

PPAR- γ 在八眉猪不同组织中的表达差异

王 博, 吴江维, 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: 以八眉猪为试验材料, 提取其内脏脂肪、皮下脂肪、肌肉、肾脏、肝脏、心脏、肺脏和脾脏总 RNA 和总蛋白质, 设计合成 PPAR- γ 1 和 PPAR- γ 2 基因的引物, 以猪 β -actin 基因为内参, 用半定量 (Semi-Quantitative, SQ) RT-PCR 检测 PPAR- γ 1 和 PPAR- γ 2 mRNA 在以上各组织中的表达; 用免疫印迹技术 (Western Blot) 检测以上各组织中 PPAR- γ 1 和 PPAR- γ 2 蛋白的表达。结果显示, PPAR- γ 1 mRNA 及蛋白在以上各组织均表达, 在内脏脂肪和皮下脂肪组织中表达水平显著高于其他组织, 在肺脏中表达水平最低; PPAR- γ 2 mRNA 和蛋白质高表达于内脏脂肪、皮下脂肪、脾脏和心脏, 而在肺脏、肾脏、肝脏、肌肉中表达水平很低。结果提示, PPAR- γ 在不同组织的表达差异, 可能与其在不同组织中的功能有关。

关键词: PPAR- γ 1; PPAR- γ 2; 组织表达; 猪

中图分类号: S828.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)03-0273-05

Tissue Differential Expression of PPAR- γ in Bamei Pig

WANG Bo, WU Jiang-wei, YANG Gong-she*

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

Abstract: Total RNA and protein were extracted from visceral adipose tissue, subcutaneous adipose tissue, skeletal muscle, kidney, liver, heart, lung and spleen of Bamei pig. The primers of PPAR- γ 1 and PPAR- γ 2 were designed and synthesized. The specific expression of PPAR- γ 1 and PPAR- γ 2 in different tissues were investigated by Semi-Quantitative RT-PCR and Western Blot. The results showed that the mRNA and protein of PPAR- γ 1 were expressed in all above-mentioned tissues, and highly expressed in visceral adipose tissue, subcutaneous adipose tissue and lower expressed in lung; PPAR- γ 2 mRNA and protein were highly expressed in visceral adipose tissue, subcutaneous adipose tissue, spleen and heart, while remarkable lower in lung, kidney, liver and muscle. In conclusion, the results suggested that PPAR- γ might have various effects on different tissues of pig.

Key words: PPAR- γ 1; PPAR- γ 2; tissue expression; pig

猪是肥胖程度最高的肉用家畜, 我国地方猪种在这方面尤为突出, 八眉猪属于我国优良地方品种, 肉细腻, 风味佳, 但生长速度慢, 脂肪沉积能力强^[1], 严重影响了其经济性能。近年来发现了多个调控脂肪沉积的基因, 过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (Peroxisome proliferators-activated receptor- γ ,

PPAR- γ) 就是其中最重要的基因之一^[2-3], 它是一个配体激活的转录因子, 为核激素受体超家族的一员^[4], 不但调控多种细胞增殖和分化相关基因的表达^[5], 而且也调控脂质生物合成和糖代谢相关基因的表达^[6]。PPAR- γ 有两个亚型, 由同一基因编码, 但启动子和 mRNA 剪接形式不同, 它们分别为

收稿日期: 2007-02-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (2004CB117506)

作者简介: 王 博 (1982-), 男, 陕西华县人, 硕士生, 主要从事动物生物技术研究, E-mail: wangbo0117@gmail.com

* 通讯作者: 杨公社, Tel: 029-87092430, Fax: 029-87092430, E-mail: gsyang999@hotmail.com

PPAR- γ 1 和 PPAR- γ 2^[7]。近年来对 PPAR- γ 的研究大都集中在人和啮齿动物上,未见其在猪不同组织表达的报道。本研究旨在通过 SQ RT-PCR 和 Western blot 方法检测八眉猪不同组织中 PPAR- γ 的两个亚型 PPAR- γ 1 和 PPAR- γ 2,在 mRNA 和蛋白水平的表达差异,明确其不同组织中的表达规律,为进一步研究猪脂肪沉积的调控和品种选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本组织来源 八眉猪由宝鸡市苜蓿农场提供。八眉猪屠宰后迅速取出心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉、内脏脂肪和皮下脂肪组织,切块,每块重约 25 g,铝箔包装并标记,立即置于液氮中冷却,之后放入 -70°C 保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 TRNzol_总 RNA 提取试剂(天为时代生物技术有限公司),Revert- AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit[#] K1621(Fermentas),Taq DNA Polymerase[#] EP0402(Fermentas),反转录和 PCR 反应均在 myc1e(Bio-Rad, Inc.)PCR 仪上进行,PPAR- γ 抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc. SC-7273),二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,ZB-2305)。 β -actin 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,bs-0061R),二抗(武汉博士德生物工程有限公司,BA1054),Super ECL Plus 超敏发光液(北京普利莱基因技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 检测 PPAR- γ mRNA 的表达

1.2.1.1 组织总 RNA 提取:组织在液氮中研成粉末,取 60 mg 加入 1.5 mL 离心管,立即加入 1 mL TRNzol_总 RNA 提取试剂,之后按 TRNzol_总 RNA 提取试剂操作说明操作。测定总 RNA 的浓度和完整性,置于 -70°C 保存。

1.2.1.2 引物的设计与合成:PPAR- γ 1 基因引物根据 GenBank 中猪的 PPAR- γ 1 基因序列 AJ006756 设计:Sense:5' CAACCTTCCTGTATGTTAGTGG3', Antisense:5' CCTGATGGCGT-TATGAGACA3',预期产物长度 595 bp,PPAR- γ 2 基因引物根据 GenBank 中猪的 PPAR- γ 2 基因序列 AF059245 设计:Sense:5' TTATTGACCCAGAAAGCGAT3', Antisense:5' TATGGCACTTTGGT AGTCCTG3',预期产物长度 289 bp, β -actin 基因引

物: Sense:5' ACTGCCGCATCCTCTTCCTC3', Antisense:5' CTCCTGCTTGCTGATCCACATC3',预期产物大小为 399 bp,引物均由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2.1.3 RT-PCR 反应: RT 反应:取 7 μL 提取的总 RNA,按 Fermentas RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit[#] K1621 试剂盒推荐的方法以随机六聚体为引物合成 cDNA 第一链。PCR 反应:50 μL 反应体系中含有:30.5 μL 灭菌的二蒸水、5 μL 10 \times PCR buffer (NH₄)₂ SO₄、5 μL 2 mmol/L dNTPs Mix、1 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 I、1 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 II、3 μL 25 mmol/L MgCl₂、2.5 μL 0.5U/ μL Taq DNA Polymerase、2 μL cDNA 模板。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,56.5 $^{\circ}\text{C}$ (PPAR- γ 1)/58 $^{\circ}\text{C}$ (PPAR- γ 2)/56.8 $^{\circ}\text{C}$ (β -actin) 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,28 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 30 min。

2.5 μL PCR 扩增产物与 0.5 μL 6 \times Loading buffer 混合,在 1% 的含溴化乙啶的琼脂糖凝胶中电泳,Dolphin-DOC 凝胶成像系统照相并分析图像,测定各条带的 OD 值,结果用 PPAR- γ 1、PPAR- γ 2 基因和 β -actin 电泳带 OD 值的比值表示。

1.2.2 Western blot 检测 PPAR- γ 表达 组织总蛋白提取:组织在液氮中研成粉末,取 100 mg 加入 1.5 mL 离心管,再加入 1 mL 组织裂解液^[8],4 $^{\circ}\text{C}$ 充分混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 10 min,取上清,留一部分检测蛋白质浓度,其余与等体积上样缓冲液混匀,100 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, -70°C 保存。

蛋白电泳:取蛋白样品 80 μg ,上样,以 80 V 电压,在 12% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中分离约 2 h 后,转移至 PVDF 膜上。蛋白免疫印迹:5% BSA 室温封闭 2 h,一抗(PPAR- γ 为 1:300, β -actin 为 1:200)室温孵育 2 h,二抗(PPAR- γ 为 1:3 000, β -actin 为 1:4 000)室温孵育 2 h,ECL 发光液混合后作用 PVDF 膜 3 min,压 X 光片 1 min,X 光片显影和定影。

1.3 统计分析

用 SPSS 13.0 软件对试验数据进行单因素方差分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,显示为柱状图。

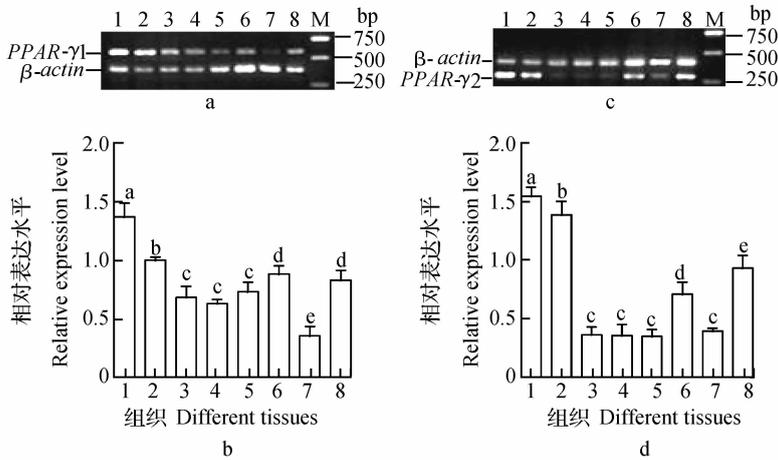
2 结果与分析

2.1 PPAR- γ mRNA在八眉猪不同组织的表达

选择4种不同的循环次数,分别扩增PPAR- γ 1、PPAR- γ 2和 β actin基因,最后确定循环次数为28次,PPAR- γ 1、PPAR- γ 2和 β actin 28次循环扩增后,所有样品的扩增条带经Dolphin-DOC数据转换系统转换后,每个组织样扩增条带中PPAR- γ 1、PPAR- γ 2的转换OD值与 β actin的值相比,即得PPAR- γ 1、PPAR- γ 2 mRNA的相对表达丰度。

各组数据经SPSS13.0软件分析后,结果显示,PPAR- γ 1 mRNA在各组织均表达,在内脏脂肪组织中表达水平显著地高于其他组织($P < 0.05$),在

皮下脂肪组织中显著地高于脾脏、心脏、肝脏、肺脏、肾脏和肌肉组织($P < 0.05$),在脾脏和心脏中显著地高于肝脏、肾脏、肺脏和肌肉组织($P < 0.05$),在肺脏中表达水平显著地低于其他组织($P < 0.05$)(图1a,1b)。PPAR- γ 2 mRNA在内脏脂肪中表达水平显著地高于其他组织($P < 0.05$),在皮下脂肪组织中显著地高于脾脏、心脏、肌肉组织、肾脏、肝脏和肺脏($P < 0.05$),在脾脏中显著地高于心脏、肝脏、肺脏、肾脏和肌肉组织($P < 0.05$),在心脏中显著地高于肝脏、肺脏、肾脏和肌肉组织($P < 0.05$)(图1c,1d)。图中不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。



1. 内脏脂肪;2. 皮下脂肪;3. 肌肉;4. 肾脏;5. 肝脏;6. 心脏;7. 肺脏;8. 脾脏;M. Marker。下同
1. Visceral adipose;2. Subcutaneous adipose;3. Muscle;4. Kidney;5. Liver;6. Heart;7. Lung;8. Spleen;M. Marker DL2000. The same as below

图1 八眉猪不同组织中PPAR- γ 1(a)、PPAR- γ 2(c)及内参 β actin基因RT-PCR产物电泳图,和PPAR- γ 1(b)及PPAR- γ 2(d)mRNA的表达

Fig. 1 Electrophoresis result of PPAR- γ 1(a)、PPAR- γ 2(c)and β actin RT-PCR products and expression of the PPAR- γ 1 (b)and PPAR- γ 2 (d) mRNA in Bamei porcine tissues

2.2 PPAR- γ 蛋白在八眉猪不同组织的表达

不同组织样经Western blot检测,Dolphin-DOC凝胶成像系统软件测定各条带吸光度,计算PPAR- γ 1、PPAR- γ 2与 β actin条带吸光度的比值,用SPSS 13.0软件分析组数据,结果显示,PPAR- γ 1在内脏脂肪组织中表达水平显著地高于其他组织($P < 0.05$),在皮下脂肪组织中显著地高于脾脏、心脏、肝脏、肺脏、肾脏和肌肉组织($P < 0.05$),在脾脏、心脏、肾脏和肌肉组织中显著地高于肝脏和肺脏($P < 0.05$),在肝脏中显著地高于肺脏($P <$

0.05)(图2b)。PPAR- γ 2在内脏脂肪中表达水平显著地高于其他组织($P < 0.05$),在皮下脂肪组织中显著地高于脾脏、心脏、肌肉组织、肾脏、肝脏和肺脏($P < 0.05$),在脾脏中显著地高于心脏、肝脏、肺脏、肾脏和肌肉组织($P < 0.05$),在心脏中显著地高于肝脏、肺脏、肾脏和肌肉组织($P < 0.05$),在肌肉组织和肾脏中显著地高于肝脏和肺脏($P < 0.05$),在肺脏中显著地高于肝脏($P < 0.05$)(图2c)。图中不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

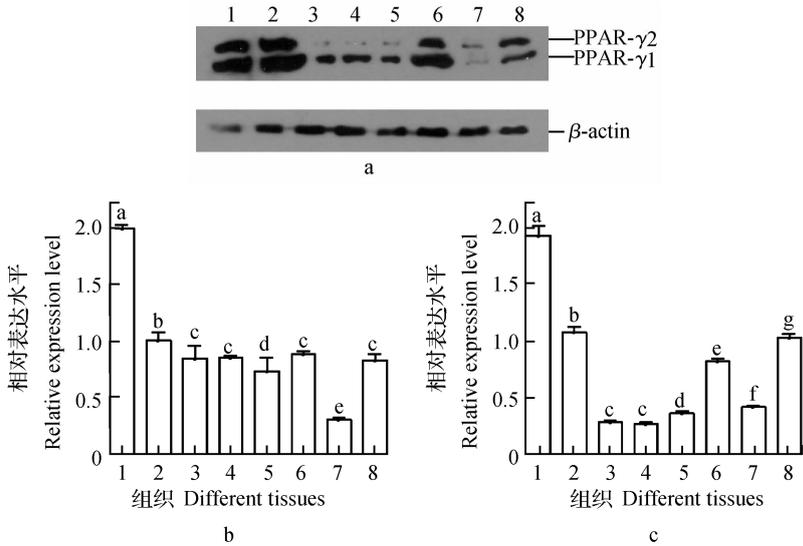


图2 八眉猪不同组织中 PPAR- γ 1、PPAR- γ 2 及内参 β -actin 免疫印迹检测结果 (a), 和 PPAR- γ 1 (b) 及 PPAR- γ 2 (c) 蛋白的表达

Fig. 2 Western Blot result of PPAR- γ 1、PPAR- γ 2 and β -actin protein (a) and expression of the PPAR- γ 1 (b) and PPAR- γ 2 (c) protein in Bamei porcine tissues

3 讨论

研究表明, PPAR- γ 在体内的分布具有组织特异性, Mukherjee 等用 Northern blot 在人的心脏、肝脏、肾脏、脂肪组织及肌肉组织中检测到了 PPAR- γ 的表达^[9]。本研究发现, PPAR- γ 在猪的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、脂肪组织和肌肉组织均表达, 该结果与 Mukherjee 的研究结果基本一致。另有报道指出, PPAR- γ 在大鼠的白色脂肪组织、脾脏、肾脏中表达, 在肝脏和心脏中未发现其表达^[10], 与本研究结果不一致, 这可能是物种间差异所致。因此, 本试验也为猪作为一种研究人类肥胖及其相关疾病的模型动物比啮齿动物更合适的观点^[11-12] 提供又一佐证。

PPAR- γ 1 和 PPAR- γ 2 在体内分布也具有其自身的特点, PPAR- γ 1 在多种组织中表达, 而 PPAR- γ 2 是脂肪组织所特有的^[7], 而 Vidal-Puig 等用 Northern blot 在大鼠的骨骼肌中检测到 PPAR- γ 1 的同时也检测到 PPAR- γ 2 的 mRNA 的表达^[13-14], 本研究发现 PPAR- γ 2 在内脏脂肪、皮下脂肪、脾脏、心脏、肺脏、肾脏、肝脏和肌肉组织中均表达, 但在肺脏、肾脏、肝脏、肌肉中表达水平明显低于 PPAR- γ 1, 这些结果的不一致需要进一步证实。同时, PPAR- γ 1 和 PPAR- γ 2 在同一组织表达差异的机理有待进一步研究。它们在同一组织的表达差异

也提示, PPAR- γ 1 和 PPAR- γ 2 在同一组织可能具有不同的功能。

皮下脂肪组织和内脏脂肪组织有其发育和分布的特点, 有学者报道, PPAR γ 能降低血浆游离脂肪酸水平, 调节脂肪在内脏和皮下的分布^[15]。本研究发现 PPAR γ 在猪内脏脂肪组织表达水平显著高于皮下脂肪组织, 此结果提示, 这种差异可能是调控脂肪组织在内脏和皮下分布不同的一个关键因素, 但 PPAR- γ 调节体脂分布的具体机制尚需深入研究。

有报道指出, PPAR- γ 在免疫系统有高水平的表达^[16], 而脾脏作为机体免疫器官在免疫系统起着重要的作用, 本研究在脾脏中也检测到 PPAR- γ 高水平的表达, 与以往报道相一致^[10]。PPAR- γ 能调节免疫细胞分泌肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)^[17] 和白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)^[18] 等炎症细胞因子, 脂肪组织也可分泌 TNF- α ^[19] 和 IL-6^[20], 而本研究发现 PPAR- γ 在脂肪组织和脾脏均有高水平的表达, 脂肪组织对细胞因子如 TNF- α 和 IL-6 的分泌等是否同免疫细胞一样也受到 PPAR- γ 调节, 是一个值得探讨的问题。

参考文献:

- [1] 吴江维, 孙超, 杨公社. SQ-PCR 检测不同品种猪脂肪组织 SOCS-3 基因表达[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(3): 222-226.

- [2] LOWELL B B. PPAR γ : an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function[J]. *Cell*, 1999,99(3):239-242.
- [3] SHARMA A M, STAELS B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue-understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007,92(2):386-395.
- [4] EVANS R M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily[J]. *Science*, 1988,240(4 854):889-895.
- [5] FARMER S R. Regulation of PPAR γ activity during adipogenesis[J]. *Int J Obes*, 2005,29(1):13-16.
- [6] ABDELRAHMAN M, SIVARAJAH A, THIEMERMANN C. Beneficial effects of PPAR-gamma ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock[J]. *Cardiovasc Res*, 2005,65(4):772-781.
- [7] GURNELL M. PPAR γ and metabolism: insights from the study of human genetic variants[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003,59(3):267-277.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 费里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社,1992:880-898.
- [9] MUKHERJEE R, JOW L, CROSTON G E, et al. Identification, characterization and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPAR gamma2 versus PPAR gamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists[J]. *J Biol Chem*, 1997,272(12):8 071-8 076.
- [10] BRAISSANT O, FOUFELLE F, SCOTTO C, et al. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta and -gamma in the adult rat[J]. *Endocrinology*, 1996,137(1):354-366.
- [11] BELLINGER D A, MERRICKS E P, NICHOLS T C. Swine models of type 2 diabetes mellitus: insulin resistance, glucose tolerance and cardiovascular complications[J]. *ILAR J*, 2006,47(3):243-258.
- [12] LARSEN M O, ROLIN B. Use of the Gottingen minipig as a model of diabetes, with special focus on type 1 diabetes research[J]. *ILAR J*, 2004,45(3):303-313.
- [13] VIDAL-PUIG A, JIMENEZ-LINAN M, LOWELL B B, et al. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents[J]. *J Clin Invest*, 1996,97(11):2 553-2 561.
- [14] BODEN G, LAAKSO M. Lipids and glucose in type 2 diabetes: what is the cause and effect[J]. *Diabetes Care*, 2004,27(9):2 253-2 259.
- [15] TSAI Y S, MAEDA N. PPAR γ : a critical determinant of body fat distribution in humans and mice [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2005,15(3):81-85.
- [16] CLARK R B, BISHOP-BAILEY D, ESTRADA-HERNANDEZ T, et al. The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses[J]. *J Immunol*, 2000,164(3):1 364-1 371.
- [17] HONG G, DAVIS B, KHATOON N, et al. PPAR gamma-dependent anti-inflammatory action of rosiglitazone in human monocytes: suppression of TNF alpha secretion is not mediated by PTEN regulation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003,303(3):782-787.
- [18] JIANG C, TING A T, SEED B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines[J]. *Nature*, 1998,391(6 662):82-86.
- [19] WINKLER G, KISS S, KESZTHELYI L, et al. Expression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF-alpha, soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level[J]. *Eur J Endocrinol*, 2003,149(2):129-135.
- [20] KELLER C, KELLER P, MARSHAL S, et al. IL-6 gene expression in human adipose tissue in response to exercise--effect of carbohydrate ingestion [J]. *J Physiol*, 2003,550(Pt 3):927-931.