

文章编号:1000-0615(2007)03-0369-05

碳水化合物、脂肪对翘嘴红鲌 *PEPCK* 基因表达的影响

俞菊华, 戈贤平, 唐永凯, 刘 波

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室,江苏 无锡 214081)

摘要:使用实时定量 RT-PCR 测定了摄食无糖(脂肪 9.13%, 蛋白 63.38%)、高糖(糖 23.93%, 脂肪 9.94%, 蛋白 40.53%)、低脂(中糖)(脂肪 9.92%, 糖 14.45%, 蛋白 50.14%)、高脂(脂肪 19.93%, 糖 14.98%, 蛋白 40.88%)饲料的翘嘴红鲌在摄食后 0、3、6、12、24 h *PEPCK* 的表达水平。结果显示,饲料中糖含量一致的情况下,高脂组和低脂组翘嘴红鲌 *PEPCK* 的表达差异不显著;脂肪水平一致时,高糖(23.93%)和中糖(14.45%)饲料组翘嘴红鲌 *PEPCK* 的表达,除了在 0、3 h 时高糖组显著高外,6、12、24 h 没显著差异,但 12、24 h 高糖组 *PEPCK* 相对较低,分别是中糖组的 75% 和 65%;无糖组 *PEPCK* 的表达量除了在 12 h 和其他各组一致(均较低)外,在其他时间均明显高,特别是摄食后 24 h 其表达量为其他组同期的 2.5~4.7 倍。由此可见,当饲料中至少含 14.45% 糖但又低于 23.93% 时,饲料中的营养成分对 *PEPCK* 的表达没显著影响,而无糖饲料 *PEPCK* 的表达明显较高,和无糖饲料会引起较强的糖异生作用一致。

关键词:翘嘴红鲌;磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶;碳水化合物;脂肪;实时定量 RT-PCR

中图分类号:Q 786 **文献标识码:**A

Effects of carbohydrate, lipid in diets on the *PEPCK* gene expression of *Erythroculter ilishaeformis*

YU Ju-hua, GE Xian-ping, TANG Yong-kai, LIU Bo

(Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology Certificated by the Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Phosphoenolpyruvate carboxykinase (*PEPCK*, E. C. 4. 1. 1. 32), one of the key enzymes in the glyconeogenesis, simultaneously decarboxylates and phosphorylates oxaloacetate to generate phosphoenolpyruvate. The aim of this study was to analyze the nutritional regulation of *PEPCK* gene expression in topmouth culter (*Erythroculter ilishaeformis*), a kind of freshwater economic fish with clean white flesh tasting fine, tender and delicious. On the one hand, this can accumulate data describing molecular control mechanism of carbohydrate metabolizing enzymes by fish, on the other hand, also provide reference and guidance to the aquaculture diet formula of topmouth culter. Four groups of juvenile topmouth culter were pair-fed for 8 wk with carbohydrate free (carbohydrate 0%, protein 63.38% and lipid 9.13%), medium (carbohydrate 14.45%, protein 50.14% and lipid 9.92%), and high (carbohydrate 23.93%, protein 40.53% and lipid 9.94%) levels of carbohydrate diets and high level of lipid diets (carbohydrate 14.98%, protein 40.88% and lipid 19.93%).

收稿日期:2006-10-08

资助项目:国家重点基础研究“九七三”规划项目(2004CB117401);国家科技支撑计划(2006BAD03B07)

作者简介:俞菊华(1966-),女,江苏吴县人,副研究员,主要从事水产动物遗传育种研究

通讯作者:戈贤平, E-mail: gexp@ffrc.cn

Each group had three redundancies with 60 individuals. At the end of the experiment, livers of three individuals were picked randomly per redundancy at fast and 3 h, 6 h, 12 h, 24 h after refeeding, respectively. The liver was stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and used to extract total RNA using Trizol Reagent(Promega). Then real-time RT-PCR was employed to detect the *PEPCK* mRNA / β -actin mRNA using $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method to calculate. Results indicated that there was no significant difference of *PEPCK* expression levels between high and low lipid (medium carbohydrate) group fish with the same level carbohydrate content. And when the lipid maintained more or less constant, the expression levels of *PEPCK* in medium and high carbohydrate had no significant differences at 6 h, 12 h and 24 h after refeeding, however, the expression levels were significantly higher at 0 h and 3 h in high carbohydrate group than medium carbohydrate group. But the expression levels at 12 h and 24 h in high carbohydrate group were comparatively low and only 75% and 65% of medium carbohydrate group counterpart, respectively. The expression levels of carbohydrate free group fish were significantly higher than those of other three groups at 0, 3, 6, 24 h, especially at 24 h the level was 2.5 to 4.7 times higher than other groups counterpart. However, it was as low as other groups at 12 h. In conclusion, when the carbohydrate content was at least 14.45% and less than 23.93%, the nutrition contents had no significant effects on the *PEPCK* expression. The high expression levels of *PEPCK* in carbohydrate free group fish were consistent with the increasing of glycogenesis due to carbohydrate free diets.

Key words: *Erythroculter ilishaeformis*; *PEPCK*; carbohydrate; lipid; real time PCR

鱼类利用糖的能力较低,摄食后存在持续的高血糖现象,具有天生“糖尿病体质”^[1],说明鱼类糖代谢机制与人等高等脊椎动物存在着差异。而在鱼类养殖中饲料碳水化合物可起到节约蛋白质的效果,因此,研究鱼类糖代谢机制在当前饲料蛋白源紧缺的情况下有着重要的现实意义。磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(Phosphoenolpyruvate carboxykinase, *PEPCK*, E. C. 4. 1. 1. 32),催化糖异生过程中的一步限速反应,草酰乙酸形成磷酸烯醇式丙酮酸,是糖异生途径中的一种重要酶,动物血糖水平的稳定部分得益于 *PEPCK* 基因表达的精确调控^[2]。在哺乳动物 *PEPCK* 活性主要存在于肝、肾皮质、脂肪、空肠和乳腺等组织^[2]。在鱼类目前仅报道,分离了虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[3]、大西洋鲑(*Salmon salar*)^[4]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[5]、金头鲷(*Sparus aurata*)^[6]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[6]等的 *PEPCK* cDNA 全序列或部分序列,研究了虹鳟 *PEPCK* 在组织表达以及在不同营养状况下的表达变化^[3]。翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)肉质细嫩又鲜美,为鱼中上品,深受人民群众的喜爱,在我国江浙沪市场价格比较高,养殖面积也越来越大。野生翘嘴红鲌是以活鱼为主食的凶猛肉食性鱼类,但在养殖全过程中均可投喂人工饲料,因此,有必要研究翘嘴红鲌利用饲料糖的能力,这一方面为阐述鱼类

糖代谢的分子调控机理积累资料,另一方面也为翘嘴红鲌养殖饲料配方的研制提供参考和指导作用。本文在分离了我国重要的肉食性淡水经济鱼类之一的翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*) *PEPCK* 全长 cDNA 序列的基础上,使用实时定量 RT-PCR,测定了饲料中碳水化合物、脂肪含量对翘嘴红鲌 *PEPCK* 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

实验动物 实验用翘嘴红鲌鱼种共 1 000 尾,购自浙江省淡水水产研究所试验场。首先用普通颗粒饲料喂养 2 周,使其适应环境;然后选择 720 尾规格基本一致的试验鱼,平均体重(40.73 ± 0.44) g,随机分为 4 个组,分别投喂总能一致,无糖(蛋白 63.38%,脂肪 9.13%),高糖(蛋白 40.53%,脂肪 9.94%,糖 23.98%),低脂(中糖)(蛋白 50.14%,脂肪 9.92%,糖 14.45%),高脂(40.88%蛋白,19.93%脂肪,14.98%糖)饲料^[7],每组设 3 个重复,每个重复 60 尾,饲养在规格为 200 cm \times 800 cm \times 100 cm 的室内水泥池中。日粮保持总能一致,饲养 8 周,日投喂鱼体重 2% ~ 4% 的饲料。四组饲料养殖结果显示翘嘴红鲌死亡率、增重率无显著差异^[7]。采样前鱼先饥饿 48 h,然后分别于投料后 0、3、6、12、24 h 采取肝脏,

每重复取 3 尾。

主要试剂及仪器 抽提 RNA 用 Trizol Reagent (Promega), 荧光定量 RT-PCR 用 SYBR ExScript™ RT-PCR Kit (Takara, 大连), PCR 仪为 eppendorf Mastercycler Gradient, 核酸测定仪为 eppendorf Biophotometer, 实时定量 PCR 仪为 BIO-

RAD Mini-Optica。

实时定量 PCR 引物设计与合成 根据我们已分离出的翘嘴红鲌 *PEPCK* cDNA 全序列^[8] 设计引物 P1, P2。根据鱼类 β -actin 保守序列(从 Genebank 中获得)设计翘嘴红鲌 β -actin 引物, 所有引物均由上海申能博彩生物有限公司合成。

表 1 实时定量 PCR 引物

Tab.1 Primers used in Real time PCR

引物 primers	序列 sequence	退火温度(°C) annealing temperature	扩增片段长度(bp) length of fragment
PEPCK	P1 5'-GCA GGC GTT ATT TCA GGC AT-3'	60	194
	P2 5'-CCA CAC CCA GAG CTT TCA GG-3'	60	
β -actin	P3 5'-ACT TCG AGC AGG AGA T-3'	60	228
	P4 5'-ACA GTG TTG GCA TAC AG-3'	60	

1.2 方法

总 RNA 的抽提 取翘嘴红鲌肝脏 50 ~ 100 mg, 用 Trizol Reagent 抽提总 RNA, 再用 DNase I (RNase free) 处理以去除污染的 DNA。使用核酸测定仪测定 RNA 的浓度, 并根据 OD260/280 值判断 RNA 的质量, 一般为 1.8 ~ 2.0。

荧光定量 RT-PCR 根据 SYBR ExScript™ RT-PCR Kit 说明书, 进行 RT 反应, 然后, 采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时定量 PCR, 反应条件为: 95 °C 3 min, 然后 45 循环: 95 °C 10 s; 60 °C 20 s; 读板记录荧光量, 最后 72 °C 3 min, 融解曲线的反应条件为 65 °C to 90 °C, 每升高 0.2 °C 保持 0.02 s 读板记录荧光量。

PEPCK 和 β -actin 定量 PCR 扩增效率分析 用 5 μ g 总 RNA 在 20 μ L 的体积中进行 RT, 然后各取原液、稀释 5 倍、10 倍、50 倍、100 倍、500 倍的 cDNA 2 μ L 在 20 μ L 体系中使用 *PEPCK* 和 β -actin 引物进行荧光定量 PCR, 分别制作它们的标准曲线和标准方程, 分析扩增效率。

PEPCK 基因的定量检测 取各组织相同的 RT 液, 分别以 *PEPCK* 和 β -actin 引物进行荧光定量 PCR, 在扩增效率分析显示两者的扩增效率一致的前提下, 用 β -actin 为内参, 对得到的各样品 Ct 值进行均一化处理, 以无糖组禁食时 *PEPCK* 基因的表达量为基准, 应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[9] 确定不同样品 mRNA 的相对含量。

数据处理 实验数据用平均值 \pm 标准误差表示, 数据分析采用 SPSS12.0 统计软件包中 Duncan 氏多重比较分析, 当 $P < 0.05$ 时, 差异显著。

2 结果

2.1 扩增效率分析

以 DNase I 酶处理的 RNA 以及 RT 液为模板, 用 β -actin 的定量引物分别进行 PCR 反应。结果显示, 以 RT 液为模板有所需产物, 而以 RNA 为模板则无条带(未列出), 说明处理过的 RNA 无 DNA 污染。

设原液中相应基因的拷贝数为 100 000, *PEPCK* 的标准方程是 $Y = -0.2737x + 8.90$, 相关系数为 0.978; β -actin 的标准方程是 $Y = -0.2814x + 9.27$, 相关系数为 0.994; 其中 Y 代表起始模板浓度以 10 为底的对数, x 代表 Ct 值。由于两标准方程的斜率基本一致, 认为 *PEPCK* 和 β -actin 的扩增效率一样, 符合 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算的前提条件。

2.2 饲料中糖、脂肪含量以及摄食对 *PEPCK* 基因表达的影响

摄食不同饲料后, 翘嘴红鲌 *PEPCK* 的相对表达量数据见表 2。从表 2 看出, 高脂组与低脂组 *PEPCK* 的表达量在各时间均没显著差异; 高糖组 *PEPCK* 的表达量在 0、3 h 明显比中糖组高, 但在 6、12 和 24 h 没显著差异, 并且, 高糖组在 12、24 h 的表达量较中糖组低, 分别是中糖组的 75% 和 65%; 此外, 除了无糖组, 高糖组、低脂(中糖)组和高脂组之间 6、12 和 24 h *PEPCK* 的表达量也没显著差异; 无糖组 *PEPCK* 的表达量除了在 12 h 和其他各组一致(均较低)外, 在其他时间均明显高, 特别是摄食后 24 h 其表达量为其他组同期的 2.5 ~ 4.7 倍。这些说明在含糖 14.45% 但又低于 23.93% 时, 饲料中的脂肪含量和糖含量

对 *PEPCK* 的转录水平没有影响,但当饲料中没有糖时,*PEPCK* 的水平明显提高。比较各组在不同时间 *PEPCK* 的表达量,发现无糖组表达量变化最大,最高 24 h 的表达量是最低 12 h 时的 4.5 倍,变化最小的是低脂(中糖)组,最高 0 h 的表达量是最低 3 h 的 1.7 倍;另外,*PEPCK* 表达量出现的最高

值的时间没有明显的规律,基本上如前一个时间较低,则后一个时间较高,如低脂组 24 h 比高脂组低,但在 0 h 则高脂组比低脂组低,同样高糖组在 24 h 比其它组均低,但在 0 h 则均比其他组高,说明摄食对 *PEPCK* 的表达也没有显著影响。

表 2 禁食与投喂不同糖、脂含量日粮后翘嘴红鲌肝脏 *PEPCK* mRNA 水平的变化

Tab.2 Effect of fast and different carbohydrate and lipid levels in diets on *PEPCK* mRNA expression of *E. ilishaeformis*

组别 group	禁食 fasted	投料后 postprandial time			
		3 h	6 h	12 h	24 h
无糖 carbohydrate free	1 ± 0.30 ^{ABab}	1.14 ± 0.17 ^{Ab}	1.73 ± 0.39 ^{Aa}	0.49 ± 0.053 ^b	2.20 ± 0.27 ^{Aa}
高糖 high carbohydrate	1.51 ± 0.33 ^{Aa}	1.14 ± 0.10 ^{Aa}	0.96 ± 0.20 ^{Bb}	0.49 ± 0.097 ^c	0.47 ± 0.16 ^{Bc}
低脂 low lipid	0.96 ± 0.16 ^{Ba}	0.57 ± 0.060 ^{Bb}	0.78 ± 0.029 ^{Bab}	0.65 ± 0.066 ^b	0.72 ± 0.051 ^{Bab}
高脂 high lipid	0.41 ± 0.081 ^{Bb}	0.53 ± 0.035 ^{Bbc}	0.74 ± 0.059 ^{Bac}	0.50 ± 0.048 ^b	0.87 ± 0.11 ^{Ba}

注:表中值为平均值 ± 标准误(n=9);同一列数据中不同大写字母表示差异显著(P<0.05),同一行数据中不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

Notes: values are means ± SE (n=9); The different capital letters in the same column and small letters in the row stand for significant difference at 0.05 level

3 讨论

由于各组织含有 RNA 的量存在着差异,并且准确定量实验中所用的 RNA 存在困难,因此,使用内标作为参照,校正测定所用的 RNA 量,使某一基因在各组织间以及在不同阶段表达的比较成为有效和可行,这就是所谓的相对定量。在进行相对定量测定时,通常有两种方法,一种是双标准曲线法,这种方法考虑了检测基因和内标基因扩增效率不一致,但要求每次都要做标准曲线,试剂需要量大;另一种即 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法,该方法使用的前提是检测基因和内标基因扩增效率要一致,相比双标准曲线法, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 比较简单,不需要每次均做标准曲线,并且,一般扩增片段在 300 bp 内,扩增效率基本为 1。本试验设计的引物均为扩增 200 bp 左右,扩增效率结果分析表明,*PEPCK* 和 β -actin 基因扩增效率相近,符合使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法的前提条件。本实验选用的内标为 β -actin,该基因是表达量高并相对恒定的看家基因,是公认的内标基因^[10]。

实验结果表明,翘嘴红鲌 *PEPCK* 基因的表达在饲料中含糖 14.45% 但又低于 23.93% 时,饲料中的脂肪含量和糖含量对 *PEPCK* 的转录水平没有明显影响,并且摄食对该基因表达也没有明显

影响。这结果和其他研究者对鱼类 *PEPCK* 研究的结果一致,如大西洋鲑的 *PEPCK* 不受日粮中的碳水化合物影响^[11];对虹鳟和金头鲷的研究也发现饲料营养成分和摄食时间不影响 *PEPCK* 的表达^[12];Severine^[13] 等则发现饲料中蛋白质含量对虹鳟 *PEPCK* 表达没影响;Panserat^[6] 等研究显示摄食后 6 h 和 24 h,鲤 *PEPCK* 表达没差异,并且摄食含糖饲料比无糖饲料时,该基因的表达有所降低,但差异不显著。此外,翘嘴红鲌 *PEPCK* 在摄食饲料后表达会明显增加,与上述鲤的研究结果不完全一致,也许与翘嘴红鲌自然条件下为肉食性鱼类而鲤为杂食性有关,但与无糖饲料导致糖异生作用加强一致。鱼类 *PEPCK* 的表达不受营养水平调控可部分解释鱼类持续高血糖现象^[7]。另外,从本实验可知,中糖(低脂)组翘嘴红鲌各时间 *PEPCK* 的表达量变化最小,这是否与该配方各营养成分比较均衡有关,有待进一步确定。

人、鼠、鸡等脊椎动物有两种 *PEPCK* 异构体(isoform):胞质型(*PEPCK*-C),其表达在转录水平上受到胰高血糖素(cAMP 介导)、胰岛素、肾上腺皮质激素等激素以及营养素的调节^[14-15];线粒体型(*PEPCK*-M),其活性相对稳定^[16]。但研究表明它们在不同的物种中的分布和调控并不完全一样^[17]。使用 Signal IP 软件分析翘嘴红鲌 *PEPCK*

序列时,发现在氨基端具有 36 个氨基酸组成的线粒体靶序列^[8],加上本文结果,在饲料中含有一定糖时,*PEPCK* 的表达不受营养和摄食调控,这些特点与人 *PEPCK-M* 相似,因此,很可能我们分析的翘嘴红鲌 *PEPCK* 为线粒体型。虽然,翘嘴红鲌 *PEPCK* 的表达和哺乳类 M 型 *PEPCK* 的调控有着一定的相似性,但由于鱼类缺乏胰岛素等激素,并且,摄食无糖饲料后 *PEPCK* 的表达会增加,这说明两者之间一定存在着差异,因此,有必要继续深入研究该基因的调控机制,特别是分析该基因的启动子区域。另外,至今还没见在鱼类分离到 C 型 *PEPCK*,从翘嘴红鲌 *PEPCK* 酶活力和基因表达结果差异表明还存在另外一个 *PEPCK*^[7],或许与我们使用的分离基因的方法有关,或许因为另一个 *PEPCK* 的表达量较低,我们没能分离到,结合在其他鱼类也没分离到这样一个事实,可以肯定目前分离到的 *PEPCK* 为高表达的,而另一个即使存在其表达量可能也较低。

参考文献:

- [1] Wilson R P. Utilization of dietary carbohydrate by fish [J]. *Aquaculture*, 1994, 124:67-80.
- [2] Utter M F, Kolenbrander H M. *The Enzymes*[M]. New York vol,6, pp, Academic Press, 1972:136-168.
- [3] Panserat S, Plagnes-juan E, Breque J, *et al.* Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Ocorhynchus mykiss*) [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2001, 204:359-365.
- [4] Tranulis M A, Dregni O, Christophersen B, *et al.* A glucokinase-like enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1996, 114B:35-39.
- [5] Strausberg R L, Feingold E A, Grouse L H, *et al.* Generation and initial analysis of more than 15 000 full-length human and mouse cDNA sequences[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (26):16899-16903.
- [6] Panserat S, Plagnes-Juan E, Kaushik S. Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1579(1), 35-42.
- [7] 戈贤平. 不同糖、脂含量日粮对翘嘴红鲌相关糖代谢酶的调节研究[D]. 南京农业大学博士论文, 2006.
- [8] 戈贤平,俞菊华,吴婷婷. 翘嘴红鲌 *PEPCK* 基因的克隆和序列分析[J]. *中国水产科学*, 2006, 13 (3):389-396.
- [9] Kenneth J, Livakl Thomas D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using geal-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [10] Pal A Olsvik, Kai K Lie1, Ann-Elise O Jordal, *et al.* Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon [J]. *BMC Molecular Biology*, 2005, 6:21.
- [11] Tranulis M A, Dregni O, Christophersen B, *et al.* A glucokinase-like enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1996, 114B:35-39.
- [12] S P C, Blinb F, Medalea E, *et al.* Molecular cloning, tissue distribution and sequence analysis of complete glucokinase cDNAs from gilthead seabream (*Sparus aurata*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1474 (1):61-69.
- [13] Severine K, Sadasivam K, Stephane P. Low protein intake is associated with reduced hepatic gluconeogenic enzyme expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Biochem Physiol*, 2003, 129B:243-249.
- [14] Lamers W H, Hanson R W, Meisner H M. cAMP stimulates transcription of the gene for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver nuclei [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79(17):5137-5141.
- [15] Granner D, Andreone T, Sasaki K, *et al.* Inhibition of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by insulin [J]. *Nature*, 1983, 305 (5934):549-551.
- [16] Garber A, Ballard F J, Hanson R W. The significance of mitochondrial phosphoenolpyruvate formation in the regulation of gluconeogenesis in guinea pig liver [M]// *Metabolism and the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*. New York: Academic Press, 1972, 109-135.
- [17] Hanson R W, Reshef L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression [J]. *Ann Rev Biochem*, 1997, 66, 581-611.