

蓝洁, 梁旭方, 张焱鹏, 等. 草鱼神经肽Y受体对神经肽Y的响应机制及信号通路探究[J]. 华中农业大学学报, 2023, 42(4): 225-235.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.04.026

草鱼神经肽Y受体对神经肽Y的响应机制 及信号通路探究

蓝洁¹, 梁旭方¹, 张焱鹏¹, 翟丽娟², 万功伟²

1. 华中农业大学水产学院/华中农业大学鳊鱼研究中心/长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部
工程研究中心, 武汉 430070; 2. 荆州百湖生态渔业发展有限公司, 荆州 434000

摘要 为探究草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)与神经肽Y受体(NPY receptor, YR)的相互作用及信号传递机制, 对草鱼YR的基因结构、组织表达和细胞信号传导途径进行分析。结果显示, 在草鱼基因组中获取了7个YR基因的序列, 分别为Y1R、Y2R、Y2-2R、Y4R、Y7R、Y8Ra和Y8Rb。对草鱼YR进行同源性分析, 发现7个YR编码的氨基酸序列在硬骨鱼类中高度保守。组织表达结果显示, 草鱼YR主要在中枢组织表达, 但也可以位于外周组织, 包括眼睛、鳃和肠道。NPY可以激活人胚胎肾细胞(HEK293t)中Y2R、Y4R和Y8Rb的表达, Y2R与cAMP/PKA信号通路偶联; Y4R与MAPK/ERK信号通路偶联; 而Y8Rb可激活cAMP/PKA和MAPK/ERK 2条信号通路。脑室注射NPY可引起Y1R、Y2R、Y4R和Y8Rb表达量显著升高。研究结果表明, 草鱼Y2R、Y4R和Y8Rb具有功能性, 能够有效传递信号, NPY的作用很可能由这些受体介导。

关键词 草鱼; 神经肽Y受体; 神经肽Y; 信号通路

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2023)04-0225-11

神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)是一种广泛分布于许多物种中的肽, 与多种生理功能相关, 例如食物摄入、能量代谢、记忆和血压^[1]。NPY由36个氨基酸组成, 主要在中枢和外周神经元的神经分泌细胞中表达^[2], 通过激活其受体——神经肽Y受体(NPY receptor, YR)实现多种功能。因此, 研究YR信号通路对理解这一系统的生理机制至关重要。

YR作为细胞膜NPY的靶点, 属于G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor)家族成员^[3]。根据同源性和功能特征, YR又分为Y1、Y2和Y5三个亚家族, 其中Y1亚家族包含Y1R、Y4R、Y6R和Y8R, Y2亚家族则包括Y2R和Y7R, Y5亚家族仅有Y5R。在哺乳动物中已经鉴定出Y1R、Y2R、Y4R、Y5R和Y6R^[4-5], 而Y7R可能已经丢失^[6]。在硬骨鱼中, 已发现Y1R、Y2R、Y4R、Y7R、Y8R以及Y8R的亚型(Y8Ra和Y8Rb)^[6-7]。此外, 在斑马鱼(*Danio rerio*)和青鳉(*Oryzias latipes*)中还发现了Y2R的复制产物

Y2-2R^[8]。迄今为止, 对哺乳动物YR的功能已有许多探索。例如, 在这些受体中, Y1和Y5被认为参与哺乳动物食欲的调节^[9]。Y2亚家族的受体主要参与哺乳动物的食欲调节和情感行为^[10]。根据目前对哺乳动物的研究, YR介导的信号传导主要通过cAMP/PKA和MAPK/ERK 2种途径进行^[11-12]。然而, 这些受体在硬骨鱼类中的生理功能和系统的YR信号通路尚不清楚。

目前, 对硬骨鱼类NPY及其受体功能的研究已有较多^[13-15], 但大多数研究都集中在结合哺乳动物细胞系的分析来克隆和鉴定NPY及YR^[15]。笔者所在课题组先前的研究发现, NPY是草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)体内的一种促食欲因子, 其中Y8Rb可能参与了草鱼的摄食调节^[13]。然而, 草鱼YR与NPY之间的作用途径仍不清楚。因此, 本研究探索草鱼YR对NPY的响应情况及其信号通路, 以期阐明NPY与YR之间的关系, 尤其是在硬骨鱼

收稿日期: 2022-05-04

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0900400)

蓝洁, E-mail: 631885378@qq.com

通信作者: 梁旭方, E-mail: xufang_liang@hotmail.com

类中的关系和作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用草鱼购自武汉四汇水产科技有限公司,饲养于华中农业大学水产基地的循环水养殖系统中进行环境适应,水温为(23±2)℃。每天11:00按体质量的2%饲喂商业漂浮饲料(通威,广州)。HEK293t细胞购自中国典型培养物保藏中心,于37℃5%CO₂培养箱中培养。草鱼NPY购自上海吉玛制药技术有限公司,纯度为95%,于-20℃冰箱中保存。

1.2 草鱼 YR 生物信息学分析

从草鱼基因组数据库(<http://www.ncgr.ac.cn/grasscarp/>)中获得草鱼 YR 序列,分析及确定其序列组成并预测氨基酸序列。利用 Clustal(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)进行氨基酸序列多重比对。从 GenBank 或 Ensembl 数据库中获取以下 22 个物种的 YR 氨基酸序列:短吻鳄(*Alligator mississippiensis*)、热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)、鸚鵡(*Amazona aestiva*)、猪(*Sus scrofa*)、牛(*Bos taurus*)、银鲛(*Callorhinchus milii*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、狗(*Canis lupus familiaris*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、豚鼠(*Cavia porcellus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、狼鲈(*Dicentrarchus labrax*)、马(*Equus caballus*)、鸡(*Gallus gallus*)、人(*Homo sapiens*)、斑点雀鲷(*Lepisosteus oculatus*)、猴(*Macaca mulatta*)、小鼠(*Mus musculus*)、兔(*Oryctolagus cuniculus*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、猩猩(*Pan troglodytes*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*),与草鱼 YR 氨基酸序列进行多重比对,并利用 MEGAX 软件以邻接法(neighbor-joining, NJ)构建进化树(bootstrap=1 000)。

1.3 草鱼 YR 组织表达检测

选取 3 尾于同一环境养殖的草鱼,利用麻醉剂 MS222(20 mg/L)麻醉后分离组织(脑、眼睛、心脏、肌肉、肠、鳃、肝、脾、肾)并于液氮中冷冻保存、备用。用 RNAiso Plus(TAKARA,日本)从冷冻样品中提取总 RNA,使用 1 μg 总 RNA 进行 cDNA 的反转录合成(诺唯赞生物科技股份有限公司,南京)。用 qRT-PCR 检测草鱼 7 个 YR 基因的表达水平。反应体系(20 μL)包括:双蒸水 8.2 μL,上下游引物各 0.4 μL,模板 cDNA 1 μL,SYBR(诺唯赞生物科技股份有限公司,南京)10 μL。反应参数为:95℃预变性 5 min;

然后进行 40 个循环:95℃变性 15 s,退火 15 s,72℃延伸 45 s。每个样品设置 3 个重复。以 *eflα* 为内参基因,引物名称、序列及引物退火温度见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列及退火温度

| Table 1 Primer sequences and annealing temperatures used for qRT-PCR | | |
|--|----------------------------------|---------------------------------|
| 引物名称 Primer name | 引物序列 (5'-3') Sequence (5'-3') | 退火温度/℃ Annealing temperature |
| RT-eflα-F | GCTGACTGTGCCGTGCTGAT | 58 |
| RT-eflα-R | GCTGACTTCCTTGGTGATTTC | |
| RT-Y1R-F | CCACCAATTCCACCAGTCAC | 57 |
| RT-Y1R-R | ATCGCCATTACAACAAACAAAG | |
| RT-Y2R-F | TCACCTGGGTAGTAAGCG | 52 |
| RT-Y2R-R | CAGCAGCGTGAGATTG | |
| RT-Y2-2R-F | GTTGCTGGACGAATGGAAA | 56 |
| RT-Y2-2R-R | GCCGAGGTGGAAGACGA | |
| RT-Y4R-F | CCCTCAATCAAAGCAACAGT | 55 |
| RT-Y4R-R | ACCAAGCAAGCCCAAAA | |
| RT-Y7R-F | CGTGTCATTCTCACCCTG | 57 |
| RT-Y7R-R | GGATTCCTCATAGCGATACTCT | |
| RT-Y8Ra-F | TCTTGGGTGAGACGCTGTGC | 60 |
| RT-Y8Ra-R | GTGGTCGCTGAATGGGTTG | |
| RT-Y8Rb-F | CCCACTGGTTGGAAGCC | 56 |
| RT-Y8Rb-R | TGAAGGGAAGACTGAGGTTGT | |

1.4 草鱼 YR 下游 cAMP 和 P-ERK 激活程度检测

1)草鱼 YR 表达载体构建。从草鱼基因组数据库中调取所需 YR 基因的 CDS 序列,根据 CDS 序列利用 Primer 6 设计全长扩增引物,以草鱼脑组织 cDNA 为模板,使用高保真酶(诺唯赞生物科技股份有限公司,南京)进行 PCR 扩增,引物信息见表 2。扩增产物用胶回收试剂盒回收纯化,纯化产物使用克隆载体构建重组质粒后进行阳性克隆鉴定,再用康为世纪公司的试剂盒提取质粒,所得质粒 DNA 用于制备线性化载体,最后根据 YR 的 CDS 序列,设计插入片段的重组引物,引物信息见表 3。本研究所用扩增引物和重组引物都由生工(中国,上海)公司合成。使用重组引物进行 PCR 扩增,扩增产物纯化回收后进行重组反应,使用重组反应产物进行转化。转化后的重组产物根据以下体系和参数进行反应,反应体系:双蒸水 8 μL, Mix 10 μL,上下游引物各 0.8 μL,菌液 0.4 μL。反应参数:94℃预变性 10 s;94℃变性 10 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,30 个循环;72℃后延伸 10 min。反应结束后取产物进行阳性克隆鉴定,同时送生工公司测序,测序鉴定成功后

将菌液扩大培养,用于DNA提取。

2)cAMP和P-ERK激活程度检测。为了检测草鱼YR是否能被NPY激活并具有信号转导能力,使用NPY刺激处理转染了草鱼YR表达载体的HEK293t细胞,检测下游cAMP和P-ERK的激活情况。本试验设置对照组和7个试验组。对照组为转染了空载的HEK293t细胞;试验组为分别转染了Y1R、Y2R、Y2-2R、Y4R、Y7R、Y8Ra和Y8Rb的HEK293t细胞;每组设置6个平行。分别用OG(含BSA)和NPY(10^{-6} M)刺激转染了不同YR的HEK293t细胞,先进行饥饿处理,后使用cAMP-Glo™ Assay试剂盒(Promega)按照说明书检测不同YR下游cAMP的激活情况,同时采用目的抗体Phospho-p44/42 MAPK(CST公司)和内参抗体 β -tubulin(CST公司),进行Western blot以检测全细胞裂解物中的磷酸化ERK1/2。

表2 草鱼YR基因CDS全长扩增引物
Table 2 YR genes CDS full-length amplification primers of grass carp

| 引物名称 Prime name | 引物序列 (5'—3') Sequence (5'—3') |
|--------------------|----------------------------------|
| Y1R-F | ATGCCAGACTCCGCCCTGTC |
| Y1R-R | CTAGAGATCTAGGCTACTAA |
| Y2R-F | ATGAACATATCTGAAGATGAA |
| Y2R-R | TCAGTGAGTATTGATTGGTCT |
| Y2-2R-F | ATGGATTCCCTCAGCTTAATCA |
| Y2-2R-R | TCAGACATCTGTTGCGTTGAG |
| Y4R-F | ATGCTTTGCTGTCTGGAGCTA |
| Y4R-R | TTACACAGAATTGTTTCTGAGT |
| Y7R-F | ATGGGCCAATCAGATCTAGCCA |
| Y7R-R | TCAGACAGCAGCCGAGGCTGAC |
| Y8Ra-F | ATGAACTTACCGAACTTCCAGAAATACAC |
| Y8Ra-R | TTAGCAGTGAGCGCACTGTTCCGAT |
| Y8Rb-F | ATGGAGCGGTCTCATCTGAACAA |
| Y8Rb-R | TTAAATGGTCTCTTTCTGTTC |

1.5 脑室注射NPY后草鱼脑组织YR表达检测

将体质量为(42±5) g的草鱼120尾随机分为2组:对照组注射5 μ L PBS;试验组注射0.5 μ g/g的NPY溶液(5 μ g/ μ L)。每组设置3个重复,共6个养殖缸,每缸20尾草鱼。注射2 h后于缸中随机取5尾草鱼,利用麻醉剂MS222(20 mg/L)麻醉后分离脑组织并于液氮中冷冻保存、待用。利用qRT-PCR检测试验组和对照组草鱼脑组织中YR基因的相对表达量。

表3 草鱼YR基因重组引物
Table 3 Recombinant primers of YR gene of grass carp

| 引物名称 Prime name | 引物序列 (5'—3') Sequence (5'—3') |
|--------------------|--|
| Y1R-EcoR I | CGGAATTCATGCCAGACTCCGCCCTGTC |
| Y1R-Xba I | GGCTCTAAGACTAGAGATCTAGGCTACTAA |
| Y2R-EcoR I | CGGAATTCATGAACATATCTGAAGATGAA |
| Y2R-Xba I | GGCTCTAAGATCAGTGAGTATTGATTG-GTCT |
| Y2-2R-EcoR I | CGGAATTCATGGATTCCCTCAGCTTAATCA |
| Y2-2R-Xba I | GGCTCTAAGATCAGACATCTGTTGCGTT-GAG |
| Y4R-EcoR I | CGGAATTCATGCTTTGCTGTCTGGAGCTA |
| Y4R-Xba I | GGCTCTAAGATTACACAGAATTGTTTCT-GAGT |
| Y7R-EcoR I | CGGAATTCATGGGCCAATCAGATCTAGCCA |
| Y7R-Xba I | GGCTCTAAGATCAGACAGCAGCCGAGGCT-GAC |
| Y8Ra-EcoR I | CGGAATTCATGAACTTACCGAACTTC-CAGAAATACAC |
| Y8Ra-Xba I | GGCTCTAGATTAGCAGTGAGCGCACT-GTTCCGAT |
| Y8Rb-EcoR I | CGGAATTCATGGAGCGGTCTCATCTGAA-CAA |
| Y8Rb-Xba I | GGCTCTAGATTAAATGGTCTCTTTCTGTTC |

1.6 数据统计与分析

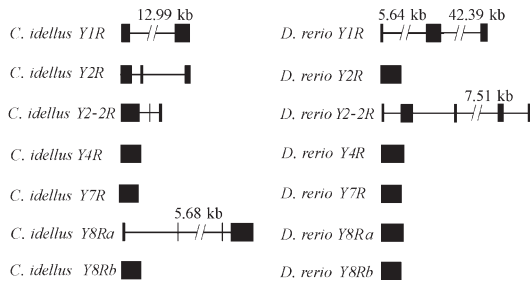
试验数据采用SPSS Statistics 19.0软件进行分析,所有数据均以“平均值±标准误”(Mean±SE)的形式表示。使用单样本t检验(one sample t-test)、独立样本t检验(independent sample t-test)和单因素方差分析(one-way ANOVA)3种方法,分别进行数据分布正态性检测、2个样本的比较分析和多个样本的差异分析。如果 $P<0.05$,则判定数据具有显著差异。

2 结果与分析

2.1 草鱼YR序列分析

草鱼YR基因序列分析结果显示,草鱼中共发现Y1R、Y2R、Y2-2R、Y4R、Y7R、Y8Ra和Y8Rb 7个YR亚型。其中Y4R、Y7R和Y8Rb只有1个外显子;Y1R具有2个外显子,1个内含子;Y2R和Y2-2R具有3个外显子,2个内含子;Y8Ra具有4个外显子,3个内含子(图1)。

草鱼Y1R与其他物种多重比对结果显示,草鱼Y1R和斑马鱼Y1R相似性最高,为98%;与斑点雀鳢Y1R相似性较高,为84%(图2A)。草鱼Y2R与斑点



黑色方块表示外显子,黑线表示内含子。The black squares represent exons and the black lines represent introns.

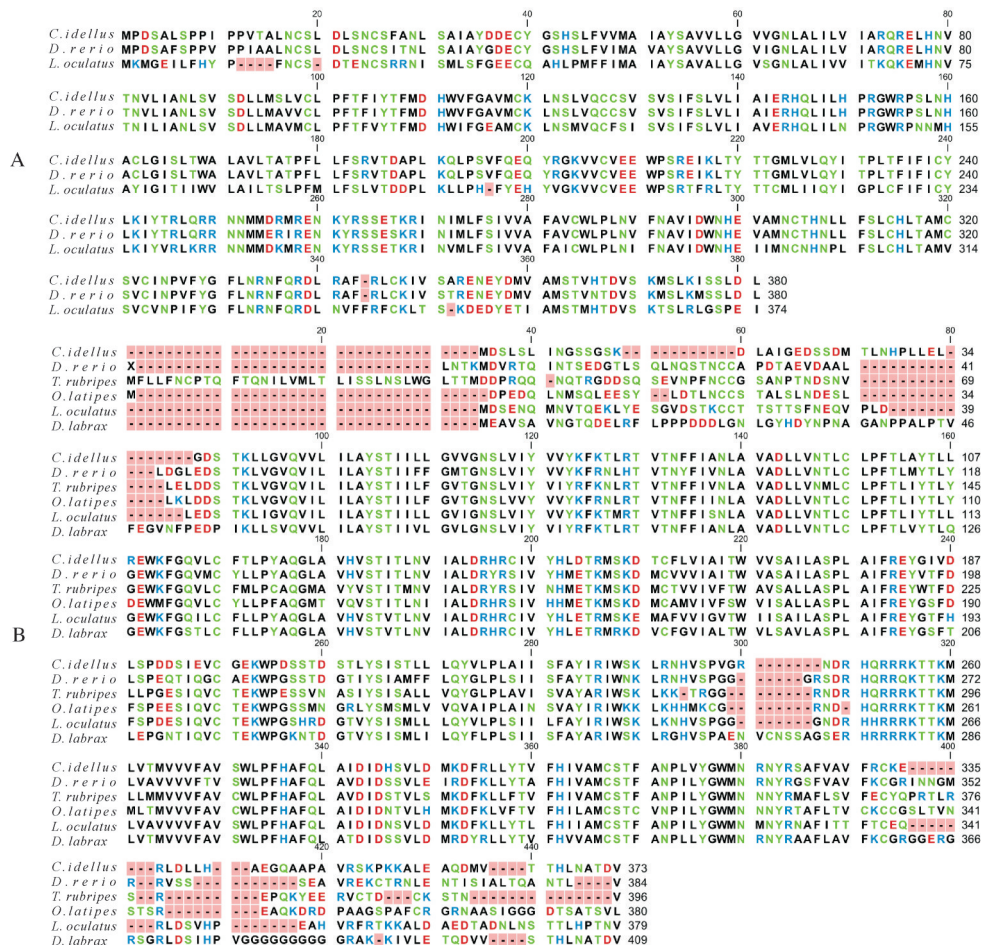
图1 草鱼和斑马鱼 YR 基因结构

Fig. 1 Genomic organization of the YR genes from zebrafish and grass carp

雀鳝 Y2R 的相似性最高,为 88%;与斑马鱼、青鳉、红鳍东方鲀和狼鲈 Y2R 的相似性较高,分别为 85%、85%、83% 和 82%(图 2B)。草鱼 Y2-2R 与斑马鱼 Y2-2R 的相似性最高,为 98%;与青鳉 Y2-2R 的相似性较高,为 82%;与红鳍东方鲀 Y2-2R 的相似性较低,为 49%(图 2C)。草鱼 Y4R 与斑马鱼 Y4R 的相似性最高,为 97%,与斑点雀鳝、青鳉、狼鲈和红鳍东方

鲀 Y4R 的相似性较高,分别为 79%、73%、73% 和 70%(图 2D)。草鱼 Y7R 与斑马鱼 Y7R 的相似性最高,为 96%;与红鳍东方鲀、青鳉、斑点雀鳝和狼鲈的相似性较高,分别为 85%、84%、84% 和 84%(图 2E)。草鱼 Y8Ra 与斑马鱼 Y8Ra 的相似性最高,为 95%;与斑点雀鳝、狼鲈、红鳍东方鲀和青鳉的相似性较高,分别为 87%、83%、81% 和 81%(图 2F)。草鱼 Y8Rb 与斑马鱼 Y8Rb 的相似性最高,为 98%;与红鳍东方鲀、狼鲈和斑点雀鳝 Y8Rb 的相似性较高,分别为 83%、83% 和 79%(图 2G)。

使用草鱼 YR 氨基酸序列构建系统发育树,与其他 22 个物种的 YR 序列进行进化分析,包括鱼类、两栖动物、爬行动物、鸟类和哺乳动物,结果如图 3 所示。草鱼 Y1R、Y4R、Y8Ra 和 Y8Rb 与 Y1 亚家族聚集在一起,而草鱼 Y2R、Y2-2R 和 Y7R 与 Y2 亚家族聚集在一起。草鱼 YR 所有亚型都与对应的斑马鱼 YR 亚型分为一支,具有很高的亲缘性,与两栖动物、爬行动物、鸟类和哺乳动物的关系较远。



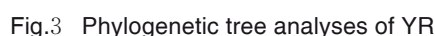




绿色表示疏水性氨基酸,红色表示带电氨基酸,蓝色表示极性氨基酸。Green represents hydrophobic amino acids, red represents charged amino acids, and blue represents polar amino acids.

图2 草鱼和其他硬骨鱼类 Y7R(E), Y8Ra(F)和 Y8Rb(G)氨基酸序列多重比对结果 (续)

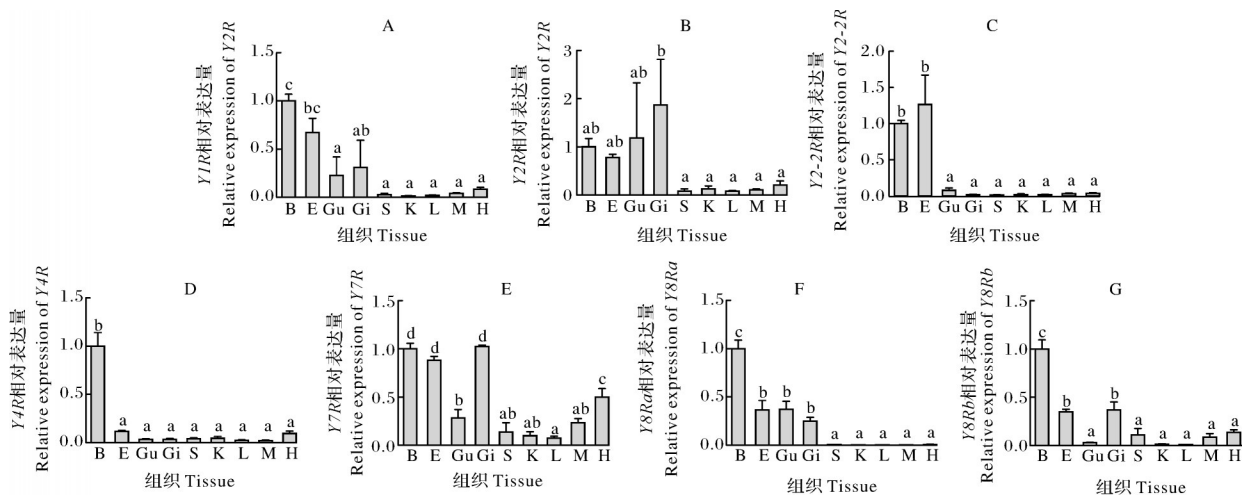
Fig.2 Multiple amino acid alignment results of Y7R(E), Y8Ra(F) and Y8Rb(G) between grass carp and other fishes (continued)



2.2 草鱼 YR mRNA在不同组织中的表达情况

以 *ef1a* 为内参基因,草鱼 YR mRNA 在 9 个组织(器官)中的相对表达情况如图 4 所示。*Y1R* 在脑中的表达量最高,其次是眼睛、鳃、肠、心、肌肉和脾,在肾和肝中的表达量最低(图 4A)。*Y2R* 在鳃中的表达量最高,其次是肠、脑、眼睛、心、肾和肌肉,在脾和肝中的表达量最低(图 4B)。*Y2-2R* 在眼睛中的表达量最高,在脑中的表达量次高,且在眼睛和脑中的表达量显著高于其他组织($P<0.05$),在肠中也有少量表达,在鳃、脾、肾、肝、肌肉和心中几乎不表达(图 4C)。*Y4R* 在脑中的表达量最高且显著高于其他组

织($P<0.05$),其次为眼睛和心,在肠、鳃、脾和肾中也有少量表达,在肝和肌肉中几乎不表达(图 4D)。*Y7R* 在鳃中的表达量最高,且在鳃、脑和眼睛中的表达显著高于其他组织($P<0.05$),其次是脑、眼睛、心、肠、肌肉、脾、肾和肝(图 4E)。*Y8Ra* 在脑中的表达量最高且显著高于其他组织($P<0.05$),其次为肠、眼睛和鳃,在脾、肾、肝、肌肉和心中几乎不表达(图 4F)。*Y8Rb* 在脑中的表达量最高且显著高于其他组织($P<0.05$),其次为鳃和眼睛,在心、脾、肌肉和肠中也有少量表达,在肾和肝中几乎不表达(图 4G)。



B: 脑 Brain; E: 眼睛 Eye; Gu: 肠道 Gut; Gi: 鳃 Gill; S: 脾 Spleen; K: 肾 Kidney; L: 肝 Liver; M: 肌肉 Muscle; H: 心 Heart. 用不同字母标记的值之间存在显著差异($P<0.05$)。Data with different letters above the bars indicated significant difference ($P<0.05$).

图 4 *Y1R*(A)、*Y2R*(B)、*Y2-2R*(C)、*Y4R*(D)、*Y7R*(E)、*Y8Ra*(F) 和 *Y8Rb*(G) 在草鱼组织中的表达

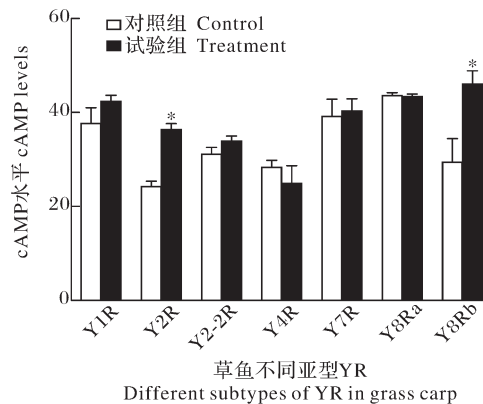
Fig. 4 The expression profile of *Y1R*(A), *Y2R*(B), *Y2-2R*(C), *Y4R*(D), *Y7R*(E), *Y8Ra*(F) and *Y8Rb*(G) genes in grass carp tissues

2.3 NPY 刺激后草鱼 YR 下游 cAMP、P-ERK 水平

图 5 所示为 NPY 刺激后草鱼 YR 下游 cAMP 水平。结果显示, NPY 结合 *Y2R* 和 *Y8Rb* 后, 下游信号通路 cAMP 水平显著高于对照组; 而 NPY 结合 *Y1R*、*Y2-2R*、*Y4R*、*Y7R* 和 *Y8Ra* 后, 下游信号通路 cAMP 水平无显著变化。如图 6 所示, NPY 结合 *Y1R*、*Y2R* 和 *Y7R* 后, 下游信号通路 P-ERK 水平较弱; 而 NPY 结合 *Y4R* 和 *Y8Rb* 后, 下游信号通路 P-ERK 水平显著高于其他受体($P<0.05$)。

2.4 脑室注射 NPY 后草鱼脑组织 YR 表达量

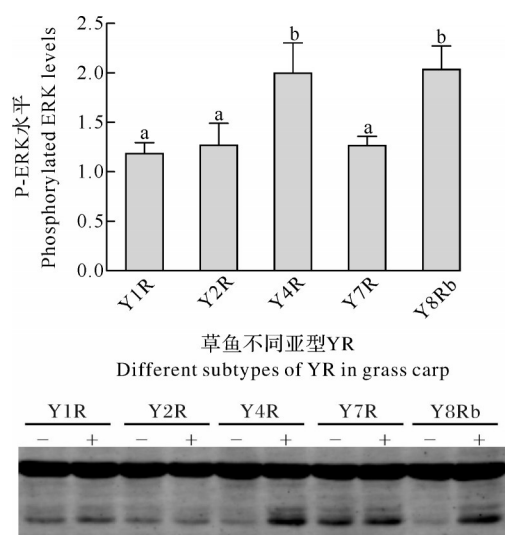
为了更好地了解 NPY 与 YR 之间的相互作用, 本研究检测了脑室注射 NPY 2 h 后 YR 在草鱼脑组织中的相对表达量(图 7)。结果显示, NPY 经脑室注射后对 *Y7R* 和 *Y8Ra* 的表达均无显著影响($P>0.05$)。*Y1R*、*Y2R*、*Y2-2R*、*Y4R* 和 *Y8Rb* 的表达量



*表示与对照相比差异显著($P<0.05$)。The asterisks indicated significant difference ($P<0.05$).

图 5 草鱼 NPY 结合不同亚型 YR 后下游 cAMP 水平

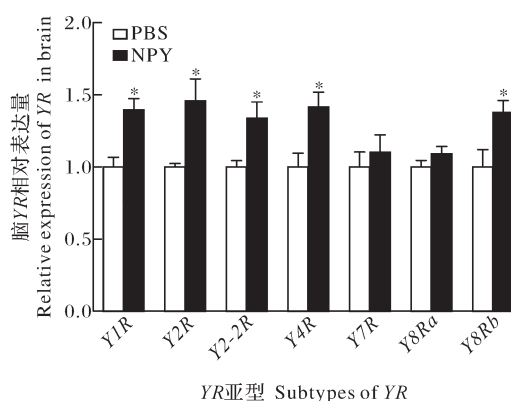
Fig. 5 cAMP levels of different subtypes of YR in grass carp after combined with NPY



不同字母标记的值之间存在显著差异($P < 0.05$)。Data with different letters above the bars indicated significant difference ($P < 0.05$).

图6 草鱼YR下游ERK磷酸化水平

Fig. 6 Phosphorylated ERK level of YR in grass carp



*表示与对照相比差异显著($P < 0.05$)。The asterisks indicated significant difference ($P < 0.05$).

图7 NPY脑室注射后YR在草鱼脑组织中的表达量

Fig. 7 The expression of YR genes in brain of grass carp by ICV administration

在NPY注射后均显著高于PBS注射组($P < 0.05$)。

3 讨论

YR亚型在不同物种中有所不同^[16-18]。本研究通过对草鱼的基因结构和氨基酸序列分析,发现草鱼共有7个YR亚型,其中包括Y2-2R及硬骨鱼类特有的Y8Ra和Y8Rb。根据系统发育分析结果,在Y2亚家族中,所有物种都具有Y2R,但只有小鼠和部分硬骨鱼类具有Y2-2R,而Y7R只在硬骨鱼类中存在。Y5R和Y6R在草鱼中缺失,这一点与其他硬骨鱼类一致。这一发现表明,Y2亚家族可能具有更保守的功能,而Y1亚家族可能随生活行为而调整功能。

据报道,硬骨鱼类的YR在大脑中表达,但也可以位于外周组织,包括眼睛和肠道^[10,19]。本研究中,Y1R在大脑和眼睛中检测到较高的表达量,并在鳃和肠道中也有部分表达。之前的研究表明,Y1R信号通路可刺激金鱼(*Carassius auratus*)和斑马鱼等硬骨鱼类的食物摄入^[20-22]。这说明草鱼Y1R可能通过脑肠轴影响摄食调控。此外,在激活Y1R的情况下,NPY在视网膜神经元中具有神经保护作用并激活视网膜神经细胞增殖^[23-24],说明草鱼Y1R可能在视网膜中发挥作用。与Y1R相似,草鱼Y2R在鳃、肠道、脑和眼睛有较高的表达。这与大黄鱼Y2R在肠道和脑具有高表达的结果相类似^[14],说明Y2R可能在草鱼的食欲调节中发挥重要作用。Y2R也在点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)的眼睛中有较高的表达水平^[15]。同时,在对大鼠视网膜细胞的研究中发现,Y2R的激活可抑制视网膜细胞的坏死性死亡^[25]。这表明Y2R可能在草鱼视网膜中发挥功能。相对于其他组织,Y4R在脑中有较高表达,这与在斑马鱼中的研究一致^[26],表明Y4R可能主要在中枢系统发挥作用。Y7R在所检测的组织中表现出分布的广泛性,这与在虹鳟中的研究一致^[27]。Y8Ra在脑中有较高表达,这与在草鱼和斑马鱼中的研究一致^[13,26]。与Y2R的表达模式相似,Y8Ra在眼睛和鳃中也有表达,这可能是由于Y2R和Y7R同属Y2亚家族,在组织表达上具有一定的相似性。类似地,Y8Rb在脑和眼睛中的较高表达与在点带石斑鱼中的研究一致^[15]。这说明Y8Rb可能主要在中枢系统和视网膜中发挥功能。在硬骨鱼类中,鳃同时具有呼吸和渗透调节功能,其中一些功能可以解释Y2R和Y7R在鳃中的高表达。同时Y1R、Y8Ra和Y8Rb也在鳃中有部分表达。这可能是由于这些受体可以介导NPY在鳃中的调节功能。YR表达的组织特异性分布差异可归因于硬骨鱼类物种之间的差异或检测方法的敏感性。基于以上结果,我们推测,YR主要在大多数硬骨鱼类的中枢神经系统和一些外周组织中表达。

1986年,YR家族在药理学上被描述为一种主要的突触前NPY/PYY受体^[28]。YR对配体的亲和力不同,其中Y1R、Y2R和Y5R对NPY的亲和力较高^[29]。为了探索不同亚型YR对NPY的响应及其信号通路,本研究在细胞水平上检测了不同亚型YR的功能性表达。本研究发现,在cAMP水平分析中,受到NPY刺激后,HEK293t细胞中表达的Y2R和

Y8Rb在功能上与Gi/o蛋白偶联,它们的激活引起cAMP/PKA信号通路的变化。而在对大黄鱼和鸡的研究中,Y2R在受到NPY刺激后也可激活调节cAMP/PKA信号通路^[14]。在P-ERK分析中,本研究发现NPY可以激活Y4R和Y8Rb,并触发细胞内MAPK/ERK信号级联。而鸡的Y4R在受到NPY刺激后也可激活调节MAPK/ERK信号通路^[30]。由此推测,与其他受体相比,Y2R、Y4R和Y8Rb与NPY更容易结合并且可以在体外传递信号。

与对照组相比,注射NPY 2 h后Y2R、Y4R和Y8Rb的表达量显著升高,表明Y2R、Y4R和Y8Rb在活体中可对NPY的刺激做出响应,这与上述细胞试验中得出的结果一致。值得注意的是,除Y2R、Y4R和Y8Rb外,Y1R也表现出对NPY的响应。这可能是由于Y1R在体外不能单独被NPY激活,或是活体中存在其他Y1R配体。

综上所述,草鱼Y2R、Y4R和Y8Rb在细胞、活体水平均对NPY的刺激具有响应,NPY很可能通过这些受体发挥作用。这些发现不仅有助于全面了解NPY系统在硬骨鱼类中的生理作用,而且有助于揭示YR在不同脊椎动物中结构和功能的变化。

参考文献 References

- [1] PEDRAZZINI T, PRALONG F, GROUZMANN E. Neuropeptide Y: the universal soldier[J]. Cellular and molecular life sciences CMLS, 2003, 60(2): 350-377.
- [2] LARHAMMAR D, BLOMQVIST A G, SÖDERBERG C. Evolution of neuropeptide Y and its related peptides[J]. Comparative biochemistry and physiology part C: pharmacology, toxicology and endocrinology, 1993, 106(3): 743-752.
- [3] RINGVALL M, BERGLUND M M, LARHAMMAR D. Multiplicity of neuropeptide Y receptors: cloning of a third distinct subtype in the zebrafish[J]. Biochemical and biophysical research communications, 1997, 241(3): 749-755.
- [4] BALASUBRAMANIAM A. Neuropeptide Y family of hormones: receptor subtypes and antagonists[J]. Peptides, 1997, 18(3): 445-457.
- [5] BLOMQVIST A G, HERZOG H. Y-receptor subtypes: how many more?[J]. Trends in neurosciences, 1997, 20(7): 294-298.
- [6] LARSSON T A, TAY B H, SUNDSTRÖM G, et al. Neuropeptide Y-family peptides and receptors in the elephant shark, *Callorhynchus milii* confirm gene duplications before the gnathostome radiation[J]. Genomics, 2009, 93(3): 254-260.
- [7] SALANECK E, LARSSON T A, LARSON E T, et al. Birth and death of neuropeptide Y receptor genes in relation to the teleost fish tetraploidization[J]. Gene, 2008, 409(1/2): 61-71.
- [8] FÄLLMAR H, SUNDSTRÖM G, LUNDELL I, et al. Neuropeptide Y/peptide YY receptor Y2 duplicate in zebrafish with unique introns displays distinct peptide binding properties[J]. Comparative biochemistry and physiology part B: biochemistry and molecular biology, 2011, 160(4): 166-173.
- [9] DAY D E, KEEN-RHINEHART E, BARTNESS T J. Role of NPY and its receptor subtypes in foraging, food hoarding, and food intake by Siberian hamsters[J]. American journal of physiology: regulatory, integrative and comparative physiology, 2005, 289(1): 29-36.
- [10] FREDRIKSSON R, LARSON E T, YAN Y L, et al. Novel neuropeptide Y Y2-like receptor subtype in zebrafish and frogs supports early vertebrate chromosome duplications[J]. Journal of molecular evolution, 2004, 58(1): 106-114.
- [11] GOLDBERG Y, TAIMOR G, PIPER H M, et al. Intracellular signaling leads to the hypertrophic effect of neuropeptide Y[J]. The American journal of physiology, 1998, 275(5): 1207-1215.
- [12] MICHEL M C, BECK-SICKINGER A, COX H, et al. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors[J]. Pharmacological reviews, 1998, 50(1): 143-150.
- [13] ZHOU Y, LIANG X F, YUAN X C, et al. Neuropeptide Y stimulates food intake and regulates metabolism in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Aquaculture, 2013, 380/381/382/383: 52-61.
- [14] WANG T M, LIANG J, XIANG X W, et al. Pharmacological characterization, cellular localization and expression profile of NPY receptor subtypes Y2 and Y7 in large yellow croaker, *Larimichthys crocea*[J/OL]. Comparative biochemistry and physiology part B: biochemistry and molecular biology, 2019, 238: 110347 [2022-05-04]. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.110347>.
- [15] WANG F, CHEN W M, LIN H R, et al. Cloning, expression, and ligand-binding characterization of two neuropeptide Y receptor subtypes in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. Fish physiology and biochemistry, 2014, 40(6): 1693-1707.
- [16] LARHAMMAR D, SALANECK E. Molecular evolution of NPY receptor subtypes[J]. Neuropeptides, 2004, 38(4): 141-151.
- [17] LARSSON T A, OLSSON F, SUNDSTROM G, et al. Early vertebrate chromosome duplications and the evolution of the neuropeptide Y receptor gene regions[J/OL]. BMC evolutionary biology, 2008, 8: 184 [2022-05-04]. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-184>.
- [18] LARSSON T A, TAY B H, SUNDSTRÖM G, et al. Neuropeptide Y-family peptides and receptors in the elephant shark, *Callorhynchus milii* confirm gene duplications before the gnathostome radiation[J]. Genomics, 2009, 93(3): 254-260.
- [19] LUNDELL I, BERGLUND M M, STARBÄCK P, et al. Cloning and characterization of a novel neuropeptide Y receptor subtype in the zebrafish[J]. DNA and cell biology, 1997, 16(11): 1357-1363.
- [20] YOKOBORI E, AZUMA M, NISHIGUCHI R, et al. Neuropeptide Y stimulates food intake in the zebrafish, *Danio rerio*[J]. Journal of neuroendocrinology, 2012, 24(5): 766-773.

- [21] MATSUDA K, KANG K S, SAKASHITA A, et al. Behavioral effect of neuropeptides related to feeding regulation in fish [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011, 1220: 117-126.
- [22] MATSUDA K, SAKASHITA A, YOKOBORI E, et al. Neuroendocrine control of feeding behavior and psychomotor activity by neuropeptide Y in fish [J]. Neuropeptides, 2012, 46 (6): 275-283.
- [23] MARTINS J, ELVAS F, BRUDZEWSKY D, et al. Activation of neuropeptide Y receptors modulates retinal ganglion cell physiology and exerts neuroprotective actions *in vitro* [J/OL]. ASN neuro, 2015, 7 (4): 1759091415598292 [2022-05-04]. <https://doi.org/10.1177/1759091415598292>.
- [24] ALVARO A R, MARTINS J, ARAÚJO I M, et al. Neuropeptide Y stimulates retinal neural cell proliferation: involvement of nitric oxide [J]. Journal of neurochemistry, 2008, 105 (6): 2501-2510.
- [25] SANTOS-CARVALHO A, AMBRÓSIO A F, CAVADAS C. Neuropeptide Y system in the retina: from localization to function [J]. Progress in retinal and eye research, 2015, 47: 19-37.
- [26] SUNDSTRÖM G, LARSSON T A, XU B, et al. Interactions of zebrafish peptide YYb with the neuropeptide Y-family receptors Y4, Y7, Y8a, and Y8b [J/OL]. Frontiers in neuroscience, 2013, 7: 29 [2022-05-04]. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00029>.
- [27] LARSSON T A, LARSON E T, FREDRIKSSON R, et al. Characterization of NPY receptor subtypes Y2 and Y7 in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Peptides, 2006, 27 (6): 1320-1327.
- [28] WAHLESTEDT C, YANAIHARA N, HÅKANSON R. Evidence for different pre- and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides [J]. Regulatory peptides, 1986, 13 (3/4): 307-318.
- [29] MERCER R E, CHEE M J S, COLMERS W F. The role of NPY in hypothalamic mediated food intake [J]. Frontiers in neuroendocrinology, 2011, 32 (4): 398-415.
- [30] GAO S Y, ZHANG J N, HE C, et al. Molecular characterization of neuropeptide Y (NPY) receptors (Y1, Y4 and Y6) and investigation of the tissue expression of their ligands (NPY, PYY and PP) in chickens [J]. General and comparative endocrinology, 2017, 240: 46-60.

Response and signaling pathway of neuropeptide Y receptors to neuropeptide Y in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

LAN Jie¹, LIANG Xufang¹, ZHANG Yanpeng¹, ZHAI Lijuan², WAN Gongwei²

1.College of Fisheries/ Chinese Perch Research Center, Huazhong Agricultural University/
Ministry of Education Engineering Research Center for the Green Development of Bulk Aquatic
Biological Industry in the Yangtze River Economic Zone, Wuhan 430070, China;
2.Jingzhou Baihu Ecological Fishery Development Co., Ltd., Jingzhou 434000, China

Abstract Neuropeptide Y receptors (YR) are thought to mediate multiple physiological functions of teleost NPY family peptides, such as feeding. However, the structure and signaling of fish NPY receptors have not been fully elucidated. In this study, the gene structure, tissue expression and signaling of YR in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) were reported. The sequences of seven YR genes of *Y1R*, *Y2R*, *Y2-2R*, *Y4R*, *Y7R*, *Y8Ra* and *Y8Rb* were obtained in the grass carp genome. Homology analysis of grass carp YR revealed that the amino acid sequences encoded by seven YR isoforms were highly conserved in teleost fish. The results of tissue expression showed that grass carp YR was mainly expressed in central tissues, but also in peripheral tissues, including eyes, gills and intestines. NPY can activate the expression of *Y2R*, *Y4R* and *Y8Rb* in HEK293t cells. *Y2R* is coupled to the cAMP/PKA signaling pathway and *Y4R* is coupled to the MAPK/ERK signaling pathway. *Y8Rb* can activate both cAMP/PKA and MAPK/ERK signaling pathways. Intracerebroventricular injection of NPY could significantly increase the expression of *Y1R*, *Y2R*, *Y4R* and *Y8Rb*. This study shows that grass carp *Y2R*, *Y4R* and *Y8Rb* are functional and can transmit signals efficiently, and NPY action is likely mediated by these receptors.

Keywords *Ctenopharyngodon idellus*; neuropeptide Y receptor; neuropeptide Y; signaling pathway

(责任编辑:边书京)