中国科学 C 辑:生命科学 2009 年 第 39 卷 第 11 期: 1069 ~ 1079
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

论 文

中华鲟生长激素受体的分子克隆和功能分析

廖志勇[①], 吴明江[①], 陈晓丽[②]

① 温州大学生命与环境科学学院, 温州 325035;
② 首都儿科研究所, 北京 100020
E-mail: zyliap@sibs.ac.cn

收稿日期: 2009-04-08; 接受日期: 2009-05-27
国家自然科学基金(批准号: 30460036)、北京市自然科学基金(批准号: 5062014)和江西省自然科学基金(批准号: 0630078)资助项目

摘要 为研究生长激素对中华鲟生长的调控机制, 克隆了中华鲟生长激素受体cDNA. csGHR cDNA 的可读框编码了 611 个氨基酸残基的跨膜蛋白质, 含有 GHR 的所有特征结构域. 序列对比发现其他种属 GHR 中高度保守的氨基酸残基在 csGHR 中发生了替换. 我们利用 CHO 细胞分析了 csGHR 的生物功能和 csGHR 分子中高度保守性氨基酸残基替换的生物意义. csGHR 稳定表达细胞中共转染的受丝氨酸蛋白酶抑制剂 2.1(Spi 1.2)启动子驱动的荧光素酶报告基因受海鲤生长激素(seabream GH, sbGH)诱导表达, 并且sbGH诱导稳定表达细胞显著增殖. csGHR稳定表达细胞培养液中检测到中华鲟生长激素结合蛋白质, 并且csGHBP的生成需要金属蛋白酶活性的参与. csGHR配体结合域的 Asp 突变为 Glu 显著提高 csGHR 介导的上述生物活性, 而 Asp 突变为Ala则明显降低csGHR的生物活性. 这些结果表明, 克隆的csGHR具有完全生物功能, 并且csGHBP可能通过csGHR蛋白酶解而生成. 这些发现将有助于全面了解中华鲟生长调控机制.

关键词
中华鲟;
生长激素受体;
生长激素结合蛋白质;
克隆;
突变

生长激素(growth hormone, GH)是生物机体生长发育和代谢的关键调控因子[1]. GH通过与靶细胞膜上的受体作用而发挥其多种生物功能. 人们克隆了多种种属生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)的cDNA. 对GHR的结构研究发现, GHR是细胞因子受体超级家族的Ⅰ型糖蛋白[2]. 不同种属GHR有共同的结构特征, 包括胞外域N-端配体结合结构域(Y/FGEFS)和 5~7 个保守的半胱氨酸残基、一次跨膜结构域、位于胞内域负责受体下游信号转导的两个保守结构域Box1 和Box2. GH结合GHR引起GHR二聚化并自磷酸化, 并且通过激活JAK2-STAT信号通路来介导细胞对GH的应答[3].

GH诱导的信号传递与其他重要激素诱导的信号传递通路类似, 也在多个方面受到严密调控. 一方面, GH的分泌被严密控制以使血液循环中的GH浓度适当. GH靶组织上GHR生物可用性的调节是对GH作用的另一重要调控方式. GH本身或其他激素也可调控GHR表达水平或细胞表面GHR的生物可用性[4,5]. 研究表明, 血液循环中GH生物可用性的调节受到高亲和性生长激素结合蛋白(growth hormone-binding protein, GHBP)存在的影响. GHBP是细胞表面GHR胞外域的循环版本. 不同种属GHBP产生的方式不同, 但主要是由两种机制产生. 一种方式是全长GHR的mRNA前体经选择性剪切得到编码GHBP的特异性mRNA, 翻译成GHBP后分泌到血液中[6]; 另一种方式是细胞膜上全长GHR经蛋白酶解得到可溶性

引用格式: 廖志勇, 吴明江, 陈晓丽. 中华鲟生长激素受体的分子克隆和功能分析. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39: 1069—1079

GHBP[7]. 因此, 在某些类型的细胞或种属中, 通过脱落而产生GHBP的蛋白酶解过程成为调节靶细胞中GHR生物可用性的重要机制. GHBP水平随生理或病理状态的不同而改变, 已成为机体应答外源GH的一个重要指标[8].

自 1987 年GHR cDNA的成功克隆极大地促进了有关哺乳动物生长调控机制的研究[9]. 然而, 直到近几年鱼类GHR cDNA才得以克隆和较为深入的研究[10~14]. 依据氨基酸序列的多样性, 鱼类GHR最初主要分为两类, 即鲑鱼类GHR(Ⅰ型GHR)和非鲑鱼类GHR(Ⅱ型 GHR). 这两类 GHR 在氨基酸序列方面的主要差异是Ⅱ型 GHR 的胞外域缺少两个半胱氨酸残基和胞内域缺少某些保守的酪氨酸残基. 因此, 有人提出在硬骨鱼类进化过程中存在两种不同GHR谱系的假说. 后来的研究在斑马鱼和地中海乌颊鱼鲷鱼中发现两个假定GHR基因组重叠群的存在, 它们的内含子与外显子的接口序列非常保守[15]. 这一发现直接挑战了上述假说. 有研究已证实, 某些种属确实同时存在两种类型GHR, 它们共同应答某些相同或不同的信号, 并都对鱼的生长起着重要的调控作用[16]. 中华鲟是早在 1 亿 4 千万年前就存在的软骨硬鳞鱼, 因保留有某些进化痕迹而被称作水生生物学的活化石. 中华鲟曾一度濒危灭绝而被列为我国一级保护动物. 研究中华鲟GHR和GHBP将有助于全面了解中华鲟生长的调控机制. 本实验室曾鉴定了中华鲟GHR及其血清GHBP[17]. 本文报道了csGHR的分子克隆、功能分析及csGHBP的调控生成.

1 材料与方法

1.1 材料

中华鲟购自上海市鱼类批发市场, 并由上海水产大学科学研究所鉴定. DNase Ⅰ, RNase H, RNAiso^{TM}和 5′-Full RACE Kit 购自 TaKaRa 公司. PolyA Tract mRNA Isolation System Ⅳ、pGEM-T 载体和 Dual Luciferase System 购自 Promega 公司. Taqman Reverse Transcription Kit 购自 Applied Systems. Expand High Fidelity PCR System 购自 Roche 公司. DMEM-(Dulbcco's Modifed Eagle Medium)、胎牛血清、100×青霉素、100×链霉素、G418 和Lipofectamine^{TM} 2000 购自Invitrogen公司. Pierce®BCA Protein Assay Kit购自美国Pierce生物技术公司. Spi 2.1-Luciferase报告基因、sbGH、鲑鱼催乳素(sPLR)和鲑鱼生长催乳素(sSL)由香港中文大学郑汉淇教授惠赠. QuantiTect SYBR Green RT-PCR试剂盒购自QIAGEN公司. 人GH(hGH)由中国科学院上海生命科学研究院生化与细胞研究所郭礼和研究员惠赠. 绵羊GH(oGH)、绵羊催乳素(oPRL)和^{125}I购自Sigma公司.

1.2 RNA 提取与纯化

一年龄中华鲟被麻醉后以断头方式处死. 取出肝脏组织, 冻存于液氮或立即用于总RNA的提取. 用RNAiso^{TM}按厂家操作说明提取总RNA, 再用PolyA Tract mRNA Isolation System Ⅳ分离纯化Poly(A)+mRNA.

1.3 cDNA 克隆和测序

Poly(A)+mRNA经DNase Ⅰ处理后, 用 1 μg Poly(A)+mRNA作模板, oligo(dT)$_{17}$作引物, 用Taqman Reverse Transcription Kit 反转录合成 cDNA 第一链. 反转录产物经 RNase H 处理后用于以下 PCR 扩增反应. 以核酸数据库中已知种属 GHR mRNA 的保守序列为基础设计了 4 条简并引物(GHR-1, GHR-2, GHR-3, GHR-4). 以 1 μL 反转录产物为模板, 用带有校功能的 Expand High Fidelity PCR System 及上述简并引物在总体积 50 μL 的体系中进行扩增. 94℃变性 60 s, 55℃退火 90 s, 72℃延伸 120 s, 30 个循环. 扩增的 cDNA 片段连接到 pGEM-T 载体, 并转化到 DH5α 感受态细胞. 重组质粒用位于pGEM-T 载体多接头区域上、下游的 T7 和 SP6 引物进行测序. 用 5′-Full RACE Kit 按厂家说明快速扩增 csGHR cDNA 的 5′端序列. 以 200 ng mRNA 为模板和一条 csGHR 特异性引物(csGHR-1)反转录合成 csGHR cDNA 第一链. 用 RNase H 处理后, 纯化 cDNA. 用末端脱氧核苷酸转移酶和 dCTP 在 4℃处理 cDNA 60 min, 在 5′端加上 oligo-dC. 以此为模板, 用带poly-dG序列的通用引物和 csGHR 特异性反向引物(csGHR-2)进行扩增. 3′-RACE 按下面所述步骤操作. 总 RNA 经 DNase Ⅰ处理后, 用带有锚定序列的oligo(dT)$_{30}$在反转录酶的作用下合成csGHR cDNA第一链. 以反转录产物为模板, 用csGHR特异性正向引物(csGHR-3)和与锚定序列互补的反向引物经PCR反应扩增csGHR cDNA

的 3 ′端序列, 即 94℃变性 45 s, 68℃退火 45 s, 72℃ 180 s, 30 个循环. 以 1 μL 上述 PCR 反应产物和 csGHR 特异性正向引物(csGHR-4)按以下程序进行巢式 PCR: 94℃变性 45 s, 60℃退火 60 s, 72℃延伸 180 s, 25 个循环. 以第一次反转录产物为模板, 用 csGHR 特异性引物 csGHR-5 和 csGHR-6 经 PCR 扩增得到 csGHR 的全长 cDNA. 所有 PCR 产物亚克隆到 pGEM-T 载体, 进行测序. 用 META Predict Protein 服务器分析工具包分析 csGHR cDNA 得到 csGHR 的氨基酸序列, 并与来自 NCBI 网站 GenBank 数据库的其他鱼类 GHR 进行序列对比分析, 包括鲷 GHR(AF502071)、金鱼 GHR(AF293417)、大菱鲆 GHR(AF352396)、银鲑 GHR(AF403540)和鲑鱼 GHR(AB071216).

1.4 质粒构建

用 csGHR 特异性引物 csGHR-7 和 csGHR-8 从 pGEM-T/csGHR 质粒扩增 csGHR 的完整编码序列, 用 Gateway Cloning System 将 PCR 产物亚克隆到 pENTR/D-TOPO 载体, 再插入到真核表达载体 pcDNA3.1/cV5, 得到质粒 pcDNA3.1/cV5-csGHR. 以 pcDNA3.1/cV5-csGHR 为模板, 用两对引物 csGHR- 9 和 csGHR-10, csGHR-11 和 csGHR-12 按 QuickChange Kit 操作说明将 csGHR 分子上第 224 位的 Asp 分别突变成 Glu 或 Ala. 所有构建的质粒均进行测序鉴定.

1.5 建立稳定表达细胞

CHO细胞用含 10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和 100 μg/mL链霉素的DMEM培养基, 于 37℃, 95%O_2/5%CO_2恒温培养. 用Lipofectamine^{TM}2000 将pcDNA3.1/cV5-csGHR或其突变体基因稳定转染CHO细胞, 用G418 进行筛选. 转染pcDNA3.1/cV5 空载体的CHO细胞为空白对照. 收集稳定表达细胞, 用磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗细胞一次, 再用含蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液(1×PBS, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5%脱氧胆酸钠)裂解细胞. 细胞裂解液于 4℃, 15000×*g*离心 20 min. 用Pierce®BCA Protein Assay Kit 测定上清液总蛋白浓度. 取等量蛋白质样品在还原性条件下用 10% SDS-PAGE 分离, 并转移到硝酸纤维素膜上. 硝酸纤维素膜与用 HRP 偶联的鼠抗 V5 抗体在含 3% BSA 和 0.5% Tween-20 的 1×PBS 缓冲液中室温反应 1 h. 用 1×PBS 缓冲液洗膜 3 次后, 暴光至感光胶片, 显色. 按前面所述方法提取稳定细胞的总 RNA, 用于 RT-PCR 分析稳定细胞中野生型和突变型 csGHR 的转录. 扩增的 DNA 片段亚克隆到 pGEM-T, 进行测序.

1.6 功能鉴定

用Lipofectamine^{TM}2000 将报告基因S pi 2.1-Luciferase 转染到生长在 24 孔板的稳定表达细胞. 平行转染空载体作为对照. 16 h 后, 分别用海鲤 GH (sbGH)、人 GH(hGH)、绵羊 GH(oGH)、绵羊催乳素(oPRL)、鲑鱼催乳素(sPLR)和鲑鱼生长催乳素(sSL)处理细胞. 收集细胞, 并用 RIPA 缓冲液裂解细胞, 于 4℃, 15000×*g* 离心 20 min. 用 Dual Luciferase System测定上清液的荧光素酶活性. 生长在 96 孔板的稳定表达细胞先用DMEM洗两次, 再用不同浓度的sbGH在每孔 1 μCi [^{3}H]-thymidine存在的情况下处理 16 h. 洗涤细胞两次, 再按文献报道的方法测定细胞吸收的[^{3}H]-thymidine量[18]. 对照细胞平行测定.

1.7 GHBP 测定

用 0.5% BSA 替换细胞培养液的血清以使稳定表达细胞进行血清饥饿. 用 50 μmol/L 的 IC3(Immunex Corp. Compound 3)预处理血清饥饿的细胞 15 min, 接着用 1 μg/mL 的佛波酯(phorbol 12-myristate, 13-acetate, PMA)处理细胞. 上述反应均于37℃在无血清培养液中进行. 用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)作溶剂对照. 用标准的GH结合法[19]测定条件培养基中的GHBP活性. 1 mL条件培养基与用^{125}I新鲜标记的sbGH在 37℃反应 45 min后, 立即用凝胶色谱法于 4℃在葡聚糖凝胶柱(G-100)上分离, 并测定被结合的sbGH. 用冰冷的PBS洗细胞一次, 终止IC3 和 PMA对细胞的刺激. 收集细胞, 用RIPA缓冲液于 4℃裂解细胞, 15000×*g* 离心 20 min. 用 Pierce®BCA Protein Assay Kit测定上清液总蛋白质浓度. 据上所述, 用蛋白质印迹方法分析稳定表达细胞中完整的 cV5-csGHR和被切割的cV5-csGHR.

1.8 RT-PCR 分析

设计 csGHR 特异性引物 csGHR-13 和 csGHR-14, 利用 QuantiTect SYBR Green RT-PCR 试剂盒采用实时定量 RT-PCR 方法分析 csGHR 的组织特异性表达

模式. 从一年龄中华鲟取出各种组织, 按上述方法提取总RNA. 1 μg总RNA用于反转录. 用 10 μL反转录产物按试剂盒操作说明进行定量PCR分析, 即 94℃变性 10 min, 接着 94℃变性 15 s, 62℃ 退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 35 个循环. 用ABI PRISM®7000 序列检测程序将荧光值转换成循环阈值(CT). β-actin的定量扩增作内标用于校正测定的csGHR mRNA值.

1.9 统计学分析

所有实验数据用 ANOVA 分析. 结果用 $\bar{x}$ ±SE 表示. P<0.05 表示数据有统计学意义.

2 结果

2.1 csGHR cDNA 克隆

利用两对简并引物(表 1), 用 RT-PCR 方法从中华鲟的肝脏组织成功克隆了 1689 个碱基的 cDNA 片段. 分别用 5′-RACE 和 3′RACE 方法克隆到 csGHRc-DNA 的 5′和 3′编码及非编码序列(图 1). 疏水性分析显示 csGHR cDNA 中共 1833 个碱基的可读框编码了一个 611 个氨基酸残基的一次跨膜蛋白质. csGHR 前体有一段假定的 19 个氨基酸残基的信号肽、含有 5 个半胱氨酸残基、5 个潜在的 N-糖基化位点和配体结合结构域(FGDFS)的 219 个氨基酸残基的胞外域、24 个氨基酸残基的疏水结构域(跨膜区)和含有两个保守功能结构域 Box 1 和 Box 2 以及 9 个酪氨酸残基共 349 个氨基酸残基的胞内域. 与其他鱼类 GHR 进行序列对比分析发现, csGHR 胞外域缺少两个普遍存在于其他种属 GHR 的半胱氨酸残基, 并且其他种属 GHR 中高度保守的配体结合结构域 FGEFS 的 Glu 残基被 Asp 替换(图 2).

2.2 csGHR 的功能分析

为了分析所克隆的 csGHR 是否具有生物活性, 通过 G418 筛选建立了稳定表达 csGHR 和其突变体的 CHO 细胞. 从经过 G418 筛选的 CHO 细胞中提取总 RNA, 用 csGHR 特异性引物经 RT-PCR 扩增到与预期大小(1126 bp)一致的 DNA 片段(图 3), 而在对照组 CHO 细胞中没有扩增到相应的 DNA 片段. 该片段亚克隆到 pGEM-T 载体后经测序得以进一步验证. 同时利用鼠抗 V5 抗体采用免疫印迹法检测到稳定表达细胞表达的 cV5-csGHR 和其突变体(图 3). 这些结果表明, csGHR 和其突变体在 CHO 细胞中已成功转录、表达.

利用上述稳定表达细胞, 用两种生物测定法证明 CHO 细胞表达的 csGHR 具有生物活性. 如图 4(A)所示, sbGH 显著地诱导转染到稳定表达细胞中受 Spi 2.1 启动子驱动的荧光素酶报告基因的表达. hGH 和 oGH 的诱导效果则明显弱于 sbGH. oPLR, sPLR, sSL 则几乎没有表现出相应的诱导效果(P<0.05). 稳定表达细胞中荧光素酶活性的诱导依赖于 sbGH 的浓度(P<0.05)(图 4(B)). GH 是诸如 β-胰岛细胞和骨髓原细胞系FDC-P1 等一系列细胞的有丝分裂原[20,21]. 研究发现, GH 能诱导转染人 GHR 的 Ba/F 细胞和转染大鼠GHR的CHO细胞增殖[22,23]. 如图 5 所示, 转染了 csGHR 的 CHO 细胞受重组 sbGH 诱导后显著增殖. 增殖效果依赖于 sbGH 的剂量, 并且在大约 400 ng/

表 1 PCR 和 RT-PCR 引物

引物	序列 (5′→3′)
GHR-1	GAAACNTTYAGNTGCTGGTGGA
GHR-2	CTTCCCCCCGTRCCAGGYCCTA
GHR-3	GARCCGTGGGTTGARTTTATRGA
GHR-4	GACACCAGANCTCCTSGGYAAC
csGHR-1	GGCTATCACGGACGACGAG
csGHR-2	CCTTAGTTTCAATTCATAATAGGTGTC
csGHR-3	GTCGAGGCAGGTTGGATGGAGCTTGC
csGHR-4	CTATTATGAAGTTAAACTAAGG
csGHR-5	AGTCTTAATAGTGCCGCACTAC
csGHR-6	TCAGCCTTATCACGGCGTGATG
csGHR-7	CACCATGGCTCTGTCAACGTCACAC
csGHR-8	AGTGCCGCACTACAATGGCTCC
csGHR-9	CACCTGATTTCGGGGAATTCTCGTCGTC
csGHR-10	GACGACGAGAATTCCCCGAAATCA
csGHR-11	CACCTGATTTCGGGGCTTTCTCGTCGTC
csGHR-12	GACGACGAGAAAGCCCCGAAATCA
csGHR-13	ATATCTGGGCTGTATACACC
csGHR-14	CGTTCAGCCCGTAAAGCGAC
β-action-f (正向)	TCCTGCGGAATCCATGAGA
β-action-r (反向)	ACGTCGCACTTCATGATGC

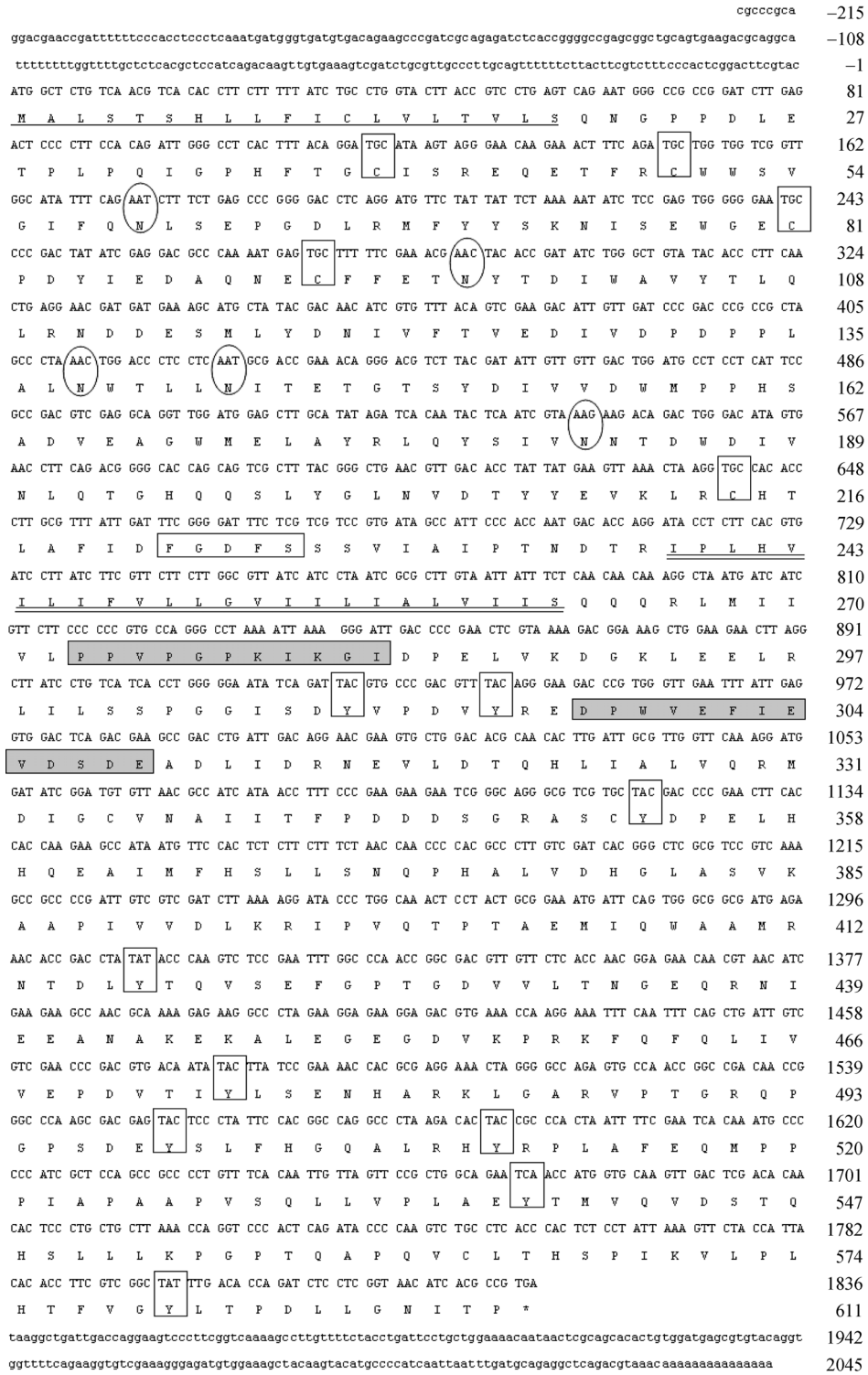


图 1 csGHR 的 cDNA 和氨基酸序列

核苷酸序列以编码起始甲硫氨酸的密码子第一个碱基编号为 1; 氨基酸序列以起始甲硫氨酸编号为 1, 共 611 个氨基酸残基; 假定信号肽用下画线标记; 胞外域的半胱氨酸残基和胞内域的酪氨酸残基用方框标记; 带外圈的是潜在的 N-糖基化位点; 用双下画线标记的是跨膜区域; Box 1 和 Box 2 结构域用灰色矩形标记; 终止密码子用星号标记

mL sbGH 时增殖效果最大(P<0.05). 与转染野生型csGHR的CHO细胞相比, 转染csGHRD224E的CHO细胞对 sbGH 的应答效应更强, 而转染 csGHR-D224A 的 CHO 细胞对 sbGH 的应答效应则明显更弱. 这些结果表明, FGDFS 结构域对 csGHR 的生物功能至关重要, 并且提示 FGDFS 结构域中 Asp 残基来自遗传进化, 使得中华鲟体内具有最佳的 GH/GHR 作用轴, 产生最有效的 GH 信号传递.

2.3 全长 csGHR 蛋白酶解生成 csGHBP

研究已证实GHBP存在于许多种属, 是GH信号传递的重要调节因子. 本研究组曾报道了中华鲟血清GHBP的鉴定[17]. 然而, 只发现编码全长csGHR的mRNA, 而没有任何其他来自于选择性剪接的mRNA

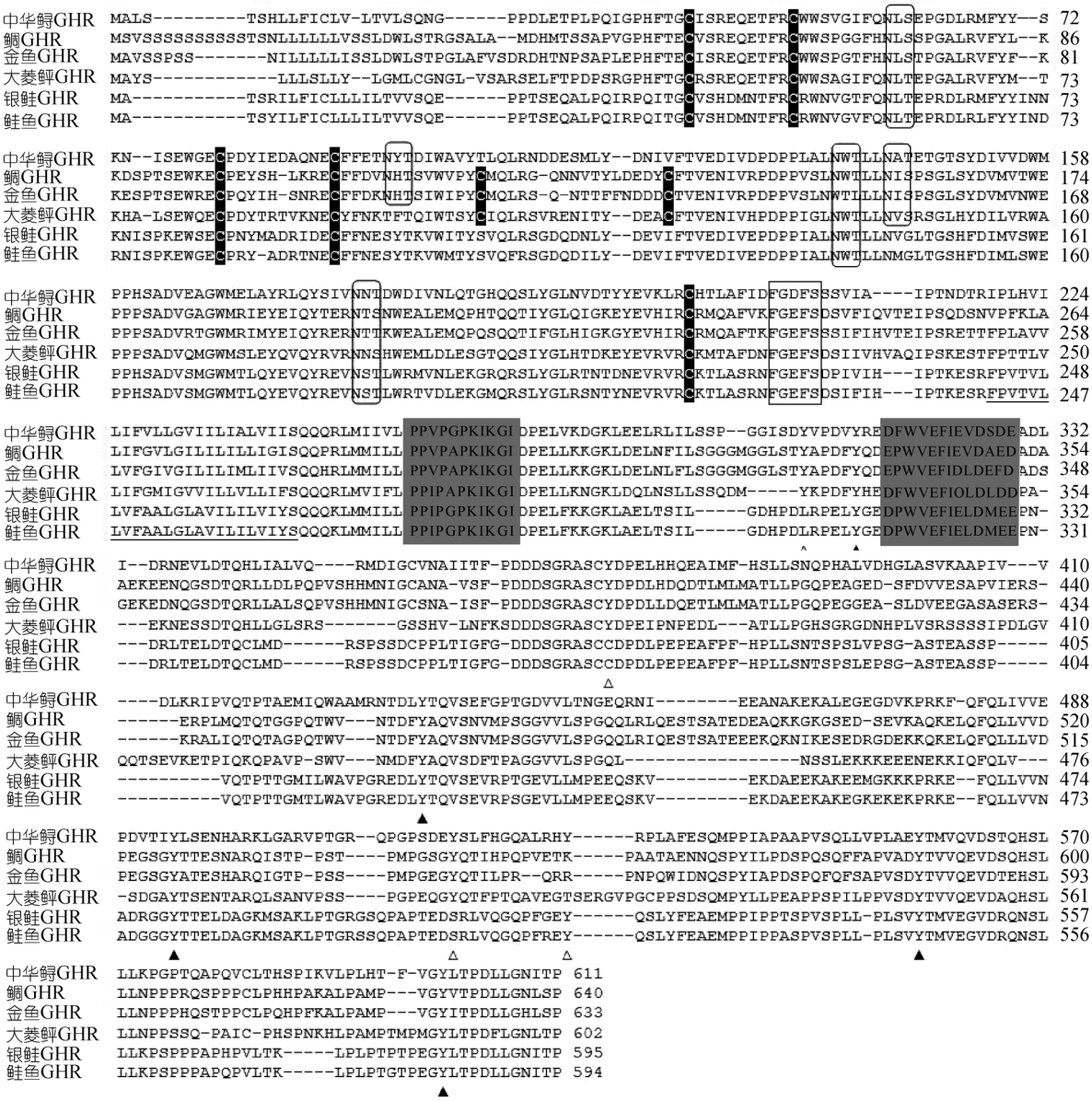


图 2 csGHR 氨基酸序列与其他鱼类 GHR 的对比分析

胞外域保守的半胱氨酸残基用黑色背景突出; 保守的潜在 N-糖基化位点用圆矩形图标记; 配体结合结构域(FGE/DFS)用矩形标记; 跨膜区域用下画实线标记; 保守的 Box 1 和 Box 2 结构域用灰色矩形标记. 在所有对比鱼类 GHR 中保守的酪氨酸残基用黑色三角标记

存在. 因此推测早期鉴定的csGHBP可能来自于全长csGHR的蛋白酶解. 如图 6(B)所示, 稳定表达csGHR的CHO细胞培养液对^{125}I-sbGH有特异性结合. 研究

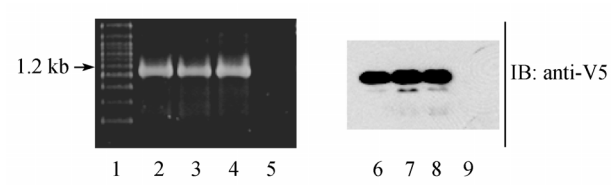


图 3 CHO 稳定表达细胞的鉴定

从转染了 pcDNA3.1-cV5/csGHR 或其突变体基因且经过 G418 筛选的 CHO 细胞提取总 RNA, 用于 RT-PCR 分析(1~5). 同时用上述细胞制备细胞裂解液, 用于蛋白质印迹分析 CHO 细胞表达的 V5-csGHR 及其突变体(6~9). 泳道 1: DNA 分子标记; 泳道 2, 6: 稳定转染 pcDNA3.1-cV5/csGHR 的 CHO 细胞; 泳道 3, 7: 稳定转染 pcDNA3.1-cV5/csGHR-D224E 的 CHO 细胞; 泳道 4, 8: 稳定转染 pcDNA3.1-cV5/csGHR-D224A 的 CHO 细胞; 泳道 5, 9: 转染 pcDNA3. 1-cV5 空载体的 CHO 细胞

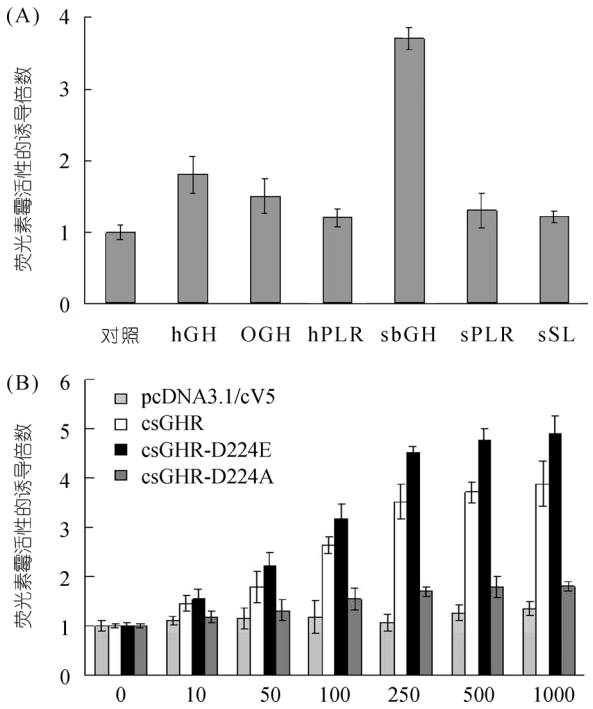


图 4 Spi 2. 1 启动子的反式激活

稳定表达 csGHR 或其突变体的 CHO 细胞转染受 Spi 2.1 启动子驱动的荧光素酶报告基因. 用系列激素处理细胞(A), 或用系列浓度的 sbGH 处理细胞(B). 收集细胞后用 RIPA 缓冲液裂解, 离心. 用 Dual Luciferase System 测定报告基因的酶活性. 共转染的β-半乳糖苷酶报告基因作对照, 用于校正转染效率的差异. 结果以 $\bar{x}$ ± SEM 表示, n=3, P< 0.05

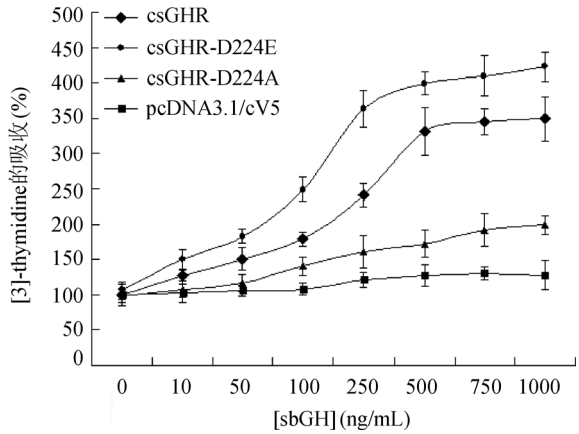


图 5 CHO 稳定表达细胞的增殖

用不同浓度的重组sbGH刺激稳定表达csGHR或其突变体的CHO细胞. 按文献报道的方法测定CHO细胞吸收的[^{3}H]-thymidine量. 图中结果以 $\bar{x}$ ± SEM 表示, n=3, P< 0.05

报道, PMA能促进稳定表达rbGHR的IM-9 细胞、仓鼠3T3-F442A细胞和CHO细胞中跨膜GHR的蛋白酶解, 导致GHBP的脱落[24]. 为分析csGHBP的生成是否受PMA诱导, 测定了稳定表达csGHR的CHO细胞受或未受PMA刺激后其培养液中csGHBP的量. 如图 6(B)所示, 未受PMA刺激的稳定表达细胞培养液表现有较低的GH结合活性. 受PMA刺激后, 稳定表达细胞培养液对GH的结合活性得以显著提高, 证明PMA能促进分泌性csGHBP的生成. 金属蛋白酶抑制剂IC3预处理稳定表达细胞能明显降低PMA诱导的csGHBP生成至 20%左右, 暗示上述细胞中csGHBP的脱落需要金属蛋白酶活性的参与. 免疫印迹分析证实, 稳定表达csGHR的CHO细胞中存在被切割的csGHR, 并且受PMA诱导. IC3 预处理细胞则显著地抑制PMA的诱导效果(图 6(A)).

2.4 csGHR 的组织特异性表达

利用csGHR特异性引物采用定量实时RT-PCR方法分析了中华鲟各组织的csGHR mRNA. 如图 7 所示, 所有分析的组织中都能检测到csGHR mRNA, 以肝组织中csGHR mRNA水平最高, 这与竞争性配体结合实验结果相符[17]. 另外, 肌肉组织中存在较高水平的 csGHR mRNA, 而肾脏和小肠中 csGHR mRNA 水平低于脂肪和脑组织. 在蛋白质水平对中华鲟各组织 GHR 的表达分析发现肾脏和小肠有相对

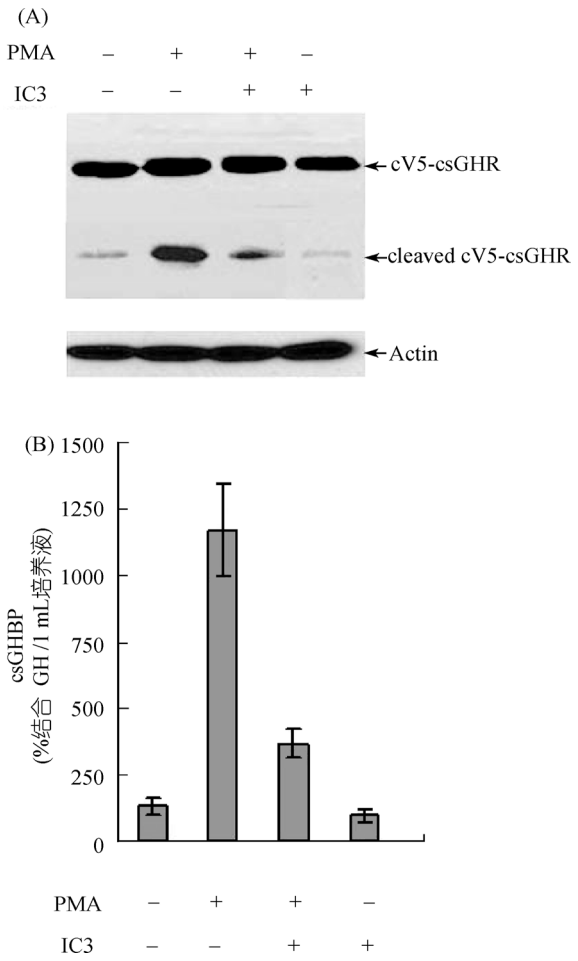


图 6　csGHBP 的生成

稳定表达 csGHBP 的 CHO 细胞在血清饥饿的状态下先后用或不用 PMA 和 IC3 处理. 分别用蛋白质印迹法分析细胞中完整或被切割的 V5-csGHR(A), 用标准的 GH 结合法测定细胞培养液中的 csGHBP(B)

高水平的csGHR, 而脂肪、肌肉和脑组织中csGHR水平很低, 甚至难以被检测到[17]. 考虑到中华鲟血清中存在较高水平的GHBP, 而且中华鲟体内只存在编码全长csGHR的mRNA, 因此推测各组织中csGHR在mRNA水平和蛋白质水平的差异可能来自不同组织中全长csGHR不同程度的蛋白酶解, 或不同组织中csGHR不同的翻译后修饰.

3　讨论

GH在鱼和其他动物体内发挥着多种重要生理功能, 包括调控体细胞生长、个体成熟、海水适应和免疫等[25,26]. GH的生理功能是通过结合到各种靶细胞

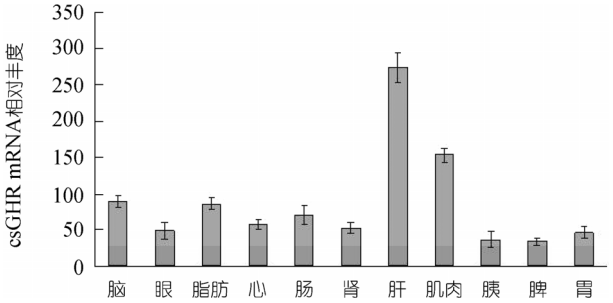


图 7　csGHR mRNA 的组织分布

提取中华鲟各种组织的总 RNA. 采用定量实时 RT-PCR 方法按 QuantiTect SYBR Green RT-PCR 试剂盒厂家说明用 ABI PRISM® 7000 序列检测程序分析 csGHR mRNA 的丰度. β-actin 的定量扩增用作内标校准 csGHR mRNA 的测定值. 不同组织中 csGHR mRNA 的相对丰度以 1000×csGHR/β-actin 表示. 图中结果以 $\bar{x}$ ± SEM 表示, n=3, P< 0.05

膜上GHR而启动的. 为了更好地了解GH对中华鲟生长的调控和相应机理, 我们从中华鲟肝脏克隆了全长csGHR的 cDNA. 从核苷酸序列推断的csGHR前体由 611 个氨基酸残基组成, 包括 19 个氨基酸残基的假定信号肽、219 个氨基酸残基的胞外结构域、24 个氨基酸残基的一次跨膜域和 349 个氨基酸残基的胞内结构域. 在CHO细胞中分析csGHR生物功能的实验结果表明, 与csGHR共转染的受Spi 2.1 启动子驱动的荧光素酶报告基因能被sbGH诱导表达, 且表达水平依赖于sbGH的量. hGH和oGH也能诱导该报告基因的表达, 但诱导效果明显弱于sbGH. oPLR, sPLR和sSL几乎不能诱导该报告基因的表达. 这些结果表明, CHO细胞表达的csGHR具有生物活性, 并且GH与GHR的结合存在种属特异性. 其次, sbGH能诱导稳定表达csGHR的CHO细胞增殖, 而且诱导效果在sbGH浓度约为 400 ng/mL时最强. Box 1 结构域是JAK2 的结合位点[27], 而GHR介导的细胞增殖需要Box 2 结构域的参与[28]. Spi 2.1 启动子含有结合STAT蛋白的顺式作用元件, 说明csGHR也是通过JAK-STAT通路传递信号, 而且csGHR中存在功能保守的Box 1 和Box 2 结构域. 序列对比分析发现Box 1 和Box 2 结构域在所有比较的鱼类GHR中高度保守, 提示在中华鲟体内存在与其他种属类似的GHR下游信号传递机制. 然而, Box 1 和Box 2 结构域周边氨基酸序列的差异可能反映了不同种属GHR适应各自机体细胞内特异信号传递分子的需要. 上述结果综合

表明, 本实验克隆的 csGHR 在 CHO 细胞中具有生物活性, 同时提示普遍存在于哺乳动物和脊椎动物的 GH-GHR 信号传递通路在进化过程的早期已出现在中华鲟体内.

csGHR 与其他种属 GHR 的序列对比发现存在几个潜在的显著差异. 除了甲鱼 GHR 的 N-端配体结合域以FGGFS形式存在[29], 该结构域的第 3 个氨基酸残基都是以 Glu 高度保守地存在于几乎所有其他种属 GHR, 即 FGEFS. 然而, Glu 被 Asp 替换最终以 FGDFS 形式存在于 csGHR 中. 将 Asp 突变成 Glu 或 Ala 之后研究了 Asp 替换 Glu 的可能生物意义. 结果发现转染了 csGHR-D224E 的 CHO 细胞对 sbGH 的应答效果明显强于转染野生型 csGHR 的 CHO 细胞, 而转染了 csGHR-D224A 的 CHO 细胞对 sbGH 的应答能力明显低于稳定表达野生型 csGHR 的 CHO 细胞. 这些结果表明 FGDFS 结构域在 csGHR 的生物功能中起重要作用, 而且提示 FGDFS 的 Asp 残基可能是进化过程中向最佳 GH/GHR 作用轴演化的结果, 使得中华鲟体内产生最有效的 GH 信号传递. GHR 的胞外域通常存在 3 对保守的半胱氨酸残基, 形成 3 个二硫键, 对稳定GHR的空间结构起重要作用[30]. 这 6 个半胱氨酸残基高度保守地存在于绝大多数种属 GHR, 但鲑鱼 GHR 的 N 端只存在 4 个半胱氨酸残基, 在胞外域形成两个二硫键[31]. 与此类似, csGHR的N-端只存在其中 5 个保守的半胱氨酸残基. 保守性半胱氨酸残基的缺少是否会导致csGHR分子中形成更具柔性结构的配体结合域将有待进一步研究. 序列分析显示, csGHR胞外域有 5 个潜在的N-糖基化位点, 比其他鱼类GHR的潜在N-糖基化位点数少. N-糖基化位点数的差异是否具有某些生理意义需要更深入地研究, 特别是可能涉及到配体的结合[32]. csGHR胞内域有 9 个酪氨酸残基, 其中Y314, Y436, Y494, Y558和Y600 在其他对比的鱼类GHR, 甚至所有已知种属GHR中具有高度保守性. 这说明上述酪氨酸残基在介导各种属GHR的某些共同生理功能方面起着关键作用. 例如, 大鼠GHR中与csGHR的Y314 同源的酪氨酸残基参了与细胞内GH信号传递分子的磷酸化和STAT的激活[33]. 因此, csGHR分子中存在这些高度保守的酪氨酸残基提示细胞内的某些信号传递事件在整个进化中是高度保守的. 另一个值得注意的是Y309, Y372 和Y519 同样出现在鲷、大菱鲆和金鱼GHR中, 但不存在于鲑鱼GHR, 而Y530 只存在于鲑鱼GHR. 这些差异可能暗示着细胞内GH信号传递的种属特异性.

许多物种的大部分循环GH与相当于全长GHR胞外域的高亲和性GHBP结合形成复合物. GHBP与GH形成复合物, 生成一个循环GH库, 阻止GH降解或排泄, 延长GH的半衰期[34]. GHBP因此可以通过与GHR竞争结合GH形成不能传递信号的GH-GHBP异源二聚体, 来调节GH的生理作用[35]. 尤为重要的是生理或病理状态下, 血清GHBP水平可反映GHR的丰度. 在稳定表达csGHR的CHO细胞培养液中检测到csGHBP. csGHBP是通过全长csGHR蛋白酶解生成, 受到PMA的强烈诱导. PMA诱导的csGHBP生成可被IC3 抑制至本底水平. 这表明csGHBP的生成机理与包括人在内的哺乳动物GHBP的生成机理相似[7]. GHR广泛表达于肝脏、肌肉、脂肪组织、软骨和脑等组织, 通常以肝脏中GHR的表达水平最高[36]. 定量实时 RT-PCR 结果表明, csGHBP 主要表达于肝脏, 与受体结合实验结果一致[17]. 中华鲟肌肉组织存在较高水平的 csGHR mRNA, 而肾脏和小肠中 csGHR mRNA 水平甚至低于脂肪组织和脑组织. 这与竞争性配体结合实验结果不一致. 这提示中华鲟各种组织可能通过调节 GHR 生物可用性来调控 GH 的作用, 例如 csGHR 的蛋白酶解. 深入研究 csGHBP 生成的调控机制将有助于阐明中华鲟各种组织中 csGHR 在蛋白质水平和 mRNA 水平上非平行性的原因及由此带来的生物学意义.

参考文献

1 Rousseau K, Dufour S. Comparative aspects of GH and metabolic regulation in lower vertebrates. Neuroendocrinology, 2007, 86: 165—174[DOI]

2 Moutoussamy S, Kelly P A, Finidori J. Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signaling. Eur J Biochem, 1998, 255: 1—11[DOI]

3 Han Y, Leaman D W, Watling D, et al. Participation of JAK and STAT proteins in growth hormone-induced signaling. J Biol Chem, 1996, 271: 5947—5952[DOI]

4 Leung K C, Waters M J, Markus I, et al. Insulin and insulin-like growth factor-I acutely inhibit surface translocation of growth hormone receptors in osteoblasts: a novel mechanism of growth hormone receptor regulation. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 11381—11386[DOI]

5 Ji S, Guan R, Frank S J, et al. Insulin inhibits growth hormone signaling via the growth hormone receptor/JAK2/STAT5B pathway. J Biol Chem, 1999, 274: 13434—13442[DOI]

6 Baumbach W R, Horner D L, Logan J S. The growth hormone-binding protein in rat serum is an alternatively spliced form of the rat growth hormone receptor. Genes Dev, 1989, 3: 1199—1205[DOI]

7 Dastot F, Sobrier M L, Duquesnoy P, et al. Alternatively spliced forms in the cytoplasmic domain of the human growth hormone(GH) receptor regulate its ability to generate a soluble GH-binding protein. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 10723—10728[DOI]

8 Fisker S. Physiology and pathophysiology of growth hormone-binding protein: methodological and clinical aspects. Growth Horm IGF Res, 2006, 16: 1—28[DOI]

9 Leung D W, Spencer S A, Cachianes G, et al. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. Nature, 1987, 330: 537—543[DIO]

10 Calduch-Giner J A, Duval H, Chesnel F, et al. Fish growth hormone receptor: molecular characterization of two membrane-anchored forms. Endocrinology, 2001, 142: 3269—3273[DOI]

11 Lee L T, Nong G, Chan Y H, et al. Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. Gene, 2001, 270: 121—129[DOI]

12 Calduch-Giner J, Mingarro M, Vega-Rubin de Celis S, et al. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone receptor(GHR). Assessment of alternative splicing. Comp Biochem Physiol B, 2003, 136: 1—13[DOI]

13 Fukada H, Ozaki Y, Pierce A L, et al. Salmon growth hormone receptor: molecular cloning ligand specificity and response to fasting. Gen Comp Endocrinol, 2004, 139: 61—71[DOI]

14 Ma X L, Liu X C, Zhang Y, et al. Two growth hormone receptors in Nile tilapia(*Oreochromis niloticus*): Molecular characterization, tissue distribution and expression profiles in the gonad during the reproductive cycle. Comp Biochem Physiol B, 2007, 147: 325—339[DOI]

15 Saera-Vila A, Calduch-Giner J A, Pérez-Sánchez J. Duplication of growth hormone receptor(GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream(*Sparus aurata*). Gen Comp Endocrinol, 2005, 142: 193—203[DOI]

16 Jiao B W, Huang X G, Chan C B, et al. The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream. J Mol Endocrinol, 2006, 36: 23—40[DOI]

17 Liao Z Y, Zhu S Q. Identification and characterization of GH receptor and serum GH-binding protein in Chinese sturgeon(*Acipenser sinensis*). Acta Biochim Biophys Sin, 2004, 36: 811—816

18 Tse D L Y, Tse M C L, Chan C B, et al. Seabream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full-length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, 1625: 64—76

19 Alele J, Jiang J, Goldsmith J F, et al. Blockade of growth hormone receptor shedding by a metalloprotease inhibitor. Endocrinology, 1998, 139: 1927—1935[DOI]

20 Billestrup N, Nielsen J H. The stimulatory effect of growth hormone, prolactin, and placental lactogen on beta-cell proliferation is not mediated by insulin-like growth factor-I. Endocrinology, 1991, 129: 883—888[DOI]

21 Colosi P, Wong K, Leong S R, et al. Mutational analysis of the intracellular domain of the human growth hormone receptor. J Biol Chem, 1993, 268: 12617—12623

22 Wang Y D, Wood W I. Amino acids of the human growth hormone receptor that are required for proliferation and Jak-STAT signaling. Mol Endocrinol, 1995, 9: 303—311[DOI]

23 Moller C, Hansson A, Enberg B, et al. Growth hormone(GH) induction of tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in cells transfected with rat GH receptor cDNA. J Biol Chem, 1992, 267: 23403—23408

24 Guan R, Zhang Y, Jiang J, et al. Phorbol ester- and growth factor-induced growth hormone(GH) receptor proteolysis and GH-binding protein shedding: relationship to GH receptor down-regulation. Endocrinology, 2001, 142: 1137—1147[DOI]

25 Björsson B T. The biology of salmon growth hormone-from daylight to dominance. Fish Physiol Biochem, 1997, 17: 9—24[DOI]

26 Yada T. Growth hormone and fish immune system. Gen Comp Endocrinol, 2007, 52: 353—358[DOI]

27 Frank S J, Gilliland G, Kraft A S, et al. Interaction of the growth hormone receptor cytoplasmic domain with the JAK2 tyrosine kinase. Endocrinology, 1994, 135: 2228—2239[DOI]

28 Ihle J N, Witthuhn B A, Quelle F W, et al. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors, Annu Rev Immunol, 1995, 13: 369—398[DOI]

29 Zhang X, Lu X, Jing N, et al. cDNA cloning and functional expression of growth hormone receptor from soft-shelled turtle(*Pelodiscus sinensis japonicus*), 2000, 119: 265—275

30 Fuh G, Mulkerrin M G, Bass S, et al. The human growth hormone receptor. Secretion from *Escherichia coli* and disulfide bonding pattern of the extracellular binding domain. J Biol Chem, 1990, 265: 3111—3115

31 Zhang Y, Jiang J, Kopchick J J, et al. Disulfide linkage of growth hormone(GH) receptors(GHR) reflects GH-induced GHR dimerization. Association of JAK2 with the GHR is enhanced by receptor dimerization. J Biol Chem, 1999, 274: 33072—33084[DOI]

32 Harding P A, Wang X Z, Kelder B, et al. *In vitro* mutagenesis of growth hormone receptor Asn-linked glycosylation sites. Mol Cell Endocrinol, 1994, 106: 171—180[DOI]

33 Lobie P E, Allevato G, Nielsen J H, et al. Requirement of tyrosine residues 333 and 338 of the growth hormone (GH) receptor for selected GH-stimulated function. J Biol Chem, 1995, 270: 21745—21750[DOI]

34 Baumann G, Shaw M A, Amburn K. Circulating growth hormone binding proteins. J Endocrinol Invest, 1994, 17: 67—81

35 Mannor D A, Winer L M, Shaw M A, et al. Plasma growth hormone binding proteins: effect on growth hormone binding to receptors and on growth hormone action. J Clin Endocrinol Metab, 1991, 73: 30—34[DOI]

36 Maharajan P, Maharajan V. Growth hormone signal transduction. Experientia, 1993, 49: 980—987[DOI]