

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

潘志雄, 王继文*, 唐 慧, 向梳瑕, 王 静,
吕 佳, 杨 超, 韩春春

(四川农业大学 畜禽品种资源发掘与利用重点实验室, 雅安 625014)

摘 要: 本研究旨在克隆鹅围脂滴蛋白(*Perilipin*)基因, 并探讨填饲对其在四川白鹅和朗德鹅肝脏中表达的影响, 为从脂滴角度研究鹅肥肝分子机理提供依据。试验选取 12 只朗德鹅和 12 只四川白鹅为研究对象, 通过 RT-PCR 方法扩增鹅 *Perilipin* 基因部分序列, 采用实时定量技术研究了该基因在皮脂、腹脂、肝脏等 10 个组织中的表达情况, 最后检测填饲后两品种鹅肝脏总脂质含量、甘油三酯(TG)水平、肝质量以及 *Perilipin* 基因表达变化。结果表明: 获得的鹅 *Perilipin* 基因序列与原鸡的同源性最高, 与哺乳动物的同源性也达到 70% 以上; 从组织表达上看, 该基因主要表达于腹脂和皮脂, 而在其他组织几乎不表达; 填饲引起鹅肝脏 *Perilipin* mRNA 表达丰度的极显著增加 ($P < 0.01$), 且与肝质量、肝内 TG 和总脂质呈显著正相关; 此外, 填饲导致其在朗德鹅肝脏中的表达丰度显著高于四川白鹅 ($P < 0.05$)。结果提示: 填饲会引起 *Perilipin* mRNA 在鹅肝脏中表达丰度的极显著增加 ($P < 0.01$), 且其增加幅度存在着品种间差异 ($P < 0.05$)。

关键词: 鹅; 填饲; 围脂滴蛋白; 基因克隆; mRNA 表达

中图分类号: S835; Q756

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)08-0939-05

Cloning of Goose *Perilipin* Gene, Tissues Expression and the Effect of Overfeeding on Its mRNA Level

PAN Zhi-xiong, WANG Ji-wen*, TANG Hui, XIANG Shu-xia,
WANG Jing, LV Jia, YANG Chao, HAN Chun-chun

(Key Laboratory of Animal Genetic Resources Exploitation and Utilization,
Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the effect of overfeeding on *Perilipin* mRNA level in goose. In this study, the Landes goose and Sichuan White goose were used to clone the partial gene sequence of *Perilipin*, and the effect of overfeeding on the transcriptional level of *Perilipin* in liver was researched. The result indicated that the obtained *Perilipin* gene sequence was 277 bp, and had high similarity with other species. The mRNA expression of *Perilipin* gene was detected in different tissues of Sichuan White goose, and its expression level was higher in abdominal adipose and subcutaneous adipose tissues. Overfeeding markedly increased the mRNA expression of *Perilipin* gene in the liver of two breeds. In control group, the mRNA level of *Perilipin* in liver of Landes and Sichuan White goose was not different; compared with control group, in overfeeding group, the mRNA level of *Perilipin* in liver was markedly higher in Sichuan White goose and Landes goose, and there was significant difference at the mRNA level of *Perilipin* in liver between the two breeds. The mRNA abundance of *Perilipin* was positively cor-

收稿日期: 2009-08-10

基金项目: 国家科技支撑计划(2008BADB2B08)资助

作者简介: 潘志雄(1983-), 男, 湖南新化人, 博士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, Tel: 0835-2886092, E-mail: pzhix217@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 王继文, E-mail: wjw2886166@163.com

related to the relative weight of liver, TG levels and total fatty acids in liver after overfeeding, and the correlation in Landes goose was stronger than that in Sichuan White goose. It was concluded that overfeeding induced the significant increase of *Perilipin* mRNA level in goose liver, and the effect of overfeeding was different between the two breeds.

Key words: goose; overfeeding; *Perilipin*; gene clone; mRNA expression

脂滴是大多数真核细胞储存脂质的主要形式,它在调节机体代谢平衡中发挥着重要的作用^[1]。正常情况下,富含甘油三酯的脂滴主要存在于脂肪细胞,而细胞代谢平衡的破坏会导致大量脂滴异常沉积于肝细胞引起肝脂肪变性,从而形成脂肪肝^[2]。脂滴蛋白是脂滴的重要组成部分,它是调节脂滴形成与分解的关键因素。围脂滴蛋白(*Perilipin*)是脂滴蛋白家族的核心成员之一,是定位于脂滴表面的高磷化的蛋白,对脂肪细胞中甘油三酯的代谢有双重调节作用,一方面可以通过阻止脂肪酶接近脂滴降低基础状态下的脂解,另一方面又可以促进激素刺激的脂肪分解^[3-4]。研究表明 *Perilipin* 基因的表达调控可能与一些代谢疾病密切相关, Straub 等发现 *Perilipin* 蛋白在非酒精性脂肪肝患者肝脏中表达显著上升,并且有助于甘油三酯在肝脏中的沉积^[5]。鹅肥肝是由于大量甘油三酯沉积于肝脏而形成的,并且不同的品种(系)在脂质沉积、肝质量等方面差异显著^[6],然而对于填饲是否引起脂滴蛋白基因表达的改变,以及这种改变是否与不同品种(系)产肝性能相关还未见报道。因此,本试验以朗德鹅和四川白鹅为材料,扩增鹅 *Perilipin* 基因,并探讨填饲对其在鹅肝脏中表达的影响,以期为深入研究脂滴在鹅肥肝形成中的作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和饲养管理

选用同批孵化的朗德鹅(Landes goose)和四川白鹅(Sichuan White goose)各 12 只,分别饲养于同一条件下。具体饲养方式如下:0~13 周群养,填饲期分笼饲养,整个饲养期采用自由饮水。0~4 周:自由采食雏鹅料(ME=12 390 kJ·kg⁻¹, CP=20.5%);4~13 周:自由采食生长鹅饲料(ME=10 920 kJ·kg⁻¹, CP=13.8%)并适当添加一定的青饲料。饲料添加量:4~5 周龄朗德鹅 150 g·只·d⁻¹、四川白鹅 125 g·只·d⁻¹;5~8 周朗德鹅 165 g·只·d⁻¹、四川白鹅 100 g·只·d⁻¹;8~13 周朗德鹅 120 g·只·d⁻¹、四川白鹅 85 g·只·d⁻¹。13 周开始预填,预填 7 d,

预填期只加精料并且供给量逐渐过渡为自由采食,14 周龄时,将每品种鹅群随机分为填饲组和对照组。对照组,继续饲喂生长鹅饲料,自由采食;填饲组,每日机器填饲 5 次,填饲期 2 周,其饲料配合:煮黄玉米、3%的鹅油和 1.5%食盐等(ME=14 154 kJ·kg⁻¹, CP=9.0%)。

1.2 样品采集及肝内甘油三酯(TG)水平、总脂质含量及肝质量测定

当填饲期结束时,对填饲组与对照组的鹅称重,整夜禁食,自由饮水。第 2 天清早进行屠宰。屠宰放血后立即剖腹,取肝脏称重,取一小块用于测肝内总脂质和甘油三酯的含量^[6],同时迅速取 50~100 mg 大小的肝组织块,液氮速冻后于-70℃冰箱保存以备 RNA 抽提。取 50~100 mg 四川白鹅对照组各组织,液氮速冻后于-70℃冰箱保存,用于组织表达检测。

1.3 基因克隆

根据其他物种 *Perilipin* 基因的保守序列合成引物:上 5'-GACCTACACCAGCACCAA-3';下 5'-GTACTCCATCAGCTTCTC-3',用于扩增鹅 *Perilipin* 基因。取 3 μg 总 RNA 根据 AMV 使用说明进行 RT 反应,PCR 反应条件为:94℃预变性 3 min;然后 94℃变性 1 min,52℃退火 1 min,72℃延伸 30 s,36 个循环;最后 72℃延伸 10 min;4℃保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离,DNA 纯化回收试剂盒纯化后与 pGEM-T 载体连接,进行克隆测序。

1.4 组织 mRNA 表达分析

以 18S 和 β actin 两个基因为内参,采用 SYBR-Green 法对 *Perilipin* 基因在四川白鹅各组织中的表达进行相对定量分析。反应体系为 25 μL:SYBR GREEN qPCR MIX 12.5 μL,上下游引物分别为 0.5 μL,模板 cDNA 为 2 μL,加水至 25 μL。PCR 反应条件:95℃预变性 10 min;然后 95℃30 s,68℃1 min,共 40 个循环,每个循环后采集荧光生成扩增曲线,68~95℃缓慢升温,产生溶解曲线。试验对所有样本进行 3 个重复测定,并在每次试验时

设阴性对照。根据本实验室扩增得到的鹅 *Perilipin* 基因序列(GenBank No.:GQ449255)设计引物,上下游引物分别为:5'-CTCTTGTCGCCTCAT-AGC-3', 5'-GCCTCCGAAGTGAAGGACAC-3'; 18S 上下游引物分别为:5'-TTGGTG-GAGCGATTTGTC-3', 5'-ATCTCGGGTGGCT-GAACG-3'; β actin 上下游引物分别为:5'-CAAC-GAGCGGTTTCAGG-TGT-3', 5'-TGGAGTTGAA-GGTGGTCTCG-3'。目的基因 mRNA 的相对表达量采用 Bio-Rad iQ5 系统 GeneExp 程序的 2(-Delta Delta C(T))方法,根据每个 PCR 反应的 Ct 值进行计算,计算前每个反应的 Ct 值用内参基因 18S 和 β actin 进行标准化校正^[7]。

1.5 填饲对 *Perilipin* 基因在两品种肝脏中表达的影响

同样以 18S 和 β actin 两个基因为内参,采用 SYBR-Green 法对 *Perilipin* 基因在填饲后四川白鹅和朗德鹅肝脏中的表达量进行定量分析。反应体系、引物序列、试验条件以及相对表达量的算法参照 1.4。

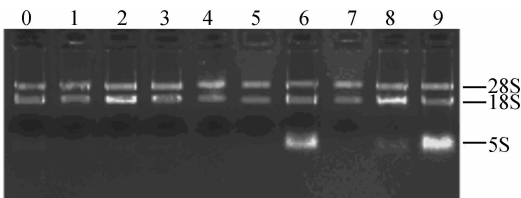
1.6 数据分析

利用 SAS9.13 软件进行分析,数据以 Mean \pm SD 表示。用 *t*-TEST 检验差异性是否显著。

2 结果

2.1 样品 RNA 的提取

按照 Trizol(Ivitrogen 公司)试剂说明书提取四川白鹅肝脏、腹脂、皮脂等 10 种组织以及两品种鹅填饲组、对照组肝脏总 RNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定抽提样品完整性(图 1),28S、18S 条带清晰完整,5S 不明显,无 DNA 和蛋白质污染条带,表明提取的总 RNA 纯度较高。



0~9 依次为:肝脏,皮脂,腹脂,小肠,胸肌,腿肌,心脏,肾脏,大脑,睾丸

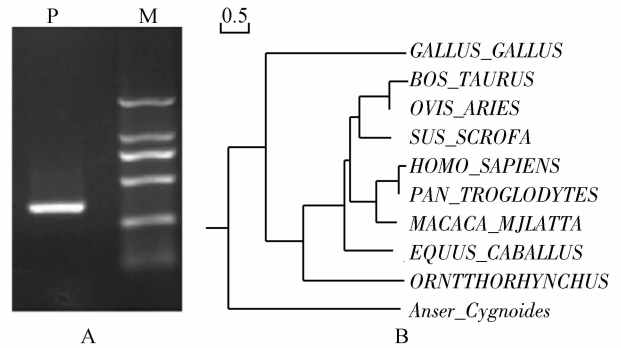
0-9. Liver, sebum, abdominal fat, small intestine, breast muscle, leg muscle, heart, kidney, cerebral, testis

图 1 RNA 1% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel (1%) electrophoresis result of total RNA

2.2 鹅 *Perilipin* 基因的克隆及序列分析

对阳性克隆质粒进行测序分析,鹅 *Perilipin* 基因的部分 cDNA 序列被克隆并证实,该 cDNA 长 277 bp(GenBank No.:GQ449255),菌液 PCR 电泳如图 2A。序列比对结果显示,鹅 *Perilipin* 基因与哺乳动物的同源性达到 70% 以上,与原鸡的高达 89%。用 DNAMAN 软件进行分子进化树构建(图 2B),结果表明,鹅跟原鸡的亲缘关系最近。



M. Marker 2000; P. *Perilipin* 基因目的条带

M. Marker 2000; P. The PCR products of *Perilipin*

图 2 鹅 *Perilipin* 基因菌液 PCR 结果(A)及分子进化树图(B)

Fig. 2 Electrophoregram of bacterial colony PCR (A) and phylogeny tree based Nei's genetic distance (B) of *Perilipin*

2.3 鹅 *Perilipin* 基因在不同组织中的表达情况

鹅 *Perilipin* 基因在鹅皮脂和腹脂中表达量较高,相比之下在其它组织几乎不表达(图 3)。

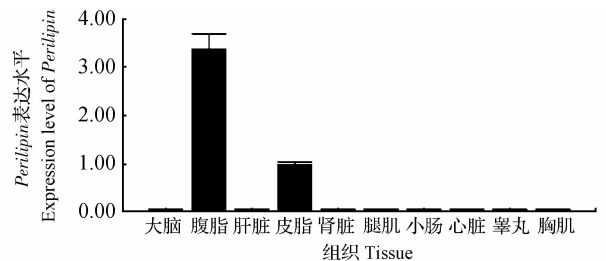


图 3 *Perilipin* 基因在不同组织中的表达情况

Fig. 3 The mRNA expression of *Perilipin* gene in different tissues

2.4 填饲对 *Perilipin* 基因在肝脏中表达的影响

与对照组相比,*Perilipin* 基因在填饲组四川白鹅和朗德鹅肝脏中的表达都极显著上升($P < 0.01$) (表 1),且填饲使 *Perilipin* mRNA 在朗德鹅肝脏中的表达丰度显著高于四川白鹅($P < 0.05$)。

表 2 表明,填饲后 *Perilipin* mRNA 的表达丰

度与总脂质水平、甘油三酯含量和肝重率在两个品种中都表现出显著正相关,而与对照组没有明显的

相关性。且朗德鹅肝质量、TG 水平和总脂质量都显著高于四川白鹅($P < 0.05$)。

表 1 填饲后 *Perilipin* mRNA 在肝脏中的表达

Table 1 The mRNA expression of *Perilipin* gene in liver after overfeeding

基因 Gene	四川白鹅 Sichuan White goose		朗德鹅 Landes goose	
	对照 Control	填饲 Overfeed	对照 Control	填饲 Overfeed
<i>Perilipin</i>	1±0.093 15	3.003±0.212 2**	0.979±0.094	5.349±0.877* [○]

*、** . 分别表示品种内在 $P < 0.05, 0.01$ 水平上的差异; [○] . 表示两个品种鹅在 $P < 0.05$ 水平上的差异。下同

*, **. The difference of correlative coefficient at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively within the same breed; [○] . The difference between two breeds at $P < 0.05$. The same as below

表 2 填饲后 *Perilipin* mRNA 在肝脏中的表达与肝质量及脂质指标的相关分析

Table 2 Correlation analysis between *Perilipin* mRNA abundance and relative weight of liver and lipid parameters after overfeeding

项目 Item	四川白鹅 Sichuan White goose		朗德鹅 Landes goose	
	对照 Control	填饲 Overfeed	对照 Control	填饲 Overfeed
总脂质含量/(%BW) Content of total lipid	0.114	0.428*	0.118	0.487* [○]
甘油三酯水平/(%BW) Level of TG	0.103	0.411*	0.121	0.485* [○]
肝重率/(%BW) Proportion of liver weight	0.134	0.453**	0.141	0.491* [○]

3 讨论

本试验通过 RT-PCR 方法获得了鹅 *Perilipin* 基因的部分序列,并提交 NCBI 数据库(GenBank No. :GQ449255)。BLAST 比对和分子进化树构建发现,鹅 *Perilipin* 基因跟原鸡的同源性最高,达到 89%,与其它物种也达到了 70%以上。表明本试验所扩增的序列为鹅的 *Perilipin* 基因。组织表达结果表明,*Perilipin* 主要表达于腹脂和皮脂,其它组织几乎不表达,与 Greenberg^[8] 和 Blanchette-Mackie^[9] 等在哺乳动物上的研究结果一致。

在正常情况下,*Perilipin* 在肝脏中表达丰度极低,然而在非酒精性脂肪肝患者肝脏中 *Perilipin* 的表达显著升高^[5]。Brasaemle 等发现,在细胞中过表达 *Perilipin* 可以促进甘油三酯的沉积^[10]。本试验结果表明,不论是四川白鹅还是朗德鹅,填饲都导致 *Perilipin* 的表达显著升高,并且伴随着肝脏内甘油三酯、总脂质的显著升高,可能暗示在 *Perilipin* 促进脂滴形成过程中,非酒精性脂肪肝和鹅肥肝具有一致性。另外,填饲不仅导致大量甘油三酯沉积于肝脏^[6],而且还极显著地提高 PPAR γ 在肝脏中表达^[11],而 *Perilipin* 是 PPAR γ 的靶基因^[12],暗示 *Perilipin* 在肥肝形成过程中扮演着重要的角色,至于 PPAR γ 如何调控 *Perilipin*,还需进一步研究。填饲引发鹅肝脂肪变性,在不同的物种间、同物种内不同品种(系)间,甚至同品种内不同个体间都存在着

较大的差异^[13],本试验以产肝性能优良的朗德鹅和产肝性能中等的四川白鹅为材料研究发现,填饲使 *Perilipin* 基因在朗德鹅中的表达显著($P < 0.05$)高于四川白鹅,并且与肝质量、肝内总脂质及甘油三酯呈正相关,这可能与朗德鹅肝脏更容易沉积脂质有关,与 Han 等人的研究结果一致^[6],*Perilipin* 基因在两品种间表达差异的原因可能是朗德鹅经过长期产肝性能的选育造成的。

参考文献:

- [1] BROWN M S, GOLDSTEIN J L. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism [J]. *Science*, 1976, 191(4223):150-154.
- [2] BRASAEMLE D L. 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.
- [3] LONDOS C, SZTALRYD C, TANSEY J T, et al. Role of PAT proteins in lipid metabolism [J]. *Biochimie*, 2005, 87(1):45-49.
- [4] MIYOSHI H, SOUZA S C, ZHANG H H, et al. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 15834-15844.
- [5] STRAUB B K, STOEFFEL P, HEID H, et al. Differential pattern of lipid droplet-associated proteins

- and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis [J]. *Hepatology*, 2008, 47(6): 1936-1946.
- [6] HAN C, WANG J, XU H, et al. Effect of overfeeding on plasma parameters and mRNA expression of genes associated with hepatic lipogenesis in geese [J]. *Asia-aust J Anim Sci*, 2008, 21:590-595.
- [7] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method [J]. *Methods (San Diego Calif)*, 2001, 25(4):402-408.
- [8] GREENBERG A S, EGAN J J, WEK S A, et al. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(17):11341-11346.
- [9] BLANCHETTE-MACKIE E J, DWYER N K, BARBER T, et al. Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes [J]. *J Lipid Res*, 1995, 36:1211-1226.
- [10] BRASAEMLE D L, RUBIN B, HARTEN I A, et al. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(49): 38486-38489.
- [11] 苏胜彦, 李齐发, 刘振山, 等. 朗德鹅填饲后不同组织 *PPAR γ* 基因 mRNA 表达量差异的初步研究[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(7):879-884.
- [12] ARIMURA N, HORIBA T, IMAGAWA M, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(11): 10070-10076.
- [13] DAVAIL S, GUY G, ANDRE J M, et al. Metabolism in two breeds of geese with moderate or large overfeeding induced liver-steatosis [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2000, 126(1):91-99.

(编辑 郭云雁)

《Journal of Animal Science and Biotechnology(畜牧与生物技术杂志)》 征 稿 启 事

经新闻出版总署批准(新出审字[2009]481号文件),由中国科学技术协会主管、中国畜牧兽医学学会主办、李德发教授主编的英文期刊《Journal of Animal Science and Biotechnology(畜牧与生物技术杂志)》(CN 11-5967/S,ISSN 1674-9782)正式创刊。

本刊从 2010 年 6 月开始出版,现面向国、内外畜牧科技与生物技术领域征集英文原创论文,征稿范围包括遗传育种、繁殖生理、生物技术、动物营养、饲料资源与饲料加工、生理生化、综述与评述。欢迎大家踊跃投稿!

期刊网站: <http://www.jastsci.org>;

投稿邮箱: xmzz@cau.edu.cn;

联系电话: 010-62732723 010-62734608