

鳊三种生长抑素 cDNA 全长克隆、组织表达 及其在脑中定位分析

代威, 赵金良*, 刘俊, 薛洋

(上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 利用 cDNA 末端快速扩增法 (RACE) 克隆了鳊脑中 3 种生长抑素前体 (preprosomatostatin, PSS I、PSS II 和 PSS III) cDNA 全长序列。结果显示, 鳊 PSS I cDNA 全长 647 bp, 含开放阅读框 369 bp, 共编码 122 个氨基酸, 前 26 个氨基酸为信号肽, C 端 SS-14 在脊椎动物中非常保守; PSS II cDNA 全长 655 bp, 开放阅读框 387 bp, 编码 128 个氨基酸, 前 25 个氨基酸为信号肽, C 端带有 [Tyr⁷, Gly¹⁰]SS-14; PSS III cDNA 全长 823 bp, 开放阅读框 333 bp, 共编码 110 个氨基酸, 前 21 个氨基酸为信号肽, C 端带有 [Pro²]SS-14。利用 RT-PCR 检测了鳊 PSS mRNA 的组织表达特征, 3 种 PSS mRNA 均在脑中表达, PSS I mRNA 在其他组织中未检测到表达, PSS II mRNA 在食道和胃中大量表达, PSS III mRNA 在肾和性腺中大量表达。推测 3 种 PSS 除一致参与神经调控外, PSS II 还可参与消化作用调控, PSS III 参与调控生殖作用。脑组织原位杂交分析表明, PSS I mRNA 在下丘脑和延脑中表达, PSS II mRNA 在下丘脑中表达, PSS III mRNA 在下丘脑、视觉盖、延脑和脊髓中表达。3 种 PSS 均在下丘脑中表达, 表明它们可能参与腺垂体激素分泌的调节; 在其他脑区存在表达差异, 推测它们还可作为神经递质或调节因子, 发挥不同的生物学效应。

关键词: 鳊; 生长抑素; cDNA; 组织表达; 定位

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

脊椎动物中, 鱼类具有独特的生长模式, 其生长不仅具有阶段性, 并且性成熟后仍能继续生长^[1]。鱼类生长与体内多种内分泌激素系统调控作用密切相关, 其中, 生长激素—胰岛素样生长因子 I 轴 (GH-IGF-I axis) 是主要调控系统之一, GH-IGF-I 轴调控途径始于垂体分泌的 GH, 而 GH 又受多种下丘脑激素的控制^[2]。生长抑素 (somatostatin, SS) 是一种抑制脑垂体分泌生长激素的神经调节肽, 广泛分布于神经系统和外周组织, 具有激素和神经递质双重作用, 通过作用于 GH-IGF-I 轴的各个环节, 参与中枢神经系统多种生理活动, 调节机体的生长、发育和代谢等多种生理过程^[3-4]。SS 能与 G 蛋白偶合的 5 种不同亚型的生长抑素受体 (somatostatin receptor, SSTR)

结合, 通过直接或间接的偶联系统启动生物反应, 实现机体生长发育调节以及其他生物学效应^[3]。

生长抑素家族是由结构类似的一类多肽组成, 它们分别由不同生长抑素前体 (preprosomatostatin, PSS) 加工而成^[5]。鱼类中, 已鉴定出有 3 种 PSS^[6]。不同的生长抑素基因可产生不同的 PSS: PSS I cDNA 的 C 端带有编码 SS-14 的序列, 可加工形成 SS-14; PSS II 的 C 端带有 [Tyr⁷, Gly¹⁰]SS-14 或其变异体; PSS III 的 C 端带有 [Pro²]SS-14 的变异体。因此, 生长抑素基因与其功能多样性研究有助于理解鱼类生长发育调控特征。

鳊 (*Siniperca chuatsi*) 是典型的肉食性鱼类, 具有生长快、肉质鲜嫩、少刺的特点, 是我国重要的淡水名贵经济鱼类。近年来, 鳊生长激素 (GH)^[7]、

收稿日期: 2011-12-20 修回日期: 2012-02-26

资助项目: 上海市科委基础研究重点项目 (09JC1406900); 上海市重点学科建设项目 (Y1101); 上海海洋大学博士启动基金 (07274)

通讯作者: 赵金良, E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

胰岛素样因子(IGF-1, IGF-2)^[8]等生长相关基因相继克隆,为研究 GH-IGF 轴对鳊生长发育调控作用奠定了分子基础。本实验利用 RACE 技术克隆了鳊生长抑素前体 PSS cDNA 全长序列,分析了 PSS mRNA 的组织表达特征,并利用原位杂交技术研究生长抑素对 GH-IGF 轴表达影响及其对生长调控作用奠定分子基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鳊成鱼购于上海市浦东新区芦潮港镇果园农贸市场。总 RNA 抽提试剂 RNAisoTM Plus、RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0、DNA Fragment Purification Kit、pMD19-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司; SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 购于 Clontech 公司; 探针标记

试剂盒 DIG RNA Labeling Kit、标记检测试剂盒 DIG Nucleic Acid Detection Kit、酵母 t-RNA、蛋白酶 K 购自 Roche 公司; 氨基烷基硅烷载玻片、鲑鱼精 DNA 购自 Sigma 公司; T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶购于 Promega 公司。

1.2 实验方法

总 RNA 提取及 cDNA 模板的合成 活体解剖,取脑、心脏、皮肤、肌肉、鳃、食道、幽门垂、脾、胃、肝、前肠、后肠、肾和性腺,置于液氮中速冻,按 RNAisoTM Plus 说明书抽提总 RNA。RNA 样品经 RNase-free DNase I 消化处理去除基因组 DNA 污染后,按照 AMV 反转录试剂盒说明反转录为 cDNA,脑组织 RNA 用 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 合成 3' 和 5' RACE-Ready-cDNA,于 -20 °C 冰箱保存备用。

引物设计与合成 所用引物见表 1,均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

表 1 引物序列及退火温度
Tab.1 Nucleotide sequences and annealing temperature of oligonucleotide primers

引物 primer	核苷酸序列(5'→3') nucleotide sequence	退火温度/°C annealing temperature	引物用途 usage
SS1F	TCCTCTCGTCTCCRSTGC	58	
SS1R	GTGAAGGTTTTCCAGAAGAA	58	
SS2F	TTCTTGTTGGCGTTGGYYCTG	60	部分序列的扩增
SS2R	CAGGAWGTGAAGCCCTTCCA	60	
SS3F	CGTGCTTCCAGTKGAGGA	56	
SS3R	CAGGAGGTGAATGTRTTCCA	56	
SS1R3	CTCCTCTCACTCACCGCTCCATCAGCT	68	
SS1R5	CAGGTGGAGAACGAGGCTCTGGAGGAGG	68	
SS2R3	GTGTTTCTCTCAGCTCGACAGAGACCA	68	3'RACE 和 5'RACE 扩增
SS2R5	AGGATTGGAGTAAACGTGCAGTGGAGGA	68	
SS3R3	AAGCTGATGTCTGGATTGCTGGATGGAG	68	
SS3R5	TACAACAGGCTATCACTGCCACAGCGTG	68	
S1R1F	CTCTCACTCACCGCTCCAT	58	
S1R1R	TCTTGCAGCCGGCTTTTCTC	58	
S2R1F	TTCTTGTTGGCGTTGGYYCTG	62	
S2R1R	CAGGAWGTGAAGCCCTTCCA	62	RT-PCR 组织表达检测
S3R1F	GCCACCAACTGCACTGCACTTT	60	
S3R1R	GCGGCTGCTTAACGCTGAACA	60	
<i>β-actin-F</i>	ATCGCCGCACTGGTTGTTGAC	58	
<i>β-actin-R</i>	CCTGTTGGCTTTGGGGTTC	58	
S11F	GGCGAATTCACAGACAGGCAGGTATTG	55	
S11R	GAGAAGCTTTCAGCAGGAAGTGAAGGT	55	
S21F	AGTGAATTCGCTGGCGCAGATGTTTCT	62	原位杂交探针制备
S21R	ATCAAGCTTTCAGTCGCTCAGGTCAA	62	
S31F	GGTGAATTCGGTGTCTGTTCAGCGTTAG	59	
S31R	TCAAAGCTTGTCTGGGAGGAAAGGAGTA	59	

cDNA 全长序列的克隆与测序 以脑组织 RNA 为模板,按照 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0 说明书进行 RT-PCR,通过同源基因序列比对,分别设计 PSS I、PSS II 和 PSS III 小片段引物,扩增 3 种 PSS 部分 cDNA 序列。根据测序结果,再分别设计特异性引物用于 3 种 PSS 的 3' RACE 和 5' RACE 扩增引物。RACE 扩增按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒的说明进行。引物序列与退火温度见表 1。RT-PCR 和 RACE 产物回收纯化后与 pMD19-T 载体连接构建重组质粒,经转化与 LB 平板培养后,筛选重组子进行插入片段检测,序列测定由上海生工生物工程技术有限公司完成。

生物信息学分析 应用 BioEdit 和 Edit Seq 程序进行开放阅读框(ORF)分析并推导相应的氨基酸序列; Signal P 3.0 server 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>)进行信号肽分析; Scratch 程序(<http://www.ics.uci.edu/~baldig/scratch/index.html>)预测二硫键; BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)进行序列同源性分析; Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>)进行多序列比对; EMBOSS(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>)进行序列相似度分析; MEGA 4.1 构建 NJ 系统进化树。

PSS mRNA 组织表达分析 分别提取 3 尾成鱼脑、心脏、皮肤、肌肉、鳃、食道、幽门垂、脾、胃、肝、前肠、后肠、肾脏和性腺 14 个组织的总 RNA,测 OD 值后,平衡起始浓度。通过比对 3 种 PSS 的 cDNA 序列,分别设计特异性引物 S1RTF 和 S1RTR、S2RTF 和 S2RTR、S3RTF 和 S3RTR(表 1)。以 β -actin 为内参基因,RT-PCR 检测 PSS I、PSS II 和 PSS III mRNA 在各组织中的表达情况。

PSS mRNA 在脑中的定位表达 根据 3 种 PSS 基因的 cDNA 序列,设计特异性引物(表 1)。用脑组织反转录 cDNA,通过特异性引物扩增出相应的序列作为转录 RNA 探针的模板。杂交探针制备按照 Roche 公司 DIG RNA Labeling Kit 试剂盒说明,经 S_p 和 T_7 聚合酶转录生成地高辛标记的 RNA 正义和反义探针。

取脑组织,于 4% 多聚甲醛(PFA)中 4 °C 固定 14 ~ 18 h。经 0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH = 7.0)清洗 2 次,梯度乙醇脱水,二甲苯透明后,石蜡包埋后切片。原位杂交(ISH)过程参照 Murray

等^[9]的方法,并稍加改进。将厚度为 6 ~ 8 μ m 石蜡切片于氨基烷基硅烷载玻片上展片,置于 37 °C 恒温箱中烘烤过夜,二甲苯脱蜡,梯度复水。杂交前预处理:组织经 PBS(pH = 7.4)漂洗,甘氨酸与 Triton X-100 处理增加组织的可穿透性,蛋白酶 K(2 μ g/mL)37 °C 处理 30 min,于 4% PFA 中固定与 PBS 漂洗后,在含 0.25% 乙酸酐(AA)的 0.1 mol/L TEA(pH = 8.0)中乙酰化。组织切片于预杂交液(含 50% 甲酰胺,4 \times SSC)中 37 °C 预杂交 30 min。甩去组织切片上的预杂交液,滴加杂交液(含预变性的地高辛标记的反义探针),用 parafilm 膜覆盖,在湿润避光环境中 45 °C 杂交 14 ~ 18 h。杂交后经 RNase A(20 μ g/mL)去除未杂交的 RNA 探针,于 SSC 溶液中清洗。免疫检测按照 DIG Nucleic Acid Detection Kit 试剂盒说明进行,碱性磷酸酶标记抗 DIG 抗体浓度为 1/300,于 NBT/BCIP 显色液中避光显色,水性封片剂封片并拍照。阴性对照为用 DIG 标记的正义探针进行杂交,其它实验步骤不变。

2 结果

2.1 鳊 PSS cDNA 全长序列与结构分析

将小片段、3' RACE 和 5' RACE 扩增序列的测序结果通过序列比对、拼接后分别得到长度为 647、655 和 823 bp 的鳊 PSS I、PSS II 和 PSS III cDNA 全长序列(GenBank 登录号分别为 JN034584, JN104627 和 JN104628)。

PSS I cDNA 包括 61 bp 的 5' 端非翻译区, 369 bp 的开放阅读框, 217 bp 的 3' 端非翻译区, 在 595 ~ 600 位点有一个多聚腺苷酸(aataaa)信号序列(图 1-a)。编码的 122 个氨基酸序列中,前 26 个氨基酸为信号肽。前体中 107 和 108 位点有精氨酸-赖氨酸(R-K)识别位点,推测其酶切后可产生 14 肽生长抑素(SS-14); 在 91 位点有精氨酸(R)识别位点,推测其酶切后可产生含 31 个氨基酸的生长抑素(SS-31)。

PSS II cDNA 包括 77 bp 的 5' 端非翻译区, 387 bp 的开放阅读框, 191 bp 的 3' 端非翻译区, 在 603 ~ 608 位点有一个多聚腺苷酸(ataaaa)信号序列(图 1-b)。编码的 128 个氨基酸序列中,前 25 个氨基酸为信号肽。前体中 113 和 114 位点有精氨酸-赖氨酸(R-K)识别位点,推测其酶切后可产生 14 肽生长抑素([Tyr⁷, Gly¹⁰]SS-14); 在

似度为 51.9%~86.7%。鳊 PSS III 氨基酸序列与斜带石斑鱼 PSS III 氨基酸序列相似度为 97.3%,与其他鱼类的相似度为 77.5%~85%,与鸟类、哺乳类的相似度为 45.7%~69%。鳊 PSS I、PSS II

与 PSS III 3 种 PSS 氨基酸序列间的相似度为 28.6%~45.2%,保守区同位于 C 端,分别位于第 108~125 位、第 116~131 位、第 108~123 位区,仅长度略有差异。

	5	15	25	35	45	55	65	75
Sch PSS I	—MVSSSRLR	CLLLLLLSLT	ASISCSAAQ	RDKLRLLH	RTPLL—GSKQ	DMSRSSLAEL	LLTDLQVEN	EALEEENFPL
Eco PSS I	MKMVSSSRLR	CLLLLLLSLT	ASISCSAAQ	RDKLRLLH	RTPLL—GSKQ	DMSRSASLAEL	LLSDLLQVEN	EALEEENFPL
Hbu PSS I	—MNSSSRLR	CLLLLLVSLT	ASISCSAAQ	RDKLRLLH	RTPLL—GSKQ	DMSRSSLAEL	LLSDLLQVEN	EALEEENFPL
Lam PSS I	MKMVSSSRLR	CLLVLLLSLT	ASISCSFAGQ	RDKLRLLH	RYPLQ—GSKQ	DMTRSALAE	LLSDLLQVEN	EALEEENFPL
Dre PSS I	—MLS—TRIQ	CALALL—SLA	LAVSSVSAAP	SDAKLRQLLQ	RSLSPAGKQ	ELARYTLADL	LS—DLVPAEN	EALEPEDLSR
Ssa PSS I	—MLS—TRVQ	CALALL—SLA	LVTVSSVSAAP	SDAKLRQLLQ	RSLMAPAGKQ	ELARNTLVEL	LS—ELTQVEN	EATELDDMSR
Omy PSS I	—MLS—TRVQ	CALALL—SLA	LVTVSSVSAAP	SDAKLRQLLQ	RSLMAPAGKQ	ELARNTLVEL	LS—ELAHVEN	EATELDDMSH
Cau PSS I	—MLS—TRIQ	CALALL—SLA	LAVCSVSAAP	TDAKLRQLLQ	RSLNPAGKQ	ELARYTLADL	LS—ELVQVEN	EALEPEDLSR
Cid PSS I	—MLS—TRIQ	CALALL—SLA	LAVCSVSAAP	TDAKLRQLLQ	RSLNPAGKQ	ELARYTLADL	LS—DLVQVEN	EALEPEDLSR
Mpe PSS I	—MLS—TRIQ	CALALL—SLA	LAVSSVSAAP	SDAKLRQLLQ	RSLNPAGKQ	ELARYTLADL	LS—DLVQVEN	EVALEPEDLSR
Ipu PSS I	—MPS—TRIQ	CALALL—AVA	LSVCSVSGAP	SDAKLRQLLQ	RSLNPAGKQ	ELTRYTLAE	LA—ELAEVEN	EVLDSDEVSR
Pan PSS I	—MLS—CRFQ	CALVLL—SLA	VVFSKVSAAAP	SDLRRLRQLLQ	RSLAAAAGKQ	ELTRYSLAE	LS—ELAQSEN	DALDSDLSR
Atr PSS I	—MLS—SRLQ	CALAFI—SLA	LAVSSVSAAP	SDPRLRQLLQ	RTLAASAGKQ	ELKYSLAE	LS—ELAQSEN	DALASDELRS
Rno PSS I	—MLS—CRLQ	CALAAL—CIV	LALGGVTGAP	SDPRLRQLLQ	KSLAAATGKQ	ELAKYFLAE	LS—EPNQTEN	DALEPEDLPQ
Hsa PSS I	—MLS—CRLQ	CALAAL—SIV	LALGCVTGAP	SDPRLRQLLQ	KSLAAAAGKQ	ELARYFLAE	LS—EPNQTEN	DALEPEDLSQ
Gga PSS I	—MLS—CRLQ	CALALL—SIA	LAVGTVSAAP	SDPRLRQLLQ	KSLAAAAGKQ	ELAKYFLAE	LS—EPSQTEN	EALASEDLRS
Rri PSS I	—MQS—CRVQ	CALTLL—SLA	LAINSSAAP	TDPRLRQLLQ	KSLAS—AGKQ	ELAKYFLAE	LS—EPSQTDN	EALASDLP
	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
	85	95	105	115	125			
Sch PSS I	PEGPEPDIHV	DLEAAAAAG	SGPLLAPRER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
Eco PSS I	AEGPEPDIHV	DLE—AAAAG	SGPLLAPRER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
Hbu PSS I	ADGPEPDIHV	DLE—AAG	SGPLLAPRER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
Lam PSS I	AEGPPEDAHA	DLE—AAS	GGPLLAPRER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
Dre PSS I	G—AEKDDVRL	ELER—AA—	GPMLAPRER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
Ssa PSS I	G—VEQEDVDL	ELER—AP—	GPVLAPRER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
Omy PSS I	G—VEQEDVDL	ELER—AP—	GPVLAPRER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
Cau PSS I	A—VEKDDVRL	ELER—AA—	GPMLAPRER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
Cid PSS I	A—VEKDDVRL	ELER—AA—	GPMLAPRER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
Mpe PSS I	A—VEKDDVRL	ELER—AA—	GPMLAPRER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
Ipu PSS I	A—AESEGARL	EMER—AA—	GPMLAPRER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
Pan PSS I	G—ADQDEVRL	ELDR—SAN	SSP—LAARER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
Atr PSS I	A—AEQNDVRL	ELER—SAN	GNPAMAPRER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
Rno PSS I	A—AEQDEMRL	ELQR—SAN	SNPAMAPRER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
Hsa PSS I	A—AEQDEMRL	ELQR—SAN	SNPAMAPRER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
Gga PSS I	G—AEQDEVRL	ELER—SAN	SNPALAPRER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
Rri PSS I	G—AEQDEVRL	ELER—SAN	SSPALAPRER	KAGCKNFFWK	TFTSC			
	:	::*	:	.*	.*	*****	*****	*****
	5	15	25	35	45	55	65	75
Sch PSS II	MQF—VVRCPA	ILALVALVLC	GPVSSQLDR	DQDQYQNDL	DLELRHRL	QRARSAGLLS	—QDWSKRAVE	DLLAQMFLPE
Eco PSS II	MQ—CIRCPY	ILVVALVLC	SPGVFSQDR	DQDQYQNDL	DLELRHRL	QRARSAGLLS	—QEWKRAVE	DLLAQMSLPE
Lam PSS II	MQ—CIRCPA	ILALLVALVLC	GPSVSSQLDR	EQS—DNQDL	DLELRHRL	ERARSAGLLS	—QEWKRAVE	ELLAQMSLPE
Dre PSS II	MRLCELQCYL	ALLGLSLVLC	GRSANSQLE—	—————	P	EMDFRHHRL	QRARATGQA—	QEWTKRDVE
Cid PSS II	MRLCELQCYL	ALLGLSLVLC	GRSANSQLE—	—————	P	DLDFRHHRL	QRARATGQA—	QEWTKRDVE
Cau PSS II	MRLCELQCYL	ALLGLSLVLC	GRSANSQLE—	—————	P	DLDFRHHRL	QRARATGQA—	QEWTKRDVE
Ssa PSS II	MKVCRIHCAL	ALLGLALATC	SQGAASQ—	—————	P	DLDLRSRRL	QRARAAGTAT	—QEWKRAVE
Omy PSS II	MKVCRIHCAL	ALLGLALATC	SQGAASQ—	—————	P	DLDLRSRRL	QRARAAGTAT	—QEWKRAVE
Gpe PSS II	MKTQVHCVL	VLLGLVLGLC	YPSAASQ—	—————	P	DLRYRS—FM	QRAHTAAMSP	—QDWSRVRVE
	:	::	* * *	* * *	* * *	::*	::*	::*
	85	95	105	115	125			
Sch PSS II	ADTQR—EAEV	VSMATGGRMN	LERSVDSVNS	LPPRRKAGC	KNFYWKGFST	C		
Eco PSS II	ADTQR—EAEV	VSMATGGRMN	LERSVDPNN	LPPRRKAGC	KNFYWKGFST	C		
Lam PSS II	ATFQR—EAED	ASMATGGRMN	LERSVDSVNS	LPPRRKAGC	KNFYWKGFST	C		
Dre PSS II	MQMRESLST	TDENEDLRVE	LERSAESSNI	IPARERKAGC	KNFYWKGFST	C		
Cid PSS II	MEMRENDIST	VDENEDLRVE	LERSAESSNI	IPARERKAGC	KNFYWKGFST	C		
Cau PSS II	MEMREGLSM	AGESEDLRLE	QERSAESSNQ	LPTRVRKEGC	KNFYWKGFST	C		
Ssa PSS II	PEAQESEVSP	AGAKEDLRVE	LERSVGNPNN	LPPRRKAGC	KNFYWKGFST	C		
Omy PSS II	LRPKR—VKCP	AGAKEDLRVE	LERSVGNPNN	LPPRRKAGC	KNFYWKGFST	C		
Gpe PSS II	DDTPQSEMST	AEEGETRVE	LERSVE—PNN	LPPRRKAGC	KNFYWKGFST	C		
	.	.	*:	***.	* * *	*****	*	*
	5	15	25	35	45	55	65	75
Sch PSSIII	—MQL	LVVLAALMGV	LFSVRAAAVL	PVEDRSPHIV	N—RELSKE	RKELILKLS	GLLDGALDTN	MLPAEAAAPG—
Eco PSSIII	—MQL	LVVLAALMGV	LFSVRAAAVL	PVEDRSPHIV	N—RELSKE	RKELILKLS	GLLDGALDTN	MLPAAAPV—
Asi PSSIII	—MQL	RASLVSLMLV	VYSLRVVAVL	PGEERLSVHS	N—RELSKE	RKEGFLKLS	GLLDG—VDS	VVLGEDVSP—
Atr PSSIII	—MQL	RARLVSLMLV	VYSLRVVAVL	PGEERLSVHS	N—RELSKE	RKEGFLKLS	GLLDG—VDS	VVLGEDVSP—
PSSIII	—Cid	MQL	LASLVSLMLV	LYSVRAAAVL	PVEERLNAQS	—RELSKE	RKELILKLS	GLLDG—VDNN

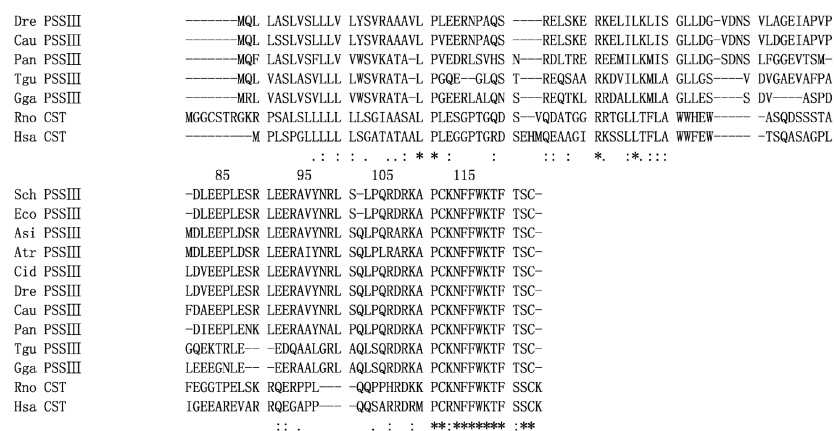


图2 脊椎动物3种PSS氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequences alignment of vertebrate PSSs

PSS 参考序列如下, Sch: 鳊 (*Siniperca chuatsi*); Eco: 斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*, PSS I : AAU93565; PSS II : AAU93566; PSS III : AAU93567); Lam: 美洲鲈 (*Lophius americanus*, PSS I : CAA23986; PSS II : CAA23987); Ipu: 斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*, PSS I : AAA49339); Dre: 斑马鱼 (*Danio rerio*, PSS I : NP_898893; PSS II : XP_694143; PSS III : NP_001038896); Mpe: 厚颌鲂 (*Megalobrama pellegrini*, PSS I : AA092644); Cau: 金鱼 (*Carassius auratus*, PSS I : AAD09359; PSS II : AAF15306; PSS III : AAD09631); Pan: 非洲肺鱼 (*Protopterus annectens*, PSS I : AF126243; PSS III : AAD39139); Atr: 高首鲟 (*Acipenser transmontanus*, PSS I : AF395849); Cid: 草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*, PSS I : ACB69423; PSS II : ACB69424; PSS III : ACB69425); Hbu: 伯氏朴丽鱼 (*Haplochromis burtoni*, PSS I : AAS97964); Ssa: 大西洋鲑 (*Salmo salar*, PSS I : NP_001134573; PSS II : ACM09523); Omy: 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*, PSS II : NP_001118175); Gpe: 象鼻鱼 (*Gnathonemus petersii*, PSS II : AAV48556); Asi: 中华鲟 (*Acipenser sinensis*, PSS III : ACN88149); Tgu: 斑胸草雀 (*Taeniopygia guttata*, PSS III : XP_002186566); Rno: 鼠 (*Rattus norvegicus*, PSS I : CAA24579; CST : NP_036967); Gga: 鸡 (*Gallus gallus*, PSS I : CAA42747; PSS III : NP_989786); Rri: 蛙 (*Rana ridibundus*, PSS I : AAC60093); Hsa: 人 (*Homo sapiens*, PSS I : NP_001039; CST : AAB66895)。

根据鳊与其他 20 种脊椎动物 PSS 氨基酸序列构建了系统关系树(图 3), 3 种 PSS 形成相对独立的分支, 哺乳类、鸟类、两栖类、鱼类分别聚支, 物种间亲缘关系与其传统分类地位基本一致。

2.2 PSS mRNA 的组织表达特征

3 种 PSS mRNA 在鳊成体 14 个组织中表达情况见图 4。PSS I mRNA 在脑中有表达, 其他组织中均未见明显表达。PSS II mRNA 在脑、食道和胃中大量表达, 心脏、皮肤、鳃和肝脏中也有少量表达。PSS III mRNA 在脑、肾脏和性腺中大量表达, 心脏、皮肤、鳃、脾脏、前肠和后肠中也有少量表达。

2.3 脑组织 PSS 原位杂交

与其他硬骨鱼类^[10]相似, 鳊脑结构分为 5 个部分: 端脑、间脑、中脑、小脑和延脑。原位杂交结果表明, PSS I、PSS II 和 PSS III 反义 RNA 探针杂交均出现明显的蓝紫色杂交信号, 与背景反差显

著, 而阴性对照组的正义探针对照中均无杂交信号(图 5)。PSS I mRNA 杂交信号分布在下丘脑和延脑, PSS II mRNA 分布在下丘脑, 丘脑中也有少量分布, PSS III mRNA 分布在下丘脑、中脑的视觉盖、延脑以及脊髓中。

3 讨论

3.1 鳊 PSS 序列与结构分析

生长抑素 SS 是由其前体 PSS 经信号肽酶、前激素转化酶等特异性加工而成的活性肽。生长抑素 SS 家族结构的多样性, 表现在具有不同的氨基酸组成和氨基酸链长度。这些差异主要来源: (1) 生物体内存在多种 SS 基因, 可编码不同的 PSS, 加工后形成不同的 SS, 氨基酸组成明显不同。(2) 相同 SS 基因编码产生的 PSS 前体, 但经不同剪切加工可形成不同的 SS, 氨基酸长度不同^[11]。

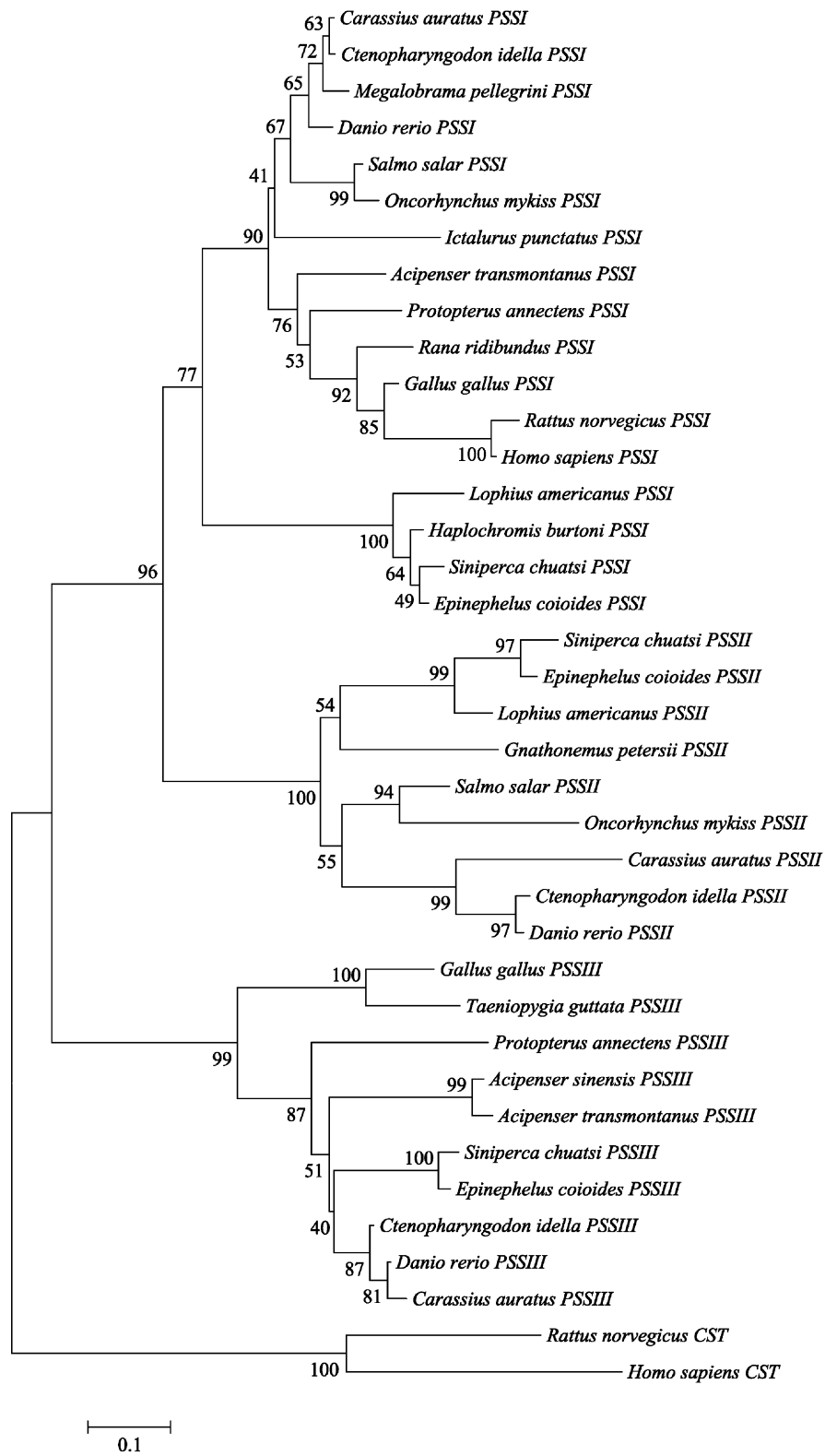


图 3 脊椎动物 PSS 的 NJ 系统进化树
 Fig.3 Phylogenetic tree of vertebrate PSS

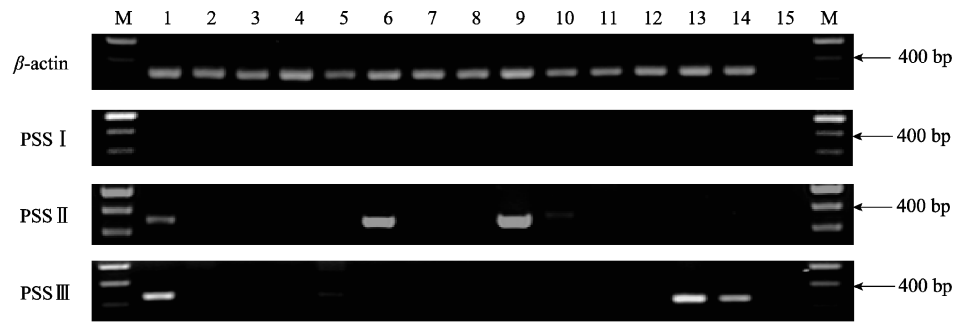


图4 鳊 PSS I、PSS II 和 PSS III mRNA 的组织表达

1. 脑; 2. 心脏; 3. 皮肤; 4. 肌肉; 5. 鳃; 6. 食道; 7. 幽门垂; 8. 脾; 9. 胃; 10. 肝胰脏; 11. 前肠; 12. 后肠; 13. 肾; 14. 性腺; 15. 对照; M. 100 bp 分子量标记。

Fig. 4 Expression of PSS I, PSS II and PSS III mRNA in adult tissues of *S. chautsi*

1. brain; 2. heart; 3. skin; 4. muscle; 5. gill; 6. esophagus; 7. pyloric caecum; 8. spleen; 9. stomach; 10. liver; 11. foregut; 12. hindgut; 13. kidney; 14. gonad; 15. contrast; M. 100 bp molecular marker.

现今已研究的动物中,共发现有3种类型 PSS: PSS I、PSS II 和 PSS III。从圆口类、软骨鱼类、硬骨鱼类、两栖类、爬行类、鸟类到哺乳类均存在 PSS I, 编码氨基酸序列相同的 SS-14, 表明 PSS I 在进化过程中具有高度保守性^[12]。目前, PSS II 仅在鱼类中发现, 在少数鱼类中还具有不同亚型^[13-14], 不同亚型可能是鱼类进化中通过基因组加倍或基因重复获得的。在人、鼠等哺乳动物中虽未发现 PSS III, 但发现了与 PSS III 高度同源的皮质醇稳定蛋白 (cortistatin), 其中有 11 个氨基酸与 [Pro²]SS-14 相同^[15]。鱼类中, 金鱼 (*Carassius auratus*)^[13]、斜带石斑鱼^[16]、斑马鱼 (*Danio rerio* GenBank 登录号: NP_898893; XP_694143; NP_00103889) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idella* GenBank 登录号: ACB69423; ACB69424; ACB6942) 等种类中均发现存在有 3 种 PSS cDNA。

本研究运用 RACE 克隆技术首次获得了鳊 3 种 PSS 的 cDNA 序列, PSS I、PSS II 和 PSS III cDNA 的全长序列分别为 647、655 和 823 bp, 编码 122、128 和 110 个氨基酸。3 种 PSS cDNA 序列相似度为 42.3%~49.4%, 氨基酸序列相似度为 40.1%~45.2%。在保守的 C 端 14 肽中, PSS I (SS-14) 与 PSS II ([Tyr⁷, Gly¹⁰]SS-14)、PSS III ([Pro²]SS-14) 组成差异明显, 在脊椎动物 PSS 系统进化树中分别 PSS I、PSS II 和 PSS III 分支聚

类, 表明它们是由不同基因编码而成。

研究发现, 鳊 PSS 中存在精氨酸-赖氨酸 (R-K)、精氨酸 (R) 多个识别位点, 提示 PSS 可经不同位点的剪切加工, 产生多种类型 SS 多肽。因此, 推测鳊 PSS I 除了可加工形成 SS-14 外, 还可以剪切产生 SS-31, 其 C 端 14 肽与 SS-14 完全相同。鱼类中还发现有其他类型 SS I 多肽, 如斜带石斑鱼中存在 SS-30 肽^[16], 高首鲟 (*Acipenser transmontanus*) 中存在 SS-28 肽^[17], 金鱼、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和团头鲂 (*Megalobrama pellegrini*) 中存在 SS-26 肽^[13-14, 18]。鳊 PSS II 可剪切形成 [Tyr⁷, Gly¹⁰]SS-14, 还可剪切产生 SS-28, 其 C 端的 14 肽与 [Tyr⁷, Gly¹⁰]SS-14 的氨基酸序列相同。尼罗罗非鱼 (*Oreochromis nilotica*)、银大马哈鱼 (*Oncorhynchus kismtch*) 中还分离到 SS-25 肽^[19-20]。鱼类 PSS II 还存在一些变异体, 如金鱼 [Glu¹, Tyr⁷, Gly¹⁰]SS-14^[13]、欧洲鳗 (*Anguilla anguilla*) [Tyr⁷, Gly¹⁰, Pro¹¹]SS-14 和 SS-25 肽^[21]。鳊 PSS III 与斜带石斑鱼^[16]一致, 除了可剪切产生 [Pro²]SS-14 外, 还可加工生成 SS-23 和 SS-28 肽。

鳊具有 3 种不同的 PSS 基因, 还可经不同剪切加工形成多种活性类型 SS。SS 类型的多样性, 推测 SS 可参与不同的生理调控, 发挥多种生物学效应, 即具有功能多样性和差异性。

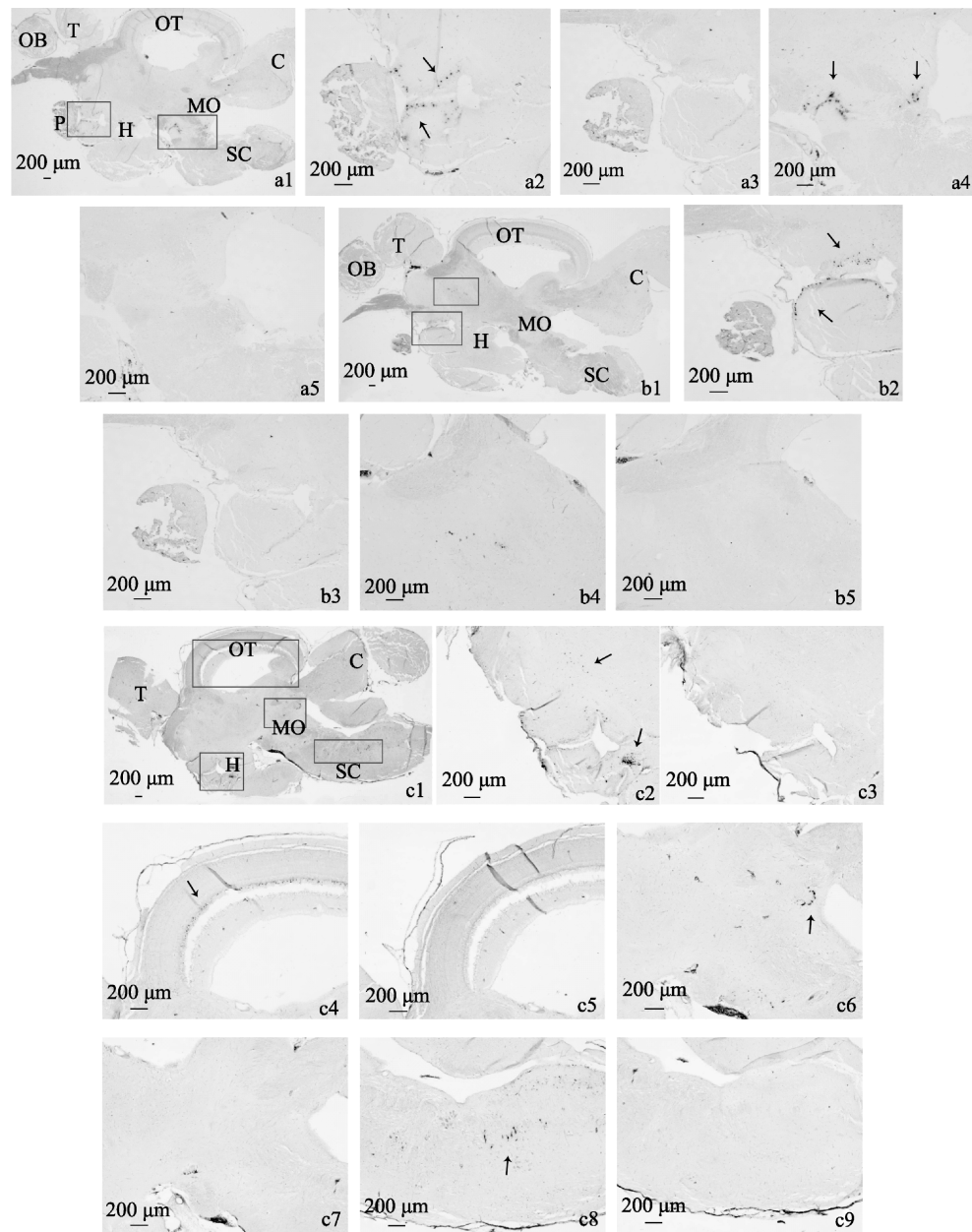


图 5 鳊 PSS I、PSS II 和 PSS III mRNA 在脑中的原位杂交

a1、a2、a4 显示鳊 PSS I 反义探针杂交, b1、b2、b4 显示鳊 PSS II 反义探针杂交, c1、c2、c4、c6、c8 显示鳊 PSS III 反义探针杂交, a3、a5、b3、b5、c3、c5、c7、c9 为相应的正义探针对照。OB. 嗅球; T. 端脑; OT. 视觉盖; C. 小脑; H. 下丘脑; MO. 延脑; SC. 脊髓; P. 垂体。

Fig. 5 In situ hybridization of PSS I, PSS II and PSS III mRNA in the brain of mandarin fish

a1, a2, a4 show the positive results of hybridization with the antisense probe for PSS I, b1, b2, b4 show the positive results of hybridization with the antisense probe for PSS II, c1, c2, c4, c6, c8 show the positive results of hybridization with the antisense probe for PSS III, a3, a5, b3, b5, c3, c5, c7, c9 show the negative results of hybridization with the sense probe. OB. olfactory bulb; T. telencephalon; OT. optic tectum; C. cerebellum; H. hypothalamus; MO. medulla oblongata; SC. spinal cord; P. pituitary.

3.2 鳊 PSS mRNA 的组织表达特征分析

RT-PCR 研究表明,鳊 3 种 PSS mRNA 表达具有明显的组织特异性,这也验证了不同 SS 的

功能多样性推测。鳊 3 种 PSS mRNA 均在脑组织中表达,表明这 3 种 PSS 加工后的 SS 可作为重要的神经调节因子,参与抑制生长激素的合成

与分泌,或通过其他作用途径调控动物生长发育。研究发现,金鱼3种类型SS均能抑制垂体GH释放,但对GH的抑制能力不同^[22]。斜带石斑鱼SS能抑制脑垂体GH释放,并呈剂量依存关系^[23]。大马哈鱼脑中SS浓度升高可引起肝脏、血浆中IGF-I水平下降^[24]。

除在脑中表达外,鳊PSS mRNA的外周组织表达存在明显差异。鳊PSS I mRNA在其它外周组织中均未检测到明显表达。虹鳟^[14]、斜带石斑鱼^[16]和中华鲟(*Acipenser sinensis*)^[25] PSS I mRNA均在脑中表达。鳊PSS I在脑组织中的特异性表达,表明它可能是一种较为专一的神经调节肽或调节激素,参与中枢神经系统对生长发育调控。鳊PSS II mRNA在食道、胃中也有大量表达,表明其还可参与胃肠道分泌和消化作用调控。其他鱼类PSS II也有类似表达,斜带石斑鱼PSS II mRNA在胃中大量表达,前肠、肝中少量表达^[16];虹鳟PSS II mRNA在食道、胃中大量表达,前肠和后肠中少量表达^[26];金鱼和欧洲鳗肠道中也发现有PSS II mRNA表达^[27]。研究表明,大西洋鳕(*Gadus morhua*)中SS能显著降低基础胃酸分泌,并能降低由蛙皮素和组胺刺激产生的胃酸分泌^[28]。鳊PSS III mRNA在肾和性腺中也有大量表达,表明其可能参与繁殖和代谢的调节。中华鲟PSS III mRNA在肾和心脏中有大量表达^[25],斜带石斑鱼PSS III mRNA在卵巢中也有表达^[16],虹鳟性成熟过程中血液SS浓度显著降低^[29]。与PSS I相比较,PSS II与PSS III的表达组织较为广泛,表明后两者可能兼有神经调节和内分泌激素功能,调节中枢神经和内脏的生理功能,发挥更广泛的生理调控作用。鳊PSS在各组织中广泛表达,且3种PSS mRNA的组织表达特征各不相同,推测不同类型SS所参与的调控途径与方式不同。

3.3 鳊PSS mRNA在脑组织中表达区域

有关SS在脑中分布的研究主要集中在高等脊椎动物,哺乳类SS神经元胞体主要存在于下丘脑^[30]。本研究中,鳊3种PSS mRNA均在脑组织中表达,原位杂交结果进一步显示,3种PSS mRNA均在下丘脑中表达。在已研究的鱼类中,也均发现下丘脑中存在PSS的表达。下丘脑是调节内脏活动和内分泌系统的高级神经系统中枢,能合成调节腺垂体激素分泌的各类多肽。原

位杂交结果表明鳊3种PSS可由下丘脑合成和分泌,推测其可参与腺垂体激素分泌的调节,参与GH-IGF I轴表达调控。

除下丘脑外,3种PSS mRNA的脑区表达存在明显差异。鳊PSS I mRNA在延脑中也有表达。不同物种间的表达也有不同,金鱼PSS I mRNA还在端脑、视觉盖、延脑和垂体中表达^[13],虹鳟PSS I mRNA在视觉盖和垂体中也有表达^[31],西伯利亚鲟PSS I mRNA还在大脑皮层、丘脑、视觉盖和垂体等区域表达^[32]。鳊PSS II mRNA在丘脑中也有少量表达。其他鱼类中,金鱼PSS II mRNA还在端脑和视觉盖中表达^[13],虹鳟PSS II mRNA与其PSS I mRNA的表达基本一致^[31]。鳊PSS III mRNA表达区域较为广泛,在视觉盖、延脑和脊髓等区域中均有表达。其他鱼类中,金鱼PSS III mRNA在嗅球、端脑、视觉盖中也有表达^[13],西伯利亚鲟PSS III mRNA还在大脑皮层和丘脑中有表达^[32]。鳊3种PSS在脑区的表达差异,表明它们还可能参与其他不同的神经调控,具有多样的生理功能。推测SS在脑中主要是作为神经递质、分泌因子或调节激素,不同SS可能具有不同的生理效应,参与不同的神经生理过程和生长发育调节。

参考文献:

- [1] Thomas P M. Paradigms of growth in fish[J]. *Comp Biochem Physiol Part B*, 2001, 129(2-3): 207-219.
- [2] Moriyama S, Ayson F G, Kawauchi H. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish[J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2000, 64(8): 1553-1562.
- [3] Patel Y C. Somatostatin and its receptor family[J]. *Front Neuroendocrin*, 1999, 20(3): 157-198.
- [4] Lin X, Peter R E. Somatostatins and their receptors in fish[J]. *Comp Biochem Physiol Part B*, 2001, 129(2-3): 543-550.
- [5] Sheridan M A, Kittilson J D, Slagter B. Structure-function relationships of the signaling system for the somatostatin peptide hormone family[J]. *Am Zool*, 2000, 40(2): 269-286.
- [6] Nelson L E, Sheridan M A. Regulation of somatostatins and their receptors in fish[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2005, 142(1-2): 117-133.
- [7] 鲁双庆,刘峰,刘臻,等. 三种鳊鱼(*Siniperca*)生长激素基因的克隆及序列比较[J]. *海洋与湖沼*,

- 2008,4(39):354-361.
- [8] 刘俊,赵金良,张敏,等. 鳊胰岛素样生长因子 - I cDNA 全长克隆及组织表达分析[J]. 动物学杂志, 2011,46(3):28-36.
- [9] Murray H M, Gallant J W, Perez-Casanova J C. Ontogeny of lipase expression in winter flounder[J]. J Fish Biol,2003,62(4):816-833.
- [10] 孟庆闻,苏锦祥,李婉端. 鱼类比较解剖学[M]. 北京:科学出版社,1987:285-297.
- [11] 叶星,李文笙,林浩然. 鱼类生长抑素及其受体的研究进展[J]. 水产学报,2007,31(2):264-272.
- [12] 刘扬,王静凤,宋微波. 鱼类生长抑素的研究进展[J]. 海洋科学,2004,28(7):67-70.
- [13] Lin X W, Otto C J, Peter R E. Expression of three distinct somatostatin messenger ribonucleic acids (mRNAs) in gold fish brain; characterization of the complementary deoxyribonucleic acids, distribution and seasonal variation of the mRNAs, and action of a somatostatin-14 variant[J]. Endocrinology,1999,140(5):2089-2099.
- [14] Kittilson J D, Moore C A, Sheridan M A. Polygenic expression of somatostatin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: evidence of a preprosomatostatin encoding somatostatin-14 [J]. Gen Comp Endocrinol,1999,114(1):88-96.
- [15] Fukusumi S, Kitada C, Takekawa S. Identification and characterization of a novel human cortistatin -like peptide[J]. Biochem Biophys Res Commun,1997,232(2):157-163.
- [16] Ye X, Li W S, Lin H R. Polygenic expression of somatostatin in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): molecular cloning and distribution of the mRNAs encoding three somatostatin precursors[J]. Mol Cell Endocrinol,2005,241(1-2):62-72.
- [17] Trabucchi M, Tostivint H, Lihmann I. Polygenic expression of somatostatin in the Sturgeon *Acipenser transmontanus*: Molecular cloning and distribution of the mRNAs encoding two somatostatin precursors [J]. J Comp Neurol,2002,443(4):332-345.
- [18] 俞菊华,夏德全,杨弘,等. RACE 法分离团头鲂生长抑素全长 cDNA 及其序列测定[J]. 水产学报, 2003,27(6):533-539.
- [19] Nguyen M, Wright J J R, Neilsen P F, et al. Characterization of the pancreatic hormones from the Brockmann body of the tilapia; implications for islet xenograft studies[J]. Comp Biochem Physiol,1995,111(1):33-44.
- [20] Plisetskaya E M, Pollock H G, Roose J B, et al. Characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) islet somatostatins [J]. Gen Comp Endocr, 1986,63(2):252-263.
- [21] Uesaka T, Yano K, Yamasaki M. Somatostatin-related peptides isolated from the eel gut; effects on ion and water absorption across the intestine of the seawater eel [J]. J Exp Biol, 1994, 188(1): 205-216.
- [22] Marchant T A, Fraser R A, Andrews P C. The influence of mammalian and teleost somatostatins on the secretion of growth hormone from goldfish (*Carassius auratus* L.) pituitary fragments *in vitro* [J]. Regul Pept,1987,17(1):41-52.
- [23] 冉雪琴,李文笙,林浩然. SRIF 及 CSH 对斜带石斑鱼脑垂体生长激素合成和分泌的调控[J]. 动物学报,2004,50(2):222-230.
- [24] Sheridan M A, Eilertson C D, Kerstetter T H. Changes in plasma somatostatin associated with seawater adaptation and stunting of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* [J]. Aquaculture, 1998, 168(1):195-203.
- [25] Li C J, Wei Q W, Zhou L, et al. Molecular and expression characterization of two somatostatin genes in the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* [J]. Comp Biochem Physiol,2009,154(1):127-134.
- [26] Moore C A, Kittilson J D, Ehrman M M, et al. Rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) possess two somatostatin mRNAs that are differentially expressed [M]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 1999,277(6):1553-1561.
- [27] Uesaka T, Yano K, Yamasaki M. Somatostatin-, vasoactive intestinal peptide-, and granulin-like peptides isolated from intestinal extracts of goldfish, *Carassius auratus*[J]. Gen Comp Endocrinol,1995, 99(3):187-306.
- [28] Holstein B, Cederberg C. Effect of somatostatin on basal and stimulated gastric secretion in the cod, *Gadus morhua* [J]. Am J Physiol,1988,254(2), G183-G188.
- [29] Holloway A C, Sheridan M A, Kraak G V D, et al. Correlation of plasma growth hormone with somatostatin, gonadals teroid hormones and thyroid hormones in rainbow trout during sexual recrudescence[J]. Comp Biochem Physiol,1999,123(3):251-260.
- [30] 谢启文. 神经肽[M]. 上海:复旦大学出版社, 2004:93-96.
- [31] Leslie A, Darlene K, Jeffrey D, et al. Localization of

- somatostatin mRNAs in the brain and pancreas of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2001, 129(2-3): 221-228.
- [32] Fátima A, Ramón A, Isabel R M. Distribution of somatostatin immunoreactive neurons and fibres in the central nervous system of a chondrosteian, the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) [J]. *Brain Res*, 2008, 12(9): 92-104.

Cloning, tissue expression of three somatostatin genes of *Siniperca chuatsi* and their localizations in brain

DAI Wei, ZHAO Jin-liang*, LIU Jun, XUE Yang

(Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Somatostatins (SS) play important physiological functions in vertebrate's growth and development, which belong to a multiple gene family. In this study, the complete cDNA sequences of three distinct preprosomatostatins (PSS I, PSS II and PSS III) were isolated from *Siniperca chuatsi* brain and cloned by means of rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full length of PSS I cDNA was 647 bp, which contained 369 bp open reading frame and encoded 122 amino acids with a signal peptide of 26 amino acids. It contained the conservative SS-14 sequence at the C-terminal extremity, which is identical with that of other vertebrates. The full length of PSS II cDNA was 655 bp, which contained 387 bp open reading frame and encoded 128 amino acids with a signal peptide of 25 amino acids. It contained [Tyr⁷, Gly¹⁰] SS-14 at the C-terminal extremity. The full length of PSS III cDNA was 823 bp, which contained 333 bp open reading frame and encoded 110 amino acids with a signal peptide of 21 amino acids. It contained [Pro²] SS-14 at its C-terminal extremity. PSS mRNA expressions in different adult tissues were analyzed by RT-PCR technique. All PSS mRNA were found in brain, while PSS I mRNA wasn't detected in other peripheral tissues, high levels of PSS II mRNA were also present in esophagus and stomach, PSS III mRNA in kidney and gonad. These suggested that all PSSs participate in neurological regulation in brain, whereas PSS II may also regulate digestion activity, and PSS III regulates reproduction activity. Cellular localization of PSS mRNAs in brain was determined by in situ hybridization, PSS I mRNA was expressed in hypothalamus and medulla oblongata, PSS II mRNA was expressed in hypothalamus, PSS III mRNA was expressed in hypothalamus, optic tectum, medulla oblongata and spinal cord. All PSS mRNA were detected in the hypothalamus, which showed they could be involved in hypothalamic-pituitary regulation. Distinct expression in other brain sections suggested somatostatins may also act as neurotransmitters or hormones, and exhibit different biological effects.

Key words: *Siniperca chuatsi*; somatostatin; cDNA; tissue expression; cellular localization

Corresponding author: ZHAO Jin-liang. E-mail: jlzha@shou.edu.cn