

山羊 *SREBP-1* 基因的超表达对脂肪酸代谢相关基因表达的影响

许会芬, 罗军, 李芳, 余康, 石恒波, 李君, 林先滋, 朱江江

西北农林科技大学动物科技学院 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100

许会芬, 罗军, 李芳, 等. 山羊 *SREBP-1* 基因的超表达对脂肪酸代谢相关基因表达的影响. 生物工程学报, 2012, 28(11): 1306-1316.

Xu HF, Luo J, Li F, et al. Effects of *SREBP-1* over-expression on fatty acid metabolism related genes expression in goats. Chin J Biotech, 2012, 28(11): 1306-1316.

摘 要: 本研究旨在通过构建西农萨能羊固醇调节元件结合蛋白-1 (*SREBP-1*) 基因的重组腺病毒超表达载体, 获得有感染性的病毒颗粒, 并检测该基因过表达后对乳腺上皮细胞中脂肪酸代谢相关基因的影响, 为进一步研究该基因在脂肪酸代谢及泌乳调控中的功能奠定基础。根据 GenBank 中收录的西农萨能羊 *SREBP-1* 基因的序列设计引物, PCR 扩增后进行测序。将测序正确的目的基因连接到穿梭载体 pAdTrack-CMV 后并进行线性化, 转化含有腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 的大肠杆菌 *Escherichia coli* BJ5183 感受态细胞中进行同源重组, 将重组成功的质粒进行 *Pac I* 酶线性化, 转染 HEK 293 细胞进行重组腺病毒的包装、扩繁及滴度测定。病毒液感染原代乳腺上皮细胞, 实时荧光定量检测 *SREBP-1* 超表达效果及对脂肪酸代谢相关基因的影响。结果表明: 重组腺病毒质粒构建成功, 腺病毒滴度为 10^9 U/mL。病毒液感染乳腺上皮细胞 48 h 后, *SREBP-1* 基因表达量上升大约 15 倍, 72 h 后, 表达量上调了 30 倍; 对脂肪酸代谢相关基因的影响在 72 h 较为明显, 其中, 脂肪酸合酶 (*FASN*) 及酰基辅酶 A 羧化酶 (*ACC*) 均显著上调了大约两倍, 过氧化物酶体增殖物激活受体 (*PPAR γ*) 上调了大约 1.5 倍, 肝素 X 受体 (*LXR α*) 及甘油三酯水解酶 (*ATGL*) 表达量升高了 1.2 倍; 其中硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 (*SCD*) 表达水平无明显变化。表明在西农萨能羊乳腺上皮细胞中, *SREBP-1* 能够促进脂肪酸合成相关基因的表达, 对山羊乳腺脂肪酸代谢具有调控作用。

关键词: 山羊, *SREBP-1*, 超表达, 脂肪酸合成

Received: April 20, 2012; **Accepted:** June 14, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31072013), Key Special Project for Breeding and Cultivation of GMO Varieties (No. 2009ZX08009-162B), R&D Special Fund for Public Welfare Industry (Agriculture) (No. 201103038).

Corresponding author: Jun Luo. Tel: +86-29-87082891; E-mail: luojun1@yahoo.com

国家自然科学基金 (No. 31072013), 转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2009ZX08009-162B), 公益性行业 (农业) 科研专项 (No. 201103038) 资助。

Effects of *SREBP-1* over-expression on fatty acid metabolism related genes expression in goats

Huifen Xu, Jun Luo, Fang Li, Kang Yu, Hengbo Shi, Jun Li, Xianzi Lin,
and Jiangjiang Zhu

College of Animal Science and Technology, Shaanxi Provincial Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: The aim of the study was to construct a recombinant adenovirus overexpression vector for Sterol Regulatory Element Binding Protein-1(*SREBP-1*) of Xinong Saanen dairy goat, and to detect its effect on genes related to fatty acid metabolism in goat mammary epithelial cells, to establish foundation for further study of its roles in metabolism of fatty acid synthesis and lactation. First, we designed primers based on the *SREBP-1* gene sequence in GenBank for PCR amplification and inserted the sequence into shuttle vector pAdTrack-CMV. The recombinant plasmid pAdTrack-CMV-*SREBP-1* linearized by *Pme* I was transformed into *E. coli* BJ5183 competence cell containing the backbone vector pAdEasy-1 to obtain recombinant vector pAd-*SREBP-1* by homologous recombination. pAd-*SREBP-1* was linearized by *Pac* I and transfected into HEK 293 cell. Then we infected goat mammary epithelial cells with recombinant adenovirus which was packaged in HEK 293 cell line. The results showed that the recombinant adenovirus vector containing *SREBP-1* was successfully constructed, and the titer of virus was 10^9 U/mL. Compared with the control group, mRNA level of *SREBP-1* increased by about 15 times after infected for 48 h and 30 times after infected for 72 h. Fatty acid synthase (*FASN*) and Acetyl-CoA carboxylase (*ACC*) was upregulated by almost 2 times. The expression level of Peroxisome proliferator activated receptor (*PPAR γ*) increased by 1.5 times. Liver X receptors (*LXR α*) and Adipose triglyceride lipase (*ATGL*) upregulated by 1.2 times compared with that of control. But Stearoyl-coenzyme A desaturase (*SCD*) had no obvious change. In conclusion, *SREBP-1* can activate the expression of genes related to fatty acid synthesis in mammary epithelial cells of Xinong Saanen dairy goat, demonstrated a regulatory function on the fatty acid metabolism in goat mammary gland.

Keywords: goat, *SREBP-1*, over-expression, fatty acid synthesis

固醇调节元件结合蛋白 (Sterol regulatory element binding protein, SREBPs) 是体内重要的核转录因子, 属于 bHLH-Zip (Basic helix-loop-helix leucine zipper) 核转录因子超家族的一员, 与体内胆固醇及脂肪生成基因的调节密切相关^[1-2]。研究发现, *SREBPs* 可以直接激活胆固醇、脂肪酸、甘油三酯及磷脂生物合成及摄取过程中 30 多个基因及还原型辅酶 II (*NADPH*) 的

表达^[2-4]。乳腺作为哺乳动物的特有器官, 是机体脂质合成的 3 个主要部位 (脂肪、肝脏及乳腺) 之一^[5]。与肝脏、脂肪不同的是, 乳腺具有较强的泌乳功能, 可以使外源基因在乳腺中表达后随乳汁排出体外^[6], 是研究基因功能的良好材料。研究表明, *SREBP-1* 基因对哺乳动物乳腺脂肪酸代谢过程发挥重要调控作用。在小鼠泌乳期内, *SREBP-1* 基因的表达量是干奶期的 3~4 倍, 其靶

基因的表达量也有不同程度的上调,在泌乳高峰期达到最高^[7]。并且随着泌乳高峰期的到来,乳中短中链脂肪酸(C6:0-C14:0)的比例也随之增大。山羊奶中短中链脂肪酸含量高,具有较高的营养价值,而关于羊奶脂肪酸代谢相关基因功能的研究较少,因此 *SREBP-1* 基因的超表达研究有助于揭示该基因的功能。

本研究通过构建 *SREBP-1* 基因的重组腺病毒超表达载体,转染 HEK 293 细胞包装扩增出高滴度的腺病毒,并感染乳腺上皮细胞,研究该基因超表达后对脂肪酸代谢相关基因的影响,为 *SREBP-1* 基因的功能研究及奶山羊脂肪酸代谢调控基因网络构建等提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV 及骨架载体 pAdEasy-1 均由清华大学常智杰教授惠赠; Primescript[®] RT Reagent Kit、SYBR[®]Premix *Ex Taq*[™] II 试剂盒、*LA Taq* DNA 聚合酶、dNTPs (10 mmol/L)、pMD19-T 载体、*Sal* I 内切酶均购自 TaKaRa (大连宝生物工程有限公司);限制性内切酶 *Pem* I、*Pac* I 及 *Not* I 均购自 NEB 公司; T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; B 型小量质粒快速提取试剂盒购自北京博大泰克公司; *Escherichia coli* Top10、MarkerIII、高纯度质粒小提中量试剂盒购自北京天根公司; PCR 引物由西安沃尔森生物技术有限公司合成;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司; FuGENE HD Transfection Reagent 购自罗氏 (Roche) 公司; 细胞培养板和培养瓶购自

NUNC 公司 (丹麦); DMEM/F-12 培养基购自 Gibco 公司; 1640 培养基及标准胎牛血清购自 Hyclone 公司。CFX96 型实时定量 PCR 仪购自美国伯乐公司。

1.2 方法

1.2.1 *SREBP-1* 基因的克隆

根据西农萨能羊 *SREBP-1* 基因的序列 (GenBank Accession No. JN790254) 设计特异性引物,并在上游和下游分别添加 *Sal* I 及 *Not* I 酶切位点 (斜体部分),并添加保护碱基 (粗体部分),上、下游引物序列分别为:*SREBP1-S* (5'-3'): **GCGTCGAC**ATGGACGAGCCACCCTTCAACGA; *SREBP1-A* (5'-3'): **TTGCGGCCG**CCTAGCTGGAGGTCACAGTGGTC。

以泌乳期乳腺组织 cDNA 为模板进行 *SREBP-1* 基因的克隆。CDS 区的 PCR 扩增体系为: 10 μ L 2 \times GC Buffer I, 0.5 μ L dNTPs (10 mmol/L), 上下游引物 *SREBP1-S* (10 μ mol/L)、*SREBP1-A* (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 1 μ L (50 ng) cDNA 模板, 0.2 μ L *LA Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L), 加入 ddH₂O 至总体积 20 μ L; 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 64 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 3.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,回收纯化后连接 pMD19-T 载体,并转化 *E. coli* Top10,提取质粒进行酶切鉴定,阳性克隆的质粒送往 Invitrogen 公司测序。

1.2.2 pAdTrack-CMV-*SREBP-1* 穿梭载体的构建与鉴定

对测序正确的 pMD19-T-*SREBP-1* 重组质粒及 pAdTrack-CMV 穿梭载体质粒进行 *Not* I 及

Sal I 双酶切,电泳检测并回收,4℃连接过夜,转化 *E. coli* Top10,挑取单克隆培养扩繁,取4 mL 菌液提取质粒后进行 *Not* I 及 *Sal* I 双酶切鉴定。阳性质粒送往 Invitrogen 公司测序。

1.2.3 pAd-SREBP-1 重组腺病毒载体的构建与鉴定

对酶切鉴定正确的 pAdTrack-CMV-SREBP-1 质粒进行 *Pem* I 线性化,回收产物转化含有腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 的 *E. coli* BJ5183 感受态细胞。挑取较小菌落培养扩繁,取4 mL 菌液提取质粒并进行 *Pac* I 酶切鉴定,然后用鉴定正确的重组质粒转化 *E. coli* Top10 感受态细胞进行扩繁,提取质粒送往 Invitrogen 公司测序。

1.2.4 pAd-SREBP-1 重组腺病毒的包装与扩增

重组质粒用 *Pac* I 酶切线性化,乙醇沉淀法回收大片段,回收产物转染生长在六孔细胞培养板中汇合度约为 80% 的 HEK 293 细胞以进行重组腺病毒的包装。病毒包装过程及收毒方法参照王伟等^[8]的具体说明。病毒原液全部接种到 HEK 293 细胞 (生长汇合度为 80%~90% 左右),接种后 4 h 更换新鲜的培养基,待细胞完全病变时 (约 2~3 d) 收集病毒,按前述方法收集的病毒液即为第二代病毒悬液。用第二代病毒悬液多次感染 HEK 293 细胞,大量扩增重组腺病毒。

1.2.5 腺病毒滴度的测定

具体测定方法参考江千里等^[9]关于批量快速测定法测定标志基因为 GFP 的重组病毒滴度的研究。

1.2.6 腺病毒感染乳腺上皮细胞最佳 MOI (Multiplicity of infection) 值的确定

将乳腺上皮细胞接种于六孔细胞培养板中,

待汇合度达到 50% 左右时,更换新鲜的培养基每孔 2 mL,分别加入 100、150、200、250 μ L 的腺病毒液 (每个处理重复 3 次)。每天更换新鲜培养基,72 h 后观察荧光表达情况,绿色荧光表达良好且没有对细胞造成明显病变的量确定为最佳接种量,并计算 MOI 值。

1.2.7 pAd-SREBP-1 腺病毒超表达效果的检测

取生长状态良好的 F11 代乳腺上皮细胞接种于六孔板中,培养 24 h 细胞达到 40% 汇合度后接种腺病毒。试验共设 4 个处理组: pAd-Control (重组过表达空载体)感染 48 h 组、pAd-Control 感染 72 h 组、pAd-SREBP-1 感染 48 h 组及 pAd-SREBP-1 感染 72 h 组。每个处理设 3 个重复,在规定时间内收集细胞提取总 RNA,检测浓度及纯度后反转录成 cDNA,将 3 个重复的 cDNA 样品等份混匀后用作 qRT-PCR 的模板。*SREBP-1* 及 *GAPDH* 基因实时定量引物见表 1,PCR 反应体系为: SYBR Premix Ex Taq (2 \times) Mix 10.0 μ L, cDNA 模板 1.0 μ L,上、下游引物混合物 (10 μ mol/L) 1.6 μ L,加 RNase free H₂O 补足 20 μ L 体系 (每个处理重复 3 次)。反应条件为: 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 39 个循环;添加溶解曲线。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析数据,其中 $\Delta C_t = C_{tSREBP-1} - C_{tGAPDH}$; $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t处理} - \Delta C_{t pAd-Control}$ 。

1.2.8 SREBP-1 基因过表达后对脂肪酸代谢相关基因的影响

利用 Primer 5 软件设计 *FASN*、*SCD*、*ACC*、*ATGL*、*LXR α* 及 *PPAR γ* 基因的实时定量 PCR 引物 (表 1)。反应体系、反应条件及数据分析方法同上。

表 1 实时定量引物

Table 1 Primers used for qRT-PCR

Gene name	Primer sequence (5'-3')	Product length (bp)
<i>SREBP1</i>	5'-Primer: CTGCTGACCGACATAGAAGACAT 3'-Primer: GTAGGGCGGGTCAAACAGG	81
<i>FASN</i>	5'-Primer: GGGCTCCACCACCGTGTTCCTA 3'-Primer: GCTCTGCTGGGCCTGCAGCTG	226
<i>ACC</i>	5'-Primer: CTCCAACCTCAACCACTACGG 3'-Primer: GGGGAATCACAGAAGCAGCC	171
<i>SCD</i>	5'-Primer: CCATCGCCTGTGGAGTCAC 3'-Primer: GTCGGATAAATCTAGCGTAGCA	257
<i>LXRα</i>	5'-Primer: CATCAACCCCATCTTCGAGTT 3'-Primer: CAGGGCCTCCACATATGTGT	163
<i>PPARγ</i>	5'-Primer: CCTTCACCACCGTTGACTTCT 3'-Primer: GATACAGGCTCCACTTTGATTGC	144
<i>ATGL</i>	5'-Primer: GGAGCTTATCCAGGCCAATG 3'-Primer: TGCGGGCAGATGTCCTCT	226
<i>GAPDH</i>	5'-Primer: GCAAGTTCCACGGCACAG 3'-Primer: GGTTCACGCCCATCACAA	249

2 结果与分析

2.1 西农萨能羊 *SREBP-1* 基因的克隆与鉴定

以泌乳期乳腺组织 cDNA 为模板扩增得到山羊 CDS 区序列 3 441 bp (图 1), 双酶切鉴定后测序结果与 GenBank 中收录的序列一致。表明成功克隆了西农萨能羊 *SREBP-1* 基因 CDS 区。

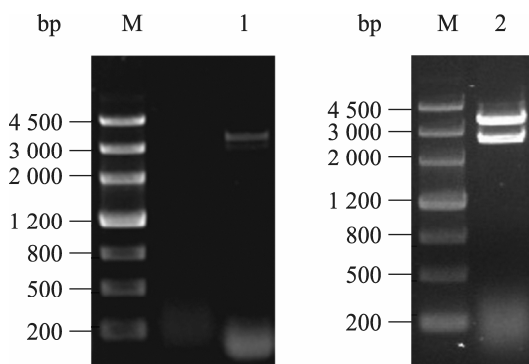
图 1 山羊 *SREBP-1* 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of goat *SREBP-1* gene. M: marker III; 1: amplification product of *SREBP-1* CDS region; 2: endonuclease analysis of pMD19-T-*SREBP-1* vector.

2.2 pAdTrack-CMV-*SREBP-1* 穿梭载体的构建与鉴定

Not I 及 *Sal* I 双酶切 pMD19-T-*SREBP-1* 质粒及 pAdTrack-CMV 质粒, 回收产物连接并转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 抽提质粒后进行 *Not* I 及 *Sal* I 双酶切 (图 2), 电泳检测得到约 9 000 bp 载体条带及 3 450 bp 目的基因条带, 与预期结果一致, 表明穿梭载体构建成功。

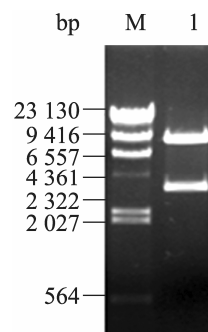
图 2 pAdTrack-CMV-*SREBP-1* 载体的构建

Fig. 2 Construction of pAdTrack-CMV-*SREBP-1* vector. M: λDNA/*Hind* III DNA marker; 1: pAdTrack-CMV-*SREBP-1* digested with *Not* I and *Sal* I.

2.3 pAd-SREBP-1 重组腺病毒载体的构建与鉴定

使用 *Pme* I 对鉴定正确的 pAdTrack-CMV-*SREBP-1* 质粒进行线性化，回收产物转化含有 pAdEasy-1 的 *E. coli* BJ5183 感受态细胞中进行同源重组，挑取较小菌落进行扩繁，重组质粒用 *Pac* I 酶切鉴定，结果显示：在 30 kb 及 4.5 kb 处有两个条带 (图 3)，表明重组腺病毒载体构建成功。

2.4 腺病毒的包装、扩增及滴度测定

取 5 μg 重组腺病毒载体用 *Pac* I 酶切线性化，乙醇沉淀法回收大片段，回收产物转染生长在六孔细胞培养板中的汇合度约为 80% 的 HEK 293 细胞以包装重组腺病毒。转染后注意更换新鲜培养基，并在转染 3 d 后观察绿色荧光表达情况，此后应每天跟踪观察腺病毒的包装与增殖过

程。转染约 10~12 d 后，细胞即出现明显的病变反应：变圆呈葡萄球状，并有 50% 左右的细胞脱壁，此时即可收集第一代腺病毒。病毒上清反复感染 HEK 293 细胞 3 次后，获得高滴度的腺病毒 (图 4)。采用病毒批量快速测定法测定其滴度为 10⁹ U/mL。

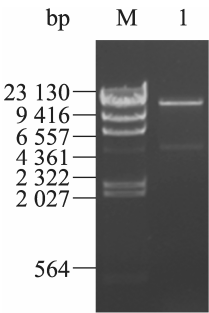


图 3 pAd-SREBP-1 重组质粒的酶切鉴定
Fig. 3 Identification of pAd-SREBP-1 recombinant plasmid by enzyme digestion. M: λDNA/*Hind* III DNA marker; 1: pAd-SREBP-1 digested with *Pac* I.

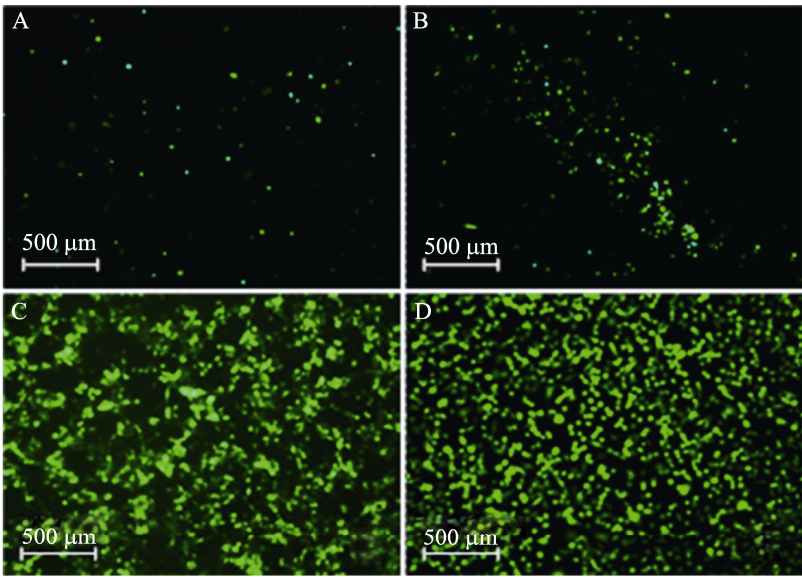


图 4 腺病毒的包装与扩增
Fig. 4 Adenovirus package and amplification. (A) GFP expression of HEK 293 cell three days after transfection of pAd-SREBP-1 recombinant adenovirus. (B) GFP expression of HEK 293 cell 8 days after transfection of pAd-SREBP-1 recombinant adenovirus. (C) GFP expression of HEK 293 cell 11 days after transfection of pAd-SREBP-1 recombinant adenovirus. (D) GFP expression of HEK 293 cell 48 h after infection of high titer of recombinant adenovirus.

2.5 腺病毒感染乳腺上皮细胞最佳 MOI (Multiplicity of infection)值的确定

对乳腺上皮细胞接种不同剂量的高滴度腺病毒液,以确定最佳感染复数 (MOI), 72 h 后置于倒置荧光显微镜下观察,发现最适宜的病毒接种量为 100 μ L, MOI 值为 200 (图 5)。

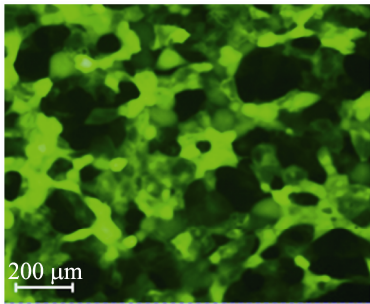


图 5 接种腺病毒 72 h 后的乳腺上皮细胞

Fig. 5 Goat mammary epithelial cells infected with adenovirus for 72 h.

2.6 乳腺上皮细胞中 *SREBP-1* 的超表达效果检测

在规定时间内收集腺病毒感染的乳腺上皮细胞样品,提取 RNA 并检测浓度及纯度,反转录后用于 qRT-PCR,检测 *SREBP-1* 基因的超表达效率。定量结果表明:与空载体感染组相比,感染重组腺病毒 72 h 组的超表达效果显著优于 48 h 感染组,感染重组腺病毒的乳腺上皮细胞在 48 h 后, *SREBP-1* 基因的 mRNA 表达量升高了约 15 倍,72 h 后靶基因的 mRNA 表达量显著升高了 30 倍 (图 6)。

2.7 *SREBP-1* 基因超表达后对脂肪酸代谢相关基因的影响

使用 2.6 中收集的 RNA 样品进行 qRT-PCR 检测 *SREBP-1* 基因超表达后对脂肪酸代谢相关基因的影响。由图 7 可以看出,接种腺病毒

(MOI=200) 72 h 后,与空载体感染组相比, *FASN* 及 *ACC* 均显著上调了约两倍, *PPAR γ* 上调了 1.47 倍, *LXR α* 及 *ATGL* 表达量均升高了 1.21 倍;但是 *SCD* 的 mRNA 水平无明显变化。

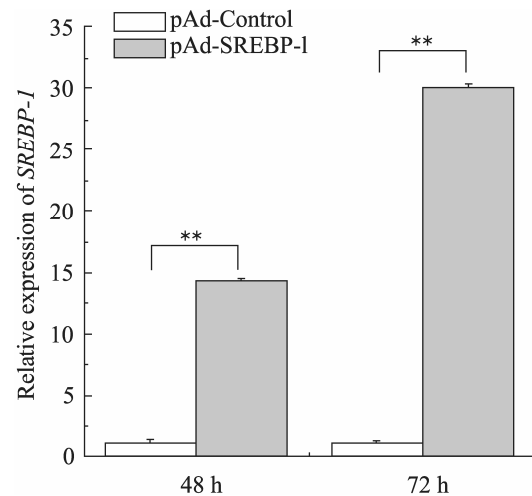


图 6 *SREBP-1* 基因在山羊乳腺上皮细胞中的超表达

Fig. 6 Over-expression of *SREBP-1* gene in goat mammary epithelial cells. $n=3$; ** $P<0.01$ compared with pAd-Control group.

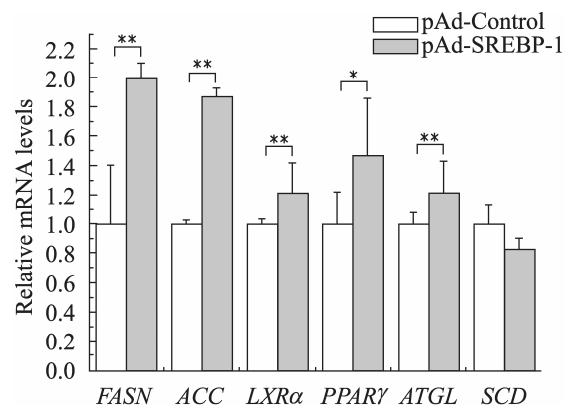


图 7 *FASN*、*ACC*、*LXR α* 、*PPAR γ* 、*SCD* 及 *ATGL* 基因实时荧光定量结果分析

Fig. 7 qRT-PCR analysis of *FASN*, *ACC*, *LXR*, *PPAR γ* , *SCD* and *ATGL* gene. $n=3$; * $P<0.05$ compared with pAd-Control group; ** $P<0.01$ compared with pAd-Control group.

3 讨论

使用腺病毒技术研究基因功能的关键是首先要获得高滴度的病毒液。在病毒的包装及扩增过程中,第一代病毒的包装决定了整个腺病毒包装能否成功,细胞的状态、腺病毒基因的转染量及第一次收集病毒的时间均会影响病毒包装的效率。首先,包装第一代腺病毒时所选取的细胞状态一定要好,选择在对数生长期的细胞进行包装,因为第一代腺病毒包装所需时间较长(7~10 d左右),因此选取的细胞密度不宜过高,一般选取汇合度约70%左右HEK 293细胞即可,接种第二代及第三代病毒的细胞汇合度一般选在80%以上。其次,重组腺病毒质粒经Pac I酶切后释放出腺病毒基因,向HEK 293细胞中转染该腺病毒基因的量应不低于4 μg ,否则造成第一次收毒时病毒滴度过低,再次扩增时不易成功。另外,第一次收病毒的时间不宜过早,只要大部分细胞仍处于贴壁状态就应继续在培养箱内培养。收毒过早会使病毒滴度偏低,直接影响后续扩繁,收毒过晚则细胞破裂,也会降低病毒滴度。在本研究中,使用收集的高滴度病毒感染乳腺上皮细胞72 h后,细胞中*SREBP-1*的mRNA的表达量上升了30倍,超表达效果显著。

SREBPs家族3个成员在机体脂质代谢过程中发挥不同的功能^[10],研究表明,*SREBP-2*基因主要参与调控机体胆固醇合成相关基因的表达,*SREBP-1*(主要是*SREBP-1c*)基因主要调控机体脂肪酸、磷脂及甘油三酯的生物合成过程^[11]。除了在肝脏、皮下脂肪组织、肾上腺及骨骼肌等组织中具有较高的表达外^[12],*SREBP-1c*在泌乳期奶牛的乳腺组织中的表达量也较高^[13]。在奶牛

乳腺组织中,*SREBP-1*基因的表达水平与乳汁中脂肪酸的种类密切相关^[14]。Bécard等^[15]利用腺病毒技术研究*SREBP-1c*基因过表达对肝脏中葡萄糖代谢相关基因的影响,结果表明*SREBP-1c*在胰岛素调控的葡萄糖代谢过程中发挥重要作用,推测其可能与胰岛素抵抗及葡萄糖代谢紊乱引起的一系列疾病的发病机制密切相关,为此类疾病的治疗提供了新的思路。Sekiya等^[16]研究发现,与肝脏组织及细胞不同的是,脂肪细胞中*SREBP-1c*表达量的上升并未引起生脂基因的变化。乳腺作为一个具有极强分泌功能的器官,不仅含有大量的乳腺上皮细胞,而且含有较多的脂肪组织,因此,乳腺在泌乳期合成脂肪酸的过程较为复杂。Brown和Goldstein^[2]研究发现,在大量合成三酰甘油酯(TAG)的组织(如乳腺)中,脂肪酸及胆固醇生物合成过程中的基因均受到SREBPs基因家族调控。另外,Michael等^[7]发现在*SREBP-1*基因敲除鼠的乳汁中所含C16:0脂肪酸的比例显著低于(下降约25%)正常组,表明由于*SREBP-1*基因功能的缺失,导致脂肪酸从头合成途径部分受阻。

脂肪酸的从头合成过程共由25种酶催化,其中,ACC催化乙酰辅酶A形成丙二酰辅酶A,*FASN*是催化丙二酰辅酶A形成16碳脂肪酸的关键酶,*SCD*是催化单不饱和脂肪酸形成的限速酶。研究表明*SREBP-1*基因可以直接调控这3种酶的活性^[17-18],进而调控体内脂肪酸的生物合成过程。Bécard等^[15]在研究中发现*SREBP-1c*超表达后*FASN*的表达量上升了2.1倍,而在*SREBP-1*基因敲除鼠中^[17],ACC及*SCD*的mRNA表达量分别下降了约2.5倍及10倍,表明*SREBP-1*可诱导生脂基因的表达。本研究中腺病毒介导的

SREBP-1 基因超表达技术, 使乳腺上皮细胞中 *FASN* 及 *ACC* 的表达量上调了 2 倍, 与前人研究结果一致。但是并未引起 *SCD* 基因的表达量发生变化, 表明活体水平与细胞水平之间可能存在一定的差异。

LXR α 是一种在肝脏组织中高表达的核受体, 固醇及其衍生物可激活该基因的表达^[19]。研究发现 *SREBP-1* 基因启动子上存在 *LXR α* 基因的结合位点 (LXRE), *LXR α* 与 LXRE 结合可直接激活 *SREBP-1* 基因的表达, 进而调控生脂基因的表达。在 *LXR α* 基因敲除的动物体内, *FASN*、*ACC* 及 *SCD* 基因的基础活性均显著降低^[20]。钟瑜等^[21]研究发现 *LXR α* 基因的超表达导致 *SREBP-1* 基因表达量升高, 而 *PPAR γ* 基因表达量下降, 其机制是由于 *LXR α* 超表达后, 与更多的配体 RXR 结合后形成异源二聚体, 导致 *PPAR γ* 无法与配体 RXR 结合, 表达受到抑制。*SREBP-1* 基因对 *LXR α* 基因有正反馈调节作用, *SREBP-1* 基因的超表达, 导致 *LXR α* 基因表达量上升了 1.2 倍, 同时也引起 *PPAR γ* 基因表达量的上升, 但 *LXR α* 和 *PPAR γ* 基因表达间是否存在确定的正相关或负相关关系尚待进一步研究证实。

目前关于 *ATGL* 及 *PPAR γ* 的研究大多与脂解相关^[22-23], *ATGL* 主要参与甘油三酯 (TG) 水解过程的第一步, 形成甘油二酯 (DG) 和游离脂肪酸^[24], DG 进一步水解后为机体供能。而 *PPAR γ* 则通过与 *LXR α* 竞争性的结合配体 RXR^[25], 使 *LXR α* -*SREBP-1* 通路介导的生脂过程受到抑制, *PPAR γ* 活性增强启动脂解过程, 为机体供能。使用 pAd-*SREBP-1* 病毒液处理乳腺上皮细胞 72 h 后, 导致 *SREBP-1* 基因及其靶基因的表达量显著上升, 脂肪酸合成过程加速, 导致脂肪沉积增加,

脂质积累到一定程度后, 产物通过反馈途径启动脂解过程^[26], *ATGL* 及 *PPAR γ* 基因上调, 以维持机体的代谢平衡。本研究发现 *SREBP-1* 超表达后, 引起 *PPAR γ* 及 *ATGL* 表达量分别上调了 1.4 倍及 1.2 倍。这一结果说明在乳腺上皮细胞中, *SREBP-1* 基因的超表达可能会引起脂代谢紊乱, 具体机制有待进一步研究。

本研究通过构建西农萨能羊 *SREBP-1* 基因的腺病毒超表达载体, 成功获得了高滴度的腺病毒 (10^9 U/mL), 并且发现在山羊乳腺上皮细胞中, *SREBP-1* 基因的超表达诱导了生脂基因的表达。推测 *SREBP-1* 基因在山羊泌乳过程中, 尤其是短中链脂肪酸的形成过程中发挥着重要作用, 对提高山羊奶的营养价值及脂肪酸代谢调控基因网络的构建均具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Yokoyama C, Wang XD, Briggs MR, et al. SREBP-1: a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*, 1993, 75(1): 187-197.
- [2] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 1997, 89(3): 331-340.
- [3] Horton JD, Shimomura L. Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Curr Opin Lipidol*, 1999, 10(2): 143-150.
- [4] Edwards PA, Tabor D, Kast HR, et al. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1529(1/3): 103-113.
- [5] Stein T, Morris JS, Davies CR, et al. Involution of the mouse mammary gland is associated with an immune cascade and an acute-phase response,

- involving LBP, CD14 and STAT3. *Breast Cancer Res*, 2004, 6(2): R75–R91.
- [6] Wang Z, Luo J, Wang W, et al. Characterization and culture of isolated primary dairy goat mammary gland epithelial cells. *Chin J Biotech*, 2010, 26(8): 1123–1127.
王桢, 罗军, 王伟, 等. 奶山羊乳腺上皮细胞的分离、培养及鉴定. *生物工程学报*, 2010, 26(8): 1123–1127.
- [7] Rudolph MC, Monks J, Burns V, et al. Sterol regulatory element binding protein and dietary lipid regulation of fatty acid synthesis in the mammary epithelium. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(6): E918–E927.
- [8] Wang W, Luo J, Zhao WS, et al. Screening of shRNA sequence target Xinong Saanen goat FAS gene and the construction of recombinant adenovirus vector. *Acta Agr Boreal-Occident Sin*, 2010, 19(3): 6–12.
王伟, 罗军, 赵旺生, 等. 西农萨能羊 FAS 基因 shRNA 序列筛选及其腺病毒载体的构建. *西北农业学报*, 2010, 19(3): 6–12.
- [9] Jiang QL, Wang JM, Wen LM, et al. Establishing a realtime large-scale recombinant virus titering method taking GFP as marker gene. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2002, 23(9): 1034–1035.
江千里, 王健民, 温丽敏, 等. 批量快速测定法测定标志基因为 GFP 的重组病毒滴度. *第二军医大学学报*, 2002, 23(9): 1034–1035.
- [10] Osborne TF, Espenshade PJ. Evolutionary conservation and adaptation in the mechanism that regulates SREBP action: what a long, strange trip it's been. *Genes Dev*, 2009, 23(22): 2578–2591.
- [11] Walker AK, Jacobs RL, Watts JL, et al. A conserved SREBP-1/phosphatidylcholine feedback circuit regulates lipogenesis in metazoans. *Cell*, 2011, 147(4): 840–852.
- [12] Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, 2004, 86(11): 839–848.
- [13] Angulo J, Hiller B, Albrecht E, et al. Effect of different dietary fats on protein expression of sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) in mammary gland tissue of lactating cows. *Lives Sci*, 2012, 143(2/3): 300–304.
- [14] Rudolph MC, Monks J, Burns V, et al. Sterol regulatory element binding protein and dietary lipid regulation of fatty acid synthesis in the mammary epithelium. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(6): E918–E927.
- [15] Bécard D, Hainault I, Azzout-Marniche D, et al. Adenovirus-mediated overexpression of sterol regulatory element binding protein-1c mimics insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice. *Diabetes*, 2001, 50(11): 2425–2430.
- [16] Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, et al. SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes. *J Lipid Res*, 2007, 48(7): 1581–1591.
- [17] Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res*, 2001, 40(6): 439–452.
- [18] Fleischmann M, Iynedjian PB. Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt. *Biochem J*, 2000, 349(Pt1): 13–17.
- [19] Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16: 459–481.
- [20] Repa JJ, Liang GS, Qu JF, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β . *Genes Dev*, 2000, 14(22): 2819–2830.
- [21] Zhong Y. RNA interference and overexpression of LXR α gene on fatty acid metabolism in the mammary gland epithelial cell of dairy goat[D]. Shaanxi: Northwest A & F university, 2011.
钟瑜. LXR α 基因 RNA 干扰和过表达对奶山羊乳

- 腺上皮细胞脂肪酸代谢的影响[D]. 陕西: 西北农林科技大学, 2011.
- [22] Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, et al. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J Biol Chem*, 2006, 281(52): 40236–40241.
- [23] Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, et al. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell*, 1999, 4(4): 611–617.
- [24] Schoenborn V, Heid IM, Vollmert C, et al. The ATGL gene is associated with free fatty acids, triglycerides, and type 2 diabetes. *Diabetes*, 2006, 55(5): 1270–1275.
- [25] Tobin KAR, Steineger HH, Alberti S, et al. Cross-talk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver X receptor- α . *Mol Endocrinol*, 2000, 14(5): 741–752.
- [26] Walker AK, Näär AM. SREBPs: regulators of cholesterol/lipids as therapeutic targets in metabolic disorders, cancers and viral diseases. *Clin Lipidol*, 2012, 7(1): 27–36.

关于增设“生物育种和工艺优化”栏目暨征稿公告

鉴于近年来国家、各部委和地方科技部门加大了对生物技术应用研究的投入, 有关生物育种和反应工艺优化方面的来稿快速增加, 我刊拟从 2013 年新增“生物育种和工艺优化”栏目, 以便快速报道针对重要微生物、重要生物体系、通过发酵、酶催化或全细胞催化产生的重要生物产品工艺优化方面的研究。

1. 征稿范围

针对新的微生物, 或新的生物体系, 或新的生物产品; 或使用传统的诱变技术对动植物、微生物进行生物育种及反应工艺的优化改良, 实验结果在现有文献基础上有明显提高, 对工业生产或应用具有一定指导意义的研究论文, 均可投稿本栏目。

2. 栏目特色

2.1 发表快: 由于该类稿件具有一定的实用性, 反映了生物工程的特点, 同时也具有一定的时效性, 为了达到与同行及时交流研究成果的目的, 我刊为该专栏投稿提供绿色审理通道, 优先审理优先发表该专栏稿件, 审理周期 1~2 周, 录用后 1 个月内可网上优先发表, 3 个月内印刷出版。

2.2 篇幅短: 文章内容紧凑, 核心结果突出, 重点报道优化方法及实验设计、优化后的营养和环境条件等工艺参数, 以及优化前后的差别等核心结果。论文篇幅限制在 3 页以内, 图表一般不超过 3 个。

3. 投稿注意事项

投稿时, 请将栏目名称选为“生物育种和工艺优化”, 建议以附件的形式单独说明来稿的创新性或是工业指导意义。为加快审稿流程, 本专栏稿件免收审理费, 版面费 1500 元/篇。

欢迎广大读者、作者踊跃来稿。

《生物工程学报》编辑部

2012-10-25