

DOI: 10.12264/JFSC2021-0230

黑斑原鲃肝脏与副肝代谢差异比较

张颖^{1,2}, 马波¹, 李雷¹, 尹家胜¹, 李宝海², 周建设²

1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 西藏自治区农牧科学院水产科学研究所, 西藏 拉萨 850002

摘要: 黑斑原鲃(*Glyptosternum maculatum*)是我国雅鲁藏布江中上游江段特有鱼类, 为适应雅鲁藏布江急流、低温的水域环境条件, 进化出独特的组织器官——副肝。本研究采用组织学、生物化学以及转录组学的方法开展了黑斑原鲃主肝与副肝代谢差异调控机制的研究。结果表明, 黑斑原鲃主、副肝脏在结构组成、肝细胞线粒体数量及线粒体蛋白质组成上无显著差异。转录组学结果表明, 主、副肝脏共有差异表达基因 77 个。经 GO 功能注释, 筛选出羟甲基戊二酸单酰 CoA 合成酶(*Hmgcl*)、血栓素合成酶(*Tbxas*)、钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶(*Cask*)、甲酰甘氨酸生成酶(*Sumf1*)、蛋白质酪氨酸激酶(*Jak1*)以及甘油酸激酶(*Glxk*)等差异表达基因, 这些基因富集到氨基酸代谢、脂肪代谢等过程。KEGG 通路富集结果显示, 差异表达基因富集到丁酸盐代谢通路(butanoate metabolism)、过氧化物酶体(peroxisome)、缬氨酸, 亮氨酸和异亮氨酸降解(valine, leucine and isoleucine degradation)、赖氨酸降解(lysine degradation)、色氨酸代谢(tryptophan metabolism)以及代谢途径(metabolic pathways)等信号通路。选出 4 个差异表达基因进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测, 结果显示 qRT-PCR 与转录组测序结果基本一致。综上所述, 黑斑原鲃主、副肝脏存在氨基酸、脂肪酸及能量代谢差异, 其代谢差异可能与 *Hmgcl*、*Ptk2b*、*Gba* 和 *Dnm1l* 等基因在主、副肝脏中的差异性表达有关($P < 0.05$)。本研究筛选出调节黑斑原鲃代谢差异的关键基因和信号通路, 为揭示黑斑原鲃主、副肝脏代谢差异机制奠定了理论基础。

关键词: 黑斑原鲃; 肝脏; 副肝; 代谢通路; 机制

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)03-0435-11

黑斑原鲃(*Glyptosternum maculatum*)隶属于硬骨鱼纲(Teleostei), 鲃形目(Siluriformes), 鲃科(Sisoridae), 原鲃属, 又名藏鲃, 主要分布于我国西藏的雅鲁藏布江流域及印度的印度河等, 海拔分布范围为 2800~4200 m^[1]。黑斑原鲃体表光滑无鳞, 底栖, 喜急流, 具有极高的营养价值、药用价值和经济价值^[2]。近年来, 因过度捕捞、水利工程开发、外来鱼类入侵等原因, 黑斑原鲃的种群数量日益减少, 资源衰竭严重, 已被列为濒危物种, 收录至《中国物种红色名录》^[3]。

研究证实, 18 种鲃科鱼类中, 7 种鲃科鱼类具有明显的副肝, 另外 11 种不具有副肝^[4]。且这些

鱼类的副肝具有形态特征、重量等差异以及随着分布海拔的升高逐渐增大的趋势。因此, 副肝是鲃科鱼类适应高海拔、急流环境的过程中, 随体形变化而形成的副肝叶^[5]。熊冬梅^[6]和张惠娟^[7]的研究表明, 黑斑原鲃主、副肝脏在乳酸脱氢酶(LDH)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)等代谢酶和蛋白酶、脂肪酶等消化功能方面不具有显著性差异, 但在抗氧化功能基因表达方面具有显著性差异^[6-7]。目前, 有关黑斑原鲃主副肝脏代谢差异分子机制的相关研究还尚未见报道。转录组测序技术(RNA-Seq)是通过高通量测序快速获取样本在某一状态下的转录本, 以此

收稿日期: 2021-05-28; 修订日期: 2021-09-17.

基金项目: 农业农村部西藏重点水域渔业资源与环境调查专项(xz03-2018); 博士后面上基金项目(2017M623324XB).

作者简介: 张颖(1977-), 女, 博士, 研究员, 从事鱼类生殖生理与繁育技术研究. E-mail: 940126179@qq.com

通信作者: 李宝海, 研究员. 主要研究方向为鱼类繁育与健康养殖技术. E-mail: lbh0891@163.com

来探索特异性状的控制基因和调控机制等的快速有效的方法,且在揭示鱼类生长发育、繁殖性状以及物质代谢分子调控机制等方面的应用越来越广泛^[8-9]。因此,本研究以黑斑原鲢主、副肝脏为研究对象,开展主、副肝脏显微结构比较、肝脏细胞线粒体数量差异分析以及转录组测序分析,获得主、副肝脏代谢差异的关键基因和信号通路,为揭示黑斑原鲢主、副肝脏代谢差异的分子调控机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的黑斑原鲢采自雅鲁藏布江江段,平均体长(13.32±3.41) cm,平均体重为(58.16±26.65) g。

挑取个体大、体表无伤的黑斑原鲢放置于实验室的循环水养殖缸内暂养,养殖温度为 11~12 °C。

1.2 实验方法

1.2.1 组织学观察 实验鱼用乙醚麻醉后,快速采集鱼体肝脏和副肝,体积大小约为 0.5 cm×0.8 cm,将其置于 Bouin's 液固定 24 h 后,70%乙醇洗涤脱色 12 h。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,Leica RM2016 型切片机连续切片(切向与身体长轴垂直),厚度为 5~6 μm,贴片、展片后 HE 染色,中性树胶封片。Leica DMI6000B 电光学显微镜下观察,Leica 软件测量并拍照。分别取 3 尾鱼的主肝、副肝于离心管中,-80 °C 冰箱暂存备用。

1.2.2 透射电镜观察 肝脏取材大小约 0.1 cm×0.1 cm,固定后于 4 °C 冰箱保存。标本定位后用 JEOL JMC-6000 透射电子显微镜观察并拍照。

1.2.3 肝脏线粒体蛋白的提取与组成分析 采用南京建成生物工程研究所研制的试剂盒提取肝脏线粒体蛋白。参照 Bradford 考马斯亮蓝法使用分光光度计对蛋白质进行定量检测。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测肝脏线粒体蛋白的组成。

1.2.4 肝脏 RNA 提取和转录组测序 利用 RNA easy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Germany) 试剂盒提取每个个体总 RNA,单个建池。采用 Agilent 2100 方法检测各 RNA 样品的纯度、浓度及完整性等。构建文库,应用 ABI StepOnePlus Real-Time PCR 和 Agilent 2100 分别对文库的浓度和插入片

段大小(insert size)进行检测。基于边合成边测序(sequencing by synthesis, SBS)技术,利用 Illumina Hi Seq 4000 (Illumina, America)平台进行高通量测序,测序读长为 PE150。

1.2.5 测序数据分析 测序数据去除接头及低质量数据后,利用 Trinity 软件将数据组装成转录本,进行转录注释及计算表达量。利用 DESeq 进行基因的差异表达分析,绘制差异表达基因火山图,并进行聚类分析。利用 NR、NT、GO、KOG、KEGG、SwissProt 和 InterPro 数据库对 Unigene 进行功能注释。使用 Bowtie2 将 clean reads 比对到 Unigene,然后使用 RSEM 计算各样品的基因表达水平。使用 DESeq2 方法进行差异基因检测,利用 GO 数据库对差异表达基因进行功能注释,采用 COG (cluster of orthologous groups of proteins)对差异表达基因进行分类统计,运用 KEGG 数据库进行通路分析,FDR≤0.01 的通路视为显著富集。

1.2.6 实时定量 PCR 为验证 RNA 测序结果,选取 6 个与代谢相关的基因通过荧光实时定量 PCR 确定其在肝脏和副肝(各 3 尾样本)中的表达水平。选用 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*)作内参,计算 mRNAs 的相对表达量。检测重复 3 次,每次设 3 个复孔,3 次重复测量的值变异系数小于 5%被认为有效。引物设计见表 1。

2 结果与分析

2.1 黑斑原鲢肝脏形态与组织学观察

如图 1 所示,黑斑原鲢的副肝位于其腹腔上部,肝脏由 3 部分组成,分别为主肝、副肝和连接带(图 2)。黑斑原鲢的主、副肝脏表面均覆有一薄层浆膜,结缔组织不发达,肝小叶分界不明显(图 2,图 3a~c)。肝小叶内肝细胞呈多边形,界限明显,细胞核位于中央,呈圆形或卵圆形(图 3a~b,图 3a~c)。每个肝小叶有一个中央静脉,管壁较薄,管腔不规则,肝细胞以中央静脉为中心向外呈放射状排列。肝细胞较大,细胞核明显,紧密、无规则地排列(图 3a,图 3a~d)。主、副肝脏组织中血管丰富,肝实质中可见伴行的小叶间动脉和小叶间静脉,在肝板之间分布有血窦(图 3a,3c)。其中,主肝组织中的血管分布数量较副肝更多。



图 1 黑斑原鲖副肝外观图

a. 副肝; b. 皮肤; c. 肌肉.

Fig. 1 Exo-celiac liver morphology photograph of *Glyptosternum maculatum*

a. Exo-celiac liver; b. Skin; c. Muscle.



图 2 黑斑原鲖副肝外形图

a. 主肝; b. 连接带; c. 副肝.

Fig. 2 Morphology of exo-celiac liver of *Glyptosternum maculatum*

a. Liver; b. Band; c. Exo-celiac liver.

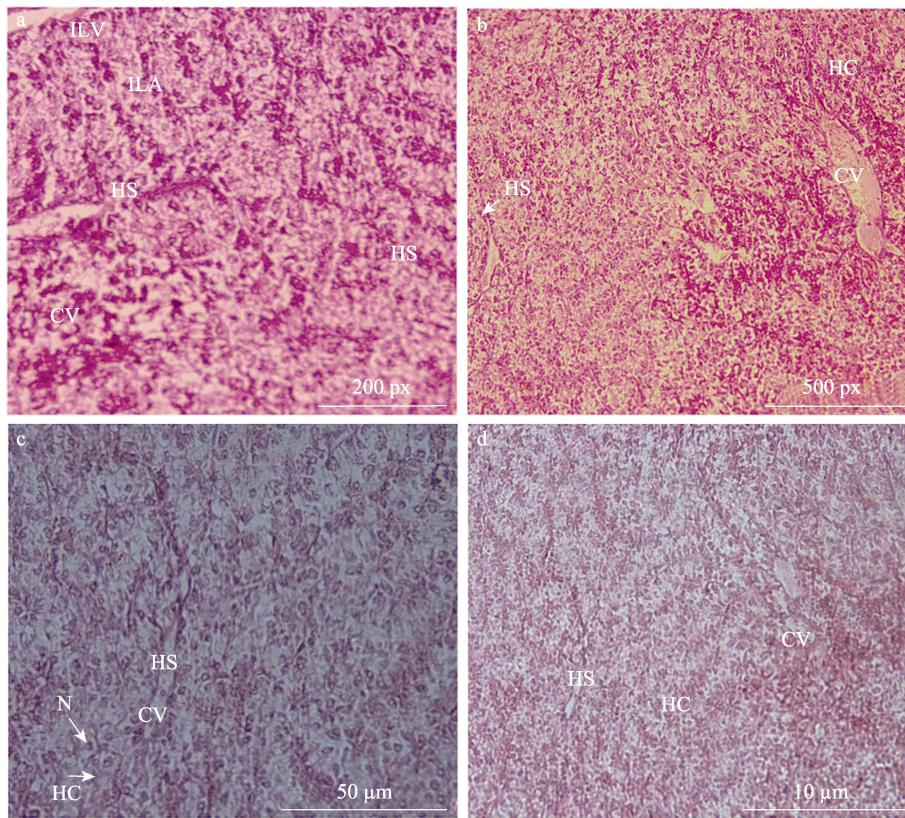


图 3 黑斑原鲖主肝与副肝组织结构

a, c. 主肝; b, d. 副肝. CV: 中央静脉; HC: 肝细胞; HS: 肝细胞索; ILV: 小叶间静脉; ILA: 小叶间动脉; N: 细胞核.

Fig. 3 Histological structure of the liver and exo-celiac liver of *Glyptosternum maculatum*

a, c. Liver; b, d. Exo-celiac liver. CV: central vein; HC: hepatocyte; HS: hepatic cords; ILV: interlobular veins; ILA: interlobular artery; N: nuclear.

超显微观察结果显示, 黑斑原鲖肝细胞形态不规则, 呈多边形, 核仁 1 或 2 个。其中, 主肝细胞中内质网和糖原均较副肝中发达, 粗面内质网呈片层状排列, 其上有大量核糖体附着(图 4a, d)。与主肝细胞相似, 副肝细胞中线粒体数量众多,

不同形状的线粒体成群分布, 呈棒状、椭圆状等, 线粒体内脊清晰可见, 有时粗面内质网分布于线粒体间(图 4d~f)。此外, 主肝和副肝的肝细胞胞质内还分布有滑面内质网、溶酶体和脂滴(图 4b~d)。主肝和副肝显微组织结构未见明显差异。

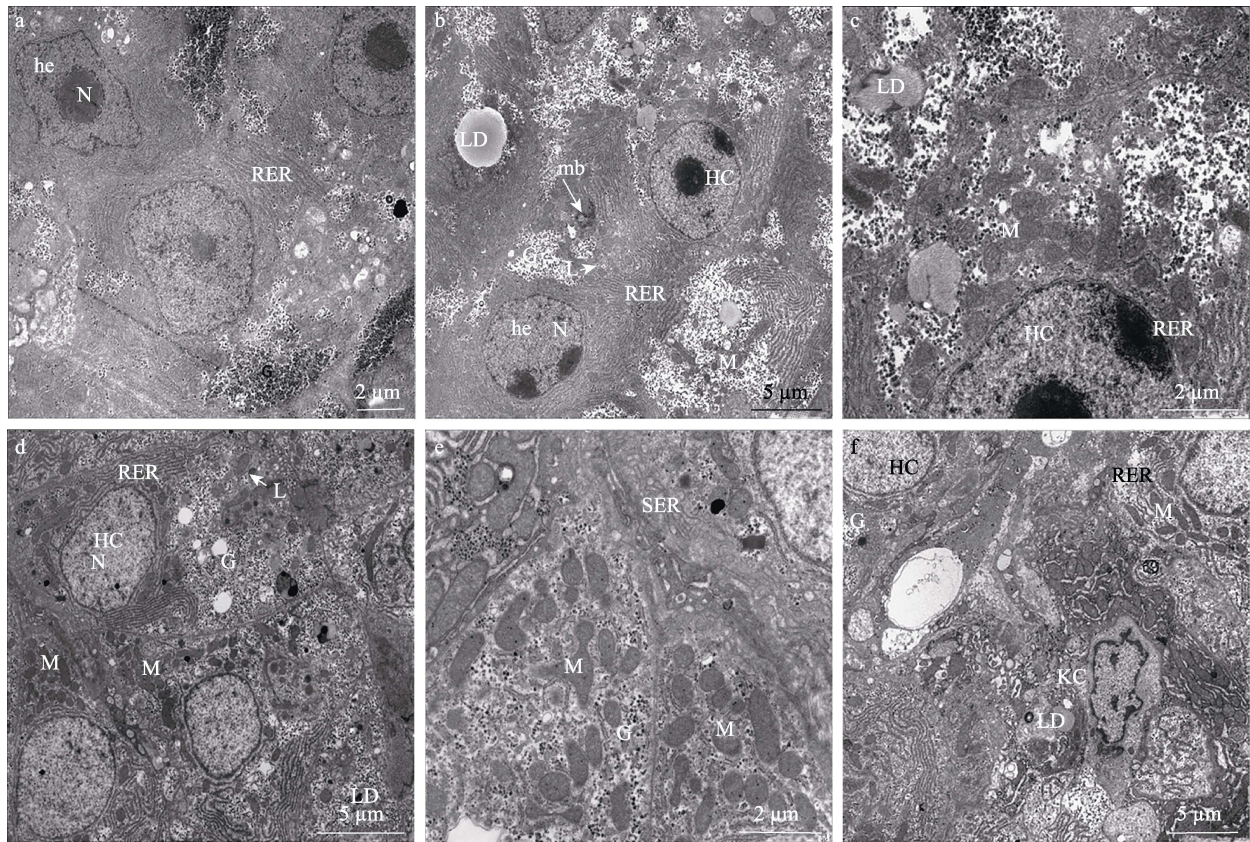


图 4 黑斑原鲃主肝与副肝超微组织结构

a-c. 主肝; d-f. 副肝. G: 糖原; HC: 肝细胞; he: 核仁; LD: 脂滴; M: 线粒体; mb: 溶酶体; N: 细胞核; RER: 粗面内质网; SER: 滑面内质网.

Fig. 4 Ultrastructure of the liver and exo-celiac liver of *Glyptosternum maculatum*

a-c. Liver; d-f. Exo-celiac liver. G: glycogen; HC: hepatocyte; he: nucleolus; LD: lipid droplet; M: mitochondria; mb: lysosomes; N: nuclear; RER: rough endoplasmic reticulum; SER: smooth endoplasmic reticulum.

2.2 黑斑原鲃肝脏线粒体形态及蛋白质组成

由图 5 可见, 黑斑原鲃主、副肝脏细胞呈圆形或多边形, 胞质内的线粒体染色为绿色, 分布于整个胞质中。由黑斑原鲃主肝与副肝肝细胞线粒体蛋白质电泳图谱可知, 主、副肝细胞线粒体的蛋白质种类较为丰富, 线粒体蛋白谱带组成上未见有明显差异, 共计有 23 条谱带。其中, 分子量大于 116 kD 的蛋白有 2 种。主、副肝细胞线粒体蛋白的其他蛋白谱带的分子量范围主要集中在 35~66.2 kD 之间(图 6)。

2.3 黑斑原鲃主、副肝脏的转录组分析

本研究共构建 12 个组织的 12 个转录组文库。从表 1 中可以看出, 本研究共获得 39.51 GB 的 Clean Data, 各样品 Clean Data 均达到 6.50 GB。另外, 各样品 GC 含量均不小于 44.85%, $\geq Q30$

(Clean Data 质量不小于 30 的碱基所占的百分比) 全在 92.18% 以上, 该结果表明测序质量可靠, 构建文库可用于后续分析。数据组装后共获得 138515 条 Unigene, 其 Unigene 长度均 ≥ 814 b。

黑斑原鲃主、副肝脏差异表达基因共有 77 个, 其中 45 个基因上调表达, 32 个基因下调表达(图 7)。差异基因表达热图(图 8)所示, 黑斑原鲃主肝与副肝组织样品间的差异基因表达模式不同, 相同样品间的低表达基因与高表达基因的表达趋势相同, 表明差异基因之间的数量差异主要为组织差异。将比对得到的 77 个显著差异基因进行功能注释, 20 个差异基因在 GO 分类中有功能意义。上述 3 个功能被区分为更具体的 26 个类别, 分别包括了 13、11 和 2 个功能亚分类。由图 9 可知, 在生物功能的组分中, 主、副肝间的差异表达基因

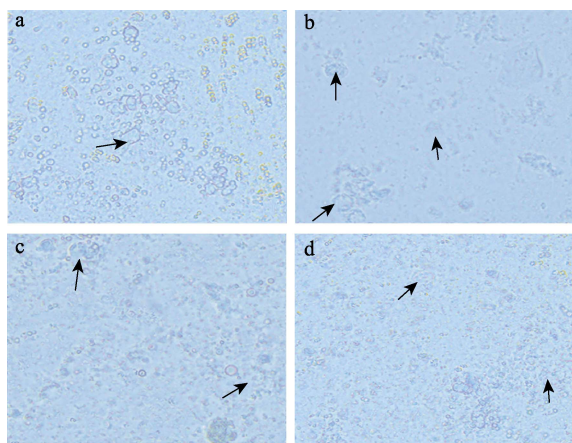


图 5 黑斑原鲢主肝和副肝细胞线粒体活体染色图
a, c. 主肝中肝细胞线粒体活体染色; b, d. 副肝中线粒体活体染色. 箭头所示为线粒体活体染色的肝细胞.
Fig. 5 Mitochondria stain of hepatocytes in liver and exo-celiac liver of *Glyptosternum maculatum*
a, c. Mitochondria stain of hepatocytes in liver; b, d. Mitochondria stain of hepatocytes in exo-celiac liver.
Arrow shows mitochondria strain of hepatocytes.

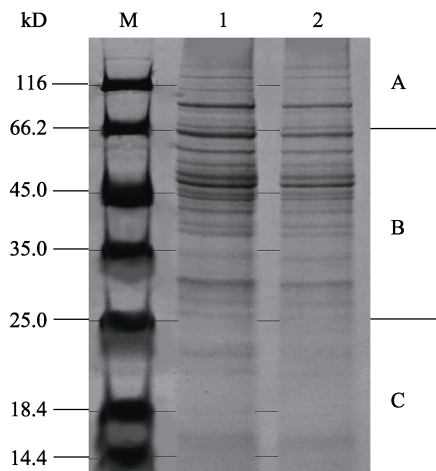


图 6 黑斑原鲢主肝和副肝脏线粒体蛋白电泳图
M: 标准蛋白质 Marker; 1. 主肝蛋白质电泳;
2. 副肝蛋肝细胞蛋白质电泳.
Fig. 6 Electrophoretogram of mitochondriaprotein in liver and exo-celiac liver of *Glyptosternum maculatum*
M: protein ladder; 1. Protein SDS-PAGE electrophoresis of liver; 2. Protein SDS-PAGE electrophoresis of exo-celiac liver.

表 1 黑斑原鲢主、副肝转录组测序信息

Tab. 1 Transcriptome sequencing of liver and exo-celiac liver in *Glyptosternum maculatum*

样品 sample name	总数据/MB total raw reads	过滤后数据/GB total clean bases	≥Q30/%	GC 含量/% GC content	比对数据 mapped reads	N50
Z1	70.63	6.55	92.71	45.29	2581655	1594
Z2	83.59	6.58	92.85	45.18	1794806	1763
Z3	82.65	6.50	92.19	45.28	2655425	1674
F1	93.22	6.59	92.73	44.85	2154646	1639
F2	88.46	6.60	92.18	45.24	1666353	1695
F3	91.12	6.69	92.80	45.01	2223181	1693

注: ≥Q30 表示 Clean Data 质量不小于 30 的碱基所占的百分比.

Note: ≥Q30 denotes the percentage of bases with Clean Data mass not less than 30.

在代谢过程(metabolic process, GO: 0004419)、细胞过程(cell process, GO: 0003857)、细胞(cell, GO: 0032968)、细胞部分(cell part, GO: 0008277)与催化活性(catalytic activity, GO: GO:0006680)中数目比例最大(图 7)。差异表达基因进行 KEGG 通路分析显示差异表达基因共富集到 68 条信号通路中。以 $P < 0.05$ 作为差异表达基因在该通路显著富集的标准, 共鉴定出 15 个通路显著富集: 包括丁酸盐代谢通路(butanoate metabolism)、过氧化物酶体(peroxisome)、缬氨酸, 亮氨酸和异亮氨酸降解(valine, leucine and isoleucine degradation)、赖氨酸降解(lysine degradation)、色氨酸代谢(tryptophan metabolism)以及代谢途径(metabolic pathways)等

信号通路。其中, 与转运和分解代谢(transport and catabolism)相关基因 7 个, 信号转导 6 个(signal transduction), 氨基酸代谢(amino acid metabolism) 10 个, 脂肪代谢(lipid metabolism) 6 个(图 10, 图 11)。筛选出 *Paaf*、*Hmgcl*、*Usp1*、*Jak1* 等基因参与脂肪代谢、氨基酸代谢以及代谢途径。

转录组分析结果显示, *Hmgcl*、*Rapgef3*、*Tbxas1*、*Cask*、*Dnm11*、*Sumf1*、*Hdac1_2* 等基因具有组织表达差异性, 仅在副肝中表达(表 2)。其中, 副肝内 *Tbxas1* 和 *Dnm11* 基因的相对表达量具有显著性差异($P < 0.05$)。而 *Jak1*、*Ptk2b*、*Glxk* 等基因仅在主肝内表达, 其中 *Ptk2b* 具有显著性表达差异($P < 0.05$)。

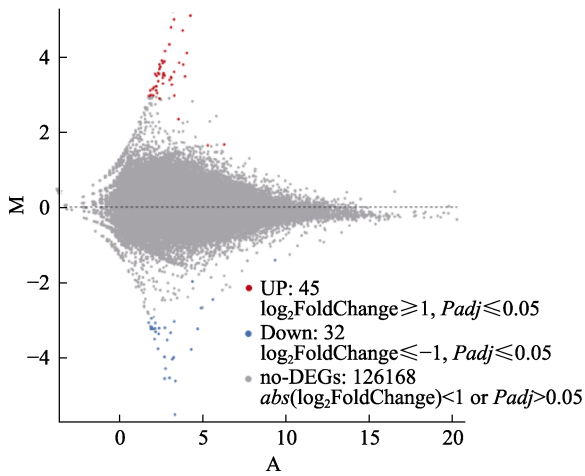


图 7 黑斑原鲢主肝与副肝差异基因图

x 轴代表主、副肝样品数量, y 轴代表差异基因表达量.

Fig. 7 DEGs number between liver and exo-cealic liver of *Glyptosternum maculatum*

The x-axis represents the sample number of liver and exo-cealic liver, y-axis represents the different gene expression.

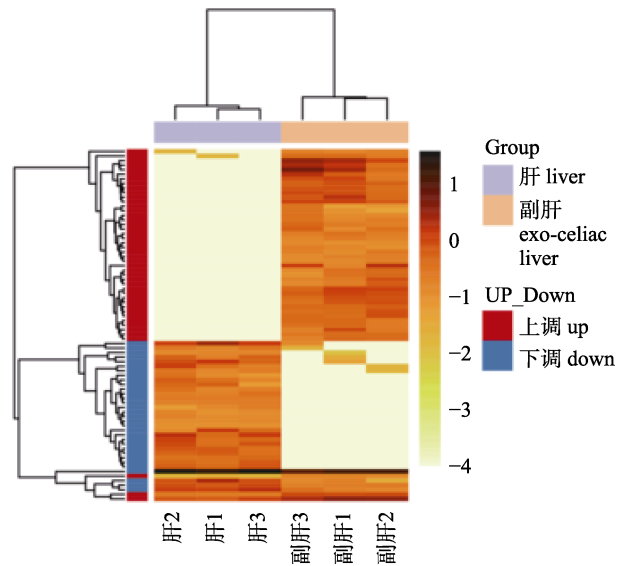


图 8 黑斑原鲢主肝与副肝差异基因表达热图

Fig. 8 DEGs phaeatmap for liver and exo-cealic liver of *Glyptosternum maculatum*

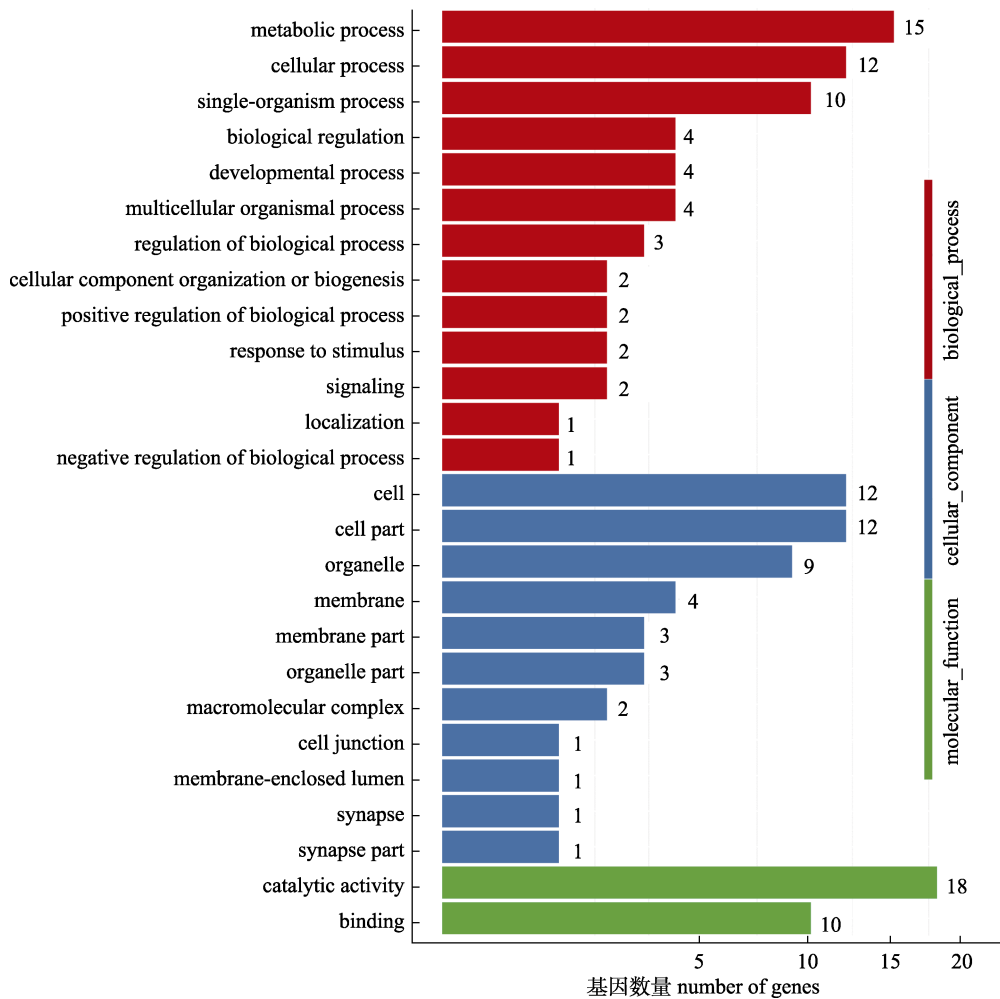


图 9 黑斑原鲢主肝与副肝间差异基因的 GO 注释

Fig. 9 Annotation categories of liver and exo-cealic liver DEGs in *Glyptosternum maculatum* mapped to GO database

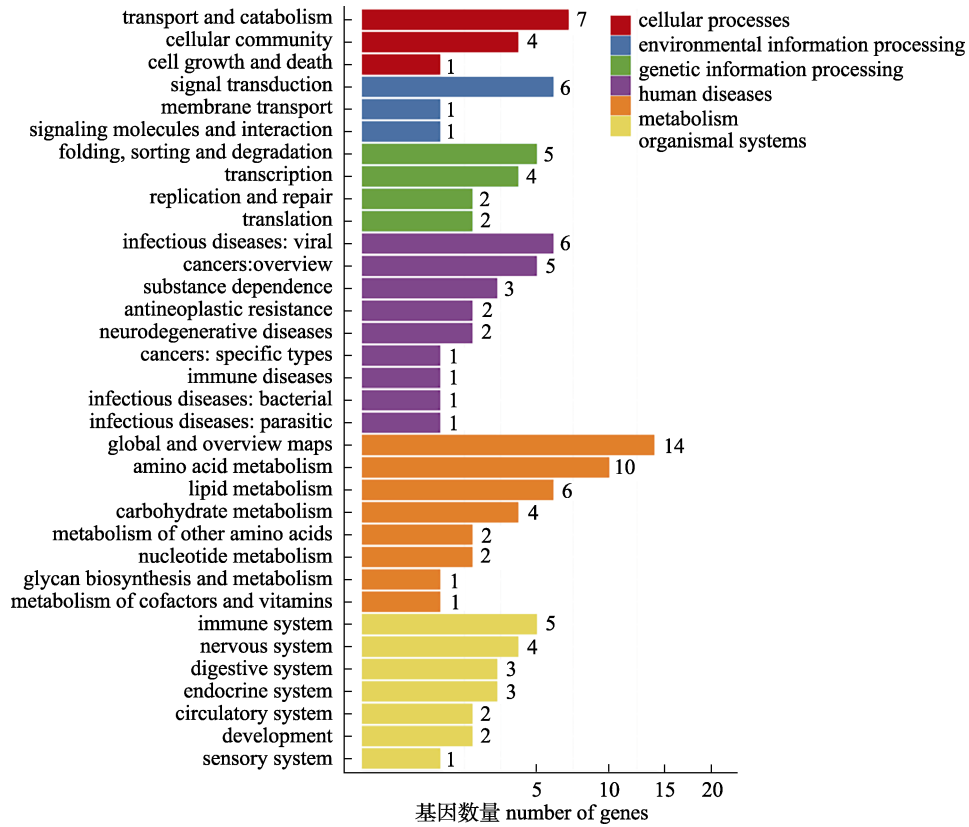


图 10 黑斑原鲮主肝与副肝差异表达基因显著富集的 KEGG 注释

Fig. 10 Annotation categories of liver and exo-celiac liver DEGs in *Glyptosternum maculatum* mapped to KEGG database

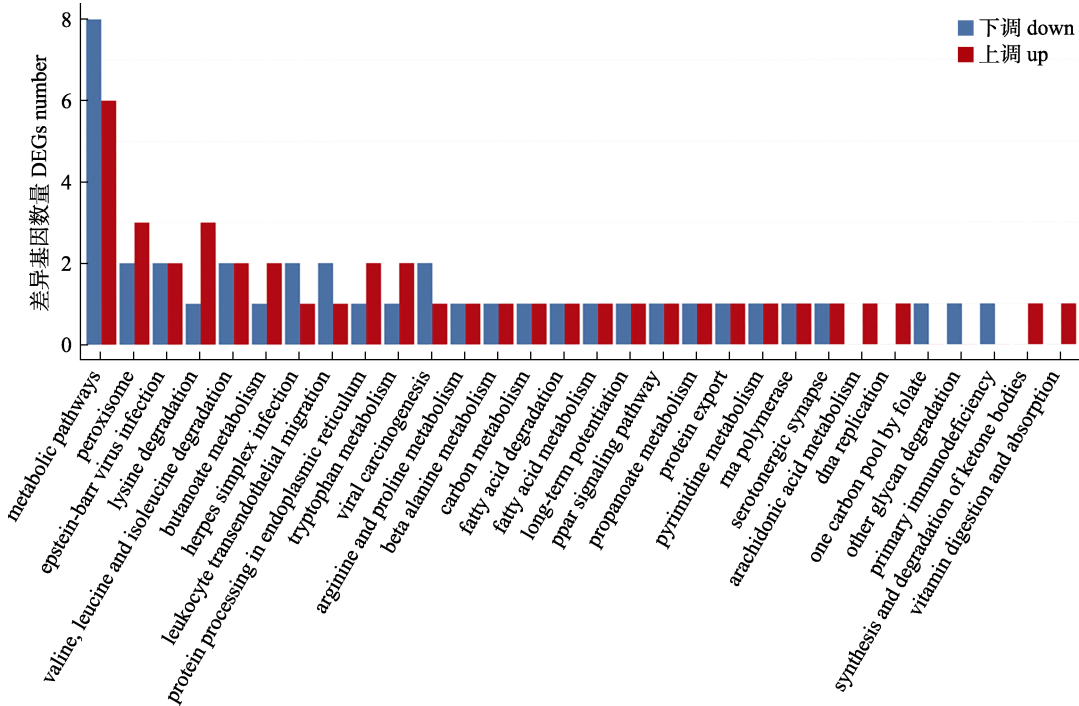


图 11 黑斑原鲮主肝与副肝差异基因的显著富集信号通路 KEGG

Fig. 11 Significantly enriched signaling pathway KEGG of DEGs between liver and exo-celiac liver in *Glyptosternum maculatum*

表 2 转录组测序分析黑斑原鲢主肝、副肝中差异表达基因(DEGs)的表达量

Tab. 2 The mRNA expression of DEGs in liver and exo-celiac liver of *Glyptosternum maculatum* by transcriptomic analysis

基因 gene	基因 ID gene ID	主肝 liver	副肝 exo-celiac liver
<i>Hmgcl</i>	CL13316.Contig1_All	0.00±0.00 ^a	1.17±0.51 ^b
<i>Rapgef3</i>	CL2171.Contig1_All	0.00±0.00	0.35±0.19
<i>Tbxas1</i>	CL9566.Contig4_All	0.00±0.00 ^a	2.45±1.25 ^b
<i>Cask</i>	CL147.Contig1_All	0.00±0.00	0.44±0.21
<i>Dnm1l</i>	CL7342.Contig2_All	0.00±0.00 ^a	0.71±0.23 ^b
<i>Sumf1</i>	CL10094.Contig7_All	0.00±0.00	3.10±2.83
<i>Hdac1_2</i>	CL6237.Contig5_All	0.00±0.00	0.69±0.29
<i>Jak1</i>	CL5657.Contig9_All	0.43±0.24	0.00±0.00
<i>Ptk2b</i>	CL4736.Contig3_All	0.24±0.06 ^a	0.00±0.00 ^b
<i>Glxk</i>	Unigene26224_All	0.65±0.16	0.00±0.00

注: 同行不同字母标注表示差异显著($P<0.05$).

Note: Different lowercase letters marked after the data in the same line indicate difference significance ($P<0.05$).

2.4 Real-time PCR 验证转录组测序数据及差异表达基因分析

对黑斑原鲢主、副肝脏 4 个差异表达基因进行实时定量 PCR 检测。如图 12 所示, 4 个基因实时定量 PCR 检测的 mRNA 表达趋势与转录组 RNA-seq 结果基本一致, 表明测序结果可靠。实时定量 PCR 检测结果表明, 与主肝相比, 副肝内 *Paaf* 基因的表达量显著高于主肝内 *Paaf* 基因的表达量($P<0.05$), 而副肝 *Gba* 基因的相对表达量则显著低于主肝内 *Gba* 基因的相对表达量($P<0.05$) (图 13)。

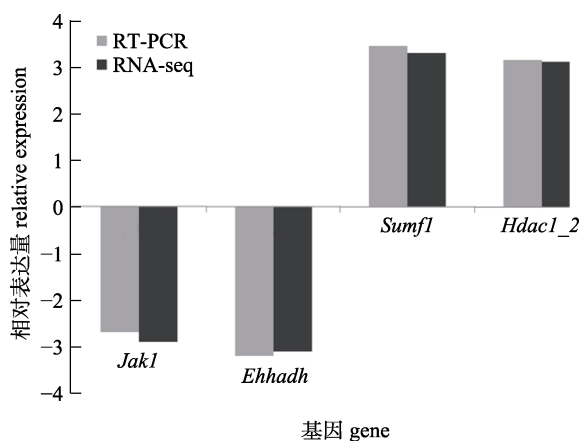


图 12 黑斑原鲢主副肝脏 4 个差异表达基因的 qRT-PCR 与 RNA-seq 表达分析

Fig. 12 Comparison of differentially expressed genes between liver and exo-celiac liver of *Glyptosternum maculatum* by qRT-PCR and RNA-seq

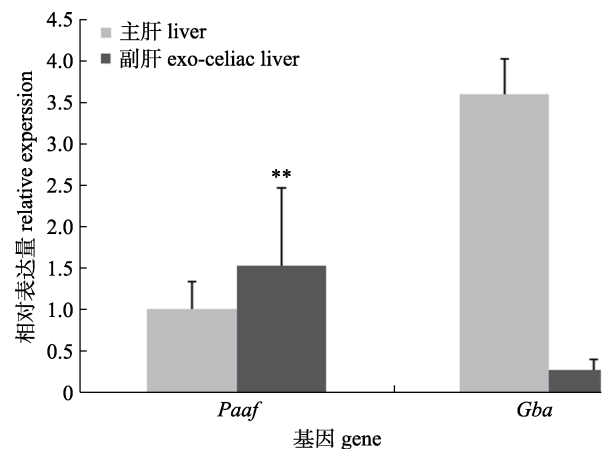


图 13 黑斑原鲢主、副肝脏差异表达基因的相对表达量
Fig. 13 Relative expression of DEGs between liver and exo-celiac liver in *Glyptosternum maculatum*

3 讨论

肝脏作为鱼体内最大的消化腺, 是其机体的消化代谢中心, 承担代谢、解毒、分泌蛋白质等多种功能^[10]。目前, 已报道的部分鲢科鱼类以及尖齿胡鲶等鲶形目鱼类中具有以连接带连结的腹腔外肝脏^[6,11]。谢从新等^[6]和曹天玲等^[11]通过比较研究将鱼类这种腹腔外肝脏定义为副肝。人体解剖学中, 将小块肝组织生长在胆囊表面或胸腔内, 不与肝脏相连者叫做副肝, 而将与肝脏连结, 且本身叶数增多者称为副肝叶^[11-12]。与谢从新等^[6]的研究结果一致, 本研究中黑斑原鲢的主、副肝脏在重量与形态特征上具有显著差异, 而在显微

结构和超显微结构上均无明显差异。此外, 其主、副肝脏细胞中线粒体数量及线粒体蛋白质组成也无显著差异。

目前, 转录组测序技术广泛地应用于鱼类组织的差异分析, 在鲤(*Cyprinus carpio*)肌肉、虾虎鱼(*Gobiopterus lacustris*)性腺、圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)肝脏, 以及红白锦鲤(*C. carpio*)皮肤等多种鱼类组织上都有应用^[13-16]。圆口铜鱼亲本与子代肝脏转录组特征分析表明, 丙酸盐代谢、丙酮酸代谢、原核生物固碳途径、乙醛和二羧酸代谢、脂肪酸代谢、萜类骨架生物合成是圆口铜鱼亲本与子代肝脏 KEGG 差异表达基因的核心代谢途径。本研究的转录组测序结果表明, 黑斑原鲢主、副肝脏差异基因主要富集在丁酸盐代谢通路、过氧化物酶体、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解, 赖氨酸降解, 色氨酸代谢以及代谢途径等信号通路中。其中, 涉及的主要代谢通路为脂肪代谢和氨基酸代谢通路。肝脏是脂肪代谢和脂肪酸 β -氧化的主要场所, 长链脂肪酸在肝脏细胞中的氧化不完全, 氧化的产物乙酰辅酶 A 既可以直接进入三羧酸循环进一步分解, 也可以转变成酮体以提高其在肝外组织中的利用率。肝脏中产生酮体的速度与肝组织利用酮体的速度相关^[17]。差异基因表达分析表明, 黑斑原鲢 *Hmgcl*、*Tbxas1*、*Dnm1l* 等基因仅在副肝中具有表达量, 且差异显著。而 *Jak1*、*Ptk2b*、*Glxk* 等基因仅在主肝内表达, 表明黑斑原鲢主、副肝脏在酮体能量代谢、线粒体功能维持等方面具有明显差异。*Hmgcl* 作为肝脏酮体生成途径关键限速酶基因之一, 在机体能量代谢、维持机体内稳态、调控生理和病理代谢等方面具有重要的作用^[18]。本研究中, 副肝中 3 种酮体生成相关酶基因 *Hmgcl*、*Acaa2*、*Bdh1* 显著高于主肝($P < 0.05$), 而 2 种酮体分解途径相关酶基因 *Acaa2*、*Bdh1* 则无显著性差异, 表明黑斑原鲢副肝的酮体生成能力高于主肝, 而酮体的分解能力与主肝无显著性差异^[19]。

研究证实, *Gba* 基因编码葡萄糖脑苷脂酶(GCase), 是一种可溶性的糖酯类物质, 广泛存在于细胞溶酶体内, 参与糖蛋白的回收利用^[15-16]。该酶的减少或缺失会导致葡萄糖脑苷脂不能正常

分解成神经酰胺和葡萄糖, 造成葡萄糖脑苷脂在各器官中大量沉积, 从而引起组织细胞大量增殖^[20-21]。本研究中, 黑斑原鲢主肝中 *Gba* 基因显著高于副肝($P < 0.05$), 且主肝细胞中内质网和糖原数量均较副肝中发达, 表明主肝中葡萄糖的合成代谢能力高于副肝。此外, 主肝细胞内的糖原数量显著高于副肝脏细胞内的糖原数量, 其原因可能与主肝 *Gba* 基因的表达量更高有关^[15]。*Dnm1l* 编码线粒体动态相关蛋白 1 (DNMIL), 介导细胞的线粒体分裂, 参与细胞凋亡及多种疾病, 是线粒体自噬发生的必要条件^[22]。研究表明, DNMIL 通过促进细胞线粒体分裂、降低线粒体融合速率, 导致线粒体自噬过度, 引起细胞损伤和死亡^[20-23]。本研究中, *Dnm1l* 仅在副肝中表达, 表明黑斑原鲢副肝细胞的线粒体分裂动态调控较为活跃^[24-25]。

参考文献:

- [1] Ding C Z, Chen Y F, He D K, et al. Reproductive biology of *Glyptosternon maculatum* in Yarlung Tsangpo River in Tibet, China[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(4): 762-768. [丁城志, 陈毅峰, 何德奎, 等. 雅鲁藏布江黑斑原鲢繁殖生物学研究[J]. 水生生物学报, 2010, 34(4): 762-768.]
- [2] Pan Y Z, Li B H, Kelsang G, et al. Embryonic development of *Glyptosternum maculatum* in Tibet[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(6): 1205-1215. [潘瑛子, 李宝海, 格桑加措, 等. 西藏黑斑原鲢胚胎发育观察[J]. 中国水产科学, 2018, 25(6): 1205-1215.]
- [3] Wang S, Xie Y. China Species Red List[M]. Beijing: Higher Education Press, 2004. [汪松, 解焱. 中国物种红色名录[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.]
- [4] Xie C X, Ma X F, Qin J H, et al. Biodiversity and Conservation Techniques of *Protosilurus nigromaculatus* in Yarlung Zangbo River[M]. Beijing: Science Press, 2016. [谢从新, 马徐发, 覃剑辉, 等. 雅鲁藏布江黑斑原鲢的生物多样性及养护技术研究[M]. 北京: 科学出版社, 2016.]
- [5] Li H J, Xie C X, Li D P, et al. Exo-celiac liver in *Glyptosternum maculatum*[J]. Progress in Natural Science, 2008, 17(9): 1109-1113.
- [6] Xiong D M. The study of digestive physiology on *Glyptosternum maculatum* (regan)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010. [熊冬梅. 黑斑原鲢消化生理的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.]
- [7] Zhang H J. Study on liver morphogenesis of *Glyptosternum maculatum* and biological adaptation[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011. [张惠娟. 黑斑原鲢肝脏的发

- 生及相关生物学适应性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.]
- [8] Connon R E, Jeffries K M, Komoroske L M, et al. The utility of transcriptomics in fish conservation[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2018, 221(Pt 2): jeb148833.
- [9] Pan Y Z, Liu H P, Zhu T B. Morphological variations between two wild groups of *Glyptosternum maculatum* in Tibet[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(5): 823-833. [潘瑛子, 刘海平, 朱挺兵. 西藏黑斑原鲃两个野生群体的形态差异[J]. *中国水产科学*, 2019, 26(5): 823-833.]
- [10] Wu Z P, Wang S Y, Zhang Y L. Identification of immunoprotection proteins in the liver tissue of *Larimichthys crocea*[J]. *Marine Sciences*, 2018, 42(3): 23-30. [吴志鹏, 王三英, 章跃陵. 大黄鱼肝脏免疫保护蛋白的鉴定[J]. *海洋科学*, 2018, 42(3): 23-30.]
- [11] Cao T L, Liang X C, Zou X Q, et al. Special organs of *Clarias gariepinus*: Extrahepar[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2017, 36(3): 325-327. [曹天玲, 梁旭晨, 邹小晴, 等. 尖齿胡鲶特殊器官——腹腔外肝[J]. *四川动物*, 2017, 36(3): 325-327.]
- [12] Zhang Y, Liu L F, Wang H, et al. Distribution and blood flow state of accessory hepatic veins by ultrasound[J]. *Journal of China Clinic Medical Imaging*, 2007, 18(3): 181-182, 188. [张彦, 刘兰芬, 王惠, 等. 副肝静脉分布规律及其血流状态的超声表现[J]. *中国临床医学影像杂志*, 2007, 18(3): 181-182, 188.]
- [13] Wang L M, Zhu W B, Fu J J, et al. De novo transcriptome analysis and comparison of the FFRC No.2 strain common carp (*Cyprinus carpio*) associated with its muscle growth[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(1): 79-87. [王兰梅, 朱文彬, 傅建军, 等. 福瑞鲤 2 号不同生长速率个体肌肉组织转录组分析[J]. *水产学报*, 2021, 45(1): 79-87.]
- [14] Dong Z D, Li X Y, Huang C Q, et al. Comparative transcriptome analysis of the gonad of the lacustrine goby (*Gobiopterus lacustris*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(3): 365-380. [董忠典, 黎学友, 黄承勤, 等. 湖栖鳉虾虎鱼性腺转录组比较分析[J]. *水产学报*, 2021, 45(3): 365-380.]
- [15] Li X M, Wu X B, Gong J L, et al. Comparative analysis of liver transcriptome of parent and offspring *Coreius guichenoti*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(4): 774-780. [李学梅, 吴兴兵, 龚进铃, 等. 圆口铜鱼亲本与子代肝脏转录组特征及对比分析[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(4): 774-780.]
- [16] Shi D J, Hu J Y, Wang S S, et al. Transcriptome analysis of skin of red and white koi carp *Cyprinus carpio* haematopterus[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(4): 475-481. [史东杰, 胡金有, 王赛赛, 等. 红白锦鲤皮肤转录组测序分析[J]. *大连海洋大学学报*, 2019, 34(4): 475-481.]
- [17] Li J P, Qin G X, Zhao Z H, et al. Differentially analysis of liver transcriptomes of finishing pigs fed different dietary fats sources[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(7): 2128-2139. [李建平, 秦贵信, 赵志辉, 等. 不同脂肪源饲粮育成猪肝脏转录组差异分析[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(7): 2128-2139.]
- [18] Luo W Q. Inactivation of HMGCL promotes proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma by suppressing oxidative stress[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2017. [罗文奇. 羟甲基戊二酰辅酶A裂解酶通过激活 ROS 抑制鼻咽癌增殖和转移的研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.]
- [19] Li Y F. Effects of two parasitic infection on ketone body metabolism in mice[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2018. [李一帆. 两种寄生性原虫感染对小鼠酮体代谢的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.]
- [20] Greuel A, Trezzi J, Glaab E, et al. GBA Variants in Parkinson's Disease: Clinical, Metabolomic, and Multimodal Neuroimaging Phenotypes[J]. *Movement Disorders*, 2020, 35(12): 2201-2210.
- [21] Sun Z. The mechanism research of inhibiting Glucocerebrosidase leads to Parkinson's disease in Mice via Decreasing Cathepsin D[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2018. [孙政. 抑制葡萄糖脑苷脂酶降低组织蛋白酶 D 引起小鼠帕金森病的机制研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2018.]
- [22] Hill B, Harwig M C, Manlandro C M, et al. FIS₁ and DNM1L cooperate in mitochondrial fission: Convergence of evolution and intelligent design[J]. *Biophysical Journal*, 2015, 108(2): 374.
- [23] Pi H F. Dynamin 1-like-dependent mitochondrial fission initiates overactive mitophagy in the hepatotoxicity of cadmium [D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2015. [皮会丰. DNM1L 蛋白介导的线粒体自噬在镉致肝脏毒性中的作用研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2015.]
- [24] Wang X Y, Chen Z F, Fan X M. et al. Inhibition of DNM1L and mitochondrial fission attenuates inflammatory response in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis[J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2020, 24(2): 1516-1528. [王晓燕, 陈珠峰, 范雪梅, 等. 抑制 DNM1L 和线粒体分裂可减弱类风湿关节炎成纤维细胞样滑膜细胞的炎症反应[J]. *细胞与分子杂志*, 2020, 24(2): 1516-1528.]
- [25] Guo B Y. The analysis of genetic diversity and the development of microsatellite markers on *glyptosternum maculatum* (regan) in the Yarlung zangbo river, China[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009. [郭宝英. 黑斑原鲃遗传多样性分析及微卫星标记的开发[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.]

Study on metabolic regulation mechanism of liver and exo-celiac liver in *Glyptosternum maculatum*

ZHANG Ying^{1,2}, MA Bo¹, LI Lei¹, YIN Jiasheng¹, LI Baohai², ZHOU Jianshe²

1. Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. Institute of Fishery Sciences, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850002, China

Abstract: The mechanisms of high-altitude adaption in *Glyptosternum maculatum*, an endemic fish from the Tibet Plateau, further provides a foundation for investigation. In this paper, the mechanism of metabolic differences between the liver and exo-celiac liver of *G. maculatum* was studied by histological and biochemical methods and Transcriptomics. The results showed that there were no significant differences in the structure, the number of mitochondria, and the protein composition of mitochondria between the liver and exo-celiac liver. A total of 138,515 unigenes with an average length of 814 bp were obtained from the two tissues. Compared with the liver, 45 upregulated genes and 32 down-regulated genes were detected in the exo-celiac liver. Through GO analysis, DEGs such as *Hmgcl*, *Tbxas1*, *Cask*, *Sumf1*, *Jak1*, and *Glxk*, which are involved in amino acid and fatty acid metabolism, were screened out. KEGG analysis showed different expression genes enriched in butanoate and tryptophan metabolism, peroxisome, valine, leucine, lysine, and isoleucine degradation, and other metabolic pathways. Four differential expression genes were selected for qRT-PCR detection. It was found that the results of qRT-PCR were consistent with the sequencing results of the transcription group. In conclusion, there are differences between amino acid, fatty acid, and energy metabolism between the liver and exo-celiac liver of *G. maculatum*. The mechanisms may be related to the significant differential expression of *Hmgcl*, *Ptk2b*, *Gba*, and *Dnm1l* genes in the liver and exo-celiac liver. In this study, we screened the key genes and signaling pathways that regulate liver metabolism mechanisms in *G. maculatum*, which laid a theoretical foundation for revealing the different metabolic mechanisms between the liver and exo-celiac liver of *G. maculatum*.

Key words: *Glyptosternum maculatum*; liver; exo-celiac liver; metabolic pathway; mechanism

Corresponding author: LI Baohai. E-mail: lbh0891@163.com