

文章编号:1000-0615(2009)06-0980-07

草鱼 *LPL* 基因的表达及饥饿和再投喂对其影响

吉红^{1,2}, 苏尚顺¹, 刘茜¹, 曹艳姿¹, 杨公社¹, 林亚秋³, 奥宏海⁴

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2. 西北农林科技大学水产科学研究所, 陕西 杨凌 712100;

3. 西南民族大学生命科学与技术学院, 四川 成都 610041;

4. 日本国立水产养殖研究所, 日本 三重 516-0193)

摘要:获得了草鱼脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, *LPL*)部分 cDNA 序列(GenBank 注册号为 FJ612596), 并进行了序列同源性分析; 采用半定量反转录聚合酶链式反应(SQ-RT-PCR)方法, 检测了 *LPL* 基因在草鱼不同组织和不同发育阶段脂肪细胞中的表达状况; 研究了饥饿和再投喂对草鱼肝胰脏 *LPL* 基因表达的影响。结果显示, 所获得的草鱼 *LPL* 部分 cDNA 序列长度为 360 bp, 与其它物种的同源性为 70%~89%; *LPL* 基因在肝胰脏、肌肉、心脏、鳃、腹腔脂肪组织中均表达, 其中在腹腔脂肪组织中表达丰度最高, 在鳃中表达丰度最低; 在成熟脂肪细胞中的表达丰度显著高于基质脉管组分(stromal vascular fraction, SVF)细胞; 草鱼 *LPL* 基因表达水平在饥饿 48 h 后显著升高, 再次投喂后 12 h, 回复到 0 h 的表达水平。研究表明, 草鱼 *LPL* 在不同组织及脂肪细胞分化的起始和终末阶段均有表达, 显示其在草鱼不同组织和脂肪细胞分化中具有重要作用, 同时, 其表达水平受营养状况的调控。论文首次克隆得到草鱼 *LPL* 基因部分 cDNA 序列, 并对其进行了表达分析, 研究结果可为 *LPL* 在鱼类脂质代谢中的作用研究提供参考和依据。

关键词:草鱼; 脂蛋白脂酶; 基因表达; 饥饿

中图分类号:Q 786; S 917

文献标识码:A

脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, *LPL*)是催化与蛋白质相联的甘油三酯水解作用的酶。它位于毛细血管内皮的腔面, 在甘油三酯代谢中起着关键的作用。它可将血液中的乳糜微粒(chylomicron, CM)和极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)所携带的甘油三酯水解成甘油和脂肪酸, 以供各种组织贮存和利用。

养殖鱼类脂肪肝及腹腔脂肪的过度蓄积已是困扰当前水产养殖业的主要问题之一。草鱼是我国的主要淡水养殖鱼类之一, 也是我国特有的养殖对象, 其脂肪肝及脂肪过度蓄积现象也比较严重。*LPL* 是脂质代谢的关键酶, 与脂肪细胞分化及脂肪沉积关系密切, 研究其在草鱼脂质代谢中的作用及机理具有重要意义。目前已经在斑马

鱼^[1] (*Danio rerio*)、虹鳟^[1] (*Oncorhynchus mykiss*)、真鲷^[2] (*Pagrus major*)、金头鲷^[3] (*Sparus aurata*)等鱼类中克隆得到 *LPL* 基因, 其在鱼类组织中的表达和活性的调控已有较多研究, 但多集中于海水鱼及淡水冷水鱼^[3-11]。Albalat 等^[8]发现虹鳟脂肪组织中 *LPL* 活性受饲喂和禁食影响。Saera-Vila 等^[3]研究了不同季节和不同饲料组成对金头鲷脂肪组织及肝胰脏 *LPL* 基因表达的影响。Oku 等^[4]研究了真鲷 *LPL* 各组织中的表达差异以及禁食和再投喂对真鲷肝胰脏 *LPL* mRNA 表达丰度的影响。而关于 *LPL* 基因在草鱼方面的研究尚未见报道。

本论文采用 RT-PCR 技术克隆草鱼 *LPL* 的部分 cDNA 序列, 研究了其在草鱼不同组织及成熟

收稿日期:2009-05-19 修回日期:2009-07-19

资助项目:国家自然科学基金项目(30771667);西北农林科技大学青年学术骨干支持计划项目;西北农林科技大学博士后流动站项目

通讯作者:吉红, Tel:029-87092139; E-mail: jihong@nwsuaf.edu.cn

脂肪细胞与基质脉管组分 (stromal vascular fraction, SVF) 细胞中的表达状况,评估了饥饿及再投喂对草鱼肝胰脏 *LPL* 基因表达的影响,为进一步探讨 *LPL* 的功能、作用机理以及调控鱼类脂肪沉积的研究提供参考资料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验鱼及取样

用于 *LPL* 基因克隆及其组织差异表达和不同发育阶段脂肪细胞 *LPL* 基因表达的草鱼 (500 ~ 800 g) 购自陕西杨凌康乐路水产品市场。试验鱼购回后即进行解剖,采集肝胰脏、肌肉、心脏、鳃、腹腔肠系膜脂肪 (intra-peritoneal fat body, IPF) 等各组织, -80 °C 保存或进行相关试验。根据刘茜等^[12]的方法获取草鱼成熟脂肪细胞和 SVF 细胞。

用于饥饿对草鱼 *LPL* 基因表达影响的试验鱼 (约 45 g), 购自陕西宝鸡陈仓区渔场, 购回后用高锰酸钾消毒处理, 在西北农林科技大学水产研究所循环水养殖系统中暂养 2 周, 饲喂商品饲料, 保持自然光照周期和温度条件。暂养结束后, 选取 30 尾鱼放置在 1 个循环水养殖缸中, 禁食 48 h 后再投喂。分别在禁食后 0 h、12 h、24 h、48 h, 以及再投喂 12 h 后随机取样 4 尾, 每尾鱼取肝胰脏组织 -80 °C 保存备用。

1.2 主要试剂

Trizol (博大泰克公司), 反转录试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶 (Fermentas 公司), DNA 回收试剂盒 (天为时代), PMD19-T 载体、*EcoR* I、*Xho* I (TaKaRa 公司), 质粒微量提取试剂盒 (安徽优品公司), I 型胶原酶 (Gibco 公司), 胎牛血清 (杭州四季清公司), DMEM 培养基、DMEM/F12 培养基 (Gibco 公司), II 型胶原酶 (Invitrogen 公司), 牛血清白蛋白 (Amersco 公司)。

1.3 草鱼 *LPL* 基因部分 cDNA 的克隆

采用 Trizol 法提取 IPF 总 RNA, 利用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 RNA 质量和纯度。cDNA 的合成取 4 μL 提取的总 RNA, 按 Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit #K1621 试剂盒推荐的方法以 Oligo (dT) 为引物合成 cDNA 第一链。根据 GenBank 中真鲷 *LPL* 基因序列 (AB243791) 设计并合成 1 对简并引物。

P1, Sense: 5'-GATAGCAACGTIATHGTIGTI GAYTGG-3', P 2 Antisense: 5'-GGTGTGAAGGAC GTCGACAAAGTCAGCGTCGTC-3'。引物由上海生工公司合成。25 μL PCR 反应体系: 灭菌的二蒸水 15.75 μL、2.5 mmol/L dNTP Mix 2 μL、PCR buffer (NH)₂SO₄ 2.5 μL、25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL、cDNA 1 μL、25 μmol/L、Primer I 0.5 μL、25 μmol/L、Primer II 0.5 μL、0.5 U/μL、*Taq* DNA Polymerase 1.25 μL。PCR 程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 50 s, 55 °C 60 s, 72 °C 60 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。扩增片段的纯化回收: 利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 按产品说明书, 从 1% 琼脂糖凝胶上回收目的条带。回收的产物 16 °C 下, 连接 T-载体 4 h, 连接产物转化后筛选阳性克隆, 提取质粒并进行测序。DNA 序列的测定在西北农林科技大学测序中心进行。测序后采用 DNAMAN 软件进行序列同源性比对及系统进化树制作。

1.4 草鱼 *LPL* 基因表达的检测

应用 Primer Premier 5.0 软件, 按照引物设计的基本要求, 设计 *β-actin* 基因 PCR 扩增引物。

Sense: 5'-GATATGGAGAAGATCTGGCA-3', Antisense: 5'-CAGAGCTTCTCCTTGATGTC-3', 产物长度为 410 bp, 根据已得的草鱼 *LPL* 片段, 设计 *LPL* 基因 PCR 特异扩增引物, Sense: 5'-CGCAACAACATTACCCAA-3', Antisense: 5'-AATCCCAATAGCGATCTGG-3'。利用 1.1 所获取的各组织和成熟脂肪细胞及 SVF 细胞, 采用半定量 (semi-quantitative, SQ) RT-PCR 法检测 *LPL* 基因组织分布及其在不同发育阶段脂肪细胞中的表达情况。*LPL* 基因和 *β-actin* 基因 PCR 反应体系同 1.3。反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 50 s, 55 °C 60 s/53 °C 60 s (*β-actin*), 72 °C 60 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。指数增长期内终止反应。2.5 μL PCR 扩增产物与微量溴酚蓝混合, 在 1% 的含溴化乙啶的琼脂糖凝胶上电泳。同时加 DNA Marker 2000, 以确定扩增产物片段的大小。电泳带在 Wealtec 凝胶成像系统拍照, 并用 Dophin-1D 凝胶分析软件分析。结果用 *LPL* 基因和 *β-actin* 电泳带吸光度的比值表示。

1.5 数据分析

采用 SPSS 13.0 软件, 用 ANOVA 对不同处理间的平均值进行统计分析, 当 $P < 0.05$ 时, 认

为差异显著。

2 结果

2.1 草鱼 LPL 基因部分 cDNA 的克隆及序列分析

采用简并引物和 RT-PCR 方法对草鱼 IPF 中的 LPL 进行扩增,获得一条特异的扩增带,其大小为 360 bp (图 1)。

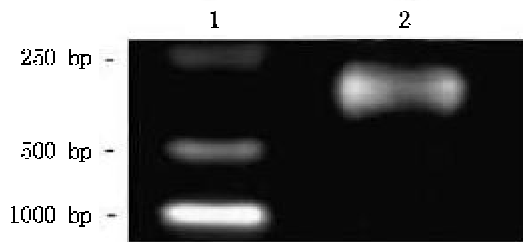


图 1 草鱼脂肪组织 LPL 的 RT-PCR 结果
1: Marker DL2000 ;2: 特异扩增带
Fig.1 RT-PCR results of LPL from adipose of grass carp
1: Marker DL2000;2: Specific amplification band

获得的特异扩增产物经回收和双向序列测定,得到核苷酸序列(图 2)。通过比对,将其命名为草鱼的 LPL 基因。草鱼 LPL 基因的部分 cDNA 序列 GenBank 注册号为 FJ612596。草鱼 LPL 基因核苷酸序列与其他物种 LPL 相对应的核苷酸序列进行多重比较,并进行了系统树制作(图 3),结果显示草鱼 LPL 基因与其他物种 LPL 基因的同源性分别为 70% ~ 89%。草鱼 LPL 基因和人 (*Homo sapiens*)、大鼠 (*Rattus norvegicus*)、小鼠 (*Mus musculus*)、牛 (*Bos taurus*)、鸡 (*Gallus gallus*)、猫 (*Felis catus*)、山羊 (*Capra hircus*)、绵羊 (*Ovis aries*)、猪 (*Sus scrofa*)、豚鼠 (*Cavia porcellus*)、猕猴 (*Macaca fascicularis*)、鼬 (*Neovison vison*)、狒狒 (*Papio anubis*)、金头鲷 (*Sparus aurata*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、真鲷 (*Pagrus major*) LPL 基因的同源性分别为 73%、71%、70%、72%、73%、71%、71%、71%、70%、70%、71%、70%、72%、73%、89%、78% 和 74%。

2.2 草鱼 LPL 在不同组织及不同发育阶段脂肪细胞的表达

采用 SQ RT-PCR 方法,对草鱼各组织的 LPL mRNA 表达情况进行了检测(图 4-A),以 β -actin

```
TTGTCCTGGCGCAACAACATTACCCAAACGTCAGCTGCTACACCAAACTAGTGGGCA
AGGATGTGGCCATGTTTGTCAACTGGTTACAGGCTGAGATGACTATCCTTGGGAGAA
ACTGCATCTGTGTGGGCTTCAGTCTTGGTCTCATGTACAGGAATCGCTGGCCTTCTCA
CCAAACATAAGOTTAACAGAATCACAGGCATGGATCCCGCTGGCCCTAGCTTTGAGTA
CGCAGATGCCAAAGCACTCTTTCCCAAGATGATGCOCTTTTGGTGACGTTCTTCACA
CCAAACTCCCGGCTCTCCAGATCCGAGTATTGGGATTGAGAGGCCAGTGGGCCACAT
AGACATCTAC
```

图 2 草鱼 LPL 基因的部分 cDNA 序列
Fig.2 Partial cDNA sequences of LPL on grass carp

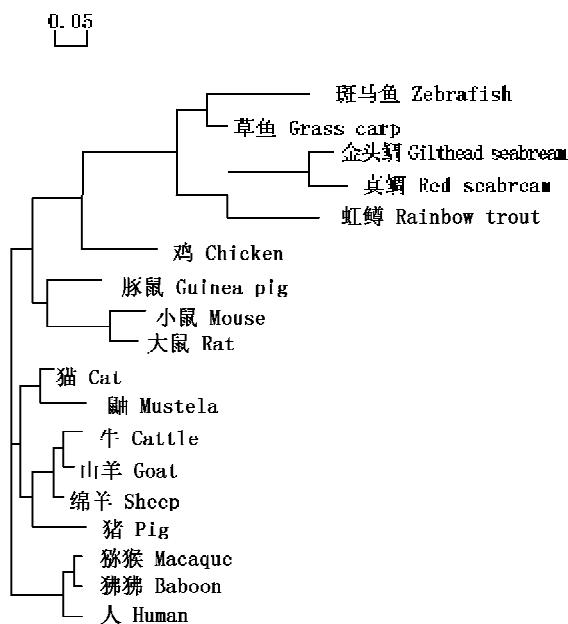


图 3 草鱼 LPL 基因与其它物种 LPL 基因的系统树
Fig.3 Phylogenetic tree of LPL gene between grass carp and other species

基因为内参,所有样品的扩增条带经 Dophin DOC 数据转换系统转换后,每个组织样扩增条带中 LPL 的转换 OD 值与 β -actin 的值相比,即得 LPL 基因的相对表达丰度(图 4-B)。由图 4 可知,LPL 基因在肝胰脏、肌肉、心脏、鳃、脂肪组织中均表达,其中在 IPF 中表达丰度最高,在鳃中表达丰度最低。

为了确认 LPL 在草鱼脂肪细胞分化中的作用,检测了其在成熟脂肪细胞和 SVF 细胞中的表达差异(图 5)。由图 5 可以看出 LPL 在成熟脂肪细胞和 SVF 细胞中均有表达,在成熟脂肪细胞中的表达丰度显著高于 SVF 细胞($P < 0.05$)。

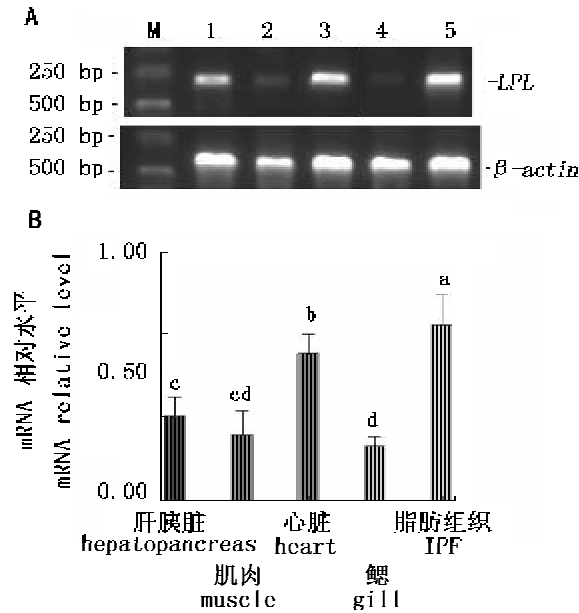


图4 LPL基因在草鱼各组织中的表达
 A. PCR扩增图;1.肝胰脏;2.肌肉;3.心脏;4.鳃;5.脂肪组织;M. Marker DL2000; B. 草鱼每种组织中LPL mRNA相对表达丰度。
 不同字母代表显著性差异($P < 0.05$)

Fig. 4 Expression of LPL gene in each tissue of grass carp

A. Result of PCR amplification; 1. hepatopancreas; 2. muscle; 3. heart; 4. gill; 5. IPF; M. Marker DL2000; B. The relative level of LPL mRNA expression in each tissue from grass carp. Different letters show significant differences ($P < 0.05$)

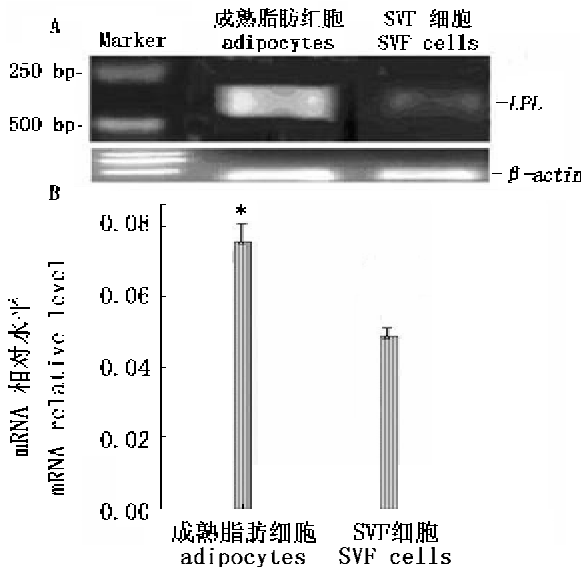


图5 LPL在草鱼成熟脂肪细胞和SVF细胞中的表达
 A. PCR扩增图;B. 草鱼成熟脂肪细胞和SVF细胞中LPL mRNA相对表达丰度。*表示 $P < 0.05$

Fig. 5 Expression of LPL in adipocytes and SVF cells of grass carp

A. Result of PCR amplification; B. The relative level of LPL mRNA expression in adipocytes and SVF cells of grass carp. * means $P < 0.05$

2.3 饥饿和再投喂对草鱼LPL mRNA表达的影响

为了研究LPL基因的营养调节机制,检测了饥饿0 h、12 h、24 h、48 h及再投喂后12 h肝胰脏中LPL mRNA表达水平(图6),并对其表达进行了显著性分析(图7)。从图6和图7可以看出,草鱼饥饿48 h后,LPL mRNA表达水平显著升高,再投喂12 h后,其表达回复到0 h水平。

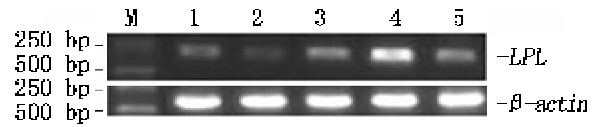


图6 饥饿和再投喂对草鱼LPL mRNA表达的影响
 1.0 h;2.12 h;3.24 h;4.48 h;5.再投喂12 h;M. Marker DL2000

Fig. 6 Effects of fasting on LPL mRNA expression of grass carp

1.0 h; 2.12 h; 3.24 h; 4.48 h; 5.12 h after refeeding; M; Marker DL2000

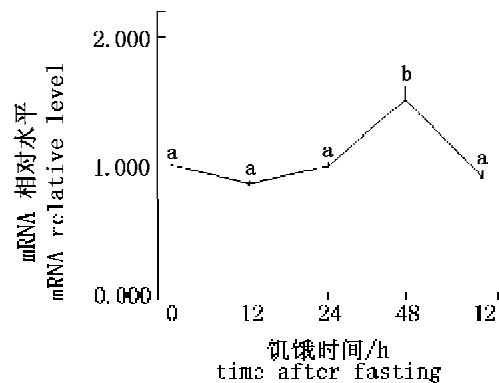


图7 草鱼饥饿48 h及再投喂过程中肝胰脏LPL表达水平的变化

不同字母代表显著性差异($P < 0.05$)

Fig. 7 Changes in the expression levels of grass carp LPL in hepatopancreas during 48 h fasting and the refeeding process

Different letters show significant differences ($P < 0.05$)

3 讨论

动物脂肪沉积的能力主要取决于组织中脂肪的合成与分解强度,还取决于甘油三酯和脂肪酸的转运速度。脂质代谢中,参与合成与分解代谢的脂质均须经过血液中的CM和VLDL等多种脂蛋白的携带完成转运,被转运的甘油三酯到达脂肪和肌肉组织后,需由一系列酶及辅助因子的

参与,分解并释放出脂肪酸,在脂肪组织和肌肉的脂肪细胞中合成脂肪贮存或氧化供能。在这个过程中 *LPL* 发挥着关键的调控作用,它通常以同源二聚体的形式发挥甘油三酯水解酶和在受体介导的脂蛋白摄入时作为配体或桥接因子的双重功能^[13]。

LPL 蛋白具有复杂的功能区域,如 N-连接糖基化位点、脂质及肝磷脂的结合位点等。cDNA 结构分析表明,这些功能区域在物种间高度保守。早在 1987 年,Wion 等^[14]已成功克隆了人的 *LPL* 基因并测序。牛、小鼠、猪、鸡、绵羊等物种的 *LPL* 基因也被成功克隆、测序^[15]。鱼类研究方面,Arnault 等^[1]得到了斑马鱼及虹鳟的 *LPL* 部分 cDNA 序列,Oku 等^[4]采用 Race 法克隆得到了真鲷的 *LPL* cDNA 全长序列并进行了相关研究。探讨 *LPL* 基因的表达情况有助于更好地了解并解决养殖鱼类的脂肪过度沉积问题。

本实验采用 RT-PCR 方法获得了草鱼的 *LPL* 基因部分 cDNA 序列,同其他物种 *LPL* 基因进行同源性分析,发现其与其它物种的同源性为 70% ~ 89%。多重序列比较表明草鱼 *LPL* 基因同斑马鱼 *LPL* 关系较近,这与物种的分类地位相似。草鱼和斑马鱼同为鲤形目(Cypriniformes)鲤科(Cyprinidae)鱼类。

同时发现草鱼 *LPL* 基因在所检测的五种组织(肝胰脏、肌肉、心脏、鳃、IPF)中均有表达,这与 Oku 等^[4]在真鲷上的研究相一致,即 *LPL* 基因在检测的八种组织(肝胰脏、肌肉、心脏、鳃、IPF、性腺、精巢、卵巢)中均表达。说明与哺乳动物肝脏中 *LPL* 低表达的情况不同^[16-18],鱼类 *LPL* 参与各个组织中的代谢调节,这可能是由于鱼类缺乏皮下脂肪层,其主要脂肪蓄积部位是 IPF、肝胰脏及肌肉。*LPL* 在草鱼不同组织中的 mRNA 表达丰度存在差异,在 IPF 中表达丰度最高,在鳃中表达丰度最低。Oku 等^[4]研究发现,真鲷 *LPL* 在肌肉中的表达最低,在其它组织中的表达没有显著差异,这可能是由于草鱼和真鲷的脂肪蓄积模式不同,也可能与研究条件不同有关。

SVF 被认为是经典的前脂肪细胞。Van 等^[19]对 SVF 细胞的系统研究形成了完整的前脂肪细胞理论,证明了 SVF 是具有增殖和向脂肪细胞分化潜能的前脂肪细胞。本研究发现 *LPL* 在草鱼成熟脂肪细胞和草鱼 SVF 细胞中均有表达,

且在成熟脂肪细胞中的表达丰度显著高于 SVF 细胞。这可与屈长青等^[20]、张国华等^[21]等在猪脂肪细胞上得出的规律相印证,即脂肪细胞在分化早期,*LPL* 表达丰度很低,分化中期升高,到分化末期表达丰度最高。

LPL 是哺乳类肥胖基因借以调节机体脂质代谢的重要的功能蛋白,其在哺乳动物上的功能研究已有报道^[22-23],通过控制脂肪组织与其它组织器官 *LPL* 表达水平的高低直接决定各组织器官脂质底物配额的相对量,从而间接决定从食物中摄入脂类的代谢途径,即以体脂形式贮存起来或作为能量底物消耗掉,并最终对机体脂质蓄积状况产生决定性影响。而 *LPL* 在鱼类上的功能研究有限。已有研究表明,饥饿能够下调虹鳟 IPF 中 *LPL* 的酶活性^[8]。另一方面,有研究指出,金头鲷组织中 *LPL* 的基因表达受季节变化影响。其 IPF 和肝胰脏组织 *LPL* 的表达变化基本一致,在春季显著升高,这与其体脂含量的增加相一致。肌肉组织中 *LPL* 的表达在夏季最高,这可能是由于肌肉发育对能量的需求增加以及蛋白分泌有关^[3]。真鲷 *LPL* 基因在肝胰脏存在营养诱导性表达,饥饿、高脂食物均是其表达诱导因子^[4-10],如 Oku 等^[4]发现,随饥饿时间的增加,真鲷 *LPL* mRNA 的表达显著升高,再投喂 6 h 后,其表达回复到 0 h 水平。本研究结果与其相一致,在禁食和再投喂过程中,草鱼肝胰脏 *LPL* mRNA 表达水平在 48 h 显著升高,表明禁食后,肝胰脏对脂质的利用增加。研究结果表明,鱼类 *LPL* 的表达水平不仅仅受外界条件如季节等的影响,还受营养水平的调控,其具体分子机理还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Arnault F, Etienne J, Noe L, et al. Human lipoprotein lipase last exon is not translated, in contrast to lower vertebrates [J]. *J Mol Evo*, 1996, 43:109-115.
- [2] Oku H, Ogata H Y, Liang X F. Organization of the lipoprotein lipase gene of red sea bream *Pagrus major* [J]. *Com Bioche Physio Part B*, 2002, 131: 775-785.
- [3] Saera-Vila A, Calduch-Giner J A, Gomez-Requeni P, et al. Molecular characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) lipoproteins lipase. Transcriptional regulation by season and nutritional

- condition in skeletal muscle and fat storage tissues [J]. *Com Bioche Physio Part B*, 2005, 142:224 - 232.
- [4] Oku H, Koizumi N, Okumura T. Molecular characterization of lipoprotein lipase, hepatic lipase and pancreatic lipase genes: Effects of fasting and refeeding on their gene expression in red sea bream *Pagrus major* [J]. *Com Bioche Physio Part B*, 2006, 145:163 - 178.
- [5] Liang X F, Ogata H Y, Oku H. Effect of dietary fatty acids on lipoprotein lipase gene expression in the liver and visceral adipose tissue of fed and starved red sea bream *Pagrus major* [J]. *Com Bioche Physio Part A*, 2002, 132: 913 - 919.
- [6] Liang X F, Oku H, Ogata H Y. The effects of feeding condition and dietary lipid level on lipoprotein lipase gene expression in liver and visceral adipose tissue of red sea bream *Pagrus major* [J]. *Com Bioche Physio Part A*, 2002, 131: 335 - 342.
- [7] Black D, Skinner E R. Changes in plasma lipoproteins and tissue lipoproteins lipase and salt-resistant lipase activities during spawning in the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) [J]. *Com Biochem Physioy Part B*, 1987, 88:261 - 267.
- [8] Albalat A, Sanchez-Gurmaches J, Gutierrez J, *et al.* Regulation of lipoprotein lipase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2006, 146:226 - 235.
- [9] Kwon J Y, Prat F, Randall C, *et al.* Molecular characterization of putative yolk processing enzymes and their expression during oogenesis and embryogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Biol Reprod*, 2001, 65: 1701 - 1709.
- [10] 梁旭方,白俊杰,劳海华,等. 真鲷脂蛋白脂肪酶基因表达与内脏脂肪蓄积营养调控定量研究[J]. *海洋与湖沼*, 2003, 34(6):625 - 631.
- [11] 梁旭方,李月琴,李贵生,等. 真鲷脂蛋白脂肪酶基因顺式元件 PPRE 及在肝脏活体调控作用[J]. *热带海洋学报*, 2004, 4:49 - 55.
- [12] 刘 茜,吉 红,苏尚顺,等. 草鱼脂肪细胞提取与保存的研究[J]. *水利渔业*, 2007, 27(2): 7 - 8.
- [13] 王 刚,曾勇庆,武 英,等. 猪肌肉组织 LPL 基因表达的发育性变化及其与肌肉脂肪沉积关系的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(3):253 - 257.
- [14] Wion K L, Kirchgessner T G, Lusis A J, *et al.* Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence [J]. *Science*, 1987, 235:1638 - 1641.
- [15] 郑麦青,曹红鹤,李宏滨,等. 脂蛋白脂酶基因的研究进展[J]. *国外畜牧科技*, 2001, 28(1):27 - 30.
- [16] Cooper D A, Stein J C, Strielemann P J, *et al.* Avian adipose lipoprotein lipase: cDNA sequence and reciprocal regulation of mRNA levels in adipose and heart [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 1008(1):92 - 101.
- [17] Kirchgessner T G, Svenson K L, Lusis A J, *et al.* The Sequence of cDNA encoding lipoprotein lipase [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(18):8463 - 8466.
- [18] Senda M, Oka K, Brown W V, *et al.* Molecular cloning and sequence of a cDNA coding for bovine lipoprotein lipase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(13):4369 - 4373.
- [19] Van R L R, Bayliss C E, Roncari D A K. Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture [J]. *J Clin Invest*, 1976, 58(9):699.
- [20] 屈长青,张国华,陈粉粉,等. 猪前体脂肪细胞的原代培养[J]. *农业生物技术学报*, 2005, 13(5): 649 - 653.
- [21] 张国华,屈长青,杨公社. 猪脂肪间充质干细胞的分离培养及其成脂分化[J]. *动物学报*, 2006, 52(5):934 - 941.
- [22] Auwerx J, Leroy P, Schoonjans K. Lipoprotein lipase: recent contributions from molecular biology [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1992, 29:243 - 268.
- [23] Zechner R. The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for energy and lipoprotein metabolism [J]. *Curr Opin Lipidol*, 1997, 8:77 - 88.

Study on the *LPL* gene expression and the influence of fasting and refeeding on it in grass carp, *Ctenopharyngodon idellas*

JI Hong^{1,2}, SU Shang-shun¹, LIU Qian¹, CAO Yan-zi¹,

YANG Gong-she¹, LIN Ya-qiu³, OKU Hiromi⁴

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. Institute of Fisheries Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

3. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;

4. National Research Institute of Aquaculture, Minami-ise, Mie 516-0193, Japan)

Abstract: For the better understanding about the mechanism of lipid metabolism at the molecular level in grass carp *Ctenopharyngodon idellas*, the partial cDNA sequence of lipoprotein lipase (LPL) gene was cloned (GenBank accession number FJ612596), and its expression in different organs, adipocytes, as well as the influence of fasting and refeeding on it in hepatopancreas were studied by means of semi-quantitative (SQ-RT-PCR). The results showed that the obtained cDNA sequence was 360 bp in length, and the homology is 70% – 89% with other species. *LPL* gene is widely expressed in hepatopancreas, muscle, heart, gill, intrapancreal fat body (IPF), mature adipocytes and stromal vascular fraction (SVF) cells, with the highest expression level in IPF, lowest one in gill among the organs ($P < 0.05$), and higher level in mature adipocytes, compared to SVF cells ($P < 0.05$). On the other hand, *LPL* gene expression level significantly increased in hepatopancreas after 48 h fasting and retrieved to the same level as 0 h after 12 h refeeding ($P < 0.05$). It could be concluded that *LPL* gene is widely expressed in various organs and at the initiation and final differentiation stage of adipocyte, regulated by the energy expenditure status, which implies its important role in lipid metabolism in grass carp. The further study on the modification mechanism of *LPL* gene is required in fish.

Key words: grass carp (*Ctenopharyngodon idellas*); lipoprotein lipase; gene expression; fasting