

草鱼 PGC-1 α 基因的表达及饲喂 n-3 HUFAs 对其影响

吉红^{1,2*}, 刘品¹, 李杰¹, 淡荣¹, 杨公社¹

(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)

摘要: 获得了草鱼过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助活化因子 1 α (PGC-1 α) 部分 cDNA 序列 (GenBank 注册号为 HM015283), 并进行了序列同源性分析; 采用实时定量反转录聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 方法, 检测了 PGC-1 α 基因在草鱼不同组织的表达状况; 研究了投喂高不饱和脂肪酸 (HUFAs) 对草鱼肝胰脏 PGC-1 α 基因时序表达的影响。结果显示, 所获得的草鱼 PGC-1 α 基因部分 cDNA 序列长度为 612 bp, 与人、牛、小鼠、斑马鱼和金鱼等动物的同源性为 75% ~ 97%; 该基因在草鱼肝胰脏、肾脏、肌肉、心脏、鳃等 10 个组织中均有表达, 其中在肾脏和心脏中表达丰度最高, 在精巢和脾脏中表达丰度最低; 草鱼摄食 HUFAs 饲料后第 7 天 PGC-1 α 基因的表达水平极显著升高, 随后又迅速下降。研究首次克隆得到草鱼 PGC-1 α 基因部分 cDNA 序列, 并发现该基因在草鱼能量代谢水平高的组织中表达较高, 且其表达受到 HUFAs 的调控, 其时序表达模式为先升高, 然后恢复到正常水平。

关键词: 草鱼; PGC-1 α ; 基因表达; 高不饱和脂肪酸

中图分类号: S 917

文献标识码: A

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 , PGC-1 α) 属于 PGC-1 转录辅助活化因子家族, 可辅助激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor α , PPAR α)、甲状腺受体 (thyroid receptor, TR)、糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR)、雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)、视黄醇 X 受体 (retinoid X receptor, RXR) 等核受体基因的表达^[1], 参与适应性产热、葡萄糖摄取、肝脏糖异生、肝脏脂肪酸 β 氧化、脂肪细胞分化、肌肉类型转换等多种代谢过程。由于 PGC-1 α 基因参与调控线粒体的生成^[2], 因此被认为是一种线粒体功能基因。

对人、小鼠和猪等陆生动物的 PGC-1 α 基因已有较多研究, Yoon 等^[3]证明 PGC-1 α 基因通过胰

岛素诱导的 cAMP 体系在肝脏糖异生作用中发挥关键作用。马仕坤等^[4]利用细菌内同源重组的方法成功构建了编码小鼠 PGC-1 α 基因的重组腺病毒载体, 并观察了其蛋白表达。水产动物方面, 已克隆得到斑马鱼 (*Danio rerio*)、金鱼 (*Carassius auratus*)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)、南极岩斑鲑 (*Chionodraco rastrospinosus*) 等鱼类 PGC-1 α 基因的部分序列。LeMoine 等^[5]探究了温度、饥饿和油脂水平对金鱼 PGC-1 家族基因表达的影响。

高不饱和脂肪酸 (highly unsaturated fatty acids, HUFAs) 对鱼类脂质代谢有较大的调控作用。Ji 等^[6]和 Om 等^[7]发现在日粮中添加二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 可抑制黑鲷脂质合成并促进其脂质利用。吉红等^[8]证实 HUFAs 能够抑制草鱼脂质合成及其转运的能力, 并可降低其肝胰脏及腹腔脂肪的沉积。HUFAs 作为转录因子的配体可调控脂质代谢相关基因的

收稿日期: 2010-06-28 修回日期: 2010-07-15

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; 中国博士后基金项目 (20080431254)

通讯作者: 吉红, Tel: 029-87092585, E-mail: jihong@nwsuaf.edu.cn

表达,如抑制乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC)、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS) 等脂肪酸合成酶系基因的表达,促进肉碱棕榈酰转移酶 I (carnitine palmitoyl-transferase, CPT I)、羟甲基戊二酰辅酶 A (hydroxymethylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 等脂肪酸氧化酶系基因的表达^[9]。而探讨 PGC-1 α 与 HUFAs 关系的研究仅见 Flachs 等^[10] 在小鼠上的报道。

本试验采用 RT-PCR 技术克隆草鱼 PGC-1 α 基因的部分 cDNA 序列,研究其在草鱼不同组织中的表达状况,并评估 HUFAs 对草鱼肝胰脏 PGC-1 α 基因表达的影响,以期为进一步探讨 PGC-1 α 的功能、作用机理以及与草鱼脂质蓄积的关系的研究提供参考资料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

用于 PGC-1 α 基因克隆和组织表达的草鱼 (500 ~ 800 g) 购自陕西杨凌康乐路水产品市场,4 尾试验鱼购回后立即解剖取其肝胰脏、脑、心、肌肉、肠、脂肪组织等 10 个组织,液氮浇冻后于 -80 °C 保存备用。

饲养试验用鱼由西北农林科技大学安康水产试验示范站提供,挑选体重为 (10 \pm 2) g 的 64 尾鱼随机分到 4 个水族箱 (110 cm \times 60 cm \times 40 cm) 中,用加热棒将水温控制在 (28 \pm 1) °C,光周期为 12L:12D。根据暖水性鱼类半精制典型试验配方 (Lovell^[11]),制作等氮等能的两组饲料,具体配方及营养水平见表 1。精制鱼油购自无锡迅达海洋生物制品厂,亚麻油购自大连圣基生物制品有限公司,大豆油购自西安嘉里油脂工业有限公司。氨基酸混合物、混合无机盐及混合维生素均参照文献 [6, 11]。各原料均粉碎过 60 目筛,将原料按比例混匀后压制成直径 2 mm,长 3 mm 颗粒,于冰箱冷藏保存,随用随取。

饲养试验前用对照组饲料驯养 1 周,正式饲养时间为 4 周,每晚清污。饲喂后第 7、14、21、28 天从每缸中随机捞出 4 尾鱼,断脊髓处死后,迅速取其肝胰脏,液氮浇冻后 -80 °C 保存。

1.2 主要试剂

RNAVzol (威格拉斯公司),氯仿,异丙醇,无水乙醇,反转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶

(Fermentas 公司),DNA 回收试剂盒 (天为时代),PMD19T 载体、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 荧光染料 (TaKaRa 公司)。

1.3 草鱼 PGC-1 α 基因克隆及序列分析

根据 GenBank 中斑马鱼 (登录号:AY998087)、金鱼 (登录号:EU426842)、红鳍东方鲀 (登录号:DQ157766) 等的 PGC-1 α 保守序列设计引物,并在上海生物工程技术服务有限公司合成 (表 2)。RNAVzol 试剂盒提取草鱼肝胰脏总 RNA,利用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。取 1 μ L 提取的总 RNA 进行 cDNA 的合成,按 Fermentas Revert Aid TM First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒推荐的方法以 Oligo dT 为引物合成 cDNA 第一链。

25 μ L PCR 反应体系为 ddH₂O 16.85 μ L, 2.5 mmol/L dNTP Mix 2 μ L, PCR Buffer (NH)₂ SO₄ 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, cDNA 1 μ L, 25 μ mol/L Primer I 0.5 μ L, 25 μ mol/L Primer II 0.5 μ L, 0.5 U/ μ L Taq DNA Polymerase 0.15 μ L。

PCR 程序:94 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 45 s, 40 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 DNA 片段在 T₄ 连接酶的作用下,16 °C 连接 4 h,使其连接到 pMD19-T 载体上 (TaKaRa 公司),随后将连接产物转化到感受态细胞 *Escherichia coli* DH 5 α 后筛选阳性克隆,接种于 10 mL LB 培养基中,过夜培养后菌液 PCR 方法鉴定其转化结果。鉴定为阳性的菌液由上海生物工程技术服务有限公司测序。测序后采用 DNAMAN 软件进行序列同源性比对,用 MEGA 软件制作物种系统进化树制作。

1.4 荧光实时定量 PCR 检测 PGC-1 α 基因表达

组织差异表达 根据克隆得到的草鱼 PGC-1 α 基因 cDNA 的序列,用 Primer Express v2.0 设计并在上海生物工程技术服务有限公司合成了实时定量 PCR 特异引物 (表 2)。采用 qRT-PCR 检测 PGC-1 α 基因在草鱼不同组织中的表达情况。

提取草鱼各组织 RNA,参照逆转录试剂盒 (TaKaRa, China) 说明进行反转录。实时定量检测利用 CFX96 实时定量 PCR 检测系统 (Bio-Rad, USA) 进行,反应体系为 20 μ L:0.6 μ L 10 mmol/ μ L 的上下游引物、1 μ L 逆转录产物、10 μ L 2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II S、7.8 μ L 灭菌水。

表 1 试验饲料配方、营养组成和主要脂肪酸组成
Tab. 1 Formulation, proximate composition and major fatty acid composition of the experimental diets

饲料配方 (g/kg) formulation	试验组 experimental group		饲料配方 (g/kg) formulation	试验组 experimental group	
	对照组 control group	HUFAs 组 HUFAs group		对照组 control group	HUFAs 组 HUFAs group
酪蛋白 casein	320	320	概率养分 (%) proximate composition		
明胶 gelatin	80	80	粗蛋白 crude protein	362.14	361.37
糊精 dextrin	280	280	粗脂肪 crude lipid	49	49.1
纤维素 cellulose	150	150	水分 moisture	88.5	94.0
猪油 lard	20	10	灰分 ash	56.1	56.2
大豆油 soybean oil	15	15	主要脂肪酸 (% 总脂肪酸) major fatty acid		
菜籽油 linseed oil	15	15	C18:2n-6	25.03	24.11
鱼油 fish oil	0	10	C18:3n-3	19.53	20.34
羧甲基纤维素钠 carboxymethylcellulose	20	20	C20:5n-3	-	2.99
混合无机盐 ^a mineral mix	40	40	C22:6n-3	-	2.19
混合维生素 ^b vitamin mix	10	10	Σ PUFA ^d	25.03	24.30
氨基酸混合物 ^c amino acid mixture	40	40	DHA + EPA	-	5.18
抗坏血酸磷酸酯 ascorbic phosphate ester	10	10	DHA/EPA	-	0.73
			n-3 HUFAs	-	6.12
			n-3/n-6	0.78	1.09

注: a. 混合无机盐 (g/100 g) 硫酸铝钾 0.159, 碳酸钙 18.101, 磷酸二氢钙 44.601, 氯化钴 0.07, 硫酸镁 5.216, 硫酸锰 0.07, 氯化钾 16.553, 碘化钾 0.014, 碳酸锌 0.192, 磷酸二氢钠 13.605, 硒酸钠 0.006, 硫酸铜 0.075, 柠檬酸铁 1.338; b. 混合维生素 (mg/100 g) 硫胺素 5, 核黄素 5, 维生素 A 2 500 IU, 维生素 E 40, 维生素 D₃ 2 400 IU, 甲萘醌 4, 盐酸吡哆醇 4, 氰钴胺 0.01, 生物素 0.6, 泛酸钙 10, 叶酸 1.5, 烟酸 20, 肌醇 200; c. 氨基酸混合物 (g/100 g) L-色氨酸 0.2, L-苯丙氨酸 0.6, L-天门冬氨酸 1.0; L-缬氨酸 0.7, L-精氨酸 1.5, d. 多不饱和脂肪酸。
Notes: a. Mineral mixture (g/100 g of diet) KAl(SO₄)₃ 0.159, CaCO₃ 18.101, CaH₂PO₄ 44.601, CoCl₂ 0.070, MgSO₄ 5.216, MnSO₄ · H₂O 0.070, KCl 16.553, KI 0.014, ZnCO₃ 0.192, NaH₂PO₄ 13.605, Na₂SeO₃ 0.006, CuSO₄ · 5H₂O 0.075, Ferric citrate 1.338; b. Vitamin mix contained (mg/100 g of diet) thiamine 5; riboflavin 5; vitamin A 2 500 IU; vitamin E 40; vitamin D₃ 2 400 IU; menadione 4; pyridoxine HCl 4; cyanocobalamin 0.01; biotin 0.6; calcium pantothenate 10; folic acid 1.5; niacin 20; inositol 200; and cellulose was used as a carrier; c. Amino acid mixture (g/100 g of diet) L-tryptophane 0.2; L-phenylalanine 0.6; L-aspartic acid 1.0; L-valine 0.7; L-arginine 1.5; d. Polyunsaturated fatty acids.

表 2 PGC-1 α 基因克隆及实时定量检测引物
Tab. 2 Primers used for clone and quantitative real-time PCR

	基因扩增引物 primer (5'-3')	PCR 产物 (bp) product
PGC-1 α	上游: GTGGAGAGAACTAGAGTGTGCTG 下游: GTCGCTAGAGGTGAGGTACTTG	612
实时定量检测 qRT-PCR		
PGC-1 α	上游: GATGTCAGTGACCTCGATGCA 下游: CAGCAAGTTGGCCTCATTTC	143
β -actin	上游: CGTGACATCAAGGAGAAG 下游: GAGTTGAAGGTGGTCTCAT	288

注: β -actin 引物序列参照 Li 等^[12]。

Notes: The primer sequence of β -actin was referred to Li *et al*^[12].

反应条件为 95 °C, 10 s; 95 °C, 15 s; 57 °C, 15 s; 40 个循环。根据扩增曲线得到的 Ct 值 (荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数), 计算出目标基因 PGC-1 α 和对照基因 β -actin Ct 值的差异 Δ Ct; 进而以差异最大的样本作为参照样本, 计算

出不同样品相对于参照样本基因表达倍数 $2^{\Delta\Delta Ct}$, 从而制作出相对定量的图表。

饲喂后肝胰脏时序表达 提取饲养前和饲养 4 周的试验鱼肝胰脏 RNA, 进行反转录, 荧光实时定量 PCR 法检测试验鱼肝胰脏 PGC-1 α 基因的时序表达变化, 方法同组织差异表达中检测方法。

1.5 数据分析

采用 SPSS 13.0 软件, 所得数据用平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 采用 ANOVA 和 *t* 检验进行显著性检验分析, 当 $P < 0.05$ 时, 认为差异显著, 当 $P < 0.01$ 时, 认为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 草鱼 PGC-1 α 基因部分 cDNA 的克隆及序列分析

RNAVzol 提取草鱼肝胰脏 RNA 并进行质量检测 (图 1), 反转录后 RT-PCR 方法对 PGC-1 α

基因进行扩增,获得一条特异的扩增条带,测序得其大小为 612 bp,与预期片段大小一致,如图 2 所示。

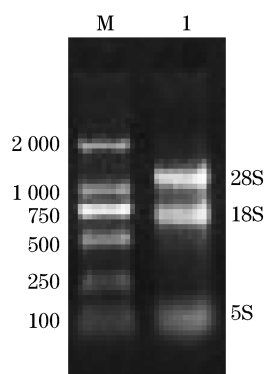


图 1 草鱼肝脏 RNA 的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis profiles of total RNA from hepatopancrease of grass carp

M. Marker DL2000; 1. RNA.

将获得的特异扩增序列经胶回收和双向测定后,得到其核苷酸和蛋白序列(图 3)。运用 DNAMAN 软件获得的基因序列同金鱼 PGC-1 α

基因核苷酸序列进行同源性比对分析,其同源性为 97%。同斑马鱼、红鳍东方鲀、恒源猴(*Macaca mulatta*)、猪(*Sus scrofa*)、小鼠(*Mus musculus*)、狗(*Canis familiaris*)、人(*Homo sapiens*)的等物种核苷酸同源性分别为 90%, 82%, 77%, 77%, 76%, 75%, 75%, 71% 并制作系统树(图 4)。可确定所得序列为草鱼 PGC-1 α 基因部分序列。

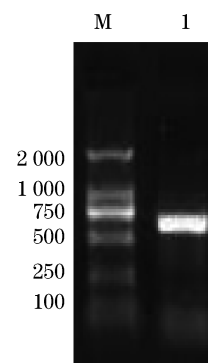


图 2 草鱼肝脏 PGC-1 α 基因的扩增条带图谱

Fig. 2 RT-PCR results of PGC-1 α gene from hepatopancrease of grass carp

M. Marker DL2000; 1. Amplification of purpose strap.

```

1  TGGAGAGAACTAGAGTGTGCTGCCTTGGTTGGTGAAGACCAGCCCCTTTGCCCTGACCTGCCTGAGCTTGACCTCTCTGAGCTGGATGTC
1  W R E L E C A A L V G E D Q P L C P D L P E L D L S E L D V
91  AGTGACCTCGATGCAGATAGCTTTCTGGGAGGACTCAAGTGGTACAGCGACCAATCAGAAATCATTCCAGTCAGTATGGCAATGAGGCA
31  S D L D A D S F L G G L K W Y S D Q S E I I S S Q Y G N E A
181 TCAAACCTGTTTGAAGATAGATGAGGAAAATGAGGCCAACTTGCTGGCAGTGCTCACAGAAACCTGGACAGTATCCAGTGGACGAA
61  S N L F E K I D E E N E A N L L A V L T E T L D S I P V D E
271 GACGGTTTGCCTTCGTTTCGAGGCCCTGGCAGATGGGACGTGACCAATGCCAGTGATCAGAGCTGTCCTTCCACCCCGATGGCTCGCCA
91  D G L P S F E A L A D G D V T N A S D Q S C P S T P D G S P
361 CGGACCCAGAGCCAGAGGAGCCTTCCCTGCTGAAGAAGCTCCTCCTGGCGCCTGCTAACTCCAGCTCAGCTATAATCAATACCCAGGT
121 R T P E P E E P S L L K K L L L A P A N S Q L S Y N Q Y P G
451 GGCAAGGCACAGAACCATGCAGCCAGCAACCAACGGATCAGACCAACACCTGCTGTTGCCAAGACAGAAAACCTTGGAACAGCAAACCA
151 G K A Q N H A A S N Q R I R P T P A V A K T E N P W N S K P
541 CGAGGGCCTGTCCCAACCGTCTGTGAGACACCCCTTGCACTGAGCTGCTCAAGTACCTCACCTCTAGCGAC
181 R G A C P N R S V R H P C T E L L K Y L T S S D

```

图 3 草鱼 PGC-1 α 基因的部分 cDNA 及氨基酸序列

Fig. 3 Partial sequences(cDNA and protein) of PGC-1 α of grass carp

2.2 PGC-1 α 基因在草鱼各组织中的表达

采用 qRT-PCR 方法,对草鱼各组织的 PGC-1 α mRNA 丰度进行检测(图 5),由图 5 可知,PGC-1 α 基因在肾脏、心脏表达量最高,在肝胰脏、肌肉、心脏、鳃、肠道中表达量次之,在脂肪、脾脏和精巢表达量最低。

2.3 饲喂 HUFA 对草鱼肝胰脏 PGC-1 α 基因时序表达的影响

由图 6 可知,整个饲喂过程中,对照组草鱼肝胰脏 PGC-1 α 基因的表达量比较稳定,而试验组

在饲喂后的第 7 天出现一个峰值,随后又下降。

组间比较显示,饲喂后的第 7 天试验组 PGC-1 α 基因相对表达量极显著高于对照组($P < 0.01$),而在饲喂过程中的第 14、21 和 28 天 PGC-1 α 基因表达量在两组之间差异不显著($P > 0.05$)。

3 讨论

PGC-1 家族成员主要参与调控能量代谢的多个方面如线粒体生成、糖异生和脂质代谢^[13]。

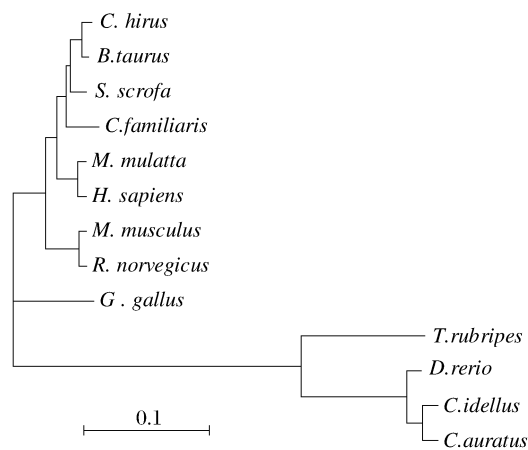


图 4 PGC-1 α 基因氨基酸序列系统树

Fig. 4 PGC-1 α gene relationship from different species was shown in a phylogenetic tree

所用序列的 GenBank 登录号为山羊 (*C. hircus*, GenBank: EU304457), 欧洲牛 (*B. taurus*, GenBank: BC151326), 野猪 (*S. scrofa*, GenBank: NM213963), 家犬 (*C. familiaris*, GenBank: XM_859277), 恒河猴 (*M. mulatta*, GenBank: XM_001105289), 人 (*H. sapiens*, GenBank: NM013261), 小家鼠 (*M. musculus*, GenBank: NM_008904), 褐家鼠 (*R. norvegicus*, GenBank: NM_031347), 原鸡 (*G. gallus*, GenBank: NM_001006457), 红鳍东方鲀 (*T. rubripes*, GenBank: DQ157766), 斑马鱼 (*D. rerio*, GenBank: AY998087), 草鱼 (*C. idellus*, GenBank: HM015283), 金鱼 (*C. auratus*, GenBank: EU426842)。

Rodgers 等^[14]认为线粒体相关基因中, PGC-1 家族主要是调控线粒体生成, 氧化代谢和葡萄糖、脂质和能量间的平衡。

目前 PGC-1 α 在哺乳动物中研究较多, 而在

鱼类上研究较少。对草鱼 PGC-1 α 基因部分 cDNA 序列进行克隆是研究其在草鱼代谢中作用的基础。本试验获得的片段同 GenBank 上已发表的人、褐家鼠、小家鼠、野猪等哺乳动物序列进行比对分析, 其同源性为 75% ~ 77%, 将其与几种鱼类上获得的片段进行比对, 其同源性在 80% ~ 97%, 表明所得 PGC-1 α 基因片段有较高保守性。

PGC-1 α 基因的表达具有明显组织特异性, 在有高能量需求及线粒体丰富的组织中表达水平相对较高, 且传递能量代谢需求的信号可诱导其水平升高^[15]。研究发现 PGC-1 α 基因在心、肾、棕色脂肪组织、肝脏及脑组织中都有所表达, 以协同调节代谢途径和生物过程^[16]。PGC-1 α 基因在本试验检测的 10 个草鱼组织中均有表达, 其中在心脏和肾脏的表达量最高, 显著高于其他 8 个组织。Larrouy 等^[17]发现 PGC-1 α 基因在人的肾脏和肝脏中的表达量较高, 在大肠、小肠和脂肪组织中表达量较低, 本研究结果与其相近。

一般认为, PGC-1 α 基因的表达可以反映出细胞的能量需求以及能量需求增加的状态, 如寒冷、饥饿以及机械运动。Puigserver 等^[18]指出低温处理后小鼠棕色脂肪组织 PGC-1 α 基因的表达显著升高, 但是温度对该基因在白色脂肪、肝脏、心脏和肾脏中的表达没有影响。LeMoine 等^[5]研究发现温度影响金鱼 PGC-1 α 基因在红肌和白肌中的表达, 但是对肝胰脏和心脏 PGC-1 α 基因的表达影响不大, 而饥饿能显著提高 PGC-1 α 基因的表达。

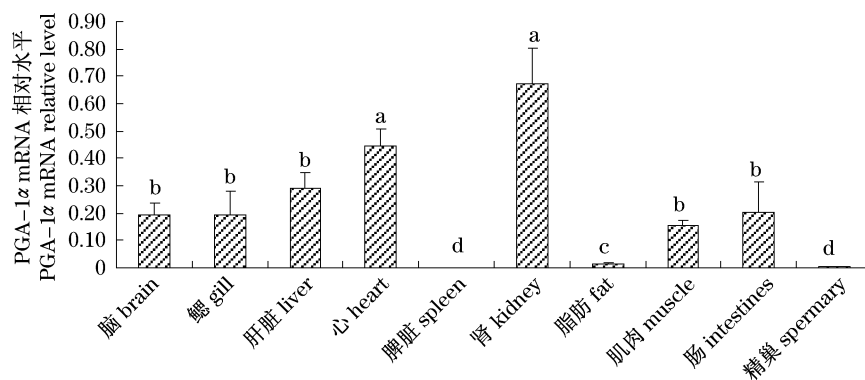


图 5 PGC-1 α 基因在草鱼不同组织的表达

字母不同代表差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 Tissue expression of PGC-1 α gene in grass carp

Different letter means significant difference ($P < 0.05$).

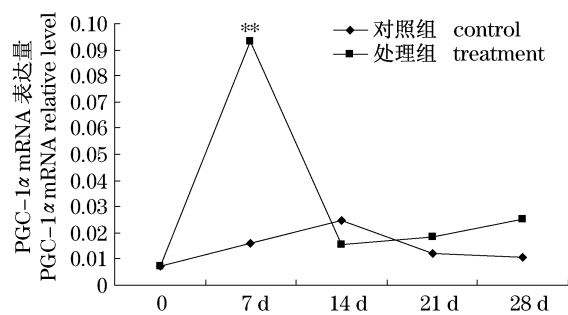


图6 HUFAs对草鱼肝脏中PGC-1 α 基因
时序表达的影响

** 代表差异极显著($P < 0.01$)。

Fig. 6 Effect of HUFAs on PGC-1 α expression
in grass carp hepatopancreas

** Represents difference was extremely significant($P < 0.01$).

鱼类终生在水中生活,其肾脏除了有泌尿的功能之外,还可调节并维持体液平衡。作为淡水鱼类,草鱼的体液浓度大于外界水环境,为了保证进入鱼体的水不会影响其正常代谢,肾脏必须旺盛代谢,因此需要能量较多,PGC-1 α 基因的表达量较高。与陆生动物相比,鱼类生活在水中的特点使其在维持体位等方面消耗的能量较少,因此推测肌肉中线粒体活跃程度也相应弱一些,PGC-1 α 的表达水平相对较低。且草鱼属于无胃类动物,消化作用主要是在肠道中进行,因此肠道负担较重,需要大量供能。鱼类的鳃担负着呼吸和排泄代谢废物的作用,也需要大量供能。本试验中,PGC-1 α 在草鱼的脾脏、脂肪组织和精巢中的表达量很低。脾脏是主要的免疫器官、脂肪组织和精巢主要是能量储备器官因此代谢不是很旺盛,相应的PGC-1 α 的表达较低。

HUFAs作为一种重要营养物质,可通过影响动物体内多种与脂肪代谢有关酶的基因表达调节动物的脂肪代谢。Al-Hasani等^[19]研究发现n-3 HUFAs能够抑制小鼠体内脂肪酸合成,促进脂肪酸的 β 氧化,减少甘油三酯的合成。Madsen等^[20]也发现饲喂富含n-3 HUFAs的日粮能减少小鼠白色脂肪的量,抑制肥胖的发生。而Todorčević等^[21]在离体条件下发现n-3 HUFAs能够抑制大西洋鲑(*Salmo salar*)前体脂肪细胞的分化和脂质的积累。

另外,HUFAs能够影响到线粒体的功能,Kjær等^[22]证明饲料中添加HUFAs会引起线粒体功能基因酰基辅酶A氧化酶(acyl-CoA oxidase, ACO)和肉碱棕榈酰转移酶II(carnitine

palmitoyltransferase, CPT-II)的表达升高以及线粒体膜磷脂组成的变化,Flachs等^[10]研究发现DHA和二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)能够上调小鼠白色脂肪组织的线粒体生成和 β 氧化,同时发现线粒体相关基因PGC-1 α 和氧化代谢基因核呼吸因子(nuclear respiratory factor-1, Nrf-1)的表达上调了3倍。Desvergne等^[23]研究证明HUFAs能够通过激活PPAR α 上调CPT-I、ACO等 β 氧化相关基因的表达。本试验中,饲喂n-3 HUFAs的日粮后第7天,试验鱼肝胰脏PGC-1 α 基因表达量显著升高,推断n-3 HUFAs可能通过诱导PGC-1 α 等线粒体相关基因的表达影响其线粒体的生成以及脂肪酸的 β -氧化。而随后PGC-1 α 基因表达量下降的结果与Coulter等^[24]在小鼠上的相关报道一致,该研究发现小鼠在冷刺激1d内PGC-1 α 的表达量迅速升高,但是在随后的3d内又降了下来,表明PGC-1 α 受外界因素影响是瞬时的,当其所调控的代谢达到机体需要的水平后,其转录强度又会恢复到正常水平。

参考文献:

- [1] Puigserver P, Spiegelman B M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator [J]. *Endocrine Reviews*, 2003, 24 (1): 78-90.
- [2] Liang H Y, Bai Y D, Li Y F, et al. PGC-1-induced mitochondrial alterations in 3T3 fibroblast cells [J]. *New York Academy of Sciences*, 2007, 1100 (1): 264-279.
- [3] Yoon C J, Puigserver P, Chen G X, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1 [J]. *Nature*, 2001, 413 (6852): 131-138.
- [4] 马仕坤, 钟立, 程庆丰, 等. 编码小鼠 PGC-1 α 基因的重组腺病毒载体构建及鉴定 [J]. *重庆医科大学学报*, 2009 (1): 6-8.
- [5] LeMoine C M R, Genge C E, Moyes C D. Role of the PGC-1 family in the metabolic adaptation of goldfish to diet and temperature [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2008, 211 (9): 1448-1455.
- [6] Ji H, Om A D, Yoshimatsu T, et al. Effect of dietary docosahexaenoic acid on lipogenesis and lipolysis in black sea bream *Acanthopagrus schlegelii* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, 26 (1): 112-121.

- [7] Om A D, Umino T, Nakagawa H, *et al.* The effect of dietary EPA and DHA fortificati on lipolysis activity and physiological function in juvenile black sea bream *Acanthopagrus schlegeli* [J]. *Aquaculture Research*, 2001, 32 (Suppl. 1) : 255 - 262.
- [8] 吉红,曹艳姿,刘品,等. 饲料中 HUFA 影响草鱼质代谢的研究 [J]. *水生生物学报*, 2009, 33 (5) : 881 - 889.
- [9] 黄艳玲,罗绪刚. 饲料脂肪酸对脂肪代谢酶有关基因表达的影响 [J]. *动物营养学报*, 2005, 17 (4) : 1 - 5.
- [10] Flachs P, Horakova O, Brauner P, *et al.* Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat [J]. *Diabetologia*, 2005, 48 (11) : 2365 - 2375.
- [11] Lovell T. *Nutrition and feeding of fish* [M]. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989.
- [12] Li G G, Liang X F, Xie Q, *et al.* Gene structure, recombinant expression and functional characterization of grass carp leptin [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 166 (1) : 117 - 127.
- [13] Finck B N, Kelly D P. PGC-1 α coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116 (3) : 615 - 622.
- [14] Rodgers J T, Lerin C, Haas W, Gygi S P, *et al.* Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1 [J]. *Nature*, 2005, 434 (7029) : 113 - 118.
- [15] Knutti D, Kralli A. PGC-1, a versatile coactivator [J]. *Trends in Endocrinology Metabolism*, 2001, 12 (8) : 360 - 365.
- [16] Picard F, Gehin M, Annicotte J S, *et al.* SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues [J]. *Cell*, 2002, 111 (7) : 31 - 41.
- [17] Larrouy D, Vidal H, Andreelli F, *et al.* Cloning and mRNA tissue distribution of human PPAR γ coactivator-1 [J]. *International Journal of Obesity*, 1999, 23 (12) : 1327 - 1332.
- [18] Puigserver P, Wu ZH D, Cheol Won Park, *et al.* A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis [J]. *Cell*, 1998, 92 (6) : 829 - 839.
- [19] Al-Hasani H, Joost H G. Nutrition/diet induced changes in gene expression in white adipose tissue [J]. *Best Pract. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2005, 19 (4) : 589 - 603.
- [20] Madsen L, Petersen R K, Kristiansen K. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1740 (2) : 266 - 286.
- [21] Todorčević M, Vegusdal A, GjØen T, *et al.* Changes in fatty acids metabolism during differentiation of Atlantic salmon preadipocytes; effects of n-3 and n-9 fatty acids [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1781 (6 - 7) : 326 - 335.
- [22] Kjør M A, Todorčević M, Torstensen B E, *et al.* Dietary n-3 HUFA affects mitochondrial fatty acid beta-oxidation capacity and susceptibility to oxidative stress in Atlantic salmon [J]. *Lipids*, 2008, 43 (9) : 813 - 827.
- [23] Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism [J]. *Endocrine Reviews*, 1999, 20 (5) : 649 - 688.
- [24] Coulter A A, Bearden C M, Liu X T, *et al.* Dietary fat interacts with QTLs controlling induction of Pgc-1 and Ucp-1 during conversion of white to brown fat [J]. *Physiological Genomics*, 2003, 14 (2) : 139 - 147.

PGC-1 α gene expression and the influence of dietary n-3 HUFAs in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

JI Hong^{1,2*}, LIU Pin¹, LI Jie¹, DAN Rong¹, YANG Gong-she¹

(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)

Abstract: The partial cDNA of peroxisome proliferator activated receptor-gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 α) was cloned (GenBank accession number HM015283), and the homologous alignment was analyzed. The expression in different organs of PGC-1 α was detected in grass carp with the methods of qRT-PCR. The influence of dietary highly unsaturated fatty acids (HUFAs) on the temporal expression of PGC-1 α in hepatopancreas of grass carp was also studied. The results showed that the obtained cDNA sequence was 612 bp in length, and its homology with human, cow, mice, zebra fish and other species is 75% – 97%; and it is revealed that PGC-1 α is widely expressed in hepatopancreas, kidney, muscle, heart, gill, and so on, with the highest expression level observed in kidney and heart, lowest in spermary and spleen. After six days feeding with HUFAs contained diet, the expression level of PGC-1 α was significantly increased, then descended quickly in the following days. Our results indicate that PGC-1 α is mainly express in high energy generating tissues and its expression level described as could be regulated by HUFAs. The expression pattern of PGC-1 α induced by dietary HUFAs could be rising at first then going down back to the normal level.

Key words: grass carp; PGC-1 α ; gene expression; highly unsaturated fatty acids (HUFAs)

Corresponding author: JI Hong. E-mail: jihong@nwsuaf.edu.cn