore the expression levels of *LRH-1* in brain (including forebrain, hypothalamus, pituitary), liver, kidney and gonad. The results indicated *LRH-1* expressed in brain, liver, kidney, and gonad with relatively high level in male and female fish liver. The expression levels in female liver and ovary were significantly higher than in male fish liver and testis, respectively. In ovary, the expression level of *LRH-1* varied with the developmental phases. There were two highest expression levels in ovary of phase III and V. After spawning or degeneration of ovary, the *LRH-1* expression level decreased sharply. And after 12 h of LRH-A intramuscular injection, the expression level of *LRH-1* significantly decreased in ovary. However, it significantly increased in liver and kidney. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (5): 649–659]

Key words: *Pelteobagrus fulvidraco*; liver receptor homolog-1 (LRH-1); phylogenetic analysis; real-time RT-PCR; expression pattern

Corresponding author: XU Pao. E-mail: xup@ffrc.cn