

GnIH 多肽对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 下丘脑生殖相关基因表达的影响*

刘 权^{1,2} 王 滨¹ 柳学周^{1,2①} 徐永江¹ 史 宝¹ 刘增新^{1,2}

(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. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 本研究首次通过下丘脑离体孵育的方法研究促性腺激素抑制激素(Gonadotropin-inhibitory hormone, GnIH)多肽对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)下丘脑中生殖相关基因的表达调控。研究结果显示, tsGnIH-1 促进了 *gnrh2* 和 *gnih* 的表达, 对 *gnrh3* 和 *kiss2* 的表达无影响; tsGnIH-2 抑制了 *gnrh3* 的表达, 对 *gnrh2*、*kiss2* 和 *gnih* 的表达无影响。GnIH 多肽对生殖相关基因的不同调控表明同一前体蛋白编码的不同 GnIH 多肽在生殖调控中的作用不尽相同。本研究结果增加了对 GnIH 参与鱼类生殖调控机制的认识, 为深入研究奠定了基础。

关键词 半滑舌鳎; 促性腺激素抑制激素; 促性腺激素释放激素; 下丘脑; 生殖相关基因

中图分类号 S917; Q575; Q492 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0056-07

包括硬骨鱼类在内的脊椎动物生殖神经内分泌活动主要受到下丘脑-垂体-性腺轴(Hypothalamo-pituitary-gonadal axis)的调控。下丘脑神经肽促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)曾被认为是促性腺激素(Gonadotropin, GTH)神经内分泌调控的主要促进因子, 但没有一种下丘脑因子能够抑制 GTH 分泌。直到 Tsutsui 等(2000)从日本鹌鹑(*Coturnix japonica*)脑中分离出一种下丘脑十二肽(SIKPSAYLPLRFa), 因其能够抑制鹌鹑垂体 GTH 的分泌, 所以命名为促性腺激素抑制激素(Gonadotropin-inhibitory hormone, GnIH), 这是第 1 次在脊椎动物中鉴定出的具有抑制生殖功能的下丘脑多肽。随后, 从鱼类到哺乳类中都鉴定出了 GnIH 的同源基因, 并对其结构与功能的多样性开展了大量的研究(Ogawa *et al*,

2014; Osugi *et al*, 2014; Ubuka *et al*, 2013; 王滨等, 2016)。

不同物种 *GnIH* 基因编码的前体多肽经过酶切加工可产生不同种类的成熟肽(Ogawa *et al*, 2014; Osugi *et al*, 2014; Tsutsui *et al*, 2012)。这些多肽的 C 末端都有一个特征性基序-LPXRFa(X=L 或者 Q), 因此, 从结构看应该被称作 LPXRFa 多肽。

现在普遍认为, 在鸟类和哺乳类中 GnIH 作用于下丘脑 GnRH 神经元或者直接作用于垂体来抑制 GTH 的合成与分泌(Bentley *et al*, 2009; Clarke *et al*, 2014; Kriegsfeld *et al*, 2010)。然而, GnIH 对鱼类垂体激素合成与分泌的表达调控作用仍存在争议。金鱼(*Carassius auratus*) GnIH 多肽 gfGnIH-1 促进了星点东方鲀(*Takifugu niphobles*)垂体 LH β 、FSH β 、GH 以及 PRL

* 国家自然科学基金项目(31602133; 31502145)、国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)、山东省自然科学基金项目(ZR2016CB02)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016018)共同资助 [This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31602133 and 31502145), China Agriculture Research System (CARS-50), Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2016CB02), and Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016018)]. 刘 权, E-mail: liuquan90@126.com

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

收稿日期: 2016-08-05, 收修改稿日期: 2016-09-22

的表达(Shahjahan *et al*, 2011、2016)。腹腔注射金鱼 GnIH 多肽 gfGnIH-2 和 gfGnIH-3 显著降低了金鱼垂体 LH β /FSH β 的表达水平(Qi *et al*, 2013)。同样, 腹腔注射斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) gGnIH-2 也降低了垂体 LH β 的表达水平(Wang *et al*, 2015)。此外, 侧脑室注射欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*) sbGnIH-1 和 sbGnIH-2 的结果显示, sbGnIH-1 不影响垂体 LH β 、FSH β 和 GH 的表达, 但 sbGnIH-2 显著降低了三者的表达(Paullada-Salmeron *et al*, 2016)。综上所述, GnIH 多肽参与了脊椎动物垂体功能, 但 GnIH 在不同物种间, 尤其是硬骨鱼类中, 对垂体激素合成与分泌的作用是不同的。

除了直接作用于垂体外, GnIH 也能够通过作用于下丘脑 GnRH 神经元进而调控 GTH 的合成与分泌。然而, GnIH 对鱼类下丘脑生殖相关基因表达调控的研究较少, 尚无定论。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是一种重要的海水养殖经济鱼类。近年来, 对半滑舌鳎生殖相关功能基因已有一些报道, 例如 FSH β 、LH β 、GTH α 和 *mPR-Like* 等(Shi *et al*, 2015; 柳学周等, 2015), 但鲆鲽鱼类中尚未见有关 GnIH 的研究报道。为研究 GnIH 在鱼类生殖调控中的作用机制, 本研究首次通过下丘脑离体孵育实验, 结合荧光定量 PCR 技术, 研究 GnIH 多肽对下丘脑生殖相关基因(包括 *GnRH*、*kiss2* 和 *GnIH*)的表达调控影响, 以期阐明 GnIH 对半滑舌鳎生殖轴的调控作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

半滑舌鳎成熟肽 tsGnIH-1 (SLDLERLNMRVTP-TASKSSLPTIHKLYPPTVNPPIHANMPMRF-NH₂) 和 tsGnIH-2 (EVEPEDDQSHNTPNMPQRF-NH₂)均由上海强耀生物科技有限公司合成, 纯度 > 95%。将多肽溶于灭菌超纯水配成 1 mmol/L 母液, 分装于 PCR 管 (5 μ l/管), -80 $^{\circ}$ C 保存备用。L15 培养基干粉(Leibovitz's L15 Medium powder)及双抗(Penicillin-Streptomycin-Glutamine)均购自 Life Technologies 公司; 牛血清白蛋白 BSA (Albumin Bovine Serum, Fraction V, Fatty Acid-Poor, Endotoxin-Free)购自 Calbiochem 公司; HEPES 购自 Solabio 公司; RNA 提取试剂 RNAiso Plus、反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real-time)以及荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR[®]Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus)均购自 TaKaRa 公司, 其余为国产分析纯。

1.2 实验用鱼

实验用半滑舌鳎购自山东青岛钩予水产有限公司, 2 龄, 雌性, 体重为(573.8 \pm 26.6) g, 性腺指数(Gonadosomatic index, GSI=性腺重/体重 \times 100)为(1.54 \pm 0.08)%。半滑舌鳎用 0.05% 的 MS-222 麻醉后, 用剪子沿侧线的延长线剪开头部处死, 迅速取出下丘脑, 置于冰预冷的新鲜 L15 培养基中。L15 培养基配方(表 1)参照 Wang 等(2014)。取样工具在使用前均在 180 $^{\circ}$ C 烘烤 6 h, 取样结束后, 立刻将样品转移到细胞房内进一步处理。

将表 1 组分溶于 800 ml 超纯水中, 用 5 mol/L NaOH 调 pH 至 7.2, 用超纯水定容至 1 L, 用磁力搅拌器搅拌, 待充分溶解后, 用 0.2 μ m 滤膜过滤除菌, 分装至 50 ml 离心管, 用封口膜密封管盖, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

表 1 Leibovitz's L15 培养基配方
Tab.1 The formula of Leibovitz's L15 medium

组份 Components	量 Amount
L15 培养基干粉 Leibovitz's L15 Medium powder	13.7 g
4-羟乙基哌嗪乙磺酸 HEPES	1.19 g
氯化钠 NaCl	2.66 g
牛血清白蛋白 BSA	1 g
100 \times 双抗 Penicillin-Streptomycin-Glutamine	10 ml

1.3 离体孵育实验

所有操作均在无菌超净工作台中进行。将下丘脑转移到培养皿中, 用新鲜的 L15 培养液清洗 2 次。用巴氏吸管将下丘脑逐个转移至 24 孔培养板中, 每孔加入 1 ml L15 培养液, 然后放在 25 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱 (HF 151 UV, Heal Force 公司)预孵育 1 h。预孵育结束后, 去除孵育液, 按以下方法处理: 对照组, 每孔加入 1 ml 的 L15 培养液; tsGnIH-1 实验组, 每孔加入 1 ml 终浓度为 1 μ mol/L tsGnIH-1 的 L15 培养液; tsGnIH-2 实验组, 每孔加入 1 ml 终浓度为 1 μ mol/L tsGnIH-2 的 L15 培养液, 然后将培养板放在 25 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中孵育 24 h。GnIH 多肽浓度选择参考之前已发表文献(Biran *et al*, 2014; Di Yorio *et al*, 2016)。孵育结束后, 将下丘脑转移到含有 1 ml RNAiso Plus 的 Eppendorf 管中。每个下丘脑用注射器抽打数次, 使之与 RNAiso Plus 匀浆完全, 在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存, 直至 RNA 提取。该实验重复 2 次, 每次实验每种处理 4-6 个重复。

1.4 总 RNA 提取、反转录与荧光定量检测

按照 RNAiso Plus 操作说明提取下丘脑总 RNA, 通过 NanoDrop2000C 分光光度计(Thermo 公司)测定 RNA 的纯度和浓度, 取 1 μg 总 RNA 非变性电泳(0.8% 琼脂糖凝胶)检验其完整性。纯度高且完整的 RNA 按照 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real-time)反转录试剂盒说明书进行反转录实验。反转录实验体系为 20 μl , 先取 1 μg 总 RNA 与 2 μl 5 \times gDNA Eraser Buffer、1 μl gDNA Eraser, 用无 RNase 水补充至 10 μl , 充分混匀、短暂离心后按以下反应程序进行: 42 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 将这一步的反应液与 1 μl RT Primer Mix、1 μl PrimeScript™ RT Enzyme Mix I、4 μl 5 \times PrimeScript Buffer、4 μl 无 RNase 水, 充分混匀、短暂离心后按以下反应程序进行: 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s; 将反转录产物 10 倍稀释后-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

按照 Wang 等(2016)所述方法通过荧光定量 PCR 检测相关基因表达分析。荧光定量扩增体系为 20 μl , 包括 10 μl 2 \times SYBR®Premix Ex Taq™ II、0.8 μl 上下游引物(每种引物浓度均为 10 $\mu\text{mol/L}$)、2 μl 稀释的 cDNA 模板和 7.2 μl 无菌水, 充分混匀、短暂离心后通过 Mastercycler ep realplex Real-time PCR 仪(Eppendorf 公司)进行荧光定量检测, 每个样品 3 个平行, PCR 程序采用两步法: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 共 40 个循环。反应结束后进行熔解曲线分析以及 PCR 产物测序, 进而验证产物特异性。18S 作为内参基因, 定量 PCR 检测所使用的引物(利用 Primer premier 5.0 设计)以及它们的扩增片段长度与扩增效

率等信息见表 2。基因相对表达量参照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算(Livak *et al*, 2001), 结果以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)表示。采用 SPSS 17 进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 与 Ducan 多重比较, $P < 0.05$ 认为有显著性统计差异。

2 结果

2.1 GnIH 多肽对 *gnrh2* mRNA 表达量的影响

以对照组作为参照, 研究比较 tsGnIH-1 与 tsGnIH-2 对半滑舌鳎下丘脑 *gnrh2* mRNA 表达量的影响。如图 1 所示, tsGnIH-1 多肽显著促进了 *gnrh2* mRNA 的表达水平($P < 0.05$), tsGnIH-1 处理组 *gnrh2* mRNA 的表达量是对照组的 1.85 倍; 而 tsGnIH-2 多肽有所降低了 *gnrh2* mRNA 表达量, 与对照组相比无显著差异。

2.2 GnIH 多肽对 *gnrh3* mRNA 表达量的影响

以对照组作为参照, 研究比较 tsGnIH-1 与 tsGnIH-2 对半滑舌鳎下丘脑 *gnrh3* mRNA 表达量的影响。如图 2 所示, tsGnIH-2 多肽显著抑制了 *gnrh3* mRNA 的表达水平($P < 0.05$), tsGnIH-2 处理组 *gnrh3* mRNA 表达量为对照组的 39%; 然而, tsGnIH-1 多肽不影响 *gnrh3* mRNA 的表达水平, tsGnIH-1 处理组 *gnrh3* mRNA 表达量较对照组增加 6%。

2.3 GnIH 多肽对 *kiss2* mRNA 表达量的影响

为了研究 GnIH 多肽是否通过 Kiss 系统调控半滑舌鳎生殖, 以对照组作为参照, 分析比较了 tsGnIH-1

表 2 定量 PCR 引物信息

Tab.2 Primer information for quantitative Real-Time PCR

名称 Name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	扩增长度 Amplicon size(bp)	扩增效率 PCR efficiency	GenBank 登录号 GenBank Accession No.
GnIH-F	GGAAATCAGCCTACAGTGACAAAA	120	1.11	KU612223
GnIH-R	GCCTCTCCAAGTCCAAACTCC			
kiss2-F	GGCAACTGCTGTGCAACGA	133	1.01	KX090946
kiss2-R	AAGACAGAAAGCGGGGAGAAC			
GnRH2-F	GGAATCTGAACTGGAGAACTGCT	121	1.09	KX090947
GnRH2-R	TGGCTGCTCACAACCTTTATCAC			
GnRH3-F	AGGCAGCAGAGTGATCGTG	92	1.08	JQ028869
GnRH-R	CACCTGGTAGCCATCCATAAGAC			
18S F	GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	107	1.00	GQ426786
18S R	AGTGGGGTTTCAGCGGGTTAC			

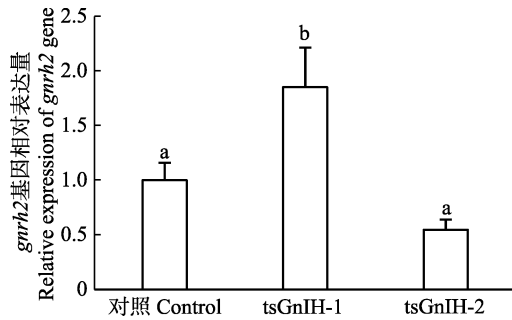


图 1 半滑舌鳎 GnIH 多肽对离体孵育下丘脑 *gnrh2* mRNA 表达量的影响

Fig.1 *in vitro* effects of GnIH peptides on *gnrh2* mRNA levels in the hypothalamus of *C. semilaevis*

不同字母表示不同组之间有显著性差异, 下同

Groups with different letters are significantly different from each other, the same as below

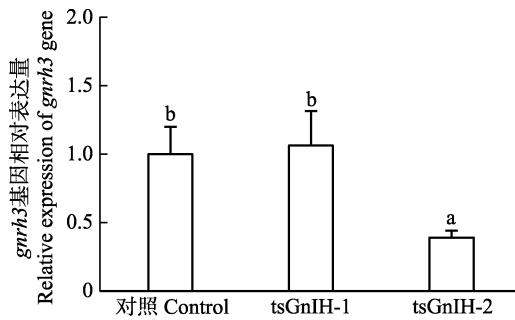


图 2 半滑舌鳎 GnIH 多肽对离体孵育下丘脑 *gnrh3* mRNA 表达量的影响

Fig.2 *in vitro* effects of GnIH peptides on *gnrh3* mRNA levels in the hypothalamus of *C. semilaevis*

与 tsGnIH-2 对半滑舌鳎下丘脑 *kiss2* mRNA 表达量的影响。如图 3 所示, tsGnIH-1 处理组 *kiss2* mRNA 的表达量为对照组的 85%, 而 tsGnIH-2 处理组 *kiss2* mRNA 的表达量为对照组的 95%。结果表明, tsGnIH-1 与 tsGnIH-2 多肽均不影响 *kiss2* mRNA 的表达水平。

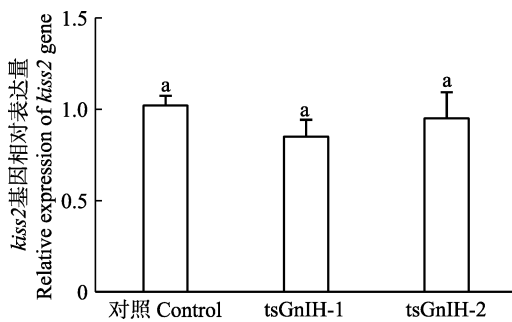


图 3 半滑舌鳎 GnIH 多肽对离体孵育下丘脑 *kiss2* mRNA 表达量的影响

Fig.3 *in vitro* effects of GnIH peptides on *kiss2* mRNA levels in the hypothalamus of *C. semilaevis*

2.4 GnIH 多肽对 *gnih* mRNA 表达量的影响

为了研究 GnIH 多肽对 GnIH 系统的自调控, 以对照组作为参照, 分析比较了 tsGnIH-1 与 tsGnIH-2 对半滑舌鳎下丘脑 *gnih* mRNA 表达量的影响。如图 4 所示, tsGnIH-1 多肽显著促进了 *gnih* mRNA 的表达水平 ($P < 0.05$), tsGnIH-1 处理组 *gnih* mRNA 表达量为对照组的 1.61 倍; 然而, tsGnIH-2 多肽不影响 *gnih* mRNA 的表达水平, tsGnIH-2 处理组 *gnih* mRNA 表达量为对照组的 83.53%。

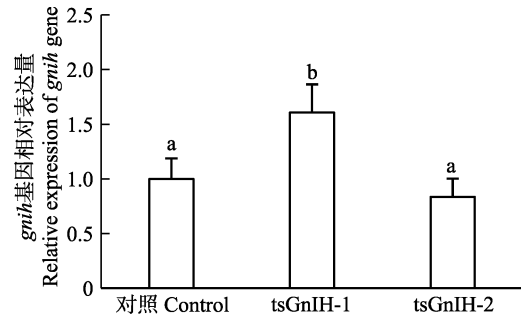


图 4 半滑舌鳎 GnIH 多肽对离体孵育下丘脑 *gnih* mRNA 表达量的影响

Fig.4 *in vitro* effects of GnIH peptides on *gnih* mRNA levels in the hypothalamus of *C. semilaevis*

3 讨论

GnIH 是最近发现的一种新型下丘脑神经肽, 也是目前脊椎动物中唯一发现的生殖抑制因子, 其在鸟类和哺乳类生殖调控中的作用受到了广泛研究, 然而, 有关 GnIH 对鱼类生殖调控的研究相对较少, 尤其是 GnIH 在鱼类生殖调控中的精确作用及其分子机制尚未阐明 (Kriegsfeld *et al*, 2015; Tsutsui *et al*, 2015; Ubuka *et al*, 2016)。目前, 在金鱼、斑马鱼 (*Danio rerio*)、星点东方鲀、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、斜带石斑鱼和欧洲海鲈等鉴定出了 GnIH 同源基因, 并对其调控鱼类生殖活动的功能进行了初步研究 (Kriegsfeld *et al*, 2015; Tsutsui *et al*, 2015; Ubuka *et al*, 2016)。为了进一步研究 GnIH 在鱼类生殖调控中的作用机制, 本研究首次通过下丘脑离体孵育的方法研究了 GnIH 多肽对半滑舌鳎下丘脑生殖相关基因的表达调控。

在之前的研究中, 通常采用在体手段 (腹腔注射或者侧脑室注射) 研究 GnIH 对下丘脑生殖相关基因的表达调控。然而, 多种内源性因子参与或者互相作用, 导致在体实验结果经常很难解释。因此, 本研究采用下丘脑离体孵育方法研究 GnIH 多肽对半滑舌鳎下丘脑生殖相关基因的表达调控, 避免了内源性因子

的影响。GnRH 是垂体 GTH 合成与分泌的主要促进因子,在脊椎动物中已经鉴定出了 15 种 GnRH 亚型,其中 8 种存在于硬骨鱼类中;每种硬骨鱼类中存在至少 2 种形式的 GnRH 多肽(Ohkubo *et al.*, 2010)。目前,在半滑舌鳎中鉴定出 2 种 *gnrh* 基因,即 *gnrh2* (GenBank 登录号: KX090947)和 *gnrh3* (GenBank 登录号: JQ028869)。在本研究中, tsGnIH-1 促进了半滑舌鳎下丘脑 *gnrh2* 的表达,但不影响 *gnrh3* 的表达。侧脑室注射欧洲海鲈 sbGnIH-1 和腹腔注射斜带石斑鱼 gGnIH-1 均不影响 *gnrh3* 的表达 (Paullada-Salmeron *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015)。然而,侧脑室注射欧洲海鲈 sbGnIH-1 也不影响 *gnrh2* 的表达 (Paullada-Salmeron *et al.*, 2016)。不同于 tsGnIH-1, tsGnIH-2 显著降低了半滑舌鳎下丘脑 *gnrh3* 的表达,但不影响 *gnrh2* 的表达。腹腔注射金鱼 gfGnIH-2 显著降低了 *gnrh3* 的表达,但不影响 *gnrh2* 的表达 (Qi *et al.*, 2013)。相反,侧脑室注射欧洲海鲈 sbGnIH-2 显著降低了 *gnrh2* 的表达,但不影响 *gnrh3* 的表达 (Paullada-Salmeron *et al.*, 2016); 腹腔注射斜带石斑鱼 gGnIH-2 也不影响 *gnrh3* 的表达 (Wang *et al.*, 2015)。半滑舌鳎和欧洲海鲈中只存在 2 种 GnIH 多肽,然而,在金鱼和斜带石斑鱼中存在 3 种 GnIH 多肽。腹腔注射金鱼 gfGnIH-3 不影响 *gnrh2* 的表达,但抑制了 *gnrh3* 的表达 (Qi *et al.*, 2013)。相反,腹腔注射斜带石斑鱼 gGnIH-3 却促进了 *gnrh3* 的表达 (Wang *et al.*, 2015)。综上所述, GnIH 对下丘脑 GnRH 亚型的不同调控具有物种特异性,甚至同一前体蛋白编码的不同 GnIH 多肽具有不同的功能。

Kiss 也是生殖调控的一种新型下丘脑神经肽,通过直接作用于 GnRH 神经元促进 GnRH 分泌进而上调生殖轴,是青春期启动的一个关键因子 (Tsutsui *et al.*, 2010)。在斑马鱼、金鱼、青鳉 (*Oryzias latipes*)、欧洲海鲈和鲈鱼 (*Scomber japonicus*) 中存在 2 种 *kiss* 基因,即 *kiss1* 和 *kiss2*; 然而,在塞内加尔鳎 (*Solea senegalensis*)、星点东方鲀和斜带石斑鱼中只存在 *kiss2* 基因 (Mechaly *et al.*, 2013)。目前,在半滑舌鳎中也只鉴定出了部分 *kiss2* 序列 (GenBank 登录号: KX090946)。在本研究中, tsGnIH-1 和 tsGnIH-2 均不影响 *kiss2* 表达。同样,腹腔注射斜带石斑鱼 3 种 GnIH 多肽均不影响 *kiss1* 及 *kiss2* 的表达 (Wang *et al.*, 2015)。哺乳类 GnIH 同源多肽 RFRP3 也不影响大鼠 *kiss1* 表达 (Johnson *et al.*, 2008)。上述结果说明, GnIH 多肽对 GnRH 亚型的表达调控可能不需要 Kiss 系统介导。此外,侧脑室注射欧洲海鲈 sbGnIH-1 也不影响 *kiss1* 和 *kiss2* 的表达,

但 sbGnIH-2 均降低了 *kiss1* 及 *kiss2* 的表达,这说明在欧洲海鲈中, sbGnIH-2 主要发挥生殖调控的抑制作用 (Paullada-Salmeron *et al.*, 2016)。

本研究也探索了 GnIH 对其自身前体基因的表达调控。结果表明, tsGnIH-1 上调了半滑舌鳎下丘脑 *gnih* 表达,然而, tsGnIH-2 对 *gnih* 表达无影响。同样,腹腔注射金鱼 gfGnIH-3 也促进了小丑鱼 *gnih* 表达 (Choi *et al.*, 2016)。然而,侧脑室注射欧洲海鲈 sbGnIH-1 不影响 *gnih* 的表达, sbGnIH-2 却抑制了 *gnih* 的表达 (Paullada-Salmeron *et al.*, 2016)。在哺乳类和鸟类中已证实多种因子 (例如光照、压力等) 影响了 *gnih* 的表达,进而影响季节性生殖调控 (Tsutsui, 2009; Tsutsui *et al.*, 2015; Ubuka *et al.*, 2008)。鱼类生殖活动也受到光照等环境因子的影响, GnIH 是否参与了鱼类季节性生殖活动需要进一步深入研究。

4 小结

GnIH 是一个多功能的神经肽,在下丘脑-垂体-性腺轴多个水平参与了生殖调控。GnIH 对鱼类生殖调控的作用仍存在争议,需要进一步深入研究; GnIH 调控鱼类垂体激素合成与分泌的信号转导机制网络需要进一步完善; GnIH 与其他因子之间如何互相作用、在垂体水平将多种信号整合进而调控生殖等生理过程仍不清楚 (王滨等, 2016)。本研究首次通过下丘脑离体孵育的方法研究了 GnIH 多肽对半滑舌鳎下丘脑生殖相关基因的表达调控。结果表明, tsGnIH-1 促进了 *gnrh2* 和 *gnih* 的表达,对 *gnrh3* 和 *kiss2* 的表达无影响; tsGnIH-2 抑制了 *gnrh3* 的表达,对 *gnrh2*、*kiss2* 和 *gnih* 的表达无影响。GnIH 多肽对生殖相关基因的不同调控表明了生殖调控的复杂性,即使同一前体蛋白编码的不同 GnIH 多肽在生殖调控中的作用也不尽相同。该研究结果增加了对 GnIH 参与鱼类生殖调控机制的认识,为下一步研究奠定了基础。

参 考 文 献

- Bentley GE, Ubuka T, McGuire NL, *et al.* Gonadotrophin-inhibitory hormone: A multifunctional neuropeptide. *Journal of Neuroendocrinology*, 2009, 21(4): 276–281
- Choi YJ, Kim NN, Habibi HR, *et al.* Effects of gonadotropin inhibitory hormone or gonadotropin-releasing hormone on reproduction-related genes in the protandrous cinnamon clownfish, *Amphiprion melanopus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 235: 89–99
- Clarke IJ, Parkington HC. Gonadotropin inhibitory hormone

- (GnIH) as a regulator of gonadotropes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 385(1–2): 36–44
- Di Yorio MP, Perez Sirkin DI, Delgadin TH, *et al.* Gonadotrophin-inhibitory hormone in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*: Structure, brain distribution and differential effects on the secretion of gonadotrophins and growth hormone. *Journal of Neuroendocrinology*, 2016, 28(5), doi: 10.1111/jne.12377
- Johnson MA, Fraley GS. Rat RFRP-3 alters hypothalamic GHRH expression and growth hormone secretion but does not affect Kiss-1 gene expression or the onset of puberty in male rats. *Neuroendocrinology*, 2008, 88(4): 305–315
- Kriegsfeld LJ, Gibson EM, Williams WP 3rd, *et al.* The roles of RFamide-related peptide-3 in mammalian reproductive function and behaviour. *Journal of Neuroendocrinology*, 2010, 22(7): 692–700
- Kriegsfeld LJ, Ubuka T, Bentley GE, *et al.* Seasonal control of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in birds and mammals. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2015, 37: 65–75
- 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]
- 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
- Mechaly AS, Vinas J, Piferrer F. The kisspeptin system genes in teleost fish, their structure and regulation, with particular attention to the situation in Pleuronectiformes. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 188: 258–268
- Ogawa S, Parhar IS. Structural and functional divergence of gonadotropin-inhibitory hormone from jawless fish to mammals. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2014, 5: 177
- Ohkubo M, Aranishi F, Shimizu A. Molecular cloning and brain distribution of three types of gonadotropin-releasing hormone from mummichog *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Fish Biology*, 2010, 76(2): 379–394
- Osugi T, Ubuka T, Tsutsui K. Review: evolution of GnIH and related peptides structure and function in the chordates. *Frontiers in Neuroscience*, 2014, 8: 255
- Paullada-Salmeron JA, Cowan M, Aliaga-Guerrero M, *et al.* Gonadotropin inhibitory hormone down-regulates the brain-pituitary reproductive axis of male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*, 2016, 94(6): 121
- Qi X, Zhou W, Li S, *et al.* Evidences for the regulation of GnRH and GTH expression by GnIH in the goldfish, *Carassius auratus*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2013, 366(1): 9–20
- Shahjahan M, Doi H, Ando H. LPXRFamide peptide stimulates growth hormone and prolactin gene expression during the spawning period in the grass puffer, a semi-lunar synchronized spawner. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 227: 77–83
- Shahjahan M, Ikegami T, Osugi T, *et al.* Synchronised expressions of LPXRFamide peptide and its receptor genes: seasonal, diurnal and circadian changes during spawning period in grass puffer. *Journal of Neuroendocrinology*, 2011, 23(1): 39–51
- Shi B, Liu X, Xu Y, *et al.* Molecular characterization of three gonadotropin subunits and their expression patterns during ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(2): 2767–2793
- Tsutsui KA. New key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. *Progress in Neurobiology*, 2009, 88(1): 76–88
- Tsutsui K, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, *et al.* Discovery and evolutionary history of gonadotropin-inhibitory hormone and kisspeptin: New key neuropeptides controlling reproduction. *Journal of Neuroendocrinology*, 2010, 22(7): 716–727
- Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, *et al.* A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 275(2): 661–667
- Tsutsui K, Ubuka T, Bentley GE, *et al.* Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): discovery, progress and prospect. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 177(3): 305–314
- Tsutsui K, Ubuka T, Son YL, *et al.* Contribution of GnIH research to the progress of reproductive neuroendocrinology. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2015, 6: 179
- Ubuka T, McGuire NL, Calisi RM, *et al.* The control of reproductive physiology and behavior by gonadotropin-inhibitory hormone. *Integrative and Comparative Biology*, 2008, 48(5): 560–569
- Ubuka T, Son YL, Bentley GE, *et al.* Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), GnIH receptor and cell signaling. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 190(9): 10–17
- Ubuka T, Son YL, Tsutsui K. Molecular, cellular, morphological, physiological and behavioral aspects of gonadotropin-inhibitory hormone. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 227: 27–50
- Wang B, Jia J, Yang G, *et al.* *In vitro* effects of somatostatin on the growth hormone-insulin-like growth factor axis in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 237: 1–9
- Wang B, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* Progress of research on gonadotropin-inhibitory hormone and its receptors in fish.

- Journal of Fisheries of China, 2016, 40(2): 278–287 [王滨, 柳学周, 徐永江, 等. 鱼类促性腺激素抑制激素及其受体的研究进展. 水产学报, 2016, 40(2): 278–287]
- Wang B, Qin C, Zhang C, *et al.* Differential involvement of signaling pathways in the regulation of growth hormone release by somatostatin and growth hormone-releasing hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Molecular and Cellular Endocrinology, 2014, 382(2): 851–859
- Wang Q, Qi X, Guo Y, *et al.* Molecular identification of GnIH/GnIHR signal and its reproductive function in protogynous hermaphroditic orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). General and Comparative Endocrinology, 2015, 216: 9–23

(编辑 冯小花)

Effects of Gonadotropin-Inhibitory Hormone Peptides on the Reproduction-Related Gene Expression in the Hypothalamus of Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

LIU Quan^{1,2}, WANG Bin¹, LIU Xuezhou^{1,2}①, XU Yongjiang¹, SHI Bao¹, LIU Zengxin^{1,2}

(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. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The neuroendocrine regulation of reproduction in vertebrates, including fish, is primarily controlled by the hypothalamo-pituitary-gonadal (HPG) axis, with each component secreting specific neuropeptides or hormones. A classic example of such regulation is the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system. It was believed that GnRH was the only hypothalamic stimulator of the release of pituitary gonadotropins, and that there was no inhibitory neuropeptide in the reproductive axis. However, this notion has been challenged by the recent discovery of a vertebrate hypothalamic neuropeptide that suppresses pituitary gonadotropins release. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) is a novel hypothalamic neuropeptide which was identified in 2000 from the brain of Japanese quail (*Coturnix japonica*). To date, GnIH orthologs have been isolated from fish to mammals and GnIH is the only reported inhibitor of reproduction in any vertebrate. GnIH acts on the pituitary and on GnRH neurons in the hypothalamus to decrease gonadotropin synthesis and release, inhibiting gonadal development and maintenance via a novel G-protein-coupled receptor (GPR147). It is well accepted that GnIH acts as an inhibitory factor in the control of reproduction in birds and mammals. However, the role of GnIH in the control of gonadotropin synthesis and release has been debatable in fish. In this study, we evaluated the effects of GnIH peptides on the reproduction-related gene expression in the hypothalamus of half-smooth tongue sole using a primary hypothalamus culture system for the first time. Our results showed that tsGnIH-1 increased the expression of *gnrh2* and *gnih* mRNAs, but had no effects on *gnrh3* or *kiss2* mRNA expression. On the other hand, tsGnIH2 significantly inhibited *gnrh3* mRNA expression. However, tsGnIH2 altered neither *gnrh2*, *kiss2* nor *gnih* mRNA levels. Our findings suggested that GnIH peptides derived from the same precursor played different roles in the reproduction-related gene expression in tongue sole, and provided information for the future studies on the regulation of reproduction by GnIH peptides in fish.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH); Gonadotropin-releasing hormone (GnRH); Hypothalamus; Reproduction-related gene

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