

半滑舌鳎富含亮氨酸的G蛋白偶联受体基因(*LGR8*)的分子克隆和表达分析

吴娅红^{1,3} 陈松林^{1,2*} 刘肖峰¹ 董忠典¹ 张宁¹ 于洋¹ 修旺珊¹

1 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 青岛 266071; 2 海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 青岛 266071; 3 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

*通讯作者, chensl@ysfri.ac.cn

摘要 富含亮氨酸的G蛋白偶联受体(leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 8, *LGR8*) 在哺乳类动物雄性精巢下降过程中起重要作用。本研究在前期完成的半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)全基因组测序与转录组测序的基础上,通过RACE方法克隆得到半滑舌鳎*LGR8*基因(GenBank登录号: KP749830),该基因全长2 768 bp,开放阅读框(open reading frame, ORF)为2 205 bp,编码734个氨基酸,5'-非翻译区(untranslated regions, UTR)为272 bp,3'-UTR为296 bp。氨基酸序列中含有10个LRRs区域、1个LDL-A区域和1个7tm-1结构域。实时定量PCR(Real-time quantitative PCR, qRT-PCR)结果显示,在3龄性成熟鱼体中*LGR8*主要在雄鱼脑和性腺中表达,且显著高于其他组织($P < 0.05$);在雌鱼各组织中均有表达,但是大多数组织(除肠和心脏)中表达量无显著差异;在雄鱼性腺和脑中的表达量要显著高于雌鱼($P < 0.05$)。对雄鱼不同时期的性腺进行qRT-PCR检测结果显示,*LGR8*基因在鱼体发育80 d表达量开始上升,150~210 d表达量达到最大,且显著高于其他组织($P < 0.05$)。研究表明*LGR8*可能在半滑舌鳎性别决定和性腺发育中起一定作用,为半滑舌鳎性别决定机制的研究提供了一定的理论基础。

关键词 半滑舌鳎,富含亮氨酸的G蛋白偶联受体基因(*LGR8*),实时荧光定量PCR(qRT-PCR),性别分化

Molecular Cloning and Expression Analysis of Leucine Rich Repeat Containing G Protein Coupled Receptor 8 Gene (*LGR8*) in Half-smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

WU Ya-Hong^{1,3} CHEN Song-Lin^{1,2*} LIU Xiao-Feng¹ DONG Zhong-Dian¹ ZHANG Ning¹ YU Yang¹ XIU Wang-Shan¹

1 Scientific Research Institute of China, The Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071, China; 2 Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, National Laboratory for Ocean Science and Technology, Qingdao 266071, China; 3 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

*Corresponding author, chensl@ysfri.ac.cn

Abstract Leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 8 (*LGR8*) plays an important role in the process of testicular descent in male mammals. *LGR8* gene in half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) was cloned on the basis of the entire genome and transcriptome sequencing using RACE method. *LGR8* gene contained 2 768 nucleotides, and the open reading frame (ORF) was 2 205 bp, which encoded 734 amino acids, 272 bp of 5'-UTR and 296 bp of 5'-UTR. The amino acid sequences contained 10 LRRs areas, a LDL-A

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(No. 31130057)、国家高技术研究发展计划(863)项目(No. 2012AA10A403)和山东省泰山学者攀登计划专项资助

收稿日期: 2015-03-16 接受日期: 2015-04-07

regional structure and a 7tm-1 domain. The results of Real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) showed that *LGR8* mainly expressed in brains and gonads of the sexual maturity male bodies of three years old fish, which was extremely higher than that of other tissues. There was no significant difference among the most tissues in females(except the intestine and the heart).. It was noteworthy that the expression level of *LGR8* in the brain and gonad of males are significantly higher than that of females ($P<0.05$). The results of gonad in different periods by qRT-PCR showed that *LGR8* gene began to rise at 80 d, and the expression was up to the maximum amount between 150 and 210 d, when the expression was significantly higher than that in other tissues ($P<0.05$). The results suggested that *LGR8* might play a significant role in gender determination and development of the gonads in half smooth tongue sole which provides certain theoretical basis for the sex determination mechanism study of half smooth tongue sole.

Keywords Half smooth tongue sole, Leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 8 gene (*LGR8*), Real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR), Gender determination

富含亮氨酸的G蛋白偶联受体8(leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 8, *LGR8*)是体内胰岛素样因子3(insulin-like 3, *INSL3*)的特异受体,且*LGR8*属于G蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR)家族(段守兴, 李建宏, 2011)。该基因首次由Overbeek等(2005)发现并命名为*GREAT*基因,由于该基因最先被作为一种松弛素受体而描述,因此也称作松弛素家族受体2基因(relaxin family peptide receptor 2, *RXFP2*)。哺乳动物中*LGR8*作为体内*INSL3*的唯一受体,主要高表达于睾丸引带等组织(Ferlin et al.,2003)。在人体研究中发现编码*INSL-3*和*LGR8*蛋白耦合受体的两个基因控制索状引带和腹股沟韧带的分化发育,而这些都是睾丸下降所必需的(Ferlin et al., 2003)。王毅等(2012)发现野生型小鼠(*Mus musculus*)*LGR8*蛋白表达水平高于*INSL3*基因敲除的小鼠,且认为*INSL3-LGR8*系统可能是保持男性精细胞存活的一个因素。Gorlov等(2002)研究表明,*LGR8*纯合子突变的雄性转基因小鼠发生高位腹内隐睾。目前普遍认为,*INSL-3*激活*GREAT/LGR8*受体*INSL-3*或*LGR8*的突变可能导致隐睾症(董德鑫, 徐祗顺, 2006)。*LGR8*基因在人和小鼠等哺乳动物中研究较多,在鱼类中尚未见相关研究报道。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)属于舌鳎科(*Cynoglossidae*),舌鳎属(*Cynoglossus*),是一种既具有较高营养价值又肉质鲜美的海水暖温型鱼类,因而广受消费者亲睐,具有极高的经济价值和市场前景,故而成为优良的海水增养殖品种(柳学周等, 2005)。半滑舌鳎成鱼雌、雄个体差异非常大,雌鱼生长速度比雄鱼快2~3倍,成熟雌鱼体重是雄鱼的

三倍之多(季相山等, 2010)。因此研究半滑舌鳎性别决定基因和遗传机制对于半滑舌鳎性别控制具有重要意义,进而可以达到提高半滑舌鳎产量的目的。本研究从半滑舌鳎雄性性腺中成功克隆得到*LGR8*基因,通过分析该基因在不同组织以及不同时期雄鱼性腺中表达量,初步了解该基因在性别分化中的作用,为进一步探讨半滑舌鳎性别决定机制提供新的理论基础,同时也填补了*LGR8*基因在鱼类研究中的空白。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)均取自山东省黄海水产有限公司。取3龄性成熟雌鱼和雄鱼的脑、性腺、肠、心脏、肾脏、脾脏、血液后立即投入液氮中,转入-80℃低温冰箱保存,以备后续提取RNA使用;剪取半滑舌鳎少量尾鳍保存于无水乙醇中,以备后续用于遗传性别鉴定。

1.2 方法

1.2.1 生理性别及遗传性别鉴定

用2.5%的戊二醛将性腺固定后,通过乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋等,做半滑舌鳎性腺切片,用苏木精-伊红染色后,用Nikon光学显微镜(Nikon EcLIPsE 80i)进行观察,鉴定实验鱼的生理性别。

用酚氯仿法提取鳍条DNA,用实验室半滑舌鳎性别特异引物cseF682 F/R(Chen et al., 2007)进行PCR扩增,扩增体系:DNA(320 ng/μL) 1.0 μL、

2×Super Mix 5.0 μL、cseF682-F/R(10 μmol/L)各0.25 μL、ddH₂O 4.5 μL。PCR反应程序为:95℃ 10 min;95℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 30 s,设定循环数为35;72℃ 10 min,4℃ 10 min。PCR结束后经4%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 RNA提取和cDNA合成

本实验采用Trizol试剂法提取RNA,具体步骤按照试剂盒(Invitrogen Carlshad, USA)说明书进行。-80℃保存备用。

将RNA在冰上解冻后按照以下配置DNA去除体系:5×gDNA Buffer 2 μL、RNA 300~1 000 ng、RNase-Free ddH₂O补足到10 μL,混匀离心,置于PCR仪(君意JY300C)中,42℃ 3 min。然后配置以下反转录体系:10×Fast RT buffer 2 μL、RT Enzyme Mix 1 μL、oligo d(T) 2 μL、RNase-Free ddH₂O 5 μL。配好后将反转录体系加到DNA去除体系中,充分混匀,置于PCR仪,42℃ 15 min,95℃ 3 min,低温保存备用。

1.2.3 LGR8基因的克隆

根据已知半滑舌鲷全基因组测序结果(Chen et al., 2014),获取LGR8基因的部分片段,设计特异引物LGR8-RACE-5'/3'-TD和试剂盒自带引物UPM、NUP(表1),以半滑舌鲷3龄鱼精巢cDNA为PCR模板,用于RACE第一步的Touchdown PCR反应。RACE反应按照SMART™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)进行。将第一步产物稀释10倍后作为第二步巢式PCR的反应模板,巢式反应引物为LGR8-RACE-5'/3'-N(表1)。第二步PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离后获取的目的片

段经回收、纯化、连接、转化、挑菌,选取阳性克隆菌液后送往基因公司测序。本研究涉及的所有引物均用Primer Premier 5.0软件设计,由华大基因公司合成,测序均由英潍捷基基因公司(中国)完成。

1.2.4 序列拼接分析及系统进化树的分析

将所得序列用NCBI-BLAST同源检索,确定所得序列为LGR8基因;利用软件Vector NTI Advance11进行序列拼接;用DNASTar分析开放阅读框和蛋白质翻译;将半滑舌鲷和GenBank中13种代表物种的LGR8氨基酸序列进行多序列比对和同源性比较;利用MEGA5.0和Clustalx1.83软件以除权配对法(UPGMA)构建系统进化树,设置1 000次bootstraps进行系统进化评估。

1.2.5 实时定量PCR(qRT-PCR)表达分析

根据得到的半滑舌鲷LGR8基因的编码区序列,设计表达分析引物1339 LGR8-F和1476 LGR8-R(表1)进行qRT-PCR。以β-actin为内参基因(季相山等,2010),用ABI-7500FAST Real-time PCR仪进行实时定量分析。将3龄半滑舌鲷的脑、性腺、肠、肾、心脏、脾脏和血液进行定量分析,同时对不同时期半滑舌鲷性腺,包括35、52、80、120、150和210 d以及1龄和3龄雄鱼以及1龄伪雄鱼进行定量分析,每种组织和不同时期的样本分别选取3个不同的平行实验个体,每个实验个体设定3次重复。实验所用试剂盒为SuperReal Premix Plus(TIANGEN),PCR反应程序按照试剂盒说明书进行。PCR扩增体系(15 μL):0.3 μL 50×ROX,0.75 μL cDNA模板(540 ng/μL)、7.5 μL SYBR Mix、1339 LGR8-F和1476 LGR8-R(10 μmol/L)各0.3 μL,6.0

表1 LGR8基因克隆及表达引物

Table 1 Primers for DNA clone and expression analysis of LGR8

引物名称Primer name	序列(5'~3')Sequence	用途Function
LGR8-RACE-5'-N	ACTCAAGTTCACACCG	克隆基因末端序列
LGR8-RACE-3'-N	CTCCCCATCAACAGTGCTCTCAACC	Clone cDNA ends
LGR8-RACE-5'-TD	TTGTCCCCACAGCGGCGTTCATTGTGTCTCTGATGCCCTCTGC	
LGR8-RACE-3'-TD	CTAATACGACTCACTATAGGGCA	
UPM	AGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
1339 LGR8-F	TTTTTCGTCGGGGTGTTCG	实时定量PCR
1476 LGR8-R	GGTCAGCAGGAGAACGGAA	qRT-PCR
Actin-F	GAGTAGCCACGCTCTGTCT	qRT-PCR内参基因
Actin-R	GCTGTGCTGTCCCTGTA	Reference gene of qRT-PCR

μL RNase-Free H_2O 。

1.2.6 数据统计

用 SPSS 17.0 分析软件采用 One-way ANOVA 进行统计分析及 Duncan's 多重比较, 当 $P < 0.05$ 时差异显著, 当 $P < 0.01$ 时差异极显著。

2 结果与分析

2.1 成熟半滑舌鲷雌雄鱼性腺切片

此时期精巢中分布着主要为精原细胞和初级精母细胞; 精原细胞多呈圆形或卵圆形, 体积较大, 其直径约为 $8 \mu\text{m}$, 核位于细胞中央; 初级精母细胞体积比精原细胞小, 其形态似精原细胞, 呈圆形或椭圆形, 细胞染色很浅, 细胞直径约为 $6 \mu\text{m}$ (图 1A)。此时期卵巢处于第 I 时相, 卵原细胞呈椭圆形, 细胞直径约为 $35\sim 55 \mu\text{m}$, 核位于细胞中央, 呈圆球形, 大而透明, 核膜清晰, 在同一切面上, 核内有 3~5 个核仁, 在核内分散存在 (图 1B)。

2.2 半滑舌鲷性别鉴定

经 4% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 半滑舌鲷遗传雌鱼 DNA 中能扩增出两条小于 250 bp 的条带 (169 和 134 bp), 而遗传雄鱼中只有一条 169 bp 的条带, 如图 2 所示。

2.3 半滑舌鲷 *LGR8* 基因克隆及其 DNA 序列

本研究通过 RACE 克隆的半滑舌鲷 *LGR8* 基因全长为 2 768 bp (图 3), 位于 19 号染色体上, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 2 205 bp, 编码 734 个氨基酸, 5'-UTR 为 272 bp, 3'-UTR 为 296 bp。其蛋白质结构中含有 10 个 LRRs 区域、1 个 LDL-A 区域和 1 个 7tm-1 结构域 (图 4)。该基因的全长序列已提交到 GenBank 数据库 (登录号: KP749830)。

2.4 系统进化树分析

对 *LGR8* 不同生物个体进行系统进化树分析结果如图 5 所示。利用 MEGA5.0 软件构建不同生物氨基酸序列系统进化树, 结果显示, 半滑舌鲷与硬骨鱼类中红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、深裂眶锯雀鲷 (*Stegastes partoitus*) 等亲缘关系较近, 而与已研究的哺乳动物小鼠及人类的亲缘关系较远。说明在进化过程中, *LGR8* 基因

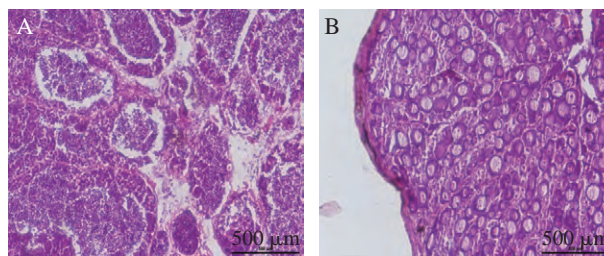


图 1 半滑舌鲷雄鱼(A)和雌鱼(B)个体性腺细胞

Figure 1 The sex gland cell in male (A) and female (B) of half smooth tongue sole

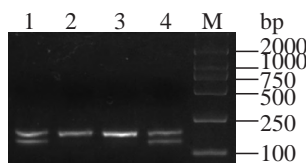


图 2 半滑舌鲷雌雄鱼性别鉴定凝胶结果

Figure 2 The sex determination result of half smooth tongue sole

M: DL2000 marker; 1 and 4: 雌鱼; 2 and 3: 雄鱼

M: DL2000 marker; 1 and 4: Female fish; 2 and 3: Male fish

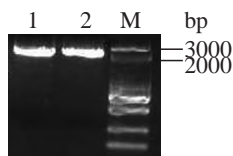


图 3 半滑舌鲷 *LGR8* 基因全长

Figure 3 The total length of *LGR8* in half smooth tongue sole

M: DL3000 marker; 1 and 2: *LGR8*

结构在高等动物体内发生了较大的变化。

2.5 *LGR8* 基因在半滑舌鲷雌雄鱼不同组织中的表达

对半滑舌鲷不同组织的 *LGR8* 基因表达量进行检测发现, *LGR8* 在雌鱼和雄鱼体内的表达量有较大差异 (图 6)。 *LGR8* 在雄鱼脑、性腺中的表达量显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 而在雌鱼各组织 (除肠和心脏) 间表达量无显著差异, 在雄鱼脑和性腺中的表达量要显著高于在雌鱼中的表达量 ($P < 0.05$)。结果显示, *LGR8* 基因主要在半滑舌鲷雄鱼体内脑和性腺中表达, 这可能与雄性发挥某种特异性生理功能具有一定关联。

2.6 *LGR8* 基因在半滑舌鲷雄鱼不同发育时期的表达

LGR8 基因在半滑舌鲷性腺不同发育时期的表

AACCAAGTCTCTTTGGTCTGTGTGTGTCTGCAGCCTCACGTCTGTGAGTTTCGTTCAATTTATTTGTTTTGCCTTTTCCCCTGCA
 CTGAATCGGAGGAACGTTATTTTGAACCATGTTCTGTGTGTGACTGGAAGGCTGACAGACGCATCCGTTTTTGGGGTTATGTCCTT
 ATTGCAGGCACCATTTTACGTTTCATGCTGACATTCTTTTGTGCTGTGTGATTTTTTTTTAACCTGTCAAACCTGGAGTTGGTGCCTC
 GG
 1 ATGTCTTTGCCTCTGTCTATGTCCTCTGTCGAGCAAAGTGAAGCAGAGGTTCGATGCCCTTGGGGCAGTTCCCCGTGTGGAACTTGAGT
 1 M S L P L S M S L S S K V E A E V R C P L G Q F P C G N L S
 91 GAGTGCCTCCCCAGGCTCTGCAGTGAACGACACAAGGACTGTCCAATGGAGCGGACGAACGCCGCTGTGGGGACAACATTGGATGG
 31 E C L P Q A L Q C N G H K D C P N G A D E R R C G D N I G W
 181 GCAGATATAGTGGGTGAACTTTAGAGAATACCAATCCTGTGGACCAGTACTCCGGGGATGAGTGTTTTTTGACGGAATATCCAGATAGC
 61 A D I V G E T L E N T N P V D Q Y S G D E C F L Q E Y P D S
 271 TGTGACTGCATCCAGACAGAGGTGGTGTGTGGAGGTGAACCTTCAGAATGTTCCACCTCTGTCTCCAAATGTGACCTGTCACTG
 91 C D C I Q T E V V C V E V N L Q N V P P L S P N V T W L S L
 361 AGGGCCAATAGGATTCAAGTGTGACTGATTTGTTTTCTCAGAATACCCTGCCCTACAGAGACTATTTCTCAAAAACAACAGCCTGCAG
 121 R A N R I Q V L T D F V F S E Y P A L Q R L F L Q N N S L Q
 451 TTTATTTCCAGACAGCTTTCGAGGCTACACAAATAAAAAGGCTTTCCTCAGTGATAACTTGATATCGTCCCTCAGTCTGGTGTG
 151 F I S R H A F R G L H K L K R L F L S D N L I S S L S P G V
 541 TTTGGTACCTACACCAGTTAGAGTGGCTAATGTTGGATAACAATCCACTGAGGATTCTGGCTCAGGACACATTATTGGGCTGCAGTCT
 181 F G D L H Q L E W L M L D N N P L R I L A Q D T F I G L Q S
 631 CTTGATCTATCTATGTTGGGCCTTCACTGGAGCAGTCTCCTCACCCAGCTTCTGCCAGCACATGCCTTCTTAGACTGGCTGGAT
 211 L V Y L S M V G T S L E Q L P H P S F C Q H M P S L D W L D
 721 CTCGAGGGAAACAGATTCAAATCTCAATTAATCCCTCCTGAACACTTGCAGCAAGCTCAGGGTCTGTTCTAATGGACAACATGATT
 241 L E G N Q I Q T L N Y S L L N T C S K L R V L F L M D N M I
 881 AAGAGAGTTCCTGAAAACACTTTCCTGTCTGTGGAACTTACTGAATTGAATCTGTCCAGCAACCGGATAAGAGAGCTGCCAAAAAC
 271 K R V P E N T F L S L W K L T E L N L S S N R I R E L P K N
 971 ACTTTTAAAAGCCTTTCCAACTCTCTCCTTCGACTAAATGTCTCCCAATCCCTTCTCCAAATCCAGCCAGCCACTTAAATCATTTG
 301 T F K S L S N S L R L N V S H N P L L Q I Q P S H F N H L
 1061 ACACAGCTTCAGTCTTGGCCTAGAAAGGATCCAGATCCAGACTAAGATGTTTCTGCCCATGAAGAACCTGTACACATA
 331 T Q L Q S L A L E G I E I P D I Q T K M F L P M K N L S H I
 1151 TACTTCAAGAAGTCCAGTACTGCTCTATGCCCCATGTCAGGCTCTGTAAACCAACACAGATGGGATATCTTATTGAGGACCTG
 361 Y F K K F Q Y C S Y A P H V R S C K P N T D G I S S F E D L
 1241 CTGGTAACGTAAGTACTGCGGGTGTCTGTGGGTCATTGCCTTCATCACGTGCTTGGTAACCTCTTGTGCATCGGCATGAGTTCGCTG
 391 L A N V V L R V S V W V I A F I T C F G N L F V I G M R S L
 1331 ATCCGAGCCGAGAACAATCTACACGCTGCATGTATCAAAGTCTGTGCTGTGCCGACTGCCTCATGGGTGTGTACCTCTTTTTCGTCGGG
 421 I R A E N N L H A A C I K V L C C A D C L M G V Y L F F V V G
 1421 GTGTTCGATGTCAAAGTTTCGAGGCGAGTACAATCGTAATGCCCTGCTGTGGATGGAGAGTGTGGAGTGTGCYACATTGGTTTTTGGCC
 451 V F D V K F R G Q Y N R N A L L W M E S V E C R T I G F L A
 1511 ATGCTCTCCTCAGAGGTTTCCGTTCTCTGCTGACCTACCTGACCCTGGAAAAGTTCCTGGTTATTGTCTTCCCGTTCAGAACTCTGCG
 481 M L S S E V S V L L L T Y L T L E K F L V I V F P F S N L R
 1601 CCAGGAAACTTCAGACTGGGGTGGTCTGCATCTATCTGGGTCTGGGCTTTATTATAGCTGCTGTGCCGCTAATGATGAGGAAGT
 511 P G K L Q T G V V L A S I W V L G F I I A A V P L M N E E V
 1691 TTTGAAACTACTACGACGTAATGGAGTCTGTTCCCGCTGCCTGACAGGCAAGAAAAACCAACTGCCAAAGGATATCCACAGG
 541 F G N Y Q G R N G V C F P L H S D R Q E K P T A K G Y S T G
 1781 ATTTTTCTGGGTCTAAACGTGGTGGCGTTCCTGGTGATAGTGTCTCTTACTTCTCAGCATGTTCTACTCCATCTATAAAACCGCATCAAC
 571 I F L G L N V V A F L V I V F S Y F S M F Y S I Y K T G I N
 1871 GCCACAGACCTGAGGAGCAGACTACACAGAGATGTGGCTGTGGCCAACAGATTCTTCTTATTGTGTCTCTGATGCCCTCTGCTGGATT
 601 A T D L R S R L H R D V A V A N R F F F I V F S D A L C W I
 1961 CCCATATTTTTGGTGAAGATCCTCTCACTACTAAAGGTGGAGATACCAGGACAATCTCCAGCTGGGTGCTCATCTTATCCTCCCCATC
 631 P I F L V K I L S L L K V E I P G T I S S W V V I F I L P I
 2051 AACAGTCTCTCAACCCATTCTTACACGTTAACCACAGTTTCTCAGGGAGCAGGTGGAAGTCTTACTCTGCCGTGGCAGAGAAGA
 671 N S A L N P I L Y T L T T S F R E Q V E V L L C R W Q R R
 2141 CACATCTGAAGAAAGCGTAAAAGCCTCACTTCTCCACAATCTTATGAGGACATCAAGGCCTCAATGCTACCAGCAGCCAGCCTAC
 701 H I L K K D R K S L T S S T I F M E A S R P Q C Y Q Q P A Y
 2231 CTCCAACGCATATCACTGACTGGTGCAGATCCTCGCTACGCTGA
 731 L Q R I S L T G A D P R Y A *
 GGGAGACCAGAACTGCCAGGCTTTTTTGTGATTGGAACTATGGGTCTGAAATGGAGACTTTCGACTCTTCTGGCATGAC
 AGCTGACTGATTCTGAGTTTCAACAATAAACAGCCACAGGGCTGTGTGCTTTTTTCTCGCCTTGTTTACACAACAATAA
 GTGGTCCGTGATTACTGAGGAGGAGCCGGGCCAAAGTATGACCTTCTCCAGTGATTGACATTTGAGCCTTTCACATTGAT
 CGTATGGAATATCATCAAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图4 半滑舌鲷 LGR8 氨基酸序列

Figure 4 The amino acid sequence of LGR8 in half smooth tongue-sole

小方框: 翻译起始位点和终止位点; 长方框: 7tm-1 结构域; 下划线: LDL-A 区域; 阴影: LRRs 序列

Short frame: The start locus and the terminal locus; long frame: The 7tm-1 motif; Underline: LDL-A; Shadow: LRRs sequences

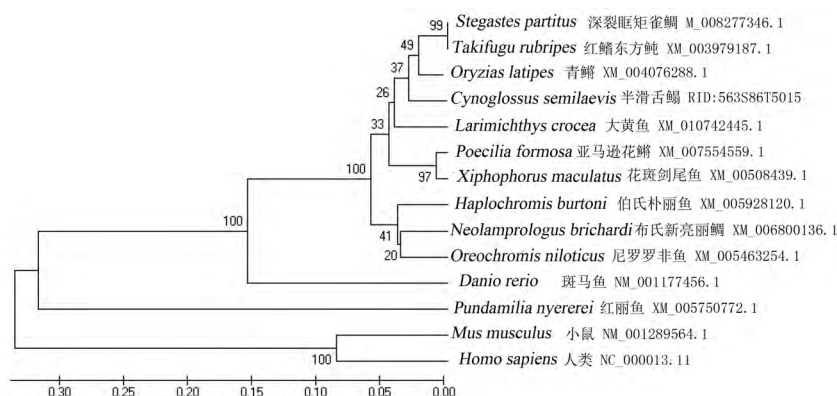


图5 半滑舌鲷与其他物种LGR8的系统进化树

Figure 5 The phylogenetic tree based on UPGMA method of half smooth tongue-sole and the other spices

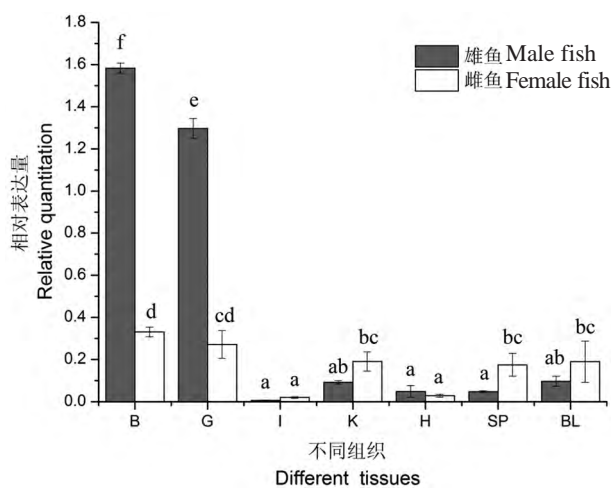
达情况显示(图7),雄鱼在发育前期35~52 d基本表达量较少,出膜80 d后表达量开始上升,80~210 d表达量呈逐渐上升趋势,210 d之后表达量开始降低,其中在150和210 d的表达量达到最高水平,且显著高于其他时期($P < 0.01$)。这表明LGR8基因主要在半滑舌鲷鱼体发育5~7个月时发挥作用。此时半滑舌鲷处于性腺发育后期及分化开始初期之间,结果表明,LGR8基因可能参与了其间的某些生理功能。

2.7 LGR8基因在半滑舌鲷不同性别成鱼中的表达

检测LGR8在雄鱼、雌鱼和伪雄鱼性腺中的表达水平(图8),结果显示,LGR8在雌鱼性腺中表达量很低,而正常雄鱼和伪雄鱼性腺中的表达量都显著高于在雌鱼性腺中的表达量($P < 0.05$),可能由于伪雄鱼遗传性别为雌性而生理性别为雄性。研究结果更进一步证明了LGR8基因是雄性优势表达基因,说明了其在雄性性别维持及发挥雄性生理功能等方面起到一定作用。

3 讨论

本研究通过RACE技术克隆到LGR8基因的全长(GenBank 登录号: KP749830)。LGR8在哺乳类动物中是控制雄性动物睾丸下降过程中的一个重要基因。LGR8蛋白在哺乳动物研究中发现有两个结合点:分别是高亲和力位点(外功能区)和低亲和力位点(跨膜区);其中高亲和力位点位于LRRs上,低亲和力位点被证实是在LGR8的TM外环影天线II(TM EL II)上(Scott et al.,2006)。Scott等(2009)在人体中发现LGR8外功能区主要包含10个LRRs和其帽状结构,其次是A类低密度脂蛋白(LDL-A

图6 LGR8在3龄半滑舌鲷雌雄鱼体内不同组织中的表达
Figure 6 Expressions of LGR8 in various tissues of 3 years old males and females of *Cynoglossus semilaevis*

B: 脑; G: 性腺; I: 肠; K: 肾; H: 心脏; SP: 脾脏; BL: 血液。不同字母表示差异显著($P < 0.05$); 内参基因: β -actin, n=3; 下同
B: Brain; G: Gonad; I: Intestinal; K: Kidney; H: Heart; SP: Spleen; BL: Blood. Different letters mean significant difference; Reference gene: β -actin, n=3; The same below

模块)。同年Hartley等(2009)确定了LGR8上的LRRs、TM外环影天线和LDL-A模块在信号转导中发挥重要作用。通过NCBI-BLAST发现,在半滑舌鲷LGR8蛋白结构中含有10个LRRs区域、1个LDL-A区域以及1个7tm-1结构域,这与哺乳类动物的结构极其类似。利用氨基酸序列通过生物进化树对不同生物的亲缘关系进行了分析,半滑舌鲷的LGR8基因与青鳉、红鳍东方鲀、以及深裂眶矩雀鲷聚为一支,与人类和小鼠等哺乳动物亲缘关系较远。可能是在生物进化过程中由于生理结构的显著差距,基因水平上发生了较大的变化。但其主要

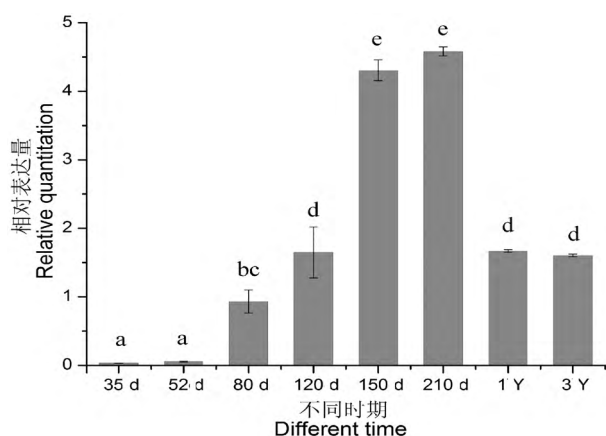


图7 *LGR8*在半滑舌鲷雄性不同发育时期性腺中的表达
Figure 7 Expressions of *LGR8* gene in different periods of gonads in male *Cynoglossus semilaevis*

功能区仍然存在很大相似性,这些结构域很可能在半滑舌鲷中起着与哺乳动物相似的作用。

在哺乳动物中*LGR8*的研究主要集中在雄性精巢下降过程,由于其物种的差异性,在鱼类研究中主要侧重于其性腺中基因的相对表达量研究。*LGR8*在人体内多种组织中都有表达,如精巢、引带、卵巢、子宫、大脑、骨骼肌和肾脏等,但其主要在精巢和引带组织显著高表达(Filonzi et al., 2007)。本研究发现,*LGR8*基因主要在雄鱼脑、性腺中表达,而在雌鱼各组织(除肠和心脏)中无显著差异,且雄鱼在脑和性腺的表达量要极显著高于雌鱼($P<0.05$)。这表明*LGR8*基因在雌雄鱼体内存在显著差异表达,由于存在丘脑下部分泌促性腺激素释放激素刺激脑垂体分泌促性腺激素,在促性腺激素的作用下,性腺分泌性激素的机制,这一结果预示*LGR8*基因可能半滑舌鲷脑-垂体-性腺轴上起重要作用。但由于实验技术限制,实验未获得半滑舌鲷垂体组织,因此还待后续验证。本研究结果显示,雄鱼*LGR8*的表达量从35到210 d呈逐渐上升趋势,210 d之后表达量又开始降低,在150和210 d两个阶段达到了顶峰;在半滑舌鲷孵化后80 d的仔鱼中,雌鱼、雄鱼的原始生殖细胞经过有丝分裂分别分化为卵原细胞和精原细胞;106日龄精巢内精原细胞数量急剧增多,充满整个精巢。据梁卓等(2012)研究显示,半滑舌鲷在140日龄已经完成分化,而马学坤等(2006)研究发现半滑舌鲷150日龄左右开始细胞学分化,半滑舌鲷性腺分化的时间无统一结论,这可能与水温、季节和鱼苗本身有关。汪娣(2012)等研究发现,温度影响了半滑舌鲷性腺

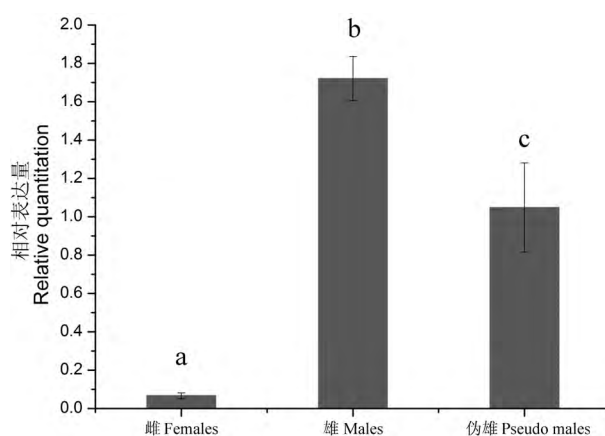


图8 *LGR8*基因在1龄半滑舌鲷成鱼性腺中的表达
Figure 8 Expression of *LGR8* in gonads of adult *Cynoglossus semilaevis*

发育程度,且二者呈现线性关系,在适当温度范围内,性腺发育速度随着温度升高而加快。*LGR8*基因表达量在此期间显著升高,这表明*LGR8*基因不仅参与了性腺的发育过程,很可能主要在鱼体性腺发育末期以及性腺开始分化后行使其生理学功能。通过对雌、雄鱼以及伪雄鱼的定量研究发现,伪雄鱼性腺*LGR8*的表达量介于雌雄鱼表达量之间,且雄鱼和伪雄鱼的表达量显著高于雌鱼性腺的表达量,由于伪雄鱼是由遗传雌性向生理雄性转变的一种鱼,这进一步验证了*LGR8*在维持雄性性征或完成雄鱼生理功能方面发挥着十分重要作用。以上结果可以得出,*LGR8*在半滑舌鲷体内可能在雄鱼发育和分化过程中起重要作用。此外,*LGR8*还在其他组织器官中发挥一定的作用。Sedaghat等(2009)发现在帕金森病中*LGR8*可作为一个标记蛋白指示束旁核神经元功能的变化。Ferlin等(2009)通过敲除*LGR8*基因发现实验小鼠成骨量减少。

4 结论

本研究克隆得到半滑舌鲷*LGR8*基因,并通过qRT-PCR发现其在半滑舌鲷雌鱼各组织中均有表达,但是表达量(除肠和心脏)无显著变化,雄鱼主要在性腺和脑中表达,且显著高于雌鱼各组织表达量。在雄鱼不同发育时期性腺中,主要表达时期为150~210 d,显著高于其他时期($P<0.05$)。伪雄鱼性腺的表达量介于成熟雌鱼和雄鱼之间,且显著高于雌鱼表达量。推测*LGR8*基因主要在半滑舌鲷雄鱼性腺维持和行使其某些特异性功能时发挥作

用。本研究初步阐明了该基因在半滑舌鳎性别分化中的作用,为进一步研究半滑舌鳎性别决定机制提供了理论基础,填补了LGR8基因在鱼类的研究空白。

参考文献

- 董德鑫,徐祗顺. 2006. INSL-3与GREAT/LGR8导致隐睾症的研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, (2): 233-236. (Dong D X, Xu D X. 2006. INSL-3 and GREAT/LGR8 leads to the research of cryptorchidism[J]. International Journal of Urology and Nephrology, (2): 233-236.)
- 段守兴,李建宏. 2011. LGR8基因与隐睾相关性的研究进展[J]. 中国男科学杂志, 25(2): 67-69. (Duan S X, Li J H. 2011. The research of LGR8 genetic correlation with cryptorchidism[J]. Chinese Journal of Andrology, 25(2):67-69.)
- 季相山,陈松林,马洪雨,等. 2010. 半滑舌鳎养殖群体中自然性逆转伪雄鱼的发现[J]. 水产学报, 32(2): 322-327. (Ji X S, Chen S L, Ma H Y, et al. 2010. Reverse pseudo male fish of half smooth tongue sole found in natural breeding group[J]. Journal of Fisheries, 32(2): 322-327.)
- 梁卓,陈松林,张静,等. 2012. 半滑舌鳎养殖群体性腺发育观察[J]. 南方农业报, 43(12): 2074-2078. (Liang Z, Chen S L, Zhang J, et al. 2012. The gonads development of half smooth tongue sole in aquaculture group[J]. Journal of Southern Agriculture, 43(12): 2074-2078.)
- 柳学周,庄志猛,马爱军,等. 2005. 半滑舌鳎繁殖生物学及繁育技术研究[J]. 海洋水产研究, 26(5): 7-14. (Liu X Z, Zhuang Z M, Ma A J, et al. 2005. Half smooth tongue sole reproduction biology and breeding technology research[J]. Marine Aquaculture Research, 26(5): 7-14.)
- 马学坤,柳学周,温海深,等. 2006. 半滑舌鳎性腺分化的组织学观察[J]. 海洋水产研究, 27(2): 55-61. (Ma X K, Liu X Z, Wen H S, et al. 2006. The gonad differentiation histological observation of half smooth tongue sole [J]. Marine Aquaculture Research, 27(2):55-61.)
- 汪娣,田永胜,陈松林,等. 2012. 水温对半滑舌鳎性腺组织发育的影响[J]. 水产学报, 32(2): 263-267. (Wang D, Tian Y S, Chen S L, et al. 2012. The influence of water temperature in half smooth tongue sole gonad tissue development[J]. Journal of Fisheries, 32(2): 263-267.)
- 王毅,张少华,刘娟,等. 2012. *Insulin-3*基因敲除鼠生殖系统LGR8蛋白的表达[J]. 西安交通大学学报(医学版), (2):172-175. (Wang Y, Zhang S H, Liu J, et al. 2012. Expression of LGR8 protein in the reproduction system in

- Insulin-3* knockout mice[J]. Journal of Xian Jiaotong University (Medical Sciences), (2): 172-175.)
- Ferlin A, Simonato M, Bartoloni L, et al. 2003. The INSL3 LGR8/GREAT ligand receptor pair in human cryptorchidism[J]. The Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism, 88(9): 4273-4279.
- Chen S L, Li J, Deng S P, et al. 2007. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Marine Biotechnology, 9(2): 273-280.
- Chen S L, Zhang G J, Shao C W, et al. 2014. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle[J]. Nature Genetics, 46(3): 253-260.
- Ferlin A, Pepe A, Giansello L, et al. 2009. New roles for INSL3 in adults[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 160: 215-218.
- Filonzi M, Cardoso L C, Pimenta et al. 2007. Relaxin family peptide receptors Rxfp1 and Rxfp2: Mapping of the mRNA and protein distribution in the reproductive tract of the male rat[J]. Reprod Biol Endocrinol, 5: 29.
- Gorlov I P, Kamat A, Bogatcheva N V, et al. 2002. Mutations of the GREAT gene cause cryptorchidism[J]. Human Molecular Genetics, 11(19): 2209-2318.
- Hartley B J, Scott D J, Callander G E, et al. 2009. Resolving the unconventional mechanisms underlying RXFP1 and RXFP2 receptor function[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 160: 67-73.
- Overbeek P A, Gorlov I P, Sutherland R W, et al. 2005. A transgenic insertion causing cryptorchidism in mice[J]. Genesis, (30): 26-35.
- Scott D J, Layfield S, Yan Y, et al. 2006. Characterization of novel splice variants of LGR7 and LGR8 reveals that receptor signaling is mediated by their unique low density lipoprotein class a modules[J]. Journal of Biological Chemistry, 281(46): 34942-34954.
- Scott D J, Tregear G W, Bathgate R A, et al. 2009. Modeling the primary hormone-binding site of RXFP1 and RXFP2[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 160: 74-77.
- Sedaghat K, Finkelstein D I, Gundlach A L. 2009. Effect of unilateral lesion of the nigrostriatal dopamine pathway on survival and neurochemistry of parafascicular nucleus neurons in the rat- evaluation of time-course and LGR8 expression[J]. Brain Research, 1271: 83-94.

(责任编辑 靳晓霞)