



大菱鲂脂质代谢相关基因 $PPARs$ 的组织表达及其对高温胁迫的响应

赵亭亭^{1,2,3}, 杨双双^{1,3}, 马爱军^{1,3*}, 黄智慧^{1,3},
孙志宾^{1,3}, 王新安^{1,3}, 夏丹丹^{1,3}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东省海洋渔业生物技术与遗传育种重点实验室, 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266237)

摘要: 为研究大菱鲂过氧化物酶体增殖物激活受体家族($PPARs$)的组织分布和高温胁迫下 $PPARs$ 在肾脏中的表达情况。实验采用荧光定量PCR(qPCR)技术检测 $PPARs$ 基因3种亚型在大菱鲂不同组织中的表达情况以及高温胁迫下大菱鲂肾脏中 $PPARs$ 的表达情况。qPCR结果显示, 大菱鲂 $PPARs$ 3种亚型的组织分布存在显著差异。 $PPAR\alpha 1$ 和 $PPAR\alpha 2$ 在心脏中的表达量显著高于其他组织; $PPAR\beta$ 在大菱鲂的各个组织中普遍表达; $PPAR\gamma$ 在大菱鲂的鳃中出现了显著性的高表达。大菱鲂肾脏中 $PPARs$ 的mRNA水平随着温度升高呈现出不同的响应模式。 $PPAR\alpha$ 随温度升高表达水平先显著降低, 后有所升高; $PPAR\beta$ 的表达量在14、20、23和25 °C时差异不显著, 当温度升高至大菱鲂的致死温度28 °C时, 表达量出现了显著性的升高; $PPAR\gamma$ 在14 °C时表达水平很低, 但随着温度的升高不断增加。研究表明, 大菱鲂中存在 $PPAR\alpha$ 、 $PPAR\beta$ 和 $PPAR\gamma$ 3种亚型, 而且三者可能以组织特异性的方式参与脂质代谢的调节, 首次指出 $PPARs$ 3种亚型在温度胁迫中的表达变化, 对 $PPARs$ 的研究将推动鱼类脂代谢研究, 揭示鱼类 $PPARs$ 在脂质代谢调控以及响应逆境胁迫中的重要作用。

关键词: 大菱鲂; 脂质代谢; 过氧化物酶体增殖物激活受体($PPARs$); 基因表达; 高温胁迫

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

鱼类的生长繁衍与环境条件密切相关, 作为变温水生动物, 温度更是影响鱼类生长发育重要的环境因子之一。高温胁迫会使鱼体产生应激反应, 引起一系列的变化, 包括基因、mRNA、蛋白质及代谢产物等^[1-5], 直接影响细胞、组织、器官等的生物学功能, 进而造成鱼体生长与代谢紊乱、抗病能力下降及肉质改变等。大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)是原产于欧洲沿海的

一种名贵经济鱼类, 自1992年引入我国后, 已发展成为我国北方沿海工厂化养殖业的主导品种之一。大菱鲂作为一种冷温性鱼类, 对环境指标特别是温度条件要求较为严格, 其最适生长温度为14~17 °C, 最高致死温度为28~30 °C。大菱鲂适低温的特性, 使其在北方夏季高温时需要使用温度较低的地下海水进行养殖, 而地下海水资源有限, 不能满足养殖的需要, 提高

收稿日期: 2019-04-18 修回日期: 2019-06-05

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-47-01); 青岛海洋科学与技术国家试点实验室“鳌山人才”培养计划项目(2017ASTCP-OS04); 国家自然科学基金(41706168); 山东省农业良种工程(2019LZGC013); 国家重点研发计划(2018YFD0900102); 烟台市科技计划(2018ZDCX021)

通信作者: 马爱军, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

了养殖成本,也限制了这一重要的海水养殖鱼种的养殖范围,因此对其耐热机理的研究及耐热品种的培育具有非常重要的研究意义和生产价值。

研究表明,压力条件下,细胞的应激反应与能量代谢(糖、脂代谢)的改变关系密切,高温显著改变脂质和碳水化合物的代谢,脂类物质的代谢在抵抗高温胁迫中发挥着重要的作用^[6]。脂肪作为鱼类所需的三大营养物质之一,在维持鱼类生存和健康方面发挥了重要作用,脂类代谢的紊乱会直接影响鱼类的生长、发育以及多种生理活动,包括其抗逆性^[7]。因此脂类代谢的研究具有重要的生物意义。大量的研究表明,鱼类脂质代谢反应路径受到精密的调控,过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)是一类核激素超家族受体,是控制脂质代谢的主要核受体之一,在调节脂质代谢相关基因的转录中起到重要作用。PPARs最初发现于非洲爪蟾(*Xenopus laevis*),随后在小鼠(*Mus musculus*)中被克隆^[8]。在哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼类中发现PPARs存在3种亚型,即PPAR α 、PPAR β (也称PPAR δ)和PPAR γ ,当它们在体内被相应配体激活时,与视黄醇受体(retinoid X receptor, RXR)形成异二聚体,结合于靶DNA序列,调节与糖脂代谢相关的基因转录。国内外研究人员对啮齿动物、人类和家禽家畜的PPARs基因的结构和功能、表达模式以及调控脂类代谢等方面进行了广泛而深入的研究。发现PPARs的靶基因多与脂质转运和代谢相关,在脂肪酸氧化及脂肪代谢中起到重要作用^[9],PPAR α 和PPAR β 激活脂肪分解代谢相关的酶,调节目标基因编码酶的表达,参与线粒体 β -氧化,PPAR γ 控制脂肪积累并调节脂肪和骨骼的形成。鱼类中PPARs 3种亚型的研究起步较晚,目前已经在斑马鱼(*Danio rerio*)^[10]、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[11]以及红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)^[12]等多种鱼类中完成了对PPARs的序列克隆和鉴定工作。关于鱼类PPARs相关研究仍停留在序列克隆、组织特异性或发育特异性的表达模式分析层面,而有关鱼类PPARs在逆境胁迫下的研究却鲜有报道。

本研究利用荧光定量PCR技术分别对PPARs的3种亚型进行组织特异性表达分析,以及高温胁迫对其影响效应的分析。该实验结果将为深入研究大菱鲆脂质代谢以及高温胁迫下脂质代谢的调控机理提供有价值的参考资料。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验所用大菱鲆取自山东烟台天源水产养殖公司,均为人工繁育的健康、有活力的幼鱼,体质量为(290.0 \pm 10.2)g,体长为(18.5 \pm 2.1)cm。

1.2 升温处理与取样

挑选健康正常的60尾鱼,分别放入3个容积为2 m³的实验桶中,每桶20尾鱼。暂养2周后进行升温实验。暂养与实验期间禁食,每日换水1次,持续充气。升温处理参考Ndong等^[13]的方法并稍作改动:设计5个实验温度(14、20、23、25和28 $^{\circ}$ C),其中14 $^{\circ}$ C为常温对照组。开始实验,在(14 \pm 0.5) $^{\circ}$ C持续12 h后,从每个桶中随机选取3尾鱼,MS222麻醉后迅速剖取肠、肝脏、鳃、心脏、肾脏、头肾、脑、垂体、肌肉、脾脏、皮肤和胃共12个组织。剩余的大菱鲆按每12 h升温1 $^{\circ}$ C的方法分别升至实验温度,在每个实验温度点持续12 h后取肾脏组织。所取样品立即放入RNase-Free冻存管,迅速放入液氮中保存备用。实验全程采用静水法,自动恒温加热器控温,保证各实验桶同步升温。

1.3 总RNA提取、定量与完整性检测及cDNA合成

采用动物组织总RNA提取试剂盒(RNAPrep pure Tissue Kit,天根)提取样品总RNA,用1%琼脂糖凝胶电泳和Nanodrop 2000对所提RNA的质量和浓度进行检测。检测合格的RNA按照反转录试剂盒(TranScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix,全式金)所示步骤合成cDNA,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.4 荧光定量PCR

选取大菱鲆的持家基因 β -actin为内参基因^[14],评估所合成的cDNA模板质量。根据大菱鲆基因组提供的PPAR α 1、PPAR α 2、PPAR β 和PPAR γ 基因序列,利用Primer Premier 5.0软件进行荧光定量PCR引物设计。将合成的引物进行PCR反应并对产物进行测序,以检测引物的特异性。引物合成及相关测序工作均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

使用荧光定量PCR技术检测大菱鲆PPARs基因RNA水平的组织分布。具体操作方法:以14 $^{\circ}$ C下大菱鲆的肠、肝脏、鳃、心脏、肾脏、头

肾、脑、垂体、肌肉、脾脏、皮肤和胃12个组织反转录的cDNA作为模板,以及每个基因的特异性引物P1/P2(*PPARα*1)、P3/P4(*PPARα*2)、P5/P6(*PPARβ*)和P7/P8(*PPARγ*)(表1),在Applied Biosystems StepOnePlusPCR扩增仪上进行,按照TransStart Top Green qPCR SuperMix使用说明,采用SYBR Green I 嵌合荧光法进行扩增反应。荧光定量PCR的反应体系为20 μL: TransStart Top Green qPCR SuperMix(2×)10.0 μL、上下游引物各0.4 μL(10 μmol/L)、ROX Reference Dye I(50×)0.4 μL、DNA模板1.0 μL、RNase-Free Water 7.8 μL。反应程序:94 °C预变性30 s;94 °C变性5 s,60 °C退火30 s,循环40次。在荧光定量PCR程序结束之后,基于*PPARα*1、*PPARα*2、*PPARβ*、*PPARγ*以及 β -actin基因的 C_t 值采用 $\Delta\Delta C_t$ 法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)^[15]计算mRNA的相对表达量。

表1 实验中所用引物

Tab. 1 Primer sequences used in the experiment		
引物名称 primer name	基因名称 gene name	引物序列(5'-3') primer sequence
P1(S)	<i>PPARα</i> 1	CTACTCAAGCCTGGACCTCAACGA
P2(AS)	<i>PPARα</i> 1	TCACTGAAGGGACGCCGA
P3(S)	<i>PPARα</i> 2	CCCTGATAACACCTTCTCTTTCCC
P4(AS)	<i>PPARα</i> 2	TGTCTCGGTCGTCTTGATGTCCTG
P5(S)	<i>PPARβ</i>	ACGGCAAAGGCTTCGTTACC
P6(AS)	<i>PPARβ</i>	CTAATGGCAGCAACAACAGG
P7(S)	<i>PPARγ</i>	ATCTGAAATACTCCCCCTCACCAC
P8(AS)	<i>PPARγ</i>	GCTGATGCTCGTCATTCCCAA
P9(S)	β -actin	CATGTACGTTGCCATCCAAG
P10(AS)	β -actin	ACCAGAGGCATACAGGGACA

注: S代表上游引物, AS代表下游引物

Notes: S represents the upstream primer and AS represents the downstream primer

同样,分别以在14、20、23、25和28 °C持续处理12 h后的肾脏组织cDNA为模板,荧光定量PCR检测肾脏中*PPARα*1、*PPARα*2、*PPARβ*和*PPARγ*的mRNA相对表达量,进行数据分析。

1.5 数据分析

采用SPSS 23.0软件进行数据统计分析,结果用平均值±标准差(mean±SD)表示。使用Levene检验对方差的均匀性进行检验,采用单因素方差分析法检测平均值之间的差异,用Duncan氏检验对数据进行统计学分析($P<0.05$ 为显著性

水平),用GraphPadPrism 6软件进行作图。

2 结果

2.1 大菱鲂PPARs的组织表达模式

大菱鲂*PPARα*的组织分布 荧光定量PCR检测大菱鲂*PPARα*在组织中的表达(图1-a),大菱鲂*PPARα*1在心脏中表达量最高,显著高于其他组织($P<0.05$),肾脏和肝脏中的表达量次之,在脑中也有较高的表达,在胃和脾脏中几乎检测不到*PPARα*1的表达。大菱鲂*PPARα*2与*PPARα*1的表达模式相似,在心脏中表达显著($P<0.05$)

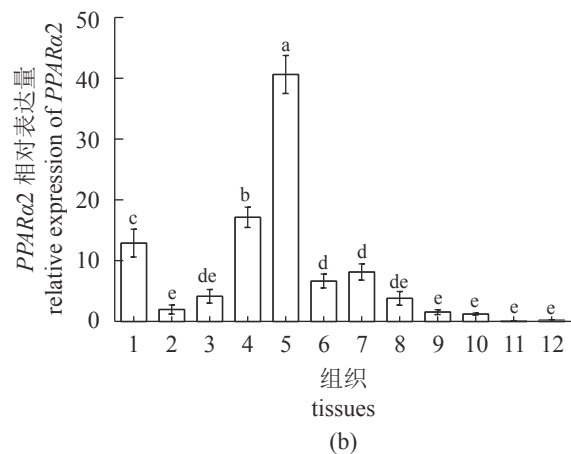
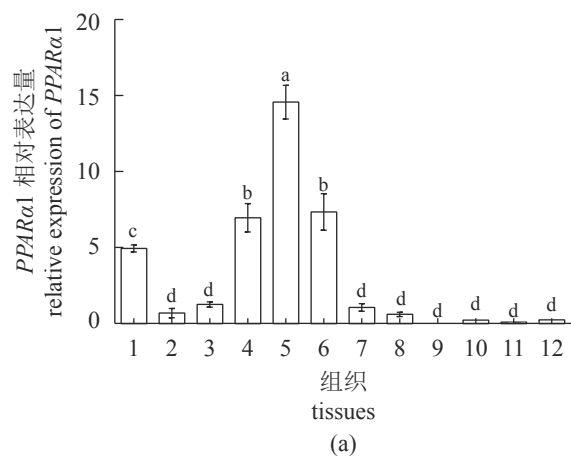


图1 *PPARα*1(a)和*PPARα*2(b)在大菱鲂各个组织中的表达分布

1. 脑, 2. 垂体, 3. 头肾, 4. 肾脏, 5. 心脏, 6. 肝脏, 7. 肠, 8. 肌肉, 9. 胃, 10. 皮肤, 11. 脾脏, 12. 鳃, 不同的字母代表组间差异显著($P<0.05$), 下同

Fig. 1 Distribution of *PPARα*1(a) and *PPARα*2(b) in various tissues of *S. maximus*

1. brain, 2. pituitary, 3. head kidney, 4. kidney, 5. heart, 6. liver, 7. intestine, 8. muscle, 9. stomach, 10. skin, 11. spleen, 12. gill, different letters represent significant differences between groups ($P<0.05$), the same below

(图1-b), 肾脏和肝脏中的表达量次之。*PPARα1*和*PPARα2*相似的表达模式揭示二者可能发挥类似的功能, 基于二者在心脏中特异性的高表达, *PPARα*可能在心脏中发挥特殊的作用。

大菱鲆*PPARβ*的组织分布 *PPARβ*在大菱鲆的各个组织(脑、垂体、头肾、肾脏、心脏、肝脏、肠、肌肉、胃、皮肤、脾脏和鳃)中呈现组成性表达模式, 在肝中的表达量明显高于其他组织, 脑中表达量次之, 在心脏、肾脏、肌肉中也有较高的表达(图2)。

大菱鲆*PPARγ*的组织分布 大菱鲆*PPARγ*基因的mRNA表达水平通过荧光定量PCR的检测后, 呈现出与*PPARα1*、*PPARα2*以及*PPARβ*明显不同的组织分布模式。*PPARγ*在大菱鲆的鳃中出现了显著性的高表达($P<0.05$), 心脏和肠中的表达量次之, 而其他组织中表达量较低且无显著性差异(图3)。

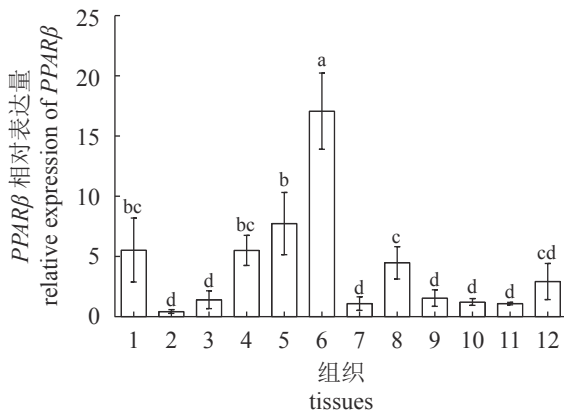


图2 *PPARβ*在大菱鲆各个组织中的表达分布

Fig. 2 Distribution of *PPARβ* in various tissues of *S. maximus*

2.2 大菱鲆肾脏*PPARs*对高温胁迫的响应模式

实验检测了经过升温胁迫处理的不同温度下大菱鲆肾脏*PPARs*基因mRNA水平的表达变化, *PPARs*的3个亚型随着温度升高, 呈现出不同的变化模式。

大菱鲆的*PPARα1*和*PPARα2*呈现出类似的温度响应模式, 在正常生长温度14℃, *PPARα1*和*PPARα2*具有较高的表达量, 随着温度的逐渐升高, 二者的表达量在20℃时急剧下降, 而随着温度的继续升高, 表达水平又出现不同程度的升高, 但是*PPARα2*的表达水平变化更为显著($P<0.05$)(图4)。大菱鲆*PPARβ*的表达量在14、20、23和25℃时差异不显著, 而当温度升高至

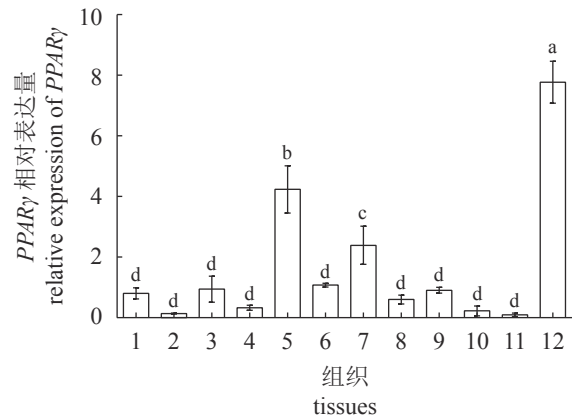


图3 *PPARγ*在大菱鲆各个组织中的表达分布

Fig. 3 Distribution of *PPARγ* in various tissues of *S. maximus*

大菱鲆的致死温度28℃时, *PPARβ*的表达量出现了显著性的升高($P<0.05$)(图5)。随着温度的升高, 大菱鲆肾脏中*PPARγ*则呈现出与其他3个基因完全不同的表达趋势。处于正常生长温度的大菱鲆肾脏中*PPARγ*的表达水平很低, 随着温度的不断升高, *PPARγ*的表达量也不断升高, *PPARγ*的表达量在28℃时比在14℃时高出10倍(图6)。

3 讨论

鱼类脂质代谢反应路径受到精密的调控, 其中核受体介导的慢调节是调节脂肪酸代谢的重要方式之一。这种方法主要是通过对核受体的表达水平和活性进行调节, 从而诱发由这些核受体控制的下游脂代谢相关基因的表达改变^[16-17]。研究表明, *PPARs*主要存在α、β、γ3个亚型, 是调控脂肪分解代谢的主要核受体。

本研究结果证明大菱鲆具有哺乳动物*PPARα*、*PPARβ*和*PPARγ*的同源物, 而且表达2种类型的*PPARα*, 分别为*PPARα1*和*PPARα2*。*PPARα*、*PPARβ*和*PPARγ*3种亚型在大菱鲆大多数组织内均有表达, 但是表达模式存在显著差异, 不同的表达模式揭示三者可能以组织特异性的方式参与脂类代谢的调节。在哺乳动物中, *PPARα*一项很重要的功能就是参与心脏脂质代谢的调控^[18], 线粒体脂肪酸氧化是心脏收缩所需能量的主要来源。Urbatzka等^[19]的研究结果表明大菱鲆的*PPARα1*在心脏、肾脏、肝脏和脑中有较高的表达, *PPARα2*特异性地高表达于心脏中, 其心脏中*PPARα2*的mRNA表达量是鳃、肌肉、肝脏和脑等组织的5~10倍, 本实验结果也表明大菱鲆

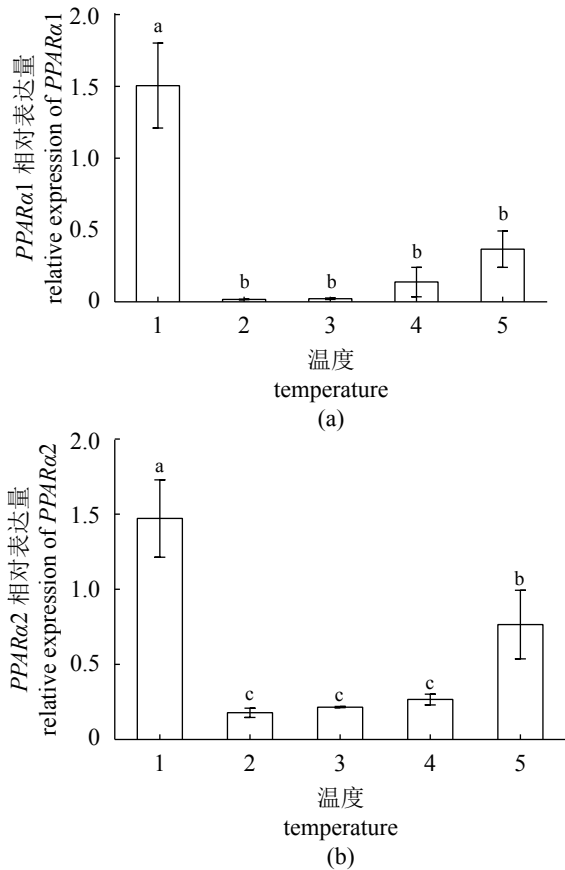


图 4 大菱鲆肾脏中 *PPARα1*(a)和 *PPARα2*(b)在常温和不同温度胁迫下的 mRNA 表达水平

Fig. 4 mRNA expression levels of *PPARα1* (a) and *PPARα2* (b) in the kidney of *S. maximus* under normal temperature and different temperature stresses

1. 14 °C, 2. 20 °C, 3. 23 °C, 4. 25 °C, 5. 28 °C, the same below

*PPARα1*和 *PPARα2*主要高表达于心脏、肾脏以及脑等脂肪酸代谢率较高的组织内, 这提示 *PPARα* 在大菱鲆中的功能可能与哺乳动物相似, 在心脏的脂质代谢调控中发挥重要作用。本结果显示大菱鲆的 *PPARβ*广泛分布于各个组织内, 在肝脏、脑、心脏、肾脏和肌肉等组织中的表达量明显高于其他组织, 这与Batista-Pinto等^[20]对鳟的研究情况类似。而且对斑马鱼的研究也表明 *PPARβ*在鱼类肝脏、肾脏、心脏和肌肉等组织中都有广泛分布, 尤其在肌肉中的表达量明显高于 *PPARα*和 *PPARγ*^[21]。目前的研究表明 *PPARβ*主要涉及到脂质合成、循环以及细胞分化等基础的细胞功能, 这与其组成性的表达模式有密切关系。大菱鲆的 *PPARγ*呈现出与 *PPARα1*、*PPARα2* 以及 *PPARβ*明显不同的组织分布模式, *PPARγ*在大菱鲆的鳃中出现了显著性的高表达。钱云霞等^[22]对花鲈(*Lateolabrax japonicas*)的 *PPARγ*研究结

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

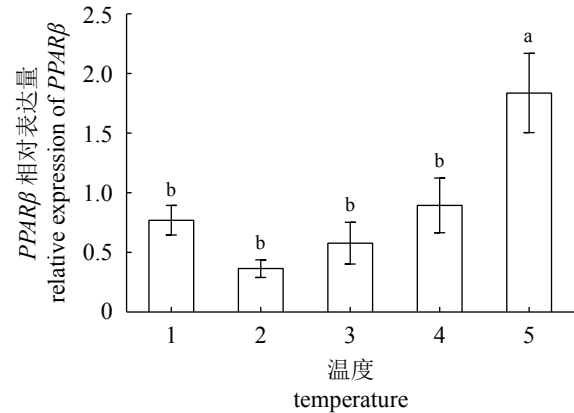


图 5 大菱鲆肾脏中 *PPARβ*在常温和不同温度胁迫下的 mRNA 表达水平

Fig. 5 mRNA expression levels of *PPARβ* in the kidney of *S. maximus* under normal temperature and different temperature stresses

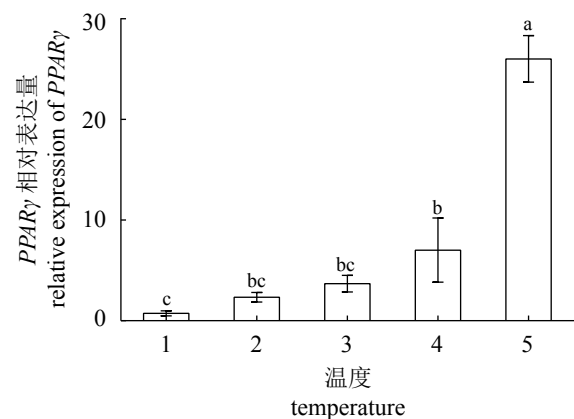


图 6 大菱鲆肾脏中 *PPARγ*在常温和不同温度胁迫下的 mRNA 表达水平

Fig. 6 mRNA expression levels of *PPARγ* in the kidney of *S. maximus* under normal temperature and different temperature stresses

果表明, 花鲈的 *PPARγ*在鳃、肝脏和脂肪组织中高表达, 与本结果基本一致。硬骨鱼鳃通常负责渗透压调节和排泄, 是鱼类一个重要的多功能器官, 而且鱼类的鳃具有很大的黏膜表面积, 因此鳃是鱼类主要的黏膜及免疫屏障之一^[23]。由此推断大菱鲆 *PPARγ*在鳃中的特异性表达可能与渗透调节以及免疫调节有关。大量的研究表明, 鱼类的不同组织器官的脂质代谢活性存在较大差异, 不同组织器官的脂质代谢活性的差异与组织器官的功能特异性和其对能量需求的不同有关^[24-26]。 *PPARα*、*PPARβ*和 *PPARγ*组织特异性的分布方式, 很可能是不同组织和器官的脂质代谢活性差异的关键所在。

<http://www.scxuebao.cn>

研究表明,低温和高温驯化后的鱼类,其机体的脂肪酸代谢都会发生明显改变。本研究表明,随着升温胁迫程度的不断加深,大菱鲆肾脏PPARs基因的RNA水平呈现出不同的响应模式。目前普遍认为,在脂肪酸代谢的调控中, α 和 β 亚型起到促进脂肪酸 β -氧化的调控作用,温度升高时PPAR α 表达水平的降低,可能与高温胁迫时,机体能量代谢活动由脂分解转向碳水化合物的氧化代谢有关^[27-28]。大菱鲆PPAR β 的表达量在14、20、23和25℃时差异不显著,而当温度升高至大菱鲆的致死温度28℃时,PPAR β 的表达量出现了显著性的升高,推测大菱鲆PPAR β 不仅与脂肪酸氧化有关,更是与能量平衡的维持密切相关。而处于正常生长温度的大菱鲆肾脏中PPAR γ 的表达水平很低,随着温度的不断升高,PPAR γ 的表达水平也不断升高, γ 亚型很可能是温度诱导型核受体,参与高温胁迫存在时脂质代谢的调控过程。近几年的研究表明,哺乳动物的PPARs在伤害感受中发挥着复杂的作用^[29],PPAR γ 介导了庆大霉素中毒大鼠中omega-3多不饱和脂肪酸的肾脏保护作用^[30],异甘草素对LPS诱导的急性肺损伤的保护作用也与PPAR γ 的激活有关^[31]。推测大菱鲆PPAR γ 随着温度升高,表达水平的不断升高,与高温引起的肾脏损伤与保护有密切关系,但是关于海洋生物这方面的研究却鲜有报道,还有待进一步深入。

本研究发现大菱鲆中存在PPAR α 、PPAR β 和PPAR γ 3种亚型,而且三者可能以组织特异性的方式参与脂类代谢的调节,首次指出大菱鲆PPARs 3种亚型在温度胁迫中呈现出不同的响应模式,然而具体机制有待于进一步研究。目前,关于PPARs 3种亚型的研究大部分还是在mRNA水平开展,需进一步得到蛋白和磷酸化蛋白水平的验证才能充分阐明鱼类脂质体系的运作细节和调控机制,这将会推动鱼类脂质代谢研究的进一步深入,揭示鱼类PPARs在脂质代谢调控以及响应逆境胁迫中的重要作用。

参考文献:

- [1] Wang K H, Liu Y R, Tian J L, *et al.* Transcriptional profiling and identification of heat-responsive genes in perennial ryegrass by RNA-sequencing[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1032.
- [2] Hu Y C, Kang C K, Tang C H, *et al.* Transcriptomic analysis of metabolic pathways in milkfish that respond to salinity and temperature changes[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134959.
- [3] Callaghan N I, Tunnah L, Currie S, *et al.* Metabolic adjustments to short-term diurnal temperature fluctuation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2016, 89(6): 498-510.
- [4] Mushtaq M Y, Marçal R, Champagne D L, *et al.* Effect of acute stresses on zebra fish (*Danio rerio*) metabolome measured by NMR-based metabolomics[J]. *Planta Medica*, 2014, 80(14): 1227-1233.
- [5] Forgati M, Kandalski P K, Herrerias T, *et al.* Effects of heat stress on the renal and branchial carbohydrate metabolism and antioxidant system of Antarctic fish[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2017, 187(8): 1137-1154.
- [6] Fernandez M V S, Johnson J S, Abuajamieh M, *et al.* Effects of heat stress on carbohydrate and lipid metabolism in growing pigs[J]. *Physiological Reports*, 2015, 3(2): e12315.
- [7] Martins D A, Rocha F, Castanheira F, *et al.* Effects of dietary arachidonic acid on cortisol production and gene expression in stress response in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) post-larvae[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2013, 39(5): 1223-1238.
- [8] Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators[J]. *Nature*, 1990, 347(6294): 645-650.
- [9] 徐有良. PPAR与动物脂肪细胞分化和脂肪代谢[J]. *广东畜牧兽医科技*, 2007, 32(6): 9-11, 25.
Xu Y L. The relationship between PPAR with animal lipocyte's differentiation and lipometabolism[J]. *Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science*, 2007, 32(6): 9-11, 25(in Chinese).
- [10] Ibabe A, Bilbao E, Cajaraville M P. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in zebrafish (*Danio rerio*) depending on gender and developmental stage[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2005, 123(1): 75-87.
- [11] Boukouvala E, Antonopoulou E, Favre-Krey L, *et al.* Molecular characterization of three peroxisome proliferator-activated receptors from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Lipids*, 2004, 39(11): 1085-1092.
- [12] Kondo H, Misaki R, Gelman L, *et al.* Ligand-dependent

- transcriptional activities of four torafugu pufferfish *Takifugu rubripes* peroxisome proliferator-activated receptors[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 154(1-3): 120-127.
- [13] Ndong D, Chen Y Y, Lin Y H, *et al.* The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(6): 686-694.
- [14] 王家庆, 侯林, 李晓燕, 等. 大菱鲆 β -actin基因的初步研究[J]. *水产科学*, 2007, 26(4): 214-217.
- Wang J Q, Hou L, Li X Y, *et al.* The cloning and analysis of the β -actin gene in Turbot[J]. *Fisheries Science*, 2007, 26(4): 214-217(in Chinese).
- [15] Schmittgen T D, Zakrajsek B A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2000, 46(1-2): 69-81.
- [16] Robinson-Rechavi M, Carpentier A S, Duffraisse M, *et al.* How many nuclear hormone receptors are there in the human genome?[J]. *Trends in Genetics*, 2001, 17(10): 554-556.
- [17] Robinson-Rechavi M, Marchand O, Escriva H, *et al.* Euteleostfish genomes are characterized by expansion of gene families[J]. *Genome Research*, 2001, 11(5): 781-788.
- [18] Djouadi F, Brandt J M, Weinheimer C J, *et al.* The role of the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in the control of cardiac lipid metabolism[J]. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 1999, 60(5-6): 339-343.
- [19] Urbatzka R, Galante-Oliveira S, Rocha E, *et al.* Tissue expression of PPAR-alpha isoforms in *Scophthalmus maximus* and transcriptional response of target genes in the heart after exposure to WY-14643[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2013, 39(4): 1043-1055.
- [20] Batista-Pinto C, Rodrigues P, Rocha E, *et al.* Identification and organ expression of peroxisome proliferator activated receptors in brown trout (*Salmo trutta*)[J]. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Gene Structure and Expression*, 2005, 1731(2): 88-94.
- [21] Ibabe A, Grabenbauer M, Baumgart E, *et al.* Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2002, 118(3): 231-239.
- [22] 钱云霞, 杨孙孝, 梁洪, 等. 鲈PPAR γ 基因的克隆、组织表达及其抗体制备[J]. *水产学报*, 2010, 34(8): 1156-1164.
- Qian Y X, Yang S X, Liang H, *et al.* Gene cloning, tissue expression and preparation of monoclonal antibody of *Lateolabrax japonicus* PPAR γ [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(8): 1156-1164(in Chinese).
- [23] 赵华富. 饲料胆碱对生长中期草鱼肌肉品质、鳃免疫功能的调控作用及其机制研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- Zhao H F. Effects of dietary choline on flesh quality and gill immune function of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and the mechanisms[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2015(in Chinese).
- [24] Stubhaug I, Frøyland L, Torstensen B E. β -Oxidation capacity of red and white muscle and liver in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)-effects of increasing dietary rapeseed oil and olive oil to replace capelin oil[J]. *Lipids*, 2005, 40(1): 39-47.
- [25] Tocher D R, Fonseca-Madrigal J, Dick J R, *et al.* Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 137(1): 49-63.
- [26] 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.
- [27] Guderley H. Metabolic responses to low temperature in fish muscle[J]. *Biological Reviews*, 2004, 79(2): 409-427.
- [28] Windisch H S, Kathöver R, Pörtner H O, *et al.* Thermal acclimation in Antarctic fish: transcriptomic profiling of metabolic pathways[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2011, 301(5): R1453-R1466.
- [29] Giniatullin R, Bart G, Tavi P. Complex role of peroxisome proliferator activator receptors (PPARs) in nociception[J]. *Scandinavian Journal of Pain*, 2015, 9(1): 70-71.
- [30] El-Ashmawy N E, Khedr N F, El-Bahrawy H A, *et al.* Upregulation of PPAR- γ mediates the renoprotective effect of omega-3 PUFA and ferulic acid in gentamicin-

- intoxicated rats[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 99: 504-510.
- [31] Zhang W B, Wang G, Zhou S J. Protective effects of isoliquiritigenin on LPS-induced acute lung injury by activating PPAR- γ [J]. *Inflammation*, 2018, 41(4): 1290-1296.

Tissue expression of lipid metabolism related genes *PPARs* and their responses to heat stress in turbot (*Scophthalmus maximus*)

ZHAO Tingting^{1,2,3}, YANG Shuangshuang^{1,3}, MA Aijun^{1,3*}, HUANG Zhihui^{1,3},
SUN Zhibin^{1,3}, WANG Xin'an^{1,3}, XIA Dandan^{1,3}

(1. Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding, Qingdao Key Laboratory of Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China)

Abstract: *Scophthalmus maximus* is a commercially valuable flatfish and one of most promising aquaculture species in Europe. Since *S. maximus* was introduced into China in 1990s, it has been a major maricultured fish in northern coastal areas of China. As a kind of cold-water fish, *S. maximus* has strict requirements for breeding temperature, which greatly limits the breeding range of this important marine fish. Therefore, it is of great research significance to explore the mechanism of heat-resistance in turbot. In this paper, tissue distribution of *PPARs* and the expression of *PPARs* in kidney at different temperature were analyzed by qPCR. The results showed that there are significant differences in the tissue distribution of the three subtypes of *S. maximus PPARs*. *PPAR α 1* and *PPAR α 2* were markedly expressed in the heart, *PPAR β* was widely distributed in various tissues of *S. maximus*, while *PPAR γ* was significantly expressed in the gill of *S. maximus*. What's more, the transcript abundance of *PPARs* in *S. maximus* kidney showed different response patterns to the elevated temperature. At 20 °C, the expression level of *PPAR α* diminished dramatically and then increased with the elevated temperature. The expression of *PPAR β* was not significantly different at 14, 20, 23 and 25 °C, however, its transcript abundance increased significantly when the temperature was increased to the lethal temperature of *S. maximus* at 28 °C. The expression level of *PPAR γ* showed a tendency to increase with increasing temperature. In summary, our results revealed that there are three subtypes *PPAR α* , *PPAR β* and *PPAR γ* in *S. maximus*, which may be involved in the regulation of lipid metabolism in a tissue-specific manner, and more importantly, the expression of three subtypes of *PPARs* under thermal stress was pointed out for the first time. Collectively, these studies will shed light on the regulation mechanism of *PPARs* on lipid metabolism in the kidney of *S. maximus* during heat stress, which will promote the further study of fish lipid metabolism.

Key words: *Scophthalmus maximus*; lipid metabolism; peroxisome proliferator activated receptors (*PPARs*); gene expression; heat stress

Corresponding author: MA Aijun. E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-47-G01); Aoshan Talents Cultivation Program Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2017ASTCP-OS04); National Natural Science Foundation of China(41706168); Agricultural Fine Breed Project of Shandong(2019LZGC013); National Key Research and Development Plan(2018YFD0900102); Science and Technology Development Projects of Yantai City (2018ZDCX021)