

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18082

## 刀鲚 *PPAR $\gamma$* 基因的 cDNA 克隆及其应激应答

高俊<sup>1</sup>, 徐钢春<sup>1,2</sup>, 杜富宽<sup>2</sup>, 聂志娟<sup>2</sup>, 顾若波<sup>1,2</sup>

1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081

**摘要:** 旨在研究刀鲚(*Coilia nasus*)过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR $\gamma$ )基因的应激调控表达, 克隆并获得了刀鲚 *PPAR $\gamma$*  基因的 cDNA 全长。刀鲚 *PPAR $\gamma$*  基因的 cDNA 全长 1951 bp, 开放阅读框 1470 bp, 预测编码 489 个氨基酸。刀鲚 *PPAR $\gamma$*  包括 4 个功能结构域, 即 A/B 区, DNA 结合区(DNA binding domain, DBD 区), 铰链区, 配体结合区(ligand binding domain, LBD 区)。运用荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR) 检测刀鲚 *PPAR $\gamma$*  基因在不同组织、运输胁迫和胚胎发育时期的表达。结果显示, 刀鲚 *PPAR $\gamma$*  在各组织中均有表达, 其中在肝中表达量最高, 在脑、肠、心脏、肾、头肾、肌肉中相对高表达, 在鳃和脾中微量表达。运输胁迫过程中, *PPAR $\gamma$*  基因表达显著上调( $P<0.05$ ), 在 4 h 达到峰值, 随后显著降低, 但仍高于对照组。*PPAR $\gamma$*  在胚胎发育时期各时期均表达, 其中在受精卵时期高表达, 随后表达量急剧降低, 并在此后的时期一直处于较低的表达水平。*PPAR $\gamma$*  基因在应激过程中发挥重要作用, 也是胚胎发育过程中重要的基因。本研究为刀鲚的人工繁育和应激调控提供了理论基础。

**关键词:** 刀鲚; *PPAR $\gamma$* ; 应激应答; 运输应激; 胚胎表达

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)02-0242-09

刀鲚(*Coilia nasus*)俗称刀鱼, 是长江重要的洄游性鱼类<sup>[1]</sup>。刀鲚应激反应强烈, 日常装载、运输等操作极易造成其损伤, 甚至死亡<sup>[2-3]</sup>。Du 等<sup>[4]</sup>运用转录组技术研究发现运输应激导致刀鲚肝“代谢”和“免疫”相关基因显著变化, 激活氧化应激, 进而诱导并激活肿瘤坏死因子介导的线粒体凋亡通路, 最终引起细胞凋亡, 进而引发肝、心脏等组织的严重损伤, 诱发应激猝死。因此, 氧化应激是造成刀鲚应激损伤和死亡的重要原因, 研究氧化应激相关通路是解析刀鲚应激损伤和猝死机制的关键。

过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator activated receptor, PPARs), 由英国科学家 Issemann 等<sup>[5]</sup>在 1990 年首先发现, 具有

PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ (也称 PPAR $\delta$ )、PPAR $\gamma$  3 种亚型<sup>[6]</sup>。PPAR $\gamma$  在脂质代谢、缓解炎症和抑制凋亡方面发挥重要作用(图 1)。大量研究发现, PPAR $\gamma$  能够调控许多参与调节细胞内外脂质代谢的目的基因的表达<sup>[7-11]</sup>, 如调控编码参与过氧化物酶体  $\beta$  氧化相关酶的基因<sup>[12-15]</sup>。此外, PPAR $\gamma$  的激活能够显著增加谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶(SOD)的量并显著减少丙二醛(MDA)缓解氧化应激<sup>[16]</sup>, 还能调控过氧化氢酶(CAT)基因的表达来清除活性氧(ROS)<sup>[17]</sup>。不仅如此, PPAR $\gamma$  还能缓解氧化应激引起的炎症反应和抑制细胞凋亡。通过预先激活 PPAR $\gamma$  能够降低缺血再灌注大鼠海马体环氧合酶-2(COX-2)表达, 抑制丝裂原激活蛋白激酶(MAPKs)和核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B), 缓解炎症反应,

收稿日期: 2018-03-07; 修订日期: 2018-07-22.

基金项目: 江苏省成果转化资金专项(BA2015167); 江苏省水产三新工程重大专项(D2015-14); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2017JBFM14).

作者简介: 高俊(1992-), 男, 硕士研究生, 从事鱼类规模化繁育及健康养殖技术研究. E-mail: missing\_life@163.com

通信作者: 顾若波, 研究员, 从事鱼类繁育及养殖技术研究. E-mail: gurb13616172005@163.com

对缺血再灌注大鼠海马体起到保护作用<sup>[18-19]</sup>; *PPAR $\gamma$*  的激活能够有效地抑制细胞凋亡<sup>[20]</sup>, 可能是通过升高抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达实现的<sup>[21]</sup>。目前已经在黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)<sup>[22]</sup>、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[23]</sup>、花鮰(*Lateolabrax japonicus*)<sup>[24]</sup>和点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)<sup>[25]</sup>等多种鱼类中开展 *PPAR $\gamma$*  基因克隆和功能研究。鉴于其重要的生物学功能, 本研究克隆了刀鲚 *PPAR $\gamma$*  基因 cDNA 全长, 检测了刀鲚 *PPAR $\gamma$*  基因在不同组织的表达, 并探究了其在运输应激过程的应答, 为进一步了解缓解刀鲚应激猝死、减少应激造成的经济损失, 并为刀鲚及其他鱼类的早期发育过程中的能量代谢研究提供新的研究方向。

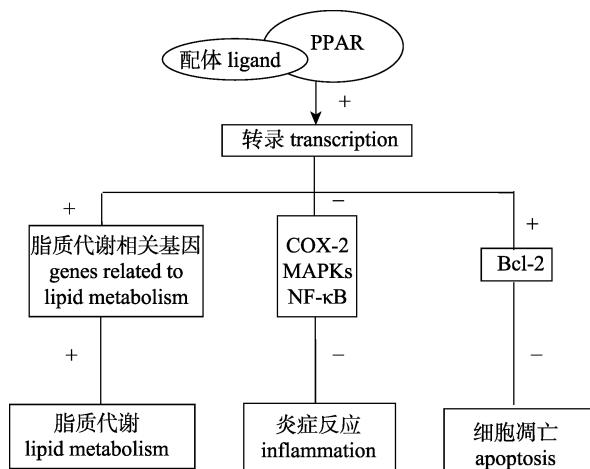


图 1 *PPAR $\gamma$*  信号通路图<sup>[7]</sup>  
Fig. 1 Signal pathway of *PPAR $\gamma$* <sup>[7]</sup>

## 1 材料与方法

### 1.1 总 RNA 提取及 *PPAR $\gamma$* 基因的获取

本研究所采用的刀鲚及其胚胎均来自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴屺亭养殖基地。使用 Trizol 法提取总 RNA。提取的 RNA 经 1% 琼脂糖电泳检验, Andy Safe<sup>TM</sup>DNA Gel Stain 染色显示其完整性。Prime Script<sup>TM</sup> II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 日本)反转录获得第一链 cDNA。根据本实验室刀鲚全基因组拼接和组装的数据, 获得刀鲚 *PPAR $\gamma$*  基因的 cDNA 序列, 设计引物扩增其全长, 并将该片段克隆到 pGEM-T 载体(TaKaRa, 日本)上, 经大肠杆菌

DH5 $\alpha$  感受态细胞(TaKaRa, 日本)转化, 筛选阳性克隆并测序(博尚生物, 上海)。运用 RACE 方法扩增 *PPAR $\gamma$*  基因的全长序列(转导生物公司, 武汉)。

### 1.2 序列分析

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中的 BLASTn 和 BLASTp 分析刀鲚 *PPAR $\gamma$*  基因序列和氨基酸序列与其他物种的相似性。SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测结构域。ClustalX 1.83 软件进行氨基酸多重序列比对。MEGA 7.0 软件构建进化树。

### 1.3 应激实验

将刀鲚幼鱼放养在 3 个水泥池(7 m×5 m×1 m)中, 每个水泥池 120 尾。从每个水泥池中利用趋光性快速取出 5 尾, 作为对照组, 共计 15 尾。捞取刀鲚幼鱼后立即用 70 mg/L MS-222 麻醉并立即处理。然后从每个水泥池中利用拉网捕捞 75 尾, 混合并随机重新分到 15 个养殖桶(75 m×55 m×33 m)中, 随机分成 5 组, 每组 3 个养殖桶用于在不同时间点取样, 分装完后, 立即对其中 3 个养殖桶取样, 作为 0 h, 用以消除拉网等操作对鱼体的应激。将其余养殖桶每 5 min 摆晃 10 s, 以模拟运输过程。模拟运输过程后分别在 2 h、4 h、6 h、8 h 从每个养殖桶中取 5 尾鱼同样用 70 mg/L MS-222 麻醉。麻醉后, 分别称重(8.86 g±1.76 g; n=90), 量体长(136.98 mm±9.26 mm; n=90), 快速分离组织鳃、脑、肝、脾、肠、心脏、肾、头肾和肌肉, 于液氮中保存, 运送回实验室存于-80℃ 冰箱中, 用于分子生物学测定。

### 1.4 刀鲚 *PPAR $\gamma$* 的转录表达

荧光定量 PCR 检测刀鲚 *PPAR $\gamma$*  基因在不同组织、胚胎发育时期和运输应激的表达。在刀鲚 *PPAR $\gamma$*  基因组织表达检测中, 从对照组各平行组中随机取 1 尾刀鲚, 每个样品做 3 次重复。在刀鲚 *PPAR $\gamma$*  基因运输胁迫应答检测中, 从对照组、0 h、2 h、4 h、6 h、8 h 各平行组中随机取 3 尾刀鲚, 每个样品做 3 次重复。在刀鲚 *PPAR $\gamma$*  基因胚胎表达检测中, 从每个胚胎发育时期各随机取 10 个胚胎为一组, 每组样品做 3 个重复。PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit (TaKaRa, 日本) 反转录获得第一链 cDNA。根据刀鲚 *PPAR $\gamma$*  cDNA 核心序列设计

表 1 本研究所使用的引物  
Tab. 1 Sequences of primers used in this study

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 application
4S	CCATAAAGGTTGAGCGGGAGTC	<i>PPAR<math>\gamma</math></i> 扩增上游引物 forward primer for <i>PPAR<math>\gamma</math></i> amplification
4A	CAGCAGCGTAATTGGTCGTT	<i>PPAR<math>\gamma</math></i> 扩增下游引物 reverse primer for <i>PPAR<math>\gamma</math></i> amplification
A459-1	CTTGCAGCCCTCACAG	5'RACE 特异性引物 5' RACE specific primer
A459-2	TAGTGGTACCCCGAGGCC	5'RACE 特异性引物 5' RACE specific primer
A459-3	GCACTCCAGGTTCCCCAG	5'RACE 特异性引物 5' RACE specific primer
C1	TGATTGGGACTGGGGATTGAA	18S rRNA 定量上游引物 forward primer for 18S rRNA RT-qPCR
C2	TAGCGACGGGCGGTGTGT	18S rRNA 定量下游引物 reverse primer for 18S rRNA RT-qPCR
35S	TCAGAAGAACGGTTCGACTAAAG	<i>PPAR<math>\gamma</math></i> 定量上游引物 forward primer for <i>PPAR<math>\gamma</math></i> RT-qPCR
35A	GACATTCCCACCAAAAGACACT	<i>PPAR<math>\gamma</math></i> 定量下游引物 reverse primer for <i>PPAR<math>\gamma</math></i> RT-qPCR

引物(表 1), 扩增片段为 124 bp, 以 18S rRNA 为内参, 扩增片段为 114 bp。使用 Sofast Eva Green Supermix (Bio-Rad, 美国) 和 Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, 美国) 进行荧光定量。反应条件为 94℃ 2 min; 40 个循环: 94℃ 15 s, 60℃ 30 s; 72℃ 45 s。检测熔解曲线和扩增曲线。运用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算相对表达量。

## 1.5 数据统计

运用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Duncan 多重比较分析, 所有数据均以平均值±标准误 ( $\bar{x} \pm SE$ ) 表示。

表 2 其他物种 *PPAR $\gamma$*  氨基酸序列 NCBI 登录号

Tab. 2 GenBank accession numbers of *PPAR $\gamma$*  used in this study

物种 species	登录号 accession number
智人 <i>Homo sapiens</i>	AAA80314.2
大西洋鲱 <i>Clupea harengus</i>	XP_012688561.1
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	KKF28083.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	AAC52134.1
团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>	ADH95692.2
花鮰 <i>Lateolabrax japonicus</i>	ABC70398.1
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	AAT85618.1
虹鱣 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	ADN92686.1
真鲷 <i>Pagrus major</i>	BAF80459.1
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	ACF70732.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_571542.1
军曹鱼 <i>Rachycentron canadum</i>	ABV55020.1
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	BAF52670.1

## 2 结果与分析

### 2.1 刀鲚 *PPAR $\gamma$* 基因全长和序列分析

刀鲚 *PPAR $\gamma$*  基因 cDNA 全长 1951 bp, 其中

5'-UTR 195 bp, 3'-UTR 286 bp, 开放阅读框 1470 bp, 起始于 196~198 位的 ATG 起始密码子, 终止于 1663~1665 位的终止密码子, 预测编码 489 个氨基酸(图 2)。

与其他物种对比, 刀鲚 *PPAR $\gamma$*  的氨基酸序列同样包括四个功能结构域, 即 A/B 区、DNA 结合区(DNA binding domain, DBD 区)、铰链区(hinge region)、配体结合区(ligand binding domain, LBD 区)。其中, DBD 区和 LBD 区在不同物种中序列高度保守(图 3)。

### 2.2 刀鲚 *PPAR $\gamma$* 与其他生物同源性比较和系统发育分析

对比刀鲚 *PPAR $\gamma$*  与大西洋鲱(*Clupea harengus*)等鱼类 *PPAR $\gamma$*  氨基酸序列, 结果发现刀鲚与同属鲱形目的大西洋鲱同源性高达 79%, 其他结果如下: 团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) 59%、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) 57%、斑马鱼(*Danio rerio*) 57%、真鲷(*Pagrus major*) 56%、军曹鱼(*Rachycentron canadum*) 56%、花鮰(*Lateolabrax japonicus*) 56%、金头鲷(*Sparus aurata*) 56%、大黄鱼(*Larimichthys crocea*) 56%、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*) 55%。

根据 MEGA 7.0 软件绘制刀鲚 *PPAR $\gamma$*  序列系统进化树(图 4)。结果表明, 刀鲚与同属鲱形目的大西洋鲱亲缘关系较近, 而与属于鲀形目的红鳍东方鲀亲缘关系较远。这与传统分类学结果一致。

### 2.3 刀鲚 *PPAR $\gamma$* 在不同组织的表达

运用 RT-qPCR 方法检测刀鲚 *PPAR $\gamma$*  在鳃、脑、肝、脾、肠、心脏、头肾、肾、肌肉 9 个不同组

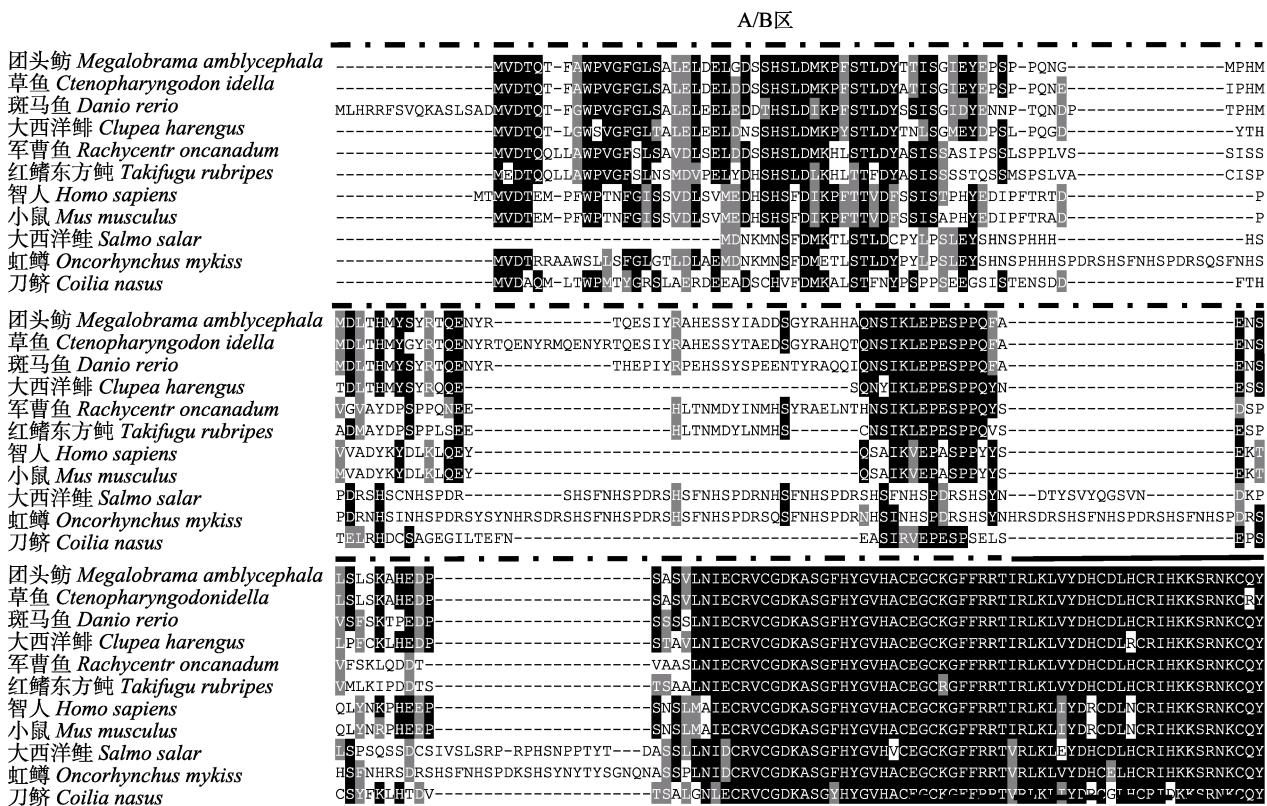
1 tttctgttaatgcattgttccgacaaacgcgtcgaaatggattcaaacatcgacagacacaggataatttc 90  
 91 attcataactgaacatcacaaacgttacaatcaagaagccactccatttccggaaatcggttacactccctc 180  
 181 agaagagcggcggagaatggtgacgacag**ATG**CTCACCTGGCCCATGACCTACGGCGTAGCTGGCGAGCAGGGAGGC 270  
 M L T W P M T Y G R S L A E R D E E A D 20  
 271 AGCTGCCACGTGTCGACATGAAGGCCGTCCACCTCAACTACCCCAGCCCCCAGCGAGGGAGGCAGCATCAGCACCGAGAACCTCG 360  
 21 S C H V F D M K A L S T F N Y P S P P S E E G S I S T E N S 50  
 361 GATGATTTCACACACAGGAACCTGCGCATGATTGAGGGAGGGAAACTTACAGAGTTCAATGAGGCATCCATAAGGGTTGAG 450  
 51 D D F T H T E L R H D C S A G E G I L T E F N E A S I R V E 80  
 451 CGGGAGTCTCCATGGAGCTGTGAGCCGAGCTGCTCTATTCAGCTGCACACAGACGTCACTTCTGCCTGGGAAACCTGGAGTC 540  
 81 P E S P S E L S P S C S Y F K L H T D V T S A L G N L E C 110  
 541 AGGGTCTGGGGACAAGGGCTGGGGTACCACTATGGTGTGCGATGGCTGTGCAAGGGTCTTCAGAAGAACGGTCTGACTA 630  
 111 R V C G D K A S G Y H Y G V H A C E G C K G F F R R R T V R L 140  
 631 AAGTTGATATACGACCCTGTTGCGACTGTCGCAATTGACAAGAAAAGCGCAATAAGTGCCAGTACTGTCGTTCCAGAAGGTGTCT 720  
 141 K L I Y D R C G L H C R I D K K S R N K C Q Y C R F Q K C L 170  
 721 TTGGTGGGAATGTCACAAATGCTATTGCTTCGCTGAATGCCTCACACAGAGCAGAGAAGCTCTGGCGAAATGCCAAGGAGATG 810  
 171 V L G M S H N A I R F G R M P H T E R E K L L G E I A K E M 200  
 811 GAGCAGCTAGACCGAGAGGAGCAGACAGATGGGGCTGGCCAACACCTTACGATTCCTACATCAAACACTTCCCATTGCCAAGG 900  
 201 E Q L D R E A A D M R G L A K H L Y D S Y I K H F P L P K S 230  
 901 AAGGCCAAAGCTATTCTCGGGAAAGACCAACATCCATGCGCCTTGTCAATCCACGACATGAAGTCGCTGGCGGGCGCAGCTG 990  
 231 K A K A I L S G K T N I H A P F V I H D M K K S L A A G R Q L 260  
 991 ATCGACTGACGGCAGCTGCCGGAGAGGTGGAGCTGGCACGGCCCTGCAACCCCTGGAGGAGCAGGGTGGAGCTGCTCTTCTCCGC 350  
 261 I D C R Q L P G Q K V E L A T A L H P L E D E V E L S F F R 1080  
 1081 CGCGTGCAGATCCGACCGCCGAGATCATCTCGAGATCACCGAGATTCGCAAGAGCATTCCGGCTTCCAGGGCTGGACCTGAACGAC 290  
 291 R V Q I R T A E I I C E I T E F A K S I P G F Q G L D L N D 1170  
 1171 CAGATCACGCTGCTGAAGTACGGCCATAGAGGCCATGATCATCTCGACGGCCCTCATGAAACAAGGAGCGCGCTCATGGCTGC 320  
 321 Q I T L L K Y G A I E A M I I L W T P L M N K D G A L M A C 1260  
 1261 GGGCAGCTCTCACGCGCAGAGTCCCTCGAGGCTCCGAGAGCCCTCGAGAGCTGGAGCTGGAGAGCAGAGCTGGACTCGCCATCAAG 1530  
 351 G Q F I T R E F L R S L R E P F D E I L E P K F D F A I K 1350  
 1351 TTCAACACGCTCGACCTAGACGACAGTGCACCTCGCTCTTCATTGCGGTACATCATACTTTGAGACCGGGCCGGCTGGTAACCG 380  
 381 F N T L D L D S D L A L F I A V I I L C G D R P G L V N A 1440  
 1441 AAGCCGCTGGAGGAGCTGCAGGGGGCGGTGTCAGGGCGCTGGACATTACCTGAGGGCTGACACCCGGAGCGCGCTCAGCTTTGCC 410  
 411 K P V E D L Q G A V L Q A L D F H L K A V H P E R P Q L F A 1530  
 1531 AAGCTGCTGAGAAGATGAGCAGCTGGCCCCCTGGTGGCGCACGTGCGCAAGATCCACCTACTGAAGAAGCCGAGCTGGACATG 440  
 441 K L L Q K M S D L R P L V A D H V R K I H L L K P E L D M 1620  
 1621 TGTCTCCATCCTCTGCTGGGGAGATCATGAGAGACCTGTACT**TAG**cgccacacactacccttagctggtaacctggccctgttaat 470  
 471 C L H P L G E I M R D L Y \* 1710  
 1711 cattcaagaatgattingcggggctgttacccaggctacacactccctctgttatccataggcgttagccacagggtggc 1800  
 1801 ctggggctgttacccactgttacaaaaaaa 1890  
 1891 gtgtgttgggctgttacccactgttacaaaaaaa 1950

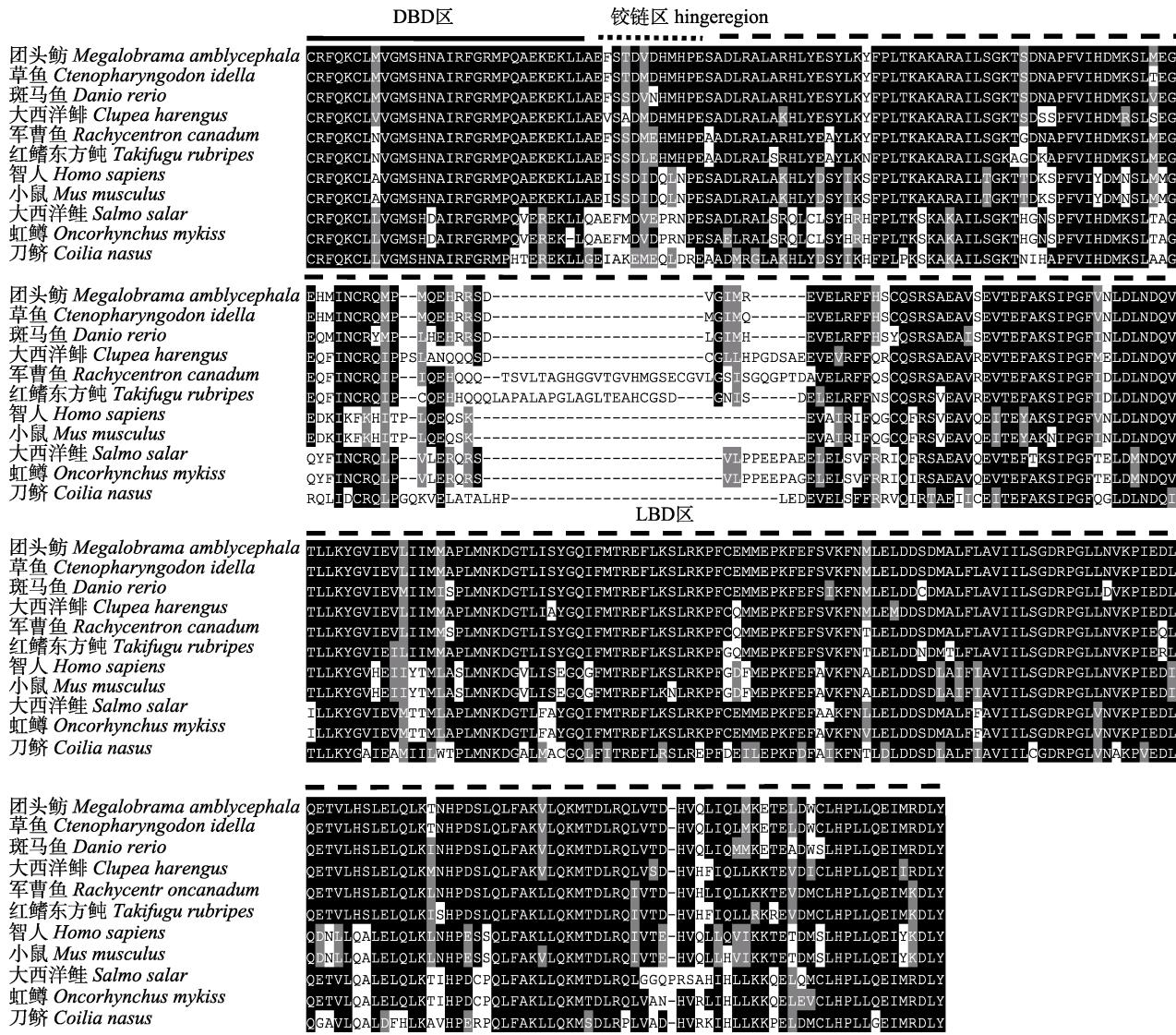
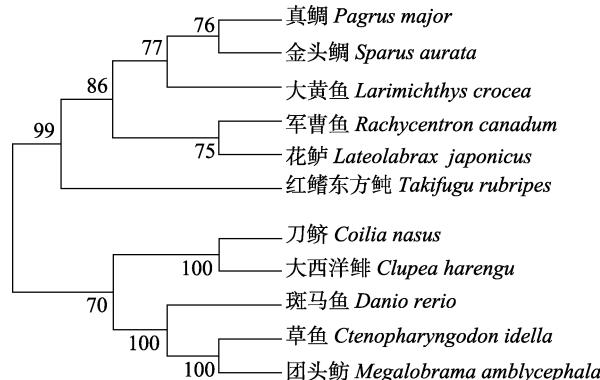
图 2 刀鲚 *PPAR $\gamma$*  基因 cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列

起始密码子(ATG)和终止密码子(TAG)分别用红色加粗字体表示, 氨基酸序列在核苷酸序列下以单大写字母符号表示, 小写字母表示非编码区序列。

Fig. 2 The full-length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *Coilia nasus PPARY* gene

The start codon (ATG) and stop codon (TAG) are respectively indicated in bold red font; the amino acid sequence is represented by a single capital letter under the nucleotide sequence, and the lowercase letters represent the non-coding region sequence.

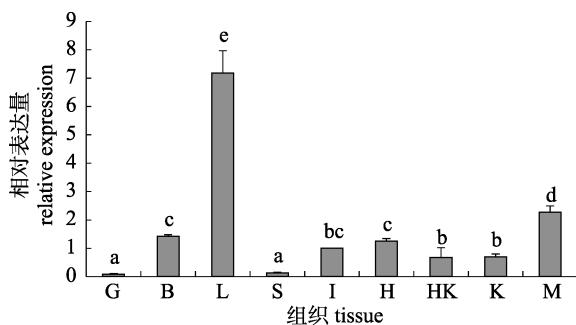


图 3 刀鲚 PPAR $\gamma$  与其他鱼类 PPAR $\gamma$  氨基酸序列多重比对Fig. 3 Alignment of the PPAR $\gamma$  amino acid sequences between *Coilia nasus* and other species图 4 刀鲚 PPAR $\gamma$  与其他鱼类氨基酸序列进化树(基于邻接法)Fig. 4 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of *Coilia nasus* and other teleosts based on neighbor-joining

织的表达(图 5), 结果显示刀鲚 PPAR $\gamma$  在各组织中均有表达, 其中在肝中表达量最高, 在脑、肠、心脏、肾、头肾、肌肉中相对高表达, 在鳃和脾中微量表达。

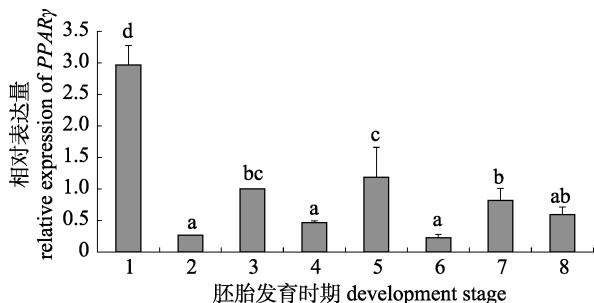
#### 2.4 刀鲚 PPAR $\gamma$ 在胚胎发育时期的表达

运用 RT-qPCR 方法检测 PPAR $\gamma$  在刀鲚胚胎不同发育时期的表达(图 6)。各时期均检测到 PPAR $\gamma$  表达。PPAR $\gamma$  在受精卵时期表达量最高, 随后表达量显著降低, 在多细胞期、神经胚期和出膜前期表达量显著上升, 但仍显著低于受精卵时期。自 2 细胞期到出膜后期, 在此阶段 PPAR $\gamma$  一直处于较低的表达水平。

图 5 *PPAR $\gamma$*  在刀鲚不同组织中的表达

B: 脑; G: 鳃; H: 心脏; HK: 头肾; I: 肠; K: 肾; L: 肝;  
M: 肌肉; S: 脾。不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 5 Expression of *Coilia nasus PPAR $\gamma$*  in different tissues  
B: brain; G: gill; H: heart; HK: head kidney; I: intestine; K: kidney; L: liver; M: muscle; S: spleen. Bars with different lowercase letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

图 6 *PPAR $\gamma$*  在刀鲚不同胚胎发育时期的表达

1: 受精卵; 2: 2 细胞期; 3: 多细胞期; 4: 囊胚期; 5: 神经胚期; 6: 肌肉效应期; 7: 出膜前期; 8: 出膜后期。

Fig. 6 Expression of *Coilia nasus PPAR $\gamma$*  during embryonic development  
1: fertilized eggs; 2: 2-cell stage; 3: multi-cell stage; 4: mid-gastrula stage; 5: neural stage; 6: muscle burl stage; 7: pre-hatching; 8: post-hatching.

## 2.5 刀鲚 *PPAR $\gamma$* 对运输应激的应答

运用 RT-qPCR 方法检测运输胁迫过程中刀鲚肝 *PPAR $\gamma$*  基因的应答。结果表明, 相对于对照组, 运输应激(0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h)*PPAR $\gamma$*  基因表达显著上调了 4.32~62.08 倍。其中, 在运输应激 4 h 后 *PPAR $\gamma$*  基因表达达到峰值, 随后表达量显著降低(图 7)。

## 3 讨论

### 3.1 刀鲚 *PPAR $\gamma$* 序列分析

*PPARs* 的激活需要 LBD 与配体的结合, 被配体激活的 *PPARs* 与类视黄醇 X 受体(retinoid X receptor, RXR)结合形成异二聚体。激活的 *PPAR/RXR* 异二聚体的 DBD 区与靶基因启动子上的 *PPAR*

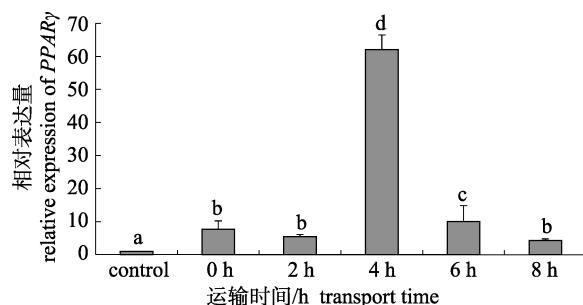
图 7 运输应激条件下刀鲚 *PPAR $\gamma$*  在肝中的表达

Fig. 7 Expression of *Coilia nasus PPAR $\gamma$*  in liver under transport stress

反应元件(peroxisome proliferator response element, PPRE)相结合, 调节靶基因转录<sup>[21]</sup>。刀鲚 *PPAR $\gamma$*  的氨基酸序列与其他物种多重比对结果显示, DBD 区和 LBD 区氨基酸序列高度保守, 这表明刀鲚 *PPAR $\gamma$*  的配体和靶基因可能与其他物种极其相似。

### 3.2 刀鲚 *PPAR $\gamma$* 的组织表达和应激应答

在不同的硬骨鱼类中, *PPAR $\gamma$*  在不同组织的表达具有种间差异<sup>[22-25]</sup>。刀鲚 *PPAR $\gamma$*  在肝中高表达, 表明 *PPAR $\gamma$*  在刀鲚肝内代谢中发挥重要作用。硬骨鱼类肝是调节代谢和免疫抵御的重要器官<sup>[26]</sup>。本研究发现, 运输胁迫过程中刀鲚肝 *PPAR $\gamma$*  的表达量显著上升, 并一直处于高表达水平。刀鲚应激反应强烈, 极易造成猝死, 多项研究表明<sup>[2, 4, 27]</sup>, 应激导致大量能量被消耗, 机体会动员糖脂代谢为机体提供能量。肝 *PPAR $\gamma$*  的高表达预示着线粒体和过氧化物酶体的  $\beta$  氧化活动增强<sup>[28-29]</sup>。研究表明, *PPAR $\gamma$*  调控肝脂质代谢过程中发挥重要作用<sup>[30]</sup>。在运输胁迫过程中, *PPAR $\gamma$*  的表达量显著上升, 并在 4 h 达到峰值, 随后显著降低。这与刀鲚在运输胁迫过程中血浆皮质醇变化趋势相似<sup>[2, 31]</sup>。*PPAR $\gamma$*  作为核受体, 受到激素的调控。因此, 在运输胁迫过程中, 刀鲚 *PPAR $\gamma$*  的表达可能是受到血浆皮质醇变化的调节, 从而调节机体脂质代谢来动员脂质以应对应激反应。

此外, 运输应激还会引起刀鲚强烈的免疫反应和细胞凋亡<sup>[4]</sup>。*PPAR $\gamma$*  能够下调其靶基因的表达来减少细胞凋亡<sup>[20, 32]</sup>, Ren 等<sup>[21]</sup>研究发现 *PPAR $\gamma$*  的激活可能是通过增加 Bcl-2 的表达来缓解细胞凋亡。断奶仔猪经脂多糖(LPS)刺激后, 其

下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA 轴)中 PPAR $\gamma$  的表达均上升<sup>[33]</sup>。在人类的一些炎症疾病中, PPAR $\gamma$  的表达水平也表现为上升<sup>[34-35]</sup>。因此, 刘玉兰等<sup>[33]</sup>推测 PPAR $\gamma$  的表达上升可能通过负反馈调节炎症细胞因子的释放。Luo 等<sup>[25]</sup>研究发现激活 PPAR $\gamma$  确实能够下调某些促炎细胞因子。运输胁迫引起的肝损伤导致刀鲚肝 PPAR $\gamma$  的高表达, PPAR $\gamma$  再通过调节下游靶基因来缓解应激引起的炎症反应和细胞凋亡, 增强机体对应激反应的耐受性。通过预先激活 PPAR $\gamma$  能够缓解缺血再灌注大鼠海马体的炎症反应, 对缺血再灌注大鼠海马体起到保护作用<sup>[18]</sup>, 还能减少细胞凋亡, 对细胞起保护作用<sup>[21]</sup>。这为以后刀鲚的抗应激研究提供了很好的方向。

### 3.3 刀鲚 PPAR $\gamma$ 在不同发育时期的胚胎中的表达

PPAR $\gamma$  主要通过调控脂质代谢和转运相关基因在脊椎动物个体发育中发挥重要作用<sup>[36-38]</sup>。脂质和糖原是胚胎发育过程中的主要能量来源, 糖酵解和三羧酸循环途径在此阶段保持很高活性<sup>[39]</sup>。本研究中, 刀鲚 PPAR $\gamma$  在受精卵和胚胎发育各时期均有表达。刀鲚 PPAR $\gamma$  在受精卵时期高表达, 随后表达量急剧降低, 并在此后一直处于较低的表达水平。这表明脂类的利用在刀鲚胚胎发育时期并不活跃, 暗示其他营养物质如碳水化合物、氨基酸等可能是此阶段的主要功能物质。有研究表明, 一些与刀鲚同为产含有油球的浮性卵的鱼类如阿拉斯加狭鳕(*Theragra chalcogramma*)、大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)胚胎中的脂肪酸含量在孵化前一直处于较稳定的水平, 这些鱼类在孵化前并不会利用脂类提供能量<sup>[38, 40-41]</sup>。

综上所述, 本研究获得了刀鲚 PPAR $\gamma$  的 cDNA 全长序列, 系统分析了其序列特征, 探讨了 PPAR $\gamma$  在刀鲚不同组织, 运输胁迫过程以及胚胎发育时期的表达模式。以上结果表明 PPAR $\gamma$  在刀鲚运输胁迫过程中发挥重要作用, 同样在胚胎发育时期发挥重要功能。PPAR $\gamma$  对上述生物学过程中的靶基因的调控需要进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Jiang T, Yang J, Liu H B, et al. Life history of *Coilia nasus*, from the Yellow Sea inferred from otolith Sr:Ca ratios[J].
- [2] Xu G C, Du F K, Nie Z J, et al. Effects of 10‰ salinity to the plasma osmotic pressure, cortisol, glucose and liver glycogen in *Coilia nasus* stressed during loading and transportation[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 66-72. [徐钢春, 杜富宽, 聂志娟, 等. 10‰盐度对长江刀鲚幼鱼装载和运输胁迫中应激指标的影响[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 66-72.]
- [3] Gao J W, Du F K, Gu R B, et al. Effect of transport stress on physiological-biochemical indices and expression of HPI genes and roles of glycyrrhizia on transport response in *Coilia nasus*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(6): 817-825. [高金伟, 杜富宽, 顾若波, 等. 运输应激对刀鲚生理生化指标和 HPI 轴基因表达影响及甘草甜素的作用[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(6): 817-825.]
- [4] Du F K, Xu G C, Nie Z J, et al. Transcriptome analysis gene expression in the liver of *Coilia nasus* during the stress response[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 558.
- [5] Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators[J]. *Nature*, 1990, 347: 645-650.
- [6] Gao J, Xu G C, Du F K, et al. Tissue expressions and functions of PPARs genes in fish[J]. *Journal of Yangtze University: Natural Science Edition*, 2016, 13(33): 43-46. [高俊, 徐钢春, 杜富宽, 等. 鱼类 PPARs 基因组织表达及功能研究进展[J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2016, 13(33): 43-46.]
- [7] Schadinger S E, Bucher N L R, Schreiber B M, et al. PPAR $\gamma$ 2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes[J]. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 2005, 288(6): 1195-1205.
- [8] Yu Y H, Wu S C, Cheng W T, et al. The function of porcine PPAR $\gamma$  and dietary fish oil effect on the expression of lipid and glucose metabolism related genes[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2011, 22(2): 179-186.
- [9] Thomas A W, Davies N A, Moir H, et al. Exercise-associated generation of PPAR $\gamma$  ligands activates PPAR $\gamma$  signaling events and upregulates genes related to lipid metabolism[J]. *Journal of Applied Physiology*, 2012, 112(5): 806-815.
- [10] Almeida P E, Carneiro A B, Silva A R, et al. PPAR $\gamma$  Expression and function in mycobacterial infection: Roles in lipid metabolism, immunity, and bacterial killing[J]. *PPAR Research*, 2012, 2012: Article ID 383829.
- [11] Savage D B, Tan G D, Acerini C L, et al. Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ [J]. *Diabetes*, 2003, 52(4): 910-917.
- [12] Alvares K, Fan C, Dadras S S, et al. An upstream region of the enoyl-coenzyme A hydratase/3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase gene directs luciferase expression in liver in response to peroxisome proliferators in transgenic mice[J]. *Cancer Research*, 1994, 54(9): 2303-2306.
- [13] Bardot O, Aldridge T C, Latruffe N, et al. PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response ele-

- ment upstream of the bifunctional enzyme gene[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 192(1): 37-45.
- [14] Marcus S L, Miyata K S, Zhang B, et al. Diverse peroxisome proliferator-activated receptors bind to the peroxisome proliferator-responsive elements of the rat hydratase/dehydrogenase and fatty acyl-CoA oxidase genes but differentially induce expression[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993, 90(12): 5723-5727.
- [15] Osumi T, Osada S, Tsukamoto T. Analysis of peroxisome proliferator-responsive enhancer of the rat acyl-CoA oxidase gene[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1996, 804: 706-708.
- [16] Zhang Y, Cui Y, Wang X L, et al. PPAR $\alpha/\gamma$  agonists and antagonists differently affect hepatic lipid metabolism, oxidative stress and inflammatory cytokine production in steatohepatitic rats[J]. Cytokine, 2015, 75(1): 127-135.
- [17] Girnum G D, Domann F E, Moore S A, et al. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter[J]. Molecular Endocrinology, 2003, 16: 2793-2801.
- [18] Collino M, Aragno M, Mastrocola R, et al. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR- $\gamma$  agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion[J]. European Journal of Pharmacology, 2006, 530(1-2): 70-80.
- [19] Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2011, 1812(8): 1007-1022.
- [20] Peng S Y, Xu J M, Ruan W B, et al. PPAR- $\gamma$  activation prevents septic cardiac dysfunction via inhibition of apoptosis and necroptosis[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017, 2017: Article ID 8326749.
- [21] Ren Y S, Sun C B, Sun Y, et al. PPAR gamma protects cardiomyocytes against oxidative stress and apoptosis via Bcl-2 upregulation[J]. Vascular Pharmacology, 2009, 51(2-3): 169-174.
- [22] Zheng J L, Zhuo M Q, Luo Z, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*: molecular characterization, mRNA expression and transcriptional regulation by insulin *in vivo* and *in vitro*[J]. General and Comparative Endocrinology, 2015, 212: 51-62.
- [23] Cho H K, Kong H J, Nam B H, et al. Molecular cloning and characterization of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ [J]. General and Comparative Endocrinology, 2009, 163(3): 251-258.
- [24] Dong X J, Xu H G, Mai K S, et al. Cloning and characterization of SREBP-1 and PPAR- $\alpha$  in Japanese seabass *Lateolabrax japonicus*, and their gene expressions in response to different dietary fatty acid profiles[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 180: 48-56.
- [25] Luo S W, Huang Y H, Xie F X, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of PPAR gamma in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) after the *Vibrio alginolyticus* challenge[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 43(2): 310-324.
- [26] Press C M, Evensen Ø. The morphology of the immune system in teleost fishes[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9(4): 309-318.
- [27] Du F K, Xu G C, Li Y, et al. Cloning of *POMC* cDNA and the stress response in *Coilia nasus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(2): 231-238. [杜富宽, 徐钢春, 黎燕, 等. 刀鲚 *POMC* 基因的 cDNA 克隆及其应激应答[J]. 中国水产科学, 2017, 24(2): 231-238.]
- [28] 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.
- [29] Ibabe A, Grabenbauer M, Baumgart E, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in the liver of gray mullet (*Mugil cephalus*)[J]. Acta Histochemica, 2004, 106(1): 11-19.
- [30] Tsai M L, Chen H Y, Tseng M C, et al. Cloning of peroxisome proliferators activated receptors in the cobia (*Rachycentron canadum*) and their expression at different life-cycle stages under cage aquaculture[J]. Gene, 2008, 425(1-2): 69-78.
- [31] Du F K, Xu G C, Gao J W, et al. Transport-induced changes in hypothalamic-pituitary-interrenal axis gene expression and oxidative stress responses in *Coilia nasus*[J]. Aquaculture Research, 2016, 47(11): 3599-3607.
- [32] Collino M, Aragno M, Mastrocola R, et al. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR- $\gamma$  agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion[J]. European Journal of Pharmacology, 2006, 530(1-2): 70-80.
- [33] Liu Y L, Shi J X, Lu J, et al. Effects of lipopolysaccharide challenge on PPAR $\gamma$  expression in hypothalamus pituitary gland adrenal gland axis of weanling pigs[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2011, 47(1): 25-28. [刘玉兰, 石君霞, 鲁晶, 等. 脂多糖刺激对断奶仔猪下丘脑-垂体-肾上腺轴 PPAR $\gamma$  表达的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2011, 47(1): 25-28.]
- [34] Winczyk K, Pawlikowski M. Immunohistochemical detection of PPARgamma receptors in the human pituitary adenomas: correlation with PCNA[J]. Folia Histochemica et Cytobiologica, 2005, 43(3): 137-141.
- [35] Betz M J, Shapiro I, Fassnacht M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists suppress adrenocortical tumor cell proliferation and induce differentiation[J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2005, 90(7): 3886-3896.
- [36] Michalik L, Desvergne B, Dreyer C, et al. PPAR expression and function during vertebrate development[J]. Bioinformatics, 2004, 46(1): 105-114.
- [37] Cunha I, Galante-Oliveira S, Rocha E, et al. Dynamics of PPARs, fatty acid metabolism genes and lipid classes in eggs

- and early larvae of a teleost[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 164(4): 247-258.
- [38] Cunha I, Galante-Oliveira S, Rocha E, et al. Expression of intercellular lipid transport and cholesterol metabolism genes in eggs and early larvae stages of turbot, *Scophthalmus maximus*, a marine aquaculture species[J]. Marine Biology, 2015, 162(8): 1673-1683.
- [39] Boulekbache H. Energy metabolism in fish development[J]. American Zoologist, 1981, 21(2): 377-389.
- [40] Ohkubo N, Sawaguchi S, Hamatsu T, et al. Utilization of free amino acids, yolk proteins and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of walleye pollock *Theragra chalcogramma*[J]. Fisheries Science, 2006, 72(3): 620-630.
- [41] Zhu P, Parrish C C, Brown J A. Lipid and amino acid metabolism during early development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)[J]. Aquaculture International, 2003, 11(1-2): 43-52.

## Molecular cloning and stress response of *PPAR $\gamma$* in *Coilia nasus*

GAO Jun<sup>1</sup>, XU Gangchun<sup>1, 2</sup>, DU Fukuan<sup>2</sup>, NIE Zhijuan<sup>2</sup>, GU Ruobo<sup>1, 2</sup>

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

**Abstract:** *Coilia nasus* is a commercially important fish species that is valued for its nutritive value and is used as a delicacy. It is widely distributed in the Yangtze River, coastal waters of China and Korea, and Ariake Sound in Japan. *C. nasus* is highly responsive to stress, which often causes tissue damage, apoptosis, and ultimately death during loading and transport, hampering the development of this industry. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are ligand-dependent transcription factors belonging to the nuclear receptor superfamily. Like other nuclear receptors, PPARs consist of four domains that have distinct functions. The A/B domain, located in conserved N-terminus, is responsible for ligand-independent transcription activity. The C domain, which is the DNA-binding domain (DBD), contains two zinc finger structures. The D domain, the hinge region, connects the DBD with the ligand-binding domain (LBD) and is involved in the conformational changes of PPARs. The E/F domain is an LBD. Transcriptional activation by PPARs requires the presence of PPAR response elements (PPREs) in the promoter of the target gene. PPARs bind PPREs as heterodimers with retinoid X receptor. Three isoforms of PPARs, *PPAR $\alpha$* , *PPAR $\beta$* , and *PPAR $\gamma$* , have been cloned in various mammals and fish. *PPAR $\gamma$*  is involved in many processes such as ontogenesis, lipid metabolism regulation, peroxisome biogenesis, immune functions and inflammation, and oxidative stress. The aim of this study was to investigate the stress response and expression of *PPAR $\gamma$*  during the embryonic development of *C. nasus*. Full-length *PPAR $\gamma$*  cDNA was obtained, which contained 1951 base pairs with an open reading frame of 1470 base pairs, encoding 489 amino acids. *PPAR $\gamma$*  has four functional domains, A/B region, DBD, hinge region, and LBD. Real-time quantitative PCR was used to detect the expression of *PPAR $\gamma$*  in different tissues and under transport stress. The results showed that *C. nasus PPAR $\gamma$*  was expressed in all tissues, with the highest expression observed in the liver, relatively high expression detected in the brain, intestine, heart, kidney, head kidney, and muscle, and low expression in the gill and spleen. During transport stress, *PPAR $\gamma$*  expression was significantly up-regulated ( $P<0.05$ ), peaked at 4 h, and was then significantly down-regulated. High expression of *PPAR $\gamma$*  may increase lipid metabolism and relieve inflammation and apoptosis. *PPAR $\gamma$*  plays an important role in lipid metabolism and stress responses. During embryonic development, *PPAR $\gamma$*  shows the highest expression in the fertilized egg stage, after which its expression is rapidly decreased and then remains at a lower level. Lower expression of *PPAR $\gamma$*  may down-regulate lipid metabolism and transportation. This study provides information regarding the theoretical basis of stress regulation.

**Key words:** *Coilia nasus*; *PPAR $\gamma$*  gene; stress response; transport stress; embryonic development

**Corresponding author:** GU Ruobo. E-mail: gurb13616172005@163.com