

鹅 $LXR\alpha$ 基因的克隆及填饲对其 mRNA 水平的影响

韩春春, 黄晓宇, 王继文*

(四川农业大学畜禽品种资源发掘与利用重点实验室, 雅安 625014)

摘要: 为了研究填饲对 $LXR\alpha$ mRNA 表达水平的影响, 本试验以四川白鹅和朗德鹅为试验对象, 通过 RT-PCR 方法克隆了鹅肝脏 X 受体 α ($LXR\alpha$) 基因部分序列, 并采用 SYBR-Green 法研究了填饲对 $LXR\alpha$ 基因在肝脏和脂肪组织中转录水平的影响。结果获得了 1 005 bp 的鹅 $LXR\alpha$ 部分序列, 且与其它物种有较高的相似性, 但存在 8 个氨基酸变异位点。 $LXR\alpha$ 基因在肝脏、腹脂和皮脂中都有表达, 但在肝脏中的表达量最高。填饲引起鹅皮脂、腹脂和肝脏的 $LXR\alpha$ mRNA 表达丰度的显著增加。对照组中, $LXR\alpha$ 在朗德鹅肝中的表达量高于四川白鹅($P < 0.05$), 而在皮脂、腹脂中朗德鹅的表达量低于四川白鹅($P < 0.05$)。填饲组, 在肝和腹脂中 $LXR\alpha$ 的表达量四川白鹅显著高于朗德鹅($P < 0.05$), 皮脂中表达量品种间差异不显著。填饲后 $LXR\alpha$ mRNA 表达丰度与皮脂、腹脂和肝脏的相对质量呈显著正相关, 并且朗德鹅的相关性要强于四川白鹅。结论: 填饲引起鹅肝脏和脂肪组织的 $LXR\alpha$ mRNA 表达丰度的显著增加, 填饲对 $LXR\alpha$ mRNA 表达的影响存在显著的品种差异。

关键词: 鹅; 填饲; $LXR\alpha$; 基因克隆; mRNA 表达

中图分类号: S835; Q756

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)09-1405-05

Cloning of Goose $LXR\alpha$ Gene and the Effect of Overfeeding on Its mRNA Level

HAN Chun-chun, HUANG Xiao-yu, WANG Ji-wen*

(Key Lab of Animal Genetic Resources Exploitation and Utilization, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: To understand the effect of overfeeding on $LXR\alpha$ mRNA level, the Landes goose and Sichuan White goose were used to clone the partial gene sequence of Liver X Receptor α ($LXR\alpha$) by RT-PCR, and the effect of overfeeding on the transcriptional level of $LXR\alpha$ in liver and adipose tissues was researched by SYBR-Green in this study. The result indicated that the obtained $LXR\alpha$ gene sequence was 1 005 bp, and had high similarity with other species. There were 8 amino acid variation sites. The mRNA expression of $LXR\alpha$ gene was detected in liver, abdominal adipose and subcutaneous adipose tissues of two breeds, while its expression level was the highest in liver. Overfeeding significantly increased the mRNA expression of $LXR\alpha$ gene in the three detected tissues. In control group, the mRNA level of $LXR\alpha$ in liver of Landes goose was significantly higher than that of Sichuan White goose, but the mRNA level of $LXR\alpha$ in abdominal adipose and subcutaneous adipose tissues of Landes goose was significantly lower than that of Sichuan White goose. In overfeeding group, the mRNA level of $LXR\alpha$ in liver and abdominal adipose tissues of Sichuan White goose was significantly higher than that of Landes goose, but there was no significant difference at the mRNA level of subcutaneous adipose tissues between the two breeds. The mRNA abundance of $LXR\alpha$ was positively correlated to the relative weight of liver, abdominal adipose and subcutaneous adipose tissues after overfeeding, and the correlation in Landes goose was stronger than that in Sichuan White goose. It was concluded that overfeeding induced the significant increase of $LXR\alpha$ mRNA level in goose liver and adipose tissues, and the effect of o-

收稿日期: 2008-08-05

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2008BADB2B08)

作者简介: 韩春春(1980-), 女, 山东安丘人, 博士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: chunchunhai_510@163.com

* 通讯作者: 王继文, E-mail: wjw2886166@163.com

verfeeding was difference between the two breeds.

Key words: goose; overfeeding; *LXR α* ; gene clone; mRNA expression

肝脏 X 受体 (Liver x-activate receptors α , *LXR α*) 是核受体超家族的成员之一,也是重要的脂质传感器,在一些脂肪代谢旺盛的组织中如肝脏、小肠、心脏中大量存在,通过其相应的配体过氧化物酶增殖受体 (PPAR) 或维甲酸 X 受体 (RXR) 等形成异二聚体,然后在特定的激活剂 (氧化固醇类) 的激活下调控靶基因的转录,从而影响机体内脂类和糖类物质的代谢^[1]。*LXR α* 的过度表达会使脂肪合成相关酶的基因转录明显加强,造成肝脏脂质积聚,引起脂肪变性^[2]。填饲不仅能诱发大量脂肪沉积于肝脏中,也能增加肝外组织的脂肪沉积,但肝脏及肝外组织的脂肪沉积在不同物种、品种内,甚至同品种内不同个体间都表现出明显的差异^[3-4]。

本试验以产肝性能较好的朗德鹅和产肝性能中等的四川白鹅为试验材料,研究鸟类 *LXR α* cDNA 序列的结构特征和变异特点,检测填饲对 *LXR α* 在肝脏和脂肪组织中的表达水平,分析 *LXR α* 表达量与肝脏和脂肪组织中脂肪沉积间的关系,为进一步探讨 *LXR α* 在肝脏和脂肪组织脂肪沉积中的作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验动物

选用 54 只朗德鹅 (*Anser anser*) 和 57 只四川白鹅 (*Anser cygnoides*) 公鹅作为试验群体。2 个品种均分为对照组和填饲组,14 周龄开始填饲,填饲 2 周,根据单位体质量填饲等量饲料 (平均 $25 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1} \cdot 100 \text{ g BW}^{-1}$) 对朗德鹅与四川白鹅进行填饲。填饲期间单笼饲养,整个饲养期间自由饮水。

1.2 各组织相对质量测定及样品采集

当填饲结束时,对填饲组与对照组的鹅称重,整夜禁食,自由饮水。第 2 天清早进行屠宰。屠宰放血后立即剖腹,取肝脏,皮下脂肪 (皮脂) 和腹部脂肪组织 (腹脂),迅速取 50~100 mg 大小的组织块,于液氮速冻后 $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存以备抽提 RNA; 之后进行屠宰测定。

1.3 基因克隆

根据其它动物的同源保守序列合成了下列 1 对引物:上游 $5' \text{-ACAAGTCCTCAGGCTTCCACTA-CA-3'}$; 下游 $5' \text{-GGTCACTCATCCACATCCCA-GA-3'}$ 。取 $3 \text{ } \mu\text{g}$ 总 RNA,根据 AMV 使用说明进

行 RT 反应,PCR 反应条件: $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $58 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min; $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离, DNA 经纯化回收试剂盒纯化后与 pGEM-T 载体连接,进行克隆测序。

1.4 基因表达分析

以 18S 作为对照,采用 SYBR-Green 法对 *LXR α* mRNA 表达量进行定量分析。反应体系为 $25 \text{ } \mu\text{L}$: SYBR-Green qPCR MIX $12.5 \text{ } \mu\text{L}$, 上下游引物各 $0.5 \text{ } \mu\text{L}$, 模版 cDNA $2 \text{ } \mu\text{L}$, ddH₂O 补足 $25 \text{ } \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 然后 $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $62 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min 共 40 个循环,每个循环后采集荧光生成扩增曲线, $62 \sim 92 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 缓慢升温,产生熔解曲线。试验对所有样本进行 3 个重复测定,并在每次试验时设阴性对照。根据本实验室扩增得到的鹅 *LXR α* (EF635218) 序列设计引物,上下游引物分别为: $5' \text{-CCCAGCCCTTCCCACAAACT-3'}$, $5' \text{-CCCAGCCCTTCCCACAAACT-3'}$; 18S 上下游引物分别为: $5' \text{-TTGGTGGAGCGATTTGTC-3'}$, $5' \text{-ATCTCGGGTGGCTGAACG-3'}$ 。参照 Livak 和 Schmittgen 的方法^[5],用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法度量目标基因的 mRNA 相对表达水平,以 18S 为内标基因进行标准化。

1.5 数据分析

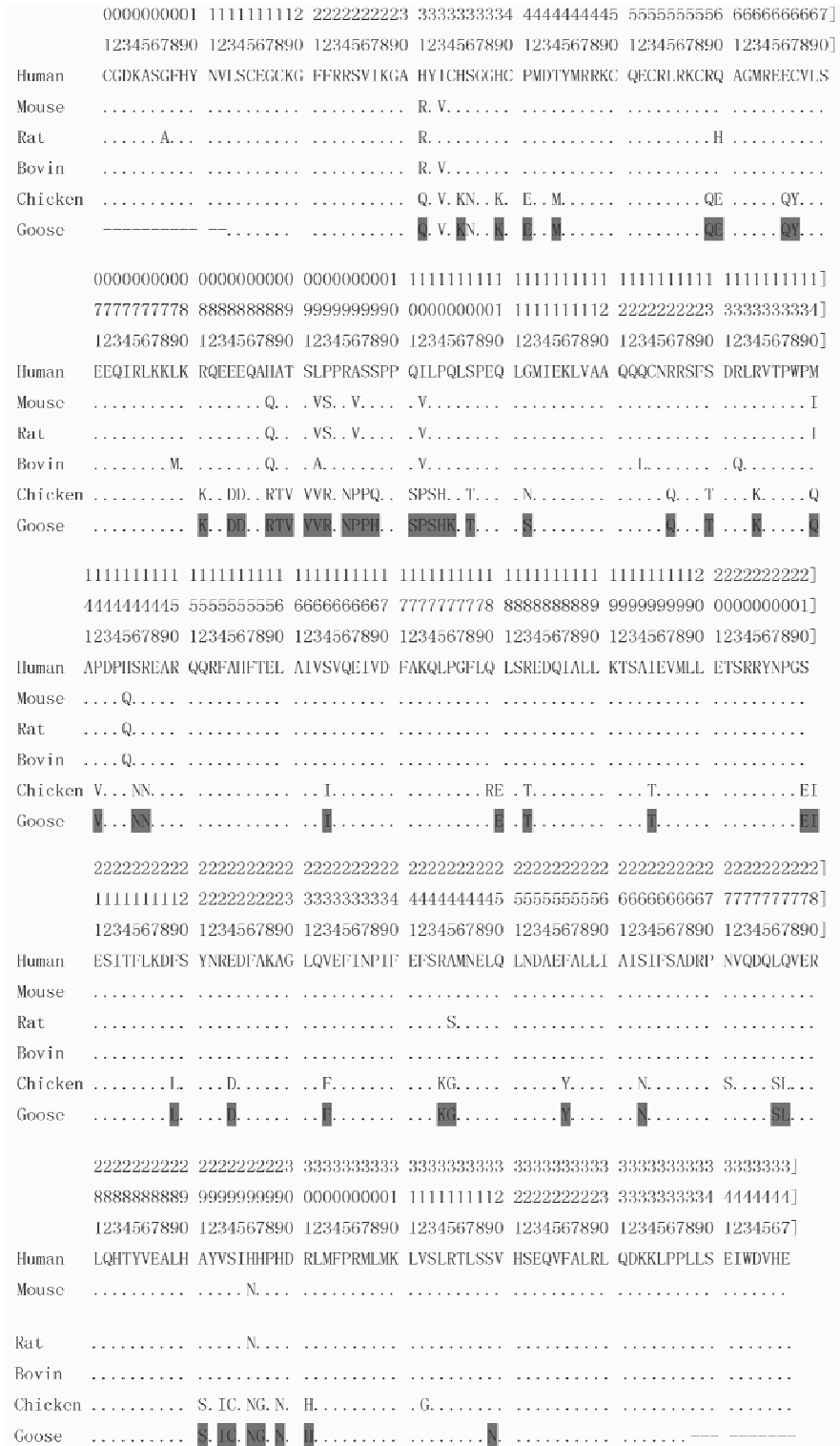
利用 SASv6.12 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 *t*-test 检验差异显著性。

2 结果

2.1 序列分析

对阳性克隆质粒进行测序分析,鹅 *LXR α* 基因的部分 cDNA 序列被克隆并证实,该 cDNA 长约 1 000 bp (EF635218)。序列比对结果显示,所测的鹅 *LXR α* 基因与哺乳动物此基因的同源性达到 74% 以上,与鸡的高达 95.2%。对鹅 *LXR α* 基因推导的氨基酸序列与人、原鸡、野猪和小鼠的同源性分别为 81%、98%、81% 和 82%。鹅与鸡的氨基酸序列间共有 8 个变异位点;鸟类和哺乳类有 41 个变异位点,与哺乳动物的氨基酸序列间有 67 个变异位点 (图 1)。在鹅和原鸡的变异位点中,其中极性与非极性氨基酸的变化发生在第 412 位;带正电荷与不带电荷氨基酸变化发生在第 198、205 和 397 位;不带电荷氨基酸的相互变化发生在第 212、371 和 419

位;在第 279 位发生了正电荷氨基酸代替非极性氨基酸。



数字表示氨基酸残基位置, · 表示高度保守区, 阴影表示鹅与其它物种不同的氨基酸残基
Numbers indicate the residue positions; Amino acids very highly conserved in these species are indicated as dot; The different residue positions between goose and human are shaded

图 1 鹅与其它物种 LXR α 基因氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment among goose and others species of LXR α gene

2.2 填饲对 *LXRα* 基因表达的影响

如表 1 所示, *LXRα* 基因在鹅肝、皮脂、腹脂中都有表达, 填饲引起 *LXRα* 基因在 3 种组织中的表达都明显增加。对照组中, *LXRα* 在朗德鹅肝中的

表达量高于四川白鹅 ($P < 0.05$), 而在朗德鹅皮脂、腹脂中的表达量低于四川白鹅 ($P < 0.05$)。填饲组中, 在肝和腹脂中 *LXRα* 的表达量四川白鹅要高于朗德鹅 ($P < 0.05$), 皮脂中表达量差异不显著。

表 1 填饲对 *LXRα* 基因表达的影响

Table 1 Effect of overfeeding on *LXRα* mRNA expression

组织 Tissue	对照组 Control group		填饲组 Overfed group	
	朗德鹅 (n=8)	四川白鹅 (n=9)	朗德鹅 (n=8)	四川白鹅 (n=10)
	Landes goose	Sichuan White goose	Landes goose	Sichuan White goose
肝脏 Liver	1.000 ± 0.114*	0.877 ± 0.094	2.123 ± 0.145 ^{○○}	2.397 ± 0.241 ^{○*}
皮脂 Subcutaneous adipose tissue	0.390 ± 0.072	0.832 ± 0.063**	1.629 ± 0.113 ^{○○}	1.514 ± 0.106 ^{○○}
腹脂 Abdomen adipose tissue	0.515 ± 0.011	0.864 ± 0.027**	0.969 ± 0.061 [○]	1.786 ± 0.120 ^{○*}

、 * . 分别表示同一处理中两品种间在 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 水平上的差异; ○、○○. 分别表示同一品种鹅中填饲效应在 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 水平上的差异

、 * . Difference between two breeds at $P < 0.05$ or $P < 0.01$, respectively; ○, ○○. Effect of overfeeding at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively

2.3 *LXRα* 基因表达与脂肪组织相对质量间的关系

表 2 表明, *LXRα* mRNA 的表达丰度与腹脂

率、皮脂率和肝重率在 2 个品种中都表现出明显正相关。朗德鹅的相关性要强于四川白鹅 ($P < 0.05$)。

表 2 填饲后 *LXRα* mRNA 表达与各组织相对质量相关分析

Table 2 Correlation analysis between *LXRα* mRNA abundance and relative weight of several tissues

品种 Breed	腹脂率/%BW	皮脂率/%BW	肝重率/%BW
	Proportion of abdomen	Proportion of subcutaneous	Proportion of
	adipose tissue weight	adipose tissue weight	liver weight
四川白鹅 (n=10) Landes goose	0.429*	0.413*	0.472**
朗德鹅 (n=8) Sichuan White goose	0.489*	0.473*	0.492*

、 * . 分别表示相关系数在 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 水平上的差异

、 * . Difference of correlative coefficient at $P < 0.05$ or $P < 0.01$, respectively

3 讨论

本研究通过 RT-PCR 方法获得长度为 1 005 bp 的鹅 *LXRα* 基因部分序列, 编码 325 个氨基酸, 鹅与其它物种的 *LXRα* 基因具有很高的序列同源性, 与原鸡 *LXRα* 基因的同源性大于其它哺乳类动物, 有 8 处氨基酸的变异, 包含了极性、非极性、带正电荷和不带电荷氨基酸的替换, Svensson 等研究认为, 当人 *LXRα* 基因的 E267、H421、W443 发生突变时, 会影响 *LXRα* 功能的发挥^[6]。鹅 *LXRα* 基因的这 3 个位点在物种间高度保守, 没有发生突变。在原鸡和鹅中发生的 8 个氨基酸位点的变异是否会影响 *LXRα* 基因在不同物种中的功能仍需进一步的研究。

LXRα 在不同组织中存在一定的表达特异性, 在与脂代谢密切相关的组织中表达量较高, 在肝脏中表达最高^[7], 这与肝脏中活跃的脂质代谢有关。本研究中得到了类似的结果, 无论是朗德鹅还是四川白鹅, *LXR* 均在肝脏中的表达量最高, 在皮脂和腹脂中也有较高的表达。 *LXRα* 可以通过调节生酯酶基因的表达诱导机体脂肪酸合成增加^[8-9], 因此填饲对 *LXRα* 基因表达的调节可能与填饲引起的脂肪沉积变化有关。填饲后鹅皮脂、腹脂和肝脏的 *LXRα* mRNA 表达丰度显著增加, 但不同的组织填饲效应不同, 这与填饲导致的各组织的脂肪沉积增加相一致, *LXRα* 基因表达与各组织相对质量间明显的相关性证明了这点。研究表明填饲引起朗德鹅

强烈的肝内脂肪沉积,而四川白鹅的脂肪组织发育更为明显^[10]。填饲引起的 LXR α mRNA 表达量的增加在肝脏中最明显,这可能与水禽肝脏脂肪沉积能力尤为强大有关。LXR α 基因在 2 个品种鹅中的基因表达情况不同,LXR α 基因表达量与各组织相对质量的相关性也存在品种差异,说明填饲对 LXR α 基因转录影响的品种差异与填饲诱导的 2 品种不同的脂肪沉积能力有关。

目前研究认为 LXR α 在特异激活剂(如胆固醇氧化物或类似物)的作用下其 mRNA 表达丰度增加^[11],美国 Scripps 研究所的科学家们研究发现,LXR α 能够被葡萄糖激发,起到食物传感器的作用,并能协调人体对营养物质的反应和控制与脂肪代谢相关基因的表达^[12],导致过量的葡萄糖被转变为甘油三酯并储存在肝脏,并促使肝脏向血液循环中释放甘油三酯^[13],从而诱导脂肪组织中脂肪酸合成增加。因此填饲高能碳水化合物能诱导鹅肝脏和脂肪组织中 LXR α 表达量的显著增加,从而导致鹅肝脏及脂肪组织相对质量的显著增长。

4 结 论

LXR α 基因在朗德鹅和四川白鹅德肝脏、皮脂和腹脂中均有表达,且在肝脏中表达量最高。填饲引起的 LXR α mRNA 表达量的变化在不同组织和不同品种存在差异,并且填饲效应与脂肪沉积特性相一致。

参考文献:

- [1] SCHULTZ J R, TU H, LUK A, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis [J]. *Genes & Develop*, 2000, 14: 2831-2838.
- [2] SASWATA TF, BRADLEY H. The mechanisms mediate the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase gene transcription by the liver X receptor agonist T-0901317 [J]. *J Lipid Res*, 2006, 47: 2451-2461.
- [3] BÉNARD G, LABIE C. Evolution histologique du foie des palmipèdes au cours du gavage [A]. The 3èmes Journées de la recherche sur les Palmipèdes à Foie gras [C]. Bordeaux, ITAVI, 1998.
- [4] IJAZ S, YANG W, WINSLET MC, et al. Impairment of hepatic microcirculation in fatty liver [J]. *Microcirculation*, 2003, 10(6):447-456.
- [5] LIVAK K J, SEHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} Method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [6] SVESSON S, ÖSTBERG T, JACOBSSON F M, et al. Crystal structure of the heterodimeric complex of LXR α and RXR β ligand-binding domains in a fully agonistic conformation [J]. *The EMBO Journal*, 2003, 22(18):4625-4633.
- [7] GORDON A F, ELISABETH F, JOHAN A. Nuclear Receptors and the control of meat metabolism [J]. *Ann Rev Physiol*, 2003, 65:261-311.
- [8] CHAWLA A, BOISVERT WA, LEE CH, et al. A PPAR γ -LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis [J]. *Mol Cell*, 2001, 7: 161-171.
- [9] DARIMONT C, AVANTI O, ZBINDEN I, et al. Liver X receptor preferentially activates de novo lipogenesis in human preadipocytes [J]. *Biochimie*, 2006, 88: 309-318.
- [10] HAN C C, WANG J W, XU H Y, et al. Effect of overfeeding on plasma parameters and mRNA expression of genes associated with hepatic lipogenesis in goose [J]. *J Anim Sci*, 2008, 21: 590-595.
- [11] WATANABE Y, JIANG S, TAKABE W, et al. Expression of the LXR alpha protein in human atherosclerotic lesions [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25:622-625.
- [12] LAFFITTE B A, CHAO L C, LI J, et al. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(9): 5419-5424.
- [13] GREFHORST A, VAN DIJK T H, HAMMER A, et al. Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice [J]. *Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 289(5): 829-838.