

猪 *Nhlh2* 基因启动子活性及其表达调控的初步研究

温丽娟¹, 刘发伟¹, 林长光², 陈子韬¹, 张哲¹, 张豪¹, 李加琪¹, 袁晓龙^{1*}

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642; 2. 福建光华百斯特生态农牧发展有限公司, 三明 365106)

摘要: 旨在研究母猪 *Nhlh2* 基因启动子活性及其与转录因子之间的调控关系, 为探索该基因的表达调控提供分子水平的依据, 也为研究母猪繁殖机制提供一定的参考。本研究以猪卵巢组织 DNA 为模板, PCR 扩增 *Nhlh2* 不同长度的启动子缺失片段, 克隆到 pGL3-basic 载体构建启动子报告基因重组质粒, 并将其转染到猪卵巢颗粒细胞, 测定相对双荧光素酶活性值; 通过染色质免疫共沉淀技术(ChIP), 研究 *Nhlh2* 启动子与 YY1、C/EBP β 蛋白之间的相互作用; 随后构建转录因子超表达、突变载体和小干扰 RNA(siRNA), 利用双荧光素酶检测系统进行活性验证。经双荧光素酶报告系统检测发现, *Nhlh2* 基因的 P7(-238~+129)区域启动子转录活性最高, -654~-238 片段范围可能存在负调控元件, -238~-20 区域可能存在正调控元件; 通过生物信息学分析和 ChIP 验证, *Nhlh2* 启动子区 -101~-85 和 -153~-140 区域分别是转录因子 YY1 和 C/EBP β 的结合位点; 突变 YY1 和 C/EBP β 的结合位点后, P7 的双荧光活性显著上调; 超表达 YY1 和 C/EBP β 后, P7 的双荧光活性显著下调; 干扰 YY1 和 C/EBP β 的表达后, P7 的双荧光活性显著上调。本研究确定了猪 *Nhlh2* 基因的核心启动子区域为 -238~+129, YY1 和 C/EBP β 分别结合在 *Nhlh2* 基因启动子区的 -101~-85 和 -153~-140 区域, 抑制猪 *Nhlh2* 基因的转录活性。

关键词: 猪; *Nhlh2* 基因; 启动子活性; 转录调控元件

中图分类号: S828.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)04-0667-08

Analysis of the Promoter Activity and Expression Regulation of Porcine *Nhlh2* Gene

WEN Li-juan¹, LIU Fa-wei¹, LIN Chang-guang², CHEN Zi-tao¹,
ZHANG Zhe¹, ZHANG Hao¹, LI Jia-qi¹, YUAN Xiao-long^{1*}

(1. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Fujian Guanghua BEST Eco-agriculture and Animal Husbandry Development Co. Ltd.,
Sanming 365106, China)

Abstract: The present study aimed to explore the promoter activity of *Nhlh2* gene and the relationship between the promoter activity and transcription factors in cells, and further provide a theoretical basis for the regulating mechanism of *Nhlh2* gene in pigs. Based on the template of porcine ovarian genomic DNA, PCR was used to amplify different length deletion fragments of *Nhlh2* gene promoter. These fragments were cloned into pGL3-basic to build the promoter recombinant plasmid, and then were transfected into the porcine ovarian granulosa cells. The relative luciferase activities of these plasmids were further measured by using the dual luciferase assay system. Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) was used to confirm the interaction between YY1, C/EBP β and the promoter of *Nhlh2*. Finally, the overexpression and mutant vectors, small interfering RNA (siRNA) of YY1 and C/EBP β were constructed, the luciferase activity was detected by dual luciferase reporter assay system. Results showed that transcription activity of P7 (-238-+129) region was the highest, -654-238 was the potential region contain-

收稿日期: 2017-10-10

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-35); 福建省科技重大专项(2012NZ0003-3); 国家科技基础性工作专项(2014FY120800633); 华南农业大学大学生创新训练项目

作者简介: 温丽娟(1992-), 女, 福建龙岩人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: WenLJSCAU@163.com

* 通信作者: 袁晓龙, 博士, 副教授, E-mail: yxl@scau.edu.cn

ning the negative regulatory element, and -238-20 was the potential region containing the positive regulatory element; After the bioinformatic analysis and ChIP test, we found the binding sites of YY1 and C/EBP β at *Nhlh2* gene promoter were -101-85 and -153-140, respectively. After mutating the binding sites of YY1 and C/EBP β , the transcription activity of P7 was significantly up-regulated; The overexpression of YY1 and C/EBP β significantly reduced the transcription activity of P7, and the transcription activity was significantly up-regulated by YY1-siRNA and C/EBP β -siRNA. These results indicate that the core promoter region of *Nhlh2* is -238+129. Furthermore, YY1 and C/EBP β respectively bound at -101-85 and -153-140 of *Nhlh2* gene promoter to inhibit the transcription of *Nhlh2* gene in pigs.

Key words: pigs; *Nhlh2* gene; promoter activity; transcription regulatory elements

Nhlh2 基因也称为 NSCL-2, 该基因编码的蛋白属于碱性螺旋-环-螺旋转录因子, 由 V. Göbel 等^[1] 在 1991 年首次在小鼠胎脑 cDNA 文库中筛选分离得到。研究表明, *Nhlh2* 通过调控下丘脑 GnRH 的分泌, 参与调控小鼠初情期的启动^[2-3]。与正常小鼠相比, *Nhlh2* 突变导致下丘脑 GnRH 神经元数量减少 50%, 同时体内 GnRH 的浓度下降 80%~90%^[3-4]。*Nhlh2* 敲除的小鼠在胚胎发育初期阶段, GnRH 神经元滞留在嗅觉/视前区, 并表现出非正常性凋亡^[5]。*Nhlh2* 敲除的雌性小鼠, 大部分卵泡在窦状卵泡阶段停止生长发育^[4], 排卵数下降 50%、发情间期延长及繁殖性能显著下降^[6]。此外, D. Nonneman 等^[7] 通过全基因组关联分析发现, 与母猪初情期启动失败高度关联的 SNP 位点位于 *Nhlh2* 基因附近。这些结果表明, *Nhlh2* 可能参与调控哺乳动物卵泡的成熟、排卵及初情期启动等繁殖活动。但是目前关于 *Nhlh2* 基因的表达调控机制仍不清楚。

本研究以猪卵巢基因组 DNA 为模板, 以猪颗粒细胞为细胞模型, 通过克隆猪 *Nhlh2* 基因的启动子区域序列, 构建不同缺失长度的报告基因系统, 分析了该基因的启动子活性, 并研究了部分转录因子与该基因的表达调控关系。本研究能够为后续母猪 *Nhlh2* 基因的结构和功能研究提供分子基础, 也为母猪繁殖机制的研究提供一定的参考。

1 材料与方法

试验于 2016 年 5 月至 2017 年 4 月在华南农业大学广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室完成。

1.1 试验材料

试验动物及相关组织: 用于猪 *Nhlh2* 启动子克隆的 DNA 模板样品来自中山某猪场的长大二元杂

交母猪的卵巢组织, 猪卵巢颗粒细胞是用广州市某屠宰场商品猪卵巢组织培养的原代细胞。

分子克隆试验材料: 基因组 DNA 抽提试剂、无内毒素质粒小量提取试剂、普通质粒小量提取试剂、凝胶回收试剂购自美国 Magen 公司, pMD-18T Vector, DNA A-Tailing Kit, PrimeStar HS, T4 连接酶、限制性内切酶、10 \times Loading Buffer 购自美国 TaKaRa 公司, Trans5 α Chemically Competent Cell 购自北京全式金有限公司, YY1 Antibody, C/EBP β Antibody, GAPDH Antibody 购自上海 absin 有限公司。

细胞培养与检测试剂: 培养基、青链霉素(双抗溶液)购自 Invitrogen 公司, 胎牛血清、胰蛋白酶购自 GIBCO, 用于细胞转染的 Lipofectamine[®] 3000 购自美国 Invitrogen 公司, YY1-siRNA 和 C/EBP β -siRNA 由广州锐博生物有限公司合成, pGL3-basic 载体、pCDNA3.1 载体、荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司。其他均为常规化学试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 猪 *Nhlh2* 启动子的克隆 根据 NCBI 基因数据库中猪 *Nhlh2* 基因 5' 上游序列, 设计合适的引物(表 1), 使用 PrimeStar HS 高保真酶, 以猪卵巢组织 DNA 为模板, PCR 克隆扩增猪 *Nhlh2* 基因 5' 上游 -3 565~+129 bp 片段。PCR 采用 10 μ L 反应体系: 5 μ L PrimeSTAR HS, 0.3 μ mol \cdot L⁻¹ 上下游引物, 0.3 μ L DNA 模板, ddH₂O 补足至 10 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min, 共循环 35 次。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后回收加 A 尾, 取 4 μ L 产物加 1 μ L pMD18-T 载体, 16 $^{\circ}$ C 连接反应 5 h, 转化大肠埃希菌 DH5 α , 培养 12 h, 挑取单个菌落、扩增、测序。测序鉴定正确的质粒命名为 T-Nhlh2。

1.2.2 *Nhlh2* 启动子报告基因重组体的构建和序

列分析 以测序鉴定正确的 T-*Nhlh2* 为模板,设计 8 条不同的上游引物,PCR 扩增 8 条不同 5' 端的缺失片段(扩增引物见表 1),琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,用 *Mlu* I、*Xho* I 双酶切胶回收系列缺失片段 PCR 产物,同时 pGL3-basic 经 *Mlu* I、*Xho* I 双酶切,定向连接,转化大肠埃希菌 DH5 α ,氨苄青霉素平板涂板后,培养过夜进行抗性筛选,阳性克隆经双酶切鉴定正确后,命名为 P1~P8。利用 TF-BIND^[8]和 JASPAR^[9]等生物信息学网站预测分析目的片段存在的潜在转录因子结合位点。

1.2.3 转录因子 YY1、C/EBP β 表达载体、突变体的构建 根据 YY1、C/EBP β 基因的序列,分别设计引物(表 1),反应条件及体系按 PrimeStar HS PCR 说明书进行,YY1 经 *Nhe* I、*Xho* I 双酶切,C/EBP β 经 *Kpn* I、*Xho* I 双酶切,分别连接 pCDNA3.1 载体获得 pCDNA3.1-YY1、pCDNA3.1-C/EBP β 。以 P7(-238~+129)为模板,根据重叠 PCR 原理,设计含有突变碱基的引物(表 1),构建 YY1、C/EBP β 潜在结合位点突变的突变载体,命名为 pGL3-P7-YY1-Mut、pGL3-P7-C/EBP β -Mut。

1.2.4 猪卵巢颗粒细胞的培养及转染 原代颗

粒细胞的培养及传代参考文献[10-11],待细胞汇合度约 90%时,以 2.5×10^5 个·孔⁻¹接种于 24 孔板,按照 Invitrogen 公司的 Lipofectimine 3000 转染试剂盒说明书操作。每个试验设置 4 个复孔,转染后在无双抗的 10% 胎牛血清 DMEM 培养基 500 μ L 中培养 6 h 后更换为含有双抗的 10% 胎牛血清 DMEM 培养基中继续培养,在瞬时转染细胞 24 h 后,用双荧光素酶报告基因系统进行荧光素酶活性检测,收集数据分析启动子片段转录活性。

1.2.5 染色质免疫共沉淀(ChIP) ChIP 试验的操作流程参照文献[12-13],用终浓度为 1% 甲醛在 37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 10 min,使蛋白与 DNA 交联。用终浓度为 0.125 mol·L⁻¹的甘氨酸室温处理 5 min 终止交联。收集细胞后超声破碎。 $10\ 000 \times g$,4 $^{\circ}$ C 离心细胞液,收集上清。用特异性抗体与 DNA 结合蛋白结合,对应抗体为,阳性对照:Anti-RNA Polymerase II 抗体;阴性对照:兔 IgG 抗体;试验组:YY1 或 C/EBP β 特异性抗体,沉淀法分离复合体。反向交联操作释放出 DNA,并消化蛋白质。PCR 检测 *Nhlh2* 启动子 -101~-85 和 -153~-140 处片段,引物序列见表 2。

表 1 引物列表

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物大小/bp Products size
P1-F	<u>CG</u> <u>ACGCGT</u> CGAGCCTTTGTAGTTCCACCAG	3 694
P2-F	<u>CG</u> <u>ACGCGT</u> CGAAAAGTCCAGAAAGGT	2 677
P3-F	<u>CG</u> <u>ACGCGT</u> CGGCACAGAAGGAAGACCCAT	2 150
P4-F	<u>CG</u> <u>ACGCGT</u> CGGTGAGGGTAACTGTAGGTGT	1 686
P5-F	<u>CG</u> <u>ACGCGT</u> CGGGTGGGGTAAGGCTGTAAT	1 173
P6-F	<u>CG</u> <u>ACGCGT</u> CGACAGTGATCCCTGAAATTGC	783
P7-F	<u>CG</u> <u>ACGCGT</u> CGAGCTAAGTTTCTATCGTGGA	367
P8-F	<u>CG</u> <u>ACGCGT</u> CGTCTCTTCCACCATCTCCAGG	149
R	<u>CCG</u> <u>CTCGAG</u> CGAAAGTGAATGTCTCCCGGAA	
YY1-F	<u>CTA</u> <u>GCTAGCT</u> AGGCCTCGGGCGACACCC	1 174
YY1-R	<u>CCG</u> <u>CTCGAG</u> TCACTGGTTGTTTTGGCCT	
C/EBP β -F	<u>GG</u> <u>GGTACC</u> ATGCAACGCCTGGTGGCCT	1 041
C/EBP β -R	<u>CCG</u> <u>CTCGAG</u> CTAGCAGTGGCCGAGGAGG	
YY1-NF	ATTAAGTGACTCATG TAAG TTCTTCTGTCCAATAGGA	
YY1-NR	TCCTATTGGACAGAAGA ACTTAC ATGAGTCACTTAAT	
C/EBP β -NF	AAATATTTGGGCTGT AGCCG ATCCACACTGTGACA	
C/EBP β -NR	TGTCACAGTGTGGGAT CGGCT ACAGCCCAAATATTT	

下划线为酶切位点,灰色部分为保护碱基,斜体加粗的碱基表示突变碱基

The underlines are the enzyme digestion sites; Grey parts indicate the protected sequencing bases; Bases in italic and bold represent the mutation bases

表 2 ChIP 验证引物信息

Table 2 Primers used in ChIP

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物大小/bp Products size
Nhlh2(-118/-14)	F: AGTCCAATTAAGTGACTCATGT R: AGAGATAAAGGCTTAAGCAGGG	105
Nhlh2(-225/-112)	F: TATCGTGGACTGCTTTCAACT R: TTGGACTTGACATCTGTCACA	114
GAPDH	F: TACTAGCGGTTTTACGGGCG R: TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA	166

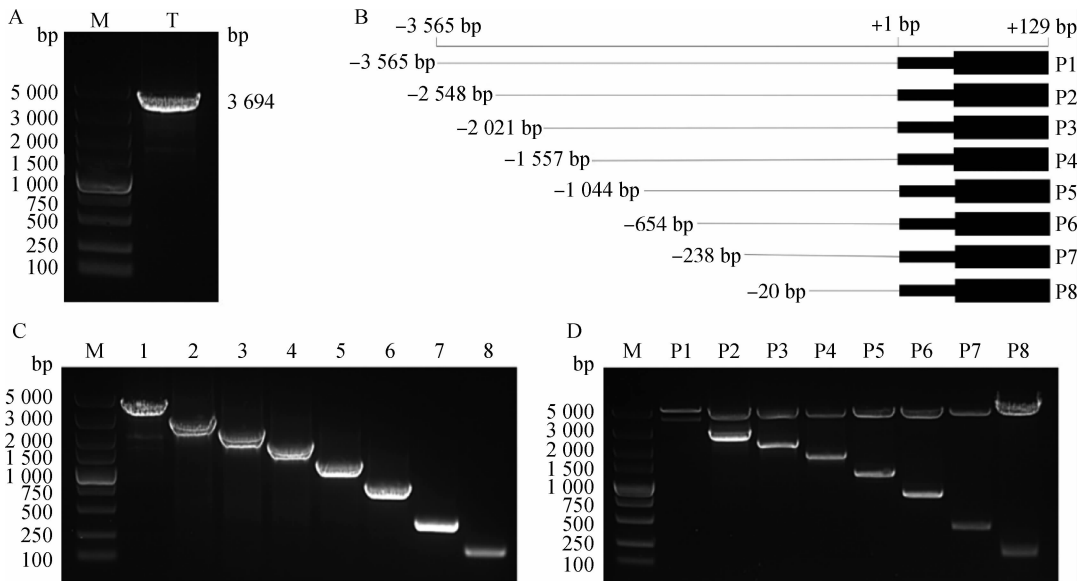
1.2.6 统计分析 所有数据均用“平均值±标准差”表示,并经双尾 *T*-test 检验差异是否具有统计学意义。* 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 猪 *Nhlh2* 启动子缺失片段报告基因重组质粒的构建和酶切鉴定

从猪卵巢基因组 DNA 中克隆获得 -3 565 ~

+129(3 694 bp)的 *Nhlh2* 的 5' 端片段(图 1A),并命名为 T-Nhlh2。以 T-Nhlh2 为模板,设计 8 条不同的上游引物,PCR 扩增出 8 条不同 5' 端的缺失片段(图 1B),经琼脂糖凝胶电泳分析验证,扩增产物与预期片段大小相符(图 1C)。用限制性内切酶 *Mlu* I、*Xho* I 酶切这些 5' 端的缺失片段和双荧光素酶载体后,构建了 P1~P8 报告基因系统重组质粒,并经双酶切(图 1D)和测序鉴定。



A. *Nhlh2* 启动子扩增产物; B. *Nhlh2* 启动子 5' 端缺失片段长度图示; C. *Nhlh2* 启动子 5' 端缺失片段扩增产物; D. *Nhlh2* 启动子 5' 端缺失片段的酶切鉴定。M. DNA 相对分子质量标准; T. 3 694 bp(T-Nhlh2); 1~8. *Nhlh2* 基因 5' 端逐段缺失扩增结果(-3 565~+129, -2 548~+129, -2 021~+129, -1 557~+129, -1 044~+129, -654~+129, -238~+129, -20~+129); P1~P8. P1~P8 载体的酶切鉴定

A. Products of *Nhlh2* promoter amplification; B. Length of *Nhlh2* promoter 5' fragments; C. Products of 5' fragments of *Nhlh2* promoter amplification; D. Identification of *Nhlh2* promoter 5' deletion fragments by restriction enzymes. M. DNA marker DL5000; T. 3 694 bp (T-Nhlh2); 1-8. The DNA bands of 5' fragments of *Nhlh2* gene unidirectional deletions (-3 565+129, -2 548+129, -2 021+129, -1 557+129, -1 044+129, -654+129, -238+129, -20+129); P1-P8. Identification of vectors P1-P8 by restriction enzymes

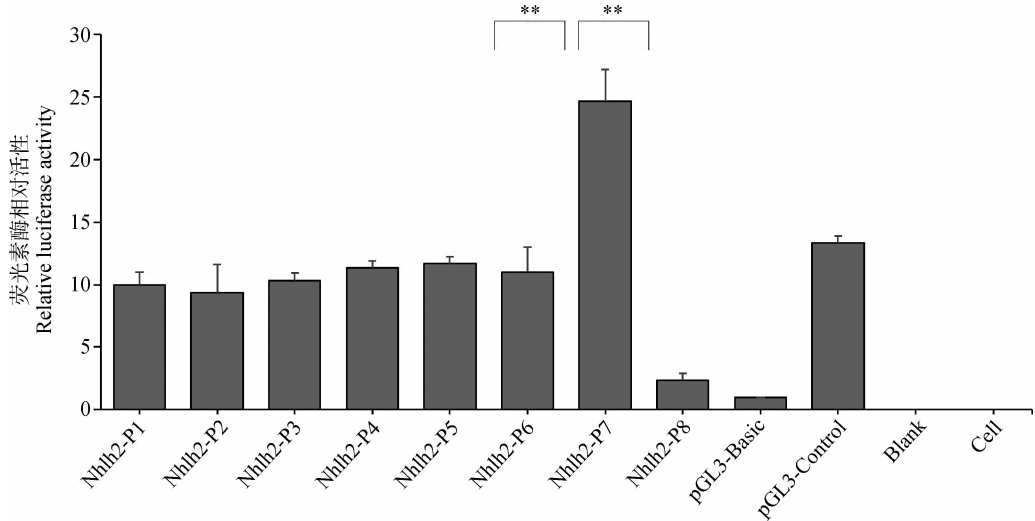
图 1 *Nhlh2* 启动子片段缺失报告载体的构建

Fig. 1 Construction of *Nhlh2* promoter fragment deletion vectors

2.2 猪 *Nhlh2* 基因启动子不同缺失片段活性分析

将构建的 8 个启动子缺失片段的报告基因重组质粒瞬时转染至猪卵巢颗粒细胞,24 h 后裂解细胞并收集裂解液进行双荧光素酶活性检测。结果显示,P1~P6 片段双荧光素酶活性差异不显著;P7 (-238~+129) 区域的相对活性最高,说明猪

Nhlh2 基因的核心启动子区域为 -238~+129;与 P6 (-654~+129) 相比,P7 片段活性显著升高了 1.24 倍($P=0.0018$),表明 -654~-238 片段范围可能存在负调控元件(图 2);与 P8 (-20~+129) 片段相比,P7 片段荧光活性下降了 9.57 倍($P=0.0001$),表明 -238~-20 区域可能存在正调控元件(图 2)。



** . $P < 0.01$, the same as below

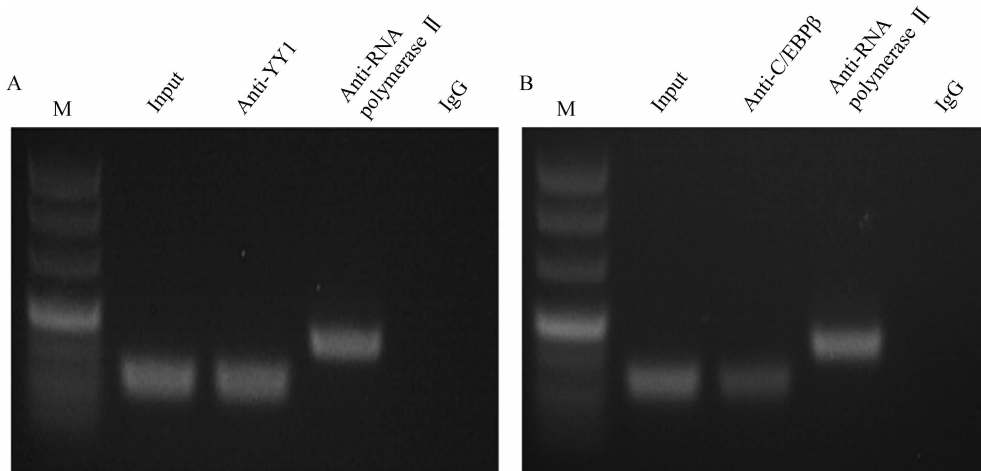
图 2 *Nhlh2* 的 5' 端缺失片段启动子活性

Fig. 2 Luciferase activities of *Nhlh2* promoter 5' deletion fragments

2.3 转录因子 YY1、C/EBP β 与 *Nhlh2* 基因启动子的互作

结合 TFBIND、JASPAR 等生物信息学软件对 -238~-20 区域进行预测,发现该区域存在多个潜在的转录因子结合位点,本研究关注 YY1 和

C/EBP β 与 *Nhlh2* 之间的表达调控关系。ChIP 试验结果表明,转录因子 YY1 识别并结合在 *Nhlh2* 基因 -101~-85 区域(图 3A);转录因子 C/EBP β 识别并结合在 *Nhlh2* 基因 -153~-140 区域(图 3B)。



A. YY1 结合位点 ChIP 验证结果;B. C/EBP β 结合位点 ChIP 验证结果。M. DNA 相对分子质量标准;Anti-YY1/Anti-C/EBP β . 试验组;input/Anti-RNA polymerase II. 阳性对照;IgG. 阴性对照

A. ChIP validation of YY1 binding site at *Nhlh2*; B. ChIP validation of C/EBP β binding site at *Nhlh2*. M. DNA marker DL500; Anti-YY1/Anti-C/EBP β . Experimental group; Input/Anti-RNA polymerase II. Positive control; IgG. Negative control

图 3 *Nhlh2* 基因启动子区转录因子结合位点 ChIP 验证

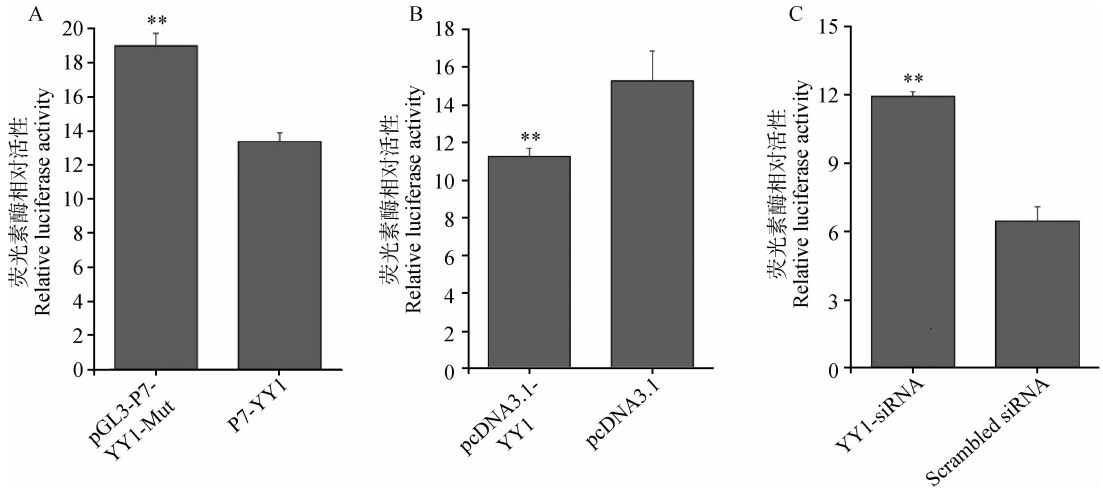
Fig. 3 The results of transcription factor binding sites at *Nhlh2* gene promoter by ChIP

2.4 猪 *Nhlh2* 基因核心启动子区转录因子结合位点的活性验证

如图 4 和图 5 所示,以 pGL3-P7 为野生型,构建两个转录因子结合位点的突变体 pGL3-P7-YY1-Mut、pGL3-P7-C/EBP β -Mut,并构建了 pCDNA3.1-YY1 和 pCDNA3.1-C/EBP β 两个真核表达载体及干扰小 RNA(YY1-siRNA 和 C/EBP β -siRNA) 转染至猪卵巢颗粒细胞,探索 YY1 和 C/EBP β 与 *Nhlh2* 之间的表达调控关系。

结果显示,pGL3-P7-YY1-Mut 与野生型相比,

双荧光素酶活性上调 0.42 倍($P=7.22\times 10^{-11}$)(图 4A);超表达 YY1 后,pGL3-P7 的双荧光素酶活性下调了 0.36 倍($P=1.28\times 10^{-2}$)(图 4B);抑制 YY1 的表达后,pGL3-P7 的双荧光素酶活性上调了 0.85 倍($P=2.79\times 10^{-4}$)(图 4C)。pGL3-P7-C/EBP β -Mut 与其野生型相比,双荧光素酶活性上调 1.53 倍($P=2.23\times 10^{-13}$)(图 5A);超表达 C/EBP β 后,pGL3-P7 的双荧光素酶活性下调了 3.49 倍($P=2.03\times 10^{-4}$)(图 5B);抑制 C/EBP β 的表达后,pGL3-P7 的双荧光素酶活性上调了 0.52 倍($P=1.35\times 10^{-2}$)(图 5C)。

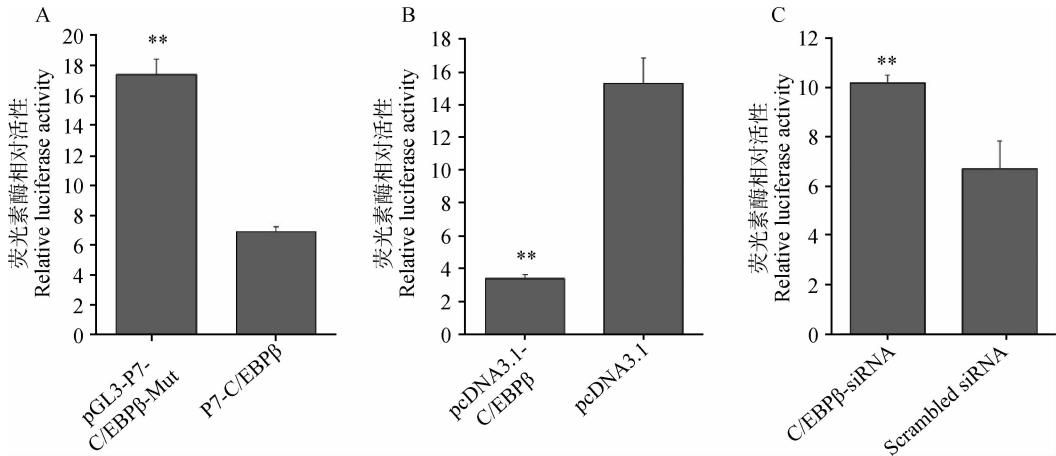


A. YY1 结合位点突变对 *Nhlh2* 启动子活性影响;B. 超表达 YY1 对 *Nhlh2* 启动子活性影响;C. YY1-siRNA 对 *Nhlh2* 启动子活性影响

A. Effects of YY1 binding site mutation on the promoter activity of *Nhlh2*; B. Effects of overexpressed YY1 on the promoter activity of *Nhlh2*; C. Effects of YY1-siRNA on the promoter activity of *Nhlh2*

图 4 YY1 对猪 *Nhlh2* 启动子活性的影响

Fig. 4 Effects of YY1 on the promoter activity of porcine *Nhlh2* gene



A. C/EBP β 结合位点突变对 *Nhlh2* 启动子活性影响;B. 超表达 C/EBP β 对 *Nhlh2* 启动子活性影响;C. C/EBP β -siRNA 对 *Nhlh2* 启动子活性影响

A. Effects of C/EBP β binding site mutation on the promoter activity of *Nhlh2*; B. Effects of overexpressed C/EBP β on the promoter activity of *Nhlh2*; C. Effects of C/EBP β -siRNA on the promoter activity of *Nhlh2*

图 5 C/EBP β 对猪 *Nhlh2* 启动子活性的影响

Fig. 5 Effects of C/EBP β on the promoter activity of porcine *Nhlh2* gene

3 讨 论

大量研究表明,哺乳动物的 *Nhlh2* 参与调控卵泡的成熟、排卵及初情期启动等繁殖活动^[4, 6], *Nhlh2* 可能是影响母猪繁殖活动的重要候选基因。本研究以长大二元杂交母猪卵巢的基因组 DNA 为模板,成功构建了 8 个 *Nhlh2* 基因不同缺失长度的启动子双荧光素酶报告载体,双荧光活性检测结果表明,P7 的启动子活性最高,说明 *Nhlh2* 基因的核心启动子区域为 -238~+129(图 2)。同时,P7 的启动子活性是 P6 的 2.24 倍、P8 的 10.57 倍,表明 -654~-238 片段范围可能存在负调控元件,而 -238~-20 区域可能存在正调控元件(图 2)。另外,P8 的启动子活性与 pGL3-basic 空载体相近,因此 P8 可能无启动子活性。

生物信息学分析表明,*Nhlh2* 启动子区 -101~-85 和 -153~-140 区域分别是转录因子 YY1、C/EBP β 的潜在结合位点。本试验利用 ChIP 技术验证了转录因子 YY1 和 C/EBP β 结合在 *Nhlh2* 基因核心启动子区域(图 3)。双荧光素酶活性检测结果显示,pGL3-P7-YY1-Mut 与野生型相比,双荧光素酶活性显著上调;超表达 YY1 后,pGL3-P7-YY1 的双荧光素酶活性显著下调,抑制 YY1 的表达后,pGL3-P7-YY1 的双荧光素酶活性显著上调。同时,pGL3-P7-C/EBP β -Mut 与野生型相比,双荧光素酶活性显著上调,超表达 C/EBP β 后,pGL3-P7-C/EBP β 的双荧光素酶活性显著下调,抑制 C/EBP β 的表达后,pGL3-P7-C/EBP β 的双荧光素酶活性显著上调,这些结果表明,转录因子 YY1、C/EBP β 结合在 *Nhlh2* 基因启动子上抑制其转录活性。

研究表明,转录因子 YY1 通过结合在 *Kiss1* 基因的启动子上,参与并调控下丘脑 GnRH 的分泌,进而影响雌性动物初情期启动^[14-15]。YY1 突变雌性个体表现出发情启动失败、无性行为、不育^[16],并且在卵母细胞和颗粒细胞之间的信号传导中扮演重要角色,参与调控卵泡颗粒细胞的生长发育与卵母细胞成熟^[17-18]。更重要的是,在哺乳动物初情期启动过程中,YY1 结合在大量表达上调基因的启动子上^[19]。转录因子 C/EBP β 是一类结合于 DNA 增强子区域的多功能反式作用因子,其也和卵巢卵泡的发育密切相关^[20-21]。研究表明,特异性敲除卵巢颗粒细胞 C/EBP β 后,卵泡发育停滞,无法发生排卵和形成黄体^[22]。同时,研究发现,C/EBP β 调控卵巢雌

激素和孕酮的合成^[23-24],如果抑制卵巢 C/EBP β 的表达,将引起小鼠的排卵异常^[25],导致小鼠无生育能力^[26]。C/EBP β 也可以调节瘦素受体基因的表达,进而调节小鼠排卵^[27]。这些研究结果表明,YY1 和 C/EBP β 参与调控哺乳动物卵泡的成熟、排卵及初情期启动等繁殖活动,也佐证了 *Nhlh2* 可能是影响母猪繁殖活动的重要候选基因。

4 结 论

本研究通过构建猪 *Nhlh2* 启动子缺失片段报告基因系统,发现 *Nhlh2* 基因的核心启动子区域为 -238~+129,-654~-238 片段范围可能存在负调控元件,而 -238~-20 区域可能存在正调控元件;转录因子 YY1、C/EBP β 结合在 *Nhlh2* 基因启动子上抑制其转录活性。本研究为后续母猪 *Nhlh2* 基因的结构和功能研究提供了分子基础。

参考文献(References):

- [1] GÖBEL V, LIPKOWITZ S, KOZAK C A, et al. NSCL-2: a basic domain helix-loop-helix gene expressed in early neurogenesis[J]. *Cell Growth Differ*, 1992, 3(3): 143-148.
- [2] HERBISON A E, PORTEOUS R, PAPE J R, et al. Gonadotropin-releasing hormone neuron requirements for puberty, ovulation, and fertility[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(2): 597-604.
- [3] KRÜGER M, RUSCHKE K, BRAUN T. NSCL-1 and NSCL-2 synergistically determine the fate of GnRH-1 neurons and control *neclin* gene expression[J]. *EMBO J*, 2004, 23(21): 4353-4364.
- [4] GOOD D J, PORTER F D, MAHON K A, et al. Hypogonadism and obesity in mice with a targeted deletion of the *Nhlh2* gene[J]. *Nat Genet*, 1997, 15(4): 397-401.
- [5] COGLIATI T, DELGADO-ROMERO P, NORWITZ E R, et al. Pubertal impairment in *Nhlh2* null mice is associated with hypothalamic and pituitary deficiencies[J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(12): 3013-3027.
- [6] JOHNSON S A, MARÍN-BIVENS C L, MIELE M, et al. The *Nhlh2* transcription factor is required for female sexual behavior and reproductive longevity[J]. *Horm Behav*, 2004, 46(4): 420-427.
- [7] NONNEMAN D, LENTS C, ROHRER G, et al. Genome-wide association with delayed puberty in swine[J]. *Anim Genet*, 2014, 45(1): 130-132.

- [8] TSUNODA T, TAKAGI T. Estimating transcription factor bindability on DNA [J]. *Bioinformatics*, 1999, 15(7-8): 622-630.
- [9] MATHELIER A, FORNES O, ARENILLAS D J, et al. JASPAR 2016: a major expansion and update of the open-access database of transcription factor binding profiles [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44 (D1): D110-D115.
- [10] 高萍, 钟玉宜, 张爱玲. 母猪卵巢颗粒细胞的分离培养及鉴定 [J]. 广东农业科学, 2014, 41(4): 131-135.
GAO P, ZHONG Y Y, ZHANG A L. Separation, culture and identification of sow ovarian granulosa cells [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(4): 131-135. (in Chinese)
- [11] LIU J Y, DU X, ZHOU J L, et al. MicroRNA-26b functions as a proapoptotic factor in porcine follicular Granulosa cells by targeting Sma-and Mad-related protein 4 [J]. *Biol Reprod*, 2014, 91(6): 146.
- [12] GADE P, KALVAKOLANU D V. Chromatin immunoprecipitation assay as a tool for analyzing transcription factor activity [M]//VANCURA A. Transcriptional Regulation: Methods and Protocols. New York, NY: Springer, 2012: 85-104.
- [13] RODRÍGUEZ-UBREVA J, BALLESTAR E. Chromatin immunoprecipitation [M]//STOCKERT J C, ESPADA J, BLÁZQUEZ-CASTRO A. Functional Analysis of DNA and Chromatin. Totowa, NJ: Humana Press, 2014: 309-318.
- [14] MUELLER J K, KOCH I, LOMNICZI A, et al. Transcription of the human *EAP1* gene is regulated by upstream components of a puberty-controlling Tumor Suppressor Gene network [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 351(2): 184-198.
- [15] ROTH C L, MASTRONARDI C, LOMNICZI A, et al. Expression of a tumor-related gene network increases in the mammalian hypothalamus at the time of female puberty [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(11): 5147-5161.
- [16] GRIFFITH G J, TRASK M C, HILLER J, et al. Yin-yang1 is required in the mammalian oocyte for follicle expansion [J]. *Biol Reprod*, 2011, 84(4): 654-663.
- [17] MAALOUF S W, SMITH C L, PATE J L. Changes in MicroRNA expression during maturation of the bovine corpus luteum: regulation of luteal cell proliferation and function by microRNA-34a [J]. *Biol Reprod*, 2016, 94(3): 71.
- [18] SANDISON H E, USHER S, KARIMIANI E G, et al. PLK1 and YY1 interaction in follicular lymphoma is associated with unfavourable outcome [J]. *J Clin Pathol*, 2013, 66(9): 764-767.
- [19] MANDAL K, BADER S L, KUMAR P, et al. An integrated transcriptomics-guided genome-wide promoter analysis and next-generation proteomics approach to mine factor(s) regulating cellular differentiation [J]. *DNA Res*, 2017, 24(2): 143-157.
- [20] NALBANT D, WILLIAMS S C, STOCCO D M, et al. Luteinizing hormone-dependent gene regulation in Leydig cells may be mediated by CCAAT/enhancer-binding protein- β [J]. *Endocrinology*, 1998, 139(1): 272-279.
- [21] STERNECK E, TESSAROLLO L, JOHNSON P F. An essential role for C/EBP β in female reproduction [J]. *Genes Dev*, 1997, 11(17): 2153-2162.
- [22] FAN H Y, LIU Z L, JOHNSON P F, et al. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)- α and - β are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes [J]. *Mol Endocrinol*, 2011, 25(2): 253-268.
- [23] ZHEN Y H, WANG L, RIAZ H, et al. Knockdown of CEBP β by RNAi in porcine granulosa cells resulted in S phase cell cycle arrest and decreased progesterone and estradiol synthesis [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 143: 90-98.
- [24] CHRISTENSON L K, JOHNSON P F, MCALLISTER J M, et al. CCAAT/enhancer-binding proteins regulate expression of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(37): 26591-26598.
- [25] PALL M, HELLBERG P, BRÄNNSTRÖM M, et al. The transcription factor C/EBP- β and its role in ovarian function; evidence for direct involvement in the ovulatory process [J]. *EMBO J*, 1997, 16(17): 5273-5279.
- [26] REN Y A, LIU Z L, MULLANY L K, et al. Growth Arrest Specific-1 (GAS1) is a C/EBP target gene that functions in ovulation and corpus luteum formation in mice [J]. *Biol Reprod*, 2016, 94(2): 44.
- [27] DUPUIS L, SCHUERMAN Y, COHEN T, et al. Role of leptin receptors in granulosa cells during ovulation [J]. *Reproduction*, 2014, 147(2): 221-229.