

膜孕激素受体(mPR α)在半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)卵母细胞成熟过程中的表达特征*

李晓妮^{1,3} 柳学周^{1,2,3} 史宝^{1,2} 徐永江^{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 通过实时荧光定量 PCR 方法(qRT-PCR)检测半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)雌性性成熟不同时期、不同时相卵母细胞中膜孕激素受体(mPR α)的表达,通过 qRT-PCR 和 Western blotting 方法检测促性腺激素(HCG)对成熟期半滑舌鲷卵母细胞 mPR α 表达的影响,同时,采用原位杂交、免疫组化和 Western blotting 方法研究雌性性成熟半滑舌鲷 mPR α mRNA 和蛋白在各组织中的表达。对半滑舌鲷性成熟不同时期、不同时相卵母细胞中 mPR α mRNA 的定量研究结果显示,在成熟时期半滑舌鲷 V 时相卵母细胞的 mPR α mRNA 表达量最高。HCG 对成熟期半滑舌鲷卵母细胞 mPR α 表达的影响研究结果显示,20 IU/ml HCG 比 10 IU/ml HCG 对成熟时期半滑舌鲷卵母细胞 mPR α mRNA 和蛋白表达的促进作用更明显,进一步证明 mPR α 介导孕激素参与了卵母细胞成熟的调控。对 mPR α 组织表达的定量和定位研究中,Western blotting 结果显示,在半滑舌鲷的卵巢、垂体、脑、头肾、肾、肝脏组织中均有 mPR α 蛋白表达,且在脑、垂体和卵巢中表达量较高,表明 mPR α 在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、垂体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卵母细胞膜上,且在其他组织的外周和管腔结构表达。本研究为进一步研究 mPR α 在膜上的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;半滑舌鲷;原位杂交;免疫组化;Western blotting;实时荧光定量 PCR
中图分类号 S961 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0025-09

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)是我国重要的海水养殖经济鱼类(柳学周等, 2005),其养殖产业是我国北方海水养殖业的重要组成部分,在一定程度上代表了我国水产养殖业,尤其是海水养殖业的发展方向(杨正勇等, 2009)。近年来,半滑舌鲷生殖调控及规模化人工繁育技术的研究获得重大突破(柳学周等, 2006),但在生产实践中,时常出现亲鱼产卵质量差等现象,影响了苗种生产(史宝等, 2013)。因此,研

究其生殖内分泌调控等方面的机理显得尤为重要。

膜孕激素受体(mPR)介导孕激素在细胞膜上发挥生理学功能,如参与鱼类卵母细胞的成熟(Hanna *et al*, 2009; Mourot *et al*, 2006; Tokumoto *et al*, 2006; Tubbs *et al*, 2010)。在鱼类生殖相关组织如卵巢和脑等检测到 mPRs 蛋白的表达,表明它们在卵巢和脑中介导孕激素行使不同的作用(Hanna *et al*, 2009)。mPR α 作为 mPRs 家族的重要受体基因,在其中扮演着重要的角

*国家自然科学基金项目(31201982)、国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)和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: 2015-12-14, 收修改稿日期: 2016-01-25

色, 研究其表达对了解整个 mPR 家族的功能具有重要意义。目前, mPR α 在人类(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)等动物研究中有很多新进展(Frye *et al*, 2014; Thomas *et al*, 2014; Lu *et al*, 2015), 近几年在斑马鱼(*Danio rerio*) (Thomas, 2012)、金鱼(*Carassius auratus*) (Kazeto *et al*, 2005a、b; Oshima *et al*, 2014)、漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*) (Tan *et al*, 2014a)和大西洋绒须石首鱼(*Micropogonias undulatus*) (Tan *et al*, 2014b)几种硬骨鱼类中有研究。但在重要海水经济鱼类半滑舌鲷中的研究鲜有报道, 史宝等(2013)研究了 mPR α 基因在性成熟半滑舌鲷各组织中的表达分布, 但有关 mPR α 的空间定位表达及生理功能研究仍相对较少, 相关研究工作亟待开展。

本研究通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)、原位杂交、Western blotting 和免疫组化等方法从基因和蛋白水平对 mPR α 在半滑舌鲷不同发育阶段卵母细胞和组织中的表达进行了定量和定位研究, 为 mPR α 在半滑舌鲷卵母细胞成熟过程中的生理功能提供重要参考资料, 并为鱼类繁殖内分泌调控研究提供科学依据, 同时为多产优产的目标提供解决思路。

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物

实验用半滑舌鲷取自山东青岛忠海水产有限公司。雌性半滑舌鲷亲鱼全长为 53–66 cm, 体重为 1266.3–2271.0 g。实验所用的亲鱼为人工培育养殖达到性成熟的 3 龄全人工亲鱼。不同繁殖期在相同亲鱼培育池中随机选取 4 条半滑舌鲷雌鱼, 分别对不同繁殖期鱼的卵巢取样, 连续采集 1 年。解剖前先用 MS-222(Sigma 公司)麻醉亲鱼, 部分卵巢组织取出后放于 Davidson's AFA 中固定, 显微镜下按不同发育时相直径将卵巢组织的卵母细胞分类(柳学周等, 2015), 使用液氮速冻后保存在–80℃, 一部分样品用于提取 RNA, 另一部分样品用于提取蛋白。在半滑舌鲷繁殖季节, 挑选腹部有明显膨大隆起且柔软的雌鱼, 取各组织样, 将其分为 3 部分, 在 4℃条件下使用 4%多聚甲醛固定 20 h, 梯度甲醇脱水, 在–20℃条件下保存于甲醇中, 一部分用于免疫组化, 一部分样品用于原位杂交; 使用液氮速冻后保存在–80℃的样品, 用于总 RNA 和总蛋白的提取。在显微镜下按不同发育时相将卵巢组织的卵母细胞分类, 一部分样品用于促性腺激素(HCG)处理并培养, 另一部分不处理作为对照, 处理完的卵母细胞放于–80℃保存, 用于之后的

总 RNA 和总蛋白的提取。

1.2 总 RNA 提取、cDNA 的合成和 qRT-PCR

半滑舌鲷不同发育阶段卵母细胞取自不同性腺发育期, 卵巢分期参考柳学周等(2009)。每个卵母细胞发育时相设 4 个重复, 从不同发育时期的半滑舌鲷中分别挑取 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 生物公司的 PrimerScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒合成 cDNA 第一链, 用于基因表达分析。ST-mPR α F 引物序列: 5'-CTCCATCTATCGGCTTCA AACAA-3'; ST-mPR α R: 5'-ACCAATCTGCTCCATCA CCAC-3', 引物由 TaKaRa 生物公司合成。qRT-PCR 反应体系为 20 μ l: 1 μ l cDNA 模板, 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、60℃ 20 s, 共 40 个循环。使用 18S rRNA 基因作为内参对照, 用以校正所有样品中 RNA 的量。qRT-PCR 反应及信息收集均在 Mastercycler ep realplex 实时荧光定量 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, 重复 3 次实验, 同时设阴性对照, 以确认实验结果的可靠性。

1.3 mPR α 原位杂交质粒构建、探针合成与纯化

根据半滑舌鲷 mPR α cDNA 序列设计和合成引物。上游: 5'-AAGCTTCAGCCTTCACCTACCTCTCC T-3'; 下游: 5'-GAATTCGCAGGCAGTGAAGATGAA CAG-3'。PCR 预期扩增产物为 650 bp, 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。分别用限制性内切酶 Hind III 和 EcoR I (均购自 NEB 公司)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。然后通过 T4 快速连接酶(购自 NEB 公司)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(全式金), 挑取 PCR 检测阳性克隆, 扩增培养, 少量提取质粒, 用 Hind III 和 EcoR I 进行双酶切鉴定, 然后测序验证。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 EcoR 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, 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。

1.4 mPRA mRNA 在成熟雌鱼组织中的定位

采用 Roche 公司的 DIG Wash and Block Buffer Set、Blocking Reagent 和 NBT/BCIP Stock Solution 试剂盒进行。详细操作参照产品说明书。

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%和 50%乙醇逐级脱水, 各处理 5 min。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 μg/ml 蛋白酶 K(默克公司)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°C 预杂交 8 h, 再加入反义 RNA 探针 200 ng 的杂交液, 70°C 过夜。50% 无 tRNA 和肝素的预杂交液和 50% 2×SSC, 70°C, 15 min, 0.2×SSC, 70°C, 1 h。1×MAB 室温 5 min。含 10% 山羊血清(博奥森公司)的封闭液室温封闭, 6 h。1:500 封闭液稀释的抗体, 4°C 过夜。PBST 室温冲洗 6 次, 每次 15 min; 碱性磷酸缓冲液室温冲洗 2 次, 每次 10 min。加 200 μl 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。

1.5 成熟雌鱼组织中 mPRA 蛋白定量分析

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°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(Thermo Scientific 公司)测定组织总蛋白浓度。分析半滑舌鲷 mPRA 蛋白序列选择抗原表位, 并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。使用此多克隆抗体进行 Western blotting, 检测蛋白的表达水平。

12% SDS-PAGE 蛋白电泳, 每孔上样量约 80 μg, 220 V 25 min。转膜: 缓冲液泡凝胶 15 min, 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 PVDF 膜; 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。洗涤取出 PVDF 膜, 1×PBST 洗涤; 5% 脱脂奶粉溶液封闭(1×PBST 稀释)室温 3 h; 洗涤; 加溶解一抗与 3% BSA(1:2000)摇床, 室温 2 h; 洗涤; 二抗(羊抗兔 IgG 抗体)(1×PBST 1:2000 稀释)[生工生物工程(上海)股份有限公司]摇床, 室温 2 h; 洗涤; DAB 显色拍照, 分析灰度。

1.6 mPRA 蛋白在成熟雌鱼组织中的表达定位

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 μm 厚度石蜡切片, 37°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×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×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°C 20 min, 自然冷却至室温修复抗原; 洗涤; 3% BSA 封闭(溶于 1×PBST), 摇床上室温振荡 2 h。抗 mPRA 抗体(1:1000)稀释, 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×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 分化复蓝后, 立即自来水冲洗; 梯度乙醇脱水; 二甲苯透明 2 min; 封片; 拍照。

1.7 HCG 调控卵母细胞 mPRA mRNA 和蛋白的表达

从半滑舌鲷不同发育阶段的卵巢分离出不同发育时相、未受损的卵母细胞。24 孔细胞培养板上每个孔放入 pH 为 7.6 的 2 ml 培养液(SIGMA, 美国), 培养液添加 HCG 溶液(SIGMA, 美国), 使其终浓度为 10 IU/ml 或 20 IU/ml, 同时, 每个激素添加实验组相应设置 1 个空白对照组。卵母细胞经 22°C、6 h 培养后, 使用移液器将培养液移出, 收集卵母细胞, 迅速放入液氮中冻存, 用于 mRNA 和蛋白表达分析; 每个样品设置 3 个平行, 重复 3 次实验。

1.8 统计分析

基因表达实验所得数据用相对定量的 2^{-ΔΔCt} 方法(Livak *et al*, 2001)计算后, 使用 SPSS 17.0 软件的单因素方差分析(One-way ANOVA)(Tukey's HSD 检验)进行数据处理。 $P < 0.05$ 为差异显著。相对表达量数据均表示为平均数±标准误(Mean±SE)。蛋白表达水平检测采用 AIC.AlphaView 成像分析系统(Cell Biosciences Inc)分析灰度值。

2 结果

2.1 半滑舌鲷不同发育期的卵母细胞不同时相 mPRA mRNA 相对表达量比较

在性腺发育 II 期, 处于 II 时相的卵母细胞中 mPRA mRNA 的表达量最高; 在性腺发育 III、IV 期,

mPRA mRNA 表达量最高值分别出现在 III、IV 时相的卵母细胞中；性腺发育 V 期鱼的卵母细胞中，*mPRA* mRNA 表达量最高值出现在 V 时相卵母细胞 ($P < 0.05$)。卵母细胞 *mPRA* mRNA 表达的最高值出现在性腺发育 V 期 ($P < 0.05$)。*mPRA* mRNA 在性成熟半滑舌鲷的 V 时相卵母细胞的作用效果最强(图 1)。

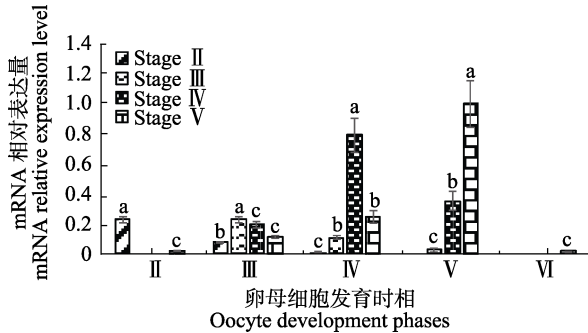


图 1 不同发育时期半滑舌鲷卵母细胞不同时期 *mPRA* mRNA 的相对表达

Fig.1 The relative expression of *mPRA* mRNA at different oocyte phases in different development stage of *C. semilaevis*

不同字母间差异显著 ($P < 0.05$)，下同

Different letters represent significant difference ($P < 0.05$), the same as below

2.2 不同浓度 HCG 调控不同发育时期卵母细胞 *mPRA* mRNA 和蛋白表达

利用 qRT-PCR、Western blotting 技术，检测不同浓度 HCG 处理下半滑舌鲷卵母细胞 *mPRA* mRNA 和蛋白表达情况。结果显示，用 20 IU/ml 和 10 IU/ml HCG 处理的不同时期卵母细胞中 *mPRA* mRNA(图 2)和蛋白(图 3)的表达量都有所提高。20 IU/ml HCG 培养的细胞中 *mPRA* mRNA 和蛋白表达量远高于 10 IU/ml HCG 培养的卵母细胞中 *mPRA* mRNA 和蛋白的表达量。蛋白表达结果显示，20 IU/ml HCG 对成熟时期半滑舌鲷 V 时相卵母细胞调控作用最明显。

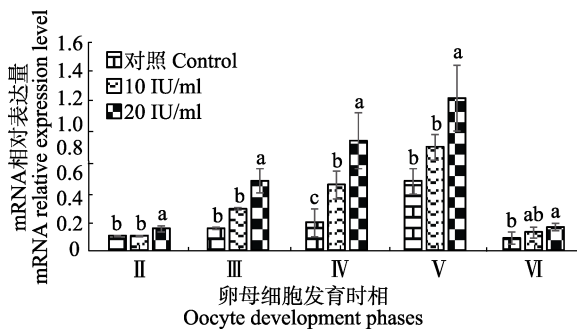


图 2 不同浓度 HCG 调控半滑舌鲷不同发育阶段卵母细胞 *mPRA* mRNA 的表达

Fig.2 Effects of HCG at different concentrations on *mPRA* mRNA expression in different oocyte phases of *C. semilaevis*

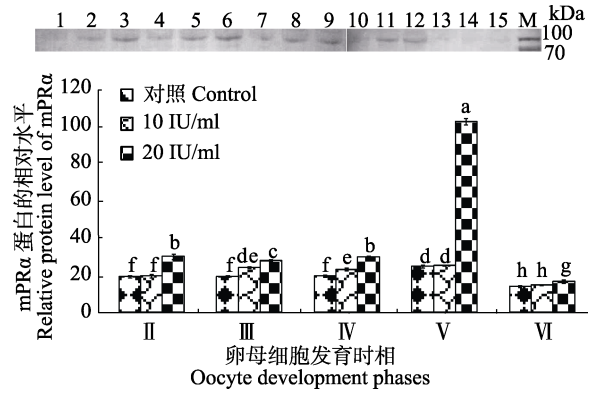


图 3 不同浓度 HCG 对不同时期卵母细胞 *mPRA* 蛋白表达量的影响

Fig.3 Effects of HCG at different concentrations on *mPRA* protein expression in different oocyte phases of *C. semilaevis*

1: 对照组, II 期卵母细胞; 2: 10 IU/ml HCG, II 期卵母细胞; 3: 20 IU/ml HCG, II 期卵母细胞; 4: 对照组, III 期卵母细胞; 5: 10 IU/ml HCG, III 期卵母细胞; 6: 20 IU/ml HCG, III 期卵母细胞; 7: 对照组, IV 期卵母细胞; 8: 10 IU/ml HCG, IV 期卵母细胞; 9: 20 IU/ml HCG, IV 期卵母细胞; 10: 对照组, V 期卵母细胞; 11: 10 IU/ml HCG, V 期卵母细胞; 12: 20 IU/ml HCG, V 期卵母细胞; 13: 对照组, VI 期; 14: 10 IU/ml HCG, VI 期卵母细胞; 15: 20 IU/ml HCG, VI 期卵母细胞; M: 分子量标准

1: Control group, stage II oocytes; 2: 10 IU/ml HCG, stage II oocytes; 3: 20 IU/ml HCG, stage II oocytes; 4: Control group, stage III oocytes; 5: 10 IU/ml HCG, stage III oocytes; 6: 20 IU/ml HCG, stage III oocytes; 7: Control group, stage IV oocytes; 8: 10 IU/ml HCG, stage IV oocytes; 9: 20 IU/ml HCG, stage IV oocytes; 10: Control group, stage V oocytes; 11: 10 IU/ml HCG, stage V oocytes; 12: 20 IU/ml HCG, stage V oocytes; 13: Control group, stage VI oocytes; 14: 10 IU/ml HCG, stage VI oocytes; 15: 20 IU/ml HCG, stage VI oocytes; M: Marker

2.3 *mPRA* mRNA 和蛋白在不同组织中的表达

对不同组织中 *mPRA* 总蛋白表达量进行 Western blotting 检测，结果见图 4，*mPRA* 蛋白表达量在脑、卵巢中相对较高，其他组织中也有表达，表达量相对较少(图 4)。

用所标记的正反义探针分别与半滑舌鲷卵巢、肝脏、头肾、肾脏、脑等组织中 mRNA 进行原位杂交反应，如图 5 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 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半滑舌鲷卵巢、肝脏、头肾、肾脏、脑、垂体组织蛋白进行免疫反应，如图 6 所示，一抗孵育的 A、B、C、D、E、F 显示免疫显色结果，用 1×PBS

代替一抗孵育作为阴性对照的 a、b、c、d、e、f 没有免疫显色信号。

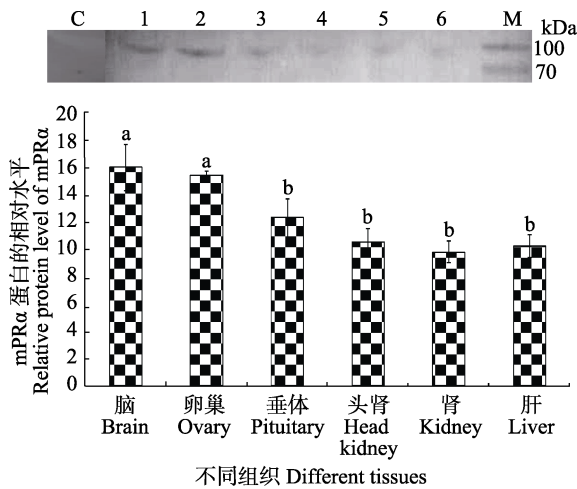


图 4 各组织 mPR α 蛋白表达量

Fig.4 Expression level of mPR α protein in different tissues

1: 脑; 2: 卵巢; 3: 垂体; 4: 头肾; 5: 肾; 6: 肝;

M: 分子量标准; C: 对照

1: Brain; 2: Ovary; 3: Pituitary; 4: Head-kidney; 5: Kidney;
6: Liver; M: Marker; C: Control

图 5-A 和图 6-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 5-B、图 6-B 和图 6-D 显示,相比内部头、肾、脑的表达部位,mPR α mRNA 和蛋白在组织外周的显色表达更明显。图 5-C 和图 6-C 显示,mPR α mRNA 和蛋白主要在肝脏的胆总管或肝静脉周围显色。图 5-E 和图 6-E 显示,mPR α mRNA 和蛋白主要在肾脏的外周部位和肾小管表达,放大 1000 倍可以很明显地看出其在外周部位以及肾小管的管腔内外的表达。图 5-F、图 5-G 和图 6-F 显示,mPR α mRNA 和蛋白主要在垂体外周组织表达。

3 讨论

3.1 mPR α 在卵母细胞成熟过程中的表达及激素调控后的表达分析

孕激素作为一种甾体激素,参与调控生物体内的多种生理过程,在动物生殖活动中起着非常重要的作用(Arck *et al*, 2007)。当孕激素与其受体结合后,激活成熟促进因子,卵母细胞完成减数分裂成熟(Masui *et al*, 1971; Nagahama, 1987)。Pace 等(2005)研究表明,孕激素可通过 mPRs 诱导卵母细胞成熟。Tokumoto

等(2006)检测到 mPR α mRNA 在成熟金鱼卵母细胞各个发育阶段均表达。本研究分析 mPR α 作用精确到半滑舌鲷卵巢不同发育时期的不同时相卵母细胞。通过实时荧光定量技术分析,显示在半滑舌鲷不同发育时期的性成熟卵巢的卵母细胞也都有 mPR α mRNA 的表达,表明 mPR α 在不同时相卵母细胞都发挥着一定的生理作用;并且卵母细胞 mPR α mRNA 表达的最高值出现在 V 期卵巢的第 V 时相卵母细胞中。李晓晓(2013)¹⁾研究发现,在半滑舌鲷性成熟繁殖周期,卵巢 mPR α mRNA 表达量最大值出现在 V 期卵巢,本研究从细胞水平进一步验证了 V 期半滑舌鲷第 V 时相 mPR α mRNA 表达量最高。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,且 Western blotting 结果显示,其蛋白表达量丰富,此阶段 mPR α mRNA 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功能上发挥重要的作用。相关报道发现与本研究相似的结果:斑马鱼、金鱼和斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)中,mPR α 均参与诱导卵母细胞成熟(Kazeto *et al*, 2005a、b; Tokumoto *et al*, 2012 a、b)。

鱼类的卵母细胞生长完成后,促黄体激素刺激卵巢滤泡产生成熟诱导类固醇激素,然后成熟诱导类固醇激素通过 mPR α 诱导卵母细胞成熟(Nagahama *et al*, 2008)。本研究采用促性腺激素诱导半滑舌鲷卵母细胞成熟后,发现不同时相卵母细胞中 mPR α mRNA 和蛋白的表达都明显上调。在 HCG 激素调控作用下,mPR α 的正向应答效应进一步证明 mPR α 介导孕激素参与了卵母细胞成熟调控过程。20 IU/ml HCG 对 mPR α mRNA 和蛋白表达的调控作用比 10 IU/ml HCG 作用更明显,表明 mPR α mRNA 和蛋白表达对 HCG 调控作用存在剂量依存关系。赵维信等(1986)也发现了类似结果,大西洋鲑(*Salmo salar*)的卵母细胞在促性腺激素刺激下,可连续地释放孕激素(17 α , 20 β -DHP),此时卵母细胞的胚泡破裂达到最后成熟,同时,该研究也说明孕激素是一种高效催熟剂。

3.2 mPR α 组织表达与定位分析

史宝等(2013)研究发现,mPR α mRNA 较丰富地表达于半滑舌鲷卵巢、垂体、脑、头肾、肾组织,而在肝组织中表达较弱。本研究用 Western blotting 方法检测半滑舌鲷 mPR α 蛋白的表达,结果显示,mPR α 蛋白在卵巢、脑、垂体中表达量较高,在肝、肾、头肾组织中也有表达,与 mPR α mRNA 结果基本一致。

1) Li XX. Study on the physiological function of membrane progestin receptor in the reproductive cycle of flatfish. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013 [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]

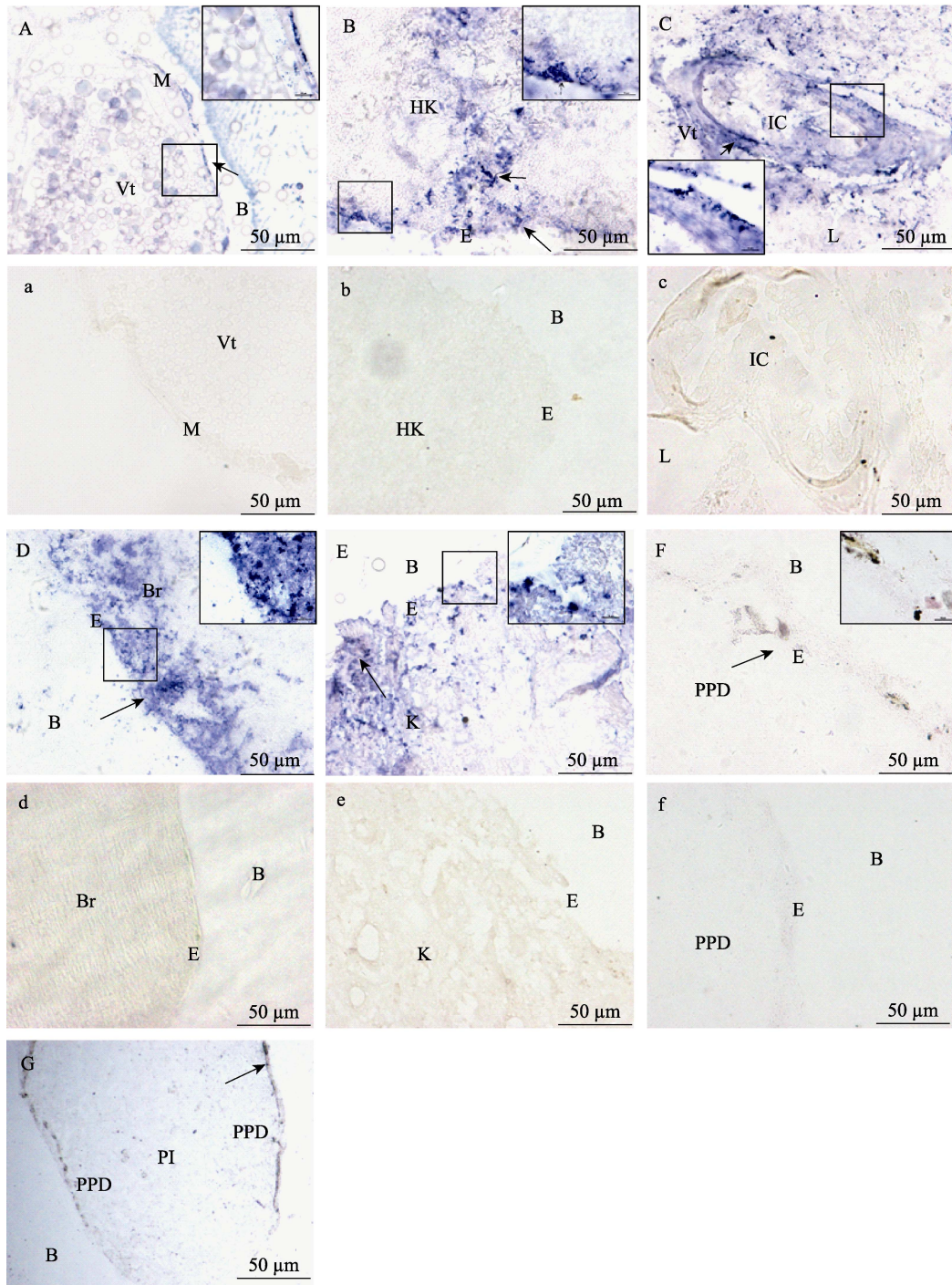


图 5 半滑舌鳎 *mPRA* mRNA 在不同组织中的表达(200 倍)

Fig.5 The expression of *mPRA* mRNA in different tissues of *C. semilaevis* ($\times 200$)

A: 卵巢; B: 头肾; C: 肝脏; D: 脑; E: 肾; F: 垂体; G: 垂体(100 倍); 角图为相应组织放大 1000 倍, 箭头指向为阳性信号位置; a、b、c、d、e 和 f: 卵巢、头肾、肝脏、脑、肾和垂体的对照组
 IC: 胆小管; 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;
 P: 垂体细胞; PPD: 外周部位; PI: 中间部

A: Ovary; B: Head-kidney; C: Liver; D: Brain; E: Kidney; F: Pituitary; G: Pituitary ($\times 100$), the arrows indicated the positive reaction; the corner of pictures were $\times 1000$;

a, b, c, d, e, and f: Control group of ovary, head-kidney, liver, brain, kidney, and pituitary
 IC: Ile canaliculus; K: Kidney; Vt: Vitelogenic oocytes; E: Edge of tissues; L: Liver; B: Blank; Br: Brain cell;
 HK: Head-kidney cell; M: Oocyte membrane; PPD: Proximal part distalis; PI: Pars intermedia

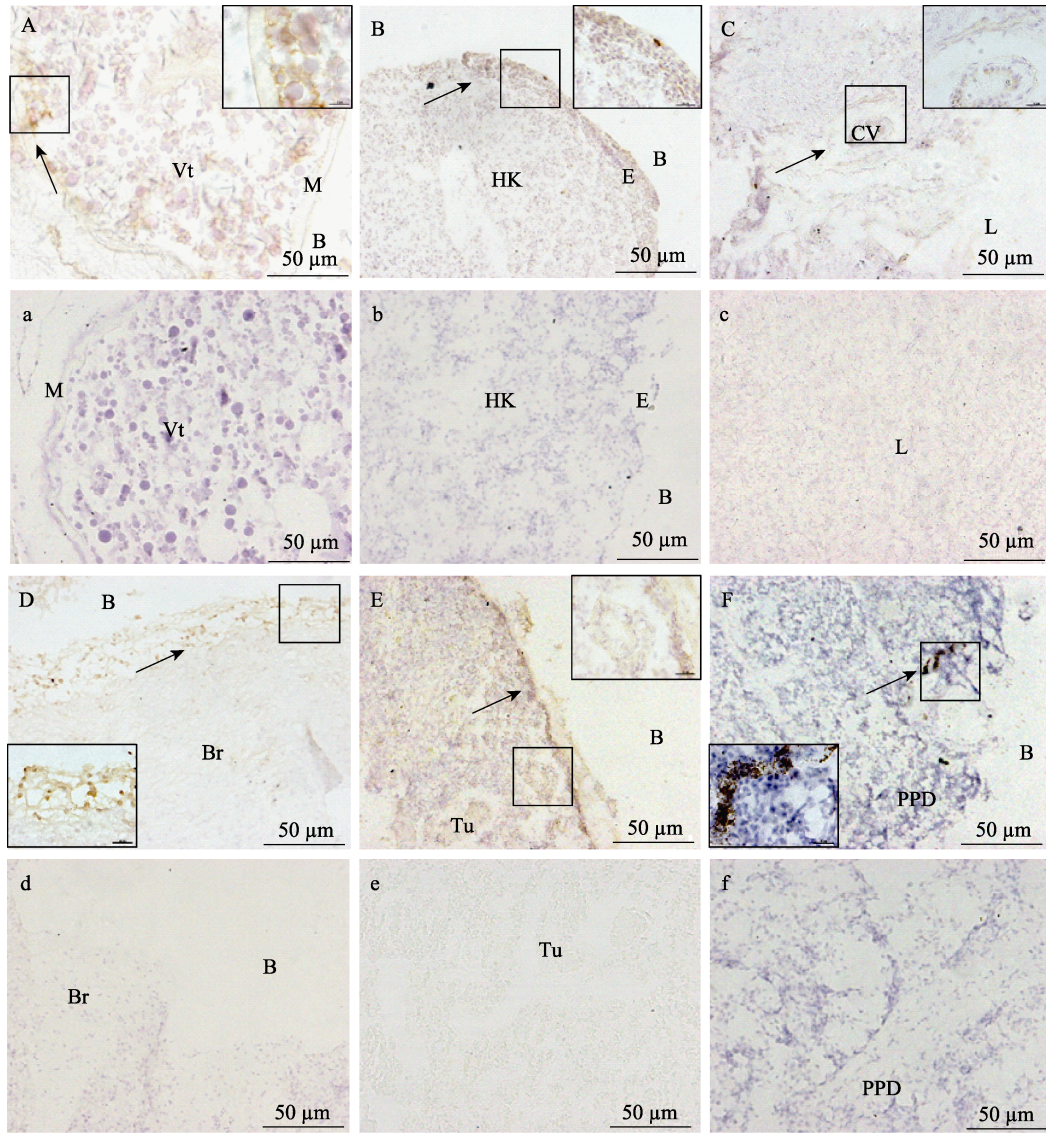


图 6 半滑舌鲷 mPR α 蛋白在不同组织中的表达分布(200 倍)

Fig.6 The expression distribution of mPR α protein in different tissues of *C. semilaevis* ($\times 200$)

A: 卵巢; B: 头肾; C: 肝脏; D: 脑; E: 肾; F: 垂体; 角图为相应组织放大 1000 倍; 箭头指向为阳性信号位置; a、b、c、d、e 和 f: 卵巢、头肾、肝脏、脑、肾和垂体的对照组

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; P: 垂体细胞; PPD: 外周部位; CV: 肝静脉

A: Ovary; B: Head-kidney; C: Liver; D: Brain; E: Kidney; F: Pituitary; the corner pictures were $\times 1000$; The arrows indicated the positive reaction; a, b, c, d, e, and f: Control group of ovary, head-kidney, liver, brain, kidney, and pituitary

Tu: Tubules; K: Kidney; Vt: Vitelogenic oocytes; E: Edge of tissues; L: Liver; B: Blank; Br: Brain cell; HK: Head-kidney cell; M: Oocyte membrane; PPD: Proximal part distalis; CV: Central venous

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, 在垂体、脑中, 主要在外周部分表达。半滑舌鲷 *mPR α* mRNA 和蛋白在脑、垂体、性腺中的丰富表达, 说明了 *mPR α* 参与介导孕激素调控半滑舌鲷繁殖内分泌系统。硬骨鱼类在生长、发育和繁殖过程中, 体内的神经、免疫及内分泌三大系统起到重要的作用; 性类

固醇激素受体不仅存在于性腺中, 在脑及免疫相关组织中也大量存在, 通过 3 个系统之间的反馈作用, 在神经-内分泌-免疫网络中起重要作用(Pakdel *et al*, 1997)。本研究用 RNA 原位杂交、免疫组化以及 Western blotting 方法在雌性半滑舌鲷的免疫相关组织肝、肾、头肾中检测到 *mPR α* mRNA 和蛋白表达, 在头肾、肾主要显色在组织的外周部分。在肝脏主要

显色在胆小管和肝静脉等与外界联系的管腔周围,在肾脏中也观察到其在肾小管附近表达丰富。因此,孕激素可能通过和其他系统交互连接部位和组织建立联系,从而行使其调控半滑舌鳎机体免疫系统的功能,但 mPR α 调控免疫系统的机理当前并不清楚。

综上所述, mPR α 不仅在介导孕激素促进半滑舌鳎卵母细胞成熟的生理功能上发挥重要的作用,而且参与介导孕激素调控雌性半滑舌鳎机体的神经-内分泌-免疫网络系统,但其作用机制尚不明了,进一步的关联分析,将会为解析膜孕激素受体作用机制提供广阔的前景。另外,膜孕激素受体 mPR(α 、 β 、 γ)和孕酮受体膜组分 PGRMC(1、2)均为膜孕激素受体家族成员,在组织表达上存在重叠分布,因此,单独分析膜孕激素受体亚型的作用机制仍有一定技术挑战。尽管核孕激素受体(nPR)不像膜孕激素受体具有跨膜蛋白区域,但参与膜孕激素受体介导的信号通路,这也增加了膜孕激素受体研究的复杂性。本研究为进一步研究膜孕激素受体生理功能提供了组织学依据。

参 考 文 献

- Arck P, Hansen PJ, Biserka MJ, *et al.* Progesterone during pregnancy: Endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2007, 58(3): 268–279
- Frye CA, Walf AA, Kohtz AS, *et al.* Progesterone-facilitated lordosis of estradiol-primed mice is attenuated by knocking down expression of membrane progesterin receptors in the midbrain. *Steroids*, 2014, 81(3): 17–25
- Hanna RN, Zhu Y. Expression of membrane progesterin receptors in zebrafish (*Danio rerio*) oocytes, testis and pituitary. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(1): 153–157
- Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Thomas P, *et al.* Molecular characterization of three forms of putative membrane-bound progesterin 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 progesterin 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(1–2): 204–211
- Liu XZ, Xu YJ, Liu NZ, *et al.* Study on histological and morphometric characters of gonad development of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(6): 25–35 [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, 30(6): 25–35]
- Liu XZ, Shi B, Li XX, *et al.* Molecular characterization of the novel membrane progesterin 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]
- Liu XZ, Zhuang ZM, Ma AJ, *et al.* Operative technologies for seedling rearing of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(2): 17–24 [柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鳎苗种生产技术的开发研究. *海洋水产研究*, 2006, 27(2): 17–24]
- Liu XZ, Zhuang ZM, Ma AJ, *et al.* Reproductive biology and breeding technology of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(5): 9–16 [柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鳎繁殖生物学及繁育技术研究. *海洋水产研究*, 2005, 26(5): 9–16]
- Lu J, Reese J, Zhou Y, *et al.* Progesterone-induced activation of membrane-bound progesterone receptors in murine macrophage cells. *Journal of Endocrinology*, 2015, 224(2): 183–194
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology*, 1971, 177(2): 129–145
- Mourot B, Nguyen T, Fostier A, *et al.* Two unrelated putative membrane-bound progesterin receptors, progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and membrane progesterin receptor (mPR) beta, are expressed in the rainbow trout oocyte and exhibit similar ovarian expression patterns. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2006, 4(1): 1–14
- Nagahama Y, Yoshikuni M, Yamashita M, *et al.* Regulation of oocyte maturation in fish. *Development Growth and Regeneration*, 2008, 50(Suppl 1): S174
- Nagahama Y. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. *Zoological Science*, 1987, 4: 209–222
- Oshima T, Nakayama R, Roy SR, *et al.* Purification of the goldfish membrane progesterin receptor α (mPR α) expressed in yeast *Pichia pastoris*. *Biomedical Research*, 2014, 35(1): 47–59
- Pace MC, Thomas P. Activation of a pertussis toxin-sensitive, inhibitory G-protein is necessary for steroid-mediated oocyte maturation in spotted seatrout. *Developmental Biology*, 2005, 285(1): 70–79
- Pakdel F, Delaunay F, Ducouret B, *et al.* Regulation of gene expression and biological activity of rainbow trout estrogen receptor. *Kidney International Supplement*, 1988, 25(3): S104–S109
- Shi B, Li XX, Liu XZ, *et al.* Molecular cloning and tissue expression analysis of membrane progesterin 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]
- Tan W, Aizen J, Thoas P. Membrane progesterin receptor alpha mediates progesterin-induced sperm hypermotility and increased fertilization success in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *General and Comparative Endocrinology*, 2014a, 200: 18–26

- Tan W, Thomas P. Activation of the Pi3k/Akt pathway and modulation of phosphodiesterase activity via membrane progesterin receptor- α (mPR α) regulate progesterin-initiated sperm hypermotility in Atlantic croaker. *Biology of Reproduction*, 2014b, 90(5): 105
- Thomas P, Pang Y, Dong J. Enhancement of cell surface expression and receptor functions of membrane progesterin receptor α (mPR α) by progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1): Evidence for a role of PGRMC1 as an adaptor protein for steroid receptors. *Endocrinology*, 2014, 155(3): 1107–1119
- Thomas P. Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 175(3): 367–383
- 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, Tokumoto M, Oshima T, *et al.* Characterization of multiple membrane progesterin receptor (mPR) subtypes from the goldfish ovary and their roles in the induction of oocyte maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 2012a, 177(1): 168–176
- Tokumoto T. Identification of membrane progesterin receptors (mPR) in goldfish oocytes as a key mediator of steroid non-genomic action. *Steroids*, 2012b, 77(10): 1013–1016
- Tubbs C, Psce M, Thomas P. Expression and gonadotropin regulation of membrane progesterin receptor alpha in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) gonads: Role in gamete maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(1): 144–154
- Yang ZY, Wang CX. On the development of flatfish aquaculture industry of China: A global perspective. *Chinese Fisheries Economics*, 2009(6): 115–121 [杨正勇, 王春晓. 全球视野下中国鲆鲽类养殖业的发展. *中国渔业经济*, 2009(6): 115–121]
- Zhao WX, Wright RS. Sex steroids production by vitellogenic ovarian follicles of Atlantic salmon (*Salmo salar*) *in vitro*. *Journal of Fisheries of China*, 1986(4): 389–394 [赵维信, Wright RS. 促性腺激素诱发大西洋鲑卵黄发生期卵巢滤泡释放性类固醇激素的离体研究. *水产学报*, 1986(4): 389–394]

(编辑 冯小花)

The Expression Patterns of Membrane Progesterin Receptor α (mPR α) During Oocytes Maturation in *Cynoglossus semilaevis*

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

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, 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 investigated the expression patterns of the mRNA and proteins of membrane progesterin receptor alpha (mPR α) in different tissues and oocyte phases using quantitative real-time PCR (qRT-PCR), *in situ* hybridization, immunohistochemistry, and western blotting analysis. Mature tissue samples were collected from female half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. After *in vitro* incubation with or without human chorionic gonadotropin (HCG), the levels of mPR α mRNA and proteins in the oocytes at different developmental stages were measured with qRT-PCR and western blotting analysis. It was shown that the highest level of mPR α mRNA appeared in Phase V oocyte of mature *C. semilaevis*. 20 IU/ml HCG promoted the mRNA and protein expression more effectively than 10 IU/ml HCG. This further implied that mPR α was involved in the regulation of oocyte maturation through guiding progesterone. The western blotting analysis confirmed that the expression of mPR α proteins was higher in the brain, pituitary, 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 peripheral or bureaucratic structures of other organs. Our study enriched the knowledge about mechanisms of membrane receptor signal transduction.

Key words Membrane progesterone receptor; *Cynoglossus semilaevis*; *in situ* hybridization; Immunohistochemistry; Western blotting; qRT-PCR

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