

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00454

# 鸡 *PPAR $\gamma$* 基因的表达特性及其对脂肪细胞增殖分化的影响

王丽, 那威, 王宇祥, 王彦博, 王宁, 王启贵, 李玉茂, 李辉

东北农业大学动物科学技术学院, 农业部鸡遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150030

**摘要:** 为分析鸡 *PPAR $\gamma$*  基因的组织表达特性及其在脂肪细胞增殖和分化过程中的功能, 文章以东北农业大学高、低腹脂双向选择品系肉鸡为实验材料, 利用 Western blotting 方法, 检测 *PPAR $\gamma$*  基因的组织表达特性及其在高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织间的表达差异; 采用 RNAi 技术, 在鸡原代脂肪细胞中抑制 *PPAR $\gamma$*  基因的表达后, 通过 MTT 和油红 O 提取比色的方法, 研究鸡 *PPAR $\gamma$*  基因对脂肪细胞增殖和分化的调控作用; 利用 Real-time PCR 和 Western blotting 技术, 分析 *PPAR $\gamma$*  基因表达下调后, 其他脂肪细胞分化转录因子以及与脂肪细胞分化相关的重要基因的表达变化情况。结果表明, *PPAR $\gamma$*  基因在 7 周龄高脂系肉鸡腹部脂肪组织、肌胃、脾脏、肾脏组织中表达量较高, 在心脏中表达量较低, 在肝脏、胸肌、腿肌、十二指肠中未检测到表达信号; 与高脂系相比, *PPAR $\gamma$*  基因在 5 和 7 周龄低脂系肉鸡腹部脂肪组织中的表达量较低 ( $P < 0.05$ ); *PPAR $\gamma$*  基因的表达量下降后, 鸡脂肪细胞的增殖能力增强, 分化能力减弱; 同时, *C/EBP $\alpha$* 、*SREBP1*、*A-FABP*、*Perilipin1*、*LPL*、*IGFBP-2* 基因的表达量均下降 ( $P < 0.05$ )。由此可见, *PPAR $\gamma$*  基因的表达可能与肉鸡腹部脂肪的沉积有一定的关系, 该基因可能是调控鸡脂肪细胞增殖与分化的关键因子。

**关键词:** 鸡; *PPAR $\gamma$*  基因; 脂肪细胞增殖分化; 组织表达; RNAi;

## Characterization of chicken *PPAR $\gamma$* expression and its impact on adipocyte proliferation and differentiation

WANG Li, NA Wei, WANG Yu-Xiang, WANG Yan-Bo, WANG Ning, WANG Qi-Gui, LI Yu-Mao, LI Hui

Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

**Abstract:** To characterize the chicken *PPAR $\gamma$*  gene expression and its impact on chicken adipocyte proliferation and differentiation, western blotting approach was conducted to investigate the expression of *PPAR $\gamma$*  in various chicken tissues and the difference of expression level in abdominal adipose tissues between the NEAU broiler lines divergently selected for

收稿日期: 2011-10-08; 修回日期: 2012-02-19

基金项目: 现代农业产业技术体系建设项目(编号: CARS-42), 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号: 2009CB941604)和黑龙江省高等学校科技创新团队建设项目(2010td02)资助

作者简介: 王丽, 硕士研究生, 研究方向: 家禽遗传育种。E-mail: wangli930@yahoo.cn

通讯作者: 李辉, 教授, 博士, 研究方向: 家禽遗传育种。E-mail: lihui@neau.edu.cn

网络出版时间: 2012-3-27 9:42:39

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120327.0942.002.html>

abdominal fat content. The expression of *PPAR $\gamma$*  gene was suppressed in chicken adipocytes using RNAi technology, and the roles of *PPAR $\gamma$*  gene in the adipocytes proliferation and differentiation were investigated by MTT assay and Oil Red O staining extraction assay, respectively. After *PPAR $\gamma$*  gene was downregulated, the expression level of other transcript factors and marker genes related to the adipocyte differentiation was detected by Real-time PCR and Western blotting analyses. The results showed that *PPAR $\gamma$*  highly expressed in abdominal adipose tissue, gizzard, spleen, kidney, lowly expressed in heart, and not expressed in liver, breast muscle, leg muscle, and duodenum. Meanwhile, *PPAR $\gamma$*  expressed much higher in fat birds than in lean ones in abdominal adipose tissue at 5 and 7 weeks of age ( $P < 0.05$ ). RNAi analysis showed that knockdown of *PPAR $\gamma$*  gene increased chicken adipocyte proliferation and decreased cell differentiation and significantly decreased the expression levels of *C/EBP $\alpha$* , *SREBP1*, *A-FABP*, *Perilipin1*, *LPL*, and *IGFBP-2* ( $P < 0.05$ ). In summary, *PPAR $\gamma$*  gene may be related to the broiler abdominal fat deposition, and be probably a key regulator of chicken adipocyte proliferation and differentiation.

**Keywords:** chicken; *PPAR $\gamma$* ; adipocyte proliferation and differentiation; tissue expression; RNAi

肉鸡业在世界范围内, 尤其在中国等发展中国家具有良好的发展前景。在过去的半个多世纪里, 依赖于表型值的选择在肉鸡育种上已经取得了显著进展, 现代肉鸡在日增重和产肉量等方面都得以明显的提高。然而, 在生产性能大幅度提高的同时, 肉鸡自身生理适应能力等方面也出现了一系列亟待解决的问题, 如体脂蓄积过多、猝死症、腹水综合征、腿部疾病、免疫力下降等。其中, 肉鸡体脂(尤其是腹脂)沉积过多已成为一个极为突出的问题。肉鸡体内脂肪沉积过多不仅会降低饲料转化率, 同时还会影响产肉量和肉的品质, 给生产者和消费者带来巨大的损失。因此, 控制脂肪在鸡体内的过度蓄积已成为家禽育种学家主要的奋斗目标之一<sup>[1,2]</sup>。

动物体内脂肪的形成包括脂肪细胞数目增加和体积增大两个方面, 而脂肪组织中脂肪细胞的过度增殖和分化则会造成脂肪形成加剧从而引发机体脂肪的过度蓄积, 因此研究脂肪细胞分化对防止动物体内脂肪过度沉积具有特别重要的意义<sup>[3]</sup>。脂肪细胞分化是一个由众多转录因子共同调控的过程, 过氧化物酶体增殖物激活受体家族(PPARs)、CAAT 增强子结合蛋白家族(C/EBPs)和固醇调节元件结合蛋白家族(SREBPs)在此过程中发挥着极其重要的作用。其中, PPARs 的作用尤为突出<sup>[4]</sup>。过氧化物酶体增殖物激活型受体(Peroxisome proliferator activated receptors, PPARs)于 1990 年被 Issemann 和 Green 发现, 是一类配体依赖型转录因子, 属 II 型核受体超家族, 因其能被过氧化物酶体增殖物激活而得名<sup>[5]</sup>。

PPARs 主要包括 3 种亚型, 即  $\alpha$ 、 $\beta$ (或  $\delta$ )和  $\gamma$ , 它们与配体结合后均能与视黄酸类受体形成异二聚体, 通过与靶基因启动子上游的过氧化物增殖体反应元件结合而发挥转录调控作用<sup>[6]</sup>。*PPAR $\gamma$*  是 PPAR 家族中最具脂肪细胞专一性且成脂作用最强的成员, 它主要在脂肪组织中表达, 并在脂质代谢和脂肪细胞分化过程中起重要作用<sup>[7]</sup>。鼠的研究表明, *PPAR $\gamma$*  的表达可以诱导脂肪细胞出现生长抑制现象并启动前体脂肪细胞分化成成熟的脂肪细胞<sup>[8]</sup>。近年来, 控制脂肪细胞成熟的转录调控网络研究已成为热点<sup>[9]</sup>, *PPAR $\gamma$*  基因恰恰处于该调控网络的中心位置, 在脂肪细胞分化过程中, 尤其是脂肪细胞分化早期起到了不可或缺的重要作用<sup>[7]</sup>。最近的研究表明, 没有任何一个因子能在 *PPAR $\gamma$*  不存在的情况下起始脂肪细胞的分化过程<sup>[10]</sup>。

然而, 以上绝大部分研究结果都来自哺乳动物, 在鸡上的相关报道很少。而且, 禽类与哺乳动物在脂肪形成的机制方面并不完全相同。因此, 本研究利用 Western blotting 的方法, 分析了鸡 *PPAR $\gamma$*  基因的组织表达规律, 并通过 RNAi 的方法, 进一步研究了该基因在鸡脂肪细胞增殖和分化过程中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

组织样品来自东北农业大学选育的肉鸡高、低腹脂双向选择品系 7 周龄公鸡(高脂系 5 只, 低脂系

5 只)。AA 肉仔鸡鸡胚购自东北农业大学孵化场, 在实验室统一孵化并饲养至 12 日龄。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、RNAi 重组体 pGenesil-1/PPAR $\gamma$  shRNA1(干扰载体, 以下简称 sh PPAR $\gamma$ )、无关 RNAi 重组体 pGenesil-1/PPAR $\gamma$  shRNA0(无关干扰载体, 以下简称 Control)均为本实验室保存。

## 1.2 方法

### 1.2.1 组织及细胞蛋白的提取

组织蛋白提取: 取东北农业大学肉鸡高、低腹脂双向选择品系 7 周龄高脂系肉鸡的心脏、肝脏、腹部脂肪组织、胸肌、腿肌、肌胃、十二指肠、脾脏和肾脏 9 种组织, 以及高、低脂系 7 周龄肉鸡腹部脂肪组织(高脂 5 只, 低脂 5 只)各 1 g, 在液氮中研磨后, 加入含有 1 mmol/L PMSF 的细胞裂解液, 振荡混匀后室温静置 30 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 用 BCA 方法测定蛋白浓度, -80 $^{\circ}$ C 保存。

细胞蛋白提取: 将收集的细胞直接加入含有 1 mmol/L PMSF 的细胞裂解液, 其他步骤与组织蛋白提取相同。

### 1.2.2 Western blotting 检测

每种蛋白上样量为 100  $\mu$ g, 经 SDS-PAGE 电泳分离后, 电转至 PVDF 膜上; 将膜放入脱脂奶粉中, 室温封闭 1 h; 用 PBST 洗涤后加入 1:1000 稀释的一抗(本研究制备的鸡 PPAR $\gamma$  抗血清), 室温振荡孵育 2 h; 洗涤后加入 1:5000 稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG-北京中杉金桥生物技术有限公司), 室温振荡孵育 1 h; 洗涤后用增强型 ECL 显色液(哈尔滨海基生物技术有限公司)显色 3 min, 暗室曝光。

### 1.2.3 前脂肪细胞的培养及诱导分化

在鸡脂肪细胞增殖和分化的研究中, 研究者往往采集 2~4 周龄仔鸡的腹部脂肪组织来培养脂肪细胞<sup>[11]</sup>。本课题组在前人研究的基础上, 经过多年的摸索, 确立了以 12 日龄肉仔鸡腹部脂肪组织为材料培养原代前脂肪细胞的方法<sup>[12]</sup>。因此, 本研究取 12 日龄商品 AA 肉仔鸡, 无菌采集腹部脂肪组织, 放入装有 PBS 的平皿中, 反复冲洗, 尽量除去血管和筋膜, 用眼科剪剪碎组织, 随即转入含有消化液的试管中, 于 37 $^{\circ}$ C 消化 65 min(每 5 min 震荡一次)。消化

完毕, 加入全培养基终止消化, 吸管吹打, 分别经 100 目和 600 目的不锈钢筛网过滤。滤液分装入离心管, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃培养液, 用红细胞裂解液重悬细胞, 制成细胞悬液, 室温孵育 10 min 后 2 000 r/min 离心 10 min, 细胞沉淀用培养液重悬, 2 000 r/min 离心 10 min, 再用培养液重悬后的细胞悬液就是基质-血管细胞(S-V 细胞), 即前脂肪细胞。将分离的前脂肪细胞计数后, 按  $2\sim 3\times 10^5$ /mL 左右的密度接种, 置 5%CO $_2$  培养箱中培养, 48 h 后换液洗去未贴壁的细胞。细胞汇合度达到 80%~90%时进行传代。

待传代后的细胞汇合度达到 80%~90%时, 换为诱导分化的培养基(完全培养基加入油酸)诱导其分化, 诱导 24 h 后进行 RNAi 实验。

### 1.2.4 细胞转染

前脂肪细胞诱导分化后 24 h 进行转染。按 FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent(Roche 公司)说明书操作。

### 1.2.5 Real-time PCR

用总 RNA 极速提取试剂盒(上海飞捷生物技术有限公司)提取细胞总 RNA, 然后反转录为 cDNA。使用的 Real-time PCR 仪型号为 ABI 7500。反应体系为: SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (2 $\times$ )(宝生物工程(大连)有限公司)5  $\mu$ L, ROX Reference Dye II(50 $\times$ )0.2  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.2  $\mu$ L, cDNA 模板 1  $\mu$ L, ddH $_2$ O 3.4  $\mu$ L, 总体积为 10  $\mu$ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 复性延伸 34 s, 共 40 个循环。溶解曲线 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 每个样品设 3 孔重复。所用引物序列见表 1。以 GAPDH 和  $\beta$ -actin 基因为内参, 利用  $2^{-Ct}$  的方法将原始 Ct 值转换为相对的基因表达量。所用引物序列见表 1。

### 1.2.6 MTT 检测

细胞接种于 96 孔板, 经诱导、转染后, 在指定的时间点, 每孔加入 20  $\mu$ L MTT(GIBCO(Invitrogen)公司), 继续孵育 4 h。小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加 150  $\mu$ L DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。选择 490 nm 波长, 在酶标仪上测定各孔光吸收值, 记录结果, 以时间为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

表 1 Real-time PCR 分析所用的引物

基因名称	GenBank 登录号	引物序列(5'→3')
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	AF470456	F: GTGCAATCAAAATGGAGCC R: CTTACAACCTTCACATGCAT
<i>C/EBP<math>\alpha</math></i>	X66844	F: GCGACATCTGCGAGAACG R: GTACAGCGGGTTCGAGCTT
<i>SREBP1</i>	AY029224	F: GGTCGGGGCCATGTTGA R: CAGGTTGGTTCGGGGTGA
<i>GATA2</i>	NM001003797	F: AACTGTGGAGCAACCGCTAC R: AGTCCGACGGCATTACAAAC
<i>A-FABP</i>	AY675941	F: AGTTTGTGGGCACCTGGAAGC R: CCATCCACCACTTTCCTCTT
<i>Perilipin1</i>	NM001127439	F: GGGGTGACTGGCGGTTGTA R: GCCGTAGAGGTTGGCGTAG
<i>LPL</i>	NM205282	F: GGTCGGGGCCATGTTGA R: CAGGTTGGTTCGGGGTGA
<i>IGFBP2</i>	U15086	F: TGCCGGATGAGCGAGGTC R: CCATTCACCGACATCTTGG
<i>FAS</i>	NM205155	F: AAGGAGGAAGTCAACGG R: TTGATGGTGAGGAGTCG
<i><math>\beta</math>-actin</i>	NM. 205518	F: TCTTGGGTATGGAGTCCTG R: TAGAAGCATTTGCGGTGG
<i>GAPDH</i>	K01458	F: AGAACATCATCCCAGCGT R: AGCCTTCACTACCTCTTG

### 1.2.7 油红 O 提取比色

培养细胞弃去培养液经 PBS 洗 3 次后, 10% 的福尔马林固定液固定 30 min, PBS 洗 3 次, 蒸馏水洗 3 次, 32 °C 干燥, 1% 油红 O(GIBCO(Invitrogen)公司)染色液染色 40 min, PBS 洗 3 次, 100% 异丙醇溶解细胞中的油红 O 15 min, 以 1 mL 100% 异丙醇调零, 分光光度计 500 nm 波长比色, 记录吸光度值。每组内设置 3 个重复进行比较。

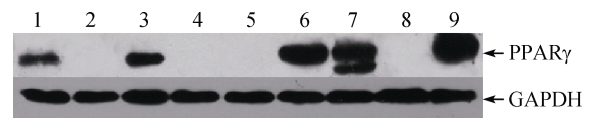
### 1.2.8 统计分析

Real-time PCR 得出的基因原始表达量经反正弦 ( $Y = \sin^{-1} \sqrt{X}$ ) 转换后, 利用 JMP4.0(SAS Institute Inc., Cary, NC) 软件对实验数据进行 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异显著; 其他数据直接利用 JMP4.0 软件进行 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 鸡 *PPAR $\gamma$* 基因组织表达特性

以 *GAPDH* 基因为内参, 利用 Western blotting 的方法检测鸡 *PPAR $\gamma$*  在肉鸡 9 种组织中的表达情况。结果表明, 鸡 *PPAR $\gamma$*  在腹部脂肪组织、肌胃、脾脏、肾脏中表达量较高, 在心脏中表达量较低, 在肝脏、胸肌、腿肌、十二指肠中没有检测到表达信号(图 1)。

图 1 鸡 *PPAR $\gamma$*  组织表达特性

1: 心脏; 2: 肝脏; 3: 脂肪; 4: 胸肌; 5: 腿肌; 6: 肌胃; 7: 脾; 8: 十二指肠; 9: 肾。

### 2.2 鸡 *PPAR $\gamma$* 基因在高、低脂系公鸡脂肪组织中的表达规律

以 *GAPDH* 基因为内参, 采用 Western blotting 的方法分析鸡 *PPAR $\gamma$*  在东北农业大学高、低脂系 5、7、9 周龄公鸡腹部脂肪组织中的表达差异, 结果显示鸡 *PPAR $\gamma$*  在 5 和 7 周龄高脂系公鸡脂肪组织中蛋白表达丰度显著高于低脂系公鸡脂肪中的表达丰度 ( $P < 0.05$ ), 但在 9 周龄时, *PPAR $\gamma$*  在两系间的表达量没有显著差异 ( $P > 0.05$ )(图 2)。

### 2.3 鸡 *PPAR $\gamma$* 基因在脂肪细胞分化过程中的表达规律以及最佳干扰时间点的确定

分别以  *$\beta$ -actin* 和 *GAPDH* 基因为内参, 采用 Real-time PCR 的方法分析鸡 *PPAR $\gamma$*  基因在脂肪细胞分化过程中的表达规律。结果显示, *PPAR $\gamma$*  基因的表达量随着油酸诱导时间的延长而逐渐升高, 48 h 达到顶峰, 然后逐渐降低(图 3)。选择目的基因稳定高丰度表达的时间是进行 RNAi 实验的前提, 诱导后

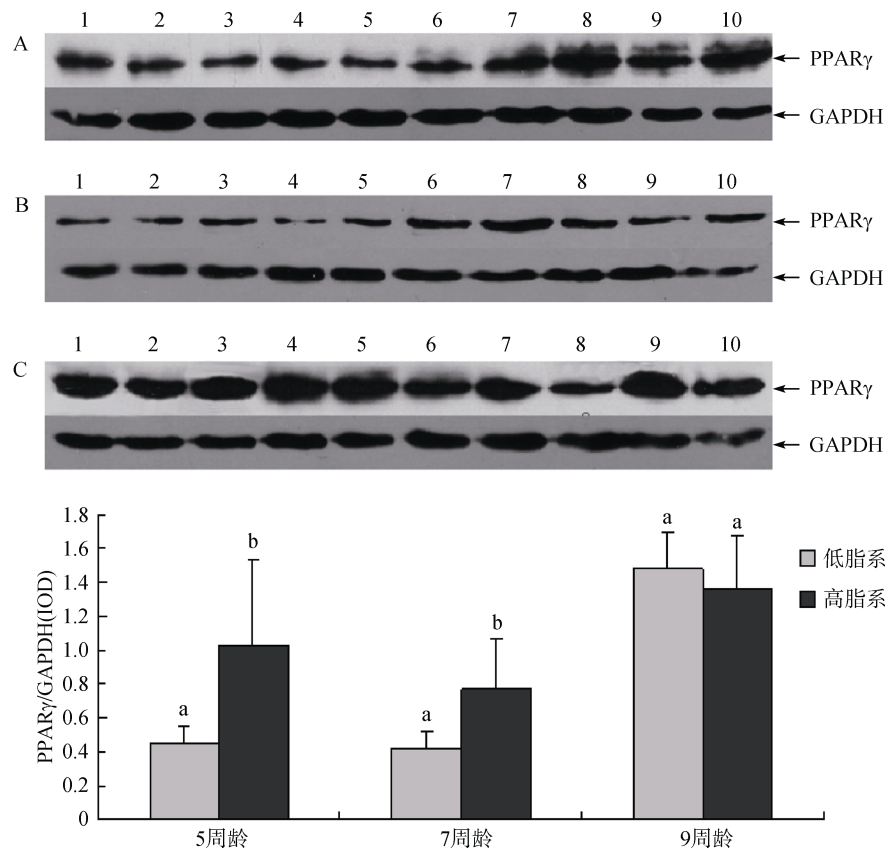


图 2 PPAR $\gamma$ 在高、低脂系脂肪组织中的表达特性

1~5: 低脂系肉鸡腹部脂肪组织; 6~10: 高脂系肉鸡腹部脂肪组织; A: 5周龄; B: 7周龄; C: 9周龄; 字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

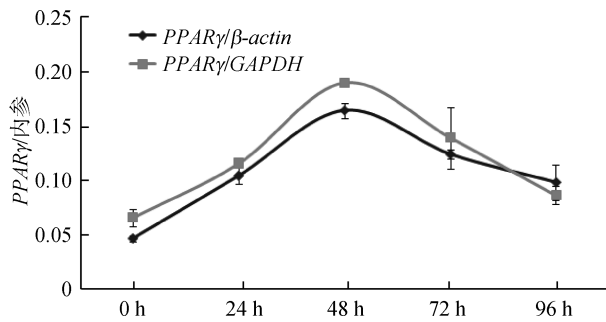


图 3 鸡 PPAR $\gamma$ 基因在脂肪细胞分化过程中的表达规律

24 h PPAR $\gamma$ 基因具有较高的表达水平, 且处于上升阶段, 便于展开干扰实验, 因此, 本研究选择前脂肪细胞诱导 24 h 作为最佳干扰时间点。

#### 2.4 干扰效果以及最佳检测时间点的确定

分别用 RNAi 重组体 pGenesil-1/PPAR $\gamma$ shRNA1 (sh PPAR $\gamma$ )和无关 RNAi 重组体 pGenesil-1/PPAR $\gamma$ shRNA0(Control)转染脂肪细胞, 在转染后不同时间点(0 h、24 h、48 h、72 h)收集细胞, 提取总 RNA, 利

用 Real-time PCR 的方法对干扰效果进行检测。结果显示转染后 24 h 干扰效果最明显(图 4)。同时, Western blotting 的结果也证明, 干扰 24 h 后, PPAR $\gamma$ 的表达量显著降低( $P < 0.05$ )(图 5)。因此, 将该时间点作为最佳检测时间点, 进行后续相关基因的检测。

#### 2.5 下调 PPAR $\gamma$ 基因表达量对鸡脂肪细胞增殖和分化的影响

##### 2.5.1 PPAR $\gamma$ 基因表达量下降后鸡脂肪细胞增殖情况

利用 MTT 的方法检测 PPAR $\gamma$ 基因表达量下降后脂肪细胞的增殖情况。以干扰时间点为 0 点(则诱导时间点为-24 h), 在干扰后每隔 12 h 对干扰组和无关干扰组的细胞增殖情况进行比较。结果显示, 从干扰后 36 h 开始, 直至 72 h, 干扰组的细胞增殖能力显著高于无关干扰组( $P < 0.05$ )(图 6)。

##### 2.5.2 PPAR $\gamma$ 基因表达量下降后鸡脂肪细胞分化情况

利用油红 O 提取比色的方法检测 PPAR $\gamma$ 基因表

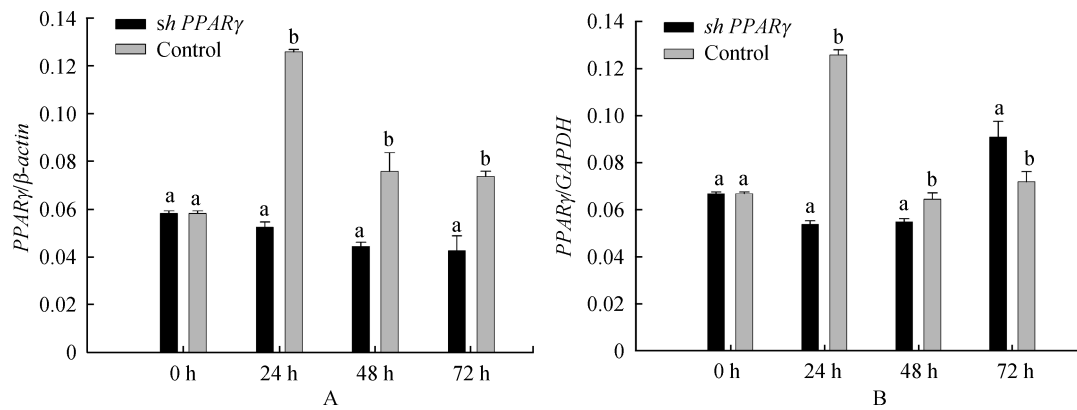


图 4 干扰后 *PPAR $\gamma$*  基因在脂肪细胞中的表达量(Real-time PCR)  
A : 以  $\beta$ -actin 为内参; B : 以 *GAPDH* 为内参。字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

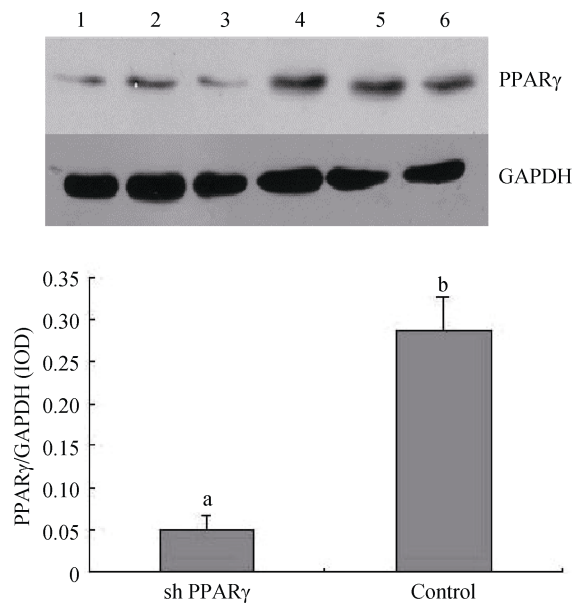


图 5 Western blotting 检测干扰后 *PPAR $\gamma$*  基因在脂肪细胞中的表达量  
1~3 : 干扰组; 4~6 : 无关干扰组。字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

达量下降后脂肪细胞的分化情况。以干扰时间点为 0 点(则诱导时间点为-24 h), 在干扰后每隔 12 h 对干扰组和无关干扰组的细胞分化情况进行比较。结果显示, 从干扰后 12 h 开始, 直至 72 h, 干扰组的细胞分化能力显著低于无关干扰组( $P < 0.05$ )(图 7)。

## 2.6 鸡 *PPAR $\gamma$* 基因表达量下降后其他基因表达量的变化

### 2.6.1 鸡 *PPAR $\gamma$* 基因表达量下降后其他基因在 mRNA 水平上的表达情况

在干扰 *PPAR $\gamma$*  基因 24 h 后, 利用 Real-time PCR 的方法检测其他脂肪细胞分化转录因子(*C/EBP $\alpha$* 、*SREBP1*、*GATA2*)和其他与脂肪细胞分化相关的重要基因(*A-FABP*、*Perilipin1*、*LPL*、*IGFBP-2*、*FAS*)的表达量变化情况。结果显示, *PPAR $\gamma$*  基因表达量降低后, *C/EBP $\alpha$* 、*SREBP1*、*A-FABP*、*Perilipin1*、*LPL* 和 *IGFBP-2* 基因的表达量均明显降低( $P < 0.05$ ), *GATA2* 和 *FAS* 基因的表达量没有发生明显的变化(图 8)。

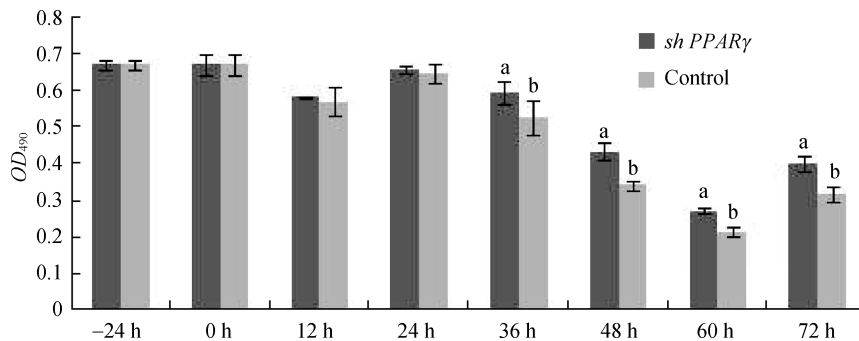


图 6 *PPAR $\gamma$*  基因表达量下降后鸡脂肪细胞的增殖情况  
字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

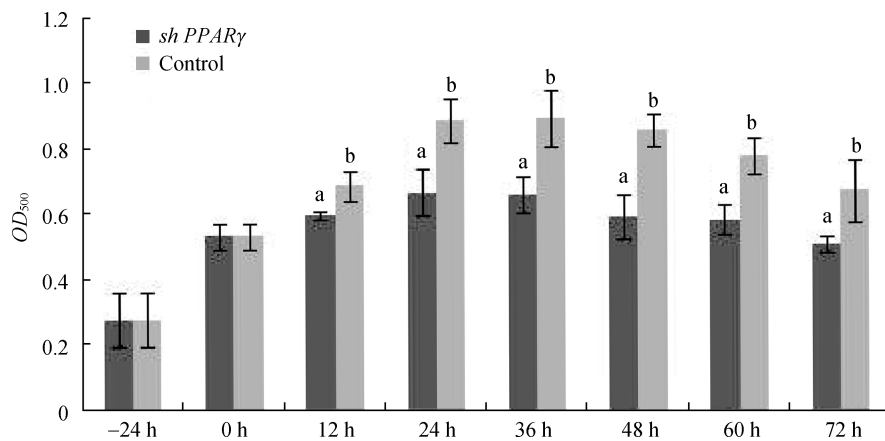


图 7 *PPAR* $\gamma$  基因表达量下降后鸡脂肪细胞的分化情况  
字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

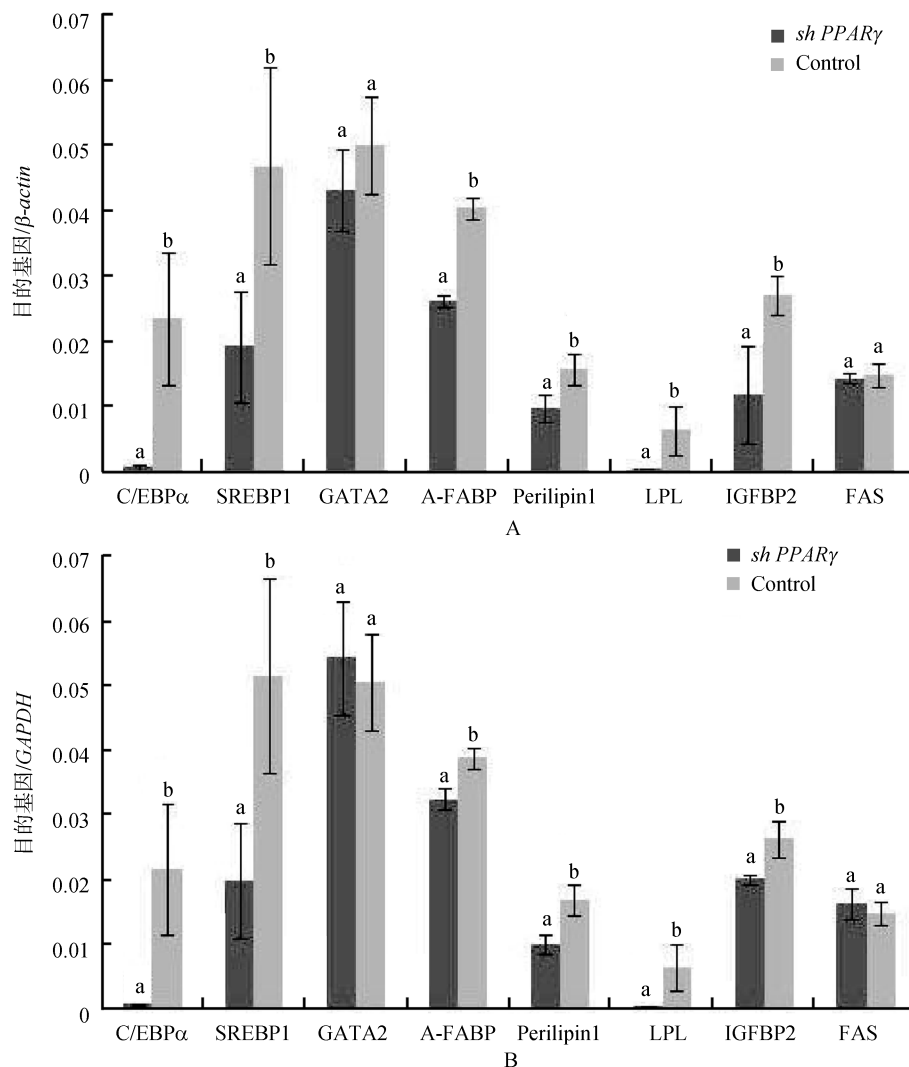


图 8 鸡 *PPAR* $\gamma$  基因表达量下降后其他基因在 mRNA 水平的表达情况  
A: 以  $\beta$ -actin 为内参; B: 以 GAPDH 为内参。字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.6.2 鸡 *PPAR $\gamma$* 基因表达量下降后其他基因在蛋白质水平上的表达情况

在干扰 *PPAR $\gamma$*  基因 24 h 后, 利用 Western blotting 的方法检测其他脂肪细胞分化转录因子 (C/EBP $\alpha$  和 SREBP1) 和其他与脂肪细胞分化相关的重要基因 (A-FABP 和 Perilipin1) 表达量的变化情况。结果显示, *PPAR $\gamma$*  基因表达量降低后, C/EBP $\alpha$ 、SREBP1 和 A-FABP、Perilipin1 的表达量均明显降低 ( $P < 0.05$ ) (图 9)。

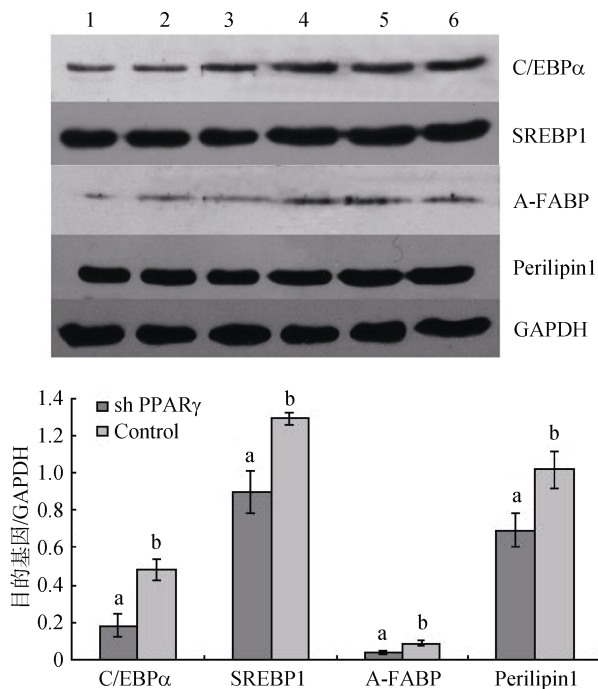


图 9 其他基因在蛋白质水平的表达情况  
1~3 : 干扰组; 4~6 : 无干扰组。字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

*PPAR $\gamma$*  基因的组织表达研究已在人类和多种动物上展开。在成年爪蟾上的研究结果显示, *PPAR $\gamma$*  基因在脂肪组织中表达量最高, 在肝脏和肾脏中表达较低; 在成年啮齿动物上的研究也得到了相似的结果, 即 *PPAR $\gamma$*  基因主要在脂肪组织中表达<sup>[13]</sup>。人类的研究结果表明, *PPAR $\gamma$*  基因在脂肪组织中表达量较高, 在骨骼肌、肝脏和心脏中表达量较低<sup>[14]</sup>。Meng 等<sup>[15]</sup>利用 RT-PCR 的方法对 *PPAR $\gamma$*  基因在 8 周龄肉鸡不同组织中的表达研究表明, *PPAR $\gamma$*  基因在腹部脂肪组织中高表达, 并且在心脏、脾脏、小肠、肺、肾脏、肌胃、脑中也有不同程度的表达, 但在肝脏

和肌肉中不表达; Northern blotting 的结果显示该基因只在腹脂和肾脏中表达。本研究利用 Western blotting 的方法分析了 *PPAR $\gamma$*  基因在 7 周龄肉鸡不同组织中的表达规律, 结果表明, *PPAR $\gamma$*  在肉鸡腹部脂肪组织高表达的同时, 在脾脏、肾脏和肌胃中的表达量也较高, 在心脏组织中表达量较低, 在肝脏、胸肌、腿肌和十二指肠中没有检测到表达信号。本研究结果与其他物种上的研究结果<sup>[13,14]</sup>以及我们前期的研究结果一致, 即 *PPAR $\gamma$*  基因在脂肪组织中高表达<sup>[15]</sup>。本研究还比较了 *PPAR $\gamma$*  基因在东北农业大学肉鸡高、低脂双向选择品系 (5、7 和 9 周龄) 脂肪组织中的表达情况。结果表明, *PPAR $\gamma$*  在 5 周龄和 7 周龄高脂系肉鸡脂肪组织中的表达量显著高于低脂系 ( $P < 0.05$ )。众所周知, 动物体内脂肪的形成包括脂肪细胞数目增加和体积增大, 即增殖与分化两个方面<sup>[3]</sup>。Hermier 等<sup>[16]</sup>在对  $F_8$  和  $F_9$  世代高、低脂系肉鸡的腹部脂肪进行比较研究的过程中发现, 从 2 周龄开始, 高脂系肉鸡腹部脂肪细胞的体积大于低脂系。本课题组关于东北农业大学选育的肉鸡高、低脂双向选择品系的研究结果也表明, 生长前期 (3、4、5、6、7 周龄) 高脂系肉鸡腹部脂肪细胞的体积大于低脂系<sup>[17]</sup>。结合本研究的结果可以发现这一规律, 即肉鸡腹部脂肪细胞体积的大小与 *PPAR $\gamma$*  基因的表达量有着密切的关系, 高脂系肉鸡腹部脂肪细胞体积大于低脂系, 同时 *PPAR $\gamma$*  基因在高脂系肉鸡腹部脂肪组织中的表达量高于低脂系。脂肪细胞体积的大小与其分化程度有着密切的关系, 由此可以推测, *PPAR $\gamma$*  基因与鸡脂肪细胞分化过程密切相关, 并且有可能起到主要的调控作用。

为进一步揭示 *PPAR $\gamma$*  基因在鸡脂肪细胞分化过程中所发挥的重要作用, 本研究在细胞水平展开了深入的研究。以鸡原代脂肪细胞为实验材料, 利用 RNAi 技术, 分别从转录、翻译和细胞形态等方面研究了鸡 *PPAR $\gamma$*  基因对脂肪细胞增殖和分化的调控作用。结果表明, *PPAR $\gamma$*  基因的表达量降低后, 脂肪细胞的增殖能力显著增强, 分化能力显著降低。该结果与本课题组前期在前脂肪细胞上的研究结果相一致, 即 *PPAR $\gamma$*  基因有抑制鸡前脂肪细胞增殖, 促进分化的作用<sup>[12]</sup>。哺乳动物上的研究也发现了类似的结果。在脂肪细胞分化这样一个受众多基因共同调控的复杂过程中, *PPAR $\gamma$*  基因处于脂肪细胞分化过



程调控网络的中心位置,在脂肪细胞分化过程中,尤其是脂肪细胞分化早期发挥着不可或缺的重要作用<sup>[7]</sup>;脂肪细胞分化诱导过程中,*PPAR $\gamma$* 基因是在大多数脂肪细胞特异基因的表达之前被诱导的<sup>[18]</sup>;*PPAR $\gamma$* 基因的表达足以诱导脂肪细胞出现生长抑制现象,并启动前体脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞<sup>[8]</sup>,而在缺失 *PPAR $\gamma$*  的情况下,脂肪细胞的分化则无法正常启动<sup>[19]</sup>;它可通过调节转录因子 *C/EBP $\alpha$* 、脂代谢关键酶活转运蛋白、脂肪细胞分泌蛋白的表达来影响脂肪细胞的分化过程<sup>[20]</sup>。由此可见,无论是在禽类,还是在哺乳动物,*PPAR $\gamma$* 基因在脂肪细胞分化的过程中均发挥着重要的调控作用。

除 *PPAR $\gamma$*  基因外,还有大量的基因参与到脂肪细胞分化的过程中,共同组成了脂肪细胞分化的调控网络,如 *C/EBP $\alpha$* 、*SREBP1*、*GATA2*、*A-FABP*、*Perilipin1*、*LPL*、*IGFBP-2* 和 *FAS* 等。*CAAT/增强子结合蛋白  $\alpha$ (C/EBP $\alpha$ )*,是第一个被证明能在脂肪细胞分化过程中起重要作用的转录因子,它能够促进 *PPAR $\gamma$*  基因的高表达,保持分化细胞的表型<sup>[21]</sup>;类固醇调控元件结合蛋白 1(*SREBP1*),是脂肪细胞分化过程中另一重要的转录因子,其对脂类的生成、脂肪细胞的分化及机体的生长发育有重要作用<sup>[22]</sup>,并可以调节葡萄糖、脂肪酸以及甘油三酯代谢中关键基因的表达<sup>[23]</sup>,此外,*SREBP1* 还与 *PPAR $\gamma$*  基因的内源配体的生成有关<sup>[21,24]</sup>;*GATA2* 是脂肪细胞分化过程中的负转录调控因子,其在前脂肪细胞中大量表达,通过抑制 *PPAR $\gamma$*  基因的表达来抑制脂肪细胞的终末分化<sup>[25]</sup>;脂肪型脂肪酸结合蛋白(*A-FABP*)基因在哺乳动物的脂肪酸运输和脂肪细胞分化过程中发挥着重要的作用<sup>[26]</sup>,是脂肪细胞分化晚期的标志之一<sup>[27]</sup>,在诱导脂肪细胞分化的过程中,它能够直接被 *PPAR $\gamma$*  基因在转录水平激活<sup>[28]</sup>;脂滴包被蛋白 1(*Perilipin1*)特异性地分布于脂肪细胞脂滴的表面<sup>[29]</sup>,在脂肪细胞脂解过程中发挥着十分重要的功能,其 5'侧翼区存在 *PPAR $\gamma$*  基因功能性的反应原件(PPRE),内源性的 *PPAR $\gamma$* 2 蛋白能够结合 *Perilipin1* 基因的启动子区,调控 *Perilipin1* 基因在脂肪细胞分化过程中的表达<sup>[30]</sup>;脂蛋白酯酶(*Lipoprotein lipase, LPL*)是催化甘油三酯水解作用的酶,它可将血液中的乳糜微粒和极低密度脂蛋白(VLDL)所携带的甘油三酯水解成甘油和脂肪酸,以供机体各组织贮存和利用,

该基因的表达是脂肪细胞分化的早期标记,*LPL* 的表达预示着脂肪积累的开始<sup>[31]</sup>;类胰岛素生长因子结合蛋白 (Insulin-like growth factor binding protein, *IGFBP2*)能调控前体脂肪细胞的增殖分化,影响脂肪代谢<sup>[32]</sup>;脂肪酸合成酶(*FAS*)在动物体脂沉积中发挥重要作用<sup>[33]</sup>,其功能是将碳水化合物合成脂肪酸,并以甘油三酯的形式储存<sup>[34]</sup>,有文献报道,在哺乳动物的肝细胞中异位表达 *PPAR $\gamma$*  可以上调 *FAS* 基因的表达量<sup>[35]</sup>。

本研究结果显示,随着 *PPAR $\gamma$*  基因表达量的下调,许多与脂肪细胞分化相关基因的表达量表现出不同程度的降低:*C/EBP $\alpha$* 、*SREBP1*、*A-FABP* 和 *Perilipin1* 基因的表达量无论是在 mRNA 水平还是在蛋白质水平都明显降低;*LPL* 和 *IGFBP-2* 基因在 mRNA 水平的表达量显著降低。由此可见,*PPAR $\gamma$*  基因在脂肪细胞分化过程的调控网络中处于中心位置,发挥着调控其他脂肪细胞分化相关基因的表达的重要作用。

进一步利用在线分析软件(TFSEARCH)对所检测基因的启动子序列进行分析,结果表明,*C/EBP $\alpha$* 、*A-FABP* 和 *Perilipin1* 基因的启动子区都存在 *PPAR $\gamma$*  基因的结合位点,*SREBP1*、*LPL*、*IGFBP-2*、*GATA2* 和 *FAS* 基因上没有发现 *PPAR $\gamma$*  基因的结合位点。由此推测,鸡 *PPAR $\gamma$*  基因可能通过与 *C/EBP $\alpha$* 、*A-FABP* 和 *Perilipin1* 基因的启动子区结合来调控它们的表达。在脂肪细胞分化过程中,*PPAR $\gamma$*  基因与 *C/EBP $\alpha$*  基因间的相互调控作用一直以来都是研究的热点,大量的研究表明它们之间有相互的调控作用<sup>[4,19]</sup>。本课题组前期的研究结果证实,鸡 *PPAR $\gamma$*  基因的启动子区有 *C/EBP $\alpha$*  的结合位点,*C/EBP $\alpha$*  能够直接结合在 *PPAR $\gamma$*  基因的启动子区,从而执行对 *PPAR $\gamma$*  基因的调控作用<sup>[36]</sup>,但 *PPAR $\gamma$*  基因对 *C/EBP $\alpha$*  的调控作用是否是通过直接结合于其启动子区来实现的还在进一步的研究中。在哺乳动物上有研究证明,*PPAR $\gamma$*  基因对 *C/EBP $\alpha$*  基因的调控过程不是通过结合在其启动子上来完成的,而是通过蛋白-蛋白间的作用进行表达调控的<sup>[37,38]</sup>。在哺乳动物上,已经证实 *PPAR $\gamma$*  基因可结合在 *A-FABP* 和 *Perilipin1* 基因的启动子上发挥调控功能<sup>[30,39,40]</sup>。关于禽类 *PPAR $\gamma$*  基因对以上 3 个基因的具体调控机制还有待进一步的实验证明。由于 *SREBP1*、*LPL* 和 *IGFBP-2* 这 3 个基因的启动

子上没有发现 *PPAR $\gamma$*  基因的结合位点, 而其表达量却随着 *PPAR $\gamma$*  基因表达量的降低而降低, 因此我们推测 *PPAR $\gamma$*  基因对这 3 个基因的调控作用可能是通过其他因子间接发挥的, 具体机制有待进一步研究。哺乳动物上的研究表明, 在成熟的脂肪细胞中, *PPAR $\gamma$*  基因的表达量下调后, *GATA2* 基因的表达量并未受到影响, 仍然维持在一个较低的表达水平<sup>[41]</sup>, 这与本研究结果一致。结合在线分析软件预测的结果——鸡 *PPAR $\gamma$*  基因的启动子区有 *GATA2* 的结合位点, 可推测出, 鸡 *GATA2* 基因与哺乳动物 *GATA2* 基因相似, 是 *PPAR $\gamma$*  基因的上游基因, 其表达不受 *PPAR $\gamma$*  基因的直接调控。本研究还发现鸡 *FAS* 基因在脂肪细胞中的表达可能也不受 *PPAR $\gamma$*  基因的直接调控, 而哺乳动物上的研究结果表明, 肝脏组织 *PPAR $\gamma$*  基因的表达可以上调 *FAS* 基因的表达<sup>[35]</sup>, 推测产生这种现象的原因可能是因为 *FAS* 在脂肪组织中和在肝脏组织中有着不同的表达调控模式, 也有可能是由于禽类与哺乳动物在脂肪形成以及脂类代谢方面存在差异。综上所述, 鸡 *PPAR $\gamma$*  基因对其他众多脂肪细胞分化转录因子以及脂肪细胞分化相关的重要基因具有调控作用。

本研究通过 Western blotting 的方法检测了 *PPAR $\gamma$*  基因的组织表达特性, 分析了其在高、低脂系肉鸡脂肪组织中的表达差异, 并通过 RNAi 的方法, 进一步分析了该基因对鸡脂肪细胞增殖和分化的影响以及可能的作用机制。本研究为更加深入的研究 *PPAR $\gamma$*  基因在禽类脂肪细胞分化过程中所发挥的作用及探索以 *PPAR $\gamma$*  基因为中心的脂肪细胞分化调控网络奠定了基础。

随着大量细胞水平 RNAi 研究的成功, 人们逐渐把目光投向体内基因的表达抑制方面。2002 年, Kay 研究小组<sup>[42]</sup>首次将体外合成的针对荧光素酶的 siRNA 和表达荧光素酶的质粒同时转染成年小鼠的肝脏, 成功地观察到荧光素酶的表达受到特异的抑制, 这一成果暗示体内的 RNAi 研究必将成为今后的研究热点。然而, 目前 RNAi 在动物活体水平的研究还仅限于小鼠和大鼠, 因此, 我们将在肉鸡活体水平进一步验证本研究的结果, 为阐明鸡 *PPAR $\gamma$*  基因的功能和推动 RNAi 技术的发展奠定基础。

#### 参考文献(References):

- [1] 李辉, 杨山. 控制鸡体内脂肪沉积的研究进展. 见: 中国畜牧兽医学界第十届全国会员代表大会暨学术年会论文集(畜牧卷). 北京: 中国农业大学出版社, 1996: 168-173.
- [2] Zerehdaran S, Vereijken AL, van Arendonk JA, van der Waaijt EH. Estimation of genetic parameters for fat deposition and carcass traits in broilers. *Poult Sci*, 2004, 83(4): 521-525.
- [3] Bray GA, Bouchard C. Handbook of obesity-clinical applications. 3rd ed. New York: Informa Health Care, 2008: 1-2.
- [4] Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 2009, 20(3): 107-114.
- [5] Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 1990, 347(6294): 645-650.
- [6] Ferré P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 2004, 53(Suppl. 1): S43-S50.
- [7] Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPAR $\gamma$ . *Cell*, 2005, 123(6): 993-999.
- [8] El-Jack AK, Hamm JK, Pilch PF, Farmer SR. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ . *J Biol Chem*, 1999, 274(12): 7946-7951.
- [9] MacDougald OA, Mandrup S. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab*, 2002, 13(1): 5-11.
- [10] Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPAR $\gamma$ . *Annu Rev Biochem*, 2008, 77: 289-312.
- [11] Ramsay TG, Rosebrough RW. Hormonal regulation of postnatal chicken preadipocyte differentiation *in vitro*. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2003, 136(2): 245-253.
- [12] Wang Y, Mu Y, Li H, Ding N, Wang Q, Wang Y, Wang S, Wang N. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  gene: a key regulator of adipocyte differentiation in chickens. *Poult Sci*, 2008, 87(2): 226-232.
- [13] Michalik L, Desvergne B, Dreyer C, Gavillet M, Laurini RN, Wahli W. PPAR expression and function during vertebrate development. *Int J Dev Biol*, 2002, 46(1): 105-114.
- [14] Rosen ED, Spiegelman BM. PPAR $\gamma$ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem*, 2001, 276(41): 37731-37734.
- [15] Meng H, Li H, Zhao JG, Gu ZL. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma gene in various chicken tissues. *Domest Anim Endocrinol*, 2005, 28(1): 105-110.
- [16] Hermier D, Quignard-Boulangé A, Dugail I, Guy G, Sali-chon MR, Brigant L, Ardouin B, Leclercq B. Evidence of enhanced storage capacity in adipose tissue of genetically

- fat chickens. *J Nutr*, 1989, 119(10): 1369–1375.
- [17] Guo L, Sun B, Shang Z, Leng L, Wang Y, Wang N, Li H. Comparison of adipose tissue cellularity in chicken lines divergently selected for fatness. *Poult Sci*, 2011, 90(9): 2024–2034.
- [18] Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*, 1998, 78(3): 783–809.
- [19] Rosen ED, Hsu CH, Wang XZ, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR $\gamma$ : a unified pathway. *Genes Dev*, 2002, 16(1): 22–26.
- [20] Seo JB, Noh MJ, Yoo EJ, Park SY, Park J, Lee IK, Park SD, Kim JB. Functional characterization of the human resistin promoter with adipocyte determination- and differentiation- dependent factor1/sterol regulatory element binding protein 1c and CCAAT enhancer binding protein- $\alpha$ . *Mol Endocrinol*, 2003, 17(8): 1522–1533.
- [21] Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*, 2006, 4(4): 263–273.
- [22] Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 activates PPAR $\gamma$  through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(8): 4333–4337.
- [23] Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 2002, 109(9): 1125–1131.
- [24] Otto TC, Lane MD. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2005, 40(4): 229–242.
- [25] Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(12): 885–896.
- [26] Motojima K. Differential effects of PPAR $\alpha$  activators on induction of ectopic expression of tissue-specific fatty acid binding protein genes in the mouse liver. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32(10): 1085–1092.
- [27] Xu AM, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang JL, Wat NM, Wong WK, Lam KSL. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem*, 2006, 52(3): 405–413.
- [28] Kim YO, Park SJ, Balaban RS, Nirenberg M, Kim Y. A functional genomic screen for cardiogenic genes using RNA interference in developing *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(1): 159–164.
- [29] Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem*, 1991, 266(17): 11341–11346.
- [30] Arimura N, Horiba T, Imagawa M, Shimizu M, Sato R. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes. *J Biol Chem*, 2004, 279(11): 10070–10076.
- [31] Ailhaud G. Early adipocyte differentiation. *Biochem Soc Trans*, 1996, 24(2): 400–402.
- [32] Brockmann GA, Haley CS, Wolf E, Karle S, Kratzsch J, Renne U, Schwerin M, Hoeflich A. Genome-wide search for loci controlling serum IGF binding protein levels of mice. *FASEB J*, 2001, 15(6): 978–987.
- [33] Smith S, Witkowski A, Joshi AK. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res*, 2003, 42(4): 289–317.
- [34] Chirala SS, Wakil SJ. Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids*, 2004, 39(11): 1045–1053.
- [35] Schadinger SE, Bucher NLR, Schreiber BM, Farmer SR. PPAR $\gamma$ 2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288(6): E1195–E1205.
- [36] Ding N, Gao Y, Wang N, Li H. Functional analysis of the chicken PPAR $\gamma$  gene 5'-flanking region and C/EBP $\alpha$ -mediated gene regulation. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2011, 158(4): 297–303.
- [37] Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- $\gamma$ . *Nature*, 2005, 437(7059): 759–763.
- [38] Hamm JK, Park BH, Farmer SR. A role for C/EBP $\beta$  in regulating peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*, 2001, 276(21): 18464–18471.
- [39] Chui PC, Guan HP, Lehrke M, Lazar MA. PPAR $\gamma$  regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *J Clin Invest*, 2005, 115(8): 2244–2256.
- [40] Guan HP, Ishizuka T, Chui PC, Lehrke M, Lazar MA. Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPAR $\gamma$  in adipocytes. *Genes Dev*, 2005, 19(4): 453–461.
- [41] Schupp M, Cristancho AG, Lefterova MI, Hanniman EA, Briggs ER, Steger DJ, Qatanani M, Curtin JC, Schug J, Ochsner SA, McKenna NJ, Lazar MA. Re-expression of GATA2 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  depletion to revert the adipocyte phenotype. *J Biol Chem*, 2009, 284(14): 9458–9464.
- [42] McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature*, 2002, 418(6893): 38–39.