



团头鲂 PGC1 α 分子特征及其对营养限制、 高糖饲料和葡萄糖负荷的响应

丁志荣¹, 李向飞², 刘文斌², 谢帝芝¹,
徐超^{1*}, Jean-Jacques Yao Adjoumani²

(1. 华南农业大学海洋学院, 广东 广州 510642;

2. 南京农业大学动物科技学院, 江苏省水产动物营养重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 为探究过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅激活因子 1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 α , PGC1 α) 基因在团头鲂糖代谢中的作用, 实验从团头鲂肝脏中克隆获得了 PGC1 α 基因的片段序列, 并对其开展了生物信息学分析; 同时研究了饥饿、高糖(糖水平: 45%) 饲料及葡萄糖负荷对团头鲂脑和肝脏 PGC1 α 表达的影响。结果显示, 获得的团头鲂 PGC1 α 基因 cDNA 片段长为 2 566 bp, 其中包含 1 404 bp 的开放阅读框并编码 467 个氨基酸, 与草鱼的同源性为 96.79%; 与正常投喂组相比, 饥饿 10 d 组鱼脑和肝脏中 PGC1 α 的 mRNA 水平显著升高, 饥饿再投喂 1 h 后恢复至对照组的表达水平。饲喂高糖饲料(12 周)后, 与对照组相比, 鱼脑和肝脏中 PGC1 α 的 mRNA 水平显著降低。此外, 葡萄糖负荷后, 脑和肝脏中 PGC1 α 的 mRNA 水平在 2 h 内显著降低至最小值, 随后逐渐升高至基础水平。研究表明, PGC1 α 在团头鲂糖代谢过程中可能发挥重要作用。

关键词: 团头鲂; 过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅激活因子 1 α ; 糖代谢; 基因克隆; 基因表达
中图分类号: S 963.7 **文献标志码:** A

糖类作为三大营养物质(蛋白质、脂肪、糖)中最廉价的能量源^[1], 水产饲料中添加适量糖水平可节约饲料中蛋白质原料的用量。然而, 鱼类是先天性糖尿病体质, 对糖类的利用率较低^[2], 当摄食高碳水化合物饲料后会出现血糖持续偏高, 代谢负荷加重, 进而抑制鱼体生长^[2]。血糖调控机制是生理学研究的重要内容之一, 糖稳态对生物有机体能量代谢平衡意义重大。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助活化因子 1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 α , PGC1 α) 属于 PGC1 转录辅助活化

因子家族成员, 其广泛参与机体的能量生成与利用过程^[3]。糖代谢上的研究证实, PGC1 α 是调节机体糖异生的关键因子, 其在肝细胞中过度表达可显著上调磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)、葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)等糖异生关键酶的转录水平, 导致肝糖输出增加, 进而升高机体血糖水平^[4]。糖尿病动物模型上的研究发现, 干扰 PGC1 α 表达会导致机体产生胰岛素抵抗和葡萄糖不耐受等现象^[4]。然而, 以上研究均来源于哺乳动物, 水产动物上的研究尚较缺乏。目前, 已克隆获得斑马鱼(*Danio rerio*)、金鱼(*Carassius*

收稿日期: 2020-12-20 修回日期: 2021-05-06

资助项目: 国家自然科学基金(31872576, 32002361); 国家现代农业产业技术体系(CARS-45-14)

第一作者: 丁志荣, 从事水产动物营养与饲料科学研究, E-mail: zrding@stu.scau.edu.cn

通信作者: 徐超(照片), E-mail: xuc1213@scau.edu.cn



auratus)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)、齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*) 等鱼类的 *PGC1 α* 基因全长序列^[5-6]。但对基因在鱼类糖代谢中的作用仍缺乏研究。此外, *PGC1 α* 分子克隆研究主要集中于杂食性和肉食性鱼类, 对草食性鱼类上的研究较少。

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 是我国重要的淡水草食性经济鱼类。相较肉食和杂食性鱼类, 其具有较高的糖耐受能力, 但过高的饲料糖水平仍会使其产生高血糖症状, 进而抑制鱼体生长。因此, 本实验旨在克隆团头鲂 *PGC1 α* 基因的 cDNA 片段序列, 并分析其分子特征; 同时探究团头鲂 *PGC1 α* 基因在饥饿、高糖饲料喂养及葡萄糖负荷下的表达量变化。本实验所获结果将为鱼类糖代谢的调控提供效应靶点, 并有助于高糖低蛋白水产饲料的研发。

1 材料与amp;方法

1.1 实验鱼和实验设计

实验所用团头鲂购自于江苏省扬州市国家良种场。实验开始前, 将鱼暂养于池塘网箱内 2 周, 用含 32% 蛋白和 31% 糖水平的商品饲料 (帅丰饲料有限公司, 江苏省, 中国) 进行驯化。随后, 挑选 4 条体质量为 (43.72 ± 0.16) g 的团头鲂进行麻醉 (使用 100 mg/L 的 MS-222), 取其肝脏组织用液氮迅速冷冻, 放置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中用于 *PGC1 α* 基因克隆。

营养限制实验 随后, 选取 54 条鱼 [(62.96 ± 2.57) g] 进行饥饿再投喂实验。实验分为 3 个组: 连续 10 d 投喂组 (fed 10 d group)、饥饿 10 d 组 (fasted 10 d group)、饥饿 10 d 后投喂 1 h 组 (re-fed 1 h group), 每组 3 个重复。实验结束后, 每缸 (水体容量为 200 L) 随机选取 4 条鱼迅速使用 100 mg/L 的 MS-222 进行麻醉, 取其脑和肝脏组织用液氮迅速冷冻, 放置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

高糖营养实验 饥饿实验后, 随机选取 160 条健康的团头鲂幼鱼 [(42.11 ± 0.64) g] 进行 12 周的养殖实验。实验分为 2 个组, 每组 4 个重复。期间分别投喂基础饲料 (control: 30% 糖水平) 和高糖饲料 (high carbohydrate: 45% 糖水平), 每天 2 次 (08:00 和 17:00)。饲料配方如表 1 所示。养殖结束后, 全部鱼饥饿 24 h。随机选取 6 条鱼迅速使用 100 mg/L 的 MS-222 进行麻醉, 取其脑

和肝脏组织用液氮迅速冷冻, 放置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

葡萄糖负荷实验 对于葡萄糖负荷实验, 将体质健壮的团头鲂幼鱼 [(52.49 ± 1.02) g] 随机分为 2 组, 分别注射 1.67 mL/kg 体质量的生理盐水和 1.67 g/kg 体质量的葡萄糖溶液。将注射后的鱼随机放入 6 个循环养殖缸 (水体容量为 200 L),

表 1 实验饲料配方及营养组成

Tab. 1 Formulation and proximate composition of the different experimental diets

| | 对照组 control | 高糖组 HC |
|--|----------------|-----------|
| 原料/% ingredient | | |
| 鱼粉 fish meal | 8.00 | 8.00 |
| 豆粕 soybean meal | 26.00 | 26.00 |
| 菜粕 rapeseed meal | 17.00 | 17.00 |
| 棉粕 cottonseed meal | 17.00 | 17.00 |
| 鱼油 fish oil | 2.00 | 2.00 |
| 豆油 soybean oil | 2.00 | 2.00 |
| 玉米淀粉 corn starch | 12.00 | 25.00 |
| 微晶纤维素 microcrystalline cellulose | 13.00 | 0.00 |
| 磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ | 1.80 | 1.80 |
| 预混料 premix ¹⁾ | 1.20 | 1.20 |
| 营养成分 proximate composition (dry matter basis) | | |
| 水分/% moisture | 6.96 | 6.93 |
| 乙醚提取物/% ether extract | 5.93 | 5.94 |
| 粗灰分/% crude ash | 8.46 | 8.18 |
| 粗蛋白质/% crude protein | 29.82 | 30.03 |
| 粗纤维/% crude fiber | 16.97 | 7.28 |
| 可消化性糖/% digestible carbohydrate ²⁾ | 31.86 | 43.64 |
| 总能/(MJ/kg) total energy | 19.09 | 19.14 |

注: ① 预混料为每千克饲料提供以下矿物质(g/kg)和维生素(IU or mg/kg)包括 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 25 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7 g, Na_2SeO_3 0.04 g, KI 0.026 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, VA 900 000 IU, VD 200 000 IU, VE 4 500 mg, VK_3 220 mg, VB_1 320 mg, VB_2 1 090 mg, VB_5 2 000 mg, VB_6 500 mg, VB_{12} 1.6 mg, VC 5 000 mg, 泛酸 1 000 mg, 叶酸 165 mg, 胆碱, 60 000 mg。② 可消化性糖含量 = 100 - (水分+粗蛋白+乙醚提取物+粗灰分+粗纤维)

Notes: ① premix supplied the following minerals (g/kg of diet) and vitamins (IU or mg/kg of diet): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 25 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7 g, Na_2SeO_3 0.04 g, KI 0.026 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, vitamin A 900 000 IU, vitamin D 200 000 IU, vitamin E 4 500 mg, vitamin K_3 220 mg, vitamin B1 320 mg, vitamin B2 1 090 mg, vitamin B_5 2 000 mg, vitamin B_6 500 mg, vitamin B_{12} 1.6 mg, vitamin C 5 000 mg, pantothenate 1 000 mg, folic acid 165 mg, choline 60 000 mg. ② digestible carbohydrate content = 100 - (moisture+crude protein+ether extract+ash+crude fiber)

表 2 实验所需引物序列

Tab. 2 Primers used in the experiment

| 引物名称 primer name | 序列(5→3) sequences (5→3) | 用途 usage |
|---------------------|----------------------------|-------------|
| PGC1 α -F1 | TATGCCAACTCTCCATCAACCCCA | 中间片段扩增 |
| PGC1 α -R1 | AGGCAGGTCAGGGCAAAG | 中间片段扩增 |
| PGC1 α -F | TGCCCTCGGTTCAATTGTC | qRT-PCR |
| PGC1 α -R | GATTTCTGATTGGTCGCTGTA | qRT-PCR |
| EF1 α -F | CTTCTCAGGCTGACTGTGC | qRT-PCR |
| EF1 α -R | CCGCTAGCATTACCCTCC | qRT-PCR |

注: PGC1 α . 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子1 α ; EF1 α . 延长因子1 α

Notes: PGC1 α . peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α ; EF1 α . elongation factor 1 α

每缸 4 条鱼。随后, 分别在 0、1、2、4、8 和 12 h 采集脑和肝脏组织用液氮迅速冷冻, 放置于 -80°C 备用。期间, 每个时间点采集一个循环养殖缸, 以降低反复采样对鱼体造成的应激。

1.2 组织 RNA 提取和 cDNA 第一链合成

采用 Trizol 法 (TaKaRa, 宝生物公司, 大连) 对鱼体肝脏 RNA 进行提取。根据 RNAiso Plus 商业试剂盒说明书要求, 将提取后的组织 RNA 分别进行结构完整性及浓度和纯度检测。随后, 参照 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 试剂盒 (Invitrogen 公司) 操作说明, 以总 RNA 为模板、Oligo(dT)16 为反转录引物合成 cDNA 第一链。

1.3 cDNA 全长克隆

筛选 NCBI 网站中已发表的鱼类 PGC1 α 基因的保守区域序列, 使用 Primer Premier 5.0 设计合成简并引物 (表 2) 并进行保守片段扩增。随后, 根据 SMARTer™ RACE cDNA Amplification (Clontech 公司) 试剂盒操作说明, 分别使用引物 PGC1 α -F1, 以团头鲂 cDNA 为模板并参照确定的扩增条件 (94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 进行 34 个循环; 最后 72°C 再延伸 10 min), 进行简并引物 PCR 的两轮扩增。第一轮扩增反应体系为 ddH₂O 31.5 μL , 10 \times PCR buffer 5.0 μL , 25 mmol/L MgCl₂ 3.0 μL , 10 mmol/L dNTP mix 1.0 μL , PGC1 α -R1 2.0 μL , Abridged Anchor Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 2.0 μL , dC-tailed cDNA 5.0 μL 和 Taq DNA 聚合酶 (5 units/ μL) 0.5 μL ; 第二轮扩增反应体系为第一轮

扩增产物 5.0 μL , ddH₂O 33.5 μL , 10 \times PCR buffer 5.0 μL , 25 mmol/L MgCl₂ 3.0 μL , 10 mmol/L dNTP mix 1.0 μL , PGC1 α -R1 21.0 μL , AUAP or UAP (10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL 和 Taq DNA 聚合酶 (5 units/ μL) 0.5 μL 。纯化后的 PCR 产物鉴定阳性克隆后进行测序并在 NCBI 网站验证核心片段。最后, 使用 DNA Star Package 5.01 软件对 PGC1 α 的正反序列进行组装, 最终分别获得完整的团头鲂 PGC1 α 基因 cDNA 片段序列。

1.4 Pgc1 α 生物信息学分析

根据 NCBI 的开放阅读框 (ORF) Finder 操作流程, 寻找 Pgc1 α cDNA 中的 ORF。使用 DNA MAN 对 Pgc1 α 氨基酸序列进行检测。ExPASy 网站测定 Pgc1 α 的等电点和分子量。NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 检测 Pgc1 α 的同源性基因。利用网站 <http://sable.cchmc.org/> 预测 Pgc1 α 蛋白二级结构。MEGA 5.0 对比 Pgc1 α 相关物种的氨基酸序列。

1.5 组织 PGC1 α 基因表达量分析

团头鲂脑和肝脏 RNA 提取及其目的基因 PCR 定量, 均参照先前实验操作流程^[7]。具体流程如下: RNA 的提取过程严格参照 TaKaRa® Plus RNA Purification (Invitrogen 货号: 12 183-555) 试剂盒说明书进行。同时, 使用 Prime Script® RT reagent Kit 反转录试剂盒并按照说明书要求进行 cDNA 反转。随后, 根据 Takara SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒要求对目的基因进行荧光定量 PCR 检测, 其 20 μL 反应体系分别包含 cDNA 稀释液 2 μL , SYBR® Premix Ex Taq™ 2 10 μL , ROX Reference Dye II 0.6 μL , 上游引物 0.2 μL , 下游引物 0.2 μL 和 ddH₂O 7 μL 。最后, 使用 ABI Quantstudio™ DX 实时定量 PCR 仪 (Life Technologies 公司) 进行荧光定量检测。期间, 选择团头鲂内参引物 EF1 α (序列号: X77689.1) 对目的基因 (表 2) 的 C_t 值进行均一化处理, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[8] 来计算组织样品中 mRNA 的相对表达量。

1.6 数据统计与分析

利用 SPSS 16.0 软件并根据单因素方差分析要求对营养限制、高糖营养实验数据进行分析。同时, 根据双因素方差分析要求对葡萄糖负荷实验数据进行分析; 当存在显著差异 ($P < 0.05$) 时, 利用 Turkey 氏方法进行多重比较。

2 结果

2.1 团头鲂 *PGC1α* 基因的克隆和序列分析

实验获得 2 566 bp 的 *PGC1α* 基因片段序列, 其中包含长度为 1 404 bp 的开放阅读框并其编码

467 个氨基酸(图 1)。同时, *Pgc1α* 蛋白分子量为 53 375.53 U, 等电点为 6.56。转录因子结合位点分析结果显示, *PGC1α* 序列包括 MyOD、CREB 和 C/EBP 等结合位点。氨基酸序列分析显示, N 端含有 LXXLL 转录激活区, C 端含有一个 RNA

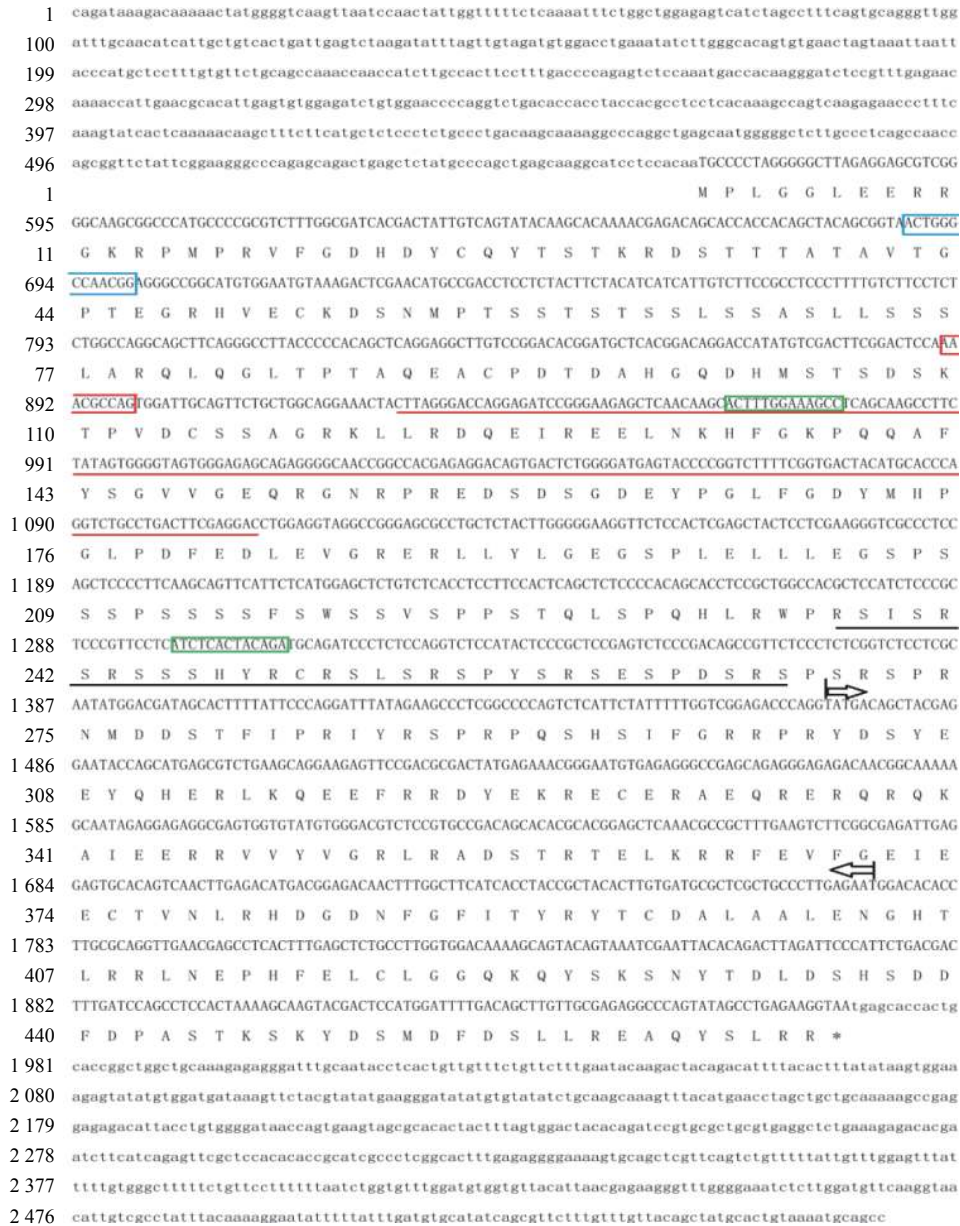


图 1 团头鲂 *PGC1α* 基因 cDNA 片段以及翻译的氨基酸序列

红色框代表 cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 结合位点, 蓝色框代表肌分化因子 (myogenic differentiation antigen, MyoD) 结合位点, 绿色框代表 CCAAT/增强子结合蛋白 (CCAAT/enhancer-binding protein, C/EBP) 结合位点, 红色和黑色下划线区域分别代表 RNA 结合区和丝氨酸/精氨酸 (serine/arginine, SR) 结构域, 箭头代表 RNA 识别区

Fig. 1 Nucleotide sequence of *PGC1α* cDNA fragment and its encoding amino acid sequences in blunt snout bream

The red, blue and green boxes indicate cAMP response element binding protein (CREB), myogenic differentiation antigen (MyoD) and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) binding site, respectively. The red and black underlined regions indicate RNA binding domain and serine / arginine (SR) domain, respectively, Arrow indicates the RNA recognition motif

识别区域和富含丝氨酸/精氨酸的结构域 (SR) 结构域。团头鲂 Pgc1 α 蛋白结构中存在 5 个 α -螺旋, 6 个 β -折叠和 12 个转角 (图 2)。

2.2 团头鲂 Pgc1 α 进化树分析

使用 NCBI 中的 BLASTp 程序对团头鲂 Pgc1 α 氨基酸序列进行同源比对 (图 3), 结果表明其与鲤科鱼类有很高的相似度。具体比对结果如下: PGC1 α 中草鱼 96.79%、鲫 (*Carassius auratus*) 87.58%、鲤 (*Cyprinus carpio*) 89.29%、黄颡鱼 (*Tachysurus fulvidraco*) 71.97%、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 71.95%、大西洋鲑 (*Salmo salar*) 56.87%、大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 55.96%、银鲑 (*Oncorhynchus kisutch*) 54.82%。使用 MEGA 3.1 软件将 Pgc1 α 氨基酸序列构建系统发育树, 结果表明

团头鲂 Pgc1 α 序列与草鱼相似性最高并聚为一支, 随后再与其他鲤科鱼类聚为一支。

2.3 营养限制对团头鲂脑和肝脏中 PGC1 α 表达的影响

饥饿 10 d 组 (10 d fasted group) 的脑和肝脏中 PGC1 α 基因表达量显著高于其他各组 ($P < 0.05$) (图 4)。饥饿 10 d 后投喂 1 h 组 (1 h-refed group) 的脑和肝脏中 PGC1 α 基因表达量与连续 10 d 投喂组 (10 d-fed group) ($P > 0.05$) 无显著差异。

2.4 饲料糖水平对团头鲂脑和肝脏中 PGC1 α 表达的影响

经 12 周养殖实验后, 高糖组 (HC) 鱼的脑和肝脏中 PGC1 α 表达量均显著降低 ($P < 0.05$) (图 5)。

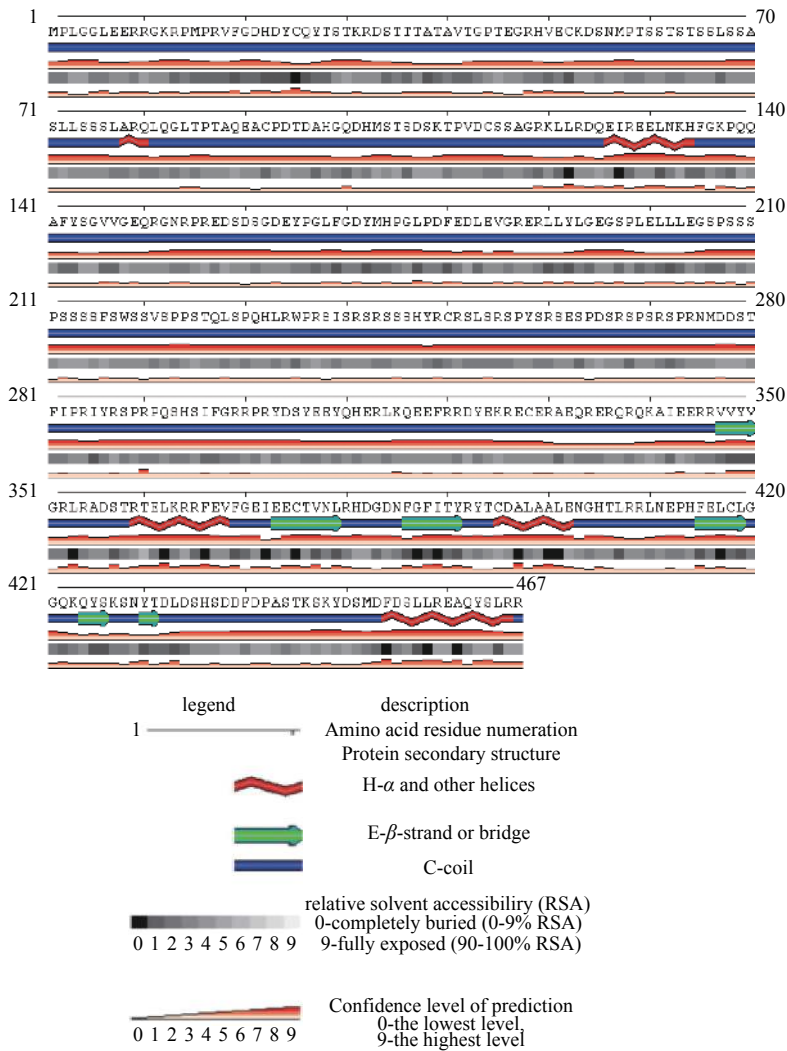


图 2 团头鲂 Pgc1 α 蛋白二级结构预测结果

Fig. 2 The secondary structure of the Pgc1 α protein in blunt snout bream

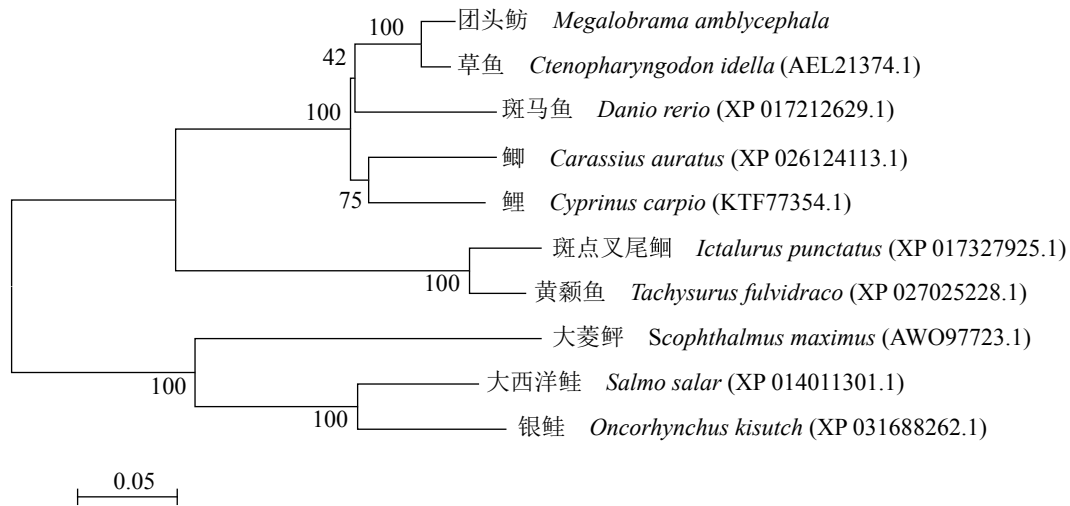


图 3 各物种间 $Pgc1\alpha$ 序列的进化分析(邻接法, MEGA 3.1)

Fig. 3 Phylogenetic tree based on $Pgc1\alpha$ sequences by MEGA 3.1 software

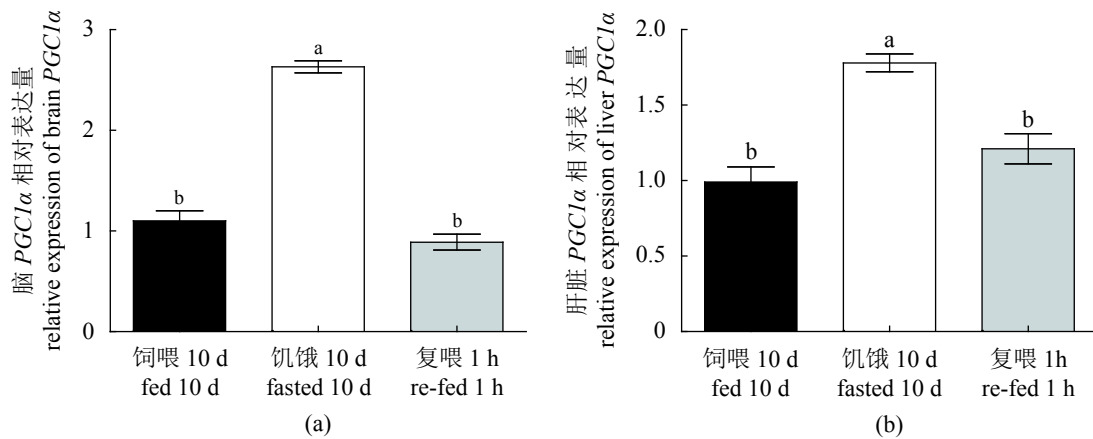


图 4 营养限制对团头鲂脑(a)和肝脏(b)中 $PGC1\alpha$ 表达的影响

每个数据表示 4 个重复。不同上标的小写字母表示不同实验组间差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 4 The mRNA levels of $PGC1\alpha$ in the brain (a) and liver (b) of blunt snout bream subjected to nutrient restriction

Each data represents the mean of four replicates. Values with the different superscript letters are significantly different among groups ($P < 0.05$)

2.5 葡萄糖负荷对团头鲂脑和肝脏中 $PGC1\alpha$ 表达的影响

葡萄糖负荷后, 采样时间和注射剂量以及二者交互作用均显著影响脑和肝脏中 $PGC1\alpha$ 的表达 ($P < 0.05$) (图 6)。葡萄糖负荷实验后, $PGC1\alpha$ 表达量显著降低 ($P < 0.05$), 最低值于 1 h 处出现。随后, 它们的表达量均显著性上调 ($P < 0.05$), 且在 8 h 回到基础值。生理盐水组, 脑组织中 $PGC1\alpha$ 表达量随时间增加显著性升高 ($P < 0.05$)。就注射剂量而言, 0 h 处脑和肝脏中 $PGC1\alpha$ 的表达量及 8 h 肝脏中 $PGC1\alpha$ 的表达量均无显著差异 ($P > 0.05$)。除此之外, 糖负荷组鱼脑和肝脏中 $PGC1\alpha$ 表达量均显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

$PGC1\alpha$ 是过氧化物酶体增植物激活受体 γ 辅激活因子 1 基因家族成员之一, 其在维持机体糖代谢稳态中发挥重要作用^[3]。目前, 关于 $PGC1\alpha$ 较为深入的研究主要集中于哺乳动物。本实验从团头鲂肝脏中克隆到 $PGC1\alpha$ 基因的 cDNA 片段序列。碱基及氨基酸序列比对结果显示, 团头鲂 $PGC1\alpha$ 结构中包含多种与哺乳动物相同的结构位点, 如 N 端 LXXLL 转录激活区、C 端 RNA 识别区和 SR 结构域及 MyOD、CREB、C/EBP 等结合位点。在这些结构中, LXXLL 转录激活区被认为是 $PGC1\alpha$ 与过氧化物酶体增植物激活受体 α (peroxisome proliferators-activated receptors α ,

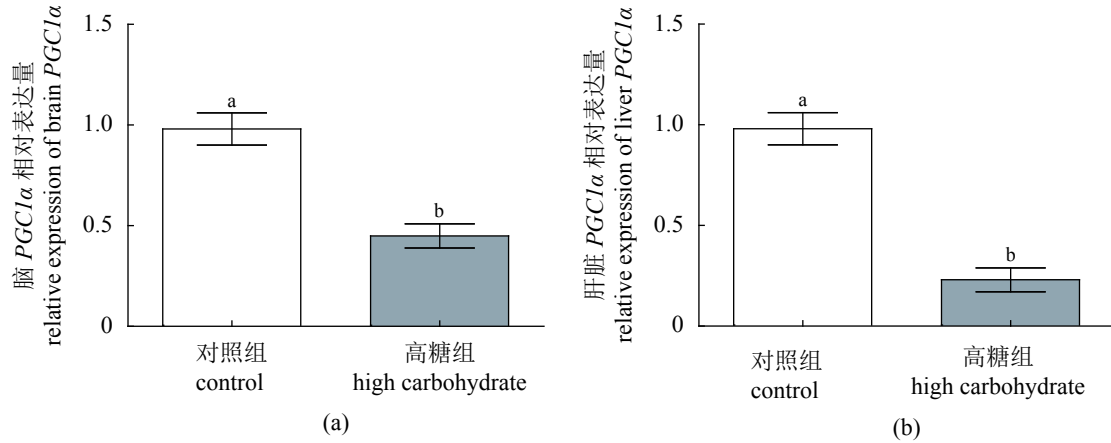


图 5 饲料糖水平对团头鲂脑 (a) 和肝脏 (b) 中 PGC1 α 表达的影响

每个数据表示 4 个重复。不同上标的小写字母表示不同实验组间差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 5 The mRNA levels of PGC1 α in the brain (a) and liver (b) of blunt snout bream subjected to different dietary carbohydrate levels

Each data represents the mean of four replicates. Values with the different superscript letters are significantly different among groups ($P < 0.05$)

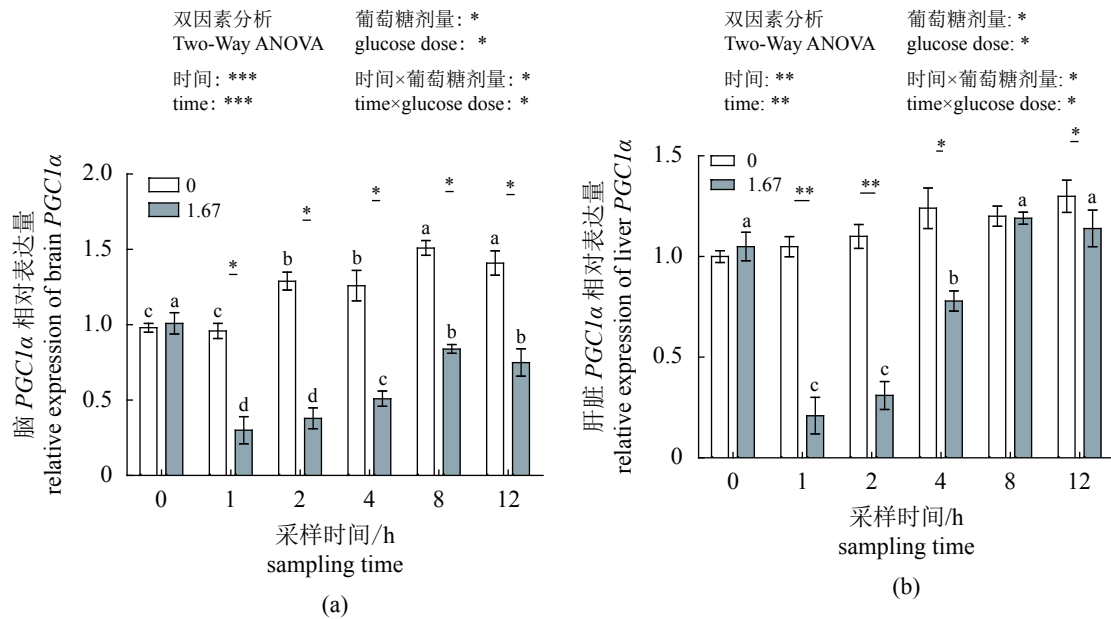


图 6 葡萄糖负荷对团头鲂脑 (a) 和肝脏 (b) 中 PGC1 α 表达的影响

每个数据表示 4 个重复。不同的小写字母表示相同组别 (每个葡萄糖剂量) 但不同采样时间点的 PGC1 α 表达量差异显著 ($P < 0.05$), 而 * 表示不同处理组在相同采样点上有显著差异 ($P < 0.05$)。双因素分析中 ns 为 $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig. 6 The mRNA levels of PGC1 α in the brain (a) and liver (b) of blunt snout bream subjected to different glucose loadings

Values are means ($n=4$) \pm SE. Significant differences ($P < 0.05$) among sampling times within each treatment are indicated by different letters. *Indicates a significant difference ($P < 0.05$) between the two treatments at each sampling time. ns notes $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

PPAR α) 等细胞核受体转录因子相互作用的关键部位^[9-10]; SR 结构域则包含多个磷酸化修饰位点可通过磷酸化和去磷酸化形式的转换, 从而调控 PGC1 α 蛋白与其下游蛋白间的相互作用^[11]。然而, 相较哺乳动物, 团头鲂 PGC1 α 基因结构上

缺少与肌细胞增强因子 2 C (myocyte enhancer factor 2 C, MEF2C) 相互作用的结合位点, 这与齐口裂腹鱼 PGC1 α 基因上的研究结果相同^[6]。这一改变被认为会降低 PGC1 α 在调控鱼体糖代谢中的作用, 由于 PGC1 α 需通过结合并激活 MEF2C 来增

加葡萄糖转运蛋白4 (glucose transporter type 4, GLUT4) 的活性, 进而增强机体的葡萄糖转运功能^[12]。此外, 同源性比对结果显示, 团头鲂 *PGC1 α* 基因与其他动物的该基因序列同源性较高, 表明不同物种间 *PGC1 α* 基因具有较高的保守性。

营养限制实验中, 饥饿 10 d 组 (10 d fasted group) 鱼的脑和肝脏中 *PGC1 α* 基因表达量被显著性上调, 但投喂 1 h 后它们呈现显著地下降趋势。先前的研究表明, 饥饿条件下, 小鼠 (*Mus musculus*) 下丘脑中 *PGC1 α* 表达的升高, 可以刺激刺鼠相关蛋白 (agouti-related protein, AgRP)、神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 等促食欲肽相关基因的表达, 从而增强机体的摄食意识^[13]。此外, 游建华在 HL-7702 肝细胞株上的研究表明, 过表达 *PGC1 α* 可以激活肝细胞核因子 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α , HNF4 α), 进而促进糖异生基因的表达和增加肝脏葡萄糖的输出, 为机体提供能量^[14]。

总的来讲, *PGC1 α* 与机体的糖脂代谢密切相关。研究表明, *PGC1 α* 是肝糖异生的关键调节因子, 能够诱导糖异生关键酶的基因表达, 导致肝糖异生增强, 肝糖输出增加, 进而升高空腹血糖水平^[15]。此外, 过表达小鼠肝脏中的 *PGC1* 可以激活过氧化物酶体增殖物激活受体 α , 增加脂肪酸的氧化, 为机体提供能量^[16]。本实验中, 高糖组鱼的脑和肝脏中 *PGC1 α* 基因表达量显著降低。这可能体现了团头鲂应对高糖营养的适应机制, 由于 *PGC1 α* 降低会抑制肝糖异生及脂肪酸氧化, 从而有助于增强饲喂高糖鱼的代谢稳态。此外, 饲喂高糖饲料致使鱼体血液中瘦素水平的升高, 可能会进一步抑制脑和肝脏中 *PGC1 α* 的表达^[17]。然而, 哺乳动物上的研究表明, *PGC1 α* 表达降低可能会抑制线粒体呼吸链酶及抗氧化酶的活性, 导致活性氧 (ROS) 积聚, 进而加剧细胞凋亡, 降低代谢功能^[18]。

本实验中, 葡萄糖注射后团头鲂脑和肝脏 *PGC1 α* 的表达量迅速发生变化, 均在 1~2 h 降低至最小值。这与陈金虎等^[19] 在小鼠下丘脑腹内侧核神经元上的结果相似, 研究显示糖负荷后腹内侧核 *PGC1 α* 表达水平在 2 h 到达最低值。这可能归因于糖负荷后鱼体增加的胰岛素水平, 由于胰岛素可以通过激活蛋白激酶 B (protein kinase B, Pkb), 致使 *Pgc1 α* 磷酸化失活, 进而降低 *PGC1 α* 表达水平^[20-21]。随后, 采样时间从 2 h 增至 12 h, 脑和肝脏中 *PGC1 α* 表达量显著上调。这

可能因为鱼体逐渐降低的胰岛素水平削弱了其对 *PGC1 α* 表达的抑制能力。此外, 上调的 *PGC1 α* 表达水平进一步回应了 2~12 h 逐渐下降的鱼体血糖水平^[22]。由于 *PGC1 α* 能够通过激活 Mef2c 来诱导内源性 *GLUT4* 基因表达, 增强外周组织摄取葡萄糖的能力, 进而维持机体的血糖稳态^[12]。此外, 与葡萄糖注射组相比, 生理盐水组鱼脑和肝脏中 *PGC1 α* 的表达量随采样时间增加而逐渐升高。这可能是由于饥饿状态下, *PGC1 α* 的激活将会促进肝糖异生和脂肪酸氧化相关基因的表达, 进而增加肝脏的葡萄糖输出及脂肪酸氧化能力, 为机体短时间内提供能量^[14,16]。

4 结论

本研究从团头鲂肝脏中克隆得到了 *PGC1 α* 基因片段序列, 长 2566 bp。营养限制、高糖营养实验发现, 饥饿和饲喂高糖饲料均会显著性下调团头鲂脑和肝脏中 *PGC1 α* 基因的表达量。此外, 葡萄糖负荷后, 脑和肝脏中 *PGC1 α* 表达量显著降低, 最低值出现在 1~2 h 处。以上结果可为研究 *PGC1 α* 在鱼类糖代谢中的作用提供基础数据和理论依据。

参考文献 (References):

- [1] Hemre G I, Mommsen T P, Krogdahl Å. Carbohydrates in fish nutrition: Effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2002, 8(3): 175-194.
- [2] Kamalam B S, Medale F, Panserat S. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies[J]. *Aquaculture*, 2017, 467: 3-27.
- [3] Handschin C. Regulation of skeletal muscle cell plasticity by the peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α [J]. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2010, 3(6): 376-384.
- [4] 赵文惠, 杨文英. *PGC-1 α* 与糖脂代谢[J]. 国外医学. 内分泌学分册, 2005, 25(5): 355-357.
Zhao W H, Yang W Y. *PGC-1 α* and metabolism of glucose and lipid[J]. *Section of Endocrinology Foreign Medical Sciences*, 2005, 25(5): 355-357(in Chinese).
- [5] 吉红, 刘品, 李杰, 等. 草鱼 *PGC-1 α* 基因的表达及饲喂 n-3 HUFAs 对其影响[J]. 水产学报, 2010, 34(9): 1327-1334.

- Ji H, Liu P, Li J, *et al.* PGC-1 α gene expression and the influence of dietary n-3 HUFAs in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(9): 1327-1334(in Chinese).
- [6] 李瑞文, 林亚秋, 郑玉才, 等. 齐口裂腹鱼PGC-1 α 基因编码区的克隆及其在肌肉组织中的表达[J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(1): 71-75.
- Li R W, Lin Y Q, Zheng Y C, *et al.* Cloning of *Schizothorax prenanti* PGC-1 α gene coding domain Sequence and its expression in *S. prenanti* muscle tissues[J]. *Letters in Biotechnology*, 2013, 24(1): 71-75(in Chinese).
- [7] Xu C, Li X F, Tian H Y, *et al.* Feeding rates affect growth, intestinal digestive and absorptive capabilities and endocrine functions of juvenile blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(2): 689-700.
- [8] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method[J]. *Methods*, 2002, 25(4): 402-408.
- [9] Shoag J, Arany Z. Regulation of hypoxia-inducible genes by PGC-1 α [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2010, 30(4): 662-666.
- [10] Puigserver P, Spiegelman B M. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator[J]. *Endocrine Reviews*, 2003, 24(1): 78-90.
- [11] 邵伟, 樊玉杰, 徐永镇. SR蛋白家族在RNA剪接中的调控作用[J]. *生命科学*, 2010, 22(7): 710-716.
- Shao W, Fan Y J, Xu Y Z. Function of SR protein family in pre-mRNA splicing[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2010, 22(7): 710-716(in Chinese).
- [12] West T, Atzeva M, Holtzman D M. Pomegranate polyphenols and resveratrol protect the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury[J]. *Developmental Neuroscience*, 2007, 29(4-5): 363-372.
- [13] Ma D, Li S, Lucas E K, *et al.* Neuronal inactivation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) protects mice from diet-induced obesity and leads to degenerative lesions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(50): 39087-39095.
- [14] 游建华. PGC1 α 协同 HNF4 α 调控鸟氨酸转氨甲酰酶的表达 [D]. 福州: 福建医科大学, 2016.
- You J H. PGC1 α and HNF4 α cooperatively regulate the expression of ornithine transcarbamylase[D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2016 (in Chinese).
- [15] 付敬敬, 李竹琴. PGC-1 α 与能量代谢相关性的研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2016, 45(9): 168-171.
- Fu J J, Li Z Q. Research progress on the correlation between PGC-1 α and energy metabolism[J]. *Journal of Medical Research*, 2016, 45(9): 168-171(in Chinese).
- [16] Lin J D, Tarr P T, Yang R J, *et al.* PGC-1 β in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(33): 30843-30848.
- [17] Tritos N A, Mastaitis J W, Kokkotou E G, *et al.* Characterization of the peroxisome proliferator activated receptor coactivator 1 alpha (PGC 1 α) expression in the murine brain[J]. *Brain Research*, 2003, 961(2): 255-260.
- [18] 朱雪婧, 文枫, 杨淡昶, 等. 高糖腹膜透析液对腹膜间皮细胞PGC-1 α 蛋白表达以及线粒体相关氧化凋亡的影响[J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2013, 38(11): 1085-1091.
- Zhu X J, Wen F, Yang D Y, *et al.* Effect of high glucose peritoneal dialysis solution on PGC-1 α expression and mitochondria related oxidative injury in human peritoneal mesothelial cells[J]. *Journal of Central South University (Medical Science)*, 2013, 38(11): 1085-1091(in Chinese).
- [19] 陈金虎, 管振龙, 赵玮琳, 等. 糖负荷对小鼠腹内侧核 PGC-1 α 表达的影响[J]. *营养学报*, 2015, 37(1): 22-26.
- Chen J H, Guan Z L, Zhao W L, *et al.* Effects of glucose load on the expression level of PGC-1 α neurons in hypothalamic ventromedial nucleus of mice[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2015, 37(1): 22-26(in Chinese).
- [20] Puigserver P, Rhee J, Donovan J, *et al.* Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction[J]. *Nature*, 2003, 423(6939): 550-555.
- [21] Daitoku H, Yamagata K, Matsuzaki H, *et al.* Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR[J]. *Diabetes*, 2003, 52(3): 642-649.
- [22] Xu C, Li X F, Shi H J, *et al.* AMP-activated protein kinase α 1 in *Megalobrama amblycephala*: molecular characterization and the transcriptional modulation by nutrient restriction and glucose and insulin loadings[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2018, 267(1): 66-75.

***PGC1 α* molecular characterization and its responsiveness to nutrient restriction, carbohydrate-enriched diets and glucose loadings in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)**

DING Zhirong¹, LI Xiangfei², LIU Wenbin², XIE Dizhi¹,
XU Chao^{1*}, Jean-Jacques Yao Adjoumani²

(1. College of Marine Sciences of South China Agricultural University & Guangdong Laboratory for
Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510642, China;

2. Key Laboratory of Aquatic Nutrition and Feed Science of Jiangsu Province, College of Animal Science and Technology,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To explore the mechanism of peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 α (*PGC1 α*) in the glucose metabolism of blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*, the partial cDNA of *PGC1 α* was cloned, and the transcriptional response of this gene to nutrient restriction, carbohydrate-enriched diets and glucose loadings were investigated. The partial cDNA was 2566 bp with an open reading frame of 1 404 bp encoding 467 amino acids, and compared to *Ctenopharyngodon idellus*, it showed 96.79% homology. The mRNA levels of *PGC1 α* in the brain and liver were significantly increased during 10 days of fasting, and then decreased to normal level after refeeding 1 h. The high-carbohydrate diet significantly decreased the mRNA levels of *PGC1 α* in the brain and liver. In addition, the mRNA levels of *PGC1 α* in the brain and liver both decreased significantly during the first 2 h, then returned to the basal value at 12 h. The results indicated that *PGC1 α* plays an important role in glucose metabolism in *M. amblycephala*. The results obtained here will provide the theoretical foundation for completing the research of *PGC1 α* functions involving the regulation of glucose homeostasis in fish.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; *PGC1 α* ; glucose metabolism; gene cloning; transcriptional analysis

Corresponding author: XU Chao. E-mail: xuc1213@scau.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31872576, 32002361); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-45-14)