

## 鸡肝脏型脂肪酸结合蛋白基因启动子活性分析

高广亮<sup>1,2</sup>, 冷丽<sup>1,2</sup>, 张会丰<sup>1,2</sup>, 贺 恭<sup>1,2</sup>, 李 辉<sup>1,2\*</sup>, 王启贵<sup>1,3\*</sup> (1. 东北农业大学 农业部鸡遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学 动物科学技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 3. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460)

**摘要:** PCR扩增鸡 L-FABP 基因 5'侧翼区约 2 kb 的 DNA 片段, 进行克隆并测序, 构建了鸡 L-FABP 基因报告基因系列缺失载体, 瞬时转染进入人肝癌细胞系, 利用双荧光素酶报告基因系统测定了荧光素酶活性。在线分析软件发现鸡 L-FABP 基因启动子区存在 HNF-1、SREBP-1、AP-1、C/EBP、Oct-1、TATA、CCAAT、GATA-1 等调控元件, 没有发现 CpG 岛。报告基因结果表明鸡 L-FABP 基因启动子 -2 076 bp/-20 bp 区域具有最强的启动子活性, -522 bp/-20 bp 区域启动子活性最弱; C/EBP $\alpha$  可以显著的抑制鸡 L-FABP 基因的表达, 这些结果为深入研究鸡 L-FABP 的表达调控机制奠定了基础。

**关键词:** 鸡; 肝脏型脂肪酸结合蛋白基因; 启动子; 活性分析

中图分类号: S852.2 文献标志码: A 文章编号: 1005-4545(2012)09-1344-05

## Activity analysis of chicken liver fatty binding protein gene promoter

GAO Guang-liang<sup>1,2</sup>, LENG Li<sup>1,2</sup>, ZHANG Hui-feng<sup>1,2</sup>, HE Qi<sup>1,2</sup>, LI Hui<sup>1,2\*</sup>, WANG Qi-gui<sup>1,3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Harbin 150030, China; 2. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 3. Chongqing Academy of Animal Science, Chongqing 402460, China)

**Abstract:** The objective of this study was to analyze the promoter structure and activity of the chicken liver fatty binding protein(L-FABP) gene. The 5'flanking 2 kb of chicken L-FABP gene was amplified by PCR, cloned and sequenced. A series of recombination plasmids of L-FABP gene were constructed and transiently transfected into human hepatoma cell line 2(HEPG2). Then their luciferase activity was measured by dual luciferase reporter gene assay system. Bioinformatics analysis revealed that the chicken L-FABP gene promoter fragment included HNF-1, SREBP-1, AP-1, C/EBP, Oct-1, TATA, CCAAT, GATA-1 and other regulatory elements binding sites and the gene promoter region can not find CpG islands. The activity of the promoter region analysis by luciferase reporter assays demonstrated that promoter region(-2 076 bp/-20 bp) was strongest promoter activity and the promoter region(-522 bp/-20 bp) was worse, and C/EBP $\alpha$  could repress the chicken L-FABP gene expression. This study will provide the foundation for in-depth study on the chicken L-FABP gene expression regulation mechanism.

**Key words:** chicken; L-FABP; promoter; activity analysis

\* Corresponding author, E-mail: lihui@neau.edu.cn; E-mail: wangqigui@hotmail.com

肝脏型脂肪酸结合蛋白(liver fatty acid binding protein, L-FABP)是大量存在禽类肝脏中的胞内脂肪酸结合蛋白,能够结合疏水性脂肪酸形成复合物<sup>[1]</sup>。在 L-FABP 基因敲除型小鼠的研究中, L-FABP 基因的缺失显著降低了肝脏内脂肪酸的  $\beta$  氧

化并能有效抑制脂肪肝的形成<sup>[2]</sup>。下调 L-FABP 的表达不仅可以降低 VLDL(very low-density lipoprotein, VLDL)的分泌,而且还可以防止脂肪肝的形成<sup>[3]</sup>。不同的研究学者也说法不一,敲除型小鼠饲喂高胆固醇日粮,出现肥胖和脂肪肝及肝内大量聚集胆固醇的症状<sup>[4-5]</sup>。有研究发现 L-FABP 基因敲除的大鼠,脂肪酸转运明显降低<sup>[6]</sup>。石慧等<sup>[7]</sup>证明鸡 L-FABP 基因在鸡肝脏和小肠组织中特异性表达,其表达情况与小鼠等哺乳动物的相似,这可能预示其功能的相似性<sup>[8]</sup>。

本试验克隆了鸡 L-FABP 基因的启动子,并进

收稿日期:2012-04-01

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972087)

作者简介:高广亮(1987-),男,硕士研究生。

\* 通讯作者, E-mail: lihui@neau.edu.cn; wangqigui@hotmail.com

行生物信息学分析,构建启动子系列缺失报告基因载体,对其活性进行分析,确定有基本转录活性的启动子区域及转录因子 C/EBP $\alpha$  对其启动活性的影响,为进一步研究鸡 L-FABP 的表达调控奠定了基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料和试剂** 克隆所用菌株 DH5 $\alpha$  由本实验室保存;pMD18-T Simple Vector、限制性内切酶 Mlu I、Bgl II、DNA Marker、LA Taq 酶、dNTPs 购自 TaKaRa 公司;荧光素酶报告基因载体、pGL3-Basic 及海肾荧光素酶报告基因载体 pRL2TK 购自 Promega 公司;T<sub>4</sub> DNA 聚合酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自北京 NEB 公司;质粒回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自 AXYGEN 生物技术有限公司;转染试剂 FuGENE HD 购于罗氏公司、DMEM 高糖培养基、胎牛血清购自 GIBCO 公司;荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司;引物合成由上海英俊生物技术有限公司完成;测序由北京华大基因有限公司完成;人肝癌细胞系 (HEPG2) 由东北农业大学生命科学院馈赠;C/EBP $\alpha$  表达载体由本实验室构建。

**1.2 启动子的序列分析** 利用在线分析软件 MOTIF Search (<http://motif.genome.jp/>) 和 TF-SEARCH ([http://cbrc.jp/research/db/TF-](http://cbrc.jp/research/db/TF-SEARCH.html)

SEARCH.html) 分析 L-FABP 基因转录因子结合位点。利用 CpG Island ([http://www.bio2soft.net/sms/cpg\\_island.html](http://www.bio2soft.net/sms/cpg_island.html)) 对序列进行 CpG 岛分析。

### 1.3 鸡 L-FABP 基因启动子报告基因载体的构建

根据 GenBank 中鸡 L-FABP 基因序列 (AF380998),设计以下特异引物(表 1)用于扩增鸡 L-FABP 基因启动子区,目标片段长度分别为 2 056、1 088、502 bp,引物序列中酶切位点序列用下划线表示。将扩增的 L-FABP-2076/-20、L-FABP-1288/-20 和 L-FABP-522/-20 片段分别连接到 pMD-18-T Simple 亚克隆载体上,利用引物两端设计的 Mlu I、Bgl II 单酶切位点,将目的片段从亚克隆载体上切割并回收,回收目的片段并与 pGL3-Basic 载体连接,利用双酶切方法筛选阳性重组质粒,测序鉴定。

**1.4 细胞培养** 人肝癌细胞系 (HEPG2) 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和链霉素的 DMEM 高糖培养基,37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱内传代培养,0.25% 胰酶消化液消化传代,每 1.5 d 传代 1 次。所有试验均采用对数生长期的细胞。

**1.5 鸡 L-FABP 基因启动子活性分析** 细胞接种于 12 孔板中,待细胞生长至 80% 汇合时,采用罗氏 HD 转染试剂按照厂商推荐的

表 1 L-FABP 基因引物设计序列

引物名称	引物序列 (5'-3')	酶切位点
L-FABP-2076/-20F	<u>ACGCGTAGGTACCGAGCTCTTACGCGTTAGTAGGGGAAATAGAAAACC</u>	Mlu I
L-FABP-2076/-20R	<u>CTCGAGACTTAGATCGCAGATCTCGAGCCAACACAAGAGAAGATGCC</u>	Bgl II
L-FABP-1288/-20F	<u>ACGCGTAGGTACCGAGCTCTTACGCGTATCAGCTCAGAGGCAGTCAC</u>	Mlu I
L-FABP-1288/-20R	<u>CTCGAGACTTAGATCGCAGATCTCGAGCCAACACAAGAGAAGATGCC</u>	Bgl II
L-FABP-522/-20F	<u>ACGCGTGCAGCTCGTCTACTGCACAAAGAGC</u>	Mlu I
L-FABP-522/-20R	<u>CTCGAGACTTAGATCGCAGATCTCGAGCCAACACAAGAGAAGATGCC</u>	Bgl II

方法转染细胞。每孔转染 DNA 总量为 2  $\mu$ g, pGL3-L-FABP 系列质粒分别与海肾荧光素酶报告基因载体 (pRL2TK) 的比值为 100 : 1。海肾荧光素酶报告基因载体作为内源参照,以消除由于转染效率及细胞活性等因素带来的差异。转染 48 h 后,根据 Promega 公司荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书,进行荧光素酶活性检测。试验重复 5 次,每次有 3 个平行试验,启动子相对活性用目的基因荧光/海肾荧光值 (Fluc/Rluc) 比值表示。

**1.6 C/EBP $\alpha$  转录因子对鸡 L-FABP 基因启动子活性影响分析** C/EBP $\alpha$  真核表达载体与分别与不同

长度鸡 L-FABP 基因启动子报告基因载体共转染 HEPG2 细胞,PCMV-HA 载体与不同长度鸡 L-FABP 基因启动子报告基因载体共转染 HEPG2 细胞作为对照组。内源参照为海肾荧光素酶报告基因载体。以报告基因相对表达量反映启动子活性。48 h 后分别检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性。试验重复 5 次,每次有 3 个平行试验,启动子相对活性用目的基因荧光/海肾荧光值 (Fluc/Rluc) 比值表示。

**1.7 数据分析** 所有数据均为 5 次独立试验结果, $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方

差分析与  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异显著,  $P < 0.01$  差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 鸡 L-FABP 基因启动子的生物信息学分析

在线分析软件 TFSEARCH 和 MOTIF Search 分析 L-FABP 启动子序列的结果表明, 在鸡 L-FABP 基因转录起始位点上游存在许多基本转录元件, 如 C/EBP $\alpha$ (-370, -1 299 bp)、GATA-1(-761 bp)、CCAAT box(-929 bp)、TATA(-1 131 bp)、AP1(-1 215 bp) 和 SREBP-1(-1 904 bp) 等转录调控元件。其中 SREBP-1 和 CCAAT box 在鸡、人、鼠的启动子序列中是高度保守的。利用 CpG 岛在线分析软件对克隆得到的启动子区序列进行分析, 结

果表明, 鸡 L-FABP 基因启动子区不存在 CpG 岛。

**2.2 鸡 L-FABP 基因启动子克隆** 以鸡基因组 DNA 为模板, 利用 PCR 方法扩增鸡 L-FABP 基因启动子区。PCR 扩增获得 3 条特异片段(2 056、1 268、502 bp), 与预期片段长度相符。初步确认为鸡 L-FABP 基因的启动子区, 回收后与 pMD18-T Simple 载体连接, 筛选阳性重组质粒并进行测序。进一步构建鸡 L-FABP 基因启动子报告基因载体 pGL3-L-FABP-522/-20、pGL3-L-FABP-1288/-20 和 pGL3-L-FABP-2076/-20, 目的片段测序结果与鸡 L-FABP 基因 DNA 序列比对结果显示获得了重组阳性质粒, 即鸡 L-FABP 基因系列缺失启动子的报告基因载体构建成功(图 1)。

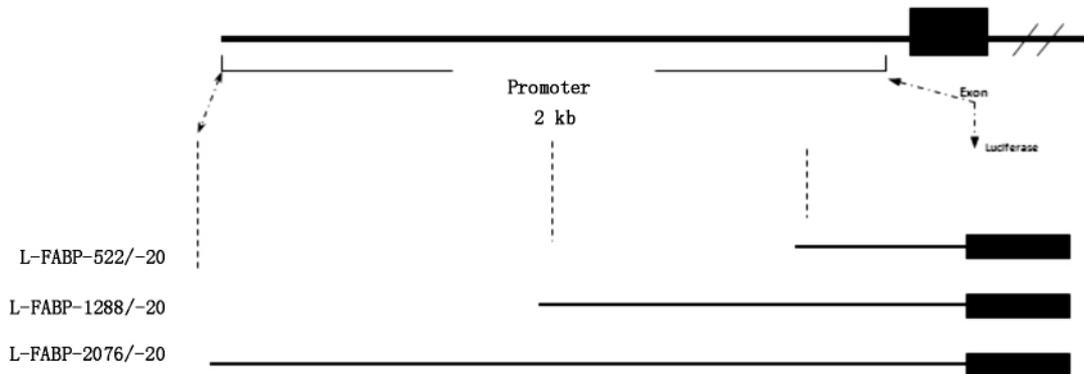


图 1 鸡 L-FABP 基因启动子系列缺失载体

**2.3 鸡 L-FABP 基因启动子报告基因分析** 为进一步研究鸡 L-FABP 基因启动子不同区域的活性, 将带有不同长度 L-FABP 基因启动子的报告基因表达载体分别与海肾质粒(pRL2TK)共转染 HEPG2 细胞, 48 h 后分别检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性。结果发现, 克隆的 3 段启动子报告基

因载体均有明显的启动活性, 与对照空载体质粒(pGL3-Basic)相比, 差异均达到了极显著水平( $P < 0.01$ )(图 2)。在 -2 076/-20 bp 区域, 报告基因活性最强, 随着片段由 5' 端逐渐缩短, 报告基因活性逐渐减弱, 在 -522/-20 bp 达到最弱。

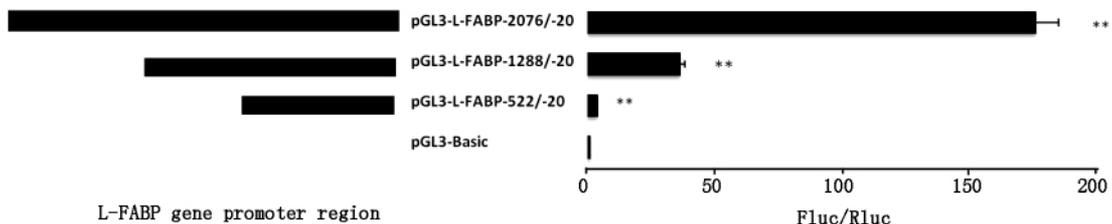


图 2 鸡 L-FABP 基因启动子 5' 侧翼区缺失片段活性分析 \*\* 表示差异极显著( $P < 0.01$ )

将不同长度鸡 L-FABP 基因启动子报告基因载体(-522/-20, -1 288/-20, -2 076/-20) 转染 HEPG2 细胞, 并以 pGL3-Basic 载体作为阴性对照。

以报告基因相对表达量反映启动子活性。经过 5 次平行试验。图 2 左侧条形图表示鸡 L-FABP 基因启动子区域, 右侧条形图表示相应的启动子相对活性。

## 2.4 鸡 C/EBP $\alpha$ 基因对 L-FABP 基因的转录调控

为进一步研究鸡 C/EBP $\alpha$  基因对 L-FABP 基因的转录调控,将不同长度 L-FABP 基因启动子的报告基因表达载体分别与 C/EBP $\alpha$  基因真核表达载体共转染 HEPG2 细胞,48 h 后分别检测萤火虫荧光素酶活性。结果发现:C/EBP $\alpha$  基因对 L-FABP 基因启动子区有负调控作用,而且对各片段均有作用,尤其对 -2 076/-20 bp 区域启动子活性作用更为明显,降低了 59.24 倍。这些结果表明鸡 L-FABP 基因可能受 C/EBP $\alpha$  的负调控,而且启动子区内存

在多个 C/EBP $\alpha$  结合位点。

鸡 L-FABP 基因启动子各报告基因载体(-2 076/-20, -1 288/-20, -522/-20)分别与 C/EBP $\alpha$  表达载体共转染 HEPG2 细胞作为试验组,与 PCMV-HA 载体共转染 HEPG2 细胞作为对照组。以报告基因相对表达量反映启动子活性。5 次平行试验。由图 3 可见,左侧条形图表示鸡 L-FABP 基因启动子区域,右侧条形图表示相应的启动子相对活性。SPSS13.0 进行 3 组数值之间单因素方差分析与 *t* 检验。

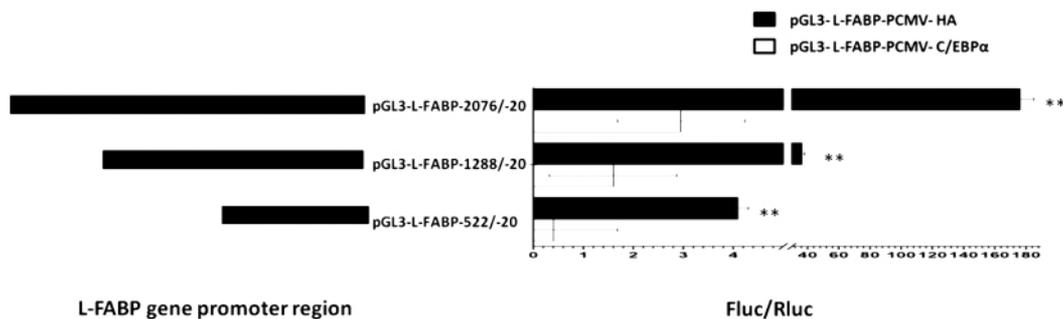


图 3 C/EBP $\alpha$  对 L-FABP 基因启动子活性的影响 \*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ )

## 3 讨论

为研究鸡 L-FABP 基因启动子活性及 C/EBP $\alpha$  转录因子对鸡 L-FABP 基因的转录调控,本试验克隆并构建了启动子系列缺失报告基因载体,并将启动子报告基因系列缺失载体瞬时转染进入人肝癌细胞系(HEPG2)中开展了鸡 L-FABP 基因启动子活性分析。本试验发现,随着片段由 5'端逐渐缩短,鸡 L-FABP 基因报告基因活性逐渐减弱,-2 076/-20 bp 区域,报告基因活性最强,在-522/-20 bp 达到最弱。因此,推测在-2 076/-1 288 bp 区域存在重要的正调控因子结合位点。

人 L-FABP 基因启动子的许多重要顺式作用元件已经被鉴定,重要的调控元件包括 PPAR 元件、甾族调节元件 SRE、CEBP $\alpha$  和 AP1 等重要的调控元件<sup>[1]</sup>。PPAR 元件结合在人 L-FABP 基因启动子区-68/-56 区域,与人 L-FABP 基因相互调节<sup>[9]</sup>,然而生物信息学分析结果显示,鸡 L-FABP 基因启动子区并不具有 PPAR 转录因子,鸡和人类的 L-FABP 基因在基因功能有所不同,这可能是导致鸡与人和鼠等哺乳动物在脂肪重头合成和脂肪酸运输过程中表达差异的原因,还需要进一步试验证明。TATA 框和起始子又称为核心启动子<sup>[10]</sup>,这一

序列含 TATAAA 共有序列,能独立执导聚合酶 II 在离体条件下的裸 DNA 模板或活体中转化的 DNA 模板上进行低水平转录。当一个激活因子结合到附近的调控元件时,TATA 框就能够执导活化转录<sup>[11]</sup>。TATA 框绝大多数在(-31 ± 2) bp 处<sup>[12]</sup>,根据在线软件分析鸡 L-FABP 基因的 5'调控区 TATA 位于(-1 131 bp)。从酵母到人类这 6 种转录因子的序列都是十分保守的<sup>[13]</sup>。CCAAT 框是转录因子是 C/EBP $\alpha$  基因 DNA 序列上的结合位点,其序列为 CCAAT。CCAAT 框在真核生物启动子上主要分布在转录起始位点前-159 ~ -51 bp<sup>[13]</sup>的区域内,根据在线软件分析鸡 L-FABP 基因的 5'调控区 CCAAT 框位于-929 bp 处,目前没有对鸡、鼠和人的 CCAAT 框保守性分析。

人 L-FABP 基因同样受 C/EBP $\alpha$  基因调控,C/EBP $\alpha$  的 DNA 结构域在人和鸡之间高度保守,氨基酸保守性也很高<sup>[14-15]</sup>。C/EBPs 家族是一类在不同物种间都具有重要生物学作用的功能基因<sup>[16-17]</sup>。生物信息学分析结果显示,在鸡 L-FABP 基因启动子-2 076/-20 bp 区域内存在 2 个 C/EBP $\alpha$  的结合位点,然而本试验发现 C/EBP $\alpha$  对 L-FABP 基因启动子区各片段均有负调控作用,且随着片段的逐渐缩短,C/EBP $\alpha$  对 L-FABP 基因抑制作用逐渐减弱。因此,推断这段区域内可能存在不止 2 个 C/EBP $\alpha$

的结合位点。本试验使用人的肝癌细胞系 HEPG2 作为试验材料,由于鸡和人的 L-FABP 基因和 CEBP $\alpha$  基因在人和鸡的肝脏中都有表达且氨基酸序列的保守性很高,因此推测在人和鸡的 L-FABP 基因具有相同的调控机制,即鸡 L-FABP 基因同样受到 C/EBP $\alpha$  基因负调控作用。

本试验克隆并构建鸡 L-FABP 基因启动子系列缺失载体,通过对其启动子活性进行分析和表达调控研究推断鸡 L-FABP 基因受多种转录因子和上游序列的调控,并且转录因 C/EBP $\alpha$  对其起到负调控作用。

#### 参考文献:

- [1] Murai A, Furuse M, Kitaguchi K, et al. Characterization of critical factors influencing gene expression of two types of fatty acid-binding proteins(L-FABP and Lb-FABP) in the liver of birds [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2009, 154: 216-223.
- [2] Newberry E P, Kennedy S M, Xie Y, et al. Diet-induced alterations in intestinal and extrahepatic lipid metabolism in liver fatty acid binding protein knockout mice [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 326(1/2): 79-86.
- [3] Spann N J, Kang S, Li A C, et al. Coordinate transcriptional repression of liver fatty acid-binding protein and microsomal triglyceride transfer protein blocks hepatic very low density lipoprotein secretion without hepatosteatosis[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 33066-33077.
- [4] Martin G G, Atshaves B P, McIntosh A L, et al. Liver fatty acid-binding protein gene ablation potentiates hepatic cholesterol accumulation in cholesterol-fed female mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290(1): 36-48.
- [5] Newberry E P, Xie Y, Kennedy S M, et al. Protection against Western diet - induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid - binding protein knockout mice [J]. *Hepatology*, 2006, 44: 1191-1205.
- [6] Newbeny E P, Xie Y, Kennedy S, et al. Decreased hepatic triglyceride accumulation and altered fatty acid uptake in mice with deletion of the liver fatty acid binding protein [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 51664-51672.
- [7] 石 慧. 鸡 A-FABP、L-FABP 多克隆抗血清制备及组织表达分析[D]. 黑龙江 哈尔滨: 东北农业大学, 2008.
- [8] Wang Q, Li H, Li N, et al. Tissue Expression and association with fatness traits of liver fatty acid-binding protein gene in chicken [J]. *Poult Sci*, 2006, 85(11): 1890-1895.
- [9] Schachtrup C, Emmler T, Bleck B, et al. Functional analysis of peroxisome proliferator response element motifs in genes of fatty acid binding proteins [J]. *Biochem*, 2004, 382: 239-245.
- [10] Pedersen A G, Baldi P, Chauvin Y, et al. The biology of eukaryotic promoter prediction—a review [J]. *Comput Chem*, 1999, 23(6): 191-207.
- [11] 凯里 M, 斯梅尔 S T. 真核生物转录调控 概念、策略与方法[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] 童克中. 基因及其表达[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] 张小辉, 祁艳霞. 真核生物启动子 TATA box、GC box 和 CAATbox 的分析[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(4): 1380-1381, 1395.
- [14] McIntosh A L, Atshaves B P, Hostetler H A, et al. Liver type fatty acid binding protein(L-FABP) gene ablation reduces nuclear ligand distribution and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  activity in cultured primary hepatocytes[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 485(2): 160-173.
- [15] 张爱朋, 王守志, 王启贵, 等. 鸡 C/EBP $\alpha$  基因的多态性与生长和体组成性状的相关研究 [J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(4): 746-752.
- [16] Zelilinger S, Ebner A, Marosits T, et al. The Hypocrea jecorina HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAATbox(ATTGG) within the cbh2(cellobiohydrolase II gene) activating element [J]. *Mol Genet Genomics*, 2001, 266(1): 56-63.
- [17] Hynes M J, Draht O W, Davis M A. Regulation of the acuF gene, encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* [J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(1): 183-190.