

# 微囊藻毒素对斑马鱼食欲调控基因的影响

李广宇, 李莉, 方洁, 钟兆山, 薛理耀, 何焱

(华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

**摘要:** 蓝藻水华大规模爆发时会产生大量有毒的微囊藻毒素 (microcystin, MC), 具有极大的危害。通过实验研究 MC-LR 对斑马鱼食欲的影响, 选取不同剂量的 MC-LR 加入各组水体中, 其中实验组的 MC-LR 终浓度依次为 0.3, 3, 30  $\mu\text{g/L}$ , 对照组的 MC-LR 浓度为 0。MC-LR 暴露 12 周后采样, 通过取样提取斑马鱼脑 RNA, 反转录为 cDNA, 利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测食欲相关基因的转录变化。实验结果表明, 当 MC-LR 浓度较低时, 促食欲基因表达降低, MC-LR 浓度升高后, 促食欲基因表达升高, 食欲会旺盛; 同时也检测到, 在 MC-LR 的存在下, 抑制食欲基因表达降低, 随后升高达到一个较稳定的状态。可见, MC-LR 可通过干扰食欲相关基因影响鱼类的摄食。

**关键词:** 水产学基础学科; 微囊藻毒素; 斑马鱼; 促食欲基因; 抑制食欲基因

中图分类号: S964.1 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2017)15-1738-06

## Effect of MC-LR on appetite-regulating genes in zebrafish

LI Guangyu, LI Li, FANG Jie, ZHONG Zhaoshan, XUE Liyao, HE Yan

(College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** A large amount of microcystin (MC) would appear when large-scale blue-green algae breaks out, which has strong damages to environment. In this study, zebrafish were exposed to varied doses of MC-LR groups (0, 0.3, 3, 30  $\mu\text{g/L}$ ). After 12 weeks, RNA was extracted from the brain samples and reverse transcribed into cDNA. Fluorescence quantitative real-time PCR (qRT-PCR) reactions were performed to detect the expression of appetite-related genes and assess the changes of zebrafish appetite. The results showed that the expression of appetite-promoting genes decreased at a lower dose MC-LR group, while the expression of appetite-promoting genes increased at a higher dose MC-LR group. In addition, MC-LR could down-regulate the expression of appetite-inhibiting genes at a lower concentration, but it would up-regulate them in a higher concentration and reach to a stable state. MC-LR could disorder appetite-related genes, which might eventually interfere ingestion of zebrafish.

**Key words:** basic subject of aquatic science; microcystin; zebrafish; appetite-promoting genes; appetite-inhibiting genes

## 0 引言

近年来, 水体富营养化加重了蓝藻水华的暴发, 一些蓝藻种类, 特别是微囊藻属, 能够产生多种强力毒素, 其中包括具有强细胞致毒性的微囊藻毒素。微囊藻毒素是已发现的各种不同蓝藻毒素中分布最广、危害最为严重的一类肝毒素<sup>[1]</sup>。在已确定的 80 多种异构体中, 毒性最大、最常见的 MC-LR 更容易积累在肝脏中<sup>[2]</sup>, 是最普遍存在和研究最多的微囊藻毒素。MC-LR 作用的主要靶器官是肝脏, 流行病学调查发现, MC-LR 可通过引发肝脏疾病而对人类的健康造成危害<sup>[3]</sup>, 室内实验同样发现急性大剂量

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20120146120007, 20120146120008)

作者简介: 李广宇 (1982—), 男, 副教授, 主要研究方向: 生态毒理学

通信联系人: 何焱, 副教授, 主要研究方向: 鱼类发育遗传学. E-mail: heyang@mail.hzau.edu.cn

MC-LR 暴露条件下, 实验动物肝脏会产生坏疽、出血<sup>[4]</sup>。同位素示踪实验结果显示, 小鼠体内 MC-LR 主要分布在肝脏中, 但在肠道和肾脏中也会有少量蓄积, 说明 MC-LR 具有多器官毒性, 肾脏和肠道等脏器同样可以被毒素影响。MC-LR 主要被释放到水体中, 因此对鱼类的生长发育有极大的影响, 目前已有多篇报道证实 MC-LR 可通过细胞凋亡与内分泌干扰抑制斑马鱼胚胎的生长发育<sup>[5-6]</sup>。因此, MC-LR 对鱼类生长和发育的影响引发了公众的关注。

正常的摄食是保证鱼类正常生长、免疫、生存极为重要的因素, 而目前对 MC-LR 的研究主要集中在其产生、检测和毒理等方面, 对鱼类食欲的影响还鲜有报道。高等动物的摄食行为通过基因调控, 这些基因可以分为促进食欲的基因和抑制食欲的基因两类, 作用于大脑中的摄食中心<sup>[7]</sup>。与食欲有关的内分泌因子有的起源于中枢神经系统, 也有的来自于外周器官或组织, 如胃、肠道、肝脏、胰腺和脂肪组织等, 外周器官或组织产生的激素通过迷走神经或者穿过血脑屏障将信息传达至中枢摄食中心, 通过它们特定的受体发挥促进食欲或抑制食欲的作用<sup>[8]</sup>。例如, 促食欲基因有下丘脑泌素 (hypocretin neuropeptide, hcrt)、神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 等; 抑制食欲基因有促胃液激素释放肽 (gastrin-releasing peptide, Grp)、促黑激素 (melanophore stimulating hormone, MSH)、瘦素 (leptin)、可卡因苯丙胺调节转录肽 (cocaine-and amphetamine-regulated transcript, CART)、黑素皮质激素受体 4 (melanocortin 4 receptor, MC4r) 等。

以脊椎动物发育生物学模式生物——斑马鱼作为研究对象, 通过 qRT-PCR 实验, 对经 MC-LR 处理的斑马鱼的食欲相关基因表达进行分析, 从而探讨 MC-LR 对斑马鱼食欲的影响。本实验采用环境浓度 MC-LR 浸泡染毒的方式对斑马鱼进行暴露, 模拟自然环境下鱼类染毒的情境, 同时从摄食角度探讨 MC-LR 对鱼类的毒性作用, 为丰富 MC-LR 的致毒机理提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与来源

MC-LR (纯度 $\geq 95\%$ ) 购自台湾 Express Technology 公司, 受精后 5 d 的健康斑马鱼幼鱼购自中国科学院水生生物研究所。

### 1.2 实验鱼的准备与处理

本实验在 12 周的时间内, 分组饲喂斑马鱼, 每组 15 条。将不同剂量的 MC-LR 加入各组水体中, 其中各实验组的终浓度分别为 0.3, 3, 30  $\mu\text{g/L}$ 。同时设置对照组, 对照组的 MC-LR 浓度为 0。斑马鱼的培养温度控制在 $(28 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ , 每天光周期的光照和无光照时间比例为 14:10。每组每天同时饲喂相同数量的饲料, 每天在上午 8 点和下午 3 点投喂丰年虫, 可以在晚上投喂少许商品饲料, 以保证斑马鱼的营养需求。取样的前 2 d 停止喂食。饲养结束后取各实验组和对照组斑马鱼的脑组织, 并用液氮速冻后置于 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

### 1.3 样品提取与引物设计

利用 SV Total RNA Isolation System (Promega 公司, 美国) 从样本的脑中提取 RNA。纯化后的 RNA 经 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 检测后, 按照 PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix Kit (TaKaRa 公司, 日本) 的说明指导进行 RNA 反转录得到合成第一链 cDNA。同时, 在 GenBank 中查找和搜索斑马鱼食欲的相关基因, 包括促食欲基因 (hcrt、NPY 及其受体) 和抑制食欲基因 (leptin 及其受体、Grp 及其受体、MSH、CART 和 MC4r), 并以 GAPDH 作为内参基因, 利用 Primer5 软件设计这些基因序列的引物, 如表 1 所示, 所有引物均由

上海科技有限公司合成, 被扩增的单个片段长度约为 150 bp.

表 1 qRT-PCR 使用的引物序列

Tab. 1 Primer sequences used in qRT-PCR

| 引物       | 序列 (5'-3')           | 引物         | 序列 (5'-3')            |
|----------|----------------------|------------|-----------------------|
| GAPDH(F) | CTGGTGACCCGTGCTGCTT  | MC4r(F)    | TCATCACTGGAGGCAACCT   |
| GAPDH(R) | TTGCCGCCTTCTGCCTTA   | MC4r(R)    | CGCAAAGCGTAGAAGATTG   |
| NPY(F)   | CAACAAAGCCCGACAACCC  | MSH(F)     | ACGCAAAGACAACCAGAC    |
| NPY(R)   | CCATGCCAAATGATCCTCA  | MSH(R)     | CACAACATCTCACTCCC     |
| NPY7r(F) | GTC AATCCGCTGCTCTATG | HCRT(F)    | GAAGCTCCAGGTGCTCGTC   |
| NPY7r(R) | CCGTTTACAATCATCCCTC  | HCRT(R)    | CAGCGGCGTCTGTTGTTGA   |
| CART(F)  | TGCTGCTGGTTTGCTGTGA  | leptinr(F) | ATGGAGTCAGCGATGGTGT   |
| CART(R)  | GCCGAGCTTCTTCTCCACA  | leptinr(R) | TGTTGTTTCGGGTGGGTGTT  |
| Grp(F)   | ATTCGTCGTGTCCATCAT   | leptina(F) | GCATTCCTTCATCAGCA     |
| Grp(R)   | GTCACAGCATCGTCGTTT   | leptina(R) | AGCCCTTGGATGGGTTTGT   |
| Grpr(F)  | ATTCGGAGACAGGTTGAG   | leptinb(F) | CCGTCACCTCCAACCTACCT  |
| Grpr(R)  | ATGGTAGGAGCGGTAGAG   | leptinb(R) | CAGCCACATCTGTATCTTTGC |

## 1.4 qRT-PCR 分析基因表达

通过 qRT-PCR 检测编码斑马鱼食欲相关基因的 mRNA 表达水平。PCR 反应混合物为 20  $\mu\text{L}$  体系, 包括 1  $\mu\text{L}$  (100 ng) cDNA 模版、10  $\mu\text{L}$  SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (2 $\times$ )、正向和反向引物各 0.4  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 以及 8.2  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。qRT-PCR 检测在 qRT-PCR 仪 miniopticon (Bio-Rad 公司, 美国) 上进行, 均进行相同条件的扩增: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 59 $^{\circ}\text{C}$  退火 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 15 s, 共 45 个循环; 于 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸处收集荧光信号, 并制作溶解曲线。

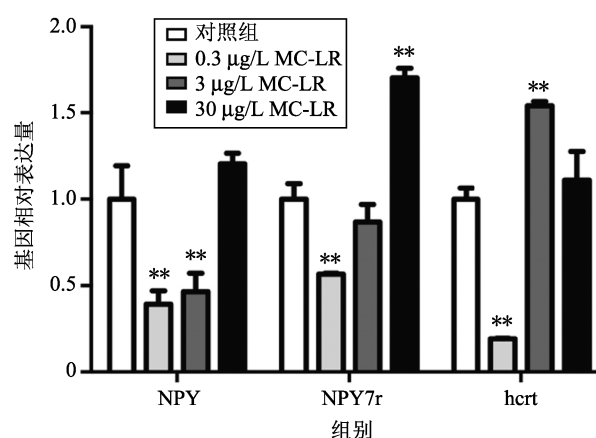
## 1.5 数据处理与统计分析

qRT-PCR 完成后, 从每个样品中获取基因的 Ct 值和  $\beta$ -肌动蛋白基因。基因的相对表达水平可以用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法计算。扩增产物的特异性通过溶解曲线分析检查, 并采用单因素方差分析对结果进行数据分析, 选取 0.05 的显著性水平。当组间出现统计学差异时, 采取邓肯法确定各组之间的差异。所有统计分析采用 SPSS 16.0 软件进行。

## 2 结果

### 2.1 MC-LR 对斑马鱼促食欲基因及其受体表达的影响

通过 qRT-PCR 实验, 得到了脑中促食欲基因及其受体基因表达量的变化, 如图 1 所示。可以看出, NPY 在较低浓度 MC-LR (0.3  $\mu\text{g/L}$  和 3  $\mu\text{g/L}$ ) 处理后表达显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而在高浓度 MC-LR (30  $\mu\text{g/L}$ ) 处理组中的表达与对照组相比无显著性变化 ( $P > 0.05$ )。其受体 NPY7r 的表达略有不同, 在低浓度 MC-LR (0.3  $\mu\text{g/L}$ ) 处理后表达显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而在高浓度 MC-LR (30  $\mu\text{g/L}$ ) 处理组中的表达显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。食欲肽 hcrtr 是一种最能反映摄食情况的重要神经肽, 图 1 明显显示出在低浓度 MC-LR



注: \*\*表示具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )

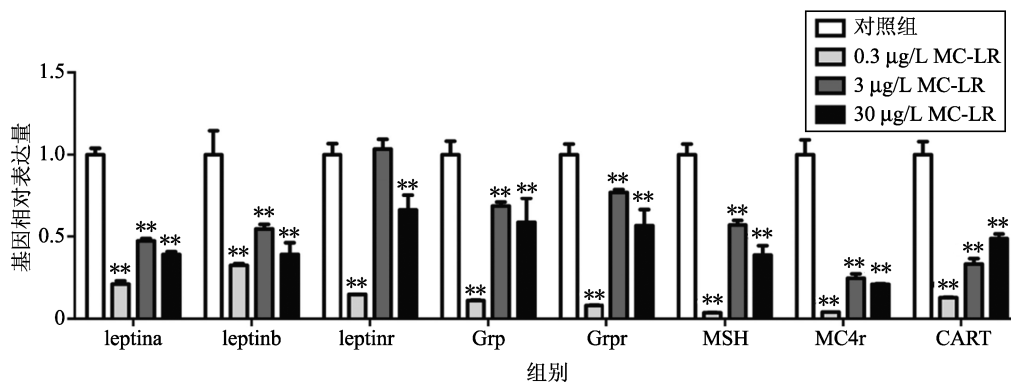
图 1 MC-LR 处理后促食欲基因表达的情况

Fig. 1 Relative expression of appetite-promoting genes after MC-LR treatment

环境中 ( $0.3 \mu\text{g/L}$ ), *hcrt* 表达与对照组相比显著降低 ( $P<0.05$ ), 而随着 MC-LR 浓度的升高, *hcrt* 的表达显著上升, 甚至高于对照组。

## 2.2 MC-LR 对斑马鱼抑制食欲基因及其受体表达的影响

由图 2 可以看出, 各抑制食欲基因的表达量具有大致相同的变化趋势。*leptin* 及其受体、*Grp* 及其受体、*MSH* 和 *MC4R* 在低浓度 MC-LR ( $0.3 \mu\text{g/L}$ ) 处理后表达量最低, 随着 MC-LR 浓度的升高, 表达先升高再降低。而 *CART* 在 MC-LR 处理后, 基因的表达显著低于对照组。尤其是在低浓度 MC-LR ( $0.3 \mu\text{g/L}$ ) 处理后表达量最低, 随着 MC-LR 浓度的升高, 其表达量也逐渐升高, 但始终低于对照组。



注: \*\*表示具有显著性差异 ( $P<0.05$ )

图 2 MC-LR 处理后抑制食欲基因表达的情况

Fig. 2 Relative expression of appetite-inhibiting genes after MC-LR treatment

## 3 讨论

本实验中, 经过不同浓度 MC-LR 浸泡处理后的斑马鱼食欲相关基因的表达有显著变化。促食欲基因 *hcrt* (*Orexin*) 是下丘脑泌素, 也称为食欲肽或开胃素, 是对两种不同神经肽激素的统称, 两者是由一种蛋白原分裂而来的, 而且两者的氨基酸排序相似度达 50%<sup>[9]</sup>。只有很少数量的细胞负责产生食欲肽 (这些细胞包括下丘脑的侧部及后部), 但这些食欲肽的影响却可直达脑部。*hcrt* 蛋白会与一种 G 蛋白偶联受体结合, 提升动物对食物的渴望, 增加食欲<sup>[9]</sup>。*NPY* 是一种由 36 个氨基酸连接而成的单链多肽, 在下丘脑弓状核部位分泌, 当其分泌量增加时可以促进脊椎动物摄食<sup>[10]</sup>。*NPY* 在调节动物新陈代谢过程中所起的作用与去甲肾上腺素类似, 它们共同存在于交感神经末梢并一起释放, 显示出明显的协同关系。*NPY* 对血压调节、促肾上腺皮质激素、生长激素, 以及促肾上腺激素释放因子、摄食及黄体生成激素等的合成与分泌起到重要作用<sup>[11]</sup>。*NPY* 受体为 G 蛋白偶联受体。大量研究表明, *NPY* 在调节动物摄食方面有重要的作用<sup>[12-13]</sup>。在本实验中, 这些促食欲基因在低浓度的 MC-LR 处理后转录水平降低, 说明低剂量的 MC-LR 对食欲产生抑制效果, 而高浓度的 MC-LR 又会上调这些基因, 促进斑马鱼的食欲, 表现出一种负反馈的趋势。

与促食欲基因的表达情况相对应, 抑制食欲基因也有不同程度的变化。*Grp* 的主要生理作用是促进促胃液素的分泌, 其细胞分布在胃腺和十二指肠腺管的中下部。金鱼进行腹腔注射 *Grp* 后, 可发现其摄食受到显著抑制<sup>[14]</sup>。*leptin* 是由脂肪细胞分泌的蛋白质类激素, 其主要由白色脂肪组织产生, 主要作用于下丘脑代谢调节中枢, 发挥抑制食欲、减少能量摄取、减少脂肪组织的合成、增加能量消耗的作用。*MSH* 是腺垂体分泌的 7 种主要激素之一, 在鱼类中促黑激素由垂体中叶分泌, 参与生长激素、醛固酮、

胰岛素的分泌调节,具有抑制摄食的功能<sup>[15]</sup>。MC4r 是下丘脑腹内侧核分泌的一类肽类物质,为黑素皮质素受体家族 5 个亚型 (MC-5R) 之一,在哺乳动物中,具有介导 leptin 的功能,是一个调节能量平衡与能量动态平衡的重要信号分子,在控制食欲和体重稳态中起关键作用,可与脑非分泌型的  $\alpha$ -MSH 结合,抑制体重的增加,控制食欲、能量代谢<sup>[15]</sup>。CART 是一种存在和分布都很广泛、并且大量表达的神经肽,在各种生命体的生理功能中起到重要作用。注射 CART 后的大鼠会有一个快速的摄食压制行为出现<sup>[16]</sup>。而且根据目前在鱼类中的研究发现,在金鱼中注射 CART 多肽,金鱼对食物的消耗减少<sup>[17]</sup>。在本实验中,这些促食欲基因在低浓度的 MC-LR 处理后表达降低,然后随着 MC-LR 浓度的升高而先升高再降低,实验结果表明,MC-LR 暴露会极大干扰鱼类的食欲相关基因,鱼类机体可能会通过调整抑制食欲基因来补偿 MC-LR 对促食欲相关基因的抑制。

## 4 结论

随着中国经济的快速发展,很多鱼米之乡蓝藻水华肆虐,极大地危害了当地水产养殖业的发展。本实验首次阐述了微囊藻毒素与鱼类食欲之间的关系,发现长期慢性暴露可导致食欲相关基因表达紊乱。本结论从机理上解释了迄今为止多个研究报道的毒素导致鱼类发育迟缓的现象,为丰富 MC-LR 的致毒机理提供了理论依据。根据本实验结果可知,MC-LR 的暴露会使鱼类食欲相关基因的表达出现紊乱,这将会极大地干扰鱼类的生长发育,对鱼类养殖产业亦会造成极大冲击,需引发关注。

### [参考文献] (References)

- [1] CARMICHAEL W W. The toxins of cyanobacteria[J]. Sci. Am., 1994, 270(1): 78-86.
- [2] HARADA K. Recent advances of toxic cyanobacteria research[J]. Journal of Health Science, 1999, 45(3): 150-165.
- [3] 俞顺章, 赵宁, 资晓林, 等. 饮水中微囊藻毒素与我国原发性肝癌关系的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23 (2): 96-99.  
YU S Z, ZHAO N, ZI X L, et al. The relationship between cyanotoxin (microcystin, MC) in pond-ditch water and primary liver cancer in China[J]. Chinese Journal of Oncology, 2001, 23(2): 96-99. (in Chinese)
- [4] ROBINSON N A, MIURA G A, MATSON C F, et al. Characterization of chemically tritiated microcystin-LR and its distribution in mice[J]. Toxicol., 1989, 27(9): 1035-1042.
- [5] YAN W, ZHOU Y X, YANG J, et al. Waterborne exposure to microcystin-LR alters thyroid hormone levels and gene transcription in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in zebrafish larvae[J]. Chemosphere, 2012, 87(11): 1301-1307.
- [6] ZENG C, SUN H, XIE P, et al. The role of apoptosis in MCLR-induced developmental toxicity in zebrafish embryos[J]. Aquat. Toxicol., 2014, 149: 25-32.
- [7] VOLKOFF H, EYKELBOSH A J, PETER R E. Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting[J]. Brain Res., 2003, 972(1-2): 90-109.
- [8] HARROLD J A, DOVEY T M, BLUNDELL J E, et al. CNS regulation of appetite[J]. Neuropharmacology, 2012, 63(1): 3-17.
- [9] SAKURAI T, AMEMIYA A, ISHII M, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior[J]. Cell, 1998, 92(4): 573-585.
- [10] LARHAMMAR D. Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide[J]. Regul. Pept., 1996, 62(1): 1-11.
- [11] DANGER J M, TONON M C, JENKS B G, et al. Neuropeptide Y: localization in the central nervous system and neuroendocrin function[J]. Fundam. Clin. Pharmacol., 2003, 4(3): 307-340.
- [12] CARPIO Y, ACOSTA J, MORALES A, et al. Cloning, expression and growth promoting action of Red tilapia (*Oreochromis* sp.) neuropeptide Y[J]. Peptides, 2006, 27(4): 710-718.

- 
- [13] LI M, TAN X, SUI Y, et al. The stimulatory effect of neuropeptide Y on growth hormone expression, food intake, and growth in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Fish Physiol. Biochem.*, 2017, 43(1): 11-18.
- [14] HIMICK B A, PETER R E. Bombesin acts to suppress feeding behavior and alter serum growth hormone in goldfish [J]. *Physiol. Behav.*, 1994, 55(1): 65-72.
- [15] ELLACOTT K L, CONE R D. The role of the central melanocortin system in the regulation of food intake and energy homeostasis: lessons from mouse models [J]. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2006, 361(1471): 1265-1274.
- [16] ELIAS C F, LEE C, KELLY J, et al. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord [J]. *Neuron*, 1998, 21(6): 1375-1385.
- [17] VOLKOFF H, PETTER R E. Effects of CART peptides on food consumption, feeding and associated behaviors in the goldfish, *Carassius auratus*: actions on neuropeptide Y and orexin A-induced feeding [J]. *Brain Res.*, 2000, 887(1): 125-133.