

DOI: 10.12264/JFSC2021-0541

团头鲂 *PGC1 β* 基因克隆及高糖胁迫、葡萄糖和胰岛素负荷对其 mRNA 表达的影响

徐超¹, 刘文斌², 谢帝芝¹, 丁志荣¹, Jean-Jacques Yao Adjoumani², 石泉¹,
李向飞²

1. 华南农业大学海洋学院, 广东 广州 510642;

2. 南京农业大学动物科技学院, 江苏省水产动物营养重点实验室, 江苏 南京 210095

摘要: 为探讨过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅激活因子 1 β (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 β , *PGC1 β*) 基因在鱼类糖代谢中的作用, 本研究采用 RACE 方法获得了团头鲂 *PGC1 β* 的 cDNA 片段序列, 利用生物信息学技术对该基因及其所编码蛋白的结构特征进行了分析; 采用实时定量 PCR 技术, 检测了高糖(45%)饲喂、葡萄糖及胰岛素负荷对团头鲂肝脏和肌肉中该基因表达的影响。结果显示, 团头鲂 *PGC1 β* cDNA 片段长为 1759 bp, 其中开放阅读框为 1719 bp, 编码 573 个氨基酸; 同源性分析结果显示, 团头鲂 *PGC1 β* 与其他鲤科鱼类的 *PGC1 β* 高度同源(氨基酸相似度 78%以上), 并与草鱼 *PGC1 β* 的进化关系最近; 高糖组鱼肝脏和肌肉中 *PGC1 β* 的表达量高于对照组, 但无显著差异; 此外, 葡萄糖及胰岛素负荷后, 肝脏中 *PGC1 β* 基因的表达量在 2 h 内显著降低至最小值, 随后逐渐升高至基础水平。以上结果提示, *PGC1 β* 可能在调节鱼类糖代谢中发挥重要作用。

关键词: 团头鲂; 过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅激活因子 1 β ; 基因克隆; 糖代谢; 基因表达

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2021)08–0959–09

糖类作为廉价的能量物质, 其在鱼饲料中适量添加可起到节约养殖成本的作用; 但鱼类对糖的利用能力相对低下, 被视作先天性的“糖尿病患者”^[1]。糖类的过量添加会导致鱼类能量代谢平衡的紊乱, 产生一系列的病理反应, 进而对其生长和健康造成负面影响^[2]。作为连接营养素和能量代谢的枢纽, 转录共激活因子家族中的过氧化物酶增殖体激活受体 γ 辅助激活因子 1 (peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1, *PGC1*) 近年来被广泛地关注。*PGC1 β* 是该辅助激活因子家族成员之一, 参与介导多种细胞的能量代谢过程。研究表明, *PGC1 β* 可以增加葡萄糖转运体 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 的表达, 增强骨骼肌的糖摄取能力^[3]。此外, *PGC1 β* 能够促

进糖异生关键酶, 如磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (phosphoenol-pyruvate carboxykinase, *PEPCK*)、葡萄糖 6 磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, *G6Pase*) 及果糖 -1,6- 二磷酸酶 (fructose-1,6-bisphosphatase, *FBPase*) 基因的表达, 致使肝脏葡萄糖输出的增加, 进而维持空腹血糖的稳定^[4–5]。在脂代谢过程中, *PGC1 β* 还可增加脂肪酸氧化酶, 如肉碱棕榈酰转移酶 1 α (carnitine palmitoyltransferase 1 α , *CPT1 α*) 的转录水平, 提高肝脏脂肪酸 β 氧化的速率, 进而维持机体代谢的稳态^[6]。然而, 以上结果主要来源于哺乳动物, 在水产动物中的研究尚较缺乏。目前, 仅在斑马鱼 (*Danio rerio*)、金鱼 (*Carassius auratus*) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 中克隆获得了 *PGC1 β* 基因的 cDNA 序列^[7–9]。对草

收稿日期: 2021-01-25; 修订日期: 2021-03-05.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872576, 32002361); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-45-14).

作者简介: 徐超(1989–), 男, 讲师, 博士, 研究方向为水生动物营养与生理学. E-mail: xuc1213@scau.edu.cn

通信作者: 李向飞, 副教授, 博士生导师, 研究方向为水产动物营养与生理学. E-mail: xfli@njau.edu.cn

鱼的研究表明, 饥饿和饲料高脂肪水平均会显著上调 *PGC1β* mRNA 的表达量。此外, 团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 肝细胞中的 *PGC1β* 基因过表达能够显著增强其线粒体的生物合成能力^[10]。以上结果提示, 该基因在鱼类能量代谢过程中起重要的调节作用^[9], 但 *PGC1β* 在鱼类糖代谢中的作用研究尚鲜见报道。

团头鲂又称武昌鱼, 具有抗病力强、肉质鲜美等优点, 被广泛养殖。该鱼是草食性鱼类, 具有较高的糖耐受能力, 但过高的饲料糖含量仍会对鱼体造成代谢负担, 进而致使其生长缓慢、厌食甚至死亡^[11]。鉴于此, 本研究旨在克隆团头鲂 *PGC1β* 基因的 cDNA 片段序列, 并分析其分子特征; 随后, 探究团头鲂 *PGC1β* 基因在高糖胁迫、葡萄糖及胰岛素负荷下的表达量变化。旨在揭示水产动物糖代谢的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼和实验设计

实验鱼来自江苏省扬州市国家良种场。实验开展前, 鱼被暂养于华南农业大学循环水系统, 期间投喂含 32%蛋白和 31%糖水平的商品饲料, 2 周。随后, 随机取 4 尾鱼, 用 MS-222 (质量浓度 100 mg/L) 麻醉, 收集肝脏组织用于 *PGC1β* 基因克隆。

随后, 将 160 尾规格均一的团头鲂幼鱼[体重 (50.45±0.33) g]随机分成 2 个组(每组 4 个重复), 分别投喂基础饲料(30%糖水平)和高糖饲料(45%糖水平), 每天投喂两次(8:00 和 17:00), 于室内循环养殖缸(水体容量为 500 L)养殖 8 周。实验饲料配方及营养组成见表 1。期间, 水温维持在 (23±0.5) °C, pH 为 7.1~7.5, 溶氧为 7.5~7.8 mg/L, 光照周期为 12 h : 12 h。饲料配方如表 2 所示。实验结束后, 取 4 尾鱼用 MS-222 (浓度 100 mg/L) 麻醉, 收集肝脏和肌肉组织于液氮中冷冻, 并置于 -80 °C 备用。

其后, 将规格均一、体重(52.49±1.02) g 的团头鲂幼鱼分成 4 组, 分别进行葡萄糖(2 组鱼)和胰岛素(另 2 组鱼)负荷实验。葡萄糖负荷实验中, 每组分别腹腔注射 16.7 mL/kg 体重的生理盐水、

表 1 实验饲料配方及营养组成
Tab. 1 Formulation and proximate composition of different experimental diets

%, 干重 dry matter			
成份 content		对照组 control	高糖组 high carbohydrate
配方 formulation			
鱼粉 fish meal		8.00	8.00
豆粕 soybean meal		26.00	26.00
菜粕 rapeseed meal		17.00	17.00
棉粕 cottonseed meal		17.00	17.00
鱼油 fish oil		2.00	2.00
豆油 soybean oil		2.00	2.00
玉米淀粉 corn starch		12.00	25.00
微晶纤维素 microcrystalline cellulose		13.00	0.00
磷酸二氢钙 calcium biphosphate		1.80	1.80
预混料 ^a premix ^a		1.20	1.20
营养组成 proximate composition			
水分 moisture		6.96	6.93
乙醚提取物 ether extract		5.93	5.94
粗灰分 crude ash		8.46	8.78
粗蛋白 crude protein		29.82	30.23
粗纤维 crude fiber		16.97	7.48
可消化性糖 ^b digestible carbohydrate ^b		31.86	42.64
总能/(MJ/kg) total energy		19.09	19.14

注: ^a 预混料为每千克饲料提供以下矿物质(g/kg)和维生素(IU or mg/kg): CuSO₄·5H₂O, 2 g; FeSO₄·7H₂O, 25 g; ZnSO₄·7H₂O, 22 g; MnSO₄·4H₂O, 7 g; Na₂SeO₃, 0.04 g; KI, 0.026 g; CoCl₂·6H₂O, 0.1 g; 维生素 A, 900000 IU; 维生素 D, 200000 IU; 维生素 E, 4500 mg; 维生素 K₃, 220 mg; 维生素 B₁, 320 mg; 维生素 B₂, 1090 mg; 维生素 B₅, 2000 mg; 维生素 B₆, 500 mg; 维生素 B₁₂, 1.6 mg; 维生素 C, 5000 mg; 泛酸, 1000 mg; 叶酸, 165 mg; 胆碱, 60000 mg. ^b 可消化性糖含量的计算方法为: 100-(水分+粗蛋白+粗脂肪+灰分+粗纤维).

Note: ^a premix supplied the following minerals (g/kg of diet) and vitamins (IU or mg/kg of diet): CuSO₄·5H₂O, 2 g; FeSO₄·7H₂O, 25 g; ZnSO₄·7H₂O, 22 g; MnSO₄·4H₂O, 7 g; Na₂SeO₃, 0.04 g; KI, 0.026 g; CoCl₂·6H₂O, 0.1 g; vitamin A, 900000 IU; vitamin D, 200000 IU; vitamin E, 4500 mg; vitamin K₃, 220 mg; vitamin B₁, 320 mg; vitamin B₂, 1090 mg; vitamin B₅, 2000 mg; vitamin B₆, 500 mg; vitamin B₁₂, 1.6 mg; vitamin C, 5000 mg; pantothenate, 1000 mg; folic acid, 165 mg; choline, 60000 mg. ^b Digestible carbohydrate content=100-(moisture+crude protein+ether extract+ash+crude fiber).

1.67 g/kg 体重的葡萄糖溶液; 胰岛素负荷实验中, 每组分别腹腔注射 1.00 mL/kg 体重的生理盐水、0.052 mg/kg 体重的胰岛素溶液^[12]。将注射后的鱼分别放入 24 个循环养殖缸(水体容量为 200 L), 每缸 4 尾鱼。随后, 分别在 0 h、1 h、2 h、4 h、8 h

和 12 h 6 个时间点收集肝脏和肌肉组织, 置于 -80 ℃ 备用。此采样过程中每个时间点采集一个循环养殖缸, 以降低反复采样对鱼体造成的应激。

1.2 *PGC1β* 基因克隆与序列分析

5'和 3' SMART cDNA 的合成参照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA) 说明书, 根据所获得的 cDNA 部分序列, 设计 5'和 3' RACE 引物(表 2), 利用所设计的引物与 UPM 扩增 *PGC1β* cDNA 的 5'和 3'端。RACE-PCR 反应条件为: 94 ℃ 4 min; 94 ℃ 30 s, 70 ℃ 2.5 min, 5 个循环; 94 ℃ 30 s, 68 ℃ 30 s, 72 ℃ 2.5 min, 5 个循环; 94 ℃ 30 s, 66 ℃ 30 s, 72 ℃ 2.5 min, 25 个循环; 72 ℃ 10 min。扩增产物纯化后, 使用 DNA Star Package 5.01 软件对 *PGC1β* 的正反序列进行组装, 最终分别获得完整的团头鲂 *PGC1β* 基因 cDNA 片段序列。

表 2 实验所需引物序列
Tab. 2 Primers used in the experiment

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence (5'-3')	退火温度/℃ annealing temperature	用途 usage
<i>PGC1β</i> -F1	AGTGGTCATCAAAAACGAGGA GCG	—	中间 片段
<i>PGC1β</i> -R1	TTGATGAGTTCCACTACCGA		扩增
<i>PGC1β</i> -F	CTCTAAGGGTGAATCGCAACG	54.60	qRT- PCR
<i>PGC1β</i> -R	TCCTCCGCCACTTCCACAT		
<i>EF1α</i> -F	CTTCTCAGGCTGACTGTGC	52.00	qRT- PCR
<i>EF1α</i> -R	CCGCTAGCATTACCCTCC		

注: *PGC1β* 表示过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 β ; *EF1α* 表示延长因子 1 α 。
Note: *PGC1β* indicates peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 β ; *EF1α* indicates elongation factor 1 α .

根据 NCBI 的开放阅读框(ORF) Finder 操作流程, 搜索 *PGC1β* cDNA 中的 ORF。使用 NCBI 网站的 BLASTN 和 BLASTX 软件进行同源基因的搜索。应用 ExPASy 网站测定 *PGC1β* 的等电点和分子量。利用网站 <http://sable.cchmc.org/>和 <http://swissmodel.expasy.org/>分别预测 *PGC1β* 二级和 3D 蛋白结构。利用 MEGA 5.0 构建 *PGC1β* 的系统进化树(neighbor-joining tree)。

1.3 组织 *PGC1β* 基因表达量分析

利用 Trizol 试剂提取来源于 4 尾团头鲂肝脏

和肌肉的总 RNA, 反转录成 cDNA 作为模板, 团头鲂 *EF1α* (序列号: X77689.1)作为内参基因^[13], 使用 *PGC1β* 特异性引物(*PGC1β*-F 和 *PGC1β*-R, 表 2)进行荧光定量 PCR 反应, 检测 *PGC1β* 的基因表达水平。其中, 20 μ L 反应体系分别包含 cDNA 稀释液 2 μ L, SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 10 μ L, ROX Reference Dye II 0.6 μ L, 上游引物 0.2 μ L, 下游引物 0.2 μ L 和 ddH₂O 7 μ L。通过 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法^[14]来计算组织样品中 *PGC1β* 的相对表达量。

1.4 数据统计与分析

利用 SPSS 16.0 软件并根据单因素方差分析要求对高糖胁迫实验数据进行分析。同时, 根据双因素方差分析要求对葡萄糖负荷、胰岛素负荷实验数据进行分析, 当存在显著差异($P<0.05$)时, 利用 Turkey's 方法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 团头鲂 *PGC1β* 基因的克隆和序列分析

本研究中, 获得 1759 bp 的 *PGC1β* 基因片段序列, 其中包含长度为 1719 bp 的开放阅读框, 其编码 573 个氨基酸(图 1)。同时, *PGC1β* 蛋白分子量为 63653.25 D, 等电点为 8.53。氨基酸序列分析表明, N 端含有 LXXLL 转录激活区, C 端含有 RNA 识别区(RRM)、PPAR 相互作用域、TPPTTPP 和 DHDYC 结构域。团头鲂 *PGC1β* 蛋白二级结构中存在 3 个 α -螺旋、4 个 β -折叠和 8 个转角(图 2, 图 3)。

2.2 团头鲂 *PGC1β* 进化分析

使用 NCBI 中的 BLASTp 程序对不同物种 *PGC1β* 氨基酸序列进行同源性比对分析, 结果表明其与鲤科鱼类有较高的相似度。具体比对结果如下: 草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) 97.70%、鲤(*Cyprinus carpio*) 85.46%、斑马鱼(*Danio rerio*) 80.45%、金鱼(*Carassius auratus*) 78.63%、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) 57.98%、大麻哈鱼(*Oncorhynchus mykiss*) 56.56%、大西洋鲑(*Salmo salar*) 55.74%、金头鲷(*Sparus aurata*) 45.99%、大黄鱼(*Larimichthys crocea*) 47.39%。用 MEGA 3.1 软件中的邻接法基于 *PGC1β* 氨基酸序列构建进化树,

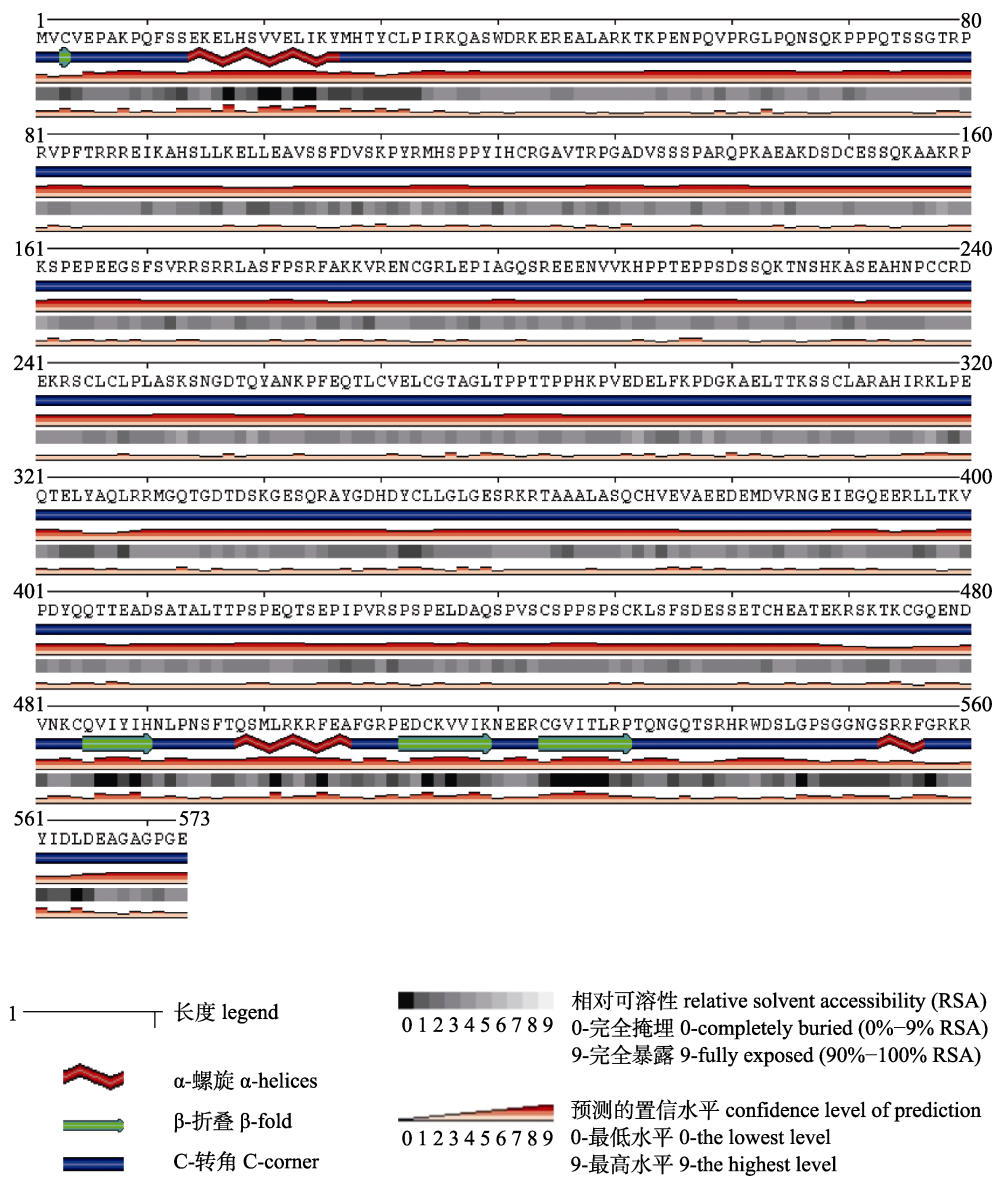


图 2 团头鲂 *PGC1β* 蛋白二级结构预测结果

Fig. 2 The secondary structure of the *PGC1β* protein in *Megalobrama amblycephala*

量以及二者交互作用对肝脏中 *PGC1β* 的表达均存在显著影响($P<0.05$)(图 6)。葡萄糖和胰岛素负荷均显著降低了 *PGC1β* 的表达量($P<0.05$), 且最低值均于负荷后 2 h 处出现; 随后其表达量显著上调($P<0.05$), 并分别于负荷后 12 h 和 8 h 回到基础值。在生理盐水组中, *PGC1β* 表达量随时间增加而显著提高($P<0.05$)。至于注射剂量, 0 h (糖和胰岛素负荷)和 8 h 及 12 h (胰岛素负荷)肝脏 *PGC1β* 的表达量无显著差异($P>0.05$)。除此之外, 糖和胰岛素负荷组鱼肝脏中 *PGC1β* 的表达量均显著低于对照组($P<0.05$)。

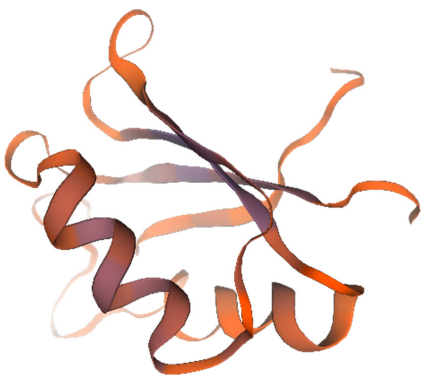
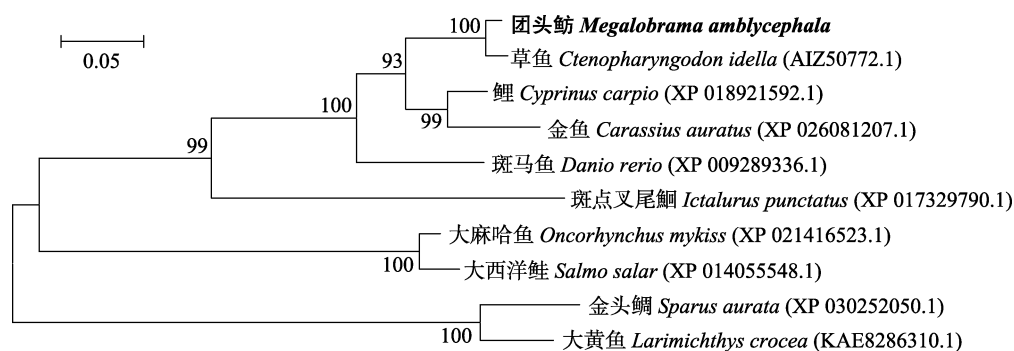
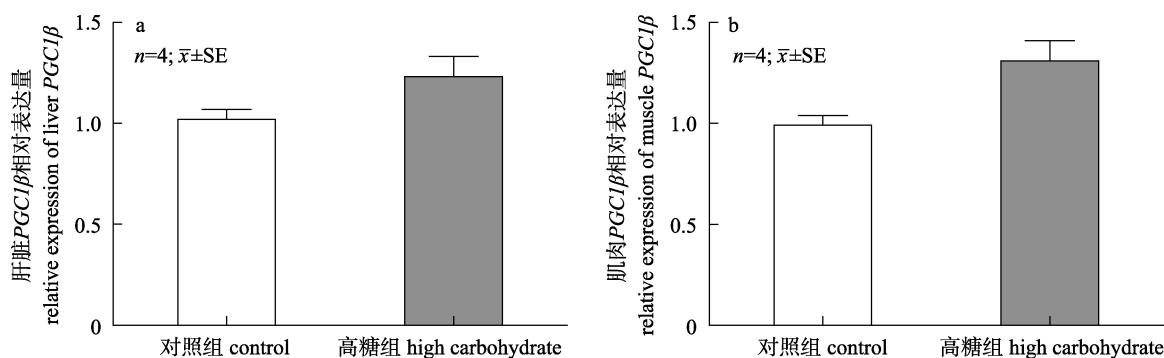
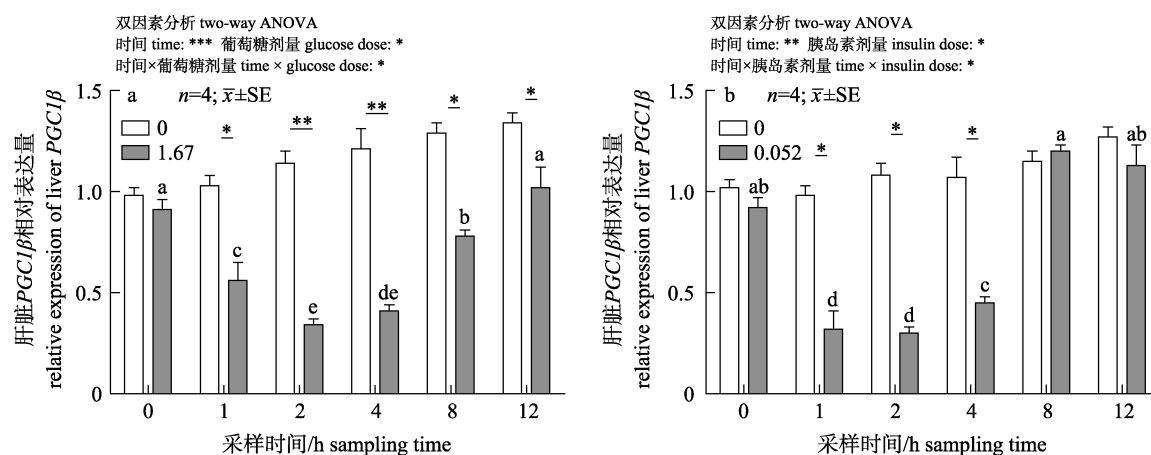


图 3 团头鲂 *PGC1β* 蛋白 3D 结构预测结果

Fig. 3 The 3D structure of *PGC1β* protein in *Megalobrama amblycephala*

图 4 基于 $PGC1\beta$ 序列的各物种间系统进化分析(邻接法, MEGA 3.1)Fig. 4 Phylogenetic tree based on $PGC1\beta$ sequences made by MEGA 3.1 software图 5 饲喂高糖饲料后团头鲂肝脏(a)和肌肉(b)中 $PGC1\beta$ 基因的表达量变化Fig. 5 The mRNA levels of $PGC1\beta$ in the liver (a) and muscle (b) of *Megalobrama amblycephala* fed high-carbohydrate diets图 6 葡萄糖(a)和胰岛素(b)负荷后团头鲂肝脏中 $PGC1\beta$ 的表达量

不同的小写字母表示相同组别(每个葡萄糖或胰岛素剂量)但不同采样时间点的 $PGC1\beta$ 表达量差异显著($P<0.05$),

表示不同处理组在相同采样时间点上显著差异($P<0.05$). 双因素分析中 $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Fig. 6 The mRNA levels of $PGC1\beta$ in the liver of *Megalobrama amblycephala* subjected to glucose (a) and insulin (b) loadings. Significant differences ($P<0.05$) among sampling times within each treatment are indicated by different letters. * indicates a significant difference ($P<0.05$) between the two treatments at each sampling time. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

3 讨论

3.1 团头鲂 $PGC1\beta$ 基因的克隆和序列分析

$PGC1\beta$ 因在糖脂代谢中的重要作用而被广泛

地关注, 但鱼类中该基因的研究相对缺乏。本研究获得了 1759 bp 的团头鲂 $PGC1\beta$ 部分 cDNA 序列, 经同源性分析, 其与草鱼 $PGC1\beta$ 的同源性最高, 达 97.70%, 与其他鲤科鱼类的同源性为 78.63%~

85.46%。说明 *PGC1 β* 在鱼类中具有较高的保守性。此外, 碱基及氨基酸序列比对结果显示, 团头鲂 *PGC1 β* 结构中包含多种与哺乳动物相同的结构位点, 如 N 端含有 LXXLL 转录激活区, C 端含有 RNA 识别区(RRM)、PPAR 相互作用域、TPPTTPP 和 DHDYC 结构域。其中, LXXLL 转录激活区、PPAR 相互作用域和 TPPTTPP 结构域被认为是 *PGC1 β* 与过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptors, PPAR)等细胞核受体转录因子相互作用的关键部位^[10,15-16]。DHDYC 结构域则是宿主细胞因子 1 的结合位点, 在调节机体免疫功能中发挥重要作用^[17]。至于 RRM 结构域, 其可调控 *PGC1 β* 自身的转录及翻译^[18]。然而, 相较哺乳动物和斑马鱼, 团头鲂 *PGC1 β* 氨基酸序列结构上存在更多的磷酸化位点^[10]。这一特点可能会使团头鲂 *PGC1 β* 存在特异性的生理功能。

3.2 饲料糖水平对肝脏和肌肉中 *PGC1 β* 表达量的影响

8 周养殖实验后, 高糖组鱼肝脏和肌肉中 *PGC1 β* 的表达量高于对照组, 尽管无显著差异, 这可能体现了团头鲂在摄食高糖饲料后的适应机制。小鼠上的研究表明, 其肝脏中的 *PGC1 β* 过表达能够诱导葡萄糖激酶(glucokinase, GK)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、磷酸果糖激酶(phospho-fructokinase, PFK)和肝型丙酮酸激酶(liver-type pyruvate kinase, LPK)等糖酵解相关基因的表达, 增强肝脏的糖酵解功能^[19], 进而改善机体的糖代谢状态。此外, 诱导小鼠肝脏中 *PGC1 β* 的表达还会通过促进固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element-binding proteins, SREBPs)及其下游靶基因如脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)和硬脂酰辅酶 A 去饱和酶-1 (stearoyl-CoA desaturase 1, SCD-1)的转录水平, 增强肝脏的脂肪合成能力, 进而有益于机体的代谢稳态^[6,19]。

3.3 葡萄糖和胰岛素负荷对团头鲂肝脏中 *PGC1 β* 表达的影响

葡萄糖及胰岛素负荷后, 团头鲂肝脏 *PGC1 β* 的表达量迅速发生变化, 均在 2 h 处降至最小值。

这与小鼠下丘脑上的研究结果相似, 即糖负荷后下丘脑腹内侧核 *PGC1* 表达水平在 2 h 处降至最低值^[20]。这可能归因于糖及胰岛素负荷后鱼体增加的胰岛素水平, 胰岛素能够通过激活蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB)致使 *PGC1* 磷酸化失活, 进而降低 *PGC1* 基因的表达量^[21-22]。其后, 采样时间从 2 h 至 12 h, 肝脏中 *PGC1 β* 表达量均显著升高至基础水平。这可能由于鱼体逐渐降低的胰岛素水平削弱了其对 *PGC1 β* 表达的抑制能力。与此同时, 增加的 *PGC1* 表达量被认为是维持机体糖代谢稳态的积极信号, 因为 *PGC1* 的激活能够促进肝脏糖酵解和脂肪合成相关基因的转录水平, 进而增强机体的糖脂代谢能力^[6,19]。此外, 基于糖及胰岛素负荷后肝脏中 *PGC1 β* 基因随采样时间的变动情况, 表明该基因参与了团头鲂糖代谢的调节活动。与葡萄糖及胰岛素注射组相比, 对照组鱼肝脏 *PGC1 β* 的表达量随采样时间的增加而逐渐升高。研究表明, 饥饿状态下, *PGC1* 的激活将会促进肝糖异生相关酶[如磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)和葡萄糖 6 磷酸酶(G6Pase)]和脂肪酸氧化相关酶[如肉毒碱棕榈酰转移酶 1 α (CPT1 α)]的活性, 进而增加肝脏的葡萄糖输出及脂肪酸氧化能力, 为机体提供能量。

4 结论

本研究通过基因克隆技术, 获得了团头鲂 *PGC1 β* 基因片段序列, 长 1759 bp。高糖胁迫实验结果发现, 高糖组鱼肝脏和肌肉中 *PGC1 β* 的表达量高于对照组, 但无显著性差异。此外, 葡萄糖及胰岛素负荷后, 鱼肝脏中 *PGC1 β* 的表达量显著降低, 最低值出现在 2 h 处。以上提示, *PGC1 β* 在团头鲂糖代谢过程中可能发挥重要作用。本实验所获结果为深入开展 *PGC1 β* 在鱼类糖代谢中的作用提供了初步信息, 并有助于水产动物高糖低蛋白饲料的研发。

参考文献:

- [1] Kamalam B S, Medale F, Panserat S. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies[J]. Aquaculture, 2017, 467: 3-27.

- [2] Hemre G I, Mommsen T P, Krogdahl Å. Carbohydrates in fish nutrition: Effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2002, 8(3): 175-194.
- [3] Michael L F, Wu Z, Cheatham R B, et al. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(7): 3820-3825.
- [4] Ji H, Lu R H, Chang Z G, et al. Biological characters and functions of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator (PGC-1) family[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 26(7): 596-603. [吉红, 卢荣华, 常志光, 等. 转录辅助活化因子 PGC-1 家族的生物学特性及功能[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, 26(7): 596-603.]
- [5] Lin J D, Tarr P T, Yang R J, et al. PGC-1 β in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(33): 30843-30848.
- [6] Lin J D, Yang R J, 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.
- [7] Ji H, Su S S, Lu R H, et al. Partial cDNA cloning and preliminary study on expression of *PGC-1 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[J]. *西北农业学报*, 2009, 18(6): 5-8.]
- [8] LeMoine C M R, 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.
- [9] Lu R H, Yang F, Sun J J, et al. 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*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(9): 1283-1290. [卢荣华, 杨峰, 孙君君, 等. 草鱼 *PGC-1 β* 基因克隆及高糖高脂饲料对其表达的影响[J]. *水产学报*, 2015, 39(9): 1283-1290.]
- [10] Lu K L, Policar T, Song X J, et al. Molecular characterization of PGC-1 β (PPAR gamma coactivator 1 β) and its roles in mitochondrial biogenesis in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(6): 1935.
- [11] Li X F, Jiang Y Y, Liu W B, et al. Protein-sparing effect of dietary lipid in practical diets for blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerlings: Effects on digestive and metabolic responses[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2012, 38(2): 529-541.
- [12] Jin J Y, Panserat S, Kamalam B S, et al. Insulin regulates lipid and glucose metabolism similarly in two lines of rainbow trout divergently selected for muscle fat content[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2014, 204: 49-59.
- [13] Zhang J, Wei X L, Chen L P, et al. Sequence analysis and expression differentiation of chemokine receptor CXCR4b among three populations of *Megalobrama amblycephala*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 40(2): 195-201.
- [14] 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*, 2002, 25(4): 402-408.
- [15] Shoag J, Arany Z. Regulation of hypoxia-inducible genes by PGC-1 alpha[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2010, 30(4): 662-666.
- [16] Puigserver P, Spiegelman B M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator[J]. *Endocrine Reviews*, 2003, 24(1): 78-90.
- [17] Vercauteren K, Gleyzer N, Scarpulla R C. PGC-1-related coactivator complexes with HCF-1 and NRF-2 β in mediating NRF-2 (GABP)-dependent respiratory gene expression[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(18): 12102-12111.
- [18] Monsalve M, Wu Z D, Adelmant G, et al. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1[J]. *Molecular Cell*, 2000, 6(2): 307-316.
- [19] Chambers K T, Chen Z J, 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.
- [20] Chen J H, Guan Z L, Zhao W L, et al. Effects of glucose load on the expression level of PGC-1 α neurons in hypothalamic ventromedial nucleus of mice[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2015, 37(1): 22-26. [陈金虎, 管振龙, 赵玮琳, 等. 糖负荷对小鼠腹内侧核 PGC-1 α 表达的影响[J]. *营养学报*, 2015, 37(1): 22-26.]
- [21] Puigserver P, Rhee J, Donovan J, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction[J]. *Nature*, 2003, 423(6939): 550-555.
- [22] Daitoku H, Yamagata K, Matsuzaki H, et al. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR[J]. *Diabetes*, 2003, 52(3): 642-649.

Molecular characterization of *PGC1 β* from *Megalobrama amblycephala* and responsiveness to dietary carbohydrate levels and glucose and insulin loadings

XU Chao¹, LIU Wenbin², XIE Dizhi¹, DING Zhirong¹, Jean-Jacques Yao Adjoumani², SHI Quan¹, LI Xiangfei²

1. College of Marine Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Key Laboratory of Aquatic Nutrition and Feed Science of Jiangsu Province, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Carbohydrates are an excellent source of energy and carbon for mammalian cells. A constant supply of glucose prevents hypoglycemia and its potentially catastrophic effects on the cells of the nervous system. Unlike for mammals, it is not usually regarded as the panacea for fish. Although the continual ingestion of a carbohydrate-enriched diet or glucose-loading can provide essential metabolic energy, most fish species appear to have impaired glucose tolerance and often display prolonged postprandial hyperglycemia. Recently, several approaches such as metabolomics and transcriptomics have been employed to assess diet-induced metabolic syndromes in fish. Findings from such studies have suggested that the disruption of energy homeostasis in fish is strongly implicated in the development of disturbances in the glucose metabolism. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 β (*PGC1 β*) is a coactivator of nuclear receptors and other transcription factors that regulates several components of energy metabolism, particularly aspects of hepatic glucose metabolism. To investigate the molecular regulatory mechanisms of glucose metabolism in fish, the full-length cDNA sequence of *PGC1 β* from *Megalobrama amblycephala* was identified by rapid amplification complementary DNA ends, and the structural features of the gene and its encoded protein were analyzed through bioinformatics methods. Using real-time PCR, the transcriptional response of this gene to dietary carbohydrate levels and glucose and insulin loadings was studied. The result revealed that the obtained cDNA of *PGC1 β* in *M. amblycephala* was 1759 bp in length, and consisted of a 1719 bp open reading frame encoding 573 amino acids. Additionally, conserved motifs were identified in the amino acid sequence of the *PGC1 β* protein, including the peroxisome proliferator-activated receptor interaction domain; the RNA recognition motif; and the LXXLL, TPPTTPP, and DHDYC motifs. Alignment based on amino acid sequences showed that *M. amblycephala PGC1 β* had a 78.63%–97.7% homology to its counterparts in the Cyprinidae family. Phylogenetic analysis showed that *M. amblycephala PGC1 β* clustered with that of grass carp. Compared with the control group, the expression levels of *PGC1 β* in the liver and muscle of fish fed high-carbohydrate diets had increased, although there were no significant differences ($P>0.05$) between the two treatments. In addition, glucose and insulin administration resulted in a significant decrease in *PGC1 β* expression in the liver, with minimum values attained at 2 h after injection. Thereafter, the expression rapidly returned to the basal value at 12 h after injection. These results elucidate the glucose metabolism regulation mechanism in fish and lay a foundation for further functional research into the *PGC1 β* gene in fish.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; *PGC1 β* ; gene cloning; glucose metabolism; gene expression

Corresponding author: LI Xiangfei. E-mail: xfli@njau.edu.cn