

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15416

团头鲂促肾上腺皮质激素释放激素受体基因序列特征及表达分析

陈凯^{1,2}, 习丙文², 滕涛^{2,3}, 王亚冰^{2,3}, 高金伟^{1,2}, 梁利国², 谢骏²

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;
2. 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081;
3. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 204182

摘要: 促肾上腺皮质激素释放激素受体(corticotropin-releasing hormone receptor, CRHR)是鱼类下丘脑-垂体-头肾调控轴上的重要应激调节因子。本研究通过 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术成功克隆出团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) CRHR1 mRNA 全长序列, 应用生物信息学方法对其序列特征进行解析; 同时采用荧光定量 PCR 技术分析了团头鲂 CRHR1 的组织分布图谱及外源性皮质醇注射模拟应激处理下团头鲂 CRHR1 mRNA 的表达变化。研究表明, CRHR1 mRNA 序列开放阅读框(open reading frame, ORF)为 1290 bp, 编码 429 个氨基酸。团头鲂 CRHR1 氨基酸序列与鲤科鱼类的 CRHR1 氨基酸序列同源性最高; 该受体具有 7 次横跨膜结构和氨基端激素受体结构域。CRHR1 在垂体中表达量最高, 其次为下丘脑, 在心脏、肝、脾等组织中表达丰度较低。经外源性皮质醇注射后, 实验组血糖和血清皮质醇显著高于对照组, 在处理 2 h 后达到峰值; 实验组血清 ACTH 水平与对照组差异总体不显著, 但呈现先升高后下降。应激处理后, CRHR1 转录水平在 4 种组织中的表达变化存在差异; 垂体中 CRHR1 在早期出现明显的表达抑制, 在下丘脑中则呈现先缓慢升高后缓慢下降的趋势, 而心脏和头肾中 CRHR1 在早期则表现出表达迅速上调而后缓慢下降的趋势。本研究进一步丰富了 CRHR 在鱼类研究方面的基础资料, 为鱼类应激调控提供了理论基础。

关键词: 团头鲂; 促肾上腺皮质激素释放激素受体; 基因克隆; 表达分析; 组织分布

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)04-0833-13

应激(stress)是机体对各种内外因素刺激所产生的非特异应答反应^[1]。渔业生产中养殖水生动物常常面临着来自环境(如水温、溶氧、亚硝酸盐等)、管理操作(如运输、分塘、疾病防治等)、生物(如病原、放养密度等)等方面的应激因素影响。Nardocci 等^[2]认为鱼体应激状态是一个资源(特别是能量)被积极需求的状态, 该状态下鱼体为保证应激相关的能量物质供应, 其他相关需求(免疫防御、生长等)供应受到限制。研究表明, 过度的应激反应会对鱼类的生长^[3]、繁殖^[4]以及抗病力^[5]等方面造成不利影响^[6]。

鱼体应激反应受到神经内分泌调控, 其中下丘脑-垂体-肾间组织(头肾)轴(hypothalamic-pituitary-interrenal axis, HPI 轴)为主要应激调控轴之一。HPI 轴在应激事件发生时被激活, 通过级联释放的促肾上腺皮质激素释放激素(corticotrophin releasing hormone, CRH)、促肾上腺皮质激素(adreno-corticotropic hormone, ACTH)以及皮质类固醇激素(corticosteroid)与其对应受体的相互作用, 最终引起皮质醇(cortisol)浓度显著升高。促肾上腺皮质激素释放激素受体(corticotropin-releasing hormone receptor, CRHR)作为 HPI 轴上的关键调

收稿日期: 2015-11-12; 修订日期: 2015-12-28.

基金项目: 国家自然科学基金(31572662); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-46-10); 江苏省水产三新工程项目(D2015-13).

作者简介: 陈凯(1990-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物病害学. E-mail: kaiaitg2009@163.com

通信作者: 谢骏, E-mail: xiej@ffrc.cn; 习丙文, E-mail: xibw@ffrc.cn

节因子,其在 HPI 轴应激调控相关功能方面起到了重要作用。目前研究发现脊椎动物中 CRHR 主要存在 2 种亚型,仅在美洲鲷(*Ameiurus nebulosus*)^[7]中发现了第 3 种亚型。其中 CRHR1 主要在脑和垂体中表达,CRHR2 则主要在以心脏和骨骼肌为代表的外周组织中的表达^[8]。CRHR 被外界应激源诱导产生的 CRH 或其他 CRH 样多肽激活,进而引起下游效应,诱导皮质醇合成释放。目前,鱼类 CRHR1 的相关研究较少,仅见美洲鲷^[7]、大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)^[9]、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[10]、红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)^[11]、慈鲷(*Astatotilapia burtoni*)^[12]等鱼类的相关报道,鱼类相关基础研究仍有待进一步加强。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)是国内大宗淡水养殖对象之一。目前高密度养殖模式下,应激现象非常突出,病害频发。本实验以团头鲂为研究对象,在转录组研究的基础上进一步获取 CRHR1 基因全长,采用外源性皮质醇注射的方式模拟应激,分析 CRHR1 在应激过程中的时空分布,以期为其应激和疾病防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所用实验鱼团头鲂均由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉基地提供,鱼体健康无伤,活力强,体重(445±32) g,体长(32±4) cm。实验前,团头鲂于循环养殖系统中暂养 2 周,水温控制在(25±1)°C,持续充氧,光周期同自然光,按体重的 3%投喂商品颗粒饲料,1 天 3 次。

1.2 样品采集

基因组织表达分布分析所需组织样品来自随机选取的 10 尾团头鲂。鱼体经 MS-222(175 mg/L)麻醉后,快速解剖,取心脏、肝、脾、鳃、肾、头肾、下丘脑、垂体、皮肤、肌肉、肠道、性腺共 12 种组织,-80°C 保存备用。

外源性皮质醇注射应激处理实验随机选取 140 尾,分为实验处理组和对照组,每组设置 2 个平行。经 2 周时间适应后,开始实验。实验组腹腔注射皮质醇溶液(1 mL/kg 体重,质量浓度为

10 mg/mL,溶剂为酒精,皮质醇购自山东西亚化工有限公司),对照组注射等量的酒精,在注射后记为 0 h。分别在 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、5 d 取样;每次每个平行组取 5 尾鱼。取样前使用 175 mg/L 的 MS-222 对鱼进行麻醉,采血。根据组织分布研究结果,采集心脏、头肾、下丘脑、垂体共 4 种组织供后续分析,-80°C 保存备用。

1.3 RNA 提取

将组织(重量<0.1 g)放入 1 mL RNAiso Plus (TaKaRa, Japan),用高通量组织破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)迅速充分匀浆后,取上清,按试剂操作说明提取 RNA,使用 NanoDrop 2000(Thermo Scientific)检测 RNA 质量及浓度,选取 OD₂₆₀/D₂₈₀ 值在 1.8~2.0 的样品,使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, Japan),按照试剂使用说明处理 RNA 去除基因组 DNA,最终以 50 ng/μL 的 RNA 进行反转录,获得的 cDNA 于-20°C 保存备用。

1.4 血液指标分析

通过尾椎静脉取血,采集的血液立即离心,收集血清,参数设置为 7500 r/min,4°C,5 min,血清保存于-20°C 备用。血糖直接由 ACCU-CHEK Pertorma 血糖仪(罗氏)测得。血清皮质醇及血清 ACTH 的检测在化学发光免疫竞争法在 MAGLUMI 1000 全自动化学发光免疫分析仪上进行,试剂盒购于深圳市新产业生物医学工程有限公司。

1.5 CRHR 克隆与生物信息学分析

根据团头鲂转录组中已获得的 CRHR 基因序列片段,设计引物(表 1)结合 RACE 试剂盒 (Invitrogen)和 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(Clontech)扩增 5'端和 3'端序列。

应用 Clustal Omega(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)对团头鲂 CRHR 氨基酸序列进行在线分析比对。其磷酸化位点通过 NetPhos 软件进行预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK>)。团头鲂 CRHR 结构由疏水性检测(<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>)、跨膜结构预测(TMhmm Server v. 2.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)和人 CRHR (NP_004373)

结构模型综合分析。团头鲂 CRHR 系统发育分析采用 MEGA4.1 软件中 Neighbor-Joining 方法, 系

统发育树各节点支持率采用自举(Bootstrap)1000 次检验。

表 1 团头鲂 *CRHR1* 克隆及实时荧光定量 PCR 所用引物

Tab. 1 Primers used for *M. amblycephala CRHR1* mRNA cloning and the quantitative real-time PCR reactions

引物 primer	序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	用途 usage
CRHR1-f	CTCAATGCCAGGAGATTCTCA	扩增 <i>CRHR1</i> 中间片段
CRHR1-r	TTCCACAGTATCAAACAGTC	
CRHR1-3	TAAGCACTCCATTCCGGGCACGGGT	RACE 扩增 <i>CRHR1</i> 3'端
CRHR1-5	CGAGGAGAAGAAAAGCAA	RACE 扩增 <i>CRHR1</i> 5'端
β -actin-F	TCGTCCACCGCAAATGCTTCTA	Real-time PCR 扩增 β -actin
β -actin-R	CCGTCACCTTACCCTTCCAGT	
RPII-F	CGCGAGTCATTCCTGTAACATC	Real-time PCR 扩增 <i>RPII</i>
RPII-R	TGACCTTCTCAGCTTACCA	
CRHR1-F	GCGATGCTCTGCTCCTACTC	Real-time PCR 扩增 <i>CRHR1</i>
CRHR1-R	CCCAGGTGCCATTAGCAAGA	

1.6 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)采用相对标准曲线法, 所用引物见表 1, 其中内参基因 β -actin 和 RP II 引物参照董晶晶等^[13], 引物合成及序列测定由生工生物工程(上海)技术有限公司完成。qRT-PCR 反应采用 SYBR Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus)试剂盒(大连宝生物有限公司), 在 ABI PRISM 7500 Real-time PCR System 仪器上进行检测和分析。参数设置参照薛春雨等^[14]。阴性对照, 以灭菌双蒸水代替 cDNA 模板; 每个样品设置 3 个重复。

1.7 数据统计与分析

数据差异显著性分析使用 SPASS 18.0(SPASS Inc., Chicago)软件中的单因素方差分析(One-Way ANOVA)和独立样本 *T* 检验(Independent samples *T* test), 显著性水平设置为 0.05。

2 结果与分析

2.1 团头鲂 *CRHR* mRNA 序列

从团头鲂转录组中获得的 *CRHR* 基因序列片段 937 bp, 与其他物种 *CRHR* 存在高度同源性。经 5'RACE-PCR 和 3'Tail-PCR 扩增获得缺失的 5'端和 3'端, 序列长度分别为 508 bp 和 457 bp; 序列拼接后获得全长 1690 bp, 其包含了一个 1290 bp 的开放阅读框, G、C 含量为 49.26%, 编码 429 个氨

基酸(图 1), 预测蛋白分子量大小为 49.51 kD, 理论等电点为 9.53, 蛋白平均疏水性为 0.283。序列氨基酸组成方面, 强碱性氨基酸(K, R)42 个, 强酸性氨基酸(D, E)23 个, 疏水氨基酸(A, I, L, F, W, V)181 个, 极性氨基酸(N, C, Q, S, T, Y)132 个。

2.2 团头鲂 *CRHR* 的同源性和进化分析

序列同源性分析表明, 团头鲂 *CRHR* 氨基酸序列与 GenBank 收录的其他脊椎动物 *CRHR1* 具有很高的同源性。其与鲤科鱼类 *CRHR1* 氨基酸序列同源性最高达 99.07%, 与人类、哺乳动物、鸟类、爬行类以及其他鱼类 *CRHR1* 氨基酸序列的同源性分别为 84.35%, 83.86%, 91.42%, 88.76%和 89.88%(表 2)。系统进化分析结果显示(图 2), 团头鲂 *CRHR* 与鲤科鱼类 *CRHR1* 聚为一支, 且与金鱼 *CRHR1* 的进化距离最近。

2.3 团头鲂 *CRHR1* 的结构及特征

序列结构分析显示: 团头鲂 *CRHR1* 存在两个保守结构域(激素受体结构, HormR 和七次横跨膜结构, 7tm_2; 图 3)。其中, HormR 结构主要存在于激素受体中, 与配体结合相关; 而 7tm_2 结构属于七次跨膜结构受体家族的特征结构。疏水性检测结果表明: 团头鲂 *CRHR1* 在 Ile¹²、Val¹⁵⁰、Ala¹⁷⁵、Cys²²⁵、Trp²⁵⁰、Phe³⁰⁰、Thr³⁴⁰、Gly³⁷⁰ 残基附近具有较强的疏水作用(图 4)。进一步的跨膜

```

1          TATCTGTTATCCACTTCTCTTTCTGCCCTCTATCTACTGGAGCA 44
45 ATGAGTCGCATCCTCCACACAGGTGTGACCATCTGGATTACACTAATCTCCAGGGCAACAGCT 110
1 MS R I L H T Q V L T I W I T L I S R A T A 22
111 GACCTGACCTGCGATGCTGTCTCTACTCTCCACAAATCTACAGCTCGCACTTTCATCTATGG 176
23 D L T C D A L L L S T N L T A R T F I L W 44
177 AACAGAGCTAGTCCCACTACAGGTTGTTTGTAACTTCGATTGATGGCATTGGG 242
45 N Q T S S P T N S T G L F C N T S I D G I G 66
243 ACATGCTGGCCAGGAGCAGTGCAGGAGAAGTGGTGTCCCGCCCTGTCGGGAGACATTCTCGGG 308
67 T C W P R S S A G E V V S R P C P E T F L G 88
309 GTCGATACAACACCAATAATGTGTACAGAGAATGTCTGTAATGGCACCTGGGCAAGAG 374
89 V R Y N T T N N V Y R E C L A N G T W A K K 110
375 GGAAACTACTCCAATGTGAGAAATCCTCAACGAGGAGAAAGAAAGCAAGCTGCATTACCACATT 440
111 G N Y S Q C Q E I L N E E K K S K L H Y H I 132
441 GCAGTCATATAAACTACCTGGGACACTGTATCTCTGGGAGCCCTGTGGTGGCCTCATCCTC 506
133 A V I I N Y L G H C I S L G A L L V A F I L 154
507 TTTATGAGACTCAGGAGTATCCGGTGTCTGAGAAATATCATCCACTGGAACCTGATTACGGCATT 572
155 F M R L R S I R C L R N I I H W N L I T A F 176
573 ATCCTGCGAAATGGCCACTGTTTGTGGTGCAGCTCACCATGAATCCAGAGGTGCATGAGAGCAAT 638
177 I L R N A T W F V V Q L T M N P E V H E S N 198
639 GTGATCTGGTGCAGGTCACAGCAGCATATAATTATTCATGTGACCAACTTCTCTGGATG 704
199 V I W C R L V T A A Y N Y F H V T N F F W M 220
705 TTTGGAGGGCTGTATCTGCATACAGCCATAGTACTGACATACTCCACAGACAAACTGAGGAAA 770
221 F G E G C Y L H T A I V L T Y S T D K L R K 242
771 TGGATTTCACTGTATAGGTTGGTATTCCATTCGCCATTATCGTCGGCTGGGCCATTGGCAAG 836
243 W M F I C I G W C I P F P I I V A W A I G K 264
837 CTGTGCTATGACAATGAAAGTGTGGTTGGGAAGCGGGCCGCATTACACTGATTATATTAC 902
265 L C Y D N E K C W F G K R A G I Y T D Y I Y 286
903 CAGGGTCCATGATCTGGTCTACTGATTAATCTCATTTTCTCTCAACATTGTGAGGATCCTG 968
287 Q G P M I L V L L I N F I F L F N I V R I L 308
969 ATGACTAAACTGAGGGCTCCACTACCTCAGAGACCATTAGTACAGAAAGCGGTGAAGGCCACA 1034
309 M T K L R A S T T S E T I Q Y R K A V K A T 330
1035 CTGGTCTCTGCCCTGTAGGCATCACATACATGTGTTCTTCGTCACCTGGCAGGATGAG 1100
331 L V L L P L L G I T Y M L F F V N P G E D E 352
1101 ATCTCACAGATGTCTTCACTTCACTTCACTCTTCTAGAGTCTTTAGGATCTTTGTGTCA 1166
353 I S Q I V F I Y F N S F L E S F Q G F F V S 374
1167 GTGTTCTACTGCTTTTGAACAGTGAGGTTTCGCTCAGCCGTTCTGTAACAGTGGCATCGTGGCAG 1232
375 V F Y C F L N S E V R S A V R K R W H R W Q 396
1233 GATAAGCACTCCATTGGGACGGGTGGCGGGCCATGTCTATTCCACCTCTCCAACGAGGGTC 1298
397 D K H S I R A R V A R A M S I P T S P T R V 418
1299 AGTTTCCACAGCATCAGCAGTCTGGGCGCTGACCTTAACAGAGCGGAGCGCCGCTCCTCCC 1334
419 S F H S I K Q S S A V * 429
ATGAGTTCGATGATAAAGTTATATGTCGCACATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 团头鲂 CRHR cDNA 序列及其翻译氨基酸序列

氨基酸序列位于核酸序列之下，粗体示起始密码子对应氨基酸，星号对应终止密码子。

Fig. 1 Full-length nucleotide and deduced amino acid sequence of *M. amblycephala* CRHR

The deduced amino acid is shown below the nucleotide sequence. The start codon is in bold and the stop codon is indicated by an asterisk.

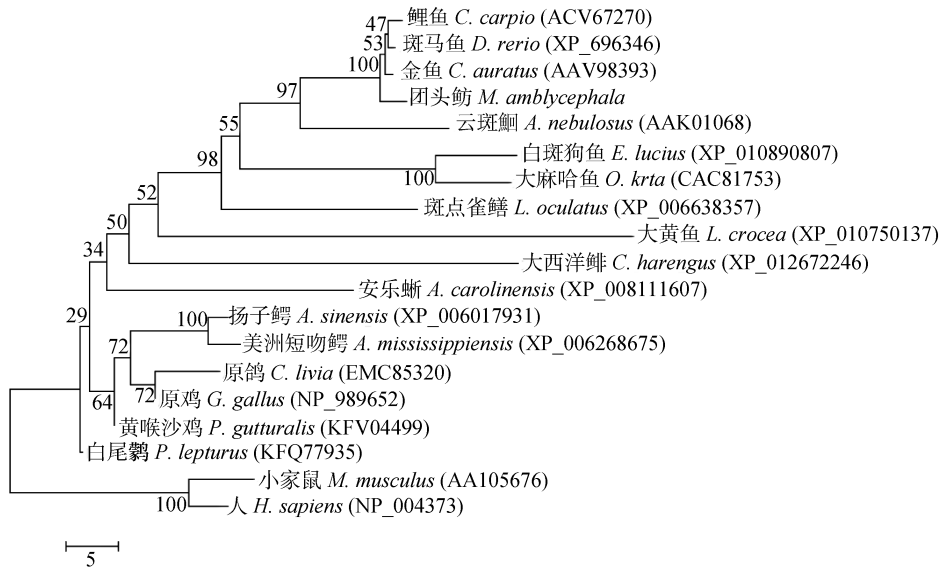


图 2 基于 CRHR1 氨基酸序列构建的 NJ 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of CRHR1 amino acid sequences built using NJ method

表 2 不同物种间 CRHR1 氨基酸序列相似性
Tab. 2 The identity of the CRHR1 amino acid sequences from different species

物种 species	L. cro	E. luc	O. ket	C. har	H. sap	M. mus	A. neb	D. rer	M. amb	C. aur	C. car	L. oeu	A. car	A. mis	A. sin	G. gal	C. liv	P. lep	P. gut
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	100.00	81.20	81.69	82.86	81.68	81.19	83.18	84.96	84.69	85.17	84.93	82.06	81.44	82.67	83.17	85.22	81.93	85.79	86.05
白斑狗鱼 <i>E. lucius</i>	100.00	100.00	96.49	84.91	83.13	82.63	89.20	90.07	89.36	90.07	89.83	88.56	85.96	85.71	86.10	90.16	86.32	90.69	90.69
大麻哈鱼 <i>O. keta</i>		100.00	100.00	85.85	83.62	83.13	88.97	90.78	90.07	90.78	90.54	88.81	85.46	85.71	86.10	89.89	85.82	90.43	90.69
大西洋鲱 <i>C. harengus</i>			100.00	100.00	82.15	81.42	84.88	89.95	89.46	89.93	89.70	85.24	85.07	86.07	85.71	89.68	85.93	89.18	89.18
人 <i>H. sapiens</i>			100.00	100.00	97.59	83.45	84.39	84.35	84.35	84.60	84.35	85.61	87.13	89.11	89.46	91.82	89.43	92.63	92.37
小家鼠 <i>M. musculus</i>			100.00	100.00	82.97	83.90	83.86	84.11	83.86	84.11	83.86	85.11	85.89	88.37	88.73	91.29	88.70	91.58	91.84
云斑鲷 <i>A. nebulosus</i>			100.00	100.00	94.42	94.17	94.87	94.64	90.05	86.88	87.38	88.24	91.82	87.96	91.58	91.58	91.58	91.58	91.58
斑马鱼 <i>D. rerio</i>			100.00	100.00	99.07	99.53	99.53	99.53	91.57	88.59	89.08	89.19	92.88	88.67	92.37	92.37	92.37	92.37	92.37
团头鲂 <i>M. amblycephala</i>			100.00	100.00	99.07	99.07	99.07	99.07	91.55	88.31	88.81	89.16	92.59	88.40	92.35	92.35	92.35	92.35	92.35
金鱼 <i>C. auratus</i>			100.00	100.00	99.53	99.53	99.53	99.53	91.79	88.56	89.05	89.16	92.86	88.64	92.61	92.61	92.61	92.61	92.61
鲤 <i>C. carpio</i>			100.00	100.00	91.55	88.31	88.81	88.81	88.81	88.81	88.81	88.81	88.81	88.81	88.81	88.81	88.81	88.81	88.81
斑点雀鲷 <i>L. oculatus</i>			100.00	100.00	86.35	88.34	89.33	91.82	88.83	91.84	92.11	92.11	92.11	92.11	92.11	92.11	92.11	92.11	92.11
安乐蜥 <i>A. carolinensis</i>			100.00	100.00	90.35	90.59	93.40	90.84	92.89	92.89	92.89	92.89	92.89	92.89	92.89	92.89	92.89	92.89	92.89
短吻鳄 <i>A. mississippiensis</i>			100.00	100.00	98.76	96.83	95.79	96.58	96.84	96.84	96.84	96.84	96.84	96.84	96.84	96.84	96.84	96.84	96.84
扬子鳄 <i>A. sinensis</i>			100.00	100.00	97.36	96.07	97.11	97.37	97.37	97.37	97.37	97.37	97.37	97.37	97.37	97.37	97.37	97.37	97.37
原鸡 <i>G. gallus</i>			100.00	100.00	99.21	97.10	97.89	97.89	97.89	97.89	97.89	97.89	97.89	97.89	97.89	97.89	97.89	97.89	97.89
原鸽 <i>C. livia</i>			100.00	100.00	97.63	98.42	98.42	98.42	98.42	98.42	98.42	98.42	98.42	98.42	98.42	98.42	98.42	98.42	98.42
白尾鸮 <i>P. lepturus</i>			100.00	100.00	98.68	98.68	98.68	98.68	98.68	98.68	98.68	98.68	98.68	98.68	98.68	98.68	98.68	98.68	98.68
黄喉沙鸡 <i>P. gutturalis</i>			100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

注: 百分比值采用软件 Clustal Omega 通过序列比对获得。
Note: The identity value is calculated in Clustal Omega.

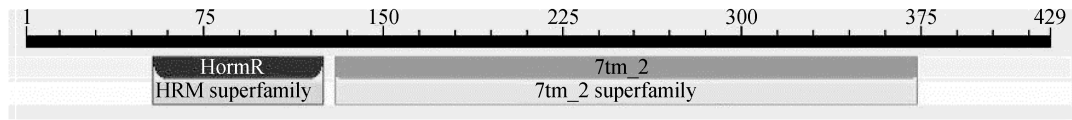


图 3 团头鲂 CRHR1 保守结构域

HormR: 激素受体结构; 7tm_2: 七次横跨膜结构.

Fig. 3 The conserved domains of *M. amblycephala* CRHR1

Horm R: Domain present in hormone receptors. 7tm_2: 7 transmembrane receptor.

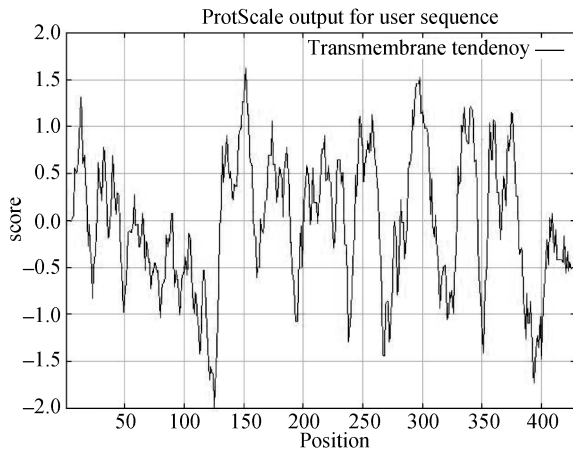


图 4 团头鲂 CRHR1 疏水性分析

图中分值越大, 其对应的氨基酸序列部分的疏水性越强.

Fig. 4 ProtScale of *M. amblycephala* CRHR1

The higher score means the stronger hydrophobicity.

结构预测显示: 在 Val¹⁵⁰、Ala¹⁷⁵、Cys²²⁵、Trp²⁵⁰、Phe³⁰⁰、Thr³⁴⁰、Gly³⁷⁰ 残基附近存在跨膜结构(图 5)。与此同时, 氨基酸序列多重对比及人 CRHR1 结构模型预测结果表明: 其跨膜结构域的数量与 TMHMM 预测结果一致(图 6), 且不同方法预测的跨膜结构位置具有一定的重合率(第一至第七跨膜结构域的重合率分别为 63%, 29%, 4%, 41%, 49%, 21%, 38%; 计算公式: 不同预测方法所预测跨膜结构氨基酸重合残基数量/不同预测方法所预测跨膜结构氨基酸残基数量的均值×100%)。此外, 人 CRHR1 结构模型预测还显示了团头鲂 CRHR1 可能的激动剂、拮抗剂结合位点以及信号肽结构。而综合人模型与 Netphos K 1.0 软件的预测结果显示: 团头鲂 CRHR1 的 Thr³¹⁰ 为潜在的 PKC 磷酸化位点。

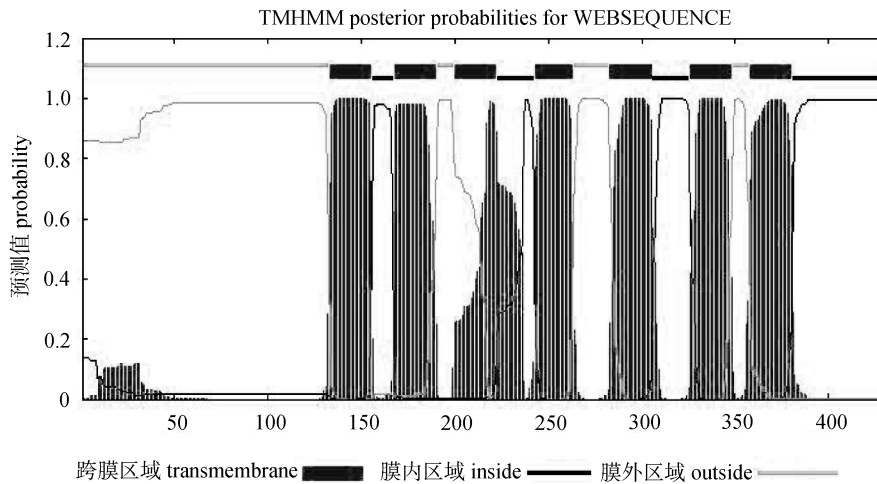


图 5 团头鲂 CRHR1 跨膜结构域预测

Fig. 5 The predicted transmembrane domain of *M. amblycephala* CRHR1

2.4 团头鲂 CRHR1 的组织分布特征

团头鲂 CRHR1 组织分布的结果显示: 其在垂体中的相对表达量最高, 下丘脑次之, 其他检视组织中, CRHR1 均有不同程度表达, 但其

表达水平均显著低于垂体和下丘脑。此外, 随机选取用于组织分布研究的团头鲂, 性腺发育状态尚不能区分精巢与卵巢, 故此并未对性腺进行区别(图 7)。

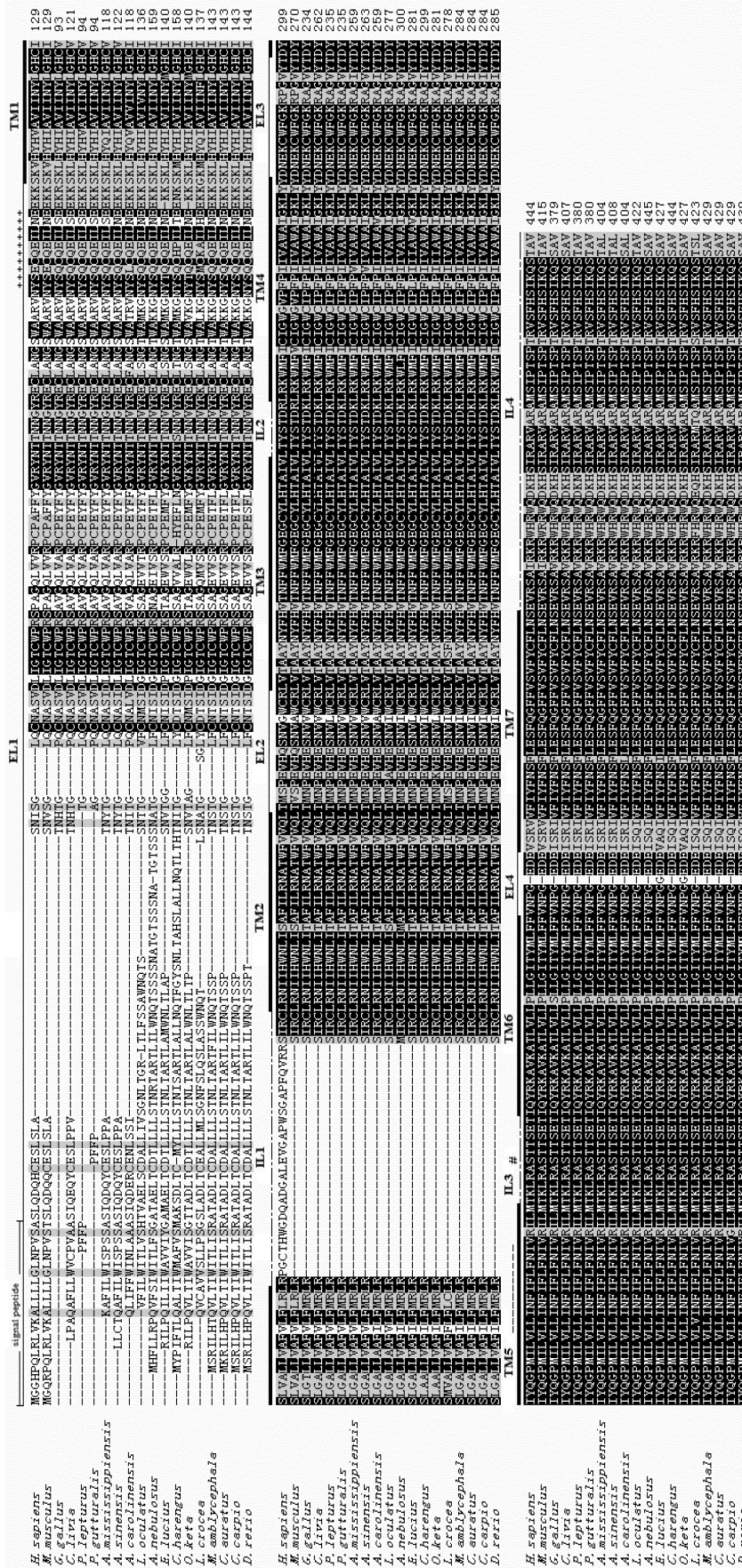


图 6 不同物种 CRHR1 氨基酸序列的多重对比

不同物种 CRHR1 跨膜结构域在氨基酸序列的多重对比的基础上, 根据人 CRHR1 结构模型进行预测, 图中注释解释如下: EL1-4, 胞外环; TM1-7, 跨膜区; signal peptide, 信号肽; “+”, 激动剂结合关键结构; “#”, 拮抗剂结合关键结构; “-”, 磷酸化作用位点。氨基酸所对应的背景颜色越深, 其在不同物种间保守程度越高。

Fig. 6 Multiple alignment of CRHR1 amino acid sequences of 19 vertebrate species

The transmembrane domain of CRHR1 is presumed by the structure model of *H. sapiens* CRHR1 based on multiple alignment of amino acid sequence, the label in the figure explained as following. EL1-4: extracellular loop; TM1-7: transmembrane domain; “+”: the critical motif of agonist binding sites; “-”: the critical motif of antagonist binding sites; “#”: phosphorylation site; the deeper color of background means the higher conserved residences.

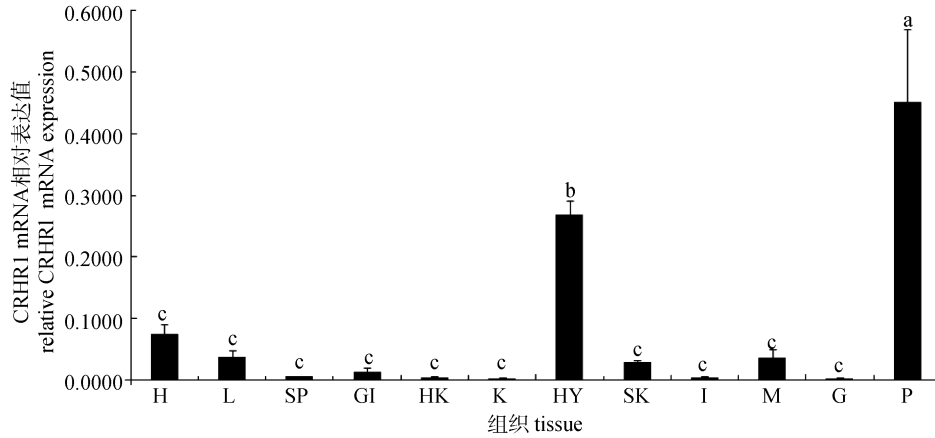


图 7 CRHR1 mRNA 在团头鲂不同组织中的表达分布

H: 心脏; L: 肝; SP: 脾; GI: 鳃; HK: 头肾; HY: 下丘脑; K: 肾; SK: 皮肤; I: 肠道; M: 肌肉; G: 性腺; P: 垂体; 不同字母表示不同时间点 CRHR1 表达差异显著(One-Way ANOVA, $P < 0.05$).

Fig. 7 Tissue-specific expression of CRHR1 in *M. amblycephala*

H: heart; L: liver; SP: spleen; GI: gill; HK: head kidney; HY: hypothalamus; K: kidney; SK: skin; I: intestine; M: muscle; G: gonad; P: pituitary. Different letter indicate statistical difference between different recovering time (One-Way ANOVA, $P < 0.05$).

2.5 皮质醇注射处理后血清应激相关指标的变化

外源性皮质醇处理后, 实验组血清 ACTH 水平在胁迫恢复前期出现明显的波动, 虽然与对照组的变化趋势基本一致(另设空白组, 其结果存在相似的变化趋势, 数据并未显示), 但其波动幅度及后期稳定水平显著高于对照组, 且其恢复稳定水平的时间明显晚于对照组(图 8)。血清皮质醇结果显示: 实验组血清皮质醇水平在胁迫恢复前期显著升高, 在 2 h 时附近达到峰值, 之后呈下降趋势, 但其持续高皮质醇水平时间长, 直到 12 h 时才恢复到正常水平。相对而言, 对照组皮质醇水平升高时间短, 达到峰值水平低, 恢复速度快, 高皮质醇水平维持时间短, 在 2 h 时附近就基本恢复了正常水平(图 9)。实验处理后, 血糖水平变化表现出一定的滞后性, 在 2 h 时显示出显著升高, 且高血糖水平维持时间长, 在 24 h 后才恢复到正常水平。而对照组在整个实验期间, 血糖水平都维持在正常水平(图 10)。

2.6 皮质醇注射处理后 CRHR1 的表达调控

皮质醇处理后, 垂体 CRHR1 表达受到抑制, 在胁迫恢复早期, 出现了显著的表达下调, 直到 8 h 时才恢复正常水平(图 11A)。与垂体中的表达变化不同, 下丘脑中 CRHR1 的表达在胁迫恢

复早期发生上调, 变化趋势似倒“V”形, 在 4 h 时达到峰值水平(图 11B)。头肾与心脏中 CRHR1 在胁迫恢复期的变化趋势类似, 在胁迫恢复前期 CRHR1 表达量显著上调, 在 4h 左右恢复正常水平(图 11C, D)。

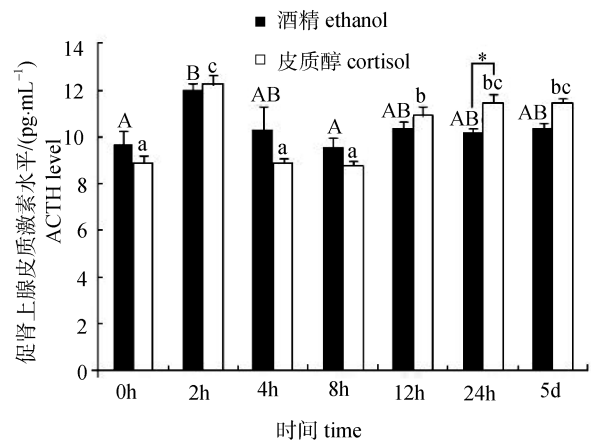


图 8 外源性皮质醇处理恢复期团头鲂血清 ACTH 水平的变化

不同字母表示不同时间点 ACTH 水平差异显著(One-Way ANOVA, $P < 0.05$), 星号表示同一时间的不同处理间 ACTH 水平差异显著(Independent samples *T* test).

Fig. 8 Effects on serum ACTH level during recovery from exogenous cortisol-stress

Different letter indicates statistical difference between different recovering time (One-Way ANOVA, $P < 0.05$). Asterisk indicates statistical difference between different treatment at the same time (Independent samples *T* test).

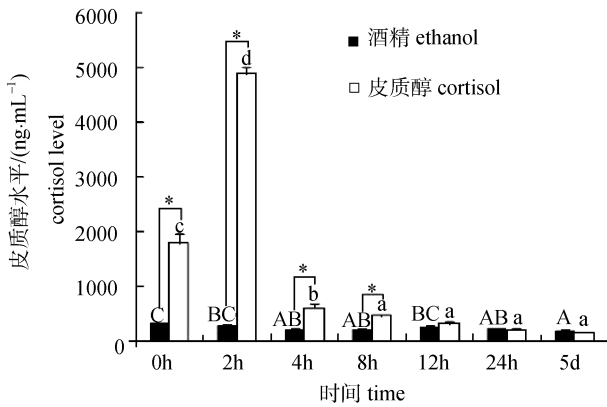


图 9 外源性皮质醇处理恢复期血清皮质醇水平的变化
不同字母表示不同时间点皮质醇水平差异显著(One-Way ANOVA, $P<0.05$), 星号表示同一时间的不同处理间皮质醇水平差异显著(Independent samples T test).

Fig. 9 Effects on serum cortisol level during recovery from exogenous cortisol-stress

Different letter indicates statistical difference between different recovering time (One-way ANOVA, $P<0.05$). Asterisk indicates statistical difference between different treatment at the same time (Independent samples T test).

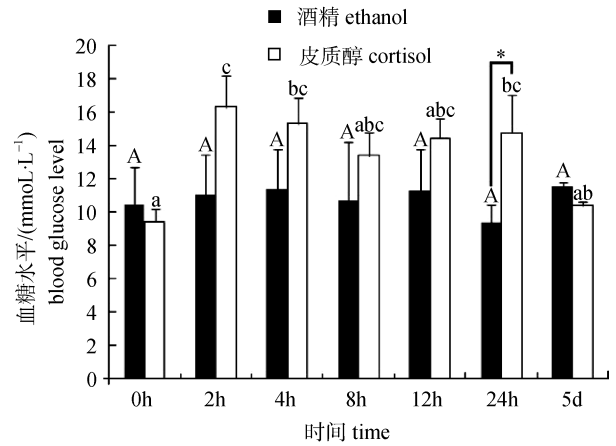


图 10 外源性皮质醇处理恢复期团头鲂血清血糖水平的变化
不同字母表示不同时间点血糖水平差异显著(One-Way ANOVA, $P<0.05$). 星号表示同一时间的不同处理间血糖水平差异显著(Independent samples T test).

Fig. 10 Effects on serum blood glucose level during recovery from exogenous cortisol-stress

Different letter indicates statistical difference between different recovering time (One-Way ANOVA, $P<0.05$). Asterisk indicates statistical difference between different treatment at the same time (Independent samples T test).

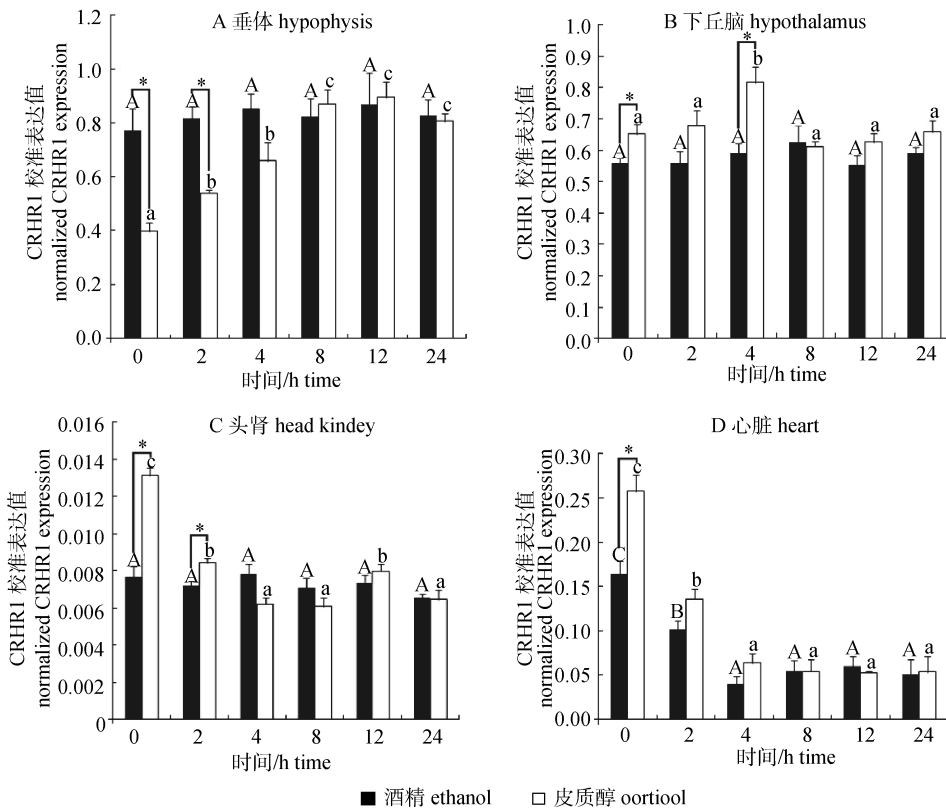


图 11 外源性皮质醇处理恢复期团头鲂 CRHR1 的组织表达变化

不同字母表示不同时间点 CRHR1 的组织表达水平差异显著(One-Way ANOVA, $P<0.05$). 星号表示同一时间的不同处理间 CRHR1 的组织表达水平差异显著(Independent samples T test).

Fig. 11 CRHR1 expression in tissues of *M. amblycephala* during recovery from exogenous cortisol-stress

Different letters indicates statistical difference between different recovering time (One-Way ANOVA, $P<0.05$). Asterisk indicates statistical difference between different treatment at the same time (Independent samples T test).

3 讨论

3.1 团头鲂 CRHR1 的结构特点

通常蛋白跨膜结构具有一定强度的疏水性。团头鲂 CRHR1 疏水性分析结果发现 Ile¹² 残基附近的强疏水性与 TMHMM 2.0 跨膜结构预测结果出现了偏离。由于细胞膜存在一定厚度, 跨膜区通常由 20 个左右的强疏水性氨基参与构成, 因此 Ile¹² 残基附近的强疏水性与跨膜结构并不相关^[15]。此外, 结构模型预测显示其氨基端存在信号肽结构。信号肽假说^[15]认为, 信号肽在蛋白质合成时会形成跨膜片段, 辅助多肽链穿过内质网膜。因此, Ile¹² 残基附近的强疏水性恰好符合信号肽假说。就预测结果而言, 3 种方法所预测的 7 个跨膜结构位置存在一定的重合率, 确保了预测的准确性^[16]。由于 TMHMM 2.0 软件分析与疏水性分析的核心算法相近, 因此两种方法在结构位置的预测结果上基本一致; 而模型分析依赖于 CRHR1 在物种进化过程中的保守性, 然而物种间毕竟存在差异, 因此可能存在偏差。

多重序列比对与模型预测分析结果显示在 EL1 存在激动剂结合位点, 与团头鲂 CRHR1 保守结构分析结果一致。而磷酸化位点的预测分析中, Netphos K 1.0 预测与模型预测结果均显示其位于 IL3 上, 由此可见 IL3 结构在 CRHR1 中的重要性以及在进化中的保守性。

3.2 团头鲂 CRHR1 组织分布特点

团头鲂 CRHR1 在垂体与下丘脑中的高丰度表达。该结果与 *A. nebulosus*^[7]、*O. keta*^[9]、*A. burtoni*^[12] 等鱼类的研究结论一致。而哺乳动物^[17]与两栖动物^[18-19]CRHR1 也有此分布特点。下丘脑作为 CRHR1 配体的主要合成部位, 而垂体又恰好是其发生作用的主要区域, 由此可见在进化过程中, CRHR1 于脊椎动物 HPI 轴中的功能具有保守性。

团头鲂 CRHR1 在外周组织中的广泛表达, 与其他学者的研究结果存在一定差异。Pohl 等^[9]对 *O. keta* CRHR1 在脑、心脏以及侧线系统等 9 种组织的表达情况进行了检测, 结果显示仅有 6 种组织表现出阳性结果。这种差异可能与作者所

用终点法 PCR 的灵敏度相关。

团头鲂 CRHR1 在外周组织中的表达分布极有可能与其功能调控相关。已有研究表明: CRHR1 在胰岛中的表达与胰岛 B 细胞的功能相关^[20]; 而免疫相关的研究中发现 CRHR1 参与了白细胞凋亡过程^[21]。鱼类的相关研究也有学者指出 *F. rubripes* 鳃中 CRHR1 的分布与其渗透压调节密切相关^[11]。因此, 团头鲂 CRHR1 能广泛的参与到其表达分布所在组织的功能调控中, 但其具体机制有待进一步研究。

3.3 团头鲂 CRHR1 在应激处理恢复阶段的调控作用

经典的 HPI 调控轴中, 机体受到应激源刺激后, 激活 HPI 轴, 最终引起皮质醇等激素的合成释放, 而达到阈值水平的激素最终促使机体动员能源应对应激事件。团头鲂在应激恢复早期血清 ACTH 水平所表现的波动性, 与虹鳟(*Onchorynchus mykiss*) 在应激后 5 min 出现的 ACTH 峰值的结果不同^[22], 这可能主要与取样时间点及鱼种有关。本文团头鲂皮质醇水平的变化与此前团头鲂应激研究^[13]中观察到的现象一致。从最终能量调动的结果来看, 实验组血糖水平在应激恢复早期表现出的滞后性升高以及应激恢复后期长时间维持的高血糖水平, 与赵建华等^[25]的观察结果一致。

受到外界刺激的团头鲂, 其下丘脑大量合成分泌 CRH 促使机体产生应激反应, 以保护自身免受外界刺激的影响。与此同时, 为避免受到过度应激带来的伤害, 位于应激轴上游的下丘脑中在应激发生的早期出现的 CRHR1 受体转录水平上调, 作者认为这属于对应激反应进行约束的一种方式, 而这一现象与前人对小鼠^[23]进行 LPS 注射研究时观察到的下丘脑中 CRHR1 表达变化结果一致。我们认为应激状态下下丘脑通过 CRHR 转录水平的变化的调控手段有两个方面, 其一, 通过 CRHR1 显著上调表达, 增强相应的反馈机制以削弱下游的应激反应, 另一方面, 位于 CRH 源头的对应受体的转录表达上调可能增加了对 CRH 的消耗, 进而减弱传递至下游组织的信号强度。然而 Makino 等^[23]在应用皮质醇注射时, 却与

我们发现不同, 这可能是使用的溶剂不同所导致的(酒精易溶于水的性质决定了本实验中皮质醇能迅速进入周围的组织环境, 因此我们的实验更趋向于急性应激; Makino 等^[23]应用芝麻油包被, 对皮质醇起到了缓释作用, 更类似于慢性应激)。而已有研究表明, 在急、慢性应激实验中, CRHR1 的调控表达存在不同表现^[24]。

而垂体作为 CRH 与 CRHR 发生作用的主要场所, 因此应激反应中 CRHR1 在垂体中表达变化有着重要意义。由于机体需要维持稳定的内环境, 受到刺激而产生的上游信号虽然在下丘脑中受到了相应的削弱处理, 但传至垂体的信号势必是要求产生应激反应以应对外界刺激, 面对要求产生应激反应的信号, 应激调控轴进一步行使其维持机体稳定、调控应激的功能, 对应激的产生进行控制, 因此机体抑制了 CRHR 在垂体中的表达, 以削弱下游效应, 进而确保机体不会产生过度强烈的应激反应。这一结果与鲤鱼^[10]以及鸟类^[25]急性应激实验中 CRHR1 的转录表现一致。然而血清皮质醇的变化与垂体中 CRHR1 的转录表现在时间轴上并不统一, 这可能与下游应激反应的即时性以及转录调控需进一步翻译修饰的滞后造成的, 因此这两者并不矛盾。

而头肾以及心脏中 CRHR1 的转录变化趋势相同, 在应激发生的早期都出现了表达上调, 这与下丘脑中转录变化存在相似之处。在这些组织中也可能通过 CRHR1 的上调表达, 增加应激信号在非靶组织发生的接收甚至是代谢处理, 从而实现上游应激信号的调节作用, 然而其中具体调控机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Wang Q P, Fang C L, Rui X D. Stress reaction in the fishes[J]. Jiangxi Fishery Sciences and Technology, 2013(3): 36–39. [王庆萍, 方春林, 芮学党. 鱼类的应激反应[J]. 江西水产科技, 2013(3): 36–39.]
- [2] Nardocci G, Navarro C, Cortes P P, et al. Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish[J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 40(2): 531–538.
- [3] Heras V D L, Martos-Sitcha J A, Yúfera M, et al. Influence of stocking density on growth, metabolism and stress of thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*) juveniles[J]. Aquaculture, 2015, 448: 29–37.
- [4] Schreck C B. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis[J]. Gen Comp Endocr, 2010, 165(3): 549–556.
- [5] Tort L. Stress and immune modulation in fish[J]. Dev Comp Immunol, 2011, 35(12): 1366–1375.
- [6] Liu X L. Research on stress reaction in the fishes[J]. Reservoir Fisheries, 2007, 27(3): 1–3. [刘小玲. 鱼类应激反应的研究[J]. 水利渔业, 2007, 27(3): 1–3.]
- [7] Arai M, Assil I Q, Abou S A B. Characterization of three corticotropin-releasing factor receptors in catfish a novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis[J]. Endocrinology, 2001, 142(1): 446–454.
- [8] Yin X P, Su J M, Pu L, et al. Research on the effect of corticotropin-releasing hormone in stress reaction in the fishes[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2014, 27(3): 57–61. [殷新平, 苏建明, 蒲龄, 等. 促肾上腺皮质激素释放激素在鱼类应激反应中的作用[J]. 水产学杂志, 2014, 27(3): 57–61.]
- [9] Pohl S, Mark G D, Craig C W, et al. Cloning and functional pharmacology of two corticotropin-releasing factor receptors from a teleost fish[J]. Eur J Pharmacol, 2001, 430: 193–202.
- [10] Huising M O, Metz J R, Schooten C V, et al. Structural characterisation of a cyprinid (*Cyprinus carpio* L.) CRH, CRH-BP and CRH-R1, and the role of these proteins in the acute stress response[J]. J Mol Endocrinol, 2004, 32: 627–648.
- [11] Cardoso J C R, Powerb D M, Elgara G, et al. Isolation and characterisation of the corticotropin releasing factor receptor 1 (CRFR1) gene in a teleost fish, *Fugu rubripes*[J]. DNA Sequence, 2003, 14(3): 215–218.
- [12] Chen C C, Fernald R D. Sequences, expression patterns and regulation of the corticotropin-releasing factor system in a teleost[J]. Gen Comp Endocr, 2008, 157(2): 148–55.
- [13] Dong J J, Xue C Y, Xi B W, et al. Molecular cloning and characterization and tissue distribution of *MC2R* in *Megalobrama amblycephala* and *MC2R* expression alteration after catching stress[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2014, 42(6): 20–26. [董晶晶, 薛春雨, 习丙文, 等. 团头鲂黑素皮质素受体 2 基因克隆、组织分布和应激后的表达分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(6): 20–26.]
- [14] Xue C Y, Dong J J, Xi B W, et al. Cloning and expression of *Muc5b* in *Megalobrama amblycephala* and *Muc5b* expression alteration after catching stress[J]. Chinese Journal of Zoology, 2014, 49(6): 886–896. [薛春雨, 董晶晶, 习丙文, 等. 团头鲂黏蛋白基因 *Muc5b* 克隆及表达分析[J]. 动

- 物学杂志, 2014, 49(6): 886–896.]
- [15] Qiu J D, Liang R P, Tan X C, et al. Analysis and prediction of protein transmembrane helical regions[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2004(5): 831–836. [邱建丁, 梁汝萍, 谭学才, 等. 膜蛋白跨膜区段的预测分析[J]. 高等学校化学学报, 2004(5): 831–836.]
- [16] Chen Z Q, Liu Q, Zhu Y S, et al. Performance analysis of methods that predict transmembrane regions[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2002, 34(3): 285–290. [陈钟强, 刘琪, 朱贻盛, 等. 膜蛋白跨膜区预测方法的评价[J]. 生物化学与生物物理学报, 2002, 34(3): 285–290.]
- [17] Richard D, Lin Q, Timofeeva E. The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of energy balance[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 440: 189–197.
- [18] Ito Y, Okada R, Noriyuki T, et al. Cloning and distribution of the bullfrog type 1 and type 2 corticotropin-releasing factor receptors[J]. Gen Comp Endocr, 2006, 146(3): 291–295.
- [19] Boorse G C, Denver R J. Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides[J]. Gen Comp Endocr, 2006, 146(1): 9–18.
- [20] Sakamoto R, Matsubara E, Nomura M, et al. Roles for corticotropin-releasing factor receptor type 1 in energy homeostasis in mice[J]. Metabolism, 2013, 62(12): 1739–1748.
- [21] Radulovic M, Weber C, Spiess J. The effect of acute immobilization stress on the abundance of corticotropin-releasing factor receptor in lymphoid organs[J]. J Neuroimmunol, 2000, 103(2): 153–164.
- [22] Sumpter J P, Dye H M, Benfey T J. The effects of stress on plasma ACTH, α -MSH, and cortisol level in salmonid fishes [J]. Gen Comp Endocr, 1986, 62: 77–385
- [23] Makino S, Takemura T, Asaba K, et al. Differential regulation of type-1 and type-2a corticotropin-releasing hormone receptor mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat[J]. Mol Brain Res, 1997(47): 170–176.
- [24] Anismana H, Prakasha P, Meral Z, et al. Corticotropin releasing hormone receptor alterations elicited by acute and chronic unpredictable stressor challenges in stressor-susceptible and resilient strains of mice[J]. Behav Brain Res, 2007, 181(2): 180–90.
- [25] Zhao J H, Yang D G, Chen J W, et al. Research and application on the biology of fish stress[J]. Chinese Bulletin of Life Science, 2011, 23(4): 394–401. [赵建华, 杨德国, 陈建武, 等. 鱼类应激生物学研究与应用[J]. 生命科学, 2011, 23(4): 394–401.]
- [26] Kang S W, Kuenzel W J. Regulation of gene expression of vasotocin and corticotropin-releasing hormone receptors in the avian anterior pituitary by corticosterone[J]. Gen Comp Endocr, 2014, 204: 25–32.

Molecular cloning, characterization, and regulation of *Megalobrama amblycephala* corticotropin-releasing hormone receptor expression

CHEN Kai^{1,2}, XI Bingwen², TENG Tao^{2,3}, Wang Yabing^{2,3}, GAO Jinwei^{1,2}, LIANG Ligu², XIE Jun²

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

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

3. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 204182, China

Abstract: Corticotropin-releasing hormone (CRH) and its receptor (CRHR) play important roles in the hormonal response to stress by regulating the release of adrenocorticotropin (ACTH) from the hypothalamic-pituitary-interrenal axis and consequent secretion of glucocorticoids. In this report, *Megalobrama amblycephala* CRHR1 cDNA was cloned by rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction (RACE-PCR) analysis and characterized by bioinformatics analysis. The expression profile of *M. amblycephala* CRHR1 in different tissues was analyzed by quantitative real-time PCR and changes in expression with stress were detected following a cortisol injection. Serum glucose, cortisol, and ACTH levels were monitored after the injection. The full-length *M. amblycephala* CRHR1 mRNA contained a 1290-bp open reading frame and encoded 429 amino acids. The amino acid sequence alignment showed that *M. amblycephala* CRHR1 had 99% sequence identity with *Carassius auratus* CRHR1. The tissue expression analysis revealed that *M. amblycephala* CRHR1 was expressed at high levels in the pituitary and hypothalamus, but lower levels were detected in liver, kidney, muscle, skin, and heart. Serum glucose plateaued at 2–24 h, serum cortisol peaked at 12 h, and serum ACTH and mRNA expression in different tissues did not change after the cortisol injection. A significant decrease in pituitary CRHR1 expression was detected immediately after the cortisol injection, whereas it increased significantly in the head kidney and heart. The change in hypothalamic CRHR1 followed a unimodal pattern of increasing slowly at the early stage and then decreasing slowly at the end. In conclusion, we cloned the full-length *M. amblycephala* CRHR1 mRNA and detected changes in CRHR1 expression after a cortisol injection.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; corticotropin-releasing hormone receptor; gene cloning; expression analysis; tissue distribution

Corresponding author: XIE Jun, E-mail: xiej@ffrc.cn; XI Bingwen, E-mail: xibw@ffrc.cn