

## 饲料脂肪对黄颡鱼卵巢脂类代谢以及 PI3KCa甲基化和转录水平的影响

卓梅琴<sup>#</sup>, 杨水波<sup>###</sup>, 凌仕诚, 罗智<sup>\*</sup>  
(华中农业大学水产学院, 分子营养实验室, 湖北武汉 430070)

**摘要:** 为了探究饲料不同脂肪水平对黄颡鱼卵巢脂肪代谢潜在的影响, 本研究设计了活体与离体两个实验。活体实验中, 分别投喂3组不同脂肪水平的饲料(脂肪含量分别为6.98%、11.34%和15.41%)8周。离体实验中, 分离原代黄颡鱼卵母细胞, 采用(0、0.2和0.5 mmol/L)3组不同脂肪酸浓度孵育48 h。活体实验结果显示: 与6.98%和15.41%脂肪水平组相比, 11.34%脂肪水平显著增加黄颡鱼卵巢甘油三酯水平(TG), 并上调FAS、G6PD、6PGD和ME的酶活性水平, 以及LPL和CD36基因表达水平。与6.98%和11.34%脂肪水平组相比, 15.41%脂肪水平组显著升高黄颡鱼的性腺指数(GSI), 并上调CPTIA和DNMT3b的基因表达水平, 以及PI3KCa启动子-64和-52 CpG位点的甲基化水平, 而显著降低PI3KCa的基因表达水平。体外细胞实验显示: 与对照组(0)相比, 0.5 mmol/L脂肪酸孵育显著增加卵母细胞TG含量, 并上调FAS、G6PD和ME酶活水平, 以及G6PD和PI3KCa的基因表达水平。同时, 与对照组相比, 脂肪酸孵育组显著降低CPTIA、ACCb、LPL、CD36、DNMT1以及DNMT3b基因的表达水平。然而, 脂肪酸孵育对卵母细胞PI3KCa的启动子甲基化水平没有影响。研究表明, 饲料不同脂肪水平影响卵巢TG的合成, 可能主要是通过脂肪转运相关基因, 并且高脂肪很可能是通过影响黄颡鱼卵巢PI3KCa启动子甲基化水平来影响PI3KCa的表达。而离体条件下, 脂肪酸促进卵母细胞TG的合成很可能是通过升高脂肪合成相关基因、降低脂肪分解和转运相关基因来实现, 但脂肪酸孵育不通过影响黄颡鱼卵母细胞PI3KCa甲基化水平来影响PI3KCa基因表达。

**关键词:** 黄颡鱼; 卵巢; 脂类代谢; 甲基化; PI3KCa

**中图分类号:** S 963.73

**文献标志码:** A

脂肪是鱼类重要的营养物质, 对鱼类的生长、发育和营养代谢均具有重要的作用。同时, 脂肪是鱼类卵巢发育、产卵和繁殖过程所必需的营养物质<sup>[1-2]</sup>。研究表明, 卵母细胞的脂滴沉积是次级卵母细胞生长期的重要特征<sup>[3]</sup>。目前, 有关饲料中不同脂肪水平对鱼类的影响主要集中在肝脏脂肪沉积方面, 而对卵巢的脂肪代谢很少有关。研究表明, 鱼类卵母细胞也可以进行内源性的脂肪合成, 并且脂肪合成、

分解和转运相关酶和基因在卵巢脂肪代谢中发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>, 如参与脂肪合成的脂肪酸合成酶(fatty acid synthetase, FAS)、葡萄糖6磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(6-phosphate- glucose dehydrogenase, 6PGD)、苹果酸酶(malic enzyme, ME)和乙酰辅酶A羧化酶a(acetyl CoA carboxylase a, ACCa), 参与脂肪分解的肉碱棕榈酰转移酶I(carnitine palmitoyltransferase I, CPTI)和乙酰辅酶A羧化酶b(acetyl

收稿日期: 2019-09-16 修回日期: 2019-09-25

资助项目: 国家自然科学基金(31422056, 31902381); 中国博士后科学基金(2019M650183); 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目(T201933)

通信作者: 罗智, E-mail: luozhi99@mail.hzau.edu.cn

CoA carboxylase b, ACCb), 以及参与脂肪转运的脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)和脂肪酸移位酶(fatty acid translocation enzyme, CD36)<sup>[6-7]</sup>。然而, 目前在鱼类中, 有关卵巢脂肪代谢的相关研究十分缺乏。

磷脂酰肌醇-3-羟激酶(phosphatidylinositol 3-hydroxykinase, PI3K)信号转导通路是机体重要的转导通路之一, 在调节细胞增殖、分化、发育和营养代谢方面具有重要作用。研究表明, PI3K调控卵巢的发育和成熟<sup>[5, 8]</sup>。同时, 本课题组前期研究也发现黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)卵巢中PI3K基因的表达量非常高<sup>[9]</sup>。此外, 本课题组的研究也发现, PI3K参与了黄颡鱼卵母细胞和滤泡细胞的脂肪代谢过程<sup>[5, 10]</sup>, 但有关PI3KCa与脂肪代谢之间的关系还不清楚。DNA甲基化与异常脂肪代谢息息相关。本课题组前期研究还发现, 黄颡鱼PI3KCa启动子存在丰富的CpG位点<sup>[11]</sup>, 通常启动子上的CpG位点发生甲基化会引起基因的沉默表达<sup>[12]</sup>, 因此本研究从DNA甲基化水平探讨PI3KCa与脂肪代谢之间的关系。

黄颡鱼是我国重要的经济鱼类, 人工繁殖技术推动了黄颡鱼养殖产业的发展。卵巢的正常脂肪代谢关系到卵母细胞的成熟和质量, 也是决定黄颡鱼人工繁殖技术成功的关键。本研究在本课题组过去十多年对黄颡鱼大量研究的基础上<sup>[7, 13-14]</sup>, 结合活体与离体实验, 探讨了不同脂肪/脂肪酸水平对黄颡鱼卵巢、卵母细胞脂肪代谢以及PI3KCa甲基化和转录水平的影响, 旨在丰富脂肪在鱼类性腺发育中作用的基础理论, 同时为黄颡鱼人工繁殖技术的发展提供新的思路。

## 1 材料与方法

实验分为两部分, 实验一: 用3种不同水平脂肪饲料(6.98%、11.34%、15.41%)喂养黄颡鱼; 实验二: 不同浓度脂肪酸(0、0.2、0.5 mmol/L)孵育黄颡鱼卵细胞。

### 1.1 实验饲料

实验饲料的配方和营养成分分析见文献<sup>[15]</sup>。配制脂肪水平含量不同的3组饲料, 用索氏抽提法测定粗脂肪, 分别为6.98%、11.34%和15.41%。饲料在80 °C烘箱中干燥, 至水分小于10%, 放置-20 °C冰箱保存备用。

### 1.2 实验鱼与饲养管理

实验中黄颡鱼分为2组, 第一组黄颡鱼购于武汉百容水产良种有限公司, 用于投喂不同脂肪水平的饲料。选择规格均一的黄颡鱼(3.79±0.16) g (mean±SE)放入9个玻璃纤维缸中, 每缸30尾, 每组3个重复。实验采用静水养殖系统, 并连续充气以保持溶解氧水平接近饱和。实验期间饱食投喂, 每天投喂2次, 投喂时间分别09:00和16:00, 投喂前进行吸污和换水, 投喂30 min后吸出残饵。实验周期8周。养殖结束后饥饿24 h, 用MS-222(10 mg/L)对实验鱼进行麻醉, 分别测量鱼的体质量和体长, 解剖获得卵巢用于计算性腺成熟指数(GSI)、甘油三酯(triglyceride, TG)含量测定、酶活性测定、DNA和RNA提取。

第二组黄颡鱼(21.1±0.3) g (mean±SE), 购于华中农业大学菜市场, 用于不同浓度脂肪酸孵育黄颡鱼卵母细胞实验。黄颡鱼卵母细胞分离及培养方法具体参照文献<sup>[5]</sup>。由于棕榈酸和油酸是食物中存在的两种最丰富的脂肪酸<sup>[15]</sup>, 以1:1的比例添加孵育卵母细胞, 探讨饲料脂肪水平在体外对黄颡鱼卵巢脂代谢的影响。采用(0、0.2、0.5 mmol/L)3种脂肪酸浓度孵育卵母细胞, 卵母细胞培养于T25细胞培养瓶, Cortland溶液作为培养基, 每个培养瓶使用5 mL培养基, 每个处理3个重复, 培养48 h后取样, 对卵母细胞进行TG含量测定、酶活性测定、DNA和RNA提取。

### 1.3 甘油三酯含量和酶活性测定

卵巢和卵母细胞TG含量根据南京建成生物试剂盒说明进行测定。脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)活性测定参考Chakrabarty等<sup>[16]</sup>的方法, G6PD和6PGD活性测定参考Barroso等<sup>[17]</sup>的方法, ME活性测定根据Wise等<sup>[18]</sup>的方法。酶活力单位(U)定义为: 30 °C下, 每毫克可溶性蛋白在1 min内转化1 μmol底物为产物。可溶性蛋白质浓度使用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)作为标准, 按照Bradford<sup>[19]</sup>的方法测定。

### 1.4 PI3KCa启动子甲基化分析

根据说明, 采用DNA试剂盒(Axygen Biotechnology, 杭州, 中国)提取卵巢和卵母细胞的基因组DNA, 然后使用DNA甲基化试剂盒(Zymo research, Orange, CA)修饰基因组DNA。具体方法如下, 通过巢式聚合酶链反应(PCR),

采用两个BSP (Bisulfite sequencing PCR) 特异性引物(表1)扩增经重亚硫酸盐修饰后的DNA模板。PCR程序为: 95 °C变性3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共30个循环; 最后72 °C延伸5

min终止。然后, 凝胶纯化回收PCR产物, 并将其克隆到PMD 19-T载体(TaKaRa, 大连, 中国)上, 随后每个处理随机选择20个克隆进行测序, 测序分析由武汉擎科生物科技有限公司进行。

表 1 用于扩增启动子区域的引物

Tab. 1 Primers used for amplification of promoter regions in bisulfite treated genomic DNA

引物名称 primers	正向引物 forward primer (5'-3')	反向引物 reverse primer (5'-3')	步骤 step
PI3KCa	GGATGTATGATGATTTTGAGTG	CTAAAATAAAAAATAAATAAACACTCC	外侧 outer
	ATTGTTGTAGATGAAGTTGTAG	CTAAAATAAAAAATAAATAAACACTCC	内侧 inner

### 1.5 实时荧光定量PCR(qPCR)检测基因表达

参考文献[11], 采用实时荧光定量PCR(qPCR)检测基因表达, 荧光定量引物见表2。qPCR反应程序为, 95 °C预变性30 s, 95 °C变性5 s, 57 °C退火30 s, 最后72 °C延伸30 s, 共40个循环。相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算<sup>[20]</sup>。选用双内参核糖体蛋白L7 (ribosomal protein L7, RPL7) 和

甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 进行标准化。预实验表明这两个内参组合在不同脂肪和脂肪酸水平处理下表达最稳定。

### 1.6 数据分析

采用SPSS 19.0软件进行数据分析, 结果表

表 2 实时荧光定量PCR引物

Tab. 2 Primers used for q-PCR from yellow catfish

引物名称 primers	正向引物 forward primer (5'-3')	反向引物 reverse primer (5'-3')	登录号 accession No.
$\beta$ -Actin	GGACTCTGGTGATGGTGTGA	CTGTAGCCTCTCTCGGTCAG	EU161066
18srRNA	CTGCCGGTGGTCTTCTTCCA	ATTCAGCGGGTCGTCTCGTC	GQ4652361
RPL7	GGCAAATGTACAGGAGCGAG	GCCTTGTGAGCTTGACGAA	KP938522
GAPDH	TTTCAGCGAGAGAGACCCAG	ATGACTCTCTTGGCACCTCC	KP938521
HPRT	ATGCTTCTGACCTGGAACGT	TTGCGGTTTCAGTGCTTTGAT	KP938523
UBCE	TCAAAGAAGAGCCAGTGGAGG	TAGGGGTAGTCGATGGGGAA	KP938524
TUBA	TCAAAGCTGGAGTTCTCGGT	AATGGCCTCGTTATCCACCA	KP938526
PI3KCa	CCAGGGAAACGGGATACA	TCCACTTACAGCAAGGAGAA	KU976455
FAS	AACTAAAGGCTGCTGGTTGCTA	CACCTTCCCGTCACAAACCTC	JN579124
G6PD	CAGGAATGAACGCTGGGATG	TCTGTACTCGGTAGGTCAGGTCC	JX992744
6PGD	GCTCTGATGTGGCGAGGTGG	CGTAGAAGGACAGTGCAGTGGTAAA	JX992745
CPTIA	ATTTGAAGAAGCACCCAGAGTATGT	CCCTTTTATGGACGGAGACAGA	JQ074177
ACCa	AATGGCTATGACTGGCAAGGG	TACCGTTCGTTCCACTAGTGATTT	JX992746
ACCb	AAGTGTCTGCTGAGCCCTGGAG	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG	JX992747
LPL	AGCGATTGGTGGGAGGATTAT	TGAGCACGGTCCAGTTTCCT	JX992743
CD36	GATCGTTCTGATTTTCGGTTGG	TTATTGTCGTACTTCGGCACTG	MG574317
DNMT1	TGTGGGGTTTGTGAGGTGTG	TTTGATGCGTCTTAAGTGCC	MH263731
DNMT3a	GCAGCCAATCAGAGTGTCTCTC	TGGTGTCTCACCATCCCAAC	MH263732
DNMT3b	ATGAATGGAAAGGATGACGGT	CAAAGAGATGCCTGATGACTGG	MH263733

示为平均值±标准误(mean±SE)。不同处理用Barlett检验方差同质性, 实验处理组之间进行单因素方差分析和Turkey等检验,  $P < 0.05$ 时代表差异显著。

## 2 结果

### 2.1 饲料脂肪水平对黄颡鱼卵巢性腺成熟指数的影响

饲料脂肪水平对黄颡鱼卵巢性腺成熟指数的影响如图1所示。黄颡鱼雌鱼性腺成熟系数最高的是饲料脂肪15.41%组, 饲料脂肪6.98%和11.34%组无显著差异(图1)。

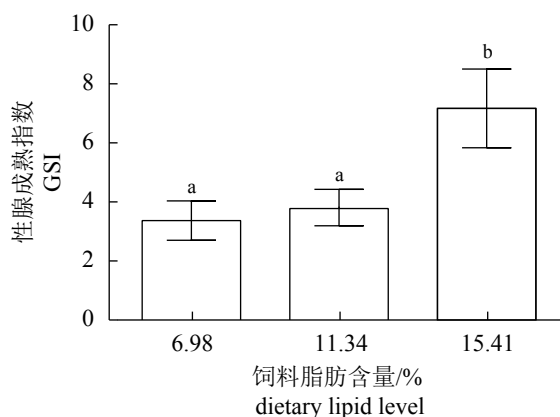


图1 饲料脂肪水平对黄颡鱼卵巢GSI的影响

不同字母的条形图表示不同组之间的差异显著性( $P < 0.05$ ),  $GSI(\text{性腺指数})\% = 100\% \times (\text{性腺质量}) / (\text{体质量} - \text{内脏质量})$

Fig. 1 Effect of dietary lipid levels on GSI in the ovary of *P. fulvidraco*

Bars that do not share a common letter mean significant difference among different group ( $P < 0.05$ ).  $GSI(\text{gonadosomatic index})\% = 100\% \times (\text{gonad weight}) / (\text{body weight} - \text{viscera weight})$ .

### 2.2 饲料脂肪水平对黄颡鱼卵巢TG含量、酶活性及脂代谢关键基因表达的影响

TG含量最高的是饲料脂肪11.34%组, 其次是饲料脂肪15.41%组, 最低的是饲料脂肪6.98%组(图2-a)。

FAS酶活性最高的是饲料脂肪11.34%组, 饲料脂肪6.98%和15.41%组之间无显著差异。G6PD酶活性最高的是饲料脂肪11.34%组, 其次为饲料脂肪15.41%组, 最低的是饲料脂肪6.98%组。与饲料脂肪6.98%组相比, 饲料脂肪11.34%组的6PGD和ME酶活性显著增高, 而饲料脂肪15.41%组则无显著差异(图2-b)。

与饲料脂肪6.98%组相比, 饲料脂肪11.48%组LPL和CD36的表达显著增高。与饲料脂肪11.34%组相比, 饲料脂肪15.41%组CPT 1A的表达显著增高, 而LPL和CD36的表达显著降低。另外, 饲料脂肪水平对FAS、G6PD、6PGD、ACCa和ACCb的mRNA水平无显著影响(图2-c)。

### 2.3 饲料脂肪水平对PI3KCa甲基化、PI3KCa和DNMTs表达的影响

采用BSP特异性引物进行PCR扩增, 在预测的CpG岛附近获得一段536 bp的序列(从-91 bp到+445 bp, 转录起始位点定义为+1), 包含34个CpG位点(图3-a)。测序结果显示PI3KCa启动子的-71、-64、-52和+8 CpG位点发生甲基化(图3-b)。饲料脂肪6.98%和11.34%组中, -71、-64、-52和+8 CpG位点的甲基化水平分别为50%、20%、20%和40%, 而饲料脂肪15.41%组, -71、64、-52和+8 CpG位点甲基化水平分别为50%、50%、50%和40%(图3-c)。与饲料脂肪6.98%和11.34%组相比, 饲料脂肪15.41%组的PI3KCa的甲基化百分比增高, 而PI3KCa的mRNA表达在饲料脂肪15.41%组降低(图3-d)。与饲料脂肪6.98%和11.34%组相比, DNMT3b的mRNA水平在饲料脂肪15.41%组显著增高。另外, 饲料脂肪水平对DNMT1和DNMT3a的mRNA表达无显著影响(图3-e)。

### 2.4 -64和-52 CpG位点结合转录因子的预测

通过在线软件(<http://www.genomatix.de>)预测6个可能与-64和/或-52 CpG位点结合的转录因子, 包括PARF(PAR/ bZIP家族)、LHXF(Lim同源域因子)、BRNF(Brn POU结构域因子)、FKHD(叉头结构域因子)、ZF06(C2H2锌指转录因子6)和CREB(cAMP-响应元件结合蛋白)(图4)。

### 2.5 不同浓度脂肪酸孵育对黄颡鱼原代卵母细胞TG含量、酶活性及脂代谢关键基因表达的影响

TG含量随着脂肪酸浓度的增加而增加(图5-a)。ME活性随着脂肪酸浓度的增加而增加。FAS和G6PD的活性在0.5 mmol/L脂肪酸组中最高, 在其两组之间无显著差异。不同组之间6PGD活性无显著差异(图5-b)。

FAS和G6PD的mRNA水平在0.5 mmol/L脂肪酸组最高, 其他两组之间无显著差异。6PGD的表达随着脂肪酸浓度的增加而增加。ACCa的

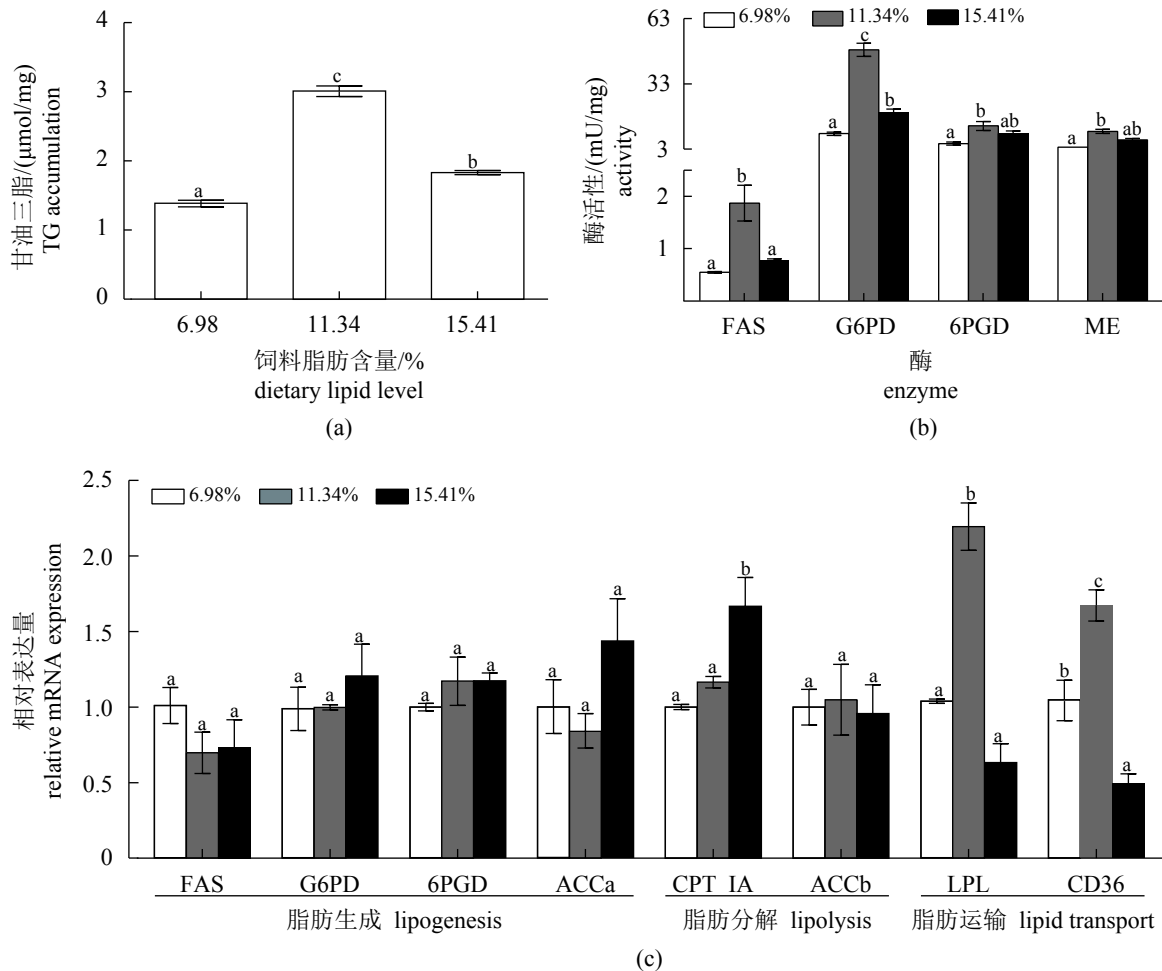


图2 饲料脂肪水平对黄颡鱼卵巢TG含量(a)、酶活性(b)和基因表达(c)的影响

不同字母的条形图表示不同组之间的差异显著性( $P < 0.05$ )

Fig. 2 Effect of dietary lipid levels on TG accumulation (a), enzymatic activities (b) and expression of genes (c) involved in lipid metabolism in the ovary of *P. fulvidraco*

Bars that do not share a common letter mean significant difference among different group ( $P < 0.05$ )

mRNA水平在0.2 mmol/L脂肪酸组最高, 对照组中最低。CPT IA和ACCb的表达随着脂肪酸浓度的增加而降低。LPL的mRNA水平在对照组中最高, 并且在其他两组之间无显著差异。CD36的表达在对照组最高, 0.2 mmol/L脂肪酸组最低(图5-c)。

## 2.6 脂肪酸孵育对PI3KCa甲基化, PI3KCa和DNMTs表达的影响

黄颡鱼卵母细胞中, PI3KCa启动子未检测到甲基化(图6-a)。随着脂肪酸孵育浓度的增加, PI3KCa的mRNA水平增加(图6-b)。DNMT1 mRNA表达在0.5 mmol/L脂肪酸组中最低, 在其他两组之间无显著差异。不同组间DNMT3a mRNA水平无显著差异。随着脂肪酸浓度的增加, DNMT3b

的mRNA水平降低(图6-c)。

## 3 讨论

脂肪是黄颡鱼卵巢发育过程中的主要能量来源, 目前有关研究主要集中于饲料中脂肪水平对鱼类的卵巢发育、产卵和繁殖现象, 很少有研究涉及饲料脂肪水平对黄颡鱼卵巢内源性脂肪合成的影响。

本实验中, 与6.98%和11.34%脂肪组相比, 15.41%脂肪组显著增加黄颡鱼的性腺指数。类似的, 对其他鱼类的研究中表明, 增加饲料脂肪含量会促进鱼类卵巢的发育<sup>[2, 21]</sup>。研究表明, 卵母细胞中的脂滴大部分是以TG的形式存在, 卵母细胞的成熟和发育依赖于卵母细胞中TG的合

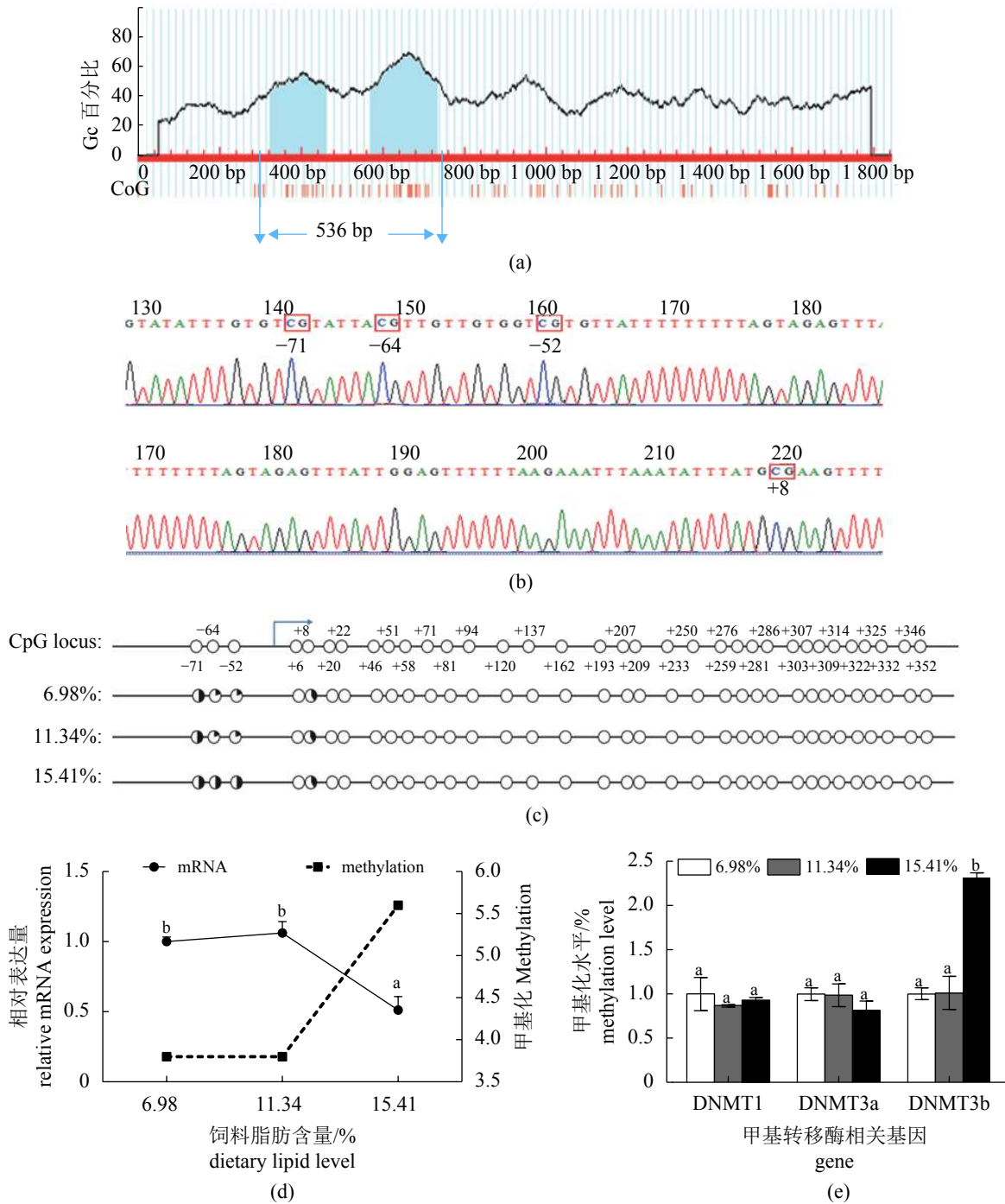


图 3 饲料脂肪水平对黄颡鱼卵巢组织中PI3KCa基因启动子区的甲基化和mRNA表达以及DNMTs表达的影响 (a)PI3KCa启动子CpG岛预测及BSP法扩增的536bp序列;(b)硫化DNA模板扩增后的测序图谱, 红色矩形表示甲基化CpG位于-71, -64, -52和+8位点;(c)PI3KCa单个CpG的甲基化状态。不同百分比的甲基化由圆圈中黑色区域的比例表示;(d)PI3KCa甲基化水平与mRNA表达的关系;(e)DNMTs表达。不同字母的条形图表示不同组之间的差异显著性( $P<0.05$ )

Fig. 3 Effects of dietary lipid levels on the promoter methylation and mRNA expression of PI3KCa, and DNMTs mRNA expression in the ovary tissues of *P. fulvidraco*

(a)The putative result of CpG islands in PI3KCa and the amplification sequence by nest PCR with two BSP specific primer pairs;(b)Sequencing chromatogram analysis of partial bisulfite-modified DNA after amplification. The red rectangles indicate methylated CpG locus at -71, -64, -52 and +8 sites;(c) Methylation status of individual CpG dinucleotides of PI3KCa. Different percentages of methylation are represented by the proportion of black area in the circle;(d)Relationship between methylation and mRNA expression of PI3KCa. Methylation level corresponds to the average methylation values of 34 CpG sites;(e)DNMTs expressions. Bars that do not share a common letter mean significant difference among different groups ( $P<0.05$ )

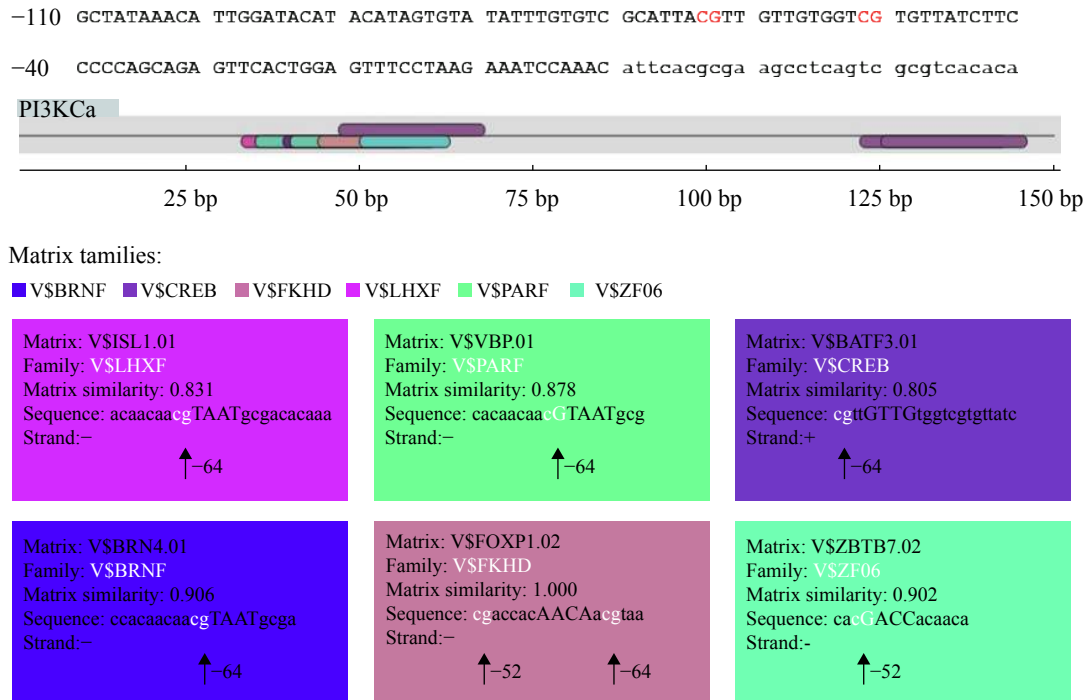


图4 PI3KCa启动子-64和-52CpG位点的可能结合的转录因子结合位点预测

转录因子结合的序列信息显示在相应颜色的框中，白色代表转录因子家族

Fig. 4 Transcription factor binding sites (TFBS) prediction at -64 and/or -52 CpG site of PI3KCa promoter

The information of TFBS was presented in the boxes with corresponding colors, the sequences at -64 and/or -52 CpG sites. The family name of predicted TFs was shown in white color

成<sup>[22]</sup>。本实验中，与6.98%和11.34%脂肪水平组相比，11.34%脂肪水平组相比现在增加卵巢TG的合成，表明适宜脂肪水平能够增加卵巢TG的合成。周海等<sup>[3]</sup>指出适宜的脂肪水平会增加中华鳄(*Acipenser sinensis*)性腺TG的蓄积。然而，与11.34%脂肪水平组相比，15.41%脂肪水平反而降低卵巢TG的合成，这可能与15.41%脂肪水平组显著增加性腺指数有关，Hoyos-Marulanda等<sup>[23]</sup>研究表明卵巢发育过程中卵母细胞的TG含量下降。此外，15.41%脂肪水平组也显著增加黄颡鱼卵巢CPT1A的基因表达。CPT1A是脂肪酸 $\beta$ 氧化的限速酶，近期我们实验室的研究表明脂肪酸 $\beta$ 氧化是黄颡鱼卵母细胞成熟的必要条件，这可能也是CPT1A在15.41%脂肪水平组高表达的原因。LPL和CD36是鱼类脂肪酸转运过程中两种最主要的酶<sup>[6]</sup>。有研究指出，在在鱼类性腺发育过程中，卵巢LPL和CD36显著高表达<sup>[24-25]</sup>。本研究中，饲料脂肪显著增加黄颡鱼LPL和CD36的基因表达，并且饲料脂肪水平影响LPL和CD36的表达水平的趋势与TG的变化非常一致，提示饲料脂肪水平影响卵巢TG的累积很可能是通过脂肪

转运基因LPL和CD36来实现。然而，郑珂珂等<sup>[26]</sup>指出，黄颡鱼高脂投喂后肝脏LPL的表达量显著增加。Sfeir等<sup>[27]</sup>高脂饲料投喂后，小鼠心脏CD36的表达量显著上升。但是，Patsouris等<sup>[28]</sup>报道高脂投喂小鼠肝脏LPL和CD36的表达量没有显著影响。

在体外实验中，0.5 mmol/L的脂肪酸孵育显著增加黄颡鱼卵母细胞的TG合成，并伴随着脂肪合成相关酶(FAS、G6PD、ME)酶活和基因表达(FAS、G6PD、6PGD、ACCa)的上调，以及脂肪分解(CPT1A、ACCb)和转运(LPL、CD36)相关基因的表达下降，提示脂肪酸促进卵母细胞TG的合成很可能是通过升高脂肪合成相关基因、降低脂肪分解和转运相关基因来实现。类似的，Ling等<sup>[15]</sup>研究也指出，脂肪酸孵育会增加细胞TG的合成。有研究表明，高浓度的脂肪酸对细胞有一定的毒性作用，此时细胞可通过酯化反应合成TG来抵抗高浓度脂肪酸毒性<sup>[15,29]</sup>。

DNA甲基化会影响基因的表达，通常认为基因启动子上的CpG位点发生甲基化会沉默基因的表达<sup>[12]</sup>。在哺乳动物中，研究表明饲料高脂很

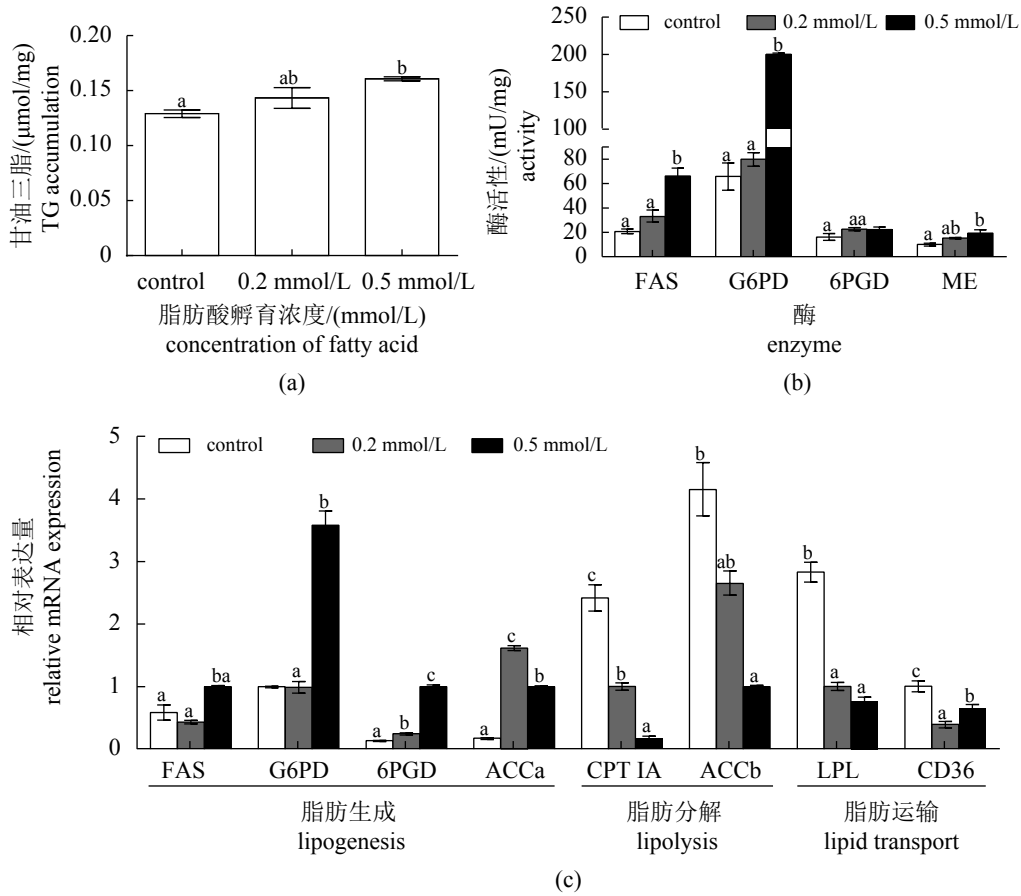


图 5 脂肪酸孵育对黄颡鱼原代卵母细胞TG含量(a)、酶活性(b)和基因表达(c)的影响  
不同字母的条形图表示不同组之间的差异显著性( $P < 0.05$ )。

Fig. 5 Effects of fatty acid incubation on TG accumulation (a), enzymatic activities (b) and expression of genes (c) involved in lipid metabolism in the primary oocytes of *P. fulvidraco*

Bars that do not share a common letter mean significant difference among different group ( $P < 0.05$ ).

可能通过DNA甲基化修饰的方式改变基因的表达<sup>[30]</sup>。PI3KCa是PI3K家族的最重要的成员之一,前期研究表明PI3K通路参与黄颡鱼的滤泡细胞的脂肪代谢作用。同时也发现PI3KCa的启动子存在丰富的CpG位点<sup>[11]</sup>,暗示了PI3KCa启动子甲基化可能参与黄颡鱼的脂肪代谢作用。本研究发现,15.41%脂肪水平组显著升高PI3KCa启动子-62和-54CpG位点的甲基化水平,而降低PI3KCa的基因表达,提示高脂可能通过DNA甲基化修饰的方式来降低PI3KCa的转录水平。通过在线软件预测-62和-54CpG位点潜在的结合转录因子分别为PARF(PAR/ bZIP家族)、LHXF(Lim同源域因子)、BRNF(Brn POU结构域因子)、FKHD(叉头结构域因子)、ZF06(C2H2锌指转录因子6)和CREB(环磷酸腺苷效应元件结合蛋白)。但是,这些转录因子是否与-62和-54的CpG位点发

生甲基化而不能正常与启动子结合需要进一步的验证。参与DNA甲基化的酶主要有3种,分别为维持甲基转移酶DNMT1以及从头甲基转移酶DNMT3a和DNMT3b<sup>[31]</sup>。本研究中发现,15.41%脂肪水平显著增加DNMT3b的基因表达,而对DNMT1和DNMT3a的基因表达不影响,提示DNMT3b可能比DNMT1和DNMT3a在调节PI3KCa启动子甲基化过程发挥更重要的作用。然而体外实验结果显示,脂肪酸孵育显著增加卵母细胞PI3KCa的基因表达,而对PI3KCa甲基化水平无影响,暗示了脂肪酸改变PI3KCa的表达并不通过DNA甲基化的方式。同时,脂肪酸孵育显著降低卵母细胞DNMT1和DNMT3b的基因表达,表明在体外脂肪酸孵育中,DNA甲基化修饰可能被抑制。由此可见,体外与体内不同脂肪水平对黄颡鱼卵巢PI3KCa甲基化和转录



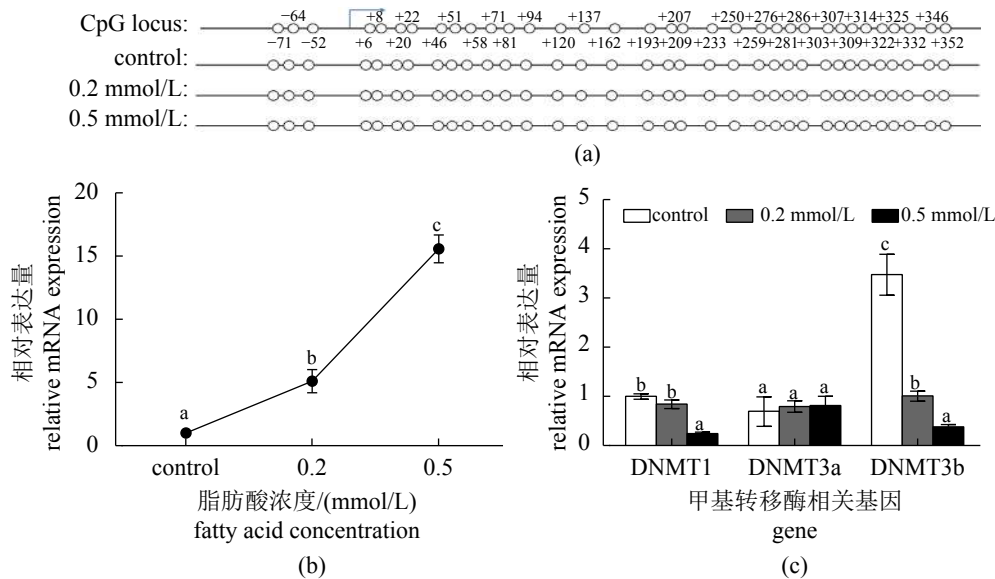


图 6 脂肪酸孵育对黄颡鱼原代卵母细胞PI3KCa甲基化水平以及PI3KCa和DNMTs基因表达的影响

(a)PI3KCa启动子中单独CpG位点的甲基化水平；(b) PI3KCa的mRNA水平；(c)DNMTs的mRNA水平；不同字母的条形图表示不同组之间的差异显著性( $P<0.05$ )

Fig. 6 Effects of fatty acid incubation on the methylation and expression of PI3KCa and DNMTs in the primary oocytes of *P. fulvidraco*

(a)None of CpG sites are methylated in the promoter of PI3KCa;(b)The mRNA levels of PI3KCa;(c)The mRNA levels of DNMTs. Bars that do not share a common letter mean significant difference among different groups ( $P<0.05$ )

水平的影响也呈现不同的影响机制。

总体而言，本研究发现不同脂肪水平对黄颡鱼卵巢脂肪代谢以及PI3KCa甲基化和转录水平在体内与体外呈现完全不同的两种方式。活体实验中，饲料不同脂肪水平影响卵巢TG的合成可能主要是通过脂肪转运相关基因，并且高脂肪很可能通过DNMT3b影响黄颡鱼卵巢PI3KCa启动子甲基化水平来影响PI3KCa的表达。离体实验表明，脂肪酸孵育促进卵母细胞TG的合成主要是通过增加脂肪合成相关基因的表达，降低脂肪酸转运和分解相关基因的表达来完成，并且脂肪酸孵育不通过DNA甲基化修饰的方式影响PI3KCa的表达。

卓梅琴，杨水波为并列第一作者。

#### 参考文献：

- [1] Luo Z, Liu Y J, Mai K S, *et al.* Effect of dietary lipid level on growth performance, feed utilization and body composition of grouper *Epinephelus coioides* juveniles fed isonitrogenous diets in floating netcages[J]. *Aquaculture International*, 2005, 13(3): 257-269.
- [2] 周海. 脂肪在中华鳄雌性腺发育过程中的作用及其相关机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [3] Patino R, Sullivan C V. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleostfish[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, 26(1): 57-70.
- [4] Johnson R B. Lipid deposition in oocytes of teleost fish during secondary oocyte growth[J]. *Reviews in Fisheries Science*, 2009, 17(1): 78-89.
- [5] Song Y F, Tan X Y, Pan Y X, *et al.* Fatty acid  $\beta$ -oxidation is essential in leptin-mediated oocytes maturation of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(5): 1457.
- [6] Sánchez-Gurmaches J, Østbye T K, Navarro I, *et al.* In vivo and in vitro insulin and fasting control of the transmembrane fatty acid transport proteins in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *American Journal of Physiology-regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2011, 301(4): 947-957.
- [7] Zhao T, Wu K, Hogstrand C, *et al.* Lipophagy mediated

- carbohydrate-induced changes of lipid metabolism via oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress and ChREBP/PPAR $\gamma$  pathways[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019. doi: 10.1007/s00018-019-03263-6.
- [ 8 ] Liu K, Rajareddy S, Liu L, *et al.* Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an old timer[J]. *Developmental Biology*, 2006, 299(1): 1-11.
- [ 9 ] Zhuo M Q, Pan Y X, Wu K, *et al.* Characterization and mechanism of phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) members in insulin-induced changes of protein metabolism in yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2017, 247: 34-45.
- [10] Zhang L H, Tan X Y, Wu K, *et al.* Regulation and mechanism of leptin on lipid metabolism in ovarian follicle cells from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 222: 116-123.
- [11] Zhuo M Q, Luo Z, Xu Y H, *et al.* Functional analysis of promoters from three subtypes of the PI3K family and their roles in the regulation of lipid metabolism by insulin in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(1): 2-20.
- [12] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory[J]. *Genes & Development*, 2002, 16(1): 6-21.
- [13] Ye W J, Tan X Y, Chen Y D, *et al.* Effects of dietary protein to carbohydrate ratios on growth and body composition of juvenile yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco* (Siluriformes, Bagridae, *Pelteobagrus*)[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 40(12): 1410-1418.
- [14] Wei C C, Luo Z, Hogstrand C, *et al.* Zinc reduces hepatic lipid deposition and activates lipophagy via Zn<sup>2+</sup>/MTF-1/PPAR $\alpha$  and Ca<sup>2+</sup>/CaMKK $\beta$ /AMPK pathways[J]. *The FASEB Journal*, 2018, 32(12): fj.201800463.
- [15] Ling S C, Wu K, Zhang D G, *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagy and Apoptosis Alleviate Dietary Fat-Induced Triglyceride Accumulation in the Intestine and in Isolated Intestinal Epithelial Cells of Yellow Catfish[J]. *The Journal of Nutrition*, 2019.
- [16] Chakrabarty K, Leveille G A. Acetyl CoA carboxylase and fatty acid synthetase activities in liver and adipose tissue of meal-fed rats[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 1969, 131(3): 1051-1054.
- [17] Barroso J B, Peragon J, Garcia-Salguero L, *et al.* Variations in the kinetic behaviour of the NADPH-production systems in different tissues of the trout when fed on an amino-acid-based diet at different frequencies[J]. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 1999, 31(2): 277-290.
- [18] Wise E M, Ball E G. Malic enzyme and lipogenesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1964, 52(5): 1255-1263.
- [19] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-type binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [20] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29: e45.
- [21] Coldebella I J, Emanuelli T, Veiverberg C A, *et al.* Effect of different dietary lipid levels on the reproduction of *Rhamdia quelen*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2013, 19(5): 751-764.
- [22] Wiegand M D. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1996, 6(3): 259-286.
- [23] Hoyos-Marulanda V, Alves B S, Ro sa, P R A, *et al.* Effects of polyunsaturated fatty acids on the development of pig oocytes in vitro following parthenogenetic activation and on the lipid content of oocytes and embryos[J]. *Animal Reproduction Science*, 2019, 205: 150-155.
- [24] Ibáñez A J, Peinado-Onsurbe J, Sánchez E, *et al.* Lipoprotein lipase (LPL) is highly expressed and active in the ovary of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during gonadal development[J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology*, 2008, 150(3): 347-354.
- [25] Ryu Y W, Tanaka R, Kasahara A, *et al.* Expression of genes involved in oocyte lipidation in cutthroat trout, *Oncorhynchus clarki*[J]. *Indian Journal of Science & Technology*, 2011, 4: 203-204.
- [26] 郑珂珂, 朱晓鸣, 韩冬, 等. 饲料脂肪水平对瓦氏黄颡鱼生长及脂蛋白脂酶基因表达的影响[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(4): 815-821.
- Zheng K K, Zhu X M, Han D, *et al.* Effects of dietary lipid level on growth and lipoprotein lipase gene expression in *Pelteobagrus vachelli*[J]. *Acta*

- Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(4): 815-821.
- [27] Sfeir Z, Ibrahimi A, Amri E, *et al.* Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1997, 57(1): 17-21.
- [28] Patsouris D, Reddy J K, Müller M, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(3): 1508-1516.
- [29] Listenberger L L, Han X, Lewis S E, *et al.* Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(6): 3077-3082.
- [30] Ge Z J, Luo S M, Lin F, *et al.* DNA methylation in oocytes and liver of female mice and their offspring: effects of high-fat-diet-induced obesity[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2013, 122(2): 159-164.
- [31] Tollefsbol T. *Handbook of Epigenetics*[M]. USA: Academic Press, 2010: 1-6.

## Effects of dietary lipid on lipid metabolism, methylation and expression of PI3KCa in the ovary of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)

ZHUO Meiqin<sup>#</sup>, YANG Shuibo<sup>##</sup>, LING Shicheng, LUO Zhi<sup>\*</sup>

(Laboratory of Molecular Nutrition for Aquatic Economic Animals, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** The present study was conducted to determine the potential mechanisms of dietary lipid level influencing lipid deposition in the ovary of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. For this purpose, two experiments were designed. In vivo, yellow catfish were fed with three diets containing 6.98%, 11.34% and 15.41% of lipid levels. In vitro, the primary oocytes from yellow catfish were incubated with three fatty acid levels (0, 0.2 and 0.5 mmol/L), respectively. Triacylglyceride (TG) contents, methylation level of PI3KCa, and enzymes activities of FAS, G6PD, 6PGD, and ME, as well as the mRNA level of PI3KCa, DNMTs and other genes involved in lipid metabolism were determined in the ovary and oocytes of yellow catfish. GSI increased with increasing dietary lipid levels. Among three lipid treatments, TG content and the enzyme activities of FAS, G6PD, 6PGD, and ME, and mRNA expression of LPL and CD36 were highest in the 11.34% of dietary lipid level in the ovary; CPT IA mRNA expression was the highest for fish fed 15.41% dietary lipid; the lowest mRNA level of PI3KCa and the highest methylation percentage of PI3KCa promoter at -64 and -52 CpG sites were found in the 15.41% of dietary lipid group; Dietary lipid levels influenced the mRNA level of DNMT3b, but not the expression of DNMT1 and DNMT3a. DNMT3b mRNA expression was the highest in 15.41% of dietary lipid group, indicating that DNMT3b was more sensitive than DNMT1 and DNMT3a in response to dietary lipid level. In contrast, the in vitro study indicated that TG content, enzyme activities of FAS, G6PD and ME, and G6PD mRNA expression were the highest in the 0.5 mmol/L FA group, and mRNA expression levels of CPT IA, ACCb, LPL and CD36 were the highest in the control; FA incubation significantly increased the mRNA level of PI3KCa, reduced mRNA levels of DNMT1 and DNMT3b, but showed no significant effect on the methylation of PI3KCa promoter and on mRNA expression of DNMT3a.

**Key words:** *Pelteobagrus fulvidraco*; ovary; lipid metabolism; methylation; PI3KCa

**Corresponding author:** LUO Zhi. E-mail: luozhi99@mail.hzau.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31422056, 31902381); China Postdoctoral Science Foundation (2019M650183); Project of Young Innovative Research Group of Hubei Provincial Department of Education (T201933)