

鸡 *PPAR γ* 基因转录本 3 上游开放阅读框转录后的调控作用

褚衍凯^{1,2,3}, 靳艳飞^{1,2,3}, 邢天宇^{1,2,3}, 马广伟^{1,2,3}, 崔婷婷^{1,2,3}, 闫晓红^{1,2,3},
李辉^{1,2,3}, 王宁^{1,2,3}

1. 农业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

摘要: 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *PPAR γ*) 是脂肪生成的关键调控因子。本实验室前期研究发现, 与人和鼠等哺乳动物 *PPAR γ* 基因的转录本不同, 鸡 *PPAR γ* 基因的多个转录本 5'UTR 区存在上游开放阅读框(upstream open reading frames, uORFs)。为了揭示该 uORF 转录后的调控作用, 本研究构建了鸡 *PPAR γ* 基因转录本 3 (*cPPAR γ 3*) 野生型 5'UTR 报告基因载体 psiCHECK2-c*PPAR γ 3*-5'UTR-WT 和 uORF 突变(uATG 突变为终止密码子 TGA)的 5'UTR 报告基因载体 psiCHECK2-c*PPAR γ 3*-5'UTR-Mut。将这两个报告基因载体分别转染永生鸡前脂肪细胞(immortalized chicken pre-adipocytes, ICPA)和鸡胚成纤维细胞 DF1, 检测海肾荧光素酶报告基因 *hRluc* 活性及其 mRNA 表达。荧光素酶报告基因检测结果显示, 在 ICPA 细胞中, psiCHECK2-c*PPAR γ 3*-5'UTR-Mut 的 *hRluc* 报告基因活性极显著高于 psiCHECK2-c*PPAR γ 3*-5'UTR-WT ($P<0.01$); 在 DF1 细胞中, psiCHECK2-c*PPAR γ 3*-5'UTR-Mut 的 *hRluc* 报告基因活性高于 psiCHECK2-c*PPAR γ 3*-5'UTR-WT, 但差异不显著($P>0.05$)。qRT-PCR 检测 *hRluc* 基因 mRNA 表达结果显示, 与 psiCHECK2-c*PPAR γ 3*-5'UTR-WT 相比, 在 ICPA 细胞中, psiCHECK2-c*PPAR γ 3*-5'UTR-Mut 转染细胞的 *hRluc* 基因的 mRNA 表达水平极显著降低($P<0.01$); 在 DF1 细胞中, psiCHECK2-c*PPAR γ 3*-5'UTR-Mut 转染细胞后, *hRluc* 基因的 mRNA 表达水平也降低, 但差异不显著($P>0.05$)。为进一步分析该 uORF 对鸡 *cPPAR γ 3* 的转录后调控作用, 本研究又分别构建了野生型 *cPPAR γ 3* 真核表达载体 pcDNA3.1-c*PPAR γ 3*-WT 和 uORF 突变的 *cPPAR γ 3* 真核表达载体 pcDNA3.1-c*PPAR γ 3*-Mut。qRT-PCR 检测 *cPPAR γ 3* 的 mRNA 表达水平, 结果显示, 在这两种细胞中, pcDNA3.1-c*PPAR γ 3*-Mut 转染细胞的 *cPPAR γ 3* mRNA 表达水平均显著低于 pcDNA3.1-c*PPAR γ 3*-WT 转染细胞 ($P<0.05$), 但 Western blot 结果显示, pcDNA3.1-c*PPAR γ 3*-Mut 转染细胞的 *PPAR γ* 蛋白表达水平极显著高于 pcDNA3.1-c*PPAR γ 3*-WT 转染细胞 ($P<0.01$)。这些研究结果表明, 5'UTR 区的 uORF 抑制鸡 *cPPAR γ 3* 的翻译。

关键词: 鸡; *PPAR γ* 基因; 上游开放阅读框; 翻译抑制

收稿日期: 2018-02-07; 修回日期: 2018-05-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号:31572392)和农业部产业体系项目(编号:CARS-41)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31572392) and the China Agriculture Research System (No.CARS-41)]

作者简介: 褚衍凯, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: chuyankai1220@163.com

通讯作者: 王宁, 博士, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: wangning@neau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.18-038

网络出版时间: 2018/7/26 18:46:07

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180726.1845.005.html>

Post-transcriptional regulation of chicken *PPAR γ* transcript variant 3 by upstream open reading frame

Yankai Chu^{1,2,3}, Yanfei Jin^{1,2,3}, Tianyu Xing^{1,2,3}, Guangwei Ma^{1,2,3}, Tingting Cui^{1,2,3}, Xiaohong Yan^{1,2,3}, Hui Li^{1,2,3}, Ning Wang^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, 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

Abstract: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPAR γ*) is a critical regulator of adipogenesis. Our previous study showed that unlike human and mouse *PPAR γ* transcripts, several chicken *PPAR γ* transcript variants contain upstream open reading frames (uORFs) in their 5' untranslated region (5'UTR). To decipher the role of uORFs in post-transcriptional regulation of chicken *PPAR γ* gene, we constructed wild-type (psiCHECK2-c*PPAR γ* 3-5'UTR-WT) and a uORF mutant (the upstream ATG (uATG) was mutated to stop codon TGA) 5'UTR reporters (psiCHECK2-c*PPAR γ* 3-5'UTR-Mut) of chicken *PPAR γ* transcript variant 3 (*cPPAR γ* 3). These two reporters were individually transfected into immortalized chicken pre-adipocytes (ICPA) and DF1 cells, and the renilla luciferase (*hRluc*) activity and mRNA expression level were detected by reporter assay and qRT-PCR. The results showed that the *hRluc* activity of the mutated 5'UTR was significantly higher than that of the wild-type 5'UTR in ICPA cells ($P < 0.01$), and the *hRluc* activity of the mutated 5'UTR tended to be higher than that of the wild-type 5'UTR in DF1 cells, but this difference did not reach statistical significance ($P > 0.05$). The qRT-PCR analysis showed, in ICPA cells, the *hRluc* mRNA expression was significantly lower in the cells transfected with the mutated 5'UTR construct than in the cells transfected with the wild-type 5'UTR construct ($P < 0.01$). In DF1 cells, the *hRluc* mRNA expression tended to be lower in the cells transfected with the mutated 5'UTR construct than in the cells transfected with the wild-type 5'UTR construct, but this difference did not reach statistical significance ($P > 0.05$). To further gain insight into the post-transcriptional regulation of *cPPAR γ* 3 by the uORF, we constructed the expression plasmids bearing the full-length coding region of chicken *PPAR γ* gene plus either wild-type or mutant uORF 5'UTR (pcDNA3.1-c*PPAR γ* 3-WT and pcDNA3.1-c*PPAR γ* 3-Mut). These two constructed *PPAR γ* expression plasmids were individually transiently transfected into both ICPA and DF1 cells, and *PPAR γ* mRNA and protein levels were assayed by qRT-PCR and western blotting. The result showed that in both cell lines, *PPAR γ* mRNA expression was significantly lower in the cells transfected with pcDNA3.1-c*PPAR γ* 3-Mut than in the cells transfected with pcDNA3.1-c*PPAR γ* 3-WT ($P < 0.05$). In contrast, western blot analysis showed that *PPAR γ* protein level was significantly higher in the cells transfected with pcDNA3.1-c*PPAR γ* 3-Mut than in the cells transfected with pcDNA3.1-c*PPAR γ* 3-WT ($P < 0.001$). Taken together, our results demonstrate that the uORF in 5'UTR of the *cPPAR γ* 3 inhibits its translation.

Keywords: chicken; *PPAR γ* gene; uORF; translational repression

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *PPAR γ*)是一个配体依赖型的转录因子,属于核内激素受体超家族成员。*PPAR γ* 被配体激活后可以与视黄醛 X 受体 α (retinoid X receptor alpha, *RXR α*)形成异二聚体,结

合于靶基因启动子区的过氧化物酶体增殖物反应元件 (PPAR response elements, PPREs)来调控基因表达^[1,2]。*PPAR γ* 是调控脂肪生成最关键的转录调控因子,也是许多脂类代谢基因的转录调控因子,与肥胖、II型糖尿病和高血压等疾病密切相关^[3-5]。研究

发现, *PPAR γ* 基因是一个受多个启动子调控的基因, 人类(*Homo sapiens*)和小鼠(*Mus musculus*)的 *PPAR γ* 基因分别有 4 个和 2 个启动子^[6, 7]。由于选择性剪接, 人的 *PPAR γ* 基因可以产生 4 种转录本—*hPPAR γ s* 1-4, 小鼠的 *PPAR γ* 基因可以产生 2 种转录本—*mPPAR γ s* 1-2, 这些 *PPAR γ* 转录异构体之间的差别主要是 5' 端非翻译区(5' untranslated region, 5'UTR)序列和长度不同^[6, 7]。本实验室前期研究发现, 鸡(*Gallus domesticus*)*PPAR γ* 基因有 3 个启动子, 由于使用不同启动子和选择性拼接, 鸡可以产生 5 种不同的 *PPAR γ* 转录本(*cPPAR γ s* 1-5), 这 5 种转录本的差别也在于 5'UTR 序列和长度不同^[8]。序列分析发现, 鸡 *PPAR γ* 基因 5 个转录本的 5'UTR 与哺乳动物 *PPAR γ* 基因各转录本的 5'UTR 序列和长度均有较大差异^[9], 提示鸡 *PPAR γ* 基因 5'UTR 的调控作用和机制可能与哺乳动物不同。

真核生物 mRNA 的 5'UTR 对基因表达具有重要的调控作用, 既可以促进基因表达也可以抑制基因表达^[10]。目前在真核生物 5'UTR 区已鉴定出大量的顺式调控元件, 如 5'帽结构、翻译起始基序、核糖体内部进入位点(internal ribosome entry sites, IRESs)、5'-末端寡嘧啶区(5' terminal oligo-pyrimidine, 5'TOPs)、G-四链体(G-quadruplexes)、5'UTR 的二级结构、上游 AUG 密码子(upstream AUG codons, uAUGs)和上游开放阅读框(upstream open reading frame, uORF)等^[11, 12], 这些调控元件可以在转录后以及翻译水平来调控基因表达^[13]。其中, uORF 是一个重要的顺式调控元件, 哺乳动物 uORF 的转录后调控研究已经较为深入^[14]。

uORF 是由上游起始密码子(upstream ATG, uATG)和上游终止密码子(upstream stop codon, uSTOP)构成的一类短小的开放阅读框, 一般位于 5'UTR 区。生物信息学分析发现, 人类约 49% 的转录本含有 uORF, 小鼠约 44% 的转录本含有 uORF, 并且许多 uORF 在物种间是高度保守的, 提示这些 uORF 序列是选择进化的结果^[15, 16]。对哺乳动物的研究发现, 在正常情况下, uORF 可以通过降低下游编码区的翻译效率或引起 mRNA 降解来抑制基因表达。然而, 当细胞处于应激状态时, uORF 可以促进某些应激相关基因的 mRNA 表达^[17]。

目前, 对 *PPAR γ* 基因的调控研究主要集中在哺乳动物上, 研究内容主要包括 *PPAR γ* 基因的转录调控和表观遗传调控等。但对 *PPAR γ* 基因 5'UTR 转录后调控的研究报道还很少。本实验室前期通过生物信息学分析发现, 与人和小鼠等哺乳动物 *PPAR γ* 基因的转录本不同, 鸡 *PPAR γ* 基因的多个转录本 5'UTR 都存在 uORF, 但其调控作用还不清楚。为了揭示 uORF 在鸡 *PPAR γ* 基因中的调控作用, 本研究选择鸡 *PPAR γ* 转录本 3(*cPPAR γ 3*), 采用基因定点突变和报告基因等技术对 uORF 的转录后调控作用进行分析, 证实 uORF 抑制鸡 *PPAR γ* 基因的翻译, 研究结果为揭示鸡 *PPAR γ* 基因的转录后调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

psiCHECKTM-2 报告基因载体购自 Promega 公司(美国), pcDNA3.1(+)真核表达载体购自 Invitrogen 公司(美国)。鸡胚成纤维细胞系 DF1 购自上海生命科学研究院细胞资源中心。鸡永生化前脂肪细胞系(imortalized chicken pre-adipocytes, ICPA)为本实验室保存^[17]。

1.2 生物信息学分析

利用 StarORF (<http://star.mit.edu/index.html>)、UTRscan (<http://itbtools.ba.itb.cnr.it/utrscan>)和 RegRNA2.0 (<http://regrna2.mbc.nctu.edu.tw>) 软件预测鸡 *cPPAR γ 3* 的 5'UTR 区潜在的顺式调控元件。利用 RNAFOLD (<http://rna.tbi.univie.ac.at>)、MFOLD (<http://mfold.rna.albany.edu>)和 GEEBEE (<http://www.genebee.msu.su>)软件预测鸡 *PPAR γ* 基因 5'UTR 的高级结构。

1.3 引物设计及合成

根据本实验室前期得到的鸡 *cPPAR γ 3* 的 5'端 mRNA 序列(GenBank 登录号: KP736528)设计 qRT-PCR 表达检测引物 *cPPAR γ 3-F1/cPPAR γ 3-R1*; 根据在 Promega 公司官方网站(www.promega.com/vectors/)中获取的 psiCHECKTM-2 载体全长序列, 设计 *hRluc*

基因的点突变引物 hRluc-F1/hRluc-R1 和 qRT-PCR 表达检测引物 hRluc-F2/hRluc-R2, 选择 *NONO* 基因 (NM_001031532) 作为内参基因。根据鸡 *PPAR γ* 基因 (NM_001001460.1) 的 mRNA 序列, 设计 CDS 区克隆引物 cPPAR γ -F/cPPAR γ -R。所有引物均利用 Primer Premier 5.0 软件设计, 由上海英骏生物技术有限公司合成。引物信息见表 1。

1.4 载体构建

1.4.1 分析 5'UTR 转录后调控的报告基因载体构建

利用点突变试剂盒(全式金, 北京)将 psiCHECKTM-2 载体的 *hRluc* 基因的起始密码子 ATG 突变为 TTG, 突变后的载体命名为 psiCHECK2M^[18], 测序验证无误后用于后续研究。

1.4.2 鸡 *cPPAR γ* 3-5'UTR 报告基因载体构建

将带有 *PPAR γ* 基因起始密码子 ATG 的野生型 *cPPAR γ* 3 的 5'UTR 序列(WT)和 uORF 突变型的 5'UTR 序列(Mut, uORF 中的 uATG 突变为终止密码子 TGA)分别插入 psiCHECK2M 载体的 *hRluc* 基因上游的 *Nhe* I 酶切位点处, 获得野生型和 uORF 突变型的 5'UTR 报告基因载体 (psiCHECK2M-cPPAR γ 3-5'UTR-WT 和 psiCHECK2M-cPPAR γ 3-5'UTR-Mut), 测序验证无误后用于后续研究。

1.4.3 鸡 *cPPAR γ* 3 真核表达载体构建

利用引物 cPPAR γ -F/cPPAR γ -R, 以 ICPA 细胞的 cDNA 为模板, PCR 扩增得到鸡 *PPAR γ* 基因 CDS 片段(两端携带 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切位点)。将 PCR 产物和 pcDNA3.1 质粒分别用 *Eco*R I 和 *Xho* I 进行双酶切, 回收纯化得到目的片段, 使用 T4 连接酶连接得到重组质粒 pcDNA3.1-CDS。人工合成鸡 *cPPAR γ* 3 野生型 5'UTR 片段和 uORF 突变的 5'UTR 片段(两端均携带 *Nhe* I 和 *Xho* I 酶切位点)克隆至 pUC57 载体中, 分别命名为 pUC57-WT-1 和 pUC57-Mut-1。用 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切重组质粒 pcDNA3.1-CDS, 同时用 *Nhe* I 和 *Xho* I 分别双酶切 pUC57-WT-1 和 pUC57-Mut-1, 回收纯化获得目的片段, T4 连接酶将目的片段与线性化质粒 pcDNA3.1-CDS 连接得到重组质粒 pcDNA3.1-cPPAR γ 3-WT 和 pcDNA3.1-cPPAR γ 3-Mut, 测序验证无误后用于后续研究。

1.4.4 鸡 *cPPAR γ* 3 5'UTR 启动子报告基因载体的构建

用 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切 pGL3-basic 报告基因质粒, 琼脂糖凝胶电泳后, 胶回收得到线性化质粒。将人工合成的鸡 *cPPAR γ* 3 野生型 5'UTR 片段和 uORF 突变的 5'UTR 片段(两端均携带 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切位点)克隆至 pUC57 载体中, 分别命名为 pUC57-WT-2 和 pUC57-Mut-2。用 *Xho* I 和 *Hind* III

表 1 本研究所使用的引物信息

Table 1 Primers used in this study

引物	序列(5'→3')	片段大小(bp)	用途
cPPAR γ 3-F1	GAGCCTGCAACAAATTACAATGG	166	qRT-PCR
cPPAR γ 3-R1	AGAAAAATAGGGAGGAGAAGGAGG		
hRluc-F2	ACCAAGACAAGATCAAGGCC	195	qRT-PCR
hRluc-R2	GAACCTCTCAGGCTCCAGT		
NONO-F	AGAAGCAGCAGCAAGAAC	115	qRT-PCR
NONO-R	TCCTCCATCCTCCTCAGT		
cPPAR γ -F	GAATTCATGGTTGACACAGAAATGCCGT	1451	CDS 区克隆
cPPAR γ -R	CCTCGAGGAGGATAAGAACTACTATCGCC		
hRluc-F1	ACTATAGGCTAGCCACCTTGGCTTCCAAGG	6273	<i>hRluc</i> 点突变
hRluc-R1	AGGTGGCTAGCCTATAGTCATGAATTATGCTG		

分别双酶切 pUC57-WT-2 和 pUC57-Mut-2 质粒,回收纯化后获得目的片段。使用 T4 连接酶将目的片段与线性化的 pGL3-basic 质粒连接,获得鸡 *cPPAR γ* 5'UTR 启动子活性分析用报告基因载体 pGL3-basic-cPPAR γ 3-WT 和 pGL3-basic-cPPAR γ 3-Mut,测序验证无误后用于后续研究。

1.5 细胞培养

DF1 细胞和 ICPA 细胞均培养在添加了 10% 胎牛血清及终浓度为 100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 °C 含 5% CO₂ 和 90% 相对湿度的细胞培养箱中传代培养,24~48 h 传代一次。

1.6 双荧光素酶报告基因活性检测

将 DF1 细胞和 ICPA 细胞分别接种到 24 孔板中 (2×10^5 个/孔),待细胞汇合度达到 50%~70% 时,参考 Lipofectamine[®]2000 (Invitrogen, 美国)说明书,将报告基因质粒分别转染细胞,转染 48 h 后收集细胞,按双荧光素酶检测试剂盒 (Promega, 美国)说明书操作,分别检测各组双荧光素酶报告基因活性。

1.7 RNA 提取及实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

将重组质粒 pcDNA3.1-cPPAR γ 3-WT 和 pcDNA3.1-cPPAR γ 3-Mut 分别转染 DF1 细胞和 ICPA 细胞,转染 48 h 后,收集细胞,按照试剂盒 RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, 德国)说明书提取细胞总 RNA。取等量的 RNA (1 μ g) 按照反转录试剂盒 PrimeScript[™]TMRT reagent Kit with gDNA Erase (宝生物工程(大连)有限公司)说明书进行反转录,然后采用 qRT-PCR 方法检测 *cPPAR γ* 3 mRNA 表达。将 psiCHECK2-cPPAR γ 3-5'UTR-WT 和 psiCHECK2-cPPAR γ 3-5'UTR-Mut 分别转染 DF1 细胞和 ICPA 细胞,提取细胞总 RNA,反转录后采用 qRT-PCR 检测 *hRluc* 基因的 mRNA 表达。

qRT-PCR 反应在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行。反应体系为: FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche 德国) 5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.2 μ L, 水 3.6 μ L, 总

体积为 10 μ L。反应条件: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 复性延伸 60 s, 共 40 个循环。以 *NONO* 基因为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的相对表达量^[19]。

1.8 Western blot 分析

将重组质粒 pcDNA3.1-cPPAR γ 3-WT 和 pcDNA3.1-cPPAR γ 3-Mut 分别转染 ICPA 细胞,转染 48 h 后,用 PBS 洗细胞 3 遍,加入含有 1 mmol/L PMSF 的细胞裂解液,振荡混匀后冰上静置 30 min, 12 000 r/min 离心 5 min,取上清,用 BCA 方法测定蛋白浓度。蛋白样经过 12% SDS-PAGE 电泳分离后,电转至 NC 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; PBST 洗涤后加入 1:1000 稀释的鸡 PPAR γ 一抗(实验室保存)室温振荡孵育 2 h; PBST 洗涤后加入 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)室温振荡孵育 1 h,洗膜后进行 ECL 显色。内参对照为 β -actin。

1.9 数据分析

运用 SAS 9.2 软件 (SAS Institute Inc.) 分析实验数据,数据结果表示为平均数 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$),采用 *t*-test 检验, n.s. 表示差异不显著, **P* < 0.05 为差异显著, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 鸡 *cPPAR γ* 3 5'UTR 区的生物信息学分析

鸡 *cPPAR γ* 3 的 5'UTR 区全长 300 bp, 利用 StarORF (<http://star.mit.edu/index.html>) 和 UTRscan (<http://itbtools.ba.itb.cnr.it/utrscan>) 软件分析鸡 *cPPAR γ* 3 mRNA 的 5'UTR 序列。结果显示,在 -39/-28 (起始密码 ATG 的 A 为 +1) 区域存在一个 uORF, 长度为 12 bp (图 1A)。对 uORF 中的上游起始密码子 uATG 的序列环境分析发现, uATG 和编码区 ATG (main ATG, mATG) 的序列环境相似, 基本符合 Kozak 规则^[20, 21] (图 1B)。

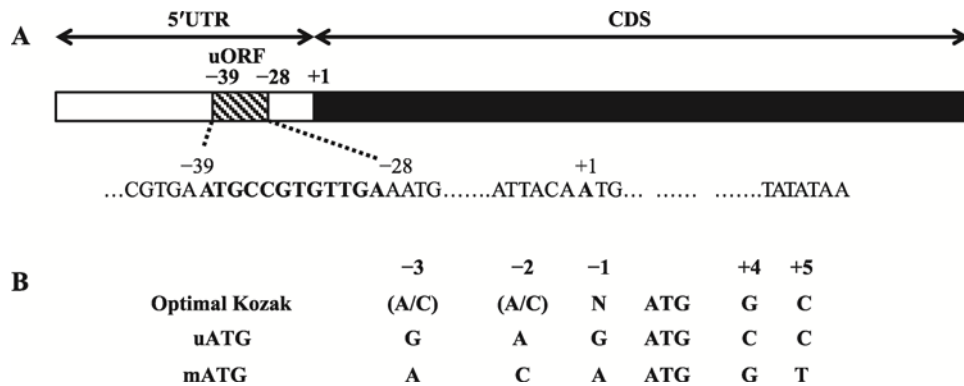


图 1 鸡 *PPARγ* 基因转录本 3(*cPPARγ3*)5'UTR 区的生物信息学分析

Fig. 1 Bioinformatics analysis of the 5'UTR of chicken *PPARγ* transcript variant 3 (*cPPARγ3*)

A: 鸡 *PPARγ* 基因转录本 3(*cPPARγ3*)5'UTR 区 uORF 的预测分析; B: uORF 的起始密码子(uATG)和编码区起始密码子(mATG)序列分析。

2.2 鸡 *cPPARγ3* 的 uORF 对报告基因的转录后调控分析

为研究鸡 *cPPARγ3* 5'UTR 区 uORF 的转录后调控作用, 本文首先构建了 5'UTR 转录后调控分析用的报告基因载体。将 psiCHECK-2 载体中 *hRluc* 基因的起始密码子 ATG 突变为 TTG, 使其不能发挥作用, 将这一报告基因载体命名为 psiCHECK2M。将 3' 末端携带起始密码子的 5'UTR 片段插入到 *hRluc* 基因上游的 *Nhe* I 酶切位点, 所插入的 5'UTR 片段作为 *hRluc* 基因的 5'UTR, 并使用 5'UTR 片段 3'末端所携带的起始密码子 ATG 来起始翻译。利用这一构建的 5'UTR 报告基因载体可以分析 5'UTR 的转录后调控作用^[18]。双荧光素酶报告基因结果显示, 与野生型载体(psiCHECK-2)相比, *hRluc* 基因的 ATG 突变后报告基因活性在 DF1 细胞和 ICPA 细胞中均极显著下降($P<0.001$, 图 2A), 表明本研究成功构建了用于分析 5'UTR 转录后调控作用的报告基因载体(psiCHECK2M), 可以用于后续相关实验。

将 *cPPARγ3* 野生型的 5'UTR 序列(WT)和 uORF 突变型的 5'UTR 序列(Mut)别插入到 psiCHECK2M 载体 *hRluc* 基因上游的 *Nhe* I 酶切位点(图 2 B 和 C)。双荧光素酶报告基因检测结果表明: 在 ICPA 细胞中, psiCHECK2M-*cPPARγ3*-5'UTR-Mut 的报告基因活性极显著高于野生型(psiCHECK2M-*cPPARγ3*-5'UTR-WT) ($P<0.01$, 图 2D) 在 DF1 细胞中 psiCHECK2M-*cPPARγ3*-5'UTR-Mut 的 *hRluc* 报告基因活性

高于野生型(psiCHECK2M-*cPPARγ3*-5'UTR-WT) 但没有达到统计学差异显著($P>0.05$, 图 2D)。为了进一步分析 uORF 的调控机制, 本研究采用 qRT-PCR 方法分别检测了 psiCHECK2M-*cPPARγ3*-5'UTR-WT 和 psiCHECK2M-*cPPARγ3*-5'UTR-Mut 转染细胞中 *hRluc* 基因的 mRNA 表达情况。结果显示: 在 ICPA 细胞中, uORF 突变后, *hRluc* 基因 mRNA 表达水平极显著降低($P<0.001$, 图 2E); 在 DF1 细胞中, uORF 突变后, *hRluc* 基因的 mRNA 表达水平低于野生型, 但是差异不显著($P>0.05$, 图 2E)。上述数据表明, uORF 可能通过抑制下游基因的翻译来调控基因表达。

2.3 鸡 *cPPARγ3* uORF 对 *PPARγ* 基因的转录后调控分析

本文进一步分析了 5'UTR 区的 uORF 对 *cPPARγ3* 的转录后调控作用, 将构建的重组质粒 pcDNA3.1-*cPPARγ3*-WT 和 pcDNA3.1-*cPPARγ3*-Mut 分别转染 DF1 细胞和 ICPA 细胞, 检测鸡 *cPPARγ3* 的 mRNA 和蛋白表达。qRT-PCR 检测结果显示, 在这两种细胞中, 与 pcDNA3.1-*cPPARγ3*-WT 转染细胞相比, pcDNA3.1-*cPPARγ3*-Mut 转染细胞后, *cPPARγ3* 的 mRNA 表达显著降低($P<0.05$) (图 3A)。Western blot 结果显示, 与 pcDNA3.1-*cPPARγ3*-WT 转染细胞相比, pcDNA3.1-*cPPARγ3*-Mut 转染细胞的 *PPARγ* 蛋白表达显著升高, 大约上调 2.3 倍($P<0.0001$) (图 3 B 和 C)。上述结果表明, uORF 通过抑制鸡 *PPARγ* 基因的翻译来调控其表达。

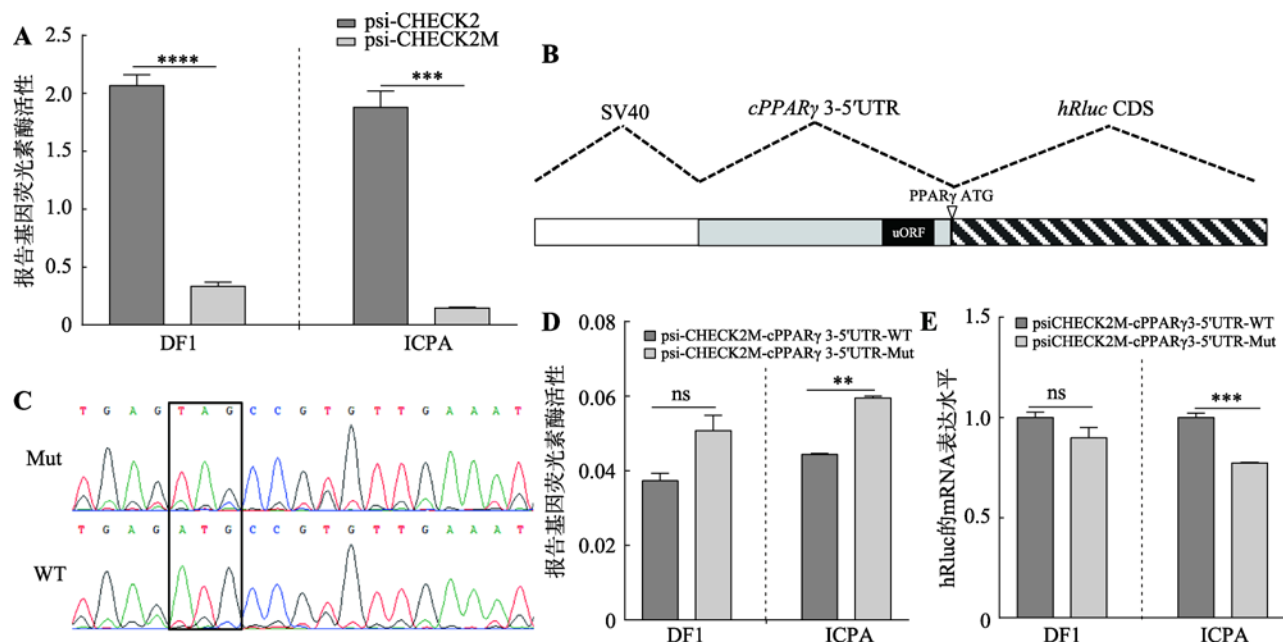


图 2 鸡 *cPPAR γ* 3'UTR 区 uORF 突变对报告基因活性和表达的影响

Fig. 2 The effects of uORF mutation in *cPPAR γ* 3'UTR on reporter activity and mRNA expression

A: psiCHECK2-M 报告基因载体的验证分析; B: *cPPAR γ* 的 3'UTR 报告基因载体结构示意图; C: 3'UTR 野生型报告基因载体 (psiCHECK2M-cPPAR γ 3'-5'UTR-WT) 和 uORF 突变的 3'UTR 报告基因载体 (psiCHECK2M-cPPAR γ 3'-5'UTR-Mut) 测序比对 (黑色方框位置为 uORF 的突变位点); D: 双荧光素酶报告基因技术检测 uORF 突变对 *hRluc* 报告基因活性的影响; E: qRT-PCR 检测 uORF 突变对 *hRluc* 基因 mRNA 表达的影响。*: $P < 0.01$; **: $P < 0.001$; ***: $P < 0.0001$; ns 表示差异不显著。

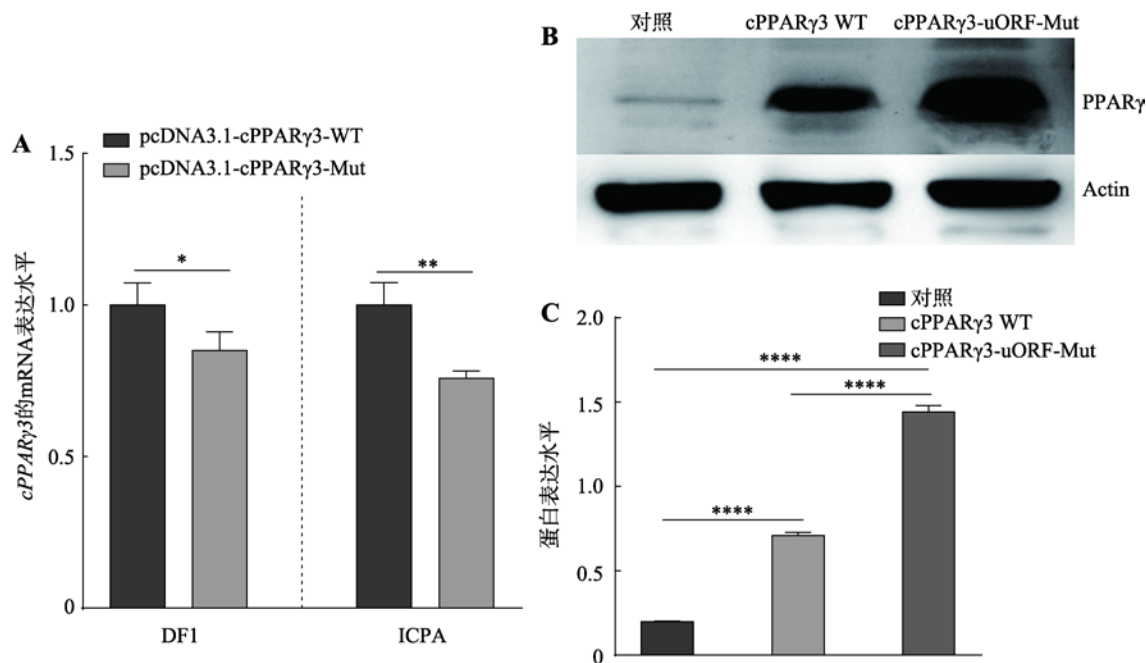


图 3 5'UTR 区 uORF 突变对 *cPPAR γ* 的 mRNA 和蛋白表达的影响

Fig. 3 The effects of 5'UTR uORF mutation on *cPPAR γ* mRNA and protein levels

A: qRT-PCR 检测 5'UTR 区 uORF 突变对鸡 *cPPAR γ* mRNA 表达的影响; B: Western blot 检测 5'UTR 区 uORF 突变对鸡 PPAR γ 蛋白表达的影响; C: uORF 突变对鸡 PPAR γ 蛋白表达影响的定量分析。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.0001$ 。

2.4 鸡 *cPPAR γ 3* 5'UTR 区的启动子活性检测

qRT-PCR 检测发现, uORF 突变会导致 *hRluc* 基因和鸡 *cPPAR γ 3* 的 mRNA 表达水平下降(图 2E, 图 3A), 这提示 5'UTR 相应的 DNA 序列可能具有启动子活性, uORF 的突变可能影响 5'UTR 的启动子活性, 从而引起下游基因 mRNA 表达变化。为确定鸡 *cPPAR γ 3* 5'UTR 区是否具有启动子活性, 本文将构建的野生型(pGL3-basic-*cPPAR γ 3*-WT)和 uORF 突变的 5'UTR 启动子报告基因载体(pGL3-basic-*cPPAR γ 3*-Mut)分别转染 ICPA 细胞和 DF1 细胞。双荧光素酶报告基因检测结果显示, 在 ICPA 细胞和 DF1 细胞中, 野生型和 uORF 突变的启动子报告基因载体的活性均极显著的高于 pGL3-basic 空载体, 活性约是 pGL3-basic 空载体的 20 倍(图 4, A 和 B)。与野生型报告基因载体相比, uORF 突变后, 启动子活性在两种细胞中均极显著下降, 分别下降约 21% 和 13% ($P < 0.01$)(图 4, A 和 B)。这些结果表明, 鸡 *cPPAR γ 3* 5'UTR 区序列具有启动子活性, uORF 突变会导致启动子活性显著降低, 这与上述 *hRluc* 基因和 *cPPAR γ 3* 的 mRNA 表达变化相一致。

3 讨论

uORF 是一种重要的顺式调控元件, 通常可以抑

制目的基因的翻译^[22]。如癌基因 *mdm2* 在正常细胞中主要表达含有 2 个 uORFs 的 *L-mdm2* 转录本, 这些 uORFs 抑制了 *mdm2* 基因的翻译, *mdm2* 蛋白表达量很低, 因此不致癌; 癌细胞中 *mdm2* 基因主要表达缺少 uORF 的 *S-mdm2* 转录本, *mdm2* 蛋白表达量比正常细胞高 20 倍以上^[23]。当机体处于应激状态时, uORF 可以促进 *ATF4*、*CAT-1* 等应激相关基因的翻译^[24]。此外, 有研究发现一些 uORF 对蛋白的翻译没有影响^[25, 26]。本研究发现鸡 *cPPAR γ 3* 5'UTR 区的 uORF 突变后, *cPPAR γ 3* 的 mRNA 表达水平显著下降(图 3A), 但是鸡 *cPPAR γ 3* 蛋白表达水平极显著升高(图 3, B 和 C), 说明该 uORF 抑制鸡 *cPPAR γ 3* 的翻译。

真核生物 mRNA 通常以“核糖体扫描”机制进行翻译^[27], 由于 5'UTR 区的 uORF 位于基因编码区阅读框(main open reading frame, mORF)的上游, 会优先被扫描, 所以 uORF 的序列组成、二级结构等都会影响基因下游编码区的翻译。研究发现, uORF 可以通过多种方式调控基因表达: (1)核糖体在扫描过程中将 uORF 当作为编码区 ORF (mORF)进行翻译, 导致 mORF 的翻译受到抑制^[28]; (2)核糖体扫描并翻译 uORF, 在翻译的延伸期或终止期形成“路障”, 阻碍核糖体继续向 3'端扫描或引起翻译起始复合物的解体从而抑制蛋白翻译; (3) uORF 可以引起

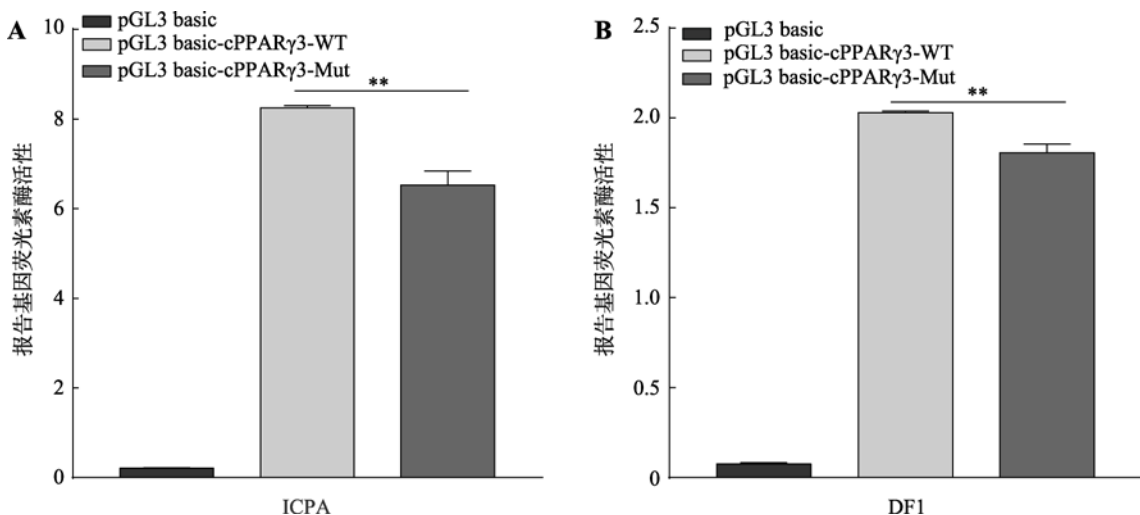


图 4 鸡 *cPPAR γ 3* 5'UTR 区的启动子活性检测

Fig. 4 The promoter activity analysis of the 5'UTR of *cPPAR γ 3*

A: *cPPAR γ 3* 5'UTR 区在 ICPA 细胞中的启动子活性检测分析; B: *cPPAR γ 3* 5'UTR 区在 DF1 细胞中的启动子活性检测分析。** $P < 0.01$ 。

无义介导的 mRNA 降解(nonsense-mediated mRNA decay, NMD), 使模板 mRNA 的降解, 无法翻译下游的编码区^[29]。本研究发现, *cPPAR γ 3* 的 uATG 基本符合 Kozak 规则, 提示该 uATG 在翻译起始阶段可能被核糖体识别并起始翻译, 从而降低了下游编码区的翻译效率。本研究证实 *cPPAR γ 3* 的 uORF 显著抑制鸡 *PPAR γ* 的翻译(图 3, B 和 C), 但 uORF 抑制 *cPPAR γ 3* 蛋白翻译的具体作用机制还有待于进一步探究。

目前已发现许多基因的 5'UTR 所对应的 DNA 序列也是其启动子的一部分, 具有启动子活性。例如, 研究发现 *CCN1*、*CCN2*、*CCN4* 基因的 5'UTR 区都有启动子活性^[30,31]。本研究发现, 鸡 *cPPAR γ 3* 5'UTR 对应的 DNA 序列也具有启动子活性, 且 uORF 中的 uATG 突变会导致启动子活性显著降低(图 4 A 和 B), 这与 *hRluc* 基因和 *cPPAR γ 3* 的 mRNA 表达变化相一致(图 2E, 图 3A)。本研究构建的 5'UTR 报告基因载体和 *cPPAR γ 3* 真核表达载体中, 5'UTR 区对应 DNA 序列在转录时可以作为转录调控元件调控下游基因的转录; 当被转录为 mRNA 的 5'UTR 后, 它又能作为转录后调控元件发挥转录后调控作用。这是 uORF 突变导致下游基因(*hRluc* 和 *cPPAR γ 3*) 的蛋白和 mRNA 表达不一致的原因。

在 uORF 转录后调控分析中, 与野生型 psiCHECK2M-*cPPAR γ 3*-5'UTR-WT 相比, 在 ICPA 细胞中 psiCHECK2M-*cPPAR γ 3*-5'UTR-Mut 的报告基因活性极显著升高, *hRluc* 基因的 mRNA 表达显著下降; 但是在 DF1 细胞中, 尽管变化趋势与 ICPA 细胞中的结果相似, 但 psiCHECK2M-*cPPAR γ 3*-5'UTR-Mut 的报告基因活性和报告基因 *hRluc* 的 mRNA 变化幅度均未达到统计学显著水平(图 2, D 和 E)。与本研究情况类似, 人 *PTCH1b* 基因 5'UTR 的 uORF 在 HEK293T 和 MCF7 细胞中的调控强度也存在差异^[32]。我们推测, *cPPAR γ 3* 的 uORF 发挥作用需要 RNA 结合蛋白、非编码 RNA 以及下游基因 mRNA 等相互作用, 而 ICPA 和 DF1 细胞所表达的 RNA 结合蛋白和非编码 RNA 的种类和含量可能存在一定的差异, 导致 uORF 在这两种细胞中的作用强度不同。

研究发现, 不同 5'末端序列的 *PPAR γ* 转录异构

体有不同的组织表达模式, 如人和小鼠的转录异构体 *PPAR γ 1* 呈现广泛的组织表达, 而 *PPAR γ 2* 的表达主要限于脂肪组织, 人的转录异构体 *hPPAR γ 3* 主要在白色脂肪组织、结肠和巨噬细胞中表达^[33]。同样, 本实验室前期研究发现, 鸡 *PPAR γ* 基因不同转录本的组织表达谱也不同^[9], 这提示 5'UTR 对各个转录本的调控作用可能不同。人 *PPAR γ* 基因各转录本的 5'UTR 区由于其二级结构和包含的调控元件存在差异致使 5'UTR 对 *PPAR γ* 的翻译有不同的调控作用^[34]。鸡 *PPAR γ* 基因的 5'UTR 与人和鼠的同源性很低, 与人和鼠的 *PPAR γ* 基因的 5'UTR 区不同, 鸡 *PPAR γ* 基因的 5'UTR 存在 uORF, 提示 *PPAR γ* 基因在鸡和哺乳动物中的转录后调控机制存在差异。*PPAR γ* 在脂肪生成、糖脂代谢等方面都发挥重要的调控作用, 而鸟类的这些生物学过程均与哺乳动物有较大的区别, 如鸡的脂肪组织对胰岛素不敏感, 鸡血清中的葡萄糖浓度是哺乳动物的 2 倍^[35,36], 鸡 *PPAR γ* 基因的 uORF 可能是导致这些差异的原因之一。研究发现, 人类许多基因由于碱基突变可以产生新的 uORF, 这些 uORF 会导致基因表达异常和疾病的发生。例如, *LDLR* 基因一个 C 碱基的缺失突变, 产生一个新的 uORF, 抑制了 *LDLR* 基因的翻译, 并最终引起人类家族性高胆固醇血症^[37]; *KCNJ11* 基因中-34 位的 C/T 突变产生了一个新的 uORF, 该 uORF 抑制了 *KCNJ11* 基因的翻译, 从而增加了先天性高胰岛素发生的风险^[38]。未来有必要进一步深入探究鸡 *PPAR γ* 基因中 uORF 在脂肪生物学中的作用和作用机制。

参考文献(References):

- [1] Ferr P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 2004, 53(1): 43–50. [DOI]
- [2] Wang L, Na W, Wang YX, Wang YB, Wang N, Wang QG, Li YM, Li H. Characterization of chicken *PPAR γ* expression and its impact on adipocyte proliferation and differentiation. *Hereditas (Beijing)*, 2012, 34(5): 454–464.
王丽, 那威, 王宇祥, 王彦博, 王宁, 王启贵, 李玉茂, 李辉. 鸡 *PPAR γ* 基因的表达特性及其对脂肪细胞增殖分化的影响. *遗传*, 2012, 34(4): 454–464. [DOI]

- [3] Monajemi H, Zhang L, Li G, Jeninga EH, Cao H, Maas M, Brouwer CB, Kalkhoven E, Stroes E, Hegele R A, Leff T. Familial partial lipodystrophy phenotype resulting from a single-base mutation in deoxyribonucleic acid-binding domain of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(5): 1606–1612. [DOI]
- [4] Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPARgamma. *Cell*, 2005, 123(6): 993–999. [DOI]
- [5] Janani C, Kumari BDR. PPAR gamma gene – A review. *Diabetes Metab Syndr*, 2015, 9(1): 46–50. [DOI]
- [6] Zhu Y, Qi C, Korenberg J R, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(17): 7921–7925. [DOI]
- [7] Aprile M, Ambrosio MR, D'esposito V, Beguinot F, Formisano P, Costa V, Ciccodicola A. PPARG in human adipogenesis: Differential contribution of canonical transcripts and dominant negative isoforms. *PPAR Res*, 2014, 2014: 537865. [DOI]
- [8] Cui TT, Xing TY, Chu YK, Li H, Wang N. Genetic and epigenetic regulation of *PPAR γ* during adipogenesis. *Hereditas (Beijing)*, 2017, 39(11): 1066–1077.
崔婷婷, 邢天宇, 褚衍凯, 李辉, 王宁. PPAR γ 在脂肪生成中的遗传和表观遗传调控. *遗传*, 2017, 39(11): 1066–1077. [DOI]
- [9] Duan K, Sun Y, Zhang X, Zhang T, Zhang W, Zhang J, Wang G, Wang S, Leng L, Li H, Wang N. Identification and characterization of transcript variants of chicken peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Poult Sci*, 2015, 94(10): 2516–2527. [DOI]
- [10] Dvir S, Velten L, Sharon E, Zeevi D, Carey LB, Weinberger A, Segal E. Deciphering the rules by which 5'-UTR sequences affect protein expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(30): E2792–2801. [DOI]
- [11] Barbosa C, Peixeiro I, Rom OL. Gene expression regulation by upstream open reading frames and human disease. *PLoS Genet*, 2013, 9(8): e1003529. [DOI]
- [12] Capell A, Fellerer K, Haass C. Progranulin transcripts with short and long 5' untranslated regions (UTRs) are differentially expressed via posttranscriptional and translational repression. *J Biol Chem*, 2014, 289(37): 25879–25889. [DOI]
- [13] Mendell JT, Sharifi NA, Meyers JL, Martinez-murillo F, Dietz HC. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutates genomic noise. *Nat Genet*, 2004, 36(10): 1073–1078. [DOI]
- [14] Johnstone TG, Bazzini AA, Giraldez AJ. Upstream ORFs are prevalent translational repressors in vertebrates. *EMBO J*, 2016, 35(7): 706–723. [DOI]
- [15] Sathirapongsasuti JF, Sathira N, Suzuki Y, Huttenhower C, Sugano S. Ultraconserved cDNA segments in the human transcriptome exhibit resistance to folding and implicate function in translation and alternative splicing. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(6): 1967–1979. [DOI]
- [16] Calvo SE, Pagliarini DJ, Mootha VK. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(18): 7507–7512. [DOI]
- [17] Spriggs KA, Bushell M, Willis AE. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 228–237. [DOI]
- [18] Kubokawa I, Takeshima Y, Ota M, Enomoto M, Okizuka Y, Mori T, Nishimura N, Awano H, Yagi M, Matsuo M. Molecular characterization of the 5'-UTR of retinal dystrophin reveals a cryptic intron that regulates translational activity. *Mol Vis*, 2010, 16(277–279): 2590–2597. [DOI]
- [19] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. [DOI]
- [20] Kozak M. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12(2): 857–872. [DOI]
- [21] Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 2005, 361: 13–37. [DOI]
- [22] Morris DR, Geballe AP. Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(23): 8635–8642. [DOI]
- [23] Landers JE, Cassel SL, George DL. Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Res*, 1997, 57(16): 3562–3568. [DOI]
- [24] Yaman I, Fernandez J, Liu H, Caprara M, Komar AA, Koromilas AE, Zhou L, Snider MD, Scheuner D, Kaufman RJ, Hatzoglou M. The Zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell*, 2003, 113(4): 519–531. [DOI]
- [25] Rogers GW Jr, Edelman GM, Mauro VP. Differential utilization of upstream AUGs in the beta-secretase mRNA suggests that a shunting mechanism regulates translation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 2794–2799. [DOI]

- [26] Lammich S, Sch S, Bel, Zimmer AK, Lichtenthaler SF, Haass C. Expression of the Alzheimer protease BACE1 is suppressed via its 5'-untranslated region. *EMBO Rep*, 2004, 5(6): 620–625. [DOI]
- [27] Hinnebusch AG, Ivanov IP, Sonenberg N. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science*, 2016, 352(6292): 1413–1416. [DOI]
- [28] Jones L, Goode L, Davila E, Brown A, McCarthy DM, Sharma N, Bhidé PG, Armata IA. Translational effects and coding potential of an upstream open reading frame associated with DOPA Responsive Dystonia. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1863(6): 1171–1182. [DOI]
- [29] Hatano M, Umemura M, Kimura N, Yamazaki T, Takeda H, Nakano H, Takahashi S, Takahashi Y. The 5'-untranslated region regulates ATF5 mRNA stability via nonsense-mediated mRNA decay in response to environmental stress. *FEBS J*, 2013, 280(18): 4693–4707. [DOI]
- [30] Huang BL, Dornbach LM, Lyons KM. The 5'-untranslated regions (UTRs) of CCN1, CCN2, and CCN4 exhibit cryptic promoter activity. *J Cell Commun Signal*, 2007, 1(1): 17–32. [DOI]
- [31] Yang C, Bolotin E, Jiang T, Sladek FM., Martinez E. Prevalence of the initiator over the tata box in human and yeast genes and identification of dna motifs enriched in human tata-less core promoters. *Gene*, 2007, 389(1): 52–65. [DOI]
- [32] Ozretić P, Bisio A, Musani V, Trnski D, Sabol M, Levanat S, Inga A. Regulation of human PTCH1b expression by different 5' untranslated region cis-regulatory elements. *RNA Biol*, 2015, 12(3): 290–304. [DOI]
- [33] Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett*, 1998, 438(1–2): 55–60. [DOI]
- [34] McClelland S, Shrivastava R, Medh JD. Regulation of translational efficiency by disparate -UTRs of PPAR splice variants. *PPAR Res*, 2009, 2009(8): 193413. [DOI]
- [35] Ji B, Ernest B, Gooding JR, Das S, Saxton AM, Simon J, Dupont J, M Tayer-coustard S, Campagna SR, Voy BH. Transcriptomic and metabolomic profiling of chicken adipose tissue in response to insulin neutralization and fasting. *BMC Genomics*, 2012, 13: 441. [DOI]
- [36] Daković N, Térézol M, Pitel F, Maillard V, Elis S, Leroux S, Lagarrigue S, Gondret F, Klopp C, Baeza E, Duclos MJ, Roest Crollius H, Monget P. The loss of adipokine genes in the chicken genome and implications for insulin metabolism. *Mol Biol Evol*, 2014, 31(10): 2637–2646. [DOI]
- [37] Sözen MM, Whittall R, Oner C, Tokatli A, Kalkanoglu HS, Dursun A, Coşkun T, Oner R, Humphries SE. The molecular basis of familial hypercholesterolaemia in Turkish patients. *Atherosclerosis*, 2005, 180(1): 63–71. [DOI]
- [38] Huopio H, Jääskeläinen J, Komulainen J, Miettinen R, Kärkkäinen P, Laakso M, Tapanainen P, Voutilainen R, Otonkoski T. Acute insulin response tests for the differential diagnosis of congenital hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(10): 4502–4507. [DOI]

(责任编辑: 赵要风)