

不同饥饿时段对黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*) ghrelin 基因表达的影响*

马细兰^{1,2} 张勇¹ 刘云¹ 黄卫人¹ 刘晓春¹ 周立斌²

(1. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室 水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室 广州 510275; 2. 惠州学院生命科学系 惠州 516007)

提要 设计了黑鲷 ghrelin 基因的特异性引物, 提取胃组织总 RNA 并扩增出目的片段, 将 PCR 产物克隆到 pGEM-T Easy 载体, 经质粒 PCR 扩增、酶切和测序鉴定重组质粒, 构建标准曲线等, 成功建立了 ghrelin 基因荧光实时定量 PCR 检测方法, 以准确分析 ghrelin 基因在黑鲷摄食调节中的作用。运用建立的荧光实时定量 PCR 方法检测了不同饥饿时段(2天、7天)黑鲷胃、肠、下丘脑组织中 ghrelin mRNA 的表达变化。结果表明, 饥饿 2 天(短期饥饿), 黑鲷胃、肠组织中 ghrelin mRNA 表达显著上升($P < 0.05$), 下丘脑 ghrelin mRNA 表达无显著变化($P > 0.05$); 饥饿 7 天(长期饥饿), 黑鲷胃、肠组织 ghrelin mRNA 表达比饥饿 2 天显著下降, 但仍显著高于对照组, 下丘脑 ghrelin mRNA 表达逐渐升高($P < 0.05$); 在同一饥饿时间内不同组织 ghrelin mRNA 表达存在显著差异($P < 0.05$)。黑鲷不同组织 ghrelin 基因的表达随不同饥饿时段呈现出不同的变化趋势, 推测 ghrelin 基因参与了黑鲷摄食调节的生物学过程。

关键词 黑鲷, ghrelin, 实时定量 PCR, 饥饿

中图分类号 S966.12

ghrelin 是由日本学者 Kojima 等(1999)在大鼠胃组织中发现的一种多肽, 它是生长激素促分泌素受体(Growth hormone secretagogue receptor, GHS-R)的具有生物活性的内源性配体。ghrelin 具有明显促进生长激素(growth hormone, GH)分泌、促进摄食、调节体重、参与能量平衡等生物学作用(徐伟等, 2007)。

哺乳动物的 ghrelin 主要由胃组织分泌, 下丘脑、肠道等组织有少量分泌。此外, 在肾脏、心脏、胎盘、垂体、甲状腺、胰腺、肺脏、脂肪组织、肌肉、生殖系统以及免疫系统等均可检测到 ghrelin mRNA 的表达或 ghrelin 的分泌(徐伟等, 2007)。鱼类 ghrelin 基因最早从金鱼中克隆得到(Unniappan *et al.*, 2002), 之后陆续在莫桑比克罗非鱼、尼罗罗非鱼(Parhar *et al.*, 2003)、日本鳊鲷(Kaiya *et al.*, 2003a)、虹鳟(Kaiya *et al.*,

2003b)及黑鲷(Yeung *et al.*, 2006)中克隆到。与哺乳动物相似, 鱼类 ghrelin 基因主要在胃肠中大量表达, 在脑区中等表达, 在其它组织如肾脏、肝脏、鳃中微量表达(Unniappan *et al.*, 2002; Kaiya *et al.*, 2003a, b)。在金鱼的脑室或腹腔注射 ghrelin 均可刺激金鱼摄食(Unniappan *et al.*, 2002; Unniappan *et al.*, 2004); 金鱼在摄食后 1—3h 下丘脑 ghrelin mRNA 表达明显下降; 摄食后 3h, 胃肠 ghrelin mRNA 表达才明显下降, 且血清中 ghrelin 水平也显著下降; 饥饿 7 天后下丘脑和胃肠中 ghrelin mRNA 表达水平均显著上升; 以上结果表明 ghrelin 参与了金鱼的摄食调节过程。

黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*)隶属鲈形目、鲷科、鲷属, 广泛分布于日本、朝鲜及我国沿海, 具有适应性强、食性杂、肉质鲜美等优良性状, 是名贵的海产

* 国家“863 计划”项目, 2006AA10A402 号; 国家自然科学基金项目, 30700611 号; 广东省自然科学基金项目, 06027456 号; 广东省高校优秀青年创新人才培养项目, A2YM08094; 惠州学院校立项目, C208.0211 号。马细兰, 博士, E-mail: mxl@hzu.edu.cn

通讯作者: 周立斌, 博士, 副教授, E-mail: zlb@hzu.edu.cn

收稿日期: 2008-02-17, 收修改稿日期: 2008-04-18

食用鱼类之一。目前 Yeung 等(2006)已克隆到黑鲟的 ghrelin 基因, 迄今未见饥饿对黑鲟 ghrelin mRNA 表达影响的研究报道。本文拟通过研究不同饥饿时段(饥饿 2 天、7 天)对黑鲟胃、肠、下丘脑组织中 ghrelin mRNA 表达的影响, 以初步探讨 ghrelin 在黑鲟摄食调节中的作用。

目前, 荧光实时定量 PCR(real-time quantitative PCR)技术已经广泛用于检测基因的表达水平, 可以非常可靠、高灵敏度地对 mRNA 的表达进行绝对定量, 用质粒 DNA 构建标准曲线, 以标准曲线对样品 mRNA 的表达进行可靠性很高的检测。本试验建立了荧光实时定量 PCR 的标准品质粒和标准曲线, 以此来对黑鲟 ghrelin 基因的表达进行准确定量, 为进一步阐释其作用的分子机理奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验鱼的来源、驯化及实验设计 实验于 2007 年 5—6 月在广东省大亚湾水产试验中心进行。实验用黑鲟(*Acanthopagrus schlegelii*)取自该中心人工育苗并养殖的鱼苗, 选取体重 110.5—120.7g 的健康鱼苗 200 尾, 暂养于室内大型塑料桶中, 每天投喂 2 次, 达饱食状态。待摄食和生长正常后, 随机选取其中的 180 尾平均放入 9 个体积为 1m³ 的塑料桶中, 充气, 日换水量为 1/3, 在实验条件下驯化 2 周后开始实验。实验过程中使用经沉淀和沙滤后的自然海水, 盐度为 26.5—27.8, 温度为 26.5—30.0℃, 光照周期为 12L : 12D。

实验设 1 个对照组和 2 个饥饿处理组, 每一处理组 3 个重复, 每一重复 20 尾鱼。实验时间为 2 周。实验设计如下:

对照组, 连续每日喂食 14 天; 饥饿 2 天组, 饥饿 2 天后连续每日喂食 12 天; 饥饿 7 天组, 饥饿 7 天后连续每日喂食 7 天; 喂食阶段, 各实验组于每天 8:00 和 16:00 各投饵 1 次。

在实验第 0、2、7 天分别从对照组、饥饿 2 天组、饥饿 7 天组中随机取鱼 5 尾, 碎冰速冻麻醉后, 尾静脉取血, 之后立刻取胃、肠及下丘脑, 组织取出后放入经 DEPC 处理后的离心管内并立即置于液氮, 带回实验室保存在 -80℃ 超低温冰箱。

1.1.2 试剂与药品 总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent 试剂盒购自 Invitrogen 公司。ReverTra Ace-a-TM Kit、Real-time PCR Master Mix 试剂盒购自 TOYOBO 公

司。ExTaq PCR kit、TaqTM 由 TaKaRa 公司生产。胶回收试剂盒 E.Z.N.A Gel Extraction Kit 和质粒纯化试剂盒 E.Z.N.A Plasmid Extraction Kit 为 Omega Bio-Tek 公司产品。InsT/AcloneTM PCR Product Cloning Kit 载体连接试剂盒购自 Fermentas 公司。X-gal、IPTG、氨苄青霉素为上海生物工程公司产品; 100bp DNA Ladder 为天为时代公司产品; PCR 引物由广州赛百胜生物技术公司合成。

1.1.3 仪器设备 PTC-200 thermocycler PCR 扩增仪为 MF Research (U.S.A) 公司产品; 定量实时 RT-PCR 扩增仪为 ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems); 电泳仪和 Gel Doc 2000 凝胶成像系统为 BioRAD (U.S.A) 公司产品; 核酸蛋白测定仪和 5804R 冷冻离心机为 Eppendorf (Germany) 公司产品; 温控振荡培养箱为江苏省太仓市实验设备厂产品。

1.2 方 法

1.2.1 总 RNA 提取 将在 -80℃ 超低温冰箱中冻存的组织取出, 组织匀浆后, 按照 Trizol Reagent 试剂盒操作说明提取组织的总 RNA, 并根据 OD₂₆₀ 值计算 RNA 的浓度, 以 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值判断其纯度。提取的 RNA 用 DEPC 处理的灭菌双蒸水融解, -80℃ 保存备用。

1.2.2 反转录(RT)合成 cDNA RT 的反应体积为 20μl, 样品 RNA 2μl, 2.5mmol/L dNTP 2μl, oligo(dT)₁₈ (16pmol/L) 2μl, 5× 逆转录缓冲液 4μl, AMV 反转录酶 1μl (5U), RNasin 1μl (40U), 补充 DEPC 处理过的水至体积 20μl。上述成分混匀后于 PCR 仪器中, 42℃ 45min、99℃ 5min 灭活 AMV 酶。

1.2.3 引物设计 参照文献(Yeung *et al*, 2006), 设计黑鲟 ghrelin 基因和 β-actin 基因的特异性引物。β-actin 作为检测 ghrelin mRNA 表达的内参基因。ghrelin 所用引物为 F1: CAGCAGAAACATGCTGATCTC 和 R1: CTGAGACTCTGGGATGTGGTG, 扩增产物为 148bp; β-actin 所用引物为 F2: ACCCAGATCATGTTTCGAGACC 和 R2: ATGAGGTAGTCTGTGAGGTCG, 扩增产物为 212bp。

1.2.4 PCR 扩增 PCR 扩增体系为反转录产物 2μl, 10× PCR 反应缓冲液 2μl, 2.5mmol/L dNTP 2μl, 0.5U/μl TaqDNA 酶 2μl, 10μmol/L 上下游引物各 1μl, 15mmol/L MgCl₂ 2μl, 补充 DEPC 处理过的水至体积 20μl。反应条件为: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 30s、55℃ 退火 45s、72℃ 延伸 40s, 共 36 个循环; 72℃ 延伸

7min。

1.2.5 重组标准品质粒制备 PCR 产物经 1.5%琼脂糖电泳, 按照 E.Z.N.A Gel Extraction Kit 的操作说明对 PCR 扩增片段进行纯化、回收。按照 InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit 载体连接试剂盒的说明书将纯化的 PCR 扩增产物与 pGEM®-T 载体在 T₄ DNA 连接酶作用下进行连接反应, 构建扩增产物的重组质粒。转化 DH₅ 感受态细胞, 涂于 Amp、X-GaL 和 IPTG 处理的 LB 琼脂平板上, 37 °C 过夜培养, 挑取单个白色菌落, 在 Amp+/LB 液体培养基中 37 °C、200r/min 过夜, 按照质粒快速提取试剂盒的操作要求提取质粒, 然后进行重组质粒 PCR、酶切(*EcoR*)和测序鉴定。

1.2.6 重组质粒定量标准曲线的建立 测定阳性重组质粒的 OD 值, 计算出拷贝数。将标准品重组质粒进行 10 倍系列稀释, 以系列稀释的质粒为模板在荧光实时定量 PCR 仪上扩增。反应体系 20μl, Mix 10μl、上下游引物(10μmol/L)0.4μl、重组质粒 DNA 1μl、荧光染料 SYBRGreen 0.04μl、灭菌双蒸水 8.2μl。Real-time quantitative PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 60s; 95 °C 变性 15s、55 °C 退火 15s、72 °C 延伸 30s, 共 40 个循环。在每个循环内加入读板步骤, 总延伸结束后, 加入融解曲线的制备(65—95 °C, 每 0.2 °C 读板 1 次)步骤。

1.2.7 目的基因的定量 使用 ABI PRISM 7900 Sequence Detection System 仪器和 Real-time PCR Master Mix 试剂盒对黑鲟 ghrelin 基因 cDNA 进行定量。反应体系及程序同 2.6。每个样品重复 3 次, 每次都标准曲线定量出相对应的域值(*C_t*)和 cDNA 拷贝数。

1.2.8 数据分析 目的基因相对表达量(ghrelin/β-actin)用平均值 ± 标准差表示, 数据分析采用 SPSS 统计分析软件 Duncan's 法进行多重比较, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果

2.1 标准曲线和融解曲线分析

根据紫外分光光度计测定的重组标准品质粒 OD 值, 对各质粒 10 倍系列稀释, 选取 6 个稀释度进行荧光实时定量 PCR 扩增反应, 以 *C_t* 值为纵坐标, 以稀释倍数的对数为横坐标, 获得相对定量标准曲线(β-actin: $y = -1.559x + 27.409$; ghrelin: $y = -1.8402x + 27.498$), 且 β-actin 和 ghrelin 基因标准曲线的相关系

数均大于 0.995, 可见 β-actin 和 ghrelin 基因 real-time PCR 在稀释度范围内有很好的线性关系。PCR 后进行熔解曲线分析, 熔解曲线结果显示 β-actin 和 ghrelin 基因扩增产物均为单峰, 且峰值单一, 表明无引物二聚体及非特异性产物, 扩增产物特异性高。

2.2 基因的定量表达

不同样品的反转录产物 cDNA 的定量差异在 10% ($n = 3$)以内, 同一样品在同一次实时荧光定量结果的差异在 2%以内。由于看家基因在各种组织中表达是恒定的, 故以看家基因 β-actin 的定量作为标准来比较不同样品目的基因表达量的差异, 即以 ghrelin/β-actin ± SE 表示 ghrelin mRNA 的相对表达量。

2.2.1 不同饥饿时段对黑鲟胃组织 ghrelin 基因表达的影响 由表 1 可以看出, 饥饿 2 天后, 黑鲟胃组织 ghrelin mRNA 的相对表达量显著上升, 随着饥饿时间的延长, ghrelin mRNA 的相对表达量逐渐下降, 饥饿 7 天组 ghrelin 相对表达量显著低于饥饿 2 天组但仍明显高于对照组($P < 0.05$)。

2.2.2 不同饥饿时段对黑鲟肠组织 ghrelin 基因表达的影响 随着饥饿时间的延长, 黑鲟肠组织 ghrelin mRNA 表达呈现出一个先升后降的变化趋势, 饥饿 2 天后黑鲟肠组织 ghrelin mRNA 相对表达量显著升高, 约为对照组的 180%, 饥饿 7 天后, 其表达量又明显下降, 但仍然显著高于对照组($P < 0.05$)(表 1)。

2.2.3 不同饥饿时段对黑鲟下丘脑组织 ghrelin 基因表达的影响 饥饿 2 天后, 黑鲟下丘脑组织 ghrelin mRNA 相对表达量无明显变化, 饥饿 7 天后, 其表达量显著升高($P < 0.05$), 约为对照组表达量的 140%(表 1)。

2.2.4 不同饥饿时段对黑鲟不同组织 ghrelin 基因表达的影响 由表 1 可以看出, 在正常投喂情况, 黑鲟不同组织中 ghrelin 基因的相对表达存在显著差异($P < 0.05$), 胃组织中表达量最高, 肠次之, 下丘脑表

表 1 不同饥饿时段对黑鲟不同组织 ghrelin mRNA 表达的影响

Tab.1 The effect of different fasting stages on ghrelin expression in different tissues of *A. schlegeli*

饥饿时段 (d)	组织		
	胃	肠	下丘脑
0	0.96 ± 0.11 ^c	0.50 ± 0.09 ^b	0.31 ± 0.03 ^a
2	1.56 ± 0.11 ^e	0.90 ± 0.17 ^e	0.30 ± 0.06 ^a
7	1.21 ± 0.09 ^f	0.75 ± 0.02 ^d	0.43 ± 0.05 ^b

注: 上标不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

达最低, 仅为胃组织中的 1/3; 饥饿 2 天后, 胃、肠组织中的表达则显著上升, 而下丘脑的表达无明显变化; 饥饿 7 天后, 胃、肠组织表达明显下降, 下丘脑组织表达显著上升。

不同饥饿时段对黑鲷不同组织中 ghrelin 基因的表达有不同的影响趋势, 随着饥饿时间的延长, 胃、肠组织中的表达呈先升后降的趋势; 下丘脑组织的表达早期无显著变化, 之后明显上升。

3 讨论

目前, 国际上对基因表达检测通用的是实时定量 PCR 方法(Giulietti *et al.*, 2001), 荧光实时定量 PCR 作为一个极有效的实验方法, 已被广泛地应用于分子生物学的各个领域。real-time quantitative PCR 技术较之以前的以终点法进行定量的 PCR 技术具有无与伦比的优势。首先, 它不仅操作简便、快速高效, 而且具有很高的敏感性和特异性。其次, 由于是在封闭的体系中完成扩增并进行实时测定, 大大降低了污染的可能性并且无须在扩增后进行操作。利用实时荧光定量 RT-PCR 对基因的 mRNA 表达水平进行研究非常可靠, 研究结果具有可比性和可重复性(Tichopad *et al.*, 2003)。本研究对黑鲷 ghrelin 基因表达情况的检测采用的是荧光染料结合法, 荧光染料是 SYBR Green, 该染料可在 PCR 产物形成过程中结合到双链 DNA 上, 利用这种染料可以避免使用昂贵的特异性水解探针。但是, SYBR Green 既可以与特异性的 PCR 产物相结合, 也可与非特性产物(如引物二聚体)相结合。在本研究中, 通过优化 PCR 反应条件, 有效地避免了这种情况的发生。

real-time quantitative PCR 根据其定量所选择标准可分为绝对定量及相对定量两大类, 前者是真正意义上的定量 PCR, 它以已知不同浓度的同种模板的系列样品作为外参照标准品, 在相同条件下与待测模板一起进行 PCR 扩增, 通过比较待测样品与标准品的扩增结果, 推断出待测样品中原始模板量(Tichopad *et al.*, 2003)。近年来 real-time quantitative PCR 尽管得到一定发展, 但由于各实验室采用标准品不一致, 难以纵向比较, 限制着 real-time quantitative PCR 的发展。标准品的构建可分为 3 种方式:(1) 化学合成目的基因, 它的优点是纯度高、定量准确, 缺点是受化学合成工艺的限制, 只能合成 120bp 以下的长度。(2) 将 PCR 扩增产物直接梯度稀释, 它的优点是方便、简单, 缺点是不准确、不稳定, 容易造成污染。

(3) 将 PCR 产物克隆到载体上, 然后抽出质粒, 经过测量浓度和拷贝数的换算, 可准确定量, 它的优点是稳定、准确。因此, 作者选用第 3 种方式构建标准品。本研究成功构建的标准品质粒和标准曲线是 mRNA 表达水平定量的基础, 对不同样品中基因含量进行定量, 进而确定基因表达的水平, 为研究黑鲷 ghrelin 基因的表达提供了一种新的研究手段。

在 real-time quantitative PCR 中, 对整个 PCR 反应扩增过程进行了实时的监测, 并连续分析扩增相关的荧光信号, 随着反应时间的延伸, 监测到的荧光信号的变化可以绘制成一条曲线。Ct 值的含义是: 每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。研究表明, 每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 起始拷贝数越大, Ct 值越小(Ginzinger, 2002)。本研究中的各基因的 Ct 值相对固定, 重复性好, 以不同浓度标准品质粒 DNA 分别进行荧光实时定量 PCR 扩增, 发现起始浓度越高, Ct 值越小, 即起始模板浓度与 Ct 值之间呈良好的线性关系, 与文献报道一致(Ginzinger, 2002)。

大量试验表明, ghrelin 参与了动物机体能量平衡的调节。大鼠外周注射 ghrelin 会导致脂肪利用减少而引起肥胖(Nakazato *et al.*, 2001; Wren *et al.*, 2001a), 脑室内注射 ghrelin 会出现剂量依赖性摄食增多和体重增加(Wren *et al.*, 2001b); 在常规饮食喂养大鼠饥饿 72h 以内(短期饥饿), 其胃壁组织 ghrelin 表达升高(24h, $P < 0.05$; 72h, $P < 0.01$), 饥饿持续时间达 120h(长期饥饿)时, 大鼠胃壁组织 ghrelin 表达又下调($P < 0.01$), 但长期高脂饮食喂养的肥胖的大鼠模型, 其胃壁组织 ghrelin 表达不受饥饿时段的影响(邵莉等, 2005)。鱼类饥饿后胃(肠)组织中 ghrelin 的表达变化存在种的特异性。饥饿 7 天后, 尼罗罗非鱼胃组织 ghrelin 的表达无显著变化(Parhar *et al.*, 2003), 金鱼短期饥饿(1—5 天)后胃肠 ghrelin 的表达无显著变化, 7 天后表达量显著升高(Unniappan *et al.*, 2004), 而本研究表明黑鲷随着饥饿时间的延长, 胃、肠组织的 ghrelin 表达出现了先升后降的变化趋势, 这与常规饮食喂养大鼠的实验结果相一致。这可能与 ghrelin 的生理功能存在种的特异性有关。已有研究表明, ghrelin 可刺激日本鳮催乳素(PRL)的释放(Kaiya *et al.*, 2003a), 却不能刺激虹鳟 PRL 的释放(Kaiya *et al.*, 2003b)。本研究实验结果表明, 黑鲷胃、肠组织 ghrelin mRNA 的表达随饥饿时间的延长先升后降, 即饥饿 2 天后表达显著上升, 但饥饿 7 天后表达明显下降, 推

测其原因可能有两个, 一是饥饿起始, 机体处于能量负平衡状态, ghrelin mRNA 的表达量增加, 促进食欲, 希望得到食物的补充, 从而维持机体能量的平衡, 但在持续饥饿的状态下, 胃、肠中储备的 ghrelin 含量已经达到一个饱和的水平, 仅需少量合成即可维持其含量的平衡, 并足以满足重新恢复进食时所需要的分泌量; 另一可能原因是在持续的饥饿状态下, 机体仍未得到食物的补充, 机体由糖、脂肪供能逐步转向由蛋白质消耗供给, 且能量供应主要流向最基本的生理活动, 同时, 相对一部分蛋白质的合成过程必然受到抑制, ghrelin mRNA 的表达量下降, 以降低代谢水平、减少能量消耗。

相关实验表明, 大鼠下丘脑弓状核腹侧存在 ghrelin 免疫反应原性的神经元, 并且在弓状核中用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测到了 ghrelin mRNA 的表达, 这表明弓状核可能是中枢神经系统中 ghrelin 的主要来源(Nakazato *et al*, 2001)。本实验通过 RT-PCR 方法同样检测到了黑鲟下丘脑 ghrelin mRNA 的表达。下丘脑 ghrelin mRNA 的表达在短期饥饿时(饥饿 2 天)无显著变化, 饥饿 7 天后表达量显著升高, 这与在金鱼中的检测结果相一致(Unniappan *et al*, 2004)。ghrelin 促进摄食的作用可能主要通过 NPY、AGRP 和 Orexin 等有较强刺激食欲作用的物质来实现。ghrelin 通过与这些下丘脑特定神经元上的 GHS-R 结合, 促进 NPY、AGRP、Orexin 和其它神经递质的释放, 形成一个促进摄食的调节路径, 说明 ghrelin 在下丘脑室旁核(PVN)通过神经肽 Y1 受体和促肾上腺激素释放因子(CRF1)受体发挥肠胃动力的中枢调节作用(Volkoff *et al*, 2001)。黑鲟下丘脑 ghrelin mRNA 的表达量在饥饿短期(饥饿 2 天)内无明显变化可能是因为下丘脑中储备的 ghrelin 含量已经达到一个相对稳定的水平, 随着饥饿时间的延长, 下丘脑中储备的 ghrelin 含量不足以维持其含量的平衡, 无法满足重新恢复进食时所需要的分泌量, 故在下丘脑室旁核(PVN)通过神经肽 Y1 受体和促肾上腺激素释放因子(CRF1)受体等作用发挥中枢调节作用, ghrelin mRNA 表达量增加。

本文比较了不同饥饿时段(2 天、7 天)对黑鲟胃、肠、下丘脑组织 ghrelin mRNA 表达的影响, 结果表明, 短期饥饿(2 天)就可引起黑鲟胃、肠组织 ghrelin mRNA 表达的显著变化, 且两者变化趋势相同, 而下丘脑组织 ghrelin mRNA 表达的升高要在长期饥饿(7 天)后才出现, 推测 ghrelin 基因参与了黑鲟的摄食调

节、能量平衡代谢的生物学过程。

参 考 文 献

- 邵 莉, 李荣英, 张一波等, 2005. 不同饥饿时段对常规及高脂饮食大鼠胃壁组织胃促生长素(ghrelin)表达的影响. 中华内分泌代谢杂志, 21(3): 265—268
- 徐 伟, 田成功, 2007. 生长激素释放肽——ghrelin 的研究进展. 医学综述, 13(5): 323—325
- Ginzinger D G, 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol*, 30: 503—512
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, 2001. An overview of real-time quantitative PCR: application to quantify cytokine gene expression. *Method*, 25(4): 386—401
- Kaiya H, Kojima M, Hosoda H *et al*, 2003a. Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. *J Endocrinol*, 176: 415—423
- Kaiya H, Kojima M, Hosoda H *et al*, 2003b. Peptide purification, cDNA and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *J Endocrinol*, 144: 5215—5226
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, *et al*, 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402: 656—660
- Nakazato M, Murakami N, Date Y *et al*, 2001. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 409: 194—198
- Parhar I S, Sato H, Sakuma Y, 2003. Ghrelin gene in cichlid fish is modulated by sex and development. *Biochem Biophys Res Commun*, 305: 169—175
- Tichopad A, Pfaffl M W, Didier A, 2003. Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR. *Mol Cell Probes*, 17: 5—10
- Unniappan S, Canosa L F, Peter R E, 2004. Orexigenic action of ghrelin in goldfish: feeding-induced changes in brain and gut mRNA expression and serum levels, and responses to central and peripheral injections. *Neuroendocrinology*, 79: 100—108
- Unniappan S, Lin X, Cervini L *et al*, 2002. Goldfish ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure, and evidence for its stimulatory role in food intake. *J Endocrinol*, 143: 4143—4146
- Volkoff H, Peter R E, 2001. Interactions between orexin A, NPY and galanin in the control of food intake of the goldfish, *Carassius auratus*. *Regul Pept*, 101: 59—72
- Wren A M, Small C J, Abbott C R *et al*, 2001a. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes*, 50: 2540—2547
- Wren A M, Small C J, Ward H L *et al*, 2001b. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, 141: 4325—4328
- Yeung C M, Chan C B, Woo N Y S *et al*, 2006. Seabream ghrelin: cDNA cloning, genomic organization and promoter studies. *J Endocrinol*, 189: 365—379

EFFECT OF DIFFERENT FASTING STAGES ON GHRELIN EXPRESSION IN BLACK SEABREAM *ACANTHOPAGRUS SCHLEGELI*

MA Xi-Lan^{1,2}, ZHANG Yong¹, LIU Yun¹, HUANG Wei-Ren¹, LIU Xiao-Chun¹, ZHOU Li-Bin²

(1. State key Laboratory of Biocontrol, Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 510275; 2. Department of Life Science, Huizhou University, Huizhou, 516007)

Abstract To analyze the roles of ghrelin in food intake of black seabream in detail, real-time quantitative PCR was adopted to examine the ghrelin gene expression. Total RNA was extracted from black seabream stomach tissue and the fragments of target gene were amplified by RT-PCR with special primers. PCR product was cloned via pGEM-T Easy vector and plasmid extracted. The recombinant plasmid was identified by PCR amplification and restriction enzyme analysis. Real time quantitative PCR was also applied to detect the ghrelin expression in stomach, intestine and hypothalamus tissues during different fasting stage. The results show that the expression of ghrelin increased in stomach and intestine tissue but not in hypothalamus tissue during a short period of fasting (2 days) ($P < 0.05$). However, during a long period of fasting (7 days), the expression decreased in stomach and intestine tissue, but still higher than that of the control ($P < 0.05$), which was increased in hypothalamus tissue ($P < 0.05$). Besides, the expression of ghrelin in different tissues at the same stage was different ($P < 0.05$). The expression of ghrelin in different tissues did change in different fasting stages, suggesting that ghrelin is involved in the regulation of food intake in black seabream.

Key words Black seabream *Acanthopagrus schlegeli*, Ghrelin, Real-time quantitative PCR, Fasting