

# 猪激素敏感脂肪酶(HSL)基因的研究概况

丁能水,黄路生,任 军,陈克飞

(江西农业大学 江西省动物生物技术重点开放实验室 南昌 330045)

**摘要:**激素敏感脂肪酶(HSL)基因影响着脂肪的沉积,它在表达或活性上的轻微变异均有可能影响猪的背膘厚和瘦肉率。从激素敏感脂肪酶的功能及作用机制出发,通过候选基因策略克隆出 HSL 基因,将其精确定位于猪 6 号染色体 6p1.1~1.2 上,进而分析了 HSL 及其基因的分子结构,比较 HSL 基因在不同物种间的同源性。不同产肉型猪种间存在 HSL 基因的多态性,籍此可为了解猪脂肪沉积的基因效应、寻找与背膘厚及瘦肉率相连锁的分子标记提供途径,最终实现利用 MAS、MAI 等技术手段提高猪的瘦肉率。

**关键词:**猪;HSL 基因;基因定位;脂肪沉积;多态性

中图分类号:Q953+.3

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2000)05-0331-03

## The Review on the HSL Gene Research

DING Neng-shui, HUANG Lu-sheng, REN Jun, CHEN Ke-fei

(Provincial Key Laboratory for Animal Biotechnology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** The HSL gene affects the accumulation of lipid and its small variation on the activity or gene expression can influence the lean percentage and backfat traits. Based on the function and acting mechanism, this gene was cloned by candidate approach and located on the porcine chromosome 6P1.1~1.2. The molecular structure of HSL and HSL gene were analyzed. The homologies was attained by comparison between different mammal animals. The polymorphism of the gene in different pig breeds was detected. This will help the understanding of the genic effect on porcine fat deposition. The HSL gene should be regarded as a candidate gene for fatness in pigs. It may have a potential use in MAS or MAI to increase the lean percentage of pig.

**Key words:** pig; HSL gene; gene localization; fat deposition

脂肪沉积是一个复杂的生理生化过程,受饮食、内分泌、神经及脂肪组织自身等多方面的调控。动物体内脂肪代谢始终处于动态之中,甘油三酯(TAG)合成和分解的状态及速率均会影响体内脂肪的积累。甘油三酯脂肪酶是 TAG 水解的限速酶,负责甘油三酯向甘油二酯的转化,因其活性受激素的控制,故被称为激素敏感脂肪酶(hormone sensitive lipase),简称 HSL 或 LIPE。

### 1 HSL 的作用机制及其调控

正常时,HSL 在动物体内存在活性和无活性两种形式,活性的 HSL 催化 TAG 水解为甘油二酯和非酯化脂肪酸。HSL 的活性受磷酸化或去磷酸化作用调控,当无活性型受到 cAMP-依赖性蛋白激酶的催化而被 ATP 磷酸化后,就转变为活性型;而活性型的则可通过作用于脂肪酶的磷酸酯酶去

磷酸化而失去活性。

HSL 的活性受一复杂的级联反应机制调控。在不同的生理状态下,机体会产生不同的激素平衡状态,使得 HSL 的活性及其作用机制都会有所改变。脂解作用激素主要有肾上腺素、去甲肾上腺素、胰高血糖素、生长激素、糖皮质激素、甲状腺激素、促肾上腺皮质激素(ACTH)、促甲状腺激素(TSH)等,其中肾上腺素、去甲肾上腺素和胰高血糖素属快速作用型,它们作用于脂肪细胞质膜表面的特异性受体后,使腺苷酸环化酶(cAMPase)激活,从而使脂肪细胞内的 ATP 转变为 cAMP,增加了 cAMP 的浓度,cAMP 又作为第二信使激活细胞内 cAMP-依赖性蛋白激酶,从而导致胞内无活性的 HSL 磷酸化转变成活性 HSL,进而发挥促脂解作用。而生长激素、糖皮质激素、甲状腺素则属慢促脂解作用型,甲状腺素的作用机制可能是促进快速促脂解激素的效应从质膜表面的受体

收稿日期:1999-11-15;修回日期:2000-03-27

基金项目:国家优秀青年教师基金及江西省跨世纪学术和技术带头人培养计划资助

作者简介:丁能水(1975-),男,江西省东乡县人,硕士研究生,专业:分子遗传学,E-mail:dingyd@fm365.com;Tel:0791-3818116

位点传递到质膜内表面的腺苷酸环化酶位点,同时它还能抑制 cAMP 磷酸二酯酶 (phosphodiesterase) 开环破坏 cAMP 生成 5' - AMP。抗脂解作用的激素有胰岛素、前列腺素 E1 及烟酸等。胰岛素的抗脂解激素效应,一方面是抑制腺苷酸环化酶,减少 cAMP 的合成;另一方面则通过激活 cAMP 磷酸二酯酶破坏 cAMP。此外,胰岛素还可通过促进 TAG 合成以抑制脂解。前列腺素 E1 和烟酸则通过阻断 cAMPase 抑制 cAMP 的合成,发挥抗脂解作用。

## 2 HSL 基因的定位

1988 年, Holm 等利用两个互补策略即表达文库的抗体筛选和根据牛 HSL 氨基酸序列构建寡核苷酸探针,从鼠的脂肪组织中克隆到 HSL 基因的全长 cDNA 序列,同时,他们利用鼠的 HSLcDNA 作为探针,通过和人-鼠杂种细胞 DNA 杂交,分离到人 HSL 基因,并将其定位于 19 号染色体 cent - q13.3 上<sup>[1]</sup>。1992 年, Gu 等利用鼠 HSLcDNA 探针进行原位杂交,将猪 HSL 基因定位于 6 号染色体 p11 - q21 上<sup>[3]</sup>。1994 年, Chowdhary 等进一步将猪 HSL 基因精确定位在 6p1.1 ~ 1.2 上<sup>[4]</sup>。猪 HSL 基因的 cDNA 序列和全长的 DNA 序列也相继被克隆和测序(Chowdhary 等, 1992; Harbitz 等, 1992)<sup>[4-5]</sup>。

## 3 HSL 及 HSL 基因的分子结构

近年来,对 HSL 基因的研究主要集中在人、牛和鼠类上,通过对不同物种的 HSL 基因的比较研究,发现 HSL 基因在物种间存在相当高的保守性。经典的 HSL 分子结构,含有三个相互独立的功能区域:调节区、催化区和脂质结合区域。

(1) HSL 调节区域 (regulatory region) 包括两个磷酸化位点:调节位点 (regulatory site) 和基本位点 (basal site)。调节区域两磷酸化位点的序列为: Met-Arg-Arg-Ser<sup>551</sup>-Val-Ser<sup>553</sup>-Glu-Ala-Ala。调节位点位于 HSL 的 3' COOH - 末端, Ser<sup>551</sup> 可被 cAMP - 依赖性蛋白激酶所磷酸化的特性是调节位点发挥作用的主要机制,该位点所在区域具有亲水和  $\alpha$  - 螺旋特性,这种结构特性使得 HSL 分子表面存在蛋白激酶进入的通道,从而行使调节 HSL 活性的功能。基本位点上的 Ser<sup>553</sup> 可被 5' - AMP - 活化蛋白激酶磷酸化,但并不能增强 HSL 的活性。这两个位点存在相互拮抗的作用,相互抑制彼此的磷酸化。

(2) 催化区 (catalytic region) 包含一个活化 Ser 位点在内的该区域的序列为 Gly - Asp - Ser - Ala - Gly (GDSAG), 具有疏水特性。该区域负责催化 HSL 的活性。

(3) 脂质结合区 (lipid binding region): 位于 3' C - 末端, 该区域的 8 个氨基酸序列 FLTLAALC 也有疏水的特性。其功能是在脂质 - 水的界面上锚定 HSL, 使其发挥脂解作用。

人 HSL 基因全长约 11kb, 包含 9 个外显子, 每个内含子剪接位点接头的序列遵循 GT/ AC (内含子两端分别邻接外显子的两个碱基) 的规则。通过人 HSL mRNA 的 5' 端引物延伸法分析, 发现转录起始位点位于翻译起始位点上游 632nt 处。猪 HSL 基因推定的 5' UTR 的启动子区域包含下列元件: 两段 TATA 序列、一个反向 CCAAT 盒, 两个不完全脂肪特异性元件 (FSE - 2) 拷贝以及 3 个糖皮质激素应答元件的拷贝, 此外, 还存在 6 个假定的 CPA 转录因子。hHSL 第一个外显子, 是最大的外显子, 除包含完整的 5' 端非翻译区外, 还编码一段 171 个氨基酸残基的多肽; 外显子 2 ~ 5, 长 91 ~ 295nt 不等, 聚簇在 -1.1kb 基因组区域内, 推定的催化位点和磷酸化位点分别由外显子 6 和 8 编码; 最后一个外显子 9 则编码一个可能的脂质结合区、3' 端非翻译区以及推定的 poly(A) 信号。

测序结果表明, 人与鼠的 HSL 基因 cDNA 有 86% 同源性, 人与猪的 HSL 基因 cDNA 序列有 80% 同源性, 它们具有类似的 HSL 基因结构, 包含 9 个外显子, 全长约 11kb。据此推导的大鼠 (Holm 等, 1988a, 1988b; Li 等, 1994)<sup>[1,2,7]</sup>、人 (Liang 等, 1993)<sup>[6]</sup>、小鼠 (Li 等, 1994)<sup>[7]</sup> 的氨基酸序列和猪的 HSL 基因推导氨基酸序列 (Harbitz 等, 1999)<sup>[8]</sup> 相比较, 假定的催化位点、调节和基本磷酸化位点以及脂质结合区域表现完全保守; 而猪和人、大鼠及小鼠间氨基酸序列的保守性分别为 85.2%、85.8% 和 85.5%; 以大鼠 HSL 蛋白为参照, 人和猪的 HSL 蛋白在紧靠活性调控 Ser 残基处缺失了 12 个氨基酸, 而小鼠则缺失了 6 个; 但不同物种间 HSL 氨基酸数目及其同源性的差异主要存在于 3' 羧基末端 (图 1 图 2)。

## 4 HSL 基因的分布、多态性及其对脂肪沉积的基因效应

Holm 等 1988 年用 RNA 印迹分析发现, HSL mRNA 水平在体内不同的组织中存在差异: 在空怀大鼠的卵巢中没有检

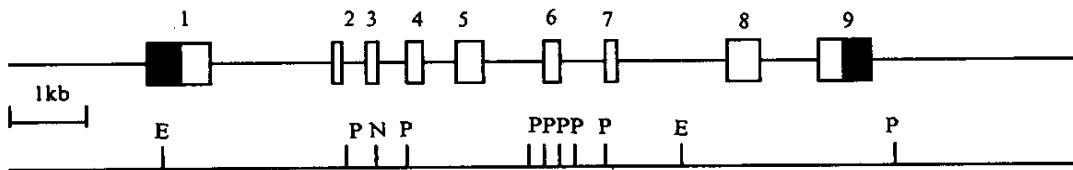


图 1 人 HSL 基因的结构简图

上图框 1 ~ 9 表示外显子, 横线表示内含子区域, 黑色部分为非编码区; 下图为一限制性内切核酸酶酶切图谱, E、N、P 分别代表 EcoRI、Not I、Pst I 酶切位点。

Fig. 1 Organization of the human HSL gene: Exons (boxes 1 ~ 9) and intronic regions are shown above a restriction map (E, EcoRI; N, Not I; P, Pst I). Noncoding regions are represented by hatched areas.

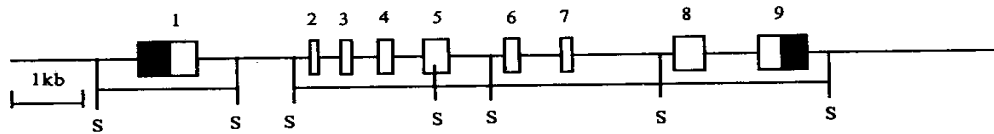


图 2 猪 HSL 基因的结构简图

框 1~9 表示外显子, 黑色部分为非编码区; 下面开放框为 *SacI* 限制性片段。

Fig. 2 Structure of the porcine hormone-sensitive lipase gene: Exon 1~9 are indicated by boxes; coding and non-coding regions by shaded and filled boxes, respectively. The *SacI*(S) restriction fragments sequenced are indicated by the open boxes.

测到 HSL mRNA, 而在怀孕动物的卵巢中存在 HSL 的 mRNA, 原因可能是孕酮产生过程中存在高活性的妊娠黄体; 心肌和骨骼肌的总 RNA 中也不能检测到 HSL mRNA, 只有一些微弱的 poly(A)<sup>+</sup>RNA 信号, 这是因为肌肉中 HSL 的表达量很低, 少于脂肪组织中的 2%; 同时检测到三类具有组织特异性分布的不同大小的 mRNA, 脂肪组织和肾上腺表达 3.3kb 的 HSL mRNA, 心肌、骨骼肌和胎盘的 HSL mRNA 则为 3.5kb, 而睾丸产生的是 3.9kb 的 HSL mRNA, 通过多聚 A 信号进行不同方式的剪接或具有多个转录起始位点可能是造成不同组织中 HSL mRNA 大小各异的主要原因。

Harbitz 等(1999)对 PiGMap 参考家系苏格兰支系的 8 个梅山 × 大白祖代群, 进行 HSL 基因的 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 多态性分析。RFLP 分析覆盖 4 个基因片段区域共 4169bp: 包括启动子 5'UTR 的 886bp, 外显子 7 至内含子 7 间的 767bp, 内含子 7 中的 1038bp, 以及内含子 7 至外显子 9 间的 1478bp。分别用了 7 种、5 种、4 种和 8 种限制性内切核酸酶进行相应区域的多态性鉴别。结果发现内含子 7 的 1167bp~1167bp 处有一 *Alu* 多态性位点。SSCP 的分析则包含了 6 个基因片段区域共 1797bp: 启动子区域上的 298bp, 5'UTR 区域 324bp, 外显子 6 至内含子 7 间的 299bp, 外显子 8 上的 312bp, 以及 3'UTR 上的 312bp 和 252bp。在外显子 8 上发现存在一 G→T 的碱基变异, 它引起相应的氨基酸 Glu→Asp 变化<sup>[8]</sup>。

杨再清等(1996)曾以两个 8 月龄瘦肉率、背膘厚和脂肪率分别相差 -9.44% ( $P < 0.01$ )、7.97% 和 18.01% ( $P < 0.05$ ) 的混系和丹系长白肥育猪为研究材料, 发现丹系长白猪血浆 cAMP、HSL 和 FFA(游离脂肪酸) 分别比混系高 32.85% ( $P < 0.05$ )、7.41% 和 23.41%, 证明通过 cAMP 调控 HSL 对猪脂肪沉积的作用具有明显的品系差异。<sup>[9]</sup> 吴桢芳(1998)分析了 55 头梅山猪、50 头通城猪、58 头大白猪和 48 头长白猪 HSL 基因的 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 多态性: RFLP 分析得到梅山猪中等位基因 R(无 *Alu* 位点) 和等位基因 Q(有 *Alu* 位点) 的频率分别为 64.5% 和 35.5%, 表现出三种基因型 PP、PQ 和 QQ, 而脂肪型的地方猪种通城猪其 HSL 的基因型全为 PP, 大白和长白猪基因型全为 QQ; SSCP 分析, 表现三种基因型 MM、MN 和 NN, 其中梅山猪和通城猪含有更多的等位基因 M, 分别占 69.5% 和 74%, 而大白和长白猪则含有更多的等位基因 N, 分别占 84.7% 和 84.5%<sup>[10]</sup>。这表明, HSL 基因在瘦肉型和脂肪型猪种间存在明显的多态

性。在大白 × 梅山和皮特兰 × 抗应激两杂交猪群中, HSL 基因的多态性与猪背膘厚呈显著相关。

HSL 基因内含子 7 上的 *Alu* 多态位点位于编码调节区域磷酸化位点外显子 8 之前, 推测该位点的变异可能对 HSL 基因的表达有一定的影响。而外显子 8 上的氨基酸变异是在距调节区域 60 个氨基酸范围之内, 它有可能影响了调节区域的功能, 改变了 HSL 的活性或 HSL 基因的表达过程, 进而对脂肪的沉积产生影响。

#### 参考文献:

- [1] Holm C, Kirchgessner T G, Svenson K L, et al. Hormone-sensitive lipase: sequence, expression and chromosomal localization to 19centq 13.3 [J]. Science, 1988a, 241: 1503~6.
- [2] Holm C, Kirchgessner T G, Svenson K L, et al. Nucleotide sequence of rat adipose hormone sensitive lipase Cdna [J]. Nucleic Acids Research, 1988b, 16: 9879.
- [3] Gu F, Harbitz I, Chowdhary B P, et al. Chromosomal localization of the hormone sensitive lipase (LIPE) and insulin receptor (INSR) genes in pigs [J]. Hereditas, 1992, 117: 231~236.
- [4] Chowdhary B P, Thomsen P D, Fllegren H, et al. Precise localization of some genetic markers in pigs using non-radioactive in situ hybridization [J]. Animal Genetics, 1992, 23: 92.
- [5] Harbitz I, Kristensen T, Kran S M, et al. Isolation and sequencing of porcine lipoprotein lipase cDNA and its use in multiallelic restriction fragment length polymorphism detection [J]. Animal Genetics, 1992, 23: 517~522.
- [6] Langin D, Laurell H, Holst L S, et al. Gene organization and primary structure of human hormone-sensitive lipase: possible significance of a sequence homology with a lipase of moraxella TA144, an antarctic bacterium [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1993, 90: 4897~901.
- [7] Li Z, Sumida M, Birchbauer A, Schotz M C, et al. Isolation and characterization of the gene for mouse hormone-sensitive lipase [J]. Genomics, 1994, 24: 259~65.
- [8] Harbitz I, Langset M, Ege A G, et al. The porcine hormone-sensitive lipase gene: sequence, structure, polymorphisms and linkage mapping [J]. Animal Genetics, 1999, 30: 10~15.
- [9] 杨在清, 马志科, 孙超, 等. 猪脂肪沉积的品系差异及其 cAMP 的调控作用 [J]. 畜牧兽医学报, 1996, 27(6): 489~494.
- [10] 吴桢芳. HSL 和 LPL 作为猪脂肪沉积性状候选基因的研究 [D]. 博士学位论文, 武汉: 华中农业大学, 1998.