

lncRNA1926和lncRNA3223在肉鸡胚胎肝细胞 脂肪代谢中的功能研究

李 辉^{1,2,3}, 张惠莉^{1,2,3}, 王有栋^{1,2,3}, 程博涵^{1,2,3}, 冷 丽^{1,2,3},
栾 鹏^{1,2,3}, 李玉茂^{1,2,3}, 白 雪^{1,2,3}

(1. 农业农村部鸡遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省普通高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室, 哈尔滨 150030;
3. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030)

摘 要: RNA-Seq 分析发现 LOC107051926 (命名为 lncRNA1926) 和 LOC112533223 (命名为 lncRNA3223) 在肉鸡胚胎肝脏组织脂肪代谢过程发挥重要作用, 但其具体功能尚不清楚。采用油红 O 染色、GPO-PAP 和 RT-qPCR 方法对 lncRNA1926 和 lncRNA3223 作功能研究。结果表明, 敲低 lncRNA1926 或 lncRNA3223 后, 显著降低胚胎原代肝细胞中脂滴沉积和甘油三酯含量; lncRNA1926 是脂肪酸合成 (ACC、FAS)、甘油三酯合成 (GPAT)、脂肪酸降解 (CPT1) 相关基因正调控因子; lncRNA3223 是脂肪酸合成 (ACC、FAS)、甘油三酯合成 (GPAT、DGAT 和 MOGAT2) 相关基因正调控因子。敲低 lncRNA1926 或 lncRNA3223, 通过抑制脂肪酸合成和甘油三酯合成相关基因表达降低甘油三酯含量, 从而降低胚胎原代肝细胞中脂滴沉积。研究结果有助于增进对鸡肝脏脂肪代谢分子调控的理解, 为肉鸡体脂性状遗传改良提供理论依据。

关键词: 肉鸡; lncRNA; 脂肪代谢; 胚胎原代肝细胞

中图分类号: S831.2

文献标志码: A

文章编号: 1005-9369(2023)08-0017-10

李辉, 张惠莉, 王有栋, 等. lncRNA1926 和 lncRNA3223 在肉鸡胚胎肝细胞脂肪代谢中的功能研究[J]. 东北农业大学学报, 2023, 54(8): 17-26. DOI: 10.19720/j.cnki.issn.1005-9369.2023.08.002.

Li Hui, Zhang Huili, Wang Youdong, et al. Functional study on lncRNA1926 and lncRNA3223 in lipid metabolism of broiler embryonic primary hepatocytes[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2023, 54(8): 17-26. (in Chinese with English abstract) DOI: 10.19720/j.cnki.issn.1005-9369.2023.08.002.

Functional study on lncRNA1926 and lncRNA3223 in lipid metabolism of broiler embryonic primary hepatocytes/LI Hui^{1,2,3}, ZHANG Huili^{1,2,3}, WANG Youdong^{1,2,3}, CHENG Bohan^{1,2,3}, LENG Li^{1,2,3}, LUAN Peng^{1,2,3}, LI Yumao^{1,2,3}, BAI Xue^{1,2,3} (1. Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Harbin 150030, China; 2. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province, Harbin 150030, China; 3. School of Animal Sciences and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: RNA-Seq analysis shows that LOC107051926 (named lncRNA1926) and LOC112533-223 (named lncRNA3223) play important roles in fat metabolism in broiler embryo liver tissues, but their specific functions remain unclear. In the present study, oil red O staining, GPO-PAP and RT-qPCR methods were used to verify the functions of lncRNA1926 and lncRNA3223 in fat metabolism. The results showed that knockdown of lncRNA1926 or lncRNA3223 significantly reduced lipid deposition

基金项目: 黑龙江省博士后面项目(LBH-Z20111); 国家肉鸡产业技术体系项目(CARS-41)

作者简介: 李辉(1963-), 男, 教授, 博士, 博士生导师, 研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail: lihui@neau.edu.cn

and triglyceride (TG) content in embryonic primary hepatocytes. lncRNA1926 was a positive regulator of genes involved in fatty acid synthesis (ACC and FAS), TG synthesis (GPAT) and fatty acid degradation (CPT1); and lncRNA3223 was a positive regulator of genes involved in fatty acid synthesis (ACC and FAS) and TG synthesis (GPAT, DGAT and MOGAT2). Knockdown of lncRNA1926 or lncRNA3233 reduced TG content by inhibiting the expression of genes involved in fatty acid synthesis and TG synthesis, thus reducing lipid deposition in embryonic primary hepatocytes. These results were helpful to improve the understanding of molecular regulation of fat metabolism in chicken liver and provide theoretical basis for genetic improvement of broiler abdominal fat traits.

Key words: broiler; lncRNA; lipid metabolism; embryonic primary hepatocytes

经长期选育,肉鸡体脂(尤其是腹脂)蓄积过多问题突出。肉鸡腹脂沉积过多降低肉仔鸡饲料转化效率、胴体瘦肉与脂肪组织比例,降低肉种鸡繁殖性能^[1-2]。因此,控制脂肪在肉鸡体内过度沉积是肉鸡育种和生产中亟待解决的问题。解决肉鸡体脂过度沉积问题,需了解家禽脂肪代谢过程。脂肪代谢主要包括甘油三酯(TG)合成代谢、转运及分解代谢^[3]。不同于哺乳动物,在家禽肝脏脂类代谢过程中,超过70%脂肪酸在肝脏组织中合成,在家禽体脂沉积过程中发挥重要作用^[4-5]。肝脏中乙酰CoA在乙酰辅酶A羧化酶(Acetyl CoA carboxylase, ACC)和脂肪酸合酶(Fatty acid synthase, FAS)作用下合成脂肪酸,脂肪酸经酯化反应生成TG^[6]。其中绝大部分TG与载脂蛋白B(Apolipoprotein B100, APOB100)通过血液循环运送到肝外组织贮存和利用,主要贮存在脂肪组织中;另一部分TG通过脂肪酸 β 氧化为肝脏提供能量^[7-8]。

鸡肝脏脂肪代谢受多种因子调控,如转录因子、信号转导分子、表观遗传修饰因子、miRNA等^[9-11]。研究发现,lncRNA在鸡肝脏脂肪代谢中发挥重要调控作用,如lncLTR、lncRNA-FNIP2等^[12-14]。目前,有关lncRNA参与调控鸡肝脏脂肪代谢研究虽有开展,但均集中在出壳后阶段,胚胎期研究尚未见报道。

为研究lncRNA在鸡胚胎期肝脏脂肪代谢中的调控作用,本课题组前期利用RNA-Seq测序技术绘制东北农业大学高、低腹脂双向选择品系(以下简称高脂系、低脂系)肉鸡胚胎期(E12、E14、E17、E21)肝脏组织lncRNA表达谱,发现lncRNA1926和lncRNA3223可能是影响肉鸡胚胎期肝脏脂肪代谢的重要调控因子(数据未发表),但其具体生物学功能尚不清楚。本文对lncRNA1926

和lncRNA3223在调控鸡胚胎原代肝细胞中脂肪代谢功能开展研究。研究结果有助于增进理解鸡肝脏脂肪代谢分子调控,为肉鸡体脂性状遗传改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

主要试剂:IV型胶原酶购自Gibco公司;胎牛血清购自Biological Industries公司;PBS缓冲液粉末购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Williams E培养基购自Gibco公司;Lipofectamine 3000转染试剂购自Invitrogen公司;TRIzol Reagent购自Invitrogen公司;BCA蛋白定量分析试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Percoll离心液购自Solarbio公司;油红O染液购自Sigma公司;PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser购自宝生物工程(大连)有限公司;FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)购自Roche公司;甘油三酯测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所、总胆固醇测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;RIPA裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司;PMSF购自上海碧云天生物技术有限公司。

主要仪器:CO₂细胞培养箱购自Thermo公司;全波长酶标仪购自Thermo公司;ABI7500实时荧光定量PCR仪购自ABI公司;倒置显微镜购自Leica公司;高速台式冷冻离心机购自Eppendorf公司;空气浴摇床购自东联电子技术开发有限公司;超净工作台购自智城分析仪器制造有限公司。

1.2 鸡胚胎原代肝细胞分离与培养

本试验选取Arbor Acres(AA)肉鸡种蛋,孵化至第17天(E17)分离胚胎肝脏组织,采用胶原酶消化法分离胚胎原代肝细胞^[15]。具体操作步骤如下:

将分离出肝脏组织用37℃ PBS清洗3次, 剪碎。剪碎后组织使用Ⅳ型胶原酶于42℃消化10 min, 使用200目与500目细胞筛过滤, 再用37℃ PBS清洗3次。将以上得到细胞沉淀重悬, 使用Percoll分离液分离胚胎原代肝细胞。将分离出细胞加入基础培养基重悬, 置于37℃, 5% CO₂培养箱中培养。

1.3 细胞转染

将分离出鸡胚胎原代肝细胞接种至12孔板中(接种密度约1×10⁵ cells·mL⁻¹), 待细胞汇合度达到50%时, 使用Lipofectamine3000转染试剂将5 μL Smart Silencer转染至原代肝细胞中, 以Smart Silencer-NC作为对照, 将转染后细胞继续置于37℃, 5% CO₂培养箱, 分别培养24和48 h后, 收集细胞作相关检测。lncRNA3223和lncRNA1926干扰片段Smart Silencer由广州锐博公司设计并合成, 包含3条siRNA和3条ASO。干扰片段具体序列见表1。

1.4 细胞总RNA提取、反转录和RT-qPCR

使用PBS清洗12孔板中细胞, 采用TRIzol提取细胞总RNA。总RNA根据PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒说明书反转录成cDNA。使用Fast-Start Universal SYBP Green Master

(Rox)试剂盒进行RT-qPCR分析。RT-qPCR反应体系包括: Fast-Start Universal SYBP Green Master 5 μL; 上、下游引物各0.2 μL; RNase Free dH₂O 3.6 μL。RT-qPCR反应条件为: 50℃ 2 min; 5℃ 10 min; 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 共40个循环。以TBP基因为内参, 利用2^{-ΔΔCT}方法分析试验数据^[16]。RT-qPCR引物见表2。

表 1 干扰片段 Smart Silencer 序列

Table 1 Sequence of Smart Silencer	
名称 Name	干扰序列(5'-3') Smart Silencer sequences
lncRNA1926 Smart Silencer	GCTGTTAAACAAAGCCACC
	CCAAAGTCTGACTGAACCAA
	TGCTCACCAAACCATCACTA
	GGTAGCATTTATTCTCTCA
	CCACCTATTATGCTGTATT
lncRNA3223 Smart Silencer	CAGAAGGATTCCAGACATT
	GCGAATATATGATGGATGA
	GAACCAAAACGACCTCTTGA
	CCACACTTTCAAAGTTCCT
	TACCACCAACAGCTCAGAGG
	GGGATCAGAAGTCAACTAAA
	TTAAACTTCAAACCTGGAGC

表 2 RT-qPCR 引物序列

Table 2 Primers used for RT-qPCR

基因名称 Name	引物序列(5'-3') Sequence	PCR产物长度(bp) PCR product length	参考文献 Reference
lncRNA1926	F: CAGCTTTCTTACCTGCAACCT	247	
	R: GGAACGTCACGCAACATGGAT		
lncRNA3223	F: CATACACCCTGCAGTCCAAGTAG	124	
	R: ATTGGTTTGTTCCTACACAGAAGG		
ACC	F: CACCTTGAACCGCAAATCAGA R: GGAGCAAATCCATGACCACTG	125	[17]
FAS	F: ATCCTTGGTGTTCTGTGACGTG R: TTGTTGATGGTGAGGAGTCGG	158	[17]
APOB100	F: GAACTAACACGCGCGCTAATT R: TTCAGGTCTTCATGCGCTTCT	151	[18]
GPAT	F: CAAAGCAAGAAAAGAGAACGAGAAC R: TGAACCAATGTCCACCTACTAAACA	141	[18]
DGAT	F: AGAACGAAGGTACAAGCAGGTG R: CAGTTGACTTCCAGGACCTCAG	325	[19]
MOGPT2	F: TATTTCCAGGCAGAGACGAA R: AGAAGTGATTTTCCAGCAA	151	[20]
PHGDH	F: AGCCAAAGCATCGGAGACA R: AGCGAGGTCAGACAGTGGG	151	[21]
CPT1	F: TAGAGGGCGTGGACCAATAA R: TGGGATGCGGGAGGTATT	229	[3]
TBP	F: GCGTTTGTCTGCTGTTATTATGAG R: TCCTTGCTGCCAGTCTGGAC	122	[22]

1.5 油红O染色、提取比色及蛋白校正

弃去12孔板中培养基, PBS清洗3次。每孔加入500 μL 4%多聚甲醛固定30 min, 吸出固定液后, 用PBS清洗3次。使用油红O染色工作液(油红O原液:去离子水=3:2, 过滤)避光染色15 min后, 吸出染色液, PBS清洗3次, 每孔加入等量60%异丙醇, 等待1~2 s后弃掉, PBS清洗3次。随后在倒置显微镜下观察并拍照。最后, 在每个孔中加入500 μL 100%异丙醇溶解油红O, 将其置于细胞震荡摇床晃动15 min后, 使用酶标仪测定 OD_{510} 。

在细胞培养板中加入胰酶, 待细胞消化为流沙状, 加入完全培养基终止消化, 将细胞收集至1.5 mL离心管中, 加入适量含1 mmol·L⁻¹ PMSF蛋白裂解液, 冰上裂解30 min, 12 000 r·min⁻¹离心5 min取上清, 使用BCA试剂盒测定蛋白浓度; 使用油红O提取比色所得到的 OD_{510} 除以相邻孔测定的蛋白浓度, 即为蛋白校正后油红O染色结果。

1.6 细胞中甘油三酯含量测定

将细胞取出后, 使用PBS清洗3次, 经胰酶消化后, 添加培养基, 1 000 r·min⁻¹离心10 min, 弃上清, 留细胞沉淀; PBS清洗2次, 1 000 r·min⁻¹离心10 min, 弃上清。在细胞沉淀中加入0.2~0.3 mL裂解液, 冰上裂解30~40 min。裂解后细胞悬液按照甘油三酯检测试剂盒说明书, 在微量酶标板上加样, 利用酶标仪在波长500 nm处测定吸光度值, 根据标准品计算细胞中TG含量。

计算公式:

$$\text{TG含量}(\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ prot}) = \frac{A_{\text{样本孔}} - A_{\text{空白孔}}}{A_{\text{标准孔}} - A_{\text{空白孔}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

$C_{\text{标准}}$: 标准品浓度; C_{pr} : 待测样本匀浆蛋白浓度。

1.7 统计分析

每次试验每组设置3个生物学重复, 所有试验至少独立重复3次。数据表示为平均值 $\pm$ 标准差。两组数据差异显著性分析采用Student's *t*-tests。 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 敲低lncRNA1926对鸡胚胎原代肝细胞脂滴沉积、甘油三酯含量及脂肪代谢相关基因表达影响

为明确lncRNA1926在鸡胚胎原代肝细胞脂

肪代谢中功能, 将lncRNA1926 Smart Silencer (si-lncRNA1926)及其阴性对照(si-NC)转染至鸡胚胎原代肝细胞中, 转染24和48 h后收集细胞, 检测lncRNA1926干扰组和对照组细胞中脂滴沉积、TG含量及脂肪代谢相关基因(脂肪酸合成基因ACC和FAS; 三磷酸甘油合成基因PHGDH; TG合成基因GPAT、DGAT和MOGAT2; TG转运基因APOB100; 脂肪酸氧化基因CPT1)表达情况。RT-qPCR结果表明, 转染后24和48 h, 相比于对照组细胞, lncRNA1926干扰组细胞中lncRNA1926表达水平分别下降59.02%和68.22% ($P<0.01$, 见图1B), 说明转染lncRNA1926的Smart Silencer可降低细胞中lncRNA1926表达水平。油红O染色和提取比色结果显示, 转染24和48 h后, lncRNA1926干扰组的脂滴沉积显著低于对照组 ($P<0.05$, 见图2A、B)。TG含量分析结果表明, 转染24和48 h后, lncRNA1926干扰组中TG含量显著低于对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.001$, 见图2C)。RT-qPCR结果显示, 转染24 h时, lncRNA1926干扰组细胞中脂肪酸合成相关基因ACC和FAS表达水平 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 见图3A、B)及脂肪酸氧化相关基因CPT1表达水平显著低于对照组 ($P<0.01$, 见图5B)。转染48 h时, lncRNA1926干扰组细胞中的脂肪酸合成相关基因ACC和FAS的mRNA表达水平显著低于对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 见图3A、B); TG合成相关基因GPAT表达水平 ($P<0.01$, 见图4A)及脂肪酸氧化相关基因CPT1表达水平 ($P<0.05$, 见图5B)显著低于对照组。但无论在敲低lncRNA1926 24或48 h时, 参与三磷酸甘油合成的PHGDH基因(见图3C), 参与TG合成的DGAT、MOGAT2基因(见图4B、C)及参与TG转运的APOB100基因(见图5A)在两组细胞中均无显著差异。

以上结果说明, 敲低lncRNA1926 24 h后, 抑制鸡胚胎原代肝细胞中脂肪酸合成和脂肪酸氧化相关基因表达; 敲低lncRNA1926 48 h后, 抑制鸡胚胎原代肝细胞中脂肪酸合成、TG合成和脂肪酸氧化相关基因表达。综上, lncRNA1926是鸡胚胎原代肝细胞中参与脂肪酸从头合成、TG合成、脂肪酸氧化相关基因正调控因子。敲低lncRNA1926可能通过抑制脂肪酸从头合成、TG合成、脂肪酸氧化, 降低细胞中TG含量, 抑制鸡胚胎原代肝细胞脂滴沉积。

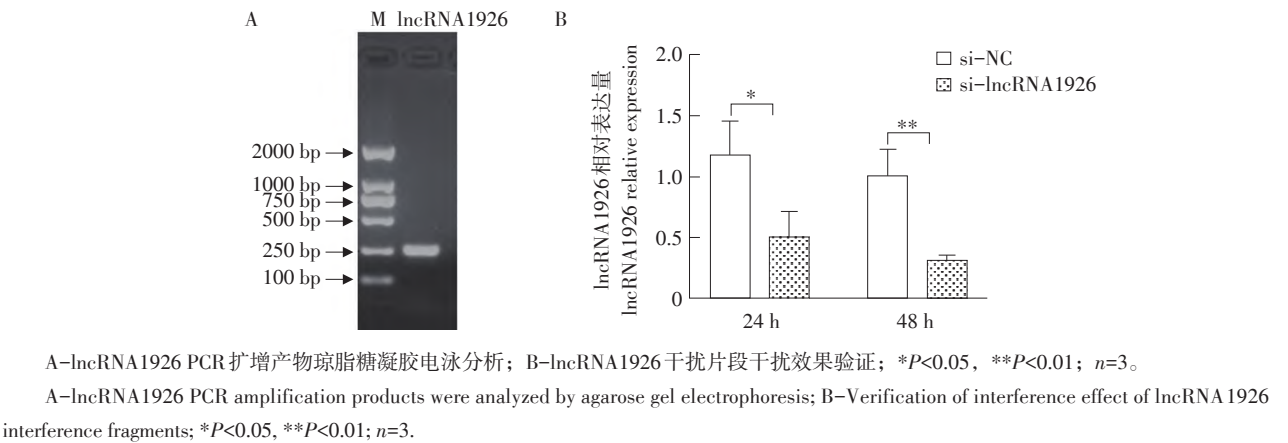


图1 lncRNA1926 干扰片段干扰效果验证

Fig. 1 Verification of interference effects of lncRNA1926 interference fragments

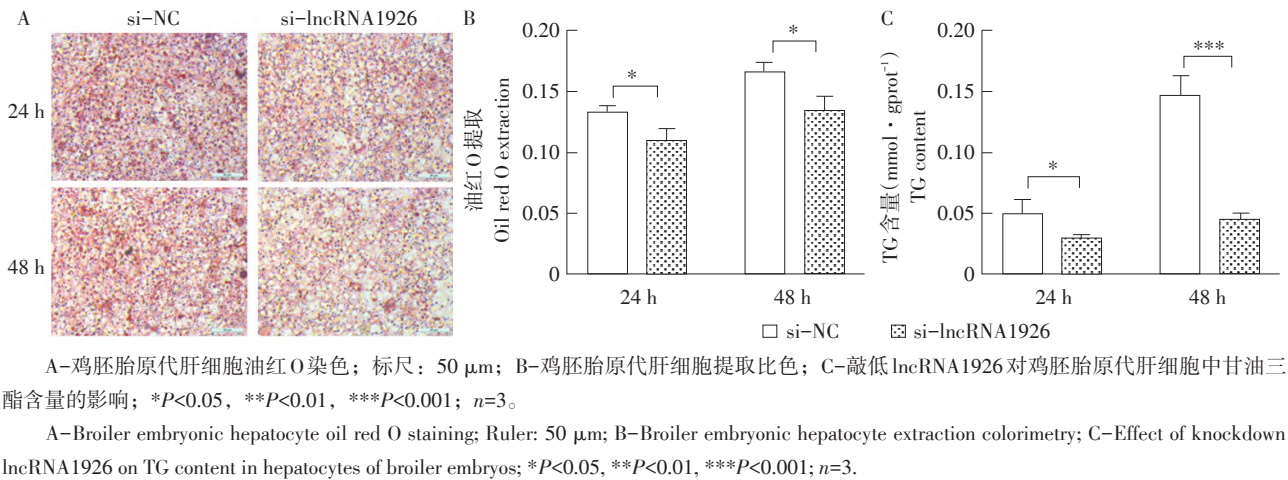


图2 敲低 lncRNA1926 对鸡胚胎原代肝细胞中脂滴沉积、甘油三酯含量的影响

Fig. 2 Effects of lncRNA1926 knockdown on lipid droplet deposition and TG content in primary broiler embryonic hepatocytes

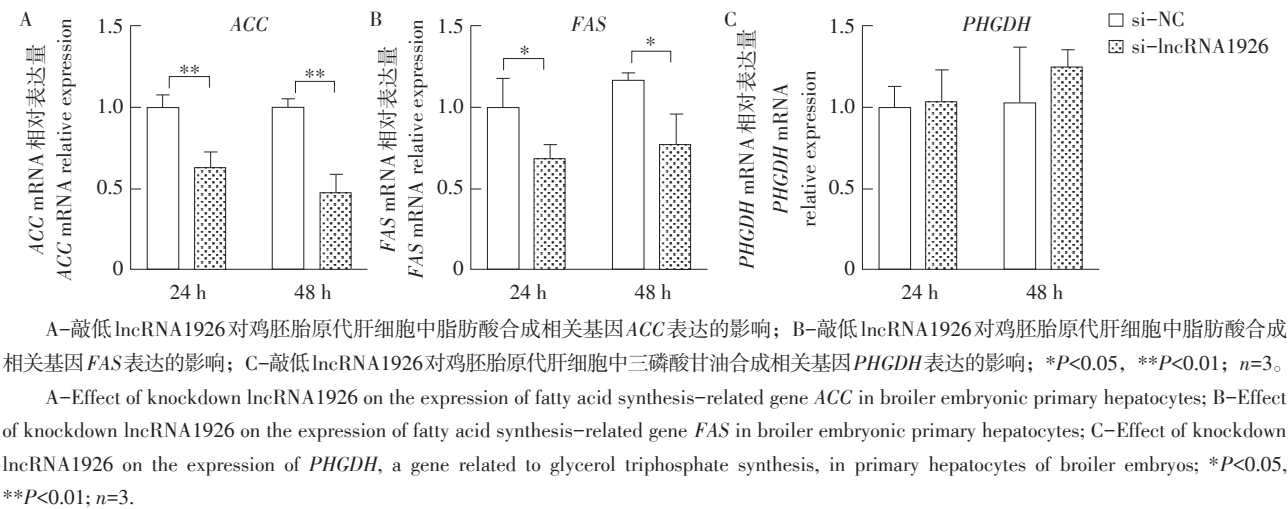
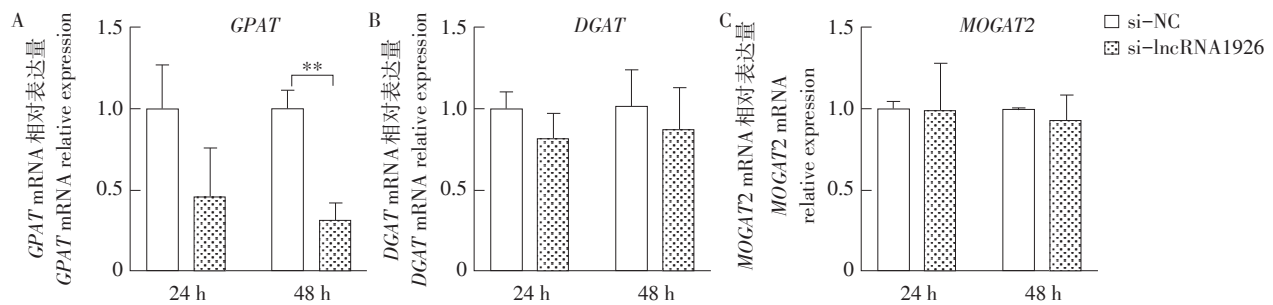


图3 敲低 lncRNA1926 对鸡胚胎原代肝细胞中脂肪酸合成和三磷酸甘油合成相关基因表达的影响

Fig. 3 Effects of knockdown lncRNA1926 on gene expression related to fatty acid synthesis and triphosphate synthesis in hepatocytes of broiler embryos

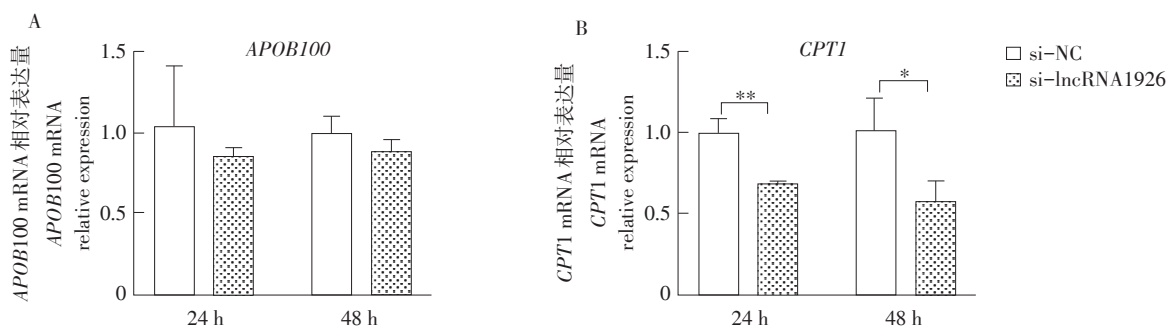


A-敲低 lncRNA1926 对鸡胚胎原代肝细胞中甘油三酯合成相关基因 *GPAT* 表达的影响；B-敲低 lncRNA1926 对鸡胚胎原代肝细胞中甘油三酯合成相关基因 *DGAT* 表达的影响；C-敲低 lncRNA1926 对鸡胚胎原代肝细胞中甘油三酯合成相关基因 *MOGAT2* 表达的影响；** $P<0.01$ ； $n=3$ 。

A-Effect of knockdown lncRNA1926 on the expression of *GPAT* gene related to TG synthesis in primary hepatocytes of broiler embryos; B-Effect of knockdown lncRNA1926 on the expression of *DGAT* gene related to TG synthesis in primary hepatocytes of broiler embryos; C-Effect of knockdown lncRNA1926 on the expression of *MOGAT2*, a gene related to TG synthesis, in primary hepatocytes of broiler embryos; ** $P<0.01$; $n=3$.

图4 敲低 lncRNA1926 对鸡胚胎原代肝细胞中甘油三酯合成相关基因表达的影响

Fig. 4 Effects of knockdown lncRNA1926 on gene expression related to TG synthesis in hepatocytes of broiler embryos



A-敲低 lncRNA1926 对鸡胚胎原代肝细胞中甘油三酯转运相关基因 *APOB100* 表达的影响；B-敲低 lncRNA1926 对鸡胚胎原代肝细胞中脂肪酸氧化相关基因 *CPT1* 表达的影响；* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ； $n=3$ 。

A-Effect of knockdown lncRNA1926 on the TG transport related gene *APOB100* in primary hepatocytes of broiler embryos; B-Effect of knockdown lncRNA1926 on *CPT1* gene of fatty acid oxygen-related gene in primary hepatocytes of broiler embryo; * $P<0.05$, ** $P<0.01$; $n=3$.

图5 敲低 lncRNA1926 对鸡胚胎原代肝细胞中甘油三酯转运、脂肪酸氧化相关基因表达的影响

Fig. 5 Effects of knockdown lncRNA1926 on gene expression related to TG transport and fatty acid oxidation in hepatocytes of broiler embryos

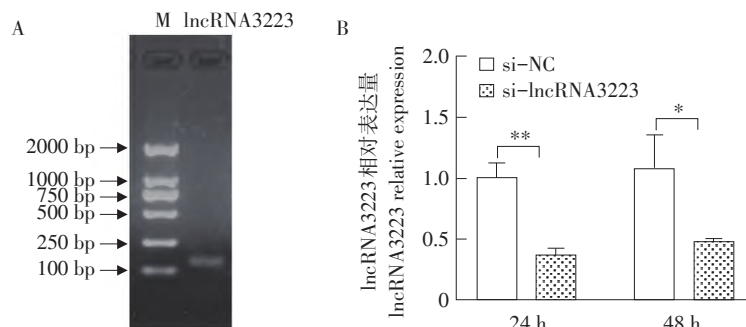
2.2 敲低 lncRNA3223 对鸡胚胎原代肝细胞脂滴沉积、甘油三酯含量及脂肪代谢相关基因表达的影响

为研究 lncRNA3223 对鸡胚胎原代肝细胞中脂肪代谢功能，将合成的 lncRNA3223 Smart Silencer (si-lncRNA3223) 及其阴性对照 (si-NC) 转染至鸡胚胎原代肝细胞中，转染 24 和 48 h 后，检测 lncRNA3223 干扰组和对照组细胞中脂滴沉积、TG 含量及脂肪代谢相关基因(同 2.1 中检测基因一致)表达情况。RT-qPCR 结果显示，转染后 24 和 48 h，相比于对照组细胞，lncRNA3223 干扰组细胞中

lncRNA3223 表达水平分别下降 63.78% 和 57.31% ($P<0.05$ 或 $P<0.01$ ，见图 6B)，表明转染 lncRNA3223 的 Smart Silencer 可成功降低细胞中 lncRNA3223 表达水平。油红 O 染色和提取比色结果显示，转染 24 和 48 h 后，lncRNA3223 干扰组脂滴沉积显著低于对照组 ($P<0.05$ ，见图 7A、B)。TG 分析结果显示，转染 24 和 48 h 后，lncRNA3223 干扰组的 TG 含量显著低于对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.001$ ，见图 7C)。RT-qPCR 结果显示，转染 24 h 时，lncRNA3223 干扰组细胞中脂肪酸合成相关基因

ACC 表达水平 ($P<0.05$, 见图 8A), *TG* 合成相关基因 *GPAT*、*DGAT* 和 *MOGAT2* 表达水平 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$, 见图 9) 显著低于对照组。转染 48 h 时, lncRNA1926 干扰组细胞中脂肪酸合成相关基因 *ACC* 和 *FAS* mRNA 表达水平 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 见图 8A、B), *TG* 合成相关基因 *GPAT*、*DGAT* 和

MOGAT2 表达水平 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 见图 9) 显著高于对照组。无论敲低 lncRNA3223 24 或 48 h, 参与三磷酸甘油合成的 *PHGDH* 基因 (见图 8C)、参与 *TG* 转运的 *APOB100* 基因 (见图 10A) 和参与脂肪酸氧化的 *CPT1* 基因 (见图 10B) 表达在两组细胞中均无显著差异。

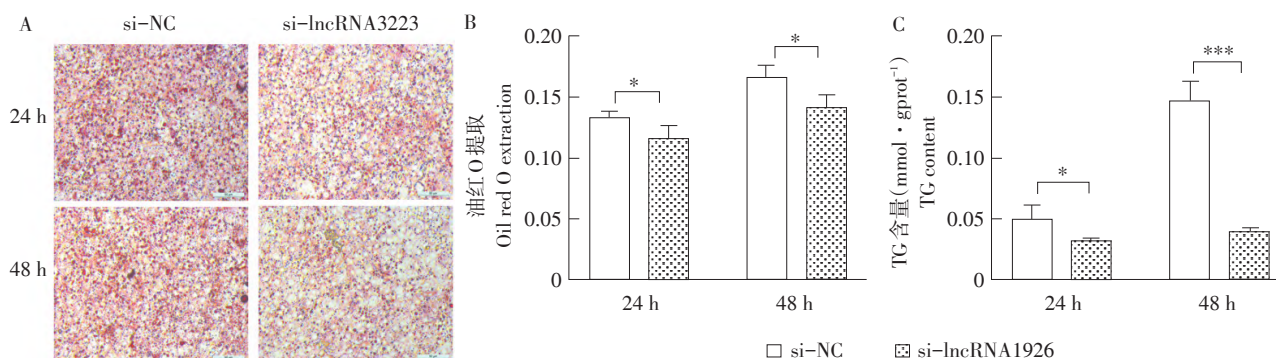


A-lncRNA3223 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳分析; B-lncRNA3223 干扰片段干扰效果验证; * $P<0.05$, ** $P<0.01$; $n=3$ 。

A-lncRNA3223 PCR amplification products were analyzed by agarose gel electrophoresis; B-Verification of interference effect of lncRNA3223 interference fragments; * $P<0.05$, ** $P<0.01$; $n=3$ 。

图 6 lncRNA3223 干扰片段干扰效果验证

Fig. 6 Verification of interference effects of lncRNA3223 interference fragments



A-鸡胚胎原代肝细胞油红 O 染色; 标尺: 50 μm ; B-鸡胚胎原代肝细胞提取比色; C-敲低 lncRNA3223 对鸡胚胎原代肝细胞中甘油三酯含量的影响; * $P<0.05$, *** $P<0.001$; $n=3$ 。

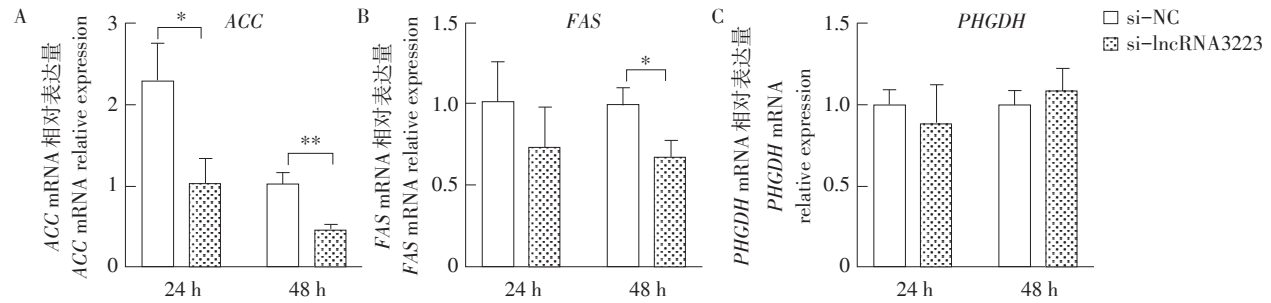
A-Broiler embryonic hepatocyte oil red O staining; Ruler: 50 μm ; B-Broiler embryonic hepatocyte extraction colorimetry; C-Effect of knockdown lncRNA3223 on TG content in hepatocytes of broiler embryos; * $P<0.05$, *** $P<0.001$; $n=3$ 。

图 7 敲低 lncRNA3223 对鸡胚胎原代肝细胞中脂滴沉积、TG 含量的影响

Fig. 7 Effects of lncRNA3223 knockdown on lipid droplet deposition and TG content in primary broiler embryonic hepatocytes

以上研究结果说明, 敲低 lncRNA3223 可抑制鸡胚胎原代肝细胞脂滴沉积, 降低细胞中 *TG* 含量, 抑制鸡胚胎原代肝细胞中与脂肪酸合成、*TG* 合成相关基因的 mRNA 表达。敲低 lncRNA3223 对鸡胚胎原代肝细胞中三磷酸甘油合成和 *TG* 转运基

因 mRNA 表达无影响。综上, 推测 lncRNA3223 是鸡胚胎肝细胞中参与脂肪酸从头合成和 *TG* 合成相关基因的正调控因子。敲低 lncRNA3223 可能通过抑制脂肪酸从头合成、*TG* 合成相关基因表达, 降低细胞中 *TG* 含量, 抑制鸡胚胎原代肝细胞脂滴沉积。

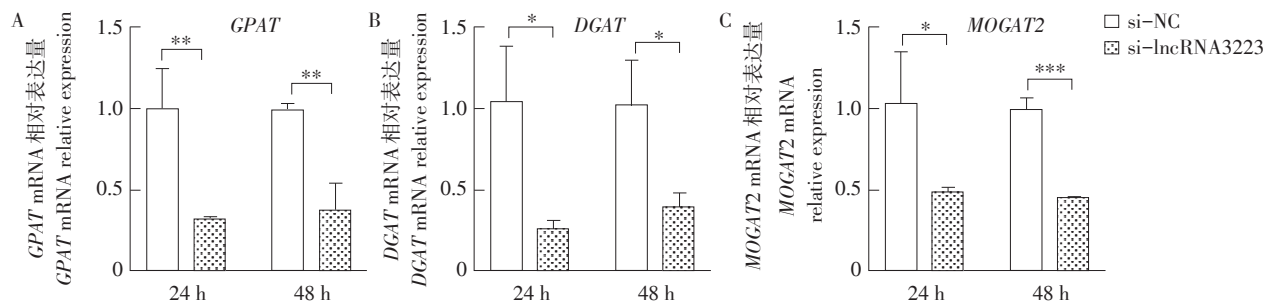


A-敲低 lncRNA3223 对鸡胚胎原代肝细胞中脂肪酸合成相关基因 *ACC* 表达的影响；B-敲低 lncRNA3223 对鸡胚胎原代肝细胞中脂肪酸合成相关基因 *FAS* 表达的影响；C-敲低 lncRNA3223 对鸡胚胎原代肝细胞中三磷酸甘油合成相关基因 *PHGDH* 表达的影响；* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ； $n=3$ 。

A-Effect of knockdown lncRNA3223 on the expression of fatty acid synthesis-related gene *ACC* in broiler embryonic primary hepatocytes; B-Effect of knockdown lncRNA3223 on the expression of fatty acid synthesis-related gene *FAS* in broiler embryonic primary hepatocytes; C-Effect of knockdown lncRNA3223 on the expression of glycerol triphosphate synthesis related gene *PHGDH* in primary hepatocytes of broiler embryos; * $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ； $n=3$ 。

图8 敲低 lncRNA3223 对鸡胚胎原代肝细胞中脂肪酸合成和三磷酸甘油合成相关基因表达的影响

Fig. 8 Effects of knockdown lncRNA3223 on gene expression related to fatty acid synthesis and triphosphate synthesis in hepatocytes of broiler embryos

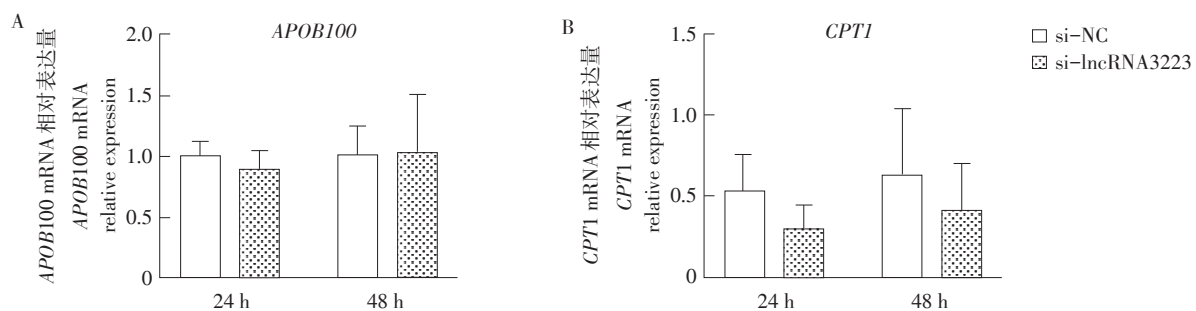


A-敲低 lncRNA3223 对鸡胚胎原代肝细胞中TG合成相关基因 *GPAT* 表达的影响；B-敲低 lncRNA3223 对鸡胚胎原代肝细胞中TG合成相关基因 *DGAT* 表达的影响；C-敲低 lncRNA3223 对鸡胚胎原代肝细胞中TG合成相关基因 *MOGAT2* 表达的影响；* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ； $n=3$ 。

A-Effect of knockdown lncRNA3223 on the expression of *GPAT* gene related to triglyceride synthesis in primary hepatocytes of broiler embryos; B-Effect of knockdown lncRNA3223 on the expression of *DGAT* gene related to triglyceride synthesis in primary hepatocytes of broiler embryos; C-Effect of knockdown lncRNA3223 on the expression of *MOGAT2* gene related to triglyceride synthesis in primary hepatocytes of broiler embryos; * $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ； $n=3$ 。

图9 敲低 lncRNA3223 对鸡胚胎原代肝细胞中TG合成相关基因表达的影响

Fig. 9 Effects of knockdown lncRNA3223 on gene expression related to triglyceride synthesis in hepatocytes of broiler embryos



A-敲低 lncRNA3223 对鸡胚胎原代肝细胞中TG转运相关基因 *APOB100* 的影响；B-敲低 lncRNA3223 对鸡胚胎原代肝细胞中脂肪酸氧化相关基因 *CPT1* 的影响； $n=3$ 。

A-Effect of knockdown lncRNA3223 on the triglyceride transport-related gene *APOB100* in primary hepatocytes of broiler embryos; B-Effect of knockdown lncRNA3223 on *CPT1* gene of fatty acid oxygen-related gene in primary hepatocytes of broiler embryo; $n=3$ 。

图10 敲低 lncRNA3223 对鸡胚胎原代肝细胞中甘油三酯转运和脂肪酸氧化相关基因表达的影响

Fig. 10 Effects of knockdown lncRNA3223 on gene expression related to TG transport and fatty acid oxidation in hepatocytes of broiler embryos

3 讨论与结论

本实验室前期研究发现, lncRNA1926和lncRNA3223在高脂系肉鸡胚胎肝脏组织中的表达显著高于低脂系肉鸡; lncRNA1926和lncRNA3223靶基因显著富集到脂质稳态、甘油代谢、TG分解代谢、脂滴形成、过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路代谢等通路(数据未发表)。以上结果暗示lncRNA1926和lncRNA3223在鸡胚胎肝脏脂肪代谢中可能发挥重要作用。基于此,本研究开展lncRNA1926和lncRNA3223功能试验,旨在揭示其对鸡胚胎原代肝细胞脂肪代谢的影响。由于NCBI数据库中lncRNA1926和lncRNA3223的cDNA序列可能不是全长,无法据此序列构建真核表达载体。因此,本研究优先选择loss-of-function(功能缺失)策略探究lncRNA1926和lncRNA3223在鸡胚胎原代肝细胞脂肪代谢中功能。

TG是脂滴形成重要原料,肝脏中脂滴沉积受TG代谢调控^[23]。本研究发现,敲低lncRNA1926或lncRNA3223导致鸡胚胎原代肝细胞中脂滴沉积、TG含量降低,表明lncRNA1926和lncRNA3223是鸡胚胎原代肝细胞中脂滴沉积的正调控因子,可能通过增加TG含量增加细胞中脂滴沉积。

樊祥宇等研究发现,禽类肝脏脂肪代谢过程中ACC和FAS表达水平降低可减少脂肪合成;岳琴等研究发现在大鼠肝脏脂肪代谢过程中ACC和FAS表达水平升高促进脂肪合成^[24-25]。本试验结果表明,敲低lncRNA1926或lncRNA3223后,肝细胞中ACC和FAS表达水平显著下降,同时肝细胞中TG含量与脂滴沉积显著减少(见图2、7)。本试验结果与前人研究结果一致。综上,lncRNA1926和lncRNA3223是肉鸡胚胎原代肝细胞中脂肪酸从头合成相关基因的正调控因子。He等发现,抑制小鼠肝脏中三磷酸甘油合成基因磷酸甘油酸脱氢酶(Phosphoglycerate dehydrogenase, PHGDH)表达可减少脂肪沉积^[26]。本试验结果表明,敲低lncRNA1926或lncRNA3223后,肝细胞中PHGDH表达水平无显著变化,但肝细胞中TG含量与脂滴沉积显著减少。本试验结果与前人研究结果不一致,推测原因是脂肪合成过程受多种基因共同调控,在敲低lncRNA1926或lncRNA3223后,虽未影响PHGDH表达,但影响其他脂肪合成基因表达,最终导致

细胞中TG含量与脂滴沉积减少。初欣欣发现,金黄地鼠肝脏中3-磷酸甘油酯酰基转移酶(Glycerol 3-phosphate acyltransferase, GPAT)和二酰甘油酯酰基转移酶(Diacylglycerol O-acyltransferase, DGAT)基因表达水平下降抑制TG合成,减少肝脏中脂滴沉积^[27]。另外,田方圆等研究发现单酰甘油酯酰基转移酶(Monoacylglycerol O-acyltransferase, MOGAT)在脂肪沉积通路上发挥重要作用^[20]。本试验结果表明,敲低lncRNA1926或lncRNA3223后,肝细胞中GPAT、DGAT和MOGAT2表达水平显著下降,肝细胞中TG含量与脂滴沉积显著减少。本试验结果与前人研究结果一致。综上,lncRNA1926和lncRNA3223是肉鸡胚胎原代肝细胞中TG合成相关基因的正调控因子。

载脂蛋白B(Apolipoprotein B100, APOB100)是血浆脂蛋白主要成分,对脂类代谢具有重要调控作用^[28]。本研究发现,敲低lncRNA1926或lncRNA3223后,肝细胞中APOB100基因表达水平均无显著变化。Clouet-Foraison等研究发现,肝细胞中APOB100表达降低会抑制TG转运^[29]。因此推测,敲低lncRNA1926或lncRNA3223对参与TG转运的APOB100基因表达无影响。周梦夏等发现,小鼠肝脏中上调肉碱脂酰转移酶(Carnitine palmitoyl-transferase 1A, CPT1)表达促进脂肪酸氧化、减少肝脏中TG沉积^[30]。本研究发现,敲低lncRNA1926后,肝细胞中CPT1表达降低,但肝细胞中TG含量与脂滴沉积显著减少。本试验结果与前人研究结果不一致,原因可能是,敲低lncRNA1926对TG合成的抑制作用强于对脂肪酸氧化的抑制作用,导致肝细胞中TG含量下降。综上,lncRNA1926是肉鸡胚胎原代肝细胞中脂肪酸氧化相关基因的正调控因子。

本研究结果表明,在鸡胚胎原代肝细胞中,敲低lncRNA1926或lncRNA3223通过抑制脂肪酸从头合成和TG合成相关基因表达降低TG含量,从而降低肝细胞中脂滴沉积。但lncRNA1926和lncRNA3223调控鸡胚胎肝细胞脂肪代谢的具体分子机制尚不清楚,未来有必要针对该问题开展深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Chen C, Su Z, Li Y, et al. Estimation of the genetic parameters of

- traits relevant to feed efficiency: Result from broiler lines divergent for high or low abdominal fat content[J]. *Poult Sci*, 2021, 100(2): 461–466.
- [2] Mohiti-Asli M, Shivazad M, Zaghari M, et al. Effects of feeding regimen, fiber inclusion, and crude protein content of the diet on performance and egg quality and hatchability of eggs of broiler breeder hens[J]. *Poult Sci*, 2012, 91(12): 3097–3106.
- [3] 刘兴鹏. 胚蛋注射及日粮饲喂油脂对肉鸡脂代谢和肉品质的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
- [4] Hillgartner F B, Salati L M, Goodridge A G. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis[J]. *Physiol Rev*, 1995, 75(1): 47–76.
- [5] Hermier D. Lipoprotein metabolism and fattening in poultry[J]. *The Journal of Nutrition*, 1997, 127(5 Suppl): 805–808.
- [6] 郑贵花, 夏广军, 尹宝珍. 乙酰辅酶 A 羧化酶在动物中的研究进展[J]. *现代农业研究*, 2019(10): 109–112.
- [7] Alvarenga R R, Zangeronimo M G, Pereira L J, et al. Lipoprotein metabolism in poultry[J]. *World's Poultry Science*, 2011, 67(3): 431–440.
- [8] 朱瑶. 草本植物复合物对产蛋高峰后期蛋鸡肝脏脂质代谢和盲肠微生物菌群的影响[D]. 郑州: 河南农业大学, 2021.
- [9] 郁建锋. *Sirt1* 基因对鸡肝脏中脂类代谢的调控及其机制研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2019.
- [10] 邵芳. 鸡 miR-33 对肝脏脂类代谢调控机理研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2014.
- [11] 孙海潮, 杨明华, 郭飞, 等. 武定鸡肝脏 miR-143 基因及其脂类代谢靶基因表达规律研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2022, 637(1): 9–16.
- [12] 李辉, 张继扬, 杜志强. 鸡长链非编码 RNA 发掘及组织特异性表达分析[J]. *东北农业大学学报*, 2016, 47(7): 40–47.
- [13] Li H, Gu Z, Yang L, et al. Transcriptome profile analysis reveals an estrogen induced lncrna associated with lipid metabolism and carcass traits in chickens (*Gallus Gallus*) [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(5): 1638–1658.
- [14] Guo L, Chao X, Huang W, et al. Whole transcriptome analysis reveals a potential regulatory mechanism of lncRNA-FNIP2/miR-24-3p/FNIP2 axis in chicken *Adipogenesis* [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 653798.
- [15] 李红. 转录组分析揭示鸡产蛋期肝脏脂质代谢调控的分子机制[D]. 郑州: 河南农业大学, 2016.
- [16] Tratwal J, Follin B, Ekblond A, et al. Identification of a common reference gene pair for qPCR in human mesenchymal stromal cells from different tissue sources treated with VEGF [J]. *BMC Mol Biol*, 2014, 15: 11.
- [17] 马艳艳. 高、低脂肉鸡产蛋性能及卵巢发育特征的比较分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2022.
- [18] 史铭欣, 史洪岩, 李辉, 等. 高、低脂系肉鸡肝脏脂肪合成代谢相关基因的表达差异分析[J]. *农业生物技术学报*, 2013, 21(3): 306–312.
- [19] 兰英. 甘油二酯酰基转移酶 2(DGAT2)与鹅肥肝 TAG 合成和分泌的关系研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2006.
- [20] 田方圆, 王台安, 李艳敏, 等. 鸡 MOGAT 和 DGAT 基因的克隆及表达特性研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(2): 214–224.
- [21] Wang H, Hu M, Ding Z, et al. Phosphoglycerate dehydrogenase positively regulates the proliferation of chicken muscle cells[J]. *Poult Sci*, 2022, 101(5): 101805.
- [22] Tratwal J, Follin B, Ekblond A, et al. Identification of a common reference gene pair for qPCR in human mesenchymal stromal cells from different tissue sources treated with VEGF [J]. *BMC Mol Biol*, 2014, 15: 11.
- [23] Farese R V Jr, Walther T C. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T[J]. *Cell*, 2009, 139(5): 855–860.
- [24] 樊祥宇, 张富群, 黄泰来, 等. 姜黄素对中速型黄羽肉鸡生长性能、腹脂沉积, 抗氧化能力, 肝脏脂肪代谢相关酶活性及基因表达的影响[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(10): 5581–5590.
- [25] 岳琴, 毛文星, 张浩天, 等. 短期奥氮平给药改变大鼠肝脏脂代谢: 量效关系研究[J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2021, 43(12): 10–18.
- [26] He L, Liu Y, Liu D, et al. Exogenous and endogenous serine deficiency exacerbates hepatic lipid accumulation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 4232704.
- [27] 初欣欣. LRTG 对金黄地鼠高脂血症模型的影响及降 TG 作用机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2014.
- [28] 陈维星, 王守志, 李辉. 鸡 ApoB 基因多态位点与生长和体组成性状的相关性研究[J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(2): 60–64.
- [29] Clouet-Foraison N, Marcovina S M, Guerra E, et al. Analytical performance specifications for lipoprotein(a), apolipoprotein B-100, and apolipoprotein A-I using the biological variation model in the EuBIVAS population[J]. *Clinical Chemistry*, 2020, 66(5): 727–736.
- [30] 周梦夏. 津力达对高脂喂养诱导胰岛素抵抗 ApoE-/- 小鼠肝脂肪酸代谢的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.