

## 黄颡鱼促黄体激素受体基因克隆及 在雌鱼繁殖周期中的表达

刘 淼<sup>1</sup>, 温海深<sup>1,2\*</sup>, 何 峰<sup>1</sup>, 李吉方<sup>1</sup>, 马瑞芹<sup>1</sup>,  
胡 健<sup>1</sup>, 母伟杰<sup>1</sup>, 张远青<sup>1</sup>, 祁保霞<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;

2. 内蒙古民族大学动物科学技术学院, 内蒙古 通辽 028000)

**摘要:** 通过简并引物扩增及 Smart<sup>TM</sup> Race 技术, 首次克隆了黄颡鱼促黄体激素受体(LHR) 基因 cDNA 全长序列。该基因全长 2 524 bp, 编码 701aa, 含有属于糖蛋白激素受体(GpHR) 家族的典型跨膜螺旋结构区域(TM helix)。9 个富含亮氨酸的重复性序列(LRRs); 4 个潜在的 N-端糖基化位点:<sup>29</sup>NFTC, <sup>82</sup>NVSR, <sup>203</sup>NGSR, <sup>548</sup>NLTV; 24 个 Ser, 6 个 Thr 和 5 个 Tyr 磷酸化位点。同时<sup>400</sup>S 为潜在的 PKC 位点。通过 RT-PCR 分析组织表达, 卵巢繁殖周期中卵巢和脑的表达水平并结合血浆中 E<sub>2</sub> 含量的变化, 发现 LHR 在卵巢中大量表达, 其次是脑、肾脏、心脏、肝脏和肠存在少量或微量的表达; 在卵巢繁殖周期中, 卵巢 LHR 表达从Ⅲ期-V 期处于较高水平, V 期达到最高峰, 随后下降到最低值; 而脑的表达高峰出现在Ⅳ期, 与血浆中 E<sub>2</sub> 变化相一致。推测卵巢和脑中 LHR 基因参与卵黄的生成, 调控卵母细胞的成熟和排卵。

**关键词:** 黄颡鱼; 促黄体激素受体; 基因克隆; 半定量 mRNA 表达

**中图分类号:** S 917.4; Q 785; Q 786

**文献标志码:** A

与脊椎动物相似, 硬骨鱼类的生殖周期受脑—垂体—性腺轴调控。而垂体是通过分泌促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH) 和促黄体激素(luteinizing hormone, LH) 参与诱导配子发育和性腺类固醇激素的生成<sup>[1-2]</sup>。其中, LH 在鱼类中也被称为促性腺激素Ⅱ(gonadotropinⅡ, GnRHⅡ), 主要功能是促进卵泡的成熟和排卵, 刺激卵泡内膜细胞产生雌激素<sup>[3]</sup>, 通过能与 LH 相结合的促黄体激素受体(luteinizing hormone receptor, LHR) 对性腺组织的介导, 实现其生理功能<sup>[4-5]</sup>。

促黄体激素受体(LHR) 属于 G-蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR) 超家族, 同促卵泡激素受体(FSHR) 和促甲状腺受体(TSHR) 共同组成糖蛋白激素受体

(glycoprotein hormone receptor, GpHR) 亚家族, 其家族成员具有一个典型的 N-末端胞外区域(extracellular domain, ECD), 由 7 个跨膜螺旋区(transmembrane helix, TM helix) 构成的锚定单元(anchoring unit) 和一段细胞内 C-末端(C-terminal domain) G 蛋白偶联区域。激素通过与受体的结合, 诱导受体构象从不活跃到活跃的转变, 引起跨膜区(TMD) 重新排列, 激活 G 蛋白偶联通路。N-末端胞外区域(ECD) 是激素识别和高度结合区, 包括富含亮氨酸的重复性区域(leucine-rich repeats, LRRs), 其中含有半胱氨酸高度保守区。7 个跨膜螺旋区(TM helix) 由 3 个包内环(intracellular loop, IL) 和 3 个包外环(extracellular loop, EL) 组成, 具有与激素结合和信号转导作用<sup>[6-8]</sup>。

收稿日期:2011-07-14 修回日期:2011-09-27

资助项目:农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室重点课题(BZ200709)

通讯作者:温海深, E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

从一些硬骨鱼类的性腺中已经克隆得到 *LHR* 基因 cDNA, 并对其功能进行了深入研究<sup>[9-11]</sup>。从研究中发现鱼类 *LHR* 基因除了在性腺中有丰富的表达外, 在非性腺组织中也有少量或微量表达<sup>[9-10]</sup>。对银大马哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*) 的研究发现, *LHR* 与 *FSHR* 不同, 它仅与银大马哈鱼的 LH 相结合<sup>[11-12]</sup>。在雌性硬骨鱼中, 有研究报道了 *LHR* 的表达与各发育期中滤泡细胞有关<sup>[13-16]</sup>, 参与卵母细胞成熟和排卵的调控。

黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*), 是我国重要的淡水养殖品种, 其雌雄个体差异大, 雄性比雌性生长快 30% 左右, 故成为我国单性育种的重要研究对象。本研究以人工养殖的雌性黄颡鱼为研究对象, 应用分子生物学方法, 首次克隆得到 *LHR* 基因的全长 cDNA 序列, 并对 *LHR* 在不同组织和整个繁殖周期的表达模式进行了研究, 为进一步阐明 *LHR* 基因的生理功能奠定基础, 为单性鱼育种提供可靠依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

2009 年 10 月—2010 年 10 月从青岛水产品市场固定摊位每月购买雌性黄颡鱼 10 尾。其中用于本实验的雌性黄颡鱼 50 尾, 体长 10.4 ~ 14.0 cm, 体质量 17.67 ~ 43.7 g。采集后在水族箱内暂养 2 ~ 3 d, 流水充氧, 人工调节光照, 自然水温。克隆黄颡鱼 *LHR* cDNA 全长的材料为性成熟雌性黄颡鱼性腺组织, 于 2011 年 3 月购自青岛南山水产市场。实验鱼尾静脉采集血液样品 (采用 MS-222 进行麻醉, 浓度为 1/30 000), 分离血清 (4 °C 储存 4 ~ 6 h 后, 16 000 r/min 离心 10 min, 取上清液), -40 °C 保存。解剖后迅速取出卵巢、肝脏、胃、肠、鳃、心、脾、肾、头肾和脑等组织, 一部分组织用 Bouin 氏液固定, 用于组织切片, 其余放在液氮中速冻, 然后转移至 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

### 1.2 试剂

引物由生工生物工程(上海)有限公司合成, Smart<sup>TM</sup> Race cDNA Amplification kit 试剂盒购自 Clontech 公司, RNA 提取试剂 RNAiso Reagent 和基因表达所用 *Taq* 酶试剂盒购自 TaKaRa 公司, M-MLV 购自 Promega 公司, 普

通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、pGM-T 载体购自北京天根生化科技有限公司, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和基因克隆所用 HiFi *Taq* 酶购自北京全式金生物技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取 -80 °C 保存的肠、鳃、心、脾、肾、头肾、卵巢、肝、胃、脑组织各 100 mg, 用 RNAiso Reagent 抽提总 RNA, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。以 DNase I 酶去除基因组 DNA, 核酸蛋白测定仪 (Biodropsis, BO-1000) 测定 RNA 浓度。各组织 RNA 分别用 M-MLV 逆转录酶以 Oligo (dT) 18 为引物合成 cDNA 第一链。合成的 cDNA 于 -20 °C 保存备用。

### 1.4 *LHR* 的全长克隆

用 RNAiso 提取总 RNA, 核酸蛋白测定仪测定总 RNA 浓度, 取 1  $\mu$ g 按照 Smart<sup>TM</sup> Race cDNA Amplification kit 试剂盒说明书合成第一链 cDNA。根据斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*, NP\_001187201.1)、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*, ABY56689.1)、黄锡鲷 (*Rhabdosargus sarba*, ABI93202.1)、日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*, ACF35638.1)、斑马鱼 (*Danio rerio*, AAV31154.1)、革胡子鲶 (*Clarias gariepinus*, AAN75752.1) 的 *LHR* 氨基酸序列, 使用 CodeHop 法<sup>[17]</sup> 在其保守区设计简并引物 LHRF1/LHRR1 和 LHRF2/LHRR2 (表 1)。以合成的第一链 cDNA 为模板, 扩增 *LHR* 片段。利用 Primer 5.0 设计特异性引物 LHR-5 和 LHR-3 (表 1)。

### 1.5 *LHR* 全长序列分析与进化树构建

根据已克隆得到的 *LHR* cDNA 全长序列通过 NCBI 数据库进行 BLAST 在线同源性分析, 并使用 DNAMAN 将 cDNA 序列转化成氨基酸序列, 利用 Clustal X 和 MEGA 4.0 构建 NJ (Neighbour-Joining, 1000rus) 法系统进化树。氨基酸分析利用 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 来预测氨基酸结构的跨膜螺旋结构区域; 经 SignalP 3.01 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽 (signal protein); 由 NetPhosK 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) 预测蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 位点; 用 NetNGlyc 1.0 Server

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 来预测 N-端糖基化位点 (N-linked glycosylation sites), 利用 NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 来预测 Ser、Thr 和 Thy 磷酸化位点。

表 1 黄颡鱼 *LHR* 基因全长克隆及半定量 RT-PCR 表达所用引物  
Tab.1 Primers used for *P. fulvidraco* *LHR* gene cloning and mRNA expression analysis

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	引物大小/bp primer size
LHRF1	CGGTACCTGTCCATCTGCaayacngnat	824
LHRR1	CAGGTAGAAGCCCATGCAGarrtngeraa	
LHRF2	CCGACGCCTTCAACCCntgygarga	968
LHRR2	GCAGCCCTGCATCTTGAYrtgrtancg	
LHR-5	CTGGGAGAAGCCTTGAAATGCGT	
LHR-3	CCAAACGAATGGCGGTGCT	
LHRF	CTACACCTTCCCTAAAGCCCTC	557
LHRR	AATGCCTGTCTGCAATCCGTAC	
18SF	CCTGAGAAACGGCTACCACATCC	
18SR	AGCAACTTTAATATACGCTATTGGAG	

### 1.6 *LHR* 的组织表达及在性腺繁殖周期中卵巢和脑的表达

根据刘文彬等<sup>[18]</sup>的方法进行组织学分期。采用半定量 RT-PCR 法, 利用特异性引物来检测 *LHR* mRNA 在雌性黄颡鱼组织中的表达情况, cDNA 稀释后取 1  $\mu$ L 作为模板进行 PCR 扩增。以黄颡鱼 18S rRNA(表 1)<sup>[19]</sup> 作为反应的内参照物。18S rRNA 所进行的 PCR 反应条件为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 57  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s 共 18 个循环, 72  $^{\circ}$ C 10 min 延伸。特异性引物 LHRR 和 LHRF 利用 Primer 5.0 软件设计(表 1)。PCR 反应条件为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 64  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s 共 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C 10 min。取 5  $\mu$ L 的 PCR 产物进行电泳。对电泳结果采用 Lane 1D 凝胶图像处理系统进行分析。

### 1.7 血浆雌二醇( $E_2$ )含量测定

用<sup>125</sup>I 放射性免疫测定方法 (RIA) 测量雌性黄颡鱼血清中雌二醇( $E_2$ )的含量, 试剂购置于天津九鼎医学生物工程有限公司<sup>[20]</sup>。

### 1.8 数据分析

所得数据均表示为平均数  $\pm$  标准误 (mean  $\pm$  SE), 采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析并

进行 Duncan 氏多重比较(当  $P < 0.05$  时差异显著)。

## 2 结果

### 2.1 *LHR* cDNA 全长序列分析和 *LHR* 氨基酸序列比对

利用简并引物 LHRF1、LHRR1 和 LHRF2、LHRR2, 以及 Primer 5.0 设计 3'RACE 扩增引物 (LHR-3) 和 5'RACE 扩增引物 (LHR-5) 克隆得到 *LHR* cDNA 序列全长 2 524 bp, 共编码 701 个氨基酸, 包含 5'非编码区 25 bp, 3'非编码区 393 bp, 开放阅读框 2 106 bp。GenBank 序列号为 JF896802。由该全长的氨基酸序列看出, 此受体具有典型的 G-蛋白偶联受体结构, 包含一个 372 aa 的包外区 (ECD); 其中 N-末端存在由 22 aa 组成的信号肽序列, 通过氨基酸比对发现 9 个富含亮氨酸的重复性序列 (LRRs) 和一个存在半胱氨酸残基的区域被称为是铰链区 (hinge region)。LRRs 是由一个较短的  $\beta$  链为基础组成的包括  $X^1X^2LX^3LX^4X^5$  的连续序列 (X 可以是任何一个氨基酸, L 是亮氨酸、缬氨酸或其他疏水性氨基酸)<sup>[21]</sup>。并且在胞外区发现两个连续的半胱氨酸残基<sup>287</sup>CC, 推测是此区域的二硫键<sup>[22]</sup>。同时还观察到与其他 G-蛋白偶联受体相似的 7 次跨膜螺旋区共 262aa, 是通过 3 个胞内环 (IL I ~ IL III) 和 3 个胞外环 (EL I ~ EL III) 连接。最后是一段 67aa 的胞内区, 并且我们发现了<sup>682</sup>CC 高度保守区, 推测是一个潜在的十六烷酰化位点。根据软件分析推测, 该基因含有 4 个 N-端糖基化位点:<sup>29</sup>NFTC, <sup>82</sup>NVSR, <sup>203</sup>NGSR, <sup>548</sup>NLTV; 共有 24 个 Ser, 6 个 Thr 和 5 个 Tyr 磷酸化位点。同时推测<sup>400</sup>S 为潜在的 PKC 位点。根据氨基酸对比, 发现了 GpHR 家族的特殊信号序列, 如<sup>287</sup>CCAF, <sup>471</sup>ERW, <sup>584</sup>FTD 和<sup>657</sup>NPFLY(图 1 和图 2)。

### 2.2 系统进化分析

利用 Clustal X 和 MEGA 4.0, 进行黄颡鱼 *LHR* 与其它物种 *LHR* 氨基酸序列进行多重对比, 构建系统进化树(图 3)。通过图 3 我们清楚地发现, 硬骨鱼类明显地分出两个分支, 黄颡鱼 *LHR* 序列存在于其中一个硬骨鱼类分支, 与斑点叉尾鲷合并为一个分支, 亲缘最近。而另一硬骨鱼 *LHR* 基因分支, 同哺乳动物(人和小鼠)和鸟类(鸡)聚为一支。

2.3 雌性黄颡鱼 LHR 基因在各组织中表达

通过 RT-PCR 方法检测 LHR 在雌性黄颡鱼心脏、肝脏、脾、胃、肾脏、卵巢、鳃、脑、头肾和肠 10 种组织中的表达。结果表明,雌性黄颡鱼 LHR

基因分别在心脏、肝脏、肾脏、卵巢、脑、肠中表达,在卵巢中有较高的表达,其次是脑、肾脏、心脏、肝脏和肠(图 4)。

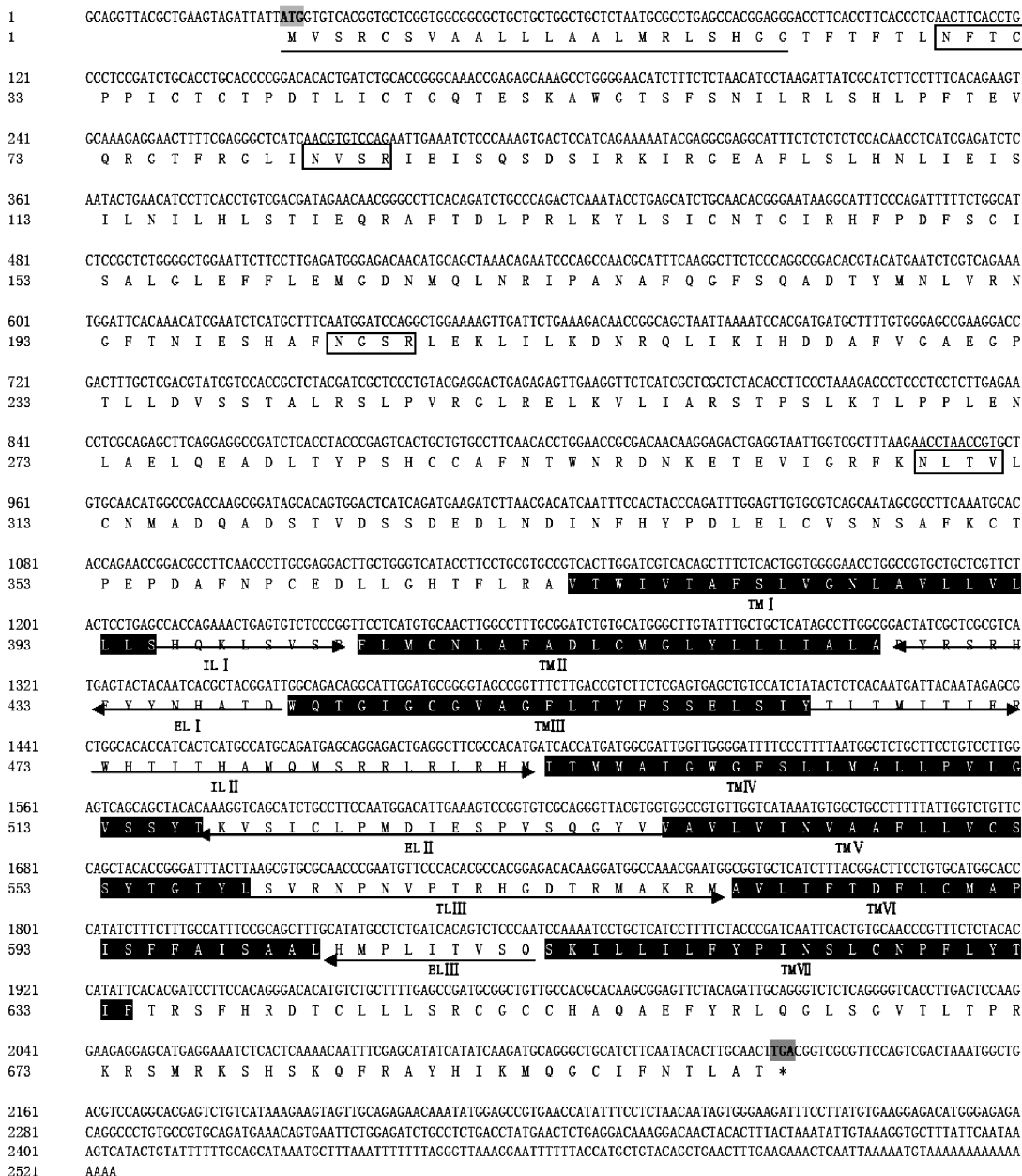


图 1 黄颡鱼 LHR cDNA 全长序列

起始密码子: ATG,信号肽: M V S R C,跨膜螺旋区(TM I - TM VII):为黑底白字,胞内环(IL I ~ IL III):→,胞外环(EL I ~ EL III):←,潜在的 N-端糖基化位点: N F I T,终止密码子:TGA,数字中核苷酸序列从 5'第一个开始(上行),氨基酸序列从起始密码子 M 开始(下行)。

Fig. 1 Full sequence of LHR cDNA of P. fulvidraco

initiation codon: ATG, signal protein: M V S R C, transmembrane helices (TM I - TM VII): black backgrounds and white words, intracellular loops (IL I - IL III): →, extracellular loops (EL I - EL III): ←, potential N-linked glycosylation sites: N F I T, termination codon: TGA, Numbers indicate the nucleotide position starting at the 5' of the sequence (top line) and the amino acid positions starting at the initial methionine (M, bottom line).

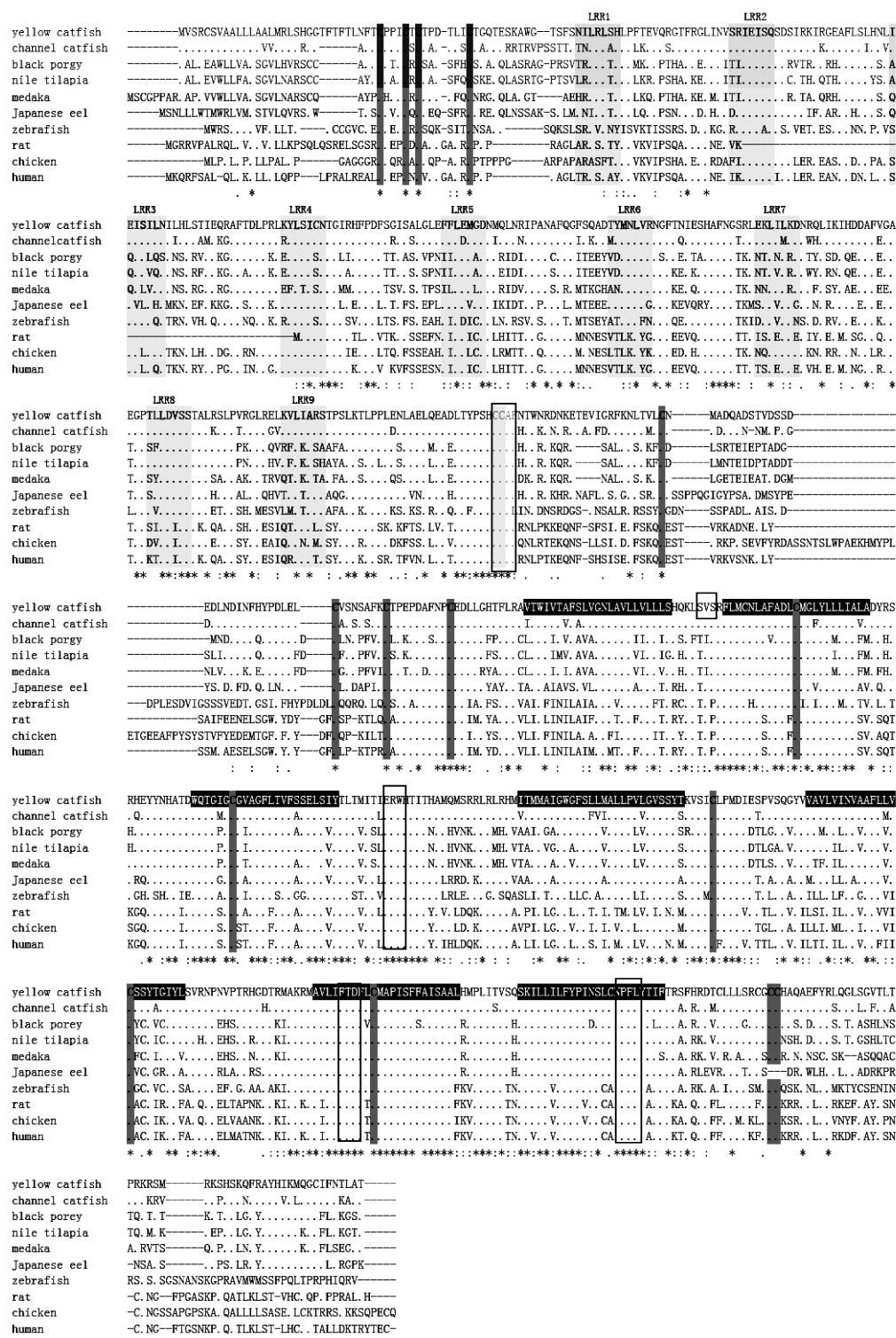


图2 黄颡鱼 LHR 与其他物种 LHR 氨基酸序列比对

富含亮氨酸的重复性区域:LRR1-9,跨膜螺旋区:为黑底白字,富含半胱氨酸残基的高度保守区:灰底黑字 C, GpHR 家族的特殊保守信号序列: [CCAF], [ERW], [FTD], [NPLY], 潜在的 PKC 磷酸化位点: [SVS]。

Fig.2 Alignment of *P. fulvidraco* LHR with LHRs from several species

Leucine-rich repeats;LRR1-9, transmembrane ( TM I - TM VII ); black backgrounds and white words, high conserved domains rich in Cys residues; gray backgrounds and black words C, special conserved signal sequence of GpHR family: [CCAF], [ERW], [FTD], [NPLY], protein kinase C sites: [SVS].

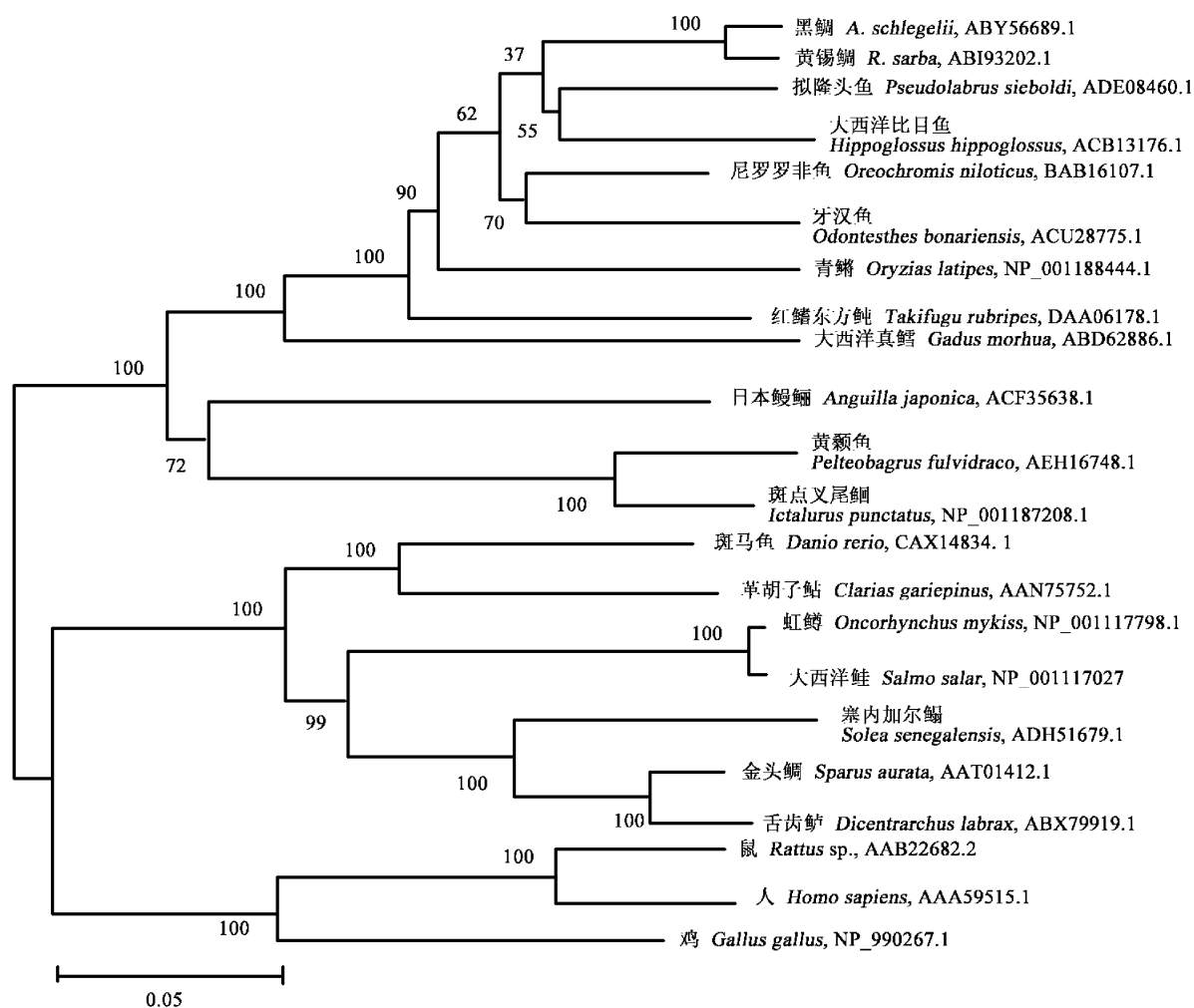


图3 22个物种 LHR 氨基酸序列构建的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree for 22 species' LHR amino acid sequences

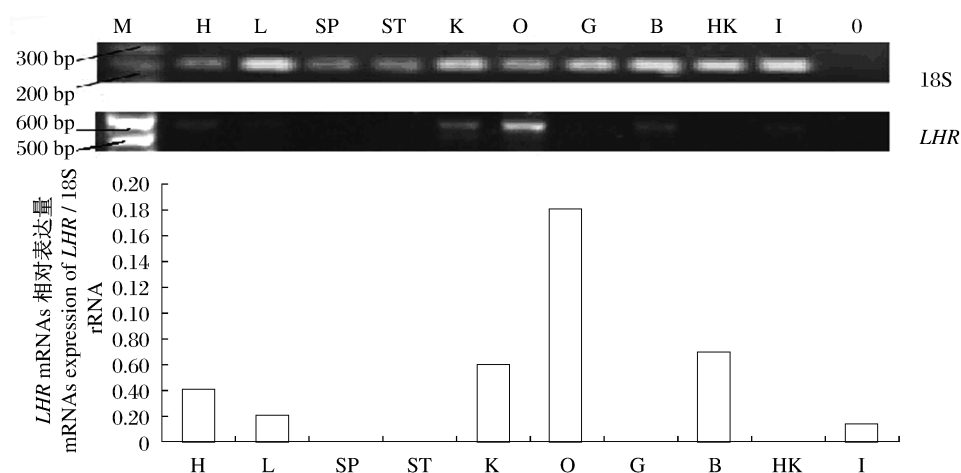


图4 LHR 在雌性黄颡鱼各组织中的表达和相对表达量 (LHR/18S)

M:DNA 分子量标准;H:心脏;L:肝脏;SP:脾;ST:胃;K:肾脏;O:卵巢;G:鳃;B:脑;HK:头肾;I:肠;0:阴性对照(以水为模板)。

Fig.4 The expression of LHR in female *P. fulvidraco* (LHR/18S)

M:DNA molecular weight marker; H:heart; L:liver; SP:spleen; ST:stomach; K:kidney; O:ovary; G:gill; B:brain; HK:head kidney; I:intestine; 0:control(using water as templet).

## 2.4 雌性黄颡鱼卵巢发育周期中 *LHR* 基因的表达水平和血浆中 $E_2$ 含量的变化

随着卵巢发育周期的变化,雌性黄颡鱼卵巢和脑中 *LHR* 的表达水平均出现相应的变化。血清中  $E_2$  含量在IV期含量最为丰富 ( $P < 0.05$ ),然后随着卵巢的发育逐渐下降,在VI期达到最低值 ( $P < 0.05$ )。通过 *LHR* 在卵巢发育周期的变化趋势,可以看出在卵巢中,从III ~ V期 *LHR* 表达处于较高水平,V期出现变化的最高峰,随后下降到最低值 ( $P < 0.05$ )。 *LHR* 在脑中变化的高峰出现在IV期 ( $P < 0.05$ ),与血浆中  $E_2$  含量的变化相似,而在II期和VI期未检测出表达量(图5)。

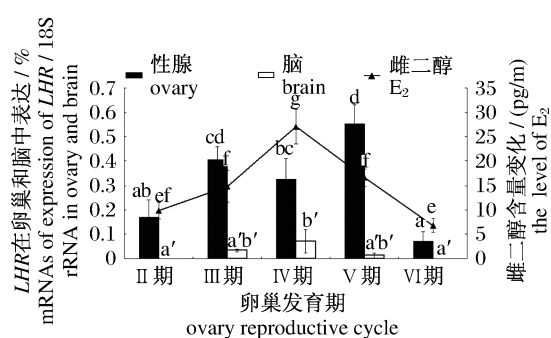


图5 不同性腺发育期雌性黄颡鱼性腺和脑中 *LHR* 的表达以及血浆中  $E_2$  含量的变化

数据均表示为平均数  $\pm$  标准误,图中标不同的字母表示显著性差异 ( $P < 0.05$ , Duncan 氏多重比较)。

Fig. 5 mRNA expression of *LHR* in ovary and brain of female *P. fulvidraco* and the level of  $E_2$  during the reproductive cycle in a year

Values are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean. Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ , One-Way ANOVA, followed by Duncan's).

## 3 讨论

通过实验克隆得到黄颡鱼 *LHR* cDNA 全长 2 524 bp, 编码 701aa。该基因核苷酸序列同斑点叉尾鲷 *LHR* 的同源性最高达 87%。具有典型的 G-蛋白偶联受体结构, 包含 N-末端序列, GpHR 家族特有的 7 次跨膜螺旋区和 C-端胞外区。从系统进化树分析, 此序列位于鱼类 *LHR* 分支中。以上证明该序列属于 GpHR 家族, 为目的基因。而在进化树中我们发现, 斑马鱼, 革胡子鲶等构成另一鱼类分支, 与哺乳动物和鸟类构为一大支, 与陈晓燕<sup>[23]</sup>对半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 的研究相一致, 推测与物种的特殊性有关。

采用半定量 RT-PCR 的方法对雌性黄颡鱼 *LHR* 基因 mRNA 组织表达进行分析, 结果表明, 雌性黄颡鱼 *LHR* 基因分别在心脏、肝脏、肾脏、卵巢、脑、肠中表达, 在卵巢中表达量最高, 其次是脑、肾脏、心脏、肝脏和肠。研究结果与革胡子鲷<sup>[24]</sup>, 斑点叉尾鲷<sup>[13]</sup> 和斑马鱼<sup>[16]</sup> 的结果相一致, 在对大马哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) 的研究发现, *LHR* 在卵巢的高表达量, 有利于参与雌鱼繁殖周期中卵巢的成熟和排卵<sup>[12]</sup>。且 *LHR* 在非性腺组织中广泛的、微弱的表达, 此现象在多种鱼和四足动物中均有发现<sup>[25-26]</sup>, 但没有相关的生理学研究证明<sup>[27]</sup>。我们推测 *LHR* 除了参与卵巢的发育, 也可能对其他组织的发育具有重要的调控作用, 但其作用机理需要深入的研究。

通过分析 *LHR* 在卵巢和脑中表达量的周年变化, 我们发现 *LHR* 在黄颡鱼卵巢 V 期达到峰值, 与大西洋比目鱼<sup>[28]</sup>、斑点叉尾鲷<sup>[13]</sup>、舌齿鲈<sup>[29]</sup> 等相似。但不同的是, 这些鱼类 *LHR* 的表达量在 III 期和 IV 期均处于较低水平, 而本研究发现黄颡鱼卵巢 *LHR* 在 III 期和 IV 期表达量相对较高。在半滑舌鲷的研究中发现, 在卵黄发生期卵巢的表达水平最高, 故作者推测 *LHR* 参与卵巢卵黄的发生与发育<sup>[23]</sup>。有报道指出, 斑马鱼 *LHR* 在未成熟卵巢中几乎无法检测到其表达, 当进入卵黄生成期后开始有表达, 然后增加, 在卵黄颗粒充满卵母细胞的时期达到最高值<sup>[16]</sup>。对促性腺激素受体在鱼类生殖周期中表达和在类固醇生成中的作用的相关研究, 表明促性腺激素受体在鱼类配子发生的特定时间发挥功能。而对于 *LHR*, 目前的研究结果大都说明, 其基因表达都是与排卵和排精过程相关<sup>[29]</sup>。已有研究证明,  $E_2$  诱导肝脏合成卵黄蛋白原, 促进卵母细胞卵黄的积累<sup>[30]</sup>, 对性腺发育和卵细胞成熟等方面有重要作用。且 ROCHA 等<sup>[31]</sup>对舌齿鲈研究发现, 在卵黄生成晚期和卵黄生成阶段之后血浆中  $E_2$  的高水平, 会产生一种诱导 *LHR* 表达的机制, 提高其表达水平。通过以上研究我们得出, 黄颡鱼 *LHR* 基因的作用开始于卵黄生成阶段, 在卵巢成熟阶段达到高峰, 推测 *LHR* 参与卵黄的生成, 调控卵母细胞的最后成熟和排卵<sup>[32]</sup>。且与激素的含量和卵巢的发育水平具有重要的关系<sup>[33]</sup>。而 *LHR* 高水平的表达, 也暗示了脑垂体刺激 LH 大量的释放, 参与卵巢的发育<sup>[29]</sup>。但有趣的是在 IV 期,

*LHR* 表达水平出现小幅下降,其机理需要深入研究。在雌性黄颡鱼的脑中,我们发现 *LHR* 在 II 期表达水平低于检测阈值,随后稳步增加,于 IV 期达到高峰,这与我们检测到的  $E_2$  在繁殖周期研究的变化趋势相似,均在 IV 期达到峰值。已知  $E_2$  参与激活雌激素响应因子(EREs),是 *LH $\beta$*  的上游调控因子,对 *LH $\beta$*  基因的表达有正反馈作用<sup>[34]</sup>,而 *LH $\beta$*  则通过与其受体结合来促进发育<sup>[35]</sup>,推测血浆中  $E_2$  对脑中 *LHR* 存在正反馈调节,参与卵巢的成熟和排卵。

本研究首次克隆得到黄颡鱼 *LHR* cDNA 全长序列。通过 RT-PCR 研究 *LHR* 在组织中的特异性表达和在性腺周期中卵巢和脑的变化水平,并结合血浆  $E_2$  含量的变化,我们发现,血浆中  $E_2$  对 *LHR* 具有正调控作用,且卵巢和脑中的 *LHR* 参与卵黄的生成,调控卵母细胞的成熟和排卵,为进一步揭示 *LHR* 的生理功能奠定基础,同时也为阐明鱼类生殖调控机制提供科学依据。

#### 参考文献:

- [ 1 ] PIERCE J, PARSONS T F. Glycoprotein hormones: structure and function [ J ]. *Annual Review of Biochemistry*, 1981, 50: 465 - 495.
- [ 2 ] QUERAT B, SELLOUK A, SALMON C. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri* {beta} subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone [ J ]. *Biology of Reproduction*, 2000, 63 ( 1 ): 222 - 228.
- [ 3 ] 李波,梁鸿雁,周虚,等. 性腺外 FSH 受体和 LH 受体表达研究进展 [ J ]. *中国兽医学报*, 2009, 29 ( 6 ): 816 - 820.
- [ 4 ] MOYLE W R, CAMPBELL R K, MYERS R V, *et al.* Co-evolution of ligand-receptor pairs [ J ]. *Nature*, 1994, 368 ( 6468 ): 251 - 255.
- [ 5 ] HEMMEN A P N, HUHTANIEMI I T. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function [ J ]. *Endocrine Reviews*, 2000, 21 ( 5 ): 551 - 583.
- [ 6 ] ASCOLI M, PUETT D. The gonadotropin hormones and their receptors [ M ] // STRAUSS J, BARBIERI R. *Yen and Jaffe ' s reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management*, 6<sup>th</sup> eds. Readfield: Saunders, 2009: 35 - 55.
- [ 7 ] JI T H, GROSSMANN M, JI I. G protein-coupled Receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions [ J ]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273 ( 28 ): 17299 - 17302.
- [ 8 ] VASSART G, PARDO L, COSTAGLIOLA S. A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors [ J ]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2004, 29 ( 3 ): 119 - 126.
- [ 9 ] ROCHA A, GÓMEZ A, ZANUY S, *et al.* Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis, and functional activity [ J ]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2007, 272 ( 1 - 2 ): 63276.
- [ 10 ] OBA Y, HIRAI T, YOSHIURA Y, *et al.* Cloning, functional characterization and expression of a gonadotropin receptor cDNA in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) [ J ]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 263 ( 2 ): 584 - 590.
- [ 11 ] YAN L, SWANSON P, DICKHOV W W. A two-receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) [ J ]. *Biology of Reproduction*, 1992, 47 ( 3 ): 418 - 427.
- [ 12 ] MIW S, YAN L, SWANSON P. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by *in vitro* ligand autoradiography [ J ]. *Biology of Reproduction*, 1994, 50 ( 3 ): 629 - 642.
- [ 13 ] KUMAR R S, IJIRI S, TRANT J M. Molecular biology of the channel catfish gonadotropin receptors: Complementary DNA cloning, functional expression, and seasonal gene expression of the follicle-stimulating hormone receptor [ J ]. *Biology of Reproduction*, 2001, 65 ( 3 ): 710 - 717.
- [ 14 ] KUMAR R S, TRANT J M. Piscine glycoprotein hormone (gonadotropin and thyrotropin) receptors: a review of recent developments [ J ]. *Comparative Biochemical and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 2001, 129 ( 2 - 3 ): 347 - 355.
- [ 15 ] BOBE J, MAUGARS G, NGUYEN T, *et al.* Rainbow trout follicular maturational competence acquisition is associated with an increased expression of follicle stimulating hormone receptor and insulin-like growth factor 2 messenger RNAs [ J ]. *Molecular Reproduction and Development*, 2003, 66 ( 1 ): 46 - 53.
- [ 16 ] KWOK H F, SO W K, WANG Y, *et al.* Zebrafish gonadotropins and their receptors: I. cloning and



- characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors evidence for their distinct functions in follicle development [J]. *Biology of Reproduction*, 2005, 72 (6): 1370 - 1381.
- [17] 陈彩芳, 温海深, 何峰, 等. 程序化设计的简并引物克隆半滑舌鳎 CYP17 基因[J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2009, 39(6): 1213 - 1218.
- [18] 刘文彬, 张轩杰. 黄颡鱼的卵巢发育和周期变化[J]. *湖南师范大学: 自然科学版*, 2003, 26(2): 73 - 78.
- [19] 张娟, 张其中, 张占会, 等. 黄颡鱼 HSC70 基因及其组织表达分析[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(3): 426 - 433.
- [20] 温海深, 宋海霞, 杨立廷, 等. 外源激素对养殖牙鲆血浆睾酮和雌二醇含量的影响研究[J]. *海洋学报: 中文版*, 2006, 28(4): 115 - 120.
- [21] KAJAVA A V, KOBE B. Assessment of the ability to model proteins with leucine-rich repeats in light of the latest structural information[J]. *Protein Science*, 2002, 11(5): 1082 - 1090.
- [22] MAUAQARS G, SCHMITZ M. Molecular cloning and characterization of FSH and LH receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 149(1): 108 - 117.
- [23] 陈晓燕. 促性腺激素受体在半滑舌鳎繁殖周期中的作用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [24] VISCHER H F, GRANNEMAN J C, LINSKENS M H, *et al.* Both recombinant African catfish LH and FSH are able to activate the African catfish FSH receptor [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2003, 31(1): 133 - 140.
- [25] VISCHER H F, BOGERD J. Cloning and functional characterization of a gonadal luteinizing hormone receptor complementary DNA from the African catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 68(1): 262 - 271.
- [26] YOU S, KIM H, HSU C C, *et al.* Three different turkey luteinizing hormone receptor (tLH-R) isoforms I: characterization of alternatively spliced tLH-R isoforms and their regulated expression in diverse tissues [J]. *Biology of Reproduction*, 2000, 62(1): 108 - 116.
- [27] ASCOLI M, FANELLI F, SEGALOFF D L. The lutropin/choriogonadotropin receptor perspective [J]. *Endocrine Reviews*, 2002, 23(2): 141 - 174.
- [28] KOBAYASHI T, PAKARINEN P, TORGERSEN J, *et al.* The gonadotropin receptors FSH-R and LH-R of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)-2. Differential follicle expression and asynchronous oogenesis [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 156(3): 595 - 602.
- [29] AN K W, LEE K Y, YUN S G, *et al.* Molecular characterization of gonadotropin subunits and gonadotropin receptors in black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*; Effects of estradiol-17 $\beta$  on mRNA expression profiles [J]. *Comparative Biochemical and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2009, 152(2): 177 - 188.
- [30] 林浩然. 鱼类生理学[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1999: 146 - 240, 188 - 191.
- [31] ROCHA A, ZANUY S, CARRILLO M, *et al.* Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin receptors, steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes in the European sea bass [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 162(3): 265 - 275.
- [32] XIONG F, LIU D, ELSHOTZ H P, *et al.* The chinook salmon gonadotropin  $\text{L}\beta$  subunit gene contains a strong minimal promoter with a proximal negative element [J]. *Molecular Endocrinology*, 1994, 8(6): 771 - 781.
- [33] BANERJEE A, KHAN I A. Molecular cloning of FSH and LH  $\beta$  subunits and their regulation by estrogen in Atlantic croaker [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 155(3): 827 - 837.
- [34] TRUDEAU V L, PETER R E, SLOLEY B D. Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in goldfish [J]. *Biology of Reproduction*, 1991, 44(6): 951 - 960.
- [35] NAGAHAMA Y, YOSHIKUNI M, YAMASHITA M, *et al.* Regulation of oocyte growth and maturation in fish [J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 1995, 30: 103 - 145.

## Cloning of *LHR* and expression analysis during the reproductive cycle in female yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)

LIU Miao<sup>1</sup>, WEN Hai-shen<sup>1,2\*</sup>, HE Feng<sup>1</sup>, LI Ji-fang<sup>1</sup>, MA Rui-qin<sup>1</sup>,  
HU Jian<sup>1</sup>, MU Wei-jie<sup>1</sup>, ZHANG Yuan-qing<sup>1</sup>, QI Bao-xia<sup>2</sup>

(1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia Nationality University, Tongliao 028000, China)

**Abstract:** The complete cDNA sequence of luteinizing hormone receptor (LHR) was cloned through degenerate primer PCR amplification and Smart<sup>TM</sup> Race technology. The length of the cDNA of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) *LHR* gene is 2 524 bp and encodes the protein of 701 amino acids. This gene belongs to glycoprotein hormone receptor (GpHR) family, which contains the conserved seven transmembrane helix domains (TM helix). Meanwhile the amino acids sequence contains nine Leucine-rich repeats (LRRs). Potential N-linked glycosylation sites are <sup>29</sup>NFTC, <sup>82</sup>NVSR, <sup>203</sup>NGSR, <sup>548</sup>NLTV in yellow catfish *LHR* gene and phosphorylation site predictions identified 24 Ser, 6 Thr and 5 Tyr potential phosphorylation sites. By Clustal X and MEGA 4.0 alignment revealed the highly conserved in GpHRs' specific signature sequences: <sup>287</sup>CCAF, <sup>471</sup>ERW, <sup>584</sup>FTD and <sup>657</sup>NPFLY. The only one protein kinase C phosphorylation site is <sup>400</sup>S. Tissue distribution pattern showed preferential expression of *LHR* in ovary, and trace amounts were detected in brain, kidney, heart, liver and intestine (brain > kidney > heart > liver > intestine). Plasma 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>) levels in reproductive cycle were detected by radio immunoassay (RIA). The result showed that the highest peak in reproductive cycle is stage IV. The high transcript level of *LHR* in ovary was revealed in the reproductive phase of ovarian cycle, which was the relatively high expression from III to V phase and the highest level in stage V. And we also analyzed the brain expression level in reproductive cycle, found the highest level in stage IV consistent with the level of E<sub>2</sub>. Results demonstrated the gene of LHR in brain and ovary might also be involved in the processes which preferentially promote vitellogenesis and regulate ovulation maturation and ovulate either indirectly or directly.

**Key words:** *Pelteobagrus fulvidraco*; luteinizing hormone receptor (LHR); gene clone; semi-quantitative RT-PCR mRNA expression

**Corresponding author:** WEN Hai-shen. E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn