

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)leptin 和 cholecystokinin 基因的克隆和表达特性研究*

刘立芹¹ 王茂廷¹ 崔文涛¹ 刘婉¹ 吕振明¹ 龚理¹
杨静文¹ 董迎辉²

(1. 浙江海洋大学 海洋生物种质资源发掘与利用国家地方联合工程实验室 舟山 316022;

2. 浙江万里学院 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室 宁波 315100)

摘要 本文克隆了两种大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)摄食调控因子胆囊收缩素(CCK)、瘦素(LEP)基因的全长序列,并对其表达特性进行了研究。结果表明,克隆得到 CCK 基因属硬骨鱼类的 CCK1 亚家族,全长 900nt,编码 137 个氨基酸,与其他鱼类的 CCK1 相比序列组成非常保守,特别是在 20 氨基酸的信号肽和 8 个氨基酸的 CCK-8 活性结构区域;而克隆得到 LEP 基因属硬骨鱼类的 LEPA 亚家族,全长 1290nt,编码 161 个氨基酸,与其他鱼类 LEP 相比基因同源性较差,但在 3D 结构上却保留了 LEP 经典的 4 个 α 螺旋特征。两种因子在所检测的所有组织中均有表达,但尤以脑、胃、肠消化道、肝脏等摄食及能量平衡相关组织中表达活性最高。8 天的饥饿能使大黄鱼脑、消化道组织的 CCK 和肝脏、脂肪组织中的 LEP 表达显著降低($P < 0.05$)。该结果说明 CCK 和 LEP 可能在大黄鱼的摄食生理和能量平衡中起着重要的调控作用;本研究将为深入了解鱼类食欲调控的神经内分泌机理提供基础。

关键词 大黄鱼;瘦素;胆囊收缩素;基因克隆;表达

中图分类号 Q789 doi: 10.11693/hyh20170400096

与其他高等脊椎动物一样,鱼类的摄食活动是受大脑和外周系统间复杂的信号反馈机制来调控的(De Pedro *et al*, 2001)。在高等动物的下丘脑中存在着一个被称为“摄食中枢”的特殊区域,该区域主要接收外周系统如消化道系统的神经内分泌信号从而控制动物的食欲(MacDonald *et al*, 2009)。而这种外周系统分泌信号多种多样,即包括胃肠道分泌的胆囊收缩素(CCK),神经肽(PYY);也包括胰腺组织分泌的胰高血糖素(GLP-1)和胰腺 B 细胞分泌的胰岛素;同时还包括脂肪组织分泌的瘦素(LEP)等多种因子(Volkoff *et al*, 2005)。所有这些信号因子可通过迷走神经上的受体或通过血液直接到达大脑传达动物摄

食和能量状态从而控制其食欲(Terova *et al*, 2008)。此外,大脑本身也可直接合成一些多肽类物质作为中枢神经信号调控食欲,从而与外周信号一起构成了复杂的动物食欲调控互作网络(Konturek *et al*, 2003)。

在诸多的食欲调控因子中,胃肠道分泌的胆囊收缩素(CCK)是其中最重要的一种。在哺乳动物中,CCK 主要起着减缓胃排空,促进胆囊收缩和胃、胰腺分泌,减少摄食活动的作用(Rehfeld *et al*, 2007)。直到最近几年,鱼类的 CCK 基因才得以成功克隆(Feng *et al*, 2012)。不同形式的 CCK,包括 CCK-8,被证实鱼类的摄食活动中起着关键的调控作用。如在鲑鱼 *Ictalurus punctatus* (Peterson *et al*, 2012)和金

* 国家自然科学基金项目,41606150号;浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室开放课题,KL2015-2号。刘立芹,博士,副教授,E-mail: liuliqin-666@163.com

通讯作者:董迎辉,博士,副教授,E-mail: 15067427669@126.com

收稿日期:2017-04-18,收修改稿日期:2017-05-19

Carassius auratus (Peyon *et al.*, 1999)中, CCK mRNA 表达在摄食后迅速增加, 从而抑制食物的进一步摄入。在金鱼的脑部或腹部中注射 CCK-8 能明显抑制食物的摄取 (Himick *et al.*, 1994)。在欧洲鲈 *Dicentrarchus labrax* 中, 口服 CCK 可迅速减少食物的摄取, 而该效应可被 CCK 专一性的抑制剂丙谷胺阻断 (Rubio *et al.*, 2008)。类似的结果还在虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* (Gélineau *et al.*, 2001)和斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus* (Silverstein *et al.*, 2000)中得到证实。但至今, 有关 CCK 在鱼类食欲调控和能量平衡中的作用仍未得到充分阐述。

由脂肪组织分泌的瘦素(LEP)也是一种重要的食欲调控因子(Zhang *et al.*, 1994)。在哺乳动物中, 瘦素是一个由 167 个氨基酸组成的 16kDa 的多肽, 在动物的摄食和能量平衡的调控中也起着关键的作用(Won *et al.*, 2012)。鱼类的 LEP 基因也是最近几年才得以成功克隆(Zhang *et al.*, 2013)。腹腔和脑室注射 LEP 可迅速减少金鱼的摄食(Volkoff, 2003)。同样腹腔注射同源重组的 LEP 可在几小时内迅速减弱虹鳟的摄食活动(Murashita *et al.*, 2008)。此外, 2—3 个星期的饥饿可减少绿太阳鱼 *Lepomis cyanellus* (Johnson *et al.*, 2000)和欧洲鲈(Won *et al.*, 2012)血清循环中的 LEP 含量, 表明 LEP 可能通过哺乳动物类似的机制调控鱼类的摄食和能量平衡。

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)是我国最重要的海水网箱养殖鱼类, 属鲈形目(Perciformes)、石首鱼科(Sciaenidae)、黄鱼属(*Pseudosciaena*), 曾是我国著名的“四大海产”之一。但 20 世纪 70 年代以来, 由于过度捕捞和海域环境的变迁, 其自然资源已严重衰竭(Sang *et al.*, 2007)。近年来, 随着大黄鱼的规模化人工繁育和养殖技术的突破, 中国沿海大黄鱼养殖产业迅速兴起, 2010 年我国沿海大黄鱼的养殖产量达到 85808t, 占当年全国海水鱼养殖产量的 8% (农业部渔业局, 2012)。为进一步提高大黄鱼的养殖产量, 在养殖规模无法继续增长的情况下, 如何提高养殖大黄鱼的摄食和饵料转化效率, 加快养殖期内大黄鱼的有效生长不失是一种可行的手段, 然而, 养殖过大黄鱼的人可能都深有体会, 大黄鱼摄食行为非常谨慎, 有时让大黄鱼开口摄食都是一件非常困难的事情, 因此对于大黄鱼摄食生理和调控机制的研究有重要意义。本文拟着重对大黄鱼两种重要的摄食调控相关因子 CCK 和 LEP 基因进行克隆, 并对其在不同组织中的表达特性进行研究, 探索饥饿等摄食和营养状

态对其表达的影响, 该研究可从一定角度了解 CCK 和 LEP 与大黄鱼摄食调控的相关性, 可为今后深入了解海洋鱼类的摄食调控机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

用于 CCK 和 LEP 基因克隆、组织特异性表达研究的大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)样本取自浙江海洋大学苍南越洋公司的养殖基地, 为体重约 150g 左右的 1 龄大黄鱼; 活体解剖大黄鱼样本, 取脑、肝脏、胃、肌肉、性腺(精巢)、心脏、前肠、脾脏、脂肪(肠系膜脂)等组织, 用液氮保存备用。用于饥饿实验的大黄鱼样本同样取自于该实验基地, 将 100 尾同规格(体重 150g 左右)的 1 龄大黄鱼平均分为两组, 正常投喂(一日两次鱼糜), 经两周的适应后开始正式实验。一组设为饥饿处理组, 停止投喂任何饵料; 一组仍为正常投喂的对照组。两组鱼均养殖于基地的渔排中, 养殖水温 25°C。经 8 天的实验后, 活体解剖实验组和对照组的样本, 取脑、胃、肝脏、脂肪等组织, 液氮保存后备用。

1.2 方法

1.2.1 CCK 和 LEP 基因的克隆 大黄鱼肝脏和胃中总 RNA 的提取采用 Trizol RNA 提取试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)参照说明书的方法进行。提取的 RNA 经 Nanodrop ND-2000 (Thermo Electrom Corporation, USA)分光光度计定量和琼脂糖电泳检测后, 用 Dnase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)去处多余的 DNA, 纯化的 RNA 用反转录试剂盒(Invitrogen, USA)反转为 cDNA 第一链后, 以反转录 cDNA 为模板, 以 GenBank 中脊椎动物的 CCK 和 LEP 保守序列设计引物(表 1), 扩增大黄鱼 CCK 和 LEP 的核心片段。PCR 扩增采用 25 μ L 反应体系进行, 内含 100ng 模板 cDNA、1 \times buffer、2.0mmol/L MgCl₂、0.2 μ mol/L 各种引物、0.2mmol/L dNTPs 和 4.0U 的 TaqDNA 聚合酶(Promega, USA)。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5min, 然后 94°C 变性 30s, 50°C 退火 30s, 72°C 延伸 30s, 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10min。PCR 产物经 pGEM-T 载体(Promega, USA)克隆后送公司双向测序。CCK 和 LEP 的全长序列参照 Sambrook 等(2001)的 3' RACE 和 5' RACE 方法扩增。其基本过程如下: 根据已获得 CCK 和 LEP 核心片段设计 3' RACE 上游引物和 5' RACE 下游引物(表 1), 以 SMARTTM RACE 试剂盒(Clontech, Palo Alto, CA,

USA)反转录合成的 cDNA 第一链为模板, 用 3' RACE 和 5' RACE 引物与 SMART™ RACE 试剂盒自带的通用引物配对, 并参照试剂盒说明书进行

CCK 和 LEP 3'和 5'端序列的扩增。所有的 PCR 扩增产物克隆到 pGEM-T 载体(Promega, USA)后, 送公司进行双向测序。

表 1 大黄鱼 CCK 和 LEP 基因克隆和表达所用引物
Tab.1 Primers used for CCK and LEP gene cloning and expression

| Primer | Sequence (5'—3') | Application |
|----------|----------------------------|---------------------------|
| CCK | | |
| dCCK F | GACWCCMGRGCCAAAYCTCAG | CCK cDNA fragment cloning |
| dCCK R | CGDCGSCCRAARTCCATCCA | CCK cDNA fragment cloning |
| 5'R-CCK1 | TCCGATGGTTGGCACT | CCK 5'-RACE cloning |
| 5'R-CCK2 | GTTTGCCGTGGAGTTTCTGC | CCK 5'-RACE cloning |
| 5'R-CCK3 | AGTCTTGCCAGCAGCTCG | CCK 5'-RACE cloning |
| 3'R-CCK1 | GCAGAAACTCCACGGCAAACAGCAGA | CCK 3'-RACE cloning |
| 3'R-CCK2 | CCATCGGATAGCAGACAGGGACTACG | CCK 3'-RACE cloning |
| RT-CCKF | TGGCTCTCACTGTCTACA | Real-time PCR for CCK |
| RT-CCKR | TTGCTCAACAGACCCTGAT | Real-time PCR for CCK |
| LEP | | |
| dLEP F | GTGRARTGGATGGCTRARCAGC | LEP cDNA fragment cloning |
| dLEP R | CCYTACBCTCATBAGAGCMTG | LEP cDNA fragment cloning |
| 5'R-LEP1 | TCAAGGGTGTGACAGAGA | LEP 5'-RACE cloning |
| 5'R-LEP2 | GCAGGTCCATCCAGAACATC | LEP 5'-RACE cloning |
| 5'R-LEP3 | GAGGGACCTGGAAGTTTCTG | LEP 5'-RACE cloning |
| 3'R-LEP1 | AATTTCTTCGCTGGCGGGATACCTCG | LEP 3'-RACE cloning |
| 3'R-LEP2 | CCACTACAGGAGCTACAGAGTCGCAA | LEP 3'-RACE cloning |
| RT-LEPF | ACTCTCCTGCATCTTCTAAGCG | Real-time PCR for leptin |
| RT-LEPR | CTTCTCCACTGATCGAGGT | Real-time PCR for leptin |
| β-actin | | |
| dACT F | TGCGTGACATCAAGGAGAAG | Real-time PCR for β-actin |
| dACT R | GCTGGAAGGTGGACAGAGAG | Real-time PCR for β-actin |

1.2.2 序列特征与系统进化 将获得的 CCK 和 LEP 全长序列与 GenBank 中的基因序列进行 BLAST 比对, 分析其同源性; 采用 ORF finder server (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) 中的软件确定基因的开放阅读框, 采用 SignalP Ver.3.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对两种基因的信号肽位点进行识别。采用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>) 程序对基因编码蛋白的可能三维结构进行预测。采用 Clustal W 程序将大黄鱼与其他脊椎动物的 CCK 和 LEP 基因序列进行比对, 采用 Mega 3.1 软件采用 Neighbor-Joining 法进行系统树的构建, 并采用 bootstrap 重复抽样 1000 次检验聚类树各分支置信度。

1.3 CCK 和 LEP 基因的组织表达研究

1.3.1 半定量 RT-PCR 分析 取大黄鱼脑、肝脏、

胃、肌肉、性腺(精巢)、心脏、前肠、脾脏、脂肪(肠系膜脂)等 9 种组织, 经同上方法提取和纯化 RNA 后, 取 2μg RNA 反转录成 cDNA 后, 用 CCK 和 LEP 特异性引物(见表 1)对各组织中的两种基因进行扩增, 以 β-actin 基因作为内参, 检测各组织中基因的表达量, β-actin 基因的扩增引物见表 1。PCR 扩增采用上述 20μL 的反应体系, 具体反应条件为, 94°C 预变性 5min, 然后 94°C 变性 30s, 50°C 退火 30s, 72°C 延伸 30s, 40 个循环, 最后 72°C 延伸 10min。PCR 产物采用 2.0%的琼脂糖电泳检测, 并用凝胶成像系统 (BIORAD)进行拍照记录。

1.3.2 实时荧光定量 qRT-PCR 分析 再次取大黄鱼上述 9 种组织, 提取和纯化的 RNA 经反转录合成第一链 cDNA 后, 用 CCK 和 LEP 特异性引物(见表 1)进行各组织基因表达的实时定量 qRT-PCR 扩增,

PCR 扩增采用上述 20 μ L 的反应体系, 内含 10 μ L 的 SYBR 荧光染料预混 extaq 酶(TaKaRa), 100ng 第一链 cDNA, 0.2 μ mol/L 双向引物。扩增反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。以 β -actin 为内参, 荧光定量 PCR 数据分析采用相对 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 每种组织基因表达量以 5 个样本(5 尾鱼)的均值来确定; 随机选择一个组织设定其基因表达量为 100%, 其他组织的表达量则以相对于该组织的相对表达量为计。

1.4 饥饿对 CCK 和 LEP 基因表达的影响

选取 CCK 表达较为丰富的脑、胃组织和 LEP 表达较为丰富的肝、脂肪组织为研究重点, 研究饥饿对两种基因表达的影响。分别提取饥饿组和对照组大黄鱼上述组织的 RNA, 经反转录为 cDNA 后, 采用同上 qPCR 法检测各组织 CCK 和 LEP 基因的表达量。荧光定量 PCR 数据分析采用相对 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 每种组织基因表达量以 5 个样本(5 尾鱼)的均值来确定, 各组织的表达量仍以相对表达量为计。

1.5 数据统计与分析

采用 SPSS19.0 软件对各项数据进行统计和分析, 所有数据均采用均值加减标准差($X\pm S$)的形式进行表述, 比较各组织或各处理组间基因表达量的差异, 并用 T 检验进行差异的显著性分析。采用双尾法进行显著性检验, 当 $P<0.05$ 时表示两组间有显著性差异, 当 $P<0.01$ 表示两组间有极显著性差异。

2 结果

2.1 大黄鱼 CCK 和 LEP 基因全长序列特征分析

2.1.1 CCK 基因 通过 RACE PCR 克隆到了一条总长为 900nt 的大黄鱼 CCK 序列(GenBank 登录号: AGR51146.1), 含 166nt 的 5'端非编码区(5'-UTR), 411nt 的开放阅读框和 326nt 的 3'端非编码区(内含终止密码子 TAA 和一个加尾信号 AATAAA)(如图 1 所示)。该序列编码一条 137 个氨基酸的多肽, 内含有一条 20 氨基酸的信号肽序列和一条 C 末端的八肽序列(CCK-8: DYVGMDF)。同源比对表明, 大黄鱼 CCK 氨基酸序列组成与美国红鱼 *Sciaenops ocellatus*

```

1      TCTCTATTTTCGCCGCTTCCGCGTTTTCTTAGCTCGGACCTGTTGGCTGTACCTAACCCG
61     GCCTAGGCCCTAGCATTTTTTTTACAGTGTGCTGTCGCCAAGAAGTGCTCTCCTCACT
121    CTCACACACTCCTCTAACCAAGCTGAACCACTTTTCTCAAGATGACTGCAGGTCTATGTGT
41     start codon M T A G L C V

          190      200      210      220      230      240
181    GTGTGTCGTGCTGGCTGTCTGTGTACAAGCTGTTTGGGGCTCCCCTTCTCCTCCCAGCT
61     C V V L A V L C T S C L G L P F S S Q L
          signal peptide
          250      260      270      280      290      300
241    CCTAGACGAGGGCCAGCGCTCCATCTCTGCTCCTTCTGAAGCTCTCCTTGAGGCTGGCAC
81     L D E G Q R S I S A P S E A L L E A G T

          310      320      330      340      350      360
301    CCACACCTTGGGAGAACCCAACCTCCAACACAGCCACTCTGCCCCGAGCTGAGAGCTCT
101    H T L G E P N L Q H S H S A P Q L R A L

          370      380      390      400      410      420
361    TCCTCTGGCTGAGGAGGATGCAGACTCCGAGCCAACCTCAGCGAGCTGCTGGCAAGACT
121    P L A E E D A D S R A N L S E L L A R L

          430      440      450      460      470      480
421    CATCTCTCCAGGAAAGTTCTGTGCGCAGAACTCCACGGCAAACAGCAGAGGCAACGG
141    I S S R K G S V R R N S T A N S R G N G

          490      500      510      520      530      540
481    GCTGAGTGCCAACCATCGGATAGCAGACAGGGACTACGTGGGGTGGATGGATTTCGGCCG
161    L S A N H R I A D R D Y V G W M D F G R
          cck8
          550      560      570      580      590      600
541    CCGTAGTGCAGGGGAGTACGAGTACTCCTCGTAAAGGGAAGTCAGGGTCTATGCCCTTC
181    R S A G E Y E Y S S *
          stop codon

601    CGTATGGGCACACAAGAAAAAGAAGAAAAAACAACGCAAGCTGGCTCCTCACTGTCT
661    CACAACAAGAGTCTATTTATGATGTATTTGTTGTACATTTGTTTGTAAAACGTGAATAAT
721    GCAATATACATATGCCAAATTTTGCAGAAAAGCTCTCACTGTCCAAGATTTGTTTGTTC
781    TGGTTTCTCTGGTTTCTTTATCATTGTTGGTGGAGAGGATCGGGGATGGCATCAGGGTC
841    TGTGAGGCAAACTGAATGAATAAGATTGAAAATACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
          polyadenylation signal

```

图 1 大黄鱼的 CCK 基因序列特征

Fig.1 The characteristics of CCK gene in large yellow croaker *P. crocea*

注: 图中列出了 CCK 基因的核苷酸序列及编码氨基酸序列, start codon 和 stop codon 分别代表起始与终止密码子; signal peptide 为信号肽区域; CCK-8 为 CCK 活性结构域; polyadenylation signal 代表加尾信号区域

(96%)、鲷鱼 *Seriola quinqueradiata* (89%)、牙鲆 *Paralichthys olivaceus* (84%) 和美洲拟鲈 *Pseudopleuronectes americanus* 的 CCK 同源性最高(图 2), 聚类分析表明(图 3), 克隆得到的大黄鱼的 CCK 与鱼类的 CCK1 亚类聚为一支, 而与鱼类的 CCK2 亚类相距较远, 表明克隆到大黄鱼 CCK 基因应该属于 CCK1 亚类。

2.1.2 LEP 基因 通过 RACE PCR 克隆到一条长为 1290nt 的 LEP 全长序列(GenBank 登陆号: AGR51148.1), 该序列含 142nt 的 5'端非编码区, 486nt 的开放阅读框和 662nt 的 3'端非编码区(内含有一段加尾信号序列 AATAAA 和一个 poly A 的尾巴)(图 4)。该序列编码一条 161 氨基酸的多肽, 内含一条 20 个氨基酸残基的信号肽序列。相对于 CCK, 大黄鱼 LEP 的保守性相对较弱, 其中与斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 的同源性最高, 达 82%, 其次与

条纹鲈 *Morone saxatilis* 的同源性达 75%, 而与其他鱼类的同源性均在 50%以下(图 5)。与人的同源性则更低。但 3D 结构预测分析表明, 大黄鱼的 LEP 多肽的三维结构则相当保守, 含 4 个 α 螺旋的经典结构, 甚至与人类的 LEP 3D 结构也高度相似(图 6), 显示了大黄鱼 LEP 结构在进化上的保守性。聚类分析表明, 鱼类的 LEP 基因与其他脊椎动物相距较远而单独成支, 鱼类的 LEP 也有两个亚类 LEPA、LEPB, 其中大黄鱼的 LEP 与鱼类的 LEPA 亚类聚为一支, 表明克隆到大黄鱼 LEP 基因应属于 LEPA 亚类。

2.2 CCK 和 LEP 基因的组织特性表达分析

采用半定量 RT-PCR 对大黄鱼 9 种组织中 CCK 和 LEP 基因的表达进行研究, 结果表明, CCK 在所检测的全部 9 种组织中均有表达。相对而言, CCK 在脑、胃、前肠、性腺(精巢)、心脏及脂肪组织中表达较高, 而在肝脏、肌肉、脾脏中表达较低(图 8A)。LEP 同样

| | |
|--------------------|---|
| yellow croaker | MTAGLCVCVVLAVLCTS-CLGLPFSSQLLDEGQRSISAPSE-ALLEAGTHTLGEPNLQSHSAPQLRALP-LAEEDADSR |
| Red drum |-.....-.....D.....H.....R.....K.....-..... |
| Winter flounder | ..T...Y.L.....-...H.L...H.E.....V..A...-.....D..S...H.RQRR.....N...-V...NG.T. |
| Japanese flounder |L.....-...H.I...H.....T.....D..S...H.RQ.R.....KS...-V...G... |
| Japanese flounder2 | .NV.I...L..A.SS.-S...SQ.MPQRAEAGEALMSD.LPPPSSNH.RQARSAPAPP.GQLANYNQ---HK.NT.P. |
| River puffer1 | .A...A.....G..F.....R..E..R..AP..Y.G...K.DGRQA..APVR.RR..S..N...-P..T... |
| River puffer2 | .NV.I...L..A.SSG-S.S...SHAMSKTAQQGAPPDNLPT---HH.RQARSAPAPP.GQFTNYNQ---VQDG..A. |
| Yellowtail 1 |-.....V.....D.DI.....Q.R.R.S.K.....-D..... |
| Yellowtail 2 | .N..I...L..AFSG.-S..R.SH.-QDEDKPEPPQLD.VMSP--QH.RHTRSAPS--GQLTPFSKPAEDEA.--P. |
| Atlantic salmo 1 |L.V..S.....R.Q..PP.Q..GPAMPPS..-R...YA.F.SK.R.RQTR...LDNTV.YT...G... |
| Atlantic Herring 2 | .NC.I...L..A.SS.G...AHPPQDEGHA.TGAVSRAA.A--VHRRHTRSVAAP-.GALLPFTKAAVED..EQ.P. |
| Rainbow trout N |L.V..S.....R.Q..PP.Q..GPAMPPS..-R...YA.F.SK.R.RQTR...LDNTV.YT...G... |
| Rainbow trout L | .N..I...L..AFSG.-S..R.SH.-QDEDKPEPPQLD.VMSP--QH.RHTRSAPS--GQLTPFSKPAEDEA.--P. |
| Rainbow trout T |M..L.V.....S.RTHF.PN.Q..SPALPP..-R..TKA.F.S..Y.R.T..S.LVNTK.YMG.-GRN... |
| Seabream 1 | .VLPYWL.....-.....VTV.....D.....HH.....K.....-..... |
| Seabream 2 | .NV.I...L..A.SSR-S.S...SHTVSQRAEGEDLPSD.LPP---HH.RQARSAPALP.GQLASYTQ---PQ.G..A. |

| | signal peptide | cck-8 | identity |
|--------------------|---|------------------------|----------|
| yellow croaker | ANLSELLARLISSRKGS-VRRNSTANSRGNLSANHRIADR | DYVGWMDFGRRSAGEY-EY SS | |
| Red drum |-.....-.....M.....E..... | | 96% |
| Winter flounder |Y.K.--.P..... | | 80% |
| Japanese flounder |Y.K.--.P..... | | 84% |
| Japanese flounder2 | NS.NQ.....-...PHQTR.SLT..AS..APG...K.. | | 46% |
| River puffer1 |T.....V..G..... | | 76% |
| River puffer2 | NS..Q.....L..-...PYQSR.SIS..AS..APS...K.. | | 46% |
| Yellowtail 1 |S..... | | 89% |
| Yellowtail 2 | TS.R.....-...FQ.S.SLS..AS.PGPS.K.K.. | | 48% |
| Atlantic salmo 1 |I.K..V...AS.....K.. | | 68% |
| Atlantic Herring 2 | TS.TQ.I.T.A...A-S...VLT..AS.PASS...K.. | | 47% |
| Rainbow trout N |L.K..V...AS.....K.. | | 69% |
| Rainbow trout L | TS.R.....-...LQ.S.SLS.EAS.PGPS.K.K.. | | 48% |
| Rainbow trout T | .K.....Q..Y-ISG...V...AS.....L.KN.. | | 60% |
| Seabream 1 |Q.....SG..... | | 86% |
| Seabream 2 | SS..Q.P.....-...PYQTR.SLT..AS..APSPW.K.. | | 44% |

图 2 大黄鱼与其他鱼类的 CCK 氨基酸序列比对结果

Fig.2 Alignment of the CCK amino acid sequences from large yellow croaker *P. crocea* with that from other teleost fish
 注: 除大黄鱼以外, 所有其他鱼类的 CCK 氨基酸序列来自 GenBank, 其中 Red drum 为美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*, ACF04738.1); Winter flounder 为美洲拟鲈(*Pseudopleuronectes americanus*, ACH42757.1); Japanese flounder 为牙鲆(*Paralichthys olivaceus*, 1-, O57312.1; 2-, BAC44892.1); River puffer 为河豚(*Tetraodon nigroviridis*, 1-, BAC44894.1; 2-, BAC44895.1); Yellowtail 为鲷鱼(*Seriola quinqueradiata*, 1-, BAE16613.1; 2-, NP001132993.1); Atlantic salmo 为大西洋鲑(*Salmo salar*, NP001132994.1); Atlantic herring 为大西洋鲱(*Clupea harengus*, AAQ17201.1); Rainbow trout 为虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*, N-, NP001118083.1; L-, NP001117817.1; T-, NP001117816.1); Seabream 为牙鲷(*Diplodus sargus*, 1-, AEU08492.1; 2-, AEU08493.1)

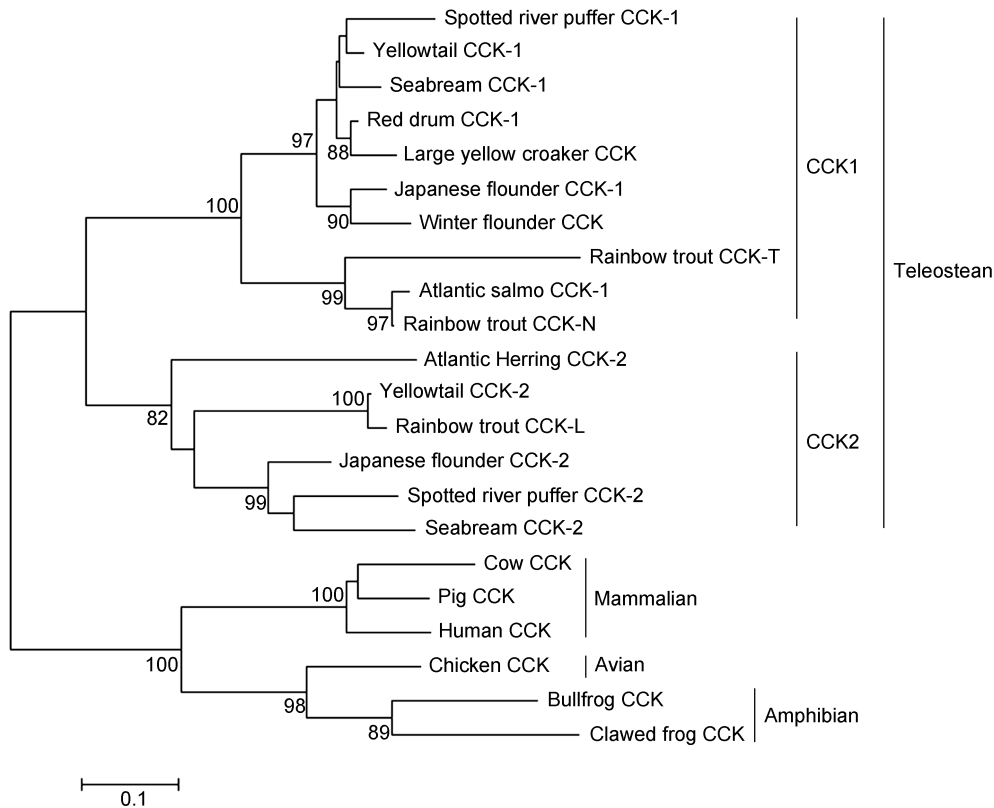


图3 大黄鱼 CCK 基因的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of CCK from large yellow croaker *P. crocea*

注: 除大黄鱼外, 用于系统树构建的所有其他物种的 CCK 均来自于 GenBank, 其中 human 为人 (*Homo sapiens*, NP000720.1); pig 为猪 (*Sus scrofa*, NP999402.1); chicken 为鸡 (*Gallus gallus*, NP001001741.1), cow 为牛 (*Bos taurus*, NP001040068.1); bullfrog 为牛蛙 (*Rana catesbeiana*, P80344.2), Clawed frog 为爪蛙 (*Xenopus laevis*, NP001079304.1), Spotted River puffer 为河豚 (*Tetraodon nigroviridis*, 1-, BAC44894.1; 2-, BAC44895.1); Yellowtail 为鳮鱼 (*Seriola quinqueradiata*, 1-, BAE16613.1; 2-, NP001132993.1); Seabream 为牙鲷 (*Diplodus sargus*, 1-, AEU08492.1; 2-, AEU08493.1); Red drum 为美国红鱼 (*Sciaenops ocellatus*, ACF04738.1); Japanese flounder 为牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*, 1-, O57312.1; 2-, BAC44892.1); Winter flounder 为美洲拟鲽 (*Pseudopleuronectes americanus*, ACH42757.1); Rainbow trout 为虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*, N-, NP001118083.1; L-, NP001117817.1; T-, NP001117816.1); Atlantic salmo 为大西洋鲑 (*Salmo salar*, NP001132994.1); Atlantic herring 为大西洋鲱 (*Clupea harengus*, AAQ17201.1)

在所有组织中均有表达, 但其在肝脏、前肠组织中表达最高, 而在其他组织中表达相对较低(图 8A)。实时定量 qRT-PCR 也给出了类似的结果, CCK 在脑、胃和前肠中表达最高, 然后依次是性腺(精巢)、脂肪、心脏、肝脏、肌肉和脾脏; 其中脑、胃和前肠中 CCK 表达量是其他组织的两倍以上(图 8B)。LEP 在肝脏中的表达最高, 然后依次为前肠、脂肪及其他组织, 肝脏中 LEP 表达量是其他组织的 8 倍以上(图 8B)。由于 CCK 在脑和胃中表达较高, 而 LEP 在肝脏和脂肪表达较高, 因此我们选取这 4 种组织用于后续的空腹实验。

2.3 饥饿对大黄鱼 CCK 和 LEP 基因表达的影响

为进一步验证两种多肽与摄食调控及能量平衡的相关性, 本研究还开展了饥饿对两基因表达的影

响。结果表明, 8 天的饥饿可造成大黄鱼脑和胃中 CCK 基因表达量相对于对照组的显著下降 ($P < 0.05$) (图 9), 其中脑中 CCK 表达量下降幅度比胃中更明显。同样, 8 天的饥饿也可造成大黄鱼肝脏和脂肪组织中 LEP 基因表达量相对于对照组的显著下降 ($P < 0.05$), 这种降低在肝脏中表现得比在脂肪中更为显著, 如图 9 所示。

3 讨论

3.1 大黄鱼 CCK、LEP 基因的序列特征与分子进化

本文首次克隆了两种大黄鱼的摄食调控因子 CCK 和 LEP 基因的全长序列, 通过 GenBank 等数据库的同源比对和 blast 搜索, 结果表明, 克隆得到的大黄鱼 CCK 和 LEP 与其他鱼类有着较高的同源性。

```

1      ATATGAGGTGAGTAAGAGATGAGTCAACAGCCCTCCACTATAAGATGTCTGTATGGAGCC
61     TAACAGTGGCATACTACTCAGACACCAGCGAAGGGATACCCTGCTATTCTAATTTCTGTA
121    CATTCTGGGAAATACTACAGAGATGGACTACAGTCTGGCACTCTGTTACTCTCTCGCA
41     start codon M D Y S L A L L F T L L H
                                signal peptide
                                220 230 240
181    TCTTCTAAGCGTGGGTACAGCTGCACCGCTGTCAGCGGAAGTAGTGAAGATGAAATCAA
61     L L S V G T A A P L S A E V V K M K S K
                                250 260 270 280 290 300
241    AGTGAATGGATGGCTGAACAGCTGGTACTTAAGCTGGACAGAACTCCAGGTCCTCC
81     V K W M A E Q L V L K L D R N F Q V P P
                                310 320 330 340 350 360
301    TGGCCTGACACTCAGCCACCTGTTGATGTTCTGGATGGACCTGCCTCCATAGTGATGGT
101    G L T L S P P V D V L D G P A S I V M V
                                370 380 390 400 410 420
361    CTTAGAGGGGTATAACAGCTTGATCTCTGACACCCCTTGATGGGGTCACCCAGGTCAGAC
121    L E G Y N S L I S D T L D G V T Q V K T
                                430 440 450 460 470 480
421    TGAATTTCTTCGCTGGCGGGATACCTCGATCAGTGGAGGAAGGGGCCTGCACTGAGCA
141    E I S S L A G Y L D Q W R K G H C T E Q
                                490 500 510 520 530 540
481    GCGGCCAAGCCATCAGTGCCAGGCCACTACAGGAGCTACAGAGTCGCAAAGAATTCAT
161    R P K P S V P G P L Q E L Q S R K E F I
                                550 560 570 580 590 600
541    TCACACTGTGAGCATCGAGGCGCTCATGAGAGTGAAGGAGTTACTCAATCTGCTGTGAA
181    H T V S I E A L M R V K E L L N L L L K
                                610 620 630 640 650 660
601    AAATCTGGATCAACTTCAGAGTTGTTCAGAGATGGACAGAAGGCCAAGTTGTTGATTAT
201    N L D Q L Q S C *
                                stop codon
661    TTTGTTAAGTCCGCATCAGTGGTGTCTGACTTTGCATCCCTCCCTCGCGGTATGTTGAAC
721    TTTGCAATGTGTTTGAAGGGAATTTATTCTTGAACGTGCACCTATTATATACACAAG
781    TATTTATTTATATATTGTATTTAGAAAATATGTATTTTGTGACATTGTTGTAATGCTTTT
841    GAGGATGTTGTAGCAAAAGTATGTGTTGTGAAAAAATATTTATGTGCAAACTGATCTA
901    TGTTTTGCACAGAAATATAAAATCAGCGCTTCATAGTGTGTTATATACACCACTGTTTT
961    AAAATATGGATCTCTATATTAATGTAATGAATCAACTGTGTACAAATGACTGCAGCTAGA
1021   GGAATGTACAGTGCAGTGAATGTCTAGTGGAAATTCCTGAAAACCAAGTTGAAAC
1081   TTGCCAAGAAATACGTGTGTTTGTCTGACAATTAGGACAGGAAGGACAAAGGCAACTTT
1141   CATTTTCAGTGAATATCATCAGCTCTCCAATATGGCTATTTATATCTGTAGATGATACT
1201   TTGTATATTTTGTACAGTTGACACTATTTTTTTAGACAAAACATAAATAATTTTACA
1261   AAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA polyadenylation signal

```

图 4 大黄鱼 LEP 基因的序列特征

Fig.4 The characteristics of LEP gene in large yellow croaker *P. crocea*

注: 图中列出了 LEP 基因的核苷酸序列和编码氨基酸序列; start codon 和 stop codon 分别代表起始与终止密码子; signal peptide 为信号肽区域; polyadenylation signal 代表加尾信号区域

| | | | | | | | |
|--------------------|------------|---------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| Yellow croaker | MDYSLALLFT | -LLHLLSVGT | AAPLSAEVVK | MKSKVKWMAE | QLVLKLD RNF | QVP----- | -PGLT LSPPV |
| Spotted grouper A | ...T....S | -...VF.... | ...PV.... | | ...VR.NKD. | |A |
| Spotted grouper B | .HIFR..VYV | S.VVAP-GCS | SL.TKGDSIR | NTIHS---II | NIAQITLVHI | KKL----- | RTR.PAA.QI |
| Striped bass A | ...T.I..S | -M.Q....SM | ...PV.... | | ...VR.N.D. | | -A.....A |
| Medaka A | ..SA.V.FAF | -F.C.N.A. | ...VNP.LQE | ..N.IDI.K | E.S.R.ESII | .TS----- | -I.PKF...S |
| Medaka B | .YMP...VYA | SF.T.P-AS. | SPATKGN.IQ | IQVHN---IV | N.AQTVAHI | RKL----- | RMQ.LMA..I |
| Atlantic salmon A1 | ..C.M...LS | S..A.F...A | G.S..LH..R | T...DL.Q | TM.IR---I | NKLDISP-NL | IE.MDPFL.A |
| Atlantic salmon A2 | ..C.M...VS | S..A.F.M.A | G.S..LDI.R | T...FL.Q | TM.YRTQMI | KKLPSSSNLV | ID..E.FF.A |
| Arctic charr A | ..C.M.P.VS | F..AHF.M.A | G.S..LDI.R | T...FL.Q | TM.YRTQMEI | KKLPSSSNLV | ID..E.FF.A |
| Arctic charr B | .HV.VV..CL | G.VVS--SV | CH.QRGRPLN | GDVQMRNNIK | L.AMITVVHI | KNY----- | LTEFNVP.EM |
| Atlantic salmon B1 | .V.VV..CL | G.VVS--SV | CH.QRGRPLN | GDVQMRNNIK | L.SMITVVHI | KNY----- | LTEFDVP.EM |
| Atlantic salmon B2 | .HV.VV..CL | G.VVS--SV | CH.QRGRPLN | GGVQMRNNIK | L.SMITVVHI | KNY----- | LTEFDVP.EM |
| Rainbow trout B | .HV.VV..CL | G.VVS--SV | CH.QRGRPLN | GDVQMGNNIK | L.AMITVVHI | KNY----- | LTEFNVP.EM |
| Brown trout B1 | .HV.VV..CL | G.VVS--SV | CH.QRGRPLN | GDVQMRNNIK | L.SMITVVHI | KNY----- | LTEFDV.LEM |
| Brown trout B2 | .HV.VV..CL | G.VVS--SV | CH.QRGRPLN | GDVQMRNNIK | L.AMVTVVHI | KNY----- | LTEFDVP.EM |
| Yellow croaker | DV-----LD | GPASIVMVL | GYNSLIS-DT | LDGVTQVKTE | ISSLAGYLDQ | WRKGHCTEQR | PKPSVPGPLQ |
| Spotted grouper A | .I----- | ..S...T.D | | FN...S...FD | ...T..IG. | ..Q..... | |
| Spotted grouper B | EPS--TPSI. | .LT..TQD.G | LLDNELQNPV | TELLS.IQAD | V...E.RVRS | FALTMDCPLQ | AR..GATSDS |
| Striped bass A | .D----- | ..LS...TI.. |-S | .I..S...VD | ...T.F.S. | ..Q...S... | ..L...V.. |
| Medaka A | .E----- | ..N.LS..MA..D | ECTNQ...N | F.EAKKI.VD | ...MDSMSE | .SDK..G..- | -----STQA |
| Medaka B | EIT--TPPIK | .L..FSHY.K | HLDNELQSPD | T.LLS.IQAD | V...D.KVQS | LGLMMNCPFQ | .R.TAEVSRF |
| Atlantic salmon A1 | AAV--DQHIE | SLP..METMG | F.QD.MLFLD | WADLK.LVED | T.TMR.L.EN | .MISR.PGRQ | Q.QTGE.R.S |
| Atlantic salmon A2 | AAG--DQPIG | .LP...ETMG | F.QD.LIFLD | MADLK.LVED | A.TMR.Q.EN | .MMSR.PGRQ | Q.QIGE.G.E |
| Arctic charr A | AAG--DQPIE | .LP...ETMG | F.QD.LISLD | MADLK.LVED | A.TMR.Q.EN | .MMSR.PGRQ | Q.QTGE.G.E |
| Arctic charr B | EFNPMNPPIE | .L...WVH.G | .LEESLQDS- | --RCG..YED | L..MR.WVHS | LSQALDCPDL | A..GGEALKT |
| Atlantic salmon B1 | EFNPMNPPIE | .L...WVH.G | .LEESLQDS- | --RCG..YED | L..MR.WVHS | LSQALGCPDL | A..GGEALKT |
| Atlantic salmon B2 | EFNPMNPPIE | .L...WVH.G | .LEESLQDS- | --RCG..YED | L..MR.WVHS | LSQALGCPDL | A..GGEALKT |
| Rainbow trout B | EFNPMNPPIE | .L...WVH.G | .LEESLQDS- | --RCG..YED | L..MR.WVHS | LSQALDCPDL | A..GKALKT |
| Brown trout B1 | EFNPMNPPIE | ...WVH.G | .LEESLQDS- | --RRG..YED | L..MR.WVHS | LSQALGCPDL | A..GGEALKT |
| Brown trout B2 | EFNPMNPPIE | .L...WVH.G | .LEESLQDS- | --RCG..YED | L..MR.WVHS | LSQALGCPDL | A..GGEALKT |

| | | |
|--------------------|---|----------|
| Yellow croaker | ELQSR--KEF IHTVSI EALM RVKELLNLLL KNLDQLQSC | identity |
| Spotted grouper A |F.....H.ET. | 82% |
| Spotted grouper B | VFPDS----- --QLHLT.T K.QRY.EKFI LHK.K.KV. | 19% |
| Striped bass A | ...R.--.K.M....F.....NH.ET. | 75% |
| Medaka A | .N.TS--RR. SI.E.MQ.VT .L.HF.L..Q N.S...EI. | 40% |
| Medaka B | LFPDI----- --HHYWTIA K.ENY.ES.H L.R.K.KV. | 19% |
| Atlantic salmon A1 | .ALKDTTRKY GLS.GPV..N .L.GY.GR.. L....NY. | 31% |
| Atlantic salmon A2 | .ALKDSVRK. GLS..PV..N .L.GY.DR.P L....RY. | 33% |
| Arctic charr A | .ALKDSVRK. GLS.CPV..N .L.GY.DR.. L....RY. | 32% |
| Arctic charr B | VY.....V EGQRYMEKIS L...K.KI. | 23% |
| Atlantic salmon B1 | VY.....V EGQRYMEKIS L...K.KI. | 25% |
| Atlantic salmon B2 | VY.....V EGQRYMEKIS L...K.KI. | 23% |
| Rainbow trout B | VY.....V EGQRYMGKIS L...K.KI. | 23% |
| Brown trout B1 | VY.....V EGQRYTEKIS L...K.KI. | 22% |
| Brown trout B2 | VY.....V EGQRYMEKIS L...K.KI. | 23% |

图 5 与其他鱼类的 LEP 氨基酸序列比对结果

Fig.5 Alignment of the LEP amino acid sequences from large yellow croaker *P. crocea* with that from other teleost fish
 注: 除大黄鱼以外, 所有其他鱼类的 CCK 氨基酸序列均来自 GenBank, 其中 Spotted grouper 为斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*, A-, AFU55260.1; B-, AFU55261.1); Striped bass 为条纹鲈(*Morone saxatilis*, AFD34355.1); Medaka 为青鳉(*Oryzias latipes*, A-, NP001098190.2; B-, NP001153914.1); Atlantic salmon 为大西洋鲑(*Salmo salar*, A1-, ACZ02412.1; A2-, ADI77098.1; B1-, NP001266063.1; B2-, NP001268365.1); Arctic charr 为北极红点鲑(*Salvelinus alpinus*, A-, BAH83535.1; B-, AGG81492.1); Rainbow trout 为虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*, AGG81493.1); Brown trout 为褐鳟(*Salmo trutta*, B1-, AGG81490.1; B2-, AGG81491.1)

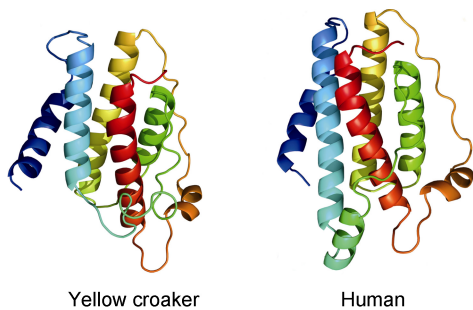


图 6 大黄鱼与人 LEP 蛋白的 3D 结构比较

Fig.6 Comparison in the 3D structures of large yellow croaker and human leptons

注: 大黄鱼与人的 LEP 3D 结构采用 SWISS-MODEL 蛋白自动建模服务器进行预测, 人的 LEP 蛋白来自 GenBank LEP (NP000221.1), 大黄鱼的 LEP 蛋白根据本研究实测基因开放阅读框推测而来

特别是 CCK 基因序列, 大黄鱼的 CCK 与美国红鱼 (Webb *et al*, 2010)、鳊鱼 (Murashita *et al*, 2007)、牙鲆 (Suzuki *et al*, 1999)、美洲拟鲈 (MacDonald *et al*, 2009) 等的同源性高达 80% 以上, 如图 2 所示, 表明鱼类的 CCK 保守性相对较强。信号肽和 CCK-8 区域是 CCK 中最为保守的区域, 如图 2 所示, 大黄鱼 20 个氨基酸的信号肽区域与美国红鱼 (Webb *et al*, 2010)、牙鲆 (Suzuki *et al*, 1999) 的同源性高达 100% 和 95%。GenBank (AB205406) 中的鳊鱼的 CCK 信号肽序列尽管不完全, 但已获得的 14 个氨基酸的信号肽序列与大黄鱼的同源性也高达 100%。同样大黄鱼的 CCK-8 区域也与大多数鱼类的高度同源, 仅在第 6 位 (从 C 端) 氨基酸上存在部分替代, 如大西洋鲱中该位点是甲硫氨酸 (Met) (Kamisaka *et al*, 2005), 而在金鱼

(Peyon *et al*, 1998) 和牙鲆 (Suzuki *et al*, 1999) 中该位点由亮氨酸 (Leu) 取代, 而在虹鳟 (Jensen *et al*, 2001) 中该位点为亮氨酸 (Leu)、精氨酸 (Asp) 或苏氨酸 (Thr)。信号肽及 CCK-8 区域的保守性可能暗示这些区域在鱼类 CCK 功能中扮演着重要角色。诚然, 在哺乳动物中, CCK-8 中的 WMDF 区域据认为是 CCK 最关键的活性结构域 (Nielsen *et al*, 1998)。同样, CCK-8 中的第 6 位氨基酸据信也是维持哺乳动物 CCK 活性的关键 (Nielsen *et al*, 1998), 该位点的变异往往造成 CCK 活性的减弱或完全丧失。但该位点在鱼类却存在广泛的变异, 该现象可能可归因于鱼类 CCK 受体在与其配体识别时相对较低的严谨性。一般而言, 硬骨鱼类中普遍存在两种形式的 CCK, 即 CCK1 和 CCK2 亚家族 (Kurokawa *et al*, 2003), 可能是鱼类早期进化过程中基因组复制的结果 (Kamisaka *et al*, 2005)。在虹鳟中, 甚至发现了 3 种类型的 CCK 即 (CCK-L, N 和 T) (Jensen *et al*, 2001), 从本研究的结果来看, 大黄鱼中也可能至少存在两种类型的 CCK, 一种是 Cai 等 (2015) 在大黄鱼中发现的 CCK2 亚型, 而另一种是本研究克隆到的 CCK, 聚类分析的结果表明, 我们克隆到的大黄鱼 CCK 与其他鱼类的 CCK1 聚在一起, 而与 CCK2 亚家族相距甚远, 因此表明本研究克隆到的大黄鱼 CCK 可能属 CCK1 亚型。

相对而言, 大黄鱼的 LEP 基因与其他鱼类的 LEP 同源性较低, 如图 5 所示。大黄鱼的 LEP 仅与斜带石斑鱼 (Zhang *et al*, 2013) 及条纹鲈 (Won *et al*, 2012) 等鲈形目的较为接近 (75% 以上), 而与其他鱼类同源性较低, LEP 基因序列这种较大的种间变异在鱼类及

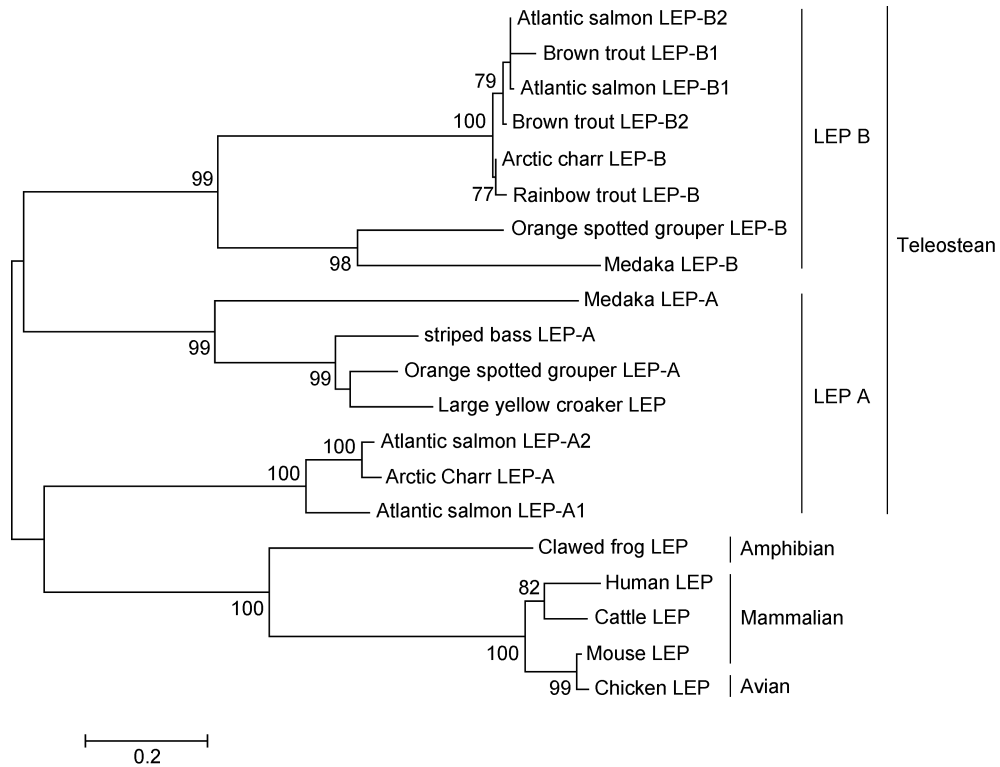


图 7 大黄鱼 LEP 基因的系统进化分析

Fig.7 Phylogenetic analysis of LEP from large yellow croaker *P. crocea*

注: 除大黄鱼外, 用于系统树构建的所有其他物种的 CCK 基因均来自于 GenBank, 其中 Clawed frog 为爪蛙(*Xenopus laevis*, NP001089183.1); Human 为人(*Homo sapiens*, NP000221.1); Cattle 为牛(*Bos taurus*, NP776353.2); Mouse 为家鼠(*Mus musculus*, NP032519.1); Chicken 为鸡(*Gallus gallus*, O42164.1). Atlantic salmon 为大西洋鲑(*Salmo salar*, A1-, ACZ02412.1; A2-, ADI77098.1; B1-, NP001266063.1; B2-, NP001268365.1); Brown trout 为褐鳟(*Salmo trutta*, B1-, AGG81490.1; B2-, AGG81491.1); Arctic charr 为北极红点鲑(*Salvelinus alpinus*, A-, BAH83535.1; B-, AGG81492.1); Rainbow trout 为虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*, AGG81493.1); Orange spotted grouper 为斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*, A-, AFU55260.1; B-, AFU55261.1); Medaka 为青鳉(*Oryzias latipes*, A-, NP001098190.2; B-, NP001153914.1); Striped bass 为条纹鲈(*Morone saxatilis*, AFD34355.1)

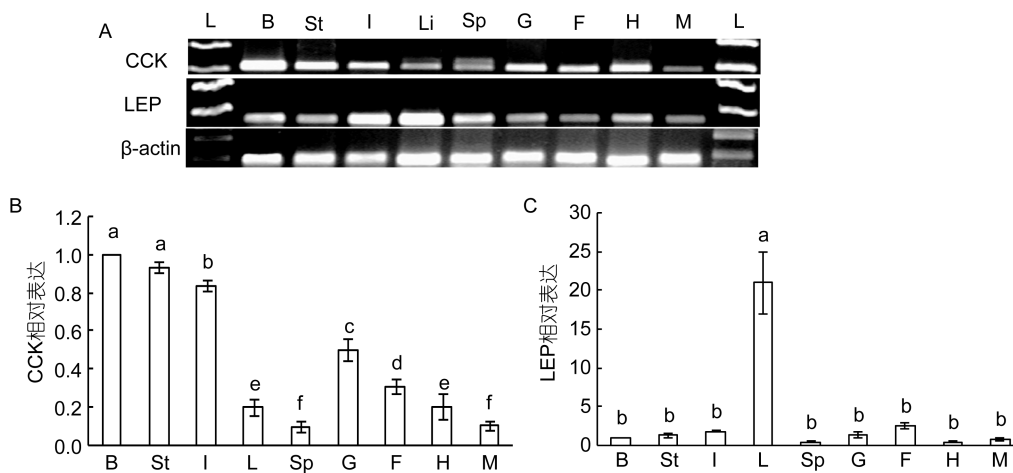


图 8 大黄鱼 CCK 和 LEP 基因表达的组织特异性研究

Fig.8 Tissue distribution of CCK and LEP mRNA in the large yellow croaker *P. crocea*

注: (A)为大黄鱼 9 种组织中 CCK 和 LEP 表达的半定量 RT-PCR 结果, β -actin 作为对照; (B), (C)分别为 9 种组织中 CCK 和 LEP 表达的 qRT-PCR 分析结果, 两个基因均选取脑中的表达量设定为 1, 其他组织表达量均为相对于脑的相对值, 柱状图上方的字母不同者表示两者有显著性差异($P < 0.05$). 标准差由 5 个样本计算而得。图中标示: L 为 marker; B 为脑; St 为胃; I 为前肠; Li 为肝脏; Sp 为脾; G 为性腺; F 为脂肪; H 为心脏; M 为肌肉

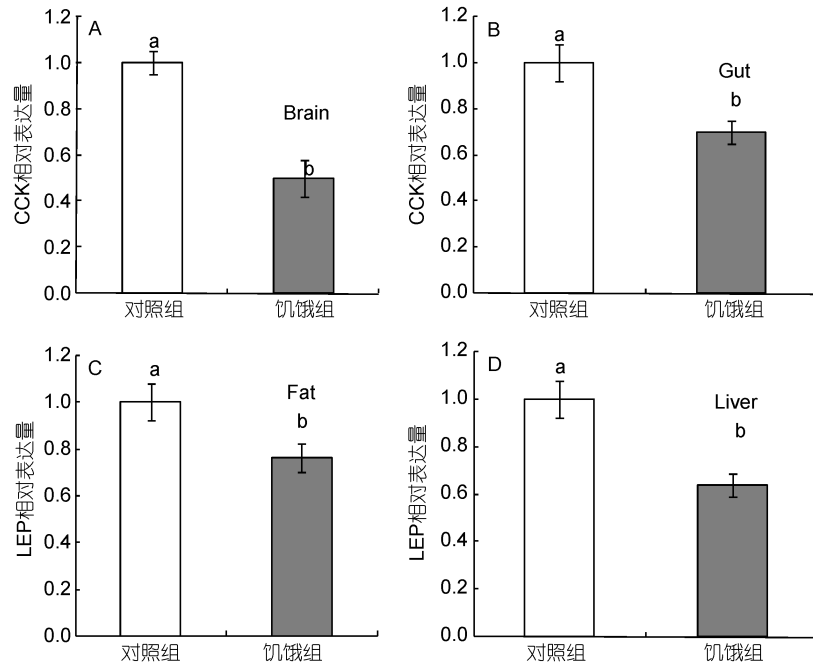


图9 饥饿对大黄鱼 CCK 和 LEP 基因表达的影响

Fig.9 Effects of fasting on CCK and LEP mRNA expression in the large yellow croaker *P. crocea*

注: A 展示了饥饿组和对照组脑中 CCK 表达量的差异; B 展示了饥饿组和对照组胃中 CCK 表达量的差异; C 展示了饥饿组和对照组脂肪组织中 LEP 表达量的差异; D 展示了饥饿组和对照组肝脏中 LEP 表达量的差异; 两个基因均选取对照组的表达量设定为 1, 饥饿组表达量为相对于对照组的相对值, 柱状图上方的字母不同者表示两者有显著性差异($P < 0.05$), 标准差由 5 个样本的表达量数据统计而来

其他脊椎动物中颇为常见(Zhang *et al.*, 2013)。然而 3D 结构模拟结果表明, 大黄鱼的 LEP 在空间结构上却保留了经典的 4α 螺旋这一 LEP 蛋白结构特征, 甚至与人类的 LEP3D 结构也高度相似(图 6), LEP 的这种 4α 螺旋经典结构据信是维持其与 LEP 受体亲和力, 并行使其生理功能所必须的(Crespi *et al.*, 2006)。本研究在大黄鱼中仅克隆到了一个 LEP 基因, 鱼类通常具有两个 LEP 亚家族基因即 LEPA 和 LEPB, 两个亚家族可能也起源于鱼类早起进化过程中基因组的复制(Frøiland *et al.*, 2010)。然而在鲈形目中情况可能并非如此, 在已研究的所有鲈形目种类中除斜带石斑鱼之外, 都仅发现了一种类型的 LEP 基因, 如条纹鲈(Won *et al.*, 2012)、蓝鳍金枪鱼(Yanowski *et al.*, 2011)、鳕鱼(李光照, 2009)等。因此在大黄鱼中是否还存在另一类型的 LEP 基因还有待于今后的进一步研究。然而聚类分析表明, 本研究获得的大黄鱼 LEP 基因与鱼类的 LEPA 亚类聚在一起, 而与 LEPB 亚类相距较远, 因此推测该 LEP 基因应属于 LEPA 亚家族类型。

3.2 大黄鱼 CCK、LEP 基因的组织表达特征及可能功能作用位点

本研究在所检测的所有 9 种组织中均检测到了

CCK mRNA 的表达, 在脑、胃、肠等组织中 CCK mRNA 的表达量最高, 大大高于剩余其他组织的表达量, 类似的结果也在虹鳟(Jensen *et al.*, 2001)、鲱鱼(Murashita *et al.*, 2007)、美国红鱼(Webb *et al.*, 2010)中有所发现, 该结果进一步证实了前人有关脑、外周消化器官是 CCK 食欲调控功能的主要位点的一般看法(Himick *et al.*, 1994)。然而, 在大黄鱼的肝脏、心脏、脾脏、肌肉、性腺(精巢)及脂肪中也检测到了少量 CCK mRNA 的表达, 在同为石首鱼科的美国红鱼中, CCK mRNA 也在肝脏、肌肉、脾脏、性腺及脂肪中有所表达(Webb *et al.*, 2010); CCK mRNA 还在美洲拟鲈的心脏、肾脏、鳃(MacDonald *et al.*, 2009)及鲱鱼的胃盲囊、直肠及胆囊(Murashita *et al.*, 2007)中被检测到。CCK 在这些组织中的功能尚不得而知。但有研究表明, CCK 可能还在动物的感觉系统(Troger *et al.*, 2007)和生殖系统(Micevych *et al.*, 1992)中发挥着重要功能; 最近, CCK 还被证实在鱼类消化道的抗炎反应及垂体的激素分泌过程也起着重要作用(Peyon *et al.*, 1998; Raybould, 2007)。因此 CCK 在大黄鱼组织中的广泛表达可能暗示着其在食欲调控外参与着广泛的生理调控功能。

LEP 基因也在所有检测的 9 种组织中均有表达,但在肝脏中 LEP 基因的表达量最高,类似的结果也出现在东方鲀(Kurokawa *et al*, 2005)、虹鳟(Murashita *et al*, 2008)、条纹鲈(Won *et al*, 2012)及大西洋鲑(Rønnestad *et al*, 2010)中,然而在脂肪组织中,LEP 基因表达量则要低的多。该结果进一步印证了前人关于硬骨鱼类的肝脏而非脂肪组织更可能是能量收支的调控中心的表述(Won *et al*, 2012)。在大黄鱼的胃、肠道等消化系统中也检测到了一定量的 LEP 基因表达,该结果与金鱼(Tinoco *et al*, 2012)及大西洋鲑(Rønnestad *et al*, 2010)肠道内检测到大量 LEP 基因表达相吻合。在哺乳动物中,胃肠道可分泌 LEP 激素以调控营养物的吸收,从而间接影响能量的收支(Rønnestad *et al*, 2010),鱼类肠道中 LEP 表达也许也与该生理功能有关。有趣的是,在大黄鱼的性腺(精巢)中也有微弱的 LEP 基因的表达,在斑马鱼(Gorissen *et al*, 2009)及大西洋鲑(Rønnestad *et al*, 2010)的卵巢中也发现了大量 LEP 基因的表达,该结果可能暗示了 LEP 在鱼类的生殖过程中的可能调控作用。

3.3 饥饿对大黄鱼 CCK、LEP 基因表达的影响及其可能机制

CCK 和 LEP 在大黄鱼脑、消化道、肝脏及脂肪等摄食及能量存储组织中的大量表达,似乎暗示了两种肽在鱼类食欲调控和能量平衡中的关键作用。为探索两者相关性,我们首先探讨了饥饿等摄食状态对大黄鱼 CCK 和 LEP 表达的影响。在哺乳动物中,脑和消化道中 CCK mRNA 表达量与血液中 CCK 含量呈正相关,并受到饥饿等摄食状态的影响而显著减少(Suominen *et al*, 1998)。在大黄鱼中,饥饿也会降低脑及胃肠道中 CCK mRNA 表达量的减少,类似的结果在包括美洲拟鲈(MacDonald *et al*, 2009)、鳊鱼(Murashita *et al*, 2007)和草鱼(Feng *et al*, 2012)等硬骨鱼类中屡有发现。然而,LEP mRNA 表达与鱼类饥饿等摄食状态的关联性则要复杂的多,LEP mRNA 受饥饿等摄食状况的调控或因物种或饥饿时间而异。在虹鳟(Kling *et al*, 2009)和斜带石斑鱼(Zhang *et al*, 2013)中 LEP mRNA 表达因饥饿而上升;在绿太阳鱼(Johnson *et al*, 2000)、大西洋鲑(Rønnestad *et al*, 2010)和条纹鲈(Won *et al*, 2012)中,LEP mRNA 表达因饥饿而减少;而在鲤鱼(Huising *et al*, 2006)和金鱼(Tinoco *et al*, 2012)中,暂时的饥饿对 LEP mRNA 表达并无显著影响。在大黄鱼中,短期的饥饿会造成了肝脏及脂肪组织中 LEP mRNA 表达的显著下降($P < 0.05$),该结

果与绝大多数哺乳动物中的研究结果相类似(Won *et al*, 2012)。饥饿对大黄鱼 CCK 和 LEP 基因表达模式的影响可能从侧面反映出了其与鱼类摄食生理与能量平衡间的相关性。

4 结论

本研究克隆得到了两种大黄鱼的摄食调控因子胆囊收缩素(CCK)、瘦素(LEP)基因的全长序列,两种因子分属鱼类的 CCK1 和 LEPA 亚家族类型。CCK 和 LEP 在大黄鱼脑、消化道等摄食及能量平衡相关组织中表达最高,饥饿等摄食状态会显著影响大黄鱼 CCK 和 LEP 的表达,该结果表明,CCK 和 LEP 可能在大黄鱼的食欲调控和能量平衡中起着重要的调控作用。

参 考 文 献

- 农业部渔业局, 2012. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社
- 李光照, 2009. 淡水养殖鱼类肥胖基因克隆与组织表达研究. 广州: 暨南大学硕士学位论文
- Cai Z N, Li W J, Mai K S *et al*, 2015. Effects of dietary size-fractionated fish hydrolysates on growth, activities of digestive enzymes and aminotransferases and expression of some protein metabolism related genes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) larvae. *Aquaculture*, 440: 40—47
- Crespi E J, Denver R J, 2006. Leptin (*ob gene*) of the South African clawed frog *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26): 10092—10097
- De Pedro N, Björnsson B T, 2001. Regulation of food intake by neuropeptides and hormones. In: Houlihan D, Boujard T, Jobling M eds. *Food Intake in Fish*. Oxford, UK: Blackwell Science, 269—296
- Feng K, Zhang G R, Wei K J *et al*, 2012. Molecular characterization of cholecystokinin in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): cloning, localization, developmental profile, and effect of fasting and refeeding on expression in the brain and intestine. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(6): 1825—1834
- Frøiland E, Murashita K, Jørgensen E H *et al*, 2010. Leptin and ghrelin in anadromous Arctic charr: cloning and change in expressions during a seasonal feeding cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 165(1): 136—143
- Gélineau A, Boujard T, 2001. Oral administration of cholecystokinin receptor antagonists increase feed intake in rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 58(3): 716—724
- Gorissen M, Bernier N J, Nabuurs S B *et al*, 2009. Two divergent leptin paralogues in zebrafish (*Danio rerio*) that originate early in teleostean evolution. *Journal of Endocrinology*, 201(3): 329—339

- Himick B A, Peter R E, 1994. CCK/Gastrin-like immunoreactivity in brain and gut, and CCK suppression of feeding in goldfish. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 267(3): R841—R851
- Huising M O, Geven E J W, Kruiswijk C P *et al*, 2006. Increased leptin expression in common carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation. *Endocrinology*, 147(12): 5786—5797
- Jensen H, Rourke I J, Møller M *et al*, 2001. Identification and distribution of CCK-related peptides and mRNAs in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1517(2): 190—201
- Johnson R M, Johnson T M, Londraville R L, 2000. Evidence for leptin expression in fishes. *Journal of Experimental Zoology Part A*, 286(7): 718—724
- Kamisaka Y, Drivenes Ø, Kurokawa T *et al*, 2005. Cholecystokinin mRNA in Atlantic herring, *Clupea harengus*-molecular cloning, characterization, and distribution in the digestive tract during the early life stages. *Peptides*, 26(3): 385—393
- Kling P, Rønnestad I, Stefansson S O *et al*, 2009. A homologous salmonid leptin radioimmunoassay indicates elevated plasma leptin levels during fasting of rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 162(3): 307—312
- Konturek S J, Pepera J, Zabielski K *et al*, 2003. Brain-gut axis in pancreatic secretion and appetite control. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54(3): 293—317
- Kurokawa T, Suzuki T, Hashimoto H, 2003. Identification of gastrin and multiple cholecystokinin genes in teleost. *Peptides*, 24(2): 227—235
- Kurokawa T, Uji S, Suzuki T, 2005. Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Peptides*, 26(5): 745—750
- MacDonald E, Volkoff H, 2009. Cloning, distribution and effects of season and nutritional status on the expression of neuropeptide Y (NPY), cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) and cholecystokinin (CCK) in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Hormones and Behavior*, 56(1): 58—65
- Micevych P, Ulibarri C, 1992. Development of the limbic-hypothalamic cholecystokinin circuit: a model of sexual differentiation. *Developmental Neuroscience*, 14(1): 11—34
- Murashita K, Fukada H, Hosokawa H *et al*, 2007. Changes in cholecystokinin and peptide Y gene expression with feeding in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): relation to pancreatic exocrine regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 146(3): 318—325
- Murashita K, Uji S, Yamamoto T *et al*, 2008. Production of recombinant leptin and its effects on food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(4): 377—384
- Nielsen K G, Bomgren P, Holmgren S *et al*, 1998. Gastrin and cholecystokinin of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, have distinct effects on gallbladder motility and gastric acid secretion *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology*, 112(2): 247—254
- Peterson B C, Waldbieser G C, Riley L G Jr *et al*, 2012. Pre- and postprandial changes in orexigenic and anorexigenic factors in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *General and Comparative Endocrinology*, 176(2): 231—239
- Peyon P, Lin X W, Himick B A *et al*, 1998. Molecular cloning and expression of cDNA encoding brain preprocholecystokinin in goldfish. *Peptides*, 19(2): 199—210
- Peyon P, Saied H, Lin X W *et al*, 1999. Postprandial, seasonal and sexual variations in cholecystokinin gene expression in goldfish brain. *Molecular Brain Research*, 74(1—2): 190—196
- Raybould H E, 2007. Mechanisms of CCK signaling from gut to brain. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(6): 570—574
- Rehfeld J F, Friis-Hansen L, Goetze J P *et al*, 2007. The biology of cholecystokinin and gastrin peptides. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7(12): 1154—1165
- Rønnestad I, Nilsen T O, Murashita K *et al*, 2010. Leptin and leptin receptor genes in Atlantic salmon: cloning, phylogeny, tissue distribution and expression correlated to long-term feeding status. *General and Comparative Endocrinology*, 168(1): 55—70
- Rubio V C, Sánchez-Vázquez F J, Madrid J A, 2008. Role of cholecystokinin and its antagonist proglumide on macronutrient selection in European sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. *Physiology & Behavior*, 93(4—5): 862—869
- Sambrook J, Russell D W, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edn. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sang W G, Wei X X, Wu H H, 2007. Effects of dietary conjugated linoleic acids on the growth and quality of large yellow croaker fish *Pseudosciaena crocea* (Richardson) in cages. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(Suppl.1): 404—406
- Silverstein J T, Plisetskaya E M, 2000. The effects of NPY and insulin on food intake regulation in fish. *Integrative & Comparative Biology*, 40(2): 296—308
- Suominen A H, Glimm D R, Tedesco D *et al*, 1998. Intestinal nutrient-gene interaction: the effect of feed deprivation and refeeding on cholecystokinin and proglucagon gene expression. *Journal of Animal Science*, 76(12): 3104—3113
- Suzuki T, Kurokawa T, McVey D C, 1999. Sequence and expression analyses of cholecystokinin (CCK) precursor cDNA in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 21(1): 73—80
- Terova G, Rimoldi S, Bernardini G *et al*, 2008. Sea bass ghrelin: molecular cloning and mRNA quantification during fasting and refeeding. *General and Comparative Endocrinology*, 155(2): 341—351
- Tinoco A B, Nisembaum L G, Isorna E *et al*, 2012. Leptins and leptin receptor expression in the goldfish (*Carassius*

- auratus*). Regulation by food intake and fasting/overfeeding conditions. *Peptides*, 34(2): 329—335
- Troger J, Kieselbach G, Teuchner B *et al*, 2007. Peptidergic nerves in the eye, their source and potential pathophysiological relevance. *Brain Research Reviews*, 53(1): 39—62
- Volkoff H, Canosa L F, Unniappan S *et al*, 2005. Neuropeptides and the control of food intake in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1—2): 3—19
- Volkoff H, Eykelbosh A J, Peter R E, 2003. Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting. *Brain Research*, 972(1—2): 90—109
- Webb K A Jr, Khan I A, Nunez B S *et al*, 2010. Cholecystokinin: Molecular cloning and immunohistochemical localization in the gastrointestinal tract of larval red drum, *Sciaenops ocellatus* (L.). *General and Comparative Endocrinology*, 166(1): 152—159
- Won E T, Baltzegar D A, Picha M E *et al*, 2012. Cloning and characterization of leptin in a Perciform fish, the striped bass (*Morone saxatilis*): control of feeding and regulation by nutritional state. *General and Comparative Endocrinology*, 178(1): 98—107
- Yanowski E, Mylonas C C, Corriero A *et al*, 2011. Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) leptin-cloning and expression patterns during the reproductive season. *Indian Journal of Science and Technology*, 4: 104—105
- Zhang H X, Chen H P, Zhang Y *et al*, 2013. Molecular cloning, characterization and expression profiles of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and Comparative Endocrinology*, 181: 295—305
- Zhang Y Y, Proenca R, Maffei M *et al*, 1994. Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505): 425—432

MOLECULAR CLONING, CHARACTERIZATION AND EXPRESSION PROFILES OF CHOLECYSTOKININ AND LEPTIN IN LARGE YELLOW CROAKER (*PSEUDOSCIAENA CROCEA*)

LIU Li-Qin¹, WANG Mao-Ting¹, CUI Wen-Tao¹, LIU Wan¹, LÜ Zhen-Ming¹,
GONG Li¹, YANG Jing-Wen¹, DONG Ying-Hui²

(1. National and Provincial Joint Laboratory of Exploration and Utilization of Marine Aquatic Genetic Resources, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract cDNAs encoding for two feeding regulation factors, cholecystokinin (CCK) and leptin (LEP), were cloned in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. mRNA tissue distribution was examined for the two peptides, as well as the effects of 8-day fasting on their expression. The results show that large yellow croaker CCK sequences displayed identity with that of teleost CCK1 gene sub-family. It is a 900bp nucleotide sequence, encoding a peptide composed of 137 amino acids. The sequences displayed great identity with the teleost CCK1 gene, especially within the segments of signal peptide and cck-8 sequences. In contrast, large yellow croaker LEP displayed less identity with other teleost LEP gene, but kept a classic LEP 3D structure formed by four-helix bundle. It is a 1290bp nucleotide sequence, which encodes a peptide composed of 161 amino acids. The sequences displayed identity with teleost LEPA gene sub-family. Both peptides are present in all tissues examined, but only abundant in the feeding regulation tissues, such as brain, gastrointestinal tract, and other peripheral tissues, including liver. The 8-day fasting induced a significant decrease in both brain and gut CCK, and liver and mesenteric fat LEP mRNA expression ($P < 0.05$). Therefore, the CCK and LEP played possibly a role in feeding regulation and digestive processes in large yellow croaker. The present results provide a basis for further investigation into the neural and gastroenteric mechanisms regulating appetite in large yellow croaker.

Key words large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*; leptin; cholecystokinin; gene cloning; expression profile