

leptin 基因在团头鲂成鱼各组织和早期发育中的表达分析

赵鸿昊^{1,2} 李学华¹ 曾 聪¹ 王卫民^{1,2} 董在杰³ 高泽霞^{1,2}

1.华中农业大学水产学院/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室/农业部淡水生物繁育重点实验室,武汉 430070;
2.淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心,武汉 430070; 3.中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,无锡 214081

摘要 应用荧光定量 PCR 方法检测团头鲂 *leptin* 及其相关基因—瘦素受体(*leptin receptor*, *leptin-R*)和瘦素受体重叠转录产物类似物 1 基因(*leptin receptor overlapping transcript like-1*, *leprotl-1*)在胚胎发育早期及成鱼各组织的表达量。结果显示,3 个基因在团头鲂成鱼所有检测组织中均有所表达,表明 3 个基因在团头鲂机体中具有多重生理功能。早期发育过程中的表达量结果显示 *leptin-R* 和 *leprotl-1* 基因在胚胎阶段的表达水平变化趋势一致,而 *leptin* 在破膜后 5 d 前一直处于较低并呈波动性变化;出膜后 12 d 时 *leptin-R* 和 *leprotl-1* 基因表达量均达到了峰值,而 *leptin* 基因从破膜后第 5 天开始表达量持续上升,在第 15 天到达峰值,表明 3 个基因可能涉及到胚胎发育早期阶段的能量调控。Pearson 相关分析显示 3 个基因在团头鲂胚胎发育早期中的表达均为显著正相关关系($P < 0.05$)。

关键词 团头鲂; *leptin* 基因; *leptin-R* 基因; *leprotl-1* 基因; 早期发育; 组织; 表达模式

中图分类号 S 917: Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)01-0092-07

Leptin 是肥胖基因的表达产物,其结构在进化过程中高度保守。自 Zhang 等^[1]定位克隆出小鼠肥胖基因后,对鱼类肥胖基因的研究也逐渐成为了关注的焦点。2005 年, Kurokawa 等^[2]首次报道的河豚(*Takifugu rubripes*) *leptin* 基因序列编码氨基酸,与人的编码氨基酸同源性仅 13.2%。随后,鲤(*Cyprinus carpio*)^[3]、虹 鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[4]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[5]、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[6]和黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[7]等鱼类 *leptin* 序列研究也得到陆续报道。作为 *leptin* 基因生理功能介导因子的 *leptin-R* 基因,目前已在斑马鱼(*D. rerio*)^[8]、河豚(*T. rubripes*)^[9]及青鳉(*Oryzias latipes*)^[10]等多种鱼类中得以确定。关于 *leprotl-1* 基因, Baillieu 等^[11]证明了人类 *leprotl-1* 基因与 *leptin-R* 基因共享第一和第二个外显子,目前仅在河豚(*T. rubripes*)^[9]、斑马鱼(*D. rerio*)^[12]和黄颡鱼(*P. fulvidraco*)^[7]等鱼类中得到克隆

报道。

随着对 *leptin* 基因结构和功能的进一步研究,不断有 *leptin* 的新功能被发现。现有研究表明,在哺乳动物体内, *leptin* 具有广泛的生物学效应^[13],包括对机体的摄食和能量消耗进行调控,并反映体内脂肪组成及含量;其还参与调节机体的免疫应答,并对动物胚胎发育和生长繁殖具有重要的作用。随着对鱼类 *leptin* 基因研究的不断深入,鱼类该基因对机体调节摄食、能量代谢、激素分泌、生长、生殖和免疫等过程的功能研究也有了一定的进展^[14],但关于其在鱼类早期发育过程中的生理意义阐述还非常有限。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*),是我国主要淡水养殖鱼类之一。本研究采用荧光定量 PCR 方法分析了 *leptin* 及其相关基因 *leptin-R* 和 *leprotl-1* 在团头鲂早期发育过程中的表达模式,旨在为阐述 *leptin* 及相关基因在鱼类早期发育过程中的生理功能积累一定的资料。

收稿日期: 2015-06-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31472271); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系建设项目(CARS-46-05); 中央高校基本科研业务费专项(2014PY013); 农业部淡水渔业与种质资源利用重点实验室开放课题(KF201308)

赵鸿昊, 硕士研究生。研究方向: 鱼类遗传育种。E-mail: zhao253091640@hotmail.com

通信作者: 高泽霞, 博士, 副教授。研究方向: 鱼类遗传育种。E-mail: gaozx@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 材料及试剂

试验所用材料均来自华中农业大学团头鲂遗传育种中心(湖北省黄冈市团风县团风镇白鹤林村)。其中团头鲂成鱼为 2 龄鱼 6 条,采集每条鱼的肌肉、脾脏、肝脏、心脏、脑、性腺、肠、鳃和肾脏等 9 个组织样品,样品速冻于液氮中过夜后保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

团头鲂早期发育的样品采集包括对催产后的团头鲂个体进行成熟卵子及未激活精液的采集,以及对团头鲂进行干法受精后,对受精卵进行定时观察,采集 1 细胞期、2 细胞期、4 细胞期、多细胞期、囊胚期、原肠胚期和破膜后 5、7、10、12、15、20、25 及 30 d 的胚胎发育及仔稚鱼时期的样品,将各样品速冻于液氮过夜后转至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA E-

raser (Perfect Real Time)试剂盒和 RNAiso Reagent (TaKaRa 公司), pMD 19-T Vector 和 Taq DNA 聚合酶 TaKaRa 公司),其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 总 RNA 提取和定量引物设计

取团头鲂成鱼各组织和胚胎发育早期各时期的样品约每管 20 g,按照 TaKaRa 试剂公司总 RNA 提取试剂盒说明书指导操作,用 Trizol 裂解法抽提总 RNA。并使用 Nano Drop 2000 对 Rnase-free water 溶解后的总 RNA 进行浓度测定,同时用 1% 的琼脂糖加 loading Buffer (含 Gel Red)染色后检测 RNA 完整性。

该试验基于笔者所在研究室已有的研究成果^[15-17],参照已克隆鉴定并提交到 GenBank 数据库中的团头鲂 *β -actin* (AY170122.2)、*leptin* (KJ 193854)、*leptin-R* (KJ 193855)和 *leprotl-1* (KJ 193853)基因序列,设计各基因的特异性定量引物(表 1)。

表 1 实验中所用到的基因荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time PCR in the present study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature	片段长度/bp Fragment length
β -actin	F:ACCCACACCGTGCCCATCTA R:CGGACAATTTCTCTTTCGGCTG	58.0	204
leptin	F:CAGTTGAGATTGCGAGTGCC R:GTTGGAGGTAACGGGGAAGG	52.3	168
leptin-R	F:TAGACGAACCAGGGTTTGATA R:ATTCTTGCTCTGGCAGGTAA	58.0	267
leprotl-1	F:CAGTTGGCAGCAGTGGTGAAG R:CATCTATCAATGGGCGGCAGT	57.3	139

1.3 反转录和克隆测序

使用 TaKaRa 公司的 PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, Dalian)试剂盒,按说明书推荐方法,进行 cDNA 第一链的合成。反转录体系设定为 20 μL 。将团头鲂成鱼相同组织的 RNA 以及相同胚胎发育时期的 RNA 样品分别等量混合,用 1 μg 的总 RNA 完成反转录。以反转录得到的 cDNA 作为 PCR 的模板,用引物对 *leptin*、*leptin-R* 和 *leprotl-1* 基因进行扩增,将扩增产物连接到 pMD19-T 载体上,后转化到大肠杆菌感受态细胞后进行平板培养,挑克隆测序。将测序所得序列与该基因的 cDNA 全长序列进行比对,以确认该扩增序列为目的基因序列。

1.4 实时荧光定量 PCR

按照试剂盒操作说明,使用 PrimeScript™ RT reagent Kit Perfect Real (TaKaRa, Dalian)试剂盒,

以团头鲂成鱼各组织和胚胎发育早期不同阶段样品的 cDNA 作为荧光定量 PCR 反应的模板 ($n=3$),按照以下反应条件进行荧光定量 PCR 反应:反应总体积为 20 μL ,包括模板 cDNA 2 μL ,正向和反向引物各 0.2 μL ,10 μL SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa 公司),ddH₂O 7.6 μL 。实时荧光定量 PCR 依托于三步法的热循环,反应程序如下:在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下预变性 30 s,接着分别是 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,58 $^{\circ}\text{C}$ (*β -actin*) /55 $^{\circ}\text{C}$ (*leptin*) /58 $^{\circ}\text{C}$ (*leptin-R*) /57.3 $^{\circ}\text{C}$ (*leprotl-1*)条件下退火 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,共 40 个循环, *β -actin* 为内参基因。

1.5 数据处理和统计分析

数据处理时,相对定量采用双标准曲线的方法进行计算。因此,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行 3 个目的基因的 mRNA 相对表达水平计算^[18],最终数值以“平均值士标准误 (Mean \pm SE)”表示。采用 One-way 方

差分析法完成统计分析,使用 SPSS 软件中 Duncan's Multiple Range Test 来比较各基因在不同时间点的相对表达水平差异性,当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。同时,利用 Pearson 进行基因表达相关性分析,相关系数(r)绝对值在 0.8~1.0 区间内,认为极强相关;0.6~0.8 之间为强相关,0.4~0.6 区间内为中等程度相关;0.2~0.4 为弱相关;0.0~0.2 极弱相关或无相关,且当 $P < 0.05$ 时认为相关性显著。

2 结果与分析

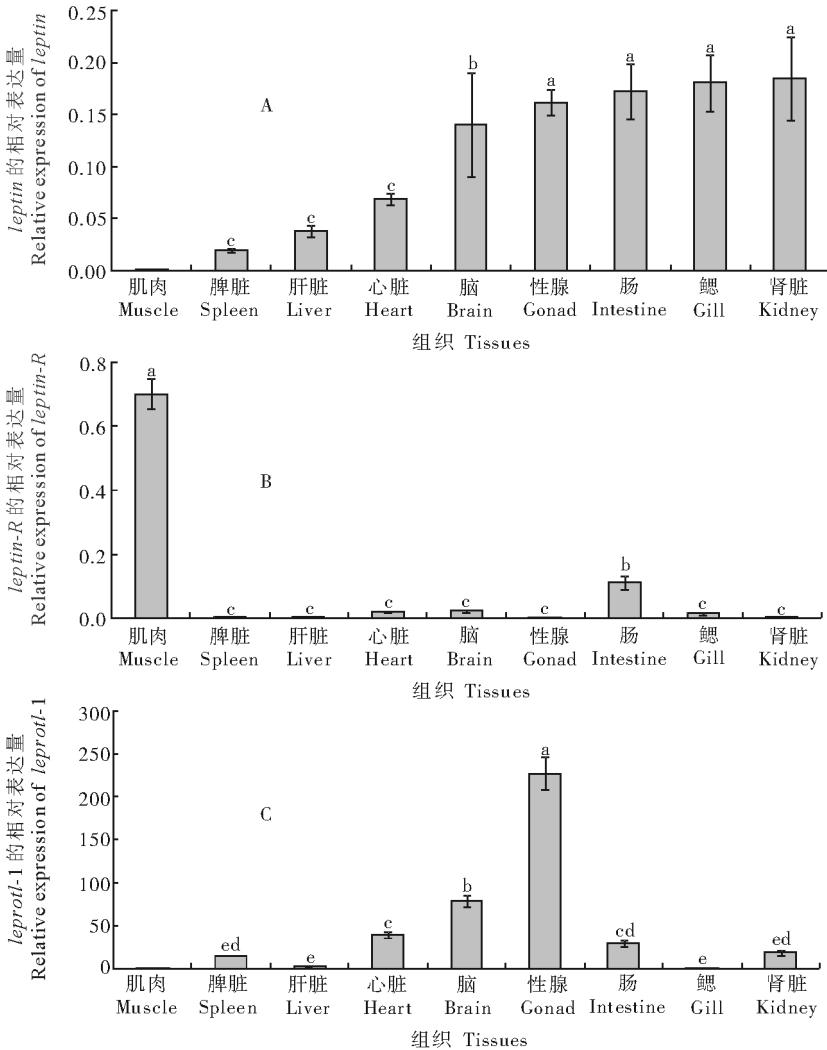
2.1 团头鲂 *leptin* 及相关基因在团头鲂成鱼各组织中的表达

Real-time PCR 定量结果显示,*leptin*、*leptin-R*

和 *leprotl-1* 在团头鲂成鱼各检测组织中均有表达,其中 *leptin* 基因在肾脏中的表达量最高,剩下的依次为鳃、肠、性腺、脑、心脏、肝脏、脾脏和肌肉组织(图 1)。*leptin-R* 基因在肌肉中表达量最高,在性腺中的表达量最低($P < 0.05$)。这些结果说明 *leptin* 和 *leptin-R* 基因在团头鲂成鱼各组织中的表达模式不同;而 *leprotl-1* 基因的表达方式与两者也不尽相同,其在团头鲂性腺组织中的表达水平最高,在肌肉组织中表达量最低。

2.2 团头鲂 *leptin* 及其相关基因在早期发育过程中的表达

应用实时荧光定量 PCR 技术对 *leptin*、*leptin-R* 和 *leprotl-1* 基因在团头鲂胚胎发育早期不同阶



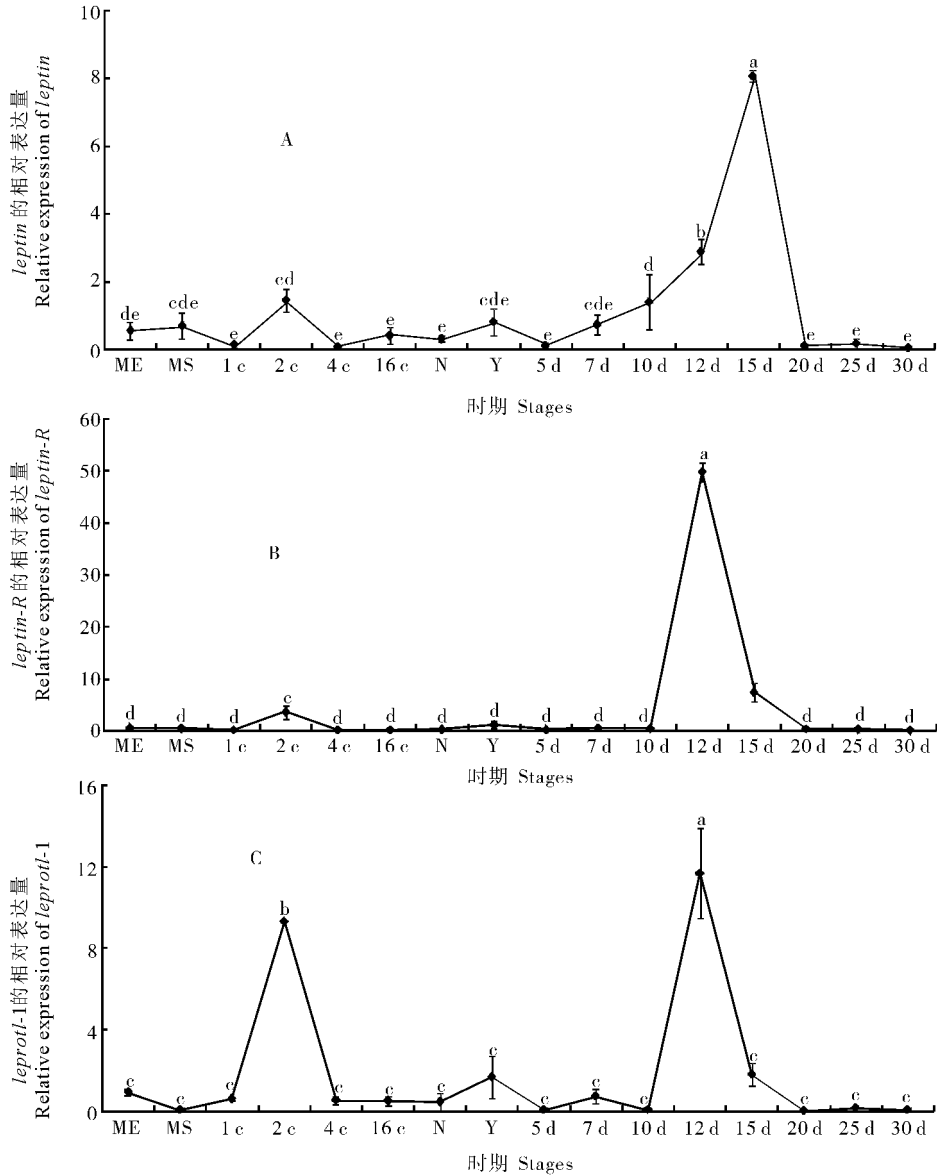
有相同字母标注表示各组织表达差异不显著($P > 0.05$)。下图同。The same marked letter in different tissues means no significant difference ($P > 0.05$). The same as below.

图 1 团头鲂 *leptin* (A)、*leptin-R* (B)、*leprotl-1* (C) 基因在成鱼各组织中的表达分析

Fig.1 The expression analysis of *leptin* (A), *leptin-R* (B) and *leprotl-1* (C) in various tissues of adults *M. amblycephala*

段的表达水平进行检测。结果显示,在成熟卵子和未激活的精子中,*leptin*、*leptin-R* 和 *leprotl-1* 基因均是处于激活状态的,随后当受精卵卵裂到 2 细胞期时,*leptin* 与 *leprotl-1* 基因的表达量显著性升高 ($P < 0.05$),*leptin-R* 虽具有相同变化趋势但并不显著;除此之外,直至破膜第 5 天后 *leptin* 基因的表达量持续升高,至破膜后 15 d 表达量达峰值;而 *leptin-R* 和 *leprotl-1* 基因则是在受精卵发育到原

肠胚时期表达量短暂上升,直至破膜后第 10 天一直处于较低且波动的表达水平,并均在破膜后第 12 天出现表达峰值 ($P < 0.05$),但在破膜后第 15 天时,*leptin-R* 和 *leprotl-1* 基因的表达量又回落到较低水平;之后,破膜第 20、25 和第 30 天的表达量也一直持续在最初的低水平状态。总的来讲,*leptin*、*leptin-R* 和 *leprotl-1* 基因在团头鲂胚胎发育早期各阶段的表达趋势基本一致,而 *leptin* 基因的表



ME:成熟卵子 Maturation egg; MS:成熟精子 Maturation sperm; 1 c:1 细胞期 One cell stage; 2 c:2 细胞期 Two cells stage; 4 c : 4 细胞期 Four cells stage; 16 c:多细胞期 Multicellular stage fertilized egg; N:囊胚期 Blastula stage; Y:肠胚期 Gastrula stage; 5 d、7 d、10 d、12 d、15 d、20 d、25 d、30 d:破膜后 5 d、7 d、10 d、12 d、15 d、20 d、25 d、30 d 5、7、10、12、15、20、25、30 days post hatching.

图 2 团头鲂 *leptin* (A), *leptin-R* (B), *leprotl-1* (C) 基因在胚胎发育早期的表达分析

Fig.2 The expression levels of *M. amblycephala leptin* (A), *leptin-R* (B) and *leprotl-1* (C) during the early developmental stages

达模式与其他 2 个基因相比有所不同。

2.3 团头鲂 *leptin* 基因表达关联性分析

对 *leptin*、*leptin-R* 和 *leprotl-1* 基因在团头鲂胚胎发育早期个体中表达的关联性分析表明,3 个基因的发育相关系数均为显著性正相关 ($P < 0.05$),且 *leptin* 与其他 2 个基因的表达相关性较弱 ($0.2 < r < 0.4$),而 *leptin-R* 与 *leprotl-1* 基因之间为强相关性 ($r > 0.6$) (表 2)。而 3 个基因在团头鲂成鱼各组织中表达关联性较之发育相关性而言具有不同的模式:*leptin* 与其他 2 个基因的表达关联性均为正相关,但 *leptin-R* 和 *leprotl-1* 基因为负性相关,同时,3 个基因之间的组织表达相关性为弱或极弱不显著相关 ($P > 0.05, r < 0.4$)。

表 2 团头鲂 3 个基因在其胚胎发育早期及成鱼各组织中表达的相关系数

Table 2 The correlation coefficients among three genes mRNA expression in early development stages and tissues of adult *M. amblycephala*

基因名称 Gene name	<i>leptin</i>	<i>leptin-R</i>	<i>leprotl-1</i>
<i>leptin</i>		0.325 *	0.321 *
<i>leptin-R</i>	0.246		0.660 * *
<i>leprotl-1</i>	0.356	-0.127	

注:对角线上方数据为不同发育时期表达相关系数,下方为不同组织表达相关系数。* 表示相关显著性在 0.05 水平; * * 表示相关显著性在 0.01 水平。Note: Data above the diagonal showed the development-related correlation coefficients and the below expressed the tissues-related correlation coefficients. *, correlation is significant at the 0.05 level (1-tailed); * *, correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

3 讨论

Leptin 的功能存在物种特异性^[19]。本研究通过 Real-time PCR 技术检测,结果显示 *leptin*、*leptin-R* 和 *leprotl-1* 基因在团头鲂成鱼各组织中均有所表达。但 *leptin* 基因在团头鲂成鱼肝脏组织中的表达量较低的这一结果与其在金鱼^[20]、虹鳟^[4]、斑马鱼^[5]、草鱼^[21]、吉富罗非鱼^[22] 和 黄颡鱼^[7] 中的研究结论不同。团头鲂成鱼肝脏中检测到 *leptin* 基因的表达量很低,这一结果出现的原因可能是由于实验采样前,我们的实验鱼体经过了短期的禁食,使得 *leptin* 基因于肝脏中的表达结果与鲤鱼控食试验的结果相似^[3];或是类似于 *leptin* 基因在青鳉^[10] 中表达的结论,肝脏组织可能不是团头鲂 *leptin* 基因的主要表达场所。同时,*leptin* 和 *leprotl-1* 基因在脑和性腺组织中的较高表达说明了该 *leptin*

基因可能参与团头鲂机体的性腺发育及生殖调控;而 *leptin* 基因在团头鲂肾脏组织中的高表达,也进一步验证了 *leptin* 通过信号转导,参与调节机体自身的免疫平衡,因此,团头鲂 *leptin* 基因对于机体也具有重要的免疫功能作用^[23-24];而 *leptin-R* 基因在团头肌肉和肠组织中的较高表达暗示着其可能具有调控能量代谢、摄食,促进机体生长和影响鱼体肉质的潜在功能。*leptin* 及其相关基因在团头鲂机体内的广泛分布,决定了其重要的生物学功能和地位。

对团头鲂 3 个基因在成熟卵子、未激活精子、胚胎发育各阶段直至破膜后 30 d 的不同发育时期的 Real-time PCR 表达量检测,发现 3 个基因在团头鲂胚胎发育和仔稚鱼发育过程中发挥着重要的生理功能。成熟的卵子和未激活精子的 *leptin*、*leptin-R* 和 *leprotl-1* 基因均已处于活化状态,说明这些基因可能参与团头鲂的性腺发育,这一结论与在大西洋鲑检测中发现的雄性幼鱼 *leptin* 基因表达和血循环中瘦素水平的研究一致,表明 *leptin* 基因发挥着重要的生殖调控功能^[25]。在受精后的一段时间除了 2 细胞期,3 个基因的表达水平一直处于较低且波动的状态,而该阶段的受精卵也正不断地进行卵裂,该过程需要消耗大量的能量,因此,*leptin* 及相关基因表达水平可能与胚胎发育时期机体自身的能量状态相关,这与 *leptin* 基因表达对斑马鱼胚胎代谢率影响研究中的结论相一致^[26];而在破膜后第 12 天,*leptin-R* 和 *leprotl-1* 基因的表达量均出现了峰值,*leptin* 基因的表达量也在破膜后第 15 天时达到最高,Zhang 等^[27] 在对点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) *leptin* 及其受体基因在胚胎发育及早期阶段表达研究中发现,*leptin* 和 *leptin-R* 基因对稚鱼后期鱼体发育具有一定的生理作用;此外,根据 *leptin* 及相关基因在人类胚胎发育阶段性别分化中发挥作用的结论^[28],推测 *leptin* 及其相关基因可能也参与并影响了团头鲂的性别分化。

leptin、*leptin-R* 和 *leprotl-1* 基因在团头鲂胚胎发育早期个体中表达均为显著性正相关 ($P < 0.05$),且相对而言 *leptin-R* 与 *leprotl-1* 基因的关联性较密切 ($r > 0.6$) 且尤为显著 ($P < 0.01$),此结果与 *leptin* 和 *leptin-R* 基因在点带石斑鱼胚胎发育过程及成鱼中的调控作用机制相一致:随着 *leptin* 表达量的升高或降低,*leptin-R* 基因的表达量变化与之相一致^[27]。3 个基因在团头鲂成鱼各组织中表达的关联性,*leptin* 与其他 2 个基因为正性相关,但

leptin-R 和 *leprotl-1* 基因为负相关,且 3 个基因之间的组织表达相关性并不紧密 ($r < 0.4$)。同时, *leptin-R* 与 *leprotl-1* 在团头鲂成鱼各组织表达的负性相关,更进一步验证了 *leprotl-1* 基因对于靶器官中 *leptin-R* 基因表达的抑制作用。

综上所述, *leptin*、*leptin-R* 和 *leprotl-1* 3 个基因在团头鲂成鱼各检测组织中的广泛表达模式,说明了 3 个基因在团头鲂机体中具有着多重生理功能。同时,3 个基因在团头鲂早期发育早期过程中也广泛存在,且各基因的表达具有明显的发育相关性变化,这些结果为进一步研究 *leptin* 及相关基因在鱼类早期发育中的生理功能提供了一定的基础资料。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. *Nature*, 1994, 372: 425-432.
- [2] KUROKAWA T, UJI S, SUZUKI T. Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian *leptin* from pufferfish, *Taki fugu rubripes* [J]. *Peptides*, 2005, 26: 745-750.
- [3] HUISING M O, GEVEN E J, KRUISWIJK C P, et al. Increased *leptin* expression in common carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation [J]. *Endocrinology*, 2006, 147: 5786-5797.
- [4] MURASHITA K, UJI S, YAMAMOTO T, et al. Production of recombinant *leptin* and its effects on food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2008, 150(4): 377-384.
- [5] GORISSEN M, BERNIER N J, NABUURS S B. Two divergent *leptin* paralogues in zebrafish (*Danio rerio*) that originate early in teleostean evolution [J]. *Endocrinology*, 2009, 201(3): 329-339.
- [6] LI G G, LIANG X F, XIE Q L. Gene structure, recombinant expression and functional characterization of grass carp *leptin* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 166(1): 117-127.
- [7] GONG Y, LUO Z, QING L Z, et al. Characterization and tissue distribution of leptin, leptin receptor and leptin receptor overlapping transcript genes in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 182: 1-6.
- [8] TANG C H, LU D Y, YANG R S, et al. Leptin-induced IL-6 production is mediated by leptin receptor, insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, NF-kappaB, and p300 pathway in microglia [J]. *Immunology*, 2007, 179(2): 1292-1302.
- [9] KUROKAWA T, MURASHITA K, SUZUKI T, et al. Genomic characterization and tissue distribution of leptinR and leptinR overlapping transcript genes in the pufferfish *Taki fugu rubripes* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 158: 108-114.
- [10] KUROKAWA T, MURASHITA T. Genomic characterization of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in the Japanese medaka, *Oryzias latipes* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(2): 229-237.
- [11] BAILLEUL B, AKERBLOM I, STROSBERG A D. The leptin receptor promoter controls expression of a second distinct protein [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 2752-2758.
- [12] STRAUSBERG R L, FEINGOLD E A, GROUSE L H, et al. Generation and initial analysis of more than 15000 full-length human and mouse cDNA sequences [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(26): 16899-16903.
- [13] 李光照, 梁旭方, 陈亮, 等. 鳊鱼肥胖基因的克隆与组织表达 [J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2010, 31(3): 318-323, 330.
- [14] MARNIX G, GERT F. Leptin in teleostean fish, towards the origins of *leptin* [J]. *Physiology*, 2014, 61/62: 200-206.
- [15] 曾聪, 曹小娟, 高泽霞, 等. 团头鲂生长性状的遗传力和育种值估计 [J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(2): 89-95.
- [16] 易少奎, 高泽霞, 赵鸿昊, 等. 团头鲂生长相关基因在不同发育时期生长轴组织的表达分析 [J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 101-109.
- [17] 高泽霞, 王卫民, 蒋恩明, 等. 团头鲂种质资源及遗传改良研究进展 [J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(3): 138-144.
- [18] KENNETH J L, THOMAS D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [19] LONDRAVILLE R L, DUVAL C S. Murine *leptin* injections increase intracellular fatty acid-binding protein in green sunfish (*Lepomis cyanellus*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2002, 129(1): 56-62.
- [20] 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 Research*, 2003, 962(1/2): 90-109.
- [21] 李观贵. 草鱼瘦素的基因结构、重组表达与功能研究 [D]. 广州: 暨南大学图书馆, 2010.
- [22] 唐永凯, 俞菊华, 徐跑, 等. 吉富罗非鱼 *leptin* 基因的克隆及其表达 [J]. 动物学杂志, 2012, 47(3): 89-94.
- [23] FANTUZZI G, FAGGIONI R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis [J]. *The Journal of Leukocyte Biology*, 2000, 68(10): 437-446.
- [24] LAM Q L K, LU L. Role of *leptin* in immunity [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2007, 4(1): 1-13.
- [25] TROMBLEY S, SCHMITZ M. Leptin in fish: possible role in sexual maturation in male Atlantic salmon [J]. *Fish Physiology*

- and Biochemistry, 2013, 39(1):103-106.
- [26] MARK R D, QIN L, MASON D K, et al. Leptin expression affects metabolic rate in zebrafish embryos (*D. rerio*) [J]. *Frontiers in Physiology*, 2013, 4:160.
- [27] ZHANG H X, CHEN H P, ZHANG Y, et al. Molecular cloning, characterization and expression profiles of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 181:295-305.
- [28] PRASHANT B, LEAH K L. Discrimination begins in the womb: evidence of sex-selective prenatal investments [J]. *Human Resources*, 2013, 48:71-113.

Expression analysis of leptin genes in adults' tissues and during early development in *Megalobrama amblycephala*

ZHAO Honghao^{1,2} LI Xuehua¹ ZENG Cong¹
WANG Weimin^{1,2} DONG Zaijie³ GAO Zexia^{1,2}

1. *Key Lab of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education/Key Lab. of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture/College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*
2. *Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China;*
3. *Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China*

Abstract In the present study, the expression levels of the *leptin* and its related genes including leptin receptor (*leptin-R*) and leptin receptor overlapping transcript like-1 (*leprotl-1*) in *Megalobrama amblycephala* during embryonic and larval development as well as in various adults' tissues were studied using qRT-PCR. The results showed that the three genes were ubiquitously expressed in all the examined adults' tissues, which suggested their multiple physiology functions in *M. amblycephala*. During embryonic and larval developmental, the *leptin-R* and *leprotl-1* genes had lower and fluctuant expression levels. Expression levels of the three genes had no differences before 5 days post-hatching (dph), which suggested that these genes may be related to the regulation of energy during early developmental stages. Expression levels of both the *leptin-R* and *leprotl-1* genes reached the peak at 12 dph, but the leptin expression increased from 5 dph and reached the peak at 15 dph, which indicated that the three genes may participated in the *M. amblycephala* sex differentiation during larval developmental stages. The correlation coefficients among *leptin*, *leptin-R* and *leprotl-1* mRNA levels indicated that these three genes were positively correlated during embryonic and larval developmental stages in *M. amblycephala*.

Keywords *Megalobrama amblycephala*; *leptin* gene; *leptin-R* gene; *leprotl-1* gene; early development; tissue; expression patterns

(责任编辑:边书京)