

mPR α 在性成熟雌性牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 不同组织中的定性定量表达特征*

李晓妮^{1,3} 柳学周^{1,2,3} 史宝^{1,2} 徐永江^{1,2} 李晓晓^{1,2} 张金勇^{1,3}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛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. 大连海洋大学 大连 110623)

摘要 通过荧光实时定量 PCR 方法(qRT-PCR)检测雌性性成熟牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)第 V 时期不同时相的卵母细胞中膜孕激素受体(mPR α)的表达,同时采用原位杂交、免疫组化和 Western blotting 方法研究性成熟雌性牙鲆 mPR α mRNA 和蛋白在各组织中的分布和表达。qRT-PCR 结果显示,在牙鲆卵巢成熟时期的第 V 时相卵母细胞, mPR α mRNA 的表达量最高,表明 mPR α 介导孕激素参与了牙鲆卵母细胞成熟的调控。组织定量定位结果显示,在牙鲆的卵巢、脑、头肾、肾、肝脏组织中均有 mPR α mRNA 和蛋白表达存在,且在脑、卵巢中表达量较高,表明 mPR α 在牙鲆不同组织中都发挥着一定的作用,且在内分泌相关组织如脑和卵巢中的作用更明显。原位杂交和免疫组化结果显示, mPR α mRNA 和蛋白表达明显定位在牙鲆卵母细胞膜上,且分布在其他组织的管腔结构。本研究为进一步探究牙鲆 mPR α 信号转导机制提供了理论基础和形态学依据。

关键词 膜孕激素受体; 牙鲆; 原位杂交; 免疫组化; Western blotting; 组织表达

中图分类号 S961 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0034-08

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)个体大、肉质细嫩鲜美,经济价值高,是我国海水增殖养殖重要的鱼类之一。近几年,对于牙鲆的研究主要集中在生化因子(温度、盐度、光照周期、光照强度)对牙鲆各个生化指标的影响、基因克隆和表达、生长、家系、疾病等方向。环境胁迫、温度、光照、养殖密度等对牙鲆繁殖内分泌功能的影响日益引起了国内外学者的关注。但关于牙鲆性腺发育成熟过程中的膜孕激素受体(mPR)的调控机制的研究却鲜有报道(史宝, 2010)¹⁾。

在孕激素诱导鱼类卵母细胞成熟过程中,不是通过激活卵母细胞内的核类固醇受体发挥生理作用,而是通过结合在细胞表面的膜受体快速地发挥生理功能。膜孕激素受体(mPRs)在孕激素参与的调控过程中起介导作用,自 Patiño 等(1990)首次报道在硬骨鱼类中发现云纹犬牙石首鱼(*Cynoscion nebulosus*)的卵巢组织中存在 mPR 以后,对于硬骨鱼类 mPRs 的研究逐渐开展起来。mPRs 在卵母细胞成熟中发挥生理调节作用最有说服力的证据是在研究硬骨鱼类卵母细

* 国家自然科学基金项目(31201982)、国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)、山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013SW042)共同资助 [This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31201982), China Agriculture Research System (CARS-50), and Shandong Youth Scientist Awards Foundation (BS2013SW042)]
李晓妮, E-mail: 857903563@qq.com

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-11-05, 收修改稿日期: 2015-12-26

1) Shi B. Study on the molecular mechanisms of reproductive endocrinology in *Paralichthys olivaceus* and *Paralichthys lethostigma*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010, 1-176 [史宝. 牙鲆繁殖内分泌分子机理研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010, 1-176]

胞的孕激素受体中获得的, Zhu 等(2003)从云纹犬牙石首鱼卵巢中克隆了该膜受体 cDNA 序列,随后在其他多种鱼类中发现有 mPRs 家族成员的存在(Tokumoto *et al*, 2006; Hanna *et al*, 2006; 史宝, 2010¹⁾、2013; 柳学周等, 2015)。Tokumoto 等(2006)研究证明, 金鱼(*Carassius auratus*)的卵母细胞膜上有 mPR α 蛋白表达。虽然前期实验克隆出牙鲆的 mPR α 基因,但目前还没有对 mPR α 基因在牙鲆组织上的表达定位研究的报道。

本研究使用 qRT-PCR、Western blotting、原位杂交和免疫组化等方法研究牙鲆 mPR α mRNA 和蛋白在不同组织和不同发育时相卵母细胞中的表达特征,探讨 mPR α 在卵母细胞成熟发生过程中的作用。对牙鲆 mPR α 在脑和卵巢中的表达研究,可以进一步了解牙鲆的繁殖机理,为养殖生产提供新的理论参考,从而更有效地调控牙鲆的繁殖以提高它们的繁殖能力,进一步推动鲆类产业发展。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用牙鲆雌鱼采自山东青岛忠海水产有限公司,为野生亲鱼自然产卵后人工育苗得到的健康苗种,经室内人工养成达到性成熟的 F₁ 代亲鱼。牙鲆雌鱼全长为 40–60 cm, 体重为 1428.7–2508.3 g, 其培育条件: 全年开放流水培育, 水温为 8–25℃, 盐度为 27–31, pH 为 7.8–8.4, 溶解氧 5 mg/L 以上。在牙鲆繁殖季节, 挑选腹部膨大、松软的亲鱼, 使用 MS-222 麻醉雌鱼后解剖, 按照牙鲆卵巢发育的组织学特征, 在显微镜下将卵母细胞按时相分类取样, 从发育 V 期卵巢分离到 II、III、IV、V 和 VI 时相卵母细胞, 用液氮将卵母细胞速冻并–80℃ 保存, 用于总 RNA 提取。雌鱼麻醉后解剖、留取各组织样品: 在 4℃ 条件下使用 4% 多聚甲醛(溶于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 PBS 中)固定 20 h, 梯度甲醇(25%、50%、75% 和 100% 甲醇溶于 0.01 mol/L PBS)脱水, 在–20℃ 条件下保存于甲醇中的样品, 一部分用于免疫组化, 一部分样品用于原位杂交; 部分性腺组织固定在 Davidsons's AFA 中, 用于验证性腺发育状况; 使用液氮速冻后保存在–80℃ 的组织样品, 用于总蛋白的提取。

1.2 实验试剂

Hind III 和 *Eco*R I 内切酶, T4 DNA 快速连接酶购自 NEB, Dig RNA Labeling Kit(SP6/T7)碱性磷酸酶标记的地高辛抗体以及 NBT/BCIP 显色试剂盒购

自 Roche 公司。引物的合成由 TaKaRa 生物公司完成; Trans5 α (DH5 α)表达菌感受态细胞、动物组织蛋白提取试剂购自北京全式金公司(TransGen Biotech); HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体购自上海生工公司。*Taq* 聚合酶、SYBR Premix Ex *Taq*、RNAiso Plus、DNA marker 和 RNA 酶抑制剂购自 TaKaRa 公司, 蛋白浓度测定试剂盒购自 Thermo Scientific 公司, 多聚甲醛、MS-222 购自 Sigma 公司, 去离子甲酰胺购自 AMRESCO 公司, 蛋白酶 K 购自默克公司, 山羊血清购自博奥森公司, 蛋白胨和酵母粉购自 OXOID 公司。

1.3 总 RNA 提取、cDNA 的合成和荧光定量 PCR

牙鲆 mPR α mRNA 在第 V 时期的不同发育阶段卵母细胞的表达分析: 每个卵母细胞发育时相设置 4 个重复, 从第 V 时期的牙鲆中分别挑取 II、III、IV、V 和 VI 时相卵母细胞, 提取总 RNA 进行反转录并参照 TaKaRa 公司的 PrimerScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒合成 cDNA 第一链并用于基因表达分析。正反引物分别为 YP-mPR α -F(TCTTGGTGAA GTGGCAGGAGAT)和 YP-mPR α -R(CGCTGAAGGAG AGGTAGGTGAA)。荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)反应体系 20 μ l: 1 μ l cDNA 模版, 0.5 μ l 引物(10 μ mol/L), 10 μ l SYBR Premix Ex*Taq*™ II 和 8 μ l ddH₂O。采用两步法 PCR 扩增程序, 反应条件为 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 5 s, 58.5℃ 30 s 共 40 个循环。使用 β -actin 基因 (β -actinF: 5'-GAAATCGCCGCACTGGTT-3'; β -actinR: 5'-GCCCATACCCACCATCACTC-3')作为内参对照, 用以校正所有样品中 RNA 的量。qRT-PCR 及信息的收集都在 Mastercycler ep *realplex* 实时定量 PCR 仪(Eppendorf 公司)上进行。程序运行完成后进行熔解曲线分析以确定引物及反应是否正常。每个样品设置 3 个平行复孔, 重复 3 次实验, 设阴性对照, 以确认实验结果的可靠性。

1.4 mPR α /pBST-18 质粒的构建

根据牙鲆 mPR α cDNA 序列, 设计引物, 由大连宝生物合成。上游: 5'-AAGCTTAGCCCTGTGGTTTCA CCGCATC-3'; 下游: 5'-GAATTCAACGGCACGTACA CGCTTTCG-3'。预期扩增产物长度为 360 bp。扩增条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 65℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 重复 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。重组质粒构建: 采用凝胶回收试剂盒回收并纯化 PCR 产物。分别用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Eco*R I 对回收的 PCR 产物和载体 pBST-18 进行双酶切, 1% 琼脂糖凝

胶电泳检测后,试剂盒回收。通过 T4 快速连接酶进行连接,将 PCR 产物克隆到 pBST-18 载体中。再将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑取 PCR 检测阳性克隆,扩增培养,小量提取质粒,用 *Hind* III 和 *Eco*R I 进行双酶切鉴定,然后测序验证。

1.5 地高辛标记 *mPR α* 正、反义 RNA 探针的合成和纯化

将扩增后的阳性菌落提取的质粒分别用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切,使其完全线性化,1%琼脂糖电泳检测并回收。回收的酶切片段即为合成正、反义 RNA 探针的模板。按 Roche 公司的 DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) 试剂盒说明书分别用 SP6、T7 转录酶进行体外转录,详细操作参照产品说明书,合成地高辛标记的正、反义 RNA 探针。合成的 RNA 探针用 1%琼脂糖电泳和紫外分光光度计鉴定检测。

1.6 原位杂交分析 *mPR α* mRNA 在成熟雌鱼各组织中的定位

采用 Roche 公司的 DIG Wash and Block Buffer Set、Blocking Reagent 和 NBT/BCIP Stock Solution 试剂盒进行。二甲苯脱蜡处理 3 次(每次 5 min),无水乙醇处理 2 次(每次 10 min),95%、70%、50%乙醇各 5 min 逐级脱水。4% PFA-PBS 固定 10 min。PBS 洗涤 3 次,每次 10 min。0.2 mol/L 的 HCl 处理 10 min。PBST 冲洗 2 次,每次 10 min。10 μ g/ml 蛋白酶 K 消化 10 min。PBST 冲洗 3 次(每次 5 min)。加入含 tRNA 和肝素预杂交液,70 $^{\circ}$ C 预杂交 8 h,再加入反义 RNA 探针 200 ng 的杂交液,70 $^{\circ}$ C 过夜。50%无 tRNA 和肝素的预杂交液和 50% 2 \times SSC、70 $^{\circ}$ C,15 min,0.2 \times SSC、70 $^{\circ}$ C,1 h。1 \times MAB 室温 5 min。含 10%山羊血清的封闭液室温封闭,6 h。1:500 封闭液稀释的抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜。PBST 室温冲洗 6 次(每次 15 min);碱性磷酸缓冲液室温 2 次(每次 10 min)。加 200 μ l BCIP/NBT 底物溶液,置黑暗处显色,观察颜色变化。待显色达到理想着色后,PBST 洗涤 5 次(每次 5 min)终止反应,4% PFA-PBS 固定 10 min,PBST 洗 3 次(每次 5 min);酒精梯度脱水、二甲苯透明,封片,拍照。

1.7 成熟雌鱼各组织中 *mPR α* 蛋白定量表达

取冻存的各组织(约 100 mg),加入 1 ml 动物组织蛋白提取试剂,使用 Pro 精密手持匀浆器充分匀浆,冰浴中静置 30 min,于 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 30 min,取上清液即得到组织蛋白提取液。12% SDS-PAGE 电泳检测提取蛋白的质量,并使用蛋白测定试剂盒测定组织总蛋白浓度。

分析牙鲆 *mPR α* 蛋白序列选择抗原表位,合成相应的免疫多肽;将合成的多肽常规免疫新西兰大白兔,制备抗体。使用多克隆抗体进行 Western blotting 检测。12% SDS-PAGE 蛋白电泳,每孔上样量约 80 μ g,220 V 25 min。缓冲液泡凝胶 15 min,转印按胶的大小剪滤纸和 PVDF 膜,将滤纸在缓冲液中浸泡 15 min。PVDF 膜甲醇中浸泡 1 min,缓冲液中浸泡 15 min 活化,按阳极-滤纸-PVDF 膜-凝胶-滤纸-阴极的顺序放入半干式转膜仪 400 mA 25 min,取出 PVDF 膜,1 \times PBST 洗涤。5%脱脂奶粉溶液封闭(1 \times PBST 稀释)室温 3 h,洗涤,加一抗和 3%BSA(1:2000),摇床,室温 2 h,洗涤。二抗(羊抗兔 IgG 抗体)(1 \times PBST 1:2000 稀释)摇床,室温 2 h,洗涤,DAB 显色拍照,分析灰度。

1.8 *mPR α* 蛋白在成熟雌鱼各组织中的定位表达

将保存在 100%甲醇中的样品取出,使用无水乙醇处理 2 次,每次 10 min;二甲苯透明,石蜡包埋,7 μ m 厚度石蜡切片,37 $^{\circ}$ C 烘干。具体免疫组化切片处理过程和条件如下(阴性对照:1 \times PBS 代替一抗,其余步骤同下):二甲苯脱蜡 2 次,每次 5 min;梯度乙醇复水各 3 min;1 \times PBST 洗涤;3% H₂O₂(溶于甲醇中)室温孵育 15 min 封闭内源酶;洗涤;0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液微波炉加热沸腾后,中低档保持 95 $^{\circ}$ C 20 min,自然冷却至室温修复抗原;洗涤;3% BSA 封闭(溶于 1 \times PBST)摇床上室温振摇 2 h;抗 *mPR α* 抗体稀释(1:1000),溶于 3% BSA 滴加到载玻片上,使其完全覆盖组织切片,湿盒中室温过夜;洗涤;二抗即羊抗兔 IgG 抗体(1:1000 稀释在 1 \times PBST 中)滴加到载玻片上,湿盒中室温 1 h;洗涤;DAB 显色;洗涤;苏木精染液复染 3-5 min;0.1% HCl 分化复蓝,立即自来水冲洗;梯度乙醇脱水;二甲苯透明 2 min;封片;拍照。

1.9 数据统计分析

使用 SPSS 17.0 软件中的单因素方差分析(One-way ANOVA) (Tukey's HSD 检验)、Duncan's 多重比较分析和 AIC.AlphaView 成像分析系统(Cell Biosciences Inc) 分析蛋白灰度。 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 第 V 期卵母细胞不同时相 *mPR α* mRNA 相对表达量比较

将牙鲆成熟期卵巢中卵母细胞分为 5 个时相。如图 1 所示,*mPR α* 基因的表达最高值出现在牙鲆发育 V 时相的卵母细胞($P < 0.05$)。表明 *mPR α* 在卵母细胞的成熟期 V 时相发挥重要的作用,其他时相有表达,但表达量低于 V 时相(图 1)。

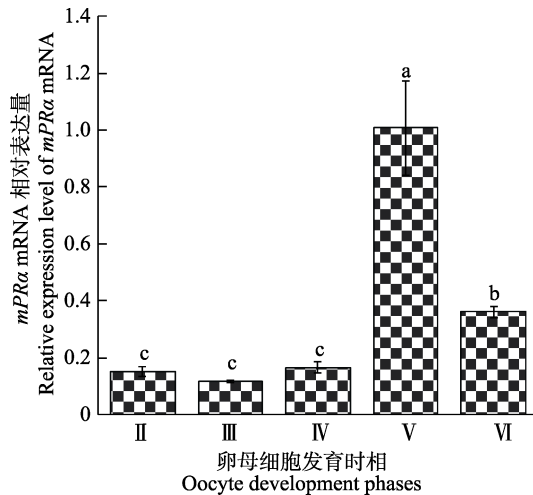


图 1 牙鲆卵母细胞不同时相 *mPR α* mRNA 相对表达
Fig.1 The relative expression of *mPR α* mRNA at different oocyte phases of *P. olivaceus*

不同字母间差异显著 ($P < 0.05$)

Different letters represent significant difference ($P < 0.05$)

2.2 *mPR α* 蛋白和 mRNA 在不同组织中的表达

对牙鲆不同组织中 *mPR α* 总蛋白表达量进行 Western-blotting 检测, 结果见图 2, *mPR α* 蛋白表达

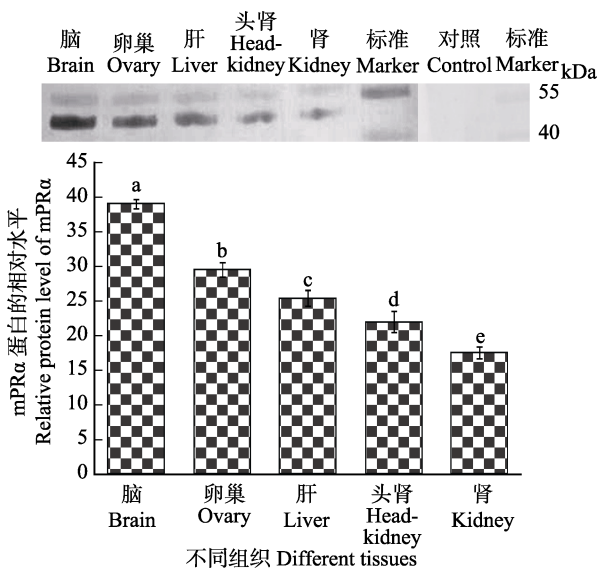


图 2 牙鲆各组织 *mPR α* 蛋白表达量

Fig.2 The expression of *mPR α* protein in each tissue of *P. olivaceus*

量在脑、卵巢中相对较高, 其他组织中也有表达, 但表达量相对较少。

用所标记的正反义探针分别与牙鲆卵巢、肝脏、头肾、肾脏、脑组织中 mRNA 进行原位杂交反应。如图 3 所示, 作为阳性对照的 A、B、C、D、E、F、G 反义探针显示阳性结果, 作为阴性对照的图 3-a、b、c、d、e、f 的正义探针没有杂交显色信号。用多克隆抗体分别与牙鲆卵巢、肝脏、头肾、肾脏、脑组织蛋白进行免疫反应, 结果如图 4 所示, 一抗孵育的 A、B、C、D、E、F, 放大结果 1、2、3、4、5、6 显示免疫显色结果, 用 1×PBS 代替一抗孵育作为阴性对照的图 4-a、b、c、d、e、f 的没有免疫显色信号。

图 3-A 和图 4-A 显示, 在成熟卵巢组织中, *mPR α* mRNA 和蛋白在卵母细胞膜上显著性表达。图 3-B、C、D、E 显示, 在其他组织中有 *mPR α* mRNA 表达, 但定位不明显。图 4-B、D 显示, *mPR α* 蛋白在头肾、脑中有表达。图 3-C 和图 4-C 图显示, 在肝脏, *mPR α* 蛋白主要在胆小管周围显色。图 3-E 和图 4-E 显示, *mPR α* 蛋白主要在肾脏的肾小管部位表达。

3 讨论

3.1 *mPR α* 在卵母细胞成熟过程中的表达分析

在多种硬骨鱼类中发现 mPRs 的存在(Tokumoto *et al*, 2006; Berg *et al*, 2005; Hanna *et al*, 2006)。史宝(2010)¹⁾首先在牙鲆中克隆得到了 *mPR α* 全长序列, 李晓晓(2013)²⁾研究发现, *mPR α* mRNA 在雌性牙鲆卵巢不同的繁殖周期中均有表达, 当卵巢发育至 V 期时, *mPR α* 的表达量达到最大值。本研究通过实时荧光定量技术分析牙鲆卵巢发育至 V 期不同时相卵母细胞的表达, 结果显示, *mPR α* mRNA 表达的最高值出现在第 V 时相卵母细胞中; 处于第 V 时相卵母细胞 *mPR α* mRNA 的高表达量进一步证明, *mPR α* 在介导孕激素促进卵母细胞成熟的生理调节功能上发挥重要的作用。*mPR α* 参与诱导卵母细胞成熟在硬骨鱼类中已有报道(Kazeto *et al*, 2005a、b; Thomas *et al*, 2004; Tokumoto *et al*, 2012), 但本研究首次将 *mPR α* 表达研究范围扩展到牙鲆卵母细胞不同时相中。RNA 原位

1) Shi B. Study on the molecular mechanisms of reproductive endocrinology in *Paralichthys olivaceus* and *Paralichthys lethostigma*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010, 1-176 [史宝. 牙鲆繁殖内分泌分子机理研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010, 1-176]

2) Li XX. Study on the physiological function of membrane progesterin receptor in the reproductive cycle of flatfish. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013, 1-73 [李晓晓. 膜孕激素受体在鲆鲽类繁殖周期中的生理功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 1-73]

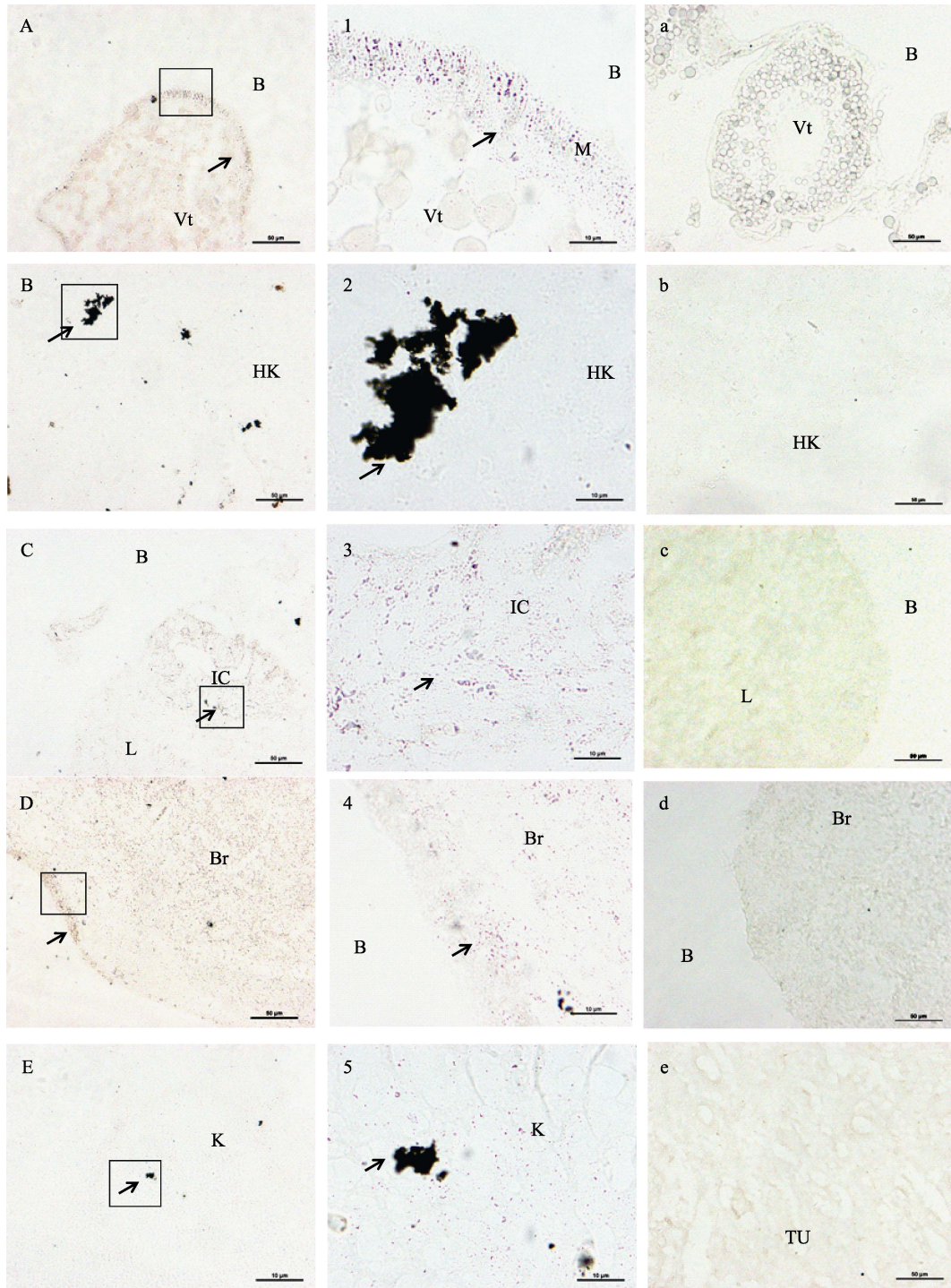


图 3 牙鲆 *mPRa* mRNA 在不同组织中的表达(200 倍)

Fig.3 The expression of *mPRa* mRNA in different tissues of *P. olivaceus* ($\times 200$)

A: 卵巢; B: 头肾; C: 肝脏; D: 脑; E: 肾; 1、2、3、4、5 为放大 1000 倍, 箭头指向为阳性信号位置;
a、b、c、d 和 e: 卵巢、头肾、肝脏、脑和肾的对照组

IC: 胆小管; TU: 肾小管; K: 肾脏细胞; Vt: 卵黄; E: 组织边缘; L: 肝脏细胞; B: 空白区; Br: 脑细胞;
HK: 头肾细胞; M: 卵母细胞膜

A: Ovary; B: Head-kidney; C: Liver; D: Brain; E: Kidney; Note: 1, 2, 3, 4, and 5: $\times 1000$ times; the arrows indicated the positive reaction; a, b, c, d, and e: Control group of ovary, head-kidney, liver, brain, and kidney

IC: Ile canalculus; TU: Tubules; K: Kidney; Vt: Vitellogenesis; E: Edge of tissues; L: Liver; B: Blank; Br: Brain cell; HK: Head-kidney cell; M: Oocyte membrane

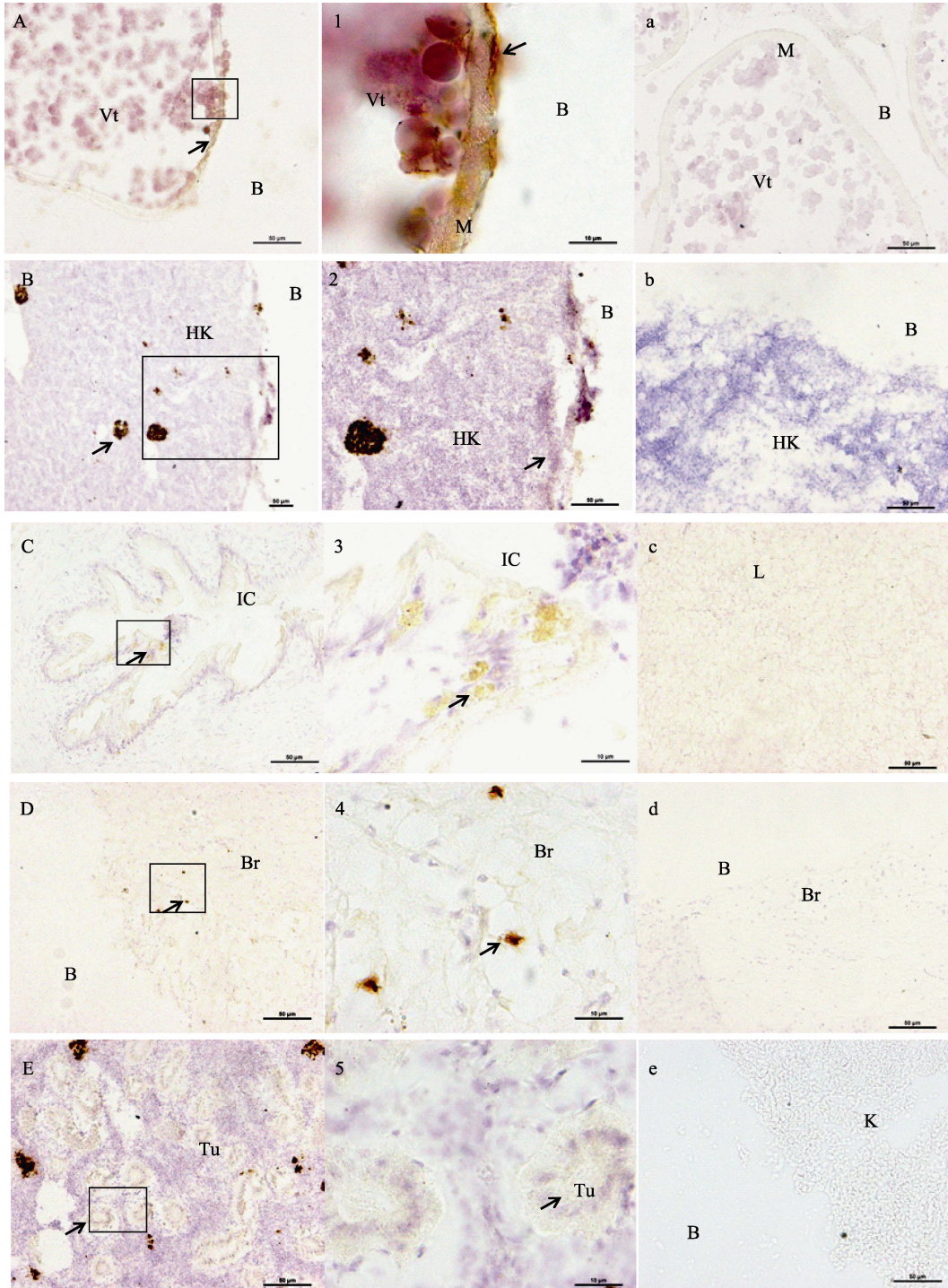


图 4 牙鲈 mPR α 蛋白在不同组织中的分布(200 倍)

Fig.4 The distribution of mPR α protein in different tissues of *P. olivaceus* ($\times 200$)

A: 卵巢; B: 头肾(100 倍); C: 肝脏; D: 脑; E: 肾; 注: 1、3、4、5 图为放大 1000 倍; 2 为放大 200 倍, 箭头指向为阳性信号位置; a、b、c、d 和 e: 卵巢、头肾、肝脏、脑和肾的对照组
 IC: 胆小管; Tu: 肾小管; K: 肾脏细胞; Vt: 卵黄; E: 组织边缘; L: 肝脏细胞; B: 空白区; Br: 脑细胞;
 HK: 头肾细胞; M: 卵母细胞膜
 A: Ovary; B: Head-kidney ($\times 100$); C: Liver; D: Brain; E: Kidney; Note: 1, 3, 4, and 5: $\times 1000$ times; 2: $\times 200$; the arrows indicated the positive reaction; a, b, c, d, and e: Control group of ovary, head-kidney, liver, brain, and kidney
 IC: Ile canaliculus; Tu: Tubules; K: Kidney; Vt: Vitellogenin oocytes; E: Edge of tissues; L: Liver; B: Blank; Br: Brain cell;
 HK: Head-kidney cell; M: Oocyte membrane

杂交、免疫组化结果显示, *mPR α* mRNA 和蛋白都在牙鲆卵巢成熟期的卵母细胞膜上显著表达, 进一步证明其作为膜上受体参与孕激素的调控作用。金鱼中也发现在卵母细胞膜上有 *mPR α* 蛋白表达(Tokumoto *et al.*, 2012), 与本研究的結果相似。

3.2 *mPR α* 表达与定位分析

本研究用 Western blotting 检测 *mPR α* 蛋白在牙鲆不同组织的表达, 结果显示, *mPR α* 蛋白在性腺、脑中表达量较高, 在肝、肾、头肾组织中表达较低。RNA 原位杂交、免疫组化结果显示, *mPR α* mRNA 和蛋白都在卵巢成熟期的卵母细胞膜上显著表达, 李晓晓(2013)¹⁾发现牙鲆 *mPR α* mRNA 较丰富地表达于脑、垂体和卵巢组织, 而在头肾、肾等组织中表达相对微弱。本研究发现, 牙鲆 *mPR α* 蛋白在不同组织中的表达量分析结果和 *mPR α* mRNA 表达量变化的结果大体一致, 为 *mPR α* mRNA 在组织中的表达提供了佐证。Zhu 等(2003)采用 Northern 杂交方法在云纹犬牙石首鱼的繁殖和神经内分泌组织检测到 *mPR α* 的表达, 在成熟的云纹犬牙石首鱼的卵母细胞检测到 *mPR α* 蛋白阳性信号, 与本研究的結果相似。Kazeto 等(2005a、b)在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)检测到 *mPR α* mRNA 表达, 主要分布在脑、垂体和性腺中。

牙鲆 *mPR α* 作为孕激素受体的一种, 其 mRNA 和蛋白在脑中表达丰富, 表明了 *mPR α* 参与介导牙鲆孕激素调控其神经内分泌系统。本研究采用 RNA 原位杂交、免疫组化以及 Western blotting 方法在性成熟雌性牙鲆的免疫相关组织(肾脏和头肾)检测到 *mPR α* mRNA 和蛋白表达, 并在肾脏的肾小管附近表达丰富; 另外, 在肝脏组织主要在胆小管中表达。因此, 在牙鲆中, 孕激素也可能通过 *mPR α* 在系统交互连接部位和组织行使其调控免疫系统的功能, 而且 *mPR α* 参与介导孕激素调控雌性牙鲆机体的神经-内分泌-免疫网络系统(内分泌调控为主), 但具体机制尚不明了。

mPR α 属于膜孕激素受体家族的一员, 相近的亚型还有 *mPR β* 和 *mPR γ* , 关于这 3 个亚型的研究报道相对比孕酮受体膜组分(PGRMC)多; 在国内仅见本课题组对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)(史宝等, 2013)和条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)(史宝等, 2015)开展的膜孕激素受体 *mPR α* 通过下丘脑-垂体-性腺轴调控繁殖的研究。本研究探明了卵母细胞成熟过程

mPR α mRNA 的时序表达特征、*mPR α* 基因和蛋白在繁殖相关组织的定位分析, 但关于 *mPR α* 参与卵母细胞成熟、抑止细胞凋亡和调控激素分泌的机制、自身启动子和外源激素影响下 *mPR α* 基因转录调控机制以及 *mPR α* 真核表达产物及其促进卵母细胞成熟作用的研究尚不明了, 如何解析这些问题需今后更深入的探索。本研究为进一步研究膜孕激素受体的功能特征以及繁殖过程的生理作用奠定重要的理论基础。

参 考 文 献

- Berg AH, Thomas P, Olsson P. Biochemical characterization of the Arctic char (*Salvelinus alpinus*) ovarian progesterone membrane receptor. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2005, 3(1): 1-9
- Hanna R, Pang Y, Thomas P, *et al.* Cell-surface expression, progesterone binding, and rapid nongenomic signaling of zebrafish membrane progesterone receptors α and β in transfected cells. *Journal of Endocrinology*, 2006, 190(2): 247-260
- Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Thomas P, *et al.* Molecular characterization of three forms of putative membrane-bound progesterone receptors and their tissue-distribution in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2005a, 34(3): 781-791
- Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Trant JM. Membrane-bound progesterone receptors in channel catfish and zebrafish ovary: Changes in gene expression associated with the reproductive cycles and hormonal reagents. *General and Comparative Endocrinology*, 2005b, 142(1): 204-211
- Liu XZ, Shi B, Li XX, *et al.* Molecular characterization of the novel membrane progesterone receptor gene and its role during ovarian development in the half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 608-619 [柳学周, 史宝, 李晓晓, 等. 半滑舌鳎新型膜孕激素受体基因分子特征及其在卵巢发育过程的作用. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 608-619]
- Shi B, Li XX, Liu XZ, *et al.* Molecular cloning and tissue expression analysis of membrane progesterone receptor alpha gene(*mPR α*) from half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 61-67 [史宝, 李晓晓, 柳学周, 等. 半滑舌鳎膜孕激素受体基因克隆与组织表达分析. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 61-67]

1) Li XX. Study on the physiological function of membrane progesterone receptor in the reproductive cycle of flatfish. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013, 1-73 [李晓晓. 膜孕激素受体在鲆鲽类繁殖周期中的生理功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 1-73]

- Shi B, Liu XZ, Chen SY, *et al.* Cloning and expression of membrane progesterin receptor (mPR α) in rock bream *oplegnathus fasciatus*. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2015, 46(3): 642–650 [史宝, 柳学周, 陈圣毅, 等. 条石鲷 mPR α 基因的 cDNA 克隆和表达模式分析. *海洋与湖沼*, 2015, 46(3): 642–650]
- Thomas P, Pang Y, Zhu Y, *et al.* Multiple rapid progesterin actions and progesterin membrane receptor subtypes in fish. *Steroids*, 2004, 69(8–9): 567–573
- Tokumoto M, Nagahama Y, Thomas P, *et al.* Cloning and identification of a membrane progesterin receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 145(1): 101–108
- Tokumoto T. Identification of membrane progesterin receptors (mPR) in goldfish oocytes as a key mediator of steroid non-genomic action. *Steroids*, 2012, 77(10): 1013–1016
- Zhu Y, Rice CD, Pang Y, *et al.* Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is all intermediary in meiotic maturation of fish oocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2003, 100(5): 2231–2236

(编辑 冯小花)

The Expression Patterns of Membrane Progesterin Receptor α (mPR α) During Sexual Maturation in Female Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

LI Xiaoni^{1,3}, LIU Xuezhou^{1,2,3}①, SHI Bao^{1,2}, XU Yongjiang^{1,2}, LI Xiaoxiao^{1,2}, ZHANG Jinyong^{1,3}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Dalian Ocean University, Dalian 110623)

Abstract In this study we collected the mature tissue samples of female Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* and investigated the expression patterns of mRNA and proteins of membrane progesterin receptor alpha (mPR α) in different tissues and different oocyte phases, using techniques such as quantitative real-time PCR, *in situ* hybridization, immunohistochemistry, and western blotting. It was shown that the highest level of mPR α mRNA appeared in the V phase of oocyte maturation. This further implied that mPR α was involved in the regulation of oocyte maturation through guiding progesterone. The western blotting analysis confirmed the expression of mPR α proteins in the ovary, brain, head kidney, kidney, and liver. Moreover, the expression of mPR α mRNA and proteins was higher in the brain and ovary than in other tissues. These results indicated that mPR α could play certain roles in different tissues, especially the endocrine-related ones. Results of *in situ* hybridization and immunohistochemistry clearly showed that the mPR α mRNA and proteins were expressed on the oocyte membrane and the bureaucratic structures of other organs. Our study enriched the knowledge about mechanisms of membrane receptor signal transduction.

Key words mPR α ; *Paralichthys olivaceus*; *in situ* hybridization; Immunohistochemistry; Western blotting; Expression pattern

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn