

禁食对大口黑鲈生长和肝脏IGF-I mRNA表达丰度的影响

陈乃松,周洁,靳利娜,周恒永,马建忠,仇小洁

(上海海洋大学 水产与生命学院,上海 201306)

摘要: 运用实时荧光定量PCR技术,研究禁食对体质量为 (100 ± 1) g的1龄大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)的生长和肝脏中类胰岛素生长因子-I (IGF-I) mRNA表达丰度的影响。在为期6周的实验期间,对照组每天表观饱食投喂2次;禁食组禁食3周后恢复投喂3周。实验期间对照组鱼体质量和体长逐渐增加。6周后,对照组鱼体增重率为10.99%,体长增加率为3.07%。禁食组禁食3周期间,鱼体质量下降了5.08%、体长减少了1.79%。同时肝组织IGF-I mRNA表达水平呈下降趋势,禁食结束时仅为对照组的29.93%。恢复投喂2周后肝组织IGF-I mRNA的表达量仍显著低于对照组($P<0.05$),鱼体质量为实验初始水平的98.54%,体长为实验初始水平的99.03%;恢复投喂3周后,禁食组鱼体质量、体长恢复到实验初始时水平($P>0.05$),但仍与对照组有显著差异($P<0.01$);肝组织IGF-I mRNA的表达丰度与对照组无显著性差异($P>0.05$)。结果显示,禁食使大口黑鲈体质量、体长下降,同时肝组织IGF-I mRNA表达丰度也随之降低;而恢复投喂后,其生长、肝脏IGF-I mRNA的表达丰度也逐渐恢复。研究表明,鱼类的营养状况、生长和与IGF-I mRNA的表达之间存有正相关关系。[中国水产科学,2010,17(4): 713-720]

关键词: 大口黑鲈; 禁食; 生长; 类胰岛素生长因子-I; 表达丰度; 实时荧光定量PCR

中图分类号: Q959; S96

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)04-0713-08

脊椎动物的生长除受到内分泌因素的调控外,外界因素如营养状况的影响也极其重要。生长激素(Growth Hormone, GH)是一种重要的多功能内分泌激素,对脊椎动物具有促进生长、能量动用和性腺发育等多种生理作用^[1]。其实GH的促生长作用并非完全是直接的,它的许多促生长作用是通过其他激素介导的。类胰岛素生长因子-I (Insulin-like Growth Factor I, IGF-I)是其中介导因子的核心成员之一^[2]。通过使用细胞和分子生物学的手段研究得出,IGF-I通过与其结合蛋白和受体的作用,起着促进细胞的增殖和分化、抑制细胞的凋亡、调节与生殖和免疫相关的激素分泌、增加蛋白质的同化、促进葡萄糖的吸收与利用等生理作用^[3]。同时,动物体的营养状况又对GH和IGF-I的生理活动产生反馈

性影响。GH、IGF和营养状况三者之间存在着相互调控的关系^[4]。营养状况对IGF-I mRNA在不同组织中的表达或血液IGF-I水平的调节在高等哺乳动物中已有较深入的研究^[5]。硬骨鱼类IGF-I的表达如同其他高等动物一样,几乎存在于所有组织,其中在肝组织中含量最高^[6]。国外文献对一些经济鱼类的营养状况对IGF-I mRNA在组织中的表达和血液中IGF-I水平的调控的分子生物学与内分泌学方面的研究已有较多的报道^[7-10]。而国内的相关研究报道甚少,所见只有华益民等对鲤(*Cyprinus carpio*)的研究^[11]。所有这些研究均表明:尽管是不同种类的脊椎动物,营养调控IGF-I的表达水平和活性对于调控其生长起着主导作用。

大口黑鲈又名加州鲈(*Micropterus salmoides*),

收稿日期: 2009-09-10; 修订日期: 2009-11-15.

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农攻字2006第6-4号).

作者简介: 陈乃松(1961-),男,副教授,主要从事水产动物营养与饲料学研究. E-mail: nschen@shou.edu.cn

分类学上隶属硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲈形目(Perciformes),太阳鱼科(Centrarchidae),原产于北美洲,是一种典型的肉食性鱼类。因其肉质鲜美、抗病力强、生长迅速、适温较广等优点,在20世纪80年代被引种到中国开展养殖生产,已成为一种重要的水产养殖品种。但大口黑鲈的人工配合饲料至今尚未研发成功。

本研究对禁食后再投喂与正常饲喂条件下对大口黑鲈的生长及肝脏中IGF-I mRNA表达丰度的影响进行对比分析,旨在探索营养胁迫条件下生长状况与IGF-I mRNA表达之间的关系,同时为进一步研究大口鲈的营养生理创建分子生物学与内分泌学的研究手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 取同一批次的1龄大口黑鲈先行实验室暂养驯化,以适应实验室的养殖环境。暂养池水体为2 m³的聚丙烯水槽,具有循环过滤、控温和增氧设施。养殖用水为加入5 mg/L硫代硫酸钠并经曝气过夜的自来水。养殖水温控制在(27±1)℃;向水体连续充气供氧;光照时间控制为:7:00至19:00。每天投饲2次(8:00和16:00)供肉食性鱼类使用的商业饲料(粗蛋白质含量:42%;粗脂肪含量:8.5%;膨化制粒),为表观饱食投喂。经2周的暂养驯化后挑选规格均匀,体质量(100±1)g、体质健壮的个体作为实验用鱼。

1.1.2 试剂和药品 总RNA提取试剂RNAiso Plus,荧光定量反转录试剂PrimeScript™RT Reagent Kit,SYBR Premix Ex Taq(Perfect Real Time)购自TaKaRa公司;琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;荧光定量PCR扩增引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.1.3 仪器 紫外分光光度计(T6,北京普析通用有限公司);高速冷冻离心机(TGL-16,湖南湘仪集团);PCR仪(TP600, TaKaRa公司,日本);荧光定量PCR仪(iQ-5, Bio-Rad公司,美国);电泳仪(CYY-6C,北京市六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 实验设计 养殖试验在室内圆锥形玻璃钢水槽(直径×高:90 cm×80 cm)中进行。各水槽与水循环净化系统相连,水交换量约为10 L/min,并连续充气供氧。每天为该系统更换500 L经处理(方法同暂养)的自来水。实验分为对照组和禁食组2个处理,每处理由3个重复组成。1个水槽作为1个重复,放养30尾鱼。6周的养殖实验期间,对照组正常投喂,禁食组先禁食3周,然后按对照组投喂方式饲养3周。所用饲料、投喂方式、水温和光照如同实验鱼的暂养驯化。

1.2.2 取样 分别于实验的第0天、8天、15天、22天、29天、36天、42天进行取样。取样前所有实验鱼经饥饿24 h,取样于8:00~9:30进行。按水槽进行集体称量体质量后并逐一进行体长(尾叉长)的测量,体质量测量精度为0.5 g,体长测量精度为1 mm。然后从每处理中随机取鱼9尾(即每水槽取3尾),鱼体表经消毒后用经高压灭菌的剪刀和镊子切开鱼体、取出肝脏,立即置于液氮中暂存,再转移至-80℃冰箱中保存备用。

1.2.3 组织总RNA的提取和肝脏中IGF-I mRNA的测定 将所采肝脏用灭菌剪刀剪成小块,用液氮研磨成粉末状,取适量放入1.5 mL离心管中,按照RNAiso Plus(TaKaRa公司)总RNA提取试剂盒的方法提取大口黑鲈肝脏总RNA,并用10 mg/mL(1%)琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测其质量和浓度,选取OD₂₆₀/OD₂₈₀值1.8~2.0的RNA供反转录使用。

使用DNase I酶切总RNA提取物以去除其中可能存在的DNA,并将RNA提取样本稀释至500 ng/μL,使用TaKaRa公司PrimeScript™RT reagent Kit试剂盒的方法对总RNA进行反转录,反转录体系为10 μL,条件为37℃ 15 min,85℃ 5 s。反转录产物经10倍稀释至5 ng/μL。

大口黑鲈IGF-I荧光定量PCR引物根据GenBank中的大口黑鲈IGF-I cDNA(GenBank:DQ666526)、金头鲷(*Sparus aurata*) IGF-I cDNA(GenBank:AY996779)、河鲈(*Perca fluviatilis* Linnaeus) IGF-I cDNA(GenBank:AJ586908)和舌齿

鲈 (*Dicentrarchus labrax*) IGF-I cDNA (GenBank: DQ105655) 序列保守区域设计。大口黑鲈 β -actin 荧光定量引物根据团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) β -actin cDNA (GenBank: AY170122) 和河鲈 β -actin 的 cDNA (GenBank: EU664997) 序列保守区域设计 (表1)。所有引物均由 Invitrogen 公司合成。IGF-I cDNA 扩增片段为 187 bp。引物使用 ddH₂O 稀释至 10 μ mol/L。

表1 定量PCR引物
Tab. 1 Primers used in quantitative PCR

引物 Primer	序列 Sequence
IGF-1F	5'-CTTCAAGACTGCCATGTGC-3'
IGF-1R	5'-GCCATAGCCTGTTGGTTTACTG-3'
β -actinF	5'-ATCGCCGCACTGCTTGTGAC-3'
β -actinR	5'-CCTGTTGGCTTTGGGGTTC-3'

使用 Bio-Rad iQ-5 荧光定量PCR仪和 SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) 试剂盒对大口黑鲈肝脏 IGF-I 和 β -actin 基因的 cDNA 进行定量分析。反应体系为 25 μ L, 其中 SYBR Premix Ex TaqTM (2 $\times$) 12.5 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。荧光定量PCR反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 58 $^{\circ}$ C 退火和延伸 30 s, 共 40 循环; 延伸结束后加入融解曲线制备步骤 (55 ~ 95 $^{\circ}$ C 30 s, 每 0.5 $^{\circ}$ C 读板 1 次)。

随机选取一个待测模板 cDNA 进行普通 PCR, 并用 20 mg/mL (2%) 琼脂糖凝胶电泳, 割胶回收纯化的目的基因和参照基因条带, 将回收的目的基因和参照基因 cDNA 溶液进行 10 倍系列稀释, 选取 6 个浓度梯度进行实时荧光定量 PCR 扩增反应, 以阈值循环数 (Threshold Cycle, C_T) 为纵坐标, 以模板浓度的对数值为横坐标, 分别制作目的基因 IGF-I 和参照基因 β -actin 的标准曲线。

1.2.4 相对定量的计算与数据处理 IGF-I mRNA 表达丰度计算以 β -actin 为内参, 对得到的各样品 C_T 值进行均一化处理, 用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法确定实验期间不同采样时间 IGF-I mRNA 的相对表达量。实验数据统计分析采用 SPSS13.0 软件处理, 进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 结果以平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm SE$) 表示。

2 结果与分析

2.1 实时荧光定量PCR的标准曲线和融解曲线分析

在不同的稀释倍数下 IGF-I 和 β -actin 基因扩增效率分别为 102.1% 和 95.5%。标准曲线的相关系数分别为 0.997 8 和 0.986 (图 1-A、B)。基因扩增效率和相关系数均满足进行实时荧光定量PCR的实验要求。

对荧光定量PCR的熔解峰图 (图 2) 与熔解曲线图 (图 3) 分析可以得出, 目的基因和内参基因的扩增产物呈现出重叠的单峰, 无非特异性产物和引物二聚体产生, 扩增特异性高。

2.2 大口黑鲈生长的变化

对照组生长持续增加, 增重率为 (10.99 $\pm$ 2.11) %, 体长增长了 (3.07 $\pm$ 1.41) %。禁食组禁食期间体质量和体长呈负增长。禁食 3 周后, 鱼体质量下降了 5.08%、体长减少了 1.79%, 与对照组呈现极显著差异 ($P < 0.01$)。禁食组恢复投喂后, 体质量、体长开始逐渐恢复。恢复投喂 2 周后, 鱼体质量为实验初始水平的 98.54%, 体长为实验初始水平的 99.03%, 已基本恢复到实验初始状态 ($P > 0.05$), 但仍极显著低于对照组 ($P < 0.01$)。恢复投喂 3 周后, 禁食组虽然保持生长, 但与对照组的差异同 2 周后。本实验显示大口黑鲈有补偿生长迹象, 但与对照组的增重率相比差异不显著 ($P > 0.05$), 详见图 4。

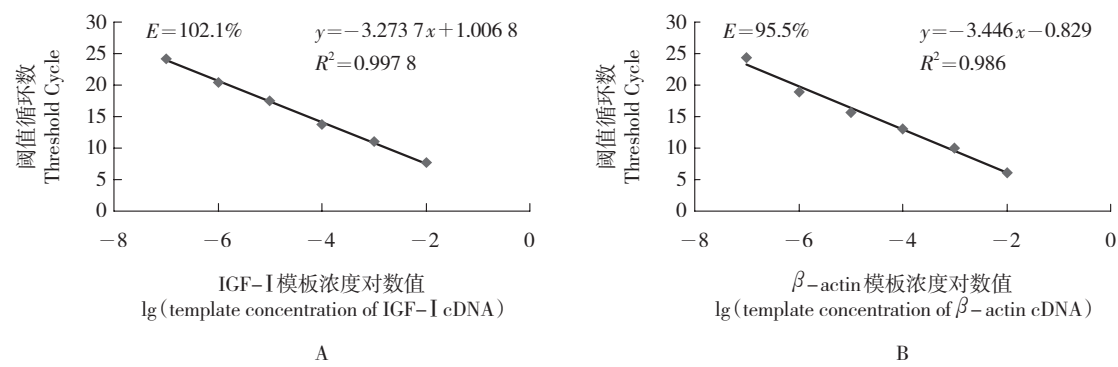


图1 实时荧光定量PCR标准曲线
 $E = (10^{-1/\text{斜率}} - 1) \times 100\%$.

Fig. 1 Standard curve by real-time fluorogenic quantitative PCR
 $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100\%$.

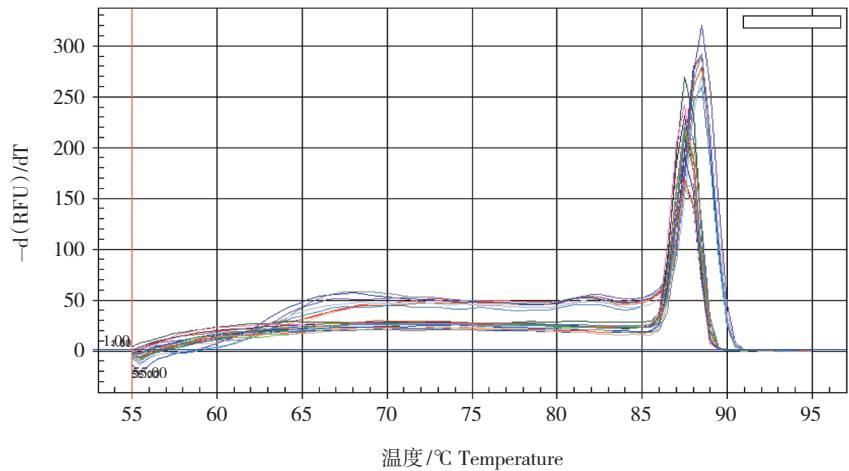


图2 实时荧光定量PCR熔解峰图
Fig. 2 Melt peak chart by real-time fluorogenic quantitative PCR

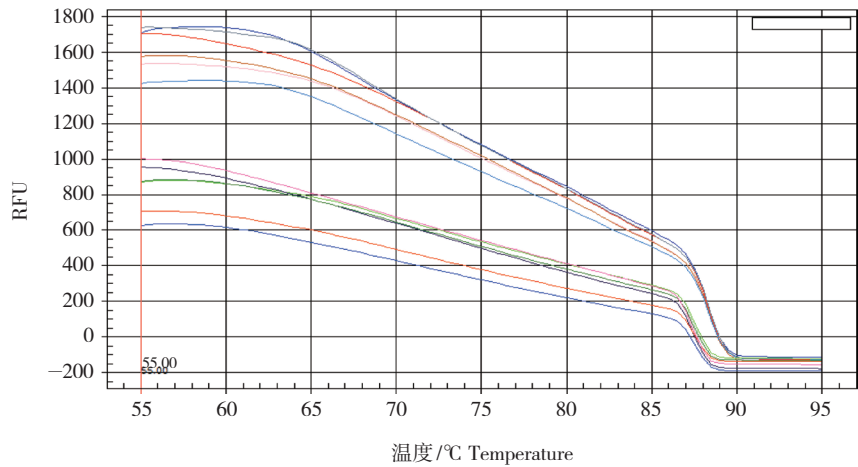


图3 实时荧光定量PCR熔解曲线
Fig. 3 Melt curve chart by real-time fluorogenic quantitative PCR

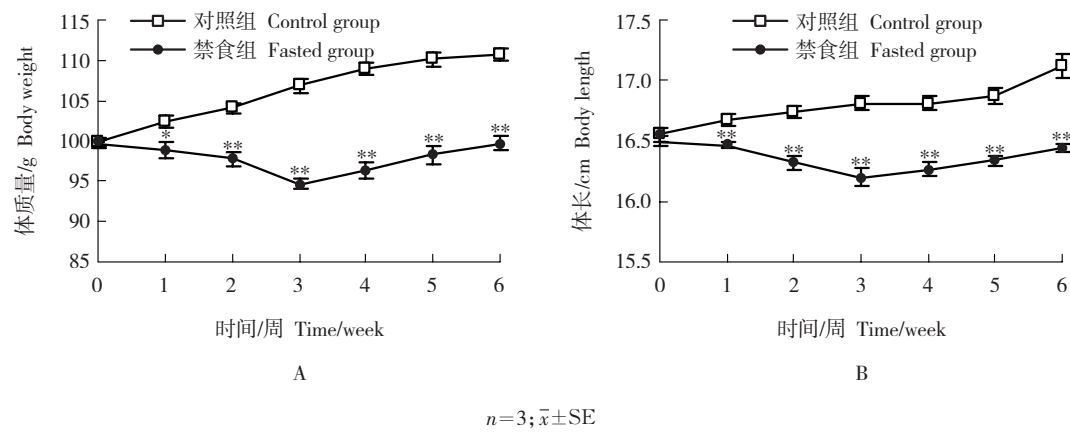


图4 大口黑鲈的生长变化
与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.
Fig. 4 Changes in growth of largemouth bass
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (with control).

2.3 大口黑鲈肝组织中IGF-I mRNA丰度的变化

禁食使大口黑鲈肝组织中IGF-I mRNA的表达水平呈下降趋势。禁食组禁食1或2周后肝组织IGF-I mRNA的表达水平低于对照组,但差异不显著($P > 0.05$);但禁食3周后,禁食组肝组织IGF-I mRNA水平极显著低于对照组($P < 0.01$)。恢复投

喂后,禁食组大口黑鲈肝组织IGF-I mRNA的表达水平逐渐恢复。但直到恢复投喂2周后肝组织IGF-I mRNA的表达量仍显著低于对照组($P < 0.05$)。当恢复投喂3周后,IGF-I mRNA表达水平与对照组相比无显著差异($P > 0.05$),详见图5。

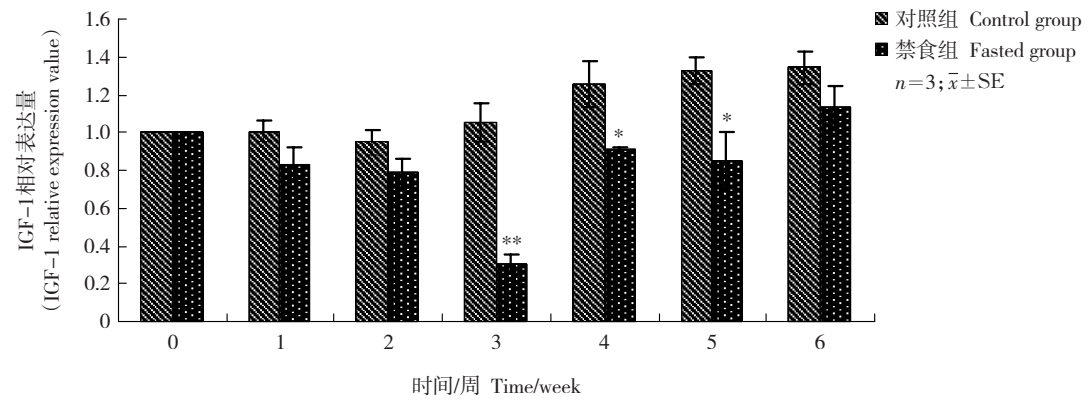


图5 禁食对大口黑鲈肝脏IGF-I mRNA表达的影响
与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.
Fig. 5 Effect of fasting on expression of IGF-I mRNA in liver of Largemouth Bass
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (with control).

3 讨论

本研究通过优化引物设计和PCR反应条件所建立的反应体系能使不同浓度底物的扩增结果相关性

高,扩增效率高(图1、图2)。在PCR反应体系中,采用非探针类荧光染料SYBR Green I与双链DNA结合后发射的荧光作为检测信号,不必因为模板不同而特别定制探针,因此设计的程序通用性好,且价格相对较

低。同时,通过熔点曲线分析可以指示双链 DNA 熔点的性质,识别扩增产物和引物二聚体,因而可以区分非特异性扩增(图3、图4)。本研究建立的方法与张弛宇等^[12]和Livak等^[13]所研究建立的方法是一致的。

本研究中尽管采用表观饱食投喂,但养殖实验中大口黑鲈的摄食率一直较低,42 d的养殖实验结束时,对照组鱼体增重率为10.99%,体长增长率为3.07%,相对于正常生长速度较为缓慢。这可能是实验过程中每周一次的测量操作对试验鱼产生的应激所致。另外,实验中所用饲料营养组成也许对大口黑鲈不是最合适的。但从实验数据分析来看,对照组与禁食组的生长参数仍表现出显著性差异。

本研究结果显示,禁食对大口黑鲈的生长和肝组织IGF-I mRNA表达产生了负面影响,再投喂后,大口黑鲈的生长和肝组织IGF-I mRNA丰度逐渐恢复。这表明营养状况在分子水平上调控大口黑鲈肝组织IGF-I mRNA表达,通过检测肝组织中IGF-I mRNA的表达丰度能够作为大口黑鲈营养与内分泌学研究的一个重要手段。有学者对于其他鱼类的研究也反映出与本研究相一致的情况。Duan和Hirano^[14]采用Northern印迹杂交法研究发现日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)在14 d的禁食后肝组织的IGF-I mRNA水平显著低于对照组。Duan和Plisetskaya^[15]对银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)的研究发现,禁食4周后肝脏中的IGF-I mRNA水平显著降低,生长停滞,而肾、脾、卵巢和肠等组织中的IGF-I mRNA水平并无显著变化,再投喂2周后肝脏中的IGF-I mRNA水平又恢复到对照的水平;同时发现禁食4周后血浆中GH的水平高于对照组4倍。该研究推论:禁食主要影响了肝组织IGF-I mRNA的表达,使循环系统中IGF-I的水平下降,从而导致生长受阻。禁食或营养限制同样导致澳洲肺鱼(*Lates calcarifer*)^[16]、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[8,17]、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[9]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[18]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[20]和鲤^[11]肝组织中IGF-I mRNA表达水平的下调。

近年来,在少数几种鱼类的重组IGF-I和GH以及相应抗体的研发取得成功,使得对这些鱼类的循环系统中的IGF-I和GH水平的检测得以实现,从而从分子生物学水平和蛋白质水平上研究鱼类营养、生长和内分泌的关系能够同时开展。从对莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicu*)^[17]、斑点叉尾鲷^[17]和鲢鳙类^[21-22]的营养状况对肝脏组织的IGF-I mRNA表达和循环系统激素水平与生长的相关性来看,它们之间存在着高度的一致性。这说明检测肝组织中IGF-I mRNA水平或循环系统中的IGF-I水平,用以反应鱼类的营养与生长状况是可靠的。研究同时发现,尽管GH是鱼类生长与发育的调控因子,但无论是脑垂体中GH mRNA表达水平还是循环系统的GH水平在所有的脊椎动物中往往与营养状况呈相反的趋势^[4,23]。另外, GH呈现脉冲性分泌,同时存在着日周期性和季节周期性变动^[24]。因此,脑垂体中GH mRNA表达水平或循环系统的GH水平则不能更好地反映鱼类的营养与生长状态。

营养对生长的控制作用是动物营养学关注的重点。当营养状况变化时动物自身通过一系列内在机制的调节对营养状况作出适应性应答。在营养受限时,动物的生长也受限。但GH在脑垂体中的基因表达水平和在循环系统中的水平,不是降低,反而升高。这种现象是由于GH的多功能性和受到IGF-I的负反馈调控作用产生的。动物在营养受限而处于分解代谢状态下, GH发挥其促进组织中脂肪分解而产生能量以维持生命活动对能量的需求。同时,因肝组织中GH受体数量的下调使得GH刺激肝组织产生IGF-I的机制失灵,从而使得GH通过IGF-I介导的促生长作用受阻。IGF-I水平的下降又负反馈调控GH水平的上升。这一现象常被称为在组织水平上对GH的抵抗^[5]。随着对IGF-I介导GH的促生长作用和负反馈调控GH生理功能的认识,人们对于IGF-I、动物生长和营养状况三者之间的相互关系给予了越来越多的关注。对于鱼类IGF-I mRNA表达水平的观测可以反映其营养、生长和代谢等状态,有助于从分子水平和内分泌水平上更加深入开展鱼类营

养与饲料学的研究^[7,20]。但是,对于鱼类的营养对内分泌调控的研究尚不如对人类和陆地高等动物的研究那么深入与完善。今后还应当深入探讨鱼类其他组织中IGF-I的自分泌和旁分泌是否也受到营养状况的影响以及各营养素(如氨基酸、能量、维生素、矿物质等)对鱼类生长与IGF-I的调节作用,以全面了解营养素对鱼类生长与IGF-I的影响,从而丰富鱼类营养学理论,指导养殖鱼类人工饲料的配制。

综上所述,本研究显示禁食对大口黑鲈生长和肝脏中IGF-I mRNA表达水平都会产生负面影响,且大口黑鲈的生长与肝脏IGF-I mRNA表达水平呈正相关。由此可见,营养状况是鱼类生长激素-类胰岛素生长因子-I (GH-IGF-I)轴重要的调节因子。把肝脏中IGF-I mRNA的表达作为指标能从分子生物学层面上反映出鱼类营养对鱼类生长和内分泌的影响。但相关的研究还有待进一步完善。

参考文献:

- [1] LeRoith D, Bondy C, Yakar S, et al. The somatomedin hypothesis: 2001 [J]. *Endocr Rev*, 2001, 22 (1): 53-74.
- [2] Mauras N, Haymond M W. Review: Are the metabolic effects of GH and IGF-I separable? [J]. *Growth Hormone IGF Res*, 2005, 15: 19-27.
- [3] Jones J I, Clemmons D R. Insulin-like growth factors and their binding protein: biological actions [J]. *Endocr Rev*, 1995, 16 (1): 3-34.
- [4] Renaville R, Hammadi M, Portetelle D. Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2002, 23: 351-360.
- [5] Straus D S. Nutritional regulation of hormone and growth factors that control mammalian growth [J]. *FTRAUS J*, 1994, 8: 6-12.
- [6] Duan C. Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish [J]. *J Nutr*, 1998, 128: 306S-14S.
- [7] Uchida K, Kajimura S, Reliy L G, et al. Effects of fasting on growth hormone/insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. *Comp Biochem Physiol Part A*, 2003, 134: 429-439.
- [8] Peterson B C, Waldbieser G C. Effects of fasting on IGF-I, IGF-II, and IGF-binding protein mRNA concentrations in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2009, 37: 74-83.
- [9] Pedrosa F L, Ayson E G, Cortado H H, et al. Changes in mRNA expression of grouper (*Epinephelus coioides*) growth hormone and insulin-like growth factor I in response to nutritional status [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2006, 145: 237-246.
- [10] Duan C, Plisetskaya E M. Nutritional regulation of insulin growth factor-I mRNA expression in salmon tissues [J]. *J Endocrinol*, 1993, 139: 243-252.
- [11] 华益民, 林浩然. 营养状况对幼年鲤鱼肝脏IGF-I mRNA表达的影响 [J]. *动物学报*, 2001, 47 (3): 94-100.
- [12] 张驰宇, 徐顺高, 黄新祥. 一种新颖简便的荧光实时RT-PCR相对定量方法的建立 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 33 (9): 883-888.
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [14] Duan C, Hirano T. Effects of insulin-like growth factor-I and insulin in the in vitro uptake of sulfate by eel branchial cartilage: evidence for the presence of independent hepatic and pancreatic sulfation factors [J]. *J Endocrinol*, 1992, 133: 211-219.
- [15] Duan C, Plisetskaya E M. Nutritional regulation of insulin-like growth factor-I mRNA expression in salmon tissues [J]. *J Endocrinol*, 1993, 139: 243-252.
- [16] Matthews S J, Kinhult A K, Hoebe P, et al. Nutritional regulation of insulin-like growth factor mRNA expression in barramundi, *Lates calcarifer* [J]. *J Mol Endocrinol*, 1997, 18 (3): 273-276.
- [17] Small B C, Peterson B C. Establishment of a time-resolved fluoroimmunoassay for measuring plasma insulin-like growth factor I (IGF-I) in fish: effect of fasting on plasma concentrations and tissue mRNA expression of IGF-I and growth hormone (GH) in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2005, 28: 202-215.
- [18] Li M, Leatherland J. Temperature and ration effects on components of the IGF system and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during the transition from late stage embryos to early stage juveniles [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, 155: 668-679.
- [19] Vera Cruz E M, Brown C L, Adam Luckenbach J, et al. Insulin-like growth factor-I cDNA cloning, gene expression and potential use as a growth rate indicator in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *Aquaculture*, 2006, 251: 585-595.
- [20] Dyer A R, Barlow C G, Bransden M P, et al. Correlation of plasma IGF-I concentrations and growth rate in aquacultured finfish: a tool for assessing the potential of new diets [J]. *Aquaculture*, 2004, 236: 583-592.

- [21] Wilkinson R J, Porter M, Woolcott H, et al. Effects of aquaculture related stressors and nutritional restriction on circulating growth factors (GH, IGF-I and IGF-II) in Atlantic salmon and rainbow trout [J]. *Comp Biochem Physiol Part A*, 2006, 145: 214–224.
- [22] Beckman B R, Shimizu M, Gadberry B A, et al. Response of the somatotrophic axis of juvenile coho salmon to alterations in plane of nutrition with an analysis of the relationships among growth rate and circulating IGF-I and 41 kDa IGFBP [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2004, 135: 334–344.
- [23] Fox B K, Breves J P, Hirano T, et al. Effects of short-and long-term fasting on plasma and stomach ghrelin, and the growth hormone/insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2009, 37: 1–11.
- [24] Canosa L F, Chang J, Peter E P. Neuroendocrine control of growth hormone in fish [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2007, 151: 1–26.

Effects of fasting on growth and expression abundance of IGF-I mRNA in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

CHEN Naisong, ZHOU Jie, JIN Lina, ZHOU Hengyong, MA Jianzhong, QIU Xiaojie

(Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The endocrine axis of growth hormone-insulin-like growth factor I plays a critical role in adjusting fish growth. Meanwhile, nutritional status exerts a complicated effect on the axis. In this study, real-time fluorogenic quantitative RT-PCR (rfqRT-PCR) was used and the effects of fasting on growth and hepatic insulin-like growth factor (IGF-I) mRNA expression abundance in 1-year aged largemouth bass, body weight (100 ± 1) g, were evaluated. During a 6 weeks' trial, control fish (Control group) were fed to apparent satiation twice daily, while test fish (Fasted group) were fasted over the first 3 weeks and re-fed over the later 3 weeks. At the end of the trial, the body weight and body length of the control fish gradually increased by 10.99% and 3.07%, respectively. Those of the fish fasted for the first 3 weeks reduced by 5.08% and 1.79%, respectively. During fasting, IGF-I mRNA expression abundance in liver came to downtrend ending in 29.93%, significantly lower compared to that of the control fish ($P < 0.01$). After 2 weeks of re-feeding, the hepatic IGF-I mRNA level was still significantly lower ($P < 0.05$) and the body weight and body length restored to 96.54% and 99.03% of the initial values, respectively. After 3 weeks of re-feeding, the expression of hepatic IGF-I mRNA did not show significant difference compared to that of the control fish ($P > 0.05$). But the fish restored only to the initial levels in body weight and body length. These results showed that fasting caused body weight and length losing with reduction of hepatic IGF-I mRNA expression in largemouth bass and that re-feeding resulted in restoration in body growth and expression of hepatic IGF-I mRNA. It was conducted that there was a positive correlation between nutritional status, growth and hepatic IGF-I mRNA level.

In most juvenile vertebrates, plasma GH is increased rather than decreased under conditions of nutritional restriction. Current evidence suggests that the biosynthesis of IGF-I is a key control point for nutritional regulation of growth. Plasma IGF-I peptide levels and hepatic IGF-I mRNA abundance are correlated with growth velocity and are consistently decreased when growth is arrested by nutritional deprivation. As for fish, many important questions need to be answered to fully understand the nutritional roles of IGF-I and the underlying molecular basis. The effect of nutritional status on the autocrine or paracrine of IGF-I in fish remains unclear. In addition, it is essential to investigate whether individual nutrients, such as amino acids, energy, minerals and vitamins, regulate IGF-I gene expression and biological activity in fish as in mammals. These pending findings will contribute to completely understanding information on fish IGF-I physiology. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 713–720]

Key words: largemouth bass; fasting; IGF-I; growth; expression abundance; rfqRT-PCR