

DOI: 10.12264/JFSC2023-0224

草鱼 *foxo4* 的基因克隆及其对饲料蛋白质营养调控的响应

徐哲华^{1,2}, 易成琳¹, 莫郁坚¹, 杨立权¹, 左安丽¹, 杨瑞瑶¹, 张鸣宇¹, 瞿符发¹,
唐建洲¹, 刘臻^{1,2}, 曹申平¹

1. 长沙学院生物与化学工程学院, 水生动物营养与品质调控湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410022;
2. 湖南师范大学生命科学学院, 淡水鱼类发育生物学国家重点实验室, 湖南 长沙 410081

摘要: 为探讨草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) *foxo4* 的分子特征及其对饲料蛋白营养调控响应的关系, 通过同源克隆获得草鱼 *foxo4* 基因序列, 其开放阅读框为 1875 bp, 编码 624 个氨基酸; 系统进化树分析表明草鱼 *foxo4* 基因与黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)亲缘关系最近。对 *foxo4* 进行组织表达分析, 发现 *foxo4* 基因 mRNA 在草鱼肌肉中表达水平最高($P<0.05$), 其次是心脏和肝, 最后是肠、脑、脾和肾。此外, 昼夜节律分析显示, *foxo4* 在 18:00 表达量最高, 而在 24:00 表达量最低。本研究进一步探究了菜粕、鱼粉和豆粕作为饲料蛋白对 *foxo4* 表达的调控, 实验结果表明, 在养殖 14 d、21 d 和 35 d 后, 草鱼肠道中 *foxo4* 基因在菜粕组和鱼粉组相对于豆粕组均出现显著的上调($P<0.05$), 这表明草鱼 *foxo4* 基因的表达与饲料中蛋白源种类密切相关。不同比例 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽(丙谷二肽)养殖实验结果显示, 在 0.5%~2%添加量范围内, 随着饲料中丙谷二肽添加比例的增加, 草鱼肠道中 *foxo4* 基因的表达呈逐渐下降趋势, 其中在对照组表达量最高, 在 1.5%丙谷二肽添加组表达量最低。综上所述, 草鱼 *foxo4* 基因表达具有组织特异性, 且受到饲料蛋白源和二肽水平的调控影响。本研究为揭示 *foxo4* 基因在鱼类中的分子特征及其对蛋白质营养调控的响应提供了基础数据。

关键词: 草鱼; *foxo4*; 基因克隆; 组织分布; 蛋白源; 丙谷二肽

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)01-0014-15

叉头框(forkhead box, Fox)蛋白家族是一类 DNA 结合区具有翼状螺旋结构的转录因子, 其广泛分布于从酵母类到哺乳类的生物类群中。Fox 蛋白家族共分为从 A 到 S 共 19 个亚族, 其中, 研究最为深入的是叉头盒转录因子 O (forkhead box O, FoxO)亚家族^[1]。Forkhead box O4 (FoxO4)是 FoxO 亚家族的成员, 在哺乳动物中该亚家族还包括 FoxO1、FoxO3 和 FoxO6, 它们在结构、功能和调控方面具有高度相似性^[2]。在部分鱼类中, FoxO 亚家族有 7 个同源性较高的成员, 即 FoxO1a、FoxO1b、FoxO3a、FoxO3b、FoxO4、FoxO6a 和

FoxO6b^[3]。Huang 等^[4]和 Carter 等^[5]在对 FoxO 及其调控机制的研究中表明, FoxO 可参与调节多种生理功能, 包括细胞周期、细胞凋亡、DNA 损伤修复、氧化应激、细胞分化、葡萄糖代谢等重要生理过程, 且其活性受磷酸化、乙酰化和泛素化多种机制调控^[4-5]。在动物体内, 转录因子 FoxO 在丝氨酸/苏氨酸激酶(serine/threonine kinases, Akt)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)等多种蛋白激酶的作用下发生磷酸化, 进而调控其下游靶基因的表达^[6]。

近年来, 国内外学者对 FoxO 功能展开了研

收稿日期: 2023-11-09; 修订日期: 2023-12-24.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32102813); 湖南省自然科学基金项目(2021JJ40627); 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题项目(2022FB08).

作者简介: 徐哲华(2001-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类营养与发育学. E-mail: xuzhehua2022@163.com

通信作者: 曹申平, 副教授, 研究方向为水生动物营养与饲料学. E-mail: spcao@ccsu.edu.cn

究。Galan 等^[7]研究发现哺乳动物 STE20 样蛋白激酶 1 (mammalian sterile20-like kinase 1, Mst1) 和 Akt 通过磷酸化 FoxO1 与 FoxO3, 抑制其与胞浆蛋白 14-3-3 的结合, 从而促进 *foxo1* 与 *foxo3* 进入细胞核进行转录, 启动相关基因表达。Barthel 等^[8]研究表明 FoxO1 蛋白在糖异生和脂肪酸的吸收过程中起重要作用, 它能够刺激磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)、葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)等关键酶的表达以及促使脂肪酸转运蛋白 CD36 从细胞质移位至细胞膜。Kim 等^[9]在小鼠上的研究发现 FoxO6 同样能刺激糖异生, 而胰岛素则是通过其独特的机制诱导 FoxO6 磷酸化并使其转录活性丧失从而起到抑制糖异生的作用。以上研究结果揭示 FoxO 对动物体内能源物质代谢具有重要调节作用。Liu 等^[10]研究发现, *foxo4* 可通过翻译后修饰以及与其他蛋白质的相互作用对其功能进行调节。这些功能包括调节细胞周期、促进细胞凋亡、参与 DNA 修复和氧化应激。如 *foxo4* 通过上调周期蛋白依赖性激酶抑制剂基因 *p27kip1*, 导致细胞周期阻滞、DNA 修复无效或过度, 进而触发细胞死亡, 因此 *foxo4* 可能在氧化应激刺激下作为细胞死亡和存活之间的开关^[11]。Chuang 等^[12]研究发现, 糖尿病患者 *foxo4* 乙酰化的改变促进了足细胞凋亡, 而减少 *foxo4* 乙酰化的策略可用于预防糖尿病足细胞丢失。此外, 转录因子 FoxO 在鱼类中也有相关研究, 如团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[3]、中国大鲵(*Andrias davidianus*)^[13]、稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)^[14]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[15]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[16-17]和斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[18]等。在斑马鱼的研究中发现, *foxo3b* 通过抑制 Wnt/b-catenin 信号通路而在其胚胎发育中发挥重要调控作用^[16]; 敲除 *foxo4* 基因能够增强斑马鱼对缺氧环境的耐受能力^[17]。在感染爱德华氏菌后, 斑点叉尾鲷显著上调体内 *foxo* 基因表达以提高其免疫功能^[18]。Wei 等^[15]和 Zhao 等^[19]研究发现 *foxo1* 和 *foxo3a* 基因能抑制鱼类骨骼肌中蛋白质的分解从而促进肌肉的生长和蛋白质沉积。以上结果表明, FoxO 在动物体的各项生理过程中具有重要作用。然而, 综合上述 FoxO 在鱼类中的研究发现, 有关 FoxO

转录因子对于鱼类中蛋白质营养代谢的影响目前还尚未报道。

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 为鲤科 (Cyprinidae), 草鱼属, 是一种典型的食草性鱼类, 是我国淡水养殖鱼类中产量最大的经济鱼类^[20]。本研究选用草鱼为研究对象, 克隆 FoxO 家族代表成员 *foxo4* 基因 CDS 区, 进行生物信息学分析; 分析草鱼 *foxo4* 基因在各组织的表达分布情况以及昼夜变化节律; 进行不同蛋白源和不同比例 L-丙氨酸-L-谷氨酰胺二肽(丙谷二肽)的营养生长实验, 探究不同饲料蛋白对草鱼肠道中 *foxo4* 基因表达的调控作用, 揭示 *foxo4* 基因在鱼类中的分子特征以及其蛋白质营养调控响应关系提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用草鱼幼鱼购自湖南省水产科学研究所(湖南长沙)。在正式实验前 2 周, 将所有鱼暂养于由 3 个玻璃纤维缸(1500 L)组成的室内循环水养殖系统中进行驯化, 驯化条件为: 水温(24.5±1.0) °C, 溶解氧含量为 6.5 mg/L 左右, 氨氮浓度 <0.5 mg/kg, pH 维持在 6.5~7.0, 12 h 光暗循环(光照从 8:00 到 20:00)。并于每日 8:00 和 14:00 对草鱼投喂实验室制备的暂养饲料(粗蛋白质 31%, 粗脂肪 5.5%, 灰分 10%, 总能量为 19 MJ/kg) 2 次。

1.2 样品采集

在本研究中, 所有的实验用鱼在解剖前浸泡在 MS-222 (60 mg/L, 间氨基苯甲酸乙酯甲烷磺酸盐, 美国 Sigma-Aldrich 公司)中进行麻醉。以无菌镊子分离采集所需测定的草鱼组织(心、肠、肝、脑、肾、脾和肌肉), 整个解剖过程在冰上进行。取样后迅速将样品冷冻在液氮中暂时保存, 然后转移至-80 °C 保存直至分析。

1.3 草鱼 *foxo4* 组织差异表达及昼夜节律表达

为了解草鱼各组织中 *foxo4* 基因的相对表达情况, 经驯化的草鱼禁食 24 h 后, 随机选取 6 尾大小相近、初重为(11.72±0.16) g 的表观健康的草鱼冰上解剖, 采集 7 个组织样品(心、肠、肝、脑、肾、脾和肌肉), 检测 *foxo4* 的组织表达模式。

随后, 分别在同一天 8 个不同时间(3:00、6:00、9:00、12:00、15:00、18:00、21:00、24:00)分别随机取 4 尾鱼采集肠道组织, 通过实时荧光定量 PCR 技术(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)分析 *foxo4* 基因表达的昼夜节律。在昼夜节律实验期间, 实验鱼停止投喂。

1.4 不同蛋白源对草鱼 *foxo4* 基因表达的影响

本研究分别以鱼粉、菜粕、豆粕作为主要蛋白源设计了 3 种等氮等脂等能实验饲料(表 1), 分别为豆粕组(soybean meal group, SM)、菜粕组

(rapeseed meal group, RM)和鱼粉组(fishmeal group, FM), 实验用鱼[初重为(11.72±0.16) g]饲养于 9 个 100 L 的玻璃纤维缸, 每组 3 个重复缸, 每缸 30 尾鱼。采用室内循环水进行养殖, 各组分别于每日 8:00 和 14:00 投喂至表观饱食。饲养条件: 水温为(24.5±1.0) °C, 溶解氧含量保持在 6.5 mg/L 以上, 氨氮浓度<0.5 mg/kg, pH 保持在 6.5~7.0 之间, 实验光周期为 12L : 12D (光照从 8:00 到 20:00)。分别在养殖实验开始后 14 d、21 d、28 d 和 35 d, 每缸取 2 尾鱼采集草鱼肠道组织, 通过 qRT-PCR 分析 *foxo4* 的转录水平。

1.5 饲料中不同 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽对草鱼 *foxo4* 基因表达的影响

本研究在基础饲料中分别添加 0.00%、0.50%、1.00%、1.50%和 2.00%比例的丙谷二肽(L-丙氨酰-L-谷氨酰胺, 源叶生物, 上海)组成 5 种实验饲料, 具体配方如表 2 所示。每个处理组 3 个

表 1 不同蛋白源实验饲料配方(%干物质)
Tab. 1 Experimental feed formula of different dietary protein sources (% dry matter)

成分 composition	鱼粉组 FM	菜粕组 RM	豆粕组 SM
鱼粉 fish meal	42.00	0.00	0.00
豆粕 soybean meal	0.00	0.00	59.80
菜粕 rapeseed meal	0.00	65.50	0.00
面粉 wheat flour	15.00	15.00	15.00
鱼油 fish oil	1.40	4.10	5.00
玉米淀粉 corn starch	14.00	1.50	4.00
α-淀粉 α-starch	14.00	1.50	4.00
胆碱 choline	0.11	0.11	0.11
多维多矿预混 ¹ premix ¹	1.50	1.50	1.50
羧甲基纤维素钠 CMC	3.00	3.00	3.00
纤维 cellulose	8.99	7.79	7.59
总计 total	100.00	100.00	100.00
近似组成 approximate composition			
粗蛋白 crude protein	31.05	31.08	31.08
粗脂肪 crude lipid	6.01	6.03	6.05
总能/(MJ/kg) gross energy	17.21	17.69	17.68
水分 moisture	10.78	10.70	10.05

注: 1. 多维多矿预混(mg/kg 饲料): 维生素 B₁, 20; 维生素 B₂, 20; 维生素 B₆, 20; 维生素 B₁₂, 0.02; 叶酸, 5; 泛酸钙, 50; 肌醇, 100; 烟酸, 100; 生物素, 0.1; 维生素 A, 11; 维生素 D, 2; 维生素 E, 50; 维生素 K, 10; 维生素 C, 100; 纤维素, 3412; NaCl, 500.0; MgSO₄·7H₂O, 8155.6; NaH₂PO₄·2H₂O, 12500.0; KH₂PO₄, 16000.0; Ca(H₂PO₄)₂·2H₂O, 7650.6; FeSO₄·7H₂O, 2286.2; C₆H₁₀CaO₆·5H₂O, 1750.0; ZnSO₄·7H₂O, 178.0; MnSO₄·H₂O, 61.4; CuSO₄·5H₂O, 15.5; CoSO₄·7H₂O, 0.91; KI, 1.5; Na₂SeO₃, 0.60; 玉米淀粉, 899.7。
Note: 1. Premix (mg/kg diet): Vitamin B₁, 20; Vitamin B₂, 20; Vitamin B₆, 20; Vitamin B₁₂, 0.02; Folic acid, 5; Calcium pantothenate, 50; Inositol, 100; Niacin, 100; Biotin, 0.1; Vitamin A, 11; Vitamin D, 2; Vitamin E, 50; Vitamin K, 10; Vitamin C, 100; Cellulose, 3412; NaCl, 500.0; MgSO₄ 7H₂O, 8155.6; NaH₂PO₄·2H₂O, 12500.0; KH₂PO₄, 16000.0; Ca(H₂PO₄)₂·2H₂O, 7650.6; FeSO₄ 7H₂O, 2286.2; C₆H₁₀CaO₆·5H₂O, 1750.0; ZnSO₄·7H₂O, 178.0; MnSO₄·H₂O, 61.4; CuSO₄·5H₂O, 15.5; CoSO₄·7H₂O, 0.91; KI, 1.5; Na₂SeO₃, 0.60; Corn starch, 899.7.

表 2 丙谷二肽实验饲料配方(%干物质)
Tab. 2 Experimental feed formula of dietary Ala-Gln level (% dry matter)

成分 component	饲料中丙谷二肽添加水平/% dietary Ala-Gln level				
	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0
丙谷二肽 Ala-Gln	0.00	0.50	1.00	1.50	2.00
鱼粉 fish meal	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
豆粕 soybean meal	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
棉籽粕 cottonseed meal	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00
菜籽粕 rapeseed meal	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
米糠 rice bran	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
次粉 middling	21.80	21.30	20.80	20.30	19.80
豆油 soybean oil	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
多维多矿预混 ¹ premix ¹	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
胆碱 choline	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
羧甲基纤维素钠 CMC	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
总计 total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
近似组成 approximate composition					
粗蛋白 crude protein	31.10	32.30	31.60	31.60	32.15
粗脂肪 crude lipid	5.46	5.29	5.45	5.61	5.54
灰分 ash	11.68	11.48	11.39	11.34	11.44
水分 moisture	11.12	11.04	10.80	12.01	11.24

注: 1. 多维多矿预混同表 1。
Note: 1. Premix is the same as tab.1.

平行, 每个平行 15 尾实验鱼[(11.72±0.16) g], 采用室内循环水进行养殖, 分别在每天的 9:00 和 15:00 饱食投喂 2 次, 养殖周期为 5 周。实验鱼禁食 24 h, 每缸随机捞取 2 尾鱼, 每组 6 尾, 冰上解剖采集其肠道组织, 通过 qRT-PCR 分析 *foxo4* 基因的相对表达水平。

1.6 RNA 提取与 cDNA 合成

取上述所需测定组织于液氮中研磨, 使用 Trizol (Takara, Kusatsu, Japan)提取总 RNA, 提取后取 3 μL 总 RNA 样品通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测其质量和完整性, 使用全波长读数仪(Thermo Fisher Scientific Inc, USA)检测 RNA 浓度和纯度(空白对照用 DEPC 水)。质量检测合格的 RNA 样品参照 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒(TaKaRa, Kusatsu, Japan)说明书合成第 1 链 cDNA。

1.7 草鱼 *foxo4* 基因的克隆

以草鱼心、肝、脾、肌肉、肠混合组织 cDNA 为模板克隆 *foxo4* 基因。在 NCBI 网站查找 *foxo4* 的同源基因, 根据物种亲缘关系越近则其同源基因间相似度和一致性越高的一般规律, 选择鲫 *foxo4* 基因序列作为草鱼 *foxo4* 克隆引物的设计模板。引物序列如表 3 所示, 将设计好的克隆引物序列委托湖南擎科生物技术有限公司(湖南, 中国)进行引物合成。以 DNA 聚合酶(*Taq* 酶)对 cDNA 模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL)为: 1.0 μL cDNA, 12.5 μL Premix Ex Hot short Version, 9.5 μL ddH₂O, 1.0 μL 正向和反向引物。PCR 条件为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min 30 s, 34 个循环; 72 °C 后

延伸 10 min; 4 °C 保存。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 使用凝胶提取试剂盒(天根, 北京, 中国)回收目的 PCR 产物, 连接到 pMD19-T 载体(TaKaRa, Kusatsu, Japan), 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 筛选得到的阳性克隆后由湖南擎科生物技术有限公司完成测序。

1.8 草鱼 *foxo4* 基因表达分析

根据草鱼 cDNA 序列设计 *foxo4* 基因的引物序列, 使用 Primer Premier 5 设计基因特异性定量引物(表 3)。选择 β -actin 作为内参基因, 采用实时荧光定量 PCR 方法检测草鱼 *foxo4* 基因在心、肠、肝、脑、肾、脾和肌肉组织中的表达量及其在肠道中表达的昼夜规律, 以及检测草鱼分别在不同蛋白源和不同比例丙谷二肽的生长实验中肠道中 *foxo4* 基因的表达情况。该过程使用 Bio-Rad CFX96™实时 PCR 检测系统(Bio-Rad, Hercules, USA)进行检测。

qRT-PCR 反应体系(16 μL)如下: 2×SYBR® Green ProTaq HS Premix (湖南艾科瑞生物工程有限公司, 湖南长沙) 8 μL, 正反引物各 0.64 μL, cDNA 模板 1 μL, ROX Reference Dye (20 μmol/L) 0.32 μL, ddH₂O 5.4 μL。扩增程序: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 进行 40 个循环。每个样本重复运行 3 次, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[21] 计算样品中 *foxo4* 基因的相对表达量。

1.9 草鱼 *foxo4* 序列分析

使用 NCBI 在线程序 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>)推测氨基酸序列。使用 ExPASy (<http://www.expasy.org/tools>)预测分子量和等电点。使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白结构域。使用 MatGAT2.02 软件将草鱼 FoxO4 氨基酸序列分别与其他物种的相应氨基酸序列多重比对。各物种 *foxo4* 的 GenBank 登录号如表 4 所示。利用 CodonW 软件对 *foxo4* 进行密码子偏好性分析。其中, 相对同义密码子使用度(relative synonymous codon usage, RSCU)指在编码相同氨基酸的同义密码子中, 某一特定密码子相对于其他同义密码子的使用概率; 有效密码子数(effective number of codon, ENC)用于描述密码子使用偏离随机选择的程度, 它能反

表 3 用于 *foxo4* 克隆和荧光定量 PCR 的引物信息
Tab. 3 Primer information for *foxo4* cloning and fluorescent quantitative PCR

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	用途 purpose
<i>foxo4</i> -F	ATGGAGGAAGAAAACGTACCCC	基因克隆 gene cloning
<i>foxo4</i> -R	TTAGCTGGGCACCCAGTTG	
<i>foxo4</i> -RT-F	GCTCCAATGCCAGCACACT	荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>foxo4</i> -RT-R	AGCCCGTCAATCAAATCCA	
β -actin-RT-F	GAACACTGTGCTGTCTGGAGGTA	荧光定量 PCR qRT-PCR
β -actin-RT-R	CTTGGGTTGGTCGTTTGAATC	

映同义密码子在密码子家族中非均衡使用的偏好程度^[22]。利用 MEGA 11 软件通过邻接(neighbour-joining, NJ)法构建进化树, 1000 次自举(bootstrap)重复检验进化树的置信度。

表 4 14 个物种 *foxo4* 序列登录号
Tab. 4 Accession number of *foxo4* of 14 species

物种 species	登录号 accession number
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	OM867542
犀角金线鲃 <i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i>	XP_016366703.1
鲫 <i>Carassius auratus</i>	XP_026136730.1
虎皮鱼 <i>Puntigrus tetrazona</i>	XP_043113405.1
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	XP_042626248.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	XP_009289443.1
黑头呆鱼 <i>Pimephales promelas</i>	XP_039521621.1
电鳗 <i>Electrophorus electricus</i>	XP_026868778.2
遮目鱼 <i>Chanos chanos</i>	XP_030621714.1
黄喉拟水龟 <i>Mauremys mutica</i>	XP_044885796.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_061259.1
人 <i>Homo sapiens</i>	NP_005929.2
普通牛 <i>Bos taurus</i>	NP_001094747.1
野猪 <i>Sus scrofa</i>	XP_003135220.1

1.10 统计分析

使用 SPSS 19.0 对所有实验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 比较草鱼不同组织或同一组织不同处理条件下 *foxo4* 基因相对表达量差异, 当 $P < 0.05$ 认为具有显著性差异。实验结果均以平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。

2 结果与分析

2.1 草鱼 *foxo4* 基因克隆及序列分析

草鱼 *foxo4* 基因的 ORF 区长 1875 bp (NCBI GenBank 登录号: OM867542), 且在第 51 个碱基处开始进行翻译, 该过程中的起始密码子是 ATG, 在第 1923 个碱基处停止翻译, 且终止密码子是 TAA, 推测该 cDNA 片段可编码 624 个氨基酸(图 1)。相对分子量为 65354.46 Da, 等电点为 5.13。使用 SMART 软件对 *foxo4* 基因在线预测分析, 结果表明, *foxo4* 基因分别由 FH、Pfam (FOXO_KIX_bdg) 和 Pfam (FOXO_TAD) 3 个功能域组成(图 2)。将草鱼 FoxO4 氨基酸序列分别与斑马鱼、人(*Homo*

sapiens)、小鼠(*Mus musculus*)和电鳗(*Electrophorus electricus*)的相应氨基酸序列进行了同源性比对分析, 结果发现该基因在不同物种间均具有较高的同源性(图 3)。

草鱼 *foxo4* 的密码子偏好性与其他物种之间存在差异, 如图 4 所示。相对同义密码子使用度(RSCU)分析显示, *foxo4* 在所有物种中对 CUG 和 AGC 密码子都表现出较高的偏好性, 这两个密码子分别编码亮氨酸和丝氨酸。此外, 草鱼和黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)对 CUG、GUG、ACA、CAC、CAG 和 AAC 这 6 个密码子的偏好性均较强且趋势相近, 而同时都对 UUA、CUA、AUA、GUU 等 19 个密码子偏好性较弱, 这说明草鱼与黑头呆鱼在密码子的偏好性上有一定的相似性, 在进化过程中亲缘关系更近。此外, ENC-plot 图(以 GC3s 为变量, ENC 为因变量)(图 5)显示所有物种的 *foxo4* 分布在标准曲线下方, 并且实际 ENC 值与理论 ENC 值不同, 且大部分离标准曲线较远, 说明大部分物种 *foxo4* 密码子偏好性形成受自然选择的作用较大。

如图 6 所示, 草鱼 *foxo4* 的进化树由两个主要分支组成, 草鱼与硬骨鱼类聚为一支, 其他四足动物聚为一支, 其中与草鱼 *foxo4* 基因进化关系最近的是黑头呆鱼, 而与黄喉拟水龟(*Mauremys mutica*)、普通牛(*Bos taurus*)、野猪(*Sus scrofa*)、小鼠和人等四足动物亲缘关系较远。

2.2 草鱼 *foxo4* 组织差异表达及昼夜节律表达分析

草鱼 *foxo4* 组织分布结果如图 7 所示, *foxo4* mRNA 在草鱼心、肠、肝、脑、肾、脾和肌肉中均有表达, *foxo4* 在各组织间的表达量存在显著差异, 在肌肉中的表达水平显著高于其他组织($P < 0.05$), 然后由高到低依次为肝、心、肠、脾、脑, 在肾中的表达量最低。

草鱼肠道 *foxo4* mRNA 的昼夜节律表达如图 8 所示。上午 3:00~9:00, *foxo4* 基因在草鱼肠道中的表达逐渐上升, 然后维持稳定, 到中午 12:00 时则显著降低至最低点($P < 0.05$); 从 12:00~18:00, *foxo4* 的表达呈显著上升趋势($P < 0.05$), 且在 18:00 时达到一天的最大值。18:00 后, *foxo4* 的表达又显著降低至最低点($P < 0.05$)。

```

1      1  gggtacgacgqcggtgattcgagctcggtacccgqgqatcctctagaqattATGGAGGAAG      M E E E
5      5  N V P P I D P D F E P Q S R P R S C T W
61     61  AAAACGTACCCCGATTGACCCAGATTTTGTAGCCGAGAGCAGACCGAGGTCATGTACAT
25     25  P L P R P D I S A V K A G G P D G S E S
121    121  GGCCGTTGCTAGACCCGACATCTCAGCTGTCAAAGCAGGGGGCCAGACGGCTCAGAGT
45     45  A A G T P P A E D D K H E P Q P I I S E
181    181  CTGCTGCTGGAACCCCGCCCGCCGAAGATGATAAACACGAGCCTCAGCCAATCATATCCG
65     65  P E K V A L S E G G V V A G V G G T T P
241    241  AGCCTGAGAAAGTAGCGCTCTCGGAGGGCGGGGTTGTGCTGGAGTGGGCGGGACACAC
85     85  R K G T S R R N A W G N Q S Y A D L I S
301    301  CTGAAAAGGCACCTCCCGGGTAATGCCTGGGGTAATCAGTCTACGCAGATCTGTATCA
105    105  Q A I E N S P E K R L T L A Q I Y D W M
361    361  GCCAGGCGATTGAAAACCTCGCCAGAAAAACGACTTACTTGGCGCAGATCTATGATTGGA
125    125  V K T V P Y F K D K G D S N S S A G W K
421    421  TGGTAAAACGGTGCCTATTTTAAGGACAAAGGAGACAGTAACAGTTCTGTGCGGTGGA
145    145  N S I R H N L S L H N K F L R V H N E S
481    481  AGAACTCCATTTCGCCACAATTTATCGTCCACACAAGTTCCTGCGAGTGCACAATGAGT
165    165  T G K S S W W M L N P E G G K T G K A P
541    541  CCACAGGAAAGAGCTCTTGGTGGATGCTCAACCCTGAGGGTGGCAAGACCGGCAAGCCC
185    185  R R R A A S M D N S S K L L K S R M R A
601    601  CTCGCCGCGCGCCCTCCATGGACAACAGCAGCAAACTGCTTAAAAGTCGTATGCGAG
205    205  K Q T K K Q A G A T G I G S S G G A L Q
661    661  CAAAGCAGACTAAAAGCAAGCTGGAGCAACTGGGATTGGAAGCTCTGGAGGTGCCCTGC
225    225  G E G A S G T S G A D S P G P P G F G
721    721  AGGGTGAGGGTGCTTCCGGCACCAAGTGGTGGGACAGTCCCGGGCTCCGGGTGAGTTG
245    245  K W G V N S S S P S S R G N L D D P D M
781    781  GAAAGTGGGGAGTGAACAGCAGCAGCCCTTCTCTCGTGGCAACCTGGATGACCCTGACA
265    265  W T S F R P R T S S N A S T L S G R L S
841    841  TGTGGACGAGTTTCAGGCCACGCACAAGCTCCAATGCCAGCAGTGGAGCGGTAGGCTTT
285    285  P I A T G Q E D E D D L P E D G L L G G
901    901  CTCCCATTTGCCACGGGGCAGGAGGATGAGGATGACCTACCTGAGGACGGCCTTCTTGGTG
305    305  Y S T G N L P P T L T E T L M E E L D L
961    961  GCTATTCTACAGGGAATCTTCCCCAACACTAACTGAGACCTCATGGAAGAACTGGATT
325    325  I D G L T L M T G P Q G G A S P S T A P
1021   1021  TGATTGACGGGCTCACTTTAATGACGGGTCCGCAAGGGGGTGCGAGCCCAAGCAGCTC
345    345  P A P P Q P L P S A S T L L P R G S S F
1081   1081  CCCCTGCCCGCCTCAACCGCTGCCTTCTGCATCCACTCTGCTGCCTCAGGGTCCAGCT
365    365  S S F R Q L Q P T K A S Q G S T P P G P
1141   1141  TTTCTCTTTCAGGCAGCTGCAGCCAACGAAGGCTTCACAGGGATCCACTCCACCAGGTC
385    385  Q S S V Q P S G G S S T S P S S F G N S
1201   1201  CGCAGAGCTCGGTTCAACCCAGCGGCGGATCCAGCACAAGCCCTTCAAGCTTCGGAAACT
405    405  L F S P L P G G P G H S G F S T R V P S S
1261   1261  CCTCTTCAGCCCTTGCCCGGTCTGCTCAGTGGTTTCAGTACTCGCGTGCCTTCCA
425    425  L E A L L T S D S P P P S D V M M T Q M
1321   1321  GCCTCGAAGCTCTCCTTACCTCCGATTCTCCCCACCCAGCGATGTCATGATGACCCAGA
445    445  D P L M P S Q G G G S L L G L A G S M S
1381   1381  TGATCCTCTCATGCCGAGCCAAGGAGGTGGCAGCCTTTTGGGGCTTGGCGGATCTATGT
465    465  S S Q A K A G Q M M L S K G I D T S T V
1441   1441  CCAGCAGCCAAGCTAAAGCAGGTGAGTGTGAGCAAAGGCATTGACACAAGCACGG
485    485  G Q M S L Q P Q T Q L Q L S Q M G Y G M
1501   1501  TGGGGCGATGAGCCTCAACCTCAAAACCAACTCCAGCTTTCACAGATGGGCTATGGAA
505    505  M H S S M N Q E P P Q L A T V K T R H Q
1561   1561  TGATGCACTCATCCATGAACCAGGAACCACTCAGCTCGCAACAGTAAAGACCCGGCATC
525    525  V P G A G L Q H G A I P S P G G N G G L
1621   1621  AGGTGCCAGGCGCTGGGCTGCAGCATGGAGCTATCCCGTCACCCGGTGGGAACGGAGGCC
545    545  Q G L G Q F A T A P C F M P S Q D R L P
1681   1681  TGCAAGGTCTAGGCCAGTTTGCAGACAGCGCCCTGCTTCATGCCCTCCAGGACCGTCTGC
565    565  T D L D I E M F T E N L D C D V E Y I I
1741   1741  CTACAGACTTGATATTGAGATGTTTCACTGAAAACCTGGACTGTGATGTGGAATATATTA
585    585  N S D L M D G D L V D F N F D P I I Q G
1801   1801  TCAACAGTGATCTTATGGATGGAGACTTGGTTGACTTCACTTTGACCCCATCATACAGG
605    605  G Q S Y P P A S T Q S S S H N W V P S
1861   1861  GTGGACAGAGCTATCCTGGGCCAGCGTCCACACAGAGCTCCTCCCAACTGGGTGCCCA
625    625  *
1921   1921  GCTAAaattcctcgaactcgaacatgcaaaactgacgaatcatgtaattcgc

```

图 1 草鱼 *foxo4* 基因 mRNA 序列

*表示终止密码子。

Fig. 1 *foxo4* gene mRNA sequence in *Ctenopharyngodon idella*

* represents termination codon.

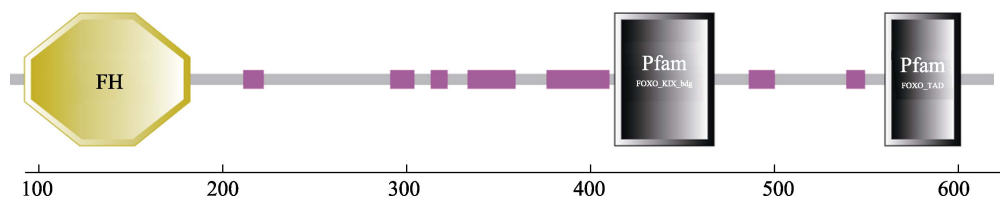


图 2 草鱼 FoxO4 蛋白保守结构域预测

Fig. 2 Prediction of conserved domain in FoxO4 protein of *Ctenopharyngodon idella*

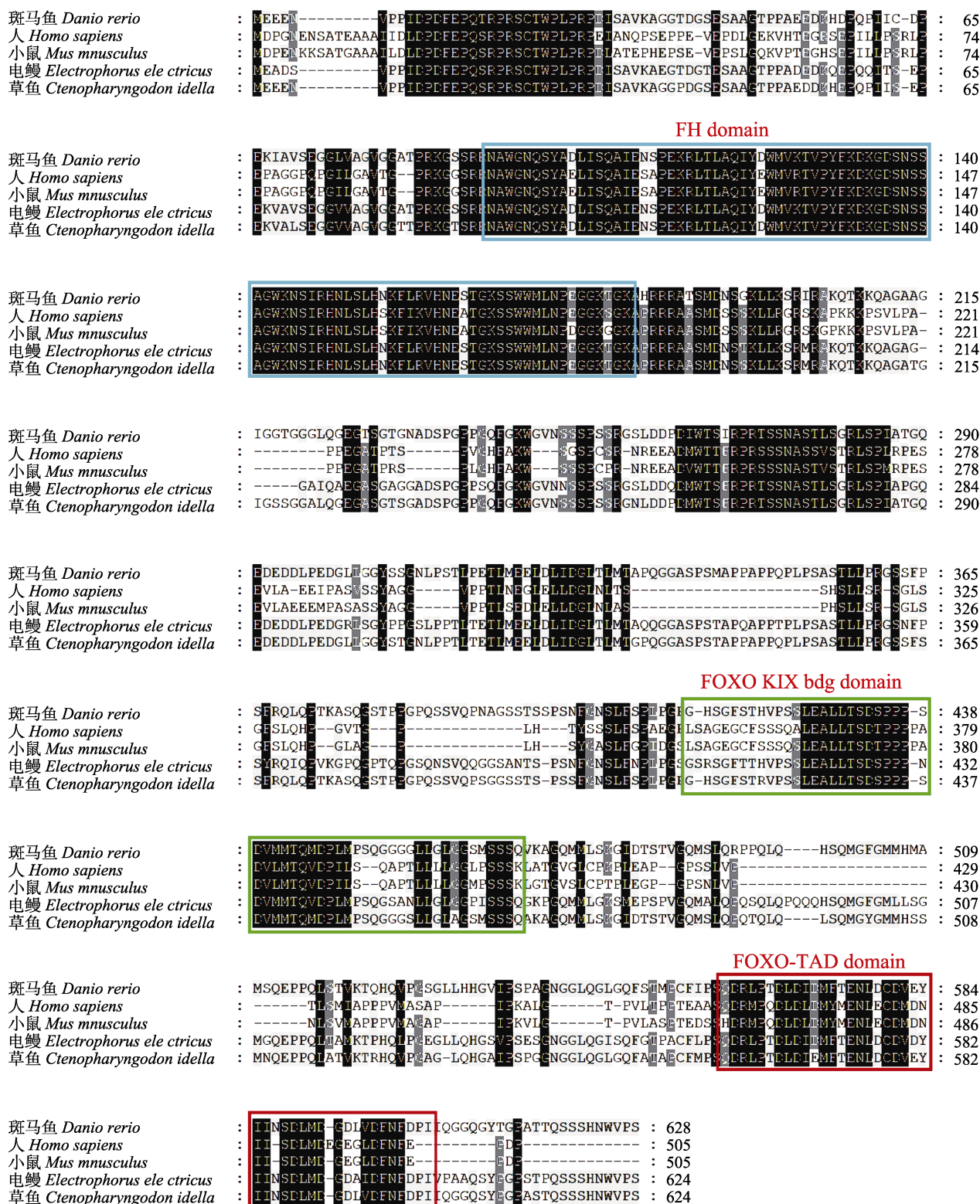


图 3 草鱼 FoxO4 和其他已知物种 FoxO4 序列的多序列比对分析

黑色阴影部分表示完全匹配的氨基酸残基，蓝色方框表示 FH 结构域，绿色方框表示

FOXO KIX bdg 结构域，红色方框表示 FOXO-TAD 结构域。

Fig. 3 Multiple sequence alignment analysis of *Ctenopharyngodon idella* FoxO4 and other known FoxO4 sequences. The black shaded part indicates the completely matched amino acid residues, the blue box indicates the FH domain, the green box indicates the FOXO KIX bdg domain, and the red box indicates the FOXO-TAD domain.

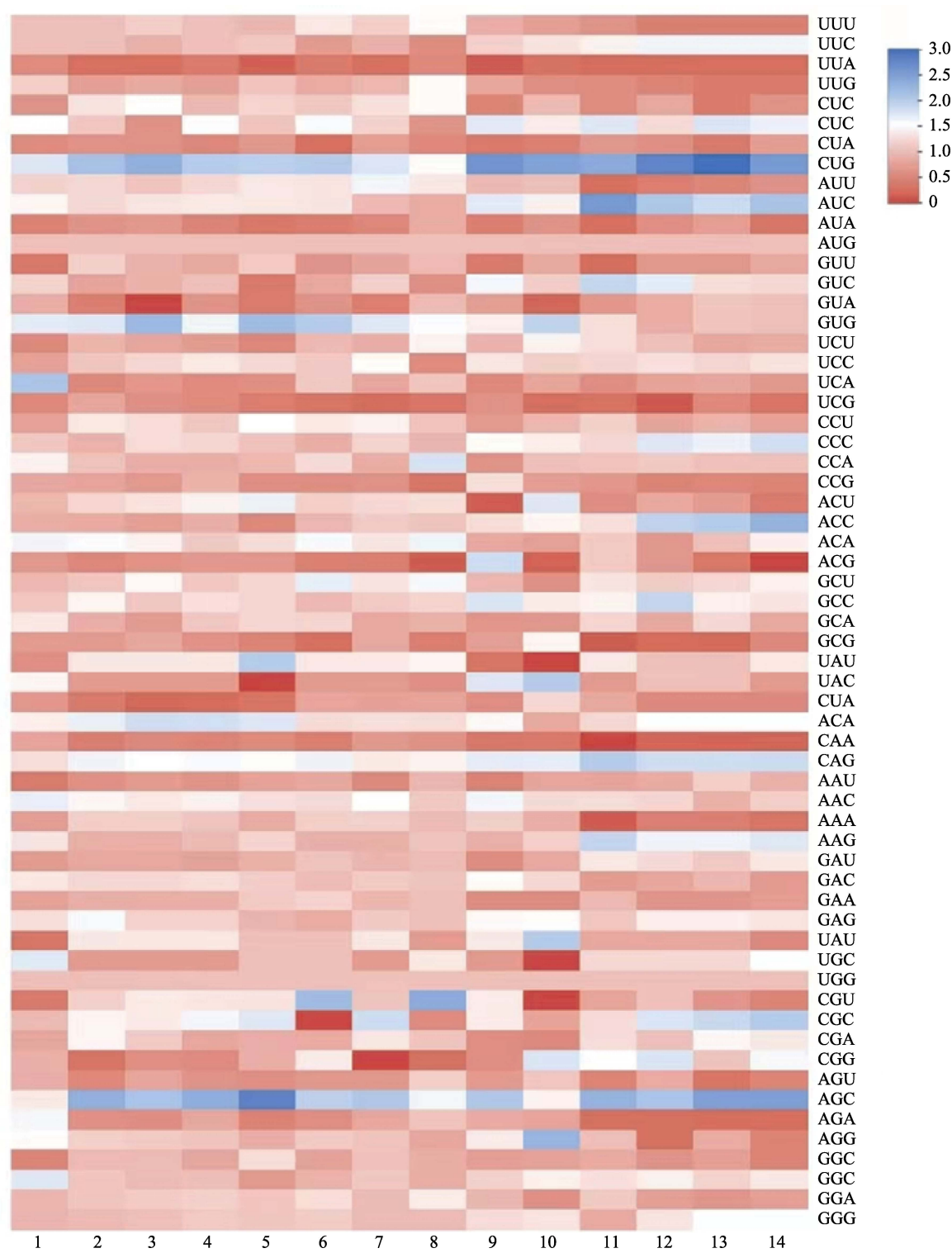


图 4 14 个物种 *foxo4* 的 RSCU 热图

1. 草鱼; 2. 犀角金线鲀; 3. 鲫; 4. 虎皮鱼; 5. 鲤; 6. 斑马鱼; 7. 黑头呆鱼; 8. 电鳗; 9. 遮目鱼;
10. 黄喉拟水龟; 11. 小鼠; 12. 人; 13. 普通牛; 14. 野猪.

Fig. 4 Heat map of RSCU values of *foxo4* from 14 species

1. *Ctenopharyngodon idella*; 2. *Sinocyclocheilus rhinoceros*; 3. *Carassius auratus*; 4. *Pimephales promelas*;
5. *Cyprinus carpio*; 6. *Danio rerio*; 7. *Pimephales promelas*; 8. *Electrophorus electricus*; 9. *Chanos chanos*;
10. *Mauremys mutica*; 11. *Mus musculus*; 12. *Homo sapiens*; 13. *Bos taurus*; 14. *Sus scrofa*.

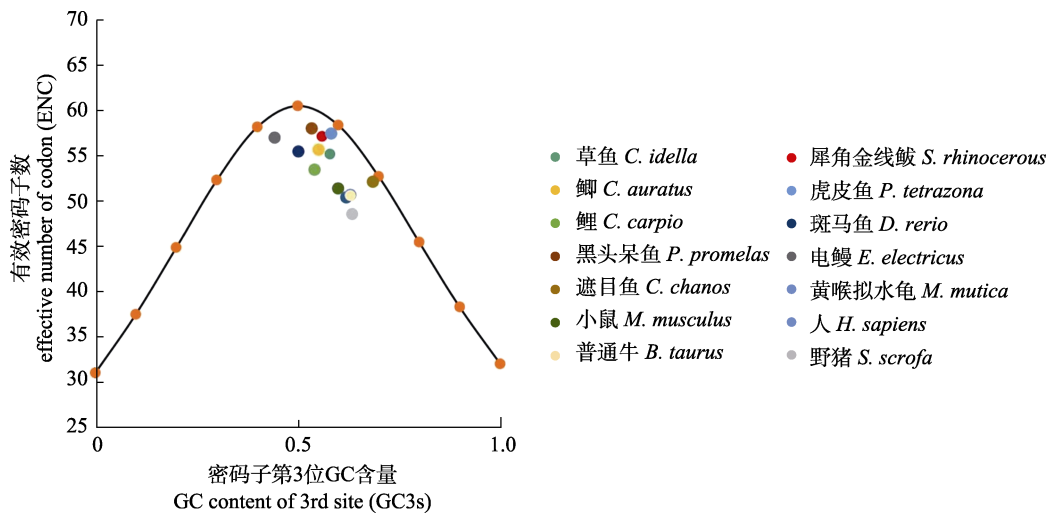


图 5 不同物种 *foxo4* 基因的 ENC-plot 分析
Fig. 5 Analysis of ENC-plot of *foxo4* of different species

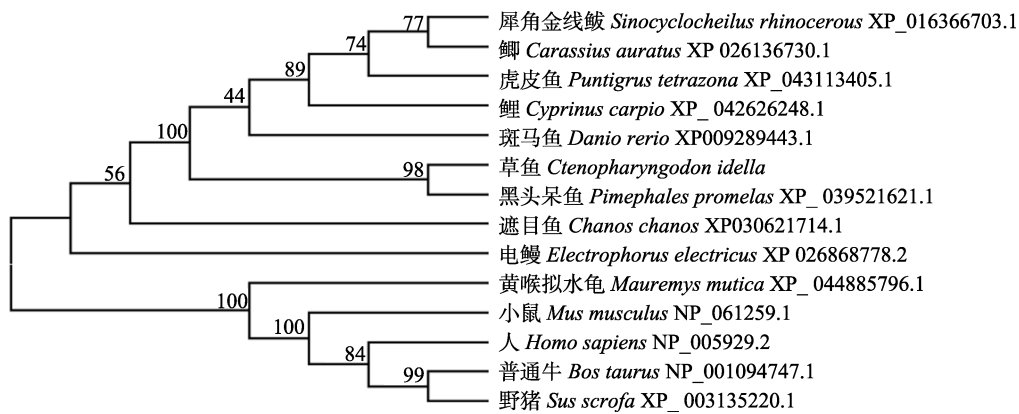


图 6 基于不同物种 FoxO4 氨基酸序列构建的系统进化树(NJ 法)
节点处数字表示 1000 次自举检验置信度.

Fig. 6 Phylogenetic tree of different species based on FoxO4 amino acid sequence by NJ method
Figures on the nodes represent percentage frequencies for tree topology after 1000 iterations.

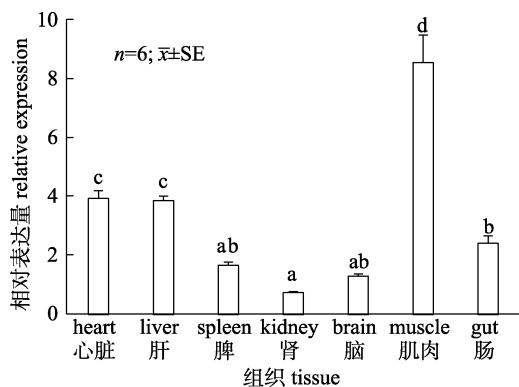


图 7 *foxo4* 在草鱼各组织中的相对表达水平
不同字母表示不同组织间差异显著($P<0.05$).
Fig. 7 Relative expression levels of *foxo4* in various tissues of *Ctenopharyngodon idella*
Different letters indicate significant differences among different tissues ($P<0.05$).

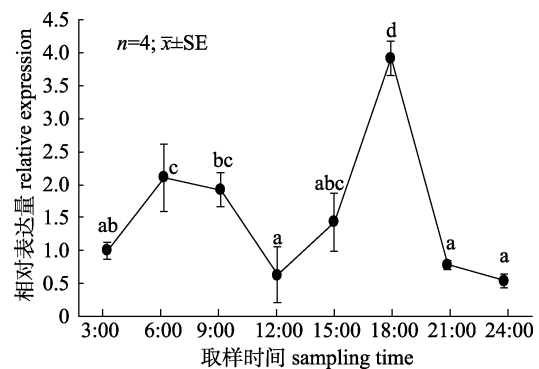


图 8 草鱼 *foxo4* 基因的昼夜变化节律
不同字母表示不同时间点组间差异显著($P<0.05$).
Fig. 8 The circadian rhythm of *foxo4* gene of *Ctenopharyngodon idella*
Different letters indicate significant differences between different time points ($P<0.05$).

2.3 不同蛋白源对草鱼 *foxo4* 基因表达的影响

如图 9 所示, 饲料中不同蛋白源对草鱼肠道 *foxo4* 表达具有显著影响。在养殖后 14 d 和 35 d, 草鱼肠道中 *foxo4* 在豆粕组表达水平均显著低于鱼粉组和菜粕组($P<0.05$); 在养殖后 21 d 和 28 d 时, *foxo4* 在豆粕组表达水平显著低于菜粕组($P<0.05$)。

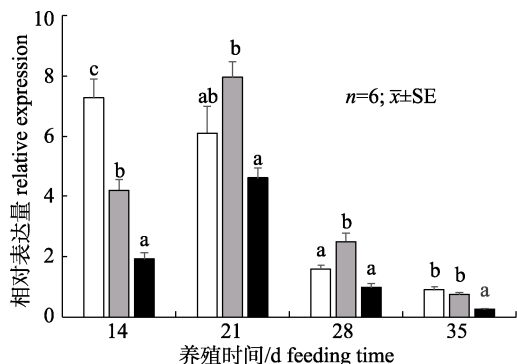


图 9 不同蛋白源对草鱼肠道 *foxo4* 基因表达的影响

FM: 鱼粉组; RM: 菜粕组; SM: 豆粕组. 不同字母表示同一时间点不同蛋白源组间差异显著($P<0.05$).

Fig. 9 Effect of different protein sources on the expression of *foxo4* gene in intestine of *Ctenopharyngodon idella*

FM: fish meal group; RM: rapeseed meal group; SM: soybean meal group. Different letters indicate significant differences among different protein source groups ($P<0.05$).

2.4 饲料添加丙谷二肽对草鱼 *foxo4* 基因表达的影响

如图 10 所示, 随着饲料中丙谷二肽添加比例的增加, 草鱼肠道中 *foxo4* 基因的表达呈逐渐下

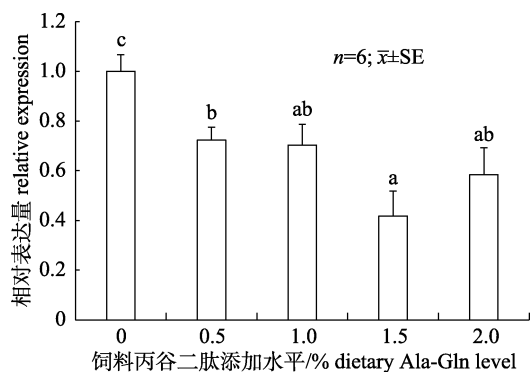


图 10 不同水平丙谷二肽对草鱼肠道 *foxo4* 基因表达的影响

不同字母表示不同丙谷二肽添加水平组间差异显著($P<0.05$).

Fig. 10 Effects of different levels of Ala-Gln on the expression of *foxo4* gene in intestine of *Ctenopharyngodon idella*

Different letters indicate significant differences between groups with different levels of Ala-Gln ($P<0.05$).

降的趋势, 并且在对照组表达量最高, 在 1.5%添加组表达量最低($P<0.05$).

3 讨论

3.1 草鱼 *foxo4* 序列分析

本研究结果表明, 草鱼 *foxo4* 基因的 ORF 区长 1875 bp, 编码 624 个氨基酸。且 FoxO4 有 3 个功能域, FH 结构域位于 92~182 个氨基酸残基, FOXO_KIX_bdg 结构域位于 413~467 个氨基酸残基, FOXO-TAD 结构域位于 560~601 个氨基酸残基。FoxO4 作为 FoxO 蛋白家族的成员, 与家族中其他成员(如 FoxO1、FoxO3、FoxO6)结构相似, 都具有 FoxO 蛋白家族特有的 FH、FOXO_KIX_bdg 和 FOXO-TAD 保守结构域^[23]。经 Expasy 预测, 该蛋白的分子量为 65354.46 Da, 等电点为 5.13。

遗传密码子偏好的分析有助于理解物种之间的进化过程和系统发育关系, RSCU 和 ENC 指数是衡量基因之间密码子偏好程度的指标^[24]。其中, RSCU 值大于 1 表示基因中特定密码子的使用频率高于预期值^[25]; ENc-plot 图中各点与期望曲线可以反映出密码子偏好性的形成是由于碱基突变还是自然选择^[26]。本研究比较了草鱼和其他物种的 *foxo4* 的 RSCU 值, 发现草鱼和黑头呆鱼含有相对多的、偏好性较强且趋势相近的密码子, 这表明两者的 *foxo4* 在进化方面关系更为密切。同时, *foxo4* 系统进化树分析显示, 草鱼也是与黑头呆鱼聚为一小支, 其 *foxo4* 序列与硬骨鱼类的相似性较高, 亲缘较近; 而与其他四足动物的相似性则较低, 亲缘较远, 这与团头鲂和稀有鮡鲫中 *foxo* 与硬骨鱼类相似性较高^[3,13]的研究结果一致。此外, ENc-plot 图显示, 遮目鱼(*Chanos chanos*)、虎皮鱼(*Puntigrus tetrazona*)、电鳗和黑头呆鱼这 4 个物种位于期望曲线附近, 说明这 4 个物种的 *foxo4* 密码子偏好性的形成主要受到突变影响。相反地, 鲤(*Cyprinus carpio*)、黄喉拟水龟、小鼠、人、普通牛和野猪这 6 个物种分布于离期望曲线最远的位置, 其余 4 个物种处于较远位置, 说明这些物种 *foxo4* 密码子偏好的形成很大程度上是由自然选择或其他因素所影响, 如 G+C 含量^[24]、tRNA 丰度^[27]、蛋白质结构^[28]等, 而非由突变引起。

3.2 草鱼 *foxo4* 基因组织表达及昼夜节律表达分析

foxo4 在多种动物体内的各类组织中均有分布。本研究结果发现,在草鱼所测试的 7 个组织中均检测到 *foxo4* 基因的分布,且在肌肉组织中其表达水平达到最高,而在肾脏中表达量处于最低水平。与此不同的是,在团头鲂中的研究发现,*foxo4* 基因在肝、脑、肠、鳃、心、脾、肾、肌肉和血液 9 种组织中均有表达且在血液中表达量最高^[3];而 *foxo4* 基因虽在哺乳动物猪的肝、肺、肾、心脏、脾、脂肪、大小肠、背最长肌 9 种组织中均有表达,但最高表达水平出现在脂肪组织^[29]。此外, Furuyama 等^[30]的研究结果揭示 *foxo4* 基因在小鼠骨骼肌组织中表达量较高,在肝脏组织中表达水平较低,这与本研究在草鱼中发现 *foxo4* 基因在肌肉组织中的表达量最高的结果一致,但与在草鱼肾脏中表达量最低的结果不同。综合以上研究结果,说明 *foxo4* 在不同物种中存在组织表达差异性,这可能与 *foxo4* 在不同动物体的不同发育时期所发挥功能不同有关。已有研究证明,*foxo1* 和 *foxo3a* 基因在促进鱼类肌肉的生长发育方面起重要作用。在大菱鲆中,当 *foxo1* mRNA 为高表达水平时,其肌肉蛋白合成增加,继而促进大菱鲆生长^[15]; Zhao 等^[19]研究表明 *foxo3a* 能够抑制鱼类肌肉中蛋白质降解,从而促进蛋白质沉积和肌肉生长。在本研究所检测的组织中, *foxo4* 在肌肉中呈现最高表达,这提示 *foxo4* 基因参与调控了草鱼肌肉的生长与发育,并在其中起着关键性作用。

本研究昼夜节律实验结果显示,草鱼 *foxo4* 基因表达水平从 3:00 至 9:00、12:00 至 18:00 均呈一定的上升趋势,并在 18:00 达到一天最大表达水平;从 18:00 至 24:00 呈下降趋势,且 *foxo4* 在 12:00 和 24:00 表达水平较低。冯军厂等^[31]在研究草鱼肠道中 *pept1* (oligopeptide transporter 1, 小肽转运蛋白 1) 基因时发现草鱼中肠段在每日 9:00 和 18:00 两次投食后, *pept1* 表达量都会有一个短暂的上升期; Xiao 等^[32]在研究湘云鲫 (*Carassius auratus*) *gls1* (glutaminase 1) 基因时也有类似发现, *gls1* 基因的表达量在每日两次喂食后均会有一定的上升。这种变化规律与实验期间

每日的摄食时间同步,在本研究中,虽然昼夜节律实验期间未进行投喂, *foxo4* 表达量依旧进行规律变化,这与鲫中研究结果相似。经短期饥饿(7 d)后,鲫体内 *igflr1*、*ucpl*、*per1* 等基因的表达仍能短暂维持与正常投喂状态下的表达保持一致^[33]。此外,廖盛臣等^[34]在对团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 的禁食研究中也发现, *mc3r* mRNA 在下丘脑中的转录表达上调的时间点与正常喂养时每天首次喂食的时间点高度吻合,并推测这是一种摄食预判行为。故本研究推测草鱼可能已形成在固定的时间点的摄食条件反射,从而在摄食时间点表现出显著的上升趋势,当食物消化完时, *foxo4* 基因的表达又回落至低点。

3.3 饲料蛋白源及二肽对草鱼 *foxo4* 表达调控的分析

草鱼作为植食性鱼类,其配合饲料主要以豆粕、棉籽粕及菜籽粕等植物性蛋白原料为主^[35]。在本研究养殖实验的 14 d、21 d 和 35 d,草鱼肠道中 *foxo4* 基因相对表达水平在菜粕组和鱼粉组相对于豆粕组均出现显著上调,这表明草鱼 *foxo4* 基因的表达与饲料中蛋白源种类密切相关。近年来,陆续有研究发现,对于植食性鱼类,存在过量使用豆粕影响鱼类健康状况的现象,如引发肠道炎症反应、肝胰脏代偿性增大等^[36-37]。周振琪^[38]研究发现, FoxO 蛋白家族在肠胃中的定位与肠胃的生理功能有关。一项针对人类的研究揭示了 FoxO4 转录因子与溃疡性结肠炎疾病(ulcerative colitis, UC)发病之间联系紧密,且 FoxO4 的表达强度与 UC 的活动性呈负相关性,分析认为 FoxO4 是 NF- κ B 重要调节因子,其可降低下游炎症因子的产生,维持肠道黏膜稳态;当 *foxo4* 表达减少或缺失时,炎症平衡破坏,炎症因子过量产生进而损伤肠道黏膜,引起 UC 发生^[39]。此外,豆粕中存在着多种抗营养因子,如胰蛋白酶抑制因子、植物血凝素等,在动物肠道中,它们与蛋白消化酶胰蛋白酶结合形成不具活性的蛋白复合物,导致胰蛋白酶活性丧失,进而降低蛋白质的消化吸收^[40]。因此,在本研究中,可能由于饲料中使用的豆粕蛋白源引起了草鱼肠道炎症、溃疡等相关病变,造成其肠道中 *foxo4* 基因表达水平显著

受到抑制, 并降低对蛋白质的消化吸收利用。此外, 本研究中华草鱼在摄食菜粕饲料后相对于豆粕饲料维持相对较高的 *foxo4* 表达水平, 可能是因为胰蛋白酶抑制因子并非菜粕中存在的主要抗营养因子。且在达氏鳢(*Huso dauricus*)中研究发现, 饲料中添加菜粕会提高其肠道中蛋白质代谢水平, 不会引起鱼体的应激反应^[41]。因此, 相比于豆粕, 菜粕对鱼类肠道 *foxo4* 基因表达具有较弱的抑制反应。

水产动物中研究表明, 谷氨酰胺(glutamine, Gln)是动物肝脏、肠道、肌肉等多种组织的主要能量来源, 对于动物基础能量代谢和生理功能发挥着至关重要的作用^[42]。丙氨酰-谷氨酰胺(Ala-Gln)与游离 Gln 具有非常相似的功能, 且 Ala-Gln 具有更好的化学稳定性和水溶性, 进入体内后能够迅速分解为 Gln 而发挥作用, 可以代替 Gln 作为水产动物肠道中能量和蛋白质的来源^[43-44]。本研究发现, 随着草鱼饲料中丙谷二肽添加比例的增加, 草鱼肠道中 *foxo4* 基因的表达呈逐渐下降的趋势, 且在 1.5%添加组表达量最低。PepT1 作为动物肠道小肽转运吸收的关键性运输载体, 其在肠道中的表达受到上游转录因子 CDX2 (Caudal-type homeobox transcription factor 2, 尾型同源盒转录因子 2)的正向调控^[45-46]。有学者发现, 哺乳动物中 *cdx2* 基因的启动子中存在着 *foxo4* 活性结合位点, *foxo4* 能直接靶向结合到 *cdx2* 启动子区域抑制 *cdx2* 的转录^[47]。因此, 肠道 *foxo4* 基因的表达与 *cdx2*、*pept1* 活性往往存在负相关性。在本研究中, 草鱼在摄食 Ala-Gln 二肽饲料后, 其肠道中小肽转运载体 *pept1* 也随之被激活表达, 由于负反馈调节作用, 高表达 *pept1* 则可能抑制草鱼肠道中 *foxo4* 基因的表达转录。然而, 有关 *pept1* 抑制 *foxo4* 基因表达的具体机制还有待进一步研究。

4 结论

本研究揭示了草鱼 *foxo4* 基因的分子特征, 且证实了草鱼 *foxo4* 基因的表达受到饲料蛋白源和二肽水平的调控影响。这将为其他硬骨鱼类 *foxo4* 分子特征的研究以及后续开展 *foxo4* 基因

调控鱼类蛋白代谢的分子机制的研究提供理论基础。

参考文献:

- [1] Martins R, Lithgow G J, Link W. Long live FOXO: Unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity[J]. Aging Cell, 2016, 15(2): 196-207.
- [2] Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2011, 1813(11): 1938-1945.
- [3] Zhang A X, Chen K, Wang W F, et al. Sequence characterization and expression analysis of the foxO gene family in *Megalobrama amblycephala*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2022, 46(11): 1684-1693. [张阿鑫, 陈康, 王伟峰, 等. 团头鲂 foxO 基因家族的序列特征及表达分析[J]. 水生生物学报, 2022, 46(11): 1684-1693.]
- [4] Huang H J, Tindall D J. Dynamic FoxO transcription factors[J]. Journal of Cell Science, 2007, 120(15): 2479-2487.
- [5] Carter M E, Brunet A. FOXO transcription factors[J]. Current Biology, 2007, 17(4): R113-R114.
- [6] Noorolayi S, Shajari N, Baghbani E, et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer[J]. Gene, 2019, 698: 120-128.
- [7] Galan J A, Avruch J. MST1/MST2 protein kinases: Regulation and physiologic roles[J]. Biochemistry, 2016, 55(39): 5507-5519.
- [8] Barthel A, Schmoll D, Unterman T G. FoxO proteins in insulin action and metabolism[J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2005, 16(4): 183-189.
- [9] Kim D H, Perdomo G, Zhang T, et al. FoxO6 integrates insulin signaling with gluconeogenesis in the liver[J]. Diabetes, 2011, 60(11): 2763-2774.
- [10] Liu W, Li Y, Luo B. Current perspective on the regulation of FOXO4 and its role in disease progression[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2020, 77(4): 651-663.
- [11] Ho S R, Wang K, Whisenhunt T R, et al. O-GlcNAcylation enhances FOXO4 transcriptional regulation in response to stress[J]. FEBS Letters, 2010, 584(1): 49-54.
- [12] Chuang P Y, Dai Y, Liu R J, et al. Alteration of forkhead box O (foxo4) acetylation mediates apoptosis of podocytes in diabetes mellitus[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23566.
- [13] Huang L Y. Cloning, tissue expression and bioinformatics analysis of cDNA encoding FoxO gene in Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*)[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2018. [黄林艳. 中国大鲵 FoxO 基

- 因亚族 cDNA 克隆, 表达及生物信息学分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2018.]
- [14] Qian J M, Min Q W, Dong R R, et al. Molecular cloning and expression analysis of Foxo3a and Foxo3b genes in *Gobiocypris rarus*[J]. Fisheries Science, 2023, 42(2): 222-232. [钱佳铭, 闵倩雯, 董然然, 等. 稀有鮡鲫 Foxo3a, Foxo3b 基因克隆和表达分析[J]. 水产科学, 2023, 42(2): 222-232.]
- [15] Wei Y L, Liang M Q, Xu H G. Fish protein hydrolysate affected amino acid absorption and related gene expressions of IGF-1/AKT pathways in turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Aquaculture Nutrition, 2020, 26(1): 145-155.
- [16] Xie X W, Liu J X, Hu B, et al. Zebrafish foxo3b negatively regulates canonical Wnt signaling to affect early embryogenesis[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24469.
- [17] Shi L L, Zhang A X, Liu H, et al. Deletion of the *foxO4* gene increases hypoxia tolerance in zebrafish[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(10): 8942.
- [18] Gao L, Yuan Z H, Zhou T, et al. FOXO genes in channel catfish and their response after bacterial infection[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2019, 97: 38-44.
- [19] Zhao Y, Li J Y, Jiang Q, et al. Leucine improved growth performance, muscle growth, and muscle protein deposition through AKT/TOR and AKT/FOXO3a signaling pathways in hybrid catfish *Pelteobagrus vachelli* × *Leiocassis longirostris* [J]. Cells, 2020, 9(2): Article No.327.
- [20] Fisheries Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2023 China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2023 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2023.]
- [21] 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(4): 402-408.
- [22] Zuo A L, Mo Y J, Yi C L, et al. Molecular characterization and dietary regulation of the forkhead box O₃ (foxo3a and foxo3b) in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Aquaculture Reports, 2023, 33: 101810.
- [23] Peng K, Li Y, Long L, et al. Knockdown of *FoxO3a* induces increased neuronal apoptosis during embryonic development in zebrafish[J]. Neuroscience Letters, 2010, 484(2): 98-103.
- [24] Parvathy S T, Udayasuriyan V, Bhadana V. Codon usage bias[J]. Molecular Biology Reports, 2022, 49(1): 539-565.
- [25] Mazumdar P, Binti Othman R Y, Mebus K, et al. Codon usage and codon pair patterns in non-grass monocot genomes[J]. Annals of Botany, 2017, 120(6): 893-909.
- [26] Yu X L, Liu J X, Li H Z, et al. Comprehensive analysis of synonymous codon usage patterns and influencing factors of porcine epidemic diarrhea virus[J]. Archives of Virology, 2021, 166(1): 157-165.
- [27] Buchan J R, Aucott L S, Stansfield I. tRNA properties help shape codon pair preferences in open reading frames[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(3): 1015-1027.
- [28] Gupta S K, Majumdar S, Bhattacharya T K, et al. Studies on the relationships between the synonymous codon usage and protein secondary structural units[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 269(3): 692-696.
- [29] Sun C J. Cloning expression and functional analysis of *FoxO4* and *PRKAA1* genes related to pork quality traits[D]. Guizhou: Guizhou University, 2017. [孙成娟. 猪肉品质性状相关基因 FoxO4、PRKAA1 的克隆表达及功能研究[D]. 贵州: 贵州大学, 2017.]
- [30] Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, et al. Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues[J]. The Biochemical Journal, 2000, 349(2): 629-634.
- [31] Feng J C, Liu Z, Lu S Q, et al. Cloning of the *Pept1* gene and analysis of its expression in *Ctenopharyngodon idellus* tissues[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(2): 276-285. [冯军厂, 刘臻, 鲁双庆, 等. 草鱼小肠转运载体 *PepT1* 基因的克隆与表达特征[J]. 中国水产科学, 2013, 20(2): 276-285.]
- [32] Xiao Y B, Huang R, Cao S P, et al. Molecular characterization and dietary regulation of glutaminase 1 (gls1) in triploid crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. Fishes, 2022, 7(6): Article No.377.
- [33] Wu P, Bao L S, Zhang R Y, et al. Impact of short-term fasting on the rhythmic expression of the core circadian clock and clock-controlled genes in skeletal muscle of crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. Genes, 2018, 9(11): Article No.526.
- [34] Liao S C, Chen K, Xi B W, et al. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of *Megalobrama amblycephala* melanocortin receptor 3 during fasting[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(3): 445-456. [廖盛臣, 陈凯, 习丙文, 等. 团头鲂黑素皮质素 3 型受体基因克隆及表达分析[J]. 中国水产科学, 2019, 26(3): 445-456.]
- [35] Wei H C, Yu H H, Chen X M, et al. Effects of soybean meal replaced by *Clostridium autoethanogenum* protein on growth performance, plasma biochemical indexes and hepatopancreas

- and intestinal histopathology of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(10): 4190-4201. [魏洪城, 郁欢欢, 陈晓明, 等. 乙醇梭菌蛋白替代豆粕对草鱼生长性能、血浆生化指标及肝胰脏和肠道组织病理的影响[J]. 动物营养学报, 2018, 30(10): 4190-4201.]
- [36] Xiang X, Zhou X H, Chen J, et al. Effect of dietary replacement of fish meal protein with soybean meal protein on the growth, body composition and hematology indices of *Schizothorax prenanti*[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(5): 723-731. [向泉, 周兴华, 陈建, 等. 饲料中豆粕蛋白替代鱼粉蛋白对齐口裂腹鱼幼鱼生长性能、体成分及血液生化指标的影响[J]. 水产学报, 2012, 36(5): 723-731.]
- [37] 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.]
- [38] Zhou Z Q. Expression and analysis of FoxO protein in pig and rat's gastrointestinal tracts[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007. [周振琪. 猪和大鼠胃肠道 FoxO 蛋白表达分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.]
- [39] Ding Y Y. Expression of FOXO4 protein in ulcerative colitis (UC) patients' intestinal tract[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008. [丁盈盈. FOXO4 转录因子在溃疡性结肠炎患者肠道的表达[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.]
- [40] Yu X J, Wu Z H, Guo J S, et al. Replacement of dietary fish meal by soybean meal on growth performance, immunity, anti-oxidative capacity and mTOR pathways in juvenile abalone *Haliotis discus Hannai* Ino[J]. Aquaculture, 2022, 551: 737914.
- [41] Yue H M, Wu J P, Chen X H, et al. Molecular cloning of glutamate dehydrogenase gene and the effect of double-low rapeseed meal addition on its transcription in juvenile *Huso dauricus*[J]. Freshwater Fisheries, 2019, 49(4): 35-41. [岳华梅, 吴金平, 陈细华, 等. 达氏鳊谷氨酸脱氢酶基因的克隆及双低菜粕添加对其表达的影响[J]. 淡水渔业, 2019, 49(4): 35-41.]
- [42] Jia S C, Li X Y, Zheng S X, et al. Amino acids are major energy substrates for tissues of hybrid striped bass and zebrafish[J]. Amino Acids, 2017, 49(12): 2053-2063.
- [43] Wang C A, Li J N, Wang L S, et al. Effects of dietary L-alanyl-L-glutamine supplementation on body composition and intestinal morphology of hybrid sturgeon *Acipenser schrenckii* ♀ × *A.baerii* ♂[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2017, 30(2): 12-16. [王常安, 李晋南, 王连生, 等. L-丙氨酰-L-谷氨酰胺对杂交鲟体成分、肠道形态的影响[J]. 水产学杂志, 2017, 30(2): 12-16.]
- [44] Wen Z W, Huang J S, Chen Y M, et al. Effects of L-alanyl-L-glutamine on growth performance, serum biochemical and antioxidant indexes of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) after hypoxia stress[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2023, 35(4): 2503-2513. [温震威, 黄建盛, 陈有铭, 等. L-丙氨酰-L-谷氨酰胺对低氧胁迫后军曹鱼幼鱼生长性能、血清生化与抗氧化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2023, 35(4): 2503-2513.]
- [45] He Z M, Cai Y Y, Yang M, et al. Transcription factor CDX2 directly regulates the expression of *Ctenopharyngodon idellus* intestinal PepT1 to mediate the transportation of oligopeptide[J]. Aquaculture Reports, 2022, 24: 101148.
- [46] Wang J L, Yan X, Lu R H, et al. Peptide transporter 1 (PepT1) in fish: A review[J]. Aquaculture and Fisheries, 2017, 2(5): 193-206.
- [47] Lu W Q, Ni Z, Jiang S Q, et al. Resveratrol inhibits bile acid-induced gastric intestinal metaplasia via the PI3K/AKT/p-FoxO4 signalling pathway[J]. Phytotherapy Research, 2021, 35(3): 1495-1507.

Molecular cloning and dietary protein regulation of *foxo4* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

XU Zhehua^{1,2}, YI Chenglin¹, MO Yujian¹, YANG Liquan¹, ZUO Anli¹, YANG Ruiyao¹, ZHANG Mingyu¹, QU Fufa¹, TANG Jianzhou¹, LIU Zhen^{1,2}, CAO Shenping¹

1. Hunan Provincial Key Laboratory of Nutrition and Quality Control of Aquatic Animals, Department of Biological and Chemical Engineering, Changsha University, Changsha 410022, China;
2. State Key Laboratory of Freshwater Fish Developmental Biology, School of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

Abstract: The Forkhead box (Fox) protein family is a family of transcription factors with wing-like helical structured DNA-binding region and is widely distributed in biological groups ranging from yeast to mammals. The Fox protein family is divided into 19 subfamilies, A to S, among which the forkhead box O (FoxO) subfamily is the most intensively studied. Forkhead box O4 (FoxO4) is a member of the FoxO subfamily, which includes FoxO1, FoxO3, and FoxO6 in mammals. These members share structural and functional similarities as well as regulations. In certain fish species, seven highly homologous members of the FoxO subfamily exist: FoxO1a, FoxO1b, FoxO3a, FoxO3b, FoxO4, FoxO6a, and FoxO6b. The involvement of FoxO in the regulation of various physiological functions, including the cell cycle, apoptosis, DNA damage repair, oxidative stress, cell differentiation, and glucose metabolism, has been demonstrated in multiple studies. Furthermore, its activity is modulated through diverse mechanisms such as phosphorylation, acetylation, and ubiquitination. To explore the molecular characteristics of *foxo4* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and its relationship with the nutritional regulation of dietary proteins, we obtained the grass carp *foxo4* sequence through homologous cloning. Its open reading frame is 1875 bp, encoding 624 amino acids, and it consists of three functional domains: FH, Pfam (FOXO_KIX_bdg), and Pfam (FOXO_TAD). Amino acid sequence alignment analysis showed that the *foxo4* gene in *C. idella* is highly homologous to that in *Danio rerio*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, and *Electrophorus electricus*. Analysis of codon usage bias revealed that *foxo4* exhibited a strong preference for CUG and AGC codons across all examined species, whereas *C. idella* and *Pimephales promelas* shared certain similarities in their codon preferences, suggesting a close evolutionary relationship between them. Phylogenetic tree analysis showed that the *foxo4* gene of grass carp has the highest homology to that of *Pimephales promelas*. Tissue expression analysis of *foxo4* revealed that the mRNA expression level of *foxo4* was most significant in grass carp muscle ($P < 0.05$), followed by the heart, liver, intestine, brain, spleen, and kidney. In addition, circadian rhythm analysis showed that the expression of *foxo4* was the highest at 18:00 and lowest at 24:00. This study also explored the effects of dietary protein on the expression of *foxo4*. The results of different protein source experiments showed that after 14, 21, and 35 days of the feeding trial, the expression of the *foxo4* gene in the intestinal tissue of grass carp was significantly upregulated in both the rapeseed meal and fish meal groups compared with that in the soybean meal group ($P < 0.05$). These findings suggest a close association between the expression of *foxo4* gene in grass carp and dietary protein sources. A feeding trial with different levels of l-alanyl-l-glutamine dipeptide (Ala-Gln) showed a gradual decrease in the expression of *foxo4* in the intestines of grass carp as the ratio of Ala-Gln in the feed increased. The control group showed the highest expression level, whereas the 1.5% addition group displayed the lowest expression level. In summary, the expression of *foxo4* in grass carp exhibits tissue specificity and is regulated by dietary protein sources and dipeptide levels. This study establishes a foundation for revealing the molecular characteristics of *foxo4* in fish and its protein nutritional response and provides basic data for subsequent studies on the molecular mechanism of *foxo4* gene regulation in fish protein metabolism in teleosts.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *foxo4*; gene cloning; tissue distribution; protein source; Ala-Gln

Corresponding author: CAO Shenping. E-mail: spcao@ccsu.edu.cn