

慢病毒介导 shRNA 干扰 RBP4 促进猪前体脂肪细胞成脂分化

程佳, 蒲蕾, 杨浩, 史新娥, 郑加盟, 张振宇, 杨公社*
(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)

摘要: 为研究视黄醇结合蛋白 4 (retinol binding protein 4, RBP4) 对猪前体脂肪细胞分化的影响, 笔者构建了 RBP4 重组慢病毒干扰载体, 包装并感染猪前体脂肪细胞, 采用 BODIPY 和油红 O 染色以及 real-time PCR 等方法, 从形态学和基因表达水平检测抑制 RBP4 表达对成脂分化的作用。研究结果显示, RBP4 重组慢病毒干扰载体构建成功, 病毒滴度达到 6.5×10^7 pfu \cdot mL⁻¹, 能显著抑制猪前体脂肪细胞中 RBP4 的表达水平 (干扰效率在 60% 以上)。同时, 干扰 RBP4 能促进猪前体脂肪细胞分化, 增加成脂关键基因 *PPAR γ* 、*SREBP-1c* 和 *aP2* 的 mRNA 表达。本研究结果表明, RBP4 对猪前体脂肪细胞分化有抑制作用, 为进一步研究 RBP4 对猪前体脂肪细胞分化的作用机制奠定基础。

关键词: 视黄醇结合蛋白 4; RNA 干扰; 慢病毒; 前体脂肪细胞; 猪

中图分类号: S813.3; Q782

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)06-0937-07

Lentivirus Mediated shRNA Interference Silencing RBP4 Promoted Differentiation of Porcine Preadipocytes

CHENG Jia, PU Lei, YANG Hao, SHI Xin-e, ZHENG Jia-meng, ZHANG Zhen-yu,
YANG Gong-she*

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

Abstract: To investigate the role of RBP4 during the differentiation of porcine preadipocytes and the biological function of RBP4, we constructed porcine RBP4 lentivirus interfering vector, then infected the porcine preadipocytes. The changes in morphology and gene expression levels were studied to evaluate the effects of RBP4 expression on preadipocyte differentiation by BODIPY, Oil Red O staining and real-time PCR analysis. The results showed that RBP4 lentivirus interfering vector was constructed correctly, virus titer was 6.5×10^7 pfu \cdot mL⁻¹. RBP4 mRNA and protein expression was remarkably reduced by approximate 60% in porcine preadipocytes infected with shRBP4. Moreover, preadipocytes differentiation was promoted and the mRNA expression levels of *PPAR γ* , *SREBP-1c* and *aP2* were increased in adipocytes by knocking down of RBP4. Therefore, adipogenic differentiation of porcine preadipocytes are inhibited by RBP4, which would help the further exploration of the biological mechanism of RBP4 during the adipogenesis.

Key words: retinol binding protein 4; RNA interference; lentivirus; preadipocyte; porcine

收稿日期: 2012-11-16

基金项目: 国家 973 计划项目 (2012CB124705); 高繁殖力转基因猪新品种培育 (2011ZX08006-005); 西北农林科技大学“创新团队建设计划”项目资助

作者简介: 程佳 (1983-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 博士, 主要从事动物生物技术研究, E-mail: chengjia@nwsuaf.edu.cn, Tel: 029-87091017

* 通信作者: 杨公社, 教授, Tel: 029-87092430, E-mail: gsyang999@hotmail.com

视黄醇结合蛋白 4 (retinol binding protein 4, RBP4) 属于视黄醇结合蛋白家族成员, 是体内负责转运维生素 A 及其各种活性代谢物的蛋白。RBP4 是 1 个新发现的脂肪因子, 主要由肝脏和脂肪组织表达和分泌, 参与胰岛素抵抗的发生^[1]。自 RBP4 被确认为脂肪细胞因子以来, 越来越多的报道显示, 血清 RBP4 水平的升高与肥胖、II 型糖尿病、胰岛素抵抗等一系列代谢疾病密切相关^[2-4]。目前, 有关 RBP4 的研究主要集中在表达量分析及临床应用上, 对其影响细胞分化和分子机制的研究相对较少^[5-7]。结合本实验室的前期研究, RBP4 在 240 日龄猪皮下脂肪组织的表达显著高于 3 日龄猪^[8], 以及 RBP4 随着猪前体脂肪细胞分化表达逐渐增加 (结果未显示) 的结果, 笔者发现无论是在活体水平还是细胞水平, 随着脂肪沉积增加, RBP4 的表达水平逐渐升高。因此, 推测 RBP4 可能在脂肪细胞分化过程中发挥重要作用, 为了研究 RBP4 在猪前体脂肪细胞分化过程中的作用, 笔者构建了 RBP4 重组慢病毒干扰载体, 通过抑制猪前体脂肪细胞中 RBP4 的表达, 探讨其对猪前体脂肪细胞分化的影响, 为深入研究 RBP4 在猪脂肪细胞分化过程中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1~3 日龄仔猪由西北农林科技大学实验猪场提供。慢病毒载体系统和 293T 细胞系由本实验室保存。限制性内切酶 (*Bam*H I 和 *Xho* I)、*Taq* 酶和 T4 连接酶、Trizol、反转录试剂盒购于 TaKaRa 公司, DMEM/F12、I 型胶原酶、Opti-MEM 和胎牛

血清购于 Gibco 公司, 质粒小量提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购于 BioFlux 公司, 转染用试剂 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、NaCl、Hepes、Polybrene 购自 Sigma 公司, RBP4 抗体购于北京义翘神州生物技术有限公司, 其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 猪前体脂肪细胞培养

按照已建立的方法操作^[9], 无菌状态下采集 1~3 日龄仔猪皮下脂肪组织, 用含双抗的 PBS 缓冲液冲洗 2 次, 剪成约 1 mm^3 的组织块, 加入 $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 I 型胶原酶消化液, 置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 振荡摇床内温育 60~80 min 后, 经 200 目钢筛过滤 2 次, 滤液以 $1\ 500\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 7 min, 弃上清, 用含双抗的 PBS 缓冲液重悬沉淀物, $1\ 500\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清, 重复 3 次后, 用基础培养液将沉淀的细胞团制成细胞悬液, 以 5×10^4 个 $\cdot \text{cm}^{-2}$ 密度接种于 35 mm 培养皿中, 加适量含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基, 置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养, 12 h 后换培养液, 除去未贴壁细胞, 之后每 48 h 换液, 待细胞汇合率达 80% 时, 用慢病毒侵染。

1.3 猪 pLentiH1-RBP4 shRNA 慢病毒重组质粒构建与鉴定

根据猪 RBP4 基因序列 (GenBank 收录号: NM_214057. 1), 利用 Invitrogen 公司在线软件 BLOCK-iTTM RNAi Designer 筛选 3 条 shRNA 靶序列, 合成针对靶序列的相应寡核苷酸序列 (表 1)。将合成的单链寡核苷酸退火形成双链, 与经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后的 pLenti-H1 载体连接, 产物转化 DH5 α 感受态细胞, 挑选阳性克隆扩繁并提取质粒, 酶切鉴定正确后, 送上海生工公司测序。

表 1 猪 RBP4 基因的干扰片段

Table 1 Design of siRNA targeting on porcine RBP4 gene

干扰序号	位置	序列信息
RNAi	Location	Synthesized oligo nucleotide
sh-RBP4-1	168-189 bp	5'-GATCCGGACAACATCGTCGCCGAATTctcgagAATTCGGCGACGGTTGTCCATTTTTTC-3' 5'-TCGAGAAAAAGGACAACATCGTCGCCGAATTctcgagAATTCGGCGACGGTTGTCCATG-3'
sh-RBP4-2	353-374 bp	5'-GATCCGAAACGATGACCACTGGATCActcgagTGATCCAGTGGTCATCGTTTTCTTTTTTC-3' 5'-TCGAGAAAAAGAAACGATGACCACTGGATCActcgagTGATCCAGTGGTCATCGTTTTTCG-3'
sh-RBP4-3	552-573 bp	5'-GATCCGCTGATCACTCACAATGGTTAactcgagTAACCATTTGTGAGTGATCAGCTTTTTTC-3' 5'-TCGAGAAAAAGCTGATCACTCACAATGGTTAactcgagTAACCATTTGTGAGTGATCAGCG-3'
Nonsense		5'-GATCCTGGCATGCGTAGAAGGCAActcgagTTGCCTTCTACGCATGCCATTTTTTC-3' 5'-TCGAGAAAAATGGCATGCGTAGAAGGCAActcgagTTGCCTTCTACGCATGCCAG-3'

小写字母代表 loop 环

Lowercase letters stand for loop ring

1.4 重组慢病毒包装、浓缩及滴度测定

采用磷酸钙转染法:转染前 24 h 以 2×10^4 个 $\cdot \text{cm}^{-2}$ 密度将 293T 细胞接种于 10 cm 皿中,待细胞密度 80%~90% 时进行转染。转染前 2~4 h 更换 8 mL 新鲜培养基,将 $\Delta 8.9$ 、VSV-G 和 Lenti H1-shRNA 重组质粒按一定比例加入 ddH₂O 中,使总体积为 480 μL ,涡旋混匀;将 520 μL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl₂ 加入质粒混合物,涡旋混匀;将 20 μL $70 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH₂PO₄ 和 980 μL 的 HN 缓冲液混匀为 HNP 缓冲液,将其边涡旋边加入质粒混合物中;室温静置 15 min 形成沉淀;将混合物滴加到细胞培养皿中;14~16 h 后更换新鲜培养基;48 和 72 h 收集上清液,3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,去除细胞碎片,0.45 μm 滤膜过滤,100 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,弃上清,得到浓缩的病毒颗粒。按照 10 倍比稀释病毒,以 $10^2 \sim 10^6$ 浓度梯度分别感染 293T

细胞,2 d 后观察荧光表达情况,按公式:病毒滴度 ($\text{pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$) = GFP 阳性细胞数 \times 病毒稀释倍数 $\div 0.01 \text{ mL}$,计算病毒滴度。

1.5 real-time PCR 检测

猪前体脂肪细胞感染病毒 48 h 后观察荧光,收集细胞,提取总 RNA,以此为模板,按照反转录试剂盒说明书的条件进行反转录合成 cDNA 第一条链,再以 cDNA 为模板,采用核酸扩增技术结合 SYBR Green I 法进行 real-time PCR 测定,具体操作按照说明书的条件进行。对 $\beta actin$ 、RBP4、PPAR γ 、 $aP2$ 和 SREBP-1c 基因进行 real-time PCR 分析,根据 NCBI 上提供猪的基因序列,设计扩增核苷酸序列的 PCR 特异性引物 F(Forward Primer)和 R(Reverse Primer),引物委托华大基因有限公司合成(表 2)。

表 2 实时定量 PCR 引物信息

Table 2 Primer sequences and parameters for real-time PCR

基因 Gene	登录号 GenBank Accession No.	序列 (5'-3') Primer sequence(5'-3')	长度/bp Length (bp)
$\beta actin$	AF054837	F: GGAAGTTCGAGCAGGAGATGG R: AGGAAGGAGGGCTGGAAGAG	138
RBP4	NM_214057.1	F: GGGCGTAGCATCCTTCCT R: TCCGATTTGCCATCACAG	264
PPAR γ	NM_214379	F: AGGACTACCAAAGTGCCATCAAA R: GAGGCTTTATCCCCACAGACAC	142
$aP2$	HM453202	F: GCGTGAGCGCAACAACA R: TCACTGGTCAGCTCCAGCAC	121
SREBP-1c	NM_214157	F: GAGCACCATAACCTTAGATGGA R: AAATTCTGGTAGCCGTGACA	201

采用 20 μL 体系:cDNA 模板 1 μL ,F 和 R 各 1 μL ,SYBR Premix Ex TaqTM ($2 \times$) 9 μL ,ddH₂O 加至 20 μL ,按以下程序进行 PCR 扩增:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,进行 40 个循环,退火时采集荧光。 $\beta actin$ 、RBP4、PPAR γ 、SREBP-1c 和 $aP2$ 均以相同的条件进行 real-time PCR 扩增,重复 3 次,基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算,以 $\beta actin$ 为内参基因。

1.6 Western blot 分析

猪前体脂肪细胞感染病毒 72 h 后观察荧光,收集细胞,用蛋白裂解液提取细胞总蛋白;猪前体脂肪

细胞感染病毒 2 d 后,进行成脂诱导分化,8 d 后收集细胞,用蛋白裂解液提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,将浓度调整一致后,加入 $2 \times$ 上样缓冲液,煮沸 15 min,用 10% SDS-PAGE 胶电泳,将目的条带转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,一抗孵育 2 h,二抗孵育 1 h,最后用 Bio-Rad ChemiDocXRS+ 曝光系统检测目的蛋白。

1.7 BODIPY 或油红 O 染色

病毒感染猪前体脂肪细胞后,进行成脂诱导分化,8 d 后吸出培养基,PBS 洗 3 次,10% 甲醛固定 30 min,PBS 洗 3 次,用 BODIPY 工作液避光浸染

15 min 或 60% 的油红 O 染色 30 min, PBS 洗 3 次后, 倒置荧光显微镜观察照相。

1.8 数据处理

用 SPSS 13.0 软件对数据采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 *t* 检验进行方差分析与显著性检验。

2 结果

2.1 猪 pLentiH1-RBP4 shRNA 慢病毒重组质粒构建与包装

先后构建了 3 个 RBP4 的慢病毒干扰载体, 分别命名为 sh-RBP4-1、sh-RBP4-2 和 sh-RBP4-3。将构建成功的慢病毒重组质粒和包装质粒 Δ 8.9、VSV-G 共转染 293T 细胞, 24 h 后观察 GFP 表达。结果显示, 293T 细胞生长良好, 80% 以上细胞表达绿色荧光蛋白 (图 1)。继续培养, 分别于 36 和 72 h 收集病毒上清, 经过滤、浓缩后, 测定滴度为 6.5×10^7 pfu \cdot mL⁻¹。

2.2 慢病毒感染猪前体脂肪细胞后对 RBP4 基因表达的影响

感染前 1 d, 按照 2×10^5 个 \cdot 孔⁻¹ 密度接种猪前体脂肪细胞。感染时, 用添加有 $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Polybrene 的 1 mL 病毒液更换细胞培养基, 24 h 后更换为含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基, 2 d 后荧光显微镜下观察, 若可见细胞发绿色荧光, 表明慢病毒已经整合到细胞基因组, 并开始表达 GFP 和干扰片段。

病毒感染猪前体脂肪细胞 48 h 后收集 RNA, 采用 real-time PCR 检测干扰片段对 RBP4 基因的干扰效率, 其中 sh-RNA-3 的干扰效率在 60% 以上, 达到预期效果, 将其重新命名为 shRBP4。Western blot 检测结果也显示, 感染了 sh-RNA-3 的猪前体脂肪细胞, RBP4 蛋白表达显著降低 (图 2)。结果表明, shRBP4 慢病毒能够有效抑制猪前体细胞中 RBP4 的表达, 在后续试验中可用于抑制 RBP4 基因。

2.3 干扰 RBP4 促进猪前体脂肪细胞分化

用 shRBP4 病毒感染猪前体脂肪细胞后, 进行诱导分化, 8 d 后进行 BODIPY 和油红 O 染色, 检测沉默 RBP4 后对脂肪细胞分化的影响, 结果 (图 3) 显示, shRBP4 处理组细胞的分化程度明显比空白对照组和无关序列处理组增加, 而在空白对照组和无关序列处理组间差异不明显, 说明减少 RBP4 的

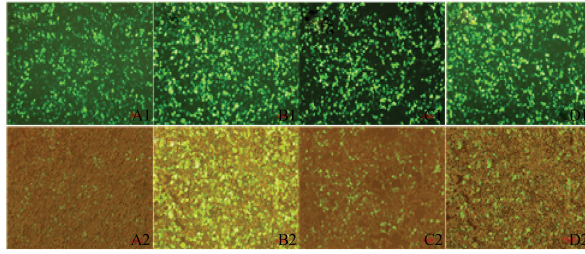
表达能够促进猪前体脂肪细胞的分化。real-time PCR 检测 RBP4 以及成脂标志基因过氧化物酶体增生物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ)、脂肪酸结合蛋白 2 (adipocyte protein 2, aP2) 和固醇调节元件结合蛋白 1c (sterol regulatory element-binding protein 1c, SREBP-1c) 基因 mRNA 表达情况, 结果 (图 4) 显示, 降低 RBP4 的表达对成脂基因的 mRNA 水平有不同程度的影响。

3 讨论

研究显示, 脂肪组织作为内分泌器官^[10], 可分泌多种细胞因子。但脂肪细胞因子的分泌紊乱会导致肥胖、糖尿病等代谢综合征^[11-12]。RBP4 是近年来新发现的脂肪细胞因子, 其蛋白水平的升高与胰岛素抵抗以及 II 型糖尿病等一系列代谢综合征有关^[13]。Q. Yang 等研究发现, 发生胰岛素抵抗的小鼠模型其病理表现与血清 RBP4 水平升高有关^[1], 而降低血清 RBP4 水平能够有效提高胰岛素的敏感性。与瘦素 (leptin) 和白介素 6 (IL-6) 相比, RBP4 与胰岛素抵抗指数有更显著的相关性^[14]。这些研究都表明, 脂肪细胞因子 RBP4 与肥胖、胰岛素抵抗及代谢综合征之间的潜在联系, 但其病理发生机制尚不清楚, 有的结论甚至存在矛盾^[5-6, 14]。因此阐明 RBP4 的细胞功能及作用机制对于控制肥胖、治疗糖尿病等相关疾病具有重要意义。

相比其他的转染方法, 慢病毒介导的 RNA 干扰, 具有感染原代细胞效率高, 能够长期稳定发挥作用等特点^[15-16]。因此, 作者构建了猪 RBP4 慢病毒干扰载体, 并带有 GFP, 可直观反应包装和感染效果。结果显示, shRBP4 慢病毒经过纯化, 滴度达到 6.5×10^7 pfu \cdot mL⁻¹。感染猪前体脂肪细胞后, 能有效降低猪前体细胞中 RBP4 的表达水平。

感染 shRBP4 的猪前体脂肪细胞, 经诱导分化后的形态学检测证明, 抑制 RBP4 表达能够增加猪前体脂肪细胞中脂质累积, 这个结果与笔者前期检测 RBP4 在猪前体脂肪细胞分化过程中的表达趋势的结果 (数据未显示), 共同验证了 RBP4 对猪前体脂肪细胞的分化有重要作用的推测。但与 L. Munkhtulga 等对 RBP4 在 3T3-L1 细胞诱导分化过程中表达规律的研究有所差别^[7], 这可能是由于细胞特性不同造成的差异。BODIPY 作为一种荧光染料能特异性的与细胞中的脂质结合并发绿色荧光,

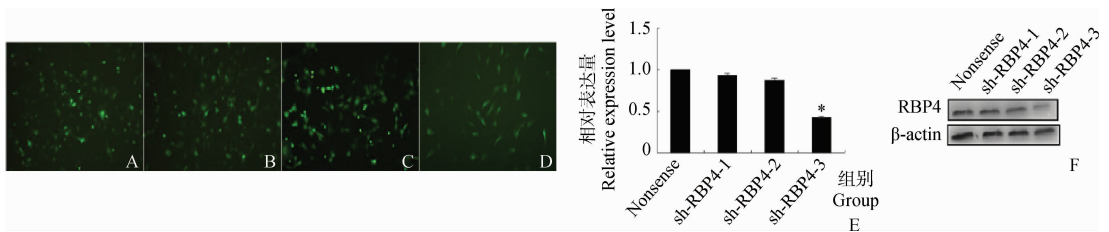


采用磷酸钙转染法将构建成功的慢病毒重组质粒和包装质粒 Δ 8.9、VSV-G 共转染 293T 细胞。36 和 72 h 收集上清,根据报告基因 *GFP* 的表达情况确定感染效率。A1. Δ 8.9、VSV-G 和 Nonsense 转染的 293T 细胞;B1. Δ 8.9、VSV-G 和 sh-RBP4-1 转染的 293T 细胞;C1. Δ 8.9、VSV-G 和 sh-RBP4-2 转染的 293T 细胞;D1. Δ 8.9、VSV-G 和 sh-RBP4-3 转染的 293T 细胞;A2、B2、C2 和 D2 是 A1、B1、C1 和 D1 相应亮视野的观察

Three recombinant plasmids and control vector were transfected into 293T cells in the presence of packaging plasmids by calcium phosphate method. Supernatant was collected at 36 h and 72 h, and the infection efficiency was determined according to the expression of the reporter gene *GFP*. A1. 293T cells were transfected by Δ 8.9, VSV-G and Nonsense; B1. 293T cells were transfected by Δ 8.9, VSV-G and sh-RBP4-1; C1. 293T cells were transfected by Δ 8.9, VSV-G and sh-RBP4-2; D1. 293T cells were transfected by Δ 8.9, VSV-G and sh-RBP4-3; A2, B2, C2 and D2 were observed in bright field

图 1 慢病毒的包装

Fig. 1 Production of recombinant lentivirus

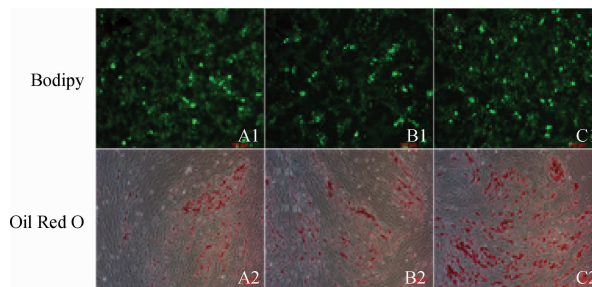


RBP4 重组慢病毒感染原代培养前脂肪细胞。A. LV-Nonsense 对照;B. LV-shRBP4-1;C. LV-shRBP4-2;D. LV-shRBP4-3;E. real-time PCR 检测干扰片段对 *RBP4* 基因的干扰效率,其中 sh-RNA-3 的干扰效率在 60% 以上 ($n=3$; $*P<0.05$);F. 感染 72 h, Western blot 检测 *RBP4* 蛋白表达, β -actin 为内对照

Primary cultured preadipocytes were infected with *RBP4* recombinant lentivirus. A. LV-Nonsense control; B. LV-shRBP4-1; C. LV-shRBP4-2; D. LV-shRBP4-3; E. Identification of RNAi efficiency by real-time PCR. Preadipocytes were infected with recombinant lentivirus for 48 h. Total RNAs were obtained for real-time PCR to analyze the relative expression level of *RBP4*. LV-ShRBP4-3 had the highest interference efficiency, approximately above 60% in mRNA level ($n=3$; $*P<0.05$); F. Preadipocytes were infected with recombinant lentivirus for 72 h, using Western blot analysis of *RBP4* protein expression, β -actin as internal control

图 2 重组慢病毒侵染猪前体脂肪细胞的鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant lentivirus

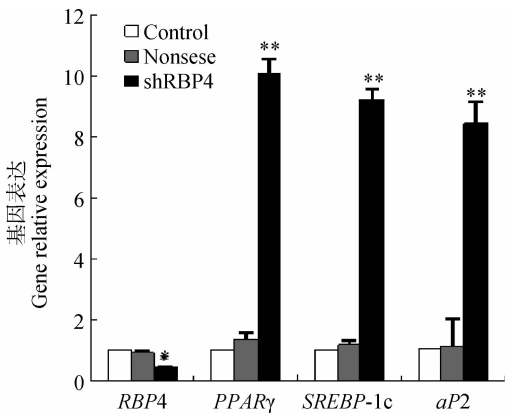


shRBP4 病毒感染猪前体脂肪细胞后进行诱导分化。细胞用 BODIPY 和油红 O 染色以检测脂质量。A1、A2. 未感染细胞对照;B1、B2. Nonsense 感染细胞对照;C1、C2. shRBP4 感染细胞

Preadipocytes were infected with shRBP4, then were induced to differentiate. Cells were stained with BODIPY and Oil red O to assess lipid accumulation. A1, A2. Primary cultured porcine preadipocytes were not infected by lentivirus; B1, B2. primary cultured porcine preadipocytes were infected with Nonsense as a control; C1, C2. Primary cultured porcine preadipocytes were infected with shRBP4

图 3 干扰 *RBP4* 对猪前体脂肪细胞成脂的影响

Fig. 3 BODIPY and Oil red O staining of porcine preadipocytes after differentiation



数据用 β -actin 归一化 ($n=3$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Data were normalized to β -actin ($n=3$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

图4 干扰 RBP4 对 PPAR γ 、SREBP-1c 和 aP2 表达的影响

Fig. 4 mRNA expression for RBP4 and adipocyte marker genes PPAR γ , SREBP-1c and aP2 in porcine preadipocytes infected with shRBP4 after differentiation by real-time PCR

以此定位细胞中的脂滴^[17]。与油红 O 染色结果相互验证,增加结果的可靠性。由于 PPAR γ 和 aP2 作为脂肪细胞分化的标志基因,其分别在启动前体脂肪细胞分化和脂肪细胞成熟阶段起关键作用^[18]。因此,干扰 RBP4 会使 PPAR γ 、SREBP-1c 和 aP2 mRNA 的表达水平显著增加,其相关分子机制还有待进一步研究。与形态学结果共同证明 RBP4 对猪前体脂肪细胞的分化有一定的促进作用。

有研究表明,RBP4 基因的多态性可以作为衡量产仔数的候选基因之一^[19-20]。结合 RBP4 在猪繁殖性状的改良研究,以期培育出皮下脂肪少、产仔数多的优良品系,是猪育种工作今后面临的机遇和挑战。此外,RBP4 是否会影响猪肉品质等问题,还有待研究。

综上所述,重组慢病毒 RBP4 载体的成功构建,以及干扰 RBP4 促进猪前体脂肪细胞分化的结果,都为进一步研究 RBP4 在猪脂肪细胞胰岛素信号通路中的功能奠定了基础。

参考文献:

[1] YANG Q, GRAHAM T E, MODY N, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2005, 436(7049):356-362.

[2] BROCH M, GOMEZ J M, AUGUET M T, et al. Association of retinol-binding protein-4 (RBP4) with lipid parameters in obese women [J]. *Obes Surg*, 2010, 20(9):1258-1264.

[3] GRAHAM T E, YANG Q, BLÜHER M, et al. Retinol binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese and diabetic subjects[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(24):2552-2563.

[4] YAO-BORENGASSER A, VARMA V, BODLES A M, et al. Retinol binding protein 4 expression in humans relationship to insulin resistance, inflammation, and response to pioglitazone[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(7):2590-2597.

[5] BAJZOVÁ M, KOVÁČIKOVÁ M, VÍTKOVÁ M, et al. Retinol-binding protein 4 expression in visceral and subcutaneous fat in human obesity[J]. *Physiol Res*, 2008, 57(6):927-934.

[6] STEFAN N, HENNIGE A M, STAIGER H, et al. High circulating retinol-binding protein 4 is associated with elevated liver fat but not with total, subcutaneous, visceral, or intramyocellular fat in humans[J]. *Diabetes Care*, 2007, 30(5):1173-1178.

[7] MUNKHTULGA L, NAGASHIMA S, NAKAYAMA K, et al. Regulatory SNP in the RBP4 gene modified the expression in adipocytes and associated with BMI[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2010, 18(5):1006-1014.

[8] LI X J, YANG H, LI G X, et al. Transcriptome profile analysis of porcine adipose tissue by high-throughput sequencing [J]. *Anim Genet*, 2012, 43(2):144-152.

[9] 张国华, 杨公社, 屈长青, 等. 猪前体脂肪细胞的分离培养[J]. *细胞生物学杂志*, 2005, 27(6): 693-696.

[10] POULOS S P, HAUSMAN D B, HAUSMAN G J. The development and endocrine functions of adipose tissue[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 323(1): 20-34.

[11] HAJER G R, VAN HAEFTEN T W, VISSEREN F L. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases [J]. *Eur Heart J*, 2008, 29(24): 2959-2971.

[12] ANTUNA-PUENTE B, FEVE B, FELLAHI S, et al. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity [J]. *Diabetes Metab*, 2008, 34(1):2-11.

[13] KOTNIK P, FISCHER-POSOVSZKY P, WABITSCH M. RBP4: a controversial adipokine [J]. *Eur J Endocri-*

- no, 2011, 165(5):703-711.
- [14] KLÖTING N, GRAHAM T E, BERNDT J, et al. Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass[J]. *Cell Metab*, 2007, 6(1):79-87.
- [15] GIRY L M, VERHOEYEN E, SALMON P. Lentiviral vectors[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 737: 183-209.
- [16] COCKRELL A S, KAFRI T. Gene delivery by lentivirus vectors[J]. *Mol Biotechnol*, 2007, 36(3): 184-204.
- [17] 王 平, 熊 燕, 杨公社, 等. 慢病毒载体介导的 RNA 干扰敲减 Akt2 表达抑制猪前体脂肪细胞分化[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(1): 53-60.
- [18] LOWE C E, ORAHILLY S, ROCHFORD J J. Adipogenesis at a glance[J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(16): 2681-2686.
- [19] DALL'OLIO S, FONTANESI L, TOGNAZZI L, et al. Genetic structure of candidate genes for litter size in Italian Large White pigs[J]. *Vet Res Commun*, 2010, 34 (Suppl 1):S203-S206.
- [20] 刘 远, 李良良, 莫小雨, 等. PRLR、RBP4 基因多态性分布及其对大白猪产仔数的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(7):120-123.

(编辑 白永平)