

光和投喂时间对大海马生长及生物钟基因和脂类代谢基因表达的影响

徐永健 柏扬 李加伟 娄烨婧

LIGHT AND FEEDING TIME ON THE GROWTH, BIOLOGICAL CLOCK GENE EXPRESSION, AND LIPID METABOLISM GENE EXPRESSION IN *HIPPOCAMPUS KUDA* BLEEKER

XU Yong-Jian, BO Yang, LI Jia-Wei, LOU Ye-Jing

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2025.2024.0255>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

盐度胁迫对幼体大海马基因转录表达的影响

EFFECTS OF SALINITY STRESS ON ANSCRIPTION AND EXPRESSION IN JUVENILE *HIPPOCAMPUS KUDA* BLEEKER
水生生物学报. 2021, 45(5): 995–1004 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.152>

5种光周期对锦鲤生长、能量收支及生物钟基因表达的影响

VARIOUS PHOTOPERIODS ON GROWTH, ENERGY BUDGETS AND GENE EXPRESSION OF CIRCADIAN CLOCK IN KOI CARP (*CYPRINUS CARPIO*)
水生生物学报. 2022, 46(5): 664–670 <https://doi.org/10.7541/2021.2021.019>

盐度变化对大海马幼体生理与摄食行为的影响

SHORT-TERM SALINITY CHANGES ON THE PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND FEEDING BEHAVIOR OF THE JUVENILE YELLOW SEAHORSE, *HIPPOCAMPUS KUDA* BLEEKER
水生生物学报. 2023, 47(12): 2045–2055 <https://doi.org/10.7541/2023.2023.0008>

共轭亚油酸对草鱼肝脏和肌肉组织的细胞学形态、抗氧化能力以及脂肪代谢相关基因表达的影响

EFFECTS OF DIETARY CLA ON CYTOLOGICAL MORPHOLOGY, ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES, AND GENE EXPRESSIONS OF LIPID METABOLISM IN THE LIVER AND MUSCLE OF GRASS CARP
水生生物学报. 2019, 43(4): 708–722 <https://doi.org/10.7541/2019.084>

光棘球海胆*seali*基因克隆及表达特性分析

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF THE *SEALI* GENE IN *MESOCENTROTUS NUDUS*
水生生物学报. 2020, 44(3): 534–540 <https://doi.org/10.7541/2020.065>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2025.2024.0255

CSTR: 32229.14.SSSWXB.2024.0255

光和投喂时间对大海马生长及生物钟基因和脂类代谢基因表达的影响

徐永健 柏 扬 李加伟 姜烨婧

(宁波大学海洋学院, 宁波 315832)

摘要: 文章以大海马(*Hippocampus kuda*)为研究对象, 分别设置2个光周期(L:D=16:8、L:D=12:12)和2个投喂时间策略(开灯后2h、关灯前2h), 分析大海马的生物钟系统之间及生物钟与脂类代谢之间的关系, 探究大海马人工养殖的适宜环境条件及其体内重要脂类物质的合成代谢条件。结果表明: 在所有组别中, 检测的7个钟基因中有6个基因(*Clock*、*Bmal1*、*Per1*、*Per2*、*Per3*和*Cry1*)在大海马的脑和肝脏中都有明显的节律性表达, 说明生物钟基因表达与光有较密切的关系。其中, 大海马在长光亮期(16:8)及开灯后2h投喂的条件下, 其脑中的中枢钟基因与肝脏中的外周钟基因间的协同性最佳, 表明该条件对大海马生长较为有利。此外, 大海马肝脏中8个脂类代谢相关基因(*Hmgcr*、*Mvk*、*Mvd*、*Lss*、*Fdps*、*Cetp*、*Scap*、*Srebp1*)在开灯后2h投喂的2个组别中都呈现了节律性表达, 而在关灯前2h投喂的2个组别中仅*Hmgcr*、*Mvk*、*Scap*、*Srebp1*等4个基因(L:D=16:8)和*Hmgcr*、*Mvk*、*Scap*、*Mvd*、*Srebp1*等5个基因(L:D=12:12)有明显节律性表达, 说明脂类代谢相关基因的表达与光影响并不非常密切, 大部分基因的表达受到了投喂时间的影响。总之, 实验证实了大海马中存在有完整的生物钟系统, 该生物钟系统与脂类代谢间存在紧密的联系。通过光和投喂时间的综合分析, 初步推断大海马养殖的适宜条件为长光亮周期及在有光时及时给饵(开灯后2h内), 该条件下能促使大海马的钟基因与代谢基因都呈现稳定的节律性表达, 且中枢钟系统与外周钟系统间的协同性达到最佳。同时, 也能较好地促进脂类物质的代谢合成和积累。

关键词: 光周期; 投喂时间; 生物钟基因; 养殖条件; 大海马

中图分类号: S965.9; Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2025)03-032515-10



生物在长期的演化中进化出“生物钟”系统。该系统能够预感外界环境变化, 并调动身体的各项机能与环境变化相耦合, 其运行机制和分子基础正在逐渐被人们所了解^[1-4]。生物钟系统是由一系列关系密切的钟基因组成, 通过钟基因转录合成相关蛋白, 对身体机能进行调控。在正常情况下, 从产生核心转录因子到蛋白质的振荡变化持续约24h^[5, 6]。生物钟系统可分为中枢钟系统和外周钟系统, 中枢钟系统位于大脑中, 主要受光影响^[3, 7, 8]。外周钟系统位于身体各个组织和器官中。当中枢钟系统受到光的影响, 其核心转录因子就开始节律性表达, 中枢钟系统还通过各种激素和神经元信号影响外周组织器官, 引起外周钟基因的节律性表达, 这是

生物钟系统的分级调控。不过, 外周钟系统不仅受到中枢钟系统的调控, 还受外界其他因素的影响, 如食物、喂食/禁食周期等^[9]。当外界环境条件使得外周与中枢钟基因的表达不协同时, 就会引起内环境的紊乱, 进而诱发各种疾病^[10-14]。目前基本搞清楚了, 哺乳动物的外周钟系统控制着代谢、免疫和行为等众多生理活动。如肝脏中约有3000个基因表现出明显的节律性振荡, 其中的许多基因都参与机体的代谢过程^[15]。而肝脏中的*Clock*和*Bmal1*基因突变后的小鼠通常患有肥胖和代谢综合征^[16, 17], 肝脏糖异生减少与*Cry*基因异常表达有关^[18]等。这些都说明生物钟系统与代谢活动存在紧密联系, 而且当钟基因的表达出现紊乱时, 会引发机体代谢紊

收稿日期: 2024-06-24; 修订日期: 2024-08-16

基金项目: 宁波大学“海洋生物技术与海洋工程”学科群专项研究基金(422004582); 国家自然科学基金(41276123)资助 [Supported by the Special Research Fund of the Discipline Group of “Marine Biotechnology and Ocean Engineering” of Ningbo University (422004582); National Natural Science Foundation of China (41276123)]

通信作者: 徐永健, 教授; 主要从事精准养殖技术研究。E-mail: xuyongjian@nbu.edu.cn

乱。因此,生物钟系统之间的协同及生物钟系统与外界环境的协调一致将有助于保持机体内环境的稳定,并最大限度提升生物对环境的适应性^[19,20]。

近些年来,探究生物钟系统在海洋生物中的运行机制,以及生物钟系统在水产养殖业中的应用研究正在逐渐增加。本文研究对象是大海马(*Hippocampus kuda*),一种海龙科的小型药用鱼类。目前由于渔业兼捕、栖息地破坏和过度开发等原因已导致其野生资源急剧下降,市场供需矛盾严重,也促进了人工养殖的蓬勃发展^[21,22]。然而,养殖过程中存在许多问题导致生产效率低下,其中大多数问题是由养殖系统中的环境胁迫引起的^[23-26]。本文拟从生物钟角度,探究大海马人工生长的适宜条件,建立科学海马养殖系统。同时,也通过探究大海马的生物钟与其脂类代谢间的关系,为提升大海马体内脂类物质积累提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与取样程序

实验用大海马(*H. kuda*)为宁波大学校内养殖基地培育。选取160尾平均体重为(0.61±0.121) g,平均体长为(5.1±1.33) cm的幼体分成4组,每组40尾,分别放入4个20 L的玻璃水族缸中饲养。每天定时更换海水,养殖条件:盐度25±0.5,温度(25±0.5)℃,光照强度1000 lx。每日投喂(冰鲜糠虾)1次,每次投喂量约8 g。各组设定条件为:组1 (G1):光周期L:D=16:8,投喂时间为开灯后2h;组2 (G2):光周期L:D=12:12,投喂时间为开灯后2h;组3 (G3):光周期L:D=16:8,投喂时间为关灯前2h;组4 (G4):光周期L:D=12:12,投喂时间为关灯前2h。各组海马在上述条件下分别驯养4周后,取样分析。在取样前,禁食24h, G1和G3分别在 ZT2 (Zeitgeber time)、ZT4、ZT6、ZT10、ZT14、ZT18、ZT20、ZT22时取样, G2和G4分别在 ZT4、ZT6、ZT8、ZT12、ZT16、ZT18、ZT20、ZT24时取样。在每个取样时间点,随机选取4尾海马经麻醉后迅速收集其脑和肝脏组织,分别放入RNA store中,立刻在液氮中速冻,再转移到-80℃冰箱中长期保存。

1.2 RNA提取和cDNA合成

将样品取出解冻,加入RNAiso PLUS溶液,离心取上清液转移到新的离心管中,加入氯仿,混匀再离心,再取上层无色溶液于新的离心管中,再加入等体积异丙醇用以沉淀RNA,离心得到RNA的白色沉淀,用乙醇洗涤两遍,然后将RNA沉淀溶于DEPC水中。用分光光度计在260和280 nm波长处测量其吸光值,并用1%琼脂糖凝胶电泳检查总RNA

样品的纯度和完整性。然后再根据TRANS的逆转录试剂盒说明书,在20 μL体系中加入适量总RNA、gDNA Remover、随机引物及RNase-free Water,实现基因组DNA去除和cDNA合成^[27]。

1.3 实时荧光定量PCR

表1中的基因选自*H. kuda*转录组数据库^[27],用Primer Premier 5软件设计特异性引物。为了有效进行定量PCR,将获得的cDNA稀释8倍。取部分cDNA稀释成浓度梯度用于评估每个基因的引物扩增效率,以确保引物的扩增效率>85%。实时荧光定量PCR在Eppendorf: Mastercycler realplex上进行操作,采用2×SYBR Green qPCR Master Mix试剂盒。qPCR反应体系为: 2×SYBR Green Master Mix 10 μL, 正向和反向引物各1 μL, cDNA 1.5 μL, RNase-free Water 6.5 μL; 反应条件为: 95℃下2min, 40个循环, 95℃ 10s、58℃ 20s、72℃ 25s, 在最后一个循环结束后做熔解曲线,从而确保仅扩增出相关的目的基因。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因的相对表达量。

表1 用于实时荧光定量PCR的有关引物及其退火温度(T_m)

Tab. 1 Sequences and annealing temperature (T_m) of primer pairs used for quantitative PCR

基因名称Gene	引物序列Sequences (5'—3')	退火温度 T_m (°C)
钟基因Clock gene		
<i>Bmal1</i>	TCAGTCAAGCGGAAATGGCT ACAATGTACACGAAGGACGCT	60
<i>Clock</i>	GAGCCTGAACGTGGCTCTAC TGTGGATCTTGTGCTCTGC	59
<i>Cry1</i>	CCCAGCAAAGACTCCTTGAG CAGTCAAAGGCCATTTCAT	59
<i>Cry2</i>	GCAGCTCCTCAAACACCTTC GGGATCAAAAATCCAGAAGCA	60
<i>Per1</i>	GAGGACTCCTGGTGCTTGAG GTTCAAGGACCTCAGCAAGC	59
<i>Per2</i>	TCTTTGCCTTAGCCGACTGT CCGCTCTACACGAGTCTACA	
<i>Per3</i>	CAAGCAAGTGCAAGCCAATA TGCAGCACAGGATACTGGAG	60
转录因子基因Transcription factor gene		
<i>Srebp1</i>	TGCAGCAATCCAATCAGAAG CACGTTTGGCTTGGTATCCT	60
<i>Srebp2</i>	CAGACCAGGTCCAGTTTGGT CCACCCAAGATTTTGAACCT	59
脂类代谢基因Lipid metabolism gene		
<i>Hmgcr</i>	GATCCCGATGACCAGACACT GAGAGCTGACCGGTCTCAAC	59
<i>Mvk</i>	ACCGAGTCCAGCACAGAAGT GCATGCTGAGGTTCTTAGCC	60
<i>Mvd</i>	TCGATGGACCAGATTGATGA TCGCTGAACCTCACCATGAAG	60
<i>Lss</i>	ATGGTGGCGTAGTCTTGGAC TGTACCTCCCCATGAGCTTC	60
<i>Fdfts</i>	TGCTGTCATGAGGTCCAGAG GGATGGAATTGGTTGGATG	59
<i>Cetp</i>	GCCTGGTTATCTCGGTTTCA CCTCTGGCCAACTATGGTGT	60
<i>Scap</i>	CCAGACCTCCTCGTCTTCAG GAGATCCGACCAGCACTCTC	60

1.4 数据分析

在实验过程中,每周从各组中随机选取20尾海马分别测定并记录相关的体长和体重,按下述公式计算各组海马的生长速率:

$$\text{体重增长率}(\text{SGR}_W, \%/d) = [(\ln W_t - \ln W_0)/t] \times 100$$

$$\text{体长增长率}(\text{SGR}_L, \%/d) = [(\ln L_t - \ln L_0)/t] \times 100$$

$$\text{饱满度}(\text{CF}, \text{g}/\text{cm}^3) = (W_t/L_t^3) \times 100$$

式中, W_t 和 L_t 分别为海马的终体重(g)和终体长(cm); W_0 和 L_0 分别为初始体重和初始体长; t 为时间(d)。

采用Two-way ANOVA分析了光和投喂时间对大海马生长的影响,并采用Tukey检验法确定不同处理之间差异的显著性。用Acro昼夜节律分析程序对基因表达的原始数据进行分析,以确定目标基因的表达是否符合余弦函数。此外,通过单因素方差分析(ANOVA)确定每个基因的不同采样时间之间的统计差异, Tukey检验用于确定样本时间点和不同样本集平均值之间差异的显著性。

2 结果

2.1 海马生长比较

经过4周养殖后,各组海马的生长出现了显著性差异($P<0.05$)。在所有处理中, G1组海马的各项生长指标都是最高的,其体长和体重也增加最多,该组的 SGR_L 和 SGR_W 远高于其他各组($P<0.05$);饱满度(CF)与G2组相近,也高于G3和G4组(表2)。G2组海马的生长尽管不如G1,但也远高于G3和G4。比较各生长指标看, G3组中海马的生长在所有处理中是最差的。

经方差分析,尽管大海马的体长增长率(SGR_L)与光周期的关系不密切($F=1.708$, $P>0.05$),但与投喂时间的关系很密切($F=171.152$, $P<0.01$),也极大地受两者共同作用的联合影响($F=20.866$, $P<0.01$)。而体重增长率(SGR_W)和CF变化却是受光($F=20.572$,

$P<0.01$; $F=256.819$, $P<0.01$)、投喂时间($F=847.781$, $P<0.01$; $F=5060.988$, $P<0.01$)及两者联合作用的密切影响($F=74.448$, $P<0.01$; $F=548.721$, $P<0.01$)。

2.2 中枢钟基因的表达分析

本实验中所有钟基因的表达在采样时间点都显示有统计上的显著差异,各组中各中枢钟基因的表达变化如图1所示。

在G1和G3中,所测的7个钟基因中有6个基因(除 $Cry2$ 外)在的大海马的大脑中都展示出明显的昼夜节律表达。其中, G1的 $Clock$ 和 $Per3$ 在开灯后1h(ZT5)达到其顶相,在光亮期的后期(ZT16-ZT18)保持相对低的表达水平; $Bmal1$ 和 $Per1$ 在开灯后5h(ZT9)达到其顶相,在光暗期(ZT22-ZT24)保持低的表达水平; $Per2$ 和 $Cry1$ 在光亮期的前期(ZT9)达到表达峰值,在光亮期结束(ZT18)显示有最低表达水平。G3的 $Clock$ 和 $Per3$ 在开灯后5h(ZT9)达到峰值,比G1推迟了4h,在光亮期末有最低表达水平(ZT18-ZT20); $Bmal1$ 、 $Per1$ 、 $Per2$ 和 $Cry1$ 也都在ZT9达到峰值,其中 $Per1$ 和 $Per2$ 在光暗期有最低表达水平, $Bmal1$ 和 $Cry1$ 则在光亮周期结束时达到最低值。

在G2和G4中,这6个基因也显示有较好的节律性表达。G2的 $Clock$ 、 $Bmal1$ 和 $Per3$ 在光亮期中期(ZT7)有表达峰值,其中 $Clock$ 和 $Bmal1$ 在光暗期的前中期(ZT18-ZT22)有最低表达,而 $Per3$ 则在光亮期结束(ZT16-ZT18)出现最低值;其余的 $Per1$ 、 $Per2$ 和 $Cry1$ 在开灯后5h(ZT11)达到其顶相,同时这3基因都在光暗期中期(ZT22-ZT24)显示有最低的表达水平。G4中各基因的表达变化趋势与G2相似。

2.3 肝脏外周钟基因的表达分析

这6个钟基因在的大海马的肝脏中也表现出良好的节律性,只是在不同组中呈现不同的表达特征(图2)。G1中, $Clock$ 、 $Bmal1$ 、 $Per1$ 和 $Per2$ 在光亮期中期(ZT9)达到表达峰值, $Per3$ 和 $Cry1$ 在ZT5达到峰值; $Clock$ 和 $Per2$ 在光暗期表现为低水平,而 $Bmal1$ 、 $Per1$ 、 $Per3$ 和 $Cry1$ 则在光亮期结束(ZT9)出现最低值。G2中,6个基因的表达都在ZT11达到峰值(图2),在光暗期中前期(ZT20—ZT24)出现最低表达值。G3中, $Clock$ 在9点时达到顶相,光暗期(ZT20-ZT24)处于低水平表达; $Bmal1$ 、 $Per1$ 和 $Per2$ 在光亮期后期达到顶相(ZT17), $Per3$ 和 $Cry1$ 则在光亮期中期达到顶相(ZT13),而这5个基因的最低表达值均出现在刚开灯时(ZT4—ZT6)。G4中, $Clock$ 在11点达到顶峰,在光暗期中期处于低水平表达(ZT22—ZT24), $Bmal1$ 、 $Per1$ 、 $Per2$ 、 $Per3$ 和 $Cry1$ 在光亮期中期处于顶峰(ZT15),也是在刚开灯时处于低水平表达。

表2 不同处理中海马生长的比较

Tab. 2 Comparison of growth index of *H. kuda* in different treatments

生长指标 Growth index	G1	G2	G3	G4
初始体长 (cm)	4.99±0.25	4.98±0.17	4.99±0.35	4.98±0.18
初始体重 (g)	0.59±0.06	0.60±0.04	0.60±0.03	0.60±0.04
终体长 (cm)	8.88±0.14	8.24±0.13	7.12±0.15	7.42±0.16
终体重 (g)	2.51±0.13	1.97±0.11	1.21±0.14	1.31±0.12
SGR_L (%/d)	2.06±0.18 ^A	1.80±0.14 ^B	1.28±0.27 ^C	1.42±0.16 ^D
SGR_W (%/d)	5.20±0.38 ^A	4.27±0.25 ^B	2.53±0.34 ^C	2.82±0.25 ^D
CF (g/cm ³)	0.36±0.01 ^A	0.35±0.02 ^A	0.34±0.02 ^B	0.32±0.02 ^C

注: 同行的不同字母代表组间存在显著性差异($P<0.05$)

Note: Different letters in the same row indicate significant differences ($P<0.05$)



图 1 各组海马大脑中的钟基因的24h表达谱

Fig. 1 Expression profile of clock genes in the brain of *H. kuda*

余弦波的存在表明各基因的表达存在明显的生物节律性; X轴上黑白条表示光周期的光暗期和光亮期; 不同字母表示各基因在各采样时间点统计上的显著差异

The presence of cosine waves indicates clear Biorhythms in the expression of each gene; The black and white bars on the X-axis indicate the late light phase and light-on in the photoperiod; Uppercase letters indicate that statistically significant differences between genes at each sampling time point

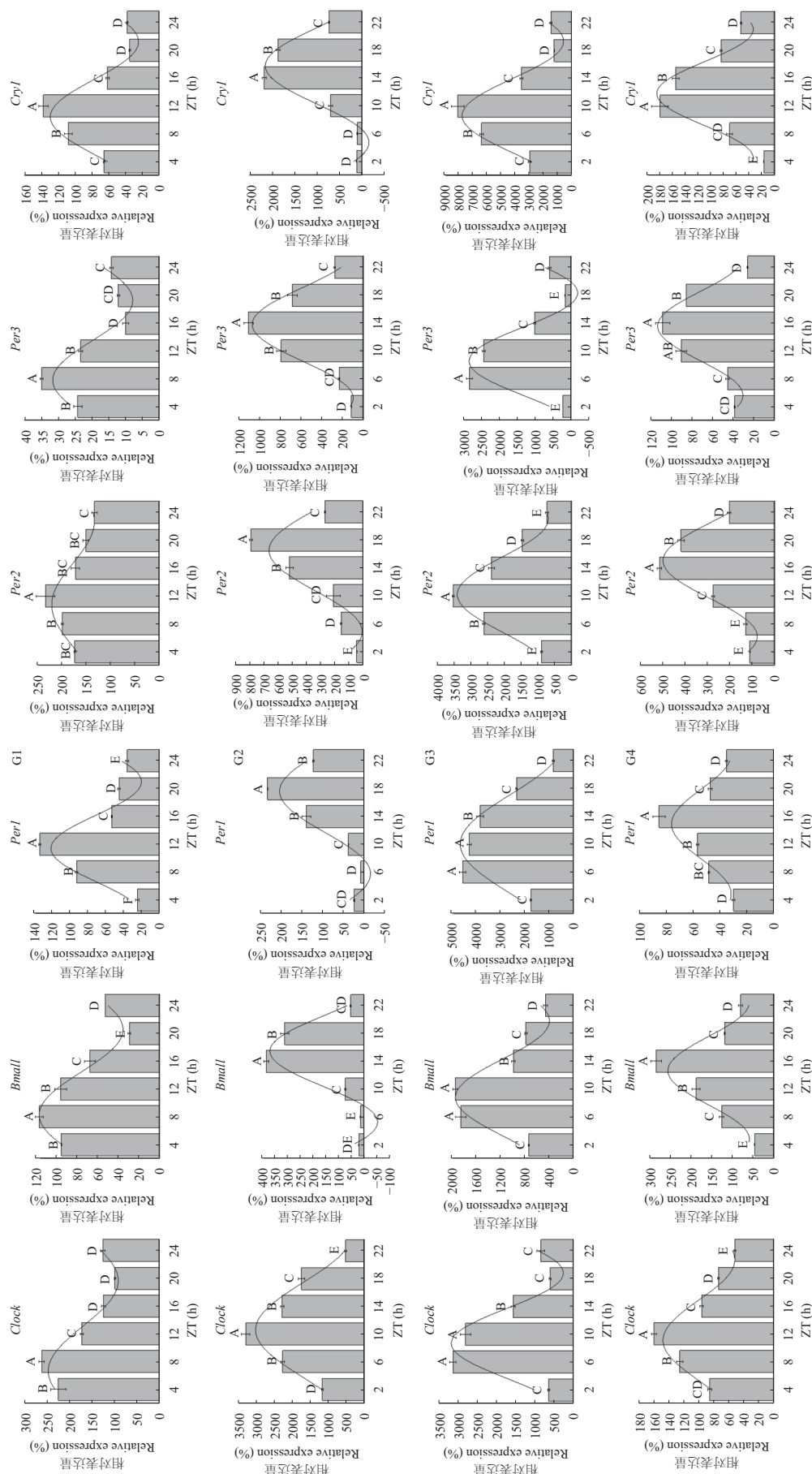


图 2 各组海马肝脏钟基因的24h表达谱

Fig. 2 Expression profile of clock genes in the liver of *H. kuda*

余弦波的存在表明各基因的表达存在明显的生物节律性; X轴上黑白条表示光周期和光暗期; 不同字母表示各基因在各采样时间点统计上的显著差异

The presence of cosine waves indicates clear Biorhythms in the expression of each gene; The black and white bars on the X-axis indicate the late light phase and light-on in the photoperiod; Uppercase letters indicate that statistically significant differences between genes at each sampling time point

2.4 钟系统间的协同性分析与比较

比较设定的4个组别中, 大海马的大脑和肝脏中的各个钟基因的表达曲线变化, 初步分析大海马的中枢钟系统与周围钟系统间的节律协同性状况。

从表3可知, G1和G3中的6个钟基因在大海马的脑和肝脏中的表达节律的变化趋势相近, 尤其是G1中两者非常接近, 更加协同; 而G2和G4中, 6个基因在大海马脑中的表达趋势与G1和G3相似, 但在肝脏中的表达与脑中完全不合拍, 甚至有几个基因的表达节律在肝脏中与脑中是完全相反的。此外, 表达的节律周期也有所变化, 如*Cry1*周期小于20h。

表3 中枢钟系统与周围钟系统间表达的协同性比较

Tab. 3 Comparison of the expressed synergy between the central and the peripheral clock system

组别 Group	来源 Origin	Clock 顶相/ 低谷	Bmal1 顶相/ 低谷	Per1 顶相/ 低谷	Per2 顶相/ 低谷	Per3 顶相/ 低谷	Cry1 顶相/ 低谷
G1	脑	6/19	9/19	11/21	10/21	7/18	10/23
	肝	6/20	9/21	11/21	10/22	8/19	10/22
G2	脑	9/21	8/20	10/20	10/22	6/18	6/18
	肝	12/24	16/6	17/6	16/5	14/4	16/5
G3	脑	5/16	10/22	9/24	8/20	5/18	8/19
	肝	9/19	9/20	10/23	11/21	9/18	8/19
G4	脑	10/21	10/20	11/22	11/21	10/21	11/22
	肝	11/23	14/4	15/5	18/7	16/6	14/23or5

2.5 肝脏中代谢基因的表达分析

在大海马肝脏中, 共分析了9个与脂类代谢相关的基因(*Hmgcr*, *Mvk*, *Mvd*, *Lss*, *Fdps*, *Cetp*, *Scap*, *Srebp1*, *Srebp2*)。G1中, 有8个基因显示有明显的昼夜节律表达(图3)。其中, *Hmgcr*、*Fdps*和*Srebp1*在开灯后5h(ZT9)达到峰值, 并在光亮期末降至较低的表达水平; *Mvk*、*Mvd*、*Lss*、*Cetp*和*Scap*在开灯后(ZT5)即达到最大值, 也在光亮期末降至最低的表达水平。G2中, 该8个基因也有明显的节律表达(图3)。仅*Hmgcr*和*Scap*在开灯后5h达到峰值, 其余6个基因在开灯后1h达到峰值, 其最低表达值都出现在光暗期前期。而在G3和G4中, 这些代谢基因并非都有明显的昼夜节律表达, G3中仅*Hmgcr*、*Mvk*、*Scap*和*Srebp1* 4个有明显的节律性, 表达峰值都出现在光亮期后期(ZT17), 较低水平在ZT4-ZT6时段。G4中多个基因(*Hmgcr*、*Mvk*、*Mvd*、*Scap*和*Srebp1*)表现有明显节律性, *Hmgcr*、*Scap*和*Srebp1*都在光亮期中后期达到顶相(ZT15), 在光暗期后期出现较低水平; 而*Mvk*和*Mvd*的顶峰出现在光暗期初期(ZT19), 最低值则出现在光亮期初期(ZT19)。

3 讨论

哺乳动物的中枢和外周生物钟系统间的相互关系以及生物钟系统和代谢活动间的相互作用机制已有很多的研究, 甚至有一些理论已用于指导生活和生产。但在水生生物中有关研究较少, 仍需进一步验证。本研究分析, 证实了大海马的中枢和外周生物钟基因的节律性表达以及两者之间存在的密切联系, 同时, 也明确了大海马的脂类代谢基因的表达与生物钟系统间也存在着密切的联系。

3.1 生物钟系统间的关系

大海马中枢6个钟基因在所有条件下都表现出明显的节律性, 且所有基因的表达变化趋势较为一致, 顶相时间都出现在光亮期前中期。其中, *Clock*出现顶相时间略早于其他基因。这种现象在金枪鱼中也有类似结果^[28], 不过在虹鳟和斑马鱼中*Clock*的顶相却出现在光亮期后期^[29, 30], 而海洋青鲷中甚至没有节律性表达^[20]。这表明了*Clock*基因在不同鱼类中存在着不同的表达方式, 其所承担的功能也可能有所不同^[28]。*Bmal1*基因在大部分鱼类中都呈现节律性表达, 也证明其在生物钟系统中的重要性^[28, 31-33]。两者结合成二聚体直接调控其他钟基因(*Per1*、*Per2*、*Per3*、*Cry1*)的表达^[28]。在本研究中, 光照不变时, 生物钟系统的主要核心转录因子的表达趋势并未发生改变, 说明光是影响中枢钟基因表达的主要因素, 这一点在哺乳动物及其他鱼类中都得以证实。大海马的肝脏中也存在钟基因, 在本试验的所有处理中也依旧表现出明显的节律性振荡。不过, 相比于脑中, 肝脏中这些基因出现的顶相时间有所改变(表3)。尤其在G3和G4中, 这些基因在脑中的表达趋势与在肝脏中的完全不同, 这说明投喂时间改变会对外周钟基因的表达产生较大的影响, 使得外周钟系统与中枢钟系统相分离。这一现象在海洋青鲷中表现得尤为明显, 过晚的投饵时间直接导致海洋青鲷肝脏中钟基因失去节律性^[20], 哺乳动物中也观察到类似的结果^[34]。外周钟系统的表达发生了严重变化, 但并未对中枢钟系统产生明显影响, 再次证明了投饵仅影响外周钟系统。结合生长结果看, 显然较长光照+及时投喂更有利于大海马的生长, 该结果也符合中枢与外周钟基因协同理论。

3.2 外周钟系统与代谢的关系

肝脏不仅是重要的外周生物钟振荡器, 同时也是机体代谢的主要场所。本研究也证实了外周生物钟与代谢间存在着紧密联系。其实, 外周钟系统的核心基因(*Clock*、*Bmal1*、*Per*和*Cry*)并不直接作

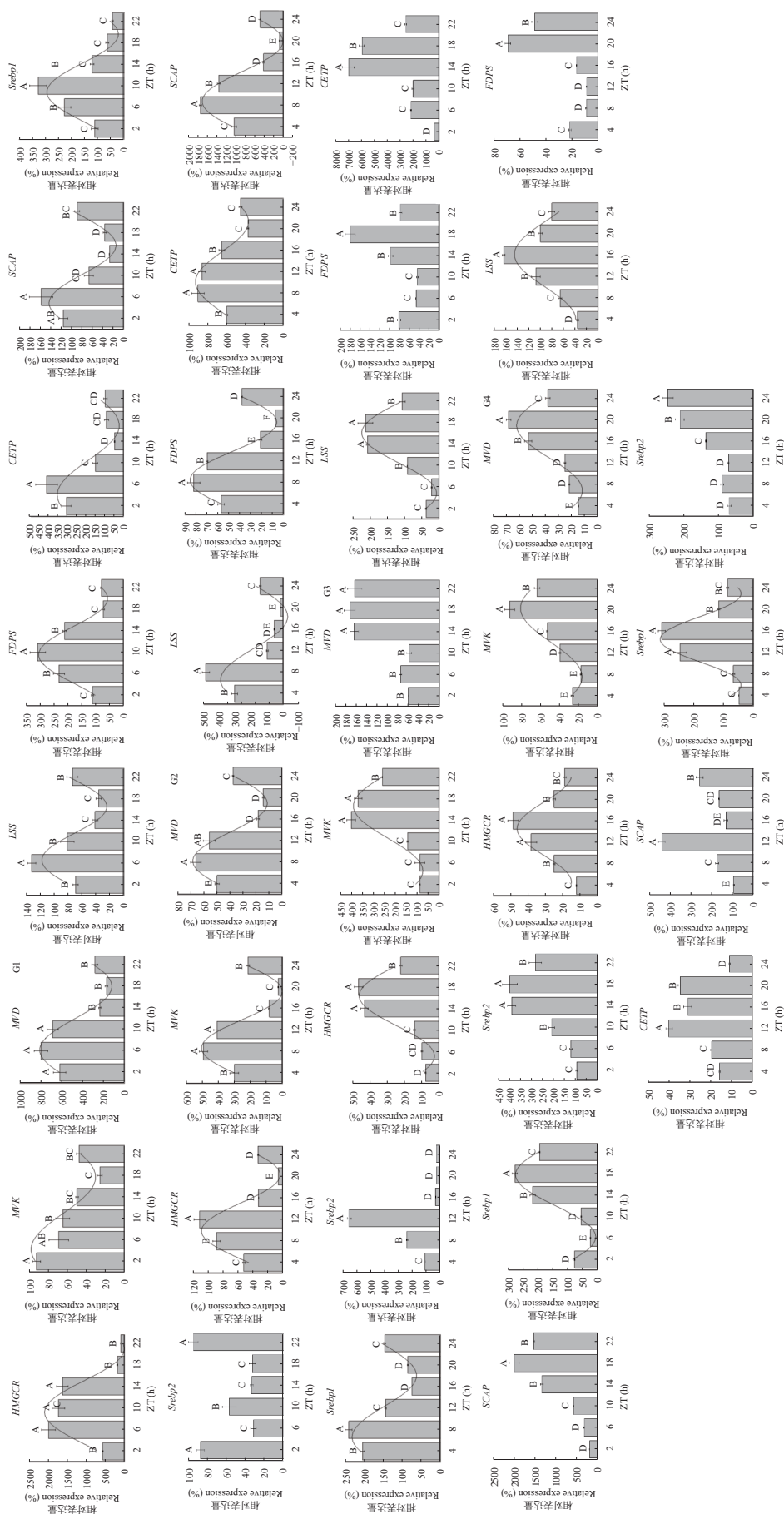


图 3 各组海马肝脏脂类代谢相关基因的 24h 表达谱

Fig. 3 Expression profile of lipid metabolic genes in the brain of *H. kuda*

余弦波的存在表明各基因表达存在明显的节律性; X轴上黑色条表示光暗期和光亮期, 不同字母表示各基因在各采样时间点统计上的显著差异

The presence of cosine waves indicates clear Biorhythms in the expression of each gene; The black and white bars on the X-axis indicate the late light phase and light-on in the photoperiod; Uppercase letters indicate that statistically significant differences between genes at each sampling time point

用于代谢过程,而是通过*Sirt1*、*Srebp*和*Ppara*等在内的一些转录因子来调节细胞代谢^[35-37]。其中,*Srebps*是脂类代谢中的关键转录调控因子。已知哺乳动物中的众多脂类代谢基因都是*Srebps*的靶基因,如生物体内甾醇化合物的合成与分解就受其调控^[38]。在本研究中,脂类代谢基因*Srebp1*和*Scap*在所有条件下都有明显的节律性表达,且表达趋势相似。例如,都在G1和G2的光亮期前中期达到顶峰,而在G3和G4中却延迟到光亮后期才达到顶峰,这证明了两个基因间的亲密关系,且这种关系与光照关系不大,而与投喂时间密切相关,进一步证实了这2基因也受到了外周钟系统的影响或调控。例如,当投喂设定在关灯前的晚上时,外周钟基因的表达节律受到了较大的影响,相应的*Srebp1*等基因的顶峰时间也延迟,从而影响到了脂类代谢和甾醇类物质的合成。此外,在甾醇合成过程中,生物体是以乙酰辅酶A为原料最终合成胆固醇,此过程的最初几步反应是将乙酰辅酶A合成为甲羟戊酸,被称为甲羟戊酸途径。其中HMGCR酶负责将3-羟基-3-甲戊二酸单酰辅酶A催化转化为甲羟戊酸,这是甲羟戊酸途径中重要的限速酶^[39],而MVK、MVD、LSS、FDPS和CETP这5个酶也是该途径上发挥重要作用的酶^[40]。在大海马肝脏中,*Hmgcr*基因在所有组中都有着节律性表达,且也受投喂时间的影响。从而造成了胆甾醇类合成途径中其他酶类的不同表现。例如,G3中*Mvd*、*Lss*、*Fdps*和*Cetp* 4个基因没有表达节律性;G4中*Lss*、*Fdps*和*Cetp*也没有节律性。这也部分说明了脂类代谢途径并不仅仅受到*Srebp*的调控,还可能有其他转录因子负责调控脂类代谢酶;还有可能是过晚的投喂导致某些转录因子的节律性丧失,从而影响到胆甾醇类的合成,这需要进一步的实验证明。从上述分析看,光是影响钟基因表达的一个重要因素,但对于外周钟基因光的影响仅是一个方面。在本研究中,相同光周期时,投喂时间的改变,外周钟基因的表达就被环境条件所夹带,逐渐脱离了中枢钟系统的协调与控制,进而导致代谢途径中的部分脂类关键酶逐渐失去协调性,甚至节律性。所以,不合理投喂会导致外周生物钟与中枢钟系统发生冲突,进而造成部分代谢途径的紊乱。对于大海马的养殖,从本实验结果看,长光亮周期+及时投喂是适合大海马生长的必要条件。

3.3 适宜生长条件的优化方向

生长测定结果也符合上述推测。本研究的G1组不但中枢钟系统和外周钟系统的协同性最佳,其生长速率也是最快的,大海马体内的胆甾醇合成与

积累也是最多的(另文发表)。这为大海马养殖适宜生长条件提供了优化方向,包括养殖环境、养殖饵料等以及精准的养殖技术,以达到最佳的生物钟系统间的协同性。影响生长的因素很多,可以优先考虑光和投喂时间的优化,因为相对的投入不多但收益很明显。从本研究看,比较G1、G2和G3的生长情况,说明投喂时间对海马生长的影响是很大的,很多研究也都证实合理的投喂时间对养殖生物的进食、消化及营养利用率的提高等是非常重要的^[41,42]。不过从第3周后,G1和G2的体重增长率也出现了显著差异,一是表明了一定时长的(>12h)光亮期基本上能满足大海马的生长所需,二也说明更长的光照对大海马的生长会更好,推测大海马的生长可能受两者的共同影响。最佳的组合条件还需要更多的实验研究。

4 结论

本研究证实大海马中存在中枢和外周钟系统,也为其脂类代谢基因的节律性变化提供了明确证据,同时通过改变光和投喂时间,证明了大海马也如同哺乳动物一样,光周期是中枢钟系统的主要驱动因素,而投喂时间是外周钟系统的主要驱动因素。通过观察中央钟系统与外周钟系统的耦合程度以及脂质代谢途径中关键酶的节律性表达,获得大海马生长的适宜条件为L:D=16:8及开灯后2h时投喂,为大海马人工养殖条件的优化指明了方向。(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Pittendrigh C S. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher [J]. *Annual Review of Physiology*, 1993(55): 17-54.
- [2] Yan J, Wang H, Liu Y, *et al.* Analysis of gene regulatory networks in the mammalian circadian rhythm [J]. *PLoS Computational Biology*, 2008, 4(10): e1000193.
- [3] Mohawk J A, Green C B, Takahashi J S. Central and peripheral circadian clocks in mammals [J]. *Annual Review of Neuroscience*, 2012(35): 445-462.
- [4] Bhadra U, Thakkar N, Das P, *et al.* Evolution of circadian rhythms: from bacteria to human [J]. *Sleep Medicine*, 2017(35): 49-61.
- [5] Maury E, Hong H K, Bass J. Circadian disruption in the pathogenesis of metabolic syndrome [J]. *Diabetes & Metabolism*, 2014, 40(5): 338-346.
- [6] Acosta-Rodríguez V A, de Groot M H M, Rijo-Ferreira F, *et al.* Mice under caloric restriction self-impose a temporal restriction of food intake as revealed by an automated feeder system [J]. *Cell Metabolism*, 2017, 26(1): 267-277.
- [7] Partch C L, Green C B, Takahashi J S. Molecular architecture of the mammalian circadian clock [J]. *Trends in*

- Cell Biology*, 2014, **24**(2): 90-99.
- [8] Honma S. The mammalian circadian system: a hierarchical multi-oscillator structure for generating circadian rhythm [J]. *The Journal of Physiological Sciences*, 2018, **68**(3): 207-219.
- [9] Asher G, Sassone-Corsi P. Time for food: the intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock [J]. *Cell*, 2015, **161**(1): 84-92.
- [10] Archer S N, Laing E E, Möller-Levet C S, *et al.* Mistimed sleep disrupts circadian regulation of the human transcriptome [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, **111**(6): E682-E691.
- [11] Buxton O M, Cain S W, O'Connor S P, *et al.* Adverse metabolic consequences in humans of prolonged sleep restriction combined with circadian disruption [J]. *Science Translational Medicine*, 2012, **4**(129): 129ra43.
- [12] Fonken L K, Workman J L, Walton J C, *et al.* Light at night increases body mass by shifting the time of food intake [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, **107**(43): 18664-18669.
- [13] Scheer F A J L, Hilton M F, Mantzoros C S, *et al.* Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, **106**(11): 4453-4458.
- [14] Suwazono Y, Dochi M, Sakata K, *et al.* A longitudinal study on the effect of shift work on weight gain in male Japanese workers [J]. *Obesity*, 2008, **16**(8): 1887-1893.
- [15] Koike N, Yoo S H, Huang H C, *et al.* Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals [J]. *Science*, 2012, **338**(6105): 349-354.
- [16] Harfmann B D, Schroder E A, Kachman M T, *et al.* Muscle-specific loss of Bmal1 leads to disrupted tissue glucose metabolism and systemic glucose homeostasis [J]. *Skeletal Muscle*, 2016(6): 1-13.
- [17] Perelis M, Marcheva B, Ramsey K M, *et al.* Pancreatic β cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion [J]. *Science*, 2015, **350**(6261): aac4250.
- [18] Zhang E E, Liu Y, Dentin R, *et al.* Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis [J]. *Nature Medicine*, 2010, **16**(10): 1152-1156.
- [19] Bass J, Lazar M A. Circadian time signatures of fitness and disease [J]. *Science*, 2016, **354**(6315): 994-999.
- [20] Bo Y, Zhang W, Lu J, *et al.* Rhythmic expressions of biological clocks and metabolic genes in marine medaka (*Oryzias melastigma*) [J]. *Aquaculture Research*, 2022, **53**(9): 3541-3552.
- [21] Job S D, Do H H, Meeuwig J J, *et al.* Culturing the oceanic seahorse, *Hippocampus kuda* [J]. *Aquaculture*, 2002, **214**(1-4): 333-341.
- [22] Lin Q, Li G, Qin G, *et al.* The dynamics of reproductive rate, offspring survivorship and growth in the lined seahorse, *Hippocampus erectus* Perry, 1810 [J]. *Biology Open*, 2012, **1**(4): 391-396.
- [23] Nicieza A G, Metcalfe N B. Effects of light level and growth history on attack distances of visually foraging juvenile salmon in experimental tanks [J]. *Journal of Fish Biology*, 1997, **51**(3): 643-649.
- [24] Wang Y T, Xiang J H. Studies on causation of the mass mortality of *Chlamys farreri* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, **30**(6): 770-774. [王运涛, 相建海. 栉孔扇贝大规模死亡的原因探讨 [J]. *海洋与湖沼*, 1999, **30**(6): 770-774.]
- [25] Wang L H, Huang G Q, Tian S J, *et al.* Effect of salinity on the growth of brown flounder, *Paralichthys olivaceus* and its compensatory growth following salinity manipulation [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, **15**(4): 615-621. [王丽华, 黄国强, 田思娟, 等. 盐度对褐牙鲆幼鱼生长的影响及其在盐度胁迫后的补偿生长 [J]. *中国水产科学*, 2008, **15**(4): 615-621.]
- [26] Kim D H, Kim S K, Choi J H, *et al.* The effects of manipulating water temperature, photoperiod, and eyestalk ablation on gonad maturation of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* [J]. *Crustaceana*, 2010, **83**(2): 129-141.
- [27] Pan X, Xu Y J, Ning Y, *et al.* Effects of temperature stress on genes' transcription and expression in juvenile *Hippocampus kuda* Bleeker [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2020, **34**(7): 1421-1431. [潘霞, 徐永健, 宁燕, 等. 温度胁迫对幼体大海马基因转录表达的影响 [J]. *核农学报*, 2020, **34**(7): 1421-1431.]
- [28] Betancor M B, Sprague M, Ortega A, *et al.* Central and peripheral clocks in Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*, L.): Daily rhythmicity of hepatic lipid metabolism and digestive genes [J]. *Aquaculture*, 2020(523): 735220.
- [29] Patiño M A L, Rodríguez-Illamola A, Conde-Sieira M, *et al.* Daily rhythmic expression patterns of clock1a, bmal1, and perl genes in retina and hypothalamus of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Chronobiology International*, 2011, **28**(5): 381-389.
- [30] Whitmore D, Foulkes N S, Strähle U, *et al.* Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators [J]. *Nature Neuroscience*, 1998, **1**(8): 701-707.
- [31] Cermakian N, Whitmore D, Foulkes N S, *et al.* Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control and function [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, **97**(8): 4339-4344.
- [32] Davie A, Minghetti M, Migaud H. Seasonal variations in clock - gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Chronobiology International*, 2009, **26**(3): 379-395.
- [33] Vera L M, Negrini P, Zagatti C, *et al.* Light and feeding entrainment of the molecular circadian clock in a marine teleost (*Sparus aurata*) [J]. *Chronobiology International*, 2013, **30**(5): 649-661.

- [34] Sudo M, Sasahara K, Moriya T, *et al.* Constant light housing attenuates circadian rhythms of mPer2 mRNA and mPER2 protein expression in the suprachiasmatic nucleus of mice [J]. *Neuroscience*, 2003, **121**(2): 493-499.
- [35] Walker A K, Yang F, Jiang K, *et al.* Conserved role of SIRT1 orthologs in fasting-dependent inhibition of the lipid/cholesterol regulator SREBP [J]. *Genes & Development*, 2010, **24**(13): 1403-1417.
- [36] Ponugoti B, Kim D H, Xiao Z, *et al.* SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285**(44): 33959-33970.
- [37] Ogata M, Tsujita M, Hossain M A, *et al.* On the mechanism for PPAR agonists to enhance ABCA1 gene expression [J]. *Atherosclerosis*, 2009, **205**(2): 413-419.
- [38] Bhattarai A, Likos E M, Weyman C M, *et al.* Regulation of cholesterol biosynthesis and lipid metabolism: a microRNA management perspective [J]. *Steroids*, 2021(173): 108878.
- [39] Horton J D, Goldstein J L, Brown M S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2002, **109**(9): 1125-1131.
- [40] Elsabrouty R, Jo Y, Dinh T T, *et al.* Sterol-induced dislocation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from membranes of permeabilized cells [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2013, **24**(21): 3300-3308.
- [41] López-Olmeda J F, Montoya A, Oliveira C, *et al.* Synchronization to light and restricted-feeding schedules of behavioral and humoral daily rhythms in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) [J]. *Chronobiology International*, 2009, **26**(7): 1389-1408.
- [42] Montoya A, López-Olmeda J F, Garayzar A B S, *et al.* Synchronization of daily rhythms of locomotor activity and plasma glucose, cortisol and thyroid hormones to feeding in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) under a light-dark cycle [J]. *Physiology & Behavior*, 2010, **101**(1): 101-107.

LIGHT AND FEEDING TIME ON THE GROWTH, BIOLOGICAL CLOCK GENE EXPRESSION, AND LIPID METABOLISM GENE EXPRESSION IN *HIPPOCAMPUS KUDA* BLEEKER

XU Yong-Jian, BO Yang, LI Jia-Wei and LOU Ye-Jing

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

Abstract: Biological rhythms play a critical role in the metabolism of organisms. In this study, the juvenile *Hippocampus kuda* was used as the research object. Four treatments were established, including two photoperiods (L (light):D (dark)=16:8, 12:12) and two feeding times (2h after light-on the and 2h before light-off), to analyze the interaction between the two biological clock systems of *H. kuda* and their relationship with nutrient metabolism. The aim was to determine the optimal environmental conditions for artificial breeding and the conditions necessary for the synthesis of important metabolites in *H. kuda*. Results showed that under long photoperiod (L:D=16:8) with feeding 2h after light-on, *H. kuda* exhibited the highest specific growth rate in body length (SGR_L) and body weight (SGR_W), as well as the highest condition factor (CF) in all four treatments. Rhythmic expressions were observed in six clock genes (*Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, and *Cry1*) and eight lipid-related metabolic genes (*Hmgcr*, *Mvk*, *Mvd*, *Lss*, *Fdps*, *Cetp*, *Scap*, and *Srebp1*). The trend of clock gene expression in the brain throughout the day, and its peak expression, was consistent with those in liver, which correlated with SGR_L, SGR_W, and CF. However, in the treatments where feeding occurred 2h before light-off, these parameters were significantly lower than those with feeding 2h after light-on. Additionally, the central clock system and the trend of clock gene expression in the brain throughout the day, including peak expression times, differed completely from those in the liver. Only four lipid-related metabolic genes (*Hmgcr*, *Mvk*, *Scap*, and *Srebp1*) exhibited rhythmic expression under the long photoperiod, while five lipid-related metabolic genes (*Hmgcr*, *Mvk*, *Mvd*, *Scap*, and *Srebp1*) exhibited rhythmic expressions under the short photoperiod. The study suggests that *H. kuda* possesses a comprehensive biological clock system closely linked to lipid metabolism. Combined analysis indicated that stable rhythmic expression of clock genes and metabolic genes could be maintained under the conditions of L:D=16:8 with feeding 2h after light-on. Under these conditions, the clock gene expression in the brain and liver tended to synchronize, promoting the growth of *H. kuda* and maintaining the normal lipid metabolism pathway. These findings provide a scientific basis for promoting lipid synthesis and accumulation in *H. kuda*.

Key words: Photoperiod; Feeding time; Biological clock genes; Culture conditions; *Hippocampus kuda*