

文章编号: 1004 - 7271(2005)04 - 0359 - 05

甲状腺激素受体 TR α A 基因在牙鲆不同变态发育阶段中的表达差异

施志仪, 刘 华

(上海水产大学生物技术研究中心, 上海 200090)

摘 要:为了探讨甲状腺激素受体 TR α A 基因在牙鲆不同变态发育阶段中的表达差异,以及甲状腺激素 T₄ 和硫脲处理对 TR α A 基因表达的影响,采用了半定量 RT-PCR 法测定牙鲆不同发育阶段头部甲状腺激素受体 TR α A mRNA 水平。结果显示,牙鲆不同变态发育阶段甲状腺激素受体 TR α A 基因表达存在明显差异,从受精卵到变态期 TR α A 表达量呈缓慢增加趋势,到 24 日龄出现第一个表达高峰,随后表达量下降,30 日龄之后随日龄增加表达量又逐渐增加,至变态高峰期 38 日龄出现第二个表达高峰,而且高于第一个表达高峰,至成鱼表达量再次下降至较低水平。甲状腺激素 T₄ 处理组和硫脲处理组与同日龄正常组相比,TR α A 的表达也有明显差异,在甲状腺激素 T₄ 处理组中 TR α A 表达降低,而在硫脲处理组中 TR α A 表达反而增高。甲状腺激素 T₄ 对变态期牙鲆 TR α A 基因转录可能有下降调节作用。

关键词:牙鲆;变态;甲状腺激素受体;基因表达

中图分类号:S 917 **文献标识码:**A

Differential expression of thyroid hormone receptor alpha A gene in metamorphosis of *Paralichthys olivaceus*

SHI Zhi-yi, LIU Hua

(Research Center of Biotechnology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: In order to study the expression of thyroid hormone receptor alphaA (TR α A) gene and the treating effects of thyroxine (T₄) and thiourea (TU) on the expression of TR α A gene during metamorphosis in *Paralichthys olivaceus*, semi-quantification RT-PCR of TR α A mRNA was performed. The result shows that it was a significant difference of the mRNA expression at different development stages of *Paralichthys olivaceus*. The mRNA expression of TR α A showed a tendency to increase slowly from fertilized eggs to 45 day during premetamorphosis, reaching the first peak at 24 day, reaching the second peak at the end of climax 38 day which was higher than the first peak. Thereafter the expression decreased again in adult. There was also a significant difference of the mRNA expression among control group, T₄ group and TU group. TR α A mRNA level in T₄ group was significantly lower than the age-matched control; The mRNA level in TU group was higher in comparison with the age-matched control. Thyroid hormone T₄ may down-regulate TR α A gene mRNA expression during metamorphosis in *Paralichthys olivaceus*.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; metamorphosis; thyroid hormone receptor; gene expression

收稿日期: 2005-07-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30271017)和高等教育博士项目科研基金(No. 20040264001)

作者简介: 施志仪(1954-), 男, 上海市人, 博士, 教授, 主要从事海洋生物技术和海洋药物研究。E-mail: zysy@shfu.edu.cn

自从1985年日本学者 Inui 等^[1]发现外源的 T_4 能促进牙鲆变态,而硫脲(抑制甲状腺激素的合成)使变态停滞以来,国内外许多学者围绕甲状腺激素在牙鲆变态中的作用展开了大量的研究^[2-4],许多证据证明大多数甲状腺激素产生的生物影响是通过甲状腺激素受体介导的^[2,5]。不少文献表明甲状腺激素诱导牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)变态是通过与其核受体(TRs)结合调控特异基因转录的结果^[6-8]。甲状腺激素进入细胞核后与受体结合,激活受体,从而正向或反向调节特定基因的表达^[9,10]。在牙鲆变态中 TR α A 基因在形态结构和生理功能变化最明显的骨骼肌和胃柱状上皮中表达强烈^[6],说明 TR α A 与牙鲆变态更相关,其发挥调节组织特异性发育的作用。因此本实验以牙鲆甲状腺激素受体 TR α A 基因为研究对象,对正常组、甲状腺激素 T_4 处理组和硫脲处理组通过半定量 RT-PCR 方法检测了牙鲆不同发育阶段甲状腺激素受体 TR α A 基因的表达情况,试图找出牙鲆甲状腺激素受体 TR α A 基因在不同发育阶段表达的规律以及甲状腺激素 T_4 和硫脲处理对甲状腺激素受体 TR α A 基因表达的影响,为进一步研究甲状腺激素受体对其应答基因的调控提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验用牙鲆成鱼,购自上海铜川路水产品市场;牙鲆仔鱼,购自河北省中国水产科学研究院北戴河中心实验站,运回上海水产大学生命学院生态楼暂养,水温控制在 21 ± 0.5 °C。依据 Miwa 等^[11,12]的变态分期方法,结合右眼移位的程度^[13],分别取受精卵、20日龄(early larvae)、24日龄(premetamorphosis)、30日龄(prometamorphosis)、34日龄和38日龄(metamorphic climax)、45日龄(postclimax)牙鲆仔鱼及成鱼的头部组织,并立即进行总 RNA 的提取。

甲状腺激素和硫脲浸泡处理:17日龄的牙鲆仔鱼分别用甲状腺激素 T_4 和硫脲浸泡处理,方法参照 Inui 等^[1]。左旋 T_4 和硫脲分别购自上海第一医药公司和 Sigma 公司,其工作浓度分别为 0.05×10^{-6} 和 100×10^{-6} ,每次换水后补充药物,维持药物浓度不变。

1.2 RNA 提取

用 TRizol 试剂法抽提头部组织总 RNA,具体步骤参考美国 TRizol 试剂法使用说明。

1.3 提取的 RNA 进行浓度测定和纯度、完整性鉴定

分别测定所提取的各阶段 RNA 在 260 nm 和 280 nm 波长处的吸光度(OD260 和 OD280),并获得其纯度(P值)与浓度(C值),当 P 值在 1.8~2.0 时,说明提取的 RNA 纯度高,无蛋白质和 DNA 的污染。完整性鉴定利用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.4 半定量 RT-PCR 检测 TR α A 在不同发育阶段的表达

根据已报道的牙鲆 TR α A 基因序列(Genebank 中序列编号 D16461),用 Primer Premier 5 软件设计 TR α A 基因引物,扩增产物的长度 500~850 之间,避免与 18S rRNA 内标的 315bp 扩增产物在电泳中难以分离辨别。

上游引物:5' - CCAACAAGCAGGATAGCA - 3',下游引物:5' - AGGTGGGAACCATAGGAC - 3';扩增片段大小为 618bp,引物合成委托上海生物工程有限公司进行。

因 18S rRNA 在每个时期和不同组织都能稳定表达,是优于 β -actin 或 GAPDH 的内标选择^[14]。因此,本实验选用 18S rRNA(Ambion 公司,美国,产品目录号 1718,内标片段大小为 315 bp)作为半定量 PCR 的内标。

以各期仔鱼及成鱼头部 1 μ g 总 RNA 为模板,在 AMV 逆转录酶作用下合成 cDNA 第一条链。25 μ L PCR 反应体系,包括目的引物(12.5 μ mol/L)各 1 μ L, dNTP(2.5 mmol/L)2 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, 18S rRNA 引物与竞争引物的比例是 1:4, Taq DNA 聚合酶(5U)0.3 μ L, 模板 cDNA 第一条链 1.2 μ L。稍离心混匀后,在反应混合液的上层加 20 μ L 石蜡油;进行 PCR 反应,反应过程为 95 °C 1 min, 35 循环中(95 °C

1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min), 72 °C 4 min, 保存至 4 °C。扩增后, 每管 PCR 产物取 8 μ L 进行 2% 琼脂糖电泳。

扫描拍照, 通过 TotalLab v1.10 生物电泳分析系统定量, 计算目的条带与 18S rRNA 条带的光密度比值。实验设三次重复, 取其平均值; 统计分析由 SPSS12.0 软件执行。

2 结果

2.1 RNA 抽提后的完整性鉴定

所提取的各阶段 RNA 经测定 P 值均在 1.8 ~ 2.0 之间, 说明提取的 RNA 纯度高, 无蛋白质和 DNA 的污染。从电泳图 1 中可以清楚看到 28S, 18S 的条带, 说明 RNA 抽提完整。

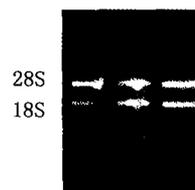


图 1 提取 RNA 检测电泳图
Fig. 1 Electrophoretic pattern of RNA isolation

2.2 牙鲈不同变态发育阶段 TR α A 基因的表达

RT-PCR 产物经电泳后, TR α A 和 18S rRNA 内标分别在 618bp 和 315bp 处出现明显条带, 与预定条带大小相一致, 如图 2 所示, 上面的条带为目的条带, 下面的条带为 18S rRNA 内标条带。图 3 是根据电泳图中上下条带光密度比值进行统计分析获得的相对基因拷贝数, 显示了目的基因 TR α A 在牙鲈不同变态发育阶段的表达水平变化。在牙鲈早期发育、变态期间以及成鱼中 TR α A 均有相当水平的基因转录, 不同发育阶段牙鲈甲状腺激素受体 TR α A 基因表达有明显差异。在受精卵中, TR α A mRNA 的表达水平较低, 至变态期表达量呈缓慢增加趋势, 到 24 日龄出现第一个表达高峰, 随后表达量下降, 30 日龄之后随日龄增加表达量又逐渐增加, 至 38 日龄出现第二个表达高峰, 而且高于第一个表达高峰, 随后其表达量再次下降至较低水平。

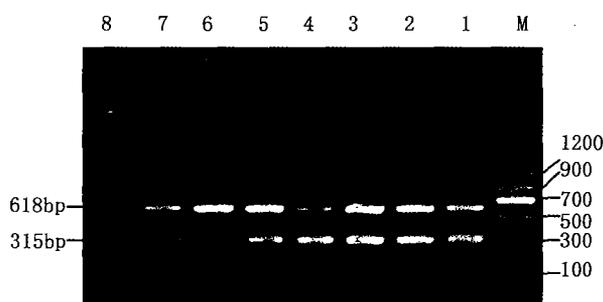


图 2 牙鲈不同变态发育阶段 TR α A 基因半定量 RT-PCR 电泳图

Fig. 2 Analysis of relative RT-PCR of TR α A at different developmental stages in metamorphic *Paralichthys olivaceus* through electrophoresis
1: 受精卵; 2: 20 日龄; 3: 24 日龄; 4: 30 日龄; 5: 34 日龄; 6: 38 日龄; 7: 45 日龄仔鱼; 8: 成鱼; M: DNA 标准

2.3 药物处理对 TR α A 基因表达的影响

图 4 上面的条带为目的条带, 下面的条带为 18S rRNA 内标条带。图 5 是根据电泳图中上下条带光

密度比值进行统计分析获得的相对基因拷贝数, 由图 5 明显可见, 疏脲处理组与同日龄正常组相比, TR α A 的表达水平增高; 而甲状腺激素处理组与同日龄正常组相比, TR α A 的表达水平降低。同时也可以看出各药物组内, 随日龄的增加, TR α A 的表达水平也随之增加, 与对应的正常组变化趋势一致。

3 讨论

甲状腺激素受体有两种亚型(subtype), 分别称为 TR α 和 TR β , 二者由不同的基因编码。TR α 基因和 TR β 基因皆可发生选择性剪切, 从而产生若干异型体(isoform)^[15], 两种亚型可结合 T₃, 均为功能性受体^[16], 影响着鱼类^[6]和两栖类^[17]的组织发育。在斑马鱼中, TR α 1 在卵巢、胚胎发育的囊胚期、原肠胚形成期高度表达^[18]。在大麻哈鱼胚胎器官形成期间(20 h ~ 31 h) TR α 表达水平较低, 在刚孵出时(32 h) TR α 出现一个表达高峰, 在幼体发育期间(33 h ~ 37 h) 于刚开口 37 h 出现一个最高峰^[19]。在日本海鳗变态高峰期间, TR α A mRNA 的表达比 TR α B 显示出更高的相关性, 并且这两种亚型在变态高峰期均有一个表达最高峰^[20]。在非洲爪蟾中, 当变态发生时 TR α 和 TR β 基因在同一个器官里高度表达, 致使不同

器官在不同阶段进行变态^[17]。

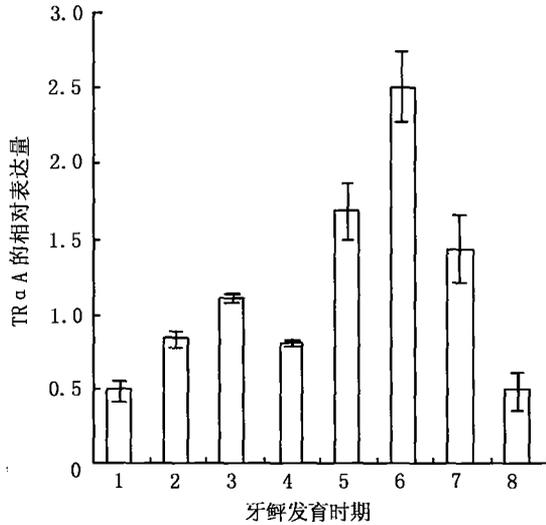


图3 牙鲆不同变态发育阶段 TRαA 基因表达
Fig.3 Expression of TRαA gene at different development stages in metamorphic *Paralichthys olivaceus*
1:受精卵;2:20日龄;3:24日龄;4:30日龄;
5:34日龄;6:38日龄;7:45日龄仔鱼;8:成鱼

在牙鲆右眼移位变态中以 TRαA 异型体最为重要。在本实验中,正常组不同发育阶段牙鲆甲状腺激素受体 TRαA 基因表达有明显的差异,从受精卵到变态前期 TRαA 表达量呈缓慢增加趋势,到变态开始,表达量剧增,24日龄出现第一个表达高峰,至牙鲆变态高峰期38日龄出现第二个表达高峰,而且高于第一个表达高峰,变态完成后表达量呈下降趋势,在成鱼中表达量再次降至较低水平。Yamano等^[6]利用 RT-PCR 技术检测了牙鲆不同发育阶段甲状腺激素受体(TRs)基因的表达情况,结果发现非常低的 TR mRNA 在受精卵中出现,孵化后检测有相对较多的 TRαA;变态前 TRs 的水平达到高峰期的一半。TRαA mRNA 在变态高峰期达到最高水平,变态后又恢复较低水平。本实验与 Yamano^[6]的研究结论一致。

药物处理组之间以及药物组与正常组之间, TRαA 的表达均有明显差异。与正常组同日龄仔鱼相比,在甲状腺激素处理组中 TRαA 表达降低,而在硫脲处理组中 TRαA 表达增高;从30日龄到38日龄,随着日龄的增加,两个药物组 TRαA 的表达量也有增加的趋势。苏青等^[21]通过对老鼠进行丙基硫氧嘧啶(一种抑制甲状腺素合成的药物)灌胃和 T₄ 注射来研究老鼠脑甲状腺激素受体基因表达的影响,发现与同日龄正常对照仔鼠相比,围生期甲减(怀孕期甲状腺功能低下)大鼠脑 TRα1 和 TRβ1mRNA 表达水平明显增加,而甲状腺激素 T₄ 替代使脑 TRα1

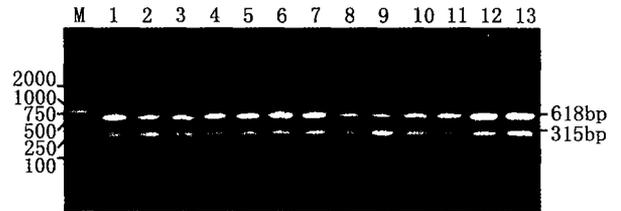


图4 正常组与药物处理组 TRαA 基因的半定量 RT-PCR 电泳图
Fig.4 Analysis of relative RT-PCR of TRαA between control group and drug treatment group in metamorphic *Paralichthys olivaceus* through electrophoresis
1:受精卵;2:20日龄;3:24日龄;4:30日龄;5:34日龄;6:38日龄;7:45日龄仔鱼;8:成鱼;9:甲状腺激素 T₄ 处理组 30日龄;10:甲状腺激素 T₄ 处理组 34日龄;11:甲状腺激素 T₄ 处理组 38日龄;12:硫脲处理组 30日龄;13:硫脲处理组 34日龄;M:DNA 分子量标准

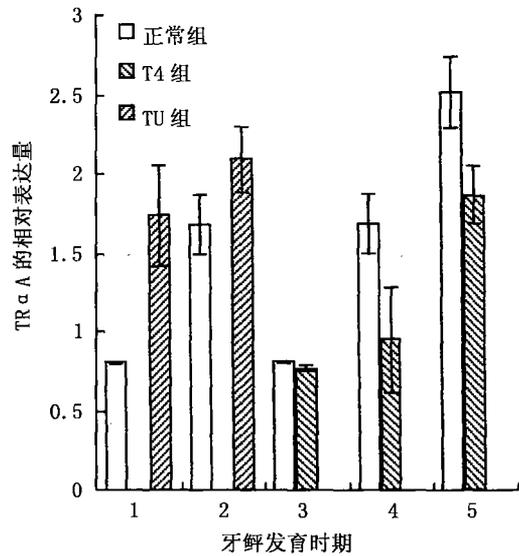


图5 TRαA 基因在正常组与药物处理组中的表达差异
Fig.5 Differential expression of TRαA gene between control group and drug treatment group
1:正常组与硫脲 TU 处理组 30日龄;2:正常组与硫脲 TU 处理组 34日龄;3:正常组与甲状腺激素 T₄ 处理组 30日龄;4:正常组与甲状腺激素 T₄ 处理组 34日龄;5:正常组与甲状腺激素 T₄ 处理组 38日龄

和 TR β 1 mRNA 表达水平降低。证实甲状腺激素对 TR α 1 和 TR β 1 mRNA 表达有下降调节作用, 而甲状腺激素缺乏可引起发育期大鼠脑 TR α 1 和 TR β 1 基因表达的增加。目前对这种变化的意义尚不清楚^[21, 22]。Alexandra 等^[23]通过细胞转染和 Western blotting 技术手段研究发现外源激素 T₃ 能诱导哺乳动物 TR α 1、TR β 2 受体蛋白的快速降解, 但不能诱导 TR α 2 受体蛋白的降解。在鱼类中是否存在类似的机理, 目前国内没有报道。

在本实验中, 硫脲因抑制甲状腺激素的合成可能致使变态期间的牙鲆甲状腺激素缺乏, 从而引起变态期牙鲆头部 TR α A 基因表达的增加; 而甲状腺激素 T₄ 对变态期牙鲆 TR α A 基因表达也可能有下降调节作用, 所以出现甲状腺激素浸泡组 TR α A 表达降低, 而在硫脲浸泡组中 TR α A 表达增高。此现象的分子机制尚待进一步地深入研究。

参考文献:

- [1] Inui Y, Miwa S. Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae[J]. Gen Comp Endocrinol, 1985, 60: 450 - 454.
- [2] Escriva H, Robinson M, Lauder V. Evolutionary biology of the nuclear receptor superfamily. In Nuclear Receptors[M]. A Practical Approach, Oxford: Oxford University Press. 1999. 1 - 28.
- [3] 鲍宝龙, 张臻宇, 龚小玲, 等. 外源甲状腺素及可的松对牙鲆早期发育阶段生长、发育和变态的影响[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(3): 242 - 246.
- [4] 张俊玲, 施志仪, 鲍宝龙. 牙鲆早期发育和变态期间 pitx 2 基因的表达[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(增刊): 348 - 352.
- [5] 张俊玲, 施志仪. 牙鲆早期阶段的变态发育及其机制[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(4): 348 - 352.
- [6] Yamano K, Miwa S. Differential gene expression of thyroid hormone receptor α and β in fish development[J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 109: 75 - 85.
- [7] Inui Y, Yamano K, Miwa S. The role of thyroid hormone in tissue development in metamorphosing flounder[J]. Aquaculture, 1995, 135: 87 - 98.
- [8] Power D M, Llewellyn L, Faustino M, et al. Thyroid hormones in growth and development of fish[J]. Com Biochem Physiol, Part C, 2001, 130: 447 - 459.
- [9] Glass C K, Franco R, Weinberger C, et al. A c-erb-A binding site in rat growth hormone gene mediates trans-activation by thyroid hormone[J]. Nature, 1987, 329: 738 - 741.
- [10] Chatterjee V K, Lee J K, Rentoumis A, et al. Negative regulation of the thyroid-stimulating[J]. Sci USA, 1989, 86: 9114 - 9118.
- [11] Miwa S, Tagawa M, Inui Y, et al. Thyroxine surge in metamorphosing flounder larvae[J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 70: 158 - 163.
- [12] Miwa S, Inui Y. Histological changes in the pituitary-thyroid axis during spontaneous and artificially-induced metamorphosis of larvae of the flounder, *Paralichthys Olivaceus*[J]. Cell Tissue Res, 1987a, 249: 117 - 123.
- [13] Minami T. The early life history of a flounder *Paralichthys Olivaceus* (in Japanese)[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1982, 48: 1581 - 1588.
- [14] Goidin D, Mammessier A, Staquet M J, et al. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations[J]. Anal Biochem, 2001, 295: 17 - 21.
- [15] 苏青, 刑惠莉, 左静南, 等. 围生期甲减对大鼠脑甲状腺激素受体基因表达的影响[J]. 上海第二医科大学学报, 2003, 23: 22 - 24.
- [16] 冯绮文, 苏青. 甲状腺激素受体研究进展[J]. 国外医学内分泌学手册, 2003, 23: 44 - 46.
- [17] Laurent M S, Sashko D, Peter I J, et al. Dual functions of thyroid hormone receptors during *Xenopus* development[J]. Comp Bioc and Phys Part B, 2000, 126: 199 - 211.
- [18] Essner J J, Johnson R G, Hackett P B. Overexpression of thyroid hormone receptor α 1 during zebrafish embryogenesis disrupts hindbrain patterning and implicates retinoic acid receptors in the control of hox gene expression[J]. Differentiation, 1999, 65: 1 - 11.
- [19] Iwan J, Sarah A R, Peter K, et al. Molecular Cloning and Expression of Thyroid Hormone Receptor Alpha during Salmonid Development[J]. Gen Comp Endocrinol, 2002, 125: 226 - 235.
- [20] Yutaka Kawakami, Minoru Tanda, Shinji Adachi, et al. Characterization of thyroid hormone receptor α and β in the metamorphosing Japanese conger eel, *Conger myriaster*[J]. Gen Comp Endocrinol, 2003, 132: 321 - 332.
- [21] 苏青, 罗敏, 陈源, 等. 围生期甲减对大鼠脑 Cox 基因表达的影响[J]. 上海第二医科大学学报, 2000, 20: 385 - 387.
- [22] Thompson C C, Weinberger C, Lebo R, et al. Identification of a thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system[J]. 1987, 237: 1610 - 1674.
- [23] Alexandra D, Li Zhao, Kyung S P, et al. Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors[J]. PNAS, 2000, 97: 8985 - 8990.