

朗德鹅 *C/EBP α* 基因的克隆及不同处理 对其在肝脏中表达的影响

于莎莉,张翔,苏胜彦,周阳,李齐发,谢庄*

(南京农业大学动物科技学院,南京 210095)

摘要: 为研究 *C/EBP α* 基因与朗德鹅肝脏脂肪代谢的关系,本研究克隆了朗德鹅 *C/EBP α* 基因,预测其蛋白结构和功能,并通过实时荧光定量 PCR 技术检测了朗德鹅肝脏 *C/EBP α* 基因在对照组和填饲、填饲+T3、填饲+T3+甜菜碱、填饲+甜菜碱等 4 个不同处理组中的表达情况。结果发现:朗德鹅 *C/EBP α* 基因序列长为 1 401 bp,开放阅读框(ORF)为 975 bp,编码 324 个氨基酸的蛋白质,两侧分别是 210 bp 的 5'-UTR 和 397 bp 的 3'-UTR;预测朗德鹅 *C/EBP α* 蛋白位于细胞核中,不含有信号肽,不含有跨膜区,含有 bZIP 功能结构域;不同填饲处理组肝脏组织中 *C/EBP α* 基因的表达显著或极显著高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中填饲+T3+甜菜碱处理组显著高于其它 3 个填饲处理组($P<0.05$),与对照组差异极显著($P<0.01$)。推测 *C/EBP α* 基因在朗德鹅肝脏脂肪代谢过程中发挥作用。

关键词: 朗德鹅;*C/EBP α* 基因;序列分析;表达水平

中图分类号:S835; Q344.13

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2011)04-0495-08

Molecular Cloning of *C/EBP α* in Landes Geese and the Effect of Overfeeding on Its mRNA Expression Levels

YU Sha-li, ZHANG Xiang, SU Sheng-yan, ZHOU Yang, LI Qi-fa, XIE Zhuang*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University,
Nanjing 210095, China)

Abstract: The experiment was conducted to clone the *C/EBP α* gene in Landes geese liver and to check the relative expression levels of *C/EBP α* mRNA of different groups. In the study, the gene sequence was obtained based on the *C/EBP α* gene sequence of chicken. The results showed that the *C/EBP α* gene has a 975 bp open reading frame (ORF) flanked by a 210 bp 5'UTR and a 397 bp 3'UTR. The deduced amino acid sequence has 324 residues, which was a nucleoprotein residing in nucleolus without signal peptide and transmembrane region. The *C/EBP α* protein contained a carboxyl terminal basic-leucine zipper (bZIP) domain, which was characterized by cysteine-rich, double-zinc finger motifs and a distinct homeodomain. Also, the levels of *C/EBP α* mRNA of different groups were detected by real-time PCR. Compared to the control group, the levels of *C/EBP α* mRNA of all overfeeding groups increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). The level of overfeeding supplemented with T3 and betaine group was higher than that of control group ($P<0.01$) and other overfeeding groups ($P<0.05$). So it is suggested that the *C/EBP α* gene may be related with lipid metabolism.

Key words: Landes goose; *C/EBP α* gene; sequence analysis; expression level

收稿日期:2010-04-07

基金项目:江苏省自然科学基金(BK2007156);江苏普通高校研究生创新计划(CX08B_159Z);国家大学生创新性实验计划(GJ0813)资助

作者简介:于莎莉(1983-),女,山东烟台人,博士生,主要从事动物分子遗传研究 E-mail:7693539163@163.com;张翔为同等贡献第一作者

*通讯作者:谢庄(1947-),E-mail:zxie@njau.edu.cn

鹅肥肝是一种高级营养品,以不饱和脂肪酸为主,易为人体吸收和利用,且可降低人体血液中胆固醇的含量,因其营养丰富、质地细嫩、香味独特,因此成为欧美各国食谱中的三大美味佳肴之一^[1-2]。鹅肥肝形成的分子机理是目前肝脏脂肪代谢领域的一个研究热点^[3],但鹅肥肝性状是一个复杂的经济性状,受众多基因和因素的影响,难以确定其主效基因,而近年来迅速发展的基因表达调控网络为研究复杂性状提供了一个非常有效的途径^[4-5]。本实验室根据前人的研究结果结合理论原理构建了动物肝脏脂代谢的基因表达调控网络^[6],发现 C/EBP α 是肝脏脂代谢中的一个重要调控因子。

C/EBP 蛋白家族(CCAAT enhancer binding proteins)是一类与 DNA 增强子区域结合的反式作用因子,因其能与启动子的 CCAAT 区及多种病毒增强子相结合而命名,进化高度保守的蛋白,其同源蛋白广泛存在于人、鼠、牛、鸡等生物体中^[7-9]。C/EBPs 在脂肪组织的发育、分化以及新陈代谢中起着重要的作用,与脂肪细胞生成和分化密切相关^[10-11]。研究发现 C/EBP α 蛋白参与脂质代谢,如脂肪酸的合成,另外在肝细胞向成熟细胞分化时也伴有 C/EBP α 基因的表达^[9]。Grant 等研究表明,T3 在维持肝脏脂平衡和重建脂平衡中发挥重要的作用^[12-16]。当脂代谢由于过营养遭到破坏时,T3 对肝脏的损伤起保护作用^[17-18]。甜菜碱处理则能减少肝脏脂肪沉积,促进脂肪酸合成,因为它能够改善肝脂肪变性,被用于治疗脂肪肝^[19-21]。目前,鹅 C/EBP α 基因序列及其基因表达调控方面的研究未见相关报道。为了研究 C/EBP α 基因与朗德鹅肝脏脂肪代谢的关系,本研究通过克隆测序获得朗德鹅 C/EBP α 基因序列,从基因结构和预测的蛋白结构

上推测其功能,检测了填饲、填饲+T3、填饲+T3+甜菜碱和填饲+甜菜碱等不同处理朗德鹅肝脏组织中 C/EBP α 基因的 mRNA 表达水平,并对不同的处理结果进行了比较分析。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取江苏兴云集团同批孵化的健康朗德鹅公鹅 30 只,前期生长阶段饲养在相同的环境条件下,自由采食和饮水。至第 12 周时,将鹅分成 5 大组,每组 6 只。其中对照组仍用常规饲料饲喂;填饲组仅用填饲料(每 100 kg 玉米中添加 0.5 kg 动物油、0.5 kg 食盐、0.01% 复合维生素)饲喂;填饲+T3 处理组在填饲开始后添加左旋甲状腺素钠(50 $\mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{只}^{-1}$,德国 Merck Phama GmbH 公司,半衰期为 7.5 d),共添加 10 d;填饲+T3+甜菜碱处理组在填饲和 T3 处理的同时添加甜菜碱(1 $\text{g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{只}^{-1}$,南京 Genetime 公司);填饲+甜菜碱处理组在填饲开始后添加甜菜碱(1 $\text{g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{只}^{-1}$,南京 Genetime 公司)。第 15 周龄时称重,屠宰全部试验鹅,测定肝质量,采取部分肝脏组织,立即置于液氮中速冻,-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用以提取 RNA,另一部分 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存提取 DNA。

1.2 PCR 引物设计

根据鸡的 C/EBP α 基因序列(GenBank 序列号:X66844),用 Primer premier 5.0 软件设计 2 对引物 P1 和 P2,用于扩增朗德鹅 C/EBP α 基因 DNA 序列。根据获得的鹅 C/EBP α 基因 DNA 序列设计引物 P3 和内参基因 $\beta\text{-actin}$ 序列(GenBank 序列号:M26111)设计引物 P4 用于荧光定量检测。所有引物均由上海英骏生物技术有限公司合成,引物信息见表 1。

表 1 朗德鹅 C/EBP α 和 $\beta\text{-actin}$ 基因 PCR 扩增引物

Table 1 Oligo nucleotide primers used in this study

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature	片段长度/bp Fragment length
C/EBP α	P1 F: AGGACCGAGGCAACCCA R: GAGTGCTCGTTCTCGCAGAT	Touchdown	401
	P2 F: CCGAACCCCTGGATTGCC R: CCCTCGCCTTTCTCCTTACA	62	1 266
$\beta\text{-actin}$	P3 F: GTGCTTCATGGAGCAAGCCAA R: TGTCGATGGAGTGCTCGTTCT	60	191
	P4 F: ACCACCGGTATTGTTATGGACT R: TTGAAGGTGGTCTCGTGGAT	65	398

1.3 DNA 和 RNA 提取

酚-氯仿法提取肝脏组织中基因组 DNA, 紫外分光光度计测定 DNA 浓度和纯度 ($OD_{260}/OD_{280} = 1.8 \sim 2.0$), 1% 琼脂糖电泳检测质量, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

硫氰酸胍-酚-氯仿 RNA 一步提取法提取肝组织总 RNA。紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度 ($OD_{260}/OD_{280} = 1.8 \sim 2.0$), 1% 琼脂糖电泳检测质量。用随机引物对总 RNA 进行反转录, 反应体系为 $25\text{ }\mu\text{L}$: $2\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA, $1\text{ }\mu\text{g}$ 随机引物, $0.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs, 20 U RNase inhibitor, 200 U MMLV 反转录酶 (Promega 公司), $5\text{ }\mu\text{L}$ $5\times$ RT-Buffer ($250\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 8.3, $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $250\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ spermidine)。先加 RNA 模板、dNTPs 和随机引物, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后立即放冰上冷却, 再加其余试剂, 混匀后 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭活 5 min。将 RT 产物置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.4 PCR 扩增和克隆测序

反应体系为 $50\text{ }\mu\text{L}$: $5\text{ }\mu\text{L}$ $10\times$ LA PCR Buffer, $4\text{ }\mu\text{L}$ dNTP Mixture ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $3\text{ }\mu\text{L}$ MgCl_2 , $1\text{ }\mu\text{L}$ Primer, $1\text{ }\mu\text{L}$ Primer GeneRacerTM3' primer, $0.5\text{ }\mu\text{L}$ LA Taq DNA Polymerase, $1\text{ }\mu\text{L}$ Template DNA, $34.5\text{ }\mu\text{L}$ ddH₂O。PCR 反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; 5 个循环 ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min); 5 个循环 ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min); 25 个循环 ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min); $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外灯下切下含有目的 DNA 的琼脂糖凝胶, 用 V-gene DNA 凝胶回收试剂盒 (杭州维特洁公司) 纯化。回收的 DNA 片段与 PDMT-19T 载体 (大连 TaKaRa 公司) 连接, 并转化 JM109 菌株。用 V-gene 质粒 DNA 提取试剂盒 (杭州维特洁公司) 提取质粒, PCR 鉴定后, 将质粒 DNA 送交由上海英骏公司测序。

1.5 实时荧光定量 PCR

反应体系 $20\text{ }\mu\text{L}$: $1\text{ }\mu\text{L}$ RT 产物, $10\text{ }\mu\text{L}$ SYBR Premix Ex TaqTM, $8\text{ }\mu\text{L}$ ddH₂O, $10\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 目的基因上游和下游引物各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 。反应程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min; 40 个循环 ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, 退火 15 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 读板 1 s); $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min, $65\sim 94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 每 $0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$

读板一次绘制熔解曲线; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。每组 6 个样品, 每个样品做 3 次重复。从每组重复里随机选取目的基因和内参基因各 1 个, 分别胶回收纯化, 10 倍梯度稀释后作为标准品, 制作标准曲线。

1.6 生物信息学及数据分析

克隆得到的核酸序列使用 NCBI 的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 程序, 参考 Kozak 一致性规律寻找 ORF。采用 DNASTAR 分析 *C/EBP α* 蛋白的氨基酸组成、分子量和等电点; 采用 ExPASy 的在线软件 Compute pI/MW (http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html) 分析蛋白质分子量和等电点。采用 ExPASy 提供的在线跨膜区预测软件 TMHMM 和 TMPRED 比较分析 *C/EBP α* 蛋白跨膜区。采用 ExPASy 的 ProtScale 程序 (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 分析蛋白质疏水性。采用 SignalP 3.0 程序 (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 对氨基酸序列进行信号肽分析。采用 NCBI 的 CDD 软件分析蛋白保守结构域。

实时荧光定量试验不同处理之间基因表达量的差异用 SPSS11.5 软件包中的 One-way ANOVA 进行分析, 试验结果表示为 $\bar{x} \pm se$ 。

2 结果

2.1 朗德鹅 *C/EBP α* 基因克隆测序结果

通过 PCR 扩增、克隆测序和比对拼接后获得朗德鹅 *C/EBP α* 基因 DNA 序列, 长度为 1 401 bp (图 1), 已提交到 GenBank, 登录号为 GU289824。通过分析发现朗德鹅 *C/EBP α* 基因没有内含子, 其外显子中开放阅读框 (ORF) 长为 975 bp, 推测编码 324 个氨基酸残基, ORF 两侧分别是 210 bp 的 5'-UTR 和 397 bp 的 3'-UTR, 另外在 1 213~1 218 bp 处存在一个标准的多聚腺苷酸加尾信号 (AATAAA)。同源性分析发现鹅 *C/EBP α* 基因 ORF 核苷酸序列与鸡、珍珠鸟的同源性分别高达 100% 和 94.58%, 与人的同源性为 52.92%, 与鼠的同源性为 58.75%。不存在信号肽。

2.2 氨基酸序列分析

朗德鹅 *C/EBP α* 蛋白相对分子量为 35.67 ku, 理论等电点 pI 为 7.09, 定位于细胞核内, 不含有明显的疏水区, 未发现跨膜区, 为非分泌性蛋白。BLAST 分

```

-210                               ctaggaacggggcaggcaggcaggcggcg
-181 agcggggctcgggcgggctggggcggggacgggctccgggcgcgccgagcgggaccgcg
-121 ccgagccgagccgagccgggggagcgcggggtgctgcgggcttggcagagccgcccgc
-61  cccgtccgaaccttgattgccggagcccttcaccatgcccggcaggctgtaggtgcttc
  1  atggagcaagccaacttctacgaggtcgattccccgccccgatgagcagcggccagcac
    M E Q A N F Y E V D S R P P M S S G Q H
61  caccagctccagactccccctgcccggcagcgcctacggctacagagaggctccctcggcg
    H Q L Q T P L P G S A Y G Y R E A P S A
121 gcggcacctgctcggggcggcgaggctcggcgacatctcgagaacgagcactccatc
    A A P A A G G A E L G D I C E N E H S I
181 gacatcagcgcctacatcgacccccgccgcttcaacgacgagttcctggccgacctcttc
    D I S A Y I D P A A F N D E F L A D L F
241 cagcacagcaagcagcaggagaagcacaaggccctcctggccgggatttcgattccac
    Q H S K Q Q E K H K A V L A G D F D F H
301 ggcatgcacggggcggcgccgcccctcggcgccggggcaccaccgcagcaccagcag
    G M H G A G A A A S A P G H H P Q H Q Q
361 cagecctgttctggetgcgcggccggctacatggacggcaagctcgaccctgtacgag
    Q P L F G C A A G Y M D G K L D P L Y E
421 cgcctcggccgcccggggttgcggccgctggctcatcaagcaggagccccgcgaggaggag
    R I A A P G L R P L V I K Q E P R E E E
481 gaggtgaaggcggcgccctggcgccctctaccgcacccgcagcagcaccctcccac
    E V K A A A L A A L Y P H P Q Q H P S H
541 ctgcagtaccagatgcccactgcgcgcagaccaccgtgacctgcagccggggcaccccc
    L Q Y Q I A H C A Q T T V H L Q P G H P
601 acgcccggccccacgcccgtgccagcccgcaccaccgcaccaccgcacccccgggc
    T P P P T P V P S P H H P H H P H P P G
661 gcgctgcccggcgtccccggcgccctcaagatgatgcccggcaccaccgggcaaatcc
    A L P A A P G A L K M M P A D H R G K S
721 aaaaagacagtggacaagaacagcaacgagtaccgctgcccgggagcgaacaacatc
    K K T V D K N S N E Y R V R R E R N N I
781 gcggtgcgcaagagccgggacaagccaagcagcgaacgtggagagcagcagaaggtg
    A V R K S R D K A K Q R N V E T Q Q K V
841 ctggagctcaccaccgacaacgagcggctcgggaagcgggtggagcagctcagccgggag
    L E L T T D N E R L R K R V E Q L S R E
901 ctggagactctcggggcatcttcaggcagctgcccgaagctcgtggtgaaggccatg
    L E T L R G I F R Q L P E S S L V K A M
961 ggacgctgcgctagccgggcccctcccgggctccgtgcgctccgagcgggtgccggagcg
    G S C A *
1 021 ggctcagattgcggggggtgggctttatTTTTTctTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTt
1 081 TTTTTTTTTTccccacagtaatgaccaataaaagaagccaggcagctgtagtattacca
1 141 ggctcggtgccttagggttgacacacgaataagctgaaaaacgtggtgggttt

```

下划线处代表起始密码子,星号代表终止密码子,加尾信号(AATAAA)用阴影框出

The horizontal lines represent the start codon, the star represents the stop codon and the shadow represents canonical polyadenylation processing signals (AATAAA)

图 1 朗德鹅 C/EBPα 基因序列及其推测编码的蛋白序列

Fig. 1 DNA sequence of gC/EBPα and its deduced coding protein of Landes geese

析发现朗德鹅 C/EBPα 蛋白氨基酸与珍珠鸟、鸡的同源性分别为 84.97%和 100%,与人、鼠的同源性分别为 37.73%和 60.88%,可见不同物种间 C/EBPα 蛋白具有一定的保守性(图 2)。

蛋白保守结构域分析发现朗德鹅 C/EBPα 蛋白第 246~310 个氨基酸间存在 1 个 bZIP 结构域(图 2),与鸟类以及其它物种的 C/EBPα 蛋白一致。bZIP 是 C/EBPs 蛋白的特征性结构,由 2 种功能域组

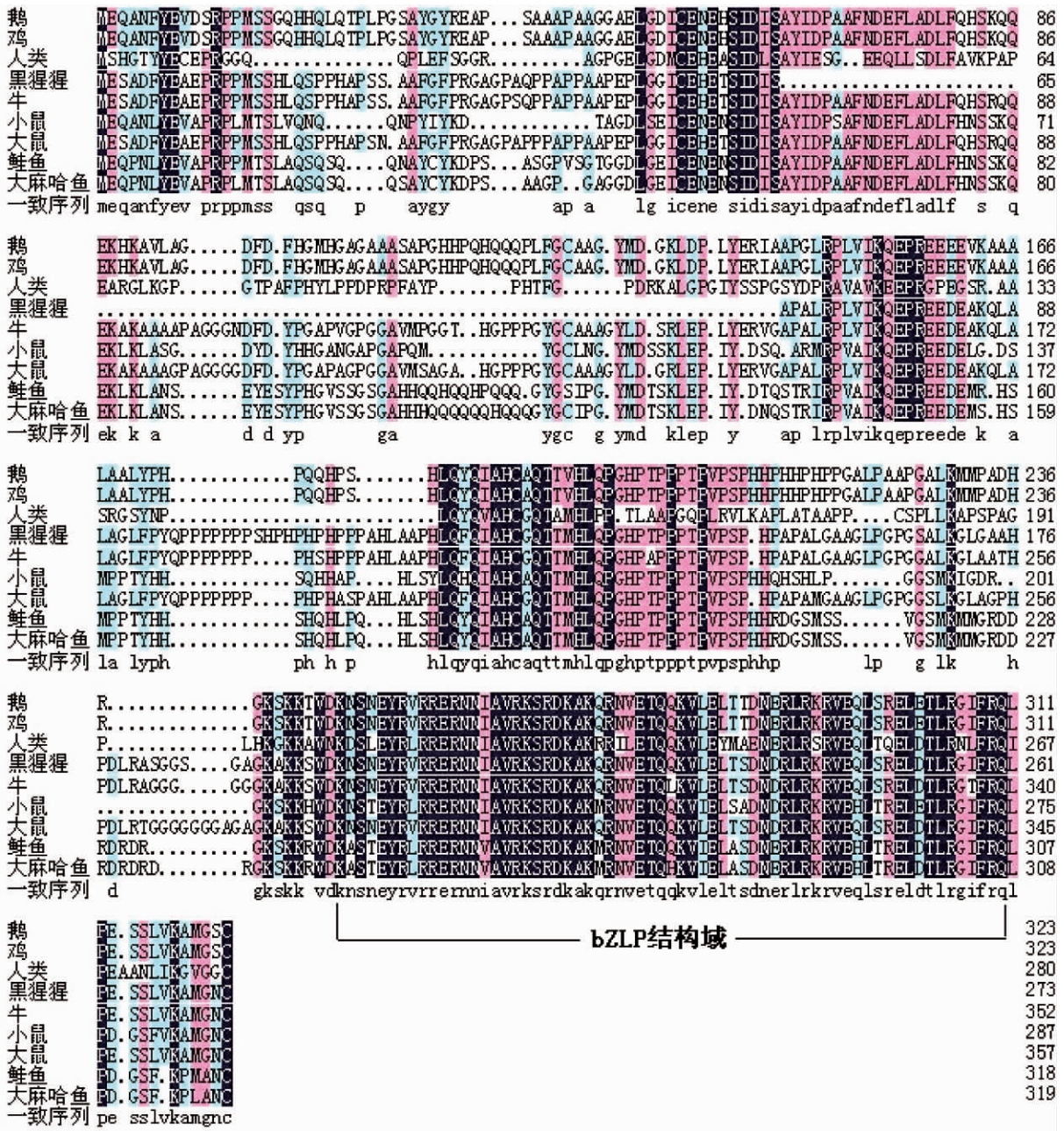


图 2 鹅 C/EBP α 蛋白序列与其它 8 种动物的同源蛋白序列比较

Fig. 2 A multiple sequence alignment of C/EBP α homologous protein from different species

成,即靠近氨基端的具有 DNA 结合功能的碱性氨基酸区(basic region, BR)和羧基端的亮氨酸拉链结构域(leucine zipper, LZ)。该结构域中的亮氨酸拉链结构域作为蛋白与 DNA 之间相互作用的结构域,在信号转导、细胞分化和细胞骨架的形成中发挥重要作用^[10]。

利用推测的朗德鹅 C/EBP α 蛋白氨基酸序列通过 Blast 程序检索出其他物种的同源蛋白,包括牛(NP_789741. 2)、人(NP_004355)、小鼠(NP_

031704. 2)、大鼠(NP_036656. 1)、珍珠鸟(XP_002188412. 1)、鸡(NP_001026630. 1)、大马哈鱼(ABD84406)、爪蟾(NP_001011044)。采用 MEGA 4.1 软件中的 NJ 法构建了 C/EBP α 基因编码产物的系统发育树(图 3),结果发现聚类结果与经典分类学结果基本一致。从图 3 可以看出,朗德鹅首先与鸡聚为一类(BP=99%),再与珍珠鸟相聚(BP=100%);哺乳动物中的人和其他 3 个物种聚为一类(BP=100%);这两大类(鸟类和哺乳类)再与鱼类

和爬行类相聚。可见 C/EBP α 蛋白质在序列上的同源性在很大程度上反映了物种间的亲缘关系。

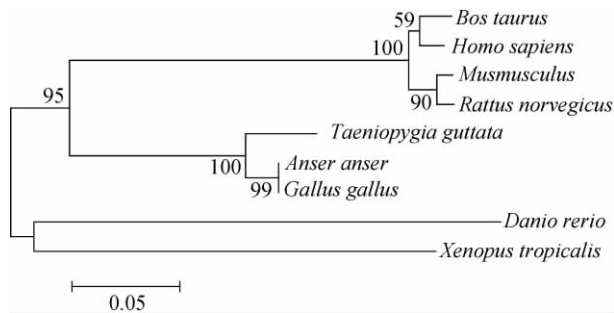
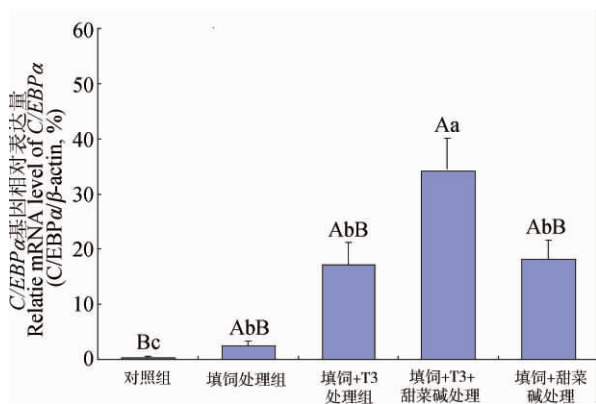


图3 根据 C/EBP α 基因序列构建的 NJ 树

Fig. 3 Neighbour-Joining tree of C/EBP α genes

2.3 不同填饲处理的朗德鹅肝脏组织中 C/EBP α 基因 mRNA 的表达

4 个不同填饲处理组和对照组朗德鹅肝脏组织 C/EBP α 基因 mRNA 的表达情况见图 4。由图 4 可以看出,填饲+T3+甜菜碱处理组肝脏中 C/EBP α 基因显著高于其他填饲处理组 ($P < 0.05$),极显著高于对照组 ($P < 0.01$),填饲组、填饲+T3 处理组和填饲+甜菜碱处理组之间差异均不显著,但均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。



不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$),不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Different capital letters notify the extremely significant difference ($P < 0.01$), different small letters notify the significant difference ($P < 0.05$)

图4 不同处理组朗德鹅肝脏组织中 C/EBP α 基因 mRNA 表达水平

Fig. 4 The relative expression levels of C/EBP α mRNA in liver of Landeese geese of different treatment groups

3 讨论

C/EBP α 最早是从肝脏和脂肪等组织中发现的转录因子,以异源二聚体的形式发挥作用。异源二

聚体主要通过转录起始的不同形成 42 和 30 ku 的 C/EBP α ^[10]。我们从朗德鹅肝脏组织中获得 C/EBP α 基因编码蛋白的相对分子量为 35.67 ku,与鸟类同源蛋白氨基酸序列的同源性在 94% 以上,与哺乳动物的总体同源性在 78% 以上,蛋白结构域分析表明朗德鹅 C/EBP α 蛋白与鸟类以及其它物种一样含有 C/EBPs 蛋白家族特征性的 bZIP 结构域,位于编码区的第 246~310 个氨基酸之间。bZIP 结构域中的亮氨酸拉链结构域作为蛋白与 DNA 之间相互作用的结构域,在信号转导、细胞分化和细胞骨架的形成中发挥重要作用^[10-16],由此我们推测朗德鹅 C/EBP α 蛋白功能与其它物种相似,具有 DNA 结合活性,参与基因转录调控。同源蛋白聚类分析结果表明,C/EBP α 同源蛋白分别聚于不同的分支,非洲蟾蜍和鱼类蛋白聚类于一个分支,鸟类聚类于一个分支,而哺乳动物聚类于另一支,表明 3 大分支的进化机制明显不同。

C/EBP α 敲除可导致脂肪代谢障碍,粒细胞缺乏和致命性的低血糖症^[22],而其单独表达增强可诱导前脂肪细胞 3T3-L1 向脂肪细胞分化,这说明 C/EBP α 基因在脂肪代谢中具有关键作用,尤其是在脂肪细胞分化中发挥重要作用。本研究中所有填饲处理组朗德鹅肝脏组织中 C/EBP α 基因转录水平均高于对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),表明 C/EBP α 基因在朗德鹅肝脏脂肪代谢过程中发挥作用。相对于填饲组,填饲+T3 处理组朗德鹅肝脏组织中 C/EBP α 基因表达增强,但未达到显著水平。苏胜彦等研究发现 T3 处理可使朗德鹅肝脏组织中 PPAR γ 基因的表达增强,从而影响肝细胞中脂滴的沉积^[23],而研究已证实 C/EBP α 在脂肪细胞分化的后阶段起重要作用,可促进 PPAR γ 基因的高表达、保持分化细胞的表型^[24-25],结合我们研究小组前期检测的 T3 处理后朗德鹅肝脏组织学变化(空泡数量明显减少,细胞质内脂滴增加,肝细胞膨胀^[6]),我们推测 C/EBP α 基因在 T3 处理降低填饲对肝脏的损伤中发挥了一定的作用。与填饲组相比,填饲+甜菜碱处理组朗德鹅肝脏组织 C/EBP α 基因 mRNA 表达量虽未达到显著水平,但上升趋势明显,这可能是因为甜菜碱处理后肝细胞内脂滴沉积均匀化,促进了脂肪酸合成,抑制肝细胞的增殖,并能够维持这种状态^[18-21],从而既保证了肝脏质量的增加,又减少了细胞的凋亡,这与 Su 等^[1]的肝脏组织学观察结果(甜菜碱处理后,空泡数量明显减少,

脂滴沉积分布均匀,数量较多)和 Ji 等^[22]在甜菜碱处理影响酒精性脂肪肝基因表达中的研究结果一致。填饲+T3+甜菜碱处理组朗德鹅肝脏组织 C/EBP α 基因表达显著高于填饲组 ($P < 0.05$), 极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 说明 T3 和甜菜碱协同作用后共同增强了 C/EBP α 基因的表达量, 与分别单独添加 T3 和甜菜碱处理的结果相一致, 但提高转录水平的效果更明显。

4 结 论

本研究获得了朗德鹅 C/EBP α 基因 DNA 序列, 推测鹅 C/EBP α 蛋白具有 C/EBPs 蛋白家族的特征性结构和 DNA 结合活性, 参与基因的转录调控。不同处理组的表达情况表明 C/EBP α 基因在朗德鹅肝脏脂代谢调控网络中发挥一定的作用, 结合前期的组织学观察结果^[1], 我们推测 C/EBP α 基因能够促进朗德鹅肝脏细胞内脂滴的均匀沉积, 保护肝脏组织。为了进一步研究 C/EBP α 基因在朗德鹅肝脏脂肪代谢和肝脏保护中的作用, 下一步我们将重点分析 C/EBP α 基因的多态性与产肝性能间的关系, 不同处理对肝脏 C/EBP α 蛋白表达的差异, 采用 RNAi 或基因敲除等方法研究朗德鹅肝脏 C/EBP α 基因的功能, 分析 C/EBP α 基因调控肝脏脂肪代谢、肝脏保护的分子机制等, 为探索朗德鹅脂肪肝形成的分子机理提供依据。

参考文献:

- [1] SU S Y, DODSON M V, LI X B, et al. The effects of dietary betaine supplementation on fatty liver performance, serum parameters, histological changes, methylation status and the mRNA expression level of spot14 α in Landes goose fatty liver[J]. *Comp Biochem Physiol, Part*, 2009, 154(3):308-314.
- [2] 徐国庆, 储冬生, 高宏巍, 等. 鹅肥肝中差异表达基因的筛选、克隆及分析[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2009, 27(3):310-313.
- [3] 苏胜彦, 李齐发, 陈睿, 等. 填饲对朗德鹅产肝性能、肝脏组织学和脂生成基因表达水平的影响[J]. 中国农业科学, 2009, 42(7):2523-2530.
- [4] PRADINES J, RUDOLPH-OWEN L, HUNTER J, et al. Detection of activity centers in cellular pathways using transcript profiling[J]. *Biopharm Stat*, 2004, 14(3):701-721.
- [5] OURFALI O, SHLOMI T, IDEKER T, et al. SPINE: a framework for signaling-regulatory pathway inference from cause-effect experiments [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23: 1359-1366.
- [6] 苏胜彦. 朗德鹅肝脏脂平衡调节的初步研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [7] KOGEL D, SVENSSON B, COPANAKI E. Induction of transcription factor C/EBP homology protein mediates hypoglycaemia induced necrotic cell death in human neuroblastoma cells [J]. *Neuro-chemistry*, 2006, 99(3): 952-964.
- [8] YIN L, WANG Y, DRIDI S, et al. Role of CCAAT/enhancer binding protein, histone acetylation, and co-activator recruitment in the regulation of malic enzyme transcription by thyroid hormone[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2005, 245: 43-52.
- [9] WANG X, HUANG G, MEI S, et al. Over-expression of C/EBP-alpha induces apoptosis in cultured rat hepatic stellate cells depending on p53 and peroxisome proliferators activated receptor gamma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 380(2):286-291.
- [10] RAMJI D P, FOKA P. CCAAT enhancer binding proteins: structure, function and regulation[J]. *Biochem J*, 2002, 365:561-575.
- [11] MENÉNDEZ H A, VEGA-NE, SANTOS A, et al. Regulation by thyroid and retinoic acid of the CCAAT/enhancer binding protein α and β genes during liver development[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 234: 605-610.
- [12] GRANT N. The role of triiodothyronine-induced substrate cycles in the hepatic response to overnutrition: thyroid hormone as an antioxidant [J]. *Med Hypotheses*, 2007, 68: 641-649.
- [13] VENTURA-HOLMAN T, MAMOON A, MAHER J F, et al. Thyroid hormone responsive genes in the murine hepatocyte cell line AML 12[J]. *Gene*, 2007, 396(2):332-337.
- [14] CHEN S S, CHEN J F, JOHNSON P F, et al. C/EBP β , when expressed from the C/EBP α in the liver but not in adipose tissue [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20:7292-7299.
- [15] QIAO L, MACLEAN P S, SCHAACK. C/EBP alpha regulates human adiponectin gene transcription through an intronic enhancer[J]. *Diabetes*, 2005, 54(6):1744-1754.
- [16] TAPIA G, FERNÁNDEZ V, PINO C, et al. The acute phase response of the liver in relation to thyroid hormone-induced redox signaling[J]. *Free Radic Bi-*

- ol Med*, 2006, 40(9):1628-1635.
- [17] VENTURA-HOLMAN T, MAMOON A, MAHER J F, et al. Thyroid hormone responsive genes in the murine hepatocyte cell line AML 12[J]. *Gene*, 2007, 396(2):332-337.
- [18] HUANG Q C, XU Z R, HAN X Y, et al. Changes in hormones, growth factor and lipid metabolism in finishing pigs fed betaine[J]. *Anim Feed Sci Technol*, 2006, 105: 78-85.
- [19] HUANG Q C, XU Z R, HAN X Y, et al. Effect of dietary betaine supplementation on lipogenic enzyme activities and fatty acid synthase mRNA expression in finishing pigs[J]. *Anim Feed Sci Technol*, 2008, 140: 365-375.
- [20] PEREIRA R C, DELANY A M, CANALIS E. CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (DDIT3) induces osteoblastic cell differentiation [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(4):1952-1960.
- [21] KHARBANDA K, MAILLIARD M, BALDWIN C, et al. Betaine attenuates alcoholic steatosis by restoring phosphatidylcholine generation via the phosphatidylethanolamine methyltransferase pathway [J]. *Hepatology*, 2007, 46: 314-321.
- [22] JI C, CHAN C, KAPLOWITZ N. Predominant role of sterol response element binding proteins (SREBP) lipogenic pathways in hepatic steatosis in the murine intragastric ethanol feeding model [J]. *Hepatology*, 2006, 45(5):717-724.
- [23] 苏胜彦,李齐发,刘振山,等. 朗德鹅填饲后不同组织 PPAR γ 基因 mRNA 表达量差异的初步研究[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(7):879-884.
- [24] ROSEN E D, HSU C H, WANG X, et al. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR gamma; a unified pathway[J]. *Genes Dev*, 2002, 16:22-26.
- [25] 罗锦标,田勇,陶争荣,等. PPAR 基因在鹅肥肝形成中的可调节性表达[J]. 中国农业科学, 2008, 41(10):3270-3276.

(编辑 郭云雁)