

综述

DOI号: 10.3724/SP.J.0000.2009.30546

鱼类 ghrelin 研究进展

马细兰^{1,2} 刘晓春¹ 周立斌² 陈勇智² 张勇¹

(1. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广州 510275;

2. 惠州学院生命科学系, 惠州 516007)

PROGRESS ON GHRELIN IN FISH

MA Xi-Lan^{1,2}, LIU Xiao-Chun¹, ZHOU Li-Bin², CHEN Yong-Zhi² and ZHANG Yong¹

(1. State Key Laboratory of Biocontrol Institute of Aquatic Economics and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economics, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275; 2. Department of Life Science, Huizhou University, Huizhou 516007)

关键词: 鱼; Ghrelin; 生理功能

Key words: Fish; Ghrelin; Physiological functions

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)03-0546-06

1999年日本学者 Kojima *et al*^[1]在大鼠胃组织中首次发现了一种多肽, 当这种多肽与生长激素促分泌素受体 (Growth hormone secretagogue receptor, GHS-R) 结合后, 能刺激生长激素 (Growth hormone, GH) 的分泌, 因此将其命名为 ghrelin (ghre 即 grow 之意)。此后, 人们相继发现 ghrelin 在摄食、能量平衡、体重、心血管等方面显示出多种调节作用。目前有关人类和哺乳动物 ghrelin 的研究主要集中在药学研究和畜牧饲料开发两大方面, 并取得了一定成效。国内外有关鱼类 ghrelin 的研究资料较少, 相关报道仅见于少数的几种鱼类。本文从鱼类 ghrelin 的结构、组织分布及生理功能三个方面综述了鱼类 ghrelin 研究的进展情况。

1 Ghrelin的结构

1.1 基因结构 2000年, Wajurajch *et al*^[2]首次报道了人类 ghrelin 基因的结构, 它位于 3p25-26 染色体上, 包含 3 个内含子和 4 个外显子。2001年, Tanaka *et al*^[3]发表了鼠 ghrelin 基因的结构, 鼠 ghrelin 基因中存在一个很短的非编码外显子, 故其包含了 5 个外显子和 4 个内含子, 其中第一个外显子只有 19bp 属于 ghrelin cDNA 的非编码区域。比较人类和鼠的 ghrelin 基因发现, 它们在 5'启动子区都存在一个高

度同源的 19 bp 区域和一个类似于 TATA box 的 TATATAA 序列, 这表明哺乳动物 ghrelin 基因的内含子、外显子结构及启动子区域都是高度保守的。

2002年, Unnappan *et al*^[4]首次确定了金鱼 (*Carassius auratus*) ghrelin 的基因序列, 之后人们陆续确定了莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[5]、日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)^[6]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[7] 及黑鲷 (*Sparus macrourus*)^[8] 的 ghrelin 基因结构。虹鳟 ghrelin 基因与鼠的相似, 在 5'末端存在一个短的外显子, 包含 4 个内含子和 5 个外显子。除虹鳟外, 其余几种鱼类的 ghrelin 基因结构都与人类 ghrelin 基因结构相似, 包含 3 个内含子和 4 个外显子, 但鱼类 ghrelin 基因的内含子比人类的明显要短, 并且鱼类 ghrelin 基因不具备鼠 ghrelin 基因的短的非编码外显子。图 1 为金鱼 ghrelin 基因的结构图示, 其余几种鱼类 ghrelin 基因的结构与之相似。

1.2 多肽结构 Ghrelin 在合成过程中, 先产生其前体, 然后再水解生成有活性的 ghrelin。大多数哺乳动物有活性的 ghrelin 由 28 个氨基酸组成, 分子质量约为 3300, 颗粒直径约为 90—150 nm, 其前体 N 端前 23 个氨基酸具有信号肽特征, 从第 24 位至第 52 位的 28 个氨基酸为 ghrelin 成熟肽序列, C

收稿日期: 2008-06-25 修订日期: 2009-02-18

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006AA10A402); 国家自然科学基金 (30700611); 广东省自然科学基金 (06027456); 广东高校优秀青年创新人才培养项目 (A2YM08094); 惠州学院校立项目 (C208.0211) 资助

作者简介: 马细兰 (1976—), 女, 广东南雄人; 博士; 主要从事鱼类生理及分子生物学研究。E-mail: mx@hzu.edu.cn

通讯作者: 周立斌, E-mail: zlb@hzu.edu.cn; Tel: 0752-2527603

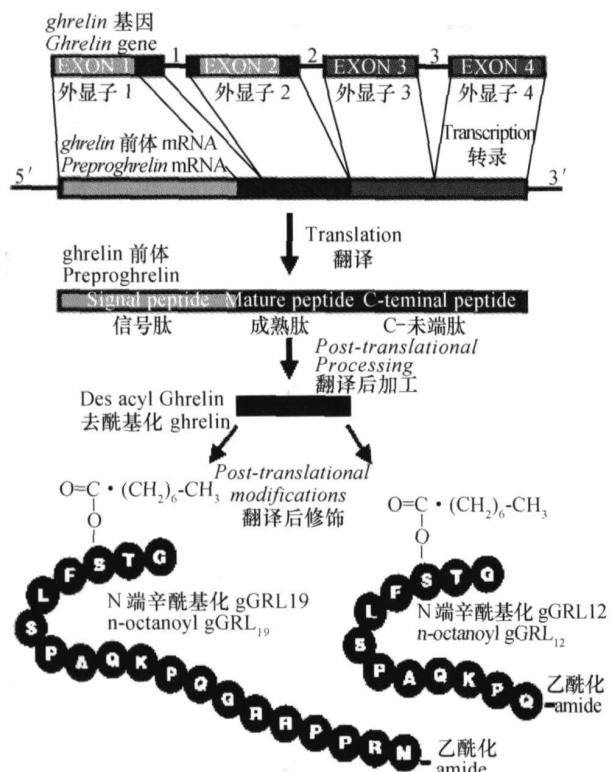


图 1 金鱼 ghrelin 基因 N 端酰基化、乙酰化修饰及多肽形成过程

(引自 Unniappan & Peter 2005)

Fig. 1 Proposed scheme of the formation of n-octanoylated and isolated putative ghrelin peptides from the ghrelin gene in goldfish (from Unniappan & Peter 2005)

Ghrelin 基因结构中方框代表外显子 1、2、3、4 横线代表内含子 1、2、3。在该图所示的 ghrelin 基因中，方框表示外显子 1、2、3 和 4，横线表示内含子 1、2 和 3。

末端的 P-R(脯氨酸-精氨酸)结构为其识别部位^[1]。ghrelin 主要有两种分子存在形式,一种是无活性的 N 端去辛酰基化;另一种是有活性的 N 端辛酰基化,即第三位丝氨酸的 N 端与十八辛酸以酯键连接,N 端辛酰基化对 ghrelin 生物活性具有重要作用^[1]。

与哺乳动物相似,鱼类 ghrelin 也由其前体加工而来,前体包括信号肽、成熟肽和 C 末端肽^[4]。金鱼前体 ghrelin (*Pmgghrelin*)基因编码的氨基酸序列表明其成熟肽存在两个剪切位点和两个乙酰化修饰位点,因此金鱼 *Pmgghrelin* 基因可通过不同剪接方式形成含 19 和 12 个氨基酸的两种多肽^[4](图 1)。虹鳟 *Pnoghrelin* 基因同样可以通过不同剪接方式形成含 24 和 21 个氨基酸的两种多肽^[7]。Paihar *et al*^[9] 通过生物化学的方法也分离纯化出了尼罗罗非鱼两种有活性的内源 ghrelin 蛋白。

鱼类 ghrelin 多肽的另一显著特点是 C 末端的乙酰化修饰,非鱼类脊椎动物 ghrelin 多肽不存在 C 末端乙酰化修饰,虹鳟 ghrelin 例外,它同时存在乙酰化-ghrelin 和非乙酰化-ghrelin 两种形式^[7](表 1)。不同鱼类 ghrelin 多肽的 N 端酰基化存在一定差异,目前金鱼和尼罗罗非鱼 ghrelin 多肽的 N 端酰基化方式尚未确定,其他几种鱼类 ghrelin 的 N 端酰基化大都为辛酰基化(表 1)。

比较不同种动物 ghrelin 成熟肽的氨基酸序列发现,哺乳动物 ghrelin 成熟肽 N 端的前 10 个氨基酸完全相同,而非哺乳动物的只有前 7 个氨基酸完全相同,且与哺乳动物的氨基酸序列相似。大多数动物 ghrelin 成熟肽的第二、三位氨基酸均为丝氨酸(Serine, S),但也有例外,如金鱼的第二位氨基酸改变为苏氨酸(Threonine, T),牛蛙的第二、三位氨基酸分别为亮氨酸(Leucine, L)和苏氨酸(T)所取代,呈现出一定的种间特异性(图 2)。

表 1 各种鱼类 ghrelin 多肽的特征比较

Tab. 1 List of fish ghrelin peptides known so far and its major features

种类 Species	成熟肽长度 (氨基酸数目) Length of the mature peptide(number of amino acids)	N 端酰基化修饰 Acyl modification	C 端乙酰化修饰 C-terminal amidation	文献 References
金鱼 Goldfish	19 或 12	未定	乙酰化	Unniappan, <i>et al</i> 2002 ^[4]
日本鳗鲡 Japanese eel	21	辛酰基化或去辛酰基化	乙酰化	Kaiya, <i>et al</i> 2003a ^[6]
莫桑比克罗非鱼 Mozambique tilapia	20	去辛酰基化	乙酰化	Kaiya, <i>et al</i> 2003b ^[5]
尼罗罗非鱼 Nile tilapia	20	未定	乙酰化	Kaiya, <i>et al</i> 2003b ^[5]
虹鳟 Rainbow trout	24 或 21	辛酰基化或去辛酰基化	乙酰化或非乙酰化	Kaiya, <i>et al</i> 2003c ^[7]
黑鲷 Black seabream	20	辛酰基化	乙酰化	Yeung, <i>et al</i> 2006 ^[8]

Goldfish	:	GISFLSPAQKPGGRRPPRM-----	: 19
Eel	:	GSSFLSPSQRPGKDKKPPRV-----	: 21
Tilapia	:	GSSFLSPSQPKPQNKVKSRI-----	: 20
Trout	:	GSSFLSPSQPKVRQGKGKPPRV-----	: 23
Bullfrog	:	GLLFLSPADMQKIAERQSQNKLHRGNMM	: 28
Turtle	:	GSSFLSPEYQNTQQRKDPKKHTKLN---	: 25
Chicken	:	GSSFLSPTYKNIQQQKDTRKPTARLH--	: 26
Human	:	GSSFLSPEHQVRVQQRKESKKPPAKLQPR	: 28

图 2 哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类和鱼类 ghrelin 成熟肽的比较
(引自 Unniappan & Peter 2005)

Fig 2 Comparison of amino acid sequences of mammalian, avian, reptilian, amphibian and fish ghrelin peptides (from Unniappan & Peter 2005)

左边标识动物种类的名称,右边标识 ghrelin 成熟肽的氨基酸数目,彩色标识在高度保守的生物活性中心域内出现的氨基酸变异。各种动物的 ghrelin 氨基酸序列来自 NCBI GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), 序列号分别为人类 Human (AB029434)、鸡 Chicken (NM_001001131)、龟 Turtle (AB16145)、牛蛙 Bullfrog (AB058510)、虹鳟 Trout (AB096919)、罗非鱼 Tilapia (AB077764)、鳗鲡 Eel (AB062427)、金鱼 Goldfish (AF454389)

The name of the species is given on the left side of the alignment and the number of amino acids in the peptide is provided on the right side of the alignment. The colored amino acids highlight the differences in the highly conserved "bioactive core" of ghrelin peptide. The National Center for Biotechnology Information's GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) accession numbers of the sequences are provided below, within the brackets of the species. Human (AB029434), chicken (NM_001001131), turtle (AB161457), bullfrog (AB058510), rainbow trout (AB096919), tilapia (AB077764), eel (AB062427) and goldfish (AF454389).

2 Ghrelin 的分布

Kojima *et al.*^[1] 采用 Northern blot 方法首次发现了大鼠胃组织有 ghrelin 的 mRNA 表达。随后, Date *et al.*^[10] 在大鼠的胃、小肠、大肠、胰腺、肝脏、心脏、肺、白脂肪、下丘脑、垂体和前脑中均发现了 ghrelin 的 mRNA 表达。Gnanapavan, *et al.*^[11] 通过 RT-PCR 方法发现人类的胃、肾上腺、心房、乳房、口腔黏膜、食道、输卵管、脂肪、胆囊、淋巴细胞、回肠、肾脏、脾脏、心脏、肺、淋巴管、肌肉、心肌、卵巢、精巢、胎盘、前列腺、胰腺、甲状腺、皮肤、垂体、血管多种组织都有 ghrelin 的 mRNA 表达。尽管目前还不清楚 ghrelin 的 mRNA 在人体内如此广泛表达的机制, 但这些研究结果表明 ghrelin 可能在人体内具有广泛的生理作用。

Unniappan *et al.*^[4] 采用 RT-PCR 方法发现在金鱼的端脑、下丘脑、消化道(肠)、脾和鳃组织中有 ghrelin 的 mRNA 表达, 且肠道的表达最为强烈。日本鳗鲡的胃、肠、脑、心脏、体肾和头肾中都有 ghrelin 的 mRNA 表达^[6]; 虹鳟 ghrelin 主要表达部位在胃, 其次是脑和肠^[7]; 莫桑比克罗非鱼 ghrelin 也是胃组织表达量最高, 脑、肾、鳃组织表达量较低^[5]。相反, Pahar *et al.*^[9] 用 RT-PCR 方法检测发现尼罗罗非鱼 ghrelin 在胃组织中不表达。Sakata *et al.*^[12] 用原位杂交方法

研究发现在虹鳟胃黏膜的开放型细胞和闭合型细胞中均有 ghrelin 的 mRNA 表达。用 Northern blot 方法只检测到 ghrelin 在鱼类的胃、消化道中有表达而在脑区无表达。综合以上研究成果可以看出, 鱼类 ghrelin 的 mRNA 表达主要是集中在消化道内, 而在脑内的表达较弱。这就说明了消化道是鱼类 ghrelin 分泌的主要部位, 可能与鱼类的摄食消化相关。

3 Ghrelin 的生理功能

人们对哺乳动物 ghrelin 的各种生理功能已经做了较为深入的研究^[13-15], 鱼类在该方面的研究相对较少。鱼类 ghrelin 的主要生理功能是调节脑垂体的激素分泌、调节摄食和摄水行为等。

3.1 调节垂体激素的分泌

3.1.1 生长激素 (Growth hormone GH)

在体和离体实验都表明 ghrelin 具有调控鼠、猪、牛和人 GH 分泌的功能。ghrelin 可以促使灌流孵育中的大鼠垂体前叶细胞^[16]、猪^[17] 和牛^[18] 静态孵育中的生长激素细胞分泌 GH, 这表明哺乳动物的 ghrelin 可直接作用于垂体, 调节 GH 的释放。腹腔注射 ghrelin 可以促进大鼠 GH 的释放, 并且呈剂量依赖性^[11]; 对大鼠侧脑室连续注射 ghrelin 12d 第 6 天时血浆中 GH 浓度明显升高, 但在第 12 天时血浆浓度无显著变化^[19]。离体实验表明生长抑素 (Somatostatin SS) 可抑制 ghrelin 诱导的 GH 释放; 用 GHRH 和 ghrelin 灌流大鼠垂体前叶细胞, 两者无明显的协同促进 GH 分泌的作用, 两者单独作用时对 GH 的促分泌作用效果相当^[16]。注射 GHRH 可提高大鼠垂体中 ghrelin 的 mRNA 表达水平, 导致血清中 ghrelin 水平上升, 并通过自分泌或旁分泌的方式诱导大鼠生长激素细胞 GH 的分泌^[20]。

Ghrelin 促进鱼类 GH 分泌的研究最早是用哺乳动物的 ghrelin 进行离体实验。Riley *et al.*^[21] 用大鼠 ghrelin 对莫桑比克罗非鱼的脑垂体孵育 8h 后发现 GH 的分泌量增多; Kaiya *et al.*^[6] 用 0.1 nmol/L 的鳗鲡 ghrelin 静态孵育罗非鱼整个脑垂体 2h 后, GH 分泌量显著升高; 用 10 nmol/L 的罗非鱼 ghrelin 进行罗非鱼脑垂体孵育也可得到类似的效果^[5]。这些研究结果说明, 鱼类 ghrelin 同样可直接作用于鱼类的脑垂体生长激素细胞以促进 GH 释放。尽管现在还不清楚金鱼脑垂体中是否存在生长激素促分泌素受体 (GHS-R), 但最近 Yung *et al.*^[8] 在黑鲷的脑垂体中检测到高水平的 GHS-R 的 mRNA 表达。生长激素抑制素 (SS) 可抑制 ghrelin 诱导的离体灌流孵育和静态培养金鱼垂体碎片细胞 GH 的分泌作用, 说明与哺乳动物一样, 鱼类 ghrelin 的促 GH 分泌作用同样受到 SS 的抑制^[22]。

有关 ghrelin 促进鱼类 GH 分泌的信号传导机制目前尚未清楚。磷酸脂酶 C (PLC) 或蛋白激酶 C (PKC) 可阻断猪的生长激素细胞中 ghrelin 促进 GH 分泌的作用, 表明这两者参与了猪 ghrelin 促进 GH 分泌的作用; 腺苷酸环化酶 (AC) 或蛋白激酶 A (PKA) 同样可抑制猪 ghrelin 的促 GH 分泌作用; 另外还可通过阻断 L-型电位敏感钙通道 (VGCC) 的钙离子内

流来抑制 ghrelin 对猪 GH 的促分泌作用^[23]。因此, 在猪的生长轴上至少有三种细胞内信号传导途径(AC/PAK、PLC/PKC 和 VSCC 钙通道)参与了 ghrelin 促 GH 分泌的调节机制, 以上任何一种途径功能受阻都会影响 ghrelin 的促 GH 分泌作用。Chang *et al.*^[24]对调节金鱼 GH 分泌的信号传导机制做了较为深入的研究。内分泌因子调节金鱼 GH 分泌的主要传导途径包括 PKC、AC-cAMP-PKA 和 VSCC, 跟猪的类似, 金鱼以上三条信号传导途径都参与了金鱼 ghrelin 促 GH 分泌的过程。离体研究表明 ghrelin 还可提高金鱼 GH mRNA 的表达, 表明 ghrelin 可能对 GH 的合成也有促进作用^[22]。

在体实验结果同样表明 ghrelin 对鱼类 GH 的分泌有促进作用。虹鳟腹腔注射 ghrelin 后 30 min 至 3 h 内血清中 GH 水平升高^[7]; 与此结果相同, 金鱼腹腔注射 ghrelin 后 15—30 min 内血清中 GH 水平有所升高, 注射 45 min 后血清中的 GH 水平恢复到正常^[22], 以上结果说明外周 ghrelin 可通过血液循环直接作用于垂体, 从而促进鱼类 GH 的释放。研究发现鼠的胃传出神经也参与了 ghrelin 在外周促 GH 分泌的作用^[10], 鱼类是否也存在这种外周调节机制有待进一步研究。

除了 ghrelin 的外周作用外, Unnappan *et al.*^[22]还发现侧脑室注射金鱼 ghrelin 15—30 min 后, 金鱼血清 GH 水平也有所升高。尽管 ghrelin 这种作用机制尚不清楚, 但可以推测, 由侧脑室注射的 ghrelin 可能通过脑血屏障进入垂体直接作用于垂体上的生长激素细胞促进 GH 的分泌; 也可能是通过中枢神经调控 ghrelin 影响脑部神经细胞生长激素释放因子和释放抑制因子的表达, 进而调控生长激素的合成或分泌。

综上所述, ghrelin 是鱼类的一种生长激素促分泌素, 鱼类胃肠组织和脑组织中产生合成的 ghrelin 可通过自分泌或旁分泌的方式调节鱼类垂体中 GH 的分泌(图 3)。

3.1.2 促黄体生成激素(Luteinizing hormone LH)

有关 ghrelin 对哺乳动物促黄体生成激素 LH 和促卵泡成熟激素(Follicle stimulating hormone FSH)的促分泌作用的研究结果各不相同。Kojima *et al.*^[11]研究发现 ghrelin 对鼠垂体细胞 LH 和 FSH 的分泌无促进作用, 相反, Fernandez-Femandez *et al.*^[25]在离体实验中发现 ghrelin 可以刺激鼠垂体碎片分泌 LH 和 FSH。静脉注射 ghrelin 对鼠血清中 LH 和 FSH 水平无影响^[11], 但是 Furuta *et al.*^[26]研究发现静脉注射 ghrelin 会明显抑制卵巢切除雌鼠的 LH 释放脉冲频率和 FSH 的浓度。

有关 ghrelin 对鱼类促黄体生成激素 LH 和促卵泡成熟激素(FSH)分泌影响的研究不多, Unnappan 和 Peter^[27]报道了 ghrelin 可以刺激静态孵化系统和灌流孵化系统中的金鱼脑垂体碎片细胞释放 LH, 并且呈剂量依赖性, 这表明 ghrelin 可直接作用于促性腺细胞以促进 LH 的分泌。用 ghrelin 和 GHS-R 拦抗物共同孵化金鱼的脑垂体碎片细胞后发现 ghrelin 的促 LH 分泌作用受阻, 表明 ghrelin 直接刺激促性腺细胞分泌 LH, 但这个过程可能受 GHS-R 的调节; 金鱼 L 型 VSCC 和 PLC-PKC 的钙内流调节机制也可能参与了内分泌

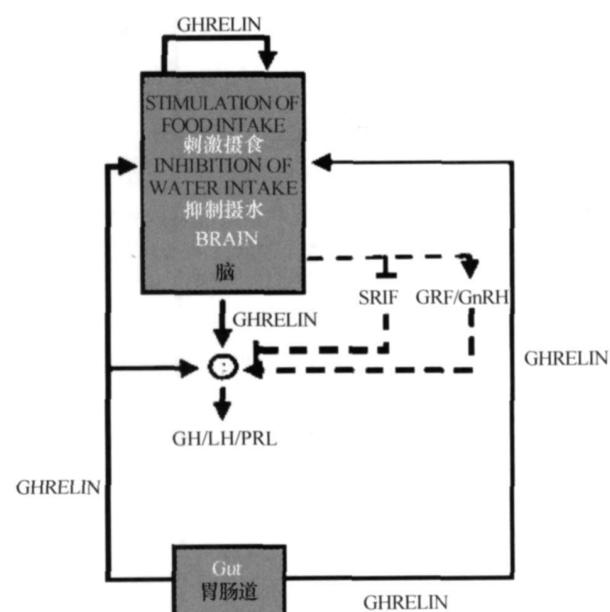


图 3 Ghrelin 的产生途径及其在鱼类中的生理功能(引自 Unnappan & Peter 2005)

Fig 3 Scheme showing the possible routes through which ghrelin produced from the gut and brain causes its known physiological effects in fish (from Unnappan & Peter 2005)
P 代表垂体; 实线代表已确定的生理功能; 虚线表示推测的生理功能; 箭头表示刺激作用; 钝尾横线表示抑制作用。在消化道中产生的 ghrelin 进入血液循环直接作用于垂体, 刺激垂体激素 GH、LH、PRL 的释放。在脑区产生的 ghrelin 也可直接作用于垂体, 从而促进 GH、LH、PRL 的释放。消化道和脑区产生的 ghrelin 都可通过生长激素释放因子、生长抑素、GnRH 的调节来影响 GH 和 LH 的释放。消化道和脑区分泌的 ghrelin 还可直接作用于脑, 引发鱼类的摄食行为或抑制摄水行为

“P” stands for pituitary. Solid lines represent biological actions for which supportive evidence is currently available and broken lines indicate putative routes of action of ghrelin. Pointed arrows indicate a stimulatory effect and a blunt end represents an inhibitory effect. Ghrelin produced in the gut enters the circulation and acts directly on the pituitary, stimulating the release of pituitary hormones including the growth hormone (GH), luteinizing hormone (LH) and prolactin (PRL). Brain ghrelin might also cause a direct effect on the pituitary, stimulating the release of GH, LH and PRL. Additionally, ghrelin produced from the gut and brain may also differentially act on growth hormone releasing factor somatostatin and/or gonadotropin releasing hormone neurons modulating the secretion of GH and LH. Ghrelin produced from both gut and brain acts on the brain to elicit orexigenic responses. Ghrelin produced from the gut and brain might contribute to its central effects in inhibiting drinking behavior.

因子对 LH 分泌的调节作用, 这些因子同样可调节 LH mRNA 的表达^[28]。

不论是腹腔注射还是侧脑室注射 ghrelin 1 h 后都可使金鱼血浆中的 LH 水平升高, 这与离体实验所得的结果相符合,

表明 ghrelin 是金鱼 LH 分泌的一种有效生理调节因子。鱼类 ghrelin 促进 LH 分泌的中枢调节机制仍不清楚, 可能与其调节 GH 的分泌机理类似, ghrelin 可能直接作用于下丘脑 LH 释放因子或抑制因子从而调节垂体 LH 的分泌(图 3)。

3.1.3 其他激素

催乳素 (Prolactin, PRL) 和生长催乳素 (Somatotropin, SL) 都是结构类似于 GH 的多肽类激素。鼠 ghrelin 可刺激罗非鱼垂体 PRL 的分泌^[21]。用 ghrelin 肝育日本鳗鲡^[5]或罗非鱼^[6]脑垂体 2—8 h 后均可刺激其 PRL 的分泌, 但用 ghrelin 离体肝育虹鳟^[7]脑垂体后并不能刺激其 PRL 的分泌, 这说明 ghrelin 的某些生理功能可能具有种属的特异性。到目前为止, 仅有 Kaiya *et al.*^[7] 报道了 ghrelin 对 SL 的影响。ghrelin 离体肝育虹鳟的整个脑垂体对 SL 的分泌没有影响; 腹腔注射 ghrelin 也未发现其对 SL 分泌有影响^[7], 表明 ghrelin 并不参与虹鳟 SL 分泌调控。ghrelin 对其他鱼类 SL 分泌是否有影响, 还有待于进一步研究。

3.2 调节摄食

3.2.1 Ghrelin 对摄食的调节作用

研究表明 ghrelin 具有促进哺乳动物摄食的功能。人类血清 ghrelin 水平在餐前升高和餐后降低, 进一步证明了 ghrelin 是一种摄食的引发剂^[29]。在金鱼的脑室或腹腔注射金鱼 ghrelin 或人 ghrelin 均可刺激金鱼摄食^[27]。金鱼下丘脑和胃肠组织 ghrelin mRNA 表达水平摄食后下降, 禁食 7 d 后上升; 禁食 3 d 和 5 d 后, 血清中 ghrelin 蛋白水平显著上升, 但禁食 7 d 后血清中 ghrelin 蛋白水平又恢复到对照组水平^[27]。由于 ghrelin 前体在金鱼的外周组织 (脾脏、肝脏) 中也有 mRNA 表达; 所以在金鱼中, 脾脏和肝脏等组织所合成分泌的 ghrelin 使得在饥饿状态下血液循环中的 ghrelin 水平升高, 这可能是导致血清中 ghrelin 的高峰时间与脑部和肠道中 ghrelin mRNA 表达的高峰时间不相一致的原因^[4]。以上结果表明 ghrelin 参与了金鱼的摄食调节。

3.2.2 Ghrelin 调节摄食的可能机制

Ghrelin 对哺乳动物摄食的调节主要通过中枢食欲调节网络实现^[30], 弓状核是下丘脑调节食物摄入的主要部位, 包括促进食欲 (神经肽 Y/刺鼠相关蛋白, NPY/AGRP) 和减少食欲 (阿片黑皮素原) 的神经元。哺乳动物的生长激素促分泌素受体 GHS-R 存在于 NPY 和 AGRP 神经原上, 脑室内注入中和 NPY、AGRP 的抗体或 NPYY1 受体的拮抗剂, 可以阻断 ghrelin 促进食欲的效果。ghrelin 激活位于弓状核的产生 NPY/AGRP 神经元的 GHS-R, 促进 NPY 和 AGRP 的表达和释放, 刺激食物摄入。NPY 或 AGRP 的单独缺失对 ghrelin 促进食欲的作用影响很小, 但如果同时缺失就完全消除了 ghrelin 促进食欲的作用, 表明 ghrelin 在发挥食欲调节作用时, NPY 和 AGRP 是必需的。人类 ghrelin 的类似物 BM 228163 可以与 GHS-R1a 结合但不具备受体激活活性, 因此可以阻断 ghrelin 对 GHS-R 的激活。在体内, BM 228163 可以阻断 ghrelin 对 GH 分泌的刺激作用, 但不能阻断其促进摄食、增加体重的作用, 表明 ghrelin 可能通过未知受体起作用。

在金鱼中存在许多促进摄食的神经内分泌因子及其受体如 NPY、甘丙肽 (Galantin, Gal)、orexin、黑色素-4 受体 (Melanocortin-4 receptor, MC4-R)、刺鼠相关蛋白 (AgRP) 和抑制因子如胆囊收缩素 (Cholecystokin CCK)、铃蟾肽 (Bombesin, BBS)、促肾上腺皮质激素释放因子 (Corticotrophin releasing factor, CRF)、瘦素 (Leptin), 这些释放因子和抑制因子相互作用共同调节金鱼的摄食^[31]。鱼类的 ghrelin 与上述摄食相关的多肽基本上无共同的 mRNA 表达区域, 但金鱼在调节摄食相关的脑区存在 ghrelin mRNA 的表达。最近的研究表明, 黑鲷的 GHS-R mRNA 在脑区也有表达^[32], 这进一步说明了鱼类 ghrelin 可能是通过作用于脑来调控摄食的, 其调控途径如图 3 所示。

3.3 调节摄水

Kozaka *et al.*^[33] 研究了多种物质如 ghrelin 复合胺、催乳素、苯肾上腺素、 λ -氨基丁酸等对日本鳗鲡摄水行为的影响, 结果发现腹腔注射人类 ghrelin 后对日本鳗鲡的摄水行为具有最强的抑制作用, 说明 ghrelin 是一种强烈抑制日本鳗鲡摄水行为的多肽, 其调控途径如图 3 所示。ghrelin 对其他鱼类摄水行为是否有影响, 还有待于进一步研究。

4 总结与展望

Ghrelin 与鱼类的摄食、生长和生殖密切相关, 是鱼类内分泌学研究的一个新热点。鱼类 ghrelin 的研究起步较晚, 其生理功能存在较大种间差异, 并且离体和在体实验结果往往不一致。因此, 应在多个层次上深入研究 ghrelin 在不同鱼类、特定发育期和不同环境条件下的生理功能特点, 在理论上阐明鱼类 ghrelin 结构与功能的相互关系。

现有研究表明, ghrelin 可显著刺激鱼类的摄食, 如果给经济养殖鱼类投喂含 ghrelin 添加剂的饲料, 就可以明显促进鱼类摄食, 从而提高鱼类的生长速度, 最终提高鱼产量和产品质量, 对鱼类的饲料开发具有重大的实践意义; 另外, ghrelin 可直接作用于鱼类脑垂体, 促进 GH 和 LH 的双重释放, 在调控鱼类生长和繁殖方面具有重要的作用, 如果能够研制出 ghrelin 的激动剂或拮抗剂, 就可通过不同的给予途径来控制鱼类的生长和繁殖过程, 最大程度地发挥鱼类的潜在生理功能, 对渔业生产具有重大的指导意义。

参考文献:

- [1] Kojima M, Hosoda H, Date Y, *et al*. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide [J]. *Nature*, 1999, **402**: 656—660
- [2] Wajnrajch M P, Ten I S, Gertner JM, *et al*. Genomic organization of the human ghrelin gene [J]. *J Endocrinol Genet*, 2000, **1**: 231—233
- [3] Tanaka M, Hayashida A Y, Iguchi T, *et al*. Organization of the mouse ghrelin gene and promoter occurrence of a short non coding first exon [J]. *Endocrinology*, 2001, **142**: 3697—3700
- [4] Unnappan S, Lin X, Cervini L, *et al*. Goldfish ghrelin molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food in-

- take [J]. *Endocrinology*, 2002, **143**: 4143—4146
- [5] Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, et al. Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2003b, **135**: 421—429
- [6] Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, et al. Amidated fish ghrelin purification cDNA cloning in the Japanese eel (*Anguilla japonica*) and its biological activity [J]. *J Endocrinol* 2003a, **176**: 415—423
- [7] Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, et al. Peptide purification, cDNA and genomic DNA cloning and functional characterization of ghrelin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Endocrinology*, 2003c, **144**: 5215—5226
- [8] Yeung C M, Chan C B, Woo N Y, et al. Seabream (*Sparus acrocephalus*) ghrelin cDNA cloning, genomic organization and promoter studies [J]. *Endocrinol*, 2006, **189**: 365—379
- [9] Parhar IS, Sato H, Sakum A Y. Ghrelin gene in cichlid fish is modulated by sex and development [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **305**: 169—175
- [10] Date Y, Kojima M, Hosoda H, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans [J]. *Endocrinology*, 2000, **141**: 4255—4261
- [11] Gnanapavan S, Kohl R, Bustin SA, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor GHS-R₁ in humans [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, **87**: 2988—2991
- [12] Sakata I, Mori T, Kaiya H, et al. Localization of ghrelin-producing cells in the stomach of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Zoolog Sci*, 2004, **21**: 757—762
- [13] Cummings D E, Shannon M H. Roles for ghrelin in the regulation of appetite and body weight [J]. *Arch Surg*, 2003, **138**: 389—396
- [14] van der Lely A J, Tschöp M, Heiman M L, et al. Biological, physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of ghrelin [J]. *Endocr Rev*, 2004, **25**: 426—457
- [15] Korbonits M, Goldstone A P, Georgiou M, et al. Ghrelin, a hormone with multiple functions [J]. *Front J Neuroendocrinol*, 2004, **25**: 27—68
- [16] Yanazaki M, Nakamura K, Kobayashi H, et al. Regulatory effect of ghrelin on growth hormone secretion from perfused rat anterior pituitary cells [J]. *J Neuroendocrinol*, 2002, **14**: 156—162
- [17] Hashizume T, Horiechi M, Tate N, et al. Effects of ghrelin on growth hormone secretion from cultured adenohypophyseal cells in pigs [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2003, **24**: 209—218
- [18] Gavaskar-Joksimovic A, Jeftevija K, Scanes C G, et al. Stimulatory effect of ghrelin on isolated porcine somatotropes [J]. *Neuroendocrinology*, 2003, **77**: 367—379
- [19] Date Y, Murakami N, Kojima M, et al. Central effects of a novel acylated peptide ghrelin on growth hormone release in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000b, **275**: 477—480
- [20] Kanegaishi J, Tanura H, Shimizu T, et al. Regulation of the ghrelin gene growth hormone-releasing hormone upregulates ghrelin mRNA in the pituitary [J]. *Endocrinology*, 2001, **142**: 4154—4157
- [21] Riley L G., Hirano T, Grau E G. Rat ghrelin stimulates growth hormone and prolactin release in the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) [J]. *Zool Sci*, 2002, **19**: 797—800
- [22] Unnappan S, Canosa L F, Peter R E. Orexigenic actions of ghrelin in goldfish (*Carassius auratus*): feeding-induced changes in brain and gut mRNA expression and serum levels and responses to central and peripheral injections [J]. *Neuroendocrinology*, 2004, **79**: 100—108
- [23] Malagon M M, Luque R M, Ruiz-Guerrero E, et al. Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin stimulated growth hormone release in somatotropes [J]. *Endocrinology*, 2003, **144**: 5372—5380
- [24] Chang J P, Johnson J D, Van Goor F, et al. Signal transduction mechanisms mediating secretion in goldfish gonadotropes and somatotropes [J]. *Biochem Cell Biol*, 2000, **78**: 139—153
- [25] Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Aguilar E, et al. Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats [J]. *Neurosci Lett*, 2004, **362**: 103—107
- [26] Furuta M, Funabashi T, Kuriura F. Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **288**: 780—785
- [27] Unnappan S, Peter R E. In vitro and *in vivo* effects of ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone release in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, **286**: 1093—1101
- [28] Yaniv Z, Gur G, Melamed P, et al. Regulation of fish luteinizing hormones [J]. *Int Rev Cyt*, 2003, **225**: 131—185
- [29] Cummings D E, Purnell J Q, Frayo R S, et al. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans [J]. *Diabetes*, 2001, **50**: 1714—1719
- [30] Nakazato M, Murakami N, Date Y, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding [J]. *Nature*, 2001, **409**: 194—198
- [31] Volkoff H, Peter R E. Interactions between orexin A, NPY and galanin in the control of food intake of the goldfish, *Carassius auratus* [J]. *Regul Pept*, 2001, **101**: 59—72
- [32] Chan C B, Cheng C H. Identification and functional characterization of two alternatively spliced growth hormone secretagogue receptor transcripts from the pituitary of black seabream, *Acanthopagrus schlegeli* [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, **214**: 81—95
- [33] Kozaka T, Fujii Y, Ando M, et al. Central effects of various ligands on drinking behavior in eels acclimated to seawater [J]. *J Exp Biol*, 2003, **206**: 687—692
- [34] Unnappan S, Peter R E. Structure, distribution and physiological functions of ghrelin in fish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A, 2005, **140**: 396—508