

促性腺激素调控半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) 卵母细胞孕酮受体膜组分 1 的表达特征*

张金勇^{1,3} 柳学周^{1,2,3} 史宝^{1,2} 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 采用 qRT-PCR 方法分析性成熟半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)不同发育时期卵巢卵母细胞的孕酮受体膜组分 1 (PGRMC1) mRNA 的表达, 研究发现, 在发育 IV 期的卵巢, 处于第 IV 时相的卵母细胞 PGRMC1 mRNA 表达量最高($P < 0.05$); 在发育 V 期的卵巢, 成熟期卵母细胞的 PGRMC1 mRNA 表达量最高($P < 0.05$)。采用不同浓度促性腺激素(HCG)处理卵巢发育 V 期半滑舌鲷不同时相的卵母细胞, 并通过 qRT-PCR 和 Western blotting 技术对其表达量变化进行检测。结果显示, 20 IU/ml HCG 对 PGRMC1 mRNA 和蛋白表达的调控作用比 10 IU/ml HCG 作用更明显, 表明 PGRMC1 mRNA 和蛋白表达对 HCG 调控作用存在剂量依存关系。HCG 对半滑舌鲷不同时相的卵母细胞的调控作用效果不同, 对第 V 时相卵母细胞作用最明显($P < 0.05$), 表明 PGRMC1 主要在卵母细胞成熟阶段发挥作用。PGRMC1 对 HCG 调控作用的正向应答效应预示其参与了卵母细胞成熟调控, 为进一步探讨 PGRMC1 在半滑舌鲷繁殖过程的功能提供重要基础资料。

关键词 半滑舌鲷; 孕酮受体膜组分 1 (PGRMC1) 基因; 卵母细胞; HCG 调控; 表达分析
中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0042-06

孕酮受体膜组分 1 (Progesterone receptor membrane component 1, PGRMC1) 是单次跨膜蛋白, 属于膜相关孕激素受体 (Membrane-associated progesterone receptor, MAPR) 家族。Meyer 等 (1996) 从猪肝实质细胞微粒体膜中提取并纯化了与孕激素高亲和力的 PGRMC1 蛋白。已有研究证明, PGRMC1 作为接头蛋白, 与配体分子共同参与调节与它结合的蛋白之间的相互作用和跨膜转运; 与孕激素结合, 介导调控孕激素信号通路 (Cahill, 2007; Lösel et al, 2008)。PGRMC1 mRNA 表达和定位在牛 (*Bovine*) (Dode et al, 2006)、大鼠 (*Rattus norvegicus*) (Peluso et al, 2006) 和人 (*Homo*

sapiens) 的卵母细胞 (Wood et al, 2007), 参与调控雌性配子发育和抑制卵母细胞凋亡。PGRMC1 在人和鼠等哺乳动物成熟过程中具有重要的调控作用 (Peluso et al, 2008)。

膜相关孕激素受体家族基因在鱼类中的相关研究并不多, 国外报道的有云纹犬牙石首鱼 (*Cynoscion nebulosus*) (Patiño et al, 1990)、条纹狼鲈 (*Morone saxatilis*) (King et al, 1997)、金鱼 (*Carassius auratus*) (Tokumoto et al, 2012)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) (Kazeto et al, 2005) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (Yoshikuni et al, 1993) 等研究, 国内已报道的有半滑

* 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 the National Natural Science Foundation of China (31201982), China Agriculture Research System (CARS-50), and Shandong Youth Scientist Awards Foundation (BS2013SW042)] 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: 2016-08-05, 收修改稿日期: 2016-08-23

舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)的膜孕激素受体 mPR α (史宝等, 2013)和新型膜孕激素受体 mPRL(柳学周等, 2015), 条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)膜孕激素受体 mPR α (Shi *et al*, 2015)等; 该家族基因在鱼类生殖调控过程中具有重要的调控作用, 介导孕激素诱导卵母细胞成熟。尽管该家族中的 PGRMC1 研究的历史较长, 但关于其在鱼类卵母细胞发育成熟过程中的作用机制尚未明确, 仅见 PGRMC1 参与调控卵母细胞同步成熟、排卵的虹鳟卵巢发育的报道(Mourot *et al*, 2006)。

本实验室前期研究表明, PGRMC1 mRNA 在半滑舌鲷性成熟期时, 在与繁殖相关的脑、垂体和卵巢组织中表达丰富, 说明半滑舌鲷 PGRMC1 参与了卵母细胞的发育、成熟过程(张金勇等, 2016)。为了进一步了解半滑舌鲷下丘脑-垂体-性腺轴(HPG 轴)中 PGRMC1 对卵子发育成熟的作用机制, 本研究采用 qRT-PCR 和 Western blotting 技术分析体外培养条件下不同卵巢发育时期和不同发育时相的卵母细胞 PGRMC1 的表达特征, 为阐明 PGRMC1 参与调控半滑舌鲷卵母细胞成熟提供重要资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用半滑舌鲷取自山东烟台海阳市黄海水产有限公司, 挑取人工培育达到性成熟的 3 龄雌性亲鱼 21 尾, 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 \times 5 m \times 1 m)全年开放流水培育, 水温为 10–25 $^{\circ}$ C, 盐度为 27–31, pH 为 7.8–8.4, 溶解氧为 5 mg/L 以上, 饲喂人工配合饲料。取样时, 使用质量浓度为 210 mg/L 的 MS-222 将亲鱼麻醉后解剖, 为了获得不同发育时相的卵母细胞, 选择性腺发育至 IV 期和 V 期的卵巢, 从卵巢中分离出不同发育时相的、未受损的卵母细胞(李晓晓, 2013)¹⁾, 用于体外培养, 分析不同时相卵母细胞 PGRMC1 的表达。

1.2 卵母细胞体外孵育

24 孔细胞培养板的每个孔放入 pH=7.6 的 1 ml DMEM 培养液(SIGMA)。剥离的卵母细胞样品用于促性腺激素(HCG)调控实验, 同时设置对照组。每孔放入 30 个卵母细胞, HCG 孵育浓度分别为 0、10 IU/ml

和 20 IU/ml, 共 3 个浓度组, 使用振荡培养箱 BSD-250(上海博迅)孵育卵母细胞, 24 $^{\circ}$ C 培养 6 h, 每 30 min 检查孵育情况, 观察卵母细胞发育进程。卵母细胞体外培养结束后, 分别将实验用卵母细胞在液氮速冻并转至–80 $^{\circ}$ C 冰箱存放, 用于 mRNA 和蛋白表达分析。

1.3 PGRMC1 的 qRT-PCR 检测

采用 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 抽提总 RNA 后, 按照 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA 第一链, 用于基因表达分析。半滑舌鲷 PGRMC1 基因的实时定量引物参照 SYBR Premix Ex TaqTM II (TaKaRa)引物设计原则, 设计引物 RT-PGRMC1 F1(5'-GCTGAGTGG-GAGGCTCAGTT-3')和 RT-PGRMC1 R1(5'-TGTCC-TTTGCTTCCTCATCGT-3'), 以 18S rRNA 为内参基因, 引物分别为 18S F(5'-GGTCTGTGATGCCCTTAG ATGTC-3')和 18S R(5'-AGTGGGGTTCAGCGGGTT-AC-3')。使用 Mastercycler ep *realplex* Real-time PCR 仪(Eppendorf)和 SYBR Premix Ex TaqTM II (TaKaRa)荧光试剂, PCR 反应体系为 20 μ l; 上下游引物各 0.8 μ l, cDNA 模版 1 μ l, SYBR Premix Ex TaqTM II 10 μ l, 补充 ddH₂O 至 20 μ l。采用两步法, PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 54.4 $^{\circ}$ C 20 s, 40 个循环。以 18S 作为内参基因来校正样品中 RNA 的量。程序运行完成后进行熔解曲线分析, 检验产物的特异性。实验样品设 3 个平行, 实验重复 3 次, 同时设阴性对照(模板以 ddH₂O 代替), 用以确认实验结果的可靠性。

1.4 PGRMC1 的 Western blotting 分析

使用动物组织蛋白提取试剂提取已收集的卵母细胞总蛋白, 取冻存在无酶 EP 管中的卵母细胞, 加入 0.5 ml 动物组织细胞裂解液, 使用无酶研磨棒充分匀浆, 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。

将 40 μ g 总蛋白质进行 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 60 V 1 h, 然后 90 V 1.5 h。将分子量标准和凝胶上的蛋白电转移到 PVDF 膜上。1 \times PBST 洗涤 PVDF 膜 2 次(每次 5 min), 5%脱脂奶粉溶液室温封闭(1 \times PBST 稀释)1 h。洗涤, 加入由免疫新西兰大白兔

1) 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]

制备的一抗与 5% BSA, 室温摇床 2 h, 一抗稀释 1:1500。二抗(联科生物公司)室温摇床 2 h, 稀释度为 1:2000。TBST 洗膜 2 次(每次 10 min), TBS 洗膜 1 次, 5 min。经二氨基联苯胺(DAB)显色, Nikon E80i 显微镜拍照, 蛋白灰度分析。

1.5 数据统计分析

利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法(Livak *et al*, 2001)处理 *PGRMC1* 基因的相对表达量数据。基因和蛋白表达数据使用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), Tukey's HSD 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, $P<0.05$ 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 卵子形成过程中 *PGRMC1* 的时序表达

采用 qRT-PCR 方法检测了半滑舌鲷不同发育期的卵巢中不同发育时相卵母细胞的 *PGRMC1* mRNA 的相对表达量(图 1)。结果显示, 在性腺发育为 IV 期和 V 期的卵巢中, 不同发育时相卵母细胞的 *PGRMC1* mRNA 的相对表达量随着卵母细胞的发育逐渐增高, 以 V 时相卵母细胞时达到峰值, VI 时相时又降为较低水平($P<0.05$)。同时, 比较 IV 期和 V 期卵巢中的 V 时相卵母细胞的 *PGRMC1* mRNA 表达量可看出, 以进入成熟期的 V 期卵巢中的 V 时相卵母细胞的 *PGRMC1* mRNA 表达量最高($P<0.05$), 表明此时的卵母细胞进

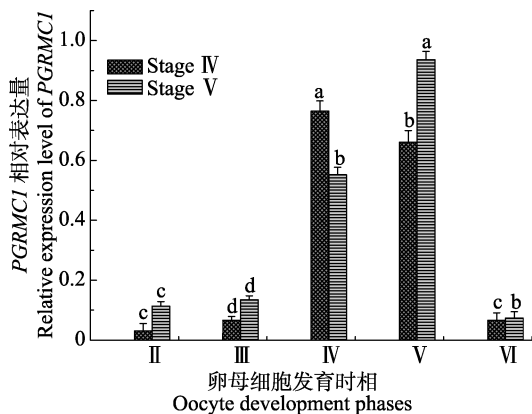


图 1 半滑舌鲷卵巢 IV 和 V 期中卵母细胞不同发育时相 *PGRMC1* mRNA 的表达水平

Fig.1 The relative expression levels of *PGRMC1* mRNA at different oocyte phases in different development stages of *C. semilaervis*

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

入成熟期, 此阶段 *PGRMC1* 基因的生理学作用效果最明显, 预示 *PGRMC1* 基因在卵母细胞成熟过程中起着重要的调控作用。

2.2 HCG 对不同发育时相卵母细胞 *PGRMC1* 表达的调控作用

使用 HCG 孵育半滑舌鲷 V 期卵巢中不同发育时相的卵母细胞 6 h 后, 采用 qRT-PCR 方法检测其 *PGRMC1* 基因的表达变化。由图 2 得知, 10 IU/ml 和 20 IU/ml 剂量的 HCG 对半滑舌鲷卵母细胞中 *PGRMC1* 基因表达都有一定的促进作用, 均高于对照组; 不同发育时相卵母细胞的 *PGRMC1* mRNA 的相对表达量随着卵母细胞的发育逐渐增高, 第 V 时相卵母细胞时达到峰值, 第 VI 时相时又降为较低水平($P<0.05$); 特别是对即将进入成熟阶段卵母细胞中 *PGRMC1* 基因的表达量提升明显($P<0.05$), 表明 HCG 通过 *PGRMC1* 提升了卵母细胞的减数分裂成熟能力。研究结果预示, *PGRMC1* 和卵母细胞成熟存在密切关系。此外, 20 IU/ml 剂量的 HCG 对 *PGRMC1* 基因表达的调控作用比剂量为 10 IU/ml HCG 作用更明显, 表明 *PGRMC1* 基因表达受 HCG 调控作用存在剂量依存关系。

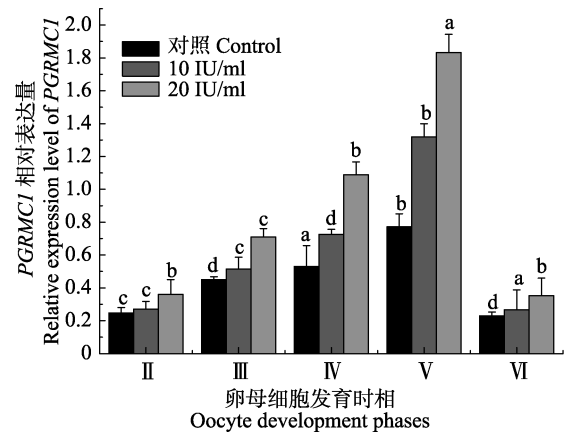


图 2 半滑舌鲷不同发育时相卵母细胞在不同浓度 HCG 调控下 *PGRMC1* mRNA 的表达水平
Fig.2 Effects of HCG at different concentrations on *PGRMC1* mRNA expression in different oocyte phases of *C. semilaervis*

采用 Western blotting 方法检测了半滑舌鲷 *PGRMC1* 蛋白的表达情况(图 3), 结果显示, 检测到清晰蛋白条带, 分子量大约为 21 kDa, 与预测的蛋白分子量 20.64 kDa 相当(图 3-A)(张金勇等, 2017, 待发表)。终浓度为 10 IU/ml 和 20 IU/ml HCG 处理组对各发育时相卵母细胞 *PGRMC1* 蛋白表达的促进作用明显, 均高于对照组; 不同发育时相卵母细胞的 *PGRMC1* 蛋白表达量随卵母细胞发育逐渐增高, 第 V 时相卵母细胞时达到

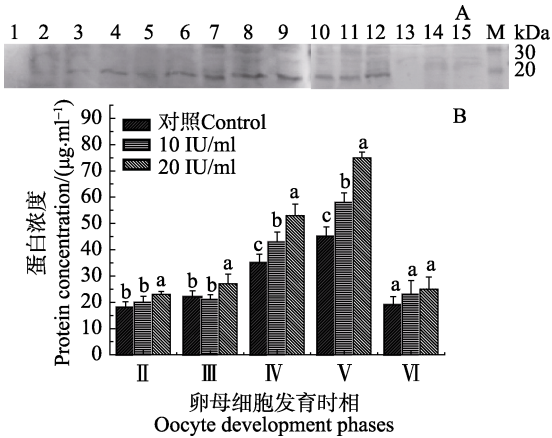


图 3 不同浓度 HCG 对半滑舌鳎不同时期卵母细胞 PGRMC1 蛋白表达量的影响

Fig.3 Effects of HCG at different concentrations on PGRMC1 protein expression in different oocyte phases of *C. semilaevis*

A: PGRMC1 蛋白表达量电泳;

B: PGRMC1 蛋白表达量量化丰度

A 图中的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 和 13、14、15 各条带组分别对应 B 图中 II 时相、III 时相、IV 时相、V 时相、VI 时相的卵母细胞; M 为蛋白分子量标准

A: Electrophoretogram of PGRMC1 protein expression;
B: Quantitative abundance of PGRMC1 protein expression
Digit 1, 2, and 3; 4, 5, and 6; 7, 8, and 9; 10, 11, and 12; 13, 14, and 15 in figure A corresponded to II, III, IV, V, VI groups in figure B, respectively; M: Protein molecular weight marker

峰值, 第 VI 时相时又降为较低水平 ($P < 0.05$), 且 PGRMC1 蛋白表达与 HCG 调控作用存在剂量依存关系。结果显示, HCG 在调控卵母细胞成熟过程中, PGRMC1 蛋白表达规律与 PGRMC1 基因的表达规律相似。

3 讨论

膜孕激素受体家族包括孕激素膜受体(mPRs)和孕酮受体膜组分(PGRMCs)两类受体, 其中, 膜孕激素受体有 3 个亚型, 即 mPR α 、mPR β 和 mPR γ ; 孕酮受体膜组分有 2 种亚型, 即 PGRMC1 和 PGRMC2。本实验室前期研究已克隆得到半滑舌鳎 PGRMC1 基因全长序列, 分析了 PGRMC1 mRNA 在性成熟雌性半滑舌鳎卵巢不同发育时期的表达特征, 发现在卵巢中 PGRMC1 mRNA 表达水平随卵巢发育逐步上升, V 期时达到最高值 ($P < 0.05$) (张金勇等, 2016)。Preechaphol 等 (2010) 报道, 眼柄摘除的斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的不同发育阶段的卵巢中 PGRMC1 mRNA 的表达均高于对照组, 说明 PGRMC1 参与斑节对虾的卵母细胞发育成熟的调控。尽管半滑舌鳎和斑节对

虾处于不同进化地位, 但半滑舌鳎和斑节对虾 PGRMC1 mRNA 在卵巢组织表达规律和生理作用上表现出相似性, 这表明适当形式的孕激素有可能通过 PGRMC1 诱发卵母细胞发育和成熟。本研究中, 半滑舌鳎卵巢发育至 IV 期时, PGRMC1 mRNA 在第 IV 时相的卵母细胞中表达量最高; 在卵巢发育至 V 期时, PGRMC1 mRNA 表达的最高值出现在第 V 时相的卵母细胞中。由此看来, PGRMC1 对半滑舌鳎卵母细胞发育、成熟起重要的调控作用, 卵母细胞的最终成熟以及排卵等过程的完成可能需要大量 PGMRC1 的参与。

鱼类卵母细胞成熟是一个由多因子调控的复杂生理过程, 卵母细胞减数分裂起始于胚胎期, 最后发育成为可受精的卵细胞(邓晓惠, 2004)。采用 HCG 分别孵育金鱼和大西洋绒须石首鱼 (*Micropogonias undulatus*) 的卵母细胞, mPR α 蛋白水平升高; 上调的卵母细胞 mPR α 蛋白水平与卵母细胞成熟相关(Zhu *et al*, 2003; Tokumoto *et al*, 2006)。PGRMC1 和 mPR α 同为膜孕激素受体家族成员, 它们在不同鱼类类似的表达模式预示着在卵巢发育成熟过程中很可能都具有重要的生理功能。本研究通过不同浓度 HCG 处理半滑舌鳎卵巢成熟期的不同时期相的卵母细胞, 发现半滑舌鳎卵母细胞 PGRMC1 蛋白和 mRNA 对 HCG 的调控正向应答; PGRMC1 蛋白和 mRNA 表达量的提高, 可能增强了半滑舌鳎卵母细胞对孕激素的应答能力, 提高了卵母细胞减数分裂成熟能力。柳学周等(2015、2014)发现, 雌性半滑舌鳎血清中促黄体激素(LH)和孕激素的浓度在卵巢成熟过程中逐渐升高, 并在 V 期卵巢达到最高值; 这两种激素变化规律与当前研究中 PGRMC1 蛋白和 mRNA 在卵母细胞表达变化趋势相吻合, 表明半滑舌鳎脑垂体分泌的 LH 作用于 HPG 轴, 促使卵巢分泌孕激素, PGRMC1 介导孕激素诱导卵母细胞成熟。半滑舌鳎为卵巢发育非同步、分批产卵的鲆鲽类, 本研究中 PGRMC1 蛋白和 mRNA 在不同时期相卵母细胞中均检测到表达, 这也说明 PGRMC1 可以介导孕激素维持卵母细胞发育和抗凋亡, 这与人类 PGRMC1 具有抑制卵巢早衰的生理功能相一致(Mansouri *et al*, 2008)。

本研究探明了卵母细胞成熟过程中 PGRMC1 mRNA 的时序表达特征, 解析了促性腺激素调控不同发育时期相卵母细胞 PGRMC1 蛋白和 mRNA 的表达规律, 但关于 PGRMC1 参与信号传导通路以及 PGRMC1 真核表达产物及其促进卵母细胞成熟作用的更深入机

制尚不明了, 这些问题需今后更深入的探索。

参 考 文 献

- Cahill MA. Progesterone receptor membrane component 1: An integrative review. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 105(1–5): 16–36
- Deng XH. Technology and color atlas of reproductive medical science. Jinan: Shandong Science and Technology Press, 2004, 93–94 [邓晓惠. 生殖医学技术及彩色图谱. 济南: 山东科学技术出版社, 2004, 93–94]
- 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
- 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*, 2005, 34(3): 781–791
- King W 5th, Ghosh S, Thomas P, *et al.* A receptor for the oocyte maturation-inducing hormone 17 α , 20 β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one on ovarian membranes of striped bass. *Biology of Reproduction*, 1997, 56(1): 266–271
- 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. 半滑舌鲷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, Shi B, Wang SS, *et al.* Full length cDNA cloning and expression of luteinizing hormone (LH) and which serum concentration was measured in half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Engineering Science*, 2014, 16(9): 50–60 [柳学周, 史宝, 王珊珊, 等. 半滑舌鲷促黄体激素基因克隆和表达分析及其血清浓度测定. *中国工程科学*, 2014, 16(9): 50–60]
- 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
- 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
- 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
- Meyer C, Schmid R, Scriba PC, *et al.* Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 239(3): 726–731
- Mourot B, Nguyen T, Fostier A, *et al.* Two unrelated putative membrane bound progesterone receptors, progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1) and membrane progesterone 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
- Patiño R, Thomas P. Characterization of membrane receptor activity for 17 alpha, 20 beta, 21-trihydroxy-4-pregnen- 3-one in ovaries of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *General and Comparative Endocrinology*, 1990, 78(2): 204–217
- Peluso JJ, Pappalardo A, Losel R, *et al.* Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action. *Endocrinology*, 2006, 147(6): 3133–3140
- 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 progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1) of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 168(3): 440–449
- 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. 半滑舌鲷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]
- Shi B, Liu XZ, Xu YJ, *et al.* Molecular and transcriptional characterization of GTHs and mPR α during ovarian maturation in rock bream *Oplegnathus fasciatus*. *Journal of Experimental Zoology, Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 2015, 323(4): 430–444
- Tokumoto T. Identification of membrane progesterone receptors (mPR) in goldfish oocytes as a key mediator of steroid non-genomic action. *Steroids*, 2012, 77(10): 1013–1016
- Tokumoto M, Nagahama Y, Thomas P, *et al.* Cloning and identification of a membrane progesterone receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 145(1): 101–108
- Wood JR, Dumesic DA, Abbott DH, *et al.* Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2007, 92(2): 705–713
- Yoshikuni M, Shibata N, Nagahama Y. Specific binding of [³H] 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one to oocyte cortices of

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 1993, 11(1–6): 15–24

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]

Zhu Y, Rice CD, Pang Y, *et al.* Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an 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)

HCG Regulation of PGRMC1 Expression in the Oocyte of Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

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

Abstract In this study we investigated the characteristics and mechanisms of the expression of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) during oocyte maturation of the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Expression of *PGRMC1* mRNA in the oogenesis of the ovarian development stages IV and V were monitored with qRT-PCR technique. The results showed that the highest level of *PGRMC1* mRNA appeared in Phase V oocytes of the mature *C. semilaevis*. In general, the transcription of *PGRMC1* peaked in different developmental phases of oocyte. This suggested that PGRMC1 participated in ovarian development and maturation of *C. semilaevis*. Next we tested whether HCG treatment affected PGRMC1 expression in different stages of oogenesis using qRT-PCR and western blotting analysis. It was shown that HCG could up-regulate the expression of PGRMC1 mRNA and protein, and that 20 IU/ml HCG was more powerful than 10 IU/ml ($P < 0.05$). The effect of HCG varied in different phases of oocyte and was the most obvious in Phase V, indicating that PGRMC1 played an important role in the mature stage. The results above suggested that PGRMC1 could regulate the maturation of *C. semilaevis* oocytes. Our findings may shed light on future exploration of the role of PGRMC1 in the reproductive function of *C. semilaevis*.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; PGRMC1 gene; Oocyte maturation; HCG regulation; Expression analysis

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