

FKBP51 参与高脂诱导的线粒体损伤

刘明,邱彬,王婷婷,邓然,刘云波*,雍伟东*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,北京 100021)

【摘要】 **目的** 通过高脂喂养 C57BL/6J 小鼠,探究小鼠高脂饮食对线粒体结构和功能的影响。**方法** 随机选取 4 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠,分别进行正常饮食和高脂饮食饲养 6 周后通过体重和 HE 染色确认高脂诱导的肥胖表型,利用二代测序技术对正常饮食和高脂饮食小鼠肝脏 mRNA 表达谱测序并用 BRB-ArrayTools 筛选差异基因,对差异基因进行 GO 本体分析和 KEGG 通路分析,应用透射电镜和 western blotting 技术检测高脂饮食下小鼠肝脏线粒体显微结构及相关功能蛋白的表达情况。**结果** 与正常饮食组小鼠相比,高脂饮食组小鼠体重显著增加,肝脏中脂肪沉积明显增多。利用 DAVID 在线工具对差异基因进行 GO 本体分析及 KEGG 通路分析,发现这些主要基因变化与线粒体相关。通过透射电镜观察,发现高脂饮食组小鼠线粒体变形、增大甚至破裂坏死。此外,高脂饮食组小鼠肝脏线粒体中线粒体融合蛋白(mitofusin 1, MFN1)和抗增殖蛋白 1(prohibitin1, PHB1)的相对表达量显著增加,而 FKBP51 的表达量显著降低。**结论** FKBP51 通过影响线粒体形态与结构来参与高脂诱导的线粒体损伤。

【关键词】 FKBP51;线粒体损伤;高脂

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 04-0001-06

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2018. 04. 001

Involvement of FKBP51 in mitochondrial damage induced by high fat diet feeding

LIU Ming, QIU Bin, WANG Tingting, DENG Ran, LIU Yunbo*, YONG Weidong*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of high fat diet feeding on mitochondrial structure and function. **Methods** Male C57BL/6J mice at the age of 4 weeks were used in this study. After 6 weeks of regular diet (RD) or high-fat diet (HF) feeding, the high fat-induced obesity phenotype was confirmed by body weight measurement and liver histopathology. RNA was isolated from the liver tissue of RD and HF mice and the expression profiles were detected using RNA-seq. Differentially expressed genes between RD and HF mice were analyzed using BRB-ArrayTools. DAVID online tools were applied to analyze the GO and KEGG pathways. Transmission electron microscopy and western blotting were performed to observe the mitochondrial ultrastructure and quantified the expression of function-related proteins. **Results**

【基金项目】 中国医学科学院医学创新基金(DCIFM 2017-I2M-3-015);国家自然科学基金(81700751,81272273);北京市自然科学基金(7164278)。

【作者简介】 刘明(1991—),男,硕士研究生,专业:动物学。E-mail: 234480989@qq.com

【通信作者】 雍伟东,男,研究员,研究方向:生殖与发育生物学。E-mail: yongwd@hotmail.com。

刘云波,男,研究员,研究方向:实验动物质量控制。E-mail: yunboliu@126.com。 * 共同通信作者

Compared with the RD mice, the body weight gain was faster in the HF mice. The size of the lipid droplets was bigger in the HF-fed mouse liver tissue. Multiple pathway analysis all identified that these major gene changes were related to mitochondria. The mitochondrial deformation, enlarged or even destruction was observed in the high fat diet group observed by transmission electron microscopy. This observation was further confirmed by detecting of the expression of genes in the HF liver mitochondria. The levels of MFN1 and PHB1 were significantly increased, while the level of FKBP51 was significantly decreased. **Conclusions** *FKBP51* is involved in the high-fat-induced mitochondrial damage via morphological and structural damages of mitochondria.

【Key words】 *FKBP51*; mitochondrial damage; high fat diet; mice

肥胖已成为世界性的流行性疾病,并呈急剧上升趋势,是糖尿病、心血管疾病及某些癌症发生的危险因素。肥胖是生物体内脂质过多的状态,现代人长期高热量食物的饮食方式、久坐不动的生活方式以及遗传易感性都可能会扰乱脂代谢稳态的平衡,造成脂代谢紊乱和有关器官的病理生理变化,引发肥胖、脂肪肝、高脂血症、动脉粥样硬化等多种代谢性疾病,因此对脂质代谢的调控成为肥胖研究的热点领域^[1-3]。

线粒体是细胞内重要的亚细胞结构之一,是柠檬酸循环及氧化磷酸化进行的重要场所,有细胞“能量工厂”之称^[4]。目前的研究表明,线粒体作为细胞内脂肪酸氧化的核心细胞器,是脂肪酸氧化的主要场所,对于维持体内能量平衡尤为重要。慢性脂质积累将增强线粒体脂肪酸氧化率,增加活性氧的生成^[5]。脂质摄取过量将导致脂肪在脂肪组织以外的组织中发生异位沉积,在这些组织中存储的多余脂肪大多经无氧途径产生有毒的脂质中间体,引起线粒体功能障碍及内质网压力升高,最终导致细胞死亡。机体还可在 NADPH 氧化酶类和其他助氧化剂酶的催化下产生非线粒体来源的活性氧^[4]。过多的活性氧,不仅造成线粒体功能受损,还会造成线粒体形态的变化。线粒体形态受其融合及裂变的动态平衡调节,这一过程主要受线粒体融合蛋白 MFN1 和 MFN2 等蛋白的调控,介导线粒体在细胞中的重新分布以及受损线粒体的恢复。最近研究者证实,在肥胖症模型 Zucker 大鼠中,线粒体形态发生明显变化,表现为线粒体表面积明显增大而体积减少,表明肥胖症中骨骼肌线粒体个体更小、线粒体网络更细碎^[6]。以上研究表明高脂诱导线粒体形态功能变化,从而影响线粒体脂肪酸代谢,增加脂滴积累。

FKBP51 是一种具有肽酰脯氨酰顺-反异构酶活性的免疫亲和蛋白,它含有的肽重复结构域可介导蛋白与蛋白之间的相互作用。作为一种共伴侣蛋

白,它能直接与 HSP90 等伴侣蛋白结合参与激素-受体复合物的形成及调控^[7]。当前研究发现,禁食情况下小鼠下丘脑中 *FKBP51* 的高表达能够减少糖皮质激素的负反馈,导致糖皮质激素水平升高,从而促进肥胖的发生^[8]。此外,我们的前期研究发现,敲除 *FKBP51* 能够通过调节 PPAR γ 活性,抑制脂肪细胞的分化合成,抵制高脂饮食诱导的小鼠体内脂肪积累^[9]。以上证据都表明 *FKBP51* 在脂肪形成和分化中具有重要作用。最新的研究表明,在脂肪分化过程中, *FKBP51* 能够在 PKA 信号通路的调控下穿梭于细胞核-线粒体之间,从而影响基因的表达^[10]。

因此,我们推测 *FKBP51* 可能通过影响线粒体的形态与功能,调节高脂诱导下的体内脂肪分化和积累,对抗肥胖的发生。本研究利用高脂诱导肥胖小鼠模型,探讨高脂饮食条件下, *FKBP51* 基因对线粒体形态与功能的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 C57BL/6J 小鼠 12 只,4 周龄,体重 9 ~ 11 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2012-0001]。小鼠随机分为两组:正常饮食组(RD)和高脂饮食组(HF),每组 6 只。实验动物饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所[SYXK(京)2011-0022]。动物实验方案经中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会批准,批准号为 ILAS-PG-2014-013。

1.2 主要试剂和仪器

高脂饲料(60 kcal% fat, D12492)购自美国 Research Diets 公司;Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂购自美国 Sigma 公司;线粒体提取试剂盒(89801)购自美国 Thermo Fisher 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自中国碧云天

生物科技有限公司; COXIV、MITOFUSIN、PHB1 和 FKBP51 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。使用比例均为抗体:稀释液 = 1: 1000。

电子天平(精度 0.01 g, 上海民桥电子天平厂); 石蜡切片机(IVS-401, 日本 Sakura Finetek 公司); 光学显微镜(BX50, 日本 Olympus 公司); 化学发光成像系统(Tanon 5500, 中国天能公司); 透射电镜(JEM-1400, 日本 JEOL 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 高脂诱导肥胖表型的建立

小鼠 4 周龄时分别进行正常饮食和高脂喂养, 每周称量并记录小鼠体重 1 次, 连续记录六周。小鼠脱颈处死后迅速取出肝脏组织, 用 10% 中性福尔马林固定, 经石蜡包埋后以 4 μm 厚度切片, 随后进行 HE 染色, 在光学显微镜下观察并拍照。

1.3.2 RNA 测序及差异基因的 GO 本体分析

小鼠脱颈处死后在冰上迅速取出肝脏组织, 利用 Trizol 法提取 RNA, 并将样品交由华大基因测序, 使用 DEGseq 软件^[11]进行差异基因分析, 限定 P 值后获得差异基因列表。通过在线工具 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>), 利用基因本体数据库(GO)将功能相同的基因聚类到一个单元, 在细胞成分上对差异基因进行注释, 并对其中线粒体相关基因功能进行分析。

1.3.3 差异基因的 KEGG 通路分析

利用全基因组及代谢途径数据库(KEGG)对同一通路的差异基因进行聚类分析。

1.3.4 电镜观察线粒体形态

小鼠脱颈处死后于手术台边取黄豆粒大小肝

脏 3~4 块, 在 2.5% 的戊二醛中 4℃ 固定 2 h, 用磷酸缓冲液冲洗 3 次, 每次 10 min, 之后再用 1% 锇酸固定 2 h, 双蒸水冲洗并脱水后进行包埋并切片, 并在电镜下观察线粒体形态。

1.3.5 肝脏线粒体蛋白提取及 western blotting 检测

取上述正常和高脂饮食组雄鼠各 2 只, 脱颈处死后取 0.2 g 肝脏匀浆, 依据线粒体提取试剂盒说明粗提线粒体。线粒体蛋白经 BCA 法定量后以 40 μg 上样量进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜封闭后孵育一抗过夜。次日孵育二抗(1: 4000)后以 ECL 法使用化学发光成像系统采集荧光信号。

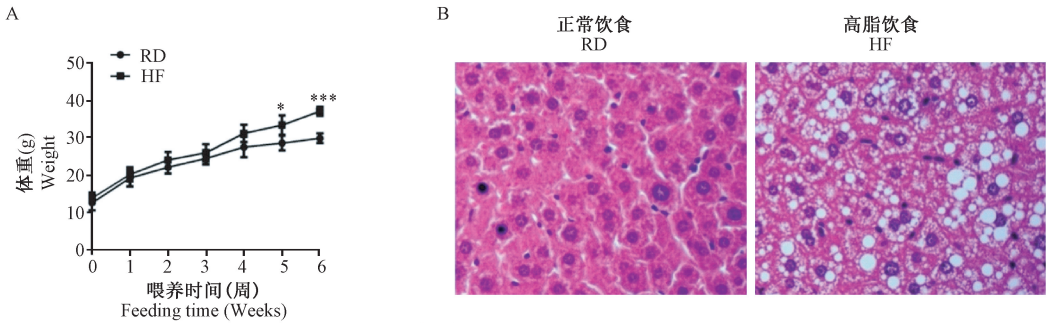
1.4 统计学方法

实验数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 应用 GraphPad Prism 6.0 软件以 T-test 双尾法进行检验分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 高脂喂养诱导小鼠肥胖表型

高脂饮食组小鼠喂养前四周体重持续高于正常饮食组小鼠; 高脂喂养 6 周后, 小鼠体重达到 (37.17 ± 1.23) g, 而正常饮食组小鼠体重仅为 (29.95 ± 1.30) g, 二者相比具有显著性差异($P = 0.0002$, 图 1A), 结果表明高脂饮食以后小鼠体重明显增加。正常饮食组小鼠肝脏切片 HE 染色显示肝细胞呈多边形, 界限清楚, 胞浆丰富; 高脂饮食组小鼠肝脏切片可见不同程度的肝细胞脂肪变性, 肝细胞胞浆内出现大量脂肪空泡(图 1B)。结果表明高脂模型建立成功。



注:A:与正常饮食小鼠比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; B:小鼠肝脏石蜡切片 HE 染色。

图 1 高脂饮食对小鼠体重和肝脏脂肪的影响 ($n = 6$, Bar = 50 μm)

Note. A: Compared with the RD mice, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. B: RD mice and HF mice. HE staining.

Fig. 1 Effect of high fat feeding on the body weight and liver fat of the mice

2.2 高脂诱导和正常饮食小鼠肝脏差异基因的 GO 本体分析

利用第二代高通量基因测序技术,对高脂饮食组和正常饮食组小鼠的肝脏 mRNA 进行表达谱测序,差异基因的 *P* 值限定为 0.01 后得到差异基因列表,共得到 437 个差异基因。利用 DAVID 工具对差异基因进行 GO 本体分析,从细胞组成上对基因进行注释(表 1),发现差异基因主要参与线粒体、线粒体基质、线粒体内膜和细胞器膜等亚细胞结构的组成。其中,线粒体组成相关基因数量最多,对其相关基因进行功能分析(表 2),发现线粒体中基因功能大多跟氧化磷酸化相关。研究表明,线粒体是细

胞内氧化磷酸化进行的重要场所,作为细胞内脂肪酸氧化的核心细胞器,对于维持体内能量平衡尤为重要。所以本研究认为在高脂饮食的条件下,细胞组成的差异基因主要集中在线粒体中,且与氧化磷酸化相关。

2.3 高脂诱导和正常饮食小鼠肝脏差异基因的 KEGG 通路分析

对差异基因进行 KEGG 通路分析(表 3),发现这些差异基因主要参与淀粉和蔗糖代谢、糖酵解/葡萄糖生成、脂肪消化吸收以及不饱和脂肪酸生物合成等通路,这些通路基本都与线粒体的氧化磷酸化功能相关,与 GO 本体分析结果一致。

表 1 高脂诱导和正常喂养小鼠肝脏差异基因的 GO 本体分析			
Tab.1 GO analysis of differentially expressed genes between the RD mice and HF mice			
细胞组成 Cellular components	基因数目 Number of genes	<i>P</i> -值 <i>P-value</i>	Benjamini 值 Benjamini values
线粒体 Mitochondria	61	2.90E-06	1.02E-04
线粒体基质 Mitochondrial matrix	9	0.027228691	0.287914308
线粒体内膜 Mitochondrial inner membrane	14	0.034361243	0.336081274
细胞器膜 Organelle membrane	12	1.67E-06	8.22E-05

注: Fisher 检验, $P < 0.1$; Benjamini-Hochberg 校正, $P < 1$ 。
Note. Fisher's exact test, $P < 0.1$. Benjamini-Hochberg correction, $P < 1$.

表 2 线粒体中差异基因功能分析	
Tab.2 Functional analysis of differential genes in the mouse mitochondria	
基因名称 Name of genes	基因功能 Function of genes
<i>Aco2</i>	有助于肝脏线粒体中脂肪酸的氧化 Contributes to oxidation of fatty acids in hepatocyte mitochondria
<i>Dgat2</i>	在哺乳动物甘油三酯合成中起基础性作用 Plays a fundamental role in mammalian triglyceride synthesis
<i>Hadh</i>	在短链脂肪酸的线粒体 β -氧化中起重要作用 Plays an important role in mitochondrial β -oxidation of short chain fatty acids
<i>Pdk4</i>	抑制糖酵解并增强脂肪酸的氧化 Suppresses glycolysis and enhances oxidation of fatty acids

表 3 高脂诱导和正常喂养小鼠肝脏差异基因的 KEGG 通路分析			
Tab.3 The KEGG pathway of differentially expressed genes between the RD mice and HF mice			
KEGG 通路 KEGG Pathways	基因数目 Number of genes	<i>P</i> -值 <i>P-value</i>	Benjamini 值 Benjamini values
淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	4	0.053944079	0.288242572
糖酵解/葡萄糖生成 Glycolysis/Glucogenesis	6	0.032079549	0.217347273
脂肪消化吸收 Fat digestion and absorption	5	0.018468971	0.172087696
不饱和脂肪酸生物合成 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	4	0.035055335	0.228815718

注: Fisher 检验, $P < 0.1$; Benjamini-Hochberg 校正, $P < 1$ 。
Note. Fisher's exact test, $P < 0.1$. Benjamini-Hochberg correction, $P < 1$.

2.4 高脂喂养引起小鼠肝脏线粒体形态变化

正常饮食组小鼠肝细胞线粒体呈椭圆形结构,嵴形态正常,糙面内质网较为丰富(图 2A)。高脂饮食组小鼠肝脏线粒体嵴模糊、断裂甚至消失。线粒体结构不规则且有融合趋势,表现为变形、增大甚至破裂坏死(图 2B)。

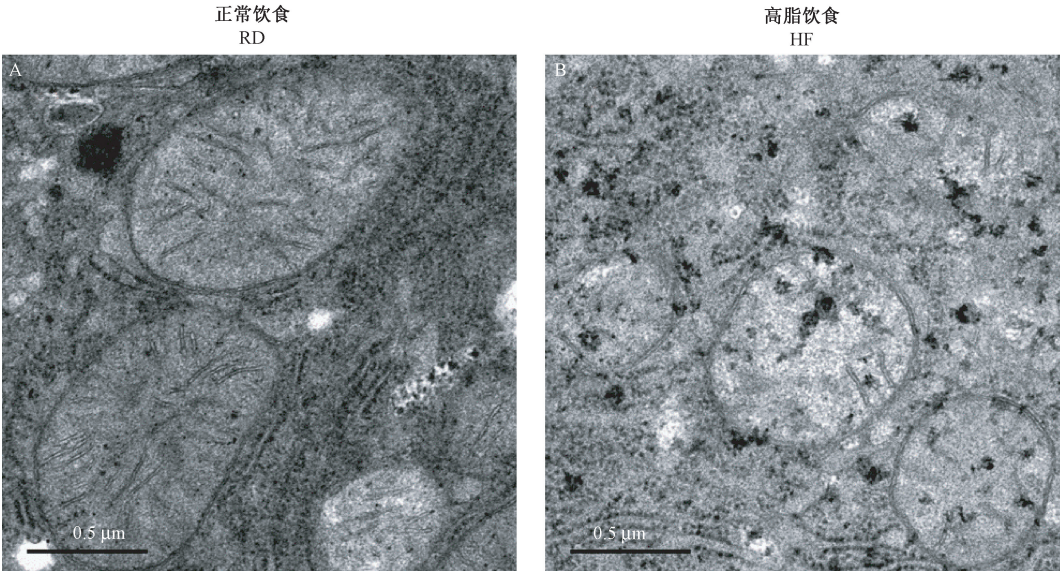
2.5 高脂诱导影响小鼠肝脏线粒体功能蛋白的表达

为进一步验证高脂喂养对肝脏线粒体的影响,提取了肝脏的线粒体蛋白,利用 western blotting 技术检测线粒体相关蛋白和 FKBP51 的表达。结果显示,高脂饮食后,小鼠肝脏线粒体中融合蛋白 MFN1 和抗细胞增殖蛋白 PHB1 蛋白与内参 COXIV 相比,表达量显著升高,FKBP51 蛋白表达量显著降低(图 3)。这

些结果表明高脂饮食可能通过 MFN1 和 PHB1 蛋白影响线粒体的结构和功能,FKBP51 基因可能在这一过程中发挥重要的调节作用。

3 讨论

本研究通过高脂饮食喂养小鼠 6 周,发现高脂饮食组和正常饮食组小鼠体重明显高于对照组,且 HE 染色显示高脂喂养小鼠肝细胞内出现大量脂肪堆积,表明高脂诱导小鼠肥胖模型建立成功。利用第二代高通量基因测序技术,对高脂喂养和正常饮食小鼠的肝脏 mRNA 进行表达谱测序,以此来阐述高脂饮食对肝脏组织产生的影响,揭示其中的分子机制。共得到 437 个差异基因,利用 DAVID 工具对差异基因进行GO本体分析,从细胞组成上对基因



注:A:正常饮食组小鼠肝细胞;B:高脂饮食组小鼠肝细胞。
图 2 高脂饮食对小鼠肝细胞线粒体影响(Bar = 0.5 μm)

Note. A: RD mouse; B: HF mouse.

Fig. 2 Effect of high fat feeding on the ultrastructure of mitochondria in the mouse hepatocytes

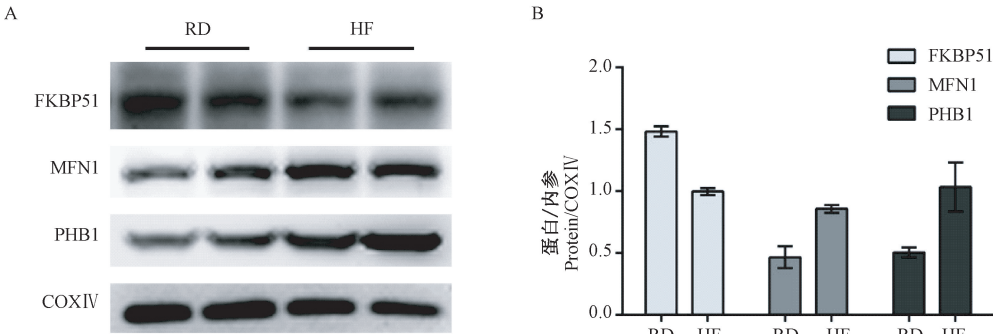


图 3 肝脏线粒体中 FKBP51、MFN1 和 PHB1 的表达
Fig. 3 Expression of FKBP51, MFN1 and PHB1 in the mitochondria of RD and HF mouse hepatocytes

进行注释,可以看出差异基因主要涉及到线粒体、线粒体基质、线粒体内膜和细胞器膜等方面,对差异基因进行 KEGG 通路分析发现这些差异基因主要参与淀粉和蔗糖代谢、糖酵解/葡萄糖生成、脂肪消化吸收以及不饱和脂肪酸生物合成等通路,这些通路基本都与线粒体的氧化磷酸化功能相关。线粒体是细胞内重要的亚细胞结构之一,是柠檬酸循环及氧化磷酸化进行的重要场所,有细胞“能量工厂”之称^[4]。线粒体在体内能量代谢的氧化磷酸化过程中发挥重要作用,这些过程影响了生物体内几种成分的生物合成,包括氨基酸生物合成,核苷酸生物合成以及血红素生物合成等。因此,研究高脂喂养与正常饮食小鼠 RNA-seq,对于从分子水平揭示高脂饮食在生物体内的作用是一个重要突破口。

电镜下观察发现线粒体形态结构发生明显变化,提示高脂饮食导致线粒体结构改变。线粒体形态结构主要受线粒体融合蛋白 MFN1 和 MFN2 等蛋白的调控,它们通过调节线粒体融合及裂变的动态平衡影响线粒体的形态结构。其中,MFN1 蛋白是线粒体膜融合的关键蛋白,其表达异常可导致线粒体膜结构改变,使线粒体融合分裂功能受损。PHB1 是一种分子伴侣蛋白,作为一种细胞表面受体,参与细胞增殖、凋亡、转录以及线粒体蛋白质折叠调节等,在维持线粒体正常结构和功能方面起到重要作用^[12]。通过 western blotting 技术分析线粒体功能相关蛋白表达,发现 MFN1 和 PHB1 表达量显著升高,提示高脂饮食导致线粒体结构和功能改变。进一步通过 western blotting 技术分析,发现高脂饮食小鼠线粒体中共伴侣蛋白 FKBP51 表达量明显低于对照组。

FKBP51 是一种具有肽基脯氨酰顺-反异构酶活性的免疫亲和蛋白,含有多肽重复序列结构域(TPR),能够介导蛋白与蛋白之间的相互作用,作为共伴侣蛋白参与 GR 等多种复合体的功能调节。Taishin 等^[13]研究发现,FKBP51 可以在线粒体中表达,是一个线粒体蛋白,起到保护细胞免受氧化应激的作用,当其不在细胞核中时,FKBP51 可与 GR 形成复合物定位于线粒体中,其在亚细胞中的定位是由细胞动态条件改变的,当 FKBP51 在线粒体中表达量减少,可能会通过影响线粒体的形态和功能从而调节体内脂肪分化。

综上所述,FKBP51 通过影响线粒体形态与结

构来参与高脂诱导的线粒体损伤。

参考文献:

- [1] Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance [J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(2): 507–520.
- [2] Wymann MP, Schneiter R. Lipid signalling in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(2): 162–176.
- [3] Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, et al. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Endocr Rev*, 2002, 23(2): 201–229.
- [4] Fischer F, Hamann A, Osiewacz HD. Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways [J]. *Trends Biochem Sci*, 2012, 37(7): 284–292.
- [5] Fisher-Wellman KH, Neuffer PD. Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23(3): 142–153.
- [6] Bach D, Pich S, Soriano FX, et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 17190–17197.
- [7] Lagadari M, Zgajnar NR, Gallo LI, et al. Hsp90-binding immunophilin FKBP51 forms complexes with hTERT enhancing telomerase activity [J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(7): 1086–1098.
- [8] Yang L, Isoda F, Yen K, et al. Hypothalamic Fkbp51 is induced by fasting, and elevated hypothalamic expression promotes obese phenotypes [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 302(8): E987–991.
- [9] Stechschulte LA, Qiu B, Warriar M, et al. FKBP51 Null mice are resistant to diet-induced obesity and the PPAR γ agonist rosiglitazone [J]. *Endocrinology*, 2016, 157(10): 3888–3900.
- [10] Toneatto J, Charo NL, Susperreguy S, et al. [The dynamic mitochondria-nuclear redistribution of FKBP51 during the process of adipocyte differentiation is regulated by PKA] [J]. *Medicina (B Aires)*, 2013, 73(5): 401–405.
- [11] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57–63.
- [12] Artal-Sanz M, Tsang WY, Willems EM, et al. The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(34): 32091–32099.
- [13] Toneatto J, Guber S, Charo NL, et al. Dynamic mitochondrial-nuclear redistribution of the immunophilin FKBP51 is regulated by the PKA signaling pathway to control gene expression during adipocyte differentiation [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 23): 5357–5368.