

草鱼 *PGC-1 β* 基因克隆及高糖高脂饲料对其表达的影响

卢荣华, 杨 峰, 孙君君, 谢帝芝, 秦超彬, 杨丽萍, 郑文佳, 聂国兴*

(河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453007)

摘要:为探讨过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子-1 β 基因在草鱼能量代谢中的作用, 本研究克隆了草鱼 *PGC-1 β* 基因的核心序列, 并对其进行了生物信息学分析; 利用 Real-time PCR 技术检测了 *PGC-1 β* 在不同组织中的表达状况; 同时研究了饥饿、饥饿再投喂及高糖(糖含量 45%)高脂(脂含量 8%)饲料对草鱼肝脏 *PGC-1 β* 表达的影响。结果显示, 所获得的草鱼 *PGC-1 β* 基因部分 cDNA 片段长为 885 bp(GenBank 登录号: KM580493.1), 共编码 293 个氨基酸, 与斑马鱼的同源性为 81%; 该基因在脑中的表达量最高, 肠和肝脏次之; 与正常投喂组相比, 饥饿(7 d)导致 *PGC-1 β* 在肝脏中的 mRNA 水平显著升高, 饥饿再投喂后几乎恢复到对照组的表达水平。饲喂高脂以及高糖高脂饲料(65 d)后, 与对照组相比, 草鱼肝脏中 *PGC-1 β* 的 mRNA 水平显著升高。研究结果表明, *PGC-1 β* 基因在草鱼能量代谢旺盛的组织中高表达, 同时饥饿处理、饲料糖和脂肪水平等营养状况显著影响 *PGC-1 β* mRNA 的表达。以上提示, *PGC-1 β* 在草鱼能量代谢过程中可能起到重要作用。

关键词:草鱼; *PGC-1 β* ; 组织表达; 营养调控; 能量代谢

中图分类号: Q 785; S 965

文献标志码: A

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子-1 β (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 beta, *PGC-1 β*)属于 *PGC-1* 转录辅助活化因子家族, 具有调节机体适应性产热、线粒体生成、脂质代谢、血糖平衡及葡萄糖转运、激活糖异生关键酶活性等功能^[1-7]。与陆上动物研究相比, 对鱼类 *PGC-1 β* 的研究还比较少, 仅在斑马鱼(*Danio rerio*)、金鱼(*Carassius auratus*)中有报道, 研究显示低温可引起金鱼肌肉中 *PGC-1 β* 的表达上调, 饥饿能引起其肝脏中 *PGC-1 β* 表达升高^[8-9]。

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国特有的淡水性鱼类, 属于“四大家鱼”之一, 生长快、肉质好, 具有较高的经济价值。近几年来, 随着养殖规模不断加大, 生产中经常出现肝脏脂肪代谢障碍和肝脏脂肪大量蓄积的情况^[10-12]。本实验采

用 RT-PCR 技术克隆草鱼 *PGC-1 β* 基因的部分 cDNA 序列, 研究其在草鱼不同组织中的表达状况, 探讨不同营养条件对草鱼肝脏 *PGC-1 β* 基因表达的影响, 研究结果为进一步探讨 *PGC-1 β* 在草鱼能量代谢中的功能、与草鱼脂质蓄积的关系及其作用机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

RNA 提取试剂 RNAiso Plus、反转录试剂盒 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeScript RT Kit (Perfect Real Time) 和荧光定量试剂盒 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNase Plus) 均购自 TaKaRa; Quick Gel Extraction Kit 购自北京康为世纪生物科技有限公司; PGEM-T Vector 购自 Promega 公司。

收稿日期:2015-01-26

修回日期:2015-06-17

资助项目:国家自然科学基金(31372545, 31402311); 河南省高校科技创新团队支持计划(14IRTSTHN013); 河南省科技创新杰出青年支持计划(154100510009); 河南省基础与前沿技术研究(142300410158); 河南省教育厅科学技术研究专项(14A240002)

通信作者:聂国兴, E-mail:niegx@htu.cn

1.2 草鱼 *PGC-1 β* 基因部分 cDNA 序列克隆

健康草鱼,体质量约 100 g,取自河南师范大学水产养殖基地,在实验室流水养殖桶(200 L)中暂养,水交换量 1 L/min,喂食商品饲料,每天饲喂 3 次,8:30、13:00 和 17:30,平均水温(25 ± 1) °C,DO > 5 mg/L,氨态氮 < 0.01 mg/L,光照周期为 12 L:12 D。无菌条件下取肝脏,以液氮为介质,在研钵中将组织研磨成粉末状,按照 RNAiso Plus 说明书提取并纯化总 RNA。琼脂糖凝胶电泳法检测其完整性,超微量分光光度计法检测其浓度和纯度。

根据 GenBank 中斑马鱼 *PGC-1 β* cDNA 的保守序列以及课题组获取的草鱼转录组测序数据为参考,利用 Primer 5.0 生物软件设计 1 对特异引物,用于 *PGC-1 β* 中间片段的克隆,并合成 β -actin 基因 PCR 扩增引物(表 1)。以提取的草鱼肝脏总 RNA 为模板,按照 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒的说明,合成第一链 cDNA。进行 PCR 扩增反应,克隆草鱼 *PGC-1 β* 基因部分 CDS 序列。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,将目的条带切胶回收,并采用 Quick Gel Extraction Kit 进行纯化,然后将纯化产物连接至 PGEM-T 载体,经 16 °C 连接 6~8 h 后,转染 JM109 感受态细胞,进行蓝白斑筛选。37 °C 倒置培养 10~14 h 后,挑取 6~8 个阳性菌落,用于 PCR 验证。选择阳性克隆进行测序(英潍捷基上海贸易有限公司)。

PCR 反应体系:25 μ L 反应体系中含有:2.5 μ L 10 × PCR buffer(无 Mg^{2+}),1.5 μ L $MgCl_2$ (25 mmol/L),1 μ L cDNA 模板,上下游引物各 0.5 μ L,2 μ L dNTP (10 mmol/L),0.2 μ L Taq DNA 聚合酶,加无菌水至终体积 25 μ L。PCR 反应条件:94 °C 4 min; 94 °C 30 s,57.8 °C 30 s,72 °C 45 s,34 个循环; 72 °C 7 min。利用 PTC-200 DNA

engine (MJ Research, BIO-RAD, Inc) 进行扩增。

1.3 序列分析

将测序获得的 *PGC-1 β* 的部分 cDNA 序列,通过 ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/>) 的 TranslateTool 软件预测其氨基酸序列;用 Mega 5.0 软件构建邻接(Neighbour-Joining, NJ)进化树,1 000 次自举(Bootstrap)重复检验进化树的置信度。

1.4 草鱼 *PGC-1 β* 组织表达分析

采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术,检测 *PGC-1 β* 基因在草鱼 8 个组织中的相对表达量。首先根据所获得的 *PGC-1 β* 的部分 cDNA 序列设计正反向引物 *PGC-1 β -F* 和 *PGC-1 β -R*,内参引物为 β -actin-F 和 β -actin-R(表 1),将模板进行梯度稀释,检测目的基因和内参基因的扩增效率,其扩增效率分别为 98% 和 97%。取 3 条草鱼,其养殖条件同 1.2。取样前禁食 12 h,草鱼麻醉后,无菌条件下迅速分离脑、肝脏、肠、肾脏、脾脏、肌肉、脂肪和性腺组织。液氮速冻后 -80 °C 保存备用。按照 RNAiso Plus 说明书提取总 RNA,利用 PrimeScript RT Kit (Perfect Real Time) 反转录获得第一链 cDNA。采用 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪,参照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNase Plus) 说明书,进行实时定量 PCR。PCR 反应体系为 20 μ L; SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2X) 10 μ L, PCR Forward Primer (10 μ M) 0.4 μ L, PCR Reverse Primer (10 μ M) 0.4 μ L, ROX Reference Dye II (50 X) 0.4 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 加无菌水至总体积为 20 μ L。PCR 程序采用两步法:95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 共 40 个循环。反应结束后进行溶解曲线分析,以验证产物特异性。每个样品 3 个平行,反应结束后进行数值分析。

由扩增曲线得出各样品 qRT-PCR 扩增的 Ct 值,相对表达量参照 Livark 等^[13] 提出的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法计算出样品中 *PGC-1 β* 基因 mRNA 相对表达丰度。

表 1 *PGC-1 β* 基因克隆及实时定量检测引物

Tab. 1 Primers used for clone and quantitative real-time PCR

引物名称 primer name	序列(5'→3') sequences(5'→3')	用途 usage	产物长度/bp product length	退火温度/°C T_m
<i>PGC-1β-F1</i>	CGCCTTCCGCTGACACAGAGGA	中间片段扩增	885	57.8
<i>PGC-1β-R1</i>	TGGCATACTGCGTGCTCTCC	中间片段扩增		
<i>PGC-1β-F</i>	AGAGGAAGAGGAGGATGAAGAG	qRT-PCR	119	60
<i>PGC-1β-R</i>	CTGAGGAGAAGTGAAGGCTTTG	qRT-PCR		
β -actin F	CGTGACATCAAGGAGAAG	qRT-PCR	288	60
β -actin R	GAGTTGAAGGTGGTCTCAT	qRT-PCR		

1.5 饥饿再投喂对草鱼肝脏 *PGC-1 β* 表达影响

选取 81 尾平均体质量为 (52.35 ± 0.61) g 的草鱼,养殖条件同 1.2。随机分为 3 组:正常投喂组、饥饿组、饥饿再投喂组,每组 3 个重复,每个重复 9 尾鱼。其中,正常投喂组持续 7 d 投喂商用饲料,每天 8:30、12:30 和 16:30 各 1 次。正常投喂组在第 7 天投喂 4 h (12:30) 后取样;饥饿组不投喂任何饲料,饥饿 7 d 后同样在 12:30 取样;饥饿再投喂组饥饿 6 d,在第 7 天早 (8:30) 饱食投喂,4 h 后 (12:30) 取样。每组取 9 尾草鱼,实验用鱼断头处死后,迅速取出肝脏组织,液氮速冻后 -80 °C 保存备用。采用 qRT-PCR 技术,检测每个实验组肝脏中 *PGC-1 β* 的相对表达量,检测

方法同 1.4。

1.6 不同营养素对草鱼肝脏 *PGC-1 β* 表达影响

选取 360 尾平均体质量为 (39.98 ± 0.84) g 的草鱼,随机分为 4 组:根据草鱼对糖脂的营养需求量设计对照组、高糖组、高脂组和高糖高脂组,每组 3 个重复,每个重复 30 尾鱼,养殖条件同 1.2,饲养实验前用对照组饲料驯养 1 周,正式饲养周期为 65 d,每晚清污。实验饲料组成及成分分析见表 2。饲养实验结束后每组取 9 尾草鱼,麻醉后无菌条件下分离肝脏,液氮速冻后 -80 °C 保存备用。采用 qRT-PCR 技术,检测每个实验组 *PGC-1 β* 的相对表达量,检测方法同 1.4。

表 2 实验饲料组成及成分分析

Tab.2 Formulation and proximate composition of the experimental diets

成分 ingredients	对照组 control	高糖组 H-CHO	高脂组 H-LIP	高糖高脂组 H-CHO&H-LIP	%
配方 formulation					
酪蛋白 casein	31	31	31	31	
明胶 gelatin	7	7	7	7	
鱼油 fish oil	2.03	2.03	4	4	
大豆油 soybean oil	2.02	2.03	4	4	
DL-甲硫氨酸 DL-Met	0.2	0.2	0.2	0.2	
糊精 dextrin	30	44.36	29.98	44.35	
矿物质预混料 mineral mix ¹⁾	1	1	1	1	
维生素预混料 vitamin mix ¹⁾	0.1	0.1	0.1	0.1	
乙氧基喹啉 ethoxy quinoline	0.05	0.05	0.05	0.05	
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	22.6	8.23	18.67	4.3	
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	2	2	2	2	
羧甲基纤维素钠盐 CMC-Na	2	2	2	2	
组成成分分析 proximate analysis					
粗蛋白 crude protein	32.36	32.36	32.36	32.36	
粗脂肪 crude lipid	4.19	4.19	8.06	8.06	
碳水化合物 carbohydrates	30.8	45.17	30.8	45.18	

¹⁾ 预混料由深圳康达尔孟州饲料有限公司提供,可为每千克饲料提供 Cu 2.8 mg, Fe 35 mg, Mn 15 mg, Zn 35 mg, VA 5 500 IU, VB₂ 6 IU, VB₆ 8 IU, 泛酸钙 20 IU, 烟酸 16 IU, VD₃ 1 050 IU, VE 20 IU, VK₃ 3 IU, 氯化胆碱 500 IU

¹⁾ The premix was from Shenzhen Kangdaer (Mengzhou) Feed Co., Ltd., which can provide the following diets of per kg: Cu 2.8 mg, Fe 35 mg, Mn 15 mg, Zn 35 mg, VA 5 500 IU, VB₂ 6 IU, VB₆ 8 IU, calcium pantothenate 20 IU, niacin 16 IU, VD₃ 1 050 IU, VE 20 IU, VK₃ 3 IU, choline chloride 500 IU

1.7 统计分析

采用 SPSS Statistics 17.0 进行 One-Way ANOVA 分析和 LSD 与 Duncan 氏比较,结果以平均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示,若 $P < 0.05$,表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 草鱼 *PGC-1 β* 基因 cDNA 核心序列的克隆

通过测序结果分析,确定克隆得到的草鱼 *PGC-1 β* 基因核心片段为 885 bp (GenBank 中的登录号为 KM580493.1),编码 293 个氨基酸 (图 1)。

```

1      CGCCTTCOGCTGACACAGAGGAAGAGGAAGAGGAGGATGAAGAGGACAGTGACTCGGAGG
1      P S A D T E E E E E D E E D S D S E
61     AGGAGGAGGAGGAGGAGTCAATCCAGCAGOGAGAGTGAGAGCATGGTGTGCGTTGAGCCAG
20     E E E E E E S S S S E S E S M V C V E P
121    CAAAGCCTCAGTTCTCCTCAGACAAGGAAGTGCACCTCTGTAGTGGAACTCATCAAATACA
40     A K P Q F S S E K E L H S V V E L I K Y
181    TGCACACGTACTGCTGCGGATACGCCAAACAGGCCAGCTGGGATCGCAAAGAGCGTGAGG
60     M H T Y C L P I R K Q A S W D R K E R E
241    CTTTGGCGGAAAGACCAAGCCTGAGAGCCCGCAAGTCCCGCTGGCTTCTCAGAACT
80     A L A R K T K P E S P Q V P R G L P Q N
301    CTCAGAAAACCGCCCTCAGACCAAGCAGTGGGACCAAGGGTCCCTTCACTCGCC
100    S Q K P P P Q T S S G T R P R V P F T R
361    GCAGGGAATCAAAGCCACTCCCTGCTCAAGGAGCTGTTAGAGGCAGTCAGTTCCCTTTG
120    R R E I K A H S L L K E L L E A V S S F
421    AOGTAAGCAAGCCTTACAGAAATGCACAGCCCCCTTATATCCACTGCAAGGGGGCTGTGA
140    D V S K P Y R M H S P P Y I H C R G A V
481    CTCGGCCCGGCACTGATGTTTCTTCTCCCTGCACGTCAGCCCAAAGCTGAAGCTAAAG
160    T R P G T D V S S S P A R Q P K A E A K
541    ACTCAGACTGTGAGAGCTCGCAAAAGGCGCAAAGCGCCCAAAGCCCTGAGCCAGAGG
180    D S D C E S S Q K A A K R P K S P E P E
601    AAGGTCCTTTTCGGTCAGGCGTCTCGCCGGCTAGCCTCCTTCCCAAGCCGATTCGCTA
200    E G S F S V R R S R R L A S F P S R F A
661    AGAAAGTCCGTGAGAACTGTGGCCGGTTGGAGCCCATGTGCGGCAATCCAGGGAAGAGG
220    K K V R E N C G R L E P I A G Q S R E E
721    AGAACATAGTCAAACATCCTCCCACTGAGCCTCCTTCTGATAGCAGCCAGAAGACCAACT
240    E N I V K H P P T E P P S D S S Q K T N
781    CCTACAAGGCTTCTGAAGCCAAATAOCCATGTTGCAAGGACGAGAAACGCTCCTGCTCT
260    S Y K A S E A N N P C C K D E K R S C L
841    GTCTGCGCTGGCGTCCAAATCCAAGGAGACAGCAGTATGCCA
280    C L P L A S K S N G D T Q Y

```

图1 草鱼 *PGC-1 β* 基因 cDNA 核心序列与推测的氨基酸序列

连续大写字母代表核苷酸序列,对应的氨基酸序列用带有间隔的大写字母在其下方表示。左端数字分别表示核苷酸和氨基酸序列编号

Fig. 1 cDNA and deduced protein sequences of the grass carp *PGC-1 β*

The nucleotide sequence is represented by the continuous capital letters, and the interval capital letters followed under the nucleic acid sequence represent the corresponding amino acid sequence. The serial numbers of the nucleotide and amino acid sequences are indicated by the figures in left

将草鱼 *PGC-1 β* 编码的氨基酸与斑马鱼 (*D. rerio*, XP_009289336), 墨西哥脂鲤 (*Astyanax mexicanus*, XP_007246474), 白斑狗鱼 (*Esox lucius*, XP_010897892), 半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*, XP_008325391) 和孔雀鱼 (*Poecilia reticulata*, XP_008419081) 的相应序列分析比较发现,草鱼 *PGC-1 β* 与斑马鱼、墨西哥脂鲤、白斑狗鱼、半滑舌鳎和孔雀鱼之间的同源性分别为 81%、62%、55%、43% 和 46%。结果表明本实验所得的草鱼 cDNA 部分序列所编码的多肽与斑马

鱼的 *PGC-1 β* 基因的氨基酸同源性序列较高,与其他物种的同源性较低。

2.2 氨基酸序列的系统进化树分析

运用系统发育分析软件 MEGA5.0, 构建 NJ 树 (图 2)。在多重比较的基础上构建的 *PGC-1 β* 系统发育树中,爬行类和鸟类聚为一支,鱼类单独为一支,其中草鱼与斑马鱼聚在一起,草鱼和斑马鱼同为鲤科 (Cyprinidae) 鱼类,符合氨基酸同源性比对结果。

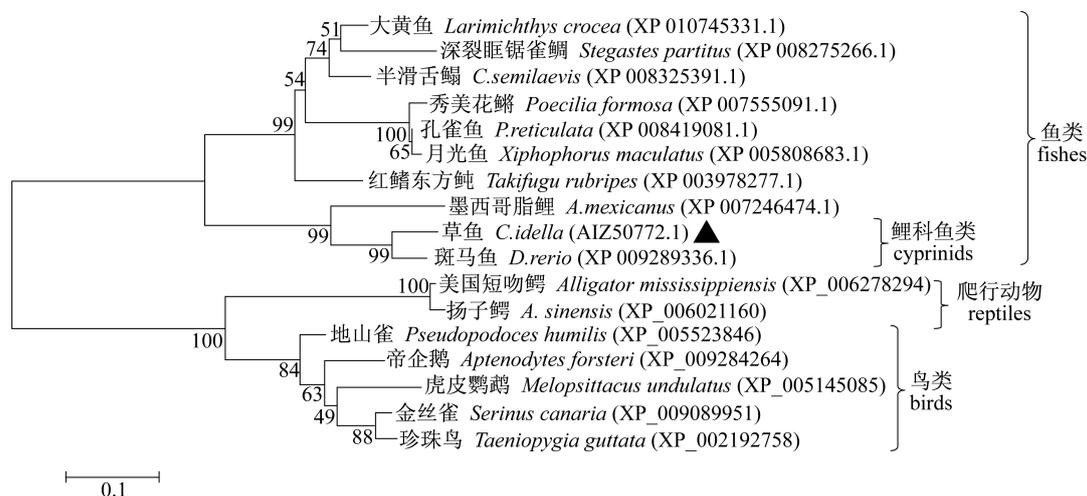


图 2 鱼类 *PGC-1β* 编码的氨基酸序列与其他脊椎动物 *PGC-1β* 的系统进化树

草鱼 *PGC-1β* 用▲标出

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the amino acid sequence of *PGC-1β*, showing the relationship between the fishes and other known vertebrates

The solid triangle marks the grass carp *PGC-1β*

2.3 草鱼 *PGC-1β* 组织差异表达

采用 qRT-PCR 技术检测 *PGC-1β* 基因在肝脏、脑、肾脏、肠、脾脏、脂肪、性腺和肌肉组织中的相对表达量(图 3),发现在肌肉中的 *PGC-1β* 的表达量最低,以此作为基线 1,其他组织显示的是相对于肌肉中的 *PGC-1β* mRNA 的表达倍数。结果显示,草鱼 *PGC-1β* 基因在脑和肠中的表达量较高,肝脏、脂肪和肾脏次之,在性腺、脾脏和肌肉中的表达量比较低。

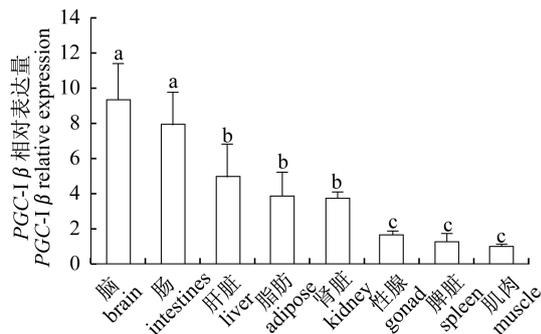


图 3 *PGC-1β* mRNA 的各组织相对表达丰度

图中数据表示为平均值 ± 标准差 (n = 3), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Fig. 3 The relative abundance of *PGC-1β* mRNA expression in different tissues of grass carp

Error bars indicate the mean and standard deviation (n = 3), different letters indicate statistical difference ($P < 0.05$), the same as below

2.4 饥饿再投喂条件下草鱼肝脏组织 *PGC-1β* 基因的表达

采用 qRT-PCR 技术,以 β -actin 基因为内标参照,计算出饥饿再投喂条件下各组中 *PGC-1β* 基因 mRNA 相对表达丰度。与正常投喂对照组相比,草鱼在饥饿 7 d 后,其肝脏组织中 *PGC-1β* 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$),而在重新投喂后,其表达水平下降,并恢复至正常投喂水平,与对照组无显著性差异 ($P < 0.05$) (图 4)。

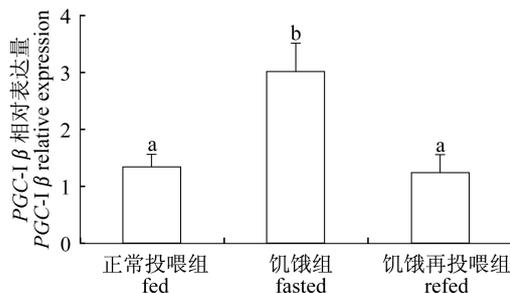


图 4 饥饿与饥饿再投喂对草鱼肝脏 *PGC-1β* 表达水平的影响

Fig. 4 Effect of fasting and refeeding on the expressions of *PGC-1β*

2.5 高糖高脂饲料对草鱼肝脏 *PGC-1β* 的表达影响

采用 qRT-PCR 技术,以 β -actin 基因为内标

参照,计算出对照组、高糖组、高脂组和高糖高脂组 *PGC-1 β* 基因的相对表达量。结果显示:高脂组和高糖高脂组 *PGC-1 β* 表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$),对照组和高糖组差异不显著 ($P > 0.05$) (图 5)。

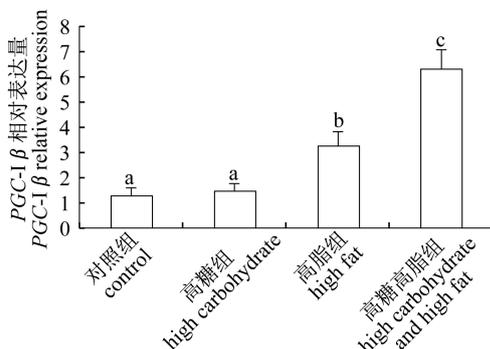


图 5 高糖高脂营养对草鱼肝脏 *PGC-1 β* mRNA 表达水平的影响

Fig. 5 *PGC-1 β* mRNA expression level in liver of grass carp affected by high carbohydrate and high fat

3 讨论

本研究首次克隆出了草鱼 *PGC-1 β* 的部分 cDNA 序列,通过系统发育树分析,草鱼与斑马鱼聚为一支,显示 *PGC-1 β* 的系统进化关系与传统分类学表征的进化关系相一致。在克隆得到草鱼 *PGC-1 β* 基因的部分 cDNA 片段的基础上,对其进行组织分布特异性研究是功能研究的重要前提。本实验检测了草鱼 8 个组织(肌肉、脑、肝脏、肾脏、性腺、脂肪、肠和脾脏)中 *PGC-1 β* mRNA 的表达丰度,结果表明,*PGC-1 β* 基因在 8 种组织中均有表达,在能量需求高的组织如脑、肝脏和脂肪等组织中表达量高,存在组织差异性。在陆上动物的研究中显示,*PGC-1 β* 在肝脏、心脏和棕色脂肪等组织中高表达^[2,14-15]。吉红等^[8]在斑马鱼中的研究表明,*PGC-1 β* 在肌肉组织、肝脏、心脏、鳃和腹腔脂肪组织中均有表达,在鳃中的表达丰度最高,存在组织差异性。金鱼中 *PGC-1 β* 在心脏中表达最高^[9]。上述研究显示鱼类 *PGC-1 β* 的组织表达丰度变化与陆上动物有差异,但均有在能量需求量高的组织中表达量丰富的特点。

在饥饿再投喂实验中,与对照组相比较,饥饿(7 d)引起草鱼肝脏中 *PGC-1 β* mRNA 水平显著升高;而再投喂降低了 *PGC-1 β* 的表达,并几乎

恢复至对照组水平。Lin 等^[2]对大鼠 (*Rattus norvegicus*) 的研究发现,肝脏中 *PGC-1 β* 水平的升高,可以激活 PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha,过氧化物酶体增殖物激活受体 α) 的表达,PPAR α 再通过诱导脂肪酸氧化的基因 MCAD (medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase,中链酰基辅酶 A 脱氢酶) 和 CPT1 (carnitine palmitoyltransferase 1,肉毒碱棕榈酰转移酶 1) 的表达,增强机体的脂肪酸氧化能力,为机体在短时间内提供能量;Gacias 等^[16]在小鼠 (*Mus musculus*) 骨骼肌中的研究表明,禁食 24 h 后,参与脂肪酸 β 氧化路径的 CACT (carnitine/acylcarnitine translocase,左旋肉碱/酰基肉碱转位基因) 的表达可以被 *PGC-1 β* 和 ERR α (estrogen-related receptor α ,雌激素相关受体) 共激活。

以往的研究结果表明,*PGC-1 β* 与糖脂代谢密切相关。Lin 等^[2]在大鼠肝癌细胞中超表达 *PGC-1 β* 几乎没有影响 PEPCCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase,磷酸烯醇丙酮酸羧激酶) 和 G6Pase (glucose-6-phosphatase,葡萄糖 6 磷酸酶) 的 mRNA 水平;但在小鼠肝脏中的研究显示 *PGC-1 β* 可通过活化 ChREBP (carbohydrate response element binding protein,碳水化合物反应元件结合蛋白) 来协调营养输入过程中的脂质合成,并通过诱导 GK (glucokinase,葡萄糖激酶), GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,3-磷酸甘油醛脱氢酶), PFK phosphofructokinase,磷酸果糖激酶) 和 LPK (liver-type pyruvate kinase,肝型丙酮酸激酶) 的转录水平进而增强糖酵解过程^[17]。可见,在陆上动物中,*PGC-1 β* 对糖代谢的作用有不同之处。在草鱼中的研究结果也显示,高糖组并没有显著增加其肝脏中 *PGC-1 β* 的表达量,推测原因有 3 个,一是物种特异性,鱼类和哺乳动物对糖的利用能力存在明显不同;二是草鱼体内的慢性代偿反应;三是糖浓度不足以诱导涉及到这些过程中的重要基因如 *PGC-1 β* 发生显著变化等;但高脂以及高糖高脂饲料投喂对 *PGC-1 β* 的影响都与对照组表现出显著的差异 ($P < 0.05$),这和 Lin 等^[18]在小鼠肝脏中的研究结果类似,研究显示高浓度脂肪酸可有力地诱导小鼠肝脏中 *PGC-1 β* 的表达,*PGC-1 β* 再通过辅激活 SREBPs (sterol regulatory element-

binding proteins, 固醇调节元件结合蛋白)、LXR (liver X-activated receptor, 肝 X 受体) 和 Foxa2 (forkhead boxa2, 叉头框转录因子 A2) 等转录因子以及 SREBP 的下游靶基因包括 FAS (fatty acid synthase, 脂肪酸合成酶)、SCD-1 (stearoyl-CoA desaturase 1, 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 - 1)、HMG-CoA 还原酶 (hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, 羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶)、DGAT (Diacylglycerol acyltransferase, 二脂酰甘油酰基转移酶) 和 GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase, 甘油 - 3 - 磷酸酰基转移酶) 来调节肝脏脂肪形成和脂蛋白代谢^[17-18]。LeMoine 等^[9]在金鱼中的研究显示饥饿能引起其肝脏中 *PGC-1 β* 表达升高, 低温 (4 °C) 可引起金鱼肌肉中 *PGC-1 β* 的表达上调, 这与吉红等^[8]在斑马鱼中发现的饥饿可诱导肝脏中的 *PGC-1 β* 的表达升高结果一致; 鱼类在低温和饥饿条件下 *PGC-1 β* 升高可能诱导机体脂肪酸氧化能力增强以产生更多的能量用于抵抗低温和饥饿的胁迫。

PGC-1 β 在不同条件下促进脂肪酸氧化和脂肪合成的双向作用机理并不清晰, 有研究认为, 在高浓度营养或者饥饿再投喂条件下, *PGC-1 β* 可上调生脂转录因子 ChREBP 和 SREBP-1 的表达, 向脂合成的方向进行; 而当机体在空腹或者低营养等状态下, *PGC-1 β* 可增强脂肪酸氧化相关的酶基因活性以提高脂肪酸分解代谢的能力^[17]。鱼类在自然状态下, 经常受到食物缺乏的威胁, 在饥饿状态下, 鱼类会通过自身的能量调节机制分配利用能量, 维持其正常的生理代谢。综合以上分析, 鱼类 *PGC-1 β* 在调控能量代谢中可能起着和在哺乳动物中类似的功能, 但其作用机制是否和哺乳动物一样, 尚需进一步的研究。

参考文献:

- [1] Finck B N, Kelly D P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2006, 116 (3): 615 - 622.
- [2] Lin J, Tarr P T, Yang R, *et al.* PGC-1 β in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (33): 30843 - 30848.
- [3] Nagai Y, Yonemitsu S, Erion D M. *et al.* The role of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 β in the pathogenesis of fructose-induced insulin resistance [J]. *Cell Metabolism*, 2009, 9 (3): 252 - 264.
- [4] Sonoda J, Mehl I R, Chong L W, *et al.* PGC-1 β controls mitochondrial metabolism to modulate circadian activity, adaptive thermogenesis, and hepatic steatosis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, 104 (12): 5223 - 5228.
- [5] Andersen G, Wegner L, Yanagisawa K, *et al.* Evidence of an association between genetic variation of the coactivator PGC-1 β and obesity [J]. *Journal of Medical Genetics*, 2005, 42 (5): 402 - 407.
- [6] Kamei Y, Ohizumi H, Fujitani Y, *et al.* PPAR γ coactivator 1 β /ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high - energy expenditure and antagonizes obesity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100 (21): 12378 - 12383.
- [7] Lin J, Handschin C, Spiegelman B M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators [J]. *Cell Metabolism*, 2005, 1 (6): 361 - 370.
- [8] Ji H, Su S S, Lu R H, *et al.* Partial cDNA cloning and preliminary study on expression of PGC1 β in zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2009, 18 (6): 5 - 8. [吉红, 苏尚顺, 卢荣华, 等. 斑马鱼 PGC-1 β 基因部分 cDNA 的克隆及其表达的初步研究. 西北农业学报, 2009, 18 (6): 5 - 8.]
- [9] LeMoine C M, 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.
- [10] Cao J M, Liu Y J, Lao C L, *et al.* Effect of different dietary fatty acids on tissue lipid content and fatty acid composition of grass carp [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 1997, 9 (3): 36 - 44. [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. 动物营养学报, 1997, 9 (3): 36 - 44.]
- [11] Feng J, Jia G. Studies on the fatty liver diseases resulted from different lipid levels in *Sciaenops ocellatus* diets [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29 (1): 61 - 64. [冯健, 贾刚. 饵料中不同脂肪水平诱导红姑鱼脂肪肝病的研究. 水生生物学报, 2005, 29 (1): 61 - 64.]
- [12] Cheng H L, Xia D Q, Wu T T. Fatty liver and

- regulation of lipids metabolism in fish [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2006, 18 (4): 294 – 298. [程汉良, 夏德全, 吴婷婷. 鱼类脂类代谢调控与脂肪肝. 动物营养学报, 2006, 18 (4): 294 – 298.]
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method [J]. Methods, 2001, 25 (4): 402 – 408.
- [14] Uldry M, Yang W, St-Pierre J, *et al.* Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation [J]. Cell Metabolism, 2006, 3 (5): 333 – 341.
- [15] St-Pierre J, Lin J, Krauss S, *et al.* Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivators 1 α and 1 β (PGC-1 α and PGC-1 β) in muscle cells [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278 (29): 26597 – 26603.
- [16] Gacias M, Pérez M A, Pujol V M, *et al.* PGC-1 β regulates mouse carnitine-acylcarnitine translocase through estrogen-related receptor α [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2012, 423 (4): 838 – 843.
- [17] Chambers K T, Chen Z, Lai L, *et al.* PGC-1 β and ChREBP partner to cooperatively regulate hepatic lipogenesis in a glucose concentration-dependent manner [J]. Molecular Metabolism. 2013; 2 (3): 194 – 204.
- [18] Lin J, Yang R, Tarr P T, *et al.* Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 β coactivation of SREBP [J]. Cell, 2005, 120 (2): 261 – 273.

Molecular cloning of *PGC-1 β* gene and effects of high carbohydrate and high fat feed on its expression in liver of grass carp *Ctenopharyngodon idella*

LU Ronghua, YANG Feng, SUN Junjun, XIE Dizhi, QIN Chaobin,
YANG Liping, ZHENG Wenjia, NIE Guoxing*
(College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: To investigate the mechanism of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 beta (*PGC-1 β*) in the energy metabolism of grass carp *Ctenopharyngodon idella*, the partial cDNA of *PGC-1 β* was cloned, and tissue expression and nutritional regulation were investigated. The partial cDNA was 885 bp (GenBank number: KM580493.1), encoding a polypeptide of 293 amino acids, compared to zebra fish, it showed 81% homology. Quantitative real-time PCR showed that highest *PGC-1 β* mRNA expression was detected in brain, followed by intestine and liver. *PGC-1 β* gene expression levels in liver were significantly increased during 7 days of fasting and decreased to normal level after refeeding. The expression of *PGC-1 β* was significantly affected by dietary lipid and carbohydrate, significantly higher in liver of fish fed the diet with high carbohydrate and high lipid. The results indicate that *PGC-1 β* is regulated by the energy expenditure status, which implies it plays an important role in energy metabolism in grass carp.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *PGC-1 β* ; tissue distribution; nutritional regulation; energy metabolism

Corresponding author: NIE Guoxing. E-mail: niegx@htu.cn