

## pGhrelin 对离体猪脂肪细胞 Caspase-3 活性及基因表达的影响\*

唐胜球<sup>1,2)</sup> 束 刚<sup>1)</sup> 朱晓彤<sup>1)</sup> 王松波<sup>1)</sup>  
高 萍<sup>1)</sup> 王修启<sup>1)</sup> 张永亮<sup>1)</sup> 江青艳<sup>1)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup> 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642; (<sup>2)</sup> 韶关大学英东生物工程学院, 韶关 512005)

**摘要** 研究新近发现的猪 Ghrelin (porcine ghrelin, pGhrelin)对猪前体脂肪细胞 Caspase-3 活性及其基因表达的影响。采用细胞培养技术,以仔猪背部皮下前体脂肪细胞为靶细胞,经 0、1、10 和 100 nmol/L pGhrelin 处理细胞 48 h 后,于倒置生物显微镜下进行脂肪细胞形态学观察。利用 MTT 法测定 pGhrelin 对细胞增殖的影响。采用分光光度法检测 Caspase-3 活性。以实时荧光定量 RT-PCR 方法测定 Caspase-3 的基因表达。结果显示,10 nmol/L pGhrelin 可以显著降低脂肪细胞 Caspase-3 的活性与 mRNA 的表达水平( $P < 0.05$ ),100 nmol/L pGhrelin 对猪脂肪前体细胞增殖有极显著促进作用( $P < 0.01$ )。上述结果表明,pGhrelin 可以下调 Caspase-3 的活性与基因表达,促进脂肪细胞增殖,抑制脂肪细胞凋亡,其机制可能与 Caspase-3 依赖性凋亡调节信号通路有关。

**关键词** pGhrelin, 猪, 脂肪细胞, Caspase-3, 增殖, 凋亡  
**学科分类号** Q7

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2008.00714

脂肪代谢是指脂肪在体内的降解和合成过程及其调节,与机体内多种生理功能联系密切,并影响其正常运转。而脂肪代谢紊乱是指正常的脂肪代谢由于多种因素的综合作用发生异常,是影响健康和寿命的主要因素之一,也会直接导致代谢综合征与各种疾病产生<sup>[1]</sup>。机体内脂肪代谢过程受到多种因素的调控,诸如营养物质、激素与多种生理活性物质等。脂肪的沉积是脂肪合成代谢与分解代谢的一种平衡状态,依赖于脂肪前体细胞的增殖、分化与凋亡状况,其调控同样受到多种生理机制的参与。

Ghrelin 是 Kojima 等<sup>[2]</sup>从鼠与人的胃分泌细胞中提取纯化出来的,由 28 个氨基酸残基构成的多肽,并被认为是生长激素释放激素受体(GHS-R)的内源性配基,具有强烈刺激脑垂体前叶释放生长激素<sup>[3~5]</sup>、调节机体生长发育<sup>[6]</sup>、增加食欲<sup>[7,8]</sup>、影响能量平衡<sup>[9]</sup>和细胞增殖分化与凋亡等生物学效应<sup>[10,11]</sup>。而 Caspase-3 是在细胞凋亡过程中的具体执行者<sup>[12]</sup>。因此,研究 pGhrelin 对离体猪脂肪细胞 Caspase-3 活性与基因表达影响,有助于进一步揭示 pGhrelin 影响脂肪代谢的分子机制,为代谢综合征与脂肪代谢紊乱寻找新靶点及其调控途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料与仪器

pGhrelin(美国 Phoenix pharmaceuticals 公司);胰蛋白酶、I 型胶原酶、新生牛血清、青霉素、链霉素、DMEM 及 DMEM/F12(美国 Gibco 公司);HEPES、油红 O(美国 Amresco 公司);牛血清白蛋白(BSA)、胰岛素和地塞米松(dexamethasone, Dex)(美国 Sigma 公司);Realtime PCR Master Mix(日本 Toyobo 公司);Trizol 总 RNA 抽提试剂盒(广州赛百盛公司);M-MLV 反转录酶(美国 Promega 公司);RNasin、反转录随机引物、DNA Maker DL-2000(日本 Takara 公司);Taq DNA 聚合酶、dNTPs 等 PCR 反应体系(立陶宛 Fermentas 公司);

\* 国家自然科学基金资助项目(30471268),高等学校博士学科点专项科研基金资助项目和国家自然科学基金委-广东联合基金重点项目(U0731004)。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 020-85280872, E-mail: qyjiang@scau.edu.cn

收稿日期: 2008-11-17, 接受日期: 2009-02-24

引物由北京赛百盛公司合成; 测序由上海生工生物技术公司完成。

IX70 型倒置生物显微镜(日本 Olympus 公司); HBPX220 型梯度 PCR 仪(英国 Hybaid 公司); GDS8000PS 型凝胶成像系统(美国 UVP 公司); ABI7500 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞分离与纯化.** 参照 Akanbi 等<sup>[13]</sup>方法改进, 将 7 日龄长白仔猪颈部放血处死, 经 75%(体积比)酒精消毒、晾干, 稍后于无菌条件下取出背部皮下的脂肪组织, 以 DMEM 培养液漂洗, 去除结缔组织和血管, 尽量剪碎至 1 mm<sup>3</sup> 左右, 移入 10 ml 离心管, 4℃ 离心(800 *g*) 5 min, 弃去 DMEM 液, 将剩下组织移入 25 cm<sup>2</sup> 玻璃培养瓶中, 用含 0.1% I 型胶原酶消化液(10 mmol/L HEPES、118 mmol/L NaCl、50 mmol/L KCl、1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、15 mmol/L D-葡萄糖、1.5% BSA) 37℃ 水浴消化 60~70 min, 每 15 min 用吸管轻轻吹打组织使其分散, 当组织块成絮状后, 用 100 目网筛过滤去除未消化的组织块, 4℃ 离心(800 *g*) 5 min, 过滤, DMEM 漂洗, 4℃ 离心(800 *g*) 沉淀后, 加入红细胞裂解液(154 mmol/L NH<sub>4</sub>Cl、5.7 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.1 mmol/L EDTA)处理 10 min, 4℃ 离心(800 *g*) 剔除红细胞, 用含 10% 新生牛血清的 DMEM/F12 培养液重悬细胞, 计数, 台盼蓝检测细胞活率, 按 1×10<sup>5</sup> 个/ml 接种, 置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 隔日换液, 观察细胞生长情况。

**1.2.2 细胞形态学观察.** 台盼蓝检测细胞活率, 并细胞计数后, 用含 5% 胎牛血清及双抗的 DMEM/F12 培养液将细胞悬液稀释为 1×10<sup>5</sup> 个/ml, 在 6 孔板中接种 2 ml, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 和饱和湿度的条件下细胞培养箱内培养。24 h 细胞贴壁后, 用无血清培养液[含 5×10<sup>-7</sup> mol/L 地塞米松、1×SITE(Sigma- Aldrich 公司, 含 10 mg/L 牛胰岛素、5.5 mg/L 人转铁蛋白、2.9×10<sup>-8</sup> mol/L 亚硒酸钠、2 mg/L 乙醇胺)、10 mg/L 维生素 C、0.15% BSA 和双抗的 DMEM/F12 基础培养液] 全量换液, 以后每 24 h 更换培养液, 倒置生物显微镜下观察脂肪细胞

形态及生长情况, 继续培养至细胞铺满培养板 80%~90% 时, 用磷酸盐缓冲液洗净后, 加入 2 ml 含有 0、1、10 和 100 nmol/L pGhrelin 等药物的无血清培养液, 37℃ 培养箱中培养。

**1.2.3 细胞鉴定.** 参照 Ramírez 等<sup>[14]</sup>的方法, 采用油红 O 染色对背部皮下前体脂肪细胞进行鉴定。取 1.2.2 中无血清培养液培养 216 h 的成熟体脂肪细胞, 去除培养液后加甲醛固定液固定 2 h, 经 PBS 清洗, 加油红 O 染色, 倒置生物显微镜下观察细胞内聚脂, 并拍照。

**1.2.4 细胞增殖.** 利用 MTT 法<sup>[15]</sup>对细胞增殖进行测定。将 1.2.1 中分离到的背部脂肪细胞(1×10<sup>5</sup> 个/ml)按 100 μl/孔接种于 96 孔培养板中, 按照 1.2.2 的培养方法换液, 48 h 后, 加入 15 μl 5 g/L MTT 溶液(终浓度为 0.65 g/L), 放回培养箱继续培养 4 h 后, 终止培养, 1 500 r/min 离心并移除上清, 用 PBS 清洗 1 遍后每孔中加入 150 μl DMSO, 室温下低速振荡 30 min, 选择波长 490 nm, 在酶联免疫检测仪上读取吸光值(A<sub>490</sub>)。

**1.2.5 Caspase-3 活性.** 采用 1.2.2 中细胞培养与处理方法, 经 0、1、10 和 100 nmol/L pGhrelin 处理 48 h 后收集细胞, 采用 Caspase-3 比色法试剂盒按照厂家说明进行测定(Medical & Biological Laboratories Co., LTD, Japan)。

## 1.2.6 Caspase-3 基因表达.

采用实时定量 RT-PCR 方法检测了猪脂肪前体细胞分化过程中 Caspase-3 基因的表达丰度。具体方法为: 采用 1.2.2 中细胞培养与处理方法, 经 0、1、10 和 100 nmol/L pGhrelin 处理 48 h 后收集细胞, 抽提总 RNA。

各取 2 μg 总 RNA, 用随机引物和 M-MLV 反转录酶进行反转录, 反转录产物用 1×TE 稀释 4 倍后作为 PCR 扩增模板。应用 Primer premier 5.0 软件设计 Caspase-3 特异性上下游引物(表 1)。实时定量 RT-PCR 选用 β-actin rRNA 为内标基因, 在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(ABI PRISM 7500, 美国)上进行<sup>[16]</sup>。实时荧光定量 PCR 结束后, 得出 Caspase-3 与 β-actin mRNA 的表达丰度。

Table 1 Oligonucleotide sequences of primers

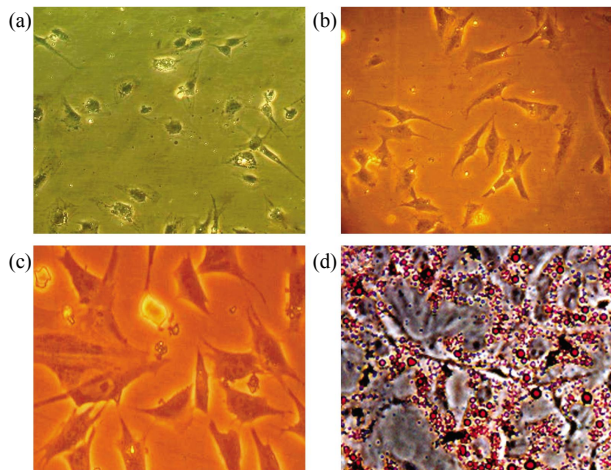
| Genes     | GenBank No. | Sequences(5'→3')                 | Product/bp |
|-----------|-------------|----------------------------------|------------|
| Caspase-3 | AB029345    | Sense: TGGGATTGAGACGGACAGT       | 100        |
|           |             | Antisense: AGTAACCAGGTGCTGTAGAAT |            |
| β-Actin   | AF05483     | Sense: TTCCAGCCCTCCTTCCTG        | 94         |
|           |             | Antisense: GGTCTTGCGGATGTCTG     |            |

**1.2.7 数据处理.** 采用 SPSS14.0 软件(SPSS In., USA)对所得数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 并进行 Duncan's 多重比较,  $P < 0.05$  具有显著性差异, 所得结果以  $\bar{x} \pm s$  表示.

2 结果与分析

2.1 猪皮下前体脂肪细胞的形态学观察与油红 O 染色鉴定

猪皮下脂肪组织采用 I 型胶原酶消化法可分离纯化到前体脂肪细胞, 且分散性好、活力强、纯度高、生长状态良好. 本试验采用 0.1% I 型胶原酶对猪皮下脂肪组织进行消化, 可得到分离效果较好的脂肪前体细胞, 经台盼蓝染色检测, 细胞成活率达到 95% 以上. 分离纯化后的前体脂肪细胞以含 5% 胎牛血清的完全培养液接种, 2~4 h 后少量脂肪细胞开始逐渐贴壁, 伸出伪足, 呈圆形或不规则的多边形, 未贴壁细胞为球形(图 1a). 培养 24 h 后, 大量细胞开始伸出伪足, 变为梭形或多角形, 相邻细胞的伪足之间出现交错, 细胞处于相对静止期, 无明显增殖(图 1b). 96 h 后细胞增殖迅速, 细胞数量明显增多, 脂肪细胞进入对数增长期, 单个细胞体积增大、数量增多, 并出现小量的小脂滴(图 1c). 脂肪前体细胞经诱导分化 96 h 后, 细胞数量已经大量增加, 并出现单层汇合状态, 出现大量的圆形脂滴, 逐渐向成熟脂肪细胞转化. 继续诱导培养至 240 h, 众多的小脂滴开始聚集融合, 体积增大, 在细胞内形成多个或单个大脂滴, 最后占据细胞的绝大部分, 标志着脂肪前体细胞已分化为成熟的脂肪细胞, 经油红 O 特异性染色鉴定发现,

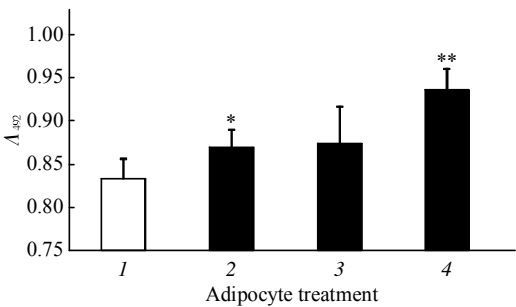


**Fig. 1 Morphocytology observation and dyeing by Oil Red O of porcine back adipose layer adipocyte**  
(a) After cultured 4 h, 200 $\times$ . (b) After cultured 24 h, 200 $\times$ . (c) After cultured 96 h, 300 $\times$ . (d) After cultured 240 h, 300 $\times$ .

所取细胞为前体脂肪细胞, 纯度高, 外观典型(图 1d). 从图 1d 还可见脂肪细胞膜已大量破损, 细胞开始消融, 凸显凋亡小体, 细胞轮廓逐渐消失, 呈现凋亡细胞的典型形态.

2.2 pGhrelin 对仔猪原代脂肪细胞增殖的影响

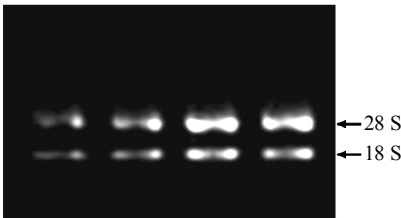
图 2 所示, 1 和 100 nmol/L pGhrelin 组与对照组相比的促增殖效果分别达到显著( $P < 0.05$ )和极显著水平( $P < 0.01$ ), 而 10 nmol/L pGhrelin 组也有促增殖作用, 但差异不显著( $P > 0.05$ ). 整体趋势显示为 pGhrelin 呈剂量依赖性促进猪前体脂肪细胞的增殖.



**Fig. 2 Effects of pGhrelin on the proliferation of piglet adipocyte in primary culture**  
Groups in the column diagram with \*are significantly different ( $P < 0.05$ ), \*\*are more significantly different ( $P < 0.01$ ), or no letter are insignificantly different ( $P > 0.05$ ) compared with control. 1: Control; 2: 1 nmol/L pGhrelin; 3: 10 nmol/L pGhrelin; 4: 100 nmol/L pGhrelin ( $n=12$ ).

2.3 原代培养仔猪脂肪细胞总 RNA 的抽提

用 Trizol 抽提原代培养仔猪背部皮下脂肪细胞的总 RNA. 紫外分光光度计检测  $A_{260}/A_{280}$  的比值介于 1.8~2.0, 说明所抽提到的总 RNA 纯度较高. 经琼脂糖凝胶电泳检测表明, 总 RNA 的 28 S、18 S 两条带明亮清晰, 比例适当, 表明所抽提到的总 RNA 无降解、质量高, 可作为后续研究应用.



**Fig. 3 Agarose gel eletrophoresis photo of the total RNA**

2.4 Caspase-3 与  $\beta$ -actin 基因 RT-PCR 产物琼脂凝胶电泳分析

由图 4 可见, Caspase-3 与  $\beta$ -actin 基因 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳条带清晰并且单一, 表明无

非特异扩增, 且条带的大小分别为 100 bp 与 94 bp, 为目标基因。

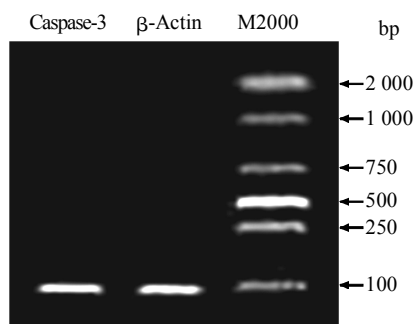


Fig. 4 Agarose gel electrophoresis photo of Caspase-3

## 2.5 pGhrelin 对猪脂肪细胞中的 Caspase-3 活性的影响

从图 5 可见, 与对照组相比, pGhrelin 处理都降低了脂肪细胞中 Caspase-3 的活性, 其中 10 nmol/L 与 100 nmol/L pGhrelin 组分别达到显著( $P < 0.05$ )和极显著水平( $P < 0.01$ )。

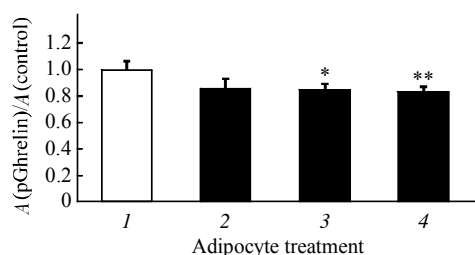


Fig. 5 Effects of the Caspase-3 activity in piglet adipocyte by pGhrelin

1: Control; 2: 1 nmol/L pGhrelin; 3: 10 nmol/L pGhrelin; 4: 100 nmol/L pGhrelin. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ( $n=6$ ).

## 2.6 pGhrelin 对猪脂肪细胞中 Caspase-3 基因表达的影响

由图 6 可知, pGhrelin 明显下调猪脂肪细胞中 Caspase-3 mRNA 的表达, 其中 10 nmol/L pGhrelin

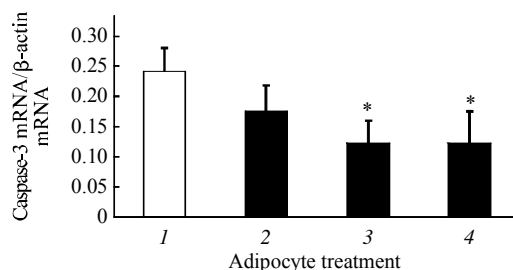


Fig. 6 Effects of Caspase-3 mRNA expression in piglet adipocyte by pGhrelin( $n=6$ )

1: Control; 2: 1 nmol/L pGhrelin; 3: 10 nmol/L pGhrelin; 4: 100 nmol/L pGhrelin. \* $P < 0.05$  ( $n=6$ ).

与 100 nmol/L pGhrelin 组差异显著( $P < 0.05$ ), 而 1 nmol/L pGhrelin 组差异不显著( $P > 0.05$ )。

## 3 讨 论

### 3.1 离体培养脂肪前体细胞的形态学观察

体外培养前体脂肪细胞, 是研究离体脂肪细胞增殖分化规律的前提条件。诸多研究表明, 脂肪细胞的分化过程大致如下: a. 多能干细胞向脂肪细胞定向分化, 形成间充质前体细胞或称前体脂肪细胞, 为一种尚未出现脂滴的梭形细胞; b. 前体脂肪细胞经过克隆性增殖, 形成前脂肪细胞, 此时细胞刚开始出现脂滴; c. 前脂肪细胞经过生长抑制、克隆性增殖和一系列基因表达的变化, 形成多室脂肪细胞内含大量小脂滴; d. 多室脂肪细胞随着脂类在细胞中的沉积, 小脂滴逐渐汇集成一个大脂滴充满细胞的大部分, 形成单室脂肪细胞, 即成熟的脂肪细胞<sup>[17, 18]</sup>。

在本实验所得脂肪细胞的培养过程中, 发现细胞接种后 4 h 开始贴壁, 并出现梭形细胞。接种 24 h, 脂肪细胞基本都变成了梭形或多角形细胞。接种 96 h, 细胞数目大量增加, 并出现小脂滴。接种 240 h 后, 大部分脂肪细胞被大脂滴充满。以上形态学观察基本符合脂肪细胞分化的典型规律, 并经油红 O 特异性染色表明, 体外培养脂肪细胞取得成功。

### 3.2 原代培养仔猪脂肪细胞总 RNA 的抽提

利用 Trizol 对脂肪细胞总 RNA 的抽提, 是体外对脂肪细胞增殖、分化和凋亡调控的重要步骤, 抽取总 RNA, 通过凝胶成像系统, 能检验出总 RNA 的纯度, 保证总 RNA 的完整性, 能提供足够的 RNA 进行目标基因的后续研究。

### 3.3 Caspase-3 基因反转录产物琼脂糖凝胶电泳

以总 RNA 抽提产物为模板扩增出 Caspase-3 与  $\beta$ -actin 基因条带, 经凝胶成像系统分析, Caspase-3 与  $\beta$ -actin 基因位于 100 bp 和 94 bp 的位置, 说明 Caspase-3 与  $\beta$ -actin 目的基因扩增成功。为后面的实时荧光定量 Q-PCR 检测目标基因的表达量提供了标准品。

### 3.4 pGhrelin 对猪前体脂肪细胞增殖的影响

Ghrelin 可通过胃肠道、垂体及下丘脑发挥对能量平衡的调节作用, 是一种促采食的脑肠肽。大鼠脑室内注射或外周注射 Ghrelin 后都有增加摄食的作用, 与脑室内注射 NPY 所产生的作用相似<sup>[19]</sup>。大鼠外周注射 Ghrelin 会导致脂肪利用减少而引起

肥胖,脑室内注射会出现剂量依赖性摄食增多和体重增加<sup>[20]</sup>。大量研究指出, Ghrelin 能促进脂肪细胞增殖与分化<sup>[21~24]</sup>。可见, Ghrelin 对机体脂肪的积累与代谢有调节作用。

Kim 等<sup>[25]</sup>研究发现, Ghrelin 作用于 3T3-L1 脂肪细胞后,与表达于脂肪细胞的 Ghrelin 受体结合,引起 MAPK 信号通路激活, IPS1 相关的 PI3K 活性升高及 Akt 磷酸化增强,此外, Ghrelin 还能阻断由肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF $\alpha$ )激活 Caspase-3 诱导的细胞凋亡途径,从而促进细胞增殖分化,抑制细胞凋亡。

本实验中增殖研究显示, pGhrelin 呈剂量依赖性促进猪前体脂肪细胞增殖,其机理可能与 pGhrelin 降低 Caspase-3 的活性与基因表达有关。

### 3.5 pGhrelin 对猪前体脂肪细胞中 Caspase-3 活性及其基因表达的影响

细胞凋亡的调控机制十分复杂。根据引起细胞凋亡的刺激不同,有多种途径导致细胞凋亡。目前认为,成熟神经细胞凋亡经胞外死亡受体诱导和胞内线粒体损伤两条途径相继激活 Caspases 家族,并通过它们之间的级联作用调控细胞凋亡<sup>[26]</sup>。

Caspase 家族(一类天冬氨酸特异性酶切半胱氨酸蛋白酶)是一组蛋白酶,属于半胱氨酸蛋白酶,在细胞凋亡的启动和完成中起重要作用,是细胞凋亡的“执行者”。蛋白酶一旦被激活,能将细胞内的蛋白质降解,使细胞不可逆地走向死亡。Caspase 家族分为两类,一类为“执行者”,如 Caspase-3、6、7,它们可直接降解胞内的结构蛋白和功能蛋白,引起凋亡,但不能通过自催化或自剪接的方式激活。另一类为“启动者”,如 Caspase-8、9、10 接受到信号刺激后,能通过自剪接而激活,然后引起 Caspase 级联反应<sup>[27]</sup>。Caspase-3 能直接裂解多个重要的结构与功能蛋白,是细胞凋亡性死亡的最终“执行者”,是哺乳动物细胞凋亡的关键蛋白酶<sup>[26, 28, 29]</sup>。在正常状态下, Caspase 家族都以无活性的酶原(30~50 ku)形式表达, Caspase 酶原由原结构域、大亚基(~20 ku)和小亚基(~10 ku)构成。当细胞发生凋亡时 Caspase 可以被蛋白酶裂解,大亚基和小亚基形成活化的 Caspase。一些 Caspase 活化后可以次序激活其他 Caspase,如 Caspase-9 可使 Caspase-3 酶原激活形成具有分解蛋白质活性的 Caspase-3,形成 Caspase 级联反应,促发细胞凋亡<sup>[27]</sup>。在目前已知的 14 种 Caspase 中, Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 与细胞凋亡的关系最为密切,在细胞凋

亡中起执行凋亡的作用<sup>[30]</sup>。

Caspase-3 在正常细胞中是以酶原形式存在,受凋亡刺激因素作用后激活,活化的 Caspase-3 可以激活核因子、细胞骨架蛋白及 DNA 修复酶等,引起细胞形态的变化如出现细胞皱缩、DNA 裂解、染色体浓缩和凋亡小体的形成等,最终导致细胞凋亡, Caspase-3 在各种因素启动的凋亡程序中起最后的枢纽作用<sup>[31~33]</sup>。研究证实, TNF- $\alpha$  可以通过激活 Caspase-3 诱导脂肪细胞凋亡, TNF- $\alpha$ 、胰岛素和 Caspase-3 被认为是调节脂肪组织细胞数的途径之一<sup>[34]</sup>。而 Kim 等<sup>[25]</sup>指出, Ghrelin 可以抑制 TNF- $\alpha$  诱导的凋亡途径。Zhang 等<sup>[35]</sup>研究发现, Ghrelin 可以降低 Bcl-2 活性,减少 Bax 生成,阻碍 cytochrome C 释放,抑制 Caspase-3 活性与表达,抑制脂肪细胞凋亡。此外,据赵宏等<sup>[36]</sup>研究发现,酰基化 Ghrelin 可以抑制高糖诱导的血管内皮细胞凋亡及凋亡蛋白 Caspase-3 的表达。因此,本实验通过检测 Caspase-3 活性及其基因 mRNA 的表达量,可以揭示 pGhrelin 影响脂肪细胞凋亡的分子机理。

本研究结果表明,猪前体脂肪细胞经 pGhrelin 处理后, Caspase-3 的活性都明显低于对照组,其中 10 nmol/L 与 100 nmol/L pGhrelin 差异显著( $P < 0.05$ )。而 Caspase-3 基因 mRNA 表达量检测结果得出,在离体培养猪前体脂肪细胞中,加入 pGhrelin 可以下调 Caspase-3 mRNA 的表达。根据上述实验结果与文献报道,我们推测, pGhrelin 能通过下调猪前体脂肪细胞中 Caspase-3 基因 mRNA 的表达,进而降低脂肪细胞中活性 Caspase-3 的产生,减缓脂肪细胞的凋亡速度,从而达到促进脂肪细胞增殖与脂肪组织的沉积作用。

### 参 考 文 献

- 1 Chen H C, Farese R V. Inhibition of triglyceride synthesis as a treatment strategy for obesity: lessons from DGAT1-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25**(3): 482~486
- 2 Kojima M, Hosoda H, Date Y, *et al*. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 1999, **402**(6762): 656~660
- 3 Date Y, Murakami N, Kojima M, *et al*. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **275**(2): 477~480
- 4 Kuramochi M, Kohno D, Onaka T, *et al*. Galanin-like peptide and ghrelin increase cytosolic  $Ca^{2+}$  in neurons containing growth hormone-releasing hormone in the arcuate nucleus. *Regul Pept*, 2005, **126**(1~2):85~89

- 5 Rak A, Gregoraszcuk E L. Local feedback loop of ghrelin-GH in the pig ovary: Action on estradiol secretion, aromatase activity and cell apoptosis. *Growth Horm IGF Res*, 2008, **18**(3): 221~227
- 6 Zhang W L, Lei Z H, Su J, *et al.* Expression of ghrelin in the porcine hypothalamo- pituitary-ovary axis during the estrous cycle. *Anim Reprod Sci*, 2008, **109**(1~4): 356~367
- 7 Salfen B E, Carroll J A, Keisler D H, *et al.* Effects of exogenous ghrelin on feed intake, weight gain, behavior, and endocrine responses in weanling pigs. *J Anim Sci*, 2004, **82**(7): 1957~1966
- 8 Vizcarra J A, Kirby J D, Kim S K, *et al.* Active immunization against ghrelin decreases weight gain and alters plasma concentrations of growth hormone in growing pigs. *Domestic Animal Endocrinology*, 2007, **33** (2): 176~189
- 9 Mladenov M I, Hristov K L, Duridanova D B. Ghrelin suppression of potassium currents in smooth muscle cells of human mesenteric artery. *Gen Physiol Biophys*, 2006, **25**(3): 333~338
- 10 Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, *et al.* Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol*, 2002, **159**(6): 1029~1037
- 11 Jankowska A, Laubitz D, Guillaume D, *et al.* The effect of pentaghrelin on amylase release from the rat and porcine dispersed pancreatic acinar cells *in vitro*. *Livestock Science*, 2007, **108**(1~3): 65~67
- 12 Chiou S K, Jones M K, Tarnawski A S. Survivin-an anti-apoptosis protein:its biological roles and implications for cancer and beyond. *Med Sci Monit*, 2003, **9**(4): 143~147
- 13 Akanbi K A, Brodie A E, Suryawan A, *et al.* Effect of age on the differentiation of porcine adipose stromal-vascular cells in culture. *J Anim Sci*, 1994, **72**(11): 2828~2835
- 14 Ramirez-Zacarias J L, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red O. *Histochemistry*, 1992, **97**(6): 493~497
- 15 Gao S Y, Chen J N, Dong L, *et al.* Targeting delivery of oligonucleotide and plasmid DNA to hepatocyte *via* galactosylated chitosan vector. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, **60**(3): 327~334
- 16 Morifuji M, Sakai K, Sanbongi C, *et al.* Dietary whey protein downregulates fatty acid synthesis in the liver, but upregulates it in skeletal muscle of exercise-trained rats. *Nutrition*, 2005, **21** (10): 1052~1058
- 17 Gregoirje F M, Smas C M, Sul H S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*, 1998, **78**(3): 783~809
- 18 Ntambi J M, Kim Y C. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr*, 2000, **130**: 3122s~3126s
- 19 Kamegal J, Tamura H, Shimizu T, *et al.* Central effect of Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology*, 2000, **141**(12): 4797~4780
- 20 Nakazato M, Murakami N, Date Y, *et al.* A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 2001, **409**(6817): 194~198
- 21 Choi K, Roh S G, Hong Y H, *et al.* The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology*, 2003, **144**(3): 754~759
- 22 Ott V, Fasshauer M, Dalski A, *et al.* Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression. *Horm Metab Res*, 2002, **34**(11~12): 640~645
- 23 Zwirska-Korczala K, Adamczyk-Sowa M, Sowa P, *et al.* Role of leptin, ghrelin, angiotensin II and orexins in 3T3 L1 preadipocyte cells proliferation and oxidative metabolism. *J Physiol Pharmacol*, 2007, **58**(Suppl)1: 53~64
- 24 Zhang W, Zhao L, Lin T R, *et al.* Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Mol Biol Cell*, 2004, **15**(5): 2484~2491
- 25 Kim M S, Ycon C Y, Jang P G, *et al.* The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*, 2004, **18**(9): 2291~2301
- 26 Benn S C, Woolf C J. Adult neuron survival strategies-slammimg on the brakes. *Neurosci Nature Rev*, 2004, **5** (9): 686~700
- 27 Chowdhury I, Tharakan B, Bhat G K. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2008, **151**(1): 10~27
- 28 David S P, Erick J, Morris H, *et al.* Multiple pathway of neuronal death induced by DNA-damaging agents, NGF deprivation, and oxidative stress. *J Neurosci*, 1998, **18**(3): 830~840
- 29 Haviv R, Lindenboim L, Li H, *et al.* Need for caspases in apoptosis of trophic factor-deprived PC12 cells. *J Neuronsci Res*, 1997, **50**(1): 69~80
- 30 Watt W, Koeplinger K A, Mildner A M, *et al.* The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure*, 1999, **7**(9): 1135~1143
- 31 John C R. Mechanisms of apoptosis. *Am J Path*, 2000, **157** (5): 1415~1430
- 32 Cohen G M. Caspase: The executioners of apoptosis. *Biochem J*, 1997, **326**( Pt 1): 1~16
- 33 Earnshaw W C, Martins L M, Kaufmann S H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 1999, **68**(1): 383~424
- 34 Qian H, Hausman D B, Compton M M, *et al.* TNF-alpha induces and insulin inhibits caspase-3 dependent adipocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **284**(5): 1176~1183
- 35 Zhang Y, Ying B, Shi L, *et al.* Ghrelin inhibit cell apoptosis in pancreatic beta cell line HIT-T15 *via* mitogen-activated protein kinase/phosphoinositide 3-kinase pathways. *Toxicology*, 2007, **237** (1~3): 194~202
- 36 赵宏, 丁丽颖, 刘国良. 酰基化 ghrelin 抑制高糖诱导的人血管内皮细胞凋亡. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15**(11): 831~833  
Zhao H, Ding L Y, Liu G L. Chin J Arteriosclerosis, 2007, **15**(11): 831~833

## Effects of pGhrelin on Caspase-3 Activity and Gene Expression of Porcine Preadipocytes in Culture\*

TANG Sheng-Qiu<sup>1,2)</sup>, SHU Gang<sup>1)</sup>, ZHU Xiao-Tong<sup>1)</sup>, WANG Song-Bo<sup>1)</sup>, GAO Ping<sup>1)</sup>,  
WANG Xiu-Qi<sup>1)</sup>, ZHANG Yong-Liang<sup>1)</sup>, JIANG Qing-Yan<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

<sup>2)</sup> College of Yingdong Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China)

**Abstract** To investigate the effects of porcine Ghrelin (pGhrelin), a newly discovered peptide on porcine preadipocyte Caspase-3 activity and gene expression, piglet subcutaneous preadipocytes treated with 0, 1, 10 and 100 nmol/L pGhrelin were cultured for 48 h, and preadipocyte morphology was observed under an inverted biological microscope, the effects of preadipocyte proliferation was measured by MTT, preadipocyte Caspase-3 activity was detected with spectrophotometric method, Caspase-3 gene expression level was determined using real-time fluorescent quantitative RT-PCR. 10 nmol/L pGhrelin significantly decreased preadipocyte Caspase-3 activity and mRNA expression level ( $P < 0.05$ ), 100 nmol/L pGhrelin significantly promoted porcine preadipocyte proliferation compared to control group ( $P < 0.01$ ). pGhrelin downregulated Caspase-3 activity and expression mRNA of porcine preadipocyte, induced preadipocyte proliferation and inhibited apoptosis. Caspase-3 dependent apoptosis regulation signalling was supposed to be involved in the apoptosis mechanism.

**Key words** pGhrelin, pig, preadipocyte, Caspase-3, proliferation, apoptosis

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2008.00714

---

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30471268), The Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education and The Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China(U0731004).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-20-85280872, E-mail: qyjiang@scau.edu.cn

Received: November 17, 2008 Accepted: February 24, 2009