

敲降 *VPS28* 基因对中国荷斯坦奶牛乳脂合成的调控

刘莉莉¹, 郭爱伟¹, 吴培福¹, 陈粉粉¹, 杨亚晋¹, 张勤²

1. 西南林业大学生命科学学院, 昆明 650224

2. 中国农业大学动物科技学院, 畜禽育种国家工程实验室, 北京 1000193

摘要: 本课题组前期通过 GWAS 研究, 发现 *VPS28* 基因在荷斯坦奶牛乳腺组织中特异性高表达, 且其 5'-UTR 的突变位点-58C>T 与乳脂性状关联, 但其对乳脂性状的调控机理尚未明确。本研究为了明确 *VPS28* 基因及其突变位点-58C>T 对乳脂的调控机理, 首先利用启动子活性分析检测突变位点-58C>T 对 *VPS28* 基因的影响, 发现该突变位点显著降低 *VPS28* 基因启动子活性; 然后利用 RNA 干扰技术敲降奶牛原代乳腺上皮细胞中 *VPS28* 基因表达量, 检测 *VPS28* 通路和乳脂合成相关基因 mRNA 表达量以及细胞中脂肪滴形态, 分析结果发现敲降 *VPS28* 基因可降低泛素化-溶酶体和泛素化-蛋白酶体通路基因和乳脂合成相关基因的表达量, 并提高细胞中甘油三酯的合成, 预示 *VPS28* 基因可能通过泛素化-溶酶体和泛素化-蛋白酶体途径调控乳脂生成。本研究结果在转录组水平揭示 *VPS28* 基因对乳脂合成的调控机制, 为奶牛乳脂性状的分子育种研究提供参考依据。

关键词: 中国荷斯坦奶牛; *VPS28* 基因; 单核苷酸多态性; 乳脂合成; 调控

Regulation of *VPS28* gene knockdown on the milk fat synthesis in Chinese Holstein dairy

Lili Liu¹, Aiwei Guo¹, Peifu Wu¹, Fenfen Chen¹, Yajin Yang¹, Qin Zhang²

1. College of Life Science, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

2. Key Laboratory of Animal Genetics and Breeding of Ministry of Agriculture, College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: In a previous genome-wide association study on milk production traits in Chinese Holstein population, we discovered *VPS28* gene was highly expressed in mammary gland tissue. Further, a -58C>T mutation at the 5'-UTR of the gene was significantly associated with milk fat content traits. However, its regulation on milk fat content is still uncertain. In this study, we explored the effect of this -58C>T mutation on *VPS28*, and found that it could significantly reduce

收稿日期: 2018-05-15; 修回日期: 2018-07-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 3120772), 国家转基因育种发展专项(编号: 2014ZX0800953B), 教育部重点学科生物学一级学科建设项目(编号: 51400666)和云南省教育厅科学研究基金教师类项目(编号: 2018JS333)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 3120772), the National Major Development Program of Transgenic Breeding (No. 2014ZX0800953B), Ministry of education key subject biology level discipline construction project (No. 51400666) and Yunnan Provincial Department of Education Fund for Scientific Research (No. 2018JS333)]

作者简介: 刘莉莉, 博士, 讲师, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: liulily0518@163.com

通讯作者: 张勤, 博士, 教授, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: qzhang@cau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.yczz.18-134

网络出版时间: 2018/10/30 18:23:39

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20181030.1822.002.html>

promoter activity of *VPS28* gene. To identify the potential function of this SNP, we performed RNAi experiments to knockdown *VPS28* gene in BMECs and examined the general effects of *VPS28* knockdown on BMECs. The results showed that *VPS28* knockdown could decrease the mRNA expression of genes in ubiquitination-lysosome and ubiquitination-proteasome pathways, increase the mRNA expression of genes in milk fat synthesis pathway and promote triglyceride synthesis in BMECs. Our data indicate that *VPS28* gene could regulate milk fat synthesis pathway; and promote triglyceride synthesis in BMECs. Our data indicate that *VPS28* gene could regulate milk fat synthesis through modulating the ubiquitination-lysosome and ubiquitination-proteasome systems. Our results demonstrate the molecular mechanism of *VPS28* on regulation of milk synthesis in dairy cattle through the ubiquitination signaling pathway, thereby supporting a relationship between milk fat synthesis and ubiquitination and laying the molecular foundation in breeding of dairy cattle in the future.

Keywords: Chinese Holstein dairy; *VPS28* gene; single nucleotide polymorphism; milk fat related genes; transcriptional regulation

牛奶中乳脂含量约 3%~5%, 其含量高低直接影响了牛奶的营养价值和口味, 因此乳脂含量是衡量牛奶品质的重要指标。如何提高牛奶中的乳脂水平并改善牛奶品质成为学术界关注的焦点, 也是生产者、消费者和乳品加工企业关注的热点。虽然可以通过生鲜奶后加工而提高乳脂含量, 但人工处理过程会导致牛奶中其他重要营养成分损失, 甚至生成其他有害物质, 同时额外增加了牛奶的生产成本。因此, 通过分子遗传标记辅助选育等现代分子育种手段选育提高乳脂含量一直是奶牛育种的主要育种目标之一。

乳脂的主要成分是甘油三酯(triglyceride, TG), 约占 99%, 由磷脂膜包被形成乳脂肪球从奶牛乳腺组织的乳腺上皮细胞释放到牛奶中^[1]。乳脂的合成途径主要有两种: 一是直接利用血液中游离的长链脂肪酸(18~24 个碳原子)进行合成; 二是利用前体小分子从头合成短链和中链脂肪酸(4~14 个碳原子)再合成乳脂。游离的长链脂肪酸以及从头合成短/中链脂肪酸都需要逐步经过激活、合成、转运等酶类作用合成甘油三酯, 并在脂蛋白的协助下被释放到细胞外形成乳脂^[2~5]。由此可见, 乳脂合成过程中有关酶类发挥了关键作用。

在前期奶牛产奶性状全基因组关联分析研究中, 本课题组发现 *VPS28*(vacuolar protein sorting 28)基因 5'-UTR (5'-untranslated region)存在一个突变位点 -58C>T 与奶牛乳脂率存在关联($P=7.32E-60$), 是

与乳脂率关联最强的 SNP (single nucleotide polymorphism)之一, 对该基因的 mRNA 表达研究表明, 该基因在奶牛乳腺组织中特异性高表达^[6], 但是其具体调控机理尚未明确, 在畜禽中也尚未见到关于该基因的报道。因此, 本研究以 *VPS28* 基因为奶牛乳脂性状的重要候选基因, 采用 RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi)对牛原代乳腺上皮细胞中的 *VPS28* 进行敲降, 检测重要乳脂合成相关基因的表达变化, 为阐明 *VPS28* 基因调控乳脂合成的分子机制提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

牛原代乳腺上皮细胞(bovine primary mammary epithelial cells, BMECs)、人胚肾 293T 细胞系(human embryo kidney 293T, HEK293T)和牛基因组 DNA 为本实验室冻存; DMEM/F12 培养基、DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基、胎牛血清、双抗(Penicillin-Streptomycin Solution)购自美国 Gibco 公司; 限制性内切酶 *Kpn* I、*Bgl* II 和 T4 DNA 连接酶购自美国 NEB 公司; DNA 纯化回收及质粒制备试剂盒购自北京全式金生物科技有限公司; 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 购自北京天根生化科技有限公司; 干扰片段 siRNA 合成于上海吉玛制药技术有限公司; 双荧光素酶报

告基因检测试剂盒(Dual-Luciferase Reporter Assay System)、萤光素酶报告基因载体(pGL4.14)、海肾萤光素酶报告基因载体(pRL-TK)购自美国 Promega 公司;转染试剂 Lipofectamin 2000、TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;转染试剂 X-treme GENE siRNA Transfection Reagent、SYBR Green Mix 购自美国 Roche 公司。

1.2 启动子报告基因载体的构建

根据 *VPS28* 基因(GenBank 登录号 :AC_000171.1) 及萤光素酶报告基因载体 pGL4.14 的序列信息设计 PCR 引物,并在上、下游引物的 5'端加入酶切位点 *Kpn* I 和 *Bgl* II (引物信息见表 1)。然后以奶牛基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增得到 CC 型和 TT 型 *VPS28* 基因 5'UTR 区域并将其克隆到 pUCm-T 载体上。测序无误后,经双酶切及胶纯化回收,分别将 CC 型和 TT 型 *VPS28* 基因 5'UTR 区域插入 pGL4.14 萤光素酶报告基因载体上,分别获得报告基因载体质粒 pGL4.14-CC 和 pGL4.14-TT。

1.3 *VPS28* 基因的启动子活性分析

将 HEK293T 细胞系培养于 DMEM 全培养基中(含有 10%胎牛血清,100 U/mL 青霉素-链霉素),并将其置于 37℃、5% CO₂ 浓度以及湿度为 90%的细胞培养箱中。当细胞汇合度达到 90%时,用 0.05%胰酶进行消化并将 HEK293T 细胞以 2×10⁵/孔传代接种至 24 孔板中。待细胞汇合度达到 70%时,分别取将 450 ng 报告基因载体质粒 pGL4.14-CC、pGL4.14-TT 及 pGL4.14 与 50 ng RPL-TK 内参质粒混合,使用 LTX 转染试剂共转染 HEK293T 细胞系,6~8 h 后更换完全培养基。转染 48 h 后,收集细胞并制备细胞裂解液,然后按双萤光素酶报告基因检测试剂盒说明书(Promega, 美国)进行操作,分别测定各组的萤火虫萤光素酶及海肾萤光素酶活性,通过二者比值获取启动子活性。

表 1 牛 *VPS28* 基因启动子区扩增引物
Table 1 Primers of bovine *VPS28* gene promoter

引物名称	引物序列(5'→3')	引物长度(bp)	酶切位点	产物大小(bp)
VPS28-F	CGGAggtaccTGCACCAGGATAAGCCCAGA	30	<i>Kpn</i> I	335
VPS28-R	TTTTagatctGAGTGGCTGGGATCCCGTGA	30	<i>Bgl</i> II	

1.4 BMECs 中 *VPS28* 基因的敲降

将 BMECs 培养于 DMEM/F12 全培养基中(含有 10%胎牛血清,100 U/mL 青霉素-链霉素),并将其置于温度 37℃,CO₂ 浓度 5%,湿度 90%的细胞培养箱中。当细胞汇合度达到 100%时,用 0.25%胰酶进行消化并将 BMECs 以 2.5×10⁵/孔传代接种至 6 孔板中。培养 24 h 后汇合度达 80%时,将 2 μg siRNA 溶解于 Opti-MEM 中,使用转染试剂 X-treme GENE siRNA Transfection Reagent 转染 BMECs,6~8 h 后更换完全培养基。转染 24 h 后在荧光显微镜下检测转染效率,转染 72 h 后收集细胞并在每孔细胞中加入 1 mL TRIzol 裂解进行总 RNA 提取。将提取的总 RNA 进行 1%琼脂糖凝胶电泳,检测 RNA 的完整性及有无 DNA 污染。采用 Nanodrop 检测总 RNA 的浓度和质量,保证样品浓度 200 ng/μL,然后按照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书进行反转录。

1.5 *VPS28* 基因及乳脂合成相关基因表达量的检测

结合 KEGG 网站(KEGG-Table of Contents, <http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>),本研究选择脂类合成、泛素化-溶酶体和泛素化-蛋白酶体通路中 38 个基因作为候选基因,采用 qRT-PCR 方法检测这 38 个相关基因 mRNA 表达量的变化(具体基因和引物信息见表 2)。以 *GAPDH* 为内参基因,采用比较 *Ct* 值法即 2^{-ΔCt} (ΔCt=目的基因 *Ct* 值-内参基因 *Ct* 值)表示目的基因的相对表达量。采用 ROCHE 公司 SYBR Green Mix 进行定量表达检测。反应体系及反应程序参照 SYBR Green Master Mix 说明书,在 Roche Light Cycler 480 荧光定量 PCR 仪上进行扩增。

1.6 BMECs 中脂肪滴的电镜检测

收集足量敲降 *VPS28* 基因前后的 BEMC,然后依次对其进行固定、包埋、切片和染色。将处理好

表 2 候选基因的引物序列及其相对表达量

Table 2 Primers of the candidate genes for qRT-PCR and their relative expression

基因	引物序列 (5'→3')	相对表达量	基因	引物序列 (5'→3')	相对表达量
<i>GAPDH</i>	AGATGGTGAAGGTCGGAGTG CGTTCTCTGCCTTGACTGTG	/	<i>HERC3</i>	CTCGAGGGCCTAGCTGTCT TTTGTGAGAAGGGTCTGGCG	0.73*
<i>VPS28</i>	GGAAACAAGCCGAGCTGTA CTGGATCTCGTCCATGGCTC	0.28*	<i>VPS45</i>	CCCCAAAGATGCTGTGGCTA AGTGTGCTGGGGCCTAGATA	0.42*
<i>LPL</i>	AGCTCCAAGTCGCCTTTCTC TCCTGGTTGAAAGTGCCTC	0.48*	<i>CHMP2B</i>	ACGAGGTACACAGAGGGCTA AGCTGTTTGGCTAAACTCTGC	0.38*
<i>LDLR</i>	TGTTGGACACAGTACCCAG AAGGTCGCGACTTGTCTCAG	2.72*	<i>CHMP3</i>	GTTTGAAATCACCAGAGGGG CTAAAGGTTCAAGGCTCCGGG	0.77*
<i>CD36</i>	GACGGATGTACAGCGGTGAT GAAAAAGTGCAAGGCCACCA	16.00**	<i>PIP5K</i>	CTCAGCACCTGGAAGAGCAA TTCTTCTTTCCCGAGCCAC	1.48*
<i>ACSL1</i>	GGGCCTGCGGAGGAGA GGCAGCCGAAAGTACTGGAA	3.76*	<i>CYHR1</i>	GCCAACCTGCTTTTGGGAAG GGTTGTGAAAACGCCACAA	1.21*
<i>FABP3</i>	ACGCGTTCTCTGTCTCTTT AACCAGACCCGAGTGACTTC	3.79*	<i>CP</i>	CATGGTGGCCAAAGGTGTTG CATCTGCTGGAGATTTTGGCA	1.5*
<i>ACACA</i>	AGTGTCTGATCAGGTCTTCTTGT GGGAGGCAAAAACCTCCAGA	0.67*	<i>PSMC1</i>	GGTACGACTCCAACCTCAGGC ATCCGGTTTGTGGCCATGAT	2.90*
<i>ACBP</i>	TGGAATCTTTGCAACACCGC TGTCACCCACAGTTGCTTGT	0.83*	<i>PSMC3</i>	TGAACAAGACGCTGCCGTAT TGCCGCGTAGAGGTTTTGAT	1.76*
<i>FASN</i>	AGGCGTGCGTGACACTT AATACAGTTGGCCGTCACCA	6.85*	<i>PSMC5</i>	CTCTGCACAAGATCCTGCCT ATGCTTCACAGGCAGCTCAA	3.27*
<i>SCD</i>	TCCTGATCATTGGCAACACCA CCAACCCACGTGAGAGAAGAA	1.48*	<i>PSMD12</i>	ATACGTCAGGCATCTCGCAG GGCCATGTTGTAGGGGACAA	0.37*
<i>DGAT1</i>	TACCCCGACAACCTGACCTA GGGAAGTTGAGCTCGTAGCA	2.06*	<i>UBB</i>	TGGCATGTGTTGGGTTCTGT CGAAGATCTGCATTTTGACCTG	0.56*
<i>LPIN1</i>	CTTCGATTCCCAAACCGGGA TCACAGTGACGAACACCTGG	2.35*	<i>UBC</i>	GACCGGGAGTTCAGTCTTCG TTTACCAGTGAGGGTCTTCACAA	1.28*
<i>ADFP</i>	GCGTCTGCTGGCTGATTTT AGCCGAGGAGACCAGATCATA	2.95*	<i>UBA52</i>	GCCCAGTGACACCATAGAGA GCAGGGTGGACTCTTTCTGG	1.28*
<i>APOE</i>	CATGCTGGGCCAGTCTACC CTTCTTCAGGTCGTACGCTTGGA	0.48*	<i>UBE2</i>	CTGGCACAGTATATGAAGACCTGA GGTAGCAGGGTGTGAGGAAC	1.09*
<i>PRKCA</i>	GACTTCGGGATGTGCAAGGA CGTACGGCTGATAGGCGATT	2.40*	<i>TUBA</i>	TGTCTACTCCTGTTGCCTGC AGGCATTGCCGATCTGGAC	0.5*
<i>MAPK1</i>	AACAAAGTCCGAGTCGCCAT CGATGGTCGGTGCTCGAATA	2.54*	<i>ISG15</i>	CCATCCTGGTGAGGAACGAC GTCTGCTTGACACGCTCCT	19**
<i>ARF6</i>	AACTGGTATGTGTCAGCCCTC GAAAGAGGTGATGGTGGCGA	4.68*	<i>MX1</i>	TGCCAACTAGTCAGCACTACATT TGTACAGGTTGCTCTTGGACTC	1.08*
<i>STAM1</i>	CCTGGTACTGCGGCTAACAA ACGAACCTTCCGGCCTTCAT	1.23*	<i>SPPI1</i>	TCCGCCCTTCCAGTTAAACC GCTTCTGAGATGGGTCAGGC	3.2*
<i>EEA1</i>	CAGGCCCAGGACAGCTTAAA GCAAGTTCCTGTGCTGCTTG	7.68*	<i>RPS27A</i>	TTTCGTGAAGACCCTGACGG GTCTTTGCTGGTCAGGAGGAA	2.13*

*表示 $P < 0.05$ ，差异显著；**表示 $P < 0.01$ ，差异极显著。

的切片置于 JEM-1400 透射电子显微镜(日本电子公司)下观察。

1.7 数据与分析

所有实验数据均为 3 次独立重复实验结果,以均数±标准差表示,两组数据差异使用 *T* 检验进行统计分析,对 3 组或以上实验数据采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)结合 Bonferroni 或者 Duncan 多重比较方法进行统计分析, $P < 0.05$ 时认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 VPS28 基因多态位点对该基因的表达调控

本课题组前期研究发现 *VPS28* 基因 5'-UTR 存在-58C>T 突变位点,该位点与奶牛乳脂率存在极强关联^[6]。为了进一步验证该突变位点对 *VPS28* 基因的表达调控,本研究克隆了野生型和突变型牛 *VPS28* 基因 5'-UTR 片段,并构建了启动子报告基因载体 pGL4.14-CC 和 pGL4.14-TT。将所构建的重组载体转染 HEK293T 细胞系,48 h 后检测报告基因活性。结果如图 1 所示,与 pGL4.14 载体相比,两重组载体均显示了较强的荧光素酶信号,但突变型重

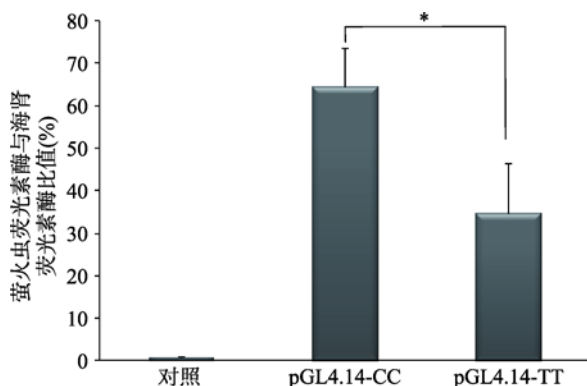


图 1 *VPS28* 基因不同基因型启动子荧光素酶表达载体转染 293T 细胞的相对荧光值

Fig. 1 Relative fluorescence values of different genotype promoters of bovine *VPS28* gene in 293T cells

pGL4.14-CC: 野生型启动子片段重组载体; pGL4.14-TT: 突变型启动子片段重组载体。每组数据均通过 3 次重复计算平均数±标准差; *表示 $P < 0.05$, 数据间差异显著。

组载体 pGL4.14-TT 的活性显著低于野生型重组载体 pGL4.14-CC ($P < 0.05$)。该结果表明, *VPS28* 基因 5'-UTR 的-58C>T 突变位点可以降低该基因的启动子活性而降低其 mRNA 表达量。

2.2 BMECs 中 VPS28 基因的敲降

本研究采用 RNAi 技术对 BMECs 中 *VPS28* 基因进行敲降。首先基于 *VPS28* 基因的 mRNA 序列 (GenBank 登录号: NM_001035504.2) 设计 3 条 RNA 干扰片段(图 2A), 然后分别转染单片段 siRNA (siRNA1、siRNA2、siRNA3) 及串联片段 siRNAs (siRNA12、siRNA13、siRNA23、siRNA123) 敲降 *VPS28* 基因。结果表明(图 2, B 和 C), 在干扰片段 siRNA 连续作用 72 h 后, 串联片段 siRNA23 显示了最高的干扰效率, 达 71%。因此, 本研究将串联干扰片段 siRNA23 作为敲降 *VPS28* 基因的干扰片段。

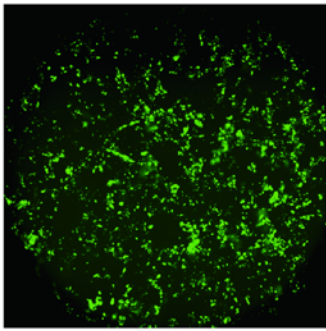
2.3 差异表达基因的效应分析

以 *GAPDH* 为内参基因, 采用 qRT-PCR 方法检测 38 个候选基因在敲降 *VPS28* 基因后的表达趋势, 结果如表 2 所示。在乳脂合成过程中, 相关酶类基因 *DGAT1*、*FASN*、*SCD*、*GPI*、*ACSL1*、*FABP3*、*ADFP* 和 *CD36* mRNA 表达量上调 ($P < 0.05$), 而 *ACACA* mRNA 表达量下调 ($P < 0.05$); 包含 *VPS28* 基因在内的内体蛋白分选转运装置超级复合体 ESCRTs (endosomal sorting complexes required for transport) 的亚基 *ARF6*、*EEA1*、*STAM*、*VPS45*、*CHMP2B*、*CHMP3* 基因 mRNA 表达量显著下调 ($P < 0.05$); 蛋白酶体系统的亚基 *PSMC1*、*PSMC3* 和 *PSMC5* 基因显著上调 ($P < 0.05$), 而 *PSMD12* 基因 mRNA 表达量下调 ($P < 0.05$); 泛素化途径相关基因 *UBB* 和 *TUBA* mRNA 表达量下调 ($P < 0.05$), *ISG15*、*UBE2L6*、*UBC*、*SPPI* 和 *MX1* 基因 mRNA 表达量上调 ($P < 0.05$)。

为明确这些候选基因间的联系及其对乳脂合成的作用, 本研究利用 String 在线软件 (STRING: functional protein association networks, <http://string-db.org/>) 对其进行综合分析并绘制了相应的通路图 (图 3)。结合 38 个候选基因所在通路的生物学功能, 本研究发现, *VPS28* 基因被敲降可以直接下调细胞中 ESCRTs 基因的表达。这表明 *VPS28* 基因可通过

A ATGttcac gggatcccag ccactcctgg catgggagcc cctggaaaca agccggagct gtataggaa gtgaagctgt acaagaacgc
 ccgtgagcgg gagaagtacg acaacatggc ggagctgttt gcggtgggta agacgatga agccctggag aaggcgtaca tcaaggactg
 cgtcaccgcc aacgagtaca ccgagcctg ctcccgactc ctgggccagt acaagcggc ctccggcag gtccagggtc cagaaatcag
 ctccattgat gaattctgcc gcaagtttcg cctggactgc ccactggcta tggagaggat caaggaggac cggcccatca ccatcaagga
 cgacaaaggc aacctgaacc gctgcatagc ggacgtggtc tgcgtcttta tcacggtgat ggacaagctg cgccctggaga tccgagccat
 ggacgagatc cagcctgacc tgcgggagct gatggagacc atgcaccgca tgagccacct gcccctgac ttcgagggcc gccagacggt
 cagccagtgg ctgcagacc tgaaggcat gtcggcctca gatgagctgg atgactccca ggtgcgccag atgctcttcg acctggagtc
 ggcctacaac gccttcaacc gcttctgca tgcTGA

B



C

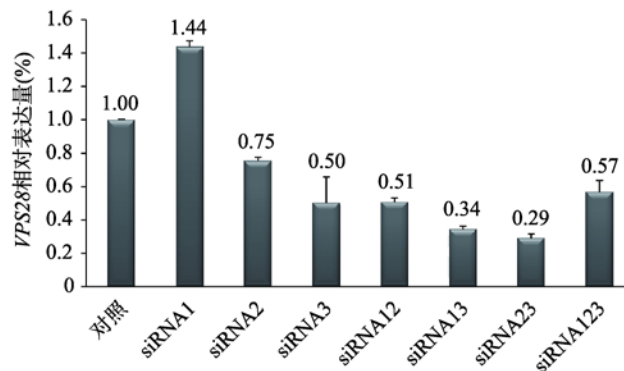


图 2 BMECs 中 *VPS28* 基因的干扰

Fig. 2 The *VPS28* knockdown with siRNAs in BMECs

A: *VPS28* 基因 siRNA 干扰片段; B: 细胞中 *VPS28* 基因串联干扰片段 siRNA23 的转染效率; C: 细胞中 *VPS28* 基因干扰片段 siRNAs 的干扰效率。每组数据均通过 3 次重复计算平均数±标准差。

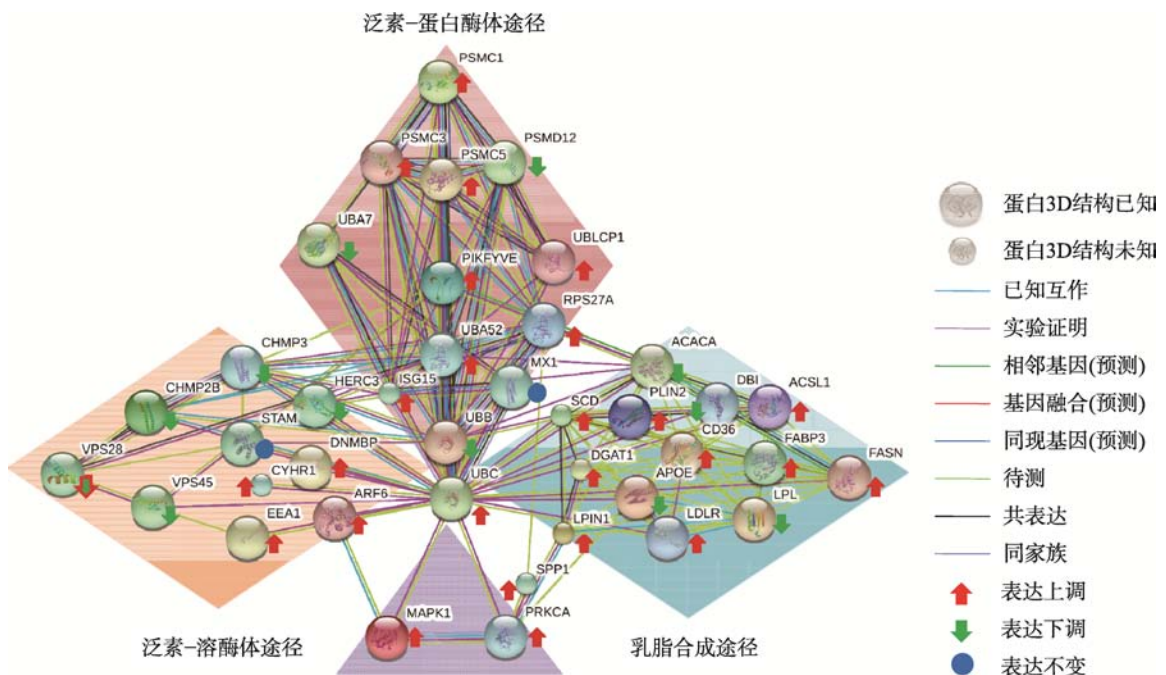


图 3 BMECs 中 *VPS28* 基因被敲降后乳脂合成及 *VPS28* 所在通路中相关基因通路图

Fig. 3 Possible signal network and distinct pathway related to the effect of *VPS28* knockdown on milk fat synthesis in BMECs

ESCRTs 下调泛素化-溶酶体和泛素化-蛋白酶体通路基因的表达来影响乳脂合成过程中酶类的泛素化降解,进而调控乳脂的生成。

2.4 BMECs 中脂肪滴的检测

为了更直观地检测 *VPS28* 基因敲降对 BMECs 中乳脂合成的影响,本研究使用电子显微镜直接观察 *VPS28* 基因被敲降前后细胞中脂肪滴的变化。结果如图 4 所示,与正常 BMECs 相比,敲降 *VPS28* 基因的细胞中能直观地观察到大量且体积较大的脂肪滴储存在细胞质中。因此,*VPS28* 基因被敲降可直接导致 BMECs 中脂肪滴的合成增加。

3 讨论

本研究将 *VPS28* 基因作为影响奶牛乳脂性状的重要功能候选基因,选择该基因的突变位点-58C>T 作为重要突变位点,对该基因和突变位点进行了功能验证,试图揭示 *VPS28* 基因及其突变位点-58C>T 对乳脂合成的调控作用,为 *VPS28* 基因的功能研究以及奶牛乳脂性状相关分子遗传标记的筛选提供科学依据。

人(*Homo sapiens*)和小鼠(*Mus musculus*)中有关 *VPS28* 的研究表明,*VPS28* 是真核细胞中内体蛋白分选转运装置复合体 ESCRT-I 的一个亚单位,ESCRT-I 与 ESCRT-0、ESCRT-II 和 ESCRT-III 共同

组成超级复合体 ESCRTs^[7-9]。*VPS28* 通过与其他复合体亚基相互作用保证了对其他复合体的召集和连接过程,因此 *VPS28* 与 ESCRTs 的稳定性有关^[10]。ESCRTs 是真核细胞中由囊泡分拣蛋白组成的一种重要复合体,通过与多囊体共同作用对泛素化膜蛋白进行识别分选,并将其转运至溶酶体中降解,这种泛素-溶酶体系统是细胞中多种膜结构受体下调的主要途径^[11,12]。泛素化是一种重要的蛋白质翻译后修饰,指泛素蛋白在一系列酶的催化作用下共价结合到靶蛋白的过程。泛素化信号通路直接介导了真核生物细胞内蛋白质的降解,影响蛋白质的活性和定位,调控包括细胞周期、细胞凋亡、转录调控、DNA 损伤修复以及免疫应答等在内的多种细胞活动^[13,14]。研究发现,ESCRTs 中 *VPS28* 突变可以导致胚胎细胞中囊泡数量显著增多,说明 *VPS28* 可以通过 ESCRTs 对细胞中膜结构内陷和分泌过程产生影响^[15]。另有研究表明 ESCRTs 可以通过泛素化作用参与蛋白酶体对胞质中泛素化蛋白质的降解^[16]。蛋白酶体是存在于哺乳动物细胞中具有蛋白水解酶作用的巨型蛋白质复合物,与泛素化信号系统一起构成泛素-蛋白酶体系统,对细胞中胞质蛋白进行选择降解。泛素-蛋白酶体系统介导的蛋白质降解通路不仅可以清除细胞内功能异常及变性蛋白质,还可以通过降解不同途径活化物或抑制物而调控特定蛋白质的表达^[17]。因此,泛素-蛋白酶体系统是调节多种细胞生物学过程如基因转录调控、细胞信号转

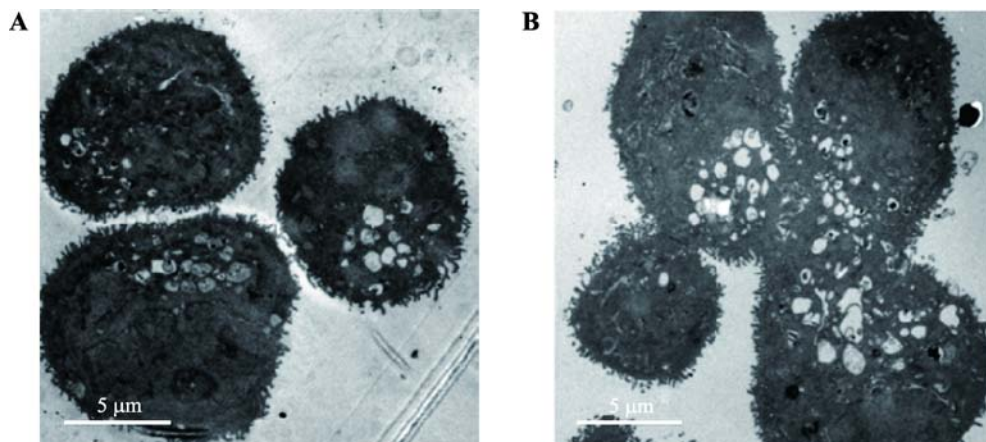


图 4 BMECs 中脂肪滴电镜扫描图

Fig. 4 Electron micrographs of lipid droplets in BMECs

A: *VPS28*^{+/+} BMECs; B: *VPS28*^{-/-} BMECs.

导和转运特殊细胞内蛋白的关键机制。有研究表明泛素-蛋白酶体系统通过调控蛋白质降解影响细胞中脂类合成过程,我们在前期研究中也同样证实泛素-蛋白酶体系统在高糖调控乳脂合成过程汇总起到了重要作用^[18]。综合以上研究,我们推测 *VPS28* 可能通过 ESCRTs 参与泛素-溶酶体和泛素-蛋白酶体系统影响奶牛乳脂合成过程中膜受体蛋白和胞质蛋白的泛素化降解和乳脂肪球的形成分泌,进而调控乳脂的合成。

为阐明 *VPS28* 基因及其突变位点对奶牛乳脂合成的调控机理,本研究首先对 *VPS28* 基因 5'-UTR 的-58C>T 突变位点进行启动子活性分析,结果发现 *VPS28* 基因的该突变位点确实可导致其基因 mRNA 表达量显著下降,预示了该突变位点可能通过下调基因表达量而影响乳脂生成;然后,进一步利用 RNAi 干扰技术敲降奶牛原代乳腺上皮细胞中 *VPS28* 基因,并检测泛素化-溶酶体、泛素-蛋白酶体和乳脂合成途径中的相关基因 mRNA 表达量,试图在 RNA 水平上分析 *VPS28* 基因低表达对乳脂合成的影响。结果发现,ESCRT-0 亚基的基因(*ARF6*、*EEA1* 和 *STAM*)mRNA 表达量上调,ESCRT-II 亚基的基因(*VPS45*、*CHMP2B* 和 *CHMP3*) mRNA 表达量下调,ESCRTs 亚基的基因 mRNA 表达量的不平衡说明 *VPS28* 基因敲降确实造成了 ESCRTs 稳定性受到了影响;泛素-蛋白酶体系统的大部分相关基因(*SG15*、*UBE2L6*、*UBC*、*SPPI*、*MX1*、*PSMC1*、*PSMC3* 和 *PSMC5*) mRNA 表达量上调,说明细胞中泛素化水平上升。因此,该结果从 RNA 水平证明了 *VPS28* 基因被敲降确实可以通过抑制细胞中 ESCRTs 的功能而增加泛素-溶酶体和泛素-蛋白酶体系统在细胞中泛素化作用,从而造成细胞中泛素化水平上升。

本研究通过检测乳脂合成相关基因的 mRNA 表达量也证实了该结果:乳脂合成过程的合成酶相关基因 *FASN*、*ASCL1*、*SCD* 和 *DGAT1* 及转运酶相关基因 *FABP3*、*ADFP* 和 *CD36* 的 mRNA 表达量均显著上调。乳脂的主要成分是甘油三酯,约占 99%,由磷脂膜包被形成乳脂肪球从奶牛乳腺组织的乳腺上皮细胞释放到牛奶中^[1]。乳脂的合成途径主要有两种:一种直接利用血液中游离的长链脂肪酸(18~24 个碳原子)进行合成;另一种是利用乙酸、丙酸等前体小分子从头合成短链和中链脂肪酸(4~14

个碳原子)再合成乳脂。游离的长链脂肪酸需要与细胞膜上受体作用通过转运蛋白 *CD36* 进入细胞中,前体小分子物质则可以直接进入细胞中并在合成酶 *FASN* 等酶类作用下从头合成短链和中链脂肪酸,这些脂肪酸在激活酶和结合酶 *ASCL1*、*FABP3* 等酶类作用下被转运至内质网中,再逐步通过内质网中的甘油二酯酰基转移酶 *DGAT1* 和酰基辅酶 A 去饱和酶 *SCD* 等酶类作用下合成甘油三酯;甘油三酯在内质网小叶中形成并累积成脂肪滴,在脂蛋白 *ADFP* 等协助下被分泌到腺泡中,最后通过与细胞膜上受体相结合使得脂肪滴通过细胞的顶浆膜释放到细胞外形成乳脂^[2,4,5,19]。*CD36* 是细胞膜上的转运膜蛋白,通过翻转作用将细胞外的游离脂肪酸转运进细胞中,并且研究发现 *CD36* 直接受泛素化调控^[20]。本研究发现 *VPS28* 基因被敲降可显著增加脂肪酸转运蛋白 *CD36* 基因的 mRNA 表达量,这就表明乳腺上皮细胞中 *VPS28* 基因被敲降可以通过增加 *CD36* 表达量而提高细胞转运脂肪酸的能力。脂肪酸合成酶 *FASN* 和酰基辅酶 A 合成酶 *ASCL1* 是前体分子合成脂肪酸过程中的关键酶^[21,22],本研究发现 *VPS28* 基因被敲降可显著增加脂肪酸合成酶 *FASN* 和酰基辅酶 A 合成酶 *ASCL1* 的 mRNA 表达量,这就表明乳腺上皮细胞中 *VPS28* 基因被敲降可以提高细胞中前体分子合成脂肪酸的能力。甘油二酯酰基转移酶 *DGAT1* 和酰基辅酶 A 去饱和酶 *SCD* 是细胞中合成甘油三酯的限速酶,可以被甘油二酯特异激活,*DGAT1* 和 *SCD* 基因高表达可以使细胞中甘油三酯合成增加^[4,23]。脂肪分化蛋白 *ADFP* 是细胞中脂肪滴表面蛋白,是脂质蓄积的特异性标志^[24,25],本研究发现 *VPS28* 基因被敲降可以显著增加 *DGAT1*、*SCD* 和 *ADFP* 基因的 mRNA 表达量,这就从 RNA 水平表明 *VPS28* 被敲降可以增加细胞中甘油三酯的合成。同时,本研究通过电子显微镜的观察,确实在 *VPS28* 基因敲降的奶牛乳腺上皮细胞中观察到大量蓄积的脂肪滴,这就再次证实了 *VPS28* 基因被敲降可以增加乳脂的合成。综上所述,本研究从 RNA 水平证明了 *VPS28* 基因 5'-UTR 的突变位点-58C>T 可以降低其 mRNA 表达量,影响 ESCRTs 的稳定性而阻碍细胞中泛素-溶酶体系统对泛素化膜蛋白的降解以及泛素-蛋白酶体系统对泛素化胞质蛋白的降解,进而增加了细胞转运游离脂肪酸和从头合成脂肪酸的能力,导致

细胞中乳脂的合成增加。

综上所述,本文在前期研究基础上,选择 *VPS28* 基因作为影响奶牛乳脂性状的重要候选基因,选择该基因的突变位点-58C>T 作为重要突变位点,并对该基因和该突变位点进行了 RNA 水平的功能验证,发现 *VPS28* 基因及其突变位点可以通过泛素化信号通路调控乳脂的合成,为 *VPS28* 基因的功能研究以及奶牛乳脂性状相关分子遗传标记的筛选提供科学依据。此外,泛素化信号通路在细胞中参与多种信号通路,本研究结果有望揭示泛素化信号通路调控乳脂合成的新机制,并为泛素化信号通路在其他奶牛生产性状或其他畜禽生产性状的作用机制研究提供参考。

参考文献(References):

- [1] Walther TC, Farese RV. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1791(6): 459–466. [DOI]
- [2] Heid HW, Keenan TW. Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *Eur J Cell Biol*, 2005, 84(2–3): 245–258. [DOI]
- [3] Bauman DE, Mather IH, Wall RJ, Lock AL. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J Dairy Sci*, 2006, 89(4): 1235–1243. [DOI]
- [4] Bionaz M, Looor JJ. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics*, 2008, 9: 366. [DOI]
- [5] McManaman JL, Russell TD, Schaack J, Orlicky DJ, Robenek H. Molecular determinants of milk lipid secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2007, 12(4): 259–268. [DOI]
- [6] Jiang L, Liu X, Yang J, Wang H, Jiang J, Liu L, He S, Ding X, Liu J, Zhang Q. Targeted resequencing of GWAS loci reveals novel genetic variants for milk production traits. *BMC Genomics*, 2014, 15: 1105. [DOI]
- [7] Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, 2009, 458(7237): 445–452. [DOI]
- [8] Elia N, Sougrat R, Spurlin TA, Hurley JH, Lippincott-Schwartz J. Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(12): 4846–4851. [DOI]
- [9] Agromayor M, Soler N, Caballe A, Kueck T, Freund SM, Allen MD, Bycroft M, Perisic O, Ye Y, McDonald B, Scheel H, Hofmann K, Neil SJ, Martin-Serrano J, Williams RL. The UBAP1 subunit of ESCRT-I interacts with ubiquitin via a SOUBA domain. *Structure*, 2012, 20(3): 414–428. [DOI]
- [10] Hoeller D, Dikic I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature*, 2009, 458(7237): 438–444. [DOI]
- [11] Winter V, Hauser MT. Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(3): 115–123. [DOI]
- [12] Saksena S, Sun J, Chu T, Emr SD. ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(12): 561–573. [DOI]
- [13] Hirsch C, Gauss R, Horn SC, Neuber O, Sommer T. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature*, 2009, 458(7237): 453–460. [DOI]
- [14] Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, 2001, 106(2): 145–155. [DOI]
- [15] Sevrioukov EA, Moghrabi N, Kuhn M, Krämer H. A mutation in *dVps28* reveals a link between a subunit of the endosomal sorting complex required for transport-I complex and the actin cytoskeleton in *Drosophila*. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(5): 2301–2312. [DOI]
- [16] Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 1994, 79(1): 13–21. [DOI]
- [17] da Fonseca PC, He J, Morris EP. Molecular model of the human 26S proteasome. *Mol Cell*, 2012, 46(1): 54–66. [DOI]
- [18] Liu L, Jiang L, Ding XD, Liu JF, Zhang Q. The regulation of glucose on milk fat synthesis is mediated by the ubiquitin-proteasome system in bovine mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 465(1): 59–63. [DOI]
- [19] Reinhardt TA, Lippolis JD. Bovine milk fat globule membrane proteome. *J Dairy Res*, 2006, 73(4): 406–416. [DOI]
- [20] Smith J, Su X, El-Maghrabi R, Stahl PD, Abumrad NA. Opposite regulation of CD36 ubiquitination by fatty acids and insulin: effects on fatty acid uptake. *J Biol Chem*, 2008, 283(20): 13578–13585. [DOI]
- [21] Roy R, Ordovas L, Zaragoza P, Romero A, Moreno C, Altarriba J, Rodellar C. Association of polymorphisms in the bovine FASN gene with milk-fat content. *Anim Genet*, 2006, 37(3): 215–218. [DOI]
- [22] Bionaz M, Looor JJ. ACSL1, AGPAT6, FABP3, LPIN1, and SLC27A6 are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation. *J Nutr*, 2008, 138(6): 1019–1024. [DOI]
- [23] Tao H, Chang GJ, Xu TL, Zhao HJ, Zhang K, Shen XZ. Feeding a high concentrate diet down-regulates expression of ACACA, LPL and SCD and modifies milk composition in lactating goats. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130525. [DOI]
- [24] McManaman JL, Zabaronick W, Schaack J, Orlicky DJ. Lipid droplet targeting domains of adipophilin. *J Lipid Res*, 2003, 44(4): 668–673. [DOI]
- [25] Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res*, 1998, 294(2): 309–321. [DOI]