



林长高, 刘林, 王辉, 等. 基于 RNA-Seq 技术分析微囊藻毒素-LR 对草鱼肝脏脂质代谢的影响[J]. 江西农业大学学报, 2022, 44(1): 166–174.

LIN C G, LIU L, WANG H, et al. Effects of microcystin-LR on lipid metabolism of liver in grass carp based on RNA-Seq[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2022, 44(1): 166–174.

基于 RNA-Seq 技术分析微囊藻毒素-LR 对草鱼肝脏脂质代谢的影响

林长高, 刘 林, 王 辉, 隗黎丽*

(江西农业大学 动物科学技术学院, 江西 南昌 330045)

摘要:【目的】为探讨微囊藻毒素-LR(MC-LR)对草鱼肝脏脂质代谢的影响机制,对已获得的草鱼肝脏转录组数据进行了挖掘分析。【方法】草鱼经腹腔注射不同剂量(0, 25, 75, 100 $\mu\text{g/kg}$) MC-LR 96 h 后,分离肝脏提取 RNA, 依托 Illumina HiSeq-2500 平台进行转录组测序分析,将筛选到的差异表达基因(DEGs)进行 KEGG Pathway 分析。同时利用荧光定量 PCR(qRT-PCR)对随机选取的 3 个 DEGs 的表达模式进行验证。【结果】25, 75, 100 $\mu\text{g/kg}$ 3 个实验组中的脂质代谢相关 DEGs 分别有 37、363 和 132 个。75 $\mu\text{g/kg}$ 和 100 $\mu\text{g/kg}$ 2 个实验组中的 DEGs 分别富集到脂肪酸分解代谢等 15 个脂质代谢通路上。而 25 $\mu\text{g/kg}$ 实验组中 DEGs 富集到 12 个脂质代谢通路上,和其它 2 个剂量相比,脂肪酸合成通路、不饱和脂肪酸合成通路以及脂肪酸延长通路中没有 DEGs。PPAR 信号通路作为脂质代谢的关键调控通路,在 3 个 MC-LR 处理组中也有大量 DEGs,其共同 DEGs 主要有 *PPAR α* 、*FABP*、*CYP7A1* 和 *LPL* 等 7 个基因。qRT-PCR 结果显示 *PPAR α* 、*LPL* 和 *CPT1* 表达结果与转录组测序结果趋势一致。【结论】通过对转录组测序数据的深入挖掘,分析得到了大量草鱼肝脏脂质代谢相关通路和 DEGs,表明 MC-LR 干扰了草鱼肝脏脂质代谢,另外,部分 DEGs 有望被开发为鉴定 MC-LR 干扰鱼类脂质代谢的分子标记。

关键词: 草鱼; 肝脏; 脂质代谢; 微囊藻毒素-LR; 转录组测序

中图分类号: S949 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2022)01-0166-09

Effects of Microcystin-LR on Lipid Metabolism of Liver in Grass Carp Based on RNA-Seq

LIN Changgao, LIU Lin, WANG Hui, WEI Lili*

(College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: [Objective] In order to explore the effects of microcystin-LR (MC-LR) on hepatic lipid metabolism of grass carp (*Ctenopharygodon idella*), the present study analyzed the transcriptome of liver in grass carps. [Method] Grass carps were injected with 0, 25, 75, 100 $\mu\text{g/kg}$ MC-LR for 96 h, the livers were isolated and the total RNA were extracted, then RNA-seq were analyzed based on the Illumina-HiSeq 2500 platform. Differen-

收稿日期: 2021-07-10 修回日期: 2021-11-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31760764, 31460146)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China(31760764, 31460146)

作者简介: 林长高, orcid.org/0000-0002-1162-9563, linchanggao2021@163.com; *通信作者: 隗黎丽, 副教授, 博士, 主要从事鱼类免疫学研究, orcid.org/0000-0002-9451-3231, hbliliwei@163.com。

tially expressed genes (DEGs) closely related to lipid metabolism were screened out. A KEGG pathway enrichment analysis of these DEGs was conducted. Simultaneously, the expression patterns of three randomly selected DEGs were verified by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). [Result] The RNA-seq analysis screened out 37, 363 and 132 DEGs in the doses of 25, 75, 100 $\mu\text{g/kg}$ MC-LR groups, respectively. These DEGs in 75 and 100 $\mu\text{g/kg}$ MC-LR groups were enriched to 15 lipid metabolism pathways including catabolism of fatty acids, etc., DEGs in 25 $\mu\text{g/kg}$ MC-LR groups were enriched to 12 lipid metabolism pathways. and there were no DEGs in fatty acid biosynthesis pathway, biosynthesis of unsaturated fatty acids pathway and fatty acid elongation pathway. In addition, PPAR pathway was the key regulatory pathway in lipid metabolism, and there were a large amount of DEGs in the PPAR pathway in the three dose groups. Among them, the common DEGs mainly included 7 DEGs like PPAR, FABP, CYP7A1 and LPL. The results of qRT-PCR of PPAR α , LPL and CPT1 were consistent with the sequencing data. [Conclusion] By digging into transcriptome sequencing data, a large amount of pathways and DEGs related to liver lipid metabolism of grass carps were obtained. The study suggests that MC-LR disturbs the lipid metabolism of fish, and the DEGs are expected to be developed as molecular markers to identify the lipid metabolism in fish interfered by MC-LR.

Keywords: grass carp; liver; lipid metabolism; microcystin-LR; RNA-seq

【研究意义】目前普遍认为鱼类的生理和物种差异、遗传和基因突变、营养素摄入不平衡、能量摄入过度以及养殖环境中污染物可干扰鱼类的脂质代谢,从而造成鱼类脂肪严重沉积^[1]。结合现有的研究报道,学者们主要从营养与饲料的角度对鱼类脂质代谢进行了研究,而环境污染物影响鱼类脂质代谢的研究相对较少。近年来,随着水体环境污染日益严重,养殖水体中的环境污染物对养殖鱼类脂肪沉积的影响也引起了研究者的重视。【前人研究进展】微囊藻毒素(microcystins, MCs)是富营养化水体中有毒蓝藻细胞所产生的一类具有生物活性的环状七肽化合物,也是水体环境常见的污染物。到目前为止,发现已知结构的MCs变体多达100余种,其中微囊藻毒素-LR(microcystins-LR, MC-LR)是目前已知的毒性最强的一种淡水蓝藻毒素^[2]。MC-LR的主要作用靶器官是肝脏,有关MC-LR肝毒性的机制已经成为学术界研究的热点问题。Wu等^[3]研究表明MC-LR可诱导小鼠肝脏原代细胞中ROS的过量产生,导致肝细胞氧化损伤、凋亡及坏死。Zhan等^[4]则指出MC-LR可触发斑马鱼肝脏内质网应激反应,引起肝脏细胞凋亡。亦有研究表明MC-LR暴露可对小鼠肝脏不饱和脂肪酸的生物合成及PPAR代谢通路造成影响,最终导致脂质代谢紊乱^[5]。【本研究切入点】在笔者之前的研究中,根据转录组测序结果主要对免疫及凋亡相关的通路及基因进行了报道^[6],然而深入挖掘数据发现,MC-LR对草鱼肝脏脂质代谢也有明显的影响。【拟解决的关键问题】本研究结合前期已获得MC-LR诱导后草鱼肝脏转录组测序数据^[6],重点对脂质代谢相关通路和差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)进行深入分析,为进一步了解MC-LR对鱼类脂质代谢的影响提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及主要试剂

试验用草鱼购于江西省南昌神龙渔业公司,平均体质量为 $(22.13 \pm 2.17)\text{g}$ 。试验草鱼买回后先在室内暂养2周,暂养期间每日按照鱼体质量的2.0%进行投喂,并保持水温在 $(20 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 。实验用MC-LR(纯度 $\geq 95\%$),购自Taiwan Algal Science Inc公司, RNA提取试剂盒TRIzol reagent购于Invitrogen公司,逆转录试剂盒RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit和SYBR Green Real-time PCR Master Mix购于Promega公司。

1.2 试验方法

1.2.1 试验鱼处理及样品采集 草鱼在实验室暂养2周后,挑选体质健康的草鱼随机分成4个组(包括1个对照组和3个MC-LR实验组),每组设3个平行组。随后将购买的MC-LR(纯度 $\geq 95\%$, Taiwan Al-

gal Science Inc)用 0.8% 生理盐水溶解稀释成 25, 75, 100 μg/kg 3 个剂量。采用腹腔注射染毒,注射量为 0.1 mL/尾;对照组每尾草鱼经腹腔注射等量的 0.80% 的生理盐水。在染毒 96 h 后,分别从实验组和对 照组中各取 6 尾鱼分离肝脏,每个组 3 尾鱼混合成 1 个样置于液氮中保存。

1.2.2 转录组测序与分析 取液氮中保存的草鱼肝脏组织按照 TRIzol reagent(Invitrogen)操作说明进行 总 RNA 的提取,用 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 RNA 是否存在降解和污染,通过紫外分光光 度计 Nanno-Photometer(LabTech, USA)检测提取的总 RNA 的纯度。将符合要求的总 RNA 送交北京贝瑞 和康生物技术有限公司,其中每个组送 2 个重复样品,构建的 8 个 cDNA 文库采用 IlluminaHiseq-2500 平 台进行转录组测序。对测序获得的原始数据进行数据整理分析,然后将获得的 Clean Reads 采用 HISAT (version 0.1.6)与草鱼基因组(草鱼基因组下载地址:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome)进行比对分析, 再根据 FPKM(Fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped)方法计算各样本间基因的 差异表达,随后根据差异表达基因进行基因功能注释及富集分析^[6]。

1.2.3 荧光定量 PCR 分析 为了验证 MC-LR 对草鱼肝脏转录组测序结果的准确性,在差异基因数据 库中随机挑选 3 个基因,利用 Primer 5.0 设计引物(表 1),分析荧光定量 PCR(qRT-PCR)结果是否与 转录组测序结果一致。取转录组测序剩余的 RNA 样品,其中对照组和实验组均有 2 个重复,采用 Rever- tAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行反转录合成 cDNA。随后将 cDNA 模板稀释 10 倍保存 于-20 ℃备用。荧光定量 PCR 采用 CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System,反应体系为:10 μL SYBR Green Real-time PCR Master Mix, 2.0 μL 稀释的 cDNA 模板,上下游引物分别各 0.5 μL(20 μmol/L), 加 ddH₂O 补充至 20 μL。反应程序为:95 ℃变性 5 min;95 ℃ 10 s, 58 ℃ 15 s, 72 ℃ 20 s, 40 个循环, 72 ℃延伸 5 min。每个样品的定量分析重复 3 次,以 GAPDH 作为内参基因,采用 2^{-ΔΔC_t}法计算相对表 达量。

表 1 荧光定量 PCR 引物
Tab.1 Primers of quantitative real-time PCR

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primerse sequence(5'-3')	登录号 Accession number	产物大小/bp Product size
<i>PPARα</i>	F:AGCAGAGAAGGACGTCAG R:GAGTGCTGGTCTTGCCGTGTA	FJ231987.1	152
<i>LPL</i>	F:AGTACGCAGATGCCCCAAAG R:CTGGCCTCTGAATCCCAATAC	FJ436077.1	104
<i>CPT1</i>	F:AATTCTGCTTGACTTATGAG R:CCTGTCCAAGGTACTTAGAC	JF728839.1	127
<i>GAPDH</i>	F:AACTGAATCCTCTGTGTATCC R:GTCCGTTGTTGACCTCACCT	GQ266395.1	124

2 结果与分析

2.1 肝脏脂质代谢相关的 KEGG 通路

对照组和 3 个 MC-LR 实验组的 clean reads 数据为 4.1×10⁷~5.6×10⁷,与对照组相比,25, 75, 100 μg/kg 实验组的差异表达基因分别有 953、4 729 和 2 265 个,其中表达上调的基因分别有 574、2 498 和 1 472 个, 表达下调的基因分别有 379、2 231 和 793 个,3 个 MC-LR 实验组共同的上调表达基因有 320 个,下调 的有 137 个^[6]。

通过 KEGG 分析发现,25 μg/kg 实验组草鱼肝脏暴露 96 h 后,DEGs 富集在 12 条脂质代谢相关通路 上,而在 75 μg/kg 和 100 μg/kg 实验组中,DEGs 富集在 15 条脂质代谢通路上,与 25 μg/kg 实验组脂质代谢 通路相比,还富集了不饱和脂肪酸生物合成、脂肪酸延长和脂肪酸合成代谢 3 条脂质代谢通路(表 2)。

表 2 MC-LR对草鱼肝脏脂质代谢通路的影响
Tab.2 The effects of MC-LR on the lipid metabolism of grass carp liver

脂质代谢相关通路 Lipid metabolism related pathways	差异表达基因数 The number of DEGs			P 值 P value		
	25 μg/kg	75 μg/kg	100 μg/kg	25 μg/kg	75 μg/kg	100 μg/kg
脂肪酸降解 Fatty acid degradation	1	40	13	0.930 977 8	8.422 393×10 ⁻¹³	0.006 650 41
甾类激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis	7	50	14	0.117 972 3	6.565 845×10 ⁻¹¹	0.090 644 00
初级胆汁酸生物合成 Primary bile acid biosynthesis	1	19	6	0.663 603 7	3.116 186×10 ⁻⁸	0.033 105 61
不饱和脂肪酸生物合成 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	0	23	12	—	7.105 087×10 ⁻⁸	0.000 118 86
脂肪酸延长 Fatty acid elongation	0	21	9	—	1.029 333×10 ⁻⁵	0.012 384 97
甘油酯代谢 Glycerolipid metabolism	5	37	14	0.513 327 5	0.001 647 232	0.201 232 70
花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism	5	35	8	0.500 312 6	0.004 460 549	0.851 046 60
脂肪酸合成代谢 Fatty acid biosynthesis	0	10	6	—	0.025 563 06	0.033 105 61
甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism	8	45	19	0.495 927 7	0.090 098 75	0.397 437 60
类固醇生物合成 Steroid biosynthesis	2	9	7	0.328 877 0	0.102 749	0.015 977 76
酮体的合成与降解 Synthesis and degradation of ketone bodies	1	5	1	0.554 333 9	0.338 926 7	0.851 668 00
亚油酸代谢 Linoleic acid metabolism	2	14	1	0.736 243 9	0.373 811 3	0.998 029 10
亚麻酸代谢 Alpha-Linolenic acid metabolism	1	11	2	0.905 232 5	0.579 710 4	0.973 894 20
鞘脂类代谢 Sphingolipid metabolism	2	28	12	0.983 742 2	0.610 463 6	0.730 973 90
醚脂类代谢 Ether lipid metabolism	2	16	8	0.884 800 4	0.714 933 8	0.614 326 70

2.2 脂质代谢通路中的 DEGs

2.2.1 不同剂量 MC-LR 对草鱼肝脏脂质代谢通路差异表达基因的影响 根据表 2 可知,25 μg/kg 实验组草鱼肝脏中涉及到的脂质代谢通路上的 DEGs 为 37 个。其中脂肪酸合成通路、不饱和脂肪酸合成通路以及脂肪酸延长通路上均未富集 DEGs。脂肪酸降解通路、初级胆汁酸合成通路和酮体的合成与降解通路均有 1 个 DEGs,醚脂类代谢通路、类固醇合成通路、亚油酸代谢通路和鞘脂类代谢通路中均有 2 个 DEGs,甘油酯代谢通路和花生四烯酸代谢通路中有 5 个 DEGs,甾类激素生物合成通路有 7 个 DEGs,甘油磷脂代谢通路则出现 8 个 DEGs。

75 μg/kg 实验组草鱼肝脏中脂质代谢 DEGs 上升至 363 个,其中脂肪酸合成代谢、不饱和脂肪酸合成通路、脂肪酸延长通路以及脂肪酸降解通路均富集了大量 DEGs,这 4 个通路上分别有 10、23、21 和 40 个 DEGs。初级胆汁酸合成通路有 19 个 DEGs,甘油酯代谢通路有 37 个 DEGs,甾类激素生物合成通

路有 50 个 DEGs,花生四烯酸代谢通路有 35 个 DEGs,甘油磷脂代谢通路有 45 个 DEGs,醚脂类代谢通路有 16 个 DEGs,类固醇合成通路有 9 个 DEGs,亚油酸代谢通路有 14 个 DEGs,鞘脂类代谢通路有 28 个 DEGs,酮体的合成与降解有 5 个 DEGs。

100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 实验组草鱼肝脏中脂质代谢相关基因有 132 个发生了显著变化,其中脂肪酸合成代谢、不饱和脂肪酸合成通路、脂肪酸延长通路以及脂肪酸降解通路分别有 6、12、9 和 13 个基因有显著变化。甘油磷脂代谢通路有 19 个 DEGs,甘油酯代谢通路和甾类激素生物合成通路均有 14 个 DEGs,鞘脂类代谢通路有 12 个 DEGs,花生四烯酸代谢通路和醚脂类代谢通路均有 8 个 DEGs,类固醇合成通路有 7 个 DEGs,初级胆汁酸合成通路有 6 个 DEGs,而亚油酸代谢通路和酮体的合成与降解通路均只有 1 个 DEGs。

2.2.2 不同剂量 MC-LR 暴露下草鱼肝脏共同的脂质代谢差异表达基因 由表 2 可知,经不同剂量 MC-LR 处理后,有 12 个基因在 3 个实验组中表达同时上调(表 3),有 14 个基因在 3 个剂量组中表达同时下调(表 3)。其中表达上调的基因主要有: *SMPD2*、*cPLA2*、*PTGES3*、*SQS*、*UGT5A4*、*GSH-Px* 和 *PTGS* 等。表达下调的基因主要有: *MICAL3A*、*LIPC*、*LPL*、*BDH1*、*ETTNPL*、*UGT1A7*、*SOAT2*、*UGT1A7* 和 *CPT-1* 等。

表 3 不同剂量 MC-LR 暴露下草鱼肝脏共同的脂质代谢差异表达基因

Tab.3 The common DEGs of lipid metabolism from grass carp liver exposure to different doses of MC-LR					
基因缩写 Gene symbol	基因登录号 Gene Bank	基因描述 Gene description	变化倍数 Change folds		
			25/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	75/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	100/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
<i>SQS</i>	NP_001189454.1	squalene synthase	4.63	2.64	17.88
<i>SMPD2</i>	AAI63237.1	sphingomyelin phosphodiesterase 2	3.41	47.18	29.65
<i>PTGES3</i>	NP_001002137.1	prostaglandin E synthase 3	3.32	6.36	5.78
<i>uncharacterized protein</i>	XP_005157370.1	uncharacterized protein	2.81	20.39	3.20
<i>GSH-Px</i>	AHJ80778.1	glutathione peroxidase	2.71	8.17	50.21
<i>PTGS2</i>	KTF91275.1	prostaglandin G/H synthase 2	2.64	233.94	1 370.04
<i>UGT5A4</i>	NP_001170969.1	UDP glucuronosyltransferase 5 family, polypeptide A4 precursor	2.57	7.78	14.62
<i>ACSBG2</i>	KTG02735.1	long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG2	2.51	8.57	2.60
<i>OXCT1</i>	NP_001007292.1	succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial	2.25	5.03	2.33
<i>cPLA2</i>	NP_571370.1	cytosolic phospholipase A2	2.23	5.74	3.51
<i>hypothetical protein</i>	KTG34553.1	hypothetical protein	2.19	3.46	4.38
<i>uncharacterized protein</i>	NP_001038796.1	uncharacterized protein	2.11	12.04	3.10
<i>CPT-1</i>	AJQ31839.1	carnitine palmitoyltransferases I	0.50	0.19	0.39
<i>BDH1</i>	KTG35420.1	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	0.49	0.24	0.49
<i>hypothetical protein</i>	ACN66300.1	hypothetical protein	0.49	0.27	0.42
<i>MICAL3A</i>	KTG35420.1	Protein-methionine sulfoxide oxidase mical3a	0.49	0.22	0.18
<i>LPIN2</i>	XP_005163511.1	phosphatidate phosphatase LPIN2 isoform X1	0.45	0.28	0.32
<i>LPIN1</i>	XP_005158866.1	phosphatidate phosphatase LPIN1 isoform X2	0.45	0.22	0.11
<i>ETTNPL</i>	NP_956743.1	ethanolamine-phosphate phospho-lyase	0.44	0.23	0.37
<i>LPL</i>	ACN66300.1	lipoprotein lipase	0.42	0.27	0.46
<i>hypothetical protein</i>	KTF79716.1	hypothetical protein	0.39	0.07	0.39
<i>uncharacterized protein</i>	NP_001070194.1	uncharacterized protein	0.31	0.09	0.39
<i>SOAT2</i>	XP_010864570.1	sterol O-acyltransferase 2	0.31	0.12	0.34
<i>hypothetical protein</i>	KTG40982.1	hypothetical protein	0.29	0.26	0.13
<i>UGT1A7</i>	ADC91940.1	UDP glucuronosyltransferase 1 family polypeptide b7 short isoform	0.21	0.18	0.24
<i>LIPC</i>	NP_957316.1	hepatic triacylglycerol lipase precursor	0.15	0.13	0.52

2.3 不同剂量 MC-LR 对草鱼肝脏 PPAR 信号通路和基因的影响

3 个剂量的 MC-LR 对草鱼肝脏 PPAR 信号通路均有影响,其中 25 $\mu\text{g/kg}$ 实验组草鱼肝脏 PPAR 信号通路涉及 12 个基因有显著变化,其中表达显著上调的基因主要包括 *FABP1* 和 *FABP4*,表达显著下调的基因主要包括 *FATP*、*PPAR α* 、*CYP7A1*、*LPL*、*ADIPO*。而 75 $\mu\text{g/kg}$ 实验组中草鱼肝脏共有 70 个基因有显著差异表达,表达显著上调的基因主要包括 *FABP1*、*FABP4*、*ILK* 和 *AQP7* 等 9 个基因,表达显著下调的基因包括 *FATP*、*PPAR α* 、*SCD-1*、*CYP7A1*、*CYP8B1*、*CYP27*、*FATP1*、*LPL*、*CYP4A1*、*CPT-1* 和 *CPT-2* 等 61 个基因。100 μg MC-LR/kg 实验组中草鱼肝脏则有 31 个基因表达有显著变化,其中有 *FABP1*、*PGAR*、*FABP4*、*CAP* 和 *UBC* 6 个基因表达显著上调,*FATP*、*PPAR α* 、*RXR*、*SCD-1*、*LPL*、*CYP7A1*、*CYP8B1*、*CYP27*、*CPT-1*、*CPT-2*、*LCAD* 和 *ACO* 等 25 个基因表达显著下降。3 个剂量的 MC-LR 对草鱼肝脏 PPAR 信号通路上诱导的共同的 DEGs 有 8 个(表 4),包括 3 个上调的和 5 个下调的表达基因,其中 *FABP4* 显著上调,在 25、75 和 100 $\mu\text{g/kg}$ 实验组的表达分别上调了 3.39、41.07 和 25.46 倍;*FABP1* 分别上调了 4.56、2.45 和 2.19 倍;*PPAR α* 在 3 个剂量组中分别下调了 0.32、0.15 和 0.24 倍,*CYP7A1* 分别下调了 0.47、0.18 和 0.35 倍,*LPL* 分别下调了 0.42、0.27 和 0.46 倍;其他 3 个表达有显著变化的为未知基因。

表 4 不同剂量 MC-LR 暴露下草鱼肝脏 PPAR 信号通路上共同的差异表达基因

Tab.4 The common DEGs of PPAR pathway from grass carp liver exposure to different dose of MC-LR					
基因缩写 Gene symbol	基因登录号 Gene Bank	基因描述 Gene description	变化倍数 Change folds		
			25/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	75/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	100/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
<i>hypothetical protein</i>	KTG20094.1	hypothetical protein	4.08	19.43	43.11
<i>FABP4</i>	AEZ53130.1	fatty acid-binding protein 4	3.39	41.07	25.46
<i>FABP1</i>	NP_001019822.1	fatty acid binding protein 1	4.56	2.45	2.19
<i>uncharacterized protein</i>	NP_001076488.1	uncharacterized protein	0.27	0.14	0.28
<i>hypothetical protein</i>	KTG40982.1	hypothetical protein	0.29	0.26	0.13
<i>PPARα</i>	ACM78031.1	peroxisome proliferator activated receptor alpha	0.32	0.15	0.24
<i>LPL</i>	ACN66300.1	lipoprotein lipase	0.42	0.27	0.46
<i>CYP7A1</i>	AMM04294.1	cholesterol 7 alpha hydroxylase	0.47	0.18	0.35

2.4 荧光定量 PCR 验证结果

为验证测序数据的准确性,随机选取的 3 个 DEGs 进行 qRT-PCR 反应。结果显示这 3 个基因表达水平的趋势变化与转录组测序结果中的表达趋势基本一致,表明转录组测序结果可信。

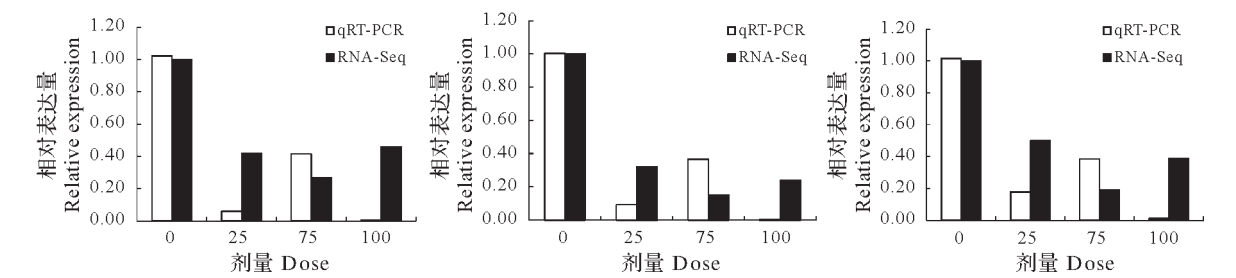


图 1 3 个 DEGs 的荧光定量 PCR 及转录组的比较分析

Fig.1 Comparison of three DEGs by quantitative real-time PCR and transcriptome analysis

3 讨论

3.1 MC-LR 对草鱼肝脏脂质代谢通路和差异表达基因的影响

肝脏是一个高度活跃的代谢器官,在全身脂质代谢的各个方面起着关键作用^[7]。目前,已有一些研究表明 MCs 对小鼠肝脏脂质代谢有影响,并从基因表达水平、酶活水平、组织病理切片等方面进行了研究。如 MC-LR 可导致小鼠脂质代谢相关基因(*Angpt1* 和 *PPAR*)在 mRNA 和蛋白水平均发生改变,增加腹腔脂肪质量和体脂比,降低空腹血糖、血清中高密度脂蛋白以及甘油三酯含量^[8]。韦宏旷等^[9]通过检测

分析 MC-LR 对小鼠 MDA 的影响,发现 MC-LR 会对肝脏脂质代谢有影响。另外,MC-LR 也可通过改变血清中甘油三酯、不饱和脂肪酸和极低密度脂蛋白等代谢物的水平,从而造成小鼠肝脂质代谢紊乱,引起肝脏质量和腹部脂肪质量增加^[5]。以上报道均表明 MC-LR 可影响哺乳动物的脂质代谢。

脂质是生物体内重要的一大类化合物,可分为脂肪酸、鞘脂类、糖脂和多聚酮类等八大类。这些脂质在生物体内发挥重要的生理功能。脂质稳态是由复杂的网络和反馈机制控制的,涉及机体的多个组织器官、转录因子、酶、激素和营养物质等,不同的信号通路之间存在复杂的交互作用^[10-11]。脂质代谢受多个信号通路共同调控,包括脂肪酸合成代谢、不饱和脂肪酸合成通路、脂肪酸延长通路、脂肪酸降解通路、甘油磷脂代谢通路、甘油酯代谢通路、甾类激素生物合成通路、鞘脂类代谢通路、花生四烯酸代谢通路、醚脂类代谢通路等多个通路。本研究结果发现在低剂量组(25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组)的草鱼肝脏中有 12 条通路受到影响,而 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 实验组受到影响的通路均有 15 条。在低剂量组中,脂肪酸合成通路、不饱和脂肪酸合成通路以及脂肪酸延长通路没有受到影响,这说明 MC-LR 对草鱼肝脏脂质代谢通路的影响存在一定的剂量差异。低剂量 MC-LR 对草鱼肝脏脂质代谢影响较小,而高剂量对草鱼肝脏脂质代谢影响非常大,尤其是对脂肪酸降解信号通路有显著影响,这与其他人报道不太一致。李智等^[12]经转录组测序分析发现凡纳滨对虾注射 MC-LR 后,主要引起鞘脂类代谢障碍,而谭智蓉等^[13]通过转录组测序同样发现 MC-LR 主要对欧洲鳗鲡肝脏鞘脂类代谢有影响。尽管在笔者的研究中发现 3 个剂量组均可以导致鞘脂类代谢通路发生变化,但相对于其他通路来说,鞘脂类代谢通路在 25, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 实验组中受到影响的脂质代谢通路中均位列较后,这说明 MC-LR 对草鱼肝脏的影响并不是以鞘脂类代谢为主。除此之外,甘油磷脂代谢通路也有受到影响,这与在斑马鱼中的报道相似^[14]。花生四烯酸、亚油酸和 α -linoleic 酸在鱼体中也起着非常重要的作用^[15],本研究也发现了 MC-LR 可以引起这些通路的变化,必需的和重要的脂肪酸代谢通路中的任何干扰都可能影响大量的细胞和生物过程,这或许可以解释 MC-LR 可引起机体多方面毒性。以上研究说明这些代谢途径并不是独立工作的,而是相互联系的,因此 MC-LR 对草鱼脂质代谢的影响也是非常复杂多样的。

机体内脂质代谢与众多脂质代谢相关基因的表达密不可分。本研究的转录组测序结果显示 25, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个剂量组中的差异表达的脂质相关基因分别有 37、363 和 132 个,其中 3 个剂量组中共同差异表达的差异基因为 27 个。这也说明 MC-LR 对草鱼肝脏的脂质代谢存在明显影响。除了脂质运输外,肝脏中脂质含量也依赖于脂肪酸 β -氧化及胆固醇代谢和运输^[16]。其中,肉碱棕榈酰转移酶系统在长链脂肪酸的 β -氧化过程中十分关键^[17]。Peroxisomal acyl-CoA oxidase 1 (acox1), acyl-CoA dehydrogenase (acadm) 和线粒体膜 carnitine-dependent enzyme shuttle (cpt1a, cpt2) 是脂肪酸 β -oxidation 的关键酶^[18]。CPT-1 是肉碱棕榈酰转移酶系统的第一个成分和限速步骤^[19],转录组测序和荧光定量的结果均显示 CPT-1 在 3 个剂量组中的表达下降,说明 MC-LR 可降低长链脂肪酸的 β -氧化,从而造成脂肪的沉积。另外,在本研究中,前列腺素的合成相关的基因 *PTGS2* 和 *PTGS3* 显著上调,这可能与必须脂肪酸的合成被干扰相关,这些脂肪酸是合成前列腺素的前体分子^[14]。肝脏脂肪生成与脂肪分解的不平衡是引起脂肪代谢异常的重要原因之一^[20],而肝脏脂质代谢异常也是诱发肝癌的机制之一^[21],因此,MC-LR 易导致肝癌的发生的机制可能与脂质代谢也有关。

3.2 MC-LR 对草鱼肝脏 PPAR 信号通路和差异表达基因的影响

PPAR 信号通路可以调控一系列与脂质代谢相关的基因和通路^[22],这一通路在细胞内脂肪酸代谢和脂质储存中起着重要作用^[23]。不饱和脂肪酸的生物合成是 PPAR 信号通路调控的下游途径之一^[24],在不饱和脂肪酸生物合成的过程中,长链脂酰辅酶 A 在 *Acaa1a* 和 *Scd1* 作用下通过脱乙酰、去饱和和延长转化为多种未饱和脂肪酸,从而导致不饱和脂肪酸水平增加^[25]。类固醇生物合成途径也受到 PPAR 信号通路激活的干扰,从而导致与胆汁酸代谢相关的胆固醇、胆碱和牛磺酸水平降低^[26-27]。胆汁酸是一类胆固醇类内分泌信号分子,在机体胆固醇吸收、代谢及调节中起着重要作用^[28]。同时,胆汁酸可促进脂溶性营养物质的吸收和消化^[29],其合成过程中出现的任何损伤都会引起整个脂质代谢过程的紊乱^[30]。

PPAR 信号通路可参与机体不同生理条件下的大量生化过程,其中包括炎症、癌症等多种复杂疾病的病理生理过程^[5,31]。在本研究中,3 个剂量组的差异表达基因均可富集到 PPAR 信号通路上。PPAR α 作为转录因子,它在肝脏脂质代谢中起着重要的调节作用^[32-33],PPAR α 也被认为是众多调控脂分解代谢中

最为关键的调控因子^[34],其可诱导脂肪酶分解基因的表达从而在脂肪酸的分解代谢方面起着重要的作用^[35]。激活PPAR α 可促进脂肪酸的吸收、利用以及脂肪酸的分解代谢^[33]。笔者目前的研究显示PPAR α 在3个剂量组中的表达均显著下降,PPAR α 信号通路的其他下游基因如*CYP7A1*、*LPL*等表达也明显下调,这些结果说明MC-LR可降低草鱼肝脏分解脂肪的能力从而影响脂质代谢,可能会加速脂肪的沉积。FABPs属于细胞内蛋白家族,它可以可逆地与疏水性配体结合,包括饱和及不饱和脂肪酸等,在脂质代谢中发挥重要作用^[36]。本研究发现*FABP1*和*FABP4*在3个剂量组中都表达增加,尤其是*FABP4*表达最高上调了41.07倍。*FABP4*作为细胞内脂质伴侣,可影响吸收、运输、酯化和脂肪酸的 β -氧化,调节能量平衡和细胞内脂质信号转导^[37],本研究中3个剂量组的*FABP4*均表达上调,这进一步表明MC-LR可能引起草鱼肝脏代谢性障碍。

4 结 论

本研究通过挖掘转录组测序数据,发现MC-LR可干扰草鱼肝脏脂质代谢,且对草鱼肝脏脂质代谢的影响是一个复杂的生物过程,脂质代谢差异表达基因主要富集在脂肪酸降解和PPAR信号通路上,这些差异表达基因可尝试开发为鉴定MC-LR干扰鱼类脂质代谢的分子标记。

参考文献 References:

- [1] 杜震宇.养殖鱼类脂肪肝成因及相关思考[J].水产学报,2014,38(9):1628-1638.
DU Z Y.Causes of fatty liver in farmed fish: a review and new perspectives[J].Journal of fisheries of China,2014,38(9):1628-1638.
- [2] PUDDICK J, PRINSEP M, WOOD S A, et al.High levels of structural diversity observed in microcystins from microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners[J].Mar drugs,2014,12(11):5372-5395.
- [3] WU Y L, HE Y, SHI J J, et al.Microcystin-LR promotes necroptosis in primary mouse hepatocytes by overproducing reactive oxygen species[J].Toxicology and applied pharmacology,2019,377(2):114626.
- [4] ZHAN C H, LIU W J, ZHANG F, et al.Microcystin-LR triggers different endoplasmic reticulum stress pathways in the liver, ovary, and offspring of zebrafish(*Danio rerio*)[J].Journal of hazardous materials,2020,386:121939.
- [5] ZHANG Z, ZHANG X X, WU B, et al.Comprehensive insights into microcystin-LR effects on hepatic lipid metabolism using cross-omics technologies[J].Journal of hazardous materials,2016,315:126-134.
- [6] WEI L, LIU Y, ZHONG S, et al.Transcriptome analysis of grass carp provides insights into the immune-related genes and pathways in response to MC-LR induction[J].Aquaculture,2018,488:207-216.
- [7] CANBAY A, BECHMANN L, GERKEN G.Lipid metabolism in the liver[J].Zeitschrift fur gastroenterologie,2007,45(1):35-41.
- [8] 李天凤.微囊藻毒素-LR暴露与C57BL/6小鼠脂质代谢紊乱的实验研究[D].南京:南京大学,2013.
LI T F.The experimental study on microcystin-LR induced the lipid metabolism disorders of C57BL/6 mice[D].Nanjing: Nanjing University,2013.
- [9] 韦宏旷.微囊藻毒素-LR对小鼠肝细胞的氧化损伤及 γ -GCS基因表达的影响[D].南宁:广西医科大学,2014.
WEI H K.Study on the oxidative damage and alternation of γ -GCS expression in hepatocytes of mice exposed to microcystin-LR[D].Nanning:Guangxi Medical University,2014.
- [10] CAPITÃO A, LYSSIMACHOU A, CASTRO L F C, et al.Obesogens in the aquatic environment: an evolutionary and toxicological perspective[J].Environment international,2017,106:153-169.
- [11] MOSETI D, REGASSA A, KIM W K.Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules[J].International journal of molecular sciences,2016,17(1):124.
- [12] 李智.微囊藻毒素对凡纳滨对虾体液免疫相关基因表达的影响[D].上海:上海海洋大学,2014.
LI Z.The effect of Microcystin-LR on *Litopenaeus vannamei* humoral immune-related genes[D].Shanghai:Shanghai Ocean University,2014.
- [13] 谭智蓉.转录组水平研究MC-LR对欧洲鳗鲡肝脏脂质代谢影响[D].厦门:集美大学,2018.
TAN Z R.Transcriptome study of the effect of MC-LR on lipid metabolism in *Anguilla anguilla* liver[D].Xiamen:Jimei University,2018.

- [14] PAVAGADHI S, NATERA S, ROESSNER U, et al. Insights into lipidomic perturbations in zebrafish tissues upon exposure to microcystin-LR and microcystin-RR[J]. *Environmental science and technology*, 2013, 47(24): 14376-14384.
- [15] SORBERA L A, ZANUY S, CARRILLO M. A role for polyunsaturated fatty acids and prostaglandins in oocyte maturation in the sea bass *Dicentrarchus labrax*[J]. *Annals of the New York academy of sciences*, 1998, 839: 535-537.
- [16] SHI H, FANG R, LI Y, et al. The oncoprotein HBXIP suppresses gluconeogenesis through modulating PCK1 to enhance the growth of hepatoma cells[J]. *Cancer letters*, 2016, 382(2): 147-156.
- [17] KASTANIOTIS A J, AUTIO K J, KERÄTÄR J M. Mitochondrial fatty acid synthesis, fatty acids and mitochondrial physiology [J]. *Biochimica et biophysica acta-molecular and cell biology of lipids*, 2017, 1862(1): 39-48.
- [18] CHENG J, LV S, NIE S, et al. Chronic perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure induces hepatic steatosis in zebrafish[J]. *Aquatic toxicology*, 2016, 176: 45-52.
- [19] MORASH A, KAJIMURA M, MCCLELLAND G. Intertissue regulation of carnitine palmitoyltransferase I (CPTI): mitochondrial membrane properties and gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2008, 1778(6): 1382-1389.
- [20] KUO Y T, LIN T H, CHEN W L, et al. Alpha-lipoic acid induces adipose triglyceride lipase expression and decreases intracellular lipid accumulation in HepG2 cells[J]. *European journal of clinical pharmacology*, 2012, 692(1-3): 10-18.
- [21] GREENFIELD V, CHEUNG O, SANYAL A J. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Current opinion in gastroenterology*, 2008, 24(3): 320-327.
- [22] HOSTETLER H A, BALANARASIMHA M, HUANG H, et al. Glucose regulates fatty acid binding protein interaction with lipids and peroxisome proliferator-activated receptor α [J]. *Journal of lipid research*, 2010, 51(11): 3103-3116.
- [23] VARGA T, CZIMMERER Z, NAGY L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2011, 1812(8): 1007-1022.
- [24] MONTANARO M A, BERNASCONI A M, GONZÁLEZ M S, et al. Effects of fenofibrate and insulin on the biosynthesis of unsaturated fatty acids in streptozotocin diabetic rats[J]. *Prostaglandins leukot essent fatty acids*, 2005, 73(5): 369-378.
- [25] FOUFELLE F, FERRÉ P. Mechanism of storage and synthesis of fatty acids and triglycerides in white adipocytes, in: *physiology and Physiopathology of Adipose tissue* [M]. Paris: Springer, 2012: 101-121.
- [26] PAVAGADHI S, NATERA S, ROESSNER U. Insights into lipidomic perturbations in zebrafish tissues upon exposure to microcystin-LR and microcystin-RR[J]. *Environmental science and technology*, 2013, 47(24): 14376-14384.
- [27] CHANG Y Y, CHOU C H, CHIU C H, et al. Preventive effects of taurine on development of hepatic steatosis induced by a high-fat/cholesterol dietary habit[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2011, 59(1): 450-457.
- [28] ANDERSON J L, CARTEN J D, FARBER S A. Zebrafish lipid metabolism: From mediating early patterning to the metabolism of dietary fat and cholesterol[J]. *Methods in cell biology*, 2011, 101: 111-141.
- [29] CHIANG J Y. Bile acids: Regulation of synthesis[J]. *Journal of lipid research*, 2009, 50(10): 1955-1966.
- [30] HOUTEN S M, WATANABE M, AUWERX J. Endocrine function of bile acids[J]. *EMBO journal*, 2006, 25(7): 1419-1425.
- [31] JIN X, JIA T, LIU R, et al. The antagonistic effect of selenium on cadmium induced apoptosis via PPAR- γ /PI3K/Akt pathway in chicken pancreas[J]. *Journal of hazardous materials*, 2018, 357(7): 355-362.
- [32] JANNA A, PATRICK A, DOV B, et al. PPAR α dependent regulation of vanin-1 mediates hepatic lipid metabolism[J]. *Journal of hepatology*, 2014, 61(2): 366-372.
- [33] KERSTEN S. Integrated physiology and systems biology of PPAR α [J]. *Molecular metabolism*, 2014, 3(4): 354-371.
- [34] SPIEGELMAN B M, FLIER J S. Obesity and the regulation of energy balance[J]. *Cell*, 2001, 104(4): 531-543.
- [35] RIBET C, MONTASTIER E, VALLE C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor control of lipid and glucose metabolism in human white adipocytes[J]. *Endocrinology*, 2010, 151(1): 123-133.
- [36] VEERKAMP J H, MAATMAN R G. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes[J]. *Progress in lipid research*, 1995, 34(1): 17-52.
- [37] HOTAMISLIGIL G S, BERNLOHR, D A. Metabolic functions of FABPs-mechanisms and therapeutic implications[J]. *Nature reviews endocrinology*, 2015, 11(10): 592-605.