

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 体表色素细胞观察及 POMC 表达特性分析*

史学营^{1,2} 徐永江¹ 武宁宁³ 柳学周^{1①} 杨洪军⁴ 臧坤^{1,2}
史宝¹ 李存玉^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 青岛市海洋与渔业局渔业技术推广站 青岛 266001;
4. 日照市水利养殖场 日照 276805)

摘要 为认识养殖半滑舌鳎无眼侧黑化的细胞学特性,利用显微观察方法研究了其皮肤黑色素细胞、黄色素细胞和虹彩细胞的形态特征,比较了3种色素细胞在有眼侧皮肤、无眼侧正常和黑化皮肤中的数量分布特征。为进一步揭示无眼侧黑化的分子机制,克隆了半滑舌鳎 POMC 基因的 cDNA 序列。结果显示,黑色素细胞较大,含黑色和棕色的色素颗粒,有树突状分枝不明显和延伸成放射状两种形态;黄色素细胞较小,含黄色素颗粒;虹彩细胞最小,含鸟粪素颗粒。半滑舌鳎 POMC 基因的 cDNA 序列长 910 bp,包括一个 114 bp 的 5'非翻译区和一个 154 bp 的 3'非翻译区,开放阅读框长度为 642 bp,共编码 213 个氨基酸,包含 ACTH、 α -MSH、 β -MSH、 γ -LPH、 β -内啡肽 5 个多肽序列,但缺失 γ -MSH 和大部分连接区。半滑舌鳎 POMC 基因的氨基酸序列与其他鱼类的同源性为 30%–64%。定量 PCR 分析显示, POMC mRNA 主要在垂体中表达,其次是脑、性腺和无眼侧黑化皮肤。正常与黑化皮肤中的差异表达结果显示,无眼侧黑化皮肤中 POMC mRNA 表达量最高,并与有眼侧皮肤和无眼侧正常皮肤中的 POMC mRNA 表达量差异显著,揭示了 POMC 的表达与无眼侧黑化性状密切相关。

关键词 半滑舌鳎; 色素细胞; POMC; 基因克隆; 组织表达

中图分类号 S968 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)02-0045-10

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)主要分布在黄渤海海域(姜言伟等, 1993),是一种重要的人工增殖鱼种(邓景耀等, 1988; 肖登元等, 2014; 于朝磊等, 2014)。近年来,半滑舌鳎养殖产量不断增加,已形成规模化养殖(柳学周等, 2014)。但是,在养殖生产中养殖鱼存在较高比例的无眼侧黑化现象,主要表现为腹面部分(20%–50%)覆盖斑状色素群(主要出现在腹面的尾部、中部)或腹面全部覆盖黑色素,且发生比率高达 60%–90%,严重影响了商品鱼的市场价格,

无眼侧黑化现象成为产业发展的一个制约因素。

国内外学者就养殖鲆鲽类的无眼侧黑化现象及其可能机制开展了诸多研究,主要集中在色素细胞(Shikano *et al.*, 2007; Isojima *et al.*, 2013)、环境因素影响(Kang *et al.*, 2012)、功能基因调控(Kobayashi *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2005、2009; Yoshikawa *et al.*, 2013)等方面,但黑化形成的具体机制尚未明了。在色素细胞研究方面,国外学者对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、条斑星鲽(*Verasper moseri*)等鱼种的色素

* 国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)、国家国际科技合作专项项目“近海衰退渔业种群重建关键技术合作研究”(2013DFA31410)和国家留学人员科技活动项目择优资助经费共同资助。史学营, E-mail: shixueying0106@sina.com

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-09-22, 收修改稿日期: 2014-12-04

细胞形态及分布发育模式进行了研究,并初步揭示了其与无眼侧黑化特征的关系(Shikano *et al*, 2007; Isojima *et al*, 2013)。在分子机制研究方面,围绕体色相关功能基因——阿黑皮素原(Proopiomelanocortin, POMC)及其编码神经肽——黑色素富集激素(MCH)、黑色素刺激素(MSH)及其受体,对其在鲆鲽类无眼侧黑化发生过程的生理功能及可能机制研究方面取得了一些进展(Kang *et al*, 2012、2013; Mizusawa *et al*, 2011)。POMC 是多种不同功能的多肽类激素的蛋白前体,可水解成促肾上腺皮质激素(Adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、脂肪酸释放激素(Lipotrophic hormone, LPH)和 β -内啡肽(β -endorphin)等多种不同功能的多肽(魏平, 2001),其中 ACTH 又可生成黑细胞色素刺激素(Melanocyte stimulating hormone, MSH)以及类促肾上腺皮质激素垂体中叶肽(CLIP 片段),而 MSH 是诱发养殖鱼类体色黑化的重要多肽之一。已有研究表明, POMC 在鱼类中可能具有体色调节、分解脂肪、渗透压调节、促进摄食等多种功能(Arends *et al*, 1998; Prltchard *et al*, 2002),因此近年来成为鱼类体色调控机制研究的热点之一。Kang 等(2012)研究发现, POMC 可能参与介导了高密度和黑暗环境诱发养殖牙鲆无眼侧黑化发生的过程。同时,对条斑星鲽的研究也发现 POMC 及其衍生多肽 MSH 都参与色素细胞的调节过程以及环境诱发无眼侧黑化的过程调节,表明其与无眼侧黑化有直接联系(Kobayashi *et al*, 2009; Takahashi *et al*, 2005、2009; Yoshikawa *et al*, 2013)。

本研究着眼于养殖半滑舌鲷的无眼侧黑化问题,研究了其色素细胞的类型、分布模式及其与无眼侧黑化的关系,同时克隆了体色相关功能基因 POMC 并分析了其表达特性及其与无眼侧黑化的关系,以期在细胞和分子水平上认识养殖半滑舌鲷无眼侧黑化的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料及取样

试验用半滑舌鲷 10 尾于 2013 年 8 月取自山东青岛某养殖场,试验鱼全长 25–35 cm,体重 250–350 g。根据无眼侧黑化情况,分别取样无眼侧正常和无眼侧黑化的养殖鱼(图 1)。实验鱼以 MS-222 (280 mg/L)麻醉致死,取样有眼侧鳞片和皮肤、无眼侧正常和黑化区域的鳞片和皮肤,用于色素细胞观察。快速取性腺、肝脏、心脏、胃、肠、脾、肾、头肾、垂体、脑、鳃、肌肉、有眼侧正常皮肤、无眼侧黑化皮肤、无眼侧正常皮肤组织投入液氮中,后转入 -80°C 超低温冰箱保存,用于总 RNA 的提取。

1.2 色素细胞类型和数量分布特性分析

取半滑舌鲷有眼侧、无眼侧黑化、无眼侧正常的鳞片或皮肤,常规方法制作临时装片。如果样品不平整或不在同一平面上,可置于生理盐水(0.85%)中伸展 3–5 min,并用纸吸干水分,再用中性树胶将其固定于载玻片上。置于高级研究型正立显微镜(NIKON 80i)下对色素细胞进行观察、测量和记录,并用 CCD 数码智能型成像系统进行拍照。每尾鱼制作临时装片 8–10 个。

在 40 倍物镜下记录每个视野下各种不同类型色素细胞的数量,每个样本观察 30 个视野进行统计分析,实验结果表示为 Mean \pm SD。利用 SPSS 17.0 软件对无眼侧和有眼侧皮肤或鳞片上的色素细胞数量进行单因素方差分析(ANOVA),设定差异显著水平 P 为 0.05,当 $P<0.05$ 时表示差异显著。

1.3 POMC 克隆及表达特性分析

1.3.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成 利用 RNAiso Plus (TaKaRa)试剂盒并按照操作说明抽提各

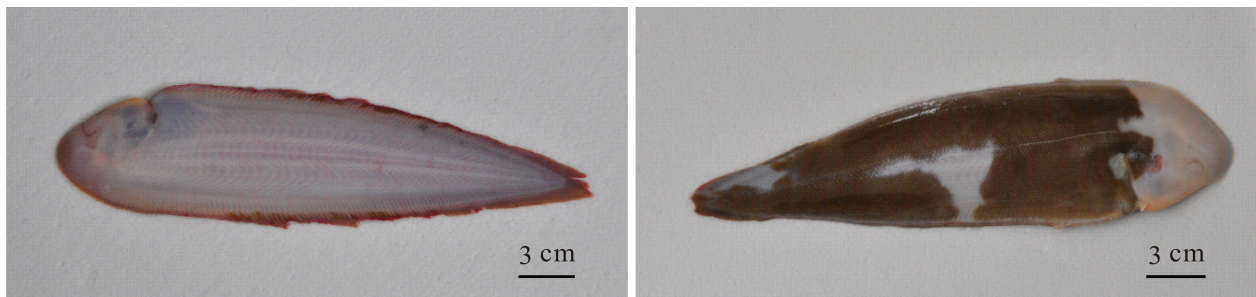


图 1 无眼侧正常(左)与无眼侧黑化(右)的半滑舌鲷

Fig.1 Normal coloration (left) and hypermelanosis (right) on the blind side of *C. semilaevis*

组织总 RNA, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量, Nanodrop2000(Thermo)测定 RNA 浓度。以 PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit(宝生物, 大连)合成 cDNA 第一链, 于-20℃保存备用。

1.3.2 POMC 基因中间片段扩增 以垂体 cDNA 为模板, 利用特异性引物 POMC-F 和 POMC-R(表 1), 通过 RT-PCR 扩增获得半滑舌鳎 POMC 基因的中间片段。PCR 扩增体系为 25 μ l, 反应条件为 94℃ 5 min, 94℃ 30 s、53℃ 30 s、72℃ 50 s 34 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离后, 切胶回收、纯化后连接并转化至 *Trans1-T1* 感受态细胞, LB 固体培养基 37℃ 培养过夜, 挑取阳性克隆送至北京华大公司测序。

1.3.3 POMC 的 RACE 扩增 根据得到的中间片段设计 RACE 引物 POMC-GSP5、POMC-GSP3、POMC-NGSP5 和 POMC-NGSP3(表 1)。以垂体 RNA 为模板, 根据 Clontech SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 反转录试剂盒(TaKaRa)的操作说明, 合成用于 5'-RACE 及 3'-RACE 的第一链 cDNA。

5'-RACE 及 3'-RACE: 按 Smart RACE Advantage 2 试剂盒(Clontech)操作说明进行 PCR 扩增。第 1 次 PCR 分别使用引物 POMC-GSP5 和 POMC-GSP3, PCR 条件: 94℃ 30 s; 65℃ 30 s, 13 个循环, T_m 每个循环降低 0.5℃, 72℃ 延伸 1 min; 然后 94℃ 30 s、58℃ 30 s、72℃ 60 s, 28 个循环, 最后 72℃ 延伸 4 min。

以第 1 次 PCR 产物为模板, 分别使用引物 POMC-NGSP5 和 POMC-NGSP3 进行巢式 PCR, PCR 条件同第 1 次 PCR。取 5 μ l PCR 产物置于 1%琼脂糖

凝胶电泳检测后, 对目的条带进行回收、载体连接、转化、菌液培养后筛选阳性克隆测序。

1.4 POMC 表达特性

检测了 3 尾半滑舌鳎的脑、垂体、鳃、心、头肾、肾、肝、脾、胃、肠、性腺、肌肉、有眼侧皮肤、无眼侧黑化皮肤、无眼侧正常皮肤等组织中 POMC mRNA 的表达特性。以 18S rRNA 为内参基因设计实时定量引物 Sole-18S F 和 Sole-18S R, 利用 Mastercycler ep realplex real-time PCR 仪(Eppendorf), 使用 SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa)嵌合荧光法进行实时定量 PCR 扩增反应。PCR 反应体系: 2 \times SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μ l, 引物 SPOMC-DF3、SPOMC-DR3 (10 μ mol/L) 各 1.0 μ l, 模板 cDNA 2.0 μ l, 加 ddH₂O 至 20 μ l; PCR 条件: 95℃ 30 s、95℃ 5 s、58℃ 28 s, 40 个循环。对得到的各样品 C_t 值进行均一化处理, 应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法(Livak *et al*, 2001)确定各组织中 POMC mRNA 的相对表达量。

1.5 生物信息学分析

利用 DNASTAR(版本 5.0.1)分析半滑舌鳎 POMC 的序列结构, 预测分子量、等电点及氨基酸同源性; 信号肽预测使用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); 氨基酸序列比对和系统进化分析使用 ClustalX 2.0.12 (<http://www.clustal.org/download/current/>) 和 MEGA 5.1(<http://www.megasoftware.net/mega51.html>)。系统进化树构建使用 MEGA 5.0 软件中 Neighbor-joining 法(自展值为 1000)。半滑舌鳎 POMC 同源性比较与进化树构建使用的物种及其 GenBank 获取号见表 2。

2 结果

2.1 半滑舌鳎色素细胞的类型与分布特征

半滑舌鳎的色素细胞类型主要有 3 种: 黑色素细胞、黄色素细胞和虹彩细胞。黑色素细胞较大, 细胞直径 10–60 μ m, 细胞形状不规则, 大体分为两种类型: 一种树突状分枝不明显; 另一种延伸成放射状。黄色素细胞较小, 圆形或椭圆形, 细胞直径 1–5 μ m, 视野下呈黄色, 大部分聚集在一起, 多连成一片分布。虹彩细胞较大, 细胞直径 10–70 μ m, 分布较均匀, 含有鸟粪素颗粒, 呈灰色或彩色, 形状不规则, 呈卵圆形、棒状或多边形等。另外, 还有许多复合色素细胞, 它们以其中一种色素颗粒为主, 但含有其他一些色素颗粒(图 2)。

表 1 POMC 克隆与定量检测的引物

Tab.1 Primers used for POMC amplification and qPCR analysis for *C. semilaevis*

引物 Primer	引物序列 Nucleotide sequence (5'-3')
POMC-F	ATGTGTCCTGTGTGGCTATTGGTG
POMC-R	GAAGCCGCCGTAGCGTTTG
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
POMC-GSP5	CTGCTGTCCGTCTTTGTTGATG
POMC-GSP3	GTCAGTGCTGGGAGCATCCG
POMC-NGSP5	TTTGCTGGCGGGCGGACC
POMC-NGSP3	AAAACGTCGCCCGGTCAAAG
SPOMC-DF3	TACATGGGAGCAGAAGAGGAA
SPOMC-DR3	AGCCACCAATAGCCACAGAG
Sole-18S F	CCTGAGAAACGGCTACACATC
Sole-18S R	CCAATTACAGGGCCTCGAAAG

表 2 半滑舌鳎 POMC 氨基酸同源性分析与进化树构建所使用的物种

Tab.2 Species used for amino acid homology and phylogenetic analysis for POMC of *C. semilaevis*

学名 Species	登录号 Accession number	分类 Category
半滑舌鳎 <i>C. semilaevis</i>	KJ748570	硬骨鱼纲、鲈形目 Osteichthyes, Pleuronectiformes
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	AAG16978	硬骨鱼纲、鲈形目 Osteichthyes, Pleuronectiformes
塞内加尔鳎 <i>Solea senegalensis</i>	CCA65461	硬骨鱼纲、鲈形目 Osteichthyes, Pleuronectiformes
斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	AAO11696	硬骨鱼纲、鲈形目 Osteichthyes, Perciformes
罗非鱼 <i>Oreochromis mosambicus</i>	AAD41261	硬骨鱼纲、鲈形目 Osteichthyes, Perciformes
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	NP_001118190	硬骨鱼纲、鲑形目 Osteichthyes, Salmoniformes
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	Q9YGK5	软骨鱼纲、鲤形目 Chondrichthyes, Cypriniformes
白鲟 <i>Acipenser transmontanus</i>	JC5283	软骨鱼纲、鲟形目 Chondrichthyes, Acipenseriformes
雀鳝 <i>Lepisosteus osseus</i>	AAB03227	软骨鱼纲、雀鳝目 Chondrichthyes, Lepisosteiformes
非洲肺鱼 <i>Protopterus annectens</i>	BAA32607	软骨鱼纲、美洲肺鱼目 Chondrichthyes, Lepido sireniformes
白斑角鲨 <i>Squalus acanthias</i>	BAA32606	角鲨目 Squaliformes
赤鲉 <i>Dasyatis akajei</i>	BAA35126	下孔总目 Hypotremata
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	NP_001080838	两栖纲 Amphibia
鸡 <i>Gallus gallus</i>	NP_001026269	鸟纲 Aves
牛 <i>Homo sapiens</i>	NP_000726	哺乳纲 Mammalia

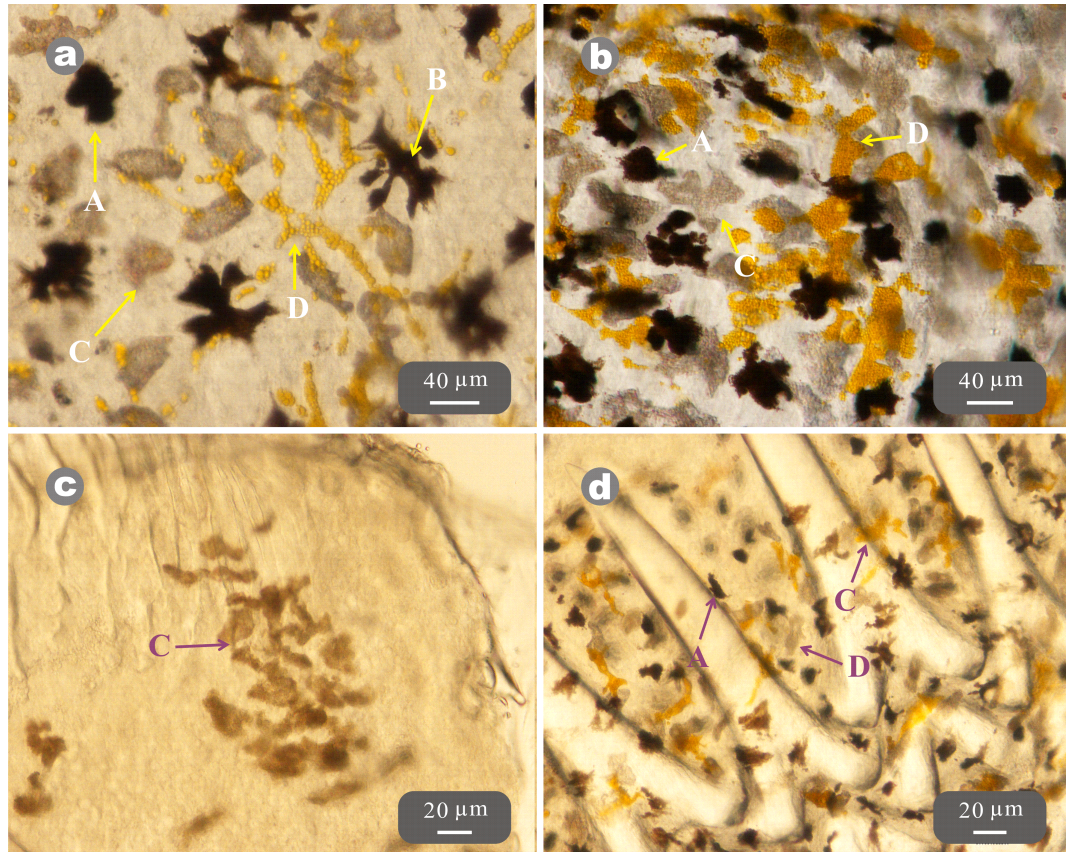


图 2 半滑舌鳎色素细胞形态特征

Fig.2 The morphology of chromatophores on the skin of *C. semilaevis*

1. 无眼侧黑化皮肤上的色素细胞×400; 2. 有眼侧正常皮肤上的色素细胞×400;
3. 无眼侧正常鳞片上的虹彩细胞×200; 4. 有眼侧正常鳞片上的色素细胞×200

A. 分枝不明显的黑色素细胞; B. 延伸成放射状带分枝的黑色素细胞; C. 虹彩细胞; D. 黄色素细胞

1. Chromatophores from blind-side skin with hypermelanosis ×400; 2. Chromatophores from eye-side skin ×400;

3. Iridophore on blind-side scale ×200; 4. Chromatophores from eye-side scale ×200

A. Melanophores without apparent branch; B. Melanophores with extended and radial branch; C. Guanophore; D. Xanthophore

比较了半滑舌鳎有眼侧正常皮肤、无眼侧正常和黑化皮肤色素细胞的数量分布。结果显示, 无眼侧正常皮肤中未发现黑色素细胞分布, 而无眼侧黑化皮肤中单位视野中黑色素细胞的分布数量(14.3 ± 2.4 个/视野)显著低于有眼侧正常皮肤黑色素细胞分布数量(23.3 ± 3.7 个/视野) ($P < 0.05$)。另外, 无眼侧黑化皮肤中虹彩细胞的分布数量(20.2 ± 2.9 个/视野)也显著低于有眼侧正常皮肤(25.3 ± 5.6 个/视野) ($P < 0.05$)。无眼侧正常皮肤中黄色素细胞和虹彩细胞数量与有眼侧正常皮肤和无眼侧黑化皮肤相比也较少, 且分布不均匀。在无眼侧黑化的皮肤或鳞片上, 以延伸成放射状的黑色素细胞分布为主(占 60%以上), 而在有眼侧正常皮肤或鳞片上, 以树突状分枝不明显的黑色素细胞分布为主。

2.2 POMC 序列分析

半滑舌鳎 POMC 基因 cDNA 序列(GenBank 序列号: KJ748570)全长 910 bp, 其中开放阅读框长为 642 bp,

编码 213 个氨基酸, 3'的非编码序列长 154 bp, 5'的非编码序列长 114 bp, 3'端非编码区含有一个加尾信号 ATTAAG(图 3), 编码蛋白分子量为 23.70 kDa, 等电点为 6.51。

2.3 POMC 编码蛋白空间结构分析

通过 SOPMA 软件分析 POMC 编码蛋白的空间结构: 在 POMC 成熟蛋白的二级结构中, α -螺旋占 30.99%, β -转角占 3.29%, 无规则卷曲占 55.40%, 延伸链占 10.33%(图 4)。并通过 I-TASSER 软件预测了半滑舌鳎 POMC 蛋白质的三级结构, 如图 5 所示。

2.4 POMC 系统进化分析

利用 Neighbor-joining 方法, 以 MEGA 5.0 软件构建基于半滑舌鳎 POMC 氨基酸序列与其他脊椎动物(表 2)POMC 的系统进化树(图 6)。结果显示, 半滑舌鳎与塞内加尔鳎、牙鲆的亲缘关系最近, 并与斜带石斑鱼、罗非鱼同处一个小分支, 但与牛、鸡、鲈则

```

-113          AGC AGT GGT ATC AAC GCA GAG TAC ATG GGA GCA GAA GAG GAA ACA ACA AAT TCT
-60 ACA TCA GAA TTT TAG ACC AAA AGA AGA AAA CAG AAC AAC AAG GAA GAC GTG GAC AGG AAA
  1  ATG GGT CCT CTG TGG CTA TTG GTG GCT GTG GGG GTT ATG GGC GTG GCC GGA GGA GCT GCC
  1  M G P L W L L V A V G V M G V A G G A A
    <-----信号肽 Signal peptide----->
  61  AGT CAG TGC TGG GAT CCC AGT TGT TTA CAG GCT GAC TCC AAG AGC AGT GCC ATG GGC TGT
  21  S Q C W D P S C L Q A D S K S S A M G C
    <----->
 121  CTC CAC CTC TGT CTC ACC GAC CTC CAT GCT GAA ACT CCT GTC CTT CCT GGT GAC GCC CAC
  41  L H L C L T D L H A E T P V L P G D A H
    -----N·端多肽 N·terminal peptide-----
 181  CTC CAA CCA CCC ACT CTG TCA GAC TCC ACC TCT TCC TCC GCT TCC CAG ACC AAG CGC TCC
  61  L Q P P T L S D S T S S S A S Q T K R S
    -----> <----->
 241  TAC TCC ATG GAG CAC TTT CGC TGG GGG AAA CCT GTT GGC CGG AAG CGC CGC CCC ATC AAA
  81  Y S M E H F R W G K P V G R K R R P I K
    -----> <----->
 301  GTC TAC ACA GCA AAT GGT GGG GAG AAC GAG TCA GCT GAT GTT TTC CCA GAA GAG ATG AGA
 101  V Y T A N G G E N E S A D V F P E E M R
    -----ACTH(α-MSH)----->
 361  AGA CGG GAA TTA GCC AAT GAG CTG CTT GTG GCG GAG GAG GAG GCA GAC AAG GAG ATG AAA
 121  R R E L A N E L L V A E E E A D K E M K
    <----->
 421  GCA GCA GGG GAG GAG GAT GAC GAG CAT CTT TCA GAT GAA GTC CAA GAC CAA AAG GAT GCC
 141  A A G E E D D E H L S D E V Q D Q K D A
    -----γ-LPH----->
 481  ACT TAC AAG ATG AGA CAC TTC CGG TGG GGC GGG TTG CCT TCC AAC AAA CGC TAC GGA GGC
 161  T Y K M R H F R W G G L P S N K R Y G G
    -----β-MSH-----> <----->
 541  TTC ATG AAG AGC TGG GAT GAA CAT GGA CAT CAG AGG CCA CTA CTT ACA CTC CTC AAG AAC
 181  F M K S W D E H G H Q R P L L T L L K N
    -----β-Endorphin----->
 601  ATC ATC AAC AAG GAA GGA CAG CAG AAG CGG AGT GGC TGA GCT TAG CCT TTT AAG AGA
 201  I I N K E G Q Q Q K R S G *
    ----->
 661  TCT GAC TGG TCA GAG AGG GCA GCG GAA CTG TTT CCT GAA ACT GAA TGG GAG ACA AAG TTT
 721  TGA TAT TAA ATG ATT TAT GTA AAT AAA TGT AAA GGA ATA AAA ATC AAT AAA CAT TTA CAA
 781  GTA AAA AAA AAA AAA A
  
```

图 3 半滑舌鳎 POMC 的 cDNA 序列及推断的氨基酸序列分析

Fig.3 cDNA sequence and putative amino acid sequence of the POMC of *C. semilaevis*

起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA 分别以阴影和黑框表示; *表示终止密码子; 加尾信号以下划线标出 The start and stop codons are shown by shadow and box respectively; Asterisk indicates stop codon; The putative polyadenylation signal (ATTAAG) is underlined

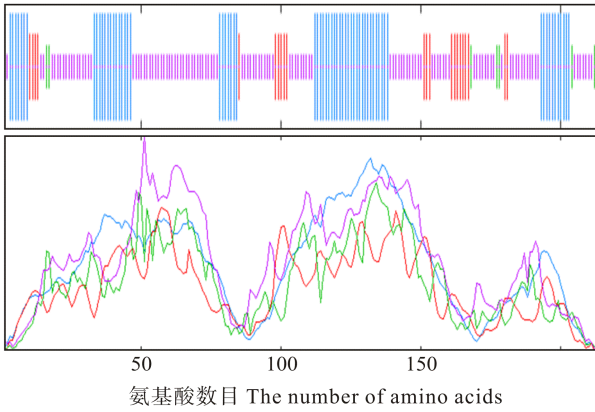


图 4 SOPMA 软件对半滑舌鳎 POMC 蛋白二级结构的分析结果

Fig.4 Secondary structure of *C. semilaevis* POMC protein analyzed by SOPWA software

蓝色表示 α -螺旋; 绿色表示 β -转角;
 紫色表示无规则卷曲; 红色表示延伸链
 Blue: α -helix; Green: β -turn; Purple: Random coil;
 Red: Extended strand



图 5 I-TASSER 软件对 POMC 蛋白三级结构的分析结果

Fig.5 Tertiary structure of *C. semilaevis* POMC protein analyzed by I-TASSER software

处于不同的分支, 表明亲缘关系远。

2.5 同源性分析

对氨基酸序列同源性分析显示, 半滑舌鳎 POMC

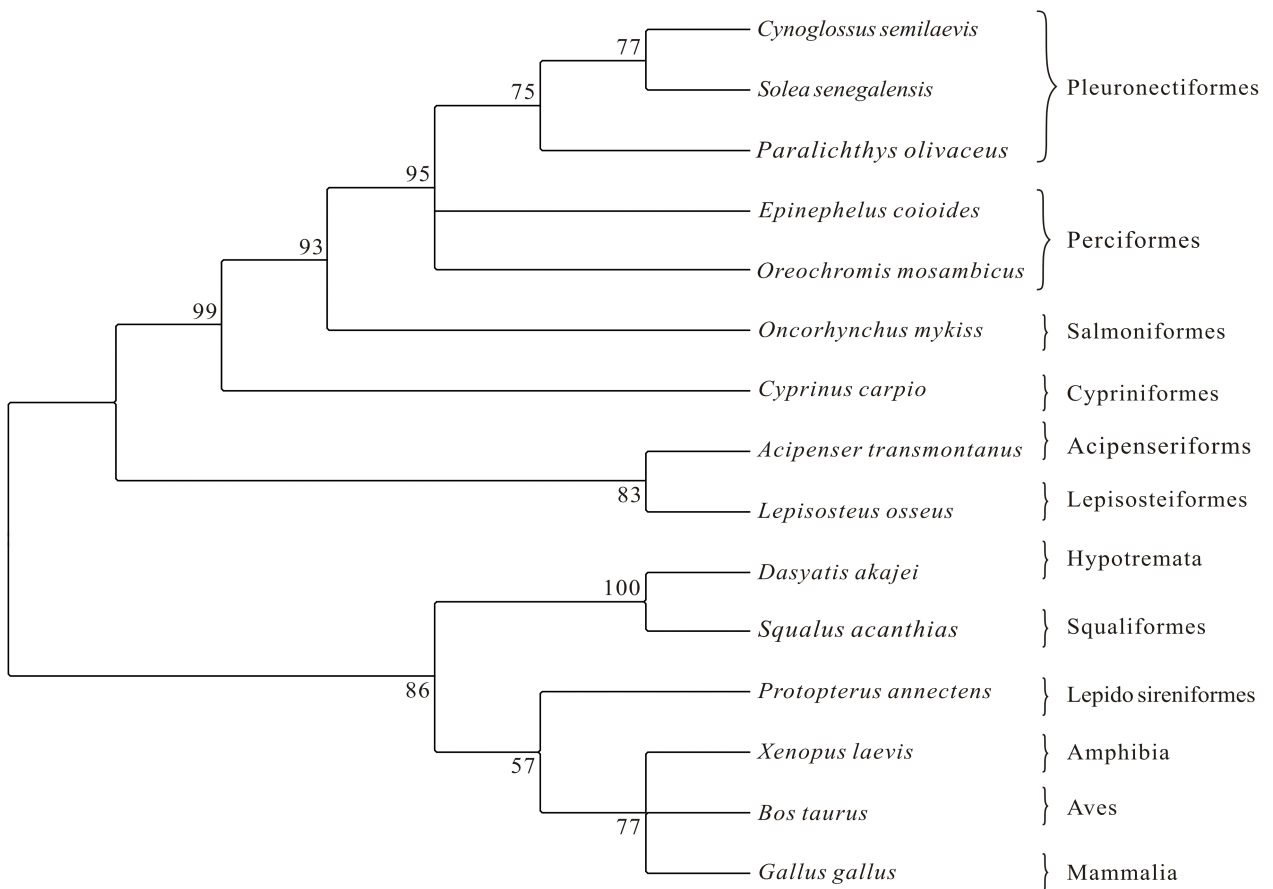


图 6 半滑舌鳎 POMC 与其他物种系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of POMC gene from *C. Semilaevis* and other vertebrates

氨基酸序列保守性不高, 其中与罗非鱼同源性最高, 带石斑鱼同源性为 58%, 与其他鱼和动物的同源性为 64%, 其次是塞内加尔鲷和牙鲆, 均为 62%, 与斜 30%–47%(图 7)。

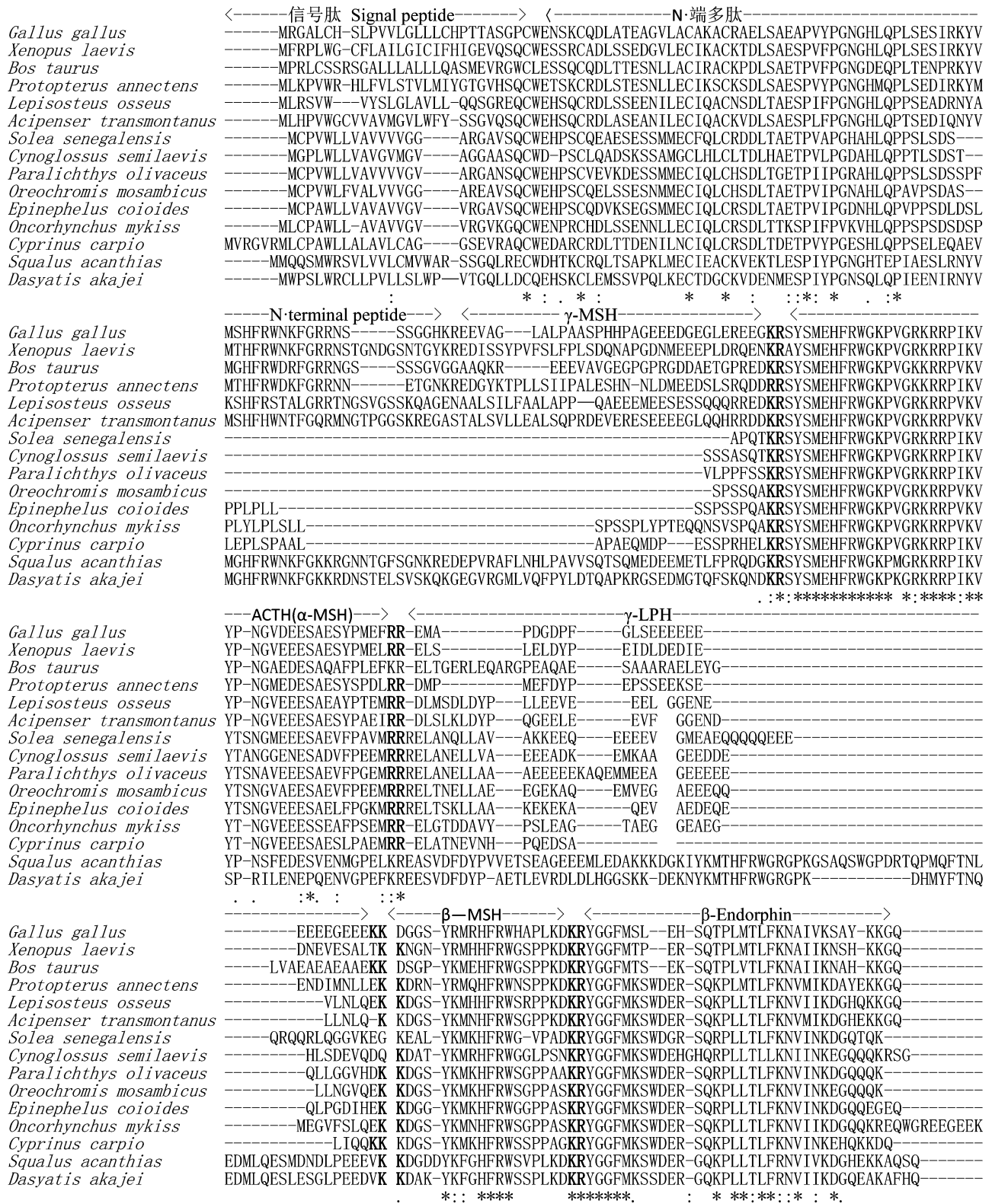


图 7 半滑舌鲷与其他物种 POMC 氨基酸序列的同源性比较
Fig.7 Amino acid sequence alignment of *C. semilaevis* POMC with other vertebrates

蛋白水解裂解位点用粗体表示。Proteolytic cleavage sites are shown in bold

2.6 POMC 组织表达分析

定量 PCR 检测显示,半滑舌鲷 POMC mRNA 在被检测的 15 个组织中均有表达,但在不同组织中 mRNA 表达水平差异较大,其中在垂体中具有最高表达水平($P<0.05$) (图 8)。对除垂体之外的 14 个组织中 POMC mRNA 表达水平进行单因素方差分析发现,脑中 POMC mRNA 表达水平最高,其次为性腺和无眼侧黑化皮肤(图 8)。比较了有眼侧正常皮肤与无眼侧正常、黑化皮肤中 POMC mRNA 的表达水平,发现无眼侧黑化皮肤中 POMC mRNA 表达水平显著高于有眼侧和无眼侧正常皮肤($P<0.05$),而有眼侧和无眼侧正常皮肤中 POMC mRNA 表达水平差异不显著($P>0.05$) (图 8)。

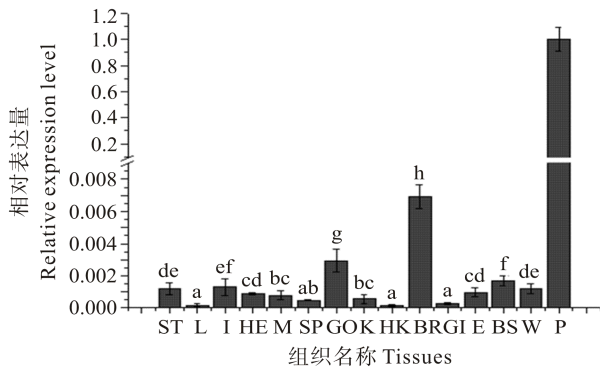


图 8 半滑舌鲷 POMC mRNA 在不同组织中的表达水平

Fig.8 Relative expression levels of POMC mRNA in different tissues of *C. semilaepis* determined by real-time quantitative PCR analysis

ST: 胃; L: 肝; I: 肠; HE: 心; M: 肌; SP: 脾; GO: 性腺;

K: 肾; HK: 头肾; BR: 脑; GI: 鳃; E: 有眼侧皮肤;

BS: 无眼侧黑化皮肤; W: 无眼侧正常皮肤; P: 垂体

不同字母表示在 $P=0.05$ 水平上差异性显著($P<0.05$), $n=9$

ST: Stomach; L: Liver; I: Intestine; H: Heart; M: Muscle;

SP: Spleen; GO: Gonad; K: Kidney; HK: Head kidney;

B: Brain; GI: Gill; E: Eye-side skin; BS: Blind-side

hypermelanosis skin; W: Blind-side normal skin; P: Pituitary
Different letters indicate significant difference at $P=0.05$ level ($P<0.05$), $n=9$

3 讨论

已有研究表明,鱼类皮肤中一般存在 4 种色素细胞类型,分别为黑色素细胞、黄色素细胞、红色素细胞和虹彩细胞(又名鸟粪素细胞) (薛继鹏等, 2010; Brown, 1933; van der Salm *et al*, 2005; 刘晓东等, 2008)。对牙鲆的研究表明,其色素细胞类型主要为黑色素细胞、黄色素细胞、虹彩细胞(Isojima *et al*, 2013),也有报道显示某些鲆鲽类皮肤中除色素细胞

外还存在一种形态和功能不明确的白色体(Burton *et al*, 2010)。本研究发现,半滑舌鲷皮肤和鳞片上分布的色素细胞主要为黑色素细胞、黄色素细胞和虹彩细胞 3 种,没有发现红色素细胞或白体形态细胞的存在。本研究发现,半滑舌鲷有眼侧和无眼侧黑化的鳞片或皮肤中色素细胞类型一致,这与牙鲆的观察结果相同(Isojima *et al*, 2013)。但是,本研究发现,半滑舌鲷有眼侧皮肤中黑色素细胞和虹彩细胞的分布密度显著高于无眼侧黑化皮肤,但黄色素细胞分布数量无显著差异,这种色素细胞的分布特性与牙鲆不同,可能与种的特异性和计数方法有关。另外,这种黑色素细胞的差异可能与无眼侧黑化皮肤多分布延伸成放射状的黑色素细胞,而有眼侧皮肤多分布树突状分枝不明显的黑色素细胞有关,其较大的体积导致单位面积内分布数量减少。Isojima 等(2013)在综合了牙鲆幼鱼无眼侧黑化区域的色素细胞、鳞片的数量分布和形态特征的基础上提出,牙鲆无眼侧黑化可能不是由色素细胞的异常分布而简单决定的,而是由无眼侧体表皮肤生理生化状态的改变造成的一个复杂的生理过程。下一步,将对半滑舌鲷皮肤组织结构和发育过程进行深入研究,以期揭示在生理学角度认识其与无眼侧黑化现象的关系。另外,也发现无眼侧黑化皮肤中的 POMC mRNA 表达水平显著高于有眼侧正常皮肤和无眼侧正常皮肤,验证了半滑舌鲷无眼侧黑化过程为一种内源性的神经内分泌调控决定的复杂过程,而不仅仅是色素细胞数量的简单变化。

有关鲆鲽类 POMC 的研究主要集中在条斑星鲽和牙鲆方面,但对 POMC 及下游多肽的生理作用认识有限。对条斑星鲽的研究表明,其表达 3 种不同形式的 POMC 分子(Takahashi *et al*, 2005; Kobayashi *et al*, 2008),而与半滑舌鲷具有较近亲缘关系的牙鲆和塞内加尔鲷都只表达两种 POMC 分子形式(Kim *et al*, 2009; Wunderink *et al*, 2012)。基因组测序结果显示,半滑舌鲷也表达两种不同分子形式的 POMC 基因(Chen *et al*, 2013),这种不同分子形式的 POMC 可能是由于染色体基因组加倍引发的(Kim *et al*, 2009; Wunderink *et al*, 2012),但具体机制尚有待于验证。目前本实验室正在开展半滑舌鲷第二种分子形式的 POMC 结构与生理功能研究。已有研究表明,条斑星鲽 POMC 主要在垂体中表达,同时也在脑、鳃、心脏、肾脏、肝脏、肠道、精巢、肌肉、血液和皮肤组织中表达(Takahashi *et al*, 2005),当养殖鱼从白色环境转移到黑色环境, POMC-A 表达下降,而 POMC-C 升高,表明 POMC 参与了环境对无眼侧黑化的调节作用(Kobayashi *et al*, 2008);牙鲆的 POMC mRNA 主

要在垂体中表达, 另外在脑中有较低表达, 在性腺中仅有微量表达(Kim *et al*, 2009)。在高密度养殖和黑暗养殖环境下, 垂体 POMC 的组织表达量显著高于普通养殖环境的鱼, 也表明牙鲆 POMC 主要参与了环境因子诱发的无眼侧黑化发生过程(Kang *et al*, 2012)。本研究发现, 半滑舌鲷 POMC 主要在垂体高丰度表达, 其次是脑、性腺和皮肤, 此外在其他组织中也有少量表达, 表明半滑舌鲷 POMC 除通过内分泌途径外, 可能还通过自分泌和旁分泌等形式参与体色调节、类固醇合成、能量平衡、应激反应、免疫应答和繁殖调节等多种生命过程(Arends *et al*, 1998; Prltchard *et al*, 2002)。另外, 无眼侧黑化皮肤中 POMC mRNA 表达水平显著高于有眼侧正常皮肤、无眼侧正常皮肤, 也表明半滑舌鲷 POMC 基因在皮肤黑化性状的发生过程中起着重要的调控作用, 但其具体的调控途径尚有待于今后对 POMC 及其编码肽生理功能及作用信号途径的深入研究。

参 考 文 献

- 于朝磊, 常青, 吕云云. 甘露寡糖对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther)稚鱼生长、肠道发育和非特异性免疫水平的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(6): 53-59
- 邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布. 海洋水产研究, 1988, 9: 11-89
- 刘晓东, 陈再忠. 七彩神仙鱼皮肤色素细胞观察及类胡萝卜素组分分析. 上海水产大学学报, 2008, 17(3): 339-343
- 肖登元, 梁萌青, 王新星, 等. 饲料中不同水平维生素 A 对半滑舌鲷亲鱼繁殖性能及后代质量的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(3): 50-59
- 柳学周, 庄志猛. 半滑舌鲷繁育理论与养殖技术. 北京: 中国农业出版社, 2014, 1-10
- 姜言伟, 万瑞景, 陈瑞盛, 等. 渤海半滑舌鲷人工育苗工艺技术的研究. 海洋水产研究, 1993, 14: 25-33
- 薛继鹏, 张彦娇, 麦康森, 等. 鱼类的体色及调控. 饲料工业, 2010, 11(3): 122-127
- 魏平. 垂体内外 POMC 基因表达调控研究进展. 国外医学: 内分泌学分册, 2001, 21(1): 39-41
- Arends RJ, Vermeer H, Martens GJ, *et al*. Cloning and expression of two proopiomelanocortin mRNAs in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). Mol Cell Endocrinol, 1998, 143(1): 23-31
- Brown FA. The controlling mechanism of chromatophores in palaemonetes. Proc Natl Acad Sci USA, 1933, 19(3): 327-329
- Burton D. Flatfish (Pleuronectiformes) chromatic biology. Rev Fish Biol Fish, 2010, 20(1): 31-46
- Chen S, Zhang G, Shao C, *et al*. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. Nat Genet, 2013, 46(3): 253-260
- Isojima T, Tsuji H, Masuda R, *et al*. Formation process of staining-type hypermelanosis in Japanese flounder juveniles revealed by examination of chromatophores and scales. Fish Sic, 2013, 79(2): 231-242
- Kang DY, Kim HC. Functional characterization of two melanin-concentrating hormone genes in the color camouflage, hypermelanosis and appetite of starry flounder. Gen Comp Endocr, 2013, 189: 74-83
- Kang DY, Kim HC. Relevance of environmental factors and physiological pigment hormones to blind-side hypermelanosis in the cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish Physiol Biochem, 2012, 14(21): 356-357
- Kim KS, Kim HW, Chen TT, *et al*. Molecular cloning, tissue distribution and quantitative analysis of two proopiomelanocortin mRNAs in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). BMB Reports, 2009, 42(4): 206-211
- Kobayashi Y, Chiba H, Amiya N, *et al*. Transcription elements and functional expression of proopiomelanocortin genes in the pituitary gland of the barfin flounder. Gen Comp Endocr, 2008, 158(3): 259-267
- Kobayashi Y, Mizusawa K, Yamanome T, *et al*. Possible paracrine function of α -melanocyte-stimulating hormone and inhibition of its melanin-dispersing activity by N-terminal acetylation in the skin of the barfin flounder, *Verasper moseri*. Gen Comp Endocr, 2009, 161(3): 419-424
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- Mizusawa K, Kobayashi Y, Sunuma T, *et al*. Inhibiting roles of melanin-concentrating hormone for skin pigment dispersion in barfin flounder, *Verasper moseri*. Gen Comp Endocr, 2011, 17(1): 75-81
- Prltchard LE, Tumbull AF, White A. Proopiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signaling and obesity. J Endocrinol, 2002, 172(3): 411-421
- Shikano T, Shimada Y, Nakamura A. Chromatophore distribution and inferior performance of albino Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* with special reference to different chromatophore expression between albinism and pseudo-albinism. J Exp Zool, 2007, 307A(5): 263-273
- Takahashi A, Amano M, Itoh T, *et al*. Nucleotide sequence and expression of three subtypes of proopiomelanocortin mRNA in barfin flounder. Gen Comp Endocr, 2005, 141(3): 291-303
- Takahashi A, Kobayashi Y, Amano M, *et al*. Structural and functional diversity of proopiomelanocortin in fish with special reference to barfin flounder. Peptides, 2009, 30(7): 1374-1382
- van der Salm AL, Spanings FAT, Gresnigt R, *et al*. Background adaptation and water acidification affect pigmentation and stress physiology of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Gen Comp Endocr, 2005, 144(1): 51-59

Wunderink YS, Vrieze ED, Halm S, *et al.* Subfunctionalization of POMC paralogues in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Gen Comp Endocr*, 2012, 175(3): 407–415
Yoshikawa N, Matsuda T, Takahashi A, *et al.* Developmental

changes in melanophores and their asymmetrical responsiveness to melanin-concentrating hormone during metamorphosis in barfin flounder (*Verasper moseri*). *Gen Comp Endocr*, 2013, 194: 118–123

(编辑 冯小花)

Preliminary Studies on Blind-side Hypermelanosis of *Cynoglossus semilaevis*: Chromatophores Observation and Expression of Proopiomelanocortin

SHI Xueying^{1,2}, XU Yongjiang¹, WU Ningning³, LIU Xuezhou¹①, YANG Hongjun⁴,
ZANG Kun^{1,2}, SHI Bao¹, LI Cunyu^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Fishery Technology Extension Center of Qingdao, Qingdao 266001; 4. Rizhao Water Conservancy Fish Farm, Rizhao 276805)

Abstract The hypermelanosis on the blind-side of *Cynoglossus semilaevis* have reduced its market value and affected its availability in the enhancement program, which has adverse effects on the sustainable development of the farming industry. However the underlying mechanisms of hypermelanosis have not been clarified yet. To investigate the cytological mechanism of hypermelanosis on the blind-side of *C. semilaevis*, we identified three kinds of chromatophores, namely melanophore, xanthophore and iridophore, based on the microscopic observation, and we described their morphology. The melanophore contained black and brown pigment granules and had a relatively larger nucleus. They could be characterized into two types according to the morphology. In contrast, the nuclei of xanthophore and iridophore were relatively small. The distribution and pattern of the three chromatophores in the eye-side and the blind-side skin were examined and compared. We isolated and sequenced the proopiomelanocortin (POMC) cDNA from pituitary using RT-PCR and RACE. The POMC cDNA was 910 bp in length consisting of a 114 bp 5'-UTR, a 154 bp 3'-UTR, and a 642 bp open reading frame that encoded 213 amino acids. The amino acid sequence was composed of the signal peptide, ACTH, α -MSH, β MSH, γ -LPH, and β -endorphin domains, without γ -MSH and most of the joining peptide domains. The amino acid homology analysis revealed that *C. semilaevis* POMC shared 30%–64% similarity with their fish counterparts. Quantitative PCR results showed that POMC mRNA was mainly expressed in the pituitary and was also expressed in the brain, gonad and the black skin (hypermelanosis) on the blind side. The POMC mRNA expression level in the blind-side black skin was significantly higher than that in the ocular-side and in the blind-side normal skin, which indicated a close correlation between the POMC gene and the hyperpigmentation on the blind-side. Our study provided basic information on the cytological and molecular mechanisms of hyperpigmentation on the blind-side of *C. semilaevis*.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Chromatophores; Proopiomelanocortin; Molecular cloning; Spatial expression

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn