

鳊两种生长抑素受体 cDNA 全长克隆与组织表达

代 威 赵金良* 苗田田 郭金涛

农业部淡水水产种质资源重点实验室 上海海洋大学 上海 201306

摘要:利用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆了鳊 (*Siniperca chuatsi*) 脑中 2 种生长抑素受体 (somatostatin receptor, SSTR2 和 SSTR3) cDNA 全长序列。结果显示,鳊 SSTR2 cDNA 全长 1 820 bp, 含开放阅读框 1 146 bp, 编码 382 个氨基酸; SSTR3 cDNA 全长 1 874 bp, 含开放阅读框 1 458 bp, 编码 486 个氨基酸。SSTR 均由 5 个结构区域组成: N 端、7 个转膜区 (TMD)、3 个细胞外袢 (ECLs)、4 个细胞内袢 (ICLs) 和 C 末端。NJ 系统进化树分析显示,鳊 SSTR2 和 SSTR3 分别形成相对独立的分支,两者间的氨基酸序列相似度为 51.2%, 表明它们是由不同基因编码而成。利用实时荧光定量 RT-PCR 技术检测了鳊 SSTR2 和 SSTR3 mRNA 的组织表达特征,它们均在多种组织中广泛表达, SSTR2 mRNA 在肝中表达量最高, SSTR3 mRNA 在胃中表达量最高。SSTR2、SSTR3 表达差异反映它们可能参与不同生理调控作用。

关键词:鳊; 生长抑素受体 2; 生长抑素受体 3; cDNA; 组织表达; 实时荧光定量 RT-PCR

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2012)05-93-08

Cloning and Expression of Two Somatostatin Receptor Genes in *Siniperca chuatsi*

DAI Wei ZHAO Jin-Liang* MIAO Tian-Tian GUO Jin-Tao

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

Abstract: The complete cDNA sequences of two distinct somatostatin receptor genes (SSTR2 and SSTR3) were isolated from *Siniperca chuatsi* brain and cloned by means of rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full length of SSTR2 cDNA was 1 820 bp, containing 1 146 bp open reading frame and encoding 382 amino acids, whereas the full length of SSTR3 cDNA was 1 874 bp, containing 1 458 bp open reading frame and encoding 486 amino acids. Five domains were detected in SSTRs: the N-terminal domain, seven putative transmembrane domains (TMD), three extracellular loops (ECLs), four intracellular loops (ICLs) and the C-terminal domain. NJ phylogenetic tree showed that SSTR2 and SSTR3 formed two independent branches, and that the amino acid sequence similarity between SSTR2 and SSTR3 was 51.2%, which indicated that they were encoded by two different genes. A wide tissue expression of SSTR2 and SSTR3 mRNA were revealed by real-time quantitative RT-PCR, with the highest expression of SSTR2 mRNA in liver, and SSTR3 mRNA in stomach, suggesting that they may be involved in different physiological regulations.

Key words: Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*); Somatostatin receptor 2; Somatostatin receptor 3; cDNA; Tissue expression; Real-time quantitative RT-PCR

基金项目 上海市科委重点基础项目 (No. 09JC1406900), 上海市重点学科建设项目 (No. Y1101);

第一作者介绍 代威, 男, 硕士研究生; 研究方向: 水产动物遗传育种; E-mail: mrdavy323@163.com。

收稿日期: 2012-04-17, 修回日期: 2012-07-17

鱼类生长受遗传、激素、营养以及环境等多种因素的影响,其中,生长激素-胰岛素样生长因子 I (growth hormone-insulin-like growth factor-I, GH-IGF-I axis) 生长轴是鱼类生长发育的主要内分泌调控系统之一^[1]。生长抑素 (somatostatin, SS) 是由下丘脑分泌的一种抑制脑垂体分泌生长激素 (growth hormone, GH) 的神经调节肽,具有激素和神经递质双重作用,参与机体生长、发育和代谢等多种生理调节^[2]。生长抑素的生物学效应均通过生长抑素受体 (somatostatin receptor, SSTR) 介导产生。SSTR 是一种膜蛋白受体,生长抑素通过与 SSTR 结合,可激发不同的信号通路,作用于 GH-IGF-I 轴的各个环节,实现多种生理调控过程^[3-4]。鱼类中,生长抑素与 SSTR 结合后除通过抑制生长轴上 GH、IGF-I 来调控生长外,还可通过抑制胰岛素 (insulin, INS) 的释放,导致合成代谢向分解代谢转变^[5]。

哺乳动物现已发现存在 5 种 SSTRs, 即 SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4 和 SSTR5, 它们由不同基因编码并分布在不同的染色体上^[6]。Hoyer 等根据受体结构及其对配体的应答特性,将 5 种 SSTRs 分为 2 个亚类: SSTR2、SSTR3 和 SSTR5 属于一亚类; SSTR1 和 SSTR4 属于另一亚类^[7]。在鱼类中,现已发现存在 SSTR1、SSTR2、SSTR3 和 SSTR5 这 4 种 SSTRs^[4]。

鳊 (*Siniperca chuatsi*) 是我国重要的淡水名贵经济鱼类,具有生长快、肉质鲜嫩、少刺的特点。近年来,鳊生长激素^[8]、胰岛素样因子 (insulin-like growth factors, IGF-I, IGF-II)^[9-10]、生长抑素 (SS1, SS2, SS3)^[11] 等生长轴相关调控基因相继克隆。在此基础上,本研究利用 RACE 技术克隆了鳊生长抑素受体 SSTR2 和 SSTR3 的 cDNA 全长序列,并对其结构特征进行了初步分析,利用实时定量 PCR 分析了 SSTR2 和 SSTR3 mRNA 的组织表达特征,为进一步研究生长抑素作用及其与生长抑素受体的调控途径积累分子基础资料。

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。活体解剖,取脑、鳃、食道、幽门垂、前肠、后肠、肝胰脏、脾、肾、心、肌肉、精巢,置于液氮速冻, -80℃ 保存备用。

总 RNA 抽提试剂 RNAisoTM Plus、RT-PCR 试剂盒 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0、实时荧光定量 RT-PCR 试剂盒 PrimeScript^R RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time)、SYBR^R Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus)、pMDTM19-T Vector 购自宝生物工程(大连)有限公司; RACE 试剂盒 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 购于 Clontech 公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 的合成 取液氮冻存的成体各组织,按 RNAisoTM Plus 说明书抽提总 RNA,经 RNase-free DNase I 消化处理去除基因组 DNA 污染。按照 AMV 反转录试剂盒说明反转录为 cDNA,脑组织用 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 合成 3' 和 5' RACE-Ready-cDNA, -20℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 引物设计与合成 所用引物见表 1,均由上海英潍捷基贸易有限公司合成。

1.2.3 cDNA 部分与全长序列的扩增 比对分析 GenBank 数据中生长抑素受体的同源序列,分别在 SSTR2 和 SSTR3 的保守区域设计通用引物,以脑组织 RNA 反转录成的 cDNA 为模板,按照 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 说明书进行 RT-PCR,扩增 SSTR2 和 SSTR3 部分 cDNA 序列。

根据测序所得的部分 cDNA 序列,分别设计 SSTR2 和 SSTR3 的 3' RACE 和 5' RACE 基因特异性引物。RACE 扩增按照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒的说明进行。主要步骤如下:以 3'-RACE-Ready cDNA 为模板,以通用引物 UPM 和 SR2R3/SR3R3 进行 3'-RACE 扩增,4℃ 保存。以 5'-RACE-Ready cDNA 为模板,以通用引物 UPM 和 SR2R5/SR3R5 进行 5'-RACE 扩增,4℃ 保存。

1.2.4 PCR 产物克隆与测序 RT-PCR 和 RACE 产物电泳检测后,用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收纯化,纯化产物与

表 1 引物序列及退火温度

Table 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	产物大小(bp) Product size	引物用途 Usage
SR2F	AGTGACGAAYATCTACAT	52	577	SSTR2 部分序列的扩增
SR2R	CCAACAGAGGACRAACAC	52		
SR3F	TGATGAGCTCTTCATGCT	54	526	SSTR3 部分序列的扩增
SR3R	CACAGCAACAACRATCAC	54		
SR2R3	ATGGGTTCACCACCTCAACCAAGCT	68	585	SSTR2 的 3'RACE 扩增
SR2R5	GCAAAGTATCGATCGATGCTCATCACCA	68	1 263	SSTR2 的 5'RACE 扩增
SR3R3	TGGCGTTTCAGAACCCTCCAGTCG	68	1 192	SSTR3 的 3'RACE 扩增
SR3R5	CAGACGGCACATGAAGGAGCCAAACG	68	890	SSTR3 的 5'RACE 扩增
S2RTF	CCCATCCTCTACGCCCTTCCT	60	115	SSTR2 组织表达检测
S2RTR	TGCTGCGCCTGCTGCTCACTG	60		
S3RTF	GCGCGCTTTCATCATTTACACCT	60	145	SSTR3 组织表达检测
S3RTR	CTCCGACTTCCTTCGCTTGG	60		
β -actin F	GCGTGACATCAAGGAGAA	60	181	β -actin 组织表达检测
β -actin R	CATACCGAGGAAGGAAGG	60		

pMD19-T 载体连接构建重组质粒,转化感受态大肠杆菌 DH5 α 后经 LB 平板培养,筛选重组子进行插入片段检测,序列测定由上海英潍捷基贸易有限公司完成。

1.2.5 生物信息学分析 应用 BioEdit 和 Edit Seq 程序进行开放阅读框 (opening reading frame, ORF) 分析,并推导相应的氨基酸序列;应用 Scratch 程序 (<http://www.ics.uci.edu/~baldig/scratch/index.html>) 预测二硫键;应用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行序列同源性分析;应用 Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) 进行多序列比对;应用 NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测糖基化位点;应用 ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测蛋白质分子量和等电点;应用 EMBOSS (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>) 进行序列相似度分析;应用 MEGA4.1 构建 NJ 系统进化树;应用 Sigmaplot 10.0 构建相对表达量柱状图;应用 SPSS 19.0 进行数据统计学分析。

1.2.6 组织表达分析 根据克隆获得的 SSTR2 和 SSTR3 的 cDNA 序列,分别设计荧光定量 PCR 引物,并设计内参基因 β -actin 的荧光

定量 PCR 引物。以脑组织总 RNA (浓度为 0.5 g/L) 为模板,反转录成 cDNA,用 EASY Dilution 做 5 个 10 倍梯度稀释,各设 3 个重复。分别以上述特异性引物进行实时定量 PCR 扩增,扩增程序为:95°C 40 s;95°C 10 s,60°C 20 s,40 个循环;60~95°C 融解。以各扩增曲线的 Ct 值为 X 轴,各稀释浓度的对数值为 Y 轴,制作 β -actin、SSTR2 和 SSTR3 扩增标准曲线。

根据所制标准曲线,调整各基因扩增体系。以 3 尾成体组织的 cDNA 为模板,进行内参基因 β -actin 与目的基因 SSTR2 和 SSTR3 的实时荧光定量 PCR 反应。扩增程序与标准曲线的扩增程序相同,每个样品进行 3 次重复,相应的空白对照以 ddH₂O 为模板。根据内参基因 β -actin 对所检测到的各组织样品 Ct 值进行均一化处理,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对不同组织 SSTR2 和 SSTR3 mRNA 的表达量进行比较分析。采用 SPSS19.0 统计分析软件进行 Duncan's 法单因素试验统计分析和显著性检验。

2 结 果

2.1 鳊 SSTR cDNA 全长序列、结构和系统分析 小片段与 3'RACE、5'RACE 扩增产物经测序、比对、拼接,分别获得了鳊 SSTR2、SSTR3

cDNA 全长序列 1 820 bp、1 874 bp (GenBank 登录号: JQ798173、JQ798174)。SSTR2 含开放阅读框 (ORF) 1 146 bp, 编码 382 个氨基酸序列 (图 1)。分子量为 42.78 ku, 等电点 (pI) 为 8.87。第 62、67、100、123、197、231、272、310 位

的 8 个半胱氨酸可形成 4 个二硫键。SSTR3 含 ORF 1 458 bp, 编码 486 个氨基酸序列 (图 1)。分子量为 53.96 ku, pI 为 6.56, 第 74、135、184、210、242、287、323、345 位的 8 个半胱氨酸可形成 4 个二硫键。氨基酸序列结构分析表明,

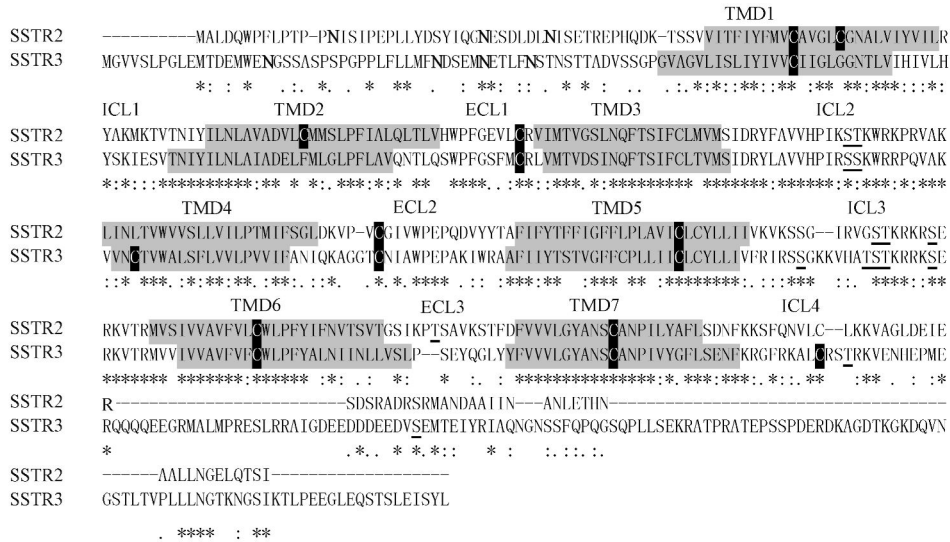


图 1 鳊 SSTR2 和 SSTR3 氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequences alignment of *Siniperca chuatsi* SSTR2 and SSTR3

7 个转膜区 (TMD) 加阴影, 半胱氨酸残基用黑底白字标出, 糖基化位点字体加粗, 磷酸化位点加下划线, 相同的氨基酸用 * 标出。ICL. 细胞内衬; ECL. 细胞外衬。

Seven putative transmembrane domains (TMD) are shaded, cysteine residues are indicated by black background and white letters, glycosylation sites are shown as bold upper case letters, kinase specific phosphorylation sites are indicated by underlining, the same amino acids marked with * . ICL. Intracellular loop; ECL. Extracellular loop.

表 2 鳊与其他物种 SSTR2 和 SSTR3 氨基酸相似度比较

Table 2 Amino acid similarities of SSTR2 and SSTR3 between *Siniperca chuatsi* and other known species

生长抑素受体 2 SSTR2	相似度 (%) Similarity	生长抑素受体 3 SSTR3	相似度 (%) Similarity
斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	96.9	伯氏朴丽鱼 <i>Haplochromis burtoni</i>	91.3
罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	94.5	斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	91.2
金鱼 <i>Carassius auratus</i>	84.0	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	78.8
伯氏朴丽鱼 <i>Haplochromis burtoni</i>	82.6	金鱼 <i>Carassius auratus</i>	77.8
斑马鱼 2A <i>Danio rerio</i> 2A	75.5	鸡 <i>Gallus gallus</i>	62.7
斑马鱼 2B <i>Danio rerio</i> 2B	83.5	人 <i>Homo sapiens</i>	61.0
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	82.4	小鼠 <i>Mus musculus</i>	58.6
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	81.3		
人 2A <i>Homo sapiens</i> 2A	75.3		
人 2B <i>Homo sapiens</i> 2B	68.5		
鸡 <i>Gallus gallus</i>	72.7		
小鼠 2A <i>Mus musculus</i> 2A	72.7		
小鼠 2B <i>Mus musculus</i> 2B	66.4		

SSTR 由 5 个结构区域组成: N 末端、7 个转膜区 (TMD)、3 个细胞外袢 (ECLs)、4 个细胞内袢 (ICLs) 和 C 末端。鳊 SSTR2 和 SSTR3 第 7 个 TMD 中均存在保守的氨基酸序列: YANSCANPL/VLY。SSTR2 在 N 末端存在 3 个天冬酰胺连接的糖基化位点, 在 ICL2、ICL3 和 ECL4 中发现存在 6 个潜在的激酶特异磷酸化位点。SSTR3 的 N 末端中存在 4 个天冬酰胺连接的糖基化位点, 在 ICL2、ICL3、ICL4 和 C 末端区域中存在 9 个潜在的激酶特异磷酸化位点。

SSTR 氨基酸序列比对分析表明 (表 2), 鳊 SSTR2 氨基酸序列与其他鱼类的相似度高, 其中与斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 相似度最高, 而与鸟类和哺乳类的相似度相对较低。鳊 SSTR3 氨基酸序列与其他鱼类的相似度高, 其中与斜带石斑鱼和伯氏朴丽鱼 (*Haplochromis burtoni*) 氨基酸序列相似度最高, 而与鸟类和哺乳

类的相似度相对较低。鳊 SSTR2 与 SSTR3 间的氨基酸序列相似度为 51.2%。

根据 SSTR2 和 SSTR3 氨基酸序列构建了脊椎动物 NJ 系统关系树 (图 2), SSTR2 和 SSTR3 分别形成相对 2 个独立的分支; 各分支内, 哺乳类、鸟类、鱼类分别聚支, 物种间亲缘关系与其传统分类地位一致。

2.2 鳊 SSTR mRNA 的组织表达特征 以 10 倍梯度稀释 (共 5 个梯度) 的脑组织 cDNA 为模板, β -actin、SSTR2 和 SSTR3 基因特异性引物进行实时荧光定量 PCR 反应, 构建各基因的标准曲线。 β -actin、SSTR2 和 SSTR3 的扩增效率 E 值分别为 99.5%、103.3% 和 102.7%, 相关系数 R^2 分别为 0.999、0.998 和 0.962。内参基因与 SSTR2 和 SSTR3 基因标准曲线的线性关系良好, 能够在所设置的实验浓度范围内进行准确的定量分析。

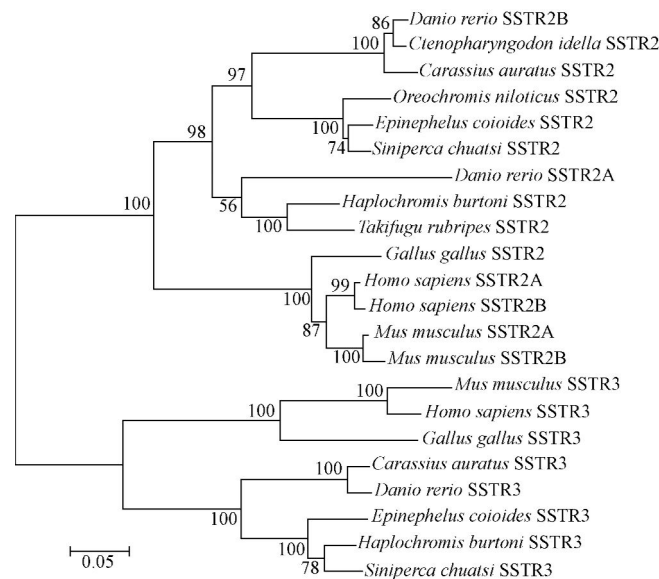


图 2 脊椎动物 SSTR2 和 SSTR3 的 NJ 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of vertebrate SSTR2 and SSTR3

Siniperca chuatsi: 鳊; *Epinephelus coioides*: 斜带石斑鱼 (SSTR2: ACI12981, SSTR3: ACI12982); *Oreochromis niloticus*: 罗非鱼 (SSTR2: XP_003438730); *Takifugu rubripes*: 红鳍东方鲀 (SSTR2: AAL32173); *Danio rerio*: 斑马鱼 (SSTR2A: XP_689033, SSTR2B: XP_694885, SSTR3: XP_695365); *Carassius auratus*: 金鱼 (SSTR2: AAF98367, SSTR3: AAM82355); *Ctenopharyngodon idella*: 草鱼 (SSTR2: ACB69421); *Haplochromis burtoni*: 伯氏朴丽鱼 (SSTR2: AAS97962, SSTR3: AAS97963); *Mus musculus*: 小鼠 (SSTR2A: AAA58256, SSTR2B: CAA48766, SSTR3: AAA40144); *Gallus gallus*: 鸡 (SSTR2: NP_001025516, SSTR3: NP_001019754); *Homo sapiens*: 人 (SSTR2A: AAF42809, SSTR2B: AAF42810, SSTR3: AAA60592)。

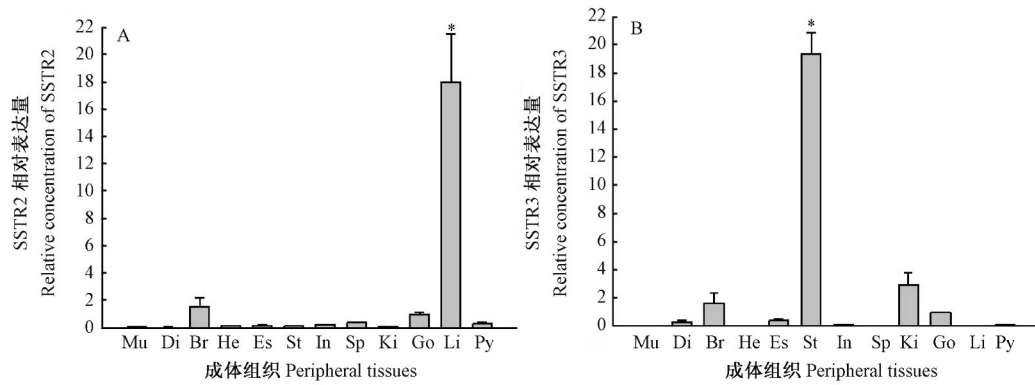


图3 鳊成体各组织 SSTR2 (A)、SSTR3 (B) mRNA 的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of SSTR2 (A) and SSTR3 (B) mRNA in adult tissues of *Siniperca chuatsi*

Mu:肌肉; Gi:鳃; Br:脑; He:心; Es:食道; St:胃; In:肠道; Sp:脾; Ki:肾; Go:精巢; Li:肝; Py:幽门垂。表达值以β-actin 内参基因加以校正,数值表示为相对于对照因子(精巢)的倍数变化(平均值±标准差)。* 表示该组织与其他组织有显著差异 (P<0.05)。

Mu: Muscle; Gi: Gill; Br: Brain; He: Heart; Es: esophagus; St: Stomach; In: Intestine; Sp: Spleen; Ki: Kidney; Go: Gonad; Li: Liver; Py: pyloric caecum. Expression values were normalized to those of internal reference beta-actin. Data were expressed as the mean fold change (Mean ± SD, n=3) from the calibrator group (gonad). Expression values of tissues with (*) are significantly different from the others, respectively (P<0.05).

鳊成体各组织中 SSTR2 和 SSTR3 mRNA 的相对表达量见图 3。SSTR2、SSTR3 在所检组织中均有较广泛的表达。其中,SSTR2 在肝中表达量最高 (P<0.05),约为精巢的 18 倍;其次是脑、脾、精巢和幽门垂;心、食道、胃、肠道表达量较低。SSTR3 在胃组织中表达量最高 (P<0.05),约为精巢的 19.3 倍;其次是脑、食道、肾和精巢;鳃和幽门垂的表达量较低。

3 讨论

3.1 鳊 SSTR 序列与结构分析 鱼类生长抑素受体研究相对较少,根据现有资料,金鱼 (*Carassius auratus*)^[12]、斑马鱼 (*Danio rerio*, GenBank 序列号:XP-685832、XP-689033、XP-695365、XP-688757)和斜带石斑鱼^[13]中已克隆获得了 4 种 SSTR (SSTR1、SSTR2、SSTR3 和 SSTR5),在金鱼 SSTR1、SSTR3、SSTR5 和斑马鱼 SSTR1、SSTR2 中还发现存在亚型^[12]。本研究运用 RACE 技术从鳊脑中克隆获得了 SSTR2 和 SSTR3 基因 cDNA 全长序列,分别为 1 820 bp和 1 874 bp,编码 382 和 486 个氨基酸。鳊 SSTR2、SSTR3 与其他鱼类氨基酸序列

相似度均高于与鸟类和哺乳类的。脊椎动物 SSTRs 系统进化树中,鳊 SSTR2 和 SSTR3 分别与其他物种的 SSTR2 和 SSTR3 聚类,表明它们分别由不同基因编码而成。

氨基酸结构比对分析表明,鳊 SSTR2 和 SSTR3 均含有 7 个 TMD、4 个 ICL、3 个 ECL 的结构域,第 7 个 TMD 中均存在保守的氨基酸序列 YANSCANPL/VLY。鳊 SSTR2 和 SSTR3 中均存在 8 个半胱氨酸残基。其中,位于 ECL1 和 ECL2 中的 2 个相对保守的半胱氨酸残基形成的二硫键可使受体折叠成稳定的三级结构^[14]。C 末端存在半胱氨酸残基可与细胞膜上其他受体相连接^[15]。鳊 SSTR2 和 SSTR3 氨基酸序列相似度为 51.2%,氨基酸序列差异主要集中在 N 末端和 C 末端区域,7 个 TMD 的氨基酸序列相似度较高,SSTR2 与 SSTR3 氨基酸序列长度的差异主要在 C 末端。

研究发现,SSTR 的 N 末端区域中均存在天冬酰胺连接的糖基化位点,这些糖基化位点能够增加受体的长度和分子量,提高与配体间的亲合力^[16-17]。鳊 SSTR2 和 SSTR3 氨基酸序列的 N 端区域中分别存在 3 个(14、30、37 位

点)和4个(在18、36、41、46位点)天冬酰胺连接的糖基化位点。斜带石斑鱼、金鱼 SSTR2 N 端存在3个糖基化位点,斜带石斑鱼 SSTR3 N 端存在5个糖基化位点^[12-13]。小鼠(*Mus musculus*) SSTR3 糖基化位点缺失时,其与配体亲和力显著减低,且对腺苷酸环化酶的释放有抑制作用^[17]。对人类(*Homo sapiens*) SSTR1 研究发现,由 TMD3 的 Asp¹³⁷、TMD4 的 Phe¹⁹⁶、TMD5 的 Phe²³²、TMD6 的 Gln²⁹¹ 和 TMD7 的 Ser³⁰⁵ 形成的特殊结构,是 SS-14 的核心结构 (Phe⁶-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe¹¹) 的结合区^[18]。

3.2 鳊 SSTR mRNA 组织表达特征分析

SSTR 受体家族在各组织中有广泛表达,以 SSTR2 表达最为广泛^[19]。实时荧光定量 RT-PCR 表明,鳊 SSTR2 和 SSTR3 mRNA 也在多种组织中表达,其中,SSTR2 主要在肝、脑、脾、精巢和幽门垂中表达,SSTR3 主要在胃、脑、食道、肾和精巢中表达。这与斜带石斑鱼、金鱼的表达特征基本相似,但也表现出明显的组织特异性^[13,20]。

鳊 SSTR2 和 SSTR3 mRNA 在脑中均有较高表达水平。研究显示,鳊3种SS均在脑中表达量较高,且均在下丘脑中表达^[11]。下丘脑是各种内分泌激素的分泌中枢,可合成和分泌生长激素(GH)。研究表明,金鱼和斜带石斑鱼中生长抑素(SS)均能抑制垂体GH释放,并呈剂量依存关系^[21-22]。因此,推测鳊脑中SS^[11]可与SSTR2、SSTR3结合,参与脑的神经和激素调控,但SS与SSTR结合的具体调控通路有待进一步研究。

鳊 SSTR2 mRNA 在肝组织中表达量最高。肝是GH-IGF轴调控的主要效应组织,GH与其受体结合后,可刺激肝中IGF-I的合成与分泌,IGF-I通过血液循环完成其生物学效应。已有研究证明,银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)SS能降低肝中GH与受体的结合能力^[23],虹鳟(*O. mykiss*)SS可抑制肝中IGF-I的合成与分泌^[24]。对鳊生长抑素基因组织表达研究发现,生长抑素前体(PSS)II mRNA 主要在肝胰脏中表达^[11]。受体SSTR2与PSSII

在主要表达组织上存在明显的一致性,但尚不清楚生长抑素与受体的特异结合作用是否存在剂量对应表达关系。

鳊 SSTR3 mRNA 在胃中表达量最高。与 PSS I、PSS III 相比,鳊 PSS II 在食道和胃表达水平最高^[11]。研究发现,SS对胃中激素释放、胃酸与胃酶分泌以及胃肠道运动均有一定的调节作用^[2,25]。大西洋鳕(*Gadus morhua*)SS可抑制胃蛋白酶原的分泌^[26]。SS对消化作用的调节是否主要通过SSTR3受体通路实现有待进一步验证。

鳊 SSTR2 和 SSTR3 mRNA 组织表达差异表明,不同受体可能参与不同生理调控作用。同时也暗示不同类型SS与SSTR的结合可能具有组织特异性和差异性。

参 考 文 献

- [1] Moriyama S, Ayson F G, Kawauchi H. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000, 64(8): 1553 - 1562.
- [2] Patel Y C. Somatostatin and its receptor family. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 1999, 20(3): 157 - 198.
- [3] 叶星,李文笙,林浩然. 鱼类生长抑素及其受体的研究进展. *水产学报*, 2007, 31(2): 264 - 272.
- [4] Lin X, Peter R E. Somatostatins and their receptors in fish. *Comparative Biochemistry Physiology: B*, 2001, 129(2/3): 543 - 550.
- [5] Eilertson C D, Sheridan M A. Differential effects of somatostatin-14 and somatostatin-25 on carbohydrate and lipid metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 1993, 92(1): 62 - 70.
- [6] Nelson L E, Sheridan M A. Regulation of somatostatins and their receptors in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 142(1/2): 117 - 133.
- [7] Hoyer D, Lübbert H, Bruns C. Molecular pharmacology of somatostatin receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1994, 350(5): 441 - 453.
- [8] 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. *海洋与湖沼*, 2008, 39(4): 354 - 361.
- [9] 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. *动物学杂志*, 2011,

- 46(3): 28–36.
- [10] 刘俊. 鳊胰岛素样生长因子-I, -II cDNA 全长克隆及组织表达分析. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2011.
- [11] 代威, 赵金良, 刘俊, 等. 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. 水产学报, 2012, 36(7): (出版中)
- [12] Lin X W, Peter R E. Somatostatin-like receptors in goldfish: cloning of four new receptors. *Peptides*, 2003, 24(1): 53–63.
- [13] Dong H Y, Li W S, Lin H R. Comparative analyses of sequence structure, evolution, and expression of four somatostatin receptors in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, 323(1): 125–136.
- [14] McKibbin C, Toye A M, Reeves P J, et al. Opsin stability and folding: the role of Cys185 and abnormal disulfide bond formation in the intradiscal domain. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 374(5): 1309–1318.
- [15] Lefkowitz R J. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor Kinases and β -Arrestins in receptor signaling and desensitization. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(30): 18677–18680.
- [16] Rens-Domiano S, Reisine T. Biochemical and functional properties of somatostatin receptors. *Journal of Neurochemistry*, 1992, 58(6): 1987–1996.
- [17] Nehring R B, Richtera D, Meyerhof W. Glycosylation affects agonist binding and signal transduction of the rat somatostatin receptor subtype 3. *Journal of Physiology-Paris*, 2000, 94(3/4): 185–192.
- [18] Kaupmann K, Bruns C, Raulf F, et al. Two amino acids, located in transmembrane domains VI and VII, determine the selectivity of the peptide agonist SMS 201-995 for the SSTR2 somatostatin receptor. *EMBO Journal*, 1995, 14(4): 727–735.
- [19] Liu Q, Cescato R, Dewi D A, et al. Receptor signaling and endocytosis are differentially regulated by somatostatin analogs. *Molecular Pharmacology*, 2005, 68(1): 90–101.
- [20] Lin X W, Janovick J A, Cardenas R, et al. Molecular cloning and expression of a type-two somatostatin receptor in goldfish brain and pituitary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2000, 166(2): 75–87.
- [21] Marchant T A, Fraser R A, Andrews P C, et al. The influence of mammalian and teleost somatostatins on the secretion of growth hormone from goldfish (*Carassius auratus* L.) pituitary fragments *in vitro*. *Regulatory Peptides*, 1987, 17(1): 41–52.
- [22] 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. *动物学报*, 2004, 50(2): 222–230.
- [23] Gray E S, Young G, Bern H A. Radioreceptor assay for growth hormone in coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and its application to the study of stunting. *Journal of Experimental Zoology*, 1990, 256(3): 290–296.
- [24] Poppinga J, Kittilson J, McCormick S D, et al. Effects of somatostatin on the growth hormone-insulin-like growth factor axis and seawater adaptation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 2007, 273(2/3): 312–319.
- [25] Very N M, Sheridan M A. The role of somatostatins in the regulation of growth in fish: fish growth and metabolism. environmental, nutritional and hormonal regulation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, 27(3/4): 217–226.
- [26] Holmgren S, Jönsson A C, Holstein B. Gastrointestinal peptides in fish // Nilsson S, Holmgren S. *Fish Physiology: Recent Advances*. London: Croom Helm Ltd, 1986: 119–139.