

文章编号:1000-0615(2012)04-0497-06

DOI:10.3724/SP.J.1231.2012.27733

牙鲆生长抑素基因的表达及细胞定位

陈晓武, 施志仪*, 江山, 李倩

(上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 采用 RACE 和 荧光定量 PCR 技术克隆牙鲆生长抑素(SS)基因 cDNA 序列并且分析了其在仔鱼期的表达规律, 同时通过免疫细胞化学染色, 对牙鲆胃肠道和脑垂体等器官的生长抑素分泌细胞进行定位。最终获取包含完整编码区的牙鲆 SS 基因 cDNA 序列, 其编码区长为 381 bp, 推测编码的蛋白质为 126 个氨基酸, 其前 23 个氨基酸为信号肽, 分子量为 14.3 ku, 理论等电点为 8.33。牙鲆仔鱼不同发育时期的 SS 基因表达量比较结果表明, 出膜后仔鱼体内 SS 基因表达不断增加, 到变态发育期变化不大, 变态后期又开始显著增加。免疫组织化学染色结果表明, SS 细胞存在于胃、胰腺和脑垂体中。在胃中, 生长抑素分泌细胞主要分布于胃上皮层; 在胰腺中, 生长抑素分泌细胞零散地分布, 血管周围较多; 在脑垂体中细胞密度高, 集中在脑垂体的周边区域。

关键词: 牙鲆; 生长抑素; 序列分析; 免疫组化

中图分类号: Q 785; S 917

文献标志码: A

生长抑素又称生长激素释放抑制因子, 因为能抑制生长激素的释放而得名, 成熟的生长抑素是一种 14 个氨基酸的多肽^[1]。生长抑素在中枢和周围神经系统中表达, 在消化道和其它器官中也有表达, 还能作为神经递质和神经调质抑制促甲状腺素、催乳素、胰岛素和胰高血糖素的释放^[2]。鱼类生长抑素的研究始于 20 世纪 80 年代, 国外完成多种鱼生长抑素分泌细胞的鉴别与定位、基因表达和生长抑素受体克隆等方面的研究工作, 证明生长抑素对某些鱼具有抑制生长, 调节渗透压和参与变态发育等生理功效^[3-5]。国内也有部分淡水、海水鱼生长抑素分泌细胞鉴别和定位的报道, 相关结果也提示生长抑素具有抑制生长、参与发育和生理调控等功能^[6-9]。迄今为止, 多数报道集中在生长抑素细胞的定位, 而生长抑素基因的克隆和分子进化相关资料较少, 从而限制了对该基因的深入研究。所以, 从分子水平上在不同鱼体内对该基因家族进行系统分析是未来研究的重点。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是我国重要的海水养殖鱼类之一, 属近海温水性底栖鱼类。近年来, 牙鲆的人工育苗规模和养殖业发展迅速。随着牙鲆养殖业的发展, 通过内分泌生理学研究提高牙鲆生长速度, 对于促进牙鲆的健康养殖、提高产量具有重要意义。本实验克隆了与牙鲆生长密切相关的生长抑素基因并且进行了组织定位, 分析了其在不同发育时期的表达规律, 为阐明牙鲆下丘脑-垂体生长轴的调控机制积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

5'RACE 试剂盒(Clontech), *Taq* LA DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶、RNAiso 购自 TAKARA 公司。克隆载体 pUCm-T、T₄ 连接酶、X-gal、IPTG、DNase、核酸电泳 Marker 购自北京天根生物公司。大肠杆菌 DH5 α 感受态由本实验室保存。小量胶回收、质粒抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公

收稿日期: 2011-09-14 修回日期: 2011-10-22

资助项目: 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); 上海市教委科研创新项目(12YZ126)

通讯作者: 施志仪, E-mail: zyshi@shou.edu.cn

司。其它生化试剂购自中国医药集团上海化学试剂公司。牙鲆受精卵购自中国水产科学研究院北戴河中心实验站,于自动海水循环系统中进行人工喂养,海水盐度 30,温度控制在 20 °C,仔鱼以人工孵化的卤虫作为饵料。

1.2 RACE 法克隆生长抑素基因 5'端序列

按 RNAiso 试剂说明书提取仔鱼体内总 RNA。紫外线分光光度计测 OD₂₆₀/OD₂₈₀,并估算 RNA 的纯度。取 2 μg RNA 采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。质量合格的 RNA 于-80°C超低温冰箱保存备用。根据牙鲆的 EST 片段(GenBank 登录号: FE043280.1)序列设计 5'RACE 扩增引物: GSP5-TCTTGGTTCTGGTACTGGTC。PCR 扩增条件参照 RACE 试剂盒说明书如下,各取 1 μL 总 RNA 以 5'反转录引物进行反转录合成第一链 cDNA,合成产物加 100 μL Tricine-EDTA 缓冲液-20°C保存,作为 PCR 模板。PCR 体系总体积 50 μL,各种成分如下:灭菌去离子水 34.5 μL,PCR Buffer 5 μL,dNTP mix(10 mmol/L)1 μL,polymerase Mix 1 μL,cDNA 2.5 μL,UPM 5 μL,5'RACE 引物(10 mmol/L) 1 μL。PCR 采用 touch-down 法,步骤一:94 °C 30 s;72 °C 3 min,5 个循环。步骤二:94 °C 30 s;70 °C 30 s;72 °C 3 min,共 5 个循环。步骤三:94 °C 30 s;68 °C 30 s;72 °C 3 min,25 个循环。PCR 产物经过克隆,测序由上海生工生物工程有限公司完成。

1.3 SS 基因的序列分析

使用 NCBI 网站的 ORFfinder 搜索开放阅读框,推算编码的蛋白序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)。Proteinpredict 在线计算蛋白的分子量和等电点等化学特性(<http://www.predictprotein.org/>)。SignalP 3.0 预测信号肽的长度和位置(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。

1.4 定量 PCR 分析

荧光定量 PCR 使用的总 RNA 提取方法同上。反转录和定量 PCR 条件和体系参考 TAKARA 公司 SYBR ExScript RT-PCR Kit 说明书,PCR 总体积为 20 μL,其它组分的含量按比例相应降低。定量 PCR 在 Bio-Rad iCycler 荧光定量 PCR 仪上进行,对样品和标准品进行 PCR 扩增、检测和相对定量分析。标准品 DNA 设置 2 个重复,待测样品 3 个重复。标准曲线和基因表达水平由系统分析,基线由软件自动设置。在 SS 的 3 端非编码区设计定量

PCR 引物: SS-F(CCAGAGGGATGCTGAGAT); SS-R(AGTCGGTGAGGTGAAGGT); 内标 β-actin 引物序列: β-actin-F(GGAAATCGTGCCTGACATT-AAG); β-actin-R(CCTCTGGACAACGGAACCTCT)。

1.5 免疫组织化学定位

固定的牙鲆胃肠道、脑垂体等组织经过梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续切片,厚度为 6 μm,常规 H.E 染色。免疫组织化学染色方法参照 SP 检测试剂盒说明书,过程如下:切片经二甲苯脱蜡、梯度酒精复水后以 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶 10 min,洗净后在室温下与山羊抗血清孵育 15 min,再进入一抗 37 °C 中孵育 2 h,然后分别在生物素化二抗和辣根酶标记链霉卵白素工作液中 37 °C 下孵育 15 min,最后以 DAB 显色。全部过程均在 pH=7.3 环境和湿盒中进行。每种抗体反应时均以相邻切片作为阴性对照。阴性对照除一抗以 PBS 替代之外,其余步骤均同实验组,最后使用 Olympus 显微镜对组织切片进行观察拍照。

2 结果

2.1 牙鲆生长抑素基因克隆

所有提取的总 RNA 样品都经过紫外分光光度计测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值,确保在 1.8~2.0。电泳检测总 RNA 的完整性,RNA 没有降解的样品保留备用。5'RACE 克隆长度为 173 bp,经过与已知 EST 序列拼接后得到全长 656 bp 的 cDNA 序列,5'端和 3'端非编码区长分别为 66 bp 和 209 bp。推测的开放读码可编码 126 个氨基酸的多肽,蛋白质分子量约 14.3 ku,理论等电点(pI)为 8.33,前 23 个氨基酸为信号肽序列(图 1)。

```

CTTCTCTCTCAGTGGCGTTGACTTCTCAGGTTGTTCACTCTCTCTGATAICTACAGGT
1 ATGCAGTGTGTACGTTGTCCCGCTTCTTCATCTCTGTTGGGGTTGGTTCTGTGGGTCGG
1 M Q C V R C P A F F I L V G L V L C G P
61 GTTTTCTCTCAGCCGACAGAGATCAGGACCCAGTACCAGAACCAAGACTGGACCTGGAA
21 Y F S Q P D R D Q D Q Y Q N Q D L D L E
121 CTGCATCATCGCCGCTGCTGCAAAAAGCCCGAGTGGCCGACTCTTACACAGGAGTGG
41 L H H R R L L Q K A R S A G L L T Q E W
181 AGTAAACCTGCTGTTTCAGGACCTGCTGTCTCAGATGTTCTCTGCTAAGCCGACGCCAG
61 S K P A V Q D L L S Q M S L P K A D A Q
241 AGGGATGCTGAGATGGTTTCCACGGCGACAGGAGGAAGATGAACCTGGAGCGTCCATC
81 R D A E M V S T A T G G R M N L E R S I
301 GAACCCCAACAACCTGCCCCCGGAAACGCAAGCTGGGTGCAAGAATCTACTGG
101 E P P N N L P P R E R K A G C K N F Y W
361 AAAGGCTTCACTTCTGTAA
121 K G F T S C *
TGCCCCACCCAGCTGAGGCCACCATCACACACCAAGCAATCGCAGCACCTGACCTTCACTCACC
GACTGGACGGACCAATCAGCAGCTGTGGTGCAGTGTACCTGATAAATATCTATGTAATATCAITTAAG
AAAAATCTGAGAAAAA

```

图 1 牙鲆 SS 基因 cDNA 序列和推测氨基酸序列 下划线的 1~23 位氨基酸表示信号肽序列,“*”表示终止密码子。

Fig. 1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of SS gene

The amino acids underlined from 1-23 is signal peptide. “*” represents termination codon.

2.2 牙鲆 SS 基因在牙鲆不同生长时期的表达差异

牙鲆出膜后仔鱼体内 SS 基因表达随着不同发育时期有一定的变化。出膜前几乎检测不到其表达, 出膜后一直到变态前 SS 基因表达量不断上升, 出膜后 13 天仔鱼的表达量约为出膜后 3 天仔鱼的 2 倍(图 2)。而到变态发育期其表达量出现波动, 差异不显著, 变态后期开始明显上升, 可见该基因的表达量有一定的时间差异。

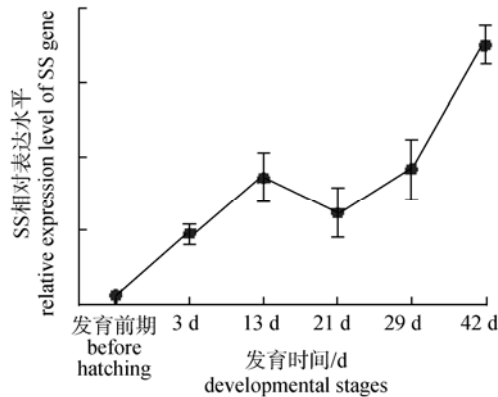


图 2 牙鲆 SS 基因在牙鲆不同发育时期的相对表达量
Fig. 2 Expression of SS gene of *P. olivaceus* during different developmental stages after hatching

2.3 牙鲆生长抑素细胞定位

SS 基因的免疫阳性细胞存在于下丘脑、脑垂体、胃和肝胰脏中, 其他部位均未见明显分布。在胃中, 细胞主要分布于胃黏膜上皮, 以胃部最多, 幽门部较少, 细胞有呈卵圆形, 也有球形、三角形和拉长的纺锤形状。部分细胞可明显看到有极性, 有管状开口朝向胃腔, 细胞体积较大, 胞质内充满棕褐色阳性颗粒, 胞核多居中, 染色浅。牙鲆的胰脏弥散于肝脏之中, 形成肝胰脏。免疫阳性细胞分布于胰腺区内, 多数位于血管周围, 细胞着色深, 呈圆形, 体积小, 胞核不明显。而肝细胞区没有阳性细胞分布。SS 细胞在脑垂体中集中分布于腺垂体, 密度很大, 阳性反应强烈, 在下丘脑也有成片的阳性反应区。因为免疫反应强烈, 细胞连成一片, 难以分辨细胞大小和形态(图版)。

3 讨论

在脊椎动物体内, SS 基因一般有多个拷贝, 其翻译的产物又通过不同方式剪切产生成熟蛋白质。比如在斑马鱼(*Danio rerio*)体内, 通过染色体加倍或串联重复的形式演化出 SS₁, SS₂, SS₃, SS₄, SS₅ 和

SS₆ 共 6 个生长抑素基因^[10]。SS₁ 基因在所有的脊椎中都存在, SS₂ 和 SS₃ 等基因则在鱼类中报道比较多^[11]。SS 基因的蛋白质前体都要经过信号肽酶和转化酶的加工, 形成不同长度的 SS 家族成员。哺乳类动物体内 SS 主要以 2 种成熟体形式存在, 即 SS₁₄ 和 SS₂₈, SS₂₈ 在多肽的氨基端比 SS₁₄ 保留的更长^[12]。不同动物体内 SS₁₄ 具有高度同源性, 已经发现的 SS₁₄ 氨基酸序列基本相同。硬骨鱼类体内至少含有 PSS I 和 PSS II 两种 SS 前体, 经过剪切加工成不同长度的成熟肽^[13], PSS I 和 PSS II 仅有约 30% 的同源性^[14]。石斑鱼(*Anabarilius macrolepis*) PSS II 前体为 127 个氨基酸, 美洲鲈鱼(*Lophius americanus*)为 125 个氨基酸^[15], 而齿蝶鱼(*Pantodon buchholzi*)略短, 包含了 115 个氨基酸^[16]。本研究克隆得到牙鲆 SS 前体长为 126 个氨基酸的多肽和石斑鱼、美洲鲈鱼和齿蝶鱼前肽相似性分别为 82.6%, 70.8% 和 40.6%, 与已经报道的其他动物 PSS I 前体相似性很低。可见, 本实验克隆的牙鲆 SS 为 II 型, 同时也说明 SS II 具有一定的保守性, 部分序列变异则可能是鱼类在适应生活环境变化过程中形成的。

基因表达变化是生命活动调控的重要机制。不同发育阶段、不同生理状态下或发育时期基因的表达决定了生命过程变化, 因此, 比较基因表达可为分析生命活动过程提供重要信息。牙鲆 SS 基因随仔鱼发育时间的增加表达量逐渐增加, 其原因可能是仔鱼组织器官在不断成熟发育成熟, 提示 SS 基因发挥越来越重要的生物学功能。在变态期达到一个相对稳定的水平, 推测是由于变态过程中仔鱼生活习性改变的影响和体内基因调控的结果。

在高等脊椎动物体内, 生长抑素由胃肠道、脑和胰岛的 D 细胞分泌, 部分甲状腺 C 细胞也可表达^[17]。鱼类也有较多报道。在有胃的鱼类, 如河鲈(*Perca fluviatilis*)、云斑鲮(*Xenocypris argentea*)、短盖巨脂鲤(*Colossoma brachypomum*)、尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)^[18]、鳊(*Siniperca chuatsi*)^[19]、黑鲷(*Sparus macrocephalus*)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[20-23] 等体内 SS 细胞仅存在胃黏膜, 肠道中未见到。而非鲫在胃、前肠和中肠中均有分布^[24]。但也有报道大口黑鲈消化道黏膜均未见到 SS 内分泌细胞^[25]。本实验结果表明, 牙鲆仅在胃黏膜中存在

SS 分泌细胞。从形态上看, SS 细胞开口朝向消化腔, 由于观察的方向不同也会出现不同的形态。无胃与有胃鱼由于消化道的结构及食性差异导致所分布的免疫活性内分泌细胞的规律有区别, 说明牙鲆的胃不仅是一个消化器官, 而且还是一个重要的内分泌器官。结果提示在养殖生产中, 有可能利用营养和某些外部条件来调控牙鲆的 SS 的分泌, 提高牙鲆生长速度。

鱼类的胰岛中含有较高比例的 SS 分泌细胞, 而且至少已经发现两种不同的类型。罗非鱼胰岛内有 SS₁₄ 和 SS₂₅ 两种类型的内分泌细胞, SS₁₄ 细胞和胰岛素细胞密切联系, SS₂₅ 细胞则围绕在外。两种细胞所占比例高达 44.9%^[26]。在琵琶鱼(*Lophomus setigrus*)体内, 通过不同的抗体, 发现分泌 SS₁₄ 和 SS₂₈ 的两种细胞, 说明存在两种不同类型的细胞分别加工 SS₁₄ 和 SS₂₈ 两种成熟肽^[27]。金头鲷(*Sparus aurata*)胰腺内, 也发现了 SS₁₄ 和 SS₂₅ 两种内分泌细胞, SS₂₅ 细胞在胰岛外周, 胞质内包含大的中或低密度颗粒, 而 SS₁₄ 细胞位于胰岛中央和胰岛素细胞混合在一起, 胞质内包含了小的颗粒。说明 SS 前体可能在不同的细胞内被加工成 SS₁₄ 和 SS₂₅^[28]。另外, 采用相同类型的 SS 抗体, 方之平等^[24]研究发现, 非鲫胰脏的 SS 分泌细胞集中分布于胰岛中央, 而短盖巨脂鲤的胰岛中则未见 SS 细胞分布。本实验使用的是 SS₁₄ 抗体, 显示牙鲆胰腺内阳性细胞比较多, 多数细胞可见明显的分布在血管周围。人体内生长抑素在脑中的分泌主要通过下丘脑室周核具有神经内分泌功能的神经元细胞分泌, 再通过神经轴突运输到垂体前叶。在牙鲆的垂体前叶和下丘脑都检测到集中分布的 SS 细胞, 结果和高等脊椎动物类似。上述结果提示牙鲆生长抑素在消化道、脑和胰腺中具有不同的分泌形式和作用机理。

参考文献:

- [1] Shen L P, Pictet R L, Rutter W J. Human somatostatin I: sequence of the cDNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982, 79(15): 4575–4579.
- [2] Larsson L I, Goltermann N, de Magistris L, et al. Somatostatin cell processes as pathways for paracrine secretion[J]. Science, 1979, 205(4413): 1393–1395.
- [3] Andrews P C, Dixon J E. Isolation and structure of a peptide hormone predicted from a mRNA sequence. A second somatostatin from the catfish pancreas[J]. Journal of Biological Chemistry, 1981, 256(16): 8267–8270.
- [4] Very N M, Knutson D, Kittilson J D, et al. Somatostatin inhibits growth of rainbow trout[J]. Journal of Fish Biology, 2001, 59(1): 157–165.
- [5] Sheridan M A, Eilertson C D, Kerstetter T H. Changes in plasma somatostatin associated with seawater adaptation and stunting of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*[J]. Aquaculture, 1998, 168(1–4): 195–203.
- [6] 方静, 樊均德, 何敏. 生长抑素在齐口裂腹鱼消化道和脑中的定位[J]. 水生生物学报, 2009, (3)33: 478–483.
- [7] 叶星, 李文笙, 林浩然. 鱼类生长抑素及其受体的研究进展[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 264–272.
- [8] 俞菊华, 夏德全, 杨弘, 等. RACE法分离团头鲂生长抑素全长cDNA及其序列测定[J]. 水产学报, 2003, 27(6): 533–539.
- [9] 舒妙安, 徐海圣, 朱有法, 等. 黄鳝胃肠的生长抑素分泌细胞及超微结构[J]. 水产学报, 2002, 26(3): 202–216.
- [10] Liu Y, Lu D, Zhang Y, et al. The evolution of somatostatin in vertebrates[J]. Gene, 2010, 463(1–2): 21–28.
- [11] Andrews P C, Pollock H G, Elliott W M, et al. Isolation and characterization of a variant somatostatin-14 and two related somatostatins of 34 and 37 residues from lamprey (*Petromyzon marinus*)[J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(30): 15809–15814.
- [12] Lin X W, Otto C J, Peter R E. Evolution of neuroendocrine peptide systems: gonadotropin-releasing hormone and somatostatin[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 1998, 119(3): 375–388.
- [13] Moore C A, Kittilson J D, Ehrman M M, et al. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess two somatostatin mRNAs that are differentially expressed[J]. American Journal of Physiology, 1999, 277(6 Pt 2): R1553–R1561.
- [14] Conlon J M, Tostivint H, Vaudry H. Somatostatin- and urotensin II-related peptides: molecular diversity and evolutionary perspectives[J]. Regulatory Peptides, 1997, 69(2): 95–103.
- [15] Spiess J, Noe B D. Processing of an anglerfish somatostatin precursor to a hydroxylysine-containing somatostatin 28[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985, 82(2): 277–281.
- [16] Youson J H, Al-Mahrouki A A, Amemiya Y, et al. The fish endocrine pancreas: review, new data, and future research directions in ontogeny and phylogeny[J]. General and Comparative Endocrinology, 2006, 148(2): 105–115.
- [17] Alumets J, Sundler F, Hakanson R. Distribution, ontogeny and ultrastructure of somatostatin immunoreactive cells in the pancreas and gut[J]. Cell and Tissue Research, 1977, 185(4): 465–479.
- [18] Noaillac-Depeyre J H E. Evidence for somatostatin, gastrin and pancreatic polypeptide-like substances in the mucosa cells of the gut in fishes with and without stomach[J]. Cell and Tissue Research, 1981, 216(1): 193–203.

- [19] 潘黔生, 方之平. 几种激素在鳃胃肠道内分泌细胞中存在的免疫细胞化学证据[J]. 水生生物学报, 2001, 25(6): 565-570.
- [20] 王寿昆, 李君秋, 林建斌, 等. 褐牙鲆消化道内分泌细胞免疫组织化学的定位[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2007, 36(2): 171-175.
- [21] 林树根, 杨志峰, 王寿昆. 黑鲷消化道内分泌细胞免疫组织化学的定位[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2006, 35(1): 77-81.
- [22] 林树根, 黄小华, 吴德峰. 花鲈消化道内分泌细胞的鉴别和定位[J]. 水生生物学报, 2005, 29(1): 7-12.
- [23] 林树根, 吴德峰, 王寿昆. 日本鳗鲡胃肠胰内分泌细胞的鉴别与定位[J]. 水产学报, 2003, 27(6): 513-518.
- [24] 方之平, 潘黔生. 两种有胃真骨鱼胃肠胰系统中内分泌细胞的鉴别与定位[J]. 华中农业大学学报. 1997, 16(6): 594-598.
- [25] Pan Q S, Fang Z P, Huang F J. Identification, localization and morphology of APUD cells in gastroenteropancreatic system of stomach-containing teleosts[J]. World Journal of Gastroenterology, 2000, 6(6): 842-847.
- [26] Yang H, Morrison C M, Conlon J M, *et al.* Immunocytochemical characterization of the pancreatic islet cells of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. General and Comparative Endocrinology, 1999, 114(1): 47-56.
- [27] McDonald J K, Greiner F, Bauer G E, *et al.* Separate cell types that express two different forms of somatostatin in anglerfish islets can be immunohistochemically differentiated[J]. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1987, 35(2): 155-162.
- [28] Abad M E, Garcia A A, Lozano M T, *et al.* Somatostatin 14- and somatostatin 25-like peptides in pancreatic endocrine cells of *Sparus aurata* (teleost): a light and electron microscopic immunocytochemical study[J]. General and Comparative Endocrinology, 1992, 86(3): 445-452.

Expression and cellular localization of somatostatin from *Paralichthys olivaceus*

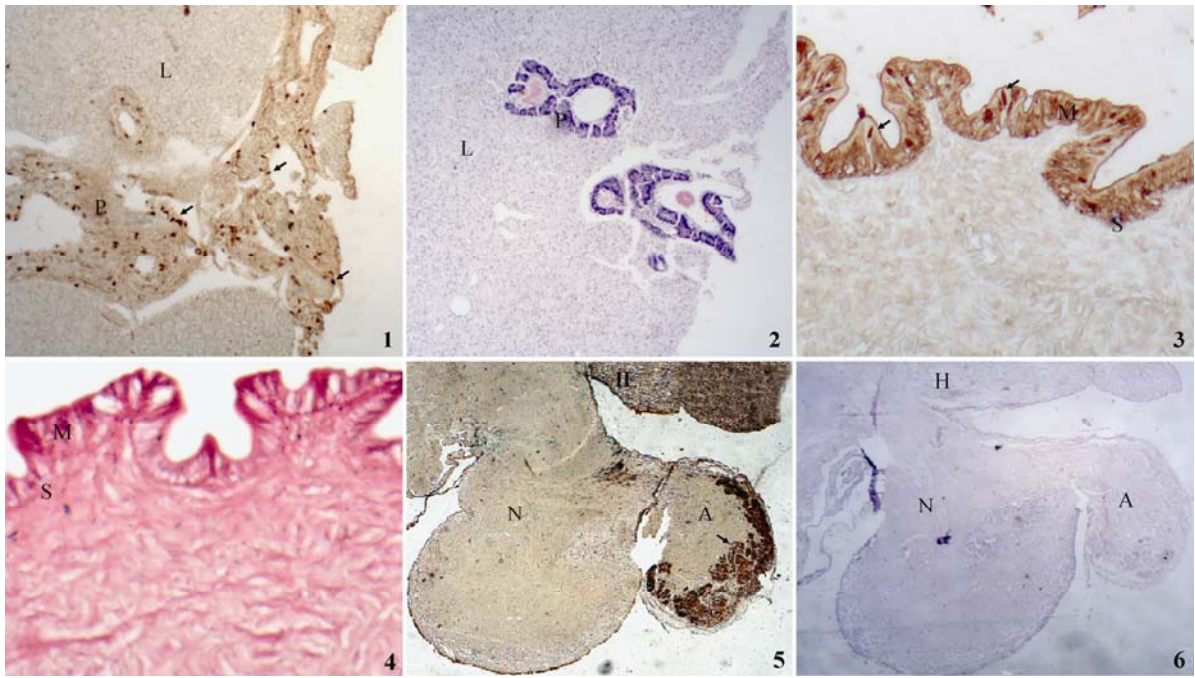
CHEN Xiao-wu, SHI Zhi-yi*, JIANG Shan, Li Qian

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306)

Abstract: Somatostatin (SS) called also somatotropin release-inhibiting factor is a peptide named for its ability to inhibit pituitary growth hormone release. To facilitate investigation of the SS function in the teleost, its coding sequence in *paralichthys olivaceus* was isolated by the technique of Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE). SYBR Green I Quantitative Real-time PCR analysis and immunohistochemistry were used to assess the expression of SS at mRNA and protein level. The deduced protein sequence contains 126 amino acid residues and a predicted molecular mass of 14.3 kD. Very low level of SS mRNA is presented during the first three days after hatching. The expression level of the SS gene was increased constantly before metamorphosis and steadily during the metamorphosis, then increased significantly during post-metamorphosis. There was no SS-positive reaction in the oropharyngeal cavity and esophagus. SS secreting cells are only distributed in the stomach, pancreas and pituitary. Several types of SS secreting cells could be distinguished in above organs. In stomach, SS secreting cells are dispersively distributed among the epithelium cells, presenting various kinds of forms such as ovoid, globular, triangle, elongated or spindle-shaped aspects. The pancreas and liver of flounder combine into a single organ named hepatopancreas, and SS-positive cells are only located in the pancreas, showing as globular-shaped, most of them are closed to blood vessels. SS-positive cells at high density are located in pars distalis of pituitary, so it is difficult to distinguish the shape of those cells.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; somatostatin; sequence analysis; immunohistochemistry

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



图版 牙鲆SS细胞的免疫学定位

1. 肝胰腺, 免疫组化染色, $\times 200$; 2. 肝胰腺, H.E染色, $\times 100$; 3. 胃, 免疫组化染色, $\times 200$; 4. 胃, H.E染色, $\times 200$; 5. 脑垂体, 免疫组化染色, $\times 40$; 6. 脑垂体, H.E染色, $\times 40$ 。缩写: L: 肝; P: 胰; M: 粘膜; S: 粘膜下层; H: 下丘脑; N: 神经垂体; A: 腺垂体。箭头示阳性细胞。

Plate Immunohistochemical observations of SS cells of *P. olivaceus*

1. hepatopancreas, immunohistochemistry, $\times 200$; 2. hepatopancreas, H.E, $\times 100$; 3. stomach, immunohistochemistry, $\times 200$; 4. stomach, H.E, $\times 200$; 5. pituitary, immunohistochemistry, $\times 40$; 6. pituitary, H.E, $\times 40$. Abbreviation: L: liver; P: pancreas; M: mucosus; S: submucosus; H: hypothalamus; N: neurohypophysis; A: adenohypophysis. Arrow indicates the positive cells.