

DOI: 10.12264/JFSC2022-0227

活饵与饲料投喂下鳊胃饥饿素的表达变化比较

姚晓丽^{1, 2, 3}, 赵金良^{1, 2, 3}

1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;
2. 上海海洋大学, 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306;
3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306

摘要: 为探讨饲料代替活饵投喂对鳊(*Siniperca chuatsi*)胃饥饿素(ghrelin)的调控作用, 本研究通过转录组测序和基因组测序数据匹配, 首次获得了鳊(*Siniperca chuatsi*)胃饥饿素前体基因 DNA 序列, 对其胃中分泌细胞进行定位。诱食试验模拟鳊进食前看到食物但不能摄食, 进食试验模拟鳊正常摄食。研究检测了诱食、进食后胃饥饿素基因和蛋白表达水平变化。结果表明, 鳊胃饥饿素前体由信号肽、成熟肽(胃饥饿素)和 C-端肽 3 部分构成; 前体基因含有 4 个外显子和 3 个内含子, 属于 II 型基因型; 编码 107 个氨基酸, 成熟肽胃饥饿素由 20 个氨基酸构成, 活性中心为 GSSF。免疫组化显示胃饥饿素阳性细胞位于胃腺中。诱食试验中, 活饵组胃饥饿素 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高; 而饲料组胃饥饿素基因 mRNA 和蛋白表达水平未发生显著变化, 且显著低于活饵组($P < 0.05$)。进食实验中, 活饵组进食后 0 h, 胃饥饿素 mRNA 和蛋白表达水平显著上升($P < 0.05$), 进食后 2 h 下降至摄食前水平($P < 0.05$), 后续无显著变化($P > 0.05$); 饲料组进食后 0 h 胃饥饿素 mRNA 表达水平未出现显著变化($P > 0.05$), 蛋白水平呈波动变化, 进食后 2 h 及后续胃排空时间内皆无显著变化($P > 0.05$)。综上, 鳊胃饥饿素细胞位于胃腺位置, 参与调节摄食活动, 进食前上升, 进食后下降, 而饲料投喂下 ghrelin 对摄食调节作用明显减弱, 研究结果可为鳊饲料养殖提供科学参考。

关键词: 鳊; 胃饥饿素; 饲料投喂; 活饵投喂

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)12-1728-10

摄食是鱼类个体生长、发育、繁殖等各种活动获得能量的唯一途径^[1]。摄食活动受到外周传感因子和中枢神经内分泌系统的共同调控^[2]。胃肠道黏膜内的机械和化学感受器能够感受胃肠道的内容物、酸碱度及营养成分含量变化等, 上传给下丘脑, 下丘脑作为摄食调控中心, 整合信号通路和营养因子, 通过调控胃饥饿素(ghrelin)、酪酪肽(peptide tryosin tryosin, PYY)、神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)、胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)等多种调节因子表达, 将信号反馈给外周组织^[3]。

胃饥饿素是由外周分泌的、具有促摄食作用

的胃肠肽^[3]。胃饥饿素前体有 2 种基因型, I 型含有 5 个外显子和 4 个内含子, II 型含有 4 个外显子和 3 个内含子, 两种亚型皆有促摄食作用^[4]。X/A 样细胞分泌胃饥饿素前体蛋白, 主要定位在胃(有胃鱼)或前肠(无胃鱼)中^[5], 以细胞形态区分为封闭型和开放型 2 种, 封闭型 X/A 样细胞多呈圆形, 感受胃内压力, 而开放型 X/A 样细胞多呈三角形或长条形, 感受胃内化学物质^[6]。

胃饥饿素最初在大鼠胃中被发现, 并证实了其具有促食欲的作用^[7]。目前胃饥饿素已被证实可以促进胃肠动力、增加进食量、调节能量代谢和促进胃酸分泌^[8]。在鱼类中, 2002 年首次成功克

收稿日期: 2022-06-10; 修订日期: 2022-08-11.

基金项目: 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-46).

作者简介: 姚晓丽(1998-), 女, 硕士研究生, 专业方向为鱼类遗传育种. E-mail: 1536940393@qq.com

通信作者: 赵金良, 教授, 研究方向为鳊、罗非鱼种质资源与遗传育种. E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

隆了金鱼(*Carassius Auratus*)胃饥饿素基因^[9], 至今已在大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[10]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[6]等多种鱼类上确认其存在。禁食和再投喂实验表明大黄鱼胃饥饿素具有促摄食作用^[10]。通过力量位移传感器, 证明斑马鱼(*Danio rerio*)胃饥饿素浓度的增加显著升高了肠道紧张性收缩频率^[11]。草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)胃饥饿素能够与下丘脑受体(GHS-R)结合激活中枢 NPY 信号通道, 释放神经肽 Y 和刺鼠相关蛋白(agouti-related protein, AgRP), 同时抑制前阿黑皮素原(proopiomelanocortin, POMC)通道, 使食欲增强, 摄食量提高^[12]。

鳊(*Siniperca chuatsi*)是典型的肉食性鱼类, 自开口期起终生以活鱼饵为食, 生产上主要以活鱼饵投喂为主。近年来, 鳊饲料驯养研究取得了较快的进展, 然而, 与活饵投喂相比, 饲料驯食后摄食量显著下降^[13]。胃饥饿素是外周分泌的促摄食因子, 饲料驯食后鳊摄食量的降低是否与胃饥饿素的调控作用相关有待研究。前期, Song 等^[14]首次获得了鳊胃饥饿素前体的 cDNA 序列, 胃饥饿素前体 mRNA 在胃中表达水平最高, 禁食能诱导其 mRNA 表达量增加。组氨酸可通过激活脑 mTOR 信号通路上调胃饥饿素表达, 促进鳊摄食^[15]。为此, 本研究通过比较活饵投喂与饲料投喂条件下, 鳊在诱食、进食后不同时间段胃饥饿素 mRNA 和蛋白表达的变化, 进一步明确胃饥饿素在摄食过程中的调节作用, 以及饲料驯食后胃饥饿素调节变化, 为其饲料养殖提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验用鱼 本研究所用鳊鱼苗购自浙江省湖州市南浔菱湖某家庭农场, 全长(5.16±0.44) cm, 暂养于上海海洋大学滨海基地水泥池。适应 1 周后, 将所有实验鱼分为活饵组(live bait group, LB)和饲料组(compound food group, CF), 活饵组每日投喂适口鲢鱼, 饲料组按曾萌冬^[13]方法进行慢性驯化。鳊专用饲料粉购自浙江益祥生物科技有限公司(粗蛋白≥48.0%, 粗脂肪≥4.0%, 粗纤维≤3%, 粗灰分≤19%, 钙≥2.0%, 总磷≥1.0%, 氯

化钠≤3.0%, 赖氨酸≥2.3%)。饲料组每天饱食投喂 2 次, 时间分别为 9:00, 17:00。共进行为期 8 周的投喂(LB 组连续投喂 8 周活饵鱼, CF 组用饲料驯化 2 周后保持饲料投喂 6 周), 后开始正式实验。

1.1.2 实验试剂 免疫组化试剂盒(abs996)和 PBS (abs9266)购自上海爱必信生物科技有限公司。一抗(鼠单克隆 Anti-Ghrelin 抗体, ab57222)购自上海 Abcam 贸易有限公司, 该抗体和试剂盒已在斑马鱼^[16]、金鱼^[17]等鱼类上多次验证其有效性。总 RNA 提取试剂(TRIZOL, DP424)购自北京天根生化科技有限公司, 反转录试剂盒(AG11705)和荧光定量试剂(AG11701)购自湖南艾科瑞生物工程技术有限公司, 鱼 ghrelin Elisa kit 试剂盒(ml035512)购自上海酶联生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 胃饥饿素前体基因 DNA 序列分析 从本实验室鳊转录组数据库中搜寻胃饥饿素 cDNA 序列, 利用该序列匹配鳊基因组数据库, 获得胃饥饿素前体基因 DNA 序列。利用 Bioedit 软件将胃饥饿素 cDNA 序列与其前体基因 DNA 序列进行比对, 得到非编码区、外显子与内含子序列。利用 ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)寻找开放阅读框, 并预测氨基酸序列。利用 SignalP5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/>)预测信号肽的切割位点。利用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)预测氨基酸分子量和 pI 值。将预测的鳊胃饥饿素前体氨基酸序列与其他脊椎动物氨基酸序列进行比较, 利用 NJ 法构建进化树。

1.2.2 免疫组化 随机取 LB 组 3 尾, 用 MS-222 (1 : 10000)麻醉, 取出胃组织, 放入 4%多聚甲醛(pH7.2, 4 °C)中固定 24 h, 再经分级乙醇系列脱水, 二甲苯透明后, 包埋于石蜡中并切片(厚度为 5~8 μm), 干燥过夜。实验步骤参考免疫组化试剂盒说明书。组织经脱蜡和复水后, 用 Tris-EDTA 缓冲液(pH9.0)进行抗原修复(95 °C, 20 min), 后用内源性过氧化物酶封闭剂室温孵育 10 min。将组织与鼠抗(1 : 500, 鼠单克隆 Anti-Ghrelin 抗体, ab57222)在 37 °C 潮湿环境下孵育 40 min, 再与二抗(HRP 酶标抗小鼠&兔二抗聚合物)于潮湿避光 37 °C 环境下孵育 30 min。组织经 PBS 洗涤后,

用 DAB 显色液室温显色 5 min, 苏木精复染后水洗反蓝, 并封片。在光学显微镜(BK-DM500, 重庆奥特光学仪器有限责任公司)下观察、拍照。

1.2.3 诱食实验 取喂养 8 周的 LB 组和 CF 组鳊各 2 组, 共 4 组, 分别暂养于水族箱内(0.6 m×0.3 m×0.35 m), 箱内中间放置一个透明盒(15.0 cm×10.0 cm×15.0 cm), 饥饿 48 h 后开始试验。分别向透明盒内投喂活鱼饵或饲料, 投喂过程持续 10 min, 保证每条试验鱼仅能看到食物但不能摄食, 投喂活饵记为活饵诱食(live bait attraction, LBA), 投喂饲料记为饲料诱食(compound food attraction, CFA)。4 个实验组分别记为: 活饵组-活饵诱食(live bait-live bait attraction, LB-LBA)、活饵组-饲料诱食(live bait-compound food attraction, LB-CFA)、饲料组-活饵诱食(compound food-live bait attraction, CF-LBA)和饲料组-饲料诱食(compound food-compound food attraction, CF-CFA)。每组 10 尾, 设 3 个平行组。

诱食结束后, 每实验组随机取 5 尾, 用 MS-222(1 : 10000)麻醉, 解剖取出胃组织, 用 DEPC 水清洗后装于冻存管, 保存于液氮中, 用于荧光定量 PCR 和 ELISA 检测。

1.2.4 进食实验 取喂养 8 周的 LB 组和 CF 组鳊进行进食实验, 共 2 组。饥饿 48 h 后, LB 组投喂活饵, CF 组投喂饲料, 至表现饱食点后结束投喂。每组 20 尾, 平行 3 组。

先采集餐前~0 h 胃组织。饱食投喂后, 采集餐后 0 h、2 h、8 h、16 h、24 h 及 28 h(直至胃排空), 每实验组每个时间点抽取 5 尾。实验用水族箱和采样方法同上。

1.2.5 实时定量 PCR 使用 TRIzol 法提取 RNA 试剂盒, 提取胃总 RNA, 并测定质量和浓度。使用艾科瑞反转录试剂盒(AG11705)将 RNA 逆转录为 cDNA。根据鳊胃饥饿素前体 cDNA 序列, 利用 Primer 5 设计引物(引物序列为表 1)。PCR 反应液含 10 μL PCR Master mix、1 μL cDNA 模板、上下游引物各 0.8 μL、RNase-free 水 7.4 μL。PCR 反应程序如下: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s; 特定退火温度 53.4 °C, 退火 30 s; 72 °C 60 s 延伸, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min, 并储

存在 4 °C。荧光定量 PCR 在定量热循环仪(Bio-Red, USA)中进行。反应体系包括: 10 μL 2×SYBR® Green Prc Taq HS Premix、1 μL cDNA 模板、上下游引物各 0.4 μL、RNase-free 水 8.2 μL。反应程序包括: 95 °C 30 s; 95 °C 8 s、53.4 °C 30 s 下进行 40 个循环; 随后 95 °C 15 s、65 °C 1 min、95 °C 30 s 并结束程序。每个 RNA 样品一式 3 份进行。

1.2.6 酶联免疫分析 应用双抗体夹心法测定胃饥饿素蛋白水平。用纯化的胃饥饿素捕获抗体包被微孔板, 制成固相抗体, 往包被的微孔中依次加入胃饥饿素, 再与 HRP 标记的检测抗体结合, 彻底洗涤后加底物 TMB 显色。实验用量和反应步骤按照说明书进行。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度, 通过标准曲线计算样品中胃饥饿素含量。

1.2.7 统计分析 统计结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。结果由 SPSS 22.0 处理。方差齐性检验后, 采用单因素方差分析或 *t* 检验对数据进行分析。*P*<0.05 表示差异显著。

表 1 实时定量 PCR 引物

Tab. 1 Primers for real-time PCR determinations of the studied genes

基因 gene	引物名称 primer	序列 (5'-3') sequence (5'-3')	GenBank ID
ghrelin	ghrelin F	TTGCTGGTCTTCTGTTGTGT	ON652818
	ghrelin R	TTCCCCTTGTCTGAGGTTTT	
β-actin	B F	GTGCGTGACATCAAGGAGAAG	AY885683.1
	B R	GGAAGGAAGGCTGGAAGAGG	

2 结果与分析

2.1 鳊胃饥饿素前体基因序列

鳊胃饥饿素前体基因 DNA 序列全长 1717 bp, 包括 4 个外显子和 3 个内含子, 开放阅读框 324 bp, 共编码 107 个氨基酸(图 1)。5'UTR 长 151 bp (1~151 bp); 第 1 个外显子长 114 bp (152~265 bp), 编码 38 个氨基酸(Met¹-Gln³⁸); 第 2 个外显子长 78 bp (1007~1084 bp), 编码 26 个氨基酸(Asn³⁹~Thr⁶⁴); 第 3 个外显子长 112 bp (1170~1281 bp), 编码 37 个氨基酸(Ile⁶⁵~Ala¹⁰¹); 第 4 个外显子长 20 bp (1372~1391 bp), 编码 6 个氨基酸(Glu¹⁰²~

```

acgctcttccgatcttttcaagggagaagaactaaggtcgggtgctcggatcagattcagataagcagatcaa 73
cattttaaccatttacacggtagattgcttcatcatattgtctgtagtagatcgagcagttgagatttttatt 146
ccaccATGTTTCTGAAGAGAAACACCTGTTTGGCTGGTCTTCCTGTTGTGTTCTCTGACCTTGTGGTCAAGTC 219
      M F L K R N T C L L V F L L C S L T L W C K S 23
GACCAGTGC CGGCTCCAGCTTTCTCAGCCCTTCACAAAACCTCAGgtaaggtgctttttgtctgagcagtc 292
      T S A G S S F L S P S Q K P Q 38
ttaacacatttggattcattcttcaactctttattaaaataaaacattgaatgtaaaccaagaaaatgaatg 365
taaccaatcacttaaaaataaaagccgtttcctttagaacctgctggtctgactatgaagccatcgtcac 438
ttccaacataacttaataaactcagttttccttaacaattacttattactgacttaaatatttggtaaaaact 511
tttgttaactgtcacatgtaatgtcaagccatgtgtcaatattttacacttaatcatgtctctttgtctcc 584
atcccactgagccccatgttcaatttctggaaaatgtctttatttaaatatgtagttatgatgagagttgtgc 657
tgacgaccgtcctgactgaaatgttcaactttttcacattttacactaaagtcattcttttgatattgtgataa 730
ctgaatggcctctttttgtcagctcgcaggcatgtttcctatcatgtcatggaattttcaactttgcca 803
gatggagtaaaaagaggaaatttgacgtatcaaatgagatgaattaagggctttatgggtaatgcaatcata 876
gttagaacttcaaatacagtgactgcgttgttactatactttataaatctccttgactgcatttgaacttct 949
aatgtaaagctgaattggttacaatcatgacgatttgtctgttctgggtcatccacagAACAGGGGAAGCCTT 1022
      N K G K P 43
TCAGAGTCGGCCGCCAAGTCATGGAGGAGCCTAATCAACCCACTGAGGACAACCACATCACAgtgagtggaat 1095
F R V G R Q V M E E P N Q P T E D N H I T 64
taacactcatgactacagtacaccaccgaaaacatcatccctttaaacttcatggtcttctcctctctctgagta 1168
gATAAGTGCCCCCTTTGAAATTGGCATCACATGAGAGAGAGGACTTTGAGGAGTACGGGTGTAGCGCTGCAG 1241
      I S A P F E I G I T M R E E D F E E Y G V A L Q 88
GAGATCGTTCAGCGTCTGCTGGGAACACACAGACAGCAGgttgtgttcccttctgccaatatacagtaaaat 1314
      E I V Q R L L G N T Q T A 101
aattaaacttacaatttttaacgtcatttttaacataatgggttgtcttgtttcagAGGGACGATCACAAC 1387
      E G R S Q L 107
TTGAagatcatggacaagaatttcaaatttgcgtctcaatgccttccaatttcaacttcattagatagtgat 1460
      * 107
cattaaaatgctgaaagcaattagcccgtagacatgctggtctcatttctttcaaagcttaatgtattgttta 1533
gctcagggctgttaaaacattgttactcagactgtggctaattgagttacagctctgtaccactaaatcttaga 1606
gaaatgactgatgtccatgtcattacaatctaagcattaaactgttaagcaggtgaaaccagtgtaaaatt 1679
agcaaaaataatcttaactcaagattttttggcacttt 1717
    
```

图 1 鳊胃饥饿素前体基因序列与推导氨基酸序列

绿色片段示 5'非编码区和 3'非编码区. 红色片段示编码区, 共 4 个片段. 蓝色片段示内含子, 共 3 个片段. 蓝色横线示信号肽区域, 黄色横线示成熟肽区域, 绿色横线示 C 端肽区域. 红色方框示活性中心. *代表终止密码子.

Fig. 1 Preproghrelin gene sequence and deduced amino acid sequence of *Simiperca chuatsi*

Green segments indicate 5'UTR and 3'UTR. Red fragments show coding DNA sequence (CDS), 4 segments in total.

Blue fragments indicate introns, 3 introns in total. The blue horizontal line indicates the signal peptide region.

The yellow horizontal line indicates the mature peptide region. The green horizontal line indicates the C-terminal peptide region. The red square indicates the active core. * represents the stop codon.

Leu¹⁰⁷); 最后为 326 bp (1392~1717 bp)的 3'UTR. 3 个内含子长分别为 741 bp (266~1007 bp), 85 bp (1169~1085 bp), 90 bp (1282~1371 bp), 每个内含子两端均具有剪切供体和受体位点(GT/AT).

胃饥饿素前体蛋白由信号肽、成熟肽、C 端肽 3 部分组成. 信号肽由 N-端 26 个氨基酸构成 (Met¹~Ala²⁶); 成熟肽胃饥饿素由随后的 20 个氨基酸构成(Gly²⁷~Val⁴⁶); C 端肽由剩下的 61 个氨基酸构成(Gly⁴⁷~Lys¹⁰⁷). 成熟肽分子量和理论 pI 值为 2189.50 和 11.26, 前 7 位氨基酸保守性较高, 第 3 位丝氨酸(Ser²⁹)具有潜在的酰基化修饰位点, 构成“GSSF”活性中心.

鳊胃饥饿素前体氨基酸序列与硬骨鱼类相似度较高(图 2). 其中, 与大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)一致性最高(85.9%), 与鸟类、两栖类、

哺乳类一致性较低. 不同物种胃饥饿素前体氨基酸序列构建的系统发育树, 硬骨鱼类单独聚成一支, 鳊与鲈形目聚成一个分支(图 3).

2.2 免疫组化定位

免疫组化结果显示, 黏膜层褶皱形成胃小凹, 基部含有胃腺. Ghrelin 阳性细胞主要分布于黏膜层的胃腺中(图 4), 分布较疏.

2.3 诱食期胃饥饿素表达水平变化

与饥饿状态相比, 活饵组在不同诱食条件下, 胃饥饿素 mRNA 表达水平皆显著提高($P < 0.05$), 且活饵诱食表达水平显著高于饲料诱食($P < 0.05$); 而饲料组在不同诱食条件下, 胃饥饿素 mRNA 表达水平皆无显著变化($P > 0.05$). 同时, 在相同饥饿/诱食条件下, 饲料组胃饥饿素 mRNA 表达水平皆显著低于活饵组($P < 0.05$)(图 5).

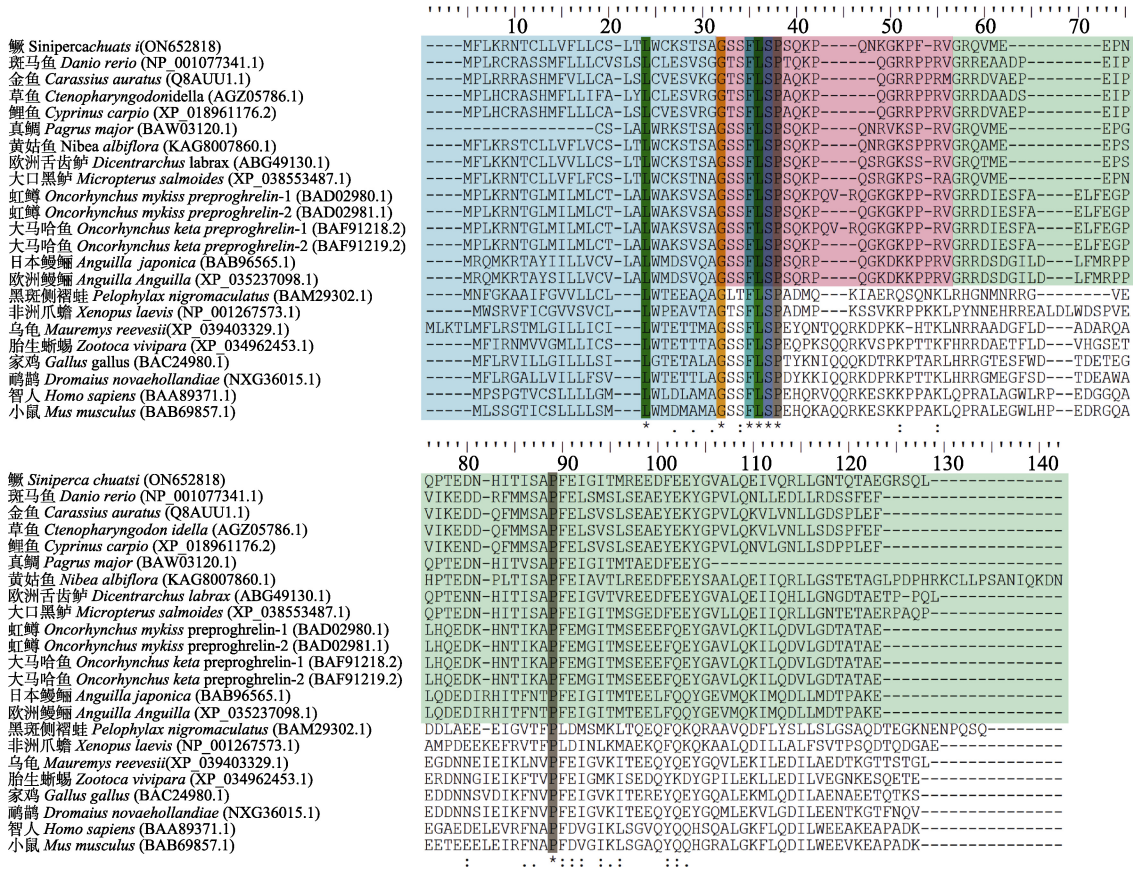


图 2 脊椎动物胃饥饿素前体氨基酸序列多重比对

蓝色方框示信号肽, 红色方框示成熟肽, 绿色方框示 C-端肽. *表示代表此位点氨基酸残基完全一致. :代表此位点氨基酸残基性质特别相近. .代表此位点氨基酸残基性质微弱相近.

Fig. 2 Multiple alignment of amino acid sequences of preproghrelin in vertebrates

The blue box shows the signal peptide. Red box shows maturation peptide. Green box shows C-terminal peptide. * indicates positions which have a single, fully conserved residue. : indicates that amino acid residue properties at this site are particularly similar, and . indicates that amino acid residue properties at this site are slightly similar.

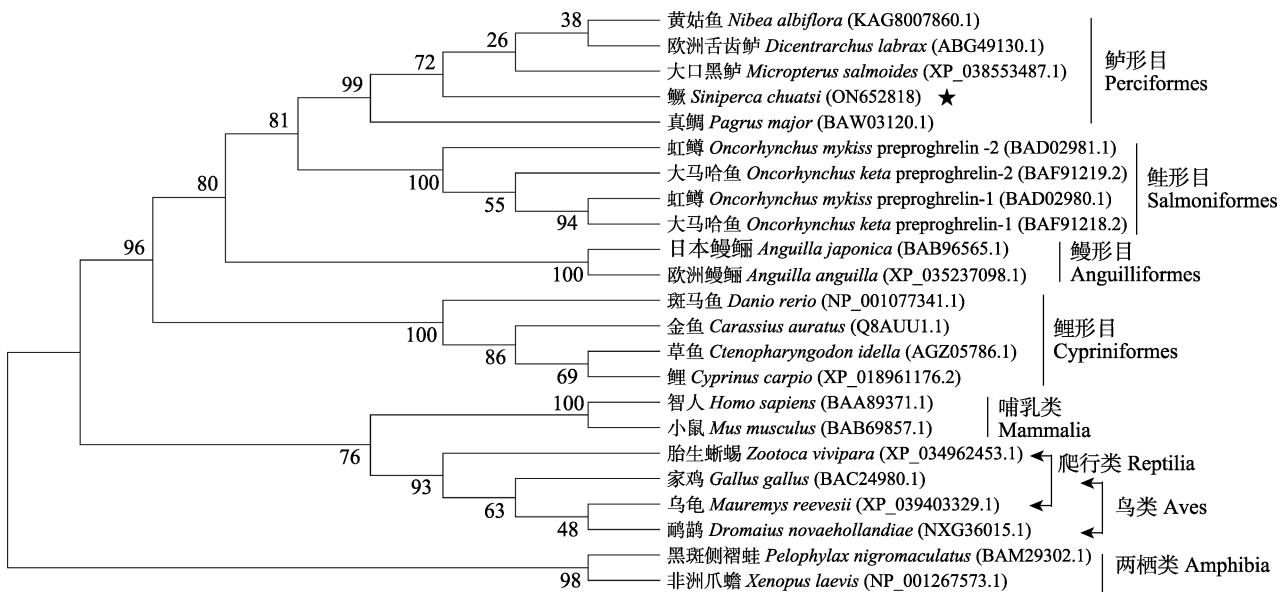


图 3 基于脊椎动物胃饥饿素前体氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on preproghrelin amino acid sequences of vertebrates

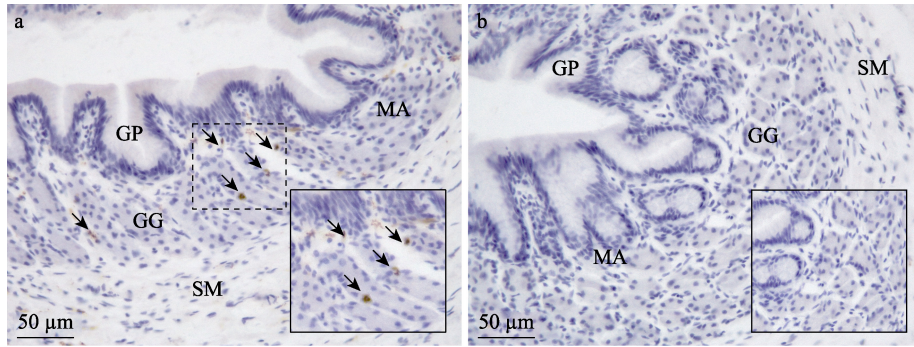


图 4 鳊胃饥饿素免疫组化细胞定位

a: 免疫阳性细胞(箭头); b: 对照组. GG: 胃腺; GP: 胃小凹; MA: 黏膜层; SM: 黏膜下层. 箭头指向为阳性细胞, a 内小框为虚线范围所示内容.

Fig. 4 The localization of the immune response to ghrelin in *Siniperca chuatsi*

a. Immunoreactive cells (arrow); b. Control group. GG: gastric gland; GP: gastric pit; MA: mucous layer; SM: submucosa. Arrows point to positive cells, and the small box in figure a is the content shown in the dotted line range.

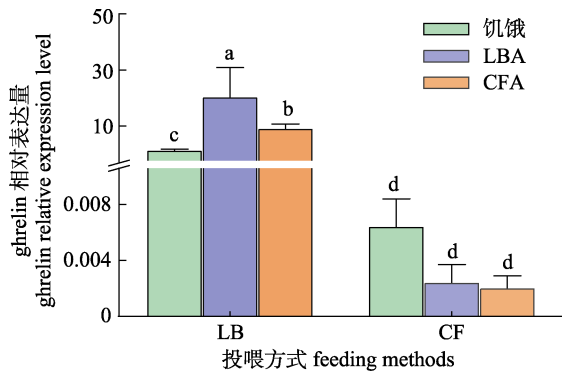


图 5 不同诱食组鳊胃饥饿素 mRNA 相对表达水平
不同字母表示不同诱食方式下差异显著($P < 0.05$). LB: 活饵组; CF: 饲料组; LBA: 活饵诱食; CFA: 饲料诱食.

Fig. 5 Relative expression levels of ghrelin mRNA in live-bait groups and compound food groups of *Siniperca chuatsi* under different food enticements

Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). LB: live bait group; CF: compound food group; LBA: live bait attraction; CFA: compound food attraction.

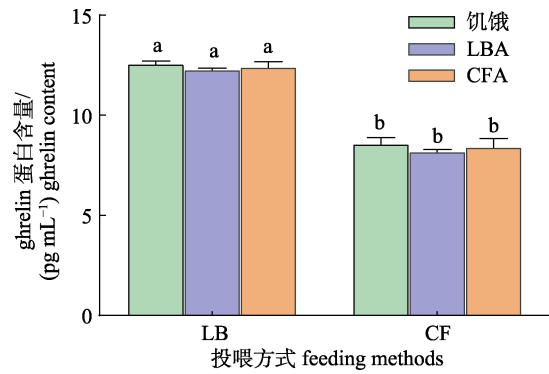


图 6 不同诱食组鳊胃饥饿素蛋白表达量
不同字母表示差异显著($P < 0.05$). LB: 活饵组; CF: 饲料组; LBA: 活饵诱食; CFA: 饲料诱食.

Fig. 6 Content of ghrelin protein in live-bait groups and compound food groups of *Siniperca chuatsi* under different food enticements

Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). LB: live bait group; CF: compound food group; LBA: live bait attraction; CFA: compound food attraction.

与饥饿状态相比, 诱食条件未引起活饵组、饲料组胃饥饿素蛋白表达水平显著变化($P > 0.05$)。同时, 在相同饥饿/诱食条件下, 饲料组胃饥饿素蛋白表达水平表达显著低于活饵组($P < 0.05$) (图 6)。

2.4 进食前后胃饥饿素表达水平变化

进食后 0 h, 活饵组胃饥饿素 mRNA 表达水平上升达最高峰; 进食后 2 h, 下降到摄食前水平 ($P > 0.05$); 进食后 2~24 h, 无显著变化 ($P > 0.05$)。进食后 0 h, 饲料组胃饥饿素 mRNA 表达水平下降, 进食后 0~28 h, 无显著变化 ($P > 0.05$)。进食前、后不同时期, 饲料组胃饥饿素 mRNA 表达水平

均显著低于活饵组 ($P < 0.05$) (图 7)。

进食后 0 h, 活饵组 ghrelin 蛋白含量显著上升 ($P < 0.05$); 进食后 2 h, 含量显著下降; 进食后 2~24 h, 含量没有显著变化 ($P > 0.05$)。饲料组进食后 0~28 h, 含量呈波动变化 ($P > 0.05$)。进食前、后不同时期, 饲料组胃饥饿素含量显著低于活饵组 ($P < 0.05$) (图 8)。

3 讨论

本研究基于鳊转录组数据与基因组数据联合分析, 获得了胃饥饿素前体基因 DNA 序列。该基

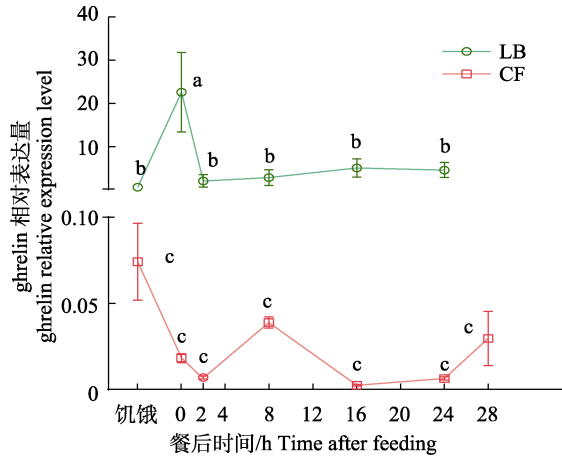


图 7 不同投喂方式下鳊胃饥饿素 mRNA 相对表达水平不同字母表示活饵组与饲料组胃饥饿素相对表达量差异显著 ($P < 0.05$)。LB: 活饵组; CF: 饲料组。

Fig. 7 Relative expression levels of ghrelin mRNA under different feedings of *Siniperca chuatsi*

Different letters indicate significant difference of ghrelin relative expression level between LB and CF ($P < 0.05$). LB: live bait group; CF: compound food group.

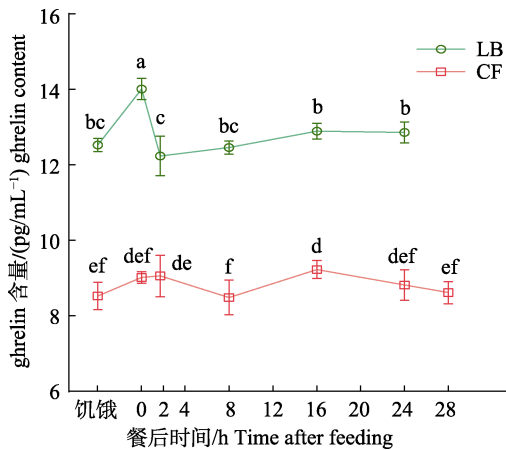


图 8 不同投喂方式下鳊胃饥饿素蛋白含量

不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。LB: 活饵组; CF: 饲料组。

Fig. 8 Content of ghrelin protein under different feedings of *Siniperca chuatsi*

Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). LB: live bait group; CF: compound food group.

因由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 为 II 型基因型。在目前已知的大部分鱼类中, 胃饥饿素前体基因均为 II 型基因型^[18], 仅少数鱼类, 如虹鳟^[6]同时存在 I、II 型基因型(I 型基因由 5 个外显子和 4 个内含子组成)。鳊胃饥饿素前体蛋白包括 3 个结构域: 信号肽、成熟肽和 C-端肽, 成熟肽包含 20 个氨基酸, 其活性中心由前 4 个氨基酸组成, 为“GSSF”, 这与 Song 等^[14]的研究结果一致。部

分鲤科鱼类的胃饥饿素活性中心由“GSSF”突变为“GTSF”, 这是由于单碱基替代(AGC-ACC)导致, 而 Ser 与 Thr 在功能上是相似的, 故不会影响胃饥饿素结构和生物学功能^[19]。该活性中心第 3 位为丝氨酸, 能够与酰基结合从而活化^[4]。金鱼虽只含有 II 型基因型, 但其氨基酸序列中发现存在 2 个酰胺化位点, 可加工成为具有 12 个或 19 个氨基酸残基的活性多肽^[20]。

免疫组化结果显示, 鳊胃饥饿素阳性细胞分布于胃黏膜层中的胃腺位置, 这与欧洲舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[21]、虹鳟^[6]相似。胃是肉食性鱼类的重要消化场所, 进食后, 食物刺激促使胃腺细胞分泌胃酸与胃蛋白酶原^[22]。鳊胃饥饿素分泌细胞的胃腺定位表明其可能是摄食调控中机械感应、营养感应等过程的重要因子。Lewin^[23]将胃饥饿素阳性细胞细分为封闭型细胞和开放型细胞, 认为封闭型细胞受到激素、神经元刺激或机械膨胀的调节, 开放型细胞通过接收腔内信息(如营养和 pH 等)来调节。在虹鳟^[6]中也同样发现了 2 种不同的阳性细胞, 引起鱼类胃饥饿素分泌的机制还有待进一步研究。

诱食试验模拟鳊捕捉食物但未摄食阶段, 排除了气味和水流的干扰, 仅保留视觉对摄食的影响。进食试验模拟鳊捕捉并摄食阶段。本研究中, 活饵诱食时, 活饵组胃饥饿素 mRNA 相对表达量皆显著上升, 说明在摄食前其食物信号通过视觉传递至脑并反馈至胃, 引起食欲提高。进食后, 胃饥饿素 mRNA 和蛋白表达呈现出先上升后下降的趋势, 后期胃饥饿素的表达没有发生变化, 说明胃饥饿素主要参与摄食前调节作用。本研究结果与金鱼^[24]、欧洲舌齿鲈^[25]摄食前后胃饥饿素表达变化类似, 但在虹鳟^[26]中没有观察到摄食前后胃饥饿素的变化。值得注意的是, 饲料诱食同样也能引起活饵组鳊胃饥饿素表达上升, 表明鳊摄食饲料时视觉起到一定作用。这为生产上鳊可被饲料驯食提供了重要的生理基础。

本研究中, 饲料组进食前后胃饥饿素 mRNA 和蛋白水平均未产生明显变化, 这可能是饲料对鳊的营养调控产生了影响。研究表明, 由于配合饲料中存在营养不平衡性和抗营养因子, 饲料投

喂会导致鳊肝脏脂肪含量上升, 摄食量下降^[13]。长期高脂投喂下, 鳊产生厌食反应, 并造成持续高血糖症^[27]。长期处于高脂投喂下, 小鼠胃饥饿素的表达水平及其阳性细胞的数量显著降低^[28]。同时, 营养感应机制能够调控胃饥饿素分泌水平。有研究表明餐后胃饥饿素的下降还与食物营养组成、小肠吸收功能与营养传感等关联^[29], 长期投喂饲料的鳊肠道小肽吸收功能下降^[13]。高脂高蛋白投喂小鼠导致胰岛素敏感性下降, 从而在摄食前后胃饥饿素没有显著变化^[30]。本研究中, 饲料组在诱食、进食过程中胃饥饿素 mRNA 与蛋白处于低水平表达, 且诱食阶段、摄食前后胃饥饿素表达未出现显著变化, 表明饲料投喂后鳊在摄食过程中胃饥饿素的调控作用减弱。饲料投喂下鳊胃饥饿素表达与分泌调控机制, 还有待深究。

4 结论

本研究首次分析了鳊胃饥饿素前体基因 DNA 序列, 属于 II 型基因型。胃饥饿素细胞位于胃腺中。活饵组诱食时胃饥饿素表达量显著上升, 进食前、后表现出先上升后下降的趋势; 饲料组胃饥饿素含量显著降低, 诱食、进食前后表达变化不明显。鳊胃饥饿素参与摄食调节, 而饲料投喂后胃饥饿素摄食调节作用减弱。

参考文献:

- [1] Calo J, Blanco A M, Comesaña S, et al. First evidence for the presence of amino acid sensing mechanisms in the fish gastrointestinal tract[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 4933.
- [2] Mazumder S K, Ghaffar M A, Das S K. Effect of temperature and diet on gastrointestinal evacuation of juvenile malabar blood snapper (*Lutjanus malabaricus* Bloch & Schneider, 1801)[J]. *Aquaculture*, 2020, 522: 735114.
- [3] Blanco A M, Bertucci J I, Valenciano A I, et al. Ghrelin suppresses cholecystokinin (CCK), peptide YY (PYY) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in the intestine, and attenuates the anorectic effects of CCK, PYY and GLP-1 in goldfish (*Carassius auratus*)[J]. *Hormones and Behavior*, 2017, 93: 62-71.
- [4] Nishi Y, Yoh J, Hiejima H, et al. Structures and molecular forms of the ghrelin-family peptides[J]. *Peptides*, 2011, 32(11): 2175-2182.
- [5] Zhou Y H, Guo M X, Li Y J, et al. Effects of Ghrelin on intestinal cell proliferation, the expression of protein absorption and metabolism factors in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2022, 22: 100928.
- [6] Sakata I, Mori T, Kaiya H, et al. Localization of ghrelin-producing cells in the stomach of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Zoological Science*, 2004, 21(7): 757-762.
- [7] 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.
- [8] Song X X, Wang M H, Jiao H C, et al. Ghrelin is a signal to facilitate the utilization of fatty acids and save glucose by the liver, skeletal muscle, and adipose tissues in chicks[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2022, 1867(2): 159081.
- [9] Unniappan S, Lin X W, 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.
- [10] Feng L, Xiaokang L, Tianqi C, et al. Characterization of ghrelin mRNA expression in fasting *Larimichthys crocea* juveniles[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2021(6): 35-40.
- [11] Olsson C, Holbrook J D, Bompadre G, et al. Identification of genes for the ghrelin and motilin receptors and a novel related gene in fish, and stimulation of intestinal motility in zebrafish (*Danio rerio*) by ghrelin and motilin[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 155(1): 217-226.
- [12] Yu X T. Effects of dietary protein sources on feeding response, immunology response and flesh quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016. [于晓彤. 不同蛋白源对草鱼摄食反应、免疫应答及肉质的影响研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.]
- [13] Zeng M D, Xu J, Song Y D, et al. Effects of replacing live bait with compound feed on growth, digestion and expression of small peptide transporter (PepT1) gene of *Siniperca chuatsi*[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52(1): 228-237. [曾萌冬, 徐俊, 宋银都, 等. 配合饲料替代活饵对鳊生长性能、消化功能及小肽转运载体基因表达的影响[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(1): 228-237.]
- [14] Song Y, Zhao C, Liang X F, et al. Effects of fasting, temperature, and photoperiod on preproghrelin mRNA expression in Chinese perch[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(3): 803-812.
- [15] Zhu Q S, He S, Liang X F, et al. Effect of six essential amino

- acids on feeding regulation of Chinese perch[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2020, 47(3): 154-161. [朱强胜, 何珊, 梁旭方, 等. 六种必需氨基酸对翘嘴鳊摄食调控的影响[J]. *水产科技情报*, 2020, 47(3): 154-161.]
- [16] Falcinelli S, Rodiles A, Hatef A, et al. Dietary lipid content reorganizes gut microbiota and probiotic *L. rhamnosus* attenuates obesity and enhances catabolic hormonal milieu in zebrafish[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 5512.
- [17] Sánchez-Bretaño A, Blanco A M, Unniappan S, et al. In situ localization and rhythmic expression of ghrelin and ghs-r1 ghrelin receptor in the brain and gastrointestinal tract of goldfish (*Carassius auratus*)[J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(10): e0141043.
- [18] Zhang X, Qi J W, Tang N, et al. Research progress of ghrelin on feeding regulation in fish species[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(9): 3394-3402. [张鑫, 齐锦雯, 唐妮, 等. 胃饥饿素对鱼类摄食调控的研究进展[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(9): 3394-3402.]
- [19] Kaiya H, Small B C, Bilodeau A L, et al. Purification, cDNA cloning, and characterization of ghrelin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 143(3): 201-210.
- [20] Unniappan S, Lin X W, 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.
- [21] Arcamone N, Neglia S, Gargiulo G, et al. Distribution of ghrelin peptide in the gastrointestinal tract of stomachless and stomach-containing teleosts[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2009, 72(7): 525-533.
- [22] Li C Y, Jeerawat T, Zha D L, et al. Comparison of digestive tract structure and distribution of gastric oxynticopeptic cells among three mandarin fish *Siniperca* species[J]. *Fisheries Science*, 2016, 35(4): 340-345. [李传阳, Thammaratsuntorn Jeerawat, 查丹琳, 等. 3 种鳊鱼消化道结构与胃中泌酸胃酶细胞分布比较[J]. *水产科学*, 2016, 35(4): 340-345.]
- [23] Lewin K J. The endocrine cells of the gastrointestinal tract. The normal endocrine cells and their hyperplasias. Part I[J]. *Pathology Annual*, 1986, 21: 1-27.
- [24] 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.
- [25] Terova G, Rimoldi S, Bernardini G, et al. Sea bass ghrelin: Molecular cloning and mRNA quantification during fasting and refeeding[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 155(2): 341-351.
- [26] Jönsson E, Forsman A, Einarsdóttir I E, et al. Plasma ghrelin levels in rainbow trout in response to fasting, feeding and food composition, and effects of ghrelin on voluntary food intake[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2007, 147(4): 1116-1124.
- [27] You J J, Ren P, He S, et al. Histone methylation of H3K4 involved in the anorexia of carnivorous mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) after feeding on a carbohydrate-rich diet[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2020, 11: 323.
- [28] Li Z R, Yu R L, Yin W Z, et al. mTOR signaling in X/A-like cells contributes to lipid homeostasis in mice[J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2019, 69(2): 860-875.
- [29] Conde-Sieira M, Soengas J L. Nutrient sensing systems in fish: Impact on food intake regulation and energy homeostasis[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2017, 10: 603.
- [30] Longo K A, Govek E K, Nolan A, et al. Pharmacologic inhibition of ghrelin receptor signaling is insulin sparing and promotes insulin sensitivity[J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2011, 339(1): 115-124.

Comparison of ghrelin expression in the stomachs of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) under different feeding diets

YAO Xiaoli^{1,2,3}, ZHAO Jinliang^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Ghrelin, an appetite-promoting gastrointestinal peptide, is involved in the feeding regulation of vertebrates. Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) is a typical carnivorous fish. It feeds on live bait throughout its life since its birth and is mainly fed with live bait during its production. In recent years, mandarin fish feed domestication research and experiments on compound food have also made rapid progress. However, compared to live bait feeding, the food intake decreased significantly after compound feed domestication. Ghrelin is the only food-promoting factor in the periphery. Whether the decrease in food intake after compound feed acclimation is related to the regulation effect of ghrelin remains to be studied. We obtained and analyzed the preproghrelin DNA sequence of *Siniperca chuatsi* for the first time by transcriptome sequencing and genome data matching and located the secretory cells. At the same time, we detected changes in the ghrelin gene and protein expression in the stomach after being induced and fed. The attraction test simulates the sighting of food before feeding but the inability to feed, while the feeding test simulates the normal feeding of mandarin fish. The results showed that the preproghrelin gene contains four exons and three introns and belongs to type II; 107 amino acids are coded, and the mature peptide ghrelin consists of 20 amino acids with GSSF as the active center. Immunohistochemistry revealed ghrelin-production cells located in the gastric glands. In the attraction test, ghrelin mRNA and protein expression levels were significantly higher in the live-bait group ($P < 0.05$). In contrast, ghrelin expression levels did not change significantly in the compound food group and were significantly lower than that in the live bait group. At 0h after feeding, ghrelin mRNA and protein levels in the live bait group increased significantly and decreased to normal levels at 2 h after feeding ($P < 0.05$), with no significant changes in subsequent gastric emptying ($P > 0.05$). Ghrelin mRNA expression levels in the compound food group did not change significantly throughout the feeding trial ($P > 0.05$), but fluctuations in protein levels were detected. In summary, ghrelin, located in the gastric glands, is involved in feeding regulation activities and shows a tendency to increase before and decrease after feeding. Additionally, compound food feeding reduced the effect of ghrelin on food regulation.

Key words: *Siniperca chuatsi*; ghrelin; live bait; compound food

Corresponding author: ZHAO Jinliang. E-mail: jlzhao@shou.edu.cn