

文章编号: 1004 - 7271(2007)04 - 0305 - 05

外源性皮质醇对异育银鲫 TSH- β mRNA 表达 和血清甲状腺激素水平的影响

曲完成, 杨艳红, 刘颖, 周正峰, 崔严慧

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:运用 *Sybr Green I* 荧光定量 RT-PCR 方法和放射免疫方法(RIA)分析了外源性皮质醇(cortisol)对异育银鲫促甲状腺激素 β 亚基(TSH- β) mRNA 表达和血清甲状腺激素水平的影响。实验设计为10周,实验组每两周注射一次0.2 mg/kg体重的cortisol(用57%酒精溶解),对照组注射同剂量的57%酒精。实验期间没有投喂饲料。在本实验条件下,研究结果显示:注射3次外源性cortisol后,异育银鲫TSH- β mRNA表达量与对照组相比略有下降;注射5次后,与对照组相比显著降低($P < 0.05$)。另一方面,RIA结果显示:注射3次外源性cortisol后,实验组与对照组相比,血清甲状腺激素 T_3 和 T_4 含量虽略有升高,但无显著差异;而注射5次后显著升高($P < 0.05$)。以上结果提示:外源性cortisol能够影响异育银鲫脑下垂体-甲状腺轴。

关键词:异育银鲫;皮质醇;*Sybr Green I* 荧光定量 RT-PCR;促甲状腺激素 β 亚基;放射免疫方法; T_3 ; T_4

中图分类号: S 917 **文献标识码:** A

Effects of exogenous cortisol on TSH- β subunit mRNA level and serum thyroid hormone levels of *Carassius auratus gibelio*

QU Xian-cheng, YANG Yan-hong, LIU Ying, ZHOU Zheng-feng, CUI Yan-hui

(College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: In this study, *Sybr Green I* fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and radioimmunoassay (RIA) methods were used to investigate the effects of exogenous cortisol on thyroid-stimulating hormone β subunit (TSH- β) mRNA and serum thyroid hormone levels of *Carassius auratus gibelio*. The study was carried out in 10 weeks, during which cortisol was injected every two weeks for experiment groups at a dose of 0.2 mg per kilogram body weight (dissolved in 57% ethanol), while the same dose of 57% ethanol was injected for control groups. The fish were not fed throughout the experimental period. The results showed that after 3 times of cortisol injection, TSH- β mRNA level decreased slightly compared with control group, but did not show significant difference; after 5 times of cortisol injection, TSH- β mRNA level decreased significantly ($P < 0.05$). On the other hand, the serum thyroid hormones RIA results showed that after 3 times of cortisol injection, T_3 and T_4 concentrations increased slightly; after 5 times of cortisol injection, T_3 and T_4 concentrations increased significantly ($P < 0.05$). From these results we concluded that exogenous cortisol could influence pituitary-thyroid gland axis function of *Carassius auratus gibelio*.

收稿日期: 2006-03-14

基金项目: 上海市重点学科建设项目资助(Y1101); 上海市教委发展基金资助(科04-135); 回国留学人员科研启动基金(科01-113)

作者简介: 曲完成(1965-), 男, 吉林榆树人, 博士后、副教授、硕士生导师, 主要从事水生动物生理方面的研究。Tel: 021-65710525; E-mail: xcqu@shfu.edu.cn

Key words: *Carassius auratus gibelio*; cortisol; *Sybr Green I* fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; thyroid-stimulating hormone β subunit; radioimmunoassay; T_3 ; T_4

压力通常是被定义为因外界刺激而导致自身生理稳态被打乱的一种状态或条件^[1]。有研究表明, cortisol 是由压力所造成危害的直接作用者^[2], 一般地, 在外界压力等刺激的作用下, 血液 cortisol 浓度升高, 由此对下丘脑-脑下垂体-肾上腺轴的反馈抑制作用增强而导致由肾上腺皮质分泌的其它种类的激素减少, 引起内分泌系统的紊乱^[3]。进一步研究结果显示: 人类成年后的高血压、冠心病和糖尿病等发病率高的群体与母体妊娠期过多地应激或过多地暴露于外源性药用糖皮质激素等有关^[4-6]。但是, 到目前为止, cortisol 对鱼类正常内分泌系统具体影响的报道还不是很多, 关于 cortisol 对鱼类的危害还需进一步的认识和研究。以鱼类为对象, 研究各种激素以及化学性物质对鱼类正常生理影响的结果, 可以为认识内分泌干扰物质对人类正常生理的影响提供理论帮助。目前, 国内外一些学者分别在组织水平、激素水平和基因水平研究了 cortisol 对动物促甲状腺激素(TSH)分泌细胞活性^[7-9]、促甲状腺激素 β 亚基 mRNA(TSH- β mRNA)水平^[10]、甲状腺组织活性^[11]和甲状腺激素(TH)水平的影响^[8, 12-14]。从以上的研究结果来看, 学者们仅就 cortisol 对脑垂体-甲状腺轴中的某一个环节进行了研究, 而对动物脑下垂体-甲状腺轴进行研究的报道并不多见。因此, 本研究以我国分布广的异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)为研究对象, 运用荧光定量 RT-PCR 方法和放射免疫方法(RIA), 从分子和内分泌水平分析 cortisol 对异育银鲫脑下垂体组织中 TSH- β mRNA 和血清 TH 含量水平的影响, 明确外源性 cortisol 对异育银鲫脑垂体-甲状腺轴的影响作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

异育银鲫购于上海孙桥水产养殖良种场, 体重在 100 g 左右。购回后暂养于实验室 160 L 水族箱内, 每日按照 1% 体重投喂饵料、暂养。一周后, 挑选健康的样本作为实验对象, 隔日开始注射激素, 注射期间均不投喂饲料。

1.1.2 主要试剂

Cortisol 购于 Sigma 公司; M-MLV-RT 试剂盒购于 Promega 公司; RNA 抽提试剂 Trizol[®] Reagent 购于 Invitrogen 公司; Perfect Real Time (*Sybr Green I*) 荧光定量反应试剂盒以及 PCR 反应试剂购于 TaKaRa 公司; 放射免疫分析试剂盒购于上海放射免疫分析技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 激素的配制、注射和样本收集

首先称取适量 cortisol 用无水乙醇进行溶解配制成母液, 通过小剂量倍比稀释实验找出其溶解下限为酒精浓度 50%, 然后将 cortisol 溶解在 57% 的酒精中。

将健康的异育银鲫分成四个注射组, 每组 6 条。实验组: 注射 3 次 0.2 mg/kg 体重的 cortisol, 注射 5 次 0.2 mg/kg 体重的 cortisol; 对照组: 注射 3 次同剂量的 57% 酒精, 注射 5 次同剂量的 57% 酒精。

该四个注射组均采用肌肉注射法, 每两周注射一次, 在第 3 次、5 次注射完后的第三天取样。取样时, 采用断尾取血法收集血液, 然后分离血清, -20 °C 保存, 备用; 同时, 自异育银鲫头部蝶鞍骨背面的小骨腔内取出脑下垂体于 1.5 mL 经 DEPC 处理过的离心管中, -70 °C 保存备用。实验期间所有注射组均无死亡现象发生。

1.2.2 总 RNA 提取, 模板的制备

按照 Trizol[®] Reagent 试剂制造商提供的方法, 从脑垂体中提取总的 RNA。反转录操作按照 Promega 公司 M-MLV-RT 试剂盒说明书进行。

1.2.3 引物设计

根据异育银鲫 TSH- β cDNA 序列^[15]和金鱼 β -actin cDNA 序列,运用 Primer Premier 5 结合 Dnastar 软件及在线 BLAST 分析,分别设计合成了适于荧光定量的目的(TSH- β cDNA)片段引物和内参(β -actin cDNA)片段引物。引物序列如下:

目的片段引物(产物长度为 176 bp):

上游引物:5'-GGGTATTTTGGATGAAGGTAGCC-3';下游引物:5'-CTTTGAACCAGGAAACGAGC-3'

内参片段引物(产物长度为 127 bp):

上游引物:5'-GATGCGGAAACTGGAAAGG-3';下游引物:5'-ACTGTGAGGGCAGAGTGCTAG-3'

1.2.4 实时荧光定量 RT-PCR 系统条件优化

利用 *Sybr Green I* 荧光染料在 ABI Prism 7000 荧光定量 PCR 仪上检测 TSH- β mRNA 表达水平。优化后的实时定量 RT-PCR 体系如下:SYBR[®] Premix EX Taq[™] (2 \times) 10 μ L;上、下游引物(10 μ M)各 0.4 μ L, ROX Reference Dye (50 \times) 0.4 μ L, DNA 模板 2.0 μ L, 灭菌双蒸水 6.8 μ L, 总量 20 μ L。将反应体系稍微离心后放入定量 PCR 仪内,采用 2 步法进行扩增。反应条件:95 $^{\circ}$ C, 10 s; 95 $^{\circ}$ C, 5 s, 60 $^{\circ}$ C, 30 s, 45 个循环。反应结束后,系统将采集到的每一循环反应时各反应管荧光强度的增长指数(DRn)进行分析绘制每一反应管的扩增动力学曲线。根据动力学曲线确定每个样品管中荧光强度增加到某一特定阈值时的扩增循环数(Ct 值)。然后计算每个样品内参片段 Ct 值与相应目的片段 Ct 值的比值,进而得出每个样品的相对值。最后,将所扩增的 PCR 产物进行溶解曲线分析(检测温度:60 $^{\circ}$ C)。

1.2.5 血清 T₃ 和 T₄ 含量的测定

异育银鲫血清 T₃, T₄ 水平的检测是采用常规 RIA 测定。首先分别配制 T₃ 标准液(0.25、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00 和 8.00 ng/mL)和 T₄ 标准液(0.50、1.25、2.50、3.75、5.00、7.50、10.00、15.00、20.00 和 40.00 ng/mL),建立 T₃ 和 T₄ 标准曲线,然后对待测样品进行 T₃, T₄ 含量测定。

1.2.6 数据处理

每组数据均以平均值 \pm 标准差表示,显著性检验采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异显著。数据统计采用 SAS 6.0 统计软件进行。

2 结果

2.1 荧光定量条件优化的结果

为保证本实验结果数据的准确性,首先随机抽取 5 个样本进行预实验,以求对荧光定量 PCR 仪功效、样品质量以及引物设计情况进行鉴定。扩增曲线显示 PCR 扩增指数增长期及平台期曲线都较为整齐,无不正常、不规则条带出现(图 1)。说明荧光定量 PCR 仪性能良好、PCR 条件、引物设计适当,扩增效果较好。

溶解曲线分析显示,特异性扩增产物都具有相同的 T_m 值。TSH- β cDNA PCR 产物的 T_m 值在 83 $^{\circ}$ C 左右, β -actin cDNA 的 T_m 值在 80.5 $^{\circ}$ C 左右,并且溶解温度单一(图 2)。另外,将该随机抽取的五个样本进行 PCR 扩增反应后,经琼脂糖凝胶电泳鉴定也同样证实了扩增系统以及反应条件、样品质量以及引物设计情况比较合理,并且所得到的 PCR 产物与预期大小一致、均为单一条带(图 3)。在此基础上,测定了外源性 cortisol 对异育银鲫 TSH- β mRNA 表达水平的影响。

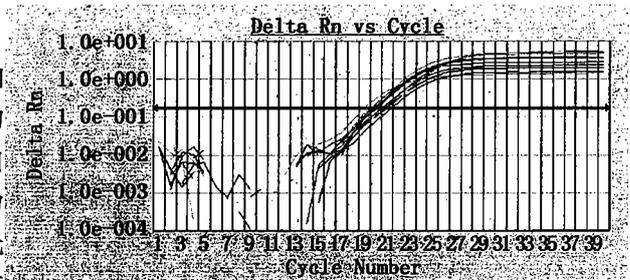


图 1 荧光定量 RT-PCR 扩增曲线分析

Fig. 1 Amplification curve analysis of fluorescence real time PCR

2.2 外源性 cortisol 对异育银鲫 TSH-β mRNA 表达水平的影响

注射外源性 cortisol 能够使异育银鲫 TSH-β mRNA 的表达量降低。注射 3 次 cortisol 后,异育银鲫 TSH-β mRNA 的表达量与对照组相比略有下降,但并无显著差异;但注射 5 次后,与对照组相比显著降低($P < 0.05$) (图 4)。

2.3 外源性 cortisol 对异育银鲫血清 T₃ 和 T₄ 含量水平的影响

随注射次数的增加,外源性 cortisol 使异育银鲫血清 T₃ 和 T₄ 含量呈逐渐升高 (图 5)。注射 3 次 cortisol 后,异育银鲫血清 T₃、T₄ 含量与对照组相比虽略有升高,却并无显著差异;但注射 5 次后,与对照组相比血清 T₃ 和 T₄ 含量显著升高($P < 0.05$)。

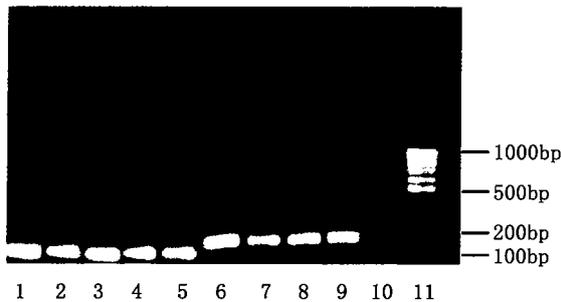


图 3 异育银鲫内参 cDNA 片段和目的 cDNA 片段 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Agarose electrophoresis of the PCR products of β -actin cDNA and *Carassius auratus gibelio* TSH- β cDNA 1~5:内参 PCR 产物;6~10:目的 PCR 产物;11. 标准分子量. 1~5: PCR products of β -actin cDNA; 6~10: PCR products of TSH- β cDNA;11. Marker.

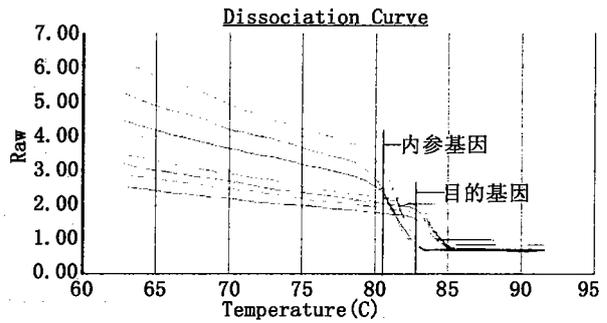


图 2 荧光定量 RT-PCR 溶解曲线分析

Fig. 2 Melting curve analysis of fluorescence real time PCR

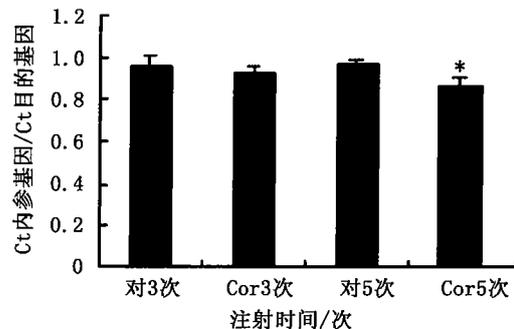


图 4 注射外源性 cortisol 对异育银鲫 TSH-β mRNA 表达水平的影响 (样本数 N=6)

Fig. 4 Effect of exogenous cortisol injection on TSH- β subunit mRNA expression of *Carassius auratus gibelio* (N=6)

“*”表示与相应对照组相比差异显著($P < 0.05$);Cor 表示注射 cortisol

3 讨论

本研究运用 *Sybr Green I* 荧光定量 RT-PCR 方法以及 RIA 方法检测了外源性 cortisol 对异育银鲫脑垂体-甲状腺轴的影响。*Sybr Green I* 荧光定量 RT-PCR 分析结果显示:在实验条件下,注射外源性 cortisol 能够导致异育银鲫 TSH- β mRNA 表达量降低。该结果与国外一些学者的研究结果相似,如 Leatherland 和 Lam^[7] 的研究结果显示,在外源性 cortisol 作用下,三刺鱼垂体 TSH 分泌细胞的体积变小;Redding 等^[8] 由研究结果推测,外源性 cortisol 对鳗鲡 TSH 的分泌有抑制作用;Pamenter 和 Hedge^[9] 的研究结果显示:外源性皮质酮能够抑制小鼠 TSH 的分泌。但与 Chowdhury 等^[10] 的体外研究结果不同,该学者离体研究结果显示:外源性 cortisol 能促进鳗鱼脑垂体细胞 TSH- β mRNA 的表达。结合本实验结果可以提示:外源性 cortisol 可以直接和间接地影响异育银鲫 TSH,并且外源性 cortisol 在体和离体环境下,对 TSH 的影响存在差异。

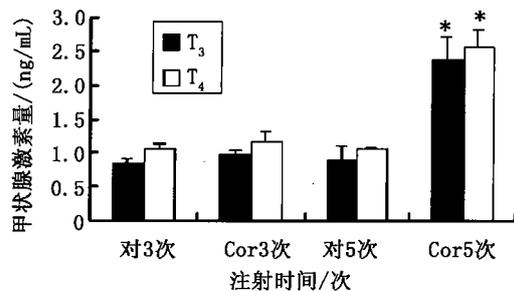


图 5 注射 3 次和 5 次外源性 cortisol 对异育银鲫血清中 TH 含量水平的影响 (样本数 N=6)

Fig. 5 Effects of cortisol on serum thyroid hormone levels of *Carassius auratus gibelio* (N=6)

“*”表示与相应对照组相比差异显著 ($P < 0.05$);Cor 表示注射 cortisol

运用 RIA 方法研究外源性 cortisol 对异育银鲫血清 T_3 和 T_4 含量水平影响的结果显示:注射外源性 cortisol 后与对照组相比,血清 T_3 和 T_4 含量水平升高。这与 Milne 和 Leatherland^[12] 的结果相似,他们的研究结果显示:cortisol 能够使虹鳟血浆中的 T_4 水平升高。相反,与 Van Overbeeke 和 McBride^[13] 及 Redding 等^[8] 的结果不同。Van Overbeeke 和 McBride^[13] 的研究结果显示:cortisol 能使鲑科鱼类红大麻哈鱼甲状腺组织细胞的体积变小,血浆 T_3 水平下降;Redding 等^[8] 的研究结果显示:cortisol 能使欧洲鳗鲡血浆中的 TH 水平降低。此外,Leatherland^[14] 用氢化椰子油溶解地塞米松或 cortisol 以体内埋植的形式对虹鳟进行处理的研究结果显示:其对血浆 TH 水平和 T_3/T_4 比例没有明显影响。由此可见,cortisol 对鱼类 TH 水平影响的机制非常复杂,这可能与研究对象的种类以及实验环境、条件等因素有关。

综合以上报道和本实验结果提示:cortisol 可能分别作用于异育银鲫脑垂体-甲状腺轴中的脑下垂体和甲状腺组织。一方面,cortisol 能够使异育银鲫脑垂体 TSH- β mRNA 的表达水平降低,同时使血清中 TH 含量水平有所升高^[15]。另一方面,由于甲状腺组织释放的 TH 对脑垂体 TSH 的合成与释放具有反馈作用^[16],所以注射 5 次后,异育银鲫血清中 TH 含量水平的显著性升高也加剧了 TSH- β mRNA 的表达水平出现了显著降低的现象。但具体的作用途径还需利用离体等实验来进一步地研究、分析。

本研究通过解析外源性 cortisol 对异育银鲫脑下垂体组织中 TSH- β mRNA 和血清 TH 含量水平的影响,其结果在一定程度上证实了外源性 cortisol 能够对异育银鲫脑垂体-甲状腺轴的正常生理功能产生影响,说明压力对生物正常生理的危害作用,但该激素的具体作用机制还有待进一步研究。本实验的完成为压力以及环境污染可能对生物机体产生影响作用的这一理论提供证据,同时也为保护生物生存环境以及制定健康水产养殖标准提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Reddy P K, Leatherland J F. Stress physiology in fish disease and disorders [J]. Cabi Pub, 1998, 279 - 301.
- [2] Barton B A, Iwama G K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis of the response and effects of corticosteroids [J]. Annual Review of Fish Diseases, 1991, (1): 3 - 26.
- [3] 温晓梅. 血清 Cortisol 检查与青少年肥胖 [J]. 中国现代医学杂志, 2001, 11 (5): 106.
- [4] Bertram C, Trowern A R, Copin N, et al. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension on utero [J]. Endocrinol, 2001, 142 (7): 2841 - 53.
- [5] Dodic M, Peers A, Coghlan J P, et al. Can excess glucocorticoid, predispose to cardiovascular and metabolic disease in middle age [J]. Trends Endocrinol Metab, 1999, 10 (3): 86 - 91.
- [6] Lou H C, Hansen D, Nordentoft M, et al. Prenatal stressors of human life affect fetal brain development [J]. Dev Med Child Neurol, 1994, 36 (9): 826 - 832.
- [7] Leatherland J F, Lam T J. Effects of prolactin, corticotrophin and cortisol on the adenohypophysis and interrenal gland of anadromous threespine sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus* L. form trachurus, in winter and summer [J]. Endocrinol, 1971, 51 (3): 425 - 436.
- [8] Redding J M, DeLuze A, Leloup-Hatey J, et al. Suppression of plasma thyroid hormone concentrations by cortisol in the European eel *Anguilla anguilla* [J]. Comp Biochem Physiol, 1986, 83 (A3): 409 - 413.
- [9] Pamenter R W, Hedge G A. Inhibition of thyrotropin secretion by physiological levels of corticosterone [J]. Endocrinol, 1980, 106 (1): 162 - 166.
- [10] Chowdhury I, Chatterjee A, Huang K Y, et al. Studies on the factors affecting thyrotropin gene expression in bighead carp *Aristichthys nobilis* [C]//6th Asian Fisheries Forum Book of Abstracts, 2001: 66.
- [11] Singh T P. Observations on the effect of gonadal and adrenal cortical steroids upon thyroid gland in hypophysectomized catfish, *Mystus vittatus* (Bloch) [J]. Gen Comp Endocrinol, 1969, 12 (3): 556 - 560.
- [12] Milne R S, Leatherland J F. Changes in plasma thyroid hormones following administration of exogenous pituitary hormones and steroid hormones to rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1980, 66 A (4): 679 - 686.
- [13] Van Overbeeke A P, McBride J R. Histological effects of 11-ketotestosterone, 17-methyltestosterone, estradiol, estradiol cypionate, and cortisol on the internal tissue, thyroid gland and pituitary gland of gonadectomized sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) [J]. Fish Res Board Can, 1971, (28): 447 - 484.
- [14] Leatherland J F. Thyroid response to ovine thyrotropin challenge in cortisol and dexamethasone treated rainbow trout, *Salmo gairdnerii* [J]. Comp Biochem Physiol, 1987, 86A (2): 383 - 387.
- [15] 曲宪成,杨艳红,刘颖,等. 异育银鲫促甲状腺激素 β 亚基基因的克隆及序列分析 [J]. 上海水产大学学报, 2006, 15 (2): 129 - 135.
- [16] 赵维信. 鱼类生理学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1993: 166.