

文章编号: 1674 - 5566(2014)04 - 0481 - 06

CRH、UI 和 UII 基因在斑马鱼发育早期的表达谱

罗 蕾, 陈阿琴, 吕为群

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘 要: 促肾上腺皮质激素释放激素 (Corticotropin-releasing hormone, CRH)、尾加压素 I (Urotensin I, UI) 和尾加压素 II (Urotensin II, UII) 广泛存在于脊椎动物中。在鱼类中, 它们在渗透压调节、繁殖、营养代谢以及应激反应中发挥着重要作用。本研究中, 通过收集 0、1.5、3、7.5、15、30、60、120、240、480、960、1920 和 3840 hpf (hours post-fertilization) 的斑马鱼早期发育样品, 运用荧光定量 PCR 技术进行检测发现 CRH、UI、UII α 和 UII β mRNA 从 0 hpf 开始存在表达, 而且 CRH、UI、UII α 和 UII β 的表达量随发育而逐渐增加, 并分别在 120 hpf 或 144 hpf 达到最高水平。相关性分析揭示在斑马鱼早期发育过程中, CRH、UI、UII α 和 UII β mRNA 的表达水平两两之间呈现极显著正相关, 这表明 CRH、UI、UII α 和 UII β 在斑马鱼早期发育过程中关系紧密并且相互合作发挥作用。

研究亮点: 目前关于 CRH、UI 和 UII 基因的研究大多都集中在成鱼上, 有关它们在鱼类发育过程中的生理功能和作用机制的研究还相对缺乏。对斑马鱼发育早期 CRH、UI、UII α 和 UII β 基因的表达谱进行研究, 为深入研究上述基因的生理功能及调控机制提供基础资料。

关键词: 斑马鱼; 个体发育; 荧光定量 PCR; 基因表达; 促肾上腺皮质激素释放激素; 尾加压素

中图分类号: S 917

文献标志码: A

促肾上腺皮质激素释放激素 (Corticotropin-releasing hormone, CRH)、尾加压素 I (Urotensin I, UI) 和尾加压素 II (Urotensin II, UII) 广泛存在于脊椎动物中^[1-4]。在硬骨鱼类中, 其特有的神经内分泌结构——尾部神经分泌系统 (Caudal neurosecretory system, CNSS) 是 CRH、UI 和 UII 的主要表达和分泌场所^[3, 5-9]。这些肽类激素在渗透压调节、繁殖、营养代谢以及应激中发挥着重要作用^[7-11]。

CRH 由 41 个氨基酸残基组成, 是小分子肽类激素, 最早从绵羊的下丘脑中分离提纯得到^[12]。不同种属间 CRH 具有较高的同源性, 人与大鼠的 CRH 相同, 与羊的 CRH 仅有 7 个氨基酸不同。UI 由 41 个氨基酸残基组成, 属于 CRH 超家族, 该家族还包括两栖动物中 40 个氨基酸的蛙皮降压肽和哺乳动物中 UI 直系同源物——尿皮质激素^[4, 8, 11, 13]。UI 最早是从白亚口鱼

(*Catostomus commersoni*) 的尾垂体提取物中分离获得^[14]。

UII 是一种含有 12 个氨基酸的环肽, C 末端的第 6 位和第 11 位的半胱氨酸残基间通过二硫键形成环形结构^[15]。最早 UII 是从长腭泥虾虎鱼 (*Gillichthys mirabilis*) 的尾垂体中发现并被分离出来^[16-17]。随后的研究发现 UII 广泛存在于从七鳃鳗到人类的整个脊椎动物中, 并且 6 个氨基酸组成的环形序列是高度保守的 (Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys), 这也被认为是 UII 的生物活性中心^[1, 16, 18-23]。在鲤科鱼类中 UII 存在多种亚型, 如鲤 UII 具有 4 个亚型^[24], 斑马鱼中 UII 存在两种亚型, 即 UII α 和 UII β ^[25]。

目前关于 CRH、UI 和 UII 基因的研究大多都集中在成鱼基础上, 但对于它们在鱼类发育过程中的生理功能与作用机制的研究还相对缺乏。本研究利用模式生物斑马鱼探讨了 CRH、UI、

收稿日期: 2014-01-14

修回日期: 2014-03-26

基金项目: 国家自然科学基金(31072228, 41376134); 高等教育博士点基金(20113104110002)

作者简介: 罗 蕾(1989—), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类环境适应性。E-mail: luolei2129919@163.com

通信作者: 吕为群, E-mail: wqlv@shou.edu.cn

UII α 和 *UII* β 在早期发育过程中的表达模式,为深入研究 *CRH*、*UI*、*UII* α 和 *UII* β 的生理功能及调控机制提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验动物为 Tubingen 品系斑马鱼 (*Danio rerio*),源自中国海洋大学段存明实验室,培养在海圣的自动循环水养殖系统中,光照黑暗比为 14:10。胚胎通过正常交配获得,在 28 °C 胚胎培养液中控光培养,按照 KIMMEL 等^[26] 的描述对其发育时期进行鉴定,收集 0、1.5、3.7、5.3、8、10、16、24、48、72、96、120 和 144 hpf (hours post-fertilization) 的斑马鱼发育样品。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计

根据 NCBI 中斑马鱼 *CRH* (NM_001007379)、*UI* (NM_001030180)、*UII* α (NM_212848) 和 *UII* β (NM_205591) 的基因序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计 qPCR 引物, β -actin (AF057040) 基因作为内参基因,引物全部由上海生工公司合成(表 1)。

表 1 基因引物序列

Tab.1 Primer pair sequences used for real-time qPCR amplifications

基因	序列 (5' - 3')
<i>CRH</i>	F: GCCGCGCAAAGTTCAAAA R: GCGAGGAGAATCTGTGCGTAA
<i>UI</i>	F: CAGGCTTCCTCACCGCTACT R: TCAATGGGACGGGCTTCA
<i>UII</i> α	F: GCAGCCGACGACATTC R: CAAAAGACCACTGGGAGGAAC
<i>UII</i> β	F: AGTCGGCGGAGATGAGCT T R: GCGGCATCATGGGAGAGATA
β -actin	F: GCTGCCTCTTCTTCTCC R: ATGTCCACGTCGCACTTC

注: *CRH* 引自 ALDERMAN 和 BERNIER^[27]; *UII* β 引自 PARMENTIER 等^[28]。

1.2.2 RNA 提取与逆转录

将各发育时期 50 枚胚胎放入 RNase-free 的 1.5 mL 的离心管中;加入 1 mL RNAiso plus (TaKaRa),用电动搅拌器搅拌混匀,激烈振荡,室温放置 5 min;加入 200 μ L 氯仿(上海生工),剧

烈振荡 15 s,室温放置 3 min;4 °C、12 000 r/min 离心 15 min;将上层水相移入一个新的 RNase-free 的 1.5 mL 离心管中,加入 500 μ L 异丙醇(上海生工),混匀,室温放置 10 min;4 °C、12 000 r/min 高速离心 10 min 弃上清,用 1 mL 预冷的 75% 乙醇(0.1% DEPC 水配置)洗涤 RNA 沉淀 1 次,4 °C、12 000 r/min 高速离心 5 min,倒去 75% 乙醇(上海生工),打开离心管盖,在室温下放置晾干,用 30 μ L Nuclease-free-water 溶解 RNA 沉淀;总 RNA 经检测 RNA 完整性和浓度后,按照 M-MLV Kit(Promega)说明书逆转录合成 cDNA。

1.2.3 荧光定量 PCR

为了检测荧光定量 PCR 引物的扩增效率,取 144 hpf 斑马鱼的 cDNA 为模板 2 倍梯度稀释后进行荧光定量 PCR 扩增。以模板量的对数为横坐标,以 Ct 值为纵坐标绘制各自的基因引物扩增效率的标准曲线。

采用 SYBR Green I(TaKaRa)嵌合荧光法,于 ABI 7500 仪器上进行荧光定量 PCR 反应,反应程序为:95 °C,30 s,一个循环;95 °C,5 s,60 °C,34 s,共 40 个循环,95 °C 溶解曲线检测反应特异性。每个样品设 3 个重复孔, β -actin 作为内参基因。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法进行相对定量。

1.2.4 数据统计分析

使用 SigmaStat 3.0 分析软件对定量数据进行单因素方差分析和 Duncan's 多重比较,*CRH*、*UI*、*UII* α 和 *UII* β 之间的相关性采用 Pearson product-moment correlation test 进行检验, $P < 0.05$ 表示差异显著或相关性显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著或相关性极显著。

2 结果

2.1 *CRH* 和 *UI* 在斑马鱼早期发育过程中的表达模式

荧光定量 PCR 结果表明在 0 hpf 到 24 hpf 过程中,*CRH* mRNA 表达量保持一个非常低的水平,随后逐渐增加并在 144 hpf 达到最高值(图 1);*UI* mRNA 表达量在 3.7 hpf 有所增加,随即急速下降,在 24 hpf 后才逐步增加并在 144 hpf 达到最高水平(图 1)。虽然 *CRH* 和 *UI* mRNA 在 24 hpf 之前都保持一个较低的表达水平,但是 *UI* 的表达模式相对 *CRH* 更具波动性。

2.2 $UII\alpha$ 和 $UII\beta$ 在斑马鱼早期发育过程中的表达模式

$UII\alpha$ (图 1) 和 $UII\beta$ (图 1) 的表达量在 72 hpf 之前都维持一个较低的水平并相对稳定,而在孵化后表达量显著增加并分别在 120 hpf 和 144 hpf 达到最高值。而且在斑马鱼早期发育过程中 $UII\alpha$ 和 $UII\beta$ 表达量的显著性变化要明显晚于 CRH 和 UI 。

2.3 斑马鱼发育早期 CRH 、 UI 、 $UII\alpha$ 和 $UII\beta$

基因表达水平之间的相关性

对 0 hpf ~ 6 dpf 斑马鱼的 CRH 、 UI 、 $UII\alpha$ 和 $UII\beta$ 基因表达量进行相关性分析,发现 CRH 与 UI 、 $UII\alpha$ 和 $UII\beta$ 的相关性均大于 0.91 ($P < 0.01$), UI 与 $UII\alpha$ 和 $UII\beta$ 的相关性均大于 0.85 ($P < 0.01$), $UII\alpha$ 和 $UII\beta$ 的相关性为 0.910 ($P < 0.01$), 因此斑马鱼早期发育过程中 CRH 、 UI 、 $UII\alpha$ 和 $UII\beta$ 两两之间呈现极显著正相关性(表 2)。

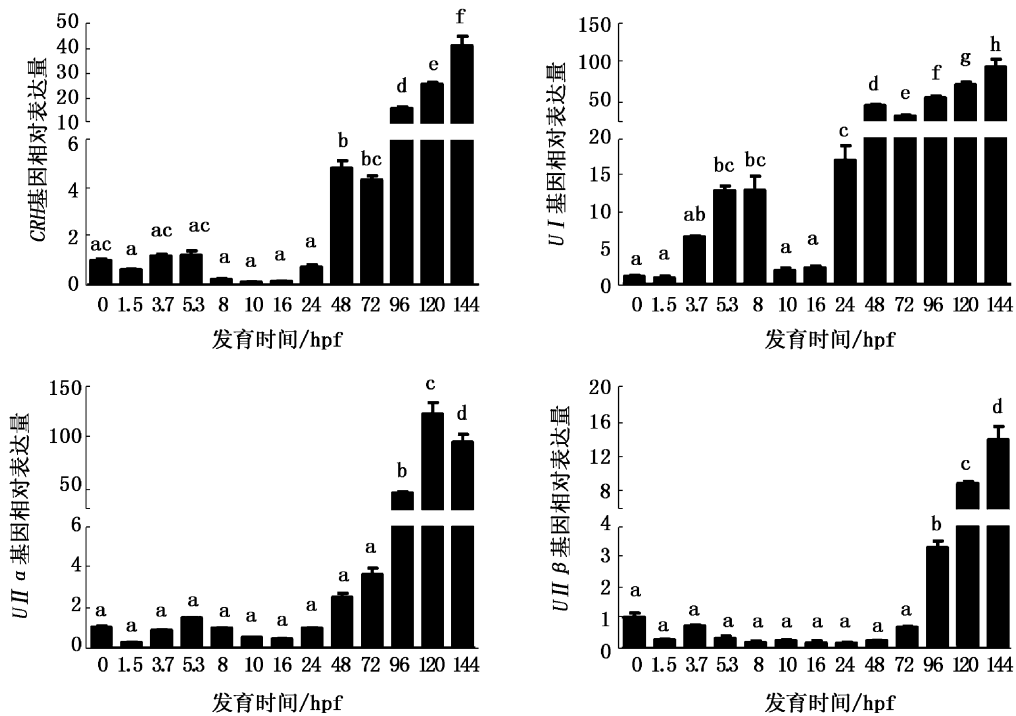


图 1 荧光定量 PCR 检测斑马鱼发育早期 CRH 、 UI 、 $UII\alpha$ 和 $UII\beta$ 的表达谱

Fig. 1 Developmental expression profile of CRH , UI , $UII\alpha$ and $UII\beta$ measured by qPCR

结果以平均值 \pm 标准误差表示,不同的字母代表存在显著性差异($P < 0.05$)。

表 2 斑马鱼发育早期 CRH 、 UI 、 $UII\alpha$ 和 $UII\beta$ 基因表达水平之间的相关性分析

Tab. 2 Relationship among CRH , UI , $UII\alpha$ and $UII\beta$ gene expression in zebrafish during the early development

相关性	CRH vs UI	CRH vs $UII\alpha$	CRH vs $UII\beta$	UI vs $UII\alpha$	UI vs $UII\beta$	$UII\alpha$ vs $UII\beta$
r	0.937 **	0.913 **	0.983 **	0.858 **	0.878 **	0.910 **

注: ** 代表相关性极显著 ($P < 0.01$)。

3 讨论

目前,有关硬骨鱼类 CRH 、 UI 和 UII (mRNA 和肽类水平) 表达的研究主要集中于描述在成鱼中的表达模式^[8-10, 28-32],但是对于硬骨

鱼类早期发育过程中 CRH 、 UI 和 UII 的研究还相对欠缺。因此,本研究对斑马鱼早期发育过程中 CNS 主要分泌产物—— CRH 、 UI 、 $UII\alpha$ 和 $UII\beta$ mRNA 的表达模式集中进行定量研究。ALDERMAN 等通过凝胶电泳检测发现斑马鱼

CRH 从 0 hpf 就存在表达, 而 *UI* 从 6 hpf 才开始表达^[27]。而 BRAUTIGAM 等采用凝胶电泳检测发现斑马鱼 *UI* mRNA 在 4 细胞期的受精卵、未受精的卵细胞以及卵巢中都存在表达^[33]。由于 *CRH*、*UI*、*UII α* 和 *UII β* mRNA 在斑马鱼早期发育过程中的表达量较低, 为了精确绘制各基因在斑马鱼发育早期的表达谱, 本研究采用荧光定量 PCR 方法进行研究。结果显示从 0 hpf 至 144 hpf, *CRH*、*UI*、*UII α* 和 *UII β* mRNA 都被检测到存在表达, 这提示 *CRH*、*UI*、*UII α* 和 *UII β* mRNA 可能存在母源性作用。斑马鱼早期发育过程中 *CRH* 和 *UI* mRNA 在 24 hpf 之前都保持一个较低的表达水平, 但是 *UI* 表达模式相对 *CRH* 更具波动性, 这与虹鳟鱼^[34] 中观察到的结果一致。在 72 hpf 之前 *UII α* 和 *UII β* 的表达量都相对较低并保持恒定, 而孵化后表达量逐渐增加。*CRH*、*UI*、*UII α* 和 *UII β* mRNA 的表达水平分别在 120 hpf 或 144 hpf 达到最高值。之前有报道发现在大马哈鱼即将孵化的胚胎中存在 *UI* 和 *UII* 的免疫活性^[35]。这些结果表明 *CRH*、*UI*、*UII α* 和 *UII β* 在鱼类早期发育过程中具有重要的功能。

值得注意的是, 在斑马鱼早期发育过程中 *CRH* 和 *UI* 表达量的显著性变化要明显早于 *UII α* 和 *UII β* 。在鱼类中, 尽管 CNSS 是 *CRH*、*UI* 和 *UII* 的主要表达和分泌场所, 但是 *CRH* 和 *UI* 还在其他脑区, 如下丘脑、垂体中表达^[27]。此外, 研究发现脑部分泌系统的形态发生和形成要早于尾部分泌系统, 并且典型的 CNSS 结构在幼鱼时期才开始形成^[35-37], 这表明在斑马鱼早期发育过程中成熟的 CNSS 并未形成。*CRH* 和 *UI* 表达量较早出现显著性变化说明在鱼类早期发育过程中脑部在发育和应激调控中起主要作用。同时这也说明斑马鱼发育早期 *CRH*、*UI*、*UII α* 和 *UII β* 的表达部位可能不是在尾部, 但这仍需进一步研究。相关性分析揭示在斑马鱼早期发育过程中, *CRH*、*UI*、*UII α* 和 *UII β* mRNA 的表达水平两两之间呈现极显著正相关, 这表明 *CRH*、*UI*、*UII α* 和 *UII β* 在斑马鱼早期发育过程中关系紧密并且相互合作来发挥作用。

所有的生物在任何时候都必须适应环境的变化, 尤其是早期发育过程。在绝大多数的鱼类中, 其受精和胚胎发生都是在体外进行, 因此它们的受精、发育以及存活都极容易受到外界环境

因素的影响。ALDERMAN 等发现斑马鱼在 3 dpf 就可以对盐度胁迫发生内分泌反应^[27]。ALSOP 和 VIJAYAN 的研究结果表明 4 dpf 的斑马鱼可以对约束产生应激^[29]。那么鱼类发育早期 *CRH*、*UI* 和 *UII* 是否会参与这些应激反应, 参与应激调控时的具体功能和作用机理, 以及相互间存在何种联系, 这些都还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] COULOUARN Y, JEGOU S, TOSTIVINT H, et al. Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors [J]. FEBS letters, 1999, 457(1): 28-32.
- [2] COULOUARN Y, LIHRMANN I, JEGOU S, et al. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(26): 15803-15808.
- [3] 吕为群, 刘爽, 钟英斌. 鱼类尾部神经内分泌系统研究进展 [J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(5): 743-749.
- [4] VAUGHAN J, DONALDSON C, BITTENCOURT J, et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor [J]. Nature, 1995, 378(6554): 287-292.
- [5] WINTER M J, ASHWORTH A, BOND H, et al. The caudal neurosecretory system: control and function of a novel neuroendocrine system in fish [J]. Biochemistry and Cell Biology, 2000, 78(3): 193-203.
- [6] 陈恒, 刘书朋, 谷平. 鱼类尾部神经内分泌系统研究进展 [J]. 上海大学学报: 自然科学版, 2000, 6(3): 248-254.
- [7] CRAIG P M, AL-TIMIMI H, BERNIER N J. Differential increase in forebrain and caudal neurosecretory system corticotropin-releasing factor and urotensin I gene expression associated with seawater transfer in rainbow trout [J]. Endocrinology, 2005, 146(9): 3851-3860.
- [8] LU W, DOW L, GUMUSGOZ S, et al. Coexpression of corticotropin-releasing hormone and urotensin i precursor genes in the caudal neurosecretory system of the euryhaline flounder (*Platichthys flesus*): a possible shared role in peripheral regulation [J]. Endocrinology, 2004, 145(12): 5786-5797.
- [9] LU W, GREENWOOD M, DOW L, et al. Molecular characterization and expression of urotensin II and its receptor in the flounder (*Platichthys flesus*): a hormone system supporting body fluid homeostasis in euryhaline fish [J]. Endocrinology, 2006, 147(8): 3692-3708.
- [10] LU W, WORTHINGTON J, RICCARDI D, et al. Seasonal changes in peptide, receptor and ion channel mRNA

- expression in the caudal neurosecretory system of the European flounder (*Platichthys flesus*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 153(1/3): 262–272.
- [11] LOVEJOY D A, BALMENT R J. Evolution and physiology of the corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in vertebrates [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1999, 115(1): 1–22.
- [12] VALE W, SPIESS J, RIVIER C, et al. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin [J]. *Science*, 1981, 213(4514): 1394–1397.
- [13] MONTECUCCHI P C, HENSCHEN A. Amino acid composition and sequence analysis of sauvagine, a new active peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei* [J]. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1981, 18(2): 113–120.
- [14] LEDERIS K, LETTER A, MCMASTER D, et al. Complete amino acid sequence of urotensin I, a hypotensive and corticotropin-releasing neuropeptide from *Catostomus* [J]. *Science*, 1982, 218(4568): 162–165.
- [15] ICHIKAWA T, ISHIDA I, OHSAKO S, et al. In situ hybridization demonstrating coexpression of urotensins I, II-alpha, and II-gamma in the caudal neurosecretory neurons of the carp, *Cyprinus carpio* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1988, 71(3): 493–501.
- [16] PEARSON D, SHIVELY J E, CLARK B R, et al. Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1980, 77(8): 5021–5024.
- [17] CLARK B R, DATTILO J, PEARSON D. Chemical synthesis of urotensin II, a somatostatin like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes [J]. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1982, 19(5): 448–453.
- [18] DOUGLAS S A, ASHTON D J, SAUERMELCH C F, et al. Human urotensin-II is a potent vasoactive peptide: pharmacological characterization in the rat, mouse, dog and primate [J]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2000, 36(5 Suppl 1): S163–S166.
- [19] DOUGLAS S A, OHLSTEIN E H. Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease [J]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2000, 10(6): 229–237.
- [20] CONLON J M, O'HARTE F, SMITH D D, et al. Purification and characterization of urotensin II and parvalbumin from an elasmobranch fish, *Scyliorhinus canicula* (common dogfish) [J]. *Neuroendocrinology*, 1992, 55(2): 230–235.
- [21] CONLON J M, O'HARTE F, SMITH D D, et al. Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1992, 188(2): 578–583.
- [22] CONLON J M, YANO K, WAUGH D, et al. Distribution and molecular forms of urotensin II and its role in cardiovascular regulation in vertebrates [J]. *The Journal of Experimental Zoology*, 1996, 275(2/3): 226–238.
- [23] AMES R S, SARAU H M, CHAMBERS J K, et al. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14 [J]. *Nature*, 1999, 401(6750): 282–286.
- [24] ICHIKAWA T, LEDERIS K, KOBAYASHI H. Primary structures of multiple forms of urotensin II in the urophysis of the carp, *Cyprinus carpio* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1984, 55(1): 133–141.
- [25] TOSTIVINT H, JOLY L, LIHRMANN I, et al. Comparative genomics provides evidence for close evolutionary relationships between the urotensin II and somatostatin gene families [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(7): 2237–2242.
- [26] KIMMEL C B, BALLARD W W, KIMMEL S R, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. *Developmental Dynamics*, 1995, 203(3): 253–310.
- [27] ALDERMAN S L, BERNIER N J. Ontogeny of the corticotropin-releasing factor system in zebrafish [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 164(1): 61–69.
- [28] PARMENTIER C, HAMEURY E, LIHRMANN I, et al. Comparative distribution of the mRNAs encoding urotensin I and urotensin II in zebrafish [J]. *Peptides*, 2008, 29(5): 820–829.
- [29] ALSOP D, VIJAYAN M M. Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish [J]. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2008, 294(3): R711–R719.
- [30] PARMENTIER C, TAXI J, BALMENT R, et al. Caudal neurosecretory system of the zebrafish: ultrastructural organization and immunocytochemical detection of urotensins [J]. *Cell and Tissue Research*, 2006, 325(1): 111–124.
- [31] BERNIER N J, ALDERMAN S L, BRISTOW E N. Heads or tails? Stressor-specific expression of corticotropin-releasing factor and urotensin I in the preoptic area and caudal neurosecretory system of rainbow trout [J]. *The Journal of Endocrinology*, 2008, 196(3): 637–648.
- [32] BERNIER N J, PETER R E. Appetite-suppressing effects of urotensin I and corticotropin-releasing hormone in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Neuroendocrinology*, 2001, 73(4): 248–260.
- [33] BRAUTIGAM L, HILLMER J M, SOLL I, et al. Localized expression of urocortin genes in the developing zebrafish brain [J]. *The Journal of Comparative Neurology*, 2010, 518(15): 2978–2995.
- [34] FUZZEN M L, ALDERMAN S L, BRISTOW E N, et al. Ontogeny of the corticotropin-releasing factor system in rainbow trout and differential effects of hypoxia on the

- endocrine and cellular stress responses during development [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 170(3): 604–612.
- [35] OKA S, CHIBA A, HONMA Y, et al. Development of the caudal neurosecretory system of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*, as revealed by immunohistochemistry for urotensins I and II [J]. *Cell and Tissue Research*, 1993, 272(2): 221–226.
- [36] IMAI K. Development of the caudal and hypothalamic neurosecretory systems of the eel, *Anguilla japonica* [J]. *Embryologia*, 1965, 9(1): 66–77.
- [37] CIONI C, FRANCIÀ N, GRECO A, et al. Development of the caudal neurosecretory system of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: an immunohistochemical and electron microscopic study [J]. *Journal of Morphology*, 2000, 243(2): 209–218.

Dynamic expression pattern of *CRH*, *UI* and *UII* in zebrafish during early development

LUO Lei, CHEN A-qin, LÜ Wei-qun

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Corticotropin-releasing hormone (CRH), Urotensin I (UI) and Urotensin II (UII) have been found throughout vertebrate species from fish to human. In fish, these peptides appear to be involved in osmoregulation, reproduction, nutritional behavior and stress responses. Embryos and larvae were collected at 0, 1.5, 3, 7, 5, 3, 8, 10, 16, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hpf (hours post-fertilization). Three biological replicate pools (n = 50 larvae per pool) were analyzed for each developmental time point. Real-time quantitative PCR results showed that the mRNA coding *CRH*, *UI*, *UII α* and *UII β* was present from 0 hpf, suggesting a maternal function. The relative amounts of *CRH*, *UI*, *UII α* and *UII β* mRNA during the early development of zebrafish gradually increased and reached the highest level at 144 hpf except *UII α* at 120 hpf. Highly significant and positive correlations between each pair of *CRH*, *UI*, *UII α* and *UII β* mRNA expression levels were found. It suggested that these genes were closely linked and cooperated to support a developmental function.

Key words: zebrafish (*Danio rerio*); development; real-time quantitative PCR; gene expression; corticotropin-releasing hormone; urotensin