

银鲳(*Pampus argenteus*)胰岛素基因的分子鉴定 及其与卵黄原蛋白基因的关联表达*

杨 阳^{1,2} 宁 超³ 王亚军³

(1. 浙江省海洋水产研究所 浙江舟山 316021; 2. 浙江省海水增殖重点实验室 浙江舟山 316021; 3. 宁波大学海洋学院 浙江宁波 315832)

摘要 胰岛素(Insulin, Ins)作为动物体内最保守的小分子蛋白,是调控血糖、脂肪和蛋白质代谢的重要激素,同时也对卵生动物的卵黄合成发挥着重要作用,但在鱼类中研究相对较少。为探讨银鲳胰岛素对卵黄合成的影响,从转录组数据中获得了银鲳 3 个胰岛素 *insulin* (*ins*)、*insulin-like* (*ins-like*) 和 *insulin-2* (*ins-2*) 基因全长 cDNA 序列。序列分析表明,银鲳 3 个胰岛素基因的氨基酸序列具有胰岛素基因的典型特征,包含 NH₂ 端分泌的信号肽和由 B 链、C 链和 A 链组成的 IIGF。系统进化树分析表明,哺乳类 *ins* 单独为一簇,鱼类 *ins* 和 *ins-2* 成一簇及鱼类 *ins-like* 单独成一簇。组织表达特征分析表明,银鲳胰岛素家族 3 个基因 *ins*、*ins-2* 和 *ins-like* 在各个组织中广泛表达,但是不同组织的 3 个基因表达水平不相同。对不同发育阶段的银鲳肝脏和卵巢组织中 3 个胰岛素基因和 3 个卵黄蛋白原(*vitellogenin*, *vtg*) 基因的表达量进行了分析,结果显示,所有银鲳 *ins* 和 *vtg* 基因在肝脏和卵巢中的表达趋势一致,从 期至 期肝脏和卵巢中逐渐升高,并在 期达到最高值,从 期至 期表达量显著下降。研究结果表明,鱼类胰岛素与卵黄原蛋白在肝脏和卵巢表达具有相同趋势,这是首次在鱼类中研究胰岛素基因与性腺发育相关性的研究。而根据昆虫中已报道胰岛素直接调控卵黄原蛋白的合成,我们推测鱼类中胰岛素可能也参与调控卵黄蛋白的合成,两者密切相关,可为深入探究鱼类胰岛素基因的功能和机制提供新思路。

关键词 胰岛素; 卵黄蛋白原; 卵巢; 肝脏; 银鲳

中图分类号 Q789; Q956; S965 doi: 10.11693/hyhz20220500117

胰岛素(insulin, Ins)是动物体内最重要的内分泌激素,能调控动物的生长、发育和代谢等各个方面,具有广泛的生物学功能(鲁程瑶等, 2018; 罗智等, 2018)。Ins 结构保守,由两个多肽组成,保守的 A 链和 B 链,中间由二硫键组成(Caruso *et al.*, 2011; Irwin, 2019)。哺乳动物中,Ins 仅由一个 *ins* 基因编码合成,是唯一降低血糖的激素,由胰岛 β 细胞合成和分泌,通过与胰岛素受体(insulin receptor, IR)特异性结合激活信号转导,从而调控糖、脂肪和蛋白质代谢(罗智等, 2018; Irwin, 2019)。胰岛素基因广泛存在于哺乳动物和鱼类中,同源基因胰岛素样多肽(insulin-like peptides,

ILPs)也广泛存在无脊椎动物中包括埃及伊蚊中发现了 8 个 ILPs (Brown *et al.*, 2008)和大多数鱼类具有多个 *ins* 基因等(Irwin, 2004, 2019)。近年来,越来越多的研究还发现,Ins 的作用与低等到高等生物的生殖密切相关,调控了动物的繁殖等活动(Caruso *et al.*, 2011; 谢鹏飞等, 2018; 彭竹清等, 2019)。

卵黄合成,又称卵黄发生,是卵生动物卵巢发育过程中最为重要的一环。卵子中的卵黄蛋白(yolk protein, YP)含有大量营养物质,包括蛋白质、脂肪和维生素等,可为早期胚胎发生和发育提供所需的营养和功能性物质(Reading *et al.*, 2011; 周阳等, 2017)。

* 浙江省海水增殖重点实验室开放课题项目, 2021KF004 号; 宁波市公益类科技计划项目, 2020N3035 号。杨 阳, 博士, 助理研究员, E-mail: yangyang19911105@163.com

收稿日期: 2022-05-03, 收修改稿日期: 2022-07-26

卵黄蛋白的前体是卵黄原蛋白(vitellogenin, Vtg), Vtg的合成受基因表达调控, 鱼类中主要在肝胰脏合成, 节肢动物中主要在脂肪体合成, 后经血液循环运送至卵母细胞表面, 经细胞膜上受体介导的内吞作用而被吸收入细胞内, 储存在卵黄颗粒中(周阳等, 2017; Sullivan *et al.*, 2018)。无脊椎动物如昆虫和甲壳动物中, 研究证实 *ins* 信号对卵巢发育, 尤其是卵黄合成具有重要的调控作用(Richard *et al.*, 2005; Parthasarathy *et al.*, 2011; Sheng *et al.*, 2011), 但在脊椎动物鱼类中关于 *ins* 信号对卵巢发育的研究还未见报道。果蝇中, 胰岛素蛋白基因突变会导致雌性不育, 卵母细胞停留在卵黄发生前阶段, 卵子不能成熟(Richard *et al.*, 2005)。研究发现胰岛素能够通过促进保幼激素(juvenile hormone, JH)和蜕皮激素合成, 促进卵黄合成(Brown *et al.*, 2008; Sheng *et al.*, 2011)。另一方面, 近期研究还发现胰岛素能直接调控卵黄发生, 在动物卵巢发育中发挥重要作用(Richard *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2017)。鱼类作为一类卵生动物, 卵巢发育中也需要合成大量卵黄原蛋白, 在卵子发生及胚胎发育过程中发挥重要作用。同时, 越来越多研究发现大多数硬骨鱼在卵巢发育中可见卵黄合成受阻, 卵母细胞发育停止并退化的现象(González-Kother *et al.*, 2020; 强俊等, 2021)。然而目前, 有关调控鱼类卵黄合成的研究还较少, 尤其关于胰岛素与卵黄合成关联的研究还未见报道。

银鲳(*Pampus argenteus*)属硬骨鱼纲(Osteichthyes), 鲈形目(Perciformes), 鲳亚目(Stromaeoidei), 鲳科(Stromateidae), 鲳属(*Pampus*), 是一种重要的海洋经济鱼类, 主要分布于中国、日本等亚洲海域, 科威特、伊拉克海域的阿拉伯湾及印度孟加拉湾等印度洋和西太平洋(James *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2021)。银鲳因其味道鲜美, 营养丰富且组成合理, 深受人们喜爱, 具有开阔的市场前景。作为一种极具前景的水产养殖物种, 近年来银鲳在人工养殖及繁育方面已有突破, 但银鲳在繁殖时期的受精卵质量与数量低下, 是制约银鲳规模化养殖的主要原因之一(施兆鸿等, 2009)。早期研究发现银鲳卵巢发育过程中还存在大量卵泡闭锁现象(王腾飞等, 2017)。鉴于胰岛素在卵黄合成中的重要作用, 本研究从肝脏转录组中获得了银鲳 *insulin* (*ins*)、*insulin-like* (*ins-like*)和 *insulin-2* (*ins-2*) 基因的 cDNA 序列, 拟分析分子特征、进化关系及组织分布, 解析其和 *vtg* 基因在卵巢发育过程中在肝脏和卵巢组织中的表达变化。研究结果不仅丰富鱼类胰

岛素基因的研究, 也为探讨卵黄合成的调控机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验样品

不同性腺发育时期的银鲳(2019年2~5月), 采自浙江象山港湾水产苗种养殖基地。所采样品均为1龄, 体重为(44.05±10.34) g。饲养温度 20~25 °C, 盐度 24±0.8, 溶解氧(7.35±0.05) mg/L, 光照周期为光照 14 h, 黑暗 10 h, 每天定时投喂 6 次人工配合饵料。共采样 5 次, 每次约 30 尾。通过 MS-222 麻醉后进行快速地解剖。根据性腺形态学判断雌雄, 其中每尾雌鱼的 1/2 卵巢组织固定于波恩试剂中, 24 h 后置换为 70%乙醇, 再 24 h 后更换一次 70%乙醇, 并长期保存, 另 1/2 卵巢组织保存于-80 °C 冰箱备用。此外, 解剖脑、心脏、肾脏、脾脏、鳃、鳍、胃、肠、皮肤、肌肉、精巢、肝脏组织也保存于-80 °C 冰箱备用。

1.2 胰岛素基因 cDNA 序列获得及序列分析

从银鲳肝脏转录组测序结果中获得 3 个 *ins*、*ins-2* 和 *ins-like* 的 cDNA 序列, 利用 Primer5.0 设计引物。按照总 RNA 提取试剂盒(Fastagen, RNAfast200 试剂盒)操作方法提取肝脏组织总 RNA, 用反转录试剂盒(TaKaRa, EasyScript® All-in-One First-Strand cDNA Synthesis 试剂盒)将 RNA 反转录成总 cDNA。利用特异性引物进行 PCR 扩增, 获得 3 个胰岛素基因的 cDNA 序列, 经 TA 克隆后送有康公司测序验证。3 个胰岛素家族基因的开放阅读框(ORF)采用 NCBI ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)查找; 运用软件 DNAMAN8.0 将 cDNA 序列翻译成氨基酸序列; 使用生物序列分析中心(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)的 SignalIP 4.1 鉴定潜在的信号肽及信号肽切割位点; 使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行氨基酸结构域分析; 通过 MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>)进行氨基酸多重序列比对分析; 使用 LALIGN (<http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN-form.html>)计算同源基因的相似性(similar)和同一性(identity)百分比; 使用 MEGA-X 软件, 在最佳拟合模型下构建系统发育 NJ 树, 重复 1 000 次, 并可可视化。

1.3 组织切片学观察

波恩试剂固定后长期保存于 70%乙醇的性腺组织, 逐步更换 80%、90%、95%、100%乙醇, 再经二甲苯透明石蜡浸泡后包埋于石蜡中, 以 5~8 μm 厚度

切片,用苏木精-伊红染色,最后经光学显微镜观察和拍照。

1.4 RNA 提取和反转录

按照总 RNA 提取试剂盒(Fastagen, RNAfast200 试剂盒)操作方法提取卵巢、脑、心脏、肾脏、脾脏、腮、鳍、胃、肠、皮肤、肌肉、精巢、肝脏组织总 RNA,用反转录试剂盒(TaKaRa, EasyScript® All-in-One First-Strand cDNA Synthesis 试剂盒)将 RNA 反转录成 cDNA,并储存于-20 °C 备用。

1.5 采用 qRT-PCR 检测银鲟胰岛素基因(*ins*, *ins-2* 和 *ins-like*)和卵黄原蛋白基因(*vtgAa*, *vtgAb* 和 *vtgB*)表达

采用 qRT-PCR 对卵巢、脑、心脏、肾脏、脾脏、腮、鳍、胃、肠、皮肤、肌肉、精巢、肝脏组织中 3 个胰岛素基因包括 *ins*、*ins-2* 和 *ins-like* 的表达量进行检测分析,同时采用 qRT-PCR 对 5 个不同发育时期的卵巢和肝脏组织中胰岛素基因(*ins*, *ins-2* 和 *ins-like*)和卵黄蛋白基因(*vtgAa*, *vtgAb* 和 *vtgB*)进行检测分析。*18S* 和 β -*actin* 作为内参基因,所有基因引物以 Premier 5.0 设计且引物序列信息如表 1 所示。按照 SYBR PreMix Ex Taq 试剂盒说明书要求在 Quantagene q225 荧光定量 PCR 仪上进行 qRT-PCR 实验,每个样品重复 3 次。

表 1 各基因荧光定量引物
Tab.1 The primer sequences of each gene for qRT-PCR

引物名称	引物序列
<i>ins</i> -F	5'-CGAGTGAGACCGCAATGGA-3'
<i>ins</i> -R	5'-CTCCACGATGCCTCGCTTCA-3'
<i>ins-2</i> -F	5'-AGAGCCAAACAGGAGCAGCA-3'
<i>ins-2</i> -R	5'-ATGGCAGCACTGCTCAACGA-3'
<i>ins-like</i> -F	5'-CCCACGGAAGACACCGACTC-3'
<i>ins-like</i> -R	5'-GATGCTGCAGGGCCTGTGA-3'
<i>vtgAa</i> -F	5'-GCCAGGACACCAAGTGCTAC-3'
<i>vtgAa</i> -R	5'-ATGAGCTTCTGCGCTTTCCC-3'
<i>vtgAb</i> -F	5'-GCGTGTGGCCAGATTTGAGA-3'
<i>vtgAb</i> -R	5'-CAGCAGAGCTTGAGCAGCTT-3'
<i>vtgC</i> -F	5'-AAAGCCTTCGCCATGAGTGG-3'
<i>vtgC</i> -R	5'-TGCTTCGGCGTGTAGTAGA-3'
<i>18S</i> -F	5'-GGTTTTCTCTCTGAACTGGGG-3'
<i>18S</i> -R	5'-CCTCCGACTTTCGTTCTTGAT-3'
β - <i>actin</i> -F	5'-ACCCAGATCATGTTTCGAGACC-3'
β - <i>actin</i> -R	5'-ATGAGGTAGTCTGTGAGGTCG-3'

1.6 数据分析

根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各个基因 mRNA 的相对表达量,

所有结果以平均值±标准误表示($n=3$),数据分析采用单因素方差分析(One-way ANOVA),然后进行 *t* 检验,显著性用 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 表示。

2 实验结果

2.1 胰岛素基因(*ins*, *ins-2* 和 *ins-like*) cDNA 序列分析

银鲟 *ins* 基因 cDNA 全长 473 bp (GenBank 登录号: BankIt2574894),其中包括一个长度为 318 bp 的 ORF,编码 105 个氨基酸,预测蛋白分子量大小为 11.86 kDa; *ins-2* 基因 cDNA 全长 351 bp (GenBank 登录号: BankIt2574894),编码 116 个氨基酸,预测蛋白分子量大小为 12.95 kDa; *ins-like* 基因 cDNA 全长 336 bp (GenBank 登录号: BankIt2574894),编码 111 个氨基酸,预测蛋白分子量大小为 12.58 kDa。蛋白结构域分析结果表明,银鲟 *ins*、*ins-2* 和 *ins-like* 基因氨基酸序列均由位于 N 端的信号肽(signal peptide)和 2 个属于胰岛素多肽 A 链和 B 链组成的 IIGF (胰岛素/胰岛素样生长因子/松弛素家族)构成(图 1),属于胰岛素家族成员。

2.2 胰岛素基因(*ins*, *ins-2* 和 *ins-like*)的系统进化分析

多序列分析结果表明,银鲟 *ins*、*ins-2* 和 *ins-like* 氨基酸序列之间的同一性(identity)为 48%~56%,相似性(similar)为 70%~77%。根据部分哺乳类和鱼类 *ins*、*ins-2* 和 *ins-like* 以及无脊椎动物 ILPs 的氨基酸全序列构建系统进化树,结果显示银鲟 *ins-like* 与三湖慈鲷(*Pundamilia nyererei*)同源性最高,同一性为 84.7%,相似性为 96.4%,聚类分析显示无脊椎动物 *ins-like* 和哺乳类 *ins* 均单独为一簇,鱼类 *ins* 和 *ins-2* 成一簇以及鱼类 *ins-like* 单独成一簇(图 2)。

2.3 卵巢组织学观察

组织学观察卵巢组织,将卵巢划分为五个时期:从 II 期到 VI 期。II 期卵巢,可见大量核仁核周和初级卵母细胞(图 3a)。核仁核周卵母细胞的细胞核明显,同时具有一个大的核仁。初级卵母细胞大的核仁消失,多个小的核仁出现。III 期卵巢,可见大量卵黄发生前卵母细胞,细胞由椭圆形转变呈多边形,多个小的核仁排列在细胞核膜上,细胞质中出现泡状小体,卵母细胞表面的放射带和两层滤泡细胞层清晰可见(图 3b)。IV 期卵巢,可见大量卵黄发生中卵母细胞,1~2 层的黄红色卵黄颗粒开始出现在卵母细胞细胞膜周围,细胞核周围出现一团致密深色颗粒(图 3c)。V 期卵巢,可见大量卵黄发生后卵母细胞,细胞直径 500~800 μ m。卵黄颗粒填充细胞质大部分,细胞核体

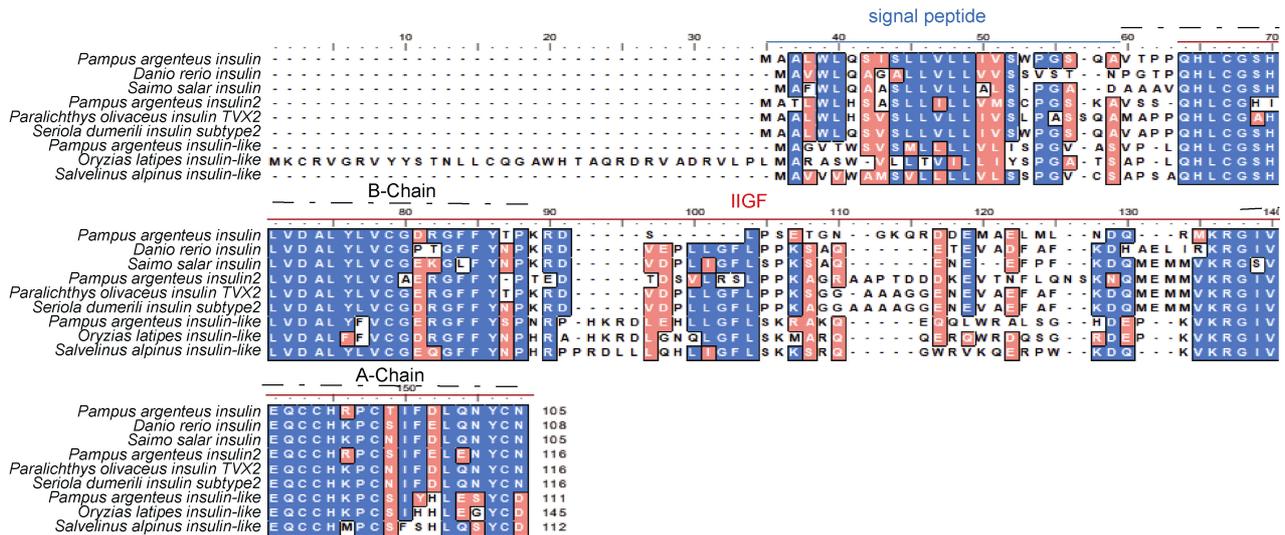


图 1 银鲟与部分鱼类的胰岛素基因多重比对

Fig.1 Multiple alignment of insulin amino acid sequences of silver pomfret and other fish

注: signal peptide: 信号肽结构; B-chain: B 链, A-chain: A 链; IIGF: 胰岛素/胰岛素样生长因子/松弛素家族; 蓝色阴影: 完全相同的氨基酸, 粉色阴影: 部分相同的氨基酸。 *Pampus argenteus*: 银鲟; *Danio rerio*: 斑马鱼; *Salmo salar*: 大西洋鲑; *Paralichthys olivaceus*: 牙鲆; *Oryzias latipes*: 青鳉; *Salvelinus alpinus*: 北极红点鲑

积减小, 放射带明显加粗(图 3d)。VI 期卵巢, 可见大量为成熟卵细胞。卵细胞体积达到最大阶段, 直径为 800~1 300 μm 左右。卵母细胞细胞质充斥大量卵黄颗粒, 在制作切片中甚至有卵黄颗粒掉落(图 3e)。

2.4 不同组织中银鲟胰岛素基因(*ins*, *ins-2* 和 *ins-like*) 的表达分析

用 qRT-PCR 检测了 *ins*、*ins-2* 和 *ins-like* 基因不同组织中的相对表达水平, 包括肝、脑、心、脾、肾、鳃、卵巢、精巢、胃、肠、肌肉、鳍和皮肤。如图 4 所示, *ins*、*ins-2* 和 *ins-like* 基因在各个组织中均有表达, 其中 *ins* 基因显著高表达在脾中, 在其他各组织中表达量相近, *ins-like* 和 *ins-2* 基因显著高表达在肝和脾中, 在其他各组织中表达量相对较低。

2.5 银鲟不同时期卵巢和肝脏中胰岛素基因和卵黄原蛋白基因的表达分析

在根据组织观察划分的卵巢不同发育时期, 采用 qRT-PCR 测定肝脏和卵巢组织中 *ins*、*ins-2*、*ins-like*、*vtgAa*、*vtgAb* 和 *vtgB* 基因的 mRNA 相对量。结果显示, 3 个胰岛素基因和 3 个卵黄蛋白原基因在肝脏和卵巢中的表达趋势一致, 从 II 期至 IV 期肝脏和卵巢中逐渐升高, 并在 IV 期达到最高值, 从 IV 期至 VI 期表达量显著下降(图 5)。在不同时期肝脏中, 胰岛素基因中 *ins-2* 和 *ins-like* 基因表达量最高, *ins* 基因表达量最低, 卵黄原蛋白基因中 *vtgAb* 基因表达量最高, *vtgAa* 和 *vtgB* 基因表达量较低, 在不同卵巢时期

中, 胰岛素基因中 *ins* 和 *ins-2* 基因表达量最高, *ins-like* 基因表达量最低, 卵黄原蛋白基因中 *vtgB* 基因表达量最高, *vtgAa* 和 *vtgAb* 基因表达量较低。

3 讨论

3.1 银鲟胰岛素基因(*ins*, *ins-2* 和 *ins-like*)的鉴定及分析

胰岛素是被广泛研究的肽激素, 调控动物生长、发育、代谢、繁殖及免疫等多项生命活动(Boucher *et al*, 2014)。本文从转录组测序数据中获得了银鲟 *ins*、*ins-2* 和 *ins-like* cDNA 序列, 分别为 318 bp、351 bp 和 409 bp, 编码氨基酸长度分别为 105 aa、116 aa 和 111 aa。序列分析显示银鲟 *ins*、*ins-2* 和 *ins-like* 氨基酸序列具有胰岛素基因的典型特征, 与其他鱼类的同源基因类似, 包含 NH-2 端分泌信号肽(signal peptide)和由 B 链、不保守的 C 链和 A 链组成的 IIGF。哺乳动物中 *Ins* 仅由一个 *ins* 基因编码合成, 由胰腺细胞生成, 是调节血糖水平的关键因子, 反应于高血糖水平, 导致肝脏和脂肪等组织吸收葡萄糖, 从而储备能量(White *et al*, 1994; Boucher *et al*, 2014)。但相比于哺乳动物, 有关鱼类胰岛素的研究较少。目前, 大约有 30 多种鱼类的胰岛素基因被发现(罗智等, 2018)。不同鱼类胰岛素的氨基酸序列相对保守(罗智等, 2018), 然而大多数鱼类, 如斑马鱼和虹鳟等中发现存在 2 个胰岛素基因 *ins* 和 *ins-2* (Irwin, 2004; Caruso

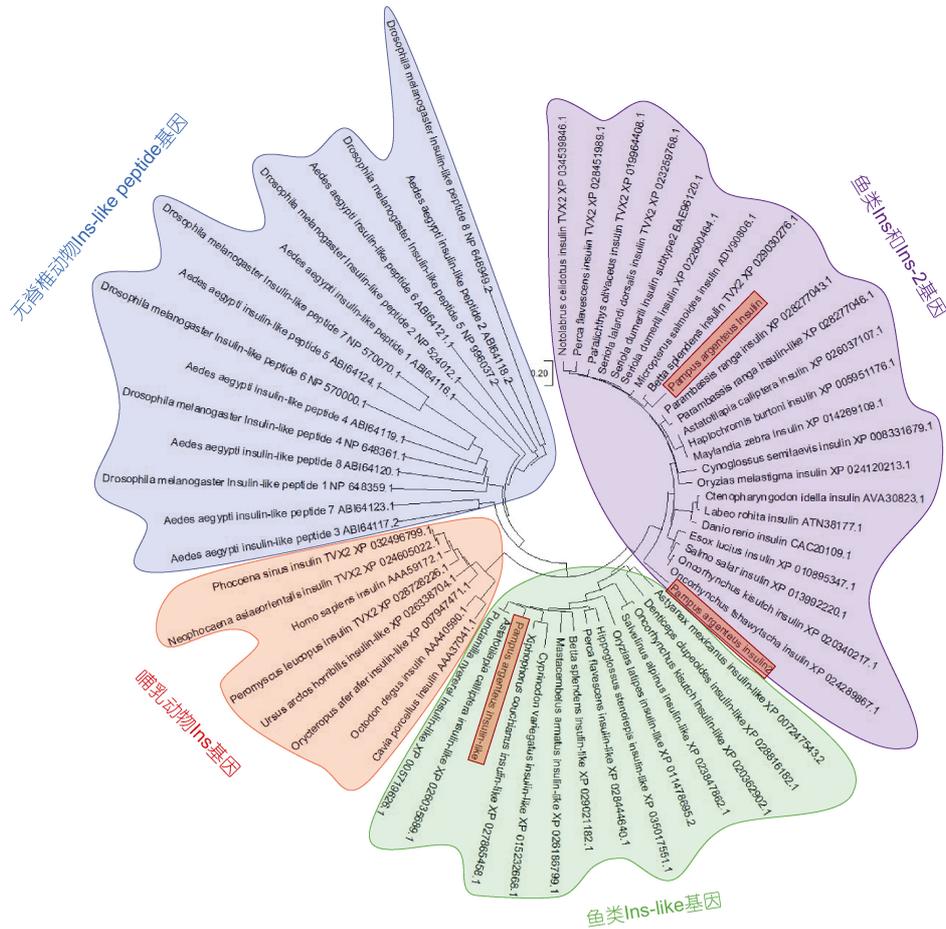


图2 银鲟和其他动物胰岛素全长氨基酸序列构建的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of the full-length amino acid sequences of silver pomfret and other animals insulin genes
 注: *Pampus argenteus*: 银鲟; *Danio rerio*: 斑马鱼; *Micropterus salmoides*: 大口黑鲈; *Haplochromis burtoni*: 伯氏妊丽鱼; *Esox lucius*: 白斑狗鱼; *Oncorhynchus kisutch*: 银大麻哈鱼; *Parambassis ranga*: 印度玻璃鱼; *Astatotilapia calliptera*: 快乐东方鲷; *Cynoglossus semilaevis*: 半滑舌鲷; *Maylandia zebra*: 斑马拟丽鱼; *Oncorhynchus tshawytscha*: 大鳞大麻哈鱼; *Oryzias melastigma*: 海水青鳉; *Ctenopharyngodon idella*: 草鱼; *Labeo rohita*: 暹罗塔野鲮; *Seriola dumerili*: 高体鲷; *Salmo salar*: 大西洋鲑; *Perca flavescens*: 黄鲈; *Seriola lalandi dorsalis*: 黄条鲷; *Betta splendens*: 暹罗斗鱼; *Paralichthys olivaceus*: 牙鲆; *Notolabrus celidotus*: 新西兰背唇隆头鱼; *Peromyscus leucopus*: 白足鼠; *Neophocaena siaeorientalis*: 长江江豚; *Phocoena sinus*: 加湾鼠海豚; *Octodon degus*: 灌丛八齿鼠; *Homo sapiens*: 智人; *Cavia porcellus*: 豚鼠; *Xiphophorus couchianus*: 库舍剑尾鱼; *Mastacembelus armatus*: 大刺鲃; *Oryzias latipes*: 青鳉; *Salvelinus alpinus*: 北极红点鲑; *Astyanax mexicanus*: 墨西哥丽脂鲤; *Denticeps clupeoides*: 齿鲱; *Pundamilia nyererei*: 三湖慈鲷; *Cyprinodon variegatus*: 北美鳉; *Hippoglossus stenolepis*: 狭鳞庸鲽; *Orycteropus afer*: 土豚; *Ursus arctos horribilis*: 灰熊; *Drosophila melanogaster*: 黑腹果蝇; *Aedes aegypti*: 埃及伊蚊

et al, 2011), 且分布在不同染色体, 斑马鱼 *ins* 位于 5 号染色体, *ins-2* 位于 14 号染色体。最近的基因组数据分析发现辐鳍亚纲的鱼类胰岛素基因具有 3 个重复基因, 但大多数硬骨鱼类中缺失第 3 个基因(Irwin, 2019)。鱼类中多个胰岛素基因的产生被认为是由于鱼类特有的(第三次)基因组大复制事件。基因复制的经典理论认为大多数基因复制之后, 只有其中一个基因保留其祖先的功能, 其他复制基因演变为假基因, 不具备功能, 或者发生突变, 转变为具新功能的基因(Taylor et al, 2004)。另外一个新的理论认为, 复

制基因可能会保留祖先基因功能的一部分, 同时其他复制基因也会行使祖先基因的一部分功能, 它们的作用相互补充(Force et al, 2000; Irwin, 2004)。因此, 鱼类中不同类型胰岛素基因的表达及功能需要进一步研究。

3.2 银鲟胰岛素基因(*ins*, *ins-2* 和 *ins-like*)的组织表达分析

各组织表达特征分析表明, 银鲟胰岛素 3 个重复基因 *ins*、*ins-2* 和 *ins-like* 在健康银鲟组织中广泛表达, 但是不同组织的 3 个基因表达水平不相同。银鲟 3 个

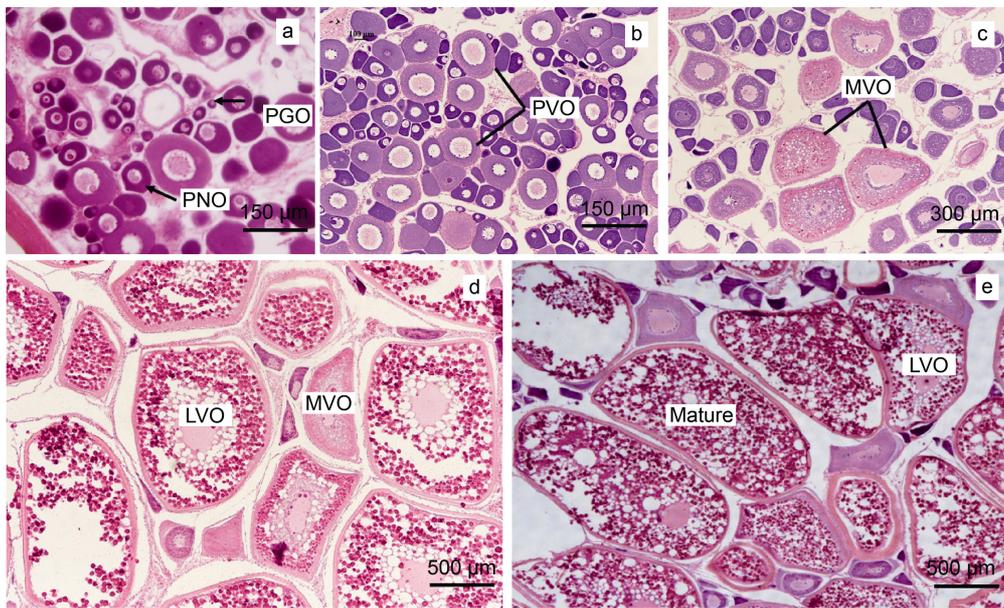


图 3 不同时期银鲳卵巢的组织学

Fig.3 Histology of ovary of silver pomfret at different developmental stages

注: a. I 期卵巢; b. II 期卵巢; c. III 期卵巢; d. IV 期卵巢; e. V 期卵巢。PGO: 初级生长卵母细胞(primary growth oocyte); PNO: 核仁核周卵母细胞(perinucleolar oocyte); PVO: 卵黄发生前卵母细胞(previtellogenic oocyte); MVO: 卵黄发生中卵母细胞(midvitellogenic oocyte); LVO: 卵黄发生后卵母细胞(late vitellogenic oocytes); Mature: 成熟卵母细胞

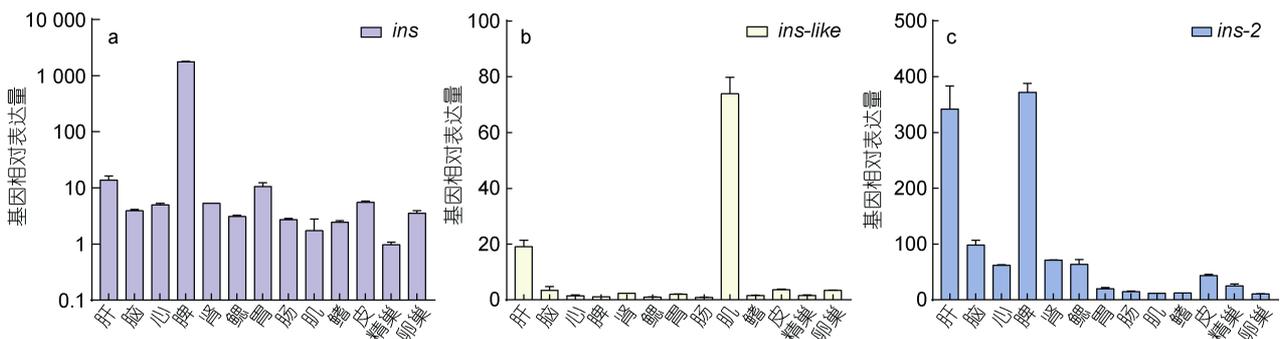
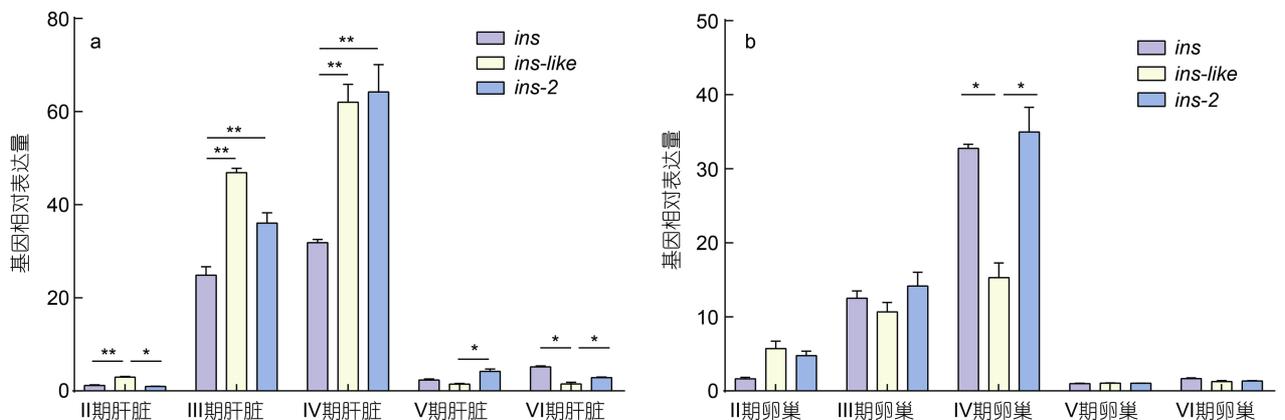


图 4 3 个胰岛素基因在银鲳各组织中表达量

Fig.4 The expression levels of three insulin genes in various tissues of silver pomfret



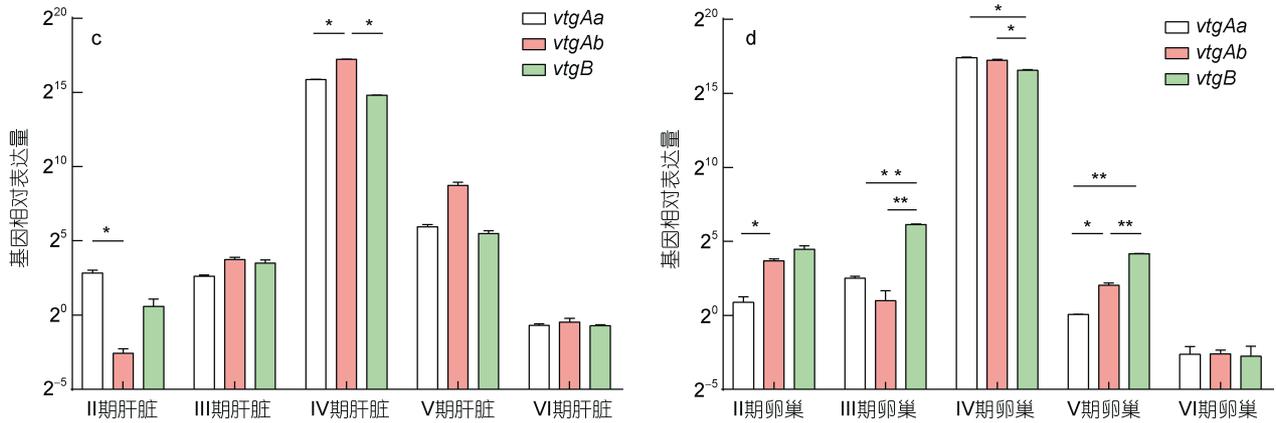


图5 胰岛素和卵黄原蛋白基因和在不同发育时期的肝脏和卵巢中表达量

Fig.5 The expression levels of insulin and vitellogenin genes in liver and ovary at different developmental stages

注: *表示 $P < 0.05$, 两组数据间具有显著性差异; **表示 $P < 0.01$, 两组数据间具有极显著性差异

胰岛素基因在肝胰脏组织中均具有较高的表达水平, 这与哺乳动物中胰岛素主要在胰腺组织中生成一致, 暗示胰岛素基因在鱼类中可能也具有相似的调控系统与功能。斑马鱼中研究也证实外源胰岛素能促进鱼体内血糖转运, 维持血糖平衡, 但鱼类胰岛素合成不足, 分泌相对延迟(鲁程瑶等, 2018)。银鲳 *ins* 和 *ins-2* 在脾脏组织中具有较高的表达水平, 同时 *ins-like* 在肌肉组织中具有较高的表达水平。已有研究证实大部分鱼类的胰岛素合成在肝脏、肌肉和生殖腺(Carusio *et al.*, 2011; 罗智等, 2018)。而不同组织的表达特征暗示 3 个胰岛素基因在功能上可能存在差异。同时, 血清胰岛素具有波动性, 与鱼类季节性繁殖改变具有相关性增长趋势(Carusio *et al.*, 2011), 这也暗示胰岛素基因参与调控了鱼类繁殖等生殖活性。

3.3 银鲳不同时期卵巢和肝脏中胰岛素基因和卵黄原蛋白基因的表达分析

鱼类作为一类卵生动物, 卵子的形成需要卵黄合成, 又称为卵黄发生, 这是卵巢发育过程中最为重要的一环。对昆虫的研究证实, ILPs 在卵巢发育中具有重要作用, 直接参与调控卵黄发生和卵母细胞发育(Brown *et al.*, 2008; Sheng *et al.*, 2011; 张龙辉等, 2014)。其他卵生动物, 如甲壳动物青蟹中也发现外源胰岛素能够刺激肝胰脏中卵黄原蛋白基因的表达(Huang *et al.*, 2017)。然而, 目前有关鱼类中胰岛素基因与卵黄原蛋白基因间关联的研究还未见报道。先前研究发现银鲳及多种鱼类具有 3 类卵黄蛋白原基因 *vtgAa*、*vtgAb* 和 *vtgB* (Yilmaz *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2018)。因此, 本研究对不同发育阶段的银鲳肝脏和卵巢组织中 3 个胰岛素基因和 3 个卵黄原蛋白基因的表达

量进行了分析。结果显示, 银鲳胰岛素基因和卵黄原蛋白基因在肝脏和卵巢中的表达趋势一致, 从期至 IV 期肝脏和卵巢中逐渐升高, 并在 IV 期达到最高值, 从 IV 期至 V 期表达量显著下降。这一结果与卵巢组织切片结果相符合, 卵母细胞积累卵黄蛋白从 III 期至 V 期。同时在其他鱼类研究发现, 卵黄蛋白原主要在肝脏中表达, 少量表达在卵巢组织中, 较高的表达量集中在卵黄发生过程的肝脏和卵巢组织中(Sullivan *et al.*, 2018; Xue *et al.*, 2018)。肝脏和卵巢中胰岛素基因与卵黄原蛋白基因相一致的表达趋势, 我们推测鱼类胰岛素可能调控着卵黄蛋白的生成, 两者关系密切, 但是否如同昆虫中研究一致, 鱼类胰岛素与卵黄蛋白合成之间存在确切因果关系, 仍需要进一步研究确认在 3 个胰岛素基因中, 在不同时期肝脏, *ins-2* 和 *ins-like* 基因表达量最高, *ins* 基因表达量最低, 而在不同时期卵巢, *ins* 和 *ins-2* 基因表达量最高, *ins-like* 基因表达量最低。肝脏和卵巢组织中胰岛素基因的不同表达水平暗示 3 个胰岛素基因可能在卵黄发生中发挥作用大小有所差异, 但具体基因的功能需要进一步研究。

4 结论

本研究鉴定了银鲳 3 个胰岛素 *insulin* (*ins*)、*insulin-like* (*ins-like*) 和 *insulin-2* (*ins-2*) 基因的 cDNA 序列, 序列分析揭示这 3 个基因的氨基酸序列具有胰岛素基因的典型特征。银鲳胰岛素家族 3 个基因 *ins*、*ins-2* 和 *ins-like* 在各个组织中广泛表达, 但是不同组织的 3 个基因表达水平不相同。同时, 在不同发育阶段的银鲳肝脏和卵巢组织中 3 个胰岛素基因和 3 个卵

黄蛋白原基因的表达趋势一致,从 期至 期肝脏和卵巢中逐渐升高,并在 期达到最高值,从 期至 期表达量显著下降。研究结果首次推测,鱼类胰岛素可能也参与调控卵黄蛋白的生成,两者密切相关,为深入探究鱼类胰岛素的功能及作用机制提供了新思路。

参 考 文 献

- 王腾飞,张鼎元,郭春阳,等,2017. 养殖银鲳性腺发育规律和性类固醇激素变化[J]. 水产学报, 41(2): 198-211.
- 张龙辉,王国栋,2014. 无脊椎动物胰岛素样蛋白(Insulin-like/related peptides)研究进展——以昆虫为例[J]. 生物技术通报(10): 33-42.
- 罗智,卓梅琴,2018. 鱼类胰岛素、胰岛素受体和胰岛素受体底物的生物学特性及其对营养物质代谢的调控[J]. 水产学报, 42(1): 149-158.
- 周阳,侯聪聪,竺俊全,2017. 硬骨鱼类卵黄原蛋白及其在卵子发生中的作用[J]. 中国细胞生物学学报, 39(5): 649-658.
- 施兆鸿,彭士明,孙鹏,等,2009. 我国鲳属鱼类养殖的发展潜力及前景展望[J]. 现代渔业信息, 24(10): 3-4, 8.
- 彭竹清,郝友进,2019. 胰岛素信号调控昆虫滞育的研究进展[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 37(6): 201-206.
- 鲁程瑶,张震,丁倩雯,等,2018. 外源性胰岛素对斑马鱼血糖及其转运的影响[J]. 生物技术进展, 8(5): 426-434.
- 谢鹏飞,李正辉,黄茜,等,2018. 昆虫胰岛素生理功能的研究进展[J]. 环境昆虫学报, 40(4): 834-839.
- 强俊,马俊蕾,曹哲明,等,2021. 鱼类卵子发育与卵泡闭锁的研究进展[J]. 中国水产科学, 28(2): 239-252.
- BOUCHER J, KLEINRIDDER A, KAHN C R, 2014. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 6(1): a009191.
- BROWN M R, CLARK K D, GULIA M, et al, 2008. An insulin-like peptide regulates egg maturation and metabolism in the mosquito *Aedes aegypti* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(15): 5716-5721.
- CARUSO M A, SHERIDAN M A, 2011. New insights into the signaling system and function of insulin in fish [J]. General and Comparative Endocrinology, 173(2): 227-247.
- GONZÁLEZ-KOTHE P, OLIVA M E, TANGUY A, et al, 2020. A review of the potential genes implicated in follicular atresia in teleost fish [J]. Marine Genomics, 50: 100704.
- GU W W, YANG Y, NING C, et al, 2021. Identification and characteristics of insulin-like growth factor system in the brain, liver, and gonad during development of a seasonal breeding teleost, *Pampus argenteus* [J]. General and Comparative Endocrinology, 300: 113645.
- HUANG X S, FENG B Y, HUANG H Y, et al, 2017. *In vitro* stimulation of vitellogenin expression by insulin in the mud crab, *Scylla paramamosain*, mediated through PI3K/Akt/TOR pathway [J]. General and Comparative Endocrinology, 250: 175-180.
- IRWIN D M, 2004. A second insulin gene in fish genomes [J]. General and Comparative Endocrinology, 135(1): 150-158.
- IRWIN D M, 2019. Duplication and diversification of insulin genes in ray-finned fish [J]. Zoological Research, 40(3): 185-197.
- JAMES C M, ALMATAR S M, 2008. Potential of silver pomfret (*Pampus argenteus*) as a new candidate species for aquaculture [EB/OL]. Marine Finfish Aquaculture Network. https://www.researchgate.net/profile/Charles_James8/publication/242257281_Potential_of_silver_pomfret_Pampus_argenteus_as_a_new_candidate_species_for_aquaculture/links/55b8838b08ae092e96589457/Potential-of-silver-pomfret-Pampus-argenteus-as-a-new-candidate-species-for-aquaculture.pdf.
- LYNCH M, FORCE A, 2000. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization [J]. Genetics, 154(1): 459-473.
- PARTHASARATHY R, PALLI S R, 2011. Molecular analysis of nutritional and hormonal regulation of female reproduction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 41(5): 294-305.
- READING B J, SULLIVAN C V, SCHILLING J, 2011. Vitellogenesis in fishes [M] // READING B J, SULLIVAN C V. Encyclopedia of Fish Physiology. New York: Plenum Press: 635-646.
- RICHARD D S, RYBCZYNSKI R, WILSON T G, et al, 2005. Insulin signaling is necessary for vitellogenesis in *Drosophila melanogaster* independent of the roles of juvenile hormone and ecdysteroids: female sterility of the *chico*¹ insulin signaling mutation is autonomous to the ovary [J]. Journal of Insect Physiology, 51(4): 455-464.
- SHENG Z T, XU J J, BAI H, et al, 2011. Juvenile hormone regulates vitellogenin gene expression through insulin-like peptide signaling pathway in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* [J]. Journal of Biological Chemistry, 286(49): 41924-41936.
- SULLIVAN C V, YILMAZ O, 2018. Vitellogenesis and yolk proteins, fish [J]. Encyclopedia of Reproduction, 6: 266-277.
- TAYLOR J S, RAES J, 2004. Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas [J]. Annual Review of Genetics, 38: 615-643.
- WHITE M F, KAHN C R, 1994. The insulin signaling system [J]. Journal of Biological Chemistry, 269(1): 1-4.
- XUE R, WANG X Y, XU S H, et al, 2018. Expression profile and localization of vitellogenin mRNA and protein during ovarian development in turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 226: 53-63.
- YILMAZ O, PRAT F, IBÁÑEZ A J, et al, 2016. Multiple vitellogenins and product yolk proteins in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): molecular characterization, quantification in plasma, liver and ovary, and maturational proteolysis [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 194/195: 71-86.

MOLECULAR IDENTIFICATION OF INSULIN GENE AND ITS ASSOCIATIVE EXPRESSION WITH VITGELLOGENIN GENE IN *PAMPUS ARGENTEUS*

YANG Yang^{1,2}, NING Chao³, WANG Ya-Jun³

(1. Marine Fishery Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316021, China; 2. Key Laboratory of Mariculture and Enhancement of Zhejiang Province, Zhoushan 316021, China; 3. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

Abstract The insulin (Ins), an evolutionarily conserved molecule among animals, is an important hormone regulating carbohydrate, fat, and protein metabolism, and also plays an important role in vitellogenesis in oviparous animals. However, there are a relatively few studies in fish. To explore the effects of silver pomfret (*Pampus argenteus*) on vitellogenesis, the full-length cDNA sequences of *insulin* (*ins*), *insulin-2* (*ins-2*), and *insulin-like* (*ins-like*) genes were obtained from liver transcriptome sequencing data of silver pomfret. Sequence analysis showed that the amino acid sequences of the three insulin genes of silver pomfret had typical characteristics of insulin gene, including signal peptide secreted from NH-2 terminal, and IIGF composed of A-, C- and B-chain. Phylogenetic tree analysis showed that mammals Ins clustered, fish Ins and Ins-2 clustered, and fish Ins-like clustered, separately from each other. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) analysis showed that the three insulin genes were widely expressed in various tissues of healthy pomfret, but their expression levels were different in different tissues. The qRT-PCR analysis of three *insulin* and three *vitellogenin* (*vtg*) genes in ovary and liver at different developmental stages were analyzed. This study firstly showed that all of the *insulin* and *vtg* genes were expressed in liver and ovary in fish. And the expression trend is consistent, gradually increased from stages II to IV in liver and ovary, and reached the highest value in stage IV, then the expression levels decreased significantly from stages IV to VI. Therefore, based on the finding in insect, we inferred that there is a close relationship between fish *insulin* and *vtg*, and insulin might participate in regulating *vtg* synthesis. This study provided a new thought for in-depth exploration of the function and mechanism of fish insulin.

Key words insulin; vitellogenin; ovary; liver; *Pampus argenteus*