

草鱼 *ghrelin* 基因的分子克隆与组织分布及其摄食调控作用分析

陈 勇¹, 李家乐^{1*}, 沈玉帮¹, 傅建军¹, 王荣泉², 宣云峰²

(1. 上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 江苏吴江国家级四大家鱼原种场, 江苏 吴江 215221)

摘要: *ghrelin* 是一种在脊椎动物摄食调节过程中起重要作用的脑肠肽, 具有明显的摄食促进作用。实验利用同源克隆技术获得了草鱼 *ghrelin* 基因的 cDNA 序列和 DNA 序列, 其中 cDNA 序列全长 506 bp, 包括 90 bp 的 5'端非编码区(5'-untranslated region, 5'UTR), 312 bp 的开放阅读框(open reading frame, ORF), 以及 104 bp 的 3'端非编码区(3'-untranslated region, 3'UTR)。开放阅读框编码的 103 个氨基酸的 *ghrelin* 前体肽, 经剪切加工后形成含有 19 个氨基酸的成熟肽。氨基酸序列分析结果显示, 草鱼 *ghrelin* 与硬骨鱼类 *ghrelin* 相似度最高, 而其他脊椎动物相似度较低, 同时草鱼 *ghrelin* 成熟肽 N 端的“活性中心”(active core)为鲤科鱼类中常见的 GTSF 形式。与大多数硬骨鱼类的 *ghrelin* 基因结构相同, 草鱼 *ghrelin* 基因也包括 4 个外显子和 3 个内含子。荧光定量 PCR 检测到 *ghrelin* mRNA 大量分布于草鱼的前肠和脾、脑、肾、肝、肌肉、皮和鳃等组织也有 *ghrelin* mRNA 分布。草鱼脑和肠中的 *ghrelin* 表达水平在摄食后下降, 随着饥饿时间的延长表达水平逐步升高, 最后维持在较高水平, 表明 *ghrelin* 作为摄食启动信号对草鱼的摄食活动起到了促进作用。

关键词: 草鱼; *ghrelin* 基因; 克隆; 组织分布; 摄食调控

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、雅罗鱼亚科(Leuciscinae)。作为大型草食性鱼类, 草鱼耐粗饲且生长迅速, 是我国乃至世界范围内的重要淡水养殖鱼类。近年来, 随着细胞生物学和分子生物学等学科的飞速发展, 以草鱼为对象的研究工作逐步上升到了分子水平, 其中绝大部分围绕遗传多样性以及免疫相关基因^[1-5]展开, 涉及摄食调控的研究还相对较少。

摄食调控在鱼类, 甚至于在所有脊椎动物的生理调节过程当中都发挥着重要作用, 摄食为生长提供所必需的营养物质, 为繁殖提供能量, 而摄食活动本身又受到一系列因素的影响。脑肠肽是一类广泛分布于中枢神经系统和消化道的多肽, 这些物质主要由消化道分泌, 而后作用于下丘脑的摄食调节

中枢, 直接或间接对摄食活动产生影响。参与摄食调控的脑肠肽主要有两种类型, 一种具有摄食促进作用(orexigenic), 另一种则抑制摄食(anorexigenic)。*ghrelin* 是迄今发现的唯一一种具有摄食促进作用的脑肠肽, 最初从小鼠胃中分离纯化得到, 具有 28 个氨基酸^[6]。已有的研究证据表明, *ghrelin* 作为摄食启动信号, 具有强烈的摄食促进作用^[7]。对金鱼和小鼠的中枢及外周实施 *ghrelin* 注射, 均有显著促进摄食和增加体质量的作用^[8-9]。除此之外, *ghrelin* 在脊椎动物中还发挥多种生理功能, 包括促进生长激素(GH)释放, 参与免疫应答和渗透压调节等^[10-11]。

本研究首次克隆获得了草鱼 *ghrelin* 基因的 cDNA 全长序列和部分基因组序列, 并对其进行了序列分析及蛋白质结构预测, 同时利用实时荧光定量 PCR 技术, 对 *ghrelin* 基因在草鱼各组织及饱食和饥

收稿日期: 2012-01-05 修回日期: 2012-02-20

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-04); 江苏省科技支撑项目(BE2008321)

通讯作者: 李家乐, E-mail: jlli@shou.edu.cn

饿状态下的相对表达量进行了研究,以期通过对 *ghrelin* 结构与功能的探究,阐明脑肠肽在草鱼摄食调控过程中所起作用及调节机制,为建立合理的草鱼投饲策略和促进草鱼快速生长提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

试验于 2011 年 3—5 月进行。所用 2 龄鱼种均取自吴江市“四大家鱼国家原种场”,平均体质量为 35.7 g,平均体长 12.4 cm。运输环节采取了严格的消毒处理措施。运抵实验室后,随机分组暂养一个月,以适应养殖缸环境。暂养期间,水温控制在 26~28 °C,光照 12 h,逐步淘汰适应力低下个体,直至每缸 40 尾。每天中午 12:00 定时投喂,一次性投喂量占鱼体总重量 4%~5%,投饲 30 min 后及时捞出剩余饵料。

1.2 *ghrelin* cDNA 和基因组 DNA 序列扩增

组织 RNA 和 DNA 提取 随机选取试验草鱼 2~3 尾,使用超剂量丁香酚麻醉后,在冰上快速分取组织,于 -80 °C 液氮保存备用。用 TRIzol RNA 试剂盒(Invitrogen, 美国),分别从脑和前肠提取总 RNA。基因组 DNA 提取采用 DNAiso Reagent kit 试剂盒(TAKARA, 大连)。用 Nanodrop ND-2000 C 分光光度计测量 DNA 和 RNA 浓度及纯度,经琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。

***ghrelin* cDNA 中间片段扩增** 取 OD_{260/280} 比值介于 1.85~1.95,且凝胶电泳检测无降解的总 RNA 2 μg,经 PrimeScript RT-PCR Kit 试剂盒(TAKARA, 大连)反转录合成 cDNA 第一链。根据已公布的金鱼等物种的 *ghrelin* 基因编码区保守序列设计特异性引物 P1、P2,以反转录合成的 cDNA 为模板扩增 *ghrelin* 中间片段。扩增试剂选用 2×Taq PCR MasterMix(天根,北京),扩增体系包括 2×Taq PCR

MasterMix 12.5 μL;上下游引物各 0.5 μL(10 μmol/L);cDNA 模板 1 μL 以及双蒸水 10.5 μL。扩增条件如下:94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。

3'端和 5'端侧翼序列扩增 根据已获得的 cDNA 中间片段,分别设计 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物。3'RACE 采用 RNA PCR Kit(AMV)3.0 试剂盒(TAKARA, 大连),以 2 μg 前肠 RNA 为模板,经反转录获得单链 cDNA,取 1 μL cDNA 作为扩增模板。扩增条件为 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环。5'端扩增采用 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(Clontech, 美国),以 2 μg 前肠 RNA 为模板反转录 5'-RACE-Ready cDNA。以通用引物 UPM、NUP 和基因特异性引物 P4、P5 进行巢式 PCR。首轮 PCR 取 1 μL 5'-RACE-Ready cDNA 作模板,以 UPM、P4 为引物,扩增条件包括:94 °C 变性 30 s, 72 °C 延伸 2 min,共 5 个循环;94 °C 变性 30 s, 70 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min,共 5 个循环;94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min,共 40 个循环。第二轮 PCR 以首轮 PCR 所得产物稀释 100 倍作为模板,以 NUP、P5 为引物进行扩增,扩增条件为 94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min,共 30 个循环。

基因组 DNA 扩增及 PCR 产物测序 在 cDNA 全长基础上,以基因组 DNA 为模板,于 3'非编码区和 5'非编码区设计外显子特异性引物 P6、P7 扩增基因组 DNA。所有扩增后的目的条带经琼脂糖凝胶回收,连接至 pGEM-T(Promega, 美国)克隆载体,热激转化 DH5α 感受态细胞后涂布含氨苄的选择性培养基,经蓝白斑筛选获得阳性克隆,选送至少 5 个阳性克隆测序。本实验所用引物均通过 Primer 6.0 软件设计,引物详情见表 1。

表 1 本实验用于扩增 *ghrelin* cDNA 和 DNA 序列以及用于荧光定量 PCR 的引物
Tab. 1 Primers used for amplification of cDNA sequences, DNA sequences, and quantitative real-time PCR

| 引物名称 primer | 引物代码 for short | 引物序列 primer sequence | 引物用途 usage |
|--------------|----------------|------------------------------------|--------------------------------|
| Ghr-F | P1 | 5'-GCTCTTAITGTCCTTCCTTG TG-3' | <i>ghrelin</i> cDNA 中间片段扩增 |
| Ghr-R | P2 | 5'-CCATAITTTCTCATACTCTGCTTCGC-3' | partial fragment amplification |
| 3'RACE | P3 | 5'-TGCTCAGAAACCCACAGG-3' | 3'RACE |
| 5'RACE outer | P4 | 5'-TCAGCAGCATCTCTTCTGCCACCCGTGG-3' | 5'RACE |
| 5'RACE inner | P5 | 5'-GCAGGACTGAGAAAGCTGGTGCCGCTCT-3' | |
| intron-F | P6 | 5'-CAGCCATTCAGAGTGTGTGTCAT-3' | <i>ghrelin</i> 基因组 DNA 扩增 |
| intron-R | P7 | 5'-TGATTCCTGTAGGACTGGTAGC-3' | genomic DNA amplification |
| qPCR-F | P8 | 5'-CGAACTGTCTGTGTCTCTGA-3' | <i>ghrelin</i> 荧光定量 PCR 引物 |
| qPCR-R | P9 | 5'-TGAATCTGTAGGCTGGTAGC-3' | primers for qPCR |
| β-actin-F | P10 | 5'-CGTGACCTGACTGACTACCT-3' | 荧光定量内参引物 |
| β-actin-R | P11 | 5'-GATACCGCAAGACTACATACC-3' | housekeeping gene primers |

1.3 各组织 *ghrelin* mRNA 分布检测

运用实时荧光定量检测技术检测 *ghrelin* mRNA 在草鱼各组织中的分布情况。用 TRIzol RNA 试剂盒(Invitrogen, 美国), 分别从脑、前肠、中肠、后肠、肾、肝、脾、鳃、肌肉、心脏、鳔和皮肤中提取总 RNA。经 PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒(TAKARA, 大连)反转录合成单链 cDNA。

分别以草鱼 β -actin cDNA(GenBank 登录号: DQ 2110 9.6.1)和已获得的草鱼 *ghrelin* cDNA 序列设计特异性引物(表 1)。以 6 个 5 倍浓度梯度稀释的 cDNA (5^0 , 5^{-1} , 5^{-2} , 5^{-3} , 5^{-4} , 5^{-5}) 作为定量检测中的标准样, 用于标准曲线绘制。检测开始前先对设计的荧光定量引物进行筛选, 只有扩增效率介于 80%~110%、无非特异性扩增产物、产物扩增量与初始模板量线性关系良好的引物才用于下一阶段的检测。荧光定量反应试剂采用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TAKARA, 大连), 25 μ L 反应体系包括 Premix Ex Taq[™] ($2 \times$), 12.5 μ L; 上下游引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L); 无菌水 9.5 μ L; cDNA 模板 2 μ L (50 ng/ μ L)。反应参数如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环, 于 72 $^{\circ}$ C 延伸处收集荧光信号。扩增结束插入溶解曲线 (60~95 $^{\circ}$ C), 根据溶解曲线确定产物特异性。每个样品设置 3 个重复, 以 β -actin 为内参基因, 相对表达量通过公式 $E^{-\Delta\Delta C_t}$ (E 为扩增效率) 计算。所有操作过程在 CFX96[™] real time PCR 检测系统(Bio-Rad)上完成。

1.4 饱食及饥饿阶段 *ghrelin* 表达水平变化

将 240 尾试验鱼随机分配至 6 个缸, 每缸 40 尾。试验组和对照组各设 3 个重复。试验开始前安排 2 周的适应期, 期间尽量减少人为干扰, 投喂方式和暂养阶段相同, 每天中午 12:00 定时投喂, 投喂量占总体质量的 4%~5%。实验开始后, 试验组为一次性投喂, 直到实验结束不再投喂; 对照组投喂方式和投喂量不变, 每天中午 12:00 定时投喂, 投喂量占总体质量的 4%~5%。采样时间点设置如下: -1 h (投喂前 1 h, 11:00), 0 h (投喂后 30 min, 12:30), +1 h (投喂后 1.5 h, 13:30), +3 h (投喂后 3.5 h, 15:30), +5 h (投喂后 5.5 h, 17:30), +1 d (投喂后 1 d, 12:00), +3 d (投喂后 3 d, 12:00), +5 d (投喂后 5 d, 12:00), +7 d (投喂后 7 d, 12:00)。在每个取样时间点, 分别从 3 个试

验组缸中各取 3 尾鱼, 麻醉后剖杀取脑和前肠, 即试验组每个时间点计脑和前肠各 9 份。相应地, 从 3 个对照组缸中各取 3 尾鱼, 剖杀取组织。按如前所述的方法步骤提取总 RNA 并反转录 cDNA。荧光定量试剂和反应条件如组织表达分布检测所述。每个样品设置 3 个重复, 以 β -actin 为内参基因。各时间点平均表达水平以试验组 0 h (投喂后 30 min, 12:30) 的平均表达水平为参照。

1.5 数据分析

用 ClustalX2 软件进行多重序列比对, SignalP 4.0Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽预测。采用邻接法(Neighbor-Joining method, NJ)和 MEGA5.05 构建系统发育树。相对表达水平通过 Relative Expression Software Tool 384 v.1 (REST) 软件计算。运用单因素方差分析(One-Way ANOVA)和多次对比检验分析比较试验组和对照组表达水平的差异性, $P < 0.05$ 视为差异显著。数据以平均值 \pm 标准误差(mean \pm SE)表示。

2 结果

2.1 克隆与序列分析

草鱼 *ghrelin* cDNA(GenBank No. JN809239)全长 506 bp(图 1), 其中开放阅读框(open reading frame, ORF)312 bp, 共编码 103 个氨基酸。N-端的 26 个氨基酸构成 *ghrelin* 前体肽的信号肽(26aa, Met¹ - Gly²⁶), 紧接着信号肽之后的 19 个氨基酸构成 *ghrelin* 成熟肽(19aa, Gly²⁷ - Val⁴⁵)。草鱼 *ghrelin* 成熟肽第三个丝氨酸(Ser³)具有潜在的酰基化修饰位点, 并参与了成熟肽“活性中心”(active core, GTSF)的构建。成熟肽 C-端有两个典型的剪切和加工位点(GRR), 分别位于第 12 个和第 19 个氨基酸之后。草鱼 *ghrelin* DNA(GenBank 登录号: JQ247040)包括 3 个内含子和 4 个外显子(图 1), 3 个内含子分别长 134, 85 和 218 bp, 每个内含子两端均有典型的剪接供体和受体位点(GT/AG)。第 1 个外显子长 204 bp, 包括 90 bp 的 5'端非编码区(5' UTR), 并翻译全部的信号肽和大部分成熟肽。第 2 个外显子长 81 bp, 翻译余下的 7 个成熟肽氨基酸和部分 C-端氨基酸。最后 2 个外显子长 221 bp, 包括具有典型多聚腺苷酸信号(AAT-AAA)的 3'端非编码区(3'UTR)。

草鱼 *ghrelin* 氨基酸序列与其他脊椎动物 *ghrelin* 氨基酸序列的比对结果如图 2 所示。与大部

```

act att tct gtc ctc tat aca atg tat ttt taa gat gca gcc att aag agt gtt gtc att aaa cag aac taa acc ggc tga ttt ccc agg ATG CCT CTG CAC TGC CGT 108
GCC AGC CAC ATG TTC CTG CTC ATA TGC GCT CTT TAC TTA TGT CTC GAG TCC GTG AGA GGC GGC ACC AGC TTT CTC AGT 186
CCT GCT CAG AAA CCA CAG gtg agc ata tat cta gtc gat gtt tct gag ttt gtt tgg agt aaa cca att ata aga act caa ttt agt tgc tca aga tta cat aaa ttc 32
P A O K P O 38
atg ctc aaa gtc ttc gaa tca gat ata tgc tgi ccc att tta ag GGT CGA AGG CCC CCA CGG GTG GGC AGA AGA GAT GCT GCT GAT TCA 384
GAG ATC CCA GTG ATT AAA GAG GAT GAT CAG TTC ATG gtaa aac ctc aat gca agt gca cat tta aat agg att tca gaa agt tac ta tgcagt cat 480
E I P V I K E D D Q F M 65
act ttc tca ctc cct gtt tag ATG AGT GCT CCG TTC GAA CTG TCC GTG TCT CTG AGT GAA GCA GAG TAT GAG AAA TAC GGT CCT 567
M S A P F E L S V S L S E A E Y E K Y G P 86

GTG CTG CAG AAG GTT CTT GTG AAT CTT CTT AGT GAT TCT CCA TTT Ggt gag cta aac tct tga tcc aaa caa gta act atg aaa att cac tat 660
V L Q K V L V N L L S D S P F 100

gaa aaa tgg cgt tta att tcc cag aaa aag tcc gta ttt tta aag aac cct aaa aac taa aag tgc ttc ctg tca gaa aat tct tca agt cac cgt ttc ctg tat ttc aat aat 774
ttt agt gtt cgt caa act aac taa tat act aaa tgt att ttc tgc ttt ttt cag AA TTC TGAc aag aag tac cag tcc tac aag aat caa ttc ctt ata aat caa aaa tta ttc 891
E F * 103
aaa att taa atc att ttc taa cag caa ttt gac aaa ata aag gat gac aaa c 943

```

图 1 草鱼基因组 DNA 核苷酸序列

大写, 小写和斜体字母分别表示开放阅读框, 非编码区以及内含子序列。对应的编码氨基酸置于核苷酸下方。粗虚线表示信号肽区域, 粗实线表示成熟肽区域。加阴影的圆圈表示成熟肽具潜在酰基化加工位点的第三个丝氨酸。条形阴影表示两个剪切和加工位点(GRR)。加粗显示内含子首尾的剪接受体和供体位点(gt/ag)。多聚核苷酸信号用双划线标注(AATAAA)。星号表示终止密码子。

Fig. 1 Nucleotide sequence of the grass carp ghrelin genomic DNA

Upper case, lower case and small italics are used to indicate the ORFs, 3'- and 5'UTR and intron sequences, respectively. Corresponding amino acids are given below the nucleotides. Bold dashed line represents the signal peptide region. Mature peptide is underlined with bold solid line. The third serine residue with potential acyl modification in mature peptide is circled and shaded. The highlighted boxes proclaim the putative cleavage sites and processing amino acid sites. splicing donor/acceptor sites (gt/ag) are in bold. The polyadenylation signal (AATAAA) was double underlined. Asterisk indicates the stop codon.

| | | | | | | | | | | | |
|------------|---|---------------------|-----------------|------------|------------|--------------|-------------|------------|------------|-------|----|
| grass carp | 1 | MPLHCRASHMFLLCALYL | CLESVRG | TSFLSPA | KPQGR | ----- | RPPRVGRRD | ----- | AADS | 53 | |
| goldfish | 1 | MPLRRRASHMFVLLCALSL | CVESVKG | TSFLSPA | KPQGR | ----- | RPPRMGRRD | ----- | VAEP | 53 | |
| carp | 1 | MPLHFRASHMFLLCALSL | CVESVRG | TSFLSPA | KPQGR | ----- | RPPRVGRRD | ----- | VAEP | 53 | |
| eel | 1 | NRQMKRTAYIILLVCVLA | WMDSVQ | AGSSFLS | PSR | PQGD | ---- | KKPPRVGRRD | SDGILDLFMR | 61 | |
| tilapia | 1 | MLLKRNTCLLAFLLCSLT | WCKSTS | SAGSSFLS | PSR | QPNK | ---- | VKSSRIGRQA | ----- | ME | 52 |
| seabass | 1 | MFLKKNTCLLVLLCSLT | WCKSTS | SAGSSFLS | PSR | QPSR | ---- | GKSSRVGRQT | ----- | ME | 52 |
| human | 1 | --- | PSPGTVC | SLLLGMLWDL | AMAGSSFLS | PEHQRVQVR | ---- | PPHKAPHVVP | ---- | ALPLS | 53 |
| emu | 1 | MFLRG-- | ALLVILLFS- | VLWTE | TTLACSSFLS | PDYKIKIQRKDP | PRKPTTKLHRR | GVGFS | SDTDEA | 62 | |
| bullfrog | 1 | M-- | NFGKAAIFGVVLFCL | LWTEGA | QAGLTL | SPADMQKIAE | ---- | RQSQNKLRHG | ----- | NMN | 52 |

| | | | | | | | | | | |
|------------|----|---------------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------|-------|--|--|-----|
| grass carp | 54 | EIPVIKEDDQFMMSAPFEL | SVSLSEAEYEKYG | PVLQKVLVNL | LDSPFEF | ----- | | | | 103 |
| goldfish | 54 | EIPVIKEDDQFMMSAPFEL | SVSLSEAEYEKYG | PVLQKVLVNL | LDSPLEF | ----- | | | | 103 |
| carp | 54 | EIPVIKEDDQFMMSAPFEL | SVSLSEAEYEKYG | PVLQKVLVNL | LDSPLEF | ----- | | | | 103 |
| eel | 62 | PPLQDEDIRHITFNIPFE | IGITMTEELFQQYGE | VMQKIMQDL | MDTPAKE | ----- | | | | 111 |
| tilapia | 53 | EPNQANEDKTITLSAPFE | IGVTLRAEDLADYI | VELQEI | VQRLGNTETAERP | SPR | ----- | | | 107 |
| seabass | 53 | EPSQPTENNHITISAPFE | IGVTVREEDFEEY | GVALQEI | IQHLLGNGDTAET | PPQL | ----- | | | 107 |
| human | 55 | NQLCDLEQQRHLLWASV | FSQSTKDSGDLTV | SGRTWGLRVLNR | FPPSSRERSRRSHQP | SCSPEL | ----- | | | 117 |
| emu | 63 | WAEDDNNSIEIKFNVPFE | IGVKITEEQYQEQML | EKVLGDI | EENTKETRMKN | ----- | | | | 116 |
| bullfrog | 53 | RRGVEDDLAGEEIGVTE | PLDMKMTQEQFQK | RAAVQDFLYSS | LLSLGVSQDTE | DKNENPQSQ | --- | | | 114 |

图 2 脊椎动物 ghrelin 氨基酸序列比对

深色阴影表示在所列举物种中均相同的氨基酸位点, 浅色阴影表示在一半以上所列物种中相同的氨基酸位点。序列上方粗实线表示 ghrelin 成熟肽区域。

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of ghrelin in vertebrates

The solid line above the sequences indicates the mature peptides region. Amino acid residues that are identical among all species are densely shadowed; those residues conserved in more than half of the listed species are lightly shadowed.

分脊椎动物不同, 草鱼 ghrelin 成熟肽活性中心不是典型的“GSSF”结构, 而是“GTSF”。氨基酸序列分析结果表明, 草鱼 ghrelin 和硬骨鱼类的 ghrelin

相似度最高, 与鲤、金鱼、裂腹鱼的相似度分别达到了 96%, 98%和 99%; 与鸟类、两栖类和哺乳类 ghrelin 的相似度则普遍较低, 其中又以与鸟类的

相似度最高(鹅: 65%, 鹌鹑: 67%)。以脊椎动物 *ghrelin* 氨基酸序列构建的系统发育树, 其拓扑结构与传统分类基本一致, 硬骨鱼类与爬行类、鸟类、哺乳类共同聚成一个大的分支, 区别于软骨鱼类和两栖类聚成的分支。硬骨鱼类分支当中, 草鱼与鲤、斑马鱼等鲤科鱼类相似度最高, 聚成鲤形目分支, 该分支再与其他硬骨鱼类聚在一起。同时, 草鱼与同属于淡水鱼类的鲇形目鱼类相似度较高, 而与海水鱼类如鳕形目和鳗鲡目的相似度相对较低, 在一定程度上反映了海淡水鱼类之间存在的进化差异(图 3)。

2.2 草鱼组织中 *ghrelin* mRNA 分布

两组标准曲线的直线回归相关系数分别为 $R^2_{(ghrelin)}=0.997$ 和 $R^2_{(\beta-actin)}=0.999$; 扩增效率(E)均接近理论扩增效率($E=100\%$); 标准曲线斜率介于

-3.19~-3.24。相对定量结果显示 *ghrelin* mRNA 在草鱼体内分布广泛, 肠道、脑、心脏、肌肉、肾脏、肝脏、鳃和皮等组织均能检测到 *ghrelin* mRNA。其中前肠和脾的 *ghrelin* 表达丰度最高, 后肠、中肠、肝脏和肌肉次之, 鳃和皮肤中的表达水平相对较低, 鳃几乎不表达(图 4)。

2.3 饱食和饥饿阶段 *ghrelin* 表达水平变化

与对照组相比, 前肠 *ghrelin* 表达水平在摄食后下降较快, 较摄食前水平下降了近 5 倍, 且下降趋势一直延续到摄食后数小时。从摄食后 3 h 开始, *ghrelin* 表达量开始缓慢回升。随着饥饿时间的延长 *ghrelin* 表达水平逐渐升高, 最后稳定在较高表达水平, 直到实验结束。脑中 *ghrelin* 表达水平在整个实验阶段相对比较平稳, 摄食后表达水平较对照组有小幅降低, 饥饿阶段则有小幅升高(图 5)。

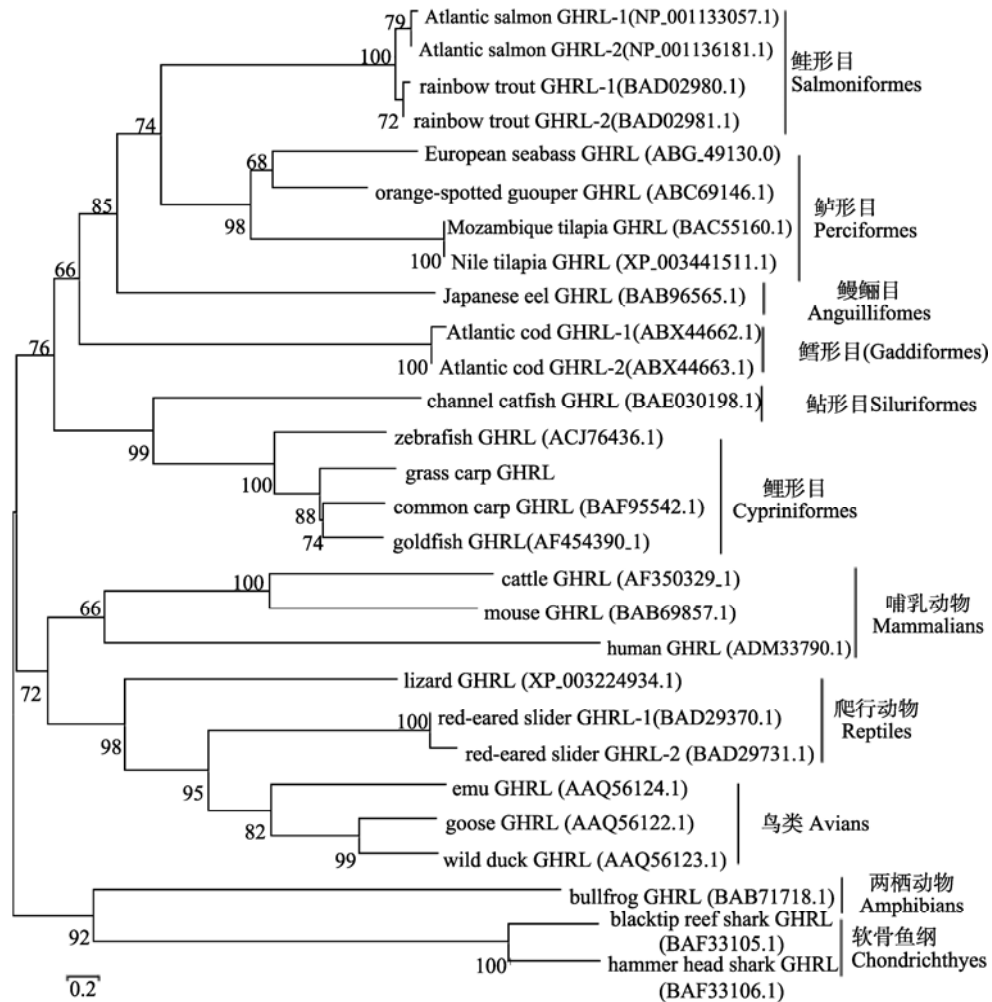


图 3 基于脊椎动物 *ghrelin* 氨基酸序列构建的系统发育树

可靠性通过采用自举检验(重复值=1 000)验证。比例尺和节点数值分别代表置换率和自举值。

Fig. 3 Phylogenetic analysis of grass carp *ghrelin* with other vertebrate species based on amino acid sequences

Reliability was evaluated by the bootstrap test with 1 000 replications. The proportional scale and panel point numbers indicate the substitution rate and the bootstrap value, respectively.

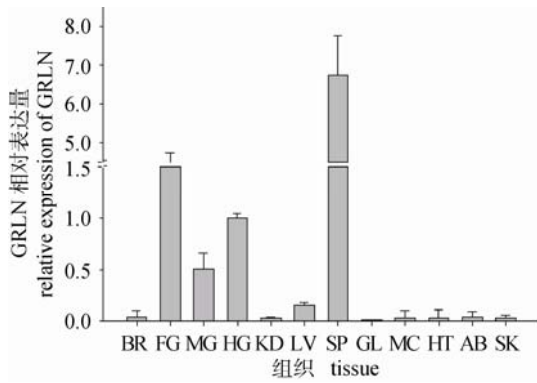


图4 草鱼 ghrelin mRNA 组织分布

各组织部位相对表达水平以后肠表达量为参照。结果以平均值 ± 标准误差显示。BR, 脑; FG, 前肠; MG, 中肠; HG, 后肠; KD, 肾; LV, 肝; SP, 脾; GL, 鳃; MC, 肌肉; HT, 心脏; AB, 鳔; SK, 皮。

Fig. 4 Tissue distribution of ghrelin mRNA in grass carp I-PCR

Expression levels of all tissues are expressed relative to that in the hindgut. Data are given as means plus or minus the standard error of the means (means ± SE). BR, brain; FG, fore-gut; MG, midgut; HG, hindgut; KD, kidney; LV, liver; SP, spleen; GL, gill; MC, muscle; HT, heart; AB, air bladder; SK, skin.

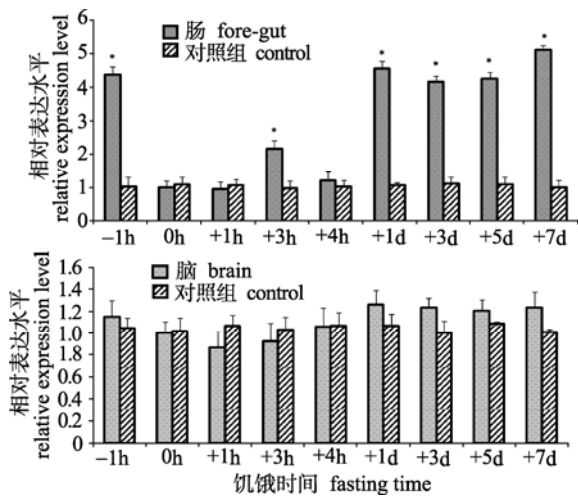


图5 草鱼前肠和脑中 ghrelin 在各采样时间点的相对表达水平

各时间点平均表达水平以试验组 0 h 平均表达水平为参照。星号表示试验组与对照组差异显著 (P < 0.05)。数值以平均值 ± 标准误差 (means ± S.E) 表示。

Fig. 5 Relative expression level of ghrelin in fore-gut and brain at each sampling time point

The relative levels were normalized as the average expression levels of treatment group fish at sampling time point 0h = 1. The asterisks (*) indicate the significant differences between treatment groups and control groups (P < 0.05). Data are given as means plus or minus the standard error of the means (means ± SE).

3 讨论

本实验采用同源克隆的方法, 首次克隆获得了草鱼 ghrelin 基因的 DNA 和 cDNA 序列。序列同源

性比较和基因结构分析证实它们与其他物种的 ghrelin 基因同源。草鱼 ghrelin 基因由 4 个外显子和 3 个内含子构成, 与金鱼^[8]和斜带石斑鱼^[12]等的 ghrelin 结构相同, 而与哺乳动物的略有不同^[13]。通常, ghrelin 前体肽的氨基酸数目存在种间差异, 但草鱼、鲤和斑马鱼等鲤科鱼类的 ghrelin 前体肽氨基酸数目基本相同或相似。ghrelin 成熟肽的前四个氨基酸构成 ghrelin 的活性中心, 这一结构对 ghrelin 的功能发挥起重要作用, 其第三位的丝氨酸酰基化与否决定了 ghrelin 成熟肽是否具有生物活性。草鱼 ghrelin 成熟肽也有这一活性中心, 但与大部分脊椎动物活性中心的第二个氨基酸是丝氨酸(Ser)不同, 草鱼活性中心的第二个氨基酸为苏氨酸(Thr), 这种替换在鲤科鱼类中较为普遍^[8, 14-15]。此外, ghrelin 成熟肽前七个氨基酸在脊椎动物中表现出高度的保守性, 除活性中心以外的三个氨基酸(Leu-Ser-Pro)在脊椎动物中几乎保持不变。草鱼 ghrelin 成熟肽的 C-端区域, 有两个典型的剪接位点(GRR), 这种结构与金鱼的相似。基于这一结构, 研究人员从金鱼中分离到了数种不同形式(分别具有 14, 17, 18 和 19 个氨基酸)的 ghrelin 成熟肽^[16]。由此推断草鱼中也可能存在不止一种形式的 ghrelin 成熟肽。最近, 一种名为肥胖抑制素(obestatin)的基因被发现镶嵌在哺乳动物的 ghrelin 基因序列之中^[17], 之前有报道证实黑鲷的 ghrelin 中也插入进了类似的基因序列^[18], 但是草鱼上没有这一结构。总体上, ghrelin 基因在脊椎动物中是相对保守的, 尤其是成熟肽的活性中心和 N-端的酰基化位点。

已有的研究表明, ghrelin 主要在脊椎动物的胃肠道表达。草鱼作为一种无明显胃部分化的鱼类, 前肠可以视为其形态学上的胃, 理论上草鱼前肠的 ghrelin 表达水平应相对较高, 实际的组织分布检测结果也证实了这一点。脾脏的高表达水平则表明 ghrelin 可能参与了草鱼的免疫调控, 因为脾脏是鱼类重要的免疫器官, 之前的研究也表明 ghrelin 介入了鱼类的免疫应答^[15, 19]。

ghrelin 是一类在脊椎动物摄食调节过程中起重要作用的脑肠肽。本实验研究了草鱼在不同饥饿程度下的 ghrelin 相对表达水平, 结果表明草鱼肠道 ghrelin 表达水平在摄食后快速下降, 随着饥饿时间的延长逐步升高, 最后稳定在较高水平, 这与在其他脊椎动物上得出的结论相似。本次实验中, 草鱼

肠道 *ghrelin* 表达水平的下降始于摄食后 1 h, 而金鱼肠道 *ghrelin* 表达水平在摄食后 3 h 才开始下降^[20]。和金鱼相比, 草鱼食欲旺盛、摄食量大, 充分摄食后肠道扩张明显。同时, Sam 等^[21]研究发现某些摄食基因的表达水平受控于胃肠道排空速度减缓导致的消化道膨胀。结合本实验结果推测, 草鱼肠道的扩张或许是导致 *ghrelin* 表达水平下降的重要原因。再者, 和大多数肉食性和杂食性鱼类相比, 食物到达和通过草鱼肠道所用时间更短^[22], 这意味着食物可以更快速地刺激草鱼肠道, 摄食中枢获得的反馈信息也更及时, 从而能更快速地调节 *ghrelin* 表达水平。

作为重要的摄食调控因子, *ghrelin* 可以加剧哺乳动物摄食前的饥饿感, 并作为摄食启动信号诱发动物的摄食行为。如果这一理论也同样适用于草鱼, 可以推测草鱼 *ghrelin* 表达水平在摄食前或短时间饥饿后应该有一个明显的上升趋势, 且这种趋势应该足够强烈方能使草鱼的摄食活动一触即发。本实验中, 对试验鱼的麻醉和剖杀一概选在平日既定的投喂时间点前后, 经过长达数周的适应期, 试验鱼已经习惯了在这个时间点开始摄食。试验鱼在摄食前 1 h 和几乎每一个饥饿时间点, 都表现出了较高的 *ghrelin* 表达水平。这一结果与 Cummings 等^[23]的报道相吻合, 即某些习惯于在既定时间点进食的动物, 其 *ghrelin* 表达水平在摄食前有一个明显的上升阶段。结合本实验, *ghrelin* 的这种高表达水平可能是一个潜在的摄食信号, 激发试验鱼对食物的渴望, 并导致 *ghrelin* 水平进一步升高, 直到摄食要求得到满足。

本实验中, 草鱼脑部 *ghrelin* 表达水平相对比较稳定, 肠道表达水平的波动性则较大, 这种表现形式可能与机体的内稳态调节机制有关。作为摄食调节的神经中枢, 大脑对来自外周刺激信号的反应应该相对稳健, 才能起到对机体能量平衡的长期调节作用, 而不至于使这种平衡由于某些短时间的不利因素, 如食物紧缺而趋于崩溃。相比之下, 外周神经系统对食物短缺的反应则相对比较灵敏, 同时肠还作为重要的消化器官直接与食物接触, 所以其 *ghrelin* 表达水平的波动性会相对较大。脊椎动物中, *ghrelin* 可以通过与其他神经信号和激素相互作用, 共同完成摄食调节过程^[24]。同时其他一些物质, 如胰岛素、胆囊收缩素和 PYY 的餐后释放, 对 *ghrelin*

的餐后表达水平也有抑制作用^[25-26]。草鱼中是否也存在这种激素间相互作用关系, 还有待进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Liu F, Xia J H, Bai Z Y, *et al.* High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis[J]. *Aquaculture*, 2009, 297(1-4): 51-56.
- [2] Lin H F, Shao J Z, Xiang L X, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) NF45 (ILF2) cDNA, a subunit of the nuclear factor of activated T-cells (NF-AT) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 21(4): 385-392.
- [3] Chang M X, Nie P, Xie H X, *et al.* Characterization and expression analysis of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in grass carp *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 110: 51-63.
- [4] Yang C R, Su J G, Huang T, *et al.* Identification of a retinoic acid-inducible gene I from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and expression analysis in vivo and in vitro[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(3): 936-943.
- [5] Yang T Y, Hao H F, Xia C, *et al.* Characterisation of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) MHC class I domain lineages[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 21(5): 583-591.
- [6] Kojima M, Hosoda H, Date Y, *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach[J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 656-660.
- [7] Näslund E, Hellström P M. Appetite signaling: From gut peptides and enteric nerves to brain[J]. *Physiology and Behavior*, 2007, 92(1-2): 256-262.
- [8] Unniappan S, Lin X, Cervini L, *et al.* Goldfish ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(10): 4143-4146.
- [9] Lawrence C B, Snape A C, Baudoin F M H, *et al.* Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(1): 155-162.
- [10] 马细兰, 刘晓春, 周立斌, 等. 鱼类 *ghrelin* 研究进展 [J]. *水生生物学报*, 2009, 33(3): 546-551.
- [11] 牟幸江, 温海深, 董双林, 等. 鱼类内源性生长激素释放肽的研究进展 [J]. *中国水产科学*, 2008, 15(3): 516-522.
- [12] 陈廷. 斜带石斑鱼脑肠肽及其受体的克隆与 mRNA 表达研究 [D]. 广州: 中山大学, 2007.
- [13] Tanaka M, Hayashida Y, Iguchi T, *et al.* Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a

- short noncoding first exon[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(8): 3697–3700.
- [14] Amole N, Unniappan S. Fasting induces preproghrelin mRNA expression in the brain and gut of zebrafish, *Danio rerio*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(1): 133–137.
- [15] Kono T, Kitao Y, Sonoda K, *et al.* Identification and expression analysis of ghrelin gene in common carp *Cyprinus carpio*[J]. *Fisheries Science*, 2008, 74(3): 603–612.
- [16] Miura T, Maruyama K, Kaiya H, *et al.* Purification and properties of ghrelin from the intestine of the goldfish, *Carassius auratus*[J]. *Peptides*, 2009, 30(4): 758–765.
- [17] Zhang J V, Ren P G, Avsian K O, *et al.* Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake[J]. *Science*, 2005, 310(5750): 996–999.
- [18] Yeung C M, Chan C B, Woo N Y, *et al.* Seabream ghrelin: cDNA cloning, genomic organization and promoter studies[J]. *Journal of Endocrinology*, 2006, 189(2): 365–379.
- [19] Hattori N, Saito T, Jiang B H, *et al.* GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils[J]. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001, 86(9): 4284–4291.
- [20] Unniappan S, Canosa L F, Peter R E. Orexigenic actions of ghrelin in goldfish: feeding-induced changes in brain and gut mRNA expression and serum levels, and responses to central and peripheral injections[J]. *Neuroendocrinology*, 2004, 79(2): 100–108.
- [21] Sam A H, Troke R C, Tan T M, *et al.* The role of the gut/brain axis in modulating food intake[J]. *Neuropharmacology*, 2011, 10(8):1–11
- [22] Du Z Y, Tian, L X, Liang G Y, *et al.* The intestinal evacuation and maximum daily consumption of purified formulated diets by juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Open Fish Science Journal*, 2009, 2: 1–5.
- [23] Cummings D E, Purnell J Q, Frayo R S, *et al.* A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans[J]. *Diabetes*, 2001, 50(8): 1714–1719.
- [24] Miura T, Maruyama K, Shimakura S I, *et al.* Regulation of food intake in the goldfish by interaction between ghrelin and orexin[J]. *Peptides*, 2007, 28(6): 1207–1213.
- [25] Williams D L, Cummings D E. Regulation of ghrelin in physiologic and pathophysiologic states[J]. *The Journal of Nutrition*, 2005, 135(5): 1320–1325.
- [26] Murashita K, Kurokawa T, Nilsen T O, *et al.* Ghrelin, cholecystokinin, and peptide YY in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Molecular cloning and tissue expression[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 160(3): 223–235.

Molecular cloning, tissue distribution and food intake regulatory effects of ghrelin in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

CHEN Yong¹, LI Jia-le^{1*}, SHEN Yu-bang¹, FU Jian-jun¹, WANG Rong-quan², XUAN Yun-feng²

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Wujiang National Farm of Four Major Domesticated Chinese Carps, Wujiang 215221, China)

Abstract: Ghrelin is one of vital brain-gut peptides involved in feeding regulation in vertebrates, and is well known for its appetite-stimulating capacity. Nucleotide sequences of *ghrelin* gene were identified both at DNA and cDNA levels, using homology-based cloning techniques from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). The 506 bp full-length ghrelin cDNA consists of a 90 bp 5'-untranslated region, a 312 bp open reading frame and a 104 bp 3'-untranslated region. The 103-amino acid prepropeptide encoded by open reading frame turns into a mature peptide with 19 amino acids after posttranslational modification. putative amino acid sequence analysis among vertebrates indicated that grass carp ghrelin showed the highest sequence homology with teleosts, and lower homology with other vertebrates. Comparison of the mature amino acid sequences revealed a conserved biological active core of ghrelin in grass carp. Genomic organization of grass carp ghrelin was composed of four exons and three introns, which was similar to that of most of teleostean species. qPCR results revealed that ghrelin was highly expressed in the fore-gut and spleen with much lower levels of expression in other tissues including brain, kidney, liver, muscle, skin and air bladder. The expression pattern that decreased in a short period of time after satiation, increased thereafter as starved time went on and kept at a high level implicated ghrelin in the orexigenic effect, as a signal of meal initiation, on short-term dietary intake in grass carp.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; *ghrelin*; molecular cloning; tissue distribution; food intake regulation

Corresponding author: LI Jia-le. E-mail: jlli@shou.edu.cn