

秀丽隐杆线虫脂肪沉积研究进展

王新鲁^{①③} 屈长青^{①②*}

① 阜阳师范学院生命科学学院 阜阳 236041; ② 抗衰老中草药安徽省工程技术研究中心 阜阳 236041;

③ 安徽大学生命科学学院 合肥 230601

摘要:脂肪的过度沉积会引发多种疾病,如心脏病、高血压、高甘油三酯血症、II型糖尿病等。小白鼠(*Mus musculus*)和猪(*Sus domesticus*)是常用的研究脂肪沉积的模式动物,近年来随着研究的深入,发现脂肪代谢调控网络错综复杂,调控因子相互作用。秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)具有结构简单、身体透明、便于观察、繁殖周期短、易于人工培养等特征,因此使得秀丽隐杆线虫进行脂肪调控的研究成为了可能。本文通过总结国内外线虫脂肪沉积方面的研究,综述秀丽隐杆线虫研究脂肪沉积的进展。

关键词:秀丽隐杆线虫;脂肪滴;脂肪沉积

中图分类号:Q955 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2012)05-131-05

Research Advance in the Regulation of Fat Deposition in *Caenorhabditis elegans*

WANG Xin-Lu^{①③} QU Chang-Qing^{①②*}

① *Fuyang Normal College of Life Sciences, Fuyang 236041;*

② *Engineering Technology Research Center of Anti-aging Chinese Herbal Medicine, Fuyang 236041;*

③ *College of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230601, China*

Abstract: Excessive deposition of fat will lead to various diseases, such as heart disease, hypertension, hypertriglyceridemia, type II diabetes etc. Mice (*Mus musculus*) and porcine (*Sus domesticus*) are commonly used models for studying lipid accumulation, but more and more researches show that lipid deposition is a very complex physiological process involving in various regulation networks of fat metabolism. Many key fat regulatory genes and fat metabolism pathways found in mammals are conserved in *Caenorhabditis elegans*. Therefore, *C. elegans* is a powerful genetic model for fat biology research. This article summarizes the progress of fat deposition in *C. elegans*.

Key words: *Caenorhabditis elegans*; Lipid droplets; Fat deposition

近年来随着人们生活水平的不断提高,饮食条件也得到了很大的改善,但由于饮食不科学也给人们带来了许多疾病,最为常见的就是肥胖。肥胖是由于遗传因素和饮食失调等原因而引起,其中由于饮食结构不合理而引起的肥胖占绝大多数。在肥胖的病人中,可以发现其脂肪细胞数目的增多和体积的增大。目前用于研究脂肪沉积的动物大多集中于小白鼠(*Mus musculus*)和猪(*Sus domesticus*),对于秀丽隐杆

线虫(*Caenorhabditis elegans*)用来研究脂肪沉积的报道较少,但线虫有其优势,结构简单,且超过60%的人类(*Homo sapiens*)疾病基因都能够其中发现^[1]。秀丽隐杆线虫是一种常见的、自由生活的小型土壤线虫,雌雄同体,雄性

* 通讯作者, E-mail: qucq518@163.com;

第一作者简介 王新鲁,男,硕士研究生;研究方向:脂肪干细胞分化调控; E-mail: wangxinlu1102@163.com。

收稿日期:2012-04-23, 修回日期:2012-07-05

个体仅占群体的 0.2%,可自体受精或双性生殖,属于小杆亚纲小杆目小杆总科,以细菌为食,其生命周期大约为 3 d,平均寿命为 3 周。其呈蠕虫状,成体长约 1.0~1.5 mm,身体直径约 70.0 μm ,在实验室通常用涂有大肠杆菌 (*Escherichia coli*) OP50 的线虫生长培养基 (nematode growth medium, NGM) 对其进行培养,线虫的脂类物质主要储存在肠上皮细胞^[2]。秀丽隐杆线虫作为重要的模式生物目前研究得已比较透彻,其遗传背景清楚、个体结构简单、生活史短、基因组测序已完成,在遗传与发育生物学、行为与神经生物学、衰老与寿命、药物筛选、环境生物学和信号传导等领域得到广泛应用^[3]。本文拟就秀丽隐杆线虫在脂肪沉积的研究进展作一综述。

1 脂肪沉积与线虫的基因调控

模式生物是一种重要的资源,它可以用来发现基因,研究发现基因在人类生命活动中发挥的功能和作用。秀丽隐杆线虫作为研究生物进程的一种极好模式,在研究脂肪沉积方面也有一定的优势。研究发现,一些生物因子在秀丽隐杆线虫和哺乳动物脂肪沉积中发挥着相同的作用。例如血清素 5-HT_{2C} 受体敲除鼠和缺失血清素信号肽的线虫都会沉积过多的脂肪^[4]。胰岛素信号途径不仅是人类控制生理代谢的重要途径,而且在线虫代谢调控中也是如此^[5]。此外,在线虫中还发现了许多与哺乳动物同源的生脂酶和脂解酶^[6]。

实验发现,经历 6 h 饥饿处理的线虫,不管是处于幼年期还是成年期,它们与食物充足的线虫相比都表现出虫体发白、缺失黑色的肠颗粒等特征^[7]。用脂肪特异性染料苏丹黑染色固定发现,食物充足的线虫体内染色较深,饥饿处理的线虫染色较浅。这说明秀丽隐杆线虫与哺乳动物一样在生理需求时动员储存的脂肪。

组织培养和生物化学方法研究证实,3 种转录因子,过氧化物增殖激活受体 (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ)、CCAAT 增强子结合蛋白 (CCAAT enhancer

binding protein, C/EBP)、固醇反应元件结合蛋白 (sterol response element binding protein, SREBP) 对哺乳动物脂肪生成起着非常重要的作用^[8]。如果秀丽隐杆线虫是一种合适研究脂肪沉积的模式生物,那么这些或者相关基因也应该在秀丽隐杆线虫中存在并对脂肪形成具有一定调控作用。数据库分析验证,线虫的 SREBP 同源物 *lpd-1* 与哺乳动物 SREBP 有 35% 同源,而与 C/EBP 有 25% 同源^[9]。构建的 SREBP-GFP 载体转化线虫,发现绿色荧光基因在线虫肠内有较高的表达量。RNA 干扰线虫的 SREBP 或 C/EBP 基因都产生相似的显型:虫体发白纤弱、生长阻滞在幼虫期,苏丹黑染色 2 种 RNA 干扰虫发现它们都不能被染色。这说明 2 种 RNA 干扰虫不能够储存脂肪,但在暗视野双折射光学显微镜下发现虫体内肠颗粒总数没有改变,又说明这 2 种线虫肠内的功能是正常的^[10]。而且研究还发现 SREBP 缺失突变体线虫同样也不能储存脂肪,这就更加确切地说明了 SREBP 调控秀丽隐杆线虫的脂肪沉积。

RNA 干扰线虫不能沉积脂肪是否还有其他原因,如 RNA 干扰线虫可能不如野生型线虫那样有效地摄入和转运食物。对 RNA 干扰线虫进食和排泄速率进行检测发现,C/EBP 和 SREBP 干扰型线虫与野生型线虫有相似的平均进食和排泄速率,且肠道的开放性也是相同的,都能够吞食和排出 0.8 μm 的胶乳珠^[7]。揭示 C/EBP 和 SREBP 这 2 种干扰型线虫的肠功能是正常的,它们在沉积脂肪方面的缺陷不是因为缺乏进食、肠道运输和排泄等原因引起的。

哺乳动物的 SREBP 和 C/EBP 基因调控许多生脂酶的表达,包括乙酰辅酶 A 羧化酶、ATP 柠檬酸裂合酶、脂肪酸合成酶、三磷酸甘油酰基转移酶、苹果酸酶^[11]。一项线虫基因组的研究证明,秀丽隐杆线虫的 SREBP 和 C/EBP 基因对这些生脂酶也具有调控作用。RNA 干扰线虫的 SREBP 或 C/EBP 基因,它们下游的生脂酶表达水平在不同程度上都有所降低。而且干扰 C/EBP 基因后 SREBP 基因的表达水平下

调,然而只干扰 *SREBP* 基因发现 *C/EBP* 基因表达并没有很大变化。这说明秀丽隐杆线虫的 *SREBP* 在 *C/EBP* 的下游,而这种上下游关系最近同样在哺乳动物中被提出。

在秀丽隐杆线虫中通过 RNA 干扰筛选出了其他调控脂肪沉积的基因 *lpd-3*、*lpd-4* 和 *lpd-5*^[7]。*lpd-3* 编码具有开放阅读框的 1 590 个氨基酸蛋白,包括一个信号序列和卷曲螺旋结构域。*lpd-3-GFP* 转基因线虫像 *SREBP-GFP* 线虫一样,在线虫肠内都有高表达量的 *GFP*,而线虫的肠又是脂肪储存的部位。RNA 干扰线虫 *lpd-3* 基因,表型为虫体发白纤弱、生长阻滞在幼虫期,不能被苏丹黑染色。检测 *lpd-3* 在人体组织中的分布,发现 *lpd-3* 转录物在人的脑部、睾丸、脂肪组织中高表达。*lpd-4* 编码细胞色素 c 氧化酶 Vb,线粒体呼吸链复合物 IV 的一个亚基。*lpd-5* 编码线粒体呼吸链复合物 1-NADH 泛醌氧化还原酶。在线虫培养基中加入复合物 I 的抑制剂鱼藤酮或复合物 IV 的抑制剂 NaN_3 ,发现线虫的子一代虫体发白纤弱、尼罗红染色较少。电子显微镜下观察线粒体呼吸链抑制线虫,发现它们拥有发育的肌肉、真皮和肠细胞,揭示线虫线粒体功能衰减明显改变脂肪沉积。在诱导 3T3-L1 细胞成脂肪分化过程中,加入鱼藤酮或 NaN_3 后培养发现,细胞中有较少的脂滴,而没有加入 2 种线粒体呼吸链抑制剂的细胞大多都分化成了脂肪细胞,通过形态学上的观察、脂滴的沉积、油红 O 染色、尼罗红荧光染色都可以发现。

2 线虫的摄食影响其脂肪沉积

实验室培养的线虫以生长在琼脂板上的大肠杆菌菌落为食。研究发现线虫以 OP50、DA837、HB101、HT115 这 4 种大肠杆菌为食,其脂肪沉积存在差异。尼罗红活体染色显示,分别以上述 4 种大肠杆菌菌落为食的线虫,其间并不存在差异,但固定后染色显示以 OP50、DA837 菌落为食的线虫脂滴数目要多于以 HB101、HT115 菌落为食的线虫^[12]。萃取以上 4 种菌落为食线虫的脂滴,薄层色谱法和气相

色谱法联合分析显示,磷脂水平并没有很大差异,但三酰甘油水平存在很大差异,以 OP50 和 DA837 菌落为食的线虫三酰甘油中脂肪酸是 HB101 菌落的 2 倍^[13]。

为什么以 4 种不同大肠杆菌为食会造成秀丽隐杆线虫脂肪储存在差异呢?检测菌体密度和 4 种菌株中大量营养成分发现,HB101 虽然有较厚的菌苔,但其和 OP50、HT115 菌苔包含相同的细胞数,然而 DA837 菌苔包含的细胞是另 3 种菌苔的 2~3 倍。大肠杆菌的主要营养成分为蛋白质,与其生长的培养基相符。DA837 细胞形态较小,有较少的蛋白、脂肪酸和干重,其余 3 种菌株每个细胞的蛋白和脂肪酸水平基本相同,而 HB101 和 HT115 要比 OP50 和 DA837 多 3~5 倍的碳水化合物含量。用多加 5% 葡萄糖的培养基培养大肠杆菌,发现其胞内碳水化合物组分大幅提高,但线虫的三酰甘油组分并没有变化。这揭示大肠杆菌菌株中碳水化合物含量并不影响秀丽隐杆线虫的脂肪沉积。更进一步分析检测 4 种大肠杆菌脂肪酸组成发现,HB101 菌株有较高的单不饱和脂肪酸及异油酸,低水平的环丙烷脂肪酸,其他 3 种菌株表现出较高的环丙烷脂肪酸沉积水平^[14]。线虫的脂肪酸组成与所食菌株的脂肪酸组成相同,但这些菌株脂肪酸组成的不同与线虫脂肪沉积并不相关。

研究显示,线虫摄食的 HB101 被认为是一种高品质的食物,它很容易被吸收,然后线虫进入休眠状态^[15]。然而,野生型的线虫生长在 OP50 上比 HB101 上休眠时间更少,减少休眠意味着有更多的时间来摄食,这可能与高脂肪储存有关。但目前还不清楚哪些特定的营养成分会影响线虫的休眠行为。

3 线虫脂肪沉积的方法学研究

脂滴被定义为真核生物的一种能够储存像三酰甘油和胆固醇酯等中性脂肪的细胞器,它是由磷脂单分子层包裹的球型结构^[16]。线虫的脂肪主要储存在肠上皮细胞,其脂肪储存器的细胞器本质和生物物理学性质还不完全确

定。线虫的脂肪储存结构被定义为许多不同的名字,如肠颗粒或溶酶体相关细胞器(lysosome related organelles, LROs)、不同于 LROs 的小囊泡和脂滴^[17]。这些名字反应了对线虫脂肪储存结构认知不同和了解的不足。

尼罗红和氟硼二吡咯(boron dipyrromethene difluoride, BODIPY)活体标记脂肪酸类似物被用于定性和定量测定线虫中脂肪的方法^[18-19]。因为活体染色标记有益于筛选和实时成像,它已被广泛用于脂肪储存突变株的筛选和线虫脂肪水平的检测,如活体线虫的油红 O 染色就非常清晰直观^[20]。然而,活体尼罗红染色标记结构最近在 glo 突变体的研究中被证明是 LROs。在 glo 突变体中,它不能被尼罗红染色标记,LROs 也缺失了。然而,气相色谱法定量分析检测三酰甘油显示脂肪水平并没有改变^[21]。

用添加有尼罗红和 BODIPY 的 OP50 大肠杆菌培养野生型脂滴和 glo-1 型秀丽隐杆线虫发现,在野生型和 glo-1 突变体中没有可检测的尼罗红染色标记。这说明尼罗红只能标记 LROs。然而,在野生型肠表皮细胞中 BODIPY 标记出两种不同的结构,一种荧光较强,另一种荧光较淡。在 glo-1 突变体中较弱的荧光依然存在,但较强的荧光没有了。这说明较强 BODIPY 荧光结构是 LROs,而弱荧光的是脂肪储存结构^[22]。

最近发现,固定后线虫的尼罗红或油红 O 染色与气相色谱分析检测的脂肪水平关系更密切,比活体尼罗红和 BODIPY 标记能够更真实地反应出线虫的脂肪水平^[23]。但固定后染色作为更好的检测脂肪水平的方法,其染色的潜在原理还不清楚,可能是尼罗红和油红 O 被传递到脂滴位置是通过 LROs 来实现的。

4 展 望

秀丽隐杆线虫用来研究脂肪沉积有诸多优势,如生命周期短、结构简单、培养简单方便、身体透明、脂肪检测技术较完善、基因组测序已完成等。采用体内荧光技术可以研究脂肪代谢的

动态全过程。在人和线虫的脂肪沉积调控网络中,其代谢通路是相同的或基本相似的,而线虫调控脂肪沉积的关键调节酶所对应的基因都已研究得十分清楚,基因功能缺失的 RNAi 品系也较易得到。不足之处是线虫与人类种间距离太远,在生理和病理方面存在较大差异。这就需要通过完善实验方案的周密性、克服线虫模型潜在缺陷等来弥补,相信随着秀丽隐杆线虫脂肪沉积研究的不断深入,其必将会为人类肥胖及其相关疾病的治疗开拓新的途径。

参 考 文 献

- [1] Hodgkin J, Horvitz H R, Jasny B R, et al. *C. elegans*: sequence to biology. *Science*, 1998, 282(5396): 2011.
- [2] 庞林海, 杜爱芳, 李孝军, 等. 秀丽隐杆线虫培养特性与保存方法研究. *浙江农业学报*, 2007, 19(1): 34-36.
- [3] Silverman G A, Luke C J, Bhatia S R, et al. Modeling molecular and cellular aspects of human disease using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Pediatric Research*, 2009, 65(1): 10-18.
- [4] Sze J Y, Victor M, Loer C, et al. Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature*, 2000, 403(6769): 560-564.
- [5] 许雪梅, 王大勇. 秀丽线虫脂肪积累调控的生理与分子机制. *生理科学进展*, 2009, 40(2): 129-134.
- [6] 李新平. RNA 干扰技术在肥胖研究中的应用. *中国公共卫生*, 2006, 22(8): 1016-1018.
- [7] Mckay R M, Mckay J P, Avery L, et al. *C. elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage. *Developmental Cell*, 2003, 4(1): 131-142.
- [8] Rosen E D, Walkey C J, Puigserver P, et al. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & Development*, 2000, 14(11): 1293-1307.
- [9] Yang F J, Vought B W, Satterlee J S, et al. An ARC/Mediator subunit required for *SREBP* control of cholesterol and lipid homeostasis. *Nature*, 2006, 442(7103): 700-704.
- [10] Leung B, Hermann G J, Priess J R. Organogenesis of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Developmental Biology*, 1999, 216(1): 114-134.
- [11] Christy R J, Yang V W, Ntambi J M, et al. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes.

- Genes & Development, 1989, 3(9): 1323 – 1335.
- [12] Kimura K D, Tissenbaum H A, Liu Y X, et al. *Daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 1997, 277 (5328): 942 – 946.
- [13] Brooks K K, Liang B, Watts J L. The Influence of bacterial diet on fat storage in *C. elegans*. *PLoS ONE*, 2009, 4(10): e7545.
- [14] Grogan D W, Cronan J E Jr. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(4): 429 – 441.
- [15] You Y J, Kim J, Raizen D M, et al. Insulin, cGMP, and TGF- β signals regulate food intake and quiescence in *C. elegans*: a model for satiety. *Cell Metabolism*, 2008, 7 (3): 249 – 257.
- [16] Martin S, Parton R G. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(5): 373 – 378.
- [17] Hermann G J, Schroeder L K, Hieb C A, et al. Genetic analysis of lysosomal trafficking in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16 (7): 3273 – 3288.
- [18] Ashrafi K, Chang F Y, Watts J L, et al. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature*, 2003, 421(6920): 268 – 272.
- [19] 屈长青, 陆娟, 姬云涛. 秀丽隐杆线虫体内脂滴的尼罗红染色观察. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2010, 19(5): 519 – 520.
- [20] 姬云涛, 屈长青, 李星辰, 等. 秀丽隐杆线虫体内脂滴的油红 O 染色观察. *中国生化药物杂志*, 2011, 32 (2): 141 – 142.
- [21] Schroeder L K, Kremer S, Kramer M J, et al. Function of the *Caenorhabditis elegans* ABC transporter PGP-2 in the biogenesis of a lysosome-related fat storage organelle. *Molecular Biology of the Cell*, 2007, 18(3): 995 – 1008.
- [22] Zhang S B, Trimble R, Guo F, et al. Lipid droplets as ubiquitous fat storage organelles in *C. elegans*. *BMC Cell Biology*, 2010, 11(1): 96.
- [23] O'Rourke E J, Soukas A A, Carr C E, et al. *C. elegans* major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles. *Cell Metabolism*, 2009, 10(5): 430 – 435.