

# 读书报告

于若梦

2017.4.2

IF: 6.541

# Long-chain acyl-CoA synthetase 6 regulates lipid synthesis and mitochondrial oxidative capacity in human and rat skeletal muscle

Bruno G. Teodoro<sup>1,2</sup>, Igor H. Sampaio<sup>1</sup>, Lucas H. M. Bomfim<sup>3</sup>, André L. Queiroz<sup>3</sup>, Leonardo R. Silveira<sup>3</sup>, Anderson O. Souza<sup>1</sup>, Anna M. A. P. Fernandes<sup>4</sup>, Marcos N. Eberlin<sup>4</sup>, Tai-Yu Huang<sup>5</sup>, Donghai Zheng<sup>5,7</sup>, P. Darrell Neufer<sup>6,7</sup>, Ronald N. Cortright<sup>5,6,7</sup> and Luciane C. Alberici<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Physics and Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil*

<sup>2</sup>*Federal Institute of Education Science and Technology of São Paulo, Sertãozinho, São Paulo, Brazil*

<sup>3</sup>*Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology*

<sup>4</sup>*Thomson Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil*

<sup>5</sup>*Department of Kinesiology*

<sup>6</sup>*Department of Physiology*

<sup>7</sup>*East Carolina Diabetes and Obesity Institute, East Carolina University, Greenville, NC, USA*

# 目录

1

前言

2

实验方法

3

实验结果



01

前言

表1 不同类型的ACSL在组织中的分布情况

名称	分布	作用
ACSL1	脂肪组织，肝和心脏	提供用于TAG合成的酰基辅酶A
ACSL3	脑，骨骼肌和睾丸	介导脂肪生成转录控制的作用
ACSL4	肝，脑和肾上腺	线粒体 $\beta$ 氧化
ACSL5	肝脏，十二指肠粘膜和棕色脂肪组织	激活长链脂肪酸用于合成细胞脂质
ACSL6	脑和骨骼肌	?

# 02

实验方法

---



## 表2 本实验用的基因及其作用

名称	功能
PGC1 $\alpha$	在线粒体合成、调节适应性产热。骨骼肌纤维类型转换等过程发挥重要作用
$\beta$ -actin	PCR常用的内参
RPL39	催化蛋白质合成
UCP3	在能量稳态和底物氧化中起重要作用
UCP2	调节机体能量代谢、调控活性氧
DGAT1	在泌乳、小肠脂肪吸收、脂蛋白组装和脂肪形成中发挥着重要的功能
DGAT2	参与肠道中脂肪吸收。血浆中甘油三酯浓度的调节、脂肪细胞中脂质的储存、肌肉中能量代谢以及体脂的合成
ACSL3	介导脂肪生成转录控制的作用
ACSL6	?



# 用Wistar大鼠进行体内研究设计



(i) 48小时禁食；

(ii) 48小时禁食后，急性口服脂质摄取80%饱和脂肪（温热黄油）和10%葡萄糖（0.2ml/体重kg）（在摄入后2,4,11和24小时处死动物）；

(iii) 含有60%脂肪的自由饮食6周；

(iv) 有氧运动训练：以60%的最大速度能力（先前通过厌氧最大容量测试确定），1小时/天，5天/周，持续6周。

# 人骨骼肌细胞的分离和培养

新鲜肌肉组织

去除脂肪和结蹄组织

成肌细胞

传代培养 (DMEM培养基)

成肌细胞 (80%)

AmaxaR (Lonza) 电穿孔技术

转染实验

# H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在大鼠骨骼肌细胞中的产生

## ◇ 转染后,

1.在37°C下在2ml含有5.6mM葡萄糖, 2 μ M Amplex超红和0.3U/ml HRP的Krebs-Henseleit培养基中保持细胞 (5 × 10<sup>5</sup>) 40分钟。

2.在5分钟, 20分钟和40分钟时, 收集等分试样 (200 μ l) 的培养基。

3.在563 / 581nm激发/发射下测定荧光强度。

# 大鼠骨骼肌细胞中的柠檬酸合酶活性

细胞

液氮下冷冻并融化两次以破坏线粒体并释放柠檬酸合酶

匀浆

12000×g, 4°C离心10分钟

含有蛋白质的上清液

Bradford测定

柠檬酸合酶活性

# 03

实验结果

---

# 营养调控实验

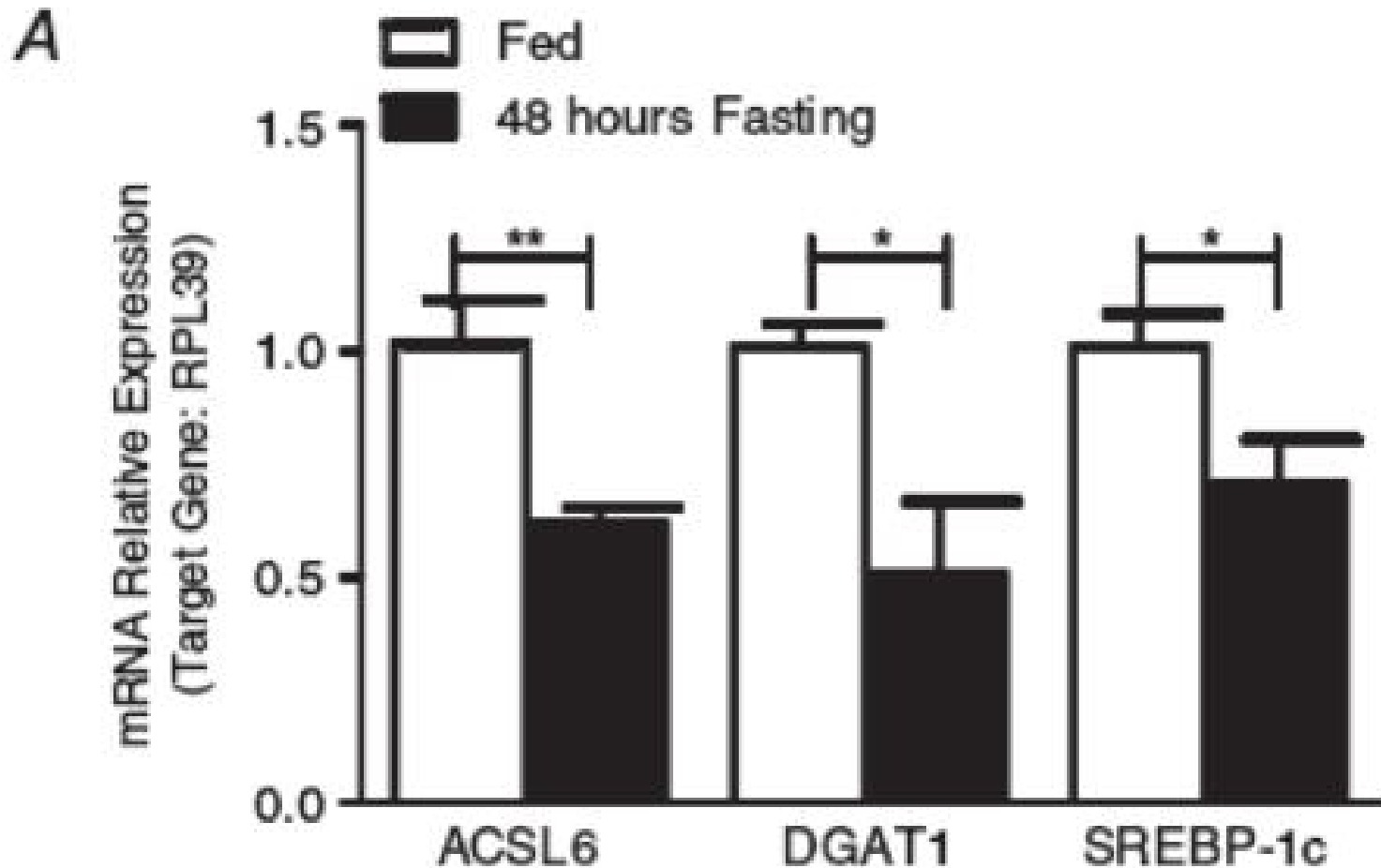


图1A 禁食48小时后ACSL6mRNA减少40%

# 营养调控实验

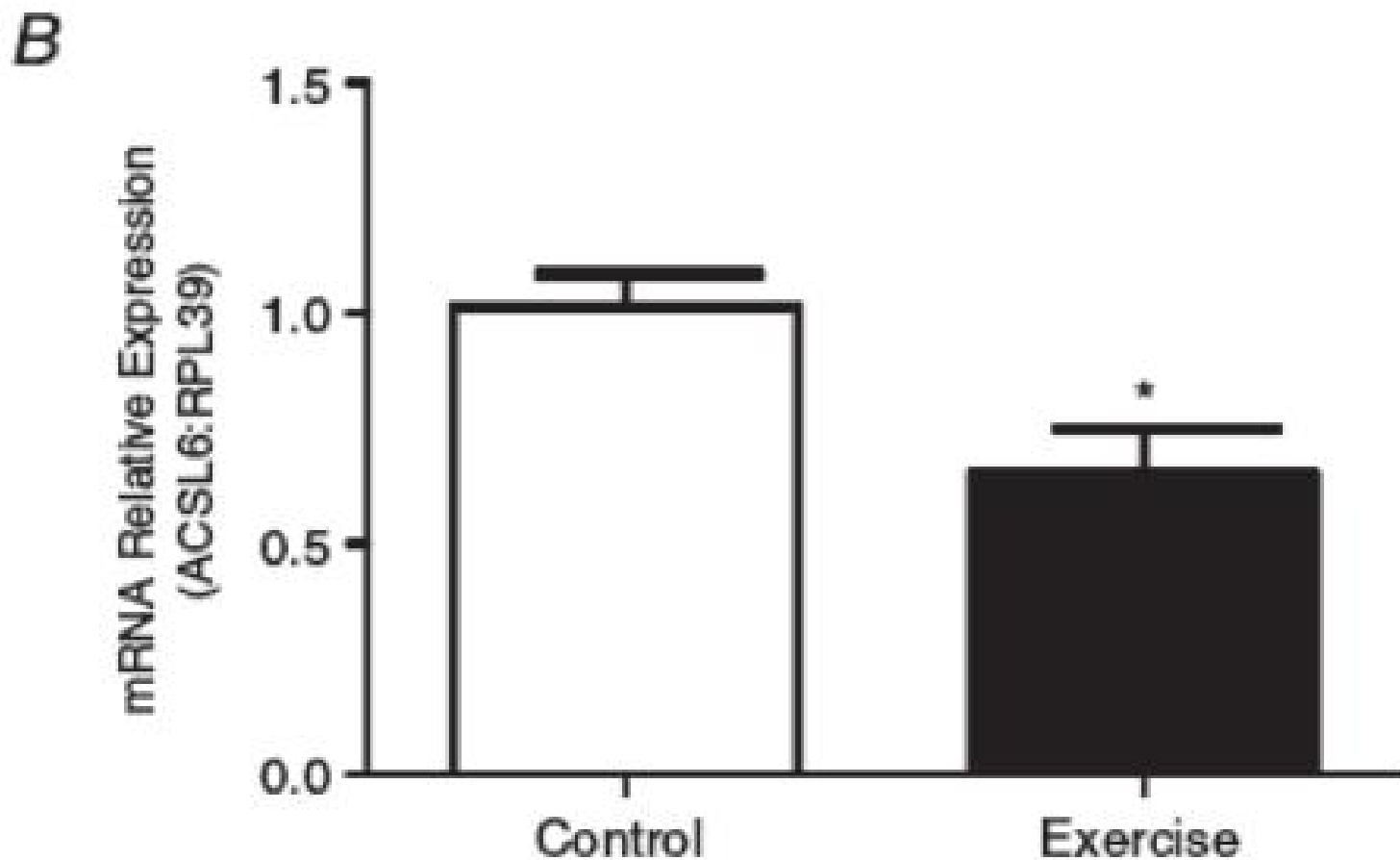


图1B 在有氧运动后，ACSL6m RNA减少35%

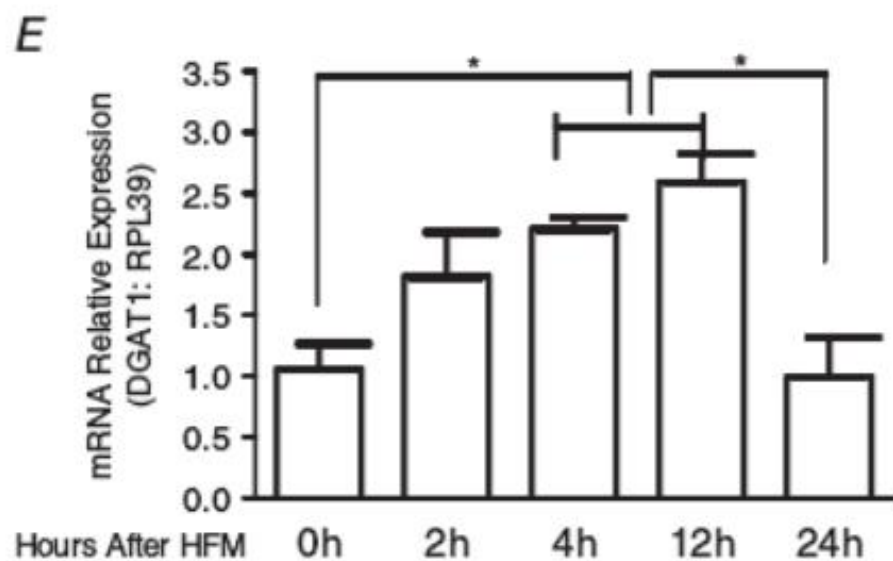
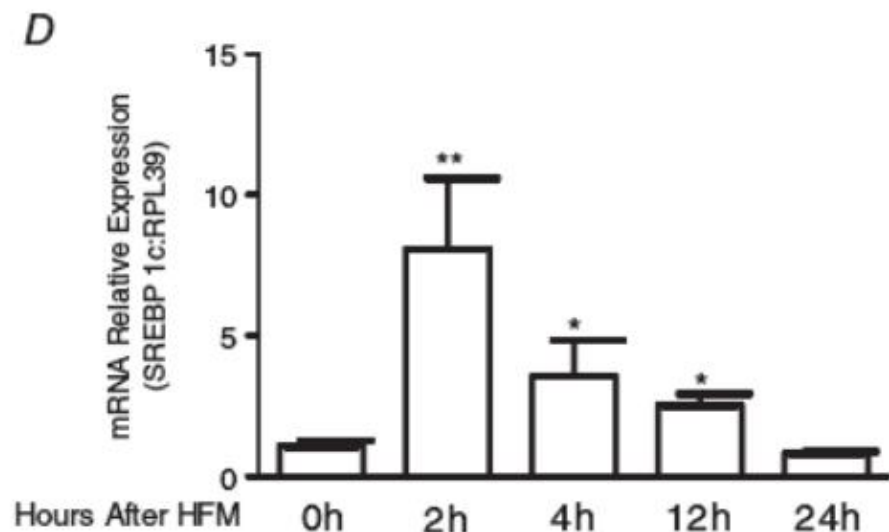
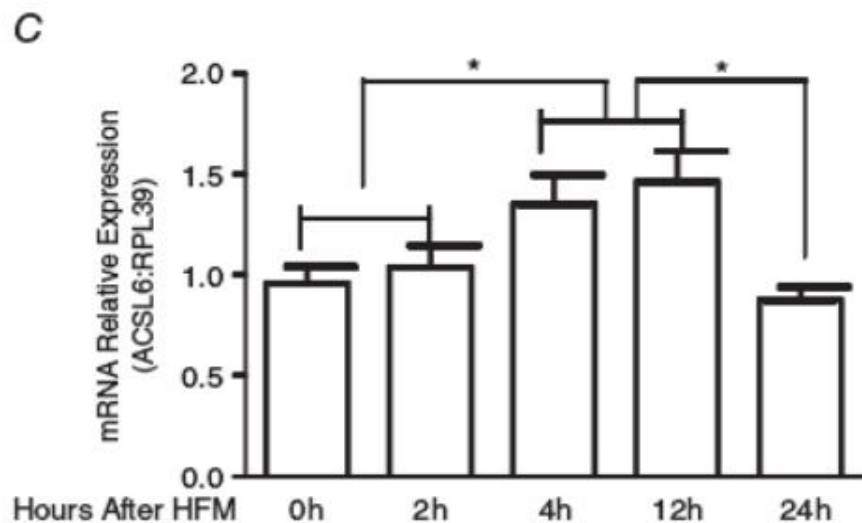


图1 C D E  
空腹48小时后 (A)  
(n = 5), 空腹肌肉  
ACSL6, SREBP-1c和  
DGAT1m RNA表达。



F

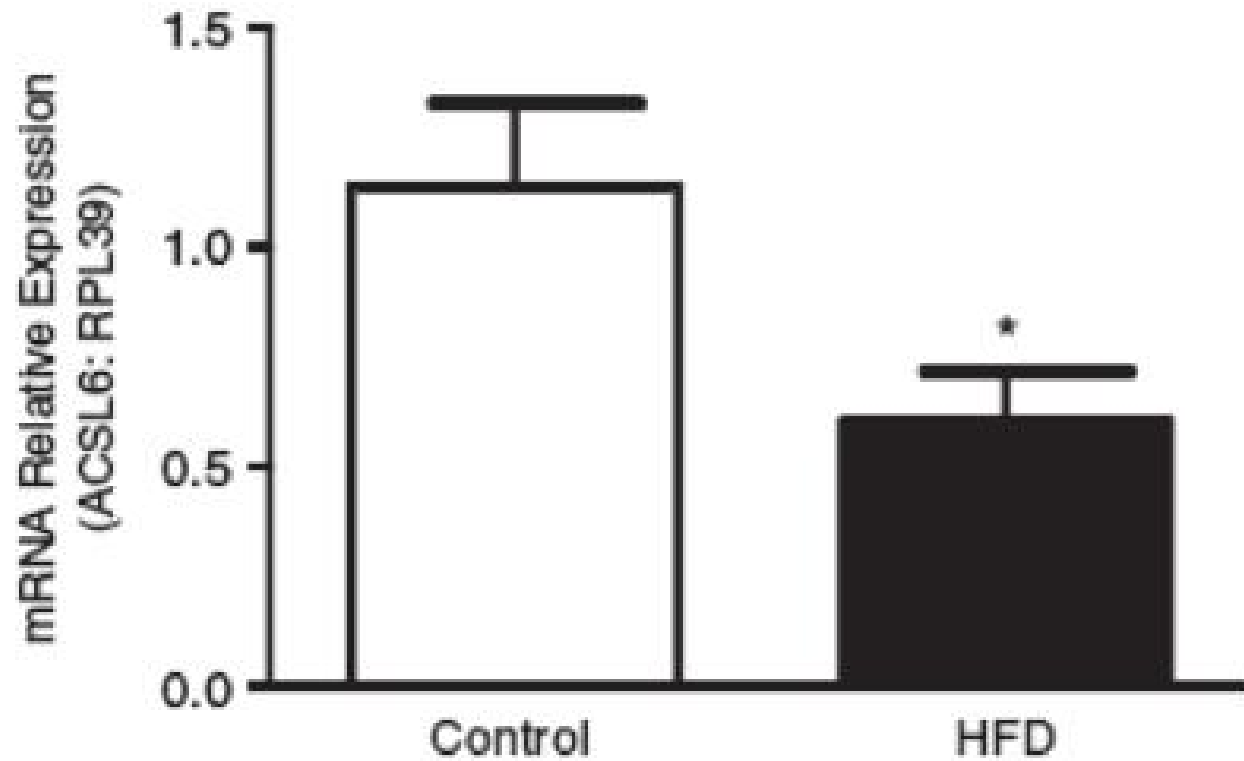


图1F 慢性HFD (60%脂质, 6周)

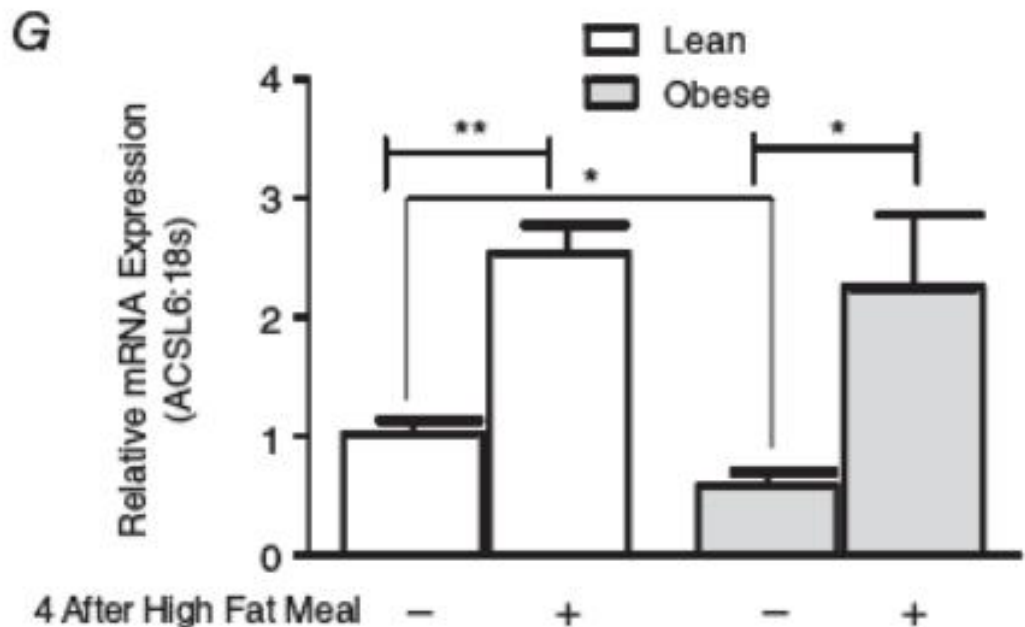


图1G 肥胖个体与精瘦个体高脂肪（脂肪70%总能量）后4小时

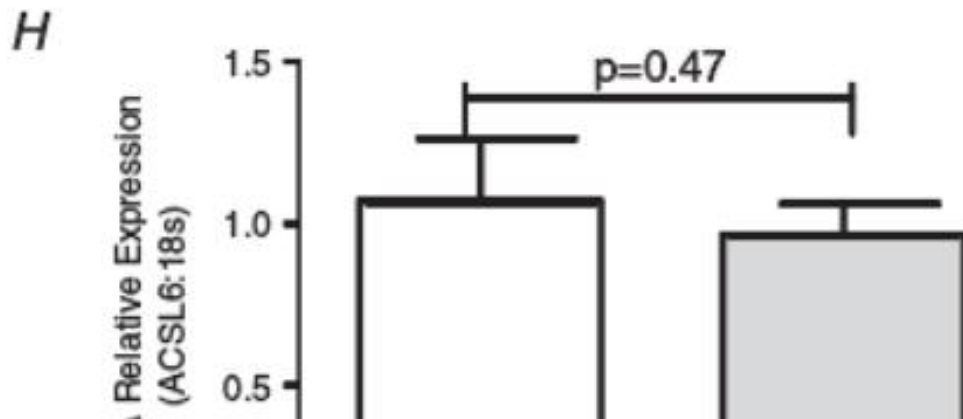


图1G HFD（脂肪60%总能量）对其影响

实验结果表明，ACSL6对脂质合成有正调节作用

## 敲低实验

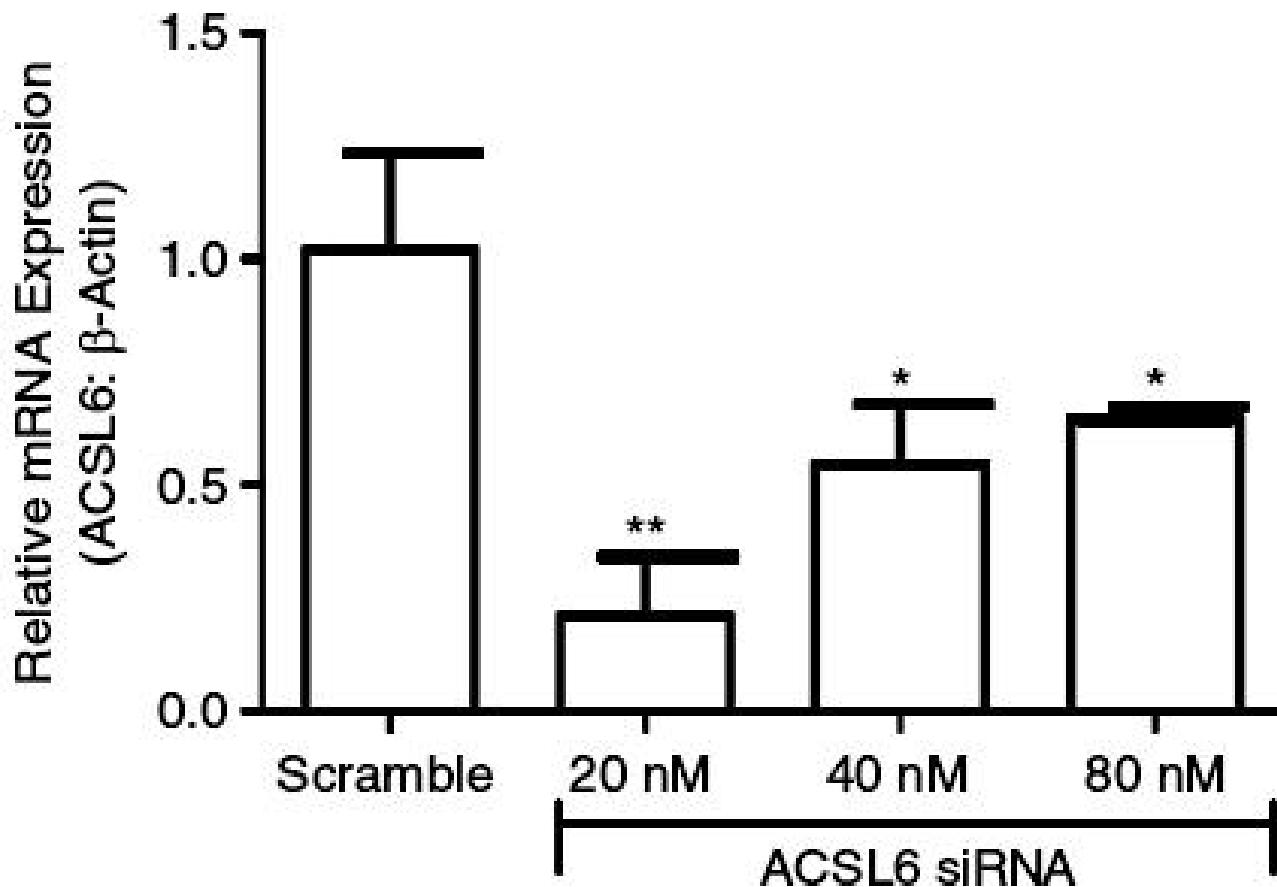
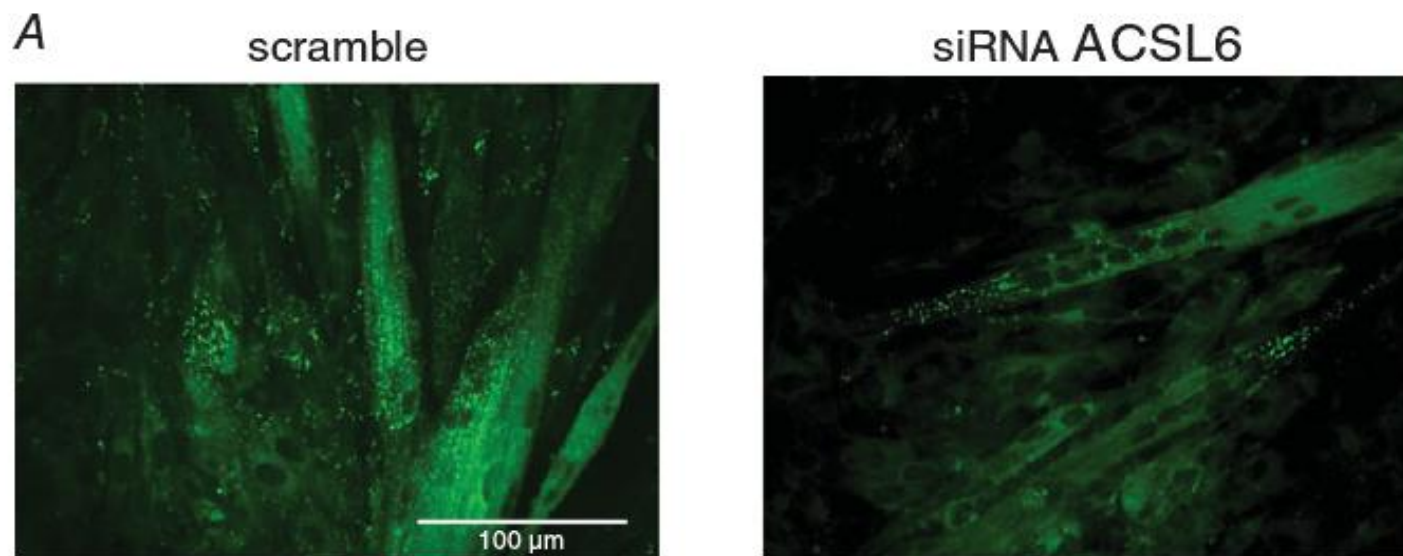


图2.特异性ACSL6 si RNA的研究对大鼠骨骼肌原代细胞中ACSL6 mRNA表达和细胞活力的影响

# 敲低实验



结果表明ACSL6参与哺乳动物骨骼肌中脂质合成



图3.大鼠骨骼肌原代细胞中ACSL6敲低的影响

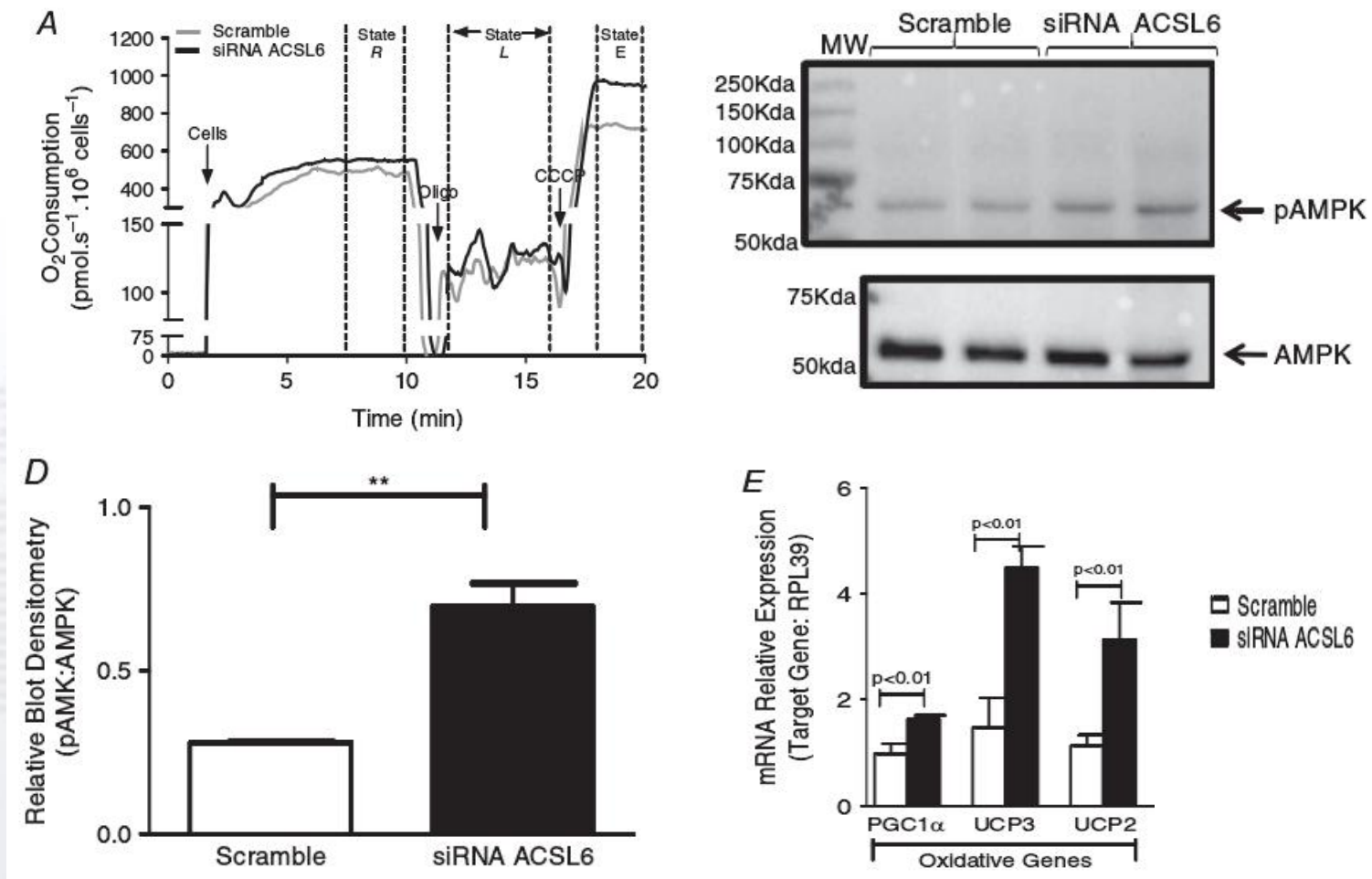
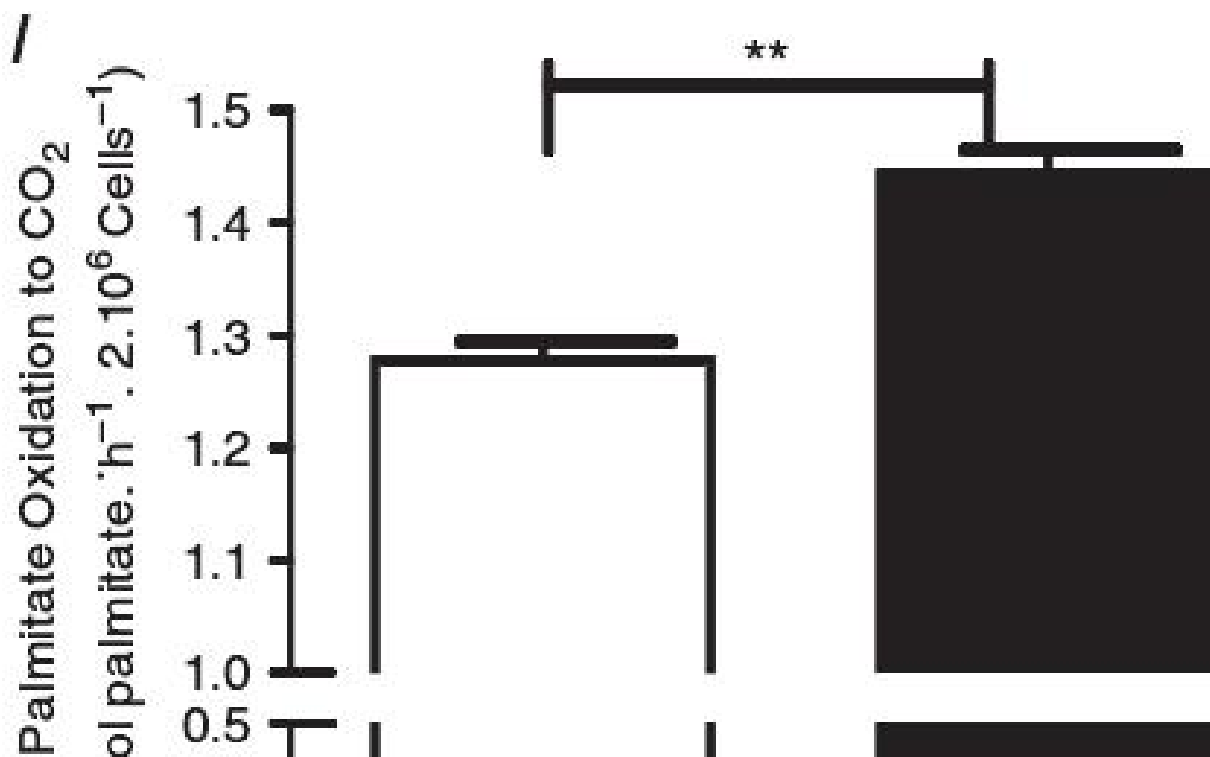


图4. ACSL6敲低对大鼠骨骼肌原代细胞氧化代谢的影响



结果表明在ACSL6敲低后，  
对线粒体氧化有正调节作用

图4. ACSL6敲低对大鼠骨骼肌原代细胞氧化代谢的影响

# 过表达实验

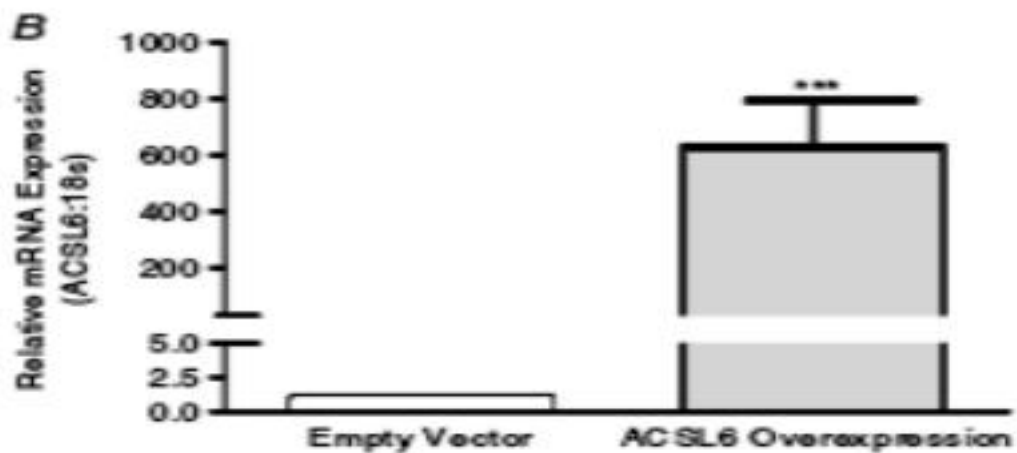
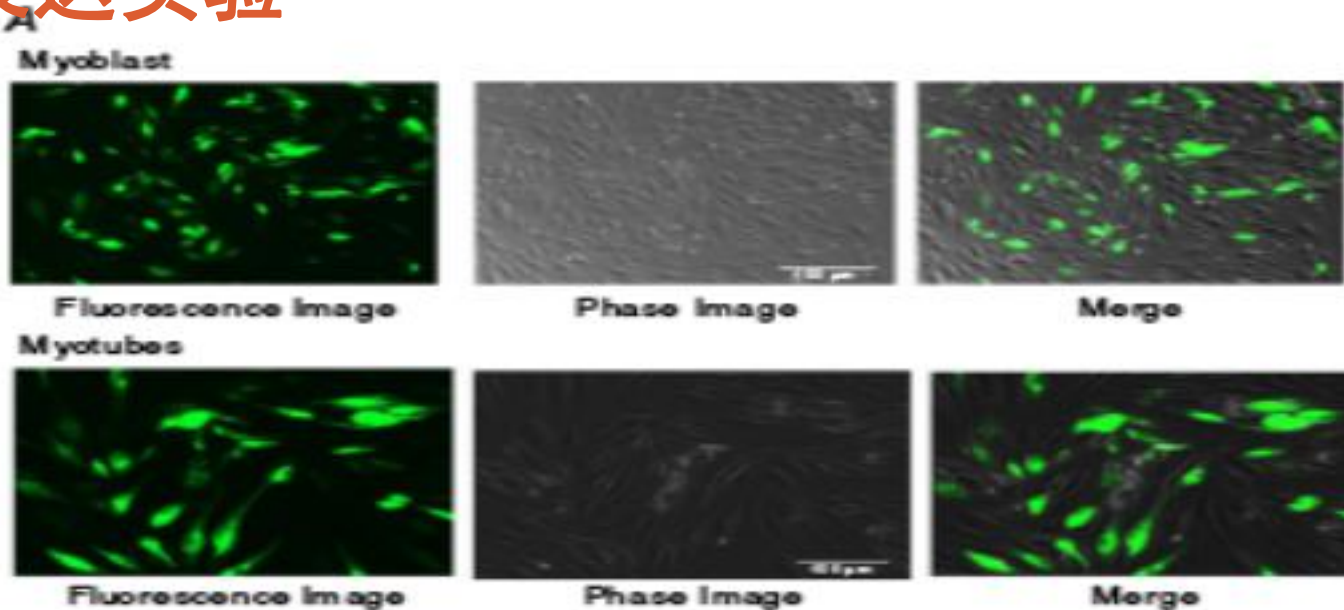
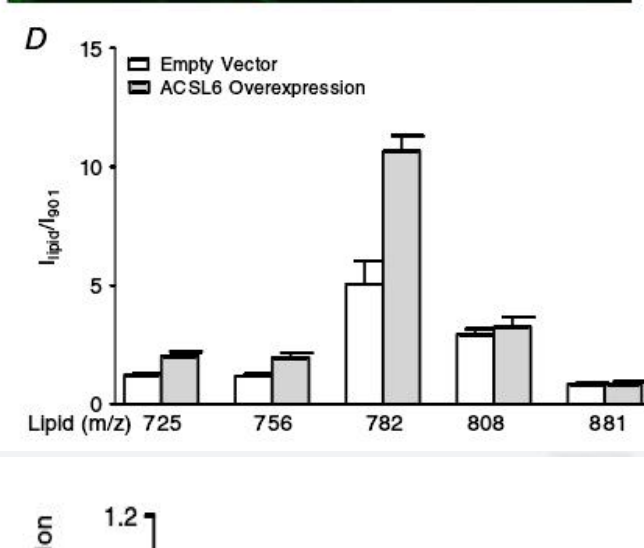
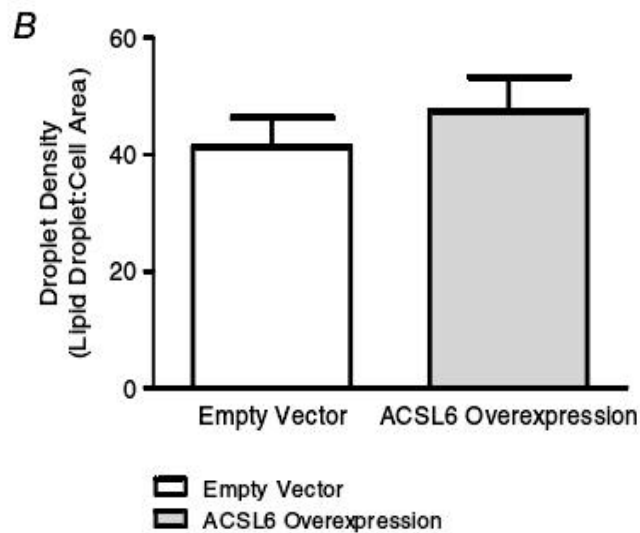
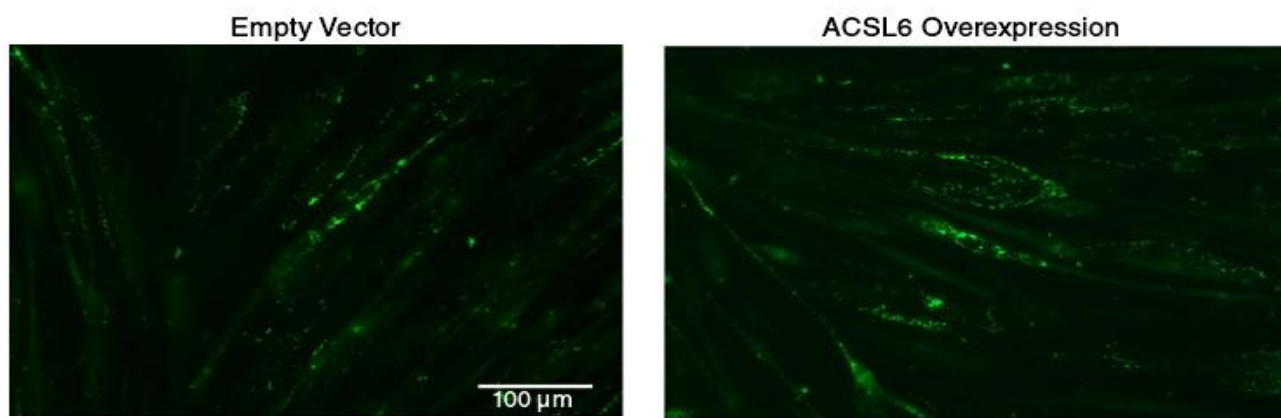


图5.人骨骼肌的ACSL6质粒转染细胞的效率



结果表明，ACSL6在人骨骼肌细胞中过表达降低细胞氧化能力



图6. ACSL6在人骨骼肌细胞中过度表达的影响



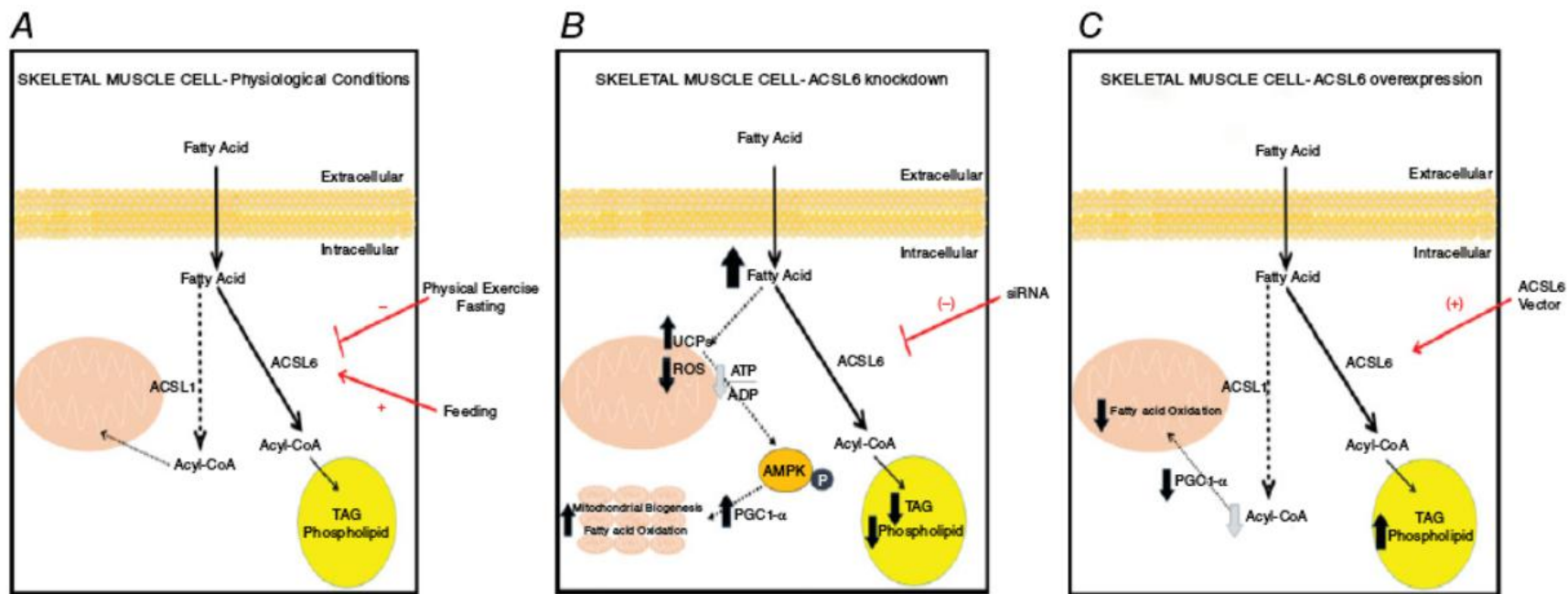


图7. ACSL6机制的代表图

研究表明，ACSL6驱酰基辅酶A进入脂质合成，避免其在线粒体中的氧化。此外，ACSL6也参与细胞呼吸的调节，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生产，脂质氧化和线粒体生物发生，其也涉及AMPK / PGC1-α 途径的活化。



**THANKS**