



## 大口黑鲈 *leptin A* 基因的组织表达及其对急性低氧胁迫的响应

张冬梅, 赵柳兰, 刘巧, 何阔, 廖磊,  
罗杰, 孙俊龙, 杨淞\*

(四川农业大学动物科技学院, 四川成都 611130)

**摘要:** 瘦素 (*leptin*) 是一种重要的激素, 参与调节动物的摄食、繁殖和能量消耗, 其可以通过抑制食欲和促进能量代谢的方式维持机体能量稳态。大多数鱼类具有双重瘦素基因。在本研究中, 利用 PCR 技术克隆了大口黑鲈 *leptin A* 基因的编码区, 其开放阅读框 (ORF) 为 486 bp, 编码 161 个氨基酸蛋白。通过与其他物种进行同源性比对, 发现鲈形目的 *leptin* 基因的保守性较高, 一致性高达 91.46%, 在大口黑鲈 *leptin A* 中几乎不存在基因特异性突变位点, 而且大口黑鲈 *leptin A* 氨基酸序列与鳊同源性最高 (92.59%), 与花鲈 (89.51%)、布氏鲳鲙 (87.04%)、斜带石斑鱼 (83.87%) 的同源性次之。组织分布结果显示, *leptin A* 基因在肝脏中的表达量最高, 在心脏、头肾、脑、中肾、肠、脾脏、鳃、肌肉和性腺中的表达量均较低。此外, 对大口黑鲈进行不同程度急性低氧胁迫 [重度低氧 (1.2±0.2)mg/L 和 中度低氧 (3.5±0.2)mg/L], 发现低氧胁迫初期时, 严重低氧组和 中度低氧组的 *leptin A* 的表达量都升高, 显著高于对照组 *Leptin A* 的表达。这表明急性低氧能够诱导大口黑鲈 *leptin A* 在肝脏中的表达。综上所述, 大口黑鲈 *leptin A* 基因与鳊 *leptin A* 基因的同源性最高, *leptin A* 主要在大口黑鲈肝脏中显著表达, 急性低氧胁迫能显著诱导 *leptin A* 的表达。

**关键词:** 大口黑鲈; 瘦素; 基因克隆; 基因表达; 低氧胁迫

中图分类号: Q 785; S 965

文献标志码: A

瘦素 (*leptin*, *Lep*) 是肥胖基因 (*obese gene*, *ob*) 编码的一种蛋白类激素, 它在摄食、生长、生殖、免疫、能量平衡等方面具有重要作用<sup>[1]</sup>。在哺乳类动物中主要由脂肪细胞分泌, 通过血液循环穿过血脑屏障, 然后作用于下丘脑内的 *leptin* 受体, 从而将外周信号反馈至中枢, 具有抑制食欲<sup>[2]</sup>、调节能量代谢<sup>[3]</sup>、神经内分泌<sup>[4]</sup>、生长<sup>[5]</sup>、生殖<sup>[6]</sup>、免疫反应<sup>[7]</sup> 等多种功能。系统发育重建表明, 由于鱼类中的基因组复制导致部分鱼类中存在不同亚型的 *leptin* 基因, 鱼类中发

现的 *leptin* 基因主要有两类: *leptin A* 和 *leptin B*, 它们在不同的器官中表达量不同。在人等哺乳动物中, *leptin* 主要储存在脂肪组织中<sup>[1]</sup>。而肝脏作为鱼类脂质的主要储存部位, *leptin* 在其中大量表达, 而在其他器官中表达量很低<sup>[8]</sup>。

溶解氧对鱼类的生存、生活和新陈代谢至关重要<sup>[9]</sup>。然而, 在养殖过程中, 低氧不可避免的发生, 从而导致鱼类免疫下降<sup>[10]</sup>、生长受阻甚至死亡<sup>[11-13]</sup>。这增加了水产养殖的成本, 严重制约了水产养殖的发展。为了在低氧的环境下存

收稿日期: 2020-01-17 修回日期: 2020-04-19

资助项目: 国家自然科学基金 (31802267); 四川农业大学双支计划 (1921993232)

通信作者: 杨淞, E-mail: ysys210@hotmail.com

活, 鱼类进化出了许多行为反应, 如抑制摄食和移动到较低的温度区域以节省能量和减少氧气消耗。虽然这些行为反应减少了对能量和氧气的需求, 但它是鱼类生长障碍的主要原因之一。因此, 为了提高鱼类耐低氧能力, 探究鱼类耐低氧策略具有重要的科学意义。

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*), 原产美国加州, 隶属于鲈形目(Perciformes)、太阳鱼科(Centrarchidae)、黑鲈属 (*Micropterus*)<sup>[14]</sup>。由于营养价值高、肉质鲜美, 深受消费者喜爱, 目前已成为重要的名优淡水养殖品种之一<sup>[15]</sup>。然而, 大口黑鲈不耐低氧, 低氧胁迫后会影响大口黑鲈免疫反应<sup>[10]</sup>、能量代谢<sup>[16]</sup>、内分泌<sup>[17]</sup>等。目前, 低氧已被证明能增加动物内分泌系统中瘦素的表达和分泌<sup>[18-20]</sup>。本研究开展了对大口黑鲈 *leptin A* 的基因克隆、组织分布以及低氧胁迫对其表达影响的研究。该实验结果将为深入研究大口黑鲈能量代谢以及低氧胁迫下其能量调控机制提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

健康的“优鲈1号”大口黑鲈 [(120±10) g] 购自四川攀枝花贻贝渔业有限公司。实验前, 将其暂养于实验室充气增氧的塑料桶中, 暂养用水为曝气24h的自来水, 每天换水1/4, 水温(20.0±0.2)°C, 光周期为自然条件(每天10h左右)。期间采用空气泵连续增氧, 保持溶解氧7.0 mg/L以上。暂养时采用饱食投喂大口黑鲈商品饲料, 保证投喂25 min后有少量残饵, 每天在8:25和14:25

定时投喂2次, 暂养2周, 为正式实验做准备。

### 1.2 大口黑鲈 *leptin A* 基因 cDNA 的克隆

暂养2周后, 取1尾实验鱼, 取出心脏、鳃、肠、肌肉、肝脏、脑、脾脏、头肾、中肾、性腺10个组织。将组织放入研钵内, 每次加入15 mL的液氮, 将组织敲碎, 用棒研磨至粉末。用Trizol法(TaKaRa, 日本)从肝脏组织中提取出总RNA。用1%琼脂糖聚丙烯酰胺凝胶电泳和NanoDrop 1000分光光度计(Thermo Scientific, 美国)检测RNA的完整性和浓度。利用Primer 5软件, 根据大口黑鲈基因组序列设计大口黑鲈 *leptin A* 特异性引物(表1)。根据说明书, 使用试剂盒(产品编号RR037A, TaKaRa)进行去基因组逆转录合成第一链cDNA。逆转录方案在37°C下进行15 min, 85°C持续5 s; 再以第一链cDNA为模板进行PCR扩增: 94°C预变性3 min; 94°C, 30 s; 56°C, 30 s; 72°C, 1 min, 共35个循环; 72°C延伸5 min; 12°C, 永久。PCR扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测、纯化回收、连接、转化, 将阳性菌落送华大基因生物科技有限公司进行测序鉴定。

### 1.3 大口黑鲈 *leptin A* 基因 cDNA 编码序列及系统进化分析

采用DNAMAN软件对2次所得到的 *leptin A* 序列片段进行拼接, 对拼接序列进行网上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)比对, 比较以上实验得到的 *leptin* 部分序列与其他物种的 *leptin* 同源性; 用ExPASy程序(<http://www.expasy.ch/tools/>)推算其开放阅读框和编码氨基酸序列情况。用

表1 克隆与表达的引物序列

Tab. 1 Primers sequence of cloning and expression

基因 gene	目的 purpose	引物 primer	5'-3' 序列 5'-3' sequence	溶解温度/°C melting temperature	扩增长度/bp amplification size
<i>LEP-A</i>	Partial cDNA	LEP-A F1	AGCGTGCGTGTCTGTATG		572
		LEP-A R1	GGTAACCCGTCAGCGAAG		
		LEP-A F2	TGACCGTTTCTGTCTC		871
		LEP-A R2	AGTTGCCCTTACCCTTC		
<i>LEP-A</i>	Real-Time PCR	rtLEP-A F	CTCTTCGCTGACGGGTTAC	89.3	136
		rtLEP-A R	AGCCTCAATGCTCACGGT		
<i>β-actin</i>	Real-Time PCR	<i>β-actin</i> F	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	85.0	193
		<i>β-actin</i> R	ATACCGAGGAAGGAAGGCTG		

Mega 7.0 软件和 DNAMAN 软件将鲈形目的 *leptin* 基因序列进行同源性分析; 采用 ClustalX 软件将获得的大口黑鲈 *leptin A* 氨基酸序列与从 NCBI 上下载下来的其他物种的 *leptin* 氨基酸序列进行比对; 基于氨基酸序列比对文件, 在 Mega 7.0 软件中采用邻接法 (neighbor-joining method) 分析系统发生关系, 构建系统进化树。

#### 1.4 大口黑鲈 *leptin A* 组织分布

按照“大口黑鲈 *leptin A* 基因 cDNA 的克隆”中提取 RNA 的方法, 提取上述 10 个组织的 RNA。根据说明书, 使用试剂盒 (产品编号 RR047A, TaKaRa) 合成第一链 cDNA。逆转录方案在 37 °C 下进行 15 min; 85 °C 持续 5 s。根据克隆所得到的大口黑鲈 *leptin A* 基因的编码序列设计 PCR 引物 (表 1), 并使用内参基因  $\beta$ -actin mRNA 作为参照。用 TB Green Premix Ex Taq II (TaKaRa) 定量测定 *leptin A* 的 mRNA 水平, qPCR 程序: 95 °C, 3 min; 95 °C, 30 s 和 62 °C, 30 s 循环 39 次, 72 °C, 60 s。以 DEPC 水作为阴性对照的模板, 每个反应包括 3 个技术重复, 以避免误差。目的基因表达数据采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  相对表达定量方法分析获得, 并用内参  $\beta$ -actin 将数据归一, 运用 Geomean 软件计算内参基因参数, 再将表达量与其标准归一 (表达量最高的为 1), 归一的数据再用 SPSS 24.0 软件进行单因素方差分析 (ANOVA)。

#### 1.5 急性低氧胁迫对大口黑鲈 *leptin A* 表达的影响

暂养 2 周后, 将剩下的实验鱼分至 9 个鱼缸 (1 个对照组和 2 个实验组, 每组 3 个重复), 每个鱼缸 25 条实验鱼。并在每个缸中装 60 L 的曝气自来水。在 2 个实验组中, 通过鼓泡氮气 25~35 min 来调节 DO 水平。重度缺氧 (L) 组 DO 含量为 (1.2±0.2) mg/L, 中度缺氧 (M) 组 DO 含量为 (3.5±0.2) mg/L<sup>[17, 21]</sup>。根据参考文献 [17], 每隔一段时间用溶解氧仪或者碘量法监测 DO 的含量, 发现 DO 升高后, 就立即充氮气降氧, 然后再检测 DO, 直到其含量保持一致。对照组 DO 与驯化期相同 (DO 为 7.0~8.0 mg/L)。实验总时长为 26 h。先将实验鱼放在相应的 DO 环境中适应 2 h, 之后开始实验, 分别在 0、4、8、12 和 24 h 采集样本。每个鱼缸在每个时间点采集 3 条鱼。解剖前用过量的 MS-222 (100 mg/L) 对鱼进行麻醉。采集肝脏组织并用 Trizol 法 (TaKaRa, 日本) 从中提取

出总 RNA。用 1% 琼脂糖聚丙烯酰胺凝胶电泳和 NanoDrop 1000 分光光度计 (Thermo Scientific, 美国) 检测 RNA 的完整性和浓度。根据说明书, 使用试剂盒 (产品编号 RR047A, TaKaRa) 合成第一链 cDNA。逆转录方案在 37 °C 下进行 15 min; 85 °C 持续 5 s。根据上述大口黑鲈 *leptin A* 定量 PCR 引物及方法, 并使用内参基因  $\beta$ -actin mRNA 作为参照, 检测肝脏中 *leptin A* 表达变化。将得到的数据用 SPSS 24.0 软件进行 ANOVA 单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 大口黑鲈 *leptin A* cDNA 氨基酸序列分析

将 PCR 扩增所得的产物经测序、拼接, 获得大口黑鲈 *leptin A* 基因部分 cDNA 序列, 其开放阅读框 (ORF) 为 486 bp, 编码 161 个氨基酸。序列已经提交至 NCBI 数据库 (GenBank: MN 887534), 大口黑鲈 *Leptin A* cDNA 序列及推测的氨基酸序列如图 1 所示。

### 2.2 大口黑鲈 *leptin A* 的系统进化分析及蛋白序列同源性比较

*leptin* 基因序列比对结果显示, 鲈形目的 *leptin* 基因保守性较高, 一致性高达 91.46%, 在大口黑鲈 *leptin A* 中几乎不存在基因特异性突变位点 (图 2)。根据氨基酸序列比对结果, 大口黑鲈的 *leptin A* 基因所编码的蛋白与鲈形目的其他种类的 *leptin* 蛋白具有多种相同的保守氨基酸, 包括 Asp、Thr、Leu、Ala、Phe、Ser、Lys 和 Val 等。此外, 大口黑鲈 *leptin A* 与鳊 (*Siniperca chuatsi*) *leptin A* 相似性高达 92.59%; 与花鲈 (*Lateolabrax maculatus*)、条纹鲈 (*Morone saxatilis*) 等鲈形目鱼类相似性为 71%~90%; 与鲤形目 (Cypriniformes) 鱼类斑马鱼 (*Danio rerio*) 相似性为 25.34%; 与哺乳类、鸟类等高等脊椎动物的相似性为 20%~35% (图 3)。通过 Mega 7.0 软件构建的系统进化树的结构显示 (图 4), 所有的鲈形目 *leptin* [条纹鲈、花鲈、大口黑鲈、鳊、舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、布氏鲷 (*Trachinotus blochii*)、翠鲳 (*Channa punctata*) 和蓝鳍金枪鱼 (*Thunnus thynnus*)] 聚为一支, 鲤形目的斑马鱼 *leptin A* 聚为一支, 所有的哺乳类、鸟类、爬行类 *leptin* 单独聚为一支。



```

1   GTTCGGAATGACTGATGCCGGCAGTGAATATGGGTAACCTGTAACAGCAITTTAAAGGAA
61  GAATAACCTGCTCATTGTGTCTCTCCTAGAAATAOCAGTGTATTCTGAATCTATA
121 CATCTGGGAAATACTACAAAT
143  ATGGACTACACCCTTGCTGTCTGTTTCTATACTGCAAGTTTTAAGTGTGGGCTCAGC
1   M D Y T L A V L F S I L Q V L S V G S A

203  GCTCCTCTGCCAGTGGAGTAGTGAAGATGAAATCAAAAAGTGAAGTGGATGGCTGAACA
21  A P L P V E V V K M K S K V K W M A E Q

263  CTGGTGGTTAAGCTGGACAAAGACTTCCAGGTCCCTGTGGCCTGACTCTCAGCCACCT
41  L V V K L D K D F Q V P V G L I L S P P

323  TCTGATGATCGGATGGACCTTCCACCATAGTGACCGTCTTGGAGGGTTACAACAGCCTG
61  S D D L D G P S T I V T V L E G Y H S L

383  ATCTCTGACAACCITTAAGGGGTCTCTCAGGTCAAGTTTGAATCTCTTGGCTGACGGGT
81  I S D N L H G V S Q V K F E I S S L I G

443  TACCTTGATCAGTGGAGGCAGGGGCAGTGCAGTGCAGCAGCGGCCAAAGCCTTGGTACCG
101 Y L D Q W R Q G H C S E Q R P K P S V P

503  GGACCCCTACAGGACCTACAGAGTGAAGAGAGTTTATTCACACCGTGAGCATGAGGCT
121 G P L Q D L Q S R K E F I H T V S I E A

563  CTCATGAGAGTGAAGGAGTTCCTAAATCTGCTGCTGAAAAATCTGGATCATCTTGAGACT
141 L M R V K E F L N L L L K N L D H L E T

623  TGCTGA
161  C *

629  AAGACAGACATTAGTCTAGTAATGGAAAGTTACTGGCAACAATTGTAAGTCTTTCATC
689  AGTGACGCTGCAATGCAATTTAAGGACTTTTATTCACAAACATCTTACTTATTACT
749  TATTATATACACATGTATTATTTATATATTTGACTTGGAAAATAGGTAITTTGTAAAA
809  GAAAAGAACAGTCTTTTCATTCACGTGTTTGGCTGCAAGTGTGGTTCACAGGAATGT
889  TAAAAGGCAAAACAGGTCTATGCTTTCACATAAAGAAAAATCGCTGCTCACAGGTTTGT
929  CTATTACTACTGTGTATCAACAAGAGCTCCAAGTGTAAAAATGGATCTACATATTA
989  ATTACATATAGCTGAGTCCGCTGAGTAAGGTTGTTTTCAGTCAGAGGGTGTGATGAG
1 049 TAGCAACGTCATCCAGGAAATTCCTGAAAAACCCGGTGGCCAAAATCAACAGAAAGCTAC
1 109 ATGGACAAGAGGGTAAAAGGGCACTAATCCCCACCCACGACGGC

```

图 1 大口黑鲈 *leptin A* cDNA 序列及推测的氨基酸序列

Fig. 1 *leptin A* cDNA sequence and its predicted amino acid sequence in *M. salmoides*

2.3 大口黑鲈 *leptin A* mRNA 的组织表达模式

通过以  $\beta$ -actin 为内参, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测 *leptin A* 在大口黑鲈各组织中的表达情况 (图 5)。结果表明, *leptin A* 在大口黑鲈各个组织中都有表达, 但在肝脏中表达量最高, 脑、肠、鳃和脾脏中表达量较低, 其余组织中只存在微量表达。

2.4 大口黑鲈 *leptin A* 在急性低氧胁迫后的表达规律

对受到低氧胁迫后的大口黑鲈的肝脏组织进行定量表达分析, 数据表明, 0 h(即低氧适应 2 h)时, 重度低氧组的 *leptin A* 表达量显著高于

对照组 ( $P < 0.05$ ), 且中度低氧组的 *leptin A* 表达量也较对照组有所升高, 但较重度低氧组有所降低; 24 h 时, 中度低氧组的 *leptin A* 表达量与重度低氧组几乎不存在差异, 但这二者 *leptin A* 表达量均较对照组有所升高 ( $P > 0.05$ )(图 6)。

3 讨论

目前已在几种硬骨鱼中证实 *leptin* 基因存在亚型, 其包括鳊<sup>[22]</sup>、花鲈<sup>[23]</sup>、斑马鱼<sup>[8]</sup>、鲤 (*Cyprinus carpio*)<sup>[24]</sup>、大西洋鲑 (*Salmo salar*)<sup>[25-26]</sup>、青鳉 (*Oryzias latipes*)<sup>[27]</sup> 等。通常将在鱼类中发现的两类瘦素基因称为 *leptin A* 和 *leptin B*, 在鱼类已克隆的瘦素基因中绝大部分是 *leptin A*。本研究

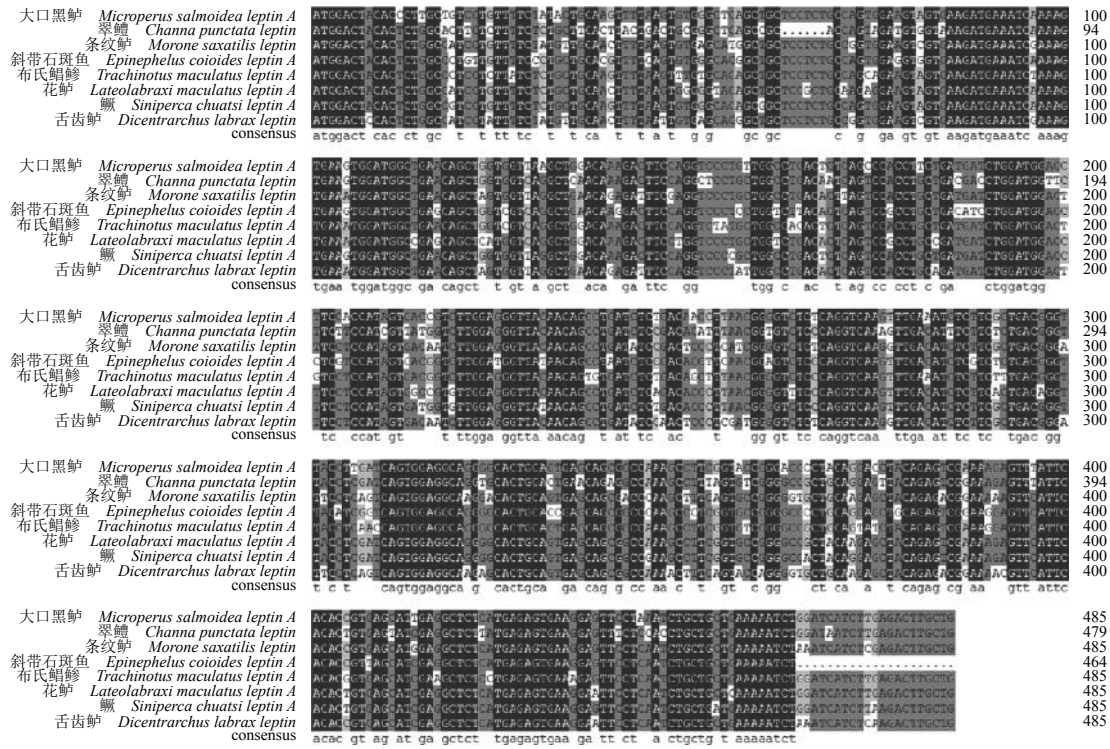


图 2 鲈形目 *leptin* 基因序列同源性比对

黑色背景表示完全保守的氨基酸位点, 深灰色背景表示氨基酸相似性大于 75%, 灰色背景表示氨基酸相似性大于 50%

Fig. 2 Homology comparison of *leptin* gene sequence in Perciformes

In the sequence, the conserved and identical residues are represented by black shading, the amino acids similarity greater than 75% and 50% are represented by dark gery and light grey respectively

首次在大口黑鲈中克隆出 *leptin A*, 其包括编码 161 个氨基酸蛋白的 486 bp 开放阅读框 (ORF)。根据鲈形目的 *leptin* 基因序列比对结果, 证明了 *leptin* 在同目的物种间高度保守, 其特异性较低。*leptin* 氨基酸序列同源性比对结果显示, 尽管与其他动物的氨基酸序列相似性较低, 但大口黑鲈 *leptin A* 与鲈形目鱼类的氨基酸序列保守性较高, 特别是和鳊的 *leptin A* 高度保守, 相似性达 92.59%, 这表明大口黑鲈与鳊之间的亲缘关系非常接近。另外, 在系统进化树中, 鲤形目的斑马鱼 *leptin A* 聚为一支, 所有的哺乳类、鸟类和爬行类 *leptin* 聚为一支, 所有鲈形目的鱼类聚为一支, 在其中大口黑鲈和鳊又聚为一支, 这也表明相比于其他物种, 鳊与大口黑鲈的亲缘关系最接近。

瘦素作为传达脂类代谢信号至脑组织的一种重要激素, 与下丘脑上分布的 *leptin* 受体结合后, 通过信号级联放大作用, 可激活多种厌食神经通路, 同时抑制促进食欲的神经通路, 增加交感神经系统活性, 导致食欲降低、增加能耗。根据这一功能, 瘦素主要由哺乳动物体内

的脂肪细胞产生。在本研究中, *leptin A* 也显示出差异表达模式, 但其主要在大口黑鲈肝脏中表达, 并在其他组织中微量表达。类似的表达模式在红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)<sup>[28]</sup>、鲤<sup>[24]</sup>、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[29]</sup>、青鲮<sup>[27]</sup> 和大西洋鲑<sup>[30]</sup> 中也有报道。在鲤<sup>[31]</sup> 和斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)<sup>[32]</sup> 中, 肝脏瘦素基因表达水平及血浆瘦素含量在摄食后会上升, 而脑中瘦素基因表达水平没有变化, 这也说明了肝脏可能是循环系统中瘦素的主要来源。这也与以前的结论一致, 即肝脏是鱼类瘦素产生的主要部位<sup>[8]</sup>。这主要是因为和哺乳动物的脂肪组织一样, 肝脏也是鱼类主要的脂质储存部位。

为了进一步了解大口黑鲈 *leptin A* 在低氧环境下的表达模式, 实验研究了急性低氧胁迫下 *leptin A* mRNA 的表达量的变化。研究表明, 低氧胁迫 0 h 时, 重度低氧组的 *leptin A* 表达量显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 且中度低氧组的 *leptin A* 表达量也较对照组有所升高, 但较重度低氧组有所降低; 24 h 时, 中度低氧组的 *leptin A* 表达量与重度低氧组几乎不存在差异, 但二者 *leptin A*



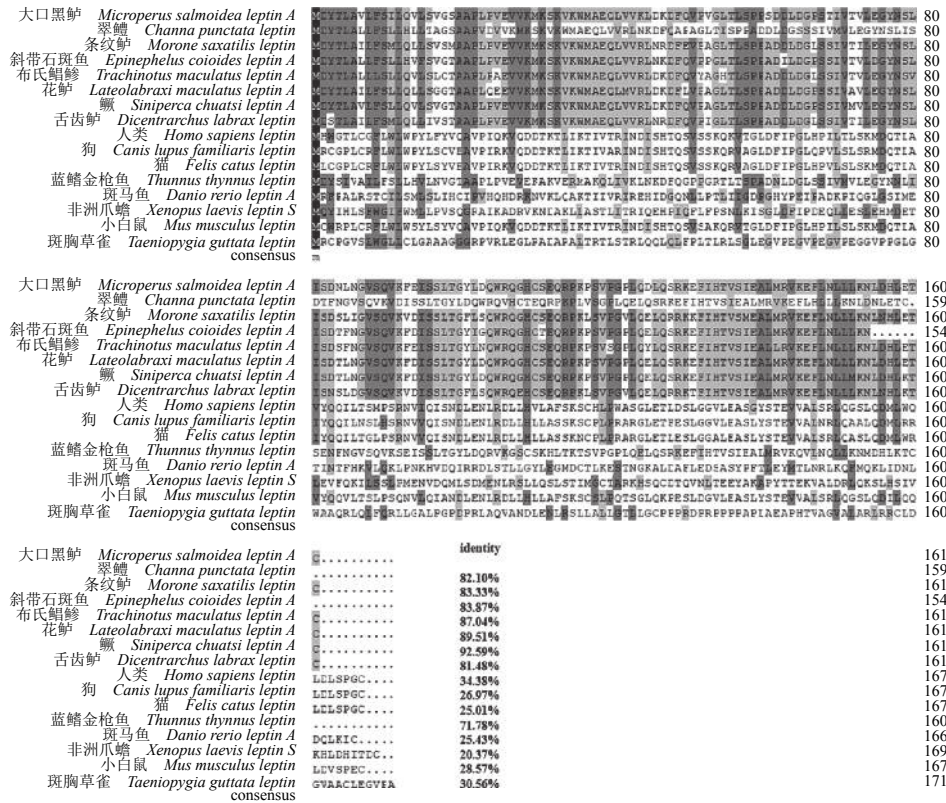


图 3 leptin 氨基酸序列同源性比对

黑色表示所有比对物种 leptin 氨基酸几乎完全一致，颜色越浅表示一致性越低

Fig. 3 Homology comparison of leptin amino acid sequence

Black indicates almost complete consistency of leptin amino acid in all comparison species. The lighter the color, the lower the consistency

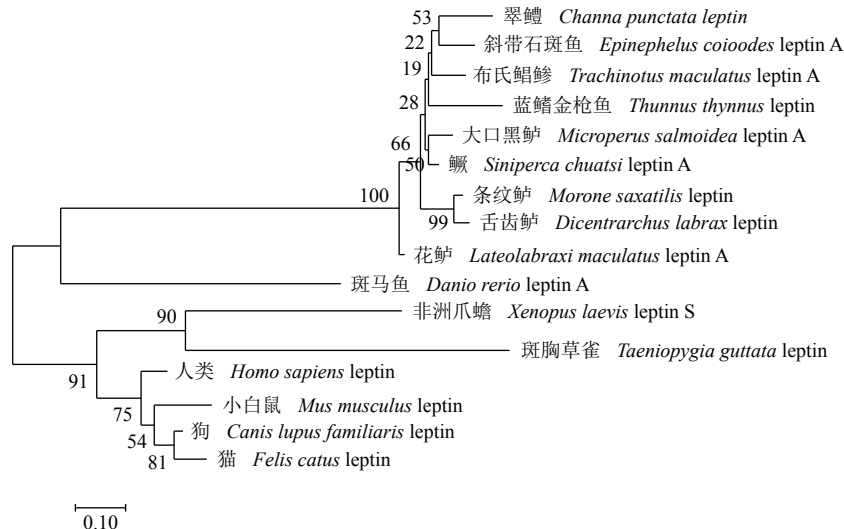


图 4 不同物种 leptin 蛋白质序列构建的 NJ 系统进化树

分支的数字代表置信度

Fig. 4 NJ phylogenetic tree constructed by leptin protein sequences of different species

The number of branches represents confidence

表达量均较对照组有所升高 ( $P>0.05$ )。近年来, 和胚胎<sup>[33]</sup>中 leptin A 的表达水平, 这些结果都表明已有报道表明, 低氧胁迫会增加斑马鱼肝脏<sup>[20]</sup> 明了低氧胁迫对 leptin A 的表达有促进作用。本

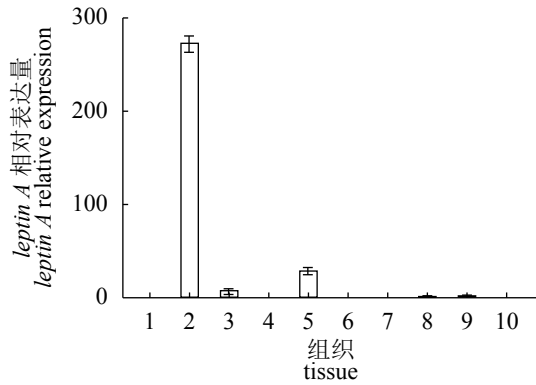


图 5 *leptin A* 在大口黑鲈各个组织中的表达分布

1. 心脏, 2. 肝脏, 3. 脑, 4. 肌肉, 5. 肠, 6. 头肾, 7. 中肾, 8. 脾脏, 9. 鳃, 10. 性腺

Fig. 5 Expression distribution of *leptin A* in various tissues of *M. salmoides*

1. heart, 2. liver, 3. brain, 4. muscles, 5. intestine, 6. head kidney, 7. middle kidney, 8. spleen, 9. gill, 10. gonads

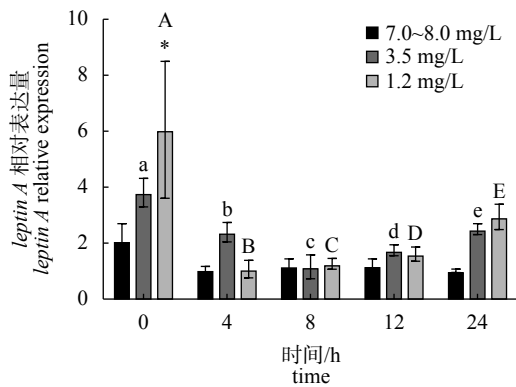


图 6 低氧胁迫后大口黑鲈肝脏 *leptin A* 的表达规律

在每个暴露水平范围内, 暴露时间的显著性差异用不同的字母表示, 小写字母表示中度低氧组, 大写字母表示重度低氧组, 星号 (\*) 表明与同一时间点的对照组之间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )

Fig. 6 Expression pattern of *leptin A* after hypoxia stress

Within each exposure level range, significant differences in exposure time were indicated by different letters, lowercase for moderate hypoxia group, uppercase for severe hypoxia group, and asterisks (\*) indicated significant differences from the control group at the same time point ( $P < 0.05$ )

课题组以往的研究表明, 大口黑鲈在低氧环境下, 其体内的低氧诱导因子 (*HIF-1*) 的表达量会升高<sup>[29]</sup>, 另外 Chu 等<sup>[20]</sup> 也发现, 在 *HIF-1* 过量表达的斑马鱼胚胎中, 其 *leptin A* 的表达量也升高。这表明在低氧情况下, *HIF-1* 可能参与调控 *leptin A* 基因在鱼类中的表达。另外, 本课题组以往的研究也发现低氧胁迫会显著增加大口黑鲈肝糖原的分解, 这表明肝糖原是急性低氧时的主要

能量来源<sup>[34]</sup>。刘才智<sup>[35]</sup> 在对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 的实验中也发现, *leptin A* 可动员肝糖原分解, 提高血糖水平。可以由此推测, 大口黑鲈在低氧条件下, 体内的低氧诱导因子 (*HIF-1*) 表达量会升高, 从而诱导肝脏中 *leptin A* 的表达, 从而 *leptin A* 可能促进体内肝糖原的分解, 为机体提供足够的能量。随着肝糖原的分解, 鱼体代谢所需能量逐渐转为其他代谢方式提供, 这可能减弱了 *leptin A* 对肝糖原的作用, 进而降低了 *leptin A* 的转录水平。所以低氧胁迫 24 h 时的 *leptin A* 的含量低于 0 h。

综上, 本研究确定了大口黑鲈 *leptin A* 基因的序列信息和组织特异性, 首次指出大口黑鲈 *leptin A* 基因受到低氧胁迫的调控, 而且推测其可能参与调节肝脏能量代谢, 为之后对于低氧胁迫调控肝脏能量代谢的研究提供了新的思路, 也为研究大口黑鲈低氧胁迫下能量调控机制提供参考依据。然而现在对于低氧如何调控大口黑鲈 *leptin A* 的表达, 以及大口黑鲈 *leptin A* 对肝糖原的调控机制尚不清楚, 其具体机制有待于进一步研究。

#### 参考文献 (References):

- [1] Zhang Y Y, Proenca R, Maffei M, *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. *Nature*, 1994, 372(6505): 425-432.
- [2] Verhagen L A W, Luijendijk M C M, Adan R A H. Leptin reduces hyperactivity in an animal model for anorexia nervosa via the ventral tegmental area[J]. *European Neuropsychopharmacology*, 2011, 21(3): 274-281.
- [3] Davis J F, Choi D L, Schurdak J D, *et al.* Leptin regulates energy balance and motivation through action at distinct neural circuits[J]. *Biological Psychiatry*, 2011, 69(7): 668-674.
- [4] Kutlu S, Aydin M, Alcin E, *et al.* Leptin modulates noradrenaline release in the paraventricular nucleus and plasma oxytocin levels in female rats: a microdialysis study[J]. *Brain Research*, 2010, 1317: 87-91.
- [5] Landersdorfer C B, Dubois D C, Almon R R, *et al.* Mechanism-based modeling of nutritional and leptin influences on growth in normal and type 2 diabetic rats[J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2009, 328(2): 644-651.

- [6] El-Eshrawy M M, Abdel Aal I A, El Hawary A K. Association of ghrelin and leptin with reproductive hormones in constitutional delay of growth and puberty[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2010, 8(1): 153.
- [7] Loffreda S, Yang S Q, Lin H Z, *et al.* Leptin regulates proinflammatory immune responses[J]. *The FASEB Journal*, 1998, 12(1): 57-65.
- [8] Gorissen M, Bernier N J, Nabuurs S B, *et al.* Two divergent leptin paralogues in zebrafish (*Danio rerio*) that originate early in teleostean evolution[J]. *Journal of Endocrinology*, 2009, 201(3): 329-339.
- [9] Zeng L, Wang Y H, Ai C X, *et al.* Effects of  $\beta$ -glucan on ROS production and energy metabolism in yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) under acute hypoxic stress[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(5): 1395-1405.
- [10] Sun J L, Zhao L L, Liao L, *et al.* Interactive effect of thermal and hypoxia on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) gill and liver: aggravation of oxidative stress, inhibition of immunity and promotion of cell apoptosis[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 98: 923-936.
- [11] Zhu C D, Wang Z H, Yan B. Strategies for hypoxia adaptation in fish species: a review[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2013, 183(8): 1005-1013.
- [12] Robertson C E, Wright P A, Köblitz L, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 mediates adaptive developmental plasticity of hypoxia tolerance in zebrafish, *Danio rerio*[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2014, 281(1786): 20140637.
- [13] Mahfouz M E, Hegazi M M, El-Magd M A, *et al.* Metabolic and molecular responses in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* during short and prolonged hypoxia[J]. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 2015, 48(5): 319-340.
- [14] 杜芳芳. 大口黑鲈 POU1F1, PSSSNPs 位点的筛选及与生长的关联性分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.
- Du F F. The SNPs screening of POU1F1 and PSS gene and its correlation with growth traits in largemouth bass[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011 (in Chinese).
- [15] 赵柳兰, 蒲粟, 杨淞, 等. 大口黑鲈外周血细胞显微结构、细胞化学特征及吞噬作用的研究[J]. *四川动物*, 2015, 34(1)-75.
- Zhao L L, Pu S, Yang S, *et al.* Microstructure and cytochemical characterisation and phagocytosis of the peripheral blood cells in *Micropterus salmoides*[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2015, 34(1)-75(in Chinese).
- [16] Sun J L, Zhao L L, Wu H, *et al.* Acute hypoxia changes the mode of glucose and lipid utilization in the liver of the largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 713: 135157.
- [17] Yang S, Yan T, Wu H, *et al.* Acute hypoxic stress: effect on blood parameters, antioxidant enzymes, and expression of *HIF-1alpha* and *GLUT-1* genes in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 449-458.
- [18] Snyder E M, Carr R D, Deacon C F, *et al.* Overnight hypoxic exposure and glucagon-like peptide-1 and leptin levels in humans[J]. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 2008, 33(5): 929-935.
- [19] Wang B H, Wood I S, Trayhurn P. Hypoxia induces leptin gene expression and secretion in human preadipocytes: differential effects of hypoxia on adipokine expression by preadipocytes[J]. *Journal of Endocrinology*, 2008, 198(1): 127-134.
- [20] Chu D L H, Li V W T, Yu R M K. Leptin: clue to poor appetite in oxygen-starved fish[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, 319(1-2): 143-146.
- [21] Wang Q F, Shen W L, Hou C C, *et al.* Physiological responses and changes in gene expression in the large yellow croaker *Larimichthys crocea* following exposure to hypoxia[J]. *Chemosphere*, 2017, 169: 418-427.
- [22] Yuan X C, Li A X, Liang X F, *et al.* Leptin expression in mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basilewsky): regulation by postprandial and short-term fasting treatment[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2016, 194: 8-18.
- [23] 张沛, 温海深, 迟美丽, 等. 花鲈瘦素基因的克隆及低盐度条件下调控表达分析[J]. *大连海洋大学学报*, 2016, 31(1): 13-18.
- Zhang P, Wen H S, Chi M L, *et al.* Cloning and expression analysis of *Leptin A* gene in seabass *Lateolabrax maculatus* exposed to low salinity[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2016, 31(1): 13-18(in Chinese).
- [24] Huising M O, Geven E J W, Kruiswijk C P, *et al.* Increased leptin expression in common carp (*Cyprinus*)
- 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



- carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(12): 5786-5797.
- [25] Rønnestad I, Nilsen T O, Murashita K, *et al.* Leptin and leptin receptor genes in Atlantic salmon: cloning, phylogeny, tissue distribution and expression correlated to long-term feeding status[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 168(1): 55-70.
- [26] Angotzi A R, Stefansson S O, Nilsen T O, *et al.* Molecular cloning and genomic characterization of novel Leptin-like genes in salmonids provide new insight into the evolution of the Leptin gene family[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 187: 48-59.
- [27] Kurokawa T, Murashita K. Genomic characterization of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in the Japanese medaka, *Oryzias latipes*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(2): 229-237.
- [28] Itoi S, Misaki R, Hirayama M, *et al.* Identification of three isoforms for mitochondrial adenine nucleotide translocator in the pufferfish *Takifugu rubripes*[J]. *Mitochondrion*, 2005, 5(3): 162-172.
- [29] Murashita K, Uji S, Yamamoto T, *et al.* Production of recombinant leptin and its effects on food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Comparative Biochemistry & Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2008, 150(4): 377-384.
- [30] Trombley S, Maugars G, Kling P, *et al.* Effects of long-term restricted feeding on plasma leptin, hepatic leptin expression and leptin receptor expression in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *General & Comparative Endocrinology*, 2012, 175(1): 92-99.
- [31] Tinoco A B, Nisembaum L G, Isorna E, *et al.* Leptins and leptin receptor expression in the goldfish (*Carassius auratus*). Regulation by food intake and fasting/over-feeding conditions[J]. *Peptides*, 2012, 34(2): 329-335.
- [32] Zhang H X, Chen H P, 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*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 181: 295-305.
- [33] Yu R M K, Chu D L H, Tan T F, *et al.* Leptin-mediated modulation of steroidogenic gene expression in hypoxic zebrafish embryos: implications for the disruption of sex steroids[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(16): 9112-9119.
- [34] Yang S, Wu H, He K, *et al.* Response of AMP-activated protein kinase and lactate metabolism of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) under acute hypoxic stress[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 666: 1071-1079.
- [35] 刘才智. 尼罗罗非鱼 Leptin A 对能量稳态的维持及调控机制研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2018.
- Liu C Z. The maintenance and regulatory mechanisms of Leptin A in energy homeostasis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[D]. Shanghai: East China Normal University, 2018 (in Chinese).

## Tissue expression of *leptin A* gene in *Micropterus salmoides* and its response to acute hypoxia stress

ZHANG Dongmei, ZHAO Liulan, LIU Qiao, HE Kuo, LIAO Lei,  
LUO Jie, SUN Junlong, YANG Song\*

(College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** *leptin* is an important hormone involved in the regulation of feeding, reproduction and energy consumption in animals, and it also can maintain body energy homeostasis by curbing appetite and promoting energy metabolism in vertebrates. Most fishes have the double *leptin* genes. In this research, the coding region of *leptin A* was cloned using PCR reaction in *Micropterus salmoides*, and the results showed that its open reading frame (ORF) was 486 bp, encoding 161 amino acid proteins. Compared with other species, it was found that the conservative property of *leptin* in Perciformes reached up to 91.46%, there is almost no gene specific mutation site in *leptin A* of *M. salmoides*, and the amino acid sequence of *leptin A* in *M. salmoides* had the highest homology with the *Siniperca chuatsi* (92.59%), followed by the *Lateolabrax japonicus*(89.51%), *Trachinotus blochii* (87.04%) and *Epinephelus coioides* (83.87%). Then, *leptin A* gene was also detected to be highly expressed in liver by fluorescence quantitative PCR (qPCR), subsequently in heart, head kidney, brain, middle kidney, intestine, spleen, gill, muscle and gonad. In addition, acute hypoxic stress was designed to detect the expression of *leptin A* [(1.2±0.2) mg/L and (3.5±0.2) mg/L]. The results showed that at the beginning of hypoxia, the expression level of *leptin A* in the extreme hypoxia group and the moderate hypoxia group was significantly higher than that in the control group, and this indicates that acute hypoxia can induce *leptin A* expression in liver. In summary, *leptin A* of *M. salmoides* has the highest homology with *Siniperca chuatsi*(92.59%); *leptin A* was significantly expressed in the liver of *M. salmoides*; acute hypoxic stress can significantly induce the expression of *leptin A*.

**Key words:** *Micropterus salmoides*; *leptin A*; gene cloning; gene expression; acute hypoxia stress

**Corresponding author:** YANG Song. E-mail: ysys210@hotmail.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31802267); “Double Support Project” Fund of Sichuan Agricultural University (1921993232)