

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16150

刀鲚 *POMC* 基因的 cDNA 克隆及其应激应答

杜富宽^{1,2}, 徐钢春², 黎燕², 练青平¹, 徐跑²

1. 农业部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省淡水水产遗传育种重点实验室, 浙江省淡水水产研究所, 浙江湖州 313001;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏无锡 214081

摘要: 为了研究刀鲚(*Coilia nasus*)阿黑皮素原(proopiomelanocortin, *POMC*)基因的应激应答及调控, 克隆了刀鲚 *POMC* 基因的 cDNA 全长。刀鲚 *POMC* 基因的 cDNA 全长 2030 bp, 编码区 699 bp, 编码 232 个氨基酸。二级结构预测显示, 刀鲚 *POMC* 包括信号肽(signal peptide)、N 末端区(N-terminal region, NPP)、促肾上腺皮质激素结构域(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、 β -脂解素(β -LPH)、 α -促黑素(α -MSH)、促肾上腺皮质激素样垂体中叶多肽(CLIP)、 γ -脂解素(γ -LPH)、 β -促黑素(β -MSH)和 β -内啡肽(β -EP)结构域。运用荧光定量的方法检测了该基因在刀鲚不同组织中的表达分布。结果显示, *POMC* 在健康刀鲚的脑高表达, 鳃、肾、精巢相对高表达, 肝、脾、肠、头肾、肌肉和卵巢中微量表达。运输胁迫后, *POMC* 基因的表达量显著下降($P < 0.05$); 10‰ NaCl 组 4 h 和 6 h *POMC* 基因的表达量显著上调 ($P < 0.05$), 6 h 的表达量恢复至应激前。*POMC* 基因在脂肪代谢及应激调控中发挥重要的功能, 本研究结果可为该基因在刀鲚后续育种及应激调控工作提供重要基础。

关键词: 刀鲚; *POMC* 基因; 应激应答; 运输胁迫

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)02-0231-08

刀鲚(*Coilia nasus*), 俗称刀鱼, 是中国重要的洄游性经济鱼类^[1-4]。刀鲚的应激反应强烈, 在日常管理如拉网、装载、运输等操作中会造成不同程度的损伤, 甚至死亡, 严重制约着该物种的规模化繁养殖^[5]。因此, 应激反应是刀鲚产业中值得深入研究的问题。

据报道, *POMC* 基因在鱼类应激调控中发挥重要功能^[6-8]。研究表明, *POMC* 具有促进鱼类性腺成熟、促进脂肪分解、抑制脂肪积累、调节渗透压、维持水盐平衡及参与应激反应等多种功能^[9-13]。鉴于其重要的生物学功能, 已经在鱼类鲤形目(Cyprinoidei)^[14]、鲇形目(Siluriformes)^[15]、鳃形目(Symbranchiformes)^[16]、鲈形目(Perciformes)^[17]、雀鳝目(Lepidosteiformes)^[18]和鲑形目(Salmoniformes)^[19]

等多种鱼类中都开展过相关研究。这些研究表明, *POMC* 是多个成熟肽的前体肽, 可以加工成多种肽类激素, 包括脂肪酸释放激素(lipotropic hormone, LPH)、 β -内啡肽 (β -endorphin)和促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)等, 其中 ACTH 又可以分解成黑细胞色素刺激激素(melanocyte stimulating hormone, MSH) 以及类促肾上腺皮质激素垂体中叶肽(corti-cotropin-like intermediate lobe peptide, CLIP), 而 MSH 又分别含有 α 、 β 、 γ 、 δ 等几种亚型^[20]。刀鲚作为一种典型的洄游性鱼类, 其 *POMC* 基因与其他洄游和非洄游鱼类相比有何异同, 而刀鲚同时具有强应激反应的特点, *POMC* 作为重要的应激调控基因, 在其应激过程中是如何应答的, 了解这些问题对于研

收稿日期: 2016-05-11; 修订日期: 2016-07-20.

基金项目: 农业部淡水渔业健康养殖重点实验室开放课题(ZJK2014003); 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2015JBF06); 江苏省科技支撑项目(BE2014307).

作者简介: 杜富宽(1983-), 男, 助理研究员. E-mail: adublg@126.com

通信作者: 徐跑, 研究员, E-mail: xup13806190669@163.com; 练青平, 高级工程师, E-mail: 82147819@qq.com

究刀鲚应激性损伤和猝死具有重要意义。但在刀鲚中没有开展过系统的相关研究, 以上问题便是本研究关注的重要内容。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼

刀鲚取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴昝亭养殖基地, 室内水泥池驯养, 早、中、晚 3 次投喂。DO (7.5±0.3) mg/L, pH 7.5±0.3。

1.2 总 RNA 的提取和 *POMC* 基因序列的获得

Trizol reagent (Invitrogen, 美国)从刀鲚肌肉中提取总 RNA, M-MLV reverse transcriptase (TaKaRa, 日本)反转录获得第一链 cDNA。根据本实验室刀鲚脑转录组的拼接和组装数据, 获得 *POMC* 基因的 cDNA 序列, 设计引物对其全长进行扩增, 将其克隆到 PMD18-T 载体(TaKaRa, 日本), 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆并测序(博尚生物, 中国)。

1.3 核酸及氨基酸序列分析

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 的 BLASTP 分析刀鲚 *POMC* 和其他同源蛋白的相似性。SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测结构域。LUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)和 GeneDoc 软件进行氨基酸的多序列比对。MEGA 7.1 (<http://megasoftware.net>)构建进化树。

1.4 刀鲚应激实验

本研究采用室内人工养殖 1 龄刀鲚为实验对象, 利用刀鲚的趋光性, 分别从 3 个等规格大小的室内水泥池中, 各取 3 尾, 共 9 尾作为对照; 采用拉网的方式, 从以上 3 个池中各取 3 尾刀鲚, 这 9 尾鱼作为应激 0 点; 另分别从每个池拉网取 120 尾, 共 360 尾鱼, 带水转运到 18 个 75 mm×55 mm×33 mm 的运鱼箱中, 每箱随机分配 20 尾; 18 个运

鱼箱分为 2 组, 每组 9 个, 分别作为正常应激组和 10‰NaCl 组, 其余实验条件两组保持一致; 对以上 18 箱鱼, 每隔 15 min 持续晃动 15 s, 模拟运输; 每组的 9 个运鱼箱分为 3 组, 每组 3 个, 3 组分别用于运输后 2 h、4 h、6 h 取材, 每组的 3 个箱作为实验重复; 每个时间点, 每箱取 3 尾鱼, 这样, 每个时间点每组分别取 9 尾鱼。

为尽量避免取材带来的应激反应, 采用 70 mg/L 的 MS-222 麻醉, 麻醉后立刻置于冰上, 抽取血液, 5000 r/min, 4℃离心收集血浆; 解剖取鳃、脑、肝、脾、肠、头肾、肾、心脏、肌肉组织, 1 mg 组织加入 1 mL Trizol, -80℃保存。

1.5 刀鲚 *POMC* 基因在不同组织中的转录表达

PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 日本) 反转录获得第一链 cDNA。*POMC* 特异性引物 171S 和 171A(表 1)扩增 110 bp 的目的片段。18S rRNA 作为内参基因, 引物 42S 和 42A(表 1)扩增 114 bp 的目的片段。使用 2×S sofast Eva-Green Supermix (Bio-Rad, 美国) Bio-Rad CFX 96 进行荧光定量。反应条件为 94℃ 2 min, 40 个循环: 94℃15 s, 60℃15 s, 72℃45 s。检测基因的溶解曲线和扩增曲线。运用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算基因表达量, 所有数据以平均相对表达量展现($\bar{x}\pm SD$)。SPSS 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 氏多重比较进行分析。所有结果均以平均值±标准误($\bar{x}\pm SE$)表示。

2 结果与分析

2.1 刀鲚 *POMC* 基因的 cDNA 全长序列

刀鲚 *POMC* 基因的 cDNA 全长 2030 bp, 5'-UTR 819 bp, 3'-UTR 513 bp, 开放阅读框区 699 bp, 预测编码 232 个氨基酸(图 1)。Polyadenylation signal (AATAA)序列位于 poly-A tail 上游 13 bp 的位置。

表 1 本研究用到的引物序列

Tab. 1 Sequence of primers used in this study

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
GSP3	CACATAGCGCAGCCATGGCCAACG	RACE 特异性引物 5' RACE specific primer
GSP2	TGCATCGCGGACTCTCCCAGCACTGA	RACE 特异性引物 5' RACE specific primer
GSP1	ACTCTGAAGAGAACAGGCTGGAA	RACE 特异性引物 5' RACE specific primer
138m1S	CTGTGCAACAGTGATGCTGAGAGGA	<i>POMC</i> 扩增上游引物 forward primer for <i>POMC</i> amplification
138m3A	GTGCTTGTGGTCAACAAAGCCTTTT	<i>POMC</i> 扩增下游引物 reverse primer for <i>POMC</i> amplification
171S	GGTGTGGAAGCAGTGAAAGGTATA	<i>POMC</i> 定量上游引物 forward primer for <i>POMC</i> RT-qPCR
171A	GTTAAGGGGAGGAATAAGCAAGTGT	<i>POMC</i> 定量下游引物 reverse primer for <i>POMC</i> RT-qPCR
42S	TGATTGGGACTGGGGATTGAA	18S rRNA 定量上游引物 forward primer for 18S rRNA RT-qPCR
42A	TAGCGACGGCGGTGTGT	18S rRNA 定量下游引物 reverse primer for 18S rRNA RT-qPCR

1 tgtgtttatgtcaccagtttatggttactcagctcgggctgcatttggggtgatcacc
 61 aagataaaacatcaaaataacatctcaagaacgttgatgttgaatgtcaggttagc
 121 gtacactggggaattccaatgtttattcaactttctcatatgccagcctaatacaggt
 181 atgacggaataatctctcatcatttttcgatccctcagcaagaggaattaacacctcc
 241 atgccttttgtcaggagcagacaacatctatcagctacccagcctgcttttaacttt
 301 cctgctgttaaacccccacatgtaattggaanaacttctacctttacatccacaggtaaaaat
 361 gagcatcaggacttgatatactcccaaacctcgttaattccatctgatgtcatctgacc
 421 ttttaagctactgattgcaggaagcagggtgacattattttgcctcaccggtcaacatttt
 481 cccgaattctggctgctcactccgtggactggactgagtgccatgagaaatgacggcggagg
 541 aagatgctgctggccagcaggtggccttgggggctggctcttctgctggcctataaaag
 601 cctgcctatgctctcacatcaggagcacaagaggacggcggcagtagcgtgcaaaa
 661 agacacacagtcacgcccagacacagcgtctgtacatctcagacttccccgagctg
 721 acaggagacaggcagagaagaagcttgcagagaagacggaaacactgtcagtgaggaga
 1 M L R G L K M
 781 acacagagacaggttagcacactcctaactgtgcaacagtATGCTGAGAGGACTGAAGATG
 8 L C P V W T L A M A A L C V L A V E V S
 841 CTGTGCTGTGTGGACGTTGGCCATGGCTGCGCTATGTGTCTGGCTGTGGAGGTCAGC
 28 S Q C W E S P R C R Y L N S E N R L E
 901 AGTCAGTGTGGAGAGTCCCGGATGCAAGTCACTCTGAAGAGAACAGGCTGGAA
 48 C I K M C R S D L T A E T P V F P G E G
 961 TGCATAAAGATGTGACAGTTCAGACCTGACGGCCGAGACCCAGTCTTTCACGGCAGGGC
 68 H L Q P P E P E T S E S N S L P A L P
 1021 CACCTCCAGCCCCAGACCCGAGACAGTGTAGGAGAGCAACTCCCTGCCGCCCTGCCG
 88 L S P A L A P Q D T S E L K Q P S P R Q
 1081 CTCAGTCCCGGTTGGCCCCAGGACACCTCGGAGCTGAAGCAGCAAGCCCCAGGCAG
 108 E E K R T Y A M D G T D G G A V K E E Q
 1141 GAGGAGAAGCGCACCTACGCCATGGAGCATTCCGCTGGGGCAAGCCCGTGGCCCGAAG
 128 R R P I K V F T N G V E E S A E E L P
 1201 CGCCGCCCATCAAGTCTTCCACCAACGGCGTGGAGGAGTGGCCGAGGAGCTTCCG
 148 A E M R R E A L D G T D G G A V K E E Q
 1261 GCGGAGATGCGCGCGAGGCGCTCGACGGCACGGACGGCGCGGTTGAAGGAGGACAG
 168 A T L A G L L A Q Q K K D A P Y V I K H
 1321 GCCACGCTGGCGGGCTGTGGCCAGCAGAAGAAGGACGGCCGTACGCTATCAAGCAC
 188 F R W S A P A S K R Y G G F M K S W D
 1381 TTCCGCTGGAGCGCGCCGCCAGCAAGCGCTACGGAGGCTTCATGAAGTCTGGGAC
 308 E R S Q K P L L T L F K N V I N K D G Q
 1441 GAGCGCAGCCAGAAGCCGCTGCTACTCTCTTAAGAAGCTATCAACAAGGACGGACAG
 228 Q K K D Q *
 1501 CAGAAGAAAGATCAGTAgctggcctgaggaagagggatggggagatggaaggggaagggg
 1561 tggcagagagagagagaaggaaggaagggagggagtggtgagagaagatgagagggaga
 1621 gagactgaaggagagcagtggtgtggaagcagtgaaaggtatcatgacattgaccaat
 1681 gagatttttccattgctttttgtgccctctgtggaaggggacacactgcttattctct
 1741 ccccttaactactaacagtagcacacagtagtagattgctttgtaatatgttgggggt
 1801 atcaaaaggctttgttgaccacaagcacttgttttttcaacttactccataataaca
 1861 ttgctatcaagaataaattctgaatatgttacatattgttgtgtgattgagtagtagt
 1921 agaagacgggtgaacgaggtattcaactaattttatgtgactatactgtaaaattaat
 1981 tatatgtgaaacataaaataaatttatcgcgaagcaaaaaaaaaaaaaaaaa

图 1 刀鲚 POMC cDNA 序列和推测的氨基酸序列
 全长 2030 bp, 编码区 699 bp, 推测编码 232 个氨基酸。5'非
 编码区 819 bp, 3'非编码区 513 bp。大写字母是下方核苷酸
 序列对应的氨基酸序列, 方框内的分别是起始密码子(ATG),
 终止密码子(TAG), (ATTTA) motif 用单下划线标出,

polyadenylation signal (AATAAA)双下划线标出。
 Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid
 sequences of *C. nasus* POMC

The full-length cDNA of *C. nasus* POMC is 2030 bp long and
 contains a 699 bp ORF that encodes a protein comprising 232
 amino acids. 5'-UTR and 3'-UTR are 819 bp and 513 bp re-
 spectively. Capital letters above the nucleotide sequences indi-
 cate the corresponding amino acid sequence. Start codon: ATG;
 Stop codon: TGA. The motif associated with mRNA instability
 (ATTTA) is under lined, and poly(A) signal sequence
 (AATAAA) is under double lined.

2.2 POMC 的同源性分析

由 NCBI 获得其他相关物种的 POMC 蛋白序

列(表 2)。进化树分析结果显示(图 2), 哺乳类
 POMC 聚为一个大类, 鱼类聚为另一个大类。鱼
 类中, 齐口裂腹鱼、鲤、稀有鮎鲫、斑马鱼、墨
 西哥脂鲤的亲缘关系较近, 这些鱼类主要生活在
 淡水中。而大西洋鲱、刀鲚、大西洋鲑、金头鲷、
 双色鲷、欧洲鳗鲡、雀鳝的亲缘关系较近, 这些
 鱼类大多具有洄游习性。本研究克隆到的基因在
 鱼类 POMC 类别中, 与大西洋鲱的 POMC 关系最近,
 进一步证明所克隆到的是刀鲚 POMC 基因。

表 2 其他物种 POMC 蛋白序列的 NCBI 登录号
 Tab. 2 GenBank accession numbers of POMC
 used in this study

物种 species	登录号 accession no.
智人 <i>Homo sapiens</i>	NP_000930.1
匙吻鲟 <i>Pan troglodytes</i>	XP_003309010.1
猕猴 <i>Macaca mulatta</i>	XP_001082999.1
鲤 <i>Canis familiaris</i>	XP_849463.3
牛 <i>Bos taurus</i>	NP_776576.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_001265512.1
黑猩猩 <i>Rattus norvegicus</i>	NP_647542.1
鸡 <i>Gallus gallus</i>	NP_001026269.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_852103.1
非洲蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	NP_001011318.1
大西洋鲱 <i>Clupea harengus</i>	XP_012692182.1
欧洲鳗鲡 <i>Anguilla anguilla</i>	AGC24763.1
齐口裂腹鱼 <i>Schizothorax prenanti</i>	AFT92021.1
稀有鮎鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	ACV72064.1
墨西哥脂鲤 <i>Astyanax mexicanus</i>	XP_007244740.1
雀鳝 <i>Lepisosteus oculatus</i>	XP_006626112.1
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	NP_001185505.1
大鼠 <i>Sparus aurata</i>	AEI28996.1
双色鲷 <i>Stegastes partitus</i>	XP_008288924.1
高首鲟 A <i>Acipenser transmontanus</i> A	AAD55816
高首鲟 B <i>A. transmontanus</i> B	AAD17806
匙吻鲟 A <i>Polyodon spathula</i> A	AAD41263
匙吻鲟 B <i>P. spathula</i> B	AAD41264
鲤 A <i>Cyprinus carpio</i> A	CAA74968
鲤 B <i>C. carpio</i> B	CAA74967
大西洋鲑 A1 <i>Salmo salar</i> A1	NP_001185504
大西洋鲑 A2 <i>S. salar</i> A2	NP_001185505
犀角金线鲃 A <i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i> A	XP_016424333
犀角金线鲃 B <i>S. rhinoceros</i> B	XP_016400131
金线鲃 A <i>Sinocyclocheilus grahami</i> A	XP_016137818
金线鲃 B <i>Sinocyclocheilus grahami</i> B	XP_016140446

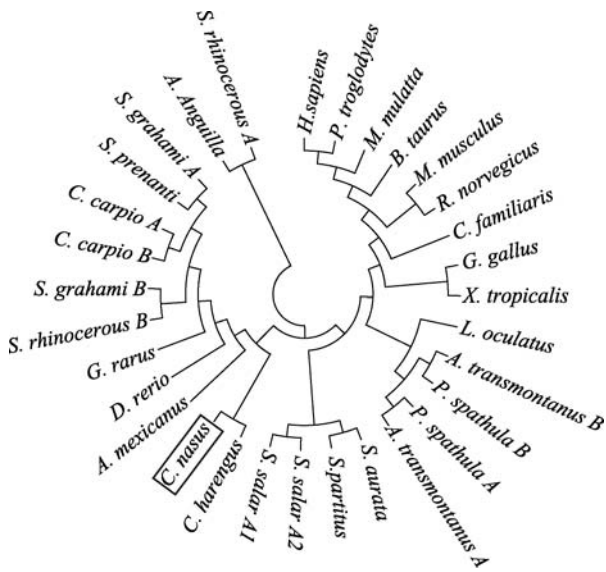


图 2 POMC 的进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of POMC sequences

A. anguilla: 欧洲鳗鲡; *A. mexicanus*: 墨西哥脂鲤; *A. transmontanus*: 高首鲟; *B. taurus*: 牛; *C. carpio*: 鲤; *C. familiaris*: 家犬; *C. harengus*: 大西洋鲱; *C. nasus*: 刀鲚; *D. rerio*: 斑马鱼; *G. gallus*: 鸡; *G. rarus*: 稀有鲟; *H. sapiens*: 人; *L. oculatus*: 雀鳝; *M. mulatta*: 猕猴; *M. musculus*: 小鼠; *P. spathula*: 匙吻鲟; *P. troglodytes*: 黑猩猩; *R. norvegicus*: 大鼠; *S. aurata*: 金头鲷; *S. grahami*: 金线鲃; *S. partitus*: 双色鲷; *S. prenanti*: 齐口裂腹鱼; *S. rhinocerosus*: 犀角金线鲃; *S. salar*: 大西洋鲑; *X. tropicalis*: 非洲爪蟾。

为了进一步明确以上两大类鱼类的 POMC 的异同, 分析了鱼类 POMC 的氨基酸序列的相似性及二级结构。刀鲚的 POMC 与其他鱼类的结构类似, 包括信号肽(signal peptide)、N 末端区(N-terminal region, NPP)、促肾上腺皮质激素结构域(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、 β -脂解素(β -LPH)、 α -促黑素(α -MSH)、促肾上腺皮质激素样垂体中叶多肽(CLIP)、 γ -脂解素(γ -LPH)、 β -促黑素(β -MSH)和 β -内啡肽(β -EP)(图 3)。与其他鱼类相似 POMC 不具备 γ -促黑素(γ -MSH)、连接区(JP)及部分 γ -脂解素(γ -LPH)。

2.3 刀鲚 POMC 基因转录表达分析

采用荧光定量的方法, 检测了 POMC 基因在刀鲚鳃、脑、肝、脾、肠、头肾、肾、心脏、肌肉、卵巢、精巢组织中的表达。结果显示, POMC 在健康刀鲚的脑高表达, 鳃、肾、精巢相对高表达, 肝、脾、肠、头肾、肌肉和卵巢中微量表达(图 4a)。

运输胁迫过程中, 相对于对照(B0), 拉网应激(0 h), 运输应激(2 h、4 h、6 h)POMC 基因的表达量显著下降($P < 0.05$); 10‰ NaCl 组 4 h 和 6 h POMC 基因的表达量显著上调($P < 0.05$), 6 h 的表达量恢复至应激前(图 4b)。

3 讨论

3.1 刀鲚 POMC 的序列分析

POMC 氨基酸序列聚类分析结果显示哺乳类 POMC 聚为一类, 鱼类 POMC 聚为另一大类, 而且分为洄游鱼类和非洄游鱼类两大类。为了分析这个差异主要分布在哪些结构域, 我们对鱼类的 POMC 氨基酸序列做了多重比对, 比对结果显示, 鱼类 POMC 的 α -MSH、CLIP、 β -MSH 和 β -EP 结构域保守性较高, 而信号肽、NPP 和 γ -LPH 结构域的保守性较低。分析这些非保守区, 发现 γ -LPH 结构域的多个氨基酸位点(图 3 中“*”所示)在洄游和非洄游鱼类中表现出差异。这些差异主要表现为非洄游鱼类(齐口裂腹鱼、鲤、稀有鲟、斑马鱼)这些位点高度一致, 而洄游鱼类的这些位点中则表现为丰富的多样性, 且与非洄游鱼类的氨基酸不同。为何洄游与非洄游鱼类在 POMC γ -LPH 结构域表现出如此差异, 这是一个值得探讨的问题。据报道, γ -LPH 具有促进脂肪分解, 调控能量平衡的功能^[21]。洄游鱼类相对于非洄游鱼类来说, 最突出的一个特点就是洄游鱼类要经历一定距离的洄游, 而洄游过程中必然要消耗不同程度的能量。根据前期的野外调查^[22], 发现刀鲚在海里育肥, 洄游前体内积累大量脂肪, 洄游过程中则很少进食, 这种长距离洄游很少进食就意味着必须动用机体本身储存的脂肪, 以提供洄游过程的能量需求。而非洄游鱼类则不必经历这种洄游过程, 一般在非极端环境下(如饥饿)不会大量动员体内脂肪。因此, 从这个角度讲, 非洄游鱼类的 γ -LPH 结构域要相对保守, 而洄游鱼类根据洄游距离的不同, 洄游习性的不同(如洄游过程是否进食)可能对脂肪代谢的程度不同, 因此表现出多样性。综上所述, 洄游和非洄游鱼类 γ -LPH 结构域的差异氨基酸位点很可能是脂肪代谢相关的重要候选位点, 值得后续深入研究。

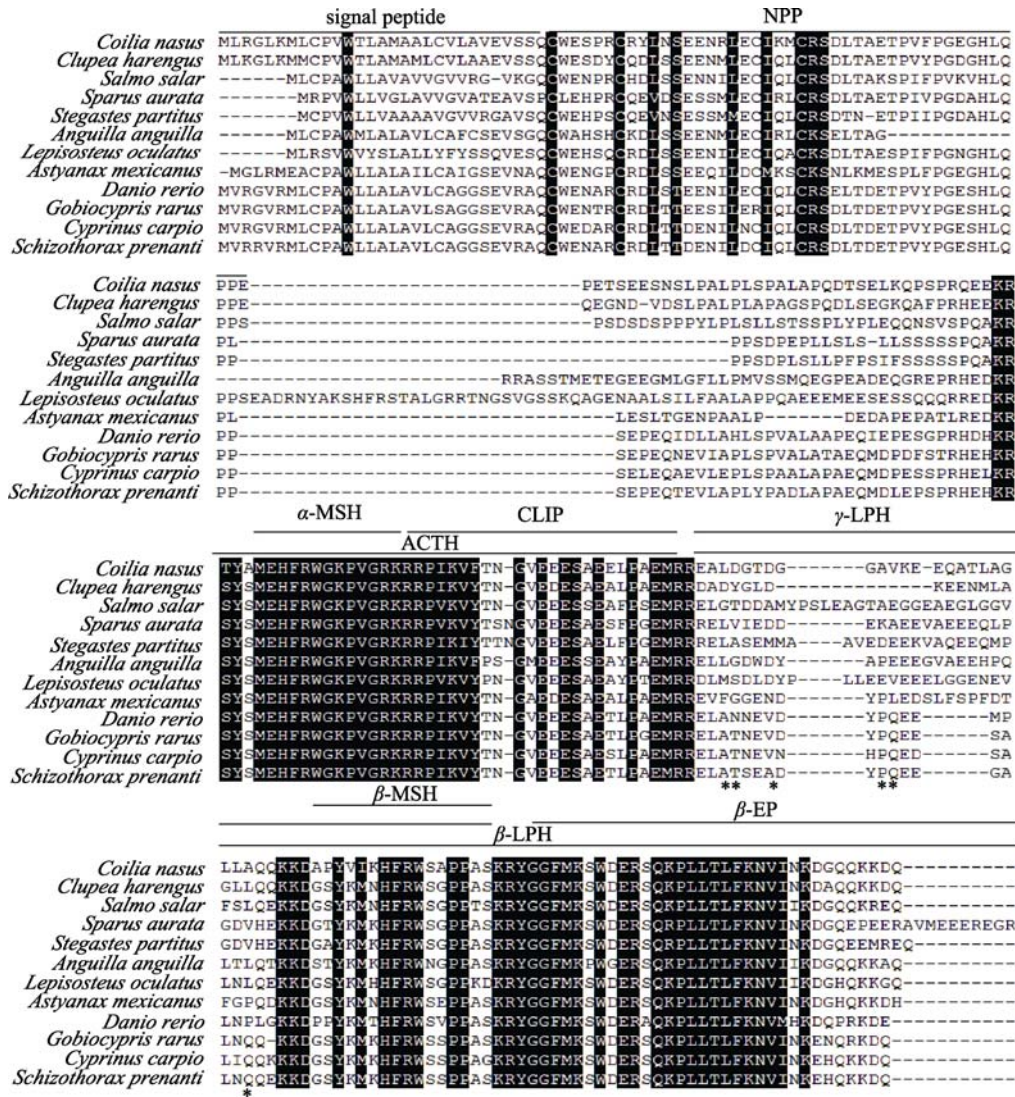


图 3 刀鲚 POMC 和其他鱼类 POMC 氨基酸序列的多重比对

Fig. 3 Alignment of the deduced amino acid sequences of *C. nasus* POMC and other reported fish POMC sequences
Anguilla anguilla: 欧洲鳗鲡; *Astyanax mexicanus*: 墨西哥脂鲤; *Clupea harengus*: 大西洋鲱; *Coilia nasus*: 刀鲚;
Cyprinus carpio: 鲤; *Danio rerio*: 斑马鱼; *Gobiocypris rarus*: 稀有鮡鲫; *Lepisosteus oculatus*: 雀鲷; *Salmo salar*:
大西洋鲑; *Schizothorax prenanti*: 齐口裂腹鱼; *Sparus aurata*: 金头鲷; *Stegastes partitus*: 双色鲷.

3.2 刀鲚 POMC 的应答调控

刀鲚 POMC 在脑组织的表达量最高, 脑组织是该基因发挥功能的重要区域, 该结果与其他鱼类的结果相一致^[23-26]。运输胁迫过程中, 我们检测了脑组织中 POMC 的表达变化。结果显示刀鲚的 POMC 相对表达量下降超过 50, 并且一直维持在低表达水平。刀鲚应激反应强烈, 在日常拉网、运输过程中极易造成死亡。针对这种应激死亡的机理, 已经开展了一些研究^[27-29]。研究结果表明, 应激反应会消耗大量能量, 机体会调动糖类和脂类

的分解代谢, 为机体提供能量以对应激反应^[28]。研究显示, POMC 基因在脂肪分解和能量平衡中发挥重要的功能。而刀鲚 POMC 在应激反应后, 表达量显著下降, 并维持在低表达水平, 不利于脂类的分解代谢及能量平衡^[12,15,18], 这可能是刀鲚应激反应强烈且容易致死的重要原因。

经过前期的不断探索, 徐钢春等^[30]发现 10% 的 NaCl 可以显著降低刀鲚的运输死亡率。但是, NaCl 是通过什么途径来缓解刀鲚应激反应强度的, 目前并不清楚。POMC 可以调控能量平衡,

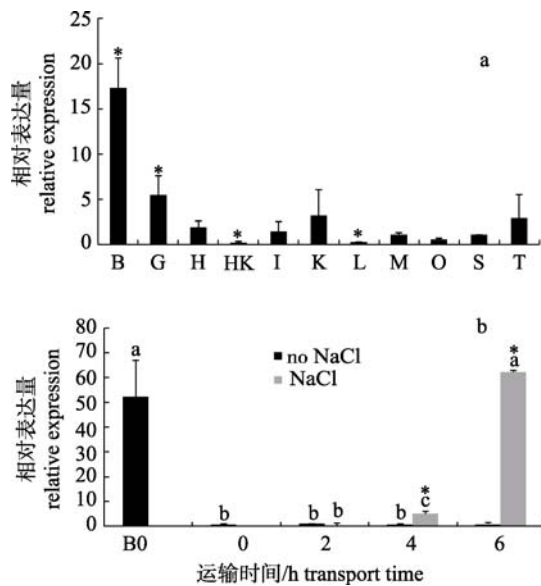


图 4 刀鲚 *POMC* 基因的表达分析

(a) *POMC* 在刀鲚不同组织的表达情况。*代表差异显著 ($P < 0.05$)。B: 脑, G: 鳃, H: 心脏, HK: 头肾, I: 肠, K: 肾, L: 肝, M: 肌肉, O: 卵巢, S: 脾, T: 精巢。(b) 运输胁迫条件下, 正常组及加盐组的 *POMC* 应答模式。“*”代表相同时间点不同组差异显著 ($P < 0.05$)。a、b、c 代表不同时间点同组内差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 Analysis of *POMC* expression of *Coilia nasus* (a) RT-qPCR analysis of the expression profiles of *POMC* in different tissues. Data were expressed as the ratio of *POMC* mRNA expression in the tissue to its expression in the spleen ($\bar{x} \pm SD$). “*” indicates significant difference ($P < 0.05$); B, brain; G, gill; H, heart; HK, head kidney; I, intestine; K, kidney; L, liver; M, muscle; O, ovary; S, spleen; T, testis. (b) Under the transport stress conditions, *POMC* response profiles in the control and salt group. “*” indicates significant difference between the two groups at the same time point ($P < 0.05$). a, b, and c indicate significant difference among different time points in the same group ($P < 0.05$).

而且在刀鲚应激状态下的表达受到显著抑制, 那么 NaCl 条件下, 该基因表达是否也会发生相应的变化。结果显示, NaCl 组 4 h 和 6 h 的 *POMC* 表达量显著上升 ($P < 0.05$), 而且 6 h 的表达量恢复至应激前水平。以上证据暗示, NaCl 很可能是通过上调 *POMC* 基因的表达, 进而加强脂类分解代谢, 为机体提供抵抗应激反应所需的能量, 从而缓解应激反应。但是, *POMC* 基因表达变化是应激强度变化的结果, 还是其原因, 这需要后续更为系统的研究。

综上所述, 本研究获得了刀鲚 *POMC* 基因的 cDNA 全长序列, 并对其序列特征进行了系统分

析, 推测了洄游和非洄游鱼类在 γ -LPH 结构域差异的原因。研究了该基因在不同组织中的表达模式及在应激及应激缓解条件下的应答模式, 以上结果表明刀鲚 *POMC* 基因是脂肪代谢和应激调控中的重要基因, 可能是以上生物学过程中的潜在靶标基因, 值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Yuan C M, Lin J B, Qin A L, et al. The taxonomy history and current situation of fishes on Chinese Coilia and talking several realizations of reconstruction old taxonomy of fishes [J]. Journal of Nanjing University: Natural Sciences, 1976 (2): 1–12. [袁传宓, 林金榜, 秦安龄, 等. 关于我国鲚属鱼类分类的历史和现状[J]. 南京大学学报: 自然科学版, 1976 (2): 1–12.]
- [2] Whitehead P J P. Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. Part 1-Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae. Rome: United Nations Development Programme[Z]. FAO Species Catalogue, 1985(7): 470–474.
- [3] Shi D, Gong D. Strategies of resource conservation for *Coilia ectenes* in the Yangtze Estuary[J]. Mar Sci, 2003, 25: 96–97.
- [4] Du F K, Nie Z J, Xu G C, et al. Cloning and tissue expression of the *MSTN* gene in *Coilia nasus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(4): 684–692. [杜富宽, 聂志娟, 徐钢春, 等. 刀鲚 *MSTN* 基因的克隆及其组织表达[J]. 中国水产科学, 2014, 21(4): 684–692.]
- [5] Gao J W, Du F K, Gu R B, et al. Effect of transport stress on physiological-biochemical indices and expression of HPI genes and roles of glycyrrhizia on transport response in *Coilia nasus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(6): 817–825. [高金伟, 杜富宽, 顾若波, 等. 运输应激对刀鲚生理生化指标和 HPI 轴基因表达影响及甘草甜素的作用[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(6): 817–825.]
- [6] Takahashi A, Kobayashi Y, Mizusawa K. The pituitary-interrenal axis of fish: a review focusing on the lamprey and flounder[J]. Gen Comp Endocrinol, 2013, 188: 54–59.
- [7] Cerdá-Reverter J M, Agulleiro M J, Guillot R R, et al. Fish melanocortin system[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 660(1): 53–60.
- [8] Alsop D, Vijayan M M. Molecular programming of the corticosteroid stress axis during zebrafish development[J]. Comp Biochem Physiol A–Mol Integr Physiol, 2009, 153(1): 49–54.
- [9] Cerritelli S, Hirschberg S, Hill R, et al. Activation of Brainstem Pro-opiomelanocortin neurons produces opioidergic analgesia, bradycardia and bradypnoea[J]. PLoS ONE, 2016, 11(4): e0153187.
- [10] Raffan E, Dennis R J, O'Donovan C J. A Deletion in the

- canine POMC gene is associated with weight and appetite in obesity-prone labrador retriever dogs[J]. *Cell Metab*, 2016, 23(5): 893–900.
- [11] Loram L C, Culp M E, Connolly-Strong E C. Melanocortin peptides: potential targets in systemic lupus erythematosus[J]. *Inflammation*, 2015, 38(1): 260–271.
- [12] Pritchard L E, Tumbull A V, White A. Proopiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signaling and obesity[J]. *J Endocrinol*, 2002, 172: 114–121.
- [13] Raffin-Sanson M L, Keyzer Y, Bertagna X. Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions[J]. *Eur J Endocrinol*, 2003, 149(2): 79–90.
- [14] Arends R J, Vermeer H, Martens G J, et al. Cloning and expression of two proopiomelanocortin mRNAs in the common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1998, 143(1–2): 23–31.
- [15] Karsi A, Waldbieser G C, Small B C, et al. Molecular cloning of proopiomelanocortin cDNA and multi-tissue mRNA expression in channel catfish[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2004, 137(3): 312–321.
- [16] Alrubaian J, Danielson P, Fitzpatrick M, et al. Cloning of a second proopiomelanocortin cDNA from the pituitary of the sturgeon, *Acipenser transmontanus*[J]. *Peptides*, 1999, 20(4): 431–436.
- [17] Lee J, Danielson P, Sollars C, et al. Cloning of a neoteleost (*Oreochromis mossambicus*) Proopiomelanocortin (*POMC*) cDNA reveals a deletion of the gamma melanotropin region and most of the joining peptide region: implications for *POMC* processing[J]. *Peptides*, 1999, 20(12): 1391–1399.
- [18] Dores R M, Smith T R, Rubin D A, et al. Deciphering post-translational processing events in the pituitary of a neopterygian fish: cloning of a gar proopiomelanocortin cDNA[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1997, 107(3): 401–413.
- [19] Salbert G, Chauveau, Bonnee G, et al. One of the two trout proopiomelanocortin messenger mRNAs potentially encodes new peptides[J]. *Mol Endocrinol*, 1992, 6(10): 1605–1613.
- [20] Wei P. Progress of *POMC* gene expression and regulation in pituitary [J]. *Foreign Medical Sciences: Section of Endocrinology*, 2001, 21(1): 39–41. [魏平. 垂体内 POMC 基因表达调控研究进展[J]. 国外医学内分泌学分册, 2001, 21(1): 39–41.]
- [21] Crine P, Gianoulakis C, Seidah N G, et al. Biosynthesis of beta-endorphin from beta-lipotropin and a larger molecular weight precursor in rat pars intermedia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75(10): 4719–4723.
- [22] Wei G L, Xu G C, Gu R B, et al. Biology and artificial breeding progress in *Coilia nasus*[J]. *Journal of Yangtze University: Natural Science Edition*, 2012, 9(7): 31–35. [魏广莲, 徐钢春, 顾若波, 等. 刀鲚的生物学及人工养殖研究进展[J]. 长江大学学报, 2012, 9(7): 31–35.]
- [23] Pritchard L E, Tumbull A V, White A. Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity[J]. *J Endocrinol*, 2002, 172: 411–421.
- [24] Ding W D, Cao Z M, Cao L P. Molecular cloning of propiomelanocortin cDNA and multi-tissue mRNA expression in *Parasilurus asotus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18 (5): 1000–1010. [丁炜东, 曹哲明, 曹丽萍. 鲢 *POMC* cDNA 的克隆与表达分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1000–1010.]
- [25] Shi X Y, Xu Y J, Wu N N, et al. Preliminary studies on blind-side hypermelanosis of *Cynoglossus semilaevis*: chromatophores observation and expression of proopiomelanocortin[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 45–54. [史学营, 徐永江, 武宁宁, 等. 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)体表色素细胞观察及 *POMC* 表达特性分析[J]. 渔业科学进展, 2015, 36(2): 45–54.]
- [26] Li C J, Zhou L, Yao B, et al. Differential analysis of expressed sequence tags from SMART cDNA plasmid libraries of the orangespotted grouper (*Epinephelus coioides*) at two different gonadal development stages[J]. *Zoological Research*, 2007, 28(3): 279–285. [李创举, 周莉, 姚波, 等. 处于性腺不同发育阶段斜带石斑鱼垂体的 EST 表达差异分析[J]. 动物学研究, 2007, 28(3): 279–285.]
- [27] Wang Y, Lu D Q, Li W P, et al. The effect of acute handling stress on the stress-related neuroendocrine factor in *Coilia nasus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(6): 803–812. [王宇, 卢丹琪, 李伟萍, 等. 急性操作胁迫对刀鲚应激反应相关神经内分泌因子的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(6): 803–812.]
- [28] Du F K, Xu G C, Nie Z J, et al. Transcriptome analysis gene expression in the liver of *Coilia nasus* during the stress response[J]. *BMC Genom*, 2014, 15: 558.
- [29] Du, F K, Xu G C, Gao J W, et al. Transport-induced changes in hypothalamic–pituitary–interrenal axis gene expression and oxidative stress responses in *Coilia nasus*[J]. *Aquac Res*, 2016, 47: 3599–3607.
- [30] Xu G C, Du F K, Nie Z J, et al. Effects of 10‰ salinity to the plasma osmotic pressure, cortisol, glucose and liver glycogen in *Coilia nasus* stressed during loading and transportation[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 66–72. [徐钢春, 杜富宽, 聂志娟. 10‰盐度对长江刀鲚幼鱼装载和运输胁迫中应激指标的影响[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 66–72.]

Cloning of *POMC* cDNA and the stress response in *Coilia nasus*

DU Fukuan^{1,2}, XU Gangchun², LI Yan², LIAN Qingping¹, XU Pao²

1. Key Laboratory of Healthy and Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Freshwater Aquaculture Genetic and Breeding of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China;
2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: The estuarine tapertail anchovy (*Coilia nasus*, junior synonym *C. ectenes*) is widely distributed in the Yangtze River, the coastal waters of China and Korea, and the Ariake Sound of Japan. It is a commercially important species because of its nutritive value and popularity. However, excess fishing and changes in aquatic ecology have almost caused extinction of this species in the middle reaches of the Yangtze River. In recent years, several studies have been performed on pond breeding and artificial propagation, and larval rearing techniques have been established. Thus, the threat to *C. nasus* resources has been alleviated. However, *C. nasus* is very sensitive to stress, which often results in death and huge economic losses. Little is known about the mechanism by which loading stress causes death in fish. Pro-opiomelanocortin (POMC) is synthesized in the corticotrophs and melanotrophs of the anterior and intermediate lobes of the pituitary, respectively, as well as in peptidergic neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus. It is post-translationally cleaved into peptide hormones, including adrenocorticotrophic hormone, β -endorphin, α -, β -, and γ -melanocyte stimulating hormone (MSH), N-POMC, and β -lipotropin (β -LPH) in tissue- and cell dependent manners. These peptides exhibit different physiological functions, such as promoting ovarian maturation, lipolysis, inhibiting fat accumulation, regulating osmotic pressure, and reacting to stressors. We cloned the *POMC* gene in *C. nasus* and determined that the full-length cDNA is 1212 bp long, with a 699 bp open reading frame that encoded a 232 amino acid protein. The POMC protein is predicted to contain the typical POMC domains of a signal peptide sequence, the N-terminal region, and the adrenocorticotrophic hormone, β -LPH, α -MSH, CLIP, γ -LPH, β -MSH, and β -EP domains. Gene expression patterns were detected in different tissues by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *POMC* was expressed strongly in the brain and relatively highly in the gill, kidney, and testis, whereas it was expressed at low levels in the liver, spleen, intestine, head kidney, muscle, and ovary. *POMC* was significantly down regulated after transport stress ($P < 0.05$) and was significantly up regulated 4 h and 6 h after transport ($P < 0.05$) in the 10‰ NaCl group ($P < 0.05$). Moreover, *POMC* expression returned to the control level before stress. The *POMC* gene plays an important role regulating fat metabolism and stress. Our results provide important clues for breeding and stress control studies in *C. nasus*.

Key words: *Coilia nasus*; *POMC* gene; stress response; transport stress

Corresponding author: XU Pao. E-mail: xup13806190669@163.com

LIAN Qingping. E-mail: 82147819@qq.com