

绵羊诱导细胞凋亡的DFF45样效应因子c基因(*CIDEc*)克隆及其在持续饥饿条件下阿勒泰羊尾脂组织中的差异表达

高磊 许瑞霞 赵伟利 杨井泉 梁耀伟 刘守仁 沈敏* 王新华*

新疆农垦科学院 畜牧兽医研究所/新疆兵团绵羊繁育生物技术重点实验室, 石河子 832000

*通讯作者, wangxinhua5751@163.com; shenmin0993@sina.com

摘要 诱导细胞凋亡的DFF45样效应因子c (cell death-inducing DFFA-like effector c, *CIDEc*)与脂肪分化密切相关,具有促进脂肪沉积的作用。本研究利用PCR技术克隆了绵羊(*Ovis aries*) *CIDEc*基因,并对其序列进行生物信息学分析;采用半定量RT-PCR方法检测了该基因在绵羊主要组织中的表达;同时利用实时荧光定量PCR技术检测了持续饥饿与充足采食状态下阿勒泰羊尾脂*CIDEc*的差异表达情况。研究表明,获得了绵羊*CIDEc*基因的cDNA序列(GenBank登录号: KM199684),其中编码区(coding sequences, CDS)全长714 bp,编码237个氨基酸。经预测*CIDEc*蛋白存在多个磷酸化位点和蛋白激酶C磷酸化位点。半定量RT-PCR结果显示,*CIDEc*仅在阿勒泰羊脂肪组织中表达,其中在尾脂中高丰度表达,而在肠系膜脂肪中表达丰度较低。经过持续4周的完全禁食后,*CIDEc*在阿勒泰羊尾脂组织中表达急剧下降,表达量极显著低于正常充足采食状态($P < 0.01$)。表明该基因在阿勒泰羊尾脂沉积过程中具有一定的调控作用。研究结果为进一步揭示*CIDEc*基因在绵羊尾脂组织中的功能提供了参考资料。

关键词 阿勒泰羊,持续饥饿,尾脂,诱导细胞凋亡的DFF45样效应因子c (*CIDEc*),表达分析

Cloning of Sheep Cell Death-inducing DFFA-like Effector c (*CIDEc*) cDNA and Its Differential Expression in Tail Fat Tissue of Altay Sheep (*Ovis aries*) in Persistent Starvation

GAO Lei XU Rui-Xia ZHAO Wei-Li YANG Jing-Quan LIANG Yao-Wei LIU Shou-Ren SHEN Min* WANG Xin-Hua*

Key Laboratory of Sheep Breeding and Development Technology of Xinjiang Production and Construction Crops/Animal Husbandry and Veterinary Institute, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, China

*Corresponding authors, wangxinhua5751@163.com; shenmin0993@sina.com

Abstract Cell death-inducing DFFA-like effector c (*CIDEc*) is related closely to adipose differentiation and promoting fat deposition. In this study, sheep (*Ovis aries*) *CIDEc* cDNA was cloned by PCR and analyzed by bioinformatics. Expression profiles of *CIDEc* in different tissues of sheep were detected by semi-quantitative RT-PCR. The expression levels of *CIDEc* in tail fat tissue after persistent starvation in Altay sheep was determined by Real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The result showed that the coding sequences (CDS) of sheep *CIDEc* gene was 714 bp and encoded 237 amino acids (GenBank accession No. KM199684). Bioinformatic analysis indicated that multiple phosphorylation and protein kinase C sites existed in the

基金项目:国家基础研究发展计划(973)前期专项项目(No. 2011CB111501)、国家自然科学基金新疆联合基金重点项目(No. U1130302)和新疆农垦科学院青年科学基金(No. YQJ201315)

收稿日期:2014-07-29 接受日期:2014-08-21

secondary structure of sheep *CIDE*C protein. The RT-PCR results confirmed that *CIDE*C mRNA expressed in adipose tissue only, and the expression level was much higher in tail fat than that in esenteric fat. After persistent starvation and fasting for 4 weeks, the expression of *CIDE*C in tail fat of Altay sheep decreased sharply, its level was very significantly lower than that in normal food-intake sheep ($P < 0.01$). Taken together, these results demonstrated that *CIDE*C might play an important role in the process of tail fat deposition. In conclusion, this work serves as the basis for further study on *CIDE*C in the tail fat of sheep.

Keywords Altay sheep, Persistent starvation, Tail fat, Cell death-inducing DFFA-like effector c (*CIDE*C), Expression analysis

脂肪是动物机体的重要组成成分,参与各种生命活动并为其提供能量保障。目前已在哺乳动物中陆续发现了多个调控脂肪代谢的转录因子(PPARs, KLF9, PRDM16, SMAD, TGF- β , C/EBPs, CIDEA, CIDEB, *CIDE*C等),这些转录因子对促进/抑制不同阶段脂肪细胞分化具有重要的作用(Mori et al., 2005; Banerjee et al., 2003; Tong et al., 2000)。其中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor, PPAR γ)、转录因子CCAAT/增强子结合蛋白 α (CCAAT/enhancer-binding protein α , C/EBP α)已被证明是控制脂肪细胞分化的主效因子(Wu et al., 1999; Wu et al., 1995; 韦璇等, 2014)。对哺乳动物脂肪相关因子初步研究表明,转录因子CCAAT/增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein, C/EBP)、偶联蛋白1(uncoupling protein 1, UCP1)、诱导细胞凋亡的DFF45样效应因子a(cell death-inducing DFFA-like effector A, CIDEA)、PPAR α/γ 、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子1(peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1, PGC1)、正性调控域16(PR domain-containing 16, PRDM16及诱导细胞凋亡的DFF45样效应因子c(cell death-inducing DFFA-like effector c, *CIDE*C)等在脂肪组织中特异性表达,并以正/负反馈方式调控脂肪细胞的分化(Seale et al., 2007; Toh et al., 2008),提示这些脂肪因子通过调节脂肪沉积和代谢,在整个机体能量内环境稳定中发挥了一定作用,是哺乳动物脂肪组织发育调控过程重要的候选基因。

*CIDE*C (*CIDE*3; 亦称FSP27)属于诱导细胞凋亡的DFF45样效应因子(cell death inducing factor DFFA like effector, CIDE)家族成员之一,是一种脂滴蛋白(Li et al., 2009)。研究表明,*CIDE*C基因在小鼠(*Mus musculus*)脂肪组织及成熟的脂肪细胞系(3T3-L1和TA1等)中特异性表达,起到抑制脂肪分

解促进脂肪细胞甘油三酯沉积的作用(Danesch et al., 1992; Nishino et al., 2008; Keller et al., 2008);缺失*CIDE*C基因的哺乳动物具有瘦表型、高耗能和胰岛素拮抗等特点,推测*CIDE*C基因在脂质贮积、脂滴形成及脂肪分解方面起到关键作用(Nishino et al., 2008; Gong et al., 2009)。Karbowska等(2012)研究显示,长期处于间歇性禁食的大鼠(*Rattus norvegicus*)白色脂肪中*CIDE*C表达水平和血清胰岛素水平呈显著升高趋势,并伴随PPAR γ 2和C/EBP α 表达水平上升,推测PPAR γ 2、C/EBP α 及胰岛素以级联调控*CIDE*C的方式参与哺乳动物的营养调控;利用PPAR γ 活化剂处理大鼠脂肪组织之后,*CIDE*C表达水平显著升高,提示动物机体在低热量情况下能够激活脂质中*CIDE*C基因的表达,促进白色脂肪中甘油三酯的沉积。Li等(2010)研究发现,棕色脂肪组织特异性标志基因(如:CEBP α/β 和PRDM16等)在缺失*CIDE*C或*CIDE*C/*Leptin*(瘦素)的小鼠白色脂肪组织中表达量均显著上升,白色脂肪组织特异性标志基因则呈下降趋势。提示*CIDE*C可能作为脂肪组织分子网络调控中心,在维持哺乳动物白色和棕色脂肪组织特性方面扮演重要的角色。

上述研究结果表明,*CIDE*C在哺乳动物氧化磷酸化、脂肪酸合成和脂肪酸氧化等多种代谢途径方面可能发挥了重要作用,但对于其确切的网络调控机制目前尚不清楚。目前针对该基因在绵羊(*Ovis aries*)中的组织表达谱,以及在绵羊脂肪沉积中的作用尚未有相关研究报道。阿勒泰羊(Altay sheep)是一种脂臀型绵羊品种,主要通过尾部脂肪沉积与代谢消长规律适应恶劣的环境以达到维持机体正常的新陈代谢和体温,是研究绵羊尾脂沉积机理的理想模型。本研究以阿勒泰羊为研究对象,通过模拟其在夏秋季节脂肪沉积、春冬季节水草匮乏时的尾脂代谢方式,进行饥饿试验;利用实时荧光定量

PCR 分析持续饥饿状态下阿勒泰羊尾脂组织 *CIDEc* 的表达变化情况,从分子水平系统研究和阐述绵羊臀脂沉积的生物学本质,为了解阿勒泰羊尾脂沉积与代谢的分子机理积累基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物、饥饿实验及样本采集

2~3 岁健康的阿勒泰母羊(*Ovis aries*)(购于阿勒泰羊种群核心区阿勒泰富蕴县)3 只,在新疆农垦科学院种羊场进行统一饲养。饥饿实验开始前先进行为期 4 周的正常饲喂,期间给予充足的饲料及饮水(单只羊日饲喂量为苜蓿 500 g,棉籽壳 200 g,玉米 200 g,自由饮水)。4 周后测量体重及尾脂体积,并手术采集尾脂组织(左部尾臀)(-20 °C 保存)。对采集部位消毒处理并按上述标准继续饲喂 4 周保证羊体恢复后,开始进行为期两周的限饲:第 1 周饲喂量减半(苜蓿 250 g,棉籽壳 100 g,自由饮水),第 2 周饲喂量减到标准的 1/4(苜蓿 125 g,棉籽壳 50 g,自由饮水)。限饲结束后进行为期 4 周的禁食,期间停止一切饲料供给,只让自由饮水。禁食 4 周后立即测量体重及尾脂体积,并采集尾脂组织(右部尾臀)(-20 °C 保存)。实验期间实时观察实验羊只的精神状况。所采集尾部脂肪组织,液氮保存用于提取总 RNA。

1.1.2 主要试剂

PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、SYBR® Premix Ex *Taq* (2×) (Tli RNaseH Plus) 及 pMD18-T 载体均购自大连宝

生物工程有限公司(大连); *Taq* DNA 聚合酶购于天根生化科技有限公司(北京); DNA 纯化试剂盒购自 Promega 公司(美国); Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司(美国)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及合成

参照 GenBank 公布的牛(*Bos taurus*)*CIEDC* mRNA 序列(登录号: XM_005222498),选取绵羊 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(glyceraldehyde-3-phospho-dehydrogenase, *GAPDH*)为内参基因,采用 Oligo6 软件分别设计引物。引物由 Invitrogen 公司合成,引物信息见表 1。

1.2.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

根据 Trizol Reagent 试剂盒说明书提取尾脂总 RNA,利用核酸蛋白分析仪测定总 RNA 浓度和纯度,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,参照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。

1.2.3 *CIDEc* 基因克隆

PCR 反应总体积 25 μL,其中 cDNA 模板 1 μL、Buffer 2.5 μL、dNTPs 2 μL、上下游引物(10 mmol/L)各 0.5 μL、*Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL、ddH₂O 18 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,切胶回收,连接 pMD18-T 克隆载体,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 感受态细胞,经菌落 PCR 鉴定,挑取阳性单克隆,送往北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。

表 1 绵羊 *CIDEc* 基因克隆与实时荧光定量引物

Table 1 Primers used for *CIDEc* cloning and qRT-PCR

引物名称 Name	引物序列(5'~3') Primer sequences	引物用途 Purpose
<i>CIDEc</i> -L	F: TTTGCCAGTGGGAAGCCTCAG R: GGTCCCATAGAGCTGAGGGAGAT	绵羊 <i>CIDEc</i> 基因克隆 For cloning sheep <i>CIDEc</i>
<i>CIDEc</i> -Ex	F: ATGGAATACGCCAAGAAGTC R: GGATTGGAATACCCTTCTG	<i>CIDEc</i> 基因定量 PCR 引物 Primers of <i>CIDEc</i> in qRT-PCR
<i>GAPDH</i> -Ex	F: CTGACCTGCCGCTGGAGAAA R: GTAGAAGAGTGAGTGTCTGCTGTT	<i>GAPDH</i> 基因定量 PCR 引物 Primers of <i>GAPDH</i> in qRT-PCR

CIDEc: 诱导细胞凋亡的 DFF45 样效应因子 c 基因; *GAPDH*: 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因

CIDEc: Cell death-inducing DFFA-like effector c; *GAPDH*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

1.2.4 生物信息学分析

应用DNAMAN 5.0软件对不同物种 *CIDECD* 基因的核苷酸及氨基酸序列进行同源性比对;利用Mega 5.1软件构建 *CIDECD* 蛋白序列进化树;利用ExPASy-ProtParam和signalP 4.0软件预测绵羊 *CIDECD* 蛋白分子量、等电点以及信号肽等;应用SMART软件分析 *CIDECD* 蛋白的结构域;利用NetPhos 2.0 Serve和NetPhosK 1.0 Server软件分别对 *CIDECD* 蛋白进行磷酸化位点及蛋白激酶C磷酸化位点预测;运用NetOGlyc 4.0和NetNGlyc 1.0软件分析 *CIDECD* 的O糖基化位点和N糖基化位点。

1.2.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测

标准曲线的建立:分别将测序正确的 *GAPDH* 和 *CIDECD* 重组表达质粒进行10倍梯度稀释,选取6~8个稀释浓度,以稀释液为反应模板进行qRT-PCR,建立标准曲线,判断其扩增效率。

qRT-PCR检测:分别以饥饿与非饥饿状态下阿勒泰羊尾脂组织cDNA为反应模板,按照标准曲线扩增体系和条件分别检测 *GAPDH* 和 *CIDECD* 基因,每个样品重复3次。qRT-PCR反应总体系(20 μ L):SYBR[®] Premix Ex (2 \times)(Tli RNaseH Plus) 10 μ L,上下游引物(10 mmol/L)各0.8 μ L,cDNA模板1 μ L,ddH₂O 6.4 μ L。循环条件:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s;58 $^{\circ}$ C 20 s;72 $^{\circ}$ C 20 s,共45个循环。扩增反应结束后,以0.1 $^{\circ}$ C/s的速度进行溶解曲线分析。

数据分析:qRT-PCR结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算饥饿与非饥饿状态下阿勒泰羊尾脂组织 *CIDECD* mRNA水平相对表达量(高磊等,2013)。利用SPSS (18.0)软件对不同条件下阿勒泰羊尾脂组织 *CIDECD* 表达量进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 绵羊 *CIDECD* 基因的克隆

所提取的阿勒泰羊不同组织总RNA经0.8%琼脂糖凝胶电泳检测,可清晰见到18S、28S和5S 3条带,无蛋白和基因组污染;经核酸蛋白分析仪检测,所有样品的 A_{260}/A_{280} 均介于1.8~2.0之间。说明提取的总RNA具有较好的完整性,符合反转录要求(图1)。

以阿勒泰羊尾脂组织cDNA为模板,对 *CIDECD* 进行特异性扩增,PCR产物经回收、克隆、测序及序

列拼接后,获得了一条长度为1 119 bp的序列(图2)。经Blast比对,该序列与GenBank公布的牛 *CIDECD* mRNA序列同源性为97.06%,确定为绵羊 *CIDECD* 基因序列。同时将获得的序列提交到GenBank,登录号为KM199684。

2.2 绵羊 *CIDECD* 基因的生物信息学分析

序列拼接结果表明,绵羊 *CIDECD* 基因CDS区全长714 bp,编码237个氨基酸(图3)。利用ExPASy ProtParam软件分析发现,绵羊 *CIDECD* 蛋白分子质量为26.6 kD,理论等电点为9.27,含有22个带负电荷的氨基酸残基(Asp+Glu)和30个带正电荷的氨基酸残基(Arg+Lys),半衰期为30 h。利用SMART在线软件对 *CIDECD* 的结构域分析表明,其含有一个DNA损伤激活酶保守结构域(CAD)和一个低复杂性区(low complexity region),无跨膜结构域;signalP 4.0在线工具预测结果显示, *CIDECD* 蛋白无信号肽。NetPhos 2.0 Server结果显示, *CIDECD* 蛋白含有9个丝氨酸磷酸化位点、5个苏氨酸磷酸化位点及2个酪氨酸磷酸化位点;糖基化位点预测结果显示, *CIDECD* 含有11个O-糖基化位点,无N-糖基化位点。

之前有学者通过绵羊基因组序列信息电子克隆了绵羊 *CIDECD* 的完整CDS区序列(登录号:XM_

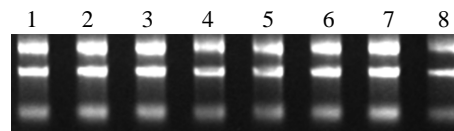


图1 总RNA电泳

Figure 1 Electrophoresis of total RNA

1: 心脏;2: 肝脏;3: 脾脏;4: 肺脏;5: 肾脏;6: 肌肉;7: 肠脂;8: 尾脂

1: Heart; 2: Liver; 3: Spleen; 4: Lung; 5: Kidney; 6: Muscle; 7: Esenteric fat; 8: Tail fat

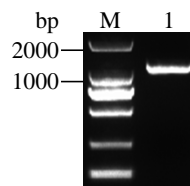


图2 绵羊 *CIDECD* 基因克隆

Figure 2 Cloning of sheep *CIDECD*

M: DNA分子量标准DL2000; 1: 绵羊 *CIDECD* 扩增产物

M: DNA marker DL2000; 1: Amplified products of sheep *CIDECD*

```

1      atggaatacgcgaagaagtcctcagccttctctaccctaagtcctctccaggatcatggcagtgagcacttcggtggtgaccagcag
1      M E Y A K K S L S L L Y P K S L S R Y M A V S T S V V T Q Q
91     cagctgtcagagcccagtgagagggccccaggggcccgccctgtagagtaaccactgtgaccggagtgtaggaagggcatcatggcg
31     Q L S E P S A E A P R A R P C R V T T A D R S V R K G I M A
181    cacagctctgaggacctccatgtcaaggtccgggataccctgatgctggcgtacaagccttcttcctggtgctggaggaagatggcaca
61     H S L E D L H V K V R D T L M L A Y K P F F L V L E E D G T
271    actgtagagacagaagggtattccaatccctggcagatgacaccgtattcattggtcctccacaaggggcagaaatggcagccccatca
91     T V E T E G Y F Q S L A D D T V F M V L H K G Q K W Q P P S
361    gaacagagcactcagtagcagctcaccctctcccgaagcctgccaagatcgatgtggcccagtaaccttcgacctatacaagtgaaac
121    E Q S T Q Y Q L T L S R K P A K I D V A R V T F D L Y K V N
451    ccacaggacttcatggctgcctgaacgtgaaggcaactctctatggcacatctccctctcctatgatctgcactgctccggggccaag
151    P Q D F I G C L N V K A T L Y G T Y S L S Y D L H C S G A K
541    cgcatcatgaaggaagctctccgctgggcccctcttcagcatgcccggccatcgccatctgctgctcggcacctctgttacctgcagcag
181    R I M K E A L R W A L F S M R A I G H L L L G T S C Y L Q Q
631    ctctggatgccacagagcggggacagccccctaagagcaagccgcatcccctcatccaaccagctgaaggtgctgcagtgga
211    L L D A T E R G Q P P K S K A A S L I P T S L K V L Q *

```

图3 绵羊 *CIDEC* 基因的 CDS 序列和推导的氨基酸序列

Figure 3 *CIDEC* CDS and protein sequences

下划线: 保守结构域; 方框: 低复杂性区

Underline: The conserved domain; Box: The low complexity region

004018279), 该序列 CDS 区全长为 669 bp, 编码 223 个氨基酸, 与本实验所获得的绵羊 *CIDEC* CDS 区序列相差 45 个碱基, 位置位于开放阅读框起始密码子区域。经 Blast 比对, 本实验所得到的绵羊 *CIDEC* 基因编码区的核苷酸序列与牛、人 (*Homo sapiens*)、小鼠和大鼠的同源性分别为 97.06%、86.16%、79.72% 和 79.03%; 氨基酸序列的同源性分别为: 94.51%、79.41%、74.90% 和 75.31%。利用 Mega 5.1 软件, 采用 NJ 法建立绵羊与其他物种的 *CIDEC* 蛋白系统进化树。结果显示, 绵羊 *CIDEC* 与反刍动物牛的遗传距离相对较近, 处于一个小分支上; 与啮齿类(小鼠、大鼠)等哺乳动物的遗传距离较远(图4)。

2.3 半定量 RT-PCR 检测

GAPDH 基因在 29 和 30 个循环时目的条带亮度基本保持一致, 说明扩增已进入平台期, 其中在 28 个循环 *GAPDH* 基因以指数形式扩增, 因此确定 28 个循环为扩增循环数(图5)。

以 *GAPDH* 为内参基因, 利用半定量 RT-PCR 对阿勒泰羊心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉、肠系膜脂肪及尾脂组织中 *CIDEC* 表达情况进行初步检测。结果显示, *GAPDH* 在各个组织中呈高丰度表达, 条带亮度基本一致, 可作为内参来定量 *CIDEC* 基因的表达。经检测, *CIDEC* 在尾脂组织中呈高丰

度表达, 在肠系膜脂肪中表达较低, 在心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉不表达或表达量极低(图6)。

2.4 绵羊 *CIDEC* 基因的 qRT-PCR 分析

为了进一步了解 *CIDEC* 基因对阿勒泰羊尾脂沉积和代谢的作用, 本研究进行了饥饿实验, 并对阿勒泰羊饥饿试验前后尾脂组织中 *CIDEC* 基因的差异表达情况进行了 qRT-PCR 分析。通过临床观察, 3 只阿勒泰羊在经过 2 周逐步限饲和持续 4 周的完全禁食之后, 精神状态均表现焦灼不安、见人就叫、见什么吃什么, 表现出强烈的采食欲望。体重明显下降(从最初的平均体重 61.7 kg 下降到 49.4 kg), 皮肤松垮, 臀部尾脂的体积缩小了 1/3 之多, 用手触摸尾部脂肪感觉由最初的紧实丰满变得明显疏松、软塌。综合上述数据, 本研究所进行的饥饿实验取得了预期的效果, 可以用于后续的 qRT-PCR 实验。

通过标准曲线分析, *CIDEC* 与 *GAPDH* 基因线性关系较好, 扩增效率均在 0.999 8 以上, 回归系数均达 0.999, 溶解曲线只有单一的峰, 未出现非特异性扩增和引物二聚体。说明本研究建立的 *CIDEC* 与 *GAPDH* mRNA 定量检测方法是可行的。本研究采用相对定量方法, 以 *GAPDH* 为内参基因, 并定义

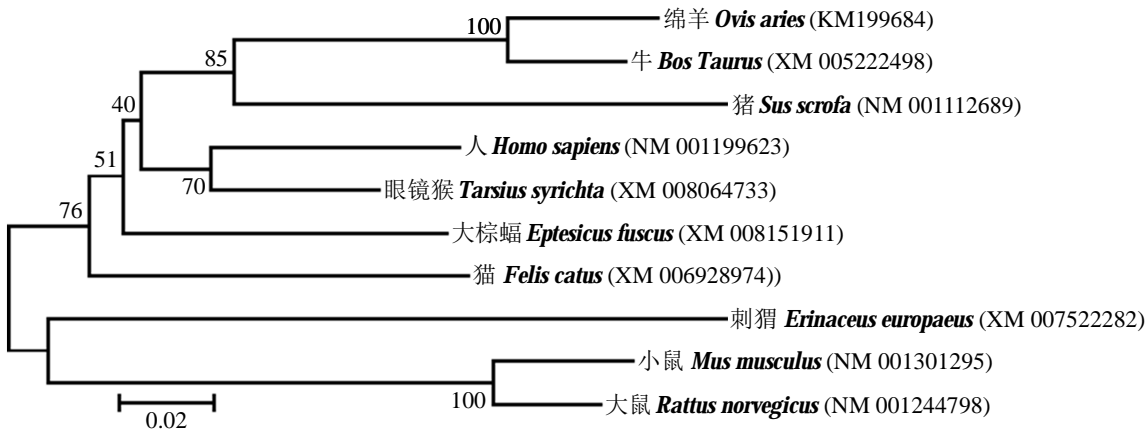


图4 不同物种CIDEC蛋白的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of CIDEC proteins

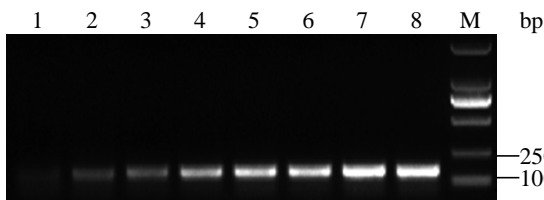


图5 半定量RT-PCR最佳循环数

Figure 5 The analysis of optimal cycles in semi-quantitative RT-PCR

1~8: 循环数分别为 20、22、24、26、27、28、29 和 30; M: DNA 分子量标准 DL2000

1~8: The cycle numbers were 20, 22, 24, 26, 27, 28, 29 and 30, respectively; M: DNA marker DL2000

CIDEC 基因在正常采食状态下阿勒泰羊尾脂组织表达水平为 1, 以便于对 *CIDEC* mRNA 在阿勒泰羊持续饥饿与正常采食状态下尾脂组织的表达水平进行相对定量(图 7)。研究发现, *CIDEC* 基因在饥饿试验前后阿勒泰羊尾脂组织的表达量存在明显差异, 正常采食(非饥饿状态)阿勒泰羊尾脂组织 *CIDEC* 的表达量极显著高于持续饥饿状态下尾脂组织的表达量($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 *CIDEC* 基因的序列分析

目前有关 *CIDEC* 在哺乳动物方面的研究还处于起步阶段。关于人(Liang et al., 2003)、鼠(Danesch et al., 1992)、牛(Wang et al., 2013)、猪(Li et al., 2009)等的 *CIDEC* 基因已经克隆, 但绵羊和山羊的尚未见报道。有学者曾对绵羊 *CIDEC* 序列进行了电子克隆(登录号为: XM_004018279), 预测其 CDS

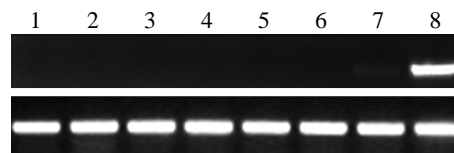


图6 阿勒泰羊不同组织CIDEC基因半定量RT-PCR结果

Figure 6 Expression levels of CIDEC in different tissues analysed by semi-quantitative RT-PCR

1: 心脏; 2: 肝脏; 3: 脾脏; 4: 肺脏; 5: 肾脏; 6: 肌肉; 7: 肠脂; 8: 尾脂

1: Heart; 2: Liver; 3: Spleen; 4: Lung; 5: Kidney; 6: Muscle; 7: Esenteric fat; 8: Tail fat

长 669 bp。本研究通过分子克隆获得的绵羊 *CIDEC* 基因经序列分析, 其 CDS 较之前电子克隆的 CDS 序列长了 45 bp, 将该序列提交 UCSC(<http://genome.ucsc.edu/>) 与 Ensemble(<http://www.ensembl.org/index.html>) 绵羊基因组数据库进行分析, 证实本次实验所获得的绵羊 *CIDEC* 序列是正确的。另外有学者发现人 *CIDEC* 基因存在 2 个可变剪切体(1.1 和 1.3 kb), 并通过生物信息学手段预测该基因在其他哺乳动物中可能也存在不同的可变剪切体(Liang et al., 2003)。但本研究在进行绵羊 *CIDEC* 基因克隆和组织表达的过程中并未发现有可变剪切体的存在。

CIDE 家族含有 2 个高度保守区域: 即位于 N 端的 CIDE-N(N-terminal CIDE domain) 结合结构域与位于 C 端的功能结构域 CIDE-C(C-terminal CIDE domain)。前者存在于所有生物体中, 后者只存在于脊椎动物中。在功能上, CIDE-N 是同类分子相互作用结构域, 主要通过分子之间的盐键介导

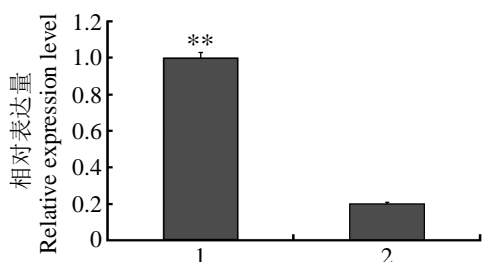


图7 *CIDE*C在持续饥饿与自由采食状态下阿勒泰羊尾脂中的表达

Figure 7 Relative expression levels of *CIDE*C in Altay sheep tail fat under persistent starvation and fasting

1: 自由采食; 2: 持续饥饿。**: 差异极显著($P < 0.01$); 内参基因: *GAPDH*, $n=3$

1: Fed ad libitum; 2: Persistent starvation and fasting. **: Very significant difference at $P < 0.01$; Reference gene: *GAPDH*, $n=3$

*CIDE*家族蛋白与DFF的相互作用。在细胞凋亡过程中,*CIDE*蛋白可以通过与含有*CIDE-N*结构域的其他蛋白相互作用而发挥功能(Wu et al., 2008)。脂滴包被蛋白基因(perilipin, Plin)主要通过与*CIDE-N*序列相互作用,从而促进*CIDE*C介导的脂质交换、脂质转运以及脂滴生长(Sunet al., 2013)。本研究结果表明,绵羊*CIDE*C的N端含有一个保守结构域即*CIDE-N*,该结构域在绵羊脂滴的生长、单个脂滴形成以及脂肪沉积等生物学过程的作用尚有待进一步研究证实。

3.2 *CIDE*C在脂肪组织中的表达分析

已有研究表明,*CIDE*C主要表达于人和小鼠的脂肪。后来在牛及猪(*Sus scrofa*)的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胃、小肠、结肠、膀胱、大脑、回肠及肌肉中均检测到了*CIDE*C的表达(Wang et al., 2013; Liang et al., 2003; 王静等, 2008)。在对高脂日粮诱导产生II型糖尿病ob/ob小鼠模型的研究显示,患有脂肪肝(包括ob/ob鼠脂肪肝、饮食诱导的脂肪肝)的小鼠肝脏*CIDE*C基因表达水平较正常小鼠显著升高(Nishino, 2008; Matsusue, 2008; Guillen, 2009),这与诱导条件下脂肪细胞在肝脏组织的大量沉积不无关系。从本次研究结果来看,*CIDE*C在绵羊的脂肪组织中特异性高表达,而在心、肝、脾、肺、肾及肌肉等组织中呈微量或不表达,这种微量表达可能与脂肪细胞或多或少存在于不同组织中有关。因此推测*CIDE*C具有脂肪细胞表达特异

性,加之其结构上存在的*CIDE-N*结构域,进一步说明绵羊*CIDE*C在脂肪沉积、分化等方面可能具有重要的调节作用。

丰满的尾脂是阿勒泰羊的一个重要品种特征,在适应逆境、维持能量平衡方面扮演重要的角色。为了进一步了解*CIDE*C基因对阿勒泰羊尾脂沉积与代谢性能的影响,本研究建立了阿勒泰羊持续饥饿状态下尾脂沉积与代谢的模型,并对其在饥饿与否状态下尾脂中的表达变化进行了跟踪检测。结果表明,*CIDE*C基因在阿勒泰羊持续饥饿与正常充足采食状态下尾脂中的表达存在极显著差异。在经过持续28 d的完全禁食后,阿勒泰羊尾脂组织*CIDE*C mRNA水平急剧下降,极显著低于正常充足采食状态($P < 0.01$)。该研究结果与Magnusson等(2008)关于肥胖患者的一项研究结论一致,当病态肥胖患者处于极低热量、极低饮食情况下,其皮下脂肪组织*CIDE*C mRNA表达水平明显下降。因此推测当阿勒泰羊处于完全饥饿状态下(此处指的是极低热量或极低饮食),机体自身不能够激活脂质中*CIDE*C的表达,无法实现调控臀部脂肪的聚集。*CIDE*C在阿勒泰羊完全饥饿状态下尾脂中表达水平的显著下调进一步证实,*CIDE*C与哺乳动物脂肪沉积存在相关性。但是,其具体机制是什么,这一过程中还涉及到哪些关键基因,这些基因之间又如何通过级联关系调控脂肪发育,并最终促进脂肪沉积,目前还不清楚。

3.3 绵羊饥饿实验

目前有关绵羊饥饿模型建立的报道较少。Gaal等(1993)研究结果显示,处于饥饿状态的美利奴羊(*Merino sheep*)(饥饿3 d)血液与脂质代谢中各类指标均发生了变化,血糖水平下降,血浆中游离脂肪酸和总胆固醇含量显著上升,说明在饥饿状态下,美利奴羊能够通过游离脂肪酸消耗脂肪来维持机体的正常新陈代谢和体温。本研究通过模拟阿勒泰羊夏秋季节脂肪沉积、春冬季节水草匮乏时的尾脂代谢方式,对3只阿勒泰羊进行了持续饥饿实验。通过对持续饥饿和正常充足采食两种极端阶段状态阿勒泰羊的体重、尾脂体积大小、形态学及其组织学检测,基本符合动物机体消长规律,重复性较好。结合Gaal等(1993)的研究结果,初步认为本研究构建的阿勒泰羊尾脂沉积与代谢模型是成功的。

3.4 *CIDEc*调控绵羊脂肪发育与沉积的研究展望

已有研究表明, *CIDEc*介导多条信号转导通路 (PI3K、insulin 及 Akt1/2 等), 参与调控脂肪细胞的分化与代谢, 进而控制脂肪细胞中脂滴的含量、能量的储存及利用 (Ito et al., 2011)。也有研究认为 *CIDEc* 基因可能是通过 PPAR γ 和 AMPK 2 个信号通路直接或间接参与了调节脂肪的代谢过程, 即 *CIDEc* 基因通过 PPAR γ 通路促进脂肪的生成, 对脂肪细胞中甘油三酯的蓄积起正调控作用; 通过 AMPK 通路抑制脂肪细胞中脂肪酸的合成, 促进脂肪酸的氧化, 对脂肪细胞中甘油三酯的蓄积起负调控作用 (Puri et al., 2008)。因此, 未来的着眼点应放在该基因所介导的信号通路及其对表型性状影响等方面。

4 结论

本研究以新疆阿勒泰羊尾脂组织 cDNA 为模板, 首次获得了绵羊 *CIDEc* 基因序列; 该基因在绵羊脂肪组织中特异性高表达, 其编码蛋白结构中含有与脂滴形成和生长相关的 CIDE-N 结构域; 通过模拟阿勒泰羊夏秋季节脂肪沉积、春冬季节水草匮乏时尾脂代谢方式, 建立了阿勒泰羊持续饥饿条件下尾脂沉积与代谢的模型; 利用实时荧光定量 PCR 技术对这两种极端状态下阿勒泰羊的尾脂表达变化进行了分析。结果表明, 在经过持续 4 周的完全禁食后, 阿勒泰羊尾脂组织中 *CIDEc* 表达急剧下降, 表达量极显著低于正常充足采食状态。本实验研究结果为进一步研究该基因在绵羊尾脂中的功能提供了基础数据。

参考文献

高磊, 甘尚权, 杨井泉, 等. 2013. 绵羊发情周期不同组织 *CRY1* mRNA 转录水平相对定量研究[J]. 遗传, 35(1): 85-92. (Gao L, Gan S Q, Yang J Q, et al. 2013. Relative quantification of mRNA transcription of *CRY1* in different tissues of sheep in oestrous cycle by Real-time quantitative PCR[J]. Hereditas, 35(1): 85-92.)

王静, 李宏基, 王伟杰, 等. 2008. 猪脂肪特异性蛋白 27 基因的克隆与序列分析[J]. 中国农学通报, 24(10): 39-42. (Wang J, Li H J, Wang W J, et al. 2008. Molecular cloning and sequence analysis of porcine fat specific protein 27[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 24(10): 39-42.)

韦璇, 徐小春, 杨雨鑫, 等. 2014. CCAAT/增强子结合蛋白 α (*C/EBP α*)与脂蛋白酯酶(*LPL*)基因在不同尾型绵羊品种尾部脂肪组织中的表达[J]. 农业生物技术学报, 22(5): 598-606. (Wei X, Xu X C, Yang Y X, et al. 2014. Differential expression of CCAAT/enhancer binding protein α (*C/EBP α*) and lipoprotein lipase (*LPL*) genes in tail adipose tissues of sheep (*Ovis aries*) with different types of tail[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 22(5): 598-606.)

Banerjee S S, Feinberg M W, Watanabe M, et al. 2003. The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 278(4): 2581-2584.

Danesch U, Hoeck W, Ringold G M. 1992. Cloning and transcriptional regulation of a novel adipocyte-specific gene, FSP27. CAAT-enhancer-binding protein (*C/EBP*) and *C/EBP*-like proteins interact with sequences required for differentiation-dependent expression[J]. Journal of Biological Chemistry, 267(10): 7185-7193.

Gaal T, Mezes M, Miskuczka O, et al. 1993. Effect of fasting on blood lipid peroxidation parameters of sheep[J]. Research in Veterinary Science, 55(1): 104-107.

Gong J, Sun Z, Li P. 2009. *CIDE* proteins and metabolic disorders[J]. Current Opinion in Lipidology, 20(2): 121-126.

Guillen N, Navarro M A, Arnal C, et al. 2009. Microarray analysis of hepatic gene expression identifies new genes involved in steatotic liver[J]. Physiological Genomics, 37(3): 187-198.

Ito M, Nagasawa M, Omae N, et al. 2011. Differential regulation of *CIDEA* and *CIDEc* expression by insulin via Akt1/2- and JNK2-dependent pathways in human adipocytes[J]. Journal of Lipid Research, 52(8): 1450-1460.

Karbowska J, Kochan Z. 2012. Intermittent fasting up-regulates *Fsp27/CIDEc* gene expression in white adipose tissue[J]. Nutrition, 28(3): 294-299.

Keller P, Petrie J T, De Rose P, et al. 2008. Fat-specific protein 27 regulates storage of triacylglycerol[J]. Journal of Biological Chemistry, 283(21): 14355-14365.

Li D, Zhang Y, Xu L, et al. 2010. Regulation of gene expression by FSP27 in white and brown adipose tissue[J]. BMC Genomics, 11: 446.

Li Y H, Lei T, Chen X D, et al. 2009. Molecular cloning, chromosomal location and expression pattern of porcine *CIDEa* and *CIDEc*[J]. Molecular Biology Reports, 36(3): 575-582.

Liang L, Zhao M, Xu Z, et al. 2003. Molecular cloning and

- characterization of *CIDE-3*, a novel member of the cell-death-inducing DNA-fragmentation-factor (DFF45)-like effector family[J]. *Biochemical Journal*, 70(Pt 1): 195-203.
- Magnusson B, Gummesson A, Glad C A, et al. 2008. Cell death-inducing DFF45-like effector C is reduced by caloric restriction and regulates adipocyte lipid metabolism [J]. *Metabolism*, 57(9): 1307-1313.
- Matsusue K, Kusakabe T, Noguchi T, et al. 2008. Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPAR-gamma target gene *Fsp27*[J]. *Cell Metabolism*, 7(4): 302-311.
- Mori T, Sakaue H, Iguchi H, et al. 2005. Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13): 12867-12875.
- Nishino N, Tamori Y, Tateya S, et al. 2008. FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 118(8): 2808-2821.
- Puri V, Virbasius J V, Guilherme A, et al. 2008. RNAi screens reveal novel metabolic regulators: RIP140, MAP4k4 and the lipid droplet associated fat specific protein (FSP) 27 [J]. *Acta Physiological (Oxf)*, 192(1): 103-115.
- Seale P, Kajimura S, Yang W, et al. 2007. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16[J]. *Cell Metabolism*, 6(1): 38-54.
- Sun Z, Gong J, Wu H, et al. 2013. Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of *Fsp27* in adipocytes[J]. *Nature Communications*, 4: 1594.
- Toh S Y, Gong J, Du G, et al. 2008. Up-regulation of mitochondrial activity and acquirement of brown adipose tissue-like property in the white adipose tissue of *Fsp27* deficient mice[J]. *PLoS One*, 3 (8): e2890.
- Tong Q, Dalgin G, Xu H, et al. 2000. Function of GATA transcription factors in preadipocyte -adipocyte transition[J]. *Science*, 290(5489): 134-138.
- Wang J, Cao X, Pan H, et al. 2013. Cell death-inducing DFFA-like effector c (*CIDEc/FSP27*) gene: Molecular cloning, sequence characterization, tissue distribution and polymorphisms in Chinese cattles[J]. *Molecular Biology Reports*, 40(12): 6765-6774.
- Wu C, Zhang Y, Sun Z, et al. 2008. Molecular evolution of Cide family protein: Novel domain formation in early vertebrates and the subsequent divergence[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 23: 159.
- Wu Z, Rosen E D, Brun R, et al. 1999. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity[J]. *Molecular Cell*, 3(2): 151-158.
- Wu Z, Xie Y, Bucher N L, et al. 1995. Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis[J]. *Genes Development*, 9(19): 2350-2363.

(责任编辑 李建琴)