

# 光唇鱼(*Acrossocheilus fasciatus*)Leptin 基因 克隆及禁食-再投喂对其表达的影响\*

穆方申 苗亮<sup>①</sup> 李明云<sup>①</sup> 侯红红 李笑萌 徐玉敏

(宁波大学 教育部应用海洋生物技术重点实验室 宁波 315211)

**摘要** 瘦素(Leptin)是在动物摄食和能量代谢调节中具有重要作用的一种蛋白。为研究光唇鱼(*Acrossocheilus fasciatus*)中 Leptin 基因(AfLep)的结构和功能,作者克隆了其 cDNA 序列全长。结果显示 AfLep 由 1315 个核苷酸组成,含 1 个长度为 516bp 的开放阅读框,预测编码蛋白由 171 个氨基酸残基组成并具有长度为 20aa 的信号肽。系统进化树中 AfLep 与其他鲤科鱼类的 Leptin 蛋白聚为一簇,与齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)进化相关性最高。多重序列比对显示 AfLep 与齐口裂腹鱼 Leptin 蛋白相似性最高(86.7%),与鲤科其他鱼类间的相似性均在 80%以上。AfLep 具有脊椎动物 Leptin 蛋白的 4 个保守 $\alpha$ 螺旋结构,其三级结构与人 Leptin 相似。AfLep 在光唇鱼肝脏中的表达量最高,其次是脑和肾,其他组织中仅有微弱表达。实时荧光定量 PCR 检测显示禁食后光唇鱼肝脏 AfLep 表达量降低( $P<0.05$ ),禁食 1d、3d、7d 时的表达量分别比与禁食前降低了 58.25%、73.82%和 92.05%;禁食 1d 和 3d 的鱼经再投喂后肝脏 AfLep 表达量均显著升高( $P<0.05$ ),但禁食 7d 的鱼再投喂后 AfLep 表达量仅略有升高( $P>0.05$ )。上述结果表明 AfLep 参与了光唇鱼的摄食管理和能量代谢调控。

**关键词** 光唇鱼; Leptin 基因; 组织表达; 禁食-再投喂

中图分类号 Q346 doi: 10.11693/hyhz20170100023

由于天然饲料的季节性丰度变化以及人工养殖中的限制性投喂,鱼类无论在野生还是养殖条件下都可能会经历一定的食物匮乏期。饥饿状态导致的鱼体生理生化、代谢变化会影响摄食行为、能量代谢、物质组成及生长发育、生殖等生命活动(王婷等, 2015; 贺诗水等, 2016)。Leptin 又称瘦素,是在动物摄食和能量平衡的调节中有重要的作用一种蛋白质激素,并在生殖和发育、免疫、心血管功能调节等方面有重要作用(Klok, 2007)。在哺乳动物中,Leptin 可通过下丘脑-垂体轴的反馈调节使动物摄食减少、能量消耗增加(Sahu, 2004)。目前已获得了斑马鱼(*Danio rerio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)

等多种鱼类的 Leptin 基因序列,虽然鱼类的 Leptin 蛋白有着相似的高级结构,但各科、目之间氨基酸序列却有较大差异,关于鱼类中 Leptin 的功能也存在争议(Copeland *et al.*, 2011)。就摄食调节方面而言,鲤(*C. carpio*)和草鱼(*C. idella*)均为禁食后 Leptin 基因表达上调、摄食表达后下调(卢荣华等, 2015),且对金鱼(*Carassius auratus*)和虹鳟(*O. mykiss*)侧脑室注射 Leptin 蛋白后可以抑制摄食、导致体重降低(de Pedro *et al.*, 2006; Aguilar *et al.*, 2010);但在点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、虹鳟(*O. mykiss*)中则发现饥饿状态下 Leptin 基因表达上调(Kling *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013)。鱼类中 Leptin 的功能可能比哺乳动物复杂,要弄清 Leptin 在鱼类摄食管理和能量代谢调控中的功

\* 浙江省海洋与渔业项目,浙海渔计[2012]83 号; 国家星火计划项目,2011GA701001 号。穆方申, E-mail: mufangshen@126.com

通讯作者: 苗亮, 博士, 硕士生导师, E-mail: miaoliang@nbu.edu.cn; 李明云, 教授, 博士生导师, E-mail: limingyun@nbu.edu.cn

收稿日期: 2017-01-26, 收修改稿日期: 2017-03-03

能及作用机制还需要进行更加广泛和深入的研究。

光唇鱼(*Acrossocheilus fasciatus*)俗称淡水石斑鱼, 属鲤形目、鲤科、鲃亚科、光唇鱼属, 不但有较高的营养价值, 还可作为小型观赏鱼(潘娜等, 2015)。近年来光唇鱼的人工繁育和养殖技术逐渐成熟, 养殖规模不断扩大, 但在摄食调控、能量代谢调节等方面鲜有研究报道。本研究克隆光唇鱼 Leptin 基因(AfLep), 并检测禁食期间及恢复投喂后 AfLep 的表达变化, 以期为研究鱼类 Leptin 的功能及其光唇鱼的摄食和能量代谢调节中的作用提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及禁食-再投喂实验

光唇鱼由浙江省新昌县新渔水产养殖专业合作社提供, 为人工繁育、养殖的 12 月龄光唇鱼, 共 450 尾, 平均体重(3.13±1.14)g、平均体长(6.82±0.64)cm。将鱼随机分配到 9 个容积为 50L 的塑料桶中, 每桶 50 尾, 暂养 4 天后开始实验。暂养期间每天投喂 2 次通威牌颗粒饲料, 每次投喂量为鱼体重的 2%。每 3 个桶为 1 组, 处理如下: 第 1 组禁食 1d 后恢复投喂, 第 2 组禁食 3d 后恢复投喂, 第 3 组禁食 7d 后恢复投喂。

### 1.2 样品采集

在禁食前(0d)和禁食后 1d、3d、7d 以及再投喂后 3h 分别采样 1 次, 每次每桶随机取样 5 尾。取样时将鱼用丁香酚麻醉后立即解剖, 其中禁食前取肌肉、鳃、心、肝脏、脾、肠、肾、脑等组织, 用于 AfLep 基因克隆、组织表达分析和表达量检测; 禁食

及再投喂后取肝脏, 用于检测 AfLep 基因表达变化。样品经液氮速冻后-80℃保存, 用 Trizol 法提取各组组织总 RNA, 反转录合成第一链 cDNA。

### 1.3 AfLep 基因克隆

检索 GenBank 数据库中鲤科鱼类 Leptin 蛋白序列, 经序列比对后根据保守区域设计 3 对兼并引物(lep1, lep2 和 lep3, 见表 1)对光唇鱼 AfLep 基因 cDNA 序列进行扩增。用 Ex Taq<sup>®</sup> Hot Start Version 聚合酶体系(TaKaRa)进行 PCR 扩增, 50μL 反应体系包括: 5U/μL 的 Ex Taq HS 0.25μL, 10×Ex Taq Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus) 5μL, dNTP Mixutre 4μL, 上、下游引物各 0.5μL, cDNA 模板 1μL, dH<sub>2</sub>O 38.75μL。反应程序为: 94℃预变性 5min; 94℃变性 30s、退火(引物退火温度见表 1)30s、72℃合成 30s, 循环 30 次; 72℃延伸 10min。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后连接入 pMD-19T 载体, 转化入感受态大肠杆菌, 挑选阳性克隆菌落送测序。引物合成和测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司进行。对测得的序列进行拼接后获得光唇鱼 AfLep 基因核心序列。

根据所获核心序列设计引物 lep-3'-RACE 和 lep-5'-RACE(表 1), 用 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 和 5'-Full RACE Kit (TaKaRa)扩增光唇鱼 AfLep 基因 cDNA 的 3'端和 5'端序列, 扩增体系及反应程序均按照说明书进行。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后连接入 pMD-19T 载体, 转化入感受态大肠杆菌, 挑选阳性克隆菌落送测序, 拼接后获得光唇鱼 AfLep 基因 cDNA 序列全长。

表 1 引物信息  
Tab.1 Information of the primers

用途	引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)	预期产物大小(bp)
核心序列扩增	lep1	F: TCTACMCMTGCWTTTTGRSCATKCT R: WGTAAYGKGGTGSSTGC	54	420
	lep2	F: GGCAGASACCATYATCMWCAGAA R: MTTGGGCAGYVTTTGVAG	56	180
	lep3	F: AAAMHRCAGGCAGASACCA R: TAGCAGCTYTTTCAMMTGGTC	44	420
3'-RACE	lep-3'-RACE	Inner: CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG Outer: TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	62	—
5'-RACE	lep-5'-RACE	Inner: GACGAGGTTTGGAGATAGTTTCAGC Outer: ACCCGAGACCTTGGAGTGGTTTAT	62	—
表达检测	q-lep	F: AGAAGGTTCTTCAAAGGCTG R: AAAGTAATGTGGTGGGTGGC	58	178
内参	$\beta$ -actin	F: CCTATTGAGCACGGTATTG R: CTGTTGGCTTTGGGATTG	58	140

#### 1.4 AfLep 序列分析及系统进化树构建

对获得的 AfLep 基因 cDNA 序列, 用在线 ORF Finder 工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)分析开放读码框(open reading frame, ORF); 用 SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)预测信号肽; 用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>)的 ProMod II 功能

对 AfLep 蛋白进行二级和三级结构预测(以蛋白质数据库中的人 Leptin 结构作为参照); 从 GenBank 数据库中检索鱼类及其他脊椎动物的 Leptin 序列(表 2), 经 Cluastal X1.83 软件进行多重比对后用 MEGA5.0 软件构建基于氨基酸序列的 NJ 法(Neighbor-joining)系统进化树, 设置 bootstraps 验证次数为 1000 次。

表 2 多重序列比对及构建系统进化树所用序列  
Tab.2 Sequences that used for multiple alignment and phylogenetic tree construction

登录号	序列名	种名	俗名
AIE45855	Leptin	<i>Schizothorax prenanti</i>	齐口裂腹鱼
CAI30828	Leptin-I	<i>Cyprinus carpio</i>	鲤鱼
CAI30828	Leptin-II	<i>Cyprinus carpio</i>	鲤鱼
ACL68083	Leptin	<i>Carassius auratus</i>	鲫鱼
ACO82076	Leptin-II	<i>Carassius auratus</i>	鲫鱼
ACI32423	Leptin	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	草鱼
AHI13615	Leptin	<i>Culter alburnus</i>	翘嘴红鲌
ACZ02412	Leptin	<i>Salmo salar</i>	大西洋鲑
ADI77098	Leptin-A2	<i>Salmo salar</i>	大西洋鲑
AGB34181	Leptin	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	虹鳟
AGR51148	Leptin	<i>Larimichthys crocea</i>	大黄鱼
AFU55260	Leptin	<i>Epinephelus coioides</i>	点带石斑鱼
CEE15395	Leptin-1	<i>Anguilla Anguilla</i>	鳗鲡
CEE15396	Leptin-2	<i>Anguilla Anguilla</i>	鳗鲡
XP_002931881	Leptin	<i>Xenopus tropicalis</i>	爪蟾
CDL67225	Leptin	<i>Columba livia</i>	鸽
NP_032519	Leptin	<i>Mus musculus</i>	小鼠
NP_000221	Leptin	<i>Homo sapiens</i>	人

#### 1.5 AfLep 组织表达及禁食-再投喂后表达变化

根据获得的 AfLep 基因 cDNA 序列设计 1 对表达检测引物 q-lep, 并以  $\beta$ -actin 作为内参(表 1), 检测 AfLep 基因在光唇鱼各组织中的表达情况及禁食-再投喂后的表达变化。

以提取的正常投喂健康光唇鱼各组织 cDNA 为模板, 通过半定量 RT-PCR 检测各组织中 AfLep 基因的表达情况。20 $\mu$ L 反应体系包括: 2 $\times$ Taq Premix-Dye 酶 10 $\mu$ L, 正反向引物各 1 $\mu$ L, 模板 cDNA 1 $\mu$ L, dH<sub>2</sub>O 7 $\mu$ L。程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后凝胶成像。

对禁食期间及再投喂后光唇鱼肝脏中 AfLep 基因的表达变化进行实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测。反应使用 SYBR<sup>®</sup>

Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂盒(TaKaRa), 20 $\mu$ L 反应体系包括: SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) 10 $\mu$ L, 正、反向引物各 1 $\mu$ L, cDNA 模板 1 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7 $\mu$ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15s, 58 $^{\circ}$ C 退火 15s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 循环 40 次并记录 C<sub>T</sub> 值。反应完成后, 系统在 65—94 $^{\circ}$ C、每次升温 0.5 $^{\circ}$ C 生成溶解曲线。以  $\beta$ -actin 为内参, 用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>T</sub></sup> 法(Livak *et al*, 2001)计算 AfLep 基因相对表达量。用 Excel2007 软件对数据进行统计, 计算平均数和标准差; 用 SPSS16.0 软件对不同时间点的基因相对表达量进行单因素方差(One way ANOVA)分析, 以 P<0.05 为具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 AfLep 序列特征

经测序和拼接, 获得 AfLep 基因序列全长

1315bp, 其中 5'端 175bp, 3'端 699bp; 该序列含有 1 个长度为 516bp 的开放阅读框(ORF), 编码 171 个氨基酸; 经 SignalP4.1 预测, 编码蛋白有长度为 20aa 的信号肽(图 1)。

基于各种动物 Leptin 氨基酸序列构建的系统进化树中(图 2), 鱼类 Leptin 独立于两栖类、鸟类、哺

乳类等其他脊椎动物而聚为一个簇; 在鱼类 Leptin 中鲤科、鳗鲡科、石首鱼科、鲑科鱼类均单独聚为一个簇; AfLep 位于鲤科鱼类的分支中, 优先与齐口裂腹鱼 Leptin 相聚。多重序列比对显示 AfLep 与齐口裂腹鱼 Leptin 相似性最高(86.7%), 与鲤科其他鱼类 Leptin 的相似性均在 80%以上, 与非鲤科鱼类

```

1  GGCCATTACGGCCTAGTTACGGGGATCATAACACCTCAGATTGCAAGCTGGTATTGCTTCGCTGTTGCAAAGTTAAAGACCCTCAACACAGGAAGC 100
101 ATG TAT TTT CCA GCT CTT CTC TAC CCC TGC ATT TTG GGC ATG CTC AAT CTG GTT CAT GGC ATT CCC GTT CAT CAG 175
1  M Y F P A L L Y P C I L G M L N L V H G I P V H Q 25
176 GAT AAC CTG AAA AAC TTG GTC AAA CTG CAG GCA GAA ACC ATC CAC AGA ATC AAC GAT CAC AAT GAG AAG CTG 250
26  D N L K N L V K L Q A E T I I H R I N D H N E K L 50
251 AAA CTA TCT CCA AAC CTC GTC ATT GGC GGT CCA GAA CTT TAC CCT GAG GTT CCT GCT GAT AAA CCA CTC CAA GGT 325
51  K L S P N L V I G G P E L Y P E V P A D K P L Q G 75
326 CTC GGG TCT ATC ATG GAC ACC CTA ACT ACC TTC CAG AAG GTT CTT CAA AGG CTG CCC AAG GGG CAT GTG AAC CAG 400
76  L G S I M D T L T T F Q K V L Q R L P K G H V N Q 100
401 ATA CGC AAC AAT TTG TCC ACA CTT CTG GGT TAC CTG AAG GAC AGA ATG AAC TCT ATG CGT TGC ACA CTC AAG GAG 475
101 I R N N L S T L L G Y L K D R M N S M R C T L K E 125
476 CCA GCT AAC GAG GGG TCA CTG GAC GCT TTC TTG GAG AAC AAC GCC ACC CAC CAC ATT ACT TTT GGG CAC TTG GCT 550
126 P A N E G S L D A F L E N N A T H H I T F G H L A 150
551 TTA GAC AGA CTG AAA CAG TTC ATG CAG AAG CTG ATT GTT AAT CTG GAC CTT TTG AAA AGC TGC TAA TTTTCTATTAT 627
151 L D R L K Q F M Q K L I V N L D L L K S C * 171
628 TGTAGCATTAAAAATATACTATTATAATATTTTAAAACCCGTATATTTATAAACCGATGCAGCATTTTGGCACATTTTGATATGTACAAATTTAT 727
728 TCCCTGGTATTAACAGGAAGCTAAAAATGTGTTTCGAGCTCATGGCATGCCAAGCAATCTGCTTGTCTACGTAACACTAACATCTGATACCTGCA 827
828 CAGATTGTCATGTCATATTCATGCTGTCTGCAGGATGACATCAGCATTTCGCTGAGCGTGCTCAATGATGTCAGTGTGTTTACCAGAAGCAACAGGTCA 927
928 GACTCTGCTGGGAAGCTGGAATCATGTTCCATTTTACTTCTTGCTGCAACACCAGCATTGTACACTCACAAAAAGGTACAAAAAGCTGCTACTGAGGCG 1027
1028 GTACGTTTTCAAAGGTACTAATATGTACCTTTAAGGAACCTAAATGCACCCCTTAGGAGTAAATGAGGTACATGTGTACCTTTTAAAAGTGACAGTTTC 1127
1128 TGTACCTTTTTTTCAGCAGGTATGGGAGGAGGGGAATAAACTCATATTTTCTACACAGATGAAATCTATGCACTTTGAATATCCTGAATATGCTAIT 1227
1228 AGTTTTGATTTTGTATTGATGCAATTTGTTTTTATAAAATGTTACCAATAAAGAAATTTCTAAGTTACATTGAAAAAATTTT 1315

```

图 1 AfLep 基因 cDNA 核苷酸序列及预测编码的氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide sequences of AfLep cDNA and deduced amino acid sequence  
注: \*示终止密码子; 下划线示信号肽

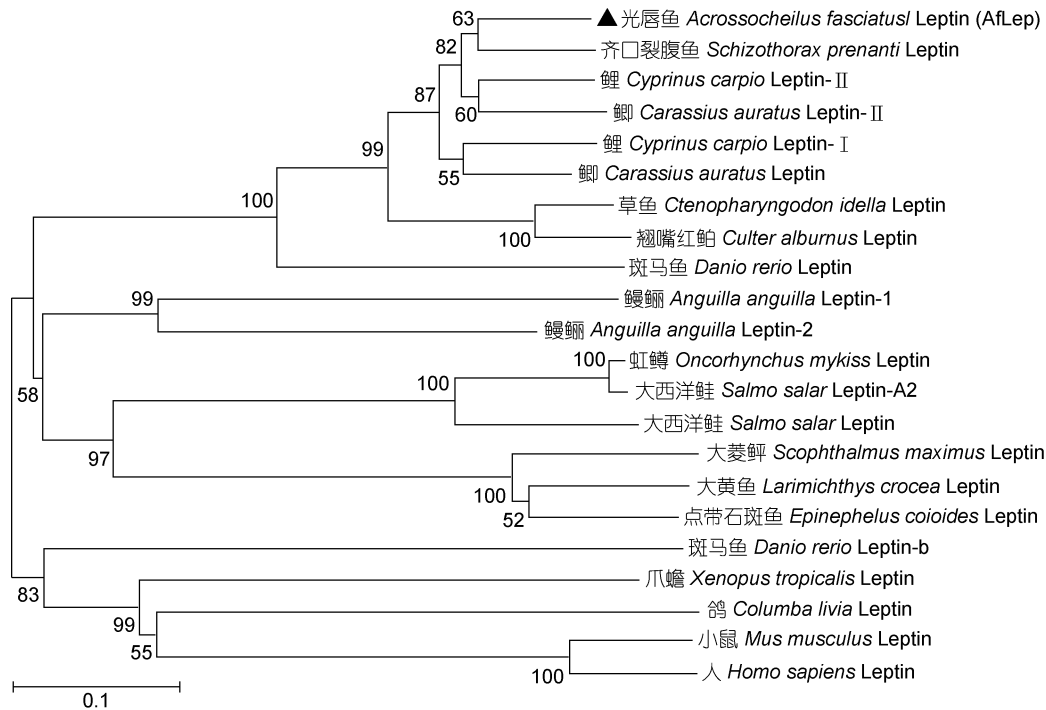


图 2 Leptin 系统进化树(NJ 法, bootstraps=1000)

Fig.2 The phylogenetic tree of Leptin (neighbor-joining method, bootstraps=1000)

Leptin 的相似性较低(30%左右), 而与两栖类、鸟类和哺乳类等其他脊椎动物 Leptin 相似性仅约 20%。

序列比对(图 3)显示光唇鱼、齐口裂腹鱼、鲤等鲤科鱼类的 Leptin 氨基酸序列较为保守, 而非鲤科

鱼类以及其他脊椎动物的 Leptin 序列差异较大; 但各种动物 Leptin 蛋白的二级结构高度保守, 均有 4 个α螺旋(Helix A-D), 且具有长度约 20aa 的信号肽。预测的 AfLep 蛋白三级空间结构也与 Leptin 蛋白相似(图 4)。

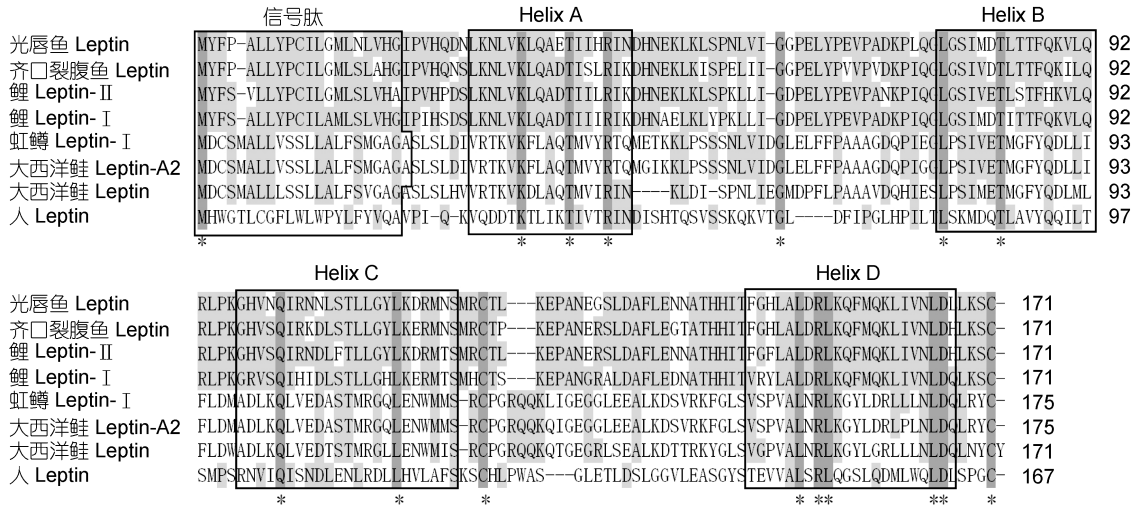


图 3 AfLep 与其他生物 Leptin 氨基酸序列比对

Fig. 3 Amino acid sequence alignment among AfLep and Leptin of other species

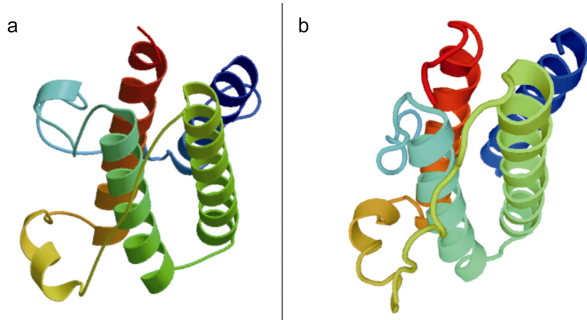


图 4 Leptin 蛋白三级结构

Fig.4 The tertiary structures of Leptin protein  
注: a: AfLep; b: 人 Leptin

2.2 组织表达特征

半定量 RT-PCR 检测显示了 AfLep 基因在光唇鱼肝脏中的表达量最高, 其次是脑和肾, 在肌肉、脾、心脏、鳃和肠等组织中仅有微弱表达(图 5)。

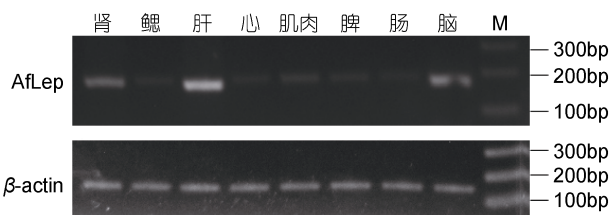


图 5 AfLep 基因在光唇鱼各组织中的表达

Fig.5 The expression of AfLep gene in various tissues of *A. fasciatus*

2.3 禁食及再投喂后光唇鱼肝脏 AfLep 基因的表达变化

经实时荧光定量 PCR 检测(图 6), 禁食后光唇鱼肝脏中 AfLep 基因表达显著下调( $P < 0.05$ ), 且表达水平随禁食时间延长而逐渐降低: 禁食 1d、3d、7d 后 AfLep 基因表达量分别比禁食前(0d)降低了 58.25%、73.82%和 92.05%。禁食-再投喂后 AfLep 基因表达上调, 其中禁食 1d 组和禁食 3d 组分别显著升高了 1.79 倍和 2.65 倍( $P < 0.05$ ), 而禁食 7d 组的表达水平仅略有升高、差异不显著( $P > 0.05$ )。

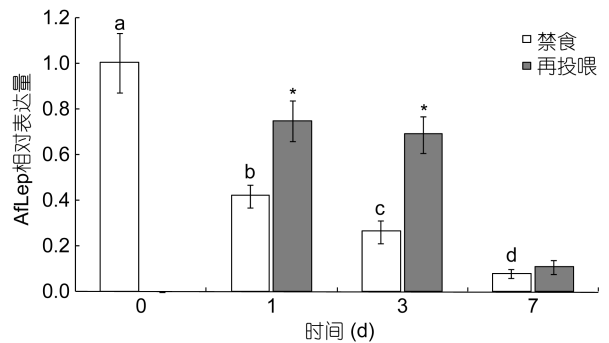


图 6 禁食及再投喂后光唇鱼肝脏中 AfLep 基因表达变化  
Fig.6 Changes in expression of AfLep in liver of *A. fasciatus* during fasting and after refeeding

注: 无相同小写字母表示禁食不同时间点 AfLep 表达量有显著差异; \*表示禁食与再投喂后 AfLep 表达量有显著差异

### 3 讨论

自 Zhang 等(1994)率先在小鼠中得到 Leptin 基因以来, 已在包括鱼类在内的脊椎动物各类群中都发现有与哺乳类 Leptin 同源的基因存在。在哺乳动物及非洲爪蟾的基因组中 Leptin 基因仅有 1 个拷贝、编码 1 种蛋白, 而在某些鱼类中则发现存在多个拷贝以及不同的 Leptin 蛋白亚型(Kurokawa *et al*, 2009; Angotzi *et al*, 2013; 卢荣华等, 2015), 这可能与鱼类在进化过程中发生过基因组复制有关(周莉等, 2006)。另外, 鱼类中 Leptin 基因的起源进化关系也比较复杂, 例如鲤(*C. carpio*)2 个 Leptin 基因拷贝所编码的蛋白相似性较高(84%), 而斑马鱼(*D. rerio*)中 2 个 Leptin 蛋白亚型的相似性却仅有 24%(卢荣华等, 2015)。本研究通过同源克隆从光唇鱼中获得了一个 Leptin 基因(AfLep), 但不能确定光唇鱼基因组中是否还存在该基因的其他拷贝。

在本研究构建的 Leptin 系统进化树中, 包括光唇鱼 AfLep 在内的各种鲤科鱼类 Leptin 聚为一簇, 其氨基酸序列相似性在 80%以上, 而非鲤科鱼类 Leptin 的相似性仅 30%左右。鱼类不同科、目之间 Leptin 氨基酸序列有较大差异, 这可能与鱼类种系发生和系统进化关系复杂有关; 但研究显示在各种脊椎动物基因组中 Leptin 基因有着相似的线性排列, 表明它们可能有相同的起源; 并且各类动物 Leptin 蛋白二级结构高度保守, 均含 2 个半胱氨酸和形成 4 个 $\alpha$ 螺旋(卢荣华等, 2015; 张沛等, 2016); 本研究预测的光唇鱼 AfLep 蛋白的空间结构也与人类 Leptin 蛋白相似。结构上的保守可能对 Leptin 蛋白的稳定性和活性有重要影响, 而氨基酸序列的低相似性则反映了 Leptin 基因在物种进化中的差异, 这种差异可能导致该基因在不同生物中功能的多样化。

小鼠等哺乳动物中 Leptin 基因主要在脂肪组织表达(Trayhurn *et al*, 1995), 两栖类 Leptin 则是脑和心脏中表达量较高。在光唇鱼肝脏中 AfLep 基因高表达, 斑马鱼(*D. rerio*)、花鲈(*Lateolabrax maculatus*)、鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)、点带石斑鱼(*E. coioides*)等鱼类中也是肝脏中 Leptin 基因表达量最高(Gorissen *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2013; 张沛等, 2016; Yuan *et al*, 2016); 但也有些鱼类在其他组织中出现 Leptin 的高表达, 如团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)肾脏、鳃、肠、性腺中 Leptin 的表达量远均高于肝脏(赵鸿昊等, 2016), 大西洋鲑(*S. salar*)Leptin 则是在脑中表

达量最高、肌肉中也有较高表达(Ronnestad *et al*, 2010); Leptin 基因组织表达的这种差异性提示该基因在鱼类中可能有多种功能, 并且在不同鱼类中的功能可能有较大差异。

在人、小鼠等哺乳动物中的实验显示饥饿后 Leptin 基因表达量和血浆 Leptin 蛋白水平显著降低、进食后升高(Kolaczynski *et al*, 1995; Saladin *et al*, 1995; Trayhurn *et al*, 1995; Weigle *et al*, 1997)。本研究中 AfLep 在光唇鱼肝脏中的表达也表现为禁食后显著降低、恢复喂食后升高, 提示该基因有降低食欲的作用, 在草鱼(*C. idella*)、金鱼(*C. auratus*)、鲈鱼(*Morone saxatilis*)、虹鳟(*O. mykiss*)等鱼类中也得到了相似的结果(卢荣华等, 2015), 但在点带石斑鱼(*E. coioides*)和虹鳟(*O. mykiss*)中则发现禁食后 Leptin 基因表达上调、血浆 Leptin 蛋白含量升高(Kling *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2013)。这可能与不同鱼类在摄食和糖、脂代谢管理方式上有着很大的差异有关, 例如通常情况下机体处于饥饿状态时会分解脂肪提供能量, 但真鲷(*Pagrus major*)幼鱼经过短期饥饿后却出现了脂肪含量的升高(Kaneko, 2016); 而肉食性和植食性鱼类在糖代谢上也有很大不同(Moon, 2001)。另外, 本研究中禁食 1d 和 3d 的光唇鱼在摄食后肝脏 AfLep 基因表达量均显著升高, 提示此时鱼体的能量储备可能消耗不大; 而禁食 7d 组摄食后肝脏 AfLep 基因表达仍处于较低水平, 提示鱼体脂肪消耗过多、需摄取更多食物进行补充。贺诗水等(2016)也发现鲫鱼(*Carassius auratus*)饥饿 4d 后脂肪含量仅下降了约 10%, 而饥饿 6d 后已减少了 50%以上。虽然本研究表明 AfLep 基因参与了光唇鱼的摄食管理, 但要弄清其作用机制以及在能量代谢中的功能仍需进一步研究。

### 参 考 文 献

- 王 婷, 刘利平, 陈桃英等, 2015. 鳗鲡(*Anguilla japonica*)性腺发育和饥饿胁迫下生物学指标及体内蛋白质与氨基酸含量变化. 海洋与湖沼, 46(6): 1373—1379
- 卢荣华, 孙君君, 梁旭方等, 2015. 鱼类 leptin 的生物学特性及功能. 水生生物学报, 39(3): 583—589
- 张 沛, 温海深, 迟美丽等, 2016. 花鲈瘦素基因的克隆及低盐度条件下调控表达分析. 大连海洋大学学报, 31(1): 13—18
- 周 莉, 汪 洋, 桂建芳, 2006. 鱼类特异的基因组复制. 动物学研究, 27(5): 525—532
- 赵鸿昊, 李学华, 曾 聪等, 2016. leptin 基因在团头鲂成鱼各组织和早期发育中的表达分析. 华中农业大学学报, 35(1): 92—98
- 贺诗水, 王洪凯, 蒋万祥等, 2016. 上市前短期饥饿对鲫鱼肌

- 肉品质的影响. 食品工业科技, 37(1): 334—337
- 潘娜, 苗亮, 李星云等, 2015. 浙江新光唇鱼 (*Acrossocheilus*) COII 和 D-loop 基因克隆及系统发育分析. 海洋与湖沼, 46(2): 381—388
- Aguilar A J, Conde-Sieira M, Polakof S *et al*, 2010. Central leptin treatment modulates brain glucosensing function and peripheral energy metabolism of rainbow trout. *Peptides*, 31(6): 1044—1054
- Angotzi A R, Stefansson S O, Nilsen T O *et al*, 2013. Molecular cloning and genomic characterization of novel leptin-like genes in salmonids provide new insight into the evolution of the leptin gene family. *General and Comparative Endocrinology*, 187: 48—59
- Copeland D L, Duff R J, Liu Q *et al*, 2011. Leptin in teleost fishes: an argument for comparative study. *Frontiers in Physiology*, 2: 26
- de Pedro N, Martínez-Álvarez R, Delgado M J, 2006. Acute and chronic leptin reduces food intake and body weight in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Endocrinology*, 188(3): 513—520
- 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
- Kaneko G, Shirakami H, Yamada T *et al*, 2016. Short-term fasting increases skeletal muscle lipid content in association with enhanced mRNA levels of lipoprotein lipase 1 in lean juvenile red seabream (*Pagrus major*). *Aquaculture*, 452: 160—168
- 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
- Klok M D, Jakobsdottir S, Drent M L, 2007. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity Reviews*, 8(1): 21—34
- Kolaczynski J W, Considine R V, Ohannesian J *et al*, 1995. Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes*, 45(11): 1511—1515
- Kurokawa T, Murashita K, 2009. Genomic characterization of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. *General and Comparative Endocrinology*, 161(2): 229—237
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Moon T W, 2001. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2—3): 243—249
- 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
- Sahu A, 2004. Minireview: a hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology*, 145(6): 2613—2620
- Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M *et al*, 1995. Transient increase in *obese* gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*, 377(6549): 527—528
- Trayhurn P, Thomas M E A, Duncan J S *et al*, 1995. Effects of fasting and refeeding on *ob* gene expression in white adipose tissue of lean and obese (*ob/ob*) mice. *FEBS Letters*, 368(3): 488—490
- Weigle D S, Duell P B, Connor W E *et al*, 1997. Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(2): 561—565
- Yuan X C, Li A X, Liang X F *et al*, 2016. Leptin expression in mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basilewsky): regulation by postprandial and short-term fasting treatment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 194: 8—18
- 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

## CLONING AND EXPRESSION OF LEPTIN GENE IN *ACROSSOCHEILUS FASCIATUS* DURING FASTING AND REFEEDING

MU Fang-Shen, MIAO Liang, LI Ming-Yun, HOU Hong-Hong, LI Xiao-Meng, XU Yu-Min  
(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract** Leptin plays an important role in regulation of food intake and energy expenditure in animals. To study the structure and function of Leptin gene in commercial fish *Acrossocheilus fasciatus*, we cloned the cDNA sequence of Leptin gene in *A. fasciatus*, named AfLep. The full-length of AfLep cDNA sequence was 1315bp, contained an open reading frame (ORF) of 516bp encoding 171 amino acids; and the initiative 20 amino acid consisted of signal peptide. In the phylogenetic tree, AfLep gathered with Leptin of other Cyprinidae fish and was most closely related to Leptin of *Schizothorax prenanti*. The multiple sequence alignment showed that AfLep shared the highest amino acid sequence identify (86.7%) with Leptin of *S. prenanti*, and had more than 80% sequence identity to other Cyprinidae fish. The predicted protein of AfLep has four  $\alpha$  helices regions, which is conserved in vertebrates. The predicted tertiary structure of AfLep is similar to human Leptin. AfLep gene had the highest expression level in liver, followed by brain and kidney, and weakly expressed in other tissues. Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) showed that the expression of AfLep decreased significantly in liver after being fasted ( $P<0.05$ ), and reduced by 58.25%, 73.82%, and 92.05% after fasting 1d, 3d, and 7d, respectively, compared to pre-fasting. When the fish were refed 1d and 3d after fasting, the expression level of AfLep in liver significantly increased ( $P<0.05$ ), but in the group of fasting 7d the AfLep expression was slightly elevated after refeeding ( $P>0.05$ ). All these results indicate that AfLep participates in the adjustment of feeding regulation and energy metabolism.

**Key words** *Acrossocheilus fasciatus*; Leptin gene; tissue expression; fasting and refeeding