

HOPX 基因过表达对鸡前脂肪细胞增殖的影响

史洪岩, 贺 蓁, 程 敏, 孙婴宁, 李 辉, 王 宁

(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, 哈尔滨 150030)

摘要: 【目的】构建鸡 HOPX 基因 (homeodomain only protein X) 全长编码区 (coding region sequence, CDS) 的真核表达载体, 转染鸡原代前脂肪细胞, 探讨 HOPX 基因过表达对鸡原代前脂肪细胞增殖的影响。【方法】利用 Primer Premier 5.0 软件设计鸡 HOPX 基因 CDS 区上、下游引物, 以 AA 肉鸡腹部脂肪组织的 cDNA 为模板, 采用 PCR 扩增、克隆鸡 HOPX 基因全长 CDS 区, 并将其亚克隆至真核表达载体 (pCMV-HA vector), 获得 HOPX 基因的真核表达载体 pCMV-HA-HOPX。采用双酶切鉴定、测序及 Western blotting 方法分析鉴定 pCMV-HA-HOPX。采用胶原酶法分离培养 12 日龄 AA 商品肉仔鸡腹部脂肪组织原代前脂肪细胞, 瞬时转染 pCMV-HA-HOPX, 转染 6 h 后消化细胞, 按照每孔 50 000 个细胞数接种 12 孔培养板, 并在细胞贴壁 0、24、48 和 72 h, 分别采用显微镜观察和 CCK-8 细胞增殖检测试剂盒分析 HOPX 基因过表达对鸡原代前脂肪细胞增殖的影响; 同时, 利用 TRIzol 法提取组织和细胞总 RNA, 并反转录合成 cDNA, 采用 Real-time RT-PCR 方法分析细胞增殖标志基因 *Cyclin D1* 和 *PCNA* 的 mRNA 表达。【结果】测序结果显示, 鸡 HOPX 基因的全长 CDS 区大小为 222 bp, 与 NCBI 发布的鸡 HOPX 基因 mRNA 序列 (NM_204556) 一致; 利用 HA 标签抗体的 Western blotting 分析显示, 真核表达载体 pCMV-HA-HOPX 能够表达出预期大小的蛋白分子 (约 9.5kD), 表明鸡 HOPX 基因的真核表达载体 pCMV-HA-HOPX 构建成功。显微镜观察发现, 转染 pCMV-HA-HOPX 载体的细胞 (*HOPX* 过表达组) 在细胞贴壁后培养 24 和 48 h 的细胞数量低于转染 pCMV-HA vector 空载体 (空载体对照组) 的细胞数量; CCK-8 检测分析发现, 转染 pCMV-HA-HOPX 载体细胞的吸光度值 (OD 值) 在细胞贴壁后培养 24、48 和 72 h 都极显著低于空载体对照组 ($P < 0.01$)。与细胞增殖检测结果相一致, 细胞增殖标志基因表达检测分析发现, 在细胞贴壁后培养 24 h 后, *HOPX* 过表达组细胞 *Cyclin D1* 基因的 mRNA 表达量显著低于空载体对照组 ($P < 0.05$); 在细胞贴壁后培养 48 h 时, *HOPX* 过表达组的 *PCNA* 基因的 mRNA 表达量显著低于空载体对照组 ($P < 0.05$); 在细胞贴壁后培养 72 h 时, *HOPX* 过表达组的 *PCNA* 和 *Cyclin D1* 基因的表达量均极显著低于空载体对照组 ($P < 0.01$)。【结论】HOPX 基因过表达在体外抑制鸡原代前脂肪细胞的增殖。

关键词: 鸡; *HOPX*; 前脂肪细胞; 增殖

Effect of HOPX Gene Overexpression on Chicken Preadipocyte Proliferation

SHI Hong-yan, HE Qi, CHENG Min, SUN Ying-ning, LI Hui, WANG Ning

(College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University/Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture/Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province, Harbin 150030)

Abstract: 【Objective】The objective of this study was to construct the eukaryotic expression vector of chicken full-length HOPX gene and investigate the effect of HOPX gene overexpression on chicken preadipocytes proliferation. 【Method】Using Primer Premier 5.0 software, a pair of primers was designed to amplify the full-length coding sequence (CDS) of chicken *HOPX*. The

收稿日期: 2014-03-13; 接受日期: 2015-01-12

基金项目: 国家“973”计划 (2009CB941604)、国家肉鸡产业技术体系项目 (CARS-42)、黑龙江高校科技创新团队建设项目 (2010td02)

联系方式: 史洪岩, E-mail: shihongyan_yusheng@163.com. 通信作者王宁, E-mail: wayane123@aliyun.com

full-length coding sequence (CDS) of chicken HOPX gene was PCR amplified from the cDNA from the abdominal fat tissues of AA broiler chickens and cloned into pCMV-HA vector. Chicken preadipocytes were isolated from the abdominal fat tissues of 12-day-old AA broiler chicken by collagenase digestion, cultured and transfected with pCMV-HA-HOPX and pCMV-HA empty vector, respectively. Cell proliferation was assayed by microscopic examination and Cell Counting Kit-8 (CCK-8). Gene expression was measured by Western blotting and quantitative Real-time RT-PCR. 【Result】 The sequencing results showed that the full-length coding sequence of chicken HOPX gene is 222 bp and identical with NCBI reference sequence (NM_204556). Western blotting analysis showed that pCMV-HA-HOPX could correctly express the HA-tagged HOPX. The microscopic examination showed that the numbers of the preadipocytes transfected with pCMV-HA-HOPX were less than those of the preadipocytes transfected with empty pCMV-HA vector at 24 h and 48 h after of cell adhesion. CCK-8 analysis showed that the OD values of the preadipocytes transfected with pCMV-HA-HOPX were significantly lower than those of the preadipocytes transfected with empty pCMV-HA vector at 24 h, 48 h and 72 h after of cell adhesion ($P < 0.01$). Consistently, at 24 h after of cell adhesion, the mRNA expression of *CyclinD1* was significantly lower in HOPX-overexpressing preadipocytes than in control preadipocytes ($P < 0.05$); at 48 h after of cell adhesion, the mRNA expression of *PCNA* was significantly lower in HOPX-overexpressing preadipocytes than in control preadipocytes ($P < 0.05$); at 72 h after of cell adhesion, the mRNA expression of *CyclinD1* and *PCNA* were extremely significantly lower in HOPX-overexpressing preadipocytes than in control preadipocytes ($P < 0.01$) 【Conclusion】 HOPX gene overexpression *in vitro* inhibits chicken preadipocyte proliferation.

Key words: chicken, HOPX, preadipocyte, proliferation

0 引言

【研究意义】脂肪过度沉积影响人类健康, 严重者会导致肥胖症及其相关疾病的发生, 如 II 型糖尿病、高血压、高血脂及脂肪肝等。畜禽体内脂肪过度沉积同样影响畜禽的健康, 而且还会导致畜禽饲料利用率、生产性能及产品品质的下降。脂肪沉积涉及脂肪细胞数目的增加和脂肪细胞体积的增大^[1]。目前对人和小鼠脂肪细胞增殖和分化的调控机制已有深入研究和比较透彻的了解, 但禽类中的研究相对较少, 本试验以鸡为研究对象, 首次研究 HOPX 基因过表达对鸡原代前脂肪细胞增殖的影响。【前人研究进展】同源异型盒基因 (homeobox genes) 家族成员多, 分布广, 参与脊椎动物和无脊椎动物的器官发育和组织形成。同源异型盒基因主要分为两类, 一类是 HOX 基因, 该基因家族成员在染色体上成簇排列; 另一类是 non-HOX 基因, 又称 ParaHox 基因, 其家族成员散在分布于不同染色体上^[2]。HOPX (homeodomain only protein X) 基因属于 non-HOX 基因家族成员^[3], 又被称为 *HOD*、*HOP*、*OBI*、*LAGY*、*TOTO*、*CAMEO*、*NECCI* 和 *SMAP31*。脊椎动物的 HOPX 基因是一个由 73 个氨基酸残基组成, 大小约 8 kD 的蛋白质, 具有一个由 60 个氨基酸构成的非典型同源结构域^[4], 目前 HOPX 是已知的最小同源结构域蛋白^[5]。HOPX 基因的氨基酸序列组成具有高度保守性, 例如人和小鼠的 HOPX 蛋白同源性能能够达到 92%^[3]。HOPX 是一类特殊的同源异型盒蛋白, 即 HOPX 基因不能直接结合

DNA, Chong 等^[6]发现 HOPX 基因的非典型同源结构域中与 DNA 结合的必要氨基酸发生了突变; Hyun 等^[4]发现 HOPX 具有特殊的蛋白质 3D 结构, 这些都导致 HOPX 基因不能直接结合 DNA 双链。因此, HOPX 基因是通过与其他蛋白质的相互作用来发挥其生物学功能, Hyun 等^[4]证实 HOPX 能与血清反应因子 (serum response factor, SRF) 蛋白相互作用, 参与心脏发育的调节; Kook 等^[7]发现 HOPX 能够与去乙酰化酶 2 (histone deacetylase 2, HDAC2) 蛋白相互作用, 通过稳定 HDAC2 和 Gata4 的复合物, 从而使心肌细胞稳定增殖^[8]。Kee 等^[9]在研究 HOPX 基因对骨骼肌细胞发育的影响中发现 HOPX 蛋白能够和 Epc1 (enhancer of polycomb1) 蛋白相互作用, 促进骨骼肌细胞分化。目前, 对 HOPX 的研究主要集中在心脏发育^[5]、骨骼肌发育^[9]、免疫应答^[10]、角质细胞分化^[3, 11]以及癌症发生^[12-13]等方面。【本研究切入点】前期的研究表达谱芯片和 Northern blotting 分析发现, 鸡 HOPX 基因在鸡脂肪组织中表达较高, 且具有一定的脂肪组织表达特异性^[14]。Real-time RT-PCR 表达分析显示, HOPX 基因在东北农业大学高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织间差异表达, 即在高脂系鸡腹部脂肪组织中 HOPX 基因的表达量要高于低脂系^[15], 推测 HOPX 基因可能在鸡脂肪生长发育过程中发挥作用, 但截至目前尚未有研究证实 HOPX 基因在脂肪细胞增殖和分化中发挥作用, 为此本研究开展了 HOPX 基因过表达对鸡原代前脂肪细胞增殖影响的研究。【拟解决的关键问题】揭示 HOPX 基因过表达对体外培养鸡原代前脂肪细胞增殖的影响。

1 材料与方法

本试验于 2012 年 9 月至 2014 年 1 月在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及东北农业大学动物科学技术学院完成。

1.1 试验材料

选取 12 日龄 AA 商品肉仔鸡为试验材料。鸡 C/EBP α 真核表达质粒 pCMV-HA-C/EBP α 和增强型绿色荧光蛋白表达质粒 pEGFP 为农业部鸡遗传育种重点实验室保存质粒。所用试剂包括: pCMV-HA vector (Clontech); Easytaq PCR 聚合酶、RNase Inhibitor、dNTPs 和 Oligo dT primer18 (Takara); 限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I 和 T4 DNA 连接酶 (NEB); 凝胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒 (Axygen); Endo-free Plasmid Midi Kit (OMEGA 公司); TRIzol[®] Reagent、Opti-MEM[®] Medium 和 Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen); 逆转录试剂盒 (Promega); DMEM/F12 培养基、胎牛血清 (FBS) 和胶原酶 I (Gibco); FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche); RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)、Actin 抗体(抗 β -actin 小鼠单克隆抗体)和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (碧云天生物技术研究); HA 标签抗体 (TIANGEN); 超敏 ECL 化学发光试剂盒 (哈尔滨海基生物有限公司); CCK-8 试剂盒 (日本东仁研究所)。

引物由上海英骏生物工程技术有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 鸡原代前脂肪细胞的分离培养 采用农业部鸡遗传育种重点实验室建立的肉仔鸡腹部脂肪组织原代前脂肪细胞分离和培养方法^[6], 分离和培养鸡原代前脂肪细胞。具体操作如下: 选取 12 日龄 AA 商品肉仔鸡, 在无菌条件下采集鸡腹部脂肪组织, 放入装有 10 mL 无菌 PBS 的平皿中, 反复冲洗, 尽量除去血管和筋膜, 剪碎组织, 转入含有消化液的试管中, 37℃ 消化 65 min, 每隔 5 min 轻轻摇动一次。消化完毕, 加入与消化液相同体积的全培养基 (DMEM/F12+10%FBS+1%K) 终止消化, 轻轻吹打均匀, 分别经 100 目和 600 目不锈钢筛网过滤。过滤后培养基混合液分装入 15 mL 离心管中, 700×g 离心 10 min 弃上清, 用红细胞裂解液重悬细胞沉淀, 室温孵育 10 min 后轻轻吹匀, 将细胞悬液按照 700×g 离心 10 min, 细胞沉淀用全

培养基重悬, 700×g 离心 10 min, 再用全培养基重悬, 重悬后的细胞悬液就是基质-血管细胞 (S-V 细胞), 即鸡原代前脂肪细胞。将分离的鸡原代前脂肪细胞计数后, 按 (2—3) × 10⁵/mL 左右的密度接种, 置 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 恒温培养, 培养 48 h 后换液, 细胞汇合度达到 80%—90% 时进行传代, 传代所用的全培养基不含双抗。

1.2.2 鸡 HOPX 基因真核表达载体的构建 根据 NCBI 发布的鸡 HOPX 基因的 mRNA 序列 (NM_204556), 利用 Primer Premier 5.0 软件设计全长 CDS 区的扩增引物 HOPX-P11-F 和 HOPX-P11-R。HOPX-P11-F: TCG AATTCAAATGGCCACGGAGAAGTCAGT; HOPX-P11-R: CCCTCGAGACTAGTCCCTCACAGACCCAC ATTCT, 上游引物引入 *EcoR* I 酶切位点, 下游引物引入 *Xho* I 酶切位点 (下划线表示), 扩增产物包括 HOPX 基因的起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG, 产物大小为 222 bp。提取 AA 鸡脂肪组织总 RNA, 按照 Promega Improm-II (Promega, Madison, WI, USA) 试剂盒说明书将总 RNA 反转录为 cDNA, 利用 Easytaq 聚合酶对鸡 HOPX 基因全长编码区进行 PCR 扩增, 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 7 min。将扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收后连接到 pCMV-HA vector 真核表达载体上。构建好的质粒经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定无误后, 送上海英骏生物工程技术有限公司进行测序。

1.2.3 细胞转染 将鸡原代前脂肪细胞接种在 6 孔细胞培养板中培养, 待细胞汇合度达到 70%—80%, 采用转染试剂 Lipofectamine[®] 2000 转染质粒, 具体步骤参照 Lipofectamine[®] 2000 说明书进行。将增强型绿色荧光蛋白表达质粒 pEGFP 转染鸡前脂肪细胞, 转染 24 h 时荧光显微镜检测, 确定细胞的转染效率。将真核表达载体质粒 pCMV-HA-HOPX、pCMV-HA-C/EBP α (阳性对照) 和空载体质粒 pCMV-HA vector (阴性对照) 转染细胞, 转染 48 h 时裂解细胞, 收集细胞裂解液, 采用 Western blotting 验证真核表达载体 pCMV-HA-HOPX 能否正确表达 HOPX。

1.2.4 总 RNA 及总蛋白的提取 细胞和组织总 RNA 提取: 按 TRIzol[®] Reagent 说明书提取 12 日龄 AA 肉仔鸡腹部脂肪组织总 RNA 和 12 日龄 AA 肉仔鸡腹部原代前脂肪细胞总 RNA。

细胞总蛋白提取: 取出细胞培养板, 弃去细胞培养基, 无菌 PBS 轻洗两次。按照 6 孔板每孔加入 100 μ L

的 RIPA 细胞裂解液 (含 $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF), 放置于冰上裂解 30 min。裂解完全后, 将裂解液移至 1.5 mL 进口离心管中, 4°C , $10\,000\times g$ 离心 10 min, 上清即为细胞总蛋白, 将上清转移至新的 1.5 mL 进口离心管中, -80°C 保存。

1.2.5 Real-time RT-PCR 检测 按 Promega Improm-II (Promega, Madison, WI, USA) 反转录试剂盒说明书, 将提取的细胞总 RNA 反转录为 cDNA。使用

Real-time PCR 仪 (ABI 7500) 进行检测。反应体系为: FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) ($2\times$) $5\ \mu\text{L}$, cDNA 模板 $1\ \mu\text{L}$, 上、下游引物 ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 $0.2\ \mu\text{L}$, ddH₂O $3.6\ \mu\text{L}$, 总体积为 $10\ \mu\text{L}$ 。反应条件: 95°C 预变性 10 min; 95°C 变性 15 s, 60°C 复性延伸 60 s, 共 40 个循环。以 β -actin 基因为内参, 利用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 的方法将原始 Ct 值转换为相对的基因表达量。所用引物序列见表 1。

表 1 Real-time RT-PCR 分析所用的引物

Table 1 Real-time RT-PCR primers used in this study

基因名称	GenBank 登录号	引物序列(5'→3')	产物大小
Gene name	GenBank accession No.	Sequences of primers (5'→3')	Product size (bp)
<i>β-actin</i>	NM_205518	F: TCTTGGGTATGGAGTCCTG R: TAGAAGCATTTGCGGTGG	331
<i>PCNA</i>	EU240627	F: GTGCTGGGACCTGGGTT R: CGTATCCGCATGTCTTCT	217
<i>Cyclin D1</i>	GGU40844	F: CTCGGAGCTACCTGCATGTTTGT R: TTTACGGATGATCTGTTTGGTGT	237

1.2.6 Western blotting 检测 每个样品的上样量 $80\ \mu\text{g}$, 经 SDS-PAGE 电泳分离后, 电转至 PVDF 膜上; 将膜置于 2.5% 脱脂奶粉中, 室温封闭 3 h 后, PBST 洗涤膜 (5 min/次 \times 2 次), 然后加入稀释好的待检测抗体, 抗体稀释比例分别为 Actin 抗体 (1 : 1 000), HA 标签抗体 (1 : 200)。 4°C 孵育过夜, 次日弃一抗, 用 PBST 洗涤膜 (5 min/次 \times 4 次) 后, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (1 : 5 000), 室温孵育 1—2 h 后, PBST 洗涤膜 (5 min/次 \times 4 次), 然后用 ECL 显色液显色曝光。

1.2.7 细胞增殖检测 待鸡原代前脂肪细胞生长至汇合度达到 70%—80%, 分别瞬时转染 pCMV-HA-HOPX (过表达组) 和 pCMV-HA vector (空载体组), 6 h 后采用胰酶法消化细胞, 利用完全培养基 (DMEM/F12+10%FBS) 终止消化, 分别将过表达组和空载体对照组细胞, 装入 15 mL 离心管中, 按照 $97.28\times g$ 离心 10 min 收集细胞并弃掉培养基。全培养基重悬细胞后采用红细胞计数板对细胞进行计数, 按照每孔 50 000 个细胞将细胞接种在 12 孔培养板中培养, 每组处理设置 3 个重复。接种 4 h 后细胞贴壁, 并记为试验 0 h, 分别在试验 0、24、48 及 72 h 进行光学显微镜细胞观察、CCK-8 检测和 Real-time RT-PCR 基因表达检测。CCK-8 试剂盒检测时, 每孔避光加入 CCK-8 试剂 $100\ \mu\text{L}$, 在 37°C 、5% CO₂ 培养箱孵育 3 h 后, 按照每孔取 $100\ \mu\text{L}$ 加入 96 孔板, 采

用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (OD 值)。

1.2.8 统计分析 所得数据利用 JMP5.0 软件进行 t 检验, $*P<0.05$ 为差异显著, $**P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

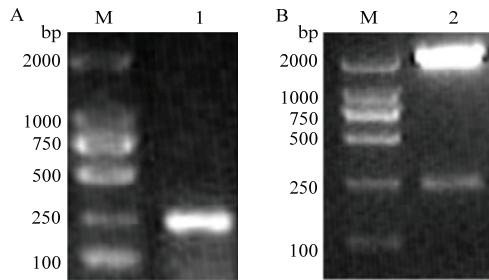
2.1 鸡 HOPX 基因真核表达载体的构建

利用引物 HOPX-P11-F 和 HOPX-P11-R, 以 AA 肉鸡腹部脂肪组织的 cDNA 为模板, 采用 PCR 扩增鸡全长 HOPX 基因编码区, 琼脂糖凝胶电泳检测到一条长约 222 bp 的特异性条带 (图 1-A), 该片段大小与预期的 HOPX 基因全长编码区大小一致。将该目的片段进一步亚克隆到 pCMV-HA vector 载体上。pCMV-HA-HOPX 载体经内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后, 得到与目的片段大小一致的片段 (图 1-B)。测序分析显示, 所测克隆序列与 NCBI 发布的 HOPX 基因 (NM_205155)CDS 区碱基序列一致, 且与 pCMV-HA vector 载体上的 HA 标签序列阅读框一致, 能够表达出带有 HA 标签的 HOPX 融合蛋白, 大小约为 9.5 kD。将真核表达载体 pCMV-HA-HOPX、pCMV-HA-C/EBP α 和空载体 pCMV-HA vector 分别瞬时转染鸡原代前脂肪细胞, 在转染 48 h 时收集细胞, 提取细胞总蛋白, 利用 HA 标签抗体进行 Western blotting 检测。结果图 2 所示, 在阳性对照的细胞裂解液中检测到了预期大小 (约 35kD) 的蛋白分子, 而在阴性对照的细

胞裂解液中没有检测到蛋白分子, 笔者在转染 pCMV-HA-HOPX 的细胞裂解液中可检测到一个约 9.5 kD 大小的蛋白, 其大小与携带 HA 表达标签的 HOPX 蛋白大小相一致 (图 2), 这些数据说明已成功构建了鸡 HOPX 基因的真核表达载体 pCMV-HA-HOPX 已构建成功。

2.2 转染效率检测

利用转染试剂 Lipofectamine[®]2000 将增强型绿色荧光蛋白表达质粒 pEGFP 转染鸡原代前脂肪细胞, 转

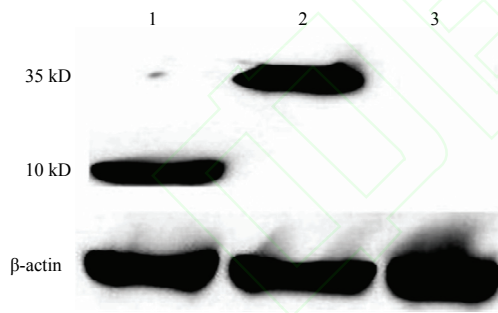


A: 鸡 HOPX 基因 RT-PCR 产物; B: 真核表达质粒 pCMV-HA-HOPX 的 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切鉴定。M: Trans2000 DNA marker; 泳道 1 为 HOPX 基因 RT-PCR 产物; 泳道 2 为 pCMV-HA-HOPX 的 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切鉴定

A: RT-PCR product of chicken HOPX gene; B: Identification of recombinant plasmid pCMV-HA-HOPX by double digestion of *Eco*R I and *Xho* I. M: Trans2000 DNA marker; lane 1: RT-PCR product of HOPX gene; lane 2: Identification of the eukaryotic expression vector pCMV-HA-HOPX by double digestion of *Eco*R I and *Xho* I

图 1 鸡 HOPX 基因真核表达载体 pCMV-HA-HOPX 的构建

Fig. 1 Construction of the eukaryotic expression vector pCMV-HA-HOPX



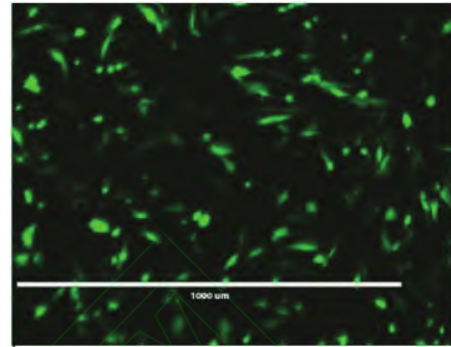
1: pCMV-HA-HOPX 转染细胞的裂解液; 2: pCMV-HA-C/EBP α 转染细胞的裂解液; 3: pCMV-HA 载体转染细胞的裂解液 Western blotting 分析证明 pCMV-HA-HOPX 过表达载体能够表达 HOPX

1: Lysate of pCMV-HA-HOPX-transfected cells; 2: Lysate of pCMV-HA-C/EBP α -transfected cells; 3: Lysate of pCMV-HA vector-transfected cells; Western blotting analysis demonstrated that HOPX protein was expressed in the chicken preadipocytes transfected with HOPX overexpression vector (pCMV-HA-HOPX)

图 2 HOPX 过表达载体 (pCMV-HA-HOPX) 的 Western blotting 验证

Fig. 2 Verification of HOPX overexpression vector (pCMV-HA-HOPX) by Western blotting analysis

染 24 h 后, 在荧光显微镜下观察计数, 根据发荧光的细胞数占总细胞数的比例, 确定细胞转染效率。结果如图 3 所示, 本研究的鸡前脂肪细胞转染效率约为 60%, 提示转染试剂 Lipofectamine[®]2000 在鸡原代前脂肪细胞中具有较好的转染效率, 可以用于后续研究。



培养鸡前脂肪细胞, 转染 pEGFP 转染细胞, 24 小时后利用荧光显微镜分析细胞转染效率

Chicken preadipocytes were transfected with pEGFP, and the transfection efficiency was examined under fluorescence microscope

图 3 鸡前脂肪细胞的转染效率检测

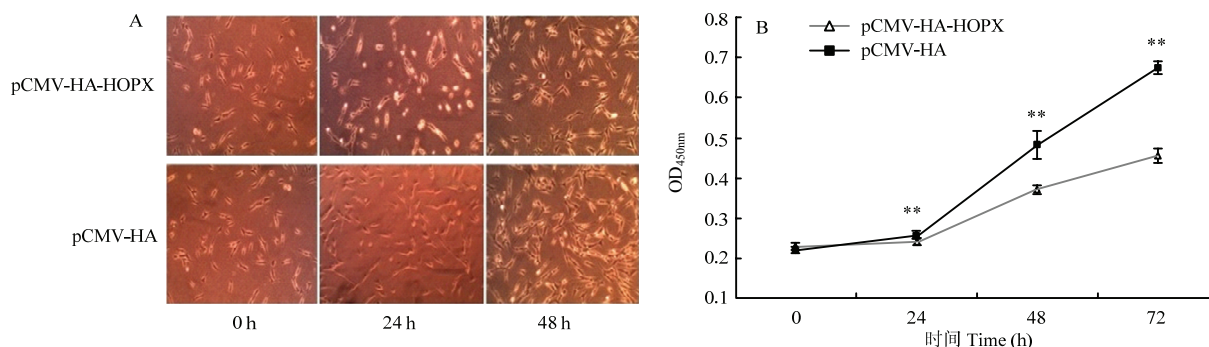
Fig. 3 Detection of transfection efficiency in chicken preadipocytes

2.3 过表达 HOPX 基因对鸡原代前脂肪细胞增殖的影响

利用光学显微镜观察鸡原代前脂肪细胞的增殖情况, 观察发现, 细胞接种 4 h 后细胞贴壁生长, 过表达组与对照组细胞数量基本一致, 此时时间点定为贴壁 0 h; 贴壁 24 h 后 HOPX 过表达组的细胞数量低于对照组细胞; 贴壁 48 h 后, 过表达组细胞数量明显低于对照组细胞数量 (图 4-A)。显微镜观察提示, HOPX 基因过表达抑制鸡前脂肪细胞增殖。与此相一致, CCK-8 分析显示, 在细胞贴壁 24、48 和 72 h, HOPX 基因过表达组细胞的吸光度值 (OD_{450}) 极显著低于空载体对照组 ($P < 0.01$) (图 4-B)。这些数据都提示, HOPX 基因过表达抑制鸡原代前脂肪细胞的增殖。

2.4 过表达 HOPX 基因对细胞增殖标志基因的影响

采用 Real-time RT-PCR 检测细胞增殖标志基因 *PCNA* 和 *Cyclin D1* 在 HOPX 过表达组和对照组的表达量。结果发现, 在细胞贴壁 24 h 时, HOPX 过表达组的 *Cyclin D1* 表达量显著低于空载体对照组 ($P < 0.05$) (图 5-B), 在细胞贴壁 48 h 时, HOPX 过表达组的 *PCNA* 表达量显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 5-A),

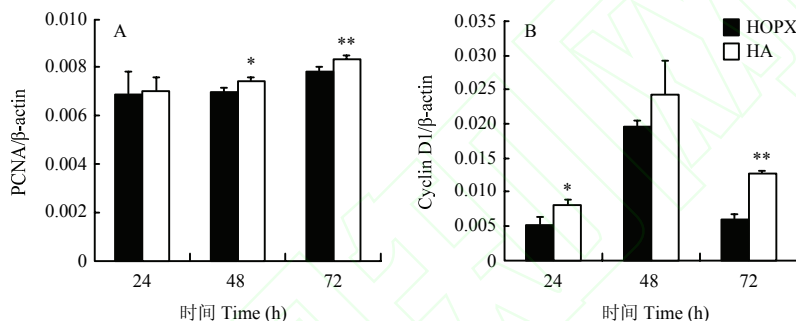


A: 显微镜下观察 *HOPX* 过表达对鸡前脂肪细胞增殖的影响; B: CCK-8 方法检测 *HOPX* 过表达对鸡前脂肪细胞增殖的影响

A: The effect of *HOPX* overexpression on chicken preadipocyte proliferation evaluated by microscope; B: The effect of *HOPX* overexpression on chicken preadipocyte proliferation evaluated by CCK-8 assay

图 4 *HOPX* 过表达对鸡前脂肪细胞增殖的影响

Fig. 4 The effect of *HOPX* overexpression on chicken preadipocyte proliferation



A: *HOPX* 过表达对 *PCNA* 基因表达的影响; B: *HOPX* 过表达对 *Cyclin D1* 基因表达的影响

A: The effect of *HOPX* overexpression on *PCNA* expression in pCMV-HA-HOPX and empty vector-transfected chicken preadipocytes; B: The effect of *HOPX* overexpression on *Cyclin D1* expression in pCMV-HA-HOPX and empty vector-transfected chicken preadipocytes

图 5 *HOPX* 基因过表达对前脂肪细胞 *PCNA* 和 *Cyclin D1* 基因表达的影响

Fig. 5 Effect of *HOPX* overexpression on gene expression of *PCNA* and *Cyclin D1* in chicken preadipocytes

在细胞贴壁 72 h 时, *HOPX* 过表达组的 *PCNA* 和 *Cyclin D1* 的表达量均极显著低于对照组 ($P < 0.01$) (图 5)。这些结果与显微镜检测和 CCK-8 细胞增殖检测结果一致。

3 讨论

农业部鸡遗传育种重点实验室的前期研究结果提示, *HOPX* 基因在鸡脂肪生长发育中发挥一定作用^[15], 本研究成功构建鸡 *HOPX* 基因的真核表达载体 pCMV-HA-HOPX, 采用基因过表达技术, 发现 *HOPX* 基因过表达能体外抑制鸡原代前脂肪细胞的增殖。

HOPX 是公认的肿瘤抑制因子, 人胰腺癌、大肠癌、子宫内膜癌、食管鳞状细胞癌、肺癌及胃癌的研究都证实, *HOPX* 可抑制癌细胞增殖^[13, 17-21]。Hiroshi

等^[17]研究发现 *HOPX* 基因过表达抑制大肠癌细胞系 HCT116 和 DLD1 细胞的增殖, 并随着时间延长细胞增殖差异越来越明显。本研究的结果与文献报道一致, 光学显微镜检测和 CCK-8 细胞增殖检测发现, 与空载体对照组相比, *HOPX* 过表达能抑制鸡原代前脂肪细胞的增殖 (图 4)。*PCNA* 和 *Cyclin D1* 是重要的细胞增殖标志基因^[22-23], *PCNA* 及 *Cyclin D1* 表达分析的结果同样支持 *HOPX* 基因能够抑制鸡原代前脂肪细胞增殖这一结论 (图 5)。

东北农业大学高、低脂肉鸡的腹部脂肪细胞数量存在显著差异, 其中 7 周龄高脂系肉鸡的脂肪细胞数是低脂系肉鸡的 1.9 倍^[24]。笔者前期的基因表达分析显示, *HOPX* 基因在高脂系肉鸡脂肪组织中表达量要高于低脂系肉鸡^[15], 因此推测 *HOPX* 基因可能具有促

进脂肪细胞增殖的作用。但与推测结果相反,本试验发现 HOPX 基因过表达在体外具有抑制鸡原代前脂肪细胞增殖的作用,出现这一不一致的原因可能是:一是体内脂肪组织的生长发育的调控因素众多,分子调控机制复杂,本研究为体外基因过表达分析,体外的基因研究结果不能完全反映体内的基因功能;二是脂肪细胞的增殖和分化具有高度协同作用^[25],HOPX 基因也可能还参与调控鸡脂肪细胞的分化。目前已有报道 HOPX 基因能够促进骨骼肌细胞分化^[9]和角质形成细胞分化^[3],笔者在鸡原代前脂肪细胞分化中初步研究发现,HOPX 基因过表达促进体外培养的鸡原代前脂肪细胞的分化(未发表资料)。HOPX 基因在体内前脂肪组织生长发育中的作用有待于基因敲除动物的建立和研究。尽管 HOPX 基因在鸡脂肪细胞增殖和分化中的分子机制还有待进一步深入研究,但可以肯定 HOPX 基因是一个新的脂肪生长发育调控因子。

4 结 论

在体外试验的条件下首次发现 HOPX 基因过表达抑制鸡原代前脂肪细胞的增殖。研究证实 HOPX 是一个新的脂肪生长发育调控因子,研究结果为鸡脂肪生长发育分子机制的阐明奠定了基础。

References

- [1] 鞠大鹏,詹丽杏. 脂肪细胞分化及其调控的研究进展. 中国细胞生物学学报, 2010, 32(5): 690-695.
Ju D P, Zhan L X. Advances of adipocyte differentiation and its regulation. *Chinese Journal of Cell Biology*. 2010, 32(5): 690-695. (in Chinese)
- [2] 金淑清,浦予飞,裘莹. HOX 基因的研究进展. 癌症进展, 2011, 9(2): 154-158.
Jin S Q, Pu Y F, Qiu Y. Advances in the study of HOPX gene. *Oncology Progress*, 9(2): 154-158. (in Chinese)
- [3] Obarzanek F M, Favre B, Kypriotou M, Ryser S, Huber M, Hohl D. Homeodomain-only protein HOP is a novel modulator of late differentiation in keratinocytes. *European Journal of Cell Biology*, 2011, 90(4): 279-290.
- [4] Hyun K W, Raina J S, Hae J K, Sera S, Jason A L, Fionna E, Loughlin Z Y, Jonathan A E, Joel P M. Analysis of the structure and function of the transcriptional coregulator HOP. *Biochemistry*, 2006, 45(35): 10584-10590.
- [5] Fabian C, Hyun K, Aaron D G, Ronniel N, Kuangyu J, Joel P M, Min M L, Rita M, Jun L, Robert Schnepf, Christine B, Jiri N, Robert J S, Mary C M. Hop is an unusual homeobox gene that modulates cardiac development. *Cell*, 2002, 110(6): 713-723.
- [6] Chong H S, Liu Z P, Robert P, Zhang C L, Wang D Z. Modulation of cardiac growth and development by HOP, an unusual homeodomain protein. *Cell*, 2002, 110(6): 725-735.
- [7] Hyun K, John J L, Aaron D G, Lu M M, Yung W W W, Joel M, Zhou R, Victor F, Peter G, Jonathan A E. Cardiac hypertrophy and histone deacetylase-dependent transcriptional repression mediated by the atypical homeodomain protein Hop. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, 112(6): 863-871.
- [8] Trivedi C M, Zhu W T, Wang Q H, Jia C, Kee H J, Li L, Hannehalli S, Epstein J A. Hopx and Hdac2 interact to modulate Gata4 acetylation and embryonic cardiac myocyte proliferation. *Developmental Cell*, 2010, 19(3): 450-459.
- [9] Kee H J, Kim J R, Nam K I, Park H Y, Shin S, Kim J C, Shimono Y, Takahashi M, Jeong M H, Kim N, Kim K K, Kook H. Enhancer of polycomb1, a novel homeodomain only protein-binding partner, induces skeletal muscle differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284: 16308-16316.
- [10] Daniel H, Yisong Y W, Elizabeth E E, Richard A F. Homeodomain only protein is required for the function of induced regulatory T cells in dendritic cell-mediated peripheral T cell unresponsiveness. *Nature Immunology*, 2010, 11(10): 962-968.
- [11] Yang J M, Sim S M, Kim H Y, Park G T. Expression of the homeobox gene, HOPX, is modulated by cell differentiation in human keratinocytes and is involved in the expression of differentiation markers. *European Journal of Cell Biology*, 2010, 89(7): 537-546.
- [12] Denisa K, Jiří P, Jan K, Kateřina T, Vladimír Č, Jiří H. Downregulation of the HOPX gene decreases metastatic activity associated with metasta. *Molecular Cancer Research*, 2013, 11(10): 1235-1247.
- [13] Mina W, Keishi Y, Hiroshi K, Akira O, Hiroshi K, Hiroshi N, Kazunori N, Akira E, Masahiko W. Cancer specific promoter CpG Islands hypermethylation of HOP homeobox (HOPX) gene and its potential tumor suppressive role in pancreatic carcinogenesis. *BMC Cancer*, 2012, 12: 397.
- [14] 王洪宝. 影响鸡脂类代谢重要基因的筛选及调控通路分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008.
Wang H B. Identification of Important Genes and Pathways in Chicken Lipid Metabolism[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [15] 张坤, 张志威, 王维世, 闫晓红, 李辉, 王宁. 鸡 HOPX 基因的克

- 隆及表达分析. 东北农业大学学报, 2012, 43(12): 46-53.
- Zhang K, Zhang Z W, Wang W S, Yan X H, Li H, Wang N. Cloning and expression of chicken HOPX gene. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2012, 43(12): 46-53. (in Chinese)
- [16] Wang Y X, Mu Y S, Li H, Ding N, Wang Q G, Wang Y B, Wang S Z, Wang N. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Gene: A Key Regulator of Adipocyte Differentiation in Chickens. *Poultry Science*, 2008, 87(2): 226-232.
- [17] Hiroshi K, Keishi Y, Mina W, Ofer M, Akira O, Hideaki T, Hiroyuki S, Kenichi K, David S, Masahiko W. Epigenetic silencing of HOPX promotes cancer progression in colorectal cancer. *Neoplasia*, 2012, 14(7): 559-571.
- [18] Yamaguchi S, Asanoma K, Takao T, Kato K, Wake N. Homeobox gene HOPX is epigenetically silenced in human uterine endometrial cancer and suppresses estrogen-stimulated proliferation of cancer cells by inhibiting serum response factor. *International Journal of Cancer*, 2009, 124(11): 2577-2588.
- [19] Yamashita K, Kim M S, Park H L, Tokumaru Y, Osada M, Inoue H, Mori M, Sidransky D. HOP/OB1/NECC1 promoter DNA is frequently hypermethylated and involved in tumorigenic ability in esophageal squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer Research*, 2008, 6(1): 31-41.
- [20] Chen Y, Petersen S, Pacyna-Gengelbach M, Pietas A, Petersen I. Identification of a novel homeobox-containing gene, LAGY, which is downregulated in lung cancer. *Oncology*, 2003, 64(4): 450-458.
- [21] Ooki A, Yamashita K, Kikuchi S, Sakuramoto S, Katada N, Kokubo K, Kobayashi H, Kim M S, Sidransky D, Watanabe M. Potential utility of HOP homeobox gene promoter methylation as a marker of tumor aggressiveness in gastric cancer. *Oncogene*, 2010, 29(22): 3263-3275.
- [22] Daniel R D. Toxicological and Pathological Applications of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), A novel endogenous marker for cell proliferation. *Critical Reviews in Toxicology*, 1993, 23(1): 77-109.
- [23] Ohta Y, Ichimura K. Proliferation markers, proliferating cell nuclear antigen, Ki67, 5-bromo-2'-deoxyuridine, and cyclin D1 in mouse olfactory epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2000, 109(11): 1046-1048.
- [24] Guo L, Sun B, Shang Z, Leng L, Wang Y, Wang N, Li H. Comparison of adipose tissue cellularity in chicken lines divergently selected for fatness. *Poultry Science*, 2011, 90(9): 2024-2034.
- [25] 吴家睿. 脂肪细胞分化: 一个故事, 两个章节. 科学通报, 2011, 56(17): 1327-1334.
- Wu J R. Adipogenesis: One process with two stages. *Chinese Science Bull (Chinese Ver)*, 2011, 56(17): 1327-1334. (in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)