

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20221213001

http://www.yykxjz.cn/

张文静, 徐永江, 崔爱君, 王滨, 姜燕, 王开杰, 周鹤庭. 黄条鲮*igfbp-1*和*igfbp-2*基因克隆、表达及其生长调控作用. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 84-98

ZHANG W J, XU Y J, CUI A J, WANG B, JIANG Y, WANG K J, ZHOU H T. Molecular cloning, expression profiles of insulin-like growth factor-binding protein-1 (*igfbp-1*) and *igfbp-2* and their regulation effects on growth of yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*). Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 84-98

黄条鲮*igfbp-1*和*igfbp-2*基因克隆、表达及其生长调控作用*

张文静^{1,2} 徐永江^{2①} 崔爱君² 王滨² 姜燕² 王开杰² 周鹤庭²

(1. 浙江海洋大学国家海洋设施养殖工程技术研究中心 浙江 舟山 316022; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室深蓝渔业工程联合实验室 山东 青岛 266071)

摘要 胰岛素样生长因子结合蛋白(insulin-like growth factor binding proteins, IGFbps)在调节胰岛素样生长因子的生物学活性和生长调控中起着至关重要的生理作用。本研究克隆了黄条鲮(*Seriola aureovittata*) *igfbp-1*、*igfbp-2a*和*igfbp-2b*等3个基因 cDNA 编码的开放阅读框(ORF)序列, 分析了其组织分布特征, 并检测了工厂化不同养殖密度下黄条鲮肝脏中5个基因*igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b*、*igf-1*和*igf-2*对生长的调控作用。结果显示,*igfbp-1*的ORF长为741 bp, 共编码246个氨基酸;*igfbp-2a*的ORF长度为882 bp, 共编码293个氨基酸;*igfbp-2b*的ORF长度为810 bp, 共编码269个氨基酸。它们均具有广泛的组织表达特性, 其中在肝脏中显著高表达, 且具有性别二态性表达特性。工厂化养殖条件下, 低密度组实验鱼生长速度最快且*igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b*、*igf-1*和*igf-2*表达量均最高, 与中、高密度组有显著性差异($P<0.05$), 且与血清IGF-1、GH表达趋势相同, 与皮质醇含量及葡萄糖浓度的趋势相反; 而中、高密度组实验鱼的生长及*igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b*、*igf-1*和*igf-2*表达量均无显著差异。本研究表明,*igfbp-1*、*igfbp-2a*和*igfbp-2b*参与了不同养殖密度下黄条鲮生长的调控过程, 且与*igf-1*、*igf-2*对生长的表达调控存在正向协同效应。研究结果为阐释黄条鲮生长的分子机制以及工厂化条件下适宜养殖密度的调控提供了理论依据。

关键词 cDNA 克隆; *igfbp-1*; *igfbp-2*; 黄条鲮; 组织表达; 生长调控

中图分类号 S965.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0084-15

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)在脊椎动物的生长发育和代谢调节中起着重要作用, 主要包括IGFs (IGF-1、IGF-2和IGF-3)、细胞表面受体(IGF-1R和IGF-2R)和IGF结合蛋白(IGFBP)等关键因子。IGFBP是一个由6个成员组成的蛋白质

家族(IGFBP1~6) (Hwa *et al*, 1999; Duan *et al*, 2005), 对IGF有高度的亲和力。IGFBP通过与IGF及其受体之间的相互作用影响IGF的分布、稳定性、生物学活性以及在体循环中的流通、转运, 从而实现对脊椎动物生长的调控。目前, 在哺乳动物中已发现有6种

* 国家重点研发计划项目(2022YFD2401102)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室“十四五”重大项目(2022QNLM30001-1)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD47)、农业农村部财政专项-海洋渔业生物资源收集与保藏项目、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助。张文静, E-mail: 1024159439@qq.com

① 通信作者: 徐永江, 研究员, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-12-13, 收修改稿日期: 2023-02-13

类型的 *igfbp*, 每一种通常都有一个等位基因形式, 而在斑马鱼(*Danio rerio*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)等硬骨鱼中每个 *igfbp* 则有 2 个或 4 个亚型, 它们虽然在结构上高度同源, 但各有不同的结构功能和组织表达特性(Allard *et al*, 2018)。研究显示, 肝脏是硬骨鱼类 *igfbp* 主要的合成场所(钱焜等, 2014)。*igfbp-1* 被认为是硬骨鱼生长、繁殖和发育的重要调控因子(Wood *et al*, 2005a; Garcia de la Serrana *et al*, 2018), 如在大西洋鲑幼鱼中,*igfbp-1* 可以与皮质醇相互作用来调控生长(Breves *et al*, 2020)。在斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)体外孵育的原代肝细胞中,*igfbp-1* 可通过与胰岛素的互作进而实现对细胞代谢和生长的调控(Yang *et al*, 2019)。在硬骨鱼中,*igfbp-2* 具有广泛组织表达特性, 对 *igf* 的调控可能通过自分泌或者旁分泌的通路进行。如在斑马鱼中, 长期禁食诱导了肝脏中 *igfbp-2* 表达量增加(Duan *et al*, 1999)。另外,*igfbp-2* 会通过高亲和力来抑制 *igf* 配体的活性从而对斑马鱼生长过程起抑制调控作用(Wood *et al*, 2005b)。Chen 等(2014)在金鱼(*Carassius auratus*) *igfbp-2* 的克隆、分子表征及表达分析中发现, 禁食后金鱼肝脏中 *igfbp-2* 表达量显著上调, 并在饲养后迅速恢复到正常水平, 表明 *igfbp-2* 的表达可能与金鱼的合成和分解代谢有关, 且受到代谢因子的调控。

黄条鲷(*Seriola aureovittata*)是一种具有长距离洄游特性的暖温性大洋性经济鱼类, 分布于全球海洋中上层, 具有较高的经济价值和营养价值(徐永江等, 2019), 适宜在陆基工厂化循环水、深水网箱、围栏以及养殖工船等多种模式下养殖(崔爱君等, 2022)。黄条鲷体型大、生长速度快, 我们前期陆海接力养殖的研究表明, 鱼类的生长受到多种环境因素的影响, 如养殖密度、温度等(Ndandala *et al*, 2022; 倪嘉豪等, 2020), 同时受到内源性生长激素-胰岛素样生长因子(GH-IGFs)轴的调控。*igfbp-1* 和 *igfbp-2* 是硬骨鱼类生长轴的重要调控因子, 它们通过与 *igfs* 及其受体协同作用调控鱼类的生长发育和营养代谢, 但其在黄条鲷生长调控中的功能与作用目前尚未见报道。

本实验室前期已开展黄条鲷快速生长的调控机制相关研究, 克隆了 *gh*、*igf-1*、*igf-2*、*ghr* 等生长相关功能基因, 并揭示了其在早期生长发育中的分子调控功能(Wang *et al*, 2019、2020)。为进一步揭示生长轴在黄条鲷生长中的调控作用, 本研究克隆得到黄条鲷 *igfbp-1*、*igfbp-2a* 和 *igfbp-2b* 基因开放阅读框(ORF)区域, 解析其结构特征及表达特性, 并探究肝脏中 *igfbp-1*、*igfbp-2* 与生长轴关键因子 *igf-1*、*igf-2* 对不

同养殖密度下黄条鲷生长的调控作用, 为进一步阐释黄条鲷生长调控机制与开发养殖关键技术提供支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用黄条鲷取自大连富谷食品有限公司工厂化养殖车间, 在 6 个容积约 3 m³ 的圆形玻璃缸水槽中随机投放实验用鱼, 采用流水养殖的方式, 日换水率 400%以上。养殖水温保持在 22~27 °C, 盐度为 29~32, 溶解氧>6 mg/L。按鱼体重的 3%~5%投喂冰鲜玉筋鱼(*Ammodytes personatus*), 均饱食投喂。每天投喂后 1 h 清理养殖水槽, 保持底部清洁。实验开始之前, 将实验鱼在玻璃缸水槽中暂养适应 14 d。将筛选后体质健康的 1 龄鱼[平均体长为(33.12±0.83) cm, 平均体重为(565.83±70.22) g]重新随机分布, 并开始正式实验, 设置低密度组(10 尾/m³)、中密度组(20 尾/m³)和高密度组(30 尾/m³) 3 个实验组, 每个实验组设 2 个平行。实验鱼在不同养殖密度下 60 d 后取样。暂养结束时随机取雌雄鱼各 3 尾, 用 120 mg/L 的 MS222 麻醉处理, 在冰盘上快速取脑、垂体、鳃、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、头肾、胃、肌肉、性腺等组织于 1.5 mL 无酶灭菌离心管中, 置于液氮中保存, 后转入-80 °C 冰箱中保存, 用于 *igfbp-1*、*igfbp-2a* 和 *igfbp-2b* 基因克隆与组织分布分析。实验结束时, 每个密度组分别采集 6 条实验鱼的肝脏组织于 1.5 mL 无酶灭菌离心管中, 置于液氮中保存后转入-80 °C 中保存, 用于检测不同养殖密度下肝脏组织中 *igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b*、*igf-1* 和 *igf-2* 基因对黄条鲷生长的表达调控作用分析。

1.2 黄条鲷 *igfbp-1*、*igfbp-2* 基因克隆

提取肝脏组织总 RNA, 使用 RNAiso Plus 试剂盒(TaKaRa); 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 以 NanoDrop2000C 分光光度计(Thermo, 美国)测定 RNA 的质量。用 PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser (Perfect Real-Time)反转录试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA 第一链。

根据 GenBank 数据库中黄条鲷 *igfbp* 基因的预测序列设计引物(表 1), 按照表 2 中的 PCR 体系及程序扩增 *igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b* 3 个基因的 ORF 区。

PCR 扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳后, 将目的条带切胶、回收, 将胶回收产物用 pEASY-T1 Simple 载体(TransGene Biotech, 中国)、Trans1-T1

表1 基因克隆及定量表达分析用的引物序列

Tab.1 Primer sequences used for gene cloning and quantitative expression analysis

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	目的 Purpose
<i>igfbp-1</i>	F: ATGCTTCTGTATTTAAACATCCTGGTG R: TCAGTGTGTGACTTCTTGATGACACTC	ORF 扩增 ORF amplification
<i>igfbp-2a</i>	F: ATGATAATGACCAAAAACCTCATGCCTA R: CTATATCTGGGCCATGTCAGGGA	ORF 扩增 ORF amplification
<i>igfbp-2b</i>	F: ATGGTCATACATTTTACATACGGATGGC R: TCAGCGGGACGTTGATGCA	ORF 扩增 ORF amplification
<i>qigfbp-1</i>	F: TGAGAAGACATTTGTGGCAGGAGTG R: CGGGATGGCAGGACAGTTGTTC	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>qigfbp-2a</i>	F: GACACCGAGACGACCACTTTCAG R: ATCTCACTCACGCCCTGCTCAG	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>qigfbp-2b</i>	F: CACCAAGAGACCAGCCATAGATGC R: ACTCCGTCTGACAGGCACTCTG	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>qigf-1</i>	F: TTGTGTGTGGAGAGAGAGGCTTT R: GAAGCAGCATTCGTCACAATG	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>qigf-2</i>	F: GCAAAGATACGGACCACTCACT R: CGCAGGACTGGACGAAGACAT	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>arp</i>	F: TGCCATTGTCATACACTTGCTG R: GGGGAACCATTGAAATCTTGAG	内参基因 Reference gene

表2 黄条鲮 *igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b* PCR 体系及扩增程序Tab.2 PCR system and amplification procedure for *Seriola aureovittata igfbp-1*, *igfbp-2a* and *igfbp-2b*

基因 Gene	PCR 体系 PCR system	PCR 扩增条件 PCR amplification conditions
<i>igfbp-1</i>	25 μ L Premix <i>Taq</i> TM (TaKaRa <i>Taq</i> TM Version 2.0 plus dye)、正反引物各 1 μ L、cDNA 模板 2 μ L、ddH ₂ O 补充终体积为 50 μ L	95 $^{\circ}$ C 5 min, 38 个循环(95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s), 72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存
<i>igfbp-2a</i>	25 μ L Premix <i>Taq</i> TM 、正反引物各 1 μ L、cDNA 模板 2 μ L、ddH ₂ O 补充终体积为 50 μ L	95 $^{\circ}$ C 5 min, 38 个循环(95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1min), 72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。
<i>igfbp-2b</i>	0.5 μ L Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs)、正反引物各 2.5 μ L、10 μ L 5 \times Q5 reaction buffer、1 μ L 10 mmol/L dNTP、cDNA 模板 3 μ L、ddH ₂ O 补充终体积为 50 μ L	98 $^{\circ}$ C 30 s, 50 个循环(98 $^{\circ}$ C 10 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s), 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

Phage Resistant 感受态细胞(TransGene Biotech,中国)进行连接转化。之后挑取阳性克隆,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.3 序列分析

利用 BLAST 程序比对所得 cDNA 及其氨基酸序列;利用 DNAMAN 进行多序列比对及预测蛋白分子量和等电点;利用 SignalP 5.0 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)在线软件预测蛋白的信号肽;利用 NetPhos 3.1 Server 软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>)预测磷酸化位点;利用 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析预测结构域;利用 SWISS-MODEL 软件(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)预测蛋白 3D 结构,建立模型;

利用 MEGA 7 软件构建系统进化树。

1.4 基因表达特性分析

检测了 *igfbp-1*、*igfbp-2a* 和 *igfbp-2b* 基因的组织表达特性,以及工厂化不同养殖密度下实验鱼肝脏中 *igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b*、*igf-1* 和 *igf-2* 基因 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

基因定量检测使用 SYBR Premix Ex *Taq*TM(TaKaRa)试剂盒,定量 PCR 体系为 10 μ L: cDNA 模板 1 μ L, TB Green Premix Ex *Taq*TM II (TaKaRa) 5 μ L,上下游引物各 0.4 μ L, 灭菌水 3.2 μ L。运用 LightCycler480 荧光定量 PCR 仪(美国)进行 qRT-PCR。采用两步法反应,PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,共 40 个循环。每个样品设 3 个重复,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。黄条鲮 *arp* 基因作为内参(表 1)。

1.5 统计分析

数据表示为平均值±标准误(Mean±SE), 用 SPSS 26.0 软件对基因在不同组织间、不同性别间的表达水平差异进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 运用 Duncan 多重比较进行显著性检验。采用 Pearson 法进行基因表达量与不同养殖密度下生长的相关性分析。以 $P < 0.05$ 作为差异显著性标准。

2 结果

2.1 黄条鲮 *igfbp-1* 和 *igfbp-2* 的基因结构特征

黄条鲮 *igfbp-1* 基因 ORF 长度为 741 bp, 共编码 246 个氨基酸, 其编码蛋白预测分子量为 26.558 kDa, 等电点为 6.55; 预测信号肽为 23 个氨基酸, 整个编码序列包含 18 个半胱氨酸残基, 聚集在 N 末端和 C 末端结构域(图 1)。

igfbp-2a 基因 ORF 长度为 882 bp, 编码 293 个氨基酸, 预测信号肽为 33 个氨基酸, 其编码的蛋白预测分子量为 32.850 kDa, 等电点为 7.42, 成熟蛋白在其 N 末端和 C 末端含有 18 个半胱氨酸残基(图 2)。

igfbp-2b 基因 ORF 长度为 810 bp, 编码 269 个氨基酸, 预测信号肽为 23 个氨基酸, 其编码的蛋白预测分子量为 29.774 kDa, 等电点为 7.19, 成熟蛋白在其 N 末端和 C 末端含有 18 个半胱氨酸残基(图 3)。

3 个基因编码的蛋白 3D 空间结构如图 4 所示: IGFBP 空间结构 N 末端均存在胰岛素样生长因子结合蛋白同源物(IB)保守结构域, C 末端均含有甲状腺球蛋白 I 型重复(Ty-1)保守结构域, 且均具有蛋白激酶 A 和 C、酪蛋白激酶和细胞周期素依赖蛋白激酶 5 磷酸化位点。IGFBP-1 的 N 端结构域位于 32~109, C 端结构域位于 165~240, 该域具有 3 个二硫键, 分别位于 165~195、206~217、219~240; 具有 DNA 依赖性蛋白激酶磷酸化位点; α -螺旋占 26.83%, 延伸链占 7.72%。IGFBP-2A 的 N 端结构域位于 37~114, C 端结构域位于 197~276, 该域中, 3 个二硫键分别位于 197~231、242~253、255~276, 还存在一个 N-糖基化位点位于 275, 以及 P38 蛋白激酶、DNA 依赖性蛋白激酶、丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶、细胞分裂周期激酶 2、蛋白激酶 G 磷酸化位点; α -螺旋占 29.69%, 延伸链占 6.83%。IGFBP-2B 的 N 端结构域位于 26~102, C 端结构域位于 173~252, 该域中, 3 个二硫键分别位于 173~207、218~229、231~252, 还存在糖原合成酶激酶-3 磷酸化位点; α -螺旋占 25.65%, 延伸链占 9.67%。

```

1 ATGCCATGATTATATGAGAAGACATTGTGGCAGGAGTGGCTCTGGCTGTCTAGTCATG
1 M P G L Y E K T F V A G V A L A V L V M
                                     signal peptide
61 GTGAGATCCTCCCCAGTGGTGGGACCGGAGCAATCCGCTGTGCCCCCTGCACGCAGGAG
21 V R S S P V V G P E P I R C A P C T Q E
                                     IB domain
121 AAACAGAACAACGTCTGCCATCCCGGCAGACTGCAAGCAGGTGCTGAGGGAGCCTGGC
41 K Q N N C P A I P A E C K Q V L R E P G
181 TGGCGTGTGCATGGCTGGCTGGACAAAGGTGCATCCTGTGGAGTTCACACAGCC
61 C G C C M A C A L D K G A S C G V H T A
241 CACTGTGGTGGGGTCTCCGCTGCACTGCCAGGCCGGGTGAGGCCAGACCTCTCCATGCT
81 H C G E G L R C T A R P G E A R P L H A
301 CTGACCAGGGGCAAGGGTCTGCACTGAAGACTTGGGCAAGAGAACTGAAGGACTC
101 L T R G Q G V C T E D L G Q E E T E G L
361 CCTGACCACGGCTCCCTGCACTACCTGTTGGGCTCAACCTTCCCTTTGACCACCATGAC
121 P D H G S L H Y L L G L N L P F D H H D
421 ACTGCTGAGGGCAAGAGAGCATCAAGGCCAAGGTCAACGCTATCCGCAACAACTGGAA
141 T A E G Q E S I K A K V N A I R N K L E
481 CAACAGGACCCCTGTACATTGAAGTGCACAACGCACTGGACATGATAGCCAGCTCTCAG
161 Q Q G P C H I E L H N A L D M I A S S Q
                                     Thyroglobulin_1 domain
541 CAGAACTAGGAGAGAAGTTCACAACCTTCTACCTCCCAACTGTGACAAGTACGGCTTC
181 Q K L G E K F T T F Y L P N C D K Y G F
601 TAGAAGCCCAAGCAGTGTGAGTCTCTCTGGTGGGCGCCGCTCGCTGGTGGTGTG
201 Y K P K Q C E S S L V G P P A R C W C V
661 TCTCCCTGGAATGGGAAGAAGATCCCAGGATCGAGGACCTGCTGGGTGATTGAGTGT
221 S P W N G K K I P G S S D L L G D S E C
721 CATCAAGAAGTACACACTGA
241 H Q E V T H *
    
```

图 1 黄条鲮 *igfbp-1* 基因 ORF 序列和推导的氨基酸序列
Fig.1 ORF sequence and the deduced amino acid sequence of *igfbp-1* gene from *Seriola aureovittata*

ORF 区用大写字母表示。起始密码子加框。信号肽加下划线。下划线和加粗的氨基酸序列表示保守结构域(IB 结构域和 Ty_1 结构域)。灰色阴影表示半胱氨酸残基;

*表示终止密码子。下同。

The ORF domain is indicated by capital letters. The start codon is boxed. The signal peptide is underlined. The underlined and bold amino acid sequence represent the conserved domains (IB domain and Ty_1 domain). The gray shadow shows cysteine residues. The stop codon is indicated by an asterisk. The same as below.

2.2 氨基酸序列同源性与系统进化分析

同源性分析表明, 黄条鲮 IGFBP-1 氨基酸序列与五条鲮(*Seriola quinqueradiata*)、斜带石斑鱼、黄金鲮(*Perca flavescens*)的 IGFBP-1 同源性分别为 98.37%、84.08%、83.20%, 与哺乳动物的 IGFBP-1 同源性为 41%~46% (图 5)。IGFBP-2A 与高体鲮(*Seriola dumerili*)、河鲈(*Perca fluviatilis*)、鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)的同源性分别为 100%、95.90%、96.59%、93.01%, 与高等脊椎动物的同源性为 50%~51%。*igfbp-2b* 氨基酸序列与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、斑马鱼、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的同源性分别为

```

1 ATGATATGACCAAAAAACCTCATGCCTATAACGATGCTGCTGCTACGTGGGCTGCAGCTTG
1 M I M T K N L M P I T M L S Y V G C S L
   signal peptide
61 CTGATCCTCTCCGCGTCTTTCGCGGGCGCTCCCTGGCCGAGATGGTGTTCGCGTCCCG
21 L I L S A S F A G A S L A E M V F R C P
   IB domain
121 GGCTGCACCCGGGAGCGCCAGGCGTGTGCCAAAAGCTCACCGAGACTTGC CGGAGATA
41 G C T A E R Q A L C P K L T E T C A E I
181 GTGCGGAACCGGGCTCGGGTGTGCCCCGTGTGCGCCGCAAGAGGGCGAGATGTGC
61 V R E P G C G C C P V C A R Q E G E M C
241 GGCGTGTACACCCGAGGTGTCCACCGTCTCCGATGCTACCCACCGCGATTCCGAG
81 G V Y T P R C S T G L R C Y P T P D S E
301 CTTCCCTGGAGCAACTGGTGCAGGGCCAGGGGCGTGC CGGCAAAAGTGGACACCGAG
101 L P L E Q L V Q G Q G Q C R R K V D T E
361 ACGACCACTTTCAGCCAGGAGCAGCGGGAGCAACACAGCGGTGAGGCGTGGAGCGCTG
121 T T T F S Q E H R E Q T S G E A V E P L
421 CCTGAGCAGGGGTGAGTGCAGGCGTCCGGAAGCCAGTAAAGAGACCCCTGG
141 P E Q G V S E I P A V R K P S K E T P W
481 CTGGGACCAAGAGAGCGCAGTGC CGCAGCATAGACAGGAGATGAAGACCAAGATGAG
161 L G P K E S A V R Q H R Q E M K T K M K
541 ACCAACAAAGTGAAGAGGTCAAACCTACTCGGCCAAGCAGACTCAGTGTGACGAGGAG
181 T N K V E E V K P T R P K Q T Q C Q Q E
601 CTTGACCAAGTCTGGAGCGGATATCAAGATGCCCTTCAGAGATAACCGAGGTCCCTG
201 L D Q V L E R I S K M P F R D N R G P L
   Thyroglobulin_1 domain
661 GAAGACCTGTATGCCCTGCACATCCCAACTGTGACAAGGGGGCAGTATAACCTCAA
721 E D L Y A L H I P N C D K R G Q Y N L K
771 CAGTGAAGATGTCTTCCACGGCCAGAGGGGCGAGTGCCTGGTGCCTCAACCTCACACC
241 Q C K M S L H G Q R G E C W C V N P H T
781 GGCGGACTATCCCATCAGCCCAACCGTGAAGGGGCGACCCCAACTGCAGCAGTACCTC
261 G R P I P S A P T V R G D P N C S Q Y L
841 AGAGAGCTGGAGCTCCCTGCATGACATGCCCCAGATATAG
881 R E L E L E L P D M A Q I *

```

图2 黄条鲷 *igfbp-2a* 基因 ORF 序列和推导的氨基酸序列
Fig.2 ORF sequence and the deduced amino acid sequence of *igfbp-2a* gene from *Seriola aureovittata*

```

1 ATGTCATACATTTTACATACGGATGGCTGTTTGCATACATGCTTTGCCITGGAATCTTA
1 M V I H F T Y G W L F A Y I A L P G I L
   signal peptide
61 CTCGGGATTTAGCTTTCGATGCCAAGTTGCACCGGGCGGTTAGCTGCGTGC
21 L G D L A F R C P S C T A A R L A A C P
   IB domain
121 AAAGTCAACACAGTATGTCAGAGATCGTGAGAGGCCAGGCTGTGGTGTGCTCAATG
41 K V T T V C A E I V R E P G C G C P M
181 TGTGCCAGGCTGGAGGGGAGCTTTCGCGGTCTACACGCGAGTGTGCTCCACTGGCCTG
61 C A R L E G E L C G V Y T P R C S T G L
241 AGATGCTACCCGAGCGCAGAGGCTGAGTACCTTGCACAGCTCATCCAGGGTTTGGT
81 R C Y P S A E A E L P L Q Q L I Q G L G
301 CGATGTGGCCAAAAGTGGAAATAGATTGCACAAGTTTGGACCAACCGCAACAAATGAG
101 R C G Q K V E I D S T S L D H Q A T N E
361 GTGCATGGGACTGAGAATCCACTACCAAGAGACCAGCCATAGATGCTGCGTATGGCAG
121 V H G T E N P L T K R P A I D A A L W Q
421 GAGTCGGCCAGGCAGCACTTGAACGAGCGCAAAACCAAGATGAAGACAAATCAACT
141 E S A R Q Q Y L N E R K T K M K T N Q L
481 GAGGACCCCGAACCCGAAAGCTCCTCAGAGTGCCTGTCAGACGGAGTTGGACAAGTGC
161 E D P R T P K A P Q S A C Q T E L D K V
   Thyroglobulin_1 domain
541 TTAGAGGAGATCCAAAATGACCTCTGAGGATAACAGAGGCCCGCTGGAGAACCTGTAT
181 L E E I S K M T S E D N R G P L E N L Y
601 GGCCTCAAATTTCCAAACTGTGACAGACATGGATTGTACAACCTCAAACAGTGAACATG
201 G L K F P N C D R H G L Y N L K Q C N M
661 TCCACCCAGCCAGAGGGGCGAGTGTGGTTCGCTTAACCCCTTAACCTGGATCCAGATA
221 S T H G Q R G E C W C V N P L T G I Q I
721 CCGGCGACACATAAGTCAGAGGGATCCCAACTGTAAACCAGTTTCAAGAGGAGCTCAGG
241 P A T P K V R G D P N C N Q F Q E E L R
781 GCAATGCCACTGCATCAACCTCCCGCTGA
861 A M P T A S T S R *

```

图3 黄条鲷 *igfbp-2b* 基因 ORF 序列和推导的氨基酸序列
Fig.3 ORF sequence and the deduced amino acid sequence of *igfbp-2b* gene from *Seriola aureovittata*

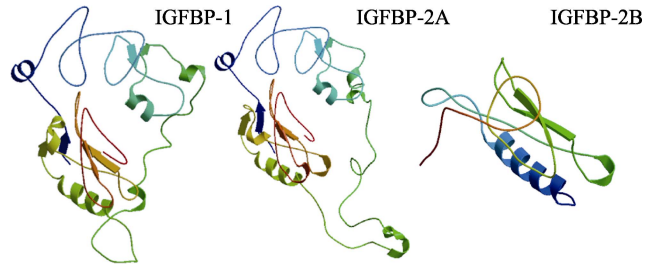


图4 黄条鲷 IGFBP-1、IGFBP-2A、IGFBP-2B 蛋白结构
Fig.4 3D structure of *Seriola aureovittata* IGFBP-1, IGFBP-2A, and IGFBP-2B

84.39%、60.08%、56.93%，与高等脊椎动物的同源性为45%~47%。黄条鲷 IGFBP-2A 和 IGFBP-2B 的氨基酸序列同源性为55.22% (图6)。

系统进化分析表明，黄条鲷 IGFBP-1 与五条鲷 IGFBP-1 聚为一个小的分支，又与黄金鲈和斜带石斑鱼等鲷形目鱼类聚为一个大的分支，哺乳动物的 IGFBP-1 单独为一分支。IGFBP-2A 与高体鲷 IGFBP-2 聚为一个小的分支，与河鲈和鞍带石斑鱼等鲷形目鱼类 IGFBP-2A 聚为一支，又与大菱鲆 IGFBP-2A、牙鲆 IGFBP-2A 鲷形目鱼类聚为大的一支。而 IGFBP-2B 与牙鲆 IGFBP-2B 等鲷形目鱼类聚为一小支，然后与斑马鱼 IGFBP-2B 鲤形目鱼类聚为一支，哺乳动物 IGFBP-2 聚为一支，表明黄条鲷 IGFBP-2B 在系统进化上的保守性较低(图7)。

2.3 组织分布

黄条鲷 *igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b* 基因在所检测组织中均有分布(图8)。*igfbp-1* 在雌雄鱼肝脏中均表达量最高($P < 0.05$)，在性腺中也有高表达，且雄鱼表达量高于雌鱼($P < 0.05$)，其他组织间的表达量极低且无显著差异。*igfbp-2a* 在雌雄鱼在肝脏中均表达量最高($P < 0.05$)，其次为性腺($P < 0.05$)，在其他组织中表达量相对较低，雌鱼肝脏中的表达量高于雄鱼的表达量($P < 0.05$)。*igfbp-2b* 在雌雄鱼肝脏中均表达量最高($P < 0.05$)，在其他组织中表达量较低且无显著性差异，雄鱼肝脏中的表达量高于雌鱼($P < 0.05$)。

2.4 肝脏 *igfbp* 对不同养殖密度下生长的表达调控

本实验室前期研究已表明，在不同工厂化养殖密度条件下，黄条鲷的生长性能出现明显差异：低密度组实验鱼终末体质量和肥满度显著高于高密度组($P < 0.05$)，增重率和特定生长率显著高于中、高密度组($P < 0.05$)，而中、高密度组实验鱼生长差异不显著(姜燕等, 2022)。

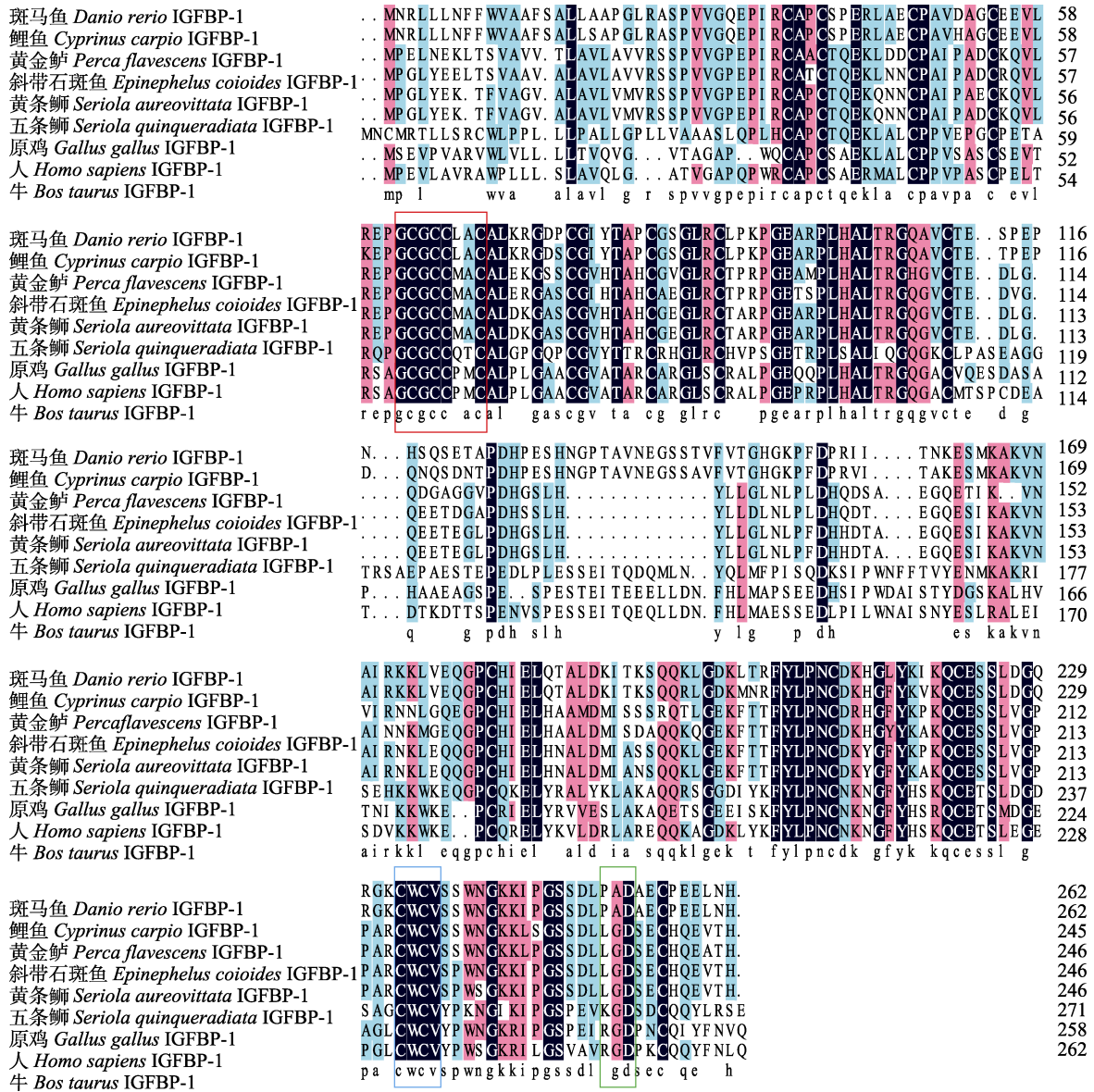
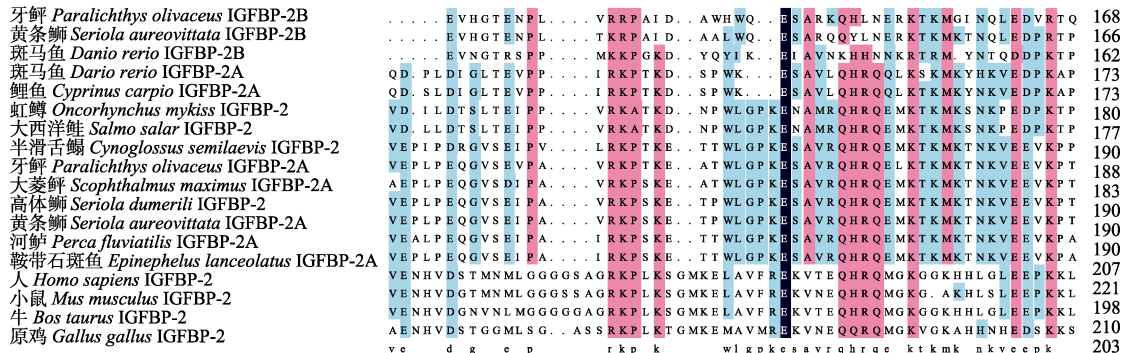


图 5 黄条鲷 IGFBP-1 与其他物种氨基酸序列比对

Fig.5 Amino acid sequence alignment of *Seriola aureovittata* IGFBP-1 with other species

红色框表示(GCGCCXXC)结构域, 蓝色框表示(CWCV)结构, 绿色框表示 RGD 结构。下同。

The red box represents the (GCGCCXXC) structure, the blue box the (CWCV) structure, and the green box the RGD structure. The same as below.



牙鲆 *Paralichthys olivaceus* IGFBP-2B
 黄条鲷 *Seriola aureovittata* IGFBP-2B
 斑马鱼 *Danio rerio* IGFBP-2A
 斑马鱼 *Dario rerio* IGFBP-2A
 鲤鱼 *Cyprinus carpio* IGFBP-2A
 虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* IGFBP-2
 大西洋鲑 *Salmo salar* IGFBP-2
 半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis* IGFBP-2
 牙鲆 *Paralichthys olivaceus* IGFBP-2A
 大菱鲆 *Scophthalmus maximus* IGFBP-2A
 高体鲷 *Seriola dumerili* IGFBP-2
 黄条鲷 *Seriola aureovittata* IGFBP-2A
 河鲈 *Perca fluviatilis* IGFBP-2A
 鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus* IGFBP-2A
 人 *Homo sapiens* IGFBP-2
 小鼠 *Mus musculus* IGFBP-2
 牛 *Bos taurus* IGFBP-2
 原鸡 *Gallus gallus* IGFBP-2

牙鲆 *Paralichthys olivaceus* IGFBP-2B
 黄条鲷 *Seriola aureovittata* IGFBP-2B
 斑马鱼 *Danio rerio* IGFBP-2A
 斑马鱼 *Dario rerio* IGFBP-2A
 鲤鱼 *Cyprinus carpio* IGFBP-2A
 虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* IGFBP-2
 大西洋鲑 *Salmo salar* IGFBP-2
 半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis* IGFBP-2
 牙鲆 *Paralichthys olivaceus* IGFBP-2A
 大菱鲆 *Scophthalmus maximus* IGFBP-2A
 高体鲷 *Seriola dumerili* IGFBP-2
 黄条鲷 *Seriola aureovittata* IGFBP-2A
 河鲈 *Perca fluviatilis* IGFBP-2A
 鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus* IGFBP-2A
 人 *Homo sapiens* IGFBP-2
 小鼠 *Mus musculus* IGFBP-2
 牛 *Bos taurus* IGFBP-2
 原鸡 *Gallus gallus* IGFBP-2

牙鲆 *Paralichthys olivaceus* IGFBP-2B
 黄条鲷 *Seriola aureovittata* IGFBP-2B
 斑马鱼 *Danio rerio* IGFBP-2A
 斑马鱼 *Dario rerio* IGFBP-2A
 鲤鱼 *Cyprinus carpio* IGFBP-2A
 虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* IGFBP-2
 大西洋鲑 *Salmo salar* IGFBP-2
 半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis* IGFBP-2
 牙鲆 *Paralichthys olivaceus* igfbp-2a
 大菱鲆 *Scophthalmus maximus* IGFBP-2A
 高体鲷 *Seriola dumerili* IGFBP-2
 黄条鲷 *Seriola aureovittata* IGFBP-2A
 河鲈 *Perca fluviatilis* IGFBP-2A
 鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus* IGFBP-2A
 人 *Homo sapiens* IGFBP-2
 小鼠 *Mus musculus* IGFBP-2
 牛 *Bos taurus* IGFBP-2
 原鸡 *Gallus gallus* IGFBP-2

牙鲆 *Paralichthys olivaceus* IGFBP-2B
 黄条鲷 *Seriola aureovittata* IGFBP-2B
 斑马鱼 *Danio rerio* IGFBP-2A
 斑马鱼 *Dario rerio* IGFBP-2A
 鲤鱼 *Cyprinus carpio* IGFBP-2A
 虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* IGFBP-2
 大西洋鲑 *Salmo salar* IGFBP-2
 半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis* IGFBP-2
 牙鲆 *Paralichthys olivaceus* IGFBP-2A
 大菱鲆 *Scophthalmus maximus* IGFBP-2A
 高体鲷 *Seriola dumerili* IGFBP-2
 黄条鲷 *Seriola aureovittata* IGFBP-2A
 河鲈 *Perca fluviatilis* IGFBP-2A
 鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus* IGFBP-2A
 人 *Homo sapiens* IGFBP-2
 小鼠 *Mus musculus* IGFBP-2
 牛 *Bos taurus* IGFBP-2
 原鸡 *Gallus gallus* IGFBP-2

牙鲆 *Paralichthys olivaceus* IGFBP-2B
 黄条鲷 *Seriola aureovittata* IGFBP-2B
 斑马鱼 *Danio rerio* IGFBP-2B
 斑马鱼 *Dario rerio* IGFBP-2A
 鲤鱼 *Cyprinus carpio* IGFBP-2A
 虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* IGFBP-2
 大西洋鲑 *Salmo salar* IGFBP-2
 半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis* IGFBP-2
 牙鲆 *Paralichthys olivaceus* IGFBP-2A
 大菱鲆 *Scophthalmus maximus* IGFBP-2A
 高体鲷 *Seriola dumerili* IGFBP-2
 黄条鲷 *Seriola aureovittata* IGFBP-2A
 河鲈 *Perca fluviatilis* IGFBP-2A
 鞍带石斑鱼 *Epinephelus lanceolatus* IGFBP-2A
 人 *Homo sapiens* IGFBP-2
 小鼠 *Mus musculus* IGFBP-2
 牛 *Bos taurus* IGFBP-2
 原鸡 *Gallus gallus* IGFBP-2

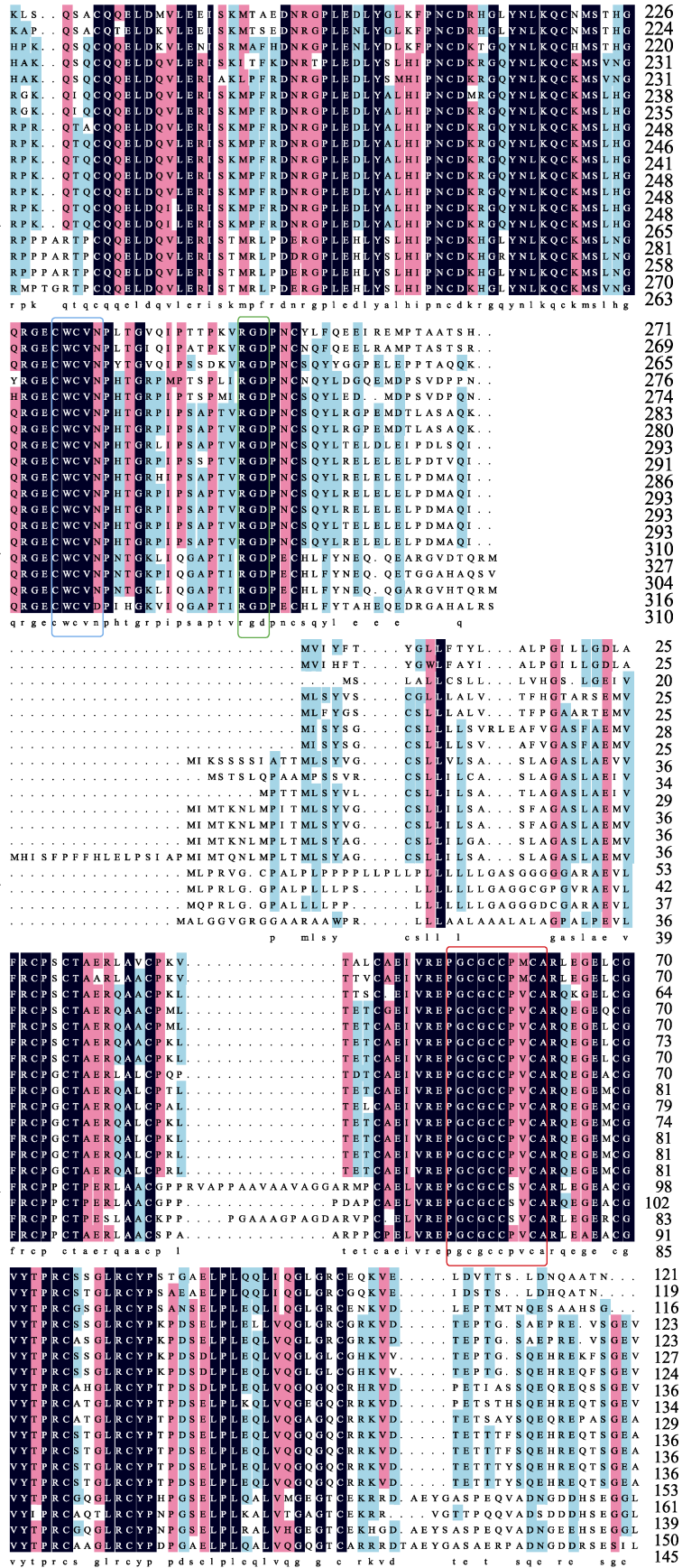


图6 黄条鲷 IGFBP-2 与其他物种氨基酸序列比对

Fig.6 Amino acid sequence alignment of *Seriola aureovittata* IGFBP-2 with other species

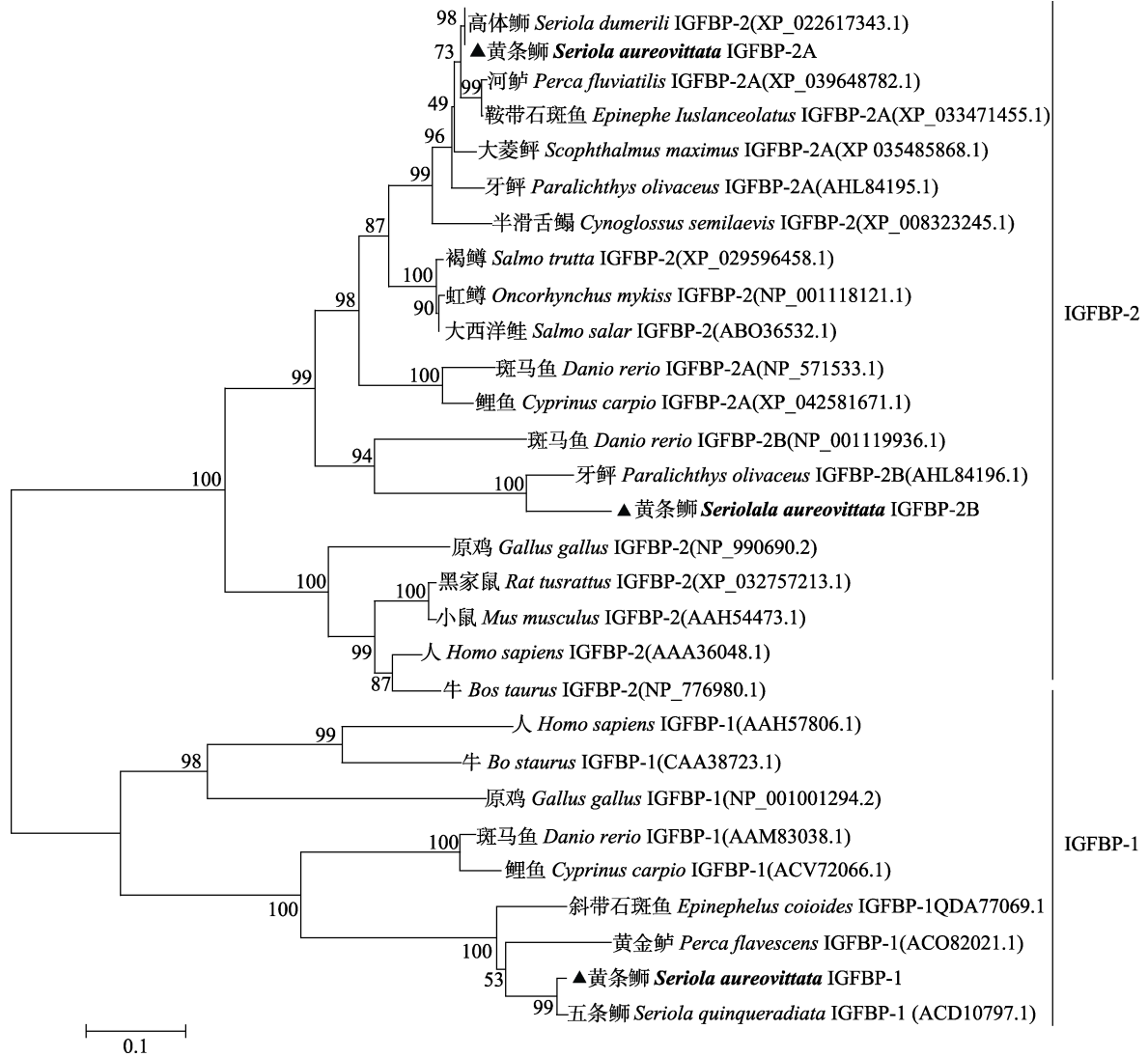


图 7 黄条鲷 IGFBP-1 和 IGFBP-2 氨基酸序列的系统进化树
Fig.7 Phylogenetic tree of *Seriola aureovittata* IGFBP-1 and IGFBP-2 amino acid sequences

检测了不同养殖密度组黄条鲷肝脏中 *igfbp-1*、*-2a*、*-2b* 以及 *igf-1* 和 *igf-2* 基因表达水平变化(图 9): 随着密度的增加, *igfbp-1*、*-2a*、*-2b* 的表达量呈现下降趋势, 低密度组表达量最高($P < 0.05$), 中、高密度组表达量低且无显著性差异; *igf-1* 和 *igf-2* 也呈现低密度组表达量最高的表达特性($P < 0.05$) (图 9)。相关性分析表明, 各基因表达水平均与低密度组实验鱼生长呈现显著正相关(*igfbp-1* $r = 0.836$, $P < 0.05$; *igfbp-2a* $r = 0.443$, $P < 0.05$; *igfbp-2b* $r = 0.549$, $P < 0.05$; *igf-1* $r = 0.500$, $P < 0.05$; *igf-2* $r = 0.925$, $P < 0.05$), 但与中、高密度组实验鱼生长无显著相关关系。

3 讨论

3.1 黄条鲷 *igfbp-1*、*igfbp-2* 基因结构与系统进化分析

本研究首次获得了黄条鲷 *igfbp-1*、*igfbp-2a* 和

igfbp-2b 基因的 ORF 序列。结果显示, 与其他硬骨鱼类基本一致, *igfbp-1* 和 *igfbp-2* 中均存在 N 末端结构域中 12 个半胱氨酸残基和 C 末端结构域中 6 个半胱氨酸残基, 这些半胱氨酸残基参与内部二硫键的形成以及帮助形成 N 末端和 C 末端结构域的球状结构, 且在进化上较为保守(Hwa *et al*, 1999; Zhou *et al*, 2008)。已有研究发现, 半胱氨酸残基参与了草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) *igfbp-2* 空间结构的形成(Yang *et al*, 2020)。序列比对结果显示, 在 N 末端结构域中, 黄条鲷 3 个 *igfbp* 之间也存在一个共同的保守的基序(GCGCCXXC), 五条鲷中也存在类似情况(Pedroso *et al*, 2009), 此基序在与 *igf* 的相互作用中起着重要作用(Kamangar *et al*, 2006)。不同物种中 *igfbp* 的 N 末端和 C 末端具有高度的保守性。中间可变结构域保守性较低, 翻译后修饰, 如糖基化位点和磷酸

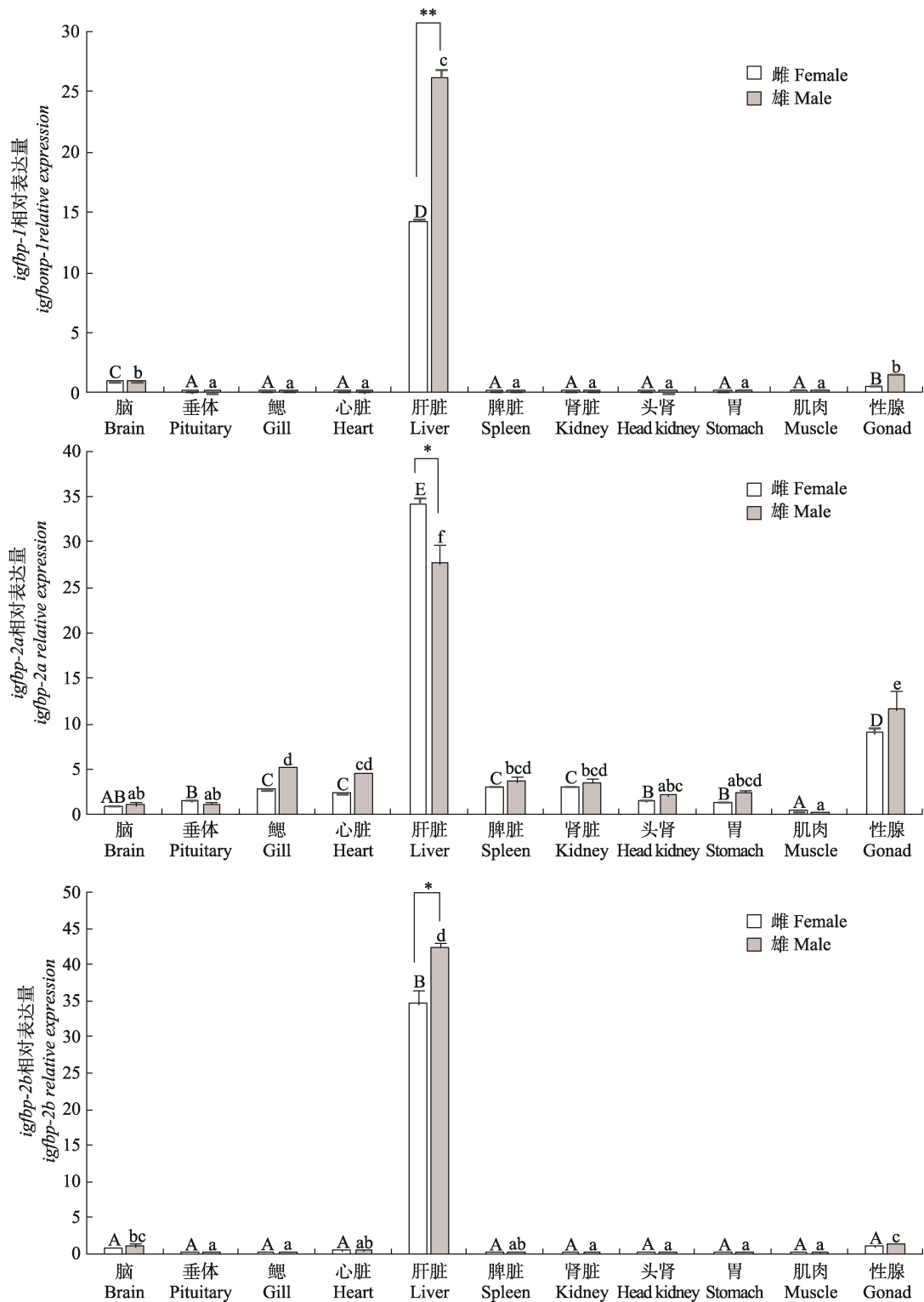


图8 黄条鲷 *igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b* 基因在不同组织中的相对表达量

Fig.8 Relative expression levels of *igfbp-1*, *igfbp-2a*, and *igfbp-2b* in different tissues of *Seriola aureovittata*

不同大写字母表示雌鱼不同组织之间差异显著($P < 0.05$); 不同小写字母表示雄鱼不同组织之间差异显著($P < 0.05$)。

*表示雌鱼和雄鱼在同一组织内存在显著差异($P < 0.05$), **代表有极显著差异($P < 0.01$)。

Different capital letters indicate significant differences between different tissues of female ($P < 0.05$), and different small letters indicate significant differences between different tissues of male ($P < 0.05$). * indicates significant difference within the same tissue between female and male fish ($P < 0.05$), and ** indicates highly significant difference within the same tissue between female and male fish ($P < 0.01$).

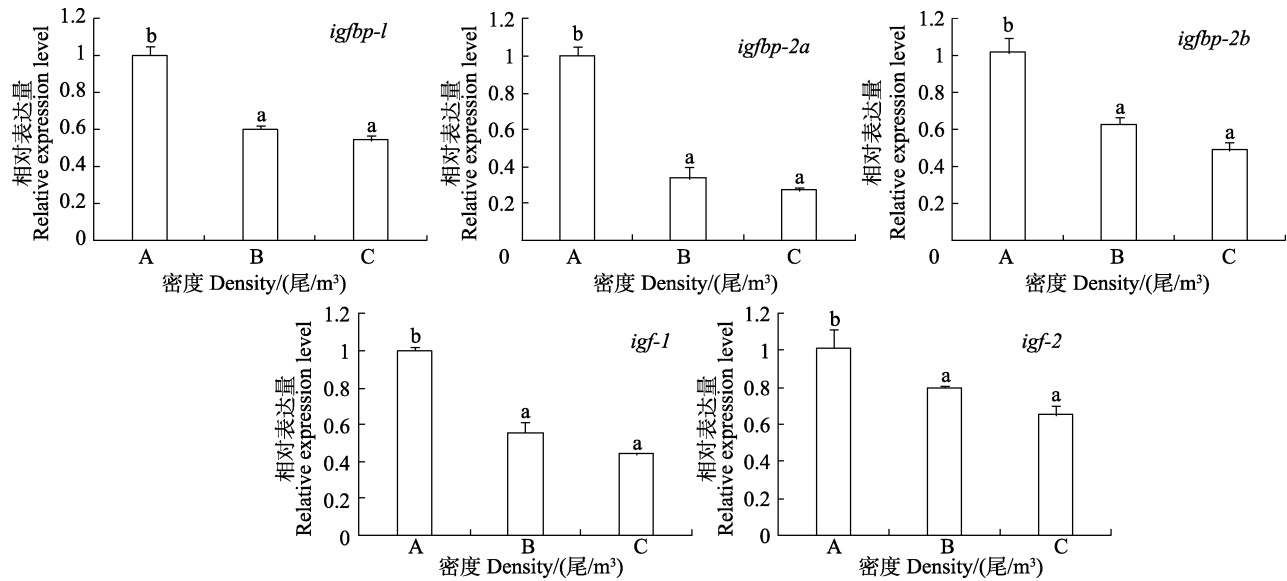


图 9 不同养殖密度下黄条鲷肝脏 *igfbp-1*、*igfbp-2a*、*igfbp-2b*、*igf-1* 和 *igf-2* 基因的表达特性
Fig.9 Expression characteristics of liver *igfbp-1*, *igfbp-2a*, *igfbp-2b*, *igf-1*, and *igf-2* of *Seriola aureovittata* under different stocking densities

A、B、C 分别代表低、中、高密度组。

A, B, and C stand for low, medium, and high density culture group, respectively.

化位点,通常在这个中间区域发现(Zhou *et al*, 2008)。黄条鲷 *igfbp-1* 和 *igfbp-2* 的 C 末端结构域高度保守,其中包含一个保守的 CWCV 结构,此结构被称为甲状腺球蛋白 I 型重复结构域(钱焜等, 2014),可能在 *igfbp* 和 *igf* 与细胞外基质的结合中起重要作用(Bach, 2018)。先前研究表明,所有哺乳动物 *igfbp-1* 和 *igfbp-2* 的 C 末端都含有 RGD 结构(Rodgers *et al*, 2008),人类 *igfbp-1* 可以通过 RGD 结构与 $\alpha 5\beta 1$ 整合素结合来刺激细胞迁移(Feng *et al*, 2015),但在黄条鲷与其他硬骨鱼的 *igfbp-1* 中,其 C 末端区域缺失 RGD 结构,取而代之的结构为 LGD。斑马鱼(Maures *et al*, 2002)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)(钱焜等, 2014)、大菱鲆(胡健等, 2012) *igfbp-1* 中也均未发现 RGD 结构。而哺乳动物、鸟类和其他已知硬骨鱼 *igfbp-2* 中的 RGD 结构在黄条鲷 *igfbp-2* 中有发现,花鲈、大菱鲆 *igfbp-2* 中也是如此,表明 *igfbp-1* 在鱼类与硬骨鱼类中发挥生理功能的机制存在差异。

本研究从黄条鲷肝脏中克隆出 2 种类型的 *igfbp-2*, 分别为 *igfbp-2a*、*igfbp-2b*。黄条鲷 *igfbp-2a* 和 *igfbp-2b* 基因位于不同分支。*igfbp-2a* 与高体鲷关系最近,和斑马鱼 *igfbp-2a* 聚为一支;而 *igfbp-2b* 与牙鲆关系最近,和斑马鱼 *igfbp-2b* 聚为一支。系统进化分析结果表明黄条鲷 *igfbp-2a* 和 *igfbp-2b* 基因起源于同一祖先基因,经历了鱼类基因组的复制,是人类等其他哺乳动物 *igfbp-2* 的同源基因。在虹鳟体内也

发现了 2 种同源的 *igfbp-2* (钱焜等, 2014), 其中一种还被误命名为 *igfbp-3* (Maures *et al*, 2002), 原因是其结构与其他 *igfbp* 结构相似度很低。本研究也发现,黄条鲷 *igfbp-2b* 在结构上保守性较差,系统进化分析也表明其与鲽形目(Pleuronectiformes)、鲤形目(Cypriniformes)聚为一支,表明其在系统进化上保守性不高。在斑马鱼及其他鱼中也发现, *igfbp-2* 存在类似同源性且具有不同功能,可能是由基因组复制引起并在进化过程中发生了生理功能的改变(Allard *et al*, 2018)。本研究虽未对其功能进行研究,但发现在黄条鲷生长调控中与 *igfbp-2a* 表达量一致,表明虽结构不保守,但功能是保守的。

3.2 组织分布特征

已有研究表明,肝脏是硬骨鱼 *igfbp-1* 合成的主要场所(Pedroso *et al*, 2009)。本研究在黄条鲷中检测到 *igfbp-1* mRNA 在肝脏中表达量最高,在脑和性腺中也有显著表达,但其他组织中 *igfbp-1* mRNA 表达量极低;组织分布特征与五条鲷(Pedroso *et al*, 2009)、牙鲆(翟万营等, 2012)类似。但也有研究表明,陶洋等(2011)在草鱼成鱼的脾、肌、眼、鳃、胰脏、肠、脑和性腺中均未检测到 *igfbp-1* mRNA 的表达。以上结果表明,不同鱼类 *igfbp-1* mRNA 主要在肝脏中表达,在除肝脏以外的组织中表达分布差异较大,这可能取决于物种的特异性。

Zhou(2008)等对斑马鱼研究发现,斑马鱼基因组包含2个 *igfbp-2*, *igfbp-2a* 和 *igfbp-2b* 的蛋白具有类似的生物活性,但这2个基因却表现出不同的时空表达模式。本研究黄条鲮 *igfbp-2* mRNA 在肝脏组织中显著高表达,与鲤鱼(*Cyprinus carpio*) (Chen *et al*, 2009)、斜带石斑鱼(Chen *et al*, 2010)、五条鲮(Pedroso *et al*, 2009)的研究结果一致。*igfbp-2a* mRNA 表达量最丰富的组织是肝脏,性腺次之,在鳃、心脏、肾脏、头肾中也有较高表达但无显著差异。*igfbp-2b* mRNA 也是在肝脏组织表达量最高,其余组织中均有分布,但表达量极低且无显著差异。这些结果表明,除了在结构和系统进化上有差别外,黄条鲮*igfbp-2*的2种等位基因在生理功能上可能也不同,其功能的差异特性及可能的作用通路有待于今后进一步验证。另外,本研究还发现,黄条鲮 *igfbp-2a* mRNA 在性腺中也有明显高表达,可能说明其除了调控生长之外,还有更广泛的生物功能,这在其他鱼中也有发现,如在鲤鱼(Chen *et al*, 2009)和虹鳟(钱焜等, 2014)性腺中也检测到有表达,表明 *igfbp-2* 对于鱼类性腺发育也可能具有重要的调控作用(Chen *et al*, 2010),但 *igfbp-2* 对黄条鲮性腺发育是否具有生理调控作用尚需进一步确认。

本研究还发现,雌雄鱼相同组织中同一基因的表达量之间也存在差异,比如雄鱼肝脏中基因的表达量 *igfbp-1* 和 *igfbp-2b* 显著高于雌鱼,而雌鱼肝脏 *igfbp-2a* 表达量则显著高于雄鱼。这种性别之间基因的组织差异性表达,说明 *igfbp* 发挥生理功能时可能具有性别二态性,同黄条鲮 *hsp70* 的基因表达模式相似(方璐等, 2023),但这种雌雄差异的特性具体是由什么决定以及可能的信号通路尚不清楚,值得今后深入研究。

3.3 IGFBPs 对黄条鲮生长的表达调控作用

越来越多的研究证实,IGFBP 通过生长轴(GH/IGF-I axis)对鱼类生长代谢起着重要的生理调控作用(Reinecke, 2010)。胡健等(2012)对大菱鲆早期生长发育过程的调控机制的研究表明,IGFBP-1 和 IGFBP-2 对细胞增殖、生长及组织器官分化发育都起着重要的生理学作用。本实验室开展的工厂化养殖密度对黄条鲮生长的影响研究发现,低密度组实验鱼生长显著快于高密度组(姜燕等, 2022)。本研究进一步发现,在工厂化低密度养殖条件下,黄条鲮肝脏中 *igfbp-1*、*igfbp-2*、*igf-1* 和 *igf-2* mRNA 表达水平均显著高于高密度组实验鱼,同时,这些生长关键因子的表达与低养殖密度下的快速生长呈显著正相关关系,表明

IGFBPs 与 IGFs 等生长因子通过生长轴对黄条鲮的生长起着正向协同调控作用。已有研究表明, *igfbp-1* 主要在肝脏中合成,其表达和分泌受到分解代谢因子和激素的高度调控,如肝脏 *igfbp-1* 表达水平被饥饿、缺氧和应激高度诱导(Maures *et al*, 2002; Kajimura *et al*, 2006)。Breves 等(2016)的研究也表明,在饥饿条件下,大西洋鲑的肝脏 *igfbp1a1* 显著上调表达,但同时肌肉 *igf1* 则显著下调表达,表明肝脏和肌肉组织中的生长关键因子可能通过不同的途径参与了生长代谢调控。对五条鲮的研究也表明,在实验鱼饥饿并恢复投喂后生长速度加快,同时,肝脏中 *igfbp-1*、*igfbp-2*、*igfbp-3*、*igfbp-5* 和 *igf-1* 表达量均升高,表明生长轴关键因子 *igf-1* 与 *igfbps* 协同参与了饥饿后的代谢补偿生长调控(Pedroso *et al*, 2009)。另外,对若鲉杜父鱼(*Scorpaenichthys marmoratus*) (Strobel *et al*, 2020) 研究也表明,实验鱼在饥饿条件下生长受到抑制,同时肝脏 *igf-1* 和 *igfbp-1* 表达水平升高,而 *igfbp-2b* 基因表达水平降低,推测是 *igf-1* 通过与 *igfbp* 的结合直接调节细胞有丝分裂和代谢过程,激活生长因子的合成和释放来调节机体生长(Qian *et al*, 2016; Hack *et al*, 2019)。在体外细胞孵育水平上,有学者研究了生长激素对鲤鱼原代培养肝细胞中 *igfbp-1a* 的表达影响,结果表明,生长激素下调了肝细胞中 *igfbp-1a* 的表达,推测通过 MAPK 和三碘化磷激酶信号通路实现了对细胞生长的调控(Chen *et al*, 2018)。本研究结果表明,高密度抑制了黄条鲮肝脏 *igfbps* 与 *igs* 基因的表达,且它们在生长过程中起正向协同调控作用。

本实验室的前期研究还发现,工厂化低密度养殖条件下显著快速生长的黄条鲮血清中 IGF-1、GH 的水平均显著高于高密度组条件下生长显著迟滞的实验鱼,而血清中皮质醇含量及葡萄糖浓度显著低于高密度组(姜燕等, 2022)。本研究深入分析发现,低密度下快速生长的黄条鲮肝脏中 *igfbp-1*、*igfbp-2*、*igf-1* 和 *igf-2* mRNA 显著高表达,且血清 IGF-1、GH 具有相同表达趋势,与皮质醇含量及葡萄糖浓度表达趋势相反,表明生长轴关键因子与皮质醇和葡萄糖参与了不同密度下黄条鲮的生长调控。皮质醇是指示生物应激状态程度的重要因子,而葡萄糖则是机体供能的重要来源以及应对环境胁迫的重要生理指标。已有研究表明,胰岛素可降低 *igfbp-1* 的表达,糖皮质激素可增加其表达(O'brien *et al*, 1995),这种调节机制有助于促进 *igfbp-1* 在饥饿和分解代谢条件下的表达,包括氨基酸短缺和缺氧(McLellan *et al*, 1992)。在不利生长条件下, *igfbp-1* 的功能是通过与 *igf* 结合并抑制 *igf* 活性来降低发育和生长速率(Maures *et al*, 2002;

Kajimura *et al.*, 2006)。新近对大西洋鲑幼鱼的研究表明, 外源皮质醇激素可以通过调节 GH/IGF-I 生长轴, 主要是肝脏中 *igf-1*、*igf-2*、*igfbp-1* 和 *igfbp-2* 的表达来影响大西洋鲑幼鱼的生长和离子调节(Breves *et al.*, 2020)。同时, Yang 等(2020)在草鱼肝脏细胞的体外孵育研究中发现, 肝细胞 *igfbp-2* 的表达受到葡萄糖、胰岛素和胰高血糖素的调控。因此, 本研究发现的黄条鲮肝脏 IGFBP-1、IGFBP-2、IGF-1 和 IGF-2 等生长因子与血清皮质醇、葡萄糖之间存在的相关表达调控, 是否是黄条鲮通过调整机体代谢水平以适应环境从而获得不同密度下的快速生长优势尚有待于深入研究。

参 考 文 献

- ALLARD J B, DUAN C. IGF-binding proteins: Why do they exist and why are there so many? *Frontiers in Endocrinology*, 2018, 9: 117
- BACH L A. What happened to the IGF binding proteins? *Endocrinology*, 2018, 159(2): 570–578
- BREVES J P, PHIPPS-COSTIN S K, FUJIMOTO C K, *et al.* Hepatic insulin-like growth-factor binding protein (*igfbp*) responses to food restriction in Atlantic salmon smolts. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 233: 79–87
- BREVES J P, SPRINGER-MILLER R H, CHENOWETH D A, *et al.* Cortisol regulates insulin-like growth-factor binding protein (*igfbp*) gene expression in Atlantic salmon parr. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2020, 518: 110989
- CHEN W B, LI W G, ZHANG Z, *et al.* Cloning, molecular characterization and expression analysis of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) cDNA in goldfish, *Carassius auratus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40(6): 1669–1681
- CHEN W B, LI W S, LIN H R. Common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2): Molecular cloning, expression profiles, and hormonal regulation in hepatocytes. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(3): 390–399
- CHEN W B, LIN H R, LI W S. Molecular cloning and expression profiles of IGFBP-1a in common carp (*Cyprinus carpio*) and its expression regulation by growth hormone in hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 221/222: 50–59
- CHEN W B, WANG Y, LI W S, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*: Molecular characterization, expression profiles and regulation by 17 β -estradiol in ovary. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 157(4): 336–342
- CUI A J, XU Y J, LIU X Z. Comparative analysis of digestive enzyme activities among three *Seriola* species. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(6): 102–110 [崔爱君, 徐永江, 柳学周. 3 种养殖鲷鱼消化相关酶活性的比较分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(6): 102–110]
- DUAN C, DING J, LI Q, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein 2 is a growth inhibitory protein conserved in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(26): 15274–15279
- DUAN C, XU Q J. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 142(1/2): 44–52
- FANG L, XU Y J, CUI A J. Molecular cloning and temporal expression pattern of *hsp70* gene during the early life stages of *Seriola lalandi*. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(4): 00–00 [方璐, 徐永江, 崔爱君. 黄条鲮 *hsp70* 基因克隆及其在早期生长发育过程中的表达调控特性. *渔业科学进展*, 2023, 44(4): 00–00]
- FENG N P, ZHANG Z, WANG Z F, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-2 promotes adhesion of endothelial progenitor cells to endothelial cells via integrin $\alpha 5\beta 1$. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2015, 57(3): 426–434
- GARCIA DE LA SERRANA D, MACQUEEN D J. Insulin-like growth factor-binding proteins of teleost fishes. *Frontiers in Endocrinology*, 2018, 9: 80
- HACK N L, CORDOVA K L, GLASER F L, *et al.* Interactions of long-term food ration variation and short-term fasting on insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathways in copper rockfish (*Sebastes caurinus*). *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 280: 168–184
- HU J, WEN H S, GUAN J, *et al.* Cloning of IGFBP-1, -2 and expression analysis during adult and early developmental stages in *Scophthalmus maximus*. *Acta Oceanologica Sinica (in Chinese)*, 2012, 34(5): 139–146 [胡健, 温海深, 关健, 等. 大菱鲆 2 种类胰岛素样生长因子结合蛋白基因克隆及在成鱼和早期发育期中的表达. *海洋学报(中文版)*, 2012, 34(5): 139–146]
- HWA V, OH Y, ROSENFELD R G. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrine Reviews*, 1999, 20(6): 761–787
- JIANG Y, WANG X, XU Y J, *et al.* Effects of industrial stocking density on the growth and physiological characteristics of *Seriola lalandi*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(9): 1290–1299 [姜燕, 王维鑫, 徐永江, 等. 工厂化养殖密度对黄条鲮生长和生理特性的影响. *中国水产科学*, 2022, 29(9): 1290–1299]
- KAJIMURA S, AIDA K, DUAN C. Understanding hypoxia-induced gene expression in early development: *in vitro* and *in vivo* analysis of hypoxia-inducible factor 1-regulated zebra fish insulin-like growth factor binding protein 1 gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26(3): 1142–1155

- KAMANGAR B B, GABILLARD J C, BOBE J. Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-1, -2, -3, -4, -5, and -6 and IGFBP-related protein 1 during rainbow trout postvitellogenesis and oocyte maturation: Molecular characterization, expression profiles, and hormonal regulation. *Endocrinology*, 2006, 147(5): 2399-2410
- MAURES T J, DUAN C. Structure, developmental expression, and physiological regulation of zebrafish IGF binding protein-1. *Endocrinology*, 2002, 143(7): 2722-2731
- MCLELLAN K C, HOOPER S B, BOCKING A D, *et al.* Prolonged hypoxia induced by the reduction of maternal uterine blood flow alters insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) and IGFBP-2 gene expression in the ovine fetus. *Endocrinology*, 1992, 131(4): 1619-1628
- NDANDALA C B, DAI M S, MUSTAPHA U F, *et al.* Current research and future perspectives of GH and IGFs family genes in somatic growth and reproduction of teleost fish. *Aquaculture Reports*, 2022, 6: 101289
- NI J H, ZHU X J, JI Y P, *et al.* Effects of breeding density on the growth, metabolic enzyme activity and related gene expression level of juvenile *Pampus argenteus*. *Journal of Tropical Oceanography*, 2020, 39(2): 54-64 [倪嘉豪, 朱晓静, 季益平, 等. 养殖密度对银鲳幼鱼生长、代谢酶活力及其相关基因表达的影响. *热带海洋学报*, 2020, 39(2): 54-64]
- O'BRIEN R M, NOISIN E L, SUWANICHKUL A, *et al.* Hepatic nuclear factor 3- and hormone-regulated expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein 1 genes. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15(3): 1747-1758
- PEDROSO F L, FUKADA H, MASUMOTO T. Molecular characterization, tissue distribution patterns and nutritional regulation of IGFBP-1, -2, -3 and -5 in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(3): 344-353
- QIAN B Y, XUE L Y. Liver transcriptome sequencing and de novo annotation of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under heat and cold stress. *Marine Genomics*, 2016, 25: 95-102
- QIAN K, WEN H S, CHI M L, *et al.* Cloning and characteristics of insulin-like growth factor-binding protein-1, 2 genes (*igfbp-1*, 2) of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) and their expression analysis. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2014, 44(9): 37-45 [钱焜, 温海深, 迟美丽, 等. 海产花鲈 IGFBP-1、2 基因的克隆及表达分析. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2014, 44(9): 37-45]
- REINECKE M. Influences of the environment on the endocrine and paracrine fish growth hormone-insulin-like growth factor-I system. *Journal of Fish Biology*, 2010, 76(6): 1233-1254
- RODGERS B D, ROALSON E H, THOMPSON C. Phylogenetic analysis of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) and IGFBP-related protein gene families. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 155(1): 201-207
- STROBEL J S, HACK N L, LABEL K T, *et al.* Effects of food deprivation on plasma insulin-like growth factor-1 (Igf1) and Igf binding protein (Igfbp) gene transcription in juvenile cabezon (*Scorpaenichthys marmoratus*). *General and Comparative Endocrinology*, 2020, 286(C): 113319
- TAO Y, ZOU S M. cDNA cloning and expression of insulin-like growth factor binding protein gene IGFBP-1 in *Ctenopharyngodon idellus*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20(1): 15-21 [陶洋, 邹曙明. 草鱼胰岛素样生长因子结合蛋白 IGFBP-1 基因的全长 cDNA 克隆及表达. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(1): 15-21]
- WANG B, XU Y J, LIU X Z, *et al.* Molecular characterization and expression profiles of insulin-like growth factors in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) during embryonic development. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(1): 375-390
- WANG B, ZHANG Y X, LIU Q, *et al.* Molecular identification and developmental expression patterns of growth hormone and its receptors in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(9): 7305-7312
- WOOD A W, DUAN C, BERN H A. Insulin-like growth factor signaling in fish. *International Review of Cytology*, 2005a, 243: 215-285
- WOOD A W, SCHLUETER P J, DUAN C. Targeted knockdown of insulin-like growth factor binding protein-2 disrupts cardiovascular development in zebrafish embryos. *Molecular Endocrinology*, 2005b, 19(4): 1024-1034
- XU Y J, ZHANG Z R, LIU X Z, *et al.* Morphometric characteristics of the embryonic and postembryonic development of yellowtail kingfish, *Seriola aureovittata*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(1): 172-182 [徐永江, 张正荣, 柳学周, 等. 黄条鲷早期生长发育特征. *中国水产科学*, 2019, 26(1): 172-182]
- YANG G K, CHEN B C, SUN C Y, *et al.* Molecular identification of grouper *Igfbp1* and its mRNA expression in primary hepatocytes under Gh and insulin. *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 281: 137-144
- YANG G K, ZHAO W L, QIN C B, *et al.* Molecular identification of grass carp *igfbp2* and the effect of glucose, insulin, and glucagon on *igfbp2* mRNA expression. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2020, 46(4): 1469-1482
- ZHAI W Y, ZHANG J L, SHI Z Y, *et al.* The full-length cDNA cloning and gene expression analysis of insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(2): 170-179 [翟万营, 张俊玲, 施志仪, 等. 牙鲆胰岛素样生长因子结合蛋白 IGFBP-1 cDNA 全长的克隆及表达分析. *水产学报*, 2012, 36(2): 170-179]

ZHOU J F, LI W H, KAMEI H, *et al.* Duplication of the IGFBP-2 gene in teleost fish: Protein structure and

functionality conservation and gene expression divergence. PLoS One, 2008, 3(12): 1–11

(编辑 冯小花)

Molecular Cloning, Expression Profiles of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-1 (*igfbp-1*) and *igfbp-2* and their regulation effects on growth of Yellowtail Kingfish (*Seriola aureovittata*)

ZHANG Wenjing^{1,2}, XU Yongjiang^{2①}, CUI Aijun², WANG Bin²,
JIANG Yan², WANG Kaijie², ZHOU Heting²

(1. National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Joint Laboratory for Deep Blue Fishery Engineering, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China)

Abstract Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) play crucial roles in regulating biological activities of insulin-like growth factors (IGFs) and growth performance in vertebrates. IGFBP is a six-member protein family (IGFBP1–6) with a high affinity for IGF. It affects the distribution, stability, and biological activity of IGF by regulating the interaction between IGF ligands and receptors. Recently, IGFBP-1 was identified as a regulator of growth, reproduction, and development in bony fish, such as juvenile Atlantic salmon, where IGFBP-1 interacts with cortisol to regulate growth. IGFBP-1 regulates cell metabolism and growth through interaction with insulin in primary hepatocytes incubated in vitro in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). IGFBP-2 has a wide range of tissue expression characteristics in bony fish, and IGF regulation may occur through autocrine or paracrine pathways. For example, long-term fasting induced increased *igfbp-2* mRNA expression in the liver of zebrafish. In addition, IGFBP-2 can inhibit the activity of IGF ligand through its high affinity with IGF to play an inhibitory and regulatory role in zebrafish growth. *igfbp-2* mRNA expression was significantly up-regulated in *Carassius auratus* (goldfish) liver after fasting, and quickly recovered to normal levels after feeding. This indicated that *igfbp-2* mRNA expression may be related to the anabolism and catabolism of goldfish, and is regulated by metabolic factors.

Yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*) of the Carangidae family has high economic value and nutrition value. It is a warm and temperate oceanic fish with long distance migration characteristics that is distributed in the middle and upper oceans globally. This species is large with a fast growth rate, and is a promising candidate for aquaculture in land-based industrial circulating water system, deep-water cages, net pen systems, and aquaculture craft, *etc.* Our laboratory studied the regulatory mechanism of the rapid growth of yellowtail kingfish and cloned *gh*, *igf-1*, *igf-2*, *ghr*, and other growth-related functional genes to reveal their molecular regulation in early growth and development. *igfbp* genes regulate the growth, development, and nutrient metabolism of fish through their interaction with growth axis. The mechanism of IGFBP and how it influences the regulation of yellowtail kingfish growth is unreported. This paper further studied the growth of yellowtail kingfish

① Corresponding author: XU Yongjiang, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

by analyzing the key growth axis factors.

RNAiso Plus reagent (TaKaRa) was used to extract total RNA from tissues. RNA integrity was detected by agarose gel electrophoresis, and RNA quality was determined by a NanoDrop 2000C spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). First, cDNA strand was synthesized using a PrimeScript™ RT reagent kit with a gDNA Eraser (Perfect Real-Time) reverse transcription kit (TaKaRa). Primers were designed to clone the predicted sequence of yellowtail kingfish *igfbp* gene according to the NCBI GenBank database. The product was amplified by polymerase chain reaction, purified from agarose gel electrophoresis, linked with T4 Ligases, transformed into Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell, and positive clones were selected and tested. Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to analyze the distribution of yellowtail kingfish tissues and the expression patterns of liver tissues under different densities of industrial culture.

The lengths of *igfbp-1*, *igfbp-2a*, *igfbp-2b* open reading frame (ORF) domains were 741 bp, 882 bp, and 801 bp, and encoded 246 amino acids, 293 amino acids, and 269 amino acids, respectively. The conserved domain of insulin growth factor-binding protein homologues (IB) was present in the N-terminus of the three *igfbps*, and the conserved domain of thyroglobulin type-1 repeat (Ty-1) was present in the C-terminus. They had a wide range of tissue expression characteristics and were highly expressed in the liver. There were differences between the expression of the same gene in the same tissues of male and female fish. For example, the expression of *igfbp-1* and *igfbp-2b* genes was significantly higher in the liver of male fish compared with female fish, while *igfbp-2a* expression was significantly higher in the liver of female fish compared with male fish. The tissue differential expression of genes between sexes indicates that *igfbp* may have sex dimorphism when it plays a physiological role. However, the specific characteristics of this difference between males and females and the possible signaling pathway are unclear. The fish in the low-density group showed the greatest growth rate and the highest expression levels of *igfbp-1*, *igfbp-2a*, *igfbp-2b*, *igf-1*, and *igf-2* under industrial culture conditions. These expression levels were significantly different from those of the medium and high-density groups ($P < 0.05$). However, there were no significant differences in the expression levels of growth and liver genes between the middle and high-density groups.

igfbp-1, *igfbp-2a*, and *igfbp-2b* participated in the growth regulation of yellowtail kingfish. The expression regulation of *igf-1* and *igf-2* had a positive synergistic effect with growth regulation of yellowtail kingfish. The ORF regions of *igfbp-1*, *igfbp-2a*, and *igfbp-2b* genes of yellowtail kingfish were cloned, and the structural characteristics, tissue expression characteristics, and relationships with growth performance were analyzed under different culture densities. The content of serum IGF-1, GH, cortisol, and glucose concentration was detected in the early stage. The expression trend of *igfbp-1*, *igfbp-2*, *igf-1*, and *igf-2* was the same as that of serum IGF-1 and GH in the liver of yellowtail kingfish rapidly growing at the low-density group, but contrary to the expression trend of cortisol content and glucose concentration. This indicated that the key factors of growth axis, cortisol, and glucose participated in the growth regulation of yellowtail kingfish at different densities. However, the specific regulatory mechanism requires further study. The results provide a theoretical basis for interpreting the molecular mechanism of the growth of yellowtail kingfish and the regulation of suitable culture densities under industrial conditions.

Key words cDNA cloning; *Seriola aureovittata*; *igfbp-1*; *igfbp-2*; Tissue expression; Growth regulation