

李丹阳, 罗丽飞, 曹文怡, 等. 雌激素受体基因对泥鳅雌雄和倍性生长差异的表达调控作用[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(6): 164-172.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.06.022

雌激素受体基因对泥鳅雌雄和倍性生长差异的表达调控作用

李丹阳¹, 罗丽飞¹, 曹文怡¹, 周小云¹, 高泽霞^{1,2}

1. 华中农业大学水产学院/农业农村部淡水生物繁育重点实验室/
长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心/
农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070;
2. 湖北省名优鱼育种与健康养殖工程技术研究中心, 武汉 430070

摘要 为探讨雌激素受体基因与鱼类雌雄及倍性生长差异之间的相关性, 选取雌性生长快于雄性、且四倍体生长快于二倍体的泥鳅为研究对象, 首先克隆泥鳅雌激素受体基因, 获得 $ER\alpha$ (1 821 bp)、 $ER\beta 1$ (1 008 bp) 和 $ER\beta 2$ (1 197 bp) 的 cDNA 序列, 氨基酸序列比对发现泥鳅 ERs 分别与鲤科鱼类相应亚型具有较高的同源性。采用 qRT-PCR 检测 ER 基因在二倍体泥鳅性成熟前后 5 个关键时期的表达情况及二倍体、四倍体相关组织间的差异表达。结果显示, 3 个基因在雌雄个体性成熟前后脑、肌肉、肝脏和性腺组织中均存在差异表达, 其中 $ER\alpha$ 在泥鳅雄性个体脑、肌肉和性腺组织中的表达量显著高于雌性 ($P < 0.05$), 而在雌性肝脏组织中的表达量普遍高于雄性 ($P < 0.05$); $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$ 在精巢组织中的表达量一直处于较高水平。泥鳅倍性间的比较结果显示, 3 个 ER 基因在泥鳅二倍体脑组织中的表达量显著高于四倍体的表达量, 且雄性的表达量均高于雌性, 其中 $ER\alpha$ 表达差异最为显著。本研究结果表明, 无论是针对倍性生长差异还是雌雄生长差异, $ER\alpha$ 均表现为在生长较慢(二倍体、雄性)个体脑组织中有相对高表达, 推测脑组织中 $ER\alpha$ 基因对鱼类个体生长速度具有一定抑制作用。

关键词 泥鳅; 多倍体; 雌激素受体; 生长差异; 基因表达; 克隆及同源性分析

中图分类号 Q 959.54 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)06-0164-09

在哺乳动物中, 17 β -雌二醇(17 β -Estradiol, 17 β -E₂)可通过雌激素受体在个体发育中发挥调控摄食行为、调节能量平衡的重要作用。有研究表明, 将 E₂ 注射到小鼠不同的大脑区域会改变动物的摄食行为和体质量^[1]。有研究报道卵巢切除的小鼠出现体质量增加、脂肪含量升高的表型, 并且这种肥胖表型可以通过体外补充 E₂ 来减弱^[2-3]。雌激素受体(estrogen receptor, ER)是雌激素发挥生理作用的关键所在^[4]。在哺乳动物中发现雌激素受体只有 $ER\alpha$ 和 $ER\beta 2$ 种亚型^[5-6], 而在硬骨鱼类中普遍存在 $ER\alpha$ 、 $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$ 三种亚型, 例如尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[7]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[8]、大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)^[9]。ER 除可以调节性腺生长和分化外, 在机体能量代谢方面也发挥重要作用。在哺乳动物中, $ER\alpha$ 基因在调节机体能量代谢过程中比 $ER\beta$ 基因发挥着更为重要的生理功能, 例如一些学者研究发

现 $ER\alpha$ 基因突变体小鼠的体质量明显比正常小鼠大, 具有典型的肥胖特征, 而 $ER\beta$ 特异缺失的小鼠的体质量和正常小鼠没有显著差异^[10-11]。性别异形现象在鱼类中普遍存在, 部分鱼类雌雄生长速度差异显著, 且表现出物种特异性。此外, 鱼类多倍体通常表现为比二倍体更快的生长速度^[12]。目前, 关于雌激素在鱼类中的研究还停留在初步的探索阶段, 还没有雌激素受体相关基因在调控鱼类个体生长速度差异方面的研究报道。

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)是我国重要的小型淡水经济鱼类, 生长速度快, 繁殖能力强, 在自然界中普遍存在多倍体现象^[12-13]。泥鳅雌性生长速度明显快于雄性^[14], 且四倍体泥鳅的生长速度明显快于二倍体^[15]。本研究克隆泥鳅雌激素受体 3 个基因 $ER\alpha$ 、 $ER\beta 1$ 、 $ER\beta 2$ 的 cDNA 核心序列, 采用 qRT-PCR 对二倍体泥鳅生长发育的 5 个关键时期 4 种组织以及泥鳅二倍体和四倍体成鱼不同组织中

收稿日期: 2020-03-02

基金项目: 国家重点研发计划蓝色粮仓创新专项(2018YFD0900205); 国家自然科学基金项目(31872559); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系建设项目(CARS-46-08); 中央高校基本科研业务费专项(2662018PY035)

李丹阳, 硕士研究生. 研究方向: 鱼类表观遗传学. E-mail: 1434740711@qq.com

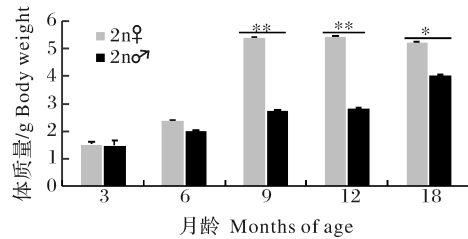
通信作者: 高泽霞, 博士, 教授. 研究方向: 鱼类遗传育种. E-mail: gaozx@mail.hzau.edu.cn

ER 基因的表达量进行分析,旨在为研究 ER 调控鱼类雌雄和倍性生长差异的分子机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用泥鳅均为笔者所在实验室的人工繁殖群体。采集二倍体泥鳅性成熟前后生长发育阶段 5 个时期(3、6、9、12、18 月龄)和 18 月龄四倍体泥鳅,随机选取体型正常泥鳅雌雌各 6 尾,其中二倍体泥鳅各月龄阶段雌雄生长差异见图 1;采集的 18 月龄四倍体泥鳅雌性、雄性平均体质量分别为(11.57±



* 表明雌雄间存在显著差异 ($P < 0.05$); ** 表明雌雄间存在极显著差异 ($P < 0.01$)。Note: The super “*” means significant difference between females and males ($P < 0.05$); “**” means extremely significant difference between females and males ($P < 0.01$).

图 1 不同月龄二倍体雌性和雄性泥鳅的体质量比较
Fig.1 Comparison of weight between male and female diploid of *M. anguillicaudatus* at different months of age

5.31) g 和(7.35±2.08) g,均显著高于 18 月龄二倍体泥鳅雌雄体质量 ($P < 0.05$)。个体经 MS-222 (100 mg/L)麻醉后,迅速采集脑、肌肉、肝脏和性腺组织,所有样品液氮速冻后转-80℃冰箱保存,用于后续 RNA 提取。

1.2 总 RNA 提取、cDNA 合成及检测

采集的各样品总 RNA 利用 Trizol (TaKaRa, 大连)法按照说明书步骤提取。后续 RNA 的纯度、完整性检测以及高质量 RNA 反转录成 cDNA 的方法均参考陈宇龙等^[16]方法。

1.3 ER 基因的克隆及序列分析

将 NCBI 上下载的斑马鱼 *ERα*、*ERβ1* 和 *ERβ2* 基因的 cDNA 序列与实验室前期已获得的泥鳅转录组数据进行 blast, 获得泥鳅 3 个目的基因的 cDNA 片段。用 Primer Premier 5.0 软件针对泥鳅 3 个基因设计简并引物,引物由武汉擎科有限公司合成(表 1)。以反转录得到的 cDNA 为模板,将 3 个基因合成引物分别进行 PCR 扩增。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,将条带单一的产物送武汉擎科有限公司测序。测序结果经 blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)后,将正确的目的基因片段利用 Mega 7.0 软件进行拼接。最后将拼接序列与斑马鱼基因序列进行比对以确定编码区是否完整。

表 1 基因克隆和 qRT-PCR 分析引物信息

Table 1 Primer sequences for genes clone and qRT-PCR analysis

引物 Primer	引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'-3')	产物长度/bp Product size	
基因扩增引物 Primers for genes amplification	<i>ERα-f1</i>	GAACACGCAGTACCCTAA	624	
	<i>ERα-r1</i>	ACAGGACCAGACTCCATAA		
	<i>ERα-f2</i>	GAAGTAGGGATGATGAAAGG	972	
	<i>ERα-r2</i>	GTGGGTGTAGAGGGTGG A		
	<i>ERα-f3</i>	GAAGAGAAGCAGTGGTGG	354	
	<i>ERα-r3</i>	TTTGTGGGTGTAGAGGGT		
	<i>ERβ1-f1</i>	CTAACCAACCTCGCTGAC		1 008
	<i>ERβ1-r1</i>	CTGGCTGTCTCCTCTGT		
	基因荧光定量引物 Primers for genes real time PCR	<i>ERβ2-f1</i>	AAAACCATCCGCCAGTGGGAGT	501
		<i>ERβ2-r1</i>	TTTGTCCGCCAGGTTGGTGAGTG	
		<i>ERβ2-f2</i>	AAAGACCGTTCCTGAGGCC	694
		<i>ERβ2-r2</i>	GGAGCAGGGTCCATTTGAGA	
		<i>ERβ2-f3</i>	TGCTCATGCTGCTGTCCCA	
		<i>ERβ2-r3</i>	ATCCTACAGTCCCCGTTC A	
		<i>ERα-RTf</i>	GATGTCCCTGCTCACCAA	225
<i>ERα-RT r</i>		CATTCTCCTCGCTCCTAT		
基因荧光定量引物 Primers for genes real time PCR		<i>ERβ1-RTf</i>	TGAGGCGAGAACGGTGCAGTTAG	159
	<i>ERβ1-RT r</i>	CAGAAGGGACGAGGTGATGAGGG		
	<i>ERβ2-RTf</i>	GGTGCATTTGTTGGAGTG	205	
	<i>ERβ2-RT r</i>	TCTTAACCGAGATGTGC		
	<i>β-actin-RTf</i>	CTCAATCCCAAAGCCAACAG	155	
<i>β-actin-RT r</i>	GGAAGAGCATAACCCTCGTAGA			

1.4 泥鳅 ER 基因理化性质分析及进化树的构建

在 NCBI 的 ORF finder 里分析 $ER\alpha$ 基因开放阅读框的序列信息 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>); 使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对 $ER\alpha$ 基因的分子质量及等电点等理化性质进行分析; 使用 DNAMAN 软件对来自不同物种、不同进化地位的脊椎动物的 $ER\alpha$ 基因进行氨基酸序列比对, 并使用 Mega 7.0 软件构建 ER 基因 3 个亚型的系统进化树, 进行雌激素受体基因 3 个亚型的聚类分析。

1.5 ER 基因表达分析

基于所得到的泥鳅 $ER\alpha$ 、 $ER\beta_1$ 和 $ER\beta_2$ 的序列信息, 利用 Primer Premier 5.0 设计其定量引物, 由武汉擎科有限公司合成(表 1), 以泥鳅 β -actin 为内参基因。使用 QuantStudio 6 Flex 实时荧光定量 PCR 仪以及 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TliR-NaseH Plus) 试剂盒 (TAKARA, 大连), 分别以二倍体泥鳅不同发育时期不同组织样品以及二倍体和四倍体成鱼的脑、肌肉、肝脏和性腺组织的 cDNA 为模板, 进行 qRT-PCR 反应。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算出 ER 基因的 3 个亚型各自在泥鳅各组织样品中的相对表达量。通过 SPSS 软件中的 Duncan's Multiple Range Test 来分析雌激素受体 3 个基因亚型在二倍体泥鳅性成熟前后 5 个关键时期的表达情况及二倍体、四倍体相关组织间的差异表达。

2 结果与分析

2.1 泥鳅 ER 理化性质分析

利用同源克隆拼接核心序列, 获得了泥鳅 $ER\alpha$ 、 $ER\beta_1$ 和 $ER\beta_2$ 基因的 cDNA 核心序列, 分别为 1 821、1 008、1 197 bp。其中 $ER\alpha$ 基因获得了完整的 CDS 序列, ProtParam 软件预测结果显示, 泥鳅 $ER\alpha$ 基因由 607 个氨基酸残基构成, 分子式为 $C_{2903}H_{4606}N_{840}O_{898}S_{43}$, 分子质量为 67.02 ku, 理论等电点 (PI) 为 8.63, 为碱性蛋白。氨基酸残基中 Arg (6.6%)、Gly (7.2%)、Ser (12.4%)、Leu (9.1%) 的频率较高, 极性氨基酸占 62.4%, 非极性氨基酸占 37.6% (图 2)。消光系数 ($M^{-1}cm^{-1}\gamma = 280\text{ nm}$) 为 61 530, 不稳定系数为 66.06, 属不稳定类蛋白; 疏水指数为 69.41, 平均亲水性为 -0.45, 属于可溶性蛋白。

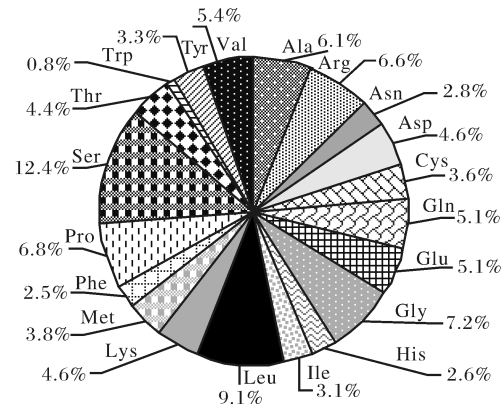


图 2 泥鳅 $ER\alpha$ 基因氨基酸频率分布图

Fig.2 Amino acid frequency distribution of $ER\alpha$ gene in *M. anguillicaudatus*

2.2 泥鳅 ER 氨基酸序列比对分析

使用 DNAMAN 软件对人 (*Homo sapiens*)、鼠 (*Mus musculus*)、鸡 (*Gallus gallus*)、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 等几个物种 3 个雌激素受体基因的氨基酸进行同源性分析, 并使用 Mega 软件构建进化树。在进化树中, $ER\alpha$ 和 $ER\beta$ 亚型各聚为一类, 形成 2 个大分支(图 3); 在 $ER\beta$ 亚型中, 鱼类 $ER\beta_1$ 和 $ER\beta_2$ 各单独聚为一支, 再与其他脊椎动物的 $ER\beta$ 聚在一起; 泥鳅 $ER\beta_1$ 和 $ER\beta_2$ 均与鲤和斑马鱼在进化树中距离最近。泥鳅 $ER\alpha$ 蛋白的氨基酸序列与鲤 (83.44%) 和斑马鱼 (85.02%) 具有较高的同源性; 与其他鱼类具有中度同源性 (55%~60%), 而与人 (46.39%)、鼠 (46.83%)、家鸡 (46.8%) 具有低度同源性(图 4)。

2.3 泥鳅 ER 基因在雌雄生长发育过程中的表达比较

采用基因荧光定量表达分析方法比较了 $ER\alpha$ 、 $ER\beta_1$ 和 $ER\beta_2$ 基因在泥鳅 3、6、9、12、18 月龄的雌雄个体中的差异表达。结果显示, 3 个基因在泥鳅生长发育过程中的表达存在一定差异(图 5)。其中在雌性的各个组织中, $ER\alpha$ 在脑、肌肉、肝脏和性腺组织中的表达量整体呈现出先上升后下降的趋势(图 5A、B、C、D)。 $ER\beta_1$ 在脑、肌肉和性腺中的表达量整体呈现出先下降后上升的趋势(图 5E、F、H), 而在肝脏组织中的表达量整体呈现出先上升后下降的趋势。 $ER\beta_2$ 在脑和肝脏组织中的表达量整体呈现出先上升后下降的趋势(图 5I、K), 而在肌肉和性腺组织中整体呈现先下降后上升的趋势

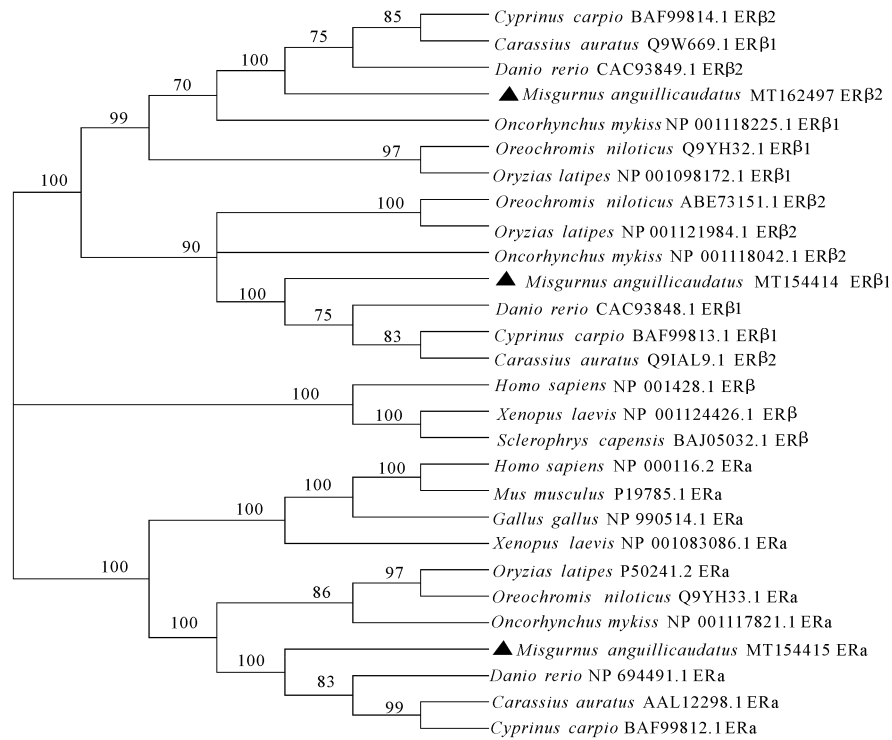
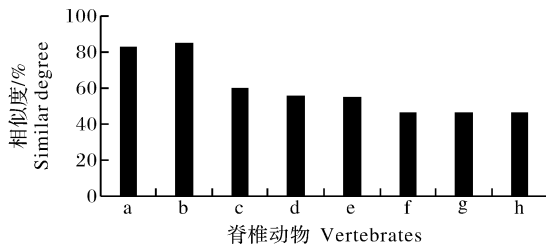


图 3 ERs 的系统进化树分析

Fig.3 Phylogenetic tree of ERs



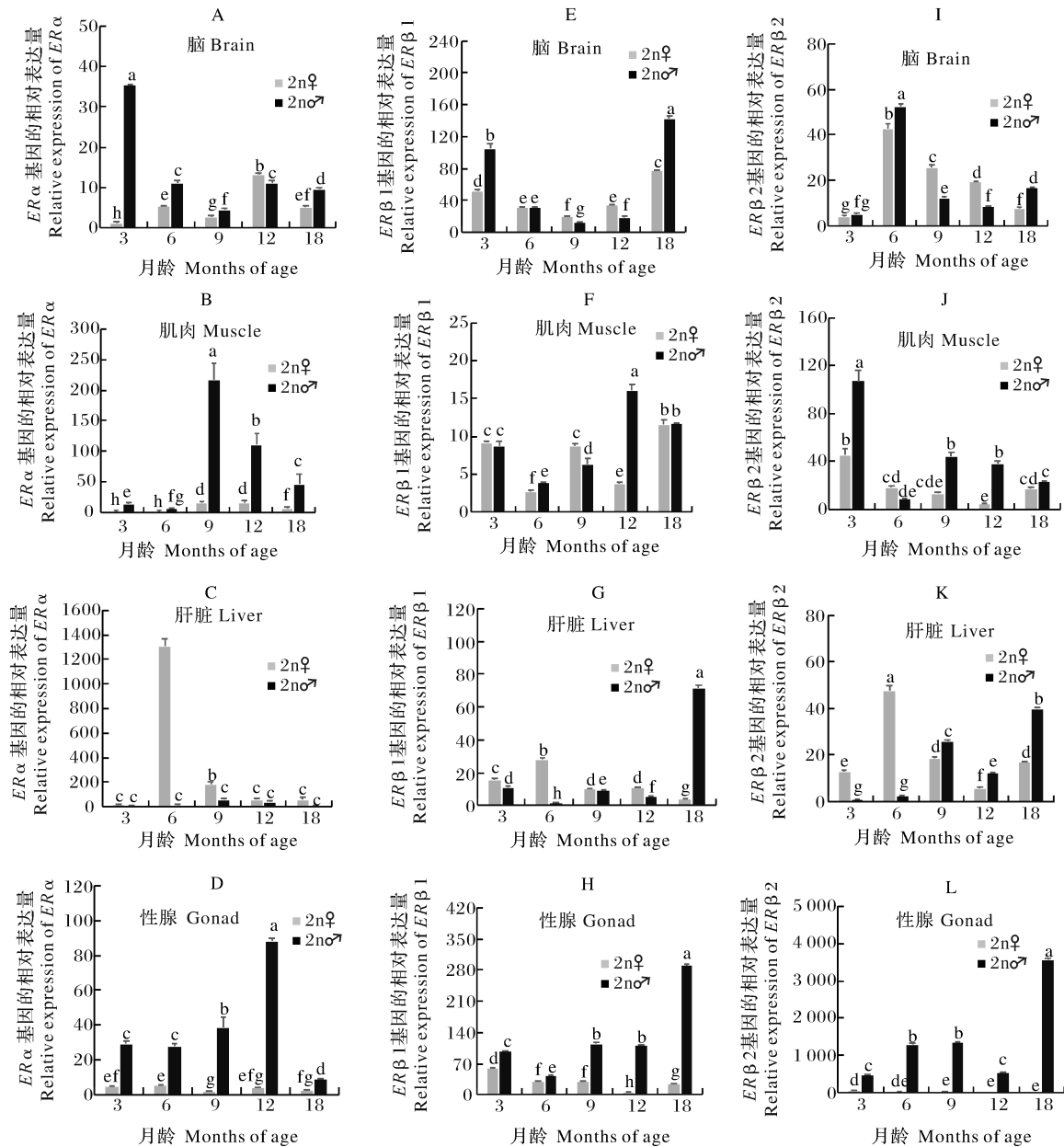
a: 鲤 *Cyprinus carpio*; b: 斑马鱼 *Danio rerio*; c: 虹鳟 *Oncorhynchus mykiss*; d: 青鳉 *Oryzias latipes*; e: 罗非鱼 *Oreochromis niloticus*; f: 人 *Homo sapiens*; g: 鼠 *Mus musculus*; h: 鸡 *Gallus gallus*.

图 4 泥鳅 $ER\alpha$ 基因与其他脊椎动物的同源性比较

Fig.4 Comparison of homology between $ER\alpha$ genes in *M. anguillicaudatus* and other vertebrates

(图 5J、L)。在雄性的各个组织中, $ER\alpha$ 在肝脏和精巢组织中的表达量随着个体的生长整体呈现出先上升后下降的趋势(图 5C、D); 在脑组织中表达量逐渐下降(图 5A), 而在肌肉组织逐渐上升(图 5B)。 $ER\beta_1$ 在各个组织中的表达量整体均呈现出先下降再上升的趋势(图 5E、F、G、H)。 $ER\beta_2$ 在脑和肌肉组织中的表达量整体均呈现出逐渐下降的趋势(图 5I、J), 而在肝脏和精巢组织中的表达量整体呈现出

逐渐上升的趋势(图 5K、L)。在泥鳅雌雄生长发育过程中, $ER\beta_1$ 和 $ER\beta_2$ 在脑组织中的表达模式表现相反, $ER\beta_1$ 整体呈现出先下降再上升的趋势, 而 $ER\beta_2$ 整体呈现出先上升再下降的趋势。此外, $ER\alpha$ 和 $ER\beta_2$ 在肌肉中的表达模式相反; $ER\alpha$ 、 $ER\beta_1$ 和 $ER\beta_2$ 在雌性肝脏组织中有相同的表达模式, 均呈现出先上升后下降的表达趋势; $ER\beta_1$ 和 $ER\beta_2$ 在卵巢中也有相同的表达模式, 均呈现出先下降后上升的表达趋势; $ER\alpha$ 基因在雌雄相同组织中的表达比较结果显示, $ER\alpha$ 在雄性各生长时期的脑组织、肌肉组织和性腺组织中的表达量均显著高于雌性 ($P < 0.05$) (图 5A、B、D), 而在雌性肝脏组织中的表达量显著高于雄性(图 5C)。 $ER\beta_1$ 在各个生长时期精巢组织中的表达量均显著高于卵巢(图 5H), 而在雌性各个时期肝脏组织中的表达量显著高于雄性(图 5G)。 $ER\beta_2$ 在雄性各个生长时期肌肉和精巢组织的表达量均显著高于雌性(图 5J、L), 3、6、18 月龄雄性脑组织的表达量显著高于雌性, 而在 9、12 月龄雌性脑组织的表达量显著高于雄性(图 5I)。



组间标注不同小写字母表示这些组中雌激素受体基因的表达具有显著性差异($P < 0.05$)。Different lowercase letters between groups indicate that the expression of estrogen receptor genes in the groups is significantly different ($P < 0.05$).

图 5 3 个雌激素受体基因在泥鳅 5 个时期 4 个组织的表达情况

Fig.5 Relative expression of three estrogen receptor genes in tissues at different stages of *M. anguillicaudatus*

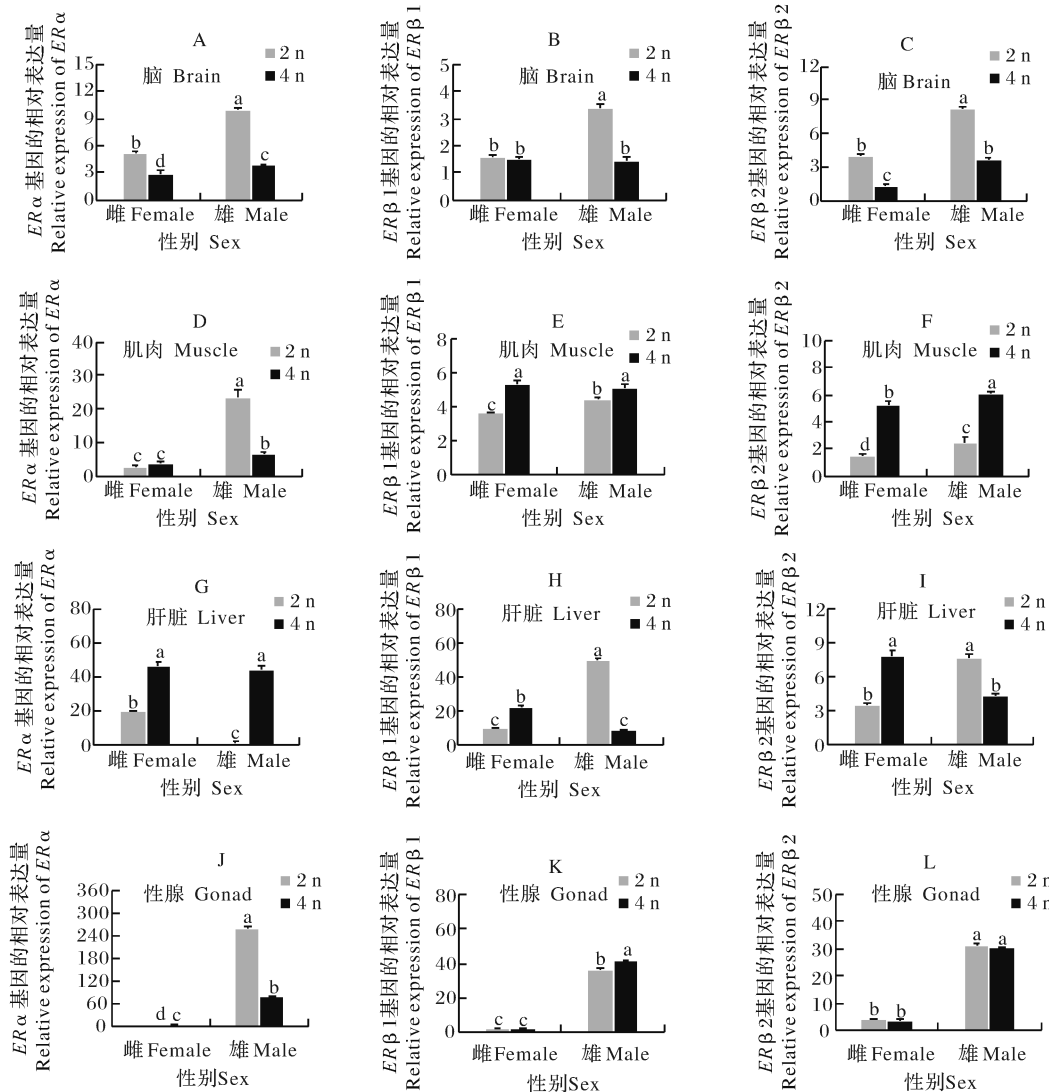
2.4 二倍体和四倍体泥鳅 ER 基因的表达差异分析

泥鳅雌激素受体基因 $ER\alpha$ 、 $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$ 在泥鳅不同倍性以及不同性别间表达均有差异,如图 6 所示:在脑组织中,同一性别的二倍体泥鳅 $ER\alpha$ 和 $ER\beta 2$ 表达量均显著高于四倍体 ($P < 0.05$) (图 6A 和 6C);在同一倍性中,雄性 $ER\alpha$ 和 $ER\beta 2$ 的表达量显著高于雌性 ($P < 0.05$) (图 6A 和 6C)。

雄性二倍体 $ER\beta 1$ 的表达量显著高于四倍体 ($P < 0.05$),二倍体、四倍体雌性间无显著差异(图 6B)。在肌肉组织中的表达结果显示,雄性二倍体 $ER\alpha$ 的表达量显著高于四倍体 ($P < 0.05$) (图 6D);雌雄 $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$ 在四倍体的表达量均高于二倍体 ($P < 0.05$) (图 6E 和 6F)。在肝脏组织中,雌雄 $ER\alpha$ 在四倍体的表达量显著高于二倍体 ($P < 0.05$) (图 6G);在雌性个体中,四倍体 $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$ 的

表达量均高于二倍体 ($P < 0.05$)；在雄性个体中，二倍体 $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$ 的表达量均高于四倍体 ($P < 0.05$) (图 6H 和 6I)。在性腺组织中，无论倍性， $ER\alpha$ 均在雄性中的表达量显著高于雌性 ($P < 0.05$)

(图 6J)； $ER\beta 1$ 在雄性四倍体的表达量显著高于二倍体的 ($P < 0.05$) (图 6K)，雌性倍性间无显著差别；无论倍性， $ER\beta 2$ 在雄性中的表达量均显著高于雌性 ($P < 0.05$) (图 6L)。



组间标注不同小写字母表示这些组中 ER 基因的表达具有显著性差异 ($P < 0.05$)。Different lowercase letters between groups indicate that the expression of ER genes in the groups is significantly different ($P < 0.05$).

图 6 ER 基因在二倍体、四倍体泥鳅各组织中的相对表达量

Fig.5 Relative expression of ERs in tissues of diploid and tetraploid *M. anguillicaudatus*

3 讨论

本研究获得了泥鳅雌激素受体基因 $ER\alpha$ 、 $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$ 的 CDs 区核酸的序列信息，分别采用 PCR、基因克隆和测序等技术，并通过 ProtParam 进一步分析 $ER\alpha$ 基因的理化性质，可为研究 ER 基因对泥鳅雌雄和倍性生长差异的表达调控作用提供

理论依据。对泥鳅 $ER\alpha$ 基因序列分析发现，该基因的长度和其所编码的氨基酸数量与斑马鱼和鲤最相似，相似度在 80%~90%。在进化树中也表现出相似的结果， $ER\alpha$ 基因与斑马鱼和鲤距离最近，再次验证了 $ER\alpha$ 基因与各个物种的亲缘关系。物种亲缘关系的远近可以由基因的同源性来间接表明。本研究克隆得到的泥鳅 $ER\alpha$ 、 $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$ 氨基酸序

列比对结果表明泥鳅的 3 种 ERs 与鲤和斑马鱼氨基酸序列的一致性高达 80% 以上,表明 ERs 在鲤科鱼类中高度保守。

本研究中 $ER\alpha$ 、 $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$ 三个基因表达结果显示,在二倍体泥鳅不同生长发育阶段, $ER\alpha$ 都表现为在雄性的脑、肌肉和性腺组织的表达量显著高于雌性;倍性间比较结果显示, $ER\alpha$ 、 $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$ 基因在二倍体泥鳅脑组织的表达量均显著高于四倍体。结合泥鳅雌雄之间以及二倍体和四倍体的生长特性,结果表明雌激素受体 $ER\alpha$ 普遍在生长速度较慢个体的脑组织中高表达。已有报道表明无论是在人类还是其他哺乳动物中, $ER\alpha$ 基因在调节体质量平衡上扮演着重要的角色。例如,Xu 等^[11]和 Heine 等^[17]通过基因敲除技术获得只在脑组织中特异缺失 $ER\alpha$ 基因的小鼠,实验小鼠表现为摄食增多、活动减少,从而导致肥胖。而抑制 $ER\beta$ 则不会出现肥胖表型,此外 $ER\alpha$ 选择性激动剂可以有效地抑制摄食,而 $ER\beta$ 选择性激动剂则不会改变摄食行为^[10-11]。由此我们推测脑组织中 $ER\alpha$ 的高表达可能在一定程度上起到了抑制雄性泥鳅生长的作用。 $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$ 在脑组织中的表达模式刚好相反, $ER\beta 1$ 整体呈现出先下降再上升的趋势,而 $ER\beta 2$ 整体呈现出先上升再下降的趋势,说明这两个基因可能在脑组织中相互协调发挥一定的生理作用。有研究证据表明, $ER\beta$ 在预防饮食引起的肥胖方面起着重要的作用,但 $ER\beta$ 具体的调节机制有待进一步研究^[18]。 $ER\alpha$ 在各月龄雄性的肌肉组织中整体呈现出一个逐渐上升的趋势,而 $ER\beta 2$ 整体呈现出一个逐渐下降的趋势,表明 $ER\alpha$ 和 $ER\beta 2$ 在泥鳅性成熟前后的肌肉组织中相互协调发挥一定的生理作用。 $ER\alpha$ 和 $ER\beta 2$ 在雄性肌肉组织的表达量均显著高于雌性,这在一定程度上证实了雌激素可以直接抑制肌肉中 GHR 编码 mRNA 的水平^[19],同时,这也可能是泥鳅雄性的生长速率比雌性低的原因之一。本研究中, $ER\alpha$ 基因在雌雄肝脏组织中的表达量均呈现出先上升再逐渐下降的趋势,且各个月龄雌性的表达量显著高于雄性。这与海水青鳉^[20]和斑马鱼的研究结果一致^[21]。众所周知,雌二醇通过肝脏合成的卵黄蛋白原释放到血液再转运到卵母细胞。 $ER\alpha$ 、 $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$ 基因在精巢的表达量均高于卵巢,这与在斑马鱼^[22]和虹鳟^[23]中的研究结果一致,提示 ER 基因在介导雌激素调控早期精子的发生、成熟和排出中发挥重要的

作用。并且 ER 基因在性腺组织的这种表达规律在脊椎动物中的保守性较高^[24]。

泥鳅雌激素受体基因 3 个亚型($ER\alpha$ 、 $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$)在不同组织间表达丰度不同,表明其在不同组织可能参与不同的生理功能。在泥鳅生长发育过程中无论雌雄, $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$ 在脑组织中的表达模式刚好相反, $ER\beta 1$ 整体呈现出先下降再上升的趋势,而 $ER\beta 2$ 整体呈现出先上升再下降的趋势;除此之外, $ER\alpha$ 和 $ER\beta 2$ 在肌肉中的表达模式刚好相反; $ER\alpha$ 、 $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$ 在雌性肝脏组织中有相同的表达模式,均呈现出先上升后下降的表达趋势; $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$ 在卵巢中也有相同的表达模式,均呈现出先下降后上升的表达趋势。这些研究结果表明:雌激素受体的各亚型组成一个调控体系,在鱼类生长发育不同阶段各组织器官的生长和新陈代谢过程中发挥着重要的作用。

本研究通过对泥鳅雌激素受体基因 ERs 的克隆及同源性分析,发现 ERs 在鲤科鱼类中具有较高的保守性。泥鳅生长发育 5 个关键时期以及在二倍体、四倍体间不同组织的定量表达分析结果表明脑组织中 $ER\alpha$ 基因对鱼类个体生长速度可能具有一定的抑制作用。 $ER\alpha$ 、 $ER\beta 1$ 和 $ER\beta 2$ 三个基因组成一个复杂的调控体系,彼此之间相互调节,在机体生长发育中共同发挥作用。

参考文献 References

- [1] BUTERA P C, BEIKIRCH R J. Central implants of diluted estradiol: independent effects on ingestive and reproductive behaviors of ovariectomized rats[J]. Brain research, 1989, 591(2):266-273.
- [2] ROESCH D M. Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats[J]. Physiology and behavior, 2006, 87(1):39-44.
- [3] ROGERS N H, PERFIELD J W, STRISSEL K J, et al. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity[J]. Endocrinology, 2009, 150(5):2161-2168.
- [4] HAN J, FANG Z. Estrogenic effects, reproductive impairment and developmental toxicity in ovoviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS)[J]. Aquatic toxicology, 2010, 99(2):281-290.
- [5] KUIPER G G, ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary[J]. Proceedings of the national academy of sciences, 1996, 93(12):5925-5930.

- [6] MOSSELMAN S, POLMAN J, DIJKEMA R. ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor [J]. FEBS letters, 1996, 392(1): 49-53.
- [7] WANG D S, SENTHILKUMARAN B, SUDHAKUMARI C C, et al. Molecular cloning, gene expression and characterization of the third estrogen receptor of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Fish physiology and biochemistry, 2005, 31(2/3): 255-266.
- [8] MENG X, BARTHOLOMEW C, CRAFT J A. Differential expression of vitellogenin and oestrogen receptor genes in the liver of zebrafish, *Danio Rerio* [J]. Analytical & bioanalytical chemistry, 2010, 396(2): 625-630.
- [9] ZHANG Y, WANG H, QIN F, et al. Molecular characterization of estrogen receptor genes in loach *Paramisgurnus dabryanus* and their expression upon 17 α -ethinylestradiol exposure in juveniles [J]. General & comparative endocrinology, 2012, 178(2): 194-205.
- [10] THAMMACHAROEN S, GEARY N, LUTZ T A, et al. Divergent effects of estradiol and the estrogen receptor- α agonist PPT on eating and activation of PVN CRH neurons in ovariectomized rats and mice [J]. Brain research, 2009, 1268: 88-96.
- [11] XU Y, NEDUNGADI T, ZHU L, et al. Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction [J]. Cell metabolism, 2011, 15(5): 453-465.
- [12] COMBER S C L, SMITH C. Polyploidy in fishes: patterns and processes [J]. Biological journal of the linnean society, 2005, 82(5): 531-552.
- [13] 宋晓然, 詹凡玢, 王卫民. 泥鳅二倍体与四倍体 trim63a 基因的克隆及表达分析 [J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(5): 17-25. SONG X R, ZHANF B, WANG W M. Cloning and expression analysis of trim63a indipoloid and tetrapoloid *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2019, 38(5): 17-25 (in Chinese with English abstract).
- [14] 王元军, 李殿香. 大鳞副泥鳅雌雄个体的形态分析 [J]. 四川动物, 2005, 25(2): 159-160. WANG Y J, LI D X. Morphological analysis of male and female individuals of the loach *Paramisgurnus dabryanus* [J]. Sichuan journal of zoology, 2005, 25(2): 159-160 (in Chinese with English abstract).
- [15] FENG B, YI S V, LI R, et al. Comparison of age and growth performance of diploid and tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* in the Yangtze River basin, China [J]. Environmental biology of fishes, 2017, 100(7): 815-828.
- [16] 陈宇龙, 张丽红, 周佳佳, 等. 团头鲂肌腱发育相关基因 tnmd/xirp2a 的克隆和表达 [J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(2): 1-8. CHEN Y L, ZHANG L H, ZHOU J J, et al. Cloning and expression analysis of tnmd / xirp2a genes relating to tendon development in *Megalobrama amblycephala* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2019, 38(2): 1-8 (in Chinese with English abstract).
- [17] HEINE P A, TAYLOR J A, IWAMOTO G A, et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice [J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2000, 97(23): 12729-12735.
- [18] FORYST-LUDWIG A, CLEMENZ M, HOHMANN S, et al. Metabolic actions of estrogen receptor beta (ER β) are mediated by a negative cross-talk with PPAR γ [J/OL]. PLoS Genetics, 2008, 5(6): e1000108 [2020-03-02]. <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1000108>.
- [19] ZHANG Y, WANG H, QIN F, et al. Molecular characterization of estrogen receptor genes in loach *Paramisgurnus dabryanus* and their expression upon 17 α -ethinylestradiol exposure in juveniles [J]. General & comparative endocrinology, 2012, 178(2): 194-205.
- [20] 张民, 安哲, 彭会. 海水青鳞雌激素受体基因的克隆、组织表达特性及环境雌激素 EE2 对其表达的影响 [J]. 大连海洋大学学报, 2018, 33(2): 25-35. ZHANG M, AN Z, PENG H. Molecular cloning, tissue distribution and 17 α -ethinylestradiol (EE2) exposure effect on mRNA expression of three estrogen receptor genes in marine medaka *Oryzias melastigma* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2018, 33(2): 25-35 (in Chinese with English abstract).
- [21] GAYATHRI C, AMENA A, JAN-KE G, et al. Levels of 17 β -estradiol receptors expressed in embryonic and adult zebrafish following in vivo treatment of natural or synthetic ligands [J/OL]. PLoS One, 2010, 5(3): e9678 [2020-03-02]. https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=18a3c89c1577ea6667877ff321eac14-2&site=xueshu_se&hitarticle=1.
- [22] MENG X, BARTHOLOMEW C, CRAFT J A. Differential expression of vitellogenin and estrogen receptor genes in the liver of zebrafish, *Danio Rerio* [J]. Analytical & bioanalytical chemistry, 2010, 396(2): 625-630.
- [23] DELALANDE C, GOUPIL A S, LAREYRE J J, et al. Differential expression patterns of three aromatase genes and of four estrogen receptors genes in the testes of trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Molecular reproduction and development, 2015, 82(9): 694-708.
- [24] VERDERAME M, SCUDIERO R. A comparative review on estrogen receptors in the reproductive male tract of non-mammalian vertebrates [J]. Steroids, 2018, 134: 1-8.

Regulation of *ER* genes on growth of different sex and ploidy in *Misgurnus anguillicaudatus*

LI Danyang¹, LUO Lifei¹, CAO Wenyi¹, ZHOU Xiaoyun¹, GAO Zexia^{1,2}

1.College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/
Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Engineering Research Center of
Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River
Economic Belt, Ministry of Education/Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics,
Breeding and Reproduction of Ministry of Education, Wuhan 430070, China;
2.Engineering Technology Research Center for Fish Breeding and
Culture in Hubei Province, Wuhan 430070, China

Abstract In order to investigate the relationship between estrogen receptor (*ER*) genes and growth of different sexes and ploidy in fish, loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) whose female growth is faster than that of male and whose tetraploid growth is faster than diploid were selected as the research object in this study. We firstly cloned the cDNA sequences of three *ER* genes of loach, including *ER α* (1 821 bp), *ER β 1* (1 008 bp) and *ER β 2* (1 197 bp). Amino acid sequence alignment revealed that the loach *ER* genes shared higher similarity with corresponding subtypes of carps. Quantitative RT-PCR was used to detect the expression of *ER* genes at five growth stages of diploid loach, as well as in different tissues in diploid and tetraploid adults. The results showed that the three *ER* genes were differentially expressed in the brain, muscle, liver, and gonadal tissues of the male and female individuals before and after sexual maturity. Among them, the expression of *ER α* in the brain, muscle and gonad tissues of males was significantly higher than that of females ($P < 0.05$), and expression in the female liver was generally higher than that in males ($P < 0.05$). The expression levels of *ER β 1* and *ER β 2* in the testis were always high. Comparison results between different ploidy showed that expression of the three *ER* genes in the diploid brain were significantly higher than that of the tetraploids, and the expression levels of males were higher than that of females, with the expression of *ER α* being the most significant. The results of this study indicated that regardless of the difference between ploidy and sex growth, *ER α* appears to have relatively high expression in the brain of slow-growing (diploid, male) individuals. Therefore, we speculate that the *ER α* gene in the brain might have a certain inhibitory effect on the growth rate of fish.

Keywords *Misgurnus anguillicaudatus*; polyploid; estrogen receptor; growth difference; gene expression; cloning and homology analysis

(责任编辑:边书京)