

## 急性操作胁迫对刀鲚应激反应相关神经内分泌因子的影响

王宇<sup>1,2</sup>, 卢丹琪<sup>2</sup>, 李伟萍<sup>1</sup>, 徐跑<sup>3</sup>, 顾若波<sup>3</sup>,  
姚溢<sup>2</sup>, 梁瑶思<sup>2</sup>, 张勇<sup>2</sup>, 林浩然<sup>1,2\*</sup>

(1. 海南大学海洋学院, 海南海口 570228;

2. 中山大学生命科学院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, 广东广州 510275;

3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏无锡 214081)

**摘要:**为深入了解刀鲚应激反应中相关神经内分泌因子作用的分子机理,采用手工捕捉的方式对刀鲚进行了急性操作胁迫。通过放射免疫法和化学发光法测定刀鲚应激反应后头肾和血浆皮质醇含量的变化,结果显示,刀鲚胁迫刺激后血浆皮质醇含量极显著性升高,血浆皮质醇浓度平均升高56.48%,头肾皮质醇含量显著性升高,头肾皮质醇浓度平均升高49.68%,表明急性操作胁迫确实引起刀鲚的应激反应。通过同源克隆的方法获得刀鲚促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、硬骨鱼紧张肽(UI)、阿黑皮素原(POMC)基因的部分序列,并应用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)方法检测上述神经内分泌因子mRNA的表达变化,结果显示,CRH基因的表达水平极显著性下降,POMC基因的表达水平显著性下降,UI基因的表达水平有下降趋势但不显著。上述结果显示,皮质醇、CRH、UI和POMC等神经内分泌因子通过鱼类下丘脑—脑垂体—肾间腺轴参与刀鲚应激反应的调节,为进一步了解刀鲚胁迫应答的作用机理,实现对其有效调控打下基础。

**关键词:**刀鲚; 应激反应; 促肾上腺皮质激素释放激素(CRH); 硬骨鱼紧张肽(UI); 阿黑皮素原(POMC); 皮质醇

**中图分类号:** S 917.4

**文献标志码:** A

刀鲚(*Coilia nasus*), 鲱形目(Clupeiformes)、鳀科(Engraulidae)、鲚属(*Coilia*)。体型长,头侧扁,向后逐渐变细呈镰刀状,因此俗称刀鱼。刀鲚生活在长江中下游的太湖、巢湖等湖泊及较大的江河中,属溯江洄游性鱼类。长江刀鲚是一种经济价值极高的名贵鱼种,近年来由于过度捕捞和水环境污染,其天然种群资源急剧减少,已处于濒危状态。恢复刀鲚天然种群资源的有效措施之一是人工繁殖苗种和增殖放流。刀鲚对应激反应十分敏感,人为手工操作容易受伤死亡,易阻碍其人工繁殖过程。因此,以刀鲚为研究对象,系统深入研究和阐明鱼类应激反应的下丘脑—脑垂体—肾间腺轴神经内分泌调控作用机理,既有重要而

普遍的生理意义,亦为有效调节与缓解应激反应,使刀鲚和其他一些野生珍贵鱼类的人工繁殖能够顺利进行打下基础。

环境对鱼类所处的生存状态产生的压力为环境胁迫,分为急性和慢性两种环境胁迫<sup>[1]</sup>。手工操作(handling)可引起急性环境胁迫<sup>[2]</sup>,且引发鱼体强烈的应激反应。而血液中皮质醇水平的升高是鱼类应激反应的主要特征,可作为应激反应强度的一个重要指标<sup>[1]</sup>。

促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)、尾加压素(urotensin I, UI)是近年来研究较为普遍的应激相关激素。在哺乳动物中,CRH是一种41个氨基酸组成的肽,

收稿日期:2013-12-10 修回日期:2014-04-21

资助项目:国家科技支撑计划(2012BAD26B05);江苏省水产三新工程项目(Y2013-33);江苏省科技支撑计划(农业)项目(BE2011411)

通信作者:林浩然, E-mail: lsslhr@mail.sysu.edu.cn

主要调节下丘脑—垂体—靶腺轴,促进促肾上腺皮质激素(adreno-cortico-tropic-hormone, ACTH)的释放<sup>[4-5]</sup>,进而促进皮质醇的升高。UI作为CRH家族的成员之一,与CRH功能相似,同样能激发ACTH的分泌。在硬骨鱼中,CRH系统被认为主要在鱼脑的视前区分泌<sup>[6]</sup>,该区类似于哺乳动物的下丘脑室旁核,同样能调控下游皮质醇的变化<sup>[7]</sup>。环境胁迫还会间接影响鱼类的摄食行为,在硬骨鱼类中,POMC系统在摄食行为和能量代谢的调节中起重要作用,因此探究阿黑皮素原(proopiomelanocortin, POMC)与应激的关系有着重要的意义。在硬骨鱼类中,POMC基因主要在下丘脑的侧结节核(LTN)中表达<sup>[8]</sup>。已有研究表明,CRH、UI表达量的上升会刺激POMC的表达<sup>[9]</sup>,而高浓度的皮质醇可抑制POMC的表达<sup>[10]</sup>。

本研究采用手工捕捉方式对刀鲚进行急性操作胁迫,并且通过研究皮质醇的变化,以及胁迫相关基因CRH、UI和POMC mRNA的表达变化来探讨刀鲚在急性应激下激素与分子水平的调节。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

长江刀鲚取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心泰州秋雪湖养殖基地。体长(134 ± 6) mm。体质量(7.8 ± 2) g。实验前实验鱼暂养在循环水养殖系统已超过6个月。

### 1.2 实验设计

实验将36尾刀鲚分为2组,其中对照组和应激组各18尾。应激组处理方式:采用手工捕捉的方式对刀鲚进行急性操作胁迫,将应激组全部刀鲚一同捞起,暴露于空气中5 s,再放入水中3 min,然后重复以上操作共0.5 h。对照组不做手工操作处理。

所有刀鲚取样前均使用MS-222麻醉10 min,分别测量体长和体质量,并以含适量肝素钠的注射器从尾静脉取血,再解剖取全脑和头肾,迅速置于液氮中保存以备后续实验使用。

### 1.3 样品的测定

化学发光标记免疫分析法测定血浆皮质醇含量 取200 μL血液,以5 000 r/min离心10 min分离血浆,以100 μL血浆为标准量,使用全自动化学发光免疫分析仪(Maglumi 1000,中

国)进行皮质醇浓度检测,试剂盒购自深圳市新产业生物医学工程股份有限公司。

放射性免疫试验测定头肾皮质醇含量 切取头肾组织标本,称取重量1~9 mg,统一加入500 μL的PBS,用注射器抽提的方式制作标本匀浆液,3 000 r/min离心20 min后,收集上清液,样品中的皮质醇(Cortisol,缩写为Cor.)和加入的<sup>125</sup>I标记的皮质醇(<sup>125</sup>I-皮质醇)共同与一定量的特异性抗体产生竞争性免疫反应。<sup>125</sup>I-Cor.同抗体的结合量与标准或样品中Cor.的含量呈一定的函数关系。用免疫分离试剂(PR)将结合部分(B)与游离部分(F)分离后,测定结合部分的放射性强度,并计算相应结合率B/B<sub>0</sub>。用已知标准Cor.含量与对应结合率作图,即得标准抑制曲线。从标准曲线上查得对应结合率的待测样品中Cor.的含量。将Cor.浓度结果除以起始的称取重量得出相对浓度。

### 1.4 总RNA的提取及cDNA的合成

按照TRIzol说明书上的方法提取并纯化总RNA,通过琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性,用超微量分光光度计测定RNA浓度。再根据OD<sub>260/280</sub>检测RNA纯度。然后以总的RNA为模板,根据TOYOBO反转录试剂盒中的操作说明,合成cDNA,然后保存在-20℃冰箱中。

### 1.5 CRH、UI、POMC和β-actin基因片段的获得

依据NCBI收录的CRH、UI、POMC和β-actin的鱼类同源基因片段,设计相对保守区的简并引物(表1)。以合成的cDNA为模板,分别对刀鲚的β-actin, CRH, UI和POMC基因进行PCR扩增,将克隆所得的片段分别连接至pGEM-T Easy Vector载体(Promega),并转化大肠杆菌DH5α感受态细胞中(TaKaRa),涂板37℃过夜后挑选单克隆,37℃200 r/min振荡培养12 h,筛选阳性克隆菌株送至Invitrogen公司测序。将测序结果在NCBI上提供的BLAST程序中进行(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。确认所得片段正确后以测序所得序列设计特异性引物(表2),进行定量检测。

### 1.6 CRH、UI和POMC基因的表达分析

以Oligo(dT)为引物逆转录合成的cDNA第一条链为模板,β-actin为内参基因。采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)对CRH、UI和POMC基

因的表达变化进行分析。*RT-qPCR* 的反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  SYBR Green realtime PCR master Mix (TOYOBO), 特异引物见表 2。检测基因的溶解曲线和扩增曲线根据仪器分析得出各个样品的  $C_T$  值, 再计算出 *CRH*、*UI* 和 *POMC* 基因表达水平。

表 1 刀鲚  $\beta$ -*actin*、*CRH*、*UI* 和 *POMC* 基因克隆所设计的简并引物

Tab. 1 Degenerate primers designed for the cloning of the *C. nasus*  $\beta$ -*actin*, *CRH*, *UI* and *POMC* cDNA

引物名称 primer	引物序列 primer sequence (5'-3')
$\beta$ F	GACATGGAGAAGATCTGGCA
$\beta$ R	CCTCTCRGCWGTGGTGGT
CRH F	SGTGRYTCTGCTMGTTGCCT
CRH R	TGRAAGGTCAGRTCYAGGGA
U F	CCGYCCKYTGGTCTGCT
U R	CATYTTTCTSAGCAGGTGGA
P F	GCCAAGCGCTCCTACTC
P R	CAGCGGAAGTGCTTCATCTT

Notes: K = G + T, S = G + C, V = A + G + C, R = G + A, W = A + T, Y = C + T, B = G + C + T, M = A + C; F indicates forward; R, reverse

表 2 刀鲚  $\beta$ -*actin*、*CRH*、*UI* 和 *POMC* 基因定量所用特异引物

Tab. 2 Quantitative primers of *C. nasus*  $\beta$ -*actin*, *CRH*, *UI* and *POMC* genes used in Real-time qPCR

引物名称 primer name	引物序列 primer sequence (5'-3')
$\beta$ - <i>actin</i> F	TGATGTCACGCACGATTTC
$\beta$ - <i>actin</i> R	CCCATCTATGAAGCTACGC
CRH F	GACTGCTGCTGAGGGTCTG
CRH R	TCGTCCTCCTCGTTGCCTTT
UI F	CGTTCCTTTGGTCTGCTAA
UI R	CCAGACTGTTTCCCTCCTCC
POMC F	CCCTGCTCCTCGCTTTCTG
POMC R	GCCGCCGATCAAACCTCTA

## 1.7 数据分析

数据统计采用 GraphPad Prism 5 软件对所有应激组与对照组进行 *t* 检验, 最后将几组数据汇总作图。结果均表述为平均值  $\pm$  标准误 (mean  $\pm$  SE)。\*  $P < 0.05$  表示差异显著, \*\*  $P < 0.01$  表示差异极显著, \*\*\*  $P < 0.001$  表示差异特别显著。

## 2 结果

### 2.1 应激反应相关神经内分泌因子 *CRH*、*UI* 和 *POMC* 基因的克隆

使用简并引物对  $\beta$ -*actin*、*CRH*、*UI*、*POMC* 基因进行部分片段克隆。

所得  $\beta$ -*actin* 基因中间片段长度为 920 bp, 编码 306 个氨基酸 (图 1), 得到的 *CRH* 基因片段长

```

ttcacacaggaacagctatgaccatgattacccaagctctaatacactcactatagg
F T Q E T A M T M I T P S S N T T H Y R
gaaagcttgcattgcaggcctctgcagtcgacgggcccggatccgattcacacctctac
E S L H A G L C S R R A R D P I H T F Y
aacagctgcgtgttgcctccgaggacacccctcctgcttaccgagcccccctgaac
N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N
cccaagccaacagggaaaagatgacacagatcatgttcgagacctcaacacccccgcc
P K A N R E K M T Q I M F E T F N T P A
atgtacgtgccatccagctgtgctgctccctgtatgctcaggtcgtaccactggatc
M Y V A I Q A V L S L Y A S G R T T G I
gtgatggactccggtgatggtgtgaccacactgtgccatctatgaaggctacgccctg
V M D S G D G V T H T V P I Y E G Y A L
ccccagccactcctcctctggacctggctggcctgacctgactgactacatcgaag
P H A I L R L D L A G R D L T D Y L M K
atcctgaccgagagggctacagcttaccaccacagccgagagggaaaatcgtgcgtgac
I L T E R G Y S F T T T A E R E I V R D
atcaaggaaaagctgtgctatgtcgcctcagcttcgagcagagatggcaccgccgcc
I K E K L C Y V A L D F E Q E M G T A A
tctcctcctcctggagaagactacgagctgacctgacggacaggtcatcaccattgce
S S S S L E K S Y E L P D G Q V I T I G
aacgagaggttcaggtgccccgagccctctccagccttctcctcctggatgaatcc
N E R F R C P E A L F Q P S F L G M E S
tgtggtatccatgagaccacctcaactccatcatgaagtgtgatgtcgacatccgtaag
C G I H E T T F N S I M K C D V D I R K
gacctgtacccaacactgtgctgtctggtggcaccaccatgtacctggcctcctgat
D L Y A N T V L S G G T T M Y P G I A D
agaatgcagaaggagatcacatccctggccccagcacaatgaaatcaagatcattgcc
R M Q K E I T S L A P S T M K I K I I A
ccacctgagcgtaaatactctgtctggatcgaggctccatcctggcctcctcctgccc
P P E R K Y S V W I G G S I L A S L S T
ttccagcagatgaatctaga
F Q Q M N L

```

图 1 刀鲚  $\beta$ -*actin* 基因的 cDNA 及其预测的氨基酸序列

Fig. 1 Partial cDNA and predicted amino acid sequence of the *C. nasus*  $\beta$ -*actin* gene

度为 416 bp, 编码 138 个氨基酸(图 2), 得到的 *UI* 基因片段长度为 395 bp, 编码 131 个氨基酸(图 3), 得到的 *POMC* 基因片段长度为 219 bp, 编码 72 个氨基酸(图 4)。

用 ClustalX 将刀鲚的  $\beta$ -actin、*CRH*、*UI* 和 *POMC* 基因中间片段与其他几种鱼类的同源基因氨基酸序列进行对比, 对比结果显示(图 5 ~ 图 8),  $\beta$ -actin、*CRH*、*UI* 和 *POMC* 基因片段与其他物种相应基因的氨基酸序列高度保守, 表明所克隆到的片段为  $\beta$ -actin、*CRH*、*UI*、*POMC* 基因片段, 保证后续定量实验的准确性。

ttttgacatgaagctcaattttctcgccacctctgctctctctgttgctttccatctcgg
F D M K L N F L A T F V L L V A F P S R
catgaatgtagagcattgacagcccagtcagcaagctcctggcgccgaccacgacct
H E C R A I D S P S Q Q A P G A D H D P
cagcagcagtccttccaattttggcacgtgtgggagaggaatacttcatccgacttggc
Q Q Q S V P I L A R V G E E Y F I R L G
aacggaatccaaattcacctctgcccgccacaacatgtatcccgaacctccccgtca
N G N P N S P L P A T N M Y P E T S P S
gttttcaaaagactctccagctacagctaacgcaacgtctgctacaggcgaagtgtgt
V F K R A L Q L Q L T Q R L L Q G K V G
aacgttaagcgctctgccaattatgcacaacagcttgacgactcgtatggaaggagg
N V K R L V T N Y A Q Q L D D S M E R E
cgacggtcggaagaacctctatttctctgtatctgaccttccacctgctacaat
R R S E E P P I S L D L T F H L L Q

图 2 刀鲚 *CRH* 基因的 cDNA 及其预测的氨基酸序列

Fig.2 Partial cDNA and predicted amino acid sequence of the *C. nasus CRH* gene

Gobio gobio -----HTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLN
Rhamdia quelen -----HTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLN
Morulius calbasu -----HTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLN
Danio rerio -----HTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLN
Coilia nasus FTQETAMTITPSSNTTHYRESLHAGLCSRRARDPIHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLN
Cirrhinus molitorella -----HTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLN
Elopichthys bambusa -----HTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLN

tccgttcttttggctctgtaaatagctacggttctgctgtccagccacattccaccttaat
S V P L V L L I A T V L L S S H I H L N
gtgtgtcgaccctgagcatttttgacagccatgggtacaggagtcaactggacgaggtg
V C R P L S I F D S H G Y R S Q L D E V
ctgttgaagcaggcactctgctgtgtcttatcacatcggagagaagattctgcagtat
L L K A G D S A V S Y H I G E K I L Q Y
ttgcagaagaacccccctctgcaaaaggcttttcacgtgttcatgttgacagcatcgcg
L Q K N P A L Q R G L S R V H V D S I A
actccacttacctcggaggacttgctcacttggcgcgactctgacgccagggtagac
T P L T S E G L A H L A R S L T P R V D
gaccactcgtcgtcggaggaggaaacagctctggaagatctgtggagttgtccaagaga
D H S S S E E G N S L E D L V E L S K R
aatgacgacctccgatctccatcgacctcacttt
N D D P P I S I D L T

图 3 刀鲚 *UI* 基因的 cDNA 及其预测的氨基酸序列

Fig.3 Partial cDNA and predicted amino acid sequence of the *C. nasus UI* gene

caagcgctctactccatggagcatttccgctgggaaaacctgttggcgaaaagcgcgcg
K R S Y S M E H F R W G K P V G R K R R
ccgatcaaacctacacctccaatgggtgtggaggaggagtcagctgaggttttccctgga
P I K L Y T S N G V E E E S A E V F P G
gaggtgaggaggcgggaagcagaaagcaggagcaggggcagctccatgatgtccaggag
E V R R R R E A E S E E Q G Q L H D V Q E
aaaaaagacagcacatacaagatgaagcacttccgctg
K K D S T Y K M K H F R

图 4 刀鲚 *POMC* 基因的 cDNA 及其预测的氨基酸序列

Fig.4 Partial cDNA and predicted amino acid sequence of the *C. nasus POMC* gene

\*\*\*\*\*

<i>Gobio gobio</i>	PKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYAL
<i>Rhamdia quelen</i>	PKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYAL
<i>Morulus calbasu</i>	PKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYAL
<i>Danio rerio</i>	PKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYAL
<i>Coilia nasus</i>	PKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYAL
<i>Cirrhinus molitorella</i>	PKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYAL
<i>Elopichthys bambusa</i>	PKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYAL
	*****
<i>Gobio gobio</i>	PHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMGTAA
<i>Rhamdia quelen</i>	PHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMGTAA
<i>Morulus calbasu</i>	PHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMGTAA
<i>Danio rerio</i>	PHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMGTAA
<i>Coilia nasus</i>	PHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMGTAA
<i>Cirrhinus molitorella</i>	PHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMGTAA
<i>Elopichthys bambusa</i>	PHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMGTAA
	*****
<i>Gobio gobio</i>	SSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRK
<i>Rhamdia quelen</i>	SSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRK
<i>Morulus calbasu</i>	SSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRK
<i>Danio rerio</i>	SSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRK
<i>Coilia nasus</i>	SSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRK
<i>Cirrhinus molitorella</i>	SSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRK
<i>Elopichthys bambusa</i>	SSSTLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRK
	***:*****
<i>Gobio gobio</i>	DLYANTVLSGGTMYPGIADRMQKEITSLAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLST
<i>Rhamdia quelen</i>	DLYANTVLSGGTMYPGIADRMQKEITSLAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLST
<i>Morulus calbasu</i>	DLYANTVLSGGTMYPGIADRMQKEITSLAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLST
<i>Danio rerio</i>	DLYANTVLSGGTMYPGIADRMQKEITSLAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLST
<i>Coilia nasus</i>	DLYANTVLSGGTMYPGIADRMQKEITSLAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLST
<i>Cirrhinus molitorella</i>	DLYANTVLSGGTMYPGIADRMQKEITSLAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLST
<i>Elopichthys bambusa</i>	DLYANTVLSGGTMYPGIADRMQKEITSLAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLST
	*****

图 5 刀鲚  $\beta$ -actin 基因与其他鱼类同源分子的氨基酸序列比对

横线(-)表示缺失的氨基酸残基位点,星号(\*)表示氨基酸残基完全一致,点号(:)表示氨基酸残基基本一致

Fig. 5 Amino acid sequence alignment of  $\beta$ -actin gene from *C. nasus* and other fishes

Lines(-) indicate the lack of the amino acid residues, asterisk(\*) indicates that the amino acid residues are the same, and the dots(:) mean amino acid residues are similar

```

Carassius auratus  FDMKLNFLVTTVALLVAFPPPYECRAI
Cyprinus carpio    FDMKLNFLVTTVAPLVAFPPPYECRAI
Danio rerio        FDMKLNFLVTTVALLVAFPPPYECRAI
white suckers      FDMKLNFLVTTVALLVAFPPPYECRAI
Coilia nasus       FDMKLNFLAT--FLLVAFPSRHECRAI
                    *****.*   *****.:*****

Carassius auratus  E-GSSNQPTDPDGERQSPVRLARLGEYFIRLGNRNQNYLRSPADSPETSQS--KRALQ
Cyprinus carpio    E-SSSNQLTDPDGERQSPVRLARLGEYFIRLGNRIQNSLRSPADSPETSQS--KRALQ
Danio rerio        E-SSSNQPADDGERQSPVRLARLGEYFIRLGNRNPTSPRSPADSPETSQP--KRALQ
white suckers      D-SSSNQPTDPDGERQSPVRLARLGEYFIRLGNRYQNSLRSPDTPETSQP--KRALQ
Coilia nasus       SPSQQAPGADHDPPQQSVPIARVGEYFIRLGNPNNSPLPATNMPETSPPSVFKRALQ
                    . . . . . * * :.* * :*:***** . . . . . :**** . *****

Carassius auratus  LQLTQRLLGKVGNIQRLDGNALRALDSVERERRSEPPISLDLTFHLL-
Cyprinus carpio    LQLTQRLLGKVGNIQRLDGNALRALDSVGRERRSEPPISLDLTFHLL-
Danio rerio        LQLTQRLLGKVGNIQRLDGSYALRALDSMERERRSEPPISLDLTFHLL-
white suckers      LQLTQRLLGKVGNGRWDGNALRALDSEERERRSEPPISLDLTFHLLR
Coilia nasus       LQLTQRLLQGVGNVNRVLTNYAQLDSDMERERRSEPPISLDLTFHLLQ
                    *****:*****.*   .** : ** *****

```

图 6 刀鲚 CRH 基因与其他鱼类同源分子的氨基酸序列比对

横线(--)表示缺失的氨基酸残基位点,星号(\*)表示氨基酸残基完全一致,点号(:或.)表示氨基酸残基基本一致

Fig. 6 Amino acid sequence alignment of CRH gene from C. nasus and other fishes

Lines(--) indicate the lack of the amino acid residues, and asterisk(\*) and dots(: or .) show that amino acid residues of CRH are almost the same with other fishes

```

Anguilla japonica  PVPLVLLIATVLLTSHIPPSACRPRDLSRFDGHGYKTQMDEVLLKAGDNAVSYLIGEKIL
Oryzias latipes    PVPLVLLIATVLLTSHIPPSACRPRDLSRFDGHGYKTQMDEVLLKAGDNAVSYLIGEKIL
Coilia nasus       SVPLVLLIATVLLSSHIHLNVCR---LIFDSHGYSQLDEVLLKAGDSAVSYHIGEKIL
                    .*****:***** .**   **.*:*.*****.***** *****

Anguilla japonica  RYLQRNPRFQKGLLQFPLDNLQVMTPLTTKELGHLARSLP--LTEEESLDEGNSLEDFAE
Oryzias latipes    RYLQRNPRFQKGLLQFPLDNLQVMTPLTTKELGHLARSLP--LTEEESLDEGNSLEDFAE
Coilia nasus       QYLQKNPALQRGLSRVHVDSI--ATPLTSEGLAHLARSLTPRVDDHSSSEEGNSLEDLVE
                    :*:** :*:** . :* : *****: *.*****. : :.* :*****:.*

Anguilla japonica  LSKRNDDPPISIDLT
Oryzias latipes    LSKRNDDPPISIDLT
Coilia nasus       LSKRNDDPPISIDLT
                    *****

```

图 7 刀鲚 UI 基因与其他鱼类同源分子的氨基酸序列比对

横线(--)表示缺失的氨基酸残基位点,星号(\*)表示氨基酸残基完全一致,点号(:或.)表示氨基酸残基相似程度较高

Fig. 7 Amino acid sequence alignment of UI gene from C. nasus and other fishes

Lines(--) indicate the lack of the amino acid residues, the same amino acid residues are indicated by asterisk(\*) and the dots(: or .) indicate the less similar ones

```

Paralichthys olivaceus KRSYSMEHFRWGKPVGRKRRPVKVYTS DGVEEESAEVFPPEMLRRELAEA
Verasper moseri      KRSYSMEHFRWGKPVGRKRRPVKVYTS DGVEEESAEAFPEMLRRELPA
Coilia nasus         KRSYSMEHFRWGKPVGRKRRPIKLYTSNGVEEESAEVFPGEVRRRE---A
                    *****:***:***** ** *: ** *
Paralichthys olivaceus EDQETVAAGEQEKLDVHEKKDSTYKMKHFR
Verasper moseri      DDQETVAAGEQEKLDVHEKKDSTYKMKHFR
Coilia nasus         ES-----EQGQLHDVQEKDSTYKMKHFR
                    :.      **:****:*****

```

图 8 刀鲚 POMC 基因与其他鱼类同源分子的氨基酸序列比对

横线(-)表示缺失的氨基酸残基位点,星号(\*)表示氨基酸残基完全一致,点号(:或.)表示氨基酸残基相似程度较高

Fig. 8 Amino acid sequence alignment of POMC gene from *C. nasus* and other fishes

Lines(-) indicate the lack of the amino acid residues, and asterisk(\*) and dots(: or .) show that amino acid residues of POMC are similar to other fishes

## 2.2 应激反应中皮质醇含量变化

血浆皮质醇浓度是最能反映机体应激反应强度的一个重要参数。本研究结果表明,对照组与应激组的血浆皮质醇浓度之间存在极显著性差异。与对照组相比,应激组在手工捕捉刺激 0.5 h 后血浆皮质醇含量极显著性升高( $P < 0.01$ ),血浆皮质醇浓度平均升高 56.48%,头肾皮质醇含量显著性升高( $P < 0.05$ ),头肾皮质醇浓度平均

升高 49.68%。以此说明了本次试验应激的有效性(图 9-a,图 9-b)。

## 2.3 手工捕捉对 CRH、UI 和 POMC 基因表达水平的影响

手工捕捉的应激组与未经任何刺激的对照组进行 CRH、UI 和 POMC 基因表达水平的对比。结果如图 10-a,应激组 CRH mRNA 表达水平与对照组相比,有显著性的降低( $P < 0.05$ )。图 10-b 表明

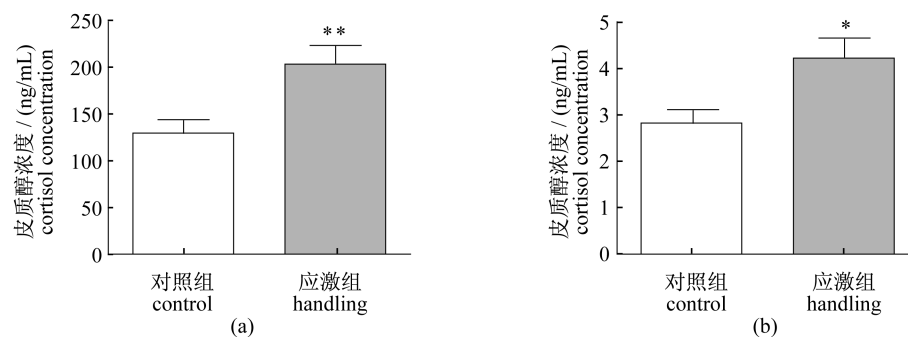


图 9 急性应激对血浆(a)与头肾(b)皮质醇浓度的影响

Fig. 9 Effect of acute stress on plasma(a) cortisol concentration and head-kidney(b) cortisol concentration

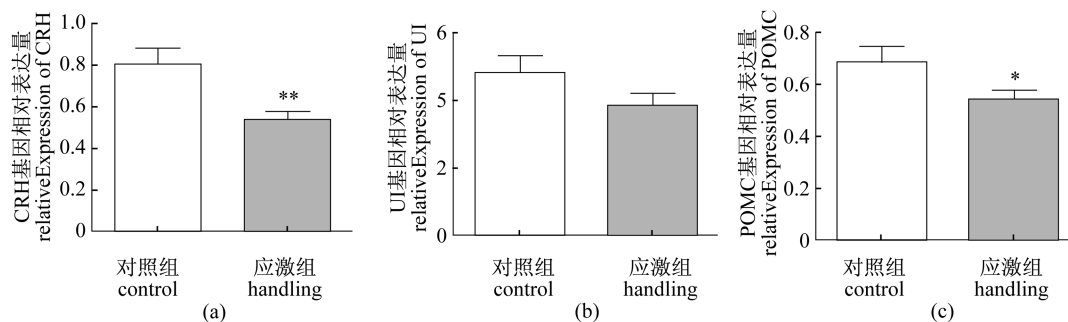


图 10 急性应激对脑部 CRH(a)、UI(b)和 POMC(c) mRNA 表达水平的影响

Fig. 10 Effect of acute stress on the expression of CRH(a), UI(b) and POMC(c) in brain

急性应激 0.5 h 后脑部 UI mRNA 表达水平略有降低,但与对照组相比无显著性差异。UI 作为 CRH 家族成员,在应激下同样作用于下游,起调节皮质醇的作用。图 10-c 结果表明,应激组的 POMC 的 mRNA 表达水平与对照组相比,有显著性的降低( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

本研究采用手工捕捉的方式对刀鲚进行了急性操作胁迫实验,通过化学发光标记免疫分析法和放射免疫法分别测定头肾和血浆的皮质醇浓度变化,确定 0.5 h 手工捕捉急性胁迫对刀鲚确实能够引起显著的应激反应。鱼体在急性操作胁迫下首先产生促皮质类固醇释放因子(CRF),并与其它 CRH 家族成员(如 UI)共同刺激促肾上腺皮质激素( ACTH)分泌并传递于肾间组织,然后由肾间组织产生以皮质醇为主的皮质类固醇,并释放到血液中。鱼体应激反应最终是导致其血液相关激素水平的升高,如血浆皮质醇。因此血浆皮质醇浓度可以被当做鱼类应激反应的一个灵敏信号<sup>[11-13]</sup>。头肾是鱼类分泌皮质醇的主要部位,肾间组织的皮质醇变化同样可作为应激反应的信号<sup>[14]</sup>。

其次,应激反应相关神经内分泌因子 CRH、UI 和 POMC 等 mRNA 的表达量变化亦可以表示刀鲚在急性应激下这些因子的调节作用。本研究证实应激组脑中 CRH、POMC 的 mRNA 表达量显著低于对照组,推测刀鲚在接受急性应激后,CRH 存在短时间内的升高,随后激活下游信号通路,促进促肾上腺皮质激素 ACTH 的升高,通过级联反应,最后导致皮质醇的升高。当血浆皮质醇浓度过高时,对 CRH 基因表达进行强烈的负反馈调节,使 CRH mRNA 水平下降至显著低于对照组的水平,从而反映出刀鲚对于急性操作胁迫十分敏感的特征。与之相比, Bernier 等<sup>[7]</sup>对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的应激相关实验显示,虹鳟在刺激后的 96 h 内,CRH 和 UI mRNA 的表达呈现先升高后降低的趋势,可降低到对照组水平之下。而刀鲚在急性应激 0.5 h 内 CRH mRNA 就开始降低至低于对照组的水平,UI 下降但无显著性差异,推测 UI 0.5 h 后恢复到对照组水平或继续下降,使接下来的一段时间内皮质醇的浓度下降,导致刀鲚适应环境胁迫的能力下降。比较

Ramsay 等<sup>[15]</sup>对斑马鱼(*Danio rerio*)的急性应激实验,刀鲚暴露于空气的时间远小于斑马鱼,3 h 后斑马鱼已恢复到对照组水平,表明斑马鱼再次达到代谢的平衡,保持机体内环境的稳定状态,而刀鲚短时间内皮质醇浓度虽显著上升,但随后皮质醇浓度会随着上游 CRH、UI 的 mRNA 表达量的下降而降低,且急性操作胁迫 0.5 h 后,少数刀鲚已表现出极度的不适应。这正是由于刀鲚自身十分敏感,胁迫对刀鲚的刺激超过机体本身可以调控的阈值,机体抗干扰抗逆能力较差,最终导致死亡。

另一方面,手工捕捉的方式进行急性操作胁迫下,刀鲚脑中 POMC mRNA 表达量显著低于对照组,推测急性应激下高浓度皮质醇会强烈抑制刀鲚脑中 POMC mRNA 表达使 POMC 显著下降,加上 CRH mRNA 表达下降,会减少对 POMC 神经元的刺激<sup>[9]</sup>,而 CRH 的显著下降会使随后的皮质醇浓度下降,从而对 POMC 表达抑制逐渐下降<sup>[16]</sup>。与此不同的是,在慢性应激下,CRH 在较长的一段时间内缓慢升高,长时间刺激使 POMC 基因表达量升高,抑制摄食<sup>[17-18]</sup>。经过一段较长时间后,皮质醇对 POMC 的抑制作用反而逐渐减弱,推测这也是 POMC 基因在慢性应激下表达可能会上升的原因之一。表达上升的 POMC 在摄食行为中起抑制食欲和减轻体重的作用<sup>[19-20]</sup>。而皮质醇的大量升高会负反馈调节 CRH 的分泌<sup>[10]</sup>,亦会抑制 POMC 的表达。本研究中,刀鲚在进行急性操作胁迫后 POMC mRNA 表达量显著性下降,同样会引起接下来的一段时间内皮质醇的浓度下降,导致刀鲚适应环境胁迫的能力降低。

### 参考文献:

- [1] Wang W B, Li A H. The effect of environmental stress to fish immune system[J]. Journal of Fisheries of China, 2002, 26(4): 368 - 374. [王文博,李爱华. 环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概况. 水产学报, 2002, 26(4): 368 - 374.]
- [2] Pickering A D. Environmental stress and the survival of brown trout, *Salmo trutta* [J]. Freshwater Biology, 1989, 21(1): 47 - 55.
- [3] Westphal N J, Seasholtz A F. CRH-BP: The regulation and function of a phylogenetically conserved binding protein [J]. Frontiers in Bioscience, 2006, 11(11): 1878 - 1891.



- [ 4 ] Hubbard C S, Dolence E K, Shires J A, *et al.* Identification of brain target neurons using a fluorescent conjugate of corticotropin-releasing factor [ J ]. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2009, 37 ( 4 ): 245 – 253.
- [ 5 ] Bernier N J, Flik G, Klaren P H M. Chapter 6: Regulation and contribution of the corticotropic, melanotropic and thyrotropic axes to the stress response in fishes [ M ] // Nicholas J, Bernier D G V D. *Fish Physiology*, Salt Lake City: Academic Press, 2009; 235 – 311.
- [ 6 ] Bernier N J, Alderman S L, Bristow E N. Heads or tails? Stressor-specific expression of corticotropin-releasing factor and urotensin I in the preoptic area and caudal neurosecretory system of rainbow trout [ J ]. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2008, 196 ( 3 ): 637 – 648.
- [ 7 ] Cerda-Reverter J M, Ringholm A, Schioth H B, *et al.* Molecular cloning, pharmacological characterization, and brain mapping of the melanocortin 4 receptor in the goldfish: Involvement in the control of food intake [ J ]. *Endocrinology*, 2003, 144 ( 6 ): 2336 – 2349.
- [ 8 ] Licinio J, Bongiorno P B, Gold P W, *et al.* The gene encoding for the novel transacting factor proopiomelanocortin corticotropin-releasing hormone responsive element binding protein 1 ( PCRH-REB-1 ) is constitutively expressed in rat pituitary and in discrete brain regions containing CRH or CRH receptors: Pathophysiological implications [ J ]. *Endocrinology*, 1995, 136 ( 10 ): 4709 – 4712.
- [ 9 ] Lin H R. *Fish physiology* [ M ]. Guangzhou: Sun Yat-sen University Press, 2011; 353 – 355. [ 林浩然. 鱼类生理学. 广州: 中山大学出版社, 2011; 353 – 355. ]
- [ 10 ] Strange R, Schreck C. Anesthetic and handling stress on survival and cortisol concentration in yearling chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [ J ]. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1978, 35 ( 3 ): 345 – 349.
- [ 11 ] Strange R, Schreck C, Ewing R. Cortisol concentrations in confined juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [ J ]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1978, 107 ( 6 ): 812 – 819.
- [ 12 ] Barton B A, Peter R E, Paulencu C R. Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport, and stocking [ J ]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1980, 37 ( 27 ): 805 – 811.
- [ 13 ] Conde-Sieira M, Alvarez R, Lopez-Patino M A, *et al.* ACTH-stimulated cortisol release from head kidney of rainbow trout is modulated by glucose concentration [ J ]. *Journal of Experimental Biology*, 2013, 216 ( Pt 4 ): 554 – 567.
- [ 14 ] Ramsay J M, Feist G W, Varga Z M, *et al.* Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress [ J ]. *Aquaculture*, 2009, 297 ( 1 – 4 ): 157 – 162.
- [ 15 ] Therrien M, Drouin J. Molecular determinants for cell specificity and glucocorticoid repression of the proopiomelanocortin gene [ J ]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1993, 680 ( 1 ): 663 – 672.
- [ 16 ] Maruyama K, Wada K, Ishiguro K, *et al.* Neuromedin U-induced anorexigenic action is mediated by the corticotropin-releasing hormone receptor-signaling pathway in goldfish [ J ]. *Peptides*, 2009, 30 ( 12 ): 2483 – 2486.
- [ 17 ] Shimakura S, Kojima K, Nakamachi T, *et al.* Neuronal interaction between melanin-concentrating hormone- and alpha-melanocyte-stimulating hormone-containing neurons in the goldfish hypothalamus [ J ]. *Peptides*, 2008, 29 ( 8 ): 1432 – 1440.
- [ 18 ] Loos R J F, Lindgren C M, Li S, *et al.* Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity [ J ]. *Nature Genetics*, 2008, 40 ( 6 ): 768 – 775.
- [ 19 ] Pritchard L E, White A. Neuropeptide processing and its impact on melanocortin pathways [ J ]. *Endocrinology*, 2007, 148 ( 9 ): 4201 – 4207.

## The effect of acute handling stress on the stress-related neuroendocrine factor in *Coilia nasus*

WANG Yu<sup>1,2</sup>, LU Danqi<sup>2</sup>, LI Weiping<sup>1</sup>, XU Pao<sup>3</sup>, GU Ruobo<sup>3</sup>,  
YAO Mi<sup>2</sup>, LIANG Yaosi<sup>2</sup>, ZHANG Yong<sup>2</sup>, LIN Haoran<sup>1,2\*</sup>

(1. Ocean College, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. State Key Laboratory of Biocontrol, Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, College of Life Sciences, Sun Yat-Sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China;

3. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** The present study aimed to investigate the changes in mRNA levels for the stress-related neuroendocrine factor in response to the acute handling stress in *Coilia nasus*. The radioimmunoassay (RIA) and chemical luminal immunoassay (CLIA) were introduced to detect the cortisol levels in plasma and head-kidney. Fish in stress group showed a significant elevation of cortisol concentration in both plasma ( $P < 0.01$ ) and head-kidney ( $P < 0.05$ ). The plasma cortisol concentration and head-kidney cortisol concentration have risen by 56.48% and 49.68%, respectively, suggesting that the acute stress response was instantly induced after handling. Moreover, the partial sequences of *C. nasus* corticotropin-releasing hormone (CRH), urotensin I (UI) and proopiomelanocortin (POMC) were cloned by homology cloning, and *C. nasus* brain CRH, POMC and UI mRNA levels were determined by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The CRH ( $P < 0.01$ ) and the POMC ( $P < 0.05$ ) mRNA expressions were significantly suppressed after a half-hour handling stimulation. But there was no significant change in brain UI mRNA level. Taken together, the acute stress response in *C. nasus* could be regulated by the stress-related neuroendocrine factor, including cortisol, CRH, UI and POMC, via the hypothalamic-pituitary-interrenal stress axis, which gave us a valuable insight into the *C. nasus* stress system, and could help developing the stress relief strategy for *C. nasus*.

**Key words:** *Coilia nasus*; stress; corticotropin-releasing hormone (CRH); urotensin I (UI); proopiomelanocortin (POMC); cortisol

**Corresponding author:** LIN Haoran. E-mail: lsslhr@mail.sysu.edu.cn