

# IGF- I mRNA 在不同年龄鲤表达的差异和 LHRH- A 对 IGF- I mRNA 表达的影响

华益民 林浩然

(中山大学生命科学院, 广州 510275)

**摘要:** 利用 RNA 酶保护法对 7 月龄性未成熟幼鲤和 2 龄性成熟鲤组织胰岛素样生长因子- I(IGF- I)mRNA 的表达水平进行测定, 结果表明成鱼肝和肾脏组织 IGF- I mRNA 的丰度显著高于幼鱼。对鲤成鱼和幼鱼腹腔注射促性腺激素释放激素类似物(LHRH- A, D- Ala<sup>6</sup>- Pro<sup>9</sup>- NEt- LHRH) 使血清生长激素(GH) 水平和肝组织 IGF- I mRNA 水平都显著升高, 而成鱼生殖腺 IGF- I mRNA 的丰度比对照组显著增加。研究结果提示鲤在不同发育阶段肝组织 IGF- I mRNA 的表达存在差别, 其中 2 龄成鱼大于 7 月龄幼鱼; LHRH- A 可能通过刺激垂体 GH 的释放间接促进肝组织 IGF- I mRNA 的表达, 亦可能通过某种未知途径刺激生殖腺 IGF- I mRNA 的表达。

**关键词:** 鲤; 胰岛素样生长因子- I; 年龄; LHRH- A

**中图分类号:** S965. 116      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000- 3207(2001) 05- 0498- 05

在硬骨鱼类不同的发育阶段, 肝组织 IGF- I mRNA 的表达可能存在差异。Duan 等<sup>[1]</sup> 根据其对象大马哈鱼不同发育阶段组织 IGF- I mRNA 表达水平的检测结果, 认为肝组织 IGF- I mRNA 水平随着年龄的增长而显著下降。然而, Shamblott 和 Chen<sup>[2]</sup> 对虹鳟成鱼和幼鱼组织 IGFs mRNA 的表达水平的研究结果则显示, 成鱼肝组织 IGF- I mRNA 和 IGF- II mRNA 水平都显著高于幼鱼, 约为幼鱼表达量的两倍。因此, 关于硬骨鱼类 IGF- I mRNA 表达在个体发育过程的变化有必要进一步研究。

本文以我国常见的经济鱼种鲤为材料, 研究成年鲤和性腺未成熟鲤的肝脏和其他组织 IGF- I mRNA 的表达水平, 并观察 LHRH- A 对鲤血清 GH 水平和组织 IGF- I mRNA 表达的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 实验用鱼** 7 月龄幼年鲤, 性腺处于发育早期(GSI 为 3. 1%—5. 6%, 体重 65—75g); 2 龄成年鲤, 雌性或雄性, 性腺处于退化期(1997 年 7 月, GSI 为 6. 1—9. 7%, 体重 450—600g), 均购于广州郊区鱼场。幼鱼和成鱼分养于室外水泥池, 适应两周后各取 20

收稿日期: 1999- 06- 25; 修订日期: 2001- 04- 20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39570099); 中山大学基础学科前沿课题基金资助项目

作者简介: 华益民, (1967—), 男, 安徽省芜湖市人; 博士; 现在主要从事鱼类分子生物学研究工作

通讯作者: 林浩然(E- mail: Ls32@zsu. edu. cn)

尾健康鲤用于实验。

**1.2 设计和取样** LHRH- A (宁波制药厂产品) 溶于 0.7% NaCl 溶液, 先以 0.1 $\mu$ g/g 体重的剂量鲤腹腔注射一次, 隔天再注射 0.2 $\mu$ g/g 体重剂量 LHRH- A。对照组注射 0.7% NaCl 的载体溶液。第二次注射 6h 后开始取样。取样时先用 MS- 222 (Syndel 公司产品) 麻醉鲤, 用一次性注射器从尾静脉抽取 1mL 血液冰上放置 4h, 12000r/min 于 4℃ 离心 6min, 取血清于- 20℃ 冷冻保存。取血后迅速用灭菌的剪刀和镊子打开鱼体, 取出各组织, 置于液氮中保存或立即提取核酸。血清 GH 的测定用本实验室建立的同源 GH 放射免疫测定法<sup>[3]</sup>。

**1.3 组织总核酸(TNA)的提取和组织 TNA 样品中 IGF- I mRNA 测定** 组织 TNA 用蛋白酶 K 法提取。TNA 中的 DNA 含量用改良二苯胺比色法测定。鲤 IGF- I cDNA 片段 5' 端非翻译区到 ORF 的 A 区 *Xho* I 酶切位点共 475bp 构建于质粒载体 pBluescript SK 上。用 *Eco*R I 线性化质粒作为模板, T7 RNA 聚合酶体外转录合成  $\alpha$ - <sup>32</sup>P- UTP 标记反义 RNA 探针; 用 *Xho* I 线性化质粒为模板, T3 RNA 聚合酶体外转录合成正义鲤 IGF- I RNA 片段。体外转录产物经 Sephadex G25 离心柱层析纯化。TNA 样品 (包括梯度鲤 IGF- I RNA) 和适量探针经变性后置于 50℃ 杂交过夜。用 RNase 工作液充分酶解探针和未配对的 RNA 片段。受保护的杂交分子通过三氯乙酸沉淀法沉淀于 Whatman GF/C 滤纸, 晾干后在液闪仪上 Cerenkov 计数。通过绘制的标准曲线, 计算样品中 IGF- I mRNA 的含量<sup>[4]</sup>。

**1.4 数据处理** 实验数据以平均值  $\pm$  标准误表示。各组间数据差异经 Student 样品均值 T 检验分析,  $p < 0.05$  表示有显著性差异,  $p < 0.01$  表示有极显著差异。

## 2 结果

### 2.1 2 龄成鱼和 7 月龄幼鱼血清 GH 水平的差异

2 龄成鱼血清中 GH 水平平均为 41.3  $\pm$  2.3ng/mL, 显著高于 7 月龄幼鱼的 29.8  $\pm$  4.8ng/mL (图 1)。

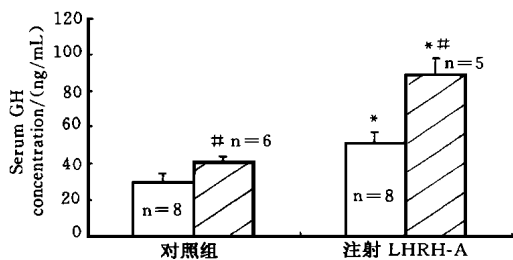


图 1 注射 LHRH- A 对 2 龄 (▨) 和 7 月龄 (□) 鲤血清 GH 水平的影响。数据以平均值  $\pm$  SEM (n= 5-8) 表示。

\* 表示显著高于对照组, # 表示显著高于 7 月龄鱼。

Fig. 1 Serum GH levels of 2- year old and 7- month old common carp after second injection of LHRH- A.

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n= 5-8).

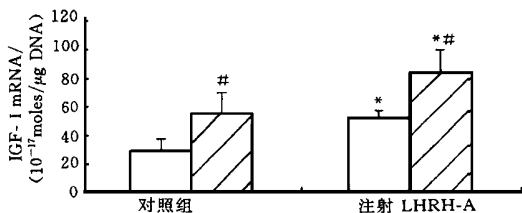


图 2 隔日二次注射 LHRH- A 对 7 月龄和 2 龄 鲤鱼肝组织 IGF- I mRNA 表达的影响。

数据以平均值  $\pm$  SEM (n= 5) 表示。图例同图 1。

Fig. 2 Hepatic IGF- I mRNA levels of 7- month old and 2- year old common carp 6 h post second injection of LHRH- A. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n= 5).

2.2 2 龄成鱼和 7 月龄幼鱼肝组织 IGF- I mRNA 表达的差异

对 5 尾 2 龄成鱼的测定表明, 肝组织 IGF- I mRNA 水平平均达  $55.9 \pm 14.4 \times 10^{-17}$  moles/ $\mu$ gDNA, 而 5 尾 7 月龄幼鱼肝组织 IGF- I mRNA 则平均为  $29.9 \pm 7.3 \times 10^{-17}$  moles/ $\mu$ gDNA。因此, 与血清 GH 水平相应, 2 龄成鱼肝组织 IGF- I mRNA 水平也明显高于 7 月龄的幼鱼(图 2)。

2.3 2 龄成鱼和 7 月龄幼鱼其他组织 IGF- I mRNA 表达的差异

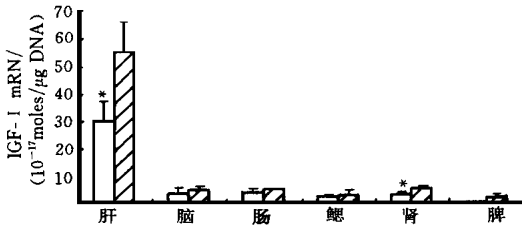


图 3 7 月龄和 2 龄鲤鱼各组织 IGF- I mRNA 表达的差异。  
数据以平均值 $\pm$ SEM 表示(7 月龄幼鱼脾和肾组织样品  
分别为 3 和 4 例; 其余皆为 5 例)。图例同图 1。

Fig. 3 The difference of tissue IGF- I mRNA expression  
of 7- month old and 2- year old common carp. Values  
are expressed as means $\pm$ SEM.

成鱼脑、肠、鳃、肾脏和脾脏 IGF- I mRNA 的丰度分别为  $5.2 \pm 1.2 \times 10^{-17}$ 、 $5.3 \pm 0.4 \times 10^{-17}$ 、 $3.4 \pm 1.4 \times 10^{-17}$ 、 $5.7 \pm 0.4 \times 10^{-17}$  和  $2.5 \pm 0.8 \times 10^{-17}$  moles/ $\mu$ gDNA。在幼鱼中, 脑、肠、鳃、肾脏和脾脏组织 IGF- I mRNA 的丰度分别为  $3.9 \pm 1.7 \times 10^{-17}$ 、 $4.2 \pm 1.2 \times 10^{-17}$ 、 $2.8 \pm 0.5 \times 10^{-17}$ 、 $3.7 \pm 0.2 \times 10^{-17}$ 、 $0.7 \pm 0.1 \times 10^{-17}$  moles/ $\mu$ gDNA。经统计分析 2 龄成鱼肾组织中 IGF- I mRNA 丰度显著高于幼鱼, 其他组织包括肠、鳃、脑、脾等未发现存在显著差异(图 3)。

2.4 注射 LHRH- A 对 2 龄成鱼和 7 月龄幼鱼血清 GH 影响

2 龄成鱼二次注射 LHRH- A 后, 血清 GH 水平达  $89.7 \pm 8.4$  ng/ mL, 与对照组相比极显著升高 ( $p < 0.01$ ); 7 月龄幼鲤在注射 LHRH- A 后, 血清中 GH 水平升至  $51.4 \pm 5.4$  ng/ mL, 也有较大幅度的增长 ( $p < 0.05$ ) (图 1)。

2.5 注射 LHRH- A 对 2 龄成鱼和 7 月龄幼鱼肝组织 IGF- I mRNA 表达的影响

在二次注射 LHRH- A 后 2 龄鱼肝组织 IGF- I mRNA 含量为  $83.4 \pm 15.8 \times 10^{-17}$  moles/ $\mu$ gDNA, 与对照组相比表达水平有显著增高; 二次注射 LHRH- A 后 7 月龄鱼肝组织 IGF- I mRNA 水平也升至  $51.9 \pm 4.0 \times 10^{-17}$  moles/ $\mu$ gDNA, 与对照组相比也有明显升高(图 2)。

2.6 注射 LHRH- A 对 2 龄成鱼和 7 月龄幼鱼其他组织 IGF- I mRNA 表达的影响

成年鲤( $n = 4 \diamond 3 \text{♀}$ , 1  $\text{♂}$ )生殖腺在注射 LHRH- A 后 IGF- I mRNA 表达水平由  $4.3 \pm 1.3 \times 10^{-17}$  moles/ $\mu$ gDNA, 升至  $20.8 \pm 4.4 \times 10^{-17}$  moles/ $\mu$ gDNA。其他组织如肠、肾、鳃、脑、脾等 IGF- I mRNA 的表达未发现显著变化。

3 讨 论

Duan 等报道银大马哈鱼不同发育阶段肝组织 IGF- I mRNA 的表达水平随着年龄的增长而下降, 而肝以外的其他任何组织在不同发育阶段都不存在显著的差别。然而, Shambloott 和 Chen<sup>[2]</sup>对银大马哈鱼亲缘关系较近的虹鳟的研究却发现成鱼肝组织中 IGF- I mRNA 和 IGF- II mRNA 均约为幼鱼的两倍。本文研究结果表明, 2 龄成年鲤肝组织 IGF- I mRNA 丰度虽然未达 7 月龄幼鱼的两倍, 但明显地高于幼鱼; 肝外组织 IGF- I

mRNA 除肾脏外鲤和银大马哈鱼相似, 成鱼和幼鱼不存在明显的差异。成鱼肾组织中 IGF- I mRNA 表达水平显著高于幼鱼的意义值得进一步研究。

在哺乳动物和鸟类已经证实, 营养和 GH 是 IGF- I mRNA 表达的主要调节因子。近年来在鲑鳟鱼类和鳊鱼的研究表明肝组织 IGF- I mRNA 的表达也主要接受营养状况和 GH 的调节, 其他组织则不受它们的调节<sup>[2]</sup>。因此, 对处于正常营养状态的鱼, 血液中 GH 的水平是其肝组织 IGF- I mRNA 表达的主要决定因子。最近, 本实验室对鲤不同发育阶段(从 2 月龄到 3 龄)血清中 GH 水平进行了测定, 结果显示, 3—4 月龄的鲤血清 GH 水平最高, 6 月龄鲤血清 GH 水平有所降低, 1 龄鱼性成熟早期血清 GH 水平最低, 以后在性成熟中期, 成熟期和退化期过程中血清 GH 水平逐渐升高; 2 龄性成熟鱼血清 GH 水平进一步增高, 而 3 龄鱼血清 GH 水平逐渐下降。对 2 龄成年鲤和 7 月龄鲤血清 GH 水平的检测结果和王黎等的结果一致。这可能就是鲤成鱼和幼鱼肝组织 IGF- I mRNA 表达水平不一致的主要原因。Duan 等报道银大马哈鱼幼鱼在 7—8 月份生长最快, 其后生长速率下降, 到第二年 3 月生长率又开始增高; 幼鱼肝组织 IGF- I mRNA 丰度在 5—6 月份最高, 7 月份则显著降低, 以后到第二年的 4 月份又出现第二个峰值; 肝组织 IGF- I mRNA 的丰度与血清 GH 水平的变化相似, 但滞后约一个月。Shamblott 和 Chen 在比较虹鳟成鱼和幼鱼组织 IGF- I mRNA 表达水平的差异时没有指出虹鳟鱼的准确年龄和季节。

在鲤科鱼类, GnRH 不仅刺激垂体合成和释放 GtH, 还能刺激垂体合成和分泌 GH<sup>[5]</sup>。通过体腔注射 LHRH- A 后, 7 月龄幼鱼和 2 龄成年鲤血清 GH 水平都明显升高, 同时两者肝 IGF- I mRNA 水平也明显增高, 这些结果提示 LHRH- A 可能通过促进垂体 GH 分泌间接导致了肝 IGF- I mRNA 表达的增强。由于幼鱼和成鱼肝外组织(成鱼性腺例外)都未发现 IGF- I mRNA 丰度增加, 因此鲤肝外组织可能不受 GH 的调节。实验中发现处于退化期的成鱼性腺在注射 LHRH- A 后 IGF- I mRNA 表达量增加, 表明 IGF- I 在鲤性腺的发育和成熟过程中可能起着一定的作用。IGF- I mRNA 在成鱼性腺中表达的增加是由 LHRH- A- GH 轴完成的, 还是通过 LHRH- A- GtH 轴间接实现的, 值得进一步探索。

## 参考文献:

- [1] Duane. Tissue specific expression of insulin like growth factor I messenger ribonucleic acids in salmonids: developmental, hormonal, and nutritional regulation [A]. In: "Perspectives in Comparative Endocrinology". 365—372. National Research Council of Canada
- [2] Shamblott M J, Chen T T. Age related and tissue specific levels of five form of insulin like growth factor mRNA in a teleost [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1993, 2(6): 351—361
- [3] 王黎, 林浩然, 张为民. 阿扑吗啡对 LHRH- A 促进鲤鱼 GtH 和 GH 分泌的影响[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1997, 36: 119—121
- [4] 华益民, 林浩然, 钟翎. 用 RNase 保护法定量检测鲤鱼组织 IGF- I mRNA 的表达[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(4): 121—124
- [5] 林浩然. 鱼类生长和生长激素分泌活动的调节[J]. 动物学报, 1996, 42(1): 69—79

## DIFFERENTIAL EXPRESSION AND EFFECT OF LHRH-A ON EXPRESSION OF IGF-I mRNA IN JUVENILE AND ADULT COMMON CARP ( *CYPRINUS CARPIO* )

HUA Yimin and LIN Haoran

( *School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275* )

**Abstract:** IGF-I mRNA expression of 7-month old juvenile and 2-year old adult common carp were determined by RNase Protection Assay. Results showed that the hepatic IGF-I mRNA level of adult fish was significantly higher than that of 7-month old juvenile fish; while in other tissues there was no significant difference between the two fish groups except that kidney IGF-I mRNA level of adult fish was higher than that of juvenile fish. After twice i. p. injections of LHRH-A, the levels of serum GH and hepatic IGF-I mRNA in fish of both ages increased greatly, and the IGF-I mRNA level of gonadal tissue in adult fish increased when compared with controls. No changes in amount of IGF-I mRNA in other tissues were observed after injections of LHRH-A. It is suggested that the level of hepatic IGF-I mRNA expression changes with different developmental stages; LHRH-A may stimulate the production of IGF-I by promoting the synthesis and release of pituitary GH; and probably, LHRH-A stimulates the IGF-I expression in gonads by other mechanism.

**Key words:** Common carp; Insulin-like growth factor-I; Age; LHRH-A