

蔡润佳, 张静, 黄建盛, 等. 低温胁迫对军曹鱼幼鱼脂代谢相关基因表达的影响[J]. 海洋学报, 2021, 43(11): 116–122, doi:10.12284/hyxb2021122

Cai Runjia, Zhang Jing, Huang Jiansheng, et al. Effects of low temperature stress on the expression of genes related to lipid metabolism of juvenile cobia, *Rachycentron canadum* [J]. Haiyang Xuebao, 2021, 43(11): 116–122, doi:10.12284/hyxb2021122

低温胁迫对军曹鱼幼鱼脂代谢相关基因表达的影响

蔡润佳^{1,2}, 张静^{1,2}, 黄建盛¹, 施钢¹, 潘传豪¹, 谢瑞涛¹,
陈刚¹, 张健东¹, 王忠良¹, 汤保贵^{1,2,3*}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东湛江 524088; 2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江), 广东湛江 524025; 3. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东湛江 524088)

摘要: 将两组军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 幼鱼分别在常温 (30.5±1.0)°C 和低温 (20.0±0.5)°C 环境下饲养 7 d, 并于第 1 天、第 4 天、第 7 天 3 个时间点采集肝脏、肌肉和腹腔脂肪, 利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 技术分析 5 个脂代谢相关基因的表达变化情况, 以探究低温胁迫对军曹鱼脂质合成与分解代谢的影响。结果显示, 第 1 天时, 肝脏的肉碱脂酰基转移酶-1 基因 (*cpt-1*)、脂肪激素敏感脂肪酶基因 (*hsl*) 以及肌肉的 *cpt-1*、*hsl*、单酰基甘油酯酶基因 (*mgl*) 等显著上调 ($p<0.05$), 肝脏、肌肉的乙酰辅酶 A 羧化酶基因 (*acc*) 和脂肪酸合成酶基因 (*fas*) 以及腹腔脂肪 (IPF) 5 个脂代谢相关基因表达均显著下调 ($p<0.05$); 第 4 天时, 肝脏的 *cpt-1*、*hsl*、*mgl* 和肌肉的 *hsl*、*mgl*、*acc*、*fas* 以及 IPF 的 *cpt-1*、*hsl*、*mgl*、*acc* 等表达上调 ($p<0.05$), 肝脏的 *acc*、*fas* 表达显著下调 ($p<0.05$); 第 7 天时, 肝脏和 IPF 的 *cpt-1*、*hsl*、*mgl*、*acc* 和肌肉的 *hsl*、*mgl*、*acc* 等表达上调 ($p<0.05$), 肌肉 *cpt-1* 和肝脏 *fas* 表达显著下调 ($p<0.05$)。结果表明, 军曹鱼幼鱼在低温胁迫前期通过抑制脂合成代谢, 促进肝脏和肌肉中的脂质水解, 通过抑制腹腔脂肪的脂质分解来响应低温胁迫; 在低温胁迫后期, 军曹鱼幼鱼脂合成和分解代谢均显著提高, 且利用脂肪酸提供能量的主要组织由前期的肝脏和肌肉转变为肝脏和腹腔脂肪。

关键词: 低温胁迫; 脂代谢; 基因表达; 军曹鱼; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S965.399

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2021)11-0116-07

1 引言

水温是鱼类最重要的环境因子之一, 对鱼类的分布、生存具有决定作用, 而当水温低于适宜温度范围时, 会深刻影响着鱼类的免疫^[1]、发育^[2]、生长^[3]等各种生命活动。目前的研究^[4-6]表明, 鱼类脂代谢活动也受到低温的影响, 低温胁迫会导致鱼体脂代谢相关指标产生变化。目前关于低温胁迫对鱼类脂代谢相关基因的研究在多个物种上已有报道, 如低温胁迫会

降低斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 肝脏 *cpt-1*、*scd-1* 和 *fabp10* 的相对表达量^[7]; 方玲玲^[8] 研究发现, 低水温对卵形鲳鲆 (*Trachinotus ovatus*) 肌肉 *ppara* 和 *cpt-1* 基因的表达具有诱导作用; Mininni 等^[9] 对低温胁迫下的金头鲷 (*Sparus aurata*) 应用转录组测序发现, 肝脏中大量脂代谢相关基因参与了对低温的响应。可见低温胁迫对鱼类脂代谢相关基因的表达具有较大的影响, 也暗示脂代谢调节可能是鱼类应对低温胁迫的重要途径。

收稿日期: 2021-01-01; 修订日期: 2021-03-30。

基金项目: 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江)项目(ZJW-2019-06); 湛江市海洋经济创新发展示范项目(XM-202008-03); 国家海水鱼产业技术体系项目(CARS-47-G08)。

作者简介: 蔡润佳(1995—), 男, 广东省汕头市人, 研究方向为水产经济动物生物学。E-mail: 906636294@qq.com

* 通信作者: 汤保贵(1975—), 博士, 副教授, 主要研究方向为鱼类养殖与遗传育种。E-mail: zjtbq@163.com

鱼类脂肪合成代谢中, 乙酰辅酶 A 作为底物经过乙酰辅酶 A 羧化酶 (Acetyl-CoA Carboxylase, ACC) 的催化后产生丙二酰辅酶 A, 丙二酰辅酶 A 被脂肪酸合成酶 (Fatty Acid Synthase, FAS) 多次催化后产生饱和脂肪酸, 鱼体可以此为原料进一步合成机体所需的各种脂肪酸^[10]。脂肪分解代谢主要包括甘油三酯的水解和细胞内 β -氧化等步骤, 甘油三酯水解是指甘油三酯被脂肪激素敏感脂肪酶 (Hormone Sensitive Lipase, HSL)、单酰基甘油酯酶 (Monoacylglycerol Lipase, MGL) 等催化生成甘油二酯、甘油一酯和游离脂肪酸的过程^[11-13]。胞内 β -氧化主要发生在线粒体上^[14], 借助脂酰肉碱转移系统中的酶催化长链脂酰 CoA, 而肉碱脂酰基转移酶-1 (Carnitine palmitoyl Transferase-1, CPT-1) 对线粒体 β -氧化的速度起着决定作用^[10]。

军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 属于暖水性鱼类, 适宜温度范围为 21~31℃, 在两广海域养殖常遭受寒潮等极端天气下的低温胁迫。温度会影响军曹鱼的生长、抗氧化酶活性等^[15-16], 但未见与脂代谢关系方面的研究。鱼类的脂肪主要储存在肝脏、肌肉、腹腔和皮下组织等 4 个部位^[17], 在军曹鱼中则主要分布在肝脏、肌肉和腹腔。本研究采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法对比分析军曹鱼幼鱼脂代谢相关基因在不同温度 (低温和常温)、时间 (第 1 天、第 4 天、第 7 天) 及组织 (肌肉、肝脏和腹腔脂肪) 的表达变化情况, 为进一步分析军曹鱼脂代谢的分子机制提供参考。

2 材料和方法

2.1 实验动物与管理

将 90 尾军曹鱼幼鱼 [体重 (211.17±9.51) g] 平均放养在 6 个 300 L 的养殖桶中, 每天饱食投喂两次 (08:00 和 16:00), 暂养 5 d 后开始正式实验。常温对照组水温为 (30.5±1.0)℃, 低温实验组采用密封瓶装冰块按照 0.5℃/h 匀速降温至 (20.0±0.5)℃, 实验期间静水养殖且每天更换 50% 等温新鲜海水。预实验过程中发现军曹鱼幼鱼在 20℃ 时完全无食欲, 为避免残余饲料污染水质, 故低温组不投喂, 对照组保持每天两次正常喂食。实验组和对照组均不间断充气, 维持溶氧在 5 mg/L、pH 为 7.4~7.8; 每隔 30 min 检测 1 次水温, 每天使用水质检测试剂盒监测水质, 维持对照组和低温组除温度外的水环境因子一致且保持有害物质浓度处于较低水平 (氨氮小于 0.02 mg/L、亚硝酸盐小于 0.01 mg/L)。

2.2 样品采集

预试验结果显示, 军曹鱼在 20℃ 的低温条件下

半致死时间为 7 d, 所以正式实验时长设置为 7 d。在第 1 天、第 4 天、第 7 天时分别采集低温胁迫组和常温对照组样品, 将每桶 3 尾鱼的组织样品混合成一管, 以同个水温中 3 个桶的样品作为 3 个生物学重复进行检测。采用丁香酚麻醉后取肌肉、肝脏和腹腔脂肪放入液氮速冻, 再转移至 -80℃ 冰箱中保存待测。

2.3 总 RNA 提取与反转录

将样品放置于装有少量液氮的研钵中研碎至粉末状, 然后按照 RNA 提取试剂盒 (TransZOL Up Plus RNA Kit, 北京全式金生物技术有限公司) 说明书进行总 RNA 的提取, 提取后采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验提取的 RNA 条带以及使用超微量核酸蛋白检测仪对 RNA 的纯度和浓度进行检测。取 1 μ L 总 RNA 为反转录的模板按照反转录试剂盒 (EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix, 北京全式金生物技术有限公司) 说明书合成第一链 cDNA。

2.4 引物设计

从军曹鱼已有转录组数据 (未发表) 中查找各个目标基因及内参基因 β -actin 基因序列, 使用 Primer 5.0 软件设计各个基因的上、下游引物序列, 引物由上海生工生物股份有限公司合成。引物经过验证确保特异性, PCR 结果无二聚体和非特异性扩增后作为正式实验引物。本实验所用引物序列如表 1 所示, 其中 *acc*、*fas*、*hsl*、*cpt-1* 和 *mgl* 为目标基因, β -actin 为内参基因。

2.5 基因表达量检测

采用荧光定量试剂盒 (PerfectStart Green qPCR SuperMix, 北京全式金生物技术有限公司) 对肝脏、肌肉和腹腔脂肪等组织进行检测, 将 5 个基因测得的 Ct 值按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[18] 计算相对表达量。10 μ L 反应体系包括 ddH₂O 3.5 μ L、上下游引物各 0.5 μ L、cDNA (100 ng/ μ L) 0.5 μ L、SYBR Green Supermix 5 μ L。PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 30 s; 94℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 15 s, 72℃ 延伸 10 s, 循环 40 次; 72℃ 延伸 5 min。分析溶解曲线确保扩增结果为单 PCR 产物。每个样本重复 3 次。

2.6 统计分析

实验数据采用平均值±标准差 (Mean±SD) 表示, 采用 SPSS 19.0 软件的 *T* 检验对相同时间点的对照组和低温组数据进行差异分析。分析结果默认当 $p < 0.05$ 时为差异显著, $p < 0.01$ 时为差异极显著。

3 结果

3.1 低温胁迫下军曹鱼脂分解相关基因表达

军曹鱼幼鱼在低温胁迫第 1 天、第 4 天和第 7 天

表 1 本实验引物序列
Table 1 The primers used in the experiment

引物名称	序列(5'-3')	用途
<i>acc</i> -F	TCGCCAGTCTCCCAACTCCTAT	<i>acc</i> 荧光定量引物
<i>acc</i> -R	ACCTGTCCACCTCCTCCTTCAT	<i>acc</i> 荧光定量引物
<i>fas</i> -F	AGCATCTGTATCGCCCGTTGA	<i>fas</i> 荧光定量引物
<i>fas</i> -R	GTCGGTCTGTGGGTCTCCTTGT	<i>fas</i> 荧光定量引物
<i>hsl</i> -F	AGCAGTCTGGTTTGGGTTTGGC	<i>hsl</i> 荧光定量引物
<i>hsl</i> -R	AGGTCTGGGTAATGCGTTCA	<i>hsl</i> 荧光定量引物
<i>cpt-1</i> -F	TACCGCTTGGCTATGACTGGAC	<i>cpt-1</i> 荧光定量引物
<i>cpt-1</i> -R	TTGCTGGAGATGTGGAAGTTGATG	<i>cpt-1</i> 荧光定量引物
<i>mgl</i> -F	CACCTGCGACCTTGGACCTCTTGG	<i>mgl</i> 荧光定量引物
<i>mgl</i> -R	AACCATCCTTCTGGGCGTAATC	<i>mgl</i> 荧光定量引物
β - <i>actin</i> -F	AGGGAAATTGTGCGTGAC	内参基因荧光定量引物
β - <i>actin</i> -R	AGGCAGCTCGTAGCTCTT	内参基因荧光定量引物

注: *acc*为乙酰辅酶A羧化酶基因; *fas*为脂肪酸合成酶基因; *hsl*为脂肪激素敏感脂肪酶基因; *cpt-1*为肉碱脂酰基转移酶-1基因; *mgl*为单酰基甘油酯酶基因; β -*actin*为 β -肌动蛋白基因。

时, 肝脏 *cpt-1* 表达量均极显著高于对照组 ($p < 0.01$), 肝脏 *hsl* 表达量在低温胁迫第 1 天和第 4 天时极显著高于对照组 ($p < 0.01$), 第 7 天时表达量下降但仍显著高于对照组 ($p < 0.05$), 肝脏 *mgl* 表达量在第 1 天时与对照组无显著差异 ($p > 0.05$), 第 4 天和第 7 天时均极显著高于对照组 ($p < 0.01$) (图 1a)。随着低温胁迫时间的延长, 军曹鱼肌肉 *cpt-1* 表达量呈现先升后降的趋势, 其中第 1 天时极显著高于对照组 ($p < 0.01$), 第 4 天时下降至与对照组无显著差异 ($p > 0.05$), 第 7 天时表达量下降至极显著低于对照组 ($p < 0.01$), 肌肉 *hsl* 表达量在低温胁迫第 1 天、第 4 天和第 7 天时均极显著高于对照组 ($p < 0.01$), 肌肉 *mgl* 表达量在胁迫过程中逐渐上升, 第 1 天时显著高于对照组 ($p < 0.05$), 第 4 天和第 7 日均极显著高于对照组 ($p < 0.01$) (图 1b)。腹腔脂肪 *cpt-1* 表达量在低温胁迫第 1 天时极显著低于对照组 ($p < 0.01$), 第 4 天时升高至显著高于对照组 ($p < 0.05$), 第 7 天时表达量约为对照组的 6 倍, 并达到差异极显著水平 ($p < 0.01$), 腹腔脂肪 *hsl* 表达量和 *mgl* 表达量变化趋势完全一致, 两个基因均在第 1 天时极显著降低了表达 ($p < 0.01$), 在第 4 天和第 7 天时升高至极显著高于对照组 ($p < 0.01$) (图 1c)。

3.2 低温胁迫下军曹鱼脂合成相关基因表达

军曹鱼幼鱼在低温第 1 天和第 4 天时极显著降低了肝脏 *acc* 表达量 ($p < 0.01$), 而胁迫至第 7 天时肝

脏 *acc* 表达量则显著高于对照组 ($p < 0.05$), 呈现出先下降后上升的趋势。肝脏 *fas* 表达量在低温胁迫的第 1 天、第 4 天和第 7 天时均极显著低于同期对照组 ($p < 0.01$), 仅约为对照组表达量的 0.2 倍 (图 2a)。军曹鱼幼鱼肌肉 *acc* 表达量在低温胁迫过程中呈现出先降后升的趋势, 在第 1 天时显著低于对照组 ($p < 0.05$), 第 4 天和第 7 天时均极显著高于对照组表达量 ($p < 0.01$), 肌肉 *fas* 表达量随着低温胁迫的进行表现为先降后升再降的趋势, 第 1 天时极显著低于对照组 ($p < 0.01$), 在第 4 天时表达量达到最高且极显著高于对照组 ($p < 0.01$), 第 7 天时又下降至与对照组无显著差异 ($p > 0.05$) (图 2b)。腹腔脂肪中, 军曹鱼腹腔脂肪组织 *acc* 表达量随着低温胁迫的进行呈现先降后升趋势, 其中第 1 天时极显著低于对照组 ($p < 0.01$), 第 4 天时显著高于对照组 ($p < 0.05$), 第 7 天时表达量进一步提高, 与对照组达到差异极显著水平 ($p < 0.01$), 腹腔脂肪组织 *fas* 表达量在低温胁迫第 1 天时极显著降低 ($p < 0.01$), 但在第 4 天和第 7 天时升高至与对照组无显著差异 ($p > 0.05$) (图 2c)。

4 讨论

4.1 低温胁迫对军曹鱼幼鱼脂分解代谢的影响

鱼类吸收脂肪酸后以甘油三酯的形式进行储存, 并在机体需要的时候通过甘油三酯水解和脂肪酸胞

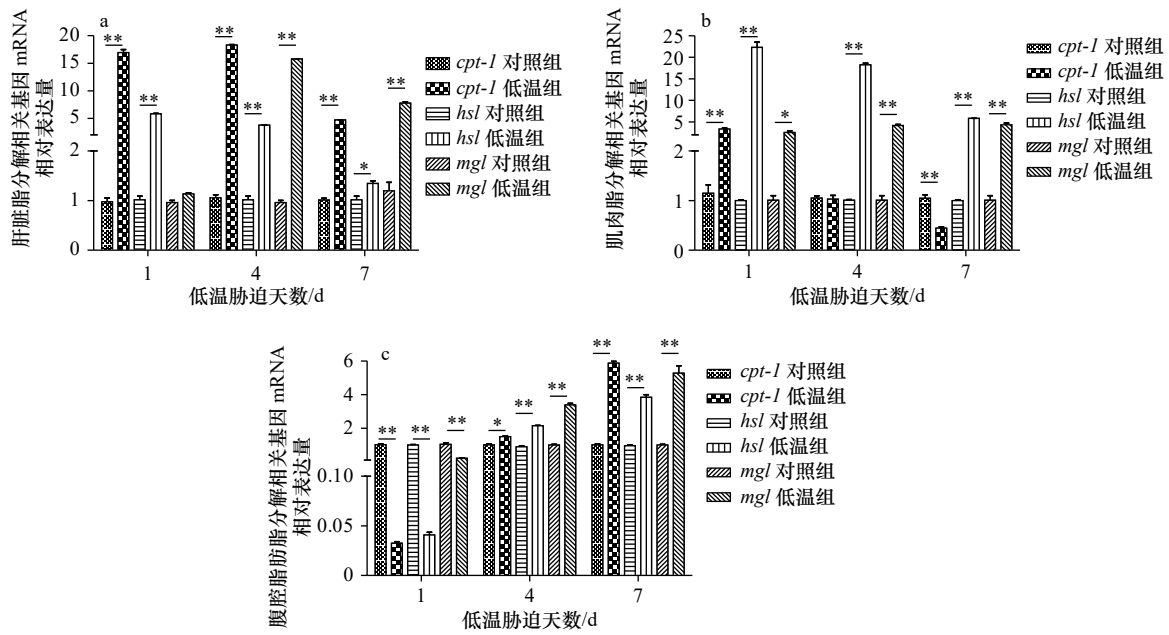


图1 低温胁迫下军曹鱼幼鱼3个脂分解相关基因表达量

Fig. 1 Expression of three lipolysis-related genes in juvenile cobia under low temperature stress

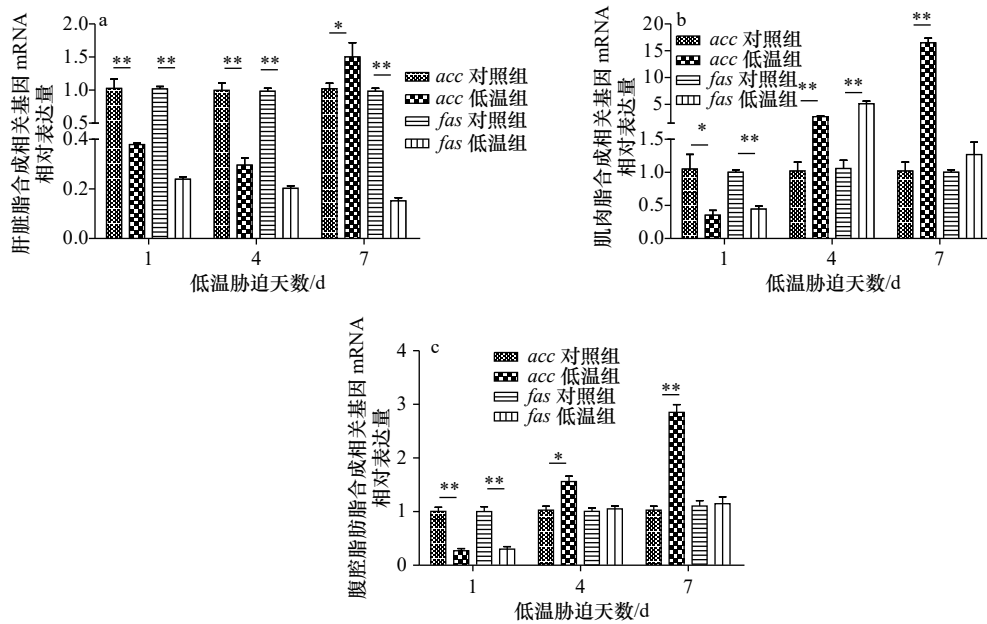
*表示低温组与同期对照组之间差异显著 ($p < 0.05$); **表示差异极显著 ($p < 0.01$)* indicates a significant difference ($p < 0.05$); ** indicates extremely significant difference ($p < 0.01$) compared with the control group in the same period

图2 低温胁迫下军曹鱼幼鱼3个脂合成相关基因表达量

Fig. 2 Expression of three lipid synthesis-related genes in juvenile cobia under low temperature stress

*表示低温组与同期对照组之间差异显著 ($p < 0.05$); **表示差异极显著 ($p < 0.01$)* indicates a significant difference ($p < 0.05$); ** indicates extremely significant difference ($p < 0.01$) compared with the control group in the same period

内氧化来产生能量。研究表明,甘油三酯代谢过程受到水环境温度的影响。Wen等^[19]研究发现,低温虽然导致了七彩神仙鱼 (*Symphysodon aequifasciatus*) 的代谢率下降,但是七彩神仙鱼可以通过自主调节来维持内环境稳态,提高甘油脂代谢就是其中的途径之一。

在鲤^[20]、金头鲷^[21]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[22] 等物种上也发现低温胁迫对鱼体脂代谢具有促进作用。在本研究中,军曹鱼幼鱼腹腔脂肪组织在低温胁迫第1天时降低了 *hsl* 基因和 *mgl* 基因的表达,在第4天和第7天时又显著上调了这两个基因的表达量。由此推

测军曹鱼在低温胁迫后期才开始释放储存在腹腔脂肪的脂质。在肝脏组织中, *hsl* 表达量先升高后逐渐降低, *mgl* 表达量在低温第 1 天时与对照组无显著差异, 在低温胁迫后期才有显著提高, 结果暗示, 军曹鱼肝脏在低温胁迫过程中首先通过提高对甘油三酯的催化效率来满足机体对脂肪酸的需要, 在胁迫后期还会通过增强催化分解甘油一酯来进一步补充机体的游离脂肪酸含量。在肌肉组织中, 军曹鱼在低温过程中均显著提高了 *hsl* 基因和 *mgl* 基因的表达, 推测促进脂肪水解代谢是维持肌肉能量供应的重要途径之一。

游离脂肪酸从甘油三酯中释放出来之后, 还需要经过 β -氧化才能释放出能量, 此过程主要受到 *cpt-1* 活力的影响。本研究发现, 在低温胁迫前期, 肝脏和肌肉 *cpt-1* 表达量均显著升高, 与卵形鲳鲹^[8]、斜带石斑鱼^[7]、多鳞白甲鱼 (*Onychostoma macrolepis*)^[23] 等物种的研究结果一致, 可见提高脂肪酸 β -氧化可能是多种鱼类应对低温胁迫的共有反应。但随着低温胁迫时间的延长, *cpt-1* 表达量在军曹鱼 3 种组织中出现了差异, 在肝脏中的表达量与胁迫前期一致仍显著高于对照组, 但在肌肉中表达量逐渐下降, 腹腔脂肪中的表达量则逐渐升高。由 *cpt-1* 基因在 3 个组织的表达情况推测, 军曹鱼在低温胁迫前期进行脂肪酸 β -氧化的主要组织是肝脏和肌肉, 而在胁迫后期进行脂肪酸 β -氧化的主要组织则变成是肝脏和腹腔脂肪。

4.2 低温胁迫对军曹鱼幼鱼脂合成代谢的影响

动物体在正常情况下, 体内的脂质主要来自食物摄入和体内生物合成等两个途径^[24], 食物摄入减少或停止会导致脂质代谢的平衡受到破坏, 此时提高脂质生物合成相关基因表达, 可使机体的脂质代谢恢复到一个新的平衡。ACC 和 FAS 是影响脂肪生物合成的两个关键限速酶^[25-26]。通过对军曹鱼肌肉、肝脏和腹腔脂肪的检测分析发现, 除了肝脏 *fas* 的表达水平在低温时均极显著低于对照组之外, *acc* 表达量在 3 种组织以及 *fas* 在肌肉和腹腔脂肪中的变化趋势都表现

为先下降后上升。推测低温胁迫第 1 天时, 由于机体代谢强度随着温度的下降而下降, 所以出现了脂质合成基因表达量减少的情况。但随着军曹鱼在低水温环境中进行适应性调整, 脂质合成相关基因表达量有所提升。乙酰辅酶 A 被 ACC 催化后产生的丙二酰辅酶 A 是脂质代谢的关键调控因子, 可以决定脂肪酸是氧化供能还是进行酯化反应^[10], 并且能够抑制肉碱转移酶的活性从而减少脂肪酸的氧化^[27], 增加脂肪在细胞内的沉积^[28]。军曹鱼肝脏 *fas* 表达水平的降低可能导致丙二酰辅酶 A 的蓄积, 从这方面看, 低温条件下, 军曹鱼可能通过丙二酰辅酶 A 来调节体内脂肪酸氧化过程, 以延长脂肪酸供能的时间。另外, *fas* 表达量在肝脏和腹腔脂肪中呈现出下降或与对照组无显著差异的趋势, 仅在低温胁迫第 4 天时的肌肉组织中极显著升高, 表明肝脏和腹腔组织在低温胁迫过程中, 与对照组脂肪酸生物合成量相比没有升高甚至有所下降。在胁迫中期, 肌肉中脂肪酸合成基因的表达显著增加, 说明低温胁迫对军曹鱼脂肪酸在不同组织间的分布产生一定影响。本实验中, 发现军曹鱼肌肉在低温前期中显著上调了脂分解相关基因的表达, 而增加肌肉在低温胁迫中期脂质合成相关基因的表达可以补偿前期过多的消耗, 从而维持肌肉中脂肪酸含量的相对稳定。肝脏同样作为低温前期的主要供能组织, *fas* 表达量却在整个低温过程中极显著降低, 推测组织脂肪含量以及组织功能可能是肝脏与肌肉 *fas* 差异表达的重要因素, 具体原因则有待进一步分析。

5 结论

从基因表达水平上看, 军曹鱼幼鱼在低温胁迫前期通过抑制脂合成代谢, 促进肝脏和肌肉中的脂质水解, 抑制腹腔脂肪的脂质分解来响应低温胁迫; 在低温胁迫后期, 军曹鱼幼鱼脂合成和分解代谢均显著提高, 且利用脂肪酸提供能量的主要组织由前期的肝脏和肌肉转变为肝脏和腹腔脂肪。

参考文献:

- [1] 管敏, 张厚本, 王龙, 等. 急性低温胁迫对史氏鲟幼鱼抗氧化和免疫指标的影响[J]. 淡水渔业, 2018, 48(6): 17-22.
Guan Min, Zhang Houben, Wang Long, et al. The effects of acute low temperature stress on antioxidative and immune indices of juvenile Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*)[J]. Freshwater Fisheries, 2018, 48(6): 17-22.
- [2] 冉皓宇, 陈良标. 低温驯化对斑马鱼胚胎发育和mtDNA拷贝数的影响[J]. 生物学杂志, 2019, 36(5): 16-20.
Ran Haoyu, Chen Liangbiao. Effects of cold acclimation on the embryogenesis and mtDNA copy number in zebrafish embryos[J]. Journal of Biology, 2019, 36(5): 16-20.
- [3] 张宇航, 高扬, 李文红, 等. 低温停食和复温后投喂频率对奥尼罗非鱼幼鱼生长的影响[J]. 西南农业学报, 2020, 33(9): 2125-2131.
Zhang Yuhang, Gao Yang, Li Wenhong, et al. Effects of feeding frequency after food deprivation with low temperature and rewarming on growth of hybrid tilapia juvenile (*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*)[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2020, 33(9): 2125-2131.

- [4] Ibarz A, Beltrán M, Fernández-Borrás J, et al. Alterations in lipid metabolism and use of energy depots of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at low temperatures[J]. *Aquaculture*, 2007, 262(2/4): 470–480.
- [5] He J, Qiang J, Yang H, et al. Changes in the fatty acid composition and regulation of antioxidant enzymes and physiology of juvenile genetically improved farmed tilapia *Oreochromis niloticus* (L.), subjected to short-term low temperature stress[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2015, 53: 90–97.
- [6] Sun Junlong, Zhao Liulan, Cui Can, et al. Influence of long-term temperature stress on respiration frequency, Na⁺/K⁺-ATPase activity, and lipid metabolism in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2019, 83: 165–171.
- [7] Sun Zhenzhu, Tan Xiaohong, Liu Qingying, et al. Physiological, immune responses and liver lipid metabolism of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) under cold stress[J]. *Aquaculture*, 2019, 498: 545–555.
- [8] 方玲玲. 卵形鲳鲹PPAR α 及CPT I 基因的克隆及不同条件对其表达影响的分析[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2016.
Fang Lingling. Molecular cloning and expression under the different conditions of peroxisome proliferator activated receptors- α and Carnitine Palmitoyltransferase I in *Trachinotus ovatus*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2016.
- [9] Mininni A N, Milan M, Ferrarasso S, et al. Liver transcriptome analysis in gilthead sea bream upon exposure to low temperature[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 765.
- [10] 萧培珍. 日粮中添加水飞蓟素对草鱼脂质代谢的影响及其机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
Xiao Peizhen. Effect of dietary silymarin on lipid metabolism of grass carp (*Ctenopharygodon idellus*)[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2017.
- [11] Lampidonis A D, Rogdakis E, Voutsinas G E, et al. The resurgence of hormone-sensitive lipase (HSL) in mammalian lipolysis[J]. *Gene*, 2011, 477(1/2): 1–11.
- [12] Blankman J L, Simon G M, Cravatt B F. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol[J]. *Chemistry & Biology*, 2007, 14(12): 1347–1356.
- [13] Long J Z, Li Weiwei, Booker L, et al. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects[J]. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5(1): 37–44.
- [14] Mannaerts G P, Debeer L J, Thomas J, et al. Mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in liver homogenates and isolated hepatocytes from control and clofibrate-treated rats[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254(11): 4585–4595.
- [15] 杨健, 陈刚, 黄建盛, 等. 温度和盐度对军曹鱼幼鱼生长与抗氧化酶活性的影响[J]. *广东海洋大学学报*, 2007, 27(4): 25–29.
Yang Jian, Chen Gang, Huang Jiansheng, et al. Effects of temperature and salinity on the growth and activities of antioxidant enzymes of cobia (*Rachycentron canadum*) juveniles[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2007, 27(4): 25–29.
- [16] 孙丽华, 陈浩如. 温度和体质量对军曹鱼生长及氮收支的影响[J]. *水产学报*, 2013, 37(10): 1527–1534.
Sun Lihua, Chen Haoru. Effects of water temperature and fish size on growth and nitrogen budget of cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(10): 1527–1534.
- [17] Ackman R G. Fish lipids, Part 1[M]. Farnham, Surrey: Fishing News Books Ltd., 1980: 86–103.
- [18] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101–1108.
- [19] Wen Bin, Jin Shirong, Chen Zaizhong, et al. Physiological responses to cold stress in the gills of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) revealed by conventional biochemical assays and GC-TOF-MS metabolomics[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 640–641: 1372–1381.
- [20] Dietrich M A, Hliwa P, Adamek M, et al. Acclimation to cold and warm temperatures is associated with differential expression of male carp blood proteins involved in acute phase and stress responses, and lipid metabolism[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 76: 305–315.
- [21] Mateus A P, Costa R, Gisbert E, et al. Thermal imprinting modifies bone homeostasis in cold challenged sea bream (*Sparus aurata*)[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2017, 220: 3442–3454.
- [22] Lu Dongliang, Ma Qiang, Wang Jing, et al. Fasting enhances cold resistance in fish through stimulating lipid catabolism and autophagy[J]. *The Journal of Physiology*, 2019, 597(6): 1585–1603.
- [23] 邓伟. 温度胁迫对多鳞白甲鱼AMPK介导的能量稳态及脂肪酸代谢的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
Deng Wei. Influence of temperature stress on the AMPK-mediated energy homeostasis and fatty acid metabolism in *Onychostoma macrolepis*[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2019.
- [24] 林超, 柳军, 孙宏斌. 脂质生物合成的转录调控. 相关靶标确证及新药发现[J]. *中国科学: 化学*, 2015, 45(9): 923–936.
Lin Chao, Liu Jun, Sun Hongbin. Transcriptional regulation of lipid biosynthesis, related target validation and drug discovery[J]. *Scientia Sinica Chimica*, 2015, 45(9): 923–936.
- [25] 严媛, 程汉良, 许建和, 等. 草鱼乙酰辅酶A羧化酶 β 基因全长cDNA分子克隆与表达分析[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(5): 1827–1836.
Yan Yuan, Cheng Hanliang, Xu Jianhe, et al. Molecular cloning of acetyl-CoA carboxylase β full-length cDNA from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and expression analysis[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(5): 1827–1836.
- [26] 杨文平, 王爱民, 於叶兵, 等. 梭鱼脂肪酸合成酶基因部分片段的克隆和表达分析[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(23): 49–54.
Yang Wenping, Wang Aimin, Yu Yebin, et al. Cloning and expression analysis of partial fragments of fatty acid synthase gene from *Liza haematocheila*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(23): 49–54.

- [27] McGarry J D, Brown H F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system—From concept to molecular analysis[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 244(1): 1–14.
- [28] 李亮, 程彦伟. 乙酰辅酶A羧化酶在治疗肥胖中的潜在作用[J]. *生命的化学*, 2007, 27(2): 180–182.
Li Liang, Cheng Yanwei. The potential effects of Acetyl-CoA carboxylase in curing obesity[J]. *Chemistry of Life*, 2007, 27(2): 180–182.

Effects of low temperature stress on the expression of genes related to lipid metabolism of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*

Cai Runjia^{1,2}, Zhang Jing^{1,2}, Huang Jiansheng¹, Shi Gang¹, Pan Chuanhao¹, Xie Ruitao¹,
Chen Gang¹, Zhang Jiandong¹, Wang Zhongliang¹, Tang Baogui^{1,2,3}

(1. Fishery College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang), Zhanjiang 524025, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In order to explore the effects of low temperature stress on the expression of genes related to lipid synthesis and catabolism in cobia (*Rachycentron canadum*), the experiment set up a normal temperature group (30.5±1.0)°C and a low temperature group (20.0±0.5)°C, and used real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) to analyze the expression levels of 5 target genes in liver, muscle and intraperitoneal fat (IPF). The results showed that at 1 d, the expression of carnitine palmitoyl transferase-1 and hormone-sensitive lipase genes of liver, carnitine palmitoyl transferase-1, hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase genes of muscle were up-regulated ($p<0.05$), acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase genes of liver, muscle and 5 lipid metabolism related genes of IPF were significantly down-regulated ($p<0.05$); at 4 d, the expression of carnitine palmitoyl transferase-1, hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase genes of liver, and hormone-sensitive lipase, monoacylglycerol lipase, acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase genes of muscle and carnitine palmitoyl transferase-1, hormone-sensitive lipase, monoacylglycerol lipase, acetyl-CoA carboxylase genes of IPF were up-regulated ($p<0.05$), acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase gene of liver were down-regulated ($p<0.05$); at 7 d, the expressions of carnitine palmitoyl transferase-1, hormone-sensitive lipase, monoacylglycerol lipase, acetyl-CoA carboxylase genes of liver and IPF, and hormone-sensitive lipase, monoacylglycerol lipase, acetyl-CoA carboxylase genes of muscle were up-regulated ($p<0.05$), carnitine palmitoyl transferase-1 gene of muscle and fatty acid synthase genes of liver were down-regulated ($p<0.05$). The results showed that cobia responded to low temperature stress by inhibiting lipid synthesis and metabolism, promoting lipid hydrolysis in the liver and muscle, and inhibiting the lipid hydrolysis of IPF in the early stage of low temperature stress; in the late period of low temperature stress, cobia lipid synthesis and catabolism were significantly increased, and the main tissue that used fatty acids to provide energy was transformed from the liver and muscle to liver and IPF.

Key words: low temperature stress; lipid metabolism; gene expression; *Rachycentron canadum*; real-time qRT-PCR