

冷驯化对中缅树鼩 PPAR α 、COX II 及 PGC-1 α 基因表达量的影响

侯东敏¹, 章迪², 余婷婷¹, 王政昆¹, 高文荣¹, 朱万龙^{1*}

(1. 云南省高校西南山地生态系统动植物生态适应进化及保护重点实验室, 云南师范大学生命科学学院, 昆明 650500;
2. 云南经济管理学院, 昆明 650106)

摘要: 为了研究冷驯化条件下中缅树鼩 *Tupaia belangeri* 的脂肪组织是否会转化, 本研究测定了冷驯化条件下中缅树鼩脂肪组织质量, 脂肪转化因子过氧化物酶体增殖激活受体 α (PPAR α)、环氧化酶-2 (COX II) 及过氧化物酶体增殖物受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α) 基因表达量的变化。结果表明: 中缅树鼩冷驯化组无论是褐色脂肪组织 (BAT) 质量, 还是大网膜白色脂肪组织 (WAT) 质量均较对照组显著增加 ($P < 0.01$), 脂肪转化因子 PPAR α 、COX II 及 PGC-1 α 基因表达量也显著上调 ($P < 0.01$)。以上结果说明中缅树鼩 WAT 中 PPAR α 、COX II、PGC-1 α 基因表达量的增加可能诱导了 WAT 细胞褐变, 进而向 BAT 细胞转化和提高 BAT 中解偶联蛋白 1 的表达。

关键词: 中缅树鼩; 脂肪组织; 冷驯化

中图分类号: Q95-33 文献标志码: A 文章编号: 1000-7083(2017)01-0034-05

Effect of Cold Exposure on the Expressions of PPAR α , COX II and PGC-1 α in *Tupaia belangeri*

HOU Dongmin¹, ZHANG Di², YU Tingting¹, WANG Zhengkun¹, GAO Wenrong¹, ZHU Wanlong^{1*}

(1. Key Laboratory of Ecological Adaptive Evolution and Conservation on Animals-Plants in Southwest Mountain Ecosystem of Yunnan Province Higher Institutes College, School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China;
2. Yunnan College of Business Management, Kunming 650106, China)

Abstract: In order to investigate whether the adipose tissue of *Tupaia belangeri* would be transformed under cold acclimation, the mass of adipose tissue, changes of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), cyclooxygenase-2 (COX II) and peroxisome proliferators-activated receptor- γ coactivator-1 (PGC-1 α) genes were measured in the present study. The results showed that mass of brown adipose tissue and omental white adipose tissue, the mRNA expressions of PPAR α , COX II and PGC-1 α genes were increased extreme significantly under cold exposure compared with control ($P < 0.01$). And these indicated that the increased expressions of PPAR α , COX II and PGC-1 α genes under cold condition may cause the transformation of white adipose tissue to browning beige adipocyte, which then transformed to brown adipose tissue and increase the level of uncoupling protein 1 in brown adipose tissue.

Keywords: *Tupaia belangeri*; adipose tissue; cold exposure

动物在野外生存面临许多环境因子的胁迫, 尤其是在冬季, 如环境温度较低和食物资源较差 (Voltura & Wunder, 1998)。当环境温度较低时, 小型哺乳动物会表现出生理、行为等方面的适应性特征变化 (Feder & Block, 1991), 而这往往会影响到其野外的生存策略 (朱万龙等, 2008)。生理上, 小型哺乳动物通常会在低温环境下增加产热能力, 其主要的适应性产热 (非

颤抖性产热) 发生器官是褐色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT)。已有研究表明: 低温条件下小型哺乳动物的白色脂肪组织 (white adipose tissue, WAT) 可以褐变, 进而向 BAT 转化 (Cypess *et al.*, 2009; van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009; Enerback, 2010; Bircerdinc *et al.*, 2013), 从而提高其产热能力。其中几种重要的脂肪转化因子起着重要的作用, 如 COX II 和

收稿日期: 2016-08-31 接受日期: 2016-11-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31660121); 联合支持国家计划项目 (2015GA008); 云南省科技计划重点项目 (2016FA045)

作者简介: 侯东敏 (1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 动物生理生态, E-mail: hou192@163.com

* 通信作者 Corresponding author, 男, 副教授, 主要从事动物生理生态研究, E-mail: zwl_8307@163.com

PGC-1 α 能诱导 WAT 中 BAT 细胞的形成 (Gesta *et al.*, 2007; Madsen *et al.*, 2010; Vegiopoulos *et al.*, 2010), PPAR α 能诱导原代 BAT 细胞和 BAT 中解偶联蛋白 1 (uncoupling protein 1, UCP1) 的表达 (Feder & Block, 1991)。这 3 种转录因子在冷驯化条件下表达量上调, 可以使 WAT 褐变向 BAT 转化, 从而增加动物的产热能力 (Bierdinc *et al.*, 2013)。

中缅树鼩 *Tupaia belangeri* 主要栖息在热带、亚热带地区, 为东洋界特有的小型哺乳动物。研究表明树鼩科 Tupaiidae 动物由南向北扩散, 即支持“岛屿起源”假说 (Olson *et al.*, 2005), 而本研究组之前的研究也支持这一假说 (王政昆等, 1994, 1995, 1999; 张武先等, 2002)。目前, 实验动物的研发趋向动物体型小型化发展, 树鼩因体型较小 (一般为 80 ~ 150 g)、进化地位和灵长类相似、人工繁殖和饲养成本较低, 近年来已被广泛用作生物、医学等科学研究的实验动物 (Kawamichi & Kawamichi, 1979)。本研究组先前的研究结果指出, 中缅树鼩在冷驯化条件下的产热、BAT 质量和 UCP1 含量显著增加 (王政昆等, 1995), 那么在该环境下中缅树鼩的 WAT 是否会向 BAT 转化, 导致 BAT 质量和 UCP1 含量增加, 从而增加其产热能力? 本研究在此假设的基础上, 在冷驯化条件下测定中缅树鼩的脂肪组织质量, 脂肪转录因子 PPAR α 、COX II 及 PGC-1 α 基因表达量, 来验证低温条件下中缅树鼩的 WAT 是否会褐变, 进而向 BAT 转化。

1 材料与方法

1.1 动物来源

中缅树鼩捕自云南省昆明市禄劝县的灌丛中, 于云南师范大学生命科学学院动物饲养房 (昆明) 单笼室温饲养 (温度 25 \pm 1 $^{\circ}$ C, 光照 12L:12D)。饲料为标准的雏鸡饲料 (昆明生产的产蛋雏鸡饲料), 熟喂, 自由饮水。实验动物均为成年非繁殖期个体。

1.2 动物处理

预适应 1 周后进行正式实验, 随机分成 2 组: 对照组和冷驯化组 (每组各 10 只), 实验前, 2 组动物体质量差异无统计学意义。冷驯化组在温度 5 \pm 1 $^{\circ}$ C, 光照 12L:12D 环境中驯化 28 d; 对照组在温度 25 \pm 1 $^{\circ}$ C, 光照 12L:12D 环境中驯化 28 d。驯化期间动物可以自由取食和饮水。2 组动物于 28 d 后断颈处死, 称量其大网膜 WAT 和肩胛骨间 BAT 质量, 取出皮下 WAT 于 -80 $^{\circ}$ C 保存, 用于相关脂肪转

录因子基因表达量的测定。

1.3 表达量测定

1.3.1 RNA 提取及纯度鉴定 皮下脂肪组织总 RNA 的提取与纯化根据 RNApure 高纯总 RNA 快速抽提试剂盒 (BioTeke Co.) 提供的方法进行。通过琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 纯度和完整性检验。提取的总 RNA 置于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.2 cDNA 第一链合成 第一链的合成以皮下脂肪组织总 RNA 为模板, 根据 FastQuant RT Kit (With gDNase) 试剂盒提供的方法进行。基因组 DNA 的去除体系包括: 2 μ L 5 \times gDNA Buffer, 4 μ L 总 RNA, 4 μ L Rnase-Free ddH₂O, 配制体积 10 μ L, 混匀。离心, 42 $^{\circ}$ C 孵育 3 min。然后置于冰上。反转录反应体系包括: 2 μ L 10 \times Fast RT Buffer, 1 μ L RT Enzyme Mix, 2 μ L FQ-RT Primer Mix, 5 μ L Rnase-Free ddH₂O, 配制体积 10 μ L。将反转录反应中的 Mix 加到 gDNA 去除步骤的反应液中, 充分混匀。42 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 95 $^{\circ}$ C 孵育 3 min 之后放于冰上, 得到的 cDNA 低温保存。

1.3.3 PPAR α 、COX II 及 PGC-1 α 基因 cDNA 序列的扩增 根据已知脊椎动物 PPAR α 、COX II 及 PGC-1 α 基因氨基酸保守序列设计引物 (表 1) (章迪等, 2014)。以上述 cDNA 第一链为模板进行 RT-PCR, 扩增条件均为: 95 $^{\circ}$ C 变性 4 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 54 ~ 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 37 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增体系为 50 μ L: 1 μ L 模板 (10 ng \cdot μ L⁻¹), 1 μ L 上游引物 (10 pmol \cdot μ L⁻¹), 1 μ L 下游引物 (10 pmol \cdot μ L⁻¹), 4 μ L dNTP (10 mmol \cdot L⁻¹, pH8.0), 1 μ L Taq 酶 (4 U \cdot μ L⁻¹), 5 μ L 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺), 37 μ L ddH₂O。扩增产物效果见图 1。

1.3.4 实时荧光定量 PCR (FQ-PCR) 模板 cDNA 用 ABI-7000™ 实时荧光 PCR 仪进行扩增, 同时检测荧光信号。FQ-PCR 反应体系依照 SYBR Green

表 1 扩增中缅树鼩 PPAR α 、COX II、PGC-1 α 引物
Table 1 Primers used for amplifying PPAR α , COX II, PGC-1 α genes of *Tupaia belangeri*

引物 Primer	序列 Sequence 5' - 3'
PPAR α F	GCTCCGATGGGTCTGTTAT
PPAR α R	GGTGAGGATTTCGCCTTT
COX II F	CATGAAGTTTGATCCAGAGCTG
COX II R	CTGAATGACTCAACAACTGGG
PGC-1 α F	GTGTCACCACCCAAATCCTTA
PGC-1 α R	ATTCTTCCCTCTTCAGCCTCT

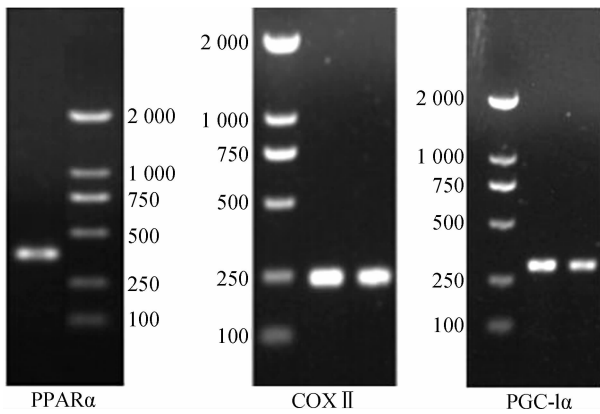


图 1 中缅树鼩 PPAR α 、COX II、PGC-1 α 的 PCR 扩增电泳图
Fig. 1 PCR electrophoresis of PPAR α , COX II and PGC-1 α in *Tupaia belangeri*

Realmaster Mix 试剂盒说明进行配制。反应体系为 20 μL :9 μL SYBR Green Realmaster Mix, 0.5 μL F 引物 (12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.5 μL R 引物 (12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.5 μL cDNA 模板, 9.5 μL RNase ddH₂O。扩增条件为第一步 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 第二步 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 第三步 60 $^{\circ}\text{C}$ 35 s, 第二步到第三步重复 37 个循环。1 个基因的每个样本均进行 3 次实时荧光定量平行重复, 采用的数据为 3 次平行测定结果的平均值 (朱万龙等, 2014)。内参基因引物 F:5'-GAGAGGGAATCGTGCGTGAC-3'; 引物 R:5'-CATCTGCTGGAAGGTGGACA-3'。

1.3.5 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 相对定量法 目的基因的转录表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 相对定量法进行计算, 用内参基因作均一化处理, $\Delta\Delta\text{CT} = (\text{CT}_{\text{目的基因}} - \text{CT}_{\text{内参基因}})_{\text{处理组}} - (\text{CT}_{\text{目的基因}} - \text{CT}_{\text{内参基因}})_{\text{对照组}}$, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 可反映出用内参基因均一化处理后, 该样本目的基因的初始模板量相对于对照样本的表达倍数 (差异) (Livak & Schmittgen, 2001; Crott *et al.*, 2007; Ornatowska *et al.*, 2007)。对于对照组样本, $\Delta\Delta\text{CT} = 0$, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}} = 1$ 。而对于冷驯化组样本, 若 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}} > 1$, 说明该基因表达上调; 若 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}} < 1$, 说明该基因表达下调。

1.4 统计分析

实验数据的统计分析采用 SPSS 16.0 处理。采用独立样本 *t* 检验对不同组中 WAT、BAT 质量和相关脂肪转化因子表达量的差异进行处理。结果以平均值 \pm 标准误 (Mean \pm SE) 表示, 其中 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有高度统计学意义。

2 结果

实验前, 对照组和冷驯化组中缅树鼩的体质量

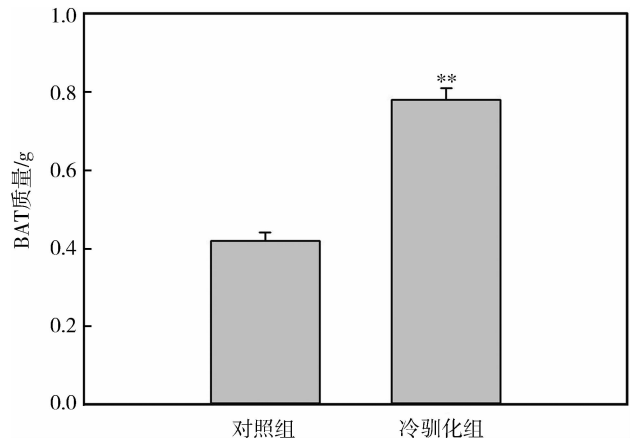


图 2 冷驯化对中缅树鼩褐色脂肪组织质量的影响
Fig. 2 Effect of cold acclimation on brown adipose tissue mass in *Tupaia belangeri*

** $P < 0.01$; 下同 The same below.

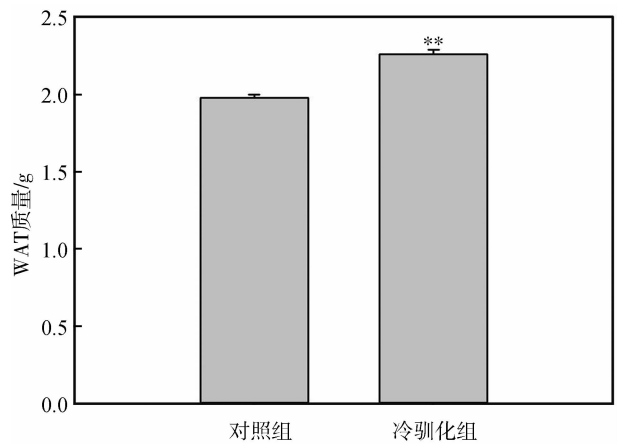


图 3 冷驯化对中缅树鼩白色脂肪组织质量的影响
Fig. 3 Effect of cold acclimation on white adipose tissue mass in *Tupaia belangeri*

分别为 103.56 $\text{g} \pm 2.32 \text{g}$ 和 102.89 $\text{g} \pm 3.02 \text{g}$, 2 组体质量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。冷驯化 28 d 后, 2 组脂肪组织质量差异有高度统计学意义 (BAT: $t = -6.92$, $P < 0.01$, 图 2; WAT: $t = -5.56$, $P < 0.01$, 图 3), 冷驯化组显著高于对照组, 其中 BAT 质量为冷驯化组较对照组升高了 85.71%, WAT 质量则增加了 14.14%。

冷驯化 28 d 后, 中缅树鼩 PPAR α 、COX II 和 PGC-1 α 基因表达量显著高于对照组 (PPAR α : $t = -6.36$, $P < 0.01$, 图 4: A; COX II: $t = -7.44$, $P < 0.01$, 图 4: B; PGC-1 α : $t = -2.87$, $P < 0.01$, 图 4: C), 其中冷驯化组 PPAR α 、COX II 和 PGC-1 α 基因表达量分别是对照组的 7.68 倍、5.65 倍和 9.98 倍。

3 讨论

栖息环境不同, 小型哺乳动物在低温条件下的

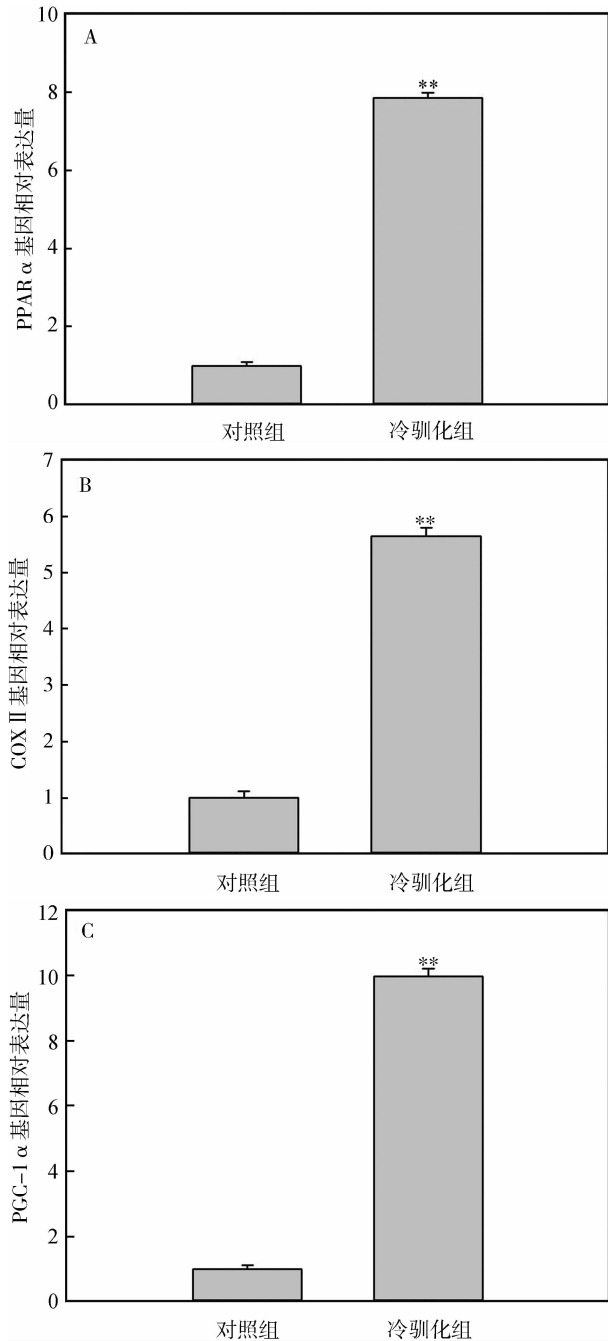


图4 冷驯化对中缅树鼩 PPAR α (A)、COX II (B) 和 PGC-1 α (C) 基因表达量的影响

Fig. 4 Effect of cold acclimation on PPAR α (A), COX II (B) and PGC-1 α (C) expressions in *Tupaia belangeri*

体质量变化模式也不同,有些动物体质量变化不明显,如小林姬鼠 *Apodemus sylvaticus* (Klaus *et al.*, 1988) 和非洲刺毛鼠 *Acomys cahirinus* (Khokhlova *et al.*, 2001), 而有些动物体质量增加,如环颈旅鼠 *Dicrostonyx groenlandicus* 和金黄仓鼠 *Mesocricetus auratus* (Nagy & Negus, 1993)。在本研究中,冷驯化组中缅树鼩大网膜 WAT 质量显著增加,和本研究组之

前研究结果中中缅树鼩的体质量变化趋势一致,说明在冷驯化过程中,中缅树鼩体质量的增加可能和体内 WAT 质量的增加有关,当然,WAT 的增加也和动物在该驯化条件下食物充足、不受限制有关(王政昆等,1995)。动物在低温条件下,一般会增加其产热能力来维持生存(Hayes & Chappell, 1986)。本研究中,中缅树鼩在冷驯化条件下,BAT 质量较对照组显著增加,说明中缅树鼩在该条件下增加 BAT 质量,从而增加 UCP1 的含量,最终增加非颤抖性产热来应对低温胁迫,这和本研究组先前的研究结果一致(Zhu *et al.*, 2012)。BAT 的质量增加可能是中缅树鼩自身在冷驯化条件下的 BAT 增生,还有可能是 WAT 褐变向 BAT 的转化而来。

脂肪转化因子 PPAR α 、COX II 及 PGC-1 α 在 WAT 向 BAT 的转变中具有重要作用(Madsen *et al.*, 2010)。PPAR α 表达量的上调能诱导原代 BAT 细胞增生和 UCP1 的高表达(Barbera *et al.*, 2001; Tong *et al.*, 2005)。COX II 对于 WAT 中诱导形成 BAT 细胞是必需的,有研究表明 WAT 中诱导出现的 BAT 细胞中 UCP1 的表达依赖于 COX II (Madsen *et al.*, 2010)。PGC-1 α 表达过高会使小鼠 *Mus musculus* 的 WAT 中具有 UCP1 阳性表达的 BAT 细胞增加(Puigserver *et al.*, 1998)。本研究中,冷驯化 28 d 后,PPAR α mRNA、COX II mRNA 及 PGC-1 α mRNA 的基因表达量显著增加,这可能诱导了中缅树鼩 WAT 中 BAT 细胞的形成,或者使脂肪组织中 UCP1 含量增加,从而增加其在冷环境中的产热能力。

总之,中缅树鼩在冷驯化条件下通过增加脂肪转录因子的基因表达量,可能使得 WAT 细胞褐变增加 UCP1 表达量,促进了 BAT 细胞的分化和代谢,弥补中缅树鼩在冷环境中适应性产热的不足,以抵抗低温环境。

参考文献:

- 王政昆,李庆芬,孙儒泳. 1995. 中缅树鼩的非颤抖性产热及细胞呼吸特征[J]. 动物学研究, 16(3): 408-414.
- 王政昆,李庆芬,孙儒泳. 1999. 光周期和温度对中缅树鼩产热能力的影响[J]. 动物学报, 45(3): 287-293.
- 王政昆,孙儒泳,李庆芬. 1994. 中缅树鼩静止代谢率的研究[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 30(3): 408-414.
- 张武先,王政昆,徐伟江. 2002. 冷驯化对中缅树鼩能量代谢的影响[J]. 兽类学报, 22(2): 123-129.
- 章迪,张浩,朱万龙. 2014. 中缅树鼩 PRDM16、BMP7、PPAR α 、COX II 及 PGC-1 α 基因的扩增研究[J]. 生物过程, 4(3): 52-60.

- 朱万龙, 蔡金红, 张麟, 等. 2014. 中缅树鼩体质量、血清瘦素和下丘脑神经肽表达量的季节性变化[J]. 生物学杂志, 31(3): 33-37.
- 朱万龙, 王海, 贾婷, 等. 2008. 冷驯化对大绒鼠和高山姬鼠肝脏线粒体呼吸的影响[J]. 四川动物, 27(3): 371-377.
- Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, *et al.* 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene: a link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell [J]. Journal of Biological Chemistry, 276(2): 1486-1493.
- Birerdinc A, Jarrar M, Stotish T, *et al.* 2013. Manipulating molecular switches in brown adipocytes and their precursors: a therapeutic potential [J]. Progress in Lipid Research, 52(1): 51-61.
- Crott JW, Liu Z, Choi SW, *et al.* 2007. Folate depletion in human lymphocytes up-regulates p53 expression despite marked induction of strand breaks in exons 5-8 of the gene [J]. Mutation Research, 626(1-2): 171-179.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, *et al.* 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans [J]. The New England Journal of Medicine, 360(15): 1509-1517.
- Enerback S. 2010. Human brown adipose tissue [J]. Cell Metabolism, 11(4): 248-252.
- Feder ME, Block BA. 1991. On the future of animal physiological ecology [J]. Functional Ecology, 5(2): 135-144.
- Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. 2007. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source [J]. Cell, 131(2): 242-256.
- Hayes JP, Chappell MA. 1986. Effects of cold acclimation on maximum oxygen consumption during cold exposure and treadmill exercise in deer mice *Peromyscus maniculatus* [J]. Physiological Zoology, 59(4): 453-459.
- Kawamichi T, Kawamichi M. 1979. Spatial organization and territory of three shrews (*Tupaia glis*) [J]. Animal Behavior, 27(2): 381-393.
- Khokhlova I, Krasnov BR, Shenbrot GI, *et al.* 2001. Body mass and environment: a study in Negev rodents [J]. Israel Journal Zoology, 47(1): 1-13.
- Klaus S, Heldmaier G, Ricquier D. 1988. Seasonal acclimation of bank voles and thermogenic properties of brown adipose tissue mitochondria [J]. Journal of Comparative Physiology B, 158(2): 157-164.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 25(4): 402-408.
- Madsen L, Pedersen LM, Lillefosse HH, *et al.* 2010. UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity [J]. PLoS ONE, 5(6): e11391. DOI:10.1371/journal.pone.0011391.
- Nagy TR, Negus NC. 1993. Energy acquisition and allocation in male collared lemmings *Dicrostonyx groenlandicus*: effects of photoperiod, temperature, and diet quality [J]. Physiological Zoology, 66(4): 537-560.
- Olson LE, Sargis EJ, Martin RD. 2005. Intraordinal phylogenetics of tree shrews (Mammalia: Scandentia) based on evidence from the mitochondrial 12S rRNA gene [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 35(3): 656-673.
- Ornatowska M, Azim AC, Wang X, *et al.* 2007. Functional genomics of silencing TREM-1 on TLR4 signaling in macrophages [J]. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 37(6): L1377-L1384.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, *et al.* 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis [J]. Cell, 92(6): 829-839.
- Tong Y, Hara A, Komatsu M, *et al.* 2005. Suppression of expression of muscle-associated proteins by pparalpha in brown adipose tissue [J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 336(1): 76-83.
- van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, *et al.* 2009. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men [J]. The New England Journal of Medicine, 360(15): 1500-1508.
- Vegiopoulos A, Muller-Decker K, Strzoda D, *et al.* 2010. Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by *de novo* recruitment of brown adipocytes [J]. Science, 328(5982): 1158-1161.
- Voltura MB, Wunder BA. 1998. Effects of ambient temperature, diet quality, and food restriction on body composition dynamics of the prairie vole, *Microtus ochrogaster* [J]. Physiological Zoology, 71(3): 321-328.
- Zhu WL, Jia T, Huang CM, *et al.* 2012. Changes of energy metabolism, thermogenesis and body mass in the tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) during cold exposure [J]. Italian Journal of Zoology, 79(2): 175-181.