

食源性肥胖大鼠下丘脑 *Tsc1* 启动子区甲基化率、 mTOR 表达变化*

张林¹, 李珂², 何虹², 胡茂清^{1△}

1. 成都中医药大学第三附属医院 四川省糖尿病防治中心(成都 610041); 2. 成都中医药大学 针灸推拿学院(成都 610041)

【摘要】 目的 观察食源性肥胖大鼠下丘脑结节性硬化症基因 1(tuberous sclerosis complex 1, *Tsc1*)启动子区甲基化率及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的表达。方法 16 只雄性 SD 大鼠分为高脂喂养组和基础饲料喂养组(对照组),每组 8 只,共喂养 12 周。测定两组大鼠体质量、腹腔脂肪量、腹腔脂肪/体质量比值,采用重亚硫酸盐的测序法检测 *Tsc1* 启动子甲基化,RT-PCR、Western blot 分别检测 mTOR mRNA 和蛋白表达。结果 高脂组大鼠体质量、腹腔脂肪量、腹腔脂肪/体质量比均高于对照组($P < 0.05$)。两组大鼠下丘脑 *Tsc1* 启动子区均有 11 个位点可被甲基化,食源性肥胖组甲基化率($94.50\% \pm 4.66\%$)高于对照组($86.60\% \pm 3.49\%$, $P < 0.002$),mTOR mRNA 和蛋白表达均高于对照组($P < 0.05$)。结论 食源性肥胖大鼠下丘脑 *Tsc1* 基因启动子甲基化率增加,其下游基因 *mTOR* 表达上调,可能参与了肥胖的发生。

【关键词】 食源性肥胖 结节性硬化症基因 1 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 甲基化

***Tsc1* Promoter Methylation Rate, mTOR Expression in Food-induced Obese Rat Hypothalamus** ZHANG Lin¹, LI Ke², HE Hong², HU Mao-qing^{1△}. 1. The Third Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Diabetes Mellitus Prevention and Cure Center of Sichuan Province, Chengdu 610041, China; 2. Acupuncture and Massage College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610041, China
△ Corresponding author, E-mail: humaoqing2010@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the methylation rate of tuberous sclerosis complex 1 (*Tsc1*) promoter and expression of mammalian target of rapamycin (mTOR) in food-induced rat hypothalamus. **Methods** 16 male SD rats were divided into high fat diet induced group (8 rats) and normal control group (8 rats) feeding for 12 weeks. Body mass, mass of celiac fat, celiac fat/body mass were measured. Methylation of *Tsc1* promoter, mRNA and protein expression of mTOR were detected by bisulfite sequencing method, RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** Mass of celiac fat, celiac fat/body mass were higher in food-induced rat than that in control group. There were 11 methylation sites in SD rat hypothalamus. Obese group has significantly higher methylation rates ($94.50\% \pm 4.66\%$) than that of control group ($86.60\% \pm 3.49\%$) ($P < 0.002$). The mRNA and protein expression of mTOR were noted lower in control group than in obese group ($P < 0.05$). **Conclusion** The increased methylation rate of *Tsc1* promoter in food-induced rat hypothalamus and up-regulated expression of mTOR, downstream gene of *Tsc1* may promote the obesity.

【Key words】 Food-induced obesity *Tsc1* mTOR Methylation

肥胖已成为全世界范围内一个越来越令人关注的问题。2007~2008 年进行的中国糖尿病和代谢紊乱研究发现超重或肥胖发生率较 2002 年增加 1 倍^[1]。随着肥胖患病率的增高,与其相关的慢性非传染性疾病如糖尿病、高血压、心脑血管疾病等的患病率也呈明显的增加趋势。

肥胖是在基因和环境因素共同作用下的结果,其发病机制的研究取得了一定的进展,但目前治疗未有突破,进一步探索肥胖的发病机制可能为其治

疗提供新的思路。结节性硬化症基因 1(tuberous sclerosis complex 1, *Tsc1*)是与能量代谢过程有关的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)基因的上游抑制因子,缺失 *Tsc1* 基因的小鼠发生肥胖症^[2]。有资料发现 *Tsc1* 基因启动子在乳腺癌组织中可被甲基化^[3]。肥胖动物模型 *Tsc1* 甲基化变化及是否与肥胖有关目前尚未明确。本课题对肥胖大鼠 *Tsc1* 甲基化率、mTOR 表达进行研究,从表观遗传角度探讨其发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 3 周龄健康雄性 SD 大鼠共 16

* 国家自然科学基金(No. 81202844)和成都中医药大学基金(No. ZRYY201113)资助

△ 通讯作者, E-mail: humaoqing2010@163.com

只,体质量 58~85 g,成都中医药大学动物中心提供,室温 22~24 °C,自然光照,自由进食进水。

1.1.2 试剂及仪器 测序分析仪(美国 ABI 公司),凝胶成像系统(Gene Genius 公司),cDNA 合成试剂盒(上海生工 SK2445),*Taq* DNA 聚合酶及 dNTP(上海生工),质粒抽提试剂盒(Axygen),感受态细胞制备试剂盒(上海生工 SK9307),pUC18-T(上海生工),Trizol 提取试剂盒(Invitrogen),荧光定量 PCR 仪(ABI),总蛋白抽提试剂盒(Thermo-Pierce),mTOR 抗体(Santa-Cruz)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠分组 大鼠适应性喂养 3 d 后,随机分为普通饲料喂养组和高脂喂养组。依据 Deng 等^[4]方法配制高脂饲料。每周称体质量,共造模 12 周。

1.2.2 样本采集 大鼠饲养 12 周后空腹称体质量,腹腔注射利多卡因处死,迅速剥离脑组织,取下丘脑置于液氮罐保存,检测 *Tsc1* 启动子甲基化率,*mTOR* mRNA、蛋白质表达。分离肠系膜脂肪、肾周脂肪、附睾脂肪并称重。

1.2.3 腹腔脂肪量、腹腔脂肪量/体质量比值 腹腔内脂肪量=肠系膜脂肪+肾周脂肪+附睾脂肪,计算腹腔脂肪量/体质量比值。

1.2.4 重亚硫酸盐的测序法检测 *Tsc1* 启动子甲基化 采用 DNA 重亚硫酸盐处理提取的基因组 DNA。将 2 μg DNA 使用双蒸水稀释至 50 μL,加 5.5 μL 新鲜配制的 3 mol/L NaOH,42 °C 水浴 30 min,加 10 mmol/L 对苯二酚(氢醌)30 μL,3.6 mol/L 亚硫酸氢钠 520 μL。避光、混匀,石蜡油封层,50 °C 避光水浴 16 h,加入 300 μL 结合液(6 mol/L 盐酸胍)混匀后移到 UNIQ 柱中,加入洗液离心,55 °C 烘箱放置 10 min,加入预热的双蒸水 50 μL,55 °C 烘箱放置 20 min,室温离心,收集洗脱液,加 5.5 μL 3 mol/L NaOH,8 μL 3 mol/L 乙酸钠,4 μL 10 mg/mL 糖原和 270 μL 冰无水乙醇,置于-20 °C,过夜沉淀。离心后加 500 μL 70%乙醇,加入 20~30 μL 双蒸水,溶解沉淀。PCR 扩增:*Tsc1* 启动子引物:上游 F: 5'-GATTGTTGTTAATAATAATGTGATGTG-3',下游 R: 5'-TCACCACAACTACTCCTACTCAAC-3',扩增产物长度 511 bp。反应条件:98 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 45 s,66 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,40 个循环,72 °C 8 min。PCR 纯化产物连接到 pUC18-T 载体,并转化感受态细胞,选取阳性克隆,提取质粒,上海英拜生物科技有限公司进行测序。依据亚硫酸氢钠

处理甲基化的胞嘧啶不转化成胸腺嘧啶的原理,确定 CpG 是否被甲基化及其位置,甲基化率(%)=被甲基化位点/55×100%(55 为每个样本可被甲基化的位点)。

1.2.5 Real time-PCR 检测 *mTOR* mRNA 表达 运用逆转录及 Real time-PCR 技术检测 *mTOR* mRNA 表达。*mTOR* 引物序列为上游 F: 5'-GCGTCCGGGGTGTAGAGTA-3',下游 R: 5'-TGGGTCATCCTTGTTCGTGT-3',扩增产物长度为 138 bp;选择 β-actin 为内参,引物序列上游 F: 5'-CGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3',下游 R: 5'-AGCCACCAATCCACACAGAG-3',扩增产物长度为 163 bp。在 0.2 mL PCR 管中加入以下试剂:5 μL 总 RNA、1 μL Random Primer p(dN)6 (0.2 μg/μL)、5 μL RNase-free ddH₂O;70 °C 温浴 5 min;冰浴 10 s,离心加入下列试剂:4.0 μL Reaction Buffer、2.0 μL dNTP Mix(10 mmol/L)、1.0 μL RNase inhibitor(20 U/μL)、2.0 μL AMV Reverse Transcriptase(10 U/μL);37 °C 温浴 5 min;42 °C 温浴 60 min;70 °C 温浴 10 min,终止反应。按照试剂盒内说明书配制 20 μL 反应体系,在 ABI Stepone plus 仪器上进行反应,反应条件为 95 °C 起始模板变性 2 min,95 °C 变性 10 s,65 °C 退火 40 s,68 °C 延伸 1 min,循环 40 次,重复实验 3 次,采用 2^{-ΔΔCt} 计算 *mTOR* mRNA 相对表达量。见图 1。

1.2.6 Western blot 检测 mTOR 蛋白表达 使用蛋白质抽提试剂进行蛋白提取,测定蛋白浓度,每孔配制含 50 μg 总蛋白样的样品液,上样前煮沸 3 min,进行 SDS-PAGE 电泳(分离胶、积层胶浓度分别为 100 g/L、40 g/L),然后将内参蛋白 β-actin 及 mTOR 蛋白转移至 PVDF 膜,在 5% BSA 溶液中室温孵育 1 h,加抗 mTOR 抗体(200 μg/mL 以 1:200 比例稀释,终浓度为 1 μg/mL)4 °C 过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二体(稀释比例 1:1 000),室温孵育膜 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。曝光处理后进行灰度值计算,以 mTOR 目的蛋白和内参 β-actin 灰度值比值作为目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠体质量、腹腔脂肪量比较

由表 1 可见,造模前,两组大鼠基础体质量无差异($P=0.695$),喂养 12 周后,高脂喂养组大鼠体质量

量、腹腔脂肪量、腹腔脂肪/体质量比值均较基础饲料喂养组大鼠增加($P<0.05$)。

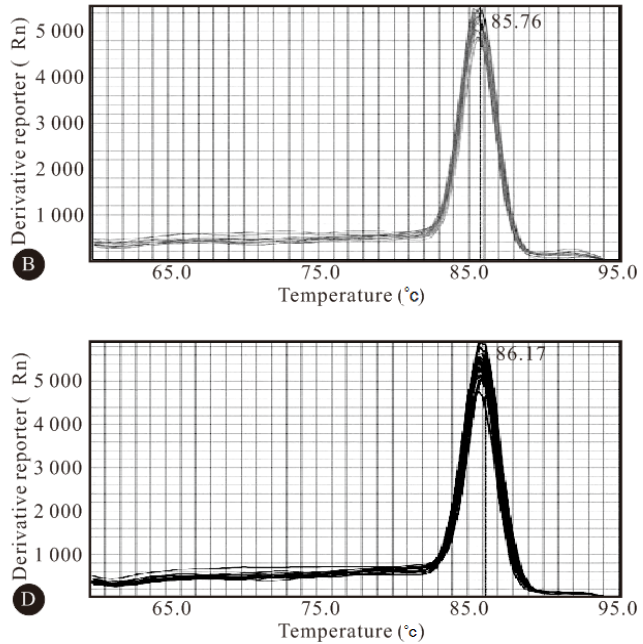
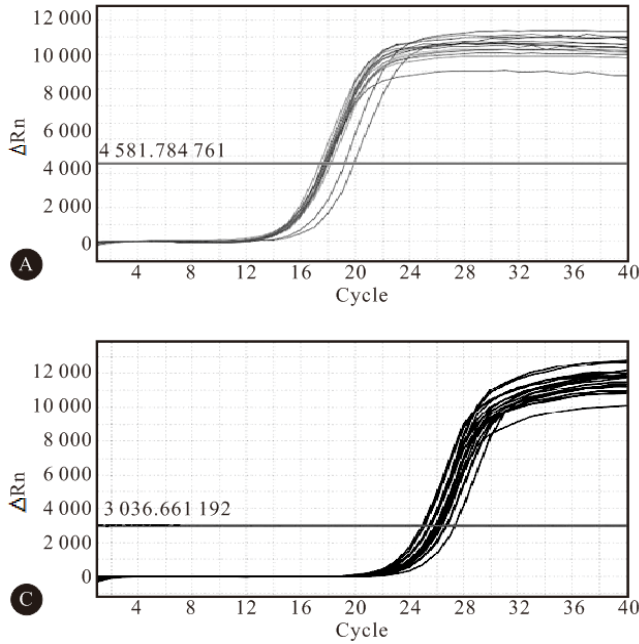


图 1 β -actin 扩增曲线(A)及熔解曲线(B), *mTOR* 扩增曲线(C)及熔解曲线(D)

Fig 1 β -actin amplification (A) and melting curve (B), *mTOR* amplification (C) and melting curve (D)

表 1 两组大鼠体质量、腹腔脂肪量、腹腔脂肪/体质量比较

Table 1 The body mass, mass of celiac fat and celiac fat/ body mass in the two groups

Group	n	Body mass (g)		Mass of celiac fat (g)	Celiac fat/body mass (%)
		0 week	12 weeks		
Control	8	68.56±7.50	355.00±50.13	7.69±2.51	2.00±0.41
Obese	8	70.19±8.68	458.88±43.22*	23.31±1.28*	5.08±1.28*

* $P<0.05$, vs. control group

2.2 两组大鼠下丘脑 *Tsc1* 基因启动子甲基化率比较

图 2 分别显示对照组和肥胖组大鼠下丘脑 *Tsc1* 基因启动子区均有 11 个位点可被甲基化,对照组甲基化率为 $86.60\% \pm 3.49\%$,肥胖组甲基化率为 $94.50\% \pm 4.66\%$,对照组低于肥胖组($P<0.002$)。

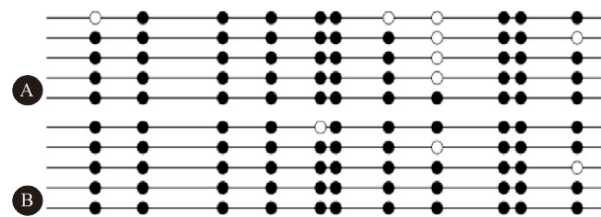


图 2 对照组(A)和肥胖组(B) *Tsc1* 启动子甲基化与非甲基化位点
Fig 2 Methylated and unmethylated sites of *Tsc1* promoter in control group (A) and obese group (B)

Solid, hollow represent methylated and unmethylated CpG sites, respectively. Each row represents a clone

2.3 两组大鼠下丘脑 *mTOR* mRNA、蛋白质表达比较

由表 2 可见肥胖组下丘脑 *mTOR* mRNA 的相对表达量高于对照组($P<0.05$), *mTOR* 蛋白质表达在肥胖组也高于对照组($P<0.05$)。见图 3。

表 2 两组大鼠下丘脑 *mTOR* mRNA、蛋白质表达

Table 2 The expression levels of mRNA and protein of *mTOR* in hypothalamus of two groups

Group	n	<i>mTOR</i> mRNA	<i>mTOR</i> protein
Control	8	1.01±0.16	0.34±0.02
Obese	8	1.81±0.51*	0.39±0.02*

* $P<0.05$, vs. control group

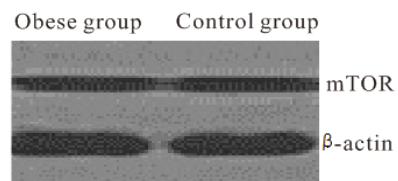


图 3 肥胖组、对照组 *mTOR* 蛋白表达

Fig 3 Expression of *mTOR* protein in obese and control group

3 讨论

目前肥胖的发病机制仍未阐明,近年研究显示表观遗传可能参与了肥胖的发生发展。本研究从表观遗传学角度探讨 *Tsc1*-mTOR 信号与肥胖的关系。

下丘脑 *mTOR* 基因表达参与肥胖和能量感知。本课题通过高脂喂养 12 周 SD 大鼠,其体质量、腹腔脂肪量、腹腔脂肪/体质量比均显著高于普通饮食组,与前文献报道一致^[5]。*mTOR* 是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是调节细胞存活、增殖的信号转导途径中的重要调控蛋白。本研究结果显示肥胖大鼠下丘脑 *mTOR* mRNA 和蛋白表达均高于对照组。Cota 等^[6]发现当大鼠进食后,下丘脑 *mTOR* 蛋白的活性增加,并且其下游靶酶表达也随之增加。当大鼠饥饿 48 h 后,*mTOR* 蛋白活性明显降低,其靶酶磷酸化程度明显减少,而大鼠禁食后再喂食,下丘脑 *mTOR* 蛋白活性再次增加,提示下丘脑 *mTOR* 信号通路参与了机体的能量感知代谢过程。

下丘脑 *Tsc1* 基因启动子甲基化可能与肥胖有关。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶催化下,以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,将甲基转移到 DNA 分子上特定碱基的过程,是表观遗传修饰的一项重要重要的调控机制^[7]。肿瘤抑制因子 *Tsc* 基因的蛋白产物之一为 *TSC1*,具有 GTP 酶活性,是 *mTOR* 信号通路上游的重要抑制调节器。SD 大鼠下丘脑 *Tsc1* 基因启动子是否存在 DNA 甲基化位点目前尚未见报道。本研究采用重亚硫酸盐测序法检测 *Tsc1* 基因启动子区甲基化位点,发现其存在 11 个 CpG 位点能被甲基化,并且发现肥胖组甲基化率高于对照组。*Tsc1* 基因缺失小鼠会摄取过量的食物,

脂肪垫增加,体质量显著增加,发生肥胖症^[2]。以上结果提示食源性肥胖大鼠下丘脑 *Tsc1* 基因启动子甲基化增加,对下游基因 *mTOR* 的抑制减弱,可能促进了肥胖的发生。

基因启动子区的胞嘧啶被甲基化后大多导致该基因表达沉默,进一步的研究应对 *Tsc1* 基因的 mRNA 及蛋白质表达进行测定,并阻断 *Tsc1* 的甲基化以明确 *Tsc1*-mTOR 信号在肥胖发病中的表观遗传机制。

参 考 文 献

- 1 Yang ZJ, Liu J, Ge JP, *et al.* Prevalence of cardiovascular disease risk factor in the Chinese population: the 2007-2008 China National Diabetes and Metabolic Disorders Study. *Eur Heart J*, 2012; 33(2): 213-220.
- 2 Mori H, Inoki K, Münzberg H, *et al.* Critical role for hypothalamic mTOR activity in energy balance. *Cell Metab*, 2009; 9(4): 362-374.
- 3 Jiang WG, Sampson J, Martin TA, *et al.* Tuberlin and hamartin are aberrantly expressed and linked to clinical outcome in human breast cancer: the role of promoter methylation of *TSC* genes. *Eur J Cancer*, 2005; 41(11): 1628-1636.
- 4 Deng G, Long Y, Yu YR, *et al.* Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS pathway. *Int J Obes (Lond)*, 2010; 34(1): 165-171.
- 5 邓刚, 余叶蓉. 中药黄芪对肥胖大鼠内皮血管舒张功能的影响. *四川大学学报(医学版)*, 2009; 40(4): 608-611.
- 6 Cota D, Proulx K, Smith KA, *et al.* Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*, 2006; 312(5775): 927-930.
- 7 Barros SP, Offenbacher S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J Dent Res*, 2009; 88(5): 400-408.

(2014-06-30 收稿, 2014-10-08 修回)

编辑 吕熙