

漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*) LH β 基因 克隆及其在卵巢不同发育期的表达特征*

柳学周¹ 臧 坤^{1,2} 徐永江¹ 李春广¹ 史 宝¹ 王妍妍¹

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 利用 cDNA 末端快速克隆(Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE)方法获得了漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)促黄体素(Luteinizing Hormone, LH) β 亚基的 cDNA 全长序列,检测了 LH β 亚基 mRNA 的组织表达水平,揭示了垂体、肝脏和卵巢中 LH β 亚基 mRNA 在卵巢发育周期中的表达水平变化,利用酶联免疫技术(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA)测定了血浆 LH 和雌二醇(Estrodial, E₂)表达水平的变化。结果表明,漠斑牙鲆为卵巢非同步发育分批产卵性鱼类, LH β 亚基 cDNA 序列全长 597 bp,开放阅读框 (Open reading frame, ORF)长 438 bp,编码 145 个氨基酸, LH β 亚基 mRNA 具有广泛的组织分布特性。与肝脏和卵巢相比,垂体中 LH β 亚基 mRNA 表达水平在卵巢发育各个阶段都有较高表达水平,在 IV 期表达水平迅速升高至较高水平并保持至 VI 期。卵巢中 LH β mRNA 表达水平在 V 期达到峰值,而肝脏中 LH β mRNA 表达水平在 II 期时达到峰值,在 V 期也有相对较高的表达水平。血浆 LH 和 E₂ 表达水平在卵巢发育周期中均呈现趋势一致的规律性变化。研究结果可为认识漠斑牙鲆生殖调控机制提供基础资料。

关键词 漠斑牙鲆; LH β 亚基; 卵巢发育周期; 表达特性; 血浆激素浓度
中图分类号 S961 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)04-0022-10

硬骨鱼类的生殖受下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴的调控,垂体中合成和分泌的卵泡刺激素(Follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体素(LH)等性激素与硬骨鱼类的性腺发育、配子发生以及排精产卵等过程密切相关。已有研究表明, LH 可通过促进雌鱼卵巢滤泡细胞产生促成熟激素(Maturation-inducing hormone, MIH)(如 17 α , 20 β -二羟黄体酮)以及提高 MIH 受体含量而提高卵母细胞成熟能力,促进雌鱼卵母细胞最终成熟、排卵及产卵(Kagawa *et al*, 1998)。LH 属于糖蛋白二聚体家族,其 α 亚基与 FSH 和促甲状腺激素(Thyrotropin, Thyroid-stimulating hormone, TSH)相同而 β 亚基表现出表达和调控特异性(Pierce *et al*, 1981)。硬骨鱼类的 LH β 亚基首先在大鳞大麻哈鱼

(*Oncorhynchus chustschawyttscha*)(Trinh *et al*, 1986)中发现,之后学者们对大麻哈鱼(*Oncorhynchus chusketa*)(Sekine *et al*, 1989)、条纹狼鲈(*Morone saxatilis*)(Hassin *et al*, 1995)、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)(Yoshiura *et al*, 1996)、金鱼(*Carassius auratus*)(Sohn *et al*, 1998)、真鲷(*Chrysophrys major*)(Gen *et al*, 2000)等 30 多种硬骨鱼类的 LH β 亚基进行了研究,为认识鱼类生殖调控机制和突破调控产卵技术提供了理论和技术支撑。

漠斑牙鲆属鲽形目 Pleuronectiformes、鲆科 Bot-hidae、牙鲆属 *Paralichthys*, 自然分布于美国北卡罗来纳州至佛罗里达州北部大西洋沿岸,以及佛罗里达州南部海湾至德克萨斯州南部海峡沿岸。漠斑牙鲆具有较高的经济价值和养殖应用前景,我国 2001 年引

* 鲆鲽类现代化产业技术体系(CARS-50)和国家 863 计划项目(2012AA10A413)共同资助。柳学周, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn
收稿日期: 2013-11-18, 收修改稿日期: 2014-01-14

入漠斑牙鲆开展人工繁育技术研究, 2004 年以来突破了其苗种规模化繁育技术(柳学周等, 2007), 近期 Tubbs 等(2011)对一种 MIH(20 β -S)受体在雄鱼生殖发育中的作用有初步报道, Picha 等(2012)对 IGF-II 在漠斑牙鲆卵母细胞成熟中的作用进行了研究, 但 LH 在漠斑牙鲆生殖调控机制方面的研究国内均属空白。本研究通过利用组织学手段、RACE 技术、半定量 RT-PCR 技术和 ELISA 技术对漠斑牙鲆的卵巢周期发育特征、LH 亚基的 cDNA 结构特征及其在卵巢发育周期中的作用及机制进行了探讨, 以期对漠斑牙鲆生殖调控机制研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼及水处理

本研究用实验鱼于 2010 年 7 月–2011 年 2 月取自青岛忠海水产有限公司, 共取人工培育的 3 龄以上性成熟漠斑牙鲆雌鱼(全长 41–56 cm, 体重 880–2960 g) 25 尾。漠斑牙鲆雌鱼培育水温 14–23 $^{\circ}$ C, 盐度 27–31, pH 7.8–8.4, 溶解氧 6 mg/L 以上, 日换水率 300%–500%。

2010 年 10 月上旬–2011 年 1 月下旬对漠斑牙鲆亲鱼进行控温控光培育。培育用水以锅炉升温水、自然海水和地下海井水调兑, 温度由 18 $^{\circ}$ C 逐渐下降至 14 $^{\circ}$ C, 再由 14 $^{\circ}$ C 逐渐升至 18.5 $^{\circ}$ C。亲鱼培育池水面光照强度为 300 lx, 光照时间由 12 h 逐渐缩短至 10 h。

1.2 样品采集

根据肉眼观察雌鱼卵巢在体表的隆起程度, 利用本实验室开发的鲆鲽类性腺发育检测器(实用新型专利号: ZL200520086221.1)挑选处于不同卵巢成熟期的亲鱼。

根据卵巢成熟度, 在 2010 年 7、10、11、12 月和翌年 2 月分别取样, 每次取样 5 尾漠斑牙鲆亲鱼。实验鱼以 MS-222(180 mg/L)麻醉后, 尾静脉抽血 2–3 ml, 4 $^{\circ}$ C 静置 6 h 后 10000 r/min 离心 5 min 分离上层血浆, 放入–30 $^{\circ}$ C 保存以测定 LH 和 E₂ 的表达水平。快速取卵巢、肝脏、心脏、胃、肠、脾、肾、垂体、脑、鳃、肌肉组织投入液氮中, 后转入–80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存用于总 RNA 的提取。取卵巢前、中、后部于 Davidson 固定液中固定 24 h 后转入 70%酒精保存用于组织切片观察, 确定卵巢发育时期。

1.3 卵巢发育期的确定

卵巢样品自 70%酒精取出后, 首先经酒精梯度

(70%–100%)脱水, 石蜡包埋后, 切成 7 μ m 厚的切片, 苏木精–伊红染色后, 中性树胶封片, 在显微镜(NIKON 90i)下观察、拍照, 根据卵巢切面中所占面积超过 50%或居最高比例的卵母细胞时相确定卵巢发育时期, 统计视野为 30 个, 卵母细胞时相的确定参考刘筠等(1978)的分类方法。

1.4 漠斑牙鲆 LH 亚基克隆

用 RNAiso Plus(TaKaRa)抽提各组织的总 RNA。以微量核酸测定仪(Nanodrop ND2000)测定 RNA 浓度, 提取的 RNA 以 1%琼脂糖凝胶电泳检测质量。利用 SMARTTM RACE cDNA 合成试剂盒(Clontech)合成第一链 cDNA, 所有操作按照试剂盒说明书进行。

根据 GenBank 登记的鲆鲽类 LH 亚基的基因序列设计简并引物 LHF 和 LHR(表 1), 以垂体 cDNA 作为模板, 扩增漠斑牙鲆 LH 基因的核心序列, PCR 反应体系 25 μ l, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min, (94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s)30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离后, 切胶回收目的条带并纯化。回收 PCR 产物与 pEASY-T3 载体连接, 转化至 *Trans1-T1* 感受态细胞, LB 固体培养基 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取阳性克隆送至北京华大公司测序。

根据扩增得到的核心序列设计 RACE 引物 LHGSP5、LHGSP3、LHNGSP5 和 LHNGSP3(表 1), 应用 SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒(TaKaRa)扩增 LH 的 cDNA 全长序列。按照试剂盒操作说明, 合成用于 5'-RACE 及 3'-RACE 的第一链 cDNA, 合成的 cDNA 第一链分别用 Smart RACE Advantage 2 PCR 试剂盒(Clontech)进行 PCR 扩增。第一次梯度 PCR 使用引物 LHGSP5 和 LHGSP3, PCR 条件: 94 $^{\circ}$ C 30 s,

表 1 实验所用引物及其序列
Tab.1 Primer sequences used for the PCR analysis in the present study

引物名称 Primers	引物序列 Nucleotide sequence(5'-3')
LHF	GTACCAGCATGTGTGCACGT
LHR	GTYGGGCTGCAGGCTCT
LHGSP5	TGGACCCGACCGTCTCTACCCTGTGG
LHGSP3	TGGAAGGTGCAGTCGGACGTGTTGAGT
LHNGSP5	CACTCAACACGTCCGACTGCACCTTCC
LHNGSP3	GCAGTAACAGCTCACGGCCACAGGGTAG
LHF1	GTACCAGCACGTGTGCACGT
LHR1	GTCTGGCTGCAGGCTCT
18S F	GGTAACGGGGAATCAGGGTT
18S R	TCGGGAGTGGGTAATTTGCC

71℃ 30 s, 16个循环, T_m 每个循环降低 0.5℃, 72℃ 延伸 1 min; 然后 94℃ 30 s, 63℃ 30 s, 72℃ 60 s, 28个循环。

以第一次 PCR 的产物为模板, 使用引物 LHNGSP5 和 LHNGSP3 进行巢式 PCR, PCR 条件: 94℃ 30 s, 72℃ 60 s 进行 5 个循环; 然后 5 个循环(94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 60 s), 最后 25 个循环(94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 60 s)。取 5 μ l PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 对目的条带进行回收、与载体连接、转化、筛选阳性克隆并测序。

1.5 LH 亚基组织表达和卵巢发育周期表达特性分析

提取卵巢、肝脏、心脏、胃、肠、脾、肾、垂体、脑、鳃、肌肉组织的总 RNA, 分别取 1 μ g 每个组织的总 RNA, 按照 1.4 的操作反转录获得 cDNA。取等量各组织的 cDNA, 利用特异性引物 LHF1 和 LHF2 (表 1), 以 18S rRNA 为内参基因(18SF 和 18SR)进行半定量 PCR 分析, PCR 条件: 94℃ 5 min, (94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s)35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 对电泳结果进行分析以确定 LH 亚基 mRNA 在不同组织的表达情况与卵巢发育周期中垂体、肝脏和卵巢中 LH 亚基 mRNA 的表达水平变化。

1.6 血浆 LH 和 E_2 表达水平测定

血浆 LH 和 E_2 的测定采用鱼源酶联免疫(ELISA)试剂盒(CUSABIO 公司, 上海)进行。以标准品浓度作横坐标, 对应 OD 值作纵坐标, 绘制出标准品线性回归曲线, 根据曲线方程计算各样品浓度值。LH 和 E_2 标准品线性回归方程的相关系数 R^2 值均大于等于 0.9900, 最低检测浓度分别小于 1.0 IU/L 和 1.0 pmol/L, 板内、板间变异系数均小于 15%。

1.7 序列及数据分析

利用 DAMBE(<http://aixl.uottawa.ca/>)对已知物种

LH 亚基序列进行比对分析。测序结果利用 Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>)进行序列拼接, BLAST 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行基因序列的同源性分析。用 DNASTar 软件(<http://dnastar.com>)确定 LH 基因开放阅读框并翻译成氨基酸序列, 预测分子量、等电点等。用 Clustalx2.0.12(<http://www.clustal.org/download/current/>)和 MEGA 4.1(<http://www.megasoftware.net/mega41.html>)进行氨基酸序列对位排列、系统树构建和序列同源性分析。LH 亚基 mRNA 的组织表达和不同发育时期的表达水平, 使用 ImageJ2x 软件(版本: 2.1.4.7)对电泳图谱结果进行半定量分析。

对计算得出的数据进行单因素方差(ANOVA)统计分析(SPSS v 16.0), 差异显著性水平 P 设为 0.05, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果

2.1 漠斑牙鲆各卵巢发育时期的特征

本研究发现, 漠斑牙鲆雌性亲鱼 7 月份卵巢呈前部钝圆逐渐往后细长延伸的圆锥形, 切片发现卵巢中主要细胞类型为 时相卵母细胞(图 1a), 该期卵母细胞核膜清晰, 细胞核大呈圆形, 核仁较小, 确定为 II 期卵巢。人工温光调控条件下, 10 月漠斑牙鲆卵巢呈亮白色且前部呈膨胀延长的三角形, 卵巢内主要包含 时相、 时相(图 1b)和 时相卵母细胞(图 1c), 其中 时相卵母细胞以细胞膜内侧出现液泡层为主要特点, 此时其数量在卵巢中占主要地位, 说明卵巢发育至 期。11 月份卵巢呈丰盈三角形且在卵巢腔内向后延伸明显, 表面血管发达, 体表可见明显隆起, 卵巢内可见少量透明卵粒, 包含 时相、 时相、 时相和 时相卵母细胞(图 1d), 其中以包含卵黄颗粒为主要特征的 时相卵母细胞数量占优势地位, 此时卵巢为 IV 期卵巢; 12 月份卵巢极度发育, 体表可见

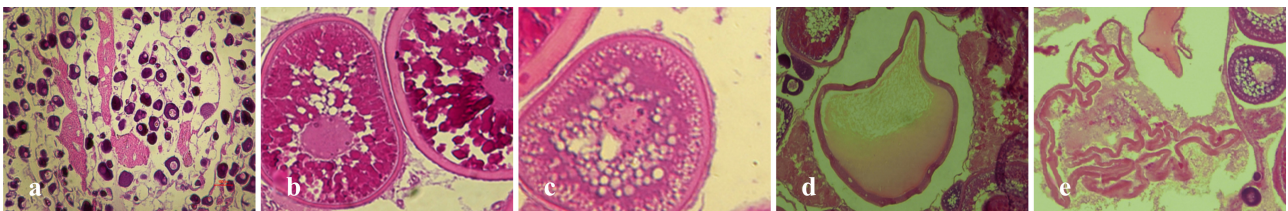


图 1 各时相卵母细胞形态

Fig.1 The morphology of oocytes at different developmental phases

a. 时相卵母细胞 $\times 40$; b. 时相卵母细胞 $\times 200$; c. 时相卵母细胞 $\times 200$; d. 时相卵母细胞 $\times 200$; e. 时相卵母细胞 $\times 200$
a. Oocyte of stage II $\times 40$; b. Oocyte of stage III $\times 200$; c. Oocyte of stage IV $\times 200$; d. Oocyte of stage V $\times 200$; e. Oocyte of stage VI $\times 200$

圆柱形隆起, 卵巢内包含 时相、 时相、 时相和 时相卵母细胞, 且出现卵黄板的 时相卵母细胞占优势地位, 该期卵巢发育至 V 期。次年 2 月份卵巢退化, 体积和重量减小明显, 卵巢中可见卵母细胞排空后的滤泡膜(图 1e), 时相、 时相和 时相的卵母细胞也同时存在, 此时卵巢发育至 VI 期。图 1 所示为各时相卵母细胞形态特征。

2.2 漠斑牙鲈 LH 亚基的序列分析

LH 亚基的 cDNA 序列(GenBank 获取号: JX002656)(图 2)全长为 597 bp, 编码 145 个氨基酸, 包括一个长 438 bp 的开放阅读框(ORF), 一个 72 bp 的 5'非编码区, 一个 87 bp 的 3'非编码区, 一个终止密码子(TGA)。DNASTAR 预测漠斑牙鲈 LH 亚基蛋白分子量为 16383.31 Da, 等电点为 5.58。在 LH 亚基氨基酸序列中发现一个 N-糖基化位点, 靠近蛋白的 C 端。

同源性分析表明, 漠斑牙鲈 LH 基因与鲷形目鱼类中的牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)氨基酸同源性最高, 达到 97.9%, 与鲈形目鱼类中条纹狼鲈同源性为 74.5%, 与鲑形目鱼类氨基酸同源性下降至为 48.5%–51.8%, 而与鸡(*Gallus gallus*)的氨基酸同源性仅为 37.9%, 与马(*Equus caballus*)的氨基酸同源性为 35.2%(图 3)。

采用 Neighbor-joining 法构建漠斑牙鲈 LH 亚基, 与其他脊椎动物的系统进化树(图 4)对比发现, 漠斑牙鲈 LH 亚基与其他鲷形目鱼类聚为一个独立的分支, 漠斑牙鲈与牙鲈同源性最高, 在同一个分支上。与鲈形目、 鲑形目、 鲑形目鱼类同属一个大的分支。

2.3 LH 亚基在雌性漠斑牙鲈组织中的分布

LH 亚基在除肌肉以外的垂体、脑、卵巢、肝、心、脾、肾、胃、肠、鳃中均有表达。垂体中的表达量明显高于其他组织, 肝脏、心脏、胃、肠、鳃中也有较高表达, 而在脑、卵巢、肾脏、脾脏中表达量相对较低(图 5)。

2.4 LH 亚基在雌性漠斑牙鲈卵巢不同发育时期垂体、肝脏、卵巢中的表达水平

利用半定量 PCR 方法分析了漠斑牙鲈垂体、肝脏和卵巢中 LH mRNA 表达水平在不同卵巢发育时期的变化特性。与肝脏和性腺相比, 垂体中 LH 亚基 mRNA 表达水平在卵巢发育各个阶段都有较高表达水平, 在 7 月(II 期)时表达水平相对较低, 在 11 月(IV 期)表达水平迅速升高至较高水平并保持至 VI 期(图 6)。

卵巢中 LH mRNA 表达水平在 II、V 期表达水平平均较高, 且在 V 期达到峰值, 在 VI 期显著降低,

```

-108                                     ag tcc gtc tcc
-60 ggc tca acc acc agc agc tgt tga atc gat cgt gga cac aaa cac ttc atc tcc tgc agg
1  ATG TCG ATG CAG CTC AGC CTG AGA GTG AAG ATC CCT CTG ACG TTG ATT TTC TTT CTC TCG
   M  S  M  Q  L  S  L  R  V  K  I  P  L  T  L  I  F  F  L  S
61  TCC ATG TGG CCC CTG GCC CCC GCA GAG GCC TTC CAG CTA CCG ACG TGT CTT CTC ATC AAG
   S  M  W  P  L  A  P  A  E  A  F  Q  L  P  T  C  L  L  I  K
121 CAA ATG GTG TCT CTG GAG AAG GAG GGC TGT CCC AAG TGT CAC ACC GTG GAA ACC ACC ATC
   Q  M  V  S  L  E  K  E  G  C  P  K  C  H  T  V  E  T  T  I
181 TGC AGT GGA CAC TGC AAA ACC AAG GAT CCC GTC GCC AAG ATC CCC TTC CTC AAC ATG TAC
   C  S  G  H  C  K  T  K  D  P  V  A  K  I  P  F  L  N  M  Y
241 CAG CAC GTG TGC ACG TAC CAG GAG CTG TAC TAC AAG ACG TTT GAA CTT CCA GAC TGT CCT
   Q  H  V  C  T  Y  Q  E  L  Y  Y  K  T  F  E  L  P  D  C  P
301 CCA GGC GTG GAC CCG ACC GTC TCC TAC CCT GTG GCC GTG AGC TGT TAC TGC GGC CGC TGT
   P  G  V  D  P  T  V  S  Y  P  V  A  V  S  C  Y  C  G  R  C
361 GCA CTC AAC ACG TCC GAC TGC ACC TTC CAG AGC CTG CAG CCA GAC TTC TGC ATG AAC GAC
   A  L  N  T  S  D  C  T  F  Q  S  L  Q  P  D  F  C  M  N  D
421 ATC CCC TTC TAC GAC TGA acg tta aac act gga gtc caa acc atg ttt aat aaa aga cag
   I  P  F  Y  D  *
481 atc ttt aca ttc acc act gcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 2 LH 亚基的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig.2 cDNA sequence and induced amino acid sequence of LH β subunit gene

终止密码子(TGA)以星号标注, 3'-UTR 端 aataa 序列以框标注, N-糖基化位点 NTSD 以下划线标注

The asterisk indicates the stop codon (TGA). The nucleotides corresponding to the polyadenylation signal in the 3'-untranslated region (aataa) are marked with rims. The potential N-glycosylation site (NTSD) in N-region was single underlined

```

Southern flounder      1 -MSMQLSLRVKIPLTLIFFL----SSMWPLAPAEAFQ-----LPTCLLIKQMVLSLEKE
Japanese flounder     1 -...I...V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
Atlantic halibut      1 METE.I.V...L.....V.....K.Q.....
Korean rockfish       1 ----MM-AMF.VM.SWI.GAS--Y.I....A.....S.Q...N.T.....
Longtooth grouper    1 M.AV.VG-.MF.M.SL.GAS--I.S...A.....P.Q...N.T.....
Striped sea-bass      1 -.AV.A-.MF.V.SL.GAT--DI.....P.Q...N.T.....
Swamp eel             1 -.AA.V-.MFL.MIDL.GAS--I....A.....P.Q...N.T.....
Senegalese sole      1 MAAV.IR-.LTFH...TVL.GSS--T.D..P..VSS-----SP.Q.VN.T....D
Coho salmon          1 ----VG--TL.S.F.CIL-----E.M.GSL-----MQP.QP.N.T.....
Atlantic salmon       1 MLGLHVG--TL.S.F.CIL-----E.V.GSL-----MQP.QP.N.T.....
Rainbow trout         1 MLGLHVG--TL.S.L.CIL-----E.V.GSL-----MQP.QP.N.T.V...
Russian sturgeon     1 -----MPASVS.LLL.F-----SA.VLSRSSS-----RL.EPVNETI.A...
Marbled eel          1 -----MSVYPECTWL.FV---CLCHLPVS.GGSL-----LP.EP.NETI.V..D
Zebrafish             1 -----MLLAGNGV..F----LFFL.A.QSLV-----F.R.E.VNET.V...
Grass carp            1 -----MLVVRNILL.L.F---CLVVL.VF.QSSF-----P.EPVNET.AV...
Chicken               1 MGGA.VLVLMTLLG.PPATTGNPPVAVDP..VVGPPMGLGGGGR.P.RP.NVT.AV..D
Horse                 1 -----METLQGL.LWM.LS----VGGVW.SRGPLR-----L.RP.NATLAA...

Southern flounder      49 GCPKCHTVETTICSGHCKTKDPVAKIPFLNMYQHCVTYQELYKTFELPDCPPGVDPTVS
Japanese flounder     49 .....
Atlantic halibut      50 .....N...I...V.....
Korean rockfish       47 ..S...P.....P...I...S.V.....DF.....S.....T
Longtooth grouper    52 .....P.....I...I...S.V.E...RDF.H.....T
Striped sea-bass      51 .....P.....I...I...S.V...RD.H.....T
Swamp eel             51 .....P.....I...I...S.V...RDW...F.....
Senegalese sole      52 ..HT..P.....Y...I.....DVH...H...G...S.T
Coho salmon           37 ...T.LVIQ.P...V.E.F.S..STV...RDVR.E.IR...W..H.T
Atlantic salmon       42 ...T.LVIQ.P...V.E.F.S..STV...RDVR.E.IR...W..H.T
Rainbow trout         42 ..T.LVIQ.P...V.E.F.S..STV...RDVR.E.IR...W..H.T
Russian sturgeon     39 E...LLIQ.S...S.P...F.SALSTVQ...KD.RFV.VT.....HFT
Marbled eel          43 ....LVFQ.S...I...SY.S.LSTV.R...RDVR.E.VR...R...H.T
Zebrafish             42 ....LVFQ...V.R...Y.S..STVH.T...RDVR.E.IN...SA...QIT
Grass carp            42 ....LVFQ...L.E..Y.S..STV...RDVR.E.VR...HIT
Chicken               61 ...Q.MA.T.A.G.Y.R.RE..YRS.LGPPP.SA..GA.R.ERWA.WG..I.S.R.L
Horse                 42 A..I.I.FT.S.A.Y.PSMVR.MPAALPAIP.P...R..RFASIR..G...M..

Southern flounder      109 YPVAVSCYCGRCALNTSDCTFQSLQPDFCMNDIPFYD-----
Japanese flounder     109 .....
Atlantic halibut      110 .....E.....
Korean rockfish       107 ...L.H...MD...E...N.....HY-----
Longtooth grouper    112 ...L.H...MD...E...N.....Y-----
Striped sea-bass      111 ...Q.H...MD...E...N.....Y-----
Swamp eel             111 ...L.H...MD...YE.R...I...L..Y-----
Senegalese sole      112 ...S.S..MD...YE...I...L..Y-----
Coho salmon           97 ...L.D.SL.NMD...IE...ITQRVLT.GDMW-----
Atlantic salmon       102 ...L.D.SL.NMD...IE...ITHRALM.GNMW-----
Rainbow trout         102 ...L.D.SL.NMD...IE...ITQRVLT.GDMW-----
Russian sturgeon     99 F.L.L..E.SL.RMES...I.VG.SD..SGELAIQNY-----
Marbled eel          103 F...L..D.NL.TMD...AI...R...SQRASLPA-----
Zebrafish             102 ...L.D.SL.TI...I...SQREDFSA-----
Grass carp            102 ...L.D.SL.TMD...IE...SQREDFPV-----
Chicken               121 L...L..R.A..PMA...V.G.G.A..GAPGG.GGE-----
Horse                 102 F...L..H..P.QIK.T..GVFRD..LA.APQASSSSKDPSPQPLTSTSTPTPGASRRSS

Southern flounder      -----
Japanese flounder     -----
Atlantic halibut      -----
Korean rockfish       -----
Longtooth grouper    -----
Striped sea-bass      -----
Swamp eel             -----
Senegalese sole      -----
Coho salmon           -----
Atlantic salmon       -----
Rainbow trout         -----
Russian sturgeon     -----
Marbled eel          -----
Zebrafish             -----
Grass carp            -----
Chicken               -----
Horse                 162 HPLPIKTS

```

图 3 漠斑牙鲈 LH β 亚基的氨基酸序列与其他脊椎动物的同源性比对

Fig.3 Comparison of LH β subunit precursors between southern flounder and other vertebrates

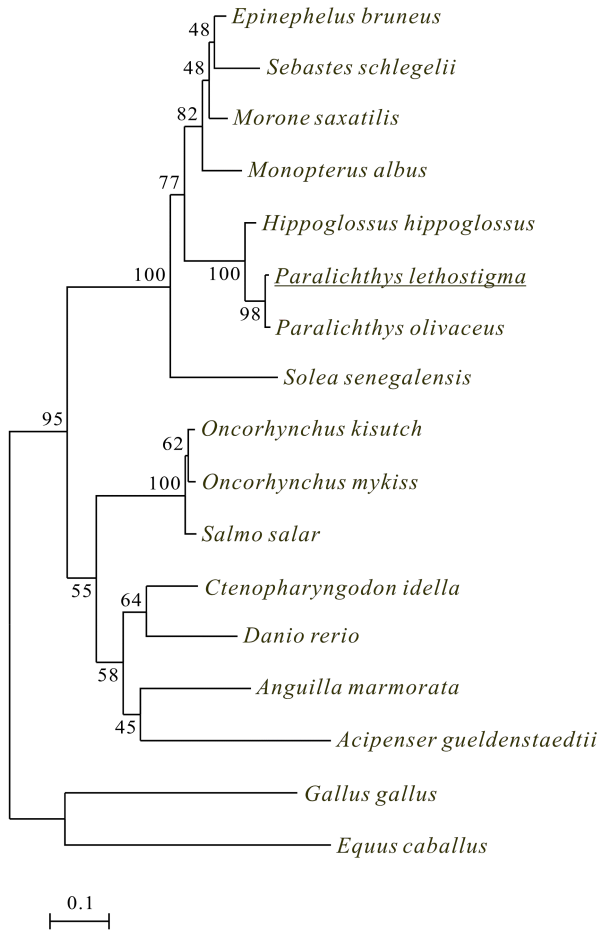


图 4 漠斑牙鲆 LH β 亚基与其他脊椎动物 LH β 亚基的系统进化树对比

Fig.4 Unrooted phylogenetic tree of LH β in vertebrates using Neighbor-Joining method (Mega 4.1 software) according to the amino acid sequence alignments of *Paralichthys lethostigma* with ClustalX.

Boot strap values are based on 1000 repeats. GenBank accession numbers: *Sebastes schlegelii*(AAU14142), *Epinephelus bruneus* (ABQ57400), *Morone saxatilis* (AAC38019), *Monopterus albus* (ACF70665), *Hippoglossus hippoglossus* (CAD10502), *Paralichthys olivaceus* (AAK58602), *Solea senegalensis* (ABU95600), *Oncorhynchus kisutch* (AAO72300), *Oncorhynchus mykiss* (NP001117677), *Salmo salar* (NP001167142), *Acipenser gueldenstaedtii* (AAP97490), *Anguilla marmorata* (ACK87153), *Ctenopharyngodon idella* (ABM73670), *Danio rerio* (AAV31153), *Equus caballus* (P08751), *Gallus gallus* (ADY03193)

漠斑牙鲆用下划线标注

Paralichthys lethostigma is underlined

在 II 期和 III 期保持较低水平(图 6)。

肝脏中 LH mRNA 表达水平在 II 期时达到峰值, 其后表达水平下降, 在 V 期也有相对较高的表达水平, 而在其它各期表达水平较低(图 6)。

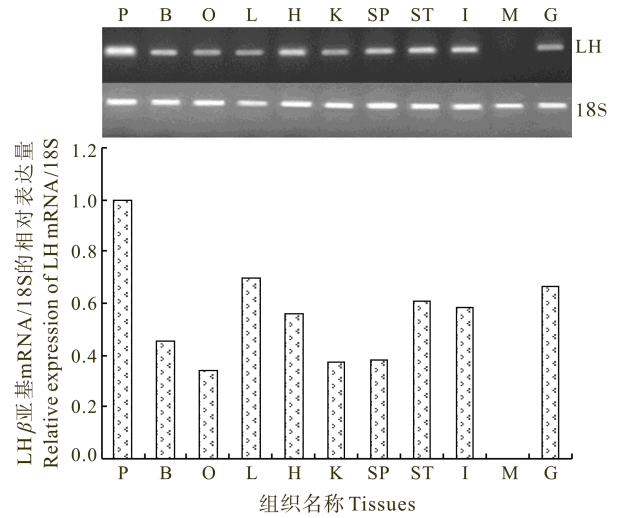


图 5 LH β 亚基在漠斑牙鲆不同组织中的表达特性

Fig.5 Expression pattern of LH β subunit in various tissues of *Paralichthys lethostigma*

P: 垂体; B: 脑; O: 卵巢; L: 肝脏; H: 心脏; K: 肾; SP: 脾; ST: 胃; I: 肠; M: 肌肉; G: 鳃
P: pituitary; B: brain; O: ovary; L: liver; H: heart; K: kidney; SP: spleen; ST: stomach; I: intestine; M: muscle; G: gill

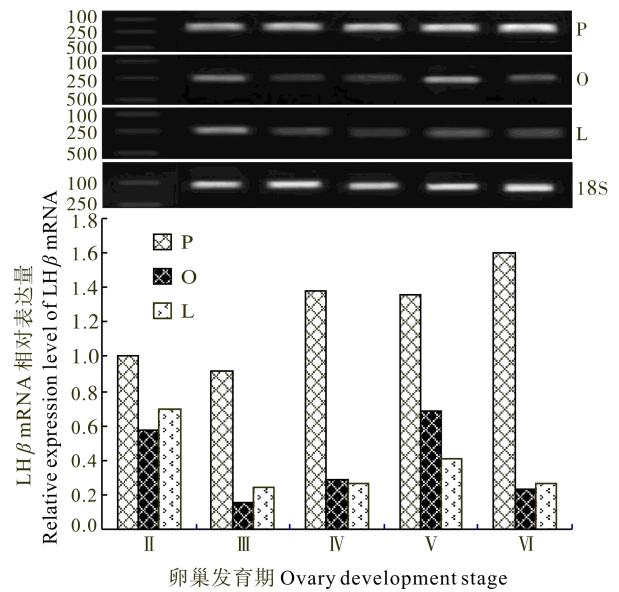


图 6 漠斑牙鲆雌鱼卵巢发育周期中垂体、卵巢和肝脏中 LH β 亚基表达特性

Fig.6 Expression patterns of pituitary, ovary and liver LH β mRNA levels in *P. lethostigma* during ovarian maturation cycle

M: Marker; P: 垂体; O: 卵巢; L: 肝脏

M: Marker; P: pituitary; O: ovary; L: liver

2.5 雌性漠斑牙鲆卵巢发育周期中血浆 LH 和 E₂ 的浓度变化

血浆中 LH 和 E₂ 表达水平测定结果显示, 血浆

LH 表达水平在卵巢发育至 II 期时较高, III 期、IV 期下降, 至 V 期显著升高, 而后在 VI 期下降(图 7); 血浆 E₂ 表达水平变化与 LH 变化趋势一致(图 8)。

3 讨论

本研究首先利用组织学手段认识了漠斑牙鲆卵巢发育特征, 然后采用 RACE 和 RT-PCR 方法克隆了 LH 亚基序列, 分析了其表达特性, 并测定了卵巢发育周期中血浆 LH 和 E₂ 浓度的变化情况, 为揭示漠斑牙鲆生殖调控机制提供了基础资料。

组织学观察表明, 漠斑牙鲆同一发育时期的卵巢中有不同时相的卵母细胞存在, 表明其为非同步发育分批产卵性鱼种, 与同属鲽形目的圆斑星鲽(*Verasper variegatus*)(徐永江等, 2011)和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)(柳学周等, 2009)等一致。此外, 在

期卵巢中均可见 时相卵母细胞, 验证了漠斑牙鲆卵巢内卵母细胞具有持续发育的潜质(柳学周等 2007)。

漠斑牙鲆 LH 亚基只有一个 N-糖基化位点, 这与多数硬骨鱼类 LH 亚基类似, 被认为是 LH 亚基的保守特征之一(Swanson *et al*, 2003)。LH 亚基的 N-糖基化位点主要作用是识别并与细胞受体结合(Miranda *et al*, 2007), 牙鲆 LH 亚基存在两个糖基化位点(Kajimura *et al*, 2001), 可能是由种间的特异性决定的, 其作用机制是否存在差异尚有待于深入研究。氨基酸比对分析显示漠斑牙鲆与其他鲽形目鱼类具有相同的氨基酸缺失, 系统进化树中漠斑牙鲆也与多数鲽形目鱼类在一个分支节点上, 分子进化研究得出的漠斑牙鲆分类地位与形态学上得出的分类进化地位一致。

LH mRNA 在雌性漠斑牙鲆中主要在垂体中表达, 该特征与其他硬骨鱼类相同(Jackson *et al*, 1999;

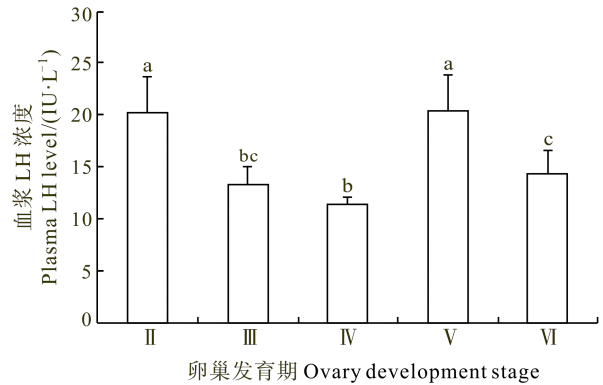
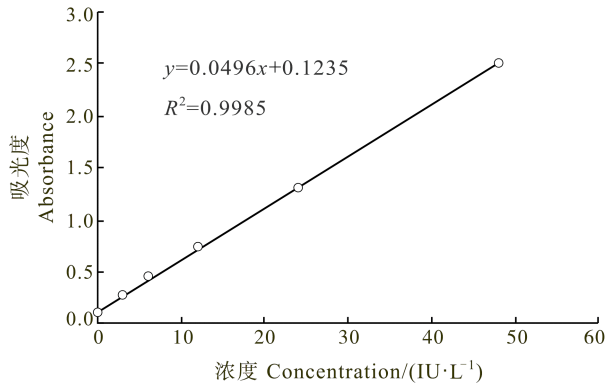


图 7 漠斑牙鲆卵巢发育周期中血浆 LH 的表达水平变化(左为标准曲线, 右为试验测定值)

Fig.7 Changes of plasma LH levels in female *P. lehostigma* during ovarian maturation cycle

*不同字母表示在 $P=0.05$ 水平上差异性显著($P < 0.05$), $n=5$

*Different letters indicate significant difference at $P=0.05$ level ($P < 0.05$), $n=5$

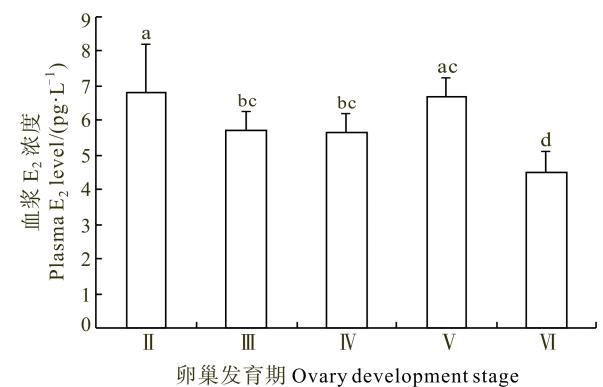
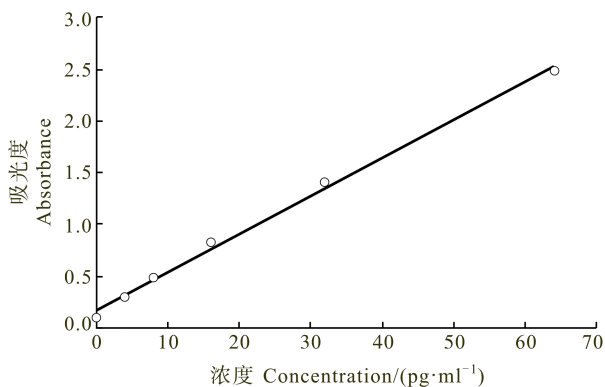


图 8 漠斑牙鲆卵巢发育周期中血浆 E₂ 表达水平变化(左为标准曲线, 右为试验测定值)

Fig.8 Changes of plasma E₂ levels in female *P. lehostigma* during ovarian maturation cycle

*不同字母表示在 $P=0.05$ 水平上差异显著($P < 0.05$), $n=5$

*Different letters indicate significant differences at $P=0.05$ level ($P < 0.05$), $n=5$

Gen *et al.*, 2000; Meiri *et al.*, 2004; Hellqvist *et al.*, 2006), 表明垂体是 LH 的主要分泌和表达作用器官。此外, 本研究还发现, LH 亚基在脑、卵巢、肝、心、脾、肾、胃、肠、鳃等组织中表达广泛, 与斑马鱼(*Danio rerio*)的 LH 亚基 mRNA 也有广泛组织分布的结果相同(So *et al.*, 2005)。这种多组织表达特性暗示 LH 除通过垂体分泌参与卵母细胞的发育成熟调控之外, 还可能更为广泛的生理功能, 其中, Hellqvist 等(2006)报道肝脏中 LH 可能涉及卵黄的合成和运输, 其他组织中 LH 亚基的表达有待进一步研究。

已有研究表明, 鱼类卵巢发育周期中垂体 LH 亚基 mRNA 的表达水平变化存在明显种间差异, 可将其分为 3 种表达模式。(1) 随着卵巢发育垂体中 LH 亚基的表达水平逐渐升高, 在排卵期达到峰值, 金鱼(Kobayashi *et al.*, 1997)、条纹狼鲈(Shimon *et al.*, 1999)和蓝攀鲈(*Trichogaster trichopterus*)(Jackson *et al.*, 1999)均属于这种模式。(2) 在卵黄生成期和卵母细胞成熟期垂体 LH 亚基表达水平一直较高, 到排卵结束后随卵巢退化而明显下降, 真鲷(Gen *et al.*, 2000)和三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)(Hellqvist *et al.*, 2006)属于这种类型。(3) 卵巢发育前期, LH 表达一直处于较低水平, 在卵母细胞最终成熟和排卵期会急剧升高, 虹鳟(Weil *et al.*, 1995)和金头鲷(Meiri *et al.*, 2004)均表现出这种特点。漠斑牙鲈垂体 LH mRNA 表达水平在卵巢发育 I 期和 II 期较低, 而在 IV 至 VI 期均较高, 与金鱼(Kobayashi *et al.*, 1997)、条纹狼鲈(Shimon *et al.*, 1999)和蓝攀鲈(Jackson *et al.*, 1999)等同属类似表达模式。

卵巢不同发育时期, 漠斑牙鲈性腺和肝脏中 LH 亚基 mRNA 表达水平的变化暗示, LH 除通过垂体合成和分泌调节卵巢发育外, 还可能通过旁分泌和(或)自分泌的途径参与调节。本研究发现, 漠斑牙鲈肝脏中 LH 亚基 mRNA 表达水平在卵巢成熟启动前期较高, 而在卵黄发生期处于较低水平, 表明漠斑牙鲈肝脏中 LH 可能因参与卵黄合成和运输而消耗(Hellqvist *et al.*, 2006)。而卵巢中 LH 亚基 mRNA 表达水平在性腺发育启动期(I 期)较高, 则可能暗示 LH 还直接参与了卵母细胞的早期发育。已有研究表明, 鱼类 LH 主要通过刺激卵巢滤泡细胞产生促成熟激素 MIH(如 17 α , 20 β -二羟黄体酮)以及提高 MIH 受体含量而促进卵母细胞最终成熟、排卵及产卵(Kagawa *et al.*, 1998)。本研究中卵巢 LH 亚基 mRNA 表达水平在产卵期(III 期)达到峰值, 其可能原因为卵母细胞的最终成熟以及排卵和产卵等过程的顺利进行需要大

量 LH 的参与, 这种 LH 的表达特性是否具有物种特异性尚有待进一步研究。此外, 本研究发现肝脏中 LH 亚基 mRNA 表达水平变化与血浆 LH 浓度变化相一致, 从激素水平上暗示垂体外组织的 LH 合成和分泌对 LH 发挥作用有重要影响。垂体以外器官的 LH 亚基 mRNA 表达水平研究较少, 为深入理解 LH 在鱼类中的作用机制, 今后需要在这一方面加强相关研究。

本研究发现, 漠斑牙鲈卵巢不同发育时期血浆中 LH 水平变化与垂体 LH mRNA 的表达水平变化并不具有一致性, 对蓝攀鲈(Jackson *et al.*, 1999)、虹鳟(Weil *et al.*, 1995)和条纹狼鲈(Shimon *et al.*, 1999)的研究也出现类似结果。Halban 等(1994)认为这种情况可能与垂体 LH 分泌的调节方式有关。漠斑牙鲈雌鱼血浆 LH 浓度在卵黄生成前(II 期)表现出较高水平, 而此时垂体中 LH 亚基 mRNA 表达水平不高, 但 VI 期的 LH 亚基 mRNA 表达水平很高, 暗示连续两个生殖周期中 LH 合成和分泌的可能具有一定的迟滞现象, Gomez 等(1999)在虹鳟的研究中也发现了 LH 合成和分泌的延迟效应, 这种延迟可能与 LH 参与行使生理功能的时间顺序有关, 有待于深入研究。漠斑牙鲈雌鱼在卵母细胞发生启动(I 期)和卵黄发生期(IV 期)血浆中 LH 表达水平较低, 而垂体和卵巢中 LH mRNA 表达水平不断升高, 肝脏的 LH mRNA 表达水平较低, 表明血浆 LH 可能主要在肝脏 LH 基因的调节下参与了卵黄的发生和发育调控过程。漠斑牙鲈血浆 LH 在卵黄生成期(IV 期)的低表达水平与蓝攀鲈(Jackson *et al.*, 1999)等研究结果相似, 而与真鲷(Gen *et al.*, 2000)和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(Aizen *et al.*, 2007)卵黄生成期血浆 LH 就处于较高水平不同, 表明 LH 的促进卵黄生成作用具有物种差异性。在卵母细胞成熟期(V 期), 与多数鱼类相同, 漠斑牙鲈的血浆 LH 表达水平明显升高, 与垂体、卵巢和肝脏中 LH mRNA 的高表达水平一致, 表明其在卵母细胞最终成熟、排卵和产卵中共同发挥了重要生理调节作用。排卵期结束后(VI 期)血浆 LH 迅速下降到最低水平, 而此时垂体 LH mRNA 表达水平仍保持较高表达水平, 尽管未发现其他硬骨鱼类 VI 期有 LH 亚基 mRNA 高表达出现, 但近期对鲈鱼(*Scomber japonicus*)的免疫组化研究显示 LH 细胞在排卵后期仍有较高水平的免疫反应(Nyuji *et al.*, 2011), 可能与下一个生殖周期中 II 期血浆 LH 的升高有关, 但具体机制有待探究。

血浆 E₂ 和 LH 的表达水平在漠斑牙鲈雌鱼生殖周期中均表现出先下降后升高再下降的波动变化, 二

者变化基本一致的情况在虹鳟(Hirohiko *et al.*, 2003)的研究中也有出现, Hirohiko 等(2003)发现 LH 通过提高芳香化酶活力和芳香化酶基因 P450 的表达水平,促进真鲷卵巢滤泡中 E₂的合成,而 Ando 等(2003)研究发现 E₂能够通过刺激促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)产生而促进 LH 的分泌, LH 和 E₂表现出相互促进的关系。E₂在卵巢发育 II 期时浓度较高,表明在卵黄生成前期的 E₂有重要作用,徐永江等(2010)通过免疫组织化学方法发现在半滑舌鳎 II 时相卵母细胞 E₂及其受体 ER α 均有较强表达也说明这一点。在卵母细胞发生启动和卵黄生成期(III 期和 IV 期)漠斑牙鲆的血浆 E₂浓度与 II 期相比稍有下降,但仍处于较高水平,与多数硬骨鱼相同,表现出 E₂在诱导肝脏的肝细胞合成卵黄蛋白原方面的作用(Lange *et al.*, 2003)。在卵母最终成熟和排卵期(V 期)E₂水平稍有升高,与其他多次产卵鱼类出现的随卵母细胞成熟而下降的结果不同(Methyen *et al.*, 1992),可能与内分泌系统的环境适应机制有关。产卵结束卵巢退化期(VI 期)E₂下降到最低水平。

参 考 文 献

- 刘筠, 陈淑群, 王义铄, 等. 草鱼产卵类型的研究. 水生生物学报, 1978, 6(3): 247-257
- 徐永江, 柳学周, 王清印, 等. 养殖圆斑星鲈血浆性类固醇激素表达与卵巢发育及温光调控的关系. 中国水产科学, 2011, 18(4): 836-846
- 徐永江, 柳学周, 温海深, 等. 性类固醇激素及其受体在半滑舌鳎性腺分化发育过程中的表达与生理功能. 中国海洋大学学报, 2010, 40(7): 66-72
- 柳学周, 孙中之, 田景波, 等. 漠斑牙鲆繁殖生物学及苗种繁育技术研究进展. 渔业现代化, 2007, 34(2): 14-17
- 柳学周, 徐永江, 刘乃真, 等. 半滑舌鳎卵巢发育的组织学和形态数量特征研究. 渔业科学进展, 2009, 33(6): 25-35
- Aizen J, Kasuto H, Levavi B. Development of specific enzyme-linked immune-osorbent assay for determining LH and FSH levels in tilapia, using recombinant gonadotropins. Gen Comp Endocrinol, 2007, 153(1-3): 23-332
- Ando H, Swanson P, Urano A. Regulation of LH synthesis and release by GnRH and gonadal steroids in masu salmon. Fish Physiol Biochem, 2003, 28(1-4): 61-63
- Gen K, Okuzawa K, Senthiekumaran B, *et al.* Unique expression of gonadotropin-I and-II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation. Biol Reprod, 2000, 63(1): 308-319
- Gomez JM, Weil C, Ollitrault M. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen Comp Endocrinol, 1999, 113(3): 413-428
- Halban PA, Irminger JC. Sorting and processing of secretory proteins. Biochem, 1994, 299(pt1): 1-18
- Hassin S, Elizur A, Zohar Y. Molecular cloning and sequence analysis of striped bass (*Morone axatilis*) gonadotrophin-I and -II subunits. Mol Endocrinol, 1995, 15(1): 23-35
- Hellqvist A, Schmitz M, Mayer I, *et al.* Seasonal changes in expression of LH- β and FSH- β in male and female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. Gen Comp Endocrinol, 2006, 145(3): 263-269
- Hirohiko K, Koichiro G, Koichi O, *et al.* Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major*. Biol Reprod, 2003, 68(5): 1562-1568
- Jackson K, Goldberg D, Ofir M, *et al.* Blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) gonadotropic β subunits (I and II) cDNA sequences and expression during oogenesis. J Mol Endocrinol, 1999, 23: 177-187
- Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K, *et al.* GTH II but not GTH I induces final maturation and the development of maturational competence of oocytes of red seabream in vitro. Gen Comp Endocrinol, 1998, 112(1): 80-88
- Kajimura S, Yoshiura Y, Suzuki M, *et al.* cDNA cloning of two gonadotropin b subunits (GTH-I b and -II b) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Gen Comp Endocrinol, 2001, 122: 117-129
- Kobayashi M, Kato Y, Yoshiura Y, *et al.* Molecular cloning of the cDNAs encoding two gonadotropin β subunits (GTH-I β and -II β) from the goldfish, *Carassius auratus*. Gen Comp Endocrinol, 1997, 105(3): 372-378
- Lange IG, Hartel A, Meyer HHD. Evolution of oestrogen function in vertebrates. J Steroid Biochem, 2003, 83(1-5): 219-226
- Meiri I, Knibb WR, Zohar Y, *et al.* Temporal profile of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and growth hormone gene expression in the protandrous hermaphrodite, gilthead seabream, *Sparus aurata*. Gen Comp Endocrinol, 2004, 137(3): 288-299
- Methven DA, Crim LW, Norberg B, *et al.* Seasonal reproduction and plasma levels of sex steroids and vitellogenin in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Can J Fish Aquat Sci, 1992, 49(4): 754-759
- Miranda LA, Strüssmann CA, Guilgur LG, *et al.* Cloning of FSH-b, LH-b and glycoprotein hormone subunits in pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes): expression profile and relationship with GnRH expression and plasma sex steroid levels in male fish. J Fish Biol, 2007, 71(6): 1571-1589
- Nyuji M, Shiraishi T, Selvaraj S, *et al.* Immunoreactive changes in pituitary FSH and LH cells during seasonal reproductive and spawning cycles of female chub mackerel *Scomber japonicas*. Fish Sci, 2011, 77(5): 731-739
- Picha ME, Shi B, Thomas P. Dual role of IGF-II in oocyte maturation in southern flounder *Paralichthys lethostigma*: Up-regulation of mPRA and resumption of meiosis. Gen

- Comp Endocrinol, 2012, 177(2): 220–230
- Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem*, 1981, 50: 465–495
- Sekine S, Saito A, Itoh H, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of chum salmon gonadotropin cDNAs. *Proc Natl-Acad Sci USA*, 1989, 86(22): 8645–8649
- Shimon H, Claire HH, Yonathan Z. Ontogeny of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone gene expression during pubertal development in the female striped bass, *Morone saxatilis* (Teleostei). *Biol Reprod*, 1999, 61(6): 1608–1615
- So WK, Kwok HF, Ge W. Zebrafish gonadotropins and their Receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits—their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity. *Biology of Reproduction*, 2005, 72(6): 1382–1396
- Sohn YC, Suetake H, Yoshiura Y, *et al.* Structural and expression analyses of gonadotropin I beta subunit genes in goldfish (*Carassius auratus*). *Gene*, 1998, 222(2): 257–267
- Swanson P, Dickey JT, Campbell B. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiol Biochem*, 2003, 28(1–4): 53–59
- Trinh KY, Wang NC, Hew CL, *et al.* Molecular cloning and sequencing of salmon gonadotropin subunit. *Eur J Biochem*, 1986, 159(3): 619–624
- Tubbs C, Tan WX, Shi B, *et al.* Identification of 17, 20 beta, 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 beta-S) receptor binding and membraneprogesterone receptor alpha on southern flounder sperm (*Paralichthys lethostigma*) and their likely role in 20 beta-S stimulation of sperm hypermotility. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 170(3): 629–639
- Weil C, Bougoussa HM, Gallais C, *et al.* Preliminary evidence suggesting variations of GtH 1 and GtH 2 mRNA levels at different stages of gonadal development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol*, 1995, 100(3): 327–333
- Yoshiura Y, Suetake H, Aida K. Duality of gonadotropin in a primitive teleost, Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Mol Endocrinol*, 1996, 16(2): 171–181

(编辑 刘丛力)

Molecular Cloning and Differential Expression of LH β Subunit During the Ovarian Maturation Cycle of *Paralichthys lethostigma*

LIU Xuezhou¹, ZANG Kun^{1,2}, XU Yongjiang¹, LI Chunguang¹, SHI Bao¹, WANG Yanyan¹

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The role of the endocrine pathway in the regulation of southern flounder *Paralichthys lethostigma* reproduction has been unclear. Here we aimed to explore the underlying mechanisms by investigating the expression pattern of luteinizing hormone β subunit (LH β). Using samples isolated from pituitary of *P.* we obtained the full-length cDNA sequence of LH β with the RACE method. The spatial and temporal expression patterns of LH β mRNA in different tissues during an ovarian maturation cycle were analyzed using the qPCR assay. The levels of plasma LH and E₂ during an ovarian maturation cycle were also measured using the ELISA method. Our results revealed an asynchronous oocyte development and batch spawning in southern flounder. The cDNA sequence of LH β had a length of 597 bp and it encoded 145 amino acids. LH β expression was detected in all examined tissues except for muscle, which implied it could be involved in multiple physiological functions in southern flounder. The LH β mRNA level in pituitary was high through the entire ovarian maturation cycle, and peaked at stage V and VI. In the ovary the LH β mRNA level peaked at stage V. In the liver the LH β mRNA level was the highest at stage II and relatively high at stage V. The levels of plasma LH and E₂ fluctuated in a similar pattern during the ovarian maturation cycle. These results suggested that LH β might regulate the ovarian maturation cycle via endocrine, paracrine and autocrine pathways. Our study provided insights into the functions of the endocrine pathway in the reproduction of southern flounder.

Key words *Paralichthys lethostigma*; LH β subunit; Ovarian maturation cycle; Expression pattern; Plasma hormone levels