

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2011.00473

大口黑鲈 *GHRH-LP* 和 *GHRH* 基因序列同源性、 基因结构和时序表达研究

韩林强^{1,2} 白俊杰¹ 李胜杰¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广州 510380;

2. 上海海洋大学水产生命学院, 上海 271017)

摘要: 促生长激素释放激素(Growth hormone releasing hormone, GHRH)是生长激素释放调控的重要因子。过去人们一直将鱼类的促生长激素释放激素样多肽(Growth hormone releasing hormone like peptide, GHRH-LP)误认为是 GHRH, 直到最近才分离出 *GHRH* 基因。为了了解 *GHRH* 和 *GHRH-LP* 基因的结构特征及表达差异, 研究克隆了大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)*GHRH* 和 *GHRH-LP* 基因, 同时应用实时定量 PCR 技术研究这两个基因的组织表达及发育时序表达情况。结果显示, 大口黑鲈 GHRH 的成熟肽由 27 个氨基酸残基组成, GHRH-LP 的成熟肽由 44 个氨基酸残基组成。两个基因均由 5 个外显子和 4 个内含子组成, 但两者成熟肽编码区在外显子上的分布有明显不同。与其他脊椎动物比较, GHRH 同源性为 74%—100%, 而 GHRH-LP 同源性为 41%—96%, 两者间具有一定的相似性(37%—63%)。*GHRH* 基因仅在前脑和延脑中表达, 而 *GHRH-LP* 基因在中枢神经系统及外周组织中均有表达; 在胚胎发育过程中 *GHRH* 在神经胚后期检测到表达, 其表达水平在仔鱼出膜 1d 后显著提高, 而 *GHRH-LP* 在囊胚期及后续发育过程中均检测到表达。基因结构、序列同源性及其表达谱研究均表明, *GHRH* 和 *GHRH-LP* 存在显著差异, 应为具有不同功能的两个基因。

关键词: 大口黑鲈; *GHRH*; *GHRH-LP*; 基因结构; 时空表达

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2011)03-0473-09

促生长激素释放激素(Growth hormone releasing hormone, GHRH)最先是在胰腺癌组织中分离的一种由动物下丘脑分泌的多肽类物质, 其主要生物学功能是刺激垂体细胞合成、分泌生长激素(Growth Hormone, GH)^[1]。此外 GHRH 对细胞增殖分化, 脑垂体形成等也有重要作用^[2,3]。促生长激素释放激素样多肽(Growth hormone releasing hormone like peptide, GHRH-LP), 又称为脑垂体腺苷酸环化酶激活多肽关联蛋白(PACAP-related peptide, PRP)是一种在与脑垂体腺苷酸环化酶激活多肽(Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide, PACAP)共编码的一种生物活性多肽^[4,5]。研究发现 *GHRH-LP* cDNA 广泛分布于中枢神经系统及外周神经系统,

在神经系统、消化系统及生殖系统中均具有重要的调节作用, 并在原索动物、鱼类、两栖类、鸟类及哺乳类动物中高度保守^[6]。聚类分析表明 GHRH 与 GHRH-LP 同属胰高血糖素家族。在哺乳动物中, 这两个多肽是由不同基因编码的, 但在非哺乳动物中过去认为这两个蛋白为同一物质, 并认为哺乳类 *GHRH* 基因是在进化过程中由非哺乳类动物 *GHRH-LP* 基因演化而来的, 并据此推测非哺乳类动物 GHRH-LP 也起着促生长激素释放功能^[7,8]。然而在鱼类及两栖类动物中的研究表明, 尽管 GHRH-LP 激素能表现出促进鱼类脑垂体生长激素释放的能力, 但其促生长激素释放的效应极其微弱^[9-11], 推测在非哺乳脊椎动物中也可能和在哺乳动物中一样, 存

收稿日期: 2010-02-08; 修订日期: 2010-08-12

基金项目: 国家科技支撑项目(2006BAD01A1209); 农业部公益性行业科研专项(200903045); 农业部“948”项目(2010-29); 国家自然科学基金项目(30600152); 广东省科技计划项目(2007B020708008)资助

作者简介: 韩林强(1985—), 男, 江西人; 在读硕士研究生; 研究方向为水产动物遗传育种。E-mail: hlq850112@sina.com

通讯作者: 白俊杰. Tel: 020-81616129; E-mail: jjbai@163.net

在两个基因分别编码 GHRH 与 GHRH-LP, 只是鱼类及两栖类 *GHRH* 基因当时尚未被发现^[12]。2007 年 Lee, *et al.*在斑马鱼(*Danio rerio*)和金鱼(*Carassius auratus*)中分离出一个不同于 *GHRH-LP* 的新基因, 序列同源性, 基因结构及在染色体中的布局等分析均表明其与哺乳动物 *GHRH* 基因高度相似^[13], 受体结合实验亦表明, 鱼类 GHRH 较之 PACAP 或 GHRH-LP 能与 GHRH 更加特异的结合^[13], 揭示在鱼类中 GHRH 与 GHRH-LP 确实是由两个不同的基因分别编码的。

目前, *GHRH* 在斑马鱼和金鱼中已被克隆获得, 但它与 *GHRH-LP* 在基因结构和体内表达方面的比较研究在鱼类中尚未见报道, 导致很多研究者仍将这两个基因混淆。本研究采用大口黑鲈作为实验材料, 克隆了 *GHRH* 和 *GHRH-LP* 基因, 并比较分析了这两个基因的结构特征、序列同源性和组织表达及胚胎发育表达特征, 为区分鱼类 *GHRH* 和 *GHRH-LP* 及探索这两个基因的功能差异奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用大口黑鲈体重约(250±50) g, 取自珠江水产研究所良种基地; Trizol reagent 购自 Invitrogen 公司; PrimerScript™ RT-PCR Kit, 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 和 Pmd18-T vector system 购自 TaKaRa 公司; BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit, Blood & Cell Culture DNA Kit 和 GenomeWalker

Universal Kit 均购自 Clontech 公司; RNase Free DNase I 购自 Promega 公司; ReverTra Ace-α-® Kit 试剂盒购自 TOYOBO, Power SYBR Green Master Mix 购自 Applied Biosystem 公司; 大肠杆菌 DH5α 由本实验室保存。

1.2 方法

脑组织总 RNA 及 DNA 的提取 取大口黑鲈前脑组织 30 mg, 按照 Invitrogen 公司 Trizol reagent 试剂方法进行 RNA 及 DNA 提取。

GHRH 3'序列的扩增与克隆 参照 GenBank 中已登录的斑马鱼(*Danio rerio*, NM_001080092)、金鱼(*Carassius auratus*, DQ991243)、爪蛙(*Xenopus laevis*, NM_001096728)、鸡(*Gallus gallus*, NM_001040464)等动物的 *GHRH* 基因 cDNA 序列, 在成熟肽区域上设计上游引物 P1、P2(表 1)。首先利用 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 试剂盒反转录总 RNA, 以此为模版, 用 P1 和该试剂盒自带 3' RACE Outer Primer 引物进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94℃, 3min; 94℃, 30s; 55℃, 30s; 72℃, 1min, 30 个循环; 72℃, 5min。然后用 P2 和 3' RACE inner Primer 进行第二轮巢式扩增, PCR 反应程序同上, 仅退火温度改为 50℃。目的片段经低熔点琼脂糖凝胶回收纯化, 与 pMD18-T 载体连接, 转化感受态大肠杆菌 DH5α, 筛选阳性克隆并送上海生工公司测序。

GHRH 基因组序列及侧翼序列的扩增和克隆 按照 Genome Walker Universal Kit 试剂盒的操作, 取 4 个酶切文库为模板, 使用试剂盒提供的引物

表 1 引物名称及序列
Tab. 1 Primer sequences applied in largemouth bass *GHRH*, *GHRH-LP* clone and gene expression research

引物名称 Primer names	引物序列(5'→3') Primer sequences	引物名称 Primer names	引物序列(5'→3') Primer sequences
P1	5'-CATGCTGAYGCCATCTTTACC-3'	R1	5'-GCCAGTTCGAGYAAAGCSAC-3'
P2	5'-AYGCCATCTTTACCAACAGC-3'	R2	5'-GTCTAYGGAATCWTAAATGCAC-3'
P3	5'-ATCCAGACATCTTGACCCGTTTTAGCAT-3'	R3	5'-TYCTAAYTCTCTGTCTRTACCT-3'
P4	5'-AACAAGTGACAGAGGGCACAGCTATGAC-3'	R4	5'-TGACAACGACGCCTTCGATGAG-3'
P5	5'-CATGAGGCCAAGACTGCTGAGTTGAGA-3'	R5	5'-CTCTGACTCTCTCCATGCTGTTGTCG-3'
P6	5'-TTCCTCCAACCTCGTTCTTTACAGATG-3'	R6	5'-AATTCCCATCCTCATCGAAGGCGTC-3'
P7	5'-TGCCCTTCACTCTCATCTCTCATCCTC-3'	R7	5'-CTCTCCCTGCTTCCCTGCCATA-3'
P8	5'-TAGCTCCCAGTCACTCCCACATCACAC-3'	R8	5'-CAGGTATTTCTGCACGGCCATCT-3'
P9	5'-CCGCTCTACCCATCCATTA-3'	R9	5'-ACACCTATCGGACTAAGTTACCCT-3'
P10	5'-GCTCTCACTTTTCATCTCCCAG-3'	P10	5'-GCTCTCACTTTTCATCTCCCAG-3'
P11	5'-GGACACGGAAAGGATTGACAG-3'	P11	5'-GGACACGGAAAGGATTGACAG-3'
P12	5'-CGGAGTCTCGTTTCGTATCGG-3'		

AP1 与 P3 引物进行 PCR 扩增, 94℃, 3min, 1 个循环; 94℃, 30s; 67℃, 3min, 5 个循环; 94℃, 30s; 63℃, 30s; 72℃, 3min, 27 个循环; 72℃, 5min。取该 PCR 产物稀释 100 倍后利用 AP2 和 P4 进行巢式扩增, 程序同上。同样, 利用 P5、P6 及 P7、P8 进行 3' 及 5' 侧翼序列的第二轮扩增。利用 Vector NTI 7.0 软件拼接上述序列并找出内含子 3、4。

生物信息学分析及实验验证 利用在线软件 GeneScan 预测外显子 1 和 2。使用 PrimerScript™ RT-PCR Kit 反转录 RNA, 引物 P9 和 P10 进行 PCR 扩增: 94℃, 3min, 一个循环; 94℃, 30s; 55℃, 30s; 72℃, 1min, 30 个循环; 72℃, 5min。产物经回收测序并将序列与前面扩增获得的序列进行比对分析, 确认在线软件 GeneScan 预测外显子 1 和 2 的正确性。

***GHRH-LP* cDNA 序列的扩增与克隆** 参照 GenBank 中已登录的斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*, AY869693)、橙色莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*, AY522580)、蓝曼龙 (*Trichogaster trichopterus*, EU107387)、慈鲷鱼 (*Astatotilapia burtoni*, EU523856) 等 *GHRH-LP* 基因的 cDNA 序列, 在同源保守区内设计引物。反转录过程按照 TaKaRa 公司 PrimerScript™ RT-PCR Kit 试剂盒中的操作步骤进行。取反转录液作为模板, 采用 R1 和 R3 引物进行 PCR 扩增, 反应结束后利用第一次 PCR 产物为模板采用 R2 和 R3 引物做巢式 PCR 扩增。扩增产物经低熔点琼脂糖凝胶回收纯化与 pMD18-T 载体连接转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 经菌落 PCR 验证后送阳性克隆测序。在此基础上, 根据核心片段序列信息设计 3' RACE 及 5' RACE 引物。3' RACE 按照 TaKaRa 公司 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 试剂盒进行, 通过基因特异引物 R4 和试剂盒 3' RACE Outer Primer 及 3' RACE Inner Primer 两轮 PCR, 获得目的条带, 胶回收连接后转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性克隆测序, 反应程序为: 94℃ 3min 变性, 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 45s 32 个循环, 72℃ 延伸 5min。5' RACE 按照 Clontech 公司 BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒进行操作, 利用基因特异引物 R5 及巢式引物 R6 与试剂盒自带引物 UPM 及 NUP 两轮扩增获得, 反应程序为: 95℃ 3min 变性, 94℃ 30s, 68℃ 30s, 72℃ 1min 20s 5 个循环; 94℃ 30s, 64℃ 30s, 72℃ 1min 20s 5 个循环; 94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 1min 20s 27 个循环, 72℃ 延伸

5min, 条带胶回收克隆送样测序。

***GHRH-LP* 基因组序列的克隆** 参照大口黑鲈 *GHRH-LP* cDNA 序列, 设计引物 R7、R8, 以大口黑鲈基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应程序为: 94℃ 3min 变性, 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 3min, 32 个循环, 72℃ 延伸 7min, 目的片段经回收克隆后送测序。

基因的时空表达谱研究 为了研究 *GHRH* 和 *GHRH-LP* 基因在大口黑鲈胚胎发育中的表达情况, 取一对健康亲鱼(♀650 g, ♂600 g)催产后放养在水泥池中自然交配受精, 收集受精卵于室温下培育, 不同发育阶段(未受精卵、受精卵、桑椹胚、囊胚中期、原肠早期、原肠中晚期、体节出现期、神经胚、肌肉效应期、出膜前、刚出膜、出膜后 1d、2d、3d、4d)各取 50 粒卵(幼鱼)提取总 RNA。取 1 μ g 总 RNA, 经 DNase I (Promega)处理后, 用 ReverTra Ace- α -® Kit 试剂盒中试剂反转录合成 cDNA, 然后利用 Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) 在 ABI 7300 定量 PCR 仪上进行基因定量, 反应体系为 20 μ L: cDNA 产物 1 μ L, Power SYBR Green Master Mix 10 μ L, *GHRH* 基因特异引物 P9 和 P10(*GHRH-LP* 引物 R9 和 R10 或 R9 和 R11 或内参基因 18S 特异引物 P11 和 P12)各 0.2 μ L 及水 8.2 μ L。反应程序为: 95℃ 2min, 95℃ 15s, 56℃ 30s, 72℃ 30s, 共 45 个循环, 最后在 65℃—95℃ 范围内检测扩增产物的融解曲线。

为了研究 *GHRH* 和 *GHRH-LP* 基因在大口黑鲈各组织中的表达情况, 取 3 尾成鱼[(250 $\pm$ 50) g]在水泥池暂养 3d 后无菌条件下取各组织样本(前脑、中脑、小脑、延脑、垂体、鳃、心、肝、脾、胃、肾、肠、肌、脂肪组织)提取 RNA, 将上述 3 尾鱼相同组织的等量 RNA 混合作为一个样品用于后续定量 PCR 实验, 实验程序同上。整个实验重复三次。

2 结果

2.1 大口黑鲈 *GHRH* 基因的 cDNA 序列分析

在已知鱼类 *GHRH* 基因最保守区域设计一对部分重叠引物 P1 和 P2, 结合 oligo dT 引物, 获得了大口黑鲈 *GHRH* cDNA 3'端 399 bp 的片段。RACE 技术获取大口黑鲈 *GHRH* 基因 cDNA 5'端序列失败后, 利用 Genomewalk 技术向基因的 5'端扩增基因组序列, 经在线软件 Genescan 分析, 所获得的 5'侧

翼序列包含该基因第 1、第 2 外显子及内含子 1, 起始密码子位于第一外显子。利用引物 P9 和 P10 在 cDNA 库中扩增及测序后验证了预测的准确性。获得大口黑鲈 *GHRH* cDNA 序列 629 bp(Genbank 登录号: HQ640678), 其中 ORF 长为 426 bp, 编码 140 个氨基酸; 3' 非翻译区长为 171 bp, 存在 Poly(A)加尾信号 ATTAAG。氨基酸序列分析(表 2)结果表明, 大口黑鲈 *GHRH* 与青鳉 *GHRH* 的相似性最高, 为 100%; 与其他两栖类及鱼类的同源性介于 70%—96%。利用在线软件 SignalP 3.0 Server 分析 *GHRH* 基因编码的氨基酸序列, 预测出该蛋白具有一个 18 个氨基酸的信号肽(M1-G18), 成熟肽位于第 65 至第 91 个氨基酸。

2.2 大口黑鲈 *GHRH-LP* 基因 cDNA 序列分析

大口黑鲈 *GHRH-LP* 基因存在两种 cDNA 序列, 其中序列 a 全长 742 bp, 包含 54 bp 的 5' UTR, 525 bp 的 ORF, 164 bp 的 3'UTR (Genbank 登录号: HQ651674); 序列 b 全长为 758 bp, 包括 54 bp 的 5' UTR, 420 bp 的 ORF 框, 284 bp 的 3' UTR (Genbank 登录号: HQ651675)。这两种 mRNA 在阅读框及 3' 末端存在两处可变剪切, 序列 a 具有较大的阅读框和较短的 3'末端, 编码 PACAP 和 *GHRH-LP*; 而序列 b 仅编码 PACAP, 具有较长的 3'末端。利用在线软件 SignalP 3.0 Server 分析 *GHRH-LP* 基因编码的氨基酸序列, 预测出该蛋白具有一个 24 个氨基酸的信号肽(M1-C24), *GHRH-LP* 成熟肽位于第 84—128 个氨基酸, PACAP 成熟肽位于第 131—168 个氨基酸位置。序列同源性分析结果表明, 大口黑鲈与青鳉和牙鲆的 *GHRH-LP* 的相似性最高, 为 96%, 与其他

鱼类和两栖类的相似性在 41%—78% (表 2)。

2.3 大口黑鲈 *GHRH* 和 *GHRH-LP* 基因组序列分析

以大口黑鲈基因组 DNA 酶切连接文库为模板, 利用基因组步移技术经 2 轮 PCR 扩增, 获得了 *GHRH* 基因组 DNA 序列 4167 bp, 与克隆的 cDNA 序列比对分析得出, 大口黑鲈 *GHRH* 基因由 5 个外显子及 4 个内含子组成, 长度分别为: 109、105、105、126、175 bp, 702、355、120、113 bp (图 1a, Genbank 登录号: HQ640680)。大口黑鲈 *GHRH-LP* 基因同样包含 5 个外显子及 4 个内含子, 长度分别为: 84、105、135、105、454 bp, 409、959、344、633 bp (图 1b, Genbank 登录号: HQ640681)。基因内含子与外显子边界均符合 GT-AG 规则。大口黑鲈 *GHRH* 基因成熟肽位于外显子 3 和 4 中, 信号肽位于外显子 1 和 2 中, 总体排布与哺乳动物 *GHRH*(图 1c)结构类似而明显区别于脊椎动物 *GHRH-LP* 基因(图 1d); 而大口黑鲈 *GHRH-LP* 基因成熟肽位于外显子 4 和 5 中, 第一外显子不包括阅读框在内, 其外显子排布与其他脊椎动物 *GHRH-LP* 基因结构高度相似。

2.4 *GHRH* 和 *GHRH-LP* 基因表达谱研究

采用荧光定量 PCR 方法对大口黑鲈 *GHRH* 和 *GHRH-LP* 基因的时空表达谱进行了研究, 数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。组织表达研究结果表明, 大口黑鲈 *GHRH* 只在大脑及延脑中检测到表达, 而在中脑、小脑、垂体及外周组织中均未检测到该基因的表达(图 2A); *GHRH-LP* 基因广泛分布于中枢神经系统及外周组织中, 但是在不同组织中的表达水平有所变化。但总体而言, 在中枢神经系统表达量高, 在外围组织中表达量较低(图 2B)。胚胎发育研究结果表明,

表 2 大口黑鲈与其他脊椎动物 *GHRH* 和 *GHRH-LP* 氨基酸序列同源性比较
Tab. 2 Homology analysis of largemouth bass *GHRH*, *GHRH-LP* N1-27 amino acid sequence to those of other vertebrates

物种 Species	<i>GHRH</i> Homology (%)	<i>GHRH-LP</i> Homology (%)	<i>GHRH/GHRH-LP</i> Homology (%)
鸡 <i>Gallus gallus</i>	85	59	59
爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	74	56	56
人 <i>Homo sapiens</i>	85	41	48
小鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	70	48	52
虹鳉 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	96	59	59
金鱼 <i>Carassius auratus</i>	96	59	59
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	96	78	44
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	100	96	37
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	96	96	37
斑胸草雀 <i>Taeniopygia guttata</i>	81	59	63

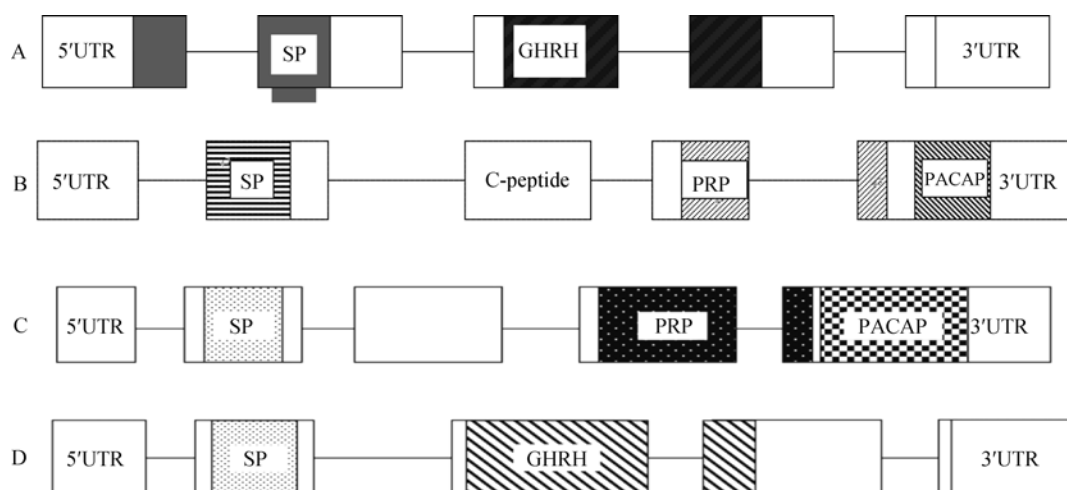


图1 大口黑鲈 *GHRH* 基因(A)、*GHRH-LP* 基因(B)及哺乳动物 *GHRH-LP* 基因(C)、*GHRH* 基因(D)的基因组结构^[11]

Fig. 1 Schematic diagrams summarizing the structural organization of Largemouth bass *GHRH* (A), *GHRH-LP* (B), vertebrate *GHRH-LPs* (C) and mammalian *GHRH* (D)

UTR 表示非翻译区; SP 表示信号肽; *GHRH* 表示促生长激素释放激素; PRP 表示脑垂体腺苷酸环化酶激活多肽关联蛋白; PACAP 表示脑垂体腺苷酸环化酶激活多肽; 外显子用方框表示, 内含子用直线表示

Abbreviations are: UTR, untranslated region; SP, signal peptide; PRP, PACAP related peptide; PACAP, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide; *GHRH*, growth hormone releasing hormone; Genes Exons are shown in box and introns are shown in line. The length of exons and introns are not draw to scale

大口黑鲈 *GHRH* 首先在神经胚阶段检测到微弱表达, 出膜后表达水平逐步提高(图 2C); 而 *GHRH-LP* 基因囊胚期即检测到微弱表达, 且随着发育的进行表达量逐步提高(图 2D)。*GHRH-LP* 在胚胎发育过程及成鱼消化系统中的表达结果表明, *GHRH-LP* 可能在胚胎发育及食欲调节过程中发挥着重要作用^[14, 15]。

3 讨论

3.1 大口黑鲈 *GHRH* 和 *GHRH-LP* 氨基酸序列与其他脊椎动物同源性比较

大口黑鲈 *GHRH* 基因编码 141 个氨基酸, 序列同源性分析表明, 与其他脊椎动物比较 *GHRH* 前肽同源性较低, 介于 32%—56%, 而在成熟肽区域(N1-27aa)序列则高度保守, 同源性介于 74%—100% (表 2), 显示基因的不同区域在进化过程中受到的选择压力并不一致, 成熟肽区域可能因为承担着重要的生理作用而更加保守。而 *GHRH-LP* 蛋白(N1-27aa)保守性则在鱼类及哺乳动物中比较低, 但与 *GHRH* 相比较仍有一定的同源性(37%—63%), 尤其是在 N 端, 这也可能是 *GHRH-LP* 蛋白在鱼类中能够表现出一定的促生长激素释放能力的原因^[9, 10]。

3.2 *GHRH* 和 *GHRH-LP* 基因的系统发生

关于 *GHRH* 和 *GHRH-LP* 的进化关系, 此前曾有学者认为哺乳类 *GHRH* 基因是由低等脊椎动物

GHRH-LP 基因进化而来^[7]。本文基于已克隆及生物信息学推测出的各物种 *GHRH* 序列和 *PRP* 序列, 利用 *PACAP* 基因序列作为外群, 构建系统发生树(图 1)。大口黑鲈 *GHRH* 与之前已克隆出来的两栖类、鸟类及哺乳类 *GHRH* 聚为一支, 而大口黑鲈与其他鱼类和两栖类的 *GHRH-LP* 蛋白则与哺乳类 *PRP* 聚为另一支, 二者间分化明显。据此, Tam, et al.^[16]认为鱼类及两栖动物中先前称为 *GHRH* 的 *GHRH-LP* 蛋白应该是哺乳动物 *PRP* 的同源物, 应统一命名为 *PRP* 蛋白。通过系统发生树的分析结果, 也进一步表明了大口黑鲈 *GHRH* 不同于鱼类中已分离出的 *GHRH-LP* (*PRP*) 蛋白, 而是哺乳动物 *GHRH* 的同源产物。

关于 *GHRH* 和 *GHRH-LP* 的进化关系, 目前认为 *GHRH*、*GHRH-LP* 以及 *PHI-VIP* 应是由一共同的祖先基因进化而来, 在生物进化的第一次染色体倍增过程中该祖先基因形成两支, 其中一支在第二次染色体倍增过程中又形成两个拷贝, 一个形成 *GHRH* 基因, 另一个丢失; 而另一支倍增后形成 *GHRH-LP* 基因(*Salmon-like type*)和 *PHI-VIP* 基因^[13]。

3.3 *GHRH* 表达谱

为了将鱼类 *GHRH* 与 *GHRH-LP* 基因区分开来, 我们研究了这两个基因在大口黑鲈胚胎发育及各组织中的表达特征, 并与其在其他动物中的研究做了

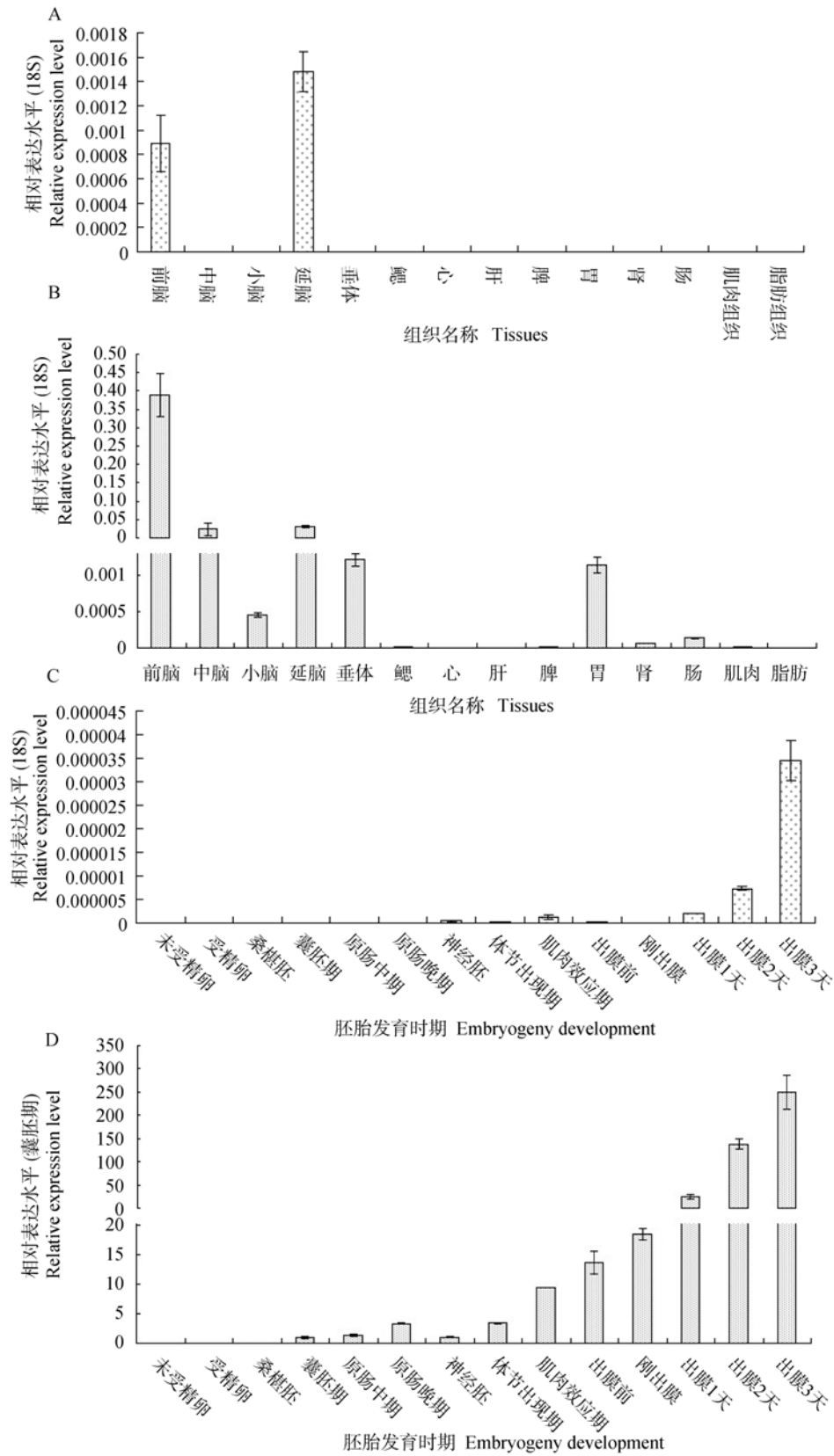


图 2 大口黑鲈 *GHRH* 组织表达(A)及 *GHRH-LP* 组织表达(B)和胚胎发育表达谱(C)及胚胎发育表达谱(D)

Fig. 2 Tissue expression pattern of *GHRH* (A) and *GHRH-LP* in central nerves and peripheral tissues (B) and expression pattern of *GHRH* (C), *GHRH-LP* (D) in embryogeny development

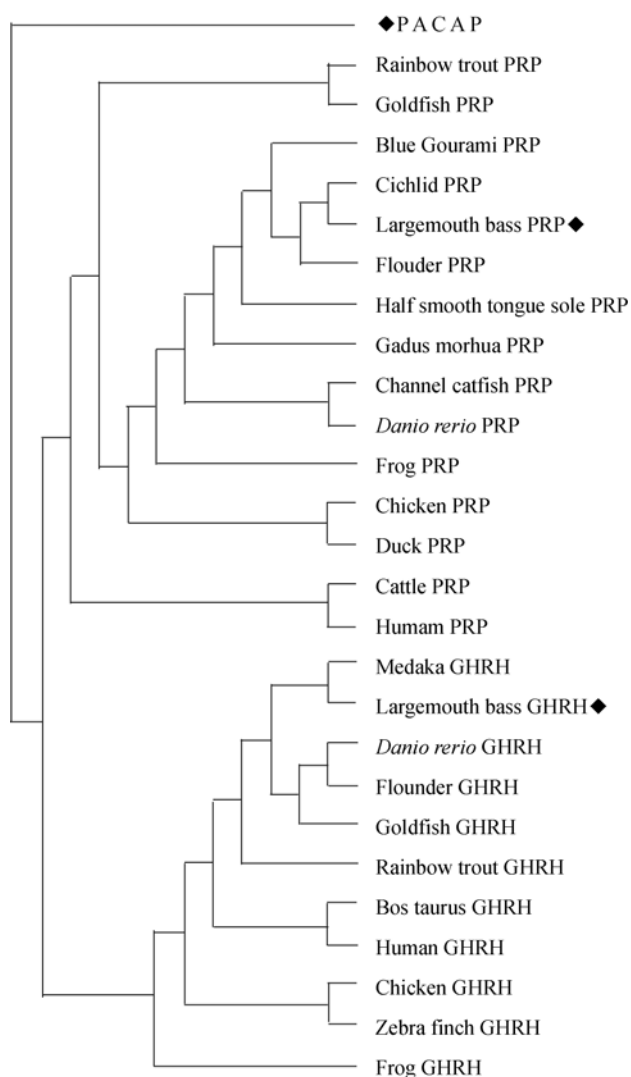


图 3 *GHRH*、*GHRH-LP* (PRP)、*PACAP* 系统发生树分析(以 *PACAP* 序列作为外群)

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *GHRH*, *GHRH-LP* (PRP), *PACAP* and the *PACAP* sequences were used as an out group

比较。*GHRH* 在哺乳动物中主要是由下丘脑分泌表达的, 是垂体生长激素的正性调控因子^[1]。不同于 *GHRH* 基因, *PRP* 基因在哺乳动物中主要是在中枢神经及外周呼吸系统、消化系统和内分泌系统中的神经纤维中表达^[17, 18]。Lee, *et al.*^[13]通过 qRT-PCR 技术研究了金鱼及爪蟾 *GHRH* 的表达情况, 发现与哺乳动物 *GHRH* 表达情况相似, 主要在大脑中表达。在斑马鱼及斜带石斑鱼等中的研究结果表明, *GHRH-LP* 表达情况与哺乳动物 *PRP* 的表达情况更加相似, 主要在脑、垂体、精巢、肠、肾等组织中表达^[19-21]。此外, Wang, *et al.*在鸡上同时比较了 *GHRH* 与 *GHRH-LP* 基因的组织表达特征, 显示 *GHRH* 主要在下丘脑中大量表达, 并在中脑及后脑

中检测到微弱表达, 而 *GHRH-LP* 则在中枢神经组织中广泛表达^[12]。本研究发现 *GHRH* 在大口黑鲈中的表达只局限在前脑及延脑, 其他中枢神经组织及外周组织未检测到表达, 而 *GHRH-LP* 较之具有更广泛的组织表达并以中枢神经系统表达水平最高, 暗示了这两种蛋白可能在功能上有着不同的作用。

GHRH 对于哺乳动物脑垂体的形成具有重要的诱导分化作用^[22]。在本研究中大口黑鲈 *GHRH* 基因在神经胚时期检测到微弱表达, 表明 *GHRH* 可能在鱼类神经发育, 尤其是脑垂体的分化过程中发挥了重要作用。此外, *GHRH* 对于胚胎发育后期脑垂体细胞的增殖亦具有重要的刺激作用, 缺失 *GHRH* 将导致脑垂体发育不良^[17]。鱼类脑垂体在出膜时仍未发育完善, 其正常的激素分泌活动要在出膜生长几天后才趋于正常^[23-25]。本研究在出膜 1d 后检测到 *GHRH* 表达水平的显著升高, 表明 *GHRH* 可能也参与了鱼类脑垂体细胞的增殖过程。与 *GHRH* 相比, 本文在囊胚期即检测到 *GHRH-LP* 的微弱表达。Wu, *et al.*^[26]在斑马鱼中研究发现, 受精 30min 后即可可以在受精卵中检测到 *GHRH-LP* mRNA 的存在, 抑制 *GHRH-LP* 基因的表达将导致脑部发育异常, 表明该基因在动物脑部正常发育过程中发挥重要作用。

总之, 此次克隆出的大口黑鲈 *GHRH* 与哺乳动物 *GHRH* 在序列同源性、基因结构、组织表达分布等方面更加相似而明显区别于 *GHRH-LP* 基因, 是哺乳动物 *GHRH* 的同源基因; 而 *GHRH-LP* 应为哺乳动物 *PRP* 的同源物, 应统一命名为 *PRP* 蛋白。

参考文献:

- [1] Mayo K E, Cerelli G M, Lebo R V, *et al.* Gene encoding human growth hormone-releasing factor precursor: structure, sequence, and chromosomal assignment [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, **82**(1): 63—67
- [2] Mayo K E, Miller T, DeAlmeida V, *et al.* Regulation of the pituitary somatotroph cell by *GHRH* and its receptor [J]. *Recent Progress in Hormone Research*, 2000, **55**: 237—266
- [3] Billestrup N, Swanson L W, Vale W. Growth hormone releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, **83**(18): 6854—6857
- [4] Miyata A, Arimura A, Dahl R R, *et al.* Isolation of a novel 38 residue hypothalamic polypeptide which stimulate adenylate cyclase in pituitary cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1989, **164**(1): 567—574

- [5] Bell G I. The glucagon superfamily: precursor structure and gene organization [J]. *Peptides*, 1986(Suppl. 1): 27—36
- [6] Ole S. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and adrenomedullary function [J]. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative Comparative Physiology*, 2003, **284**: R586—R587
- [7] Hoyle C H. Neuropeptide families: evolutionary perspectives [J]. *Regulatory Peptides*, 1998, **73**: 1—33
- [8] Montero M, Yon L, Kikuyama S, *et al.* Molecular evolution of the growth hormone releasing hormone/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide gene family. Functional implication in the regulation of growth hormone secretion [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2000, **25**: 157—168
- [9] Vaughan J M, Rivier J, Spiess J, *et al.* Isolation and characterization of hypothalamic growth hormone releasing factor from common carp, *Cyprinus carpio* [J]. *Neuroendocrinology*, 1992, **56**: 539—549
- [10] Parker D B, Power M E, Swanson P, *et al.* Exon skipping in the gene encoding pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in salmon alters the expression of two hormones that stimulate growth hormone release [J]. *Endocrinology*, 1997, **138**: 414—423
- [11] Rousseau K, Le B, Pichavant K, *et al.* Pituitary growth hormone secretion in the trubot, a phylogenetically recent teleost, is regulated by a species specific pattern of neuropeptides [J]. *Neuroendocrinology*, 2001, **74**: 375—385
- [12] Wang Y J, Li J, Wang C Y, *et al.* Identification of the endogenous ligands for chicken growth hormone releasing hormone (GHRH) receptor: evidence for a separate gene encoding GHRH in submammalian vertebrates [J]. *Endocrinology*, 2007, **148**(5): 2405—2416
- [13] Lee L T O, Siu F K Y, Tam J K V, *et al.* Discovery of growth hormone releasing hormones and receptors in nonmammalian vertebrates [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, **104**(7): 2133—2138
- [14] Miranda L A, Strobl-Mazzulla P H, Somoza G M. Ontogenetic development and neuroanatomical localization of growth hormone releasing hormone (GHRH) in the brain and pituitary gland of pejerrey fish *Odonthesthes bonariensis* [J]. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2002, **20**: 503—510
- [15] Portbury A L, McConalogue K, Furness J B, *et al.* Distribution of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) immunoreactivity in neurons of the guinea pig digestive tract and their projections in the ileum and colon [J]. *Cell and Tissue Research*, 1995, **279**(2): 385—392
- [16] Tam J K V, Lee L T O, Chow B K C. PACAP related peptide (PRP)—Molecular evolution and potential functions [J]. *Peptides*, 2007, **28**: 1920—1929
- [17] Matsubara S J, Sato M, Mizobuchi M, *et al.* Differential gene expression of growth hormone releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues [J]. *Endocrinology*, 1995, **136**: 4147—4150
- [18] Arimura A, Somogyvari V A, Miyata A, *et al.* Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes [J]. *Endocrinology*, 1991, **129**(5): 2787—2789
- [19] Ando E, Nokihara K, Naruse S. Development of pituitary adenylate cyclase activating polypeptides specific radioimmunoassay systems and distribution of PACAP like immunoreactivity in guinea pig tissues [J]. *Biomedical Peptides, Proteins nucleic Acids*, 1994—1995, **1**(1): 45—50
- [20] Montero M, You L, Rousseau K, *et al.* Distribution, characterization, and growth hormone releasing activity of pituitary adenylate cyclase activation polypeptide in the European eel, *Anguilla anguilla* [J]. *Endocrinology*, 1998, **139**(10): 4300—4310
- [21] Jiang Y, Li W S, Xie J, *et al.* Sequence and expression of a cDNA encoding both pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and growth hormone releasing hormone in grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Li Xue Bao* (Shanghai), 2003, **35**(9): 864—872
- [22] Frohman LA, Kineman R D. Growth hormone releasing hormone and pituitary somatotrope proliferation [J]. *Minerva Endocrinologica*, 2002, **27**(4): 277—285
- [23] Lu S Q, Liu Y, Cheng S Q. Studies on the origin and development of the pituitary gland of the teleost, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Journal of Hunan Agricultural University*, 1996, **22**(2): 182—186 [鲁双庆, 刘筠, 陈淑群. 草鱼脑垂体的起源和发生的研究. 湖南农业大学学报, 1996, **22**(2): 182—186]
- [24] Li W S, Chen D, Wong A O, *et al.* Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, **144**(1): 78—89
- [25] Lu Y J, Hu W, Zhu Z Y. Gene expression profiles of growth and reproduction related genes during the early development of common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(6): 1126—1131 [卢月娇, 胡炜, 朱作言. 鲤鱼发育早期 HPG 轴和 GH/IGF 轴相关因子的转录起始分析. 水生生物学报, 2009, **33**(6): 1126—1131]
- [26] Wu S, Adams B A, Fradinger E A, *et al.* Role of two genes encoding PACAP in early brain development in zebrafish [J]. *Annals of New York Academy of Science*, 2006, **1070**: 602—612

COMPARISON OF GENE STRUCTURE, SEQUENCE HOMOLOGY AND EXPRESSION PATTERN OF LARGEMOUTH BASS *GHRH-LP* AND *GHRH*

HAN Lin-Qiang^{1,2}, BAI Jun-Jie¹ and LI Sheng-Jie

(1. Key Lab of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation of Chinese Academy of Fishery Sciences, Pearl River Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 271017, China)

Abstract: Growth hormone releasing hormone (GHRH) is an important factor involved in growth hormone synthesis and secretion. In mammals, the GHRH and GHRH-LP are encoded by two separate genes. However, in non-mammalian vertebrates, it is believed that the GHRH-like peptide is the counterpart of GHRH in mammals. A real *GHRH* gene was discovered in goldfish and zebrafish recently. Its gene structure and expression distribution in teleost need to be further studied. In order to distinguish the characteristic of *GHRH* and *GHRH-LP* genes and further understand the GH secretion net in teleost, the cDNA sequences and genome gene structure of these two genes were determined in this study, and the gene expression pattern of GHRH and GHRH-like peptide in central nervous system, peripheral tissues and embryogenesis were compared respectively in largemouth bass (*Micropterus salmoide*). The results showed that both *GHRH* and *GHRH-LP* genes were consisted of 5 exons and 4 introns, and the exon-intron arrangement of genes were apparently different from each other, but showed conserved pattern with other vertebrates, respectively. The GHRH mature peptide was 27 amino acid length, which shared highly homologous with other vertebrates (74%—100%); while GHRH-LP mature peptide was 44 amino acid length and showed mediate conservation with other vertebrate (41%—96%). The tissue distribution study showed that the *GHRH* mRNA expression was restricted in brain and medulla, and that *GHRH-LP* was widely distributed in central nerves and peripheral tissues. The *GHRH* mRNA was first detected at neural stage during embryogenesis period, and maintained at a high level during larval developing; *GHRH-LP* mRNA was first detected in blastula stage, and retain a considerable expression level at all the next stage examined. The results demonstrate that the GHRH and GHRH-LP are encoded by two different genes in largemouth bass.

Key words: Largemouth bass (*Micropterus salmoides*); GHRH; GHRH-LP; Gene structure; Temporal and spatial expression pattern