

# 斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)两种神经肽 NPB 的发现及表达分析\*

李伟萍<sup>1</sup> 胡哲<sup>2</sup> 李玉<sup>2</sup> 王翔<sup>2</sup> 黄文<sup>2</sup> 王宇<sup>1</sup>  
肖玲<sup>2</sup> 李水生<sup>2</sup> 张勇<sup>2</sup> 林浩然<sup>1,2</sup>

(1. 海南大学海洋学院 海口 570228;

2. 中山大学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)

**摘要** 神经肽 B(Neuropeptide B, NPB)在生命体的许多生理活动中发挥着重要作用,如调节摄食行为、能量平衡、睡眠、神经内分泌功能和调节炎症性疼痛等。为了研究在石斑鱼中 NPB 与摄食调控的关系,本文对斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)转录组数据比对分析后,在斜带石斑鱼中克隆得到了两种 NPB(NPB1 和 NPB2)基因的 cDNA 序列,首次发现鱼类存在两种 NPB 基因。作者对 NPB 编码蛋白的信号肽及其成熟肽的结构进行了预测,发现与其它脊椎动物相一致。采用实时荧光定量 PCR 技术,研究了斜带石斑鱼不同组织中的 mRNA 的表达模式,结果发现 NPB1 和 NPB2 在脑组织中广泛表达,且在下丘脑中表达最为丰富;在其它的外周组织器官中也有相应的表达。饥饿试验的研究结果表明,在禁食 3d 和 7d 后, NPB1 和 NPB2 的 mRNA 表达量都发生了显著的下调;复投喂后表达量恢复。由此可见 NPB1 和 NPB2 参与了斜带石斑鱼摄食行为的调节。

**关键词** 斜带石斑鱼; NPB; 基因克隆; 组织分布; 摄食调控

**中图分类号** Q95 doi: 10.11693/hyhz20140400098

鱼类的摄食和生长受许多神经内分泌因子的调节,如食欲素(Orexin)、促肾上腺皮质激素释放因子(corticotropin releasing factor, CRF)、神经肽 Y(Neuropeptide Y, NPY)、神经肽 W(Neuropeptide W, NPW)和神经肽 B(Neuropeptide B, NPB)等(傅小锁等, 1993; 肖东等, 2000; 谭雪梅等, 2004; 李昀等, 2009; 雷治海等, 2010)。在 2002—2003 年间, NPB 作为 G 蛋白偶联受体 GPR7(Neuropeptide B/W receptor-1, NPBWR1)和 GPR8(Neuropeptide B/W receptor-2, NPBWR2)的内源性配体从哺乳动物的下丘脑提取物中被分离鉴定出来(Fujii *et al.*, 2002; Shimomura *et al.*, 2002; Brézillon *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003)。随着研究的不断深入, NPB 被认为是与调节摄食、能量平衡、睡

眠、神经内分泌功能以及调节炎症性疼痛等功能相关(Ishii *et al.*, 2003; Aikawa *et al.*, 2008; Hirashima *et al.*, 2011; Skrzypski *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 2012)。

NPB 广泛分布在整个脑组织的不同部位如海马组织、下丘脑室旁核、动眼神经副核和中脑导水管周围灰质等(Tanaka *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2006),特别是在下丘脑中,均能检测到了 NPB 与 GPR7 mRNA 的高度表达(Schulz *et al.*, 2007),此外,在哺乳动物中的一些外周组织,也检测到 NPB mRNA 的表达(Brézillon *et al.*, 2003)。

在硬骨鱼类的研究中, NPB 已从斑马鱼(Tanaka *et al.*, 2003)、鲑鱼(Leong *et al.*, 2010)和罗非鱼(Yang *et al.*, 2014)等鱼类中克隆得到,并发现 NPB 与摄食调控

\*国家 863 计划项目, 2012AA10A407 号; 广东省科技计划项目, 2012B090500008 号; 广州市科技计划珠江科技新星专项, 2013J2200093 号; 广东省海洋渔业科技攻关与研发项目, A201400A01 号, A201501A03 号, A201501A09 号。李伟萍, 硕士研究生, E-mail: weipinglee59@126.com

通讯作者: 林浩然, 中国工程院院士, 教授, E-mail: lsslhr@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2014-04-17, 收修改稿日期: 2015-02-26

活动相关。由于鱼类作为脊椎动物中种类最多的一个群体,其进化的原始性、物种的多样性以及生活环境的复杂性,其摄食调控机制也复杂而多样性。斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)是我国南方重要的经济鱼类,研究其生长与摄食调控机制具有重要的应用价值。

本文利用生物信息学分析和基因克隆技术在斜带石斑鱼中克隆得到了两种 NPB 基因 cDNA 序列,分析了 NPB 的信号肽及成熟肽结构及其在不同组织器官中的分布表达模式,并进一步研究了其在摄食调控下的表达模式,证明了这两种 NPB 均参与了斜带石斑鱼摄食调控。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

**1.1.1 克隆和组织分布的样品采集** 本实验所用斜带石斑鱼来自广东省大亚湾水产试验中心,均为健康的1—2龄鱼,体重为720—770g,并以25—30°C循环过滤海水饲养。取样前,先用冰块冷冻麻醉1—2 min,然后取出其不同分区的脑组织和外周组织,并放入液氮中进行速冻处理,而后转存放于-80°C超低温冰箱备用。取样时所用的所有解剖器械(如剪刀、镊子、锡箔纸等)均经过180°C 4h以上的烘烤灭菌,存放样品的1.5 mL离心管为进口离心管(不含有RNA酶)。所有的动物实验均按照中山大学动物研究伦理委员会对进行动物实验时所做的规章制度进行操作。

**1.1.2 饥饿实验的样品采集** 实验所用斜带石斑鱼来自广东省大亚湾水产试验中心,体重32—60 g,体长12—15 cm的仔鱼。将仔鱼( $n=150$ )驯养于室内海水池中,并把短期饥饿的鱼分成6组,驯养(每天9:00 定点投喂)两周后开始进行短期(7d)饥饿实验:实验第3天取饥饿组和对照组(投喂组)样品,并将其中3组恢复投喂;实验第7天取饥饿组、对照组(投喂组)和饥饿复投组样品。取下的下丘脑组织于冻存管中,液氮速冻保存带回实验室,并将其转存到-80°C超低温冰箱备用。实验所用的解剖器具和玻璃器皿等均经过180°C烘烤5h用以灭活RNA酶。

### 1.2 方法和处理

**1.2.1 引物设计** 根据已有的斜带石斑鱼转录组数据(未公开)和GenBank上已上传的NPB基因序列的比对分析,找出了两个与NPB相似的基因序列,并暂命名为NPB1和NPB2。利用引物设计软件primer premier 5.0设计斜带石斑鱼NPB克隆和RT-PCR的特异性引物。具体引物序列如表1所示。

表1 PCR引物序列

Tab.1 Sequences of the Primers used for PCR

引物名称	序列(5' 3')	应用实验
NPB1-F	AGAGGTCAGTCAGGTTTGCCG	PCR
NPB1-R	ACGCGGACAGGCAGTCCAGGG	PCR
NPB2-F	TCACTCTGGGTCAGTTTACG	PCR
NPB2-R	GCACGCTTTCAAGAAGTAGG	PCR
NPB1-qt-F	TGCTCATCTCCTGCCATCC	PCR/qt-PCR
NPB1-qt-R	TCTCCTCAGACTCGGACCTT	PCR/qt-PCR
NPB2-qt-F	AGGCGTGGTACAAGCAGAT	PCR/qt-PCR
NPB2-qt-R	AACAGGCATCGTCTTCAGG	PCR/qt-PCR
-actin-F	TTCACCACCACAGCCGAGA	PCR/qt-PCR
-actin-R	TGGTCTCGTGGATTCCGCAG	PCR/qt-PCR

**1.2.2 总RNA提取及cDNA模版的制备** 参照Trizol<sup>®</sup> reagent(由美国Invitrogen公司提供)说明书及操作步骤,将总RNA提取出来,并通过反转录技术制备cDNA模版以备基因克隆(polymerase chain reaction, PCR)和实时定量PCR(real time-polymerase chain reaction, RT-PCR)使用。

**1.2.3 NPB基因的克隆与分析** 以脑组织反转录产物为模板,利用NPB1和NPB2的简并引物(NPB-F和NPB-R)进行聚合酶链式反应(PCR)来克隆和验证NPB1和NPB2基因。通过琼脂糖凝胶电泳后将PCR产物的目的条带进行切胶回收,用胶回收试剂盒E.Z.N.A<sup>®</sup> Plasmid Extraction Kit(Omega Bio-Tek公司, USA)进行分离纯化,并将胶回收产物进行连接和转化以及菌株培养鉴定,最后送至广州英骏公司进行测序。根据测序结果利用DNAssist2.2和BioEdit软件将NPB翻译成相应的氨基酸序列,通过使用Clustal W1.83和MEGA 4.0软件将NPB的蛋白序列进行多重比对和进化树分析,并在在线预测网站SignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对其NPB进行信号肽的预测分析等。

**1.2.4 实时定量PCR及数据分析** 根据以上的实验方法,提取总RNA制备定量cDNA模版以及提取标准质粒DNA制备标准曲线,以备RT-PCR使用。选取-actin作为内参基因和选用SYBR<sup>®</sup> Green Realltime PCR Master Mix plus kit(TOYOBO公司, Japan)试剂盒进行RT-PCR试验。使用仪器为ABI 7900HT sequence detection system。具体反应程序为:首先95°C预变性2min;然后95°C变性15s,55°C退火15s,72°C延伸30s,共40个循环;最后在84°C收集荧光。对溶解曲线分析,以确定PCR产物质量,用

Excel 对实验数据进行初步处理, 再利用 Graphpad Prism5.0 软件进一步处理和分析数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 斜带石斑鱼 NPB1 和 NPB2 基因序列的鉴定与分析

在本研究中, 作者在对斜带石斑鱼 NPB 基因克隆分析的基础上, 发现了两个 NPB 基因(分别命名为 NPB1 和 NPB2), 其开放阅读框(ORF)分别为 393bp 和 387bp, 各自编码的蛋白质序列为 130 个氨基酸(aa)和 128aa, 如图 1a 所示。在 NPB1 和 NPB2 的氨基酸序列的 N-末端均有一个包含了 25aa 的预测信号肽, 而紧随其预测信号肽之后则出现了各自的包含 29aa 成

熟肽, 以及两个由氨基酸残基(RR)构成的蛋白质水解切割位点(Arg49-Arg50 和 Arg55-Arg56), 并且都具有一个相对较长的 C-末端, 如图 1b 所示。

如表 2 所示, 根据不同物种的 NPB 的氨基酸序列比对表可知, 斜带石斑鱼 NPB1 的氨基酸序列与尼罗罗非鱼和斑马宫丽鱼的同源性最高高达 92%; 其次是剑鱼、青鳞和斑马鱼等, 同源性高达 60%以上; 而与哺乳类的同源性则比较低, 如人类的 52%, 小家鼠的 48%和大鼠 45%。而斜带石斑鱼 NPB2 与鲑鱼的同源性最高, 为 61%; 与尼罗罗非鱼、青鳞和斑马鱼等都在 50%以上; 与哺乳动物的相似性则在 45%左右, 其中与人类的相似性为 48%, 较 NPB1 与人类的同源性(52%)略低。

表 2 斜带石斑鱼 NPB1 和 NPB2 蛋白质前体氨基酸序列与其它脊椎动物的同源性百分比

Tab.2 Pairwise comparison in homology for *E. coioides* NPB1 and NPB2 protein sequence with other species NPB protein sequences

物种	基因库收录序号	氨基酸同源性百分比(%)	
		Ep-npb1	Ep-npb2
[ <i>Epinephelus coioides</i> ]斜带石斑鱼 NPB1		100	59
[ <i>Epinephelus coioides</i> ]斜带石斑鱼 NPB2		59	100
[ <i>Oreochromis niloticus</i> ]尼罗罗非鱼	XP_003455810.1	92	55
[ <i>Maylandia zebra</i> ]斑马宫丽鱼	XP_004539074.1	92	57
[ <i>Xiphophorus maculatus</i> ]剑尾鱼	XP_005805134.1	86	57
[ <i>Oryzias latipes</i> ]青鳞	XP_004066211.1	81	54
[ <i>Lepisosteus oculatus</i> ]斑点雀鲷	XP_006635208.1	67	55
[ <i>Latimeria chalumnae</i> ]矛尾鱼	XP_005989170.1	75	57
[ <i>Danio rerio</i> ]斑马鱼	NP_001120841.1	69	55
[ <i>Salmo salar</i> ]鲑鱼	ACI66524.1	63	61
[ <i>Xenopus tropicalis</i> ]非洲爪蟾	XP_002937351.1	60	52
[ <i>Mustela putorius furo</i> ]雪貂	XP_004749308.1	57	43
[ <i>Gallus gallus</i> ]鸡	XP_001231800.2	32	31
[ <i>Mus musculus</i> ]小家鼠	XP_006532795.1	48	44
[ <i>Rattus norvegicus</i> ]大鼠	NP_695205.1	45	44
[ <i>Homo sapiens</i> ]人类	NP_683694.1	52	48

如图 2 所示, 根据斜带石斑鱼与某些典型的哺乳动物和鱼类的 NPB 的氨基酸序列所构建的进化树系统分析表明, NPB 前体蛋白斜带石斑鱼的 NPB1 和 NPB2 基因共同聚集在硬骨鱼类的一个大分支上而与哺乳类分开。其中 NPB1 又与尼罗罗非鱼和斑马宫丽鱼关系较近, 与剑尾鱼和青鳞关系次之, 而与哺乳类关系较远, 与鸟类关系最远; NPB2 则与鲑鱼关系相近, 与斑马鱼关系次之, 同样与哺乳类和鸟类关系较远。

### 2.2 NPB 在斜带石斑鱼中的组织分布表达模式

如图 3 所示, 通过逆转录 PCR 和实时荧光定量

PCR 技术在斜带石斑鱼的不同器官组织中对 NPB1 和 NPB2 的 mRNA 的表达水平进行了空间表达模式的检测, 所有的数据都表明了, NPB1 和 NPB2 基因在脑组织中广泛表达, 特别是在下丘脑中的表达极其丰富。其中而 NPB1 其它脑区如端脑、中脑、延脑和垂体的表达量较低, 特别是嗅球和小脑的表达量在脑区中是最低的; 而 NPB2 则在嗅球和中脑的表达量是最低的。NPB1 和 NPB2 在其它外周组织器官中也有少量的表达, 如 NPB1 在性腺、鳃和肌肉中的表达量相对较高一点, 而 NPB2 则在性腺和心脏中的表达量相对



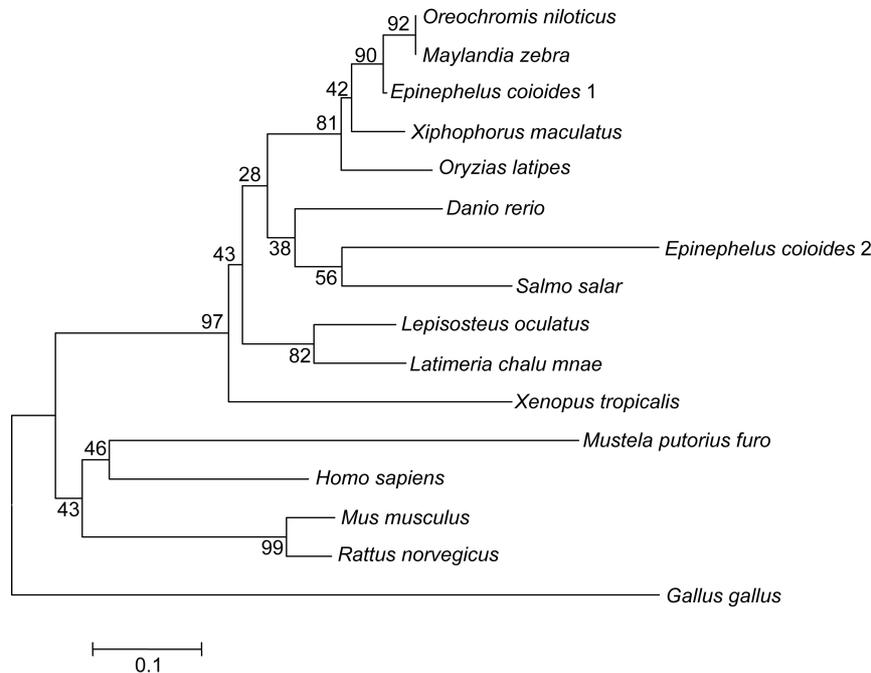


图 2 斜带石斑鱼 NPB1 和 NPB2 与其它物种的进化树分析

Fig.2 Phylogenetic tree illustrating the relationship between *E. coioides* NPB1 and NPB2 with those of other species NPB

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) NPB1 和 NPB2; 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, GenBank accession No. XP\_003455810.1); 斑马宫丽鱼(*Maylandia zebra*, No. XP\_004539074.1); 剑尾鱼(*Xiphophorus maculatus*, No. XP\_005805134.1); 青鳉(*Oryzias latipes*, No. XP\_004066211.1); 斑点雀鳉(*Lepisosteus oculatus*, No. XP\_006635208.1); 矛尾鱼(*Latimeria chalumnae*, No. XP\_005989170.1); 斑马鱼(*Danio rerio*, No. NP\_001120841.1); 鲑鱼(*Salmo salar*, No. ACI66524.1); 非洲爪蟾蜍(*Xenopus (Silurana) tropicalis*, No. XP\_002937351.1); 雪貂(*Mustela putorius furo*, No. XP\_004749308.1); 鸡(*Gallus gallus*, No. XP\_001231800.2); 小家鼠(*Mus musculus*, No. XP\_006532795.1); 大鼠(*Rattus norvegicus*, No. NP\_695205.1); 人类(*Homo sapiens*, No. NP\_683694.1)

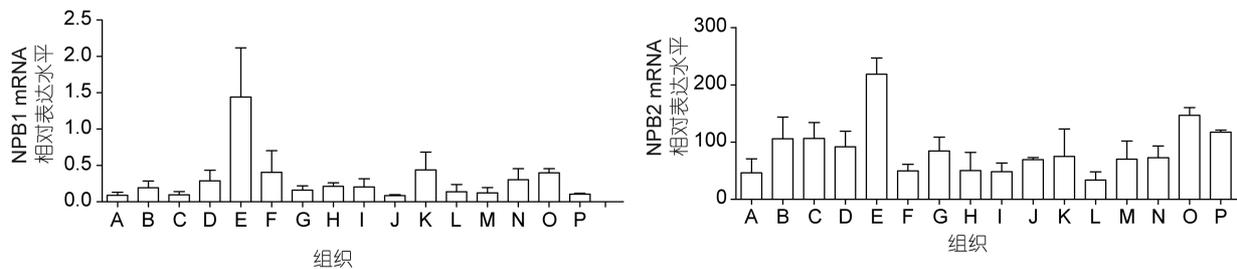


图 3 斜带石斑鱼 NPB1 和 NPB2 在不同组织中的表达模式

Fig.3 Tissue distribution of NPB1 and NPB2 of *E. coioides*

所有数值用平均值  $\pm$  标准差(mean  $\pm$  SEM)来表示。各个字母所代表的组织器官如下: A. 嗅球; B. 端脑; C. 小脑; D. 垂体; E. 下丘脑; F. 中脑; G. 延脑; H. 肝脏; I. 胃; J. 肠道; K. 肌肉; L. 肾脏; M. 脾脏; N. 鳃; O. 性腺; P. 心脏

较高, 其它组织如鳃、脾脏、肌肉、胃、肠和肝脏中的表达量都相对较低一些。由此可见, NPB2 与 NPB1 在外周组织中的表达模式是有些微差异的, 即 NPB2 在外周组织中的表达更为广泛; 但是两者都在下丘脑中拥有更为丰富的分布表达。

### 2.3 饥饿试验中 NPB 在下丘脑表达模式

如图 4 所示, 在饥饿试验的研究中发现, 斜带石斑鱼在禁食 3d 和 7d 后, 其 NPB1 和 NPB2 的 mRNA

相对表达量与投喂组的相比较, 都显著发生了下调; 复投喂后, NPB1 和 NPB2 的 mRNA 表达恢复, 与对照组水平相当。

## 3 讨论

基于 GenBank 数据库和实验室研究组已有的石斑鱼转录组数据的比对分析结果, 作者在斜带石斑鱼中克隆得到了两种编码神经肽 NPB 的亚型基因

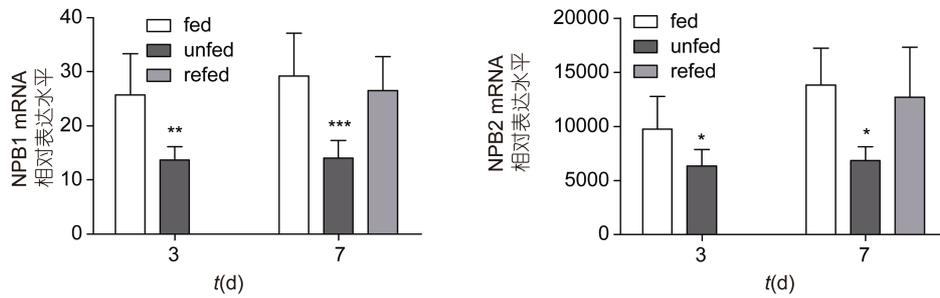


图4 食物剥夺试验中斜带石斑鱼 NPB1 和 NPB2 在下丘脑的表达模式

Fig.4 Expression pattern of the *E. coioides* NPB1 and NPB2 in food deprivation

fed: 正常投喂组; unfed: 饥饿处理组; refed: 饥饿处理后复投喂组。NPB mRNA 相对表达水平用平均值  $\pm$  标准差(mean  $\pm$  SEM)表示( $n=10$ ); \*表示与正常投喂组差异显著( $P<0.05$ )

NPB1 和 NPB2, 其在 N-末端的信号肽和成熟肽结构序列, 与尼罗罗非鱼、斑马鱼、小鼠和人类等均在 N-末端拥有的信号肽和成熟肽结构相似。除了哺乳动物, NPB 在斑马鱼、非洲爪蟾和罗非鱼中已被克隆出来(Tanaka *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2014), NPB 是由不同的肽前体衍生的, 即前体 NPB (Hirashima *et al.*, 2011), 成熟的神经肽 NPB 则由 29 个氨基酸组成, 并且它在 N-末端的色氨酸残基翻译后被溴化修饰(Fujii *et al.*, 2002), 这些数据表明, 斜带石斑鱼 NPB 的蛋白质的一级结构与其它脊椎动物相一致。同源性分析表明, 斜带石斑鱼 NPB1 和 NPB2 均与其它鱼类 NPB 的同源性相对较高, 与哺乳类和鸡的同源性则相对较低; 其中与哺乳类和鸡相比较, NPB1 的同源性则比 NPB2 略高。而根据斜带石斑鱼与某些典型的哺乳动物和鱼类的 NPB 的氨基酸序列所构建的进化树系统分析数据也证实了这一结果, NPB1 和 NPB2 基因共同聚集在硬骨鱼类的一个大分支上而与哺乳类和鸟类分开。由此可见在, 斜带石斑鱼的 NPB1 的氨基酸序列在结构上是比较保守的, 而 NPB2 的保守性则比较低。此外, 斜带石斑鱼 NPB1 和 NPB2 的氨基酸序列的相似性较高, 达 59%, 并且都有两个潜在的由精氨酸残基(RR)组成的蛋白质水解切割位点(Arg49-Arg50 和 Arg55-Arg56), 与人类和尼罗罗非鱼相似(Fujii *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2014), 这意味着斜带石斑鱼这两种亚型 NPB 的成熟肽可能各自有两种肽蛋白质异构体 NPB23 和 NPB29 参与其生理调控功能。

组织分布的研究表明, 斜带石斑鱼 NPB1 和 NPB2 基因在脑组织中广泛表达, 特别是在下丘脑中的表达极其丰富, 这一结果与其它脊椎动物中的 NPB 表达分布情况相一致(Fujii *et al.*, 2002; Brézillon *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2014)。在哺

乳动物中, NPB 及其受体 GPR7 在脑组织区域广泛表达, 特别是在下丘脑中表达丰富(Hochol *et al.*, 2006; Schulz *et al.*, 2007; Hondo *et al.*, 2008; Sakurai, 2013), 如 NPB 广泛分布在整个脑组织的不同部位如海马组织、下丘脑室旁核、动眼神经副核和中脑导水管周围灰质等(Tanaka *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2006)。在大鼠中, NPB-免疫反应的阳性体细胞被发现于下丘脑内的许多区域, 并且在下丘脑的这些区域也检测到 GPR7 mRNA 的高浓度表达, 这些区域包括下丘脑腹内侧核、背内侧下丘脑核、弓状核、视前核和从腹侧到未定带(Schulz *et al.*, 2007)。而在硬骨鱼类中, 也分别在斑马鱼(Tanaka *et al.*, 2003)、鲑鱼(Leong *et al.*, 2010)和尼罗罗非鱼(Yang *et al.*, 2014)等的下丘脑中检测到了 NPB 的丰富表达。此外, 在哺乳动物中的一些外周组织, 如在人类的肾脏、子宫、卵巢、睾丸和胎盘中, 在鼠科动物的胃、脊髓、睾丸、肝和肾等组织中也检测到 NPB mRNA 的表达(Brézillon *et al.*, 2003)。与此相似, 在斜带石斑鱼的外周组如性腺、心脏和鳃等组织中也检测到了 NPB mRNA 的表达, 特别是 NPB2 在外周组织中的表达更为广泛。由于 NPB1 和 NPB2 在斜带石斑鱼中枢神经系统的广泛分布和在各种外周组织的表达模式, 暗示着这两种神经肽在斜带石斑鱼中可能与许多生理活动的调节有关。

由于下丘脑是许多复杂的生理活动的调节中枢, 而就 NPB 和 GPR7 在下丘脑的分布情况推测其与摄食调控和能量消耗有关(Hondo *et al.*, 2008; Civelli *et al.*, 2008), 而前人的研究也表明 NPB/GPR7 与摄食行为调节有关(Tanaka *et al.*, 2003; Samson *et al.*, 2004; Johansson *et al.*, 2008)。在本研究中, 斜带石斑鱼在禁食 3d 和 7d 后, 其 NPB1 和 NPB2 的 mRNA 相对表达量与正常投喂组相比都具有显著的下调表达变化;

而复投喂后, NPB1 和 NPB2 恢复上调表达并与正常投喂组无明显差异。这一结果表明 NPB1 和 NPB2 均参与了斜带石斑鱼的摄食调控。尼罗罗非鱼在禁食 7d 和 14d 后, NPB 在下丘脑的表达没有明显的变化, 而在复投喂之后出现了明显的上调表达(Yang *et al.*, 2014)。这些结果表明, 在硬骨鱼类中, NPB 也参与了摄食调节。

### 参 考 文 献

- 李 昀, 肖云虹, 张 磊, 2009. 促肾上腺皮质激素释放因子及其受体的研究. 山东医药, 49(48): 110—111
- 肖 东, 林浩然, 2000. 鱼类摄食和生长的神经内分泌调控途径研究进展. 中国水产科学 7(3): 102—106
- 傅小锁, 张景艳, 1993. 神经肽 Y 及其作用. 生理科学进展, 24(2): 152—155
- 雷治海, 苏 娟, 贾晓庆等, 2010. 神经肽 W 和神经肽 B 的研究进展. 畜牧与兽医, 42(8): 94—99
- 谭雪梅, 陈代文, 羊云飞, 2004. 增食欲素及其生理功能. 中国饲料, (14): 2—7
- Aikawa S, Ishii M, Yanagisawa M *et al.*, 2008. Effect of neuropeptide B on feeding behavior is influenced by endogenous corticotropin-releasing factor activities. *Regulatory Peptides*, 151(1—3): 147—152
- Brézillon S, Lannoy V, Franssen J-D *et al.*, 2003. Identification of natural ligands for the orphan G protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *Journal of Biology Chemistry*, 278(2): 776—783
- Civelli O, Zhou Q-Y, 2008. Orphan G protein-coupled receptors and novel neuropeptides. Berlin Heidelberg: Springer, 1—256
- Fujii R, Yoshida H, Fukusumi S *et al.*, 2002. Identification of a neuropeptide modified with bromine as an endogenous ligand for GPR7. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37): 34010—34016
- Hirashima N, Tsunematsu T, Ichiki K *et al.*, 2011. Neuropeptide B induces slow wave sleep in mice. *Department of Molecular Pharmacology, University of Tsukuba*, 34(1): 31—37
- Hochol A, Belloni A S, Rucinski M *et al.*, 2006. Expression of neuropeptides B and W and their receptors in endocrine glands of the rat. *International Journal of Molecular Medicine*, 18(6): 1101—1106
- Hondo M, Ishii M, Sakurai T, 2008. The Npb/NPW neuropeptide system and its role in regulating energy homeostasis, pain, and emotion. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 46: 239—256
- Ishii M, Fei H, Friedman J M, 2003. Targeted disruption of GPR7, the endogenous receptor for neuropeptides B and W, leads to metabolic defects and adult-onset obesity. *Proceedings of the National Academy of Science*, 100(18): 10540—10545
- Jackson V R, Lin S H, Wang Z W *et al.*, 2006. A study of the rat neuropeptide B/neuropeptide W system using in situ techniques. *Journal of Comparative Neurology*, 497(3): 367—383
- Johansson A, Fredriksson R, Winbergren S *et al.*, 2008. The relative impact of chronic food restriction and acute food deprivation on plasma hormone levels and hypothalamic neuropeptide expression. *Peptides*, 29(9): 1588—1595
- Leong J S, Jantzen S G, Von Schalburg K R *et al.*, 2010. *Salmo salar* and *esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome. Victoria, British Columbia: Biology, Centre for Biomedical Research, University of Victoria, 279
- Sakurai T, 2013. NPBWR1 and NPBWR2: Implications in energy homeostasis, pain, and emotion. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4: 23
- Samson W K, Baker J R, Samson C K *et al.*, 2004. Central neuropeptide B administration activates stress hormone secretion and stimulates feeding in male rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 16(10): 842—849
- Schulz S, Stumm R, Höllt V, 2007. Immunofluorescent identification of neuropeptide B-containing nerve fibers and terminals in the rat hypothalamus. *Neuroscience Letters*, 411(1): 67—71
- Shimomura Y, Harada M, Goto M *et al.*, 2002. Identification of neuropeptide W as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(39): 35826—35832
- Skrzypski M, Pruszyńska-Oszmalek E, Ruciński M *et al.*, 2012. Neuropeptide B and W regulate leptin and resistin secretion, and stimulate lipolysis in isolated rat adipocytes. *Regulatory Peptides*, 176(1—3): 51—56
- Tanaka H, Yoshida T, Miyamoto N *et al.*, 2003. Characterization of a family of endogenous neuropeptide ligands for the G protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 100(10), 6251—6256
- Watanabe N, Wada M, Irukayama-Tomobe Y *et al.*, 2012. A single nucleotide polymorphism of the neuropeptide B/W receptor-1 gene influences the evaluation of facial expressions. *PLoS One*, 7(4): e35390
- Yang L, Sun C Y, Li W S, 2014. Neuropeptide B in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Molecular cloning and its effects on the regulation of food intake and mRNA expression of growth hormone and prolactin. *General and Comparative Endocrinology*, 200(1): 27—34

## DISCOVERY OF NEUROPEPTIDE B IN GROUPEP *EPINEPHELUS COIOIDES* AND ITS EXPRESSION PATTERN

LI Wei-Ping<sup>1</sup>, HU Zhe<sup>2</sup>, LI Yu<sup>2</sup>, WANG Xiang<sup>2</sup>, HUANG Wen<sup>2</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>,  
XIAO Ling<sup>2</sup>, LI Shui-Sheng<sup>2</sup>, ZHANG Yong<sup>2</sup>, LIN Hao-Ran<sup>1,2</sup>

(1. College of Ocean, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract** The neuropeptide B (NPB) plays an important role in the regulation of various physiological activities in organisms for regulating feeding behavior, energy balance, sleep, neuroendocrine function, and inflammatory pain. To investigate the function of feeding, we cloned and identified two structures of NPB hypotype genes (NPB1 and NPB2) in the grouper *Epinephelus coioides* for the first time and compared the transcriptome against the GenBank. NPB1 and NPB2 were found having an open reading frame (ORF) of 393bp and 387bp for encoding a 130 amino-acid (aa) and 128aa-protein sequences, respectively, and having signal peptide and mature peptide structures in the N-terminal regions of the two genes. With real-time quantitative PCR technology, we determined the mRNA expression level of grouper NPB in different tissues. The expression patterns revealed that, NPB1 and NPB2 were widely expressed in brain, especially in hypothalamus, and they were also expressed correspondingly in other peripheral tissues and organs. Our study on food deprivation in the groupers showed that, fasting for 3 and 7 days down-regulated the NPB1 and NPB2 mRNA expression level in the hypothalamus. Therefore, NPB1 and NPB2 are involved in regulating food intake of the groupers.

**Key words** grouper *Epinephelus coioides*; NPB; genetic cloning; tissues distribution; feeding regulation