

東海大學畜產與生物科技學系

Department of Animal Science and Biotechnology Tunghai

University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：陳珠亮

Advisor: Chu-Liang Chen

不同產蛋能力台灣土雞前脂肪細胞分化能力之比較

Comparative Studies in Preadipocyte Differentiation  
between Taiwan Country Chickens with Different Egg  
Productions

研究生：黃政猷

Graduate student: Jheng-Yu Huang

中華民國一〇一年一月

January, 2012

# 目錄

摘要.....	7
前言.....	8
文獻檢討.....	10
壹、台灣土雞產業概況.....	10
貳、禽類能量代謝.....	11
參、產蛋能力與脂質代謝.....	12
肆、脂肪組織種類與功能.....	13
一、脂肪組織種類.....	13
二、脂肪組織功能.....	14
(一) 脂質生成作用.....	14
(二) 脂質分解作用.....	15
(三) 脂肪激素.....	16
伍、中鏈脂肪酸.....	17
陸、脂肪細胞研究模式.....	18
一、研究模式.....	19
(一) 體內試驗 ( <i>in vivo</i> ).....	19
(二) 體外試驗 ( <i>in vitro</i> ).....	19
二、脂肪細胞培養.....	20

( 一 ) 初代細胞培養.....	20
( 二 ) 細胞株培養.....	20
三、脂肪細胞分化機制.....	21
( 一 ) 生長停滯.....	22
( 二 ) 細胞複製擴增.....	22
( 三 ) 分化早期基因表現.....	22
( 四 ) 分化末期表現.....	23
柒、脂肪細胞分化與代謝相關基因.....	23
一、Peroxisome proliferator-activated receptor ( PPARs ).....	23
二、Fatty acid synthase ( FAS ).....	25
三、Sterol regulatory element binding proteins ( SREBPs ).....	26
四、Lipoprotein lipase ( LPL ).....	27
五、Very low density lipoprotein receptor ( VLDLR ).....	27
六、Stearoyl CoA desaturase ( SCD ).....	28
七、Vimentin.....	29
八、Perilipin.....	30
九、Adiponectin.....	31
材料與方法.....	33
壹、材料.....	33

一、脂肪細胞.....	33
二、試驗材料.....	33
貳、方法.....	34
一、脂肪細胞培養.....	34
二、Oil-Red O 染色、油滴計數和定量.....	34
三、三酸甘油酯含量分析 ( TG assay ).....	35
四、甘油-3-磷酸去氫酶活性分析 ( GPDH activity assay ).....	36
五、總 RNA 的萃取.....	37
六、即時定量聚合酶連鎖反應 ( real-time PCR ).....	37
七、統計分析.....	39
<b>結果與討論.....</b>	<b>40</b>
一、脂肪細胞外觀型態.....	40
二、Oil-Red O 染色、油滴計數和定量.....	41
三、三酸甘油酯含量之比較.....	41
四、GPDH 活性之比較.....	42
五、分化過程相關基因表現比較.....	42
1. 分化初期相關基因表現之比較.....	43
2. 脂質代謝相關基因表現之比較.....	44
3. 脂肪細胞油滴結構相關基因表現之比較.....	45

4. 動物能量代謝相關基因表現之比較.....	46
結論.....	47
參考文獻.....	59
英文摘要.....	78

# 圖表目錄

表 1 即時聚合酶連鎖反應分析雞脂肪細胞基因 mRNA 表現之引子序.....	39
圖 1 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化型態比較...	49
圖 2 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞油滴數量比較...	50
圖 2 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化脂質堆積比較.....	51
圖 3 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化三酸甘油酯含量比較.....	52
圖 4 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化 GPDH 活性比較.....	53
圖 5 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化期間分化相關基因 mRNA 表現比較.....	54
圖 6 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化期間脂質代謝相關基因 mRNA 表現比較 (一).....	55
圖 7 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化期間脂質代謝相關基因 mRNA 表現比較 (二).....	56
圖 8 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化期間油滴結構相關基因 mRNA 表現比較.....	57
圖 9 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化期間脂肪細	

胞分泌激素 adiponectin mRNA 表現比較.....58

# 摘要

雞隻產蛋是一個能量需求非常密集的過程，而動物體內能量平衡受到脂肪組織調控，因此脂肪組織的發育關係著雞隻的繁殖表現。前人研究發現產蛋數高的台灣土雞 L2 品系比生長速度快、產蛋數低的 B 品系，有較高的前脂肪細胞分化與脂質代謝能力；推測 L2 品系因應產蛋時所需大量能量供應，有較佳的脂肪分化與脂質代謝表現。由於產蛋能力與脂肪細胞之相關性，本論文進一步探討同樣 L2 品系雞隻，其產蛋數量與前脂肪細胞分化能力之間的關係。以 40 週齡的土雞 L2 品系作為試驗材料，依 40 週齡產蛋數量分為高產蛋（ $108.7 \pm 0.5$  顆）與低產蛋（ $71.3 \pm 0.5$  顆）組，取雞隻腹脂部位脂肪組織，經分離取前脂肪細胞，進行初代細胞分化培養。經分化誘發後，培養至第六天進行各項分析，比較 L2 雞隻產蛋數量高低與前脂肪細胞分化上差異。細胞內堆積的油滴以 oil-Red O 染色並定量、並以 TG 分析測定細胞三酸甘油酯含量，細胞分化程度則以甘油-3-磷酸去氫酶活性分析，以上試驗結果顯示高產蛋和低產蛋組間無顯著差異。以即時定量聚合酶連鎖反應，分析高低產蛋脂肪細胞分化相關基因 mRNA 表現，結果顯示分析的基因中，除了 LPL mRNA，高產蛋組高於低產蛋組細胞外，其餘 peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )、fatty acid synthase (FAS)、stearoyl CoA desaturase (SCD)、sterol regulatory element binding protein1 (SREBP1)、adiponectin、very low density lipoprotein receptor (VLDLR)、perilipin 以及 vimentin 等基因在高產蛋組與低產蛋組的脂肪細胞中皆無顯著差異。試驗結果顯示，同樣 L2 品系雞隻，高產蛋組與低產蛋組的前脂肪細胞分化能力和分化相關基因 mRNA 表現無顯著差異，唯獨 LPL mRNA 高產蛋組表現高於低產蛋組。綜合以上結果，我們認為前脂肪細胞分化能力可能不是影響 L2 品系雞隻產蛋量高低的因素，可能是其他因素造成產蛋量差異。但是脂肪細胞 LPL mRNA 表現則可能是影響 L2 產蛋量高低的關鍵基因，需要再進一步探討。

關鍵詞：台灣土雞、產蛋、脂肪細胞、分化



# 前言

畜禽肉品是提供民眾動物性蛋白質主要來源之一，自從臺灣經濟與生活品質的提升，國人對於肉品的口味與健康的要求也日漸嚴苛。另一方面我國加入世界貿易組織之後，進口畜產品競爭國內市場。禽畜產業在國內與國外兩方面影響下，如何降低成本和提高雞肉品質以及保有在地特色土雞風味，是國內畜禽產業重點發展方向。

臺灣本土所飼養的土雞，雖然生長期長且生產成本高，但因為其抗病力強、肉質鮮美、而且適合國人烹調方法，一直是台灣土雞優於外來白肉雞的特性。近年來，臺灣土雞經由選拔，生長速率與飼料利用效率已有相當改善，卻也衍生出種類繁殖性能下降的現象（趙等，2005），成為台灣土雞產業另一項所面臨的重要課題。

從 1982 年起，中興大學收集全國土雞，研究其生長與繁殖性狀，依據不同特性分別培育各種品系的雞隻。選拔目標為早熟性狀，以及生長體重和雞冠大小為選拔指標，是 B 品系為公系之一。選拔目標為高產蛋率，從初產至 40 週齡的產蛋數為選拔指標，是 L2 品系為母系之一。L2 品系有較高的產蛋率，而 B 品系有較佳的生長性能與較大的脂肪組織但產蛋性能不佳（陳，2004）。脂肪是禽畜肉品風味來源，過多的脂肪不僅是雞隻飼糧成本的浪費，也是影響消費者的健康與購買意願，脂肪組織的發育多寡與肉品的經濟價值有密不可分的關係。

脂肪組織控制動物體內的能量平衡，脂肪組織受到脂質合成作用與脂質分解作用，過多能量會儲存於脂肪組織中；而缺乏能量時從脂肪組織分解獲得能量，藉由這兩者關係去調控脂肪組織的大小（Goodridge and Ball, 1966, 1967；Sanz *et al.*, 2000）。母雞在產蛋期間，需要大量能量去維持雞蛋的形成，能量來自於家禽肝臟中的脂質代謝，合成的脂質會送至脂肪組織儲存，而過多的脂肪儲存，會降低家禽的繁殖性能（Robinson *et al.*, 1993）。來航雞在能量缺乏下會導致產蛋數下降並且有時會降低雞蛋的大小（Weiss *et al.*, 1979）。

影響土雞繁殖性能之性狀很多，例如濾泡生長速率、初產日齡、初產後產蛋率、產蛋週期長度、休產期長短與土雞特有的賴菴性等。然而 Decuyper 等人 (2006) 指出，由於肉雞的選拔一直是在以追求高生長效率方向下進行，其所導致的低繁殖性狀與生殖機制本身並無太大關係，而可能是促進快速生長的能量代謝方式，導致了繁殖性能的下降。而種雞飼養上必須使用限飼，以提高產蛋能力，更加說明能量代謝是造成我們目前所面對問題的主要原因。由於生物體的能量主要以三酸甘油酯的形式儲存於脂肪組織，愈來愈多的證據顯示，脂肪組織的能量儲存與供給，以及脂肪細胞素分泌的功能，在生物體的能量代謝與使用上扮演著中樞角色 ( Havel, 2004 )，因此脂肪組織的發育關係著雞隻的繁殖表現。

本研究使用的雞隻是經選拔育種的臺灣土雞 L2 品系，再依產蛋數多寡分作高產蛋數與低產蛋數兩組。本試驗利用初代細胞培養模式，比較在高產蛋數與低產蛋數之脂肪細胞分化能力差異，其目的在探討產蛋數量是否是主要影響脂肪細胞分化的關鍵之一。並對脂肪細胞型態外觀、分化能力和基因表現是否有差異，進一步確定產蛋能力與脂質利用的相關性，能夠藉由此了解改善台灣土雞生長效率以及能提高產蛋數量，增進土雞在臺灣的經濟價值。

# 文獻檢討

## 壹、台灣土雞產業概況

雞肉是目前國人生活中常見的食物之一，其中又以白肉雞是商業生產最重要的機種，也是畜牧產業進步國家所飼養的唯一商用雞種。依據行政院農委會的統計資料顯示，我國在民國 98 年肉雞產值 171 億 9 千萬多萬，而土雞產值為 213 億 3 千多萬（行政院農委會，2009），由此可知，土雞在台灣市場佔有一定的重要性。

土雞非單一品種，是臺灣地區生產者與消費者對有色雞隻的統稱（李與黃，1988），國內土雞品種甚多，目前一般市面上銷售之主流品種可區分為紅羽土雞、黑羽土雞、閩雞、鬥雞、珍珠雞（裸頸雞）及烏骨雞等，其中又以紅羽及黑羽土雞為國內飼養量之大宗（行政院農委會畜牧處，李宜謙）。雖然白肉雞生產成本低，可是它的肉質不受國人喜好，而土雞生長期長、生產成本高，它的肉質鮮美，抗病力強，口味又符合國人喜愛。

中興大學從民國七十一年起與行政院農業委員會合作進行土雞育種工作，收集全國各地土雞，研究土雞的特性，並訂育種方法，根據土雞性能形成不同品系進行閉鎖族群選拔改良。土雞以雞肉品質為主要目標，再者為改善生產效率。公系以選拔早熟性為主，以雞冠面積為選拔指標，目前已形成公系 B 和 S 二種品系；母系的公雞也以早熟性為選拔為主，母雞則選拔以 40 週以前的產蛋數，母系 L2 和 D 二種品系（李，1992）。近年來，國內商業生產的土雞為了得到更高生產獲利，而選拔生長效率快與飼料效率高，在此同時土雞失去應有的風味與肉質，甚至影響到土雞的繁殖性能（趙等，2005）。因此，在保有土雞的獨特風味肉質且不影響繁殖性狀條件下，如何選拔與飼養管理等方法去提升土雞經濟價值，是台灣土雞產業發展的一大目標。

## 貳、禽類能量代謝

動物體的脂質生成作用主要在肝臟和脂肪組織，在反芻動物中，例如羊和牛大約 90% 脂質都由脂肪組織所生成 (Pearce, 1983)，而家禽脂質生成主要以肝臟為主，部分以脂肪組織生成 (Leveille, 1969; O'Hea and Leveille, 1969; Pearce, 1977)。五週齡小雞有 65-70% 的脂質在肝臟中生成 (Saadoun and Leclercq, 1983)，六至七週齡的雞 80-85% 的脂質會在脂肪組織堆積 (Griffin *et al.*, 1992)，二、五和十五週齡之雞的肝臟脂質生成並沒有受到年齡的改變而有所影響，其他組織的脂質生成能力卻隨著年齡增長而提升 (Saadoun and Leclercq, 1986)。

家禽能量來源主要由肝臟的脂質生成作用與飼糧而來 (Griffin *et al.*, 1992)，飼糧中的碳水化合物經由腸道吸收後，分解成葡萄糖，再經由糖解作用形成丙酮酸再轉化成乙醯輔酶 A。以乙醯輔酶 A 為基質，藉由脂肪酸合成酶作用 (Fatty acid synthase, FAS) 合成脂肪酸。在家禽試驗中餵飼標定 C<sup>14</sup> 的脂肪酸，發現家禽主要是由小腸吸收脂肪酸 (Noyan *et al.*, 1964)。當飼料進入家禽消化道後形成食糜 (chyme)，食糜在小腸中與膽汁和胰液混合，藉由膽鹽與磷脂質將飼料中的脂肪迅速乳化 (Sato *et al.*, 2008)，所形成的乳糜微粒在家禽稱作門脈微粒 (portomicrons)，是因為家禽之淋巴系統不如哺乳動物發達，所以家禽所形成的門脈微粒主要是透過肝門靜脈系統循環，運送到肝臟中進行代謝 (Sklan *et al.*, 1983; Krogh, 1985)。飼糧中的三酸甘油酯和膽固醇，由小腸黏膜細胞所形成的乳糜微粒所運輸；肝臟中新生成的脂肪酸，經酯化成三酸甘油酯再和磷脂質 (phospholipids)、脫輔基蛋白 B (apoprotein-B)、膽固醇 (cholesterol) 以及膽固醇酯 (cholesterylesters) 結合形成極低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 透過血液運輸至各個組織利用 (O'Hea and Leveille, 1969; Siuta-Mangano *et al.*, 1982)。

肝臟為禽類脂質合成的主要器官，在肝臟所形成的脂質藉由 VLDL 在體內血液中運輸。脂肪細胞所獲得的脂肪酸是由脂蛋白脂解酶 (lipoprotein lipase, LPL) 水解

VLDL 而來。卵巢的脂質則是由雌激素將 VLDL 轉變成 VLDLy (yolk targeted; 以卵黃為運輸目標) 再與脂蛋白元 B (apolipoprotein B) 和 apo-VLDL-II 結合為單元體, 此單元體結構體積小所以可以通過卵巢直達卵母細胞表面而利用 (Speake *et al.*, 1998; Walzem *et al.*, 1999)。

LPL 是主要水解脂質的脂蛋白, 與 VLDL 作用將三酸甘油酯水解為脂肪酸和甘油供給細胞利用, 其活性受到肥胖、飲食與體內賀爾蒙所影響 (Fisher *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 2010)。哺乳類動物在飽食狀態中, 其脂肪組織的 LPL 活性會上升而肌肉組織 LPL 活性則下降, 使脂肪組織得以儲存能量; 在飢餓狀態中, 脂肪組織和肌肉組織的 LPL 活性則相反, 使肌肉組織可以獲得能量。(Hermier, 1997; Fielding and Frayn, 1998) 在禽類動物脂肪組織中, 其 LPL 活性比較不受於飲食狀態控制 (Hermier *et al.*, 1984), 而是受到高濃度胰島素所刺激提高其活性, 使脂肪組織可以儲存能量 (Borron *et al.*, 1979)。

## 參、產蛋能力與脂質代謝

雞隻在產蛋期間, 卵在 6-7 天中直徑會由 4 mm 發育到 37 mm, 而一般蛋中脂質約佔蛋總重的 10%, 因此產蛋是一段需求能量很密集的過程, 以提供新的卵黃形成 (Richards *et al.*, 2003; Williams, 2005)。產蛋雞 VLDL 成分上的三酸甘油酯與磷脂含量比未成熟蛋雞高, 推測蛋雞需要較多的能量以提供生殖所需 (Griffin *et al.*, 1982)。蛋雞在缺乏能量狀態下, 會導致蛋雞的產蛋數下降並且有時會降低雞蛋的大小 (Weiss and Scott, 1979); 而且蛋雞在過度餵飼下, 不僅造成蛋雞產生脂肪肝的病症也會使產蛋數量的下降 (Walzem *et al.*, 1994)。另外 Chen 等人 (2006) 指出在母雞在過度餵飼下, 其腹脂量以及血液中的葡萄糖、三酸甘油酯、胰島素和瘦體素的濃度都明顯高於正常餵飼的母雞。而且在過度餵飼的母雞中, 其產蛋數量也較正常餵飼低, 也發現有半數上的母雞有嚴重繁殖問題, 如軟殼雞蛋、多卵黃雞蛋和一天

內產出多顆蛋等問題，而且在母雞任飼下，會使其性早熟而提早產蛋，其產蛋量都比限飼的母雞顯著的少（Robinson and Wilson, 1996；Sun *et al.*, 2006）。由此可知，脂肪組織在母雞能量代謝上扮演重要的角色，並且母雞產蛋能力高低和能量代謝之間有密切相關性。

## 肆、脂肪組織種類與功能

### 一、脂肪組織種類

哺乳類動物的脂肪組織是能量平衡中重要關鍵，脂肪組織種類可分兩種，白色脂肪組織（white adipose tissue, WAT）和褐色脂肪組織（brown adipose tissue, BAT）（Cinti, 2005）。脂肪組織會因動物體的種類和年齡而有不同的含量與分布。白色脂肪組織（WAT）主要分布於皮下、腹部和內臟等區域。其生理功能上，具有絕緣熱、保持恆溫、保護臟器受到衝擊以及是能量儲存的重要場所。白色脂肪組織含有 60% 至 85% 的脂質，三酸甘油酯在脂質佔 90% 至 99%，其餘部分為游離脂肪酸、二酸甘油酯、單酸甘油酯、磷脂質、膽固醇和酯化膽固醇所組成（Albright and Stern, 1998）。另外，白色脂肪組織的脂肪細胞具有單一或少許脂肪滴（直徑 10-100  $\mu\text{m}$ ），其為三酸甘油酯儲存的位置，佔脂肪細胞體積的 90%，脂肪細胞含有少量粒線體且形態細小（Murphy and Vance, 1999；Cinti, 2009）。當動物體內有過多能量時，白色脂肪組織能將過多能量以三酸甘油酯的形式儲存；而當缺乏能量時，白色脂肪組織將三酸甘油酯透過解脂作用（lipolysis）分解為脂肪酸和甘油以提供動物體使用（Darlington *et al.*, 1998）。褐色脂肪組織常見於小型哺乳類動物和人類新生兒中。其主要分布於肩胛間、頸部、胸骨及腋窩部（Saely *et al.*, 2010）。褐色脂肪組織主要是熱能的產生，具有維持體溫恆定的功能，褐色脂肪組織中的脂肪細胞則具有小而多的脂肪滴（直徑 2-10  $\mu\text{m}$ ），富含粒線體，而粒線體當中具有唯一的粒腺體蛋白質，稱為非偶合蛋白（uncoupling protein），其具有調控熱生成和粒線體呼吸鏈（Klaus, 1997）。褐色脂肪組織消耗能量產生熱能，而白色脂肪組織則是儲存能量，兩者是調

控動物體能量恆定的重要關鍵 (Jequier and Tappy, 1999)。

## 二、脂肪組織功能

### (一) 脂質生成作用 (Lipogenesis)

當動物體攝取過多能量時，可將能量轉換脂肪形式儲存於體內，此作用稱為脂質生成作用。在動物體中的脂肪酸來源，可由食物中攝取獲得，另外可透過脂質生成作用來獲得身體所需的脂肪酸以及合成三酸甘油酯。

脂肪細胞具有合成脂肪酸的功能，主要是由粒線體中的乙醯輔酶 A (acetyl-CoA) 與草醯乙酸 (oxaloacetate) 形成檸檬酸 (citrate)，再經由 ATP-檸檬酸分解酶 (ATP-citrate lyase) 分解為乙醯輔酶 A 和草酸乙酸。乙醯輔酶 A 可由乙醯輔酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase) 羧化為丙二醯輔酶 A (malonyl-CoA)，進而形成棕櫚酸 (Masoro, 1965)。棕櫚酸可由脂肪酸合成酶 (fatty acid synthesis, FAS) 的作用，將其脂肪酸藉由延長和去飽和作用形成其他較長鏈或是不飽和的脂肪酸 (Martin *et al.*, 1961)。

脂肪細胞中的油滴以三酸甘油酯為主要儲存的形式。三酸甘油酯是由三分子的脂肪酸和一分子的甘油所組成。然而，有研究指出脂肪細胞中缺乏甘油激酶 (glycerol kinase, GyK)，無法直接利用甘油合成三酸甘油酯 (Reshef *et al.*, 2003)。脂肪細胞則是以糖酵解作用中的產物，二羥丙酮磷酸 (dihydroxyacetone phosphate, DHAP) 作為前驅物與 GPDH 反應，再透過甘油-3-磷酸去氫酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH) 作用產生甘油-3-磷酸 (glycerol-3-phosphate, G3P)。脂肪酸透過醯基-CoA 合成酶 (acyl-CoA synthesis, ACS) 與 ATP 和 CoA 形成醯基-CoA，二分子之醯基-CoA 與甘油-3-磷酸作用形成 1, 2-二醯基甘油磷酸 (1, 2-diacylglycerol phosphate)，另一分子醯基-CoA 於二醯基甘油醯基轉移酶 (diacylglycerol acyltransferase) 作用下再和 1, 2 二醯基甘油磷酸形成三酸甘油酯 (Steinberg *et al.*, 1961)。

## (二) 脂質分解作用 (Lipolysis)

在動物體內分解三酸甘油酯，形成三分子的脂肪酸和一分子的甘油，稱為脂質分解作用。當動物體內需要能量，脂肪細胞的脂質分解作用會受到內泌素所誘發，例如兒茶酚胺 (catecholamines)。首先脂肪細胞膜上的  $\beta$ -adrenergic receptors 受到兒茶酚胺誘發後， $\beta$ -adrenergic receptors 中與 Gs protein 結合的腺苷酸環化酶 (adenylyl cyclase) 會將 ATP 轉化為 cAMP，此時 protein kinase A 受到 cAMP 刺激去將兩種主要的蛋白質磷酸化，一為脂肪滴表面蛋白 (perilipin)，為脂肪細胞內脂肪滴表面上的結構蛋白；二為激素敏感性脂質分解酶 (hormone-sensitive lipase; HSL)，受到磷酸化的激素敏感性脂質分解酶，會從細胞質進入到脂肪滴內進行三酸甘油酯的分解 (Zimmermann *et al.*, 2004; Carmen and Victor, 2006; Nishino *et al.*, 2007)。脂肪細胞中三酸甘油酯分解是由三個連續反應完成，三反應是由三個酵素所催化，為三酸甘油酯水解酶 (adipose triglyceride lipase, ATGL)、HSL 和單酸甘油酯水解酶 (monoglyceride lipase, MGL)；ATGL 主要催化三酸甘油酯，HSL 則催化二酸甘油酯，MGL 催化單酸甘油酯 (Zimmermann *et al.*, 2009; Haemmerle *et al.*, 2002)。由三個酵素催化的總反應就稱為脂質分解作用。

甘油由脂質分解作用產生，其不容易被脂肪組織所利用，甘油透過血液運輸，由具有高甘油激酶活性的肝臟與腎臟所利用。甘油受到甘油激酶轉換為甘油-3-磷酸，再透過甘油-3-磷酸去氫酶作用形成二羥丙酮磷酸，接著可進入糖解作用 (glycolysis) 生成 ATP 或是進入糖質新生成作用 (gluconeogenesis) 生成葡萄糖 (Robinson and Newsholme, 1969; Dipple *et al.*, 2001)。

脂質分解作用所產的游離脂肪酸，在脂肪組織中可以被醯基-CoA 合成酶再次轉換成醯基-CoA，再與甘油-3-磷酸進行酯化反應形成三酸甘油酯。當脂質分解速率大於再酯化速率，所累積的游離脂肪酸會釋入血漿中與白蛋白結合，然後在細胞內與輔酶 A 轉換為脂醯輔酶 A (fatty acyl CoA)，接著與肉鹼 (carnitine) 結合在細胞粒線體進行  $\beta$ -氧化反應。 $\beta$ -氧化反應為脂肪酸氧化的主要路徑也是脂質代謝中主要能



量的來源 ( Heimberg *et al.*, 1969 ; Robinson and Newsholme, 1969 )。

### ( 三 ) 脂肪激素

在過去研究中都認為脂肪組織只有儲存能量的功能。而已有研究證實，脂肪組織在體內能量平衡、胰島素阻抗性、免疫反應與生殖方面中都扮演主要調控的角色。尤其是在成熟的脂肪細胞中所分泌的激素，都有調控體內能量代謝的功能 ( Kim and Moustaid-Moussa, 2000 ; Morrison and Farmer, 2000 ; Avram *et al.*, 2005 )。

脂聯素 ( adiponectin 又稱 AdipoQ ) 主要由脂肪細胞所分泌的蛋白質，富含於人體血液中，分子量約為 30kDa 也稱為 Acrp30，可受到胰島素刺激而分泌 ( Scherer *et al.*, 1995 )，另外研究發現肥胖動物血液中的脂聯素濃度低於非肥胖的動物 ( Arita *et al.*, 1999 )，而且在肥胖動物給予高濃度脂聯素有助於提升胰島素的敏感度進而增加葡萄糖的攝取 ( Berg *et al.*, 2002 )，以上顯示脂聯素與調控體內能量平衡有關。acylation stimulating protein ( ASP ) 也由脂肪細胞分泌，會增加 diacylglycerol acyltransferase 活性進而刺激三酸甘油酯的合成，並且刺激葡萄糖運輸來調控能量平衡 ( Mohamed-Ali *et al.*, 1998 ; Murray *et al.*, 1999 )。另外由脂肪細胞所分泌的抗胰島素激素 ( resistin )，其在肥胖動物中表現量較多並且會導致胰島素的敏感性降低，這被認為與肥胖和糖尿病有關 ( Stepan *et al.*, 2001 )。抗胰島素激素會透過回饋訊號去抑制脂肪細胞分化 ( Kim *et al.*, 2001 )。

瘦體素 ( leptin )，為 16 kDa 的蛋白質，在食物攝取、能量消耗、生殖方面和免疫功能都有參與調控 ( Friedman and Halaas, 1998 ; Rahmouni and William, 2001 ; Russell *et al.*, 2001 )。在哺乳類動物實驗發現，血液中瘦體素濃度與動物體的體脂肪呈正相關 ( Maffei *et al.*, 1995 ; Considine *et al.*, 1996 )。瘦體素也被視為體內能量平衡的感應器，研究發現在動物禁食下，會導致動物體重下降並且瘦體素分泌量也降低 ( Considine *et al.*, 1996 )，而在過度餵飼下，動物體重增加，瘦體素也隨之增加 ( Kolaczynski *et al.*, 1996 )。另外，動物體受到瘦體素處理下，其食物攝取量會降低、

體重與脂肪量下降並且會增加代謝率 ( Pelleymounter *et al.*, 1995 ; Levin *et al.*, 1996 ; Dridi *et al.*, 2005 )。

綜合以上研究發現，脂肪細胞不單只有儲存能量的功能，成熟脂肪細胞所分泌的激素，例如：interleukin-6 ( IL-6 ) 和 tumor necrosis factor- $\alpha$  ( TNF- $\alpha$  ) 也具有調節體內能量平衡、免疫反應以及心血管疾病 ( Mohamed-Ali *et al.*, 1998 ; Ouchi *et al.*, 1999 )。

## 伍、中鏈脂肪酸

中鏈脂肪酸 ( medium chain fatty acids, MCFAs ) 主要由 6 至 12 個碳所組成 ( Seaton *et al.*, 1986 )，其中以辛酸 ( octanoic acid，又稱 caprylic acid ) 為代表性的中鏈脂肪酸。辛酸是從天然椰子油和母乳中被發現，由 8 個碳所組成，碳鏈中不含雙鍵，屬於飽和脂肪酸 ( Takeuchi *et al.*, 2008 )。

MCFAs 的特性分子量小且高水溶性，其消化、吸收及運輸皆與長鏈脂肪酸 ( long chain fatty acids, LCFAs ) 不盡相同。MCFAs 的碳鏈較 LCFAs 短，能增進胰蛋白酶活性作用，因此增加 MCFAs 的水解速率，並且在小腸中比 LCFAs 快水解又迅速被小腸吸收 ( Bach and Babayan, 1982 ; Caspary, 1992 )，MCFAs 不需透過 acyl-CoA synthase 成為三酸甘油酯，再與乳糜微粒結合等過程，可較快離開小腸直接進入血管 ( Bach and Babayan, 1982 )。在運輸系統上，MCFAs 是經由肝門靜脈循環 ( portal circulation ) 到達肝臟 ( Papamandjaris *et al.*, 1998 )，而 LCFAs 是形成乳糜微粒進入淋巴系統，再到左鎖骨下靜脈透過外圍組織抵達肝臟。

肝細胞的粒腺體  $\beta$ -氧化 (  $\beta$ -oxidation ) 為脂質最主要的分解作用場合。LCFAs 其分子量大無法通過粒腺體的膜，因此必須經由與肉鹼 ( carnitine ) 的結合方可進入粒腺體內，而後再與肉鹼分離才可進行  $\beta$ -氧化反應；MCFAs 因分子量小，可直接進入粒腺體的膜行  $\beta$ -氧化反應 ( Friedman *et al.*, 1990 )，因此 MCFAs 比 LCFAs 更容易

讓動物體消化吸收。在體外試驗中，含有 MCFAs 的三酸甘油酯比含有 LCFAs 還要容易被 HSL 水解 (Raclot *et al.*, 2001)，因此意指 MCFAs 的三酸甘油酯在能量平衡的調控上具有較快代謝的特性。

在早期 MCFAs 就利用來治療吸收不良症候群的病患，因 MCFAs 具有容易被小腸吸收的特性，用來取代食物中 LCFAs 已提供患者所需的脂肪酸 (Schizas *et al.*, 1967)。動物試驗中分別飼予 LCFAs 或 MCFAs 飼糧，發現餵飼 MCFAs 組別的增種情形較 LCFAs 組別低 (Lasekan *et al.*, 1992)，於肉雞試驗中，發現 MCFAs 會抑制雞隻肝細胞分泌 VLDL，進而降低脂肪團塊的大小 (Tachibana *et al.*, 2002)。在體外試驗，額外添加 MCFAs 的辛酸於 3T3-L1 細胞培養中，發現辛酸會抑制 PPAR $\gamma$  與 C/EBP $\alpha$  等分化相關基因 (Han *et al.*, 2002；Guo *et al.*, 2006)，促進 3T3-L1 的  $\beta$ -氧化 (Guo *et al.*, 2006) 以及基礎脂質分界作用 (Lei *et al.*, 2004)，而降低 3T3-L1 的三酸甘油酯生成。

研究發現源自不同物種取出的脂肪前身細胞 (stromal vascular cells) 所需的培養模式或是細胞表型皆會與前脂肪細胞株有所差異 (Boone *et al.*, 1999)，培養初代前脂肪細胞常見細胞生長密集 (confluence) 後，生長表現仍無停滯現象，此與一般細胞株 3T3-L1 長滿後生長會產生停滯有極大差異 (Sato *et al.*, 1996；Nakajima *et al.*, 2002)。此外，從豬皮下脂肪取出的初代細胞，也有生長密集後仍持續分裂的情形，當添加辛酸後可以抑制豬初代前脂肪細胞的有絲分裂，促使細胞進入生長停滯而停止細胞分裂且同時開始脂質生成 (Nakajima *et al.*, 2003)。因此，辛酸對脂肪細胞分化的影響，會因物種、脂肪組織來源以及培養模式的不同而有相異的結果。

## 陸、脂肪細胞研究模式

脂肪組織在動物體能量平衡中扮演重要角色，當動物獲取過多能量時，體內會把多餘能量以三酸甘油酯的形式儲存於脂肪細胞中；而當動物缺乏能量時，體內的

脂肪細胞會將三酸甘油酯分解為脂肪酸與甘油，以供給動物所需的能量。近年來研究發現，脂肪細胞不只是儲存能量而已，成熟的脂肪細胞會分泌許多激素，對於動物體的能量平衡、胰島素敏感性、免疫功能和心血管疾病等都有參與調節。脂肪細胞的分化會受到許多因子調節，像是賀爾蒙和營養因子（Ding and Mersmann, 2001），而調節脂肪組織的增加或是減少，進而影響動物的肥胖或是營養不良的症狀（Trayhurn and Beattie, 2001）。因此，為了探討脂肪組織與體內能量代謝的相關性，脂肪細胞在研究上扮演重要的角色。脂肪細胞的研究模式可分為體內試驗（*in vivo*）和體外試驗（*in vitro*）兩種。

## 一、 研究模式

### （一） 體內試驗（*in vivo*）

對動物體直接處理研究並觀察其體內細胞表現之影響。生物體為一複雜反應器，其細胞的表現受到各種因子影響，如外在因子像是，環境、氣候和食物；內在因子則是體內荷爾蒙等，這些因子在相互作用下，無法單獨研究試驗處理對目標細胞的影響。體內試驗是去觀察研究以整個動物體的角度所產生的生理反應。

### （二） 體外試驗（*in vitro*）

體外試驗是將動物體內的細胞取出體外進行培養，培養環境是模擬動物體內的生理環境，例如：溫度、濕度、酸鹼度、滲透壓和無菌環境等，並且提供細胞生長所需的營養成分，例如：胺基酸、維生素和微量元素等。此試驗不像體內試驗受到複雜的環境影響，可單純研究細胞分裂、分化、合成代謝和訊息傳遞等。可依照人為的控制改變培養條件，如：物理、化學和生物等外界因素之下，可進一步了解細胞在單一因子或是多因子影響下所產生的生理變化。然而，體內試驗的細胞所呈現的是動物整體細胞間相互作用的反應，與人為環境去培養細胞所產生的反應仍是具有差異性，並且無法確切的表現出動物體的生理反應，故體外細胞培養下的生理狀態

與體內試驗的細胞狀態不完全相同。

## 二、 脂肪細胞培養

細胞培養是基礎細胞生物學研究方法，這方法已被廣泛地應用在脂質生成與脂肪組織研究上 (Novakofski, 2004)。細胞培養可分為初代細胞培養和細胞株培養。

### (一) 初代細胞培養

初代細胞培養是直接取自動物體內的器官或組織並且利用機械、化學或酵素等方式分解而獲得細胞，然後進行培養，然而此細胞生命週期短無法多次繼代培養 (Freshney, 2005)。初代細胞優點是取自動物體的細胞，能反映出相似於原動物體內的狀態和功能 (Avram *et al.*, 2007)。初代脂肪細胞培養模式起於 1971 年，從人類脂肪組織中的基質血管部分 (stromal-vascular fraction) 藉由膠原蛋白酶分解與離心方式分離出前脂肪細胞 (Ng *et al.*, 1971)。初代脂肪細胞研究顯示，來自不同部位所取出的脂肪細胞具有不同脂質生成能力與生化反應，例如：內臟脂肪與皮下脂肪對於腎上腺刺激具有不同脂質分解反應 (Rosen *et al.*, 2000)。

### (二) 細胞株培養

細胞株是從動物體內取出細胞經過多次的繼代培養、生物學鑑定、單細胞培養分離與篩選後得到型態均一、生長增殖能力穩定並且生物性狀表現清楚的細胞群，並且因分裂不受限制可大量培養，又容易儲存，故非常適合研究培養 (Freshney, 2005)。脂肪細胞株在長久研究下，已經有許多種類前脂肪細胞被篩選出，應用於脂肪代謝相關實驗 (Smyth *et al.*, 1993)，例如：3T3-L1 (Green and Kehinde, 1974b)、3T3-F442A (Green and Kehinde, 1976)、Ob17 (Nadal-Ginard, 1978)、ST13 (Hiragun *et al.*, 1980)、1246 (Darmon *et al.*, 1981)、PFC6 (Ailhaud, 1982) 和 TA1 (Chapman *et al.*, 1984) 等。

其中 3T3-L1 和 3T3-F442A 兩種為最早且被廣泛使用的細胞株 ( Novakofski, 2004 )，來自於 17 至 19 天的瑞士 3T3 小鼠胚胎的纖維母細胞 ( Green and Meuth, 1974a ; Green and Kehinde, 1975 ; Smas and Sul, 1995 )。3T3-L1 和 3T3-F442A 細胞株除了在分化的條件上有些不同外，兩種細胞株在其它表現反應極為相似。在以上兩種細胞株中又以 3T3-L1 最常使用來分析前脂肪細胞的分化機制。前脂肪細胞在給予適當的分化激素誘發後，便會逐步分化成熟的脂肪細胞，一般而言，細胞分化開始後的第 4 天，有 90% 的細胞會分化為脂肪細胞並且累積脂肪滴 ( Cowherd *et al.*, 1999 ; Ntambi and Young-Cheul, 2000 )。

### 三、 脂肪細胞分化機制

脂肪細胞的分化是從前脂肪細胞轉變成熟脂肪細胞且細胞中累積含有三酸甘油酯的脂肪滴，此分化過程有助於了解動物體內脂質代謝相關研究。

前脂肪細胞開始進入分化前，細胞需形成 confluence，這是前脂肪細胞之間增生分裂至緊密貼合，並且此時細胞會停止分裂 ( Avram *et al.*, 2007 )，這時使用分化試劑去刺激分化。初代脂肪細胞和細胞株常使用分化試劑去刺激分化，分化試劑分別為胰島素 ( insulin )、dexamethasone ( DEX ) 和 isobutylmethylxanthine ( IBMX ) ( Rubin *et al.*, 1978 )。分化試劑使脂肪細胞分化主要透過三種路徑去誘發，胰島素是透過 insulin-like growth factor-I ( IGF-I ) 的受體誘發磷酸酪胺基酸激酶 ( phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K ) 路徑以及有絲分裂活化蛋白質激酶 ( mitogen-activated protein kinase, MAPK ) 路徑，進而促使細胞分化 ( Kohn *et al.*, 1996 ; Novakofski, 2004 )；DEX 是人工合成糖皮質激素，此激素可誘發 CCAAT/enhancer binding proteins ( C/EBP )  $\beta$  and  $\delta$ ，進而活化 proliferator-activated receptors  $\gamma$  ( PPAR $\gamma$  ) 表現，PPAR $\gamma$  是刺激前脂肪細胞分化為脂肪細胞的分化基因 ( Wu *et al.*, 1996 )；IBMX 可增加 cAMP 濃度去活化 PKA 路徑，而且 IBMX 也相似 DEX 可活化 C/EBPs，其主要針對 C/EBP $\delta$ ，進而使 PPAR $\gamma$  表現 ( Parsons *et al.*, 1988；

Ntambi and Young-Cheul, 2000 )。脂肪細胞分化過程可分為四個階段：生長停滯 ( growth arrest )、細胞複製擴增 ( clonal expansion )、分化早期基因表現和分化末期表現 ( Gregoire *et al.*, 1998 )。

### ( 一 ) 生長停滯

當細胞在 confluence 時，就是細胞與細胞間緊密接合，此時細胞處於細胞週期中的 G<sub>1</sub> 時期並且生長停滯 ( Scott *et al.*, 1982 )。生長停滯對於前脂肪細胞進入分化是必要條件 ( Avram *et al.*, 2007 )，另外 C/EBP $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  不僅是細胞分化的重要因子並且在細胞生長停滯也參與調控 ( Gregoire *et al.*, 1998 )。

### ( 二 ) 細胞複製擴增

前脂肪細胞脫離生長停滯後，開始進入細胞週期並且有至少一次 DNA 複製以及細胞擴增，此現象為細胞複製擴增 ( Tang *et al.*, 2003 ; Avram *et al.*, 2007 )。

### ( 三 ) 分化早期基因表現

前脂肪細胞經歷生長停滯與細胞複製擴增後，進入到分化之間伴隨多種基因的表現改變。脂肪細胞分化早期，主要受到兩種轉錄因子家族所調控，C/EBPs 和 PPARs ( Gregoire *et al.*, 1998 )。PPARs 中以 PPAR $\gamma$  和  $\delta$  為早期脂肪細胞分化基因。3T3-L1 脂肪細胞受到分化試劑刺激後第 2 天，PPAR $\gamma$  表現量逐漸上升 ( Chawla and Lazar, 1994 )，另外 PPAR $\delta$  比 PPAR $\gamma$  更早表現於脂肪細胞中。在 C/EBPs 中以 C/EBP $\beta$  和  $\delta$  也為脂肪細胞分化早期基因 ( Tang and Lane, 1999 )，並於中期後表現量下降，且同時誘發 PPAR $\gamma$  和 C/EBP $\alpha$  表現 ( Wu *et al.*, 1995 ; Clarke *et al.*, 1997 )。PPAR $\gamma$  和 C/EBP $\alpha$  為脂肪細胞分化中後期基因，負責調控下游分化以及代謝相關基因，使細胞開始堆積油滴 ( Ntambi and Young-Cheul, 2000 )。

#### (四) 分化末期表現

脂肪細胞分化前，前脂肪細胞型態類似於纖維母細胞，當受到分化刺激後，其纖維母細胞的型態會逐漸成為圓形，並具有脂肪細胞累積油滴的特徵和生化反應 (Otto and Lane, 2005)。在分化末期階段，脂肪細胞會增加脂質生成作用中三酸甘油酯代謝相關酵素，例如：ATP 檸檬裂解酶 (ATP citrate lyase)、蘋果酸酶 (malic enzyme)、乙醯輔酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase)、固醇輔酶 A 去飽和酶 (stearoyl-CoA desaturase)、甘油-3-磷酸醯基轉化酶 (glycerol-3-phosphate acyltransferase)、甘油-3-磷酸去氫酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase)、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase) 和甘油醛-3-磷酸去氫酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)，這些酵素在此階段表現量會增加 10 到 100 倍 (Spiegelman *et al.*, 1983; Paulauskis and Sul, 1988; Weiner *et al.*, 1991)。另外葡萄糖轉運蛋白 (Garcia de Herreros and Birnbaum, 1989)、胰島素受體數目和胰島素敏感性 (Rubin *et al.*, 1978) 也在此階段增加。在分化末期脂肪細胞增加脂質生成作用，同時也分泌出脂肪組織的特異性蛋白質，像是脂肪細胞脂肪酸結合蛋白 (adipocyte-specific fatty acid binding protein, aP2) (Bernlohr *et al.*, 1984)、脂肪酸轉位酶 (fatty acid translocase/CD36, FAT/CD36) (Ibrahimi *et al.*, 1996) 和脂肪滴表面蛋白 (perilipin) 等 (Greenberg *et al.*, 1993)。

## 柒、脂肪細胞分化與代謝相關基因

### 一、過氧小體增生活化受體 (peroxisome proliferator- activated receptor, PPARs)

過氧小體增生活化受體 (PPARs) 是受配體活化的轉錄因子，屬於細胞核荷爾蒙受體超級家族之一 (Michalik *et al.*, 2006)。具有調控能量平衡、細胞分化、細胞



凋亡和發炎反應等功能 (Houseknecht *et al.*, 2002)。

目前 PPARs 已被發現有三種異構物，分別為 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$  (或稱  $\delta$ )、PPAR $\gamma$  (Braissant and Wahli, 1998)。PPAR $\alpha$  大量表現於心臟、肝臟、腎臟、腸黏膜、骨骼肌和棕色脂肪組織中，主要參與脂肪酸代謝 (Mandard *et al.*, 2004)；PPAR $\beta/\delta$  在各組織都有表現，但主要表現於皮膚、腸道、胎盤、骨骼肌、脂肪組織和腦中，主要調控細胞增生與分化 (Levine, 2008)；PPAR $\gamma$  有兩種異構體，分別為 PPAR $\gamma$ 1 和 PPAR $\gamma$ 2，兩者差異於 N 端的序列不同 (Michalik *et al.*, 2006)。PPAR $\gamma$ 1 在脂肪組織有少量表現外，並且腸道、腦、血管細胞和免疫發炎細胞都有表現 (Tontonoz *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1995)；PPAR $\gamma$ 2 大量表現於脂肪組織中 (Tontonoz *et al.*, 1994)，參與脂肪細胞的脂質生成作用 (Rosen *et al.*, 2000; Levine, 2008)。

因為 PPAR 是受配位體活化的轉錄因子，所以會受到許多不同的配位體調控，目前所發現的配位體有多元不飽和脂肪酸 (PUFAs)、胰島素增敏劑 (Thiazolidinediones, TZD)、固醇類 (steroids)、維生素 A 和 D (Clarke *et al.*, 1999; Desvergne and Wahli, 1999)。研究發現，胰島素和腎上腺皮質素會促進人類脂肪細胞的 PPAR $\gamma$  表現 (Vidal-Puig *et al.*, 1997)，胰島素是透過 PI3K 路徑磷酸化 PPAR $\gamma$  (Al-Rasheed *et al.*, 2004)，TZD 為人工合成的配位體，對 PPAR $\gamma$  有較高的親和力，提升轉錄作用的活性，使 PPAR $\gamma$  mRNA 和蛋白質表現提高 (Schoonjans *et al.*, 1996; Bouaboula *et al.*, 2005)。

剔除 PPAR $\gamma$  基因的小鼠脂肪細胞實驗發現，脂肪細胞不能行脂質生成作用產生油滴，並且其下游基因 aP2 和 adipsin 都無法表現 (Rosen *et al.*, 1999)；小鼠動物實驗中，缺乏 PPAR $\gamma$  使其脂肪組織無法形成 (Barak *et al.*, 1999)。PPAR $\gamma$  對於脂肪細胞是必要的分化基因。在雞隻的前脂肪細胞實驗中，細胞在分化後 9 小時內發現 PPAR $\gamma$  表現量隨時間增加 (Matsubara *et al.*, 2005)；另外透過 small interference PPAR $\gamma$  (siPPAR $\gamma$ ) RNA 干擾雞前脂肪細胞 PPAR $\gamma$  的表現，會抑制前脂肪細胞的分化並且促進前脂肪細胞的增殖，而且脂肪細胞分化相關 adipocyte fatty acid-binding protein (A-FABP) 基因表現量也受 siPPAR $\gamma$  調控而下降 (Wang *et al.*, 2008)。表示

PPAR $\gamma$  也是屬於雞前脂肪細胞分化早期的重要因子。

PPAR $\gamma$  不只是前脂肪細胞分化的關鍵因子，而且對於脂肪細胞的能量代謝也有影響。在 3T3-L1 成熟脂肪細胞抑制 PPAR $\gamma$  表現的實驗中，發現細胞型態變小，而且細胞內三酸甘油酯含量、游離脂肪酸攝取及胰島素導致葡萄糖攝取都有降低，另外有增加細胞脂解作用 (Tamori *et al.*, 2002)。給予第二型糖尿病患者 PPAR $\gamma$  的促進劑 TZD，可降低患者的胰島素抗性 (Spiegelman, 1998)，也降低血中膽固醇、三酸甘油酯和游離脂肪酸的濃度 (Burant *et al.*, 1997; Houseknecht *et al.*, 2002)。

## 二、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS)

脂肪合成酶 (FAS) 為動物體內脂質新生成作用中的重要酵素，主要參與催化 acetyl-CoA 和 malonyl CoA，合成棕櫚酸 (palmitate) (Paulauskis and Sul, 1989)。家禽中 FAS 活性比其他脂質新生成的相關酵素較高，所以 FAS 為家禽脂質新生作用中最為重要的酵素 (Liou and Donaldson, 1973)。FAS 主要表現於脂肪組織、肝臟和泌乳腺中，FAS 表現會受到葡萄糖、胰島素、cAMP 和甲狀腺激素等所調控 (Boizard *et al.*, 1998)。在脂肪細胞分化過程中，細胞經過早期分化基因 (如 C/EBP $\beta$ ) 開始表現後，接著胰島素藉由 PI3K 路徑刺激 FAS 基因表現，進而促使脂肪細胞開始累積油滴 (Wang and Sul, 1998)。

FAS 基因表現會受到內分泌和營養物所調控，成熟脂肪細胞在胰島素處理下，會增加 FAS 基因的表現；另外 dibutyryl cAMP 處理下，會抑制脂肪細胞中 FAS 基因表現 (Paulauskis and Sul, 1988)。動物在禁食中，其肝臟中 FAS 含量低，若是結束禁食再餵飼高碳水化合物，其 FAS 濃度急劇提升 (Moustaid and Sul, 1991)。在動物實驗中大鼠給予 glucagon 或 dibutyryl cAMP，其肝臟中 FAS 酵素活性下降 (Lakshmanan *et al.*, 1972)。人類的肝臟細胞培養實驗中，添加葡萄糖會增進 FAS 基因的表現 (Semenkovich *et al.*, 1993)。在人類肝臟細胞中膽固醇以及 25-OH cholesterol 處理下，其 FAS 的 mRNA 表現會受到抑制 (Bennett *et al.*, 1995)。另外，

在雞的初代脂肪細胞給予分化試劑去刺激後，隨著分化時間增加，FAS 的 mRNA 表現量也隨即增加，表示 FAS 也參與雞脂肪細胞的脂質生成作用 ( Matsubara *et al.*, 2005 )。

### 三、固醇調節區域結合蛋白 ( sterol regulatory element binding proteins, SREBPs )

固醇調節區域結合蛋白 ( SREBPs ) 參與脂質和膽固醇合成代謝的基因調控。SREBPs 結構分為三個部分：一為氨基端轉錄因子區由 480 個胺基酸組成，二為含兩個疏水穿膜片段的中間疏水區由 80 個胺基酸組成，三為羧基端調節區由 590 胺基酸組成 ( Brown and Goldstein, 1997 )。人體中 SREBPs 有三種異構型 SREBP-1a、SREBP-1c 和 SREBP-2，SREBP-1a 主要參與膽固醇、脂肪酸和三酸甘油酯等代謝基因的調控；SREBP-1c 功能與 SREBP-1a 相像，其主要調控脂肪酸代謝，但不參與膽固醇代謝；SREBP-2 主要參與膽固醇代謝的基因調控 ( Shimano *et al.*, 1997 ; Horton *et al.*, 2002 )。另外研究發現在齧齒動物中 SREBP-1 的 mRNA 高度表現於棕色脂肪組織、白色脂肪組織和肝臟中，並且 SREBP-1 在大鼠脂肪細胞分化期間而被誘發，因此大鼠 SREBP-1 又稱為 adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1 ( ADD1 ) 主要調控脂肪細胞脂質代謝的重要基因 ( Tontonoz *et al.*, 1993 ; Bennett *et al.*, 1995 )。

在先前研究發現，FAS 的啟動子上具有 SREBPs 的結合位 ( Kim and Spiegelman, 1996 )，在細胞株實驗中，將 SREBP 過表現會活化 FAS 的啟動子 ( Magaña and Osborne, 1996 )；在初代細胞實驗，利用腺病毒轉染肝臟細胞或脂肪細胞，使 SREBP 表現活化或抑制，都會造成細胞內 FAS 基因表現改變 ( Boizard *et al.*, 1998 ; Foretz *et al.*, 1999 )；在動物實驗中，過表現 SREBP 基因的轉殖小鼠中，其 FAS 基因也明顯提高表現 ( Shimano *et al.*, 1996 )。由以上證實 SREBPs 和 FAS 是互相關聯，且對於脂質代謝是重要的基因。

#### 四、脂蛋白脂解酶 ( lipoprotein lipase, LPL )

脂蛋白脂解酶 ( LPL ) 為調控體內脂質代謝的重要酵素，主要由脂肪組織、心肌、骨骼肌和乳腺等所合成。LPL 位於動脈內皮細胞上作用，負責水解極低密度脂蛋白和乳糜微粒中的三酸甘油酯產生游離脂肪酸 ( Goldberg, 1996 )。

LPL 受到轉錄因子調控、轉譯後修飾、組織區位的特異性、營養因子和賀爾蒙等影響，其活性會有所不同 ( Bergö *et al.*, 1996 ; Wang and Eckel, 2009 )。LPL 啟動子上有 PPAR 的結合位，在肝臟和脂肪組織中 LPL 的表現會受到 PPAR $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  配體而增加 ( Carroll and Severson, 2001 )；LPL 活性在心肌、骨骼肌和脂肪組織遠高於肝臟 ( Mead *et al.*, 2002 )；在禁食下大鼠脂肪組織中的 LPL 活性低於未禁食的狀態，而在心肌方面，禁食下 LPL 活性高於未禁食 ( Bergö *et al.*, 1996 )；另外 LPL 活性會受到胰島素和葡糖糖的影響而增加 ( Ong and Kern, 1989 ; Semenkovich *et al.*, 1989 )，兒茶酚胺則是降低 LPL 的活性 ( Deshaies *et al.*, 1993 )。

LPL 在脂質代謝中扮演調控平衡的角色，在 LPL 基因剔除小鼠中，會提高血中三酸甘油酯和 VLDL 膽固醇的含量，形成所謂的高三酸甘油酯血症 ( Weinstock *et al.*, 1995 )；而在轉殖過表現 LPL 基因的小鼠中，LPL 活性提高，並且顯著降低血中三酸甘油酯含量，另外對於餵高脂肪飲食的小鼠，有助於改善胰島素抗性和高三酸甘油酯血症 ( Shimada *et al.*, 1993 ; Shibasaki *et al.*, 2006 )。

#### 五、極低密度脂蛋白受體 ( very low density lipoprotein receptor, VLDLR )

極低密度脂蛋白受體 ( VLDLR ) 是屬於低密度脂蛋白受體 ( low density lipoprotein receptor, LDLR ) 的家族之一。VLDLR 與 LDLR 主要差異在於蛋白質胺基端結構不同，VLDLR 胺基端由八個富含半胱胺酸結合的重複序列，而 LDLR 由七個組成 ( Takahashi *et al.*, 1992 ; Willnow, 1999 )。VLDLR 在人類、老鼠、兔子和雞

等物種都有發現，其表現於心臟、骨骼肌和脂肪組織，其中人類與雞 VLDLR 的蛋白質序列有 84% 相同，VLDLR 在人類的卵巢中有表現 (Frykman *et al.*, 1995)。而雞的 VLDLR 主要表現在卵母細胞膜上高於體細胞，並且是母雞繁殖的關鍵因子之一 (Niemeier *et al.*, 1996; Baba *et al.*, 2002)。VLDLR 主要與富含三酸甘油酯的脂蛋白 E (apolipoprotein E, apo E) 作結合，像是 VLDL、中密度脂蛋白 (intermediate density lipoprotein, IDL) 和乳糜微粒 (Sakai *et al.*, 1994)。

在小鼠實驗中，將剔除 VLDLR 基因的小鼠餵飼高脂肪飼糧，其皮下和內臟的脂肪組織含量都明顯低於同樣餵飼高脂肪飼糧的野生型小鼠，並且基因剔除小鼠血液中的葡萄糖和胰島素顯著低於野生型小鼠，而基因剔除小鼠的血液中三酸甘油酯含量高於野生型小鼠，另外在葡萄糖耐受性測試中，餵飼高脂肪飼糧的基因剔除小鼠，其葡萄糖耐受性顯著好於餵飼高脂肪飼糧的野生型小鼠 (Frykman *et al.*, 1995; Goudriaan *et al.*, 2001)。以上實驗證實，VLDLR 是調控脂質代謝的重要角色。

## 六、固醇輔酶 A 去飽和酶 (stearoyl CoA desaturase, SCD)

固醇輔酶 A 去飽和酶 (SCD) 是參與合成單元不飽和脂肪酸 (mono-unsaturated fatty acids, MUFAs) 的速率決定酵素，負責將 palmitoyl-CoA 和 stearoyl-CoA 個別轉化成 palmitoleoyl-CoA 和 oleoyl-CoA。由 SCD 所合成的單元不飽和脂肪酸是形成酯化膽固醇、三酸甘油酯、蠟酯和磷脂質 (Ntambi and Miyazaki, 2004)。SCD 在老鼠中發現有三種異構物，分別為 SCD-1、SCD-2 和 SCD-3。SCD-1 主要表現於白色脂肪組織、棕色脂肪組織和肝臟；SCD-2 主要表現於新生小鼠的腦部；SCD-3 主要表現於皮膚組織 (Ntambi, 1999)。

SCD-1 表現受到飲食、賀爾蒙和環境因子所調節，像是高碳水化合物飲食、胰島素、葡萄糖、膽固醇、低氣溫、光線等都誘發肝臟中 SCD-1 表現；共軛亞麻油酸、cAMP、TNF- $\alpha$  和甲狀腺激素則抑制 SCD-1 表現 (Jeffcoat and James, 1978; Ntambi, 1999)。具有糖尿病大鼠在禁食狀態下會降低 SCD 活性，在禁食後再餵飼高碳水化

合物或給予胰島素，SCD 活性會再度誘發提升 (Holloway and Holloway, 1975)。瘦體素是調控能量平衡與飽食感的激素，會抑制肝臟的 SCD-1 基因表現和酵素活性，進而造成小鼠攝食量降低以及體重下降 (Cohen *et al.*, 2002; Cohen and Friedman, 2004)。

剔除 SCD-1 基因小鼠餵飼高碳水化合物無法誘發三酸甘油酯的合成，儘管 SREBP-1 和 FAS 等脂質合成基因被誘發表現，代表三酸甘油酯的合成需要 SCD-1 基因參與作用 (Miyazaki *et al.*, 2001)。另外研究發現，缺失 SCD-1 基因小鼠在肝臟和棕色脂肪組織會顯著提升  $\beta$ -氧化反應速率 (Dobrzyn *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004)。以上實驗結果，SCD-1 在脂質代謝與能量消耗的是重要的調節因子。

## 七、細胞骨架蛋白 (vimentin)

細胞骨架是真核細胞非常複雜的結構，此結構由以微管蛋白 ( $\alpha/\beta$ -tubulin) 異構體組成的微管 (microtubules, MTs) 和肌動蛋白 (actin) 為基礎蛋白所構成的微絲 (microfilaments, MFs) 以及中間絲 (intermediate filaments, IFs) 等三個主要絲狀多重成分聚合物所組成的纖維網路，以維持細胞形狀與細胞各種活動 (Zehner and Paterson, 1983; Ingber, 1993)。中間絲是維持細胞質內結構以及細胞外觀形狀，並且連結細胞膜與核膜的橋樑，負責訊息間的傳遞 (Podolin and Prystowsky, 1991)。屬於中間絲蛋白家族有 desmin、keratins、neurofilament proteins 和 vimentin。vimentin 主要由間質細胞合成，vimentin 基因表現在各種細胞內都有發現 (Zehner and Paterson, 1983)。

脂肪細胞研究發現，vimentin、actin 和 tubulin 表現隨分化而增加 (O'Shea Alvarez, 1991; Teichert-Kuliszewska *et al.*, 1996)。3T3-L1 脂肪細胞分化過程中，vimentin 結構會隨著分化過程而改變，使細胞內結構會重新組合，以調節因油滴大小而改變的細胞結構 (Franke *et al.*, 1987)。另外在 3T3-L1 實驗中，抑制 vimentin 表現會降低細胞內油滴的累積 (Lieber and Evans, 1996)。在家禽實驗發現，肥胖品系與瘦品系

雞隻的腹部脂肪組織中，其 vimentin 基因表現有差異性，表示 vimentin 與脂肪細胞結構與體積有相關 (Wang *et al.*, 2009)。vimentin 結構位置轉移至油滴上的機制尚未明瞭，但 vimentin 是保護並穩定脂肪油滴結構，且預防油滴與細胞內的胞器直接接觸 (Franke *et al.*, 1987；Wang *et al.*, 1997)。

## 八、脂肪滴表面蛋白 (perilipin)

脂肪滴表面蛋白 (perilipin) 是一種磷酸蛋白，被發現於 3T3-L1 脂肪細胞的油滴表面上並且阻隔油滴與細胞內胞器的接觸，占全細胞蛋白質的 0.25% 至 0.5% (Brown, 2001)。perilipin 具有三種異構物，主要由同一段基因經由選擇性剪接而產生，perilipin A 主要存在於脂肪細胞和固醇類分泌細胞，perilipin B 存在於脂肪細胞，perilipin C 則存在於固醇類分泌細胞，其中在脂肪細胞中 perilipin A 是 PKA 磷酸化的主要目標 (Egan *et al.*, 1990；Londos *et al.*, 1999)。

有研究發現，動物營養狀態會影響 perilipin 去調控脂肪細胞的脂解作用。當動物在餵飼狀態下，非磷酸態 perilipin 會阻隔脂解酶對脂肪細胞油滴的分解作用，進而儲存三酸甘油酯；而當受到兒茶酚胺刺激時，細胞內 cAMP-dependent protein kinase A (PKA) 會磷酸化 perilipin 和細胞質內的 HSL，而磷酸化的 perilipin 會使油滴表面結構改變，接著 HSL 會從細胞質移動到油滴表面作結合，造成三酸甘油酯分解 (Tansey *et al.*, 2004；Brasaemie *et al.*, 2009)。perilipin 啟動子上具有 PPAR response element (PPRE)，可受到 PPAR $\gamma$  的調節，並且使用 TZD 藥物可增加脂肪細胞中 perilipin 表現 (Nagai *et al.*, 2004)。

在動物實驗發現，剔除 perilipin 基因小鼠腹部脂肪含量低於正常小鼠，另外基因剔除小鼠有提升體內代謝率並且葡萄糖耐受性和胰島素抗性也增加，在餵飼高脂肪飼糧，剔除 perilipin 基因小鼠不易形成肥胖 (Tansey *et al.*, 2001)。剔除 perilipin 基因小鼠脂肪細胞實驗發現，甘油釋出量在脂解作用未受賀爾蒙刺激的基礎狀態中，剔除 perilipin 脂肪細胞高於控制組；甘油釋出量在異丙腎上腺素刺激脂解作用

下，剔除 perilipin 脂肪細胞低於控制組。由此可推測知道，脂解作用未受賀爾蒙刺激的基礎狀態，perilipin 具有保護三酸甘油酯，避免遭受水解，得以儲存三酸甘油酯，另外在賀爾蒙刺激脂解作用下，perilipin 才能促使 HSL 作用於油滴並水解三酸甘油酯 (Brasaemle *et al.*, 2000; Sztalryd *et al.*, 2003)。

## 九、脂聯素 (adiponectin)

脂聯素 (adiponectin) 為脂肪組織所分泌的激素，另外像是 adipisin、leptin、plasminogen activator inhibitor-1、resistin 和 TNF- $\alpha$  等也是脂肪組織所分泌的激素，由脂肪細胞所分泌的激素通稱為 Adipocytokines (Chandran *et al.*, 2003; Kadowaki and Yamauchi, 2005)。

adiponectin 蛋白質在 1995 至 1996 年間被發現，這相同激素因透過不同研究方法發現，而授於此激素有不同名稱，又稱為 adipose most abundant gene transcript 1 (apM1) (Maeda *et al.*, 1996)、gelatin binding protein of 28kDa (GBP28) (Nakano *et al.*, 1996)、adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30) (Scherer *et al.*, 1995) 和 adipoQ (Hu *et al.*, 1996)。apM1 和 GBP 從人類中發現，Acrp30 和 adipoQ 從小鼠中發現。

已有實驗證實 adiponectin 基因表現降低與肥胖和胰島素抗性有相關性 (Hu *et al.*, 1996)。脂質生成作用時，adiponectin 會開始活化表現，但是在肥胖產生時會啟動負回饋機制，去抑制 adiponectin 的表現 (Díez and Iglesias, 2003)。在 3T3-L1 脂肪細胞實驗中，誘發具胰島素抗性的細胞其 adiponectin 基因表現較未處理的控制組低 (Fasshauer *et al.*, 2002); 在恆河猴動物實驗中發現，肥胖初期時血液中 adiponectin 濃度開始下降，並且在糖尿病產生期間，血中 adiponectin 依然處於低濃度狀態 (Hotta *et al.*, 2001)，因此在動物中 adiponectin 濃度與表現量降低是代表產生肥胖與糖尿病的指標。在 adiponectin 基因剔除小鼠中，會產生胰島素抗性以及葡萄糖耐受不良 (Kubota *et al.*, 2002); 在高脂肪餵飼的野生型小鼠中使 adiponectin 過表現以及



在高脂肪餵飼的 adiponectin 基因剔除小鼠中再轉殖 adiponectin，都有助於改善血中胰島素、葡萄糖和游離脂肪酸濃度 (Maeda *et al.*, 2002)。由以上可知 adiponectin 在調節葡萄糖和脂質代謝中扮演重要的腳色，也是肥胖與糖尿病相關性指標。

adiponectin 受到內泌素和轉錄因子所調控，interleukin-6、TNF- $\alpha$  和葡萄糖皮質素會抑制 adiponectin 基因表現 (Bruun *et al.*, 2003; Fasshauer *et al.*, 2003; Degawa-Yamauchi *et al.*, 2005)；leptin 和 insulin-like growth factor 1 (IGF-1) 會調節 adiponectin 表現上升 (Halleux *et al.*, 2001; Delporte *et al.*, 2004)。許多實驗發現 adiponectin 受到脂肪細胞分化轉錄因子調控，adiponectin 啟動子上具有 C/EBPs 的結合位，adiponectin 也會受到 C/EBPs 表現提昇而升高 (Park *et al.*, 2004)；在大鼠實驗發現脂肪組織中增加 PPAR $\gamma$  表現也伴隨提升 adiponectin 的表現量 (Karbowska and Kochan, 2005)。另外，TZD 為 PPAR $\gamma$  的促進劑，用來治療第二型糖尿病患者的胰島素敏感性，實驗發現可提升患者血中 adiponectin 濃度，並且透過活化 adiponectin 啟動子增加其 mRNA 表現 (Maeda *et al.*, 2001)。

# 材料與方法

## 壹、材料

### 一、脂肪細胞

使用中興大學選育的台灣土雞 L2 品系，依其至 40 週齡產蛋數分高產組與低產組，高產蛋組是 6 隻試驗土雞產蛋數量為  $108.7 \pm 0.5$  顆，低產蛋組是 6 隻試驗土雞產蛋數量為  $71.3 \pm 0.5$  顆。取雞隻腹脂部位脂肪組織，經分離取前脂肪細胞，進行初代細胞分化培養，比較不同產蛋數台灣土雞前脂肪細胞分化能力。

### 二、試驗材料

細胞培養液 Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 medium ( 50:50 ) ( DMEM/F12 ; 產品編號 : 12500-062 )、胎牛血清 ( fetal bovine serum, FBS ; 產品編號 : 04-001-1A )、雞血清 ( chicken serum, CKS ; 產品編號 : 16110-82 ) 購自 Gibco BRL ( Grand Island, NY ) ; Collagenase type I ( 產品編號 : LS004196 ) 購自 Worthington ( Freehold, NJ ) ; 胰島素 ( insulin ; 產品編號 : I-1882 )、葡萄糖皮質素 ( dexamethasone, Dex ; 產品編號 : D4902 )、isobutylmethylxanthine ( IBMX ; 產品編號 : I-7018 )、oil-Red O ( 產品編號 : O-0625 )、formaldehyde ( 產品編號 : F-1268 )、glycerol ( 產品編號 : G-6279 )、isopropanol ( 產品編號 : I-9516 )、氯仿 ( chloroform ; 產品編號 : C-2423 )、辛酸 ( octanoic acid ; 產品編號 : C-2875 ) 購自 Sigma ( St. Louis, MO ) ; RareRNA 萃取液 ( 產品編號 : GPR02 ) 購自真興實業有限公司 ( 台中 ) ; 無水酒精 ( absolute ethanol ; 產品編號 : 32221 ) 購自 Riedel-deHaen ( Seeize, Germany ) ; SuperScript II reverse transcriptase ( 產品編號 : 18064 )、0.1 M Dithiothreitol, DTT ( 產品編號 : y00147 )、5X first standard buffer ( 產品編號 : y02321 )、10mM dNTP ( 產品編號 : 18427 ) 購自 Invitrogen ( Carlsbad, CA ) ; SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix ( 產品編號 :

4309155) 購自 Ambion (Austin, TX); 蛋白質分析套組 (Bio-Rad Protein Assay; 產品編號: 500-0006) 購自 Bio-Rad (Hercules, CA); Triglycerides (產品編號: TR213) 購自 RANDOX (Antrim, U.K.)。

## 貳、方法

### 一、脂肪細胞培養

首先將雞隻犧牲，以頸部動脈放血，取腹部脂肪組織置於培養皿，剪碎至約 2 mm 大小後，以含有 2 mg collagenase/mL DMEM/F12 [Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 medium (50:50)，含有 100mM N-2 hydroxyethyl- piperazine-N9-2 ethanesulfonic acid (HEPES) 與 1.5% bovine serum albumin (BSA), pH 7.4]，培養於 37°C 震盪水浴槽 (130 rpm) 120 分鐘。加入 5 倍體積未含有 collagenase 的 buffer，以過濾去除未消化的組織。以 50×g 離心 3 分鐘，分離出含前脂肪細胞之間質血管細胞 (stromal-vascular cells)，再以 lysis buffer (0.154M NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1mM EDTA) 培養於室溫 10 分鐘去除紅血球。以含有 10% FBS 的 DMEM/F12 培養液培養細胞。

待細胞長滿於培養皿時，加入 10% chicken serum (CKS) 的 DMEM/F12 與外源性分化試劑 (10 µg/mL 胰島素與 1µM Dex) 之培養液，以誘發細胞分化，並將誘發細胞分化之日定義為第 0 天。細胞培養期間每兩天換一次培養液，更換之培養液除含血清外，額外添加胰島素 (10 µg/mL)。培養箱環境溫度設定為 37°C，使用二氧化碳濃度為 5%。

### 二、Oil-Red O 染色、油滴計數和定量

脂肪細胞培養於 3.5 cm<sup>2</sup> 培養皿中，於分化後第 6 天以 oil-Red O 染劑 (0.3% oil-Red O, 60% isopropanol) 將細胞內脂質染色。染色前先去除了培養液，以 1X phosphate-buffered saline (PBS; 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9.4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl) 清洗

兩次，加入 10% formaldehyde，在室溫中靜置 30 分鐘以固定細胞，再以滅菌水清洗。接著加入 oil-Red O 染劑，在室溫中避光靜置 30 分鐘，最後以滅菌水清洗，再以 10% glycerol 保存樣本，並將其結果掃描存檔。

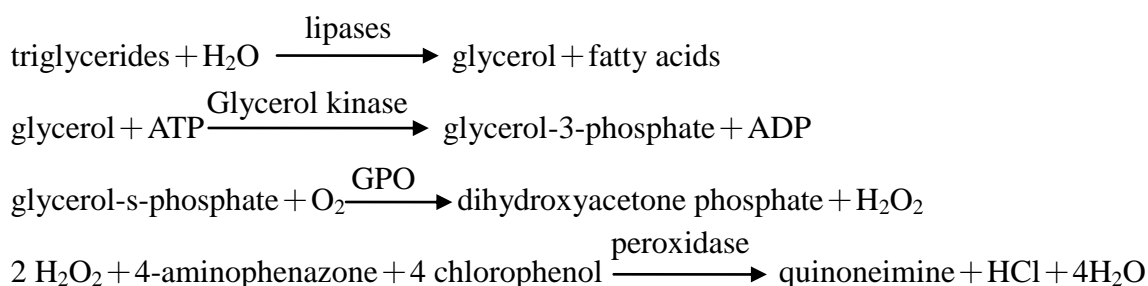
將 oil-Red O 染色後的樣本以 isopropanol 萃取脂質 5 分鐘，然後收集混合均勻，利用分光光度計於波長 510 nm 下讀取樣本吸光值。吸光值與脂質的濃度成正比。

利用 Image Pro Plus 6.0 影像軟體分析，將 oil-Red O 染色的油滴，以 0.5 $\mu$ m 直徑的圓圈選，計算出大於或等於 0.5 $\mu$ m 的油滴數量。

### 三、三酸甘油酯含量分析 ( triglycerides assay )

脂肪細胞培養於 3.5 cm<sup>2</sup> 培養皿中，於分化後第 6 天測細胞內三酸甘油酯含量。分析前先去培養液，以 1X PBS 清洗，而後加入 500  $\mu$ L homogenizing buffer ( 0.25M sucrose, 1mM EDTA, 5mM Tris, 1mM DTT )，用細胞刮杓將細胞從培養皿刮下，收集至 1.5 mL 離心管，再以超音波震碎機均質之，均質後的樣本於室溫下，12500 $\times$ g ( roter 1159, MIKRO 22R ) 離心 5 分中，取上清液於離心管中。

測定三酸甘油酯濃度原理如下：



將樣本液 10  $\mu$ L 與三酸甘油酯試劑 1 ml 混合，於 37 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘後，利用分光光度計於波長 500 nm 測定吸光值。測定吸光值與甘油濃度成正比。細胞釋出甘油含量單位為 mmole/mg protein。以蛋白質分析套組測定細胞內總蛋白質濃度，用牛血清白蛋白為標準液，定量三酸甘油酯含量分析結果。

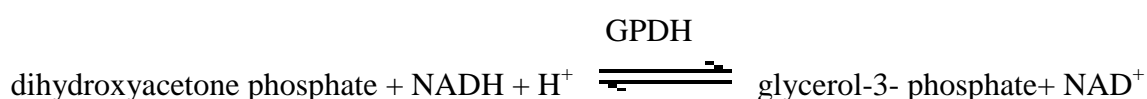
計算式如下：

$$\text{TG ( mmole / mg protein )} = \frac{[(2.29 \times \text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{standard}}) \times \text{培養液體積}(\mu\text{l})]}{\text{mg protein}}$$

#### 四、甘油-3-磷酸去氫酶活性分析 ( glycerol-3- phosphate dehydrogenase, GPDH )

脂肪細胞培養於 3.5 cm<sup>2</sup> 培養皿中，於分化後第 6 天測細胞內 GPDH 活性。細胞分析活性前先去培養液，加入 500  $\mu\text{L}$  homogenizing buffer，再以細胞刮杓將細胞從培養皿刮下來，收集至 1.5 mL 離心管中，以超音波震碎機均質之，均質後的樣本液於 4°C，12500 $\times$ g 離心 5 分鐘，取上清液至離心管中並置於冰上。

原理如下：



進行 GPDH 活性分析前，首先配製 Triethanolamine-EDTA premix pH7.5 ( 200 mM triethanolamine；5 mM Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O )，配製完後充氮氣並避光，接著於塑膠比色管中注入 800  $\mu\text{L}$  assay buffer ( 200 mM Triethanolamine；5mM EDTA；滅菌水 4.8 mL；0.22 mM  $\beta$ -NADH；0.083 mM  $\beta$ - mercaptoethanol ) 保持於 37°C 下，再注入 100  $\mu\text{L}$  的 0.8 mM dihydroxyacetone phosphate lithium solution ( DHAP ) 作為受質，最後注入 100  $\mu\text{L}$  的樣本上清液，迅速混勻，利用分光光度計以波長 340 nm 讀取樣本吸光值，以 0.5 分鐘為起始吸光值 ( A<sub>0</sub> )，並以每 5 秒為間隔，持續監測 5 分鐘，取 4.5 分鐘為最終吸光值 ( A<sub>4.5</sub> )，計算最終吸光值逾起始吸光值之差 (  $\Delta A$  )。以蛋白質分析套組測定上清液中蛋白質濃度，以牛血清白蛋白為標準液，進而算出 GPDH 活性。

GPDH 活性計算方程式：

$$\text{GPDH activity ( U/mg )} = \frac{\Delta A / \text{min}}{0.00625 \text{ OD} \times 1 \text{ nMole} \times \text{mg protein}}$$

## 五、總 RNA 萃取

3.5 cm<sup>2</sup> 培養皿中添加 500 μL 的 rareRNA 萃取液，以細胞刮杓將細胞刮下，收集至 1.5 mL 離心管中，放置於室溫 5 分鐘，然後加入氯仿 300 μL，以 4°C，12000 ×g ( roter 1159；MIKRO 22R ) 離心 10 分鐘。離心後，將上清液收集至新離心管，然後添加上清液 2 倍體積的無水酒精，再以 4°C，12000×g 離心 5 分鐘，去除上清液，再添加 70% 酒精，以 4°C，14000×g 離心 1 分鐘，將上清液去除乾淨，置於室溫使其沉澱物乾燥，再添加適量的 DEPC H<sub>2</sub>O，以溶解離心管內沉澱物，最後再以 60°C 培養 5 分鐘後，將所萃取的總 RNA 存放 80°C 中。

## 六、即時定量聚合酶連鎖反應 ( real-time polymerase chain reaction )

首先進行反轉錄反應 ( reverse transcription, RT )，將所萃取的 RNA 定量為 1.2 μg/μL，加入 1 μL 的 random primer ( 3 μg/μL ) 和 9 μL 滅菌水，於 70°C 培養 10 分鐘後，將樣本置於冰上，加入 4 μL 5X buffer、2 μL DTT ( 0.1 M ) 和 1 μL dNTP ( 10 mM ) 混合均勻，以 25°C 培養 10 分鐘，42°C 培養 2 分鐘，再加入 1 μL superscript II RT ( 200 units/μL )，以 42°C 培養 50 分鐘，70°C 培養 15 分鐘，最後加入 1 μL RNase H ( 2 units/μL )，37°C 培養 20 分鐘，完成反轉錄反應，實驗樣本 cDNA 保存 -20°C。

接著進行即時聚合酶連鎖反應 ( real-time polymerase chain reaction )，每一反應放入 10 μL 的 SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix，所需引子一對各取 1 μL，以滅菌水將體積補至 19 μL，之後加入 1 μL cDNA，總體積為 20 μL。混合均勻後以如下條件：50°C、2 分鐘，90°C、10 分鐘；之後以 95°C、15 秒，60°C、1 分鐘進行 40 循環，

於 ABI StepOne 系統進行即時聚合酶連鎖反應以觀察目標基因的表現。以 18S 作為內源控制組，設定合適閾值 (threshold)，根據 SYBR<sup>®</sup> Green 與參考染劑 (reference dye) ROX 相減的螢光量對照閾值反應出每個樣本的 cycle 數，即 Ct 值，與內源控制組 18S 的 CT 值相減成為  $\Delta Ct$  (目標基因之 Ct 值 - 18S 基因之 Ct 值)，目標基因之表現量 =  $2^{-\Delta Ct}$ 。反應所用引子序列如表 1。

表 1 即時聚合酶連鎖反應分析雞脂肪細胞基因 mRNA 表現之引子序列

基因名稱	參考序列 NCBI GeneBank#	引子序列	引子濃度 (nM)
PPAR $\gamma$	NM_001001460	5'-CCAGCGACATCGACCAGTT-3' 5'-AGGACTTTATGTATGAGTCATACAAATGC-3'	200
LPL	NM_205282	5'-GTTCTCCTGGCCTTGCTAACTG-3' 5'-TTGCCAAACACACCACTTGAA-3'	700
FAS	NM_205155	5'-GCATGTCACAACCTCTGAGGATACTGT-3' 5'-GCCATGTAATAGGAATGAAATGCA-3'	500
adiponectin	AY523637	5'-ACCTATGACCAGTTCCAGGAGAAC-3' 5'-CAAGCTGAGGTGCAGCAAGAC-3'	500
SCD	NM_204890	5'-CACCGTGTCCACCACAAGTTC-3' 5'-GAAGTAGCCCCGCATAGCATT-3'	250
SREBP1	NM_204126	5'-CATTGGGTCACCGCTTCTTCGTG-3' 5'-CGTTGAGCAGCTGAAGGTACTCC-3'	100
perilipin	XM_413860	5'-GCACTGGCTCTAGGGTTTAACTG-3' 5'-TTCTGCAAAGGCTGATTCTTCTTC-3'	250
VLDLR	NM_205229	5'-GCTTGGGCTGTTCTTCCTATCTT-3' 5'-GCCAATTACGCCACATGAAGT-3'	250
vimentin	AH002482	5'-CGCACCAACGAGAAGGTAGAG-3' 5'-GAAGCGCACCTTGTCGATGTA-3'	250
18S	M59389	5'-TTCGTATTGTGCCGCTAGAG-3' 5'-GCATCGTTTATGGTCGGAAC-3'	50

## 七、統計分析

實驗採用飼養在相同環境、飼料與飲水條件之雞隻，將雞隻犧牲採取腹脂進行分析，依測定項目所得數據，使用統計軟體 SAS (1999) 進行分析，以 t 檢定比較高產蛋與低產蛋組間之差異。



# 結果與討論

為了瞭解雞隻的產蛋能力與其脂質代謝的相關性，本試驗採用了同品系蛋雞 (L2)，再依蛋數高低分作兩組，藉由不同產蛋數雞隻去分析其脂肪細胞功能來比較兩者的關係。

前人實驗以 B 和 L2 品系雞隻，取其腹脂進行前脂肪細胞之初代培養，於分化第 0 天，更換 4 種不同分化培養模式之培養液，分別為 (1) 雞血清 (CKS)、(2) 雞血清添加 insulin 和 Dex、(3) 雞血清添加 insulin、Dex 和 IBMX 以及 (4) 雞血清添加 insulin、Dex 與 1.5 mM 辛酸。結果發現三酸甘油酯含量與 GPDH 活性分析中，在第 4 種分化培養模式下，B 與 L2 品系雞隻脂肪細胞分化程度較其它模式更好，並且僅在第 4 種分化培養模式下 B 與 L2 品系雞隻脂肪細胞間有明顯差異 (黃，2008)。因此本實驗利用 (3) 與 (4) 兩種分化培養模式，去處理高產蛋與低產蛋組，藉由不同的環境培養，是否能增加高產蛋與低產蛋組的差異性，進而瞭解產蛋數與脂肪分化的相關性。

試驗以 40 週齡的蛋雞品系 (L2)，依產蛋數分高產蛋組 ( $108.7 \pm 0.5$  顆, H) 與低產蛋組 ( $71.3 \pm 0.5$  顆, L)。取雞隻腹脂藉由膠原蛋白酶處理，所取得的脂肪細胞進行初代培養，於第 0 天分化時，分別以兩種不同的培養液皆添加分化試劑 (insulin, Dex) 作培養，為雞血清不含辛酸 (-OCT) 以及含有 1.5 mM 辛酸 (+ OCT)，培養至第 6 天，觀察細胞外觀形態、分析三酸甘油酯和 GPDH 活性。並且於第 0、2、4 和 6 天萃取 RNA，利用 real-time PCR 分析基因表現。

## 一、脂肪細胞外觀形態

不同產蛋數雞隻脂肪細胞外觀型態實驗結果顯示 (圖 1)。雞前脂肪細胞初代培養，於第 0 天分化刺激後，H 組與 L 組的脂肪細胞處理在不含辛酸 (-OCT) 和

含有 1.5 mM 辛酸 ( +OCT ) ，觀察 H 組與 L 組的脂肪細胞油滴堆積。於 +OCT 處理下 H 組與 L 組的脂肪細胞有明顯的油滴堆積，並且於分化第 6 天觀察 H 組與 L 組的脂肪細胞，兩組在 +OCT 處理下油滴堆積明顯多於 -OCT 處理。但在分化後 2、4 和 6 天的 H 組與 L 組脂肪細胞大小、油滴含量和油滴數目上無明顯的差異性。

## 二、Oil-Red O 油滴染色、油滴計數與定量

Oil-Red O 為親脂性染劑，可將脂肪細胞內油滴染成紅色，而當脂肪細胞分化程度愈好則油滴堆積愈多，故 oil-Red O 染色則愈深。高產蛋與低產蛋組雞隻前脂肪細胞經初代培養，於第 0 天分化刺激後，H 組與 L 組的脂肪細胞處理在不含辛酸 ( -OCT ) 和含有 1.5 mM 辛酸 ( +OCT )，並於分化後第 6 天以 oil-Red O 染色 ( 圖 2 ) 在 -OCT 處理下，H 組與 L 組的脂肪細胞油滴染色較不明顯，在 +OCT 處理下，H 組油滴數量為  $176\pm 36$ ，L 組油滴數量為  $183\pm 67$ ，兩組脂肪細胞油滴數量上無差異性。

圖 3A 為分化後第 6 天 oil-Red O 染色的培養皿外觀，圖 3B 為 oil-Red O 染劑定量結果。結果顯示在 -OCT 處理下，H 組 OD 為 1.21，L 組 OD 為 1.24；在 +OCT 處理培養下，H 組 OD 為 1.6，L 組 OD 為 1.43，高產蛋與低產蛋組其油滴堆積，兩組在統計上無顯著差異。

## 三、三酸甘油酯含量之比較

脂肪細胞中的油滴主要是以三酸甘油酯的形式儲存，三酸甘油酯的合成是透過糖解作用產生的甘油-3-磷酸，以及細胞內與細胞外透過脂解作用或是脂肪酸新合作用所提供的脂肪酸，而形成三酸甘油酯 ( Jones *et al.*, 1997 )。雞隻前脂肪細胞經初代培養，於第 0 天分化刺激後，H 組與 L 組的脂肪細胞處理在不含辛酸 ( -OCT ) 和含有 1.5 mM 辛酸 ( +OCT )，並於分化後第 6 天，以試劑測定細胞內三酸甘油酯含量。實驗結果顯示 ( 圖 4 )，在 -OCT 處理下，H 組的三酸甘油酯含量為  $249.9\pm 38.1$  nmole/mg protein，L 組的三酸甘油酯為  $195.2\pm 31.3$  nmole/mg protein；在 +OCT 處理

下，H 組的三酸甘油酯含量為  $1081.1 \pm 70.6$  nmole/mg protein，L 組的三酸甘油酯為  $1079.3 \pm 84.9$  nmole/mg protein。H 組與 L 組在不同培養模式下，兩組間的三酸甘油酯含量在統計上都無顯著差異。

#### 四、GPDH 活性之比較

GPDH 功能是将二羟基丙酮磷酸 ( dihydroxy acetone phosphate ) 还原成三酸甘油酯之前驱物 sn-甘油-磷酸 ( sn-glycerol-3-phosphate )，此催化反应为可逆的氧化还原反应，并以 nicotinamide adenine dinucleotide ( NADH ) 为还原剂 ( Kozak and Jensen, 1974 )。前脂肪细胞于分化后，会活化 GPDH 活性，使脂肪细胞有堆积油滴的能力，GPDH 活性随著分化程度而增加，所以可透过 GPDH 活性瞭解脂肪细胞分化之能力。鸡隻前脂肪细胞经初代培养，于第 0 天分化刺激后，H 组与 L 组的脂肪细胞处理在不含辛酸 ( -OCT ) 和含有 1.5 mM 辛酸 ( +OCT )，并于分化后第 6 天，以试剂测定细胞内 GPDH 活性。实验结果显示 ( 图 5 )，在 -OCT 处理下，H 组与 L 组的 GPDH 活性分别为  $4.1 \pm 0.6$  nM/min/mg protein 与  $3.9 \pm 0.5$  nM/min/mg protein；在 +OCT 处理下，H 组与 L 组的 GPDH 活性分别为  $9.9 \pm 1.1$  nM/min/mg protein 与  $10 \pm 0.9$  nM/min/mg protein。高产蛋与低产蛋组在不同培养模式下，两组间的 GPDH 活性在统计上都无显著差异。

#### 五、分化过程相关基因表现比较

上述之实验结果得知，在不同培养模式不含辛酸 ( -OCT ) 和含有 1.5 mM 辛酸 ( +OCT ) 处理下，前脂肪细胞于分化后第 6 天，以 oil-Red O 染色细胞内堆积的油滴并定量、TG 分析测定细胞三酸甘油酯含量，和 GPDH 活性分析细胞分化程度，L2 品系之高产蛋 ( H ) 与低产蛋组 ( L ) 脂肪细胞在各项分析无显著差异。因此本实验利用 real-time PCR 分析脂肪细胞中分化相关基因表现，分别比较高产蛋与低产蛋组前脂肪细胞分化初期与后期基因表现，进一步了解在不同产蛋数的脂肪细胞

胞中，其內源分化基因表現是否會有所差異。

## 1. 分化初期相關基因表現之比較

40 週齡 L2 品系之高產蛋與低產蛋雞隻，分析其脂肪細胞於第 0、2、4 和 6 天在 -OCT 與 +OCT 不同分化培養下的分化相關基因表現，比較高產蛋與低產蛋雞隻脂肪細胞分化基因之差異性。雞隻前脂肪細胞在初代培養實驗中，發現脂肪細胞中的 PPAR $\gamma$  在分化後 9 小時內，就開始表現並且隨時間逐漸增加，代表 PPAR $\gamma$  為雞隻前脂肪細胞分化早期的重要調節因子 (Matsubara *et al.*, 2005)。在此實驗結果顯示，H 組與 L 組的 PPAR $\gamma$  基因，不論是在 -OCT (圖 6A) 或是 +OCT (圖 6B) 培養模式下，其表現有隨著分化天數增加而提高。在黃 (2008) 論文中，L2 品系脂肪細胞在 +OCT 處理下，發現其 PPAR $\gamma$  表現沒有提升反而下降，本實驗中 H 組與 L 組在 +OCT 處理下 PPAR $\gamma$  基因表現相類似，其基因表現沒有受到 OCT 刺激而提升表現。不過 H 組與 L 組的 PPAR $\gamma$  基因在 -OCT 或是 +OCT 培養模式下，於第 0 天分化後 2、4 和 6 天，兩組在統計上都無任何顯著差異。

研究發現人類中，肥胖族群脂肪組織的 PPAR $\gamma$  基因表現高於非肥胖族群 (Lefebvre *et al.*, 1998)，並且 Sato 等人 (2009) 發現雞隻脂肪組織隨週齡增長而增加，而且脂肪組織含量與 PPAR $\gamma$  基因表現呈正相關，代表 PPAR $\gamma$  基因表現可作為分辨脂肪組織多寡的指標。在本實驗 PPAR $\gamma$  基因表現在 H 組與 L 組間無差異，可能 H 組與 L 組的脂肪組織含量相當。

PPAR $\gamma$  基因在牛、鼠和人類的卵巢都有發現。在小鼠的卵母細胞中缺失 PPAR $\gamma$  基因會導致小鼠生育能力下降 (Cui *et al.*, 2002)；在家禽方面，其卵巢的 PPAR $\gamma$  基因，蛋雞表現高於尚未產蛋的母雞 (Sato *et al.*, 2004)，表示卵巢中 PPAR 基因是參與繁殖作用的重要因子。本實驗有不同產蛋數量的 L2 品系土雞，其脂肪組織的 PPAR $\gamma$  表現無顯著差異，在雞隻中脂肪組織的 PPAR $\gamma$  基因可能不具代表影響產蛋量的關鍵。而有不同產蛋量的 L2 土雞，其卵巢中的 PPAR $\gamma$  基因表現是否有不同，值

得進一步探討。

## 2. 脂質代謝相關基因表現之比較

脂肪酸合成酶 (FAS) 為動物體內脂肪酸合成過程中速率決定酵素之一，並且是家禽脂質新生作用中最為重要的酵素 (Liou and Donaldson, 1973)。在 -OCT (圖 7A) 與 +OCT (圖 7B) 處理下，H 組和 L 組則無任何顯著差異。

脂蛋白脂解酶 (LPL) 是體內脂質代謝的重要酵素，研究證實 LPL 是主要調控雞隻脂質堆積的酵素 (Sato *et al.*, 1999)，並且 LPL 基因主要表現於雞隻脂肪組織中，其表現量顯著高於其他組織，如：腦、心臟、肝臟和卵巢等 (Sato *et al.*, 2010)。實驗結果顯示，於第 6 天 -OCT 處理下 (圖 7C)，H 組的 LPL 基因表現顯著高於 L 組；而在 +OCT 處理下 (圖 7D)，H 組與 L 組則無顯著差異。有研究觀察來亨雞中，母雞血液的 LPL 活性高於公雞，推測是 LPL 水解 VLDL，以提供產蛋時所要的能量 (Chen *et al.*, 2010)，另外產蛋雞大約有 10% VLDL 受到 LPL 水解，足以提供產蛋所需能量 (Salvante *et al.*, 2007)，所以 LPL 對蛋雞而言，是提供能量的重要酵素。對於本實驗 H 組的 LPL 基因表現高於 L 組，推測 LPL 基因是影響產蛋量高低的關鍵基因。

極低密度脂蛋白受體 (VLDLR) 主要與富含三酸甘油酯的脂蛋白 E (apo E) 作結合，像是 VLDL、中密度脂蛋白 (IDL) 和乳糜微粒 (Sakai *et al.*, 1994)。VLDLR 是影響母雞繁殖的關鍵因子之一 (Bujo *et al.*, 1995)。在 -OCT (圖 7E) 與 +OCT (圖 7F) 處理下，H 組和 L 組的 VLDLR 基因表現隨著分化天數增加而提升，但 H 組和 L 組間的 VLDLR 基因表現則無任何顯著差異。

固醇調節區域結合蛋白 (SREBPs) 參與脂質和膽固醇合成代謝的基因調控 (Shimano, 2001)，並且 SREBP-1 在雞隻的脂質生成作用重要的調節因子 (Liu *et al.*, 2010)。在 -OCT 處理下 (圖 8A)，H 組與 L 組的 SREBP-1 基因表現隨著分化天數增加而提升；而在 +OCT 處理下 (圖 8B)，H 組與 L 組的 SREBP-1 基因表現則依

分化天數增加而降低。結果相似於 3T3-L1 前脂肪細胞受到辛酸刺激而抑制脂質堆積，而其分化基因如 PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  和 SREBP-1 等表現也受抑制 ( Han *et al.*, 2002 )，推測雞脂肪細胞的 SREBP-1 基因是受到辛酸影響，而造成分化後表現量降低。不過，辛酸對於牛和豬的前脂肪細胞株卻是具有誘發脂肪細胞分化的功能 ( Nakajima *et al.*, 2003 ; Sato *et al.*, 1996 )，表示不同物種對辛酸有不同的反應機制。H 組與 L 組在 -OCT 與 +OCT 處理下，兩組間的 SREBP-1 基因表現則無顯著差異性。

固醇輔酶 A 去飽和酶 ( SCD ) 是參與合成單元不飽和脂肪酸 ( MUFAs ) 的速率決定酵素 ( Ntambi, 2004 )。在 -OCT 處理下 ( 圖 8C )，H 組與 L 組的 SCD 基因表現依分化天數增加而有降低的趨勢，初代脂肪細胞與脂肪細胞株對於分化有不同的表現，而本實驗使用初代脂肪細胞，不像細胞株分化有一致性的結果 ( Poulos *et al.*, 2010 )。而在 +OCT 處理下 ( 圖 8D )，H 組與 L 組的 SCD 基因表現則依分化天數增加而升高。H 組與 L 組在 -OCT 與 +OCT 處理下，兩組間的 SCD 基因表現則無顯著差異性。

### 3. 脂肪細胞油滴結構相關基因表現之比較

perilipin 為脂肪油滴上的特異蛋白，其功能參與儲存與分解脂肪油滴 ( Fanke *et al.*, 1987 ; Greenberg *et al.*, 1991 )。在黃 ( 2008 ) 論文中，發現 L2 品系脂肪細胞的 perilipin 基因在分化第 2、4 和 6 天，其 +OCT 處理的表現量顯著高於 -OCT 處理，此結果對照於本實驗也有相同發現，H 組與 L 組的 perilipin 基因表現在第 2、4 和 6 天中 +OCT ( 圖 9B ) 處理也顯著高於 -OCT ( 圖 9A ) 處理。而在 -OCT 與 +OCT 處理下，H 組與 L 組的 perilipin 基因表現依分化天數增加而有上升的趨勢。但在 H 組與 L 組的 perilipin 基因表現，在兩組間則無顯著差異。

vimentin 是與油滴結構相關的基因，在家禽發現 vimentin 與脂肪細胞結構與體積有相關 ( Wang *et al.*, 2009 )。vimentin 基因表現在 -OCT ( 圖 9C ) 與 +OCT ( 圖

9D) 處理下，H 組與 L 組間則無顯著差異。

#### 4. 動物能量代謝相關基因表現之比較

脂聯素 (adiponectin) 是由脂肪組織分泌，為脂肪細胞激素 (adipocytokine) 的一種，且具有生理功能的蛋白激素，在脂質生成時會刺激脂聯素的表現，但肥胖狀況下會產生負回饋機制，造成其表現量降低 (Diez and Iglesias, 2003)。在黃 (2008) 論文中，發現 L2 品系的 adiponectin 基因表現在分化第 2 天，其 +OCT 處理的表現量顯著高於 -OCT 處理，對照本實驗 H 組與 L 組在分化第 4 和 6 天 adiponectin 基因，+OCT (圖 10A) 處理的表現量也高於 -OCT (圖 10B) 處理。而在 -OCT 與 +OCT 處理下，H 組與 L 組的 adiponectin 基因表現，在兩組間則無顯著差異。

# 結論

為了提升土雞經濟生產獲利，藉由育種選拔生長快並且飼料效率高，卻造成土雞繁殖性能降低，說明雞隻產蛋能力與體內能量代謝有相當大的關係。當體內有過多能量時，會以三酸甘油酯儲存於脂肪組織中，而近年來脂肪組織不再單純作為能量儲存的功用，脂肪組織具有調控能量代謝的作用，雖然肝臟主要是雞隻脂質合成的場所，但是脂質最終儲存位置是脂肪組織，並且對於脂肪研究探討較少，因此雞隻脂肪組織的能量代謝是值得研究之議題。

本研究使用中興大學選育成的 40 週齡 L2 品系台灣土雞為研究材料，依產蛋數量區分為高產蛋組與低產蛋組。依產蛋數量做區分的目的，因前人研究 B 品系與 L2 品系土雞，證實發現產蛋數較多的 L2 品系比生長速度快、產蛋數低的 B 品系，有較高的前脂肪細胞分化與脂質代謝能力（陳，2004）。推測 L2 品系因應產蛋時需要大量能量供應，有較佳的脂肪分化與脂質代謝表現。由於產蛋能力與脂肪細胞之相關性，進一步以同樣 L2 品系區分產蛋數，探討產蛋數量與脂肪細胞分化能力之相關性。本試驗使用初代脂肪細胞，其優點是初代細胞接近於原生物體內細胞的生理狀態，但初代細胞培養不如細胞株有生長停滯，造成初代脂肪細胞分化程度不一致。

試驗使用 -OCT 和 +OCT 分化培養模式，比較 L2 品系中高產蛋組（H）與低產蛋組（L）的脂肪細胞分化能力。透過 -OCT 和 +OCT 的不同培養環境，提升高產蛋組與低產蛋組脂肪分化能力與基因上的差異，結果顯示，oil-Red O 染色定量、三酸甘油酯含量分析和 GPDH 活性分析在 -OCT 和 +OCT 分化培養模式下，H 與 L 組間無顯著差異。在即時定量聚合酶連鎖反應分析 H 與 L 組間脂肪細胞分化相關基因 mRNA 表現，在 LPL 基因中，培養於 -OCT 下的 H 與 L 組有顯著差異外，其餘 PPAR  $\gamma$ 、FAS、SCD、SREBP1、adiponectin、VLDLR、perilipin 以及 vimentin 等基因，在 -OCT 和 +OCT 分化培養模式下，H 與 L 組間脂肪細胞都無差異。

三酸甘油酯含量分析和 GPDH 活性分析中發現，與 -OCT 分化培養模式相比



下，+OCT 分化培養模式有顯著提升雞隻脂肪細胞的三酸甘油酯含量和 GPDH 活性，和前人實驗相符合（黃，2008），在雞隻脂肪細胞分化相關基因 mRNA 表現，PPAR $\gamma$ 、LPL、perilipin 和 adiponectin 等基因 mRNA 表現在+OCT 與-OCT 分化培養模式的結果都與前人實驗相符合（黃，2008）。培養環境對雞隻脂肪細胞影響極大，是環境造成雞隻脂肪細胞的遺傳差異，還是原本遺傳差異所產生的結果，還需要進一步的探討，所以需慎選培養環境，以觀察雞隻脂肪細胞的變化。

上述結果得知，在 L2 品系中高產蛋與低產蛋組，無法從脂肪細胞分化上得到更多相關資訊，而且實際動物生理環境不像細胞培養的環境單純，動物體可能不單受到脂肪組織調控，也受到外在環境與賀爾蒙等因子調節，導致雞隻產蛋數量上的不同。唯獨在 LPL 基因上發現，H 與 L 組間有差異性，在 Griffin 等人（1987）發現生長中的肉雞，其 LPL 活性較好，表示需要大量能量供應肉雞成長，與本試驗 H 組的 LPL 基因表現高於 L 組，可能 H 組產蛋也需要大量能量去供應，推測 LPL 基因可能是影響產蛋量高低的關鍵因子，還需要進一步的探討。若能從脂肪組織與產蛋能力之間找出關鍵因子，以調控脂肪組織不過度蓄積，且不影響肉品風味，又可達到最高產蛋性能，以提升台灣土雞產業的經濟價值並外銷全球。

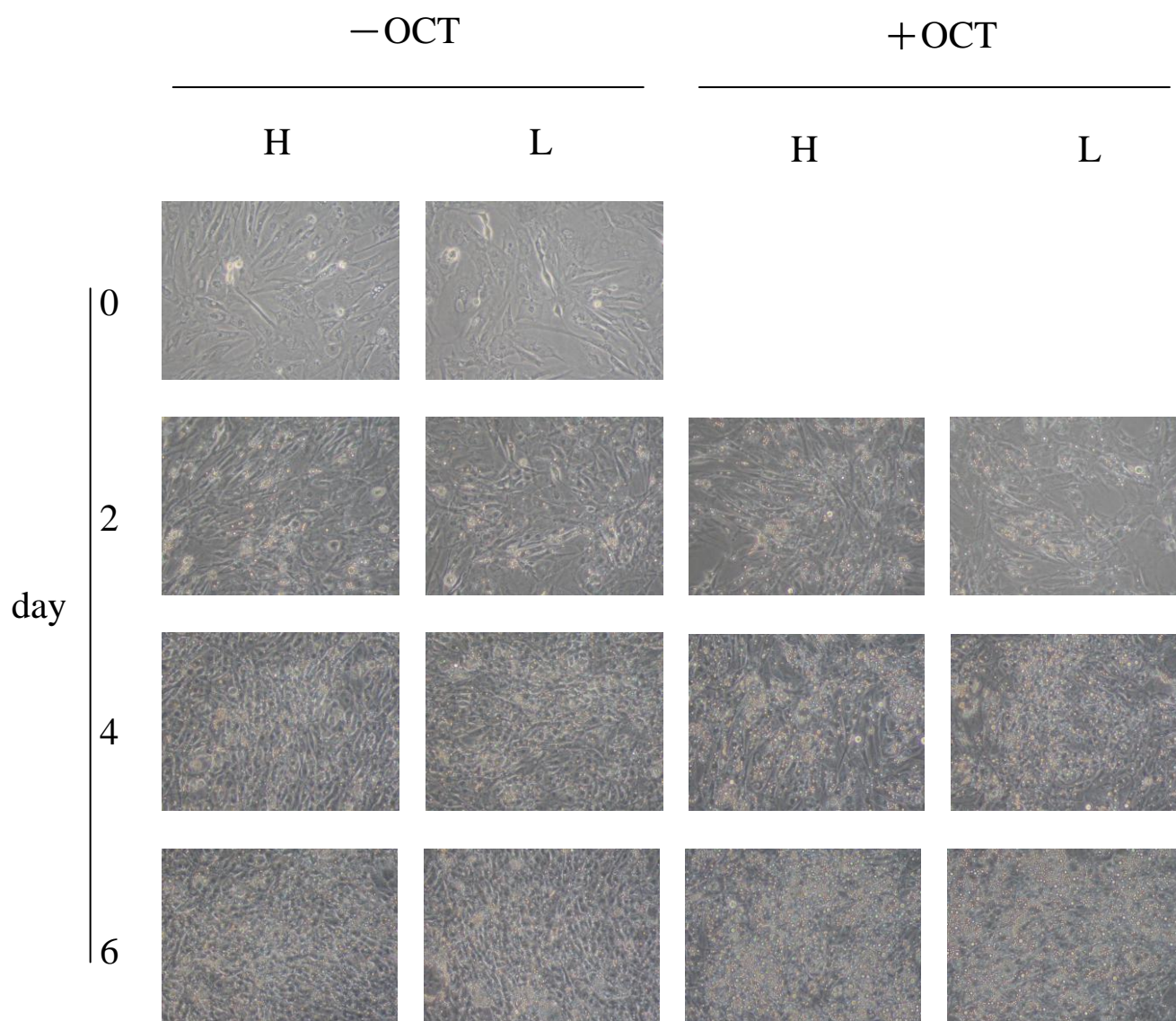
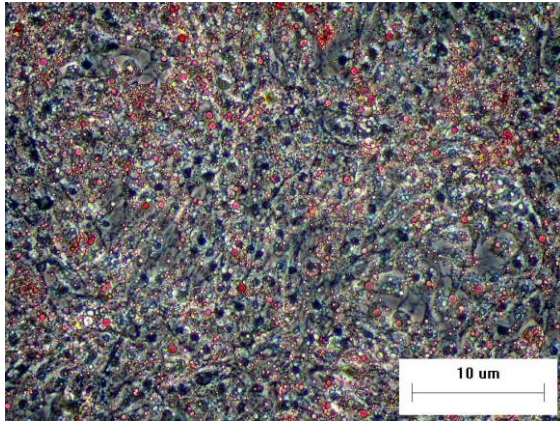


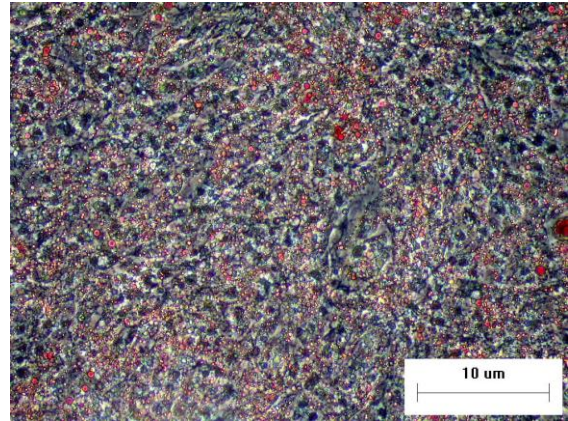
圖 1 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化型態比較。分化後培養於雞血清不含辛酸 (-OCT) 以及含有 1.5 mM 辛酸 (+OCT)。放大倍率皆為 100 倍。

Figure 1 The formation of adipocytes during the differentiation of preadipocytes from L2 line Taiwan country chickens with high (H) and low (L) egg productions (Magnification: 100X).

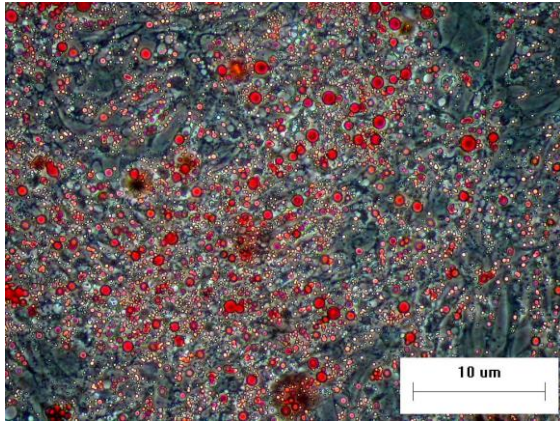
H(-OCT)



L(-OCT)



H(+OCT)



L(+OCT)

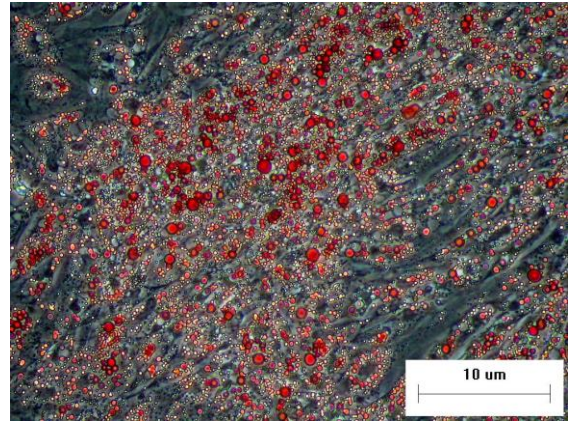


圖 2 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞油滴數量比較。分化後第 6 天培養於雞血清不含辛酸 (-OCT) 以及含有 1.5 mM 辛酸 (+OCT)。利用 oil-Red O 將雞隻前脂肪細胞油滴染色。放大倍率皆為 100 倍。

Figure 2 The lipid droplets of adipocytes during the differentiation of preadipocytes from L2 line Taiwan country chickens with high (H) and low (L) egg productions (Magnification: 100X).

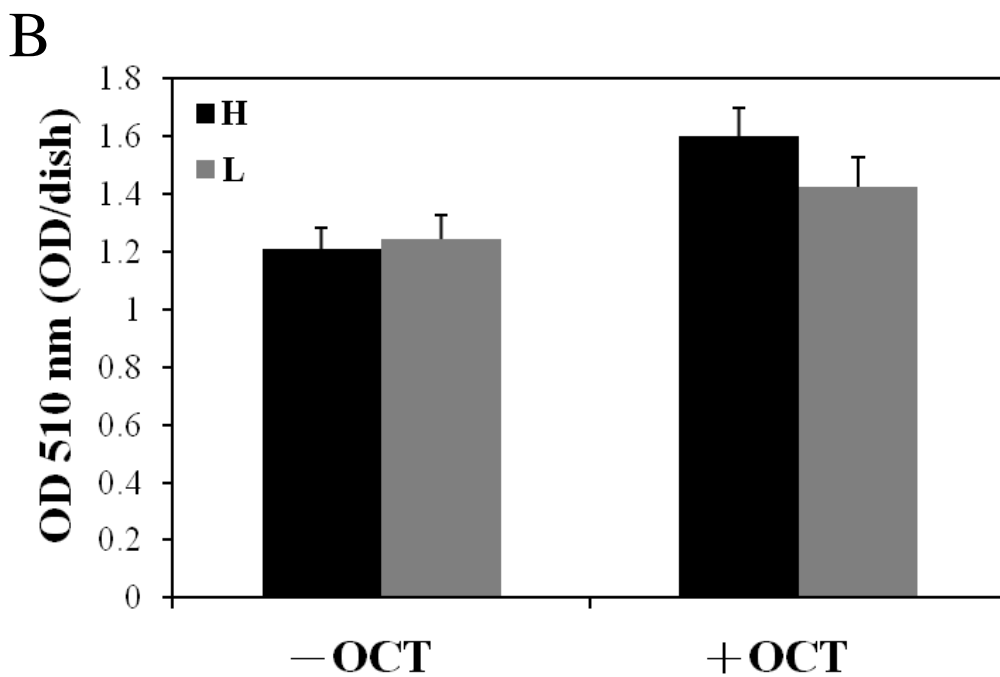
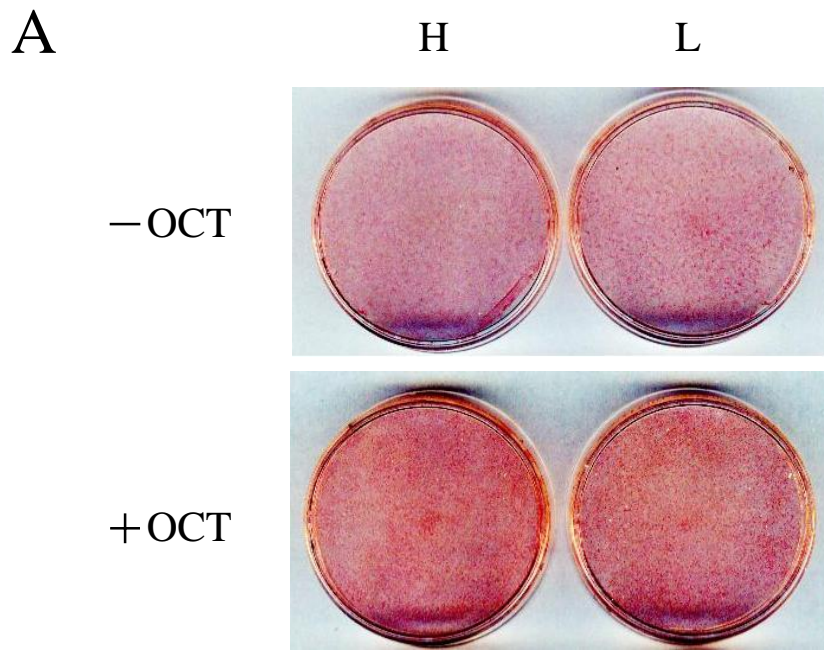


圖 3 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化脂質堆積比較。A：oil-Red O 染色之結果。B：圖 2A 培養皿 oil-Red O 染定量之結果。分化後培養於雞血清不含辛酸 (-OCT) 以及含有 1.5 mM 辛酸 (+OCT)。

Figure 3 Fat accumulation of adipocytes during the differentiation of preadipocytes from L2 line Taiwan country chickens with high (H) and low (L) egg productions. Values are means  $\pm$  SEM, n = 6.

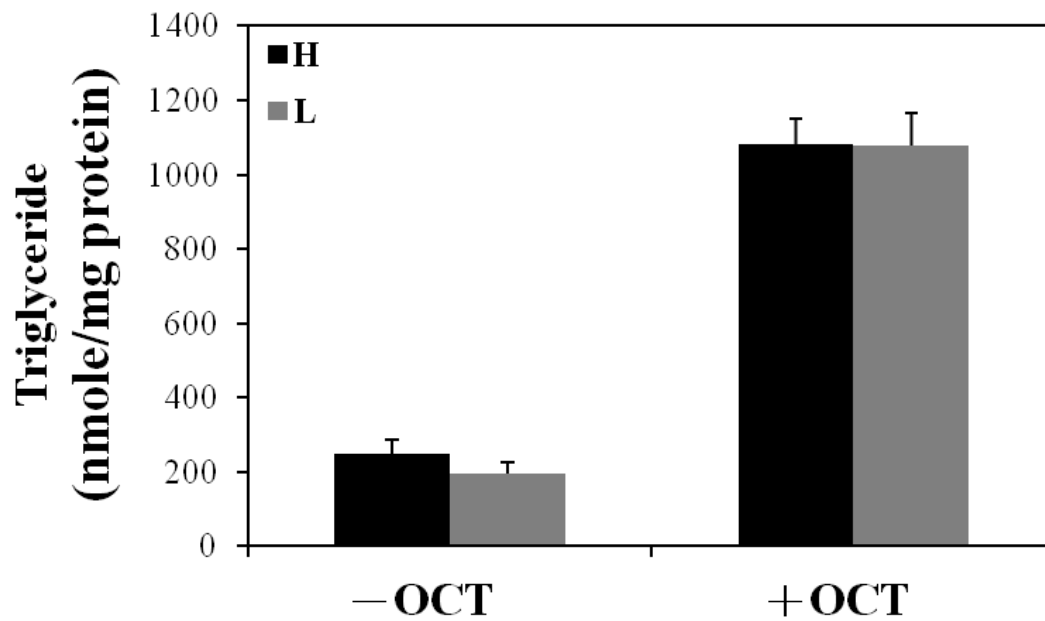


圖 4 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化三酸甘油酯含量比較。分化後培養於雞血清不含辛酸 ( -OCT) 以及含有 1.5 mM 辛酸 ( +OCT) 。

Figure 4 Triglyceride content of adipocytes during the differentiation of preadipocytes from L2 line Taiwan country chickens with high (H) and low (L) egg productions. Values are means  $\pm$  SEM, n = 6.

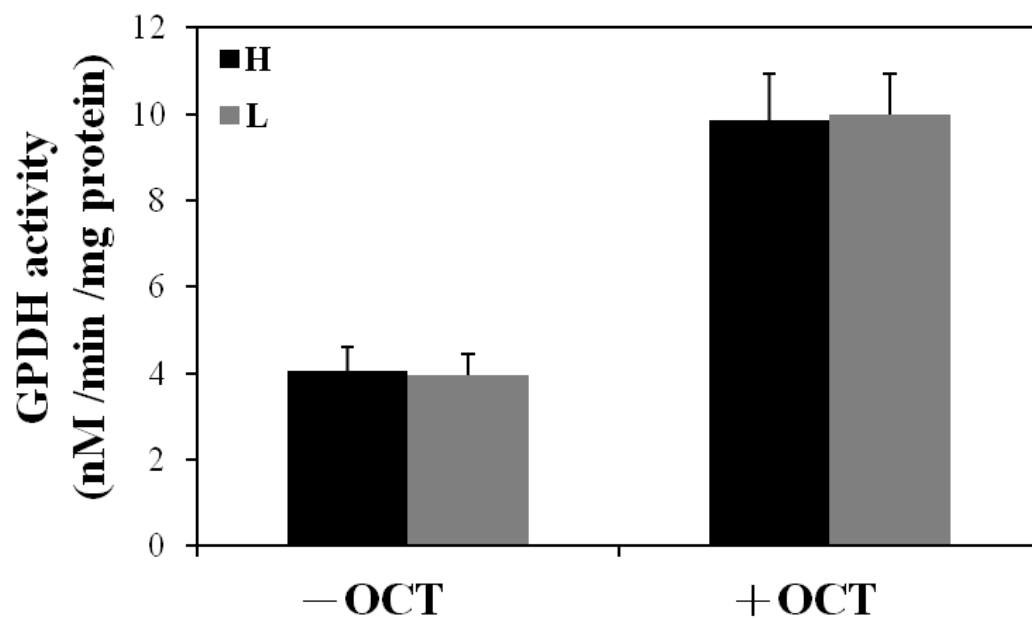


圖 5 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化 GPDH 活性比較。分化後培養於雞血清不含辛酸 ( -OCT) 以及含有 1.5 mM 辛酸 ( +OCT)。

Figure 5 GPDH activities of adipocytes during the differentiation of preadipocytes from L2 line Taiwan country chickens with high (H) and low (L) egg productions. Values are means  $\pm$  SEM, n = 6.

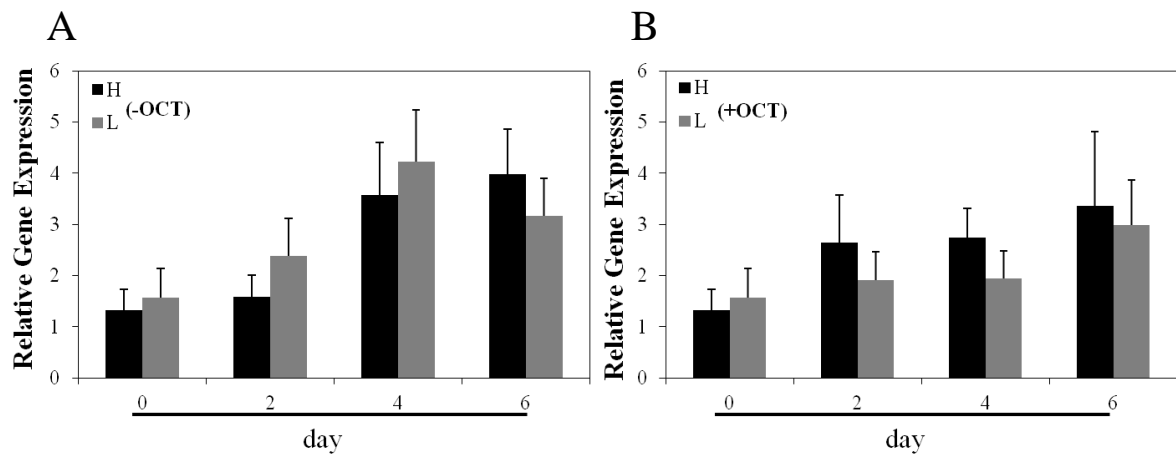


圖 6 高產蛋 ( H ) 與低產蛋 ( L ) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化期間分化相關基因 mRNA 表現比較。40 週齡 L2 品系雞隻，取腹脂 S-V 細胞，分別於誘導分化過程的第 0、2、4 和 6 天，萃取 RNA 經由 real-time PCR 分析。分化培養於 -OCT (A) 和 +OCT (B) 之 PPAR $\gamma$  mRNA 表現。分化後培養於雞血清不含辛酸 ( -OCT ) 以及含有 1.5 mM 辛酸 ( +OCT )。

Figure 6 The mRNA levels of differentiation-related genes during the differentiation of preadipocytes from L2 line Taiwan country chickens with high (H) and low (L) egg productions. Values are means  $\pm$  SEM, n = 6.

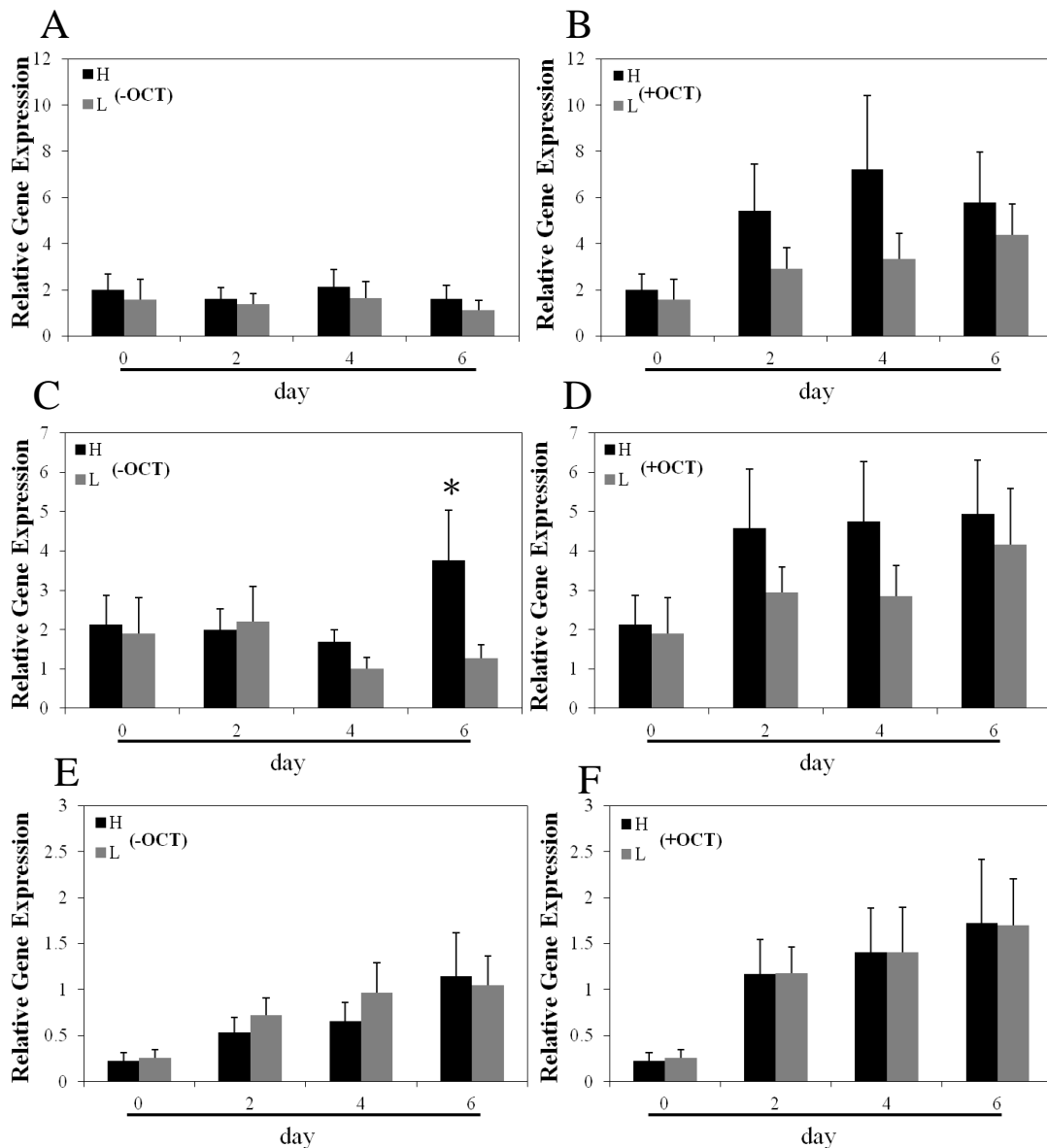


圖 7 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化期間脂質代謝相關基因 mRNA 表現比較 (一)。40 週齡 L2 品系雞隻，取腹脂 S-V 細胞，分別於誘導分化過程的第 0、2、4 和 6 天，萃取 RNA 經由 real-time PCR 分析。分化培養於 -OCT (A) 和 +OCT (B) 之 FAS mRNA 表現。於 -OCT (C) 和 +OCT (D) 之 LPL mRNA 表現。於 -OCT (E) 和 +OCT (F) 之 VLDLR mRNA 表現。分化後培養於雞血清不含辛酸 (-OCT) 以及含有 1.5 mM 辛酸 (+OCT)。

Figure 7 The mRNA levels of lipid metabolism-related genes during the differentiation of preadipocytes from L2 line Taiwan country chickens with high (H) and low (L) egg productions (1). Values are means  $\pm$  SEM, n = 6, \* : P < 0.05 vs. L.



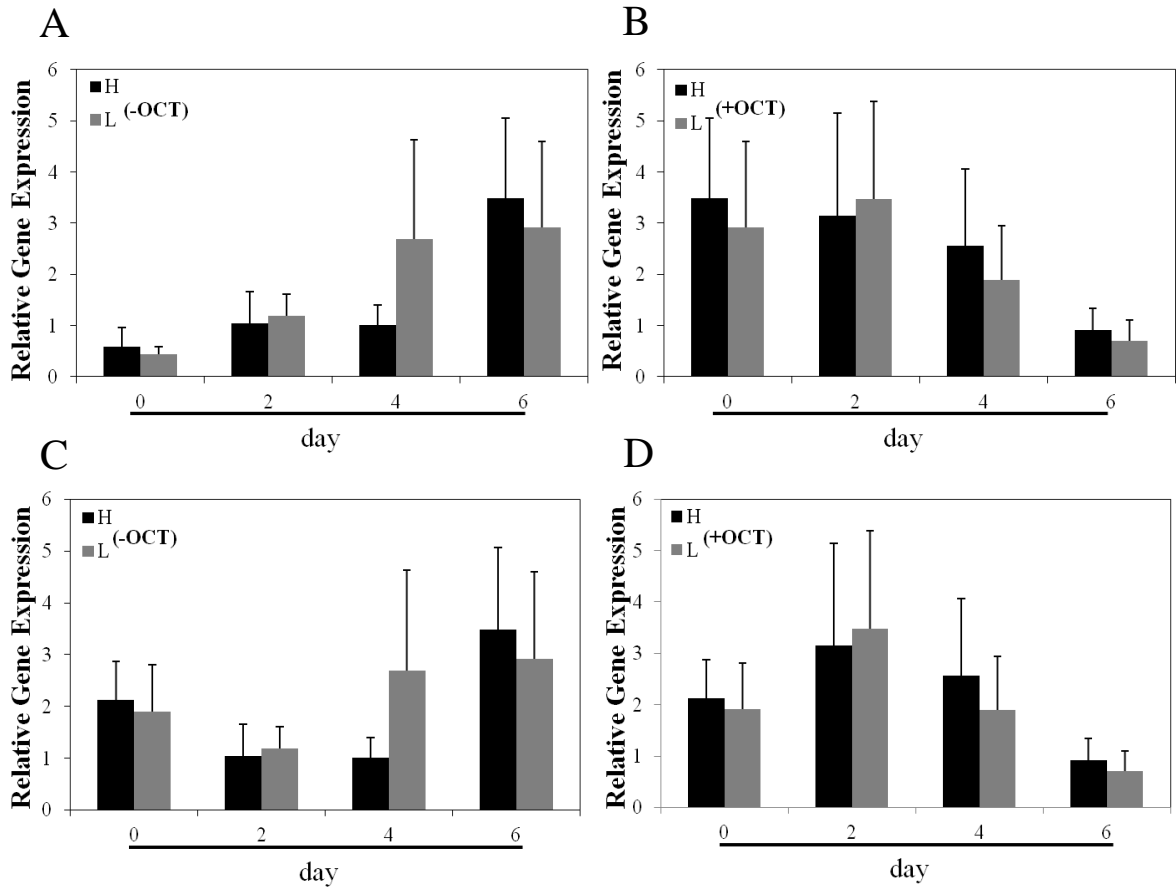


圖 8 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化期間脂質代謝相關基因 mRNA 表現比較 (二)。40 週齡 L2 品系雞隻，取腹脂 S-V 細胞，分別於誘導分化過程的第 0、2、4 和 6 天，萃取 RNA 經由 real-time PCR 分析。分化培養於 -OCT (A) 和 +OCT (B) 之 SREBP-1 mRNA 表現。於 -OCT (C) 和 +OCT (D) 之 SCD mRNA 表現。分化後培養於雞血清不含辛酸 (-OCT) 以及含有 1.5 mM 辛酸 (+OCT)。

Figure 8 The mRNA levels of lipid metabolism-related genes during the differentiation of preadipocytes from L2 line Taiwan country chickens with high (H) and low (L) egg productions (2). Values are means  $\pm$  SEM, n = 6.

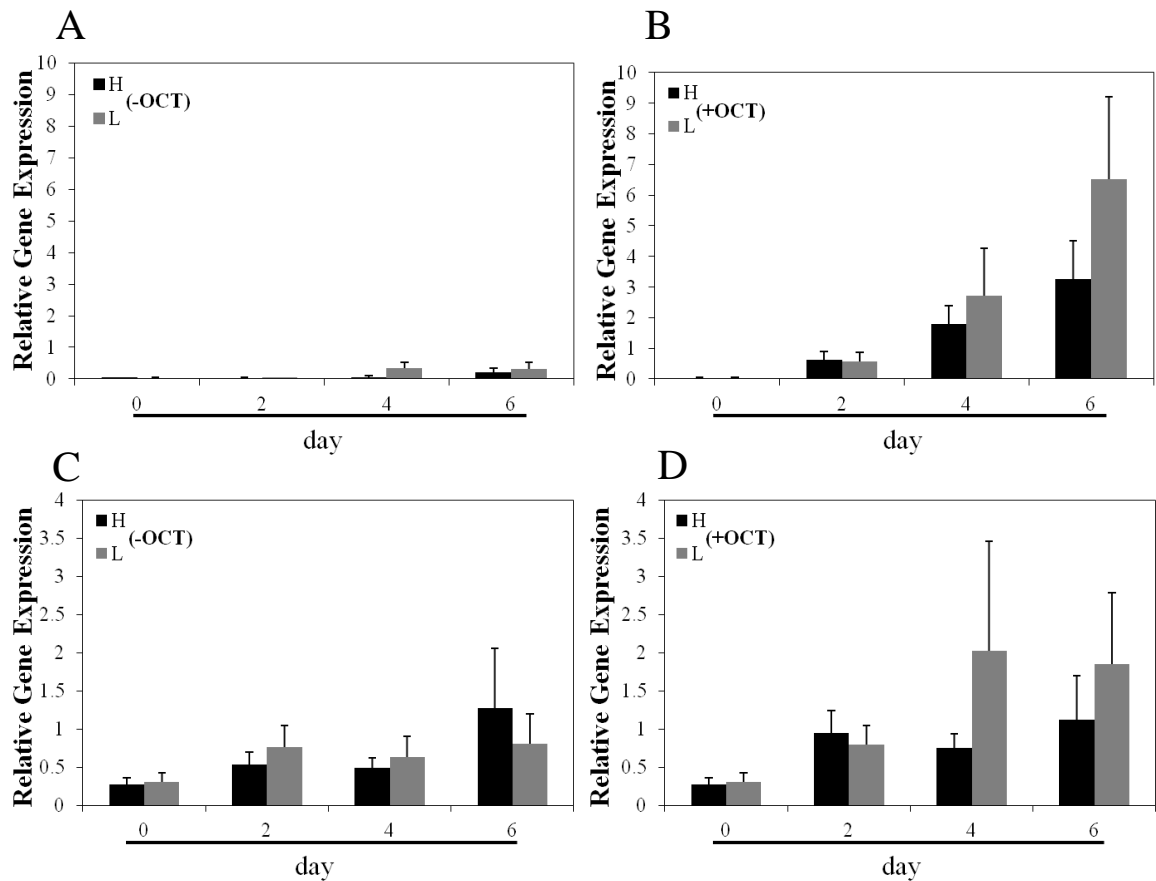


圖 9 高產蛋 (H) 與低產蛋 (L) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化期間油滴結構相關基因 mRNA 表現比較。40 週齡 L2 品系雞隻，取腹脂 S-V 細胞，分別於誘導分化過程的第 0、2、4 和 6 天，萃取 RNA 經由 real-time PCR 分析。分化培養於 -OCT (A) 和 +OCT (B) 之 perilipin mRNA 表現。分化培養於 -OCT (C) 和 +OCT (D) 之 vimentin mRNA 表現。分化後培養於雞血清不含辛酸 (-OCT) 以及含有 1.5 mM 辛酸 (+OCT)。

Figure 9 The mRNA levels of lipid droplet structure-related genes during the differentiation of preadipocytes from L2 line Taiwan country chickens with high (H) and low (L) egg productions. Values are means  $\pm$  SEM, n = 6.

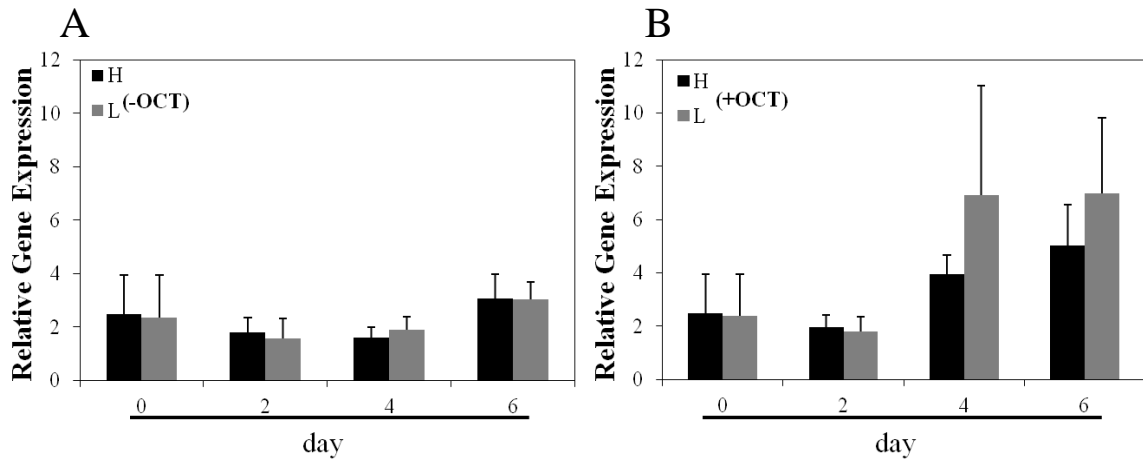


圖 10 高產蛋 ( H ) 與低產蛋 ( L ) L2 品系雞隻前脂肪細胞分化期間脂肪細胞分泌激素 adiponectin mRNA 表現比較。40 週齡 L2 品系雞隻，取腹脂 S-V 細胞，分別於誘導分化過程的第 0、2、4 和 6 天，萃取 RNA 經由 real-time PCR 分析。分化培養於 -OCT ( A ) 和 +OCT ( B ) 之 adiponectin mRNA 表現。分化後培養於雞血清不含辛酸 ( -OCT ) 以及含有 1.5 mM 辛酸 ( +OCT )。

Figure 10 The mRNA levels of energy metabolism-related genes during the differentiation of preadipocytes from L2 line Taiwan country chickens with high (H) and low (L) egg productions. Values are means  $\pm$  SEM, n = 6.

# 參考文獻

- 李淵百、黃暉煌。1988。台灣土雞育種。中國畜牧會誌 17(3-4):29-47。
- 李宜謙。2010。土雞產業之輔導成果及展望。農政與農情 220:62。
- 李淵百。1992。台灣的土雞。國立中興大學。台中。
- 行政院農業委員會。2009。98年台灣農業統計年報。行政院農業委員會。台灣。
- 趙清賢、黃雅梅、陳志峰、何玉珍、蘇夢蘭、李淵百。2005。台灣商用母土雞的產蛋性能。中國畜牧會誌 34(3):151-161。
- 陳奕廷。2004。雞脂質利用與產蛋率的探討。碩士論文。東海大學。台中。
- 黃嵩程。2008。比較不同產蛋能力台灣土雞其脂肪細胞分化之表現。碩士論文。東海大學。台中。
- Ailhaud, G. 1982. Adipose cell differentiation in culture. *Mol. Cell Biochem.* 49:17-31.
- Albright, A. L., and J. S. Stern. 1998. Adipose tissue. In: *Encyclopedia of Sports Medicine and Science*. Online Available: <http://www.sportsci.org/encyc/adipose/adipose.html>. Accessed Dec. 29, 2005.
- Al-Rasheed, N. M., R. S. Chana, R. J. Baines, G. B. Willars, and N. J. Brunskill. 2004. Ligand-independent activation of peroxisome proliferator-activated receptor- gamma by insulin and C-peptide in kidney proximal tubular cells: dependent on phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Biol. Chem.* 279:49747-49754.
- Arita, Y., S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257:79-83.
- Avram, M. M., A. S. Avram, and W. D. James. 2005. Subcutaneous fat in normal and diseased states: 1. Introduction. *J. Am. Acad. Dermatol.* 53:663-670.
- Avram, M. M., A. S. Avram, and W. D. James. 2007. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J. Am. Acad. Dermatol.* 56:472-492.
- Baba, T., A. Iwasawa, O. Doi, F. Suzuki, and T. Nakamura. 2002. Correlating changes in follicular VLDL binding and follicular aromatase activity in the ovulation cycle of the laying hen. *J. Poult. Sci.* 39:100-108.
- Bach, A. C., and V. K. Babayan. 1982. Medium-chain triglycerides: an update. *Am. J. Clin. Nutr.* 36:950-962.
- Barak, Y., M. C. Nelson, E. S. Ong, Y. Z. Jones, P. Ruiz-Lozano, K. R. Chien, A. Koder, and R. M. Evans. 1999. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose

- tissue development. *Mol. Cell* 4:585-595.
- Bennett, M. K., J. M. Lopez, H. B. Sanchez, and T. F. Osborne. 1995. Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways. *J. Biol. Chem.* 270:25578-25583.
- Berg, A. H., T. P. Combs, and P. E. Scherer. 2002. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 13:84-89.
- Bergö, M., G. Olivecrona, and T. Olivecrona. 1996. Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. *Biochem. J.* 313:893-898.
- Bernlohr, D. A., C. W. Angus, M. D. Lane, M. A. Bolanowski, and T. J. J. Kelly. 1984. Expression of specific mRNAs during adipose differentiation: identification of an mRNA encoding a homologue of myelin P2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81:5468-5472.
- Boizard, M., X. Le Liepvre, P. Lemarchand, F. Fougère, P. Ferré, and I. Dugail. 1998. Obesity-related overexpression of fatty-acid synthase gene in adipose tissue involves sterol regulatory element-binding protein transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273:29164-29171.
- Boone, C., F. Grégoire, and C. Remacle. 1999. Regulation of porcine adipogenesis in vitro, as compared with other species. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17:257-267.
- Borron, D. C., L. S. Jensen, M. G. McCartney, and W. M. Britton. 1979. Comparison of lipoprotein lipase activities in chickens and turkeys. *Poult. Sci.* 58:659-662.
- Bouaboula, M., S. Hilairet, J. Marchand, L. Fajas, G. Le Fur, and P. Casellas. 2005. Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. *Eur. J. Pharmacol.* 517:174-181.
- Braissant, O., and W. Wahli. 1998. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology* 139:2748-2754.
- Brasaemle, D.L., B. Rubin, I. A. Harten, J. Gruia-Gray, A. R. Kimmel, and C. Londos. 2000. Perilipin a increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J. Biol Chem.* 275:38486-38493.
- Brasaemle, D. L., V. Subramanian, A. Garcia, A. Marcinkiewicz, and A. Rothenberg. 2009. Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism. *Mol. Cell Biochem.* 326:15-31.
- Brown, D. A. 2001. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr. Biol.* 11:446-449.
- Brown, M. S., and J. L. Goldstein. 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89:331-340.

- Bruun, J. M., A. S. Lihn, C. Verdich, S. B. Pedersen, S. Toubro, A. Astrup, and B. Richelsen. 2003. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines in vivo and in vitro investigations in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: 527-533.
- Bujo, H., T. Yamamoto, K. Hayashi, M. Hermann, J. Nimpf, and W. J. Schneider. 1995. Mutant oocyte low density lipoprotein receptor gene family member causes atherosclerosis and female sterility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:9905-9909.
- Burant, C. F., S. Sreenan, K. Hirano, T. A. Tai, J. Lohmiller, J. Lukens, N. O. Davidson, S. Ross, and R. A. Graves. 1997. Troglitazone action is independent of adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 100:2900-2908.
- Carmen, G. Y., and S. M. Victor. 2006. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal* 18:401-408.
- Carroll, R., and D. L. Severson. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor- alpha ligands inhibit cardiac lipoprotein lipase activity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281:888-894.
- Caspary, W. F. 1992. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 55:299-308.
- Chandran, M., S. A. Phillips, T. Ciarald, and R. R. Henry. 2003. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 26:2442-2450.
- Chapman, A. B., D. M. Knight, B. S. Dieckmann, and G. M. Ringold. 1984. Analysis of gene expression during differentiation of adipogenic cells in culture and hormonal control of the developmental program. *J. Biol. Chem.* 259:15548-15555.
- Chawla, A., and M. A. Lazar. 1994. Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:1786-1790.
- Chen, K. L., T. Y. Lee, C. C. Huang, Y. C. Chen, and P. W. Chiou. 2010. Effect of caponization and exogenous androgens implantation on blood lipid and lipoprotein profile in male chickens. *Poult. Sci.* 89:924-930.
- Chen, S. E., J. P. McMurtry, and R. L. Walzem. 2006. Overfeeding-induced ovarian dysfunction in broiler breeder hens is associated with lipotoxicity. *Poult. Sci.* 85:70-81.
- Cinti, S. 2005. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 73:9-15.
- Cinti, S. 2009. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297:977-986.
- Clarke, S. D., P. Thuillier, R. A. Baillie, and X. Sha. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: a family of lipid-activated transcription factors. *Am. J. Clin. Nutr.* 70:566-571.
- Clarke, S. L., C. E. Robinson, and J. M. Gimble. 1997. CAAT/enhancer binding proteins

- directly modulate transcription from the peroxisome proliferator- activated receptor gamma 2 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240:99-103.
- Cohen, P., M. Miyazaki, N. D. Socci, A. Hagge-Greenberg, W. Liedtke, A. A. Soukas, R. Sharma, L. C. Hudgins, J. M. Ntambi, and J. M. Friedman. 2002. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 297:240-243.
- Cohen, P., and J. M. Friedman. 2004. Leptin and the control of metabolism: role for stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1). *J. Nutr.* 134:2455-2463.
- Considine, R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, C. C. Marco, L. J. McKee, T. L. Bauer, and J. F. Caro. 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. Med.* 334:292-295.
- Cowherd, R. M., R. E. Lyle, and R. E. J. McGehee. 1999. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10:3-10.
- Cui, Y., K. Miyoshi, E. Claudio, U. K. Siebenlist, F. J. Gonzalez, J. Flaws, K. U. Wagner, and L. Hennighausen. 2002. Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPARgamma) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *J. Biol. Chem.* 277:17830-17835.
- Darlington, G. J., S. E. Ross, and O. A. MacDougald. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 273:30057-30060.
- Darmon, M., G. Serrero, A. Rizzino, and G. Sato. 1981. Isolation of myoblastic, fibro-adipogenic, and fibroblastic clonal cell lines from a common precursor and study of their requirements for growth and differentiation. *Exp. Cell Res.* 132:313-327.
- Decuypere, E., P. M. Hocking, K. Tona, O. Onagbesan, V. Bruggeman, E. K. M. Jones, S. Cassy, N. Rideau, S. Metayer, Y. Jegou, J. Putterflam, S. Tesseraud, A. Collin, M. Duclos, J. J. Trevidy, and J. Williams. 2006. Broiler breeder paradox: a project report. *World's Poult. Sci. J.* 62:443-453.
- Degawa-Yamauchi, M., K. A. Moss, J. E. Bovenkerk, S. S. Shankar, C. L. Morrison, C. J. Lelliott, A. Vidal-Puig, R. Jones, and R. V. Considine. 2005. Regulation of adiponectin expression in human adipocytes: effects of adiposity, glucocorticoids, and tumor necrosis factor alpha. *Obes. Res.* 13:662-669.
- Delporte, M. L., S. A. El Mkaem, M. Quisquater, and S. M. Brichard. 2004. Leptin treatment markedly increased plasma adiponectin but barely decreased plasma resistin of ob/ob mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.* 287:446-453.
- Deshaies, Y., A. G elo en, A. Paulin, A. Marette, and L. J. Bukowiecki. 1993. Tissue-specific alterations in lipoprotein lipase activity in the rat after chronic infusion of isoproterenol. *Horm. Metab. Res.* 25:13-16.
- Desvergne, B., and W. Wahli. 1999. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Nuclear Control of Metabolism. *Endocr. Rev.* 20:649-688.

- Díez, J. J., and P. Iglesias. 2003. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur. J. Endocrinol.* 148:293-300.
- Ding, S., and H. J. Mersmann. 2001. Fatty acids modulate porcine adipocyte differentiation and transcripts for transcription factors and adipocyte- characteristic proteins. *J. Nutr. Biochem.* 12:101-108.
- Dipple, K. M., Y. H. Zhang, B. L. Huang, L. L. McCabe, J. Dallongeville, T. Inokuchi, M. Kimura, H. J. Marx, G. O. Roederer, V. Shih, S. Yamaguchi, I. Yoshida, and E. R. McCabe. 2001. Glycerol kinase deficiency: evidence for complexity in a single gene disorder. *Hum. Genet.* 109:55-62.
- Dobrzyn, P., A. Dobrzyn, M. Miyazaki, P. Cohen, E. Asilmaz, D. G. Hardie, J. M. Friedman, and J. M. Ntambi. 2004. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:6409-6414.
- Dridi, S., J. Buyse, E. Decuyper, and M. Taouis. 2005. Potential role of leptin in increase of fatty acid synthase gene expression in chicken liver. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29:646-660.
- Egan, J. J., A. S. Greenberg, M. K. Chang, and C. Londos. 1990. Control of endogenous phosphorylation of the major cAMP-dependent protein kinase substrate in adipocytes by insulin and beta-adrenergic stimulation. *J. Biol. Chem.* 265:18769-18775.
- Fasshauer, M., J. Klein, S. Neumann, M. Eszlinger, and R. Paschke. 2002. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 290:1084-1089.
- Fasshauer, M., S. Kralisch, M. Klier, U. Lossner, M. Bluher, J. Klein, and R. Paschke. 2003. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301:1045-1050.
- Fielding, B. A., and K. N. Frayn. 1998. Lipoprotein lipase and the disposition of dietary fatty acids. *Br. J. Nutr.* 80:495-502.
- Fisher, R. M., S. E. Humphries, and P. J. Talmud. 1997. Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 135:145-159.
- Foretz, M., C. Pacot, I. Dugail, P. Lemarchand, C. Guichard, X. Le Lièvre, C. Berthelie-Lubrano, B. Spiegelman, J. B. Kim, P. Ferré, and F. Foufelle. 1999. ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol. Cell Biol.* 19:3760-3768.
- Franke, W. W., M. Hergt, and C. Grund. 1987. Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules. *Cell* 49:131-141.
- Freshney, R. I. 2005. Culture of animal cells: a manual of basic technique. p175 in



- Primary Culture in Types of Primary Cell Culture. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, New Jersey.
- Friedman, J. M., and J. L. Halaas. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770.
- Friedman, M. I., I. Ramirez, C. R. Bowden, and M. G. Tordoff. 1990. Fuel partitioning and food intake role: for mitochondrial fatty acid transport. *Am. J. Physiol.* 258:216-221.
- Frykman, P. K., M. S. Brown, T. Yamamoto, J. L. Goldstein, and J. Herz. 1995. Normal plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding very low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:8453-8457.
- Garcia de Herreros, A. and M. J. Birnbaum. 1989. The acquisition of increased insulin-responsive hexose transport in 3T3-L1 adipocytes correlates with expression of a novel transporter gene. *J. Biol. Chem.* 264:19994-19999.
- Goldberg, I. J. 1996. Lipoprotein lipase and lipolysis central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J. Lipid Res.* 693-707.
- Goodridge, A. G., and E. G. Ball. 1966. Lipogenesis in the pigeon: in vitro studies. *Am. J. Physiol.* 211:803-808.
- Goodridge, A. G., and E. G. Ball. 1967. Lipogenesis in the pigeon: in vivo studies. *Am. J. Physiol.* 213:245-249.
- Goudriaan, J. R., P. J. Tacken, V. E. Dahlmans, M. J. Gijbels, K. W. van Dijk, L. M. Havekes, and M. C. Jong. 2001. Protection from obesity in mice lacking the VLDL receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1488-1493.
- Green, H., and M. Meuth. 1974a. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3:127-133.
- Green, H., and O. Kehinde. 1974b. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* 1:113-116.
- Green, H., and O. Kehinde. 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 1:19-27.
- Green, H., and O. Kehinde. 1976. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 7:105-113.
- Greenberg, A. S., J. J. Egan, S. A. Wek, N. B. Garty, E. J. Blanchette-Mackie, and C. Londos. 1991. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J. Biol. Chem.* 266:11341-11346.
- Greenberg, A. S., J. J. Egan, S. A. Wek, M. C. J. Moos, C. Londos, and A. R. Kimmel. 1993. Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:12035-

12039.

- Gregoire, F. M., C. M. Smas, and H. S. Sul. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78:783-809.
- Griffin, H., G. Grant, and M. Perry. 1982. Hydrolysis of plasma triacylglycerol-rich lipoproteins from immature and laying hens (*Gallus domesticus*) by lipoprotein lipase in vitro. *Biochem. J.* 206:647-654.
- Griffin, H. D., S. C. Butterwith, and C. Goddard. 1987. Contribution of lipoprotein lipase to differences in fatness between broiler and layer-strain chickens. *Br. Poult. Sci.* 28: 197-206.
- Griffin, H. D., K. Guo, D. Windsor, and S. C. Butterwith. 1992. Adipose tissue lipogenesis and fat deposition in leaner broiler chickens. *J. Nutr.* 122:363-368.
- Guo, W., W. Xie, and J. Han. 2006. Modulation of adipocyte lipogenesis by octanoate: involvement of reactive oxygen species. *Nutr. Metab.* 3:30.
- Haemmerle, G., R. Zimmermann, M. Hayn, C. Theussi, G. Waeg, E. Wagner, W. Sattler, T. M. Magin, E. F. Wagner, and R. Zechner. 2002. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J. Biol. Chem.* 277:4806-4815.
- Halleux, C. M., M. Takahashi, M. L. Delporte, R. Detry, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and S. M. Brichard. 2001. Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 1102-1107.
- Han, J., S. R. Farmer, J. L. Kirkland, B. E. Corkey, R. Yoon, T. Pirtskhalava, Y. Ido, and W. Guo. 2002. Octanoate attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Nutr.* 132:904-910.
- Havel, P. J. 2004. Update on adipocyte hormones: Regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 53:143-151.
- Heimberg, M., I. Weinstein, and M. Kohout. 1969. The effects of glucagon, dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, and concentration of free fatty acid on hepatic lipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 244:5131-5139.
- Hermier, D., M. J. Chapman, and B. Leclercq. 1984. Plasma lipoprotein profile in fasted and refed chickens of two strains selected for high or low adiposity. *J. Nutr.* 114: 1112-1121.
- Hermier, D. 1997. Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. *J. Nutr.* 127:805-808.
- Hiragun, A., M. Sato, and H. Mitsui. 1980. Establishment of a clonal cell line that differentiates into adipose cells in vitro. *In Vitro* 16:685-693.
- Holloway, C. T., and P. W. Holloway. 1975. Stearyl coenzyme A desaturase activity in mouse liver microsomes of varying lipid composition. *Arch. Biochem. Biophys.* 167: 496-504.

- Horton, J. D., J. L. Goldstein, and M. S. Brown. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109:1125-1131.
- Hotta, K., T. Funahashi, N. L. Bodkin, H. K. Ortmeyer, Y. Arita, B. C. Hansen, and Y. Matsuzawa. 2001. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50:1126-1133.
- Houseknecht, K. L., B. M. Cole, and P. J. Steele. 2002. Peroxisome proliferator- activated receptor gamma (PPARgamma) and its ligands: a review. *Domest. Anim. Endocrinol.* 22:1-23.
- Hu, E., P. Liang, and B. M. Spiegelman. 1996. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* 271:10697-10703.
- Ibrahimi, A., Z. Sfeir, H. Magharaie, E. Z. Amri, P. Grimaldi, and N. A. Abumrad. 1996. Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:2646-2651.
- Ingber, D. E. 1993. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 104:613-627.
- Jeffcoat, R., and A. T. James. 1978. The control of stearoyl-CoA desaturase by dietary linoleic acid. *FEBS Lett.* 85:114-118.
- Jequier, E., and L. Tappy. 1999. Regulation of body weight in humans. *Physiol. Rev.* 79: 451-480.
- Jones, B. H., M. K. Standridge, and N. Moustaid. 1997. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* 138:1512-1519.
- Kadowaki, T., and T. Yamauchi. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 26:439-451.
- Karbowska, J., and Z. Kochan. 2005. Effect of DHEA on endocrine functions of adipose tissue, the involvement of PPAR $\gamma$ . *Biochem. Pharmacol.* 70:249-257.
- Kim, J. B., and B. M. Spiegelman. 1996. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 10: 1096-1107.
- Kim, K. H., K. Lee, Y. S. Moon, and H. S. Sul. 2001. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 276: 11252-11256.
- Kim, S., and N. Moustaid-Moussa. 2000. Secretory endocrine and autocrine/ paracrine function of the adipocyte. *J. Nutr.* 130:3110-3115.
- Klaus, S. 1997. Functional differentiation of white and brown adipocytes. *Bioessays.* 19: 215-223.
- Kohn, A. D., S. A. Summers, M. J. Birnbaum, and R. A. Roth. 1996. Expression of a

- constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* 271:31372-31378.
- Kolaczynski, J. W., J. P. Ohannesian, R. V. Considine, C. C. Marco, and J. F. Caro. 1996. Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:4162-4165.
- Kozak, L. P., and J. T. Jensen. 1974. Genetic and developmental control of multiple forms of L-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 249:7775-7781.
- Krogdahi, A. 1985. Digestion and absorption of lipids in poultry. *J. Nutr.* 115:675-685.
- Kubota, N., Y. Terauchi, T. Yamauchi, T. Kubota, M. Moroi, J. Matsui, K. Eto, T. Yamashita, J. Kamon, H. Satoh, W. Yano, P. Froguel, R. Nagai, S. Kimura, T. Kadowaki, and T. Noda. 2002. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J. Biol. Chem.* 277:25863-25866.
- Lakshmanan, M. R., C. M. Nepokroeff, and J. W. Porter. 1972. Control of the synthesis of fatty-acid synthetase in rat liver by insulin, glucagon, and adenosine 3':5' cyclic monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69:3516-3519.
- Lasekan, J. B., J. Rivera, M. D. Hirvonen, R. E. Keeseey, and D. M. Ney. 1992. Energy expenditure in rats maintained with intravenous or intragastric infusion of total parenteral nutrition solutions containing medium- or long-chain triglyceride emulsions. *J. Nutr.* 122:1483-1492.
- Lee, S. H., A. Dobrzyn, P. Dobrzyn, S. M. Rahman, M. Miyazaki, and J. M. Ntambi. 2004. Lack of stearoyl-CoA desaturase 1 upregulates basal thermogenesis but causes hypothermia in a cold environment. *J. Lipid Res.* 45:1674-1682.
- Lefebvre, A.M., I. Chen, P. Desreumaux, J. Najib, J. C. Fruchart, K. Geboes, M. Briggs, R. Heyman, and J. Auwerx. 1998. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APC-Min/+ mice. *Nat. Med.* 4:1053-1057.
- Lei, T., W. Xie, J. Han, B. E. Corkey, J. A. Hamilton, and W. Guo. 2004. Medium-chain fatty acids attenuate agonist-stimulated lipolysis, mimicking the effects of starvation. *Obes. Res.* 12:599-611.
- Leveille, G. A. 1969. In vitro hepatic lipogenesis in the hen and chick. *Comp. Biochem. Physiol.* 28:431-435.
- Levin, N., C. Nelson, A. Gurney, R. Vandlen, and F. de Sauvage. 1996. Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 93:1726-1730.
- Levine, T. B. 2008. Metabolic syndrome and cardiovascular disease; Peroxisome proliferators activated receptors. Elsevier p283-p300.
- Lieber, J. G., and R. M. Evans. 1996. Disruption of the vimentin intermediate filament system during adipose conversion of 3T3-L1 cells inhibits lipid droplet accumulation.

- J. Cell Sci. 109:3047-3058.
- Liou, G. I., and W. E. Donaldson. 1973. Relative activities of acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthetase in chick liver: effects of dietary fat. *Can. J. Biochem.* 51:1029-1033.
- Liu, S., Y. Wang, L. Wang, N. Wang, Y. Li, and H. Li. 2010. Transdifferentiation of fibroblasts into adipocyte-like cells by chicken adipogenic transcription factors. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 156:501-508.
- Londos, C., D. L. Brasaemle, C. J. Schultz, J. P. Segrest, and A. R. Kimmel. 1999. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10:51-58.
- Maeda, K., K. Okubo, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and K. Matsubara. 1996. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys. Res. Commun.* 221:286-289.
- Maeda, N., M. Takahashi, T. Funahashi, S. Kihara, H. Nishizawa, K. Kishida, H. Nagaretani, M. Matsuda, R. Komuro, N. Ouchi, H. Kuriyama, K. Hotta, T. Nakamura, I. Shimomura, and Y. Matsuzawa. 2001. PPAR $\gamma$  ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50:2094-2099.
- Maeda, N., I. Shimomura, K. Kishida, H. Nishizawa, M. Matsuda, H. Nagaretani, N. Furuyama, H. Kondo, M. Takahashi, Y. Arita, R. Komuro, N. Ouchi, S. Kihara, Y. Tochino, K. Okutomi, M. Horie, S. Takeda, T. Aoyama, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 2002. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* 8:731-737.
- Maffei, M., J. Halaas, E. Ravussin, R. E. Pratley, G. H. Lee, Y. Zhang, H. Fei, S. Kim, R. Lallone, and S. Ranganathan. 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight- reduced subjects. *Nat. Med.* 1: 1155-1161.
- Magaña, M. M., and T. F. Osborne. 1996. Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. *J. Biol. Chem.* 271:32689-32694.
- Mandard, S., M. Muller, and S. Kersten. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol. Life Sci.* 61:393-416.
- Masoro, E. J. 1965. Mechanisms related to the homeostatic regulation of lipogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 131:199-206.
- Martin, D. B., M. G. Horning, and P. R. Vagelos. 1961. Fatty acid synthesis in adipose tissue. I. Purification and properties of a long chain fatty acid-synthesizing system. *J. Biol. Chem.* 236:663-668.

- Matsubara, Y., K. Sato, H. Ishii, and Y. Akiba. 2005. Changes in mRNA expression of regulatory factors involved in adipocyte differentiation during fatty acid induced adipogenesis in chicken. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 141:108-115.
- Mead, J. R., S. A. Irvine, and D. F. Ramji. 2002. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J. Mol. Med.* 80:753-769.
- Michalik L., J. Auwerx, J. P. Berger, V. K. Chatterjee, C. K. Glass, F. J. Gonzalez, P. A. Grimaldi, T. Kadowaki, M. A. Lazar, S. O'Rahilly, C. N. Palmer, J. Plutzky, J. K. Reddy, B. M. Spiegelman, B. Staels, and W. Wahli. 2006. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* 58: 726-741.
- Miyazaki, M., Y. C. Kim, and J. M. Ntambi. 2001. A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. *J. Lipid Res.* 42:1018-1024.
- Mohamed-Ali, V., J. H. Pinkney, and S. W. Coppack. 1998. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 22:1145-1158.
- Morrison, R. F., and S. R. Farmer. 2000. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J. Nutr.* 130:3116-3121.
- Moustaïd, N., and H. S. Sul. 1991. Regulation of expression of the fatty acid synthase gene in 3T3-L1 cells by differentiation and triiodothyronin. *J. Biol. Chem.* 266:18550- 18554.
- Murphy, D. J., and J. Vance. 1999. Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem. Sci.* 24:109-115.
- Murray, I., J. Kohl, and K. Cianflone. 1999. Acylation-stimulating protein (ASP): structure–function determinants of cell surface binding and triacylglycerol synthetic activity. *Biochem.* 342:41-48.
- Nadal-Ginard, B. 1978. Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA synthesis. *Cell* 15:855-864.
- Nagai, S., C. Shimizu, M. Umetsu, S. Taniguchi, M. Endo, H. Miyoshi, N. Yoshioka, M. Kubo, and T. Koike. 2004. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor responsive element within the murine perilipin gene. *Endocrinology* 145:2346-2356.
- Nakano, Y., T. Tobe, N. H. Choi-Miura, T. Mazda, and M. Tomita. 1996. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J. Biochem.* 120:803-812.
- Nakajima, I., S. Muroya, R. Tanabe, and K. Chikuni. 2002. Extracellular matrix development during differentiation into adipocytes with a unique increase in type V

- and VI collagen. *Biol. Cell* 94:197-203.
- Nakajima, I., S. Muroya, and K. Chikuni. 2003. Growth arrest by octanoate is required for porcine preadipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309:702-708.
- Ng, C. W., W. J. Poznanski, M. Borowiecki, and G. Reimer. 1971. Differences in growth in vitro of adipose cells from normal and obese patients. *Nature* 231:445.
- Niemeier, A., M. Gåfvels, J. Heeren, N. Meyer, B. Angelin, and U. Beisiegel. 1996. VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. *J. Lipid Res.* 37:1733-1742.
- Nishino, N., Y. Tamori, and M. Kasuga. 2007. Insulin efficiently stores triglycerides in adipocytes by inhibiting lipolysis and repressing PGC-1 $\alpha$  Induction. *Kobe J. Med. Sci.* 53:99-106.
- Novakofski, J. 2004. Adipogenesis: usefulness of in vitro and in vivo experimental models. *J. Anim. Sci.* 82:905-915.
- Noyan, A., W. J. Lossow, N. Brot, and I. L. Chaikoff. 1964. Pathway and form of absorption of palmitic acid in the chicken. *J. Lipid Res.* 5:538-541.
- Ntambi, J. M. 1999. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J. Lipid Res.* 40:1549-1558.
- Ntambi, J. M., and K. Young-Cheul. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.* 130:3122-3126.
- Ntambi, J. M., and M. Miyazaki. 2004. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog. Lipid Res.* 43:91-104.
- O'Hea, E. K., and G. A. Leveille. 1969. Lipid biosynthesis and transport in the domestic chick (*Gallus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 30:149-159.
- Ong, J. M., and P. A. Kern. 1989. The role of glucose and glycosylation in the regulation of lipoprotein lipase synthesis and secretion in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 264:3177-3182.
- O'Shea Alvarez, M. S. 1991. 3T3 cells in adipocytic conversion. *Arch. Invest. Med.* 22:235-244.
- Otto, T. C., and M. D. Lane. 2005. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40:229-242.
- Ouchi, N., S. Kihara, Y. Arita, K. Maeda, H. Kuriyama, Y. Okamoto, K. Hotta, M. Nishida, M. Takahashi, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 1999. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100:2473-2476.
- Raclot, T., C. Holm, and D. Langin. 2001. A role for hormone-sensitive lipase in the selective mobilization of adipose tissue fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1532:88-96.

- Rahmouni, K., and W. G. Haynes. 2001. Leptin signaling pathways in the central nervous system interactions between neuropeptide Y and melanocortins. *Bioessays*. 23:1095-1099.
- Papamandjaris, A. A., D. E. MacDougall, and P. J. Jones. 1998. Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sci*. 62:1203-1215.
- Park, S. K., S. Y. Oh, M. Y. Lee, S. Yoon, K. S. Kim, and J. W. Kim. 2004. CCAAT/enhancer binding protein and nuclear factor-Y regulate adiponectin gene expression in adipose tissue. *Diabetes* 53:2757-2766.
- Parsons, W. J., V. Ramkumar, and G. L. Stiles. 1988. Isobutylmethylxanthine stimulates adenylate cyclase by blocking the inhibitory regulatory protein, Gi. *Mol. Pharmacol*. 34:37-41.
- Paulauskis, J. D., and H. S. Sul. 1988. Cloning and expression of mouse fatty acid synthase and other specific mRNAs. Developmental and hormonal regulation in 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem*. 263:7049-7054.
- Paulauskis, J. D., and H. S. Sul. 1989. Hormonal regulation of mouse fatty acid synthase gene transcription in liver. *J. Biol. Chem*. 264:574-577.
- Pearce, J. 1977. Some differences between avian and mammalian biochemistry. *Int. J. Biochem*. 8:269-275.
- Pearce, J. 1983. Fatty acid synthesis in liver and adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc*. 42:263-271.
- Pelleymounter, M. A., M. J. Cullen, M. B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone, and F. Collins. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269:540-543.
- Podolin, P. L., and M. B. Prystowsky. 1991. The kinetics of vimentin RNA and protein expression in interleukin 2-stimulated T lymphocytes. *J. Biol. Chem*. 266:5870-5875.
- Poulos, S. P., M. V. Dodson, and G. J. Hausman. 2010. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Exp. Biol. Med*. 235:1185-1193.
- Reshef, L., Y. Olswang, H. Cassuto, B. Blum, C. M. Croniger, S. C. Kalhan, S. M. Tilghman, and R. W. Hanson. 2003. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem*. 278:30413-30416.
- Richards, M. P., S. M. Poch, C. N. Coon, R. W. Rosebrough, C. M. Ashwell, and J. P. McMurtry. 2003. Feed restriction significantly alters lipogenic gene expression in broiler breeder chickens. *J. Nutr*. 133:707-715.
- Robinson, F. E., J. L. Wilson, M. W. Yu, G. M. Fasenko, and R. T. Hardin. 1993. The relationship between body weight body reproductive efficiency in meat-type chicken. *Poult. Sci*. 72:912-922.



- Robinson, F. E., and J. L. Wilson. 1996. Reproductive failure in overweight male and female broiler breeders. *Anim. Feed Sci. Technol.* 58:143-150.
- Robinson, J., and E. A. Newsholme. 1969. The effects of dietary conditions and glycerol concentration on glycerol uptake by rat liver and kidney-cortex slices. *Biochem. J.* 112:449-453.
- Rosen, E. D., C. J. Walkey, P. Puigserver, and B. M. Spiegelman. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 14:1293-1307.
- Rosen, E. D., P. Sarraf, A. E. Troy, G. Bradwin, K. Moore, D. S. Milstone, B. M. Spiegelman, and R. M. Mortensen. 1999. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 4:611-617.
- Rubin, C.S., A. Hirsch, C. Fung, and O. M. Rosen. 1978. Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* 253:7570-7578.
- Russell, C. D., M. R. Ricci, R. E. Brolin, E. Magill, and S. K. Fried. 2001. Regulation of the leptin content of obese human adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280:399-404.
- Saadoun, A., and B. Leclercq. 1983. Comparison of in vivo fatty acid synthesis of the genetically lean and fat chickens. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 75:641-644.
- Saadoun, A., and B. Leclercq. 1986. In vivo lipogenesis in genetically fat and lean chickens of various ages. *Physiol. B.* 83:607-611.
- Saely, C. H., K. Geiger, and H. Drexel. 2012. Brown versus white adipose tissue: A mini-review. *Gerontology* 58:15-23.
- Sakai, J., A. Hoshino, S. Takahashi, Y. Miura, H. Ishii, H. Suzuki, Y. Kawarabayasi, and T. Yamamoto. 1994. Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene. *J. Biol. Chem.* 269:2173-2182.
- Salvante, K.G., G. Lin, R. L. Walzem, and T. D. Williams. 2007. Characterization of very-low density lipoprotein particle diameter dynamics in relation to egg production in a passerine bird. *J. Exp. Biol.* 210:1064-1074.
- Sanz, M., C. J. Lopez-Bote, D. Menoyo, and J. M. Bautista. 2000. Abdominal fat deposition and fatty acid synthesis are lower and beta-oxidation is higher in broiler chickens fed diets containing unsaturated rather than saturated fat. *J. Nutr.* 130:3034-3037.
- Sato, K., N. Nakanishi, and M. Mitsumoto. 1996. Culture conditions supporting adipose conversion of stromal-vascular cells from bovine intramuscular adipose tissues. *J. Vet. Med. Sci.* 58:1073-1078.
- Sato, K., Y. Akiba, Y. Chida, and K. Takahashi. 1999. Lipoprotein hydrolysis and fat accumulation in chicken adipose tissues are reduced by chronic administration of

- lipoprotein lipase monoclonal antibodies. *Poult. Sci.* 78:1286-1291.
- Sato, K., K. Fukao, Y. Seki, and Y. Akiba. 2004. Expression of the chicken peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  gene is influenced by aging, nutrition, and agonist administration. *Poult. Sci.* 83:1342-1347.
- Sato, K., H. Abe, T. Kono, M. Yamazaki, K. Nakashima, T. Kamada, and Y. Akiba. 2009. Changes in peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression of chicken abdominal adipose tissue with different age, sex and genotype. *Anim. Sci. J.* 80:322-327.
- Sato, K., H. S. Seol, and T. Kamada. 2010. Tissue distribution of lipase genes related to triglyceride metabolism in laying hens (*Gallus gallus*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 155:62-66.
- Sato, M., K. Sato, and M. Furuse. 2008. Change in hepatic and plasma bile acid contents and its regulatory gene expression in the chicken embryo. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 150:344-347.
- Scherer, P. E., S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini, and H. F. Lodish. 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270:26746-26749.
- Schizas, A. A., J. A. Cremen, E. Larson, and R. O'Brien. 1967. Medium-chain triglycerides--use in food preparation. *J. Am. Diet. Assoc.* 51:228-232.
- Schoonjans, K., J. Peinado-Onsurbe, A. M. Lefebvre, R. A. Heyman, M. Briggs, S. Deeb, B. Staels, and J. Auwerx. 1996. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPARE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15:5336-5348.
- Scott, R. E., D. L. Florine, J. J. J. Wille, and K. Yun. 1982. Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G1 phase of the cell cycle: GD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79:845-849.
- Seaton, T. B., S. L. Welle, M. K. Warenko, and R. G. Campbell. 1986. Thermic effect of medium-chain and long-chain triglycerides in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 44:630-634.
- Semenkovich, C. F., M. Wims, L. Noe, J. Etienne, and L. Chan. 1989. Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. *J. Biol. Chem.* 264:9030-9038.
- Semenkovich, C. F., T. Coleman, and R. Goforth. 1993. Physiologic concentrations of glucose regulate fatty acid synthase activity in HepG2 cells by mediating fatty acid synthase mRNA stability. *J. Biol. Chem.* 268:6961-6970.
- Shibasaki, M., H. Bujo, K. Takahashi, K. Murakami, H. Unoki, and Y. Saito. 2006. Catalytically inactive lipoprotein lipase overexpression increases insulin sensitivity in mice. *Horm. Metab. Res.* 38:491-496.
- Shimada, M., H. Shimano, T. Gotoda, K. Yamamoto, M. Kawamura, T. Inaba, Y. Yazaki,

- and N. Yamada. 1993. Overexpression of human lipoprotein lipase in transgenic mice. Resistance to diet-induced hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* 268:17924-17929.
- Shimano, H., J. D. Horton, R. E. Hammer, I. Shimomura, M. S. Brown, and J. L. Goldstein. 1996. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J. Clin. Invest.* 98: 1575-1584.
- Shimano, H., J. D. Horton, I. Shimomura, R. E. Hammer, M. S. Brown, and J. L. Goldstein. 1997. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.* 99:846-854.
- Shimano, H. 2001. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog. Lipid Res.* 40:439-452.
- Siuta-Mangano, P., D. R. Janero, and M. D. Lane. 1982. Association and assembly of triglyceride and phospholipid with glycosylated and unglycosylated apoproteins of very low density lipoprotein in the intact liver cell. *J. Biol. Chem.* 257:11463-11467.
- Sklan, D., A. Geva, P. Budowski, and S. Hurwitz. 1984. Intestinal absorption and plasma transport of lipids in chicks and rats. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 78:507-510.
- Smas, C. M., and H. S. Sul. 1995. Control of adipocyte differentiation. *Biochem. J.* 309: 697-710.
- Smyth, M. J., R. L. Spark, and W. Wharton. 1993. Proadipocyte cell lines: models of cellular proliferation and differentiation. *J. Cell Sci.* 106:1-9.
- Speake, B. K., A. M. Murray, and R. C. Noble. 1998. Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. *Prog. Lipid Res.* 37:1-32.
- Spiegelman, B. M., M. Frank, and H. Green. 1983. Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development. *J. Biol. Chem.* 258:10083-10089.
- Spiegelman, B. M. 1998. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47:507-514.
- Steinberg, D., M. Vaughan, and S. Margolis. 1961. Studies of triglyceride biosynthesis in homogenates of adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 236:1631-1635.
- Steppan, C. M., S. T. Bailey, S. Bhat, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahima, and M. A. Lazar. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-312.
- Sun, J. M., M. P. Richards, R. W. Rosebrough, C. M. Ashwell, J. P. McMurtry, and C. N. Coon. 2006. The relationship of body composition, feed intake, and metabolic

- hormones for broiler breeder females. *Poult. Sci.* 85:1173-1184.
- Sztalryd, C., G. Xu, H. Dorward, J. T. Tansey, J. A. Contreras, A. R. Kimmel, and C. Londos. 2003. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J. Cell Biol.* 161:1093-1103.
- Tachibana, S., K. Sato, T. Takahashi, and Y. Akiba. 2002. Octanoate inhibits very low-density lipoprotein secretion in primary cultures of chicken hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 132:621-627.
- Takahashi, S., Y. Kawarabayasi, T. Nakai, J. Sakai, and T. Yamamoto. 1992. Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:9252-9256.
- Takeuchi, H., S. Sekine, K. Kojima, and T. Aoyama. 2008. The application of medium-chain fatty acids edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 1:320-323.
- Tamori, Y., J. Masugi, N. Nishino, and M. Kasuga. 2002. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 51:2045-2055.
- Tang, Q. Q., and M. D. Lane. 1999. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev.* 13:2231-2241.
- Tang, Q. Q., T. C. Otto, and M. D. Lane. 2003. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:44-49.
- Tansey, J. T., C. Sztalryd, J. Gruia-Gray, D. L. J. V. Roush, Zee, O. Gavrilova, M. L. Reitman, C. X. Deng, C. Li, A. R. Kimmel, and C. Londos. 2001. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 6494-6499.
- Tansey, J. T., C. Sztalryd, E. M. Hlavin, A. R. Kimmel, and C. Londos. 2004. The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB Life* 56: 379-385.
- Teichert-Kuliszewska, K., B. S. Hamilton, D. A. Roncari, J. L. Kirkland, W. S. Gillon, M. Deitel, and C. H. Hollenberg. 1996. Increasing vimentin expression associated with differentiation of human and rat preadipocytes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 3:108-113.
- Tontonoz, P., J. B. Kim, R. A. Graves, and B. M. Spiegelman. 1993. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol. Cell Biol.* 13:4753-4759.
- Tontonoz, P., E. Hu, R. A. Graves, A. I. Budavari, and B. M. Spiegelman. 1994. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 8:1224-1234.

- Tontonoz, P., R. A. Graves, A. I. Budavari, H. Erdjument-Bromage, M. Lui, E. Hu, P. Tempst, and B. M. Spiegelman. 1994. Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res.* 22:5628-5634.
- Trayhurn, P., and J. H. Beattie. 2001. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nutr. Soc.* 60:329-339.
- Vidal-Puig, A. J., R. V. Considine, M. Jimenez-Liñan, A. Werman, W. J. Pories, J. F. Caro, and J. S. Flier. 1997. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* 99:2416-2422.
- Walzem, R. L., P. A. Davis, and R. J. Hansen. 1994. Overfeeding increase very low density lipoprotein diameter and causes the appearance of a unique lipoprotein particle in association with failed yolk deposition. *J. Lipid Res.* 35:1354-1366.
- Walzem, R. L., R. J. Hansen, D. L. Williams, and R. L. Hamilton. 1999. Estrogen induction of VLDL assembly in egg-laying hens. *J. Nutr.* 129:467-472.
- Wang, D., and H. S. Sul. 1998. Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 273:25410-25426.
- Wang, D., N. Wang, N. Li, and H. Li. 2009. Identification of differentially expressed proteins in adipose tissue of divergently selected broilers. *Poult. Sci.* 88:2285-2292.
- Wang, H., and R. H. Eckel. 2009. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297:271-288.
- Wang, S. M., T. H. Fong, S. Y. Hsu, C. L. Chien, and J. C. Wu. 1997. Reorganization of a novel vimentin-associated protein in 3T3-L1 cells during adipose conversion. *J. Cell Biochem.* 67:84-91.
- Wang, Y., Y. Mu, H. Li, N. Ding, Q. Wang, Y. Wang, S. Wang, and N. Wang. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene: a key regulator of adipocyte differentiation in chickens. *Poult. Sci.* 87:226-232.
- Weiner, F. R., P. J. Smith, S. Wertheimer, and C. S. Rubin. 1991. Regulation of gene expression by insulin and tumor necrosis factor alpha in 3T3-L1 cells. Modulation of the transcription of genes encoding acyl-CoA synthetase and stearoyl-CoA desaturase-1. *J. Biol. Chem.* 266:23525-23528.
- Weinstock, P. H., C. L. Bisgaier, K. Aalto-Setälä, H. Radner, R. Ramakrishnan, S. Levak-Frank, A. D. Essenburg, R. Zechner, and J. L. Breslow. 1995. Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. Mild hypertriglyceridemia with impaired very low density lipoprotein clearance in heterozygotes. *J. Clin. Invest.* 96:2555-2568.
- Weiss, F. G., and M. L. Scott. 1979. Effects of dietary fiber, fat and total energy upon

- plasma cholesterol and other parameters in chickens. *J. Nutr.* 109:693-701.
- Williams, T. D. 2005. Mechanisms underlying the costs of egg production. *Bioscience* 55:39-48.
- Willnow, T. E. 1999. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J. Mol. Med.* 77:306-315.
- Wu, Z., Y. Xie, N. L. Bucher, and S. R. Farmer. 1995. Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes Dev.* 9:2350-2363.
- Wu, Z., N. L. Bucher, and S. R. Farmer. 1996. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol. Cell Biol.* 16:4128-4136.
- Zehner, Z. E., and B. M. Paterson. 1983. Characterization of the chicken vimentin gene: single copy gene producing multiple mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80: 911-915.
- Zhu, Y., C. Qi, J. R. Korenberg, X. N. Chen, D. Noya, M. S. Rao, and J. K. Reddy. 1995. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:7921-7925.
- Zimmermann, R., J. G. Strauss, G. Haemmerle, G. Schoiswohi, R. Birner-Gruenberger, M. Riederer, A. Lass, G. Neuberger, F. Eisenhaber, A. Hermetter, and R. Zechner. 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306:1383-1386.
- Zimmermann, R., A. Lass, G. Haemmerle, and R. Zechner. 2009. Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1791:494-500.

# **Comparative studies in preadipocyte differentiation between Taiwan country chickens with different egg productions**

Jheng-Yu Huang

## **ABSTRACT**

Egg production is an energy-intensive process in chickens. Adipose tissues are known to regulate energy balance in animals. Therefore, development of adipose tissues may play roles in animal proliferation and reproduction. Two selected lines of Taiwan country chickens originated from a common population with relatively high (L2 line) and low (B line) egg yields were used in a previous study that indicated the correlation between laying performance and the differentiation capacity, triglyceride accumulation, and lipolysis activity of adipocytes. This study aimed to further investigate the possible correlation between preadipocyte differentiation and egg production efficiency within L2 line chickens. The L2 chickens were divided into high ( $108.7 \pm 0.5$ ) and low ( $71.3 \pm 0.5$ ) egg production groups according to their egg productions at age of 40 weeks. Preadipocytes collected from abdominal adipose tissues were cultured and induced to differentiate. Oil-Red O staining, triglyceride content and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity assays were performed on day 6 after the induction of differentiation. The results of oil-Red O staining, triglyceride content and GPDH activity assays showed that no significant differences between adipocytes from chickens with high and low egg productions. The mRNA expression of adipocyte differentiation-related genes were measured using real-time polymerase chain reaction. The results revealed that the lipoprotein lipase (LPL) mRNA level was higher in high egg production than those in low egg production group. However, no significant differences in the mRNA levels of peroxisome proliferator-activated receptor ( $\text{PPAR}\gamma$ ), fatty acid synthase (FAS), stearoyl CoA desaturase (SCD), sterol regulatory element binding protein1 (SREBP1), adiponectin, very low density lipoprotein receptor (VLDLR), perilipin, and vimentin were found between these two groups. Taken together, differentiation capacity of preadipocytes may not relate to egg productions in L2 line chickens. However the significance of LPL expression difference between L2 chickens with high and low egg productions required further study.

Keywords: Adipocytes, Differentiation, Laying performance, Taiwan Country Chicken