

鸡 *BMP7* 基因组织表达特性及其在高、低脂系脂肪组织中表达差异研究*

冷 丽^{1,2} 程博涵^{1,2} 李 辉^{1,2**}

(1.东北农业大学动物科学技术学院 黑龙江哈尔滨 150030 ;

2.农业部鸡遗传育种重点实验室 黑龙江哈尔滨 150030)

摘 要 骨形态发生蛋白7(Bone morphogenetic proteins 7, BMP7)是一类与骨骼发育密切相关的酸性多肽,属于TGF- β 超家族,能够诱导血管周围及结缔组织中的间充质细胞向骨细胞方向分化。近期研究结果表明,BMP7在哺乳动物棕色脂肪组织发育过程中发挥重要作用。目前还没有关于鸡*BMP7*基因表达规律的研究。本研究以东北农业大学高脂系肉鸡为试验材料,采用半定量RT-PCR的方法检测*BMP7*基因在不同组织中的表达特性,发现*BMP7*在鸡23种组织中均有表达;采用半定量RT-PCR和Real-time PCR的方法检测*BMP7*基因在高、低脂系肉鸡脂肪组织间的表达差异,发现*BMP7*基因在高脂系肉鸡脂肪组织中的表达量显著高于低脂系($P < 0.05$)。本研究为进一步揭示*BMP7*基因与鸡脂肪组织发育之间的关系奠定了基础。

关键词 鸡;骨形态发生蛋白7;脂肪组织;表达

Tissue Expression Characteristic of Chicken *BMP7* Gene and Expression Differences in the Adipose Tissue between Two Chicken Lines*

LENG Li^{1,2}, CHENG Bohan^{1,2}, LI Hui^{1,2**}

(1.College of Animal Science and Technology,

Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030 ;

2.Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding,

Ministry of Agriculture, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) is the acidic peptides closely related to bone development belonging to the TGF- β superfamily which can induce mesenchymal cells around the blood vessels and connective tissue differentiate to bone. Recent studies found that BMP7 plays an important role in the development process in mammalian brown adipose tissue. So far there is no study about the expression pattern of chicken *BMP7* gene. In the present study, the Northeast Agricultural University broiler lines divergently selected for abdominal fat were used. Semi-quantitative RT-PCR was used to detect *BMP7* gene expression characteristics in different tissues, and the results showed that *BMP7* expressed

收稿日期 2012-01-11

修回日期 2012-03-03

* 基金项目:国家自然科学基金(No.31101708);现代农业产业技术体系专项资金(CARS-42);教育部博士点新教师基金(20112325120010)

** 通讯作者, E-mail: lihui@neau.edu.cn

in all the 23 kinds of tissues. Semi-quantitative RT-PCR and Real-time PCR methods were used to detect *BMP7* gene expression differences between the fat line and the lean line in adipose tissue, the results showed that *BMP7* gene expression level in the fat line was significantly higher than the lean line ($P < 0.05$). Our result would lay foundation for further study of the relationship between *BMP7* with adipose tissue development in chickens.

Key words :chicken ;bone morphogenetic protein 7 ;adipose tissue ;expression

脂肪组织在控制能量平衡中有重要作用。哺乳动物有两种不同的脂肪组织:白色脂肪组织和棕色脂肪组织,白色脂肪组织在甘油三酯的储存中有重要作用,棕色脂肪组织主要作用为消耗能量,产生身体热量。BMP家族多个成员参与脂肪细胞分化(即脂肪组织发育)的调控^[1],其中BMP7参与棕色脂肪细胞分化的调控。研究表明BMP7在没有激素诱导的情况下,也可推动棕色脂肪细胞分化,活化整个棕色脂肪组织发育过程^[2]。BMP7诱导棕色脂肪细胞分化早期调控因子PRDM16(PR-domain-containing 16)和PGC-1(Peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator-1)的表达,增加脂肪细胞分化调控因子PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor)、C/EBPs(CCAAT/enhancer-binding proteins)和棕色脂肪细胞标记基因UCP1(Uncoupling protein 1)的表达量,此外还可以通过激活MAPK14(p38 mitogen-activated protein kinase)和PGC-1依赖的信号通路诱导线粒体的生物合成^[2]。BMP7可以促进间充质祖细胞向棕色脂肪细胞的定向过程,敲除*BMP7*的小鼠胚胎表现出明显的棕色脂肪组织缺失,并且几乎完全缺失UCP1,腺病毒介导的小鼠体内*BMP7*表达可以促进棕色脂肪组织的显著增长^[2]。

研究表明,鸟类无棕色脂肪组织只有白色脂肪组织^[3]。因此研究鸟类*BMP7*基因对脂肪组织分化的调控,不但对培育低脂家禽具有重要意义,而且对探索*BMP7*与白色脂肪组织发育关系也具有重要意义。目前还没有鸟类*BMP7*基因的研究报道,本研究内容如下:以东北农业大学肉鸡第十四世代12周龄高脂系为试验材料,通过半定量RT-PCR的方法分析鸡*BMP7*基因在23种组织中的表达特性。以东北农业大学肉鸡高、低脂系第十一世代为试验材料,通过半定量RT-PCR的方法分析鸡*BMP7*基因在高、低脂系2~10周龄鸡腹部脂肪组织中的表达规律。以东北农业大学肉鸡

高、低脂系第十四世代为试验材料,通过RT-PCR的方法分析鸡*BMP7*基因在高、低脂系1~12周龄鸡腹部脂肪组织中的表达规律。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物

东北农业大学肉鸡高低脂选择系十一世代、十四世代肉鸡(来自于东北农业大学阿城畜牧基地鸡场)为试验材料,采取新鲜的腹脂、心脏、肝脏等样品于-80℃保存备用。

1.1.2 试验试剂

DNA Marker、dNTP、Taq酶、SYBR Green 荧光定量PCR试剂盒等购自大连宝生物公司;RT-PCR试剂盒购自Promega公司,琼脂糖购自原平皓公司。

1.1.3 主要分子生物学软件

Oligo 6.0,Primer Premier 5.0(引物设计)。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取及反转录

采用TRIzol试剂提取脂肪、心脏、肝脏等组织的总RNA,并反转录成cDNA。

1.2.2 引物设计

根据NCBI数据库鸡*BMP7*基因预测序列XM_417496和鸡*GAPDH*序列NM_204305,结合UCSC鸡基因组数据库跨内含子设计表达分析引物:

c*BMP7*-F:TGGTGGAGCATGACAGAGAG;
c*BMP7*-R:CCTGGAGGACCTGGTAGACA;
c*GAPDH*-F:CTGTCAAGGCTGAGAACG;
c*GAPDH*-R:GATAACACGCTTAGCACCA。设计扩增片段大小*BMP7*为183bp,*GAPDH*为185bp。

1.2.3 RT-PCR和Real-Time PCR

BMP7 PCR反应条件:94℃预变性7min,94℃变性30s,56.9℃退火30s,72℃延伸30s,72℃终末延伸7min,循环数为35。

GAPDH PCR反应条件:94℃预变性7min,94℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸30s,72℃

终末延伸7 min 循环数为25。以反转录cDNA为模板进行PCR,反应采用25 μL体系,产物琼脂糖凝胶电泳,利用electrophoresis gel imaging system (UVP)获得电泳照片,利用系统自带软件获取检测基因电泳条带的积分光密度(Integrated option density, IOD)。

Real-Time PCR反应液的组成: SYBR 5 μL, ROX 0.2 μL, 上/下游引物各0.2 μL, H₂O 3.4 μL, cDNA 1 μL, 总体系为10 μL。反应条件: 95 °C 变性2 min, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40个循环。

1.2.4 数据分析

IOD值表示检测基因经过PCR后的产物量, *BMP7*基因的相应表达量表示为:

$$\text{Rel.Quantity} = \frac{\text{IOD}(\text{BMP7})}{\text{IOD}(\text{GAPDH})}$$

RT-PCR的数据采用 $2^{-\Delta\text{ct}}$ 法分析,并进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 *BMP7*基因在肉鸡第十四世代12周龄高脂系23种组织中的表达特性

随机取东北农业大学肉鸡第十四世代12周龄高脂系23种组织(每种组织取3只鸡),从不同鸡只的组织中提取总RNA,反转录得到不同组织的cDNA,同种组织的cDNA制备成混合样品,并以其为模板进行*BMP7*基因在鸡不同组织中的表达特性分析(见图1)。

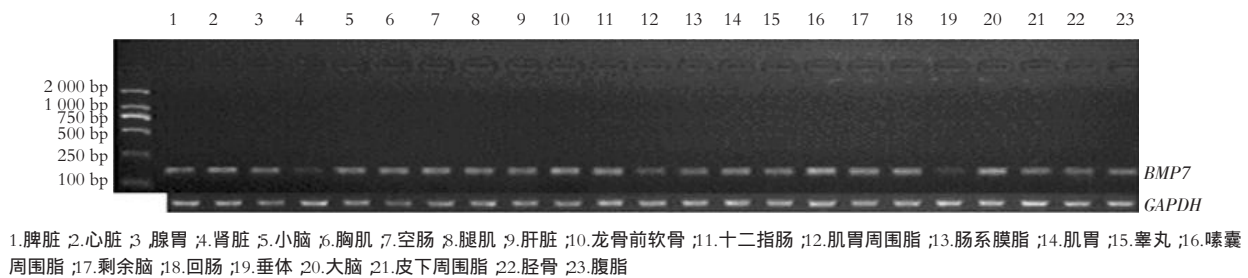


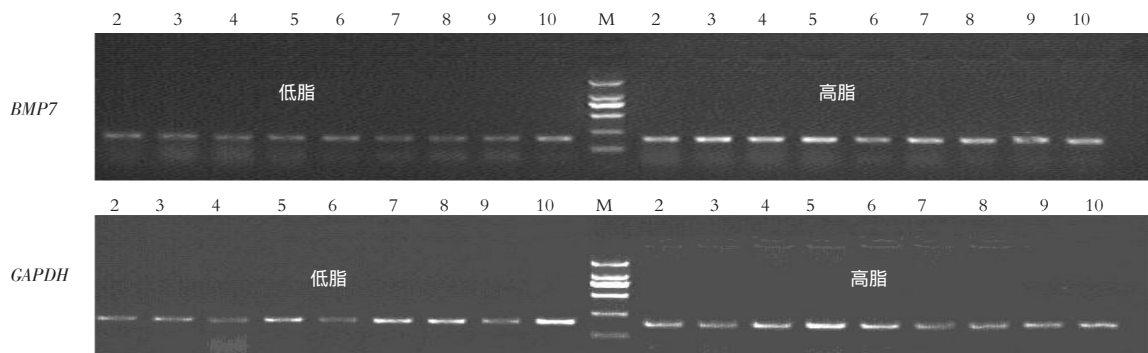
图1 第十四世代12周龄鸡*BMP7*基因组织表达特性

结果表明, *BMP7*基因在东北农业大学肉鸡第十四世代12周龄高脂系各种组织中均有表达。

2.2 鸡脂肪组织*BMP7*基因表达规律分析(半定量RT-PCR)

随机取东北农业大学肉鸡高、低脂系第十一

世代2到10周龄低脂系与高脂系鸡只各1只,从不同周龄高、低脂系鸡脂肪组织中提取总RNA,反转录得到不同鸡的脂肪组织cDNA,并以其为模板进行*BMP7*基因在鸡脂肪组织中的表达规律分析(见图2、3)。



M.Marker DL2000 2~10.2~10周龄, 高脂 为高脂系鸡, 低脂 为低脂系鸡

图2 第十一世代高、低脂系鸡脂肪组织中*BMP7*基因表达

结果表明, *BMP7*基因在东北农业大学肉鸡高、低脂系第十一世代2~10周龄脂肪组织中均有表达,并且在高脂系中的表达量明显高于低脂系。

2.3 鸡脂肪组织*BMP7*基因表达规律分析(RT-PCR)

为了进一步验证*BMP7*基因在东北农业大学肉鸡高、低脂系第十一世代脂肪组织中的差异

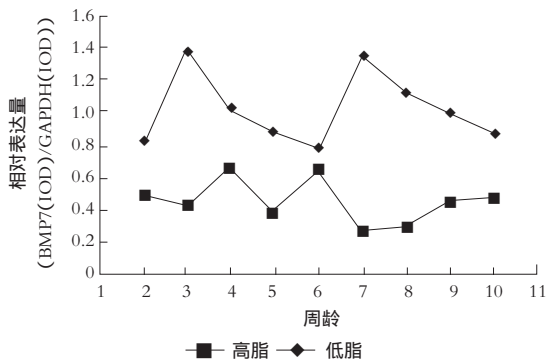
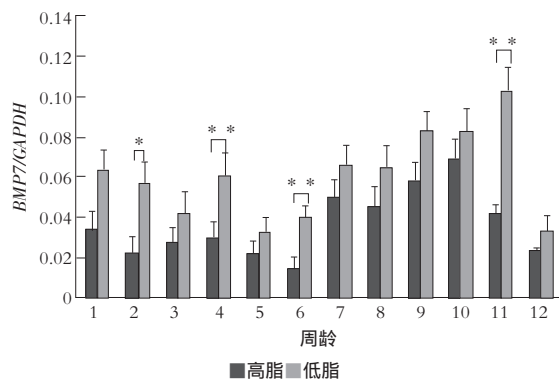


图3 第十一代高、低脂系鸡脂肪组织中BMP7基因相对表达量线形图

表达结果,我们又随机取东北农业大学肉鸡高、低脂系第十四世代1~12周龄低脂系与高脂系鸡只各4只,从不同周龄高、低脂系鸡脂肪组织中提取总RNA,反转录得到不同鸡的脂肪组织cDNA,将不同鸡的脂肪组织cDNA混合做为模板进行BMP7基因在鸡脂肪组织中的表达规律分析(见图4)。



注: *表示差异显著($P < 0.05$); **表示差异极显著($P < 0.01$)

图4 第十四世代高、低脂系鸡脂肪组织中BMP7基因相对表达量柱形图

结果表明,BMP7基因在东北农业大学肉鸡高、低脂系第十四世代1~12周龄脂肪组织中均有表达,且在高脂系中的表达量高于低脂系,其中在2、4、6、11周龄差异达到了显著或极显著水平。

3 讨论

在哺乳动物上的研究结果表明,BMP7在许多组织中都有表达,徐业芬等^[4]以湖羊为试验材料发现BMP7基因在垂体及下丘脑、子宫、输卵管、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉组织中表达。赵巧辉^[5]以家兔为试验材料发现BMP7基因在心脏、脾脏以低丰度表达,在肺脏、脊髓、十二

指肠中表达丰度中等,在肝脏、肾脏、脑中以高丰度表达。近期研究表明,在早期鸡胚中,BMP7主要在将来发育为表皮的外胚层中表达^[6]。本研究中,BMP7基因在鸡23种组织中的广泛表达,再一次印证了该基因在机体器官形成及功能维持方面的重要性。BMP7基因在东北农业大学高、低脂系第十一世代和第十四世代肉鸡腹部脂肪组织中的表达规律一致,均为高脂系脂肪组织的表达量高于低脂系鸡只脂肪组织的表达量,这暗示了BMP7所在的信号通路可能是高、低脂系选择压的一个作用点。同时,哺乳动物中的研究表明BMP7是一个在棕色脂肪组织分化中发挥功能的基因,虽然鸡只有白色脂肪组织,但有研究表明哺乳动物白色脂肪细胞在特定的情况下(如暴露在寒冷的环境中)可以获得棕色脂肪细胞的特征^[7],因此我们推测在鸡体内(鸟类)白色脂肪组织可能部分发挥着棕色脂肪组织的功能。此外,这也许还暗示了在哺乳动物中BMP7基因可能对白色脂肪组织的发育具有一定的调控作用。

参考文献:

- Rosen E D, Macdougald O A. Adipocyte differentiation from the inside out[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(12): 885-896.
- Tseng Y H, Kokkotou E, Schulz T J, et al. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure[J]. Nature, 2008, 454(7207): 1000-1004.
- 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.
- 徐业芬, 李齐发, 李二林, 等. 湖羊BMP2、BMP4、BMP6和BMP7基因mRNA表达水平与排卵数关系的研究[J]. 中国农业科学, 2009, 42(10): 3655-3661.
- 赵巧辉. 家兔骨形态发生蛋白-7(BMP-7)cDNA的克隆与表达[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2008.
- Streit A, Lee K J, Woo I, et al. Chordin regulates primitive streak development and the stability of induced neural cells, but is not sufficient for neural induction in the chick embryo [J]. Development, 1998, 125(3): 507-519.
- Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti M C, et al. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 279(3): C670-C681.