

研究报告

猪脂肪组织发育过程中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因及脂肪转录因子的时序表达

罗肖, 李惠侠, 杨公社

西北农林科技大学 动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 杨凌 712100

摘要: 为研究 Wnt/ β -catenin 信号通路对猪脂肪组织发育的影响, 并探讨其可能的作用机制, 以 1~120 日龄长白猪脂肪组织为试验材料, 采用 SQ RT-PCR 法检测 Wnt 信号通路中相关基因 β -catenin、GSK3 β 、Fz1 及主要的脂肪转录因子 PPAR γ 、C/EBP α 和分化早期标志基因 LPL mRNA 的表达变化; 石蜡切片免疫组化方法定性检测 β -catenin 在脂肪组织发育中的时序表达变化。SQ RT-PCR 结果显示, β -catenin mRNA 在猪出生第 1 天有高水平表达, 随着个体日龄的增长, 其表达量逐渐降低, 60 日龄后维持在一个较低水平。GSK3 β 和 Fz1 mRNA 的表达量也伴随脂肪组织的发育而逐渐降低。而 LPL、PPAR γ 和 C/EBP α 的 mRNA 表达量随着个体日龄的增长而逐渐升高, 60 日龄后仍保持高水平的表达。石蜡切片免疫组化结果显示, 随着脂肪组织的发育, β -catenin 蛋白的表达也随之降低, 并且 β -catenin 蛋白的表达部位逐渐由细胞核和细胞质共表达变为只在细胞质中表达。上述基因表达的时序变化规律提示, β -catenin 在维持前体脂肪细胞的未分化状态, 抑制脂肪组织发育中具有重要作用, 其作用机制可能是通过对脂肪细胞转录因子 PPAR γ 、C/EBP α 及分化早期标志基因 LPL mRNA 的调控来进行的。

关键词: Wnt/ β -catenin, 猪, 脂肪发育, 时序表达

Sequential Expression of Wnt/ β -catenin Signal Pathway Related Genes and Adipocyte Transcription Factors During Porcine Adipose Tissue Development

Xiao Luo, Huixia Li, and Gongshe Yang

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

Abstract: To evaluate the influence of Wnt/ β -catenin signal pathway on the porcine adipose tissue development and explore the mechanism, we detected the mRNA expression of Wnt/ β -catenin signal pathway related genes: β -catenin, GSK3 β , Fz1 and adipogenic transcription factors: PPAR γ , C/EBP α and early differentiation marker gene LPL with semi-quantitative (SQ) RT-PCR method. Immunohistochemical method (IHC) was applied to qualitatively measure the sequential expression of β -catenin protein. The results of SQ RT-PCR showed that β -catenin highly expressed at the first day after birth, then decreased to a low plateau after 60 days, the expression of GSK3 β and Fz1 also decreased with the development process of the porcine adipose tissue development. However, the sequential expression of PPAR γ , C/EBP α , LPL appeared to be an opposite manner and kept at a high level after 60 days.

Received: December 18, 2007; **Accepted:** March 11, 2008

Supported by: the National High Technology Research and Development Program ("863" Program) of China (No. 2006AA10Z138).

Corresponding author: Gongshe Yang. Tel/Fax, +86-29-87092430; E-mail, gsyang999@ hotmail.com

国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(No. 2006AA10Z138)资助。

The result of IHC showed that the expression of β -catenin protein was strong in nucleus and cytoplasm at the first day after birth, then tended to decline with the process of adipose tissue development and could be only found in cytoplasm after 30-day old. These results suggest that β -catenin plays an important role in the undifferentiated state maintenance of preadipocytes and the inhibition of porcine adipose tissue development, the mechanism maybe due to its regulation function on the adipogenic transcription factors PPAR γ , C/EBP α and early differentiation marker gene LPL.

Keywords: Wnt/ β -catenin, pig, adipose tissue development, sequential expression

在动物体内, 前体脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞是在一系列转录因子的激活与表达下完成的, 且这一过程对于脂肪组织的正常功能非常重要^[1]。LPL 是脂肪细胞早期分化的一个标志基因, 其 mRNA 的表达通常作为脂肪细胞早期分化的标志; C/EBP α 和 PPAR γ 是调控脂肪细胞分化的主要转录因子, 通过诱导其它分化相关基因和生脂基因的表达, 促进脂肪细胞的分化^[2,3]。许多信号通路及外源因子能够通过调节这些转录因子从而调节脂肪形成^[4]。近几年, 研究者利用 3T3-L1 和 3T3-F442A 前体脂肪细胞系研究证实, Wnt/ β -catenin 信号通路能够调节脂肪形成^[5-8]。 β -catenin 作为 Wnt/ β -catenin 信号通路的第二信使, 是 Wnt 信号通路的核心成分^[9]。缺乏 Wnt 信号时, 胞质内的 β -catenin 被 GSK3 β 磷酸化进而被多功能复合物降解。Wnt 受体如 Fz1 能促进降解复合物的分离而阻止 β -catenin 的降解, 使胞质内的 β -catenin 聚积后转入到核内, 活化 TCF 靶基因家族, 诱导 Wnt/ β -catenin 靶基因的表达, 控制主要的脂肪形成转录因子 C/EBP α 和 PPAR γ 的诱导作用。

研究表明脂肪组织的发育具有种属特异性, 啮齿类动物脂类代谢受多种激素调控, 且具有高胰岛素敏感性, 但猪的脂类代谢受激素调控相对单一并且胰岛素敏感性不强, 因而, 调控猪脂肪发育的信号通路及生长因子与啮齿类动物相比也有所不同^[10]。目前, Wnt/ β -catenin 信号通路在猪脂肪发育中的作用还未见报道, β -catenin 与脂肪形成转录因子 C/EBP α 和 PPAR γ 在活体内生理水平下具体作用机制还有待研究。因此, 本研究利用不同日龄猪脂肪组织, 检测 Wnt/ β -catenin 信号通路的相关基因 β -catenin、GSK3 β 和 Fz1 以及脂肪转录因子 C/EBP α 、PPAR γ 及 LPL 的表达情况, 初步研究 Wnt/ β -catenin 信号通路与脂肪转录因子的时序表达规律, 为进一步揭示 Wnt/ β -catenin 信号通路调节脂肪形成的作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物

根据猪脂肪生长特性, 随机选择健康 1、3、10、20、30、60、120 日龄长白猪, 由杨凌本香集团格尔润种猪场提供。

1.1.2 试剂

一抗 (Anti- β -catenin Developed in Rabbit, Product No.C2206, Sigma, 美国), 稀释比例为 1:2 500; 二抗(EnVision⁺, Peroxidase, Rabbit, Code No. GK400305, DAKO, 丹麦); 显色剂(Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Code No.GK346810, DAKO, 丹麦); TRIzol Reagent (Cat. No. 15596-026, Invitrogen, 美国); RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (# K1621, Fermentas); 2 \times Taq PCR Master Mix(KT201, Tiangen); 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 检测 Wnt/ β -catenin 信号通路的相关基因及脂肪分化标志基因的时序表达

严格按照 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂说明书步骤和条件提取不同日龄猪脂肪组织中的总 RNA, 测定其吸光度。RNA 浓度(g/L) = $A_{260} \times 100 \times 40/1000$, $A_{260}/A_{280}=1.8\sim2.0$, 并进行琼脂糖凝胶电泳, 检测所提取的 RNA 完整性。

取 5 μ g RNA, 1 μ L (1g/L) Oligo(dT)₁₆, 加 DEPC 处理过的 H₂O 至 12 μ L, 70 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冰上按指定的顺序加入: 15 \times 反应缓冲液 4 μ L, RibolockTM 核糖核酸酶抑制剂(20 u/ μ L) 1 μ L, 10 mmol/L/ dNTP 2 μ L, 25 $^{\circ}$ C 培育 10 min。然后加入 1 μ L M-MLV 反转

录酶(200 u/μL), 总体积至 20 μL。接着 42°C 温育 60 min, 70°C 加热反应 10 min, 终止反应, 冰上冷却。合成的 cDNA 置-20°C 保存。以β-actin 作为内参, 半定量 RT-PCR 检测 β-catenin、GSK3β、Fz1、C/EBPα、PPARγ、LPL mRNA 的表达。引物相关参数见 Table 1。

25 μL PCR 反应体系: ddH₂O 11 μL、cDNA 模板 0.5 μL、10 μmol/L 上游引物 0.5 μL、10 μmol/L 下游引物 0.5 μL、12.5 μL 2 × Taq PCR Master Mix。反应条件为 95°C 预变性 3 min, 94°C 变性 30 s, 49°C ~58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 循环 28 次, 72°C 终延伸 10 min, 4°C 30 min。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳。应用凝胶成像分析系统进行成像和分析, 测定各条带的吸光度值。以 β-actin 为内参, 计算各泳道中目的基因的相对含量, 结果以各条带与 β-actin 条带灰度比值表示。每组试验设置 3 个重复。

1.2.2 免疫组化

采集不同日龄猪皮下脂肪组织→4%多聚甲醛固定→石蜡包埋→切片(6~8 μm)→脱蜡→蒸馏水冲洗→PBS 冲洗→0.3% H₂O₂ 甲醛溶液阻断内源性过氧化物酶(15 min)→PBS 冲洗 3 次→胎牛血清封闭非特异性抗原(30 min)→滴加一抗工作液, 37°C 孵育 1 h 或 4°C 过夜→PBS 冲洗 3 次→加二抗工作液, 37°C 孵育 30 min→PBS 冲洗 3 次→DAB 显色→苏木精复染→中性树胶封片。

1.2.3 统计分析

采用 SPSS 11.5 软件包对数据进行单因素方差分析(ONE WAY ANOVA), 方差分析采用 LSD 法。实验数据以平均值±标准差($\bar{X} \pm S$)表示。

1.2.4 结果判定

与阴性对照相比, 细胞质/核呈棕黄色为弱阳性, 棕色为中性, 棕褐色为强阳性。

表 1 引物参数
Table 1 The parameters of the primers

Gene name	Oligonucleotides	Accession number	Product/bp	T _m /°C	Cycles
β-catenin	F: 5'-TACCGTTGGATTGATTCG-3' R: 5'-GTCAGAGGTGCTGTGGCT-3'	NM_214367	396	50.4	30
GSK3β	F: 5'-GTAGCATGAAAGTTAGCAGAG-3' R: 5'-TTGACATAGATCACAGGGAG-3'	BC060743	406	51	32
Fz1	F: 5'-TCGTCTATCTGTTTCATCGGC-3' R: 5'-CATAACTCTTGACGCTCTGG-3'	NM_021266	246	52.6	30
C/EBPα	F: 5'-ACGCAGCCTTACGGAACT-3' R: 5'-5' TTGTTTAGTTGGGATTGCT-3'	AF103944	388	54.3	31
PPARγ	F: 5'-TGACCCAGAAAGCGATGC-3' R: 5'-CCTGATGGCGTCGTTATGAGACA-3'	DQ437885	595	56	28
LPL	F: 5'-GCAGGAAGTCTGACCAATAAG-3' R: 5'-GGTTTCTGGATGCCAATAC-3'	NM214286	183	54.3	29
β-actin	F: 5'-ACTGCCGCATCTCTTCCTC-3' R: 5'-CTCCTGCTTGCTGACCACATC-3'	AY550069	399	55.5~56	28

F and R indicate forward and reverse primers, respectively

2 结果

2.1 猪脂肪组织发育过程中 Wnt/β-catenin 信号通路相关基因的时序表达

2.1.1 猪脂肪组织发育过程中 β-catenin mRNA 的时序表达

分别取 1、3、10、20、30、60、120 日龄猪皮下脂肪组织, 提取总 RNA, 检测 β-catenin 的时序表达情况。由 Fig. 1 可以看出, 猪出生的第 1 天, β-catenin 在脂肪组织中有高水平的表达, 而随时间

间的推移, 表达量明显地降低, 第 1、3、10、20、30 和 60 天之间均有显著差异($P < 0.05$); 第 120 天与第 60 天相比没有显著差异($P > 0.05$), 说明 β-catenin 的表达量维持在较低水平。

2.1.2 猪脂肪组织发育过程中 GSK3β mRNA 的时序表达

由 Fig. 2 可知, GSK3β 伴随着脂肪的发育, 其表达量呈逐渐降低的趋势, 第 60 天后稳定低表达, 二者之间差异不显著($P > 0.05$)。

2.1.3 猪脂肪组织发育过程中 *Fz1* mRNA 的时序表达

猪出生的第 1 天, *Fz1* mRNA 在脂肪组织中有高水平的表达, 随着生长天数的增加, 其表达量逐渐降低, 第 60 天后稳定低表达($P>0.05$)(Fig. 3)。

2.2 猪脂肪组织发育过程中脂肪主要转录因子的时序表达

2.2.1 猪脂肪组织发育过程中 *LPL* mRNA 的时序表达

在猪出生的第 1 天到第 10 天时, *LPL* mRNA 的表达量相对较低, 且差异不显著($P>0.05$), 20 日龄时其表达量开始增加, 并持续升高, 到 60 日龄时 *LPL* mRNA 表达趋于稳定($P>0.05$)(Fig. 4)。

2.2.2 猪脂肪组织发育过程中 *PPAR γ* mRNA 的时序表达

随着脂肪组织的发育, *PPAR γ* mRNA 的表达量逐渐升高, 第 1、3、10、20、30 天之间差异均显著($P<0.05$), 在第 60 天后保持着高水平的表达($P>0.05$)(Fig. 5)。

2.2.3 猪脂肪组织发育过程中 *C/EBP α* mRNA 的时序表达

C/EBP α mRNA 的表达情况与 *PPAR γ* 相似, 由 Fig. 6 可以看出, 第 1、3、10、20、30 天之间差异均显著($P<0.05$), 在 60 日龄后达到稳定的高表达($P>0.05$)。

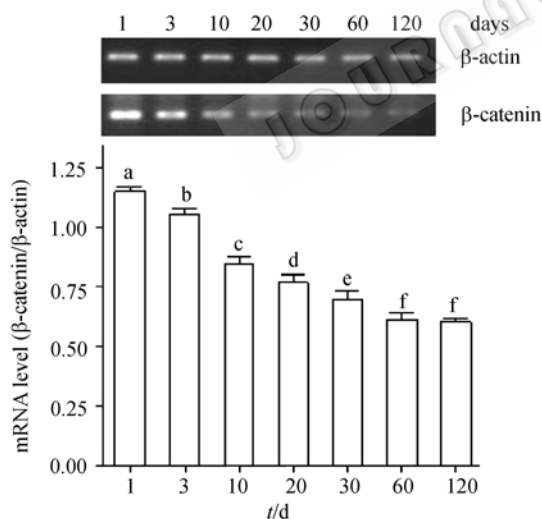


图 1 猪脂肪组织发育过程中 β -catenin mRNA 的时序表达
Fig. 1 Expression of β -catenin mRNA during adipose tissue development

Subcutaneous fatty tissues were isolated from Landrace with indicated days. Total RNA was isolated and mRNA expression was measured using SQ RT-PCR. Data are $\bar{X} \pm S$ from three experiments. Different letters show significant differences ($P<0.05$), same letters do not show significant differences ($P>0.05$)

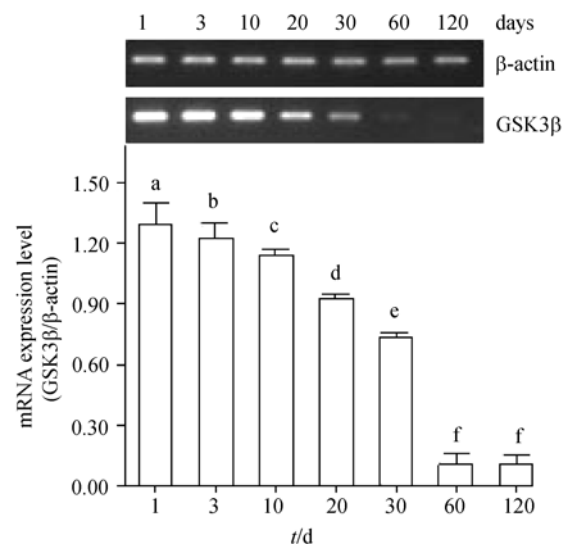


图 2 猪脂肪组织发育过程中 *GSK3 β* mRNA 的时序表达

Fig. 2 Expression of *GSK3 β* mRNA during adipose tissue development

Subcutaneous fatty tissues were isolated from Landrace with indicated days. Total RNA was isolated and mRNA expression was measured using SQ RT-PCR. Data are $\bar{X} \pm S$ from three experiments. Different letters show significant differences ($P<0.05$), same letters do not show significant differences ($P>0.05$)

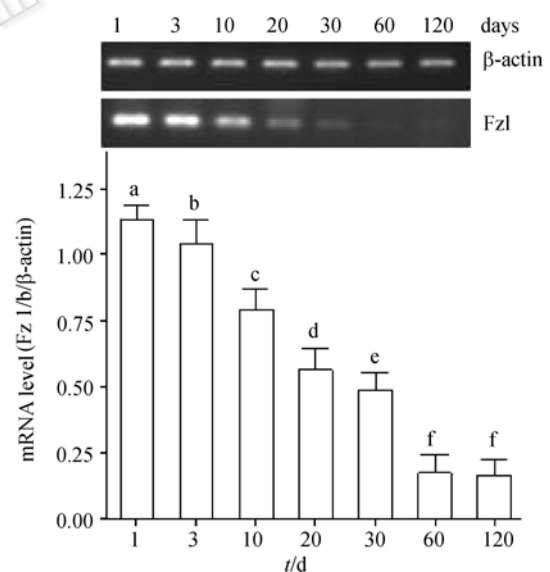


图 3 猪脂肪组织发育过程中 *Fz1* mRNA 的时序表达

Fig. 3 Expression of *Fz1* mRNA during adipose tissue development

Subcutaneous fatty tissues were isolated from Landrace with indicated days. Total RNA was isolated and mRNA expression was measured using SQ RT-PCR. Data are $\bar{X} \pm S$ from three experiments. Different letters show significant differences ($P<0.05$), same letters do not show significant differences ($P>0.05$)

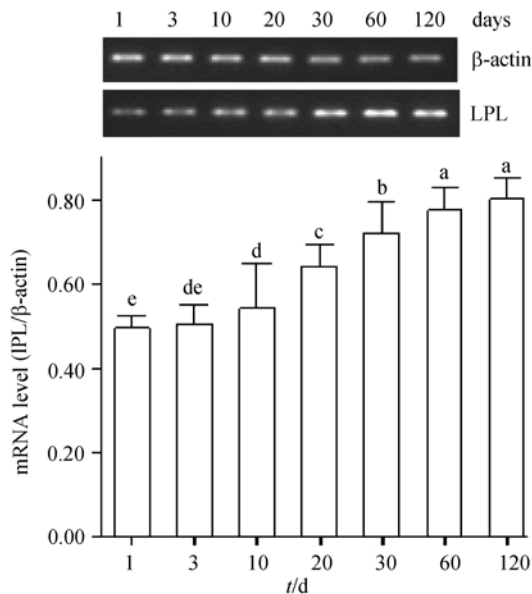


图4 猪脂肪组织发育过程中 LPL mRNA 的时序表达

Fig. 4 Expression of LPL mRNA during adipose tissue development

Subcutaneous fatty tissue were isolated from Landrace with indicated days. Total RNA was isolated and mRNA expression was measured using SQ RT-PCR. Data are $\bar{X} \pm S$ from three experiments. Different letters show significant differences ($P < 0.05$), same letters do not show significant differences ($P > 0.05$)

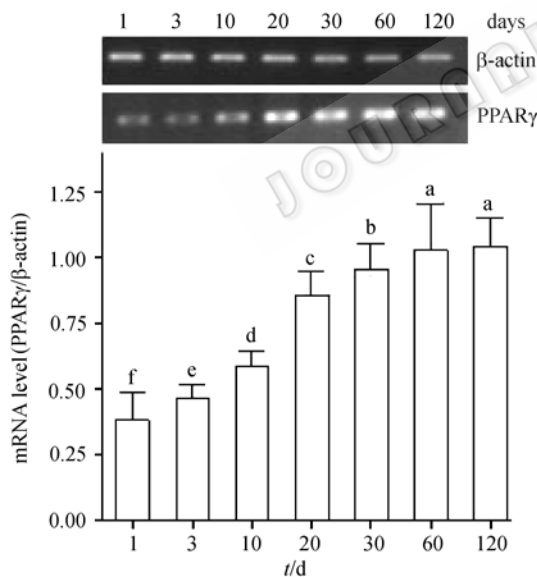


图5 猪脂肪组织发育过程中 PPARγ mRNA 的时序表达

Fig. 5 Expression of PPARγ mRNA during adipose tissue development

Subcutaneous fatty tissues were isolated from Landrace with indicated days. Total RNA was isolated and mRNA expression was measured using SQ RT-PCR. Data are $\bar{X} \pm S$ from three experiments. Different letters show significant differences ($P < 0.05$), same letters do not show significant differences ($P > 0.05$)

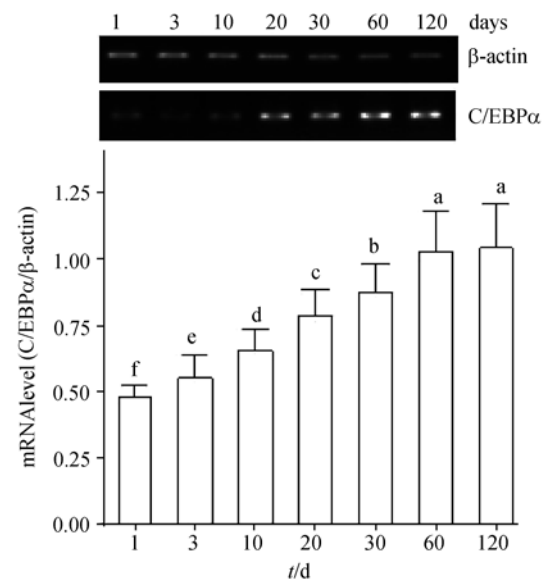


图6 猪脂肪组织发育过程中 C/EBPα mRNA 的时序表达

Fig. 6 Expression of C/EBPα mRNA during adipose tissue development

Subcutaneous fatty tissue were isolated from Landrace with indicated days. Total RNA was isolated and mRNA expression was measured using SQ RT-PCR. Data are $\bar{X} \pm S$ from three experiments. Different letters show significant differences ($P < 0.05$), same letters do not show significant differences ($P > 0.05$)

2.3 猪脂肪组织发育过程中 β-catenin 蛋白的时序表达

2.3.1 猪脂肪组织发育过程中 β-catenin 蛋白的时序表达变化

石蜡切片能很好地显示组织结构,成熟的脂肪组织在石蜡切片标本上,脂滴为酒精和二甲苯等脂溶剂所溶而呈空泡状,胞质位于细胞边缘成一薄层,核亦被挤到细胞的边缘,压成扁形。本研究石蜡切片免疫组化结果显示:在猪出生第1天时,皮下脂肪组织中含有大量未充脂的前体脂肪细胞及基质微管成分(Stromal vascular fraction, SVF),前体脂肪细胞呈束存在,β-catenin 在前体脂肪细胞和 SVF 细胞的核及质内均呈强阳性表达(Fig. 7a)。在出生后第10天时,前体脂肪细胞的束状形态消失,逐渐出现多室的脂肪细胞,此时 β-catenin 在脂肪细胞质和前体脂肪细胞核内呈中阳性表达(Fig. 7b)。由 Fig. 7c 和 Fig. 7d 可知,β-catenin 在第20天时的表达主要集中在细胞质和细胞核中,呈弱阳性。在第30天时,已能观测到较大的单室脂肪细胞的形态,此时,β-catenin 的表达主要集中在脂肪组织中的 SVF 细胞和前体脂肪细胞的细胞质上,呈弱阳性。而在第60

天时,由于脂滴的聚集,脂肪细胞的体积增大,除在脂肪组织中的 SVF 细胞和前体脂肪细胞中有弱阳性表达外,已检测不到 β -catenin 的表达(Fig. 7e)。

2.3.2 β -catenin 在猪脂肪组织发育过程中的表达强度变化

从 Table 2 可以看出, β -catenin 在脂肪组织发育过程中的表达是逐渐减弱的,30 日龄以后,在 SVF

细胞核和前体脂肪细胞核中未检测到 β -catenin,而在成熟脂肪细胞中,无论是细胞核还是细胞质,均未检测出 β -catenin。

3 讨论

在哺乳动物体内,脂肪组织不仅是重要的能量贮库和赋形组织,还是保持内环境稳定及分泌激素

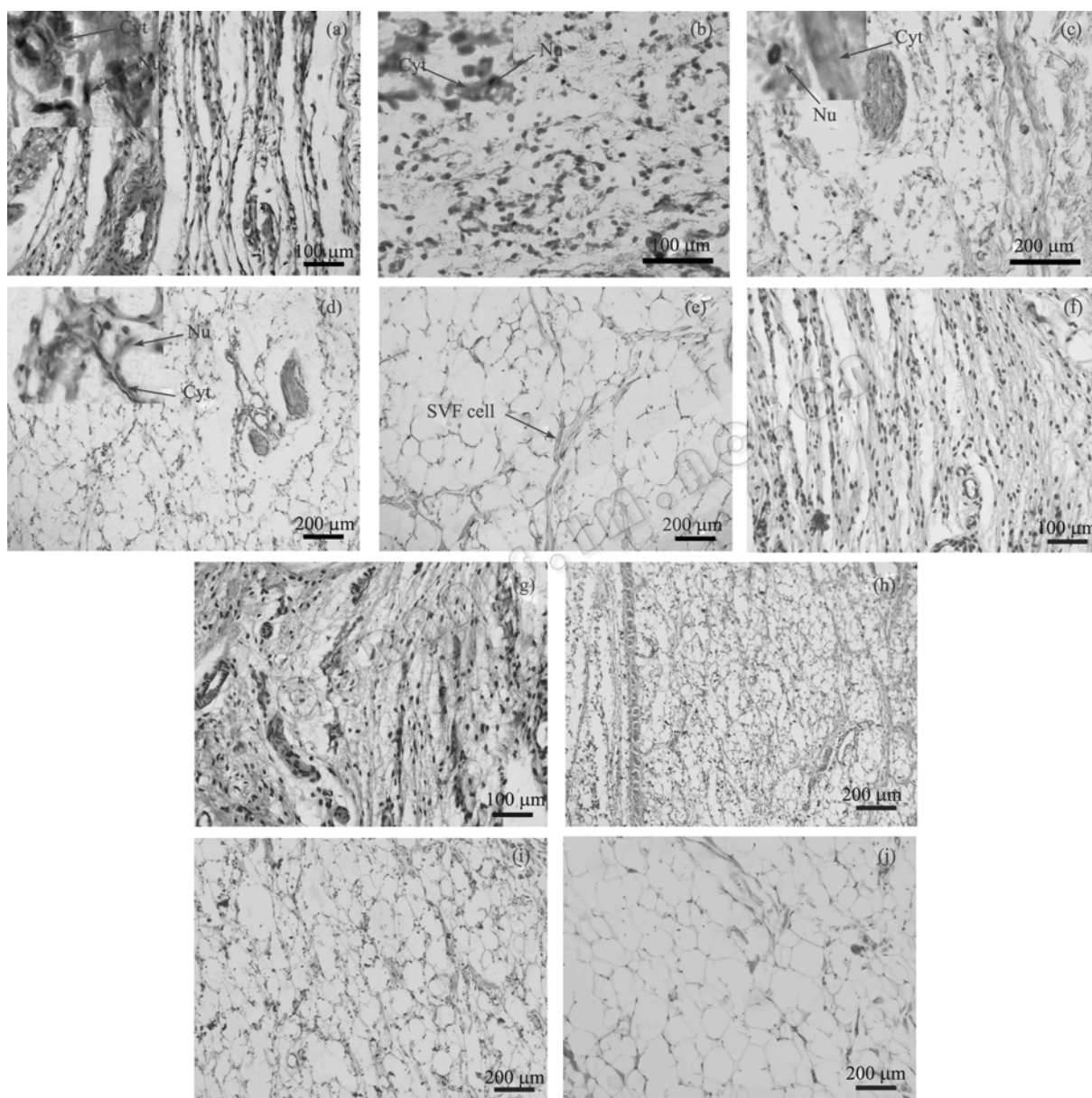


图 7 猪脂肪组织发育过程中 β -catenin 蛋白的时序表达变化

Fig. 7 Expression of β -catenin during adipose tissue development

(a)1-day old. β -catenin expressed strongly in preadipocytes nucleus and cytoplasm. (b) 10-day old. β -catenin expressed less strongly in adipocytes cytoplasm and preadipocytes nucleus. (c) 20-day old. β -catenin expressed weakly in adipocytes cytoplasm. (d)30-day old. β -catenin expressed weakly in adipocytes plasmalemma and SVF cells cytoplasm (e) 60-day old. Adipocytes invisible, β -catenin expressed weakly in SVF cells and preadipocytes. Bar: (a), (b), (f), (g) 400 \times ; (c, d, e, h, i, j) 200 \times . Nu: nucleus; Cyt: cytoplasm. (f~j) Haematoxylin & Eosin (HE) Staining of corresponding days as controls

表2 β -catenin 在猪脂肪组织发育过程中的表达强度变化
Table 2 Expression intensity of β -catenin during adipocyte tissue development

Day	Stain intensity					
	SVF cells		Preadipocytes		Adipocytes	
	Nu	Cyt	Nu	Cyt	Nu	Cyt
1	+++	+++	+++	+++	-	-
10	++	++	++	++	-	-
20	+	+	+	+	-	-
30	-	+	-	+	-	-
60	-	+	-	+	-	-

“+” stands for weak intensity, “++” stands for less strong intensity, “+++” stands for strong intensity. Nu: nucleus; Cyt: cytoplasm

和细胞因子的重要内分泌器官。脂肪细胞过度增殖与分化是导致肥胖及Ⅱ型糖尿病等疾病的重要原因^[11]。因此,脂肪形成的研究一直是国内外生物学及医学领域的研究热点之一。先前关于脂肪形成的研究主要集中在体外分化系统,最常用的有鼠源性前体脂肪细胞系和原代前体脂肪细胞^[12-16]。体外分化系统因存在培养基及各种作用因子的影响,与活体内生理状态下有一定差异。猪基因组的研究表明^[17],其在遗传上比通常使用的其他实验动物如小鼠等更接近人类,而且猪具有较强的脂肪沉积能力。这对猪在医学研究和药物试验上的应用具有重要意义。

Wnt/ β -catenin 信号通路的核心成分 β -catenin 是一种多功能蛋白,它不仅作为一种细胞间黏附分子发挥作用,而且还参与决定细胞的分化和命运,这取决于它在质膜和细胞核上的定位。结合在膜上的 β -catenin 在细胞吸附中起到重要作用^[18-21]。而与核结合的 β -catenin 则通过影响 TCF/LEF 转录因子而发挥作用^[22]。调控脂肪细胞分化的主要转录因子 C/EBP α 、PPAR γ 均是 Wnt/ β -catenin 信号通路的靶基因,受 TCF/LEF 家族调控。而 LPL 则作为脂肪细胞分化的一个早期标志,其 mRNA 的表达量反映脂肪细胞的分化程度。

本试验利用 SQ RT-PCR 检测不同日龄猪脂肪组织中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因 β -catenin、Fz1、GSK3 β mRNA 的表达。结果表明,随着个体日龄的增长,脂肪组织中 β -catenin mRNA 的表达量逐渐降低,60 日龄以后,维持在一个较低的水平(Fig.1)。这与 Moldes M 等人^[5]在 3T3-L1 前体脂肪细胞系中得到的结果一致。但据苏小舟等^[23]报道,

β -catenin 在黄牛毛囊中的表达只在胚胎期,这可能是由于物种和组织不同而存在差异。有人研究表明,GSK3 β 能够持续磷酸化 β -catenin; Fz1 作为 Wnt 信号通路的特异性受体,能够调节 β -catenin 的表达^[8],本试验结果显示,二者 mRNA 的表达量均随着个体年龄的增长而降低,并均在 60 日龄以后维持在一个较低水平(Fig.2, Fig.3),这进一步证实,在猪脂肪组织发育过程中,Wnt/ β -catenin 信号通路起着调节作用。近来研究发现,Wnt/ β -catenin 信号通路在 3T3-L1 前体脂肪细胞系中,能够通过调节 C/EBP α 和 PPAR γ 的相互作用从而抑制脂肪细胞分化^[24]。本试验通过对脂肪细胞主要转录因子 PPAR γ 、C/EBP α 及 LPL 表达变化的研究结果表明,三者随着脂肪组织的发育,表达量逐渐升高(Fig.4, Fig.5, Fig.6),由此推断,在猪脂肪组织发育过程中, β -catenin mRNA 的表达变化同脂肪细胞特异转录因子的表达的确存在一定的联系:当 LPL、PPAR γ 和 C/EBP α 均处在高量表达时, β -catenin 及 Fz1、GSK3 β mRNA 的表达却降到一个极低的水平。

石蜡切片免疫组化由于其组织结构保存良好,组织结构清晰,抗原定位准确,因此广泛用于生理和病理研究。本研究石蜡切片免疫组化结果表明,随着脂肪组织的发育, β -catenin 蛋白的表达也是随之降低,在 30 日龄以后,除在 SVF 细胞和前体脂肪细胞中有微量表达外,未检测到 β -catenin 蛋白的表达。这与 Cawthorn WP 等人^[25]在 3T3-L1 前体脂肪细胞系中所得结果一致。有研究发现, β -catenin 能进入细胞核内与 C/EBP α 、PPAR 相互作用,在 ST2 细胞系中,Wnt/ β -catenin 信号通路激活的状态下,超表达 C/EBP α 或 PPAR γ 能抑制 β -catenin 功能的发挥^[26]。本研究结果表明,随着脂肪组织的发育, β -catenin 蛋白的表达由核、质均表达逐渐只在细胞质中表达。而在成熟脂肪细胞中,始终未检测出 β -catenin 蛋白的表达(Table 2)。由此推断,在猪脂肪组织发育过程中, β -catenin 表达量的降低,可能是由于 C/EBP α 、PPAR 的调控作用。然而,Wnt/ β -catenin 信号通路中的关键因子 β -catenin 与脂肪细胞主要转录因子 C/EBP α 、PPAR 等在生理水平下是如何相互作用的,在猪脂肪组织发育过程中的关系如何,目前还不是很清楚。由于脂肪组织的特性——脂肪组织中始终存在 SVF 细胞和未成熟的前体脂肪细胞,

可根据贮存能量的需要, 终身进行分化和增殖。这提示我们, 在脂肪组织发育的任意一个阶段, 是否可以通过调节 β -catenin 的表达变化, 控制脂肪组织中前体脂肪细胞的增殖和分化, 从而抑制或治疗肥胖? 这一假设尚有待于进一步研究证实。

REFERENCES

- [1] Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*, 2006, **4**: 263–273.
- [2] Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 1998, **274**(46): 30057–30060.
- [3] Matsusue K, Peters JM, Conzalez FJ. PPAR β /delta potentiates PPAR γ -stimulated adipocyte differentiation. *FASEB J*, 2004, **18**(12): 1477–1479.
- [4] MacDougald OA, Mandrup S. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab*, 2002, **13**: 5–11.
- [5] Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, *et al.* Peroxisome proliferators-activated receptor γ suppresses Wnt/ β -catenin signaling during adipogenesis. *Biochem J*, 2003, **376**(Pt3): 607–613.
- [6] Jennifer AK, MacDougald OA. Wnt Signaling Inhibits Adipogenesis through β -Catenin-dependent and independent Mechanisms. *Biol Chemistry*, 2005, **280**(25): 24004–24010.
- [7] Kanazawa A, Tsukada S, Kamiyama M, *et al.* Wnt5b partially inhibits canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway and promotes adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; **330**(2): 505–510.
- [8] Huelsken J, Behrens J. The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2002, **15**: 3977–3978.
- [9] Uthoff SM, Eichenberger MR, McAuliffe TL, *et al.* Wingless-type frizzled protein receptor signaling and its putative role in human colon cancer. *Mol Carcinog*, 2001, **31**(1): 56–62.
- [10] Ding ST, McNeel RL, Mersmann HJ. Expression of porcine adipocyte transcripts: tissue distribution and differentiation *in vitro* and *in vivo*. *Comp Biochem and Physiol B Biochem Mol Biol*, 1999, **123**(3): 307–318.
- [11] Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am. J Clin Nutr*, 2006, **83**: 461S–465S.
- [12] Jessen BA, Stevens GJ. Expression profiling during adipocyte differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *Gene*, 2002, **299**(1): 95–100.
- [13] Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*, 1998, **78**(3): 783–809.
- [14] Li HX, Yang GS. Effects of docosahexaenoic acid on rat adipocytes proliferation and differentiation. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, **21**(5): 840–843.
- 李惠侠, 杨公社. 二十二碳六烯酸对大鼠脂肪细胞增殖分化的影响. *生物工程学报*, 2005, **21**(5): 840–843.
- [15] Pang WJ, Sun SD, Bai L, *et al.* Effects of resveratrol on pig primary preadipocytes proliferation, differentiation and transcription expression of *Sirt1* gene. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, **22**(5): 850–855.
- 庞卫军, 孙世铎, 白亮, 等. 白藜芦醇对猪原代前体脂肪细胞的增殖与分化及 *Sirt1* 基因转录表达时序的影响. *生物工程学报*, 2006, **22**(5): 850–855.
- [16] Lu RH, Li Y, Zhang LJ, *et al.* Effects of baicalein on the proliferation and differentiation of pig preadipocyte. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, **22**(6): 1002–1006
- 卢荣华, 李影, 张立杰, 等. 黄芩素对猪前体脂肪细胞增殖分化的影响. *生物工程学报*, 2006, **22**(6): 1002–1006.
- [17] Wernersson R, Schierup MH, Jorgensen FG. Pigs in sequence space: a 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing. *BMC Genomics*, 2005, **6**: 70.
- [18] Peifer M. Cell adhesion and signal transduction: the Armadillo connection. *Trends Cell Biol*, 1995, **5**: 224–229.
- [19] Miller JR, Moon RT. Signal transduction through β -catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev*, 1996, **10**: 2527–2539.
- [20] Cavallo R, Rubenstein D, Peifer M. Amadillo and Dtcf: a marriage made in the nucleus. *Curr Opin Genet Dev*, 1997, **7**: 459–466.
- [21] Cong F, Zhang J, Pao W, *et al.* A protein knockdown strategy to study the function of β -catenin in tumorigenesis. *BMC Mol Biol*, 2003, **9**(4): 10.
- [22] Barker N, Catenins CH. Wnt signaling and cancer. *Bioessays*, 2000, **22**(11): 961–965.
- [23] Su XZ, Yu F, Zhao YH, *et al.* Temporal and spatial expressions of β -catenin in the morphogenesis of hair follicle of the hoof periphery in bovine embryo development. *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(6): 1–5.
- 苏小舟, 郁枫, 赵云辉, 等. β -Catenin 在胎牛蹄边缘毛囊形态发生中表达的时空变化. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(6): 1–5.
- [24] Kawai M, Mushiaki S, Besso K, *et al.* Wnt/Lrp/ β -catenin signaling suppresses adipogenesis by inhibiting mutual activation of PPAR γ and C/EBP α . *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **363**(2): 276–282.
- [25] Cawthorn WP, Heyd F, Hegy K, *et al.* Tumour necrosis factor- α inhibits adipogenesis via a β -catenin/TCF4 (TCF7L2)-dependent pathway. *Cell Death Differ*, 2007, **14**(7): 1361–1373.
- [26] Kang S, Bennett CN, Gerin I, *et al.* Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein and peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem*, 2007, **282** (19): 14515–14524.