

孕酮受体膜组分 1 基因在性成熟雌性半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)的组织学定位定量分析*

张金勇^{1,3} 史宝^{1,2} 柳学周^{1,2,3} 徐永江^{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. 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 116023)

摘要 运用 Western blotting、免疫组化和原位杂交方法检测性成熟半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)孕酮受体膜组分 1 (Progesterone receptor membrane component 1, PGRMC1)蛋白和 mRNA 在不同组织的分布和表达特征。原位杂交结果发现, PGRMC1 mRNA 主要分布在成熟的卵母细胞膜上,在脑组织神经元和分散的垂体细胞中也有表达。利用制备的半滑舌鲷 PGRMC1 多克隆抗体,对不同组织中的 PGRMC1 蛋白表达量进行 Western blotting 检测,发现在半滑舌鲷卵巢、脑、肝脏中 PGRMC1 蛋白表达量相对较高,在垂体、头肾、肾也有表达,但表达量相对较少。免疫组化结果表明,半滑舌鲷 PGRMC1 蛋白在成熟的卵母细胞膜上显著表达,进一步证明 PGRMC1 为卵膜上的受体基因,推测其主要在卵膜上行使相关的生理功能。研究结果为探究 PGRMC1 在半滑舌鲷卵母细胞成熟过程中的生理功能提供了重要参考。

关键词 半滑舌鲷; 孕酮受体膜组分 1; 卵母细胞成熟; 表达分析

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0048-08

孕酮受体膜组分 1 (Progesterone receptor membrane component 1, PGRMC1)为广泛存在于真核生物中的膜相关的孕激素受体蛋白 (Membrane-associated progesterone receptor protein, MAPR)家族中的一员。PGRMC1 以多肽单体的形式存在,为二聚体或低聚体,这些存在形式均可以介导孕激素快速反应性,引起膜相关信号传导(张颖等, 2013)。研究发现,在不同的环境条件下 PGRMC1 能改变它的亚细胞定位,参与不同的细胞调控活动;与 PGRMC1 蛋白的多亚细胞定位特点对应的是 PGRMC1 能与不同的蛋白结合,通过不同的配基相互作用发挥不同的生物学功能

(Lösel *et al*, 2008)。已有研究表明, PGRMC1 在参与大鼠(*Rattus norvegicus*)和人(*Homo sapiens*)颗粒/黄体细胞胆固醇代谢和类固醇生物合成(Hughes *et al*, 2007; Suchanek *et al*, 2005)、基因转录(Peluso *et al*, 2012)、介导孕激素在卵巢细胞中的抗凋亡活动(Mansouri *et al*, 2008)、诱导卵母细胞成熟(Peluso *et al*, 2008)、促进体外卵巢细胞的存活(Luciano *et al*, 2008)、细胞分裂(Luciano *et al*, 2011; Liu *et al*, 2009)和精子顶体反应(Bryan *et al*, 2015)等方面有重要的调控作用。

目前,在鱼类中关于 PGRMC1 的相关研究较少,仅在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Mourot *et al*, 2006)、

* 国家自然科学基金项目(31201982)、山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013SW042)和国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31201982), Shandong Youth Scientist Awards Foundation (BS2013SW042) and China Agriculture Research System (CARS-50)] 张金勇, E-mail: jinyongzhang2013@126.com

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

收稿日期: 2016-07-22, 收修改稿日期: 2016-09-19

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)(徐驰, 2011)¹⁾、海七鳃鳗(*Petromyzon marinus*)(Bryan *et al.*, 2015)有过报道。PGRMC1 在鲆鲽类中的繁殖调控作用机制尚不清楚, 相关研究亟待开展。本实验室前期实验初步研究了半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) PGRMC1 基因结构及表达特征(张金勇等, 2016), 本研究采用原位杂交、免疫组化技术和 Western blotting 等方法研究了半滑舌鲷 PGRMC1 基因在半滑舌鲷不同组织中的细胞学定位和表达特征, 为探明 PGRMC1 的生理功能, 特别是在下丘脑-垂体-性腺轴(HPG 轴)和卵母细胞成熟过程中所参与的调控作用提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用半滑舌鲷取自山东烟台黄海水产有限公司。挑取人工培育达到性成熟 3 龄雌性亲鱼 21 尾。所用亲鱼全长为 52–59 cm, 体重为 1183.9–1349.2 g。实验用鱼的培育条件: 在室内水泥池中(5 m×5 m×1 m)全年开放流水培育, 饲喂人工配合饲料, 水温为 10–25℃, 盐度为 27–31, pH 7.8–8.4, 溶解氧为 5 mg/L 以上。使用 MS-222 麻醉亲鱼后解剖, 留取脑、垂体、性腺、肾等各组织样品, 4%多聚甲醛[溶于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)中]在 4℃条件下固定 20 h, 梯度甲醇脱水, -20℃保存在甲醇中的样品, 一部分用于免疫组化, 一部分样品用于原位杂交; 液氮速冻后转至-80℃保存各组织样品, 用于总蛋白的提取。

1.2 PGRMC1/pBST-18 质粒构建和探针制备

根据所得半滑舌鲷 PGRMC1 的 cDNA 序列全长, 设计扩增产物为 280 bp 的原位杂交探针引物, PGRMC1-ISH-F(5'-AAGCTTCCGAGGAAAGCGAAGTAC-3')和 PGRMC1-ISH-R(5'-GAATTCCATAAACTTCTTCCCCCG-3'), 构建重组质粒(PGRMC1/pBST-18, Roche)作为模板制备地高辛标记的 RNA 探针, 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, 使其线性化, 按照 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, 反应体系为 10 μl: 线性化质粒 DNA 4 μg, DIG-UTP Mixture 1 μl, 10×Buffer 1 μl, 反转录酶 1 μl, RNA 酶抑制剂 1 μl, 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。

1.3 切片原位杂交分析

将处理好的原位杂交切片在烘箱 37℃烘 3 h 后进行切片原位杂交, 二甲苯脱蜡处理 3 次(每次 5 min), 乙醇梯度脱水(100%乙醇 2 次, 每次 10 min; 95%、70%、50%乙醇各 1 次, 每次 5 min)。4% PFA-PBS 固定 10 min。PBS 冲洗 3 次, 每次 10 min。0.2 mol/L 的 HCl 处理 10 min。PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。10 μg/ml 蛋白酶 K 消化 10 min。PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入含 tRNA 和肝素预杂交液, 70℃预杂交 8 h, 再加入反义 RNA 探针 200 ng 的杂交液, 70℃过夜。50%无 tRNA 及肝素的预杂交液和 50% 2×SSC, 70℃放置 15 min; 0.2×SSC, 70℃放置 1 h。1×MAB 室温 5 min。含 10%山羊血清的封闭液室温封闭 6 h。1:500 稀释的碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体, 4℃孵育过夜。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 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。

1.4 Western blotting

取冻存的半滑舌鲷脑、垂体、卵巢等组织(约 100 mg), 加入 1 ml 动物组织蛋白提取试剂, 匀浆器充分匀浆、冰浴静置 30 min, 于 4℃、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。

分析半滑舌鲷 PGRMC1 蛋白序列选择抗原表位, 制备抗体。统一蛋白上样量为 40 μg, 12% SDS-PAGE 胶蛋白电泳, 60 V 1 h, 然后 90 V 1.5 h; 经转膜、PVDF 膜活化, 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 将分子量标准和凝胶上的蛋白电转移到 PVDF 膜上; 1×PBST 洗涤 PVDF 膜 2 次, 每次 5 min, 5%脱脂奶粉溶液封闭(1×PBST 稀释)室温 3 h; 洗涤; 加一抗(半滑舌鲷 PGRMC1 多克隆抗体)与 5% BSA 室温摇床 2 h, 一抗稀释 1:1500 (1×PBST 稀释); 二抗(羊抗兔 IgG 抗体)室温摇床 2 h, 稀释度为 1:2000 (1×PBST 稀释)。DAB 显色, Nikon E80i 显微镜拍照, 蛋白灰

1) Xu C. *mPRA* and *PGRMC1*: cDNAs cloning and expression profiles in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Master's Thesis of Sun Yat-sen University, 2011 [徐驰. 斜带石斑鱼 *mPRA* 和 *PGRMC1* 基因 cDNA 的克隆及表达模式分析. 中山大学硕士研究生学位论文, 2011]

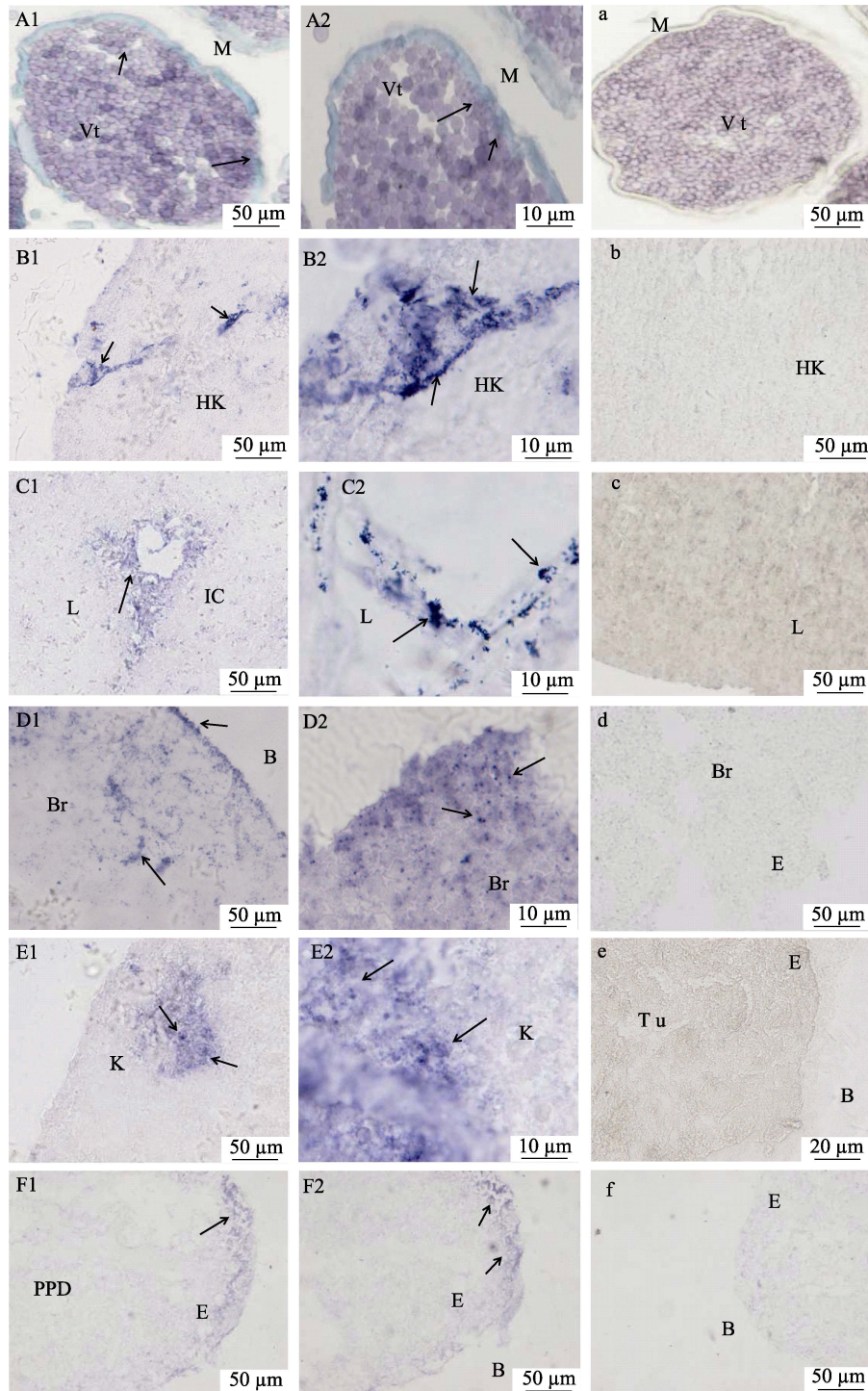


图 1 半滑舌鳎 *PGRMC1* 在不同组织中的定位

Fig.1 Location of *PGRMC1* gene in different tissues of *C. semilaevis*

A1: 卵巢; B1: 头肾; C1: 肝脏; D1: 脑; E1: 肾; F1: 垂体; A2、B2、C2、D2 和 E2 分别为卵巢、头肾、肝脏、脑和肾放大 1000 倍, F2 为垂体放大 200 倍; a、b、c、d、e 和 f: 卵巢、头肾、肝脏、脑、肾和垂体的阴性对照组

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

A1: Ovary; B1: Head-kidney; C1: Liver; D1: Brain; E1: Kidney; F1: Pituitary; A2, B2, C2, D2 and E2: Ovary, head-kidney, liver, brain, and kidney ($\times 1000$); F2: Pituitary ($\times 200$); a, b, c, d, e, and f:

Negative control of ovary, head-kidney, liver, brain, kidney, and pituitary

TU: Tubules; K: Kidney; Vt: Vitelo genic oocytes; E: Edge of tissues; L: Liver; B: Blank; Br: Brain cell; HK: Head-kidney cell; M: Oocyte membrane; PPD: Proximal part distalis

度分析。同时采用空白对照检测多克隆抗体的特异性。

1.5 免疫组化

取 100% 甲醇中保存的样品, 使用常规切片制备方法获取免疫组化切片, 免疫组化实验过程: 二甲苯脱蜡 2 次, 每次 5 min; 梯度乙醇复水 3 min; 1×PBST 洗涤; 3% H₂O₂ 封闭内源酶, 室温孵育 15 min; PBST 洗涤; 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液修复抗原, 微波炉加热沸腾后, 中低档保持 95℃ 20 min, 自然冷却至室温; PBST 洗涤; 5% BSA 封闭(溶于 1×PBST)室温摇床 2 h; 半滑舌鳎 PGRMC1 抗体(1:1000)稀释, 使其完全覆盖组织切片, 湿盒中室温过夜; PBST 洗涤; 二抗使用羊抗兔 IgG 抗体(1:1000 稀释), 湿盒中室温 1 h; PBST 洗涤; DAB 显色; PBST 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; Nikon E80i 显微镜拍照。阴性对照组采用 1×PBS 代替一抗, 孵育方法相同。

1.6 统计分析

蛋白表达数据使用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)检验和 Duncan's 多重比较分析。相对表达量数据均以平均数±标准误(Mean±SE)表示, 当 $P < 0.05$ 时表示差异显著, AIC.AlphaView 成像分析系统(Cell Biosciences Inc)分析蛋白灰度, 并制成柱状图。

2 结果

2.1 PGRMC1 基因的细胞学定位

原位杂交分析 PGRMC1 mRNA 在繁殖相关组织中的细胞学定位见图 1。图 1-A1 显示, 在成熟卵巢组织中, PGRMC1 mRNA 在卵母细胞膜上显著性表达, 图 1-A2 为放大 1000 倍表达结果, 明显看出在卵母细胞膜上的阳性信号。图 1-B1 显示在头肾组织中, PGRMC1 mRNA 的表达在组织外周的显色更显著, 并向内管道式延伸, 图 1-B2 为放大 1000 倍结果, 明显显示 PGRMC1 mRNA 表达部位并向内管道式延伸。图 1-C1 显示肝脏 PGRMC1 mRNA 主要定位在胆小管周围, 图 1-C2 为放大 1000 倍结果。图 1-D1 显示, 在脑组织中, PGRMC1 mRNA 主要定位在外周部位, 图 1-D2 为部分放大区域。图 1-E1 及放大 1000 倍的图 1-E2 显示, PGRMC1 mRNA 在肾小管区域显色信号丰富。图 1-F1 和图 1-F2 显示, 在垂体组织中, PGRMC1 mRNA 阳性信号分布于分散的垂体细胞中。

2.2 PGRMC1 蛋白表达量

半滑舌鳎 PGRMC1 蛋白在不同组织表达水平的结果显示, 在卵巢、脑、垂体、肝脏、头肾和肾脏组织检测到蛋白条带, 分子量约为 21 kDa, 与预测的蛋白分子量 20.64 kDa 相当(图 2-A)。对照组采用多肽抗原进行 Western blotting, 证实了抗体特异性。半滑舌鳎 PGRMC1 蛋白表达量在卵巢、脑、肝脏中相对较高, 在肾脏、垂体、头肾组织中也有表达, 但表达量相对较少(图 2-B)。基于 PGRMC1 蛋白在卵巢、脑和肝脏等组织中的较高水平表达, 说明 PGRMC1 在半滑舌鳎多种组织中参与调节孕激素生理功能。

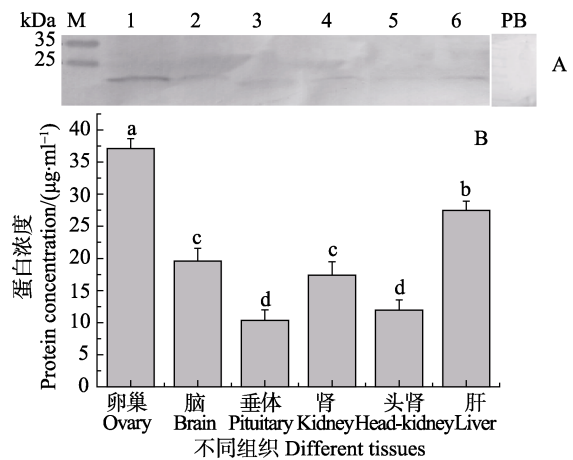


图 2 半滑舌鳎各组织 PGRMC1 蛋白表达量

Fig.2 Expression of PGRMC1 protein in the tissues of *C. semilaevis*

A: PGRMC1 蛋白表达电泳; B: PGRMC1 蛋白表达量量化丰度

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

M: 蛋白分子量标准; PB: 阴性对照

不同字母间差异显著 ($P < 0.05$)

A: Electrophoregram of PGRMC1 protein expression;

B: Protein expression abundance for PGRMC1

1: Ovary; 2: Brain; 3: Pituitary; 4: Kidney; 5: Head-kidney; 6: Liver; M: Protein molecular weight marker; PB: Negative control
Different letters represent significant difference ($P < 0.05$)

2.3 PGRMC1 蛋白的细胞学定位

免疫组化结果表明, 半滑舌鳎 PGRMC1 在卵巢、脑和垂体的细胞学定位与原位杂交实验结果基本一致(图 3)。PGRMC1 在性成熟半滑舌鳎不同组织中的分布强度见表 1。图 3-A1 结果显示, 在性成熟卵巢组织中, PGRMC1 主要在卵母细胞膜上表达丰富, 放大 1000 倍的图 3-A2 可以很明显地看出其在膜附近的表达。图 3-B1 结果显示, 头肾的表达部位主要在外周组织, 放大 1000 倍的图 3-B2 可以很明显地看出其在外周部位的表达。图 3-C1 显示肝脏 PGRMC1 主要定位在肝静脉周围显色, 放大 1000 倍的图 3-C2 可

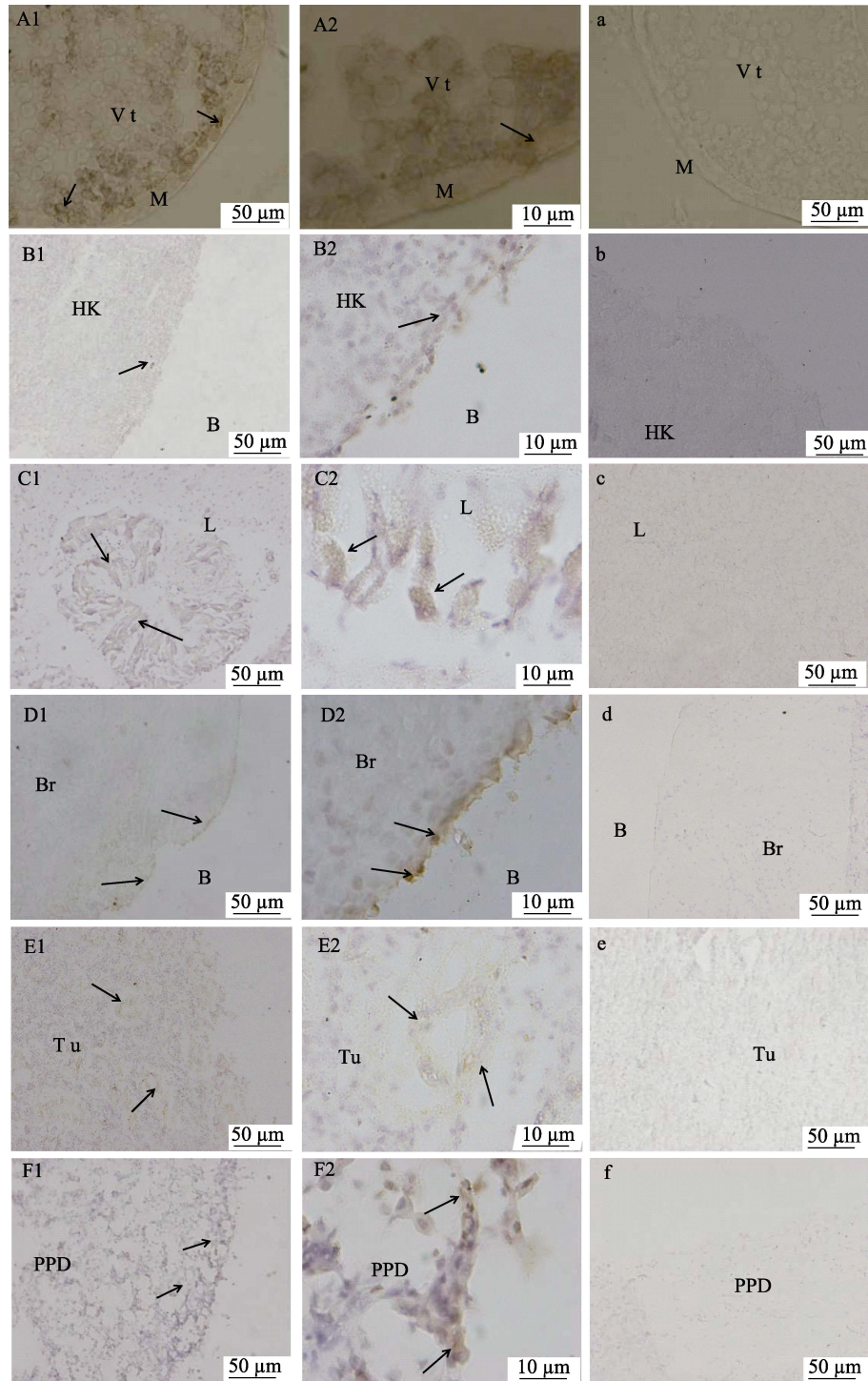


图 3 半滑舌鳎 PGRMC1 蛋白在不同组织中的分布

Fig.3 Location of PGRMC1 protein in different tissues of *C. semilaevis*

A1: 卵巢; B1: 头肾; C1: 肝脏; D1: 脑; E1: 肾; F1: 垂体; A2、B2、C2、D2、E2 和 F2: 卵巢、头肾、肝脏、脑、肾和垂体放大 1000 倍; a、b、c、d、e 和 f: 卵巢、头肾、肝脏、脑、肾和垂体的阴性对照组
 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

A1: Ovary; B1: Head-kidney; C1: Liver; D1: Brain; E1: Kidney; F1: Pituitary; A2, B2, C2, D2, E2 and F2: Ovary, head-kidney, liver, brain, kidney, and pituitary ($\times 1000$); a, b, c, d, e, and f: Negative control 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

表 1 PGRMC1 在性成熟半滑舌鲷组织中的分布强度
Tab.1 Intensity distribution of PGRMC1 in different tissues of *C. semilaevis*

组织 Tissues	强阳性反应 Strong immunopositive reaction	中等阳性反应 Medium positive reaction
卵巢 Ovary	细胞膜 Cell membrane +++	细胞质 Cytoplasm ++
头肾 Head-kidney	头肾细胞 Head-kidney cells +++	
肝脏 Liver	肝静脉周围 Hepatic vein +++	
脑 Brain	神经元 Neuron +++	
肾 Kidney	肾小管附近 Renal tubule +++	
垂体 Pituitary	垂体细胞 Pituitary cell +++	

以看出 PGRMC1 在肝静脉管腔内外部位表达。在显示脑组织的图 3-D1 中, PGRMC1 主要定位在脑组织的神经元, 图 3-D2 为放大 1000 倍表达结果。图 3-E1 显示, 在肾脏组织中, PGRMC1 主要在外周组织和肾小管区域中表达, 右图 3-E2 为放大 1000 倍结果, 很明显地看出其在外周部位以及肾小管的管腔内外表达。图 3-F1 和图 3-F2 显示, 在垂体组织, PGRMC1 主要分布在垂体中分散的细胞。

3 讨论

PGRMC1 在大鼠和人颗粒/黄体细胞胆固醇代谢和性类固醇生物合成(Hughes *et al.*, 2007; Suchanek *et al.*, 2005), 介导孕激素在卵巢细胞中的抗凋亡和正向调控具有催化活性的芳香化酶家族基因(Mansouri *et al.*, 2008), 诱导哺乳动物卵母细胞成熟(Peluso *et al.*, 2008)和精子顶体反应(Bryan *et al.*, 2015)等方面有重要的调控作用。前期研究已克隆得到半滑舌鲷 PGRMC1 基因全长序列, 并对 PGRMC1 mRNA 在性成熟雌性半滑舌鲷不同组织的表达特征进行了分析, 发现半滑舌鲷 PGRMC1 mRNA 组织表达广泛, 其中卵巢组织中相对表达量最高(张金勇等, 2016)。

本研究通过 Western blotting 检测 PGRMC1 蛋白在半滑舌鲷不同组织的表达水平, 显示 PGRMC1 蛋白在卵巢、脑、肝脏中表达量相对较高, 而在垂体、肾和头肾组织中也有一定的表达。免疫组化和 RNA 原位杂交实验结果显示, PGRMC1 蛋白和 mRNA 阳性信号在性成熟卵巢的卵母细胞膜上、脑内部分神经元区域和垂体内分散的细胞上有明显分布。这进一步揭示 PGRMC1 在性成熟雌性半滑舌鲷不同组织的表达特征, 即 PGRMC1 较丰富地表达于卵巢、脑和肝脏, 说明 PGRMC1 在半滑舌鲷繁殖轴和肝脏组织介导孕激素参与繁殖内分泌调控。原位杂交检测斑节对虾(*Penaeus monodon*)卵巢组织中 PGRMC1 mRNA 的杂交信号, 发现在卵巢卵黄形成早期和卵黄形成期都

有杂交信号, 并且在卵黄形成期, 卵巢比卵黄形成早期卵巢的杂交信号明显; 免疫组化显示, PGRMC1 蛋白阳性信号也存在于卵泡层和滤泡细胞细胞膜(Preechaphol *et al.*, 2010); 这些研究表明, PGRMC1 在斑节对虾卵母细胞成熟过程中起着重要的调控作用。Mourot 等(2006)采用原位杂交方法检测到未性成熟的虹鳟鱼卵巢组织 PGRMC1 mRNA 的杂交信号; 在牛(Bovine)的卵母细胞, qRT-PCR 研究发现, PGRMC1 mRNA 表达丰富(Dode *et al.*, 2006); 前期的研究表明, 在半滑舌鲷繁殖周期, 卵巢中 PGRMC1 mRNA 表达水平从卵巢发育 II-V 期稳步上升, V 期时达到最高值, VI 期时下降显著且表达水平最低($P < 0.05$)(张金勇等, 2016)。当前的研究发现, 半滑舌鲷 PGRMC1 基因和蛋白定位在成熟卵母细胞膜上, 预示 PGRMC1 在细胞膜上介导内分泌调控卵母细胞的成熟过程。另外, Western blotting 分析 PGRMC1 分布在牛的生发泡和 M II 期卵母细胞, 参与合子原核的形成; 在胚胎发育过程中, 囊胚期 PGRMC1 的表达丰富(Luciano *et al.*, 2010); 在哺乳动物中, PGRMC1 参与调控胚胎发育, 但在低等脊椎动物——鱼类中 PGRMC1 的调控机制未见报道。在本研究中, PGRMC1 在具有受精能力的卵母细胞的细胞膜上表达丰富, 呈现母源基因的表达特征, 由此推测, PGRMC1 在半滑舌鲷胚胎发育过程中也可能具有重要的生理功能。

半滑舌鲷 PGRMC1 蛋白和 mRNA 定位在其肝脏组织的胆小管和肝静脉区域, 可能因为胆小管和肝静脉的管腔中分布着很多的微绒毛, 其上的细胞膜丰富, 因此, PGRMC1 有明显的杂交信号。半滑舌鲷 PGRMC1 在肝脏胆小管和肝静脉等与外界联系的管腔周围内细胞有明显的阳性信号, 这与已有的鼠 PGRMC1 的研究结果相一致(Nölte *et al.*, 2000)。

本研究探明了 PGRMC1 蛋白和 mRNA 在繁殖相关组织的细胞学定位特征, 但关于 PGRMC1 的具体生理功能作用途径及机制尚不明了, 如何解析这些问

题需今后更深入的研究。

参 考 文 献

- Bryan MB, Chung-Davidson YW, Ren JF, *et al.* Evidence that progestins play an important role in spermiation and pheromone production in male sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 212: 17–27
- Dode MAN, Dufort I, Massicotte L, *et al.* Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 2006, 73(3): 288–297
- Hughes AL, Powell DW, Bard M, *et al.* Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes. *Cell Metabolism*, 2007, 5(2): 143–149
- Liu L, Wang J, Zhao L, *et al.* Progesterone increases rat neural progenitor cell cycle gene expression and proliferation via extracellularly regulated kinase and progesterone receptor membrane components 1 and 2. *Endocrinology*, 2009, 150(7): 3186–3196
- Lodde V, Peluso JJ. A novel role for progesterone and progesterone receptor membrane component 1 in regulating spindle microtubule stability during rat and human ovarian cell mitosis. *Biology of Reproduction*, 2011, 84(4): 715–722
- Lösel RM, Besong D, Peluso JJ, *et al.* Progesterone receptor membrane component 1—Many tasks for a versatile protein. *Steroids*, 2008, 73(9–10): 929–934
- Luciano AM, Lodde V, Franciosi F, *et al.* Progesterone receptor membrane component 1 expression and putative function in bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development. *Reproduction*, 2010, 140(5): 663–672
- Mansouri MR, Schuster J, Badhai J, *et al.* Alterations in the expression, structure and function of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) in premature ovarian failure. *Human Molecular Genetics*, 2008, 17(23): 3776–3783
- Mourot B, Nguyen T, Fostier A, *et al.* Two unrelated putative membrane bound progestin receptors, progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1) 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
- Nölte I, Jeckel D, Wieland FT, *et al.* Localization and topology of ratp28, a member of a novel family of putative steroid-binding proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2000, 1543(1): 123–130
- Peluso JJ, Lodde V, Liu X. Progesterone regulation of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) sumoylation and transcriptional activity in spontaneously immortalized granulosa cells. *Endocrinology*, 2012, 153(8): 3929–3939
- Peluso JJ, Romak J, Liu X. Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) is the mediator of progesterone's antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells as revealed by PGRMC1 small interfering ribonucleic acid treatment and functional analysis of PGRMC1 mutations. *Endocrinology*, 2008, 149(2): 534–543
- Preechaphol R, Klinbunga S, Yamano K, *et al.* Molecular cloning and expression of progesterin membrane receptor component 1(PGRMC1) of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 168(3): 440–449
- Suchanek M, Radzikowska A, Thiele C. Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nature Methods*, 2005, 2(4): 261–267
- Zhang JY, Liu XZ, Shi B, *et al.* Molecular cloning, tissue and spatio-temporal expression pattern of PGRMC1 in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 1080–1090 [张金勇, 柳学周, 史宝, 等. 半滑舌鳎孕酮受体膜组分 1 基因的克隆及组织和时空表达规律. *中国水产科学*, 2016, 23(5): 1080–1090]
- Zhang Y, Ruan XY, Tian XX, *et al.* Progress in research on possible role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in the mechanism of breast cancer development. *Journal of Capital Medical University*, 2013, 34(4): 496–500 [张颖, 阮祥燕, 田玄玄, 等. 孕激素受体膜组分 1 (PGRMC1)在乳腺癌发生风险方面的研究进展. *首都医科大学学报*, 2013, 34(4): 496–500]

(编辑 冯小花)

Quantitative and Qualitative Expression Analysis of the Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1) in the Tissues of Female Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

ZHANG Jinyong^{1,3}, SHI Bao^{1,2}, LIU Xuezhou^{1,2,3}①, XU Yongjiang^{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. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Dalian Ocean University, Dalian 116023)

Abstract Progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) may play an important role in oocyte maturation of the female half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). To better understand the underlying mechanisms, here we measured the mRNA expression of PGRMC1 in different tissues with *in situ* RNA hybridization and immunohistochemistry, and analyzed the protein expression with western blotting. According to the results of *in situ* RNA hybridization, the mRNA of PGRMC1 was detected in the membrane of oocytes, in scattered cells of the entire pituitary, and in the neurons of the brain. Immunohistochemistry showed strong signals of PGRMC1 in the oocyte membrane of the mature ovary, and signals were also observed in the liver, kidney, and head kidney of *C. semilaevis*. In the liver, PGRMC1 was mainly expressed in the bile duct and hepatic veins that were connected to the outer tissue. In the kidney, the PGRMC1 was expressed in the vicinity of the renal tubules. The results above demonstrated that PGRMC1 was a membrane receptor that functioned on the cell membrane. We also analyzed the protein sequence of PGRMC1, selected epitope of the sequence, and synthesized the corresponding immune polypeptide. We obtained the polyclonal antibody of PGRMC1 by immunizing New Zealand rabbit with the recombinant protein. The antibody was applied to measure the expression level of PGRMC1. Western blotting results showed that the expression of PGRMC1 protein was higher in the ovary, liver, and brain, and was relatively low in the kidney, head kidney, and pituitary. Our results may provide valuable information on the physiological function of PGRMC1 in the oocyte maturation and reproductive endocrinal regulation of *C. semilaevis*

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Oocyte maturation; PGRMC1; Expression analysis

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