

转移人生长激素基因和注射人生长激素 对促进银鲫生长的研究*

许克圣¹ 魏彦章¹ 郭礼和² 朱作言¹

(1 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

(2 中国科学院细胞生物学研究所, 上海 200031)

提 要

本研究将人生长激素基因重组 DNA 导入银鲫受精卵,或用人生长激素对 60 日龄银鲫连续 6 周腹腔注射,均观察到了受体鱼的快速生长效应,转移人生长激素基因鱼在 60 日龄时的平均体重比对照鱼平均体重增加 82%,相应体长平均值比对照鱼增加 19.7%;在 125 日龄时,转基因组平均体重比对照组增加 17.7%,相应体长平均值比对照增加 3.5%。定期注射人生长激素,在 6 周的注射实验过程中,实验鱼的体重,体长都与对照组相近或略有减小。但是,在水泥池中饲养一个月后,注射 10 μ g/g 体重的实验组鱼平均体重比相应对照组鱼的平均体重增加 32%;相应体长平均值增加 11%。

关键词 银鲫,人生长激素基因,人生长激素,增长效应

Pickford^[13]首次发现,切除垂体的鲮鱼 (*Pundulus heteroclitus*) 对注射牛或鱼的生长激素有补偿效应。Higgs 等^[8]发现把牛的生长激素注入大麻哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*) 体内 8 周,其生长速度比对照提高 30—60%。Komourdjian^[10]的研究表明,猪生长激素有促进虹鳟 (*Salmo gairdneri*) 生长的作用。Adelman^[3,4]发现注射鲤鱼 (*Cyprinus carpio* Linnaeus) 的生长激素也能促进鲤鱼本身生长。人们还发现,注射外源生长激素不仅能加快受体鱼的生长,而且还能提高某些鱼对盐水的适应力^[9]和提高鱼的饵料转换系数^[12]。例如,Weatherley 和 Gill^[14]将牛的生长激素注入狗鱼 (*Esox americanus vermiculatus* Lesueur) 体内获得了体长为 40.7cm 的超大型个体,而天然环境中所记录到这种鱼的最大个体仅为 38.1cm。Agellon 等^[7]将重组 DNA 表达的虹鳟生长激素注入虹鳟体内后,受体鱼生长速度和饵料转换系数均有提高。Donaldson 等^[6]认为,注射外源生长激素导致受体鱼生长速度加快的原因可能是由于鱼类在正常情况下,鱼体内生长激素的量并没有达到饱和值,而外来的此种激素仍有发挥其生理作用的余地。可是 Weatherley 和 Gill^[14]认为,快速生长的原因,可能是生长激素促进了肌纤维的生长。新形成的肌纤维使轴肌群变得更为发达和充实。无论外源生长激素对受体鱼的作用机理如何,它对鱼具有促生长效应是肯定无疑的。朱作言等人^[1,2,15]运用基因转移技术,将小鼠重金属结合

* 国家“863-101-08-30”课题和国家“七·五”生物技术攻关资助项目。

1989 年 5 月 12 日收到。

蛋白基因启动与调控顺序与人生长激素基因的重组 DNA 导入鱼的受精卵内,获得了快速生长的转基因鱼,证明了外源基因在受体鱼体内的整合,表达和促进生长作用以及通过性腺向子代的传递,从而建立了一个完整的转基因鱼模型。在此基础上,本实验以银鲫为对象,比较转移人生长激素基因和人生长激素之间的相应生理效应,并检验了人生长激素对银鲫的促生长作用。

材 料 和 方 法

(一) 实验材料

实验鱼银鲫 (*Carassius auratus gibelio* Bloch) 取自本所实验场; 人生长激素基因为 pMhGH/BamHI 线性顺序(图 1)。

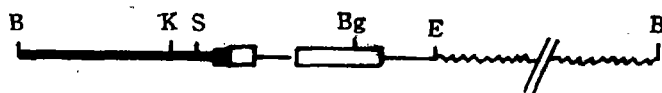


图 1 转移用的外源基因 PMhGH/BamHI. pMhGH(7.88kb) 为克隆在质粒 pBR322 EcoRI

位点上的 MT-hGH 融合基因

■——小鼠 MT-1 基因 5' 端侧翼顺序; ■——小鼠 MT-1 基因启动顺序; □——人生长激素基因外显子; ————人生长激素基因内含子及 3' 端侧翼顺序; ^^^——质粒 pBR322

B BamHI; Bg BglII; E EcoRI; K KpnI; S SacI;

Fig. 1 The transgene pMhGH/BamHI. pMhGH (7.88kb) consists of a MT-hGH fused gene inserted in the EcoRI site of the pBR322.

■——Mouse MT-1 gene 5' end flanking sequence; ■——Mouse MT-1 gene; □——Human growth hormone gene exon; ————Human growth hormone gene introns and 3' end flanking sequence; ^^^——plasmid pBR322

人生长激素(hGH)由中国科学院上海细胞生物学研究所提供;胰蛋白酶购自美国 Difco 公司; α - 32 P-dCTP 购自英国 Ameraham 公司。

(二) 实验方法

1. 人生长激素基因转移

在繁殖季节,实验用银鲫经人工催产和授精,用 0.25% 的胰蛋白酶消化去卵壳,将无壳卵移至 Holtfreter 氏液中,在第一次卵裂前,用显微注射法将人生长激素基因导入银鲫受精卵胚盘内,每个卵接受 1—2nl 注射液,约含 10^8 基因拷贝。显微注射后,受体卵在 Holtfreter 氏液中培养发育,随着胚胎发育至原肠末期,培养液逐渐用充气的冷开水稀释,心跳期后移至充气的冷开水中直至孵化出苗。鱼苗能摄食后移到水族箱内饲养,定期换水和投喂饵料,观察其生长效应。在发育不同时期提取胚胎或成鱼总 DNA,经与 α - 32 P-doTP 标记的 MT-hGH 片段探针进行分子杂交,检测外源基因在受体鱼胚胎发育过程中的行为和外源基因整合率。对照组除了不接受外源基因外,其它的饲养管理,样品处理及检测程序均与实验组相同。

2. 人生长激素对鱼体注射

将银鲫鱼苗养到 60 日龄 (约 3cm) 开始做人生长激素的鱼体注射实验。实验包括 $2\mu\text{g/g}$ 体重和 $10\mu\text{g/g}$ 体重 2 个不同剂量的实验组和一个对照组, 每组 12 尾鱼。对实验组鱼进行腹腔注射, 每周注射一次, 连续 6 周, 对照组不注射。另外随机取 12 尾转移人生长激素基因的同龄银鲫在同样条件下饲养观察, 以比较其生长效果。每次注射前测量体重, 体长。注射期间分别养在同一水体的 4 个大小相同的网箱内, 水温在 $28-30^{\circ}\text{C}$ 之间。最后一次注射后, 4 组鱼分别放养在大小相同的 4 个水泥池 ($5\text{m} \times 3\text{m} \times 0.8\text{m}$) 中。定期换水和投喂饲料。一个月后再测量其体重和体长。

结果和讨论

(一) 外源基因的促生长效应

DNA 分子杂交结果证明, 在银鲫胚胎发育过程中, 外源基因的行为基本上与在受体鲫鱼, 泥鳅的结果一致^[2]。在成活的受体银鲫群体中, 外源基因整合率约为 50%。60 日龄时, 对照组 12 尾银鲫平均体重 $0.47\text{g} \pm 0.15$, 实验组 12 尾平均体重为 $0.86\text{g} \pm 0.23$, 比对照组平均体重增加 82%。实验组平均体长 ($3.1\text{cm} \pm 0.19$) 的增加为对照组平均值 ($2.59\text{cm} \pm 0.33$) 的 19.7%; 125 日龄时, 对照组 12 尾平均体重为 $22.9\text{g} \pm 3.2$; 实验组 12 尾平均体重为 $27\text{g} \pm 2.6$, 比对照组平均值增加 17.7%, 但体长没有明显增加 (表 1)。

表 1 人生长激素基因和人生长激素对银鲫生长的影响

Tab. 1 Effects of hGH gene and hGH on growth of Crucian carp

时间(周) Time(weeks)	1 60-day-old fish		2		3	
	体重 Body weight (g)	体长 Body length (cm)	体重 Body weight (g)	体长 Body length (cm)	体重 Body weight (g)	体长 Body length (cm)
hGH gene	$0.86 \pm 0.23^{**}$	$3.1 \pm 0.19^{**}$	$2.34 \pm 0.33^{**}$	$4.1 \pm 0.2^{**}$	$3.78 \pm 0.53^{**}$	$4.7 \pm 0.2^{**}$
hGH $10\mu\text{g/g}$	0.53 ± 0.17	2.6 ± 0.24	1.56 ± 0.19	3.7 ± 0.6	2.48 ± 0.81	4.1 ± 0.3
hGH $2\mu\text{g/g}$	0.51 ± 0.14	2.6 ± 0.74	1.68 ± 0.44	3.8 ± 0.2	2.68 ± 0.43	4.2 ± 0.2
control	0.47 ± 0.15	2.5 ± 0.33	1.48 ± 0.44	3.6 ± 0.4	2.58 ± 0.63	4.2 ± 0.3

时间(周) Time (weeks)	4		5		6		10 125-day-old fish	
	体重 Body weight (g)	体长 Body length (cm)	体重 Body weight (g)	体长 Body length (cm)	体重 Body weight (g)	体长 Body length (cm)	体重 Body weight (g)	体长 Body length (cm)
hGH gene	$4.9 \pm 0.78^{**}$	$5.02 \pm 0.2^{*}$	$6.04 \pm 1.28^{*}$	$5.45 \pm 0.3^{*}$	$8.75 \pm 1.36^{*}$	$6.28 \pm 0.27^{*}$	$27.0 \pm 2.6^{*}$	8.98 ± 1.7
hGH $10\mu\text{g/g}$	3.3 ± 0.85	4.38 ± 0.4	4.20 ± 0.87	4.69 ± 0.3	5.25 ± 0.87	5.31 ± 0.41	$30.5 \pm 7.9^{*}$	$9.61 \pm 0.9^{*}$
hGH $2\mu\text{g/g}$	3.7 ± 0.41	4.49 ± 0.2	4.27 ± 0.72	4.85 ± 0.3	5.85 ± 0.71	5.49 ± 0.16	21.1 ± 1.8	8.46 ± 0.2
control	3.6 ± 0.87	4.50 ± 0.5	5.02 ± 0.34	5.11 ± 0.4	6.91 ± 1.45	5.90 ± 0.39	22.9 ± 3.2	8.65 ± 0.7

* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$.

实验证明: 1) 转移人生长激素基因的银鲫表现出快速生长效应; 2) 这种快速生长效应在个体发育的早期尤为显著, 如 60 日龄时增重 82%, 差异极显著 ($P < 0.001$), 125 日龄时增重 17.7%, 差异显著 ($P < 0.01$); 3) 受体鱼体重增加大于体长的增加值。如 125 日龄时, 实验组的体长与对照组相比未表现出显著差异 ($P > 0.6$)。在外形上, 快速生长的转移人生长激素基因受体鱼表现出体高, 背部肌肉明显增厚, 反映了生长激素基因促进生长机制是加速体内蛋白质的合成。

(二) 注射人生长激素对鱼体的生长效应

人生长激素对银鲫的腹腔注射实验是从 60 日龄开始的, 注射后一周, 剂量为 $2\mu\text{g/g}$ 体重的实验组的体重, 体长平均值分别为 $1.68\text{g} \pm 0.44$, $3.8\text{cm} \pm 0.2$; 剂量为 $10\mu\text{g/g}$ 体重的实验组的体重, 体长平均值分别为 $1.56\text{g} \pm 0.19$, $3.7\text{cm} \pm 0.6$, 对照组的体重, 体长平均值分别为 $1.48\text{g} \pm 0.44$, $3.6\text{cm} \pm 0.4$, 差异均不显著 ($P > 0.5$)。在以后的注射实验过程中 (第二至第六周), 两组实验组鱼的体重, 体长不但没有增加, 反而比对照组的略有减少 (图 2, 3)。

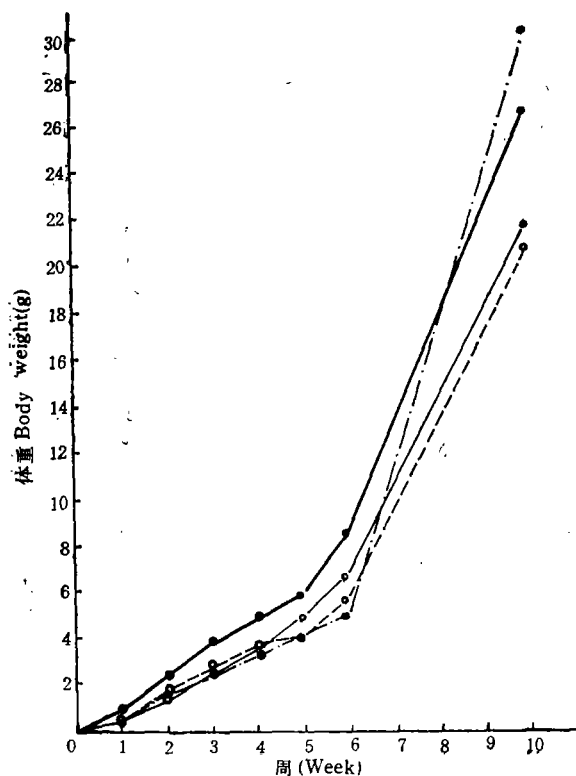


图2 人生长激素基因和人生长激素对银鲫体重的影响

—●—转移人生长激素基因 --○--注射人生长激素 ($2\mu\text{g/g}$) --●--注射人生长激素 ($10\mu\text{g/g}$) —○—对照组

Fig. 2 Effects of the hGH gene and hGH on the body weight of Crucian Carp

—●—hGH gene --○--hGH ($2\mu\text{g/g}$) --●--hGH ($10\mu\text{g/g}$) —○—Control

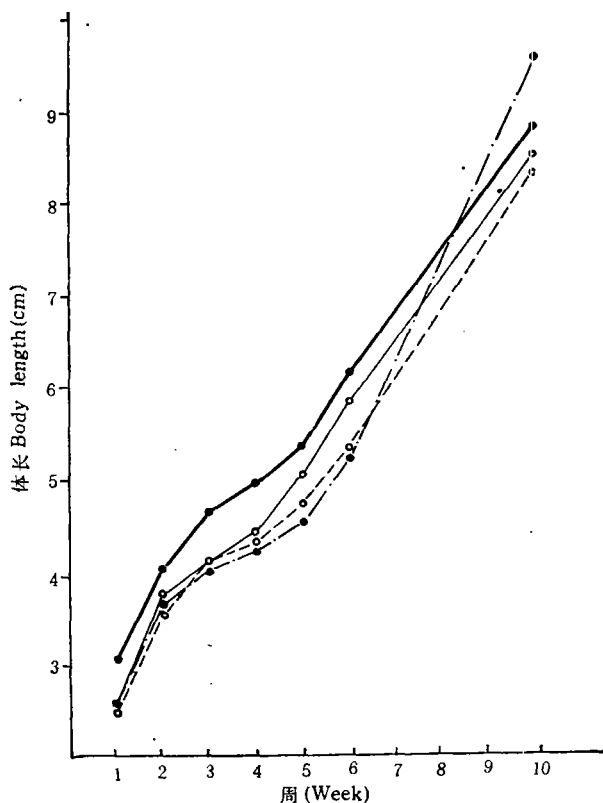


图3 人生长激素基因和人生长激素对银鲫体长的影响

—●—转移人生长激素基因 --○--注射人生长激素 (2μg/g) ···●···注射人生长激素 (10μg/g) —○—对照组

Fig. 3 Effects of the hGH gene and hGH on the body length of Crucian carp

—●—hGH gene --○-- hGH (2μg/g) ···●···hGH(10μg/g) —○—Control

有趣的是,第六周注射后一个月(即125日龄)检查时,注射剂量为10μg/g体重的实验组鱼平均体重为 $30.5\text{g} \pm 7.9$,对照组鱼平均体重为 $22.9\text{g} \pm 3.2$,实验组比对照组平均值增重32.9%。实验组的平均体长为 $9.6\text{cm} \pm 0.9$,对照组平均体长为 $8.65\text{cm} \pm 0.7$,体长平均值增加11%。体重和体长增加均有显著差异($P < 0.01$ 和 $P < 0.02$)。但是,注射剂量为2μg/g体重的实验组鱼未表现出促生长效应。

如前所述,无论注射天然的或工程菌表达的高等动物或鱼的生长激素,对鱼均有明显的促生长作用。在本实验中,注射10μg/g体重的工程菌表达的人生长激素的生物活性对银鲫未表现出严格种族特异性。即有加快银鲫生长的作用。生长激素的生理功能是通过作用肝细胞,由后者释放出生长促进因子(IGF)实现的。已有实验证实,鱼类肝细胞生长激素受体具有对高等脊椎动物生长激素的广泛适应性,这也许是因为鱼类处于脊椎动物进化较低水平的缘故¹⁾。一般说来,正常情况下,生长激素在血液中的含量在ng/ml水平,即小剂量的生长激素含量便显示其生物学功能。比较2μg/g体重和10μg/g体重

1) F. Leung, 私人通讯。

两个注射实验组的结果,不难看出前者因剂量低而对银鲫无促进生长效应。Agellon 等人用 $0.2\mu\text{g/g}$ 体重的虹鳟生长激素处理同种幼鱼,也获得明显的促生长效应。说明人生长激素对银鲫虽然有生物学功能,但其效率却低于鱼类自身的生长激素。

Gill 等^[7]和 Agellon^[9]的工作均表明,大西洋鲑和虹鳟在接受外源生长激素注射第二周即表现出快速生长效应。而我们在注射实验的第六周内,实验鱼不但没有加速生长,其生长速度反而比对照鱼稍有下降(图 2,3)。直到注射结束一个月后,剂量为 $10\mu\text{g/g}$ 体重的实验组才表现出明显的快速生长效应。原因可能是,由于我们开始注射实验时,受体鱼苗太小(约 0.5g),承受机械损伤和压力的能力很弱,影响到正常的摄食和新陈代谢活动,导致整个注射过程中实验鱼体重的下降。另外,肝细胞生长激素受体的亲和力又与营养状况有关,高水平营养有利于生长激素与受体的结合^[11]。我们的实验鱼在注射过程中,摄食和营养处于不佳的状态,可能影响到生长激素和受体的结合。停止注射后,银鲫表现出的快速生长效应也从另一方面反映了肝脏产生生长促进因子的能力,以及后者的生理效应可以维持相当长的时间。

参 考 文 献

- [1] 朱作言等,1986。人生长激素基因在泥鳅受精卵显微注射后的生物学效应。科学通报,(5): 387—389。
- [2] 朱作言等,1989。转基因鱼模型的建立。中国科学 (B),(2):147—155。
- [3] Adelman, I. R., 1977. Effect of bovine growth hormone on growth of carp (*Cyprinus carpio*) and the influences of temperature and photoperiod. *J. Fish Res. Board Can.*, **34**: 509—515。
- [4] Adelman, I. R., 1982. Enhancement of growth of common carp by injection of a homogenate of carp pituitary glands. *Proc. Fish-Cult.*, **44**(2): 94—97。
- [5] Agellon, L. B., et al., 1988. Promotion of rapid growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by a recombinant fish growth hormone. *J. Fish Aquat. Sci.*, **45**: 146—151。
- [6] Donaldson, E. M., 1979. Hormonal enhancement of growth in fish. p. 455—597. in *Fish Physiology*, Vol. VII. Chapter 9. Hoar, W. S., Randall, D. J. and Brett (eds), J. R., Academia Press, New York。
- [7] Gill, J. A., et al., 1985. Recombinant chicken and bovine growth hormone accelerate growth in aquacultured juvenile Pacific Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Bio Technology*, **3**: 643—646。
- [8] Higgs, D. A., et al., 1975. A preliminary investigation of the effects of bovine growth hormone on growth and muscle composition of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **27**: 240—253。
- [9] Komourdjian, M. P., et al., 1976. The effect of porcine somatotropin on growth, and survival in seawater of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Parr. Canad. J. Zool.*, **54**: 531—535。
- [10] Komourdjian, M. P., et al., 1978. Growth of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, after hypophysectomy and somatotropin therapy. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **34**: 158—162。
- [11] Lamming, G. E., et al., 1988. Regulating growth of animals. *Nature*, **336**(3): 19—20。
- [12] Markert, J. R., et al., 1977. Influence of bovine growth hormone on growth rate, appetite and food conversion of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fed two diets of different composition. *Can. J. Zool.*, **55**: 74—83。
- [13] Pickford, G. E., 1954. The response of hypophysectomized male killifish to purified fish growth hormone, as compared with the response to purified beef growth hormone. *Endocrinology*, **55**: 274—287。
- [14] Weatherley, A. H., and Gill, H. S., 1987. Growth increases produced by bovine growth hormone in grass pike, *Esox americanus vermiculatus* (Lesueur), and the underlying dynamics of muscle fiber growth. *Aquaculture*, **65**: 55—66。
- [15] Zhu, Z., et al., 1985. Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus*, L. 1758). *J. Applied. Ichthyology*, **1**: 31—34。

THE EFFECTS OF GROWTH ENHANCEMENT OF HUMAN GROWTH HORMONE GENE TRANSFER AND HUMAN GROWTH HORMONE ADMINISTRATION ON CRUCIAN CARP (*CARASSIUS AURATUS GIBELIO*, BLOCH)

Xu Kesheng¹ Wei Yanzhang¹ Guo Lihe² and Zhu Zuoyan¹

(1 *Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072*)

(2 *Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai 200031*)

Abstract

In this paper, we observed the growth enhancement of crucian carp which were treated in the following two ways: 1) The fertilized eggs of the fish were microinjected with the p^{hGH} recombinant DNA containing human growth hormone(hGH) gene capped with mouse metallothionein-1 (MT-1) gene promoter and control sequences. Each egg received 10⁸ copies of the novel gene. The gene transferred eggs were allowed to proceed in individual development. 2) The juvenile fish (60 days old) from part of the control group were intraperiodically injected with biosynthetic human growth hormone at the concentration of 10μg/g(bw)/week for six weeks.

At the 60 and 120 days, the average body weights of the gene transferred fish were 82% and 17% heavier than those of the control, respectively. After one month of ending the hGH administration, the average body weight of the hGH injected fish (10μg/g(bw)/week) were 32.8% heavier than that of the control. On the other hand, the fish injected with 2μg/g(bw)/week of the hGH did not show any growth improvement.

Key words

Crucian carp, hGH gene, hGH, Growth enhancement