

DOI: 10.12264/JFSC2022-0199

翘嘴鱥 *pgc1* 基因表达特征及水体镉暴露对其节律性表达的影响

潘亚雄¹, 陶晋升¹, 张宇^{1,2}, 周俊¹, 潘佳琳¹, 唐昭阳¹, 樊轶为¹, 胡名广¹, 李慧菊¹, 黄鑫¹, 褚武英¹, 张建社¹

1. 长沙学院生物与环境工程学院, 湖南 长沙 410022;

2. 盐城工学院海洋与生物工程学院, 江苏 盐城 221051

摘要: 镉(Cd)是一种具有高度细胞毒性的重金属, 其生物半衰期长, 不易降解, 水体中即使很低浓度镉也能对鱼类造成较大损伤。过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子 1 (peroxisome proliferator activated receptor- γ co-activator-1, *pgc1*)是一种转录共激活因子, 其通过激活 PPAR γ 等转录因子活性而参与一系列基因表达调控, 在生物能量代谢、线粒体生物合成、抗氧化等生理过程中起着重要的调控作用。为了阐明鱥(*Siniperca chuatsi*) *pgc1* 基因序列特征、组织表达及重金属镉胁迫对其昼夜节律性表达的影响, 本研究对鱥 *pgc1 α* 、*pgc1 β* 基因启动子顺式调控元件、序列特征、组织表达以及水体镉暴露下鱥脑组织中 *pgc1 α* 和 *pgc1 β* 基因表达的昼夜节律进行了分析。结果表明, 鱥 *pgc1 α* 和 *pgc1 β* 启动子中存在 NF-E2、IRF1 等能量代谢相关转录因子结合位点, *pgc1 β* 启动子上存在节律转录因子 KLF9 结合位点。鱥 *pgc1 α* 、*pgc1 β* 基因都包含完整的 LXXLL 基序和 RRM 结构域, 与斑马鱼(*Danio rerio*) *pgc1 α* 和 *pgc1 β* 基因同源性分别为 51.6% 和 59.7%, 与人类基因同源性分别为 41.5% 和 28.4%, 序列保守性较低。鱥 *pgc1 α* 和 *pgc1 β* 基因表达具有明显的组织特异性, 均在脑、肾脏、心脏中特异性表达。自然条件下, 鱥脑组织中 *pgc1 α* 和 *pgc1 β* 表达具有显著的昼夜节律性, 均为昼高夜低的表达趋势, 其基因表达峰值相位分别为 ZT 7.07 h 和 ZT 8.25 h。重金属镉胁迫导致鱥脑组织 *pgc1 α* 和 *pgc1 β* 基因表达昼夜差异减小, 振幅下降, 基因表达峰值相位分别提前至 ZT 3.71 h 和 ZT 5.65 h, 表明水体镉暴露对鱥脑组织 *pgc1 α* 、*pgc1 β* 基因昼夜节律性表达具有显著的扰乱作用。

关键词: 鱥; *pgc1*; 组织表达; 镉暴露; 昼夜节律

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)01-0075-11

过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子 1 (peroxisome proliferator-activated receptor co-activated factor 1, *pgc1*) 在细胞能量代谢中起着重要的调控作用, 其通过调节下游靶基因的表达, 协同控制线粒体合成、脂质代谢平衡、葡萄糖代谢平衡等多种生理过程^[1-2]。*pgc1* 主要有 *pgc1 α* 和 *pgc1 β* 两个基因亚型^[3]。*pgc1 α* 是线粒体合成相关基因的转录辅激活因子, 最早作为脂代谢调控核受体 PPAR γ 的辅激活因子被发现^[4], 其在氧化代谢活跃的组织中高表达, 通过促进 PPAR α 和 NRF1 的转录活性调控心肌线粒体生成与脂肪酸 β 氧化^[5-6]。

pgc1 β 也在能量代谢中发挥重要调节作用^[6-7], 如参与葡萄糖异生、脂代谢、线粒体生物合成及氧化分解等生理过程的调控^[8-9]。

镉(Cd)是一种非必需的有毒重金属, 其容易在生物体内蓄积, 进而导致器官损伤等毒性作用^[10-11]。鱼类作为生活在水中的低等脊椎动物, 直接与水中的重金属接触, 对 Cd 具有较高的敏感性^[12]。研究表明 Cd 暴露能诱导鱼类肝脏等组织产生氧化应激反应进而导致组织损伤^[13-14], 此外 Cd 还能通过诱导线粒体损伤, 降低线粒体氧化能力和 ATP 合成, 进而抑制机体能量代谢^[15]。生物节律

收稿日期: 2022-05-21; 修订日期: 2022-08-10.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31820103016; 32002364); 湖南省自然科学基金项目(2021JJ40628).

作者简介: 潘亚雄(1989-), 男, 博士, 讲师; 研究方向为鱼类生理代谢调控. E-mail: biopyx@163.com

通信作者: 张建社, 教授, 研究方向为水生动物营养与品质调控. E-mail: jzhang@ccsu.edu.cn

对生物的生理和行为有重要的调节作用^[16], 生物体内的生物钟可以使生物体预知环境的改变, 并将外界信息变化传递给生物体相关组织器官, 使得各组织内的某些基因表达发生一定的改变, 从而使其相关功能适应环境的变化^[17]。在鱼类中, 关于重金属镉对生物昼夜节律的影响研究还较少, 在斑马鱼(*Danio rerio*)中的研究表明, 镉胁迫下斑马鱼表现出运动障碍、昼夜行为活动模式异常等现象^[18]。*pgc1* 作为细胞能量代谢重要调节因子是否介导了重金属镉的节律毒性效应还未见有报道。

鳜(*Siniperca chuatsi*)是一种经济价值高的淡水名贵鱼类, 其肉质细嫩、味道鲜美、营养丰富, 在我国广泛养殖, 但其作为典型的肉食性鱼类, 需摄食活饵或驯化后摄食高蛋白含量饵料, 同时对水质要求较高, 对水环境污染耐受性差, 易受水质影响而导致存活率低。本研究对鳜 *pgc1* 基因序列特征及其组织表达模式进行了分析, 并研究了水体镉暴露对鳜脑组织昼夜节律的转录调控, 为探究重金属镉对鱼类生物节律毒性效应提供了新的视角。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

RNA 提取(TRIzol)试剂、Nuclease-Free Water、MonTrack™ TBE、MonTrack™ D2000 Plus DNA Ladder、MonPro™ SYBR® Green qPCR Mix (None Rox)购自莫纳生物科技有限公司; CdCl₂·5H₂O、氯仿、异丙醇、无水乙醇购自上海国药; 琼脂糖购自美国 Sigma 公司; Ultra GelGreen 核酸染色剂购自南京诺唯赞生物科技有限公司; Loading Buffer、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.2 实验鱼及饲养管理

实验鱼由长沙市望城区团山湖村鳜鱼养殖场提供, 将实验鳜置于室内实验基地在 LD 光制(光暗比 12 h : 12 h, 光照期为 6:30—18:30, 暗周期为 18:30—翌日 6:30)下驯养 2 周, 每天在同一时间段进行投食, 保证实验鱼的生物周期性一致, 同时, 缸中充气以维持水体溶氧充足。待实验鳜状态稳定后, 禁食 24 h, 选取规格一致、健康的鳜 6 尾,

用 100 mg/L MS-222 (3-氨基苯甲酸乙酯甲磺酸) 对鱼进行麻醉, 然后放置在冰上解剖, 快速取其肠道、肝脏、脑、肾脏、脾脏、心脏、鳃、肌肉 8 个组织, 置入冷冻管, 液氮速冻后, 放入 -80 ℃ 冰箱用于后续基因组织表达分析。另选取健康、大小规格一致的鳜, 体重(200±15) g (平均值±标准误), 随机分为两组, 每组 3 缸, 每缸 12 尾, 分别置于容积 200 L 玻璃缸中, 每缸水量为 150 L, 实验用水为曝气后的城市自来水。向实验缸中加入已经配好的 CdCl₂ 母液(对照组不添加, 镉处理组水体 CdCl₂ 终质量浓度: 20 μg Cd/L)。本实验采用静态水养殖系统, 缸中持续充气以维持水体溶氧充足, 实验在室温和 LD 光制(水温 24.0 ℃±1.0 ℃, 光暗比 12 h : 12 h)下进行, 每天饱食投取饵料鱼 2 次, 投食量根据摄食量调节, 半小时后清理剩余饵料鱼和粪便, 用已曝气去氯的自来水换取缸中 25% 的水(镉处理组换的水中提前溶入适量的 CdCl₂ 母液, 保持水体中的 Cd 浓度在 20 μg Cd/L)。

1.3 样品采集

实验鳜连续镉暴露两周, 禁食 24 h 后开始 24h 连续取样。取样时间点分别是 06:30 (ZT0)、09:30 (ZT3)、12:30 (ZT6)、15:30 (ZT9)、18:30 (ZT12)、21:30 (ZT15)、00:30 (ZT18)、次日 03:00 (ZT21)、次日 06:30 (ZT24), 共 9 个时间点, ZT0 表示每天光照开始的时间。每个时间点每个处理组随机选取 3 尾鱼, 用 100 mg/L MS-222 对鱼进行麻醉, 然后放置在冰上解剖, 快速取脑组织, 置入冻存管, 液氮速冻后, 放入 -80 ℃ 冰箱保存备用。

1.4 基因表达检测

采用 Trizol 法提取样品总 RNA(参照说明书进行), 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性, Nanodrop ND-2000 超微量分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 比值和 A_{230}/A_{260} 比值分析 RNA 纯度并测定 RNA 浓度。逆转录使用 Takara 公司 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒进行, 在逆转录前, 使用试剂盒中的 DNA 酶去除总 RNA 中的基因组 DNA 残留, 使用试剂盒自带引物进行逆转录获得 cDNA, 稀释后用于 qPCR 分析。荧光定量 PCR 使用 MonPro 公司的 MonPro™ SYBR® Green qPCR Mix (None Rox)试剂盒进行,

qPCR 反应采用两步法。qPCR 所用引物由 Primer 5.0 设计(表 1), 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量^[19], 根据预实验筛选, 选择表达最稳定的 *rpl13* 和 *elfa* 作为本研究的内参基因。基因组织表达半定量 PCR 采用 Monad PCR mix 进行, 反应为 25 μ L 体系, PCR 反应结束后, 取 2 μ L 的 PCR 产物在琼脂糖凝胶中电泳, 使用 Bio-Rad 凝胶成像仪对条带拍照。

表 1 引物序列
Tab. 1 Sequence of primers

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequences (5'-3')	用途 utilization
<i>pgc1α-F1</i>	CCTCCTGGTCTCGTCACAAAC	RT-qPCR
<i>pgc1α-R1</i>	CGAACTCCCCGTTCTCATAG	RT-qPCR
<i>pgc1β-F1</i>	ACACCAATGTTGCCACGAA	RT-qPCR
<i>pgc1β-R1</i>	AGGCTCAGCGCACAGTAGTC	RT-qPCR
<i>pgc1α-F2</i>	CGGGCAGTAAGTCAGGTAGA	RT-PCR
<i>pgc1α-R2</i>	GGTGTATCCCTTGTGGTCATT	RT-PCR
<i>pgc1β-F2</i>	CAATCAGGTATCGGATGGAAA	RT-PCR
<i>pgc1β-R2</i>	TGGCAGGTTGTGGATGTAAAA	RT-PCR
<i>rpl13-F</i>	CACAAGAAGGAGAAGGCTGGGT	内参
<i>rpl13-R</i>	TTTGGCTCTTGGCACGGAT	内参
<i>elfa-F</i>	ATACGCCTGGGTTTGGAC	内参
<i>elfa-R</i>	AGTTTCTGCCGTTGAG	内参

1.5 数据处理与统计分析

使用 SPSS 19.0 软件(SPSS, Michigan Avenue, Chicago, IL, 美国)进行数据统计分析, 结果采用平均值±标准误(means±SE)表示, 并使用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行不同时间点指标差异性统计检验, 多重比较选择 Tukey 法, 使用独立样本 T 检验进行不同处理组指标差异性统计检验。在进行显著性分析之前, 所有数据进行 Kolmogorov-Smirnov 分析以检验数据正态分布性, Levene 分析以检验方差齐性, 显著性水平为 $P<0.05$ 。生物节律拟合使用 Matlab 软件进行, 拟合的余弦方程为: $f(t)=M+A\cos(\pi t/12-\varphi)$; 其中 $f(t)$ 是指在给定时间点基因表达水平; M 为基因表达中值, 即波动变化的中线; A 为节律振荡的振幅; t 为时间; φ 为峰值相位, 是振荡达到峰值对应的时间; 同时满足方差分析 $P<0.05$ 且余弦分析信噪比

$SE(A)/A<0.30$ 时, 则说明该基因具有显著昼夜节律性。

2 结果与分析

2.1 鳜 *pgc1* 基因氨基酸序列比对及同源性分析

鳜 *pgc1α* 和 *pgc1β* 基因 cDNA 全长分别为 3822 bp 和 2817 bp, 编码氨基酸长度分别为 1273aa 和 938aa。*pgc1α* 含有 1 个 LXXLL 基序以及 1 个 RRM 结构域, 而 *pgc1* 含有两个 LXXLL 基序以及一个 RRM 结构域, PGC1α 和 PGC1β 的 LXXLL 基序和 RRM 结构域高度保守(图 1)。

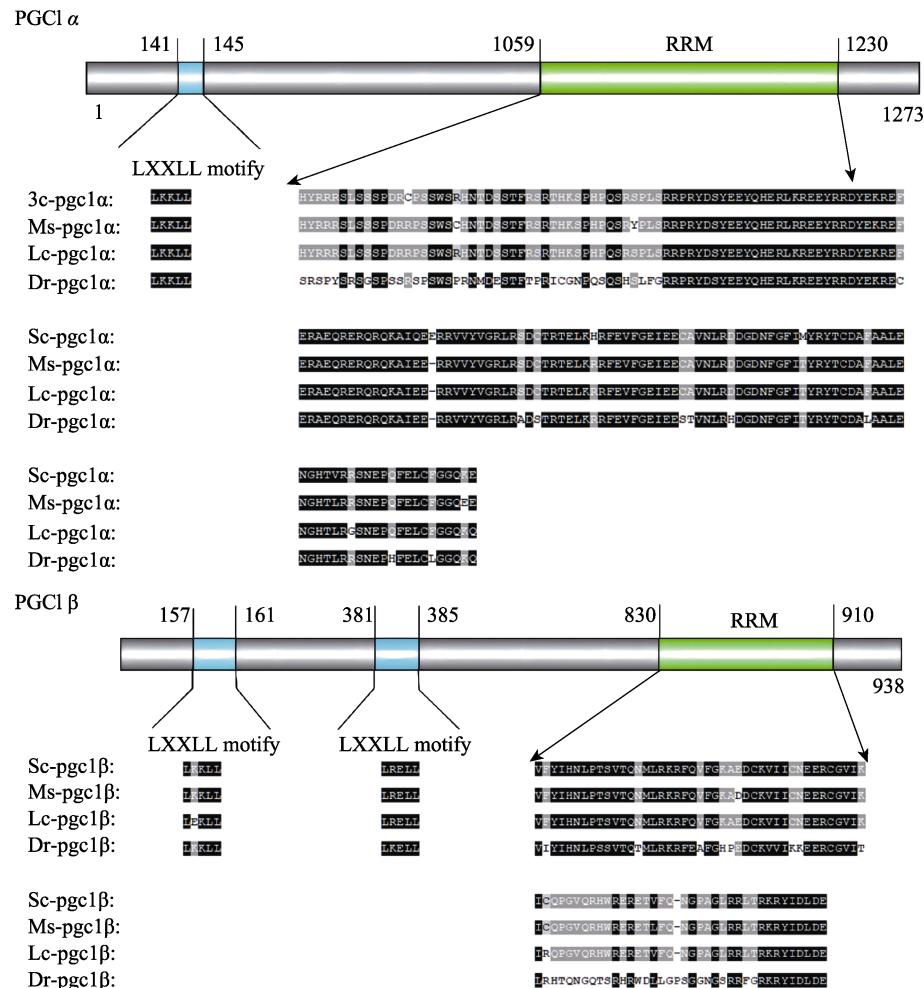
序列同源性分析表明, 鳜 *pgc1α* 和 *pgc1β* 与斑马鱼基因同源性分别为 51.6% 和 59.7%, 与人类基因同源性分别为 41.5% 和 28.4%, 序列保守性较低。此外, 鳜 *pgc1α* 和 *pgc1β* 两种基因亚型之间序列同源性低至 24.9%, 表明鳜两种 *pgc1* 基因亚型之间存在较大差异。进化分析表明, *pgc1* 分为 *pgc1α* 和 *pgc1β* 两个大类, 鳜 *pgc1α* 先与同源性最高的加州鲈(*Micropterus salmoides*)汇集在一支, 然后与大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、红鳍东方鲀(*Taleifugu rubripes*)、斑马鱼聚集于同一支, 最后与亲缘关系较远的爪蟾、智人、牛聚为一类; *pgc1β* 拓扑结构与 *pgc1α* 类似(图 2)。*pgc1α* 和 *pgc1β* 两个分支的拓扑结构与物种演化关系一致, 且鱼类、两栖类和哺乳类物种均有两个 *pgc1* 亚型, 表明 *pgc1α*、*pgc1β* 两个基因亚型可能产生于脊椎动物祖先共有的基因倍增事件。

2.2 鳜 *pgc1α* 和 *pgc1β* 上游转录因子结合位点预测

对鳜 *pgc1α* 和 *pgc1β* 基因转录起始位点上游 2 kb 序列进行转录因子结合位点预测分析, *pgc1α* 基因启动子有多个重要转录因子结合位点(图 3), 如 MYOD、SOX1 和 IRF1 等, 而 *pgc1β* 基因启动子区域仅有 KLF9、NFE2 等转录因子结合位点(图 4), 其中 KLF9 在昼夜节律与代谢调控中起着重要的作用^[20]。

2.3 基因组织表达分析

为研究鳜 *pgc1α* 和 *pgc1β* 基因在不同组织中的表达水平, 对鳜心、肝、脾、肾、鳃、肠、脑、肌肉组织进行半定量 PCR 以及实时荧光定量 PCR 检测, 结果如图 5 所示, *pgc1α* 和 *pgc1β* 基因表达

图1 鲢 PGC1 α 、PGC1 β 序列分析

Sc: 鲢; Ms: 加州鲈; Lc: 大黄鱼; Dr: 斑马鱼.

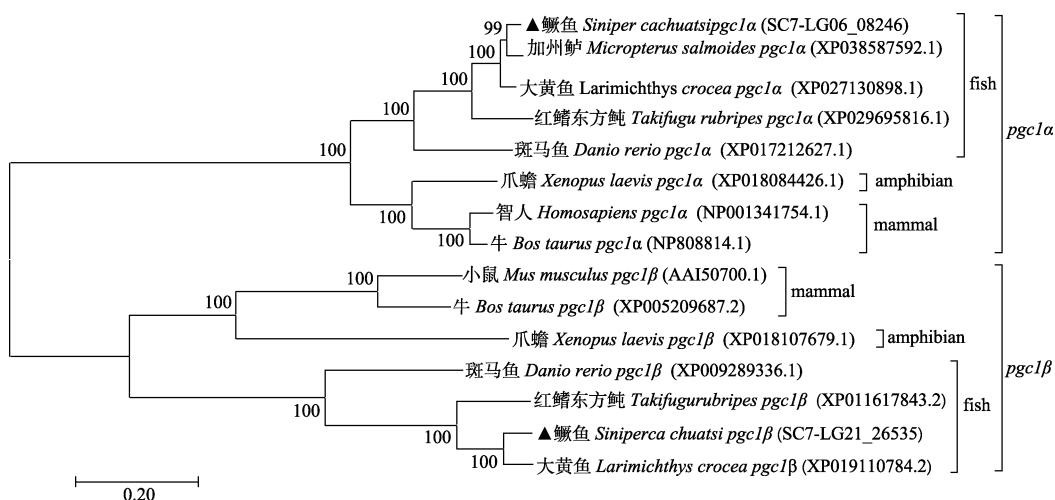
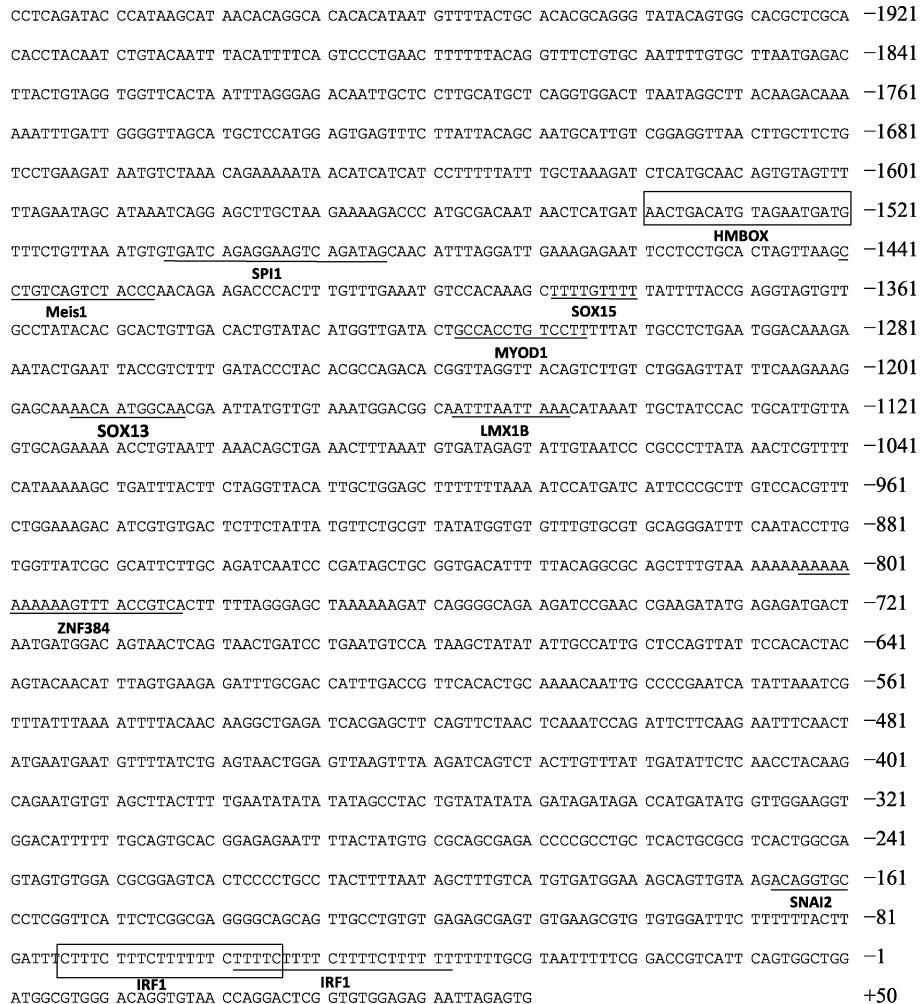
Fig. 1 PGC1 α and PGC1 β sequence analysis of *Siniperca chuatsi*Sc: *Siniperca chuatsi*; Ms: *Micropterus salmoides*; Lc: *Larimichthys crocea*; Dr: *Danio rerio*.

图2 pgc1 基因家族进化分析

Fig. 2 Phylogenetic tree based on pgc1 gene family

图3 鳜 *pgc1α* 基因转录因子结合位点预测Fig. 3 Prediction of transcription factor binding sites of *pgc1α* gene in *Siniperca chuatsi*

具有明显的组织特异性,且均在脑、肾脏、心脏中高表达,在肌肉、肝脏等组织中表达量较低,在各组织中,*pgc1α* 均是主要表达亚型,实时荧光定量和半定量检测结果一致。

2.4 镉胁迫对鳜脑组织 *pgc1α* 和 *pgc1β* 昼夜节律表达的影响

采用实时荧光定量 PCR 对鳜脑组织中 *pgc1α* 和 *pgc1β* 基因 24 h 昼夜节律表达进行分析,结果表明,自然条件下鳜 *pgc1α* 和 *pgc1β* 均呈现出昼高夜低的表达模式(图 6),余弦拟合分析表明其表达均具有显著的昼夜节律性, *pgc1α* 和 *pgc1β* 表达峰值相位分别为 ZT7.07 和 ZT8.25(表 2)。镉暴露(20 μg Cd/L, 14 d)后, *pgc1α* 基因在鳜脑组织中表达量相比对照组在多个取样时间点均下降,基因表达峰值相位变为 ZT3.71, 相比对照组 ZT7.07

提早了 3.36 h; *pgc1β* 基因相位为 ZT5.65, 相比对照组也提早了 2.6 h, 且两基因的振幅均减小, 表明水体镉暴露会导致鳜脑组织 *pgc1α* 和 *pgc1β* 基因表达昼夜节律性紊乱。

3 讨论

pgc1 基因在生物能量代谢中具有重要的作用,但目前对 *pgc1* 基因的研究主要集中于哺乳动物,在水生动物上的研究较少。本研究从鳜中鉴定得到两个 *pgc1* 亚型(*pgc1α*、*pgc1β*),该 *pgc1α* 和 *pgc1β* 基因亚型均有 *pgc1* 典型结构域,如 LXXLL 基序和 RRM 结构域。LXXLL 基序是 *pgc1* 与细胞核受体转录因子相互作用的关键位点^[22-23],在 *pgc1* 与激素核受体配体结合域的疏水端相互作用中起着至关重要的作用^[24],RRM 结构域在调控基

ACTGTCCTT TAAGGTCAGT GTTGTCAAGC AGGCTTTGA AAGACATGCA GAGCTCTGTT ATGGCCATCA CCTGCCTCAG -1921
MYBL1
ACAGTTAACCA TTTTCTGC ACACACACAC ACACACACAC ATAAACTAC AGAGCAGAAA AGCCCTGTGC TGCAATGCAG -1841
RREB1
TGATAACATT ACAATCACTG GTGTTAGTGT GTGTGTCCTA ATGCTGGATT TTCTCCTCGG GTCTATATCA GCTGCTTGTG -1761
GGAATAACTA AATGTGAAA CTCTTAATC AATAACAGCA CAGAGTAAAAATGTA ATAAAATCTG ACATAGCACT -1681
CDX2
AAAAGTTAG ATTGCATCAT ATAATAATT TGGTGCATGA TGTGATATTA TGACATGGT ATTCTGGAG TCATTTTTAA -1601
CEBPB
TAATATTGTA ATAATTTCAC ATTGAATAAA ATACCAAAC AAAGTAAAGT CACATTCAA AATAAGTGTG TTCTCCTGAT -1521
CCATTATCTG TTATGATGTT GACACAAAGC TGACTGCCG CTCATTCACT GTAATCTGG GATCACATTC ATCCCTAATG -1441
TGTGTCCTT CTTACAAACT GCATGACTCA CTCATATGAA ACTGATCAA CACAGTTATT GATTTTTTT AATAGCCAA -1361
NFE2
AACATTTTA CAAATATAAT TCTAAATGTT TTTCATCACA CATCCCCAA GAGGCAGCAA CAAACGACAA CATGTTGCAA -1281
CTGCTGCAAC GGCTAGCACA TACAGTAGT TTGTAGCAA TTATGTTGA TTTCATGTC AATGCACTTC ACGTTTATCT -1201
GCCCATGGGT TTTTTTCTC AGCTGCCTGG GAGGACAGTC CTTTATTGCC ATAAAATAT AAAAGTGGAA ACGTTTATGT -1121
GGCTGTTACT GTCCGGCCTT TGACACAAAC AGAAAACACC AAAAATGAA TAAATAATA AATAAACTGC ATCAGTGTG -1041
CGATTGAAAT AGAGTTACAG TGGTACAATG GCATCAGCTA ATGTAATCAA CTATGCTAGC TACATGACTG ACAGAAGTTG -961
DUXA
GTGTTGAGT TGCCCGCCTT TGACACAAAC AGAAAACACC AAAAATGAA TAAATAATA AATAAACTGC ATCAGTGTG -881
SOX10
ACAGGACTTT TCAAGCATAAC AAAGTGTGTC CTGAATGATC GGGCCCTTG TATTTGTGT TTGTGATAAT GACTGAAATT -801
ACTCAACTTC CAACTGGAGA ACCAGATTG TTTTGTC GCTTGCTTC TTGCTGTTTC TGCTTGAT GAAGGGCAA -721
AATGTTGAAT TCTTGATTTT AGGTGGTATA CATAGACTTT ATTACCACTG AAGCTGTGGT ATATTGATGT GGAGAAATTA -641
CTAACCTATA AACACAGTAA CCAAGTGGCA CCATGACTTA AAGATCTGCC AGCCTTCAGT CAGCATTGTA AAAAGAAAAG -561
MAFF
TTGTTTCTC TCAAAATGTC TTATTTCTA TGACAGGTAAC ACACATTGTG GAGACAACAA GAATATCCTA TATAAAATCG -481
ACACAATTAC TATCAGGTTC AAAACCGCAT ACTGTATTCA CATATACTTG ATGACAATCT CTAAATATC TTGAAATGT -401
CACTTTAATA TCTATCTATC TATCTATTAA ATAGACTTG TAATACTGAA TATCTTCATA TTAATTATT AAAAATTAA -321
POU4F2
AACTATAATT TCATGTAATT ATATTTGTG CTTTATTAA ATCCGTTTT GTAAATTATC TTCAATGGA AATAATTTC -241
CTTTAGTTA ATCGCAATGA AATTACATTA ATCCTCATTT TATTGTGGGA CCCCTGGAG CCACTGCATT GACCCCTGGA -161
ZBTB6
GGTTTCCCGA CCCCACTTTG GAGAACCGCA TGCTTTAAT GTCTGGGTT TGTTCTGTG TGAAACAGA TGCGCCCCCT -81
FOX3A
GCAGGCGGCC TTCCCCCACT GCTCCTCCTC TTCCCTCAT ACTCCGCTCT CTGACTCCAC GGCTCCTCAT TCACTAGAAG -1
ATGGCGGACT GCGCTCACT ATTAGATGAG GAACTCTCGT CATTGTCCTT +50

图4 鲢 *pgc1 β* 基因转录因子结合位点预测
Fig. 4 Prediction of transcription factor binding sites of *pgc1 β* gene in *Siniperca chuatsi*

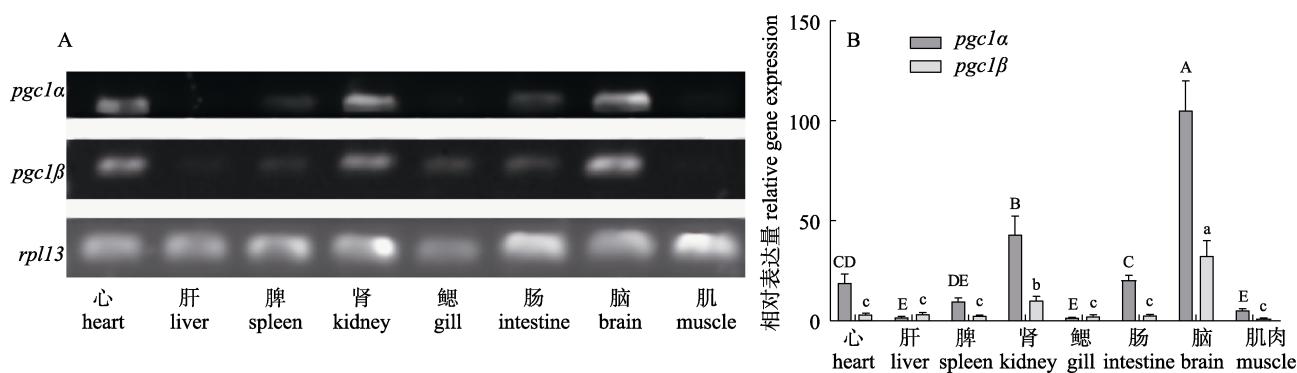


图5 鲢 *pgc1 α* 、*pgc1 β* 组织表达分析

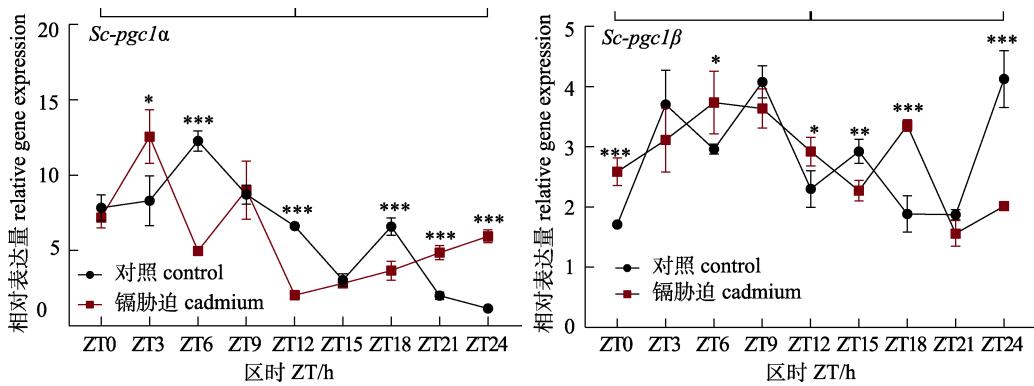
(A)基于DNA凝胶电泳半定量分析; (B) qPCR相对表达量分析; 大写字母表示 *pgc1 α* 水平差异显著($P<0.05$),

小写字母表示 *pgc1 β* 水平差异显著($P<0.05$), 不同的字母表示差异显著($P<0.05$).

Fig. 5 Relative mRNA expression of *pgc1 α* and *pgc1 β* tissue expression of *Siniperca chuatsi*

(A) Semi-quantitative analysis based on DNA gel electrophoresis; (B) qPCR relative expression analysis.

The uppercase letter indicates the *pgc1 α* significant indigenous level ($P<0.05$); the lowercase letter indicates the *pgc1 β* significant indigenous level ($P<0.05$), and different letters indicate the difference significant indigenous level ($P<0.05$).

图 6 正常投喂组、镉胁迫组鱥脑中的 *pgc1α*、*pgc1β* 基因的节律表达

白色和黑色条带分别代表昼夜两个阶段, 图中每个时间点的数值代表 *pgc1α*、*pgc1β* 基因在该区时的表达水平, 采用 $\bar{x} \pm SD$ 表示, 不同区时之间的差异由不同的*表示 (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$)。

Fig. 6 Rhythm expression of *pgc1α* and *pgc1β* genes in normal feeding group and cadmium stress group of *Siniperca chuatsi* brain. White and black bands represent two phases of day and night, respectively. The value of each time point in the figure represents the expression level of *pgc1α*、*pgc1β* gene in the region, expressed as ($\bar{x} \pm SD$), and the difference between different regions is indicated by different * (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$)。

表 2 鳥脑 *pgc1α*、*pgc1β* 基因的节律性参数Tab. 2 Rhythmic parameters of *pgc1α* and *pgc1β* genes transcription in brain of *Siniperca chuatsi*

基因 gene	分组 group	振幅 amplitude	中值 mesor	峰值相位 acrophase	峰值对应时区 ZT	噪信比 SE(A)/A	P	有无节律性 rhythmicity
<i>pgc1α</i>	对照 control	3.68	6.39	1.85	ZT7.07	0.048	<0.05	有 yes
<i>pgc1α</i>	镉胁迫 cadmium	3.35	5.69	0.98	ZT3.71	0.040	<0.05	有 yes
<i>pgc1β</i>	对照 control	0.73	2.85	2.16	ZT8.25	0.055	<0.05	有 yes
<i>pgc1β</i>	镉胁迫 cadmium	0.67	2.75	1.48	ZT5.65	0.244	<0.05	有 yes

注: 拟合的 2 个波形峰值之间一半的距离即振幅, 曲线的平均值即中值, 最高振幅所在的时间点相对应的弧度即峰值相位, 峰值相位 $\phi \times 12/\pi$ 即得峰值对应区时, 噪声/信号振幅比即 SE(A)/A 值, 当信噪比 <0.3 且 $P < 0.05$ 则认为基因表达有节律性^[21]。

Note: Half the distance between the two fitted waveform peaks is the amplitude; the average value of the curve is the median; the arc corresponding to the time point where the maximum amplitude is located is the peak phase; peak phase $\phi \times 12/\pi$ is the corresponding peak area; noise/signal amplitude ratio is SE(A)/A value^[21]. If SE(A)/A <0.3 and $P < 0.05$, gene expression is considered to be rhythmic^[21].

因自身转录中起着重要作用^[25], 表明鱥两个 *pgc1* 基因亚型可能都具有 *pgc1* 生物学功能。同源性分析表明, 鳥 *pgc1α* 和 *pgc1β* 基因亚型之间序列同源性较低, 且 *pgc1β* 在鱼类中保守性更低, 表明鱥 *pgc1β* 可能与 *pgc1α* 功能上具有一定差异性。哺乳类中的研究表明, 尽管 *pgc1α* 与 *pgc1β* 基因都参与线粒体生物合成、脂肪酸 β -氧化和抗氧化基因表达调控, 但 *pgc1α* 与 *pgc1β* 基因参与的代谢通路具有差异性, *pgc1α* 在禁食期间促进糖异生, 而 *pgc1β* 则促进脂肪酸从头合成和 VLDL 合成和转运^[26]。在金鱼中的研究也发现, 低温胁迫下 *pgc1α* 主要通过调控 PPAR α 转录活性激活脂肪酸氧化代谢, 而 *pgc1β* 则通过激活 NRF1 转录活性激活线粒体基因表达^[27]。

本研究在鱥 *pgc1α* 与 *pgc1β* 启动子上预测到 IRF1、NFE2 和 KLF9 等多个转录因子靶向位点。其中 KLF9 直接受核心生物钟基因调控, 是营养代谢昼夜节律调控的枢纽基因^[20], 表明鱥 *pgc1* 表达可能受节律因子直接调控, 而可能在营养物质的节律性调控中发挥作用。在小鼠 *pgc1* 启动子中也发现 KLF9 能够直接结合到小鼠 *pgc1α* 的启动子区, 参与小鼠 *pgc1α* 转录活性的调控^[28], 说明 KLF9 对 *pgc1* 的转录调控在鱼类和哺乳类中具有一定的保守性。IRF1 参与了 *pgc1α* 介导的心肌能量代谢重塑^[29], NFE2 则在调节细胞能量代谢、炎症反应等生理过程中发挥着重要作用^[30]。此外, 哺乳类中的研究揭示 *pgc1* 基因表达受 SREBP1 等脂代谢调控基因调控而参与脂类代谢稳态调控^[8]。

然而本研究在鱥 *pgc1α* 与 *pgc1β* 基因启动子上均未发现脂代谢相关转录因子结合位点, 表明鱼类 *pgc1α* 和 *pgc1β* 在脂代谢调控中可能与哺乳类具有一定差异性。

组织表达分析表明, 鱥 *pgc1α* 和 *pgc1β* 基因表达具有显著的组织特异性, 且均在脑、心脏和肾脏中表达量较高, 而在肌肉和肝脏等组织中表达较低。*pgc1* 在能量代谢调控中具有重要作用, 哺乳类中的研究发现 *pgc1* 主要在高能量需求的组织中表达, 如心脏、肌肉、脑、肾脏和棕色脂肪组织等^[31]。本研究发现鱼类 *pgc1* 组织分布与哺乳类具有部分一致性, 但与哺乳类不同, *pgc1α* 和 *pgc1β* 基因均在鱥肌肉组织中低表达, 这可能与鱼类骨骼肌与哺乳类骨骼肌的组成差异性有关。哺乳类动物骨骼肌肌纤维呈嵌合式分布, 富含线粒体的氧化型肌纤维和线粒体较少的酵解型肌纤维散漫分布, 肌肉组织 *pgc1* 的表达包括了两种类型肌纤维的基因表达。鱼类骨骼肌以酵解型的白肌纤维为主, 其线粒体含量较少^[32]。鱥肌肉组织中 *pgc1* 表达量低也说明 *pgc1* 在肌肉中的表达可能存在氧化代谢旺盛的红肌, 而在白肌中表达量较低。

昼夜节律是普遍存在的一种生命现象, 以 24 h 为周期调控生物体新陈代谢、生理机能和行为等过程, 在维持生物体的生理功能、调节机体应对内外环境的适应性中发挥重要作用^[33]。生物体能量代谢具有显著的昼夜节律变化特征, 其昼夜节律性调控与机体代谢稳态密切相关^[34]。与哺乳类一样, 鱼类活动具有稳定的昼夜节律性。我们已在鱥中克隆到了全部的核心生物钟基因(*clocks*、*bmal1*、*pers*、*crys*、*rors*、*rev-erbs* 等), 证实了鱥和哺乳类具有同样的由核心生物钟调控的昼夜节律性机制^[35]。研究表明 *pgc1α* 通过与核心生物钟基因作用, 在能量代谢昼夜节律性调控中起着关键作用^[36]。本研究发现鱥脑组织中 *pgc1α* 和 *pgc1β* 基因呈现显著的昼夜节律性表达, 且都呈昼高夜低型表达趋势, 基因表达峰值分别出现在 ZT7.07 和 ZT8.25。位于脑组织中的松果体是鱼类核心生物组织, 控制着鱼类的生物节律^[37], 本研究首次证实 *pgc1α* 和 *pgc1β* 基因在鱼类脑组织存在昼夜

节律性表达。生物钟会受到环境胁迫等因素的影响而改变, 而生物节律的异常可能导致机体功能紊乱或疾病的产生^[38], 研究表明重金属镉具有很强的内分泌毒性效应, 能通过影响脑组织褪黑素分泌而导致机体生物钟紊乱^[39-40]。而脑组织也是水体重金属镉毒性的重要靶器官^[41], 但关于重金属镉对鱼类昼夜节律影响的研究还较少。本研究发现水体镉暴露对鱥脑组织 *pgc1α* 和 *pgc1β* 昼夜节律性表达具有显著影响。镉胁迫下, *pgc1α* 和 *pgc1β* 峰值相位相比对照组分别提早了 3.36 h 和 2.6 h, 且基因表达振幅均减弱, 表明水体镉暴露会导致鱥脑组织 *pgc1α*、*pgc1β* 表达昼夜节律紊乱。本研究为从昼夜节律角度研究水体重金属污染对鱼类毒性效应提供了新的视角。

参考文献:

- [1] Liu C, Lin J D. PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2011, 43(4): 248-257.
- [2] Chen S D, Lin T K, Lin J W, et al. Activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV and peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1α signaling pathway protects against neuronal injury and promotes mitochondrial biogenesis in the hippocampal CA1 subfield after tra[J]. Journal of Neuroscience Research, 2010, 88(14): 3144-3154.
- [3] Scarpulla R C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2011, 1813(7): 1269-1278.
- [4] Puigserver P, Wu Z D, Park C W, et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis[J]. Cell, 1998, 92(6): 829-839.
- [5] Lehman J J, Barger P M, Kovacs A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2000, 106(7): 847-856.
- [6] Lin J D, Puigserver P, Donovan J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1β (PGC-1β), A novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(3): 1645-1648.
- [7] Vianna C R, Huntgeburth M, Coppari R, et al. Hypomorphic mutation of PGC-1β causes mitochondrial dysfunction and liver insulin resistance[J]. Cell Metabolism, 2006, 4(6):

- 453-464.
- [8] 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.
- [9] Shao D. Molecular mechanism of PGC-1 β -regulated mitochondrial biogenesis in myotubes and hepatic heme biosynthesis in rat hepatocytes[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2010. [邵迪. PGC-1 β 调节小鼠 C2C12 细胞线粒体发生和大鼠肝细胞血红素合成的机制研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2010.]
- [10] Cavas T, Garanko N N, Arkhipchuk V V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2005, 43(4): 569-574.
- [11] Liu W C, Li M Y. Research advance of toxicological effects and toxigenicity mechanism of cadmium[J]. *Guangdong Trace Elements Science*, 2005, 12(12): 1-5. [刘伟成, 李明云. 镉毒性毒理学研究进展[J]. 广东微量元素科学, 2005, 12(12): 1-5.]
- [12] Wang X N, Zheng X, Yan Z G, et al. Screening of native fishes for deriving aquatic life criteria[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2014, 27(4): 341-348. [王晓南, 郑欣, 闫振广, 等. 水质基准鱼类受试生物筛选[J]. 环境科学研究, 2014, 27(4): 341-348.]
- [13] Xie D M, Gong S L, Li Y W, et al. Cadmium induces histological damage and oxidative stress in the liver of zebrafish[J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2018, 35(4): 31-36, 2. [谢冬梅, 龚仕玲, 李英文, 等. 镉诱导斑马鱼肝脏的组织学损伤和氧化应激[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2018, 35(4): 31-36, 2.]
- [14] Liu J, Qu W, Kadiiska M B. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, 238(3): 209-214.
- [15] Lu Z. Mitochondrial toxicity and mechanism of cadmium and arsenic on juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*[D]. Yantai: Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, 2020. [路珍. 镉和砷对褐牙鲆幼鱼线粒体的毒性效应及其作用机制[D]. 阳台: 中国科学院大学(中国科学院烟台海岸带研究所), 2020.]
- [16] Liu Z Y, Zhou Z C, Lü W Q. Effects of light cycle on the circadian rhythm of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(2): 180-189. [刘曾宇, 周志成, 吕为群. 光照周期对尼罗罗非鱼幼鱼昼夜节律调节的作用[J]. 上海海洋大学学报, 2019, 28(2): 180-189.]
- [17] Ben-Shlomo R, Kyriacou C P. Circadian rhythm entrainment in flies and mammals[J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2002, 37(2): 141-156.
- [18] Xiao B, Chen T M, Zhong Y B. Possible molecular mechanism underlying cadmium-induced circadian rhythms disruption in zebrafish[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 481(3-4): 201-205.
- [19] 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.
- [20] Knoedler J R. Identification of Genomic Targets of Krüppel-like Factor 9 in Mouse Hippocampal Neurons: Evidence for a Role in Modulating Peripheral Circadian Clocks[D]. Michigan: University of Michigan, 2016.
- [21] Liu J J, Chu W Y, Zhu X, et al. Embryonic development characteristics and rhythmic expression analysis of ROR α gene under starvation in *Siniperca chuatsi*[J]. *Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2021, 39(5): 190-197. [刘晶洁, 褚武英, 朱鑫, 等. 鲢 ROR α 基因的胚胎发育特征及饥饿对其节律性表达影响分析[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2021, 39(5): 190-197.]
- [22] Li Y, Kovach A, Suino-Powell K, et al. Structural and biochemical basis for the binding selectivity of peroxisome proliferator-activated receptor γ to PGC-1 α [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(27): 19132-19139.
- [23] 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.
- [24] Villena J A. New insights into PGC-1 coactivators: Redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond[J]. *The FEBS Journal*, 2015, 282(4): 647-672.
- [25] Xu C, Liu W B, Xie D Z, et al. Molecular characterization of PGC1 β from *Megalobrama amblycephala* and responsiveness to dietary carbohydrate levels and glucose and insulin loadings[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(8): 959-967. [徐超, 刘文斌, 谢帝芝, 等. 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[J]. 中国水产科学, 2021, 28(8): 959-967.]
- [26] Piccinini E, Villani G, Moschetta A. Metabolic aspects in NAFLD, NASH and hepatocellular carcinoma: The role of PGC1 coactivators[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2019, 16(3): 160-174.
- [27] 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(Pt 9): 1448-1455.

- [28] Zhang L. KLF9 is a key mediator of heart mitochondrial function[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2018.
[张磊. KLF9 调节心脏线粒体代谢功能的分子机制研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.]
- [29] Huang Y H, Wang S B, Zhou J, et al. IRF1-mediated downregulation of PGC1 α contributes to cardiorenal syndrome type 4[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 4664.
- [30] Yin Y Y, Peng H, Shao J B, et al. Regulatory role of NF-E2-related factor 2 pathway in mitochondrial function[J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2019, 33(7): 542-549. [尹圆圆, 彭辉, 邵军波, 等. NF-E2 相关因子 2 通路对线粒体功能的调控作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(7): 542-549.]
- [31] Larrouy D, Vidal H, Andreelli F, et al. Cloning and mRNA tissue distribution of human PPAR γ coactivator-1[J]. *International Journal of Obesity*, 1999, 23(12): 1327-1332.
- [32] Shi J, Chu W Y, Zhang J S. Muscle growth, differentiation and gene expression regulation in fish[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(6): 1145-1152. [石军, 褚武英, 张建社. 鱼类肌肉生长分化与基因表达调控[J]. 水生生物学报, 2013, 37(6): 1145-1152.]
- [33] Kim Y H, Lazar M A. Transcriptional control of circadian rhythms and metabolism: A matter of time and space[J]. *Endocrine Reviews*, 2020, 41(5): 707-732.
- [34] Poggio-galle E, Jamshed H, Peterson C M. Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans[J]. *Metabolism*, 2018, 84: 11-27.
- [35] Wu P, Li Y L, Cheng J, et al. Daily rhythmicity of clock gene transcript levels in fast and slow muscle fibers from Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 1008.
- [36] Lin J D. Minireview: The PGC-1 coactivator networks: Chromatin-remodeling and mitochondrial energy metabolism[J]. *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md), 2009, 23(1): 2-10.
- [37] Ben-Moshe Z, Foulkes N S, Gothilf Y. Functional development of the circadian clock in the zebrafish pineal gland[J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 235781.
- [38] Koch C E, Leinweber B, Drengberg B C, et al. Interaction between circadian rhythms and stress[J]. *Neurobiology of Stress*, 2017, 6: 57-67.
- [39] Lafuente A. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis is target of cadmium toxicity. An update of recent studies and potential therapeutic approaches[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 59: 395-404.
- [40] Xiao B, Chen T M, Zhong Y B. Possible molecular mechanism underlying cadmium-induced circadian rhythms disruption in zebrafish[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 481(3-4): 201-205.
- [41] Zheng J L, Yuan S S, Wu C W, et al. Acute exposure to waterborne cadmium induced oxidative stress and immunotoxicity in the brain, ovary and liver of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 180: 36-44.

Expression characteristics of *pgc1* and effects of cadmium exposure on its rhythmic expression in Chinese perch *Siniperca chuatsi*

PAN Yaxiong¹, TAO Jinsheng¹, ZHANG Yu^{1,2}, ZHOU Jun¹, PAN Jialin¹, TANG Zhaoyang¹, FAN Yiwei¹, HU Mingguang¹, LI Huiju¹, HUANG Xin¹, CHU Wuying¹, ZHANG Jianshe¹

1. College of Biological and Environmental Engineering, Changsha University, Changsha 410022, China;

2. College of Marine and Bioengineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 221051, China

Abstract: Cadmium (Cd) is a highly toxic heavy metal element which has a long half-life and is difficult to degrade. Even at very low concentrations, it can cause great damage to fish. Peroxisome proliferator activated receptor- γ co-activator-1 (*pgc1*) is a transcriptional co-activator that coordinately regulates the activities of PPAR γ , plays an important regulatory role in energy metabolism, mitochondrial biosynthesis, and antioxidative system in organisms. In this study, the cis-regulatory elements, sequence characteristics, evolutionary relationship, tissue expression characteristics of *pgc1 α* and *pgc1 β* gene promoter in Chinese perch, and the circadian rhythm of *pgc1 α* and *pgc1 β* genes in brain exposed to cadmium were analyzed. The results showed that NF-E2 and IRF1 binding sites existed in the promoter of *pgc1 α* and *pgc1 β* , and KLF9 binding sites existed in the promoter of *pgc1 β* . Both *pgc1 α* and *pgc1 β* genes contained a complete LXXLL motif and RRM domain. Chinese perch *pgc1 α* and *pgc1 β* shared 51.6% and 59.7% homology with zebrafish and 41.5% and 28.4% homology with human homologous genes, respectively. The expression of *pgc1 α* and *pgc1 β* genes in Chinese perch has obvious tissue specificity, and are highly expressed in the brain, kidney, and heart. Under natural conditions, the expression of *pgc1 α* and *pgc1 β* in Chinese perch brain showed a trend of being high in the day and low in the night, and the peak phase of gene expression was ZT 7.07 h and ZT 8.25 h, respectively. The diurnal variation of *pgc1 α* and *pgc1 β* gene expression in Chinese perch brain was reduced and the amplitude was decreased under heavy metal cadmium stress. The peak phase of gene expression was advanced to ZT 3.71 h and ZT 5.65 h, respectively, indicating that cadmium exposure causes a significant disturbance on the circadian rhythm of *pgc1 α* and *pgc1 β* in Chinese perch brain.

Key words: *Siniperca chuatsi*; *pgc1*; tissue expression; cadmium; circadian rhythm

Corresponding author: ZHANG Jianshe. E-mail: jzhang@ccsu.edu.cn