

人生长激素和转移的人生长激素基因 对去垂体鱼的生长代偿效应

崔宗斌 谢岳峰 许克圣 郭礼和 朱作言

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

(* 中国科学院上海细胞生物研究所, 200031)

提 要

通过显微注射技术,将小鼠重金属螯合蛋白(MT-1)基因启动顺序与人生长激素基因顺序的重组体 pMThGH 注入鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 的受精卵内,由此发育的转基因鱼及其后代 F1 和 F2 均显示出快速生长效应。去垂体后,转基因鲤鱼 F2 持续生长,而非转基因鲤鱼和鲫鱼 (*Carassius auratus*) 的生长停止。给去垂体的鲫鱼腹腔注射生物合成的人生长激素 (hGH),可恢复其生长。实验结果表明,转基因鱼体内表达和体外生物合成的 hGH 均能代偿鲤鱼和鲫鱼的内分泌生长激素并刺激去垂体鱼的生长。

关键词 鲤鱼,人生长激素,人生长激素基因,代偿效应,去垂体

动物生长激素(GH)为单链多肽,分子量约 2.2 万道尔顿(dalton)。在脊椎动物体内, GH 由垂体前叶合成并分泌。GH 对哺乳动物的生长和发育至关重要,它通过诱导靶细胞合成促生长因子(如 IGF)而刺激肌肉,骨骼和有关组织的生长。GH 在低等脊椎动物鱼类体内作用的机制尚不清楚。不过,早期的研究指出,哺乳动物的 GH 可以促进鱼类的生长^[1];注射牛 GH(1 μ g/g BW/2d),可增加去垂体鲇鱼的体重和体长^[2]。近期证明生物合成的 GH 亦能促进鱼类体重和体长的生长^[3,4];在转入 GH 基因鱼及其后代 F1 和 F2 也证实了这种促生长效应^[5-8]。本实验通过研究人 GH 和人 GH 基因在去垂体鱼体内的功能,试图从另一角度证实外源人 GH 基因在转基因在鱼体内的表达,并建立一个鱼类垂体激素的代偿模型。

材料和方法

实验鱼包括鲤鱼 (*Cyprinus carpio* L.) 和鲫鱼 (*Carassius auratus* L.)。其中转入 GH 基因鲤鱼 F2,系由转入 GH 基因鲤鱼 F1 阳性个体繁殖并经尾鳍 DNA 斑点杂交所证实的阳性鱼。鲫鱼取自本所关桥养殖场。实验鱼均为 6 月龄,置室内饲养两周后供去垂体用。

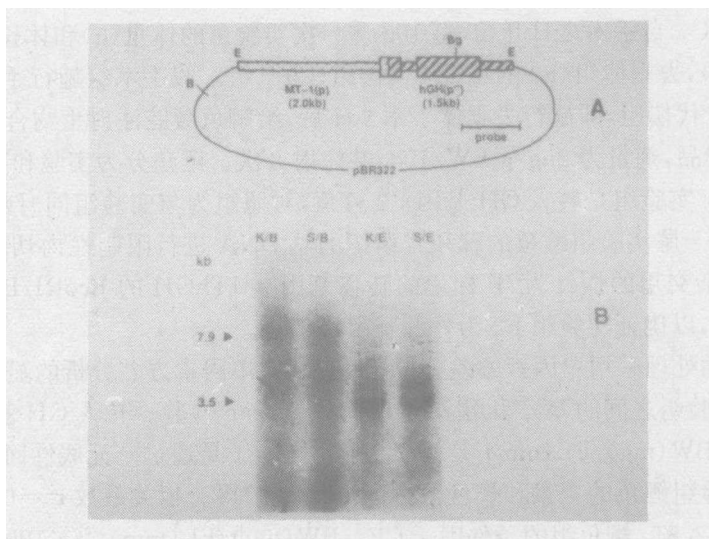


图1 质粒 pMThGH 的结构(A)及其在转基因 F2 代鲤鱼体内的存在(B)

Fig. 1 The construct of pMThGH(A) and its existence in a transgenic common carp F2(B)

用来获得亲代转基因鲤鱼的 pMThGH/BamHI 片段在 F2 代的脾和肾总 DNA 经 BamHI 酶切时未完全出现,说明 pMThGH 的 BamHI 位点在转基因鲤鱼或其后代体内被部分修饰。然而, EcoRI 酶切脾和肾的总 DNA, 出现一个 3.5Kb 的含完整 MThGH 的片段,同时,亦出现约 4.2Kb 的片段。表明外源 DNA 在转基因鱼的后代体内的修饰发生在两端,整合的外源基因在转基因鲤鱼的后代仍存在。B: BamHI; Bg: BglII; E: EcoRI; K/B: BamHI 酶切肾总 DNA (6 μ g); K/E: EcoRI 酶切肾总 DNA (6 μ g); S/B: BamHI 酶切脾总 DNA (6 μ g); S/E: EcoRI 酶切脾总 DNA (6 μ g); Kb: 千碱基对

Total DNA from kidney and spleen of a transgenic common carp F2 was digested with BamHI or EcoRI. After agarose gel electrophoresis and hybridization against 32 P-labelled probe of hGH gene (a fragment of BglII/EcoRI), The pMThGH/BamHI fragment of 7.9kb, used for producing the transgenic common carp, was not completely recovered from the BamHI digestion which suggested that the BamHI sites were modified when the transgene integrated into the host genome or inherited by the offsprings. However, a 3.5kb of EcoRI band containing the entire MThGH fragment was recovered from the kidney and spleen samples. A minor band of EcoRI of about 4.2kb was also hybridized against the hGH probe. The reason is not clear. These data indicated that the modification of foreign DNA in the descendant of transgenic fish mainly happened at the both ends and the inside integrity of the transgene remained. B: BamHI Bg: BglII; E: EcoRI; K/B: Kidney DNA (6 μ g) digested with BamHI; S/E: spleen DNA (6 μ g) digested with EcoRI; Kb: kilo base pairs

去垂体采用刘沛霖等^[9]改进的“口腔”手术法。手术后的鱼饲养在 15℃, 从第 25—30d 逐渐升温至 22℃。自手术之日开始, 每 10d 测一次实验鱼的体重(g)和体长(cm)。鲫鱼分为假手术组(A), 去垂体组(B)和人 GH 代偿组(C)三组。假手术组施行手术但不切除垂体。所谓人 GH 代偿组, 即施行去垂体手术 30d 后, 给鲫鱼腹腔注射生物合成的人 GH, 每 10d 注射一次样品, 剂量为 2μg/g BW/10d, 共注射 8 次。鲤鱼分为实验和对照两组, 两组均施行去垂体。实验组是转人 GH 基因 F2 鲤鱼, 对照组为与实验组同月龄的普通鲤鱼。实验结束后, 对一尾实验组鲤鱼的脾和肾组织的总 DNA 进行限制性内切酶解, Southern 转移和杂交。杂交用的探针为³²P 标记的转移基因 pMThGH 的 EcoRI/BglII 酶切片段 (0.8Kb)(图 1), 以确证实验组 F2 为外源基因携带者。

生长数据的处理采用单因素方差分析和 T-检验。单因素方差分析的显著差异在 99% 可信度水平, 实验组之间的差异采用多重比较的 Duncan 检验。转人 GH 基因 F2 鲤鱼的条件因子 $CF = BW(mg)/FL(mm)^{2.81} \times 100$ 。指数 2.81 是通过一元线性回归在整个实验期间记录的实验组鲤鱼的重量和长度数据的 Log 值求得。相关系数 $r^2 = 0.97$, 线性关系极显著, 斜率为 2.81。鲫鱼组的条件因子 $CF = BW(mg)/FL(mm)^{2.81} \times 100$ 。指数 2.81 是通过一元线性回归所有记录的假手术组和人 GH 代偿组鱼的重量和长度的 Log 值求得。相关系数 $r^2 = 0.86$, 线性关系显著, 斜率亦为 2.81。各实验组鱼的特殊生长率(SGR)依公式 $(\ln V_1 - \ln V_0)/(t_1 - t_0) \times 1000$ 求得, 其中 $\ln V_1$ 和 $\ln V_0$ 是实验结束(t_1)和实验开始(t_0)时重量(mg)或长度(mm)的自然对数值。系数 1000 表示计算结果单位为 SGR/%/d。

结果和讨论

(一)去垂体鱼的存活率

鱼类垂体能分泌多种激素, 调节机体的代谢、生长和繁殖, 而损伤或切除垂体必然会对鱼类的存活产生重要影响。故本实验首先测定了去垂体鱼的存活率(表 1), 从表 1 可以发现, 相同的饲养条件下, 去垂体鲤鱼的存活率均低于去垂体鲫鱼。鲤鱼和鲫鱼在分类地位上十分接近, 但其存活对垂体的依赖性却表现出很大的趋异性。Parwez 等^[10]曾就垂体的重要性将硬骨鱼分为两大类, 其中一类必需由垂体激素调节渗透压, 以适于在淡水生存; 另一类则不然, 去垂体不影响其渗透压调节和在淡水的生存能力。

手术导致的器械损伤不是影响手术鱼存活的重要因素, 因为手术后 45d, 假手术鱼的存活率为 100%。而手术后的饲养温度对去垂体鱼的存活率影响显著, 当饲养温度由 15℃ 升高至 25℃ 时, 去垂体对鱼类存活率的影响尤为显著, 显示出较高温度条件下, 鱼体较高的代谢速率要求较严格的垂体激素调节。

必须指出, 去垂体的转人 GH 基因 F2 代鲤鱼的存活率(去垂体后 87d 为 40%)明显高于对照组(去垂体后 87d 为 15%)(表 2)。这一结果表明, 转基因 F2 代鲤鱼体内人 GH 基因的表达产物可在一定程度上代偿其内源 GH, 从而维持去垂体鱼的存活。

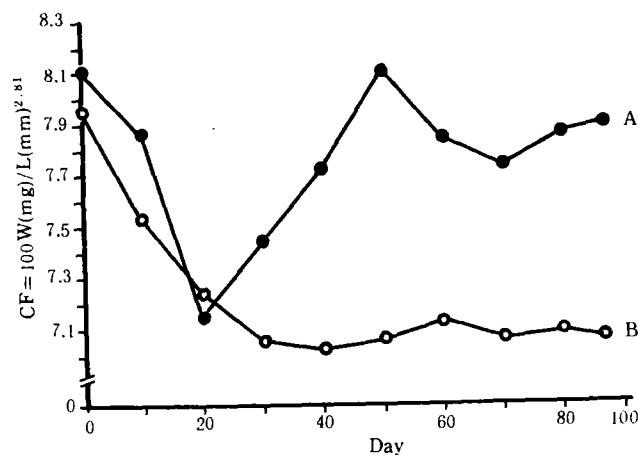


图2 去垂体对转人GH基因鲤鱼(A)和对照鲤鱼(B)的CF值的影响

Fig. 2 The effect of hypophysectomy on CF of the pMThGH-transgenic common carp F2 (A) and the control fish (B)

- A —●— F2 转基因鲤鱼, MThGH 基因携带者 (n=4)
F2 transgenics, MThGH gene carrier (n=4)
B —○— 对照鲤鱼 (n=3) Non-transgenic control (n=3)

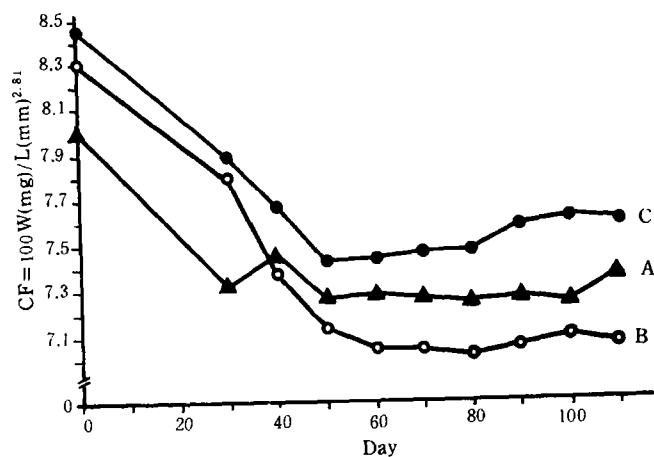


图3 去垂体及注射人GH对鲫鱼CF值的影响

Fig. 3 The effect of hypophysectomy and hGH-injection on CF of crucian carp. A组为假手术组; B组和C组施行去垂体。去垂体后30d, 对C组注射人GH, 共注射8次, 剂量为2μg/g BW/10d

Group A is sham-operated, group B and C are hypophysectomized. Group C has received 8 injection of hGH of 2μg/g BW/10 days since 30-days post-hypophysectomy

- A —▲— 假手术组 (n=10) Sham-operated group (n=10)
B —○— 去垂体组 (n=8) Hypophysectomized group (n=8)
C —●— 人GH代偿组 (n=8) Hypophysectomized and injecting hGH group (n=8)

表1 去垂体鱼的存活率

Tab. 1 The survival rates of hypophysectomized fish

鱼/手术方式 Fish/Operation	饲养温度(°C) Rearing temp(°C)	手术鱼数 No. fish operated	手术后不同时间的存活率(%) Survival rates(%) at		
			2 days	25 days	45 days
鲫鱼/假手术 Crucian carp/Sm	15	15	100	100	100
鲫鱼/去垂体 Crucian carp/Hx	15	15	100	93.3	93.3
鲫鱼/假手术 Crucian carp/Sm	25	15	100	100	100
鲫鱼/去垂体 Crucian carp/Hx	25	15	100	66.7	53.5
鲤鱼/假手术 Common carp/Sm	15	10	100	100	100
鲤鱼/去垂体 Common carp/Hx	15	10	100	70	60
鲤鱼/假手术 Common carp/Sm	25	10	100	100	100
鲤鱼/去垂体 Common carp/Hx	25	10	90	40	20

注: Hx: 去垂体, Hypophysectomy; Sm: 假手术, Sham-operation

表 2 去垂体对鲤鱼的影响

Tab. 2 The effect of hypophysectomy on common carp

鱼	转基因鲤鱼 F2 代	非转基因鲤鱼
Fish	pMThGH-transgenic common carp F2	Non-transgenic common carp
	去垂体	去垂体
手术方式 Operation	Hx	Hx
手术鱼数 No operated(day 0)	10	20
存活鱼数 No survived(day 87)	4	3
存活率		
Survial rate(%)	40	15
体 重 BW at day 0	88.0±4.3	83.5±2.4
体 重 BW at day 87	97.0±5.4	78.3±2.3
SGR _w (%/day)	1.12±0.32	-0.74±0.24 * *
体 长 FL at day 0	138.5±5.1	138.2±3.4
体 长 FL at day 87	143.5±4.2	138.5±4.2
SGR _L (%/day)	0.41±0.18	0.03±0.01 *

注: BW: 体重, Body weight(g); FL: 体长, Fork length(mm)

SGR_w--体重特殊生长率, Specific growth rate of body weight

SGR_L--体长特殊生长率, Specific growth rate of fork length

数值以平均值±标准方差表示 Values are expressed as means±SD

* * 与去垂体转基因鲤鱼 F2 代比较, T-检验, $p < 0.01$ Comparing with Hx-transgenic F2, T-test; $P < 0.01$

* 与去垂体转基因鲤鱼 F2 代比较, T-检验, $P < 0.05$ Comparing with Hx-transgenic F2, T-test; $p < 0.05$

0.05

表 3 人 GH 对去垂体鲫鱼的的影响

Tab. 3 The effect of hGH on hypophysectomized crucian carp

鱼	A 组	B 组	C 组
Fish	Group A	Group B	Group C
手术方式 Operation	假手术	去垂体	去垂体加注射人 GH
	SM	Hx	Hx+hGH
手术鱼数 No operated (day 0)	12	12	12
存活鱼数 No survived (day 110)	10	8	8
存活率 Survival rate(%)	83.3	66.7	66.7
体重 BW at day 30	66.8±4.6	71.0±2.6	69.8±3.6
体重 BW at 110	71.4±5.9	68.8±2.9	73.5±4.2
SGR _w (%/day)	0.66±0.21 * *	-0.41±0.15	0.71±0.31 * *, +
体长 FL at day 30	134.8±4.6	131.8±6.1	130.5±6.2
体长 FL at day 110	137.2±4.7	132.5±5.3	135.0±6.1
SGR _L (%/day)	0.33±0.12 *	0.07±0.35	0.43±0.09 * *, +

注: HX+hGH: 手术后 30 天时, 对 C 组注射人 GH

30 days-post hypophysectomy 8 injection of hGH of 2μg/g BW/10 days was carried out.

数值以平均值±平均标准误表示

Values are expressed as means±SE

* * 与 B 组比较, Duncan-test; $p < 0.01$ * * Comparing with Group B, Duncan-test; $p < 0.01$

* 与 B 组比较, Duncan-test; $P < 0.05$ * Comparing with Group B, Duncan-test; $p < 0.05$

+ 与 A 组比较, Duncan-test; $P > 0.05$ Comparing with Group A, Duncan-test; $P > 0.05$

(二)转人 GH 基因 F2 代鲤鱼的生长代偿效应

朱作言等^[5]的研究结果表明,外源人 GH 基因能够在转基因鲤鱼体内整合与表达,并能随性腺传递到子代。本实验进一步证明,外源人 GH 基因不仅存在于转基因鱼 F2 代的肾脏和脾脏中,而且保持了转移基因在转基因鱼 F2 体内的结构完整性(图 1)。去垂体后,对照组鲤鱼的生长停止($r^2=0.4, n=3$),而去垂体的实验组鲤鱼保持继续生长($r^2=0.97, n=4$),说明外源人 GH 基因在 F2 代鲤鱼体内得到了表达,其表达产物补偿了因去垂体造成的内源 GH 馈缺,并在鲤鱼体内行使了促生长功能。比较实验组和对照组鲤鱼的特殊生长率亦得到同样结论(表 2)。

(三)人 GH 对去垂体鲫鱼的影响

去垂体后,鲫鱼的生长停止(鲫鱼 B 组: $r^2=0.54, n=8$)。当给去垂体鲫鱼注射人 GH ($2\mu\text{g/g BW}/10\text{d}$),可恢复去垂体鲫鱼的生长(鲫鱼 C 组: $r^2=0.85, n=8$),但这种生长的线性关系不及假手术组显著(鲫鱼 A 组: $r^2=0.91, n=10$)。由于手术切除了整个垂体腺,而注射人 GH 仅补偿了去垂体鱼的内源 GH,不能补偿去垂体导致的其它各种垂体激素的缺失。对各实验组鲫鱼的生长结果比较(表 3)亦发现,人 GH 能够在鲫鱼体内行使促生长效应。

(四)实验鱼 CF 值的变化

在手术后的 20d 内,去垂体的实验组鲤鱼平均体重下降而平均体长不变,因而其 CF 值降低($p<0.05$)。随后,实验组鲤鱼的平均体长和体重都增加,同时其 CF 值逐渐回升。手术后 50d 时,实验组鲤鱼的 CF 值同手术前没显著差别($p>0.05$)。然而,对照组鲤鱼的 CF 值在整个实验过程中下降显著($p<0.01$),最后稳定在比手术前低的水平(图 2)。

在鲫鱼组的实验中,手术后的最初 30d,假手术鱼(A 组)和去垂体鱼(B, C 组)的平均体长变化不大而平均体重减轻,其 CF 值均显著下降($p<0.05$)。补充人 GH 的最初 20d,人 GH 代偿组(C 组)的平均体长几乎不变而平均体重下降,其 CF 值亦下降;20d 以后,其平均体长和体重均增加,CF 值回升;持续注射人 GH 80d,CF 值恢复到一个稳定的水平。手术 30d 以后,假手术组(A 组)的 CF 值稳定在与人 GH 代偿组相似的水平。在整个实验过程中,去垂体组(B 组)的平均体重降低而体长几乎不变,因而其 CF 值持续下降(图 3)。

作者注意到,手术鱼 CF 值的早期下降是由于手术损伤导致体重下降引起的。转基因 F2 鲤鱼体内表达的人 GH 和给去垂体鲫鱼注射的人 GH,对体重的刺激效应优先于对体长的刺激效应,因而,它们的 CF 值在下降后回升。这一结果同转 pMThGH 基因鲤鱼体重加倍而体长增加很少的观察一致^[8]。但与 Gill 等^[4]的观察不一致,他们认为牛 GH 对虹鳟体长的刺激效应优先于对体重的刺激效应,因而导致 CF 值的下降。此外,实验组鲤鱼与人 GH 代偿组鲫鱼的 CF 值回升幅度不同,导致这种差别的原因尚不清楚。

目前,垂体激素作用的机制及其相互关系的研究尚待深入;此外,对垂体激素功能缺陷症的治疗尚无良方。为此,我们的研究有助于建立了一个研究垂体激素功能及垂体激素基因治疗的动物模型。

参 考 文 献

- [1] Komourdjian M P, Saunders R L, Fenwick J C. The effect of porcine somatotropin on growth and survival in seawater of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Zool.*, 1976, **54**: 531—535.
- [2] Kayes T. Effect of hypophysectomy, beef growth hormone replacement therapy, pituitary autotransplantation, and environmental salinity on growth in black bullhead (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1977, **33**: 371—381.
- [3] 许克圣等. 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, 水生生物学报, 1991, **15**(2): 103—109.
- [4] Gill J A, et al. Recombinant chicken and bovine growth hormone accelerate growth in aquacultured juvenile pacific salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Bio/Technology*, 1985, **3**: 643—646.
- [5] 朱作言等. 转基因鱼模型的建立, 中国科学, 1989, **B**(2): 147—155.
- [6] Du S J, et al. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an “all fish” chimeric growth hormone gene construct. *Bio/Technology*, 1992, **10**: 176—180.
- [7] Zhang P, et al. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV rainbow trout-GH cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *Mol. Reproduction and Development*, 1990, **25**: 3—13.
- [8] Zhu Z. Growth hormone gene and the transgenic fish. In *Agricultural Biotechnology*. Edited by C. B. You and Z. L. Chen. China Science and Technology Press, 1992, Beijing, pp. 106—116.
- [9] 刘沛霖, 曹杰超. 单尾金鱼脑垂体切除的方法, 水产学报, 1965, **2**(2): 71—75.
- [10] Parwez I, Goswami S V, Sundararal B I. Effects of hypophysectomy on some osmoregulatory parameters of catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *J. Exp. Zool.*, 1984, **229**: 375—381.

THE GROWTH REPLACEMENT OF HYPOPHYSECTOMIZED FISH BY HUMAN GROWTH HORMONE AND THE CORRESPONDING TRANSGENE

Cui Zongbin Xie Yuefeng Xu Kesheng Guo Lihe* and Zhu Zuoyan

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

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

Abstract

Transgenic common carp (*Cyprinus carpio*) have been produced by microinjecting a construct pMThGH, a human growth hormone (hGH) gene with a mouse metallothionein-1 (MT) gene promoter in pBR322, into fertilized eggs. The transgenic fish and the descendent generation F1 and F2 have exhibited growth enhancement. After hypophysectomy, the growth of the pMThGH-transgenic F2 common carp continued while the growth of control fish, including non-transgenic common carp and crucian carp (*Carassius auratus*), ceased. This cessation in crucian carp could be overcome by subcutaneous injection of recombinant hGH. It has therefore been demonstrated that hGH, both from the transgene expression *in vivo* and from biosynthetic source via subcutaneous injection, can replace the carp's endogenous growth hormone to stimulate the growth rate following hypophysectomy.

Key words Carp, Human growth hormone, Human growth hormone gene, Replacement effect, Hypophysectomy