

· 基础研究 ·

OSBPL2 基因缺陷型巴马小型猪肥胖相关特征的分析

王天明¹, 曾华沙¹, 王 盈^{1,2}, 杨海元^{1,2}, 姚 俊¹, 鲁雅洁¹, 魏钦俊¹, 曹 新^{1,2*}, 戴一凡^{1,2}

¹南京医科大学医学遗传学系, ²江苏省异种移植重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:分析氧化固醇结合样蛋白2(oxysterol binding protein-like 2, OSBPL2)基因缺陷型巴马小型猪肥胖相关的表型特征和可能机制。方法:将3月龄野生型(wild type, WT)和OSBPL2缺陷型(mutant type, MT)巴马小型猪饲喂高脂饲料(high fat diet, HFD)。喂食9个月后检测体重、皮下脂肪厚度, HE染色观察肝脏脂肪变性, 电镜观察肝脏组织亚细胞结构, 检测血清甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶等生化指标, 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测肝脏脂肪合成相关基因的变化, Western blot及免疫组织化学法检测脂肪酸结合蛋白4(adipocyte fatty acid binding protein 4, FABP4)及酰基辅酶A氧化酶1(acylcoenzyme A oxidase 1, ACOX1)蛋白表达水平。结果:MT-HFD组体重、皮下脂肪厚度明显高于WT-HFD组($P < 0.05$); HE染色结果显示, MT-HFD组脂肪细胞显著增大($P < 0.001$); MT-HFD组肝脏脂肪空泡变性明显多于WT-HFD组。qRT-PCR、Western blot及免疫组织化学染色结果发现, MT-HFD组肝组织中FABP4蛋白含量明显增加, ACOX1蛋白明显减少;电镜结果显示MT-HFD组肝脏线粒体相关内质网膜长度变短。结论:OSBPL2缺陷引起巴马小型猪肥胖相关表型特征, 可能与抑制脂肪酸 β -氧化、影响能量代谢平衡及促进脂肪分化有关。

[关键词] 氧化固醇结合蛋白样蛋白2; 基因敲除; 巴马小型猪模型; 肥胖

[中图分类号] R589.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)09-1281-08

doi:10.7655/NYDXBNS20200907

Obesity-related phenotypic analysis of OSBPL2 gene knockout Bama miniature pigs

WANG Tianming¹, ZENG Huansha¹, WANG Ying^{1,2}, YANG Haiyuan^{1,2}, YAO Jun¹, LU Yajie¹, WEI Qinjun¹, CAO Xin^{1,2*}, DAI Yifan^{1,2}

¹Department of Medical Genetics, ²Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to analyze the obesity-related phenotypic characteristics and possible mechanism of oxysterol binding protein-like 2 (OSBPL2) gene knockout in Bama miniature pigs. **Methods:** Three month-old wild-type (WT) Bama miniature pigs and OSBPL2 mutant type (MT) Bama miniature pigs were fed with high-fat diet (HFD). Body weight and subcutaneous fat thickness were measured after feeding 9 months; liver steatosis was observed by HE staining; liver subcellular structure was observed by electron microscopy; serum was collected to detect total cholesterol, total triglycerid, high density lipoprotein cholesterol, low density lipoprotein cholesterol, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase; the mRNA expression of genes involved fat synthesis and adipose differentiation in liver were measured by real-time quantitative PCR; the protein expression levels and distributions of adipocyte fatty acid binding protein (FABP4) and peroxisomal acylcoenzyme A oxidase 1 (ACOX1) were detected by Western blot and immunohistochemistry. **Results:** The body weight and subcutaneous fat thickness significantly increased in MT-HFD group ($P < 0.05$). HE staining results showed the area of subcutaneous fat cells increased significantly in MT-HFD group ($P < 0.001$), and a large number of fat vacuoles were observed in the liver tissue of MT-HFD group. the qRT-PCR, Western blot and IHC results showed that FABP4 mRNA and protein expression increased, while ACOX1 expression decreased in pigs of MT-HFD group. Electron microscopy analysis results showed the length of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane decreased in MT-HFD group. **Conclusion:** OSBPL2 deficiency may cause obesity-related phenotypic characteristics in Bama miniature pigs, which may be associated with the

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81771000); 南京医科大学科研创新基金重大项目(2017NUMCX001); 江苏省财政厅转化医学实验室平台建设项目经费支持

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

inhibition of fatty acid β -oxidation, the influence of energy metabolism balance and the promotion of adipose differentiation.

[Key words] oxysterol binding protein-like 2(OSBPL2); gene knockout; Bama miniature pigs; obesity

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(09): 1281-1288]

肥胖是一种由多因素引起的慢性代谢性疾病,表现为个体体内脂肪组织过多和/或脂肪分布异常。分子流行病学调查证实,遗传已成为与肥胖病因学相关的重要因素^[1-2]。基因变异导致脂质代谢紊乱是肥胖发生的主要分子病理学基础。

肥胖相关基因表达水平与脂肪堆积、脂肪细胞分化以及能量代谢调节密切相关。脂肪酸结合蛋白4(adipocyte fatty acid binding protein 4, FABP4)是一种脂肪分化的标志蛋白,在脂质代谢中发挥重要作用。研究表明,FABP4的表达水平与猪的肌肉脂肪发育和积聚呈正相关,并且是反映长白猪和杜洛克猪肌肉脂肪水平的重要指标,FABP4的异常升高促进脂肪分化并引起炎症反应,甚至进一步造成动脉粥样硬化^[3-4]。酰基辅酶A氧化酶1(peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1, ACOX1)是极长链脂肪酸(very-long-chain fatty acids, VLCFA)在过氧化物酶体上进行 β -氧化的限速酶,在能量代谢中发挥重要作用。据报道,ACOX1缺陷导致过氧化物酶体代谢异常,从而导致多种与过氧化物酶体相关的疾病,如肝肾脑综合征(Zellweger syndrome, ZS)、新生儿大脑白质退化症(neonatal adrenoleukodystrophy, NALD)等^[5]。ACOX1的下调抑制了脂肪酸 β -氧化的能力,造成VLCFA堆积,进一步可能引起线粒体损伤。

线粒体相关内质网膜(mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane, MAM)是线粒体与内质网之间的接触位点,它调节多种细胞生物学功能,如脂质代谢、Ca²⁺信号转导、线粒体分离融合、线粒体自噬、内质网应激和炎症免疫等。有报道显示,MAM的结构和功能异常还与肥胖、胰岛素抵抗的发生发展密切相关^[6-8]。

氧化固醇结合蛋白(oxysterol binding protein, OSBP)是一类氧化固醇的受体蛋白,参与细胞内胆固醇的转运和代谢。与OSBP结构具有较高同源性的蛋白被称为OSBP相关蛋白(OSBP-related protein, ORP),ORP家族成员通常被认为是固醇传感器,它将信息传递入细胞以维持脂代谢、能量平衡和参与细胞信号转导。氧化固醇结合蛋白样蛋白2(oxysterol binding protein-like 2, OSBPL2)是ORP蛋白家族的一类重要成员(ORP2),编码该蛋白的基因

定位在人染色体20q13.33上,cDNA全长4 027 bp,编码480个氨基酸,它广泛表达于哺乳动物的多种组织中,参与调节细胞内胆固醇代谢^[9]。研究表明,OSBPL2基因缺陷能够引起细胞内脂质代谢异常^[10],但其在突变动物模型上的相关研究目前未见文献报道。

本课题组为证实OSBPL2基因突变致聋的基因型与表型的相关性,已通过CRISPR/Cas9技术构建了OSBPL2基因缺陷巴马小型猪^[11-12],在成功获得了耳聋表型外,发现基因缺陷小型猪具有明显的肥胖特征。本研究对小型猪的肥胖表型特征和可能机制进行了研究,为深入阐明OSBPL2调节能量代谢、影响脂肪蓄积的分子机制提供了重要的模型动物和实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

OSBPL2基因缺陷型的巴马小型猪由本课题组构建,饲养于南京医科大学江苏省异种移植重点实验室大动物实验基地,接受标准的饲养程序,南京医科大学实验动物福利伦理委员会同意后取材,取材过程均在麻醉下进行。

基础饲料(basic chow, BC)购自江苏正大苏垦猪业有限公司,高脂饲料(high fat diet, HFD)购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司。高脂饲料按如下配方制备:63.5%基础饲料,1.5%胆固醇,15%油脂,10%猪油,10%蛋黄。

FABP4、ACOX1抗体(A0232、A8091,武汉爱博泰克生物科技有限公司)、山羊抗兔IgG二抗(A21020,武汉亚科因生物技术有限公司)、DAB免疫显色试剂(GK347071,上海基因科技股份有限公司)、苏木精及伊红(G1004、G1001,武汉谷歌生物科技有限公司)、异氟烷(O21400,华中海威基因科技有限公司),脂肪合成代谢相关基因引物由北京擎科生物科技有限公司合成(表1)。

1.2 方法

1.2.1 组织标本采集

对缺陷型(mutant type, MT)和野生型(wild-type, WT)仔猪进行耳穿孔筛选。断奶后,所有仔猪均饲

喂基础饲料1个月。根据实验设计,3月龄时饲喂HFD,得到MT-HFD组和WT-HFD组,每组6只。巴马猪饲养至12月龄时处死,取腹部及背部皮下脂肪组织、肝脏组织置于4%多聚甲醛中固定。取肝脏组织置于戊二醛固定液中用于电镜观察。参照文献[13],测量巴马猪胴体肩胛后沿、最后肋处、腰荐接合处距背正中线的4 cm处背部皮下脂肪厚度,3点平均值作为背部皮下脂肪平均厚度,测量并拍照。

1.2.2 HE染色和免疫组化染色

样品石蜡包埋,切成4 μm的薄片。组织切片苏木素染色5~10 min,伊红染色3 min,显微镜下观察HE染色结果。组织切片经柠檬酸盐缓冲液抗原修复,3% H₂O₂孵育,一抗(1:100)4℃孵育过夜,二抗(1:200)室温孵育60 min,DAB显色1~2 min,苏木素染色,显微镜下观察免疫组化的结果。

1.2.3 血脂生化检测

对巴马小型猪处死前1 d禁食过夜后进行颈静脉采血。全血样品500 g离心15 min,分离获得血清。采用BS-230生化分析仪检测甘油三酯(total triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(as-

parate aminotransferase, AST)等生化指标。

1.2.4 电镜观察以及MAM长度的计算

新鲜肝脏组织戊二醛固定,将组织切成60 nm薄片并染色,电镜观察细胞的亚显微结构及内质网、线粒体的位置,选取2 900和11 000的放大倍数进行拍照,用MIB软件和Image J软件分析线粒体及内质网,低于12 nm处认为是MAM,计算MAM平均长度^[14]。

1.2.5 实时定量PCR

取巴马小型猪肝脏组织,使用TRIzol在组织匀浆器中提取总RNA,定量后取1 μg总RNA反转录成cDNA,随后进行实时定量PCR(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)检测。采用20 μL扩增体系:SYBR[®]Green Master Mix (2×) 10 μL, cDNA 1 μL, 上游引物0.5 μL, 下游引物0.5 μL, ddH₂O 8 μL。扩增程序如下:预变性95℃ 5 min;变性95℃ 10 s,退火/延伸60℃ 30 s,共40个循环。目标基因C_t值使用GAPDH基因C_t值校正。引物序列见表1。

1.2.6 蛋白质免疫印迹

取巴马小型猪肝脏组织,使用RIPA裂解液在组织匀浆器中提取总蛋白,用BCA试剂定量。取等量蛋白,10% SDS-PAGE电泳分离并转至硝酸纤维素膜上。5%脱脂奶粉溶液封闭2 h,分别加入FABP4抗体、ACOX1抗体或GAPDH抗体4℃孵育过夜。次日加入相应二抗室温孵育2 h。最后加入ECL化

表1 实时定量PCR引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因名	序列(5'→3')	长度(bp)
GAPDH	上游 GCAAAGTGGACATTGTCGCCATCA	160
	下游 TCCTGGAAGATGGTGATGGCCTTT	
CEBPα	上游 CGTGGAGACTCAACAGAAGG	95
	下游 GCAGCGTGTCAGTTCGCGG	
ACOX1	上游 ATGAGATGGATAATGGCTACCTG	129
	下游 CGTAGGTCAGCTTGTACTCAG	
PLIN2	上游 AGATGAATCCCCTGTGCTG	135
	下游 TGATCGTGGATGTTCTGTGG	
ERLIN2	上游 GACAAAGCTTCTCATTGCAGC	144
	下游 GTCTCCTTCTCCATCACCTTC	
COPA	上游 CTCAGTTTCACCCCTCAGAAG	136
	下游 CCAGTTATTCTCTCACATCCG	
FABP4	上游 AGTCAAGAGCACCATAACCTTAG	136
	下游 AGCCGTGACACCTTTCATG	

GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase); CEBPα: CCAAT增强子结合蛋白α(CCAAT/enhancer-binding protein alpha); PLIN2: 围脂滴蛋白2(Perilipin-2); ERLIN2: 内质网脂筏相关蛋白2(endoplasmic reticulum lipid raft-associated protein 2); COPA: 衣被蛋白α亚基(coatomer subunit alpha)。

学发光试剂利用凝胶成像系统成像。

1.3 统计学方法

计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 GraphPad Prism 进行统计学检验, 两独立样本采用 *t* 检验进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 同月龄巴马小型猪体重及皮下脂肪检测

10月龄MT-HFD巴马猪体重为(70.33 ± 6.04)kg, 显著高于WT-HFD组(52.80 ± 4.60)kg ($P < 0.05$, 表2)。MT-HFD组与WT-HFD组背部皮下脂肪及腹部皮下脂肪厚度差异明显。MT-HFD组背部脂肪厚度为(8.13 ± 0.54)cm, 显著高于WT-HFD组(5.04 ± 0.37)cm ($P < 0.01$), MT-HFD组腹部脂肪厚度为(6.03 ± 0.47)cm, 也显著高于WT-HFD组(4.16 ± 0.76)cm ($P < 0.05$, 表2, 图1)。

2.2 同月龄巴马小型猪皮下脂肪细胞面积的比较

HE染色观察, 与WT-HFD组相比, MT-HFD组背部脂肪细胞体积增大, 腹部脂肪细胞大小较为均一(图2A、B)。为进一步确认, 参照文献[15], 利用Image J软件测量了脂肪细胞的大小。WT-HFD组背部脂肪细胞面积平均值为5 411.38 μm², 而MT-HFD组为5 838.88 μm², 因此对5 000~ < 7 500 μm²的细胞进行比较, 发现没有明显差异, 但MT-HFD组2 500~ < 5 000 μm²的细胞分布比例为(33.65 ±

表2 巴马小型猪体重及皮下脂肪厚度比较

Table 2 Comparison of Bama miniature pigs on weight, thickness of subcutaneous fat ($\bar{x} \pm s$)

组别	WT-HFD组	MT-HFD组
体重(kg)	52.80 ± 4.60	70.33 ± 6.04**
腹部脂肪厚度(cm)	4.16 ± 0.76	6.03 ± 0.47*
背部脂肪厚度(cm)	5.04 ± 0.37	8.13 ± 0.54**
肩胛后沿	6.43 ± 0.40	10.70 ± 0.62***
最后肋处	4.40 ± 0.40	6.60 ± 0.53**
腰荐结合处	4.30 ± 0.30	7.10 ± 0.46***

与WT-HFD组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=6$)。

1.05)%, 低于WT-HFD组的(36.95 ± 1.02)% ($P < 0.05$), 而MT-HFD组7 500~ < 10 000 μm²的细胞分布比例为(18.40 ± 0.43)%, 高于WT-HFD组的(15.03 ± 0.42)% ($P < 0.001$, 图2C), 表明MT-HFD组背部大脂肪细胞比例增加, 小脂肪细胞比例减少。随后又测量了腹部脂肪细胞的面积, 发现WT-HFD组腹部脂肪细胞面积平均值为7 084.75 μm², 而MT-HFD组为7 073.88 μm², 由图2D可见, MT-HFD组2 500~ < 5 000 μm²的细胞分布比例为(20.51 ± 0.87)%, 低于WT-HFD组的(26.61 ± 0.94)% ($P < 0.01$), 并且MT-HFD组5 000~ < 7 500 μm²的细胞分布比例为(31.62 ± 1.36)%, 高于WT-HFD组的(23.77 ± 1.12)% ($P < 0.01$), 7 500~ < 10 000 μm²的细胞分布比例为(27.63 ± 0.58)%, 也高于WT-HFD组的(19.34 ± 0.49)% ($P < 0.001$, 图2D)。以上结果

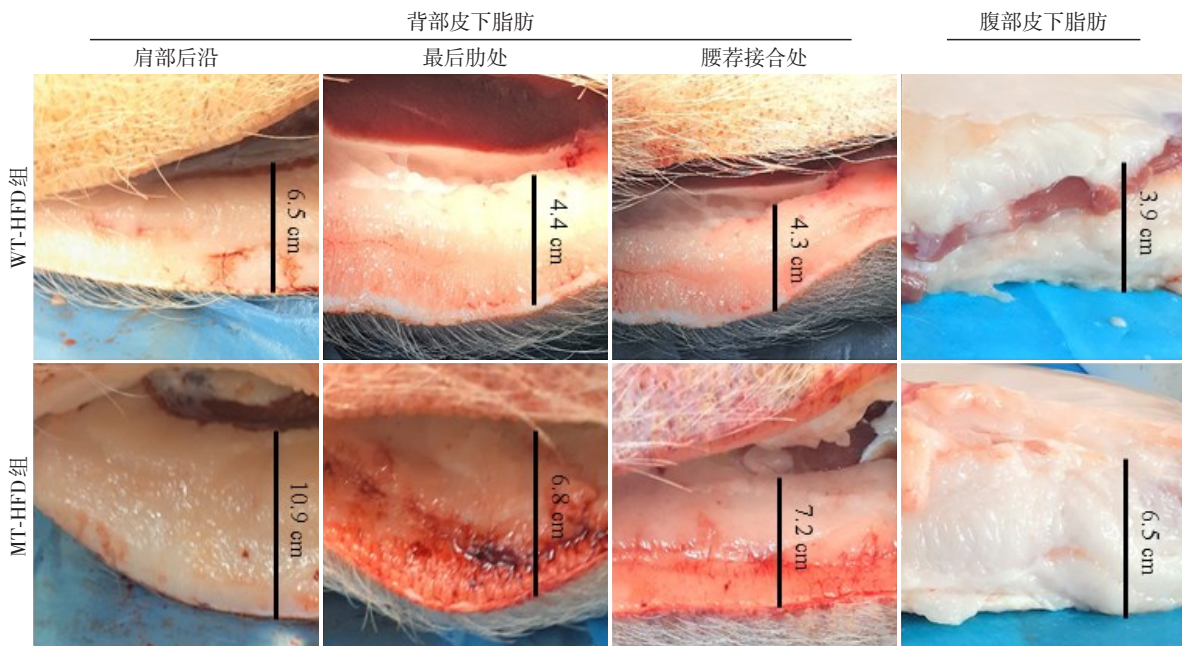


图1 两组巴马小型猪皮下脂肪的检测结果

Figure 1 Thickness of subcutaneous fat in Bama miniature pigs of two groups

表明 MT-HFD 组背部和腹部大脂肪细胞比例增加,小脂肪细胞比例减少,背部和腹部脂肪细胞增大,差异均有统计学意义。

2.3 同月龄巴马小型猪血脂分析

高脂饲养第2、4、8、12个月采血检测血脂水平,MT-HFD组TC、LDL-C均高于WT-HFD组,差异均具有统计学意义(图3)。

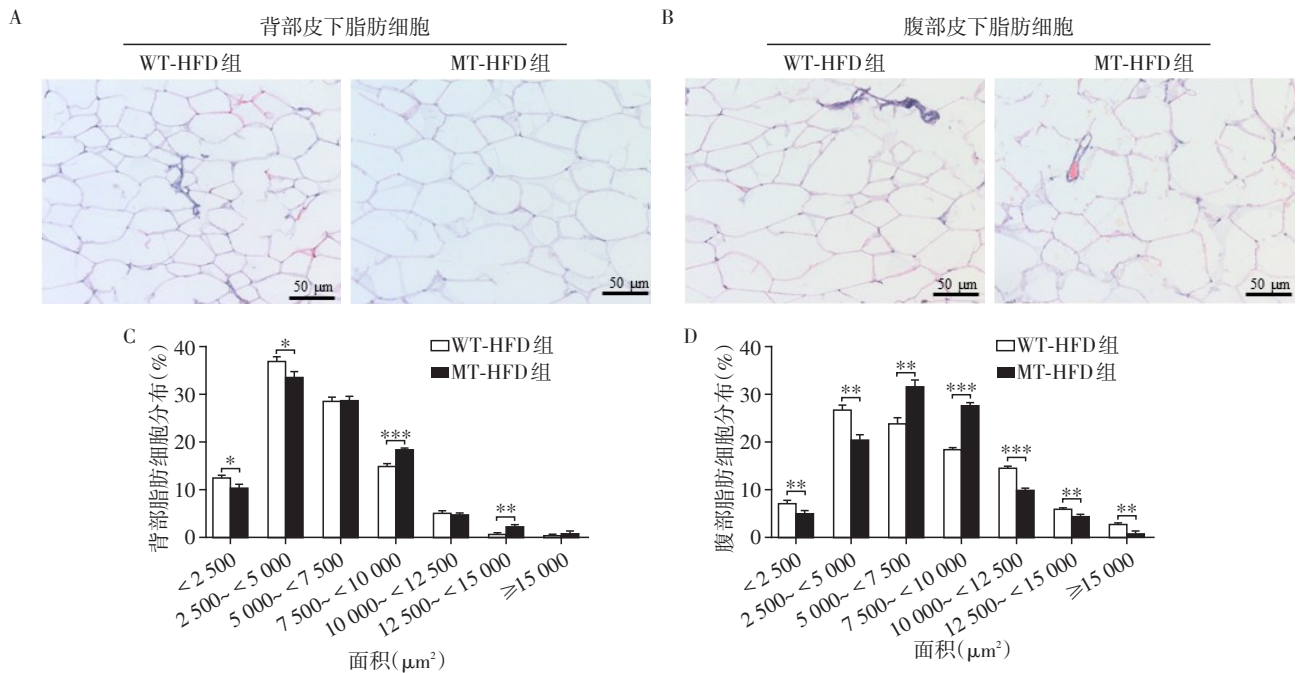
2.4 同月龄巴马小型猪肝组织结构及肝功能生化分析

HE染色可见MT-HFD组脂肪空泡数量明显增加(图4A)。血液生化检测发现,MT-HFD组血清ALT为(55.60 ± 8.80)U/L,明显高于WT-HFD组的

(21.67 ± 7.23)U/L ($P < 0.01$),MT-HFD组血清AST为(40.10 ± 14.48)U/L,与WT-HFD组(40.00 ± 3.30)U/L相比无显著差异(图4B、C),表明MT-HFD组出现了更明显的肝功能损伤。

2.5 电镜下同月龄巴马小型猪肝细胞MAM比较

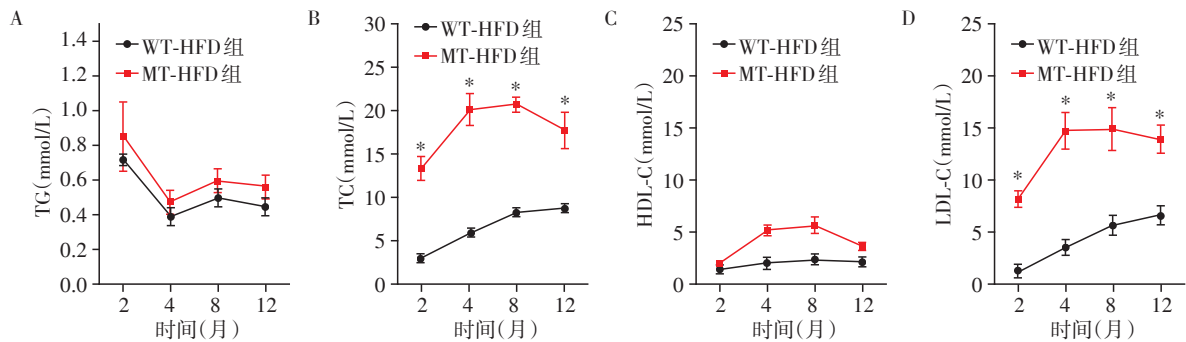
电镜下观察亚显微结构可见,MT-HFD组MAM平均长度为(245.70 ± 10.77)nm,明显低于WT-HFD组(438.80 ± 14.63)nm ($P < 0.001$);MT-HFD组MAM占线粒体周长比例为(33.92 ± 12.65)%,明显低于WT-HFD组(52.36 ± 15.51)%,差异有统计学意义 ($P < 0.01$,图5),表明MT-HFD组MAM长度变短,间距变宽,可能影响内质网与线粒体之间的关联。



A:背部皮下脂肪组织形态学观察;B:腹部皮下脂肪组织形态学观察;C:背部皮下脂肪细胞面积分布比较;D:腹部皮下脂肪细胞面积分布比较。两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ ($n=6$)。

图2 两组巴马小型猪皮下脂肪细胞面积的比较

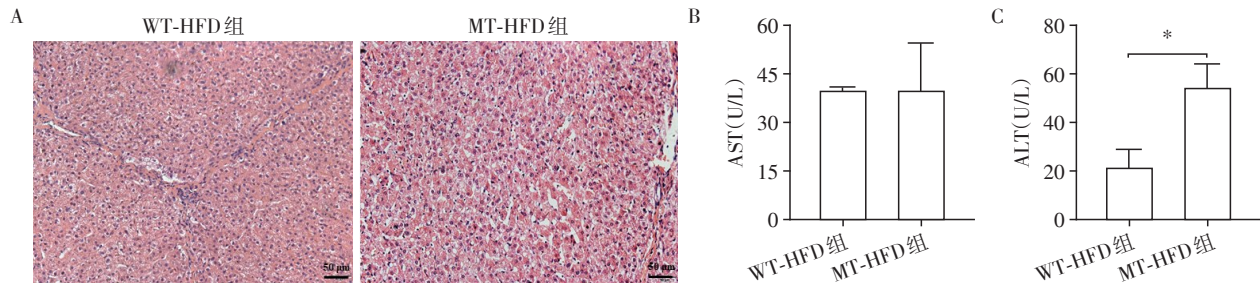
Figure 2 Comparison of subcutaneous fat cell distributions in Bama miniature pigs of two groups



A:两组TG水平比较;B:两组TC水平比较;C:两组HDL-C水平比较;D:两组LDL-C水平比较。与WT-HFD组比较,* $P < 0.05$ ($n=6$)。

图3 两组巴马小型猪血脂水平比较

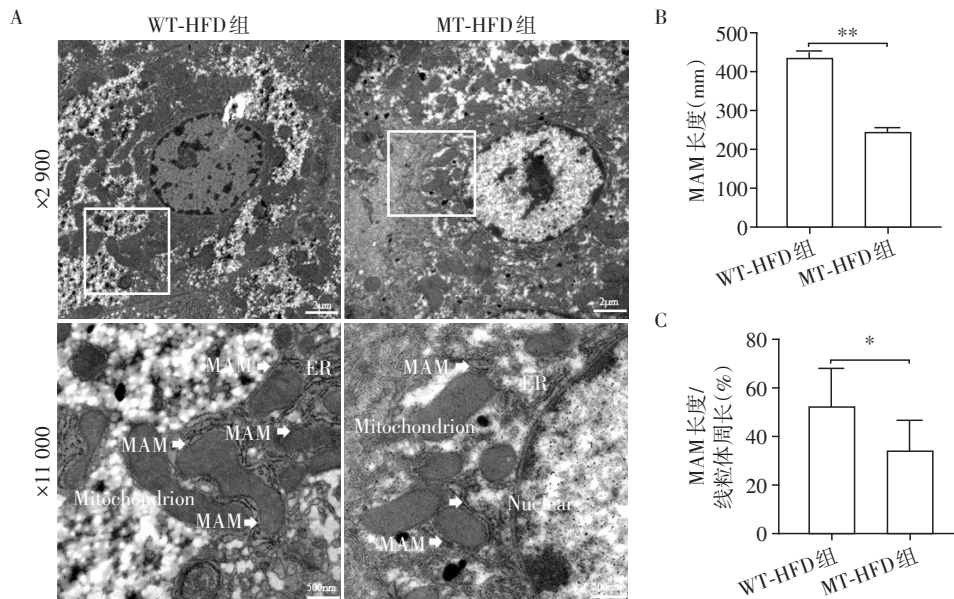
Figure 3 Comparison of serum lipid levels in Bama miniature pigs of two groups



A: 肝脏 HE 染色切片; B: 两组 AST 水平比较; C: 两组 ALT 水平比较。两组比较, * $P < 0.01$, $n = 6$ 。

图4 两组巴马小型猪肝组织病理结构及肝功能分析

Figure 4 Comparison of liver pathologic structure and liver function in Bama miniature pigs of two groups



A: 两组肝细胞电镜观察结果。MAM: 线粒体相关内质网膜(白色箭头); ER: 内质网; Mitochondrion: 线粒体; Nucleus: 细胞核。B: 两组肝细胞内线粒体平均 MAM 长度比较。C: 两组肝细胞内 MAM 长度占线粒体周长百分比比较。两组比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ ($n = 6$)。

图5 电镜下两组巴马小型猪肝细胞线粒体相关内质网膜比较

Figure 5 Electron microscope analysis of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in Bama miniature pigs of two groups

2.6 巴马小型猪肝细胞中脂肪合成代谢相关基因的表达检测

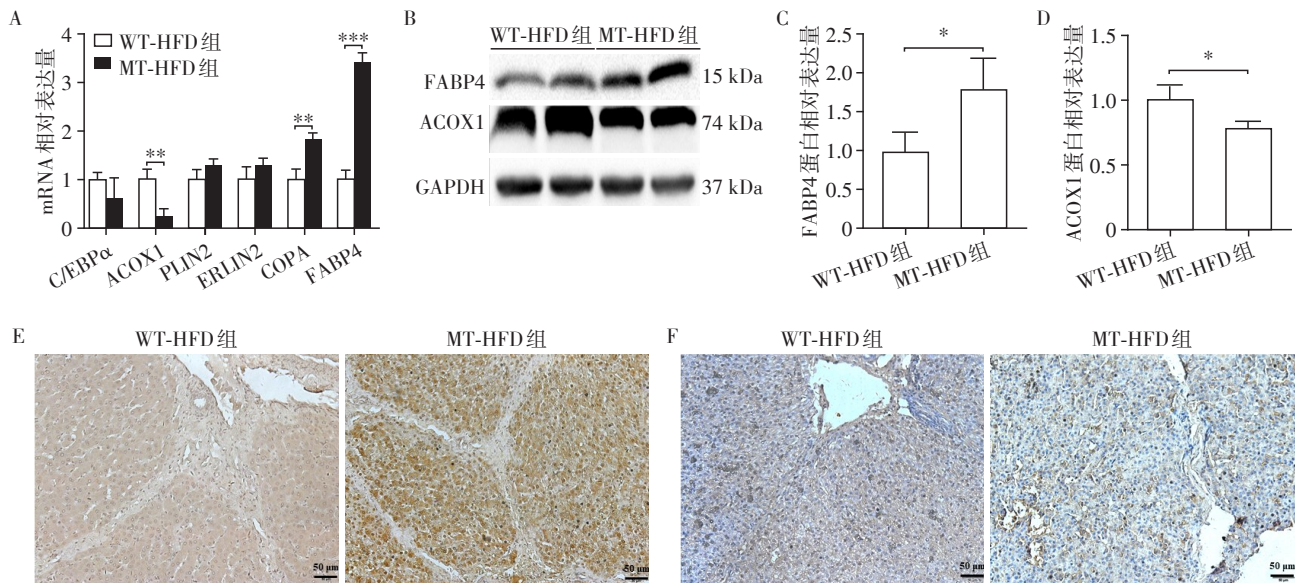
qRT-PCR 检测多个脂肪合成代谢相关基因, 发现 MT-HFD 组肝脏组织 FABP4 的 mRNA 水平明显上调, COPA 的 mRNA 水平也出现上升, ACOX1 的 mRNA 水平明显下调(图 6A)。Western blot 可见 MT-HFD 组 FABP4 表达上调, ACOX1 下调(图 6B~D)。免疫组化显示 FABP4 蛋白在 MT-HFD 组肝脏组织的分布增加, ACOX1 蛋白的分布减少(图 6E、F)。结果提示, MT-HFD 组肝脏内脂肪积聚可能是通过上调 FABP4 表达促进了脂肪分化, 进而下调了 ACOX1, 抑制了细胞内脂肪酰β-氧化。

3 讨论

肥胖是一种由多因素引起的慢性代谢性疾病, 其

根本原因是体内能量的长期不平衡, 主要表现为异常或过多脂肪的蓄积^[16]。肥胖增加了代谢疾病(如 II 型糖尿病和脂肪肝)、心血管疾病(如高血压和中风)、阿尔茨海默症、抑郁症以及癌症的发病风险。

肥胖具有很强的遗传倾向, 可分为单基因综合征肥胖、非综合征肥胖和普通(多因素)肥胖。在单基因综合征肥胖方面, 最典型的有 Prader-Willi 综合征、Prader-Willi 样综合征、脆性 X 综合征、Bardet-Biedl 综合征、Albright 遗传性骨营养不良和 WAGR (Wilms-Tumour-Aniridia-Syndrom) 综合征等^[17]。在单基因非综合征肥胖方面, 目前已发现多个基因, 它们主要是通过瘦素-黑皮质素途径调节体内的能量平衡^[18]。下丘脑通过瘦素及其受体从脂肪组织接收信号, 监控体内能量储备。在普通(多因素)肥胖方面, 目前已发现多种肥胖症相关基因参与了神经元神



A: 肝脏脂肪合成代谢相关基因的mRNA表达水平;B: Western blot检测肝脏组织FABP4和ACOX1蛋白表达水平;C: 两组FABP4蛋白表达的定量分析;D: 两组ACOX1蛋白表达的定量分析;E: 免疫组化检测FABP4蛋白表达水平;F: 免疫组化检测ACOX1蛋白表达水平。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=6$)。

图6 巴马小型猪肝细胞中脂肪合成代谢相关基因的表达检测

Figure 6 Expressions of genes related to fat anabolism in liver of Bama miniature pigs in two groups

经回路的途径,如食欲和满足感的调节,胰岛素分泌和动员,脂肪生成,能量和脂质代谢等^[19]。研究表明,大多数肥胖个体会发展为普通(多因素)肥胖^[2]。

OSBPL2是本课题组前期发现的一个新的致聋基因^[20],后续的细胞-分子功能研究中发现,在听觉细胞OC-1中,OSBPL2的缺失可以增加胆固醇的生物合成,并通过抑制,腺苷酸激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)活性来驱动活性氧的产生^[21]。在Hela细胞中,OSBPL2的缺失通过AMPK/SP1和SREBF2信号通路上调角鲨烯单加氧酶表达,从而增加细胞内胆固醇和胆固醇酯^[22-23]。在HuH7细胞中,敲除OSBPL2可降低葡萄糖的吸收和糖原合成能力并抑制糖酵解^[10]。此外,研究表明OSBPL2蛋白定位在脂滴表面,参与调节中性脂质代谢^[10],以上研究结果提示OSBPL2基因功能具有多效性。

为进一步证实OSBPL2突变致聋的表型效应及可能存在脂质代谢异常的相关特征,本研究前期通过CRISPR/Cas9技术构建OSBPL2敲除的巴马小型猪模型。与预期一致,在获得了明确听力障碍表型特征的同时,也明显观察到了一系列肥胖表型。发现OSBPL2敲除后背部和腹部的脂肪厚度明显增加,且大脂肪细胞增加,小脂肪细胞减少。在观察腹部脂肪细胞的过程中,发现细胞大小分布范围较狭窄,OSBPL2敲除后是否抑制了脂肪细胞增生,还

需要进一步验证。同时分析了部分与肥胖发生相关的基因在转录水平和蛋白水平的表达状况,OSBPL2敲除后引起的FABP4表达水平上调可能促进脂肪分化。COPA作为一种与脂滴生长相关的复合物衣被蛋白复合物I的亚基^[24],其转录水平的上调同样反映了脂肪细胞内脂质的变化,进而引起肝内脂肪积聚。同时ACOX1表达下调可能影响了MT-HFD组脂肪酸 β -氧化能力,从而影响细胞内线粒体功能,最终导致肥胖表型的产生。除了测量肥胖相关的表型特征,还通过电镜检测了MAM的结构特征,观察到MT-HFD组细胞内MAM长度变短,间距变宽,推测MT-HFD组肝细胞出现MAM功能异常。此外,研究表明酰基辅酶A-胆固醇酰基转移酶(acyl-coenzyme A-cholesterol acyltransferase, ACAT)也被证实位于MAM上,可将细胞内游离的胆固醇转化为胆固醇酯,从而维持体内胆固醇代谢的平衡。小凹蛋白1(caveolin-1, CAV1)基因敲除小鼠的肝细胞表现为MAM间距增宽,线粒体功能受到明显影响,表明MAM异常影响线粒体功能^[25]。本课题组前期研究也表明OSBPL2缺陷能够导致细胞内的氧化应激以及不同程度的线粒体损伤^[21]。

以上结果提示,OSBPL2缺陷引起巴马小型猪产生肥胖相关的表型特征,并在细胞及分子水平得到部分验证。OSBPL2功能障碍可能是通过抑制脂肪酸 β -氧化,造成了MAM功能异常及线粒体功能障

碍,从而影响能量代谢平衡。然而,OSBPL2如何调节能量代谢造成脂肪蓄积的分子机制尚需进一步的深入研究。

[参考文献]

- [1] GHABEN A L, SCHERER P E. Adipogenesis and metabolic health [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(4): 242-258
- [2] ROHDE K, KELLER M, LA COUR POULSEN L, et al. Genetics and epigenetics in obesity [J]. *Metabolism*, 2019, 92: 37-50
- [3] CHEN Q M, WANG H, ZENG Y Q, et al. Developmental changes and effect on intramuscular fat content of H-FABP and A-FABP mRNA expression in pigs [J]. *J Appl Genet*, 2013, 54(1): 119-123
- [4] 王克强, 戴文鹏, 黄湖南, 等. FABP4通过上调GLUT1表达和有氧糖酵解促进肠癌细胞侵袭转移[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(2): 210-214
- [5] STEINBERG S J, DODT G, RAYMOND G V, et al. Peroxisome biogenesis disorders [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763(12): 1733-1748
- [6] TUBBS E, THEUREY P, VIAL G, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2014, 63(10): 3279-3294
- [7] BASSOT A, CHAUVIN M A, BENDRID I N, et al. Regulation of mitochondria-associated membranes (MAMs) by NO/sGC/PKG participates in the control of hepatic insulin response [J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1319
- [8] YANG M, LI C, SUN L. Mitochondria-associated membranes (MAMs): a novel therapeutic target for treating metabolic syndrome [J/OL]. *Curr Med Chem*, 2020. DOI: 10.2174/0929867327666200212100644
- [9] OLKKONEN V M, KOPONEN A, ARORA A. OSBP-related protein 2 (ORP2): Unraveling its functions in cellular lipid/carbohydrate metabolism, signaling and F-actin regulation [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2019, 192: 105298
- [10] KENTALA H, KOPONEN A, VIHINEN H, et al. OSBP-related protein-2 (ORP2): a novel Akt effector that controls cellular energy metabolism [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(21): 4041-4057
- [11] 曾华沙, 姚俊, 王红顺, 等. 人/猪OSBPL2同源性比较及猪PFFs靶基因敲除细胞系的建立 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(2): 149-154
- [12] YAO J, ZENG H, ZHANG M, et al. OSBPL2-disrupted pigs recapitulate dual features of human hearing loss and hypercholesterolaemia [J]. *J Genet Genomics*, 2019, 46(8): 379-387
- [13] 王重龙, 陶立, 张勤, 等. B超活体测定猪背膘厚和眼肌面积 [J]. *安徽农业科学*, 2005, 33(3): 451-452
- [14] PURI R, CHENG X T, LIN M Y, et al. Mul1 restrains Parkin-mediated mitophagy in mature neurons by maintaining ER-mitochondrial contacts [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3645
- [15] TAKEI R, INOUE T, SONODA N, et al. Bilirubin reduces visceral obesity and insulin resistance by suppression of inflammatory cytokines [J]. *PLoS One*, 2019, 14(10): e0223302
- [16] RYAN D H, KAHAN S. Guideline recommendations for obesity management [J]. *Med Clin North Am*, 2018, 102(1): 49-63
- [17] PIGEYRE M, YAZDI F T, KAUR Y, et al. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2016, 130(12): 943-986
- [18] CHOQUET H, MEYRE D. Molecular basis of obesity: current status and future prospects [J]. *Curr Genomics*, 2011, 12(3): 154-168
- [19] MILAGRO F I, GOMEZ-ABELLAN P, CAMPION J, et al. CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA methylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake [J]. *Chronobiol Int*, 2012, 29(9): 1180-1194
- [20] XING G, YAO J, WU B, et al. Identification of OSBPL2 as a novel candidate gene for progressive nonsyndromic hearing loss by whole-exome sequencing [J]. *Genet Med*, 2015, 17(3): 210-218
- [21] WANG H, LIN C, YAO J, et al. Deletion of OSBPL2 in auditory cells increases cholesterol biosynthesis and drives reactive oxygen species production by inhibiting AMPK activity [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(9): 627
- [22] ZHANG C, ZHANG H, ZHANG M, et al. OSBPL2 deficiency upregulate SQLE expression increasing intracellular cholesterol and cholesteryl ester by AMPK/SP1 and SREBF2 signalling pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 383(2): 111512
- [23] 陈庆, 鲁雅洁, 姚俊, 等. 基于CRISPR/Cas9技术建立敲除OSBPL2基因的HeLa细胞株 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(9): 1072-1078
- [24] LI C, LUO X, ZHAO S, et al. COPI-TRAPP II activates Rab18 and regulates its lipid droplet association [J]. *EMBO J*, 2017, 36(4): 441-457
- [25] SALA-VILA A, NAVARRO-LERIDA I, SANCHEZ-ALVAREZ M, et al. Interplay between hepatic mitochondria-associated membranes, lipid metabolism and caveolin-1 in mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27351

[收稿日期] 2019-12-27