

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-Ala⁶-Pro⁹-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^[1]根据其对银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, Shambrott 和 Chen^[2]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 $\mu\text{g}/\text{g}$ 体重的剂量鲤腹腔注射一次,隔天再注射0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ 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^[3]。

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EcoR I线性化质粒作为模板,T7 RNA聚合酶体外转录合成 α -³²P-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^[4]。

1.4 数据处理 实验数据以平均值±标准误表示。各组间数据差异经Student 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±2.3ng/mL,显著高于7月龄幼鱼的29.8±4.8ng/mL(图1)。

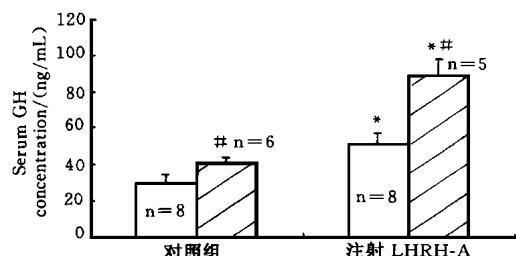


图1 注射LHRH-A对2龄(▨)和7月龄(□)

鲤血清GH水平的影响。数据以平均值

±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±SEM (n=5—8).

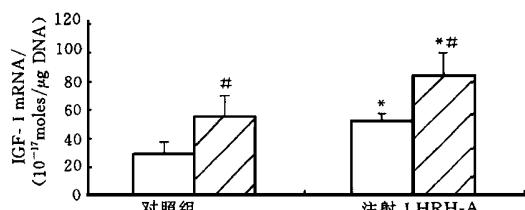


图2 隔日二次注射LHRH-A对7月龄和2龄鲤鱼肝组织IGF-I mRNA表达的影响。

数据以平均值±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±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/ μgDNA , 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/ μgDNA 。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

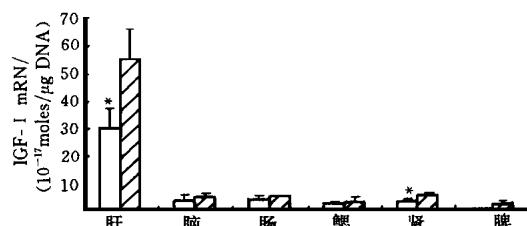


图 3 7 月龄和 2 龄鲤鱼各组织 IGF-I mRNA 表达的差异。

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/ μgDNA 。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/ μgDNA 。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 $89.7 \pm 8.4 \text{ ng/mL}$, 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 $51.4 \pm 5.4 \text{ ng/mL}$, 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/ μgDNA , 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/ μgDNA , 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($n = 4 \diamond 3 \varphi, 1 \delta$)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/ μgDNA , 升至 $20.8 \pm 4.4 \times 10^{-17}$ moles/ μgDNA 。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, Shamblott 和 Chen^[2]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鳗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^[2]。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。Shambrott 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^[5]。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] Duan C. 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] Shambrott 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