

文章编号: 1674 - 5566(2014)03 - 0321 - 08

牙鲆胚后发育过程中 I 型脱碘酶基因的原位表达谱

盖军伟, 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: 甲状腺激素 T3 在鱼类胚后发育与变态发育过程中发挥着重要作用, 甲状腺激素 T4 通过 I 型甲状腺氨酸脱碘酶(Diol)生成 T3, 因此, 调查 *Diol* 基因在胚后发育包括变态发育过程中原位表达谱, 有助于理解 T3 在胚后发育中的具体作用。利用 RNA 整体原位杂交技术, 发现 *Diol* 主要在牙鲆肠道、鳃、肝、肌肉、鳍、眼睛周围等器官和组织表达, 鳃、肠道、奇鳍中的 *Diol* 原位表达谱有一定的规律性, 尤其在生骨肌细胞向鳍褶中迁移、臀鳍和背鳍(包括冠状幼鳍)的鳍条和支鳍骨的发生过程中, *Diol* 可能通过影响这些组织器官的 T3 水平而发挥重要作用。

研究亮点: 本研究观察了牙鲆胚后发育过程中 *Diol* 的整体表达型式, 首次发现 *Diol* 在鲽形目鱼类冠状幼鳍发生过程中表达, 有助于理解 T3 调控变态发育的作用。

关键词: 牙鲆; I 型脱碘酶; 变态; 冠状幼鳍; RNA 整体原位杂交

中图分类号: S 917

文献标志码: A

鱼类胚胎在孵化破膜后, 进入胚后发育阶段继续发育, 如鳍褶逐渐消失, 形成由鳍条组成的背鳍、尾鳍和臀鳍。大多数鲽形目鱼类, 如牙鲆(*Paralichthys olivaceus*), 其背鳍在发育过程中出现冠状幼鳍逐渐延长, 再到变态时逐渐缩短的现象^[1]。在仔鱼向稚鱼转变的变态阶段, 鲽形目鱼类最为显著的变化是一只眼睛逐渐从头部一侧移动到另一侧^[2]。此外, 鳃、肠、肌肉等组织在胚后发育过程中也出现分化^[3-4]。鱼类胚后发育过程受到甲状腺激素的调控^[5], 母源性甲状腺激素在胚后逐渐消耗殆尽, 然后自体甲状腺逐渐发育发挥分泌功能^[6]。鲽形目鱼类在变态过程中, 如果甲状腺激素合成被抑制, 则眼睛不能移位, 仔鱼也不能成功转变为稚鱼^[7-8]。发挥主要功能的是甲状腺激素 T3, 由通过脱碘酶去掉 T4 的一个碘而成, 其中, I 型脱碘酶(Diol)在调控组织的 T3 供应中起着重要的作用^[9-10]。除了 I 型脱碘酶外, II 型脱碘酶也在 T4 向 T3 转变过程中发挥作用。此外, I 型脱碘酶也能把 T4 转变成没有活性的 rT3^[11]。有研究认为, 在两栖类非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)甲状腺激素调控的变态发育过程

中, I 型脱碘酶被认为不起作用^[12-13], ITOH 等^[4]利用 RNA 切片杂交检测法发现 *Diol* 主要局限于牙鲆肝组织。本研究利用 RNA 整体原位杂交检测了 *Diol* 在牙鲆胚后发育过程中的表达分布, 发现其可能与鳃、肠道, 尤其是包括冠状幼鳍在内的鳍的发育有关。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

牙鲆仔鱼购自山东青岛忠海水产有限公司。按照参考文献[14]的方法, 在上海海洋大学水产与生命学院实验室饲养。仔鱼早期用褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)饲养, 后期用卤虫(*Eubranchipus vernalis*)无节幼体饲养至变态结束, 饵料密度维持在 5 个/mL。养殖温度控制在 18~20℃。变态发育的阶段划分为变态前(眼睛开始移动之前, 17 DAH)、E 期(眼睛开始移动, 19 DAH)、F 期(从左侧可以看到右眼, 但右眼上缘还没有到背鳍中线, 21 DAH)、G 期(右眼上缘到背中线, 23 DAH)、H 期(右眼刚好位于头顶, 27 DAH)。

收稿日期: 2014-01-23 修回日期: 2014-03-12

基金项目: 国家自然科学基金(31072201)

作者简介: 盖军伟(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类发育生物学, E-mail: junweigai@126.com

通信作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

1.2 I 型脱碘酶基因的克隆

采用 Trizol 法提取牙鲆仔鱼总 RNA^[15]。以 18 T 为引物,利用 M-MLV 逆转录酶将牙鲆仔鱼总 RNA 逆转录合成 cDNA 第一条链,通过比对 3 种脱碘酶的氨基酸序列,找出特异性最大的氨基酸片段,然后根据 GenBank 中 *Dio1* 的序列(登录号:AB362421.1),以上游引物 5'-CATCGCAGAGGCTCATTCAACAG-3'和下游引物 5'-GACITTTCCCAGCCTGAAGCAC-3'扩增长度 214 bp 的 *Dio1* 片段。PCR 反应条件为:94 ℃ 2 min,然后 94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,进行 35 个循环。割胶回收目标片段,连接至 pGEM-T 载体,转化至大肠杆菌中。挑选阳性克隆送至商业公司测序鉴定,通过核苷酸序列比对,发现所克隆的序列与牙鲆 *Dio1* 序列完全相似,与牙鲆 *Dio2* (登录号:AB362422.1) 序列 6.5% 相似,与牙鲆 *Dio3* (登录号:AB362423.1) 序列 28.5% 相似。

1.3 RNA 整体原位杂交

利用克隆长度为 214 bp 的 *Dio1* 基因片段作为模板制备探针,将含此片段基因的质粒分别用限制性内切酶 *Not* I 和 *Sac* II (Fermentas 公司) 单酶切线性化,分别用 T7 RNA Polymerase 或 SP6 RNA Polymerase (Promega 公司) 体外合成含地高辛标记的反义和正义 RNA 探针(正义 RNA 探针杂交结果作为阴性对照)。RNA 整体原位杂交之前,需对甲醇保存的仔鱼样品梯度复水,经 3% H₂O₂ 强光照射去除色素。用蛋白酶 K 消化,然后置于 4% PFA 中固定,保持仔鱼的完整性。PBST 漂洗两次后用预杂交液处理 4 h 以封闭非特异性位点,之后将样品置于 48 ℃ 杂交液(含探针)过夜。杂交完后用 50% 甲酰胺和 5 × SSC 梯度复水至 0.2 × SSC,用马来酸缓冲液洗脱一次。样品在 37 ℃ 抗体稀释液预处理 1 h 后,用 1:2 000 ~ 1:5 000 比例稀释地高辛抗体(Roche 公司),于 4 ℃ 孵育过夜。经 PBST 漂洗若干次后,加 FAST RED (Roche 公司) 于室温下遮光显色 2 ~ 3 h 后,用 0.5 × PBST 漂洗两次,然后用 4% PFA 在 4 ℃ 下保存,采用尼康 SMZ 1500 显微镜观察和记录整体信号。

2 结果与分析

2.1 *Dio1* 基因在胚后各期牙鲆的整体表达型式

孵化后第 3 天,就可见 *Dio1* 基因在肠道、鳃、

肝上表达(图版 I - 1),孵化后第 9 天,*Dio1* 基因主要在肠道、鳃和肌肉上表达,在鳍褶上有微弱表达(图版 I - 2),奇怪的是 *Dio1* 基因从孵化后第 6 天就不在肝组织表达。孵化后第 13 天,*Dio1* 仍主要在肠道、鳃、肌肉上表达,不过肠道上主要集中在后肠表达,肌肉上主要集中在大侧肌的背腹两端,而在鳍褶上表达变得明显(图版 I - 3)。孵化后 16 d,*Dio1* 在鳃和鳍褶上表达更为明显,在尾鳍的支鳍骨上也明显表达,而在肠道和大侧肌的背腹两端表达已很弱(图版 I - 4)。作为变态前的孵化后 17 d,*Dio1* 基因的表达型式与 16 d 非常相似,但鳍褶上的信号减弱,而在支鳍骨上表达更加明显(图版 I - 5)。变态 E 期,鱼身体开始变得更加侧扁,表达型式与变态前孵化后 17 d 相似,但表达信号要弱,信号在鳃和眼睛周围要更加明显一些(图版 I - 6)。变态 F 期(孵化后 19 d),身体侧扁和眼睛移位也更加明显,表达型式没有明显变化,鳍条上的信号开始增强(图版 I - 7)。变态 G 期,眼睛移位已非常明显,*Dio1* 仍在鳍条、支鳍骨、鳃、眼睛周围表达,但表达信号非常明显(图版 I - 8)。到变态 H 期,眼睛已移位到头顶,表达型式相似,但表达信号更加强烈,尤其在大侧肌的背腹两端表达重新出现,且信号明显(图版 I - 9)。鳃上信号集中在鳃丝末端。所有的阴性对照均没有明显的红色信号,代表性的阴性对照见图版 I - 10。

2.2 *Dio1* 基因在胚后牙鲆背鳍和臀鳍上的表达型式

背鳍、臀鳍、尾鳍等奇鳍鳍条的发育伴随着鳍褶的退化,在牙鲆背鳍发育过程中还伴随着冠状幼鳍的发育,*Dio1* 基因在此过程中发生了明显的变化。在孵化后 3 d 牙鲆的背部鳍褶上有微弱的 *Dio1* 基因表达信号(图版 II - 1),在孵化后第 9 天的背部鳍褶 *Dio1* 基因表达信号增强,尤其是鳍褶基部的肌肉部位表达信号非常强烈(图版 II - 2),这种情况在孵化后 13 d 也是如此(图版 II - 3),而到孵化后 16 d,不管是鳍褶还是鳍褶基部的肌肉的表达信号又变得微弱(图版 II - 4),在变态前的孵化后 17 d,*Dio1* 基因表达信号出现在鳍褶下端和基部(图版 II - 5),在变态开始的变态 E 期,可见 *Dio1* 基因在背鳍已形成的鳍条和支鳍骨上表达(图版 II - 6),在变态 F 期,表达没有明显变化(图版 II - 7),在变态 G 期,在鳍

条和支鳍骨上的信号明显增强(图版 II-8),在变态 H 期,在鳍条和支鳍骨上都有表达,但在支鳍骨上的信号要明显强于鳍条(图版 II-9)。臀鳍发生过程 *Dio1* 基因表达型式与背鳍发生过程的表达十分相似(图版 II-10~18)。牙鲆冠状幼鳍的发生略早于背鳍其他部位的发生,*Dio1* 基因开始在孵化后 9 d 牙鲆近头部的背鳍褶基部表达(图版 II-19),到孵化后 13 d,表达信号向背鳍褶顶端和头部前方扩展(图版 II-20),在 16 DAH 的牙鲆仔鱼中出现 4 条带有 *Dio1* 信号的冠状幼鳍鳍条(图版 II-21)。所有的阴性对照均没有明显的红色信号(图版 II-22~24)。

2.3 *Dio1* 基因在与眼睛移动相关的眼睛周围组织中的表达

眼睛移动是由于眼睛腹面皮肤组织的分裂细胞数目要明显多于背面的结果^[16],因此,调控眼睛移动的相关分子也应在眼睛背腹面皮肤上呈不对称分布。在变态前,不管是移动眼(右眼)还是非移动眼(左眼),*Dio1* 基因在牙鲆眼睛周围表达明显,但未见背腹面信号强弱上有明显差异(图版 III-1~3)。到变态 E 期,*Dio1* 基因在两眼周围的表达型式没有明显的变化(图版 III-4~6)。到变态 F 期,右眼移动要明显一些,*Dio1* 基因移动眼腹面的表达信号要略强于背面(图版 III-7~9),而非移动眼的背面的表达信号要略强于腹面(图版 III-7~9),在 G 期仍是这种眼睛背腹面的表达差异模式(图版 III-10~12)。到眼睛移到头顶的变态 H 期,*Dio1* 基因表达水平明显降低,在眼睛背腹面的表达差异已很不明显(图版 III-13~15)。所有的阴性对照均没有明显的红色信号(图版 III-16~18)。

3 讨论

甲状腺激素在鱼类胚后发育过程,尤其在比目鱼类变态发育过程中发挥着重要作用^[5]。I 型脱碘酶的主要作用是把 T4 转化为更具生理作用的 T3,因此,观察胚后发育过程中 *Dio1* 基因表达型式及其变化,可更详细地了解 T3 在胚后发育过程中的作用。*Dio1* 基因主要在牙鲆的肠道、鳃、肝、肌肉、鳍、眼睛周围等表达,表明 T3 可能在这些器官发育过程中起调控作用。尤其在背鳍和臀鳍的发育过程中,*Dio1* 基因表达有明显的变化。背鳍和臀鳍发生过程中的细胞主要来自

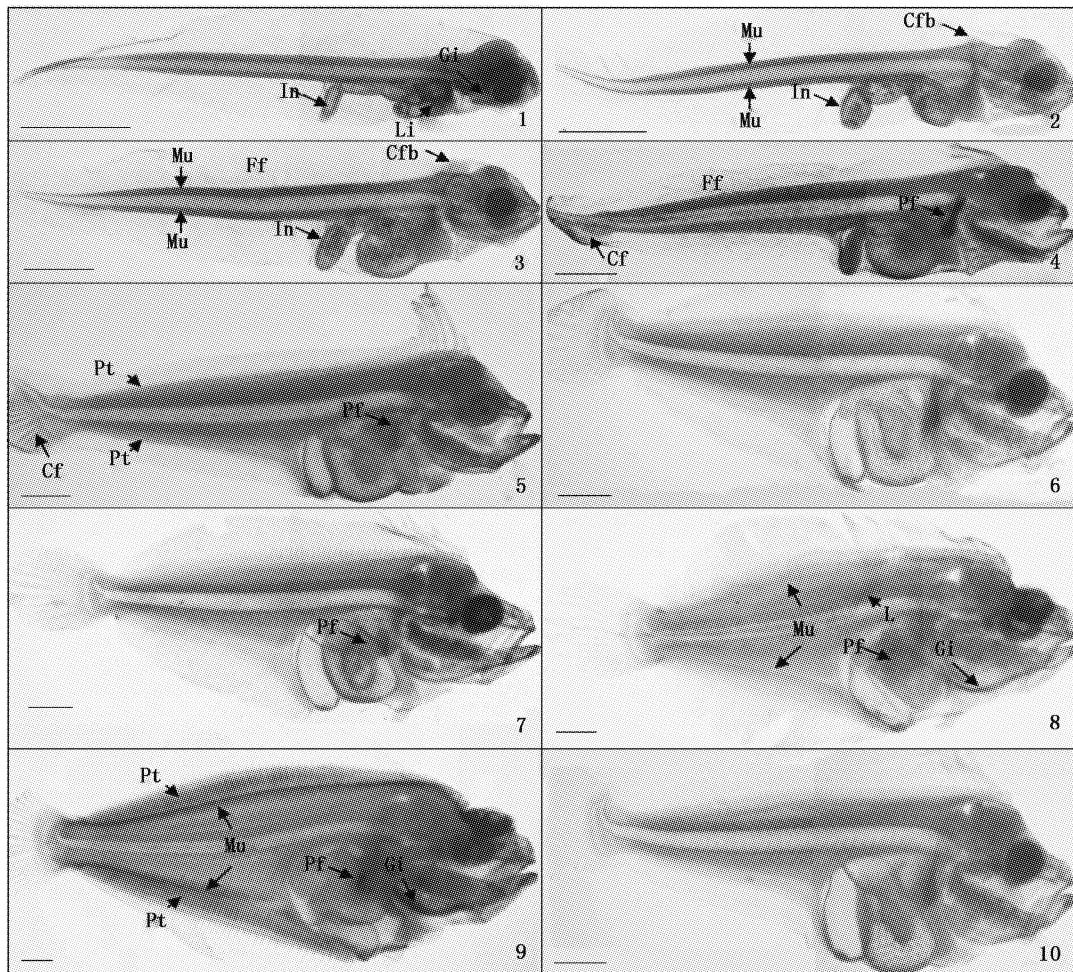
鳍褶基部的生骨肌细胞的迁移^[17]。在孵化后第 9 天和 13 天,背鳍和臀鳍的鳍褶和鳍褶基部的肌肉部位 *Dio1* 基因表达均增强,而到孵化后第 16 天,鳍褶和鳍褶基部的肌肉部位的表达信号又同时变弱,提示 T3 可能在鳍褶基部的生骨肌细胞向鳍褶迁移过程中发挥作用。变态开始后 *Dio1* 基因在鳍条和支鳍骨形成过程中表达,表明 T3 参与鳍条和支鳍骨形成的调控。冠状幼鳍的形成从背部鳍褶前端的原基开始,逐渐向背鳍褶顶端和头部前方扩展而成^[18]。离体实验表明甲状腺激素能促进冠状幼鳍的吸收^[19],在本研究中首次观察到 *Dio1* 基因在冠状幼鳍原基、鳍条上表达,表明 T3 参与冠状幼鳍的发生。鉴于冠状幼鳍是背鳍的一部分,进一步表明 T3 参与背鳍发育的调控。

牙鲆变态过程中,甲状腺激素 T4 水平在变态早期比较低,在变态中期增加显著,并在变态高峰期达到最大值,变态晚期开始下降^[20],*Dio1* 基因在变态期牙鲆的原位杂交信号强弱与 T4 变化规律相一致,表明与爪蟾变态过程中 *Dio1* 基因表达水平没有明显差异的情况不同^[12-13,21],*Dio1* 在牙鲆变态阶段 T4 向 T3 转化过程中发挥作用。牙鲆最明显的变态事件是眼睛从头部的右侧移过头顶到另一侧,眼睛移动主要是眶下组织中分裂细胞的数目要多于眶上组织的结果^[16]。整个变态过程中,*Dio1* 在牙鲆两眼的周围组织中表达,但在眼睛背腹区域没有明显差异,提示 *Dio1* 在 T3 调控眼睛移动过程中发挥作用,但不是至关重要的作用。

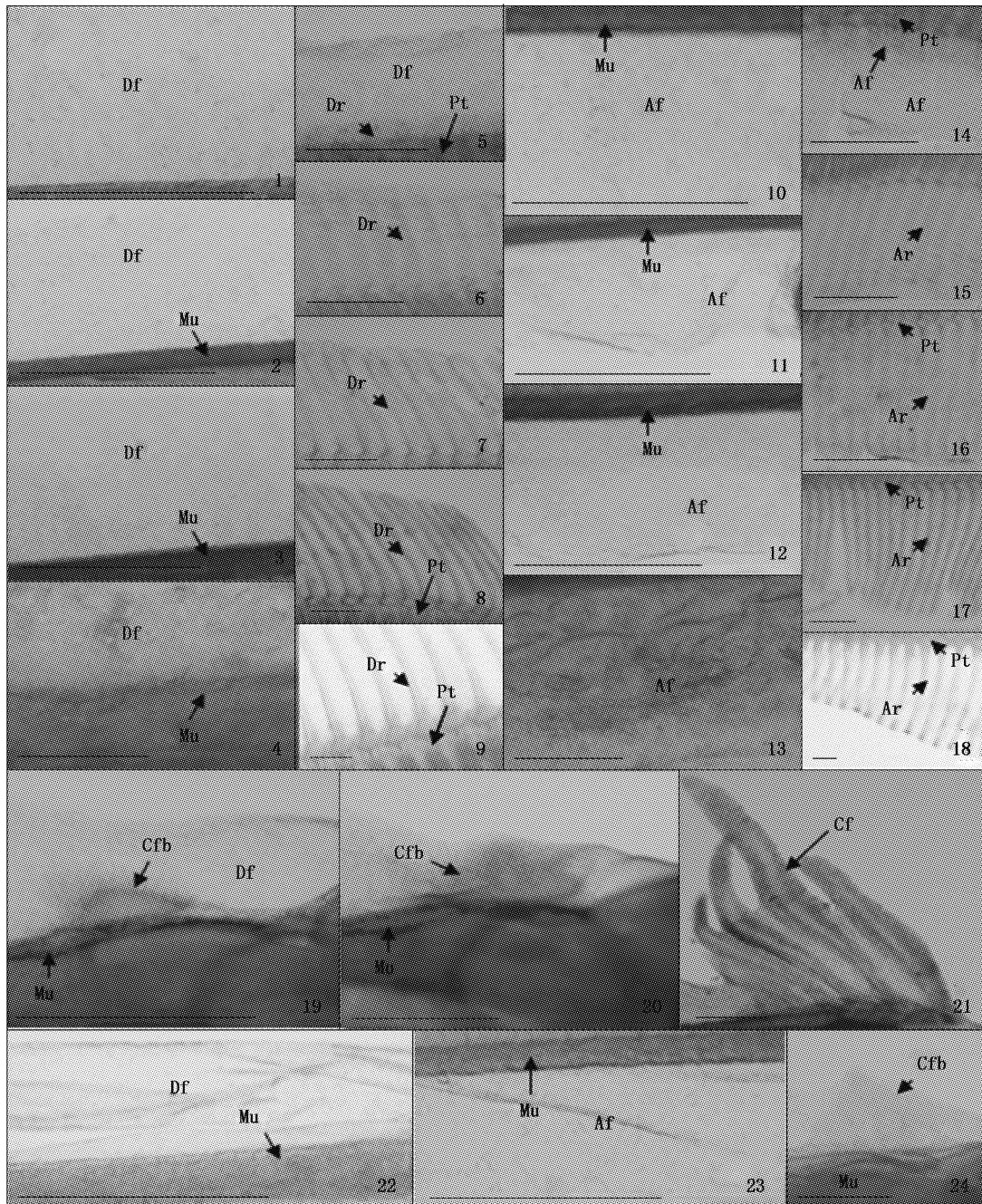
一般认为,血液中的 T3 主要是通过来自肝脏的 I 型脱碘酶对 T4 脱碘作用的结果,令人奇怪的是,只有在孵化后 3 d 的牙鲆肝脏中检测到 *Dio1* 基因的表达,而在肠道、鳃、肌肉、鳍等多处持续表达,表明 *Dio1* 基因并不局限于肝脏。ITO 等^[4]利用 RNA 切片杂交技术在变态期牙鲆的肝脏中检测到 *Dio1* 基因的表达,推测认为与调节各组织变态同步的 T3 是来自肝脏 *Dio1* 酶作用的结果。本研究利用整体 RNA 原位杂交技术检测到牙鲆变态阶段 *Dio1* 基因主要在鳍条、支鳍骨、鳃、眼睛周围、大侧肌的背腹肌肉两端等处表达,在肝脏中基本没有表达,表明这些组织的 T3 是该组织的 I 型脱碘酶作用的结果。

参考文献:

- [1] 张孝威, 何桂芬, 沙学绅. 牙鲆和条鳎卵子及仔、稚鱼的形态观察[J]. 海洋与湖沼, 1965, 7(2): 159-180.
- [2] BREWSTER B. Eye migration and cranial development during flatfish metamorphosis: a reappraisal (Teleostei: Pleuronectiformes) [J]. Journal of Fish Biology, 1987, 31: 805-833.
- [3] SOFFIENTINO B, GOMEZ-CHIARRI M, SPECKER J. Developmental changes in stomach, intestine, and skin glycoconjugates in summer flounder (*Paralichthys dentatus*): A lectin histochemical study [J]. Aquaculture, 2006, 253(1/4): 680-687.
- [4] ITOH K, WATANABE K, WU X, et al. Three members of the iodothyronine deiodinase family, dio1, dio2 and dio3, are expressed in spatially and temporally specific patterns during metamorphosis of the flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Zoological Science, 2010, 27(7): 574-580.
- [5] POWER D M, LIEWLLYN L, FAUSTINO M, et al. Thyroid hormones in growth and development of fish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology, 2001, 130(4): 447-459.
- [6] 赵维信, 贾江. 鳊, 团头鲂和巨脂鲤早期发育阶段甲状腺激素的含量变化研究 [J]. 上海水产大学学报, 1997, 21(2): 120-125.
- [7] INUI Y, MIWA S. Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae [J]. General and Comparative Endocrinology, 1985, 60(3): 450-454.
- [8] BLANTON M L, SPECKER J L. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction [J]. Critical Reviews in Toxicology, 2007, 37(1/2): 97-115.
- [9] van der GEYTEN S, BYAMUNGU N, REYNS G E, et al. Iodothyronine deiodinases and the control of plasma and tissue thyroid hormone levels in hyperthyroid tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Journal of Endocrinology, 2005, 184(3): 467-479.
- [10] ALVAREZ L, HERNANDEZ S, MARTINEZ-DE-MENA R. The role of type I and type II 5' deiodinases on hexachlorobenzene-induced alteration of the hormonal thyroid status [J]. Toxicology, 2005, 207(3): 349-362.
- [11] BIANCO A C, KIM B W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action [J]. Journal of Clinical Investigation, 2006, 116(10): 2571-2579.
- [12] BROWN D D. The role of deiodinases in amphibian metamorphosis [J]. Thyroid, 2005, 15(8): 815-821.
- [13] BROWN D D, CAI L. Amphibian metamorphosis [J]. Development Biology, 2007, 306(1): 20-33.
- [14] BAO B, YANG G, LIU Z, et al. Isolation of SFRS3 gene and its differential expression during metamorphosis involving eye migration of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects, 2005, 1725: 64-70.
- [15] 韦芬, 何欣慰, 鲍宝龙. 牙鲆 *ras-2* 基因 cDNA 全长的克隆和变态时期的表达分析 [J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(5): 1-5.
- [16] BAO B, LIU Z, YANG G, et al. Proliferating cells in suborbital tissue drive eye migration in flatfish [J]. Developmental Biology, 2011, 351(1): 200-207.
- [17] FREITAS R, ZHANG G J, COHN M J. Evidence that mechanisms of fin development evolved in the midline of early vertebrates [J]. Nature, 2006, 442: 1033-1037.
- [18] 蔡文超, 柳学周, 马学坤, 等. 半滑舌鳎早期发育阶段鳃和冠状幼鳍的生长发育规律研究 [J]. 海洋水产研究, 2006, 27(2): 94-98.
- [19] de JESUS E G, INUI Y, HIRANO T. Cortisol enhances the stimulating action of thyroid hormones on dorsal fin-ray resorption of flounder larvae *in vitro* [J]. General and Comparative Endocrinology, 1990, 79(2): 167-173.
- [20] TAGAWA M, TANAKA M, MATSUMOTO S, et al. Thyroid hormones in eggs of various freshwater, marine and diadromous teleosts and their changes during egg development [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1990, 8(6): 515-520.
- [21] ISORNA E, OBREGON M J, CALVO R M, et al. Iodothyronine deiodinase and thyroid hormone receptors regulation during flatfish (*Solea senegalensis*) metamorphosis [J]. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2009, 312B(3): 231-246.

图版 I *Dio1* 基因在胚后发育各期牙鲈的表达Plate I Expression pattern of *Dio1* during post-embryo development in *P. olivaceus*

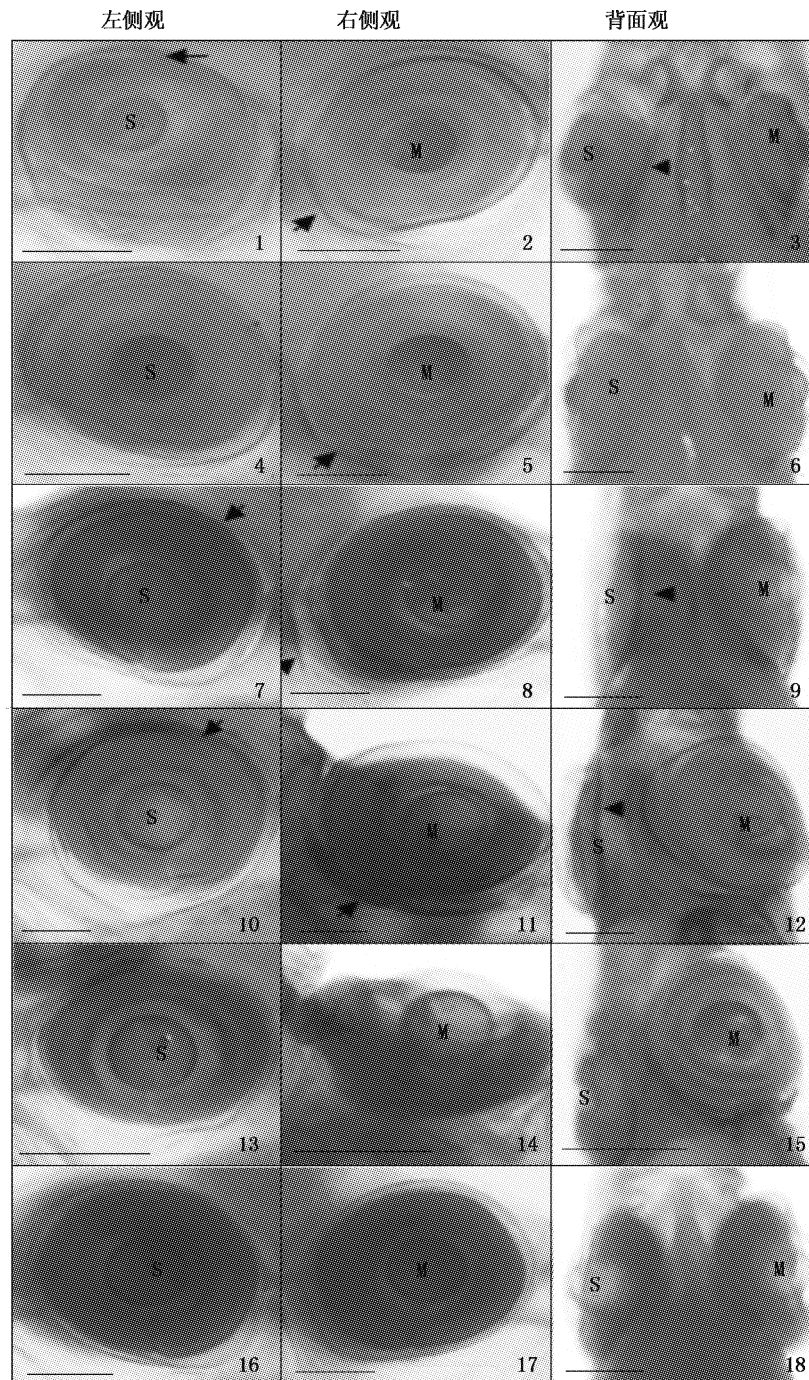
1. 3DAH; 2. 9DAH; 3. 13DAH; 4. 16DAH; 5. 变态期前期; 6. 变态 E 期; 7. 变态 F 期; 8. 变态 G 期; 9. 变态 H 期; 10. 阴性对照。图 1-4 的比例尺为 500 μm , 图 5-10 的比例尺为 200 μm ; In. 肠道; Li. 肝; Gi. 鳃; Mu. 肌肉; Cfb. 冠状幼鳍原基; Ff. 鳍褶; Pf. 胸鳍; Cf. 尾鳍; Pt. 支鳍骨; L. 侧线。



图版 II *Dio1* 基因在背鳍和臀鳍发育过程中的表达

Plate II Expression pattern of *Dio1* during dorsal and anal fin development in *P. olivaceus*

1,10. 3DAH; 2,11,19,22,23. 9DAH; 3,12,20,24. 13DAH; 4,13,21. 16DAH; 5,14. 变态期前期; 6,15. 变态 E 期; 7,16. 变态 F 期; 8,17. 变态 G 期; 9,18. 变态 H 期; 22~24. 对照。1~4,10~13 的比例尺为 300 μm ,其余的比例尺为 200 μm ; Df. 背鳍鳍褶; Dr. 背鳍鳍条; Mu. 肌肉; Pt. 支鳍骨; Af. 臀鳍鳍褶; Ar. 臀鳍鳍条; Cfb. 冠状幼鳍原基; Cf. 冠状幼鳍。



图版 III *Dio1* 基因在眼睛移动相关的眼睛周围组织中的表达

Plate III Expression pattern of *Dio1* in the tissues around both eyes during metamorphosis of *P. olivaceus*

1~3. 变态期前期; 4~6. 变态 E 期; 7~9. 变态 F 期; 10~12. 变态 G 期; 13~15. 变态 H 期; 16~18. 对照; 所有标尺为 200 μm ; 箭头所示为基因表达信号; S. 非移动眼; M. 移动眼。

Expression pattern of *Dio1* during the post-embryo development in *Paralichthys olivaceus*

GAI Jun-wei, BAO Bao-long

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

Abstract: Thyroid hormone, mainly active triiodothyronine (T3), plays important roles during the fish post-embryo development including metamorphosis. Because of very small amount of T3 in whole body of larva, its distribution in different tissues during fish post-embryo development is not easy to be detected. As one kind of deiodinases, deiodinase I can convert thyroxine (T4) into the active T3. The expression pattern of *Dio1* gene during post-embryo development can indirectly indicate the T3 distribution in different tissues. *Dio1* gene is mainly expressed in intestine, gill, liver, body muscle, fin, and skin around eyes in post-embryo developing flounder *Paralichthys olivaceus*, indicating T3 regulates those tissues development. Specially during the process of anal fin and dorsal fin (including crown-like larval fin) development, expression pattern of *Dio1* was evidently associated with the formation of fin fold, fin rays and pterygiophores, suggesting thyroid hormone plays important role in regulating media fin development.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; deiodinase 1; metamorphosis; crown-like larval fin; whole-mount RNA *in situ* hybridization