

综述与专论

肥胖基因的研究进展

周 炜

(复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

缪为民 焦炳华

(第二军医大学微生物学教研室, 上海 200433)

摘要 肥胖症是摄食和能耗平衡机制的失调, 可引起多种疾病, 如 II 型糖尿病、高血压、高血脂和癌症等。肥胖基因的克隆为研究肥胖的机制提供了重要途径。肥胖基因编码消瘦激素, 作用于下丘脑, 控制代谢、能耗和生殖系统。实验表明, 重组的消瘦激素具有使肥胖基因缺陷和神经肽 Y 缺陷小鼠代谢和体重正常化, 恢复肥胖基因缺陷小鼠生育能力等活性。进一步研究肥胖基因作用机制, 开发针对各种缺陷的药物, 能使肥胖症的治疗成为可能。

关键词 肥胖基因, 定位克隆, 消瘦激素, 消瘦激素受体

学科分类号 Q75

肥胖是西方国家的一个常见问题。美国国立卫生研究院 (NIH) 的数据显示美国人中有一半超重, 三分之一的人患肥胖症。解决这一问题需花费昂贵的经济和医学代价。肥胖的人们每年花费 300 亿美元试图使自己变得苗条, 无力减轻体重的人们将成为糖尿病和心血管疾病的高危人群, 并将导致过早死亡。Friedman 实验室于 1994 年首次识别和克隆出小鼠和人的肥胖基因, 为揭开肥胖症之迷及肥胖症的诊治奠定了基础。

1 定位和克隆

很早以前人们就开始对肥胖症进行研究, 1783 年 Lavoisier 和 Laplace 研究表明能量平衡受生理调节。1950 年发现了第一个隐性基因突变, 命名为肥胖基因 (obese gene)^[1], 它是一个单基因突变, 导致深度肥胖和 II 型糖尿病, 但其研究一直进展甚微。Friedman 实验室经过八年努力, 遵循定位克隆技术思路, 将肥胖基因定位于小鼠 6 号染色体的一个 RFLP 标志附近, 继而构建了一个覆盖肥胖基因的 650 kb 关键区域的 P1 克隆重叠群, 然后用外显子捕捉法分离得到小鼠的肥胖基因, 并以之

为探针分离得到人的同源序列。突变检测发现实验所用的两种小鼠, C57BL/6J ob/ob 品系为密码子 105 的无义突变而产生的无功能的 mRNA, SM/CKC-^{Dac} ob^{2J}/ob^{2J} 品系不合成肥胖基因 mRNA^[2]。

根据已知的小鼠肥胖基因 cDNA 设计引物, 用大鼠腹膜后脂肪组织提取的 RNA 为模板, Murakami 等通过 RT-PCR 得到了大鼠肥胖基因^[3]。

2 分子结构

肥胖基因编码 4.5 kb mRNA, 含一个高度保守的 167 个氨基酸的开放阅读框和一个 21 肽的信号序列, 成熟产物为 16 ku 的分泌型蛋白, 由于该蛋白质可使动物更瘦, 故被命名为消瘦激素 (leptin, 取自希腊字根 leptos, 意为瘦)。肥胖基因在脊椎动物中高度保守。人和小鼠的总编码序列 84% 同源, 其中 5' 和 3' 非翻译区 30% 同源, N 端信号序列比分子其他部分同源性低些, 成熟蛋白 N 端保守性更强。大鼠肥胖基因与小鼠 96% 同源, 与人同

源性也在 80% 以上.

小鼠的肥胖基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 编码序列为第二和第三外显子. 第一个外显子上游有含 TATA 序列的启动子, 长

度为 762 bp, 但 -762 到 -161 位缺失不影响活性, -161 位以后的小启动子含一致的 Sp1 和 CCAAT/增强子结合蛋白 (C/EBP) 基序^[4].

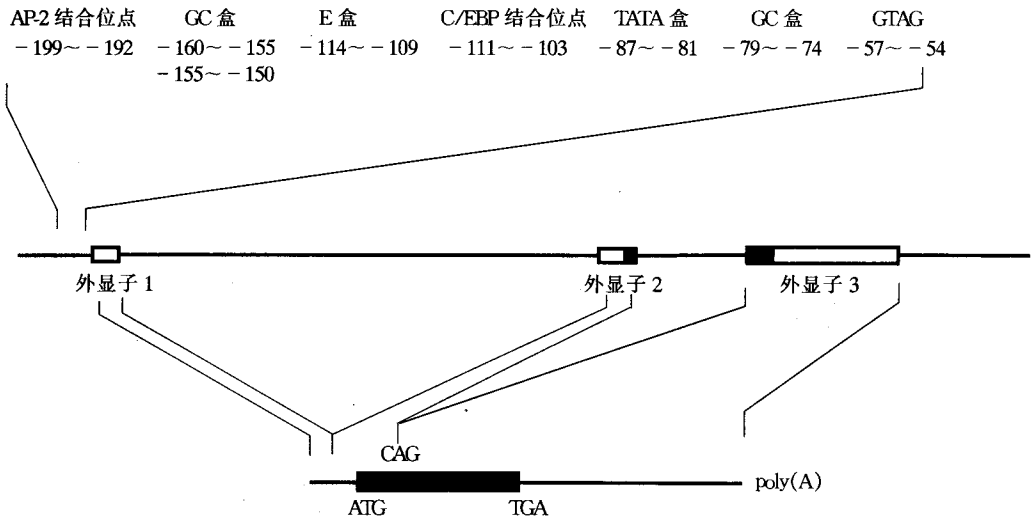


图 1 人肥胖基因分子结构示意图

人基因组中肥胖基因为单拷贝, 位于 7q31.3, 覆盖约 20 kb 的区域, 同样由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 第一外显子和第一内含子位于 5'非翻译区, 直至 ATG 起始密码子上游 29 bp, 其后是第二外显子, 第二内含子位于 +49 位谷氨酰胺, 第三外显子包括下游编码序列和 3'非翻译区. 转录起始区在 ATG 起始密码子上游 54~57 bp, 172 bp 的 5'侧区包括一个 TATA 盒类似序列 (TATAWAW, W=A/T) 和几个顺式作用元件——3 份拷贝的 GC 盒 (GGGCGG), 一个 AP-2 结合位点 (CCCAGGGC), 一个 C/EBP (TKNNGYAAK, K=G/T, N=A/C/G/T, Y=C/T), 一个 E 盒 (CANNTG, N=A/C/G/T) (图 1). 人肥胖基因 cDNA 5'端在转录起始位点下游 44~47 bp, 而小鼠和大鼠分别在 ATG 上游 57 和 60 bp, 5'非翻译区小鼠和大鼠肥胖基因 cDNA 93% 同源, 而与人分别为 51% 和 47% 同源. 第 4 183 位胞嘧啶有 polyA 尾, 表明肥胖基因 cDNA 3'端也即第三外显子的 3'端在该位点,

由此, 三个外显子总和 4 240 bp, 加上 polyA 尾的 200 bp, 与 RNA 印迹结果 (肥胖基因 mRNA 约 4.5 kb) 一致. 3'非翻译区人和小鼠约 50% 同源, 在 3'侧区 +4 417~+4 538 位有特征性的富含 CT 序列.

人和小鼠中均发现两种不同 cDNA, 分别为 166 和 167 个氨基酸, 不同仅在有 +49 位的谷氨酰胺, 分析显示剪接区有一个供体和两个受体位点, 内在替代剪切位点在 +49 位谷氨酰胺, 可见是同一前体由不同剪切机制产生的两种 mRNA^[5].

3 基因工程表达和生物学活性

人和小鼠的肥胖基因编码序列 (含信号序列) 利用六聚组氨酸融合表达载体在大肠杆菌 (*E. coli*) 中得到大量表达, 重组蛋白经固定金属亲和层析 (IMAC), 六聚组氨酸尾切除, 再次 IMAC, 浓缩, Superdex 75 16/60 柱凝胶过滤得到纯化的 16 ku 的消瘦激素^[6].

C57BL/6J 品系为肥胖基因的双倍体缺陷

(ob/ob) 小鼠, 症状有肥胖、高体脂沉积、高血糖、高胰岛素血症、低温、胰岛素抗性、饮食亢进、褐色脂肪组织低代谢和白色脂肪组织过量等. 用消瘦激素对该品系小鼠每日作腹腔内注射发现体重、体脂含量、摄食量、血清葡萄糖和胰岛素浓度均下降, 代谢率和体温上升, 活动水平提高, 而正常对照组 28 d 周期的消瘦激素注射以上参数无明显改变. 实验中还发现消瘦激素的剂量与效应有关. 消瘦激素的注射对糖尿病基因双倍体缺陷 (db/db) 小鼠无明显效应.

消瘦激素直接注射脑, 可使注射剂量减少而同样导致 ob/ob 小鼠和饮食诱导的肥胖小鼠的摄食量和体重下降, 且对 db/db 小鼠无效, 与注射血液产生的效应相同^[7]. 另发现神经肽 Y 缺陷的 ob/ob 小鼠产生与注射消瘦激素的 ob/ob 小鼠相似的效应^[8].

ob/ob 小鼠的显著特征是不育, 雄性有时可通过节制饮食而治愈, 雌性即使限制饮食使体重恢复正常也无法治愈. 雌性小鼠早期性发育正常但无排卵和动情周期, 性激素水平很低. 持续注射消瘦激素能恢复雌性小鼠的生育能力, 使排卵, 怀孕和分娩正常化^[9]. 用消瘦激素注射饥饿小鼠发现其睾酮含量比对照组高 2~3 倍, 并发现消瘦激素能防止饥饿母鼠的发情周期延缓, 能使母鼠性成熟提前 3 天 (原为出生后 40 天). 对 8 名男孩的血液消瘦激素浓度检测发现消瘦激素浓度升到正常的 2~3 倍时睾酮在血液中可测, 发育开始^[10]. 以上结果证明消瘦激素不仅能防止体重过度增加, 而且能帮助调节性激素产生, 启动发育. 饥饿和过瘦使女人停止排卵, 男人睾酮含量下降, 而由脂肪组织产生和分泌的消瘦激素在这两类人中产量下降, 可见消瘦激素是通过复杂的神经系统来控制代谢和能量消耗及生殖系统.

4 体内表达状况

几个遗传性肥胖的啮齿动物模型: C57BL/6J ob/ob 小鼠, Zucker fatty (fa/fa)

大鼠, Wistar fatty (fa/fa) 大鼠, 纯因正常大鼠过度进食导致的或下丘脑腹侧正中损伤导致的肥胖大鼠中, 脂肪细胞的肥胖基因 mRNA 表达显著提高. 人的肥胖基因 mRNA 表达随肥胖相关疾病严重程度而成比例提高^[5].

以小鼠肥胖基因序列为引物, 从 JCR: LA 和 Sprague-Dawley 品系大鼠的 RNA, 应用 RT-PCR 扩增出 360 bp 的片段, 以这个片段为探针进行 RNA 印迹, 仅脂肪细胞有 4.5 kb 的肥胖基因 mRNA, 肥胖鼠比正常鼠白色脂肪细胞的 mRNA 量高 10 倍, 肥胖鼠的白色脂肪细胞的 mRNA 量比褐色脂肪细胞高 30 倍, 成熟脂肪细胞中肥胖基因 mRNA 在肥胖和正常鼠均存在且前者比后者多, 而前脂肪细胞中仅肥胖鼠有, 正常鼠无. 两个品系的大鼠均有肥胖基因 mRNA, 可见肥胖基因没有缺陷, 缺陷的很可能是基因的受体或受体后的信号传导途径中的环节^[11].

几乎同时, Masuzaki 等^[12]发现在饮食诱导的肥胖大鼠, 所有脂肪细胞中肥胖基因的表达均比正常增加两倍以上, 脂肪重量是正常的 2 倍左右体重增高, 且导致中度高血糖和高胰岛素血症. 该工作的意义在于是没有遗传变异导致的肥胖, 表现的肥胖基因表达上升与以前在没有肥胖基因突变的人细胞中肥胖基因表达上升一致^[5].

5 功能和机制

大鼠实验^[13]和小鼠实验^[14]不约而同地证实了肥胖基因的产物的作用部位在下丘脑, 这一调节进食和代谢的中心. 小鼠消瘦激素受体基因的克隆^[15], 和随即被确认为糖尿病基因 (diabetic gene)^[16], 使得消瘦激素作用机制初见端倪. 根据脂肪稳态理论: 脂肪组织产生消瘦激素的量取决于体内脂肪含量, 消瘦激素通过作用于下丘脑调节机体胃口. 当体内脂肪含量增高时, 脂肪细胞产生消瘦激素, 消瘦激素作用于大脑使之产生相关作用停止饮食和提高活动水平; 反之, 脂肪含量下降时, 消瘦激素浓度下降, 给大脑信号以增强饮食和降低活动

水平^[17].

细致研究发现一级结构与其他蛋白质毫无同源性的肥胖基因, 在三维结构上与白介素 2 和生长因子等螺旋结构的细胞因子同源. 消瘦激素受体与第一类细胞因子受体家族同源, 由 840 个氨基酸的胞外结合区, 34 个氨基酸的跨膜区和可变的胞内区组成. 不同剪切形式形成几种不同的受体, 它们在包括胞内区 29 个氨基酸在内的第 889 位赖氨酸以上是相同的, 较短的胞内区含 34 个氨基酸的 ob Ra 和含 32 个氨基酸的 ob Rc 可能是运载体; 较长的胞内区含 304 个氨基酸的 ob Rb 可能作用在信号传导的第一步, 其长胞内区有 JAK 和 STAT 结合基序, 而 JAK 和 STAT 结合是第一类细胞因子受体信号传导的关键步骤; 最短的无跨膜区的 ob Re 与其他剪切形式至第 796 位的组氨酸相同, 总长仅 808 个氨基酸, 是一种可溶性受体. 初步认为, 肥胖基因和它的受体结合后激活 JAK-STAT 信号传导途径, 形成 STAT-1 和 STAT-3 复合物, 进而调节受消瘦激素控制的基因的转录^[18].

消瘦激素受体在下丘脑 4 个主要区域表达, 包括弓形核区, 这一部位正是神经肽 Y 的主要产生位点, 神经肽 Y 缺陷能减轻肥胖基因缺陷造成的影响, 双突变子代的胃口, 代谢和脂肪水平均在正常和 ob/ob 小鼠之间, 可见低水平消瘦激素表达使神经肽 Y 表达升高, 而神经肽 Y 缺陷正好逆转该作用. agouti 基因是第一个被克隆的肥胖相关基因^[19], 这种基因突变使小鼠毛色亮黄且导致肥胖, 其作用机制也是在其受体得到克隆后才得以认识. agouti 蛋白结合的黑色皮质激素受体 (MCR) 之一, MCR-4, 也在下丘脑弓形核产生. MCR-4 基因敲除的小鼠和 ob/ob 小鼠均为神经肽 Y 高表达, 提示这三者紧密相关.

根据已知研究结果, 可以得到以下消瘦激素作用机制 (图 2): 每一步产生问题, 都将导致肥胖和相关症状的出现, 消瘦激素拮抗物存在会使血液中自由消瘦激素浓度下降, 运载体缺陷使消瘦激素无法通过血管转运和血脑屏

障, 受体缺陷, 信号传导途径的任何一步缺陷, 转导物缺陷等都会表现出消瘦激素抗性. 所以, 人群中真正肥胖基因缺陷仅 5%, 而大多数表现为消瘦激素抗性.

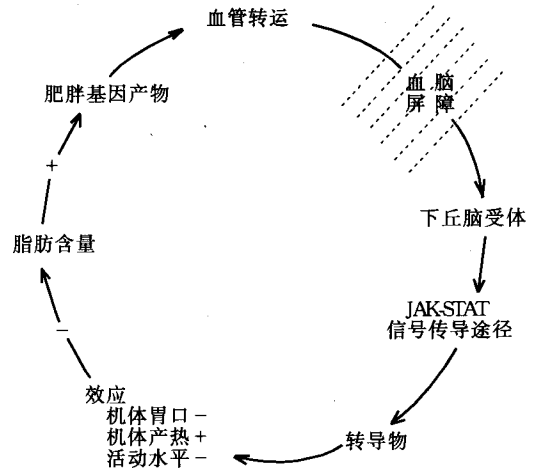


图 2 肥胖基因作用机制示意图

+: 正调控; -: 负调控.

6 前景和展望

自肥胖基因被克隆以来, 这一领域一直是举世瞩目的热点, 各国研究人员纷纷投入, 研究论文如雨后春笋般冒出, Amgen 公司甚至出资 2 000 万美元独家买断基于该基因的相关产品开发权.

虽然大多数人属于食物诱导的肥胖, 而肥胖基因缺陷引起的仅占 5%. 但是 Masuzaki 实验组的试验结果表明消瘦激素对食物诱导引发的肥胖同样有效, 这提示消瘦激素可能成为潜在的一种非常有效的减肥药物.

从目前来看, 当务之急是将肥胖基因的作用机制搞清楚. 众所周知, 肥胖不是简单的一个原因引起, 而是多种因素的综合, 只有彻底弄清其作用机制, 将相关基因或产物一一列出, 进一步开发针对各种缺陷的药物, 才能真正给肥胖患者带来福音.

参 考 文 献

- 1 Ingalis A M, Dickie M M, Snell G D. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered*, 1950, 41 (12): 317~

- 318
- 2 Zhang Y, Proenca R, Maffei M *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994, **372** (6505): 425~ 432
 - 3 Murakami T, Shima K. Cloning of rat obese cDNA and its expression in obese rats. *BBRC*, 1995, **209** (3): 944~ 952
 - 4 He Y, Chen H, Quon M J *et al.* The mouse obese gene. Genomic organization, promotor activity, and activation by CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem*, 1995, **270** (48): 28887~ 28891
 - 5 Isse N, Ogawa Y, Tamura N *et al.* Structure organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J Biol Chem*, 1995, **270** (46): 27728~ 27733
 - 6 Halaas J L, Gajiwala K S, Maffei M *et al.* Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 1995, **269** (5223): 543~ 546
 - 7 Campfield L A, Smith F J, Guisez Y *et al.* Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 1995, **269** (5223): 546~ 549
 - 8 Erickson J C, Hollopatar G, Palmiter R D. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science*, 1996, **274** (5293): 1704 ~ 1707
 - 9 Chehab F F, Lim M E, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*, 1996, **12** (3): 318~ 320
 - 10 Ahima R S, Prabakaran D, Mantzoros C *et al.* Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 1996, **382** (6588): 250~ 252
 - 11 Vydelingum S, Shillabeer G, Hatch G *et al.* Overexpression of the obese gene in the genetically obese JCR: LA corpulent rat. *BBRC*, 1995, **216** (1): 148~ 153
 - 12 Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K *et al.* Augmented expression of the obese gene in adipose tissue from rats fed high-fat diet. *BBRC*, 1995, **216** (1): 355~ 358
 - 13 Van Dijk G, Thiele T E, Donahey J C *et al.* Central infusion of the leptin and GLP-1 (7-36) amide differentially stimulate c-Fos in the rat brain. *Am J Physiol*, 1996, **271** (4): R1096~ 1100
 - 14 Lee G H, Proenca R, Montez J M *et al.* Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, 1996, **379** (6566): 632~ 635
 - 15 Tartaglia L A, Dembski M, Weng X *et al.* Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 1995, **83** (7): 1263~ 1271
 - 16 Chen H, Charlat O, Tartaglia L A *et al.* Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor gene in db/db

- mice. *Cell*, 1996, **84** (3): 491~ 495
- 17 Gura T. Obesity sheds its secrets. *Science*, 1997, **275** (5301): 751~ 753
- 18 Vongs A, Fong T M, Xu L *et al.* Functional STAT 1 and 3 signaling by the leptin receptor (OB-R); reduced expression of the rat fatty leptin receptor in transfected cells. *Endocrinology*, 1996, **137** (11): 5178~ 5181
- 19 Bultman S, Michaud E, Woychik R. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell*, 1992, **71** (7): 1195~ 1204

Research Progress on the Obese Gene. ZHOU Wei (*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, China*); MIAO Wei-min, JIAO Bing-hua (*Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China*).

Abstract Obesity is the disorder of the mechanisms in balancing food intake and energy expenditure. It leads to several diseases such as type II diabetes, hypertension, hyperlipidaemia and cancers. The positional cloning of the obese gene provides an important approach to the research of the mechanisms of obesity. Leptin, the product of obese gene, acts on the hypothalamus, controlling metabolism, energy expenditure and reproductive system. Research data showed that the recombinant leptin normalized the metabolism and body weight of the obese gene deficiency mice and the neuropeptide Y deficiency mice, corrected the sterility of the obese gene deficiency mice. Further researches on the mechanisms of the obese gene and development of the drugs according to different kinds of deficiency can make it possible to the treatment of obesity.

Key words obese gene, positional cloning, leptin, leptin receptor