

doi: 10.7541/2022.2020.288

鳊*plin2*生物信息学分析、组织表达及其在肝脏脂肪蓄积中的作用

高俊杰^{1,2} 梁旭方^{1,2} 蔡文静^{1,2} 庄武元^{1,2}

(1. 华中农业大学水产学院, 华中农业大学鳊鱼研究中心, 武汉 430070; 2. 农业农村部淡水生物繁育重点实验室/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 为探究鱼类脂滴包被蛋白*plin2*(Perilipin 2)基因的结构和功能, 研究成功地克隆并鉴定出鳊(*Siniperca chuatsi*)*plin2*的2个亚型, 分别命名为*plin2a*和*plin2b*。氨基酸多重比对发现其编码序列与刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)具有高度的同源性。结构域分析发现鳊*plin2a*和*plin2b*具有与哺乳动物相似的N末端PAT结构域和11-mer重复结构域。基因共线性分析发现*plin2*两个亚型在鳊和刺鱼中高度保守。系统发育分析表明鳊*plin2*和刺鱼、攀鲈(*Anabas testudineus*)和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)近源。RT-qPCR检测了*plin2a*与*plin2b*基因在鳊不同组织中的表达分布情况, 结果表明鳊*plin2a*在肝脏中表达最高, 其次是脂肪和脾脏组织; 相反, *plin2b*基因在鳊的肝脏中几乎不表达, 主要在肾脏、胃、脂肪和脑组织表达。此外, 还探究了鳊肝脏和肝细胞在脂肪蓄积状态下*plin2a*基因的转录水平变化。实验结果表明在过量添加碳水化合物饲喂(8周)后, 鳊肝脏中*plin2a*基因mRNA水平明显升高, 鳊肝脏细胞在0.1 mmol/L 棕榈酸钠刺激后显著增加了*plin2a*的mRNA水平。研究表明, 鳊*plin2*两个亚型可能出现功能分化, 并且*plin2a*作为肝脏脂代谢中的重要调节因子, 可能在鳊肝脏脂肪蓄积中发挥更重要的功能。

关键词: *plin2*; 脂类代谢; 生物信息学; 组织表达; 肝脏; 鳊

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2022)03-0273-09



细胞内脂滴(Lipid droplet, LD)在维持细胞能量稳态、新陈代谢和信号传导中起着不同的作用^[1,2]。最近研究揭示了脂滴包被蛋白(Perilipin, PLIN)在LD的发生和调节LD上的蛋白质运输中的重要性^[3,4]。PLINs是最丰富的脂滴包被蛋白, 在中性脂质代谢中起着核心作用^[5]。哺乳动物的PLIN蛋白质N端具有一个保守的PAT结构域, 最近一些研究表明, PLIN家族蛋白参与了中性脂质储存和利用的调控^[6,7]。在哺乳动物中, 具有组织特异性的脂滴包被蛋白已经进化并赋予其不同的功能^[8,9]。然而, 大多数关于PLIN蛋白功能的研究都是在哺乳动物系统中进行的, 主要集中在中性脂质代谢上, 而对非哺乳动物脊椎动物的研究相对较少。

在PLIN家族的5个成员中, *plin2*是一个在大多数组织中普遍表达的50 kD的蛋白质, 在脂滴的形成和稳定, 长链脂肪酸的吸收和脂质积累中起着关

键作用^[10-12]。*Plin2*水平受细胞内脂滴和三酰甘油含量的正调节^[12]。随着脂肪组织中的脂肪细胞成熟, *plin2*逐渐被*plin1*取代, 但在其他组织中*plin2*仍然作为主要脂滴相关蛋白发挥作用^[7]。此外, 一些证据表明*plin2*在脂肪肝的诱发中起着重要作用^[13,14]。研究发现*plin2*基因缺失可防止肥胖和胰岛素抵抗, 并显著降低肝脏甘油三酯和胆固醇水平^[15]。因此, *plin2*蛋白被认为是治疗哺乳动物脂肪肝形成的潜在靶点。

脂肪肝是目前养殖鱼类普遍存在的一种生理病理现象。鳊(*Siniperca chuatsi*)是主要原产湖北的我国传统名贵肉食性鱼, 肉质丰腴细嫩, 营养价值高, 是我国淡水养殖的理想选择^[16]。但是鳊等肉食性鱼类对糖类利用能力较差, 饲料中碳水化合物过多会使其营养成分不平衡和能量摄入过多, 最终导致脂肪肝形成及生长速度下降^[17]。对

收稿日期: 2021-01-04; 修订日期: 2021-05-28

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0900400); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-46)资助 [Supported by the National Key R & D Program of China (2018YFD0900400); China Agriculture Research System (CARS-46)]

作者简介: 高俊杰(1995—), 男, 硕士研究生; 主要从事鱼类营养与饲料研究。E-mail: junjie_gaohzau@hotmail.com

通信作者: 梁旭方(1965—), 男, 教授; 主要从事鱼类营养和摄食调控及饲料利用遗传改良研究。E-mail: xufang_liang@hotmail.com

于鱼类*plin2*的功能及*plin2*是否可以作为水产养殖中预防脂肪肝的潜在靶点,目前还没有系统的研究。本研究对鳊*plin2*基因进行了相关生物学分析和表达特征进行了研究。此外,我们还探究了在鳊肝脏脂肪蓄积状态下*plin2*基因表达情况。本研究将有助于进一步了解*plin2*在鱼类肝脏中发挥的作用,并为解决水产养殖业中的脂肪肝问题提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼及饲养条件

实验用鱼来自湖北武汉华中农业大学鳊研究中心。120尾鳊(80±5) g随机分为2组,每组设置3个平行,每缸(350 L)20尾并暂养于华中农业大学循环水系统2周,水温维持在(23.0±0.5)°C, pH 7.1—7.5,溶氧为7.5—7.8 mg/L,光照周期为自然光照周期。所有的鱼在驯化后投喂人工饲料。分别投喂含不同碳水化合物饲料,对照组和实验组分别含0淀粉和20%淀粉,饲料配方在本实验室先前研究中已描述^[18],所有饲料成分均购自武汉高龙饲料有限公司。在为期8周养殖期间每天早上9:00和下午17:30喂食2次。饲养试验结束饥饿6h后每缸随机捕获6尾鱼,用MS222(50 mg/L)进行麻醉。获取肝脏组织并在液氮中冷冻后保存于-80°C进行后续实验。

1.2 不同亚型*plin2*基因序列分析

根据已公开的鳊基因组数据库(<http://genomes.igb-berlin.de/cgi-bin/hgGateway?db=sinChu7>)获得*plin2a*和*plin2b*序列,通过Editseq^[19]和Clustal W2^[20]软件将鳊CDS(Coding sequence)序列转为氨基酸序列并将鳊和刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)其他物种的*plin2*基因进行氨基酸多重序列比对(表1)。通过对哺乳动物*plin2*氨基酸序列比对鳊PAT结构域和11-mer重复结构域进行鉴定,通过Expert Protein Analysis System (<https://web.expasy.org/protscale/>)预测鳊*plin2*的亲水性。通过GenBank和ENSEMBL数据库调取了人、斑马鱼和刺鱼等3个物

表1 不同物种*plin2*氨基酸序列信息

Tab. 1 Amino acid sequence information of *plin2* in different species

物种 Species	中文名 Chinese name	序列来源 EMBL/GenBank database
Human (<i>Homo sapiens</i>)	人	ENST00000276914
Mouse (<i>Mus musculus</i>)	小鼠	NP_031434.3
Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	斑马鱼	ENSDART00000175378.2
Stickleback (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	刺鱼	ENSGACP00000025962 ENSGACP00000023613

种的*plin2*氨基酸序列,进行鳊*plin2*基因共线性分析。

1.3 PLIN家族进化树分析

系统进化树重建使用了人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、黑猩猩(*Pan troglodytes*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、斑点雀鲷(*Lepisosteus oculatus*)、腔棘鱼(*Latimeria chalumnae*)、日本青鳉(*Oryzias latipes*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、攀鲈(*Anabas testudineus*)、亚马逊帆鱼(*Poecilia formosa*)和绿河豚(*Tetraodon nigroviridis*)等其他物种的PLIN家族氨基酸序列,且均从GenBank和ENSEMBL数据库中获得。用ClustalW2对鳊与上述物种的PLIN家族进行氨基酸序列多重比对后,通过GBLOCKS选取合适的保守区序列用于后续分析。利用ModelFinder寻找最佳的核苷酸替代模型: JTT+G4(BIC),再通过Phylo-Suite^[21]软件使用贝叶斯法重建系统进化树。贝叶斯法分析同时运行2个独立的反应,每个反应4条马尔科夫链,共运行100万次。

1.4 鳊*plin2*基因组织表达检测

从暂养于华中农业大学鳊鱼研究中心循环水系统中随机抽取6尾鳊,用MS222(50 mg/L)进行麻醉后采集鳊脾脏、脑、肝脏、脂肪、肌肉、肠道、胃、肾脏和心脏等组织样本,使用RNAiso Plus(TaKaRa)抽提鳊不同组织和肝脏细胞总RNA,通过多功能酶标仪(Bio-Tek)和1%琼脂糖凝胶电泳检测提取RNA的纯度和浓度。采用HiScript® II Reverse Transcriptase(Vazyme)反转录合成cDNA,用ChamQ SYBR qPCR Master Mix试剂盒(Vazyme)进行RT-qPCR,所用引物见表2。RT-qPCR反应体系: ChamQ SYBR qPCR Master Mix(Vazyme)10 μL,上游引物和下游引物各0.4 μL,模板cDNA 1 μL,用ddH₂O将反应体系补足到20 μL。反应程序为95°C,预变性5min,然后40个循环: 95°C变性15s, 57°C退火30s, 72°C延伸45s,溶解曲线以0.5°C/s速率从95°C降到65°C,每隔6s采集1次数据信号。

1.5 鳊肝脏细胞分离与培养

用麻醉剂MS222(50 mg/L)将鳊麻醉,剪断尾鳍放血完全后,用75%的酒精擦拭鱼体。以下操作均在无菌条件下进行,从腹腔内小心取出肝脏,并转移至含有DPBS的细胞培养皿中,清洗血块后用解剖刀将肝组织剪成1—2 mm³左右的组织块,放入AIM试剂中浸泡1h,且隔30min换一次试剂。吸走AIM并将肝组织剪碎后转入15 mL无菌离心管中,

用0.25%胰蛋白酶28℃恒温消化30min, 每5—7min用含10% FBS的M199培养基中和消化收集细胞1次。细胞悬液经100 mm细胞筛网过滤, 以去除组织碎片, 1000 r/min, 5min收集细胞于15 mL无菌离心管, 并用红细胞裂解液和DPBS清洗2遍以去除血液红细胞。随后1000 r/min, 5min用M199基础培养基漂洗1次, 最后将收集的鳊肝细胞重悬于M199完全培养基中。将细胞接种于细胞培养板, 接种密度约为 2×10^6 个细胞/mL, 根据本实验室先前研究结果, 选用0.1 mmol/L浓度的棕榈酸钠处理肝细胞构建高脂模型^[22], 并将处理好的细胞放于28℃含5% CO₂细胞培养箱中进行培养48h, 在倒置相差显微镜下观察鳊肝脏原代细胞的生长情况。之后提取鳊肝细胞总RNA, 进行RT-qPCR相关检测。

1.6 统计分析

用SPSS Statistics 19.0软件对数据进行分析。以鳊核糖体蛋白L13a (Ribosomal protein L13a, rpl13a)作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对基因表达水平^[23]。单样本 t 检验(One sample t -test)用来检测数据分布的正态性; 独立样本 t 检验(Independent sample t -test)用来分析2个样本之间的差异; 单因素方差分析(One-way ANOVA)用来检验多个样本之间的差异性; 数据均以平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SE)表示, 差异显著度为显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)。

2 结果

2.1 鳊*plin2*基因序列分析

将鳊*plin2a*和*plin2b*目的序列进行生物学信息比对分析, 其中*plin2a*基因包含一个1344 bp的ORF(Open Reading Frame), 编码447个氨基酸; *plin2b*基因包括一个1011 bp的ORF, 编码336个氨基酸。鳊*plin2*基因序列与其他物种进行氨基酸多重比对显示, 鳊*plin2a*与刺鱼*plin2a*具有高度一致性(75%), 与哺乳动物和斑马鱼中报道的*plin2*相比, 序列同源性为57%—59%。鳊*plin2b*与刺鱼*plin2b*同

源性下降到55%左右, 而与斑马鱼和哺乳动物*plin2*报道的氨基酸序列相比同源性处于相对较低水平(34%—40%)。通过分析发现鳊*plin2*具有与其他同源基因一样的结构域, 表现出一个N-末端PAT结构域和一个11-mer重复结构域。根据哺乳动物*plin2*的疏水特性, 鳊*plin2a*和*plin2b*均没有预测到有助于膜定位的疏水序列的大区域, 这表明鳊*plin2*内的区域可能在空间上聚集在一起形成疏水分子的识别表面。

2.2 *plin2*基因共线性分析

对*Plin2*基因进行共线性分析表明, 鳊*plin2a*和*plin2b*分别位于6号和9号染色体, 人类*plin2*基因位于9号染色体(图1)。人与鳊*plin2a*具有共线性的基因共有12个, 但临近基因*dennd4c*、*haus6*和*zdhc21*排列顺序不同; 人与鳊*plin2b*具有共线性的基因共有14个, 但临近基因*acer2*、*smulb*、*dnajal*和*aptx*排列顺序不同(图1)。Plin2在斑马鱼中位于15号染色体, 而刺鱼与鳊表现一致, 分化为*plin2a*和*plin2b*两个亚型, 分别位于7号和9号染色体(图2)。斑马鱼与鳊*plin2*两个亚型都表现为没有临近基因, 然而刺鱼*plin2*两个亚型与鳊的上下游基因则表现出高度的一致性(图2)。

2.3 *plin2*进化分析

使用贝叶斯法重建鳊与其他物种PLIN家族的系统进化树(图3), 聚类关系主要分为硬骨鱼*plin2*, 哺乳类*plin2*、*plin1*、*plin3*和*plin6*五个部分, 哺乳动物*plin3-plin5*分布于其中(图3a)。系统发育结果显示PLIN家族可以分为两大支, 其中分支I包括*plin1-plin5*, 分支II只包括*plin6*(图3b)。分支I又可以分为*plin5*、*plin1/plin3/plin4*及*plin2*三个分支。其中鳊*plin2a*与刺鱼、红鳍东方鲀和绿河豚在进化距离上较为接近, 鳊*plin2b*则与攀鲈最为接近。

2.4 鳊*plin2*基因表达分布

分别对鳊的脾、脑、脂肪、肌、肠、胃、肾和心等9个组织进行*plin2a*和*plin2b*基因相对表达分析(图4)。Plin2a基因在鳊的肝脏中表达最高, 其次

表2 鳊组织表达引物列表

Tab. 2 Primers used for the study

基因 Gene	引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'—3')	退火温度 T_m (°C)	片段长度 Product length (bp)	扩增系数 Correlation coefficient (R^2)	扩增效率 PCR efficiency (%)
<i>plin2a</i>	plin2a-F	TCACCACTGCTTACCCAT	57	268	0.997	102.9
	plin2a-R	TTGTCCATCCCGTCCTG				
<i>plin2b</i>	plin2b-F	GGGCAGGATACAGCAGG	57	212	0.998	96.9
	plin2b-R	CCAGTCGCACAGGGTAA				
<i>RPL13A</i>	RPL13A-F	CACCCTATGACAAGAGGAAGC	58	100	0.991	101.6
	RPL13A-R	TGTGCCAGACGCCCAAG				

是脂肪和脾脏组织, 在其他组织中相对表达较低(图 4A)。相反*plin2b*基因在鳃的肝脏中几乎不表达, 在肾脏组织中表达最高, 其次是胃、脂肪和脑组织, 在其他组织中相对表达较低(图 4B)。

2.5 高碳水化合物对 $plin2$ 基因表达影响

我们先前的研究表明, 随着饲料碳水化合物含量增加到20%, 鱼体脂质含量逐渐升高, 同时组织

学分析显示, 碳水化合物含量添加20%组肝脏组织中出现大量脂滴, 进而诱发了肝脏脂肪变性。如图 5 所示, 与对照组相比, 高糖组肝脏中的 $plin2a$ 基因转录水平极显著上调($P<0.01$)。

2.6 棕榈酸钠刺激鳃肝脏细胞对 $plin2$ 表达影响

用0.1 mmol/L棕榈酸钠构建的鳃肝脏原代细胞其细胞生长状态和形态与正常培养的鳃肝脏原代

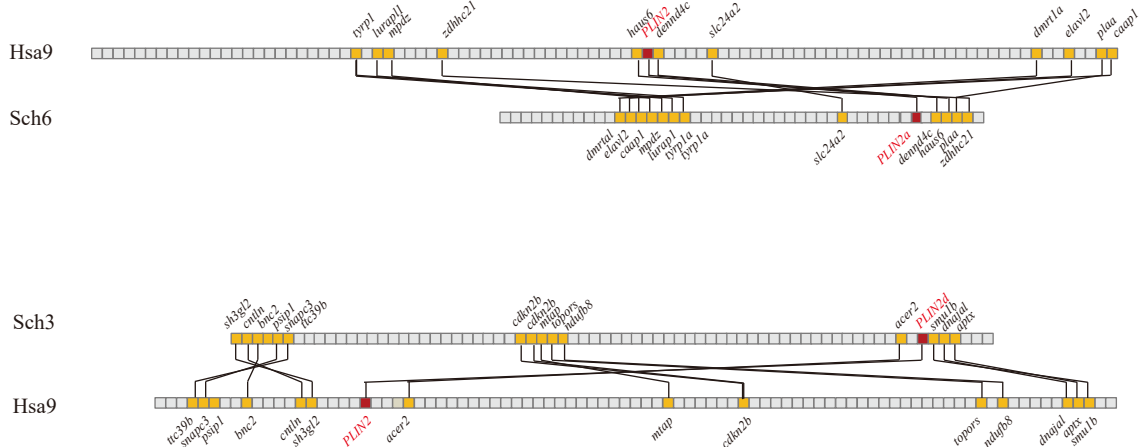


图 1 鳃和人 $plin2$ 基因共线性

Fig. 1 Syntenic analysis for *plin2* genes in *S. chuatsi* and *H. sapiens*

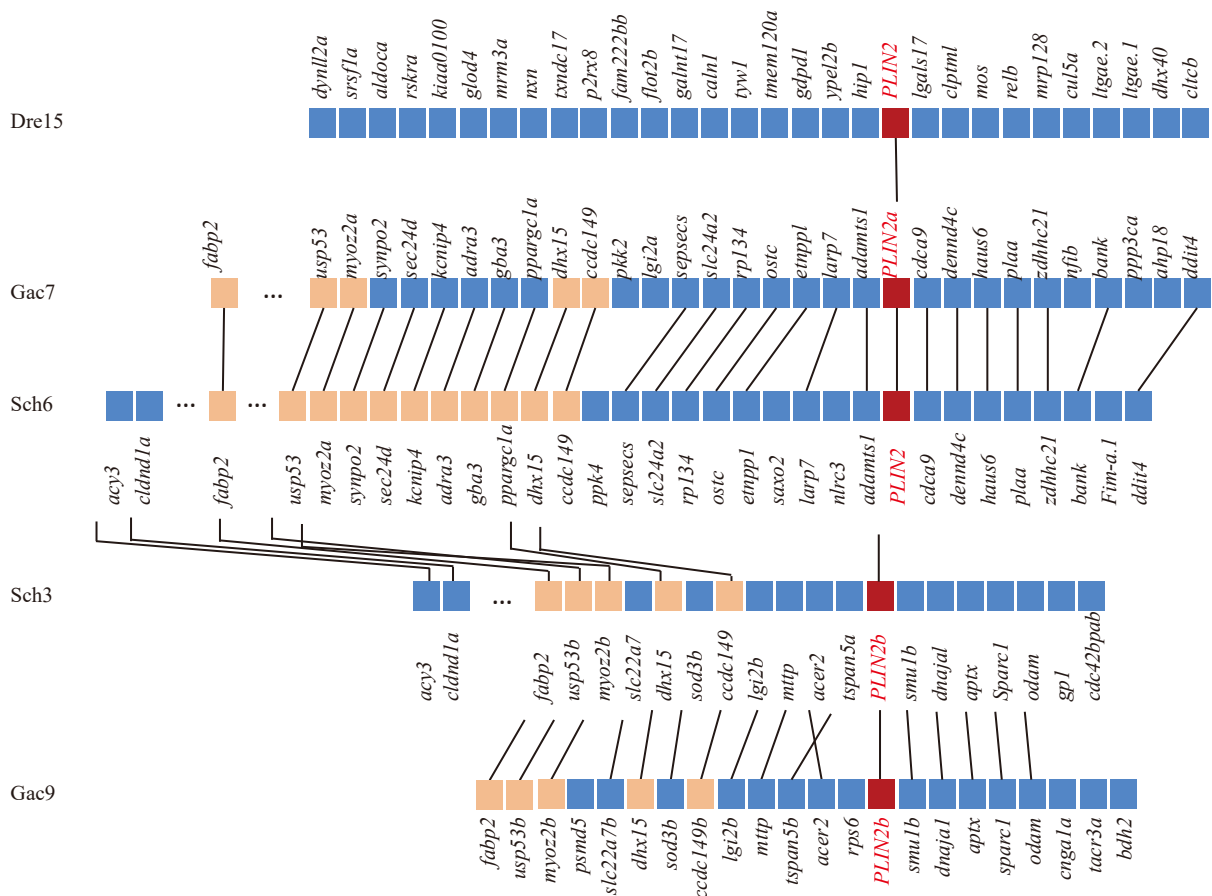


图 2 鳃和其他硬骨鱼类 $plin2$ 基因共线性

Fig. 2 Syntenic analysis for *plin2* genes in *S. chuatsi* and other teleost species

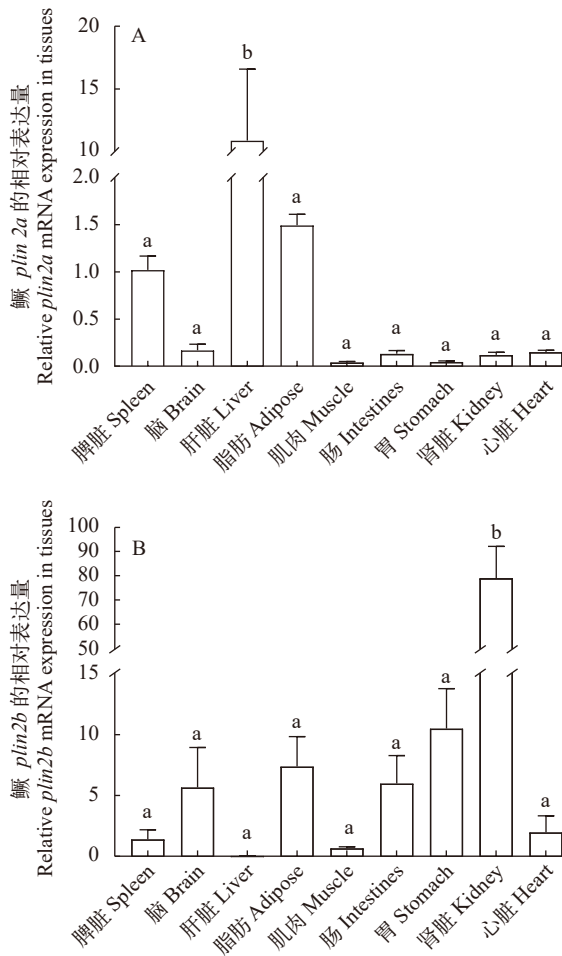


图4 鳊*plin2a*和*plin2b*在不同组织中的相对表达量

Fig. 4 The relative expression of *plin2a* (A) and *plin2b* (B) genes in different tissues of *S. chuatsi*

标准差上方不同字母表示差异显著($P < 0.05$); 下同

Different letters above the error bars indicate significant differences ($P < 0.05$). The same applies below

3 讨论

3.1 鳊*plin2*的分子特征

脂滴包被蛋白PLIN家族是主要的脂滴蛋白,在脂滴形成和甘油三酯代谢中起重要作用。与哺乳动物PLIN基因家族相比,硬骨鱼类PLIN家族的组成更具物种特异性和复杂性^[24]。然而,对于PLIN家族研究主要集中在哺乳动物中,而在硬骨鱼中对PLIN家族的研究较少^[25]。在PLIN家族中,*plin2*一般位于中性脂滴的多种组织和培养细胞系中,被认为在哺乳动物脂肪肝的形成中起到至关重要的作用^[26]。本研究对鳊*plin2*基因的序列和组织表达情况进行了鉴定和分析。此外,本研究探究了在鳊肝脏脂肪处于蓄积状态下*plin2*的表达变化情况。

先前研究表明,斑马鱼和穴居鱼保持着*plin2*的

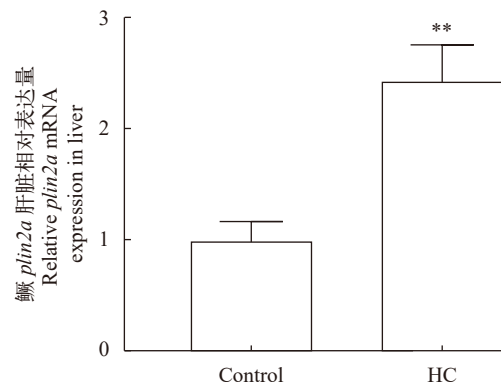


图5 高糖饲料对鳊肝脏 *plin2a* mRNA 水平的影响

Fig. 5 Effects of high-carbohydrate diet on *plin2a* mRNA of *S. chuatsi* liver

标准差上方**表示差异极显著($P < 0.01$)

** . extremely significant differences ($P < 0.01$)

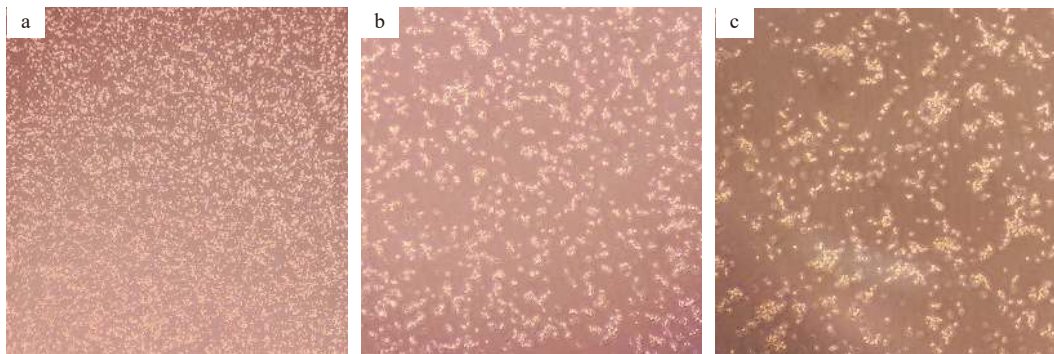


图6 倒置相差显微镜下观察的鳊肝脏原代细胞形态

Fig. 6 Observation of *S. chuatsi* hepatocytes under inverted phase contrast microscope

a. 鳊肝脏原代细胞正常培养24h (40×); b. 鳊肝脏原代细胞正常培养48h (100×); c. 鳊肝脏原代细胞经0.1 mmol/L PA刺激培养48h (100×)

a. Morphology of hepatocytes cultured for 24h (40×); b. Morphology of hepatocytes cultured for 48h (100×); c. Morphology of hepatocytes cultured with 0.1 mmol/L PA for 48h (100×)

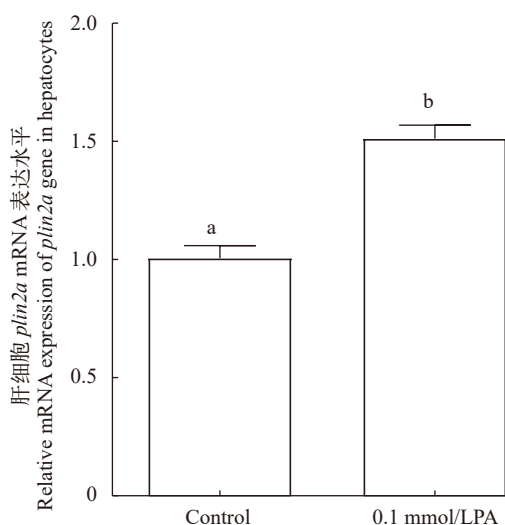


图7 棕榈酸钠刺激鳊肝细胞 *plin2a* mRNA 水平的影响

Fig. 7 Effects of palmitate on *plin2a* mRNA of *S. chuatsi* hepatocytes

一个拷贝, 与人类的 *plin2* 同源^[27]。而在硬骨鱼基因组复制过程中产生的 *plin2* 基因, 如刺鱼和亚马逊帆鱼保留了两个亚型, 分别命名为 *plin2a* 和 *plin2b*^[24]。在鳊基因组中, 经过分析比对发现与刺鱼和亚马逊帆鱼相同, 产生了 *plin2a* 和 *plin2b* 两个亚型, 而 *plin2* 的加倍现象, 可能会导致其在鳊糖脂代谢中的作用更加复杂。同源性分析还表明, 鳊 *plin2a* 基因与刺鱼 *plin2a* 基因具有高度的同源性, 但鳊 *plin2b* 与刺鱼 *plin2b* 基因同源性并不是很高。在鳊 *plin2a* 和 *plin2b* 中发现了包括PAT结构域和11-mer重复结构域在内的人类PLIN蛋白的定义特性。高度保守的N-末端PAT结构域被认为参与了 *plin2* 的脂滴稳定和蛋白酶体降解; 11-mer重复结构域可能与C-末端结构域协同调节乳脂分泌有关^[5, 27]。这些结构域的保守性表明, 鳊 *plin2* 可能是针对脂滴, 其功能可能与甘油三酯的储存和动员有关。蛋白质的亲疏水性对于其折叠具有重要作用, 在我们对鳊 *plin2* 蛋白亲疏水性预测后, 发现鳊 *plin2* 两个亚型都不具有大面积疏水或亲水域。有研究发现在对小鼠 *plin2* 以及 *plin3* 蛋白序列进行疏水预测中, 其N端PAT结构域和11-mer重复区域中观察到疏水性/亲水性片段的交替模式^[7, 12]。同时2种蛋白质未预测到大段的疏水序列, 这表明在空间上, 其蛋白质中的区域可能汇聚在一起从而形成了较大的疏水性配体识别表面发挥功能。

3.2 鳊 *plin2* 的系统发育分析

聚类分析将PLIN家族大致分为5类, *plin2* 明显地分为硬骨鱼和哺乳动物两部分, 其余PLIN家族分类并不十分明显, 这可能是由于物种选择数目不多的问题。系统发育分析主要将PLIN家族分为两大

支, 其中分支 I 包括 *plin1-plin5*, 分支 II 只包括 *plin6*。分支 I 进化分析显示鳊 *plin2a* 与刺鱼、红鳍东方鲀和绿河豚在进化距离上较为接近, 鳊 *plin2b* 则与攀鲈最为接近。脊椎动物PLIN基因家族是在脊椎动物辐射的基础上进行了两轮全基因组复制而产生的, 共有4个基因: *plin1*、*plin2*、*plin4-plin5-plin3* 集群祖先和 *plin6*^[24, 29]。其中 *plin6* 作为PLIN家族的额外分支, 是硬骨鱼特有的^[24]。经过一系列串联复制和分化后产生了现在PLIN家族中的 *plin3*、*plin4* 和 *plin5* 基因, 完成了人类PLIN家族的5个基因库。在硬骨鱼基因组复制后, 4个PLIN家族基因变成了8个基因, 除 *plin2* 外其余的基因都恢复为单一拷贝, 本研究对鳊PLIN系统发育重建中也支持上述发现。

3.3 鳊 *plin2* 的组织表达分布

一般认为 *plin2* 存在于中性脂滴的多种组织和培养细胞系中, 包括乳腺、肝脏、骨骼肌、小鼠脂肪细胞和人肝癌细胞等^[2, 30]。本研究结果表明鳊 *plin2* 的2个亚型的组织表达情况有很大差异, *plin2a* 基因在鳊的肝脏中表达最高, 其次是脂肪和脾脏组织。然而 *plin2b* 基因在鳊的肝脏中几乎不表达, 与其他组织相比, 在肾、胃、脂肪和脑组织中的表达水平更高。基于 *plin2* 组织表达结果, 我们推测 *plin2a* 和 *plin2b* 在鳊脂滴形成和脂肪蓄积中的功能发生了分化, *plin2a* 可能在鳊肝脏脂肪合成和分解中发挥更加重要的功能, 而 *plin2b* 可能主要在肾、胃、脂肪等其他组织发挥作用。

3.4 鳊 *plin2* 与肝脏脂肪蓄积密切相关

鳊等肉食性鱼类对于糖类物质利用能力差, 本实验室先前研究表明当饲料中过量添加淀粉(20%)会造成鳊肝脏脂肪蓄积^[18]。为了进一步探究 *plin2a* 对鳊肝脏脂肪蓄积的影响, 首先我们通过过量投喂碳水化合物诱导了鳊肝脏中的脂质含量增加。另外, 哺乳动物体内 *plin2* 的丰度与细胞内脂质水平直接相关, 而 *plin2* 水平的升高则与脂肪堆积引起的疾病有关^[28]。研究表明, 与正常人的肝细胞相比, 脂肪性肝病患者肝细胞中 *plin2* 的表达水平上调^[11, 14]。在喂食高脂肪或酒精饮食的小鼠中, 在酒精性肝病的实验模型中, *plin2* 表达上升并且包裹大量的脂滴^[31]。因此, 我们同时构建了鳊肝细胞高脂模型研究 *plin2a* 的作用。本研究参考了Yang等^[32]利用棕榈酸钠诱导了草鱼肝细胞脂肪蓄积以及实验室先前工作^[22], 采用棕榈酸钠添加剂来诱导鳊肝细胞的脂肪蓄积, 先前本实验室研究表明用0.1 mmol/L PA对鳊肝脏原代细胞进行刺激后, 其甘油三酯水平显著增加且脂滴荧光强度增加, 因此我们选择该浓度进一步研

究*plin2*功能作用^[22]。我们的结果表明,与不添加淀粉组相比,鳊肝脏*plin2a*的mRNA表达水平极显著增加。在细胞水平上同样发现通过棕榈酸钠构建的鳊肝细胞高脂模型中,细胞内*plin2a*的表达水平显著增加。有研究表明,*plin2*作为肝脏组织中最丰富的脂滴蛋白,与脂肪酸摄取以及脂解关系密切^[11]。当肝脏敲除*plin2*的小鼠饲喂高脂饲料后,其肝脏脂肪水平降低,同时脂肪合成相关基因的表达受到抑制^[14, 15]。在哺乳动物中*plin2*过量表达会造成肝细胞中甘油三酯沉积,从而导致脂肪变性。而抑制*plin2*表达可能在防止肝脏脂肪蓄积具有一定作用^[31]。基于上述发现,我们推测*plin2a*可能影响肝脏中脂肪合成和脂滴增加,是鳊肝脏脂肪蓄积的重要调节因子。

综上所述,我们在本研究中鉴定出鳊*plin2*的2个亚型,生物信息学分析和组织表达分布情况表明不同亚型之间可能出现功能分化,当鳊肝脏处于脂肪蓄积状态下*plin2a*表达上升,说明该亚型可能在肝脏脂质代谢中行使一定的功能。因此,需要进一步研究*plin2*对鳊肝脏脂质代谢的作用机制,为阐明和预防鳊脂肪肝形成提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, *et al.* The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**(46): 44507-44512.
- [2] Brown D A. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat [J]. *Current Biology*, 2001, **11**(11): R446-R449.
- [3] Granneman J G, Moore H-PH. Location, location: protein trafficking and lipolysis in adipocytes [J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2008, **19**(1): 3-9.
- [4] Brasaemle D L, Dolios G, Shapiro L, *et al.* Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**(45): 46835-46842.
- [5] Miura S, Gan J W, Brzostowski J, *et al.* Functional conservation for lipid storage droplet association among perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, drosophila, and dictyostelium [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**(35): 32253-32257.
- [6] Wolins N E, Brasaemle D L, Bickel P E. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins [J]. *FEBS Letters*, 2006, **580**(23): 5484-5491.
- [7] Brasaemle D L. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis [J]. *Journal of Lipid Research*, 2007, **48**(12): 2547-2559.
- [8] Sanders M A, Madoux F, Mladenovic L, *et al.* Endogenous and synthetic ABHD5 ligands regulate ABHD5-perilipin interactions and lipolysis in fat and muscle [J]. *Cell Metabolism*, 2015, **22**(5): 851-860.
- [9] Moore H-PH, Silver R B, Mottillo E P, *et al.* Perilipin targets a novel pool of lipid droplets for lipolytic attack by hormone-sensitive lipase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**(52): 43109-43120.
- [10] Gao J, Serrero G. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**(24): 16825-16830.
- [11] Conte M, Franceschi C, Sandri M, *et al.* Perilipin 2 and age-related metabolic diseases: a new perspective [J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2016, **27**(12): 893-903.
- [12] Itabe H, Yamaguchi T, Nimura S, *et al.* Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2017, **16**(1): 1-11.
- [13] Chang B H J, Li L, Paul A, *et al.* Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, **26**(3): 1063-1076.
- [14] Motomura W, Inoue M, Ohtake T, *et al.* Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, **340**(4): 1111-1118.
- [15] Libby A E, Bales E, Orlicky D J, *et al.* Perilipin-2 deletion impairs hepatic lipid accumulation by interfering with sterol regulatory element-binding protein (SREBP) activation and altering the hepatic lipidome [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, **291**(46): 24231-24246.
- [16] Liang X F, Oku H, Ogata H Y, *et al.* Weaning Chinese perch *Siniperca chuatsi* (Basilewsky) onto artificial diets based upon its specific sensory modality in feeding [J]. *Aquaculture Research*, 2015, **32**(S1): 76-82.
- [17] Wang J, Liang X F, He S, *et al.* Lipid deposition pattern and adaptive strategy in response to dietary fat in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) [J]. *Nutrition & Metabolism*, 2018, **15**(1): 77.
- [18] Zhang Y, Liang X F, He S, *et al.* Effects of high carbohydrate diet-modulated microbiota on gut health in Chinese perch [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020(11): 2255.
- [19] Clewley J P. Macintosh sequence analysis software [J]. *Molecular Biotechnology*, 1995, **3**(3): 221-224.
- [20] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, **23**(21): 2947-2948.
- [21] Zhang D, Gao F, Jakovlić I, *et al.* PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2020, **20**(1): 348-355.
- [22] Xu J. Study on the regulation of glucose and lipid metabolism by Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) leptin a and leptin b [D]. Wuhan: Institute of Huazhong Agricultural University, 2020: 87. [徐晶. 鳊鱼leptin a和leptin b对糖脂代谢调控机制的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学,

- 2020: 87.]
- [23] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.
- [24] Granneman J G, Kimler V A, Zhang H, *et al.* Lipid droplet biology and evolution illuminated by the characterization of a novel perilipin in teleost fish [J]. *Elife*, 2017(6): e21771.
- [25] Bi J, Xiang Y, Chen H, *et al.* Opposite and redundant roles of the two *Drosophila* perilipins in lipid mobilization [J]. *Journal of Cell Science*, 2012, **125**(15): 3568-3577.
- [26] Sztalryd C, Brasaemle D L. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2017, **1862**(10): 1221-1232.
- [27] Lumaquin D, Johns E, Weiss J, *et al.* An in vivo reporter for tracking lipid droplet dynamics in transparent zebrafish [J]. *BioRxiv*, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.11.09.375667>
- [28] McManaman J L, Zabaronick W, Schaack J, *et al.* Lipid droplet targeting domains of adipophilin [J]. *Journal of Lipid Research*, 2003, **44**(4): 668-673.
- [29] Patel S, Yang W, Kozusko K, *et al.* Perilipins 2 and 3 lack a carboxy-terminal domain present in perilipin 1 involved in sequestering ABHD5 and suppressing basal lipolysis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, **111**(25): 9163-9168.
- [30] Phillips S A, Choe C C, Ciaraldi T P, *et al.* Adipocyte differentiation-related protein in human skeletal muscle: relationship to insulin sensitivity [J]. *Obesity Research*, 2005, **13**(8): 1321-1329.
- [31] Imamura M, Inoguchi T, Ikuyama S, *et al.* ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts [J]. *American Journal of Physiology-endocrinology and Metabolism*, 2002, **283**(4): E775-E783.
- [32] Yang S S, Yu C B, Luo Z, *et al.* Berberine attenuates sodium palmitate-induced lipid accumulation, oxidative stress and apoptosis in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) hepatocyte in vitro [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(88): 518-527.

BIOINFORMATICS AND EXPRESSION ANALYSIS OF *PLIN2* IN CHINESE PERCH (*SINIPERCA CHUATSI*) AND ITS ROLE IN LIVER FAT ACCUMULATION

GAO Jun-Jie^{1,2}, LIANG Xu-Fang^{1,2}, CAI Wen-Jing^{1,2} and ZHUANG Wu-Yuan^{1,2}

(1. College of Fisheries, Chinese Perch Research Center, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Lab of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education, Wuhan 430070, China)

Abstract: Perlipin2 (*plin2*) belongs to a family of related proteins named perilipin or PLIN (Perlipin), and is expressed in most tissues. *plin2* plays a key role in the formation and stabilization of lipid droplets and fatty liver formation. However, little is known about the function of *plin2* in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*). This study identified two subtypes of *plin2* gene in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*), named *plin2a* and *plin2b*, respectively. Domain analysis found that *plin2a* and *plin2b* of Chinese perch included the conserved N-terminal PAT domain and 11-mer repeating domain. *plin2* systemic analysis revealed that the genes adjacent to two subtypes of *plin2* were strictly conserved in Chinese perch and stickleback. According to the phylogenetic analysis, *plin2a* and *plin2b* in Chinese perch had a closer relationship with stickleback, climbing perch and tongue sole. Meanwhile, we tested its mRNA expression of *plin2a* and *plin2b* in different tissues using real-time quantitative PCR. Both *plin2* genes widely distributed but with some differences. *plin2a* had the highest level in liver, while *plin2b* had almost no expression in the liver. *plin2b* was mainly expressed in kidney, stomach, adipose and brain. To explore the function of *plin2* in Chinese perch, we detected *plin2a* mRNA level in high-carbohydrates diet-fed fish. The result showed that compared with fish fed control diet, high-carbohydrate diet significantly increased the hepatic *plin2a* level. In addition, we found that *plin2a* mRNA level was also significantly increased after stimulating with 0.1 mmol/L sodium palmitate in Chinese perch hepatocytes. This study shows that the two subtypes of *plin2* genes in Chinese perch may have functional differentiation. *plin2a*, as an important regulator in liver lipid metabolism, may play an important role in the accumulation of fat in the liver of Chinese perch.

Key words: *Plin2*; Lipid metabolism; Bioinformatics; Tissue expression; Liver; *Siniperca chuatsi*