研究论文

鳜个体发育中胃腺结构和功能发育

张琦^{1,2,3}, 曹林军^{1,2,3}, 陈铭^{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: 胃腺是胃消化功能中的重要内分泌腺体。为明确鳜(*Siniperca chuatsi*)个体发育中胃腺结构和功能发育特征, 采用石蜡切片、荧光定量 PCR 和酶联免疫反应技术(ELISA)对孵化后 0~45 d (0~45 dph, days post hatching)鳜胃腺 发育过程进行了组织学观察,并测定了胃蛋白酶原(PG A1, A2, A-like, C)和胃质子泵(HK-*a*, HK-*β*)基因表达、胃蛋 白酶原(PG A 和 PG C)含量、总胃蛋白酶(Pep)活性的变化趋势。结果显示,4 dph, 鳜胃腔形成;8 dph,胃黏膜层褶 皱增多,柱状上皮细胞出现;10 dph,胃壁结构明显,泌酸胃酶细胞出现;13 dph,胃腺出现;后期,随着胃体发育, 胃壁黏膜层厚度增加,胃腺长度、宽度增加,泌酸胃酶细胞数目、大小均呈现递增趋势。PG A1、PG A2、PG A-like、 PG C 和 HK-*a*、HK-*β*基因相对表达量均随着胃结构发育呈上升趋势;8 dph,4 个胃蛋白酶原基因均开始表达,随后 各基因表达水平呈不同水平级上升,相对表达水平大小次序为:PG A1>PG A2>PG C>PG A-like;HK-*β*于6 dph表达, HK-*a* 于 8 dph表达,与胃蛋白酶原基因表达开始时间一致。4 dph,胃蛋白酶原(PG A 和 PG C)含量随胃发育均呈 上升趋势,PG A含量极显著高于 PG C (*P*<0.01)。总胃蛋白酶活性于4 dph就可检测,随胃发育呈上升趋势。综上,鳜 泌酸胃酶细胞 10 dph 出现,胃腺 13 dph 出现;胃蛋白酶原和 HK-*a* 基因 8 dph 表达;PG A、PG C 含量和总胃蛋白 酶活性 4 dph 出现;胃消化生理功能出现早于胃腺形态发生。研究结果为鳜胃消化生理功能发育研究提供了重要基 础资料。

关键词: 鳜; 胃腺; 泌酸胃酶细胞; 胃蛋白酶原; 胃质子泵; 胃蛋白酶 中图分类号: S917 **文献标志码: A 文章编号:** 1005-8737-(2023)02-0159-10

胃是鱼类消化道前段膨大、特化的结构,不 仅能够容纳较多的食物,还可借胃壁分泌的消化 酶参与食物消化作用^[1-2]。鱼类早期消化道为一直 管状结构;之后,前部出现膨大,胃雏形初现, 胃壁发育;胃腺(gastric gland)的出现标志着胃形 态发生^[1]。胃腺中含有大量的腺细胞,开口于胃小 凹,由腺细胞分泌的胃蛋白酶原(pepsinogen)是蛋 白质消化的重要消化酶^[3]。鱼类胃蛋白酶原、胃酸 由同一种细胞——泌酸胃酶细胞(oxynticopeptic cell)分泌,在胃酸刺激下,胃蛋白酶原转化形成 具有活性的胃蛋白酶(pepsin)^[2,4]。因此,胃蛋白酶 原与胃酸的分泌被认为是胃功能发育的分子标 志^[5-6]。

收稿日期: 2022-11-08; 修订日期: 2022-11-28.

基金项目:现代农业产业技术体系专项(CARS-46).

作者简介: 张琦(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类遗传育种. E-mail: 1330928248@qq.com

通信作者:赵金良,教授,研究方向为水产种质资源与遗传育种. E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

酸和胃蛋白酶原进行的化学性消化^[11]。胃腺中腺 细胞的数量与大小随着仔稚鱼发育逐渐增多^[12]。

前期,采用蛋白质分离技术,从鳜胃组织中 获得了4种胃蛋白酶原: PG-I、PG-II、PG-III(a)、 PG-III(b)^[13]。利用 RACE 克隆技术分别获得了鳜 3个胃蛋白酶原 A1、A2、C (PG A1、PG A2、PG C)和胃质子泵亚基(HK- α 、HK- β)基因 cDNA 序列, 并对其早期发育表达特征及胃蛋白酶活性变化进 行了初步分析^[3,14-16];采用原位杂交技术证明了 鳜 PG A1、PG A2、PG C 基因与 HK-α 基因共表 达于胃黏膜层泌酸胃酶细胞中^[15]。最近,从鳜胃 组织三代转录组测序结果中, 又获得了1个新的 胃蛋白酶原 A-like (PG A-like)基因的 cDNA 序列^[17]。 鳜属(Siniperca) 3 种鱼类中均已鉴定出 3 个 PG A 基因,其中,中国少鳞鳜(Coreosiniperca whiteheadi) 中鉴定出 2 个 PG A 基因和 1 个假基因^[18]。这些 为全面理解鳜胃蛋白酶原基因进化和胃消化生理 学研究提供了重要分子和细胞学基础。

本研究采用组织切片技术观察鳜胃腺组织结构发育,采用荧光定量 PCR 技术比较了 4 种胃蛋白酶原(PG A1、PG A2、PG A-like、PG C)和胃质 子泵亚基(HK-α、HK-β)基因的发育表达变化特征,同时,检测了胃发育过程中胃蛋白酶原(PG A 和 PG C)含量变化、总胃蛋白酶活性变化,旨在全面 理解鳜胃腺的结构与功能发育特征,为胃消化生 理学研究积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

> 續仔稚鱼于 2021 年 5 月 2 日至 6 月 16 日取 自于上海市浦东新区孙农水产养殖场。
> 續雌雄亲 鱼经人工催产,受精卵于孵化桶中孵化,孵化后, 鱼苗在原孵化桶中培育,孵化后 26 d (26 dph, days post hatching),鱼苗转移至室外水泥池中培 育,水温 23~24 ℃。4 dph 开口,以团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)鱼苗作为开口饵料,后期投 喂草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)鱼苗。0~45 dph 期间,每日采样 1 次,每次随机取 80 尾。

1.2 实验方法

1.2.1 组织切片 取各时期样品(0~20 dph 取整

鱼, 21~45 dph 解剖取胃)各 5 尾, 于 Bouin 氏液中 固定 24 h, 转存至 70% (体积分数)乙醇中。然后 经 80%~100% (体积分数)乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡 3 h, 石蜡包埋。使用 Leica RM 2016 型切片 机进行连续切片, 常规 HE 染色和 AB-PAS 染色, 中性树胶封片, 尼康 ECLIPES 80i 显微镜观察、 拍照。测量各时期胃壁厚度、黏膜层厚度、胃腺 长度、宽度和泌酸胃酶细胞大小, 并对泌酸胃酶 细胞计数。

1.2.2 胃蛋白酶原、胃质子泵基因表达 胃蛋白酶原(PG A1、PG A2、PG A-like 和 PG C)、*β*-actin 基因引物序列分别参照文献[15,17], HK-α、HK-*β* 扩增引物根据 GenBank 中胃质子泵 α 亚基、β 亚 基 cDNA 序列^[15], 采用 Primer 5.0 设计引物(表 1), 委托上海金唯智生物科技有限公司合成。

表 1 鱖胃蛋白酶原和胃质子泵基因 qPCR 分析特异性引物和退火温度

Tab. 1 Specific primers and annealing temperature for qPCR analysis of pepsinogen and gastric proton pump genes in *Siniperca chuatsi*

| 引物 primer | 序列(5'-3') sequence (5'-3') | 退火温度 annealing temperature | | |
|------------------|-------------------------------|----------------------------------|--|--|
| PG A1 F | GTGGGTGCCCTCCATCTACT | 576°C | | |
| PG A1 R | TCTGTAGGTGCTGCTCTTGC | 37.0 C | | |
| PG A2 F | TGCCTCTGACAATGTCGTGC | 57 6°C | | |
| PG A2 R | TCAATACCACCGAAGACCAC | 37.0 C | | |
| PG C F | AGCCTCTATGGAGTCTTTGG | 57 6°C | | |
| PG C R | CGAGGATGCCGTCAAACTGG | 57.0 C | | |
| PG A-like F | GCTCAGCATCCTCCACTT | 540°C | | |
| PG A-like R | GACCAAGAATCCCATCCC | 54.9 C | | |
| HK-α F | TGTCTGATGTGGGTCG | 540°C | | |
| HK-α R | ATTGGTTGGCGTTGAT | 34.9 C | | |
| HK- β F | TCAGGATTTGAGGACCCA | 540°C | | |
| HK- β R | AACCGAACAGCCACCA | 54.9 C | | |
| β -actin F | GTGCGTGACATCAAGGAGAAG | | | |
| β -actin R | GGAAGGAAGGCTGGAAGAGG | | | |

取摄食后 10~12 h (早上 5 点进行投喂,下午 3~5 点进行采样)的 2 dph 鳜(全鱼, 30 尾,每组 10 尾混合制样)、4、6、8、10、12、14 和 16 dph 鳜 (全鱼,各9尾,每组 3 尾混合制样),26 和 30 dph 鳜(去头去尾,各3 尾,每组 1 尾制样),35、40 和 45 dph 鳜(取完整内脏团,各3 尾,每组 1 尾制样), TRIzol 法提取总 RNA, 采用分光光度计和 1%琼 脂糖凝胶电泳检测其浓度和完整性, 并将 RNA浓 度调整为 1000 ng/µL, 稀释后的 RNA 反转录成 cDNA, 进行荧光定量 PCR 反应(反应体系: 2×SYBR[®] Green Prc Taq HS Premix, 10 µL; cDNA, 1 µL; Primer F, 0.4 µL; Primer R, 0.4 µL; RNase free water, 8.2 µL。扩增程序: 95 ℃, 30 s; 95 ℃, 8 s, 退火温度, 30 s, 40 个循环; 95 ℃, 15 s; 65 ℃, 1 min), 荧光定量 PCR 相关基因的引物扩增效率 为 90%~110%之间, R^2 在 0.990 以上, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_i}$ 法换算目的基因的相对表达量。

1.2.3 胃蛋白酶原含量和总胃蛋白酶活性测定 分别取摄食后 10~12 h (早上 5 点进行投喂, 下午 3~5 点进行采样)的 2、4 和 8 dph 鳜(全鱼, 各 15 尾,每组5尾混合制样),12和14 dph 鳜(全鱼,各 9 尾, 每组 3 尾混合制样), 18、22 和 26 dph 鳜(去 头去尾,各3尾,每组1尾单独制样),35、40和 45 dph 鳜(取完整内脏团, 各 3 尾, 每组 1 尾单独 制样), 以冷藏 PBS (pH7.4)洗净组织, 按组织重 量:PBS 缓冲液=1:9 的比例加入 PBS 缓冲液, 冰浴匀浆, 匀浆液 4 ℃下 2000 r/min 离心 20 min, 取上清液。胃蛋白酶原含量、胃蛋白酶活性试剂 盒(小鼠胃蛋白酶原 A 酶联免疫分析和胃蛋白酶 原 C 酶联免疫分析、鱼胃蛋白酶酶联免疫分析) 均购自上海酶联生物科技有限公司。按照试剂盒 说明依次加入试剂和样品,使用酶标仪(Synergy H1, 美国伯腾仪器有限公司)测定各样品 450 nm 的吸光度值,根据标准品浓度和对应吸光度值得 到标准曲线,然后根据每个样品的吸光度依次计 算出对应的活性或含量。

1.2.4 数据处理 采用 SPSS 24.0 软件进行方差 齐性检验和单因素方差分析(one-way ANOVA), 标准曲线采用 Excel 2019 制作,数据作图均采用 GraphPad Prism 8.0 软件,图片使用 Adobe Photoshop CC 2018 处理。

2 结果与分析

2.1 鳜胃腺结构发育

针对不同发育日龄,统计 5 个视野中鳜胃壁 厚度、黏膜层厚度,10~15 个视野中胃腺长、胃腺 宽、泌酸胃酶细胞数目和大小,统计结果如下: 4 dph,可见较明显的胃腔,胃壁由浆膜层和黏膜 层组成,黏膜层出现褶皱(图 1a); 8 dph,卵黄囊消 失,胃黏膜层褶皱增多,向内凹陷,黏膜上皮细 胞逐渐从单层矮柱状上皮细胞向单层高柱状上皮 细胞过渡(图 1b)。10 dph,胃壁四层结构出现,由 内向外依次为黏膜层、黏膜下层、肌肉层和浆膜 层,黏膜层中未出现胃腺,但可见零星分布的泌 酸胃酶细胞(图 1c)。13 dph,胃黏膜层出现简单的 单管状胃腺,胃腺中出现泌酸胃酶细胞(图 1d)。 14~45 dph,胃壁厚度逐渐增加,胃黏膜层厚度逐 渐增加,皱襞增大,胃腺逐渐变得细长,数量增 加;泌酸胃酶细胞数目逐渐增多,细胞体积逐渐 增大(图 1e, 1f, 1g, 1h)。

AB-PAS染色显示,胃黏膜层中存在3种细胞: 表层的表面黏液细胞(红色,I型黏液细胞)、中间 的颈黏液细胞(蓝色,II型黏液细胞)和底层的泌酸 胃酶细胞(图 1i)。

不同发育日龄, 鳜胃壁厚度、黏膜层厚度、 胃腺长、胃腺宽、泌酸胃酶细胞数目和大小相应 增加(表 2)。

2.2 鳜胃腺功能发育

2.2.1 胃蛋白酶原基因相对表达量 PG A1、PG A2、PG A-like 和 PG C 基因相对表达量均随着胃 的发育整体呈上升趋势(图 2)。PG A1、PG A2、PG A-like 和 PG C 基因表达呈现出较高的一致性, 都是从 8 dph 开始表达, 但其表达特点各具差异。PG A1 相对表达量在 8~14 dph 快速增加, 14~30 dph 波动上升, 30~45 dph 显著增加后小幅波动(图 2a); PG A2 相对表达量在 8~16 dph 逐渐增加, 16~26 dph 出现小幅下降, 30~45 dph 显著增加(图 2b); PG A-like 相对表达量在 8~4 dph 快速增加, 14~35 dph 波动上升, 35~45 dph 显著增加后小幅波动(图 2c); PG C 相对表达量在 8~14 dph 迅速增加, 14~16 dph 出现小幅下降, 16~35 dph 稳步上升, 35~45 dph 显著增加后小幅波动(图 2d)。

在 8~45 dph, PG A-like 基因相对表达量均极 显著低于 PG A1、PG A2 和 PG C (P<0.01)。PG A1 和 PG A2 相对表达量均显著高于 PG C (P<0.05)。 在 8~30 dph, PG A1 和 PG A2 相对表达量差异不



图 1 鳜早期胃腺发育

a. 4 dph; b. 8 dph; c. 10 dph; d. 13 dph; e. 18 dph; f. 21 dph; g. 30 dph; h. 45 dph; i. 40 dph (AB-PAS). S: 浆膜层; Muc: 黏膜层; Mus: 肌肉层; SM: 黏膜下层; EC: 上皮细胞; OC: 泌酸胃酶细胞; GG: 胃腺; GP: 胃小凹; ME: 黏膜上皮; MNC: 颈黏液细胞; SMC: 表面黏液细胞. Fig. 1 Early gastric gland development of *Siniperca chuatsi* S: serosa; Muc: mucosa; Mus: muscular layer; SM: submucosa; EC: epithelial cell; OC: oxynticopeptic cell;

GG: gastric gland; GP: gastric pit; ME: mucosa epithelium; MNC: mucous neck cell; SMC: surface mucous cell.

表 2 鳜各发育时期胃结构特征

Tab. 2 Characteristics of gastric gland in mandarin fish at different developmental stages

 $\overline{x} \pm SD$

| 孵化后天数/d days post hatching | 胃壁厚度/μm gastric wall thickness | 黏膜层厚度/µm mucosal thickness | 胃腺长/μm length of gastric gland | 胃腺宽/μm width of gastric gland | 泌酸胃酶细胞数目/个 number of oxynticopeptic cells | 泌酸胃酶细胞大小/μm ² size of oxynticopeptic cells |
|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|---|---|
| 15 | 61.34±4.21 ^e | $36.88{\pm}1.37^{d}$ | 15.27±4.17° | 6.37 ± 1.96^{d} | 1.33±0.49 ^e | $4.57{\pm}0.96^{d}$ |
| 18 | 76.81 ± 4.61^{d} | $42.68{\pm}1.73^{d}$ | $20.78 \pm 4.30^{\circ}$ | 9.65±3.23° | $3.67{\pm}0.82^{d}$ | $4.65{\pm}0.87^{d}$ |
| 21 | $132.97{\pm}10.09^{c}$ | 57.29±5.86° | 19.12±5.01° | 11.70±2.65 ^{bc} | 5.20±0.86° | 6.35±1.24 ^c |
| 30 | 336.19 ± 5.47^{b} | 194.21±2.49 ^b | $34.02{\pm}8.10^{b}$ | 13.50 ± 3.32^{b} | $7.86{\pm}1.46^{b}$ | 7.62±1.63 ^b |
| 40 | $432.45{\pm}12.18^{a}$ | 209.07±2.41ª | 64.32±13.16 ^a | 16.75±3.63ª | 12.2 ± 1.32^{a} | 12.47±1.59 ^a |

注: 同一行中具有不同上标者表示差异显著(P<0.05).

Notes: Values with different superscripts indicate significant difference (P<0.05).

大(P>0.05), 35~45 dph, PG A1 相对表达量显著高

于 PG A2 (P<0.05)。

2.2.2 胃质子泵 α 和 β 亚基基因相对表达量 HK-α

和 HK-β 基因相对表达量均随着胃的发育整体呈 上升趋势, HK-α 基因在 8 dph 开始表达, 而 HK-β 基因在 6 dph 已开始表达(图 3)。HK-α 基因相对 表达量在 8~14 dph 快速增加, 14~16 dph 略有下降, 16~35 dph 逐渐增加, 35~45 dph 显著增加(图 3a);

HK-β 基因相对表达量在 6~14 dph 逐渐增加, 14~30 dph 逐渐下降, 30~45 dph 显著增加(图 3b)。



图 3 鳜胃发育过程中 HK-α (a)和 HK-β (b)相对表达变化

不同字母表示各组间差异显著(P<0.05).

Fig. 3 Relative expression of gastric proton pump genes HK- α (a) and HK- β (b) in *Siniperca chuatsi* during gastric development Different letters indicate significant differences among groups (P<0.05).

2.3 鳜胃蛋白酶原含量和总胃蛋白酶活性变化
2.3.1 胃蛋白酶原含量 胃腺发育过程中胃蛋白酶原 PG A 和 PG C 含量变化趋势一致。不同时期的胃蛋白酶原 A 含量差异显著(P<0.05), 但不同时期的胃蛋白酶原 C 含量无明显差异(P>0.05)(图 4)。

2 dph, PG A 含量和 PG C 含量均无法检测到。PG A 含量在 4~14 dph 显著增加, 14~40 dph 波动上升, 为(132.31±5.85) ng/mL (图 4a); PG C 含量在 4~ 14 dph 逐渐增加, 14~40 dph 波动上升, 为(7.40± 0.23) ng/mL (图 4b)。







Fig. 4 Changes of pepsinogen A (a) and pepsinogen C (b) content of *Siniperca chuatsi* during gastric development Different letters indicated significant differences among groups (*P*<0.05).

2.3.2 总胃蛋白酶活性 鳜胃发育过程中总胃蛋白酶活性 4 dph 时已检测到,整体呈上升趋势 (图 5)。总胃蛋白酶活性在 4~14 dph 逐渐增加, 14~45 dph 波动上升。



3 讨论

3.1 鳜胃腺发育特征

本研究结果表明, 鳜仔鱼胃腺在 13 dph 出现, 晚于开口时间(4 dph), 这与本实验室之前的研究 结果(13 dph 出现胃腺)相一致^[9]。胃腺内的泌酸胃 酶细胞自孵化后 10 d 出现, 早于胃腺出现的时间, 表明在胃腺出现之前已经出现胃消化。随着泌酸 胃酶细胞数目和体积逐渐增加, 胃蛋白酶的分泌 水平逐渐增强, 细胞外消化逐渐成为主要消化方 式。鳜胃腺数量随着胃的发育逐渐增加, 主要集 中于胃体,胃腺的长度和宽度逐渐增加, 泌酸胃 酶细胞数目也逐渐增加, 这与大多数鱼类胃腺发 育特征保持一致^[19-21]。

 泌酸胃酶细胞的数目和大小逐渐增加,表明 鳜胃蛋白酶和胃酸的分泌机能逐渐加强。鱼体在 不同的发育阶段,其结构和功能发育是相适应 的。仔鱼发育早期阶段,碱性蛋白酶出现时期较 早,且活性较高,后期逐渐变为以酸性蛋白酶为 主^[22]。鳜仔鱼 4 dph 时开始主动摄食,进入混合 营养阶段,此时胃腔刚刚出现,但胃消化能力不 足,可能是主要依靠碱性蛋白酶和细胞内消化来 进行蛋白质的消化;随着卵黄囊的消失,仔鱼进 入外源性营养阶段,10 dph 泌酸胃酶细胞出现, 13 dph 胃腺形成,胃蛋白酶分泌能力增强,主要 依靠胃蛋白酶进行蛋白质的消化。

3.2 鳜胃蛋白酶原和胃质子泵基因早期发育表达

研究结果表明, 鳜 PG 基因自 8 dph 开始表达, 早于 10 dph 泌酸胃酶细胞和 13 dph 胃腺的出现, 推测鳜胃泌酸胃酶细胞的功能发育早于形态发 生。从混合营养阶段进入外源性营养阶段, 胃功 能发育早于形态发育可能是为了更好的适应营养 阶段的功能转变。

本研究中, 鳜 4 种 PG 基因同时开始表达, 但 4 种 PG 基因的表达水平存在差异, 这可能与鱼类 进化过程中 PG 基因经历多轮复制有关^[23], 也可 能与基因功能特化有关^[24-26]。鳜 4 种胃蛋白酶原 基因的起始表达时间基本一致, 均在 8 dph 开始 表达, 与之前的研究结果一致^[3]。PG A 和 PG C 基因同时表达的情况也存在于大菱鲆(*Scophthal*- *mus maximus*)等其他鱼类中^[27]。鳜 4 种胃蛋白酶 原基因同时开始表达有利于增强胃的消化能力, 使胃消化方式的快速转变。早期发育阶段 PG A1、 PG A2、PG A-like 和 PG C 基因的表达总体呈上 升趋势,不同胃蛋白酶原基因的相对表达量大小 为: PG A1>PG A2>PG C>PG A-like,该结果与在 鳜胃蛋白酶原基因表达中 PG A-like 基因表达量 最低,远低于 PG C 基因,而 PG C 基因的表达量 低于 PG A1 基因和 PG A2 基因的结果相一致^[17], 不同胃蛋白酶原基因的表达水平可能与其分泌细 胞的类型、位置和数量存在差异相关联^[28]。

本研究中, 鳜 HK- β 基因在 6 dph 时开始表达, 早于 HK- α 基因的 8 dph 时表达,但两个亚基的相 对表达量变化趋势是基本一致的。先前 RT-PCR 结 果显示,胃质子泵 α 、 β 亚基于 12 dph 开始表达^[16]。 胃质子泵基因的 α 亚基是离子转运的关键部位, β 亚基则起到稳定 α 亚基和辅助泌酸的作用^[29]。鳜 HK- α 和 HK- β 基因表达趋势保持一致,有利于胃 酸分泌,进而促进胃蛋白酶原的激活。

研究结果表明, 鳜胃蛋白酶原基因与胃质子 泵 α 亚基表达存在一致性, 均从 8 dph 起显著表达, 鳜胃蛋白酶原和胃质子泵基因的相对表达量随着 泌酸胃酶细胞和胃腺的出现而提高; 后期胃腺长 度、宽度, 泌酸胃酶细胞数目和大小逐渐增加, 胃 蛋白酶原和胃质子泵基因的相对表达水平呈上升 趋势。哺乳动物的胃蛋白酶原、盐酸分别由主细 胞和壁细胞分泌, 受不同机制调控^[30]。鳜胃蛋白 酶原和胃质子泵基因相对表达水平整体变化趋势 基本一致, 具有耦联性, 这是因为它们同由泌酸 胃酶细胞分泌, 可能存在共同表达的调控机制。

3.3 鳜胃蛋白酶原含量和总胃蛋白酶活性早期 发育变化

本研究中鳜 PG A 和 PG C 含量在 4 dph 就能 检测到,其变化趋势与胃蛋白酶原基因表达变化 趋势具有一致性。PG A 含量极显著高于 PG C 含 量(P<0.01),这与 3 种 PG A 基因的相对表达量总 值极显著高于 PG C 基因的相对表达量(P<0.01)的 结果相一致。在不同发育阶段,鳜 PG A 含量始终 高于 PG C 含量,可能与胃中 PG A 和 PG C 表达 细胞的类型和数量差异有关^[28];也可能与 PG A 具有多种同工酶原形式,而 PG C 仅仅为单基因 有关^[24-26]。由于 PG A 含量高于 PG C 含量,且 PG A 和 PG C 在氨基酸组成和底物结合位点上存在 明显差异^[15,17],可以推测 PG A 是胃蛋白酶原的 主要类型,负责食物蛋白的消化。

本研究中鳜 4 dph 时开始检测到总胃蛋白酶 活性,其变化趋势与胃蛋白酶原含量变化趋势具 有一致性,该结果与鳜在 0~3 dph 之间未检测到 胃蛋白酶活性保持一致^[31]。鳜胃蛋白酶原含量、 总胃蛋白酶活性出现时间(4 dph)早于胃蛋白酶原 和胃质子泵基因的表达(8 dph),可能是 4 dph 开 口摄食后消化道内食物残留造成的,也可能是肠 道内菌群分泌胃蛋白酶(原)造成的。鳜胃蛋白酶 原 A 和 C, 及胃蛋白酶活性在 26 dph 时均下降, 本实验中26 dph 时鳜鱼苗从室内孵化桶转移至室 外水泥池中养殖, 推测可能是应激反应、摄食变 化导致其下降,但具体原因不明。4 dph, 鳜仔鱼 胃腔形成,但胃腺尚未出现,胃蛋白酶原A、C含 量和总胃蛋白酶活性 4 dph 时可被检测, 该时期 鳜已经开口摄食,胃组织结构开始发育,并具有 初步消化功能; 8 dph 时卵黄囊完全消失, 胃蛋白 酶原和胃质子泵基因 8 dph 时开始表达,胃组织 结构继续发育, 形态结构尚未完全, 但胃消化功 能已经形成; 8~13 dph, 鳜泌酸胃酶细胞(10 dph) 和胃腺(13 dph)出现,胃蛋白酶原和胃质子泵基 因表达量显著增加, PG A 和 PG C 含量、总胃蛋 白酶活性逐渐增加,该时期胃形态结构基本完善, 消化能力逐渐增强。13~45 dph、 鳜仔鱼胃腺结构快 速发育、泌酸胃酶细胞大量增加,胃蛋白酶原和 胃质子泵基因相对表达量迅速增加, PGA和PGC 含量、总胃蛋白酶活性也处于上升状态,该时期 胃结构发育完善,消化能力达到幼鱼水平。这一时 期, 鳜其他消化组织(幽门盲囊)也随之发育^[32]。

4 结论

本研究观察了鳜泌酸胃酶细胞 10 dph 出现, 胃腺 13 dph 出现,胃腺长度及宽度、泌酸胃酶细胞 数目及大小随着胃结构发育逐渐增加。鳜 PG A1、 PG A2、PG A-like、PG C 和 HK-α 基因自 8 dph 开始表达, HK-β 基因自 6 dph 开始表达,它们的 相对表达水平均随着胃结构发育呈上升趋势。胃 蛋白酶原 PG A、PG C 含量和总胃蛋白酶活性均 在 4 dph 检测到,变化趋势与胃蛋白酶原和胃质 子泵基因表达一致。基于基因变化特征, 鳜胃消 化生理功能出现早于胃腺形态发生。

参考文献:

- Lou Y D. Histoembryology[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1996. [楼允东. 组织胚胎学[M]. 2版. 北 京:中国农业出版社, 1996.]
- Wei H, Wu Y. Fish Physiology[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2011. [魏华, 吴垠. 鱼类生理学[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社, 2011.]
- [3] Miao W. Larval developmental expression of pepsinogens, cloning and expression of two gastrin family genes in the mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012: 18-20]. [苗伟. 鳜胃蛋白酶原早期 发育表达及两种胃泌素家族基因的克隆与表达[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012: 18-20].]
- [4] Richter C, Tanaka T, Yada R Y. Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases: Pepsinogen, progastricsin and prochymosin[J]. The Biochemical Journal, 1998, 335(3): 481-490.
- [5] Douglas S E, Gawlicka A, Mandla S, et al. Ontogeny of the stomach in winter flounder: Characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity[J]. Journal of Fish Biology, 1999, 55(5): 897-915.
- [6] Feng S Z, Li W S, Lin H R. Characterization and expression of the pepsinogen C gene and determination of pepsin-like enzyme activity from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 149(2): 275-284.
- [7] Jiang Y G. On the biology of mandarin fish, *Siniperca chuatsi* of Liang-tze lake[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1959, (3): 375-385. [蒋一珪. 梁子湖鳜鱼的生物学[J]. 水 生生物学集刊, 1959, (3): 375-385.]
- [8] Zhang F Y, Hu W, Zhou Y X. Morphological structures of digestive tract of mandarin fish, *Siniperca chuatsi*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1998, 22(4): 380-382. [张甫英, 胡 炜, 周永欣. 鳜消化器官的组织学观察[J]. 水生生物学报, 1998, 22(4): 380-382.]
- [9] Wu X F, Zhao J L, Qian Y Z, et al. Histological study of the digestive system organogenesis for the mandarin fish, *Siniperca chuatsi*[J]. Zoological Research, 2007, 28(5): 511-518.
 [吴雪峰,赵金良,钱叶洲,等. 鳜消化系统器官发生的组

织学[J]. 动物学研究, 2007, 28(5): 511-518.]

- [10] Tian W F, Zhong J S, Qian Y Z, et al. Histological observations of retina and teeth development and their adaption to feeding in *Siniperca chuatsi*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(2): 190-198. [田文斐, 钟俊生, 钱叶洲, 等. 鳜仔鱼视网膜及口腔齿的发育对摄 食的适应[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(2): 190-198.]
- [11] Nie G F, Li J E, Ou Y J, et al. Histological studies on post-embryonic development of the digestive system in larval, juvenile, and young *Liza haematocheila*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(1): 90-103. [聂广锋, 李 加儿, 区又君, 等. 梭鱼仔、稚、幼鱼消化系统胚后发育 的组织学观察[J]. 中国水产科学, 2016, 23(1): 90-103.]
- [12] Chen X X. Histological study on postembryonic development of digestive system of *Mystus macropterus*.[D]. Chongqing: Southwest University, 2001: 1-2]. [陈细香. 大鳍鳠(*Mystus macropterus*)消化系统胚后发育的组织学研究[D]. 重庆: 西南师范大学, 2001: 1-2].]
- [13] Zhou Q, Liu G M, Huang Y Y, et al. Pepsinogens and pepsins from mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(13): 5401-5406.
- [14] Wu X F, Zhao J L. Cloning and sequencing of the full-length cDNA of pepsinogen gene from the mandarin fish, *Siniperca chuatsi*[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(6): 971-976. [吴雪峰,赵金良. 鱖胃蛋白酶原基因 cDNA 全长的克隆与序列分析[J]. 水产学报, 2008, 32(6): 971-976.]
- [15] Xue Y, Zhao J L, Deng Y F, et al. Full-length cDNA cloning and cellular expression of the pepsinogen A and gastric proton pump genes of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(7): 992-1000. [薛洋, 赵金良,邓燕飞,等. 鳜胃蛋白酶原 A、胃质子泵基因 cDNA 全长的克隆与细胞表达定位[J]. 水产学报, 2011, 35(7): 992-1000.]
- [16] Xue Y, Zhao J L, Deng Y F, et al. Cloning and spatiotemporal expression of pepsinogen and gastric proton pump genes from mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) during early ontogeny[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2013, 39(4): 881-893.
- [17] He Y D. Sequence and expression analysis of digestive enzymes in *Siniperca chuatsi*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020: 30-42. [何裕东. 鳜消化酶基因序列及表 达分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020: 30-42.]
- [18] He S, Li L, Lv L Y, et al. Mandarin fish (Sinipercidae) genomes provide insights into innate predatory feeding[J]. Communications Biology, 2020, 3(1): 1-13.
- [19] Fang H H, Wang B. Histological studies on the development of digestive system in larval and juvenile starry flounder[J].

Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(14): 50-54. [方华华,王波. 星斑川鲽仔稚鱼消化系统发育的组织学研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(14): 50-54.]

- [20] Xie M J, Ou Y J, Li J E, et al. Histology observation in digestive tract of *Eleutherollema tetradactylum* at different developmental stages[J]. South China Fisheries Science, 2016, 12(2): 51-58. [谢木娇, 区又君, 李加儿, 等. 不同发 育阶段的四指马鲅消化道组织学比较研究[J]. 南方水产 科学, 2016, 12(2): 51-58.]
- [21] Yang R B, Xie C X, Fan Q X, et al. Histological and ultrastructural studies of the stomach and intestine in larvae of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(6): 1068-1077. [杨瑞斌, 谢从新, 樊 启学,等. 黄颡鱼仔稚鱼胃肠发育的显微和超微结构研究 [J]. 水生生物学报, 2009, 33(6): 1068-1077.]
- [22] Rønnestad I, Yúfera M, Ueberschär B, et al. Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: Current knowledge, and gaps and bottlenecks in research[J]. Reviews in Aquaculture, 2013, 5: S59-S98.
- [23] Liang P, Jones C A, Bisgrove B W, et al. Genomic characterization and expression analysis of the first nonmammalian renin genes from zebrafish and pufferfish[J]. Physiological Genomics, 2004, 16(3): 314-322.
- [24] Evers M P J, Zelle B, Bebelman J P, et al. Nucleotide sequence comparison of five human pepsinogen A (PGA) genes: Evolution of the PGA multigene family[J]. Genomics, 1989, 4(3): 232-239.
- [25] Kageyama T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: Structure, function, evolution, and development[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2002, 59(2): 288-306.

- [26] Pals G, Azuma T, Mohandas T K, et al. Human pepsinogen C (progastricsin) polymorphism: Evidence for a single locus located at 6p21.1-pter[J]. Genomics, 1989, 4(2): 137-145.
- [27] Chi L, Xu S H, Xiao Z Z, et al. Pepsinogen A and C genes in turbot (*Scophthalmus maximus*): Characterization and expression in early development[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 165(1): 58-65.
- [28] Huang B, Xiao H L, Zhang X R, et al. Time-resolved fluoroimmunoassay of pepsinogen I[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2004, 24(6): 492-495. [黄飚, 肖华龙,张祥瑞,等. 胃蛋白酶原 I 时间分辨荧光免疫分析 法的建立[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(6): 492-495.]
- [29] Asano S, Matsuda S, Tega Y, et al. Mutational analysis of putative SCH 28080 binding sites of the gastric H+, K+-ATPase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(28): 17668-17674.
- [30] Tang C W. Secretory function of gastric mucosa[J]. Chinese Journal of Digestion, 2021, 41(Z1): 9-12. [唐承薇. 胃黏膜 内外分泌功能[J]. 中华消化杂志, 2021, 41(Z1): 9-12.]
- [31] Doi T. Early development of the digestive system and digestive enzyme activity of reared mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Perciformes: Sinipercidae)[J]. Aquaculture Science, 2005, 53(V): 425.
- [32] Zhao L L, Shi L L, Zhao J L, et al. Histological features of organogenesis of the pyloric caecum of *Siniperca chuatsi*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2021, 30(4): 684-690.
 [赵亮亮,施琳澜,赵金良,等. 鳜幽门盲囊早期发育的组 织学特征[J]. 上海海洋大学学报, 2021, 30(4): 684-690.]

Structural and functional development of gastric gland in *Siniperca* chuatsi

ZHANG Qi^{1, 2, 3}, CAO Linjun^{1, 2, 3}, CHEN Ming^{1, 2, 3}, ZHAO Jinliang^{1, 2, 3}

- 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: The gastric gland is an important endocrine gland of gastric digestive function. To clarify the structural and functional development characteristics of gastric glands in the ontogeny of *Siniperca chuatsi*, paraffin sections, fluorescence quantitative PCR, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to observe and describe the histological characteristics of gastric glands, the relative expression levels of pepsinogen and gastric proton pump genes, contents of pepsinogen A and C, and pepsin activity of Siniperca chuatsi from 0 to 45 days post hatching (dph). The results showed that the stomach cavity appeared at 4 dph. At 8 dph, gastric mucosal folds increased and columnar epithelial cells appeared. At 10 dph, the gastric wall was divided obviously and oxynticopeptic cells appeared. At 13 dph, gastric glands appeared. Later, the gastric wall became thicker, the length and width of gastric glands increased gradually, and the number and size of oxynticopeptic cells showed an increasing trend along with the development of the stomach. The relative expression of pepsinogens (PG A1, A2, A-like, C) and gastric proton pump genes (HK- α , HK- β) showed an upward trend with the development of the stomach. The four pepsinogen genes began to be expressed at 8 dph, and then the expression levels of each gene increased at different levels. Their relative expression level order was PG A1>PG A2>PG C>PG A-like. HK- β was significantly expressed at 6 dph, and HK- α was expressed at 8 dph, which was consistent with the time of pepsinogen gene expression. At 4 dph, pepsinogens (PG A and PG C) contents were detected, which showed an upward trend with gastric development, and PG A content was significantly higher than PG C (P<0.01). Total pepsin activity could be detected at 4 dph and increased with gastric development. In summary, the oxynticopeptic cells appeared at 10 dph and the gastric glands appeared at 13 dph. The expression of four pepsinogens and HK- α genes began at 8 dph. Pepsinogen PG A, PG C content, and total pepsin activity appeared at 4 dph, and the physiological function of gastric digestion occurred earlier than that of gastric gland morphogenesis. The results provide important basic data for the study of gastric digestive physiological function development of Siniperca chuatsi.

Key words: *Siniperca chuatsi*; gastric gland; oxynticopeptic cell; pepsinogen; gastric proton pump; pepsin Corresponding author: ZHAO Jinliang. E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

^{1.} Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;