

鸡脂肪细胞因子 *NRG4* 基因的克隆、表达及启动子分析

郭亚琦^{1,2,3} 王伟佳^{1,2,3} 高智慧^{1,2,3} 牟芳^{1,2,3} 徐海冬^{1,2,3} 李辉^{1,2,3} 王宁^{1,2,3*}

1 农业农村部鸡遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150030; 2 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; 3 东北农业大学 动物科学技术学院, 哈尔滨 150030

*通讯作者, wangning@neau.edu.cn

摘要 神经调节蛋白4 (neuregulin-4, *NRG4*)是在哺乳动物棕色脂肪组织高度表达的一个细胞因子。*NRG4*激活 ErbB4 信号通路参与调控能量平衡和糖脂代谢等。由于鸡(*Gallus domesticus*)缺乏棕色脂肪组织,目前鸡*NRG4*的组织表达和功能还不清楚。本研究以鸡脂肪组织 cDNA 为模板,PCR 扩增了 *NRG4* 基因全长编码区序列,构建了 *NRG4* 真核表达载体;以东北农业大学高、低脂双向选择品系肉鸡(NEAUHLF)为实验材料,采用 qPCR 方法开展了高、低脂系肉鸡 *NRG4* 基因的组织表达谱分析;以基因组 DNA 为模板,PCR 扩增了鸡 *NRG4* 基因的4个启动子区片段,构建了其启动子报告基因载体,并进行了启动子片段的活性分析。结果显示,鸡 *NRG4* 基因编码一个由 112 个氨基酸组成的蛋白,鸡与人(*Homo sapiens*)和小鼠(*Mus musculus*) *NRG4* 氨基酸序列的相似度均较低,分别为 57.76% 和 52.59%。组织表达谱分析显示,鸡 *NRG4* 基因在多种组织中表达,其中在肾脏的表达量最高,而在脾脏的表达量最低。高、低脂系肉鸡脂肪组织表达差异分析显示,*NRG4* 基因在高脂系肉鸡喙囊周围脂肪组织、腹部脂肪组织及肌胃周围脂肪组织中的表达水平都显著高于低脂系肉鸡($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。生物信息学分析结果表明,鸡与人和小鼠 *NRG4* 基因启动子序列的相似度都很低,但均存在 PPAR γ 和 C/EBP α 结合位点。启动子报告基因活性检测结果显示,与 pGL3-basic 空载体相比,*NRG4* 启动子报告基因载体 pGL3-*NRG4* (-2854/-2076)、pGL3-*NRG4* (-1451/+117)均具有较强启动子活性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。本研究为进一步开展鸡 *NRG4* 基因在鸡脂肪生成和脂肪组织发育中作用和机制的研究奠定了基础。

关键词 鸡;神经调节蛋白4 (*NRG4*);脂肪组织;基因表达;启动子分析

中图分类号 S831.2 **文献标识码** A

Cloning, Expression and Promoter Analysis of Adipokine *NRG4* Gene in Chicken (*Gallus domesticus*)

GUO Ya-Qi^{1,2,3} WANG Wei-Jia^{1,2,3} GAO Zhi-Hui^{1,2,3} MU Fang^{1,2,3} XU Hai-Dong^{1,2,3} LI Hui^{1,2,3} WANG Ning^{1,2,3*}

1 Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Harbin 150030, China; 2 Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province, Harbin 150030, China; 3 College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

* Corresponding author, wangning@neau.edu.cn

Abstract Neuregulin-4 (*NRG4*) is a cytokine highly expressed in mammalian brown adipose tissue. *NRG4* is involved in the regulation of energy balance and glucolipid metabolism through the activation of ErbB4 signaling pathway. To date, due to the lack of brown adipose tissue in chicken (*Gallus domesticus*), the tissue

基金项目:国家自然科学基金(31872346)

收稿日期:2021-02-26 接受日期:2021-06-20

expression and function of *NRG4* gene in chickens have not been investigated. In this study, the full-length coding sequence of chicken *NRG4* gene was amplified by PCR from the cDNA of chicken adipose tissue, and cloned to yield the *NRG4* expression vector. Expression profiling of *NRG4* gene was performed using qPCR on Northeast Agricultural University broiler lines divergently selected for abdominal fat content (NEAUHLF). Four promoter fragments of *NRG4* gene were amplified by PCR from the chicken genomic DNA, cloned, sequenced and analyzed by bioinformatics. A series of *NRG4* promoter reporters were constructed and their promoter reporter activities were determined and compared. The results showed that chicken *NRG4* gene encoded a protein of 112 amino acids and shared low amino acid identity with human (*Homo sapiens*) and mouse (*Mus musculus*) *NRG4*, 57.76% and 52.59%, respectively. Tissue expression profiling analysis showed that *NRG4* gene was widely expressed in various chicken tissues, with the highest expression in the kidney and the lowest expression in the spleen. Expression analysis of *NRG4* gene in NEAUHLF showed that *NRG4* gene expression in crop fat, abdominal fat and gizzard fat was significantly higher in the fat line than that in the lean line ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Reporter gene assays showed that compared with the empty vector pGL3-basic, pGL3-*NRG4* (-2854/-2076) and pGL3-*NRG4* (-1451/+117) had high promoter activity ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). This study paves the way for further studies on the role and mechanism of chicken *NRG4* in adipogenesis and adipose tissue development.

Keywords *Gallus domesticus*; Neuregulin-4 (NRG4); Adipose tissue; Gene expression; Promoter analysis

神经调节蛋白4 (neuregulin-4, NRG4)是哺乳动物棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)分泌的1个细胞因子, NRG4在维持能量平衡、糖脂代谢及预防非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)等起着非常重要的作用(杨帆, 李晓南, 2017)。NRGs家族其他3个成员NRG1、NRG2及NRG3主要在神经系统表达(Carteron et al., 2006)。与这3个成员不同, NRG4还在哺乳动物肺脏、心脏以及脂肪组织等组织中表达, 其中在BAT中高表达(Pfeifer, 2015)。NRG4蛋白包含1个表皮生长因子EGF样结构域(epidermal growth factor-like domain, EGF), 经蛋白水解后含EGF结构域的胞外片段可释放出来, 通过自分泌/旁分泌或内分泌方式发挥作用(Pfeifer, 2015)。哺乳动物研究发现, NRG4不能结合受体ErbB1、ErbB2或ErbB3, 而是特异性结合受体ErbB4, 激活ErbB4受体介导的通路, 进而促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡和改善细胞能量代谢(Harari et al., 1999; 杨帆, 李晓南, 2017)。靶组织和器官的鉴定发现, 肝脏是NRG4的一个主要靶器官(Wang et al., 2014)。小鼠(*Mus musculus*)体内研究表明, NRG4/ErbB4的激活可通过减弱肝脏脂肪合成来保护小鼠免受饮食诱导的胰岛素抵抗和肝脏脂肪变性(Wang et al., 2014)。在NASH小鼠模型研究中, *NRG4*基因敲除会加速肝脏损伤、纤维化、炎症和细胞死亡(Guo et al.,

2017)。NRG4被认为是与肥胖相关的有益内分泌因子。研究显示, NRG4通过提高基础代谢率及增加能量消耗来保护小鼠免受饮食引起的肥胖(Chen et al., 2017)。除此之外, NRG4还对其他多种疾病的预防和治疗起到不可或缺的作用, 例如, 血浆NRG4水平与冠心病的发病率及严重程度呈负相关(Tian et al., 2019); 血清NRG4水平与妊娠期糖尿病代谢参数相关(Kurek Eken et al., 2018); 甲状腺功能亢进症患者血清中的NRG4水平升高(Li et al., 2019); NRG4能阻止肿瘤坏死因子、干扰素- γ 诱导的结肠上皮细胞凋亡(Bernard et al., 2012), 且NRG4-ErbB4信号对坏死性小肠结肠炎具有保护作用(McElroy et al., 2014)。

目前, 人类对于NRG4在动物肝脏中的作用已有很深入的了解, 但NRG4在脂肪组织中的作用还知之甚少。研究提示, NRG4是人类米色脂肪细胞的标记物(Comas et al., 2019)。哺乳动物研究发现, 随着棕色脂肪细胞分化, NRG4表达增加。有研究发现NRG4是一种促进神经突生长的脂肪因子, 在寒冷刺激下可增加对脂肪组织神经网络发育的调控作用, 还可促进脂肪组织表达有益因子, 如脂联素、血管内皮生长因子等(Wang et al., 2014; Rosell et al., 2014; Chen et al., 2017)。但是, 目前NRG4在脂肪生成和发育中的作用和机制尚不清楚。

鸡(*Gallus domesticus*)与哺乳动物不同, 鸡没有

棕色脂肪组织, *NRG4* 基因在鸡脂肪等组织中的表达和功能均未见报道。为此, 本研究克隆了鸡 *NRG4* 基因, 检测了其在东北农业大学高、低脂鸡不同组织中的表达谱, 比较分析了该基因在东北农业大学高、低脂双向选择系肉鸡脂肪组织中的表达差异, 并开展了 *NRG4* 基因启动子的克隆及活性分析研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 基因组 DNA、细胞系和实验动物

鸡(*Gallus domesticus*)基因组 DNA 来自东北农业大学高、低脂双向选择品系(NEAUHLF)第 22 世代高脂系公鸡。鸡永生生化前脂肪细胞系 ICP1 (immortalized chicken preadipocyte cell line 1, ICP1) (Wang et al., 2017) 和鸡胚成纤维细胞系(chicken embryo fibroblast cell line, DF1) 为所在实验室保存。组织样品分别来自 NEAUHLF 第 23 世代 7 周龄高、低脂肉鸡, 包括皮下脂肪、胰腺、嗉囊周围脂肪、大脑、心脏、睾丸、腹部脂肪、腺胃、十二指肠、回肠、空肠、盲肠、肌胃、肾脏、肌胃周围脂肪、胸肌、腿肌、肝脏、脾脏。

1.1.2 菌株和试剂

克隆菌株 Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell、Trans2K DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司; 限制性内切酶 *Kpn* I、*Eco*R I 和 *Bgl* II、反转录试剂盒购自宝生物工程(大连)公司; 表达载体 pSecTag2A、TRIzol Reagent 和 Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent 购自 Invitrogen 公司(美国); Dual-Luciferase® Reporter Assay System 购自 Promega 公司(美国); 海肾报告基因质粒 pRL-TK、荧光素酶报告基因载体 pGL3-basic 均为本实验室留存; 胎牛血清购自 Biological Industries 公司(以色列); D-MEM/F-12、D-MEM、High Glucose 培养基、Trypsin-EDTA (0.25%) 购自 Gibco 公司(美国); 质粒小量制备试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司(杭州); FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 购自罗氏公司(瑞士); Phanta Max super-fidelity DNA polymerase、ClonExpress II One Step Cloning Kit 购自南京 Vazyme 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成

为检测 *NRG4* 基因在鸡不同组织中 mRNA 的表达水平, 根据 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) GenBank 数据库中鸡 *NRG4* 基因(NM_001030544.1) 和 *TBP* 基因(NM_205103.1) 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 qPCR 表达检测引物(表 1), 送至苏州金唯智生物科技有限公司合成; 为获得鸡 *NRG4* 基因的全长编码区序列(CDS) 和启动子区, 根据鸡 *NRG4* 基因序列(NM_001030544.1) 和 UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) 数据库中鸡 *NRG4* 基因组序列(chr10:3918768-3940590), 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 扩增引物(表 1), 送苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2.2 RNA 提取及 cDNA 合成

取东北农业大学高、低脂双向选择品系第 23 世代 7 周龄肉鸡各 5 只, 采用 TRIzol 法提取皮下脂肪、胰腺、嗉囊周围脂肪、大脑、心脏、睾丸、腹部脂肪、腺胃、十二指肠、回肠、空肠、盲肠、肌胃、肾脏、肌胃周围脂肪、胸肌、腿肌、肝脏、脾脏的总 RNA, 利用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒去除基因组 DNA, 并反转录合成 cDNA。

1.2.3 *NRG4* 基因克隆、序列分析及蛋白结构域分析

以脂肪组织 cDNA 为模板, 采用 PCR 方法扩增获得 *NRG4* 基因全长 CDS 区片段(引物信息见表 1)。采用琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物, 利用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收目的片段, 利用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂盒, 将目的片段连接至 pSecTag2A 载体, 所获得的 *NRG4* 重组载体送金唯智生物科技有限公司(苏州)测序。采用 Chromas 软件查看测序峰图; 采用 DNAMAN6.0 软件做序列比对。使用 NCBI 数据库对 *NRG4* 蛋白进行序列同源性比对分析; 采用在线软件 Signal IP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP/>) 预测分泌信号肽; 采用在线软件 TMHMM2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测跨膜结构; 采用在线软件 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析蛋白结构域。

1.2.4 *NRG4* 基因 qPCR 检测

NRG4 基因的 qPCR 检测使用 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)(Roche, 瑞士)。使用

ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪进行 qPCR, 反应体系为: cDNA 模板 (50 ng/μL) 1 μL, FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)(2×) 5 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.2 μL, 灭菌双蒸水 3.6 μL。反应条件为: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 复性延伸 40 s, 共 40 个循环。以 TATA 结合蛋白 (TATA-binding protein gene, *TBP*) 基因为内参基因, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法将原始 C_t 值转换为相对基因表达量。

1.2.5 *NRG4* 基因启动子生物信息学分析及启动子荧光素酶报告基因载体的构建

利用 Mulan (<https://mulan.dcode.org/>), TF-BIND (<http://tfbind.hgc.jp/>) 及 JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) 预测鸡 *NRG4* 基因启动子区转录因子结合位点; 采用 EMBOSS (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cpgplot>) 预测 CpG 岛。以鸡的混合基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *NRG4* 基因的启动子区 (引物信息见表 1)。反应体系 (50 μL): Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, Phanta Max Buffer (2×) 25 μL, dNTP Mix (0.01 mol/L each) 1 μL, 模板 DNA (50 ng/μL) 2 μL, 灭菌双蒸水 17 μL。反应条件为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 15 s (根据引物的 T_m 值), 72 °C 延伸 1 min (根据扩

增产物大小), 35 个循环; 最后 72 °C 彻底延伸 5 min。通过一步克隆法连接到 pGL3-basic 载体。经 PCR 鉴定和 *Kpn* I 和 *Bgl* II 双酶切鉴定无误后, 送苏州金唯智生物科技有限公司测序。采用 DNA-MAN 6.0 做序列比对; 采用 Chromas 查看测序峰图。将经测序无误的启动子荧光素酶报告基因载体分别命名为 pGL3-*NRG4*(-3000/-2304)、pGL3-*NRG4*(-2854/-2076)、pGL3-*NRG4*(-2729/-1012)、pGL3-*NRG4*(-1451/+117)。

1.2.6 细胞培养

ICP1 和 DF1 细胞分别培养于含 100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和 10% 胎牛血清的 D-MEM/F-12 或 D-MEM High Glucose 培养基中, 细胞置于 5% CO₂ 和 37 °C 培养箱中。

1.2.7 细胞转染和双荧光素酶报告基因活性检测

按照 Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent 说明书操作, 以 24 孔板为例, 将 pGL3-*NRG4*(-3000/-2304)、pGL3-*NRG4*(-2854/-2076)、pGL3-*NRG4*(-2729/-1012)、pGL3-*NRG4*(-1451/+117) 荧光素酶报告基因载体或 pGL3-basic 空载体分别与 pRL-TK 质粒按 100:1 的比例共转染至 DF1 或 ICP1 细胞。转染 48 h 后, 按 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, 美国) 说明书操作, 利用海肾

表 1 引物信息

Table 1 Primers information

引物名称 Primer name	引物序列(5'~3') Primer sequence	产物长度/bp Product length	$T_m/^\circ\text{C}$
NRG4-F	TCTCTTGGCTTCACTTCTC	133	60
NRG4-R	ATTGCTGCTTGTAGTCTCA		
TBP-F	GCGTTTTGCTGCTGTTATTATGAG	122	60
TBP-R	TCCTTGCTGCCAGTCTGGAC		
NRG4-CDS-F	CGCCGTACGAAGCTTGGTACCGATGCGAACAGATCATGAAG	336	60
NRG4-CDS-R	TGCTGGATATCTGCAGAATTCCTTTGTTGCAGCCATTGCTG		
NRG4-3000-F	ATTTCTCTATCGATAGGTACCCAGAGGACAAGTTACTCCACG	696	58.8
NRG4-2304-R	GCTTACTTAGATCGCAGATCTGGTTGCTGCTTCTATCGC		
NRG4-2854-F	ATTTCTCTATCGATAGGTACCACCAGGACCATTGCCACC	778	60
NRG4-2076-R	GCTTACTTAGATCGCAGATCTCATCACTGCGTTCCCAA		
NRG4-2729-F	ATTTCTCTATCGATAGGTACCTAGCATTGCGTTGACACT	1717	60
NRG4-1012-R	GCTTACTTAGATCGCAGATCTGATTGCATACAGAAGGAGC		
NRG4-1451-F	ATTTCTCTATCGATAGGTACCTCAAGCCACAGTTGTTTCCC	1762	58.5
NRG4+117-R	GCTTACTTAGATCGCAGATCTGCCGCTAATCTGCATCGT		

NRG4: 神经调节蛋白 4 基因; *TBP*: TATA 结合蛋白基因

NRG4: Neuregulin-4 gene; *TBP*: TATA-binding protein gene

荧光素酶活性进行校正。报告基因相对活性为萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶报告基因活性的比值(Fluc/Rluc)。采用 GraphPad Prism 5 绘图。

1.2.8 统计分析

数据表示为平均值±标准差。用 Student's *t*-test 方法对两组数据的差异进行比较。 $P < 0.01$ 表示差异极显著, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 鸡 *NRG4* 基因的克隆及其序列分析

根据鸡 *NRG4* 基因的 mRNA 序列 (NM_001030544.1), 利用 Primer Premier 5.0 设计扩增全长 CDS 引物 NRG4-CDS-F、NRG4-CDS-R (表 1), 以

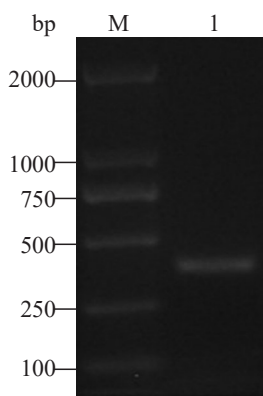


图1 鸡 *NRG4* 基因全长 CDS 区 PCR 扩增

Figure 1 PCR amplification of the full-length coding sequence (CDS) of chicken *NRG4* gene

M: Trans2K DNA 分子量标准; 1: 全长 CDS PCR 产物

M: Trans2K DNA Marker; 1: The full-length CDS PCR product

鸡脂肪组织 cDNA 为模板, 采用 PCR 扩增鸡 *NRG4* 基因的全长 CDS 区, 结果获得与预期大小 (339 bp) 一致的特异性条带 (图 1)。将目的片段胶回收后连接到 pSecTag2A 载体上, 获得 *NRG4* 基因的真核表达载体 pSecTag2A-*NRG4*。序列分析表明, 扩增的鸡 *NRG4* 基因全长 CDS 序列与 NCBI 数据库中序列 (NM_001030544.1) 一致, CDS 全长序列为 339 bp, 编码 112 个氨基酸。本研究筛选了 18 个禽类的 *NRG4* 蛋白进行序列同源性比对分析, 结果表明, 鸡 *NRG4* 与原鸡 (*Gallus gallus*) 的同源性最高, 序列相似度为 100%, 其次是与盔珠鸡 (*Numida meleagris*)、日本鹌鹑 (*Coturnix japonica*)、雉鸡 (*Phasianus colchicus*) 等禽类的同源性较高 (图 2), 而与人类和小鼠 *NRG4* 的氨基酸序列相似性较低, 分别为 57.76% 和 52.59%, 差异区域均主要存在 *NRG4* 的 C 端跨膜区附近。

2.2 鸡 *NRG4* 蛋白的结构域分析

NRG4 蛋白分泌信号肽预测结果分析发现, 与人、鼠 *NRG4* 蛋白分泌信号肽的分析结果一致, 鸡 *NRG4* 蛋白分泌信号肽的信号很低, 几乎不存在。跨膜结构分析结果发现, 鸡 *NRG4* 蛋白存在一个跨膜螺旋结构。蛋白结构域分析结果显示, 鸡 *NRG4* 蛋白包含 1 个 EGF 样结构域和 1 个跨膜区以及 1 个与跨膜区重叠的低复杂性区域 (low-complexity regions, LCRs)。与鸡相比, 人、鼠 *NRG4* 蛋白也有类似的结构, 但 LCRs 的位置以及数量存在不同, 鼠 *NRG4* 蛋白含有 2 个与跨膜区重叠的 LCRs, 而人 *NRG4* 蛋白仅在 C 端存在一个 LCRs, 且没有与跨膜

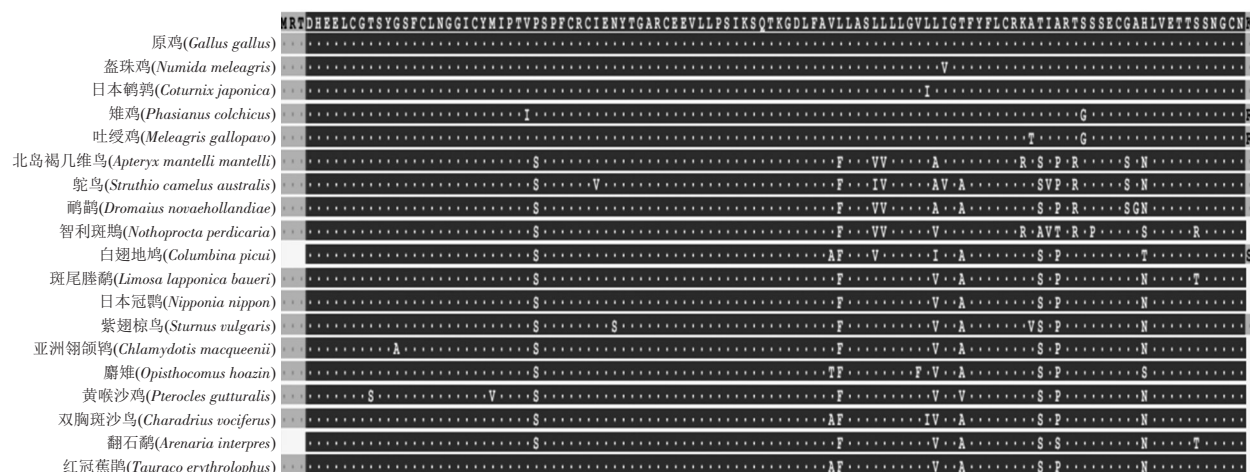


图2 鸡 *NRG4* 蛋白的多序列比对分析

Figure 2 Multiple sequence alignment of chicken *NRG4* protein

区重叠。最后,鸡NRGs家族成员的蛋白序列比对分析结果发现,鸡NRG1与NRG3类似,均含有1个EGF样结构域、2个跨膜区、多个LCRs。鸡NRG2含有1个跨膜区外,还含有一个IGc2区域。与NRG4蛋白相比,NRGs家族成员均含有1个EGF样结构域和1个跨膜区,除此之外,NRG1和NRG3多1个跨膜区及多个LCRs,NRG2多1个IGc2区域(表2)。以上结果提示,鸡NRG4蛋白结构与鸡NRGs家族其他成员以及哺乳动物NRG4蛋白存在不同。

2.3 鸡NRG4基因在高、低脂肉鸡中的组织表达谱分析

本研究以东北农业大学第23世代7周龄高、低脂双向选择品系肉鸡为材料,采用qPCR方法检测NRG4在19种鸡组织和器官中的mRNA表达。组织表达谱结果分析发现,NRG4基因在高、低脂肉鸡皮下脂肪、胰腺、嗦囊周围脂肪、大脑、心脏等19种组织中均有不同程度的表达,其中鸡NRG4基因在肾脏中表达量最高;在胸肌、胰腺、大脑、睾丸、十二指肠、空肠、肌胃、腿肌和肝脏中呈中等程度表达;皮下脂肪、嗦囊周围脂肪、心脏、腹部脂肪、腺胃、回肠、盲肠、肌胃周围脂肪中低表达;在脾脏中表达量最低。高、低脂系肉鸡脂肪组织间的表达差异分析发现,在高、低脂肉鸡嗦囊周围脂肪、腹部脂肪、肌胃周围脂肪中,NRG4基因均差异表达($n=5, P<0.01$ 或 $P<0.05$),且高脂系肉鸡脂肪组织NRG4表达量分别为低脂系肉鸡的3.75、2.55和3.58倍。除此之外,本研究也发现在高、低脂系肉鸡的十二指肠中NRG4基因也存在差异表达,低脂系肉鸡NRG4在十二指肠中的表达量是高脂系肉鸡表达量的1.76倍($n=5, P<0.05$)(图3)。

2.4 鸡NRG4基因启动子克隆及活性分析

2.4.1 鸡NRG4基因启动子的克隆及其报告基因

载体的构建

根据鸡NRG4基因的基因组序列(UCSC:chr10:3918768~3940590)选取转录起始位点上游3 000 bp和转录起始位点下游244 bp(转录起始位点TSS=+1)序列进行生物信息学分析并设计引物,以鸡基因组DNA为模板,采用PCR方法扩增NRG4基因启动子区(-3000/-2304, -2854/-2076, -2729/-1012, -1451/+117)四个片段,扩增片段大小分别为696、778、1 717和1 762 bp。PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果与预期一致(图4)。将目的片段胶回收后克隆至pGL3-basic载体上,分别获得NRG4基因的4个启动子区荧光素酶报告基因载体。测序结果显示,克隆启动子区的序列与UCSC数据库中NRG4的基因组序列(UCSC:chr10:3918768~3940590)一致,将构建的NRG4基因4个启动子荧光素酶报告基因载体分别命名为pGL3-NRG4(-3000/-2304)、pGL3-NRG4(-2854/-2076)、pGL3-NRG4(-2729/-1012)和pGL3-NRG4(-1451/+117)。

2.4.2 鸡NRG4基因启动子序列分析

通过对鸡NRG4基因启动子区序列(UCSC:chr10:3918768~3940590)分析发现,鸡NRG4基因启动子区(-3000/+224 bp)存在PPARs、C/EBPs、Sp1、AP2、NRF1和GATAs等多个转录因子的结合位点,与人和鼠NRG4启动子区相比较,鸡与人和鼠NRG4启动子区序列的相似度较低,但是都存在PPAR γ 和C/EBP α 结合位点。CpGplot分析表明,鸡NRG4基因启动子区存在一个1 206 bp的CpG岛(-1019/+186)(转录起始位点=+1),而在人和鼠NRG4启动子区均不存在CpG岛。这些结果提示鸡和哺乳动物的NRG4基因启动子区保守性较低。

2.4.3 鸡NRG4基因启动子5'端片段活性的分析

为了确定鸡NRG4基因启动子的活性,采用Lipofectamine™ 2000转染试剂,将构建的报告基因

表2 鸡NRGs家族蛋白序列比对分析

Table 2 Alignment analysis of chicken NRGS family protein sequences

鸡NRGs家族	氨基酸/aa	EGF样结构域/个	跨膜区/个	低复杂性区域/个	其他
Chicken NRG family	Amino acid	EGF-like domain	Transmembrane domain	Low-complexity regions	Other
NRG1	685	1	2	10	无 None
NRG2	742	1	1	5	IGc2
NRG3	651	1	2	4	无 None
NRG4	112	1	1	1	无 None

载体 pGL3-*NRG4*(-3000/-2304)、pGL3-*NRG4*(-2854/-2076)、pGL3-*NRG4*(-2729/-1012)、pGL3-*NRG4*(-1451/+117)或pGL3-basic分别与pRL-TK质粒共转染至鸡DF1细胞或ICP1细胞,48 h后检测启动子报告基因相对活性。报告基因活性分析结果显示,与pGL3-basic空载体相比,在DF1和ICP1细胞中,报告基因载体pGL3-*NRG4*(-2854/-2076)和pGL3-*NRG4*(-1451/+117)的活性均显著高于对

照组,其中,pGL3-*NRG4*(-1451/+117)的活性分别为对照组的20和25倍($P < 0.01$),pGL3-*NRG4*(-2854/-2076)的活性分别为对照组的6倍($P < 0.01$)和4倍($P < 0.01$);而pGL3-*NRG4*(-3000/-2304)和pGL3-*NRG4*(-2729/-1012)的活性都显著低于pGL3-basic空载体,其中,pGL3-*NRG4*(-3000/-2304)活性分别是对照组的0.7和0.3倍($P < 0.01$),pGL3-*NRG4*(-2729/-1012)活性分别是对照组的

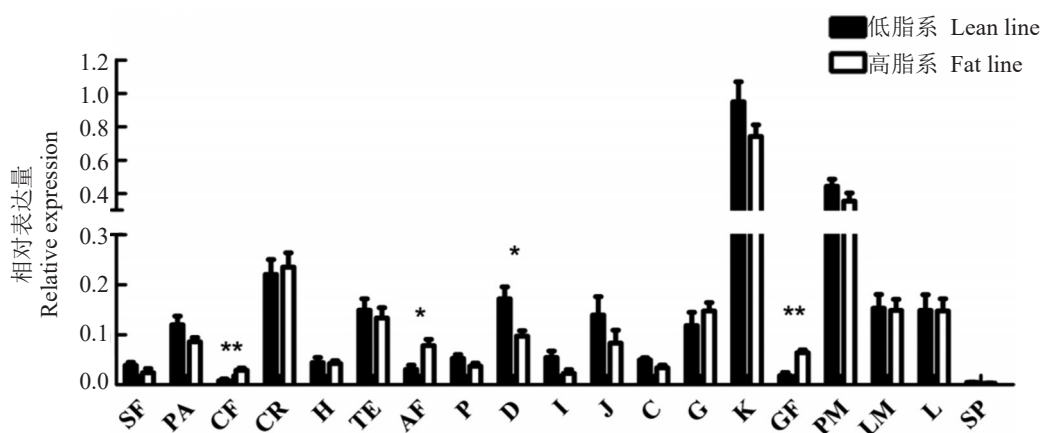


图3 鸡 *NRG4* 基因的组织表达谱

Figure 3 Tissue expression profiling of chicken *NRG4* gene

SF:皮下脂肪;PA:胰腺;CF:嗦囊周围脂肪;CR:大脑;H:心脏;TE:睾丸;AF:腹脂;P:腺胃;D:十二指肠;I:回肠;J:空肠;C:盲肠;G:肌胃;K:肾脏;GF:肌胃周围脂肪;PM:胸肌;LM:腿肌;L:肝脏;SP:脾脏;内参基因:TATA结合蛋白基因(TATA-binding protein gene, *TBP*);n=5;*:差异显著($P < 0.05$),**:差异极显著($P < 0.01$),下同

SF: Subcutaneous fat; PA: Pancreas; CF: Crop fat; CR: Cerebrum; H: Heart; TE: Testis; AF: Abdominal fat; P: Proventriculus; D: Duodenum; I: Ileum; J: Jejunum; C: Cecum; G: Gizzard; K: Kidney; GF: Gizzard fat; PM: Pectoralis muscle; LM: Leg muscle; L: Liver; SP: Spleen; Reference gene: TATA-binding protein gene (*TBP*), n=5; *: Significant difference ($P < 0.05$), **: Extremely significant difference ($P < 0.01$), The same blow

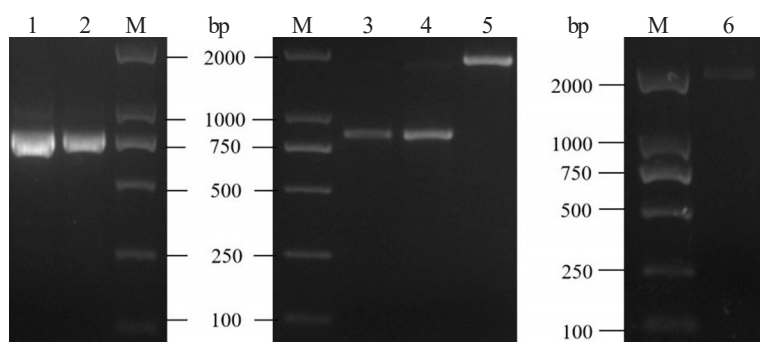


图4 鸡 *NRG4* 启动子区4个片段(-3000/-2304、-2854/-2076、-2729/-1012、-1451/+117)的PCR扩增产物

Figure 4 PCR amplification of the 4 promoter regions (-3000/-2304, -2854/-2076, -2729/-1012, -1451/+117) of chicken *NRG4* gene

M: Trans2K DNA 分子量标准;1~2: *NRG4* 启动子区-3000/-2304;3~4: *NRG4* 启动子区-2854/-2076;5: *NRG4* 启动子区-2729/-1012;6: *NRG4* 启动子区-1451/+117

M: Trans2K DNA Marker; 1~2: *NRG4* promoter region -3000/-2304; 3~4: *NRG4* promoter region -2854/-2076; 5: *NRG4* promoter region -2729/-1012; 6: *NRG4* promoter region -1451/+117

0.1 倍 ($P < 0.01$) 和 0.5 倍 ($P < 0.05$) (图 5)。这些结果提示: 在启动子-2854/-2076 区和-1451/+117 区存在正调控元件, 而启动子-3000/-2304 区和-2729/-1012 区则存在负调控元件。同时, 本研究发现报告基因载体 pGL3-*NRG4*(-2854/-2076) 与 pGL3-*NRG4*(-2729/-1012) 的活性存在很大差异 (图 5), 但两者之间存在 600 bp 左右的重叠区域, 提示未重合区域 2854/-2729、-2076/-1012 存在重要的正调控或负调控元件。

3 讨论

本研究成功克隆了鸡 *NRG4* 基因的全长 CDS 区, 同源性分析发现, 鸡与其他鸟类 *NRG4* 氨基酸序列的同源性较高, 但与人和鼠的同源性较低。蛋白结构分析显示, 在鸡、人和鼠三个物种 *NRG4* 中

含有的 LCRs 的位置和数量是不同的。有研究指出蛋白序列中 LCRs 的位置可能对他们的结合特性和生物学作用都有重要的决定作用 (Coletta et al., 2010)。这些结果均提示鸡 *NRG4* 的生物学功能可能与哺乳动物的有所不同。哺乳动物研究发现 *NRG4* 与已知的 *NRGs* 其他成员在序列上的同源性很低, 特别是在跨膜结构域附近, 而其他三个 *NRGs* 成员在这一区域表现出较高的同源性 (Harari et al., 1999)。本研究也同样发现鸡 *NRG4* 与 *NRGs* 家族其他成员氨基酸序列的相似度很低, 蛋白结构也存在很大不同, 尤其在 EGF 样结构域和跨膜区前后, 提示鸡 *NRG4* 的功能不同于 *NRGs* 家族其他成员。信号肽预测分析发现, 与哺乳动物类似, 鸡 *NRG4* 蛋白几乎不存在分泌信号肽, 这说明 *NRG4* 并不是经过经典的内质网-高尔基体途径分泌到细胞

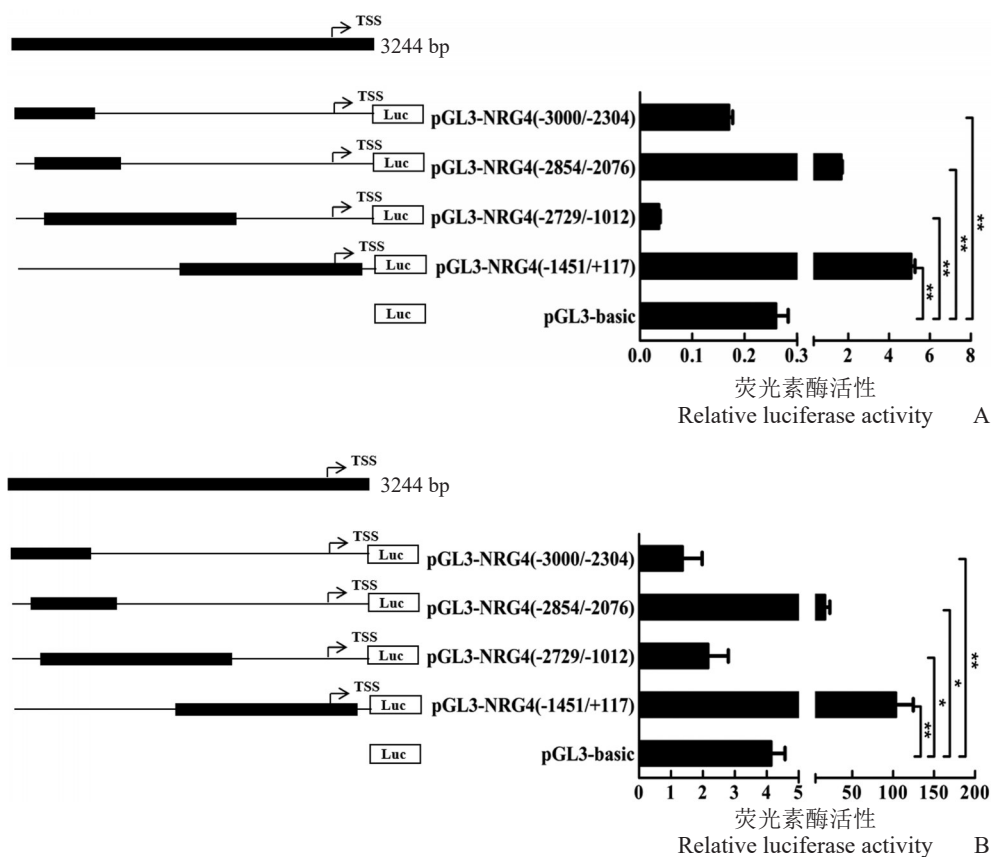


图 5 *NRG4* 基因启动子活性分析

Figure 5 Promoter activity analysis of *NRG4* gene

A. 在 DF1 细胞中的 *NRG4* 基因启动子活性分析。B. 在 ICP1 细胞中 *NRG4* 基因启动子活性分析。报告基因活性以萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值表示 (Fluc/Rluc)。TSS: *NRG4* 基因转录起始位点

A. Promoter activity analysis of *NRG4* gene in DF1 cells. B. Promoter activity analysis of *NRG4* gene in ICP1 cells. The reporter gene activity was expressed as the ratio of firefly luciferase activity to renilla luciferase activity (Fluc/Rluc). TSS: Transcription start site of chicken *NRG4* gene

外的(Lee et al., 2004),可能通过其他非经典分泌途径分泌的,例如,分泌型溶酶体途径、直接跨膜途径、外泌体释放途径、质膜出泡途径等(张楠楠等, 2009)。

鸡 *NRG4* 基因的组织表达谱分析显示, *NRG4* 基因在鸡的 19 种组织中均有所表达,这与哺乳动物研究结果一致(Wang et al., 2014)。早期研究发现,在检测的成人 8 种组织中, *NRG4* 在胰腺高表达,在骨骼肌中度表达,在大脑、胎盘等组织低表达(Harari et al., 1999)。小鼠 *NRG4* 组织表达谱分析显示, *NRG4* 基因也在多种组织广泛表达,其中,棕色脂肪组织中的表达量最高,白色脂肪组织、肝脏、肺、胰腺次之,骨骼肌、大脑、心脏、肾、脾的表达则相对较低(Wang et al., 2014)。而本研究中却发现,与哺乳动物研究结果不同,鸡 *NRG4* 基因在脂肪组织(鸡嗉囊周围脂肪,腹部脂肪等)均偏低水平表达,在肾中的表达量最高,脾中的表达量最低。这些结果提示, *NRG4* 基因的表达存在物种和组织差异。

高、低脂系肉鸡脂肪组织表达分析表明, *NRG4* 基因在嗉囊周围脂肪、腹部脂肪、肌胃周围脂肪中均差异表达($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),其中高脂系鸡脂肪组织中 *NRG4* 的表达量显著高于低脂系肉鸡($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。鼠附睾白色脂肪组织 *NRG4* 的 mRNA 表达水平与体重和肥胖呈明显的负相关(Chen et al., 2017)。基因表达分析发现,与瘦对照组相比,人和鼠的肥胖个体脂肪组织 *NRG4* 的 mRNA 水平显著降低(Wang et al., 2014)。综合这些表达数据可以看出, *NRG4* 在脂肪组织生长发育中发挥调控作用,推测 *NRG4* 通过自分泌/旁分泌方式调控脂肪生长发育。与此相一致,生物信息学分析发现,鸡 *NRG4* 启动子区存在 PPAR γ 、C/EBP α 和 Sp1 等多个转录因子结合位点。PPAR γ 和 C/EBP α 是脂肪生成的两个最关键转录因子,两者在脂肪生成中可以协同发挥作用(Ding et al., 2011; Rosen et al., 2002)。

鸡与人和鼠 *NRG4* 启动子的序列相似性很低;鸡 *NRG4* 基因启动子存在一个 CpG 岛(-1019/+186),而人和鼠 *NRG4* 启动子区不存在 CpG 岛。这些结果提示鸡和哺乳动物 *NRG4* 基因的转录调控和表观遗传调控可能并不完全相同,这可能是鸡与人和鼠 *NRG4* 组织表达谱差异的原因。

启动子报告基因的活性分析表明, pGL3-*NRG4*

(-1451/+117)报告基因载体的荧光素酶活性最高,提示-1451/+117是鸡 *NRG4* 基因启动子的关键调控区。生物信息学分析发现该区域存在许多调控转录因子结合位点,如 C/EBPs、GATAs、Sp1、AP2、NRF1 等转录因子。未来有必要通过报告基因、定点突变、EMSA 和 ChIP 技术验证这些转录因子对鸡 *NRG4* 的转录调控作用。

4 结论

本研究克隆了鸡 *NRG4* 基因全长 CDS,开展了东北农业大学高、低脂系肉鸡 *NRG4* 组织表达谱分析,以及鸡 *NRG4* 基因的启动子克隆和活性分析。研究表明, *NRG4* 基因在鸡组织和器官中广泛表达; *NRG4* 在高、低脂鸡脂肪组织差异表达。本研究的结果提示, *NRG4* 在鸡脂肪生长发育中发挥调控作用。

参考文献

- 杨帆, 李晓南. 2017. 神经调节蛋白 4 生物学功能的研究进展[J]. 生理学报, 69(3): 351-356. (Yang F, Li X N. 2017. Research progress of neuregulin 4 biological function[J]. Acta Physiologica Sinica, 69(3): 351-356.)
- 张楠楠, 刘鑫, 孙晶, 等. 2009. 真核细胞非经典蛋白分泌途径[J]. 遗传, 31(1): 29-35. (Zhang N N, Liu X, Sun J, et al. 2009. Nonclassical mechanisms of secretory protein in eukaryotic cells[J]. Hereditas, 31(1): 29-35.)
- Bernard J K, McCann S P, Bhardwaj V, et al. 2012. Neuregulin-4 is a survival factor for colon epithelial cells both in culture and *in vivo**[J]. The Journal of Biological Chemistry, 287(47): 39850-39858.
- Carteron C, Ferrer-Montiel A, Cabedo H. 2006. Characterization of a neural-specific splicing form of the human neuregulin 3 gene involved in oligodendrocyte survival[J]. Journal of Cell Science, 119(Pt 5): 898-909.
- Chen Z, Wang G X, Ma S L, et al. 2017. Nrg4 promotes fuel oxidation and a healthy adipokine profile to ameliorate diet-induced metabolic disorders[J]. Molecular Metabolism, 6(8): 863-872.
- Coletta A, Pinney J W, Solís D Y, et al. 2010. Low-complexity regions within protein sequences have position-dependent roles[J]. BMC Systems Biology, 4: 43.
- Comas F, Martínez C, Sabater M, et al. 2019. Neuregulin 4 is a novel marker of beige adipocyte precursor cells in human adipose tissue[J]. Frontiers in Physiology, 10: 39.
- Ding N, Gao Y, Wang N, et al. 2011. Functional analysis of

- the chicken *PPAR γ* gene 5'-flanking region and *C/EBP α* -mediated gene regulation[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 158(4): 297-303.
- Guo L, Zhang P, Chen Z, et al. 2017. Hepatic neuregulin 4 signaling defines an endocrine checkpoint for steatosis-to-NASH progression[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(12): 4449-4461.
- Harari D, Tzahar E, Romano J, et al. 1999. Neuregulin-4: A novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase[J]. *Oncogene*, 18(17): 2681-2689.
- Kurek Eken M, Yayla Abide C, Sahin Ersoy G, et al. 2018. Clinical significance of neuregulin 4 (NRG4) in gestational diabetes mellitus[J]. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 34(7): 605-608.
- Lee M C, Miller E A, Goldberg J, et al. 2004. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20: 87-123.
- Li M, Chen Y, Jiang J, et al. 2019. Elevated serum neuregulin 4 levels in patients with hyperthyroidism[J]. *Endocrine Connections*, 8(6): 728-735.
- Manzo M, Wirz J, Ambrosi C, et al. 2017. Isoform-specific localization of DNMT3A regulates DNA methylation fidelity at bivalent CpG islands[J]. *The EMBO Journal*, 36(23): 3421-3434.
- McElroy S J, Castle S L, Bernard J K, et al. 2014. The ErbB4 ligand neuregulin-4 protects against experimental necrotizing enterocolitis[J]. *The American Journal of Pathology*, 184(10): 2768-2778.
- Müller T, Braud S, Jüttner R, et al. 2018. Neuregulin 3 promotes excitatory synapse formation on hippocampal interneurons[J]. *The EMBO Journal*, 37(17): e98858.
- Pfeifer A. 2015. NRG4: An endocrine link between brown adipose tissue and liver[J]. *Cell Metabolism*, 21(1): 13-14.
- Rosell M, Kafrou M, Frontini A, et al. 2014. Brown and white adipose tissues: Intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice[J]. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 306(8): E945-E964.
- Rosen E D, Hsu C H, Wang X, et al. 2002. *C/EBP α* induces adipogenesis through *PPAR γ* : A unified pathway[J]. *Genes & Development*, 16(1): 22-26.
- Tian Q P, Liu M L, Tang C S, et al. 2019. Association of circulating neuregulin-4 with presence and severity of coronary artery disease[J]. *International Heart Journal*, 60(1): 45-49.
- Wang G X, Zhao X Y, Meng Z X, et al. 2014. The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis[J]. *Nature Medicine*, 20(12): 1436-1443.
- Wang W, Zhang T, Wu C, et al. 2017. Immortalization of chicken preadipocytes by retroviral transduction of chicken TERT and TR[J]. *PLOS ONE*, 12(5): e0177348.

(责任编辑 李 静)