

延边黄牛肾周棕色脂肪的鉴定与UCP1的表达

朴政玉, 罗晓彤, 金鑫, 闫研, 严昌国*

(延边大学, 吉林 延吉 133002)

摘要: 低温症是影响养牛业的一个严重问题, 棕色脂肪的快速产热是冬季维持体温的重要途径。本文对寒冷地区的延边黄牛棕色脂肪组织形态和标志分子解耦联蛋白1(UCP1)的表达进行了检测。结果显示: 新生牛存在经典的棕色脂肪组织, UCP1表达水平极显著高于三月龄小牛($P < 0.01$); 新生牛冬季肾周脂肪UCP1表达水平极显著高于夏季($P < 0.01$), 说明延边黄牛的寒冷适应性可能与棕色脂肪的季节性变化有关。

关键词: 延边黄牛; 棕色脂肪; UCP1; 生长阶段

中图分类号: S823.81

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2019)05-0058-03

Identification of Perirenal Brown Adipose Tissue and Seasonal Variation of UCP1 Expressions in Yanbian Yellow Cattle

PIAO Zhengyu, LUO Xiaotong, JIN Xin, YAN Yan, YAN Changguo*

(Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: Hypothermia is a big issue in the cattle industry, and rapid heat production by brown fat metabolism is an important way to maintain body temperature in winter. The morphology of brown adipose tissue and the expression of UCP1, a marker molecule, in Yanbian yellow cattle in cold regions were detected. The results showed that there was classical brown adipose tissue in newborn cattle, and the expression level of UCP1 was significantly higher than that in calves (3 months old) ($P < 0.01$). Furthermore, the expression level of UCP1 in perirenal fat of newborn cattle was significantly higher in winter than that in summer ($P < 0.01$), which suggested that the cold adaptability of Yanbian yellow cattle may be related to the seasonal change of brown fat tissue.

Key words: Yanbian yellow cattle; Brown adipose tissue; UCP1; Growth stage

哺乳动物主要存在两类脂肪组织: 白色脂肪组织和棕色脂肪组织。前者主要作用为储存能量, 特点是细胞内存在单腔脂滴, 富含甘油三酯, 而后者可快速产热, 主要存在于小型啮齿动物的肩胛间和人类幼儿时期的颈部, 产生热量维持体温的恒定, 特点为细胞内有多腔脂滴形态存在, 含有大量的线粒体^[1-4]。牛棕色脂肪研究较少, 大部分研究集中在牛胚胎期到出生期间的肾周棕色脂肪组织, 发现无论是棕色脂肪数量还是标志基因解耦联蛋白1(uncoupling protein 1, UCP1)表达水平都随发育逐渐下降^[5-6]。

寒冷刺激能激活棕色脂肪活性并促进棕色脂肪增殖, 棕色脂肪激活后会增加非颤抖性产热的

能力从而维持机体的体温^[7], 尤其是环境温度随季节性变化, 棕色脂肪的适应性产热允许哺乳动物很灵活地调整自己的产热能力^[8-11]。这种能够内源性产热维持体温恒定的能力对于哺乳动物的适应性进化来说至关重要, 帮助哺乳动物能够适应低温的环境^[12]。

牛受到寒冷刺激后形成的营养代谢病称之为牛低温症, 在养殖业中是一种容易发生的牲畜疾病。特别是冬春时节出生的新生牛, 因为寒冷患病率极高, 给畜牧业带来极大损失^[13-14]。我国东北地区的延边黄牛以抗寒能力强著称, 但其耐寒的具体机制尚未可知。目前国内尚无牛棕色脂肪的相关报道, 本研究以延边黄牛为研究目标, 首先通过组织学方法测定新生延边黄牛和三月龄小牛是否存在经典的棕色脂肪组织, 进而通过检测UCP1的表达探究延边黄牛棕色脂肪组织是否存在季节性变化, 以期为研究延边黄牛的寒冷适应性提供素材。

收稿日期: 2019-05-03

基金项目: 国家重点研发项目(2018YFD0501702)

作者简介: 朴政玉(1980-), 女, 助理研究员, 硕士, 从事动物遗传育种与繁殖研究。

通讯作者: 严昌国, 男, 博士, 教授, E-mail: ycg@ybu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 新生牛和小牛棕色脂肪部位形态鉴定

选取健康无异常的延边黄牛新生牛(三日龄)和小牛(三月龄),分别在肾周以及腹股沟皮下部位采集脂肪组织,一部分冻存用于定量PCR(qPCR),一部分组织多聚甲醛(PFA)固定24h后,通过75%、85%、95%以及100%酒精梯度脱水,二甲苯透明和石蜡浸蜡包埋,进行5 μ m厚度的切片,苏木精-伊红染色(HE染色)。

1.2 新生牛和小牛脂肪组织棕色脂肪关键基因的表达检测

使用TRIZOL试剂提取脂肪组织RNA,使用Promega反转录试剂盒得到cDNA。根据NCBI数据库中的primer blast功能设计牛UCP1以及内参基因GAPDH的qPCR引物(UCP1-F: CACAGAGGTGGTCAAGGTCAGA; UCP1-R: AATCGGTTTTTCAC-CACATC; GAPDH-F: AAGGTCGGAGTGAACG-GATT; GAPDH-R: ATGACGAGCTTCCCGTTCTC)。qPCR反应体系: SYBR聚合酶预混buffer 10 μ L,引物上下游各0.6 μ L,模板4 μ L, H₂O补至20 μ L。

1.3 新生牛棕色脂肪的季节变化

实验牛选取在同一饲养场,采用相同的饲养方式,新生牛出生一周内取材,夏季组选定为7月取材,冬季组选定为1月取材,收集肾周脂肪固定冻存,利用半定量PCR和qPCR开展表达量分析。半定量PCR反应体系: cDNA 1 μ L, bufeer 2 μ L, dNTP 1.6 μ L,引物(同qPCR)上下游各0.8 μ L, H₂O补至20 μ L。

2 结果与分析

2.1 新生牛和小牛脂肪组织的比较

由图1可知,新生牛肾周存在经典的棕色脂肪组织,存在明显的多腔脂滴结构,皮下脂肪细胞尽管大小类似于肾周脂肪细胞,但呈现单腔脂滴形态;小牛肾周和皮下部位的脂肪组织细胞显著大于新生牛,且均呈现单腔脂滴形态,缺乏棕色脂肪典型形态,说明在3月龄这两个部位可能不存在棕色脂肪组织,棕色脂肪组织消失的阶段值得下一步研究。

UCP1是棕色脂肪的标志基因。对两个阶段牛脂肪组织UCP1的表达进行检测(图2),发现新生牛肾周脂肪UCP1的表达量极显著高于小牛($P < 0.01$),而皮下脂肪内表达量二者无显著差异,与经典的棕色脂肪组织形态学实验结果一致。

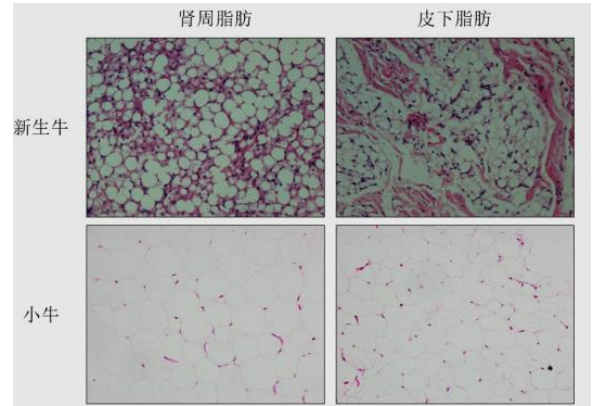


图1 新生牛(三日龄)、小牛(三月龄)的肾周脂肪和皮下脂肪组织切片染色

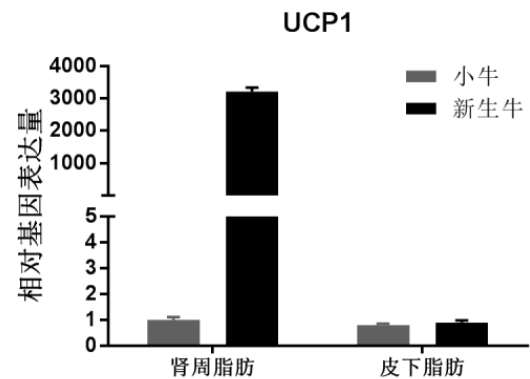


图2 新生牛(三日龄)、小牛(三月龄)的肾周脂肪和皮下脂肪组织UCP1的表达水平

2.2 新生牛肾周棕色脂肪的季节变化

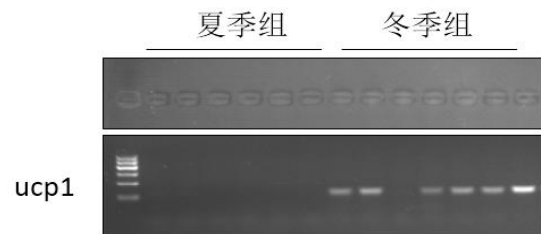


图3 新生牛夏季组和冬季组UCP1半定量

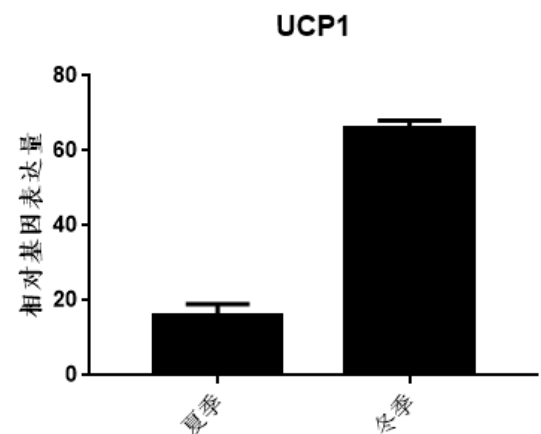


图4 新生牛夏季组和冬季组UCP1表达水平

对夏季和冬季出生的新生牛肾周脂肪中的UCP1表达进行检测(图3),利用半定量检测是否存在差异,结果表明,夏季新生牛的肾周脂肪中几乎检测不到UCP1的表达。为了进一步检测其表达水平,利用qPCR进行相对定量(图4),结果与半定量PCR一致,冬季新生牛表达水平极显著高于夏季新生牛($P<0.01$),说明延边黄牛对寒冷的抵抗性与棕色脂肪中UCP1的表达相关。

3 讨论

牛低温症一直以来是困扰养牛业的一个大问题,特别是对于刚出生不久的犊牛,自身对环境温度要求较高,如果外界气温寒冷,就容易引发此种疾病。一般来说,新生牛需要的正常生长温度是20~30℃。一旦低于20℃,新生牛患病的几率就会增大,影响新生牛的各种体征,甚至容易死亡^[12]。要保持温度,就需要额外给牛舍增加防寒保温措施,包括增加热风炉、煤炉或是暖气等设备,但无论如何都给养牛业带来极大的经济负担。而地处寒冷地区的延边黄牛,抗寒能力却极强,冬春季繁殖不受环境温度影响。本研究发现,这有可能与延边黄牛的棕色脂肪有关,新生牛肾周部位存在经典的棕色脂肪组织,并且有高表达的产热蛋白UCP1,对于保护重要脏器来说极为重要。目前小鼠的棕色脂肪研究最多,在其颈部、肩胛间、肾周、锁骨和脊柱旁等部位都有分布,而牛的其他部位是否有经典的棕色脂肪尚不确定,今后会进一步研究这个问题。

本研究发现,小牛(三月龄)的肾周棕色脂肪组织相对于新生牛已经严重白色化,没有多腔脂滴形态,UCP1表达水平也接近不可检测水平。新生牛UCP1在冬季却显著高表达,这可能与延边黄牛的寒冷适应性有关。这种适应性在小型哺乳动物中比较常见,有研究表明一种非冬眠型小型哺乳动物长爪沙鼠的棕色脂肪组织线粒体和UCP1的含量都会在冬季显著增加,并且提高了静止代谢率和非颤抖性产热,以适应寒冷的冬季^[15]。而延边黄牛是否也依赖棕色脂肪产热帮助度过寒冷的冬季还需要进一步研究。

综上,本研究确认了延边黄牛肾周部位有经典的棕色脂肪组织,并且出生后活性呈下降趋势,但新生牛肾周脂肪冬季会显著提高UCP1的表达水平,可能对于抗寒有积极的作用。充分了

解抗寒牛的产热机制对于分子育种或者遗传性基因编辑用于解决寒冷导致的牛低温症提供了一个很好的策略。这将会极大地改善整个养牛产业。

参考文献:

- [1] Lowell B B, Spiegelman B M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis[J]. *Nature*, 2000, 404(6778):652-660.
- [2] Schulz T J, Tseng Y H. Emerging role of bone morphogenetic proteins in adipogenesis and energy metabolism[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2009, 20(5-6): 520-531.
- [3] LIU Xuejiao, Christopher cervantes, LIU Feng. Common and distinct regulation of human and mouse brown and beige adipose tissues: a promising therapeutic target for obesity [J]. *Protein & Cell*, 2017, 8(6): 446-454.
- [4] 殷成港,邵 静,尹宝珍,等.阉割对延边黄牛脂肪沉积的影响及相关基因表达研究[J].*东北农业科学*,2019,44(2):44-48.
- [5] Taga H, Chilliard Y, Meunier B, et al. Cellular and molecular large-scale features of fetal adipose tissue: Is bovine perirenal adipose tissue Brown1685[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2012, 227(4):1688-1700.
- [6] Smith S B, Carstens G E, Randel R D, et al. Brown adipose tissue development and metabolism in ruminants[J]. *J Anim Sci*. 2004, 82 (3): 942-954.
- [7] Osuna-Prieto, Francisco J, Martinez-Tellez, et al. Activation of Human Brown Adipose Tissue by Capsinoids, Catechins, Ephedrine, and Other Dietary Components: A Systematic Review[J]. *Advances in Nutrition*, 2019, 10(2): 942-954.
- [8] Cannon B, Nedergaard J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance[J]. *Physiological Reviews*, 2004, 84 (1):277-359.
- [9] H Böckler, Steinlechner S, Heldmaier G. Complete Cold substitution of noradrenaline-induced thermogenesis in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*[J]. *Experientia*, 1982, 38(2): 261-262.
- [10] Klaus S, Heldmaier G, Ricquier D. Seasonal acclimation of bank voles and wood mice: nonshivering thermogenesis and thermogenic properties of brown adipose tissue mitochondria[J]. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 1988, 158(2): 157-164 .
- [11] Kronfeldschor N, Haim A , Dayan T, et al. Seasonal Thermogenic Acclimation of Diurnally and Nocturnally Active Desert Spiny Mice[J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2000, 73(1): 37-44.
- [12] Murphy W J. Resolution of the Early Placental Mammal Radiation Using Bayesian Phylogenetics[J]. *Science*, 2001, 294(5550):2348-2351.
- [13] 郭艳芹,许立军,罗颖辉,等.生产环境因素对架子牛育肥效果的影响研究[J].*吉林农业科学*,2010,35(4):49-50,55.
- [14] 红 枝,包勇志,阿拉坦胡亚嘎.牛低温症的综合防治[J].*畜牧与饲料科学*,2014(10):95-96.
- [15] 蔡理全,黄晨西.长爪沙鼠季节性产热特征比较[J].*兽类学报*,1998,18(3):215-218.