

猪激素敏感脂酶和甘油三酯水解酶基因组织表达特性研究

Study on the Characteristics of Tissue Expression of Hormone Sensitive Lipase and Triacylglycerol Hydrolase in Pigs

王 琦 张利红 张立杰 杨公社*

WANG Qi ZHANG Li-Hong ZHANG Li-Jie and YANG Gong-She*

西北农林科技大学动物科技学院动物脂肪沉积与肌肉发育实验室 杨凌 712100

Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

摘 要 以八眉猪为研究对象,采用 RT-PCR 和 Western blot 方法对猪激素敏感酯酶(HSL)和甘油三酯水解酶(TGH)基因组织表达特点进行了研究。RT-PCR 半定量检测显示,HSL 基因的 mRNA 在检测的 7 种组织中都有表达,其中在脂肪组织表达量较高,中等程度表达于心脏、肝脏、肺、脾和肾脏。TGH 基因在 7 种组织也均有表达,其中肝脏和脂肪组织表达量较高,心脏和肾脏次之,脾脏和肺脏表达量较低。Western blot 检测显示,HSL 基因在大网膜脂肪和皮下脂肪表达量最高,而在肾脏中没有检测到表达,其他组织中中度表达;TGH 基因在大网膜脂肪、皮下脂肪、肝脏、肺脏和脾脏组织中表达,其中在脂肪组织和肝脏组织中表达量最高,而在心脏和肾脏中没有检测到表达。以上结果表明:HSL 和 TGH 基因存在转录后调控,这可能与其在不同组织中的功能差异有关。

关键词 猪,HSL 基因,TGH 基因,组织表达

中图分类号 S852.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0831-05

Abstract The specific expression of TGH and HSL genes in different tissues of Bamei pig was investigated by RT-PCR and Western blot in this study. The result of RT-PCR showed that the expression of HSL could be detected in all these seven tissues examined and which was higher expressed in fat, lower in heart, liver, lung, spleen and kidney. Expression of TGH gene could also be detected in seven tissues, and higher in liver and fat, lower in heart and kidney and lowest in spleen and lung. The result of Western blot showed that HSL gene was highest expressed in epiploica fat and subcutaneous fat, higher in other tissues, but couldn't be detected in kidney. Expression of TGH was detected in epiploica fat, subcutaneous fat, liver, lung and spleen, and highest in fat and liver, but it hadn't be found in heart and kidney. These results suggested that both HSL and TGH could be regulated by post-transcriptional, and their function was involved in different tissues.

Key words pig, HSL, TGH, tissue distribution

激素敏感脂酶(Hormone Sensitive Lipase, HSL)是动物脂肪分解的关键酶。哺乳动物将体内的脂肪酸

以甘油三酯的形式储存在脂肪细胞内,HSL 可以将甘油三酯水解成甘油和游离脂肪酸以满足动物体的

Received: January 24, 2007; Accepted: March 12, 2007.

This work was supported by the grant from the National Basic Research Program of China(No.2004CB117506).

* Corresponding author. Tel: +86-29-87092430; Fax: +86-29-87092430; E-mail: gsyang999@hotmail.com

国家重点基础研究发展项目计划(973)项目(No. 2004CB117506)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

需要^[1]。长久以来人们认为 HSL 是甘油三酯水解的限速酶^[2],但随着激素敏感敲除鼠的出现,这种观点受到了更多的质疑^[3-5]。许多研究表明:脂肪组织中除去 HSL 外还存在其他甘油三酯水解酶^[6]。甘油三酯水解酶(Triacylglycerol hydrolase, TGH)是在 HSL 敲除鼠中发现的另外一种重要的脂肪水解酶,它在脂肪代谢和肝脏极低密度脂蛋白的合成中起着重要作用^[7],可能是继 HSL 之后又一个对脂肪分解起重要调控作用的脂肪酶^[8]。

生物体脂类代谢是一个十分复杂的生理生化过程,其代谢紊乱可以引起一系列的疾病。猪是脂肪沉积能力最强的动物之一,由于其与人类在生理生化方面有很多相似性,尤其存在着天然的脂肪型和瘦肉型个体,因此被认为是研究人类肥胖、糖尿病等脂肪代谢相关疾病最佳的模式动物^[9]。我国地方猪种资源丰富,与国外猪种相比有自己的品种特点,与瘦肉型长白猪相比我国地方猪种具有积脂率高、抗病性强等特点。本研究主要以我国的地方肥胖品种——八眉猪为实验动物,利用 RT-PCR 和 Western blot 方法分析检测八眉猪不同部位 HSL 和 TGH 转录水平和翻译水平上的表达规律,为进一步阐明这两种脂肪水解酶的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 取 6 头 4 月龄健康八眉公猪 35 ~ 40kg 为实验动物,由陕西省宝鸡茺良农场提供。

1.1.2 主要试剂 TRIpure Reagent 购自北京百泰克生物技术有限公司,RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit、Taq DNA Polymerase 购自 Fermentas 公司,dNTP 购自 Hualvyuan Biotechnology,β-actin、HSL 和 TGH 引物由上海生工生物技术有限公司合成,HSL 抗体由加拿大蒙特利尔大学王树沛教授馈赠,TGH 抗体由加拿大阿尔波特大学 Richard Lehner 教授馈赠,β-actin 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,其它均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 组织样提取 将猪屠宰后迅速取其肺脏、肝脏、脾脏、肾脏、心脏、皮下脂肪和大网膜脂肪,立即放入液氮中保存备用。

1.2.2 总 RNA 和总蛋白的提取 取保存在液氮中的各个组织,按照 TRIpure Reagent 总 RNA 提取试剂说明书进行总 RNA 提取,测 OD 值,计算各组织样总 RNA 浓度后分装保存于 -70℃ 冰箱中待用。取

保存在液氮中的各个组织,参照《分子克隆(第二版)》中的提取方法提取总蛋白。

1.2.3 引物设计 分别以猪的 β-actin 基因(NM_2053565)、HSL 基因(NM_214315)和 TGH 基因(NM_214246)为模板设计引物,引物用 Primer Premier 5.0 软件设计。β-actin 引物:Sense:5'-ACTGCCGCATCCTCTTCCTC-3',Antisense:5'-CTCCTGCTTGCTGATCCACATC-3';HSL 引物:Sense:5'-TCAGGTGTCTTTGCGGGTAT-3',Antisense:5'-GCCTGTTTCATTGCGTTTG-3';TGH 引物:Sense:5'-TCAGGTGTCTTTGCGGGTAT-3',Antisense:5'-GCCTGTTTCATTGCGTTTG-3'。

1.2.4 RT-PCR RT 反应总体积为 20μL,以 RNA 浓度为依据,计算各个组织加入的 RNA 量。按 Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 推荐的方法,以随机六聚体为引物合成 cDNA 第 1 链。25μL PCR 反应体系:16.5μL 灭菌的二蒸水、2.5μL 10 × PCR buffer((NH₄)₂SO₄),2.5μL 2mmol/L dNTP,0.5μL 25μmol/L Primer I,0.5μL 25μmol/L Primer II,1μL 25mmol/L MgCl₂,0.5μL 0.5u/μL Taq DNA Polymerase,1μL cDNA 模板。反应条件:HSL:95℃、10min;95℃、1min;53.3℃、1min;72℃、1min,29 个循环;72℃、10min,TGH:95℃、10min;95℃、1min;54.7℃、1min;72℃、1min,29 个循环;72℃、10min,β-actin:95℃、10min;95℃、1min;55.6℃、1min;72℃、1min,29 个循环;72℃、10min。在 PTC-200 DNA engine(MJ Research,Inc.)上进行扩增。

1.2.5 琼脂糖凝胶电泳检测 取每个组织样品的目的基因 RT-PCR 产物 4μL 和对照 β-actin 基因 RT-PCR 产物 4μL,同 1μL 上样缓冲液混合均匀,点样于琼脂糖凝胶孔中,在同一孔中加入 8μL DL2000 Marker,70V 电压下电泳 30 ~ 40min。电泳结束后,在 Wealtec 凝胶成像系统拍照,并用 Dophin-1D 凝胶分析软件分析(Wealtec Corp),应用系统软件进行吸光值比较分析,确定目的基因在组织样品中表达量的相对值。

1.2.6 Western blot 检测 将猪各个组织蛋白分别从凝胶转移至硝酸纤维素膜,用 5%脱脂奶粉溶液 4℃ 封闭过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10min;分别加入 HSL(1:2000)和 TGH(1:2000)一抗,室温孵育 3h。洗膜后再加入二抗(1:5000),室温孵育 1h,TBST 洗膜 3 次,每次 10min,最后在暗室内曝光洗片。

1.2.7 数据统计分析 用 SPSS11.5 统计分析软件进行分析,组间差异显著性用 ONE WAY ANOVA 方

差分析)进行统计分析,实验数据以平均值±标准误 (Means+SE)表示。

(表1)。表明所提取的总 RNA 完全符合后续的分

2 结果与分析

2.1 猪各组织中提取 RNA 的完整性检测及浓度计算

所有样品的总 RNA 均显示出两条清晰、一条较浅的条带,分别为 28S、18S 和 5S rRNA(图1),其中 28S rRNA 条带的亮度比 18S rRNA 条带的强,且没有 DNA 及其它明显的杂带,表明总 RNA 纯度很高且无降解。所有样品的总 RNA(无酶 DEPC 处理水溶解)的 OD₂₆₀ 值与 OD₂₈₀ 值的比值均在 1.6~2.0 之间

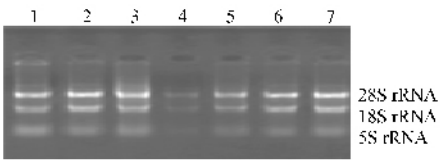


图1 各组织提取 RNA 的电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis result of RNA extracted from different tissues

1 heart 2 liver 3 kidney 4 :epiploica adipose 5 :subcutaneous adipose ; 6 :spleen 7 lung.

表 1 各组织 RNA 浓度测定

Table 1 RNA concentration measurement of different tissues

	Heart	Liver	Kidney	Epiploica adipose	Subcutaneous adipose	Spleen	Lurg
OD ₂₆₀	0.486	0.532	0.332	0.096	0.132	0.241	0.213
OD ₂₈₀	0.286	0.281	0.193	0.061	0.083	0.136	0.132
Concentration(μg/mL)	19.44	21.28	13.28	3.84	5.28	9.64	8.52

2.2 HSL、TGH 和 β-actin 基因循环数的确定

由于 HSL、TGH 基因和 β-actin 基因表达量的差异,为了防止进入 PCR 反应平台期而消除表达量的差异,要通过实验确定 PCR 反应的循环次数。本研究经过多次实验,在各基因没有进入平台期之前选择循环数,由图 2 可知,将 HSL、TGH 和 β-actin 的 PCR 循环数均定为 29 次。

2.3 HSL 和 TGH 基因在八眉猪不同组织的 RT-PCR 检测

取八眉猪 7 种组织样的 RNA 进行 PT-PCR 检测。结果发现,HSL 基因在 7 种组织都有表达,其中较高表达于大网膜脂肪和皮下脂肪,中等程度表达于心、肝脏、肺、脾和肾(图 3)。TGH 基因在 7 种组织都有表达,其中高表达于肝脏和脂肪,其次是心和肾,低量表达于脾脏和肺脏(图 4)。

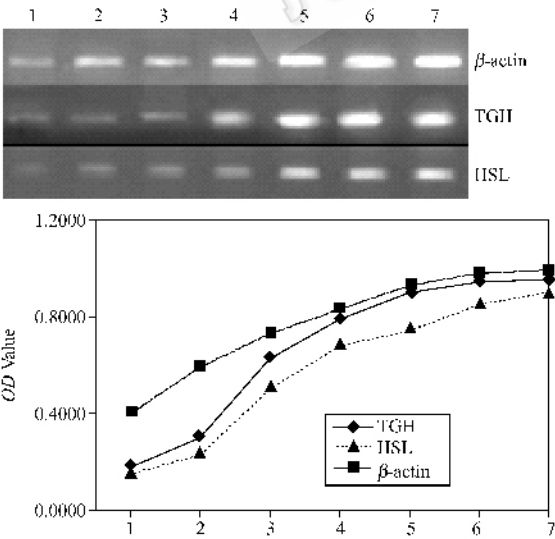


图 2 不同循环数对 β-actin、TGH 和 HSL 扩增效率的影响

Fig.2 Effect of cycles on PCR amplification efficiency of β-actin ,HSL and TGH

Cycles :1 21 times 2 23 times 3 25 times 4 27 times 5 29 times 6 31 times 7 33 times.

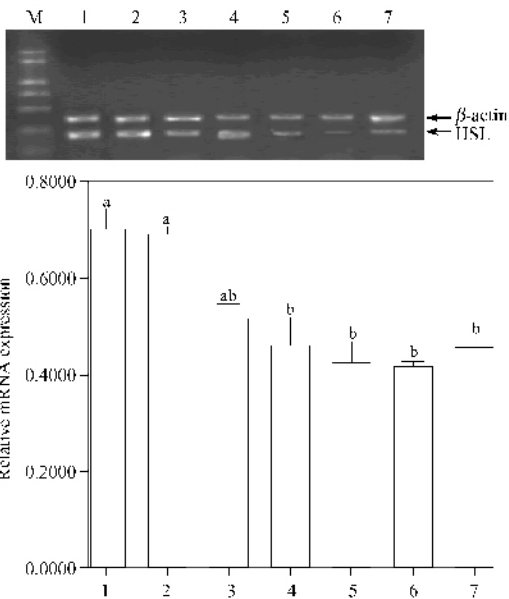


图 3 猪各组织 HSL 基因 mRNA 相对表达丰度的显著性检验

Fig.3 The significance tests of HSL mRNA expression in different tissues in pig

1 :subcutaneous adipose 2 :epiploica adipose 3 :heart muscle 4 :liver 5 :lung 6 :spleen 7 :kidney

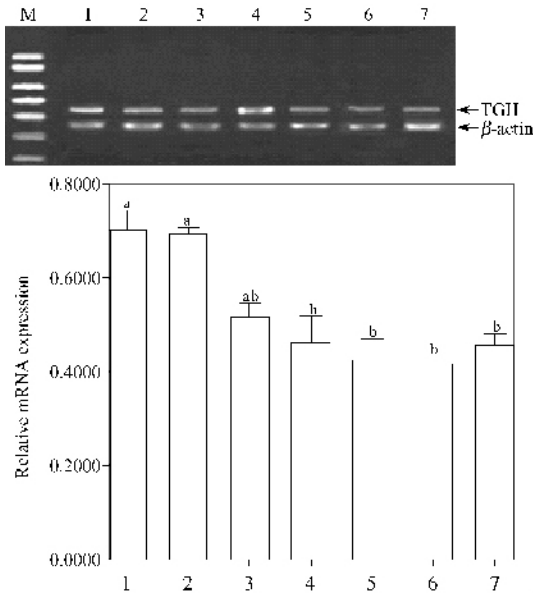


图4 猪各组织 TGH 基因 mRNA 相对表达丰度的显著性检验

Fig.4 The significance tests of TGH mRNA expression in different tissues in pig

1 subcutaneous adipose 2 epiploica adipose 3 heart muscle 4 liver 5 lung 6 spleen 7 kidney M marker DL2000.

2.4 猪各组织中提取蛋白的 SDS-PAGE 检测及 HSL 和 TGH 基因的 Western blot 检测

将从组织提取的总蛋白用 SDS-PAGE 检测,结果见图 5。由图 5 可见,所有的样品均条带清晰,没有降解和污染,符合进一步试验要求。

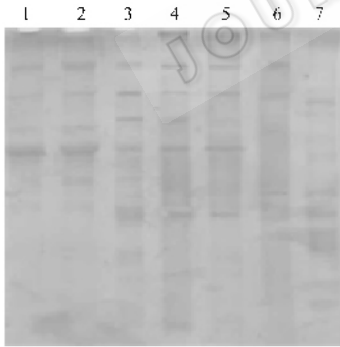


图5 猪各组织提取蛋白 SDS-PAGE 检测

Fig.5 Result of protein extracted by SDS-PAGE in different tissues

1 subcutaneous adipose 2 epiploica adipose 3 heart 4 liver 5 lung 6 spleen 7 kidney.

用 HSL 和 TGH 的特异性抗体与膜上的蛋白结合,进行 Western blot 分析,结果见图 6。由图 6A 可见,HSL 基因在皮下脂肪、大网膜脂肪、心脏、肝脏、肺脏和脾脏这 6 种组织中检测到表达。由图 6B 可见,TGH 基因在皮下脂肪、大网膜脂肪、肝脏、肺脏和脾脏这 5 种组织中检测到蛋白表达,其中皮下脂肪、大网膜脂肪和肝脏中表达量最高。

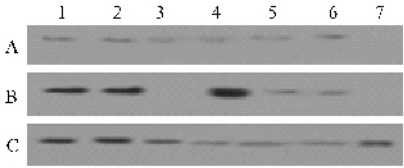


图6 HSL 和 TGH Western blot 分析

Fig.6 Analysis of expression of HSL,TGH gene by Western blot in different tissues

1 subcutaneous adipose 2 visceral adipose 3 heart 4 liver 5 lung 6 spleen 7 kidney. A HSL B TGH C β -actin.

3 讨论

甘油三酯是机体储存能量的主要物质,存在于大部分组织中,特别是在脂肪组织和肝脏中^[10]。能量的利用需要将甘油三酯水解为甘油和游离脂肪酸,然后释放到血液循环中,以供机体的能量需求。脂代谢的紊乱可以引起肥胖症和糖尿病等疾病,并且可以造成一系列并发症^[11]。目前对甘油三酯脂肪酶的研究主要集中在 HSL 和 TGH 上。

HSL 是最早发现和克隆的脂肪细胞内分解甘油三酯的脂肪酶^[12],其在多个组织中表达,在脂代谢的多个环节有作用,并且具有固醇脂水解酶活性^[1,13]。HSL 蛋白含有三个主要的结构域:催化域、编码几个磷酸位点的调节域和与脂滴蛋白结合的结合域^[14]。TGH 是羧酸酯酶家族的一员,它与来自其他物种的羧酸酯酶具有很高的同源性^[6]。TGH 位于微粒体的内质网膜上,其作用与甘油三酯的水解和极低密度脂蛋白的分泌有关^[15]。TGH 在鼠和人上分别存在于第 8 条和第 16 条染色体上^[7],其在鼠和人上表达的部位并不完全相同,在人的肝脏上表达量较高,其次是心脏、脂肪、肾脏和小肠^[6],而在鼠上肝脏、心脏、脂肪、肾脏和小肠内均有较高的表达量^[7]。本研究主要利用和人生理生化特性相似的猪为对象,来研究两种甘油水解酶的表达分布与功能的关系。

猪作为一种模式动物在肥胖和糖尿病方面的研究上有很大优势^[9]。猪与人类在生理结构和生理功能上有很多相似性,包括体重、代谢方式、器官结构和功能、肥胖的趋势等,这使猪成为研究肥胖、糖尿病、动脉粥样硬化和心血管等疾病的良好动物模型^[16]。猪作为一种模型已用于人上许多疾病的研究,包括 I 型糖尿病(胰岛素缺失)和 II 型糖尿病(胰岛素抵抗)研究,因为在心血管解剖结构和功能、代谢、脂蛋白结构和大小、肥胖的倾向和种类习性上,其表现型与人相似。不同品种猪脂肪沉积能力存在显著差异,我国的地方猪品种属于脂肪型或兼用

型 特点是膘厚油多,沉积脂肪能力强,生长速度慢,但肉质好,肉味香,耐粗饲。八眉猪是我国优良地方品种,肉质口感好,但生长速度慢,脂肪沉积快,属脂肪型猪种。

近年来,人们对基因表达的转录调控研究已十分深入,因为转录是基因表达的第一步,也是控制表达最关键的一步。但在转录以后,mRNA的加工、成熟、降解、翻译的起始等过程中都存在复杂而精细的调节机制,而且在基因表达过程中也起重要作用。因此转录后的调节也逐渐成为研究的热点。本研究显示,在转录水平上HSL和TGH的mRNA在检测的7种组织中都有表达,其中HSL在皮下脂肪和大网膜脂肪的表达量与其它组织相比差异显著($P < 0.5$)这说明HSL的功能主要集中在脂肪组织中,本研究中HSL转录水平和其他学者取得结论相一致^[1];TGH在皮下脂肪、大网膜脂肪和肝脏的表达量与其他组织相比差异显著($P < 0.5$)。TGH除去在脂肪组织中有作用外,在肝脏中也起着重要作用,这和以前所取得的结论相一致^[8,17-19]。在蛋白水平上,HSL除在肾脏没有检测到表达外,其它组织都有表达,在脂肪组织表达略高于其他组织;TGH则除去心脏和肾脏没有检测到表达外,其它组织均有表达,其中在脂肪、肝脏表达量较高,其次是肺脏和脾脏。在mRNA和蛋白水平上HSL和TGH表达检测到的不同结果说明,它们都存在着转录后调节,这种调节作用主要和它们所具有的功能相一致。TGH在肝脏中的高度表达说明其在水解甘油三酯外还和肝脏极低密度脂蛋白的聚集和分泌有关^[4,15,20]。HSL和TGH是受多种激素调节的,如Insulin、Lepin、DEX等^[21,22],但是其具体调节过程和对两种水解酶表达的影响则需要进一步的研究。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Yeaman SJ. Hormone-sensitive lipase—new roles for an old enzyme. *Biochem J* 2004 **379**(Pt 1):11–22.
- [2] Shen WJ,Patel S,Hong R,et al. Hormone-sensitive lipase functions as an oligomer. *Biochemistry* 2000 **39**(9):2392–2398.
- [3] Soni KG,Lehner R,Metalnikov P,et al. Carboxylesterase 3(EC 3. 1.1.1) is a major adipocyte lipase. *J Biol Chem* 2004 **279**(39):40683–40689.
- [4] Gilham D,Lehner R. The physiological role of triacylglycerol hydrolase in lipid metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 2004 **5**(4):303–309.
- [5] Langin D,Dicker A,Tavernier G,et al. Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes* 2005 **54**(11):3190–3197.
- [6] Dolinsky VW,Sipione S,Lehner R,et al. The cloning and expression of a murine triacylglycerol hydrolase cDNA and the structure of its corresponding gene. *Biochim Biophys Acta* 2001 **1533**(3):162–172.
- [7] Dolinsky VW,Gilham D,Alam M,et al. Triacylglycerol hydrolase: role in intracellular lipid metabolism. *Cell Mol Life Sci* 2004 **61**(13):1633–1651.
- [8] Waterman IJ,Emmison N,Sattar N,et al. Further characterization of a novel triacylglycerol hydrolase activity(pH 6.0 optimum) from microvillous membranes from human term placenta. *Placenta* 2000 **21**(8):813–823.
- [9] Dwight A,Bellinger,Elizabeth P Merricks, Timothy C Nichols. Swine models of diabetes mellitus: insulin resistance, glucose tolerance and cardiovascular complications. *ILAR J* 2006 **47**(3):243–258.
- [10] Gibbons GF,Islam K,Pease RJ. Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta* 2000 **1483**(1):37–57.
- [11] Andrea R Nawrocki,Philipp E Schere. The adipocyte as a drug discovery target. *Drug Discov Today* 2005 **10**:1359–6446.
- [12] Holm C,Kirchgessner TG,Svenson KL,et al. Hormone-sensitive lipase: sequence, expression, and chromosomal localization to 19 cent-q13.3. *Science* 1988 **241**(4872):1503–1506.
- [13] Osuga J,Ishibashi S,Oka T,et al. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 **97**(2):787–792.
- [14] Laurin NN,Wang SP,Mitchell GA. The hormone-sensitive lipase gene is transcribed from at least five alternative first exons in mouse adipose tissue. *Mamm Genome* 2000 **11**(11):972–978.
- [15] Gilham D,Alam M,Gao W,et al. Triacylglycerol hydrolase is localized to the endoplasmic reticulum by an unusual retrieval sequence where it participates in VLDL assembly without utilizing VLDL lipids as substrates. *Mol Biol Cell* 2005 **16**(2):984–996.
- [16] Larry D Young. Review of Swine Genetics in the US. *Rev Sci Tech* 1998.
- [17] Johnson WJ,Jang SY,Bernard DW. Hormone sensitive lipase mRNA in both monocyte and macrophage forms of the human THP-1 cell line. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2000 **126**(4):543–552.
- [18] Haemmerle G,Zimmermann R,Hayn M,et al. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue,muscle,and testis. *J Biol Chem* 2002 **277**(7):4806–4815.
- [19] Dolinsky VW,Gilham D,Hatch GM,et al. Regulation of triacylglycerol hydrolase expression by dietary fatty acids and peroxisomal proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta* 2003 **1635**(1):20–28.
- [20] Gilham D,Ho S,Rasouli M,et al. Inhibitors of hepatic microsomal triacylglycerol hydrolase decrease very low density lipoprotein secretion. *FASEB J* 2003 **17**(12):1685–1687.
- [21] Carmen GY,Victor SM. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal* 2006 **18**(4):401–408.
- [22] Clifford GM,Londos C,Kraemer FB,et al. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of