

雌激素受体关联受体 α 调节脂肪细胞甘油三酯分解

鞠大鹏, 何晶晶, 郑雪莉, 赵丽丽, 杨公社

西北农林科技大学动物科技学院 动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 杨凌 712100

摘要: 雌激素受体关联受体 α (Estrogen-related receptor α , ERR α) 是调控机体能量代谢的关键转录调控因子, 也是脂肪生成的关键调控者。为研究 ERR α 对脂肪细胞甘油三酯分解的影响及其分子机制, 分化的猪脂肪细胞在 PKA (Protein kinase A) 或/和 ERK (Extracellular signal-related kinase) 抑制剂预处理和不处理的情况下, 再用 Ad-ERR α 感染或 XCT790 处理 48 h。通过测定脂肪细胞中甘油三酯浓度和培养液中的甘油释放量分析脂肪细胞的脂解变化; Western blotting 方法检测 PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)、perilipin A、p-perilipin A、HSL (Hormone sensitive lipase, HSL) 和 ATGL (Adipose triglyceride lipase, ATGL) 蛋白表达。结果显示, ERR α 显著促进猪脂肪细胞分化及甘油三酯积累, 同时促进了甘油三酯水解; 分别及同时阻断 PKA 和 ERK 通路并不影响 ERR α 对脂肪细胞甘油释放的促进作用; ERR α 显著上调 HSL、ATGL、PPAR γ 及 perilipin A 蛋白表达, 但 p-perilipin A 水平并未发生变化。推测过量表达 ERR α 可能导致 HSL 和 ATGL 蛋白表达上调并促进甘油三酯水解, 从而为脂肪细胞分化提供更多的游离脂肪酸 (Free fat acid, FFA) 作为甘油三酯合成周转的底物。

关键词: 猪, ERR α , 甘油三酯水解, 脂肪细胞

Role of estrogen-related receptor α in adipocytes lipolysis

Dapeng Ju, Jingjing He, Xueli Zheng, Lili Zhao, and Gongshe Yang

Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China

Abstract: Estrogen-related receptor α (ERR α) is a key regulator for energy metabolism and adipogenesis. However, its role in lipolysis is unknown. To study the function of ERR α in lipolysis, primary cultured differentiated porcine adipocytes were treated by a specific inverse agonist XCT790 or infected with adenoviral vector expressed ERR α for 48 h, in the absence and/or presence of specific protein kinase A (PKA) inhibitor or extracellular signal-related kinase (ERK) inhibitor. Then, we measured the triglyceride (TG) content and the glycerol release into the culture media to analysis the effect of ERR α on lipolysis; Further, we analyzed the expression of PPAR γ , perilipin A, p-perilipin A, HSL and ATGL with Western blotting. Here, we found that ERR α significantly increased adipocytes differentiation, TG accumulation and glycerol release. Separately or simultaneously block the PKA and ERK pathway do not significantly altered the effect of ERR α on glycerol release. ERR α significantly up-regulated the proteins expression of PPAR γ , perilipin A, HSL and ATGL, while the p-perilipin A protein level was not significantly changed.

Received: March 24, 2010; **Accepted:** May 17, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA10Z138).

Corresponding author: Gongshe Yang. Tel/Fax: +86-29-87092430; E-mail: gsyang999@hotmail.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA10Z138) 资助。

These findings imply that $ERR\alpha$ could increase lipolysis via up-regulating HSL and ATGL, thereby to supply more FFA as substrate for a larger turnover of cellular triglyceride pool during adipocytes differentiation.

Keywords: pig, estrogen-related receptor α ($ERR\alpha$), lipolysis, adipocytes

雌激素受体关联受体 α (Estrogen-related Receptor α , $ERR\alpha$) 是最早被鉴定出的核激素受体之一^[1]。大量研究表明, $ERR\alpha$ 高表达于线粒体含量丰富的组织中, 具有促进线粒体生成及调节能量代谢相关基因表达的作用^[2-3], 此外, 最近有研究者发现 $ERR\alpha$ 很可能在调控脂肪细胞甘油三酯积累过程中发挥重要作用^[4-5]。与此结果相一致的是, 我们在前期的研究中也发现抑制 $ERR\alpha$ 蛋白表达能够减少脂肪细胞中甘油三酯积累^[6], 然而这种结果与脂肪细胞分化及甘油三酯水解的关系尚不清楚。与啮齿类动物相比, 猪的体脂沉积较多, 且在生理特性方面与人类有诸多相似之处, 是研究人类肥胖及代谢相关疾病的重要医学模型^[7]。

本研究利用携带 $ERR\alpha$ 基因的腺病毒及 $ERR\alpha$ 特异性抑制剂 XCT790^[8]处理原代培养的分化的猪脂肪细胞, 探讨 $ERR\alpha$ 对猪脂肪细胞脂解的作用及其分子机制, 为进一步研究 $ERR\alpha$ 对脂肪细胞脂代谢的作用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

实验动物: 1~3 日龄健康长白仔猪由西北农林科技大学种猪场提供, 体重 1.5~2.5 kg, 取样前用 0.5% 的新洁尔灭清洗 0.5 h, 电击处死。

实验材料: HEK293 细胞系购于中国科学院上海细胞生物学研究所。BJ5183 菌株、穿梭质 pAdTrack-CMV 和腺病毒基因组质粒 pAdeasy-1 均为西北农林科技大学动物脂肪沉积与肌肉发育实验室保存。

1.2 主要试剂

Taq 酶和限制性内切酶 *Pme* I、*Pac* I、*Xba* I、*Hind* III、CIAP (Alkaline Phosphatase, CIAP) 均购

于 NEB 公司, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、*ultra-Pfu* 高保真 *Taq* 酶购于 Bioflux 公司, 普通 *Taq* DNA 聚合酶购于 Fermentas 公司, 质粒大提试剂盒购于 Omega 公司, DMEM/F12、I 型胶原酶购于 Gibco 公司, 无酚红的 DMEM 培养基购于 Hyclone 公司, 胎牛血清购于杭州四季青公司, 脂质体 LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司, $ERR\alpha$ 特异性抑制剂 XCT790 购于 Sigma 公司, PKA 通路抑制剂 H89、ERK 通路抑制剂 PD98059、 $ERR\alpha$ 一抗 (Anti-goat)、perilipin A 一抗 (Anti-goat)、 β -actin 一抗 (Anti-mouse)、PPAR γ 一抗 (Anti-goat) 购于 Santa Cruz 公司, 磷酸化 PKA 底物一抗 (Anti-rabbit, 用于检测 p-perilipin A) HSL 一抗 (Anti-rabbit) 和 ATGL 一抗 (Anti-rabbit) 购于 CST 公司, 甘油及甘油三酯检测试剂盒购于北京普利莱基因技术有限公司, 其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 $ERR\alpha$ 腺病毒超表达载体的构建、病毒包装及滴度测定

1.3.1 带酶切位点猪 $ERR\alpha$ 基因全长开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 序列获得

猪 $ERR\alpha$ 基因全长 ORF 序列由本实验室克隆获得^[6]。在此引物基础上设计上游带 *Hind* III 酶切位点和下游带 *Xba* I 的引物 (表 1), 由上海生工生物工程技术有限公司合成。以获得的猪 $ERR\alpha$ 基因全长 ORF 序列为模板, 按照 *ultra-Pfu* 高保真 *Taq* 酶说明书进行 PCR 扩增。PCR 反应程序如下: 95 °C 6 min; 94 °C 45 s, 72 °C 45 s, 72 °C 105 s, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 30 min。

表 1 Touch down PCR 引物

Table 1 PCR primer

| Primer name | Primer sequence (5'-3') |
|-------------|---------------------------------|
| Forward | CCCAAGCTTATGTCCAGCCAGGTGGT |
| Reverse | TGCTCTAGATCAGTCCATCATGGCCTCGAGC |

1.3.2 *ERRα* 重组腺病毒表达载体构建

将上述 PCR 产物和 CMV 空载体分别用 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳后用 DNA 回收试剂盒回收, T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接。连接产物氯化钙法转化 *E. coli* DH5α 感受态细菌, 转化的菌液均匀涂布于含 100 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上进行筛选, 适时挑取单克隆摇菌, 按照质粒抽提试剂盒说明书小量提取质粒, 经 *Xba* I、*Hind* III 双酶切和 PCR 鉴定后, 将获得的阳性克隆质粒 (即 pAdTrack-*ERRα*) 送上海生工生物技术有限公司测序。获得 pAdTrack-*ERRα* 的质粒 DNA 经过 *Pme* I 线性化和 CIAP 去磷酸化, 转化已转入 pAdEasy-1 的感受态 BJ5183 菌发生同源重组。重组质粒经过 *Pac* I 酶切和 PCR 鉴定后, 将正确的重组质粒命名为 Ad-*ERRα*。质粒转化 DH5α 感受态菌扩大培养, 经去内毒素的质粒大提试剂盒提取重组质粒备用。

1.3.3 病毒包装及滴度测定

将 Ad-*ERRα* 质粒转化至 DH5α 感受态菌中扩大培养, 去内毒素质粒大提试剂盒提取质粒后, *Pac* I 酶切线性化 Ad-*ERRα* 并利用乙醇沉淀收集质粒。Lipofectamin™ 2000 携带线性化的 Ad-*ERRα* 转染 HEK293 细胞进行包装, 观察细胞内报告基因 GFP (Green fluorescent protein, GFP) 的表达及细胞的病变效应 (Cytopathic effect, CPE) 情况, 并于转染后第 5 天发生完全病变时收集上清作为病毒原液。随后利用病毒原液反复感染 HEK293 细胞, 扩增病毒。当扩增至 10 个 T25-Flask 时, 于病毒侵染 24 h 内收集细胞并悬浮 2 mL PBS 中, 液氮和 37 °C 水浴反复冻融 5 次后, 12 000 r/min 离心 10 min 收集病毒上清并于 -80 °C 保存待用。

采用重复性较高的半数组织培养感染剂量 (Tissue-culture infectious dose 50, TCID₅₀) 法测定重组腺病毒 Ad-*ERRα* 的滴度并根据 Karbers 公式计算病毒滴度。滴度 $T=10 \times 10^{1+d} (s-0.5) \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ 。其中 $d=\lg$ 稀释度=1 (对于 10 倍的稀释度而言); s =阳性比率之和 (从第一个 10 倍比稀释度算起)。并根据以下公式, 换算成 PFU/mL, 单位: $T=1 \times 10^x \text{ TCID}_{50}/\text{mL}=$

$1 \times 10^{x-0.7} \text{ PFU}/\text{mL}$ 。

1.4 原代猪脂肪细胞分离培养及诱导分化

无菌条件下采集仔猪颈背部皮下脂肪组织, 用 I 型胶原酶消化法分离猪前体脂肪细胞^[9], 以 5×10^4 细胞/cm² 的密度接种于直径 60 mm 的培养皿, 加适量含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液, 置于 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 的培养箱培养。接种当天记做第 0 天, 以后每 48 h 更换 1 次培养液, 细胞融合率至 95% 左右时更换为分化诱导培养基 (胰岛素 5 μg/mL) 诱导前体脂肪细胞分化, 直至 80% 以上的前体脂肪细胞充脂分化并形成具有明显的大脂滴后进行处理, 用于研究 *ERRα* 在脂肪细胞脂解中的作用。

1.5 甘油含量测定

用甘油检测试剂盒测定脂肪细胞培养液中的甘油浓度作为脂解率指标, 操作方法严格按照试剂盒说明书执行。测量结果经各组总蛋白浓度标准化后, 以空对照组甘油释放量的倍数表示。

1.6 Western blotting 检测 *ERRα*、HSL、ATGL、PPAR γ 、perilipin A 和 p-perilipin A 蛋白表达

细胞总蛋白提取: 根据本实验室已建立的方法^[10], 提取细胞总蛋白。考马斯亮蓝法定量后, 根据定量结果, 利用上样缓冲液将不同组织蛋白的浓度调成一致, 100 °C 沸水中煮 5 min 后, 70 °C 保存。

蛋白电泳: 取蛋白样品 50 μg 上样, 以 80 V 电压在 12% SDS-PAGE 中分离约 2 h 后, 转移至 PVDF 膜上。

蛋白免疫印迹及蛋白表达分析: 5% BSA 室温封闭 2 h, 一抗 (*ERRα*、HSL、ATGL、PPAR γ 、perilipin A 和磷酸化 PKA 底物均为 1:300) 室温孵育 2 h, 二抗 (羊二抗均为 1:3 000, 鼠二抗和兔二抗均为 1:4 000) 室温孵育 2 h, ECL 发光并利用 Bio-Rad 公司的化学发光仪 ChemiDocXRS+ 检测蛋白表达变化。曝光后, 利用 Quantity one 软件分别计算各条带与 β -actin 条带吸光度的比值, 即各蛋白表达量以目的蛋白吸光值与 β -actin 的吸光值的比值表示。处理组各蛋白的相对表达量以对照组的倍数表示。

1.7 甘油三酯含量测定及油红 O 染色

超声波法裂解细胞, 收集上清。参照甘油三酯检测试剂盒说明书, 测定脂肪细胞中甘油三酯含量, 并利用蛋白浓度对其含量进行标准化。油红 O 染色参照实验室已建立的方法^[11]进行操作。

1.8 统计分析

试验数据以平均数 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS11.5 统计分析软件中的 One-way ANOVA 进行方差分析和显著性检验, 用 LSD 检验不同处理间的差异。

2 结果

2.1 猪 pAdTrack-CMV-ERR α 穿梭载体及重组腺病毒 Ad-ERR α 的鉴定

构建的 pAdTrack-CMV-ERR α 穿梭载体进行 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切, 得到大小为 1 269 bp 和 9 220 bp 2 个片段 (图 1A), 说明穿梭载体构建成功。pAdTrack-CMV-ERR α 经测序鉴定后, *Pme* I 酶切线性化并与骨架载体 pAdEasy-1 进行重组。重组的腺病毒载体经 *Pac* I 酶切后, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳如显示出 1 条大片段 (约 30 kb) 及 1 条小片段 (约 3.0 或 4.5 kb), 则可确定为阳性克隆。本试验中重组腺病毒载体 Ad-ERR α 经 *Pac* I 酶切后电泳, 可观察到 1 条大的 DNA 片段 (约 30 kb) 和 1 条较小的 DNA 片段 (4.5 kb) (图 1B), 表明是阳性克隆。

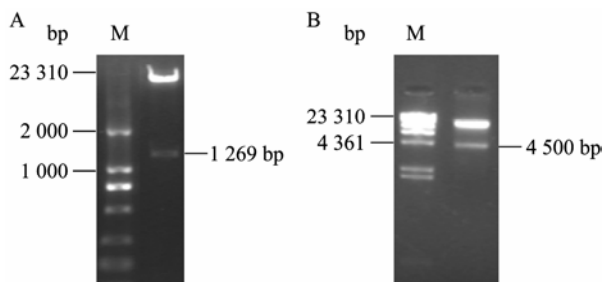


图 1 pAdTrack-ERR α 和 pAd-ERR α 的鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant pAdTrack-ERR α and recombinant Ad-ERR α . (A) pAdTrack-ERR α was identified by restriction enzyme digestion (*Xba* I and *Hind* III). (B) pAd-ERR α was identified by restriction enzyme *Pac* I digestion. M: DNA marker.

2.2 重组腺病毒的包装及滴度测定

经 *Pac* I 酶切线性化的 Ad-ERR α 转染 HEK293 细胞。Ad-ERR α 转染的 HEK293 细胞 24 h 后 GFP 开始表达 (图 2A)。转染后 48 h GFP 的表达急剧升高, 荧光数量显著增加 (图 2B)。转染后 72 h 后, 细胞肿胀、变圆、皱缩。同时, 释放到培养液上清中的腺病毒开始并感染周围的细胞 (图 2C), 随着时间的延长, 整个视野荧光数会逐渐增多。转染后 96 h, 95% 以上的细胞出现了 CPE 变化。收集的重组腺病毒原液经扩增后 (图 2D), 用 TCID₅₀ 法测定病毒滴度, 滴度达到了 9×10^8 PFU/mL。

2.3 猪脂肪细胞中 ERR α 蛋白表达的调控

为研究 ERR α 对脂肪细胞脂解及分化的影响, 我们拟采用 Ad-ERR α 及其特异性抑制剂 XCT790 调节其蛋白表达量。Ad-ERR α (MOI=20) 侵染及 $10 \mu\text{mol/L}$ XCT790^[6] 处理分化的脂肪 48 h 后, 收集细胞总蛋白进行 Western blotting 检测。结果显示, 与对照组相比, Ad-ERR α 显著上调了 ERR α 蛋白 1.7 倍, 而 XCT790 下调 ERR α 蛋白 0.5 倍 (图 3)。表明 Ad-ERR α (MOI=20) 及 $10 \mu\text{mol/L}$ XCT790 能够在脂肪细胞中有效地调控 ERR α 蛋白表达。

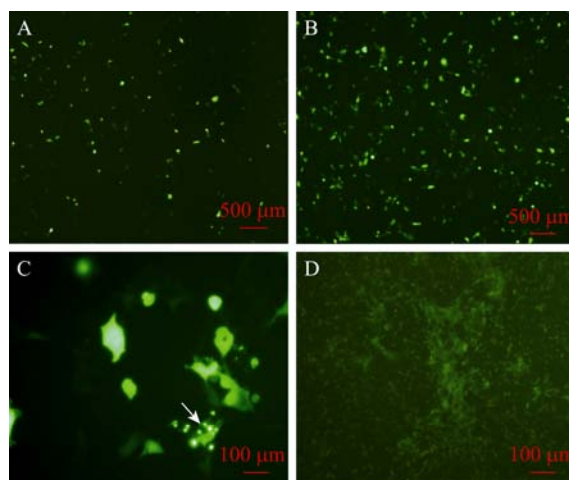


图 2 重组腺病毒 Ad-ERR α 的包装和扩繁

Fig. 2 Ad-ERR α virus production and harvest. HEK293 cells were transfected with Ad-ERR α . GFP expression was recorded at 24 h (A), 48 h (B) and 72 h (C) post transfection. (D) Ad-ERR α virus infect HEK293 cells.

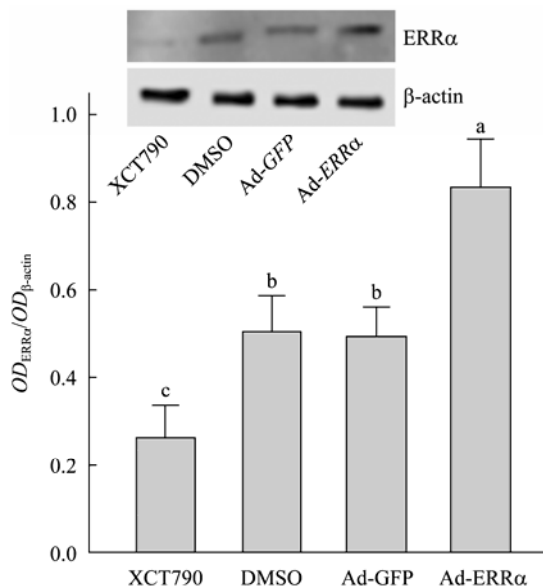


图3 Ad-ERRα及XCT790在分化的猪脂肪细胞中调控ERRα蛋白表达

Fig. 3 Regulations of ERRα protein expression in differentiated porcine adipocytes by Ad-ERRα virus and XCT790. Differentiated porcine adipocytes were infected with Ad-ERRα (or Ad-GFP) or treated with XCT790 (or DMSO) for 48 h. Whole cell protein were extracted and subjected to Western blotting with ERRα and β-actin antibodies. The relative expression level of ERRα protein among different treatment was analyzed. Different letters show significant differences ($P < 0.05$).

2.4 ERRα 促进脂肪细胞甘油三酯积累及甘油释放

实现在猪脂肪细胞中调节 ERRα 蛋白表达后,进一步分析了其对脂肪细胞甘油三酯积累和甘油三酯水解的影响。与我们之前结果相一致, Ad-ERRα 处理组细胞甘油三酯含量为其对照的 1.5 倍, 而 XCT790 处理组的甘油三酯含量仅为其对照组的 40% (图 4A)。进一步甘油释放量分析发现, Ad-ERRα 处理组细胞甘油释放量为其对照的 1.2 倍, 而 XCT790 处理组的甘油释放量为其对照组的 80% (图 4B)。以上结果表明, 尽管 ERRα 促进了脂肪细胞中甘油三酯积累, 但同时增加了脂肪细胞中脂肪水解。

2.5 PKA 通路及 ERK 通路不参与调控 ERRα 促进的脂肪细胞甘油释放

脂肪细胞甘油三酯水解不仅受脂解酶以及脂解阻碍蛋白 perilipin A 的调控, 脂解通路也发挥着重

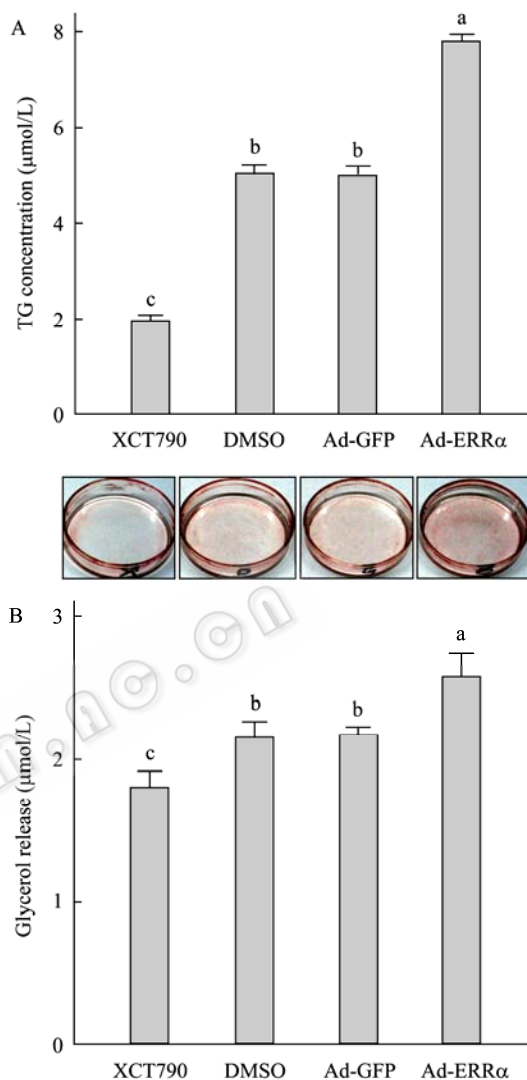


图4 ERRα 调控分化的脂肪细胞中甘油三酯积累及水解
Fig. 4 ERRα Regulate TG accumulation and lipolysis in differentiated porcine adipocytes by Ad-ERRα virus and XCT790. Differentiated porcine adipocytes were treated as described in Fig.3. The culture medium was collected for glycerol release determination. Cells were collected for TG concentration measurement. Different letters show significant differences ($P < 0.05$).

要的作用。其中, PKA^[12]通路和 ERK^[13]通路是目前研究最为清楚的两条脂解通路。我们接下来分析了这两条通路在 ERRα 促进的脂解中的作用。结果显示, 无论同时阻断两条通路或阻断其中任意一条通路后, 均不能影响 ERRα 诱导的甘油三酯水解 (图 5)。由此表明 PKA 通路及 ERK 通路不参与调控 ERRα 促进的脂肪细胞甘油释放。

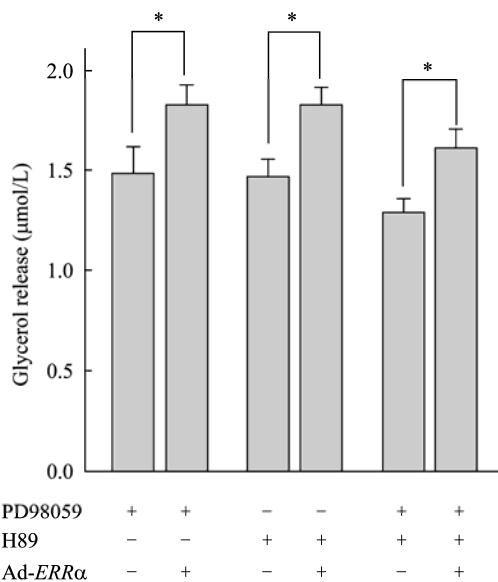


图 5 H89 及 PD98059 不影响 ERR α 对脂解的促进作用
 Fig. 5 H89 and PD98059 do not change the ERR α stimulated lipolysis. Differentiated porcine adipocytes were pretreated with H89 and PD98059 separately or simultaneously for 48 h. Then were cultured for another 48 h at the present or absent of Ad-ERR α . Cell culture medium was collected for glycerol determination. * $P < 0.05$ compared with the group without Ad-ERR α infection.

2.6 ERR α 调控 HSL、ATGL、PPAR γ 及 perilipin A 蛋白表达

由于 PKA 及 ERK 通路并不参与调控 ERR α 介导的脂肪水解, 因此对脂解装置, 如脂解酶和脂滴包被蛋白的表达进行了检测。结果显示, Ad-ERR α 显著上调了分化标志蛋白 PPAR γ 和 perilipin A 的表达 (图 6)。表明 ERR α 能够促进脂肪细胞分化。同时, 脂解酶 HSL 和 ATGL 表达量也显著上调, 而 p-perilipin A 表达量并未发生明显变化 (图 6)。表明, 过表达 ERR α 所导致的脂解增加, 很可能是通过调控脂解酶的表达而实现的。

3 讨论

ERR α 是机体能量代谢网络中的关键调控因子。在高能量消耗组织中, ERR α 能够通过调控线粒体的生物合成、氧化磷酸化以及脂肪酸的 β -氧化途径影响机体的能量平衡^[2-3], 而其在脂肪组织中的作用

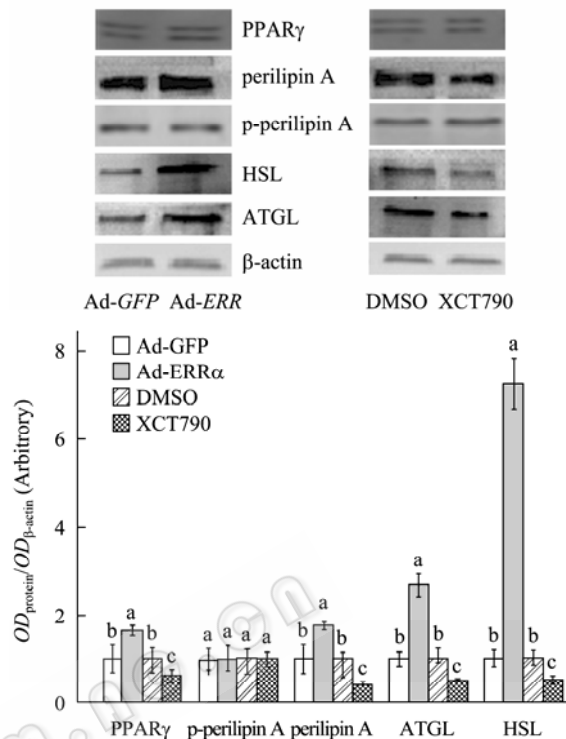


图 6 ERR α 调节 HSL、ATGL、PPAR γ 及 perilipin A 蛋白表达

Fig. 6 ERR α regulates the protein expression of HSL, ATGL, PPAR γ and perilipin A. Differentiated porcine adipocytes were treated as described in Fig. 3. Whole cell protein were extracted and subjected to western blotting with HSL, ATGL, PPAR γ , perilipin A, p-perilipin A and β -actin antibodies. The relative expression level of ERR α protein among different treatment was analyzed. Different letters show significant differences ($P < 0.05$).

一直被人们忽视。直到 ERR α 基因敲除鼠模型的产生^[14], 人们才认识到 ERR α 在脂肪形成中具有重要作用, 从而拉开了研究其在脂肪组织中生理作用的序幕。尽管目前已经发现 mERR α 随脂肪细胞分化表达量增加^[4], 并且与甘油三酯积累正相关^[5], 但其在脂解中的作用及机制尚不清楚。在成功地利用腺病毒表达载体及其特异性抑制剂 XCT790 实现对 ERR α 蛋白表达调控的基础上, 我们探讨了其在脂肪细胞甘油三酯水解中的作用及机制。

与我们之前的结果相互支持的是^[6], 过表达 ERR α 能够促进了脂肪细胞中甘油三酯的积累。而在此过程中, 对脂肪细胞分化具有决定性调控作用的

转录因子 PPAR γ 表达受到了 ERR α 的调控, 而起作用机制及其与脂肪细胞分化的关系尚有待进一步研究。脂肪细胞中甘油三酯的含量是其合成和分解动态调节的结果, 当甘油三酯合成的速度大于脂解时便会产生甘油三酯的积累。而在脂肪细胞积累甘油三酯的过程中, 脂解的变化可能存在 2 种方式。其一, 脂解作用减弱, 促进甘油三酯积累。其二, 为满足甘油三酯合成所需要大量的 FFA, 脂肪细胞除通过吸收培养基中的 FFA 以外, 还通过分解自身合成的甘油三酯^[15]。然而, 这两种作用是否发生在 Ad-ERR α 促进的脂肪细胞分化中尚不清楚。

众多文献表明, ERR α 在分化的脂肪细胞中很可能是抑制甘油三酯水解的。Luo 等^[14]和 Kutoh 等^[16]发现, ERR α 能够结合在 β_3 -AR (β_3 -adrenergic receptor, β_3 -AR) 基因启动子区域, 而 ERR α 基因敲出鼠 β_3 -AR 基因表达上升 1.7 倍, 暗示 ERR α 很可能通过下调 β_3 -AR 基因表达而抑制 PKA 通路的脂解活性。Perilipin A (Perilipin 家族的主要成员) 作为脂滴膜上保护蛋白^[17], 是多条脂解通路的终末靶点^[17-18], 对脂肪分解具有关键的调控作用。研究发现, ERR α 能够转录激活 perilipin A 的启动子活性^[19], 表明 ERR α 很可能通过调节 perilipin A 的活性影响脂肪细胞甘油三酯水解。综合考虑过表达 ERR α 促进了脂肪细胞中甘油三酯的积累, 推测 ERR α 很可能在脂肪细胞中抑制甘油三酯水解。然而, 我们在过表达 ERR α 后发现脂肪细胞的甘油释放量是显著增加的。为了解释这种现象, 我们首先分析了脂肪细胞中的主要脂解通路, 即 PKA 和 ERK 通路在此过程中的作用。由于这两条通路能够独立或协同影响脂解^[20], 因此在分别或同时阻断这两条后, 检测了 ERR α 的脂解效应。结果显示, 这两条通路均不参与调控 ERR α 介导的脂解作用; 接下来, 进一步分析了 perilipin A 的表达变化。结果显示, Ad-ERR α 显著上调 perilipin A 的表达, 而其磷酸化水平并未发生改变, 表明 perilipin A 并不参与调控此升高的脂解过程; 最后, 对脂解酶的表达量进行的检测发现,

HSL 和 ATGL 的表达量受到显著上调, 表明 ERR α 介导的脂解作用是通过上调这两种酯酶实现的。研究揭示, PPAR γ 能够直接调控 HSL^[21]和 ATGL^[22]蛋白的表达。本研究中, Ad-ERR α 显著上调 PPAR γ 、HSL 和 ATGL 蛋白表达, 由此推断, PPAR γ 表达水平的升高直接导致了 HSL 和 ATGL 蛋白的表达水平的上升。

综上所述, 本研究首次探讨了 ERR α 对脂肪细胞甘油三酯水解的影响, 初步揭示了 ERR α 调控甘油三酯水解的分子机理。本研究将为有效调控动物体脂沉积、防治人类脂代谢相关疾病提供新的靶点和理论参考。

REFERENCES

- [1] Giguere V, Yang N, Segui P, et al. Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature*, 1988, 331(6151): 91-94.
- [2] Sladek R, Bader JA, Giguère V. The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(9): 5400-5409.
- [3] Sarah H, Peter T. Adopting new orphans into the family of metabolic regulators. *Mol Endocrinol*, 2008, 22(8): 1743-1753.
- [4] Nobuhiro I, Kazuhiro I, Kuniko HI, et al. Estrogen-related receptor α modulates the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358(3): 813-818.
- [5] Nie Y, Wong C. Suppressing the activity of ERR α in 3T3-L1 adipocytes reduces mitochondrial biogenesis but enhances glycolysis and basal glucose uptake. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(9B): 3051-3060.
- [6] Ju DP, He JJ, Zheng XL, et al. Cloning, expression of the porcine Estrogen-related receptor α gene and its effect on lipid accumulation in mature adipocytes. *Chin J Biotech*, 2009, 25(11): 1627-1632.
鞠大鹏, 何晶晶, 郑雪莉, 等. 猪雌激素受体关联受体 α 基因的克隆、表达及其对脂肪细胞脂质聚集的影响. *生物工程学报*, 2009, 25(11): 1627-1632.
- [7] Yang GS, Zhang HW, Bai L, et al. Pig- α ideal study

- animal model of obesity and diabetes. *Prog Nat Sci*, 2008, 18(5): 481–487.
- 杨公社, 张浩卫, 白亮, 等. 猪—研究肥胖和糖尿病的理想模式动物. *自然科学进展*, 2008, 18(5): 481–487.
- [8] Olivia L, Stephanie B, Nathalie K, et al. Potentiation of ICI182, 780 (Fulvestrant)-induced estrogen receptor- α degradation by the estrogen receptor-related receptor- α inverse agonist XCT790. *J Biol Chem*, 2007, 282(39): 28328–28334.
- [9] Lin YQ, Zhuang HL, Yang GS. Effects of RXR α gene silencing on the porcine adipocyte differentiation *in vitro*. *Comp Biochem Phys D*, 2007, 2(3): 207–214.
- [10] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning*. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002.
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. *分子克隆实验指南*. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] Bai L, Pang WJ, Yang YJ, et al. Effects of nicotinamide on proliferation and differentiation in primarily cultured porcine preadipocytes. *Acta Zool Sin*, 2007, 53(6): 1063–1068.
- 白亮, 庞卫军, 杨燕军, 等. 烟酰胺在原代培养的猪前体脂肪细胞增殖分化中的作用. *动物学报*, 2007, 53(6): 1063–1068.
- [12] Holm C, Osterlund T, Laurell H, et al. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu Rev Nutr*, 2000, 20: 365–393.
- [13] Johanna ML, Magnus E, Stefan R, et al. β_3 - and α_1 -Adrenergic ERK1/2 activation is Src- but not Gi-mediated in Brown Adipocytes. *J Biol Chem*, 2000, 275(30): 22670–22677.
- [14] Luo JM, Robert S, Giguere V, et al. Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor α . *Mol Cell Biol*, 2003, 23(22): 7947–7956.
- [15] Yi G, Kimberly RC, Robert VF, et al. Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci*, 2008, 122(6): 749–752.
- [16] Kutoh E, Ongenae N, Claeskens A, et al. A putative white adipose tissue specific nuclear orphan receptor that interacts with the cAMP-response element of the human β_3 -adrenergic receptor gene. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 165: 85–95.
- [17] Zhang HH, Souza SC, Muliro KV, et al. Lipase-selective functional domains of perilipin A differentially regulate constitutive and protein kinase A-stimulated lipolysis. *J Biol Chem*, 2003, 278: 51535–51542.
- [18] Miyoshi H, Souza SC, Zhang HH, et al. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, 2006, 281(23): 15837–15844.
- [19] Akter, MH, Yamaguchi T, Hirose F, et al. Perilipin, a critical regulator of fat storage and breakdown, is a target gene of estrogen receptor-related receptor α . *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 368(3): 563–568.
- [20] Katrin F, Aleksandra H, Eric M. Cooperative activation of lipolysis by Protein Kinase A and Protein Kinase C pathways in 3T3-L1 Adipocytes. *Endocrinology*, 2004, 145(11): 4940–4947.
- [21] Tuo D, Song S, Li P, et al. Peroxisome proliferator activated receptor γ transcriptionally up-regulates hormone sensitive lipase via the involvement of specificity protein-1. *Endocrinology*, 2006, 147(2): 875–884.
- [22] Erin EK, Michael S, Guan HP, et al. PPAR γ regulates adipose triglyceride lipase in adipocytes *in vitro* and *in vivo*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 293: E1736–E1745.