

梧桐籽油和罗格列酮对绵羊组织中脂代谢相关酶基因表达的影响

史晓雪¹ 牛占宇¹ 幸超¹ 张三润² 闫婉姝¹ 张润厚^{1*}

(1. 内蒙古农业大学 动物科学学院, 呼和浩特 010018;

2. 内蒙古医科大学 基础教研部, 呼和浩特 010110)

摘要 为研究饲料中添加硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(SCD)的抑制剂(梧桐籽油)和促进剂(罗格列酮)对育肥绵羊背最长肌及皮下脂肪中脂代谢关键调节因子和相关酶 mRNA 表达量的影响, 选用 18 只平均体重为 27.71 ± 2.64 kg、生理状况相似的杂交公羊(美利奴♂×小尾寒羊♀)随机分为 3 组, 每组 6 只, 进行单栏饲养(2.0 m 长×1.2 m 宽)。对照组(C 组)饲喂含 4.8% 胡麻籽的饲料, 梧桐籽油组(W 组)饲喂对照组饲料+15 g/d 梧桐籽油, 罗格列酮组(L 组)饲喂对照组饲料+8 mg/d 罗格列酮。试验期 50 d, 其中过渡期 10 d, 预饲期 5 d, 正式试验期为 35 d。结果表明: 1) 与对照组相比, W 组背最长肌和皮下脂肪中 PPAR- γ mRNA 表达量分别上调了 42% 和 28%, 背最长肌中 SREBP-1 和 SCD mRNA 表达量分别下降了 20% 和 24% ($P < 0.05$); 2) 与对照组相比, L 组背最长肌中 PPAR- γ 和 SREBP-1 mRNA 表达量均有不同程度的提高, 分别提高了 93% 和 35% ($P < 0.05$), FAS、LPL 和 SCD mRNA 表达量分别提高了 36%、56% 和 22% ($P < 0.05$), L 组皮下脂肪中 PPAR- γ 和 FAS mRNA 的表达量分别提高了 25% 和 32% ($P < 0.05$)。研究表明梧桐籽油可以提高背最长肌及皮下脂肪中 PPAR- γ mRNA 的表达量, 降低背最长肌中 SREBP-1 和 SCD mRNA 的表达量; 罗格列酮可以提高背最长肌中 PPAR- γ 、SREBP-1、FAS、LPL 和 SCD mRNA 的表达量, 提高皮下脂肪中 SREBP-1 和 FAS mRNA 的表达量。

关键词 绵羊; 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶; 梧桐籽油; 罗格列酮; 基因表达

中图分类号 S513

文章编号 1007-4333(2018)10-0071-09

文献标志码 A

Effects of phoenix tree seed oil and rosiglitazone on the expression of enzymes related to lipid metabolism of sheep tissues

SHI Xiaoxue¹, NIU Zhanyu¹, XING Chao¹, ZHANG Sanrun², YAN Wanshu¹, ZHANG Runhou^{1*}

(1. College of Animal Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. Department of Basic Education, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

Abstract The objective of this study was to investigate the effects of dietary supplementation of SCD inhibitor (phoenix tree seed oil) and accelerator (rosiglitazone) on the key lipid metabolism regulator and related enzyme's mRNA expressions in the longissimus muscle and subcutaneous adipose tissues of fattening sheep. Eighteen crossbreed ram (Merino sheep ♂ × Thin-tail Han sheep ♀), which were similar in body weight [(27.71 ± 2.64) kg] and body condition, were randomly divided into 3 groups with 6 sheep in each group. The sheep in control group (C group) were fed a basal diet + 4.8% linseeds; those in phoenix tree seed oil group (W group) were fed the C group diets supplemented with 15 g/d phoenix tree seed oil and those in rosiglitazone group (L group) were fed the C group diets supplemented with 8 mg/d rosiglitazone. The trial period lasted 50 d including 10 d of transition period, 5 d of pretrial period and 35 d of trial period. The results showed that: 1) Compared to animals in control diet, the expression of PPAR- γ mRNA in the longissimus muscle and subcutaneous adipose of animals in W group were increased by 42% and

收稿日期: 2017-12-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360560)

第一作者: 史晓雪, 硕士研究生, E-mail: shixiaoxue1994@163.com

通讯作者: 张润厚, 教授, 主要从事反刍动物营养学研究, E-mail: runhouzhang@hotmail.com

28%, respectively. The expression of SREBP-1 and SCD mRNA in the longissimus muscle were decreased by 20% and 24% respectively ($P < 0.05$); 2) Compared to animals in control diet, The mRNA expression levels of PPAR- γ and SREBP-1 in the longissimus muscle of animals in L group were significantly increased by 93% and 35%, respectively ($P < 0.05$). The expression of FAS, LPL and SCD mRNA were increased 36%, 56% and 22%, respectively ($P < 0.05$). and the expression of PPAR- and FAS mRNA in subcutaneous adipose of animals in L group were significantly increased by 25% and 32%, respectively ($P < 0.05$). These results proved that the phoenix tree seed oil increased the expression of PPAR- γ mRNA in longissimus muscle and subcutaneous adipose, and decreased the expression of SREBP-1 and SCD mRNA in longissimus muscle. The rosiglitazone increased the expression of PPAR- γ , SREBP-1, FAS, LPL and SCD mRNA in longissimus muscle and the expression of SREBP-1 and FAS mRNA in subcutaneous adipose.

Keywords sheep; stearoyl-CoA desaturase; phoenix tree seed oil; rosiglitazone; gene expression

近年来,肉羊产业在内蒙古等边疆少数民族地区发展迅速,羊肉在肉类消费中所占的比例不断上升。但是,羊肉中的脂肪含量很高,有40%的脂肪是饱和脂肪,而饱和脂肪与肥胖病、高血压、冠心病和各种癌症有关。因此,降低羊肉的脂肪含量,增加共轭亚油酸(CLA)等功能性脂肪酸的比例,对于促进消费者的健康饮食具有重要意义。已研究表明,乳脂中CLA的64%~78%是由反式油酸(TVA)通过SCD的脱氢作用生成的^[1],而牛肉中CLA的86%是由TVA通过SCD的脱氢作用生成的^[2]。人体可利用TVA合成CLA^[3]。目前,关于CLA的内源生成途径在其他动物中研究较多,而在绵羊的组织中研究较少,因此,本试验拟通过在绵羊的饲料中添加SCD的抑制剂(梧桐籽油)及促进剂(罗格列酮)来探究脂代谢关键调节因子(PPAR- γ 和SREBP-1)以及脂代谢关键酶(FAS、LPL、ACC和SCD)在绵羊背最长肌及皮下脂肪中基因表达的影响,从而为CLA等功能性脂肪酸在不同体组织中的代谢机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验在优牧特公司土左旗内蒙古农业大学养殖基地进行(2016年11月12日至2017年1月1日)。试验动物由优牧特公司提供,4月龄左右、遗传背景一致、平均体重为 27.71 ± 2.64 kg、健康状况良好的杂交公羊(美利奴 δ × 小尾寒羊 η)。试验期间所用的基础日粮为商品育肥料(由优牧特公司提供)。梧桐籽油是采用亚临界低温萃取的方法所提取,产自陕西森弗天然制品有限公司。罗格列酮是由成都恒瑞制药有限公司生产的(购买于国大药房)。

1.2 试验设计及饲料

按完全随机分组方式将18只杂交公羊(美利奴

δ × 小尾寒羊 η)进行分组,随机分成3组,对照组(C组),梧桐籽油组(W组),罗格列酮组(L组),每组6只,实行单栏饲养方式(2.0 m × 1.2 m)。3个试验组所对应的饲料设计如下:1)C组饲喂含胡麻籽4.8%的饲料;2)W组饲喂对照组的饲料+15 g/d 梧桐籽油;3)L组饲喂对照组的饲料+8 mg/d 罗格列酮。试验基础饲料的精粗比为60:40(质量比)。基础饲料组成及营养水平见表1。基础饲料中脂肪酸组成及含量见表2。

1.3 饲养管理

在试验开始前用聚维酮碘消毒羊舍及周边环境,并对试验器具进行严格清洗消毒。在试验开始前,对所有试验羊统一进行驱虫,并接种疫苗。每天在07:00和17:00饲喂试验羊,自由饮水。试验期共50 d,包括10 d的过渡期,5 d的预饲期,35 d的正式试验期。W组的梧桐籽油在与饲料充分混匀后饲喂。L组的罗格列酮在饲喂前投放(口服)。

1.4 样品采集及处理

饲养试验结束后,所有试验动物拉到屠宰场屠宰,宰前试验羊禁食12 h,但可自由饮水。屠宰后立即从第十二肋骨处采取皮下脂肪及背最长肌各100 g左右,迅速置于液氮中,于-80 °C下保存,用于脂肪代谢相关酶mRNA表达量的测定。

1.5 测定指标及方法

1.5.1 组织总RNA的提取

绵羊背最长肌及皮下脂肪组织中总RNA的提取严格按Trizol总RNA提取试剂(Takara)说明书进行。全部操作需要在冰上进行,具体步骤如下:

1) 将约100 mg的组织样品放在-80 °C冷冻研钵中,立即加入适量的液氮,迅速研磨成粉末状,随即加入1 mL的RNAiso Plus继续进行研磨,直至均匀,待其融化后转移至1.5 mL无酶无菌的离心管中,室温下静置5 min。

表 1 基础饲料组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis)

原料 Ingredient	数值/% Value	指标 Index	数值/% Value
玉米 Corn	32.00	粗蛋白质 CP	13.26
玉米胚芽粕 Corn germ meal	8.00	粗脂肪 CF	5.82
葵花壳 Sunflower shell	16.00	中性洗涤纤维 NDF	34.23
羊草 <i>Leymus chinensis</i>	24.00	酸性洗涤纤维 ADF	18.90
酒糟 DDGS	5.00	钙 Ca	1.19
豆粕 Soybean meal	8.00	总磷 P	0.41
麸皮 Bran	2.50	代谢能 ^② /(MJ/kg)	8.23
预混料 ^① Premix	2.00		
石粉 Stone powder	1.40		
食盐 NaCl	0.60		
磷酸氢钙 CaHPO ₄	0.50		

注:① 每千克预混料中各营养成分分别为:碘 55 mg、锰 1 750 mg、钴 25 mg、硒 22.5 mg、铁 3 000 mg、锌 2 000 mg、维生素 A 400 000 IU、维生素 D 30 000 IU、维生素 E 3 000 IU。② 代谢能是计算值,其他营养水平均为实测值。

Note: ① The nutrient levels per kilogram premix are: I 55 mg, Mn 1 750 mg, Co 25 mg, Se 22.5 mg, Fe 3 000 mg, Zn 2 000 mg, VA 400 000 IU, VD 30 000 IU, VE 3 000 IU. ② All values are measured values except metabolizable energy.

表 2 试验饲料脂肪酸组成及含量

Table 2 Fatty acid composition and content of the test diet %

脂肪酸 Fatty acid	基础饲料 Basal diet	胡麻籽 Flaxseed	梧桐籽油 Phoenix tree seed oil
C16:0	0.89	2.67	6.15
C18:0	0.13	1.68	3.96
C18:1 n-9	1.71	9.47	22.83
C18:2 n-6	2.95	7.27	27.81
C18:3 n-3	0.13	27.13	7.53
C ₁₉ H ₃₄ O ₂	—	—	23.22

2) 加 200 μ L 的氯仿,在旋涡振荡器上充分振荡、混匀,室温下静置 5 min,然后 4 $^{\circ}$ C 下离心 12 000 r/min 15 min。

3) 移其上清液至新的 Eppendorf 管中,加入和上清液同等量的异丙醇,室温下静置 10 min,然后 4 $^{\circ}$ C 下离心 12 000 r/min 15 min。

4) 弃去其上层清液,加入 1 mL 的 75% 乙醇,洗涤沉淀,然后 4 $^{\circ}$ C 下离心 12 000 r/min 5 min。

5) 弃去乙醇,室温条件下自然干燥,得到 Total

RNA 后,用无 RNase 水进行溶解, -80 $^{\circ}$ C 下保存备用。

1.5.2 总 RNA 的检测

1) 浓度的检测:取 2.0 μ L 的总 RNA 溶液,放于全自动酶标仪上,并选择 RNA 选项,直接读取 RNA 的浓度值。其浓度值在 500~1 000 ng/ μ L 之间,可认为符合试验要求。

2) 纯度的检测:取 2.0 μ L 的总 RNA 溶液,放于全自动酶标仪上,测定 OD_{260/280} 值。其 OD_{260/280} 值为 1.9~2.1,可认为 RNA 的纯度较好;OD_{260/280} < 1.8,则表明蛋白杂质较多;OD_{260/280} 值 > 2.2,则表明 RNA 已经降解。

3) 完整性检测:取 4.0 μ L 的总 RNA 溶液和 2.0 μ L 的 6 \times Loading Buffer,充分混合后,在 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳。电泳条件为:电压 120 V,时间 30 min。电泳结束后,放在凝胶成像分析仪中进行拍照,以检测它的完整性。

1.5.3 反转录

根据 Takara 公司的 Prime ScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒要求将之前提取的总 RNA 反转录为

cDNA,全部操作需要在冰上进行,根据 Takara 公司的 Prime Script™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒使用说明书,建立 20.0 μL 的反转录体系。

1.5.4 引物设计与合成

根据 GenBank 中绵羊 FAS、ACC、LPL、SCD、PPAR- γ 、SREBP-1 和 GAPDH 基因序列,由北京六合华大基因科技有限公司合成。引物序列见表 3。

表 3 引物序列
Table 3 Primer sequences

目标 Target	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	GenBank 登录号 GenBank accession no.	长度/bp Length
脂肪酸合成酶 FAS	F:CACAACCCAAACCCCAAGA R:GAGCCACCGAAGCCAAA	XM_015098375.1	116
乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC	F:GAAAATCCACAACGCCAACCC R:CCTCCACCTCCACAAACCA	NM_001009256.1	80
脂蛋白脂酶 LPL	F:CCCAGCAGCATTATCCAGTGT R:TTCATCCGCCATCCAGTTC	NM_001009394.1	86
硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 SCD	F:GTGGGAAACAAGGCAGGAAG R:GAGTCAGGAGAGAAAGGGAGCA	NM_001009254.1	82
过氧化物酶体增殖物激活受体- γ PPAR- γ	F:CACAGGCCGAGAAGGAAAAG R:TTGGTCAGCGGGAAGGA	XM_015102092.1	133
固醇调节元件结合蛋白-1 SREBP-1	F:CGACACCACCAGCATCAAC R:GCCAGGAGAAGCACCA	XM_015098336.1	138
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH	F:GGTCGGAGTGAACGGATTTG R:TGGCAACGATGTCCACTTTG	NM_001289746	83

1.5.5 实时荧光定量 PCR

采用 SYBR Premix ExTaq™ II 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 扩增的检测。PCR 反应体系为 25.0 μL : SYBR Premix Ex Taq™ II 12.5 μL , 上、下游引物各 1.0 μL , cDNA 模板 2.0 μL 和无酶水 8.5 μL 。选用 GAPDH 基因作为内参。实时荧光定量的反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 退火温度 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 进行 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行基因相对定量分析^[4]。

1.6 数据处理与统计分析

试验数据经 Excel 2003 初步整理后,采用 SAS 9.1 统计软件中 one-way ANOVA 进行方差分析,多重比较采用 Duncan 氏法进行。 $P < 0.05$ 作为差异显著性的判断标准。

2 结果与分析

2.1 饲料中添加梧桐籽油和罗格列酮对绵羊背最长肌中脂代谢关键调节因子和相关酶基因表达的影响

饲料中添加梧桐籽油和罗格列酮对绵羊背最长

肌中脂代谢关键调节因子基因表达的影响见表 4。与对照组相比, W 组中 PPAR- γ mRNA 表达量上调了 42%, SREBP-1 mRNA 表达量下降了 20%, 且均达到显著差异水平 ($P < 0.05$); 与对照组相比, L 组中 PPAR- γ 和 SREBP-1 mRNA 表达量均有不同程度的提高, 分别显著提高了 93% 和 35% ($P < 0.05$) (表 4)。

饲料中添加梧桐籽油和罗格列酮对绵羊背最长肌中脂代谢相关酶基因表达的影响见表 5。由表 5 可知, 与对照组相比, W 组中 FAS、ACC 和 SCD mRNA 表达量有所下降, 其中 FAS 和 ACC mRNA 表达量分别下降了 8% 和 11%, 但未达到显著水平 ($P > 0.05$), SCD mRNA 表达量下降了 24% ($P < 0.05$), 另外, W 组中 LPL mRNA 表达量提高了 14%, 但未达到显著水平 ($P > 0.05$); 与对照组相比, L 组中 FAS、ACC、LPL 和 SCD mRNA 表达量均有不同程度的提高, 分别提高了 36%、13%、56% 和 22%, 其中 ACC mRNA 表达量未达到显著上调水平 ($P > 0.05$), 其余均达到显著水平 ($P < 0.05$)。

表 4 饲料中添加梧桐籽油和罗格列酮对绵羊背最长肌中脂代谢关键调节因子基因表达的影响

Table 4 Effects of supplementation of phoenix tree seed oil and rosiglitazone on the expression of lipid metabolism key regulators in the longissimus dorsi muscle of sheep

项目 Item	对照组 C	梧桐籽油组 W	罗格列酮组 L	标准差 SE	<i>P</i>
过氧化物酶体增殖物激活受体- γ PPAR- γ	1.00 c	1.42 b	1.93 a	0.04	0.023 8
固醇调节元件结合蛋白-1 SREBP-1	1.00 b	0.80 c	1.35 a	0.03	0.030 9

注:同行数据不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),相同或不标注者表示差异不显著($P > 0.05$)。下表同。Note: In the same row, values with different small letters mean significant difference ($P < 0.05$), while with the same letters or no letter mean no significant difference ($P > 0.05$). The same below.**表 5 饲料中添加梧桐籽油和罗格列酮对绵羊背最长肌中脂代谢相关酶基因表达的影响**

Table 5 Effects of supplementation of phoenix tree seed oil and rosiglitazone on the expression of lipid metabolism related enzymes in the longissimus dorsi muscle of sheep

项目 Item	对照组 C	梧桐籽油组 W	罗格列酮组 L	标准差 SE	<i>P</i>
脂肪酸合成酶 FAS	1.00 b	0.92 b	1.36 a	0.04	0.021 9
乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC	1.00	0.89	1.13	0.05	0.525 5
脂蛋白脂酶 LPL	1.00 b	1.14 b	1.56 a	0.03	0.031 4
硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 SCD	1.00 b	0.76 c	1.22 a	0.03	0.041 9

2.2 饲料中添加梧桐籽油和罗格列酮对绵羊皮下脂肪中脂代谢关键调节因子和相关酶基因表达的影响

饲料中添加梧桐籽油和罗格列酮对绵羊皮下脂肪中脂代谢关键调节因子基因表达的影响见表 6。

与对照组相比,两个试验组中 SREBP-1 mRNA 的表达量均无显著差异($P > 0.05$);W 组中 PPAR- γ mRNA 的表达量提高了 28%,L 组中 PPAR- γ mRNA 的表达量提高了 25%,且均达到显著提高水平($P < 0.05$)(表 6)。

表 6 饲料中添加梧桐籽油和罗格列酮对绵羊皮下脂肪中脂代谢关键调节因子基因表达的影响

Table 6 Effect of supplementation of phoenix tree seed oil and rosiglitazone on the expression of lipid metabolism key regulators in subcutaneous fat of sheep

项目 Item	对照组 C	梧桐籽油组 W	罗格列酮组 L	标准差 SE	<i>P</i>
过氧化物酶体增殖物激活受体- γ PPAR- γ	1.00 b	1.28 a	1.25 a	0.04	0.042 8
固醇调节元件结合蛋白-1 SREBP-1	1.00	0.83	1.02	0.03	0.357 8

饲料中添加梧桐籽油和罗格列酮对绵羊皮下脂肪中脂代谢相关酶基因表达的影响见表 7。与对照组相比,W 组中 FAS 和 ACC mRNA 表达量分别下降了 7%和 14%,LPL mRNA 表达量提高了 12%,但均未达到显著水平($P > 0.05$);L 组中 FAS、

ACC、LPL 和 SCD mRNA 表达量均有不同程度的提高,分别提高了 32%、21%、7%和 16%,其中 FAS mRNA 表达量有显著提高($P < 0.05$),其余酶的基因表达量均未达到显著变化水平($P > 0.05$)(表 7)。

表7 饲粮中添加梧桐籽油和罗格列酮对绵羊皮下脂肪中脂代谢相关酶基因表达的影响
Table 7 Effect of supplementation of phoenix tree seed oil and rosiglitazone on the expression of lipid metabolism related enzymes in subcutaneous fat of sheep

项目 Item	对照组 C	梧桐籽油组 W	罗格列酮组 L	标准差 SE	P
脂肪酸合成酶 FAS	1.00 b	0.93 b	1.32 a	0.04	0.025 4
乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC	1.00 ab	0.86 b	1.21 a	0.05	0.053 9
脂蛋白脂酶 LPL	1.00	1.12	1.07	0.06	0.997 3
硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 SCD	1.00	1.00	1.16	0.05	0.087 2

3 讨论与结论

3.1 绵羊饲粮中梧桐籽油和罗格列酮添加量的确定

CLA 存在于哺乳动物的肉制品、乳制品,海产品和植物性食品中,然而其含量和生物活性有很大差异。生物活性高的 CLA 主要来自反刍动物的产品中,其中 75% 以上为 c9t11CLA^[5]。CLA 具有抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、增强机体免疫力、减缓免疫系统副反应、预防肥胖、改善肉质和调节代谢等多种生理功能。因此,目前对 CLA 的合成和来源,以及应该如何提高动物产品中 CLA 的含量的研究受到了广泛的关注。在反刍动物的组织中,TVA 是 CLA 内源合成的重要底物。当给反刍动物饲喂了富含亚麻酸的饲料后,亚麻酸进入瘤胃通过生物氢化作用,产生中间体 TVA,然后通过乳腺等组织中的 SCD 脱氢后形成 CLA,且研究结果显示,78% 的 CLA 是由 TVA 通过 SCD 的去饱和作用而合成的^[6]。因此,本试验在绵羊基础饲粮的基础上添加 4.8% 的胡麻籽,就是为了提高内源生成 CLA 的前体物——TVA 的含量。

本试验用梧桐籽油作为 SCD 的活性抑制剂。梧桐籽油含有大量的不饱和脂肪酸,主要含有 22.83% 油酸、27.81% 亚油酸和 23.22% 亚油酸。SCD1 的活性和基因表达容易受到饲粮中脂肪酸组成和其饱和度的影响,饲粮中的饱和脂肪酸可以增加 SCD1 在组织中的活性,而多不饱和脂肪酸(PUFA)具有相反的作用,具有抑制 SCD1 活性的作用^[6]。Kay 等^[7]在奶牛饲养试验中,曾把富含亚油酸的亚油酸作为 SCD 的活性抑制剂运用,且得到良好的抑制作用。Griinari 等^[1]给产后 200 d 左右的泌乳奶牛真胃灌注 10 g/d 亚油酸后,发现奶牛乳脂肪中的 CLA 主要是由 TVA 经 SCD 的脱氢作用内源合成的。由于梧桐籽油和亚油酸中亚油酸的含量相近,

因此本试验选用梧桐籽油代替亚油酸。由于本试验采用的是直接饲喂法,考虑到瘤胃内的氢化 PUFA 可以达到 90% 左右,所以本试验在绵羊饲粮中添加 15 g/d 的梧桐籽油进行饲养试验。

本试验用罗格列酮作为 SCD 的活性促进剂。罗格列酮是噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂药物,它能显著增强靶组织对胰岛素的敏感性,并发挥拮抗胰岛素抵抗的作用。胰岛素是 SCD 基因转录的高效促进剂,这一作用已经在小鼠、牛、人、鸡的体内和体外试验中得到了证实^[8]。用 8 mg/d 罗格列酮治疗 II 型糖尿病患者后,可提高患者 SCD 活性和基因表达^[9]。在口服噻唑烷二酮类药物后,绵羊瘤胃微生物没有对其进行降解^[10]。本试验为了不影响绵羊的健康状况,在绵羊饲粮中添加 8 mg/d 的罗格列酮进行饲养试验。

3.2 饲粮中添加梧桐籽油和罗格列酮对绵羊组织脂代谢关键调节因子和关键酶的影响

过氧化物酶体增殖物激活受体(Peroxisome proliferators activated receptor,PPAR)是一种转录因子,有 3 种亚型(α 、 β 和 γ)。其中 PPAR- γ 能由多种脂肪酸和其衍生物激活,它是胰岛素细胞间信号传递及脂肪细胞基因表达的主要调控者,参与了脂代谢的调节和脂肪细胞的分化,其主要的靶基因为脂蛋白脂酶(Lipoprotein lipase,LPL)^[11]。有研究表明,在肉牛饲粮中补饲富含不饱和脂肪酸的亚油酸后,背最长肌中 PPAR- γ 的 mRNA 表达水平升高^[6]。这与本试验在饲粮中添加富含不饱和脂肪酸的梧桐籽油的结果相一致,在绵羊饲粮中添加梧桐籽油可以提高其背最长肌和皮下脂肪中 PPAR- γ 的 mRNA 表达水平,进而使组织中 LPL 的基因表达量有上调趋势。罗格列酮是噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂,主要通过 PPAR- γ 结合,进而激活 PPAR- γ 而发挥作用。Muhlhauser 等^[12]研究发现罗格列酮

可以提高胎儿骨骼肌中 PPAR- γ mRNA 的表达。给患有肾病的大鼠用罗格列酮治疗后,发现罗格列酮可提高大鼠肾皮质 PPAR- γ mRNA 的表达,从而缓解肾脏的病理损伤^[13]。刘厂辉等^[14]用 PPAR- γ 基因转染诱导兔骨髓间充质干细胞,发现 PPAR- γ 基因可促进其 LPL mRNA 的表达,这进一步说明了 PPAR- γ 作用的靶基因是 LPL。本研究在饲料中添加罗格列酮,PPAR- γ mRNA 的表达在绵羊背最长肌和皮下脂肪中同样有提高的效果,同时也提高了背最长肌中 LPL mRNA 的表达水平,说明罗格列酮可以通过激活 PPAR- γ ,提高其表达量,进而影响 LPL mRNA 的表达水平。

固醇调节元件结合蛋白(Sterol regulatory element binding proteins, SREBP)是一类膜结合蛋白,SREBP-1 是其中的一个亚型,主要与机体糖代谢和脂代谢有关,是参与脂肪合成基因转录的主要调节因子,其靶基因主要包括脂肪酸合成酶(Fatty acid synthetase, FAS)、乙酰辅酶 A 羧化酶(Acetyl-CoA carboxylase, ACC)和硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(Stearoyl-CoA desaturase, SCD)^[6,15]。陈娜^[6]在肉牛饲料中添加整粒亚麻籽和破碎亚麻籽抑制了其背最长肌中 SREBP-1 的基因表达,同时也下调了 FAS、ACC 和 SCD 的 mRNA 表达水平。在动物饲料中添加富含不饱和脂肪酸的植物油可以下调组织中 FAS、ACC 和 SCD 的基因表达^[16-18]。本研究在添加富含不饱和脂肪酸的梧桐籽油后,对绵羊背最长肌中 SREBP-1 的 mRNA 表达量有下调作用,同时也下调了组织中 SCD mRNA 的表达量,但 SREBP-1 mRNA 表达量的降低仅仅使 FAS 和 ACC 的 mRNA 表达量有下降的趋势,差异不显著,这可能是由于不同品种之间的差异所致,也可能是梧桐籽油的添加量问题,确切的原因有待进一步探索。有研究表明,多不饱和脂肪酸调控 SCD 基因表达的机理是通过抑制 SREBP-1 的转录或活化,以减少 SREBP-1 的活性形式结合在 SCD 基因的启动子上以上调其转录活性,从而抑制了 SCD 基因的转录活性^[19]。曾将苜蓿酸作为 SCD 的活性抑制剂在奶牛饲养试验中运用,并得到较好的抑制效果^[7]。用苜蓿酸处理的细胞中超过 90% 的 SCD 活性被抑制^[20]。所以本试验在添加梧桐籽油后抑制背最长肌中 SCD mRNA 的表达主要有两方面原因:一是多不饱和脂肪酸抑制了 SREBP-1 mRNA 表达量,进而对 SCD 酶 mRNA 的表达产生了抑制作用;二

是由于梧桐籽油中的苜蓿酸是 SCD 酶活性的有效抑制剂,可以通过降低 SCD 基因表达进而影响其活性。罗格列酮是噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂,主要通过 PPAR- γ 结合,进而激活 PPAR- γ 而发挥作用。用胰岛素处理牛的肝细胞,可以提高 SREBP-1 mRNA 的表达水平,同时可以使参与脂肪合成的关键酶 FAS、ACC 和 SCD mRNA 的表达显著升高^[21]。曹姝^[22]用胰岛素处理正常状态下的大鼠,可以上调其骨骼肌细胞中 SREBP-1 的 mRNA 表达量。另外,也有研究表明 PPAR- γ 也参与 SCD 基因的转录水平调控^[19],在羊乳腺上皮细胞中使用 PPAR- γ 特异性激动剂罗格列酮或过表达 PPAR- γ 都能够显著上调 FAS、ACC、SCD 和 SREBP-1 等基因的表达^[23]。本试验在绵羊饲料中添加罗格列酮,提高了背最长肌中 SREBP-1 mRNA 的表达量,同时也提高了 FAS 和 SCD mRNA 表达量,ACC mRNA 表达量也有上升趋势;一方面可能是罗格列酮通过激活 PPAR- γ 进而增强机体对胰岛素的敏感性,从而使 SREBP-1 的 mRNA 表达量上调并影响了其靶基因表达量的上升;另一方面可能是 PPAR- γ 直接对 FAS、ACC、SCD 和 SREBP-1 等的基因表达有上调作用。在男性非糖尿病人的肌筋膜外侧做开放性肌肉活检,发现与罗格列酮接触的瞬間可以增加 ACC 酶的磷酸化,最大效应为 15 min,并在 60 min 时恢复正常^[24]。本试验中添加罗格列酮仅仅使组织中 ACC 的基因表达有上调趋势,但未达到显著水平,可能是由于组织中 ACC 酶的磷酸化已经恢复正常,但也可能由于长期饲喂罗格列酮,使其体内有了一定的累积所致。另外,本试验得出多不饱和脂肪酸能上调背最长肌中 PPAR- γ 的基因表达,但没有发现其对 SREBP-1 和 SCD 等脂代谢相关基因的表达产生相似的影响。虽然激活了 PPAR- γ 能显著上调 SREBP-1 和 SCD 等脂代谢相关基因的表达^[25],但多不饱和脂肪酸又能通过不同的途径抑制 SREBP-1 和 SCD 基因的表达^[26-27]。可能是由于 PPAR- γ 和多不饱和脂肪酸是通过不同的分子机制来调控 SCD 基因的转录活性,维持细胞内各种脂肪含量的平衡进而保持细胞膜的流动性以及细胞内环境的稳态^[28]。

综上所述,根据饲料中添加梧桐籽油降低背最长肌 SCD 基因表达的结果,推测 SCD 基因表达量的降低可能会导致 TVA 向 c9t11CLA 的转化受到抑制,从而降低绵羊背最长肌中 CLA 的含量;而饲

粮中添加罗格列酮增加了背最长肌中 SCD 的基因表达,SCD 可以使饱和脂肪酸脱氢生成单不饱和脂肪酸,也可以增加 TVA 向 c9t11CLA 的转化,所以现推测添加罗格列酮可能会提高绵羊背最长肌中 CLA 及其前体物的含量。

4 结 论

1) 梧桐籽油可以提高背最长肌及皮下脂肪中 PPAR- γ mRNA 的表达量,降低背最长肌中 SREBP-1 和 SCD mRNA 的表达量。

2) 罗格列酮可以提高背最长肌中 PPAR- γ 、SREBP-1、FAS、LPL 和 SCD mRNA 的表达量,提高皮下脂肪中 SREBP-1 和 FAS mRNA 的表达量。

参考文献 References

- [1] Griinari J M, Corl B A, Lacy S H, Chouinard P Y, Nurmela K V V, Bauman D E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta 9$ -desaturase[J]. *Journal of Nutrition*, 2000, 130(9): 2285-2291
- [2] Gillis M H, Duckett S K, Sackmann J R, Keisler D H. Effect of rumen-protected conjugated linoleic acid (CLA) or linoleic acid on leptin and CLA content of bovine adipose depots[J]. *Journal of Animal Science*, 2003, 81(2): 12
- [3] Mosley E E, McGuire M, Williams J E, McGuire M A. Cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is synthesized from vaccenic acid in lactating women[J]. *Nutrition*, 2006, 136(9): 2297-2301
- [4] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [5] Pariiza M W, Park Y, Cook M E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid[J]. *Progress in Lipid Research*, 2001, 40(4): 283-298
- [6] 陈娜. 补饲亚麻籽对延边黄牛肌肉共轭脂肪酸构成及其相关基因表达的影响[D]. 吉林: 延边大学, 2015
Chen N. Effect of linseed on intramuscular conjugated fatty acid composition and its related gene expression in Yanbian yellow cattle[D]. Jilin: Yanbian University, 2015 (in Chinese)
- [7] Kay J K, Mackle T R, Auldism M J, Thomson N A, Bauman D E. Endogenous synthesis and enhancement of conjugated linoleic acid in pasture-fed dairy cows[J]. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 2002, 62: 12-15
- [8] 张蕊, 张宜辉, 邵丹, 王来娣, 龚道清. 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶基因的功能与调控[J]. *生命科学*, 2013, 25(4): 378-382
Zhang R, Zhang Y H, Shao D, Wang L D, Gong D Q. The function and regulation of stearoyl-CoA desaturase gene[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2013, 25(4): 378-382 (in Chinese)
- [9] Risérus U, Tan G D, Fielding B A, Neville M J, Currie J, Savage D B. Rosiglitazone increases indexes of stearoyl-coa desaturase activity in humans; Link to insulin sensitization and the role of dominant-negative mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma[J]. *Diabetes*, 2005, 54(5): 1379-1384
- [10] Ghoreishi S M, Rajaian H, Sheykhzade M, Alikhani M, Rahmani H R, Hajipour A R. Pharmacokinetics of pioglitazone, a thiazolidinedione derivative, in male naeni (iranian fat-tailed) sheep[J]. *Journal of Applied Animal Research*, 2012, 40(3): 208-214
- [11] 彭亦. 过氧化物酶增殖物激活受体 γ 和固醇调节元件结合蛋白-1c 在非酒精性脂肪肝大鼠肝组织中的表达及意义[D]. 湖南: 中南大学, 2011
Peng Y. Peroxisome proliferators activated receptor γ and sterol regulatory element binding protein-1c in nonalcoholic fatty liver rat liver tissue and significance[D]. Hunan: Central South University, 2011 (in Chinese)
- [12] Muhlhausler B S, Morrison J L, Mcmillen I C. Rosiglitazone increases the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in the sheep fetus in late gestation[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(9): 4287-4294
- [13] Chen L Q, Gan H, Du X G, Lv Z M. Effects of rosiglitazone on expressions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and TGF- β in rats with adriamycin nephrosis[J]. *Agricultural and Applied Economics Association*, 2010, 24(5): 955-961
- [14] 刘厂辉, 曾艳辉, 唐海林, 罗怡君, 陈代钦. PPAR- γ 基因修饰对兔骨髓间充质干细胞成脂分化及 ADRP、LPL 表达的影响[J]. *南华大学学报*, 2009, 37(4): 386-389
Liu C H, Zeng Y H, Tang H L, Luo Y J, Chen D Q. Effect of PPAR- γ transfection on differentiation of rabbit MSCs into adipocytes and expression of ADRP and LPL[J]. *Journal of Nanhua University*, 2009, 37(4): 386-389 (in Chinese)
- [15] Moon Y A, Liang G, Xie X, Frank K. The scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals[J]. *Cell Metabolism*, 2012, 15(2): 240
- [16] Khatun J, Loh T C, Akit H, Foo H L, Mohamad R. Fatty acid composition, fat deposition, lipogenic gene expression and performance of broiler fed diet supplemented with different sources of oil[J]. *Animal Science Journal*, 2017, (88)9: 1406-1413
- [17] Iyer M N, Sarmah B C, Tamuli M K, Das A, Kalita D. Effect of dietary sunflower oil and coconut oil on adipose tissue gene expression, fatty acid composition and serum lipid profile of grower pigs[J]. *Archives of Animal Nutrition*, 2012, 66(4): 271
- [18] Joseph S J, Pratt S L, Pavan E, Rekaya R, Duckett S K.

- Omega-6 fat supplementation alters lipogenic gene expression in bovine subcutaneous adipose tissue[J]. *Gene Regulation and Systems Biology*, 2010, 4(4):91
- [19] 姚大为. 奶山羊硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 基因(SCD1)启动子功能及转录调控机理研究[D]. 陕西:西北农林科技大学, 2016
- Yao D W. Promoter function and transcriptional regulation mechanism of stearoyl-CoA desaturase 1 gene of dairy goat [D]. Shanxi:Northwest A&F University, 2016(in Chinese)
- [20] Gomez F E, Bauman D E, Ntambi J M, Fox B G. Effects of sterculic acid on stearoyl-coa desaturase in differentiating 3t3-l1 adipocytes [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2003, 300(2):316-326
- [21] 丁红研. 胰岛素、胰高血糖素通过 AMPK 信号通路调控犊牛肝细胞脂代谢的机制[D]. 吉林:吉林大学, 2014
- Ding H Y. The mechanism of insulin and glucagon regulating lipid metabolism by the AMPK signaling pathway in calf hepatocytes[D]. Jilin:Jilin University, 2014(in Chinese)
- [22] 曹姝. 胰岛素对骨骼肌细胞 SREBP-1c 的调节作用[D]. 江苏:南京医科大学, 2015
- Cao S H. Regulatory effects of insulin on SREBP-1c in skeletal muscle cells [D]. Jiangsu: *Nanjing Medical University*, 2015(in Chinese)
- [23] Shi H, Luo J, Zhu J, Li J, Sun Y, Lin X. PPAR γ regulates genes involved in triacylglycerol synthesis and secretion in mammary gland epithelial cells of dairy goats[J]. *PPAR Research*, 2013(6):310948
- [24] Skrobuk P, Kuoppamaa H, Hiukka A, Koistinen H A. Acute exposure to rosiglitazone does not affect glucose transport in intact human skeletal muscle[J]. *Metabolism Clinical & Experimental*, 2010, 59(2):224-230
- [25] Shi H B, Luo J, Yao D W, Zhu J J, Xu H F, Shi H P. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ stimulates the synthesis of monounsaturated fatty acids in dairy goat mammary epithelial cells via the control of stearoyl-coenzyme a desaturase[J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(12):7844-7853
- [26] Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, DeBoseBoyd R A, Bashmakov Y. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXP [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(11):6027
- [27] Botolin D, Wang Y, Christian B. Docosahexaenoic acid (22:6, n-3) regulates rat hepatocyte SREBP-1 nuclear abundance by Erk- and 26S proteasome-dependent pathways[J]. *Journal of Lipid Research*, 2006, 47(1):181-192
- [28] Zulkifli R M, Parr T, Salter A M. Regulation of ovine and porcine stearoyl coenzyme A desaturase gene promoters by fatty acids and sterols[J]. *Journal of Animal Science*, 2010, 88(8):2565-2075

责任编辑:杨爱东