

· 动物及兽医生物技术 ·

过表达鸡 Klf2 促进 *klf7* 转录抑制脂肪细胞分化

高琴^{1,2}, 张皓¹, 王英军¹, 慕晓玲^{1,2*}, 张志威^{1,2*}

1 石河子大学医学院 组织胚胎学教研室, 新疆 石河子 832000

2 石河子大学医学院 新疆地方与民族高发疾病教育部重点实验室, 新疆 石河子 832000

高琴, 张皓, 王英军, 慕晓玲, 张志威. 过表达鸡 Klf2 促进 *klf7* 转录抑制脂肪细胞分化[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1670-1683.

GAO Qin, ZHANG Hao, WANG Yingjun, MU Xiaoling, ZHANG Zhiwei. Overexpression of chicken Klf2 promotes *klf7* transcription and inhibits adipocyte differentiation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1670-1683.

摘要: 过表达 Krüppel 样因子 2 (Krüppel like factor 2, Klf2) 或 Klf7 可抑制脂肪细胞形成, 但是在脂肪组织中 Klf2 是否调控 *klf7* 表达还不清楚。本研究采用油红 O 染色和蛋白质印迹法技术研究了过表达 Klf2 对鸡前脂肪细胞分化的影响, 结果显示过表达 Klf2 抑制油酸诱导的前脂肪细胞分化和 *ppary* 表达, 同时促进 *klf7* 表达 ($P < 0.05$)。利用 Spearman 相关性分析研究人和鸡脂肪组织中 *klf2* 和 *klf7* 的表达数据之间的关系, 发现 *klf2* 和 *klf7* 的表达数据存在明显的正相关 ($r > 0.1$)。荧光素酶报告基因分析显示, 在鸡前脂肪细胞中过表达 Klf2 促进鸡 *klf7* 启动子 (-241/-91、-521/-91、-1 845/-91、-2 286/-91 和 -1 215/-91) 的活性 ($P < 0.05$); 此外, 在鸡前脂肪细胞中, *klf7* 启动子 (-241/-91) 报告基因活性与共转染的 *klf2* 过表达质粒的浓度正相关 ($T_{au} = 0.917 66$, $P = 1.074 \times 10^{-7}$), 过表达 Klf2 显著促进 *klf7* 的 mRNA 表达水平。综上所述, 促进 *klf7* 表达可能是 Klf2 抑制鸡脂肪细胞形成的作用途径之一, 鸡 *klf7* 翻译起始位点上游 -241 bp/-91 bp 序列可能介导转录因子 Klf2 对 *klf7* 表达的转录调控作用。

关键词: 脂肪细胞分化; 转录调控; 启动子活性; Krüppel 样因子 2/7

资助项目: 国家自然科学基金(31960647, 31501947); 石河子大学青年创新拔尖人才项目(CXBJ201905)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31960647, 31501947) and the Youth Innovative Talents Project of Shihezi University (CXBJ201905).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Zhiwei, zzwneau@163.com; MU Xiaoling, xiaolingmr@163.com

Received: 2022-07-17; Accepted: 2022-12-09; Published online: 2022-12-16

Overexpression of chicken Klf2 promotes *klf7* transcription and inhibits adipocyte differentiation

GAO Qin^{1,2}, ZHANG Hao¹, WANG Yingjun¹, MU Xiaoling^{1,2*}, ZHANG Zhiwei^{1,2*}

1 Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang, China

2 Key Laboratory of High Incidence of Local and Ethnic Diseases in Xinjiang, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang, China

Abstract: Overexpression of Krüppel like factor 2 (Klf2) or Klf7 inhibits adipocyte formation. However, it remains unclear whether Klf2 regulates *klf7* expression in adipose tissue. In this study, oil red O staining and Western blotting were employed to study the effect of Klf2 overexpression on the differentiation of chicken preadipocytes. The results showed that Klf2 overexpression inhibited the differentiation of chicken preadipocytes induced by oleate and the expression of *ppary*, while promoted *klf7* expression in chicken preadipocytes. Spearman correlation analysis was used to study the correlation between the expression data of *klf2* and *klf7* in the adipose tissue of both human and chicken. The results showed that there was a significantly positive correlation between the expression of *klf2* and *klf7* in adipose tissues ($r>0.1$). Luciferase reporter assay showed that overexpression of Klf2 significantly promoted the activity of chicken *klf7* promoter (-241/-91, -521/-91, -1 845/-91, -2 286/-91, -1 215/-91; $P<0.05$). In addition, the activity of *klf7* promoter (-241/-91) reporter in chicken preadipocytes was significantly positively correlated with the amount of *klf2* overexpression plasmid transfected ($T_{au}=0.917\ 66$, $P=1.074\times 10^{-7}$). Moreover, Klf2 overexpression significantly promoted the mRNA expression of *klf7* in chicken preadipocytes ($P<0.05$). In conclusion, upregulation of *klf7* expression might be one of the pathways that Klf2 inhibits chicken adipocyte differentiation, and the sequence from -241 bp to -91 bp upstream chicken *klf7* translation start site might mediate the regulation of Klf2 on *klf7* transcription.

Keywords: adipocyte differentiation; transcriptional regulation; promoter activity; Krüppel like factor 2/7

脂肪组织是以脂肪细胞为主的结缔组织，是人和动物体内重要的能量储存和内分泌器官^[1]，在机体能量平衡调控中发挥重要作用。脂肪组织形成异常导致肥胖和脂质代谢不良，与 2 型糖尿病^[2-3]、非酒精性脂肪肝、心血管疾病^[4-6]和多种癌症^[7-8]的发生密切相关。

转录调控是脂肪组织形成的主要调控模式，过氧化物酶增殖物受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, Ppar γ)是

脂肪细胞分化的关键调控因子^[9]。此外，Krüppel 样因子 2 (Krüppel like factor 2, Klf2)和 Klf7 等转录因子也在脂肪组织形成中发挥作用。

klf2 最早被发现于肺中高水平表达，又称为肺特异 *klf* (lung *klf*, *lklf*)^[10]，是参与胚胎发育^[11]、肺发生^[12]、脂肪组织形成^[13-14]、内皮细胞功能和免疫功能调控^[15-16]的重要转录因子。*klf7* 广泛表达于成人多种组织，也称为普遍存在的 *klf* (ubiquitous *klf*, *uklf*)^[17]，在神经系统发

育、脂肪组织形成、2型糖尿病、血液疾病和多种癌症的发生中发挥调控作用。

研究哺乳动物脂肪组织,显示 *klf2* 在白色脂肪组织和棕色脂肪组织中均有表达^[18]。*klf2* 在前脂肪细胞中高表达,在成熟脂肪细胞中不表达^[14]。过表达 Klf2 抑制脂肪细胞分化^[13],在前脂肪细胞中 Klf2 至少可以通过促进 delta 样同源物 1/前脂肪因子 1 (*delta-like homologue 1/preadipocyte factor 1, dlk1/pref1*)表达^[13]和抑制 *ppary* 表达来抑制脂肪细胞的分化^[14]。此外, Klf2 对 CCAAT/增强子结合蛋白 α (CCAAT/enhancer binding protein alpha, *c/ebpa*)基因表达也具有抑制作用^[14]。

klf7 表达在 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中先下调后上调;过表达 Klf7 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化的同时抑制 *ppary* 和 *c/ebpa* 的表达。此外, Klf7 调控脂肪细胞因子瘦素和脂联素的表达和分泌。

本课题组前期研究发现, *klf2*^[10]和 *klf7*^[19-20] 在鸡腹部脂肪组织中均有表达^[21],并在体外细胞水平过表达 Klf2 或 Klf7 均可以抑制 *ppary* 启动子活性和油酸诱导的前脂肪细胞分化^[10,22],提示 Klf2 和 Klf7 在脂肪组织形成中可能存在功能交替。目前,脂肪细胞形成过程中 Klf2 和 Klf7 是否存在相互调控,特别是早期表达下调的 Klf2 是否调控后续表达下调的 *klf7* 的表达还不清楚。本文主要研究鸡前脂肪细胞中 Klf2 是否调控 *klf7* 表达,为进一步完善脂肪细胞形成的分子遗传机制奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

永生化的鸡前脂肪细胞系 (immortalized chicken preadipocyte cell lines, CP1)由东北农业大学家禽课题组惠赠,该细胞系信息详见文

献[18];油酸钠和油红 O 粉末分别购自 Thermo Scientific 公司和 Solarbio 公司;空载体质粒 pCMV-myc 购自 Clontech 公司;鸡 Klf2 过表达质粒 pCMV-myc-*klf2* 由本课题组构建并保存,详见参考文献[10];鸡 *klf7* 启动子荧光素酶报告基因质粒 pGL3-*klf7* (-2286/-91)、pGL3-*klf7* (-1 845/-91)、pGL3-*klf7* (-1 215/-91)、pGL3-*klf7* (-521/-91)和 pGL3-*klf7* (-241/-91)由本课题组构建并保存,详见参考文献[23]。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取和反转录

将鸡前脂肪细胞 ICP1 接种到 6 孔板,密度达到 60%–80%汇合时,转染 2.5 μg 的 pCMV-myc-*klf2* 或 pCMV-myc 质粒到细胞中,转染 48 h 后按 Omega 总 RNA 试剂提取盒 (Omega 公司)说明操作。反转录利用 ImProm-II reverse transcriptase 反转录试剂盒 (Promega 公司)说明书操作完成。

1.2.2 质粒制备

将-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存的质粒转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态 (北京全式金生物技术有限公司)中,将转化后的大肠杆菌接种于含有 1%氨苄青霉素 Amp (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的固体 LB 培养平板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱过夜培养后挑取单菌落,放于含有 1%氨苄青霉素的液体 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 10–15 h,之后按质粒小提试剂盒 (天根生化科技有限公司)操作完成,采用双酶切和测序 (生工生物工程 (上海)股份有限公司)验证质粒正确,转染前使用 NanoDrop 测定质粒纯度和浓度,只有当质粒纯度符合 $OD_{260}/OD_{280}=1.8\text{--}2.0$ 时才被用于后续转染实验。

1.2.3 鸡前脂肪细胞培养与诱导分化

鸡前脂肪细胞系 ICP1 细胞培养在 DMEM/F12 (Gibco 公司)补充了 10% FBS (Hyclone 公司)的培养液中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5%的 CO_2 条件下培

养。将培养的细胞以 1×10^5 的密度接种到 6 孔板中,待细胞长到约 60%–80% 时转染 pCMV-myc-*klf2* 和 pCMV-myc 质粒到细胞中,培养 2 d,细胞覆盖率达 100% 时,使用诱导培养基(油酸储存液由油酸钠配制而成,其终浓度为 100 mg/mL,诱导培养基比例为 2 mL 全培养基加入 1 μ L 油酸工作液)培养 48 h 后进行油红 O 染色。

1.2.4 油红 O 染色

将 0.5 g 油红 O 粉末加入 50 mL 100% 异丙醇中配制 1% 油红 O 储存液,滤纸过滤后备用。待染色的细胞,弃培养基,1 \times PBS 润洗 2 次,每孔加入 1 mL 4% 的福尔马林固定 30 min,弃固定液,1 \times PBS 清洗 2 次,每孔加入 1 mL 1% 油红 O 工作液,放置 37 $^{\circ}$ C 恒温箱染 1 h,每孔加入 1 mL 60% 异丙醇进行分色 10–20 s,蒸馏水润洗 3 次;倒置显微镜下不同倍数观察并留图;每孔加入 1 mL 100% 异丙醇后溶解 15 min,在波长 500 nm 处对油红 O 染色进行定量分析。

1.2.5 细胞转染

细胞转染采用 ExFect 转染试剂(Vazyme 生物科技公司)按照说明书操作,将质粒转染到鸡前脂肪细胞中,6 孔培养板每孔细胞转染质粒总量为 2.5 μ g,24 孔培养板每孔细胞转染质粒总量为 0.55 μ g。具体方案见表 1。

1.2.6 荧光素酶活性检测

细胞转染后,继续培养 48 h,用 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Vazyme 生物科技公司)试剂盒按说明书操作裂解并回收细胞,检测萤火虫荧光素酶和海参荧光素酶双报

告基因活性,启动子活性表示为萤火虫荧光素酶和海参荧光素酶的比值(Fluc/Rluc),所有报告基因实验均经过 4 次重复。

1.2.7 Western blotting

分别转染 pCMV-myc-*klf2* 或 pCMV-myc 质粒到鸡前脂肪细胞中 48 h 后,弃培养基,室温下用 PBS 洗涤 2 次。每孔加入 0.2 mL 的细胞裂解液(RIPA buffer;碧云天生物技术公司),冰上裂解 30 min,裂解完成后移至 1.5 mL 离心管中。10 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,取上清,加入 5 \times 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 金属浴 10 min 使蛋白样品变性。电泳上样量为 20 μ L,利用 Bio-Rad 的 Mini-PROTEAN3 电泳系统完成操作。采用 Bio-Rad 的 Mini Trans-Blot 系统转膜 60 min,利用含有 5% 脱脂乳的 TBST (含 0.05% 吐温的 TBS)室温封闭 2 h。洗去膜上的封闭液,将膜孵育在含一抗(小鼠抗 β -actin 单抗#TA-09 购自中杉金桥公司,1:1 000;鼠源 c-myc 标签单抗#2106036A 购自 TaKaRa 公司,1:1 000;兔源 Klf7 抗体#GR212374-49 购自 Abcam 公司,1:1 000;兔源 PPAR γ 抗体#2443S 购自 CST 公司)的 TBST 溶液中,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,然后孵育在含二抗(山羊抗兔#ZB-2301 购自中杉金桥公司,1:10 000;山羊抗小鼠#ZB-2305 购自中杉金桥公司,1:10 000)的 TBST 溶液中,室温摇床孵育 1.5 h。用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,ECL (碧云天生物技术公司)显色曝光。

表 1 不同孔径细胞培养板转染细胞数量及 ExFect 试剂和质粒

Table 1 The number of transfected cells and ExFect reagents and plasmids in cell culture plates with different apertures

Number of cells ($\times 10^5$)	Cells culture plate	Total volume (mL)	ExFect (μ L)	Overexpression plasmid (μ g)	Reporter plasmid (μ g)	genepRL-TK (μ g)
2.0–3.0	6-well plate	2.0	5.0	2.5	/	/
0.5–1.0	24-well plate	0.5	1.5	0.3	0.2	0.05

/: Indicates no data available. The same below.

1.2.8 半定量(Semi-quantitative) PCR 和实时定量(Real-time) PCR

基因表达检测的引物由 BGI 公司合成, 序列如表 2 所示。半定量 RT-PCR 使用 *Taq* DNA Polymerase (Vazyme 生物科技公司) 在 Bio-Rad (型号: C1000 Touch) PCR 系统中进行, 并采用 20 μ L 反应体系, 其中添加 1 μ L 反转录产物作为模板。PCR 扩增条件如表 3 所示。PCR 产物与 4 μ L loading buffer 混合后, 取 10 μ L 在 1.2% 的琼脂糖凝胶中进行电泳分析。

Real-time PCR 采用 20 μ L 反应体系, 其中添加 1 μ L 反转录产物作为模板。Real-time PCR 程序设定为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。所有反应均重复 3 次, 使用 $\Delta\Delta C_t$ 法计算基因表达量。

1.2.9 数据分析

数据分析采用 R 软件完成。数据的正态分布采用 Shapiro-Wilk 检验; 符合正态分布的数据以平均数 \pm 标准差表示, 脂肪组织中 *klf2*

表达水平和 *klf7* 表达水平的相关性分析采用 Spearman 秩检验, 并指定相关系数大于 0, *klf2* 和 *klf7* 表达数据采用局部加权回归法(locally weight scatterplot smoothing, LOWESS)拟合平滑曲线。2 组数据之间的比较采用双尾 *t* 检验, 多组数据之间的比较采用 DUNCAN 多重检验。 $P < 0.05$ 表示统计学差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 过表达 Klf2 抑制鸡前脂肪细胞分化的同时促进 *klf7* 表达

鸡前脂肪细胞 ICP1 中转染 pCMV-myc-*klf2* 质粒 48 h 后, 蛋白质印迹分析显示与对照组相比, 在预测 Klf2 蛋白质大小附近的 55 kDa 位置左右, 转染 Klf2 过表达质粒的细胞可以检测到明显的 myc 标签蛋白, 而转染空载体(pCMV-myc)的细胞没有, 表明 ICP1 细胞系中转染 pCMV-myc-*klf2* 能够成功表达 Klf2 融合蛋白(图 1D)。

表 2 用于半定量和实时 PCR 的引物

Table 2 Primers used for semi-quantitative and real-time PCR

Name	Sequence (5'→3')
<i>klf2</i> (JQ687128)-sense	ATACCATCCTGCCCTCCTTC
<i>klf2</i> (JQ687128)-antisense	CTGCCCATGGAAAGGATAAA
<i>klf7</i> (JQ736790)-sense	GACACCGGCTACTTCTCAGC
<i>klf7</i> (JQ736790)-antisense	CTCGCACATACTCGTCTCCA
β -actin (NM_205518)-sense	TCTTGGGTATGGAGTCCTG
β -actin (NM_205518)-antisense	TAGAAGCATTTGCGGTGG
<i>gapdh</i> (NM_204305.1)-sense	CTGTCAAGGCTGAGAACC
<i>gapdh</i> (NM_204305.1)-antisense	GATAACACGCTTAGCACCA

表 3 半定量 PCR 条件

Table 3 Conditions for semi-quantitative reverse transcription PCR

Gene	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Cycle number	Final extension
<i>klf2</i>	94 $^{\circ}$ C for 7 min	94 $^{\circ}$ C for 30 s	61 $^{\circ}$ C for 30 s	72 $^{\circ}$ C for 30 s	34	72 $^{\circ}$ C for 7 min
<i>klf7</i>	95 $^{\circ}$ C for 7 min	95 $^{\circ}$ C for 30 s	55.4 $^{\circ}$ C for 30 s	72 $^{\circ}$ C for 30 s	33	72 $^{\circ}$ C for 7 min
β -actin	94 $^{\circ}$ C for 5 min	94 $^{\circ}$ C for 30 s	60 $^{\circ}$ C for 30 s	72 $^{\circ}$ C for 30 s	28	72 $^{\circ}$ C for 7 min
<i>gapdh</i>	94 $^{\circ}$ C for 7 min	94 $^{\circ}$ C for 30 s	58 $^{\circ}$ C for 30 s	72 $^{\circ}$ C for 30 s	28	72 $^{\circ}$ C for 7 min

转染后的 ICP1 细胞继续培养到完全接触抑制后,采用诱导培养基诱导细胞分化 48 h 后,油红 O 染色显示,过表达 Klf2 的细胞中脂肪储存明显低于对照组细胞(图 1A、1B),提取比色分析显示,过表达 Klf2 的前脂肪细胞中脂肪含量显著

低于对照组细胞(图 1C),表明过表达 Klf2 抑制 ICP1 细胞向脂肪样细胞分化(图 1A–1C)。此外,蛋白质印迹分析显示,过表达 Klf2 的 ICP1 细胞中 *ppary* 的表达水平显著低于对照组(图 1D、1E),但是 *klf7* 表达水平高于对照组(图 1D、1E)。

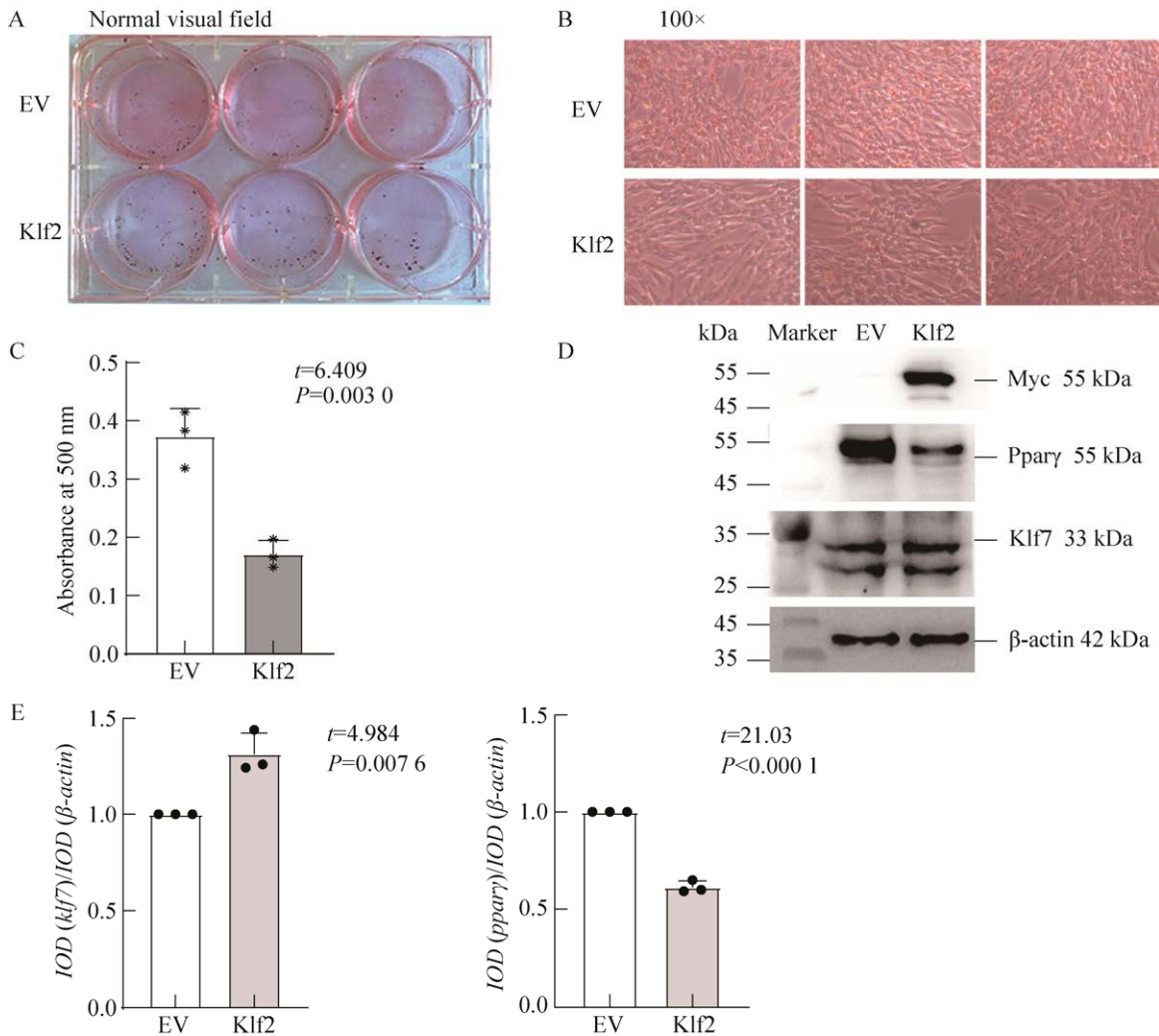


图 1 过表达 Klf2 抑制鸡前脂肪细胞分化的同时上调 *klf7* 表达

Figure 1 The chicken ICP1 preadipocytes were transfected with pCMV-myc-*klf2* (Klf2) or pCMV-myc (empty vector, EV) plasmid for 2 days, and the cells were cultured until 100% confluent. Subsequently, cells were induced to differentiate with 100 μ mol/L oleate for 48 hours, followed by testing the intracellular lipid content using oil red O staining. A–B: Oil red O staining of chicken preadipocytes induced to differentiate by oleate for 48 h. C: The lipid content of chicken preadipocytes measured by absorbance at 500 nm. D: Total protein was collected from ICP1 cells after transfection for 2 d, and the expressions of Ppar γ and *klf7* were studied by Western blotting. E: Histogram of expressions of *ppary* and *klf7* normalized to the expression of β -actin in Western blotting analysis. The data in (C) and (E) represent $\bar{x} \pm s$ deviations of three replicates, and two-tailed *t*-tests were employed to distinguish the different between the two groups.

2.2 脂肪组织中 *klf2* 和 *klf7* 表达数据的相关性

从人类蛋白质图谱 HPA 数据库获取了人脂肪组织中 *klf2* 和 *klf7* 的表达数据, Shapiro-Wilk 检验显示获取的人脂肪组织 *klf2* 和 *klf7* 表达数据不符合正态分布 ($P < 0.05$), Spearman 秩相关分析结果显示无论是腹部脂肪组织还是皮下脂肪组织人 *klf2* 和 *klf7* 的表达数据均存在显著正相关 ($r > 0.2$, $P < 0.05$), 并且, 代谢相对稳定的皮下脂肪组织中二者的相关系数高于代谢旺盛的腹部脂肪组织(图 2A)。

利用本课题组前期报道的鸡腹部脂肪组织生长发育过程中 *klf2*^[10] 和 *klf7*^[22] 表达数据研究鸡脂肪组织中 *klf2* 和 *klf7* 表达的相关性。Shapiro-Wilk 检验显示本研究使用的鸡脂肪组织 *klf2* ($W = 0.972\ 19$, $P = 0.022\ 04$) 和 *klf7* ($W = 0.914\ 27$, $P = 3.055\text{e-}06$) 表达数据不符合正态分布, Spearman 秩相关分析结果显示鸡腹部脂肪组织中 *klf2* 和 *klf7* 表达数据之间也存在明显的正相关 ($r = 0.149\ 411\ 5$, $P = 0.060\ 44$; 图 2B)。

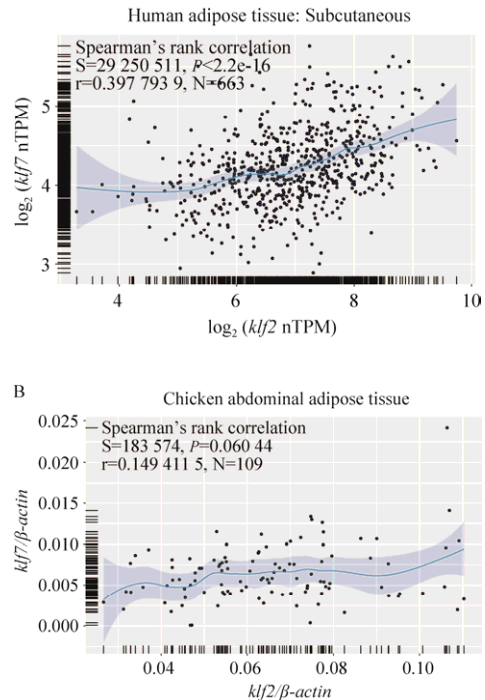
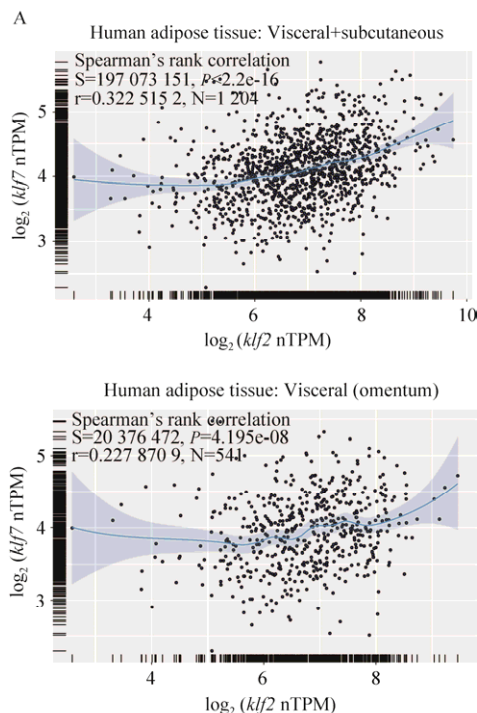


图 2 人(A)和鸡(B)皮下和内脏脂肪组织中 *klf2* 和 *klf7* 表达水平的相关性

Figure 2 Spearman correlation analysis was used to study the association between the expression data of *klf2* and *klf7* in human and chicken adipose tissues. Correlation analysis of the expression data of *klf2* and *klf7* in both visceral and subcutaneous adipose tissue of human (A) and in chicken abdominal adipose tissue (B).

2.3 过表达 Klf2 促进鸡 *klf7* 的启动子活性

为了进一步探索 Klf2 是否调控 *klf7* 表达, 本研究在鸡前脂肪细胞 ICP1 中利用荧光素酶报告基因技术研究了过表达 Klf2 (图 3C) 对多个不同长度 *klf7* 启动子活性的影响。结果显示, 与对照组相比, 过表达 Klf2 促进鸡 5 种不同长度 *klf7* 启动子 (-2 286/-91、-1 845/-91、-1215/-91、-521/-91 和 -241/-91) 报告基因的荧光素酶活性 ($P < 0.05$, 图 3A), 表明 Klf2 可能调控 *klf7* 的转录。

由于 Klf2 对所有长度的鸡 *klf7* 启动子活性均有调控作用, 我们推测至少一个 Klf2 调控

klf7 转录-241 bp 录的作用位点可能位于相对较小的启动子区域, 即翻译起始位点上到-91 bp 的序列区间。

研究鸡前脂肪细胞转染不同浓度梯度 Klf2

过表达质粒对 *klf7* 启动子(-241/-91)报告基因活性的影响, 发现转染的过表达 Klf2 质粒浓度与 *klf7* 启动子活性之间存在明显的剂量效应(图 3A, $Tau=0.917\ 66$, $P=1.074\times 10^{-7}$, 图 3B),

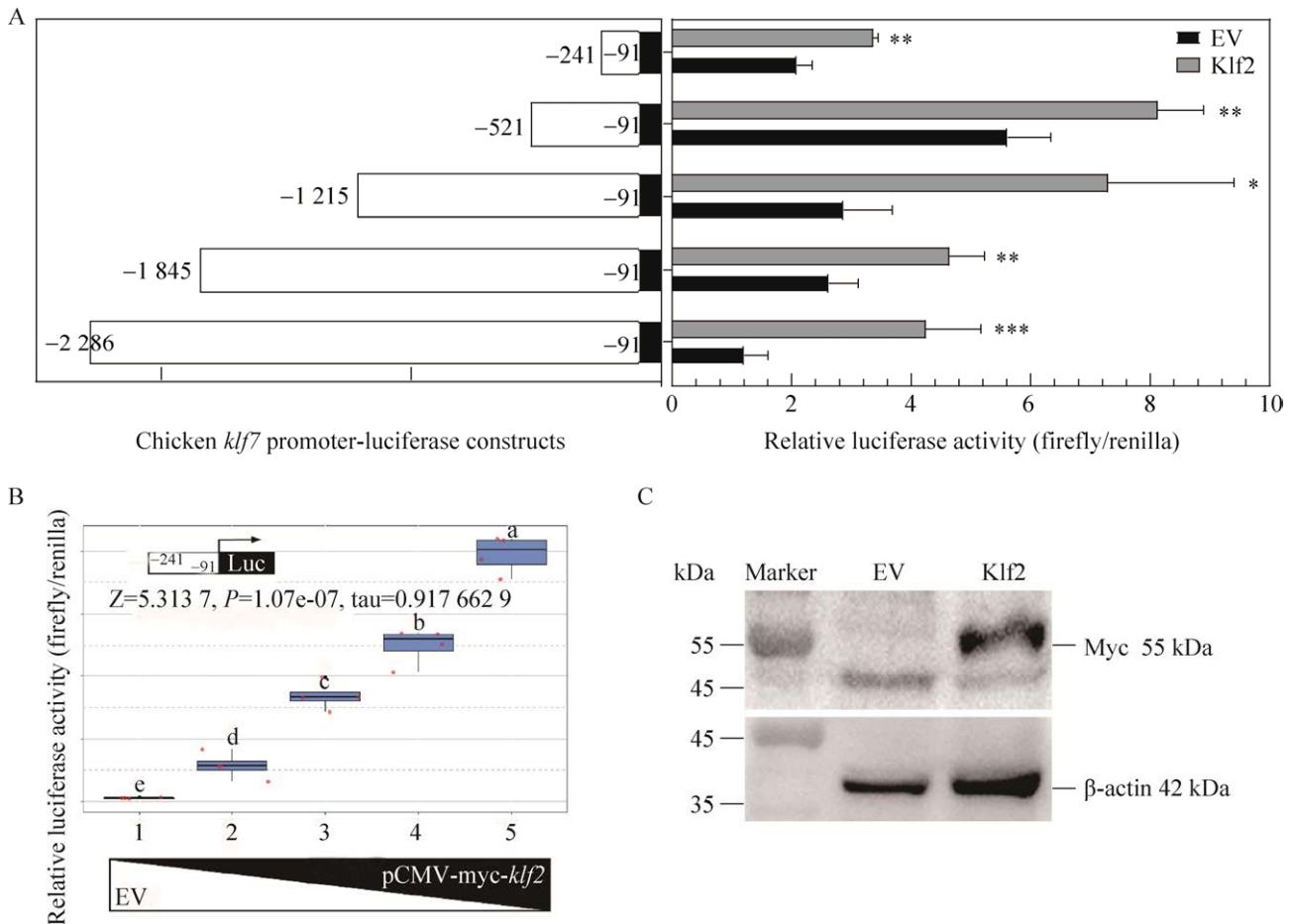


图 3 鸡不同长度 *klf7* 启动子活性与 Klf2 过表达水平的关系

Figure 3 Chicken ICP1 preadipocytes were transfected with Klf2 overexpressed plasmid (or empty vector, EV) and chicken *klf7* promoter luciferase reporter plasmids. A: Effect of overexpression of Klf2 on the activity of 5 kinds of different constructs of chicken *klf7* promoter. EV: Cells transfected with pCMV-myc; Klf2: Cells transfected with plasmid pCMV-myc-*klf2*. Double-tailed unpaired *t* test was used to analyze the difference between the two groups, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$. ***: $P<0.001$. Klf2 overexpression group versus control group (EV). B: Dose effect of Klf2 overexpression on the promoter activity of pGL3-*klf7* (-241/-91). The mass ratios of EV and the Klf2-overexpression plasmid (pCMV-myc-*klf2*) in the five plasmids mixture (1-5) were 3:0, 2:1, 1:1, 1:2 and 0:3, respectively. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$, Duncan's multiple test). C: Expression of myc-tag protein in chicken ICP1 preadipocytes transfected with pCMV-myc and pCMV-myc-*klf2* plasmid, respectively.

并且所有转染过表达质粒的细胞中 *klf7* 启动子活性都显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

JASPAR 在线工具预测结果显示, 鸡 *klf7* 启动子(-2 286/-91)序列上存在多个预测的 Klf2 转录因子结合位点, 其中 29 个预测相对得分大于 0.85, 2 个位于翻译起始位点上游-250 bp 到 -91 bp 的序列区间内(表 4)。

2.4 过表达 Klf2 促进鸡前脂肪细胞中 *klf7* 内源性 mRNA 表达

在鸡前脂肪细胞 ICP1 中转染 pCMV-myc-*klf2* 质粒 48 h 后, 半定量 RT-PCR 和 real-time PCR 分析显示, 过表达 Klf2 的 ICP1 细胞中 *klf7* 内源性 mRNA 表达水平明显高于对照组细胞 ($P < 0.05$, 图 4A-4C)。

表 4 利用 JASPAR 预测鸡 *klf7* (-2 286/-91) 启动子上 Klf2 结合位点

Table 4 The prediction of Klf2 binding sites on chicken *klf7* promoter (-2 286/-91) by JASPAR

Matrix ID	Name	Score	Relative score	Start	End	Strand	Predicted sequence
MA1515.1	Klf2	13.607 82	0.975 044	-446	-436	-	CGCCCCGCCCCA
MA1515.1	Klf2	12.004 17	0.943 536	-509	-499	+	CCCCCGCCCC
MA1515.1	Klf2	10.768 37	0.919 255	-1 513	-1 503	+	GCCCCGACCCA
MA1515.1	Klf2	10.691 45	0.917 744	-333	-323	-	CTCCCCGCCCC
MA1515.1	Klf2	10.529 12	0.914 555	-843	-833	+	CCGCACGCCCA
MA1515.1	Klf2	10.494 19	0.913 868	-365	-355	-	CCCCCGCCCCG
MA1515.1	Klf2	9.967 084	0.903 512	-827	-817	-	CGCCACTCCCC
MA1515.1	Klf2	9.789 145	0.900 016	-410	-400	-	GACCCCCCCCC
MA1515.1	Klf2	9.639 309	0.897 072	-452	-442	-	GCCCACCCCC
MA1515.1	Klf2	9.411 935	0.892 604	-248	-238	-	CCCCGCGCCCC
MA1515.1	Klf2	8.884 903	0.882 249	-518	-508	+	GGCCCCCTCCCC
MA1515.1	Klf2	8.828 209	0.881 135	-810	-800	+	CCGCCCCGCCCC
MA1515.1	Klf2	8.739 429	0.879 391	-580	-570	+	AGTCCCGCCCC
MA1515.1	Klf2	8.734 785	0.879 300	-246	-236	-	CACCCGCGGCC
MA1515.1	Klf2	8.696 106	0.878 540	-415	-405	-	CCCCCTCCCA
MA1515.1	Klf2	8.428 398	0.873 280	-411	-401	-	ACCCCCCCCCCT
MA1515.1	Klf2	8.425 542	0.873 224	-727	-717	+	CGCGCCGCCCC
MA1515.1	Klf2	8.425 542	0.873 224	-653	-643	+	CGCGCCGCCCC
MA1515.1	Klf2	8.330 393	0.871 354	-704	-694	+	CACCGCGCGCA
MA1515.1	Klf2	8.108 907	0.867 003	-732	-722	+	AGCCCCGCGCC
MA1515.1	Klf2	8.055 942	0.865 962	-450	-440	-	CCGCCACCCC
MA1515.1	Klf2	7.959 113	0.864 060	-339	-329	-	GCCCCCTCCCC
MA1515.1	Klf2	7.885 082	0.862 605	-1 090	-1 080	+	GGCCCCGCACC
MA1515.1	Klf2	7.829 531	0.861 514	-504	-494	+	CGCCCCGCCGT
MA1515.1	Klf2	7.724 930	0.859 458	-335	-325	-	CCCCGCCCCCT
MA1515.1	Klf2	7.642 578	0.857 840	-1 382	-1 372	-	CACTGCACCT
MA1515.1	Klf2	7.633 963	0.857 671	-1 465	-1 455	+	AGAAACGCCCT
MA1515.1	Klf2	7.405 438	0.853 181	-658	-648	+	CGCCGCGCGCC
MA1515.1	Klf2	7.303 934	0.851 187	-1 707	-1 697	-	AAATACACCCA

The “+” and “-” in the column of “Start” and “End” indicate upstream and downstream the initiator codon of chicken *klf7*, respectively. The “+” and “-” in the column of “Strand” indicate the same and opposite to the direction of coding sequence of chicken *klf7*, respectively.

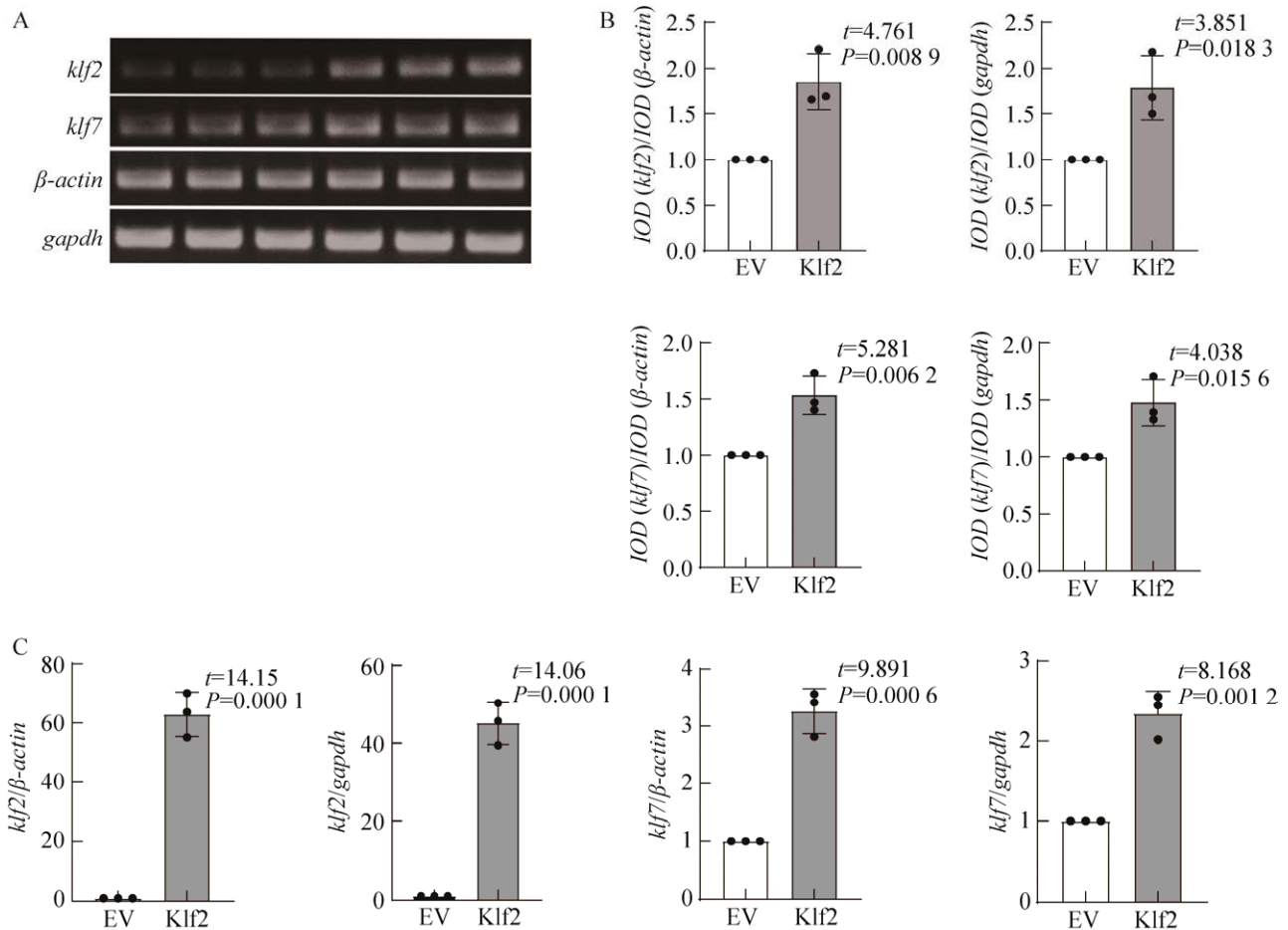


图4 过表达 Klf2 对鸡前脂肪细胞中 *klf7* 内源性 mRNA 表达的影响

Figure 4 The effect of overexpression of Klf2 on endogenous *klf7* mRNA expression in chicken proadipocytes. A: Semi-quantitative RT-PCR analysis of the effect of overexpression of Klf2 on endogenous *klf7* mRNA expression in chicken proadipocytes. B: Histogram of expressions of Klf2 and Klf7 normalized to the expression level of *gapdh* and β -actin in semi-quantitative RT-PCR analysis, respectively. Two-tailed *t*-tests were employed to distinguish the difference between the two groups. C: Real-time PCR analysis of *klf7* expression.

3 讨论与结论

脂肪细胞形成是生命科学研究的热点, 以 Ppar γ 为核心的转录调控网络^[24-26]被证明是脂肪细胞形成的关键调控方式; 很多其他作用因子能够通过作用于 *ppary* 的表达或功能影响脂肪细胞形成^[27-28]。Klfs 是一类蛋白质的羧基端具有 3 个保守的 C₂H₂ 锌指结构的转录因子, 参与调控人和动物多个生理和生化过程^[29-30]。Klfs

可以通过保守的锌指结构识别并结合靶基因调控序列区的富含 GC 序列或 CACCC 模序, 其 N 端结构域高度可变, 参与转录激活或抑制蛋白-蛋白的相互作用^[31], 此外, Klfs 家族成员的 DNA 结合位点相似^[32], 多个 Klfs 成员可以调控同一个靶基因, 在多个生命过程中不同 Klfs 存在对同一靶基因的交替调控现象^[32-33]。

本课题组前期研究显示 Klf2 和 Klf7 均可以调控鸡脂肪细胞形成和 *ppary* 的表达^[20-21,34-35]。

但是,目前 Klf2 是否调控 *klf7* 表达尚未见报道,研究脂肪细胞中 Klf2 对 *klf7* 表达的调控作用,对于完善脂肪细胞形成的分子机制具有重要意义。本研究利用过表达技术研究了 Klf2 对鸡前脂肪细胞 ICP1 分化的影响,结果显示过表达 Klf2 明显抑制油酸诱导的鸡前脂肪细胞分化和鸡前脂肪细胞中 *Ppar γ* 的表达,与本课题组前期在原代鸡前脂肪细胞报道的结果一致^[36];进一步表明在体外细胞水平,过表达 Klf2 确实可以抑制鸡脂肪细胞分化。哺乳动物的研究报道显示 Klf2 主要表达于前脂肪细胞,在成熟脂肪细胞不表达^[13],在细胞成脂分化初期 *klf2* 表达水平下调;而 *klf7* 同时高水平表达于脂肪细胞分化初期和末期,在分化中期表达下调^[17,35]。在脂肪细胞形成过程中, Klf2 和 Klf7 具有不完全相同的时空表达模式和相同的靶基因 *ppar γ* ,暗示了 Klf2 和 Klf7 对脂肪细胞形成和 *ppar γ* 表达可能存在时空顺序上的交替调控。本研究发过表达 Klf2 的前脂肪细胞中 *klf7* 的蛋白表达水平高于对照组(图 1),表明 Klf2 可能促进 *klf7* 的表达。我们猜测在脂肪细胞形成过程中,先期表达下调的 *klf2* 可能对后续表达下调的 *klf7* 的表达具有调控作用。

针对脂肪组织中 *klf2* 和 *klf7* 的表达数据的相关性分析显示,无论是成人脂肪组织还是生长发育不同阶段的鸡腹部脂肪组织中 *klf2* 与 *klf7* 的表达数据之间都存在显著正相关(图 2),提示了脂肪组织中 *klf2* 和 *klf7* 的表达之间存在联系。为了进一步明确 Klf2 是否通过转录途径调控 *klf7* 的表达,本研究利用荧光素酶报告基因技术研究了过表达 Klf2 对多个不同长度 *klf7* 启动子活性的影响,结果显示过表达 Klf2 显著促进所有长度 *klf7* 启动子报告基因的活性(图 3),Klf2 有可能通过调控 *klf7* 转录促进其表达。

Klf2 对不同长度 *klf7* 启动子(-2 286/-91、-1 845/-91、-1 215/-91、-521/-91 和-241/-91)活性均具有明显促进作用(图 3A),提示了 Klf2 调控 *klf7* 转录的一个作用位点可能位于靠近 *klf7* 转录起始位点附近的较小的启动子区域——*klf7* 翻译起始位点上游-241 bp/-91 bp 的区间。为了进一步验证 Klf2 是否确实对 *klf7* 翻译起始位点上游-241 bp/-91 bp 序列的启动子活性具有调控作用,本研究利用不同浓度梯度的 Klf2 过表达质粒和 *klf7* 启动子(-241/-91)报告基因质粒进行了共转染,荧光素酶报告基因分析结果显示 Klf2 过表达对 *klf7* 启动子(-241/-91)报告基因活性的促进作用存在明显的剂量效应(图 3B),进一步表明 *klf7* 翻译起始位点上游-241 bp/-91 bp 的序列区间中可能至少存在一个 Klf2 调控 *klf7* 转录的作用位点。生物信息学分析显示, *klf7* 翻译起始位点上游-250 bp/ -91 bp 的序列区间的存在预测的 Klf2 结合位点(表 4),Klf2 很可能通过结合这些位点调控 *klf7* 转录。

此外,利用定量 RT-PCR 技术研究过表达 Klf2 对前脂肪细胞中 *klf7* 内源性 mRNA 表达水平的影响,结果显示与蛋白水平一致,过表达 Klf2 明显促进 *klf7* 的内源性 mRNA 表达(图 4A-4C),提示 Klf2 调控 *klf7* 表达的主要途径可能是转录调控, Klf2 至少可能作用于 *klf7* 转录起始位点附近的较小启动子(-250 bp/-91 bp)区域调控 *klf7* 转录(图 5)。

本研究结果显示,在脂肪组织中 *klf2* 和 *klf7* 的表达数据存在正相关,体外鸡前脂肪细胞中过表达 Klf2 在转录水平促进 *klf7* 表达,并且鸡 *klf7* 翻译起始位点上游-241 bp/-91 bp 区间中可能至少存在一个 Klf2 作用位点。本研究结果有助于完善脂肪细胞形成的分子遗传网络,并为进一步揭示代谢疾病的分子机制提供参考。

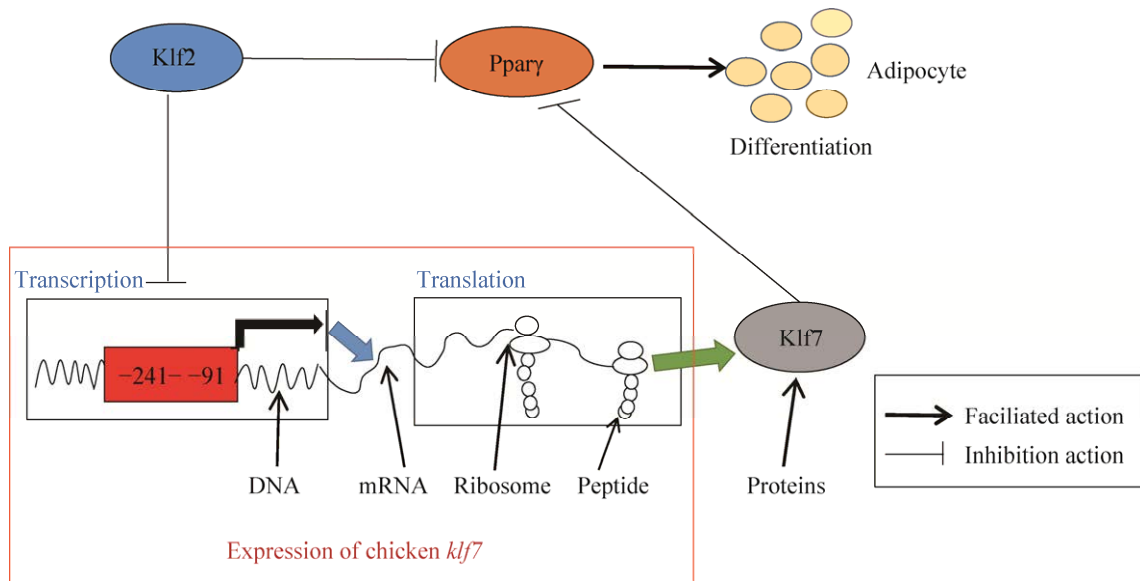


图 5 Klf2 在促进 *klf7* 表达和抑制鸡前脂肪细胞分化中的作用

Figure 5 The roles of Klf2 in promoting *klf7* expression and inhibiting differentiation of chicken preadipocytes.

REFERENCES

- [1] ROSEN ED, MacDOUGALD OA. Adipocyte differentiation from the inside out[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006, 7(12): 885-896.
- [2] GROUP LAR, WING RR, BOLIN P, BRANCATI FL, BRAY GA, CLARK JM, CODAY M, CROW RS, CURTIS JM, EGAN CM, ESPELAND MA, EVANS M, FOREYT JP, GHAZARIAN S, GREGG EW, HARRISON B, HAZUDA HP, HILL JO, HORTON ES, HUBBARD VS, et al. Cardiovascular effects of intensive lifestyle intervention in type 2 diabetes[J]. The New England Journal of Medicine, 2013, 369(2): 145-154.
- [3] ROHDEN F, COSTA CS, HAMMES TO, MARGIS R, PADOIN AV, MOTTIN CC, GUARAGNA RM. Obesity associated with type 2 diabetes mellitus is linked to decreased PC1/3 mRNA expression in the jejunum[J]. Obesity Surgery, 2014, 24(12): 2075-2081.
- [4] ALVEHUS M, BURÉN J, SJÖSTRÖM M, GOEDECKE J, OLSSON T. The human visceral fat depot has a unique inflammatory profile[J]. Obesity, 2010, 18(5): 879-883.
- [5] KOPELMAN PG. Obesity as a medical problem[J]. Nature, 2000, 404(6778): 635-643.
- [6] SERAVALLE G, GRASSI G. Obesity and hypertension[J]. Pharmacological Research, 2017, 122: 1-7.
- [7] AGHAJAN M, LI N, KARIN M. Obesity, autophagy and the pathogenesis of liver and pancreatic cancers[J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2012, 27: 10-14.
- [8] BANDINI M, GANDAGLIA G, BRIGANTI A. Obesity and prostate cancer[J]. Current Opinion in Urology, 2017, 27(5): 415-421.
- [9] WANI MA. cDNA isolation, genomic structure, regulation, and chromosomal localization of human lung kruppel-like factor[J]. Genomics, 1999, 60(1): 78-86.
- [10] ZHANG ZW, RONG EG, SHI MX, WU CY, SUN B, WANG YX, WANG N, LI H. Expression and functional analysis of Krüppel-like factor 2 in chicken adipose tissue[J]. Journal of Animal Science, 2014, 92(11): 4797-4805.
- [11] WANI MA, MEANS RT Jr, LINGREL JB. Loss of LKLF function results in embryonic lethality in mice[J]. Transgenic Research, 1998, 7(4): 229-238.
- [12] WANI MA, WERT SE, LINGREL JB. Lung kruppel-like factor, a zinc finger transcription factor, is essential for normal lung development[J]. Journal of

- Biological Chemistry, 1999, 274(30): 21180-21185.
- [13] WU JH, SRINIVASAN SV, NEUMANN JC, LINGREL JB. The KLF2 transcription factor does not affect the formation of preadipocytes but inhibits their differentiation into adipocytes[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(33): 11098-11105.
- [14] BANERJEE SS, FEINBERG MW, WATANABE M, GRAY S, HASPEL RL, DENKINGER DJ, KAWAHARA R, HAUNER H, JAIN MK. The Krüppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(4): 2581-2584.
- [15] KUO CT, VESELITS ML, LEIDEN JM. LKLF: a transcriptional regulator of single-positive T cell quiescence and survival[J]. *Science*, 1997, 277(5334): 1986-1990.
- [16] CARLSON CM, ENDRIZZI BT, WU JH, DING XJ, WEINREICH MA, WALSH ER, WANI MA, LINGREL JB, HOGQUIST KA, JAMESON SC. Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration[J]. *Nature*, 2006, 442(7100): 299-302.
- [17] 张志威, 李辉, 王宁. KLF 转录因子家族与脂肪细胞分化[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(11): 983-990.
- ZHANG ZW, LI H, WANG N. Kruppel-like factors (KLFs) and adipocyte differentiation[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 25(11): 983-990 (in Chinese).
- [18] WANG W, ZHANG TM, WU CY, WANG SS, WANG YX, LI H, WANG N. immortalization of chicken preadipocytes by retroviral transduction of chicken TERT and TR[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177348.
- [19] ZHANG ZW, WANG ZP, ZHANG K, WANG N, LI H. Cloning, tissue expression and polymorphisms of chicken Krüppel-like factor 7 gene[J]. *Animal Science Journal*, 2013, 84(7): 535-542.
- [20] SUN YN, JIN Z, ZHANG XY, CUI TT, ZHANG WJ, SHAO SL, LI H, WANG N. GATA binding protein 3 is a direct target of kruppel-like transcription factor 7 and inhibits chicken adipogenesis[J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 610.
- [21] 张志威, 陈月婵. 转录因子 KLF2、KLF3 和 KLF7 在鸡脂肪组织中的生物学功能研究[M]. 哈尔滨: 黑龙江大学出版社, 2021.
- ZHANG ZW, CHEN YC. Biological Function of Transcription Factors KLF2, KLF3 and KLF7 in Chicken Adipose Tissue[M]. Heilongjiang: University Press, 2021 (in Chinese).
- [22] ZHANG ZW, WANG HX, SUN YN, LI H, WANG N. Klf7 modulates the differentiation and proliferation of chicken preadipocyte[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2013, 45(4): 280-288.
- [23] LIN T, CHEN YC, ZHANG YL, LI YY, GAO LY, ZHANG ZW. Transcriptional control of chicken KLF7 promoter in preadipocytes[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2021, 53(2): 149-159.
- [24] TONTONOZ P, HU E, SPIEGELMAN BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor[J]. *Cell*, 1994, 79(7): 1147-1156.
- [25] ROSEN ED, SARRAF P, TROY AE, BRADWIN G, MOORE K, MILSTONE DS, SPIEGELMAN BM, MORTENSEN RM. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*[J]. *Molecular Cell*, 1999, 4(4): 611-617.
- [26] BARAK Y, NELSON MC, ONG ES, JONES YZ, RUIZ-LOZANO P, CHIEN KR, KODER A, EVANS RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development[J]. *Molecular Cell*, 1999, 4(4): 585-595.
- [27] TONG Q, DALGIN G, XU H, TING CN, LEIDEN JM, HOTAMISLIGIL GS. Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition[J]. *Science*, 2000, 290(5489): 134-138.
- [28] MINEGISHI N, OHTA J, YAMAGIWA H, SUZUKI N, KAWAUCHI S, ZHOU Y, TAKAHASHI S, HAYASHI N, ENGEL J D, YAMAMOTO M, MINEGISHI N. The mouse *GATA-2* gene is expressed in the para-aortic splanchnopleura and aorta-gonads and mesonephros region[J]. *Blood*, 1999, 93(12): 4196-4207.
- [29] KIM CK. SP and KLF transcription factors in digestive physiology and diseases[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(8): 1845-1875.
- [30] 庄兆辉, 仲永, 陈月婵, 张志威. Krüppel 样因子在肌肉组织中的功能研究进展[J]. *遗传*, 2018, 40(9): 733-748.
- ZHUANG ZH, ZHONG Y, CHEN YC, ZHANG ZW. Research progress on the roles of Krüppel-like factors in muscle tissues[J]. *Hereditas*, 2018, 40(9): 733-748 (in Chinese).
- [31] BIEKER JJ. Krüppel-like factors: three fingers in

- many pies[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(37): 34355-34358.
- [32] SHYU KG, CHENG WP, WANG BW. Angiotensin II downregulates microRNA-145 to regulate kruppel-like factor 4 and myocardin expression in human coronary arterial smooth muscle cells under high glucose conditions[J]. Molecular Medicine (Cambridge, Mass), 2015, 21(1): 616-625.
- [33] SUE N, JACK BHA, EATON SA, PEARSON RCM, FUNNELL APW, TURNER J, CZOLIJ R, DENYER G, BAO SS, MOLERO-NAVAJAS JC, PERKINS A, FUJIWARA Y, ORKIN SH, BELL-ANDERSON K, CROSSLEY M. Targeted disruption of the basic Krüppel-like factor gene (*Klf3*) reveals a role in adipogenesis[J]. Molecular and Cellular Biology, 2008, 28(12): 3967-3978.
- [34] 陈月婵, 武春艳, 张志威. 在 DF1 鸡胚成纤维细胞过表达 KLF2 对鸡 PPAR γ 和 C/EBP α 启动子活性的调控[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(8): 1045-1050.
- CHEN YC, WU CY, ZHANG ZW. Effect of Krüppel-like factor 2 (KLF2) over-expression on activities of chicken PPAR γ and C/EBP α promoters[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2017, 33(8): 1045-1050 (in Chinese).
- [35] 孙婴宁, 王维禹, 张志威, 邵淑丽, 李波, 王宁. Krüppel 样因子 7 (KLF7) 生物学功能研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2017, 44(11): 972-980.
- SUN YN, WANG WY, ZHANG ZW, SHAO SL, LI B, WANG N. Advance in biological function of Krüppel-like factor 7 (KLF7)[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2017, 44(11): 972-980 (in Chinese).
- [36] BIALKOWSKA AB, YANG VW, MALLIPATTU SK. Krüppel-like factors in mammalian stem cells and development[J]. Development (Cambridge, England), 2017, 144(5): 737-754.

(本文责编 郝丽芳)