

不同产脂能力猪脂肪合成相关基因表达谱分析

焦明慧¹, 周梅¹, 陈宏权^{1,2*}, 陈公伟¹, 谢亚男¹, 潘中婷¹, 王学故¹, 马帮军¹

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室, 合肥 230036)

摘要: 旨在筛查不同产脂能力猪脂肪合成的相关差异表达基因, 分析其与猪 *THRSP* 基因表达的关联性。实验采集 5 头瘦肉型和 3 头脂肪型猪的肝脏, 提取总 RNA, 利用基因表达谱芯片技术检测猪肝脏全基因组表达谱, 分析 *THRSP* 基因与脂肪代谢相关差异表达基因之间的关联性。结果表明, 相对瘦肉型猪, 脂肪型猪脂肪酸合酶 (*FASN*)、葡萄糖转运蛋白 4 (*GLUT4*) ($P < 0.01$) 和乙酰辅酶 A 羧化酶 α (*ACACA*) ($P < 0.05$) 基因的表达显著上调, 小 GTP 酶中 *Rab32* 和 *Rab4a* 显著上调, *Rab27a* 则表现显著下调 ($P < 0.05$); 相关性分析显示 *GLUT4*、*FASN* 和 *ACACA* 基因表达的变化与 *THRSP* 基因呈显著正相关, *Rab27a* 基因为显著负相关, *Rab32* 和 *Rab4a* 基因则相关性不明显。

关键词: 基因表达谱; 基因芯片; 猪; 脂肪沉积; *THRSP* 基因

中图分类号: S828.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)03-0367-04

Gene expression analysis related to the fatty synthesis for the different fat deposition capacity in pigs

JIAO Minghui¹, ZHOU Mei¹, CHEN Hongquan^{1,2}, CHEN Gongwei¹,
XIE Yanan¹, PAN Zhongting¹, WANG Xuegu¹, MA Bangjun¹

(1. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Anhui Provincial Laboratory for Local Livestock and Poultry Genetic Resource Conservation and Bio-breeding, Hefei 230036)

Abstract: This paper aims to screen the differentially expressed genes in fat synthesis associated with the fat deposition capacity in different pig-types, and to analyze their relationship with the expression of pig *THRSP* gene. The total RNA of the liver tissue samples from 5 lean- and 3 fat-type pigs were extracted, respectively. The differentially expressed genes were detected by using an Agilent microarray detection. The gene expression was related to *THRSP* gene. The results showed that comparing with lean-type pigs, the gene expressions of *FASN*, *GLUT4* ($P < 0.01$), and *ACACA* ($P < 0.05$) in fat-type pigs were significantly up-regulated; and the gene expressions of *Rab32* and *Rab4a* in small GTP enzyme were also significantly up-regulated, but *Rab27a* was significantly down-regulated ($P < 0.05$). The expressions of the *GLUT4*, *FASN* and *ACACA* regulated genes related significantly to that of *THRSP* gene.

Key words: gene expression profiling, gene chip, pigs, fat deposition, *THRSP* gene

不同品种猪体脂的沉积量是脂肪酸合成、脂肪摄取、脂肪降解以及体脂合成等过程综合作用的产物, 也是动态平衡的结果。这一过程需要相关酶的参与, 这些酶类的含量、活性以及相互作用方式等均可影响其酶促反应的因素对脂肪的生物合成均有不同程度的影响, 不同产脂能力猪品种的脂肪合成相关基因的表现也就自然成为研究者关注热点^[1-2]。

据已有研究报道, 调控动物脂肪沉积的基因包括: 肥胖 (*Ob*) 基因、脂肪酸结合蛋白 (*FABP*) 基因^[3]、脂蛋白酯酶 (*LPL*) 基因^[4]、解偶联蛋白 3 (*UCP3*) 基因^[5]、乙酰辅酶 A 羧化酶 (*ACC*) 基因、*NADPH* 生成酶基因、激素敏感脂肪酶 (*HSL*) 基因, 以及生长激素 (*GH*)、 β -肾上腺素受体和环磷酸腺苷 (*cAMP*)、胰岛素 (*INS*) 等众多基因^[6-7]。研究这

收稿日期: 2014-03-31

基金项目: 国家自然科学基金 (31172180) 和安徽省科技攻关项目 (1401032007, 12010302052) 共同资助。

作者简介: 焦明慧, 硕士研究生。

* 通信作者: 陈宏权, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: chqchq@ahau.edu.cn

些基因在不同产脂能力的猪品种的表达差异,除了经典的检测手段之外,基因芯片技术日臻完善,可以用来批量发现和挖掘不同组织、样品中差异表达的基因^[8-9],而基因表达谱芯片实验的主要目的之一就是发现样本间差异表达的基因。

本研究以商品瘦肉型猪(大白×长白×杜洛克三元杂交猪)和安徽地方猪种脂肪型猪(定远猪)为研究对象,采用基因芯片方法检测猪肝脏全基因组表达谱,分析不同产脂能力的猪品种之间脂肪代谢相关基因的表达差异。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试猪肝脏的采集 样本供体猪分别来自商品瘦肉猪(大白×长白×杜洛克三元杂交猪,简称瘦肉型猪)和安徽地方猪种(定远猪)。其中,瘦肉型肥育猪5头,体重约100 kg,取自中国安徽长风农牧有限公司;与瘦肉型相近日龄的定远肥育猪3头,体重约70 kg,来自地方保种场。

1.1.2 猪肝脏 DNA 和 RNA 提取 当供体猪屠宰时立刻采集其肝脏组织并以干冰保存带回实验室,然后投入液氮中冻存。运用苯酚抽提法提取肝脏 DNA,根据 TRIzol Reagent 生产厂商提供的标准操作流程进行样品总 RNA 抽提,提取的 DNA 和总 RNA 均需要进行纯度检测和分析,以确定是否能够用于后

续实验。

1.2 Agilent 猪全基因表达谱芯片(单标)

从美国 Agilent 公司订制猪全基因组表达谱芯片,芯片包含了超过42034个基因和转录本,操作流程按照芯片供应商所提供的试剂与说明书进行。

1.3 芯片数据的处理

本实验是单色荧光标记(单标)实验样品与基因芯片杂交,故扫描所得数据为单通道数据,会采用“Quantile”标准化方法对8张芯片数据进行标准化处理分析。分析指标包括三类:

(1) 信号指标: P(Present)代表探针点信号与背景信号具有显著性差异, A(Absent)代表探针点信号与背景信号无显著性差异, M(Marginal)表明探针点信号与背景信号差异介于 A 和 P 之间;

(2) 筛选阈值: 计算倍数差异 FoldChange(FC), 筛选阈值默认为 $FC \geq 2$ 和 $FC \geq 3$ 或 $FC \leq 0.5$, 且要求每个探针点的信号值(Flag 值)中至少一组内不出现 A;

(3) 显著性: 设定阈值为 $P < 0.05$ 显著水平和 $P < 0.01$ 极显著水平。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取结果

从猪肝脏组织中提取的总 RNA 检测结果见图1。其质量满足后续实验要求。

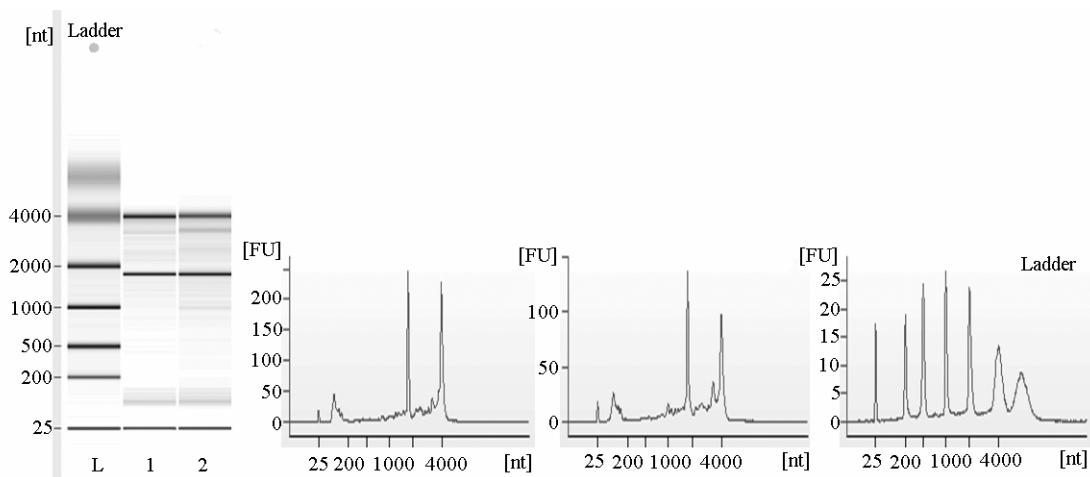


图1 样本 RNA 电泳图 (RNA 主要条带峰图)

Figure 1 The electrophoresis test of total RNA extracted from pig liver tissue

2.2 与脂肪沉积相关的差异表达基因

根据基因芯片检测结果,猪脂肪沉积关联基因差异表达(探针信号)值见表1。相对瘦肉型猪,脂肪型猪 *FASN*、*GLUT4* ($P < 0.01$) 和 *ACACA* ($P < 0.05$) 基因的表达显著上调,小 GTP 酶中 *Rab32*

和 *Rab4a* 显著上调, *Rab27a* 则表现显著下调 ($P < 0.05$)。

2.3 脂肪代谢相关差异表达基因与 THRSF 基因表达的关联性

上述猪脂肪沉积相关的差异表达基因与

THRSP 基因表达的关联性见表 2。*GLUT4*、*FASN*、*ACACA* 基因的表达与 *THRSP* 基因的关联性为显著正相关, 其中脂肪酸合酶基因表达与 *THRSP* 基因

表达的关联系数高达 0.909, 小 GTP 酶 *Rab27a* 基因呈显著负相关, *Rab32* 和 *Rab4a* 基因则相关性不明显。

表 1 脂肪型猪与瘦肉型猪有关脂肪沉积差异基因

Table 1 The differential expressive genes associated with fat deposition in Fat- and lean-type pigs

基因 Gene	脂肪型猪表达值 Expression levels in fat-type pigs	瘦肉型猪表达值 Expression levels in lean-type pigs	<i>F</i>	<i>P</i>	调控 ^① Regulation
<i>FASN</i>	12.265±0.639	8.119±0.186	61.71	0.0002**	上调 Up-regulated
<i>GLUT4</i>	9.317±0.060	7.796±0.136	66.97	0.0008**	上调 Up-regulated
<i>ACACA</i>	8.173±0.491	6.462±0.303	10.03	0.019*	上调 Up-regulated
<i>Rab32</i>	12.249±0.212	11.370±0.207	7.72	0.032*	上调 Up-regulated
<i>Rab4a</i>	11.706±0.110	11.249±0.103	8.22	0.029*	上调 Up-regulated
<i>Rab27a</i>	5.965±0.125	6.650±0.184	6.82	0.04*	下调 Down-regulated

注: ①表示脂肪型猪相对瘦肉型猪该基因表达显著上调或显著下调; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Notes: ①The gene expression was significantly up- or down-regulated, comparing fat-type pigs with lean-type pigs. * $P<0.05$ and ** $P<0.01$.

表 2 猪脂肪沉积相关的差异表达基因与 *THRSP* 基因表达的关联性

Table 2 The association of the gene expression related to fat deposition with *THRSP* gene

差异基因 Differential expression gene	与 <i>THRSP</i> 基因的关联性 Correlation with <i>THRSP</i> gene	差异基因 Differential expression gene	与 <i>THRSP</i> 基因的关联性 Correlation with <i>THRSP</i> gene
<i>FASN</i>	0.909**	<i>Rab32</i>	0.325
<i>GLUT4</i>	0.671*	<i>Rab4a</i>	0.423
<i>ACACA</i>	0.866**	<i>Rab27a</i>	-0.705*

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

3 讨论

众所周知, 中国地方猪种的产肉性能与引入猪种存在显著差异, 并分别被称为脂肪型猪和瘦肉型猪, 两者在脂肪合成与沉积能力上存在极其显著的差异。本研究在不同类型猪中发现的差异基因涉及 2 条代谢路径, 即脂肪酸生物合成通路和咖啡因代谢通路。

ACC 可以催化乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 羧化成丙二酰辅酶 A (malonyl-CoA), 而 ACC 的聚合和激活是脂肪酸从头合成途径中的第一步酶反应, 也是限速反应^[10]。ACC 的亚型 ACC α 由 *ACACA* 基因 (猪的 ACC α 基因位于第 12 号染色体)^[11]编码, 主要分布在肝脏、脂肪等组织中。本研究检测结果显示脂肪型猪肝脏的 ACC α 表达量显著高于瘦肉型猪。

FASN 与 ACC 共同参与脂肪酸从头合成, 关系十分密切。*FASN* 是内源性长链脂肪酸从头合成的关键酶^[12], 对脂肪生成有重要作用^[13]。*FASN* 在肝脏和脂肪组织中高表达^[14], 主要参与合成细胞内源性脂肪, 在脂肪细胞分化后期, *FASN* 通过高表达

参与脂滴的生成。猪的 *FASN* 基因位于第 12 号染色体, 几乎参与脂肪生物合成的整个代谢途径, 合成各类非必需脂肪酸, 为生成脂质膜、通过 β -氧化提供能量和酰化蛋白质提供原料^[15]。*GLUT4* 属于葡萄糖转运蛋白(glucose transporter GLUT)家族, 可以协助葡萄糖顺浓度从细胞外运输至细胞内^[16], 与咖啡因代谢关系密切^[17-18]。*GLUT4* 主要在肌细胞和脂肪细胞中表达, 存在于细胞质里的细胞器、内体和 *GLUT4* 贮存囊泡(*GLUT4* storage vesicle, GSV)中^[19]猪 *GLUT4* 基因位于第 12 号染色体, 参与胰岛素信号通路、脂肪细胞因子信号通路和 II 型糖尿病通路, 与脂肪代谢均存在密切关联。

Rab 蛋白家族属于 Ras 超家族。*Rab* 蛋白在真核生物细胞里是调控细胞器之间囊泡运输的重要调节因子, 对脂质生物膜的融合起重要作用^[20]。*Rab* 蛋白与 *GLUT4* 关系密切, 目前 *Rab2*、*Rab8*、*Rab10* 和 *Rab14* 已被证实存在细胞内与 *GLUT4* 存在共同定位^[21-22], 本研究数据显示 *GLUT4* 基因表达的上调, 是伴随着 *Rab32*、*Rab4a*、*Rab27a* 三种 *Rab* 蛋白显著性差异表达的。

本研究所发现差异表达基因均与 *THRSP* 基因

存在不同程度的关联性, *THRSP* 基因作为甲状腺素受体正调控或负调控激活转录因子^[23-24], 对组织特异型脂质代谢有重要调控作用。大量研究表明 *THRSP* 基因与动物脂肪沉积存在密切关系^[25-29]。在本研究中, 产脂能力显著差异的脂肪型猪和瘦肉型猪, 它们肝脏中 *THRSP* 基因的表达同样存在差异, 而在整个代谢途径上, *THRSP* 基因地位以及与本研究所发现差异表达基因之间关联性值得人们关注。

参考文献:

- [1] 周倩倩, 陈宏权, 魏汉卿 等. 猪甲状腺激素应答 Spot14 基因编码区多态性与猪产脂能力的关联性[J]. 生物化学与生物物理进展, 2011, 38(1): 84-90.
- [2] 陈华, 陈宏权, 周倩倩, 等. 猪 *THRSP* 基因 5'侧翼区序列转录调控活性的鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(3): 329-334.
- [3] Gerbens F, Verburg FJ, Van Moerkerk HT, et al. Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs[J]. J Anim Sci, 2001, 79(2):347-354.
- [4] Previato I, Parrott CL, Santamarina FS, et al. Transcriptional regulation of the human lipoprotein lipase gene in 3T3-L1 adipocytes[J]. J Biol Chem, 1991, 266(28): 18958-18963.
- [5] Knoll A, Putnova J, Dvorak J, et al. Linkage mapping of an Ava I PCR-RFLP within the porcine uncoupling protein 3 gene[J]. Anim Genet, 2000, 31(2):156-157.
- [6] Newcombe M, Cartwright AL, Harter-Dennis JM. The effect of increasing photoperiod and food restriction in sexed broiler-type birds. I. Growth and abdominal fat cellularity[J]. Br Poult Sci, 1992, 33(2): 415-425.
- [7] Donkin SS, McNall AD, Swencki BS, et al. The somatotropin dependent decrease in hepatic fatty acid synthase mRNA is the result of a decrease in gene transcription[J]. J Mol Endocrinol, 1996, 16(2): 151-158.
- [8] Hackl H, Sanchez Cabo F, Sturn A, et al. Analysis of DNA microarray data[J]. Curr Top Med Chem, 2004, 4(13): 1357-1370.
- [9] Leung YF, Cavalieri D. Fundamentals of cDNA microarray data analysis[J]. Trends Genet, 2003, 19(11): 649-659.
- [10] Bianchi A, Evans JL, Iverson AJ, et al. Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase[J]. J Biol Chem, 1990, 265: 1502-1509.
- [11] Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA, et al. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2[J]. Science, 2001, 291(5513): 2558-2559.
- [12] Wakil S J. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme[J]. Biochemistry, 1989, 28:4523-4530.
- [13] Kuhajda FP. Fatty acid synthase and cancer: New application of an old pathway[J]. Cancer Res, 2006, 66: 5977-5980.
- [14] Kusakabe T, Maeda M, Hoshi N, et al. Fatty acid synthase mainly in adult Hormone-sensitive cells or cells with high lipid metabolism and in proliferating fetal cells[J]. J Histochem Cytochem, 2000, 48(5): 613-622.
- [15] Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. Do novo fatty acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy[J]. Br J Cancer, 2009, 100: 1369-1372.
- [16] Bryant N, Covers R, JamesD, et al. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(4): 267-277.
- [17] Egawa T, Hamada T, Kameda N, et al. Caffeine acutely activates 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase and increases insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscles[J]. Metabolism, 2009, 58(11): 1609-1617.
- [18] Guarino M P, Ribeiro M J, Sacramento J F, et al. Chronic caffeine intake reverses age-induced insulin resistance in the rat: effect on skeletal muscle Glut4 transporters and AMPK activity[J]. Age (Dordr), 2013, 35(5): 1755-1765.
- [19] Martin S, Tellam J, Livingstone C, et al. The glucoses transporter(GLUT-4) and vesicle-associated membrane protein-2(VAMP-2) are segregated from recycling endosomes in insulin-sensitive cells[J]. J Cell Biol, 1996, 134(3): 625-635.
- [20] Pfeiffer S. Membrane domains in the secretory and endocytic pathways[J]. Cell, 2003, 112:507-517.
- [21] Miinea C P, Sano H, Kane S, et al. AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain[J]. Biochem J, 2005, 391: 87-93.
- [22] Larance M, Ramm G, Stockli J, et al. Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking[J]. J Biol Chem, 2005, 280: 37803-37813.
- [23] 曹志平, 李辉. Spot14 基因研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(2): 285-288.
- [24] Jump D B, Clarke S D, MacDougald O, et al. Polyunsaturated fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(18): 8454-8458.
- [25] Wang X, Carre W, Zhou H, et al. Duplicated Spot 14 genes in the chicken: characterization and identification of polymorphisms associated with abdominal fat traits[J]. Gene, 2004, 332: 79-88.
- [26] Harvatine K J, Bauman D E. SREBP1 and thyroid hormone responsive spot14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA[J]. J Nutr, 2006, 136(10): 2468-2474.
- [27] La B, Oh D, Lee Y, et al. Association of bovine fatty acid composition with novel missense nucleotide polymorphism in the thyroid hormone-responsive(*THRSP*) gene[J]. Anim Genet, 2013, 44(1): 118-119.
- [28] Zhu Q, Anderson G W, Mucha G T, et al. The Spot14 protein is required for de novo lipid synthesis in the lactating mammary gland[J]. Endocrinology, 2005, 146: 3343-3350.
- [29] Aipoalani D L, O'Callaghan B L, Mashek D G, et al. Overlapping roles of the glucose-responsive genes, S14 and S14R, in hepatic lipogenesis[J]. Endocrinology, 2010, 151: 2071-2077.