

## 摘要

视黄醇结合蛋白 4 (Retinol Binding Proteins 4, RBP4) 在血浆中与视黄醇 (维生素 A) 结合, 将视黄醇从肝脏输送到靶组织。除了作为维生素 A 的转运体, RBP4 也是一种脂肪因子, 是脂质运载蛋白家族的成员, 发挥脂肪酸转运体的作用。本试验旨在探讨 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞的生长、脂滴合成等的影响, 并研究其相关的作用机制。

首先, 试验采取 siRNA 或慢病毒转染, 对 RBP4 基因进行干扰或过表达处理, 用 CCK8 法检测细胞活力, 流式细胞仪检测细胞凋亡, RT-qPCR 检测细胞发育及乳脂合成相关基因的表达, 试剂盒测定奶牛乳腺上皮细胞脂滴含量。其次, 在 RBP4 过表达的基础上, 同时抑制 PI3K/AKT 信号通路活性, 检测细胞活性和凋亡情况、细胞发育及乳脂合成相关基因的表达、细胞脂滴含量等指标, 探讨其可能的作用机制。

结果表明:(1)干扰 RBP4, 显著降低 Caspase3、BAX、P21、P27 的表达量 ( $P<0.05$ ), 极显著降低 BCL-2 的表达量 ( $P<0.01$ ), 显著降低细胞凋亡率 ( $P<0.05$ )。此外, 干扰 RBP4 显著降低乳脂合成基因 DGAT1、FABP3、LPIN1 等表达 ( $P<0.05$ ), 极显著降低 VLDLR 表达 ( $P<0.01$ ), 但对细胞脂滴沉积不产生显著性影响 ( $P>0.05$ )。

(2) 过表达 RBP4, 极显著降低 Caspase3、BCL-2、P27 的表达 ( $P<0.01$ ), 细胞凋亡率极显著升高 ( $P<0.01$ ), 对细胞脂滴沉积也不产生显著性影响 ( $P>0.05$ )。

(3) 过表达 RBP4, 同时抑制 PI3K/AKT 信号通路, Caspase3 的表达量显著降低 ( $P<0.05$ ), P21 的表达量极显著降低 ( $P<0.01$ ), Caspase9 和 P27 的表达量显著升高 ( $P<0.05$ ), 细胞凋亡率极显著降低 ( $P<0.01$ ), 细胞脂滴含量极显著降低 ( $P<0.01$ )。

这些结果提示, RBP4 可能通过提高 Caspase3、BAX、P21、P27 等基因的表达促进细胞凋亡, 干扰 RBP4 可显著降低细胞凋亡率。干扰或过表达 RBP4 不会对细胞脂滴沉积产生显著性影响, 但过表达 RBP4 后抑制 PI3K/AKT 信号通路会极显著降低细胞的脂滴合成。

**关键词:** RBP4; 奶牛乳腺上皮细胞; 细胞生长; 乳脂合成; PI3K/AKT 信号通路

# ABSTRACT

Retinol Binding Proteins 4 (RBP4) binds to retinol (vitamin A) in plasma to transport retinol from the liver to target tissues. In addition to being a transporter of vitamin A, RBP4 is also an adipokine, a member of the lipid carrier protein family that acts as a fatty acid transporter. This study aims to investigate the effect of RBP4 on the growth and synthesis of lipid droplets in dairy cow mammary epithelial cells, and to study its related mechanism of action.

First, siRNA or lentiviral transfection was used to interfere with or overexpress RBP4 gene, CCK8 method was used to detect cell viability, flow cytometry was used to detect apoptosis, RT-qPCR was used to detect cell development and the expression of genes related to milk fat synthesis, and the kit was used to determine the content of lipid droplets in cow mammary epithelial cells. Secondly, on the basis of RBP4 overexpression, PI3K/AKT signaling pathway activity was inhibited, cell activity and apoptosis, cell development and expression of genes related to milk fat synthesis, cell lipid droplet content and other indicators were detected, and its possible mechanism of action was explored.

The results showed that: (1) interference with RBP4 significantly reduced the expression of Caspase3, BAX, P21 and P27 ( $P < 0.05$ ), significantly reduced the expression of BCL-2 ( $P < 0.01$ ) and significantly reduced the apoptosis rate ( $P < 0.05$ ). In addition, interference with RBP4 significantly reduced the expression of milk fat synthesis genes DGAT1, FABP3, LPIN1 ( $P < 0.05$ ) and VLDLR expression ( $P < 0.01$ ), but did not have a significant effect on cell lipid droplet deposition ( $P > 0.05$ ).

(2) Overexpression of RBP4 significantly reduced the expression of Caspase3, BCL-2 and P27 ( $P < 0.01$ ), increased apoptosis rate significantly ( $P < 0.01$ ), and did not have a significant effect on lipid droplet deposition ( $P > 0.05$ ).

(3) Overexpression of RBP4, while inhibiting PI3K/AKT signaling pathway, the expression of Caspase3 was significantly reduced ( $P < 0.05$ ), the expression of P21 was significantly reduced ( $P < 0.01$ ), the expression of Caspase9 and P27 was significantly increased ( $P < 0.05$ ), the apoptosis rate was significantly reduced ( $P < 0.01$ ), and the content of cell lipid droplets was significantly reduced ( $P < 0.01$ ).

These results suggest that RBP4 may promote apoptosis by increasing the expression of Caspase3, BAX, P21, P27 and other genes, and interfere with RBP4 to significantly reduce the apoptosis rate. Interfering with or overexpressing RBP4 did not have a significant effect

on cell lipid droplet deposition, but overexpression of RBP4 inhibited the PI3K/AKT signaling pathway significantly reduced lipid droplet synthesis in cells.

**KEYWORDS:** RBP4; Bovine mammary epithelial cells; Cell growth; Milk fat synthesis; PI3K/AKT signaling pathway

# 目 录

第一章 绪论 .....	1
1.1 奶牛乳腺发育研究进展 .....	1
1.1.1 乳腺发育概述 .....	1
1.1.2 乳腺发育相关基因的研究 .....	2
1.2 奶牛乳脂合成研究进展 .....	3
1.2.1 乳脂合成概述 .....	3
1.2.2 乳脂合成相关基因的研究 .....	4
1.3 RBP4 基因研究现状 .....	6
1.3.1 RBP4 基因简介 .....	6
1.3.2 RBP4 与维生素 A .....	6
1.3.3 RBP4 与脂肪酸 .....	7
1.4 PI3K/AKT 信号通路的研究进展 .....	7
1.4.1 PI3K/AKT 信号通路简介 .....	7
1.4.2 PI3K/AKT 信号通路的抑制剂 LY294002 .....	8
1.4.3 PI3K/AKT 信号通路调控细胞功能的研究 .....	8
1.5 RBP4 对 PI3K/AKT 信号通路的调控作用研究 .....	8
1.6 研究目的与意义 .....	9
第二章 材料与方法 .....	10
2.1 实验材料、试剂与仪器 .....	10
2.1.1 实验材料 .....	10
2.1.2 实验试剂 .....	10
2.1.3 常用试剂配置 .....	12
2.1.4 实验仪器 .....	12
2.2 实验方法 .....	13
2.2.1 奶牛乳腺上皮细胞的培养 .....	13
2.2.2 奶牛乳腺上皮细胞中 RBP4 基因的干扰 .....	14
2.2.3 奶牛乳腺上皮细胞中 RBP4 基因的过表达 .....	15
2.2.4 奶牛乳腺上皮细胞总 RNA 的提取、RNA 质量检测及反转录 .....	16
2.2.5 实时荧光定量 PCR .....	17
2.2.6 奶牛乳腺上皮细胞中总蛋白的提取、蛋白浓度的测定 .....	19
2.2.7 Western Blot 检测 .....	20

2.2.8 细胞活力测定 .....	20
2.2.9 细胞凋亡检测 .....	21
2.2.10 脂滴检测 .....	21
2.2.11 PI3K 抑制 .....	22
2.2.12 数据处理与分析 .....	22
第三章 结果 .....	23
3.1 奶牛乳腺上皮细胞的培养 .....	23
3.2 最佳干扰 siRNA 的筛选 .....	23
3.3 最适 MOI 值的筛选 .....	24
3.4 干扰 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞生长的影响.....	25
3.4.1 干扰 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞活力的影响.....	25
3.4.2 干扰 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞生长相关基因的影响.....	26
3.4.3 干扰 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞凋亡的影响.....	26
3.5 干扰 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞乳脂合成的影响.....	27
3.5.1 干扰 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞乳脂合成相关基因的影响.....	27
3.5.2 干扰 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞脂滴含量的影响.....	27
3.6 过表达 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞生长的影响及其与 PI3K/AKT 信号通路相 关性的探究 .....	28
3.6.1 过表达 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞活力的影响.....	28
3.6.2 过表达 RBP4 及抑制 PI3K/AKT 信号通路后对奶牛乳腺上皮细胞生长相 关基因的影响 .....	29
3.6.3 过表达 RBP4 及抑制 PI3K/AKT 信号通路后对奶牛乳腺上皮细胞凋亡的 影响 .....	29
3.7 过表达 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞乳脂合成的影响及与 PI3K/AKT 信号通路 相关性的探究 .....	30
3.7.1 过表达 RBP4 及抑制 PI3K/AKT 信号通路后对奶牛乳腺上皮细胞乳脂合 成相关基因的影响 .....	30
3.7.2 过表达 RBP4 及抑制 PI3K/AKT 信号通路对奶牛乳腺上皮细胞脂滴含量 的影响 .....	31
第四章 讨论 .....	33
4.1 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞发育及乳脂合成的影响.....	33
4.1.1 奶牛乳腺组织中 RBP4 的表达情况研究.....	33
4.1.2 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞发育的影响.....	33
4.1.3 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞乳脂合成的影响.....	34

4.2 RBP4 通过 PI3K/AKT 信号通路调控奶牛乳腺上皮细胞发育及乳脂合成的机制 .....	35
4.2.1 对 RBP4 通过 PI3K/AKT 信号通路调控细胞发育的研究 .....	35
4.2.2 对 RBP4 通过 PI3K/AKT 信号通路调控乳脂合成的研究 .....	36
第五章 结论 .....	38
参考文献 .....	39
作者简介 .....	49

## 插图清单

图 3-1	培养的奶牛乳腺上皮细胞 (40×)	23
图 3-2	不同 siRNA 转染后 RBP4 基因的表达情况	23
图 3-3	不同 siRNA 转染后 RBP4 蛋白的表达情况	24
图 3-4	不同 MOI 值对 RBP4 基因表达的影响	24
图 3-5	不同 MOI 值对 RBP4 蛋白表达的影响	25
图 3-6	干扰 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞活力的影响	25
图 3-7	干扰 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞生长相关基因的影响	26
图 3-8	干扰 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞凋亡的影响	26
图 3-9	干扰 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞乳脂合成相关基因的影响	27
图 3-10	干扰 RBP4 对奶牛乳腺上皮细胞脂滴含量的影响	28
图 3-11	RBP4 过表达对奶牛乳腺上皮细胞活力的影响	28
图 3-12	RBP4 过表达以及通过 PI3K/AKT 信号通路对奶牛乳腺上皮细胞生长相关基因的影响	29
图 3-13	RBP4 过表达以及通过 PI3K/AKT 信号通路对奶牛乳腺上皮细胞凋亡的影响	30
图 3-14	RBP4 过表达及通过 PI3K/AKT 信号通路对奶牛乳腺上皮细胞乳脂合成相关基因的影响	31
图 3-15	RBP4 过表达以及通过 PI3K/AKT 信号通路对奶牛乳腺上皮细胞脂滴含量的影响	31

## 表格清单

表 2-1	主要试剂与耗材 .....	10
表 2-2	主要仪器 .....	12
表 2-3	奶牛 RBP4 基因干扰 siRNA 序列 .....	14
表 2-4	反转录体系配置 .....	17
表 2-5	实时荧光定量扩增体系 .....	18
表 2-6	奶牛乳腺上皮细胞发育及乳脂合成相关基因实时荧光定量引物序列 .....	18

## 英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
MECs	Mammary epithelial cells	乳腺上皮细胞
BAX	BCL-2-associated X protein	BCL-2 关联 X 蛋白
BCL-2	B-cell lymphoma-2	B 淋巴细胞瘤-2 基因
Caspase	CysteinyI aspartate specific proteinase	含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶
FA	Fatty acid	脂肪酸
CLD	Cytoplasmic lipid droplet	细胞质脂滴
MFG	Milk fat globule	乳脂球
MFGM	Milk fat globule membrane	乳脂球膜
DGAT1	Diacylglycerol-O-Acyltransferase 1	二酰基甘油酰辅酶 A 酰基转移酶 1
TAG	Triacylglycerol	甘油三酯
FABP3	Fatty acid binding protein-3	脂肪酸结合蛋白 3
SCD	Stearoyl CoA desaturase	硬脂酰辅酶 A 去饱和酶
FASN	Fatty acid synthase	脂肪酸合成酶
RBP4	Retinol binding protein 4	视黄醇结合蛋白 4
MOI	Multiplicity of infection	复感染指数
qRT-PCR	Quantitative Real-time PCR	实时荧光定量 PCR
WB	Western blotting	蛋白免疫印迹
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷

# 第一章 绪论

## 1.1 奶牛乳腺发育研究进展

### 1.1.1 乳腺发育概述

乳腺是哺乳动物外分泌功能最重要的器官之一<sup>[1]</sup>，是哺乳动物泌乳的基础<sup>[2]</sup>。了解涉及乳腺发育和功能的分子机制将提高牛奶生产的效率，并促进对泌乳的了解。乳腺为乳汁合成、分泌的主要场所。由单层乳腺上皮细胞（Mammary epithelial cells, MECs）构成的腺泡，是乳汁合成、分泌的基本单元<sup>[3]</sup>。奶牛乳房中含有大量乳腺上皮细胞，对奶牛乳腺的发育及泌乳有重要影响，在奶牛乳腺中占据主要地位<sup>[4]</sup>。

乳腺是哺乳动物特有的器官，是腹侧皮肤的衍生，反刍动物乳腺的发育具有周期性<sup>[5]</sup>。奶牛乳腺主要有六个发育时期：胚胎期、青春前期、青春后期、妊娠期、泌乳期和退化期<sup>[6]</sup>。奶牛乳腺是从胚胎期开始发育的，青春后期时和其他组织共同生长。虽然青春后期乳腺发育的实质只占妊娠期和泌乳期乳腺发育的一小部分，但越来越多的证据证明，早期生命中形成的组织基础可以影响未来的乳腺发育和功能。因此，小牛犊产生的乳腺组织为随后的乳腺生长和最终的泌乳打下了基础。

奶牛乳腺生长速度在妊娠期开始后逐渐加快，在泌乳期时发育完全<sup>[7]</sup>。奶牛的乳腺被中间的悬韧带分成两个相等而不同的部分。每一半都有两个腺体，每个腺体通向一个乳头。自妊娠期起，哺乳动物乳腺细胞就大量增殖、分化成有泌乳功能的乳腺上皮细胞<sup>[8]</sup>。乳腺附着在支撑其的骨骼肌上，泌乳期会导致脑下垂体前叶释放催产素<sup>[9]</sup>，催产素与乳腺中的催产素受体结合，并导致泌乳期乳腺中的肌上皮细胞收缩。这种收缩有助于将乳汁从乳腺上皮细胞排入腺泡，然后进入乳导管和乳头<sup>[10]</sup>。在停止产奶或幼崽断奶后，乳腺就会退化。乳腺开始退化发生在泌乳后期，在干奶后奶牛乳腺加剧退化<sup>[11]</sup>。这种退化的特征是乳腺上皮细胞的凋亡或丢失。之后，乳腺开始再发育和重塑。因此，乳腺上皮细胞的数量以及分泌功能极大地影响乳腺的泌乳能力及产奶量<sup>[12]</sup>。

奶牛的乳腺经历了结构和功能发展和退化的反复循环，乳腺组织在发育过程中经历了不同激素、生长因子和编码基因调控下的细胞增殖、分化和凋亡周期。这些过程需要涉及许多具有不同调控功能的信号通路。Janus 激酶/信号转导与转录激活子 (JAK/STAT)、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶标 (PI3K/AKT/mTOR)是乳腺发育和乳蛋白合成所必需的主要信号通路<sup>[13]</sup>。有研究表明，JAK/STAT 信号通路<sup>[14]</sup>、ERK/MAPK 信号通路以及 PI3K/AKT/mTOR 信号通路都参与了奶牛乳腺上皮细胞凋亡、增殖过程的调节<sup>[15]</sup>。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/378020027136006110>