

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180312002

http://www.yykxjz.cn/

周朝伟, 雷骆, 邓星星, 袁登越, 杨旻珉, 曹高祥, 朱海星, 李岩, 朱成科, 李代金, 唐仁军, 张桂众, 李路宽, 郑宗林. 银鲫 *crh* 基因的克隆、组织表达谱及其对摄食的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 69–79

Zhou CW, Lei L, Deng XX, Yuan DY, Yang MM, Cao GX, Zhu HX, Li Y, Zhu CK, Li DJ, Tang RJ, Zhang GZ, Li LK, Zheng ZL. Cloning, tissue expression profiling, functional characterization of corticotropin-releasing hormone (*crh*) on feeding in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 69–79

## 银鲫 *crh* 基因的克隆、组织表达谱 及其对摄食的影响\*

周朝伟<sup>1#</sup> 雷 骆<sup>1#</sup> 邓星星<sup>1</sup> 袁登越<sup>2</sup> 杨旻珉<sup>1</sup>  
曹高祥<sup>1</sup> 朱海星<sup>1</sup> 李 岩<sup>1</sup> 朱成科<sup>1</sup> 李代金<sup>1</sup>  
唐仁军<sup>3</sup> 张桂众<sup>3</sup> 李路宽<sup>1</sup> 郑宗林<sup>1①</sup>

(1. 西南大学动物科学学院水产系 重庆 402460; 2. 内江师范学院生命科学院 内江 641100;  
3. 重庆市梁平区水产站 重庆 405200)

**摘要** 为研究 *crh* (Corticotropin-releasing hormone) 基因对鱼类摄食的调控作用, 首次克隆了银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) *crh* 基因 cDNA 全长序列。运用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术检测 *crh* 基因 mRNA 在不同组织的表达及餐前、餐后和禁食对其表达的影响。结果显示, 银鲫 *crh* 基因的 cDNA 序列全长为 920 bp, 其中, 5'-UTR 为 53 bp, 3'-UTR 为 378 bp, 开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 为 489 bp。推导银鲫 *crh* 基因的 ORF 区编码蛋白由 162 个氨基酸组成, 其中, 含有 11 个氨基酸的保守区, 24 个氨基酸的信号肽, 41 个氨基酸的成熟肽。氨基酸序列的多重比较分析显示, 银鲫 *crh* 基因与金鱼 (*Carassius auratus*) 的同源性为 99%, 与鲤 (*Cyprinus carpio*) 的同源性为 96%。荧光定量 PCR 表达分析显示, 银鲫 *crh* 基因在下丘脑中的表达量最高, 其次是端脑和心脏。*crh* 基因的表达量在餐前与餐后没有显著变化 ( $P > 0.05$ ), 在禁食第 5 天、第 7 天出现极显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而在复投喂后第 9 天、第 11 天出现极显著升高 ( $P < 0.01$ )。以上结果显示, *crh* 基因在银鲫摄食调控方面可能扮演着重要角色。

**关键词** 银鲫; *crh* 基因; RT-qPCR; 基因表达; 摄食调控

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)03-0069-11

摄食是包括进食及觅食的复杂行为 (Simpson *et al*, 2016), 能为动物提供所必需的营养物质与能量, 维持动物生长、繁殖等活动。与哺乳动物一样, 鱼类摄食调控是一个复杂过程, 由大脑神经中枢调控, 通

过接收和处理来自大脑和外周组织内分泌的因子进行调控 (Volkoff, 2016)。迄今为止, 在鱼类上克隆和鉴定了大量与摄食调控相关的因子, 如 Ghrelin (Zhou *et al*, 2014、2016)、Leptin (穆方申等, 2017)、CRH

\* 中央高校基本科研业务费专项资金 (XDJK2016C047) 资助 [This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities]. # 并列第一作者: 周朝伟, E-mail: zcwzq666@163.com; 雷 骆, E-mail: 626279300@qq.com

① 通讯作者: 郑宗林, 副教授, E-mail: zhengzonglin@126.com

收稿日期: 2018-03-12, 收修改稿日期: 2018-04-15

(Corticotropin-releasing hormone)(Wang *et al.*, 2014), CCK (Cholecystokinin) (Zhang *et al.*, 2017), NPY (Neuropeptide Y) (Han *et al.*, 2014)等, 然而, 由于种间特异性, 同一个基因在不同鱼类的摄食调控作用不尽相同(Liu *et al.*, 2014; Jonsson *et al.*, 2010; 卢荣华等, 2015; Zhang *et al.*, 2013; Michel *et al.*, 2016; Fuentes *et al.*, 2012)。CRH 是脊椎动物中一种含 41 个氨基酸的神经递质调节肽(Vale *et al.*, 1981), 具有调节神经内分泌、自主反馈应激等作用(Chrousos *et al.*, 2017)。CRH 可以影响哺乳动物的各种生理行为, 如 CRH 对应激后小鼠行为具有一定调节作用(Fuzesi *et al.*, 2016), CRH 通过刺激 POMC(Proopiomelanocortin)和 ACTH (Adreno-cortico-tropic-hormone)的分泌, 可以影响绵羊繁殖(周梅等, 2017), 还具有维持能量平衡(Rabasa *et al.*, 2016)及调控食欲(Rayatpour *et al.*, 2017)等功能。鱼类 CRH 可以影响生长发育、调节能量(王宇等, 2014)、调控摄食(Matsuda, 2013)等。就摄食调控而言, 目前已有实验探究了齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*) (Wang *et al.*, 2014)、金鱼(*Carassius auratus*) (Matsuda *et al.*, 2006) *crh* 基因对食欲的调节作用, 在其他鱼类上的研究还较为欠缺。

银鲫(*Carassius auratus gibelio*)是中国淡水养殖的重要品种之一, 营养价值高、生长速度快(方旭等, 2017), 在中国养殖范围广, 市场需求旺盛, 价格稳定, 养殖效益明显。到目前为止, 银鲫的摄食调控研究主要集中在饲料添加剂、环境调控等方面(张亚卓等, 2016; 尹子煜等, 2017), 从分子层面上对银鲫摄食影响因子与摄食调控、能量代谢之间关系的研究较少。

该研究克隆了银鲫 *crh* 基因的 cDNA 全长序列, 并进行了序列分析, 同时利用实时荧光定量 PCR 技术, 对 *crh* 基因在银鲫各组织及餐前、餐后和禁食状态下的相对表达量进行了研究, 以期通过对 *crh* 基因结构与功能的探索, 为建立合理的银鲫投饲策略和促银鲫快速生长提供参考资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及实验设计

银鲫购于重庆荣昌双河鱼技中心, 买回后放入西南大学荣昌校区实验基地 10 个鱼缸(110 cm×44 cm×44 cm), 暂养 2 周, 水温为(23.0±2.0)°C, 光照为自然光(12 h L : 12 h D), 每天 09:00 和 17:00 使用通威 2.0 饲料进行投喂, 投喂量为鱼体重的 2%, 所有实验鱼在摄食和行为上无明显差异。

用于基因克隆的银鲫平均体重为(293.5±17.5) g,

用于组织表达实验的银鲫平均体重为(316.33±11.7) g, 雌雄比例均为 1 : 1。

餐前、餐后实验。银鲫平均体重为(308.7±17.5) g, 以 17:00 为采样时间节点 0 h, 分别在餐前 3 h(-3 h)、餐前 1 h(-1 h)、餐点(0 h)、餐后 1 h(+1 h)、餐后 3 h(+3 h) 采取银鲫下丘脑组织, 餐后 1 h(+1 h), 餐后 3 h(+3 h) 分别有 1 组禁食组, 每组采样 6 个重复。

长时间禁食实验。银鲫平均体重为(458.33±20.10) g, 随机选 5 组鱼作为长时间禁食组, 5 组为正常投喂组, 分别在禁食第 1、第 3、第 5、第 7 天的 17:30 对禁食组和正常投喂组进行采样。第 9 天禁食组重新投食, 并在第 9、第 11、第 14 天的 17:30 对复投喂组及正常投喂组进行采样(每组采样 6 个重复)。

### 1.2 主要试剂

Primer Script<sup>®</sup> RT reagent kit、RNAiso Plus 试剂、pMD19-T 克隆载体、DNA Marker 和 Loading Buffer 均购于大连宝生物工程公司。SMARTer<sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司。去离子水、DNA 胶回收试剂盒、2×Taq PCR Master Mix 及 DH5 $\alpha$  感受态细胞购于天根生化科技公司。X-gal、氨苄青霉素和 IPTG 购于生工生物工程(上海)股份有限公司。Gold View 购自北京索莱宝科技公司。琼脂糖购自 AITresco 公司。

### 1.3 组织采样及 RNA 提取

*crh* 基因 cDNA 克隆使用脑组织, 组织表达实验采集了端脑、下丘脑、中脑、小脑、延脑、垂体、眼、心脏、肝脏、脾脏、前肠、中肠、后肠、头肾、中肾、红肌、白肌、皮肤、精巢及卵巢共 21 种组织样品。餐前、餐后和长时间禁食实验所取组织为下丘脑。采样时, 使用 MS-222 将实验鱼麻醉, 迅速取出所需组织, 用 0.6%生理盐水冲洗干净, 立即用滤纸吸干生理盐水, 再转移至液氮中冷冻, 最后转入-80 °C 冰箱保存备用。取出-80 °C 冻存的样品, 采用大连宝生物工程公司的 RNAiso Plus 试剂提取总 RNA, 测定其光密度(OD), 将 OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub> 在 1.8~2.0 的 RNA 置于-80 °C 备用。

### 1.4 银鲫 *crh* 基因的克隆

从 GenBank 中下载硬骨鱼类 *crh* 基因序列进行比对, 获得保守区一致性的序列, 采用 Premier 3.0 设计 PCR 引物(表 1)。25  $\mu$ l 反应体系: 12.5  $\mu$ l 的 2×dNTP Mix (Invitrogen), 上下游引物各 1.25  $\mu$ l, 2.5  $\mu$ l 的 cDNA 及 7.5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O(Invitrogen)。PCR 反应参数:

预变性 94℃ 5 min, 94℃变性 30 min, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 35 个循环, 最后延伸 72℃ 8 min。扩增后的目的条带经琼脂糖凝胶回收, 连接至 pMD<sup>®</sup>19-T 载体(TaKaRa, 大连), 热激转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞后均匀涂布在含氨苄西林(Amp<sup>+</sup>)的 LB 固体培养基上, 置于 37℃培养箱中过夜, 将转化后形成的白色单菌落接种进 2 ml 含 Amp<sup>+</sup>的 LB 培养基中, 所有操作均按照快速抽提质粒的试剂盒说明书进行。酶切使用 *Sal* I 和 *Bam*H I, 取大约 500 ml 的经 1%

琼脂糖凝胶电泳鉴定后显示为阳性的克隆菌液送到大连宝生物工程公司测序。

根据已获得 *crh* 核心序列设计 RACE 的巢式引物: 3'Race 特异性引物和 5'Race 特异性引物(表 1)。参照 Clontech 公司的 SMARTer RACE cDNA 试剂盒说明书制备 5'-RACE-Ready cDNA, 采用 Touchdown PCR 反应进行 3'和 5'末端扩增, 扩增产物经胶回收、连接、转化后, 筛选阳性的克隆菌液送到大连宝生物工程公司测序。

表 1 实验所用引物  
Tab.1 The primers used in this study

引物名 Primer name	引物序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
<i>crh</i> -F	5'GCAAAGTTCAAAAACCATCC 3'	<i>crh</i> gene cloning
<i>crh</i> -R	5'GGTGGCTCATTAGTTTATTAAC 3'	<i>crh</i> gene cloning
<i>crh</i> -F1	5'CGGTTTTGGCAGCTTAGGGGAGGAGT3'	<i>crh</i> gene 3'RACE outer
<i>crh</i> -F2	5'CGCAGCGTCTGTTGGAGGGGAAAGT3'	<i>crh</i> gene 3'RACE inner
<i>crh</i> -R1	5'TCCAACCTTCCCCTCCAACAGACGCT3'	<i>crh</i> gene 5'RACE outer
<i>crh</i> -R2	5'GGTGGTGAAAGGCAACGAGCAGAG 3'	<i>crh</i> gene 5'RACE inner
<i>crh</i> -F3	5'GCTCGGTAACAGAAACCAGAAT3'	<i>crh</i> gene qPCR
<i>crh</i> -R3	5'CAACTTCCCCTCCAACAGAC3'	<i>crh</i> gene qPCR
$\beta$ -actin-F3	5'CGAGCTGTCTTCCCATCCA 3'	qPCR
$\beta$ -actin-R3	5'TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG 3'	qPCR
18S-F	5'ACCACCCACAGAATCGAGAAA 3'	qPCR
18S-R	5'GCCTGCGGCTAATTTGACT 3'	qPCR

## 1.5 基因序列分析

运用 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对 cDNA 测序结果进行同源性比较。使用 SignalP Ver. 4.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)确认信号肽分位点和成熟肽。运用 ClustalW (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-e.html>)多重序列比对分析氨基酸序列。通过 Mega 5.1, 采用邻接法(Neighbour-joining, N-J)构建系统进化树, 自展(Bootstrap)重复 1000 次。

## 1.6 实时荧光定量 PCR

通过实时荧光定量检测 *crh* 基因的组织表达谱、餐前餐后及禁食表达量。所有操作过程在 CFX96 Real-Time PCR 检测系统(Bio-Rad)上完成。荧光定量反应试剂采用 SYBR Green (TaKaRa, 大连), 20  $\mu$ l 反应体系: SYBR 10  $\mu$ l; 上下游引物各 0.8  $\mu$ l; 无菌水 6  $\mu$ l; cDNA 模板 2  $\mu$ l; Rox II 0.4  $\mu$ l。反应参数: 95℃预变性 30 s, 95℃变性 5 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 45 个循环。每个样品设置 3 个重复, 内

参基因为 18S rRNA 和  $\beta$ -actin, 相对表达量通过公式  $E^{-\Delta\Delta C_t}$  (E 为扩增效率)计算。

## 1.7 数据统计及分析

用平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE)表示实验数据, 并使用 SPSS 21.0 处理结果。用单因素方差分析法(One-way ANOVA)分析方差同质性检验后的数据,  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 银鲫 *crh* 基因的克隆及序列分析

银鲫 *crh* 基因 cDNA(登录号 KY861383)全长 920 bp, 其中, 5'-UTR 为 53 bp, 3'-UTR 为 378 bp, 开放阅读框(ORF)为 489 bp。推导出银鲫 CRH 蛋白由 162 个氨基酸组成, 其中包含 24 个氨基酸组成的信号肽、41 个氨基酸构成的成熟肽和 11 个氨基酸构成的保守区(图 1)。通过氨基酸序列的多重比较分析发现, 银鲫 CRH 的氨基酸序列与鲤科鱼类具有较高同源性, 其中, 与金鱼的同源性为 99%, 与鲤的同源性

1	ACATGGGCAAGGATATATCAATTACGCACAGATTCTCCTCGCCACTTTTTGAC	53
54	ATG AAG CTC AAT TTT CTC GTC ACC ACC GTG GCT CTG CTC GTT GCC	98
1	<b>M K L N F L V T T V A L L V A</b>	15
99	TTT CCA CCA CCG TAT GAA TGT AGA GCC ATC GAA GGC AGC TCC AAC	143
16	<b>F P P P Y E C R A</b> I E G S S N	30
144	CAG CCA GCC ACG GAC CCC GAT GGA GAG CGA CAG GCC CCG CCG GTT	188
31	Q P A T D P D G E R Q A P P V	45
189	TTG GCA CGC TTA GGG GAG GAG TAC TTC ATC CGG CTC GGT AAC AGA	233
56	<u>L A R L G E E Y F I R L G</u> N R	60
234	AAC CAG AAT TAT CTC CGA TCC CCA GCC GAC AGC TTC CCC GAG ACA	278
61	N Q N Y L R S P A D S F P E T	75
279	TCC CAG TAT TCC AAA AGA GCA CTG CAG CTC CAG TTA ACG CAG CGT	323
76	S Q Y S K R A L Q L Q L T Q R	90
324	CTG TTG GAG GGG AAA GTT GGG AAC ATC GGT CGC TTG GAT GGC AAT	368
91	L L E G K V G N I G R L D G N	105
369	TAC GCG CTC CGG GCG CTC GAC TCA GTG GAG AGG GAG CGC AGG TCG	413
106	Y A L R A L D S V E R E R R <u>S</u>	120
414	GAG GAG CCG CCG ATT TCC CTG GAT CTG ACC TTT CAT CTG CTA CGA	458
121	<u>E E P P I S L D L T F H L L R</u>	135
459	<u>GAA GTA CTG GAG ATG GCC AGA GCC GAA CAA ATG GCC CAG CAA GCT</u>	503
136	<u>E V L E M A R A E Q M A Q Q A</u>	150
504	CAC AGC AAC CGC AAA ATG ATG GAA ATA TTC GGG AAG TAA	542
151	<u>H S N R K M M E I F</u> G K *	162
543	CCATGAGCAACCCATCAGCCAAAGATATTTTACATTT <sub>ag</sub> CACAGACATGAATATTCTG	602
603	TACCATAGTGCTGCTTTTCCATCATGATCTATTTATACCGGTGACTTATTTATTTGTAGA	662
663	TATTTCACTGAAGACGAATAGAGCACACTAGGTGTATATGAAGCGCAAACTGTCATCAC	722
723	TCTCCATCAATGTTATTGTATAAGTGATCATTGAGAACTGATAGTGAAGAAAACGTTTGA	782
783	GTTTCTTTAAAAAAGACAATATTTTCCAGTACTGTATTATTTATCTGACAGACCTGA	842
843	GTTTCATTGTAACATACAGTACACTGTCTACGTTTGTAAATAAACTAATGAGCAACCATT	902
903	GAAAAAAAAAAAAAAAAA	920

图1 银鲫 *crh* 基因 cDNA 序列及推导的氨基酸序列Fig.1 Nucleotide and predicted amino acid sequences of *C. auratus gibelio crh* gene

阴影部分表示信号肽区域。成熟肽氨基酸编码区用下划线，保守区用双下划线表示，\*表示终止密码子

The signal peptide region is in in shade background. Mature peptide amino acid coding region is underlined. The conserved region in the cryptic peptide is shown in double underlined. The asterisk indicates the stop codon

为 96%，而与其他硬骨鱼及哺乳动物的相似性较低(图 2)。根据这些物种的氨基酸序列，使用 MEGA 5.1 软件，运用邻接法(N-J 法)绘制系统进化树(图 3)，结果显示，银鲫与金鱼亲缘关系很近，与鲤科鱼同源性最高，单独聚为一类，与其他硬骨鱼类的联系紧密，但与哺乳动物则相对较远。

## 2.2 银鲫 *crh* 基因在不同组织的表达分析

如图 4 所示，在银鲫的端脑、下丘脑、中脑、小脑、延脑、垂体、心脏、脾脏、肝胰脏、皮肤、眼、鳃、前肠、中肠、后肠、头肾、中肾、红肌、白肌、精巢、卵巢中均检测到了 *crh* 基因的表达，其中，下丘脑里的表达量最高，端脑和心脏次之，其余组织相对表达量较低。

## 2.3 餐前餐后银鲫下丘脑中 *crh* 基因的表达变化

结果显示，从餐前 3 h 至餐点 0 h，银鲫下丘脑中 *crh* 基因的表达量逐渐降低，但差异不显著 ( $P>0.05$ )。与禁食组相比，餐后 1 h 投喂组下丘脑中 *crh* 基因表达量明显升高，但未达到统计学差异显著水平 ( $P>0.05$ )；在餐后 3 h 投喂组下丘脑中，*crh* 基因表达量又降低到与禁食组基本一致 ( $P>0.05$ ) (图 5)。

## 2.4 长时间禁食对银鲫 *crh* 基因表达的影响

从禁食第 1~7 天，禁食组下丘脑的 *crh* 基因表达量呈总体下降趋势，第 5、第 7 天禁食组下丘脑 *crh* 基因表达量极显著低于正常投喂组 ( $P<0.01$ )。在第 9、第 11 天复投喂后，实验组下丘脑 *crh* 基因表达量大幅上升，极显著高于正常投喂组 ( $P<0.01$ ) (图 6)。

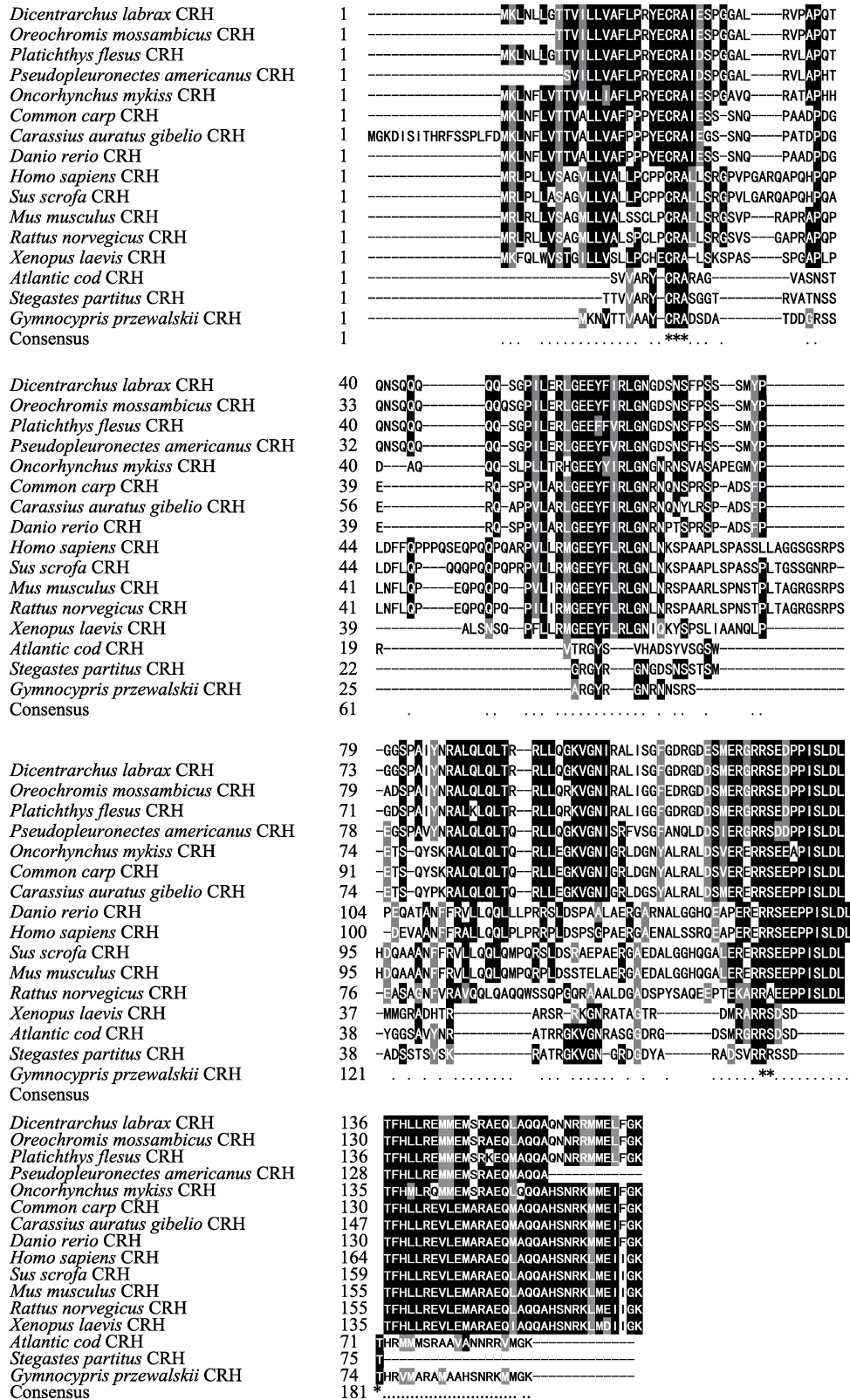


图 2 不同物种 *crh* 基因的氨基酸序列多重比较  
Fig.2 Amino acid sequences alignment of *crh* gene

阴影表示列表中超过一半的多肽残基序列为保守序列。  
More than half of the peptide residue sequences in the shading list are conserved sequences.  
The asterisk indicates that the amino acid sequence is exactly the same

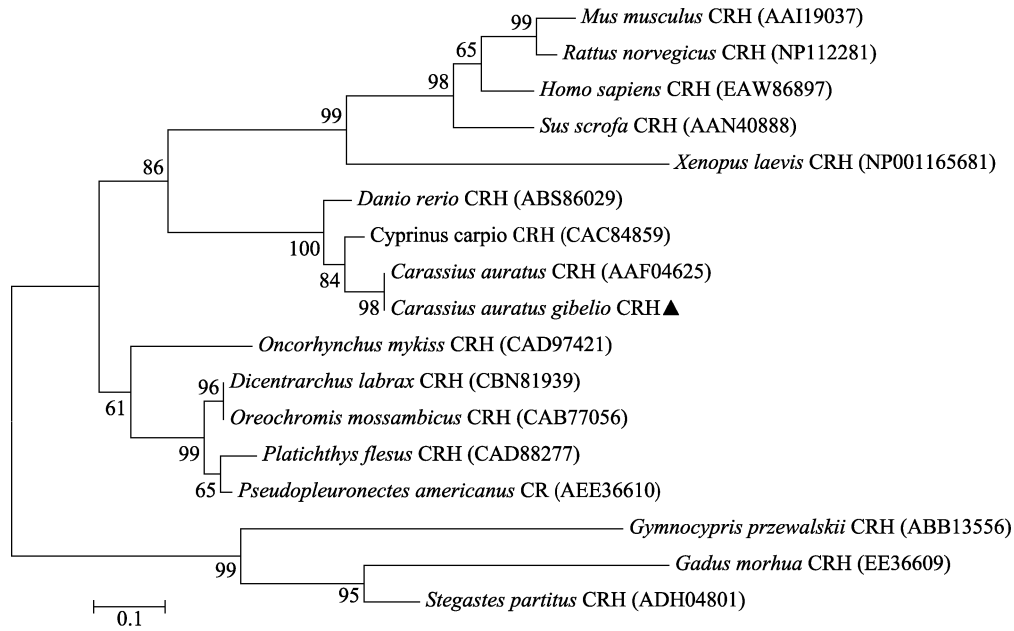
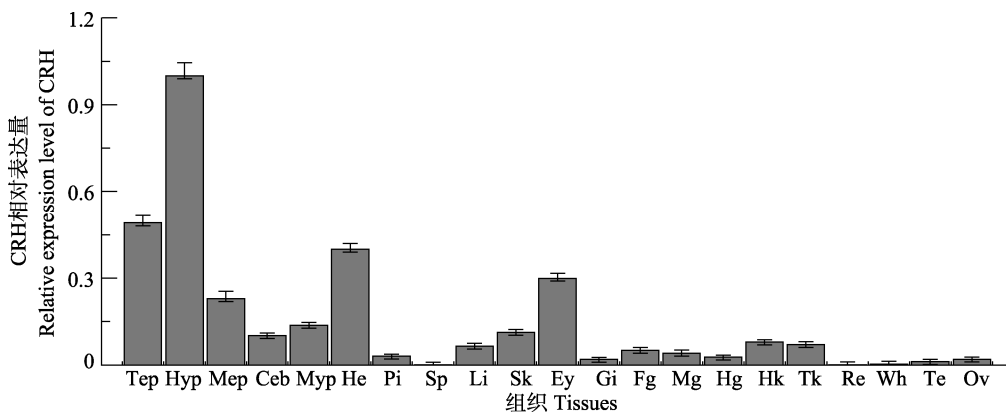


图3 CRH 的氨基酸序列系统进化分析

Fig.3 The phylogenetic analysis of the amino acid sequences of *crh* gene from *C. auratus gibelio*

每个残基替代率由比例尺表示, 步长值由节点上的数字表示

Scale bar indicates residue replacement rate. The bootstrap value is represented by the numbers at the node

图4 银鲫 *crh* 基因的组织分布Fig.4 Tissue distribution of *crh* gene in *C. auratus gibelio*

Tep: 端脑; Hyp: 下丘脑; Mep: 中脑; Ceb: 小脑; Myp: 延脑; Pi: 垂体;

He: 心脏; Sp: 脾脏; Li: 肝胰脏; Sk: 皮肤; Ey: 眼; Gi: 鳃; Fg: 前肠; Mg: 中肠; Hg: 后肠; Hk: 头肾;

Tk: 中肾; Re: 红肌; Wh: 白肌; Te: 精巢; Ov: 卵巢

Tep: Telencephalon; Hyp: Hypothalamus; Mep: Mesencephalon; Ceb: Cerebellum; Myp: Myelencephalon; Pi: Pituitary; He: Heart; Sp: Spleen; Li: Liver; Sk: Skin; Ey: Eye; Gi: Gill; Fg: Foregut; Mg: Midgut; Hg: Hindgut; Hk: Head kidney; Tk: Trunk kidney; Re: Red muscle; Wh: White muscle; Te: Testis; Ov: Ovary

### 3 讨论

#### 3.1 银鲫 *crh* 基因生物信息学的分析

该研究首次克隆了银鲫 *crh* 基因 cDNA 的全长序列, 鉴定出 *crh* 基因的 1 种亚型。同样, 在齐口裂腹鱼(Wang *et al*, 2014)、刀鲚(*Coilia nasus*)(王宇等, 2014)

和黄斑篮子鱼(*Siganus canaliculatus*)(游翠红等, 2014)中也只鉴定出 *crh* 基因的 1 种亚型, 但有趣的是, 在草鱼(殷新平, 2015)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Doyon *et al*, 2006)和鲤(Huising *et al*, 2004)中鉴定出 *crh* 基因的 2 种亚型, 可能与鱼类基因组复制相关(Meyer *et al*, 2005; Sundstrom *et al*, 2008)。这些结果



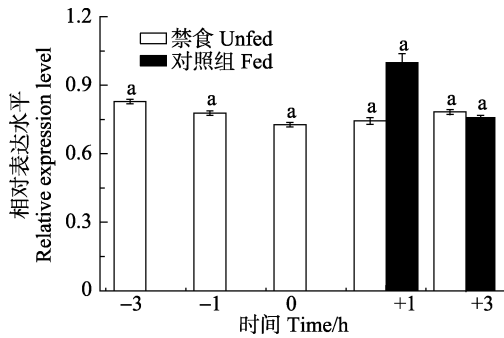


图 5 餐前餐后银鲫下丘脑中 *crh* 基因的表达情况  
Fig.5 Postprandial changes of the *crh* gene expression in the hypothalamus of *C. auratus gibelio*

图柱字母表示禁食组和投喂组(+1 h、+3 h)之间差异显著性  
The fed and unfed groups that differ significantly are indicated by different letters above bars

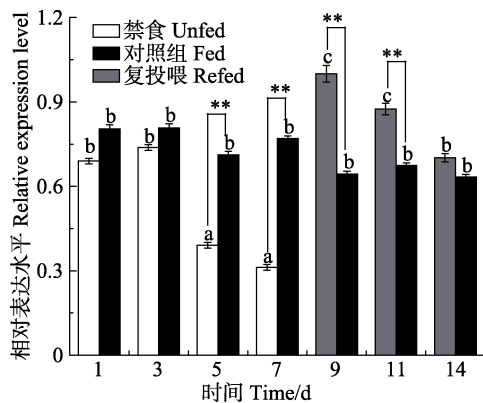


图 6 禁食和复投喂对银鲫下丘脑 *crh* 基因表达的影响  
Fig.6 Effects of fasting and refeeding on *crh* gene expression in *C. auratus gibelio* hypothalamus

图柱上的字母表示禁食组、正常投喂组及复投喂组之间的差异显著性; “\*”表示同一时间实验组和正常投喂组间的差异显著性。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$

Different letters on the bar represent significant differences between experimental groups. “\*” represents significant differences between the experimental groups at the same time point. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$

表明,硬骨鱼祖先额外的第 3 次全基因组复制导致的 *crh* 基因加倍后,部分硬骨鱼可能丢失了其中 1 个拷贝,而有些硬骨鱼在进化过程中可能保留或从其他途径获得 2 个拷贝,可能是导致目前观察到硬骨鱼基因组 *crh* 基因亚型个数多样性的重要原因。*crh* 基因进化可能在不同硬骨鱼进化中发挥非常大的作用,但其加倍后在硬骨鱼基因组产生多个亚型的具体机制以及各自生物学功能还有待深入研究。通过氨基酸序列结构的比较可知,银鲫 *crh* 基因的信号肽和成熟肽均较保守。通过对系统进化树分析发现,银鲫和金鱼亲

缘关系很近,与其他硬骨鱼类的联系紧密,但与哺乳动物则相对较远。

### 3.2 银鲫 *crh* 基因组织表达的分析

本实验使用 RT-qPCR 检测了银鲫 *crh* 基因在端脑、下丘脑、中脑等 21 个组织中的表达情况,结果显示,在银鲫下丘脑、心脏、肝脏等 21 个组织中均检测到 *crh* 基因表达,其中, *crh* 基因在下丘脑里表达量最高。此外, *crh* 基因的表达产物也广泛分布在褐牙鲂(*Paralichthys olivaceus*)(沈娇娇等, 2017)、鲤(Mazon *et al*, 2006; Huising *et al*, 2007)、草鱼(*Ctenopharynodon idellus*)(殷新平, 2015)的各个组织中,脑部表达量最高。此外,在团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)(陈凯等, 2016),斑马鱼(Chandrasekar *et al*, 2010)、金鱼(Bernier *et al*, 1999)、比目鱼(*Pleuronichthys cornutus*)(Lu *et al*, 2004)的各组织中, *crh* 基因在脑部的表达量最高。在脊椎动物上已证实,下丘脑神经元回路对摄食行为和能量的调节起着重要作用(王国文等, 2016),并且 Wang 等(2014)对齐口裂腹鱼摄食调控的研究发现, *crh* 基因也在脑部的表达量最高。上述结果推测 *crh* 基因可能通过下丘脑对银鲫的摄食行为进行调控。此外,在外周组织如肝胰脏和精巢、卵巢中检测到 *crh* 基因的表达,说明 *crh* 基因可能参与到免疫应答(Vamvakopoulos *et al*, 2013; Tort, 2011)及繁殖过程(Jeong *et al*, 1999; Chabbi *et al*, 2014),具体机制还有待进一步研究。

### 3.3 银鲫 *crh* 基因对摄食调控的影响

摄食调控是一个复杂的生理过程,涉及中枢神经系统与外周神经系统相互作用,以及内分泌系统与消化之间的相互作用(Matsuda *et al*, 2007)。调控鱼类摄食行为因子的表达受摄食状态的影响,如饱食、饥饿及限制摄食等(Hoskins *et al*, 2012)。在哺乳动物与非哺乳动物中, *crh* 基因已被证明具有调节摄食行为的作用(Rayatpour *et al*, 2017; Volkoff, 2016)。本研究中,餐后 1 h 与禁食组和餐前相比,进食组下丘脑 *crh* 基因的表达量升高,但差异不显著( $P > 0.05$ )。同样,对齐口裂腹鱼的短期禁食发现,齐口裂腹鱼下丘脑中 *crh* 基因的表达量不受短期禁食影响(Wang *et al*, 2014),推测在银鲫中 *crh* 基因的表达量不受短期禁食的影响。

在长时间禁食实验中,第 1、第 3 天禁食组的表达量低于正常投喂组,但差异不显著( $P > 0.05$ ),第 5、第 7 天禁食组 *crh* 基因表达量与正常投喂组相比,出现极显著下降( $P < 0.01$ )。第 9 天,复投喂组 *crh* 基因

表达量与正常投喂组相比, 出现极显著升高 ( $P < 0.01$ )。在齐口裂腹鱼的禁食实验中也得到相似结果(Wang *et al.*, 2014), 在第 1、第 3、第 5 天禁食组的 *crh* 基因表达量与对照组没有差异, 第 7 天禁食组 *crh* 基因的表达量显著低于进食组。在金鱼中, 长时间禁食会引起 *crh* 基因表达量的降低, 复投喂后又显著增加(Matsuda *et al.*, 2006)。根据以上结果推测, *crh* 基因可能作为一个饱感因子, 参与银鲫的摄食调控, 并且受不同禁食时间的影响, *crh* 基因表达量受长时间禁食影响, 而不受短期禁食调控。此外, Maruyama 等(2006)发现, 给金鱼脑室注射 CRH 后, 金鱼摄食能力降低, 活动能力有所提升; 此外, 给金鱼注射哺乳动物的 CRH 也会抑制其食欲(Matsuda *et al.*, 2013), 说明鱼类和哺乳动物 *crh* 基因在摄食调控中具有相似的生物学功能, 还有实验证明鱼类食欲可以被环境(秦希获等, 2017)、生理应激(穆小生, 2013)等抑制。Graf 等(2012)证明, 由应激引起的食欲抑制效应与 *crh* 基因及其相关肽表达量升高, 和下丘脑-垂体-肾上腺(HPI)应激轴激活紧密相关, 由于 *crh* 基因在下丘脑-垂体-肾上腺的应激过程中扮演着重要调节作用(殷新平等, 2014), 因此, 银鲫的 *crh* 基因可能通过激活下丘脑-垂体-肾上腺应激轴参与银鲫的摄食调控。

综上所述, 该研究确定了银鲫 *crh* 基因的 cDNA 序列, 并对其进行了分析。*crh* 基因广泛表达在银鲫各组织中, 下丘脑中表达量最高, 且下丘脑中 *crh* 基因的表达量受长期禁食的影响, 这些结果提示 *crh* 基因可能是银鲫的饱感因子, 对银鲫摄食调控起到一定的作用, 但具体机制有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- Bernier NJ, Lin X, Peter RE. Differential expression of corticotropin-releasing factor (CRF) and urotensin I precursor genes, and evidence of CRF gene expression regulated by cortisol in goldfish brain. *General and Comparative Endocrinology*, 1999, 116(3): 461-477
- Chabbi A, Ganesh CB. Glucocorticoid synthesis inhibitor metyrapone blocks stress-induced suppression along luteinizing hormone secreting cells-ovary axis in the fish *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Zoology Part A Ecological and Integrative Physiology*, 2014, 321(3): 125-134
- Chandrasekar G, Lauterg, Hauptmann G. Distribution of corticotropin-releasing hormone in the developing zebrafish brain. *Journal of Comparative Neurology*, 2010, 505(4): 337-351
- Chen K, Xi BW, Teng T, *et al.* Molecular cloning, characterization, and regulation of *Megalobrama amblycephala* corticotropin-releasing hormone receptor expression. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(4): 833-845 [陈凯, 习丙文, 滕涛, 等. 团头鲂促肾上腺皮质激素释放激素受体基因序列特征及表达分析. *中国水产科学*, 2016, 23(4): 833-845]
- Chrousos GP, Zoumakis E. Milestones in CRH Research. *Current Molecular Pharmacology*, 2017, 10(4): 259
- Doyon C, Leclair J, Trudeau VL, *et al.* Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y mRNA levels are modified by glucocorticoids in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 146(2): 126-135
- Fang X, Teng SQ, Yang JL, *et al.* Pond high-yield, efficient and healthy aquaculture technology of *Carassius auratus gibelio*. *China Fisheries*, 2017(3): 91-92 [方旭, 滕淑芹, 杨建利, 等. "中科 3 号"异育银鲫池塘高产高效健康养殖技术. *中国水产*, 2017(3): 91-92]
- Fuentes EN, Kling P, Einarsdotti IE, *et al.* Plasma leptin and growth hormone levels in the fine flounder (*Paralichthys adspersus*) increase gradually during fasting and decline rapidly after refeeding. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 177(1): 120
- Fuzesi T, Daviu N, Wamstecker CJI, *et al.* Hypothalamic CRH neurons orchestrate complex behaviours after stress. *Nature Communications*, 2016, 7: 11937
- Graf C, Kuehne C, Panhuysen M, *et al.* Corticotropin-releasing hormone regulates common target genes with divergent functions in corticotrope and neuronal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 362(1-2): 29-38
- Han J, Liu B, Jiang Z, *et al.* cDNA cloning of neuropeptide Y gene of turbot and its expression analysis for the strategy of starvation and feeding in industrial culture. *Engineering Sciences*, 2014-09
- Hoskins LJ, Volkoff H. The comparative endocrinology of feeding in fish: Insights and challenges. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 176(3): 327-335
- Huising MO, Lm VDA, Metz JR, *et al.* Corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-binding protein expression in and release from the head kidney of common carp: evolutionary conservation of the adrenal CRF system. *Journal of Endocrinology*, 2007, 193(3): 349-357
- Huising MO, Metz JR, Van SC, *et al.* Structural characterisation of a cyprinid (*Cyprinus carpio* L.) CRH, CRH-BP and CRH-R1, and the role of these proteins in the acute stress response. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2004, 32(3): 627-648
- Jeong KH, Jacobson L, Widmaier EP, *et al.* Normal suppression of the reproductive axis following stress in corticotropin-releasing hormone-deficient mice. *Endocrinology*, 1999,



- 140(4): 1702–1708
- Jonsson E, Kaiya H, Bjornsson BT. Ghrelin decreases food intake in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through the central anorexigenic corticotropin-releasing factor system. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 166(1): 39
- Liu L, Liang XF, Li J, *et al.* Feed intake, feed utilization and feeding-related gene expression response to dietary phytic acid for juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture*, 2014, 424–425(2): 201–206
- Lu RH, Sun JJ, Liang XF, *et al.* Biological characteristics and functions of Leptin in fish. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(3): 583–589 [卢荣华, 孙君君, 梁旭方, 等. 鱼类 leptin 的生物学特性及功能. *水生生物学报*, 2015, 39(3): 583–589]
- Lu W, Dow L, Gumusgoz S, *et al.* Coexpression of corticotropin-releasing hormone and urotensin i precursor genes in the caudal neurosecretory system of the euryhaline flounder (*Platichthys flesus*): A possible shared role in peripheral regulation. *Endocrinology*, 2004, 145(12): 5786
- Matsuda K, Hagiwara Y, Shibata H, *et al.* Ovine corticotropin-releasing hormone (oCRH) exerts an anxiogenic-like action in the goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 188(1): 118–122
- Matsuda K, Maruyama K. Regulation of feeding behavior by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in vertebrates. *Peptides*, 2007, 28(9): 1761–1766
- Matsuda K, Miura T, Uchiyama M, *et al.* Relationship between anorexigenic action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and that of corticotropin-releasing hormone (CRH) in the goldfish (*Carassius auratus*). *Peptides*, 2006, 27(7): 1820–1826
- Matsuda K. Regulation of feeding behavior and psychomotor activity by corticotropin-releasing hormone (CRH) in fish. *Frontiers in Neuroscience*, 2013, 7(7): 91
- Mazon AF, Verburg-van Kemenade BM, Flik G, *et al.* Corticotropin-releasing hormone-receptor 1 (CRH-R1) and CRH-binding protein (CRH-BP) are expressed in the gills and skin of common carp *Cyprinus carpio* L. and respond to acute stress and infection. *Journal of Experimental Biology*, 2006, 209(3): 510–517
- Meyer A, Vav DPY. From 2R to 3R: Evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays*, 2005, 27(9): 937–945
- Michel M, Page-Mccaw PS, Chen W, *et al.* Leptin signaling regulates glucose homeostasis, but not adipostasis, in the zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(11): 3084
- Mu FS, Miao L, Li MY, *et al.* Cloning and expression of Leptin gene in *Acrossocheilus fasciatus fasciatus* during fasting and refeeding. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(4): 822–829 [穆方申, 苗亮, 李明云, 等. 光唇鱼 (*Acrossocheilus fasciatus*) Leptin 基因克隆及禁食–再投喂对其表达的影响. *海洋与湖沼*, 2017, 48(4): 822–829]
- Mu XS. Gene cloning, specific expression in different tissues and recombinant protein preparation of 4 biomarkers in *Scophthalmus maximus*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013, 91–92 [穆小生. 大菱鲆 4 种生物标志物基因的克隆、组织特异性表达研究及重组蛋白制备. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 91–92]
- Qin XH, Wu YJ, Shi XT, *et al.* Effects of light intensity on the hatching rate of fertilized *Schizothorax chongi* eggs and on the growth and feeding of larvae. *Journal of Hydroecology*, 2017, 38(5): 97–102 [秦希获, 邬玉娇, 石小涛, 等. 光照对细鳞裂腹鱼受精卵孵化率及仔鱼生长、摄食的影响. *水生态学杂志*, 2017, 38(5): 97–102]
- Rabasa C, Dickson S L. Impact of stress on metabolism and energy balance. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 2016, 9(9): 71–77
- Rayatpour A, Ghasemi M, Radahmadi M, *et al.* Effect of intraparaventricular administration of corticotropin releasing hormone on food intake in food-deprived rats. *Journal of Isfahan Medical School*, 2017, 35(436): 70–77
- Shen JJ, Lü WQ. Effects of thyroid hormone on CRH gene expression in *Paralichthys olivaceus* at early development stage. *Journal of Southern Agriculture*, 2017, 48(2): 323–327 [沈娇娇, 吕为群. 褐牙鲈早期发育阶段 CRH 基因表达及受甲状腺激素的影响. *南方农业学报*, 2017, 48(2): 323–327]
- Simpson EH, Balsam PD. *Behavioral neuroscience of motivation*. Springer International Publishing, 2016: 1–12
- Sundstrom G, Larsson TA, Brenner S, *et al.* Evolution of the neuropeptide Y family: New genes by chromosome duplications in early vertebrates and in teleost fishes. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 155(3): 705
- Tort L. Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1366
- Vale W, Spiess J, Rivier C, *et al.* Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*, 1981, 213(4514): 1394
- Vamvakopoulos NC, Chrousos GP. Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression. *Journal of Clinical Investigation*, 2013, 92(4): 1896
- Volkoff H. The neuroendocrine regulation of food intake in fish: A review of current knowledge. *Frontiers in Neuroscience*, 2016, 10: 540
- Wang GW, Shao BP, Ding YP. The orexigenic role and

- mechanism of neuropeptide Y. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016(2): 385–391 [王国文, 邵宝平, 丁艳平. 神经肽 Y 的促摄食作用及其调控机制. *动物营养学报*, 2016(2): 385–391]
- Wang T, Zhou C, Yuan D, *et al.* Schizothorax prenanti, corticotropin-releasing hormone (CRH): Molecular cloning, tissue expression, and the function of feeding regulation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40(5): 1407–1415
- Wang Y, Lu DQ, Li WP, *et al.* The effect of acute handling stress on the stress-related neuroendocrine factor in *Coilia nasus*. *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. *水产学报*, 2014, 38(6): 803–812]
- Yin XP, Su JM, Pu L, *et al.* Research on the effect of corticotropin-releasing hormone in stress reaction in the fishes. *Chinese Journal of Fisheries*, 2014(3): 57–61 [殷新平, 苏建明, 蒲龄, 等. 促肾上腺皮质激素释放激素在鱼类应激反应中的作用. *水产学杂志*, 2014(3): 57–61]
- Yin XP. Cloning and expression of CRH, CRH-R1 from *Ctenopharyngodon idella*. Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2015, 42–43 [殷新平. 草鱼 CRH、CRH-R1 基因的全长克隆及表达分析. 湖南农业大学硕士学位论文, 2015, 42–43]
- Yin ZY, Xue M, Zheng YH, *et al.* Effect of yeast extract as feeding stimulants on diet preference of Gibel carp. *Feed Industry*, 2017, 38(8): 4–8 [尹子煜, 薛敏, 郑银桦, 等. 酵母提取物在异育银鲫饲料中促摄食作用的研究. *饲料工业*, 2017, 38(8): 4–8]
- You CH, Lu YB, Wang SQ, *et al.* Cloning of gene encoding corticotrophin-releasing hormone (CRH) and its mRNA expression after shallow water stress in *Siganus canaliculatus*. *Journal of Shantou University (Natural Science)*, 2014, 29(2): 43–51 [游翠红, 卢玉标, 王树启, 等. 黄斑蓝子鱼 CRH 基因的克隆及其在浅水应激后的 mRNA 表达. *汕头大学学报(自然科学版)*, 2014, 29(2): 43–51]
- Zhang H, Chen H, Zhang Y, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression profiles of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 181(1): 295–305
- Zhang X, Tang N, Qi J, *et al.* CCK reduces the food intake mainly through CCK1R in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt). *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 12413
- Zhang YZ, Zheng ZM, Hua JQ, *et al.* Bio-floc nutrition and nitrogen uptake by shrimp and silver prussian carp in polyculture brackish water. *Journal of Ningbo University*, 2016, 29(3): 29–33 [张亚卓, 郑忠明, 华建权, 等. 低盐度条件下生物絮团的营养组分及凡纳滨对虾和银鲫对其摄食效率的研究. *宁波大学学报(理工版)*, 2016, 29(3): 29–33]
- Zhou C, Zhang X, Liu T, *et al.* *Schizothorax davidi* ghrelin: cDNA cloning, tissue distribution and indication for its stimulatory character in food intake. *Gene*, 2014, 534(1): 72
- Zhou C, Zheng J, Luo L, *et al.* Evidence that ghrelin, may be associated with the food intake of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(6): 1–10
- Zhou M, Di R, Hu WP. Different expression of CRH and POMC genes in reproductive related tissues in small-tail han sheep and sunite sheep. *China Herbivore Science*, 2017, 37(4): 1–4 [周梅, 狄冉, 胡文萍, 等. 小尾寒羊和苏尼特羊 CRH 和 POMC 基因在繁殖相关组织中的差异性表达. *中国草食动物科学*, 2017, 37(4): 1–4]

(编辑 冯小花)

## Cloning, Tissue Expression Profiling, Functional Characterization of Corticotropin-Releasing Hormone (*crh*) on Feeding in Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*)

ZHOU Chaowei<sup>1</sup>, LEI Luo<sup>1</sup>, DENG Xingxing<sup>1</sup>, YUAN Dengyue<sup>2</sup>, YANG Minmin<sup>1</sup>, CAO Gaoxiang<sup>1</sup>, ZHU Haixing<sup>1</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, ZHU Chengke<sup>1</sup>, LI Daijin<sup>1</sup>, TANG Renjun<sup>3</sup>, ZHANG Guizhong<sup>3</sup>, LI Lukuan<sup>1</sup>, ZHENG Zonglin<sup>1</sup>①

(1. Department of Aquaculture, College of Animal Science, Southwest University Rongchang Campus, Chongqing 402460;

2. Department of Aquaculture, College of Life Sciences, Neijiang Normal University, Neijiang 641100;

3. Fisheries Administration of Liangping, Chongqing 405200)

**Abstract** To elaborate the mechanism of corticotropin-releasing hormone (*crh*) on feeding in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), we cloned and identified the full-length cDNA sequence of *crh* for the first time. We also employed real-time quantitative PCR (RT-PCR) to explore *crh* mRNA distribution in different tissues and investigated the expression of *crh* mRNA during postprandial and fasting. Here, a 920 bp full-length of *crh* gene cDNA was obtained, including a 53 bp of 5'-UTR, a 378 bp of 3'-UTR, and a 489 bp of an open reading frame (ORF). The ORF of the gibel carp *crh* gene contains 162 bp nucleotides, including an 11-amino acid conserved region, a 24-amino acid signal peptide, and a 41-amino acid mature peptide. The amino acid sequence of *crh* shares a high level of similarity with teleost CRH (99% with *Carassius auratus* and 96% with *Cyprinus carpio*). The expression of gibel carp *crh* was observed in almost all tissues, with the highest expression detected in the hypothalamus, followed by the myelencephalon and heart. There was no significant change in *crh* gene expression in the fed group compared with the fasted group in gibel carp hypothalamus after a meal ( $P>0.05$ ). However, the expression level of the *crh* gene showed a significant decrease after fasting on day 5 and day 7 ( $P<0.01$ ), a significant increase of the *crh* gene was observed after refeeding on day 9 and day 11. The results suggest that the *crh* gene may play a critical role in feeding regulation in gibel carp.

**Key words** *Carassius auratus gibelio*; *crh* gene; RT-qPCR; Gene expression; Feeding regulation

① Corresponding author: ZHENG Zonglin, E-mail: zhengzonglin@126.com