

鸡转录因子C/EBP α 、KLF2、KLF3、KLF7、PPAR α 对L-FABP启动子活性的影响

贺 蓁¹, 史洪岩¹, 王海霞¹, 高广亮^{1,2}, 王启贵^{1,2*}, 李 辉^{1*}

(1.东北农业大学动物科学技术学院,农业部鸡遗传育种重点实验室,黑龙江省普通高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室,黑龙江哈尔滨 150030;2.重庆市畜牧科学院,重庆 402460)

摘 要: L-FABP是脂肪酸结合蛋白家族重要的成员。研究发现L-FABP在不饱和脂肪酸、饱和脂肪酸、胆固醇、胆汁酸等转运过程中扮演重要角色。目前,对哺乳动物L-FABP的活性调控机制的研究已经取得了一定进展,但在禽类上的相关报道还比较少见。为探讨鸡L-FABP基因的表达调控机制,本研究利用报告基因方法在人肝癌细胞系(HEGP2)中研究C/EBP α 、KLF2、KLF3、KLF7、PPAR α 基因对鸡L-FABP基因启动子活性的影响。结果表明:C/EBP α 显著抑制了鸡L-FABP基因的表达,KLF2、KLF3、KLF7、PPAR α 基因显著促进了L-FABP基因的表达,这些结果为深入研究鸡L-FABP基因表达调控机制奠定了基础。

关键词: L-FABP基因;启动子;活性分析;鸡

中图分类号:S831.2

文献标识码:A

文章编号:0258-7033(2014)17-0013-05

禽类脂质代谢及其调控与哺乳动物不同,脂质合成主要是在肝脏中进行,而脂肪组织只是贮存的场所^[1],因此肝脏在禽类脂类代谢中发挥着非常重要的作用^[2]。肝细胞中肝脏型脂肪酸结合蛋白(liver fatty acid binding protein, L-FABP)表达水平高并且与脂肪酸代谢关系密切^[3]。研究表明L-FABP基因沉默的小鼠脂肪酸结合能力下降,甘油三酯总量下降,脂肪酸吸收和肝脏磷脂扩散发生改变^[4]。Storeh等^[5]发现,L-FABP与小肠内脂质的吸收、肝脏内脂类转运以及脂蛋白代谢均有密切关系。L-FABP可以调节胆固醇的吸收和代谢,且能影响膜双分子层中胆固醇的移动^[6]。

鸡L-FABP基因特异表达于肝脏组织和小肠^[7],与哺乳动物L-FABP蛋白结构相似^[8]。哺乳动物上研究显示,L-FABP基因启动子区存在包括PPAR元件、甾族调节元件SRE、C/EBP α 和AP1等多个重要的调控元件,这些重要的顺式作用元件已经通过实验鉴定^[9]。尽管在哺乳动物中L-FABP调控机制的研究较为透彻,但在家禽上关于L-FABP基因的报道相对较

少。本研究前期发现,鸡L-FABP基因受到C/EBP α 基因负调控作用^[10],并且通过生物学软件预测鸡L-FABP基因启动子区还存在PPAR α 转录因子结合位点。因此本研究构建了鸡真核表达载体pCMV-HA-PPAR α ,并利用前期课题组构建的鸡C/EBP α 、KLF2、KLF3、KLF7真核表达载体,利用报告基因活性检测方法在人肝癌细胞系(HEGP2)中研究这些转录因子对鸡L-FABP基因启动子活性的影响,为深入研究鸡L-FABP基因表达调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂 克隆载体pEASY-T1 Simple Cloning Kit、TransStart酶、抗HA标签鼠单克隆抗体、抗myc标签鼠单克隆抗体购自北京全式金生物技术有限公司;T4 DNA连接酶购自北京NEB公司;限制性内切酶Sal I、Xho I购自TaKaRa公司;质粒回收试剂盒购自Promega公司;山羊抗小鼠抗体、 β -actin抗体、ECL显色液购自碧云天生物技术有限公司;转染试剂LipofectamineTM 2000购自Invitrogen公司;DMEM高糖培养基、Opti-MEM培养基、胎牛血清购自GIBCO公司;海肾荧光素酶报告基因检测试剂盒购自Promega公司;C/EBP α 、KLF2、KLF3、KLF7真核表达载体由本实验室构建;人肝癌细胞系(HEGP2)由东北农业大学生命学院惠赠。

1.2 鸡pCMV-HA-PPAR α 真核表达载体的构建 根据PPAR α 基因序列(NM_001001464),设计全长编码

收稿日期:2013-12-17;修回日期:2014-01-25

资助项目:国家自然科学基金资助项目(30972087);博士后研究人员落户黑龙江科研启动资助金(LBH-Q08131);“十一五”国家科技支撑计划项目(2008BADB2B01-7)

作者简介:贺蓁(1988-),女,黑龙江哈尔滨人,在读硕士,E-mail: heqidongke@163.com

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

区克隆引物(F: 5'-ACGCGTCGACTTGACCAAAAATGGTGGACACT-3'; R: 5'-CGCTCGAGCCTTAATACATGTCCCTGTAG-3')上游引物引入 Sal I酶切位点,下游引物引入 Xho I酶切位点(下划线表示),产物大小为1 407 bp。以鸡肝脏组织cDNA为模板,采用PCR方法扩增鸡 $PPAR\alpha$ 基因全长编码区。将扩增产物回收后连接到pEASY-T1 Simple载体上,进一步亚克隆到pCMV-HA载体上。用限制性内切酶 Sal I和 Xho I对构建好的质粒进行双酶切鉴定,由上海英骏公司完成测序。

1.3 人肝癌细胞系细胞(HEPG2)的培养与转染 人肝癌细胞系(HEPG2)用含有浓度为100 U/mL青霉素和链霉素、10%胎牛血清的DMEM高糖培养基;在37°C、5%CO₂条件下培养,0.25%胰酶消化液消化,2 d传代1次。细胞的转染使用Invitrogen公司Lipofectamine™ 2000转染试剂按照试剂说明书完成操作。

1.4 总蛋白提取及Western印迹

1.4.1 总蛋白提取 在6孔板培养的HEPG2细胞中分别转染2 μg的pCMV-HA-PPAR α 、pCMV-HA-C/EBP α 、pCMV-myc-KLF2、pCMV-myc-KLF3、pCMV-myc-KLF7质粒培养48 h后,收集细胞。将收集的细胞加入含有0.15 mL的细胞裂解液振荡混匀后冰上静置30 min,将裂解液移至1.5 mL离心管中。10 000×g,4°C离心10 min,得到细胞总裂解物,-80°C保存备用。

1.4.2 Western印迹 取细胞总裂解物60 μL加入15 μL 5×Loading Buffer,100°C加热5 min使蛋白样品变性。每种蛋白上样量为15 μL,经SDS-PAGE电泳分离后,电转至NC膜上。室温封闭过夜(5%脱脂乳的PBST)。洗去膜上封闭液结合一抗(鼠源HA标签单抗,鼠源myc标签单抗),室温作用3 h,用PBST洗膜4次每次5 min,然后结合二抗(山羊抗小鼠1:5 000)

室温结合90 min,用PBST进行洗膜,ECL显色。

1.5 转录因子对鸡 L -FABP基因启动子活性影响分析 细胞接种于12孔板中,待细胞生长至70%汇合时,将C/EBP α 、KLF2、KLF3、KLF7、PPAR α 真核表达载体与鸡pGL3-L-FABP(-2076/20)基因启动子报告基因载体共转染HEGP2细胞,pCMV-HA载体与鸡pGL3-L-FABP(-2076/-20)基因启动子报告基因载体共转染HEGP2细胞作为对照组。海肾荧光素酶报告基因为内源参照。每孔细胞转染1 μg质粒(表达载体:pGL3-L-FABP质量比为3:2),0.01 μg的海肾对照质粒(PRL-TK)转染48 h,回收细胞,检测双报告基因荧光素酶活性。

1.6 统计分析 所有数据均为3次独立试验结果,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 利用Mulan (<http://mulan.dcode.org>)和TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)网站分析鸡 L -FABP启动子序列(-2076/-20)上的转录因子结合位点(图1),结果发现在鸡 L -FABP启动子(-2076/-20)序列区间存在AP1(-1271,-1218)、OCT1(-1183,-604,-140)、TATA(-1134)等结合位点,以及1个C/EBP α 和多个PPAR α 转录因子结合位点(threshold>85)。CpG岛在线分析克隆得到的序列,发现鸡 L -FABP基因启动子区不存在CpG岛。

2.2 鸡PPAR α 基因真核表达载体构建 以肉鸡肝脏组织cDNA为模板,利用鸡PPAR α 基因全长编码区1 407 bp的克隆引物进行PCR扩增,得到了1条特异

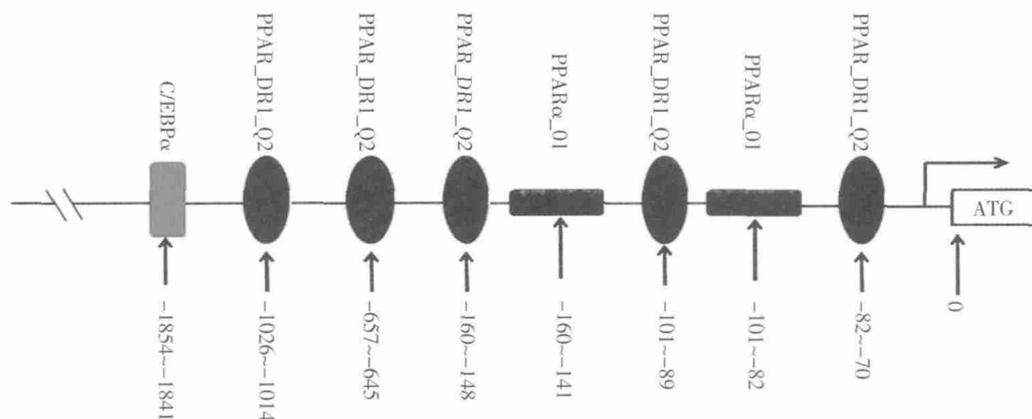


图1 鸡 L -FABP基因启动子区转录因子结合位点示意图

条带,通过克隆测序后发现该片段与预测的目的片段大小一致。将该目的片段进一步亚克隆到 $pCMV-HA$ 载体上,获得鸡 $PPAR\alpha$ 基因真核表达载体重组质粒经 Xho I、 Sal I酶切鉴定,结果显示,载体和目的基因条带大小均与理论值相符(图2),进一步测序正确后用于细胞转染。



注: M为Trans2K™ Plus II DNA Marker, 1为 $PPAR\alpha$ 基因PCR产物, 2为重组质粒经 Sal I、 Xho I双酶切结果, 3为重组质粒经 Sal I单酶切结果, 4为重组质粒经 Xho I单酶切结果

图2 鸡 $PPAR\alpha$ 基因的克隆和重组质粒的酶切鉴定

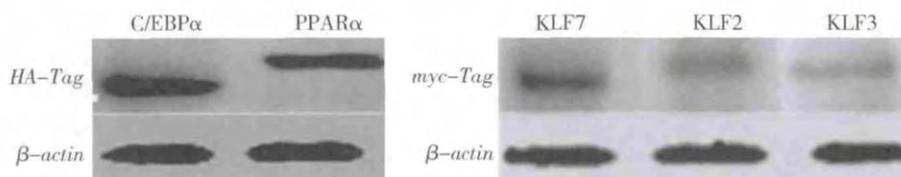
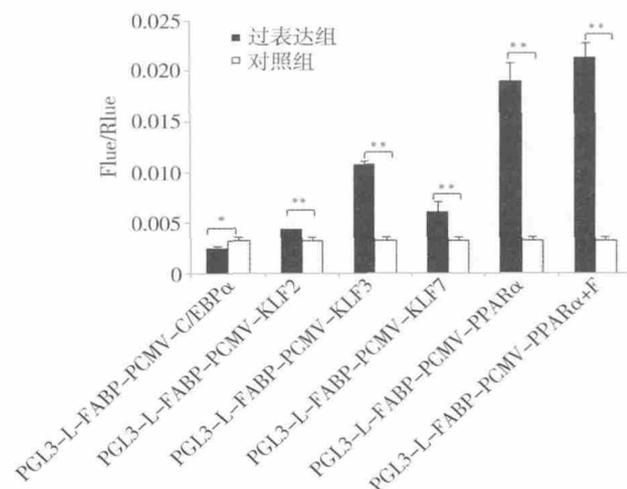


图3 $PPAR\alpha$ 、 $C/EBP\alpha$ 、 $KLF2$ 、 $KLF3$ 、 $KLF7$ 基因表达western blot结果



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

图4 鸡转录因子 $C/EBP\alpha$ 、 $KLF2$ 、 $KLF3$ 、 $KLF7$ 、 $PPAR\alpha$ 对 $L-FABP$ 基因启动子活性的影响

($P<0.05$), 过表达 $KLF2$ 、 $KLF3$ 、 $KLF7$ 、 $PPAR\alpha$ 极显著促进了 $L-FABP$ 启动子活性($P<0.01$)。 $PPAR\alpha$ 基因在不添加配基时也能极显著促进 $L-FABP$ 启动子活性。

3 讨论

C/EBP_s 家族在机体脂类代谢及脂肪细胞的分化中发挥重要作用。 C/EBP_s 可对多种细胞或组织中的

2.3 $PPAR\alpha$ 、 $C/EBP\alpha$ 、 $KLF2$ 、 $KLF3$ 、 $KLF7$ 基因的表达 将 $PPAR\alpha$ 、 $C/EBP\alpha$ 、 $KLF2$ 、 $KLF3$ 、 $KLF7$ 基因真核表达载体转染人肝癌细胞系(HEPG2) 48 h后回收细胞,提取蛋白,使用HA标签抗体和myc标签抗体通过Western blot的方法检测其在细胞中的表达。结果表明, $PPAR\alpha$ 、 $C/EBP\alpha$ 、 $KLF2$ 、 $KLF3$ 、 $KLF7$ 基因在人肝癌细胞系中表达(图3),可以进行后续实验。

2.4 转录因子对 $L-FABP$ 基因启动子活性的影响 将鸡 $C/EBP\alpha$ 、 $KLF2$ 、 $KLF3$ 、 $KLF7$ 、 $PPAR\alpha$ 基因真核表达质粒与 $L-FABP$ 基因启动子的报告基因质粒共转染到人肝癌细胞系(HEPG2)。 $PPAR\alpha$ 基因分为添加配基(Fenofibrate, 非诺贝特)和不添加配基2组。48 h后回收细胞检测萤火虫荧光素酶活性。由图4显示,过表达 $C/EBP\alpha$ 基因显著抑制鸡 $L-FABP$ 启动子活性

基因进行转录调控,在肝脏、脂肪、胰腺、小肠等细胞或组织中都可以检测到其表达信号^[11]。 $C/EBP\alpha$ 能与Ap2、SCD1、GluT4、leptin等脂肪细胞特征的启动子位点相结合并激活其表达,而突变这些基因启动子区的 $C/EBP\alpha$ 结合位点,则 $C/EBP\alpha$ 对其无激活效应^[12]。本研究通过生物信息学分析显示鸡 $L-FABP$ 基因启动子区只存在1个 $C/EBP\alpha$ 结合位点并且 $C/EBP\alpha$ 基因对 $L-FABP$ 启动子活性起到了显著的抑制作用。高广亮等^[10]研究发现, $C/EBP\alpha$ 对 $L-FABP$ 基因启动子系列缺失片段均有负调控作用且随着片段的逐渐缩短抑制作用逐渐减弱,并推断这段区域内可能存在不止2个结合位点。对于鸡 $L-FABP$ 基因翻译起始位点上游是否存在多个 $C/EBP\alpha$ 结合位点还有待于进一步研究。

本研究发现, $KLF2$ 、 $KLF3$ 、 $KLF7$ 可以显著增强鸡 $L-FABP$ 基因启动子活性。软件分析显示 $L-FABP$ 启动子区没有 $KLF2$ 、 $KLF3$ 、 $KLF7$ 转录因子结合位点,然而有研究证实 $KLF2$ 、 $KLF3$ 、 $KLF7$ 都可以结合 $C/EBP\alpha$ 启动子,抑制 $C/EBP\alpha$ 表达^[13]。 $KLF2$ 对 $C/EBP\alpha$ 和 $SREBP1c/ADD1$ 基因具有抑制作用^[14]。 $KLF3$ 是通过募集辅助抑制因子C末端结合蛋白(CtBP)形成 $KLF3-CtBP$ 抑制复合物,并结合于 $C/EBP\alpha$ 启动子上的 KLF

结合位点抑制其表达^[15]。张志威^[13]利用过表达和干扰实验发现, *KLF7*可以抑制*C/EBPα*的转录。综上所述, 可以推测*KLF2*、*KLF3*、*KLF7*对鸡*L-FABP*启动子活性的促进作用很可能是通过间接调控方式实现的, 并且很有可能是通过调控*C/EBPα*的转录实现的。

生物信息学分析结果显示鸡*L-FABP*基因启动子区具有多个PPAR α 结合位点。同时利用报告基因的方法检测转录因子PPAR α 对*L-FABP*基因启动子活性有极显著的增强作用, 并且无论是否添加非诺贝特这种增强效应都存在。*L-FABP*和PPAR α 有相似的配基连接特性, *L-FABP*可以进入细胞核与核受体PPAR α 反应。在哺乳动物上的研究显示, 无论在体内还是体外*L-FABP*基因都可以直接与PPAR α 基因相互作用^[16], 即*L-FABP*参与了脂肪酸激动PPAR α 过程并起到了配体的作用^[17]。本研究发现PPAR α 基因可以影响*L-FABP*基因的启动活性, 进一步分析发现鸡*L-FABP*基因启动子序列(-2076/-20)存在多个PPAR α 结合位点, 并且这些位点主要分布在转录起始位点前-200 bp的区域内, 这暗示PPAR α 基因可能在鸡*L-FABP*基因的转录调控中起到重要作用。在哺乳动物上研究显示*L-FABP*基因PPAR元件结合在-121/-100(CAATCACTGACCTATGGCCTAT)区域。然而关于鸡PPAR α 具体结合位点和作用机制还有待于点突变、凝胶阻滞迁移率和染色质免疫共沉淀试验进一步验证。

*L-FABP*是肝脏中唯一表达的脂肪酸结合蛋白, 介导脂肪酸及多种疏水基团的转运。本研究使用人肝癌细胞系(HEPG2)作为实验材料探索*L-FABP*转录调控机制。由于人肝脏组织中的环境与禽类肝脏所提供的环境相似, *L-FABP*基因及转录因子*C/EBPα*、*KLF2*、*KLF3*、*KLF7*、PPAR α 在人和鸡肝脏中都有表达且*L-FABP*、*C/EBPα*、PPAR α 基因氨基酸序列保守性很高^[13], 因此推测人和鸡的*L-FABP*基因具有相同的调控机制, 即鸡*L-FABP*基因受到*C/EBPα*基因负调控作用和*KLF2*、*KLF3*、*KLF7*、PPAR α 基因的正调控作用。本研究为今后深入研究鸡*L-FABP*基因转录调控关系提供参考依据。

参考文献:

[1] Griffin H D, Guo K, Windsor D, *et al.* Adipose tissue lipogenesis and fat deposition in leaner broiler chickens [J]. *J Nutr*, 1992, 122(2): 363-368.

[2] 尹靖东, 齐广海, 霍启光. 家禽脂类代谢调控机理的研究进展[J]. *动物营养报*, 2000, (2): 1-7.

[3] Storch J, Thumser A E. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1486(1): 28-44.

[4] Martin G G, Danneberg H, Kumar L S, *et al.* Decreased liver fatty acid binding capacity and altered liver lipid distribution in mice lacking the liver fatty acid-binding protein gene[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(24): 21429-21438.

[5] Storch J, Mcdermott L. Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(Suppl): S126-S131.

[6] 王南南, 徐力致, 王亚平. 肝型脂肪酸结合蛋白研究进展[J]. *生命科学*, 2012, (2): 31-36.

[7] 石慧, 王启贵, 王宇祥, 等. 鸡*L-FABP*抗血清制备及组织表达特性分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, (11): 20-23.

[8] He Y, Yang X, Wang H, *et al.* Solution-state molecular structure of apo and oleate-liganded liver fatty acid-binding protein[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(44): 12543-12556.

[9] 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(2): 216-223.

[10] 高广亮, 冷丽, 张会丰, 等. 鸡肝脏型脂肪酸结合蛋白基因启动子活性分析[J]. *中国兽医学报*, 2012, (9): 98-102.

[11] 王启贵, 李辉, 张富春. *C/EBPs*与脂肪细胞的分化调控[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2007, (12): 22-23.

[12] Macdougald O A, Lane M D. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation[J]. *Annu Rev Biochem*, 1995, 64: 345-373.

[13] 张志威. *KLF2*、*KLF3*、和*KLF7*在脂肪组织生长发育中的功能研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.

[14] Banerjee S S, Feinberg M W, Watanabe M, *et al.* The Kruppel-like factor *KLF2* inhibits peroxisome proliferator-activated receptor- γ expression and adipogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(4): 2581-2584.

[15] Turner J, Crossley M. Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Kruppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators [J]. *EMBO J*, 1998, 17(17): 5129-5140.

[16] Hostetler H A, Balanarasimha M, Huang H, *et al.* Glucose regulates fatty acid binding protein interaction with lipids and peroxisome proliferator-activated receptor alpha[J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(11): 3103-3116.

[17] Wolfrum C. Cytoplasmic fatty acid binding protein sensing fatty acids for peroxisome proliferator activated receptor activation[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(19-20): 2465-2476.

cDNA芯片筛选肉鸡胫骨软骨发育不良相关基因

田文霞*, 刘红霞, 喻进, 卢晓晓, 宁官保, 李宏全
(山西农业大学动物科技学院, 山西太谷 030801)

摘要: 本研究旨在应用cDNA芯片技术筛选福美双诱导的肉鸡胫骨软骨发育不良(TD)相关基因, 提取对照组和饲喂福美双组第2、4、8、10、15、20天的AA肉鸡生长板组织总RNA, 制备cRNA探针, 分别与cDNA芯片杂交, 重新筛选肉鸡TD差异表达克隆。结果表明: 得到第2、4、8、10、15、20天2.0倍以上差异表达克隆分别为151、90、240、589、718和733个, 共计1 398个。基因本体分析表明, 上述差异基因分别参与调节、信号转导、转录、RNA加工与修饰、翻译、蛋白折叠和蛋白水解、运输、氧化还原、生物合成、细胞周期、增殖分化、细胞凋亡、细胞粘附、免疫应答与防御反应、应激反应、电子链传递和糖基化等生物学过程; 氧化磷酸化、糖酵解与糖异生、黏着斑、细胞骨架调节、ECM-受体相互作用、MAPK、钙信号转导通路、Wnt、胰岛素信号通路、TGF- β 信号通路、泛素介导的蛋白水解、神经活性的配体-受体相互作用、VEGF、GnRH、酮体的合成与分解、细胞因子与其受体的相互作用等多条代谢途径与肉鸡TD有关。为从分子水平阐明肉鸡胫骨软骨发育不良发病机制提供可靠的生物信息学依据。

关键词: 福美双; 胫骨软骨发育不良; cDNA芯片; 差异表达基因; 肉鸡

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 0258-7033(2014)17-0017-03

收稿日期: 2014-01-09; 修回日期: 2014-03-17

资助项目: 国家自然科学基金(31072179); 山西省自然科学基金(2009011043-1); 山西省科技攻关项目(20130311027-3)

作者简介: 田文霞(1967-), 女, 山西闻喜人, 博士, 副教授, 主要从事禽病分子致病机理和免疫学研究, Email: wenxiatian@126.com

*通讯作者

肉鸡胫骨软骨发育不良(tibial dyschondroplasia, TD)以骺板成熟面形成不能血管化亦不能矿化的软骨栓为特点, 是肉鸡常见的骨骼疾病之一, 给世界肉鸡养殖业造成巨大经济损失。虽以往采用原位杂交、免疫组化、免疫印迹、RT-PCR等方法仅对软骨发育特定的生长分化相关基因在肉鸡TD后期的表达

The Transcriptional Activity of *L-FABP* Promoter Regulated by Transcription Factors *C/EBP α* , *KLF2*, *KLF3*, *KLF7*, and *PPAR α* in Chicken

HE Qi¹, SHI Hong-yan¹, WANG Hai-xia¹, GAO Guang-liang^{1,2}, WANG Qi-gui^{1,2*}, LI Hui^{1*}

(1. Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Harbin 150030, China;

Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province,

College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Heilongjiang Harbin 150030, China;

2. Chongqing Academy of Animal Science, Chongqing 402460, China)

Abstract: As an important member of the fatty acid binding protein (FABP) family, *L-FABP* plays important roles in the translocation of saturated fatty acid, unsaturated fatty acid, cholesterol, bile acid, ect. In mammals, certain progresses were made on the regulatory mechanism of *L-FABP* transcriptional activities. However, it is rarely reported in avian species. In order to investigate the regulatory mechanism of *L-FABP* gene transcription in chicken, we cotransfected *C/EBP α* , *KLF2*, *KLF3*, *KLF7*, *PPAR α* and examined their individual effects on *L-FABP* promoter activity, using a routine Luciferase report gene method in the human hepatocellular carcinoma cell line, HEPG2. The expression of *L-FABP* was significantly repressed by *C/EBP α* , but significantly promoted by *KLF2*, *KLF3*, *KLF7* and *PPAR α* , respectively. These results will provide a foundation to stimulate further research on the regulatory mechanism and function of chicken *L-FABP* gene.

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