

文章编号: 1000-0615(2016)07-0993-13

DOI: 10.11964/jfc.20150810022

草鱼 *AdipoR1-B* 基因克隆、组织分布及其表达的营养调控

杨峰, 秦超彬, 卢荣华, 孙君君, 杨丽萍, 聂国兴*

(河南师范大学水产学院, 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南新乡 453007)

摘要: 为探讨 *AdipoR1-B* 在鱼类糖类和脂质代谢中的作用, 本实验采用 RACE 方法获得了草鱼 *AdipoR1-B* 的全长 cDNA 序列(登录号: KP733846), 利用生物信息学技术对该基因及其所编码蛋白的结构特征进行了分析; 采用实时定量 PCR 技术, 检测了 *AdipoR1-B* 在 19 个不同组织中的表达特性以及高糖(45%)、高脂(8%)和高糖高脂饲喂对草鱼肝脏中该基因表达的影响。结果显示, 草鱼 *AdipoR1-B* cDNA 全长 2186 bp, 其中开放读码框为 1122 bp, 编码 373 个氨基酸; 跨膜结构分析表明草鱼 *AdipoR1-B* 为典型的 7 次跨膜蛋白; 同源性分析结果显示, 草鱼 *AdipoR1-B* 与其他物种的 *AdipoR1-B* 高度同源(氨基酸相似度 78% 以上), 并与斑马鱼 *AdipoR1-B* 的进化关系最近; 组织分布结果显示, *AdipoR1-B* 在草鱼肝脏中表达量最高, 中枢神经系统和红肌次之; 此外, 高脂和高糖高脂饲喂均能够显著提高草鱼肝脏中 *AdipoR1-B* 的表达水平。因此, 草鱼肝脏中 *AdipoR1-B* 的表达水平受到日粮中脂类水平的调控, 推测该受体可能在调节鱼类脂质代谢中发挥重要作用。

关键词: 草鱼; 脂联素受体; 基因克隆; 组织分布; 营养调控

中图分类号: Q 785; S 963

文献标志码: A

脂联素(adiponectin), 之前又被称为 Acrp30、AdipoQ、GBP28、apM1 等。在哺乳动物中, 脂联素主要为脂肪组织大量分泌的脂肪细胞因子。经过酶解作用其 C 端球状区域可形成球状脂联素, 该形式脂联素的生物学功能更为活跃, 也更为广泛^[1]。在哺乳动物中的研究发现, 脂联素在调控生物体的能量稳态、糖类和脂质代谢中发挥着重要作用, 它能够提高机体对葡萄糖的摄入量, 并促进脂肪酸的 β 氧化作用^[2-3]。脂联素的生物学效应, 是通过与其受体相结合并触发 AMPK、PPAR α 等信号通路而产生的^[4]。Yamauchi 等^[4]在人和小鼠体内首先发现了脂联素的 2 个受体, 并分别将其命名为脂联素一型受体(AdipoR1)和脂联素二型受体(AdipoR2)。其中, AdipoR1 主要介导 AMPK 信号通路, 进而抑制糖质新生并促进脂肪酸的氧化作用; 而 AdipoR2 则介导 PPAR α 信号通路, 进而促进脂肪酸的氧化作

用^[5]。此外, 这两种受体与脂联素的亲和力也有所不同。AdipoR1 是球状脂联素的高亲和力受体和全长脂联素的低亲和力受体, 而 AdipoR2 则是全长和球状脂联素的中等亲和力受体^[4]。

Nishio 等^[6]首次报道了鱼类[斑马鱼 (*Danio rerio*)]的脂联素受体, 斑马鱼的 AdipoR1 有两种亚型, 即 AdipoR1-A 和 AdipoR1-B。随后, 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 脂联素受体基因陆续被发现^[7-8]。在小鼠体内, AdipoR1 在骨骼肌中的表达量最高, 而 AdipoR2 则主要在肝脏中表达, 在其他组织中表达量很低^[4]。在鱼类中的研究发现, AdipoR1 在肝脏中的表达量要高于 AdipoR2, 并且在进化过程中, AdipoR1 的保守性更高, 尤其是胞外配体结合区域^[8]。这意味着 AdipoR1 介导的生物学功能在进化上更为保守, 在机体能量代谢过程中可能也发挥着关键作用。目前, 脂联素及其受

收稿日期: 2015-08-10 修回日期: 2016-03-17

资助项目: 国家自然科学基金(31372545, 31402311); 河南省高校科技创新团队支持计划(14IRTSTHN013); 河南省科技创新杰出青年支持计划(154100510009); 河南师范大学博士启动课题资助(qd14177)

通信作者: 聂国兴, E-mail: niegx@htu.cn

体在鱼类中的具体功能, 以及其是否参与对糖类和脂质代谢的调节尚不清晰。

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)属鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae), 是我国特有的淡水鱼类, 同时也是我国国家大宗淡水鱼类产业技术体系重点研究的鱼类之一。据中国渔业统计年鉴, 2014年我国淡水鱼类养殖产量为2602.97万t, 其中草鱼最高, 养殖产量为537.68万t。草鱼为草食性鱼类, 其天然饵料为水生植物。随着养殖规模的不断扩大, 草鱼的养殖模式已由传统的放养模式转向高投入、高产出的精养模式。饲料是精养模式中的主要成本, 而用于提供草鱼所需蛋白质的鱼粉则占饲料原料成本的比重较高。有研究表明, 饲料中适当提高糖类和脂质含量可以减少用于供能所消耗的蛋白质, 具有节约蛋白质的作用^[9]。然而, 在精养模式下, 为降低养殖成本, 饲料中糖类和脂质的含量往往较高, 极易引起草鱼肝脏中脂质的大量蓄积, 从而导致肝功能减弱和代谢紊乱^[10-12]。因此, 加深对鱼体糖类和脂质代谢调控机制的认识, 可为提高鱼体对糖类和脂质的利用并防止肝脏脂质蓄积的产生提供理论参考。

为获得脂联素一型受体基因的相关信息以及初步探讨其在鱼类能量代谢过程中的作用, 本研究以草鱼为实验对象, 通过RACE方法获得了草鱼脂联素受体AdipoR1-B的全长cDNA序列; 利用生物信息学方法, 对该cDNA序列及其编码蛋白的结构特征进行了分析和预测; 采用实时定量PCR技术检测了AdipoR1-B在草鱼各个组织中的表达水平, 以及高糖、高脂和高糖高脂饲料对草鱼肝脏中该基因表达水平的影响。本研究结果为脂联素及其受体系统在鱼体的糖类和脂质代谢中的作用提供了初步信息, 并为以后的功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

RNA提取试剂RNAiso Plus、反转录试剂盒PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)和荧光定量试剂盒SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)均购自TaKaRa; Quick Gel Extraction Kit购自北京康为世纪生物科技有限公司; PGEM-T Vector 购自Promega公司。

1.2 草鱼AdipoR1-B的cDNA克隆

体质量约100 g的健康草鱼, 取自河南师范大学水产养殖基地, 在实验室流水养殖系统中暂养, 水交换量1 L/min, 投喂商品饲料, 每天饲喂3次: 8:30、13:00、17:30, 平均水温为(25±1) °C, DO>5 mg/L, 氨态氮<0.01 mg/L, 光照周期为12L:12D。无菌条件下取肝脏, 以液氮为介质, 在研钵中将组织研磨成粉末状, 按照RNAiso Plus说明书提取总RNA。琼脂糖凝胶电泳法检测其完整性, 超微量分光光度计法检测其浓度和纯度。

通过草鱼转录组测序, 实验已经获得了草鱼AdipoR1-B部分cDNA序列。在此基础上, 利用Primer Premier 5.0生物软件设计3条特异性引物(3F1、3F2、3F3)和2条通用引物(AP、AUAP)(表1), 用于AdipoR1-B cDNA3'末端序列的克隆。以提取的草鱼肝脏总RNA为模板, 按照PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒的说明, 用AP引物代替反转录试剂盒中的Olig(T)引物合成cDNA第一条链, 然后进行巢式PCR。第一轮PCR以该cDNA为模板, 分别以引物对3F1+AUAP和3F2+AUAP进行扩增; 然后以各自稀释50倍的第一轮PCR产物为模板, 以3F2+AUAP和3F3+AUAP引物对进行第二轮嵌套PCR。2轮PCR扩增条件: 94 °C预变性3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min 40 s(第一轮PCR 30个循环, 第二轮为35个循环); 72 °C后延伸10 min。

PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳后, 将目的条带切胶回收, 并采用Quick Gel Extraction Kit进行纯化, 然后将纯化产物连接至PGEM-T载体, 经16 °C连接6~8 h后, 转化JM109感受态细胞, 进行蓝白斑筛选。37 °C倒置培养10~14 h后, 挑取6~8个单菌落进行扩大培养。经菌液PCR验证后, 选择阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.3 序列分析

将测序获得的片段和课题组已获得的序列进行拼接, 得到了AdipoR1-B完整的cDNA序列。通过ExPASy(<http://www.expasy.ch/tools/>)的TranslateTool软件推导其氨基酸序列; 利用ExPASy在线分析软件(http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool)预测蛋白质分子量和等电点; 使用DAS-TMfilter server(<http://mendel.imp.univie>。

表1 本研究所用的主要引物

Tab. 1 Primers used in the study

引物名称 primer name	序列 sequences(5'→3')	用途 usage	产物长度/bp product length	退火温度/°C T _m
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT	3'RACE		
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	3'RACE		
adipoR1-B-3F1	TAGTGCAGAGAAATCCAGAG	3'RACE		
adipoR1-B-3F2	TGGCGAGTTATCCATACAATC	3'RACE	855	55
adipoR1-B-3F3	CACCGTCTACTGCCACTCAG	3'RACE	556	55
adipoR1-B-F	TAGTGCAGAGAAATCCAGAG	qRT-PCR		
adipoR1-B-R	GAAGCAGGTAATCATTGTCC	qRT-PCR	206	60
β -actin-F	CGTGACATCAAGGAGAAG	qRT-PCR		
β -actin-R	GAGTTGAAGGTGGTCTCAT	qRT-PCR	288	60

ac.at/sat/DAS/)预测跨膜区氨基酸序列,利用 Tmpred Server(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)和 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)预测疏水性及跨膜二级结构;利用 ClustalX 1.83 软件比较氨基酸序列同源性,并用 Mega 5.0 软件通过邻接(Neighbour-Joining, NJ)法构建进化树,1000次自举(Bootstrap)重复检验进化树的置信度;利用 microRNA(miRNA)预测软件(<http://regrna.mbc.nctu.edu.tw/html/prediction.html>)预测草鱼 AdipoR1-B UTR区的 miRNA 作用靶位点。

1.4 草鱼 AdipoR1-B 组织表达分析

根据所获得的草鱼 AdipoR1-B cDNA 序列设计正反向引物,并以 β -actin 为内参基因(表1)。取3条健康草鱼(体质量1~1.3 kg),其养殖条件同1.2。取样前禁食12 h,草鱼麻醉后,无菌条件下迅速分离端脑、中脑、小脑、延脑、下丘脑、头肾、垂体、心脏、脊髓、胸腺、性腺、肝脏、白肌、红肌、肠、肾脏、脾脏、脂肪和鳃19个组织。液氮速冻后保存于-80 °C备用。按照 RNAiso Plus 说明书提取总 RNA,利用 PrimeScriptTM RT reagent Kit (Perfect Real Time) 反转录获得第一链 cDNA。将 cDNA 进行梯度稀释,检测目的基因和内参基因的扩增效率(扩增效率分别为95%和97%)。

采用 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪,参照 SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus) 说明书,进行实时定量 PCR。PCR 反应体系为 20 μ L:

SYBR[®] Premix Ex TaqTM (2 \times) 10 μ L, PCR Forward Primer (10 μ mol/L) 0.5 μ L, PCR Reverse Primer (10 μ mol/L) 0.5 μ L, ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 加无菌水至总体积为 20 μ L。PCR 程序采用两步法:95 °C 30 s; 95 °C 5 s、60 °C 1 min,共40个循环。反应结束后进行熔解曲线分析以验证产物特异性,反应条件为95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。每个样品3个平行,反应结束后进行数据分析。AdipoR1-B mRNA 的相对表达量参照 Livark 等^[13]提出的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算,然后采用 SPSS Statistics 17.0 进行 One-Way ANOVA 分析、LSD 与 Duncan 比较,结果以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。在组织表达分析中,以肝脏为对照,其他各组织 AdipoR1-B 的 mRNA 的表达量为肝脏中表达量的倍数。

1.5 高糖、高脂饲喂对草鱼肝脏 AdipoR1-B mRNA 表达的影响

选取360尾平均体质量为(40.15 \pm 0.18)g的草鱼,随机分为4组,根据草鱼对糖和脂类的营养需求量并参照文献[14],设计对照组、高糖组(45%)、高脂组(8%)和高糖高脂组,实验饲料组成及成分分析见表2。每组3个重复,每个重复30尾鱼,养殖条件同“草鱼 Adipo1-B 的 cDNA 克隆”,实验周期为60 d。实验结束时,每个重复取6尾鱼,麻醉后无菌条件下分离肝脏,液氮速冻后-80 °C 保存备用。采用 qRT-PCR 技术,检测每组肝脏中 AdipoR1-B 的相对表达量,方法同“草鱼 Adipo1-B 组织表达分析”。

表2 实验饲料组成及成分分析
Tab.2 Formulation and proximate composition of the experimental diets %

成分 ingredients	对照组 control	高糖组 H-CHO	高脂组 H-LIP	高糖高脂组 H-CHO&H-LIP
配方 formulation				
酪蛋白 casein	31	31	31	31
明胶 gelatin	7	7	7	7
鱼油 fish oil	2.03	2.03	4	4
大豆油 soybean oil	2.02	2.03	4	4
DL-甲硫氨酸 DL-Met	0.2	0.2	0.2	0.2
糊精 dextrin	30	44.36	29.98	44.35
矿物质预混料 mineral mix	1	1	1	1
维生素预混料 vitamin mix	0.1	0.1	0.1	0.1
乙氧基喹啉 ethoxy quinoline	0.05	0.05	0.05	0.05
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	22.6	8.23	18.67	4.3
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	2	2	2	2
羧甲基纤维素钠盐 CMC-Na	2	2	2	2
组成成分分析 proximate analysis				
粗蛋白 crude protein	32.36	32.36	32.36	32.36
粗脂肪 crude lipid	4.19	4.19	8.06	8.06
碳水化合物 carbohydrates	30.8	45.17	30.8	45.18

注：预混料由河南康达尔农牧科技有限公司提供。其中矿物质预混料可为每 kg 饲料提供 Cu 2.8 mg, Fe 35 mg, Mn 15 mg, Zn 35 mg; 维生素预混料可为每 kg 饲料提供 VA 5500 IU, VB₂ 6 IU, VB₆ 8 IU, 泛酸钙 20 IU, 烟酸 16 IU, VD₃ 1050 IU, VE 20 IU, VK₃ 3IU, 氯化胆碱 500 IU
Notes: the premix was provided by Henan Kondarl Agro-pastoral Science & Technology CO.Ltd.. The mineral mix can provide the following diets of per kg: Cu 2.8 mg, Fe 35 mg, Mn 15 mg, Zn 35 mg; the vitamin mix can provide the following diets of per kg: VA 5500 IU, VB₂ 6 IU, VB₆ 8 IU, calcium pantothenate 20 IU, niacin 16 IU, VD₃ 1050 IU, VE 20 IU, VK₃ 3 IU, choline chloride 500 IU

2 结果

2.1 草鱼 AdipoR1-B 的 cDNA 序列和氨基酸序列

草鱼 AdipoR1-B 的 cDNA 全长为 2186 bp, 其中 5' UTR 区为 400 bp, 3' UTR 区为 664 bp, 开放读码框为 1122 bp, 编码 373 个氨基酸(图1)。其蛋白质分子量为 42.00 ku, 等电点(pI)为 6.00, 不含信号肽。

将草鱼 AdipoR1-B 氨基酸序列分别与斑马鱼、大西洋鲑(*Salmo salar*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和虹鳟的氨基酸序列进行了同源性比对分析, 结果发现该受体在鱼类中的同源性极高(图2)。

2.2 草鱼 AdipoR1-B 跨膜区预测

跨膜区预测结果显示, AdipoR1-B 的 N 端存在较强的疏水区域, 其 C 端则表现出较强的亲水

性(图3); 经 TMHMM 跨膜结构预测发现, 该序列存在 7 个跨膜结构, 且 C 端位于膜外, N 端位于膜内(图1, 4), 这与 G 蛋白耦联受体的拓扑结构正好相反。

2.3 草鱼 AdipoR1-B 同源性比对分析

序列比对结果显示, 草鱼 AdipoR1-B 和斑马鱼的同源性最高, 达到了 93.8%, 和其他物种的同源性也达到了 78.0% 以上(表3)。因此, AdipoR1-B 的氨基酸序列在脊椎动物中的保守性较高。

2.4 草鱼 AdipoR1-B 的结构分区及同源性比对分析

AdipoR1-B 在 N 端胞内区的同源性为 56.8%~87.0%, HlyIII 结构域和 C 端胞外区的同源性分别达到了 87.7% 和 91.3%, 说明 N 端胞内区变异程度比较大, 而其他区域则相对保守(表4)。

1	TAGATACTAGTATCTAAAGAATAAGTAGTAGTAGCATGAAAATAGATATTAGTACGTTTTAAGGATTAATAATATAAACC	79
80	GGCTTGCCTGTGTCAAACCGTTAAGATATACGTTCTTCTCTCTGACGGATACAAAAGTACATCCTCTGTCTCCGC	158
159	GTGCTGATATAGCGTACTGTGTATCAGACGGTTTTAATCTATGTAAATTTAGTTATTTGTGTATAAATTTGTACTGAA	237
238	CCGAACCGACTGTTCCACAGGTTTATAGGGTTCATAGCGACCGGACGGCAAGCTGCAGCAGTAAACTCCCATGAACG	316
317	GACGTGACAGCCTGTCCAGCCAGACTCAGATTGTGAACAGTTGGACAAGGTAGAAATATCTGGGGACTTTTAGGTTTGTCT	395
396	TCCCC	400
401	ATG ACA ACG TGT CAC CAT GGT GAC TGC GGC TCC AAC AGT GAT GCC GAG CGG CGC ACC TCT	460
1	M T T C H H G D C G S N S D A E R R T S	20
461	GAT GAT GAG AAT ATG GAG ACT GCG GAG CTC ACG GAG CTT GGG CCG CTG TTG ACA ACT CCA	520
21	D D E N M E T A E L T E L G P L L T P P	40
521	GCT AGT GCA GAG AAA TCC AGA GGT GCA TCT GCA TTT CCT GAT GAG GAT GAA GAG GAA GAA	580
41	A S A E K S R G A S A F P D E D E E E E	60
581	GGT TTG CGG GTG GTT ACA CTA CCC ATG CAG GCA CAC CAT GCC ATG GAG AAG ATG GAG GAG	640
61	G L R V V T L P M Q A H H A M E K M E E	80
641	TTT GTA CAC AAG GTA TGG GAA GGA CGT TGG CGA GTT ATT CCA TAC AAT CTC CTC CCC GAT	700
81	F V H K V W E G R W R V I P Y N L L P D	100
701	TGG CTG AAG GAC AAT GAT TAC CTG CTT CAA GGA CAC CGC CCA CCC ATG CCA TCC TTC CGT	760
101	W L K N D Y L Q G H R P P M P S F R	120
761	GCC TGT TTT GGG AGC ATC TTT AGG ATT CAC ACA GAA ACT GGA AAC ATC TGG ACA CAC CTG	820
121	A C F G S I F R I H T E T G N I W T H L	140
821	CTG GGC CTA ATT CTG TTC CTT TGC TTG GGC ACA CTG ACA ATG CTG CGG CCG AAT GTG TCA	880
141	L G L I L F L C L G T L T M L R P N V S	160
881	TTC ATG GCG CCT GTG CAG GAG AAG GTG GTG TTA GGG ATG TTC TTC CTG GGT GCA GTG CTT	940
161	F M A P V Q E K V V L L G M F F L G A V L	180
941	TGT TTG TGC TCA TGG CTT TTT CAC ACC GTC TAC TGC CAC TCA GAA AAG GTC TCC AGA	1000
181	C L C F S W L F H T V Y C H S E K V S R	200
1001	ACT TTC TCC AAG TTG GAT TAC TCT GGT ATC GCT TTG TTG ATT ATG GGC TCA TTC GTT CCA	1060
201	T T F S K L D Y S G I A L L I M G S F V P	220
1061	TGG CTG TAC TAC TCG TTT TAC TGC TCG CCT CAG CCA CGG CTT ATC TAT CTG TCT GTT GTA	1120
221	W L Y Y S F Y C S P Q P R L I Y L S V V	240
1121	TGT GTG CTT GGT GTC GCT ATC ATA GTG GCC CAG GTG GAC CGA TTC GCC ACC CCT CGT	1180
241	C V L G V A A I I V A Q V D R F A T P R	260
1181	CAC CGG TCC ACA CGT GCC GGT GTT TTC CTG GGC CTT GGT CTG AGT GGG CTC ATT CCC ACA	1240
261	H R S T R A G V F L G L G L S G L I P T	280
1241	ATG CAC TTT ACC ATC ACA GAG GGT TTT GTG AAG GCA ACG ACA GTG GGT CAG ATG GGC TGG	1300
281	M H F T I T E G F V K A T T V G Q M G W	300
1301	TTC TAT CTG ATG GGT GCC ATG TAC GTC AGT GGA GCA GGA CTG TAT GCA GCA CGG ATA CCT	1360
301	F Y L M G A M Y V S G A G L Y A A R I P	320
1361	GAA CGC TAC TTT CCT GGA AGA TGT GAC ATT TGG TTT CAG TCT CAT CAG ATA TTC CAT GTG	1420
321	E R Y F P G R C D I W F Q S H Q I F H V	340
1421	CTG GTT GTC GGA GCG GCG TTT GTC CAT TTT TAT GGA ATC TCA AAC CTG CAG GAA TTC CGC	1480
341	L V V G A A F V H F Y G I S N L Q E F R	360
1481	TAT GGT CTA GAA GGA GGC TGC ACA GAT GAC ACT CTG CTG TAA	1522
361	Y G L E G G C T D D T L L *	374
1523	AAATAATAATAATAATAATCGCTTGAACCTTTGGCCGGTGCCTGCTCACTTCACAATGAACCTGGACCCGACATAATAAT	1601
1602	GATTGAAAGATCTGTATATCTCTGAGGGATTTAACATATATTAAATAAGATGTTTATTGTTAAGATACTTAAAT	1680
1681	TACTGATAAATGAGGTAGTCTTGTGTTTATATGTTCTTTACTATTTTCAGTACAGCACAGAATTTATTGTAATCACTG	1759
1760	GAATGAGTCATAAAGCATTACAGAGGCTTGTGAGAGACACTACCTCCFCCAACACTTTTTTTCTAATAGTTTTCTGATC	1838
1839	TAGTGCCTGGTTTTTTCATCTAAGGTTTTATTTACTGGTTCATGGTCTGTACTTTGTAAGAATTTAAGGGTAACACACA	1917
1918	TGAACATGCTTAGTTCTCGTTTTTCTCAACATGTTTGCATGATCATTCACTTTGACCTAAATGACCCAGAGC	1996
1997	TTCAGCAGTGGGATTCAGATTGGGGGACATGCAATTCATTTTTGTTTGTGAGTGAATCAGGATTTTCAGTCCAAATACT	2075
2076	TGTATTGGTTTTGGAAGTCATAGAAGTCAAGATATTTAAAGAGCAGAATAAAGATGAAACACCAAAAAAAAAAAAAA	2154
2155	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2186

图1 草鱼*AdipoR1-B*的cDNA序列与推测的氨基酸序列

图中灰底部分为预测的跨膜区, 星号代表终止密码子

Fig. 1 cDNA and deduced amino acid sequences of grass carp *AdipoR1-B*

The predicted transmembrane regions are shaded, and the stop codon is denoted by an asterisk

2.5 草鱼*AdipoR1-B* UTR区miRNA作用靶位点的预测

miRNA作用靶位点预测结果显示, 在*AdipoR1-B*的3' UTR区存在与miRNA *let-7*结合的位点, 包括*let-7a*、*let-7b*、*let-7c*、*let-7d*、*let-7f*、*let-7g*和*let-7i*(表5), 并且miRNA *let-7*与脂类代谢密切相关。

2.6 草鱼*AdipoR1-B*系统进化树分析

采用Mega 5.0软件, 基于氨基酸序列比对分

析, 以邻接法构建脊椎动物*AdipoR1-B*进化树(图5)。从图中可以看出, 哺乳类、鸟类的*AdipoR1-B*各聚为一支, 鱼类则单独聚为一支。并且草鱼与斑马鱼的*AdipoR1-B*聚在一起, 草鱼和斑马鱼同属鲤科鱼类, 符合氨基酸同源性比对结果。因此, *AdipoR1-B*的系统进化关系与传统分类学的进化关系相一致。

2.7 草鱼*AdipoR1-B*组织表达分析

*AdipoR1-B*在肝脏中表达量最高, 红肌和中

大西洋鲑 <i>S. salar</i>	MS---	GRNGSASDADCRISED	-RVPDVELMELGPLEETG-RQTAGKGMSEGASVLP	54
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	MS---	GRNGSASDADCRISED	-RSPDVELMELGPLEEAG-RQAGGKGMSEGASVLP	54
尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	MS---	GRNGSASDADCRISED	-QVPDVELMELGPLEEGGARQVSKSVHPEGAAMLA	55
青鳞 <i>O. latipes</i>	MS---	VRNGSAGDADCQISED	G-HVPDVELMELGPLEEGGGQVADGTHSEGAAMLT	54
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	MTTCHHGDCGSNSDAERRAT	DDDEANMEDAELSELGPLL-----	TSPANSEESRGASASP	54
草鱼 <i>C. idella</i>	MTTCHHGDCGSNSDAERRTSDDE	-NMETAELTELGPLL-----	TTPASAEKSRGASAFP	53
	*	:	:	:
大西洋鲑 <i>S. salar</i>	DD-----	EEVEEVLTLPLQAHHAMEKMEEFVHKVWKGSRVIPFHVLPEWLKNDNYLLH		108
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	DDDEDDDEEVEEVLTLPLQAHHAMEKMEEFVHKVWKGSRVIPFHVLPEWLKNDNYLLH			114
尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	DEEEE--	DDEVEVLTLPLQAHHAMEKMEEFVHKVWEGRWVIPFHVLPEWLKNDNYLLH		113
青鳞 <i>O. latipes</i>	DE-----	DEEVLTLPLQAHHAMEKMEEFVHKVWEGRWVIPFHVLPEWLKNDNYLLH		108
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	DEDE---	EEGLRVVTLPMQAHHAMEKMEEFVHKVWEGRWVIPYNLLPDWLKNDNYLLQ		110
草鱼 <i>C. idella</i>	*	:	:	:
大西洋鲑 <i>S. salar</i>	GHRPPMPSFRACFGSIFRIHTETGNIWTHLLGLILFICLGTYTILRPNMYFMAPLQEKVV			168
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	GHRPPMPSFRACFGSIFRIHTETGNIWTHLLGLILFICLGTYTILRPNMYFMAPLQEKVV			174
尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	GHRPPMPSFRACFGSIFRIHTETGNIWTHLLGLILFICLGTLTMLRPNMYFMAPLQEKVV			173
青鳞 <i>O. latipes</i>	GHRPPMPSFRACFGSIFRIHTETGNIWTHLLGLILFVCLGTLTMLRPNMYFMAPLQEKVV			168
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	GHRPPMPSFRACFGSIFRIHTETGNIWTHLLGLILFICLGTLTMLRPNVFMAPVQEKVV			174
草鱼 <i>C. idella</i>	GHRPPMPSFRACFGSIFRIHTETGNIWTHLLGLILFICLGTLTMLRPNVFMAPVQEKVV			170
	*****	:	:	:
大西洋鲑 <i>S. salar</i>	FGMFFLGAVLCLSFSLFHTVYCHSEKVSRTFSKLDYSGIALLIMGSFVPWLYYSFYCS			228
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	FGMFFLGAVLCLSFSLFHTVYCHSEKVSRTFSKLDYSGIALLIMGSFVPWLYYSFYCS			234
尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	FGMFFLGAVLCLSFSLFHTVYCHSEKVSRTFSKLDYSGIALLIMGSFVPWLYYSFYCS			233
青鳞 <i>O. latipes</i>	FGMFFLGAVLCLSFSLFHTVYCHSEKVSRTFSKLDYSGIALLIMGSFVPWLYYSFYCS			228
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	FGVFFLGAVLCLCFSLFHTVYCHSEKVSRTFSKLDYSGIALLIMGSFVPWLYYSFYCS			234
草鱼 <i>C. idella</i>	LGMFFLGAVLCLCFSLFHTVYCHSEKVSRTFSKLDYSGIALLIMGSFVPWLYYSFYCS			230
	*****	:	:	:
大西洋鲑 <i>S. salar</i>	QPRLIYLTIVCVLGIAAIIVAQWERFSTPAHRPTRAGVFMGLGSLGIVPTVHFTIEEGFV			288
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	QPRLIYLTIVCVLGIAAIIVAQWERFSTPAHRPTRAGVFMGLGSLGIVPTVHFTIEEGFV			294
尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	QPRLIYLTIVCILGIAAIIVAQWDRFSTPRHRPTRAGVFMGLGSLGIVPTMHFTIEEGFV			293
青鳞 <i>O. latipes</i>	QPRLIYLTIVCVLGIAAIIVAQWDRFSTPRHRPTRAGVFMGLGSLGIVPTMHFTIEEGFV			288
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	QPRLIYLSVVCVLGVAIIVAQWDRFATPRHRSTRAGVFLGGLSGLVPTMHFTIAEGFV			294
草鱼 <i>C. idella</i>	QPRLIYLSVVCVLGVAIIVAQVDRFATPRHRSTRAGVFLGGLSGLIPTMHFTITEGFV			290
	*****	:	:	:
大西洋鲑 <i>S. salar</i>	KATTVGQMGWFYLMGAMYITGAGLYAARIPERYFPGKCDIWFHSHQIFHVLVVAAAFVHF			348
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	KATTVGQMGWFYLMGAMYITGAGLYAARIPERYFPGKCDIWFHSHQIFHVLVVAAAFVHF			354
尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	KATTVGQMGWFYLMGAMYITGAGLYAARIPERYFPGKCDIWFHSHQIFHVLVVAAAFVHF			353
青鳞 <i>O. latipes</i>	KATTVGQMGWFYLMGAMYITGAGLYAARIPERFPGKCDIWFHSHQIFHVLVVAAAFVHF			348
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	KATTVGQMGWFYLMGAMYISGAALYAARIPERYFPGRCDIWFQSHQIFHVLVVGAAAFVHF			354
草鱼 <i>C. idella</i>	KATTVGQMGWFYLMGAMYVSGAGLYAARIPERYFPGRCDIWFQSHQIFHVLVVGAAAFVHF			350
	*****	:	:	:
大西洋鲑 <i>S. salar</i>	YGVSNLQEFYRGLGEGCTDDTLL			371
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	YGVSNLQEFYRGLGEGCTDDTLL			377
尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	YGVSNLQEFYRGLGEGCTDDSLL			376
青鳞 <i>O. latipes</i>	YGVSNLQEFYRGLGEGCTDDTLL			371
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	YGISNLQEFYRGLGEGCTDDTLL			377
草鱼 <i>C. idella</i>	YGISNLQEFYRGLGEGCTDDTLL			373
	*****	:	:	:

图 2 草鱼AdipoR1-B与其他鱼类同源分子的氨基酸序列的多序列比对分析

大西洋鲑. NP 001133596.1; 虹鳟. AEV89975.1; 尼罗罗非鱼. XP 003441547.1; 青鳞. XP 003441547.1; 斑马鱼. NP 998665.1; 草鱼. KP733846. 相同的氨基酸用星号标出. 高度保守和低度保守的氨基酸分别用(;)和(.)标出

Fig. 2 Amino acid sequences alignment of AdipoR1-B from different fishes

S. salar. NP 001133596.1; *O. mykiss*. AEV89975.1; *O. niloticus*. XP 003441547.1; *O. latipes*. XP 003441547.1; *D. rerio*. NP 998665.1; *C. idellus*. KP733846. The identical amino acids are noted by (*), and the highly or less conserved amino acids are indicated by (;) and (.)

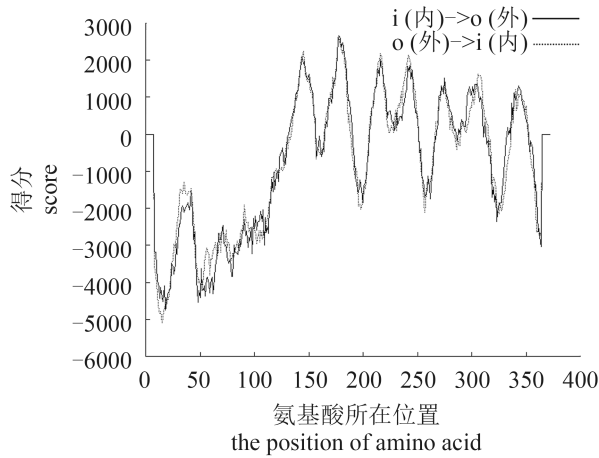


图3 草鱼AdipoR1-B疏水结构预测

Fig. 3 The hydrophobic structure prediction of grass carp AdipoR1-B

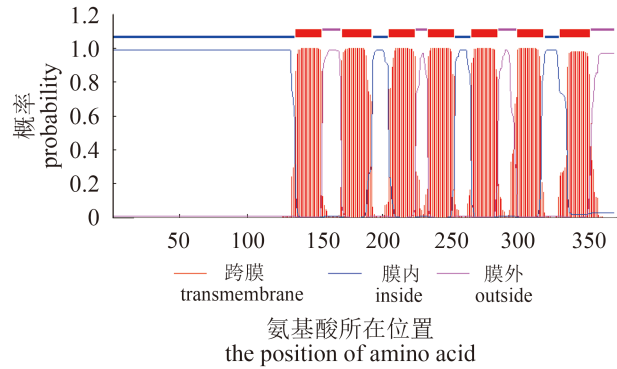


图4 草鱼AdipoR1-B跨膜结构预测

Fig. 4 Transmembrane helices prediction of grass carp AdipoR1-B

表3 草鱼AdipoR1-B与其他脊椎动物AdipoR1-B的氨基酸序列同源性比较
 Tab. 3 Percentage amino acids homology of AdipoR1-B between grass carp and other vertebrates %

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. 草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	100	93.8	82.4	80.7	82.1	79.1	78.0	78.0	78.5	79.1
2. 斑马鱼 <i>Danio rerio</i>		100	82.5	80.6	81.6	78.9	77.6	77.6	78.3	78.9
3. 青鳉 <i>Oryzias latipes</i>			100	91.6	93.8	83.0	82.4	82.2	83.6	83.6
4. 虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>				100	92.8	80.2	79.1	79.1	79.9	80.4
5. 尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>					100	81.8	81.2	81.5	82.9	83.2
6. 人 <i>Homo sapiens</i>						100	91.7	91.7	97.1	96.8
7. 原鸡 <i>Gallus gallus</i>							100	97.3	91.7	92.5
8. 绿头鸭 <i>Anas platyrhynchos</i>								100	91.4	92.0
9. 绵羊 <i>Ovis aries</i>									100	97.3
10. 小鼠 <i>Mus musculus</i>										100

枢神经系统各组织次之, 其他组织的表达量较低(图6)。

2.8 高糖、高脂对草鱼肝脏中AdipoR1-B表达水平的影响

采用qRT-PCR技术检测了高糖、高脂以及高糖高脂饲喂对草鱼肝脏AdipoR1-B mRNA表达的影响(图7)。结果显示, 高脂、高糖高脂饲喂均能够显著增加草鱼肝脏AdipoR1-B的mRNA表达量($P<0.05$), 而高糖饲喂对基因的表达水平没有影响($P>0.05$)。

3 讨论

目前, 脂联素受体基因在人、小鼠、绵

羊、野猪、原鸡、牛、斑马鱼、石斑鱼、虹鳟等物种中已被克隆, 但其功能研究尚只局限于哺乳动物。本研究结合课题组转录组测序数据及RACE方法获得了草鱼AdipoR1-B的完整开放阅读框。经过氨基酸同源性分析发现, 其与斑马鱼AdipoR1-B的同源性高达94.1%, 与其他鱼类AdipoR1的同源性在81%以上, 说明AdipoR1在鱼类中具有高度的保守性。这与在哺乳动物中的研究结果一致, 人类和小鼠AdipoR1具有96.8%的同源性^[4]。本实验通过生物信息学的方法对草鱼AdipoR1-B的跨膜区进行了预测分析, 发现它是一个7次跨膜蛋白, 并且它的羧基端(C端)位于细胞膜内, 而氨基端(N端)位于细胞膜外, 与G蛋

表 4 AdipoR1的结构分区与氨基酸序列百分比同源性

Tab. 4 Schematic diagram illustrating the structures of AdipoR1 and amino acids identities in the different domains of grass carp AdipoR1-B compared with their counterparts in other vertebrates %

	N端胞内区 N-terminal domain	Hly III 结构域 Hly III domain	C端胞外区 C-terminal domain
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	100	100	100
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	87.0	96.9	100
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	64.1	87.7	95.7
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	64.4	90.3	91.3
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	64.9	90.3	95.7
人 <i>Homo sapiens</i>	60.7	87.7	95.7
小鼠 <i>Mus musculus</i>	62.4	87.7	91.3
绿头鸭 <i>Anas platyrhynchos</i>	56.8	87.7	91.3
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	56.8	87.7	91.3
绵羊 <i>Ovis aries</i>	60.7	87.7	91.3

表 5 miRNA作用靶位点预测

Tab. 5 Prediction of miRNA target site

miRNA名称 miRNA ID	位点 locatin	长度 length	杂交反应 hybridization	最低自由能 minimum free energy	分值 score
hsa-let-7a	263-283	21	miRNA: 3'uuGAUAUGUUGGAUGAUGGAGu 5' : Target: 5'gtCTTGAGAGAC-ACTACCTCc 3' miRNA: 3'uug g u g UGUUGGAUGAUGGAGu 5'	-10.80	151.00
hsa-let-7b	263-283	21	: Target: 5'gtccttgAGAGAC-ACTACCTCc 3' miRNA: 3'uuGGUAUGUUGGAUGAUGGAGu 5'	-10.80	147.00
hsa-let-7c	263-283	22	: : : Target: 5'ggTCTTGAGAGACACTACCTCc 3' miRNA: 3'uuGAUACGUUGGAUGAUGGAGa 5'	-12.10	148.00
hsa-let-7d	264-283	20	: : : Target: 5'tcTTGAGAGAC--ACTACCTCc 3' miRNA: 3'uuGAUAUGUUAGAUGAUGGAGu 5'	-11.70	152.00
hsa-let-7f	263-283	21	: Target: 5'gtCTTGAGAGAC-ACTACCTCc 3' miRNA: 3'uuGACAUGUUUGAUGAUGGAGu 5'	-10.80	151.00
hsa-let-7g	263-283	21	: Target: 5'gtCTTGAGAGAC-ACTACCTCc 3' miRNA: 3'uugucgUGUUUGAUGAUGGAGu 5'	-14.50	159.00
hsa-let-7i	263-283	21	: Target: 5'gtccttgAGAGAC-ACTACCTCc 3'	-13.40	155.00

白耦联受体家族蛋白的拓扑结构正好相反，这与在人类、小鼠和斜带石斑鱼中的研究结果相吻合^[4,8,15]。脂联素受体属于PAQR家族，家族成员均可以划分为3个结构域：N端胞内区、Hly III结构域和C端胞外区^[16]。其中Hly III结构域与细菌溶血素III高度同源，编码7次跨膜螺旋，对于稳定AdipoRs的跨膜结构具有重要功能^[16]。斜带石斑鱼AdipoR1的Hly III结构域与其他脊椎动物的同源性分别达到了91.5%以上^[8]，而斑马鱼的AdipoR1-B则在88.0%以上^[6]，本研究中华草鱼的AdipoR1-B在87.7%以上。同时，研究发现在C端

胞外区，草鱼AdipoR1-B与其他脊椎动物AdipoR1的同源性在90%以上，这与斜带石斑鱼中的研究结果高度一致^[8]。

通过miRNA预测分析软件，发现在草鱼AdipoR1-B的3' UTR区存在稳定性很高的miRNA，如let-7家族，这是在以往鱼类AdipoR1的序列特征分析中所没有被关注的。Sun等^[17]研究发现，let-7参与调节3T3-L1细胞的脂质生成，在3T3-L1细胞脂质生成期间，let-7a、let-7b和let-7d的含量都出现了明显的上调。Esau等^[18]在人类细胞分化的研究中发现，相对于前脂肪细胞来

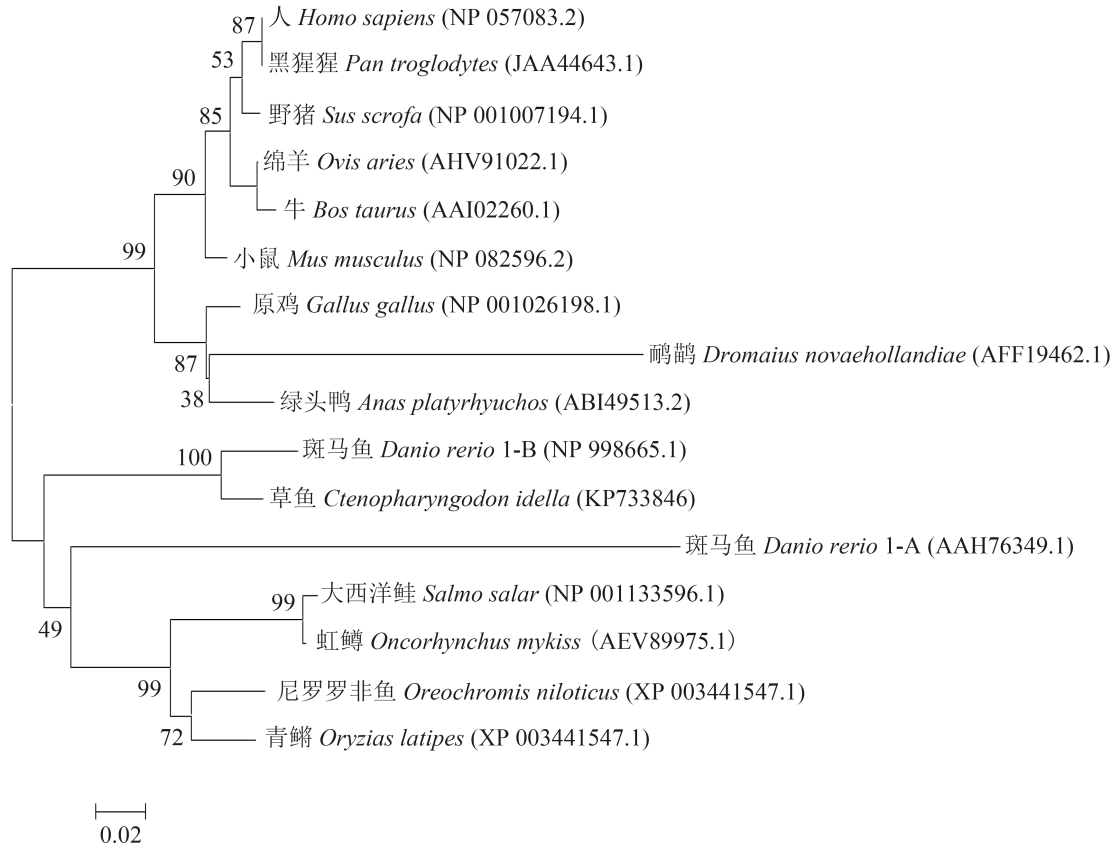


图5 脊椎动物AdipoR1-B系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of AdipoR1-B in vertebrates

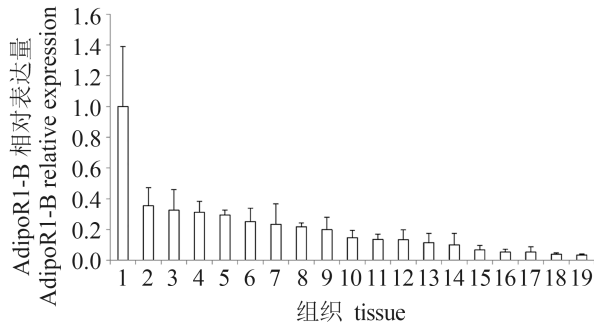


图6 草鱼AdipoR1-B mRNA的组织分布

1.肝脏; 2.中脑; 3.红肌; 4.小脑; 5.垂体; 6.延脑; 7.下丘脑; 8.端脑; 9.心脏; 10.肾脏; 11.鳃; 12.脊髓; 13.性腺; 14.脂肪; 15.胸腺; 16.肠道; 17.脾脏; 18.白肌; 19.头肾。图中数据表示为平均值±标准差(n=3)

Fig. 6 Tissue distribution of AdipoR1-B mRNA in grass carp

1.liver; 2.mesencephalon; 3.red muscle; 4.cerebellum; 5.pituitary gland; 6.medulla oblongata; 7.hypothalamus; 8.telencephalon; 9.heart; 10.kidney; 11.gill; 12.spinal cord; 13.gonad; 14.fat; 15.thymus; 16.intestine; 17.spleen; 18.white muscle; 19.head kidney. Error bars indicate the mean and standard deviation

说, let-7a和let-7c的表达水平在脂肪细胞中增

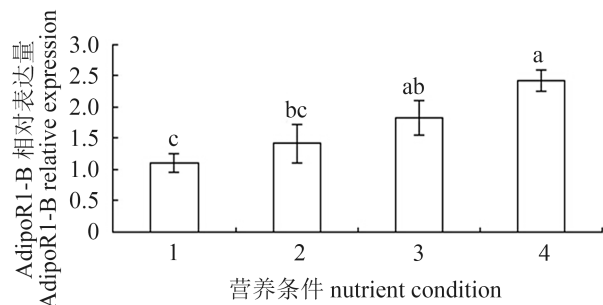


图7 草鱼肝脏AdipoR1-B mRNA在不同营养条件下的相对表达丰度

1. 对照组; 2. 高糖组; 3. 高脂组; 4. 高糖高脂组。图中数据表示为平均值±标准差(n=6), 不同字母表示差异显著(P<0.05)

Fig. 7 The relative abundance of AdipoR1-B mRNA in the liver of grass carp under different nutrient conditions

1. control; 2. H-CHO; 3. H-LIP; 4. H-CHO&H-LIP. Error bars indicate the mean and standard deviation, different letters indicate statistical difference (P<0.05)

加。Frost等^[19]在对小鼠的研究中发现, miRNA let-7家族调控葡萄糖稳态和胰岛素的敏感性。陆地动物的脂联素具有增强胰岛素敏感性、抑制肝脏葡萄糖生成和降低血糖水平等作用^[20-22]。这

些研究结果提示AdipoR1-B在调节鱼体糖和脂类代谢方面与miRNA关系密切。

实时定量 PCR 分析结果表明, AdipoR1-B mRNA在草鱼体内广泛分布, 它在19个被检测组织中都有表达, 这与哺乳动物^[4,23]、鸟类^[24]以及其他硬骨鱼类^[6-8]中的研究结果相似。因此, AdipoR1-B在脊椎动物中均具有广泛的组织表达模式, 这提示该受体在不同的组织中可发挥不同的生物学功能。此外, AdipoR1-B在脊椎动物的脑、肌肉或肝脏中具有最高的表达量, 但不同的物种有所区别。例如, 小鼠、虹鳟和鸡体内的研究表明, AdipoR1-B在肌肉中表达水平最高^[4, 7, 24]。而在斜带石斑鱼体内的研究表明, AdipoR1在脑中具有最高的表达量^[8]。在对斑马鱼的研究中发现, AdipoR1-B在肝脏和脑等组织中表达量较高^[6]。与对斑马鱼的研究结果相似, 本研究表明草鱼AdipoR1-B的mRNA在肝脏中表达量最高, 脑(端脑、中脑、小脑、延脑、下丘脑)和红肌中也较高。脑、肝和肌肉都是能量代谢比较旺盛的组织, 在对机体能量代谢调控过程中发挥重要作用。AdipoR1-B在草鱼中的这种表达特性, 暗示该受体可能参与鱼体的能量代谢调控过程。

有研究表明, 一些能量因素(如饥饿与再投喂、胰岛素等)能够影响鱼类脂联素受体的mRNA表达水平。Qin等^[8]研究显示, 在饥饿7 d的食物胁迫情况下, 斜带石斑鱼肌肉和脂肪组织中AdipoR1和AdipoR2的表达水平上升, 重新投喂后则下降, 这表明AdipoR1和AdipoR2在斜带石斑鱼的肌肉和脂肪组织中, 可能参与能量代谢的调控和维持能量平衡。Sánchez-Gurmaches等^[7]研究发现在饥饿条件下, 虹鳟脂肪组织中的脂联素表达水平升高, 白肌和红肌中脂联素受体的表达量增多; 注射胰岛素能够显著降低白肌和红肌中AdipoR1基因的表达, 说明虹鳟肌肉中的脂联素受体会根据血浆中的胰岛素水平做出相反的应答, 以保持该组织对胰岛素的敏感性。

为进一步探讨作为脂联素受体的AdipoR1-B与鱼体糖和脂质代谢的关系, 实验检测了高糖、高脂应激下AdipoR1-B mRNA在草鱼肝脏中的表达情况。结果表明高脂和高糖高脂饲料均可上调AdipoR1-B mRNA的表达水平, 说明草鱼肝脏AdipoR1-B的表达可响应日粮中脂类水平的应激。草鱼为草食性鱼类, 高脂饲料投喂能够下

调其肝脏中脂肪酸合成相关酶的活性或mRNA表达水平, 如脂肪酸合成酶(FAS)、乙酰辅酶A羧化酶(ACC)等, 从而抑制脂肪酸的合成^[14, 25]。然而, 高脂日粮条件下, 草鱼的肠系膜脂肪指数、肝脏脂质的蓄积水平以及血脂水平则升高^[14, 26-27]。这有可能是草鱼体内存在某种控制机制, 在摄入过多的外源性脂肪时, 能够通过降低脂肪酸合成相关酶的活性或转录, 进而抑制内源性脂肪的合成^[25]。AdipoR1-B是否参与这种调控机制需要进行后续的相关研究。

此外, 本研究表明草鱼肝脏AdipoR1-B的mRNA表达不能够响应高糖日粮的应激, 这与小鼠中的研究结果较为相似。小鼠在摄食高糖日粮前后, 其肝脏中AdipoR1的mRNA表达水平保持不变^[28]。对小鼠的研究表明, AdipoR1在介导AMPK信号通路后可产生2种效应, 即抑制糖质新生和促进脂肪酸氧化。然而, 在高糖日粮下, 机体并未通过转录水平启动AdipoR1 mRNA的大量表达。高糖条件下, 脂联素受体AdipoR1可能是通过其他方式实现对糖代谢的调控, 如在蛋白水平调控AdipoR1表达、将胞浆中储存的AdipoR1转移到细胞表面、促进脂联素的表达等。有研究表明, 在脂联素的刺激下细胞表面AdipoR1的表达量升高, 而AdipoR2在细胞表面的水平不发生变化^[29]。

本研究成功获得了草鱼AdipoR1-B的cDNA全长序列, 并对该序列及其所编码蛋白质的部分分子生物学特征进行了分析, 研究了草鱼AdipoR1-B的组织表达特性以及高糖、高脂、高糖高脂饲料对草鱼肝脏中AdipoR1-B mRNA表达的影响, 发现高脂及高糖高脂饲料均能够上调草鱼肝脏中AdipoR1-B mRNA的表达水平, 提示AdipoR1-B可能参与介导脂联素对草鱼脂质代谢的调控。本研究为深入开展脂联素及其受体在草鱼能量代谢过程中的作用奠定了基础。

杨峰和秦超彬为同等贡献第一作者。

参考文献:

- [1] Waki H, Yamauchi T, Kamon J, *et al.* Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(2): 790-796.

- [2] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase[J]. *Nature Medicine*, 2002, 8(11): 1288-1295.
- [3] Miller R A, Chu Q, Le Lay J, *et al.* Adiponectin suppresses gluconeogenic gene expression in mouse hepatocytes independent of LKB1-AMPK signaling[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(6): 2518.
- [4] Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects[J]. *Nature*, 2003, 423(6941): 762-769.
- [5] Yamauchi T, Nio Y, Maki T, *et al.* Targeted disruption of *AdipoR1* and *AdipoR2* causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions[J]. *Nature Medicine*, 2007, 13(3): 332-339.
- [6] Nishio S I, Gibert Y, Bernard L, *et al.* Adiponectin and adiponectin receptor genes are coexpressed during zebrafish embryogenesis and regulated by food deprivation[J]. *Developmental Dynamics*, 2008, 237(6): 1682-1690.
- [7] Sánchez-Gurmaches J, Cruz-García L, Gutiérrez J, *et al.* Adiponectin effects and gene expression in rainbow trout: an *in vivo* and *in vitro* approach[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2012, 215(8): 1373-1383.
- [8] Qin C, Wang B, Sun C, *et al.* Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) adiponectin receptors: Molecular characterization, mRNA expression, and subcellular location[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2014, 198(3): 47-58.
- [9] Grisdale-Helland B, Helland S J. Replacement of protein by fat and carbohydrate in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) at the end of the freshwater stage[J]. *Aquaculture*, 1997, 152(1): 167-180.
- [10] 曹俊明, 刘永坚, 劳彩玲, 等. 饲料中不同脂肪酸对草鱼组织脂质含量和脂肪酸构成的营养[J]. *动物营养学报*, 1997, 9(3): 36-44.
- Cao J M, Liu Y J, Lao C L, *et al.* Effect of different dietary fatty acids on tissue lipid content and fatty acid, composition of grass carp[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 1997, 9(3): 36-44(in Chinese).
- [11] 冯健, 贾刚. 饵料中不同脂肪水平诱导红姑鱼脂肪肝病的研究[J]. *水生生物学报*, 2005, 29(1): 61-64.
- Feng J, Jia G. Studies on the fatty liver diseases resulted from different, lipid levels in *Sciaenops ocellatus* diets[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(1): 61-64(in Chinese).
- [12] 程汉良, 夏德全, 吴婷婷. 鱼类脂类代谢调控与脂肪肝[J]. *动物营养学报*, 2006, 18(4): 294-298.
- Cheng H L, Xia D Q, Wu T T. Fatty liver and regulation of lipids metabolism in fish[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2006, 18(4): 294-298(in Chinese).
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [14] Guo X, Liang X F, Fang L, *et al.* Effects of dietary non-protein energy source levels on growth performance, body composition and lipid metabolism in herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val.)[J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(5): 1197-1208.
- [15] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors[J]. *Endocrine Reviews*, 2005, 26(3): 439-451.
- [16] Tang Y T, Hu T, Arterburn M, *et al.* PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 61(3): 372-380.
- [17] Sun T, Fu M, Bookout A L, *et al.* MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis[J]. *Molecular Endocrinology*, 2009, 23(6): 925-931.
- [18] Esau C, Kang X, Peralta E, *et al.* MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(50): 52361-52365.
- [19] Frost R J A, Olson E N. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(52): 21075-21080.
- [20] Berg A H, Combs T P, Du X, *et al.* The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action[J]. *Nature Medicine*, 2001, 7(8): 947-953.
- [21] Fruebis J, Tsao T S, Javorschi S, *et al.* Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(4): 2005-2010.
- [22] Xu A, Wang Y, Keshaw H, *et al.* The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003, 112(1): 91-100.
- [23] Ding S T, Liu B H, Ko Y H. Cloning and expression of

- porcine adiponectin and adiponectin receptor 1 and 2 genes in pigs[J]. *Journal of Animal Science*, 2004, 82(11): 3162-3174.
- [24] Ramachandran R, Ocon-Grove O M, Metzger S L. Molecular cloning and tissue expression of chicken AdipoR1 and AdipoR2 complementary deoxyribonucleic acids[J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2007, 33(1): 19-31.
- [25] Leng X J, Wu X F, Tian J, *et al.* Molecular cloning of fatty acid synthase from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and the regulation of its expression by dietary fat level[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2012, 18(5): 551-558.
- [26] Du Z Y, Clouet P, Zheng W H, *et al.* Biochemical hepatic alterations and body lipid composition in the herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed high-fat diets[J]. *British Journal of Nutrition*, 2006, 95(5): 905-915.
- [27] 杜震宇, 刘永坚, 田丽霞, 等. 草鱼摄食高脂饲料后血脂变化的初步研究[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2004, 43(增刊): 77-79.
- Du Z Y, Liu Y J, Tian L X, *et al.* The change of blood lipid indexes after fed high-fat diet in grass carp[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2004, 43(Suppl): 77-79(in Chinese).
- [28] Beylot M, Pinteur C, Peroni O. Expression of the adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 in lean rats and in obese Zucker rats[J]. *Metabolism*, 2006, 55(3): 396-401.
- [29] Tong K M, Chen C P, Huang K C, *et al.* Adiponectin increases MMP-3 expression in human chondrocytes through adipor1 signaling pathway[J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2011, 112(5): 1431-1440.

Molecular cloning, tissue distribution and nutritional regulation of *AdipoR1-B* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

YANG Feng, QIN Chaobin, LU Ronghua, SUN Junjun, YANG Liping, NIE Guoxing*

(College of Fisheries, Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Adiponectin is an abundantly secreted adipokine from the adipose tissue of mammals, and plays central roles in the regulation of glucose and lipid metabolism. The biological function of adiponectin is mediated by at least two putative receptors (AdipoR1 and AdipoR2). In order to investigate the molecular regulatory mechanisms of lipid metabolism and liver lipid accumulation in fish, the full-length cDNA sequences of adiponectin receptor1-B (AdipoR1-B) from grass carp has been identified by rapid amplification cDNA ends (RACE), and the structural features of the gene and its encoded protein have been analysed through bioinformatics methods. Using the method of real-time PCR, the expression pattern of AdipoR1-B in nineteen different tissues of grass carp has been studied, and the expression levels of AdipoR1-B in the liver of grass carp under different nutrient conditions with high carbohydrate (H-CHO), high lipid (H-LIP) and high carbohydrate & high lipid (H-CHO & H-LIP) have been studied. The result revealed that the obtained cDNA of AdipoR1-B in grass carp was 2186 bp in length, which consisted of a 1122 bp open reading frame (ORF), encoding 373 amino acids. Alignment based on amino acid sequences showed that grass carp AdipoR1-B had a homology of 81.0%–94.1% to its counterparts in other fishes. Phylogenetic analysis showed that grass carp AdipoR1-B clustered with that of zebrafish. The AdipoR1-B mRNA could be detected in all the examined tissues of grass carp. But the expression level in liver was the highest, followed by central nervous system and red muscle. Compared with the control group, the expression levels of AdipoR1-B in the H-LIP and H-CHO & H-LIP groups had increased significantly. This result suggested that adiponectin may improve the utilization of lipid in grass carp and it may be involved in the lipid metabolism process in fish. The research data can enrich the knowledge of lipid metabolism regulation mechanism of fish, and lay a foundation for the further functional research of the adiponectin/AdipoRs system in fish.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; adiponectin receptor; gene cloning; tissue distribution; nutritional regulation

Corresponding author: NIE Guoxing. E-mail: niegx@htu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China(31372545, 31402311); Program for Innovative Research Team (in Science and Technology) in University of Henan Province (14IRTSTHN013); Plan for Scientific Innovation Talent of Henan Province (154100510009); Doctoral Scientific Research Foundation of Henan Normal University(qd14177)