

doi: 10.7541/2015.147

乙炔基雌二醇(EE2)对雄性黄颡鱼 *GtH* 3 个亚基基因表达的影响

谭 号 李英文 饶剑军 刘智皓

(重庆师范大学生命科学学院, 重庆市高校生物活性物质工程研究中心, 重庆市高校动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要: 为研究乙炔基雌二醇(EE2)是否能影响雄性黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)垂体中促性腺激素 3 个亚基基因的表达, 从而干扰 FSH 和 LH 的分泌, 研究采用末端快速扩增(RACE)的方法在黄颡鱼垂体中克隆了促性腺激素的 2 个 β 亚基(*FSH β* 和 *LH β*)的全长 cDNA, 对其组织表达模式和雌雄性垂体中的季节表达模式进行了研究; 另外, 研究还用 100 ng/L 的 EE2 对雄性黄颡鱼(2 龄)进行了 28d 的暴露处理。结果发现, 黄颡鱼 *FSH β* cDNA 全长 528 bp, ORF 为 399 bp, 编码 132 个氨基酸; *LH β* 全长为 870 bp, ORF 为 417 bp, 编码 138 个氨基酸。序列分析结果表明, 黄颡鱼 *FSH β* 含有一个 17 氨基酸的信号肽, 2 个保守的 N-糖基化位点和 13 个半胱氨酸残基, 而 *LH β* 含有一个 18 个氨基酸的信号肽, 1 个 N-糖基化位点和 12 个半胱氨酸残基, 与其他鲶形目鱼类极其相似。进化分析显示, 黄颡鱼 *FSH β* 和 *LH β* 与鲶形目的鱼类进化关系较近。组织分布结果发现, 黄颡鱼 3 亚基均仅在垂体中表达。季节表达模式结果表明, 雌雄黄颡鱼 *GtH α* 和 *LH β* 表达水平在 5 月份左右达到最高, 随后降低; *FSH β* 在雌性的表达模式与 *GtH α* 和 *LH β* 相同, 而在雄性, *FSH β* 的表达没有明显变化。半定量 RT-PCR 结果显示, 100 ng/L 的 EE2 能显著抑制黄颡鱼促性腺激素 3 个亚基基因的表达。研究认为, EE2 抑制黄颡鱼雄性垂体 FSH 和 LH 的分泌, 可能阻碍其正常的精子发生、精子成熟和排精过程, 从而影响其正常的繁殖和发育。

关键词: 黄颡鱼; 促性腺激素 β 亚基; cDNA 克隆; 基因表达; 乙炔基雌二醇

中图分类号: X174 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2015)06-1117-09

内分泌干扰物(EDC, Endocrine Disrupting Chemicals)能模拟动物内源激素的生理生化功能, 改变动物体内源激素的合成、代谢或与激素受体的结合, 从而干扰动物内分泌系统^[1]。更多的研究表明, EDC 不仅对高等动物影响巨大^[2], 对低等脊椎动物(包括鱼类)同样危害极大。EDC 暴露的鱼类会发生性腺发育异常、生殖能力下降、配子发生障碍等^[3, 4]。因此, 对 EDC 影响鱼类性腺发育和配子发生及其可能的分子机制逐渐成为鱼类生理学和生态毒理学研究的热点。

鱼类的性腺发育和配子发生不仅受到性腺局部因子的调节, 还受到垂体细胞合成与分泌的糖蛋白激素——促性腺激素(Gonadotropin hormone, *GtH*)的调节, 其功能包括促进生殖细胞(配子)的生长、发

育、成熟、排精及排卵等^[5]。在哺乳动物中促性腺激素有 2 种: 促卵泡刺激素(Follicular stimulating hormone, FSH)和促黄体生成素(Luteinizing hormone, LH)。鱼类也有 2 种促性腺激素, 即 *GtH* I 和 *GtH* II, 分别对应于哺乳动物的 FSH 和 LH^[6]。这 2 种激素由相同的 α 亚基分别与不同的 β 亚基(*FSH β* 或 *LH β*)组成^[7, 8]。尽管下丘脑-垂体-性腺轴对鱼类内分泌系统至关重要^[9], 但相关研究集中在 EDC 对鱼类性腺发育的影响, 关于 EDC 对鱼类垂体的影响研究较少。

乙炔基雌二醇(EE2, 17 α -ethynylestradiol), 是长江污染水体中的典型 EDC 之一^[10], 浓度可达 2.67 ng/L^[11, 12]。由于 EE2 分布广泛且具有强烈的雌激素效应(比雌二醇(E2, 17 β -estradiol)高 1—5 倍^[13, 14]), 能严重影响鱼类雄性的精巢发育和精子功能, 甚至

收稿日期: 2014-11-24; 修订日期: 2015-03-02

基金项目: 重庆市科委项目(cstc2012jjA20006); 重庆市教委项目(KJ130622); 重庆师范大学校级项目(12 xlb005)资助

作者简介: 谭号(1989—), 男, 湖北利川人; 硕士研究生; 主要从事鱼类生殖生理和分子内分泌研究。E-mail: hardytam@163.com

通信作者: 刘智皓; E-mail: minenut@163.com

导致精巢畸变和繁殖障碍^[15-19]。黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)俗称黄腊丁, 属鲶形目(Siluriformes), 鲶科(Bagridae), 黄颡鱼属(*Pelteobagrus*), 是长江流域重要的养殖鱼类和捕捞对象。已有研究表明, EE2 能严重影响黄颡鱼雄性幼鱼的精巢发育和精子发生^[20], 但 EE2 是否能影响雄性黄颡鱼垂体中促性腺激素的分泌, 进而造成精巢发育和精子发生障碍, 尚不得而知。

本研究在黄颡鱼垂体中克隆了促性腺激素 2 个 β 亚基(*FSH β* 和 *LH β*)的全长 cDNA(*GtHa* 已克隆), 对其组织表达模式和季节表达模式进行了研究。同时, 本研究用 100 ng/L 的 EE2 对雄性黄颡鱼(2 龄)进行了 28d 的暴露处理, 并用半定量 PCR 的方法检测了 EE2 对促性腺激素 3 个亚基基因(*GtHa*、*FSH β* 和 *LH β*)mRNA 水平的影响, 以探讨 EE2 对垂体中促性腺激素分泌的影响。

1 材料与方法

1.1 样本采集与处理

实验所用黄颡鱼雌雄性成鱼购自重庆盘溪水产市场。解剖雌雄黄颡鱼成鱼各组织(T. 精巢、O. 卵巢、H. 心脏、S. 脾脏、HK. 头肾、K. 肾脏、I. 肠、P. 垂体、B. 脑、M. 肌肉、L. 肝脏), 迅速放入液氮中速冻, -80℃ 保存备用。

1.2 总 RNA 提取和第一链 cDNA 的合成

根据 Trizol(Invitrogen)说明书, 从黄颡鱼成鱼提取垂体总 RNA, 并测定其浓度。取 1 μ g 总 RNA, 经 gDNA Eraser(TaKaRa)去除基因组 DNA 后, 按 PrimeScript RT reagent Kit(TaKaRa)说明书合成第一链 cDNA。

1.3 引物设计

根据 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上公布的斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、革胡子鲶(*Clarias gariepinus*)、南方鲇(*Silurus meridionalis*)等 *FSH β* 和 *LH β* 的 cDNA 序列, 在其保守区域设计引物, 其中黄颡鱼 *GtHa* 序列号: ACX37700(本实验所用引物见表 1、序列号见表 2)。

1.4 *FSH β* 和 *LH β* 亚基 cDNA 的克隆

利用已合成的第一链 cDNA 在 PCR 扩增仪(Bio-Rad IQ5)上扩增中间片段。扩增条件为: 94℃ 3min, 35 个循环的 94℃ 30s, 52℃ 30s, 72℃ 30s, 延伸 7min。扩增片段在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭(EB)染色后, 在凝胶成像系统上分析。目的片段用胶回收试剂盒(Geneview)纯化后亚克隆入 pMD19-T 载体(TaKaRa), 随后用 CaCl_2 法转化到大肠杆菌 DH5 α , 经蓝白斑筛选后, 将阳性克隆送上海英骏公司(Invitrogen)测序。

根据测序验证后的中间片段序列设计 RACE 引

表 1 引物序列
Tab. 1 The primer sequences

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	目的 Purpose
GtH-F	TGTGAAGAGTGCAAACCTCAAG	中间片段、表达调控 Partial cDNA and regulation
GtH-R	GTGCTGCAATGGCAGTCTGT	
FSH-F1	ATTTCCATCACCGTGAGAG	
FSH-R1	ACTGGCTGCACTCACAGCT	
LH-F1	CACTGCGAACCCGTTAATGAG	
LH-R1	GGATTTCAGGCTCTCGATGGT	
FSH-RF	CATCACCATCAACACCACAGCCTGC	3'末端扩增
LH-RF	TGGACACCTCGGACTGTACCATCG	3'RACE
FSH-RR	TGTCCAGCTCTCGAAATTACAGGTGTCC	5'末端扩增
LH-RR	CCGTTTCATAGCGACATCTCTGTAGGT	5'RACE
FSH-F2	GGCGATGATGTGCAGAGT	全长验证 Validation of full length cDNA
FSH-R2	AGTTGTTGTGTGAAATAATGTGA	
LH-F2	AGCCTGCTGAGCGATCTT	
LH-R2	ATTTTATTCACAGTCATACTAGC	
β -actin-F	GCTGTGCTGTCCCTGTATG	内参
β -actin-R	GTGCCCATCTCCTGCTCG	Internal control

物, 扩增黄颡鱼 *FSHβ* 和 *LHβ* cDNA 的 5'和 3'末端, 步骤参照 SMART™ RACE cDNA Amplification kit (Clontech)说明书进行。根据测序得到 5'序列和 3'序列进行拼接, 并进行 End-to-End PCR 扩增验证。引物见表 1。

1.5 *FSHβ* 和 *LHβ* 亚基序列的同源性分析

根据已获得的 *FSHβ* 和 *LHβ* 全长 cDNA 序列, 应用 DNASTar 和 Clustal X 软件推导其氨基酸序列并进行多重序列对比分析。用 Mega5.0 软件构建系统进化树, 进化树中的数值表示随机进行 1000 次计算的重复率, 代表该进化树的可靠性。除澳洲鳎鲡 (*Anguilla australis*)部分氨基酸序列由 EST 推导外, 其他物种 *FSHβ* 和 *LHβ* 氨基酸序列均从 GenBank 下载。序列号见表 2。

1.6 黄颡鱼 *GtH* 3 个亚基的组织表达模式

根据 Trizol(Invitrogen)说明书, 用-80℃保存备用的各组织提取总 RNA。取 1 μg 总 RNA, 用 gDNA Eraser (TaKaRa)去除基因组 DNA 后, 合成第一链 cDNA。用基因特异性引物(*GtHα*-F/R、*FSHβ*-F1/R1 和 *LHβ*-F1/R1)研究 3 个亚基基因在黄颡鱼各组织中的表达模式, 并以 *β-actin* (*β-actin* F/R) (252 bp)作为内参。含质粒和蒸馏水为模板扩增的产物分别作为阳性和阴性对照。扩增条件为: 为 94℃ 3min, 25(目的基因)和 20(*β-actin*)个循环的 94℃ 30s, 55℃和 52℃ 30s, 72℃ 30s, 延伸 7min。PCR 产物在 1%的琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色后在凝胶成像系统上进行

拍照、分析。

1.7 季节表达模式的研究

在 2013 年的 2、5、8、9 和 12 月分别收集黄颡鱼雌雄成鱼各 6 尾, 作为 6 个平行样, 取其垂体, 液氮速冻后, -80℃保存备用。PCR 扩增检测方法见 1.6。数据用 6 尾鱼的平均值±标准误(Mean±SE)表示。结果用 SPSS 13.0 (Chicago, USA)进行方差分析和差异比较, *P*<0.05, 差异显著。柱形图用 GraphPad Prism 5(San Diego, CA)进行绘制。

1.8 雄性黄颡鱼的 EE2 暴露处理

2014 年 10 月, 于重庆盘溪水产市场购得雄性黄颡鱼(2 龄)50 尾, 选取体长[(15.20—17.80) cm]和体重[(62.20—70.51) g]相当的黄颡鱼共 36 尾。饲养水温(24±1)℃, 自然光周期, 每天喂食 2 次。驯养 2 周后, 将上述实验鱼随机分为 6 组: 3 个对照组(C, 0.05% DMSO)和 3 个 EE2(100 ng/L)处理组, 每组 6 尾。在暴露处理的 7d、14d 和 28d 取材, 每组取 2 尾鱼的垂体组织, 液氮速冻后, -80℃保存备用。实验方法和数据处理见方法 1.7。

2 结果

2.1 *FSHβ* 和 *LHβ* 克隆结果

采用 RT-PCR 和 RACE 的方法克隆得到黄颡鱼 *FSHβ* (KP036408)和 *LHβ* (KP036409)全长 cDNA 序列, 其中 *FSHβ* 长 528 bp, 包含 5'非编码区(Untranslated region, UTR)6 bp, 3'UTR 123 bp, ORF 为 399 bp, 编

表 2 物种及其序列号
Tab. 2 The species and the corresponding accession numbers

物种 Species	序列号 Accession (<i>FSHβ</i>)	序列号 Accession (<i>LHβ</i>)
斑点叉尾鲟 <i>Ictalurus punctatus</i>	NP_001187008	NP_001187008
革胡子鲶 <i>Clarias gariepinus</i>	AAN75753	P53543
南方鲶 <i>Silurus meridionalis</i>	AAN75753	AAY42269
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_991187	NP_991185
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	NP_001118058	NP_001117677
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	S21367	AAP49576
星点东方鲀 <i>Takifugu niphobles</i>	AB543564	AB543563
澳洲鳎鲡 <i>Anguilla australis</i>	AEC03631	ADQ85929
褐石斑鱼 <i>Epinephelus bruneus</i>	ABQ57399	ABQ57400
密河鳄 <i>Alligator mississippiensis</i>	NP_001274534	AB575982
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	BAC75930	ADY03193
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_032071	NP_032523
人 <i>Homo sapiens</i>	NP_001018090	NP_000885

码 132 个氨基酸; *LH β* 长 870 bp, 包含 5'UTR 105 bp, 3'UTR 348 bp, ORF 为 417 bp, 编码 138 个氨基酸。

2.2 序列及系统进化分析

多重序列对比发现, 黄颡鱼与鲶形目的斑点叉尾鲷、革胡子鲶和南方鲶的氨基酸序列高度保守。黄颡鱼 FSH β 和 LH β 分别有 2 个和 1 个糖基化位点, 同时含有 13 个和 12 个半胱氨酸残基位点, 与其他

鲶形目鱼类高度保守, 同时还发现, 黄颡鱼 FSH β 和 LH β 各自含有 17 和 18 个氨基酸组成的信号肽。

系统进化分析结果表明, 鱼类和四足类 FSH β 和 LH β 均明显分为两支。其中, 黄颡鱼 FSH β 和 LH β 在鱼类中与同为鲶形目的斑点叉尾鲷、革胡子鲶、南方鲶的进化距离最近, 其次与鲤形目的斑马鱼较近, 与其他物种鱼类较远, 而与四足类最远(图 1)。

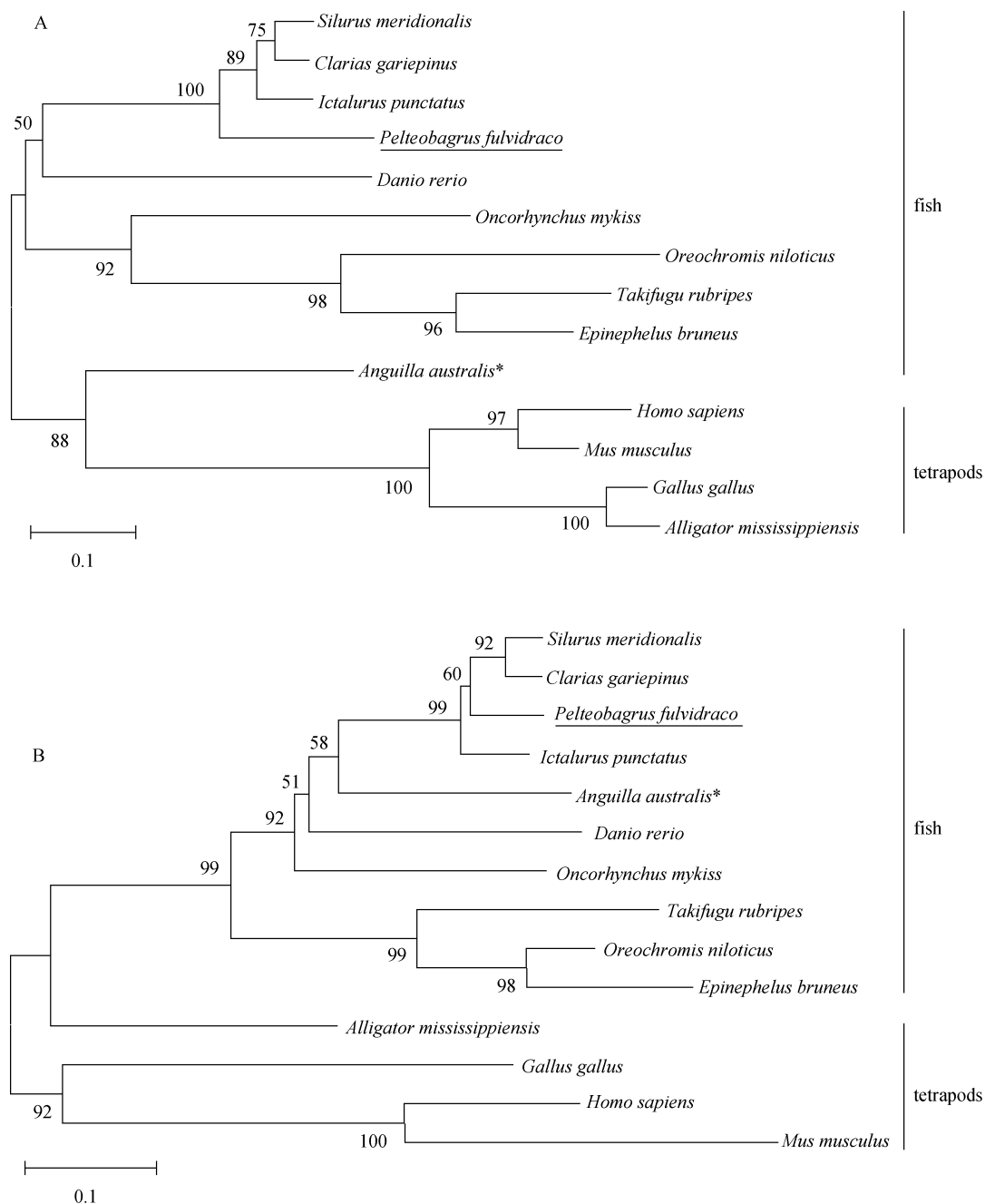


图 1 黄颡鱼与其他脊椎动物 FSH β (A)和 LH β (B)的系统进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree based on the sequences of FSH β (A) and LH β (B) of yellow catfish and other vertebrates
下划线示黄颡鱼, 星号示部分序列

Pelteobagrus fulvidraco marked undreline; asterick. partial sequences

2.3 组织表达模式

组织表达模式的研究结果表明, 黄颡鱼促性腺激素三个亚基 *GtHa*、*FSHβ* 和 *LHβ* 仅在雌雄垂体中表达, 而在性腺等其他组织中没有表达(图 2)。

2.4 季节表达模式

季节表达模式的研究结果表明, 黄颡鱼雌鱼 *GtHa*、*FSHβ* 和 *LHβ* 表达水平均在 2 到 5 月份达到最高, 而在 8 月、9 月和 12 月不同程度上显著性下调(图 3A、B、C)。与雌性的结果相似, 雄鱼 *GtHa*、*FSHβ* 和 *LHβ* 表达水平在 2 到 5 月份也达到最高, *GtHa* 和 *LHβ* 表达水平开始呈上调趋势, 随后显著

抑制(图 3D、F); 不同的是, *FSHβ* 的表达水平表现出逐月下调的变化趋势(图 3E), 但差异不显著。

2.5 EE2 对基因表达的影响

半定量 RT-PCR 结果显示, EE2 在处理 28d 显著抑制黄颡鱼促性腺激素 3 个亚基的表达。在处理 7d, *GtHa* 和 *LHβ* 的表达呈上升趋势, 且 *LHβ* 的表达显著上调; 处理 14d 后, *GtHa* 和 *LHβ* 的表达和处理组 7d 相比呈下调趋势, 其中 *LHβ* 的表达显著下调(图 4A、C); 不同的是, EE2 处理后 7d, *FSHβ* 的表达量没有变化, 处理后 14d, 表达量开始显著下调(图 4B)。

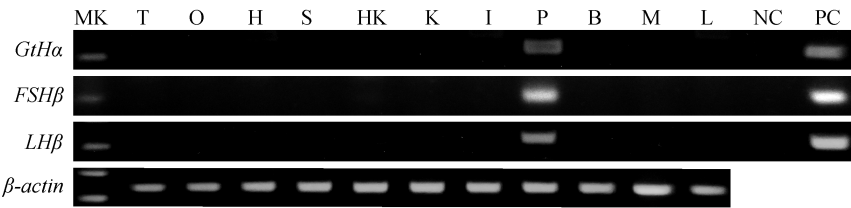


图 2 *GtHa*、*FSHβ* 和 *LHβ* 在黄颡鱼各组织中的表达

Fig. 2 The tissue-specific expression of *GtHa*, *FSHβ* and *LHβ* in *Pelteobagrus fulvidraco*

T. 精巢、O. 卵巢、H. 心脏、S. 脾脏、HK. 头肾、K. 肾脏、I. 肠、P. 垂体、B. 脑、M. 肌肉、L. 肝脏、NC. 阴性对照、PC. 阳性对照、 β -actin 作为内参基因
T. testis; O. ovary; H. heart; S. spleen; HK. head kidney; K. kidney; I. intestines; P. pituitary; B. brain; M. muscle; L. liver; NC. negative control; PC. positive control; β -actin was used as the internal control

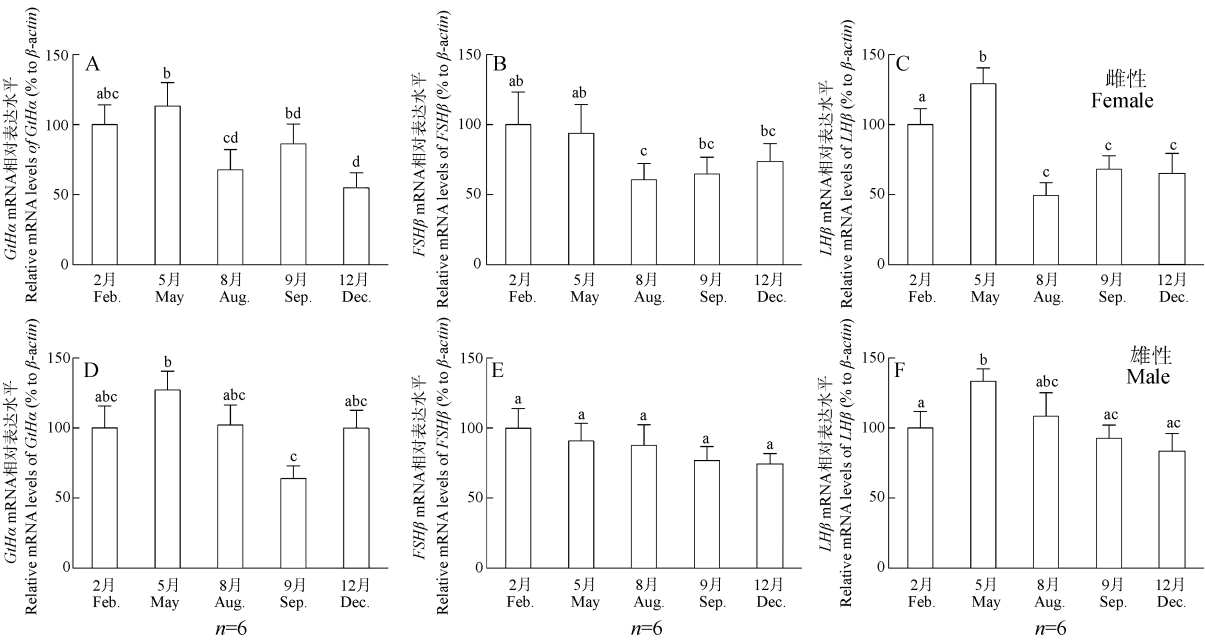


图 3 *GtHa*(A、D)、*FSHβ*(B、E)和 *LHβ*(C、F)在雌雄黄颡鱼垂体中的季节表达模式

Fig. 3 The seasonal pattern of expression of *GtHa* (A, D), *FSHβ* (B, E) and *LHβ* (C, F) in the pituitary of *Pelteobagrus fulvidraco*
a, b, c, d, 差异显著 ($P < 0.05$); $n = 6$
a, b, c & d, were significantly different ($P < 0.05$); $n = 6$

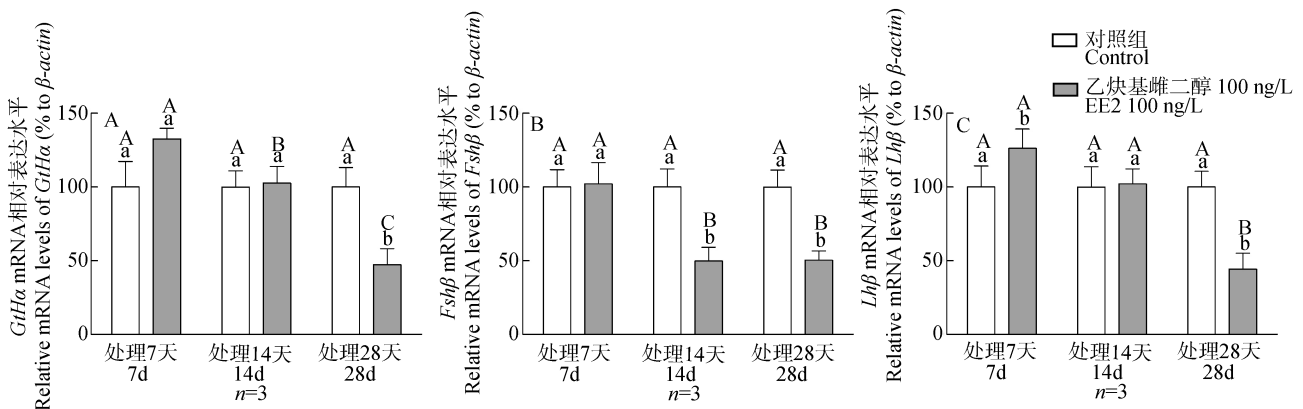


图4 EE2对黄颡鱼雄性幼鱼垂体 *GtHa*(A)、*FSHβ*(B)和 *LHβ*(C)表达的影响

Fig. 4 The effects of EE2 on the expression of *GtHa* (A), *FSHβ* (B) and *LHβ* (C) mRNA in male *Pelteobagrus fulvidraco*

大写字母, 同组不同时间结果的显著性差异 ($P < 0.05$); 小写字母, 不同组相同时间结果的显著性差异 ($P < 0.05$)。d, 处理后天数。n=3

Uppercase letters indicated significant differences in the same group at different time points ($P < 0.05$). Lowercase letters indicated significant differences at the same time point in different groups ($P < 0.05$). d: days after treatment. n=3

3 讨论

3.1 *FSHβ* 和 *LHβ* 序列分析

本研究利用 RT-PCR 和 RACE 的方法从黄颡鱼垂体中扩增出了 *FSHβ* 和 *LHβ* cDNA 全长序列。推导的氨基酸多重序列分析发现, *FSHβ* 和 *LHβ* 与同为鲶形目的斑点叉尾鲇同源性最高, 其次革胡子鲇和南方鲇。黄颡鱼 *FSHβ* 成熟肽序列中含有 2 个 N-糖基化位点, 13 个保守的 Cys 和 17 个氨基酸组合成的信号肽, 而 *LHβ* 成熟肽含有 1 个 N-糖基化位点, 12 个保守的 Cys 和 18 个氨基酸组合成的信号肽。众所周知, 蛋白质的一级结构决定高级结构, 高级结构则决定蛋白质的功能, 而 N-糖基化位点和 Cys 残基为 *FSHβ* 和 *LHβ* 蛋白折叠、特异性受体结合等功能所必需^[21]。黄颡鱼 *FSHβ* 和 *LHβ* 保守的 N-糖基化位点和 Cys 残基数量充分说明 *FSHβ* 和 *LHβ* 的结构和功能可能在鱼类进化中具有高度保守性, 与南方鲇的研究相似^[22]。系统进化分析结果表明, 黄颡鱼的 *FSHβ* 和 *LHβ* 分别与鲶形目鱼类的 *FSHβ* 和 *LHβ* 聚为一小分支, 二者与硬骨鱼的鱼类聚为一大分支, 与四足类再聚为一分支, 按照其分类地位严格聚类。

3.2 *FSHβ* 和 *LHβ* mRNA 组织表达分析

组织表达模式的结果表明, *GtHa*、*FSHβ* 和 *LHβ* 仅在垂体中表达, 而在其他已研究的组织中不表达, 表明垂体是黄颡鱼 FSH 和 LH 的主要分泌器官。不同的是, 在南方鲇中, *GtH* 3 个亚基不仅在垂体中表达, 还在卵巢中表达, 其中 *FSHβ* 在雌性南方鲇肠中

也有微弱表达^[22]。更有趣的是, 斑马鱼、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 和条石鲷 (*Oplegnathidae fasciatus*) 的 *FSHβ* 和 *LHβ* 不仅垂体和卵巢中表达, 在脑和肝等组织也有微弱表达^[23—25], 表明 *GtH* 3 个亚基基因的组织表达模式具有显著的物种差异性。

3.3 季节表达模式的分析

有研究表明, 黄颡鱼为周年产卵性鱼类, 其繁殖季节主要集中在每年的 5—7 月, 此时黄颡鱼排卵和排精最为旺盛^[26, 27]。在雌性中, FSH 主要参与卵母细胞分化、发育和卵黄的积累, 而 LH 则参与卵母细胞的成熟与排卵, 因而鱼类 FSH 分泌量的峰值要早于 LH^[9]。本研究的结果显示, 黄颡鱼雌性垂体 *LHβ* 表达的峰值出现在 5 月份, 略早于其繁殖季节; 而 *FSHβ* 的峰值出现在 2 月份左右, 早于 *LHβ* 的峰值, 与周年产卵性鱼类雌性卵母细胞发育的特点密切相关^[28]。而在雄性, FSH 主要参与精子发生和减数分裂, LH 则主要参与精子的成熟和排精^[9]。本研究的结果表明, 黄颡鱼雄性垂体 *LHβ* 的峰值也出现在 5 月, 与其在雌性的峰值出现时间完全相同。*LHβ* 的表达在鱼类雌雄性同时出现峰值^[26, 27], 为保证雌雄鱼能在相对固定的时间同时形成成熟的配子, 成功进行繁殖至关重要。然而, 与雌性 *FSHβ* 的峰值出现在 2 月份不同, 雄性 *FSHβ* 的表达相对稳定, 没有明显的季节差异。与之相对应的是, 黄颡鱼雄性比雌性多一次繁殖高峰^[26, 27], 表明黄颡鱼雄性可能具有长时间持续产生精子的潜力, 暗示 FSH 在雄性的水平可能常年处于较高水平, 与本研究的结果一致。黄颡鱼雄性的繁殖高峰多于雌性, 很可能是黄

鲮鱼一种特殊的繁殖策略。

3.4 EE2 对 FSH 和 LH 分泌的影响

黄颡鱼是我国长江流域重要的养殖对象和捕捞品种,经济效益巨大。但近年来的研究表明,长江流域逐渐成为 EDC 污染的重灾区,且呈日趋恶化的态势,严重威胁长江经济鱼类正常的生长和繁殖^[11]。其中,EE2 作为一种典型的内分泌干扰物,能严重影响鱼类雄性的精巢发育和精子发生^[29]。然而,国内外学术界对 EE2 影响长江经济鱼类的报道很少。前期研究表明,EE2 能导致黄颡鱼雄性幼鱼精子发生障碍,出现生殖细胞凋亡甚至部分性反转的现象^[20],但其影响是仅局限于精巢,抑或作用于整个下丘脑—垂体—性腺轴,有待进一步研究。本研究用 EE2 对雄性黄颡鱼进行了暴露处理,结果显示,处理 28d 后,EE2 显著抑制黄颡鱼促性腺激素 3 个亚基的表达。不同的是,EE2 始终抑制 *FSH β* 的表达,而对 *GtHa* 和 *LH β* 的影响为先上升,再下降。考虑到 FSH 和 LH 各自的不同功能,推测 EE2 首先抑制黄颡鱼精子发生的开始阶段,然后抑制精子的成熟、排精等最后过程。与本研究结果类似,EE2 能抑制稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)和银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)*FSH β* 和 *LH β* 的表达^[30, 31],造成鱼类精巢发育和生殖障碍^[32]。因此,本研究认为,EE2 对鱼类精巢发育和精子发生的影响,不仅局限于精巢本身,还可能影响内分泌的高级中枢——垂体。综上所述,EE2 可能通过抑制促性腺激素 *GtH* 3 个亚基基因的表达,干扰黄颡鱼精子发生和成熟,影响黄颡鱼正常的精巢发育和繁殖,给我国长江流域经济鱼类的水产养殖带来潜在风险。

参考文献:

- [1] Ropero A B, Alonso-Magdalena P, Ripoll C, *et al.* Rapid endocrine disruption: environmental estrogen actions triggered outside the nucleus [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, **102**(1): 163—169
- [2] Zhang X, Li J H, Ma L, *et al.* Diethylstilbestrol impairs the morphology and function of mouse gubernaculum testis in culture [J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2012, **28**(6): 397—407
- [3] Meng S L, Song C, Fan L M, *et al.* Pollution of environmental endocrine disrupting chemicals (EDCs) in water and its adverse reproductive effect on fish [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, **29**(1): 202—208 [孟顺龙, 宋超, 范立民, 等. 水体中环境内分泌干扰物 (EDCs) 污染现状及其对鱼类的生殖危害. 江苏农业学报, 2013, **29**(1): 202—208]
- [4] Tan H, Li Y W, Yin P, *et al.* Mechanisms underlying diethylstilbestrol-induced inhibition of spermatogenesis in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, **39**(2): 331—338 [谭号, 李英文, 尹盼, 等. 己烯雌酚抑制斑马鱼精子发生及其可能的分子机制. 水生生物学报, 2015, **39**(2): 331—338]
- [5] Parhar I S, Soga T, Ogawa S, *et al.* FSH and LH- β subunits in the preoptic nucleus: ontogenic expression in teleost [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, **132**(3): 369—378
- [6] Li M D, Ford J J. A comprehensive evolutionary analysis based on nucleotide and amino acid sequences of the α - and β -subunits of glycoprotein hormone gene family [J]. *Journal of Endocrinology*, 1998, **156**(3): 529—542
- [7] Sohn Y C, Suetake H, Yoshiura Y, *et al.* Structural and expression analyses of gonadotropin I β subunit genes in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Gene*, 1998, **222**(2): 257—267
- [8] Vischer H F, Teves A C, Ackermans J C M, *et al.* Cloning and spatiotemporal expression of the follicle-stimulating hormone β subunit complementary DNA in the African Catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. *Biology of Reproduction*, 2003, **68**(4): 1324—1332
- [9] Schulz R W, de França L R, Lareyre J J, *et al.* Spermatogenesis in fish [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, **165**(3): 390—411
- [10] Desbrow C, Routledge E J, Brighty G C, *et al.* Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening [J]. *Environmental Science & Technology*, 1998, **32**(11): 1549—1558
- [11] Jiang W, Yan Y, Ma M, *et al.* Assessment of source water contamination by estrogenic disrupting compounds in China [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, **24**(2): 320—328
- [12] Stanback J. Perspectives on local manufacture of contraceptives in developing countries [J]. *Family Health International*, 1997, **40**(3): 120—127
- [13] Thorpe K L, Cummings R I, Hutchinson T H, *et al.* Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish [J]. *Environmental Science & Technology*, 2003, **37**(6): 1142—1149
- [14] Urbatzka R, Rocha E, Reis B, *et al.* Effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens on steroidogenic gene expression and specific transcription factors in zebrafish [J]. *Environmental Pollution*, 2012, **164**: 28—35
- [15] Reyhanian Caspillo N, Volkova K, Hallgren S, *et al.* Short-term treatment of adult male zebrafish (*Danio Rerio*) with 17 α -ethinylestradiol affects the transcription of genes involved in development and male sex differentiation [J].

- Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2014, **164**: 35—42
- [16] Lee P Y, Lin C Y, Chen T H. Environmentally relevant exposure of 17 α -ethynylestradiol impairs spawning and reproductive behavior in the brackish medaka *Oryzias melastigma* [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, **86**(2): 338—343
- [17] Hill Jr R L, Janz D M. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): I. Effects on sex ratio and breeding success [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, **63**(4): 417—429
- [18] Weber L P, Hill Jr R L, Janz D M. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, **63**(4): 431—446
- [19] Xu H, Yang J, Wang Y, *et al.* Exposure to 17 α -ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, **88**(1): 1—8
- [20] Zhu M. The influence of EE2 and DES on the gonad development and gametogenesis of yellow catfish [D]. Thesis for Master of Science, Chongqing Normal University, Chongqing. 2013 [朱敏. DES 和 EE2 对黄颡鱼性腺发育和配子发生的影响. 硕士学位论文, 重庆师范大学, 重庆. 2013]
- [21] Gharib S D, Wierman M E, Shupnik M A, *et al.* Molecular biology of the pituitary Gonadotropins [J]. *Endocrine Reviews*, 1990, **11**(1): 177—199
- [22] Wu F, Zhang X, Zhang W, *et al.* Expression of three gonadotropin subunits in Southern catfish gonad and their possible roles during early gonadal development [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2009, **153**(1): 44—48
- [23] Kwok HF, So WK, 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
- [24] Chen D L. mRNA expression nanlysis and protein expression of gonadotropin I and II from orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* [D]. Thesis for Master of Science, Sun Yat-Sen University, Guangzhou. 2005 [陈德林. 斜带石斑鱼促性腺激素 I 和 II 的组织表达分布和蛋白表达研究. 硕士学位论文, 中山大学, 广州. 2005]
- [25] Chen S Y, Liu X Z, Shi B, *et al.* Cloning and expression patterns of gonadotropin hormone subunit in *Oplegnathidae fasciatus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, **38**(10): 1673—1686 [陈圣毅, 刘学周, 史宝, 等. 条石鲷促性腺激素亚基 β (FSH, LH)cDNA 克隆及表达特性分析. 水产学报, 2014, **38**(10): 1673—1686]
- [26] Liu W B, Zhang X J. Study on the Development and annual change in the ovary of *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2003, **26**(2): 73—78 [刘文彬, 张轩杰. 黄颡鱼的卵巢发育和周年变化. 湖南师范大学自然科学学报, 2003, **26**(2): 73—78]
- [27] Liu W B, Zhang X J. Study on the Development and Annual Change of Testis, Spermatogenesis and Spermatoleosis in *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2004, **27**(1): 66—70 [刘文彬, 张轩杰. 黄颡鱼精巢发育和周年变化及精子的发生与形成. 湖南师范大学自然科学学报, 2004, **27**(1): 66—70]
- [28] Zhang X F. Study on the development and Annual change of Gonad in *Pelteobagrus fulvidraco* [D]. Thesis for Master of Science, Dalian Fisheries University, Dalian. 2005 [张晓芳. 黄颡鱼性腺发育及周年变化的研究. 学士学位论文, 大连水产学院, 大连. 2005]
- [29] Miller H D, Clark B W, Hinton D E, *et al.* Anchoring ethynylestradiol induced gene expression changes with testicular morphology and reproductive function in the medaka [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(12): e52479
- [30] Qin F, Wang X, Liu S, *et al.* Gene expression profiling of key genes in hypothalamus-pituitary-gonad axis of rare minnow *Gobiocypris rarus* in response to EE2 [J]. *Gene*, 2014, **552**(1): 8—17
- [31] Harding L B, Schultz I R, Goetz G W, *et al.* High-throughput sequencing and pathway analysis reveal alteration of the pituitary transcriptome by 17 α -ethynylestradiol (EE2) in female coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, **142—143**: 146—163
- [32] Oropesa A L, Jiménez B, Gil M C, *et al.* Histological alterations in the structure of the testis in tench (*Tinca tinca*) after exposure to 17 α -ethynylestradiol [J]. *Environmental Toxicology*, 2014, **29**(10): 1182—1192

THE EXPRESSION OF THREE GONADOTROPIN SUBUNITS IN RESPONSE TO 17 α -ETHYNYLESTRADIOL IN MALE *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*

TAN Hao, LI Ying-Wen, RAO Jan-Jun and LIU Zhi-Hao

(Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substances, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: In this paper, we investigated how 17 α -Ethinylestradiol (EE2) regulated the expression of three gonadotropin subunits in male *Pelteobagrus fulvidraco*. We cloned the full-length cDNA sequences of two subunits of gonadotropin hormone (*FSH β* and *LH β*) from the pituitary of *Pelteobagrus fulvidraco* by using RACE. We explored the tissue-specific and the seasonal pattern of expression of the genes. Male *Pelteobagrus fulvidraco* (2 years old) were exposed to EE2 (100 ng/L) for 28 days. We found that the length of *FSH β* cDNA sequence was 528 bp and it contained a 399-bp open reading frame (ORF) which encoded a precursor protein of 132 amino acids (aa). The length of *LH β* cDNA sequence was 870 bp and it contained a 417 bp ORF that encoded a precursor protein of 138 aa. The sequence analysis showed that *FSH β* had a predicted signal peptide of 17 aa, 2 N-glycosylation sites, and 13 cysteine residues. *LH β* had a predicted signal peptide of 18 aa, 1 N-glycosylation site, and 12 cysteine residues. The phylogenetic analysis showed that *FSH β* and *LH β* were closely related to other Siluriformes species. The tissue expression analysis suggested that all the gonadotropin subunits were expressed specifically in pituitary. The seasonal pattern of expression in both genders was that *GtH α* and *LH β* mRNA peaked in May and then decreased gradually, and the expression of *FSH β* in female also peaked in May but the expression in male remained unchanged. We applied semi-quantitative RT-PCR and demonstrated that the expression of the three gonadotropin subunits was dramatically suppressed by EE2. We speculated that EE2 might reduce the generation of FSH and LH in the pituitary of male *Pelteobagrus fulvidraco*, which would probably inhibit spermatogenesis and the maturation of sperm and spermiation, and consequently impair the testicular development and reproduction.

Key words: Yellow catfish; Gonadotropin hormone β subunits; cDNA cloning; Gene expression; 17 α -Ethinylestradiol