

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.19140

异齿裂腹鱼 CCK 基因的 cDNA 克隆及其摄食功能

商振达^{1,2}, 刘锁珠^{1,2}, 谭占坤^{1,2}, 商鹏^{1,3}, 王宏辉^{1,2}, 孔庆辉¹

1. 西藏农牧学院动物科学学院, 西藏 林芝 860000;
2. 西藏高原饲料加工工程研究中心, 西藏 林芝 860000;
3. 藏猪协作研究中心, 西藏 林芝 860000

摘要: 旨在研究异齿裂腹鱼(*Schizothorax o'connori*)缩胆囊素(cholecystokinin, CCK)基因的摄食功能。本研究克隆得到了异齿裂腹鱼 CCK 基因的 cDNA 全长, 通过生物信息学分析发现其属于 CCK-1 亚型。异齿裂腹鱼 CCK 的 cDNA 全长为 773 bp, 其中开放阅读框(ORF)为 372 bp, 可以编码 123 个氨基酸。异齿裂腹鱼 CCK 由 1 个信号肽和 1 个典型的 CCK-8 肽保守结构域组成, 为亲水性蛋白, 但没有跨膜结构。运用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测异齿裂腹鱼 CCK 基因在组织中的分布情况, 以及餐前餐后和禁食复喂对其表达量的影响。结果表明, 异齿裂腹鱼 CCK 在各组织中均有表达, 其中在脑中表达量最高, 在肠道、心脏、肝、脾、肾、皮肤、鳃、眼和鳔中表达量相对较高, 在肌肉中表达量最低。餐后 CCK 基因的表达量显著升高, 禁食使异齿裂腹鱼 CCK 基因的表达量显著下降, 而复喂使 CCK 基因的表达量显著上升, 表明 CCK 基因既是异齿裂腹鱼的餐后饱感信号因子, 又是长期调控摄食因子。本研究为异齿裂腹鱼的人工饲养和品种保护等提供了理论依据。

关键词: CCK 基因; 异齿裂腹鱼; 分子克隆; 组织分布; 摄食功能调节

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)05-0834-10

异齿裂腹鱼(*Schizothorax o'connori*)又称异齿弓鱼, 地方名棒棒鱼, 隶属于鲤形目(Cypriniformes), 鲤科(Cyprinidae), 裂腹鱼属, 主要分布于雅鲁藏布江的干支流和其附属水体中, 是青藏高原特有的经济鱼种和土著鱼种之一, 对高原河流生态平衡具有重要的保护作用。异齿裂腹鱼性成熟晚、生长缓慢, 多生活于水质清新、砾石底质的河道, 以着生藻类为食^[1]。近年来, 随着进藏开发的人员越来越多, 捕捞强度逐渐增加; 加之当地藏民的放生习俗, 使雅鲁藏布江中的入侵种自然成群, 与土著鱼竞争食物, 这些都导致异齿裂腹鱼的数量逐渐减少, 因此开发异齿裂腹鱼人工养殖技术对其种群数量保护具有重要意义。

缩胆囊素(cholecystokinin, CCK)是一种由 115

个氨基酸组成的^[2], 以 CCK-4 等多种大分子形式存在于小肠黏膜、脑和周围神经组织中^[3-4], 可以使胆囊收缩的脑肠肽-胃肠肽物质^[5]。缩胆囊素具有广泛的生物活性, 主要包括调节摄食^[6](CCK 可以降低摄食量, 减短摄食时间、增加饱感)、促进胰腺分泌^[7](CCK 可以刺激胰腺分泌胰酶, 增强胰酶的活性)、促进胆囊收缩^[8]、调节胃肠道运动^[9](CCK 可以使休息状态下的胃肠道收缩)等多种功能。

所有鱼类都需要通过摄食来为个体的生长发育等活动提供物质基础^[10]。但目前, 对西藏土著鱼类摄食调控的研究大部分集中于环境因素^[11]、营养成分^[12]和消化吸收^[13]等因素对摄食的影响, 从分子水平对西藏土著鱼类摄食调控的研究还较少。因此, 本研究以异齿裂腹鱼为对象, 通过

收稿日期: 2019-05-08; 修订日期: 2019-06-18.

基金项目: 西藏自治区厅校联合基金项目(XZ2017ZRG-12(Z)); 西藏高原饲料加工工程研究中心项目(XZJYT2018GCZX); 中央财政支持地方高校发展专项资金项目(ZZXT2019-02).

作者简介: 商振达(1988-), 男, 硕士研究生, 从事高原动物营养与饲料加工研究. E-mail: 446809464@qq.com

通信作者: 孔庆辉, 助教, 从事高原动物适应生理学研究. E-mail: 770337011@qq.com

RT-PCR 和 RACE 技术克隆了异齿裂腹鱼 CCK 基因全长, 并通过 Real-time PCR 技术分析了 CCK 基因在心脏、肝、肌肉、脑、眼、肾、肠道、鳃、皮肤、鳔和脾中的表达水平, 以及投喂、禁食和复喂对 CCK 基因表达量的影响, 为进一步从分子水平研究西藏土著鱼由缩胆囊素介导的摄食调控奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用鱼 体重(1.25±0.14) kg 的健康异齿裂腹鱼共 60 尾, 采集于西藏雅鲁藏布江二级支流-巴河, 装入鱼用氧气袋运回实验室, 放入经过清洗消毒处理的养鱼缸中暂养。

1.1.2 实验试剂 组织总 RNA 提取试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品, RNA PCRTM Kit Ver.3.0 反转录试剂盒、SYBR[®] Premix Ex TaqTM 荧光定量试剂盒和 LA Taq (TaKaRa DRR02AG) 均为大连宝生物工程公司产品, M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒(B532435)、Marker (BBI B600032)、6×DNA Loading Dye、柱式 DNA 胶回收试剂盒均为生工生物工程(上海)股份有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 实验设计 实验用鱼进行 3 周的暂养, 水温控制在(12.0±1.0)°C, 其中用于基因克隆、组织分布和餐前餐后研究的鱼每天投喂 1 次(13:00, 0 h),

用于禁食复喂研究的鱼, 每天投喂 2 次(10:00 和 18:00)。饲养实验结束后, 取 3 尾健康异齿裂腹鱼, 采集心脏、肝脏、肌肉、脑、眼、肾、肠道、鳃、皮肤、鳔和脾共计 11 个组织, 用于 CCK 基因全长克隆和组织分布研究; 餐前餐后实验中, 共设置 5 个处理, 分别为餐前 3 h、餐前 1 h、0 h、餐后 1 h 和餐后 3 h, 每组 3 尾鱼作为 3 个重复; 禁食复喂实验中, 共设置 6 个处理, 分别为禁食 1 d、禁食 3 d、禁食 5 d、复喂 1 d、复喂 3 d 和复喂 5 d, 每组 3 尾鱼作为 3 个重复。

1.2.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成 利用总 RNA 提取试剂盒提取异齿裂腹鱼脑、心脏、肝脏等 11 个组织的总 RNA, 使用 RNA PCRTM Kit Ver. 3.0 反转录试剂盒, 以获取的各组织样品的总 RNA 为模板, 合成 cDNA。

1.2.3 引物的设计和合成 根据 GenBank 中的齐口裂腹鱼(KJ194185)和斑马鱼(BC162428)的 CCK 基因序列, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 CCK-1F 和 CCK-1R, CCK-2F 和 CCK-2R 用于扩增 CCK 基因的核心片段, 根据所得 CCK 基因的核心片段设计 RACE 引物 CCK-3' raceF1、CCK-3' raceF2、CCK-5' raceF1、CCK-5' raceF2、5.3' outer 和 5.3' inner, 用于扩增 CCK 基因 5' 和 3' 末端序列, 根据拼接所得的 CCK 基因序列设计荧光定量引物 CCK-realF 和 CCK-realR, 用于 Real-time PCR 法检测 CCK 基因的组织分布和摄食功能, 内参基因为 GAPDH, 所有引物具体碱基序列(表 1)。引物

表 1 异齿裂腹鱼 CCK 基因克隆及功能分析引物

Tab. 1 Primers for cholecystokinin gene cloning and function analysis in *Schizothorax o'connori*

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
CCK-1F	CCACCAAAGGTACATATCGCAG	RT-PCR
CCK-1R	GATTGACATTAAAATGGGTGACTCT	RT-PCR
CCK-2F	AGTTTCTCCAGCAGTCAGCGT	RT-PCR
CCK-2R	ATCCATCCAGCCCAAGTAATCT	RT-PCR
CCK-3' raceF1	CAAATCACAGTCTGAGAGCTCGGTCTGAT	Race-PCR
CCK-3' raceF2	CTCGGTCTGATGTAAATTTGTTGTACAATGGA	Race-PCR
CCK-5' raceF1	AGATTCCAGCGTTCATGGCTTCAGGT	Race-PCR
CCK-5' raceF2	GAGAGAAAGGCAACTGCTGGTGGAGA	Race-PCR
5.3' outer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAAC	Race-PCR
5.3' inner	GCTACGTAACGGCATGACAGTG	Race-PCR
CCK-realF	GCACCCTCCAGTGGACAAC	Real-time PCR
CCK-realR	CGGCCAAAATCCATCCAGCC	Real-time PCR
GAPDHF	CCTCATCACGAGACAACGGTATGG	Real-time PCR
GAPDHR	TTGTGCTCTGTGTCATCTCCGAAC	Real-time PCR

合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2.4 CCK 基因全长序列的克隆 核心片段 PCR 扩增使用 LA Taq 聚合酶,以脑组织的 cDNA 为扩增模板,反应体系共 25 μL ,包括 2 \times GC Buffer I 12.5 μL 、上下游引物各 0.5 μL 、dNTP 4 μL 、ddH₂O 6.3 μL 、模板 1 μL 、Taq 酶 0.2 μL 。反应程序为预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,退火 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,修复延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min,33 个循环。CCK 基因 3'末端扩增利用以 3' adaptor (GCTGTC AACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT)为反转引物的 cDNA 为模板,进行巢氏 PCR 反应,第一轮以 CCK-3' raceF1 和 5.3' outer 为上下游引物进行扩增,第二轮以 CCK-3' raceF2 和 5.3' inner 为上下游引物进行扩增。CCK 基因 5'末端扩增利用以特异性引物 CCK-RT1(GCAATGATTTATTCGTAGACA)和 CCK-RT2(TAAAGTGAGGACACAAATCATA)反转得到的 cDNA 为模板,进行巢氏 PCR 反应,第一轮以 5' adaptor (GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGCCCCCCCCCCCCCCCC)和 CCK-5' raceF1 为上下游引物进行扩增,第二轮以 5.3' outer 和 CCK-5' raceF2 为上下游引物进行扩增。扩增产物经过回收、纯化后送至上海生工生物工程股份有限公司进行测序,最后将所得序列进行拼接,获得 CCK 基因的序列。

1.2.5 Real-time PCR 检测各 CCK 基因的织分布特征和对摄食功能的影响 利用大连宝生物工程公司生产的 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒进行 Real-time PCR 分析,检测 CCK 基因在各组织中的相对表达量以及餐前餐后、禁食复喂实验组中 CCK 基因在脑组织中的相对表达量。反应体系 20 μL ,包括: 2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 10 μL 、上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.6 μL 、DNA 模板 0.8 μL 、ddH₂O 8 μL 。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s、65 $^{\circ}\text{C}$ 60 s、97 $^{\circ}\text{C}$ 1 s。

1.2.6 生物信息学和数据分析 利用 Primer Premier 5.0 软件设计本实验中所用到的所有引物。利用 DNAMAN 软件和 ExPASy 程序(<http://www.expasy.ch/tools/>)分别对 CCK 基因进行碱基序列编译和蛋

白功能位点分析;利用 DNAMAN Alignment 进行氨基酸序列同源性比较;利用 MEGA 5.0 软件构建 CCK 基因序列系统发育树;利用 ProtParam 软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)检索蛋白质序列理化参数;利用 PredictPritein (<http://web.predictprotein.org>)进行蛋白质二级结构预测;荧光定量 PCR 所得数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析,基因相对表达量的实验结果通过 IBM SPSS Statistics 软件进行处理析,采用单因素方差分析(ANOVA)进行差异性检验,结果以 $P < 0.05$ 作为显著性判断标准。

2 结果与分析

2.1 异齿裂腹鱼 CCK 基因全长克隆和氨基酸序列分析

利用上游引物 CCK-1F 和下游引物 CCK-1R、上游引物 CCK-2F 和下游引物 CCK-2R 进行 PCR 扩增,分别获得 1 条 200 bp 和 1 条 300 bp 左右的条带,测序后实际大小分别为 158 bp 和 316 bp。分别以 CCK-3' raceF1 和 CCK-3' raceF2 作为 3'RACE 特异性引物,进行 3'RACE 巢氏 PCR 反应,获得 1 条 200 bp 左右的条带,测序后实际大小为 175 bp。分别以 CCK-5' raceF1 和 CCK-5' raceF2 作为 5' RACE 特异性引物,进行 5'RACE 巢氏 PCR 反应,获得 1 条 100 bp 左右的条带,测序后实际大小为 113 bp。测定序列经过拼接获得缩胆囊素(CCK)全长 cDNA 序列。

异齿裂腹鱼 CCK 全长 cDNA 为 773 bp(图 1),其中开放阅读框(ORF)为 372 bp,可以编码 123 个氨基酸。5'端非编码序列(5'-UTR)的长度为 77 bp,3'端非编码序列(3'-UTR)的长度为 324 bp,包含典型的 polyA 尾序列。起始密码子是 ATG,终止密码子是 TAA。序列分析表明,全序列中有 5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(CK-2)、2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(PCK)和 2 个色氨酸磷酸化位点(tryphosphorlation site)。预测异齿裂腹鱼中缩胆囊素(CCK)的分子式为 C₅₆₆H₉₁₀N₁₇₄O₁₉₅S₆,分子质量为 13464.86,原子总数为 10832,理论等电点为 6.06,不稳定系数为 70.14,因此推断异齿裂腹鱼缩胆囊素属于不稳定蛋白。正电荷氨基酸残基总



图 1 异齿裂腹鱼 CCK 基因全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

粗体字表示完整的开放阅读框; 灰色阴影表示酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点(CK-2); 黑色虚线框表示色氨酸磷酸化位点; 黑色框表示蛋白激酶 C 磷酸化作用位点(PKC); 红色阴影表示保守结构域, CCK-8 肽。

Fig. 1 The full-length cDNA sequences of cholecystokinin gene and the deduced amino acid sequence of *Schizothorax o'connori*. Boldface characters represent open reading frame (ORF); casein kinase II phosphorylation sites (CK-2) are shadowed in gray; Try phosphorylation sites are in black dotted boxes; protein kinase C phosphorylation sites (PKC) are in black boxes; conserved domain, the octapeptides of CCK-8 are shadowed in red.

数(Arg+Lys)为 14, 负电荷氨基酸残基总数(Asp+Glu)为 16, 疏水值为 66.67, 总平均亲水性为-0.658, 因此异齿裂腹鱼缩胆囊素归类为亲水性蛋白。

2.2 异齿裂腹鱼 CCK 基因的进化分析

利用 DNAMAN 软件中的 Alignment 程序, 进行不同物种 CCK 序列同源性的比对。结果表明, 异齿裂腹鱼 CCK 基因序列与齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)、重口裂腹鱼(*Schizothorax davidi*)、金鱼(*Carassius auratus*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、武昌鱼(*Megalobrama amblycephala*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、斑点叉尾鮰(*Ictalurus Punetaus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)、比目鱼(*Paralichthys olivaceus*)、日本青鳉(*Oryziaslatipes*)、白鲟(*Diplodus sargus*)、原鸡(*Gallus gallus*)、红耳龟(*Trachemys scripta*)、人(*Homo sapiens*)、非洲爪蛙(*Xenopus laevis*)、牛(*Bos taurus*)、小鼠(*Mus musculus*)、猪(*Sus scrofa*)的同

源性依次为 98.37%、94.31%、94.31%、90.24%、89.43%、81.30%、65.87%、61.65%、61.54%、52.21%、52.52%、50.00%、46.15%、43.85%、42.06%、39.53%、39.68%、38.10%、36.59%(表 2)。结果表明, 异齿裂腹鱼缩胆囊素与同属于裂腹鱼属的齐口裂腹鱼和重口裂腹鱼的同源性最高。与同属于鲤形目的草鱼、金鱼、武昌鱼、斑马鱼的同源性次之。

利用 Mega 5 软件中的 Phylogenetic Analysis 程序, 构建了多物种的 CCK 氨基酸序列系统发育树。由图 2 可知, 所有动物的 CCK 基因在系统发育树上聚成 2 支, 分别为硬骨鱼 1 支, 哺乳动物、两栖动物、爬行动物和鸟纲 1 支。硬骨鱼的 CCK 有 CCK-1 和 CCK-2 两个分支, 而异齿裂腹鱼 CCK 属于 CCK-1 这一分支, 因此初步判断本研究克隆得到异齿裂腹鱼的 CCK 基因可能属于 CCK-1 亚型。

表 2 异齿裂腹鱼与其他动物缩胆囊素氨基酸序列比较
 Tab. 2 Amino acid sequence homologies of cholecystokinin between *Schizothorax o'connori* and other animals

物种 species	缩胆囊素类型 CCK type	氨基酸长度 length of amino acids	登录号 genbank accession No.	一致性/% identity
齐口裂腹鱼 <i>Schizothorax prenanti</i>	CCK	123	AIE45856	98.37
重口裂腹鱼 <i>Schizothorax davidi</i>	CCK	123	AYH63707	94.31
金鱼 <i>Carassius auratus</i>	CCK	123	O93464	94.31
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	CCK	123	AFD62909	90.24
武昌鱼 <i>Megalobrama amblycephala</i>	CCK	123	AFO67944	89.43
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	CCK	123	XP_001346140	81.30
斑点叉尾鮰 <i>Ictalurus punctatus</i>	CCK	123	NP_001187454	65.87
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	CCK-L	132	CAA09907	61.65
日本鳗鲡 <i>Anguilla japonica</i>	CCK	127	BAD01500	61.54
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	CCK-1	135	BAA23734.1	52.21
日本青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	CCK	138	XP_004073921	52.52
白鲟 <i>Diplodus sargus</i>	CCK-1	137	AEU08492	50.00
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	CCK	130	NP_001001741	46.15
红耳龟 <i>Trachemys scripta</i>	CCK	130	CAA09334	43.85
人 <i>Homo sapiens</i>	CCK	115	AAA53094	42.06
非洲爪蛙 <i>Xenopus laevis</i>	CCK-2	128	CAA87639	39.53
牛 <i>Bos taurus</i>	CCK	115	AAI14185	39.68
小鼠 <i>Mus musculus</i>	CCK	115	NP_036961	38.10
猪 <i>Sus scrofa</i>	CCK	114	NP_999402	36.59

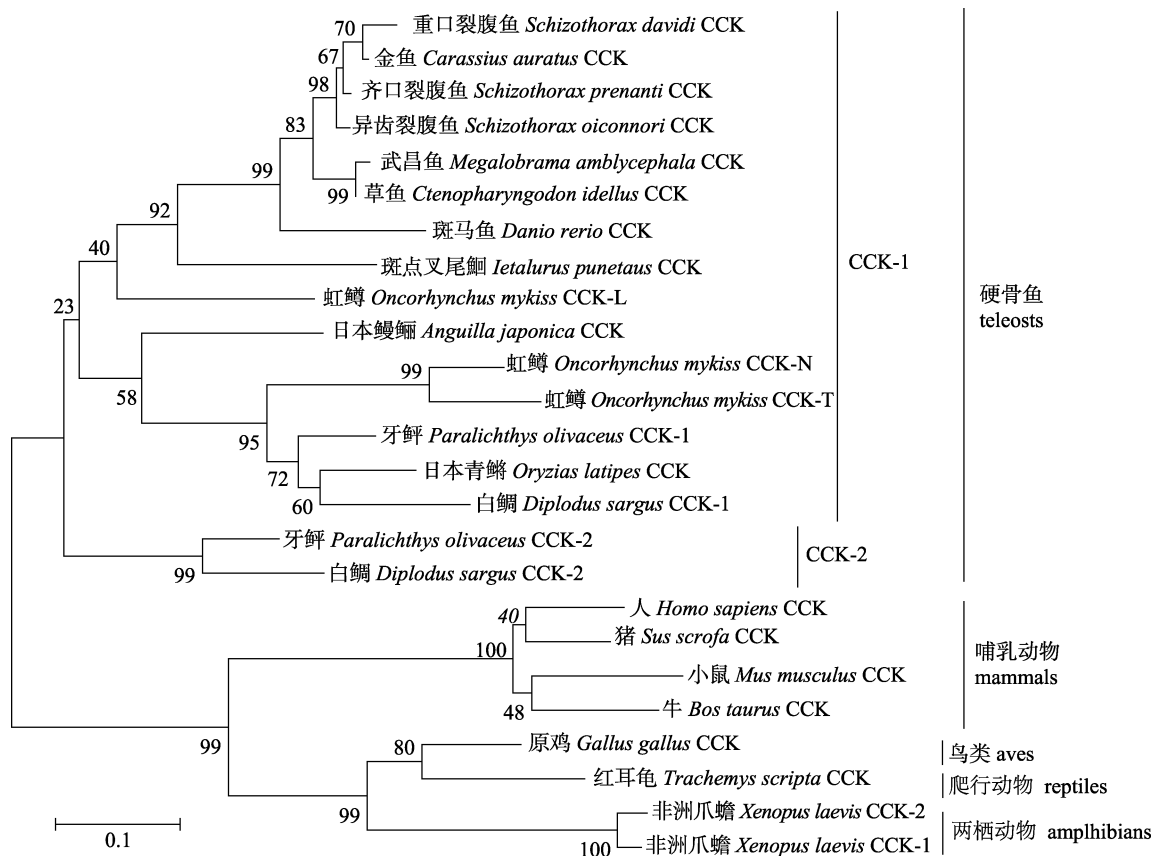


图 2 基于 CCK 氨基酸序列构建的异齿裂腹鱼及其他动物系统发育树
 节点上数据表示 1000 次重复的支持率; 比例尺表示每千碱基的替换数目。

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Schizothorax o'connori* and other animals based on cholecystokinin amino acid sequences
 Numbers at the nodes denote the bootstrap values of 1000 replicates. Scale represents the numbers of substitutions per 1000 bases.

2.3 异齿裂腹鱼 CCK 的蛋白结构分析

对 CCK 蛋白结构进行分析得到, 异齿裂腹鱼 CCK 序列包含 1 个由 21 个氨基酸残基(1~21 位氨基酸)组成的信号肽和 1 个典型的 CCK-8 肽保守结构域(104~111 位氨基酸); 利用 TMHMM 服务器分析得到异齿裂腹鱼 CCK 的蛋白结构中没有跨膜结构(图 3), 因此推测异齿裂腹鱼 CCK 不属于跨膜蛋白。利用 ProtScale 程序对 CCK 的蛋白质亲疏水性进行分析, 如图 4 所示, 该蛋白质的 4 个低分值(score<0)峰分别分布在 22~35、38~50、58~68 和 77~123 区域, 这些区域属于高亲水性。运用 PredictProtein 对 CCK 蛋白的二级结构进行预测, 分析结果显示在异齿裂腹鱼 CCK 蛋白中 H 螺旋(helix)占预测序列的 21.14%, E 折叠(sheet)占预测序列的 3.25%, L 环(loop)占预测序列的 75.61%。暴露表面>16%的残基占预测序列的 79.67%, 其他残基为 20.33%。

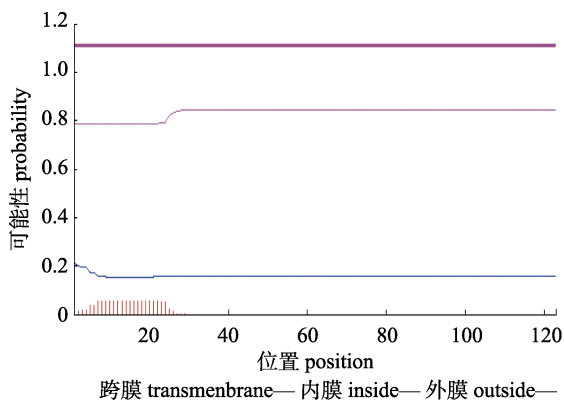


图 3 异齿裂腹鱼缩胆囊素蛋白跨膜结构

Fig. 3 Transmembrane area predicted in cholecystokinin protein from *Schizothorax o'connori*

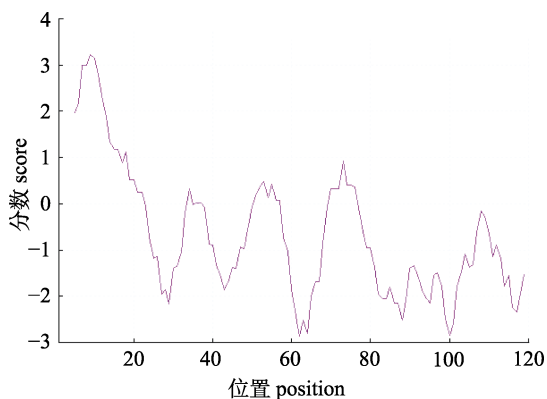


图 4 异齿裂腹鱼缩胆囊素蛋白疏水结构

Fig. 4 Hydrophobic structure predicted in cholecystokinin protein from *Schizothorax o'connori*

2.4 异齿裂腹鱼 CCK 基因的组织表达特征

通过实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)技术检测 CCK 基因在异齿裂腹鱼脑、肠道、心脏、肝、脾、肾、皮肤、鳃、眼、鳔和肌肉组织中的相对表达量。由图 5 可知, CCK 基因在异齿裂腹鱼 11 个组织中均有表达, 其中在脑组织中表达量最高, 显著高于其他组织($P<0.05$), 而在肌肉中的表达量最低, 显著低于其他组织($P<0.05$), 这与草鱼和齐口裂腹鱼中关于 CCK 基因的组织分布的研究结果相一致。以肌肉组织中的表达量作为参照, CCK 基因在脑、肠道、心脏、肝、脾、肾、皮肤、鳃、眼和鳔中的表达量分别为肌肉中表达量的 4.91、3.04、2.89、2.69、2.07、1.93、1.88、1.75、1.66 和 1.57 倍。

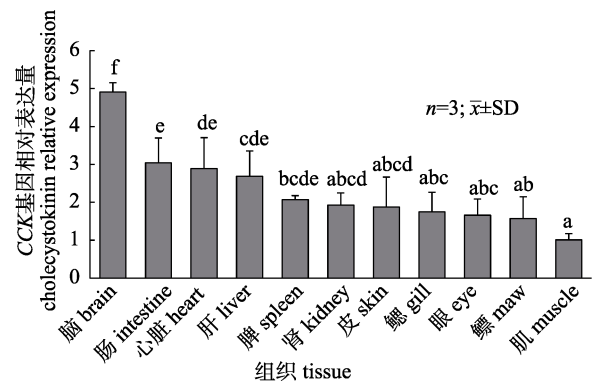


图 5 异齿裂腹鱼 CCK 基因的组织分布柱形图上方字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 5 Tissue distribution of cholecystokinin gene in *Schizothorax o'connori*

Different letters on the column indicate significant difference ($P<0.05$)

2.5 异齿裂腹鱼 CCK 基因的功能探究

2.5.1 摄食对异齿裂腹鱼 CCK 基因表达的影响

通过实时荧光定量 PCR(real-time PCR)技术检测摄食对异齿裂腹鱼 CCK 基因在脑组织中相对表达量的影响。由图 6 可知, 摄食对 CCK 基因的相对表达量有明显的影响, 在未饲喂组中, 随着饲喂时间的变化, CCK 基因的相对表达量逐渐降低, 但差异不显著($P>0.05$), 以餐前 3 h 组作为参照, 餐前 1 h、0 h、餐后 1 h 和餐后 3 h 组中 CCK 基因的表达量分别为餐前 3 h 组中表达量的 56%、52%、45%和 49%。而对饲喂组的研究表明, 摄食

使异齿裂腹鱼 *CCK* 基因的表达量显著升高 ($P<0.05$), 其中在餐后 1 h 时, 饲喂组中 *CCK* 基因的表达量为未饲喂组中表达量的 4.20 倍; 餐后 3 h 时, 饲喂组中 *CCK* 基因的表达量为未饲喂组中表达量的 4.09 倍。

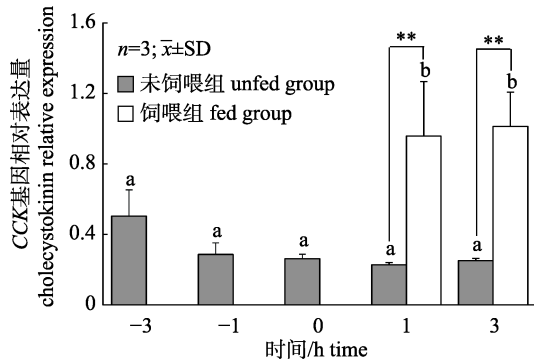


图 6 餐前餐后异齿裂腹鱼脑中 *CCK* 基因表达变化

*表示同一时间点的未饲喂组和饲喂组之间差异显著 ($P<0.05$), **表示差异极显著 ($P<0.01$).

Fig. 6 Preprandial and postprandial changes of cholecystokinin gene expression in the brain of *Schizothorax o'connori*

* represents significant difference between the fed and unfed groups at the same time point ($P<0.05$), and ** represents extremely significant difference ($P<0.01$).

2.5.2 禁食复喂对异齿裂腹鱼 *CCK* 基因表达的影响 通过实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 技术检测禁食复喂对异齿裂腹鱼 *CCK* 基因在脑组织中相对表达量的影响。由图 7 可知, 禁食复喂对 *CCK* 基因的相对表达量有明显的影响。在禁食实验中, 禁食使异齿裂腹鱼 *CCK* 基因的表达量极显著降低 ($P<0.01$)。与对照组相比, 禁食 1 d 时, 禁食组中 *CCK* 基因的表达量是对照组中表达量的 56%; 禁食 3 d 时, 禁食组中 *CCK* 基因的表达量是对照组中表达量的 69%; 禁食 5 d 时, 禁食组中 *CCK* 基因的表达量是对照组中表达量的 73%。在复喂实验中, 复喂使异齿裂腹鱼 *CCK* 基因的表达量极显著升高 ($P<0.01$), 与对照组相比, 复喂 1 d 时, 复喂组中 *CCK* 基因的表达量是对照组中表达量的 2.23 倍, 复喂 3 d 时, 复喂组中 *CCK* 基因的表达量是对照组中表达量的 2.83 倍, 复喂 5 d 时, 复喂组中 *CCK* 基因的表达量是对照组中表达量的 1.36 倍。

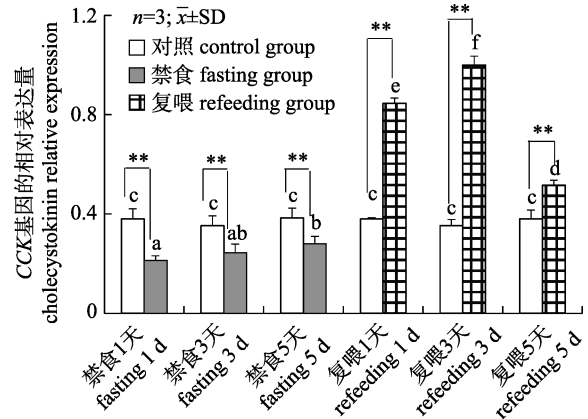


图 7 禁食和复喂对异齿裂腹鱼肝脏 *CCK* 基因表达的影响

*表示同一时间点的对照组和实验组差异显著 ($P<0.05$), **表示差异极显著 ($P<0.01$).

Fig. 7 Effects of fasting and refeeding on cholecystokinin gene expression in the liver of *Schizothorax o'connori* * and ** represent significant differences ($P<0.05$) and extremely significant differences ($P<0.01$) between the control and test groups at the same time point.

3 讨论

3.1 异齿裂腹鱼 *CCK* 序列分析

大量的研究已经证实 *CCK* 具有调节动物摄食的功能, 但物种不同其调控方式存在差异^[14-15]。本研究克隆得到异齿裂腹鱼 *CCK* 基因 cDNA 全长 773 bp, 可以编码 123 个氨基酸。其氨基酸序列包含一个由 21 个氨基酸组成的信号肽(1~21 位氨基酸)和一个典型的 *CCK* 家族的特征序列: DYLGWMDMF(104~111 位氨基酸), 这与齐口裂腹鱼^[16]、武昌鱼^[17]和草鱼^[18]等其他鱼类的研究结果相似。氨基酸同源性分析表明, 异齿裂腹鱼 *CCK* 基因与同属于硬骨鱼纲鲤形目鱼类的 *CCK* 基因序列同源性最高, 为 98.37%~81.30%; 与其他鱼类的 *CCK* 基因序列同源性较低, 为 65.87%~50.00%; 而与哺乳动物和两栖动物的同源性最低, 均低于 50.00%。异齿裂腹鱼 *CCK* 基因系统进化树分析的结果也是异齿裂腹鱼与齐口裂腹鱼、重口裂腹鱼、金鱼、草鱼、武昌鱼、斑马鱼聚在一个分支上, 亲缘关系最近, 而与哺乳动物和两栖动物亲缘关系较远。以上同源性分析和系统进化分析表明 *CCK* 基因的结构较为保守。研究还发现 *CCK* 在一些硬骨鱼中存在着 2 种或 3 种基因亚型, 如虹鳟^[19]、绿河鲶^[20]和白鲷^[21], 但本研究通过氨基酸序列同

源性分析得到, 异齿裂腹鱼的 CCK 基因与比目鱼和白鲷 CCK-1 聚在一支。因此初步判定本研究所获 CCK 基因可能属于 CCK-1 亚型。其是否还存在其他基因型, 有待进一步研究。

3.2 异齿裂腹鱼 CCK 的组织表达和摄食功能

CCK 基因在不同的动物中具有不同的组织表达特征。研究发现, CCK 作为一种脑-肠肽在部分鱼类的脑和肠道组织中均有较高表达^[22]。在本研究中, 异齿裂腹鱼 CCK 基因在脑中表达量最高, 这与草鱼^[18]、虹鳟^[19]、鲑^[23]等鱼类中的研究结果相一致, 此外, CCK 在肠道中也有较高表达, 这说明在异齿裂腹鱼中, CCK 作为一种脑-肠肽在脑和肠道组织中广泛分布, 暗示 CCK 在异齿裂腹鱼的神经系统和消化系统中可能存在着重要的生理功能。本研究还发现, CCK 基因在心脏、肝、脾、肾、皮肤、鳃、眼睛、鳔和肌肉等组织中也有表达, 但其在这些组织中的具体功能还需要做深入研究。

缩胆囊素已被证实是一种餐后饱感信号因子^[24], 有研究表明, 在金鱼中, 脑部 CCK 基因的表达量在餐后 2 h 有明显的升高, 并有持续升高的趋势^[25]; 斑点叉尾鲷大脑 CCK-a 和 CCK-b 的表达量分别在餐后 1 h 和 4 h 时有明显的增加^[26]; 而鲑摄食 3 h 后, 大脑 CCK-L 的表达量显著升高, 但 CCK-N 的表达量没有显著变化^[27]。这些研究表明, 摄食可以使 CCK 基因在脑组织中的表达量有显著性的升高, 但物种不同 CCK 基因对摄食的响应不同。因此, 本研究通过实时荧光定量技术检测餐前餐后、禁食复喂对异齿裂腹鱼 CCK 基因在脑组织中表达量的影响。研究结果显示, 异齿裂腹鱼摄食 1 h 后, 脑组织中 CCK 基因的表达量显著升高, 且随着餐后时间的增加, CCK 基因的表达量也增加。这初步说明摄食使异齿裂腹鱼脑部 CCK 基因的表达量增加, 其是异齿裂腹鱼的餐后饱感信号因子。在禁食复喂研究中, 禁食使异齿裂腹鱼脑组织中 CCK 基因的表达量显著下降, 复喂使异齿裂腹鱼脑组织中 CCK 基因的表达量显著上升, 这与草鱼^[18]、鲈^[28]和鲑^[23]等鱼类中关于禁食复喂对 CCK 基因表达量影响的研究结果相似。通常认为动物的摄食行为由摄食中枢和饱中枢控制,

下丘脑是调节食欲的基本中枢, 而外周调节信号传入食欲中枢, 经过整合信息后将复杂的信息转变为是否需要摄食的指令。其中能够参与调节指令的物质主要是中枢神经递质和脑肽。脑肽种类繁多, CCK 是其中一种具有抑制摄食功能的肽类^[29]。本研究结果表明, 异齿裂腹鱼脑中 CCK 基因在空腹状态时其表达量显著低于摄食后, 这说明异齿裂腹鱼可以通过 CCK 来调控其摄食行为。因此, 本研究推测异齿裂腹鱼脑组织中 CCK 基因可以对饱足和饥饿做出反应, 其既是异齿裂腹鱼的餐后饱感信号因子, 也是长期调控摄食因子^[29]。综上所述, 本研究初步揭示了异齿裂腹鱼 CCK 基因的生物信息学特征、组织分布以及摄食功能, 为异齿裂腹鱼的人工饲养和品种保护等提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Zhang L S. Study on the large scale artificial propagation of *Schizothorax o'connori*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2011, 41(5): 88-91, 95. [张良松. 异齿裂腹鱼人工规模化繁殖技术研究[J]. *淡水渔业*, 2011, 41(5): 88-91, 95.]
- [2] Moran T H, Kinzig K P. Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin[J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2004, 286(2): G183-G188.
- [3] Williams J A. Cholecystokinin (CCK) regulation of pancreatic acinar cells: physiological actions and signal transduction mechanisms[J]. *Comprehensive Physiology*, 2019, 9(2): 535-564.
- [4] Chaudhri O, Small C, Bloom S. Gastrointestinal hormones regulating appetite[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2006, 361(1471): 1187-1209.
- [5] Simpson K, Parker J, Plumer J, et al. CCK, PYY and PP: the control of energy balance[M]//*Handbook of Experimental Pharmacology*. Heidelberg: Springer, 2012: 209-230.
- [6] Coll A P, Farooqi I S, O'Rahilly S. The hormonal control of food intake[J]. *Cell*, 2007, 129(2): 251-262.
- [7] Plaza A, Merino B, del Olmo N, et al. The cholecystokinin receptor agonist, CCK-8, induces adiponectin production in rat white adipose tissue[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2019, 176(15): 2678-2690.
- [8] Irwin N, Frizelle P, Montgomery I A, et al. Beneficial effects of the novel cholecystokinin agonist (pGlu-Gln)-CCK-8 in mouse models of obesity/diabetes[J]. *Diabetologia*, 2012,

- 55(10): 2747-2758.
- [9] Plaza A, Merino B, Cano V, et al. Cholecystokinin is involved in triglyceride fatty acid uptake by rat adipose tissue[J]. *Journal of Endocrinology*, 2018, 236(3): 137-150.
- [10] Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake[J]. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2008, 18(2): 158-168.
- [11] Blanco S, Romo S, Villena M J. Experimental study on the diet of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) under different ecological conditions in a shallow lake[J]. *International Review of Hydrobiology*, 2004, 89: 250-262.
- [12] Quillet E, Le Guillou S, Aubin J, et al. Response of a lean muscle and a fat muscle rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) line on growth, nutrient utilization, body composition and carcass traits when fed two different diets[J]. *Aquaculture*, 2007, 269(1-4): 220-231.
- [13] Yang M. Effects of dietary acidolysis products of oxidized konjac glucomannan on intestinal digestive enzyme, intestinal microflora and intestinal mucosal immunity of *Schizothorax prenanti*[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2016. [杨敏. 氧化魔芋葡甘露聚糖酸解物对齐口裂腹鱼肠道消化酶、肠道微生物及肠黏膜免疫的影响[D]. 成都: 四川农业大学, 2016.]
- [14] Fan W, Ellacott K L J, Halatchev I G, et al. Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system[J]. *Nature Neuroscience*, 2004, 7(4): 335-336.
- [15] Irwin N, Montgomery I A, O'Harte F P M, et al. Comparison of the independent and combined metabolic effects of subchronic modulation of CCK and GIP receptor action in obesity-related diabetes[J]. *International Journal of Obesity*, 2013, 37(8): 1058-1063.
- [16] Yuan D Y, Wang T, Zhou C W, et al. Leptin and cholecystokinin in *Schizothorax prenanti*: molecular cloning, tissue expression, and mRNA expression responses to periprandial changes and fasting[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2014, 204: 13-24.
- [17] Ji W, Ping H C, Wei K J, et al. Ghrelin, neuropeptide Y (NPY) and cholecystokinin (CCK) in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*): cDNA cloning, tissue distribution and mRNA expression changes responding to fasting and refeeding[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 223: 108-119.
- [18] Feng K, Zhang G R, Wei K J, et al. Molecular characterization of cholecystokinin in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): cloning, localization, developmental profile, and effect of fasting and refeeding on expression in the brain and intestine[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2012, 38(6): 1825-1834.
- [19] Jensen H, Rourke I J, Møller M, et al. Identification and distribution of CCK-related peptides and mRNAs in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2001, 1517(2): 190-201.
- [20] Kurokawa T, Suzuki T, Hashimoto H. Identification of gastrin and multiple cholecystokinin genes in teleost[J]. *Peptides*, 2003, 24(2): 227-235.
- [21] Micale V, Campo S, D'Ascola A, et al. Cholecystokinin in white sea bream: molecular cloning, regional expression, and immunohistochemical localization in the gut after feeding and fasting[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e52428.
- [22] Johnsen A H. The phylogeny of the cholecystokinin/gastrin family[J]. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 1998, 19(2): 73-99.
- [23] Murashita K, Kurokawa T, Nilsen T O, et al. Ghrelin, cholecystokinin, and peptide YY in Atlantic salmon (*Salmo salar*): molecular cloning and tissue expression[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 160(3): 223-235.
- [24] Chaudhri O, Small C, Bloom S. Gastrointestinal hormones regulating appetite[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2006, 361(1471): 1187-1209.
- [25] Peyon P, Saied H, Lin X W, et al. Postprandial, seasonal and sexual variations in cholecystokinin gene expression in goldfish brain[J]. *Molecular Brain Research*, 1999, 74(1-2): 190-196.
- [26] Peterson B C, Waldbieser G C, Riley L G Jr, et al. Pre-and postprandial changes in orexigenic and anorexigenic factors in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 176(2): 231-239.
- [27] Valen R, Jordal A E O, Murashita K, et al. Postprandial effects on appetite-related neuropeptide expression in the brain of Atlantic salmon, *Salmo salar*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 171(3): 359-366.
- [28] MacDonald E, Volkoff H. Neuropeptide Y (NPY), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and cholecystokinin (CCK) in winter skate (*Raja ocellata*): cDNA cloning, tissue distribution and mRNA expression responses to fasting[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(2): 252-261.
- [29] Chen J. *Physiology of Domestic Animals*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015: 144-145. [陈杰. 家畜生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 144-145.]

Molecular cloning and appetite regulation of CCK in *Schizothorax o'connori*

SHANG Zhenda^{1,2}, LIU Suozhu^{1,2}, TAN Zhankun^{1,2}, SHANG Peng^{1,3}, WANG Honghui^{1,2}, KONG Qinghui¹

1. College of Animal Science, Tibet Agricultural & Animal Husbandry University, Nyingchi 860000, China;

2. Tibetan Plateau Feed Processing Research Center, Nyingchi 860000, China;

3. Tibetan Pig Collaborative Research Center, Nyingchi 860000, China

Abstract: The CCK (cholecystokinin) gene is a peptide substance which mainly distributed in the brain and intestine in a variety of macromolecules. Cholecystokinin plays an important role in the functions of regulating food intake and gastrointestinal motility, promoting pancreatic secretion and gallbladder contraction, etc. However, there are differences in the regulation modes among different species. In order to study the appetite regulation of CCK in *Schizothorax o'connori*. The cDNA full-length of the cholecystokinin gene from *Schizothorax o'connori* was cloned using RACE and RT-PCR methods, and it belonged to the CCK-1 subtype by bioinformatics analysis. The CCK mRNA levels in major tissues, before and after feeding, fasting and refeeding were detected and analyzed using quantitative real-time PCR. The results showed that the full-length cDNA of CCK gene was 773 bp, the open reading frame (ORF) was 372 bp and can encode 123 amino acids. The CCK was composed of a signal peptide and a conserved domain of the typical CCK-8 peptide, which was a hydrophilic protein but had no transmembrane structure. Sequence homologous analysis of amino acids showed that the CCK of *Schizothorax o'connori* had high homology with those of the fish belonging to Cypriniformes-teleosts, and low homology with mammals and amphibians. Tissue distribution analysis showed that the expression of CCK was highest in brain and was high in intestines, heart, liver, spleen, kidney, skin, gill, eyes, maw, while it was lowest in muscle. The CCK mRNA expression was highly elevated after feeding, and decreased after fasting and re-increased after re-feeding. The results indicated that the CCK gene was both the postprandial satiety signal and the long-term appetite regulation factor in *Schizothorax o'connori*.

Key words: CCK gene; *Schizothorax o'connori*; molecular cloning; tissue distribution; appetite regulation

Corresponding author: KONG Qinghui. E-mail: 770337011@qq.com