

网络出版时间:2019-11-27 15:19 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2020.06.001
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.s.20191127.0922.002.html

异齿裂腹鱼 *PYY* 基因的克隆、组织分布及其调节摄食功能研究

商振达^{1,2}, 刘锁珠^{1,2}, 谭占坤^{1,2}, 王宏辉^{1,2}, 商鹏^{1,3}, 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】【目的】克隆异齿裂腹鱼肽 YY 基因(*PYY*)的编码区(CDS)全长序列,对其生物信息学进行分析,并研究 *PYY* 基因在异齿裂腹鱼组织中的分布情况,以及餐前餐后和禁食复喂对 *PYY* 基因表达量的影响,为异齿裂腹鱼摄食调控机制研究提供依据。【方法】以采集于西藏雅鲁藏布江的 7~12 龄,体质量为(1.22±0.20) kg/尾的异齿裂腹鱼为对象,采用 RT-PCR 和 Race-PCR 技术克隆异齿裂腹鱼 *PYY* 基因的 CDS 全长序列,分析其编码蛋白质的氨基酸序列和蛋白结构;采用实时荧光定量 PCR,分析 *PYY* 基因在异齿裂腹鱼组织中的分布情况,以及餐前餐后和禁食复喂对 *PYY* 基因在异齿裂腹鱼脑组织中表达量的影响。【结果】异齿裂腹鱼 *PYY* 基因 CDS 序列长度为 735 bp,其中开放阅读框(ORF)为 294 bp,编码 98 个氨基酸。系统进化分析表明,异齿裂腹鱼 *PYY* 基因与同属裂腹鱼属的鱼类亲缘关系最近;氨基酸序列分析表明,*PYY* 蛋白质包括典型的特征序列和信号肽,其蛋白结构中具有亲水性结构和跨膜结构。*PYY* 基因在异齿裂腹鱼脑组织中高度表达,在其他组织中微弱表达;餐前异齿裂腹鱼 *PYY* 基因的表达量无显著性差异,但餐后 *PYY* 基因的表达量显著升高,且随着餐后时间的逐渐延长,其表达量继续升高;禁食使异齿裂腹鱼脑组织中的 *PYY* 基因表达量下降,复喂后 *PYY* 基因的表达量极显著升高。【结论】成功克隆了异齿裂腹鱼 *PYY* 基因的 CDS 全长序列,*PYY* 基因在异齿裂腹鱼脑组织中高度表达,但在肠道中微量表达,异齿裂腹鱼 *PYY* 基因是餐后饱感信号因子,具有调节动物摄食的功能。

【关键词】 异齿裂腹鱼;肽 YY;基因克隆;组织分布;摄食功能

【中图分类号】 S965.1;Q789

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2020)06-0001-09

Cloning, tissue distribution and regulating appetite function of *PYY* in *Schizothorax o'connori*

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

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

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

3 Tibetan Pig Collaborative Research Center, Nyingchi, Tibet 860000, China)

Abstract: 【Objective】 This study cloned *Schizothorax o'connori* *PYY* gene, analyzed its bioinformatics, and detected tissue distribution and mRNA levels of *PYY* gene before and after feeding, fasting, and refeeding to provide basis for understanding appetite regulatory system of CCK in *Schizothorax o'connori*. 【Method】 *Schizothorax o'connori* at the age of 7—12 years with weight of (1.22±0.20) kg/tail were col-

【收稿日期】 2019-04-23

【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(XZJYT2018GXCX);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,吉林吉林人,讲师,硕士,主要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(1990—),女(藏族),青海门源人,助教,硕士,主要从事高原动物适应生理学研究。E-mail:770337011@qq.com

lected from Yarlung Zangbo River in Tibet. The full-length CDS sequence of *Schizothorax o'connori* PYY gene was cloned by RT-PCR and Race-PCR technology, and amino acid sequence and protein structure were analyzed. The tissue distribution and appetite regulation of PYY in *Schizothorax o'connori* was investigated using real-time PCR technology. 【Result】 PYY gene sequence of *Schizothorax o'connori* was 735 bp and the open reading frame (ORF) sequence was 294 bp, encoding 98 amino acids. Phylogenetic analysis indicated that the PYY gene had the highest homology with *Schizothorax*. Amino acid sequence analysis showed that the PYY gene included typical characteristic sequence and signal peptide, and its protein structure had hydrophilic structure and transmembrane structure. According to the tissue distribution study, the PYY gene was highly expressed in brain and weakly expressed in other tissues. There was no significant difference in the expression of PYY gene before feeding, but the expression of PYY gene increased significantly after feeding, and its expression increased gradually with the extension of postprandial time. Fasting reduced the expression of PYY gene in brain and refeeding increased the expression of PYY gene. 【Conclusion】 This study successfully cloned the full-length CDS sequence of *Schizothorax o'connori* PYY gene. It was highly expressed in brain and weakly expressed in intestine. The PYY gene was the signal factor for postprandial satiety with the function of regulating appetite.

Key words: *Schizothorax o'connori*; peptide YY; molecular cloning; tissue distribution; appetite regulation

异齿裂腹鱼是鲤科裂腹鱼属的一种鱼类,俗称棒棒鱼,主要分布于雅鲁藏布江中上游的干支流和附属水底,多生活于水质清新、砾石底质的河道,以着生藻类为食,是一种性成熟晚、生长缓慢、寿命较长的高原特有经济鱼类之一^[1]。异齿裂腹鱼为青藏高原特有鱼种,对保护当地河流生态环境具有重大作用。近年来由于过度捕捞和外来鱼种入侵,异齿裂腹鱼种群数量呈下降趋势。因此,研究异齿裂腹鱼的摄食相关基因,可为人工养殖异齿裂腹鱼提供理论依据,对其种群资源的保护也具有重要意义。

肽 YY(peptide YY, PYY) 又称酪酪肽,是一种在 N 末端和 C 末端均包含酪氨酸残基的多肽物质,由 36 个氨基酸缩合而成^[2-3],一般由肠道中的内分泌细胞——L 细胞分泌^[4],在很多组织中均有分布^[5-6]。研究表明,PYY 可以进入循环系统,通过自身或与其他激素共同作用来调控动物的摄食^[7],如 PYY 可降低增食欲因子神经肽 Y(NPY) 的表达量和提高减食欲素——阿片促黑色素皮质激素(POMC)的表达^[8]。此外,PYY 还具有抑制胰腺^[9]和胃酸^[10]分泌、调节肠道蠕动^[11-12]、促进血管收缩^[13]、抑制肿瘤生长以及改变肾脏功能^[14]等生物学功能。

鱼类通过摄食来为个体的生长发育等活动提供物质基础^[15]。目前关于异齿裂腹鱼的研究主要集中在其种群动态^[16]、分子系统发育^[17]、染色体核型^[18]和个体生物学^[19]等方面,对其调控摄食基因的研究较少,仅有的研究主要集中在瘦素(leptin,

LEP)^[20]、缩胆囊素(cholecystokinin, CCK)^[20]和可卡因苯丙胺调节转录肽(cocaine-and amphetamine-regulated transcript, CART)^[21]等。PYY 基因具有调控动物摄食的作用,但其在异齿裂腹鱼中的研究尚未见报道。本试验采用 RT-PCR 和 RACE 方法克隆了异齿裂腹鱼 PYY 基因的 CDS 全长序列,并对其生物信息学进行分析,采用 Real-Time PCR 技术分析 PYY 基因在异齿裂腹鱼组织中的分布情况以及餐前餐后和禁食复喂对 PYY 基因表达量的影响,以期从分子角度探明异齿裂腹鱼的摄食调控机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

异齿裂腹鱼采集于西藏雅鲁藏布江二级支流巴河中,体质量为(1.22±0.20) kg/尾,发育时期为 7~12 龄,体况健康,采集异齿裂腹鱼 60 尾,装入鱼用氧气运输带运回实验室,放入经过清洗消毒处理的养鱼缸中暂养。

1.2 试验设计

试验用鱼进行 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),用于禁食复喂研究的鱼每天投喂 2 次(10:00 和 18:00)。暂养结束后,选取 3 尾健康的异齿裂腹鱼,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 PYY 基因全长克隆和组织分布研究。选取 21 尾

异齿裂腹鱼用于餐前餐后研究,餐前试验中,分别于餐前 3,1 和 0 h 各采集对照组(未投喂)3 尾鱼的脑组织,作为 3 个重复;餐后试验中,设置对照组(未投喂)和饲喂组,每组 6 尾鱼,分别于餐后 1 和 3 h 各采集 3 尾鱼的脑组织,作为 3 个重复。选取 36 尾异齿裂腹鱼用于禁食复喂试验,设置对照组(18 尾)和试验组(18 尾),对照组按照暂养的方式进行饲喂,试验组分别进行禁食 1,3,5 d 以及复喂 1,3,5 d 处理,处理结束后同时采集对照组和试验组各 3 尾异齿裂腹鱼的脑组织,作为 3 个重复。

1.3 异齿裂腹鱼总 RNA 提取和 cDNA 合成

利用总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取异齿裂腹鱼各组织的总 RNA,对获得的 RNA 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。以获取样品的总 RNA 为模板,采用 RNA PCRTM Kit Ver. 3.0 反转录试剂盒(大连宝生物工程公司)合成 cDNA。

1.4 异齿裂腹鱼 PYY 基因克隆

根据 NCBI 上已登录的齐口裂腹鱼(登录号 KF159000)和斑马鱼(登录号 AF233875)的 PYY 基因序列,利用 Primer 5.0 软件设计 PYY 基因的中间片段引物 PYY-1F、PYY-1R 和 PYY-2F、PYY-2R,引物信息见表 1。PCR 扩增 PYY 基因核心片段,PCR 反应体系为(25 μL):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 ,LA Taq 聚合酶 0.2 μL 。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55

$^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 修复延伸 7 min,33 个循环。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后,切下目的条带,送至上海生工生物工程有限公司测序。

根据测序所得的 PYY 基因核心片段设计 Race-PCR 引物 PYY-race-F1、PYY-race-F2、5.3' outer 和 5.3' inner,用于 PYY 基因末端序列扩增,引物信息见表 1。PYY 基因末端扩增利用以反转引物 3' adaptor 反转得到的 cDNA 为模板,进行 Race-PCR 反应,第一轮扩增 PCR 反应体系(25 μL):2 \times GC Buffer I 12.5 μL ,上游引物(PYY-race-F1) 0.5 μL ,下游引物(5.3' outer) 0.5 μL ,Dntp 4 μL ,ddH₂O 6.3 μL ,模板 1 μL ,LA Taq 聚合酶 0.2 μL 。PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 修复延伸 7 min,33 个循环。第二轮 PCR 反应体系(50 μL):2 \times GC Buffer I 25 μL ,上游引物(PYY-race-F2) 1 μL ,下游引物(5.3' outer) 1 μL ,Dntp 8 μL ,ddH₂O 12.5 μL ,模板(第一轮 PCR 稀释产物) 1 μL ,LA Taq 聚合酶 0.5 μL 。PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 修复延伸 7 min,33 个循环。扩增产物经过回收、纯化后送至上海生工生物工程有限公司进行测序,最后将所得序列进行拼接,获得 PYY 基因序列。引物合成和序列测定均由上海生工生物工程有限公司完成。

表 1 异齿裂腹鱼 PYY 基因克隆所用引物

Table 1 Primers for cloning PYY gene of *Schizothorax o'connori*

引物名称 Name of primer	引物序列(5'-3') Sequence of primer	用途 Usage
PYY-1F	TGAAAGACTTCGAAAGACTCG	RT-PCR
PYY-1R	GCAACTCAGCCATCACATCCT	RT-PCR
PYY-2F	GCGCTGAGACACTACATCAACC	RT-PCR
PYY-2R	CACAATGAAGTATACACATATACATTTCCA	RT-PCR
PYY-race-F1	CCACCTGTGCCTCCCACAGAAAAC	Race-PCR
PYY-race-F2	CCATCAGACAACCTCATCCACCGCT	Race-PCR
5.3' outer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAAC	Race-PCR
5.3' inner	GCTACGTAACGGCATGACAGTG	Race-PCR
3' adaptor	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAG-TGTTTTTTTTTT-TTTTTTTT	Race-PCR
PYY-realF	CTCTTCTGCGTGCTCCTGTG	Real-time PCR
PYY-realR	CATCCTCCGGAGTGGACCTT	Real-time PCR
GAPDHF	CCTCATCACGAGACAACGGTATGG	Real-time PCR
GAPDHR	TTGTGCTCTGTGTCATCTCCGAAC	Real-time PCR

1.5 异齿裂腹鱼 PYY 表达的实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 分析

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 PYY 基因在异齿裂腹鱼各组织中的相对表达量以及餐前餐后和禁食复喂试验在脑组织中的相对表达量。根据拼接所得的 PYY 基因序列设计 Real-time PCR 引物 PYY-realF 和 PYY-realR,内参基因

为 *GAPDH*, 其引物为 *GAPDHF*、*GAPDHR*, 引物序列见表 1。Real-time PCR 反应体系 (20 μL): $2\times$ 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 。Real-time PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 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。

1.6 异齿裂腹鱼 PYY 的生物信息学分析

采用 DNAMAN 软件和 ExPASy 程序 (<http://www.expasy.ch/tools/>) 分别对 PYY 基因进行碱基序列编译和蛋白功能位点分析; 采用 DNAMAN 软件中的 Alignmet 程序进行氨基酸序列同源性比较; 采用 MEGA 5.0 软件中的 Phylogenetic Analysis 程序构建 PYY 基因序列系统发育树; 利用 SignalP 5.0 对 PYY 蛋白结构进行分析; 利用 ProtScale 程序对 PYY 蛋白的疏水性进行分析; 采用 ProtParam 软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 检索蛋白质序列理化参数; 采用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 预测

PYY 蛋白质的三级结构。

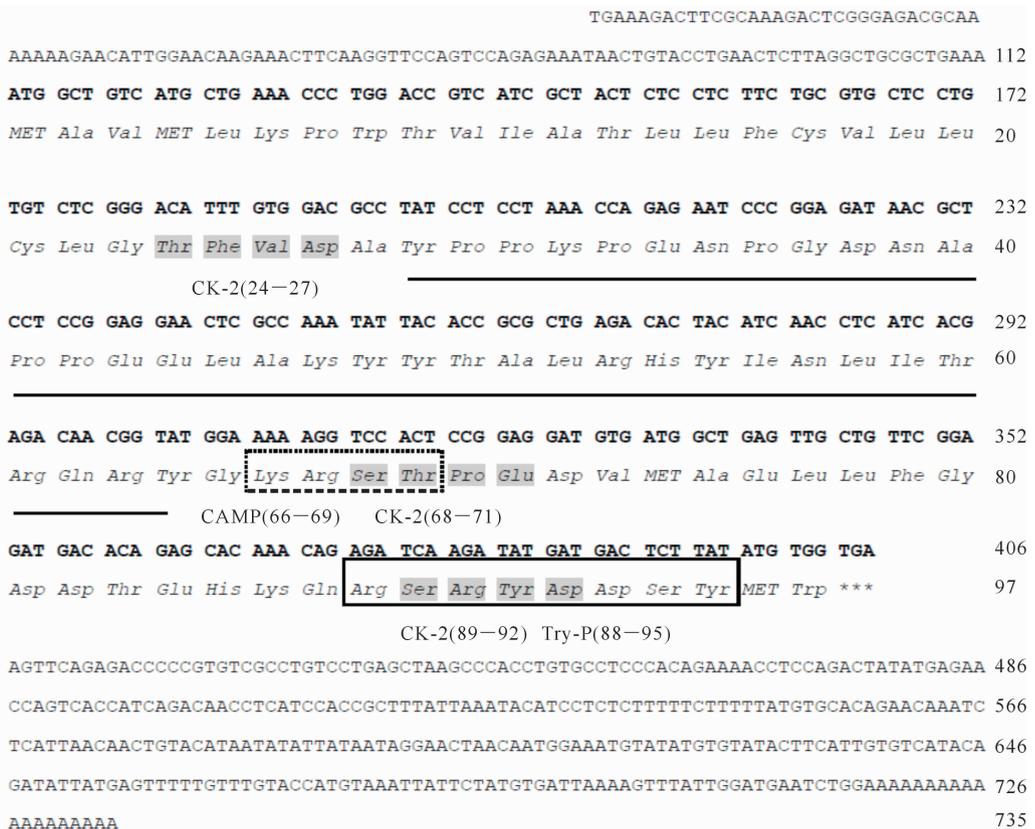
1.7 数据处理与分析

将 Real-time PCR 所得数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行分析, 基因相对表达量的试验结果通过 IBM SPSS Statistics 软件进行处理分析, 并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 PYY 基因全长 cDNA 序列克隆和氨基酸序列分析

PYY 基因 2 条核心片段长度分别为 289 和 328 bp, 3' 末端长度为 168 bp。对 3 段序列进行拼接分析, 结果 (图 1) 表明 PYY 基因 CDS 序列长度为 735 bp, 其中 5' 端非编码区为 112 bp, 3' 端非编码区为 329 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 294 bp, 共编码 98 个氨基酸, 且包含典型的 polyA 尾序列。起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA。



粗体字母表示完整的开放阅读框。灰色阴影表示酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (CK-2); 黑色虚线框表示环磷酸腺苷位点 (CAMP); 黑色实线框表示色氨酸磷酸化位点 (Try-P); 黑色下划线表示特征序列

Boldface characters represent open reading frame (ORF). Casein kinase II phosphorylation sites (CK-2) are shadowed in gray.

Cyclic adenosine monophosphate (CAMP) is in black dotted box. Try phosphorlatin (Try-P) is in black box. Feature sequence is underlined

图 1 异齿裂腹鱼 PYY 基因序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 Sequences of PYY gene and deduced amino acids from *Schizothorax o'connori*

氨基酸序列分析(图 1)表明,异齿裂腹鱼 PYY 基因全序列有 3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(CK-2)、1 个环磷酸腺苷位点(CAMP)和 1 个色氨酸磷酸化位点(Try phosphorlatin site)。预测异齿裂腹鱼 PYY 分子式为 $C_{511}H_{781}N_{131}O_{146}S_6$, 相对分子质量为 11 287.97, 原子总数为 1 575, 理论等电点为 5.59, 不稳定系数为 61.36, 因此异齿裂腹鱼 PYY 属于不稳定蛋白, 正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)总数 11 个, 负电荷氨基酸残基(Asp+Glu)总数 13 个, 疏水值为 78.45, 平均亲水性为 -0.398, 因此异齿裂腹鱼 PYY 为亲水性蛋白。

2.2 异齿裂腹鱼 PYY 基因的进化分析

由表 2 可知, 异齿裂腹鱼 PYY 氨基酸序列与齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*)、重口裂腹鱼 (*Schizothorax davidi*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、金鱼 (*Carassius auratus*)、斑马鱼 (*Danio*

rerio)、日本鳗鱼 (*Anguilla japonica*)、大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*)、鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*)、罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)、西伯利亚鲟鱼 (*Acipenser baeri*)、中华鲟 (*Acipensersinensis*)、脂鲤 (*Characin*)、鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*)、非洲爪蛙 (*Xenopus laevis*)、小鼠 (*Mus musculus*)、猪 (*Sus scrofa*)、牛 (*Bos taurus*)、原鸡 (*Gallus gallus*)、人 (*Homo sapiens*) 的同源性依次为 97.94%, 97.94%, 96.91%, 94.85%, 92.78%, 81.44%, 80.41%, 80.41%, 79.38%, 71.13%, 71.13%, 60.82%, 59.79%, 55.56%, 52.04%, 50.52%, 48.45%, 47.42% 和 47.42%。这表明异齿裂腹鱼 PYY 氨基酸序列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、斑马鱼的同源性次之。

表 2 异齿裂腹鱼与其他动物 PYY 氨基酸序列同源性的比较

Table 2 Comparison of amino acid sequences of PYY between *Schizothorax o'connori* and other animals

物种 Species	肽 YY 类型 PYY type	氨基酸长度/bp Length of amino acids	GenBank 登录号 GenBank accession No.	同源性/% Identity
齐口裂腹鱼 <i>Schizothorax prenanti</i>	PYY	97	AGY79154	97.94
重口裂腹鱼 <i>Schizothorax davidi</i>	PYY	97	AVW89324	97.94
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	PYY	97	AFE89419	96.91
金鱼 <i>Carassius auratus</i>	PYY	97	ACJ03593	94.85
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	PYY	97	AAI62428	92.78
日本鳗鱼 <i>Anguilla japonica</i>	PYY	97	BAD01501	81.44
大西洋鲑鱼 <i>Salmo salar</i>	PYY	97	NP_001132995	80.41
鳊鱼 <i>Siniperca chuatsi</i>	PYY	97	AHC02459	80.41
罗非鱼 <i>Oreochromis mossambicus</i>	PYY	97	XP_003446444	79.38
西伯利亚鲟鱼 <i>Acipenser baeri</i>	PYY	97	AJZ68874	71.13
中华鲟 <i>Acipensersinensis</i>	PYY	97	ABY27301	71.13
脂鲤 <i>Characin</i>	PYY	96	AEC12726	60.82
鲈鱼 <i>Lateolabrax japonicus</i>	PYY	97	CAB64934	59.79
非洲爪蛙 <i>Xenopus laevis</i>	PYY	99	NP_001072427	55.56
小鼠 <i>Mus musculus</i>	PYY	98	NP_001029252	52.04
猪 <i>Sus scrofa</i>	PYY	97	NP_001243457	50.52
牛 <i>Bos taurus</i>	PYY	97	NP_001035677	48.45
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	PYY	90	AND73825	47.42
人 <i>Homo sapiens</i>	PYY	90	CAG46926	47.42

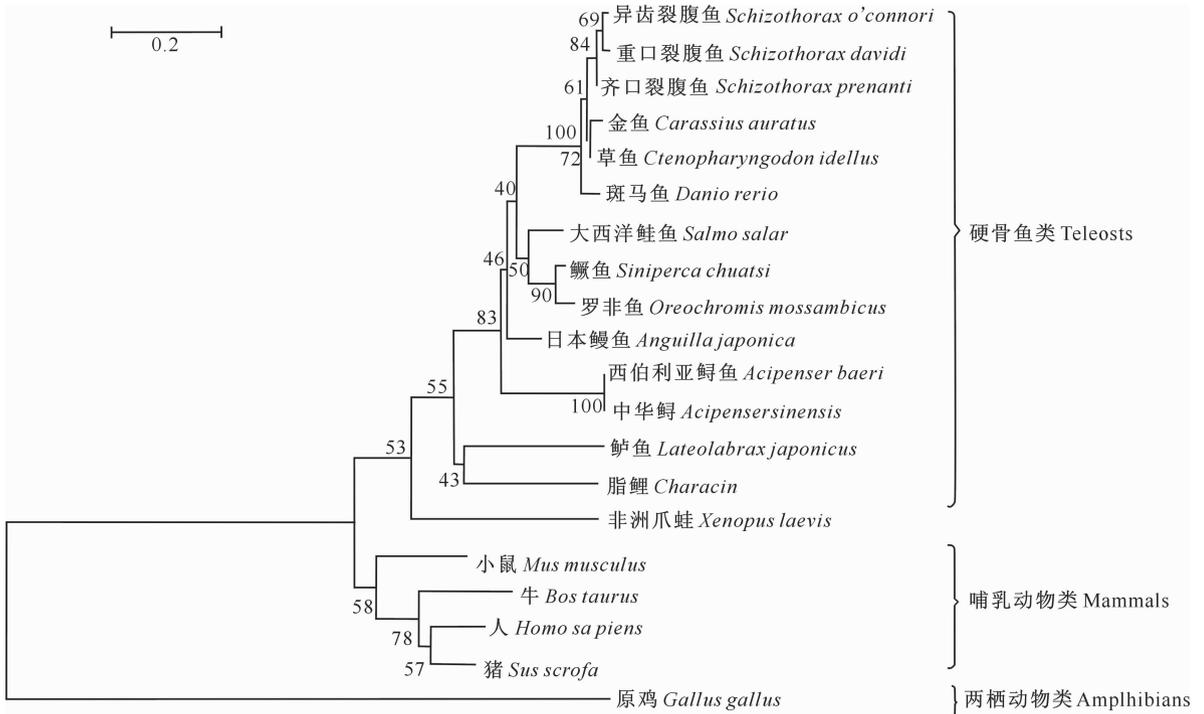
利用 MEGA 5.0 软件中的 Phylogenetic Analysis 程序, 构建了不同物种 PYY 氨基酸序列系统发育树, 结果见图 2。由图 2 可知, PYY 在系统发育树上聚成 3 支, 分别为硬骨鱼类、哺乳动物类和两栖动物类, 在硬骨鱼类中, 异齿裂腹鱼与同属鲤形目的草鱼、金鱼、斑马鱼聚在一支上, 且与同属裂腹鱼属的齐口裂腹鱼和重口裂腹鱼距离最近。

2.3 异齿裂腹鱼 PYY 的蛋白结构分析

利用 SignalP 5.0 在线软件对 PYY 蛋白结构进

行分析, 发现异齿裂腹鱼 PYY 序列包含 1 个由 28 个氨基酸残基(第 1—28 位氨基酸)组成的信号肽; PYY 蛋白具有典型的特征序列“YPPKPENPGD-NAPPEELAKYYTALRHYINLITRQRY(第 29—64 位氨基酸)”;运用 TMHMM 服务器的分析表明, 异齿裂腹鱼 PYY 蛋白结构中有 1 个跨膜结构(图 3), 因此推测异齿裂腹鱼 PYY 属于跨膜蛋白。

利用 ProtScale 程序对异齿裂腹鱼 PYY 蛋白的亲疏水性进行分析, 结果如图 4 所示。



节点上数据表示 1 000 次重复的支持率,比例尺表示每千碱基的替换数目

Numbers at the nodes denote the bootstrap values of 1 000 replicates, scale represents the number of substitutions per 1 000 bases

图 2 基于 PYY 氨基酸序列构建的异齿裂腹鱼及其他动物的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Schizothorax o'connori* and other animals based on PYY amino acid sequences

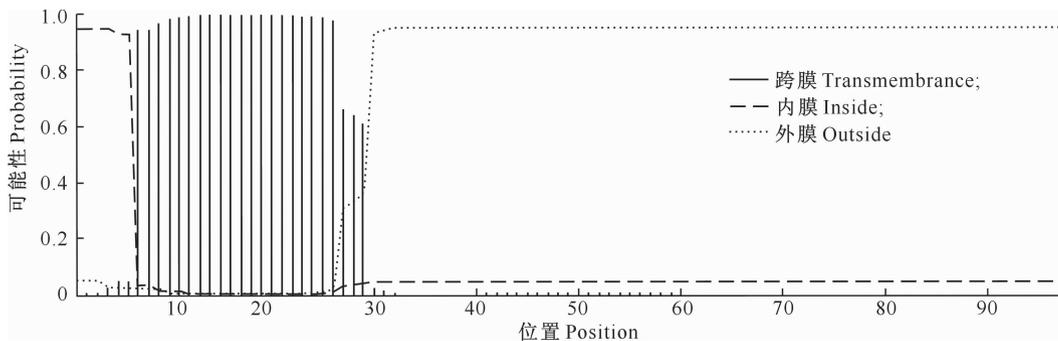


图 3 异齿裂腹鱼 PYY 蛋白跨膜结构分析

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

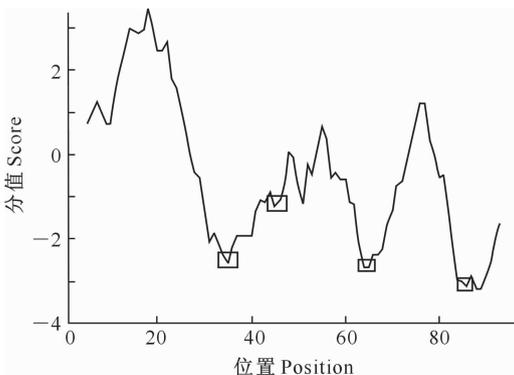


图 4 异齿裂腹鱼 PYY 蛋白的疏水结构

Fig. 4 Hydrophobic structure of PYY protein from *Schizothorax o'connori*

由图 4 可知,异齿裂腹鱼 PYY 蛋白质的 4 个低分值 (Score < 0) 峰分别分布在 35, 45, 64 和 85 区域,这些区域均属于高亲水性。运用 Phyre2 对 PYY 蛋白的三级结构进行预测,结果显示 α 螺旋占预测序列的 60%。

2.4 异齿裂腹鱼 PYY 基因的组织表达特征研究

通过实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 技术,检测 PYY 基因在异齿裂腹鱼心脏、肝脏、肌肉、脑、眼睛、肾脏、肠道、鳃、皮肤、鳔和脾脏组织中的相对表达量,结果如图 5 所示。由图 5 可知, PYY 基因在异齿裂腹鱼的 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 ($P < 0.05$),其

次是肝脏和眼,而在心脏、肌肉、肾脏、肠道、鳃、皮肤、鳔和脾脏组织中表达微弱。PYY 基因在脑组织

中的表达量为肝脏的29.40倍。

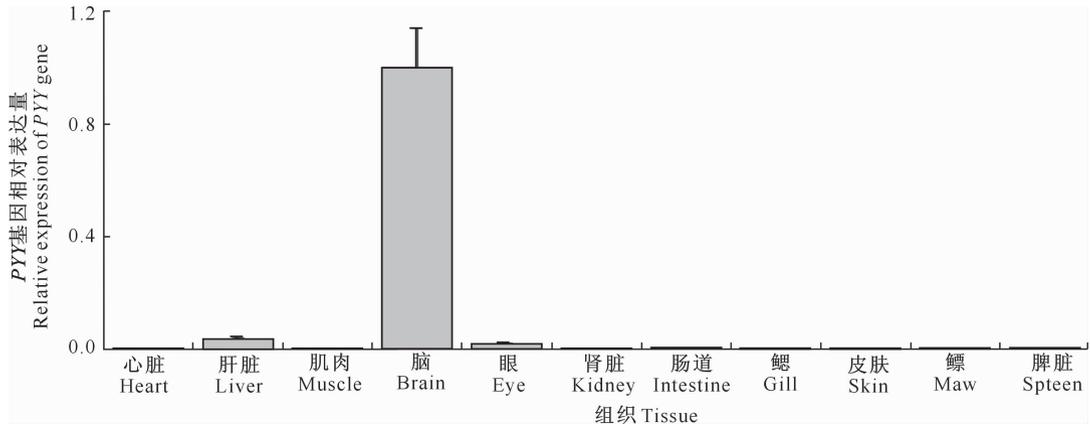


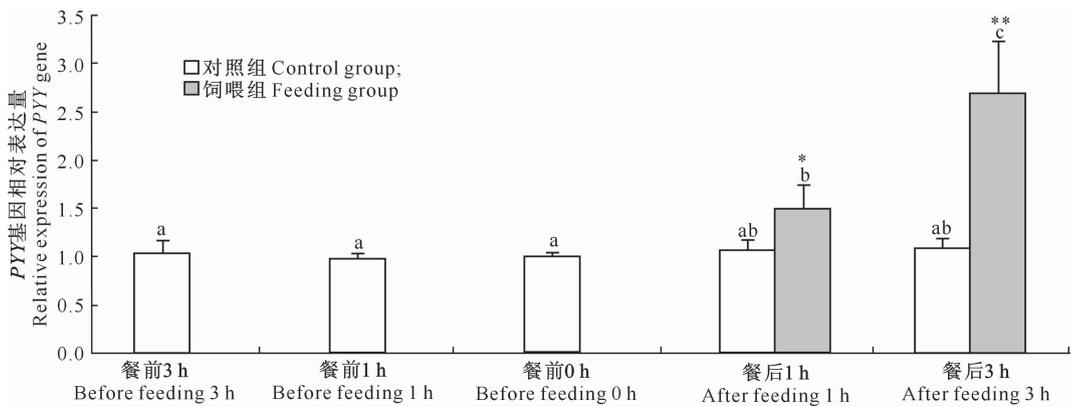
图 5 异齿裂腹鱼 PYY 基因的组织分布

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

2.5 异齿裂腹鱼 PYY 基因的功能研究

2.5.1 餐前餐后 PYY 基因的表达 通过实时荧光定量 PCR 技术检测餐前餐后对 PYY 基因在异齿裂腹鱼脑组织中的相对表达量,结果见图 6。由图 6 可知,餐前试验中,随着饲喂时间的变化,对照组 PYY 基因的相对表达量无显著性变化($P > 0.05$);

而餐后试验中,摄食使异齿裂腹鱼 PYY 基因的相对表达量显著升高($P < 0.05$),其中在餐后 1 h 时,饲喂组中 PYY 基因的相对表达量是对照组的 1.40 倍;餐后 3 h 时,饲喂组中的 PYY 基因相对表达量是对照组的 2.46 倍。



图柱上标不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)。* 和 ** 分别表示同一处理时间下

不同处理间差异显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)。图 7 同

Different lowercase letters indicate significant difference among groups ($P < 0.05$). * and ** indicate significant ($P < 0.05$) and extremely significant difference ($P < 0.01$) in relative expression level of PYY gene among different groups in the same time. The same for Fig. 7

图 6 餐前餐后异齿裂腹鱼脑组织中 PYY 基因的表达

Fig. 6 Preprandial and Postprandial change PYY gene expression in the brain of *Schizothorax o'connori*

2.5.2 禁食复喂对 PYY 基因表达的影响 由图 7 可知,禁食复喂对 PYY 基因的相对表达量有明显影响。在禁食试验中,禁食使异齿裂腹鱼 PYY 基因的相对表达量降低。与对照组相比,在禁食 1 d 时,试验组异齿裂腹鱼 PYY 基因在脑组织中的相对表达量显著降低($P < 0.05$);而禁食 3 和 5 d 时,试验组 PYY 基因的相对表达量虽有所降低,但差异不显著

($P > 0.05$)。在复喂 1,3 和 5 d 时,试验组 PYY 基因的相对表达量均极显著高于对照组($P < 0.01$),但随着复喂时间的延长,PYY 基因的相对表达量逐渐下降。复喂 1 d 时,试验组 PYY 基因的相对表达量最高,为对照组的 1.72 倍;复喂 3 和 5 d 时,试验组 PYY 基因的相对表达量分别为对照组的 1.47 和 1.30 倍。

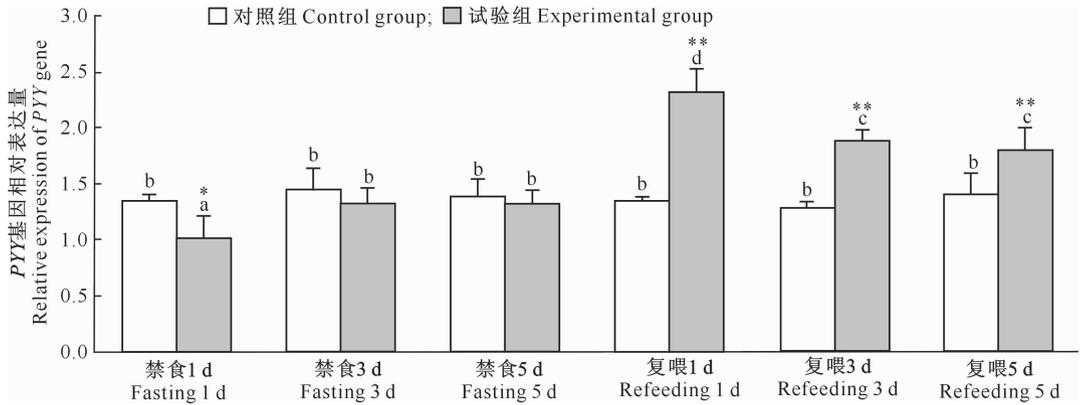


图 7 禁食复喂对异齿裂腹鱼脑组织中 PYY 基因表达的影响

Fig. 7 Effects of fasting and refeeding on PYY gene expression in brain of *Schizothorax o'connori*

3 讨论

本研究克隆得到异齿裂腹鱼 PYY 基因序列为 735 bp, 其中开放阅读框(ORF)为 294 bp, 编码 98 个氨基酸。蛋白结构分析表明, 异齿裂腹鱼 PYY 氨基酸序列包含 1 个由 28 个氨基酸残基组成的信号肽(第 1—28 位氨基酸)和 1 个典型的特征序列(第 29—64 位氨基酸), 这与齐口裂腹鱼^[22]和草鱼^[23]等其他鱼类的研究结果相似。蛋白结构分析也表明, 异齿裂腹鱼 PYY 编码的蛋白质包含多个磷酸化位点, 该蛋白质序列中有明显的高亲水性结构和跨膜结构, 这对深入研究该蛋白的功能具有重要意义。氨基酸同源性分析表明, 异齿裂腹鱼 PYY 氨基酸序列与同属于硬骨鱼纲鲤形目的鱼类同源性最高, 为 97.94%~92.78%; 与其他鱼类 PYY 氨基酸序列的同源性较低, 为 81.44%~59.79%; 与哺乳动物和两栖动物氨基酸序列的同源性最低, 为 52.04%~47.42%。PYY 基因系统进化树分析表明, 异齿裂腹鱼与齐口裂腹鱼、重口裂腹鱼、金鱼、草鱼、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, 这说明异齿裂腹鱼 PYY 基因的结构较为保守。前人在一些硬骨鱼中发现 PYY 基因还存在另外一种基因型^[24], 但本研究在异齿裂腹鱼中仅获得一种 PYY 基因型, 是否还存在其他亚型, 尚有待进一步研究。

基因在组织中的表达可能与组织的某种生理功能有关。为了明确 PYY 基因在异齿裂腹鱼中的功能, 本研究采用实时荧光定量 PCR 技术, 检测了 PYY 基因在异齿裂腹鱼 11 种组织中的分布情况。结果表明, PYY 基因在异齿裂腹鱼脑组织中高度表达, 而在肠道组织中微弱表达, 这与前人在齐口裂腹鱼^[22]、金鱼^[6]、草鱼^[21]等鱼类中的研究结果相似, 但

与斑马鱼^[25]、大西洋鲑^[26]以及哺乳动物^[27]中的研究不同, 说明物种不同, PYY 基因的组织表达特征不同, 其参与的生物学功能也可能不同; 此外本研究结果也暗示, PYY 基因可能参与异齿裂腹鱼神经系统的生理功能, 未参与消化系统的生理功能。

组织表达特征研究证实, PYY 基因主要在异齿裂腹鱼脑组织中表达, 因此推断异齿裂腹鱼 PYY 调节摄食的主要组织是脑而不是肠道, 因此本试验选择脑组织作为 PYY 基因摄食功能的研究材料。研究结果表明, 餐前异齿裂腹鱼 PYY 基因的相对表达量无显著性差异, 但餐后 PYY 基因的相对表达量显著升高, 且随着餐后时间的延长, 其表达量也持续升高, 这说明 PYY 是异齿裂腹鱼餐后饱感信号因子。已有研究表明, 齐口裂腹鱼脑部 PYY 基因的相对表达量在餐后 1 h 有明显升高, 但在餐后 3 h 时下降^[22]; 金鱼大脑 PYY 的表达量在餐后 1 h 时无明显变化, 但在餐后 3 h 时明显增加^[6]; 草鱼摄食 2 h 后, 大脑 PYY 基因的表达量最高, 而后表达量逐渐下降^[23]; 而大西洋鲑鱼大脑 PYY 的表达量在餐后并无变化^[28]。以上研究表明, 鱼种不同 PYY 基因对摄食的响应存在差异, 这可能是不同种类鱼的生存环境和饲料组成不同所致。本研究结果表明, 禁食使异齿裂腹鱼脑组织中 PYY 基因的表达量下降, 除禁食第 1 天时试验组鱼的 PYY 基因表达量显著低于对照组外, 试验第 3 天和第 5 天时, 试验组鱼的 PYY 基因相对表达量虽低于对照组, 但二者差异不显著; 与禁食第 1 天相比, 禁食第 3 天和第 5 天时试验组鱼 PYY 基因的相对表达量显著升高, 这可能是异齿裂腹鱼对禁食产生了适应性所致。复喂后, 试验组鱼的 PYY 基因表达量极显著高于对照组, 综合禁食复喂后 PYY 基因表达量的变化规律, 推断 PYY 基因在异齿裂腹鱼中具有调节摄食的作用。

[参考文献]

- [1] 西藏自治区水产局. 西藏鱼类及其资源 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
Tibet Autonomous Region Fisheries Bureau. Fishes and fish resources in Xizang, China [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1995.
- [2] Volkoff H, Canosa L, Unniappan S, et al. Neuropeptides and the control of food intake in fish [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 142(1): 3-19.
- [3] Medeiros M, Turner A J. Processing and metabolism of peptide YY: pivotal roles of dipeptidylpeptidase-IV, aminopeptidase-P, and endopeptidase-24. 11 [J]. *Endocrinology*, 1994, 134(5): 2088-2094.
- [4] Michael C J. The origin and evolution of peptide (PYY) and pancreatic polypeptide (PP) [J]. *Peptides*, 2002, 23(2): 269-278.
- [5] Zhou C, Zhang X, Liu T, et al. *Schizothorax davidi ghrelin*: cDNA cloning, tissue distribution and indication for its stimulatory character in food intake [J]. *Gene*, 2014, 534(1): 72-77.
- [6] Gonzalez R, Unniappan S. Molecular characterization, appetite regulatory effects and feeding related changes of peptide YY in goldfish [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 166(2): 273-279.
- [7] Le R C. Attenuated peptide YY release in obese subjects is associated with reduced satiety [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(1): 3-8.
- [8] Koda S, Date Y, Murakami N, et al. The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(5): 2369-2375.
- [9] Lluís F, Gomez G, Fujimura M, et al. Peptide YY inhibits nutrient-, hormonal-, and vagally-stimulated pancreatic exocrine secretion [J]. *Pancreas*, 1987, 2(4): 454-462.
- [10] Fung L C, Chisholm C, Greenberg G R. Glucagon-like peptide-1-(7-36) amide and peptide YY mediate intraduodenal fat-induced inhibition of acid secretion in dogs I [J]. *Endocrinology*, 1998, 139(1): 189-194.
- [11] Savage A, Adrian T, Carolan G, et al. Effects of peptide YY (PYY) on mouth to caecum intestinal transit time and on the rate of gastric emptying in healthy volunteers [J]. *Gut*, 1987, 28(2): 166-170.
- [12] Spiller R, Trotman I, Higgins B, et al. The ileal brake-inhibition of jejunal motility after ileal fat perfusion in man [J]. *Gut*, 1984, 25(4): 365-374.
- [13] Mentlein R, Dahms P, Grandt D, et al. Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV [J]. *Regulatory Peptides*, 1993, 49(2): 133-144.
- [14] Playford R J, Mehta S, Upton P, et al. Effect of peptide YY on human remal function [J]. *American Journal of Physiology*, 1995, 268(4): F754-F759.
- [15] Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake [J]. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2008, 18(2): 158-168.
- [16] Ma B S, Huo B, Xie C X, et al. Age validation, and comparison of otolith, vertebrae and opercular bone for estimating age of *Schizothorax o'connori* in the Yarlung Tsangpo River, Tibet [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2011, 90: 159-169.
- [17] He D K, Chen Y F, Chen Y Y, et al. Molecular phylogeny of the specialized schizothoracine fishes (Teleostei: Cyprinidae), with their implication for the uplift of the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Chin Sci Bull*, 2004, 49: 39-48.
- [18] 武云飞, 康斌, 吴翠珍. 西藏鱼类染色体多样性的研究 [J]. *动物学杂志*, 1999, 20(4): 258-264.
Wu Y F, Kang B, Wu C Z. Study on the chromosome diversity of Tibetan fish [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1999, 20(4): 258-264.
- [19] Ma B S, Xie C X, Huo B, et al. Age and growth of a long liver fish *Schizothorax o'connori* in the Yarlung Tsangpo River, Tibet [J]. *Zoological Studies*, 2010, 49: 749-759.
- [20] Yuan D, Wang T, Zhou C, 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.
- [21] Yuan D, Wer R, Wang T, et al. Appetite regulation in *Schizothorax prenanti* by three *CART* genes [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 224: 194-204.
- [22] Yuan D Y, Zhou C W, Wang T, et al. Molecular characterization and tissue expression of peptide YY in *Schizothorax prenanti*: effects of periprandial changes and fasting on expression in the hypothalamus [J]. *Regulatory Peptides*, 2014, 190: 32-38.
- [23] Chen Y, Shen Y, Pandit N P, et al. Molecular cloning, expression analysis, and potential food intake attenuation effect of peptide YY in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 187: 66-73.
- [24] Sundstrom G, Larsson T A, Brenner S, et al. Evolution of the neuropeptide Y family: new genes by chromosome duplications in early vertebrates and in teleost fishes [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 155(3): 705-716.
- [25] Soderberg C, Wraith A, Ringvall M, et al. Zebrafish genes for neuropeptide Y and peptide YY reveal origin by chromosome duplication from an ancestral gene linked to the homeobox cluster [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2000, 75(3): 908-918.
- [26] 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.
- [27] Ekblad E, Sundler F. Distribution of pancreatic polypeptide and peptide YY [J]. *Peptides*, 2002, 23(2): 251-261.
- [28] Valen R, Jordal A E, 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.