

过表达鸡 *Gata2* 或 *Gata3* 基因抑制 *Ppar γ* 基因的转录

张志威, 陈月婵, 裴文宇, 王宁, 李辉*

(农业部鸡遗传育种重点实验室; 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030)

摘要 脂肪细胞分化是脂肪组织发育的一个重要过程. 目前, 鸡脂肪细胞分化的分子调控机制还不十分清楚. 哺乳动物的研究表明, 转录因子 GATA 结合蛋白 2 (Gata2) 和 GATA 结合蛋白 3 (Gata3) 具有抑制脂肪细胞分化的功能, 它们在白色脂肪组织和棕色脂肪组织中的表达模式不同. 鸡没有棕色脂肪组织, 目前还没有关于 Gata2 和 Gata3 作用于鸡脂肪细胞分化的研究报道. 本研究利用半定量 RT-PCR 的方法分析了 *Gata2* 和 *Gata3* 基因在鸡腹部脂肪组织和前脂肪细胞中的表达规律, 发现鸡腹部脂肪组织中高水平表达 *Gata2* 基因, 低水平表达 *Gata3* 基因; 鸡前脂肪细胞中 *Gata2* 基因的表达水平远高于 *Gata3* 基因的表达水平, 油酸诱导分化后的鸡前脂肪细胞 *Gata2* 基因的表达水平明显下调. 此外, 鸡过氧化物酶体增殖体激活受体 γ (*Ppar γ*) 启动子 (-1985/-89) 报告基因荧光素活性分析和半定量 RT-PCR 发现在 DF1 细胞中过表达 *Gata2* 或 *Gata3* 抑制鸡 *PPAR γ* 基因的转录. 本研究结果为进一步研究鸡脂肪细胞分化的分子调控机制和 *Gata2* 和 *Gata3* 基因的生物学功能提供了参考.

关键词 GATA 结合蛋白 2 (Gata2); GATA 结合蛋白 3 (Gata3); 过氧化物酶体增殖体激活受体 γ (*Ppar γ*); 转录

中图分类号 Q341

Overexpression of Chicken *Gata2* or *Gata3* Suppressed the Transcription of *Ppar γ* Gene

ZHANG Zhi-Wei, CHEN Yue-Chan, PEI Wen-Yu, WANG Ning, LI Hui*

(Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Adipocyte differentiation and its regulatory mechanism in chicken adipogenesis remains unclear. The transcription factors GATA binding protein 2 (Gata2) and GATA binding protein 3 (Gata3), which expressed differently between white and brown adipose tissues, have been shown to inhibit preadipocytes differentiation in mammals. And it has not reported in chicken, where no brown adipose tissue existed. In the present study, semi-quantitative RT-PCR analysis indicated that *Gata2*, but not *Gata3*, was predominantly expressed in chicken abdominal fat tissues and chicken preadipocytes. The *Gata2* expression was significantly reduced in chicken preadipocytes when induced with oleate for differentiation. In addition, the luciferase assay and the semi-quantitative RT-PCR analysis demonstrated that the overexpression of *Gata2* or *Gata3* gene in DF1 cells inhibited the gene transcription of the chicken peroxisome proliferator-activated receptor γ (*Ppar γ*). The results will help to understand the functions of

收稿日期: 2012-05-28; 接受日期: 2012-07-11

国家 973 计划项目课题 (No. 2009CB941604); 国家肉鸡产业技术体系建设项目 (No. CARS-42); 黑龙江省高等学校科技创新团队建设项目 (No. 2010td02)

* 联系人 Tel: 0451-55191516; E-mail: lihui@neau.edu.cn

Received: May 28, 2012; Accepted: July 11, 2012

Supported by National Basic Research Program of China (No. 2009CB941604), China Agriculture Research System (No. CARS-42) and Program for Innovation Research Team in University of Heilongjiang Province (No. 2010td02)

* Corresponding author Tel: 0451-55191516; E-mail: lihui@neau.edu.cn

Gata2 and *Gata3* in the chicken adipogenesis.

Key words GATA binding protein 2 (*Gata2*); GATA binding protein 3 (*Gata3*); peroxisome proliferator-activated receptor γ (*Ppar\gamma*); transcription

脊椎动物体内, GATA 结合蛋白 (GATA binding protein, Gata) 是一类具有 2 个保守的 C-X₂-C-X₁₇-C-X₂-C (C 为半胱氨酸, X 为任意氨基酸) 型锌指结构的转录因子^[1,2]; 其氨基端锌指结构主要参与蛋白互作, 羧基端锌指结构主要作为 Gata 家族转录因子的 DNA 序列结合域, 识别并结合靶基因上保守的 (T/A) GATA (A/G) 核苷酸序列^[3]. 哺乳动物 Gata 家族共有 6 个成员, 分为 2 个亚家族^[2]. 亚家族 1 包括 *Gata1*、*Gata2* 和 *Gata3*, 主要参与调控血细胞生成和神经系统发育, 但是它们的作用并不仅限于此^[4-6]; 亚家族 2 包括 *Gata4*、*Gata5* 和 *Gata6*, 主要在中胚层和内胚层来源的组织中表达, 对心脏、肠道、血管和泌尿生殖系统的形成具有重要的调控作用^[4,7-9].

哺乳动物的研究表明, 转录因子 *Gata2* 和 *Gata3* 对脂肪组织的发育具有重要的调控作用, *Gata3* 基因缺失的小鼠胚胎干细胞表现出增强的成脂分化能力, 遗传性肥胖症小鼠白色脂肪中 *Gata2* 和 *Gata3* 基因的表达水平都呈现明显的下调趋势^[10]. *Gata2* 和 *Gata3* 基因在白色脂肪组织和棕色脂肪组织中具有不同的表达模式: *Gata2* 和 *Gata3* 基因在白色脂肪组织中同时高水平表达, 并且都是白色脂肪细胞分化的负调控因子, 强制表达 *Gata2* 或 *Gata3* 都可以抑制白色脂肪细胞的分化^[10]; 棕色脂肪组织仅表达 *Gata2* 基因不表达 *Gata3* 基因, 过表达 *Gata2* 基因显著抑制棕色脂肪细胞的分化^[11]. 进一步研究表明, 转录因子 *Gata2* 和 *Gata3* 通过抑制过氧化物酶体增殖体激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , *PPAR\gamma*) 基因的表达和与转录因子 C/EBP α (CCAAT/enhancerbinding protein α) 和 C/EBP β (CCAAT/enhancerbinding protein β) 发生蛋白互作两种途径来抑制脂肪细胞的分化^[12].

鸡只有白色脂肪组织没有棕色脂肪组织^[13]. 因此, 哺乳动物的研究结果不能直接应用于鸡. 目前, 还没有关于 *Gata2* 和 *Gata3* 直接作用于鸡脂肪细胞分化的研究报道. 本研究分析了 *Gata2* 和 *Gata3* 基因在鸡脂肪组织和脂肪细胞中的表达规律, 利用过表达分析了鸡 *Gata2* 和 *Gata3* 基因对 *Ppar\gamma* 基因转录活性的影响, 为进一步研究 *Gata2* 和 *Gata3* 基因在鸡脂肪组织中的功能提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料

东北农业大学肉鸡高、低脂双向选择系 11 世代 2~10 周龄肉鸡 (公鸡, 每周龄高、低脂系各 3 只), 屠宰后取新鲜的腹部脂肪组织于 -80℃ 保存备用; 普通 12 日龄 AA 肉仔鸡若干只.

1.2 鸡前脂肪细胞培养

从 12 日龄 AA 肉鸡中取腹部脂肪组织 (3~5 g), 用 PBS 清洗 2 遍后, 用 2 mg/mL I 型胶原酶 (Sigma) 37℃ 消化 1 h, 其间每隔 10 min 上下颠倒混匀 1 次. 然后让消化后的组织液通过 100 μ m 和 600 μ m 滤网, 除去未消化的组织块. 收集过滤后的组织消化液 200 g 离心 10 min. 弃掉上层液体, 下层细胞再次经过红细胞裂解液处理后, 200 g 离心 10 min, 获得鸡前脂肪细胞. 分离的鸡前脂肪细胞用全培养基: DMEM/F12 (Gibico) + 10% FBS (Gibico) + 1% K (penicillin-streptomycin solution; Sigma) 悬浮, 以 1×10^5 cells/cm² 的接种密度接种到细胞培养瓶中, 在 37℃, 5% CO₂ 条件下培养. 待细胞长到 70%~90% 汇合 (大约 3~4 d) 后, 用胰酶消化后, 将细胞以 1×10^5 cells/cm² 密度传代, 接种到 6 孔板培养. 接种到 12 h 后, 细胞大约长到 90% 汇合, 添加 160 μ mol/L 油酸到培养基中诱导细胞进行分化.

1.3 总 RNA 提取及反转录

RNA 提取利用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂按照说明完成. 反转录以 Oligo (dT) 为引物, 利用 Promega 公司的 ImProm-II reverse transcriptase Kit 按照说明操作完成.

1.4 鸡 *Gata2* 和 *Gata3* 基因 CDS 区序列克隆及载体构建

以高、低脂系腹部脂肪组织混合 cDNA 为模板进行 PCR, 引物信息和 PCR 条件见 Table 1. 扩增片段回收纯化后连接到 pMD-18T 载体 (TaKaRa), 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒酶切鉴定后, 进行测序 (华大基因). 测序正确后, 利用引物两端的酶切位点将目的片段亚克隆到 pCMV-Myc 载体 (Clontech).

1.5 半定量 RT-PCR

根据 NCBI GenBank 数据库的相关序列信息, 利用 Primer premier 5.0 结合 UCSC 鸡基因组跨内含

子设计 *Gata2*、*Gata3*、*Ppary* 和 *Gapdh* 表达分析引物,以东北农业大学肉鸡高、低脂系腹部脂肪组织 cDNA 和相应细胞样品 cDNA 为模板进行 PCR,除特殊说明外,PCR 引物和反应条件具体信息见 Table 2. 琼脂糖凝胶电泳后,利用 electrophoresis gel

imaging system(UVP) 获得电泳照片,利用 Quantity one(Bio-Rad) 软件获取检测基因电泳条带的积分光密度(integrated option density, IOD) 值,基因相应表达量数据化利用公式: Rel. Quantity = IOD(目的基因) /IOD(*Gapdh*).

Table 1 Primers and PCR conditions for chicken *Gata2* and *Gata3* gene clone

Gene	Sequence ID	Length/bp	Tm/°C	Sits	Cycle	Primers (5'-3')
<i>Gata2</i>	NM_001003797	1 401	55	410	32	ATTAGATCTCCATGGAGGTGGCCACGGATC
				1 810		ACGGTACCTTATCCCATGGCTGTAACCAT
<i>Gata3</i>	NM_001008444	1 335	65.7	187	36	AAGTCGACTATGGAGGTCTCCACGGACC
				1 521		GTCTCGAGCTAACCCATGGCAGTGACCAT

Table 2 Primers and conditions for semi-quantitative RT-PCR

Gene	Sequence ID	Length/bp	Tm/°C	Sits	Cycle	Primers(5'-3')
<i>Gata2</i>	NM_001003797	236	55	1 256	30	AACTGTGGAGCAACCGCTAC
				1 491		AGTCCGCAGGCATTACAAAC
<i>Gata3</i>	NM_001008444	221	65.7	341	34	GCTGTGATGGATGGAGGTCT
				561		ATATCGACGGACAAGGCAAC
<i>Ppary</i>	NM_001001460	175	61.5	309	32	CAACTCACTTATGGCTA
				483		CTTATTTCTGCTTTTCT
<i>Gapdh</i>	NM_204305	185	58	227	25	CTGTCAAGGCTGAGAAGC
				411		GATAACACGCTTAGCACCA

1.6 鸡胚成纤维细胞系(DF1)的培养

冻存的 DF1 细胞系按照以下方法进行复苏,将液氮保存的细胞放入 37 °C 水浴锅中,摇动冻存管,直至融化;融化后的细胞转移到装有 10 mL 37 °C 预温的完全培养基(DMEM/F12 + 10% FBS) 的 15 mL 离心管中,温和混匀;1000 r/min 离心 10 min 后,弃培养基. 收集细胞后,用 10 mL 完全培养基重新悬浮细胞,转移到 25 mL 培养瓶中,在 37 °C, 5% CO₂ 条件下进行培养.

1.7 Western 印迹

在 6 孔板培养的 DF1 细胞中分别转染 2 μg 的 pCMV-myc-Gata2, pCMV-myc-Gata3 和 pCMV-myc (empty vector, EV) 质粒并培养 48 h 后,弃去培养基,在室温下用 PBS 洗 1 次细胞. 按照每孔 0.15 mL 的量加入细胞裂解液(RIPA buffer),放置于冰上,轻轻摇动,作用 15 min 裂解细胞,裂解完成后,用干净的细胞刮将细胞刮于培养孔的一侧,将裂解液移至 1.5 mL 离心管中. 10 000 g, 4 °C 离心 10 min,上清即为细胞总裂解物. 取细胞总裂解物 40 μg,加入等体积的 2 × Loading buffer,100 °C 加热 5 min 使蛋白样品变性. 每个样品取 10 μL,利用 BIO-RAD 的 Mini-PROTEAN3 电泳系统进行 SDS-PAGE. 电泳结束后,采用 BIO-RAD 的 Mini Trans-Blot 系统

将蛋白样品由 PAGE 胶上转移至硝酸纤维素膜. 利用含有 5% 脱脂乳的 PBST(含 0.05% 吐温的 PBS) 室温封闭 1 h. 洗去膜上的封闭液,将膜孵育在含一抗(鼠源鸡 *Gapdh* 蛋白单抗购自碧云天: 1: 100; 鼠源 myc 标签单抗购自 Clontech: 1: 200) 的 PBST 溶液中,置于水平摇床上,室温作用 1 h. 用 PBST 洗膜 3 次,每次 5 min,然后将膜孵育在含二抗(山羊抗小鼠购自碧云天: 1: 5 000) 的 PBST 溶液中,置于水平摇床上,室温作用 1 h. 用 PBST 洗膜 3 次,每次 5 min,之后进行常规 ECL(碧云天) 显色.

1.8 细胞转染

细胞转染采用罗氏 FuGENE HD 转染试剂按照说明书操作完成.

1.9 荧光素酶活性检测

在 12 孔板培养的 DF1 细胞系中进行,所用的鸡 *Ppary* 启动子荧光素酶报告基因质粒 pGL3-basic-Ppary (-1985/-89) 由本实验室制备并保存^[14]. 海肾荧光素酶对照质粒 pRL-TK 购自 Promega 公司,每孔细胞转染 1 μg 质粒,其中包括 0.4 μg 的 pGL3-basic-Ppary (-1985/-89) 质粒,0.008 μg 的 pRL-TK,以及 0.6 μg 的 pCMV-myc-Gata2 和 EV 的混合物(pCMV-myc-Gata2 和 EV 质量比分别为: 3: 0, 2: 1, 1: 2 和 0: 3) 或 0.6 μg 的 pCMV-myc-Gata3 和 EV 的

混合物 (pCMV-myc-Gata3 和 EV 的质量比分别为 3:0, 2:1, 1:1, 1:2 和 0:3), 转染后 48 h, 回收细胞, 利用 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) 试剂盒按照说明检测双报告基因荧光素酶活性.

1.10 数据分析

两组以上数据分析运用 ANOVA 过程 (SAS 9.2), 多重比较采用 Turkey 检验, 两组数据比较采用 Student's *t*-test, $P < 0.05$ 被认为数据差异显著. 数据格式表示为平均数 \pm 标准差 (Mean \pm SD).

2 结果

2.1 鸡 *Gata2* 和 *Gata3* 的克隆和表达载体构建

利用鸡 *Gata2* 和 *Gata3* 基因克隆引物 (Table 1) 以 7 周龄肉鸡腹部脂肪组织 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 分别得到 1 条长度约为 1 400 bp 的特异性条带 (Fig. 1A, B). 测序结果显示, PCR 扩增获得的序列与 NCBI 数据库提供的鸡 *Gata2* (GenBank ID: NM_001003797) 和 *Gata3* 基因 (GenBank ID: NM_

001008444) 的全长编码区 (coding sequence, CDS) 序列完全一致, 序列相似性为 100%. 将经过测序验证的鸡 *Gata2* 和 *Gata3* 全长 CDS 区序列亚克隆到 pCMV-myc 载体上, 构建 pCMV-myc-Gata2 和 pCMV-myc-Gata3 载体, 将构建的 pCMV-myc-Gata2 和 pCMV-myc-Gata3 质粒分别进行 *Bgl* II 和 *Kpn* I, *Sal* I 和 *Xho* I 双酶切验证, 结果显示, 琼脂糖凝胶电泳条带与预期结果一致 (Fig. 1C, D), 表明载体构建成功.

2.2 *Gata2* 和 *Gata3* 基因在肉鸡高、低系 11 世代 2 ~ 10 周龄腹部脂肪组织中的表达分析

半定量 RT-PCR 发现, *Gata2* 和 *Gata3* 基因在 11 世代高、低脂系肉鸡 2 ~ 10 周龄腹部脂肪组织中均有表达 (Fig. 2A), 但是个体间的差异较大. 本研究选择的样本中, 鸡腹部脂肪组织 *Gata2* 和 *Gata3* 基因的表达水平在高、低脂两系间和不同周龄间均没有发现存在显著差异 (Fig. 2B, C; $P > 0.05$). 半定量 RT-PCR 分析用来扩增 *Gata2* 基因的 PCR 循环数小于 *Gata3* 基因 (Table 2), 暗示在鸡腹部脂肪组

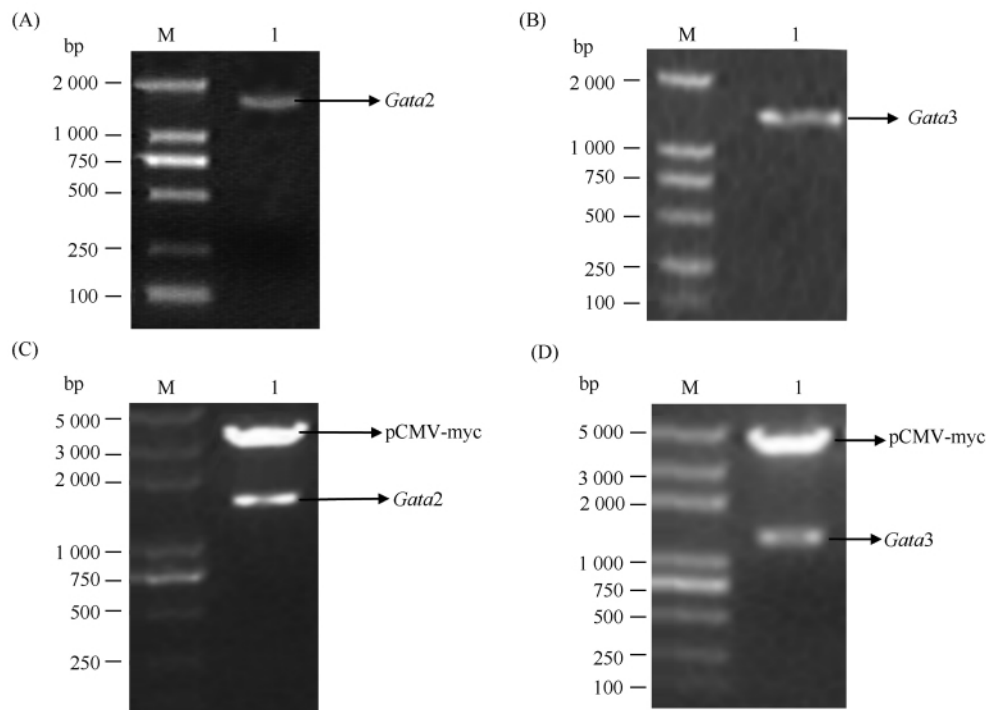


Fig. 1 The PCR amplification of chicken *Gata2* and *Gata3* genes as well as the identification of the recombinant plasmids of pCMV-myc-*Gata2* and pCMV-myc-*Gata3*

(A) The electrophoresis of the amplification of the full-length coding region of the chicken *Gata2* gene by PCR; (B) The electrophoresis of amplification of the full-length coding region of the chicken *Gata3* gene by PCR; (C) The electrophoresis of the plasmids of pCMV-myc-*Gata2* digested by *Bgl* II and *Kpn* I; (D) The electrophoresis of the plasmids of pCMV-myc-*Gata3* digested by *Sal* I and *Xho* I. M, DNA marker; 1, Designated sample

织中, *Gata2* 基因的表达水平高于 *Gata3* 基因的表达水平. 为了进一步确定 *Gata2* 和 *Gata3* 基因在鸡腹部脂肪组织中的相对表达水平, 本研究随机选取 9 个 11 世代高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织样品, 在

循环数均为 30 的情况下, 对 *Gata2* 和 *Gata3* 基因的表达水平进行了半定量 RT-PCR 分析. 结果显示, 鸡腹部脂肪组织中, *Gata2* 基因的表达水平显著高于 *Gata3* 基因的表达水平 (Fig. 2D, E; $P < 0.01$).

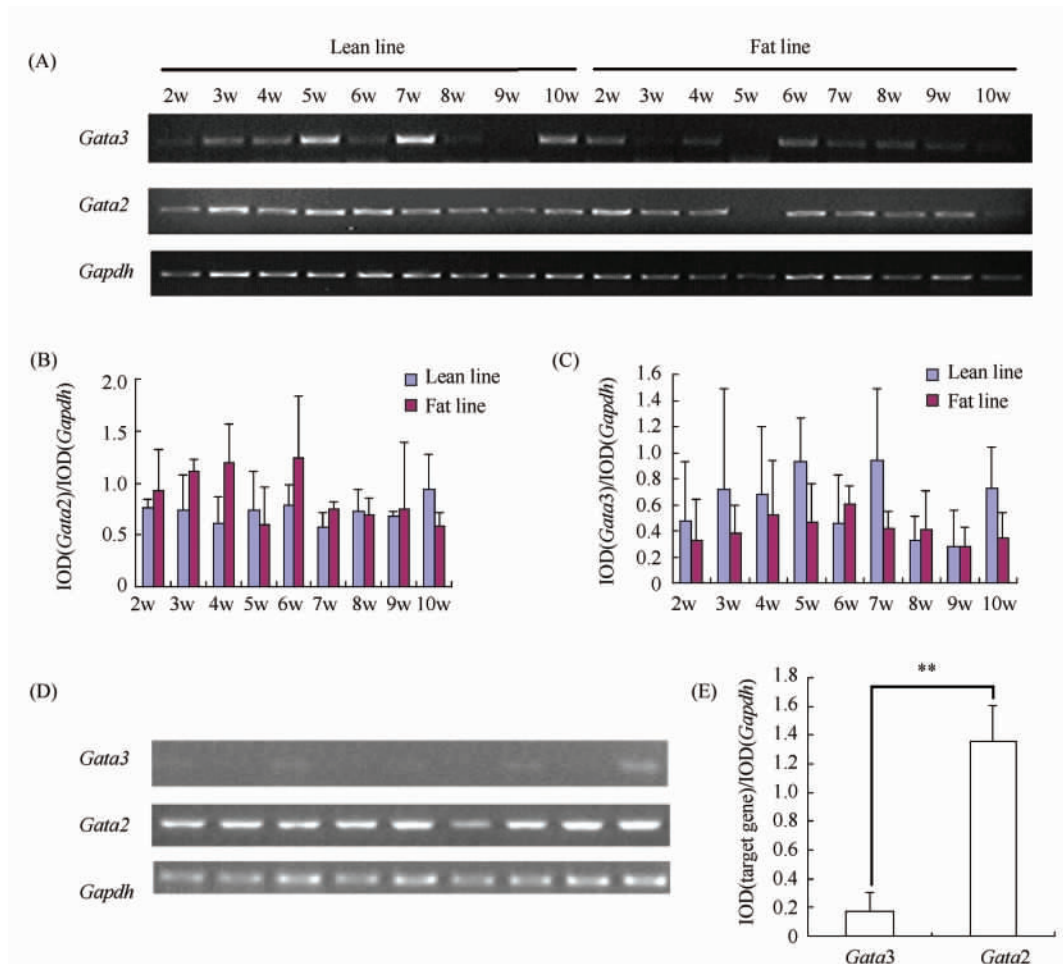


Fig. 2 Expression character of *Gata2* and *Gata3* genes in abdominal fat tissues of broilers by semi-quantitative RT-PCR

(A) Electrophoresis of expression of *Gata2* and *Gata3* genes in chicken abdominal fat tissues at various ages (one biologic replicate). (B) and (C) Histogram of expression of *Gata2* and *Gata3* genes in chicken abdominal fat tissues at various ages ($n = 3$). Error bars represent the standard deviations of three biological replicates. 2-10 w = 2-10 weeks of age. (D) Electrophoresis of relative expression of *Gata2* and *Gata3* genes in chicken abdominal fat tissues by amplification of the *Gata3* gene using the same PCR cycles as *Gata2* gene (both 30 cycles). (E) Histogram of relative expression of *Gata2* and *Gata3* genes in chicken abdominal fat tissues. The error bars represent the standard deviations of night biologic replicates; and the asterisks (**) indicate the significantly different expression levels between *Gata2* and *Gata3* in chicken abdominal fat tissues (student's *t*-test; $P < 0.01$)

2.3 鸡前脂肪细胞中 *Gata2* 和 *Gata3* 基因表达分析

半定量 RT-PCR 分析显示, *Gata2* 基因在体外培养的鸡前脂肪细胞各个时间点均具有一定程度的表达, 并且在油酸诱导分化后的鸡前脂肪细胞中的 *Gata2* 基因的表达量 (12 h, 24 h, 48 h 和 120 h) 明显低于对照组 (未诱导分化) 中 *Gata2* 基因的表达量 (Fig. 3A, B); 而 *Gata3* 基因在体外培养的鸡前脂肪

细胞中表达水平很低, 在油酸诱导组的多个时间点 (12 h, 48 h 和 120 h) 和对照组的 120 h 时间点, 用半定量 RT-PCR 方法检测不到 *Gata3* 基因在鸡前脂肪细胞中的表达 (Fig. 3C, D).

2.4 过表达鸡 *Gata2* 和 *Gata3* 基因对 *Ppar γ* 基因转录活性的影响

将鸡 *Gata2* 或 *Gata3* 基因过表达质粒与 *Ppar γ*

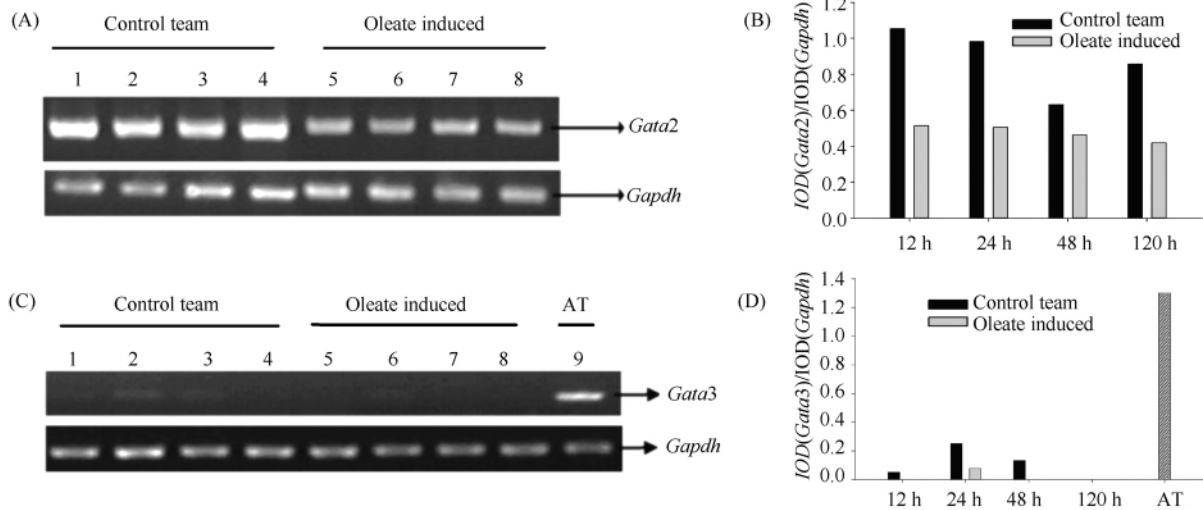


Fig. 3 Expression character of *Gata2* and *Gata3* genes in chicken preadipocytes (A) and (C), Lanes 1-4 indicated the preadipocytes cultured for 12, 24, 48 and 120 hours, respectively; lanes 5-8 indicated the chicken preadipocytes induced into differentiation by oleate for 12, 24, 48 and 120 hours, respectively; lane 9 indicated the mixed chicken abdominal fat tissue (AT) cDNA as positive control. (B) and (D), Histogram of expression of *Gata2* and *Gata3* genes

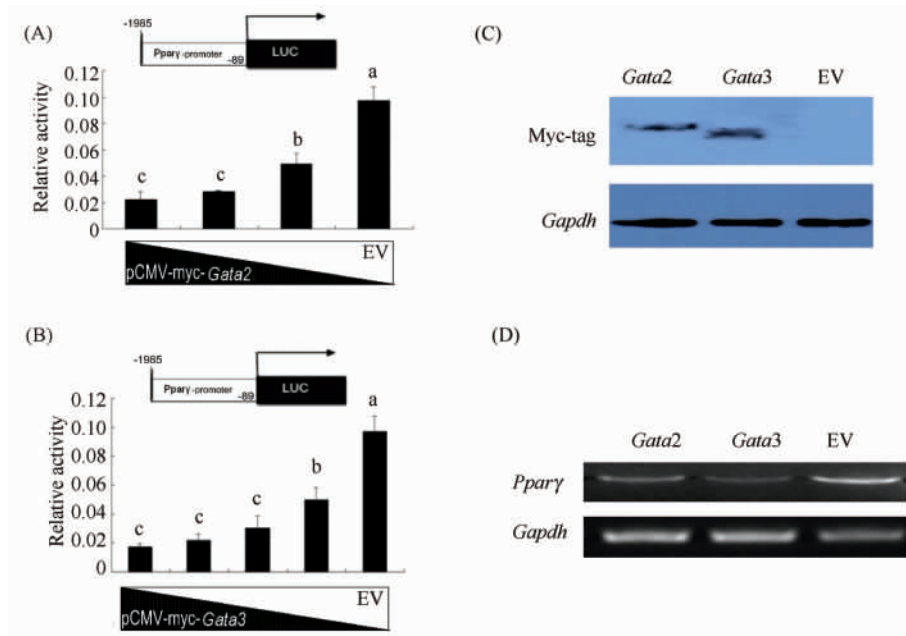


Fig. 4 Overexpression of *Gata2* and *Gata3* gene suppressed the transcription of *Pparγ* gene Luciferase assays were conducted in DF1 cells, and equal numbers of cells were seeded in 12-well dishes before transfection. (A) Subconfluent DF-1 cells were transfected with 0.4 μg of chicken *Pparγ* promoter (-1985/-89) luciferase reporter plasmid, 0.008 μg of pRL-TK and 0.6 μg of 4 different plasmid mixtures of pCMV-myc-Gata2 and pCMV-myc(empty vector, EV), the mass ratios of pCMV-myc-Gata2 /EV in the 4 plasmid mixtures were 3:0, 2:1, 1:1, 1:2, 0:3, respectively. (B) Subconfluent DF-1 cells were transfected with 0.4 μg of *Pparγ* promoter (-1985/-89) luciferase reporter plasmid, 0.008 μg of pRL-TK and 0.6 μg of 5 different plasmid mixtures of pCMV-myc-Gata3 and EV, the mass ratios of pCMV-myc-Gata3 /EV in the 5 plasmid mixtures were 3:0, 2:1, 1:2, 0:3, respectively. And for (A) and (B), data were subjected to the ANOVA procedure followed by Turkey's multiple test. The different lowercase letters above the histograms indicated significant differences among groups of samples, $P < 0.05$. (C) Western blot analysis demonstrated that pCMV-myc-Gata2 and pCMV-myc-Gata3 could express the Gata2 and Gata3 protein in DF1 cells. (D) Analysis of the *Pparγ* expression in DF1 cells transfected with pCMV-myc-Gata2, pCMV-myc-Gata3 and EV

启动子(-1985/-89)报告基因质粒共转染到鸡成纤维细胞系 DF1, 培养 48 h 后, 回收细胞分析荧光素酶活性. 结果显示, 过表达 *Gata2* 和 *Gata3* 基因 (Fig. 4 C) 显著抑制鸡 *Ppar γ* 启动子活性 ($P <$

0.05), 并且抑制呈现剂量效应 (Fig. 4 A, B). 此外, 半定量 RT-PCR 分析显示, 在 DF1 细胞中, 过表达 *Gata2* 或 *Gata3* 基因均明显抑制鸡 *Ppar γ* 基因 mRNA 表达水平 (Fig. 4D).

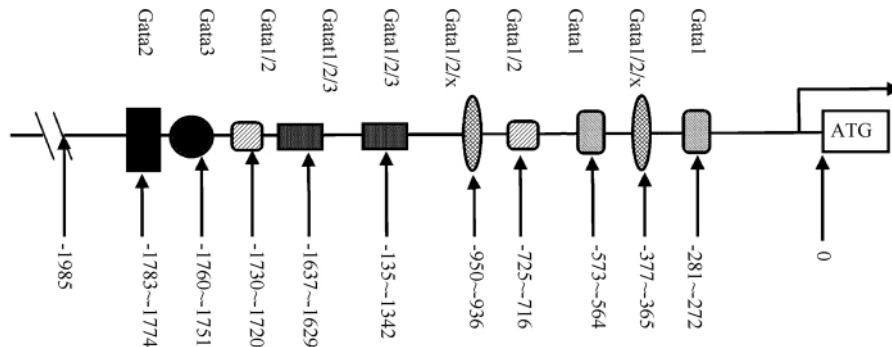


Fig. 5 Schematic diagram of the GATA-binding sites on the chicken *Ppar γ* gene promoter (-1985/-89) using TRANSFAC database (threshold > 85)

3 讨论

哺乳动物研究表明, *Gata2* 和 *Gata3* 基因在白色脂肪组织和棕色脂肪组织中的表达模式不同^[10,11]. 鸡只有白色脂肪组织, 目前还没有 *Gata2* 和 *Gata3* 在鸡脂肪组织中的表达模式研究报道, 本研究利用半定量 RT-PCR 的方法, 发现 *Gata2* 和 *Gata3* 基因在东北农业大学肉鸡高、低脂双向选择品系 2~10 周龄的腹部脂肪组织中均有表达 (Fig. 2A), 同时发现鸡腹部脂肪组织中 *Gata2* 基因的表达水平明显高于 *Gata3* 的表达水平 (Fig. 2D, E; $P < 0.01$), 此外, 在分离培养的鸡脂肪细胞中 *Gata2* 在各个时间点都具有表达, 而用 RT-PCR 方法在多个时间点检测不出 *Gata3* 的表达, 表明 *Gata2* 和 *Gata3* 在鸡腹部组织中的表达模式和在哺乳动物棕色脂肪中的表达模式^[11] 相同, 暗示在鸡腹部脂肪组织中起主要作用是 *Gata2*, 而不是 *Gata3*. 鸡脂肪细胞中几乎检测不到 *Gata3* 基因的表达, 而在鸡腹部脂肪组织各个发育时间点中确实存在 *Gata3* 基因一定程度的表达. 本研究推测, 造成这种现象的原因很可能是鸡脂肪组织中 *Gata3* 基因主要在一些非脂肪类型的细胞中表达, 在脂肪细胞中几乎不表达.

在油酸诱导分化的鸡前脂肪细胞中, *Gata2* 基因的表达量明显低于对照组中 *Gata2* 基因的表达量, 这一结果与哺乳动物白色和棕色脂肪细胞分化过程中 *Gata2* 基因表达模式相似^[10,11]. 这暗示, *Gata2* 可能也具有抑制鸡脂肪细胞分化的功能. *Ppar γ* 是鸟类和哺乳动物脂肪细胞分化的关键因

子^[15-18]. 哺乳动物的研究显示, *Gata2* 和 *Gata3* 可以通过抑制 *Ppar γ* 是基因的表达来抑制脂肪细胞的分化^[10,11]. 本研究在 DF1 细胞系中, 利用 RT-PCR 和鸡 *Ppar γ* 启动子荧光素酶报告基因分析两种方法证实, 过表达 *Gata2* 或 *Gata3* 基因抑制 *Ppar γ* 基因的转录, 进一步暗示了 *Gata2* 是鸡脂肪细胞分化的抑制因子. 此外, 转录因子 *Ppar γ* 还具有多种复杂的生理功能, 包括参与调控胰岛素抵抗^[19]、肿瘤形成^[20-22]、器官纤维化^[23,24] 和机体免疫^[25] 等. 因此, *Gata2* 和 *Gata3* 还有可能通过抑制 *Ppar γ* 的转录来对其他生理功能发挥调控作用, 本研究结果为进一步研究鸡 *Gata2* 和 *Gata3* 的生物学功能提供了参考.

分析鸡 *Ppar γ* 启动子序列 (-1985/-89) 上的转录因子结合位点, 发现在鸡 *Ppar γ* 启动子 (-1985/-89) 序列区间存在多个 *Gata2* 和 *Gata3* 转录因子的结合位点 (Fig. 5, threshold > 85). 本研究推测, 鸡转录因子 *Gata2* 和 *Gata3* 可能通过直接结合在 *Ppar γ* 启动子的这些靶位点来发挥对 *Ppar γ* 基因转录活性的抑制作用, 具体结合位点和作用机制还有待定点突变、凝胶阻滞迁移率和染色质免疫共沉淀试验的进一步分析和验证.

参考文献 (References)

- [1] Ko L J, Engel J D. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family [J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13 (7): 4011-4022
- [2] Lowry J A, Atchley W R. Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain [J]. *J Mol Evol*, 2000, 50 (2): 103-115

- [3] Morrissey E E , Ip H S , Tang Z , *et al.* GATA-4 activates transcription via two novel domains that are conserved within the GATA-4/5/6 subfamily [J]. *J Biol Chem* , 1997 , **272** (13) : 8515-8524
- [4] Patient R K , Mcghee J D. The GATA family (vertebrates and invertebrates) [J]. *Curr Opin Genet Dev* , 2002 , **12** (4) : 416-422
- [5] Ohneda K , Yamamoto M. Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage [J]. *Acta Haematol* , 2002 , **108** (4) : 237-245
- [6] Cantor A B , Orkin S H. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners [J]. *Oncogene* , 2002 , **21** (21) : 3368-3376
- [7] Molkenin J D. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4 , -5 , and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression [J]. *J Biol Chem* , 2000 , **275** (50) : 38949-38952
- [8] Molkenin J D , Tymitz K M , Richardson J A , *et al.* Abnormalities of the genitourinary tract in female mice lacking GATA5 [J]. *Mol Cell Biol* , 2000 , **20** (14) : 5256-5260
- [9] Morrissey E E , Ip H S , Lu M M , *et al.* GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm [J]. *Dev Biol* , 1996 , **177** (1) : 309-322
- [10] Tong Q , Dalgin G , Xu H , *et al.* Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition [J]. *Science* , 2000 , **290** (5489) : 134-138
- [11] Tsai J , Tong Q , Tan G , *et al.* The transcription factor GATA2 regulates differentiation of brown adipocytes [J]. *EMBO Rep* , 2005 , **6** (9) : 879-884
- [12] Tong Q , Tsai J , Tan G , *et al.* Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation [J]. *Mol Cell Biol* 2005 , **25** (2) : 706-715
- [13] Mozo J , Emre Y , Bouillaud F , *et al.* Thermoregulation: what role for UCPs in mammals and birds? [J]. *Biosci Rep* , 2005 , **25** (3-4) : 227-249
- [14] Ding N , Gao Y , Wang N , *et al.* Functional analysis of the chicken PPARgamma gene 5'-flanking region and C/EBPalpha-mediated gene regulation [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* , 2011 , **158** (4) : 297-303
- [15] Wang Y , Mu Y , Li H , *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene: a key regulator of adipocyte differentiation in chickens [J]. *Poult Sci* 2008 , **87** (2) : 226-232
- [16] Rosen E D , Macdougald O A. Adipocyte differentiation from the inside out [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* , 2006 , **7** (12) : 885-896
- [17] Farmer S R. Transcriptional control of adipocyte formation [J]. *Cell Metab* , 2006 , **4** (4) : 263-273
- [18] Lefterova M I , Lazar M A. New developments in adipogenesis [J]. *Trends Endocrinol Metab* , 2009 , **20** (3) : 107-114
- [19] Rieusset J , Chambrier C , Bouzakri K , *et al.* The expression of the p85alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase is induced by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human adipocytes [J]. *Diabetologia* , 2001 , **44** (5) : 544-554
- [20] Jackson L , Wahli W , Michalik L , *et al.* Potential role for peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) in preventing colon cancer [J]. *Gut* , 2003 , **52** (9) : 1317-1322
- [21] Kawa S , Nikaido T , Unno H , *et al.* Growth inhibition and differentiation of pancreatic cancer cell lines by PPAR gamma ligand troglitazone [J]. *Pancreas* , 2002 , **24** (1) : 1-7
- [22] Chang T H , Szabo E. Induction of differentiation and apoptosis by ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res* , 2000 , **60** (4) : 1129-1138
- [23] Yang L , Chan C C , Kwon O S , *et al.* Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in liver fibrosis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* , 2006 , **291** (5) : G902-G911
- [24] Jaster R , Lichte P , Fitzner B , *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression inhibits pro-fibrogenic activities of immortalised rat pancreatic stellate cells [J]. *J Cell Mol Med* , 2005 , **9** (3) : 670-682
- [25] Nencioni A , Wesselborg S , Brossart P. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its ligands in the control of immune responses [J]. *Crit Rev Immunol* , 2003 , **23** (1-2) : 1-13