

· 论著 ·

文章编号: 1007 - 8738(2012) 09 - 0944 - 05

脂滴包被蛋白对鸡前脂肪细胞脂质蓄积的影响

周纬男, 王宇祥, 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, 黑龙江 哈尔滨 150030)

Effect of perilipin 1 on chicken preadipocyte lipid accumulation

ZHOU Wei-nan, WANG Yu-xiang, 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] AIM: To explore the effect of perilipin 1 on chicken preadipocyte lipid accumulation. METHODS: Firstly, pcDNA3.1-perilipin 1 gene eukaryotic expression vector was constructed and transfected into primary cultured chicken preadipocytes. Twenty-four hours after transfection, chicken preadipocytes were cultured in complete medium with oleate, to induce preadipocyte differentiation. Then perilipin 1 was detected by Western blotting; the role of perilipin 1 in preadipocyte lipid accumulation was investigated by Oil Red O staining extraction assay; the expression levels of other genes (FAS, ACC and ATGL) related to the chicken adipocyte lipid metabolism were tested by real-time RT-PCR. RESULTS: pcDNA3.1-perilipin 1 gene eukaryotic expression vector upregulated the expression of perilipin 1 in the transfected chicken preadipocytes. Over-expression of perilipin 1 promoted chicken preadipocyte lipid accumulation, while there was no significant change in the expression levels of other chicken lipid metabolism related genes (FAS, ACC and ATGL). CONCLUSION: Over-expression of perilipin 1 can promote chicken preadipocyte lipid accumulation.

[Keywords] chicken; perilipin 1; adipocyte lipid accumulation; over-expression

[摘要] 目的: 探讨脂滴包被蛋白(perilipin 1)对鸡前脂肪细胞脂质蓄积的影响。方法: 首先构建 pcDNA3.1-perilipin 1 基因真核表达载体, 转染鸡原代前脂肪细胞, 24h 后添加油酸诱导前脂肪细胞分化。然后利用 Western blot 方法检测 perilipin 1 的表达; 利用油红 O 提取比色法研究 perilipin 1 对鸡前脂肪

细胞脂质蓄积的影响; 利用 Real-time RT-PCR 方法分析其他与脂类代谢相关的重要基因(FAS、ACC、ATGL)的表达变化。结果: 转染 pcDNA3.1-perilipin 1 基因真核表达载体能明显上调 perilipin 1 的表达。perilipin 1 表达量升高后, 鸡前脂肪细胞脂质蓄积能力增强, 但其他与脂类代谢相关的重要基因(FAS、ACC、ATGL)的表达量没有发生明显的变化。结论: 过表达 perilipin 1 促进鸡前脂肪细胞的脂质蓄积。

[关键词] 鸡; 脂滴包被蛋白; 脂肪细胞脂质蓄积; 过表达
[中图分类号] Q291 **[文献标识码]** A

脂滴是脂肪细胞内中性脂质的主要储存场所^[1-2]。PAT 家族蛋白是一类包被在脂滴表面的结构蛋白, 这些蛋白对于脂滴的代谢及其调节具有重要作用^[3]。脂滴包被蛋白(perilipin 1)是 PAT 家族蛋白的核心成员之一, 于 1990 年在大鼠脂肪细胞中首次被发现, 是定位于脂滴表面的高度磷酸化蛋白^[4]。哺乳动物的研究表明, perilipin 1 在脂肪细胞脂解过程中发挥着重要的调控作用: 在基础状态下, perilipin 1 包被在脂肪细胞中脂滴的表面, 通过阻止脂肪细胞中甘油三酯水解酶接近脂滴来抑制脂肪细胞的脂解作用^[5]; 另一方面, 在儿茶酚胺的刺激下, perilipin 1 可被蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 高度磷酸化而有利于脂解酶接近脂滴表面, 从而激活并促进脂解作用^[6]。

尽管 perilipin 1 在哺乳动物中的研究较为透彻, 但在家禽上还仅限于基因克隆、表达特性、基因多态性与脂肪性状的相关研究等方面^[7-10]。本课题组前期利用鸡全基因组芯片, 筛选 7 周龄肉鸡脂肪组织特异表达基因时发现, 鸡 perilipin 1 基因在脂肪组织中高表达, 同时代谢通路分析表明鸡 perilipin 1 基因参与影响脂类代谢的重要调控通路——PPAR 信号通路^[11]。随后, 我们又在鸡 perilipin 1 基因的结构、组织表达特性和基因的多态性与生长和体组成性状的相关性等方面进行了研究, 结果发现 perilipin 1 基因在鸡脂质代谢过程中可能发挥着重要作用^[12]。在此基础上, 本研究通过基因过量表达技术, 在细胞水平上分析 perilipin 1 对鸡前脂肪细胞脂质蓄积的影响, 为阐明 perilipin 1 在鸡脂质代谢过程中发挥的重要作用奠定基础。

收稿日期: 2012-06-01; 接受日期: 2012-07-01

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

作者简介: 周纬男(1987-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 硕士生

Tel: 13654549200; E-mail: zwn0501@163.com

* Corresponding author, E-mail: lihui@neau.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料 质粒 pcDNA3.1(+) 和兔抗鸡 perilipin 1 抗血清为本实验室保存, PrimeSTAR[®] HS DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司, pEASY-T1 Simple Cloning Kit 购自北京全式金生物技术有限公司, 限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I 和 T4 DNA 连接酶均购自 NEB 公司, 凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司, TRIzol[®] Reagent 购自 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒购自 Promega 公司, 油酸钠购自 Sigma 公司, DMEM/F12 培养基、胎牛血清、胶原酶 I 和油红 O 均购自 Gibco 公司, FuGENE[®] HD Transfection Reagent 和 FastStart Universal SYBR Green Master(ROX) 均购自 Roche 公司, RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)、GAPDH 抗体和 BeyoECL Plus(超敏 ECL 化学发光试剂盒)均购自碧云天生物技术研究, 辣根过氧化物酶(HPR)标记的山羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶(HPR)标记的山羊抗小鼠 IgG 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 鸡 perilipin 1 基因真核表达载体的构建 根据鸡 *perilipin 1* 基因序列(NM_001127439)设计全长编码区克隆引物(F: 5'-CCG GAATTCATGATGACGGCGAAGAAGAATCAG-3'; R: 5'-CCCTCGAGGGTCTCCCTCTCAGGCTCAGTCTCT-3'), 上游引物引入 *EcoR* I 酶切位点, 下游引物引入 *Xho* I 酶切位点(下划线表示), 产物大小为 1 589 bp。提取鸡脂肪组织总 RNA, 并反转录为 cDNA, 以其为模板, 利用高保真的 Prime-STAR[®] HS DNA 聚合酶对鸡 *perilipin 1* 基因全长编码区进行 PCR 扩增, 反应条件: 94℃ 5 min; 98℃ 10 s, 68℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 7 min。将扩增产物经琼脂糖凝胶电泳、回收加 A 后连接到 pEASY-T1 Simple 载体上, 进一步亚克隆到 pcDNA3.1(+) 载体上。构建好的质粒经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定后, 送上海英骏公司进行测序。

1.2.2 鸡前脂肪细胞的原代培养 本课题组在前人研究的基础上, 经过多年的摸索, 确立了以肉仔鸡腹部脂肪组织为材料培养原代前脂肪细胞的方法^[13]。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℃ 消化 65 min(每 5 min 震荡 1 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 50 mL/L CO₂ 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。

1.2.3 鸡前脂肪细胞的转染及诱导分化 待传代后的细胞汇合度达到 80% ~ 90% 时, 按 FuGENE[®] HD Transfection Reagent 说明书进行质粒转染。转染 24 h 后, 换为诱导培养基

(完全培养基中加入油酸) 诱导前脂肪细胞分化。

1.2.4 细胞总 RNA 及总蛋白的提取 细胞总 RNA 提取: 按 TRIzol[®] Reagent 说明书进行操作, 提取转染之后特定时间点细胞的总 RNA, 用紫外吸光法测定 RNA 浓度和纯度, -80℃ 保存。

细胞总蛋白提取: 将收集的细胞加入含有 1 mmol/L PMSF 的细胞裂解液振荡混匀后冰上静置 30 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 用 BCA 方法测定蛋白浓度, -80℃ 保存。

1.2.5 Western blot 法检测 perilipin 1 表达 每种蛋白上样量为 100 μg, 经 SDS-PAGE 电泳分离后, 电转至 PVDF 膜上; 将膜放入 50 g/L 脱脂乳中, 室温封闭 1 h; 用 PBST 洗涤后加入 1:1 000 稀释的一抗(兔抗鸡 perilipin 1 抗血清), 室温振荡孵育 1 h; 洗涤后加入 1:5 000 稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG), 室温振荡孵育 1 h; 洗涤后用 ECL 显色液显色 3 min, 暗室曝光。

1.2.6 油红 O 提取比色检测 在诱导后不同时间点取出细胞, 弃去细胞培养液, 经 PBS 清洗 3 次, 以 100 mL/L 的福尔马林固定液固定 30 min, PBS 洗 3 次, 蒸馏水洗 3 次, 32℃ 干燥, 10 g/L 油红 O 染色液染色 40 min, PBS 洗 3 次, 1 000 mL/L 异丙醇溶解被染细胞中的油红 O 15 min, 以 1 000 mL/L 异丙醇 1 mL 调零, 分光光度计 510 nm 波长比色, 记录吸光度(A)值。每组内设置 3 个重复进行比较。

1.2.7 Real-time RT-PCR 检测 将提取的细胞总 RNA 反转录为 cDNA。使用的 Real-time PCR 仪型号为 ABI 7500。反应体系为: FastStart Universal SYBR Green Master(ROX) (2 ×) 5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L) 各 0.2 μL, cDNA 模板 1 μL, ddH₂O 3.6 μL, 总体积为 10 μL。反应条件: 95℃ 预变性 10 min, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 复性延伸 60 s, 共 40 个循环。熔解曲线 95℃ 15 s, 60℃ 10 min, 95℃ 15 s, 每个样品设 3 孔重复。以 β-actin 基因为内参, 利用 $2^{-\Delta Ct}$ 的方法将原始 Ct 值转换为相对的基因表达量。所用引物序列列表 1。

表 1 Real-time RT-PCR 分析所用的引物

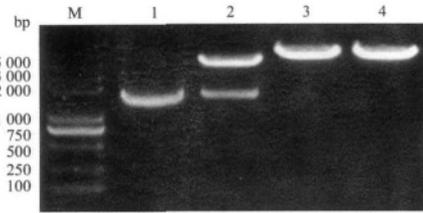
基因名称	GenBank 登录号	引物序列(5'→3')
<i>β-actin</i>	NM_205518	F: TCTTGGGTATGGAGTCTCTG R: TAGAAGCATTTCGGGTGG
<i>FAS</i>	NM_205155	F: AAGGAGGAAGTCAACGG R: TTGATGCTGAGGAGTCTG
<i>ACC</i>	NM_205505	F: TTCCTACCAAGACTCCCTAT R: GGTTCCTACGGCAACTACTC
<i>ATGL</i>	EU240627	F: TCTACTGTGGGCTGATACCT R: GTGGAAGTCTCTCGTGG

1.2.8 统计学分析 所得数据利用 JMP5.0 软件进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 真核表达载体 pcDNA3.1-perilipin 1 的构建 以肉鸡腹部脂肪组织 cDNA 为模板, 利用 *perilipin 1* 基因全长编码区的克隆引物进行 PCR 扩增, 得到 1 条特异性条带(图 1), 通过克隆测序后发现该片段长度为 1 589 bp, 与预测目的片段大小一致。将该目的片段进一步亚克隆到 pcDNA3.1(+) 载体

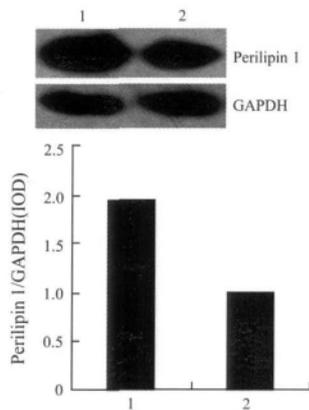
上,获得鸡 *perilipin 1* 基因真核表达载体。pcDNA3.1-*perilipin 1* 载体经内切酶 *EcoR I*、*Xho I* 酶切鉴定(图1),并于测序正确后用于细胞转染。



M: Trans2K plus DNA marker; 1: *perilipin 1* 基因 RT-PCR 产物; 2: 重组质粒经 *EcoR I*、*Xho I* 双酶切结果; 3: 重组质粒经 *EcoR I* 单酶切结果; 4: 重组质粒经 *Xho I* 单酶切结果。

图1 鸡 *perilipin 1* 基因的克隆和重组质粒的酶切鉴定

2.2 真核表达载体的过表达效果验证 分别用重组体 pcDNA3.1-*perilipin 1* 和空载体 pcDNA3.1(+) 转染鸡前脂肪细胞,24 h 后诱导细胞分化,在诱导后 48 h 收集细胞,分别提取细胞总蛋白,利用 Western blot 方法分析过表达组与空载体对照组细胞中 *perilipin 1* 的表达情况(图2)。结果显示,诱导后 48 h,过表达组细胞中 *perilipin 1* 的表达量明显高于对照组。这表明本研究所构建的真核表达载体能够有效地上调鸡前脂肪细胞中 *perilipin 1* 的表达。



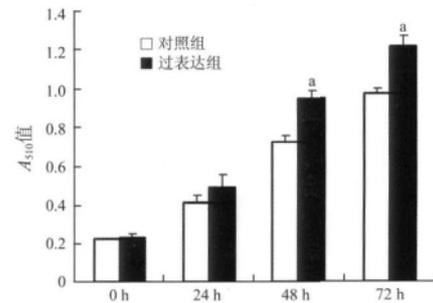
1: 过表达组细胞; 2: 对照组细胞。

图2 过表达后 *perilipin 1* 在鸡前脂肪细胞中的表达量

2.3 *Perilipin 1* 表达量升高后鸡前脂肪细胞脂质蓄积情况检测 利用油红 O 提取比色的方法检测 *perilipin 1* 表达量升高后鸡前脂肪细胞的脂质蓄积情况。以诱导时间点为 0 点(则转染时间点为 -24 h),在诱导后每隔 24 h 对过表达组和空载体对照组细胞的脂质蓄积情况进行比较。结果显示,诱导后 48 h 和 72 h,过表达组细胞脂质蓄积能力显著高于对照组细胞($P < 0.05$,图3)。

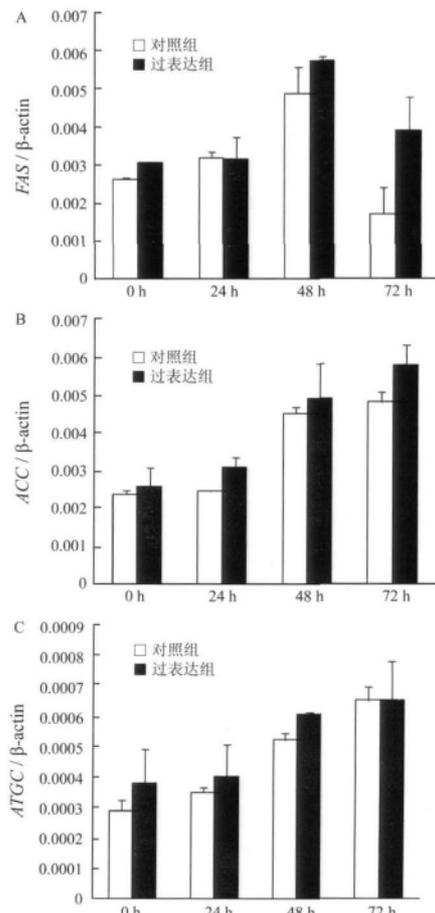
2.4 *Perilipin 1* 表达量升高后其他基因表达量的变化 为了探究过表达 *perilipin 1* 促进鸡前脂肪细胞的脂质蓄积的分子机制,本研究利用 Real-time RT-PCR 的方法检测 *perilipin 1* 表达量升高后,脂肪合成相关基因(*FAS*、*ACC*) 和脂肪分解相关基因(*ATGL*) 的表达量变化情况。以诱导时间点为 0 点(则转

染时间点为 -24 h),在诱导后每隔 24 h 对过表达组和空载体对照组细胞 *FAS*、*ACC* 和 *ATGL* 基因的表达情况进行比较。结果显示,这些基因的表达量没有发生明显的变化(图4)。



$^a P < 0.05$ vs 相应对照组。

图3 *Perilipin 1* 表达量升高后鸡前脂肪细胞脂质蓄积情况



A: *FAS* 基因; B: *ACC* 基因; C: *ATGL* 基因。

图4 *Perilipin 1* 表达量升高后其他基因在 mRNA 水平的表达情况

3 讨论

Perilipin 1 特异性地包被于脂肪细胞中脂滴的表面,调控脂肪细胞中脂质的蓄积^[14]。细胞模型和动物模型上的研究结果表明 *perilipin 1* 对脂肪组织中甘油三酯的代谢起到重要的调节作用^[3]。在 3T3-L1 前

脂肪细胞中异位表达 *perilipin 1* 能够使脂解率降低 5 倍,同时甘油三酯的含量比对照组多 6~30 倍^[5]。*perilipin 1* 基因敲除实验表明,敲除该基因的小鼠具有较高的基础脂解率,脂解导致了白色脂肪组织明显减少,同时脂肪细胞体积减小^[15-16]。提示 *perilipin 1* 是中性脂滴的保护屏障,它可以抑制脂解作用,促进脂质蓄积。因此,为进一步探究 *perilipin 1* 在鸡脂类代谢中的功能,本研究通过基因过量表达技术,检测 *perilipin 1* 对鸡前脂肪细胞脂质蓄积情况以及其他与脂类代谢相关的重要基因(*FAS*、*ACC*、*ATGL*)表达的影响,从细胞表型以及基因表达两方面阐明 *perilipin 1* 对鸡前脂肪细胞脂质蓄积的影响。

在本研究中发现,过表达 *perilipin 1* 的鸡前脂肪细胞,其脂质蓄积在诱导后 48 h 和 72 h 具有显著性差异,但是在诱导后 24 h 无明显差异。哺乳动物的研究表明,PAT 家族的蛋白在脂滴形成过程中发生转换。即脂滴形成初期主要是由 S3-12 和 TIP47 包被;当脂滴达到中等大小时,其表面的主要蛋白是 ADRP;只有脂滴达到相对成熟阶段,其表面才是由 *perilipin 1* 包被^[17]。结合哺乳动物的研究结果,我们推测在诱导后 24 h 的鸡脂肪细胞中,其分化程度较低,尚未形成成熟脂滴,包被其表面的蛋白不是 *perilipin 1*,因此,过量表达的 *perilipin 1* 无法发挥其对中性脂滴的保护功能。而随着细胞分化程度的提高,*perilipin 1* 的功能得以发挥,它通过在脂滴表面形成一个保护屏障来抑制脂滴降解,因此促进鸡前脂肪细胞脂质蓄积。

为了探究过表达 *perilipin 1* 基因促进鸡前脂肪细胞脂质蓄积的潜在机制,本研究选择了脂肪合成相关基因(*FAS*、*ACC*)和脂肪分解相关基因(*ATGL*)作为研究对象。脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, *FAS*)是脂肪酸合成的关键酶,对动物脂肪酸的合成及体脂的沉积具有重要的意义^[18];乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, *ACC*)是催化脂肪酸合成代谢第一步反应的限速酶,在脂肪酸代谢中发挥着重要作用^[19];脂肪甘油三酯脂肪酶(adipose triacylglyceride lipase, *ATGL*)能特异地水解甘油三酯的第一酯键,是甘油三酯水解过程的关键酶,在脂肪组织脂解过程中起到了重要的作用^[20],此外,研究表明,*perilipin 1* 调控 *ATGL* 介导的脂解作用^[21]。

本研究结果显示,过表达 *perilipin 1* 对其他与脂类代谢相关的重要基因(*FAS*、*ACC*、*ATGL*)的表达情况均无显著影响。*perilipin 1* 转基因鼠^[14]的研究结果表明,脂肪合成相关基因的表达在转基因鼠白色脂肪组织中也无显著差异。推测产生这种现象的原因

可能是因为 *perilipin 1* 基因是脂类代谢通路的终末靶点之一,它可能对其他与脂类代谢相关的重要基因(*FAS*、*ACC*、*ATGL*)的反馈调节作用较弱;也有可能是由于脂肪细胞脂类代谢是一个受众多基因共同调控的复杂过程,*perilipin 1* 基因是通过影响脂类代谢通路上除 *FAS*、*ACC* 和 *ATGL* 基因以外的其他基因的表达来调控脂肪细胞脂质蓄积的;或者 *perilipin 1* 基因对 *FAS*、*ACC* 和 *ATGL* 基因的表达调控主要发生在翻译后水平,而本研究仅在转录水平对其进行研究。因此,关于鸡 *perilipin 1* 基因对以上 3 个基因的具体调控机制还有待进一步研究。

综上所述,本研究构建了稳定表达的鸡 *perilipin 1* 基因真核表达载体,并发现过表达 *perilipin 1* 促进鸡前脂肪细胞脂质蓄积,为进一步研究鸡 *perilipin 1* 的功能和生物学效应奠定基础。

参考文献:

- [1] Zehmer JK, Huang Y, Peng G, et al. A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic [J]. *Proteomics*, 2009, 9(4): 914-921.
- [2] 刘芳,张利军,叶菁,等. 脂肪储存小滴蛋白 5 基因真核表达载体的构建及亚细胞定位 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010(5): 438-439.
- [3] Brasaemle DL. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis [J]. *J Lipid Res*, 2007, 48(12): 2547-2559.
- [4] Lu X, Guia-Gray J, Copeland NG, et al. The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin [J]. *Mamm Genome*, 2001, 12(9): 741-749.
- [5] Brasaemle DL, Rubin B, Harten IA, et al. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(49): 38486-38493.
- [6] Tansey JT, Huml AM, Vogt R, et al. Functional studies on native and mutated forms of perilipins. A role in protein kinase A-mediated lipolysis of triacylglycerols [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(10): 8401-8406.
- [7] Wu Y, Liu X, Hou S, et al. Identification of adipose differentiation-related protein gene in Peking duck and its expression profile in various duck tissues [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(4): 2479-2484.
- [8] 潘志雄,王继文,唐慧,等. 鹅 Perilipin 基因部分片段的克隆、不同品种及填饲对组织 mRNA 表达水平的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(8): 939-943.
- [9] 赵小玲,刘益平,罗轶,等. 鸡多个组织 Perilipin 基因表达的发育性变化与脂肪性状的相关研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2009(2): 149-154.
- [10] 雷秋霞,周艳,韩海霞,等. 鸡脂滴包被蛋白基因内含子 5 多态性与胴体及脂肪性状的相关性分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2011(12): 142-145.

(下转 951 页)

