

虹鳟 *HMGCR* 基因克隆及组织差异表达分析

陈路斯, 王震, 张剑伟, 张新党, 王恒志, 林贝贝, 邓君明\* (云南农业大学动物科学技术学院, 云南昆明 650201)

**摘要** [目的] 阐述虹鳟  $\beta$ -羟- $\beta$ -甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (*HMGCR*) 基因的 mRNA 序列, 并比较其在虹鳟不同组织器官中的表达差异。[方法] 通过 PCR 技术扩增虹鳟 *HMGCR* 基因的 mRNA 序列, 采用荧光定量 PCR 技术, 比较 *HMGCR* 基因在虹鳟肝脏、肠道、胃、心脏、鳃、脾脏、肾脏、肌肉 8 种组织器官中的表达差异。[结果] 虹鳟 *HMGCR* 基因的 mRNA 序列与大西洋鲑的同源性达 97%, 其蛋白序列与脊椎动物的同源性都在 70% 以上, 表明该基因在物种进化过程中比较保守; 该基因在虹鳟肝脏、肠道、胃、心脏、鳃、脾脏、肾脏、肌肉 8 种组织器官中均有表达; 其中, 该基因在肝脏和心脏中的表达量较高, 而在胃中的表达量最低。[结论] 该研究克隆出虹鳟胆固醇合成关键限速酶 *HMGCR* 的部分 mRNA 序列, 分析了该基因在不同组织中的表达情况, 为该酶的深入研究奠定基础。

**关键词** 虹鳟; HMG-CoA 还原酶; 基因克隆; 组织差异表达; 荧光定量 PCR

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2019)18-0095-05

**doi**: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.18.024



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Cloning and Tissue Differential Expression Analysis of *HMGCR* Gene in *Oncorhynchus mykiss*

CHEN Lu-si, WANG Zhen, ZHANG Jian-wei et al (College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201)

**Abstract** [Objective] The purpose of this study was to reveal the mRNA sequence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (*HMGCR*) and compare the gene expression levels in different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). [Method] The partial sequence of *HMGCR* gene was amplified by PCR technology and the gene expression differences among tissues such as liver, intestine, stomach, heart, gill, spleen, kidney and muscle were revealed by fluorescence quantitative PCR technology. [Result] The amino acid sequence shared 97% homology with *Salmo salar*, and the deduced protein sequence shared more than 70% homology with vertebrate, indicating that the gene was more conservative in the process of species evolution. The gene expression could be detected in the liver, intestines, stomach, heart, gill spleen, kidney and muscle of rainbow trout. The expression level of *HMGCR* gene in liver and heart was the highest, whereas which was the lowest in the stomach. [Conclusion] We cloned the partial RNA sequence of *HMGCR*, a key rate-limiting enzyme for cholesterol synthesis in rainbow trout, and analyzed the expression of *HMGCR* in different tissues, which laid a foundation for further study of the enzyme.

**Key words** *Oncorhynchus mykiss*; *HMGCR*; Gene cloning; Tissue differential expression; Real-time PCR

胆固醇是一种以环戊烷多氢菲为母体的固醇类衍生物, 主要以游离胆固醇和胆固醇酯的形式存在于动物组织细胞中。胆固醇不仅是构成生物膜的重要成分, 同时也是生物体内合成多种类固醇激素与维生素 D 的前体, 还可以作为胆汁酸生物合成的原料<sup>[1-3]</sup>。然而, 不同动物合成胆固醇的能力存在显著差异, 虾蟹等甲壳动物不具备自身合成胆固醇的能力<sup>[4-5]</sup>, 其体内胆固醇必须从外界摄取; 大部分脊椎动物体内胆固醇主要来自于组织细胞的自身合成<sup>[6]</sup>。胆固醇合成可分为 3 个阶段: 碳单位甲羟戊酸合成、鲨烯合成、胆固醇生成<sup>[7]</sup>。乙酰 CoA 是胆固醇合成的直接原料, 主要来自于葡萄糖、脂肪以及某些氨基酸的代谢, 其中 TCA 循环是直接供给途径<sup>[8]</sup>。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原生成甲羟戊酸是胆固醇合成的限速步骤, 其中催化 HMG-CoA 发生还原反应的  $\beta$ -羟- $\beta$ -甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (*HMGCR*) 是这一步骤的关键酶, 也是内源性合成胆固醇的关键限速酶<sup>[9]</sup>, 其活性将直接影响着胆固醇的合成速度。

*HMGCR* 基因表达与酶活性受激素水平的调控<sup>[10]</sup>。试验表明, 甲状腺激素<sup>[11]</sup>、胰岛素<sup>[12]</sup>可以提高 *HMGCR* 基因的转录水平, 而胰高血糖素则会降低该基因的转录<sup>[13]</sup>。糖皮质激素和雌激素通过影响 *HMGCR* 的稳定性来调节胆固醇

的合成量<sup>[6]</sup>。*HMGCR* 酶活性除受到激素影响外, 还受自身胆固醇含量的反馈调节<sup>[14]</sup>。当细胞中胆固醇含量较高时, 会抑制该酶活性, 从而减少内源性胆固醇生成量。过高胆固醇含量也会加快该酶的降解, 使细胞内胆固醇含量达到平衡, 这种降解反应依赖于跨膜区的泛素蛋白酶途径<sup>[15]</sup>。与此相反, 当细胞中胆固醇含量较低时, 该酶活性就会被激活, 从而促进内源性胆固醇生成。体外试验表明, 胆固醇能在转录水平上调节 *HMGCR*<sup>[15]</sup>, 当细胞中胆固醇含量较低时, 内质网上的 SCAP/SREBP 复合物在 SCAP 护送下进入高尔基体复合体, 在位点 1 蛋白酶和位点 2 蛋白酶的作用下, 该复合物释放 SREBP 前体, SREBP 进入细胞核中, 并与固醇反应元件结合, 从而促进 *HMGCR* 基因的转录; 当细胞中胆固醇含量较高时, SREBP 只能停留在内质网上, 无法进入细胞核中, 同时那些已经进入到细胞核中的 SREBP 也会被分解, 无法与固醇反应元件结合, 从而阻止 *HMGCR* 基因的转录<sup>[16-17]</sup>。研究表明, 不同动物的调节方式可能不同, 有些是在翻译水平上调节(如大鼠), 有些则是在转录水平上调节(如仓鼠和小鼠)<sup>[17]</sup>。

大量研究表明, 胆固醇合成代谢与鱼类健康有着密切关系<sup>[1]</sup>。*HMGCR* 作为合成内源性胆固醇的关键限速酶, 越来越引起人们的关注。目前, 人、鼠、鸡、鸭、鹅等陆生动物以及斑马鱼、草鱼等水生动物 *HMGCR* 基因序列已被成功克隆<sup>[18-19]</sup>。该研究应用 PCR 方法克隆出虹鳟胆固醇合成关键限速酶 *HMGCR* 的部分 mRNA 序列, 旨在为该酶的深入研究

**基金项目** 国家自然科学基金项目(31460693, 31760761); 云南省应用基础研究重点项目(2018FA018)。

**作者简介** 陈路斯(1994—), 女, 浙江舟山人, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物营养。\* 通信作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事水产动物营养研究。

**收稿日期** 2019-03-17

奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 试验用虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 来自当年人工培育的同一批苗种, 同种饲料饲喂。随机选取 3 条规格一致 (80 g 左右) 虹鳟, 于超净工作台中采集肝脏 (Hep)、肠道 (Int)、胃 (Sto)、脾脏 (Spl)、肾脏 (Kid)、肌肉 (Mus)、鳃 (Gil)、心脏 (Hea) 8 种组织, 装入用 0.1% DEPC 水溶液预处理过的冻存管中, 快速投入液氮中, 保存备用。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 RNA 提取及反转录。** 使用 RNA 提取试剂 (Trizol Reagent) 提取总 RNA。试验过程中应严格防止 RNase 污染。采用 1.0% 琼脂糖电泳检测其完整性, Nano Vue 微量紫外分光光度计检测浓度和纯度。为除去总 RNA 中所掺杂的基因组 DNA, 取 1  $\mu$ L 总 RNA, 加入 2  $\mu$ L 5 $\times$ DNA Eraser Buffer, 用 RNase Free dH<sub>2</sub>O 补足至反应体系为 10  $\mu$ L, 42  $^{\circ}$ C 下反应 2 min 后置于 4  $^{\circ}$ C 中保存。取 10  $\mu$ L 上述反应液, 加入 4  $\mu$ L 5 $\times$ Prime script buffer、1  $\mu$ L Prime Script RT Enzyme Mix 和 1  $\mu$ L RT primer Mix, 用 RNase Free dH<sub>2</sub>O 补足反应体系至 20  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 下反转录 15 min, 合成 cDNA, 85  $^{\circ}$ C 下反应 5 s 后于 4  $^{\circ}$ C 条件下保存。

**1.2.2 简并引物的 PCR 扩增及产物测序。** 根据 NCBI 网站 GenBank 数据库中大西洋鲑 (*Salmo salar*) (NP001167390.1)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) (AE044579.1)、欧洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*) (AAR02862.2) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) (AAI55136.1) 4 个物种的核酸序列, 利用引物在线设计软件 CODEHOP (<http://blocks.fhrc.org/codehop.html>) 设计简并引物。经 Blast 比对后, 挑选简并度较低的引物送交上海生工生物工程股份有限公司进行合成。以 HMGC-R-U<sub>1</sub> 和 HMGC-R-D<sub>1</sub> 为引物 (表 1), 进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用胶回收试剂盒 (Gel Extraction UF Kit) 进行切胶回收。取纯化后的 PCR 产物送至上海生工生物工程股份有限公司进行测序。将扩增到的序列在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对, 并对其序列进行生物信息学分析。根据简并引物 PCR 扩增到的片段在 NCBI 网站中的 Blastn 比对结果, 得到第一段 mRNA 序列。参考大西洋鲑 mRNA 序列, 设计同源引物 HMGC-R-F<sub>1</sub> 和 HMGC-R-R<sub>1</sub> (表 1), 进行 PCR 扩增取纯化后 PCR 产物送至深圳华大基因进行测序。将得到的结果在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对, 得到第 2 段 mRNA 序列。借助 DNASTAR Lasergene7 生物软件, 对所得 2 个片段进行合并, 并对合并后的片段进行生物信息学分析。

**1.2.3 各组织 HMGC-R 表达量的测定。** 利用 Trizol (Invitrogen) 法提取虹鳟肝脏 (Hep)、肠道 (Int)、胃 (Sto)、脾脏 (Spl)、肾脏 (Kid)、肌肉 (Mus)、鳃 (Gil)、心脏 (Hea) 8 种组织总 RNA, 按照反转录试剂盒说明书进行反转录, 获得 cDNA 第一模板链, 作为荧光定量 PCR 模板, 根据已获得的 HMGC-R 基因序列, 借助生物软件 DNASTAR Lasergene7 PrimerSelect 设计并筛选 HMGC-R SYBR Green II 实时荧光实时定量 PCR

引物, 以  $\beta$ -actin 为内参, 进行相对定量 (表 2)。荧光定量 PCR 采用 SYBR Green II 嵌合荧光法, 所用试剂为 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Perfect Real Time, TaKaRa, 日本), 反应在 Thermal cycler (Mastercycler ep realplex, Eppendorf, 德国) 仪器中进行。PCR 反应体系 (20  $\mu$ L): SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 10  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L, 上下游特异性引物 (10 mmol/L) 各 1  $\mu$ L, DEPC-H<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。荧光定量 PCR 反应程序如下: 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 40 个循环; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 60 s, 95  $^{\circ}$ C 15 s。以  $\beta$ -actin 为内参, 其中内参基因的退火温度为 60  $^{\circ}$ C。每个组织设 3 个平行组, 基因相对 mRNA 水平采用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法检测。所有试验数据均以平均值  $\pm$  标准误表示。采用单因素方差分析 (ANOVA), 当各处理组间存在显著差异 ( $P < 0.05$ ) 时, 采用 Duncan's 检验进行多重比较分析。数据统计与分析均使用 SPSS 17.0 统计软件进行。

表 1 HMGC-R 简并引物

Table 1 The degenerate primers of HMGC-R

引物名称 Primer name	引物用途 Primer purpose	引物序列 (5'—3') Primer sequence
HMGC-R-U <sub>1</sub>	同源克隆	GGCTGGAACCTTYGRNTGYCCNA
HMGC-R-D <sub>1</sub>	同源克隆	GACCTGTCCAARGCNTGYRC
HMGC-R-F <sub>1</sub>	同源引物	AGTTGGGGCGCTCGTTTCTTAG
HMGC-R-R <sub>1</sub>	同源引物	GTCTGCCCACTGCCTGCTCTGT

注: R=A/G, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, W=A/T, D=A/G/T, N=A/C/G/T

表 2 虹鳟荧光定量引物

Table 2 Real-time PCR primers for *O. mykiss*

引物名称 Primer name	引物用途 Primer purpose	引物序列 (5'—3') Primer sequence
HMGC-R-F	荧光定量	GCTACATGCCGTGCCAGTG
HMGC-R-R	荧光定量	ACCCCGCGTCATACCGTCAGC
$\beta$ -actin-F	荧光定量	GCTCTGCCCCAGCCATCCT
$\beta$ -actin-R	荧光定量	CGGTGCCCATCTCTGCTCAAAG

## 2 结果与分析

**2.1 HMGC-R 基因部分序列克隆和蛋白结构预测** 使用简并引物 PCR 扩增虹鳟 HMGC-R mRNA 部分序列, 经测序得到 651 bp 片段。经 NCBI 网站中 Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 比对分析, 所得片段序列与其同源物种大西洋鲑 (登录号为 NM001173919.1) 的核苷酸序列相似度达 97%。因此, 参考大西洋鲑 mRNA 序列设计同源引物后进行 PCR 扩增, 得到 651 bp 大小的序列, 使用 Lasergene 7.0 中 SeqMan 拼接后得到 1 226 bp 的 mRNA 序列。分析发现, 该片段对应 408 个氨基酸 (图 1)。

**2.2 HMGC-R 氨基酸序列同源性及系统进化树分析** 通过 Clustalx2.1 和 MEGA6.06 生物信息学软件将虹鳟 HMGC-R 的氨基酸序列和小丑鱼 (XP023142348)、大菱鲆 (AE044579)、北极红点鲑 (XP023840019)、大西洋鲑 (NP001167390)、黄鳍 (XP020469222)、高体鲷 (XP018940342)、墨西哥脂鲤 (XP007243979)、斑马鱼 (AAI17623)、稀有鮰鲫 (AHI87056)、鞍带石斑鱼 (XP023799207) 等多种鱼类的氨基酸序列进行对

比(图 2、图 3)。由图 2 可知,虹鳟与大西洋鲑(NP001167390)和北极红点鲑(XP023840019)同源性最高,遗传距离最小;与黄鳝和高体鳊具有较高的同源性;虹鳟与小丑鱼、大菱鲂等的遗传距离相对较远。

1	CCATGCCACAGTCGTGGTGTGTCAGAGCAGCCAGGTCAGAACCGGACAGTCGTTGGCGCC
1	H A H S R L V S E Q P G Q N R T V V G A
62	AGCAGTAGTCTAGCTCTCGATGGGCTACAGTCCAGAGGATGACCAAGACTACACTCTCTGG
21	S S S L A L D G P T V Q R M D Q D Y T L W
125	CCGATACCGCTCACCAGTATGGAGCTGGAGCAGGTGATAACCCCTGGGCTCTGGCTCTGCTGTG
42	P I P L T S M E L E Q V I T L G L A L L L
188	GCTGTGAAGTACGCTCTCTTGGCCGGTGGAGCAGAGTTCCTCAAGAGGCCACTCTCC
63	A V K Y V F F E P V E T E L S L K S P I S
251	ACCTCCATCTCCGCCCTGCACTGAGCCATAAGGGGGTGGAGGACTGCTCAGGAGGATCCT
84	T S I S A P A L S H K G A E D C C R R D P
314	GCACCTGCTAAAACATCCCTGACAACCAACGACGCCAACCCCTTGGCTAAAAGTACTTCT
105	A P A K T S L T I N S T P N P L A K I D S
377	AACATAGCAGCCAAAGAGGAAAGGTTGAGGGTATCAACCCCTGGTGGCTCAATGTCGAG
126	N I A A K E R V E V I Q P L V A S M L Q
440	AACGGTTCCTCTCTGAAATGGACCTCCCTCAGAGTGTAGGGGACAGTGTGTCCCCCA
147	N G S F S L N G P L P Q S L G D S V C P P
503	CCTCTTCTTTTACCCCACTCAGACAACTACGCTCTCCCAACCCCTCCAGCC
168	P P F F T P T D T T T S L P N P P S Q P
366	CGCTCACTGGCAGGTGCTGTGCATCCTCAGAAACCCCTGAGTTGGGGCTCTGTTTCTTACG
189	R S L D Q C L S I L R N P E L G A R F L S
629	AATGCCGAGGTGAGGCTGGTGCATCAGCAACATCCTGACTTATAAGCTGGAAGGCTGTC
210	N A E V M E L V T S R N I L T Y K L E A V
692	ATGGAAACACAGAGAGGGCGTGTTCATCCGGAGAGAGATGCTATCCTCAAACTACCATA
231	M E T P E R G V V I R R E M L S S K L P S
755	CCCTCTGCCTGGCTGTCTCTTCAAGGACTATGACTACACTAAGGTATGGCCACTGTC
252	P S A L A C L P Y K D Y D Y T K V M G T C
818	TGTGAGAACGTCATTGGCTACATGCCCGTGCAGTGGGAGTTGCTGGCCCTCTCTATTGGAT
273	C E N V I G Y M P V P V G V A G P L L L D
881	GGGAGCAGTTCATGTCATGCCATGGCAACGACGGAAGCTGCTGTGGCCAGCACAAACAGA
394	G K Q F H V P M A T T E G C C L V A S T N R
944	GGATGCCGGGCCATCGCTTTGAGTGGCGGTGCGACAGCAGGGTGTAGCTGACGGTATGACC
315	G C R A I A L S G G C S S R V L A D G M T
1007	CGGGCTCTGTTGACCGCTGCCTCAGCGTCCCGGCTGTAGAGGTCAAGACCTGGCTGGAG
336	R G P V V R L P S A C R A V E V K T W L E
1070	ACCACAGAGGGCTCAGGACCTCAAGGATGCCCTTGAACCAACAGCAGGTTGGCCGTG
357	T T E G F R T I K D A F D H T S R F A R L
1133	GACAAGCTATTGGTAGGTGTAGCAGGGAGGAACCTACATCCGCTTCCAGTCCCACTGGA
378	D K L L V G L A G R N L Y I R F Q S H T G
1196	GACCCATGGGCATGAACATGCTCTCAAG
399	D A M G M N M L S K

图 1 虹鳟 *HMGCR* 基因 mRNA 和相应氨基酸序列

Fig.1 mRNA and amino acid sequence of *HMGCR* gene in *O. mykiss*

**2.3 *HMGCR* mRNA 组织差异表达** 荧光定量 PCR 分析结果显示,*HMGCR* 基因在虹鳟肝脏、肠道、胃、脾脏、肾脏、肌肉、鳃和心脏组织中均能表达。由图 4 可知,*HMGCR* 的 mRNA 表达量在心脏中最高,其次是肝脏。*HMGCR* 在心脏、肝脏、脾脏和肠道中的 mRNA 表达量显著高于胃、肌肉和鳃 ( $P < 0.05$ );*HMGCR* 在胃中的 mRNA 表达量最低。

### 3 讨论

该研究通过设计简并引物并经过 PCR 扩增获得了虹鳟 *HMGCR* 基因的部分序列,并且分析了该基因在虹鳟不同组织中的表达情况。结果表明,虹鳟 *HMGCR* 基因具有高度保守性,与大西洋鲑、北极红点鲑同源性分别达到 97% 和 95%,表明该基因在硬骨鱼类生命活动中起着不可替代的重要作用。该试验结果与甘玲<sup>[20]</sup>比较猪、牛、鸡、褐家鼠、小家鼠、人和猩猩 *HMGCR* 基因氨基酸序列结果相似,发现该基因在不同物种之间的同源性较高。该研究采用实时荧光定量 PCR 技术对 *HMGCR* 基因在虹鳟不同组织中的表达进行研究,结果发现 *HMGCR* 基因在虹鳟 8 种组织中均能表达,但是存在时空差异;其中,*HMGCR* 基因在心脏中的 mRNA 表达量最高,在胃中表达量最低;*HMGCR* 基因在肝脏的 mRNA 表达量仅次于心脏;*HMGCR* 基因在肠道、肾脏和鳃中的 mRNA 表达量显著低于肝脏和心脏,高于肌肉、脾脏和胃。

胆固醇的内源性合成是机体内胆固醇的主要来源,几乎所有的组织细胞都可以合成胆固醇,肝脏和小肠是机体胆固醇合成的主要场所,前者的合成量占体内胆固醇总量的 70%~80%,后者占体内胆固醇总量的 10%<sup>[21]</sup>。该研究发现 *HMGCR* 基因在虹鳟的不同组织中表达,但表达能力存在一定的差异,该结果证实了以上观点。该试验结果发现,虹鳟 *HMGCR* 在肝脏中的 mRNA 表达量水平较高,这为肝脏是胆固醇合成的主要场所提供了证据。肝脏不仅是鱼类重要的代谢和解毒器官,而且是合成胆固醇、胆汁酸的主要场所<sup>[22]</sup>。肝脏利用胆固醇合成胆汁,促进肠道对体外胆固醇的消化吸收,其次还可以通过调控关键限速酶 *HMGCR* 基因的表达来调节细胞内胆固醇的生物合成,其中固醇调节元件 SREBP2 能激活 *HMGCR* 的转录<sup>[23]</sup>。试验发现虹鳟心脏中 *HMGCR* 含量也处于较高水平,与王晓凤<sup>[24]</sup>在猪中获得 *HMGCR* 基因的组织差异性表达具有相似结论。与磷脂一样,胆固醇是细胞膜的重要组成部分,细胞中绝大部分的胆固醇分布于细胞膜上。组成细胞膜的胆固醇主要来源于细胞的自生合成,同时细胞通过细胞膜将过量的胆固醇排出细胞外,从而使细胞膜胆固醇处于严格的动态平衡中<sup>[25-26]</sup>。胆固醇在细胞膜中能使细胞膜在较大温度变化时保持相对稳定,维持最适合细胞膜功能发挥的半流动状态,继而维持细

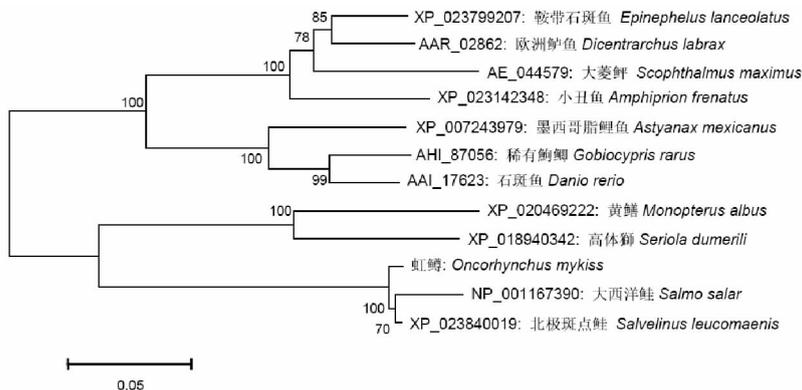


图 2 虹鳟 *HMGCR* 基因系统发生进化树分析

Fig.2 Phylogenetic tree of *HMGCR* gene of *O. mykiss* based on nucleotide sequences

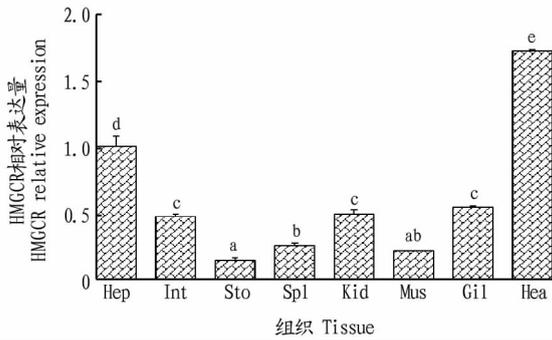


图3 虹鲟与其他物种 HMGR 氨基酸序列比较

Fig.3 The amino acid sequence alignment of HMGR between *O. mykiss* and other species

胞膜的流动性和功能性。有关哺乳动物的研究表明,细胞膜中胆固醇含量越高,细胞膜流动性越低,硬度越大,脆性越强,导致细胞膜易受到损伤,对外界环境耐受性更差<sup>[27]</sup>。根

据该试验研究结果推测,虹鲟心脏胆固醇含量高导致了虹鲟对不良环境耐受性较差。该研究结果表明在肠道、胃、脾脏、肾脏、肌肉、鳃中都发现有 *HMGR* 基因的表达,且虹鲟



注:不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different small letters indicated significant differences ( $P<0.05$ )

图4 虹鳟不同组织 *HMGCR* 的 mRNA 表达量比较

Fig.4 Comparison of mRNA expression levels of *HMGCR* in different tissues of *O. mykiss*

*HMGCR* 高表达于肝脏、心脏和肾脏,中等表达于肠道、肾脏等器官,在其余组织中表达量较低。该试验结果与在鸡、猪等研究结果一致<sup>[7,24]</sup>。由于该试验只涉及了 *HMGCR* 基因转录水平上的表达,且不同组织间 *HMGCR* 的 mRNA 表达量存在显著差异,因此无法对该现象做出深入解释,具体机理需进一步研究。

#### 4 结论

(1) 通过 PCR 技术获得了虹鳟  $\beta$ -羟- $\beta$ -甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (*HMGCR*) 基因的 mRNA 序列,并采用荧光定量 PCR 技术,验证 *HMGCR* 基因在虹鳟肝脏、肠道、胃、脾脏、肾脏、肌肉、鳃和心脏组织中均能表达,且在心脏中的表达量最高,在胃中的表达量最低。

(2) 虹鳟 *HMGCR* 蛋白与其他鱼类的 *HMGCR* 蛋白具有较高的同源性,说明该基因具有较高的保守性,对于硬骨鱼类生命活动具有重要的意义。

#### 参考文献

[1] 黄雨薇,叶土土,蔡春芳,等.氧化鱼油对草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 肝胰脏、肠道胆固醇、胆汁酸合成代谢的影响[J].基因组学与应用生物学,2015,34(8):1636-1646.

[2] SHEEN S S. Dietary cholesterol requirement of juvenile mud crab *Scylla serrata* [J]. *Aquaculture*, 2000, 189(3): 277-285.

[3] KLEWER S A, MOORE J T, WADE L, et al. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway [J]. *Cell*, 1998, 92(1): 73-82.

[4] 汪留全,李海洋,胡王,等.饲料中胆固醇水平对幼蟹生长和饲料利用率影响的研究[J].淡水渔业,2004,34(1):13-15.

[5] 温小波,陈立侨.磷脂和胆固醇在虾蟹类营养中的研究进展[J].淡水渔业,2000,30(5):25-27.

[6] 安光全.鸡 *HMGCR* 基因多态性与血清 VLDL 浓度和繁殖性状的关联研究[D].雅安:四川农业大学,2010:1-5.

[7] 魏杨.鸡 *HMGCR* 基因多态性及其与经济性状相关性研究[D].郑州:河南农业大学,2012:4-6.

[8] 从日华.品种和母猪日粮蛋白水平对仔猪肝脏胆固醇代谢的影响及其机制[D].南京:南京农业大学,2011:2-4.

[9] 黄雨薇.氧化鱼油、丙二醛对草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 肝胰脏、肠道胆固醇、胆汁酸合成代谢的影响[D].苏州:苏州大学,2015:2-4.

[10] NESS G C, WIGGINS L, ZHAO Z H. Insulin increases hepatic 3-hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA and immunoreactive protein levels in diabetic rats [J]. *Archives of biochemistry & biophysics*, 1994, 309(1): 193-194.

[11] LATOUR M A, PEEBLES E D, DOYLE S M, et al. Broiler breeder age and dietary fat influence the yolk fatty acid profiles of fresh eggs and newly hatched chicks [J]. *Poult Science*, 1998, 77(1): 47-53.

[12] NESS G C, LOPEZ D, CHAMBERS C M, et al. Effects of L-triiodothyronine and the thyromimetic L-94901 on serum lipoprotein levels and hepatic low-density lipoprotein receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and apo A-I gene expression [J]. *Biochemical pharmacology*, 1998, 56(1): 121-129.

[13] 李平华,黄阳,贺丽春,等.不同来源油脂及剂量对仔猪生长性能和血清脂质指标以及肝脏胆固醇代谢的影响[J].南京农业大学学报,2017,40(4):710-717.

[14] PLAT J, MENSINK R P. Relationship of genetic variation in genes encoding apolipoprotein A-IV, scavenger receptor BI, HMG-CoA reductase, CETP and apolipoprotein E with cholesterol metabolism and the response to plant stanol ester consumption [J]. *European journal of clinical investigation*, 2015, 32(4): 242-250.

[15] SONG B L, DEBOSEBOYD R A. Ubiquitination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in permeabilized cells mediated by cytosolic E1 and a putative membrane-bound ubiquitin ligase [J]. *Journal of biological chemistry*, 2004, 279(27): 28798-28799.

[16] 魏健,江路易,宋保亮.胆固醇的内源合成与小肠吸收[J].生命科学,2015,27(7):847-858.

[17] NESS G C, HOLLAND R C. Degradation of HMG-CoA reductase in rat liver is cholesterol and ubiquitin independent [J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(14): 3126-3130.

[18] DUCKWORTH P F, VLAHCEVIC Z R, STUDER E J, et al. Effect of hydrophobic bile acids on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity and mRNA levels in the rat [J]. *Journal of biological chemistry*, 1991, 266(15): 9413-9414.

[19] BAKKER-ARKEMA R G, DAVIDSON M H, GOLDSTEIN R J, et al. Efficacy and safety of a new HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, in patients with hypertriglyceridemia [J]. *Jama the journal of the American medical association*, 1996, 275(2): 128-133.

[20] 甘玲. 畜禽胆固醇合成关键酶 HMGCR 的生物信息学分析 [J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(7): 5-8.

[21] 邹思湘. 动物生物化学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 201-205.

[22] 黄艳玲, 罗绪刚. 饲料脂肪酸会对脂肪代谢酶有关基因表达的影响 [J]. 动物营养学报, 2005, 17(4): 1-5.

[23] 郭晓强, 郭振清. SREBP 介导的胆固醇生物合成反馈调节 [J]. 生命的化学, 2007, 27(4): 292-293.

[24] 王晓凤. 猪 *HMGCR* 基因的克隆、表达、染色体定位及多态性分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2006: 90-91.

[25] LANGE Y, STECK T L, YE J, et al. Regulation of fibroblast mitochondrial 27-hydroxycholesterol production by active plasma membrane cholesterol [J]. *Journal of lipid research*, 2009, 50: 1881-1888.

[26] 张燕萍, 钟杰, 周秋白, 等. 黄鳝 *PLA2* 基因的克隆及表达分析 [J]. 淡水渔业, 2017, 47(3): 16-24.

[27] LANGE Y, YE J, STECK T L. Activation of membrane cholesterol by displacement from phospholipids [J]. *Journal of biological chemistry*, 2005, 280: 36126-36131.