

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

飼糧二十二碳六烯酸對豬隻脂質代謝基因表現之影響(2/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2313-B-002-127-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學畜產學系暨研究所

計畫主持人：丁詩同

計畫參與人員：顏呈峰、張維峻

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

飼糧二十二碳六烯酸對豬隻脂質代謝基因表現之影響

The effect of dietary docosahexaenoic acid on the expression of genes involved in lipid metabolism in pigs

計畫編號：NSC 92-2313-B-002-127

執行期限：92年8月1日至93年7月31日

主持人：丁詩同 國立台灣大學畜產學系

計畫參與人員：顏呈峰 國立台灣大學畜產學系

一、中文摘要

飼糧中脂肪酸可被動物利用而貯存於各種組織。許(2002)於飼糧中添加2%二十二碳六烯酸DHA油，顯著增加豬隻各組織中DHA之含量，並顯著抑制仔豬肝臟中與脂質新生合成相關的轉錄因子Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1(SREBP-1) mRNA的表現。本研究的目的在餵飼豬隻高DHA或高硬脂酸飼糧，測試不同脂肪酸組成對豬隻基因表現的影響。結果發現飼糧中添加2% DHA油18天，顯著增加豬隻各肝臟中DHA之含量，並顯著增進豬隻肝臟中與脂質氧化有關基因的表現。利用抑制性雜合扣除法發現飼糧中添加DHA可刺激一些與脂質代謝相關之新穎基因的表現，本計畫亦初步利用差異篩選法確認12已知基因和3個新的基因表現隨著飼糧中不同的DHA而有所不同。這些已知基因包括：alcohol dehydrogenase、dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8、serum amyloid protein、serine protease inhibitor I、fibrinogen gamma polypeptide、vitamin D binding protein、 α 1-microglobulin-bikunin precursor、glutathione S-transferase、alpha-1 acid glycoprotein、X-box binding protein pseudogene 1、H19 gene 和 hypothetical protein MGC56918。所以餵飼DHA油除可生產高DHA肉品，亦可影響許多肝臟中基因的表現。

關鍵詞：二十二碳六烯酸，抑制性雜合扣除法，基因表現

Abstract

Dietary fatty acid composition can change fatty acid profiles in several porcine tissues. Hsu (2002) demonstrated 2% DHA oil in the diet will significantly increased the DHA in several porcine tissues. Such changes also inhibited the expression of hepatic Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1 (SREBP-1) mRNA. The purpose of current project was to test the effect of dietary high DHA and n-3 PUFA on FA composition and gene expression in the liver. Dietary DHA supplementation for 18 d increased the expression of gene related to FA oxidation. The suppression subtractive hybridization technique was used to detect hepatic genes differentially expressed in the DHA or tallow treated pigs. A differential screening procedure confirmed that there were 12 known genes and 3 novel genes differentially expressed. They were alcohol dehydrogenase, dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8, serum amyloid protein, serine protease inhibitor I, fibrinogen gamma polypeptide, vitamin D binding protein, α 1-microglobulin-bikunin precursor, glutathione S-transferase, alpha-1 acid glycoprotein, X-box binding protein pseudogene 1, H19 gene and hypothetical protein MGC56918. Taken together, dietary DHA treatment may be used to produce high

DHA meat products and to regulate gene expression.

二、緣由與目的

脂肪可被添加於家禽和家畜的飼糧中以提供能量、減少飛塵和增加適口性，飼糧中脂肪酸的變化更可以改變組織中脂肪酸的組成。飼糧中脂肪酸可被動物利用而貯存於各種組織，飼糧含不同脂肪酸的脂質來源可顯著改變豬隻脂肪組織、肌肉組織和肝臟中脂肪酸的組成(Villegas *et al.*, 1973; Otten *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1995; Innis *et al.*, 1996)。Ding *et al.* (2003) 發現飼餵 3 週齡仔豬，含 15% 牛油或 15% 魚油的飼糧，可顯著改變豬隻脂肪組織、肌肉組織和肝臟中脂肪酸的組成，隨著魚油的添加， ω -3 脂肪酸顯著增加。這些結果顯示，飼糧中的長鏈多不飽和脂肪酸(PUFA)可被豬隻利用而貯存於各種組織，並可能因此而改變各組織的生理代謝。近年來，許多研究報告指出，PUFA 的添加處理，會降低細胞內脂肪之堆積，其主要之作用機制有二。其一，PUFA 之添加，抑制細胞內許多脂肪生合成基因之表達，如：脂肪合成酶(FAS)，而其調控主要是藉由影響轉錄因子脂肪細胞分化決定因子一 (ADD1)之表現來達成；其二，藉由增加轉錄因子過氧小體增生活化受體 α (PPAR α)之表現，間接促進細胞內氧化及生熱作用。

在小鼠的試驗中，Xu *et al.* (1999)發現，AA 藉由抑制肝臟中轉錄因子 SREBP-1 之表現，減少 FAS 之合成，因而降低肝臟中脂肪堆積。並且更進一步發現，PUFA 並非影響 SREBP-1 之轉錄，而是增加其 mRNA 之降解，以達到抑制 SREBP-1 之表現(Xu *et al.*, 1999)。在豬方面，不同於小鼠，其脂肪酸之生合成，主要發生在脂肪組織，並且 ADD1(與 SREBP-1 為同一基因) 也大量表達於此。本實驗室初步之試驗發現，許多 PUFA 確實可以有效降低豬脂肪細胞 ADD1 蛋白質及 mRNA 之表現。本試驗之主要目的在於，測

定不同飼糧脂肪酸的試驗處理，對肝臟中基因表現的影響。

三、結果與討論

豬隻飼餵添加牛脂或 DHA 油的飼糧，18 天後於飼餵 2 小時後採樣，所得之肝臟組織 mRNA，經抑制性雜合扣除法(Suppression subtractive hybridization; SSH) 可將兩樣品間表顯有差異之基因篩選出來，以進行後續基因功能之研究。此技術乃先將 mRNA 經反轉錄合成雙股 cDNA 後，利用 *Rsa* I (four-base-cutting RE) 酶切之後產生鈍端分子，分成兩組加入不同的 Adaptor，雙股 cDNA 在分別接上 Adaptor 1 與 2 後稱為 testers；被扣除者之雙股 cDNA 經 *Rsa* I 酶切後不加 Adaptor 則稱為 driver。扣除的原理是在利用 tester/driver 的雙股 cDNA 經過變性分離成單股 cDNA 後，在雜合反應 (tester1/driver; tester2/driver) 時互補之 cDNA 序列會互相黏合，經過兩次雜合之後會產生五種分子 (僅一端有 adaptor 之雙股 cDNA；兩端有相同之 adaptor 之雙股 cDNA；單股 driver 及 driver 自行雜合；僅一端有 adaptor 之單股 cDNA；兩端有不同之 adaptor 之雙股 cDNA)，擁有不同 adaptor 之分子即為兩樣本間基因表現有差異者。此類分子，可進一步藉由兩種 adaptor 上之引子序列進行聚合酶鍊鎖反應 (PCR) 大量增幅，其他分子則無法被增幅。經過 PCR 產生的基因片段多為兩者間差異顯著的基因，這些分子利用 TA cloning 建立 cDNA 基因庫，經過差異性篩選後(differential screening) 即可發現差異表現的基因。計畫中利用抑制性雜合扣除法對兩種處理 (DHA 和牛脂) 之基因表現進行比較，探討基因表現之差異性，以找出各狀態下表現有所差異之基因。基因篩選出後進一步利用差異篩選法探討此等基因表現特性。我們發現 12 已知基因和 3 個新的基因表現隨著飼糧中不同的 DHA 而有所不同。這些已知基因包括：alcohol dehydrogenase、dehydrogenase/

reductase (SDR family) member 8、serum amyloid protein、serine protease inhibitor I、fibrinogen gamma polypeptide、vitamin D binding protein、1-microglobulin-bikunin precursor、glutathione S-transferase、alpha-1 acid glycoprotein、X-box binding protein pseudogene 1、H19 gene 和 hypothetical protein MGC56918。這些利用差異篩選法確認的基因須經北方吸漬法分析後才能完全確認其表現是由 DHA 調控。

北方吸漬法及定量分析後，各處理組之 ACO mRNA 表現量，經 ImageQuant 5.0 版軟體分析定量，再以持恆基因 18S rRNA 矯正後，以控制組（牛脂）之基因 mRNA 量設為 100，計算處理組各基因之相對含量。ACO mRNA 的表現量在肝臟中，分別為 100 與 120，DHA 處理組可顯著促進其表現（ $p < 0.05$ ）。Grigorios 等人（1997）證明多不飽和脂肪酸為 PPAR α 的良好配體，所以能藉由配體活化 PPAR α 活性，進而增加 ACO 之表現。本試驗中 DHA 可能因其配體（PPAR α ）的功能，進而刺激 ACO 的表現，所以飼糧中海藻 DHA 油的添加應可增進脂肪酸之氧化，減少脂肪的堆積。

綜言之，餵飼豬隻高 DHA 飼糧，可促進豬隻肝臟中許多基因之表現，以改變脂肪酸代謝，同時促進肝臟中 ACO mRNA 的表現量，刺激脂肪酸的氧化作用。上述結果顯示飼糧脂肪酸的改變，除了可改變組織中脂肪酸的組成，亦能藉由改變基因之表達來抑制體脂的堆積。所以餵飼 DHA 油除可生產高 DHA 肉品，亦可影響許多肝臟中基因的表現。

本計畫之成果將與後續之研究成果合併發表，這些結果亦將是研究生張維峻之碩士論文的一部份。

五、參考文獻

許哲銘。2002。多不飽和脂肪酸藉轉錄因子影響豬隻脂肪代謝基因之探討。國立台

灣大學畜產學系研究所碩士論文。

- Ding, S. T., A. Lapillonne, W. C. Heird, and H. J. Mersmann, 2003. Dietary fat has minimal effects on fatty acid metabolism transcript concentrations in pigs. *J. Anim. Sci.* 81:423-432.
- Grigorios, K., B. Olivier, L. Fabienne, K. Eric, P. Mai, G. P. Malcolm, and W. Walter. 1997. Fatty Acids, Eicosanoids, and Hypolipidemic Agents Identified as Ligands of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors by Coactivator-Dependent Receptor Ligand Assay. *Molecular Endocrinology.* 11:779-791.
- Hsu, J. M. and S. T. Ding. 2003. Effect of polyunsaturated fatty acids on the expression of transcription factor ADD1 and of lipogenic and fatty acid oxidation enzymes in porcine differentiating adipocytes. *British J. Nutr.* In press
- Innis, S. M., R. Dyer, P. T. Quinlan, and D. Diersen-Schade. 1996. Dietary triacylglycerol structure and saturated fat alter plasma and tissue fatty acids in piglets. *Lipids.* 31:497-505.
- Jones, P. J., B. R. Toy, and M. C. Cha. 1995. Differential fatty acid accretion in heart, liver and adipose tissues of rats fed beef tallow, fish oil, olive oil and safflower oils at three levels of energy intake. *J Nutr.* 125:1175-82.
- Otten, W., C. Wirth, P. A. Iaizzo, and H. M. Eichinger. 1993. A high omega 3 fatty acid diet alters fatty acid composition of heart, liver, kidney, adipose tissue and skeletal muscle in swine. *Ann. Nutr. Metab.* 37:134-41.
- Soazig, L.L., K. Stephane, F. Celine, L. Isabelle, L. L. Xavier, B. Raymond, F. Pascal, and D.

- Isabelle. 2001. Cholesterol, a cell size-dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 276:16904-16910.
- Villegas, F. J., H. B. Hedrick, T. L. Veum, K. L. McFate, and M. E. Bailey. 1973. Effect of diet and breed on fatty acid composition of porcine adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 36:663-668.
- Xu, J., M. T. Nakamura, H. P. Cho, and S. D. Clarke. 1999. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J Biol Chem.* 274:23577-83.
- Xu, J., M. Teran-Garcia, J. H. P. Park, M. T. Nakamura, and S. D. Clarke. 2001. Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J Biol Chem.* 276:9800-07.