

文章编号: 1674 - 5566(2012)06 - 0929 - 06

## 牙鲆变态发育过程中 *epigen* 基因的空间表达分布

李乐康, 鲍宝龙

(上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 细胞分裂在鲽形目鱼类变态过程中发挥了重要作用。*Epigen* 作为表皮分裂原, 通过激活 MAPK 通道来调控有丝分裂。以前的研究利用定量 PCR 表明, *epigen* 在变态前期表达量升高, 而变态后期表达量下降, 表明其与变态发育相关。为了进一步调查 *epigen* 与牙鲆变态发育的关系, 利用 RNA 整体原位杂交技术检测了 *epigen* 在变态期牙鲆体内的空间表达分布, 发现在变态期的各个阶段, *epigen* 基因表达分布均比较广泛, 表皮、鳃、肝脏、肠道、鳍条、支鳍骨、肌节等组织都有表达, 在牙鲆变态前和变态早期 (E 期) 信号较强, 而在变态高峰期 (F 期和 G 期) 和变态后期 (H 期) 信号逐渐变弱。*Epigen* 空间表达分布模式提示, 其作为表皮分裂原, 可能广泛参与牙鲆变态发育早期事件, 尤其可能与肝脏、肠道、支鳍骨和鳍条的发育有关。

**研究亮点:** 变态阶段基因表达水平的研究较多, 而基因空间表达分布式型的研究很少。本研究较为细致地调查了与细胞分裂相关的 *epigen* 基因在牙鲆变态各阶段的空间表达情况, 发现其广泛参与变态早期阶段的发育事件。

**关键词:** 牙鲆; 变态; *epigen*; 整体原位杂交

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

鲽形目鱼类 (比目鱼) 变态发育过程中生活方式经历了极大转变, 从浮游生活转变为底栖生活, 从而引起了游泳方式、摄食行为、色素细胞分布等改变<sup>[1-3]</sup>, 相应的其外部形态和内部结构也随之发生变化<sup>[4-7]</sup>, 尤为特别的是其一只眼睛从头部的一侧逐渐移动到另一侧, 形成脊椎动物中独一无二的外形上的左右不对称<sup>[1-3]</sup>。牙鲆是中国目前非常重要的海水鱼类养殖对象, 也是比目鱼变态发育研究中最主要的实验对象。

关于比目鱼类变态发育细胞水平上的研究, 曾有牙鲆变态发育过程中细胞凋亡和细胞分裂整体分布的调查<sup>[8-9]</sup>。细胞分裂在比目鱼变态发育中发挥着重要的作用, 在多个组织和器官的发育及再造中扮演重要角色<sup>[10-11]</sup>。分子水平上的研究主要集中在甲状腺激素受体基因等方面<sup>[12-18]</sup>, 也有通过抑制差减杂交等方法发现细胞分裂相关基因 *SFRS3* 与牙鲆眼睛移动等变态事件相关<sup>[19-20]</sup>, 但总体来看, 分子水平上关于比

目鱼变态的研究还很少, 也不够深入。甲状腺激素可从整体上调控比目鱼的变态<sup>[21-24]</sup>, 其经典的作用机制是通过与位于细胞核中的甲状腺激素受体结合, 调控下游基因的表达<sup>[12-18]</sup>。近几年来, 研究发现甲状腺激素  $T_4$  可通过与膜受体整合素 Integrin  $\alpha V\beta 3$  结合, 通过表皮细胞分裂原 (epithelial mitogen, *epigen*) 刺激表皮生长因子受体 EGFR 和下游信号分子的磷酸化激活 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 通道激活有丝分裂<sup>[14, 25-26]</sup>。此外, *epigen* 作为最新发现的表皮生长因子受体 (EGFR) 的配体, 调节细胞的生长、增殖和迁移活动, 牵涉伤口愈合和癌症<sup>[27-31]</sup>。我们前期研究表明, *epigen* 基因在牙鲆变态初期表达量明显增强, 而在变态高峰期表达量回落, 说明 *epigen* 基因可能参与牙鲆的早期变态发育事件<sup>[32]</sup>。本研究利用 RNA 整体原位杂交技术, 对 *epigen* 基因在牙鲆变态过程中的空间表达图式做进一步的调查, 为深入研究 *epigen* 在牙鲆变态发

收稿日期: 2012-03-12 修回日期: 2012-04-27

基金项目: 国家自然科学基金 (31072201); 上海市教育委员会重点学科建设项目 (S30701)

作者简介: 李乐康 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类发育生物学。E-mail: 88809269@163.com

通讯作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

育过程中所可能起到的作用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仔鱼的饲养和样品采集

牙鲆仔鱼(孵化后 15 d)购自北戴河养殖中心,在上海海洋大学养殖中心规范养殖。养殖用海水为盐卤配制,盐度为 35,充分曝气后使用,水温控制在 20 ℃ 左右,每天定时投喂卤虫无节幼体 3 次并且定时吸污、换水,同时不间断曝气,保证氧气的充足。采用 MIWA 和 INUI<sup>[22]</sup>的方法把牙鲆变态过程分为 5 个阶段:(1)变态前:眼睛开始移动之前,左右眼睛完全对称;(2)阶段 E:眼睛刚刚开始移动;(3)阶段 F:从左侧可以看见右侧的眼睛,右眼上缘还没有到达头顶;(4)阶段 G:右眼上缘超过头顶;(5)阶段 H:右眼刚好位于头顶。本实验中,孵化后 17 d、19 d、23 d、27 d 和 31 d 的仔鱼分别代表变态前、阶段 E、阶段 F、阶段 G 和阶段 H。分别取一部分各期仔鱼先用 4% PFA 固定再换成甲醇保存备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 探针的制备

根据 *epigen* 基因序列设计引物 *epigen*-F:5'-GACAAAGTCCGATTCTGACCGACGAC-3'; *epigen*-R:5'-GACTTGCAGATGCAAGAGGGTTTCGTTAC-3',克隆 211 bp 片段至 T 载体,转化后挑选阳性克隆测序验证,含 *epigen* 基因片段的质粒,分别用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Sal* I 酶切,使其完全线性化。回收的酶切片段,按地高辛标记试剂盒(Roche 公司)说明书,分别用 Sp6 和 T7 转录酶进行体外转录,合成地高辛标记的 *epigen* 正义和反义 RNA 探针。合成好的 RNA 探针用琼脂糖电泳和紫外分光光度计进行初步鉴定,制作好的探针保存在 -20 ℃ 中。

#### 1.2.2 RNA 整体原位杂交

将甲醇保存的仔鱼经过梯度复水至 PBST (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 调节 pH 至 7.4, 加入 0.1% Tween20), 然后用 100 mmol/L 的甘氨酸漂洗 30 min, PBST 洗脱两次。接下来将样品置于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 1 mol/L NaOH 溶液中, 灯光照射去色素, PBST 漂洗 2 次。经盐酸处理后用 PBST 漂洗 2 次; 蛋白酶 K 消化, 使抗原充分暴露, 再用 4% PFA 固定, 以保持仔鱼的完整性。将仔鱼放

置在预杂交液中 55 ℃ 温浴 4 h, 55 ℃ 杂交过夜, 探针浓度为 1 ng/μL。杂交完毕后用 50% 甲酰胺和 50% 5 × SSC (水溶解 175.3 g NaCl 和 88.2 g 柠檬酸钠, 调节 pH 至 7.0) 清洗 20 min。然后梯度至 0.2 × SSC, 用 0.5 × PBST 洗两次。仔鱼在 37 ℃ 抗体稀释液中震荡 1 h, 再用 1:2000 ~ 1:5000 的地高辛抗体 37 ℃ 震荡 4 h, 然后 PBST 漂洗, TSM1 (0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L MgCl<sub>2</sub>) 漂洗, TSM2 (0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L MgCl<sub>2</sub>) 漂洗, RED FAST 显色液室温下遮光显色 (2 ~ 3 h), 最后, 放置在 0.5 × PBST 中过夜, 4 ℃ 下 4% PFA 中保存。

#### 1.2.3 显微观察和图像处理

用奥林巴斯 SZX7 解剖镜观察经 RNA 整体原位杂交处理的仔鱼样品, 用 QImaging CCD 拍照记录。然后, 把经 30% 蔗糖的 PBS 4 ℃ 过夜处理的仔鱼样品包埋在琼脂胶中, 冰冻切片成 8 μm 的厚度, 该切片在显微镜下观察和拍照, 图片经 Adobe Photoshop 7.0 软件编辑。

## 2 结果

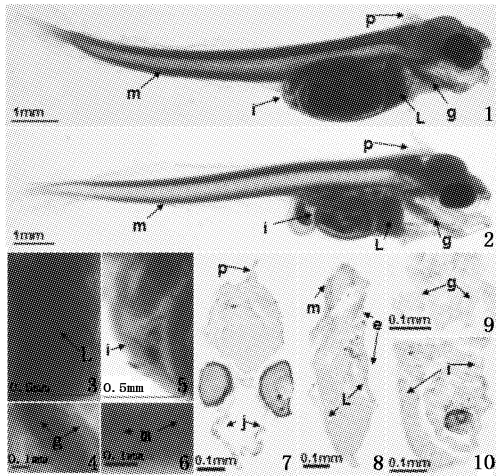
### 2.1 变态前仔鱼 *epigen* 表达的空间分布

变态前仔鱼, 眼睛还没有开始移动 (图版 I - 1)。解剖镜下观察, *epigen* 表达信号整体上较强, 且分布广泛, 在鱼体的肝脏 (图版 I - 3)、鳃 (图版 I - 4)、肠道 (图版 I - 5)、肌节 (图版 I - 6) 等部位上有较强的信号。进一步切片观察发现, *epigen* 信号主要分布在支鳍骨 (图版 I - 7)、表皮 (图版 I - 8)、肝脏 (图版 I - 8) 和鳃 (图版 I - 9)、肠道 (图版 I - 10) 和下颌骨 (图版 I - 7) 表达较弱。身体两侧并未发现不对称信号分布, 阴性对照未见信号 (图版 I - 2)。

### 2.2 阶段 E 仔鱼 *epigen* 表达的空间分布

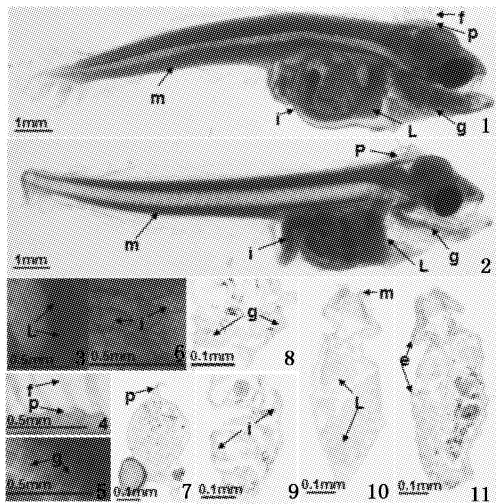
阶段 E, 牙鲆仔鱼的变态发育已经开始 (图版 II - 1), 在此阶段解剖镜观察到的 *epigen* 信号几乎遍布全身, 并且信号非常强。具体的信号分布和变态前基本一致, 信号最强仍在肝脏 (图版 II - 3)、鳍条 (图版 II - 4)、支鳍骨 (图版 II - 5)、鳃 (图版 II - 6) 和肠道 (图版 II - 7), 但 E 期仔鱼切片后下颌骨并未检测到信号分布, 支鳍骨 (图版 II - 7)、鳃 (图版 II - 8)、肠道 (图版 II - 9)、肝脏 (图版 II - 10)、肌节 (图版 II - 10) 和表

皮(图版 II - 11)信号均比变态前更强。身体两侧并未发现不对称信号分布,阴性对照未见信号(图版 II - 2)。



图版 I 变态前 *epigen* 基因的信号分布  
Plate I Expression pattern of *epigen* gene at pre-metamorphosis stage

1. 孵化后 17 d 基因表达的阳性信号; 2. 孵化后 17 d 基因表达的阴性信号; 3. 肝脏阳性信号的放大观; 4. 鳃阳性信号的放大观; 5. 肠道阳性信号的放大观; 6. 肌节阳性信号的放大观; 7. 头部横切的阳性信号; 8. 肝脏横切的阳性信号; 9. 鳃横切的阳性信号; 10. 肠道横切的阳性信号。L. 肝脏; g. 鳃; i. 肠道; m. 肌节; p. 支鳍骨; j. 颌骨; e. 表皮。红色为 *epigen* 信号。



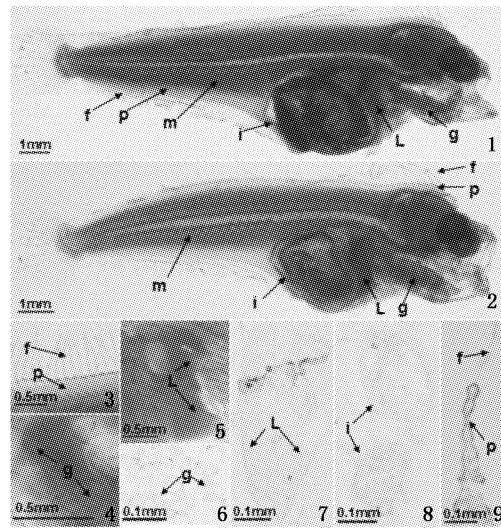
图版 II 变态 E 期 *epigen* 的表达分布

Plate II Expression pattern of *epigen* gene at stage E

1. 孵化后 19 d 基因表达的阳性信号; 2. 孵化后 19 d 基因表达的阴性信号; 3. 肝脏阳性信号的放大观; 4. 鳍条和支鳍骨阳性信号的放大观; 5. 鳃阳性信号的放大观; 6. 肠道阳性信号的放大观; 7. 头部横切的阳性信号; 8. 鳃横切的阳性信号; 9. 肠道横切的阳性信号; 10. 肝脏横切的阳性信号; 11. 腹部横切的阳性信号。L. 肝脏; f. 鳍条; p. 支鳍骨; i. 肠道; g. 鳃; m. 肌节; e. 表皮。红色为 *epigen* 信号。

### 2.3 阶段 F 仔鱼 *epigen* 表达的空间分布

F 阶段, 鳍条已经形成(图版 III - 1), *epigen* 这一时期牙鲈仔鱼表达量整体看比阶段 E 要弱, 但分布广泛, 主要在支鳍骨和鳍条(图版 III - 3)、鳃(图版 III - 4), 肝脏也有信号(图版 III - 5), 切片观察后发现, 鳃(图版 III - 6)中 *epigen* 信号明显变弱, 肝脏(图版 III - 7)和鳍条、支鳍骨(图版 III - 9)仍有信号, 肠道(图版 III - 8)内信号较弱。身体两侧并未发现不对称信号分布, 阴性对照未见信号(图版 III - 2)。



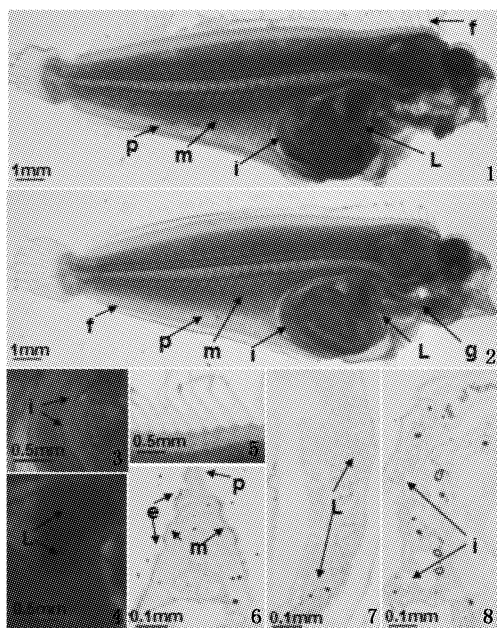
图版 III 变态 F 期 *epigen* 表达分布

Plate III Expression pattern of *epigen* gene at stage F

1. 孵化后 23 d 基因表达的阳性信号; 2. 孵化后 23 d 基因表达的阴性信号; 3. 鳍条和支鳍骨阳性信号的放大观; 4. 鳃阳性信号的放大观; 5. 肝脏阳性信号的放大观; 6. 鳃横切的阳性信号; 7. 肝脏横切的阳性信号; 8. 肠道横切的阳性信号; 9. 鳍条和支鳍骨横切的阳性信号。f. 鳍条; p. 支鳍骨; L. 肝脏; m. 肌肉; g. 鳃; i. 肠道。红色为 *epigen* 信号。

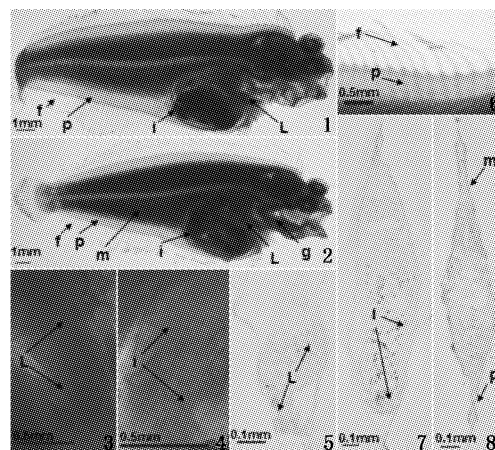
### 2.4 阶段 G 仔鱼 *epigen* 表达的空间分布

阶段 G 的仔鱼到达变态高峰期(图版 IV - 1), 但解剖镜下观察到的 *epigen* 信号却进一步减弱, 只有鳍条和支鳍骨(图版 IV - 5)的信号较强, 肠道(图版 IV - 3)和肝脏(图版 IV - 4)的 *epigen* 信号都有一定程度的降低。切片观察发现, 表皮(图版 IV - 6) *epigen* 强度相对于前几个变态阶段明显下降, 信号非常微弱, 肌节(图版 IV - 6)和支鳍骨(图版 IV - 6)信号较强, 肝脏(图版 IV - 7)内 *epigen* 信号也依然维持一定的强度, 肠道(图版 IV - 8) *epigen* 信号比较弱。身体两侧并未发现不对称信号分布, 阴性对照未见信号(图版 IV - 2)。

图版IV 变态G期 *epigen* 的信号分布Plate IV Expression pattern of *epigen* gene at stage G

1. 孵化后 27 d 基因表达的阳性信号; 2. 孵化后 27 d 基因表达的阴性信号; 3. 肠道阳性信号的放大观; 4. 肝脏阳性信号的放大观; 5. 鳍条和支鳍骨阳性信号的放大观; 6. 肌节和支鳍骨横切的阳性信号; 7. 肝脏横切的阳性信号; 8. 肠道横切的阳性信号。i. 肠道; L. 肝脏; f. 鳍条; p. 支鳍骨; e. 表皮; m. 肌节; g. 鳃。红色为 *epigen* 信号。

信号曾在牙鲆鳍条、支鳍骨、肌节、肠道、鳃、心脏、肾脏等组织中检测到<sup>[9]</sup>, 表明 *epigen* 作为一种表皮分裂原, 可能通过调控细胞分裂来广泛参与各变态发育事件。

图版V 变态H期牙鲆 *epigen* 的信号分布Plate V Expression pattern of *epigen* gene at stage H

1. 孵化后 31 d 基因表达的阳性信号; 2. 孵化后 31 d 基因表达的阴性信号; 3. 肝脏阳性信号的放大观; 4. 肠道阳性信号的放大观; 5. 肝脏横切的阳性信号; 6. 鳍条和支鳍骨阳性信号的放大观; 7. 肠道横切的阳性信号; 8. 支鳍骨和肌节横切的阳性信号。L. 肝脏; f. 鳍条; p. 支鳍骨; i. 肠道; m. 肌节; g. 鳃; 红色为 *epigen* 信号。

2.5 阶段H仔鱼 *epigen* 表达的空间分布

阶段H的牙鲆仔鱼右眼已经移动到头顶(图版V-1)。解剖镜观察, 只有肝脏(图版V-3)、支鳍骨和鳍条(图版V-4)还有 *epigen* 信号分布, 肠道(图版V-5)的信号已经基本观察不到。切片后发现, 表皮上基本已经看不到 *epigen* 的信号分布, 只有肝脏的 *epigen* 信号仍然维持一定的强度(图版V-6), 肠道(图版V-7)、肌节和支鳍骨(图版V-8)信号较为微弱。身体两侧并未发现不对称信号分布, 阴性对照未见信号(图版V-2)。

## 3 讨论

本研究通过整体原位杂交技术调查了牙鲆变态发育阶段 *epigen* 的信号分布, 发现时间上和空间上 *epigen* 表达都比较广泛, 鳃、表皮、肝脏、肠道、鳍条、支鳍骨、肌节都有分布, 并且变态前下颌骨也检测到了一定程度的 *epigen* 表达。 *Epigen* 基因表达模式与牙鲆变态阶段整体细胞分裂信号的分布模式有很大的重叠性, 较强的细胞分裂

*Epigen* 可能参与表皮、鳃、骨骼和肌肉的发育和再造。鳃中的 *epigen* 信号一直持续到F期, 之后就基本消失, 说明 *epigen* 在牙鲆变态高峰期和变态后期鳃中的作用并不明显, 只参与前期发育。表皮也存在类似现象, 变态前和变态E期信号非常强, 变态F和G期比较弱, 到变态H期基本检测不到信号, 牙鲆变态发育过程中, 生活方式从浮游型转变为底栖型, 体型从纺锤型变为侧扁型, 这样身体更容易向一侧倾倒, 所以随着变态发育的进行, 牙鲆的体高明显增长, 另外鳍条分化后, 鳍条的发育对牙鲆的生长也是至关重要的, 牙鲆在底栖生活后, 其游泳方式也发生变化, 使其更有利于匍匐水底和捕食, 本研究发现, 肌节、支鳍骨和鳍条直到变态发育H期仍存在一定强度的信号表达, 这说明 *epigen* 在鳍条、支鳍骨和肌节的发育和再造中扮演重要的角色。

*Epigen* 可能参与摄食和消化系统的再造。牙鲆变态发育过程中, 除了外部骨骼、游泳方式等发生变化, 摄食行为也发生改变, 其内部的消化系统也会随着其食性的改变而变化。本研究发

现,下颌骨只在变态前检测到了 *epigen* 信号,牙鲆在变态过程中,上下颌骨会变形使得嘴偏向身体的一侧便于摄食,说明 *epigen* 只参与早期的下颌骨生长。变态 G 期牙鲆下颌骨出现明显的细胞凋亡信号<sup>[8]</sup>,说明下颌骨的变态发育是由细胞分裂和细胞凋亡共同完成。*epigen* 在肝脏内的表达从变态前一直持续到变态 H 期,并且信号始终维持一定的强度,说明 *epigen* 在肝脏的发育和组织再造中扮演重要的角色。研究发现,在成年小鼠体内,*epigen* 主要在睾丸、心脏和肝脏中表达<sup>[32]</sup>,说明 *epigen* 是肝脏代谢和细胞分裂增殖的重要参与者。肠道中的 *epigen* 信号也从变态前一直持续到 H 期,但是只有变态前期和变态 E 期信号强,从变态 F 期开始信号就越来越弱了,这说明 *epigen* 很可能主要参与肠道的早期分化和再造。

整体来看,*epigen* 在变态前和变态 E 期信号强,之后明显下降,和之前荧光定量 PCR 得到的结果比较一致,不同的是并未观察到 19 d 仔鱼 *epigen* 表达量相比变态前期明显升高<sup>[32-33]</sup>,这种偏差可能是我们采用的技术手段不同造成的。用整条鱼做观察相比于抽提 RNA 得到的实验结果更加直观,但两者都说明 *epigen* 主要参与牙鲆变态前期的发育事件。

#### 参考文献:

- [1] 李思忠,王惠民. 中国动物志 硬骨鱼纲 鲽形目[M]. 北京:科学出版社,1995.
- [2] NELSON J S. Fishes of the world[M]. New York: John Wiley & Sons, 2006.
- [3] 张孝威,何桂芬,沙学绅. 鲆平和条鳎卵子及仔、稚鱼的形态观察[J]. 海洋与湖沼,1965,7(2):159-180.
- [4] MIWA S, YAMANO K, INUI Y. Thyroid hormone stimulates gastric development in flounder larvae during metamorphosis[J]. Journal of Experimental Zoology, 1992, 261(4):424-430.
- [5] GRAF W, BAKER R. Neuronal adaptation accompanying metamorphosis in the flatfish[J]. Journal of Neurobiology, 1990,21(7):1136-52.
- [6] YAMANO K, MIWA S, OBINATA T, et al. Thyroid hormone regulates developmental changes in muscle during flounder metamorphosis[J]. General and Comparative Endocrinology, 1991, 81:464-472.
- [7] WAGEMANS F, VANDEWALLE P. Development of the bony skull in common sole: brief survey of morpho-functional aspects of ossification sequence[J]. Journal of Fish Biology, 2001,59(5):1350-1369.
- [8] 鲍宝龙,杨桂梅,任大明. 牙鲆变态过程中的细胞凋亡[J]. 动物学报,2006,52(2):355-361.
- [9] 柯中和. 比目鱼类变态过程中细胞分裂的作用和甲状腺激素受体时空表达图式[D]. 上海:上海海洋大学,2011.
- [10] BAO B L, KE Z H, XING J B, et al. Proliferating cells in suborbital tissue drive eye migration in flatfish [J]. Developmental Biology,2011,351:200-207.
- [11] SOFFIENTINO B, SPECKER J L. Metamorphosis of summer flounder, *Paralichthys dentatus*: cell proliferation and differentiation of the gastric mucosa and developmental effects of altered thyroidal status [J]. Journal of Experimental Zoology, 2001,290(1):31-40.
- [12] YAMANO K, INUI Y. cDNA cloning of thyroid hormone receptor beta for the Japanese flounder [J]. General and Comparative Endocrinology,1995, 99(2):197-203.
- [13] YAMANO K, MIWA S. Differential gene expression of thyroid hormone receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in fish development [J]. General and Comparative Endocrinology,1998, 109(1):75-85.
- [14] GALAY-BURGOS M, POWER D M, LLEWELLYN L, et al. Thyroid hormone receptor expression during metamorphosis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2008,281(1/2):56-63.
- [15] ISOENA E, OBREGON M J, CALVO R M, et al. Iodothyronine deiodinases and thyroid hormone receptors regulation during flatfish (*Solea senegalensis*) metamorphosis [J]. Journal of Experimental Zoology Molecular and Developmental Evolution,2009, 312B(3):231-246.
- [16] MARCHAND O, DUFFRAISSE M, TRIQUENEAUX G, et al. Molecular cloning and developmental expression patterns of thyroid hormone receptors and T3 target genes in the turbot (*Scophthalmus maximus*) during post-embryonic development [J]. General and Comparative Endocrinology, 2004, 135(3):345-357.
- [17] SCHREIBER A M, SPECKER J L. Metamorphosis in the summer flounder (*Paralichthys dentatus*): stage-specific developmental response to altered thyroid status [J]. General and Comparative Endocrinology,1998, 111(2):156-166.
- [18] TAGAWA M, ARIRAKI M. Production of symmetrical flatfish by controlling the timing of thyroid hormone treatment in spotted halibut *Verasper variegatus* [J]. General and Comparative Endocrinology,2005, 141(2):184-189.
- [19] 鲍宝龙,杨桂梅,施志仪,等. 抑制差减杂交法克隆牙鲆变态早期差异表达的基因 [J]. 水产学报, 2006,30(2):204-210.
- [20] BAO B L, YANG G M, LIU Z J, et al. Isolation of SFRS3 gene and its differential expression during metamorphosis involving eye migration of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Biochimica et BiophysicaActa, 2005, 1725(1):64-70.
- [21] INUI Y, MIWA S. Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae [J]. General and Comparative Endocrinology, 1985, 60(3):450-454.
- [22] MIWA S, INUI Y. Effects of various doses of thyroxine and

- triiodothyronine on the metamorphosis of flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1987, 67(3): 356–363.
- [23] TAGAWA M, MIWA S, INUI Y, et al. Changes in thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis of the flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Zoological Science*, 1990, 7: 93–96.
- [24] 张臻宇, 鲍宝龙. 鱼类早期发育阶段甲状腺激素的作用 [J]. *上海水产大学学报*, 1999, 8(1): 68–75.
- [25] 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.
- [26] DAVIS P, LEONARD J, DAVIS F. Mechanisms of non-genomic actions of thyroid hormone [J]. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2008, 29(2): 211–218.
- [27] STRACHAN L, MURISON J, PRESTIDGE R, et al. Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(21): 18265–18271.
- [28] LIU Y, CHEN B, HU D H, et al. Dynamic study on EGF/EGFR expressions during second deep degree burn wound healing [J]. *Journal of Fourth Military Medical University*, 1999, 20(5): 457–459.
- [29] ZHAO B M, HUANG Y X, ZHANG W, et al. Zusanli electroacupuncture enhances expression of Gas and EGFR in gastric mucosa in rats [J]. *Journal of Fourth Military Medical University*, 2001, 22(9): 782–785.
- [30] ZHEN H N, ZHANG X, ZHANG Z W, et al. Expression of protooncogene *c-erbB-1* and *c-erbB-2* in human gliomas [J]. *Journal of Fourth Military Medical University*, 1999, 20(2): 106–109.
- [31] REN X L, SHEN L Y, JIN B Q. Study on anti-lung cancer effects of EGFR monoclonal antibodies [J]. *Journal of Fourth Military Medical University*, 2000, 21(3): 334.
- [32] 谢彩霞, 邢巨斌, 鲍宝龙. 牙鲆 *epigen* 基因的克隆以及在变态过程中的表达 [J]. *上海海洋大学学报*, 2010, 5(19): 577–582.
- [33] KOCHUPURAKKAL B S, HARARI D, DI-SEGNA, et al. Epigen, the last ligand of ErbB receptors, reveals intricate relationships between affinity and mitogenicity [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(9): 8503–8512.

## Expressional pattern of *epigen* gene in metamorphosing *Paralichthys olivaceus* using whole-mount *in situ* hybridization

LI Le-kang, BAO Bao-long

(The Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Cell proliferation plays important roles during metamorphosis in flatfishes. As an epithelial mitogen, *epigen* can promote cell proliferation in a dose-dependent manner via stimulating phosphorylation of the EGFR and downstream signaling molecules such as the mitogen activated protein kinase (MAPK). Q-RT-PCR result in a previous study showed that *epigen* expressed higher in early stage of metamorphosis, and became low in climate stage of metamorphosis. To further investigate the relationship between *epigen* expression and metamorphic events in *Paralichthys olivaceus*, we employed whole-mount *in situ* hybridization to detect the expressional pattern of *epigen* gene during metamorphosis. The results indicated that *epigen* expressed universally in various tissues. The expressional signal of *epigen* in larvae during pre-metamorphosis to Stage E was strong, then became weak after Stage F. It was observed that *epigen* expressed mainly in gill, liver, intestines, fin, actinost, myotome and epidermis. Tempo-spatial expressional patten of *epigen* gene in *P. olivaceus* indicates that it might participate in some metamorphic events, particularly in those events that happened during early stages of metamorphosis.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*; metamorphosis; *epigen*; whole-mount *in situ* hybridization