

doi: 10.7541/2023.2022.0175

禁食和复投喂对大口黑鲈胆囊收缩素及其受体基因表达的影响

邵嘉祺^{1,2} 李胜杰¹ 杜金星¹ 董传举² 雷彩霞¹ 宋红梅¹ 姜鹏¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广州 510380;

2. 河南师范大学水产学院, 新乡 453007)

摘要: 为研究大口黑鲈(*Micropterus salmoides*) 胆囊收缩素(Cholecystokinin, CCK)和其受体(Cholecystokinin receptor, CCKR)基因在摄食活动中的功能, 研究通过克隆得到CCK1、CCK2、CCK1R和CCK2R基因的编码区序列, 其长度分别为414、387、1368和1359 bp, 分别编码137、128、455和452个氨基酸。荧光定量结果表明CCK1和CCK2基因均在脑组织中高表达, 其次为肠道组织, 而CCK1R和CCK2R基因分别在胆囊和脑组织中高表达。在摄食后24h内, CCK1、CCK2、CCK1R和CCK2R基因的相对表达量呈先升高后下降趋势, 其中CCK1、CCK1R和CCK2R基因在摄食后3h相对表达量达到最高值, 而CCK2基因在摄食后12h相对表达量达到最高值($P<0.05$)。禁食过程中CCK1、CCK1R和CCK2R基因相对表达量在禁食14d时显著升高($P<0.05$)。复投喂后CCK1、CCK1R和CCK2R基因的相对表达趋势与餐后表达趋势相似, 呈先升高后降低趋势。但在禁食和复投喂过程中CCK2基因相对表达量并无显著变化。综上所述, 研究结果推测CCK1基因可能与CCK1R、CCK2R基因结合, 作为饱腹信号因子, 通过抑制食欲调控大口黑鲈摄食、消化等生理过程; 而CCK2基因可能作为短期食欲因子调节摄食活动。研究结果可为大口黑鲈摄食活动调节提供理论依据。

关键词: 胆囊收缩素; 胆囊收缩素受体; 摄食; 禁食复投喂; 饱腹信号因子; 食欲调控;
大口黑鲈

中图分类号: S965.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)08-1220-08



胆囊收缩素(Cholecystokinin, CCK)是一种典型的脑肠肽, 广泛存在于消化系统、中枢及外周神经系统, 通过调节机体产生饱腹信号, 进而抑制摄食活动^[1,2]。CCK基因最先发现于狗(*Canis lupus familiaris*)胃肠道中^[3], 随后在人类(*Homo sapiens*)^[4]、小鼠(*Mus musculus*)^[5]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[6]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[7]和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[8]等物种也有相关报道。研究发现不同动物中CCK存在2种甚至3种不同的亚型, 并且其功能有所差异^[6,9,10]。如Jensen等^[6]在虹鳟中发现CCK基因存在CCK-L、CCK-N和CCK-T亚型, 其中CCK-L基因作为饱腹因子调节摄食, 而CCK-N基因无显著作用; Huong等^[10]在红鲷(*Pagrus major*)中发现CCK基因存在CCK1和CCK2亚型, 其中CCK1基因在消化中发挥重要作用, CCK2基因通过向脑发

送信号以调节食物摄入和控制饱腹感; Micalel等^[9]发现白鲷(*Diplodus sargus*)体内CCK1基因的表达水平不受摄食的影响, 而CCK2基因参与消化过程的负反馈调节。

CCK基因通过与CCK受体基因(Cholecystokinin receptor, CCKR)相结合, 调节动物的摄食、消化等生理过程^[11]。CCKR基因在多数动物中存在CCK1R和CCK2R亚型^[12]。研究表明CCK与CCK1R基因结合主要作用于消化系统, CCK与CCK2R基因结合主要作用于中枢神经系统, 二者共同参与摄食活动的调节过程^[13]。鱼类中CCK基因及其受体基因在摄食活动中的功能已有相关报道。如黄尾鲷(*Seriola lalandi*)摄食其胆囊CCK1R基因表达水平上调, 进而通过结合CCK基因抑制机体摄食^[14]; 在西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)中, 经CCK2R拮抗剂LY225910

收稿日期: 2022-04-24; 修订日期: 2022-06-16

基金项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费(2022CG02)资助 [Supported by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2022CG02)]

作者简介: 邵嘉祺(1997—), 女, 硕士; 主要研究方向为水产遗传育种。E-mail: jq0822shao@163.com

通信作者: 李胜杰(1981—), 研究员; 主要研究方向为水产生物技术与遗传育种。E-mail: ssjli@163.com

处理后, 食欲因子CCK、神经肽(NPY)和尿皮质素(UCN3)基因表达水平下调^[15], 腹腔注射nesfatin-1可通过影响CCK-CCK1R通路下调食欲因子核连蛋白(NUCB2)Nucleobindin2、CCK和肽YY(PYY)基因表达, 进而抑制其摄食活动^[16]。

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)原产于北美洲的淡水湖泊和河流。自1983年引入我国后, 现已成为我国重要的淡水养殖经济鱼类, 2020年我国大口黑鲈养殖总产量为 61.95×10^7 kg^[17]。CCKs和CCKRs基因是重要的食欲调节因子^[18], 在鱼类养殖生产过程中通过调节食物摄入量进而影响生长发育。但目前为止, 大口黑鲈CCKs和CCKRs基因在摄食活动中的功能还未见相关报道。本研究对大口黑鲈CCKs和CCKRs基因的编码区序列进行了扩增, 通过摄食后、禁食与复投喂试验实验对CCKs基因及其CCKRs基因在摄食活动中的功能进行初步探讨, 以期为大口黑鲈摄食调控研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大口黑鲈选自中国水产科学院珠江水产研究所广州芳村基地。选择100尾体重为(250±10) g的健康大口黑鲈, 将其置于水温为(25±2)℃的水泥池暂养2周。暂养期间, 每天早上8:00进行饲料投喂, 大口黑鲈能够正常摄食且健康状态良好。暂养结束后, 选取3尾大口黑鲈, 采集其脑、肝脏、胃、肠道和胆囊组织, 用于CCKs和CCKRs的组织表达研究, 以及将脑组织也用于CCKs和CCKRs基因克隆。随机选取30尾大口黑鲈用于研究摄食后CCKs及CCKRs基因表达变化, 设置1个对照组和4个饲喂组, 每组各6尾鱼, 对照组在未摄食饲料时采集3尾鱼的脑组织, 饲喂组在摄食后3h、6h、12h和24h分别采集3尾鱼的脑组织。选取42尾大口黑鲈用于研究禁食复投喂对大口黑鲈CCKs和CCKRs基因表达变化的影响, 设置1个对照组、3个禁食组和3个复投喂组, 每组各6尾鱼。其中, 对照组在饲料投喂30min后采集3尾鱼的脑组织; 禁食组在禁食3d、7d和14d分别采集3尾鱼的脑组织; 复投喂组在禁食14d后进行饲料投喂, 分别在复投喂3h、6h和12h采集3尾鱼的脑组织。采集的样品放于RNA保存液中, 先在4℃存放16h, 最后转移到-80℃保存。

1.2 CCK和CCKR序列克隆和系统进化树构建

采用TRIzol试剂(Invitrogen, 美国)提取总RNA, 用反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)获取cDNA。根据大口黑鲈基因组数据库(SRR12489157)中的CCK1、CCK2、CCK1R和CCK2R基因的序列设计引物进行

目的片段的扩增(表1)。反应程序: 94℃预变性5min; 94℃变性30s, 55℃退火30s, 72℃延伸30s, 循环35次; 72℃延伸10min。根据CCK1和CCK2基因核心片段设计3'端和5'端引物(引物信息见表1), 利用RACE试剂盒(TaKaRa, 日本)进行扩增, PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后进行胶回收, 连接到pMD19-T载体, 再转化到DH5α感受态细胞, 挑选阳性克隆菌落进行测序^[19], 拼接后获得大口黑鲈CCK1和CCK2基因cDNA序列全长。使用NCBI的ORF Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)分析序列开放阅读框。通过ExPASy ProtParam软件(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析大口黑鲈CCK1、CCK2、CCK1R和CCK2R基因氨基酸序列的理化性质。利用MEGA 6.0软件^[20]的Phylogenetic Analysis程序对CCK1、CCK2、CCK1R和CCK2R基因的氨基酸序列进行NJ系统进化树构建。

1.3 CCKs及CCKRs组织表达及摄食、禁食复投喂后表达变化

利用荧光定量方法(Quantitative real-time PCR,

表1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

引物Primer	序列Sequence(5'—3')	用途Usage
CCK1-F1	TGAGGCTGACACCCACACCAT	克隆序列
CCK1-R1	AAAATCCATCCACCCCAAGTA	克隆序列
CCK2-F1	TGTGTGTCCTCCTGGCTGCTGCG	克隆序列
CCK2-R1	CACTGCGTCTTCCAAAGTCCATC	克隆序列
CCK1R-F1	ATGGAGACGTTTACAATCCAC	克隆序列
CCK1R-R1	TTAAGTCAGCTCACTCCAGGC	克隆序列
CCK2R-F1	ATGGCTCTGCAGGCGGGGAAT	克隆序列
CCK2R-R1	TCAGCAGGTGCCGCTGGTGCT	克隆序列
CCK1-5-G	CCATCCACCCCAAGTAGTCTCTG	5'-RACE
CCK1-5-NG	TTGCTGTGGAGTTTCTGCG	5'-RACE
CCK1-3-G	GCAGCGGACTGAGTGCCAACCA	3'-RACE
CCK1-3-NG	GATGGATTTTGGTCGCCGC	3'-RACE
CCK2-5-G	TTCCAAAGTCCATCCAGCCGAGG	5'-RACE
CCK2-5-NG	GCAGGGGCTGAGCGGGTATGGCG	5'-RACE
CCK2-3-G	TAGCCAACCTACAACCAGCCCCAG	3'-RACE
CCK2-3-NG	TACCTCGGCTGGATGGACTTTGG	3'-RACE
CCK1-F1	CCTCTGGCTGAGGAGGATGC	qRT-PCR
CCK1-R1	GCTATCCGGTGGTTGGCACT	qRT-PCR
CCK2-F1	GGACGCTCGAAACAGCCTGA	qRT-PCR
CCK2-R1	GACCACTGGCTCTGCTGGTG	qRT-PCR
CCK1R-F1	CCGTGCTGGTGAGGAACAGG	qRT-PCR
CCK1R-R1	GCCAGTGCCGAAGACGAAGT	qRT-PCR
CCK2R-F1	GCGCGCCCATCTCCTTCATC	qRT-PCR
CCK2R-R1	GCCTCCCTCTTCTGCACCA	qRT-PCR
β -actin-F	AAAGGGAAATCGTGCGTGAC	qRT-PCR
β -actin-R	AAGGAAGGCTGGAAGAGGG	qRT-PCR

qRT-PCR)检测*CCK1*、*CCK2*、*CCK1R*和*CCK2R*基因的组织表达分布及摄食后、禁食复投喂后不同时间段的相对表达变化。反应体系为20 μ L, 包括: 10 μ L SYBR Premix(TaKaRa, 中国)、0.4 μ L 正反向引物、8.2 μ L ddH₂O和1 μ L cDNA。反应程序为95℃预变性5min; 95℃变性10s, 60℃退火10s, 72℃延伸10s, 循环40次; 72℃延伸10min。使用QuantStudio™ 6 Flex System进行分析, 分析所得数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。内参基因为 β -actin, 引物信息见表1。

1.4 数据分析

所有数据表示为平均数 $\pm$ 标准误。通过SPSS 26.0软件中单因素方差分析(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

2.1 大口黑鲈CCKs及CCKRs基因克隆

经测序和序列拼接, 获得大口黑鲈*CCK1*基因cDNA全长为857 bp, 其中非编码区5'-UTR长106 bp, 非编码区3'-UTR长337 bp, 开放阅读框414 bp, 编码137个氨基酸; 预测CCK1蛋白分子量为14838.62 Da, 理论等电点pI为5.77, 带正电荷的氨基酸残基总数(Arg+Lys)为14个, 带负电荷的氨基酸残基总数(Asp+Glu)为17个, 脂肪族指数为84.16, 不稳定指数为65.39, 说明是不稳定性蛋白。*CCK2*基因cDNA全长为597 bp, 其中非编码区5'-UTR长112 bp, 非编码区3'-UTR长98 bp, 开放阅读框387 bp, 编码128个氨基酸; 预测CCK2蛋白分子量为13813.43 Da, 理论等电点pI为9.44, 带正电荷的氨基酸残基总数(Arg+Lys)为13个, 带负电荷的氨基酸残基总数(Asp+Glu)为9个, 脂肪族指数为71.02, 不稳定指数为71.57, 说明其是不稳定性蛋白。大口黑鲈*CCK1*和*CCK2*亚型的相似性为44.29%, 并且有一个相同的C端八肽DYLGWMDF。*CCK1R*基因的编码区序列为1368 bp, 编码455个氨基酸; 预测CCK1R蛋白分子量为50211.94 Da, 理论等电点pI为9.82, 带正电荷的氨基酸残基总数(Arg+Lys)为48个, 带负电荷的氨基酸残基总数(Asp+Glu)为21个, 脂肪族指数为98.75, 不稳定指数为36.01, 说明是稳定性蛋白。*CCK2R*基因的编码区序列为1359 bp, 编码452个氨基酸; 预测CCK2R蛋白分子量为50059.69 Da, 理论等电点pI为9.26, 带正电荷的氨基酸残基总数(Arg+Lys)为44个, 带负电荷的氨基酸残基总数(Asp+Glu)为27个, 脂肪族指数为95.58, 不稳定指数为34.23, 说明是稳定性蛋白。

2.2 大口黑鲈CCKs及CCKRs基因进化分析

*CCKs*及*CCKRs*基因系统进化树如图1和图2

所示, 分别以射水鱼的*CCK1R*和斑马鱼的*CCK2*氨基酸序列作为外类群。其中, 硬骨鱼类*CCK*基因独立于鸟类、哺乳动物和两栖动物而聚为一大支。硬骨鱼类的*CCK*基因又分为*CCK1*基因和*CCK2*基因两支, 大口黑鲈*CCK1*基因与大黄鱼(*Larimichthys crocea*)*CCK1*基因聚为一支, 大口黑鲈*CCK2*基因与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)*CCK2*基因聚为一支, 与哺乳动物小鼠*CCK*基因的亲缘关系最远。*CCKR*基因在系统进化树中分为*CCK1R*基因和*CCK2R*基因两大支, 每一大支又分为硬骨鱼类一支和鸟类、哺乳动物一支。大口黑鲈*CCK1R*基因与条纹狼鲈(*Morone saxatilis*)*CCK1R*基因聚为一支, 大口黑鲈*CCK2R*基因与射水鱼(*Taxotes jaculator*)、大西洋庸鲷(*Hippoglossus hippoglossus*)*CCK2R*基因聚为一支。

2.3 大口黑鲈CCKs及CCKRs基因组织表达分布

qRT-PCR结果表明*CCK1*、*CCK2*、*CCK1R*和

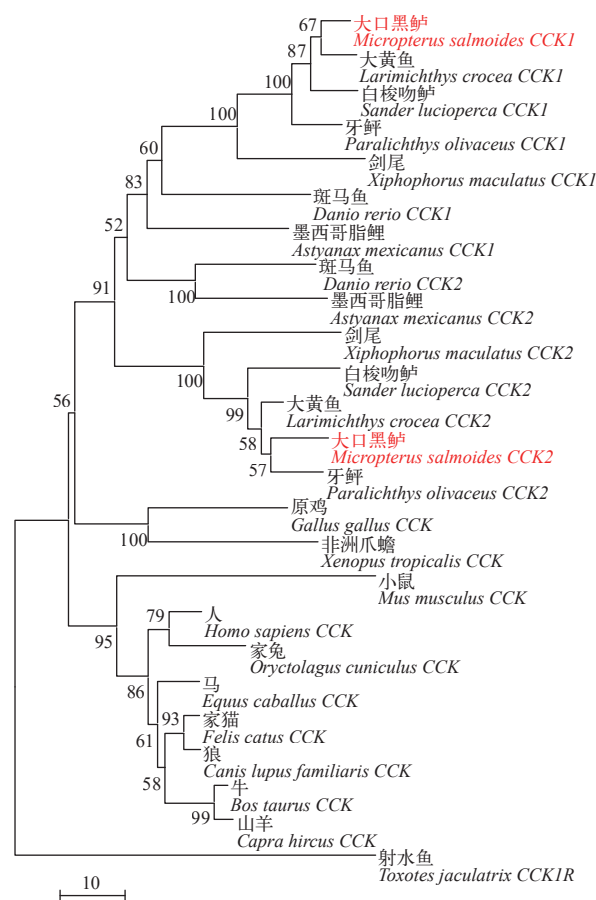


图1 大口黑鲈CCKs基因及其他物种的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of CCKs in *Micropterus salmoides* and other animals

节点上数据表示1000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 1000 replicates. Scale represents the numbers of substitutions per 1000 bases

*CCK2R*基因在脑、肝脏、胆囊、肠和胃组织中均有表达(图 3), 其中*CCK1*、*CCK2*基因在脑组织的相对表达量最高, 显著高于其他组织($P<0.05$), 其次是肠道组织, 而在肝脏、胆囊、胃中相对表达量较低。*CCK1R*基因在胆囊组织中相对表达量最高($P<0.05$), 其次是脑和肠道, 肝脏中表达量最低;*CCK2R*基因在脑组织中相对表达量最高($P<0.05$), 其次是胃和肠道, 肝脏中表达量最低。

2.4 摄食后大口黑鲈*CCK1*、*CCK2*、*CCK1R*和*CCK2R*基因表达变化

如图 4所示, 摄食后0—24h, *CCK1*、*CCK1R*和*CCK2R*基因的相对表达量呈先上升后下降趋势, 均在摄食后3h达到最高值, 随后逐渐降低, 至24h时恢复正常表达水平。而*CCK2*基因的相对表达量在餐

后12h显著增加($P<0.05$), 随后下降, 在餐后24h时恢复正常表达水平。

2.5 禁食复投喂对大口黑鲈*CCK1*、*CCK2*、*CCK1R*和*CCK2R*基因表达的影响

如图 5所示, *CCK1*和*CCK1R*基因在禁食0—7d时相对表达量并无显著差异, 而*CCK2R*基因在禁食过程中表达量逐渐降低, 禁食7d时其相对表达量显著低于无禁食。禁食14d时*CCK1*、*CCK1R*和*CCK2R*基因表达量均显著增加($P<0.05$)。而禁食3d至14d期间, *CCK2*基因相对表达量并无显著差异。在复投喂后, *CCK1*、*CCK1R*和*CCK2R*基因的相对表达趋势与摄食后变化趋势基本一致, 均呈现先升高后降低的趋势, *CCK1*和*CCK1R*基因在复投喂3h时相对表达量达到最高值, *CCK2R*基因在复投喂3h和6h中的相对表达量均显著增加, 但*CCK2*基因在复投喂3h、6h和12h的相对表达量并无显著差异。

3 讨论

3.1 大口黑鲈*CCKs*及*CCKRs*基因序列特征分析

本研究获得了大口黑鲈胆囊收缩素*CCK1*和*CCK2*基因的cDNA全长, 以及其受体*CCK1R*和*CCK2R*基因的部分编码区序列。其中, *CCK1*和*CCK2*基因分别编码137和128个氨基酸, 其相似性为44.29%。两个亚型均含有一个C端八肽DYLGWMDF, 这与齐口裂腹鱼^[21]、草鱼^[22]的研究结果一致。经系统进化树分析大口黑鲈的*CCK1*和*CCK2*基因与大黄鱼、白梭吻鲈、牙鲆的*CCK1*和*CCK2*基因亲缘关系更近, 大口黑鲈的*CCK1R*和*CCK2R*基因与条纹狼鲈的*CCK1R*和*CCK2R*基因亲缘关系更近, 而与哺乳动物和两栖动物亲缘关系较远, 表明鱼类中*CCK1*、*CCK2*、*CCK1R*和*CCK2R*基因的结构具有一定的保守性。除此之外, 荧光定量结果表明*CCK1*和*CCK2*基因脑组织中相对表达量最高, 其次为肠道组织, 这与在异齿裂腹鱼^[23]、金鱼^[24]、牙鲆^[25]和黄尾鲈^[26]中的研究结果一致, 表明*CCK1*和*CCK2*基因作为脑肠肽调节大口黑鲈的摄食活动。*CCK1R*基因在大口黑鲈胆囊组织中表达量最高, 而*CCK2R*基因在脑组织中表达量最高, 这一结果与在黄尾鲈和大西洋鲑中的研究结果一致^[14, 27]。*CCKs*和*CCKRs*基因在不同鱼类中的组织表达特征相似, 说明其在不同动物中的功能具有保守性。

3.2 大口黑鲈摄食后*CCKs*及*CCKRs*基因表达水平的变化

*CCKs*和*CCKRs*基因作为饱腹信号因子调节鱼类的摄食活动^[28], 但不同鱼类*CCKs*和*CCKRs*基因对食物摄入的响应时间存在差异。如在斑点叉尾

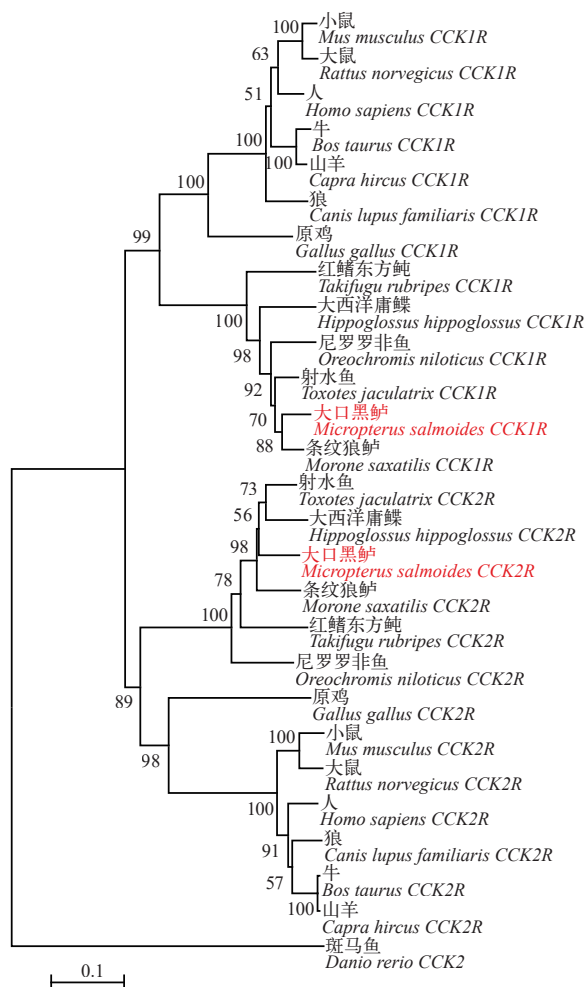


图 2 大口黑鲈*CCKRs*基因及其他物种的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *CCKRs* in *Micropterus salmoides* and other animals

节点上数据表示1000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 1000 replicates. Scale represents the numbers of substitutions per 1000 bases

鲟中,摄食后4h脑组织中 $CCK1$ 和 $CCK2$ 基因表达量显著高于对照组^[29];而金鱼脑组织中 CCK 基因表达量在摄食后2h时达到最高值^[30];在黄尾鲟中, $CCK1R$ 基因在摄食后6h其表达量达到最高值^[14]。本研究发现大口黑鲈的脑组织中 $CCK1$ 基因在餐后3h的表达量达到最高值,与布氏鲟和大西洋鲈的研究结果一致^[31, 32],表明 $CCK1$ 作为饱腹信号因子调节大口黑鲈摄食活动。除此之外,大口黑鲈的脑组织中 $CCK1R$ 和 $CCK2R$ 基因的表达趋势与 $CCK1$ 基因一致,其表达量也在餐后3h达到最高水平,表明 $CCK1$ 基因可能通过与 $CCK1R$ 和 $CCK2R$ 基因结合共同调节大口黑鲈的摄食活性。而大口黑鲈 $CCK2$ 基因在餐后12h时表达量达到最高值,说明 $CCK2$ 基因可能在食物摄入后期发挥调节作用,在食物摄入初期并

无显著作用。相似的研究在大西洋鲈中也有报道,但在大西洋鲈中 $CCK2$ 基因作为厌食因子,在大西洋鲈食物摄入的初始阶段发挥作用,而 $CCK1$ 基因则无显著作用^[32]。

3.3 禁食复投喂对大口黑鲈 $CCKs$ 及 $CCKRs$ 基因表达水平的影响

在禁食复投喂实验中,禁食0至7d期间,大口黑鲈 $CCK1$ 和 $CCK1R$ 基因的相对表达量并无显著变化, $CCK2R$ 基因的相对表达量仅在禁食7d时显著降低。但禁食14d时, $CCK1$ 、 $CCK1R$ 和 $CCK2R$ 基因的相对表达量均显著上升。相似的现象在其他鱼类中也有相关报道,如在豹纹鳐(*Raja ocellata*)禁食14d后,禁食组 CCK 基因的相对表达量显著高于摄食组^[33];美洲拟鲈(*Pseudopleuronectes americanus*)

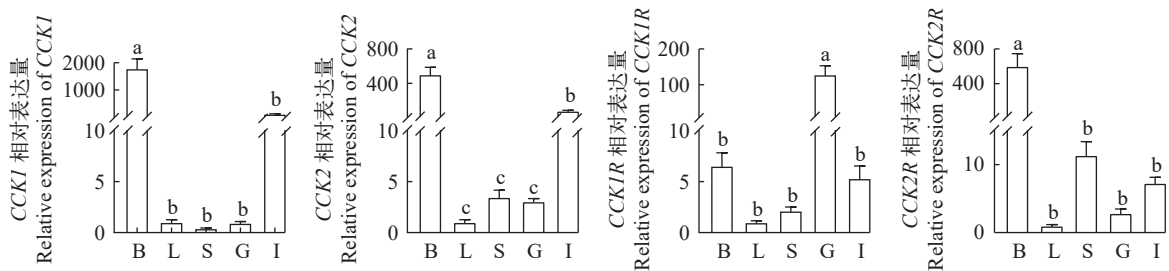


图3 大口黑鲈 $CCKs$ 及 $CCKRs$ 基因的组织分布

Fig. 3 Tissue distribution of $CCKs$ and $CCKRs$ in *Micropterus salmoides*

B. 脑; L. 肝脏; S. 胃; G. 胆囊; I. 肠道. 柱形图上字母不同表示差异显著($P<0.05$)

B. brain; L. liver; S. stomach; G. gallbladder; I. intestine. Different letters on the column indicate significant difference ($P<0.05$)

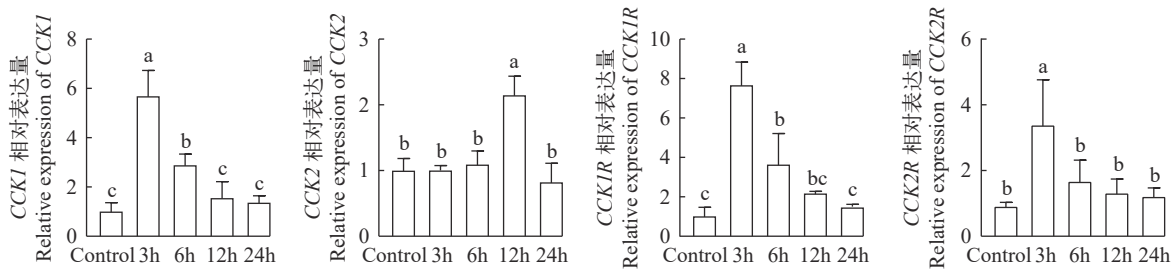


图4 摄食后大口黑鲈脑中 $CCKs$ 及 $CCKRs$ 基因表达变化

Fig. 4 Effects of postprandial changes on the expression of $CCKs$ and $CCKRs$ in the brain of *Micropterus salmoides*

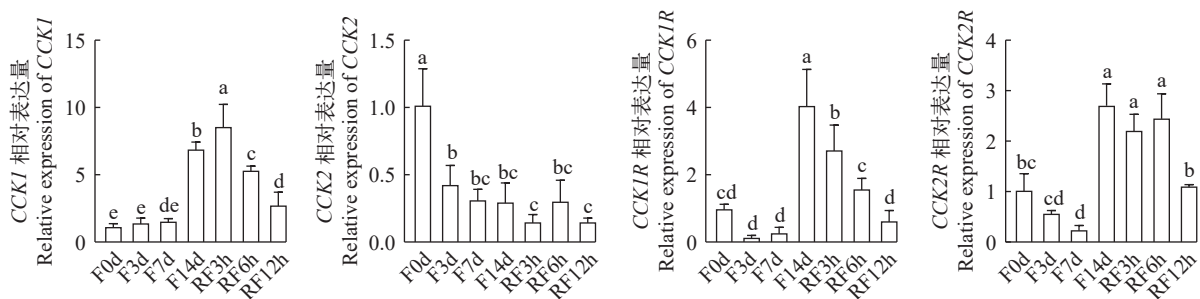


图5 禁食复投喂对大口黑鲈脑中 CCK 及 $CCKR$ 基因表达影响

Fig. 5 Effects of fasting and refeeding on the expression of $CCKs$ and $CCKRs$ in the brain of *Micropterus salmoides*

F代表禁食的时间; RF代表禁食14d后复投喂的时间

F represents the time of fasting; RF represents the time of refeeding after 14d of fasting

冬季禁食4周后, *CCK1*基因的相对表达量增加^[34], 说明长期禁食的情况下其机体不仅受机体内食欲因子的影响, 可能与该基因的其他功能作用相关。研究发现*CCK*及*CCKR*基因不只在摄食活动中发挥作用, 与机体的痛觉、焦虑情绪也密切相关^[35], 机体在长期禁食的情况, 焦虑也随之增加, 这可能是*CCK1*、*CCK1R*和*CCK2R*基因在长期禁食后基因表达水平显著升高的原因之一。在复投喂过程中, *CCK1*、*CCK1R*和*CCK2R*基因的相对表达变化趋势呈先上升后下降趋势, 均在复投喂3h后达到最高值。禁食14d复投喂后*CCK1*、*CCK1R*和*CCK2R*基因的相对表达量均显著上升这一表达趋势与其他鱼类中*CCK*及*CCKR*基因的作用机制相一致: 当食物摄入被短期抑制时, *CCK*基因及其*CCKR*基因相对表达量降低可减少机体对食物摄入的抑制作用, 增强机体摄食能力并减少能量消耗, 维持机体稳定; 当机体恢复正常摄食时, *CCK*基因及其*CCKR*基因相对表达变化又可回到正常水平^[31]。此外, Ji等^[8]发现禁食4d后团头鲂脑和肠道组织中*CCK2*基因的相对表达量显著低于对照组, 在禁食7d和15d时其相对表达量有适量增加, 复投喂后可逆转*CCK2*基因的表达。而本研究发现禁食期间使*CCK2*基因的相对表达量显著低于对照组, 且复投喂后其表达量也无回升现象, 这说明*CCK2*基因可能是作为短期食欲因子来调节摄食活动, 在长期禁食复投喂过程中无明显调节作用, 这一结果可能是由于禁食时间不足而导致*CCK2*基因在长期禁食活动中无明显调节作用。本研究结果分析推测*CCK1*基因主要通过*CCK1R*、*CCK2R*基因结合进而调节大口黑鲈的摄食活动, 也进一步表明*CCK1*、*CCK1R*和*CCK2R*基因是大口黑鲈餐后饱腹信号因子, 也是长期的摄食调控因子。

综上所述, 本研究揭示了大口黑鲈*CCK1*、*CCK2*、*CCK1R*和*CCK2R*基因的生物信息学特征、组织表达及摄食功能, 初步说明*CCKs*及其*CCKRs*基因在调节大口黑鲈摄食活动中的作用机制。*CCKs*基因作为典型的饱腹因子, 通过结合*CCKRs*基因进而抑制机体摄食活动。在禁食过程中, *CCKs*及*CCKRs*基因在不同物种的表达趋势不同, 这可能与物种所处环境和内部机体生理因素有关。本研究为后续深入开展*CCKs*及*CCKRs*基因在大口黑鲈摄食调控和能量代谢的研究提供理论基础。

参考文献:

- [1] Moran T H, Kinzig K P. Gastrointestinal satiety signals II. cholecystokinin [J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2004, **286**(2): G183-G188.
- [2] Chaudhri O, Small C, Bloom S. Gastrointestinal hormones regulating appetite [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2006, **361**(1471): 1187-1209.
- [3] Ivy A C, Oldberg E. Contraction and evacuation of gallbladder caused by highly purified "secretin" preparation [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 1927, **25**(2): 113-115.
- [4] Takahashi Y, Kato K, Hayashizaki Y, et al. Molecular cloning of the human cholecystokinin gene by use of a synthetic probe containing deoxyinosine [J]. *Proceedings of the National Academy of the United States of America*, 1985, **82**(7): 1931-1935.
- [5] Vitale M, Vashishtha A, Linzer E, et al. Molecular cloning of the mouse *CCK* gene: expression in different brain regions and during cortical development [J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, **19**(1): 169-177.
- [6] Jensen H, Rourke I J, JONSON L, et al. Identification and distribution of *CCK*-related peptides and mRNAs in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2001, **1517**(2): 190-201.
- [7] 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.
- [8] Ji W, Ping H C, Wei K J, et al. Ghrelin, neuropeptide Y (NPY) and cholecystokinin (CCK) in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*): cDNA cloning, tissue distribution and mRNA expression changes responding to fasting and refeeding [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2015(223): 108-119.
- [9] Micale V, Campo S, D'Ascola A, et al. Cholecystokinin in white sea bream: molecular cloning, regional expression, and immunohistochemical localization in the gut after feeding and fasting [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(12): e52428.
- [10] Huang T T M, Murashita K, Senzui A, et al. Cholecystokinin 1 and 2 in red seabream *Pagrus major*: molecular cloning, response to feeding, and a potential indicator of dietary protein source quality [J]. *Fisheries Science*, 2020, **86**(5): 835-849.
- [11] Yu N, Smagghe G. CCK(-like) and receptors: structure and phylogeny in a comparative perspective [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2014(209): 74-81.
- [12] Dufresne M, Seva C, Fourmy D. Cholecystokinin and gastrin receptors [J]. *Physiological Reviews*, 2006, **86**(3): 805-847.
- [13] Balaskó M, R ostás I, Füredi N, et al. Age and nutritional state influence the effects of cholecystokinin on energy

- balance [J]. *Experimental Gerontology*, 2013, **48**(11): 1180-1188.
- [14] Furutani T, Masumoto T, Fukada H. Molecular cloning and tissue distribution of cholecystokinin-1 receptor (CCK-1R) in yellowtail *Seriola quinqueradiata* and its response to feeding and in vitro CCK treatment [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013(186): 1-8.
- [15] Tang, Zhang X, Wang S, *et al.* UCN₃ suppresses food intake in coordination with CCK and the CCK2R in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2019(234): 106-113.
- [16] Zhang X, Qi J, Tang N, *et al.* Intraperitoneal injection of nesfatin-1 primarily through the CCK-CCK1R signal pathway affects expression of appetite factors to inhibit the food intake of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) [J]. *Peptides*, 2018(109): 14-22.
- [17] Fishery and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Aquatic Technology Promotion Terminal, China Society of Fisheries. Chinese Fishery Statistics Yearbook 2021 [M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2021. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2021中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.]
- [18] Du J, Zhang L F, Qin C. Progress on the function of cholecystokinin [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2007, **17**(4): 233-236. [杜静, 张连峰, 秦川. 胆囊收缩素作用的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, **17**(4): 233-236.]
- [19] Sun X, Li S J, Du J X, *et al.* Screening of SNPs in *GHRH* and association analysis with growth traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2021, **29**(5): 963-972. [孙雪, 李胜杰, 杜金星, 等. 草鱼 *GHRH* 基因 SNPs 的筛选及其与生长性状的关联分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2021, **29**(5): 963-972.]
- [20] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, **30**(12): 2725-2729.
- [21] Yuan D, Wang T, Zhou C, *et al.* Leptin and cholecystokinin in *Schizothorax prenanti*: Molecular cloning, tissue expression, and mRNA expression responses to preprandial changes and fasting [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2014(204): 13-24.
- [22] Feng K, Zhang G, Wei K, *et al.* Molecular characterization of cholecystokinin in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): cloning, localization, developmental profile, and effect of fasting and refeeding on expression in the brain and intestine [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2012, **38**(6): 1825-1834.
- [23] Shang Z D, Liu S Z, Tan Z K, *et al.* Molecular cloning and appetite regulation of CCK in *Schizothorax o'connori* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, **26**(5): 834-843. [商振达, 刘锁珠, 谭占坤, 等. 异齿裂腹鱼 CCK 基因的 cDNA 克隆及其摄食功能 [J]. *中国水产科学*, 2019, **26**(5): 834-843.]
- [24] Himick B A, Golosinski A A, Jonsson A C, *et al.* CCK/gastrin-like immunoreactivity in the goldfish pituitary: regulation of pituitary hormone secretion by CCK-like peptides in vitro [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1993, **92**(1): 88-103.
- [25] Kurokawa T, Suzuki T, Hashimoto H. Identification of gastrin and multiple cholecystokinin genes in teleost [J]. *Peptides*, 2003, **24**(2): 227-235.
- [26] Murashita K, Fukada H, Hosokawa H, *et al.* Cholecystokinin and peptide Y in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): molecular cloning, real-time quantitative RT-PCR, and response to feeding and fasting [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, **145**(3): 287-297.
- [27] Rathore R M, Angotzi A R, Jordal A E O, *et al.* Cholecystokinin receptors in Atlantic salmon: molecular cloning, gene expression, and structural basis [J]. *Physiological Reports*, 2013, **1**(5): e00069.
- [28] Wang X, Chen J, Bai B. Research progress of cholecystokinin and its receptors in regulating appetite [J]. *Journal of Jining Medical University*, 2015, **38**(4): 278-280. [王鑫, 陈京, 白波. 胆囊收缩素及受体调节食欲研究进展 [J]. *济宁医学院学报*, 2015, **38**(4): 278-280.]
- [29] Peterson B C, Waldbieser G C, Riley L G, *et al.* Pre- and postprandial changes in orexigenic and anorexigenic factors in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, **176**(2): 231-239.
- [30] Peyon P, Saied H, Lin X, *et al.* Postprandial, seasonal and sexual variations in cholecystokinin gene expression in goldfish brain [J]. *Molecular Brain Research*, 1999, **74**(1/2): 190-196.
- [31] Ye H Z, Ouyang D. D, Wang H. Y, *et al.* The effect of fasting starvation stress and preprandial and postprandial on the expression of cholecystokinin in golden pompano (*Trachinotus blochii*) [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, **38**(8): 3506-3510. [叶恒振, 欧阳冬冬, 王海洋, 等. 禁食及进餐前后对布氏鲷缩胆囊素表达的影响 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, **38**(8): 3506-3510.]
- [32] Valen R, Jordal A E O, 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.
- [33] MacDonald E, Volkoff H. Neuropeptide Y (NPY), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and cholecystokinin (CCK) in winter skate (*Raja ocellata*): cDNA cloning, tissue distribution and mRNA expression responses to fasting [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, **161**(2): 252-261.
- [34] MacDonald E, Volkoff H. Cloning, distribution and ef-

fects of season and nutritional status on the expression of neuropeptide Y (NPY), cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) and cholecystokinin (CCK) in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) [J]. *Hormones and Behavior*, 2009, **56**(1): 58-65.

[35] Roca-Lapirot O, Fossat P, Ma S, *et al.* Acquisition of analgesic properties by the cholecystokinin (CCK)/CCK2 receptor system within the amygdala in a persistent inflammatory pain condition [J]. *Pain*, 2019, **160**(2): 345-357.

FASTING AND REFEEDING ON THE EXPRESSION OF CHOLECYSTOKININ AND ITS RECEPTOR GENE IN LARGEMOUTH BASS

SHAO Jia-Qi^{1,2}, LI Sheng-Jie¹, DU Jin-Xing¹, DONG Chuan-Ju², LEI Cai-Xia¹, SONG Hong-Mei¹ and JIANG Peng¹

(1. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: CCK as brain-gut peptide, binds to its receptor (CCKR) and participates in physiological processes such as feeding and digestion in animals. In order to study the function of CCKs and CCKRs in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in feeding activities, the coding sequences of CCK1, CCK2, CCK1R and CCK2R were cloned in this study. Their lengths were 414, 387, 1368 and 1359 bp, and their encodes were 137, 128, 455 and 452 amino acids, respectively. Fluorescence quantitative results showed that both CCK1 and CCK2 were highly expressed in brain, followed by intestinal, while CCK1R and CCK2R were highly expressed in gallbladder and brain, respectively. Within 24h after ingestion, the relative expressions of CCK1, CCK2, CCK1R and CCK2R increased first and then decreased. The relative expression of CCK1, CCK1R and CCK2R reached the highest value at 3h after ingestion, while the relative expression of CCK2 was at 12h after ingestion. The relative expression reached the highest value ($P<0.05$). During fasting, the relative expression of CCK1, CCK1R and CCK2R was significantly increased on the 14th day of fasting ($P<0.05$). The relative expression trends of CCK1, CCK1R and CCK2R after refeeding were similar to those after meals, showing a trend of first increasing and then decreasing. However, there was no significant change in the relative expression of CCK2 during fasting and refeeding. In conclusion, the results of this study indicated that CCK1 can be combined with CCK1R and CCK2R to act as a satiety signal factor to regulate physiological processes such as feeding and digestion of largemouth bass by suppressing appetite; CCK2 may act as a short-term appetite factor to regulate feeding. Activity. The results of this study can provide a theoretical basis for the regulation of feeding activities of largemouth bass.

Key words: Cholecystokinin; Cholecystokinin receptor; Feeding; Fasting and refeeding; Satiety signal factor; Appetite control; *Micropterus salmoides*