

布氏田鼠 *GnRH* 基因克隆及不同组织和发育阶段的基因表达特征

刘岚^{1,2}, 陈燕^{1,2}, 李宁², 王大伟², 任飞², 宋英², 郭聪^{1*}, 刘晓辉^{2*}

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610065; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 中国农业科学院杂草鼠害生物学与治理重点开放实验室, 北京 100193)

摘要: 促性腺激素释放激素(gonadotrophin releasing hormone, GnRH)由 *GnRH* 编码, 是调节动物繁殖活动的核心神经内分泌物质。布氏田鼠 *Lasiopodomys brandtii* 是我国内蒙古东部草原区的害鼠之一, 具有明显季节性繁殖特征, 但其繁殖调控机制仍未完全明确。本研究克隆了来至布氏田鼠下丘脑的 *GnRH* cDNA 序列, 使用实时荧光定量技术检测了不同组织、不同年龄阶段 *GnRH* mRNA 水平。结果表明: 克隆获得 *GnRH* cDNA 序列 497 bp, 包含开放阅读框(ORF)273 bp, 编码 90 个氨基酸和一个终止密码子的 GnRH 前体。DNA 序列比对和氨基酸序列同源性分析表明布氏田鼠下丘脑 GnRH 基因属于 I 型, 与橙腹田鼠 *GnRH1* 相似性最高。*GnRH* mRNA 在下丘脑、垂体、睾丸、肾上腺、肠、膀胱, 均有表达。雄鼠血清睾酮水平和雌鼠血清雌二醇水平在出生后 8 周/36 周/80 周处于高水平, 显著高于 4 周龄鼠, 但除出生后 80 周鼠下丘脑 *GnRH* 表达量处于高水平, 8 周龄/36 周龄 *GnRH* 表达量与 4 周龄鼠均没有显著差异。我们认为可能的原因是, 4 周龄鼠下丘脑 GnRH 受 GnRH 调节剂的中心抑制, 而 8 周龄/36 周龄下丘脑 GnRH 受性类固醇介导的反馈抑制调控, 随年龄增加至 80 周龄, 性类固醇介导的反馈抑制消失或者应答时间延长。这些研究为探究布氏田鼠繁殖调控规律提供了更多基础资料。

关键词: 布氏田鼠; *GnRH*; 基因克隆; 基因表达特征; 繁殖调控

中图分类号: Q959.837 文献标志码: A

Molecular Cloning, Tissue Distribution and Expression of *GnRH* in Different Developmental Stages of *Lasiopodomys brandtii*

LIU Lan^{1,2}, CHEN Yan^{1,2}, WANG Dawei², LI Ning², REN Fei², GUO Cong^{1*}, LIU Xiaohui^{2*}

(1. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 2. Key Laboratory of Weed and Rodent Biology and Management, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Gonadotrophin releasing hormone (GnRH) is encoded by *GnRH* and is the core neuroendocrine substance that regulates the reproductive activity of animals. Brandt's vole (*Lasiopodomys brandtii*) is one of the rodent species in the grassland of eastern Inner Mongolia, and shows obvious seasonal reproduction, but its reproductive regulation mechanism is still not completely clear. In this study, the *GnRH* cDNA were cloned from the hypothalamus of Brandt's vole, and the *GnRH* mRNA of different tissues and different ages were measured using real-time qPCR. The results showed that 497 bp of cloned *GnRH* cDNA sequence contained an open reading frame (ORF) of 273 bp, encoding a GnRH precursor of 90 amino acids and a stop codon. Alignment of homologous DNA and amino acid sequences showed that the *GnRH* of *L. brandtii* belonged to type I, and shared the highest identify with *Microtus ochrogaste* GnRH1. *GnRH* mRNA was expressed in the hypothalamus, pituitary, testis, adrenal gland, intestine and bladder. The levels of serum testosterone/serum estradiol levels in male/female voles of 8-weeks/36-weeks/80-weeks were significantly higher than those of 4-weeks voles. The expression of *GnRH* in hypothalamus of 80-weeks voles was in the highest level, while there was no significant difference between 8-weeks/36-weeks voles and 4-weeks voles. We suggested that the possible reason was that the 4-week hypothalamic GnRH was inhibited by the center of the GnRH modulator, while the 8-week/36-week hypothalamic GnRH depended on feedback suppression of steroid. With the increasing age to 80 weeks, sex steroid-mediated feedback suppression declined and response time prolonged, leading to the high *GnRH* mRNA level in this stage. These results provide basic data for exploring the regulation of reproduction in *L. brandtii*.

Keywords: *Lasiopodomys brandtii*; *GnRH* gene; cloning; gene expression; reproductive regulation

促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH), 又称为促黄体激素释放激素(Luteinizing hormone-releasing hormone, LH-RH)、卵泡刺激激素释放激素(follicle-stimulating hormone, FSH-RH), 最早由 Shally 和 Guillenmin 从猪的下丘脑中分离出来, 是下丘脑弓状核神经内分泌小细胞分泌产生的神经激素(Lincoln, 1976; 林浩然, 2004)。随着对 GnRH 研究的逐渐深入, 目前已经发现超过 24 种不同的类型, 每种类型都以其最早鉴别出来的动物命名(Amoss *et al.*, 1971; Baba *et al.*, 1971; 叶丹等, 2003)。除了章鱼的 GnRH(octo GnRH), 所有已鉴别的 GnRH 都有 10 个氨基酸组成的相似结构。在已知 GnRH 的所有哺乳动物中, 均具有相同的 10 个氨基酸的肽链, 即 COOH-pGlu-His-Tip-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, 其中 pGlu 是末端含有一个磷酸基的谷氨酸(Fiore *et al.*, 2000; Gorbman & Sower, 2004; Lethimonier *et al.*, 2004)。

收稿日期: 2017-03-11

接受日期: 2017-05-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471790)

作者简介: 刘岚(1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生态学, E-mail: 13522108469@163.com

*通信作者 Corresponding author, E-mail: guocong@gmail.com; lxiaohui2000@163.com

GnRH 在下丘脑, 垂体和多种组织中均有表达, 在不同的组织中有不同的生物学作用, 比如消化系统中调节胃壁细胞分泌胃酸, 胎盘中可调节绒毛膜促性腺激素的分泌; 但其最主要的生物学作用是参与促性腺激素释放的调控, 形成“下丘脑-垂体-性腺”轴(hypothalamic-pituitary-gonad axis, HPG 轴)对繁殖活性进行调控(Belchetz *et al.*, 1979; Young *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2001)。当受到高级中枢神经递质的刺激或者性刺激, 下丘脑产生的 GnRH 以脉冲形式通过垂体门脉系统或神经分泌细胞的轴突末梢到达垂体前叶, 与脑垂体内促性腺激素分泌细胞的特异性受体结合, 刺激促性腺激素的生成和分泌; 之后通过血液循环系统作用于靶器官或靶细胞, 调节配子发生和性腺类固醇激素(睾酮, 雌二醇等)的产生(Dubois *et al.*, 2002; 叶丹等, 2003; Lee *et al.*, 2008; Clarke *et al.*, 2009)。

布氏田鼠 *Lasiopodomys brandtii* 属于啮齿目 Rodentia 仓鼠科 Cricetidae 田鼠亚科 Microtinae, 是我国内蒙东部草原区的害鼠之一, 主要分布于我国内蒙古、蒙古人民共和国和俄罗斯贝加尔一带的典型草原区。布氏田鼠的种群数量变化具有年间和年内周期性波动的特点, 在合适的年份一旦大量爆发会大面积啃食和破坏草原植被, 造成草原退化, 此外它还是鼠疫的自然宿主(张洁等, 1978; 张洁, 钟文勤, 1979; 侯建军, 尹峰, 1996)。因此, 对布氏田鼠的防治在草原有害生物研究中受到广泛关注。布氏田鼠具有明显的季节性繁殖特点, 繁殖期从3月下旬到8月上旬, 其种群呈现暴发式增长, 在数量高峰期更易形成严重危害(张洁, 钟文勤, 1981; 施大钊等, 1999; 宛新荣等, 2002)。近年来, 由于逐渐认识到鼠类在草原生态系统中的重要性, 因此对害鼠的防治理念从“一味灭杀”转变为“可持续控制”, 繁殖干扰方法作为一种更为合理的有害生物管理方法而得到大量研究(张知彬, 1995; Hood, 2001; 王大伟, 2011; 吕江等, 2013; 陈雅娟等, 2014)。因此, 阐明布氏田鼠繁殖调控通路对于深入理解其繁殖特征和种群数量生育干扰控制技术的研发具有重要意义。GnRH 基因是繁殖调控的中枢物质, 然而该基因的基因序列在布氏田鼠内尚未被报道。基于以上研究现状, 我们利用 RACE 技术获得了布氏田鼠下丘脑中 GnRH 的 cDNA 序列, 检测其在不同组织中及不同发育阶段的表达特征, 探究 GnRH 在布氏田鼠繁殖调控中的作用, 为后期布氏田鼠繁殖调控的研究提供基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

布氏田鼠来自实验室(中国农业科学院植物保护研究所)长期饲养种群, 饲养条件为温室 20 °C 左右, 相对湿度 75%, 自然光照。

1.2 试剂及仪器

RNAprep pure Tissue 试剂盒购于 ZYMO Research 公司(USA); SMARTer™ RACE cDNA Amplification 试剂盒购于 Clontech 公司(USA), 包含 SMARTer II A Oligonucleotide, 10× Universal Primer 和 nested Universal Primer A; LA Taq DNA polymerase 购于 TaKaRa 公司(日本); cDNA Synthesis 试剂盒购于 TransGen Biotech 公司(中国); 2×Taqman PreAmp master Mix 购于 ABI 公司(USA); 2×SsoFast™ EvaGreen Supermix with low ROX 购于 BIO-RAD 公司(USA); 2×Assay Loading Reagent 和 20×DNA Binding Dye Sample Loading Reagent 购于 Fluidigm 公司(USA); 碘^[125I]睾酮放射免疫分析药盒购于北京北方生物技术研究所(中国); 雌二醇放射免疫分析药盒购于北京北方生物技术研究所(中国); 实验引物由生物工程有限公司合成(上海); DNA 序列由华大基因(北京)测序。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 从 NCBI 下载多个物种 GnRH 基因的 cDNA 序列(橙腹田鼠 *Microtus ochrogaste*, 登录号: XP_005355523.1; 拉布拉多白足鼠 *Peromyscus maniculatus bairdii*, 登录号: XP_015841126.1; 小家鼠 *Mus musculus*, 登录号: AAI16900.1), 分析比对找到较为保守的序列, 用 Primer5.0 软件设计用于 RACE 扩增全长的两对特异性引物(表 1)。RACE 获得全长后, 利用 Primer5.0 软件设计实时荧光定量 PCR 引物(表 1)。用于实时荧光定量的 GnRH 荧光引物标准曲线: R²(相关系数)=0.996, Eff%(循环效率)=104.76, 符合荧光定量标准。

表 1 扩增布氏田鼠 GnRH 基因 cDNA 全长和实时荧光定量引物序列

Table 1 Primers used for 5'-RACE, 3'-RACE and qPCR.

引物 Primer	序列 Sequence(5'→3')	用途 Purpose
GnRH-5'-UTR1	TCTACGCTGCTGGGTATAGAAATGCT	5'-RACE-primary
GnRH-5'-UTR2	GGGTATAGAAATGCTGAAACCCACAC	5'-RACE-nest
GnRH-3'-UTR1	GCTGGGCAGAAGAAGATGTAAGTGCCT	3'-RACE-primary
GnRH-3'-UTR2	GCACTGGCCCTGAAGGATCCACAAC	3'-RACE-nest
GnRH-F	CGATTCCTTCCAAGAGATGGG	q-RCR
GnRH-R	CATCAGACTTCCAGAGCTCCT	q-RCR
β-actin-F	GCTCTCTCCAGCCTTCCTTCCTG	q-RCR
β-actin-R	GTGTTGGCGTACAGGTCCTTGCGG	q-RCR

1.3.2 *GnRH* 基因的 cDNA 克隆 取 1 只雄性布氏田鼠的下丘脑组织用于总 RNA 的提取, 操作方法根据 RNAprep pure Tissue 试剂盒说明。取 1 μ L RNA 于 Nanodrop ND-2000 分光光度计(Thermo-Fisher, USA)测浓度和 OD260/OD280 比值。RNA 的完整性用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。检测显示 OD260/280 在 1.8 到 2.0 之间, 28sRNA 是 18sRNA 的两倍, 可用于后续反转录。使用 SMARTer II A Oligonucleotide(12 μ M)(Clontech, USA)和提取的总 RNA, 根据 SMARTer™ RACE cDNA Amplification 试剂盒说明书操作, 制备 cDNA 第一条链。使用 10X Universal Primer A Mix(SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit, USA)和 *GnRH*-5'-UTR1(表 1), 根据 SMARTer™ RACE cDNA Amplification 试剂盒说明书操作, 进行第一轮 5'RACE。使用 10X Universal Primer A Mix(SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit, USA)和 *GnRH*-3'-UTR1(表 1), 根据 SMARTer™ RACE cDNA Amplification 试剂盒说明书操作, 进行第一轮 3'RACE。第一轮 5'RACE 和第一轮 3'RACE 产物稀释 50 倍作为巢式 PCR 模板, 分别加上 *GnRH*-5'-UTR2 和 *GnRH*-3'-UTR2, 按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification 试剂盒(USA)说明书操作, 产物送华大基因(北京)测序, 使用 Vector NTI 软件分析所有测序结果(ABI 格式), 最后拼接, 获得 *GnRH* 基因的 cDNA 序列。使用在线 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)分析核酸和推测的蛋白的同源性。使用 ORF Finder 在线工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)寻找开放阅读框(ORF)。使用 DNAMAN 软件分析相应氨基酸序列同源性。

1.3.3 *GnRH* 在布氏田鼠各组织中的表达分析 为了探究 *GnRH* 是否在雄性布氏田鼠下丘脑, 垂体, 性腺等多个水平对繁殖进行调控; 并且参与泌尿系统, 消化系统功能的调节。选取组织包括; 下丘脑、垂体、肾上腺、睾丸、膀胱和肠($n=3\sim 4$)。根据 RNAprep pure Tissue 试剂盒说明书提取总 RNA, 测浓度和完整性后, 符合要求的 RNA 用作模板, 根据 cDNA Synthesis 试剂盒(TransGen Biotech, 中国)操作说明合成 cDNA 第一条链。根据 Biomark 高通量基因表达实验操作流程进行目的基因预扩增 PCR, 5 μ L 体系包含: 2.5 μ L 2 \times Taqman PreAmp master Mix (ABI, USA), 0.5 μ L 500nM (10 \times) pooled primer mixture, 0.75 μ L PCR 级水, 1.25 μ L cDNA; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变形 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变形 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 4 min, 14 个循环。产物加入 1.5 μ L PCR 级水, 0.2 μ L Exonuclease I reaction buffer 和 Exonuclease I (20 units/ μ L), PCR 仪器中 37 $^{\circ}$ C 保持 30 min; 80 $^{\circ}$ C 保持 15 min。以上产物作为模板用于实时荧光定量 PCR, 根据 Biomark 高通量基因表达实验操作流程, 以 *GnRH*-F, *GnRH*-R 为引物, β -actin 为内参, 2 \times SsoFast™ EvaGreen 为荧光染料, 使用富鲁达实时荧光 PCR 仪器进行荧光定量 PCR, PCR 程序为: 95 $^{\circ}$ C 为预变性 1 min; 96 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 60 s 延伸 3 s, 30 个循环; 从 60 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C, 每 3 s 增加 1 $^{\circ}$ C。每个 PCR 循环延伸阶段收集一次荧光, 结果用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算拷贝数。

1.3.4 不同发育阶段布氏田鼠下丘脑 *GnRH* 基因表达及血液中睾酮(T)和雌二醇(E2)水平 取不同发育时期(2、4、8、36、80 周龄, $n=7\sim 8$)的雄性和雌性布氏田鼠的下丘脑组织, 总共 78 个个体, 在 5/6 月份被解剖, 并通过上述实验方法(1.3.3)进行实时荧光定量 PCR 检测, 反应结束使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法, 以 β -actin 为内参, 计算拷贝数。

血液送北京科美生物技术有限公司(中国), 用竞争放射免疫分析法, 按照碘 [125 I] 睾酮放射免疫分析药盒操作说明检测雄性布氏田鼠睾酮激素水平, 按照雌二醇放射免疫分析药盒操作说明检测雌性布氏田鼠雌二醇激素水平。睾酮精准度为: 批内变异 CV<10%; 批间变异 CV<15%; 雌二醇精准度为: 批内 CV<10%, 批间 CV<15%。2 周龄布氏田鼠个体较小, 血液不足, 未送检测。结果采用 Lg(绝对值+1)对数值进行分析(Wang *et al.*, 2012)。

1.3.5 统计分析 使用 SPSS21.0 软件对所有数据进行统计分析, 实验数据满足正态分布, 使用 *t*-test 和 One-Way ANOVA 检验; 数据不符合正态分布, 使用非参检验。显著性设置为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 *GnRH* 基因 cDNA 序列的克隆

布氏田鼠 *GnRH* 基因 cDNA 序列 497 bp, 其中开放阅读框长度 273 bp, 编码 90 个氨基酸和一个终止密码子(TAA), 其中第 22 到 31 个氨基酸序列是高度保守的序列, 与其他物种 *GnRH* 有高相似性(图 1, 图 2)。使用 NCBI 在线 BLAST, 发现布氏田鼠下丘脑 *GnRH* 基因的 cDNA 序列与橙腹田鼠(*Microtus ochrogaste*)*GnRH1* 相似性 95%, 与拉布拉多白足鼠(*Peromyscus maniculatus bairdii*)*GnRH1* 相似性 90%, 与灰仓鼠 *GnRH1*(*Cricetulus griseus*)相似性 90%, 与金色大鼠 *GnRH1*(*Mesocricetus auratus*)相似性 90%, 与小家鼠(*Mus musculus*)*GnRH1* 相似性 85%, 与褐家鼠(*Rattus norvegicus*)*GnRH* 相似性 85%。将布氏田鼠 *GnRH* 的序列提交至 GenBank, 序列号为 KY038929。

使用 DNAMAN 软件将布氏田鼠下丘脑 *GnRH* 基因相应氨基酸序列与其他物种序列进行比对(灰仓鼠 *GnRH1*、小家鼠 *GnRH1*、拉布拉多白足鼠 *GnRH1*、金色大鼠 *GnRH1*、橙腹田鼠 *GnRH1*、斑马鱼 *GnRH*、人 *GnRH1*、原鸡 *GnRH1* 和热带爪蟾 *GnRH1*(图 2), 发现不同物种间十肽区较为稳定, 布氏田鼠和所比对的哺乳动物有相同的十肽(COOH-pGlu-His-Tip-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂)(图 2)。

1 ATCGCAGCACTCAACCCAACCAAGGAAGCTTGGCATCTTTTGGCTTTCACCTCCAAC
61 AGAGTGGAGATGATCCCCAACTTATAGCTGCTGTTCTTCTGCTGAGTCTGGGTTTAA
M I P K L I A A V L L L S L G L E
121 GGCTGTTCCAGCCAGCCTGGTCTATGGGTTGCGCCCTGGAGGAAAGAGAAGCGCGAA
G C S S Q H W S Y G L R P G G K R S A E
181 CACTTGGTCGATCTTTCCAAGAGATGGGCAAAGAGGTGGATCAACCGGAGAACCCAG
H L V D S F Q E M G K E V D Q P A E P Q
241 CACTTCGAATGCACTGCCACTGGCCCGCTCGCCCTCAGGGACTGCGAGGAGCTCTG
H F E C T A H W P R S P L R D L R G A L
301 GAAAGTCTGATGGAAGAGAAACCAGGAGAAGAAGATGTAAGTGCCTGACCTGGCCCTGAAG
E S L M E E E T R Q K K M *
361 ATCCACAACACCAAGTAT AACGTGGACATTTAAGAATGTGACCTGTTATAGATCTGTAC
421 TTGTGTGGGTTTCAGCATTTTATGCCAGCAGCATGGATTTCATAATAAGCAATGTGT
481 TGTGGATCAAGTACTGG

图 1 布氏田鼠下丘脑 *GnRH* 基因的 cDNA 核酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *GnRH* gene from Brandt's vole hypothalamus

注: 下划线表示信号肽(M~S)和连接肽(S~M), 方框标出十肽区和加工位点, *表示终止密码子。

Note: The underscore indicates the signal peptide (M~S) and the associated peptide (S~M); the sequences in box are the decapeptide region and the processing site; * indicates the stop codon.

<i>Lasiopodomys brandtii</i>	MIPKLIAAVLLLSLGLGECSSQHWSYGLRPGGK	33
<i>Microtus ochrogaste</i>	MTPKLLAAVLLLSLGLGECSSQHWSYGLRPGGK	33
<i>Cricetulus griseus</i>	MIPKLTAVVLLSLCLEGCSQHWSYGLRPGGK	33
<i>Mesocricetus auratus</i>	.MIPKLTAAVLLLSLCLEGCSQHWSYGLRPGGK	33
<i>Peromyscus maniculatus bairdii</i>	MIPKLTAAVLLLSLCLEGCSQHWSYGLRPGGK	33
<i>Rattus norvegicus</i>	.MILKLMAGILLTVCLEGCSQHWSYGLRPGGK	33
<i>Homo sapiens</i>	.MKPIQKLLAGLILLTWCVEGCSQHWSYGLRPGGK	35
<i>Xenopus tropicalis</i>	MKAISTYALLLVLLFSAHVGHQAQHSYGLRPGGK	35
<i>Gallus gallus</i>	.MEKSRKILVGVLLFTASVAICLAQHWSYGLQPGGK	36
<i>Zebra fish</i>	MEWKGRLLVQLLLVLCVLEVSLCQHWSYGWLPGGK	36
Consensus	q h w s y g p g g k	
<i>Lasiopodomys brandtii</i>	RSAEHLVDSFQEMGKEVDQPAEPQHFECTAHW	65
<i>Microtus ochrogaste</i>	RSAEHLVDSFQEMGKEVDQPAEPQHFECTVHWP	66
<i>Cricetulus griseus</i>	..RNAEHLSDSFQEMGKEVDQLAEPQHFECTVRW	65
<i>Mesocricetus auratus</i>	.RNAERLGDSDFQEMDKEVDQLAEPQHLECTVHW	65
<i>Peromyscus maniculatus bairdii</i>	.RNAEHLVESFQEMGEDVDQLAEPQHFECTVHG	65
<i>Rattus norvegicus</i>	..RNTEHLVESFQEMGKEVDQMAEPQHFECTVHW	65
<i>Homo sapiens</i>	..RDAENLDSFQEIIVKEVGLAETQRFECTTHQPRSP	71
<i>Xenopus tropicalis</i>	.RDAESLQDMYPETPNEVPLFPELERLECSVPQSRNL	71
<i>Gallus gallus</i>	.RNAENLVESFQEIANEMESLGEQKAECPGSYQHP	71
<i>Zebra fish</i>	..RSVGEMEATFRMLDPGDTVLSIPADSPMEQLSPIHIVN	74
Consensus	r	
<i>Lasiopodomys brandtii</i>	PRSPLRDLRGALESLEEETRQKKM	89
<i>Microtus ochrogaste</i>	RSPLRDLRGALESLEEETRQKKM	89
<i>Cricetulus griseus</i>	PRSPLRDLRGALESLEEETRQKKM	89
<i>Mesocricetus auratus</i>	PRSPLRDLRGVLESLEEETRQKKM	89
<i>Peromyscus maniculatus bairdii</i>	.PRSPLRDLRGALESLEEESRQKKI	89
<i>Rattus norvegicus</i>	PRSPLRDLRGALESLEEERQKKM	89
<i>Homo sapiens</i>	LRDLKGALESLEEETGQKKI	91
<i>Xenopus tropicalis</i>	VLRGALMSWLDGENRKKI	89
<i>Gallus gallus</i>	.RLSDLKETMASLIEGEARRKEI	91
<i>Zebra fish</i>	EVDAEGLPLKGQRYSDRRGRV	94
Consensus		

图 2 布氏田鼠(登录号: KY038929)、灰仓鼠(登录号: AHC06151.1)、小家鼠(登录号: AAI16900.1)、拉布拉多白足鼠(登录号: XP_015841126.1)、金色大鼠(登录号: XP_005075289.2)、橙腹田鼠(登录号: XP_005355523.1)、斑马鱼(登录号: AAL99294.1)、人(登录号: NP_001076580.1)、原鸡(登录号: NP_001074346.1)和热带爪蟾(登录号: NP_001107165.1) *GnRH* 氨基酸序列比较

Fig. 2 Comparison of amino acid sequence of *GnRH* among *Lasiopodomys brandtii* (GenBank accession: KY038929), *Cricetulus griseus* (GenBank accession: AHC06151.1), *Rattus norvegicus* (GenBank accession: AAI16900.1), *Peromyscus maniculatus bairdii* (GenBank accession: XP_015841126.1), *Mesocricetus auratus* (GenBank accession: XP_005075289.2), *Microtus ochrogaste* (GenBank accession: XP_005355523.1), *Zebra fish* (GenBank accession: AAL99294.1), *Homo sapiens* (GenBank accession: NP_001076580.1), *Gallus gallus* (GenBank accession: NP_001074346.1) and *Xenopus tropicalis* (GenBank accession: NP_001107165.1)

注: 阴影标出一致区域。

Note: Identical amino acid residues are marked with shading.

2.2 *GnRH* 基因在布氏田鼠各组织的表达分析

基因组织表达特征的分析结果显示, 4 周龄雄鼠 *GnRH* 在不同组织中的表达量呈显著性差异(One-Way ANOVA 检验: $df=5$, $F=3.719$, $P<0.05$), 下丘脑中的表达量最高, 其次是肠, 肾上腺, 睾丸, 垂体, 在膀胱中表达最低(图 3), 并且下丘脑中表达量显著高于肠(LSD 检验, $P<0.05$), 肾上腺(LSD 检验: $P<0.01$), 睾丸(LSD 检验, $P<0.01$), 垂体(LSD 检验, $P<0.01$)和膀胱(LSD 检验, $P<0.01$); 8 周龄雄鼠 *GnRH* 在不同组织中的表达量呈显著性差异(ANOVA 检验: $df=5$, $F=3.196$, $P<0.05$), 下丘脑中的表达量最高, 其次是肠, 睾丸, 肾上腺, 垂体, 在膀胱中最低(图 3), 并且下丘脑中表达量显著高于肾上腺(LSD 检验, $P<0.015$), 睾丸(LSD 检验, $P<0.05$), 垂体(LSD 检验, $P<0.01$)和膀胱(LSD 检验, $P<0.05$)。

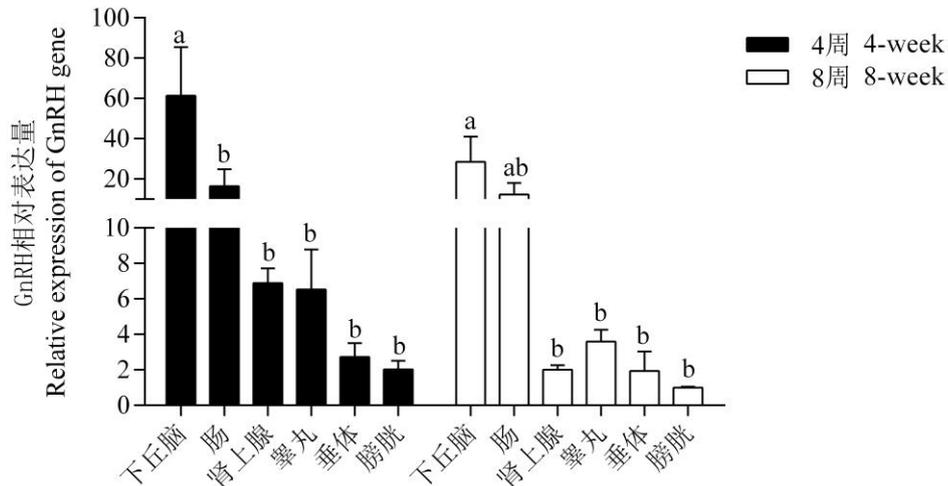


图 3 4/8 周龄雄性布氏田鼠不同组织中 *GnRH* 相对表达量(Mean±SE, $n=3$)。注: 柱形图上方不同字母表示差异显著。

Fig. 3 Tissue specific expression of *GnRH* in 4/8 week-old male Brandt's voles (Mean±SE, $n=3$). Note: Bar with different letters indicate significant difference.

1.2 不同发育阶段布氏田鼠下丘脑 *GnRH* 表达差异及血清性激素水平差异

不同发育阶段布氏田鼠下丘脑 *GnRH* 表达量结果表明, 不同周龄雄鼠之间没有显著性差异(One-Way ANOVA 检验: $df=4$, $F=2.458$, $P > 0.05$), 但 80 周龄雄鼠下丘脑 *GnRH* 表达量显著高于 2 周龄(LSD 检验: $P<0.05$)和 8 周龄(LSD 检验: $P<0.01$)(图 4: A); 不同年龄阶段雌鼠下丘脑 *GnRH* 表达量呈极显著性差异(One-Way ANOVA 检验: $df=4$, $F=7.384$, $P<0.001$), 80 周龄下丘脑 *GnRH* 表达量均极显著高于其在 2 周龄(LSD 检验, $P<0.001$), 4 周龄(LSD 检验, $P<0.001$), 8 周龄(LSD 检验, $P<0.01$)和 36 周龄(LSD 检验, $P<0.001$)(图 4: B)。

雄鼠血液中睾酮水平在不同发育阶段呈极显著差异(One-Way ANOVA 检验: $df=3$, $F=12.898$, $P<0.001$), 并且 4 周龄睾酮水平极显著低于 8 周龄(LSD 检验, $P<0.001$), 36 周龄(LSD 检验, $P<0.001$)和 80 周龄(LSD 检验, $P<0.001$)(图 4: C); 雌鼠血液中雌二醇水平没有显著性差异(One-Way ANOVA 检验: $df=3$, $F=2.757$, $P > 0.05$), 但 4 周龄雌二醇水平显著低于 8 周龄(LSD 检验, $P<0.05$)和 80 周龄(LSD 检验, $P<0.05$)(图 4: D)。

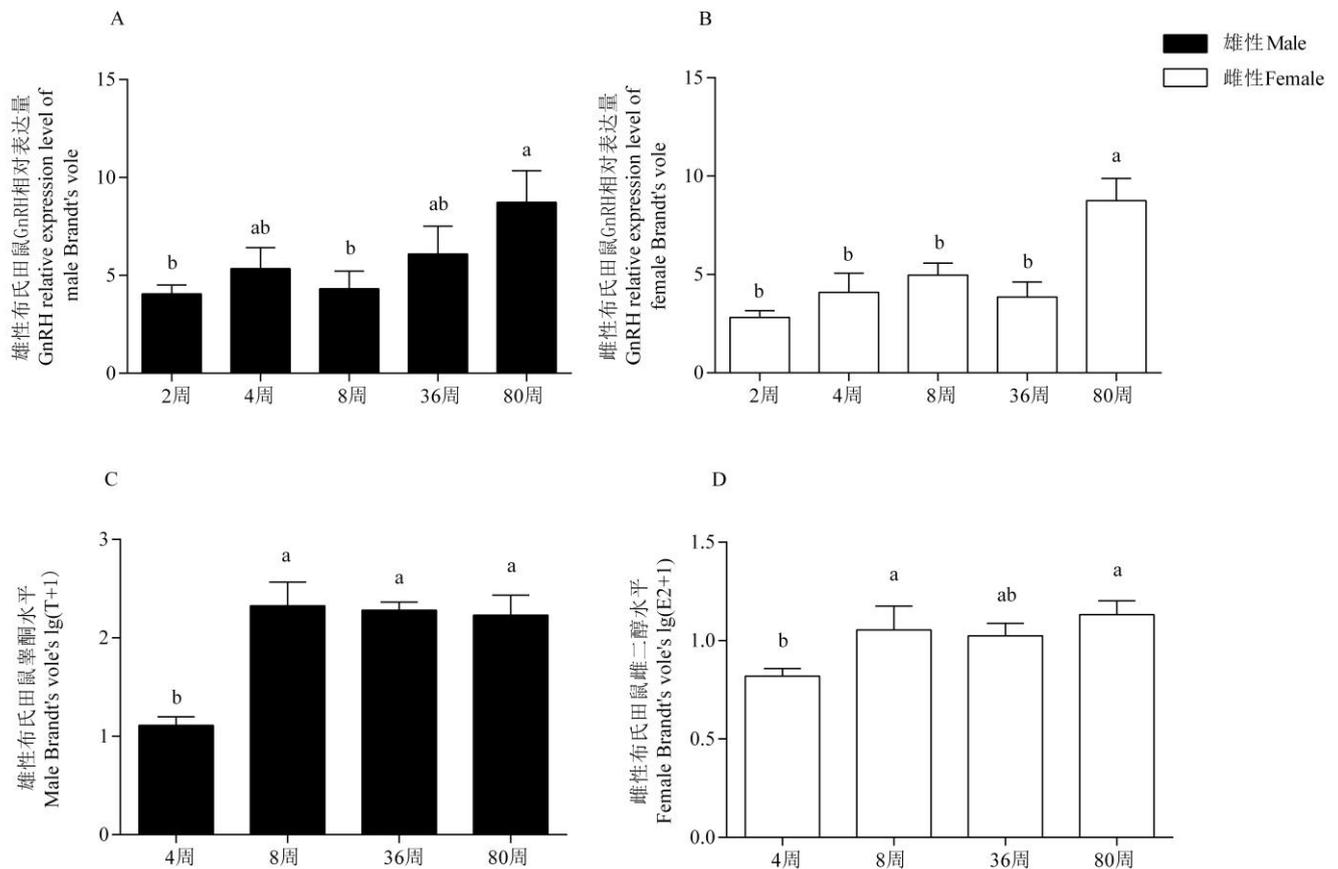


图4 不同年龄布氏田鼠下丘脑 *GnRH* 表达情况(A. 雄鼠; B. 雌鼠)及性激素水平差异(C. 雄鼠睾酮; D. 雌鼠雌二醇)(Mean±SE, n=8)
 Fig. 4 *GnRH* expression level in hypothalamus and blood testosterone level of males/estradiol level of females in Brandt's voles with different developmental stages (Mean±SE, n=8)

注: 柱形图上方不同字母表示差异显著。

Note: Bar with different letters indicate significant difference.

3 讨论

很多脊椎动物的 *GnRH* cDNA 序列都已经被克隆(Amano *et al.*, 2002; Swapna *et al.*, 2005; 丁炜东等, 2006)。本研究克隆获得 497 bp *GnRH* cDNA 序列, 编码 90 个氨基酸, 十肽区与其他哺乳动物有高度的保守性。序列比对和相应氨基酸序列同源性分析表明布氏田鼠下丘脑 *GnRH* 基因属于 I 型。在所检测的 6 个组织中, 包括下丘脑、垂体、睾丸、肾上腺、膀胱和肠, 均检测到 *GnRH* 的表达, 并且下丘脑中表达量最高。与前人的研究一致, *GnRH* 除在下丘脑中广泛表达, 还在其他组织中表达(叶丹等, 2003)。*GnRH* 在下丘脑, 垂体的表达主要与繁殖调控有关, 而在外周组织检测到表达, 提示 *GnRH* 可能参与其他生物学功能。

本研究结果显示, 出生后 8 周的雄鼠/雌鼠性激素水平均显著高于出生后 4 周鼠($P < 0.05$), 36 周龄和 80 周龄雄/雌鼠性激素水平也维持高水平, 与之前的研究吻合, 出生后 8 周雄/雌鼠性器官达到成熟状态, 8 周龄/36 周龄/80 周龄鼠性器官重量均显著高于出生后 4 周鼠(Chen, 2017)。实验用 8 周龄鼠为当年成鼠, 36 周龄和 80 周龄鼠分别为 15 年和 14 年出生的鼠, 均为越冬鼠。解剖时间为繁殖季节(5~6 月), 三者的性腺状态和性激素水平均显示它们都具有繁殖能力。这与之前的研究相符。任飞等人的研究发现, 在繁殖季节, 越冬鼠和当年成鼠均可以参加繁殖(任飞等, 2016)。

我们的实验显示, 8 周龄雄性/雌性鼠性激素水平均升高, 显著高于 4 周龄($P < 0.05$)。但下丘脑 *GnRH* 并没有相应增加, 8/36 周龄的鼠种, 我们认为性激素高水平, 的情况下, 下丘脑 *GnRH* 表达量没有显著增加, 是性激素对下丘脑 *GnRH* 负反馈的作用造成的。下丘脑是内分泌系统的控制中枢, 它可以通过下丘脑-垂体-性腺轴调节外周性激素的分泌。在正常状态下, 下丘脑可以分泌 *GnRH*, 通过垂体门脉系统作用于腺垂体, 刺激腺垂体释放促性腺激素, 如黄体生成素(LH)和卵泡刺激素(FSH), 随着血液循环到达性腺, 刺激性腺分泌性激素。性激素通常情况下可以通过负反馈调节作用而影响下丘脑和腺垂体的激素分泌(阮玲娟, 2011)。性激素可以分为雌激素、雄激素和孕激素三大类, 而以前两者为外周最主要性激素。它们主要由性腺合成和分泌。雌性大鼠的卵巢和雄性大鼠的睾丸分别是体

内分泌性激素的外周主要器官(Solomon & Herman, 2009)。下丘脑的室内侧核、正中隆起、弓状核等区域都有丰富的雄激素受体(母义明, 2004);能参与调解 HPG 轴的雌激素受体,广泛分布于大脑的多个脑区,包括海马、下丘脑、杏仁核和脑干(Freeman *et al.*, 2006)。并且在很多物种中都发现了性激素对下丘脑 GnRH, 或者促性腺激素的反馈作用。在雄性中,阉割后,下丘脑 GnRH 脉冲频率增加;阉割后,给予睾酮, GnRH 的释放被抑制。正常男性服用 Anandron(抗雄激素药)后, GnRH 脉冲频率增加。使用睾酮替代治疗原发性功能减退的患者, GnRH 脉冲频率得以减慢,并且峰值降低(母义明, 2004)。在雌性中,十个患有性卵巢癌的雌恒河猴 *M. mulatta*, 7 例血清 FSH 含量升高。少年雌猴,阉割后,血清 FSH 值远高于正常青春期水平,八个假手术的青少年控制组均没有显示 FSH 的平均(\pm SD)血清浓度的变化(Winter *et al.*, 1987)。母羊中,发现雌二醇对 GnRH 有负反馈调节(Glass, 王刚牛, 1988)。在大鼠中,卵巢切除手术后,下丘脑中雌二醇水平有所增加,并且雌二醇受体 mRNA 表达显著增加(阮玲娟, 2011)。我们的结果显示,2-4 周龄布氏田鼠的激素水平最低,同时下丘脑 *GnRH* mRNA 也表现相似的低表达水平。可能是因为,幼年时期,性器官尚未发育成熟,外周性激素水平低,对下丘脑的反馈抑制作用不明显,而主要的调节剂是下丘脑 GnRH 调节剂的中心抑制;青春期后,主要调节剂变成性激素类固醇。这一现象与恒河猴的研究的猜想较为符合,幼年促性腺激素分泌的主要调节剂是下丘脑 GnRH 调节剂的中心抑制,青春期后,促性腺激素分泌的主要调节剂变成性类固醇介导的反馈抑制(Winter *et al.*, 1987)。本实验 8 周龄鼠外周性激素显著高于出生后 4 周龄鼠,雄性睾丸和雌性卵巢在 8 周完全性成熟(Chen, 2017)。然而,与 4 周龄个体相比,8 周龄鼠下丘脑 *GnRH* 表达水平并未显著升高。4 周龄为布氏田鼠繁殖器官快速发育时期,尤其是雄性,尚未达到完全性成熟,8 周龄/36 周龄雄鼠和雌鼠则完全性成熟且处于繁殖盛期。我们认为 4 周龄期起主导作用的是下丘脑 GnRH 调节剂的中心调节,因为如果此阶段性激素反馈抑制为主导,性器官发育会受阻;而 8 周龄/36 周龄雄鼠和雌鼠在性激素水平较高时,其下丘脑 *GnRH* 表达水平较低,猜测是由于此时起主导作用的是外周性激素的调节,此时高水平的外周性激素抑制了 *GnRH* 的表达。但 80 周龄雄鼠和雌鼠均出现性激素与下丘脑 *GnRH* 表达量高水平的情况,我们猜测是由于随着年龄的增加,到 80 周龄时,下丘脑 GnRH 对外周性激素的调节变得不敏感。这与恒河猴中的研究较为相似。11 岁年龄的恒河猴,睾丸切除后,在他们接近青春期时,促性腺激素水平升高到成年范围;接近 29 岁年龄的恒河猴, LH 对睾丸切除术的反应推迟到了 6 个月以后;雌性中,4 月龄的恒河猴,卵巢切除后, FSH 在 2 周内升高,1 岁的恒河猴,卵巢切除后,最初的 FSH 上升延迟了 3 个月,1~2 岁的恒河猴,卵巢切除后,实验组和对照组间, FSH/LH 在后来的 2 年里没有统计学差异(Winter *et al.*, 1987)。所以我们猜测,当布氏田鼠的年龄逐渐增加,到达 80 周龄时,性激素对下丘脑 GnRH 的反馈作用减弱,或应答时间加长。

本研究克隆获得了布氏田鼠下丘脑 GnRH 的 cDNA 序列,属于 I 型 GnRH。结果表明 GnRH 的结构和功能是比较保守的。雄性/雌性布氏田鼠在出生后 8 周达到性成熟(Chen, 2017)。下丘脑 *GnRH* 在 4 周龄鼠中低表达,同时血清性激素呈现低水平;8 周龄/36 周龄鼠 *GnRH* 低表达,在血清中性激素显著高于 4 周龄鼠,可能与青春期及繁殖盛期成体中 GnRH 受性激素反馈抑制有关;80 周龄鼠,下丘脑 *GnRH* 表达水平升高,可能与老年个体反馈抑制现象减弱有关。不同年龄段血清性激素水平与下丘脑 *GnRH* 表达的不同步,让我们猜测下丘脑 GnRH 调节剂的中心抑制和性类固醇介导的反馈抑制调控布氏田鼠的繁殖,但在不同年龄阶段,谁为主导作用有待进一步验证。

参考文献:

- Glass JD, 王刚牛. 1988. 雌二醇和孕酮对乏情母羊 GnRH 免疫反应神经系统的影响[J]. 草食家畜, (2): 26-28.
- 兵海燕, 余纯, 李峰, 等. 2011. GnRH 通过 ERK 途径来调控大鼠睾丸间质细胞类固醇激素的合成[J]. 亚洲男性学杂志(英文版), 3: 438-445.
- 陈雅娟, 张博, 靳铁治, 等. 2014. 不育控制技术有害鼠类防控中的研究进展[J]. 陕西农业科学, 60(12): 73-76.
- 崔培. 2014. 性腺激素对初情期大鼠生殖轴上 NKB、GnRH 和 Kisspeptin 表达的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学.
- 丁炜东, 曹丽萍, 吴婷婷. 2006. 奥利亚罗非鱼促性腺激素释放激素 cDNA 的原核表达及其免疫原性研究[J]. 生物工程学报, 22(4): 561-566.
- 高彦, 冒韵东, 王炜, 等. 2009. GnRH-a 对卵巢黄体期生殖激素水平及卵泡募集的影响[J]. 现代生物医学进展, 9(12): 2295-2296.
- 侯建军, 尹峰. 1996. 关于布氏田鼠的生态学研究[J]. 内蒙古师大学报(自然汉文版), 12(4): 54-58.
- 黎金秀. 2008. 促性腺激素释放激素(GnRH)在广西摩拉杂交水牛下丘脑-垂体-卵巢轴的分布[D]. 南宁: 广西大学.
- 林浩然. 2004. 促性腺激素释放激素(GnRH)结构与功能及其受体的进化发展[J]. 中山大学学报(自然科学版), 43(6): 1-5.
- 柳海燕, 陶晓倩, 时姗姗, 等. 2009. 大鼠睾丸间质细胞中促性腺激素释放激素激动剂调控睾酮合成的机制[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 29(10): 1337-1341.
- 吕江, 张凤琴, 刘汉武, 等. 2013. 具有竞争性繁殖干扰的不育控制害鼠种群模型[J]. 工程数学学报, (2): 263-270.
- 母义明. 2004. 下丘脑-垂体轴外 GnRH 系统研究进展[J]. 武警后勤学院学报(医学版), 13(5): 424-425.
- 蒲勇, 方富贵, 王琳, 等. 2010. 不同佐剂 GnRH 疫苗主动免疫对公猪睾丸发育和血清睾酮的影响[J]. 中国兽医学报, 30(7): 992-995.
- 任飞, 王大伟, 李宁, 等. 2016. 不同季节出生的布氏田鼠繁殖发育模式分析[J]. 植物保护, 42(2): 31-37.
- 施大钊, 海淑珍, 吕东, 等. 1999. 布氏田鼠洞群内社群结构变动与序位的研究[J]. 兽类学报, 19(1): 48-55.
- 宛新荣, 王梦军, 王广和, 等. 2002. 布氏田鼠标志种群的繁殖参数[J]. 兽类学报, 22(2): 116-122.
- 王大伟, 刘祺, 刘明, 等. 2011. EP-1 包合物制备及其对布氏田鼠繁殖器官的影响[J]. 兽类学报, 31(1): 79-83.

- 叶丹, 潘建伟, 廖鸣娟. 等. 2003. 促性腺激素释放激素的结构及其生物学功能[J]. 生物化学与生物物理进展, 30(1): 49-53.
- 岳海宁, 吴润. 1995. GnRH 主动免疫对绵羊血清睾酮含量的影响[J]. 甘肃农大学报, 2: 156-159.
- 张洁, 钟文勤. 1979. 布氏田鼠种群繁殖的研究[J]. 动物学报(Current Zoology), (3): 63-72.
- 张洁, 钟文勤. 1981. 布氏田鼠洞群内群体结构的研究[J]. 兽类学报, 1(1): 53-58.
- 张洁, 周庆强, 钟文勤. 等. 1978. 布氏田鼠种群年龄的研究[J]. 动物学报(Current Zoology), (4): 41-55.
- 张一萍. 2004. 下丘脑-垂体轴外 GnRH 系统研究进展[J]. 武警后勤学院学报(医学版), 13(5): 424-425.
- 张知彬. 1995. 鼠类不育控制的生态学基础[J]. 兽类学报, 15(3): 229-234.
- 仲跻峰, 董伟. 1992. 使用 GnRH 类似物对蒙古羊超排及孕酮、雌二醇、LH 和 FSH 内分泌的影响[J]. 草食家畜, S1: 56-59.
- Amano M, Takahashi A, Yamanome T, *et al.* 2002. Molecular cloning of three cDNAs encoding different GnRHs in the brain of barfin flounder[J]. General & Comparative Endocrinology, 126(126): 325-333.
- Amoss M, Burgess R, Blackwell R, *et al.* 1971. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 44(1): 205-210.
- Baba Y, Matsuo H, Schally AV. 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 44(2): 459-463.
- Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, *et al.* 1979. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone[J]. Science, 202(4368): 631-633.
- Yan Chen, Lan Liu, Zhengguang Li, *et al.* 2017. Molecular cloning and characterization of kiss1 in Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*)[J]. Biochemistry & Molecular Biology, DOI: 10.1016/j.cbp.2017.04.006.
- Clarke IJ, Smith JT, Goodman RL, *et al.* 2009. Kisspeptin and seasonality in sheep[J]. Peptides, 30(1): 154-163.
- Dubois EA, Zandbergen MA, Peute J, *et al.* 2002. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates[J]. Brain Research Bulletin, 57(4): 413-418.
- Di FM, Rastogi RK, Ceciliani F, *et al.* 2000. Mammalian and chicken I forms of gonadotropin-releasing hormone in the gonads of a protochordate, *Ciona intestinalis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(5): 2343-2348.
- Freeman EW, Sammel MD, Lin H, *et al.* 2006. Associations of hormones and menopausal status with depressed mood in women with no history of depression[J]. Arch Gen Psychiatry, 63(4): 375-382.
- Gorbman A, Sower SA. 2004. Evolution of the role of GnRH in animal (Metazoan) biology[J]. General & Comparative Endocrinology, 134(3): 207-213.
- Hood GM, Chesson P, Pech RP. 2000. Biological control using sterilizing viruses: host suppression and competition between viruses in non-spatial models[J]. Journal of Applied Ecology, 37(6): 914-925.
- Huang W, Yao B, Sun L, *et al.* 2001. Immunohistochemical and in situ hybridization studies of gonadotropin releasing hormone (GnRH) and its receptor in rat digestive tract[J]. Life Sciences, 68(15): 1727-1734.
- Lee VHY, Lee LTO, Chow BKC. 2008. Gonadotropin-releasing hormone: regulation of the GnRH gene[J]. Febs Journal, 275(22): 5458-5478.
- Lethimonier C, Madigou T, Muñoz-Cueto JA. 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish[J]. General & Comparative Endocrinology, 135(1): 1-16.
- Lincoln GA. 1976. Seasonal variation in the episodic secretion of luteinizing hormone and testosterone in the ram[J]. Journal of Endocrinology, 69(2): 213-226.
- Marshall JC, Eagleson CA, McCartney CR. 2001. Hypothalamic dysfunction[J]. Molecular & Cellular Endocrinology 183(1-2): 29-32.
- Solomon MB, Herman JP. 2009. Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and mental illness[J]. Physiology & Behavior, 97(2): 250-258.
- Swapna I, Sreenivasulu G, Rasheeda MK, *et al.* 2005. Seabream GnRH: partial cDNA cloning, localization and stage-dependent expression in the ovary of snake head murrel, *Channa striatus*[J]. Fish Physiology and Biochemistry 31(2): 157-161.
- Wang D, Zhang J, Zhang Z. 2012. Effect of testosterone and metatonin on social dominance and agonistic behavior in male *Tscheskia triton*[J]. Behavioural Processes, 89(3): 271-277.
- Winter JS, Ellsworth L, Fuller G, *et al.* 1987. The role of gonadal steroids in feedback regulation of gonadotropin secretion at different stages of primate development[J]. Acta Endocrinologica, 114(2): 257-268.
- Young KG, Chang JP, Goldberg JI. 1999. Gonadotropin-releasing hormone neuronal system of the freshwater snails *Helisoma trivolvis* and *Lymnaea stagnalis*: possible involvement in reproduction[J]. Journal of Comparative Neurology, 404(4): 427-437.