中国水产科学　2019 年 5 月, 26(3): 445−456
Journal of Fishery Sciences of China

研究论文

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18262

团头鲂黑素皮质素 3 型受体基因克隆及表达分析

廖盛臣[1,2], 陈凯[2], 习丙文[1,2], 秦婷[2], 潘良坤[2], 谢骏[1,2]

1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;
2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081

摘要: 黑素皮质素 3 型受体(MC3R)系统与动物摄食行为以及能量调控密切相关。为丰富鱼类 MC3R 相关基础研究, 探索鱼类摄食行为与能量调控机制, 本研究克隆了团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)*mc3r* 基因, 采用分子生物信息学和相对荧光定量 PCR 方法分别对氨基酸序列保守结构域、组织表达分布和禁食条件下的表达变化等开展分析研究。结果显示, 团头鲂 *mc3r* 基因编码区全长 984 bp, 编码 327 个氨基酸, 与现有报道的 MC3R 氨基酸序列高度相似, 具有典型的 7 次跨膜结构域。组织表达图谱分析表明, *mc3r* mRNA 在下丘脑、垂体、肝脏和卵巢有相对较高的表达。禁食试验结果显示, 下丘脑和垂体中的转录变化与周期性摄食信号相关, 其中下丘脑 *mc3r* mRNA 在禁食 72 h 和 14 d 的表达显著上调(P<0.05), 垂体 *mc3r* mRNA 在禁食 72 h 和禁食 72 h 后恢复投喂 6 h 表达量显著升高(P<0.05), 而肝脏中 *mc3r* mRNA 在禁食 48 h 和 14 d 的表达量显著上调(P<0.05)。此外, 对血液皮质醇和血糖的监测结果显示, 两者均在禁食 14 d 有显著变化, 其中皮质醇水平显著高于对照组(P<0.05), 而血糖水平显著低于对照组(P<0.05)。综合本研究结果表明, MC3R 在鲤科鱼类中具有高度相似的氨基酸序列和结构域; 在组织中的转录表达变化与食物摄取有明显相关性, 对调控鱼体摄食行为和能量代谢具有重要作用。

关键词: 团头鲂; 黑素皮质素 3 型受体; 基因克隆; 组织分布; 禁食
中图分类号: S917　　**文献标志码:** A　　**文章编号:** 1005−8737−(2019)03−0445−12

黑素皮质素系统(melanocortin system, MCS)主要由源自阿黑皮素原(proopiomelanocortin, POMC)的一系列激素配体以及 5 种黑素皮质素受体亚型(MC1R-MC5R)组成, 其广泛地参与了机体在色素沉着、肾上腺皮质类固醇生成、外分泌腺调节、能量平衡等方面的生理活动[1]。而在哺乳动物中的研究已证实, MC3R 在调控能量平衡[2-4]、摄食行为[5-6]方面具有重要意义, 其与养殖动物的生产性状[7-8]、人类(*Homo sapiens*)[9-10]和小鼠(*Mus musculus*)[2-3]的肥胖症密切相关。当前已有研究尝试通过 MC3R 途径开发用于控制肥胖症的药物[10-11], 畜禽方面也有学者根据 MC3R 多态性与生长参数的相关性, 尝试开展品种选育方面的工作[8, 12]。啮齿类相关研究还发现, MC3R 激活能引起小鼠厌食行为[5]。因此, 对鱼类 MC3R 的研究可能有助于解决鱼粉替代中的摄食降低问题[13], 促进鱼类摄食[13], 提高鱼类对饵料的利用率[3]。

目前鱼类 MC3R 相关研究仅见于少数物种, 其中在白斑角鲨(*Squalus acanthias*)[14]和赤魟(*Dasyatis akajei*)[15]中仅仅开展了序列分析和药理学研究, 尚未涉及受体功能方面的研究; Renquist 等[16]在斑马鱼(*Danio rerio*)的研究中证实 MC3R 在能量调节方面的功能, 显示受体功能在进化过程中的保守性。因此, MC3R 在哺乳动物中涉及生长[7-8]、肉质[17]、抗逆性[18]以及调控脂类代谢[2, 9, 19]等诸多方面的作用, 在鱼类生理活动中可能具有相同的功能。团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)是中国重要的经济养殖品种, 目前其 MC3R 的相

收稿日期: 2018-08-03; **修订日期:** 2018-11-01.
基金项目: 国家自然科学基金项目(31572662); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-45).
作者简介: 廖盛臣(1992–), 男, 硕士研究生, 主要从事水产病害学研究. E-mail: 602468594@qq.com
通信作者: 谢骏(1966–), 研究员. E-mail: xiej@ffrc.cn

关信息尚为空白。本研究通过对团头鲂 *mc3r* 基因序列特征、组织分布特点以及在禁食条件下的转录表达开展研究，以期丰富鱼类 MC3R 基础资料，为后续研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　实验动物

本研究所用团头鲂来自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉养殖基地，于循环养殖系统(养殖桶规格：直径 820 mm，深 700 mm，12 尾/桶)中暂养。鱼体健康，体表无伤痕，体重(201.2±67.3) g，暂养期间，每天投喂两次(8:00，16:00)，光周期同自然条件，水温(25±1)℃。

1.2　*Mc3r* 克隆与生物信息学分析

根据团头鲂转录组中已获得的 *mc3r* 基因序列片段，设计引物(表 1)结合 RACE 试剂盒(Invitrogen)和 SMARTer^{TM} RACE cDNA AmplificationKit 试剂盒(Clontech)扩增 5′端和 3′端序列。RACE-PCR 产物经电泳后对目的条带进行切胶回收纯化，与 pMD18T 进行连接，转化后对阳性克隆进行测序，最后通过拼接获得完整的 cDNA 序列。应用 DNAMAN 6.0 对团头鲂 MC3R 氨基酸序列进行分析比对。其磷酸化位点通过 Netphos 3.1 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/)和 NetNG Lyc 1.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)进行预测。团头鲂 MC3R 结构域通过疏水性检测(http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl)、跨膜结构域预测(TMHMM Server V.2.0, http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM 2.0/)进行分析。采用 MEGA6.0 软件中的 Neighbor Joining 方法构建团头鲂 MC3R 序列系统发育树，1000 次自举(Bootstrap)检验计算各节点支持率。

表 1　团头鲂 *mc3r* 基因克隆及荧光定量 PCR 所用引物
Tab. 1　Primers used for *Megalobrama amblycephala mc3r* mRNA cloning and the real-time PCR reactions

引物 primer	序列(5′−3′) sequence (5′−3′)	用途 usage
mc3r-1	CTCACAATACCCAAGG	RACE 扩增 *mc3r* 5′端 RACE amplification of 5′ end of *mc3r*
mc3r-2	AGAAAAACCTCTGCCTGG	
mc3r-3	TCTGGACCTGCTCGCAC	
mc3r-4	CCAGACTTCATGTCCAGAGAATCGC	RACE 扩增 *mc3r* 3′ 端 RACE amplification of 5′ end of *mc3r*
mc3r-5	AGCCGTGACCATCTCCATCCTCCT	
mc3r-F	TGCTGCGGACATGTTGGTAA	*mc3r* RT-PCR
mc3r-R	GCAAATGGACGCCACAAGAG	
rpII-F	CGCGAGTCATTCCTGTAACATC	*rpII* RT-PCR
rpII-R	TGACCCTTCCTCAGCTTTACCA	

1.3　样品采集与禁食实验

基因组织表达分布研究所需样品来自随机选取的 12 尾团头鲂(♀∶♂ = 1∶1)。经 MS-222 (间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐，100 mg/L)深度麻醉后，迅速解剖，获取下丘脑、垂体、眼、鳃、头肾、心脏、脾、肝、肾、肠、表皮、肌肉、精巢和卵巢共 14 种组织，生理盐水冲洗后，立即放入液氮中，后转移至−80℃暂存备用。

禁食实验随机将 216 尾团头鲂分入 18 个养殖桶(养殖桶规格：直径 820 mm，深 700 mm)，每桶 12 尾，随机分为实验组与对照组(各 9 桶，对应 9 个采样时间点)。实验前均正常投喂，实验开始后实验组上午 8:00 (0 h)停止喂食，持续禁食 14 d，其中两桶分别于禁食 72 h 后恢复投喂，对照组正常喂食。分别在实验开始后的 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 78 h (记为 72 h-6，供恢复投喂后 6 h 采样), 84 h (记为 72 h-12，供恢复投喂后 12 h 采样)和 14 d 采样。为避免多次捕捞造成的应激反应，每个采样时间点对应两个养殖桶(实验和对照各 1 桶)。每桶随机获取 6 尾鱼，麻醉后，通过尾椎静脉取血，离心(3500 g，10 min，4℃)，收集血清保存于−20℃备用。快速解剖取下丘脑、垂体、肝脏和卵巢等组织，于−80℃保存备用。

1.4　血液指标分析

血糖直接由全自动生化分析仪(Mindray BS400)测得，血清皮质醇的检测通过化学发光免疫竞争法在 MAGLUMI1000 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　实时荧光定量 PCR

取组织各 0.05~0.1 g，加入 1 mL RNAiso Plus (TaKaRa，Japan)，立即用高通量组织破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)匀浆。RNA 的提取

按照试剂的操作说明进行, 应用 NanoDrop2000 (Thermo Scientific)检测 RNA 质量及浓度, 选取 OD_{260}/D_{280}值在 1.8~2.0 的样品。最终以 40 ng/μL 终浓度 RNA 作为模板, 按照 Ons Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa, Japan)试剂盒说明, 配置反应体系, 反应总体积 20 μL, 包含: 2×One Step SYBR RT-PCR Buffer 4, 10 μL; TaKaRa Ex Taq HS Mix, 1.2 μL; PrimeScript PLUS RTase Mix, 0.4 μL; Forward Primer (10 μmol/L), 0.8 μL; Reverse Primer (10 μmol/L), 0.8 μL; ROX Reference Dye II, 0.4 μL; Total RNA, 2 μL; RNase Free dH2O, 4.4 μL; 设置反应参数(阶段 1: 42℃ 5 min, 95℃ 10 s, 1 个循环; 阶段 2: 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环; 阶段 3: 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95 ℃ 30 s, 1 个循环), 进行荧光定量 PCR 反应。每个待测样本进行目的基因 *mc3r* 和内参基因 *rpII* 扩增, 设置 3 个计数重复, 每次反应设置阴性对照。采用标准曲线法计算目的基因 mRNA 的相对表达量, 本研究所使用标准曲线方程见表 2。团头鲂 *mc3r* mRNA RT-PCR 所用引物列于表 2。*rpII* 引物序列参照 Xue 等[20]。所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。

表 2　荧光定量 PCR 标准曲线
Tab. 2　The information of standard curves for RT-PCR

基因 gene	标准曲线方程 equation	回归系数 R^2	扩增效率/% efficiency	用途 use range
mc3r	$Y=-3.195X+34.462$	0.993	105.593	组织分布 tissue-specific expression
rpII	$Y=-3.567X+28.279$	0.997	101.681	
mc3r	$Y=-3.237X+32.170$	0.998	103.679	下丘脑 hypothalamus
rpII	$Y=-3.286X+31.648$	0.998	101.534	
mc3r	$Y=-3.423X+34.432$	0.995	95.956	垂体 pituitary
rpII	$Y=-3.118X+32.431$	0.998	109.300	
mc3r	$Y=-3.195X+34.462$	0.993	106.113	肝脏 liver
rpII	$Y=-3.350X+28.620$	0.997	105.400	

1.6　数据处理

所有实验数据以平均值±标准差($\bar{x}$±SD)表示, 差异显著性分析采用 GraphPad Prism 7.0 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 *mc3r* mRNA 序列

由实验室前期团头鲂转录组测序数据库获得 *mc3r* mRNA 序列片段长 972 bp, NCBI 检索结果显示其与其他物种 *mc3r* mRNA 相似度极高。经 RACE-PCR 获得 mRNA 全长 1729 bp, 包含 5′端 109 bp、3′端 636 bp 的非编码区和 1 个 984 bp 的开放阅读框, 开放阅读框 G、C 含量为 49.9%, 编码 327 个氨基酸(图 1), 预测分子量大小为 36.0 kD, 理论等电点为 8.40, 蛋白质平均疏水性 0.98; 氨基酸组成方面, 碱性氨基酸(K, R, H) 27 个, 强酸性氨基酸(D, E)14 个, 疏水性氨基酸(A, I, L, F, W, V) 187 个, 极性氨基酸(N, C, Q, S, T, Y) 99 个。

2.2　团头鲂 MC3R 结构特征

序列结构分析显示, 团头鲂 MC3R 具有 7 次横跨膜结构, 包括胞外 N-末端、跨膜区(TM)、胞内环(IL)、胞外环(EL)和胞内 C-末端(图 2)。疏水性分析结果表明: 团头鲂 MC3R 在 Ile^{50}、Ser^{90}、Ala^{130}、Leu^{170}、Leu^{200}、Ile^{250}、Val^{290} 残基附近具有较强的疏水作用(图 3)。此外, 多重氨基酸序列比较分析发现其拥有保守基序(motif) $P^{72}M^{73}Y^{74}$、$D^{141}R^{142}Y^{143}$ 和 $D^{299}P^{300}L^{301}I^{302}Y^{303}$, 以及 13 个保守的半胱氨酸残基(Cys), 其中 8 个位于跨膜区, 3 个位于第 3 个胞外环, N-末端和 C-末端各有 1 个(图 4)。功能位点预测结果显示, Thr^{313} 为受体的 PKC 磷酸化位点, Asn^{2} 和 Asn^{16} 为受体的糖基化位点。

2.3　团头鲂 MC3R 同源性和进化分析

序列同源性分析显示, 团头鲂 MC3R 氨基酸序列高度保守, 与 GenBank 中收录的脊椎动物 MC3R 氨基酸序列存在很高的相似度。其与鲤科鱼类的 MC3R 氨基酸序列相似度最高, 与斑马鱼(*Danio rerio*)和鲫(*Carassius auratus*)的 MC3R 氨基酸序列的相似性分别达到 94.19%和 96.33%; 与智人(*Homo sapiens*)、家牛(*Bos taurus*)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)等非鱼类 MC3R 氨基酸序列的同相似度也都在 65%以上(表 3)。系统进化分析结果(图 5)表明, 鱼类 MCR 的 5 种亚型各聚为一枝,

```
1   ATGAACAACTCATACTTGCAATTTCTTAAAGGACAGAAACCTGCTAACAGCACATCTTTG  60
1    M  N  N  S  Y  L  Q  F  L  K  G  Q  K  P  A  N  S  T  S  L   20

61  CCTTCTAATGTCAGTACTGTGGATCCTCCAGCAGGGGCGCTGTGCGAGCAGGTCCAGATC  120
21   P  S  N  V  S  T  V  D  P  P  A  G  A  L  C  E  Q  V  Q  I   40

121 CAGGCAGAGGTTTTTCTCACCTTGGGTATTGTGAGTCTTCTGGAGAACATACTCGTCATC  180
41   Q  A  E  V  F  L  T  L  G  I  V  S  L  L  E  N  I  L  V  I   60

181 TCGGCTGTGGTCAAAAACAAAAACCTTCACTCTCCAATGTACTTTTTCTTGTGCAGCCTG  240
61   S  A  V  V  K  N  K  N  L  H  S  P  M  Y  F  F  L  C  S  L   80

241 GCTGCTGCGGACATGTTGGTAAGTGTATCGAACTCTCTGGAGACCATTGTCATTGCAGTA  300
81   A  A  A  D  M  L  V  S  V  S  N  S  L  E  T  I  V  I  A  V   100

301 CTAAACAGTCGCATTTTGGTGGCCAGTGATTATTTTGTACGTTTGATGGACAATGTGTTT  360
101  L  N  S  R  I  L  V  A  S  D  Y  F  V  R  L  M  D  N  V  F   120

361 GACTCAATGATCTGCATTTCTCTTGTGGCGTCCATTTGCAACCTTCTGGCCATTGCCGTC  420
121  D  S  M  I  C  I  S  L  V  A  S  I  C  N  L  L  A  I  A  V   140

421 GACCGCTACGTCACAATTTTCTACGCCTTACGCTACCACAGCATAGTGACTGTACGTAGA  480
141  D  R  Y  V  T  I  F  Y  A  L  R  Y  H  S  I  V  T  V  R  R   160

481 GCGCTGGTCGCAATCGCTGCGATCTGGCTGGTGTGTGTGGTTTGTGGGATCGTCTTTATA  540
161  A  L  V  A  I  A  A  I  W  L  V  C  V  V  C  G  I  V  F  I   180

541 GTGTACTCTGAGAGCAAGACCGTGATCGTGTGTCTAATCACAATGTTCTTTGCCATGCTG  600
181  V  Y  S  E  S  K  T  V  I  V  C  L  I  T  M  F  F  A  M  L   200

601 GTTCTCATGGCAACTCTCTACGTACACATGTTTCTTCTCGCCAGACTTCATGTCCAGAGA  660
201  V  L  M  A  T  L  Y  V  H  M  F  L  L  A  R  L  H  V  Q  R   220

661 ATCGCTGCATTACCCCCAGCAGCAGCTGCCGCTGGAAACCCGGCCCCACGTCAACACAGC  720
221  I  A  A  L  P  P  A  A  A  A  A  G  N  P  A  P  R  Q  H  S   240

721 TGCATGAAGGGAGCCGTGACCATCTCCATCCTCCTCGGAGTGTTTGTGTGTTGCTGGGCG  780
241  C  M  K  G  A  V  T  I  S  I  L  L  G  V  F  V  C  C  W  A   260

781 CCCTTTTTCCTCCACCTCATTCTGCTGGTGTCGTGTCCGTACCATCCGCTCTGCCTCTGC  840
261  P  F  F  L  H  L  I  L  L  V  S  C  P  Y  H  P  L  C  L  C   280

841 TACATGTCCCACTTCACCACGTACCTGGTCCTCATTATGTGCAACTCTGTGATTGACCCC  900
281  Y  M  S  H  F  T  T  Y  L  V  L  I  M  C  N  S  V  I  D  P   300

901 CTCATCTACGCCTGCCGCAGCCTGGAAATGAGGAAGACTTTTAAGGAGATACTCTGCTGT  960
301  L  I  Y  A  C  R  S  L  E  M  R  K  T  F  K  E  I  L  C  C   320

961 TTTGGCTGCCAACCTTCACTTTAG
321  F  G  C  Q  P  S  L  *
```

图 1 团头鲂 *mc3r* 编码区全长序列及其翻译的氨基酸序列

Fig. 1 The reading frame and deduced amino acid sequences of *Megalobrama amblycephala mc3r* gene

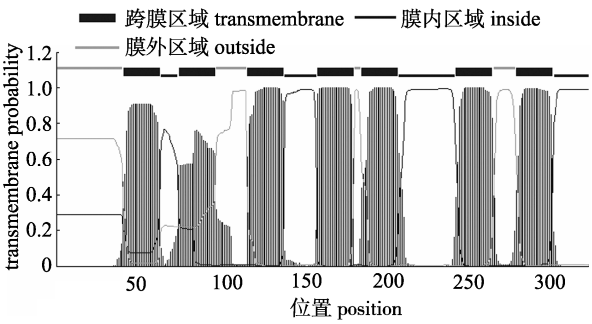

图 2 团头鲂 MC3R 跨膜结构域预测

Fig. 2 The predicted transmembrane domain of *Megalobrama amblycephala* MC3R

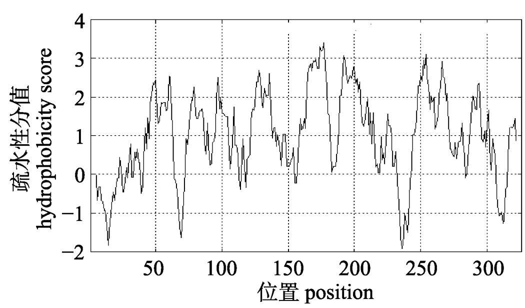

图 3 团头鲂 MC3R 疏水性分析

疏水性分值越高，对应序列中氨基酸疏水性越强.

Fig. 3 ProtScale of *Megalobrama amblycephala* MC3R

Higher score denotes stronger hydrophobicity.

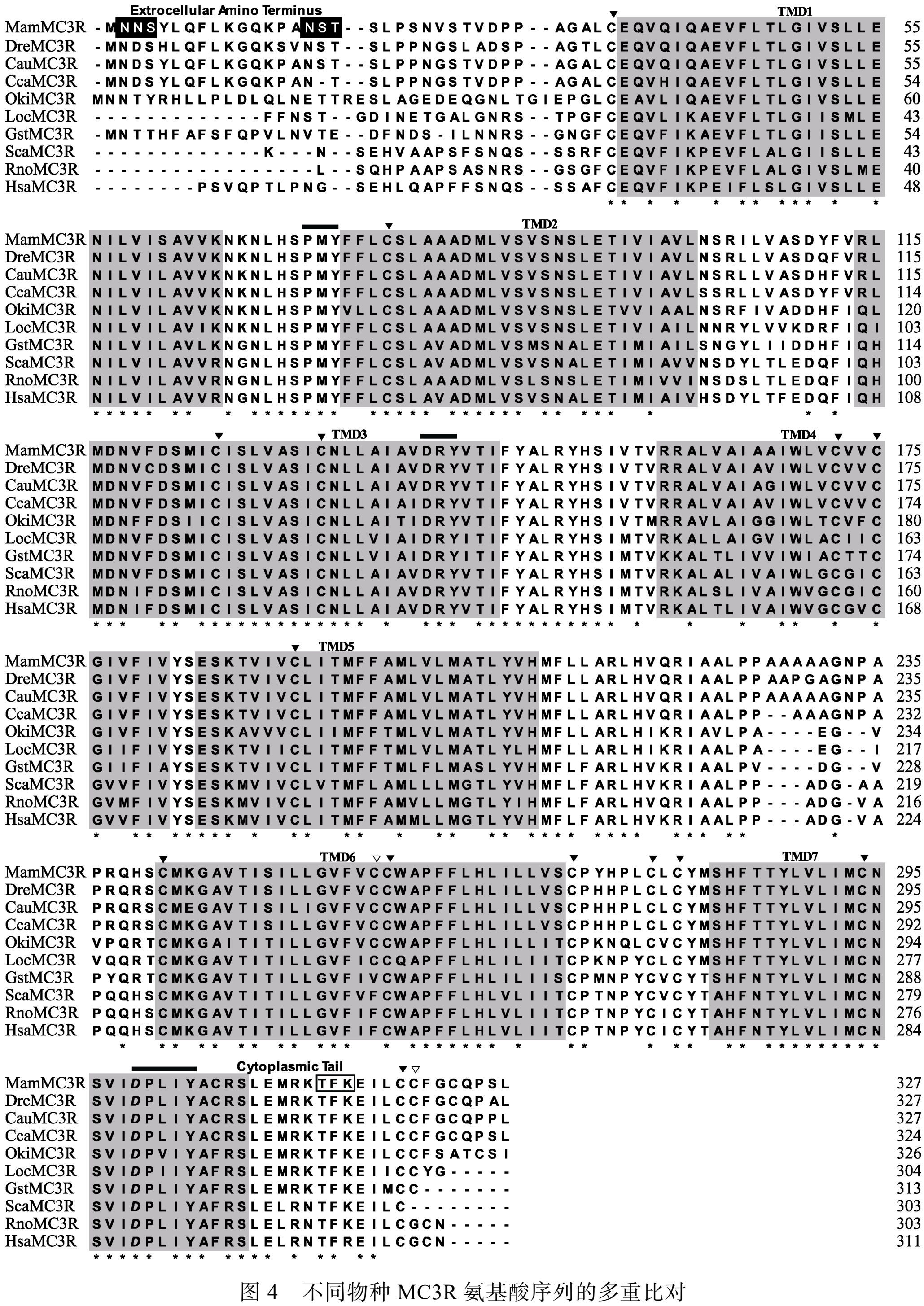

图 4　不同物种 MC3R 氨基酸序列的多重比对

灰色阴影部分为跨膜结构域, 并标记为 TMD1-7. 保守的 PMY、DRY 和 DPLIY (NPXXY)基序以横线标示. 黑色和白色箭头分别表示完全保守和高度保守的半胱氨酸残基. 两处黑色阴影显示预测的糖基化位点, 方框显示预测的磷酸化位点. 星号表示完全保守的氨基酸残基. Mam: 团头鲂; Dre: 斑马鱼; Cau: 鲫; Cca: 鲤; Oki: 银大马哈鱼; Loc: 斑点雀鳝; Gst: 红嘴潜鸟; Sca: 非洲水牛; Rno: 褐家鼠; Has: 智人.

Fig. 4　Multiple aligment of MC3R amino acid sequences of different species

Transmembrane domains in grey shadow are labelled as TMD 1-7. PMY, DRY, and DPLIY (NPXXY) motifs are marked with horizontal lines. Completely conserved and highly conserved cysteine residues are indicated by black and white arrowheads, respectively. Dark shadows show N-linked glycosylation sites. Predicted phosphorylation sites are depicted by open boxes. Asterisks indicates the conservative amino acids. Mam: *Megalobrama amblycephala*; Dre: *Danio rerio*; Cau: *Carassius auratus*; Cca: *Cyprinus carpio*; Oki: *Oncorhynchus kisutch*; Loc: *Lepisosteus oculatus*; Gst: *Gavia stellata*; Sca: *Syncerus caffer*; Rno: *Rattus norvegicus*; Has: *Homo sapiens*.

表 3 不同物种 MC3R 氨基酸序列相似性

Tab. 3 The identity of the MC3R amino acid sequences from different species %

物种 species	*G. gal*	*R. nor*	*H. sap*	*B. tau*	*O. myk*	*O. kis*	*A. mex*	*D. rer*	*M. amb*	*C. aur*
原鸡 *Gallus gallus*, *G. gal*	100.00									
褐家鼠 *Rattus norvegicus*, *R. nor*	73.21	100.00								
人 *Homo sapiens*, *H. sap*	75.36	89.78	100.00							
家牛 *Bos taurus*, *B. tau*	75.36	88.85	91.95	100.00						
虹鳟 *Onchorynchus mykiss*, *O. myk*	68.40	65.92	66.24	67.20	100.00					
银大马哈鱼 *Oncorhynchus kisutch*, *O. kis*	68.40	65.92	66.24	67.20	99.09	100.00				
墨西哥脂鲤 *Astyanax mexicanus*, *A. mex*	66.79	69.66	68.73	70.59	71.60	71.90	100.00			
斑马鱼 *Danio rerio*, *D. rer*	67.75	69.91	69.28	71.16	76.22	76.55	84.71	100.00		
团头鲂 *Megalobrama amblycephala*, *M. amb*	67.39	70.53	70.22	72.10	77.20	76.87	86.54	94.19	100.00	
鲫 *Carassius auratus*, *C. aur*	67.39	69.59	69.28	71.16	77.20	77.52	84.71	95.11	96.33	100.00

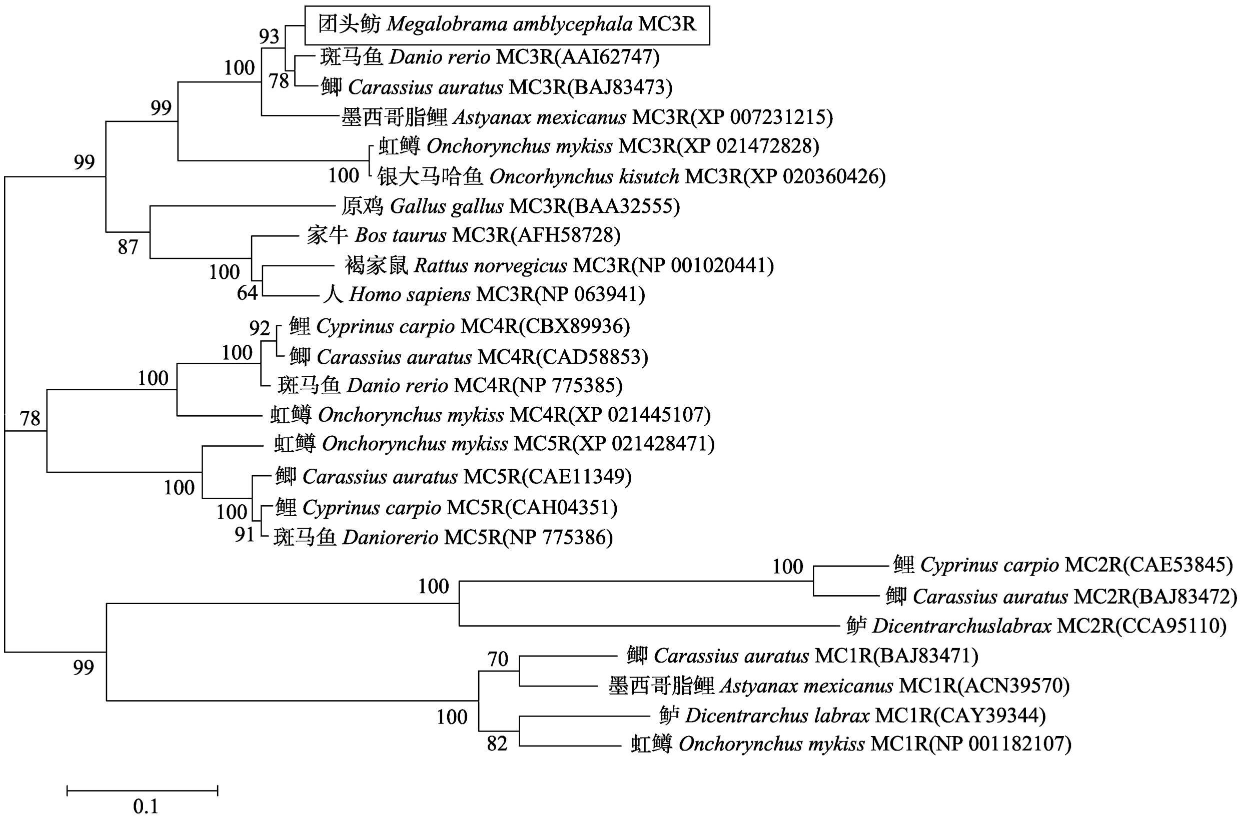

图 5 基于 MCR 氨基酸序列构建的 NJ 系统发育树

Fig. 5 NJ phylogenetic tree of MCR amino acid sequences

在 MC3R 一枝上，鱼类和非鱼类物种的 MC3R 又分作两个小枝，团头鲂 MC3R 位于鱼类 MC3R 分枝上，与鲤科鱼类进化距离最近。

2.4 团头鲂 *mc3r* mRNA 的组织分布特征

团头鲂 *mc3r* mRNA 组织分布结果显示，在所检视的组织中，*mc3r* mRNA 在下丘脑中的表达量最高($P<0.05$)，其次为垂体和卵巢(两者无显著差异，$P>0.05$)。其他检视组织均有不同程度的转录表达，但其转录水平显著低于下丘脑、垂体和卵巢的转录水平($P<0.05$)。此外，卵巢和精巢中 *mc3r* mRNA 的表达丰度存在显著差异($P<0.05$)，卵巢中的表达量显著高于精巢中的表达量($P<0.05$，图 6)。

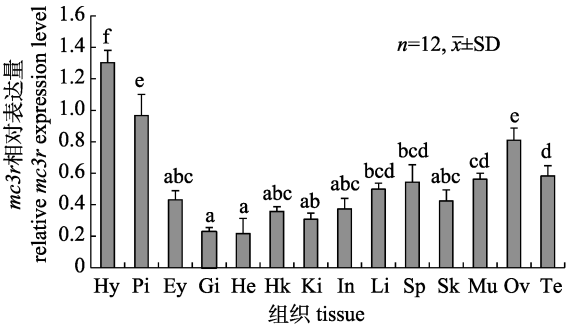

图 6　*mc3r* mRNA 在团头鲂不同组织中的分布

Hy: 下丘脑; Pi: 垂体; Ey: 眼; Gi: 鳃; Hk: 头肾; He: 心脏; Ki: 中肾; In: 肠; Li: 肝; Sp: 脾; Sk: 表皮; Mu: 肌肉; Ov: 卵巢; Te: 精巢; 精巢和卵巢的样本量为 6. 不同字母表示不同时间点 *mc3r* 表达差异显著(one-way ANOVA, $P<0.05$).

Fig. 6　Tissue-specific expression of *mc3r* in *Megalobrama amblycephala*

Hy: hypothalamus; Pi: pituitary; Ey: eye; Gi: gill; Hk: head kidney; He: heart; Ki: kidney; In: intestine; Li: liver; Sp: spleed; Sk: skin; Mu: muscle; Ov: ovary; Te: testis. The sample size of ovary and testis are all 6. Different letter indicate significant difference between different tissues (one-way ANOVA, $P<0.05$).

2.5　下丘脑中 *mc3r* mRNA 的表达变化

对照组内仅观察到 *mc3r* mRNA 的表达量在 24 h 和 48 h 时有显著上调($P<0.05$), 而禁食组中 0 h, 24 h, 48 h, 72 h 和 14 d 时的转录表达均显著高于其他时间点($P<0.05$); 与对照组相比, 禁食组 *mc3r* mRNA 在 72 h 和 14 d 时的转录水平显著上调($P<0.05$); 由此显示禁食期间, *mc3r* mRNA 的表达量在每日首次投喂时间点(8:00)附近有周期性上调的现象($P<0.05$)。而在恢复投喂后 6 h (72 h-6)时, *mc3r* mRNA 表达量最低; 其与恢复投喂后 12 h(72 h-12)的表达水平和对照组相比, 均无显著差异, 可能是恢复摄食后 *mc3r* mRNA 的转录表达也得以恢复到正常水平(图 7)。

2.6　垂体中 *mc3r* mRNA 的表达变化

对照组中 *mc3r* mRNA 的表达变化存在周期性节律变化(图 8), 每日首次投喂时间点(8:00, 对应采样时间点 0 h, 24 h, 48 h, 72 h 和 14 d)附近的 *mc3r* mRNA 的转录表达水平最高, 在摄食 6 h 后(14:00, 对应采样时间点 6 h 和 72 h-6), 其转录水平发生下调, 而在摄食 12 h 后(20:00, 对应采样时间点 12 h 和 72 h-12), 其转录水平进一步下调, 并且这种转录水平的下调在首次投喂时间点和投喂后 12 h 之间的差异显著($P<0.05$)。禁食组内

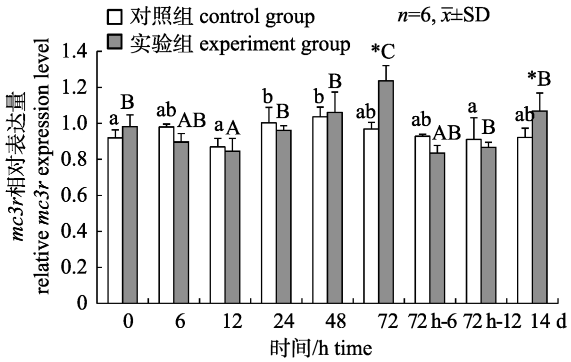

图 7　禁食状态下团头鲂下丘脑中 *mc3r* 的表达变化

不同大写字母表示实验组内不同时间点差异显著, 不同小写字母表示对照组内不同时间点差异显著($P<0.05$). *表示同一时间点实验组和对照组差异显著($P<0.05$). 72 h-6 表示饥饿 72 h 后恢复投喂 6 h, 72 h-12 表示饥饿 72 h 后恢复投喂 12 h.

Fig. 7　Effects of fasting on *mc3r* expression profile in the hypothalamus of *Megalobrama amblycephala*

Different capital letters indicate significant difference among the different time-points in the experimental group, and the lowercase letters indicate significant difference among different time-points of time in the control group ($P<0.05$). The asterisk means significant difference between the experimental and control group at the same time-point ($P<0.05$). 72 h-6 means refeeding 6 h after 72 h of fasting and 72 h-12 means refeeding 12 h after 72 h of fasting.

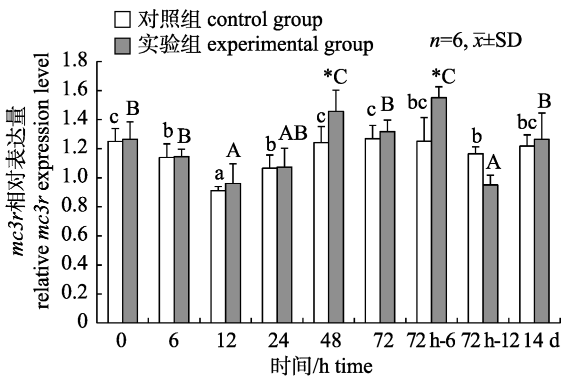

图 8　禁食状态下团头鲂垂体中 *mc3r* 基因的表达变化

不同大写字母表示实验组内不同时间点差异显著, 不同小写字母表示对照组内不同时间点差异显著($P<0.05$). *表示同一时间点实验组和对照组差异显著($P<0.05$). 72 h-6 表示饥饿 72 h 后恢复投喂 6 h, 72 h-12 表示饥饿 72 h 后恢复投喂 12 h.

Fig. 8　Effects of fasting on *mc3r* expression profile in the pituitary of *Megalobrama amblycephala*

Different capital letters indicate significant difference among the different time-points in the experimental group, and the lowercase letters indicate significant difference among different time-points in the control group ($P<0.05$).

The asterisk means significant difference between experimental and control group at the same time-point ($P<0.05$). 72 h-6 means refeeding 6 h after 72 h of fasting and 72 h-12 means refeeding 12 h after 72 h of fasting.

mc3r mRNA 的转录变化有相似的规律，而且与对照组相比，48 h 时 *mc3r* mRNA 转录表达的上调显著高于对照组水平(P<0.05)。但在禁食恢复投喂后的 6 小时(72 h-6)，*mc3r* 的转录表达出现了“异常”，其表达量不仅显著高于对照组(P<0.05)，而且其表达量是整个监测时间段中 *mc3r* mRNA 的峰值水平。

2.7 肝脏中 *mc3r* mRNA 的表达变化

对照组中 *mc3r* mRNA 的表达变化存在波动，无明显规律，其中 0 h、24 h、72 h 和 72 h-6 时的转录水平无显著差异，且与 6 h、48 h 和 14 d 时的转录水平也无显著差异，但其显著高于 12 h 时的转录水平(P<0.05)。禁食组中 *mc3r* mRNA 总的转录变化情况与对照组中的情况相似，仅仅是在禁食实验后期观察到了 *mc3r* mRNA 的差异表达，其中在 72 h 时禁食组 *mc3r* mRNA 出现了显著下调(P<0.05)，而在 14 d 时观察到 *mc3r* mRNA 转录水平的显著上调(P<0.05，图 9)。这种差异可能与机体面临长期和短期食物匮乏时所采取的应对策略相关。

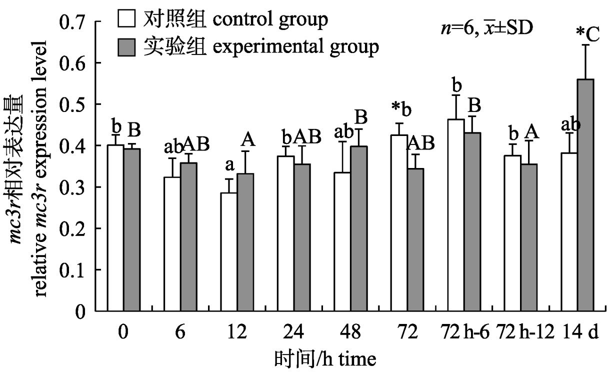

图 9 禁食状态下团头鲂肝脏中 *mc3r* 的表达变化

不同大写字母表示实验组内不同时间点差异显著，不同小写字母表示对照组内不同时间点差异显著(P<0.05). *表示同一时间点实验组和对照组差异显著(P<0.05). 72 h-6 表示饥饿 72 h 后恢复投喂 6 h, 72 h-12 表示饥饿 72 h 后恢复投喂 12 h.

Fig. 9 Effects of fasting on *mc3r* expression profile in the liver of *Megalobrama amblycephala*

Different capital letters indicate significant difference among the different time-points in the experimental group, and the lowercase letters indicate significant difference among different time-points in the control group (P<0.05). The asterisk means significant difference between the experimental and control group at the same time-point (P<0.05). 72 h-6 means refeeding 6 h after 72 h of fasting and 72 h-12 means refeeding 12 h after 72 h of fasting.

2.8 团头鲂禁食状态下皮质醇及血糖的变化

持续 72 h 的禁食以及恢复摄食过程中，实验组与对照组相比，血糖水平无显著变化(P>0.05)。此外，监测结果显示血糖的波动存在周期性变化，就本研究所设定的监测时间点而言，其峰值水平出现在 6 h 和恢复投喂后 6 h (6 h 和 72 h-6 均为一天中的 14:00)，并且其变化规律不受摄食或者禁食(3 d)以及禁食后恢复摄食的影响，由此表明鱼类具备维持血糖稳定的调节机制。而长达 14 d 的禁食，对血糖水平产生了明显的影响，禁食组血糖水平显著低于对照组水平(P<0.05，图 10)。由此表明，长期的禁食可能将鱼体储备的糖原耗尽。

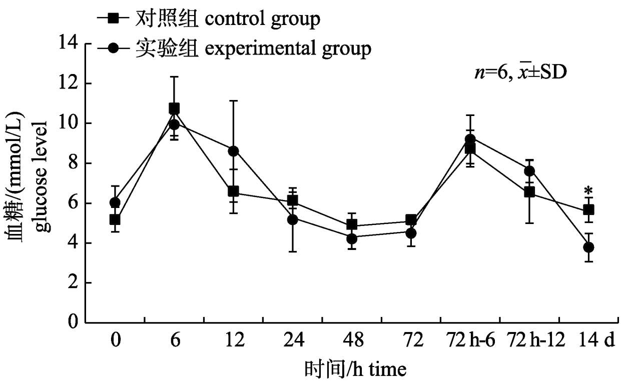

图 10 禁食状态下团头鲂血糖的变化

*表示同一时间点实验组和对照组差异显著(P<0.05).
72 h-6 表示饥饿 72 h 后恢复投喂 6 h, 72 h-12 表示饥饿 72 h 后恢复投喂 12 h.

Fig. 10 The effects of fasting on blood glucose levels of *Megalobrama amblycephala*

The asterisk means significant difference between the experimental and control groups at the same time-point (P<0.05). 72 h-6 means refeeding 6 h after 72 h of fasting, and 72 h-12 means refeeding 12 h after 72 h of fasting.

皮质醇监测结果(图 11)显示，皮质醇水平的变化也存在周期性节律，其峰值水平出现在 6~12 h，72 h-6 和 72 h-12 (一天中的 14:00~20:00)，并且皮质醇监测结果表明，摄食、禁食以及禁食后恢复摄食均未影响这一规律。此外，在禁食与恢复摄食的实验期间，实验组皮质醇含量与对照组无显著差异(P>0.05)。而禁食 14 d 时，禁食组血清皮质醇水平显著高于对照组(P<0.05)，表明机体代谢状态可能发生了变化。

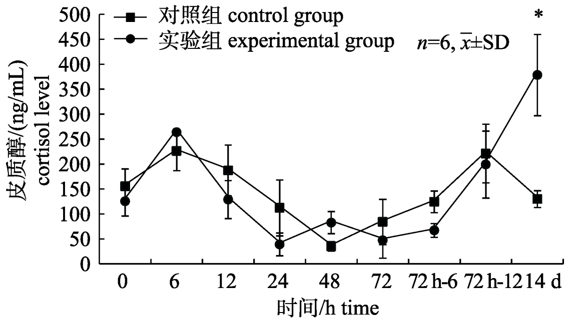

图 11　禁食状态下团头鲂血清皮质醇的变化
*表示同一时间点实验组和对照组差异显著($P<0.05$).
72 h-6 表示饥饿 72 h 后恢复投喂 6 h, 72 h-12 表示饥饿 72 h 后恢复投喂 12 h.
Fig. 11　The effects of fasting on serum cortisol levels of *Megalobrama amblycephala*
The asterisk means significant difference between the experimental and control groups at the same time-point ($P<0.05$).
72 h-6 means refeeding 6 h after 72 h of fasting and 72 h-12 means refeeding 12 h after 72 h of fasting.

3　讨论

3.1　团头鲂 *mc3r* mRNA 组织分布特点

团头鲂 *mc3r* 主要在中枢神经系统的下丘脑和垂体等组织中表达。该结果与现有白斑角鲨[14]和赤魟[15]的相关研究结果一致。关于 *mc3r* 的研究以哺乳动物最为深入, 哺乳动物的也主要在中枢神经系统如下丘脑、丘脑和海马区等部位表达[1, 21]。但是, 哺乳动物 *mc3r* 在外周组织中的表达分布情况[1, 22]与团头鲂的研究结果存在差异, 这可能与物种以及检测方法相关[1, 21-22]。如杨家大等[17]在其研究中就观察到 *mc3r* 转录水平在同一物种中存在品种差异的现象。而原鸡(*Gallus gallus*)的 *mc3r* 表达只在肾上腺中被检测到, 其脑部无转录表达[23]。

3.2　团头鲂 *mc3r* 在摄食和能量平衡中的调控作用

禁食实验中, 团头鲂 *mc3r* mRNA 在下丘脑中的转录表达上调的时间点, 与每天首次喂食的时间点高度吻合, 并且表现出周期性变化。这一现象和小鼠 *mc3r* 参与摄食预判行为十分相似[6, 24-25]。*mc3r* 转录表达在每日首次摄食时间点和禁食实验后期的升高, 反映了下丘脑中 *mc3r* 与鱼体摄食行为的相关性。由于 *mc3r* 激活能引起小鼠厌食[5], 而 *mc3r* 敲除的小鼠摄食量并无异常[2-3], 作者认为团头鲂下丘脑中 *mc3r* 在禁食期间的上调表达是对摄食行为的一种调控, 其临床症状表现为厌食, 而本质上是机体主动调整到低能耗状态(如减少摄食活动), 以保证生物渡过食物缺乏的困难时期。而其在食物出现之后的下调, 可能是下丘脑通过神经调节的方式对食物做出快速反应, 进而解除低能耗的状态(出现摄食活动), *mc3r* mRNA 转录表达量呈现下调, 其抑制摄食的作用弱化或消失。下丘脑作为能量调节的中枢, 其对能量稳态的控制势必需要整合营养、内分泌、神经等多方面的信号, MC3R 仅仅是能量调控网络中的一点。进一步明确 MC3R 在其中参与的主要调控途径及具体机制仍有待后续研究。

而垂体是机体内最重要的内分泌腺, 能分泌多种激素作用于靶器官并调节其他内分泌腺。研究显示 *mc3r* 在团头鲂垂体中的表达变化趋势与下丘脑中的情况相似, 都表现出和食物信号的密切联系, 仅在禁食恢复投喂后的 6 h (72 h-6), *mc3r* 的转录表达出现的显著上调情况和下丘脑中的情况不同, 这可能是下丘脑作为高位神经中枢, 能以神经调节的方式对外界信息快速反应, 而垂体位于其下游, 信息获取相对滞后, 而这一滞后现象给予了机体其他组织器官一定的适应时间, 避免了机体内环境平衡的快速变化, 也体现了垂体在神经系统和内分泌系统中的枢纽地位。此外, 垂体还是 MC3R 配体(ACTH 和 MSH)产生的主要场所, 其自身 *mc3r* 表达变化还可能在摄食行为以及能量平衡调节方面存在反馈调节的意义, 但这一猜想还有待进一步的实验验证。

肝脏作为机体最大的消化腺, 其在能量代谢中主要参与了食物消化和营养贮藏, 其对血糖平衡意义重大。而在本研究中, 肝脏中 *mc3r* 的表达变化, 在短期禁食(72 h)和长期禁食(14 d)中表现出不同的显著性变化, 这可能和机体在不同程度食物缺乏情况下, 营养储备和能量供给策略有关。*mc3r* 在下丘脑中激活能引起小鼠厌食[5], 而对于参与能量储备的肝脏而言, *mc3r* 的上调(厌食)可能意味着缺乏食物时的能量支出, 而其下调可能则意味着食物正常摄入后的能量收入(储能)。因此, 作者认为短期禁食情况下, 机体供能仍以

葡萄糖为主，且储备的能源物质足以应对食物不足，尚能为可能出现的食物摄入提供能量，一旦食物摄入，机体仍有储能倾向。而在长期禁食的情况下，机体供能物质已发生改变，机体可能减少甚至停止了应对食物摄入的能量预算，此时食物的摄入更大程度为供能倾向，最严重的情况是出现不可逆转饥饿，失去摄食能力。不过，这需要后续研究验证。

禁食实验中血糖和皮质醇的监测结果也在一定程度上印证了团头鲂在能量供给方面的变化。短期禁食后，团头鲂血糖和皮质醇水平仍能与对照组保持一致，无显著差异；而在长期禁食后血糖面临枯竭，出现了显著下降，即使皮质醇水平已显著升高，显示机体已经加强了糖代谢，但是无法将血糖维持在正常水平。这一现象在哺乳动物研究中已证实，禁食期间皮质醇等激素水平会升高，而且研究人员明确指出哺乳动物禁食过程可以划分为 3 个阶段(P1~P3)，其 P1 期以糖原消耗供能为主，随着禁食时间的延长，后期供能物质会转变为脂类甚至是蛋白质为主[26]。此外，团头鲂禁食过程的P1期维持时间明显长于哺乳动物[26]。这应该和作为变温动物的鱼类无需维持体温以及所处环境温度较低有关。鉴于此，后期可能有必要完善鱼类相关方面的研究。

参考文献：

[1] Gantz I, Fong T M. The melanocortin system[J]. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, 2003, 284: 468-474.

[2] Butler A A, Kesterson R A, Khong K, et al. A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse[J]. Endocrinology, 2000, 141(9): 3518-3521.

[3] Chen A S, Marsh D J, Trumbauer M E, et al. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass[J]. Nature Genetics, 2000, 26(1): 97-102.

[4] Jiang S W, Peng J, Xiong Y Z. Melanocortin receptor involvement in the regulation of food intake and energy homeostasis[J]. Hereditas, 2002, 24(2): 223-226. [蒋思文, 彭健, 熊远著. 黑素皮质素受体对动物采食量和能量稳态的调控[J]. 遗传, 2002, 24(2): 223-226.]

[5] Rowland N E, Schaub J W, Robertson K L, et al. Effect of MTII on food intake and brain c-Fos in melanocortin-3, melanocortin-4, and double MC3 and MC4 receptor knockout mice[J]. Peptides, 2010, 31(12): 2314-2317.

[6] Pandit R, Omrani A, Luijendijk M C M, et al. Melanocortin 3 receptor signaling in midbrain dopamine neurons increases the motivation for food reward[J]. Neuropsychopharmacology, 2016, 41(9): 2241-2251.

[7] Zhang Y B, Zeng R X, Du P, et al. Correlation analysis between MC3R and MC4R gene polymorphism and body weight in beagle dog[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2012, 48(13): 13-16. [张铁博, 曾瑞霞, 杜鹏, 等. 比格犬MC3R和MC4R基因多态性与体重相关性的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(13): 13-16.]

[8] Li S P, Du Z H, Ning F Y, et al. Correlation analysis between *MC3R* and *MC4R* gene polymorphism and growth traits in pigeon[J]. Hereditas, 2008, 30(10): 1333-1340. [李世鹏, 杜智恒, 宁方勇, 等. 鸽黑素皮质素受体 3、4(*MC3R*、*MC4R*)基因多态性与生长性状的相关分析[J]. 遗传, 2008, 30(10): 1333-1340.]

[9] Lee Y S, Poh L K S, Kek B L K, et al. The role of melanocortin 3 receptor gene in childhood obesity[J]. Diabetes, 2007, 56(10): 2622-2630.

[10] Timper K, Brüning J C. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity[J]. Disease Models & Mechanisms, 2017, 10(6): 679-689.

[11] Wikberg J E S, Mutulis F. Targeting melanocortin receptors: an approach to treat weight disorders and sexual dysfunction[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2008, 7(4): 307-323.

[12] Fen L, Xu Y, Li J L, et al. Molecular cloning and mutation analysis of *MC3R* gene in wild boar[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2009(6): 18-20. [冯力, 许尧, 李金玲, 等. 野猪黑素皮质素受体 3 基因的克隆及变异初步研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009(6): 18-20.]

[13] Wang J, Xue M, Wu X F, et al. Regulation mechanism of selective feed intake of fish when fed different protein source diets: a review[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(4): 833-842. [王嘉, 薛敏, 吴秀峰, 等. 鱼类对不同蛋白质源饲料选择性摄食调控机制的研究进展[J]. 动物营养学报, 2014, 26(4): 833-842.]

[14] Klovins J, Haitina T, Ringholm A, et al. Cloning of two melanocortin (MC) receptors in spiny dogfish: MC3 receptor in cartilaginous fish shows high affinity to ACTH-derived peptides while it has lower preference to gamma-MSH[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271(21): 4320-4331.

[15] Takahashi A, Davis P, Reinick C, et al. Characterization of melanocortin receptors from stingray *Dasyatis akajei*, a car-

tilaginous fish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2016, 232: 115-124.

[16] Renquist B J, Zhang C, Williams S Y, et al. Development of an assay for high-throughput energy expenditure monitoring in the zebrafish[J]. Zebrafish, 2013, 10(3): 343-352.

[17] Yang J D, Wu S R, Pan S R, et al. Transcriptional level of melanocortin-3 receptor gene in goat[J]. Journal of Southern Agriculture, 2016, 47(3): 466-471. [杨家大, 吴声榕, 潘盛榕. 山羊黑素皮质素受体-3 基因转录水平差异分析[J]. 南方农业学报, 2016, 47(3): 466-471.]

[18] Zhang D J, Liu D. Gene expression change of pig MC3R at cold stress[J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2012, 31(1): 20-21, 23. [张冬杰, 刘娣. 冷应激下民猪黑素皮质素受体基因的表达变化[J]. 畜牧兽医杂志, 2012, 31(1): 20-21, 23.]

[19] Jiang S W, Jacobsson L, Kerje S, et al. Studies of relationship between the melanocortin-3 receptor gene and body weight in chicken for high and low weight lines`intercross[J]. Acta Genetica Sinica, 2002, 29(4): 322-325. [蒋思文, Jacobsson L, Kerje S, 等. 参考家系鸡黑素皮质素受体 3 基因多态性与体重关系研究[J]. 遗传学报, 2002, 29(4): 322-325.]

[20] Xue C Y, Xi B W, Ren M C, et al. Molecular cloning, tissue expression of gene Muc2 in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* and regulation after re-feeding[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2014, 33(2): 291-298.

[21] Gantz I, Konda Y, Tashiro T, et al. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor[J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268: 8246-8250.

[22] He X P, Zhou Y N, Yan Z X, et al. Molecular cloning and analysis and tissue distribution of melanocortin receptor 3 and 4 genes in pigs (*Sus scrofa*)[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science edition), 2013, 50(4): 899-907. [何夏萍, 周彦妮, 阎振鑫, 等. 猪黑皮质素受体 3 和 4 基因克隆及分析[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2013, 50(4): 899-907.]

[23] Takeuchi S, Takahashi S. A possible involvement of melanocortin 3 receptor in the regulation of adrenal gland function in the chicken[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1999, 1448(3): 512-518.

[24] Sutton G M, Perez-Tilve D, Nogueiras R, et al. The melanocortin-3 receptor is required for entrainment to meal intake[J]. Journal of Neuroscience, 2008, 28(48): 12946-12955.

[25] Mavrikaki M, Girardet C, Kern A, et al. Melanocortin-3 receptors in the limbic system mediate feeding-related motivational responses during weight loss[J]. Molecular Metabolism, 2016, 5(7): 566-579.

[26] Bertile F, Raclot T. The melanocortin system during fasting[J]. Peptides, 2006, 27(2): 291-300.

Molecular cloning, characterization, and expression analysis of *Megalobrama amblycephala* melanocortin receptor 3 during fasting

LIAO Shengchen[1, 2], CHEN Kai[2], XI Bingwen[1, 2], QIN Ting[2], PAN Liangkun[2], XIE Jun[1, 2]

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;
2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural affairs; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: The melanocortin system consists of melanocortin peptides derived from the proopiomelanocortin gene, five melanocortin receptors, two endogenous antagonists, and two ancillary proteins. It plays a role in many important physiological functions of terrestrial animals. Studies on rodents have affirmed the role of melanocortin receptor 3 (*mc3r*) in feeding behavior and energy regulation. However, the function of *mc3r* in fish, including basic information, is not well understood. Thus, to determine the initial value of fish *mc3r* and assess the role of MC3R in fish feeding behavior and energy regulation, the full-length cDNA of *Megalobrama amblycephala mc3r* was cloned. The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence were analyzed using bioinformatics methods. Blood glucose and cortisol levels were detected, and real-time quantitative PCR was employed to characterize the tissue expression profile and expression during fasting and refeeding. The results showed that *M. amblycephala mc3r* cDNA encodes a protein of 327 amino acids, which shares a high amino acid sequence identity with that of other animals and is characteristic with the typical seven transmembrane domain. Phylogenetic analyses showed that the *mc3r* cluster was within the MC3R clade of the Cyprinidae MC3Rs. The tissue expression analysis revealed that *M. amblycephala mc3r* was highly expressed in the hypothalamus, pituitary, liver, and ovary, whereas its expression was much lower in the other detected tissues. During fasting and refeeding, *mc3r* mRNA expression in the hypothalamus and pituitary showed a periodic variation with higher expression near the first feeding time every day both in the experimental and control groups. Furthermore, the expression of *mc3r* mRNA was significantly increased and was higher than that in the control group after 72 h and 14 d fasting in the hypothalamus ($P<0.05$), whereas similar results occurred in the pituitary at 72 h fasting and 6 h after refeeding ($P<0.05$), and in the liver at 48 h and 14 d after fasting ($P<0.05$). In addition, an obvious change in blood glucose and cortisol was only observed with long term fasting ($P<0.05$). The *M. amblycephala mc3r* is not only highly conservative in genetic information, but also in its tissue expression profile and physiological function during the evolutionary process, and may play an important role in feeding behavior and energy regulation.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; melanocortin receptor 3; gene cloning; tissue distribution; fasting

Corresponding author: XIE Jun. E-mail: xiej@ffrc.cn