

肉鸡结直肠生长抑素 2 型受体 (SSTR2) 的分子克隆与发育性表达

王修启, 苏海林, 宋予震, 谭会泽, 冯定远

(华南农业大学动物科学学院, 广州 510642)

摘要: 【目的】 获得肉鸡生长抑素 2 型受体 (SSTR2) 基因序列并进行序列分析; 揭示不同基因型肉鸡结直肠 SSTR2 mRNA 表达的发育性变化并进行品种间比较。 【方法】 运用 RT-PCR 和 RACE 方法进行肉鸡 SSTR2 序列扩增相对定量 RT-PCR 方法研究 AA 肉鸡和岭南黄肉鸡结直肠 SSTR2 mRNA 表达的发育规律。 【结果】 肉鸡 SSTR2 从起始密码子至 Poly (A) 长度为 2311bp, 其 ORF 与电子克隆序列完全相同, 核苷酸序列与人 SSTR2 的同源性为 81.0%, 与大鼠 SSTR2 同源性为 79.5%。其翻译的蛋白由 371 个氨基酸组成, 比人和大鼠的 SSTR2 多 2 个氨基酸, 鸡 SSTR2 与人的同源性 87.1%, 与大鼠的同源性为 86.3%。AA 肉鸡 30d 的 SSTR2 mRNA 表达丰度显著高于其他日龄 ($P < 0.05$); 2d、16d、44d 和 58d 差异不显著 ($P > 0.05$)。黄羽肉鸡的 16 d 的 SSTR2 mRNA 表达丰度显著高于 30 d、44 d 和 58 d ($P < 0.05$), 2 d、30 d、44 d 和 58 d 之间差异不显著 ($P > 0.05$)。不同基因型 SSTR2 mRNA 表达丰度比较显示, AA 肉鸡 30 d、44 d 和 58 d 均显著高于黄羽肉鸡 ($P < 0.05$)。 【结论】 不同物种间 SSTR2 具有较高的同源性; 不同基因型肉鸡结直肠 SSTR2 mRNA 表达的发育模式不同, AA 肉鸡生长后期 SSTR2 mRNA 表达丰度显著高于黄羽肉鸡。

关键词: 肉鸡; 结直肠; SSTR2; 分子克隆; 发育性表达

Molecular Cloning and Ontogenetic Expression of SSTR2 mRNA in Colorectum of Broiler Chicken

WANG Xiu-qi, SU Hai-lin, SONG Yu-zhen, TAN Hui-ze, FENG Ding-yuan

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: 【Objective】 This study was carried out to obtain and analyze sequence of somatostatin receptor subtype 2 (SSTR2), and to reveal and compare the ontogenetic expression of SSTR2 mRNA in colorectum of different broiler chicken genotype. 【Methods】 The sequence amplification and 3' RACE of chicken SSTR2 was conducted by reverse transcription PCR (RT-PCR) and RACE; The ontogenetic expression of SSTR2 mRNA in colorectum of Arbor Acer (AA) chicken and yellow-feathered chicken was studied by relative quantitative RT-PCR. 【Results】 The length of chicken SSTR2 is 2 311bp from ATG to Poly (A) and the nucleotide sequence in ORF of AA chicken was completely same with that of an electric clone. The sequence homology were 81.0% and 79.5% identical from that of human and rat, respectively. The protein translated by the nucleotide sequence in the ORF was composed of 371 amino acids while the protein of human and rat were composed of 369 amino acids. Comparison of the chicken SSTR2 amino acid sequence revealed 87.1% and 86.3% identity with human and rat, respectively. The SSTR2 mRNA expression abundance of AA chicken on 30 d was significantly higher than that on other time points ($P < 0.05$) while the expression abundance had no significant difference on 2 d, 16 d, 44 d and 58 d ($P > 0.05$). The SSTR2 mRNA expression level of yellow-feathered chicken on 16 d was significantly higher than that on 30 d, 44 d and 58 d ($P < 0.05$) and there was no difference between 2 d, 30 d, 44 d and 58 d ($P > 0.05$). SSTR2 mRNA abundance of AA chicken was significantly higher than that of yellow-feathered chicken on 30 d, 44 d and 58 d ($P < 0.05$). 【Conclusion】 These results indicated that the homology of SSTR2 was high between species. AA chicken has the different ontogenetic expression of SSTR2 mRNA from the yellow-feathered chicken in colorectum and the expression

收稿日期: 2005-12-29; 接受日期: 2006-12-30

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目 (2004CB117501)

作者简介: 王修启 (1968-), 男, 河南新乡人, 副研究员, 博士, 研究方为动物营养消化生理与分子营养研究。Tel: 020-85285469; E-mail: xqwang@scau.edu.cn。通讯作者为冯定远 (1961-), 男, 广东阳江人, 教授, 研究方向为分子营养学。Tel: 020-85281269; E-mail: fengdy@scau.edu.cn

abundance of AA chicken is significantly higher than that of yellow-feathered chicken during the anaphase of growth.

Key words: Broiler chicken; Colorectum; SSTR2; Molecular cloning; Ontogenetic expression

0 引言

【研究意义】生长抑素(somatostatin, SS)及其受体(somatostatin receptor, SSTR)的研究不仅是神经内分泌领域的热点,也是消化生理与消化道肿瘤基因靶标治疗所关心的重要问题。其中生长抑素2型受体无论在中枢还是在消化道,对生长抑素在脑肠轴发挥作用都具有重要意义。【前人研究进展】1973年, Brazeau 从山羊下丘脑中成功提取生长抑素后^[1], 学者们一直在探索其生物学意义与作用机制。30 年的研究显示, SS 广泛存在于中枢神经系统和消化道, 可作为神经递质、旁分泌和自分泌的调质及激素, 通过 5 种受体亚型(SSTR1~5)对机体的生理活动如细胞分泌、细胞吸收、免疫反应等起着广泛的调节作用^[2]。SS 不仅具有抑制生长激素分泌的作用, 而且对胃、肠、胆、胰内、外分泌以及胃肠运动都有抑制效应^[3]。生长抑素发挥生理作用是由其受体介导的, SSTR 家族共有 5 个成员 SSTR1~SSTR5^[4, 5]。其中 SSTR2 在中枢和外周均有分布, 且具有重要的生理功能: 鸡 SS 抑制垂体分泌生长激素主要是通过 SSTR2 介导的^[6, 7]; 生长抑素通过 SSTR2 抑制人、狗和大鼠胃窦胃泌素和组胺的分泌^[8]; SSTR2 介导 SS 抑制大鼠和小鼠空肠的蠕动^[9]; 铃蟾肽抑制小鼠胃酸分泌是通过 SSTR2 实现的^[10]; 生长抑素抑制胃泌素释放和胃酸分泌的作用也是经由 SSTR2 完成的^[11~13]; SSTR2 是 SS 抑制仓鼠结肠 β 细胞和胰岛细胞释放胰岛素的作用途径^[14]。SS 可以通过 SSTR2 对炎症和伤害感受发挥抑制作用^[15], 这种作用的机制可能是由 SSTR2 介导 SS 调节瞬时受体电位离子通道(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)实现的^[16]。SS 可以抑制大鼠血浆 Ghrelin 水平的升高, SSTR2 是其发挥抑制作用的主要途径^[17]。最新的研究表明, 结直肠癌生长抑素受体表达明显低于正常黏膜^[18], 大肠癌 SSTR2 mRNA 表达与增殖细胞核抗原(其含量与细胞增殖状况密切相关, 是检测肿瘤细胞增殖动力学的有效指标)表达呈负相关, 提示 SSTR2 mRNA 是阻滞肿瘤细胞增殖的因素之一^[19], 也就是说 SSTR2 在结直肠的正常表达, 不仅对维持肠道正常生理功能, 而且对维持动物健康具有重要意义。【本研究的切入点】有关 SSTR2 的研究多集中于哺乳动物, 郭梅梅和夏东分别研究了猕猴小肠和猪垂体 SSTR2 表

达的发育性变化^[20, 21]; 鸡 SSTR2 研究较少, 鸡消化道 SSTR2 的研究还未见到相关报道。2001 年 GenBank 发布鸡 SSTR2 序列片段 320bp (AY029228), 随着鸡基因组测序工作的完成, GenBank 公布了一系列鸡功能基因 mRNA 编码区的电子克隆序列。【拟解决的关键问题】本试验在此基础上, 选取肉鸡结直肠样品进行分子克隆, 来验证鸡 SSTR2 预测序列 ORF 正确与否并进行 3' RACE 扩增, 为研究 SSTR2 基因的功能奠定基础; 同时研究不同基因型肉鸡生长发育过程中结直肠 SSTR2 mRNA 表达的演变规律, 为利用 SS 拮抗剂等生理调节剂, 通过 SSTR2 调控肉鸡对营养物质的消化吸收, 促进动物生长提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物与样品采集

1.1.1 试验动物 选用遗传背景相同、同批次、发育正常的 1d 雄性 Arbor Acre (AA) 父母代(购自广东穗屏科宝种鸡场)和岭南黄父母代(购自广东省农业科学院畜牧所祖代种鸡场, 快大型, 8 周龄上市体重 1.5 kg)肉雏鸡各 120 羽, 每个品种随机分为 4 个重复, 每个重复 30 只鸡。

1.1.2 日粮组成及营养水平 参照 NRC (1994) 和国家标准 (1986) 0~8 周龄肉鸡营养需要设计饲料配方, 日粮组成和营养水平见表 1。于试验 31 d 开始采用逐步换料的方法, 至 34 d 结束全部更换为后期日粮。

1.1.3 饲养管理与免疫 试验在华南农业大学动物科学学院种鸡场进行, 粉料饲喂。红外取暖, 自由饮水和采食, 人工持续光照, 保持正常育雏温度, 常规免疫。

1.1.4 组织采样 分别于 2、16、30、44 和 58 日龄, 每组取接近平均体重的鸡, 每重复 2 只共 80 只, 断颈宰杀, 宰前不禁食。分离肠道, 沿纵向剖开, 用 4℃ 预冷的 PBS 缓冲液冲洗, 吸水纸吸干。从回盲结向下取 3 cm 肠段, 作为结直肠样品。放入 1.5 ml 离心管中, 置液氮速冻, -70℃ 冷冻保存。

1.2 结直肠 SSTR2 的片段扩增与 3' RACE

1.2.1 样品总 RNA 提取和 RNA 电泳 采用 Trizol (北京赛百盛基因技术有限公司) 一步抽提法提取组织样的总 RNA, 紫外比色法测定总 RNA 的浓度和纯度 (Eppendorf BioPhotometer 260nm)。用 1.4% 甲醛变

表 1 日粮组成和营养水平

Table 1 Diets composition and calculated nutrients level

组分 Ingrdients	含量 Content (%)		组分 Ingrdients	营养水平 Calculated nutrients level	
	0-30 d	31-58 d		0-30 d	31-58 d
玉米 Corn	65.00	67.65	代谢能 AME(Kcal/kg)	2900	3050
玉米蛋白粉 Corn gluten meal	2.70	4.00	粗蛋白 Crude protein (%)	20.0	18.0
豆粕 Soybean meal	26.20	22.02	赖氨酸 Lys(%)	1.10	1.00
豆油 Soybean oil		2.00	蛋氨酸 Met(%)	0.52	0.45
鱼粉 Fish meal	2.00		蛋+胱 Met+Cys(%)	0.85	0.76
石粉 Limestone	0.80	0.87	钙 Calcium(%)	0.85	0.80
磷酸氢钙 CaHPO ₄	1.57	1.62	磷 Phosphorus(%)	0.67	0.61
赖氨酸 Lys (78%)	0.16	0.27	有效磷 AP(%)	0.45	0.40
蛋氨酸 Met (98%)	0.18	0.15			
食盐 NaCl	0.29	0.34			
氯化胆碱 Choline chloride (75%)	0.10	0.08			
预混料* Premix	1.00	1.00			

*提供至每千克全价料(Supplied per kg feed): Cu: 5.00 mg, Fe: 69.00 mg, Zn: 84.00 mg, Mn: 98.6 mg, I: 1.14 mg, Se: 0.30 mg; VA: 15000IU, VD₃: 3000 IU, VE: 25.5 mg, VK₃: 2.1 mg, VB₁: 2.4 mg, VB₂: 9 mg, VB₆: 5.1 mg, VB₁₂: 0.02 mg, 泛酸钙 Calpan: 12 mg, 烟酸 Niacin: 48 mg, 叶酸 Folic acid: 1.2 mg, 生物素 Biotin: 0.06 mg; 洛克沙肿 Roxarsone: 50 mg; 盐霉素 Salinomycin 90 mg

性琼脂糖凝胶电泳,根据 28S rRNA 和 18S rRNA 的灰度比评价 RNA 的质量。

1.2.2 RNA 的 DNase I 处理 应用 DNase I (Takara, 大连),按照说明书,对总 RNA 进行消化处理,以消除痕量基因组 DNA 污染。

1.2.3 反转录 分别准确量取 2 μg 各样品的总 RNA 进行反转录。建立各样品 RNA 的 cDNA(RT product)。反转录反应体积为 20 μl,其中含随机引物 Random (10) 5 μmol·L⁻¹引物,1 mmol·L⁻¹ dNTP (北京赛百盛基因技术有限公司),20 U RNA 酶抑制剂(RNase inhibitor, Takara, 大连),200 U 反转录酶(MMLV RT, Promega),4 μl 5×RT Buffer (含 250 mol·L⁻¹ Tris-HCl pH8.3, 50 mol·L⁻¹ MgCl₂, 250 mol·L⁻¹ KCl, 50 mol·L⁻¹ DTT, 2.5 mol·L⁻¹ Spermidine)。样品总 RNA、Random (10) 和 dNTP 在反转录前 70℃变性 5 min,冰上放置 5 min,再加入其余试剂,混匀后于 42℃反应 60 min,

95℃变性 5 min。反转录产物(RT Products) -20℃保存备用。

1.2.4 SSTR2 定性片段扩增 根据电子克隆预测序列(GenBank XM_425384)采用 Primer 5.0 软件设计两对产物长度分别为 578 bp 和 520 bp PCR 引物,由北京赛百盛基因技术有限公司合成,引物序列及参数见表 2。以 30 d AA 肉鸡结直肠 RT 产物为模板,进行定性扩增。PCR 反应条件为:在 25 μl 的反应体系中含有 2 μl RT Products, 2.5 μl 10×PCR Buffer, 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.2 mmol·L⁻¹ dNTP, 0.8 μmol·L⁻¹ 目的基因 SSTR2 的上、下游引物。94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 57℃退火 30 s, 72℃延伸 50 s, 共 35 圈; 72℃延伸 10 min。PCR 反应在 MJR PTC-200 PCR 仪上进行(下同)。分别选择目的片段,用 PMD18-T Vector (Takara, 大连)进行 TA 克隆,产物送上海英骏生物技术有限公司测序。

表 2 目的基因 SSTR2 和内标基因 *β-actin* 引物参数

Table 2 Parameters of primer pairs for SSTR2 and *β-actin* gene

目的基因 Target gene	引物位置 Localization	引物序列 Primer sequence	产物 Product (bp)
SSTR2 (XM 425384GenBank)	507~524	Sense 5'-TTGGGGTGTCTCCCTGTT-3'	578
	1084~1067	Antisense 5'-GGGTCCTTTGGGTTTCTG-3'	
SSTR2 (XM 425384GenBank)	1~19	Sense 5'-ATGGATCTGGAATACGAGC-3'	520
	520~504	Antisense 5'-GGGAGACACCCCAAACG-3'	
<i>beta-actin</i> (L08165 GenBank)	83~101	Sense 5'-TGCTGCGCTCGTTGTTGAC-3'	291
	373~355	Antisense 5'-GGGTGCTCCTCAGGGGCTA-3'	

1.2.5 SSTR2 的 3'RACE 根据 CloneTech Smart Race 试剂盒要求,设计 3'RACE 需要的引物两条,序列分别为: 5'-GGCTCAACGAGACCACAGAAAC CCAAAG-3'(1051-1078NGSP2)和 5'-CATCGTGGT TGCTGTCTTCAT CTTCTGC-3' (781-808GSP2)。选用 30 d AA 肉鸡结直肠经 DNase I 消化的总 RNA 混合样,按照说明书进行 RT 和巢式 TouchDown PCR,条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5cycles; 94℃ 30s, 70℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5cycles; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 25cycles; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 PMD18-T Vector (Takara, 大连) 进行 TA 克隆,产物送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.6 序列分析 将所得核苷酸序列利用 Vector Suite 5.5 和 DNA Star 等 DNA 分析软件进行分析,并利用 Blast 软件将其与人和大鼠 SSTR2 基因进行核苷酸和氨基酸序列同源性分析。

1.3 结直肠 SSTR2 mRNA 的相对定量 RT-PCR

以 β -actin mRNA 作为内标,引物序列见表 2,对 SSTR2 mRNA 进行相对定量分析。SSTR2 选用产物长度为 578 bp 的引物 (表 2)。

内标基因 β -actin Primers ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 Competimers ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$): 参照 Dieffenbach^[22]所提供的方法,将 β -actin Primers 的 3'端进行修饰 (北京赛百盛基因技术有限公司),使其在 PCR 过程中只能与模板结合而不能延伸,得到 β -actin Competimers。将 β -actin Primers 和 Competimers 均稀释至 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 备用。

PCR 反应条件 采用单管法进行 PCR 扩增,以混合样 (待测样品等比例混合) 对 PCR 反应条件、循环圈数以及目的基因 SSTR2 与内标基因 β -actin 的引物浓度等进行优化。PCR 条件如下: 在 $25 \mu\text{l}$ 的反应体系中含有 $2 \mu\text{l}$ RT Products, $2.5 \mu\text{l}$ $10\times$ PCR Buffer, $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP, $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 目的基因 SSTR2 的上、下游引物, $0.4 \mu\text{l}$ β -actin 上、下游引物, $1.6 \mu\text{l}$ β -actin Competimers, 0.5 U Tag DNA polymerase (Fermentas, Lietuva)。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 50 s, 共 29 循环; 72℃ 延伸 10 min。

电泳及灰度分析 取 $10 \mu\text{l}$ PCR 产物在 2.0% EtBr 染色的琼脂糖凝胶上电泳。图象处理及灰度分析用 LabWorks Image Acquisition and Analysis Software 4.0 (Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge, UK) 进行,根据目的基因与 β -actin PCR 产物的灰度比,确定样

品中 SSTR2 mRNA 基因表达的相对含量。RT-PCR 全过程至少重复 3 次。

1.4 数据分析

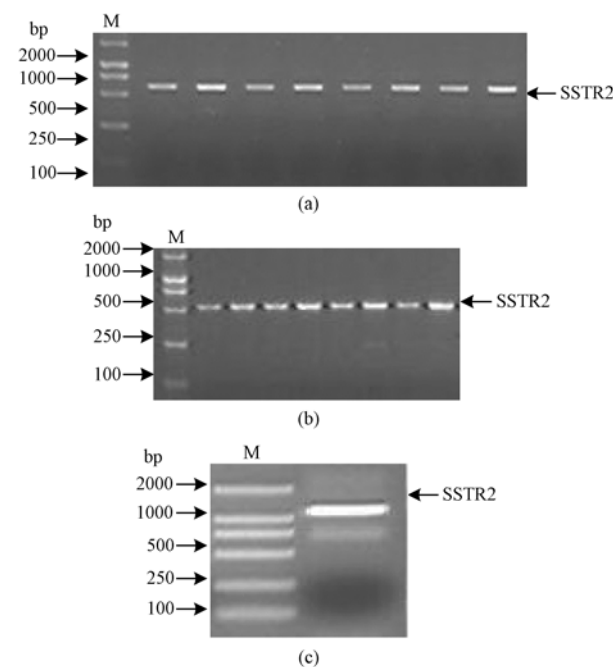
试验数据以平均数 \pm 标准误 ($\bar{X}\pm\text{S.E.M}$) 表示,用 SPSS11.5 统计软件进行单因子方差分析 (one-way ANOVA),以 Duncan 方法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 肉鸡结直肠 SSTR2 扩增片段与 3'RACE

AA 肉鸡结直肠 SSTR2 片段扩增与 3'RACE 琼脂糖凝胶电泳结果如 1 所示。用所设计的 2 对 PCR 引物,以 30 d AA 肉鸡为模板,对 8 个个体进行扩增的电泳图见图 1 (a) 和 (b); 3'RACE 琼脂糖凝胶电泳图见图 1 (c)。将所有序列片段进行拼接,得到一条从起始密码子 ATG 开始至 Poly (A) 长度为 2 311 bp 的鸡 SSTR2 mRNA 序列,已提交 GenBank 发布 (登录号: DQ305354)。

DNA 软件序列分析显示,肉鸡 SSTR2 开放阅读



(a) 578bp (n=8); (b) 520bp (n=8); (c) 3'RACE

图 1 AA 肉鸡结直肠 SSTR2 片段扩增与 3' RACE 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of different length RT-PCR product and 3'RACE for SSTR2 in colorectum of AA chickens

框（ORF）核苷酸序列与人 SSTR2（GenBank：NM001050）的同源性为 81.0%，与大鼠 SSTR2（GenBank：NM019348）同源性为 79.5%，3 个物种间保守序列的同源性为 75.6%。肉鸡 SSTR2 核苷酸序列从中止密码子后至 Poly（A）结束共有 1 195 个核苷酸，人 SSTR2 共有 1 526 个核苷酸，大鼠 SSTR2 共有 639 个核苷酸。

2.2 肉鸡与人和大鼠 SSTR2 基因氨基酸序列同源性比较

肉鸡与人和大鼠 SSTR2 氨基酸序列同源性比较



图 2 鸡与其它物种 SSTR2 氨基酸序列同源性比较

Fig. 2 Amino acids sequence alignment between the SSTR2 gene of chicken and other species

日龄结直肠 SSTR2 mRNA 表达的相对丰度。AA 肉鸡 30 d 的 SSTR2 mRNA 表达丰度显著高于其它日龄（ $P<0.05$ ）；2 d、16 d、44 d 和 58 d 差异不显著（ $P>0.05$ ）。黄羽肉鸡 16 d 的 SSTR2 mRNA 表达丰度显著高于 30 d、44 d 和 58 d（ $P<0.05$ ），2 d、30 d、44 d 和 58 d 之间差异不显著（ $P>0.05$ ）。不同基因型 SSTR2 mRNA 表达丰度比较显示，AA 肉鸡 30 d、44 d 和 58 d 均显著高于黄羽肉鸡（ $P<0.05$ ）。

3 讨论

目前 SSTRs 家族被克隆和公布序列的有人、大鼠和小鼠的 SSTR1~5 基因，猪和牛的 SSTR2 基因等^[4, 23]。Bossis 克隆了鸡 SSTR2 的片段序列（约 100 个氨基酸），发现其与猪、牛、人和大鼠的氨基酸序列

结果如图 2 所示。

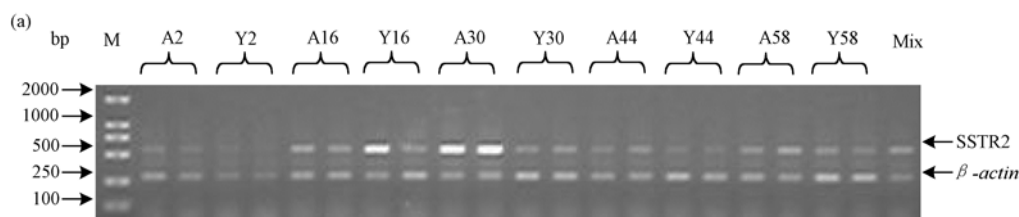
序列分析显示，肉鸡 SSTR2 由 371 个氨基酸组成，而人和大鼠的 SSTR2 由 369 个氨基酸组成。肉鸡 SSTR2 氨基酸序列与人 SSTR2 的同源性 87.1%，与大鼠 SSTR2 同源性为 86.3%，3 个物种间保守序列的同源性为 84.7%。

2.3 肉鸡结直肠 SSTR2 mRNA 表达的发育性变化

肉鸡结直肠 SSTR2 mRNA 表达的发育性变化结果见图 3。图 3（a）为 SSTR2 mRNA RT-PCR 产物代表性琼脂糖凝胶电泳图，（b）为不同基因型肉鸡不同

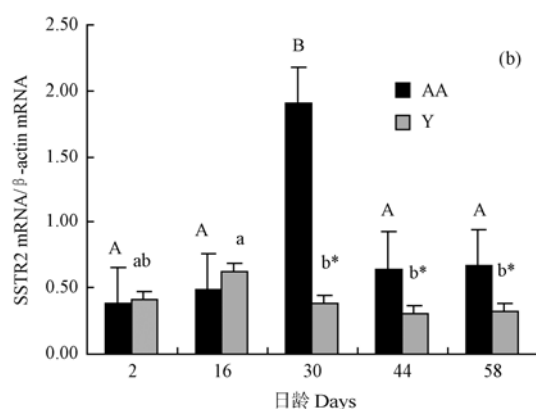
同源性分别为 95%、95%、93%和 93%^[6]，本研究显示，根据鸡 SSTR2 mRNA 预测的氨基酸全序列与人和大鼠的同源性分别为 87.1%和 86.3%。

鸡基因组测序的完成，使得利用计算机对相关功能基因进行电子克隆预测成为可能，同时也为功能基因的分子克隆提供了新的工具，但是，预测序列的正确与否，还必须通过分子克隆进行试验验证。本课题组发现，鸡胰高血糖素样肽 2 受体（glucagon-like peptide-2 receptor, GLP-2R）、鸡钠氢交换转运载体 2（ Na^+/H^+ exchanger 2, NHE2）、鸡脂肪酸转运蛋白 1（Fatty acid transport protein1, FATP1）和鸡脂肪酸转位酶（fatty acid translocase, FAT/CD36）的序列与预测序列不完全相同（待发表资料），表现为增加或缺失部分碱基片段。但是，本试验获得的鸡 SSTR2 序列，其



M, Marker(DL2000); Mix, 混合样。A2、A16、A30、A44 和 A58 分别代表 2、16、30、44 和 58 日龄 AA 鸡样品。Y2、Y16、Y30、Y44 和 Y58 分别代表 2、16、30、44 和 58 天黄羽肉鸡样品

M: Marker (DL2000); Lane Mix is mixture. A2, A16, A30, A44 and A58 represent 2d, 16d, 30d, 44d and 58d samples of AA chicken, respectively. Y2, Y16, Y30, Y44 and Y58 represent 2d, 16d, 30d, 44d and 58d samples of yellow-feathered chicken, respectively



AA 代表 AA 肉鸡, Y 代表黄羽肉鸡。无相同字母者(大写字母, AA 肉鸡; 小写字母, 黄羽肉鸡), 表示同一基因型不同日龄之间差异显著 ($P < 0.05$)。* 同一日龄不同品种间差异显著 ($P < 0.05$) $n=8$ 。

A represents AA chicken, Y represents yellow-feathered chicken. Without the same letters (capital letters for AA and lower case letters for Y) indicate significant difference between days in the same genotype ($P < 0.05$). * indicating difference between AA and Y at the same age ($P < 0.05$). $n=8$ 。

图 3 AA 肉鸡和黄羽肉鸡十二指肠 SSTR2 mRNA 表达的发育性变化

Fig. 3 Ontogenetic expression of SSTR2 mRNA in colorectum of AA and yellow-feathered chicken

编码区与电子克隆预测序列完全相同, 提示针对不同的功能基因, 其电子克隆的正确性因基因不同而存在差异, 虽然具有较大的参考价值, 但是, 在进行相关基因表达与功能研究时, 还是应该获得其实测序列才最为可靠。尽管不同物种的生长抑素结构完全相同, 但作为其主要作用途径的 SSTR2 的氨基酸组成在不同物种之间存在差异, 根据本研究获得的鸡 SSTR2 序列, 经由 Vector Suite 5.5 软件推导的鸡 SSTR2 氨基酸序列共 371 个氨基酸, 比哺乳动物 (人和大鼠) 多 2 个氨基酸, 且与哺乳动物同源性最低的部分主要集中于 N 端的 40 个氨基酸, 此区域的氨基酸组成究竟对鸡 SSTR2 具有什么样的生物学意义, 有待于从蛋白质水平上的进一步研究。

SSTR2 在结直肠的表达, 对动物健康、消化道分泌和电解质转运具有重要的生理功能, Kido 报道, 禁饲 48 h 可以显著增加大鼠结肠 SS 的浓度, 上调 SS、SSTR2 和 SSTR3mRNA 的表达, 提示饥饿状态下结直肠 SS 合成的增加及其受体基因表达的上调对维持动物内环境稳定具有重要作用^[24]。SSTR2 介导 SS 抑制

大鼠和人结肠电解质离子分泌^[25]、转运^[26, 27]和后肠运动^[28]; SSTR2 在结直肠癌患者和正常人的结直肠粘膜细胞均有表达, 提示可以选用 SS 类似物, 与 SSTR2 结合抑制肿瘤生长^[29, 30]。此外, SS 通过 SSTR2 激活抑制肠神经元的反射和免疫分泌^[31]。

RT-PCR 检测显示, 大鼠从出生到成年, 其松果体均有 SSTR2 mRNA 表达, 且表达水平不随季节而变^[32]。夏东报道, 猪垂体 SSTR2 mRNA 表达呈时序性变化, 出生时较低, 3 日龄时显著上升 ($P < 0.05$), 随后垂体 SSTR2 mRNA 表达出现品种间差异, 二花脸猪 SSTR2 mRNA 一直维持在较高水平; 而大白猪除 90 日龄外 SSTR2 mRNA 表达均显著低于 3 日龄时的表达^[21]。郭梅梅利用原位杂交检测猕猴发育过程中小肠 SSTR2 表达演变规律, 发现胚胎 6 月, 小肠黏膜上皮可见大量 SSTR2 表达, 成年时 SSTR2 表达下调^[20]。本研究结果表明, 虽然岭南黄鸡和 AA 肉鸡结直肠 SSTR2 mRNA 具有不同的发育模式, 但却具有明显的时序性特点, AA 肉鸡 30 d 时表达丰度最高, 而且显著高于其它各日龄; 黄羽肉鸡 16 d 时表达丰度最高,

而且显著高于其后各日龄的表达水平, 提示不同物种不同组织中 SSTR2 mRNA 的表达可能因个体发育而存在不同的变化模式, 通过 SSTR2 介导的 SS 对不同品种肉鸡结直肠运动和分泌的调控在时程上存在差异, 这可能是导致其生产性能不同的原因之一, 其作用的生理机制, 尚需要进一步深入研究。

4 结论

鸡 SSTR2 mRNA 从 ATG 开始至 Poly (A) 长度为 2311 bp, 不同物种间 SSTR2 的碱基序列和氨基酸序列均具有较高的同源性; 不同基因型肉鸡结直肠 SSTR2 mRNA 表达的发育模式不同, AA 肉鸡生长后期 SSTR2 mRNA 表达丰度显著高于黄羽肉鸡。

References

- [1] Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 1973, 179(4068): 77-79.
- [2] 刘燕强, 辛天蓉, 任自立. 生长抑素及其受体. 生理科学进展, 2005, 36(1): 86-92.
Liu Y Q, Xin T R, Ren Z L. Somatostatin and somatostatin receptor. *Progress in Physiological Sciences*, 2005, 36(1): 86-92. (in Chinese)
- [3] 李永渝, 高静涛. 生长抑素: 机体消化功能的重要调节因子. 生理科学进展, 1995: 26 (1): 65-68.
Li Y Y, Gao J T. Somatostatin: the important factor for regulating digestive functions. *Progress in Physiological Sciences*, 1995, 26(1): 65-68. (in Chinese)
- [4] Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W. Regulation and function of somatostatin receptors. *Journal of Neurochemistry*, 2004, 89: 1057-1091.
- [5] Moller L N, Stidsen C E, Hartmann B, Holst J J. Somatostatin receptors. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Biomembranes*, 2003, 1616(1): 1.
- [6] Bossis I, Porter T E. Identification of the somatostatin receptor subtypes involved in regulation of growth hormone secretion in chickens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2001, 182(2): 203-213.
- [7] Geris K L, de Groef B, Rohrer S P, Geelissen S, Kuhn E R, Darras V M. Identification of somatostatin receptors controlling growth hormone and thyrotropin secretion in the chicken using receptor subtype-specific agonists. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2003, 177(2): 279-286.
- [8] Zaki M, Harrington L, McCuen R, Coy D H, Arimura A, Schubert M L. Somatostatin receptor subtype 2 mediates inhibition of gastrin and histamine secretion from human, dog, and rat antrum. *Gastroenterology*, 1996, 111: 919-924.
- [9] Abdu F, Hicks G A, Hennig G, Allen J P, Grundy D. Somatostatin sst(2) receptors inhibit peristalsis in the rat and mouse jejunum. *American Journal of Physiology*, 2002, 282: 624-633.
- [10] Piqueras L, Tache Y, Martinez V. Somatostatin receptor type 2 mediates bombesin-induced inhibition of gastric acid secretion in mice. *Journal of Physiology*, 2003, 549: 889-901.
- [11] Lloyd K C, Amirmoazzami S, Friedrik F, Chew P, Walsh J H. Somatostatin inhibits gastrin release and acid secretion by activating sst2 in dogs. *American Journal of Physiology*, 1997, 272: 1481-1488.
- [12] Fung L C, Greenberg G R. Characterization of somatostatin receptor subtypes mediating inhibition of nutrient-stimulated gastric acid and gastrin in dogs. *Regulatory Peptides*, 1997, (68): 197-203.
- [13] Martínez L P a V. Role of somatostatin receptors on gastric acid secretion in wild-type and somatostatin receptor type 2 knockout mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2004, 370: 510-520.
- [14] Yao C-Y, Gill M, Martens C A, Coy D H, Hsu W H. Somatostatin inhibits insulin release via SSTR2 in hamster clonal [beta]-cells and pancreatic islets. *Regulatory Peptides*, 2005, 129(1-3): 79.
- [15] Pinter E, Helyes Z, Szolcsanyi J. Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacology & Therapeutics*, 2006, In Press, Corrected Proof.
- [16] Carlton S M, Zhou S, Du J, Hargett G L, Ji G, Coggeshall R E. Somatostatin modulates the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel. *Pain*, 2004, 110: 616.
- [17] Silva A P, Bethmann K, Raulf F, Schmid H A. Regulation of ghrelin secretion by somatostatin analogs in rats. *European Journal of Endocrinology*, 2005, 152: 887-894.
- [18] 杨小冬, 刘福坤, 许哲, 陈彻, 李刚, 吴晓宇, 张新华, 孙桂勤, 李宁, 黎介寿. 生长抑素受体在结直肠癌和正常黏膜表达及与细胞增殖和凋亡的关系. 肠外与肠内营养, 2005, 12(1): 29-32.
Yang X D, Liu F K, Xu Z, Chen C, Li G, Wu X Y, Zhang X H, Sun G Q, Li N, Li J S. Expression of somatostatin receptor in human colorectal cancers and normal mucous tissues. *Parenteral & Enteral Nutrition*, 2005, 12(1): 29-32. (in Chinese)
- [19] 代远斌, 曾希志, 向志. 人类大肠癌 SSTR2 mRNA 表达及其与细胞增殖相关性研究. 第三军医大学学报, 2005, 27: 2363-2365.
Dai Y B, Zeng X Z, Xiang Z. SSTR2 mRNA expression and correlation with proliferating cell nuclear antigen in human colorectal

- cancer. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2005, 27: 2363-2365. (in Chinese)
- [20] 郭梅梅, 谭庆华, 范 华, 黄明慧, 王春晖, 丘小庆, 唐承薇. 猕猴发育过程中肠肝生长抑素及其受体表达演变规律. *生理学报*, 2005, 57: 719-724.
- Guo M M, Tan Q H, Fan H, Huang M H, Wang C H, Qiu X Q, Tang C W. Changes of somatostatin and expression of somatostatin receptor in small intestine and liver tissues during macaque development. *Acta Physiologica Sinica*, 2005, 57: 719-724. (in Chinese)
- [21] 夏 东. 猪生长激素分泌的中枢调节及其对胃功能发育的影响. 南京农业大学博士论文, 2002: 51-56.
- Xia D. The study of central regulation of porcine GH secretion and the effect of GH on gastric functional development. Nanjing Agricultural University Doctor Paper, 2002: 51-56. (in Chinese)
- [22] Dieffenbach C W. *PCR Primer: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2003.
- [23] Moldovan S, DeMayo F, Brunicaudi F C. Cloning of the mouse SSTR5 gene. *Journal of Surgical Research*, 1998, 76(1): 57-60.
- [24] Kido T, Sumii K, Kawano M, Sumii M, Yoshihara M, Chayama K. Food deprivation enhances somatostatin and somatostatin receptor subtype expression in rat colon. *Regulatory Peptides*, 2003, 114(2-3): 167-173.
- [25] Warhurst G, Higgs N B, Fakhoury H, Warhurst A C, Garde J, Coy D H. Somatostatin receptor subtype 2 mediates somatostatin inhibition of ion secretion in rat distal colon. *Gastroenterology*, 1996, 111: 325-333.
- [26] McKeen E S, Feniuk W, Humphrey P P. Somatostatin receptors mediating inhibition of basal and stimulated electrogenic ion transport in rat isolated distal colonic mucosa. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 1995, 352: 402-411.
- [27] Hope N, Butt G, Ross I, Warhurst G, Arn M, Grigor M, Lubcke R, Barbezat G O. Somatostatin enhances cAMP-dependent short-circuit current in human colon via somatostatin receptor subtype-2. *Digestive Diseases and Sciences*, 2001, 46: 2499-2503.
- [28] Gugger M, Waser B, Kappeler A, Schonbrunn A, Reubi J C. Cellular detection of sst2A receptors in human gastrointestinal tissue. *Gut*, 2004, 53: 1431-1436.
- [29] Laws S A, Gough A C, Evans A A, Bains M A, Primrose J N. Somatostatin receptor subtype mRNA expression in human colorectal cancer and normal colonic mucosae. *British Journal of Cancer*, 1997, 75: 360-366.
- [30] Casini R C, Calabro A, Renzi D, Briganti V, Cianchi F, Messerini L, Valanzano R, Cameron Smith M, Cortesini C, Tonelli F, Serio M, Maggi M, Orlando C. Quantitative evaluation of somatostatin receptor subtype 2 expression in sporadic colorectal tumor and in the corresponding normal mucosa. *Clinical Cancer Research*, 2002, 8: 419-427.
- [30] Cooke H J, Wang Y Z, Wray D, O'Dorisio M S, Woltering E A, Coy D H, Murphy W A, Christofi F L, Gosh P, O'Dorisio T M. A multi-tyrosinated sst1/2 receptor preferring somatostatin agonist inhibits reflex and immune-mediated secretion in the guinea pig colon. *Regulatory Peptides*, 2003, 114(1): 51-60.
- [31] Mato E, Santisteban P, Chowen J A, Fornas O, Bouwens M, Puig-Domingo M, Argente J, Webb S M. Circannual somatostatin gene and somatostatin receptor gene expression in the early post-natal rat pineal gland. *Neuroendocrinology*, 1997, 66: 368-374.

(责任编辑 林鉴非)