

# 三个脂质代谢相关基因在猪囊肿卵巢中的表达

罗晓彤<sup>1</sup>, 吕香州<sup>1</sup>, 李欣<sup>2</sup>, 张琪<sup>2</sup>, 于永生<sup>2</sup>, 田子玉<sup>2\*</sup>, 金一<sup>1\*</sup>

(1. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133002; 2. 吉林省农业科学院, 长春 130033)

**摘要:**为了研究正常卵巢和囊肿卵巢中脂类代谢相关基因 *FABP3*、*FABP4*、*CPT1* 的表达, 分别收集卵巢组织、颗粒细胞、卵母细胞, 运用实时荧光定量 PCR 技术对上述 3 个基因的表达进行比较。结果显示: 囊肿卵巢组织中 *FABP3* 和 *CPT1* 表达水平显著高于正常卵巢组织, 囊肿卵巢组颗粒细胞中 *FABP3* 表达水平极显著高于正常卵巢组; 囊肿卵巢卵母细胞中 *CPT1*、*FABP4* 的表达极显著高于正常卵巢 GV 期和 M II 期卵母细胞。本研究可为深入研究脂质代谢基因在猪卵巢囊肿发生中的作用提供依据。

**关键词:**猪; 囊肿卵巢; 颗粒细胞; 卵母细胞; 脂质代谢

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2020)05-0062-03

## Expression of Three Lipid Metabolism Related Genes in Porcine Cyst Ovary

LUO Xiaotong<sup>1</sup>, LYU Xiangzhou<sup>1</sup>, LI Xin<sup>2</sup>, ZHANG Qi<sup>2</sup>, YU Yongsheng<sup>2</sup>, TIAN Ziyu<sup>2\*</sup>, JIN Yi<sup>1\*</sup>

(1. College of Agronomy, Yanbian University, Yanji 133002; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

**Abstract:** In order to investigate the expression of lipid metabolism genes *FABP3*, *FABP4*, *CPT1* involved in porcine normal and cyst ovary, ovarian tissues, granulosa cells and oocytes were collected, and the expression of genes were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that the expressions of *FABP3* and *CPT1* in porcine cyst tissues were significantly higher than those in normal ovarian tissues, the expression of *FABP3* in granulosa cells of cyst ovary was significantly higher than that of normal ovary, and the expression of *CPT1* and *FABP4* in porcine cyst oocyte were significantly higher than that in normal ovarian GV and M II oocyte. This research would provide a basis for further study of the role of lipid metabolism genes in the development of porcine ovarian cysts.

**Key words:** *Susscrofa domestica*; Cyst ovary; Granulosa cell; Oocyte; Lipid metabolism

中国是世界上养猪规模最大的国家, 但猪生产水平远低于欧美养猪发达国家<sup>[1]</sup>。在畜牧业生产中, 囊性卵巢疾病(cystic ovarian disease, COD)影响母畜的繁殖性能, 在屠宰后发现 5% ~ 10% 的母猪会出现囊肿卵巢, 对后备母猪繁育产生严重困扰, 影响经济效益<sup>[2]</sup>。作为一种复杂的多因素异质性内分泌疾病, 多囊卵巢综合征(PCOS)涉及多种遗传和环境因素, 以生殖周期紊乱不调、

高雄激素血症和多囊卵巢为主要特征<sup>[3]</sup>。研究表明体内脂肪过多与 PCOS 相关<sup>[4]</sup>。脂肪组织产生的激素、细胞因子和其他生物活性物质在调节卵巢类固醇生成、卵母细胞成熟和胚胎发育方面具有重要作用<sup>[5]</sup>。脂肪酸结合蛋白(FABP)是一个与细胞内脂肪酸转运相关的蛋白质家族, 参与特定脂肪酸的细胞内转运<sup>[6]</sup>。*FABP4* 是一种调节全身胰岛素敏感性、脂代谢和糖代谢的脂肪因子, 在血清中 *FABP4* 水平与多囊卵巢综合征的特征显著相关, 已成为一种卵巢囊肿的标志物<sup>[7]</sup>, 也是 II 型糖尿病心肌脂质存储的潜在生物标志物<sup>[8]</sup>。

本研究采集了猪正常和囊肿卵巢, 对卵巢组织、卵泡液中的颗粒细胞以及卵母细胞中的 3 个脂类代谢相关基因的表达进行了比较, 以期为进一步深入研究脂类代谢与囊肿发生的关联性提供依据。

收稿日期: 2019-06-30

基金项目: 国家自然科学基金(31960659); 吉林省科技厅重点科技攻关项目(20190301037NY)

作者简介: 罗晓彤(1981-), 女, 在读博士, 主要从事动物繁殖与生物技术研究。

通讯作者: 田子玉, 男, 硕士, 副研究员, E-mail: tzy19720220@126.com

金一, 男, 博士, 教授, E-mail: yijin@ybu.edu.cn

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料与试剂

猪卵巢取自公主岭市高金屠宰厂,孕马血清促性腺激素(PMSG)和兽用人绒毛膜促性腺激素(hCG)购自宁波第二激素厂,胎牛血清(FCS)购自Hyclone公司。其他化学药品均购自Sigma。小量RNA提取试剂盒购自QIAGEN,荧光定量试剂、反转录试剂盒购自大连TaKaRa。

### 1.2 cDNA获取

将正常卵巢和囊肿卵巢置于38.5℃生理盐水,2 h内送回实验室,分别采集卵巢组织、卵泡中的颗粒细胞和卵母细胞,对正常卵泡卵母细胞进行体外成熟。利用Trizol提取卵巢组织、颗粒细胞总

RNA,按照QIAGEN微量RNA试剂盒提取卵母细胞总RNA,对1μg总RNA进行反转录。具体反转录程序为:37℃反转录15 min,85℃处理5 s。获得的cDNA保存至-20℃冰箱备用。

### 1.3 脂质代谢相关基因表达分析

利用实时定量PCR技术对脂肪酸β氧化肉碱棕榈酰转移酶1(CPT1)、脂肪酸结合蛋白3(FABP3)和脂肪酸结合蛋白4(FABP4)的表达水平进行检测。实时定量体系为:2×SYBR Green I 10.0μL,上下游引物各0.5μL,cDNA 1.0μL,dd H<sub>2</sub>O 8.0μL。利用罗氏Roche480实时荧光定量PCR系统进行相对定量,反应程序为95℃ 5 min,95℃10 s,60℃ 15 s,72℃ 20 s,45个循环。引物具体信息见表1。

表1 定量PCR引物

基因	引物序列	片段长度(bp)	退火温度(℃)	登录号
GAPDH	F: ACACTCACTCTTCTACCTTTG	90	60	U82261.1
	R: CAAATTCATTGTCGTACCAG			
CPT1	F: TCACAAGCGAATTTGAGTGC	242	60	NM_001129805.1
	R: AAATTCAGACCGCAGTTTCG			
FABP3	F: GATAGCAGGAAGGTCAAGTCCATT	100	60	NM_001099931.1
	R: CTAGTTCCCGAACAAGCGTTGT			
FABP4	F: AGTGGATGGAAGACAACCAC	172	60	NM_001002817.1
	R: GTCGGGACAATACATCCAACAG			

### 1.4 数据统计分析

所有试验重复3次,使用GraphPad Prism7.0软件进行方差分析。图像灰度值以“平均值±标准差”表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 囊肿卵巢与正常卵巢组织形态学比较

囊肿卵巢比正常卵巢体积明显偏大,卵泡直径是正常卵泡的5~10倍,在卵泡中明显可见呈黄色透明状或有血色的卵泡液(图1)。



A: 正常卵巢; B: 囊肿卵巢

图1 正常卵巢与囊肿卵巢的形态学比较

### 2.2 3个脂质代谢相关基因在正常卵巢与囊肿卵巢组织中的表达

对囊肿卵巢和正常卵巢组织中脂质代谢基因进行表达检测,如图2所示,囊肿卵巢组织中FABP3表达水平极显著高于正常卵巢组织( $P < 0.01$ ),CPT1表达水平显著高于正常卵巢组织( $P < 0.05$ ),FABP4表达无显著差异。

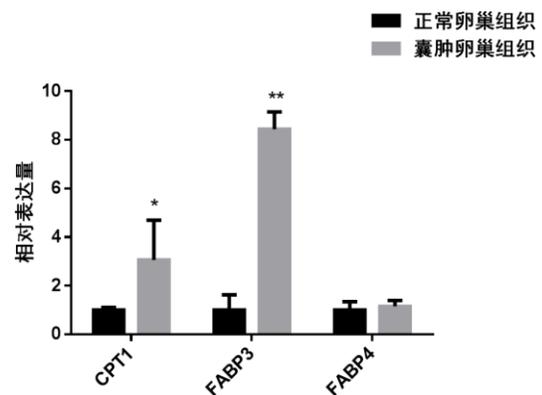


图2 正常与囊肿卵巢组织中3个脂质代谢相关基因的表达

### 2.3 3个脂质代谢相关基因在正常卵巢与囊肿卵巢颗粒细胞中的表达

对正常和囊肿卵巢中颗粒细胞中3个脂质代谢相关基因表达水平进行定量检测,发现囊肿卵巢颗粒细胞中 *FABP3* 表达水平极显著高于正常卵巢 ( $P<0.01$ ), *FABP4* 和 *CPT1* 二者无显著差异 (图3)。

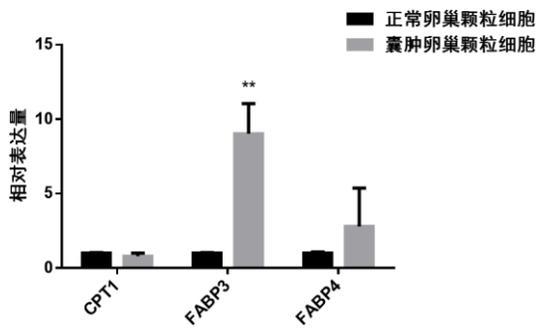


图3 正常与囊肿卵巢颗粒细胞中3个脂质代谢相关基因的表达

#### 2.4 3个脂质代谢相关基因在正常卵巢与囊肿卵巢卵母细胞中的表达

对来自正常卵巢的GV期卵母细胞、成熟后的MII期卵母细胞及来自囊肿卵巢的卵母细胞中 *CPT1*、*FABP3*、*FABP4* 的表达进行测定,结果见图4。囊肿卵巢卵母细胞组 *CPT1*、*FABP4* 表达水平极显著高于正常卵巢GV期和MII期卵母细胞 ( $P<0.01$ ), *FABP3* 有所减低,但未达到显著水平。

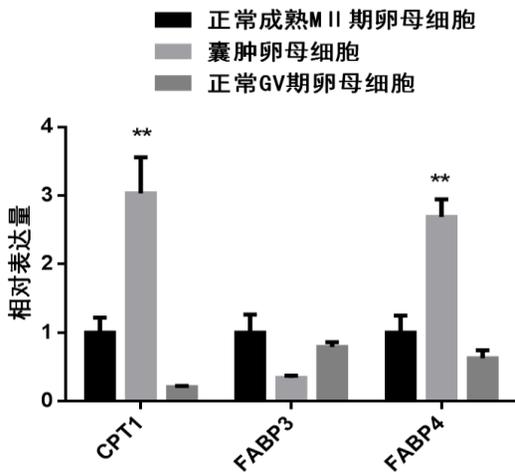


图4 囊肿卵巢卵母细胞与正常卵巢卵母细胞中3个脂质代谢相关基因的表达

### 3 讨论

卵巢囊肿可以分为卵泡囊肿和黄体囊肿,其中卵泡囊肿占囊肿发病率90%以上。卵泡囊肿是由于卵泡上皮变性、卵细胞死亡、卵泡液未吸收或增多而形成,典型特征为卵泡直径增大,大量

卵泡液滞留<sup>[9]</sup>。研究表明,肥胖与卵巢功能障碍有关<sup>[10]</sup>,脂肪细胞过度肥大后会产生高水平的脂肪特异性细胞因子,表现出缺氧、氧化应激和内质网应激<sup>[11]</sup>。本研究发现猪囊肿卵巢组织和颗粒细胞中 *FABP3* 表达量水平显著高于正常卵巢组织,说明囊肿卵巢组织和正常卵巢组织中 *FABP3* 和 *FABP4* 表达水平确实存在很大差异,但它们与卵巢囊肿发生的具体机制需要进一步研究。

在采集囊肿卵巢卵母细胞过程中,发现卵母细胞周围的卵丘细胞已发生扩散,黏液化程度甚至比体外成熟卵母细胞中更黏稠。作为脂肪细胞终末分化的标志, *FABP4* 可促进脂肪分化和脂肪沉积<sup>[12]</sup>。作为卵母细胞发育的重要能量来源,长链脂肪酸需转变为酰基肉碱才能进入线粒体基质进行氧化,进而为卵母细胞发生和发育提供能量<sup>[13]</sup>,而 *CPT* 是该转化过程的关键调节酶。

本研究发现囊肿卵巢卵母细胞中 *FABP4* 表达量极显著高于正常卵巢GV和MII期卵母细胞, *CPT1* 在囊肿卵巢组织和卵母细胞中表达量显著高于正常卵巢,可以推测囊肿卵巢中卵巢组织和卵母细胞中脂质代谢处于较高水平,但卵巢囊肿是否导致卵巢组织和卵母细胞中脂质蓄积需要深入研究。

猪囊肿卵巢卵泡直径显著高于正常卵巢,卵巢组织中 *FABP3* 和 *CPT1* 表达水平显著高于正常卵巢组织,颗粒细胞中 *FABP3* 表达水平极显著高于正常卵巢,卵母细胞中 *CPT1*、*FABP4* 的表达极显著高于正常卵巢GV期和MII期卵母细胞。

#### 参考文献:

- [1] 于永生,曹阳,罗晓彤,等.猪胎儿成纤维细胞的分离与基因转染[J].吉林农业科学,2014,39(4):50-53.
- [2] 刘广振,严树芬,邓本华,等.猪卵巢囊肿的发生与防治[J].中国猪业,2008(1):36-37.
- [3] Remzi A, Ilkbal T Y, Mehmet A Y, et al. Implications of circulating irisin and Fabp4 levels in patients with polycystic ovary syndrome[J]. J Obstet Gynaecol, 2016, 36(7): 897-901.
- [4] Siemienowicz K J, Coukan F, Franks S, et al. Aberrant subcutaneous adipogenesis precedes adult metabolic dysfunction in an ovine model of polycystic ovary syndrome (PCOS)[J]. Mol Cell Endocrinol, 2020, 519: 111042.
- [5] Maxime R, Christelle R, Michael B, et al. Adipokines and the Female Reproductive Tract[J]. Int J Endocrinol, 2014: 232454.
- [6] 崔璐,陈星,周颖,等. FABPs家族基因的研究进展[J].畜牧与兽医,2016,48(7):128-131.
- [7] Abali R, Temel Yuksel I, Yuksel M A, et al. Implications of circulating irisin and Fabp4 levels in patients with polycystic ovary syndrome[J]. J Obstet Gynaecol, 2016, 36(7): 897-901.

水平与土地集约利用程度综合指数虽有较小波动但总体均呈现不断提高趋势;两系统耦合发展经历了拮抗时期的濒临失调、磨合时期的勉强协调、低度协调、中度协调和高水平耦合时期的良好协调、优质协调的三个发展阶段六种发展类型;可以看出,缺乏土地集约利用的城市发展是粗放的发展,没有未来的发展;没有城市发展的土地集约利用更是无源之水,一纸空谈。

针对乌鲁木齐当前两系统耦合关系中土地集约利用程度滞后于城市化发展的现状发现,单靠城市化发展促进土地集约利用的被动土地利用方式是不能够满足可持续发展需要的,因此,应将合理协调城市化与土地集约利用关系的任务做在前面且主动去做,首先,应改变当前城市土地利用粗放化行为,摊大饼式的土地利用方式是对宝贵土地资源的严重浪费,重视城市土地利用规划的指导作用,做到规划编制过程因地制宜、科学有效,规划实施依规而行,重点强化土地用途管制。其次,应着力化解用地瓶颈,提高土地资源利用率,乌鲁木齐三面环山,城市用地空间受地形制约,结合“绿水青山就是金山银山”的发展思路,可探索生态资源科学整合,将制约因素转化为发展优势,进而实现保护生态环境下,土地集约利用与城市发展的契合。再者,应严格限制土地资源的浪费现象,加强土地动态巡查,对于闲置用地给予登记,核实闲置原因,及时督促并有效查处存在问题的闲置用地,鼓励城市空间的立体开发,增强资源有效利用率,进而开创乌鲁木齐城市化发展与土地集约利用共生共长、齐头并进的良好局面。

#### 参考文献:

- [1] 蒋南平,曾伟.土地资源与城市化发展:理论分析与中国实证研究[J].经济学家,2012,2(4):52-62.
- [2] 刘浩,张毅,郑文升.城市土地集约利用与区域城市化的时空耦合协调发展评价—以环渤海地区城市为例[J].地理研究,2011,30(10):1805-1817.
- [3] 徐婷婷.四川省城市土地集约利用与城市化耦合协调发展评价[D].成都:西南交通大学,2016.
- [4] 郑华伟,丑建立,刘友兆.江苏省城市土地集约利用与城市化关系的计量分析[J].长江流域资源与环境,2013,22(8):1019-1026.
- [5] 刘冰.城市开发与土地经济[J].城市规划学刊,2017(3):120-122.
- [6] 刘善开,韦素琼,高月华,等.基于耦合模型的城市土地集约利用与城市化协调发展研究—以福建省9个设区市为例[J].福建师范大学学报,2015,31(2):96-105.
- [7] 王秀,姚玲玲,李阳,等.新型城镇化与土地集约利用耦合协调性及其时空分异—以黑龙江省12个地级市为例[J].经济地理,2017,37(5):174-180.
- [8] 吴瑶.城市土地集约利用与城镇化耦合协调发展评价研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2017.
- [9] 王芳萍,师燕,姚步青,等.西宁市土地利用效益与新型城镇化耦合协调度研究[J].水土保持研究,2016,23(6):253-259.
- [10] 樊鹏飞,郭椿阳,刘志丹,等.城市化与城市土地集约利用耦合协调度评价及空间格局分析—以河南省为例[J].河南大学学报,2016,46(3):351-359,369.
- [11] 范胜龙,张莉,曾在森,等.不同经济发展水平地区开发区土地集约利用的影响因素研究—以福建省为例[J].中国土地科学,2017,31(6):51-57.
- [12] 余莉,张时龙,李清照.主成分分析在芸豆品种筛选中的应用[J].东北农业科学,2016,41(1):91-96.
- [13] 陈虹.南充市城市化水平与建设用地集约利用耦合关系研究[D].南充:西华师范大学,2016.
- [14] 王怡睿,石培基,潘竟虎,等.甘肃省城市化与土地集约利用耦合协调发展[J].中国沙漠,2015,35(4):1081-1088.

(责任编辑:王昱)

(上接第64页)

- [8] Rodríguez-Calvo R, Girona J, Rodríguez M, et al. Fatty acid binding protein 4 (FABP4) as a potential biomarker reflecting myocardial lipid storage in type 2 diabetes[J]. Metabolism, 2019, 96:12-21.
- [9] 孙艳琳.猪卵泡囊肿的发病机理研究[D].长春:吉林大学,2011.
- [10] Asemota O, Thornton K, Merhi Z, et al. Monocyte chemotactic protein-1 plays a role in ovarian dysfunction related to high-fat diet-induced obesity[J]. Syst Biol Reprod Med, 2020,66(4):236-243.
- [11] Hu W H, Qiao J. Expression and regulation of adipocyte fatty acid binding protein in granulosa cells and its relation with clinical characteristics of polycystic ovary syndrome[J]. Endocrine, 2011, 40(2):196-202.
- [12] Bakhtiarzadeh M R, Alamouti A A. RNA-Seq based genetic variant discovery provides new insights into controlling fat deposition in the tail of sheep[J]. Scientific Reports 2020, 10(1):13525.
- [13] Bradley J, Swann K. Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos[J]. International Journal of Developmental Biology, 2019, 63(3-4-5):93-103.

(责任编辑:刘洪霞)