

脂肪酸延长酶缺陷对酵母细胞脂质代谢及油酸胁迫响应的影响

程迅¹ 杜秀秀¹ 王寒冬² 黄志伟^{1*} 邓云霞¹ 沈裕虎^{2,3*}

(¹东华大学化学化工与生物工程学院生态纺织教育部重点实验室, 上海 201620;

²青海省作物分子育种重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008;

³高原生物适应与进化重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008)

摘要 生物医学证据表明, 过量的油脂特别是脂肪酸(fatty acids, FA)在非脂肪组织累积会引起脂代谢障碍, 引起细胞功能紊乱或坏死。脂肪酸延长酶家族参与脂肪酸代谢, 具有真核生物的高度保守性, 且与膜脂的代谢密切相关。但脂肪酸延长酶与细胞脂毒效应的关系并不清楚。该文利用模式生物酿酒酵母在脂类代谢研究中性状易于表征、遗传操作便利的优势, 通过对比脂肪酸延长酶缺陷型 $elo1\Delta$ 、 $elo2\Delta$ 和 $elo3\Delta$ 与野生型酵母(wild-type, WT)对不同脂肪酸胁迫的响应, 发现极长链脂肪酸延长酶基因 $ELO2$ 和 $ELO3$ 缺陷后对油酸(oleic acid, OLA)高度敏感; 细胞脂滴及中性脂质的代谢对维持细胞脂类平衡起关键作用。研究结果显示, 长链脂肪酸的合成缺陷或油酸处理均促进细胞脂滴的形成, 同时显著提高细胞中性油脂(TAG)和甾醇酯(SE)合成; 采用气相色谱-质谱联用技术分析脂肪酸组成, 结果显示, $ELO3$ 缺陷, C_{26} 脂肪酸基本检测不到, 而 C_{20} 与 C_{22} 脂肪酸会累积; $ELO2$ 缺失后, C_{26} 脂肪酸的含量也明显降低。而油酸的处理会增加BY4741胞内总的极长链脂肪酸的比例; $elo2\Delta$ 和 $elo3\Delta$ 的不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例增大; 相反, 过表达脂肪酸延长酶基因, 与野生型菌株相比能显著降低细胞油酸的含量。模式生物脂肪酸延长酶对细胞脂质代谢及油酸胁迫响应的研究, 为医学脂代谢障碍及细胞脂毒效应研究提供了基础数据。

关键词 脂肪酸延长酶; 脂毒; 脂代谢; 酿酒酵母

Study on the Response of Fatty Acid Elongase Defects to Lipid Metabolism and Oleic Acid Stress in *Saccharomyces cerevisiae*

Cheng Xun¹, Du Xiuxiu¹, Wang Handong², Huang Zhiwei^{1*}, Deng Yunxia¹, Shen Yuhu^{2,3*}

(¹Key Lab of Science & Technology of Eco-textile (Ministry of Education), College of Chemistry & Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China; ²Key Laboratory of Crop Molecular Breeding of Qinghai Province, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; ³Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China)

Abstract Biomedical evidence shows that excessive fat, especially fatty acids (FA) accumulation in non-adipose tissues can cause lipid metabolism disorder, leading to cellular dysfunction or necrosis. The fatty acid

收稿日期: 2018-01-06 接受日期: 2018-06-11

国家自然科学基金(批准号: 31100549)、青海省创新平台建设专项项目(批准号: 2017-ZJ-Y14)、青海省科技成果转化专项(批准号: 2016-NK-131)和青海省作物分子育种重点实验室开放课题(批准号: 2017-ZJ-Y14)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-67792911, E-mail: zhiwei@dhhu.edu.cn; Tel: 0971-6143282, E-mail: shenyuhu@nwipb.cas.cn

Received: January 6, 2018 Accepted: June 11, 2018

This work was supported by the National Natural Sciences Foundation of China (Grant No.31100549), Construction Project for Innovation Platform of Qinghai Province (Grant No.2017-ZJ-Y14), the Key Research and Development and Transformation Project of Qinghai Province (Grant No.2016-NK-131) and the Open Project of Qinghai Provincial Key Laboratory of Crop Molecular Breeding (Grant No.2017-ZJ-Y14)

*Corresponding authors. Tel: +86-21-67792911, E-mail: zhiwei@dhhu.edu.cn; Tel: +86-971-6143282, E-mail: shenyuhu@nwipb.cas.cn

网络出版时间: 2018-08-27 17:02:10

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180827.1702.006.html>

elongase family participates in fatty acid metabolism, which is highly conserved in eukaryotes in fatty acid metabolism and is closely related to the metabolism of membrane lipids. However, the relationship between fatty acid elongases and cellular lipotoxic effect is unclear. In this study, *Saccharomyces cerevisiae* was used as our cellular model due to the advantages of easy characterization and convenient genetic manipulation in lipid metabolism. By comparing the response of fatty acid elongase-deficient *elo1* Δ , *elo2* Δ and *elo3* Δ with that of wild-type yeast to different fatty acids, we found that long-chain fatty acid elongases *ELO2* and *ELO3* defects were highly sensitive to oleic acid. Cell lipid droplets and neutral lipid metabolism played a key role in maintaining cellular lipid homeostasis. Our results showed that the synthesis defects of long chain fatty acids or oleic acid could promote formation of cell lipid droplets, and significantly enhanced the synthesis of the cellular neutral lipids (TAG) and cholesterol ester (SE). The fatty acid composition were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). C_{26} fatty acids were barely detected, while C_{20} and C_{22} fatty acids accumulated in *elo3* Δ strain. The content of C_{26} fatty acid was also decreased significantly in *elo2* Δ strain. However, the treatment of oleic acid increased the proportion of the total very long-chain fatty acid in the BY4741 cells, and the ratios of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids were increased in *elo2* Δ and *elo3* Δ strains. On the contrary, the overexpression of long-chain fatty acid elongase genes could significantly reduce the content of oleic acid compared to the wild-type strain. Based on the study of the responses of fatty acid elongase defects to lipid metabolism and oleic acid stress in the model cells of *Saccharomyces cerevisiae*, it provides basic data for the investigation of lipid metabolism disorder and lipotoxicity effect in medicine.

Keywords fatty acid elongase; lipotoxicity; lipid metabolism; *Saccharomyces cerevisiae*

在医学上, 脂毒(lipotoxicity)是指油脂特别是脂肪酸(fatty acids, FA)在非脂肪组织累积造成脂代谢障碍, 从而引起细胞功能紊乱或坏死的现象, 是导致心脏衰竭、动脉粥样硬化、脂肪肝、糖尿病等代谢综合征的主要原因^[1-2]。过量的FA对细胞的结构和功能有重要的影响, 但细胞对过量FA胁迫的效应机制并不十分清楚^[3]。FA脂性凋亡作用的强弱受其饱和程度、碳链长度、空间构型等不同因素的影响。用软脂酸、油酸、亚麻酸孵育INS-1细胞, 发现软脂酸显著抑制细胞活性, 油酸和亚麻酸增加基础胰岛素分泌, 提示不同的FA有不同的脂毒性模式^[4]。另外一些实验也证实, 动物和酵母细胞对饱和FA和不饱和FA胁迫有不同的效应^[5-6]。脂肪酸延长酶参与脂肪酸代谢, 与膜脂的代谢密切相关^[7-8]。但截至目前, 脂肪酸延长酶(fatty acid elongase)与脂毒间的关系并不清楚。

哺乳动物的脂肪酸延长酶ELOVL家族与酵母的ELO家族, 两者垂直同源, ELOVL家族的多个成员是在ELO家族Elo1、Elo2和Elo3研究的基础上发现的。目前, 已在哺乳动物中发现ELOVL家族有7个成员: Elovl1~Elovl7。其中, Elovl3是哺乳动物第一个被发现的脂肪酸延长酶, 与棕色脂肪增生和非颤抖性产热有关^[9]; Elovl1和Elovl2作为Elovl3的同

源物被发现。通过基因酵母异源表达功能分析发现, Elovl1和Elovl3分别与酵母的Elo3和Elo2在功能上直系同源^[10]。Elovl4参与极长链脂肪酸(VLCFA)延长, 是遗传性黄斑退化的致病基因。Elovl5因与Elo2同源被发现, Elovl5参与单不饱和脂肪酸(C_{16} 、 C_{18})和多不饱和脂肪酸(C_{18} 、 C_{20} 、 C_{22})的延长, 并对人类的免疫反应起到关键性作用^[11]。Nagarajan等^[12]用锚基因相关分析方法研究髓鞘形成的分子成分时发现了Elovl6基因, 该基因的表达产物为VLCFA延长酶, 参与髓磷脂的脂质合成。也有报道认为, Elovl6是长链脂肪酰基延长反应的限速酶, 促进 C_{12} 、 C_{14} 、 C_{16} FA的延长^[13]。ELOVL基因家族在不同组织有特异性表达, 基因变异会引起相应组织的脂质堆积与病变^[11,14]。

对培养细胞和动物模型的研究有助于阐明脂毒性发生机制及提出对人类脂毒性疾病治疗的途径。酵母是用于研究降脂、降胆固醇药物的良好细胞模型, 同时也是脂毒机制研究的重要模型^[15]。酵母的ELO家族和人类的ELOVL家族的编码产物都参与极长链脂肪酸和(神经)鞘脂类的形成, 并在此基础上发挥更多的生物学作用。本文通过对比脂肪酸延长酶缺陷酵母对不同脂肪酸的响应, 确立油酸

诱导的脂毒细胞模型, 分析VLCFA合成障碍对细胞中性油脂代谢、长链脂肪酸合成的影响及油酸诱导脂毒的细胞响应规律, 探讨了脂肪酸延长酶在酵母细胞模型中参与脂质代谢及抵抗脂毒胁迫等方面的调控功能, 为医学脂代谢障碍及细胞脂毒效应的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与培养基 实验所用菌株为野生型酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae* BY4741(WT, *MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*)、*elo1Δ*(BY4741 *elo1ΔKanMX*)、*elo2Δ*(BY4741 *elo2ΔKanMX*)和*elo3Δ*(BY4741 *elo3ΔKanMX*); 所用质粒为YEplac195(*ura3⁺ Ap^r ori*); *E.coli*(*lacA, gal, metB, leuB, hisB436, hsdR*)用于质粒扩增, 以上均由本实验室提供。

酵母培养采用YPD培养基^[16]; 酵母选择性营养缺陷培养基(SC-Ura培养基), 从完全合成SC培养基^[17]中去除尿嘧啶。在YPD或SC-Ura分别加入适量棕榈酸或油酸配制FA胁迫培养基。

1.1.2 试剂与仪器 工具酶*Kpn* I、*Pst* I、*Xba* I均购于TaKaRa公司; Taq酶、Pfu酶、dNTP mix、10×buffer(MgCl₂)、10×buffer(MgSO₂)、T4 DNA连接酶、YNB(Yeast Nitrogen Base without Amino Acids)、缓冲液及基因克隆引物均购于生工生物工程(上海)股份有限公司; Lyticase(粉末)购于Sigma公司; 油红O粉末、油酸、油酸钠、棕榈酸均为国药试剂。

实验所用仪器有: Bio-Rad gene pulse xcell, Bio-Rad 2 mm CUP购于Bio-Rad(中国)公司; PCR ABI 2720购于ABI公司; Tanon-3500凝胶成像系统购于上海天能科技有限公司; BX53荧光显微镜购于日本Olympus公司; UV-2100型紫外可见分光光度计购于上海尤尼柯仪器有限公司; 实验所用的酵母基因组提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司; 大肠杆菌质粒提取试剂盒购于Biomiga公司; 凝胶DNA回收试剂盒购于上海捷瑞生物工程有限公司; 25 mm×8 mm薄层层析硅胶板HSGF-254购于烟台江友硅胶开发有限公司; 0.5 mm×100 mm点样毛细管购于上海欣鹏玻璃仪器有限公司; 0.5 mm玻璃珠购于海德创业北京生物公司。

1.2 实验方法

1.2.1 脂肪酸对脂肪酸延长酶缺陷酵母生长抑制

分析 油酸对脂肪酸延长酶缺陷酵母生长抑制分析: 将复苏的不同基因型酵母(WT、*elo1Δ*、*elo2Δ*和*elo3Δ*)细胞转接到新配制的YPD或含有0.5 mmol/L油酸或0.5 mmol/L棕榈酸的液体培养基中, 30 °C、180 r/min震荡培养, 在一定的间隔时间(0、3、6、9、12、15、18、21、24和36 h)通过分光光度计 D_{600} 测定细胞的生长, 绘制生长曲线分析油酸或棕榈酸胁迫对不同基因型酵母生长状况的影响。

1.2.2 细胞脂滴的显微观察 将过夜培养的野生型BY4741和脂肪酸延长酶缺陷菌株*elo1Δ*、*elo2Δ*和*elo3Δ*, 转接到新鲜YPD培养基中, 30 °C、180 r/min, 培养至 $D_{600}=0.5$, 加入油酸或对照(油酸溶剂)继续培养12 h。根据文献[18]所采用的方法进行酵母脂滴油红O染色及显微观察。取不同处理的酵母细胞进行油红O染色(油红O工作液: 3份1%的油红O异丙醇储液与2份双蒸水混合), 室温下染色10 min, 然后用50%异丙醇洗脱1次, 双蒸水洗脱2~3次。将染色后的酵母细胞置于载玻片上, 用荧光显微镜观察, 检测不同视野并计数细胞脂滴数, 拍照记录结果。

1.2.3 酵母细胞脂质的测定及成分分析 参考文献[19]建立的通过比色快速检测酵母中性脂含量的方法。收集上述不同处理酵母菌液, 洗涤, 然后加入适量的油红O工作液, 避光震荡染色2 h, 加入200 μL 0.1 mol/L HCl溶液, 加入800 μL无水乙醇, 震荡混匀后, 沸水浴加热3~5 min使酵母细胞破壁完全, 萃取, 离心后取萃取液于510 nm处测定其吸光度值, 检测油酸胁迫条件下4种不同基因型酵母(WT、*elo1Δ*、*elo2Δ*和*elo3Δ*)细胞中性脂的含量。

细胞脂质的成分分析: 提取酵母总脂, 取上述不同处理平稳期酵母细胞约 8×10^8 个($D_{600} \approx 40$), 进行酵母总脂提取, 提取到的总脂用30 μL甲醇/氯仿混合液(2:1, V/V)进行溶解。根据参考文献[20]利用薄层层析法检测酵母菌株三酰甘油含量, 所用扩展体系为正己烷/乙醚/乙酸=80:20:2(V/V/V), 置于碘缸中显色并拍照。使用Tanon-3500数字凝胶成像系统(上海天能科技有限公司), 与WT或对照相比, 通过TLC扫描光密度测定印迹照片, 用Band Scan软件进行定量分析TAG或SE的相对含量。

1.2.4 脂肪酸组成气相色谱-质谱联用分析 取约 1×10^9 个($D_{600} \approx 100$)上述不同处理平稳期酵母细胞, 加入1 mL甲醇:氯仿(2:1, V/V)和适量的玻璃珠, 涡旋振荡20 min以提取酵母总类脂, 根据Prasitchoke等^[21]

的方法进行甲酯化处理, 然后通过气相色谱-质谱联用仪分析脂肪酸组成。气相色谱条件: 进样器温度为240 °C, 柱温以20 °C/min的速度从80 °C升到320 °C, 然后保温5 min; 载气: 高纯氮; 流速1 mL/min。利用峰面积进行相对百分含量(%)的半定量分析^[21]。

1.2.5 脂肪酸延长酶基因极表达质粒构建 在 *ELO1*、*ELO2*和*ELO3*上下游500 bp左右设计的包含两个酶切位点引物: *Xba* I和*Kpn* I, *Pst* I和*Kpn* I, *Pst* I和*Kpn* I, 构建YEplac195-*ELO1*、YEplac195-*ELO2*和YEplac195-*ELO3*的质粒。*ELO1*: F'-gct cta gaG CAA GTA TGG TAA GTG ATT GG; R'-ggg gta CCA CTA GAA TCG CCA GAA TAA TG。 *ELO2*: F'-aac tgc agA AGC CAT GAA TTC ACT CGT T; R'-ggg gta CCT CGC TGC TCC TTC AGG TAA C。 *ELO3*: F'-aac tgc agC AAA TGA TTG ATG ACG CGA GAA; R'- ggg gta ccG GAT TAC GAC TTG GAC ACT TTA。上述3个载体转化大肠杆菌并测序确认后, 分别转化酵母野生型BY4741细胞, 构建脂肪酸延长酶基因极表达菌株, 在尿嘧啶缺陷型合成培养基(SC-Ura)上培养, 根

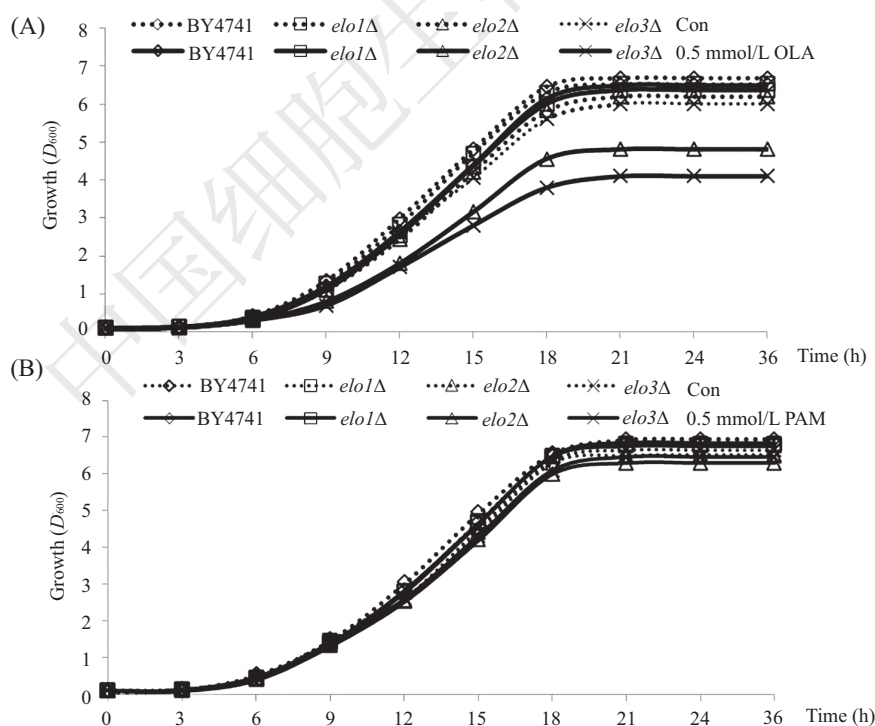
据脂肪酸组成气相色谱-质谱联用方法分析脂肪酸延长酶过表达对油酸胁迫的影响。

1.2.6 数据统计分析 文中实验数据为3~5次重复, 结果表示为平均值±标准差。野生型和突变体之间、各基因型不同处理之间的比较, 使用Student's *t*检验和单因素方差分析(ANOVA)进行分析检验, $P < 0.05$ 代表差异具有显著性。

2 结果

2.1 极长链脂肪酸延长酶缺陷酵母对油酸敏感

酵母中含有三种脂肪酸延长酶, *Elo1*延长 C_{14} -FA到 C_{16} -FA, *Elo2*延长 C_{16} -FA和 C_{18} -FA到 C_{24} -FA, *Elo3*延长 C_{18} -FA到 C_{26} -FA^[10]。油酸(OLA)胁迫对不同基因型酵母(WT、*elo1*Δ、*elo2*Δ和*elo3*Δ)生长抑制分析(图1A)表明, 极长链脂肪酸延长酶缺陷酵母*elo2*Δ和*elo3*Δ对饱和脂肪酸油酸极为敏感, 0.5 mmol/L油酸处理12 h有50%以上的抑制率, 而*elo1*Δ则没有此性状。饱和脂肪酸棕榈酸(PAM)对4种基因型酵母细胞的生长均没有明显影响(图1B), 表明饱和脂肪



A: 野生型酵母菌株BY4741和脂肪酸延长酶缺陷菌株*elo1*Δ、*elo2*Δ和*elo3*Δ在YPD或0.5 mmol/L油酸中的生长曲线; B: 棕榈酸对四种基因型酵母细胞生长影响。在YPD或含0.5 mmol/L棕榈酸液体培养基测定野生型酵母菌株BY4741和脂肪酸延长酶缺陷菌株*elo1*Δ的生长曲线。

A: growth curves of wild-type yeast strain BY4741 and fatty acid elongase-deficient strains *elo1*Δ, *elo2*Δ and *elo3*Δ in YPD or medium containing 0.5 mmol/L oleic acid; B: effect of palmitic acid on the four genotypes of yeast cells. Growth curves of the wild-type yeast strain BY4741 and the fatty acid elongase-deficient strain *elo1*Δ were measured in YPD or medium containing 0.5 mmol/L palmitic acid.

图1 酵母细胞对脂肪酸胁迫的响应

Fig.1 Response of yeast cells to fatty acids stress

酸及不饱和脂肪酸对细胞的生长影响不同, 不饱和脂肪酸(油酸)对极长链脂肪酸延长酶缺陷菌株 $elo2\Delta$ 和 $elo3\Delta$ 有明显的脂毒性, 而饱和脂肪酸(棕榈酸)对4种基因型细胞生长基本没有影响。同时也表明, 极长链脂肪酸的合成在细胞对抗外源油酸胁迫中起到重要作用。

2.2 酵母脂肪酸延长酶缺陷影响中性脂代谢, 外源油酸处理促进细胞中性脂累积

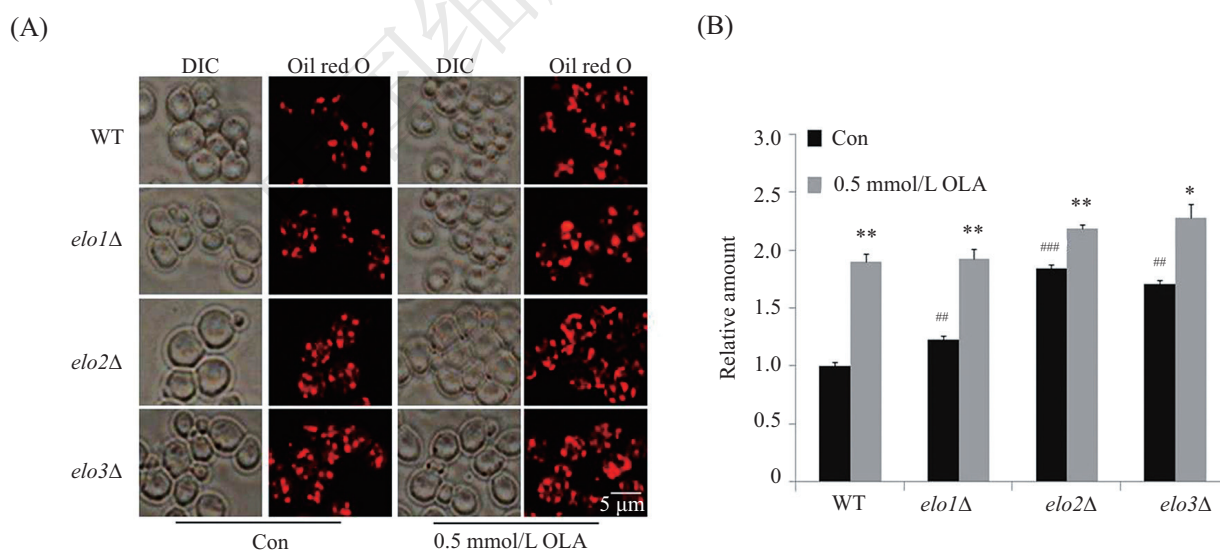
脂滴是真核生物细胞中中性脂的主要贮存场所^[22]。甘油三酯(TAG)和甾醇酯(SE)是中性脂肪核心的主要成分。0.5 mmol/L油酸和对照(0.1% NP-40, 0.5%乙醇)处理野生型和脂肪酸延长酶缺陷菌株 $elo1\Delta$ 、 $elo2\Delta$ 和 $elo3\Delta$ 12 h后, 经油红O染色, 荧光显微镜观察细胞脂滴变化。结果显示, 脂肪酸延长酶缺陷菌株 $elo2\Delta$ 和 $elo3\Delta$ 脂滴数目明显高于WT细胞, 油酸处理后4种基因型的细胞脂滴数目都明显增多(图2A)。利用油红O比色法检测各基因型细胞中性脂含量, 结果显示, 脂肪酸延长酶缺陷菌株细胞中性脂含量显著高于野生型, 尤其是极长链脂肪酸延长酶缺陷株 $elo2\Delta$ 和 $elo3\Delta$ 中性脂水平较WT分别提高了84.6%和70.5%(图2B)。油酸处理后, 胞内中性脂水平都有一个显著的提高。以上结果也表明, 比色法对中性脂含量的测定与脂滴显微观察的结果有很

高的一致性。

提取油酸处理及未处理4种基因型细胞的总类脂, 经薄层层析分析其各种油脂的组分变化, 并依据薄层层析的结果图, 使用Band Scan软件进行分析得到TAG含量(图3A)和SE含量(图3B)。结果显示, 0.5 mmol/L油酸处理后, 胞内TAG和SE的含量都有显著增加, 尤其是TAG的增加更加显著。同时也能够看出, 相对于WT, 极长链脂肪酸延长酶缺陷 $elo2\Delta$ 和 $elo3\Delta$ 菌株的TAG含量显著提高。另外, 值得关注的是, 油酸处理后 $elo2\Delta$ 和 $elo3\Delta$ 胞内的自由脂肪酸含量明显增多。

2.3 脂肪酸延长酶对酵母细胞脂肪酸组成的影响

野生型BY4741和脂肪酸延长酶缺陷菌株 $elo1\Delta$ 、 $elo2\Delta$ 和 $elo3\Delta$ 经油酸或对照不同处理, 提取酵母总类脂进行甲酯化, 然后通过气相色谱-质谱联用仪分析脂肪酸组成(图4A)。0.5 mmol/L油酸处理后, 脂肪酸的组成发生了明显的改变。伴随棕榈油酸($C_{16:1}$)百分含量的下降, 油酸($C_{18:1}$)百分含量增多, 同时在 $elo2\Delta$ 和 $elo3\Delta$ 中棕榈酸($C_{16:0}$)或硬脂酸($C_{18:0}$)的百分含量也有明显降低(图4B)。油酸处理后, 亚油酸($C_{18:2}$)成为脂肪酸组成中的主要成分之一, 而在未处理的细胞中含量低于仪器的检测限(图4B)。脂肪酸延长酶缺失后极长链脂肪酸的百分含量发生变

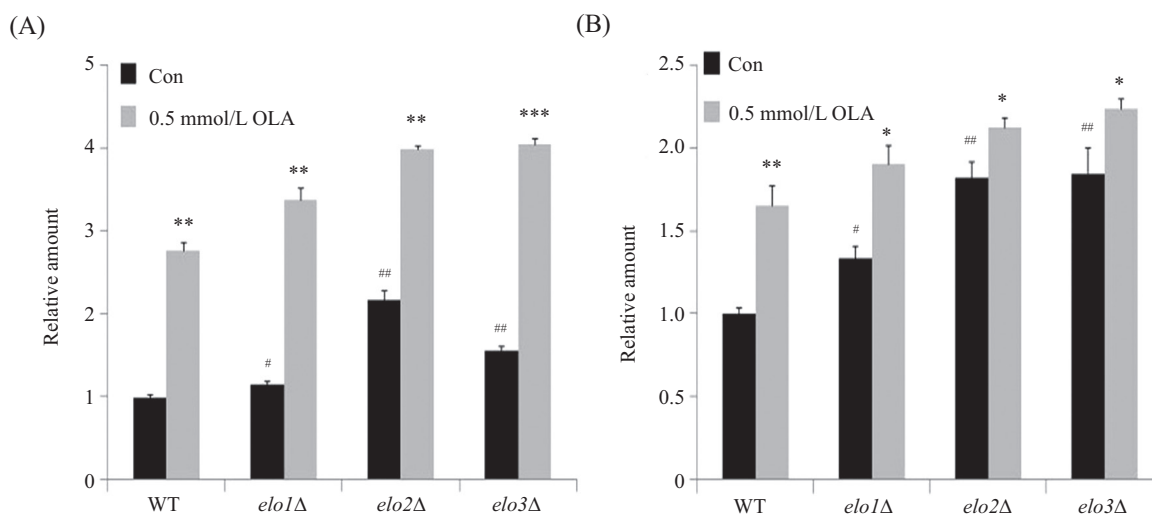


A: 油红O着色后, 脂滴的荧光显微观察; B: 油红O比色法分析中性脂含量。* P <0.05, ** P <0.01, 与未处理的细胞(Con组)相比较; # P <0.05, ## P <0.01, ### P <0.001, 与野生型相比较。

A: fluorescent microscopic observation of lipid droplets with oil red O staining; B: colorimetry analysis of neutral lipid contents with oil red O. * P <0.05, ** P <0.01 vs untreated cells (Con group) respectively; # P <0.05, ## P <0.01, ### P <0.001 vs wide-type strain.

图2 脂肪酸延长酶对酵母脂质积累的影响

Fig.2 Effects of fatty acid elongases on lipid accumulation in yeast cells



A: TAG的统计分析; B: SE的统计分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与未处理的细胞(Con组)相比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, 与野生型相比较。

A: relative amount of TAG; B: relative amount of SE. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs untreated cells (Con group) respectively; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs wide-type strain.

图3 脂肪酸延长酶对酵母脂质组成的影响

Fig.3 Effects of fatty acid elongases on the lipid composition in yeast cells

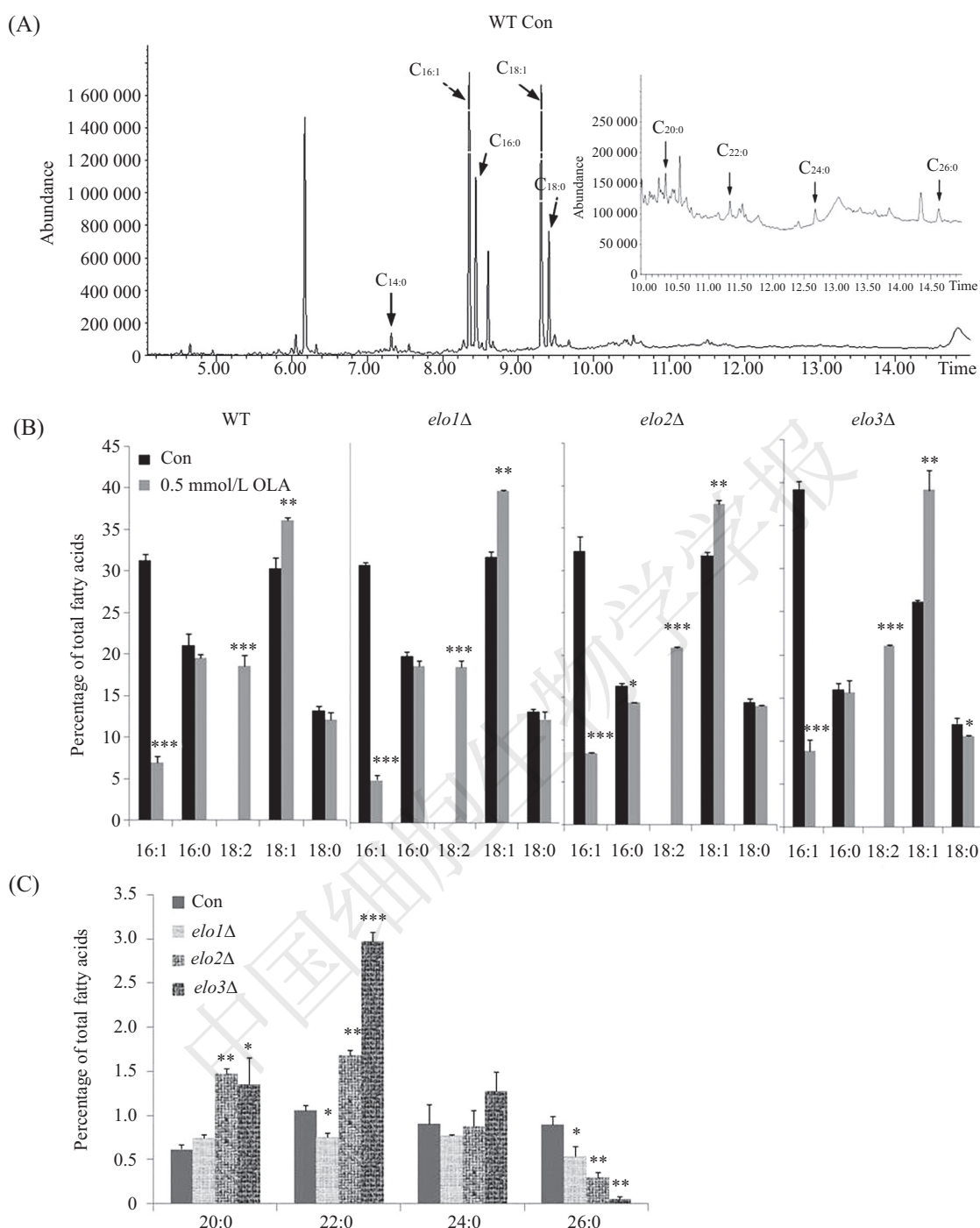
化。*ELO3*敲除后, C_{26} 脂肪酸基本检测不到, 而 C_{20} 与 C_{22} 脂肪酸会累积; *ELO2*缺失后, C_{26} 脂肪酸的含量也明显降低(图4C)。

将构建好的脂肪酸延长酶极表达质粒转入野生型酵母BY4741中, 同时将空质粒YEplac195也转入BY4741作对照。在SC-Ura培养基中过夜培养后, 转接到新鲜培养基中, 培养至 $D_{600}=0.5$, 分别加入0.5 mmol/L油酸, 与不加油酸的对照组处理12 h后相比较。提取不同处理样品总类脂, 甲酯化后通过气相色谱-质谱联用仪分析脂肪酸组成。0.5 mmol/L油酸处理后, 脂肪酸的组成中出现了未处理前检测不到的亚油酸($C_{18:2}$), 且占有很大比例。在OLA处理之后, BY4741-195细胞中棕榈油酸($C_{16:1}$)和硬脂酸($C_{18:0}$)百分含量下降。脂肪酸延长酶高表达细胞, 在OLA处理之后, 棕榈油酸($C_{16:1}$)和油酸($C_{18:1}$)百分含量均下降, 而棕榈酸($C_{16:0}$)的百分含量增大, 同时在过表达*Elo2*和*Elo3*中豆蔻酸($C_{14:0}$)的百分含量也有显著提高(图5A)。0.5 mmol/L油酸处理BY4741-195之后, 不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例(Unsat/sat, Unsaturation index)与未处理的细胞相比增大(图5B)。过表达脂肪酸延长酶之后, 不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例比转入空质粒的菌株高, 同时, 过表达脂肪酸延长酶的酵母细胞其不饱和系数显著高于阴性对照, 油酸处理后不饱和系数相对降低但仍高于阴性对照细胞(图5B)。

3 讨论

脂肪酸(FA)是细胞脂质代谢的关键分子, 但作为脂毒性的引发者可能又对细胞起到潜在的毒害作用^[1]。甘油三酯(TAGs)是甘油不溶于水的脂肪酸三酯, 它是生物体内脂质包涵体的主要成分, 是生物体中代谢能和脂肪酸(FA)的主要储存分子^[23]。利用酵母酰基转移酶缺陷菌株的研究表明, 外源不饱和脂肪酸对二酰甘油酰基转移酶缺陷菌株存在严重的脂毒效应, 并且观察到胞内活性氧的积累^[6], 膜磷脂中脂肪酸组分改变^[24]。Lockshon等^[25]在对油酸敏感菌株进行筛选时, 发现了脂肪酸延长酶2缺陷*elo2Δ*存在油酸胁迫表型。本研究结果也显示, 脂肪酸延长酶缺陷*elo2Δ*和*elo3Δ*对不饱和脂肪酸油酸极为敏感, 生长受到明显抑制, 而WT和*elo1Δ*则没有此性状, 与我们前期的研究结果一致^[15], 而且饱和脂肪酸棕榈酸对WT和*eloΔ*酵母细胞的生长都没有明显影响。这说明, 饱和脂肪酸及不饱和脂肪酸对酵母细胞的生长影响不同, 极长链脂肪酸(VLCFA)的合成在细胞对抗外源油酸胁迫中起到重要作用。

VLCFA在酵母细胞中有重要作用, 这可能是因为它们作为鞘脂和GPI-锚定的组分而拥有特殊的结构功能^[7]。鞘脂是细胞膜的重要组成成分, 同时还是重要的信号分子, 它与调控细胞生长、分化和死亡相关的信号传导途径有关^[8]。近期, 在核膜的提取物中发现含有 C_{26} 脂肪酸的磷脂酰肌醇种类, 暗示



A: 一个代表性的野生型酵母的脂肪酸组成的气相色谱图; B: 在油酸处理和未处理下, WT和*elo*Δ菌株的脂肪酸组成中主要脂肪酸的百分含量变化; C: WT和*elo*Δ菌株的各极长链脂肪酸组分百分含量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与未处理的细胞(Con组)相比较; * $P < 0.05$, 与野生型相比较。

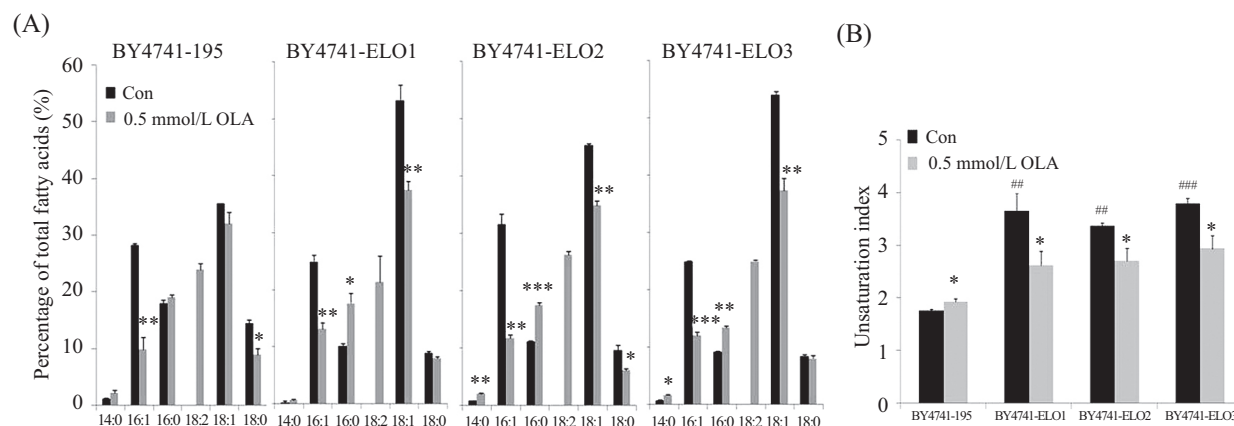
A: a representative gas chromatogram of the composition of fatty acids in the wild-type yeast cells; B: the composition of fatty acids in the wild type and *elo*Δ strains with or without the treatment of oleic acid; C: percentages of each very long-chain fatty acid component in wild type and *elo*Δ strains. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs untreated cells (Con group); * $P < 0.05$ vs wide-type strain.

图4 脂肪酸延长酶缺陷对酵母脂肪酸组成的影响

Fig.4 Effects of fatty acid elongase defects on the composition of fatty acids in yeast cells

VLCFA修饰的脂质在建立核孔复合物的膜曲率中起到结构作用^[26]。酵母的*ELO1*基因延长C₁₄-FA至

C₁₆-FA, 在脂肪酸合成酶功能缺失的背景下, *ELO1*突变株不能在月桂酸的培养基中生长; *Elo2*和*Elo3*作



A: 在油酸处理和未处理下, 高表达脂肪酸延长酶对野生型酵母菌株脂肪酸组成中链脂肪酸的百分含量的影响; B: 在油酸处理和未处理下, 高表达脂肪酸延长酶对野生型酵母菌株中不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与未处理的细胞(Con组)相比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, 与野生型相比较。

A: effects of overexpression of fatty acid elongases on the percentages of long-chain fatty acids in the wild-type yeast strains with or without the treatment of oleic acid; B: effects of overexpression of fatty acid elongases on the ratio of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids in the wild-type yeast strains with or without the treatment of oleic acid. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs untreated cells (Con group); # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs wide-type strain.

图5 高表达脂肪酸延长酶对野生型细胞脂肪酸组成的影响

Fig.5 Effects of overexpression of fatty acid elongases on the composition of fatty acids in the wild-type cells

为Elo1的同源物被发现, 两者均参与极长链脂肪酸(C_{20} - C_{26})的延长。在酵母中, Elo2p和Elo3p是负责生产饱和的 C_{26} , 在鞘脂中编码酰基链, 这些ELOs的基因同时被破坏, 产生合成致死表型^[10]。Elo2蛋白将长链脂肪酸(C_{16} -FA和 C_{18} -FA)延长为 C_{24} -FA, 而Elo3蛋白的作用底物比Elo2蛋白广泛, 且在延长 C_{24} -FA到 C_{26} -FA中起关键作用^[10]。本文研究结果显示, 脂肪酸延长酶缺陷导致油酸胁迫细胞自由脂肪酸的累积, 极长链脂肪酸的百分含量发生变化, ELO3敲除后, C_{26} 脂肪酸基本检测不到, 而 C_{20} 与 C_{22} 脂肪酸会累积, ELO2缺失后, C_{26} 脂肪酸的含量也显著降低。同时, 在以上的研究中我们发现, 油酸处理后细胞中长链脂肪酸(C_{16} - C_{18})的含量变化显著, 因此, 接下来的研究中着重分析了脂肪酸延长酶及油酸对中长链脂肪酸(C_{14} - C_{18})代谢的影响。结果表明, 在WT中过表达ELO2和ELO3, 发现豆蔻酸($C_{14:0}$)的相对含量有显著提高。这可能是VLCFA合成(C_{20} - C_{26})增多而使豆蔻酸相对含量提高。在正常环境下, 酵母能够合成 C_{16} 和 C_{18} 的饱和与单不饱和脂肪酸, 但不产生具有两个以上双键的多不饱和脂肪酸(PUFA)^[27]。在本实验中, 未处理对照组虽然含有几乎同样浓度的底物油酸($C_{18:1}$), 却几乎没有检测到产物亚油酸($C_{18:2}$), 可能就是以上的原因。酵母与人和动物的代谢机制不同, 植物和酵母细胞中可将单不饱和脂肪酸油酸

在 $\Delta 12$ 去饱和转化成亚油酸($C_{18:2}$)^[28], 油酸处理细胞内亚油酸含量有显著增加, 推测外源油酸处理促进了以上生理过程。进一步研究表明, 脂肪酸延长酶缺陷会导致超长链脂肪酸合成障碍, 油酸处理野生型细胞超长链脂肪酸水平升高, 符合以往的研究结果: 经油酸处理促进极长链脂肪酸的合成^[6,15,29]。也再一次说明, ELO2和ELO3是VLCFA合成的关键基因, 而且对促进自由脂肪酸在细胞代谢平衡有重要作用。

饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸对酵母的影响与对动物或各种细胞株的作用是不同的。Garbarino等^[6]用棕榈酸、棕榈油酸和油酸处理野生型和中性脂合成缺陷的酵母细胞, 发现棕榈酸对野生型和突变株的生长均没有影响, 而突变株对不饱和脂肪酸极为敏感。造成这种差异的原因可能与细胞内脂肪酸的去饱和能力有关。在人的动脉内皮细胞高表达脂肪酸去饱和酶SCD1能够补救棕榈酸引起的细胞死亡^[30]。而酵母中脂肪酸去饱和酶OLE1缺失后, 则会对饱和脂肪酸敏感, 同时添加不饱和脂肪酸会起到补救作用^[31]。一般来说, 膜流动性和完整性的变化是由脂质组成^[32], 特别是不饱和脂肪酸的比例改变引起的。膜脂质不饱和被认为是控制氧气衍生自由基对生物膜脂质过氧化损伤的重要因素。细胞损伤的程度与膜脂组分有关, 与磷脂脂酰基组分的不饱和度

增加正相关^[6]。本文在酵母中的研究显示,野生型细胞中过表达脂肪酸延长酶后,不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例都升高了(对照组);加油酸处理后,过表达菌株与对照的野生型菌株,也显示这个比例是提高了,但相对于自身不加油酸处理菌株而言,脂肪酸延长酶高表达菌株不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例是降低的,推测脂肪酸延长酶对不饱和脂肪酸代谢可能存在一个反馈调节机制,当不饱和脂肪酸含量相对较低,过表达脂肪酸延长酶促进不饱和脂肪酸合成,相反不饱和脂肪酸过量(油酸胁迫)过表达脂肪酸延长酶降低不饱和脂肪酸相对含量。这一推测与Oh等^[10]的研究结果,超表达ELOs能够提高不饱和脂肪酸的比例相一致。在海洋细菌霍乱弧菌中也发现,相对于大肠杆菌存在相对高比例的不饱和脂肪酸(UFA)^[33],磷脂结合的细菌细胞膜中UFA的高百分比有更好的膜流动性^[34]。VLCFA延长酶可能通过影响细胞饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比例来影响细胞对不饱和脂肪酸油酸敏感水平。

中性脂肪亦即三酰甘油(triacylglycerols, TAG),是细胞内含量最多的脂类,也是动植物细胞脂肪贮存的主要形式。细胞内TAG储集体在许多真核生物中广泛存在,而其在原核生物中的积累仅限于少数好氧异养细菌和一些蓝藻^[22]。TAG失调引起的脂肪酸过剩导致在皮下等脂肪组织堆积,形成肥胖,在肝脏等非脂肪组织过度堆积引发脂毒^[1,35]。而脂毒则是肥胖所致的心血管疾病、脂肪肝、糖尿病等疾病的重要原因^[35-36]。其中,三酰甘油(TAG)的合成与动员失调被认为是诱发肥胖及其他代谢疾病的主因之一^[35]。但其中的分子机制还远没有被研究清楚。Stylianou等^[37]在利用酵母研究脂毒胁迫机制中发现,三酰甘油合成缺陷酵母(*pah1Δ*)对油酸胁迫表现出极度的敏感,表明三酰甘油合成通路在缓解油酸等脂毒胁迫中起着重要的作用。本文对比野生型和脂肪酸延长酶缺陷菌株*elo1Δ*、*elo2Δ*和*elo3Δ*中性脂变化,可以清楚地得出,脂肪酸延长酶缺陷后,胞内中性脂积累增多,油酸处理细胞后,中性脂含量进一步提高,说明脂肪酸延长酶与中性脂的代谢密切相关,推测VLCFA延长酶缺陷可能会诱导三酰甘油合成通路的加强以缓解脂肪酸累积导致的胁迫。

参考文献 (References)

1 Brookheart RT, Michel CI, Schaffer JE. As a matter of fat. Cell

- Metab 2009; 10(1): 9-12.
- 2 Vladimir L, Petr C, Mary K, Joshua Z. Long, saturated chains: tasty domains for kinases of insulin resistance. Dev Cell 2011; 21(4): 604-6
- 3 Rudolf Z, Robert Z, Thomas OE, Sepp DK, Guenter H, Achim L, et al. Fat signals-lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. Cell Metab 2012; 15(3): 279-91.
- 4 Kawai T, Hirose H, Seto Y, Fujita H, Saruta T. Chronic effects of different fatty acids and leptin in INS-1 cells. Diabetes Res Clin Pract 2001; 51(1): 1-8.
- 5 Unger RH, Zhou YT. Lipotoxicity of β -cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. Diabetes 2001; 50(1): S118-21.
- 6 Garbarino J, Padamsee M, Wilcox L, Oelkers PM, D'Ambrosio D, Ruggles KV, et al. Sterol and diacylglycerol acyltransferase deficiency triggers fatty acid-mediated cell death. J Biol Chem 2009; 284(45): 30994-1005.
- 7 Tehlivets O, Scheuringer K, Kohlwein SD. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. Biochim Biophys Acta 2007; 1771(3): 255-70.
- 8 Ohanian J, Ohanian V. Sphingolipids in mammalian cell signaling. Cell Mol Life Sci 2001; 58(14): 2053-68.
- 9 Tvrdik P, Asadi A, Kozak LP, Nedergaard J, Cannon B, Jacobsson A. Cig30, a mouse member of a novel membrane protein gene family, is involved in the recruitment of brown adipose tissue. J Biol Chem 1997; 272(50): 31738-46.
- 10 Oh CS, Toke DA, Mandala S, Martin CE. ELO2 and ELO3, Homologues of the Saccharomyces cerevisiae ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. J Biol Chem 1997; 272 (28): 17376-84.
- 11 Leonard AE, Bobik EG, Dorado J, Kroeger PE, Chuang LT, Thurmond JM, et al. Cloning of a human cDNA encoding a novel enzyme involved in the elongation of long-chain polyunsaturated fatty acids. Biochem J 2000; 350 Pt 3: 765-70.
- 12 Nagarajan R, Le N, Mahoney H, Araki T, Milbrandt J. Deciphering peripheral nerve myelination by using Schwann cell expression profiling. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(13): 8998-9003.
- 13 Moon YA, Shah NA, Mohapatra S, Warrington JA, Horton JD. Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. J Biol Chem 2001; 276(48): 45358-66.
- 14 Westerberg R, Tvrdik P, Undén AB, Månsson JE, Norlén L, Jakobsson A, et al. Role for ELOVL3 and fatty acid chain length in development of hair and skin function. J Biol Chem 2004; 279(7): 5621-9.
- 15 Wang Q, Du X, Ma K, Shi P, Liu W, Sun J, et al. A critical role for very long-chain fatty acid elongases in oleic acid-mediated Saccharomyces cerevisiae cytotoxicity. Microbiol Res 2018; 207: 1-7.
- 16 Kurat CF, Natter K, Petschnigg J, Wolinski H, Scheuringer K, Scholz H, et al. Obese yeast: triglyceride lipolysis is functionally conserved from mammals to yeast. J Biol Chem 2006; 281(1): 491-500.
- 17 Rose MD, Winston F, Heiter. Methods in yeast genetics: A laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1990.
- 18 Adeyo O, Horn PJ, Lee SK, Binns DD, Chandras A, Chapman KD, et al. The yeast lipin orthologue PAH1p is important for bio-

- genesis of lipid droplets. *J Cell Biol* 2011; 192(6): 1043-55.
- 19 杜秀秀, 房志家, 陈忠翔, 匡鑫, 黄志伟. 酵母中性脂快速检测及积累动态分析. *生物技术通报*(Du Xiuxiu, Fang Zhijia, Chen Zhongxiang, Kuang Xin, Huang Zhiwei. Rapid quantitation and dynamic accumulation analysis of neutral lipids in yeast. *Biotechnology Bulletin*) 2014; 46(8): 208-14.
- 20 Bilyk A, Piazza GJ, Bistline Jr RG, Haas MJ. Separation of cholesterol, and fatty acylglycerols, acids and amides by thin-layer chromatography. *Lipids* 1991; 26(5): 405-6.
- 21 Prasitchoke P, Kaneko Y, Bamba T, Fukusaki E, Kobayashi A, Harashima S. Identification and characterization of a very long-chain fatty acid elongase gene in the methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*. *Gene* 2007; 391(1/2): 16-25.
- 22 Martin S, Parton RG. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(5): 373-8.
- 23 Lázaro B, Villa JA, Santín O, Cabezas M, Milagre CDF, de la Cruz F, *et al.* Heterologous expression of a thermophilic diacylglycerol acyltransferase triggers triglyceride accumulation in *Escherichia coli*. *PLoS One* 2017; 12(4): e0176520.
- 24 Petschnigg J, Wolinski H, Kolb D, Zellnig G, Kurat CF, Natter K, *et al.* Good fat, essential cellular requirements for triacylglycerol synthesis to maintain membrane homeostasis in yeast. *J Biol Chem* 2009; 284(45): 30981-93.
- 25 Lockshon D, Surface LE, Kerr EO, Kaeberlein M, Kennedy BK. The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. *Genetics* 2007; 175(1): 77-91.
- 26 Schnitter R, Brugger B, Amann CM, Prestwich GD, Epan RF, Zellnig G, *et al.* Identification and biophysical characterization of a very-long-chain-fatty-acid-substituted phosphatidylinositol in yeast subcellular membranes. *J Biol Chem* 2004; 279(3): 941-9.
- 27 Yazawa H, Iwahashi H, Kamisaka Y, Kimura K, Uemura H. Production of polyunsaturated fatty acids in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relation to alkaline pH tolerance. *Yeast* 2010; 26(3): 167-84.
- 28 Huang YS, Chaudhary S, Thurmond JM, Bobik EG Jr, Yuan L, Chan GM, *et al.* Cloning of $\Delta 12$ - and $\Delta 6$ -desaturases from *Mortierella alpina* and recombinant production of γ -linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids* 1999; 34(7): 649-59.
- 29 Rössler H, Rieck C, DeLong T, Hoja U, Schweizer E. Functional differentiation and selective inactivation of multiple, *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in very-long-chain fatty acid synthesis. *Mol Genet Genomics* 2003; 269(2): 290-8.
- 30 Peter A, Weigert C, Staiger H, Rittig K, Cegan A, Lutz P, *et al.* Induction of stearoyl-CoA desaturase protects human arterial endothelial cells against lipotoxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295: E339-49.
- 31 Nguyen LN, Nosanchuk JD. Lipid droplet formation protects against gluco/lipotoxicity in *Candida parapsilosis*: An essential role of fatty acid desaturase Ole1. *Cell Cycle* 2011; 10(18): 3159-67.
- 32 Costa V, Quintanilha A, Moradas-Ferreira P. Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Iubmb Life* 2007; 59(5): 293-8.
- 33 Feng Y, Cronan JE. Complex binding of the FabR repressor of bacterial unsaturated fatty acid biosynthesis to its cognate promoters. *Mol Microbiol* 2011; 80(1): 195-218.
- 34 Zhang H, Zheng B, Gao R, Feng Y. Binding of *Shewanella* FadR to the fabA fatty acid biosynthetic gene: implications for contraction of the fad regulon. *Protein Cell* 2015; 6(9): 667-79.
- 35 Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(6): 2595-600.
- 36 Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 2010; 51(2): 679-89.
- 37 Fakas S, Qiu Y, Dixon JL, Han GS, Ruggles KV, Garbarino J, *et al.* Phosphatidate phosphatase activity plays key role in protection against fatty acid-induced toxicity in yeast. *J Biol Chem* 2011; 286(33): 29074-85.