

Wnt10b 对山羊前体脂肪细胞分化 相关基因表达的影响

林 森^{1,2}, 林亚秋¹, 朱江江², 许 晴¹, 赵 越¹, 池永东¹, 王 永^{1,2*}

(1. 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041;

2. 青藏高原动物遗传资源保护与利用四川省重点实验室, 成都 610041)

摘要: 旨在利用 RNA 干扰技术, 明确 *Wnt10b* 基因对山羊前体脂肪细胞分化的影响。设计合成山羊 *Wnt10b* siRNA 序列, 利用胶原酶消化法获得山羊皮下和肌内前体脂肪细胞。利用有效的 siRNA 序列干扰山羊皮下和肌内前体脂肪细胞 *Wnt10b* 基因表达后, 检测其对细胞分化及脂肪细胞分化标志基因表达的影响。结果表明, 筛选获得有效的山羊 *Wnt10b* siRNA 序列, 转染山羊皮下和肌内前体脂肪细胞后, *Wnt10b* 被显著干扰, 其 mRNA 表达量分别下调 63% ($P < 0.01$) 和 67% ($P < 0.01$); 油红 O 染色结果显示, 干扰 *Wnt10b* 基因可明显抑制山羊皮下和肌内脂肪细胞的脂滴积聚; 且干扰 *Wnt10b* 基因后, 在皮下前体脂肪细胞分化过程中 *C/EBP β* 、*PPAR γ* 、*SREBP1* 和 *Pref1* 基因出现极显著下调 ($P < 0.01$), *LPL* 出现显著下调 ($P < 0.05$); 而在肌内前体脂肪细胞分化过程中, *AP2* 和 *LPL* 基因出现极显著下调 ($P < 0.01$), *C/EBP β* 出现显著下调 ($P < 0.05$), *Pref1* 出现极显著上调 ($P < 0.01$)。本试验发现, *Wnt10b* 基因可能通过调控 *C/EBP β* 、*PPAR γ* 、*SREBP1* 和 *LPL* 的表达来促进山羊皮下前体脂肪细胞分化, 通过调控 *AP2*、*LPL*、*C/EBP β* 和 *Pref1* 的表达来促进山羊肌内前体脂肪细胞分化。

关键词: 山羊; *Wnt10b* 基因; RNA 干扰; 皮下脂肪细胞; 肌内脂肪细胞

中图分类号: S827.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)04-0685-08

Effect of *Wnt10b* on the Expression of Precursor Adipocytes Differentiation Related Genes in Goat

LIN Sen^{1,2}, LIN Ya-qiu¹, ZHU Jiang-jiang², XU Qing¹,

ZHAO Yue¹, CHI Yong-dong¹, WANG Yong^{1,2*}

(1. College of Life Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China;

2. Key Laboratory of Sichuan Province for Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Exploitation, Chengdu 610041, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of *Wnt10b* gene on the precursor adipocytes differentiation of goat by RNA interference. The goat *Wnt10b* siRNA sequence was designed and compounded, and the goat subcutaneous and intramuscular precursor adipocytes were obtained by collagenase digestion. The effect of *Wnt10b* gene expression on the cell differentiation and adipocyte differentiation marker genes expression were detected by using the effective siRNA sequence to interfere the expression of *Wnt10b* gene in goat subcutaneous and intramuscular precursor adipocytes. The results showed that an effective goat *Wnt10b* siRNA sequence was obtained, and the expression of *Wnt10b* was down-regulated by 63% ($P < 0.01$) and 67%

收稿日期: 2017-09-12

基金项目: 四川省“十三五”畜禽育种攻关项目(2016NYZ0045); 国家自然科学基金(31672395); 中央高校基本科研业务费专项基金项目(2017NGJPY06)

作者简介: 林 森(1992-), 男, 福建泉州人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: ls2349@163.com

* 通信作者: 王 永, 博士, 教授, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: wangyong010101@swun.com

($P < 0.01$), respectively after transfection in goat subcutaneous and intramuscular precursor adipocytes. Results of Oil red O staining showed that the accumulation of lipid droplets were inhibited significantly by *Wnt10b* RNAi in goat subcutaneous and intramuscular adipocytes. The *C/EBP β* , *PPAR γ* , *SREBP1* and *Pref1* genes were extremely significantly down-regulated in the subcutaneous precursor adipocyte differentiation after *Wnt10b* RNAi ($P < 0.01$), *LPL* was significantly down-regulated ($P < 0.05$). The *AP2* and *LPL* were extremely significantly down-regulated ($P < 0.01$), *C/EBP β* was significantly down-regulated ($P < 0.05$), and *Pref1* was extremely significantly up-regulated ($P < 0.01$) in intramuscular precursor adipocytes differentiation. In this study, it was found that *Wnt10b* gene could promote the differentiation of goat subcutaneous precursor adipocytes by regulating the expression of *C/EBP β* , *PPAR γ* , *SREBP1* and *LPL*, and promote the differentiation of goat intramuscular precursor adipocytes by regulating the expression of *AP2*, *LPL*, *C/EBP β* and *Pref1*.

Key words: goat; *Wnt10b* gene; RNA interference; subcutaneous adipocytes; intramuscular adipocytes

在动物生产中,根据不同部位脂肪经济价值的不同其选育的方向也不同,一方面,希望动物有更低的皮下脂肪和内脏脂肪等体脂含量,另一方面,又需要适量提高肌内脂肪以改善肉品质^[1]。动物生长过程中脂肪组织的增加一部分来自于前体脂肪细胞的增殖和分化^[2-3],脂肪分化受诸多转录因子、信号通路等共同调控。同时不同的脂肪细胞其储存和释放脂质的能力及其功能特性也不同,也预示了在分子水平上不同脂肪细胞之间的差异^[4]。因此了解脂肪沉积的信号分子机制对于提高肉品质具有重要的经济意义。

Wnt (Wingless-type MMTV integration site family) 蛋白是一种重要的信号分子,在细胞增殖、分化、迁移等发育过程中发挥关键作用^[5]。其中 Wnt/ β -catenin 信号通路是脂肪细胞分化的重要调节通路之一^[6],Wnt 家族成员中,*Wnt10b* 是抑制脂肪细胞分化的主要分子开关^[7],其同样也涉及到肥胖的发病机制^[8-9]。研究发现,*Wnt10b* 转基因小鼠较野生型小鼠相比,其脂肪组织总量存在极显著的下降^[7,10],H. F. Luo 等^[11]和 J. Y. Jeong 等^[12]研究指出,猪和牛的 *Wnt10b* mRNA 表达水平与其肌内脂肪含量表现出较强的负相关。上述研究结果表明,*Wnt10b* 基因是影响动物脂肪沉积的关键候选基因,但其在山羊脂肪沉积中是否发挥相似的作用,且在不同部位(皮下和肌内)的脂肪沉积中是否发挥相同的调控作用尚未见报道。

因此,本试验以简州大耳羊体外培养的皮下和肌内前体脂肪细胞为研究对象,利用 RNA 干扰技

术使 *Wnt10b* 基因被干扰后,利用形态学检测确定其对脂肪细胞脂滴积聚的影响,利用实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR) 检测两种前体脂肪细胞成脂诱导分化过程中脂肪细胞分化标志基因的表达变化,进而阐明 *Wnt10b* 基因对山羊不同部位前体脂肪细胞分化的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 本试验选用四川省简阳大哥大牧业有限公司的 1 只 7 日龄健康简州大耳羊公羊 (*Capra hircus*) 作为研究对象。

1.1.2 主要试剂 I 型胶原酶、II 型胶原酶、油酸和油红 O 购自 Sigma 公司; Opti-MEM 购自 Gibco 公司; Lipofectamine[®] RNAiMAX Reagent 购自 Invitrogen 公司; 胰蛋白酶、PBS 和 DMEM/F12 培养基购自 Hyclone 公司; 胎牛血清购自 Gemini 公司; TRIzol 试剂和荧光定量试剂盒购自大连 TaKaRa 公司; 反转录试剂盒购于 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 的设计 根据 GenBank 上山羊 *Wnt10b* mRNA 序列 (登陆号: KU950832.1), 选择不同位点设计两对 *Wnt10b* siRNA, 这两对序列经相似性软件比对分析不与已知的任何基因存在同源性。*Wnt10b* siRNA 由 Invitrogen 公司合成, 序列信息见表 1, 分别命名为 *Wnt10b* siRNA-1 和 *Wnt10b* siRNA-2。Negative control 由公司提供。siRNA 成品为已退火的冻干粉, 使用前用 DEPC 水

去重悬将其溶解成 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品。所有 siRNA 样品经 HPLC 纯化。

表 1 山羊 *Wnt10b* 基因的 siRNA 序列

Table 1 Sequence of siRNA for goat *Wnt10b*

名称 Name	序列(5'-3') Sequence
Negative control	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT ACGUGACACGUUCGGAGAATT
<i>Wnt10b</i> siRNA-1	GCGGCUGUAACCAUGACAUTT AUGUCAUGGUACAGCCGCTT
<i>Wnt10b</i> siRNA-2	GCAAUGAGAUUCUGGGCUUTT AAGCCCAGAAUCUCAUUGCTT

1.2.2 细胞培养 试验羊带回实验室后,颈动脉放血,用新洁而灭清洗 2~3 次,再用 75% 酒精擦拭消毒,在无菌细胞培养间分别取其皮下脂肪组织和背最长肌组织,用 3 倍双抗的 PBS 清洗 3 次后在超净工作台对其进行分离修剪,分别加入 2 倍体积的 II 型和 I 型胶原酶分别消化 1.5 和 1 h(每隔 5 min 震荡 1 次),后加入等体积的 10% 胎牛血清培养液终止消化,然后分别过 400 和 200 目筛网,将滤液分装到离心管中, $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清,加入红细胞裂解液将沉淀吹散,静置 5 min, $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清,用完全培养基重悬沉淀,取适量的重悬液分别放到 60 mm 培养皿中,加入适量完全培养基混匀后,即获得前体脂肪细胞,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 的恒温培养箱中培养,隔 2 d 换液 1 次。

1.2.3 siRNA 干扰效果筛选及检测 取 F3 代的皮下前体脂肪细胞和肌内前体脂肪细胞进行培养,当细胞生长至 70%~80% 融合时进行转染,转染前 4 h 将完全培养液弃掉,每孔细胞加入 $450 \mu\text{L}$ 无双抗 10% 胎牛血清培养液(12 孔板)。分别取 $3 \mu\text{L}$ 转染试剂与 $2 \mu\text{L}$ 的 siRNA($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 加入到 $50 \mu\text{L}$ 的 Opti-MEM 中(对照组添加 Negative control,试验组添加 si*Wnt10b*),充分混匀,室温孵育 5 min。将 siRNA-转染试剂混合液滴加到细胞中,充分混匀,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养,6 h 后每孔细胞添加 1 mL 油酸诱导液($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行诱导分化。

转染 48 h 后收集细胞,TRIzol 法提取总 RNA,检测 RNA 浓度和纯度后反转录为 cDNA,采用 qPCR 技术检测干扰效果,反应体系为 $20 \mu\text{L}$:

SYBR[®] Premix Ex Taq TM ($2 \times$) PCR $10 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下游引物各 $1 \mu\text{L}$,模板 cDNA $1 \mu\text{L}$, ddH₂O $7 \mu\text{L}$ 。反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 3 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 10 s, $62 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 10 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 15 s, 40 个循环。试验设置 3 个生物学重复,2 个平行对照。

1.2.4 油红 O 染色 干扰 *Wnt10b* 基因后利用油红 O 染色检测其对山羊前体脂肪细胞分化的形态学影响。称取 0.5 g 油红 O 加入 100 mL 98% 的异丙醇配成油红 O 储存液,使用之前取 4 mL 蒸馏水加入 6 mL 油红 O 储存液制成油红 O 工作液,过滤后备用。弃去培养基后用 PBS 清洗 3 遍,10% 甲醛固定 30 min,弃去甲醛,PBS 清洗 2 遍,加入油红 O 工作液染色 8 min,弃去油红 O,PBS 清洗数遍后显微镜下观察并拍照。

1.2.5 干扰 *Wnt10b* 对脂肪细胞分化标志基因表达的影响 检测皮下前体脂肪细胞和肌内前体脂肪细胞分化过程中干扰 *Wnt10b* 后对脂肪分化标志基因 CCAAT 增强子结合蛋白 α (CCAAT enhancer binding protein α , *C/EBP α*)、CCAAT 增强子结合蛋白 β (CCAAT enhancer binding protein β , *C/EBP β*)、激活蛋白 2(Activator protein 2, *AP2*)、脂蛋白脂肪酶(Lipoprotein lipase, *LPL*)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ , *PPAR γ*)、固醇调节元件结合蛋白 1(Sterol regulatory element binding protein 1, *SREBP1*)及前脂肪细胞因子 1(Preadipocyte factor 1, *Pref1*)表达量的影响。定量引物序列信息见表 2。qPCR 反应体系及条件同 1.2.3。

1.2.6 数据处理与分析 数据用“平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)”表示,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 对实时定量 PCR 数据进行均一化处理,其中 $\Delta Ct_{(\text{目的基因})} = Ct_{(\text{目的基因})} - Ct_{(\text{内参基因})}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{样品组})} - \Delta Ct_{(\text{对照组})}$ 。利用 SPSS 18.0 软件中的 One-way ANOVA 进行显著性检验分析。当 $P < 0.05$ 时,认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 山羊皮下和肌内前体脂肪细胞中 *Wnt10b* 基因干扰效率检测

分离获得的原代山羊皮下、肌内前体脂肪细胞,培养 24 h 后,可观察到大量椭圆形、梭形细胞贴壁(图 1)。待细胞传至 F3 代,培养到 70%~80% 融合时,分别将 *Wnt10b* siRNA-1 和 *Wnt10b* siRNA-2 转染

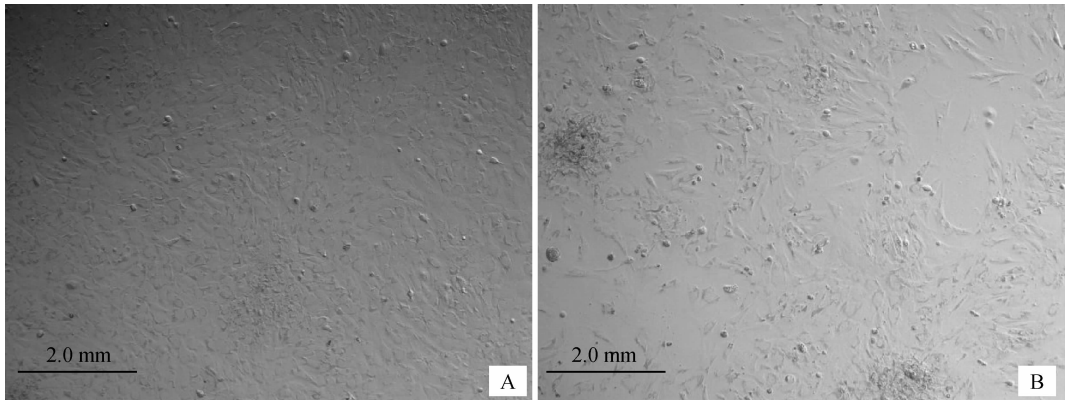
入山羊皮下和肌内前体脂肪细胞,48 h 后收集细胞, TRIzol 法提取细胞中总 RNA,并将其反转录为cDNA 进行定量检测,荧光定量结果显示,*Wnt10b* siRNA-2

(在皮下脂肪细胞中大约降低 63%,在肌内脂肪细胞中大约降低 67%)相对于 *Wnt10b* siRNA-1 更能显著干扰 *Wnt10b* 基因的表达(图 2)。

表 2 荧光定量 PCR 引物

Table 2 Primers for quantitative real-time PCR(qPCR)

基因 Gene	序列(5'-3') Sequence	退火温度/°C T _m	产物长度/bp Products length	登陆号 GenBank
<i>Wnt10b</i>	F:TCTCCTGTTCCCTGGCGTTG R:CGACAGCGTCAAGCAGACTG	62	115	KU950832.1
<i>C/EBPα</i>	F:CCGTGGACAAGAACAGCAAC R:AGGCGGTCATTGTCACTGGT	58	142	XM_018062278.1
<i>C/EBPβ</i>	F:CAAGAAGACGGTGGACAAGC R:AGGCGGTCATTGTCACTGG	61	150	XM_005701796.2
<i>AP2</i>	F:TGAAGTCACTCCAGATGACAGG R:TGACACATTCCAGCACCAGC	58	143	NM_001285623.1
<i>LPL</i>	F:TCCTGGAGTGACGGAATCTGT R:GACAGCCAGTCCACCACGAT	60	174	NM_001285607.1
<i>PPARγ</i>	F:AAGCGTCAGGGTCCACTATG R:GAACCTGATGGCGTTATGAGAC	60	197	NM_001285658.1
<i>SREBP1</i>	F:AAGTGGTGGGCTCTCTGA R:GCAGGGGTTTCTCGGACT	58	127	NM_001285755.1
<i>Pref1</i>	F:CCGGCTTCATGGATAAGACCT R:GCCTCGCACTTGTGAGGAA	65	178	KP686197.1
<i>GAPDH</i>	F:GCAAGTTCCACGGCACAG R:TCAGCACCAGCATCACCC	62	118	XM_005680968.3



A. 皮下前体脂肪细胞培养 24 h;B. 肌内前体脂肪细胞培养 24 h

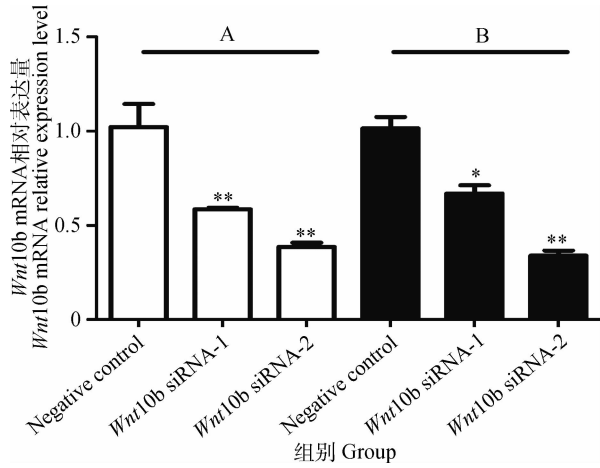
A. Primary cultured goat subcutaneous preadipocyte on 24 h; B. Primary cultured goat intramuscular preadipocyte on 24 h

图 1 原代培养脂肪细胞的形态

Fig.1 Morphology of the primary cultured adipocytes

2.2 山羊皮下和肌内前体脂肪细胞的油红 O 染色
收集细胞后进行油红 O 染色,结果显示,无论

是皮下或肌内前体脂肪细胞,在干扰 *Wnt10b* 基因后,其细胞中脂滴的聚集均明显少于对照组(图 3)。

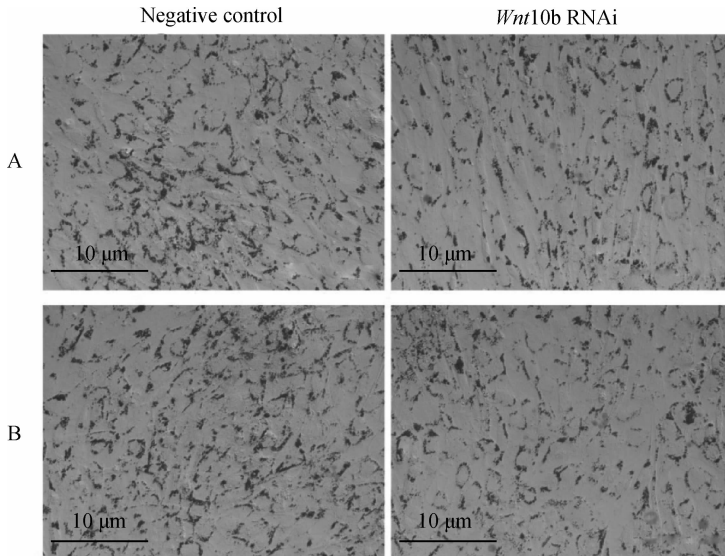


A. 皮下脂肪细胞; B. 肌内脂肪细胞。* *. 差异极显著 ($P < 0.01$); *. 差异显著 ($P < 0.05$)。 $n = 3$; 内参基因为 *GAPDH*

A. Subcutaneous adipocyte; B. Intramuscular adipocyte. * *. Extremely significant difference ($P < 0.01$); *. Significant difference ($P < 0.05$); Reference gene is *GAPDH*

图 2 *Wnt10b* mRNA 干扰效率分析

Fig. 2 Interference efficiency analysis of *Wnt10b* gene



A. 皮下脂肪细胞; B. 肌内脂肪细胞

A. Subcutaneous adipocyte; B. Intramuscular adipocyte

图 3 山羊皮下和肌内前体脂肪细胞的油红 O 染色分析 (400×)

Fig. 3 Oil red O staining analysis of goat subcutaneous and intramuscular adipocytes (400×)

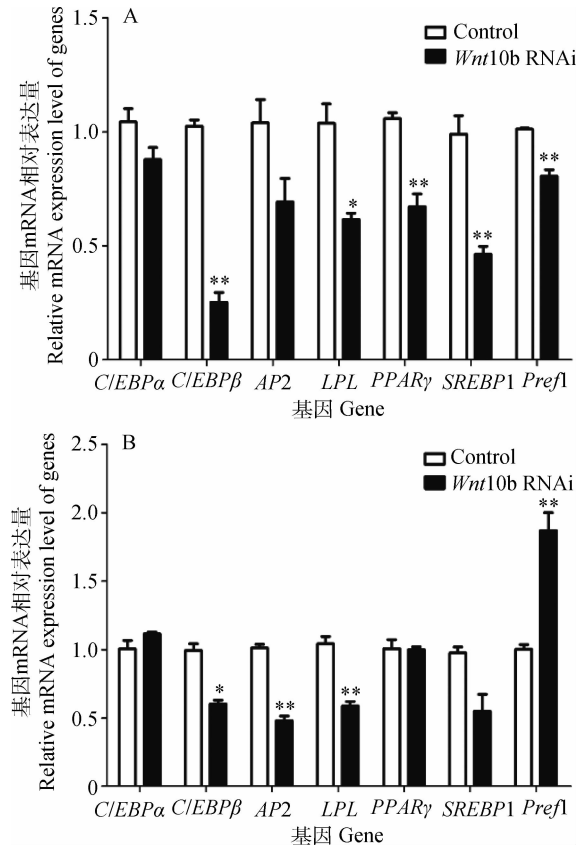
3 讨论

动物脂肪沉积与肉质性状密切相关,过量的脂肪沉积会影响动物产品的风味和品质,适量的肌内脂肪含量可调节肉的嫩度、风味与多汁性^[13],因此近年来畜牧工作者对动物脂肪沉积关键基因的功能研究备受关注。研究表明,*Wnt* 信号通路参与调控脂肪的发育与代谢^[14],其中 *Wnt10b* 通过经典 *Wnt*

2.3 干扰 *Wnt10b* 对山羊脂肪细胞分化标志基因表达的影响

qPCR 结果显示,在皮下前体脂肪细胞分化过程中,干扰山羊 *Wnt10b* 基因后,*C/EBPα* 和 *AP2* 基因的表达水平没有发生显著性变化 ($P > 0.05$),而 *C/EBPβ*、*LPL*、*PPARγ*、*SREBP1* 和 *Pref1* 的表达量呈不同水平的下降,大约分别下降 77% ($P < 0.01$),42% ($P < 0.05$),38% ($P < 0.01$),52% ($P < 0.01$)和 20% ($P < 0.01$)(图 4A)。而在肌内前体脂肪细胞分化过程中,干扰山羊 *Wnt10b* 基因后,*C/EBPα*、*PPARγ* 和 *SREBP1* 的表达水平并未发生显著性变化 ($P > 0.05$),*C/EBPβ*、*AP2* 和 *LPL* 的表达量呈不同水平的下降,大约分别下降 38% ($P < 0.05$)、53% ($P < 0.01$)和 51% ($P < 0.01$),而 *Pref1* 表达量极显著上调 ($P < 0.01$),大约上调 1.8 倍(图 4B)。

信号通路抑制 *C/EBPα* 和 *PPARγ*,以此来抑制脂肪细胞的分化^[15]。但以往关于 *Wnt10b* 基因在成脂分化中的研究多集中于小鼠和人,未见在山羊上的报道,因此本研究在干扰 *Wnt10b* 基因后,利用形态学确定其对山羊皮下前体脂肪细胞和肌内前体脂肪细胞分化的影响,并检测了这个过程中脂肪细胞分化标志基因表达的变化,为阐明该基因调控山羊肌内脂肪沉积提供重要数据。



A. 皮下脂肪细胞; B. 肌内脂肪细胞

A. Subcutaneous adipocyte; B. Intramuscular adipocyte

图4 山羊前体脂肪细胞分化过程中干扰 *Wnt10b* 对 7 个脂肪细胞分化标志基因表达的影响

Fig. 4 Effect of *Wnt10b* RNAi on 7 genes related to adipocyte differentiation in goat preadipocyte differentiation

本试验利用油红 O 染色发现,干扰 *Wnt10b* 基因能降低山羊皮下前体脂肪细胞和肌内前体脂肪细胞中脂滴的积聚, S. E. Ross 等^[15] 和 W. P. Cawthorn 等^[16] 研究发现,在 小鼠 3T3-L1 细胞中 *Wnt10b* 能够抑制成脂分化,这与本试验的研究结果恰恰相反,但具体的调控机制尚未阐明。研究发现,其他基因在 山羊或者其他物种脂肪细胞分化中也存在类似报道。例如, Kruppel 样转录因子 4 (Krupple-like transcription factor 4, *KLF4*) 基因是 3T3-L1 前体脂肪细胞早期分化所必需的转录因子^[17],然而 Y. K. Park 等^[18] 却提出了相反的观点,即 *KLF4* 对白色、棕色前体脂肪细胞分化无影响。同样 *KLF13* 通过 *PPAR γ* 促进猪前体脂肪细胞分化,但对 小鼠 3T3-L1 前体脂肪细胞分化却没有影响^[19]。表明基因在同一物种的不同细胞系或不同物种间的生物学功能存在差异,推测山羊 *Wnt10b* 基因可能具有自己独特的调控前体脂肪细胞分化的

分子机制,不能完全参照鼠源细胞系中的研究结果。实验后续将利用过表达等其他手段来进一步阐明 *Wnt10b* 在 山羊肌内前体脂肪细胞分化和其他物种及细胞系中的不同作用。

为了进一步阐明 *Wnt10b* 对 山羊前体脂肪细胞调控的分子机制,及分析比较其对不同部位前体脂肪细胞分化的机理是否相同,本研究还在干扰 *Wnt10b* 后利用 qPCR 检测了脂肪细胞分化标志基因的表达变化。机体在前体脂肪细胞向成熟脂肪细胞转变过程中受到诸多转录因子调控。其中关于 C/EBPs 和 PPARs 转录因子的表达调控是目前研究最多的。在脂肪分化的早期, *C/EBP β* 和 *C/EBP δ* 的表达量迅速增加,随后诱导激活 *PPAR γ* ,同时 *PPAR γ* 又与 C/EBPs 共同促进 *C/EBP α* 的表达^[20]。此外, *C/EBP α* 和 *PPAR γ* 可以促使自身的表达增加,同时两者彼此也可以刺激对方的激活和表达,发挥协同作用^[21],这些对于脂肪细胞分化不可或缺。 *AP2*、*SREBP1* 和 *LPL* 是脂肪细胞分化过程中的关键转录因子,在脂质代谢中起至关重要的作用,其中 *AP2* 主要参与胞内脂肪酸的运输^[22], *SREBP1* 参与胆固醇、甘油三酯和脂肪酸的合成和代谢^[23], *LPL* 的功能主要是水解甘油三酯和作为配体促进机体摄取脂蛋白^[24],同时研究报道,猪、牛、羊、鸡等动物的 *LPL* 表达量与肌内脂肪含量密切相关^[25-28]。 *Pref1* 作为脂肪细胞分化早期具有分化抑制作用的因子^[29],在调节营养代谢和脂代谢平衡,保护脂肪变性等方面起重要作用^[30]。本试验发现, *Pref1* 基因在 两处不同部位的脂肪细胞中有截然相反的结果,在 肌内脂肪细胞中,干扰 *Wnt10b* 后脂滴蓄积减少,负调控因子 *Pref1* 基因的表达水平上升,肌内脂肪属于功能性组织,其富含的磷脂是影响肉品挥发性风味成分的重要前体物,而皮下脂肪则属于储能组织, *Pref1* 基因主要在脂代谢合成方面起关键作用,这可能与 *Pref1* 基因在两种细胞中的表达差异有关,因此对于 *Wnt10b* 调控 *Pref1* 的作用机制仍需进一步探索。

研究表明,某些生物活性物质如共扼亚油酸在提高肌内脂肪含量的同时,却降低皮下脂肪的沉积^[31]。同时研究发现,离体培养猪肌内脂肪前体细胞的聚脂速度要强于皮下脂肪前体细胞,但在体的情况下,肌内脂肪的沉积晚于皮下脂肪,沉积量也少,这提示肌内脂肪细胞可能受局部肌肉组织的微环境调控^[32-34]。由以上研究推测,肌内脂肪沉积可

能与皮下脂肪沉积存在不同的调控机制。本研究发
现,干扰 *Wnt10b* 基因后在皮下脂肪细胞分化过程
中 *C/EBP β* 、*PPAR γ* 、*SREBP1* 和 *LPL* 基因出现显著
下调;在肌内前体脂肪细胞分化过程中, *C/EBP β* 、
AP2 和 *LPL* 也出现显著下调,而 *Pref1* 出现显著
上调。表明 *Wnt10b* 基因在皮下和肌内脂肪细胞成
脂分化过程中通过调控不同基因而发挥作用,可能
具有不同的作用机制。

4 讨 论

本试验发现,干扰山羊 *Wnt10b* 基因后山羊皮
下和肌内前体脂肪细胞分化受到显著抑制,且可能
通过调控 *C/EBP β* 、*PPAR γ* 、*SREBP1* 和 *LPL* 基因
的表达来抑制山羊皮下前体脂肪细胞分化,通过调
控 *AP2*、*LPL*、*C/EBP β* 和 *Pref1* 来抑制山羊肌内
前体脂肪细胞分化。提示 *Wnt10b* 基因在山羊不同
部位脂肪沉积中发挥调控作用的机制可能不同。

参考文献 (References):

- [1] NOVAKOFSKI J. Adipogenesis: usefulness of *in vitro* and *in vivo* experimental models[J]. *J Anim Sci*, 2004, 82(3): 905-915.
- [2] HARPER G S, PETHICK D W. How might marbling begin? [J]. *Aust J Exp Agric*, 2004, 44(7): 653-662.
- [3] DU M, WANG B, FU X, et al. Fetal programming in meat production[J]. *Meat Sci*, 2015, 109: 40-47.
- [4] JO J, SHREIF Z, PERIWAL V. Quantitative dynamics of adipose cells[J]. *Adipocyte*, 2012, 1(2): 80-88.
- [5] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985-999.
- [6] TANAKA K, KITAGAWA Y, KADOWAKI T. *Drosophila* segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum[J]. *J Biol Chem*, 2012, 277(15): 12816-12823.
- [7] LONGO K A, WRIGHT W S, KANG S, et al. Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(34): 35503-35509.
- [8] KUEM N, SONG S J, YU R N, et al. Oleuropein attenuates visceral adiposity in high-fat diet-induced obese mice through the modulation of WNT10b- and galanin-mediated signalings[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(11): 2166-2176.
- [9] KARCZEWSKA-KUPCZEWSKA M, STEFANOWICZ M, Matulewicz N, et al. Wnt signaling genes in adipose tissue and skeletal muscle of humans with different degrees of insulin sensitivity[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(8): 3079-3087.
- [10] WRIGHT W S, LONGO K A, DOLINSKY V W, et al. Wnt10b inhibits obesity in *ob/ob* and *agouti* mice [J]. *Diabetes*, 2007, 56(2): 295-303.
- [11] LUO H F, WEI H K, HUANG F R, et al. The effect of linseed on intramuscular fat content and adipogenesis related genes in skeletal muscle of pigs[J]. *Lipids*, 2009, 44(11): 999-1010.
- [12] JEONG J Y, KIM J S, NGUYEN T H, et al. Wnt/ β -catenin signaling and adipogenic genes are associated with intramuscular fat content in the *longissimus dorsi* muscle of Koreancattle[J]. *Anim Genet*, 2013, 44(6): 627-635.
- [13] WANG Y H, BYRNE K A, REVERTER A, et al. Transcriptional profiling of skeletal muscle tissue from two breeds of cattle[J]. *Mamm Genome*, 2005, 16(3): 201-210.
- [14] 曹怡玮, 郭熙志. Wnt 信号通路调控脂肪发育与代谢的研究进展[J]. *中国科学: 生命科学*, 2017, 47(4): 355-362.
- CAO Y W, GUO X Z. Wnt signaling regulates adipose tissue formation and metabolism[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2017, 47(4): 355-362. (in Chinese)
- [15] ROSS S E, HEMATI N, LONGO K A, et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling[J]. *Science*, 2000, 289(5481): 950-953.
- [16] CAWTHORN W P, BREE A J, YAO Y, et al. Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a β -catenin-dependent mechanism[J]. *Bone*, 2012, 50(2): 477-489.
- [17] BIRSOY K, CHEN Z, FRIEDMAN J. Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4[J]. *Cell Metab*, 2008, 7(4): 339-347.
- [18] PARK Y K, WANG L M, GIAMPIETRO A, et al. Distinct roles of transcription factors KLF4, Krox20 and PPAR γ in adipogenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 2017, 37(2): e00554-16.
- [19] JIANG S Z, WEI H K, SONG T X, et al. KLF13 promotes porcine adipocyte differentiation through PPAR γ activation[J]. *Cell Biosci*, 2015, 5: 28.

- [20] FARMER S R. Transcriptional control of adipocyte formation[J]. *Cell Metab*, 2006, 4(4): 263-273.
- [21] TANG Q Q, ZHANG J W, LANE M D. Sequential gene promoter interactions of C/EBP β , C/EBP α , and PPAR γ during adipogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 319(1): 235-239.
- [22] CHMURZYŃSKA A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism[J]. *J Appl Genet*, 2006, 47(1): 39-48.
- [23] JEON T I, OSBORNE T F. SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23(2): 65-72.
- [24] MEAD J R, IRVINE S A, RAMJI D P. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease[J]. *J Mol Med*, 2002, 80(12): 753-769.
- [25] 王 刚, 曾勇庆, 武 英, 等. 猪肌肉组织 *LPL* 基因表达的发育性变化及其与肌内脂肪沉积关系的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 38(3): 253-257.
WANG G, ZENG Y Q, WU Y, et al. The developmental changes of *LPL* mRNA expression in muscle and their association with intramuscular fat for pigs [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 38(3): 253-257. (in Chinese)
- [26] JEONG J, KWON E G, IM S K, et al. Expression of fat deposition and fat removal genes is associated with intramuscular fat content in *longissimus dorsi* muscle of Korean cattle steers [J]. *J Anim Sci*, 2012, 90(6): 2044-2053.
- [27] 乔 永, 黄治国, 李齐发, 等. 绵羊肌肉 *LPL* 基因表达的发育性变化及其对肌内脂肪含量的影响[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2323-2330.
QIAO Y, HUANG Z G, LI Q F, et al. Developmental changes of the *LPL* mRNA expression and the effect on IMF content in sheep muscle[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(10): 2323-2330. (in Chinese)
- [28] 王 晶. 广西三黄鸡肉质性状分析及 *LPL*、*H-FABP* 基因表达与肌内脂肪含量的相关研究[D]. 南宁: 广西大学, 2013.
WANG J. Studies on the meat quality traits and the relationship between *LPL* and *H-FABP* genes expression with intramuscular fat content in chicken [D]. Nanning: Guangxi University, 2013. (in Chinese)
- [29] WANG Y H, KIM K A, KIM J H, et al. Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis [J]. *J Nutr*, 2006, 136(12): 2953-2956.
- [30] CHARALAMBOUS M, DA ROCHA S T, RADFORD E J, et al. *DLK1/PREF1* regulates nutrient metabolism and protects from steatosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(45): 16088-16093.
- [31] TISCHENDORF F, SCHÖNE F, KIRCHHEIM U, et al. Influence of a conjugated linoleic acid mixture on growth, organ weights, carcass traits and meat quality in growing pigs [J]. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2002, 86(3-4): 117-128.
- [32] 张罕星, 朱晓彤, 束 刚, 等. 猪肌内脂肪前体细胞与皮下脂肪前体细胞分化过程中基因差异表达分析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3760-3768.
ZHANG H X, ZHU X T, SHU G, et al. Differential mRNA expression profiles of porcine intramuscular preadipocytes compared with subcutaneous preadipocytes during differentiation[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(11): 3760-3768. (in Chinese)
- [33] SUZUKI K, IRIE M, KADOWAKI H, et al. Genetic parameter estimates of meat quality traits in Duroc pigs selected for average daily gain, longissimus muscle area, backfat thickness, and intramuscular fat content [J]. *J Anim Sci*, 2005, 83(9): 2058-2065.
- [34] KOUBA M, BONNEAU M, NOBLET J. Relative development of subcutaneous, intermuscular, and kidney fat in growing pigs with different body compositions [J]. *J Anim Sci*, 1999, 77(3): 622-629.

(编辑 郭云雁)