

文章编号: 1000-0615(2012)05-0732-08

DOI:10.3724/SP.J.1231.2012.27708

草鱼 ATGL 基因的表达及饲喂 n-3 HUFAs 对其的影响

吉 红^{1,2*}, 黄吉芹¹, 刘 品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: 实验获得了草鱼脂肪组织甘油三酯水解酶(ATGL) 部分 cDNA 序列(GenBank 登录号为 HQ845211), 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 ATGL 基因在草鱼不同组织的表达状况; 研究了投喂 n-3 高不饱和脂肪酸(n-3 HUFAs)对草鱼肝胰脏 ATGL 基因时序表达的影响。结果显示, 所获得的草鱼 ATGL 基因部分 cDNA 序列长度为 687 bp, 与人、牛、小鼠、长腭泥鳅虎鱼、大黄鱼等物种的同源性为 65%~75%; 该基因在草鱼心脏、肝胰脏、脾脏、鳃、肾脏、肌肉、腹腔脂肪组织、脑、小肠、精巢 10 个组织中均有表达, 其中在腹腔脂肪组织中表达丰度最高, 在肝胰脏和肌肉中表达丰度次之。处理组草鱼摄食 n-3 HUFAs 饲料后, ATGL 基因的表达水平在第 1 周和第 2 周显著高于对照组, 第 3 周后, 该基因的表达水平在处理组与对照组间无显著差异。研究首次克隆得到草鱼 ATGL 基因部分 cDNA 序列, 并发现该基因在草鱼脂质蓄积及代谢较旺盛的组织中表达水平较高, 且其在肝胰脏中的表达受到 n-3 HUFAs 的影响, 其规律为先被诱导升高, 然后回复到正常水平。

关键词: 草鱼; 甘油三酯水解酶; 高不饱和脂肪酸; 基因表达

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

长期以来, 激素敏感脂肪酶(hormone-sensitive lipase, HSL) 被认为是脂肪分解主要限速酶^[1], 而敲除 HSL 基因的小鼠饲喂高脂日粮后, 白色脂肪组织甘油三酯水解酶活性保留了近 40%^[2], 且脂肪组织内有大量甘油二酯堆积^[3], 因此, 人们推测在脂肪细胞中还存在着其它甘油三酯水解酶。随后, Zimmermann 等^[4]和 Jenkins 等^[5]根据已知脂肪酶的特征性模序“GXSG”和“ α/β 水解酶折叠”, 几乎同时发现了一种新的甘油三酯水解酶, 并分别将其命名为“脂肪组织甘油三酯水解酶(adipose triglyceride lipase, ATGL)”和“iPLA2 ζ ”, 现普遍把该脂肪酶统一命名为 ATGL。由于 ATGL 含有脂肪酶的特征性功能结构域 Patatin, 也被称为 PNPLA2^[6]。ATGL 是一种催化甘油三酯第一步水解的重要脂

肪酶, 它能特异性地水解甘油三酯为甘油二酯^[7], 从而影响动物体脂肪沉积。对人、小鼠和猪等陆生动物的 ATGL 基因已有较多研究, Jenkins 等^[5]发现人的脂肪细胞中 ATGL 表达量随着脂肪细胞分化不断升高, 并在人的脂肪肉瘤细胞中也有表达。Langin 等^[8]对肥胖和正常人皮下脂肪组织进行比较测定, 发现肥胖人 ATGL 表达量低于正常人。敲除 ATGL 的小鼠脂肪组织量明显提高, 并且在多个组织中表现出甘油三酯堆积的现象^[9], 揭示了 ATGL 在脂肪分解中的重要作用。在鱼类方面, 仅可在 GenBank 中检索到长腭泥鳅虎鱼(*Gillichthys mirabilis*)和大黄鱼(*Larimichthys crocea*) ATGL 基因片段的资料, 尚无相关研究的报道。

n-3 高不饱和脂肪酸(highly unsaturated fatty

收稿日期: 2011-08-27 修回日期: 2011-12-27
资助项目: 国家自然科学基金项目(31072223)
通讯作者: 吉 红, E-mail: jihong0405@hotmail.com

acids, n-3 HUFAs)是动物体维持细胞膜结构和机能完整性所必需的一类物质,对鱼类脂质代谢也具有重要的调控作用。研究发现, n-3 HUFAs 对黑鲷(*Sparus macrocephalus*)^[10]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[11-12]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[13]等养殖鱼类的脂肪蓄积均有显著的抑制作用,其作用机制与其可抑制脂肪酸合成酶活力^[14]及促进脂肪酸 β 氧化^[15],调控鱼类 G6PDH^[16], LPL^[11], PPAR γ ^[17], HSL^[14]等脂代谢相关基因的表达有关。Ji 等^[18]最近的研究指出,日粮中添加 n-3 HUFAs 能显著促进草鱼的生长性能和脂质代谢,日粮中含有 0.52% n-3 HUFAs 能获得最大体增重,但过量的 n-3 HUFAs 会带来负面效应。上述有关 n-3 HUFAs 与鱼类脂质代谢关系的研究多涉及脂质运输、合成和氧化利用途径,对脂质水解环节的研究仅见马晶晶等^[14]关于 HSL 的报道,而 n-3 HUFAs 对 ATGL 影响的研究尚未见报道。

本实验采用 RT-PCR 技术克隆草鱼 ATGL 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 n-3 HUFAs 对草鱼肝胰脏 ATGL 基因表达的影响,为进一步探讨 ATGL 的功能、作用机理以及与草鱼脂质代谢关系的研究提供参考资料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

用于 ATGL 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心脏、肝胰脏、脾脏、鳃、肾脏、肌肉、腹腔脂肪、脑、肠、精巢等 10 个组织,液氮浇冻后于–80℃ 保存备用。

饲养试验在西北农林科技大学水产动物营养与饲料学研究室进行,试验用鱼由西北农林科技大学安康水产试验示范站提供。挑选体质量为(10±2) g 的 64 尾鱼随机分配到 4 个水族箱(110 cm × 60 cm × 40 cm)中,用加热棒将水温控制在(28±1)℃,光周期为 12h : 12h。根据暖水性鱼类半精制典型试验配方^[19],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,猪油购自杨凌康乐市场。氨基酸混合物、混合无机盐

及混合维生素均参照文献[10,19]。各原料均粉碎过 60 目筛,将原料按比例混匀后压制成直径 2~3 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一周,正式饲养时间为 4 周,每天于 8:30, 12:30, 16:30 进行投喂,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℃ 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),PMD19-T 载体,SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] II 荧光染料(TaKaRa 公司)。

1.3 草鱼 ATGL 基因克隆及序列分析

根据 GenBank 中人(*Homo sapiens* 登录号: AY894804)、牛(*Bos taurus* 登录号: FJ798978)、野猪(*Sus scrofa* 登录号: EU373817)、原鸡(*Gallus gallus* 登录号: EU240627)、小鼠(*Mus musculus* 登录号: BC019188)等的 ATGL 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 g 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 16.35 μ L, 2.5 mmol/L dNTP Mix 2 μ L, PCR Buffer (NH)₂SO₄ 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2 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℃ 预变性 2 min, 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环, 72℃ 延伸 7 min。扩增片段的纯化回收: 利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,按试剂盒说明书,从 1% 琼脂糖凝胶上回收目的条带。回收的 DNA 片段在 16℃ 下,连接 1 h,使其连接到 pMD19-T 载体上,随后将连接产物转化到感受态细胞 *E. 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工生物技术有限公司测序。测序后采用 DNAMAN 软件进行序列同源性比对,并制作物种系统进化树。

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	对照组 control group	n-3 HUFAs 组 n-3 HUFAs group
酪蛋白 casein	320	320
明胶 gelatin	80	80
糊精 dextrin	280	280
纤维素 cellulose	150	150
猪油 lard oil	20	10
大豆油 soybean oil	15	15
亚麻油 linseed oil	15	15
鱼油 fish oil	0	10
羧甲基纤维素钠 carboxymethylcellulose	20	20
混合无机盐 ^a mineral mix	40	40
混合维生素 ^b vitamin mix	10	10
氨基酸混合物 ^c amino acid mixture	40	40
抗坏血酸磷酸酯 ascorbic phosphate ester	10	10
营养组成 proximate composition		
粗蛋白 crude protein	362.14	361.37
粗脂肪 crude lipid	49	49.1
水分 moisture	88.5	94.0
灰分 ash	56.1	56.2
主要脂肪酸 major fatty acid		
C18:2n-6	25.03	24.11
C18:3n-3	19.53	20.34
C20:5n-3	n.d.	2.99
C22:6n-3	n.d.	2.19
∑ PUFA ^d	25.03	24.30
DHA+EPA	—	5.18
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/100g): 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 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 13.605, 硫酸铜 0.075, 柠檬酸铁 1.338; b.混合维生素(mg/100g): 硫胺素 5, 核黄素 5, 维生素 A 2500IU, 维生素 E 40, 维生素 D₃ 2400IU, 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/100g): L-色氨酸 0.2, L-苯丙氨酸 0.6, L-缬氨酸 0.7, L-精氨酸 1.5, L-天门冬氨酸 1.0; d.多不饱和脂肪酸。

Notes: a. Mineral mixture(g/100g of diet): KAl(SO₄)₂ 0.159, CaCO₃ 18.101, Ca(H₂PO₄)₂ 44.601, CoCl₃ 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, 2500 IU; vitamin E, 40; vitamin D₃, 2400 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/100g 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 ATGL 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 产物大小/bp product
ATGL	上游: TGGAATCTGTCGTTTCGCCG 下游: CTCTGCCAGCACTTTAGG	687
实时定量检测 qRT-PCR		
ATGL	上游: AGTGATGGTGGTCTTCAGCTCCGA 下游: AGTGTCGGACTTCAGCTCCAAAGA	166
β-actin	上游: TCCACCTTCCAGCAGATGTGGATT 下游: AGTTTGAGTCGGCGTGAAGTGGTA	115

1.4 荧光实时定量 PCR 检测 ATGL 表达

组织差异表达 根据克隆得到的草鱼 ATGL cDNA 序列, 用 PrimerQuestSM 设计并在上海生工生物技术服务有限公司合成实时定量 PCR 特异引物(表 2)。采用荧光 qRT-PCR 法检测 ATGL 在草鱼不同组织中的表达情况。

提取草鱼各组织 RNA, 参照反转录试剂盒说明进行反转录。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 反转录产物、10 μ L SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II、7.8 μ L 灭菌水。反应条件为 95 $^{\circ}$ C, 10 s; 95 $^{\circ}$ C, 15 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 40 个循环。同一样品重复 3 个反应, 以 β -actin 作为参照基因。根据扩增曲线得到的 C_t 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 ATGL 和对照基因 β -actin C_t 值的差异 ΔC_t ; 计算出不同样品相对于参照样本基因表达倍数 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 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, qRT-PCR 法检测试验鱼肝胰脏 ATGL 的时序表达变化。

1.5 数据分析

采用 SPSS13.0 软件和 EXCEL2007 软件分析, 所得数据用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 当 $P < 0.05$ 时, 差异显著。

2 结果

2.1 草鱼 ATGL 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 ATGL 基因进行扩增, 获得一条特异的扩增条带, 测序得其大小为 687 bp, 与预期片段大小一致(图 2)。

将获得的特异扩增序列测序后, 得其核苷酸和蛋白质序列(图 3)。运用 DNAMAN 软件获得的基因序列同长腭泥鳅虎鱼、大黄鱼、野猪、小鼠、牛、人、原鸡等物种核苷酸同源性分别为 75%, 66%, 65%, 67%, 66%, 67%, 68%, 并制作系统树(图 4)。

所用序列的 GenBank 登录号为褐家鼠(*R. norvegicus*, GenBank:NM_001108509), 小鼠(*M. musculus*, GenBank:BC019188), 草鱼(*C. idella*, GenBank:HQ845211), 长腭泥鳅虎鱼(*G. mirabilis*,

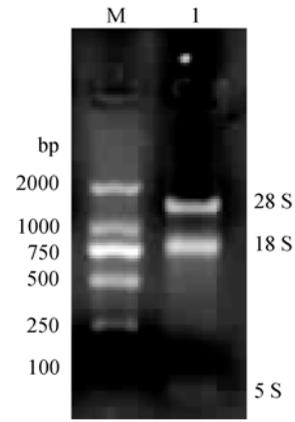


图 1 草鱼肝胰脏 RNA 的电泳图谱
Fig. 1 Electrophoresis profiles of total RNA from hepatopancreas of grass carp
M. Marker DL2000; I. RNA.

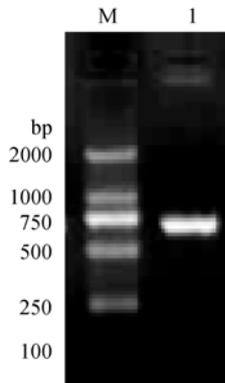


图 2 草鱼肝胰脏 ATGL 的扩增条带图谱
Fig. 2 RT-PCR results of ATGL from hepatopancreas of grass carp
M. Marker DL2000; I. Amplification of purpose strap.

GenBank:GU080308), 大黄鱼(*L. crocea*, GenBank:HQ916211), 原鸡(*G. gallus*, GenBank:EU852334:), 人(*H. sapiens*, GenBank:AY894804), 欧洲牛(*B. taurus*, GenBank:FJ798978), 野猪(*S. scrofa*, GenBank:NM_001098605)

2.2 ATGL 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 ATGL mRNA 丰度进行检测(图 5), 由图 5 可知, ATGL 基因在腹腔脂肪组织表达量最高, 在肝胰脏、肌肉中表达量次之, 在其他组织表达量较低。

2.3 饲喂 n-3 HUFAs 对草鱼肝胰脏 ATGL 基因时序表达的影响

试验期内对照组和处理组中 ATGL mRNA 的表达丰度均呈现一个先降低后升高的模式(图 6)。而摄食 n-3 HUFAs 饲料后, 处理组 ATGL 基因的

```

1  TGGAAATCTGTGGTTTCGCGGATGCGGGTTTTAGGGATCATCACATCGGTGTCGAGCTGCTTCGAGCAAGCGCGTATCTGATC
1  W N L S F A G C G F L G I Y H I G V A S C L L E Q A P Y L I

91  CGCGGGCTAGTAAGATCTACGGAGCCTCCGAGGGGCTCTACCGCATCCGTCCTCACTACTGAGGCATGTTTAGAGAAGTGTGTA
31  R G A S K I Y G A S A G A L T A S V L T T E A C L E K C C E

181  GATGTCATCAATGTTGCCAAGGAGGCGGAAAGCGTAATCTGGGCCCTTTGCACCCAAACATTCAACATAGTAAAGGTGATACGTTGAGGC
61  D V I N V A K E A R K R N L G P L H P T F N I V K V I R G G

271  CTGATCGCGACCTGCGCTCCAACGCGCACACGCTGGCCCTGCTGGTCGCTGTGTGTCACCTCACACGGGTCATGATGGGCAAAAATGTT
91  L Y R D L P S N A H T L A S G R L C V S L T R V M D G Q N V

361  CTAGTGTGCGACTTCAGCTCCAAAGATGAACATCCAGGCTCTCATTGTAGCTGTTTCATTCCTCGTATATTGTGGTTTAAATCCCTCCT
121  L V S D F S S K D E L I Q A L I C S C F I P V Y C G L I P P

451  GCCTCCGTTGTTGCGTTATGTGGATGGTGAATCAGTGATAATCTGCCCCAGTCGGAGCTGAAGAACACCATCATCTCTCCCATTC
151  A F R G V R Y V D G G I S D N L P Q S E L K N T I T V S P F

541  TCAGGAGAGAGTGATATCTGTCCAAAGACAGTTCCACCAGCTCCATGAACCTGCGTTTCACAAACACTAGCATACAAGTCAATCTAGAC
181  S G E S D I C P K D S S T S F H E L R F T N T S I Q V N L D

631  AACATGTACAGACTGAGCAAGGCCTGTTTCCCCAGAGCCTAAAGTGCTGGCAGAG
211  N M Y R L S K A L F P P E P K V L A E

```

图3 草鱼 ATGL 的部分 cDNA 及氨基酸序列
Fig.3 Partial sequences (cDNA and protein) of ATGL of grass carp

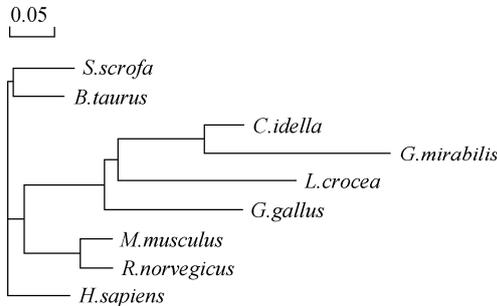


图4 ATGL 基因氨基酸序列系统树
Fig. 4 ATGL gene relationship from different species in a phylogenetic tree

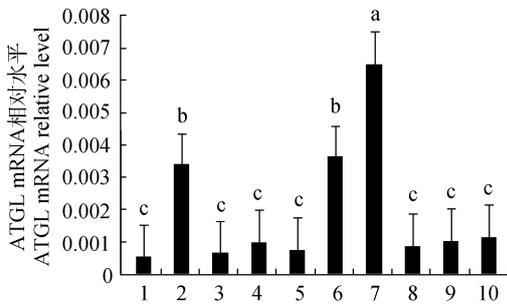


图5 ATGL 基因在草鱼不同组织的表达
1.心, 2.肝脏, 3.脾脏, 4.鳃, 5.肾, 6.肌肉, 7.脂肪, 8.脑, 9.肠, 10.精巢。字母不同代表差异显著(P < 0.05)。

Fig. 5 Tissue expression of ATGL gene in grass carp
1.heart, 2. liver, 3.spleen, 4.gill, 5.kidney, 6.muscle, 7.lipid, 8.brain, 9.intestine, 10. tertis.

表达水平在第 1 周和第 2 周显著高于对照组, 第 3 周后, 该基因的表达水平在处理组与对照组间无显著差异。

3 讨论

ATGL 是催化甘油三酯第一步水解的重要脂

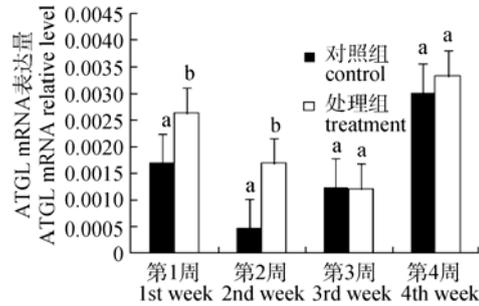


图6 n-3 HUFAs 对草鱼肝脏中的 ATGL 基因时序表达的影响
同一周字母不同表示差异显著(P < 0.05)。

Fig. 6 Effect of n-3 HUFAs on ATGL expression in grass carp hepatopancreas
Different letter means significant difference in the same week (P < 0.05).

肪酶, 在机体能量代谢调节中发挥重要作用。目前 ATGL 在哺乳动物中研究的较多, 而在鱼类上的研究还十分有限。对草鱼 ATGL 基因部分 cDNA 序列进行克隆是研究其在草鱼脂质及能量代谢中作用的基础。本试验获得的片段同 GenBank 上已发表的人、褐家鼠、小鼠、野猪等哺乳动物序列进行比对分析, 其同源性为 65%~68%, 将其与 2 种鱼类上获得的片段进行比对, 其同源性分别为 66%和 75%, 表明有可能该基因在不同物种间的保守性不高, 也可能与本试验获得的是 ATGL 基因部分片段有关。

ATGL 的表达具有明显的组织特异性, 在脂质蓄积及代谢较旺盛的组织中表达水平较高。在小鼠的组织中, 棕色脂肪组织中 ATGL 含量最高, 其次分别为皮下脂肪组织、肠系膜脂肪组织、肾上腺、睾丸、比目鱼肌、胫骨前部脂肪, 心脏、肺、肾、

肝也有少量表达^[4]。在猪的组织中, 背部脂肪的 ATGL 含量最高, 其次是肌肉、小肠、心脏, 在肝脏、脾、肺、胃、肾和卵巢中表达较少^[20]。

除脂肪组织外, 肝脏也是机体脂质沉积和代谢活动旺盛的器官, 在小鼠肝脏细胞中过表达 HSL 和 ATGL 可以促进游离脂肪酸的释放和氧化, 改善肝脏的脂质代谢^[21]。ATGL 在小鼠的肝脏中表达量较其在脂肪组织中低^[4], 但 ATGL 在调节肝脏甘油三酯转化、脂肪酸信号和分配方面却非常重要^[22]。本试验中试验鱼肝胰脏的 ATGL 表达量较高, 可能也与 ATGL 作为一种重要酯酶调节草鱼肝胰脏甘油三酯的含量有关。此外, 肌肉也是代谢活动旺盛的场所及脂质沉积的器官之一。在 ATGL 基因敲除小鼠的心肌、骨骼肌和脂肪组织中, 与游离脂肪酸摄取、氧化及甘油三酯合成相关的酶的基因表达明显下降, 从而影响机体能量代谢^[23]。Jocken 等^[24]发现 ATGL 只在人的 I 型(氧化型)肌纤维中表达, 表明该基因在肌肉中脂肪酸利用、脂质沉积和分解的重要作用。本研究也发现 ATGL 基因在草鱼肝胰脏和肌肉中的表达丰度仅次于腹腔脂肪组织。

一般认为, ATGL 的表达可反映细胞的能量需求及其增加的状态。Josep 等^[25]利用禁食和重新饲喂的方式检测小鼠脂肪组织中 ATGL 表达变化。禁食 12、24、48 h 后, 白色脂肪组织中 ATGL mRNA 水平首先升高, 随后逐渐下降至基础水平; 当重新饲喂时, 其表达量进一步下降。而 Kershaw 等^[26]测定发现, 禁食 6、12、18、24 h 后, 小鼠脂肪组织 ATGL 表达量持续上升, 重新饲喂其表达量开始下降。这可能是由于尽管 ATGL 的转录调节在正常生理状态下对代谢调控起到一定的作用, 其他因子和激素也可能对这一调节起作用。Riegler 等^[27]发现禁食后, 鸡肝脏中的 ATGL 表达发生上调。在禁食后的第三阶段即蛋白质分解阶段, 大鼠中 HSL 和 ATGL 并非共同协调能量需求, ATGL 主要是在维持游离脂肪酸的低动员速率方面起主要作用, 与游离脂肪酸浓度没有相关性, 而 HSL 却与游离脂肪酸浓度存在明显的相关性^[28]。

n-3 HUFAs 可通过影响动物体内多种脂代谢相关酶的基因表达调节动物的脂肪代谢。本试验中 ATGL 的表达呈现一个先降低后升高的变化模式, 可能是由于试验鱼机体本身对饲养环境及外源物

质的摄入有一个适应过程。在 n-3 HUFAs 作用下, 处理组 ATGL mRNA 的表达丰度首先被诱导上调, 随后恢复到正常水平, 表明 n-3 HUFAs 有促进 ATGL 基因表达的作用。马晶晶等^[14]发现 HSL 活性及基因表达水平均随饲料中 n-3 HUFAs 的添加呈升高趋势, 且高含量 n-3 HUFAs (0.94%) 可使 HSL 活性增加近一倍。本试验中, 饲喂 n-3 HUFAs 的日粮前 2 周, 试验鱼肝胰脏 ATGL 基因表达量显著升高, 这可能是由于 ATGL 与 HSL 都属于含有丝氨酸的脂酶^[4-5], n-3 HUFAs 对两种基因的调节机制相似。第 3 周后, 该基因的表达水平在处理组与对照组间无显著差异, 可能是 ATGL 受外界因素的调控是瞬时的, 当其达到机体的要求水平后, 其转录强度又会恢复至正常水平。结合能量状态与 ATGL 基因表达关系的研究结果进行分析^[25-27], n-3 HUFAs 可能通过调控 ATGL 基因表达进而影响草鱼的能量代谢。

过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ (peroxisome proliferative activated receptor γ , PPAR γ) 通过调节细胞内多种脂肪代谢相关蛋白的表达对动物体的脂质代谢进行调控。Wang 等^[29]的研究结果表明, n-3 HUFAs 可抑制大黄鱼肝脏中 PPAR γ 的表达。Kershaw 等^[30]研究发现 PPAR γ 在体内和体外均能正向调控成熟脂肪组织的 ATGL 表达。由于 n-3 HUFAs 是 PPAR γ 的配体, 推测 n-3 HUFAs 调控 ATGL 的表达有可能通过 PPAR γ 途径, 具体的调控机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2003, 31(6): 1120-1124.
- [2] Wang S P, Laurin N, Himms-Hagen J, *et al.* The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice[J]. *Obesity Research*, 2001, 9(2): 119-128.
- [3] Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, *et al.* Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (7): 4806-4815.
- [4] Zimmermann R, Strauss J G, Haemmerle G, *et al.* Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase[J]. *Science*, 2004, 306(5700): 1383-1386.

- [5] Jenkins C M, Mancuso D J, Yan W, *et al.* Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(47): 48968–48975.
- [6] Zechner R, Kienesberger P C, Haemmerle G, *et al.* Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores[J]. *The Journal of Lipid Research*, 2009, 50(1): 3–21.
- [7] Lake A C, Sun Y, Li J L, *et al.* Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members[J]. *The Journal of Lipid Research*, 2005, 46: 2477–2487.
- [8] Langin D, Dicker A, Tavemier G, *et al.* Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity[J]. *Diabetes*, 2005, 54 (11): 3190–3197.
- [9] Haemmerle G A, Lass R, Zimmermann G, *et al.* Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase[J]. *Science*, 2006, 312: 734–737.
- [10] 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.
- [11] 吉红, 曹艳姿, 刘品, 等. 饲料中 HUFAs 影响草鱼代谢的研究[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(5): 881–889.
- [12] Du Z Y, Clouet P, Huang L M, *et al.* Utilization of different dietary lipid sources at high level in herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): mechanism related to hepatic fatty acid oxidation[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2008, 14(1): 77–92.
- [13] Todorčević M, Vegusdal A, GjJøen 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 (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2008, 1781: 326–335.
- [14] 马晶晶, 邵庆均, 许梓荣, 等. n-3 高不饱和脂肪酸对黑鲷幼鱼生长及脂肪代谢的影响[J]. *水产学报*, 2009, 33(4): 639–649.
- [15] 曹俊明, 刘永坚, 劳彩玲, 等. 饲料中不同脂肪酸对草鱼组织脂质含量和脂肪酸构成的影响[J]. *动物营养学报*, 1997, 9(3): 36–44.
- [16] Kjær M A, Todorčević M, Torstensen B E, *et al.* Dietary n-3 HUFAs affects mitochondrial fatty acid β -oxidation capacity and susceptibility to oxidative stress in Atlantic salmon [J]. *Lipids*, 2008, 43: 813–827.
- [17] Todorčević M, Škugor S, Ruyt B. Alterations in oxidative stress status modulate terminal differentiation in Atlantic salmon adipocytes cultivated in media rich in n-3 fatty acids [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2010, 156: 309–318.
- [18] Ji H, Li J, Liu P. Regulation of growth performance and lipid metabolism by dietary n-3 highly unsaturated fatty acids in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2011, 159: 49–56.
- [19] Lovell T. *Nutrition and feeding of fish* [M]. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989.
- [20] Dai L H, Xiong Y Z, Jiang S W, *et al.* Molecular characterization and association analysis of porcine adipose triglyceride lipase (PNPLA2) gene[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38: 921–927.
- [21] Reid B N, Ables G P, Otlivanchik O A, *et al.* Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(19): 13087–13099.
- [22] Ong T K, Mashek T M, Bu Y S, *et al.* Adipose triglyceride lipase is a major hepatic lipase that regulates triacylglycerol turnover and fatty acid signaling and partitioning[J]. *Hepatology*, 2011, 53(1): 116–126.
- [23] Pinet M, Hackl H, Burkard T R, *et al.* Differential transcriptional modulation of biological processes in adipocyte triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase-deficient mice[J]. *Genomics*, 2008, 92(1): 26–32.
- [24] Jocken W E, Smit E, Goossens H G, *et al.* Adipose triglyceride lipase (ATGL) expression in human skeletal muscle is type I (oxidative) fiber specific[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2008, 129(4): 535–538.
- [25] Josep A V, Suheeta R, Eszter S N, *et al.* Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(45): 47066–47075.
- [26] Kershaw E E, Hamm J K, Verhagen L A, *et al.* Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin[J]. *Diabetes*, 2006, 55(1): 148–157.
- [27] Riegler B, Besenboeck C, Bauer R, *et al.* Enzymes involved in hepatic acylglycerol metabolism in the chicken[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 406: 257–261.
- [28] Bertilea F, Raclotb T. ATGL and HSL are not coordinately regulated in response to fuel partitioning in fasted rats[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2011, 22: 372–379.
- [29] Wang X X, Li Y J, Hou C L, *et al.* Influence of different dietary lipid sources on the growth, tissue fatty acid composition, histological changes and peroxisome proliferator-activated receptor γ gene expression in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.)[J]. *Aquaculture Research*, 2011, 1–11.
- [30] Kershaw, E E, Schupp M, Guan H P, *et al.* PPAR γ regulates adipose triglyceride lipase in adipocytes *in vitro* and *in vivo*[J]. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 2007, 293: E1736–E1745.

ATGL gene expression and the influence of n-3 HUFAs in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

JI Hong^{1,2*}, HUANG Ji-qin¹, LIU Pin¹

(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 adipose triglyceride lipase (ATGL) was cloned (GenBank accession number HQ845211), and the homologous alignment was analyzed in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. The expression of ATGL gene in ten different organs was detected with the methods of qRT-PCR. The influence of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids (n-3 HUFAs) on its temporal expression in hepatopancreas of grass carp was also studied. The results showed that the obtained cDNA sequence is 687bp in length, and its homology with human, cow, mice, large yellow croaker, long-jawed mudsucker and other species is 65%–75%. It is revealed that ATGL is widely expressed in heart, hepatopancreas, spleen, gills, kidney, muscle, intrapaneal fat body (IPF), brain, intestine, spermary, with the highest expression level observed in IPF. The expression level of ATGL gene in the feeding trial was increased significantly during the first and second weeks, and then appeared to have no difference compared with that of control group. Our results indicate that ATGL is mainly expressed in lipid highly metabolized and deposited tissues in grass carp, and dietary n-3 HUFAs influence the expression of ATGL gene in hepatopancreas, with the expression pattern described as rising at first, then going down to the normal level.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; adipose triglyceride lipase; n-3 highly unsaturated fatty acids (n-3 HUFAs); gene expression

Corresponding author: JI Hong. E-mail: jihong0405@hotmail.com