网络出版时间:2018-01-10 16:16 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.04.002
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180110.1614.004.html

秦川肉牛 *CGI*-58 基因 SNP 位点与肉质及其启动子活性的关系

王晓宇[1],李安宁[1],桂林生[1],Sayed Haidar Abbas Raza[1],吴 森[1],昝林森[1,2,3,4]

(1 西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100;2 国家肉牛改良中心,陕西 杨凌 712100;
3 现代牛业生物技术与应用国家地方联合工程研究中心,陕西 杨凌 712100;4 陕西省肉牛工程技术研究中心,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 【目的】探究秦川肉牛 *CGI*-58 基因 5′-调控区中 1 个新单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism,SNP)位点与肉品质的关联性,及其对该基因启动子活性的影响。【方法】选取 18～24 月龄的 480 头秦川肉牛为研究对象,测定其肌内脂肪含量、眼肌面积和背膘厚等肉品质性状指标。颈静脉采集试验牛血样,提取 DNA 样品,PCR 扩增 *CGI*-58 基因 5′-调控区,通过直接测序技术检测其单核苷酸多态性,并使用 SAS(version 8.1)软件提供的一般线性模型(GLM)对单核苷酸多态位点与肉质性状进行关联分析。通过 MatInspector 和 cMethPrimer 软件分析 *CGI*-58 基因潜在的转录因子结合位点及其甲基化水平。构建含有 SNP 位点不同基因型的双荧光素酶报告载体,并转染小鼠 3T3L-1、C2C12 细胞系和牛前体脂肪细胞,测定其在 3 种细胞中的荧光素酶相对活性,并进行统计学分析。【结果】在秦川肉牛 *CGI*-58 基因 5′-调控区发现 1 个新的 SNP 位点:g.14451079A>C。g.14451079A>C 位点共有 3 种基因型:AA、CC 和 AC,其中 AA 基因型频率最高,A 等位基因频率大于 C 等位基因频率,且 AC 基因型的启动子活性与眼肌面积显著高于其他基因型。g.14451079A>C 由 A 到 C 的突变发生在 *CGI*-58 启动子区域中一个预测的转录因子结合位点 v-myb 的第 2 个碱基 A 上,该突变导致启动子活性发生了显著变化,且该转录因子结合位点位于软件分析的 CpG 岛上。【结论】秦川肉牛 *CGI*-58 基因启动子区 g.14451079A>C 位点的单核苷酸多态性与眼肌面积存在显著关联,且对该基因启动子活性有极显著影响。

[关键词] *CGI*-58 基因;秦川肉牛;启动子活性;肉品质;v-myb
[中图分类号] S823.12 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2018)04-0013-07

Relationship between *CGI*-58 gene single-nucleotide polymorphism of Qinchuan beef cattle and meat quality and promoter activity

WANG Xiaoyu[1],LI Anning[1],GUI Linsheng[1],SAYED Haidar Abbas Raza[1],
WU Sen[1],ZAN Linsen[1,2,3,4]

(1 *College of Animal Science and Technology,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi* 712100,*China*;
2 *National Beef Cattle Improvement Center in China,Yangling,Shaanxi* 712100,*China*;
3 *Modern Cattle Biotechnology and Application of National-Local Engineering Research Center,Yangling,Shaanxi* 712100,*China*;
4 *Shaanxi Beef Cattle Engineering Center,Yangling,Shaanxi* 712100,*China*)

Abstract:【Objective】This study investigated the association between a single nucleotide polymorphism (SNP) in the 5′-regulatory region of *CGI*-58 gene and meat quality of Qinchuan beef cattle and its effect on promoter activity.【Method】A total of 480 Qinchuan beef cattle at the age of 18 to 24 months

[收稿日期] 2017-03-01
[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2015BAD03B04);国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-38);陕西省科技统筹创新工程计划项目(2014KTZB02-02-01)
[作者简介] 王晓宇(1992－),女,内蒙古乌海人,硕士,主要从事动物生物技术研究。E-mail:863900787@qq.com
[通信作者] 昝林森(1963－),男,陕西扶风人,教授,博士生导师,主要从事肉牛奶牛遗传育种及动物生长发育调控研究。E-mail:zanlinsen@163.com

were selected, and the intramuscular fat content, eye muscle area and back fat thickness were measured. Blood samples were collected from jugular vein and DNA samples were extracted. The 5′-regulatory region of *CGI*-58 gene was amplified by PCR, its single nucleotide polymorphism was detected by direct sequencing, and the general linear model (GLM) provided by SAS (version 8.1) was used to correlate the single nucleotide polymorphic site and fleshy traits. The potential transcription factor binding sites and methylation levels of *CGI*-58 gene were analyzed by MatInspector and cMethPrimer. Double luciferase reporter vectors containing different genotypes of SNP sites were constructed and then transfected them into 3T3L-1 and C2C12 cell lines of mouse and bovine preadipocytes. The relative activity of luciferase in three cells was determined and statistically analyzed.【Result】A new SNP site was found in the 5′-regulatory region of CGI-58 gene: g.14451079A>C. Three genotypes were detected at g.14451079A>C locus including AA, CC and AC. AA genotype had the highest frequency, A allele frequency was greater than C allele frequency, and the promoter activity and eye muscle area of AC genotype were significantly higher than that of other genotypes. The g.14451079A>C mutation from A to C was produced in the second base A of a predicted transcription factor binding site v-myb in the promoter region of the *CGI*-58 promoter region, and this mutation led to significant changes in promoter activity. The transcription factor binding site was located on the CpG island of software analysis.【Conclusion】The single nucleotide polymorphism of Qinchuan beef cattle *CGI*-58 gene promoter region g.14451079A>C site was significantly associated with eye muscle area and had highly significant effect on promoter activity.

Key words: *CGI*-58 gene; Qinchuan beef cattle; promoter activity; meat quality; v-myb

CGI-58 (comparative gene identification-58), 也称为 α/β-水解酶结构域蛋白 5(α/β hydrolase domain containing protein 5, ABHD5)[1], 是甘油三酯水解酶(adipose triglyceride lipase, ATGL)的激活剂, 在组织中广泛表达[2-3]。研究表明, *CGI*-58 在牛脂肪组织、心脏、肌肉、脾、肺、肝和肾中表达, 在肌肉中的表达高于其他组织[4]。同时, *CGI*-58 作为 α/β-水解酶结构域蛋白家族成员之一, 由于其结构的特殊性, 可通过蛋白质-蛋白质相互作用在脂质代谢中发挥重要作用[1]。有研究报道, *CGI*-58 突变可能会因为无法激活 ATGL 而导致三酰甘油在肝、骨骼肌、心脏等组织中的异常积累, *CGI*-58 基因缺陷导致的疾病被命名为鱼鳞癣中性脂质沉积病(neutral lipid storage disease with ichthyosis, NLSDI)[5-8]。2006 年, Lass 等[9]向小鼠睾丸、肝、骨骼肌、心肌、白色和棕色脂肪组织的裂解物中添加谷胱甘肽-S-转移酶-CGI-58 融合蛋白(GST-CGI-58), 发现其中甘油三酯水解酶活性增加 4 倍。脂肪酸结合蛋白 4 (fatty acid binding protein 4, FABP4)基因与皮下脂肪深度和大理石花纹显著相关[10]。2014 年, Ahn 等[4]在比较牛肌内脂肪组织和肌肉组织中脂肪代谢相关基因表达量时发现, *CGI*-58 在肌肉组织中的表达明显高于肌内脂肪组织, 而 *FABP*4 基因在这 2 种组织中的表达显示出相反的趋势。这些研究表明, *CGI*-58 在包括肌肉和脂肪在内的多种组织脂质代谢中发挥调节作用[11]。然而, 目前关于 *CGI*-58 基因的转录调节研究少有报道, 因此以脂肪细胞和肌细胞为模型, 在转录水平上研究 *CGI*-58 基因在脂质代谢中的作用, 探究其与肉质性状的关系, 对于实践中畜禽肉品质的改良具有一定的指导意义。

本试验在研究秦川肉牛新品系(以下简称"秦川肉牛") *CGI*-58 启动子活性的同时, 于 5′-调控区中发现了 1 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点 g.14451079A>C, 对其与秦川肉牛肉质性状进行关联分析, 探究此突变对 *CGI*-58 启动子活性的影响, 以期为 *CGI*-58 转录调控研究和秦川肉牛的分子育种工作提供可靠的理论指导。

1 材料与方法

1.1 材 料

于西北农林科技大学第三试验站秦川肉牛良种繁育场选取 480 头体况相近、18～24 月龄的秦川肉牛, 颈静脉采集血液样品, 低温保存。小鼠前体脂肪细胞 3T3L-1 和小鼠成肌细胞 C2C12 细胞系购自中国科学院细胞库, 牛前体脂肪细胞分离自 4 日龄雄性秦川肉牛皮下脂肪。

Kpn Ⅰ、*Sma* Ⅰ限制性内切酶、T4 DNA 连接

酶(宝生物工程有限公司，大连)，pGL3-Basic Vector、pRL-TK(Promega，美国)，大肠杆菌 DH5α 感受态细胞(天根生化科技有限公司，北京)，无内毒素质粒提取试剂盒(Omega，美国)，FBS(Gibco，美国)，X-treme GENE HP DNA 转染试剂(Roche，美国)等。

1.2　试验方法

1.2.1　肉质性状测定及基因组 DNA 提取　采用兽用 B 超仪对 480 头秦川肉牛的肉质性状进行活体测量，收集肌内脂肪含量(intramscular fat content，IFC)、眼肌面积(eye muscle area，EMA)和背膘厚(back fat thickness，BFT)等数据。

根据标准苯酚-氯仿实验步骤从血液中提取秦川肉牛全基因组 DNA，用多功能酶标仪(INFINIT，M200PRO，TECAN)检测 DNA 纯度及浓度，合格样品于－20 ℃保存备用。

1.2.2　扩增引物的设计与合成　根据 NCBI 公布的牛 *CGI*-58 基因序列(GenBank 登录号：AC_000179)，使用 primer blast 设计 3 对引物，扩增区域覆盖牛 *CGI*-58 基因第一外显子及其上游 2 000 bp 的片段，在上游引物和下游引物的 5′端，分别添加 *Kpn* Ⅰ和 *Sma* Ⅰ的酶切位点及保护性碱基。引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成，引物信息详见表 1。

表 1　秦川肉牛 *CGI*-58 基因 5′-调控区扩增引物信息

Table 1　Primer sequence and information of *CGI*-58 in Qinchuan cattle

引物名称 Primer	引物序列(5′→3′) Primer sequence	产物长度/bp Size	退火温度/℃ Annealing temperature
CGI-58dt1-F	CGG*GGTACC*CACCACCAGCAGGAGAAAG	998	59.3
CGI-58dt1-R	TCC*CCCGGG*ACCCAGGATACACAGGTTTGA		
CGI-58dt2-F	CGG*GGTACC*AGGGAAGGAGAGCGAGGAA	1 081	58.0
CGI-58dt2-R	TCC*CCCGGG*TGCAGGAAACCGTTGAGACT		
CGI-58dt3-F	CGG*GGTACC*CAGCTCCTCCACCAAACCAT	677	58.0
CGI-58dt3-R	TCC*CCCGGG*GGTCACATTCAGACCCGAAG		

注：下划线部分为保护性碱基；*GGTACC* 和 *CCCGGG* 分别为引入的 *Kpn* Ⅰ和 *Sma* Ⅰ酶切位点。

Note：Underlined is protective base；*GGTACC* and *CCCGGG* are the introduced *Kpn* Ⅰ and *Sma* Ⅰ cleavage sites.

1.2.3　引物筛选　随机取 48 份 DNA 样品，每样品吸取等量 DNA 作为模板，用 3 对引物分别进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 15 μL：10 pmol/L 上下游引物各 0.3 μL，20 ng/μL DNA 1 μL，2×Reaction Mix 7.5 μL，ddH_2O 5.9 μL。PCR 反应程序如下：95 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，退火 30 s(退火温度见表 1)，72 ℃延伸 30 s，循环 35 次；最后 72 ℃延伸 10 min。对 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测后，送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序，将测序结果使用 DNASTAR software (version 7.1)在 NCBI 中进行序列比对及分析。

1.2.4　*CGI*-58 基因 5′-调控区的扩增与分析　根据序列比对结果，选取与 NCBI 序列比对后有突变的区域，根据转录因子结合位点预测结果，选择引物 CGI-58dt3-F 和 CGI-58dt3-R 对 480 头秦川肉牛的 DNA 样品进行 PCR 扩增，将 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序，根据测序结果进行基因分型。

用 cMethPrimer 在线软件(http://www.urogene.org/methprimer/)对 *CGI*-58 基因的 5′-调控区进行甲基化水平分析，使用 MatInspector(http://www.genomatix.de)分析启动子区潜在的转录因子结合位点。

1.2.5　群体遗传变异性及 SNP 关联分析　采用 Nei 等[12]的方法对牛群体中的基因杂合度(He)、有效等位基因数(Ne)、多态性信息含量(PIC)和 Hardy-Weinberg 平衡进行统计学分析。用 SAS(version 8.1)软件中的一般线性模型(GLM)分析秦川肉牛肉质性状与 SNP 的关联性，其模型如下：

$$Y_{ijk}=l+A_i+G_j+e_{ijk}。$$

式中：Y_{ijk} 为第 i 个动物测量的各性状，l 为每个性状的总平均值，A_i 为年龄效应，G_j 为基因型效应，e_{ijk} 为随机误差。性状统计数据以“平均值±标准误(Mean±SE)”表示，以体现样本量对群体估计的效应。

1.2.6　双荧光素酶报告载体的构建　根据测序和基因分型结果，构建同一片段不同基因型的报告载体。使用 *Kpn* Ⅰ和 *Sma* Ⅰ限制性内切酶同时消化含不同基因型的 PCR 产物和 pGL3-Basic Vector 质粒，然后使用 T4 DNA 连接酶进行连接，构建双荧光素酶报告载体。

将连接产物转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中，使用无内毒素质粒提取试剂盒提取质粒。对质粒进行测序(生工生物工程(上海)股份有限公司)，并在

NCBI 中进行比对,以确保插入序列的准确性。使用以上双荧光素酶报告载体质粒和 pGL3-Basic 进行转染试验,重复 3 次,每次每种质粒转染 3 孔细胞。

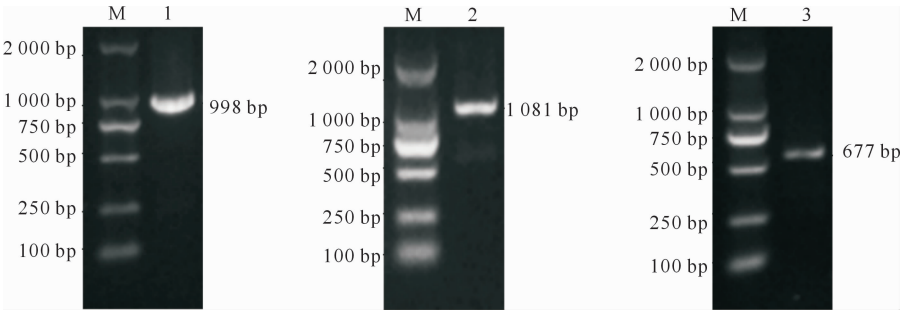
1.2.7 细胞培养和转染 将小鼠前体脂肪细胞 3T3L-1、小鼠成肌细胞 C2C12 细胞系及牛前体脂肪细胞在具有完全培养基的 24 孔板[13]中培养,3T3L-1 和 C2C12 细胞系的完全培养基为体积分数 90% DMEM+体积分数 10% FBS,牛前体脂肪细胞的完全培养基为体积分数 90% F12/DMEM+体积分数 10% FBS。将 1.2.6 中构建好的质粒用 X-treme GENE HP DNA 转染试剂转染到上述 3 种细胞中,同时转染 pRL-TK 质粒作为转染效率标准化的内参[14]。转染后 48 h 收集细胞,检测荧光素酶相对活性,反映启动子的转录活性[15]。运用 SAS(version 8.1)软件中的 ANOVA 程序进行方差分析,采用 Duncan's 法对荧光素酶相对活性值进行多重比较。$P<0.05$ 表示差异显著,$P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *CGI*-58 基因扩增引物的确定

3 对引物对 *CGI*-58 基因 5′-调控区的扩增结果如图 1 所示。由图 1 可知,CGI-58dt1-F/CGI-58dt1-R、CGI-58dt2-F/CGI-58dt2-R、CGI-58dt3-F/CGI-58dt3-R 引物的扩增产物大小分别约为 998,1 081 和 677 bp,与预期结果相符。

根据序列比对结果,选取与 NCBI 序列比对有突变的扩增区域,发现引物 CGI-58dt3-F 和 CGI-58dt3-R 扩增的片段中存在 SNP 位点;根据转录因子结合位点预测发现,该位点在 CGI-58 启动子区域中一个预测的转录因子 v-myb 的结合位点上,故选择引物 CGI-58dt3-F 和 CGI-58dt3-R 扩增的片段进行后续试验。



M. DNA Marker DL2000;1,2,3 分别为引物 CGI-58dt1-F 和 CGI-58dt1-R、CGI-58dt2-F 和 CGI-58dt2-R、CGI-58dt3-F 和 CGI-58dt3-R 的 PCR 扩增结果

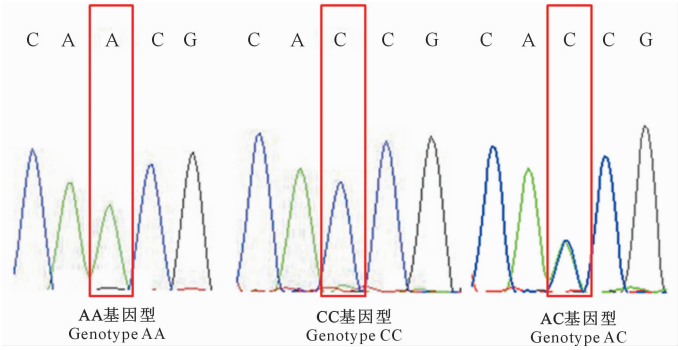
M. DNA Marker DL2000;1,2,3 are amplification products of primer CGI-58dt1-F and CGI-58dt1-R, CGI-58dt2-F and CGI-58dt2-R, CGI-58dt3-F and CGI-58dt3-R, respectively

图 1 秦川肉牛 *CGI*-58 基因 5′-调控区部分扩增结果

Fig. 1 Partial amplification results 5′-regulatory region of *CGI*-58 gene in Qinchuan beef cattle

2.2 *CGI*-58 基因的 5′-调控区分析与 SNP 确定

以 480 头秦川肉牛的血液样品为模板,选择引物 CGI-58dt3-F 和 CGI-58dt3-R 在 *CGI*-58 基因 5′-调控区扩增得到的长 677 bp 的 PCR 产物片段(从 g.14450870 到 g.14451547)进行试验。结果显示,在 *CGI*-58 基因的 5′-调控区中检测到 1 个 SNP:g.14451079A>C,且存在 3 种基因型,即野生纯合型(AA)、突变杂合型(AC)和突变纯合型(CC)(图 2)。



方框标注为 g.14451079 位点 The box is marked as g.14451079 site

图 2 秦川肉牛 *CGI*-58 基因 5′-调控区 g.14451079A>C SNP 位点测序峰图

Fig. 2 Sequencing map of g.14451079A>C SNP site in 5′-regulatory region of *CGI*-58 gene in Qinchuan beef cattle

对 *CGI*-58 基因的 5′-调控区进行甲基化水平分析，预测到 1 个 391 bp 的 CpG 岛（图 3）。对 *CGI*-58 基因 5′-调控区的核苷酸片段（g. 14450870 到 g. 14451547）进行转录因子结合位点分析，预测到过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（Peroxisome proliferator activated receptor γ，PPARγ）、NGFI-B 响应元件（NGFI-B response element，NBRE）、CCAAT 增强子结合蛋白 α（CCAAT enhancer-binding protein α，C/EBPα）、p53F、cAMP 反应性元件结合蛋白（cAMP responsive element binding protein，CREB）、v-myb、异位病毒整合位点 1（Ectopic viral integration site-1，Evi1）、Kruppel 样因子 2（Kruppel-like factor 2，KLF2）、核呼吸因子 1（Nuclear respiratory factor 1，NRF1）和类转录激活因子效应物（Transcription activator-like effector，TALE）等 10 种转录因子的结合位点（图 4）。SNP 位点 g. 14451079A>C 位于 CpG 岛内，突变发生在 v-myb 结合位点（AACG）的第 2 个 A 碱基上（图 4）。

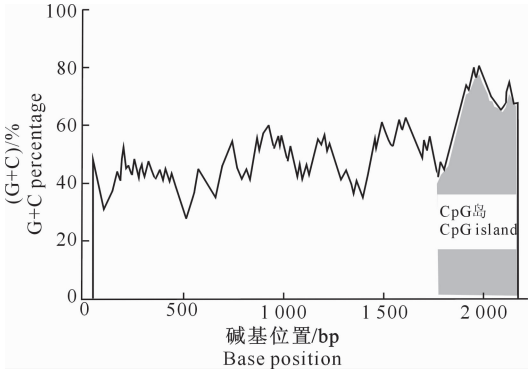


图 3　秦川肉牛 *CGI*-58 基因 5′-调控区的甲基化水平分析

Fig. 3　Analysis of methylation level of 5′-regulatory region of *CGI*-58 gene in Qinchuan beef cattle



箭头表示转录起始位点，方框标示转录因子结合位点，灰色区域为 CpG 岛序列

Arrow indicates the transcription initiation site; The transcription factor binding sites are marked with boxes; The CpG island is highlighted in gray

图 4　秦川肉牛 *CGI*-58 基因 5′-调控区扩增片段的转录因子结合位点预测

Fig. 4　Prediction of transcription factor binding sites of Qinchuan beef cattle *CGI*-58 gene 5′-regulatory region

2.3　*CGI*-58 基因 SNP 位点的群体遗传变异性

由表 2 可知，秦川肉牛 *CGI*-58 基因 5′-调控区 g. 14451079A>C SNP 位点的 3 种基因型中，AA 基因型频率最高，A 等位基因频率大于 C 等位基因频率；该 SNP 的基因型分布在 Hardy-Weinberg 不平衡中，表明基因型频率受到选择、突变或迁移的影响。此 SNP 位点属于中度多态性（0. 25＜PIC＜0. 50），具有一定的遗传潜能。He、Ne 分别为 0. 304 7和 1. 438 2。

表 2　秦川肉牛 *CGI*-58 基因 5′-调控区 SNP 位点的等位基因和基因型频率

Table 2　Genotypic and allelic frequencies in the 5′-regulatory region of *CGI*-58 gene of Qinchuan beef cattle

位点 Locus	基因型频率 Genotypic frequency	等位基因频率 Allelic frequencies	HWE	PIC	He	Ne
g. 14451079A>C	AA=0. 667 0 AC=0. 297 0 CC=0. 041 7	A=0. 812 5 C=0. 187 5	0. 087 7	0. 258 3	0. 304 7	1. 438 2

注：HWE 代表 Hardy-Weinberg 平衡；$\chi^2_{0.05}=5.991$，$\chi^2_{0.01}=9.21$。

Note: HWE for Hardy-Weinberg equilibrium; $\chi^2_{0.05}=5.991$, $\chi^2_{0.01}=9.21$.

2.4 *CGI*-58 基因 SNP 位点与肉质的关联性

由表 3 可知,AC 基因型个体的眼肌面积显著高于 AA 和 CC 型个体,3 种基因型个体的肌内脂肪含量和背膘厚性状无显著性差异($P>0.05$)。

表 3 秦川肉牛 *CGI*-58 基因 5′-调控区 SNP 位点不同基因型与肉质性状的关联性

Table 3 Association of different genotypes of SNP in the 5′-regulatory region of *CGI*-58 gene of Qinchuan beef cattle with carcass traits

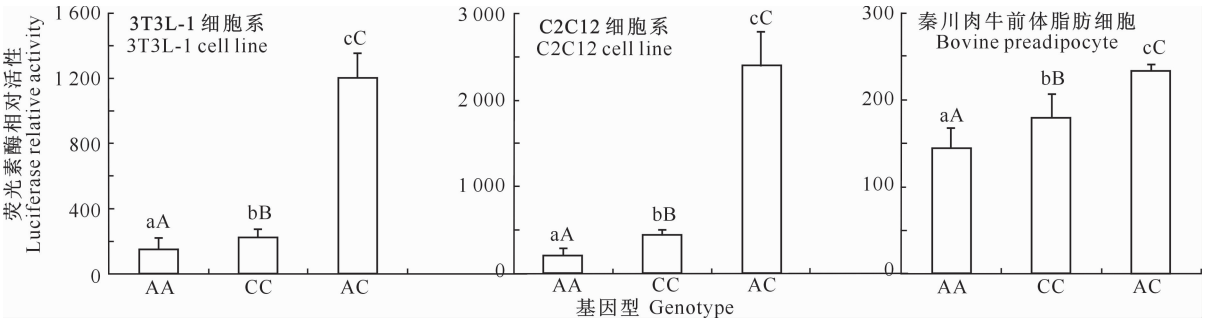
位点 Locus	基因型 Genotype	肌内脂肪含量/% IFC	眼肌面积/(cm² · 头⁻¹) EMA	背膘厚/cm BFT
g.14451079A>C	AA(320)	7.389±0.227	47.389±2.319 b	1.029±0.071
	AC(140)	7.133±0.357	56.648±3.023 a	1.073±0.080
	CC(20)	7.730±0.320	33.650±2.954 b	0.640±0.001

注:基因型一列括号中数据为该基因型样本数量;同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: The data in brackets of the genotype is the sample size, and different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

2.5 SNP 位点不同基因型的荧光素酶活性

由图 5 结果可知,在 3T3L-1、C2C12 细胞系和牛前体脂肪细胞中,AA 基因型的启动子活性最低,AC 基因型的启动子活性最高,3 种基因型在 3 种细胞中的启动子活性差异均达极显著水平。结果表明,转录因子 v-myb 结合位点(AACG)中第 2 个 A 碱基由 A 到 C 的突变会导致启动子活性发生显著变化。



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

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$), and different capital letters indicate very significant difference ($P<0.01$)

图 5 秦川肉牛 *CGI*-58 基因 5′-调控区片段 SNP 位点不同基因型的启动子活性

Fig. 5 Promoter activity of different genotypes of 5′-regulatory region SNP site of Qinchuan beef cattle *CGI*-58 gene

3 讨 论

本试验通过直接测序发现,*CGI*-58 基因 5′-调控区域存在 1 个单核苷酸多态位点 g.14451079A>C,将其不同基因型(AA、AC 和 CC)与肌内脂肪含量、眼肌面积和背膘厚等肉品质性状进行关联分析后发现,其与重要的肉质性状眼肌面积显著相关。在此之前,Ouyang 等[16]在有关鸡肉品质的研究中发现,鸡的皮下脂肪及胴体质量与鸡 *CGI*-58 基因的突变显著相关。在小鼠肌肉中特异性敲除 *CGI*-58 会导致心肌和比目鱼肌中的脂肪变性,同时导致小鼠的葡萄糖耐量和胰岛素敏感性提高[17]。Badin 等[11]在研究 *CGI*-58 对骨骼肌能量代谢调节的具体作用时发现,在人类肌细胞中过表达或降低 *CGI*-58 基因表达,会相应提高或降低甘油三酯的水解和氧化速度,说明 *CGI*-58 是调节骨骼肌甘油三酯代谢和底物氧化的限制因素。同时,CGI-58 蛋白在小鼠糖酵解和氧化活性程度不同的肌肉中有不同的表达量[18]。综上所述,CGI-58 作为甘油三酯水解酶 ATGL 的促进因子[9],在脂肪动员中发挥关键作用[16],传统研究主要集中在脂肪组织或细胞中,但是近年来关于 *CGI*-58 基因在骨骼肌、心肌等组织和细胞中调控中性脂质代谢的研究有所增加。本研究试图从转录水平探究 *CGI*-58 基因对眼肌面积的影响,采用的细胞模型包括小鼠前体脂肪细胞、小鼠成肌细胞以及牛前体脂肪细胞,结果表明,g.14451079A>C 不同基因型在 3 种细胞中的启动子活性差异都达到了极显著水平,由此推测 *CGI*-58 基因的表达可能对眼肌中的肌肉部分和肌内脂肪部分都有重要的影响。

有研究表明,CpG 岛或 CpG 区域甲基化水平的变化可影响转录因子的物理结合[19],从而影响启动子活性。本试验中位于 CpG 岛内的转录因子 v-myb 结合位点(AACG)中的第 2 个 A 碱基由 A 到 C 的

突变导致启动子活性发生了显著变化，但该碱基突变对周围甲基化水平的作用是否对启动子活性有影响，还有待于进一步验证。

同时，*CGI*-58 基因 g.14451079A>C SNP 位点的不同基因型可能导致转录因子 v-myb 与 DNA 序列的结合水平不同，继而影响到 *CGI*-58 基因表达及其在肌肉或脂肪组织中对脂质代谢的调节，最终影响肉品质，如眼肌面积。v-myb 属于原癌基因家族，可结合 CREB，是 CREB 结合蛋白家族（CREB-binding protein，CBP）的成员[20]，而 CBP 是许多脂质代谢酶的重要共激活剂，如固醇调节元件结合蛋白（sterol-regulatory element binding proteins，SREBPs）、C/EBP 和 PPAR[21]。

甘油三酯是许多重要生物化学反应（包括细胞信号转导、基因转录、能量稳态、细胞周期调节和炎症[1,22-24]）的底物和介质。*CGI*-58 的缺乏会导致甘油三酯水解酶功能的缺陷，并且影响机体中的正常脂质代谢[9]。CGI-58 作为溶磷脂酸酰基转移酶，具有单独的水解酶活性，但其特异性的酶功能（特别是在哺乳动物中）尚不清楚。最新研究表明，*CGI*-58 在酿酒酵母、NLSD-1 患者以及 *CGI*-58 敲低小鼠的成纤维细胞的过表达，最终会导致特异性磷脂总体水平的改变[3,25]。*CGI*-58 可促进巨噬细胞中 *PPARγ* 的表达，提高活性[26]，而 *CGI*-58 敲除小鼠则显示能量消耗显著增加[22]。本研究序列分析结果也显示，*CGI*-58 基因 5′-调控区域可能有 CREB、C/EBPα 或 PPARγ 等转录因子结合位点。这些都意味着 *CGI*-58 基因的转录与脂质代谢和能量平衡等信号通路不可分离，因此有必要进一步研究 CGI-58 基因的转录调控机制，以探讨其在细胞脂质代谢中的作用。

[参考文献]

[1] Oberer M，Boeszoermenyi A，Nagy H M，et al. Recent insights into the structure and function of comparative gene identification-58 [J]. Curr Opin Lipidol，2011，22(3)：149-158.

[2] Subramanian V，Rothenberg A，Gomez C，et al. Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes [J]. Journal of Biological Chemistry，2004，279(40)：42062-42071.

[3] Akiyama M，Sakai K，Takayama C，et al. CGI-58 is an α/β-hydrolase within lipid transporting lamellar granules of differentiated keratinocytes [J]. The American Journal of Pathology，2008，173(5)：1349-1360.

[4] Ahn J，Li X，Choi Y M，et al. Differential expressions of G0/G1 switch gene 2 and comparative gene identification-58 are associated with fat content in bovine muscle [J]. Lipids，2014，49(1)：1-14.

[5] Lefèvre C，Jobard F，Caux F，et al. Mutations in CGI-58，the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily，in Chanarin-Dorfman syndrome [J]. The American Journal of Human Genetics，2001，69(5)：1002-1012.

[6] Fischer J，Lefèvre C，Morava E，et al. The gene encoding adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is mutated in neutral lipid storage disease with myopathy [J]. Nature Genetics，2007，39(1)：28-30.

[7] Miranda A，DiMauro S，Eastwood A，et al. Lipid storage myopathy，ichthyosis，and steatorrhea [J]. Muscle & Nerve，1979，2(1)：1-13.

[8] Chanarin I，Patel A，Slavin G，et al. Neutral-lipid storage disease：a new disorder of lipid metabolism [J]. British Medical Journal，1975，1(5957)：553.

[9] Lass A，Zimmermann R，Haemmerle G，et al. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome [J]. Cell Metabolism，2006，3(5)：309-319.

[10] Bartoň L，Bureš D，Kott T，et al. Associations of polymorphisms in bovine DGAT1，FABP4，FASN，and PPARGC1A genes with intramuscular fat content and the fatty acid composition of muscle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls [J]. Meat Science，2016，114：18-23.

[11] Badin P M，Loubière C，Coonen M，et al. Regulation of skeletal muscle lipolysis and oxidative metabolism by the co-lipase CGI-58 [J]. Journal of Lipid Research，2012，53(5)：839-848.

[12] Nei M，Roychoudhury A K Genic variation within and between the three major races of man，Caucasoids，Negroids，and Mongoloids [J]. Am J Hum Genet，1974，26(4)：421-443.

[13] Zhao Z D，Zan L S，Li A N，et al. Characterization of the promoter region of the bovine long-chain acyl-CoA synthetase 1 gene：roles of E2F1，Sp1，KLF15，and E2F [J/OL]. https://www. nature. com/articles/srep19661. DOI：10. 1038/srep19661.

[14] Li A，Wu L，Wang X，et al. Tissue expression analysis，cloning and characterization of the 5′-regulatory region of the bovine FABP3 gene [J]. Molecular Biology Reports，2016，43(9)：991-998.

[15] Li A，Chen Y，Zhao X，et al. Characterization and transcriptional regulation analysis of the porcine TNFAIP8L2 gene [J]. Molecular Genetics and Genomics，2010，284(3)：185-195.

[16] Ouyang H，Liu Q，Xu J，et al. Effects of abhydrolase domain containing 5 gene (ABHD5) expression and variations on chicken fat metabolism [J]. Poultry Science，2015，95(1)：99-107.

[17] Xie P，Kadegowda A K，Ma Y，et al. Muscle-specific deletion of comparative gene identification-58 (CGI-58) causes muscle steatosis but improves insulin sensitivity in male mice [J]. Endocrinology，2015，156(5)：1648-1658.

（下转第 27 页）

receptors reveal conserved transmembrane homology to the human ratherthanrat sequence [J]. Biochimca et Biophysica Acta，1995，1236(1)：201-206.

[17] 王彦男，奚耕思，杨栋梁. 拟黑多刺蚁生活史研究及幼虫龄期划分 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2016，44(3)：167-172.
Wang Y N，Xi G S，Yang D L. Life cycle and larval instar differentiation of *Polyrhachis vicina* Roger [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed)，2016，44(3)：167-172.

[18] Clagett D M，Schoenleber R，Chung C，et al. Preparation of an affinity chromatography matrix for the selective purification of the dopamine D2 receptor from bovine striatal membranes [J]. Biochim Biophys Acta，1989，986(2)：271-280.

[19] Markus T，Danie R，Nadine J，et al. Function and distribution of 5-HT2 receptors in the honeybee (*Apis mellifera*) [J]. PLoS One，2013，8(12)：e82407.

[20] Colas J F，Launay J M，Kellermann O，et al. Drosophila 5-HT2 serotonin receptor：coexpression with fushi-tarazu during segmentation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，1995，92(12)：5441-5445.

[21] Sykes P A，Condron B G. Development and sensitivity to serotonin of *Drosophila serotonergic* varicosities in the central nervous system [J]. Developmental Biology，2005，286(1)：207-216.

[22] Colas J F，Launay J M，Vonesch J L. *Maroteaux* L serotonin synchronises convergent extension of ectoderm with morphogenetic gastrulation movements in Drosophila [J]. Mech Dev，1999，87(1/2)：77-91.

[23] Schaerlinger B，Launay J M，Vonesch J L，et al. Gain of affinity point mutation in the serotonin receptor gene 5-HT2D$_{ro}$ accelerates germband extension movements during *Drosophila gastrulation* [J]. Dev Dyn，2007，236(4)：991-999.

[24] Alice S F，Kerry L S，Daniel R，et al. The role of serotonin in feeding and gut contractions in the honeybee [J]. Journal of Insect Physiology，2013，61(100)：8-15.

[25] Johnson O，Becnel J，Nichols C D. Serotonin 5-HT2 and 5-HT1A-like receptors differentially modulate aggressive behaviors in *Drosophila melanogaster* [J]. Neuroscience，2009，158：1292-1300.

[26] Dierick H A，Greenspan R J. Serotonin andneuropeptide F have opposite modulatory effects on flyaggression [J]. Nat Genet，2007，39：678-682.

(上接第 19 页)

[18] Turnbull P C，Ramos S V，MacPherson R E，et al. Characterization of lipolytic inhibitor G(0)/G(1) switch gene-2 protein (G0S2) expression in male Sprague-Dawley rat skeletal muscle compared to relative content of adipose triglyceride lipase (ATGL) and comparitive gene identification-58 (CGI-58) [J]. PloS One，2015，10(3)：e0120136.

[19] Long M D，Smiraglia D J，Campbell M J. The genomic impact of DNA CpG methylation on gene expression：relationships in prostate cancer [J]. Biomolecules，2017，7(1)：15.

[20] Šmardová J，Nemajerová A，Navrátilová J，et al. CBP sensitizes v-myb-transformed monoblasts to differentiation inducers [J]. Differentiation，2005，73(5)：222-232.

[21] Yamauchi T，Oike Y，Kamon J，et al. Increased insulin sensitivity despite lipodystrophy in Crebbp heterozygous mice [J]. Nature Genetics，2002，30(2)：221-226.

[22] Lord C C，Ferguson D，Thomas G，et al. Regulation of hepatic triacylglycerol metabolism by CGI-58 does not require ATGL co-activation [J]. Cell Reports，2016，16(4)：939-949.

[23] Zechner R，Zimmermann R，Eichmann T O，et al. FAT SIGNALS-lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling [J]. Cell Metabolism，2012，15(3)：279-291.

[24] Greenberg A S，Coleman R A，Kraemer F B，et al. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans [J]. The Journal of Clinical Investigation，2011，121(6)：2102-2110.

[25] Brown J M，Betters J L，Lord C，et al. CGI-58 knockdown in mice causes hepatic steatosis but prevents diet-induced obesity and glucose intolerance [J]. Journal of Lipid Research，2010，51(11)：3306-3315.

[26] Yang D，Chen H，Zeng X，et al. Macrophage CGI-58 attenuates inflammatory responsiveness via promotion of PPARγ signaling [J]. Cellular Physiology and Biochemistry，2016，38(2)：696-713.