

# 饥饿对幼年斑马鱼下丘脑摄食相关性神经肽表达的影响

刘姗姗, 张翠珍, 彭刚

复旦大学脑科学研究院, 上海 200032

**摘要:** 脊椎动物下丘脑中的神经肽 Y(Neuropeptide Y, NPY)、GALANIN 和 GMAP 蛋白前体(GALANIN and GMAP prepropeptide, GAL)、Agouti 相关蛋白(Agouti related neuropeptide, AGRP)和阿片促黑色素原(Proopiomelanocortin, POMC)与摄食密切相关, 但在斑马鱼中对这些神经肽与摄食之间关系的研究较少。本文通过原位杂交技术和实时定量 PCR 方法, 观察饥饿 1 d、饥饿 2 d 和饥饿 2 d 喂食 2 d 后斑马鱼下丘脑中 *npv*、*galanin*、*agrp* 和 *pomca* 的表达情况。结果显示, 饥饿处理之后, *agrp* 和 *galanin* 在斑马鱼下丘脑中的表达量显著上升( $P<0.05$ )。与对照组相比, 饥饿 2 d 后斑马鱼下丘脑中 *pomca* 表达量显著下降( $P<0.05$ )。饥饿 2 d 喂食 2 d 后斑马鱼下丘脑中 *pomca*、*agrp* 和 *galanin* 的表达量与对照组相比没有显著性差异。所有实验中 *npv* 在斑马鱼下丘脑中的表达没有显著性差异。这表明饥饿处理促使斑马鱼下丘脑中 *agrp* 和 *galanin* 表达上调, *pomca* 表达下调; 及时摄食可以恢复 *agrp*、*galanin* 和 *pomca* 在下丘脑中的表达水平。

**关键词:** 斑马鱼; *npv*; *galanin*; *agrp*; *pomca*

## Effects of starvation on the expression of feeding related neuropeptides in the larval zebrafish hypothalamus

Shanshan Liu, Cuizhen Zhang, Gang Peng

Institute of Brain Science, Fudan University, Shanghai 200032, China

**Abstract:** Vertebrate feeding behavior is regulated by neuropeptide Y (NPY), GALANIN and GMAP prepropeptide (GAL), agouti related neuropeptide (AGRP) and proopiomelanocortin (POMC) in the hypothalamus. However, there are few studies on the relationship between these neuropeptides and feeding in zebrafish larvae. In the present study, real-time quantitative PCR and *in situ* hybridization were applied to examine the expression levels of *npv*, *galanin*, *agrp* and *pomca* in the hypothalamus of zebrafish larvae after starvation and re-feeding. The results showed the expression of *agrp* and *galanin* increased significantly after starvation compared to the control group, whilst the expression of *pomca* decreased significantly compared to control. If the animals were re-fed for two days after starvation, the expression of *pomca*, *agrp* and *galanin* showed no significant difference from the control. Expression of *npv* did not alter in either condition. These results indicate that starvation increases expression levels of *agrp* and *galanin*, and reduces the *pomca* expression. In addition, these starvation-induced changes can be reversed by re-feeding.

**Keywords:** zebrafish; *npv*; *galanin*; *agrp*; *pomca*

收稿日期: 2016-03-14; 修回日期: 2016-07-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31171074)资助[Supported by the National Nature Science Foundation of China(No. 31171074)]

作者简介: 刘姗姗, 硕士研究生, 专业方向: 斑马鱼神经系统发育及行为的分子机理。E-mail: 13210700024@fudan.edu.cn

通讯作者: 彭刚, 教授, 博士生导师, 研究方向: 斑马鱼神经系统发育及行为的分子机理。E-mail: gangpeng@fudan.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.16-087

网络出版时间: 2016/8/8 15:12:00

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160808.1512.002.html>

下丘脑能够参与机体大量生理活动,包括调控睡眠、抵抗焦虑和抑郁、维持能量平衡、调控体温等<sup>[1]</sup>,对动物的生存具有重要意义。20 世纪 Stellar 提出下丘脑外侧区为摄食中枢,下丘脑内侧区为饱食中枢,此后下丘脑作为摄食调控中枢被广泛研究。下丘脑通过神经肽形成摄食调控网络,神经肽存在着复杂的相互联系,共同作用调节摄食活动。

神经肽 Y(Neuropeptide Y, NPY)是一种具有 36 个氨基酸的蛋白<sup>[2]</sup>,首先在猪脑中被发现<sup>[3]</sup>,在所有脊椎动物中均保守存在。NPY 家族具有较多的功能,如调控昼夜节律、血压调控和促进胃肠蠕动等<sup>[4]</sup>。下丘脑弓状核 NPY 纤维投射到室旁核,具有刺激食欲中枢、促进摄食行为的作用<sup>[5]</sup>。GALANIN (GAL)在人类中是含有 30 个氨基酸的蛋白<sup>[6]</sup>,参与抵抗抑郁<sup>[7]</sup>,一定程度上降低癌症的复发率<sup>[8]</sup>。大鼠下丘脑中 GAL 下调促使其摄食活动降低,体重下降<sup>[9]</sup>。Agouti 相关蛋白(Agouti related protein, AGRP)在睡眠<sup>[10]</sup>和运动<sup>[11]</sup>中具有重要作用。AGRP 具有刺激食欲、减少能量消耗的作用。阿片促黑色素原(Proopiomelanocortin, POMC),在抵抗抑郁方面具有重要作用<sup>[12]</sup>,是抑制摄食活动的神经肽,主要通过裂解形成促黑激素(MSH)和促肾上腺皮质激素(ACTH)等产物发挥作用<sup>[13]</sup>。

作为国际标准化组织认可的 5 种鱼类实验动物之一,斑马鱼具有许多优点,如生长周期较短、胚胎透明、产卵量多以及体外受精等<sup>[14, 15]</sup>,并且斑马鱼是具有保守的解剖和生理特性的脊椎动物<sup>[16]</sup>,在基因水平与人类的同源性非常高<sup>[17]</sup>。同时相比较于其他脊椎模式动物,斑马鱼体型较小,在实验中也更便于操作<sup>[18, 19]</sup>。斑马鱼 *agrp* 在促进摄食方面的作用与其他脊椎动物相同,并且已有研究表明斑马鱼 *agrp* mRNA 的表达量在禁食处理之后明显上调<sup>[20]</sup>。2016 年 Tian 等<sup>[21]</sup>发现斑马鱼 *npv* mRNA 的表达量在饥饿处理初期没有显著性变化,但随着饥饿处理时间延长,其表达量显著上升。本研究主要借助实时定量 PCR 方法和原位杂交技术研究饥饿处理对下丘脑摄食相关性神经肽基因表达的影响,通过实时定量 PCR 方法可以检测基因在转录水平的变化,原位杂交技术进一步直观地呈现基因表达的情况<sup>[22]</sup>,从而进一步揭示摄食相关性神经肽与饥饿之间的关

系。实验结果显示,相比于对照组斑马鱼,饥饿处理后斑马鱼下丘脑中摄食具有促进作用的神经肽基因 *agrp* 和 *galanin* 的表达显著提高,对摄食具有抑制作用的 *pomca* 基因表达量显著性下降。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物与分组

实验主要使用野生型 AB 品系的斑马鱼,由复旦大学脑科学研究院 985 平台斑马鱼模式动物中心(上海)提供。所用的养殖系统购于北京爱生公司。系统水温为 28.5℃,pH7.2 左右,电导率为 500  $\mu\text{F}/\text{cm}^3$  左右,昼夜时间设定为 12 h/12 h。斑马鱼胚胎收集后置于胚胎培养液(15 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L KCl、1.0 mmol/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.15 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05 mmol/L 无水  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、1.0 mmol/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.83 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ )中,并于 28.5℃ 培养至第 5 d,之后喂食轮虫直至第 8 d 进行实验。

将发育至第 8 d 的斑马鱼分为:饥饿 1 d 组(1d-s)、饥饿 2 d 组(2d-s)、饥饿 2 d 喂食 2 d 组(2d-s-r)及 3 组对照组(1d-n、2d-n、4d-n),每组斑马鱼的数量约为 30 条。1d-n 组在第 9 d 仍按时喂食。1d-s 组在第 9 d 不喂食。2d-n 组在第 9、10 d 按时喂食。2d-s 组在第 9、10 d 不喂食。4d-n 组在第 9~12 d 喂食。2d-s-r 组在第 9、10 d 不喂食,在第 11、12 d 喂食。

选定发育至第 8 d 的斑马鱼作为实验对象的原因:(1) 8 d 斑马鱼已经进食一段时间;(2) 8 d 斑马鱼下丘脑等结构已经发育完全;(3) 8 d 斑马鱼原位杂交实验容易操作。

### 1.2 原位杂交

#### 1.2.1 全胚胎 RNA 提取、反转录 cDNA

从发育至第 8 d 的斑马鱼脑中提取总 RNA(GeneJET RNA Purification Kit, K0731, Thermoscientific),-80℃ 储存储备用。将提取的 RNA 用反转录试剂盒(Revert Aid Minus First Strand cDNA Synthesis kit, K1632, Thermoscientific)反转录合成 cDNA。

#### 1.2.2 引物设计

根据 NCBI 和 Ensemble 网站中 *npv*、*agrp*、*pomca* 和 *galanin* 的 mRNA 序列,利用 Oligo Analyser 1.0.2

设计引物。引物序列如表 1 所示。

1.2.3 探针标记

用地高辛标记探针<sup>[23]</sup>。质粒酶切反应体系(*EcoR*、*Hind*，Fermentas，上海)：*EcoR* 1 μL，buffer *EcoR* 3 μL，DNA 3~5 μg，灭菌水至 30 μL；*Hind* 1 μL，buffer *R* 3 μL，DNA 3~5 μg，灭菌水至 30 μL。反应温度 37℃，反应时间 3 h。柱纯化终止反应。T3 或 T7 体外合成反义 RNA 探针(Mmessage mMA-CHINE<sup>®</sup>T3，AM1348，Ambion；Mmessage mMA-CHINE<sup>®</sup>T7，AM1344，Ambion)。LiCl(Ambion)沉淀方法提纯 mRNA。

1.2.4 完整脑部获得

幼年斑马鱼 4%多聚甲醛 4℃固定过夜，甲醇脱水 1 h。用 5 号解剖针(TWEEZER DUMON<sup>®</sup> 5I-NOX，500341，World Precision Instrument)解剖出幼年斑马鱼完整脑部结构。

1.2.5 原位杂交

原位杂交参照文献<sup>[24]</sup>的方法。68℃预杂交 2~4 h，68℃杂交过夜(探针浓度为 100~200 ng/200 μL)，4℃孵育 Anti-Digoxigenin-AP(Roche，Mannheim，Germany)过夜。NBT/BCIP(Roche，Mannheim，Germany)显色。

1.2.6 信号分析

斑马鱼脑部整体原位杂交通过显微镜(Leica M205 FA，Germany)观察拍照。整理拍照结果并计数斑马鱼下丘脑中具有摄食相关性神经肽基因表达的神经元个数。

1.3 实时定量 PCR

1.3.1 引物设计

根据 NCBI 网站中 *npv*、*agrp*、*galanin*、*pomca* 及内参基因 *gapdh* 的 mRNA 序列并结合斑马鱼全基因组测序公布的序列，利用 Oligo Analyser 1.0.2 设计引物。引物序列如表 2 所示。

1.3.2 PCR 扩增体系和条件

采用实时定量 PCR 技术对不同处理组的斑马鱼头部的各个基因表达量进行相对定量分析。荧光染料为 SYBR Green I(SYBR<sup>®</sup> Green Real-time PCR Master Mix，TOYOBO)，以 *gapdh* 作为内参。实时定量 PCR 反应体系总体积为 15 μL，包括 SYBR 7.5 μL，灭菌水 4.5 μL，上、下游引物(F、R) (10 μm/L)各 1 μL，模板 (25 ng/μL) 1 μL。PCR 扩增条件：95℃预变性 2 min，95℃变性 15 s，60℃复性 15 s，72℃延伸 20 s，40 个循环；60℃延伸 20 min，4℃保存。由 Mastercycler<sup>®</sup> ep realplex 实时荧光定量 PCR 仪收集荧光信号。每个待测样品 cDNA 设置 3 个重复，对得到的 3 个 *Ct* 值取平均值，用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行计算。

1.4 数据分析

通过独立样本 T-TEST，比较饥饿 1 d 组(1d-s)、饥饿 2 d 组(2d-s)、饥饿 2 d 喂食 2 d 组(2d-s-r)及 3 组对照组(1d-n、2d-n、4d-n)斑马鱼下丘脑中摄食相关性神经肽基因表达情况。

2 结果与分析

2.1 *agrp* 基因在下丘脑中的表达

原位杂交结果证明，相比较于 1d-n 组(图 1A)，

表 1 PCR 扩增斑马鱼 *npv*、*galanin*、*pomca* 及 *agrp* 基因所用引物  
Table 1 Primers for *npv*、*galanin*、*pomca* and *agrp* amplification

目的基因	引物序列(5' 3')	产物长度(bp)	复性温度( )
<i>npv</i>	F: TCCAAGACCTCATTCACTGATG	686	55.3
	R: GGGGCAAAAAGACAGCAAACAAAG		
<i>galanin</i>	F: TTCACTCTCCAAAGACCAACTG	602	55.3
	R: AGCCGTCGAGTGATTGTGAATAC		
<i>pomca</i>	F: GCACAACCCATTAAGATCAG	1077	56.1
	R: TGCTGTTTTCAGCTCTAAGCTGG		
<i>agrp</i>	F: ACACCTTAAACCGCAGCCAATG	583	56.1
	R: GCACTACAGTCTGAGTGATTATG		

表 2 实时定量 PCR 扩增斑马鱼 *npv*、*galanin*、*pomca* 及 *agrp* 基因所用引物Table 2 Primers for real-time quantitative PCR amplification of *npv*, *galanin*, *pomca* and *agrp*

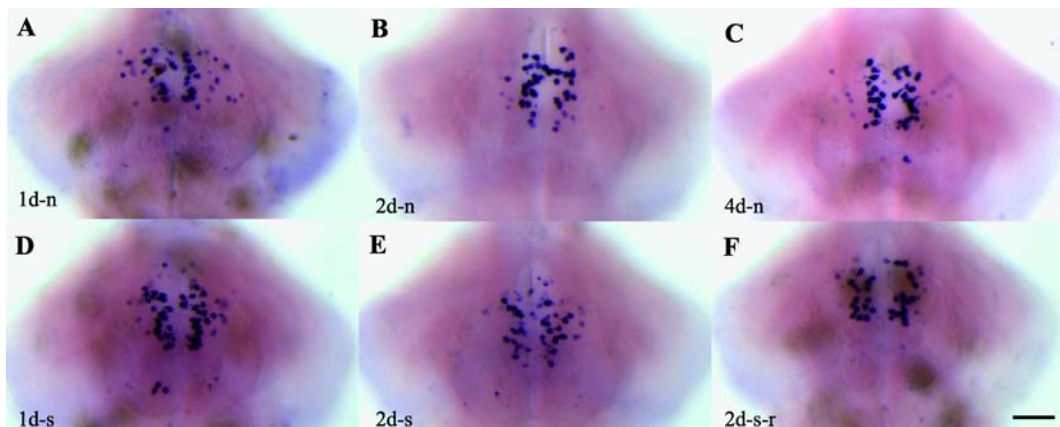
目的基因	引物序列(5' 3')	产物长度(bp)	复性温度( )
<i>npv</i>	F: CTGATGAATCCAAACATGAAGATG	279	60.1
	R: TCCTCATATCTGGTCTGGGGG		
<i>galanin</i>	F: CTCCTCGGTCCTCGTCGTATT	265	63.3
	R: GCTGTCCAGAGCCCAATTTCTT		
<i>pomca</i>	F: ACAGAGGAGAACATCTTGAATGC	269	62.9
	R: TACACCTTGATGGGTCTGCGTTT		
<i>agrp</i>	F: TATGATGAGGATCTGGGCAAAGC	308	61.8
	R: GGATTCTCTGTGCGAGTTTATGAT		

1d-s 组(图 1D)斑马鱼下丘脑中 *agrp* 基因的表达量上升。与 2d-n 组(图 1B)相比, 2d-s 组(图 1E)斑马鱼下丘脑中 *agrp* 基因的表达量增加。相比于 4d-n 组(图 1C), 2d-s-r 组(图 1F)斑马鱼下丘脑中 *agrp* 基因的表达没有明显变化。结果说明饥饿状态时幼年斑马鱼下丘脑中的 *agrp* 基因的表达会升高, 及时完成摄食活动可以再次降低 *agrp* 基因的表达。

计数斑马鱼下丘脑中具有 *agrp* 基因表达的神经元个数发现, 相比于 1d-n 组, 1d-s 组斑马鱼下丘脑中具有 *agrp* 基因表达的细胞数量显著上升( $P<0.05$ )。与 2d-n 组相比, 2d-s 组斑马鱼下丘脑中具有 *agrp* 基因表达的细胞数量显著性提高( $P<0.05$ )。相比于 4d-n 组, 2d-s-r 组斑马鱼下丘脑中具有 *agrp* 基因表达的细胞数量没有显著性变化。1d-n 组、2d-n 组和

4d-n 组斑马鱼之间下丘脑中具有 *agrp* 基因表达的细胞数量没有显著性变化, 1d-s 组、2d-s 组斑马鱼之间下丘脑中具有 *agrp* 基因表达的细胞数量也没有显著性变化, 2d-s 组与 2d-s-r 组相比具有显著性差异( $P<0.05$ )(图 2)。

实时定量 PCR 结果同样表明, 相比于 1d-n 组, 1d-s 组斑马鱼脑中 *agrp* 基因的表达量显著上升( $P<0.05$ )。与 2d-n 组相比, 2d-s 组斑马鱼 *agrp* 基因在脑中的表达量具有显著性提高( $P<0.05$ )。相比于 4d-n 组, 2d-s-r 组斑马鱼脑中 *agrp* 基因的表达量没有显著性变化。1d-n 组、2d-n 组和 4d-n 组斑马鱼之间 *agrp* 基因在脑中的表达量没有显著性变化, 1d-s 组、2d-s 组和 2d-s-r 组斑马鱼之间 *agrp* 基因在脑中的表达量也没有显著性变化(图 3)。

图 1 原位杂交检测斑马鱼下丘脑中 *agrp* 基因表达情况Fig. 1 The expression of *agrp* in zebrafish hypothalamus

A: *agrp* 基因在 1d-n 组斑马鱼下丘脑中的表达; B: *agrp* 基因在 2d-n 组斑马鱼下丘脑中的表达; C: *agrp* 基因在 4d-n 组斑马鱼下丘脑中的表达; D: *agrp* 基因在 1d-s 组斑马鱼下丘脑中的表达; E: *agrp* 基因在 2d-s 组斑马鱼下丘脑中的表达; F: *agrp* 基因在 2d-s-r 组斑马鱼下丘脑中的表达。n = 20, 图像标尺均为 50  $\mu$ m。



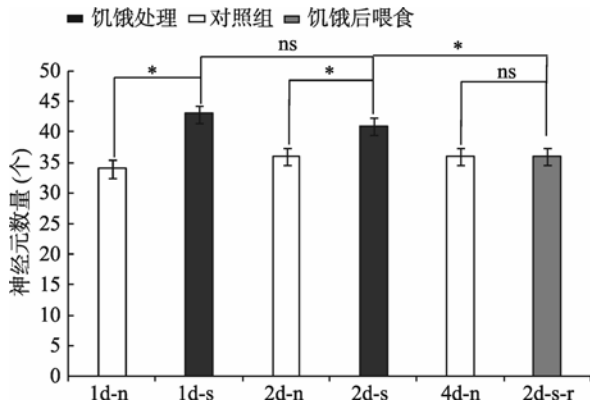


图2 斑马鱼下丘脑中具有 *agrp* 基因表达的细胞数量  
Fig. 2 The number of cells expressing *agrp* in zebrafish hypothalamus

\*表示  $P < 0.05$ ,  $n = 20$ 。

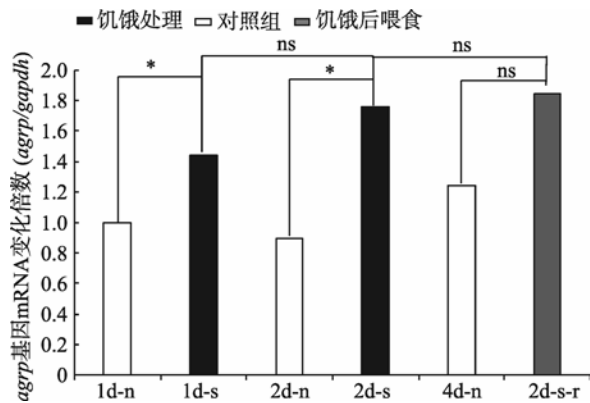


图3 实时定量 PCR 检测斑马鱼脑中 *agrp* 基因表达  
Fig. 3 The expression of *agrp* in zebrafish brains

\*表示  $P < 0.05$ ,  $n = 20$ , 内参基因为 *gapdh*。

## 2.2 *npv* 基因在下丘脑中的表达

原位杂交结果证明,相较于 1d-n 组(图 4A),1d-s 组(图 4D)斑马鱼 *npv* 基因在下丘脑中的表达量没有明显变化。与 2d-n 组(图 4B)相比,2d-s 组(图 4E)斑马鱼下丘脑中 *npv* 基因的表达量变化不是很显著。相比较于 4d-n 组(图 4C),2d-s-r 组(图 4F)斑马鱼 *npv* 基因在下丘脑中的表达量没有明显改变。说明幼年斑马鱼在饥饿 1 d 或 2 d 的情况下,其下丘脑中的 *npv* 基因表达量没有显著性变化。

实时定量 PCR 结果表明,不同处理组斑马鱼脑中 *npv* 基因的表达量没有显著性差异,但是可以看出饥饿处理组斑马鱼 *npv* 表达量相比较于对照组斑马鱼具有上升的趋势(图 5),这在一定程度上说明 *npv* 基因参与斑马鱼摄食调控,饥饿处理促使斑马鱼脑中 *npv* 基因的表达量上升。

## 2.3 *galanin* 基因在下丘脑中的表达

原位杂交结果证明,相较于 1d-n 组(图 6A),1d-s 组(图 6D)斑马鱼 *galanin* 基因在下丘脑中的表达量上升。与 2d-n 组(图 6B)相比,2d-s 组(图 6E)斑马鱼下丘脑中 *galanin* 基因的表达量增加。相比较于 4d-n 组(图 6C),2d-s-r 组(图 6F)斑马鱼 *galanin* 基因在下丘脑中的表达量没有明显变化。结果说明幼年斑马鱼在饥饿状况下,其下丘脑中的 *galanin* 基因的表达会升高,及时摄食可以恢复其表达。

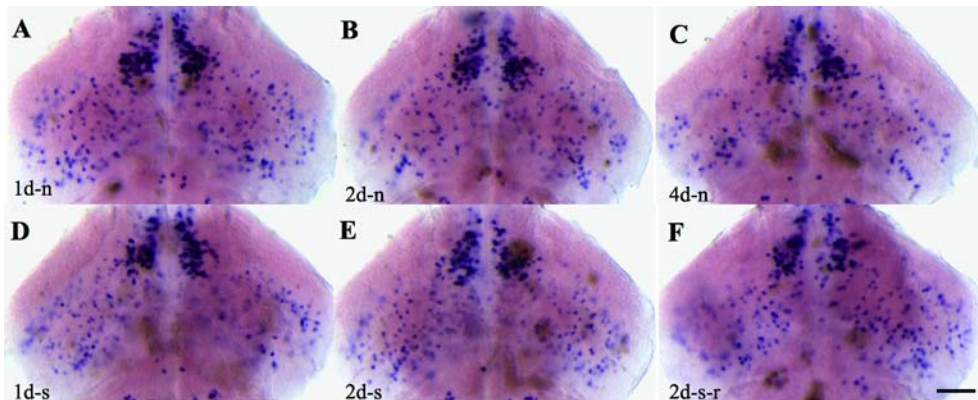


图4 原位杂交检测斑马鱼下丘脑中 *npv* 基因表达情况

Fig. 4 The expression of *npv* in the zebrafish hypothalamus

A: *npv* 基因在 1d-n 组斑马鱼下丘脑中的表达; B: *npv* 基因在 2d-n 组斑马鱼下丘脑中的表达; C: *npv* 基因在 4d-n 组斑马鱼下丘脑中的表达; D: *npv* 基因在 1d-s 组斑马鱼下丘脑中的表达; E: *npv* 基因在 2d-s 组斑马鱼下丘脑中的表达; F: *npv* 基因在 2d-s-r 组斑马鱼下丘脑中的表达。 $n = 20$ , 图像标尺均为  $50 \mu\text{m}$ 。

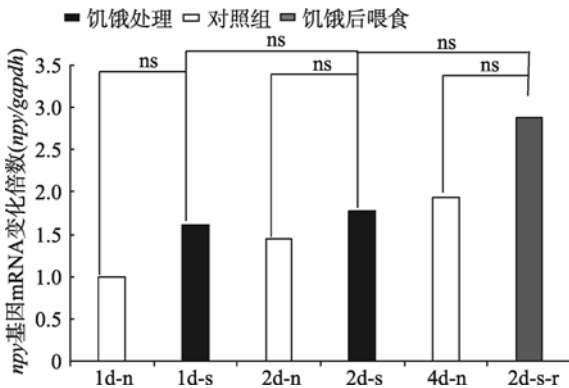


图 5 实时定量 PCR 检测斑马鱼脑中 *npy* 基因表达

Fig. 5 The expression of *npy* in zebrafish brains

n = 20, 内参基因为 *gapdh*。

*Galanin* 基因在斑马鱼下丘脑中具有较大范围的表达,计数具有 *galanin* 基因表达的神经元个数存在误差,因此将具有 *galanin* 基因表达的斑马鱼进行划分,下丘脑中 *galanin* 基因表达类似于图 7A 和 7B

的情况被定义为表达弱等级,下丘脑中 *galanin* 基因表达类似于图 7C 和 7D 的情况被定义为表达强等级。

相比于 1d-n 组,1d-s 组斑马鱼下丘脑中具有 *galanin* 基因表达的细胞数量显著上升( $P < 0.05$ )。与 2d-n 组相比,2d-s 组斑马鱼下丘脑中具有 *galanin* 基因表达的细胞数量显著性增加( $P < 0.05$ )。相比于 4d-n 组,2d-s-r 组斑马鱼下丘脑中具有 *galanin* 基因表达的细胞数量没有明显变化。1d-n 组、2d-n 组和 4d-n 组斑马鱼之间下丘脑中具有 *galanin* 基因表达的细胞数量没有显著性变化,1d-s 组、2d-s 组斑马鱼之间下丘脑中具有 *galanin* 基因表达的细胞数量也没有显著性变化,2d-s 组与 2d-s-r 组相比具有显著性差异( $P < 0.05$ )(表 3)。

实时定量 PCR 结果同样表明,相比于 1d-n 组,1d-s 组斑马鱼 *galanin* 基因在脑中的表达量显著上升( $P < 0.05$ )。与 2d-n 组相比,2d-s 组斑马鱼脑中 *galanin*

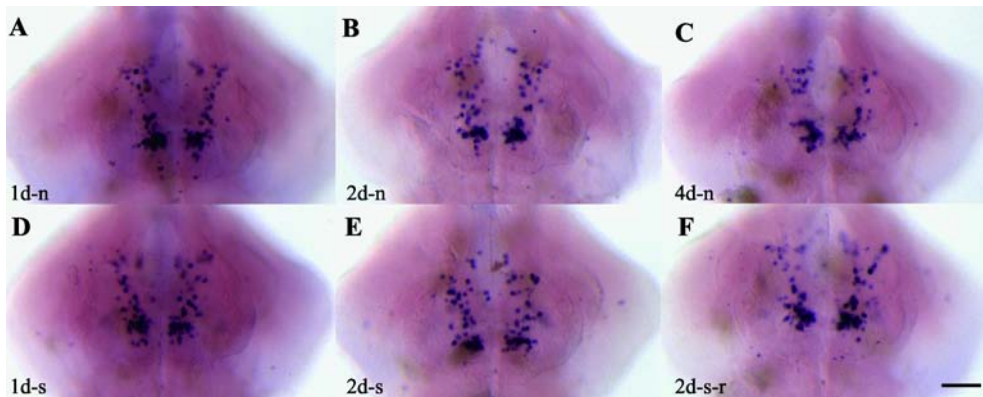


图 6 原位杂交检测斑马鱼下丘脑中 *galanin* 基因表达情况

Fig. 6 The expression of *galanin* in the zebrafish hypothalamus

A: *galanin* 基因在 1d-n 组斑马鱼下丘脑中的表达; B: *galanin* 基因在 2d-n 组斑马鱼下丘脑中的表达; C: *galanin* 基因在 4d-n 组斑马鱼下丘脑中的表达; D: *galanin* 基因在 1d-s 组斑马鱼下丘脑中的表达; E: *galanin* 基因在 2d-s 组斑马鱼下丘脑中的表达; F: *galanin* 基因在 2d-s-r 组斑马鱼下丘脑中的表达。n = 20, 图像标尺均为 50  $\mu\text{m}$ 。

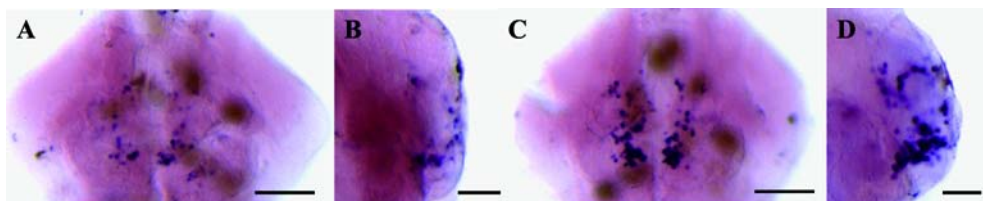


图 7 斑马鱼下丘脑中 *galanin* 基因表达等级划分

Fig. 7 The classification of *galanin* expression in the zebrafish hypothalamus

A: 弱等级腹侧观; B: 弱等级侧面观; C: 强等级腹侧观; D: 强等级侧面观。图像 A、C 标尺均为 50  $\mu\text{m}$ , 图像 B、D 标尺均为 50  $\mu\text{m}$ 。

表3 下丘脑中 *galanin* 基因表达为强等级的斑马鱼的数量(条)

Table 3 The number of zebrafish that has a higher *galanin* expression level

组别	第9天	第10天	第12天
对照组	14	10	22
饥饿组	30*	22*	20

注: 与对照组相比, \*表示  $P<0.05$ ,  $n=20$ 。

基因的表达量显著性增加( $P<0.05$ )。相比于 4d-n 组, 2d-s-r 组斑马鱼 *galanin* 基因在脑中的表达量没有明显变化。1d-n 组、2d-n 组和 4d-n 组斑马鱼之间 *galanin* 基因在脑中的表达量没有显著性变化, 1d-s 组、2d-s 组斑马鱼之间 *galanin* 基因在脑中的表达量也没有显著性变化, 2d-s-r 组与 2d-s 组相比也没有显著性差异(图 8)。

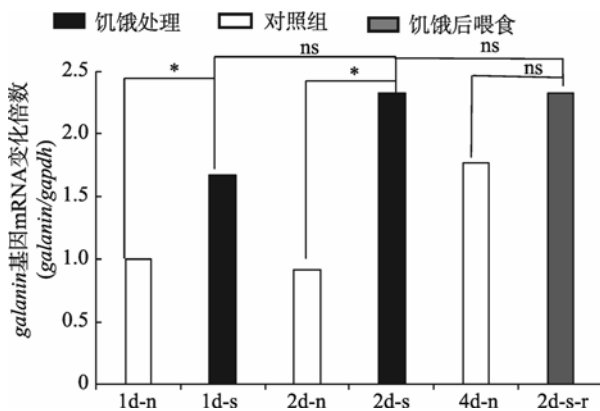


图8 实时定量 PCR 检测斑马鱼脑中 *galanin* 基因表达

Fig. 8 The expression of *galanin* in zebrafish brains

\*表示  $P<0.05$ ,  $n=20$ , 内参基因为 *gapdh*。

#### 2.4 *pomca* 基因在下丘脑中的表达

原位杂交图片的结果证明, 相比较于 1d-n 组(图 9A), 1d-s 组(图 9D)斑马鱼 *pomca* 基因在下丘脑中的表达量下降。与 2d-n 组(图 9B)相比, 2d-s 组(图 9E)斑马鱼下丘脑中 *pomca* 基因的表达量降低。相比较于 4d-n 组(图 9C), 2d-s-r 组(图 9F)斑马鱼 *pomca* 基因在下丘脑中的表达量没有显著性差异。说明幼年斑马鱼在饥饿状况下, 其下丘脑中的 *pomca* 基因表达会降低, 及时摄食可以恢复 *pomca* 基因的表达量。

计数斑马鱼下丘脑弓状核中具有 *pomca* 基因表达的神经元个数发现, 与 2d-n 组相比, 2d-s 组斑马鱼下丘脑弓状核中具有 *pomca* 基因表达的细胞数量

下降( $P<0.05$ )。相比于 4d-n 组, 2d-s-r 组斑马鱼弓状核中具有 *pomca* 基因表达的细胞数量没有显著性差异。1d-n 组、2d-n 组和 4d-n 组斑马鱼之间 *pomca* 基因在弓状核中的表达量没有显著性变化, 1d-s 组、2d-s 组斑马鱼之间 *pomca* 基因在弓状核中的表达量也没有显著性变化, 2d-s 组与 2d-s-r 组相比具有显著性差异( $P<0.05$ )(图 10)。

实时定量 PCR 结果同样表明, 与 2d-n 组相比, 2d-s 组斑马鱼脑中 *pomca* 基因的表达量下降 ( $P<0.05$ )。相比于 4d-n 组, 2d-s-r 组斑马鱼 *pomca* 基因在脑中的表达量没有显著性差异。1d-n 组、2d-n 组和 4d-n 组斑马鱼之间 *pomca* 基因在脑中的表达量没有显著性变化, 1d-s 组、2d-s 组斑马鱼之间 *pomca* 基因在脑中的表达量也没有显著性变化, 2d-s 组与 2d-s-r 组相比 *pomca* 基因在脑中的表达量具有显著性差异 ( $P<0.05$ )(图 11)。

### 3 讨论

LHA(lateral hypothalamus area)、PVN(paraventricular nucleus of hypothalamus)、VMH(ventromedial hypothalamus)等下丘脑区域对于摄食行为具有调控作用<sup>[25]</sup>, 它们之间可以通过多种神经肽相互作用调控摄食活动。NPY、GAL 和 AGRP 是下丘脑内的主要促进食欲的神经肽, 而 POMC 是下丘脑中的主要抑制食欲的神经肽。NPY 和 AGRP 共同作用于黑色素皮质激素受体(MC-R), 对 MC-R 起到抑制作用, 进而促进动物摄食活动。POMC 同样可以作用于 MC-R, 与 NPY、AGRP 不同的是, POMC 能够促进 MC-R 的活动, 进而抑制动物摄食活动<sup>[26]</sup>。斑马鱼下丘脑的结构组成与哺乳动物相似, 但更加简化。已有研究发现斑马鱼模式生物中 NPY、GAL 等神经肽之间的关系与其他脊椎动物相同<sup>[27]</sup>。

实时定量 PCR 和原位杂交的结果均显示, 饥饿处理之后 *pomca* 基因在下丘脑中的表达量下降, POMC 是下丘脑内主要厌食欲神经肽, POMC 分解产物之一是  $\alpha$  促黑激素( $\alpha$ MSH), 这种物质具有抑制动物摄食行为的功能<sup>[28]</sup>。2d-s 组斑马鱼处于饥饿状态, 其  $\alpha$ MSH 需求量相比较于 2d-n 组斑马鱼来说降低, 因此 *pomca* mRNA 在下丘脑中的表达量随之下降。2d-s-r 组斑马鱼在饥饿处理之后及时摄食, 为进



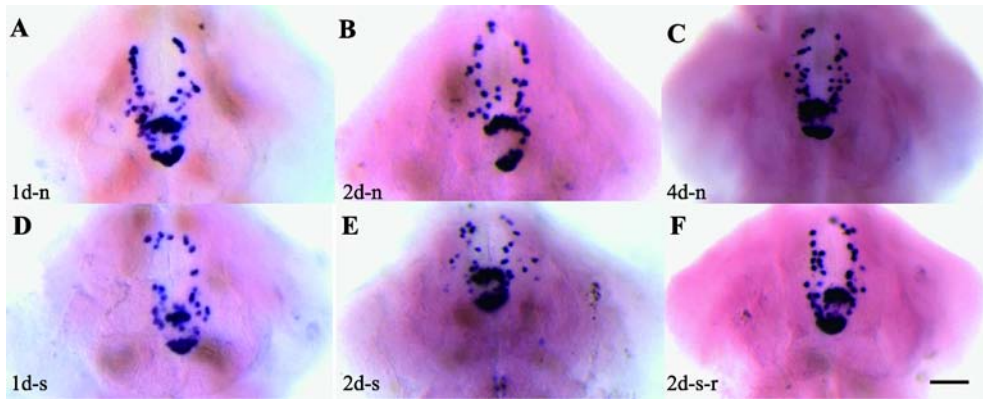


图 9 原位杂交检测斑马鱼下丘脑中 *pomca* 基因表达情况

Fig. 9 The number of cells expressing *pomca* in the zebrafish hypothalamus

A: *pomca* 基因在 1d-n 组斑马鱼下丘脑中的表达; B: *pomca* 基因在 2d-n 组斑马鱼下丘脑中的表达; C: *pomca* 基因在 4d-n 组斑马鱼下丘脑中的表达; D: *pomca* 基因在 1d-s 组斑马鱼下丘脑中的表达; E: *pomca* 基因在 2d-s 组斑马鱼下丘脑中的表达; F: *pomca* 基因在 2d-s-r 组斑马鱼下丘脑中的表达。n = 20, 图像标尺均为 50  $\mu\text{m}$ 。

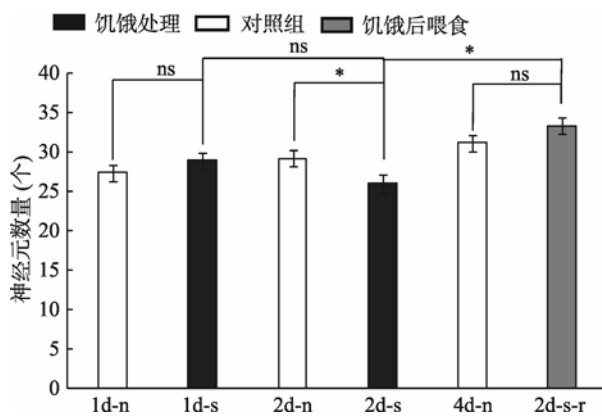


图 10 斑马鱼下丘脑弓状核中 *pomca* 基因表达

Fig. 10 The expression of *pomca* in the zebrafish hypothalamus

\*表示  $P < 0.05$ , n = 20。

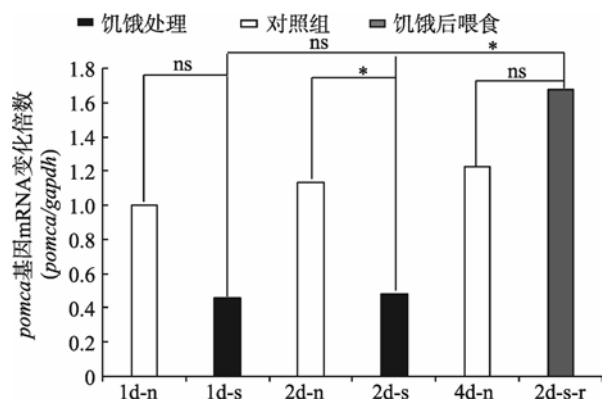


图 11 实时定量 PCR 检测斑马鱼脑中 *pomca* 基因表达

Fig. 11 The expression of *pomca* in zebrafish brains

\*表示  $P < 0.05$ , n = 20, 内参基因为 *gapdh*。

一步抑制斑马鱼的摄食行为, 其下丘脑中 *pomca* 基因的表达上升到与对照组斑马鱼相似的程度。

饥饿处理之后 *agrp* 基因在斑马鱼下丘脑中的表达量显著升高, AGRP 能够通过抑制  $\alpha$  促黑激素 ( $\alpha\text{MSH}$ ) 来促进动物摄食行为<sup>[29]</sup>。饥饿处理之后斑马鱼下丘脑中的 POMC 释放量下降, 其分解产物  $\alpha$  促黑激素 ( $\alpha\text{MSH}$ ) 含量降低,  $\alpha$  促黑激素 ( $\alpha\text{MSH}$ ) 合成量降低促使 AGRP 合成量增多, 相比较于 1d-n 组和 2d-n 组, 1d-s 组和 2d-s 组斑马鱼下丘脑中 *agrp* mRNA 的表达量上升, 下丘脑中具有 *agrp* 基因表达的神经元的数量显著性增多。2d-s-r 组斑马鱼下丘脑中 *agrp* 基因表达情况与 4d-n 组斑马鱼相似, 及时摄食促使 *agrp* 基因表达下调。

GAL 在哺乳动物中借助于其广泛分布于中枢神经系统和外周神经系统中的受体调控动物摄食行为。在下丘脑室旁核中注射过量的 GAL 可以促进动物摄食行为<sup>[30]</sup>。1d-s 组和 2d-s 组斑马鱼是饥饿处理的斑马鱼, 其下丘脑内 GAL 合成量上升, 因此在 1d-s 组和 2d-s 组斑马鱼下丘脑中具有 *galanin* 基因表达的神经元的数量显著增多。2d-s-r 组斑马鱼饥饿处理之后再喂食, 进一步抑制 *galanin* 基因表达, 从而使其表达量与 4d-n 组相同。

NPY 是下丘脑内主要的促食欲神经肽, 在动物体内注射过量的 NPY 之后, 动物突然食欲大增并且长时间过量摄食。在大量与 NPY 有关的受体中, Y5 是与 NPY 关系最为密切的<sup>[31]</sup>。借助抑制剂降低 NPY



活性, 动物的摄食行为受到极大影响。在已有研究中证明 *agrp* 可以和 *npv* 在同一细胞中表达<sup>[32]</sup>, 二者之间相互促进。所有实验组中斑马鱼下丘脑 *npv* 基因表达没有明显的改变, 这可能是由于饥饿处理程度没有达到促使 *npv* 基因表达量上调的阈值, 但从实时定量 PCR 及原位杂交结果分析可以看出 *npv* 基因表达量具有上调趋势, 已有研究中主要关注于饥饿与青春期斑马鱼 *npv* 基因表达情况<sup>[21]</sup>, 此次实验则是在幼年斑马鱼中进行。

饥饿处理后, 斑马鱼下丘脑中摄食行为具有促进作用的 *galanin* 和 *agrp* 的表达量显著性升高, 抑制摄食活动的 *pomca* 表达量下降。及时进行正常摄食活动可以降低斑马鱼下丘脑中 *galanin* 和 *agrp* 的表达量, 同时 *pomca* 表达量在一定程度上恢复。这种神经肽基因表达与饥饿之间的关系对于动物生存具有重要意义, 基于此研究可以进一步探讨肥胖与神经肽之间的关系。

## 参考文献(References):

- [1] Bolborea M, Dale N. Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci*, 2013, 36(2): 91–100. [DOI]
- [2] Larhammar D. Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul Pept*, 1996, 62(1): 1–11. [DOI]
- [3] Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y—a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, 1982, 296(5858): 659–660. [DOI]
- [4] Dumont Y, Martel JC, Fournier A, St-Pierre S, Quirion R. Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues. *Prog Neurobiol*, 1992, 38(2): 125–167. [DOI]
- [5] Williams G, Harrold JA, Cutler DJ. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proc Nutr Soc*, 2000, 59(3): 385–396. [DOI]
- [6] Yoshitake T, Wang FH, Kuteeva E, Holmberg K, Yamaguchi M, Crawley JN, Steiner R, Bartfai T, Ögren SO, Hökfelt T, Kehr J. Enhanced hippocampal noradrenaline and serotonin release in galanin-overexpressing mice after repeated forced swimming test. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(1): 354–359. [DOI]
- [7] Millón C, Flores-Burgess A, Narváez M, Borroto-Escuela DO, Santín L, Parrado C, Narváez JA, Fuxe K, Díaz-Cabiale Z. A role for galanin N-terminal fragment (1-15) in anxiety- and depression-related behaviors in rats. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2015, 18(3), doi: 10.1093/ijnp/pyu064. [DOI]
- [8] Misawa K, Misawa Y, Kanazawa T, Mochizuki D, Imai A, Endo S, Carey TE, Mineta H. Epigenetic inactivation of galanin and GALR1/2 is associated with early recurrence in head and neck cancer. *Clin Exp Metastasis*, 2016, 33(2): 187–195. [DOI]
- [9] Zafar MI, Hu CN, Liu DF, Shafqat RA, Gao F. Insulin detemir causes lesser weight gain in comparison to insulin glargine: role on hypothalamic NPY and galanin. *J Diabetes Res*, 2014, 2014: 458104. [DOI]
- [10] Shukla C, Basheer R. Metabolic signals in sleep regulation: recent insights. *Nat Sci Sleep*, 2016, 8(1): 9–20. [DOI]
- [11] Huang H, Lee SH, Ye CP, Lima IS, Oh BC, Lowell BB, Zabolotny JM, Kim YB. ROCK1 in AgRP neurons regulates energy expenditure and locomotor activity in male mice. *Endocrinology*, 2013, 154(10): 3660–3670. [DOI]
- [12] Wu YH, Patchev AV, Daniel G, Almeida OFX, Spengler D. Early-life stress reduces DNA methylation of the Pomc gene in male mice. *Endocrinology*, 2014, 155(5): 1751–1762. [DOI]
- [13] Anderson EJ, Çakir I, Carrington S, Cone R, Ghamari-Langroudi M, Gillyard T, Gimenez LE, Litt MJ. 60 years of POMC: Regulation of feeding and energy homeostasis by  $\alpha$ -MSH. *J Mol Endocrinol*, 2016, 56(4): T157–T174. [DOI]
- [14] Li L, Luo LF. Zebrafish as the model system to study organogenesis and regeneration. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(4): 421–432.  
李礼, 罗凌飞. 以斑马鱼为模式动物研究器官的发育与再生. *遗传*, 2013, 35(4): 421–432. [DOI]
- [15] Parker MO, Brock AJ, Walton RT, Brennan CH. The role of zebrafish (*Danio rerio*) in dissecting the genetics and neural circuits of executive function. *Front Neural Circuits*, 2013, 7: 63. [DOI]
- [16] Morin C, de Souza MA, Müller CP, Hardigan P, Spieler RE. Active avoidance learning in zebrafish (*Danio rerio*)—the role of sensory modality and inter-stimulus interval. *Behav Brain Res*, 2013, 248: 141–143. [DOI]
- [17] Li HH, Huang P, Dong W, Zhu ZY, Liu D. A brief history of zebrafish research—toward biomedicine. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(4): 310–320.  
李辉辉, 黄萍, 董巍, 朱作言, 刘东. 斑马鱼研究走向生物医学. *遗传*, 2013, 35(4): 310–320. [DOI]
- [18] Kalueff AV, Gebhardt M, Stewart AM, Cachat JM,

- Brimmer M, Chawla JS, Craddock C, Kyzar EJ, Roth A, Landsman S, Gaikwad S, Robinson K, Baatrup E, Tierney K, Shamchuk A, Norton W, Miller N, Nicolson T, Braubach O, Gilman CP, Pittman J, Rosemberg DB, Gerlai R, Echevarria D, Lamb E, Neuhaus SCF, Weng W, Bally-Cuif L, Schneider H. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, 2013, 10(1): 70–86. [DOI]
- [19] Burne T, Scott E, van Swinderen B, Hilliard M, Reinhard J, Claudianos C, Eyles D, McGrath J. Big ideas for small brains: what can psychiatry learn from worms, flies, bees and fish? *Mol Psychiatry*, 2011, 16(1): 7–16. [DOI]
- [20] Song Y, Golling G, Thacker TL, Cone RD. Agouti-related protein (AGRP) is conserved and regulated by metabolic state in the zebrafish, *Danio rerio*. *Endocrine*, 2003, 22(3): 257–265. [DOI]
- [21] Tian J, He G, Mai KS, Liu CD. Effects of postprandial starvation on mRNA expression of endocrine-, amino acid and peptide transporter-, and metabolic enzyme-related genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Physiol Biochem*, 2015, 41(3): 773–787. [DOI]
- [22] Zhang CX, Liu F. A brief protocol for high-resolution whole mount *in situ* hybridization in zebrafish. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(4): 522–528.  
张春霞, 刘峰. 斑马鱼高分辨率整胚原位杂交实验方法与流程. *遗传*, 2013, 35(4): 522–528. [DOI]
- [23] Chen FJ, Chen SJ, Liu SS, Zhang CZ, Peng G. Effects of lorazepam and WAY-200070 in larval zebrafish light/dark choice test. *Neuropharmacology*, 2015, 95: 226–233. [DOI]
- [24] Zhang CW, Gao JX, Zhang HF, Sun L, Peng G. Robo2-slit and Dcc-netrin1 coordinate neuron axonal pathfinding within the embryonic axon tracts. *J Neurosci*, 2012, 32(36): 12589–12602. [DOI]
- [25] Zhang WM, Zhang XX. Effects of leptin on RNA content of LHA, VMH, PVN and the body fat. *Chin J Appl Physiol*, 2005, 21(4): 365–366, 456.  
张维民, 张熙雄. Leptin 对下丘脑 LHA、VMH、PVN 的 RNA 含量和体脂肪的影响. *中国应用生理学杂志*, 2005, 21(4): 365–366, 456. [DOI]
- [26] Stocker CJ, Cawthorne MA. The influence of leptin on early life programming of obesity. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(10): 545–551. [DOI]
- [27] Podlasz P, Jakimiuk A, Chmielewska-Krzesinska M, Kasica N, Nowik N, Kaleczyc J. Galanin regulates blood glucose level in the zebrafish: a morphological and functional study. *Histochem Cell Biol*, 2016, 145(1): 105–117. [DOI]
- [28] Zheng HY, Patterson LM, Rhodes CJ, Louis GW, Skibicka KP, Grill HJ, Myers MG Jr, Berthoud HR. A potential role for hypothalamomedullary POMC projections in leptin-induced suppression of food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010, 298(3): R720–R728. [DOI]
- [29] Lu DS, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen WB, Woychik RP, Wilkison WO, Cone RD. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature*, 1994, 371(6500): 799–802. [DOI]
- [30] Mitsukawa K, Lu X, Bartfai T. Galanin, galanin receptors, and drug targets. In: Hökfelt T, ed. *Galanin*. Basel: Springer, 2010: 7–23. [DOI]
- [31] Fang PH, Yu M, Guo LL, Bo P, Zhang ZW, Shi MY. Galanin and its receptors: a novel strategy for appetite control and obesity therapy. *Peptides*, 2012, 36(2): 331–339. [DOI]
- [32] Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci*, 1998, 1(4): 271–272. [DOI]

(责任编辑: 刘峰)