

罗格列酮对猪脂肪前体细胞分化过程中聚脂相关基因表达模式的影响

刘海峰, 张煦, 李学伟, 李明洲

四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014

摘要: 为了解罗格列酮对猪脂肪前体细胞诱导分化过程的影响, 利用胶原酶消化法分离猪皮下脂肪前体细胞, 采用含50 nmol/L胰岛素、100 nmol/L地塞米松及0.25 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤的分化培养液 I (对照组)和在分化培养液 I 中添加100 nmol/L罗格列酮的分化培养液 II (实验组)两种诱导分化方法对脂肪前体细胞进行诱导分化, 借助实时定量RT-PCR方法检测了细胞分化过程中聚脂相关基因的表达。结果显示: 罗格列酮对 $PPAR\gamma$ 、 $C/EBP\alpha$ 、 $FABP4$ 、 $FASN$ 和 $GPAT$ 基因的表达有显著的上调作用, 而对 $PPAR\alpha$ 有一定的下调作用。试验组中 $PPAR\alpha$ 、 $PPAR\gamma$ 、 $C/EBP\alpha$ 、 $FABP4$ 、 $FASN$ 和 $GPAT$ 等基因分别于48 h、48 h、48 h、108 h、60 h和24 h达到表达高峰, 此时的表达量分别是诱导前的1.7、48、3.3、487.5、5.8和3.6倍, $GPAT$ 同 $PPAR\alpha$ 和 $FASN$ 基因表达量间均达到显著相关($P<0.05$); 而对照组中 $PPAR\alpha$ 、 $PPAR\gamma$ 、 $C/EBP\alpha$ 、 $FABP4$ 、 $FASN$ 和 $GPAT$ 等基因分别于84 h、96 h、48 h、96 h、36 h和36 h达到表达高峰, 此时的表达量分别是诱导前的2.1、11、1.6、216.5、3.5和2.8倍, $GPAT$ 同 $PPAR\alpha$ 和 $FASN$ 基因表达量间均达到极显著相关($P<0.01$)。本实验结果表明: 罗格列酮不仅可以极大的促进 $PPAR\gamma$ 和 $C/EBP\alpha$ 基因的表达, 还能让其协同达到表达高峰; $PPAR\gamma$ 和 $C/EBP\alpha$ 可能是调控猪脂肪前体细胞分化的关键转录因子; 在脂肪形成过程中, 甘油酯类的生物合成可能发生较早, 同时 $PPAR\alpha$ 可能主要参与甘油酯类生物合成的调控。

关键词: 罗格列酮; 脂肪形成; 脂肪前体细胞; 基因表达; 猪

Effects of rosiglitazone on expression patterns of the genes involved in adipogenesis during porcine preadipocyte differentiation

LIU Hai-Feng LI Xue-Wei ZHANG Xu LI Ming-Zhou

College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: To investigate the effects of rosiglitazone on porcine preadipocyte during the induced differentiation process, we isolated subcutaneous adipose from two days old piglets by using collagenase-digestion method and cultured preadipocyte cells in the control and experimental medium, respectively. The control group was under the conditions of 10% fetal calf serum in DMEM/F-12 (1:1), insulin (50 nmol/L), dexamethasone (100 nmol/L) and 1-methyl-3-isobutylxanthine (0.25 mmol/L), while the experimental medium was added with 100 nmol/L rosiglitazone. The expression changes of genes associated with adipogenesis between the two different conditions were measured by using qRT-PCR. The results revealed that, in the experimental group, the expression levels of $PPAR\alpha$, $PPAR\gamma$, $C/EBP\alpha$, $FABP4$, $FASN$ and $GPAT$ were up-regulated to the maximum at 48 h, 48 h, 48 h, 108 h, 60 h and 24 h after induction, respectively, and the change folds of these genes were 1.7, 48, 3.3, 487.5, 5.8 and 3.6, respectively. While, in the control group, the expression levels of these six genes were up-regulated to the maximum at different time points (84 h, 96 h, 48 h, 96 h, 36 h and 36 h, respectively) after induction, and the change folds of these genes were also different (2.1, 11, 1.6, 216.5, 3.5 and 2.8, respectively). In addition, a good correlation among the expression changes of $GPAT$ and $PPAR\alpha$, $FASN$ were all observed at $P<0.05$ in the experimental group and at $P<0.01$ in control group. These results indicated that the expression of $PPAR\gamma$, $C/EBP\alpha$, $FABP4$, $FASN$ and $GPAT$ were strongly up-regulated, and the expression of $PPAR\alpha$ was down-regulated under the effects of rosiglitazone. These results suggest that rosiglitazone has a promotive effect on $PPAR\gamma$ and $C/EBP\alpha$. Here, we present three tentatively conclusions. First, $PPAR\gamma$ and $C/EBP\alpha$ might be the key transcriptional factors for preadipocyte differentiation. Second, the phospholipids biosynthesis might appear more earlier during the process of adipogenesis. Third, $PPAR\alpha$ might play an important role in the regulation of phospholipids biosynthesis.

Keywords: rosiglitazone; adipogenesis; preadipocyte; mRNA expression; swine

收稿日期: 2008-12-30; 修回日期: 2009-01-08

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(编号: IRT0555-6)、国家科技支撑计划项目(编号: 2007BAD51B03)、农业部行业科研专项项目(编号: NYHYZX07-034)、现代农业产业技术体系建设专项(编号: NYCYTX-009)和四川省科技攻关项目(编号: 2006-YZGG-15)资助

作者简介: 刘海峰(1974-), 男, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: liuhf0-1@126.com
张煦(1987-), 女, 在读本科生, 专业: 动物科学2006级。E-mail: zxu1987@yeah.net
刘海峰, 张煦为共同第一作者。

通讯作者: 李学伟(1963-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。Tel: 0835-2886000; E-mail: lixuewei9125@126.com

脂肪前体细胞是一类具有增殖和向脂肪细胞分化能力的特化了的前体细胞,它的存在和作用持续于人的一生,与肥胖及Ⅱ型糖尿病都有密切的关系^[1,2]。近年来,脂肪前体细胞的诱导分化方法和脂肪细胞的发育机制受到越来越多研究人员的关注,随着研究的深入广泛开展,各种诱导方法和诱导因子对脂肪前体细胞进行诱导分化获得成功,其中大多采用胰岛素(Insulin, In)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(1-methyl-3-isobutylxanthine, IBMX)、地塞米松(Dexamethasone, DEX)、碘甲腺氨酸(Triiodothyronine, T3)、罗格列酮(Rosiglitazone, RSG)、胰岛素样生长因子(Insulinlike growth factor, IGF-I)等单独或联合进行诱导^[3-5],也有采用亚油酸(Conjugated linoleic acid, CLA)^[6]、促酰化蛋白(Acylation stimulating protei, ASP)^[7]等进行诱导。

前体脂肪细胞分化又称为脂肪形成,是伴随着细胞形态学、激素水平和基因表达协调变化的一个复杂的生物进程,这些变化受到过氧化物酶体增殖物激活受体 α (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha, *PPAR* α)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *PPAR* γ)和CCAAT增强子结合蛋白 α (CCAAT enhancer binding protein alpha, *C/EBP* α)等几个转录因子的协同调控^[8-10]。此外,研究发现甘油3磷酸酰基转移酶(Glycerol-3-phosphate acyltransferase, *GPAT*)是甘油酯类生物合成(Glycerolipid biosynthesis)途径的第一酶和限速酶^[11,12]。

罗格列酮(Rosiglitazone, RSG)属于噻唑烷二酮类(Thiazolidinedione, TZD),研究表明它通过结合和活化*PPAR* γ ,从而诱导前脂肪细胞分化并增强脂肪聚积,同时可增强细胞对胰岛素作用的敏感性,减轻胰岛素抵抗^[13,14]。但罗格列酮对前脂肪细胞分化过程中聚脂相关基因表达模式的影响还未见报道,文章通过分离培养猪皮下脂肪前体细胞,采用目前较通用的诱导方法(胰岛素+3-异丁基-1-甲基黄嘌呤+地塞米松)及该方法补加罗格列酮两种诱导方式对猪脂肪前体细胞进行诱导,并检测了与脂肪细胞分化启动(*PPAR* α 、*PPAR* γ 和*C/EBP* α)、脂肪酸合成(Fatty acid synthase, *FASN*)、转运(Adipocyte fatty acid binding protein 4, *FABP4*)和甘油酯类生物合成(*GPAT*)相关基因的表达模式,旨在了解罗格列酮对猪脂肪前体细胞诱导分化过程中的调控特点,为筛选更好的诱导方法,继而探索动物脂肪沉积的调控途径提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选择2日龄长白猪与荣昌猪的二元杂交健康仔猪,购自四川农业大学教学实习猪场。

1.1.2 主要试剂

DMEM/F12(1:1)培养基、胎牛血清购自Hyclone; I型胶原酶、胰岛素(In)、地塞米松(DEX)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)和罗格列酮(RSG)购自Sigma; SYBR[®] PrimeScript[™] RT-PCR KIT 购自TaKaRa。

1.1.3 培养液的配制

完全培养液: DMEM/F12基础培养液+10% FBS+100 IU/mL双抗(青霉素+链霉素); 维持培养液: 完全培养液+50 nmol/L In+100 nmol/L DEX; 分化培养液 I (对照组): 维持培养液+0.25 nmol/L IBMx; 分化培养液 II (试验组): 分化培养液 I +100 nmol/L RSG。

1.2 方法

1.2.1 猪脂肪前体细胞的原代培养和诱导分化^[15]

无菌状态下取2日龄仔猪背部皮下脂肪组织,用含 10^3 IU/mL双抗的PBS漂洗去除血污,剔除肉眼可见的结缔组织和血管,并剪成1 mm³大小的碎块,用0.1% (w/v) I型胶原酶消化液于37℃水浴锅内消化25 min,通过100 μ m尼龙筛过滤,离心5 min(1 000 r/min),沉淀用完全培养液漂洗后,用红细胞裂解液室温静置10 min以裂解红细胞,离心5 min(1 000 r/min),沉淀用完全培养液漂洗2~3次,将消化分离出的细胞用适量完全培养液稀释,吹打均匀,采用细胞计数系统(Scharfe system)进行细胞计数(左光标7.2,右光标11.4),以 2×10^5 个/瓶密度接种于细胞培养瓶置培养箱中(37℃,饱和湿度,5% CO₂)培养。对过滤后尼龙筛上的组织块重复消化处理2~3次以保证收获细胞的数量。

待原代细胞增殖到足够数量时,用0.25%胰蛋白酶37℃消化收获,细胞按 0.5×10^5 个/孔密度接种于12块6孔细胞培养板,分为2组,每组6块。待细胞长到80%愈合时,分别用分化培养液 I、II诱导培养48 h,继而用维持培养液继续培养,隔天换液。

1.2.2 基因表达检测

各组分别在诱导前12 h(-12 h)，诱导后每隔12 h收集细胞直至120 h，每个时间点均抽取3个孔(3个重复)提取总RNA。总RNA提取和cDNA的合成、PCR引物的设计及合成、标准品制备，标准曲线和溶解曲线分析均参照郭玉娇等^[16]的方法。引物由上海生工合成，相关信息见表1。PCR反应体系为25 μ L：12.5 μ L SYBR[®] Premix Ex TaqTM，0.4 μ L引物(10 μ mol/L)，2 μ L cDNA模板。PCR循环参数为：第一阶段95.0℃预变性3 min；第二阶段95.0℃ 10 s，58℃ 30 s，共40个循环。

1. 2. 3 统计分析

采用相对定量解析方法，以*ACTB*(beta actin)^[17-19]作为内参，对扩增效率达到要求的样品，根据iQTM 5(Bio- Rad)自带分析软件计算各基因各时间点的拷贝数，以目的基因mRNA的拷贝数(最大拷贝数设为1)与对应样品内参基因mRNA的拷贝数(最大拷贝数设为1)的比值表示基因mRNA的相对表达量。扩增产物的特异性通过琼脂糖凝胶电泳回收克隆测序确定。运用SAS8.2软件的PROC GLM程序进行最小二乘均值分析，结果以最小二乘均值 \pm 标准差或最小二乘均值 \pm 标准误表示，均数间的多重比较用Duncan法并进行相关分析^[16]。

表1 荧光定量RT-PCR 目的基因引物的相关信息

基因	引物序列	产物大小 (bp)	GenBank序列号
<i>PPARα</i>	F: CAGCCTCCAGCCCCTCGTC R: GCGGTCTCGGCATCTTCTAGG	381	DQ437887
<i>PPARγ</i>	F: TGACCATGGTTGACACCG R: AAGCATGAACTCCATAGTGG	381	NM_214379
<i>C/EBPα</i>	F: AACAACTGAGCCGCGAACTGGA R: CTTGAGATCTGGAGACCCGAAACC	170	AF103944
<i>FABP4</i>	F: TGGAAACTTGTCTCCAGTG R: GGTACTTTCTGATCTAATGGTG	148	AJ416020
<i>FASN</i>	F: GGGCCCAGCATCACCATAGACA R: GTTCGTGCCCCGATTGAGGAT	228	NM_001099930
<i>GPAT</i>	F: CTCCCCTGCCAGACATTTTACC R: ATCGCTGTCTTCATCTTCCTCATC	189	AY284842
<i>ACTB</i>	F: GGACTTCGAGCAGGAGATGG R: GCACCGTGTGGCGTAGAGG	233	SSU07786

2 结果与分析

两种诱导分化培养液对猪脂肪前体细胞进行诱导分化过程中相关基因不同分化时间点mRNA相对表达量结果见表2（最小二乘均值 \pm 标准差），直观变化趋势图见图1，两种诱导分化方法间各基因表达量间的比较结果见表3（最小二乘均值 \pm 标准误）。

表2 两种方法诱导分化过程中相关基因mRNA表达量的最小二乘均值及多重比较

组别	时间 (h)	基因					
		<i>PPARα</i>	<i>PPARγ</i>	<i>C/EBPα</i>	<i>FABP4</i>	<i>FASN</i>	<i>GPAT</i>
对照组	-12	0.40 \pm 0.03 ^{Eb}	0.02 \pm 0.00 ^{Gc}	0.30 \pm 0.02 ^C	0.002 \pm 0.00 ^{Dcd}	0.17 \pm 0.00 ^{Fc}	0.26 \pm 0.00 ^{CDc}
	12	0.30 \pm 0.02 ^{Fc}	0.03 \pm 0.00 ^{Fb}	0.10 \pm 0.00 ^{Fd}	0.002 \pm 0.00 ^{Dcd}	0.27 \pm 0.01 ^{Eb}	0.30 \pm 0.03 ^{Cc}
	24	0.29 \pm 0.04 ^{Fc}	0.06 \pm 0.00 ^{Da}	0.23 \pm 0.02 ^D	0.002 \pm 0.00 ^{Dcd}	0.14 \pm 0.00 ^{Fc}	0.31 \pm 0.04 ^{Cc}
	36	0.82 \pm 0.01 ^{Ba}	0.02 \pm 0.00 ^{FGcd}	0.42 \pm 0.01 ^B	0.001 \pm 0.00 ^{Dd}	0.59 \pm 0.05 ^A	0.73 \pm 0.18 ^{Aa}
	48	0.56 \pm 0.03 ^C	0.05 \pm 0.00 ^E	0.49 \pm 0.06 ^A	0.003 \pm 0.00 ^{Dcd}	0.48 \pm 0.07 ^B	0.55 \pm 0.02 ^{Bb}
	60	0.27 \pm 0.02 ^{Fc}	0.03 \pm 0.00 ^{FGd}	0.05 \pm 0.00 ^{Ge}	0.047 \pm 0.00 ^{Ca}	0.28 \pm 0.00 ^{Eb}	0.09 \pm 0.01 ^{Ed}
	72	0.40 \pm 0.01 ^{Eb}	0.09 \pm 0.01 ^C	0.16 \pm 0.02 ^{Ea}	0.118 \pm 0.01 ^B	0.36 \pm 0.02 ^{CDa}	0.56 \pm 0.04 ^{Bb}
	84	0.98 \pm 0.03 ^A	0.11 \pm 0.00 ^B	0.15 \pm 0.01 ^{Eab}	0.025 \pm 0.00 ^{CDb}	0.37 \pm 0.01 ^{Ca}	0.65 \pm 0.08 ^{ABab}
	96	0.84 \pm 0.03 ^{Ba}	0.22 \pm 0.01 ^A	0.12 \pm 0.01 ^{EFbc}	0.433 \pm 0.04 ^A	0.38 \pm 0.02 ^{Ca}	0.62 \pm 0.03 ^{ABab}
试验组	108	0.49 \pm 0.04 ^D	0.07 \pm 0.00 ^{Da}	0.05 \pm 0.00 ^{Ge}	0.020 \pm 0.00 ^{Dbc}	0.30 \pm 0.00 ^{DEb}	0.36 \pm 0.02 ^{Cc}
	120	0.39 \pm 0.01 ^{Eb}	0.03 \pm 0.00 ^{Fb}	0.03 \pm 0.00 ^{Ge}	0.024 \pm 0.00 ^{CDb}	0.15 \pm 0.01 ^{Fc}	0.14 \pm 0.00 ^{DEd}
	-12	0.40 \pm 0.03 ^{Ce}	0.02 \pm 0.00 ^{Ge}	0.30 \pm 0.02 ^{Fb}	0.002 \pm 0.00 ^{Ee}	0.17 \pm 0.00 ^G	0.26 \pm 0.00 ^{Ff}
	12	0.28 \pm 0.03 ^{Df}	0.06 \pm 0.01 ^{FGd}	0.65 \pm 0.06 ^C	0.003 \pm 0.00 ^{Ee}	0.30 \pm 0.00 ^{Fe}	0.44 \pm 0.00 ^{Ed}
	24	0.49 \pm 0.02 ^{BCcd}	0.12 \pm 0.01 ^{Db}	0.75 \pm 0.03 ^B	0.005 \pm 0.00 ^{Ee}	0.56 \pm 0.02 ^{Ca}	0.94 \pm 0.06 ^{Aa}
	36	0.44 \pm 0.05 ^{BCde}	0.10 \pm 0.01 ^{DEbc}	0.45 \pm 0.02 ^E	0.016 \pm 0.00 ^{Ee}	0.36 \pm 0.03 ^{DEc}	0.47 \pm 0.02 ^{DEd}
	48	0.68 \pm 0.01 ^{Aa}	0.96 \pm 0.04 ^A	0.99 \pm 0.02 ^A	0.454 \pm 0.01 ^C	0.85 \pm 0.02 ^B	0.89 \pm 0.02 ^{Ab}
	60	0.68 \pm 0.08 ^{Aa}	0.08 \pm 0.00 ^{EFcd}	0.08 \pm 0.01 ^{Gc}	0.168 \pm 0.01 ^{Dd}	0.99 \pm 0.02 ^A	0.52 \pm 0.01 ^{CDc}
	72	0.28 \pm 0.01 ^{Df}	0.11 \pm 0.01 ^{DEb}	0.09 \pm 0.01 ^{Gc}	0.236 \pm 0.01 ^{Dc}	0.22 \pm 0.03 ^H	0.30 \pm 0.02 ^{Fe}
(诱导分化液含罗格列酮)	84	0.42 \pm 0.01 ^{Ce}	0.23 \pm 0.03 ^C	0.55 \pm 0.06 ^D	0.603 \pm 0.06 ^B	0.34 \pm 0.02 ^{EFcd}	0.55 \pm 0.02 ^{Cc}
	96	0.25 \pm 0.01 ^{Df}	0.10 \pm 0.01 ^{DEbc}	0.10 \pm 0.00 ^{Gc}	0.209 \pm 0.01 ^{Dcd}	0.31 \pm 0.02 ^{Fde}	0.27 \pm 0.00 ^{Fef}

108	0.51±0.05 ^{Bc}	0.43±0.01 ^{Ba}	0.31±0.02 ^{Fb}	0.975±0.02 ^{Aa}	0.40±0.04 ^{Db}	0.53±0.01 ^{Cc}
120	0.62±0.03 ^{Ab}	0.42±0.02 ^{Ba}	0.37±0.02 ^{Fa}	0.898±0.09 ^{Ab}	0.55±0.01 ^{Ca}	0.72±0.04 ^B

注：在同一诱导方法内，上标字母相同者表示同一基因不同诱导分化时间差异不显著；字母不同者表示差异达显著水平（ $P<0.05$ ）（小写字母）或极显著水平（ $P<0.01$ ）（大写字母）。

2.1 对相关转录因子基因表达的影响

图1A、B、C和表2、表3结果显示，罗格列酮对PPAR γ 和C/EBP α 基因的表达有显著的上调作用，而对PPAR α 有一定的下调作用。实验组中PPAR α 、PPAR γ 和C/EBP α 均于48 h达到表达高峰，此时的表达量分别是诱导前的1.7、48和3.3倍；PPAR γ 基因诱导分化后的表达量始终高于诱导前，其他时间点均远远小于48 h时的表达量；C/EBP α 基因诱导分化后的表达量持续上升，而后有波动的表达；PPAR α 基因诱导分化后的表达量先下降，继而上升且有波动的表达。对照组中PPAR α 、PPAR γ 和C/EBP α 分别于84 h、96 h和48 h达到表达高峰，此时的表达量分别是诱导前的2.1、11和1.6倍；PPAR γ 基因诱导分化后的表达量始终高于诱导前；PPAR α 和C/EBP α 基因诱导分化后的表达量先下降，继而上升且有波动的表达。

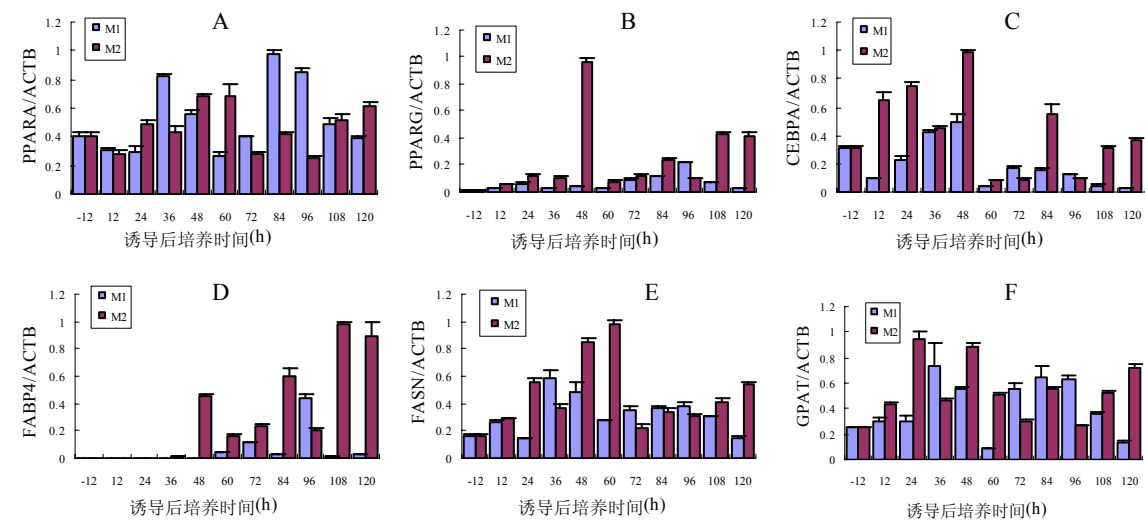


图1 基因PPAR α 、PPAR γ 、C/EBP α 、FABP4、FASN和GPAT在猪脂肪前体细胞分化过程中的表达
M1：对照组（诱导分化液不含罗格列酮）；M2：实验组（诱导分化液含罗格列酮）。

表3 诱导方法间基因表达量的最小二乘均值及多重比较		
基因	对照组	实验组
PPAR α	0.523±0.006 ^A	0.460±0.006 ^B
PPAR γ	0.067±0.003 ^B	0.239±0.003 ^A
C/EBP α	0.193±0.005 ^B	0.422±0.005 ^A
FABP4	0.062±0.005 ^B	0.324±0.005 ^A
FASN	0.317±0.005 ^B	0.459±0.005 ^A
GPAT	0.415±0.006 ^B	0.535±0.006 ^A

注：字母不同表示差异达极显著水平（ $P<0.01$ ）

2.2 对FASN和FABP4基因表达的影响

图1D、E和表2、表3结果显示，罗格列酮对FABP4和FASN基因的表达有显著的上调作用。实验组中FABP4和FASN基因分别于108 h和60 h达到表达高峰，此时的表达量分别是诱导前的487.5和5.8倍；FABP4基因在诱导分化48 h前的表达量一直较低，48 h时达到一个高表达峰，继而下降，后又逐渐增强；FASN基因诱导分化后的表达量持续上升到60 h达到表达高峰，继而回落维持一个相对稳定的表达量，且表达量始终高于诱导前。对照组中FABP4和FASN基因分别于96 h和36 h达到表达高峰，此时的表达量分别是诱导前的216.5和3.5倍；FABP4基因在诱导分化60 h前的表达量一直较低；FASN基因的表达模式和含罗格列酮的诱导分化培养相似。

2.3 对GPAT基因表达的影响

图1F和表2、表3结果显示，罗格列酮对GPAT基因的表达有显著的上调作用。实验组中GPAT

基因于24 h达到表达高峰,此时的表达量是诱导前的3.6倍,诱导分化后持续上升到表达高峰,继而回落维持一个相对稳定的表达量,且表达量始终高于诱导前;*GPAT*同*PPAR α* 和*FASN*两基因表达间的相关系数分别为0.68283和0.64233,均达到显著水平($P<0.05$)。对照组中*GPAT*基因于36 h达到表达高峰,此时的表达量是诱导前的2.8倍,在60 h有一个显著的回落;*GPAT*同*PPAR α* 和*FASN*两基因表达间的相关系数分别为0.82496和0.81231,均达到极显著水平($P<0.01$)。

3 讨论

本实验中,对照组3个转录因子基因表达高峰出现的顺序为*C/EBP α* 、*PPAR α* 和*PPAR γ* ;而含罗格列酮的诱导分化培养中3个基因同时达到表达高峰,表明罗格列酮不仅可以极大的促进*PPAR γ* 和*C/EBP α* 基因的表达量,还能让三基因协同达到表达高峰。但为何罗格列酮会下调*PPAR α* 基因的表达,有待进一步研究。

*FABP4*在诱导分化早期(36 h前)的表达量极低,之后有起伏的逐渐上升,与诱导分化过程中脂滴的变化结果相一致。Wang等^[10]以3T3-L1脂肪细胞系为对象的研究表明罗格列酮对*FABP4*基因的表达有上调作用,而对*FASN*基因的表达有下调作用,而本实验中罗格列酮对两基因均有较大的上调作用,可能与动物种属和细胞系不同有关。张罕星等^[11]以杜长大三元杂交仔猪的原代培养细胞为对象的研究表明*PPAR γ* 和*FASN*两基因的表达高峰分别出现在12 h和48 h,均早于本实验所得结果,其原因可能与诱导分化的方法有关。

*GPAT*主要参与甘油酯类生物合成,在实验组和对对照组中*GPAT*同*PPAR α* 和*FASN*两基因表达间的相关系数达到显著水平($P<0.05$)或极显著水平($P<0.01$);且*GPAT*基因在两种诱导方法中均最早出现表达高峰,这些结果暗示在脂肪形成过程中,甘油酯类的生物合成可能发生较早,同时*PPAR α* 可能主要参与甘油酯类生物合成的调控。

参考文献(Reference):

- [1] Ailhaud G, Amri E, Bardon S, Barcellini-Couget S, Bertrand B, Catalioto RM, Dani C, Doglio A, Forest C, Gaillard D. Growth and differentiation of regional adipose tissue molecular and hormonal mechanisms. *Int J Obesity*, 1991, 15:87-90.
- [2] Smith SR, Gawronska-Kozak B, Janderová L, Nguyen T, Murrell A, Stephens JM, Mynatt RL. Agouti expression in human adipose tissue: functional consequences and increased expression in type 2 diabetes. *Diabetes*, 2003, 52: 2914-2922.
- [3] Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Möller P, Heinze E, Debatin KM, Hauner H. Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obesity*, 2001, 25:8-15.
- [4] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 4279-4295.
- [5] Hemmrich K, von Heimburg D, Cierpka K, Haydarlioglu S, Pallua N. Optimization of the differentiation of human preadipocytes *in vitro*. *Differentiation*, 2005, 73: 28-35.
- [6] Brown JM, McIntosh MK. Conjugated linoleic acid in humans: regulation of adiposity and insulin sensitivity. *J Nutr*, 2003, 133(10): 3041-3046.
- [7] 卢慧玲, 王宏伟, Katherine Cianflone, 林汉华. 促酰化蛋白(ASP)诱导3T3-L1前脂肪细胞分化. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(3):383-386.
- [8] Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*, 1999, 4:585-595.
- [9] Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Gene DEV*, 2000, 14: 1293-1307.
- [10] Linhart HG, Ishimura-Oka K, DeMayo F, Kibe T, Repka D, Poindexter B, Bick RJ, Darlington GJ. C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *PNAS*, 2001, 98: 12532-12537.
- [11] Kumpl DS, Booth FW. Sustained rise in triacylglycerol synthesis and increased epididymal fat mass when rats cease voluntary wheel running. *J Physiol Biochem*, 2005, 565 (3): 911-925.
- [12] Lederer B, Hers HG. A kinetic study of glycerophosphate acyltransferase of rat adipocytes in relation to its control by noradrenaline. *Biochem J*, 1985, 226:269-274.
- [13] Stienstra R, Duval C, Muller M, Kersten S. PPARs, obesity, and inflammation. *PPAR Research*, 2007, 2007: 95974.
- [14] Wang P, Renes J, Bouwman F, Bunschoten A, Mariman E, Keijer J. Absence of an adipogenic effect of rosiglitazone on mature 3T3-L1 adipocytes: increase of lipid catabolism and reduction of adipokine expression. *Diabetologia*, 2007, 50:654-665.
- [15] 张罕星, 朱晓彤, 束刚, 高萍, 高淑静, 张常明, 江青艳, 陈瑶生. 猪脂肪前体细胞分化过程中聚脂相关基因的表达模式. 动物学报, 2007, 53(1):143-150.
- [16] 郭玉姣, 唐国庆, 李学伟, 朱砺, 李明洲. 猪脂肪组织中*IGF2* 和*IGFBP3*基因表达的发育性变化及其品种差异. 遗传, 2008, 30(5): 602-606.
- [17] Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet*, 2003, 19(7):362-365.
- [18] Erkens T, Van Poucke M, Vandesompele J, Goossens K, Van Zeveren A, Peelman LJ. Development of a new set of reference genes for normalization of real-time RT-PCR data of porcine backfat and longissimus dorsi muscle, and

- evaluation with PPARGC1A. *BMC Biotechnol*, 2006, 6: 41.
- [19] Nygard AB, Jørgensen CB, Cirera S, Fredholm M. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol Biol*, 2007, 8:67.