

· 基础研究 ·

PNPLA7在脂肪组织中的表达及调控的初步研究

蔡丽娥,张 许,季学涛,潘锦堃,厉璐帆,李 仲*

南京医科大学罕见代谢性疾病研究重点实验室,生物化学与分子生物学系,江苏省人类功能基因组重点实验室,江苏 南京 211166

[摘要] 目的:明确PNPLA7在小鼠不同组织及营养状态下的表达水平;探索不同因素对PNPLA7表达的调节作用。方法:利用生物信息学初步分析PNPLA7在正常组织器官及细胞系中的表达,荧光定量PCR的方法进一步验证PNPLA7在小鼠不同组织及不同营养状态下的表达情况。免疫印迹法及荧光定量PCR法检测脂肪细胞分化过程中和脂肪细胞在胰岛素及脂肪酸处理下PNPLA7表达水平的变化。结果:PNPLA7主要表达于代谢旺盛的组织或细胞中。在饥饿条件下,小鼠脂肪组织PNPLA7的表达水平比正常饮食条件下高,但小鼠饥饿后又喂食,其脂肪组织PNPLA7的表达水平又降低。脂肪细胞中PNPLA7表达在胰岛素处理时下调,油酸处理时上调。且在脂肪细胞分化过程中,PNPLA7表达前期下降,后期逐渐升高。结论:PNPLA7在脂肪组织中的表达水平较高,脂肪细胞分化过程中其表达水平先下降后升高,且受胰岛素及不饱和脂肪酸调控。

[关键词] PNPLA7;脂代谢;脂肪细胞**[中图分类号]** R329.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2020)01-004-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20100102

The expression and regulation of PNPLA7 in adipocyte

CAI Li'e, ZHANG Xu, JI Xuetao, PAN Jinkun, LI Lufan, LI Johnzhong*

Key Laboratory of Rare Metabolic Disease, Department of Molecular Biology and Biochemistry, Nanjing Medical University, The Key Laboratory of Human Functional Genomics of Jiangsu Province, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To explore the distributions of PNPLA7 in different tissues of mouse under different nutritional status and its expression levels in the process of adipocyte differentiation as well as insulin or fatty acids treatment on adipocytes. **Methods:** The distributions of PNPLA7 in different tissues and cell lines were preliminarily analyzed using bioinformatics, and the expressions of PNPLA7 in different tissues of mouse under different nutritional status were further identified by real time PCR. In addition, 3T3-L1 cells were induced for differentiation and then the PNPLA7 expressions in the process of differentiation and in the mature adipocytes treated with insulin or fatty acids were detected by real time PCR and Western blot. **Results:** PNPLA7 was mainly expressed in active metabolic tissues or cells. The expression level of PNPLA7 in adipocytes under starvation was higher than that in normal diet, but became lower when re-fed after starvation status. The expression level was down-regulated in insulin treatment and up-regulated in oleic acids treatment. Besides, the expression of PNPLA7 was down-regulated in the early stage and up-regulated in the later stage of 3T3-L1 cells differentiation. **Conclusion:** PNPLA7 is enriched in adipocytes and its expression level changes from down-regulation to up-regulation during the adipocyte differentiation. Besides, its expression is regulated by insulin and oil acids.

[Key words] PNPLA7; lipid metabolism; adipocyte

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(01):004-009]

[基金项目] 国家重点研发计划(2018YFA0506904);国家自然科学基金(31271268);江苏省自然科学基金(BK20150991)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lizhong@njmu.edu.cn

脂肪组织是机体能量代谢的重要器官,不同的脂肪组织存在的位置不同,主要功能及代谢方式也不同^[1]。脂肪组织可分为白色脂肪组织、棕色脂肪组织和米色脂肪组织^[2],在调节机体的能量代谢,维

持其稳态平衡中具有十分重要的作用。内脏脂肪的形成或功能障碍,会导致脂肪肝、心血管疾病、胰岛素抵抗、2型糖尿病等相关代谢性疾病的发生^[3]。而棕色脂肪及米色脂肪被认为是一种“有益”的脂肪组织,在多种小鼠模型中已经证实了它们的激活能够有效预防肥胖、2型糖尿病等代谢性疾病^[4-5]。因此,对脂肪代谢的深入研究,将为代谢性疾病的治疗提供重要的理论参考及可能靶点。

在人类基因组中共发现9个 patatin 样磷脂酶结构域蛋白(patatin-like phospholipase domain containing protein1-9, PNPLA1-9)^[6]。PNPLA2即 ATGL(adipose triglyceride lipase),主要分布于脂肪组织和肝脏中,是脂滴代谢的重要蛋白^[7]。PNPLA3 又称为脂营养蛋白(adiponutrin),其突变体(I418M)与非酒精性脂肪肝有关^[8]。PNPLA7具有溶血磷脂酶活性,在体外可以水解溶血磷脂酸和溶血磷脂胆碱^[9]。目前,关于 PNPLA7在脂肪组织中的作用还没有相关研究报道,本文通过研究小鼠不同组织及营养状态下 PNPLA7的分布及在脂肪细胞分化过程中、胰岛素和脂肪酸处理的脂肪细胞中 PNPLA7表达水平的变化,为研究 PNPLA7在脂肪中的功能及作用机制提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

C57/BL6J 小鼠购自南京大学模式动物研究所;3T3-L1 细胞由南京医科大学韩晓教授惠赠;PNPLA7 抗体由本实验室自制;PPAR- γ 抗体、Tubulin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;Calnexin 抗体购自加拿大 Stressgen 公司;蛋白 marker 购自美国 Bio-Rad 公司;TRIzol、胰岛素、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、地塞米松(DEX)、油酸(OA)、棕榈酸(PA)购自美国 Invitrogen 公司;DMEM 高糖培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,细胞培养皿和细胞培养孔板均购自美国 Corning 公司,引物由上海捷瑞基因有限公司合成,逆转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自美国 Thermo Fisher 公司;SYBR Green 购自瑞士 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和处理

将小鼠分为3组,正常饮食组:待小鼠体征稳定直接取其脂肪组织;饥饿组:将小鼠饥饿24 h后再取其脂肪组织;饥饿再喂食组:将小鼠先饥饿24 h、再喂食12 h后取脂肪组织进行QPCR检测。

1.2.2 3T3-L1 细胞培养、分化和处理

3T3-L1 细胞置于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM高糖完全培养基中于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养,隔天换液。待细胞生长至汇合度达80%~90%后,用胰酶消化并接种于24孔板中,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养,待细胞培养至接触抑制2 d后加入分化液 I (IBMx 0.05 mmol/L+DEX 1 μ mol/L+胰岛素 10 μ g/L+10%胎牛血清+DMEM),培养2 d,再换上分化液 II (胰岛素 10 μ g/L+10%胎牛血清+DMEM)继续培养2 d后换完全培养液(10%胎牛血清+DMEM培养液)至细胞分化成熟。

将培养分化好的3T3-L1细胞铺板于24孔板中,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养,待细胞培养汇合度达80%,分别用不同浓度的胰岛素、OA、PA处理细胞24 h后收取细胞样品进行后续实验。

1.2.3 RNA 提取及相对定量分析

小鼠组织在PBS中洗净血液残留后切取30~40 mg置于含1 mL TRIzol的匀浆管中匀浆;细胞用PBS洗涤2次,加入1 mL/孔 TRIzol吹打并收集于1.5 mL EP管中。氯仿-异丙醇抽提RNA,NanoDrop微量核酸测定仪进行定量及纯度分析。

逆转录试剂盒逆转录为cDNA保存于-20 $^{\circ}$ C。实时荧光定量PCR按照cDNA 1 μ L,SYBR 5 μ L,上、下游引物(2.5 mol/L)各0.75 μ L,去离子水2.5 μ L加入到PCR管中,反应在罗氏 Lightcycler 480 II 型实时荧光定量PCR仪上进行,反应程序为:预变性95 $^{\circ}$ C,1 min;95 $^{\circ}$ C,10 s;60 $^{\circ}$ C,1 min,40~50个循环;95 $^{\circ}$ C,1 min;以 $2^{-\Delta C_t}$ 计算目的基因相对表达量。

目的基因和内参引物如下:PNPLA7上游引物5'-GAGCAACCACAGTGCATGCT-3',下游引物5'-TGGGTACCTGCGCTTGATAGA-3';PPAR- γ 上游引物5'-CACAATGCCATCAGGTTTGG-3',下游引物5'-GCTGGTTCGATATCACTGGAGATC-3';AP2上游引物5'-CACCATCCGGTCAGAGAGTACTT-3',下游引物5'-CGGTGATTTTCATCGAATTCCA-3';PREF1上游引物5'-TTCTCAGGCAACTTCTGTGAGATC-3',下游引物5'-GGAAGTCACCCCCGATGTC-3';内参基因36B4上游引物5'-CACTGGTCTAGGACCCGAGAAG-3',下游引物5'-GGTGCCTCTGGAGATTTTCG-3'。

1.2.4 Western blot

3T3-L1细胞加入50 μ L细胞裂解液,置于冰上20 min,刮下细胞,转移至1.5 mL EP管中,于4 $^{\circ}$ C离心机12 000 g离心10 min,转移上清至新EP管中。用

BCA法测定样品蛋白浓度,加入上样缓冲液,煮5 min使其变性。定量后的蛋白进行SDS-PAGE电泳,转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温孵育抗体过夜,TBST洗膜,孵育二抗,TBST洗膜,ECL化学发光法检测蛋白表达。

1.3 统计学方法

所有计量数据均使用GraphPad Prism6软件进行统计学分析。定量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)进行描述,两组间比较采用双尾t检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PNPLA7在小鼠组织及细胞中的表达

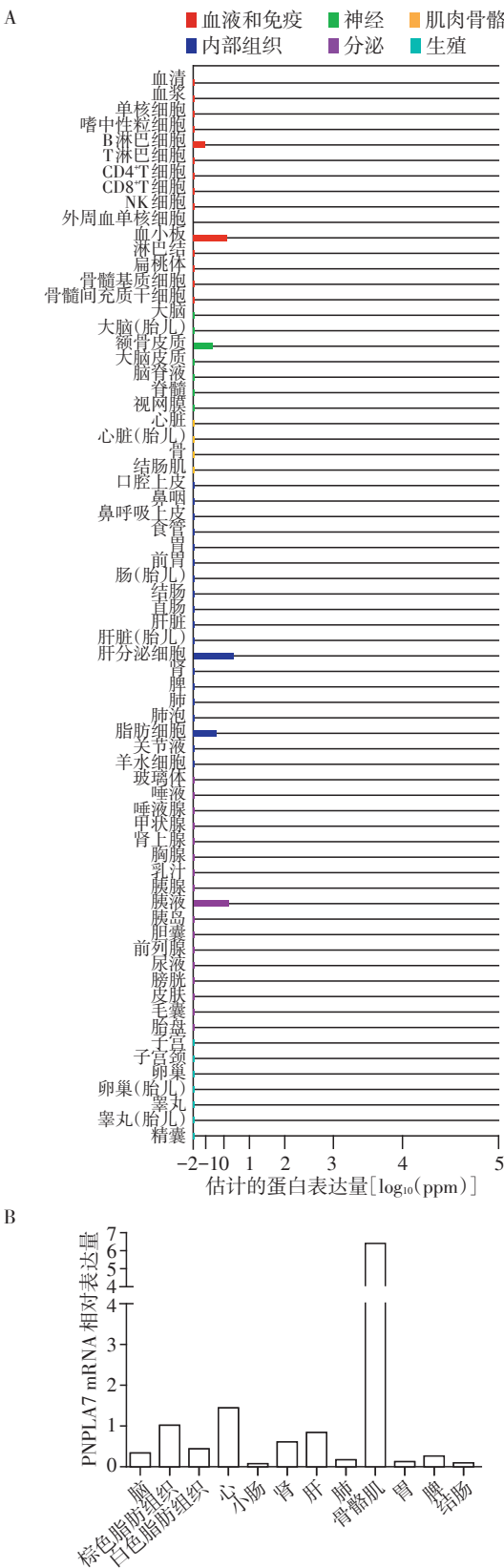
运用生物信息学的方法初步分析PNPLA7在各组织器官及细胞系中的表达水平(图1A),结果显示PNPLA7主要表达于血液系统、内分泌系统组织中。进一步提取C57/BL6J小鼠的各组织mRNA进行Q-PCR检测分析,发现PNPLA7 mRNA主要表达于肌肉、心脏、肝脏、脂肪等代谢旺盛的组织中(图1B),其中,PNPLA7在棕色脂肪组织中的表达要高于白色脂肪组织。

2.2 不同营养状态小鼠脂肪组织中PNPLA7R的表达

脂肪组织的重要功能是储存脂肪作为能源供应于需要能量的组织,因此对小鼠进行饥饿一再喂食造模实验检测PNPLA7在不同营养状态小鼠脂肪中的表达水平。结果表明与正常饮食组小鼠相比,无论棕色脂肪还是白色脂肪,在饥饿状态下小鼠PNPLA7的表达水平升高或有升高趋势,而饥饿再喂食后的小鼠相对于饥饿组小鼠脂肪组织PNPLA7的表达则降低或有降低趋势(图2)。提示PNPLA7可能与脂肪组织的能量代谢有关。

2.3 PNPLA7表达受胰岛素及不饱和脂肪酸调控

在饮食状态下,动物体内的胰岛素水平升高^[3]。所以,再喂食后小鼠脂肪组织中PNPLA7表达水平的降低是否与胰岛素水平的升高有关?我们分别将分化的3T3-L1脂肪细胞用不同浓度胰岛素处理后收取细胞样品进行Western blot分析,结果显示与无胰岛素处理相比,胰岛素处理浓度在 $1 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$ 时,PNPLA7的表达水平开始明显降低,胰岛素处理浓度在 $1 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$ 时,PNPLA7的表达水平达到最低(图3A),这与饥饿再喂食组小鼠的实验结果相一致,说明PNPLA7的表达受胰岛素负调控。脂肪细胞中含有大量的油脂,而油脂是由甘油和脂肪酸组成的,因此,我们进一步探索脂肪酸对PNPLA7的表



A:生物信息学分析PNPLA7在各组织及细胞中的表达(数据来源: Genecards); B: Q-PCR 检测 C57/BL6J 小鼠各个组织中 PNPLA7 mRNA 表达水平(与棕色脂肪组织相比), $n=3$ 。

图1 PNPLA7在小鼠中表达水平分析
Figure 1 PNPLA7 expression level analysis in mouse

达调控。用不同浓度不饱和脂肪酸油酸或饱和脂肪酸棕榈酸处理分化后的3T3-L1脂肪细胞进行Western blot分析,发现在用油酸处理时,PNPLA7的表达水平呈非浓度依赖性升高,但用棕榈酸处理时,PNPLA7的表达水平则无明显变化(图3B),说明油酸可以诱导PNPLA7的表达。

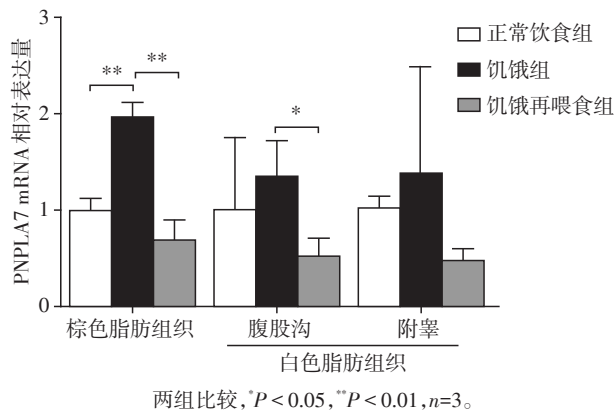


图2 不同营养状态下脂肪组织中PNPLA7的表达水平
Figure 2 The expression level of PNPLA7 in adipose tissue on different nutritional state

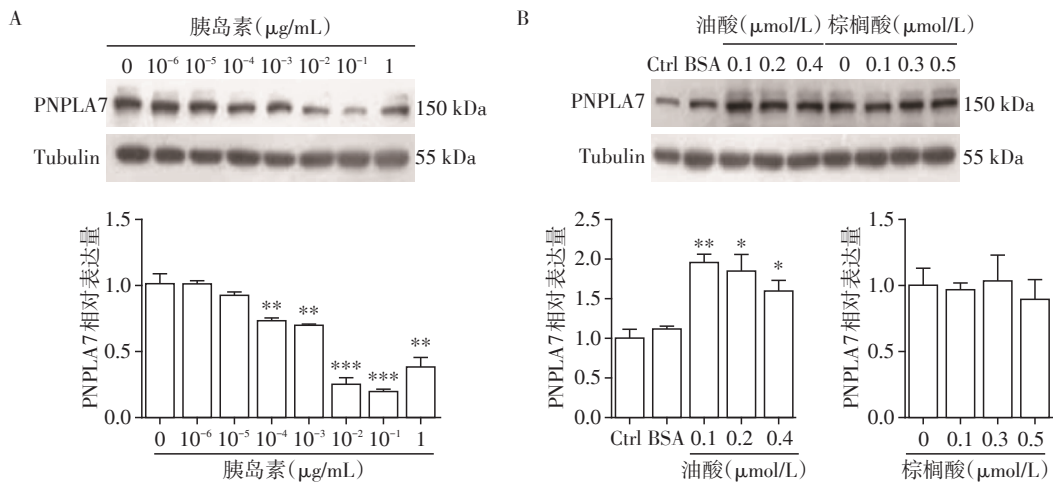
2.4 3T3-L1分化过程中PNPLA7表达水平变化
收取分化不同天数3T3-L1细胞,分别提取RNA及蛋白分析分化相关标志分子和PNPLA7的表达水平变化。Q-PCR检测分化相关标志分子PPAR- γ 、AP2随着分化逐渐升高,分化抑制分子PREF1的表达自分化开始就持续下降,而PNPLA7的表达水平在分化前期下降,在后期随着分化的过程的进行逐渐升高(图4A)。同样地,在蛋白水平上进一步证

实随分化过程的进行,分化标志分子PPAR- γ 蛋白水平升高,PNPLA7蛋白表达水平也在分化前期显著下降,而在分化的第6天显著升高(图4B),以上结果提示PNPLA7的表达水平在分化过程的前期下降,中后期开始显著升高。

3 讨论

肥胖是体内能量代谢平衡被打破的表现,而肥胖又会引起一系列相关的代谢性疾病^[10]。脂肪组织在机体能量代谢的稳态中发挥着至关重要的作用,脂肪细胞中最主要的成分是脂滴,占细胞体积的90%,是机体内储存中性脂肪、磷脂及未酯化的胆固醇细胞器。表面有很多与脂质代谢相关的蛋白,如PAT家族蛋白(perilipin1、ADRP、Tip47)^[11]、CIDE家族蛋白(CIDEA、CIDEB、CIDEA)等都与脂质代谢密切相关^[12]。与脂滴内脂质代谢相关的很多蛋白的生物学功能还有待探索,但是与脂滴内甘油三酯(triglyceride, TG)分解的关键性脂酶ATGL已经被研究清楚。PNPLA2即ATGL直接作用于TG,将TG分解为1个甘油二酯和1个脂肪酸,此步骤是TG水解过程中的限速步骤。PNPLA3的突变会导致没有催化活性的PNPLA3积聚在脂滴表面,同时改变肝脏中脂类物质的构成,并引起严重的脂肪肝病^[13]。同样也有研究报道PNPLA7在体外有很高的溶血磷脂酶活性,能够水解溶血磷脂^[14]。这些结果都说明了PNPLA蛋白家族在脂质代谢中起着重要的作用,已成为脂肪代谢研究的热点。

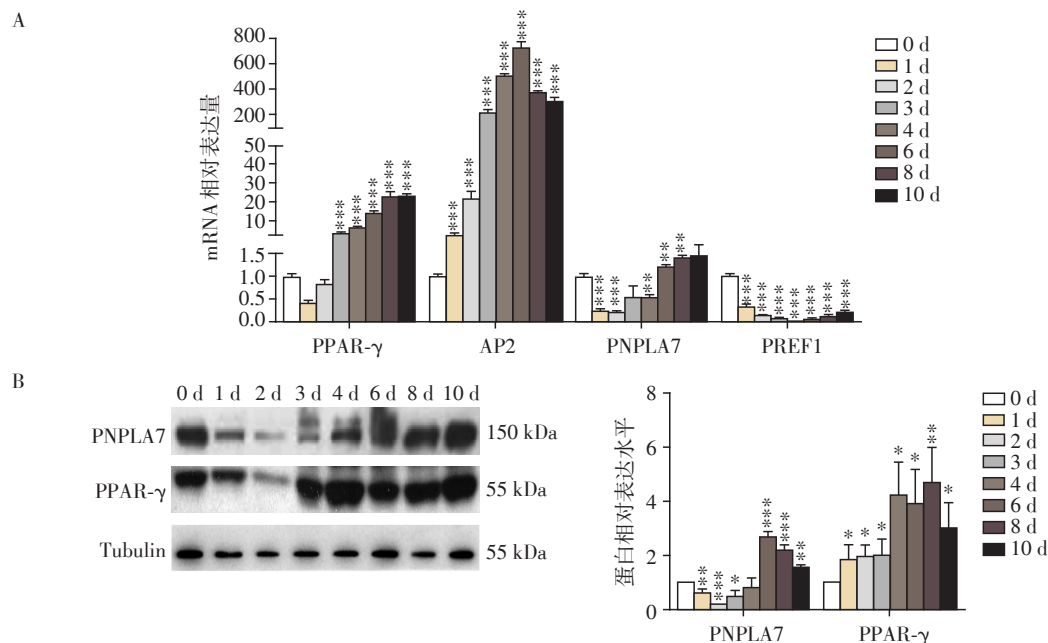
本研究首先利用生物信息学和Q-PCR的方法



A: Western blot 检测不同浓度胰岛素处理的3T3-L1脂肪细胞中PNPLA7表达水平,与对照组(0 μg/mL)相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; B: Western blot 检测不同浓度脂肪酸处理的3T3-L1脂肪细胞中PNPLA7表达水平,与对照组(BSA)相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 PNPLA7表达受胰岛素及油酸调控

Figure 3 Regulation of PNPLA7 protein by insulin and oleic acid



A: Q-PCR 检测 3T3-L1 细胞分化标志分子 PPAR-γ、AP2、PNPLA7 及 PREF1 表达水平; B: Western blot 检测 3T3-L1 细胞 PNPLA7 及 PPAR-γ 蛋白表达水平; 与 0 d 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图4 3T3-L1 分化过程中 PNPLA7 及相关基因的表达水平

Figure 4 PNPLA7 and associated gene expression level in the process of 3T3-L1 cell differentiation

明确了 PNPLA7 主要在分布于代谢旺盛的组织或细胞中,如肝脏、脂肪、肌肉等,提示 PNPLA7 与能量代谢密切相关。而脂肪作为能量代谢的重要器官,不同营养情况下机体中的相关代谢蛋白也会发生不同变化。因此本研究设置正常饮食组、饥饿组和饥饿再喂食组,对小鼠进行不同的饮食处理,模拟不同的营养状态,Q-PCR 检测结果显示,与正常饮食组小鼠相比,饥饿组小鼠的脂肪组织 PNPLA7 表达水平升高或有升高趋势,但是饥饿再喂食后 PNPLA7 的表达减少,进一步提示 PNPLA7 与能量代谢有关。饥饿再喂食小鼠胰岛素含量升高,是否是导致 PNPLA7 表达水平降低的原因呢?因此,我们将分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞用不同浓度的胰岛素处理,PNPLA7 的表达水平在 $1 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$ 胰岛素处理时,开始出现明显降低的现象。我们进一步探索脂肪酸是否会影响 PNPLA7 的表达。用不同浓度的油酸处理时,PNPLA7 的表达水平出现明显升高,但用不同浓度的棕榈酸处理时,PNPLA7 的表达水平无变化,说明 PNPLA7 受胰岛素及单不饱和脂肪酸调控。细胞分化过程是大量需能及脂质积累的过程,油酸可以诱导 PNPLA7 的表达,那 PNPLA7 在脂肪细胞的分化过程又是如何变化的?我们用 3T3-L1 细胞诱导分化为脂肪细胞,分别收取不同分化程度的细胞用 Q-PCR 及 Western blot 检测 PNPLA7

的表达水平,结果显示在细胞分化的第 1~3 天,PNPLA7 的表达水平较第 0 天相比下调,上述研究结果显示胰岛素可以下调 PNPLA7 的表达,而诱导 3T3-L1 细胞分化的分化液中就含有胰岛素,且在细胞分化的前期,主要是信号通路的转导及转录因子发挥作用,细胞主要合成分化相关的酶类或蛋白,此时细胞脂肪酸合成是比较少的,胰岛素抑制 PNPLA7 的表达更有优势。而在分化中后期(第 4 天开始),脂肪酸的合成(饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸)显著增加,不饱和脂肪酸对 PNPLA7 的诱导比胰岛素的抑制作用更有优势,所以在细胞分化中后期,PNPLA7 的表达逐渐上调。因此本文推测 PNPLA7 的表达可能是分化过程不同因素共同调控的综合效应,具体机制还有待进一步探索。本研究通过对不同组织及营养状态下脂肪组织及脂肪细胞的 PNPLA7 表达水平及调控的初步探索,为研究 PNPLA7 在脂肪中的功能及作用机制提供了实验基础。

[参考文献]

- [1] ROSEN E D, SPIEGELMAN B M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis [J]. Nature, 2006, 444(7121): 847-853
- [2] VAZQUEZ-VELA M E, TORRES N, TOVAR A R. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity [J]. Arch Med Res, 2008, 39(8): 715-728

- [3] CEDERBERG A, GRONNING L M, AHREN B, et al. FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance [J]. *Cell*, 2001, 106(5):563-573
- [4] SEALE P, CONROE H M, ESTALL J, et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(1):96-105
- [5] KOPECKY J, CLARKE G, ENERBÄCK S, et al. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity[J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(6):2914-2923
- [6] KIENESBERGER P C, OBERER M, LASS A, et al. Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(Suppl):S63-S68
- [7] ZIMMERMANN R, STRAUSS J G, HAEMMERLE G, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase [J]. *Science*, 2004, 306 (570) : 1383-1386
- [8] HE S, MCPHAUL C, LI J Z, et al. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(9):6706-6715
- [9] KIENESBERGER P C, LASS A, PREISS-LANDL K A, et al. Identification of an insulin - regulated lysophospholipase with homology to neuropathy target esterase[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(9):5908-5917
- [10] TCHERNOF A, DESPRES J P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update[J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(1): 359-404
- [11] BICKEL P E, TANSEY J T, WELTE M A. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1791(6):419-440
- [12] NISHIMOTO Y, TAMORI Y. CIDE family - mediated unique lipid droplet morphology in white adipose tissue and brown adipose tissue determines the adipocyte energy metabolism [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2017, 24 (10) : 989-998
- [13] PETER A, KOVAROVA M, NADALIN S, et al. PNPLA3 variant I148M is associated with altered hepatic lipid composition in humans[J]. *Diabetologia*, 2014, 57(10): 2103-2107
- [14] 雷永强,王秀云,李 仲. 小鼠PNPLA7敲降重组腺病毒的构建及其生物学功能的初步研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(2):155-160
- [收稿日期] 2019-06-13

(上接第003页)

- 肠外科杂志, 2016, 19(10):1081-1083
- [18] XIE D, YU C, GAO C, et al. An optimal approach for laparoscopic D3 lymphadenectomy plus complete mesocolic excision(D3+CME)for right-sided colon cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2017, 24(5):1312-1313
- [19] 龚建平. 膜解剖的兴起与混淆[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2019, 22(5):401-405
- [20] 张建平,沈 健,董小刚,等. 胃癌完整系膜切除术的实用膜解剖学初探[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2019, 22 (10):926-931
- [21] SHEN J, DONG X, LIU Z, et al. Modularized laparoscopic regional en bloc mesogastrium excision (rEME) based on membrane anatomy for distal gastric cancer[J]. *Surg Endosc*, 2018, 32(11):4698-4705
- [收稿日期] 2019-12-17