

• 动物及兽医生物技术 •

## 山羊转录因子 *c-fos* 克隆、鉴定及功能分析

胡婷婷<sup>1,2</sup>, 王永<sup>1,2</sup>, 陈定双<sup>1,2</sup>, 龚成思<sup>1,2</sup>, 李艳艳<sup>1,2</sup>, 熊燕<sup>1,2</sup>, 王建梅<sup>1,2</sup>,  
李志雄<sup>1,2</sup>, 林亚秋<sup>1,2\*</sup>

1 西南民族大学畜牧兽医学院, 四川 成都 610041

2 西南民族大学 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部/四川省重点实验室, 四川 成都 610041

胡婷婷, 王永, 陈定双, 龚成思, 李艳艳, 熊燕, 王建梅, 李志雄, 林亚秋. 山羊转录因子 *c-fos* 克隆、鉴定及功能分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1684-1695.

HU Tingting, WANG Yong, CHEN Dingshuang, GONG Chengsi, LI Yanyan, XIONG Yan, WANG Jianmei, LI Zhixiong, LIN Yaqiu. Cloning, identification and functional analysis of the goat transcription factor *c-fos*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1684-1695.

**摘要:** 转录因子 *c-fos* 在细胞增殖、分化和肿瘤形成中发挥着重要作用。本研究旨在获得山羊 *c-fos* 基因序列并阐明其生物学性质, 进一步利用过表达手段揭示 *c-fos* 在山羊皮下脂肪细胞分化过程中的调控作用。本试验以简州大耳羊为研究对象, 用逆转录 PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 技术克隆获得 *c-fos* 基因序列并分析其生物学性质; 用实时荧光定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 技术检测 *c-fos* 基因在山羊心、肝、脾、肺、肾、皮下脂肪和背最长肌 7 个组织以及皮下脂肪细胞诱导分化的 0-120 h 的表达情况; 用基因重组方法构建山羊 pEGFP-*c-fos* 过表达载体并转染至皮下前体脂肪细胞诱导分化后, 用油红 O 和 Bodipy 染色从形态学上观察其对脂滴积聚的影响, 用 qPCR 技术在 mRNA 水平上检测过表达 *c-fos* 对成脂分化标志基因的影响。结果表明, 克隆的山羊 *c-fos* 基因长 1 477 bp [编码区(coding sequence, CDS) 1 143 bp], 编码 380 个氨基酸, 亚细胞定位预测该基因主要分布于细胞核中; 表达蛋白具有一个碱性亮氨酸拉链结构; *c-fos* 基因在山羊皮下脂肪组织相对表达水平较高 ( $P < 0.05$ ), 在皮下前体脂肪细胞诱导分化后 48 h 的相对表达水平最高 ( $P < 0.01$ ); 过表达 *c-fos* 可抑制山羊皮下脂肪细胞的脂滴形成, 并极显著降低成脂标志基因 *AP2* 和 *C/EBP $\beta$*  的相对表达水平 ( $P < 0.01$ ), 且启动子结合位点预测存在多个结合位点。综上所述, *c-fos* 是山羊皮下脂肪细胞分化的负调控因子, 通过调控 *AP2* 和 *C/EBP $\beta$*  基因的表达来发挥作用。

**关键词:** 转录因子; *c-fos*; 山羊; 皮下脂肪; 细胞分化

资助项目: 国家自然科学基金(32072723, 31902154); 四川省应用基础研究计划重点项目(2022JDTD0030); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金(3300222092)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072723, 31902154), the Key Project of Sichuan Applied Basic Research Program, China (2022JDTD0030), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities, Southwest Minzu University, China (3300222092).

\*Corresponding author. E-mail: linyq1999@163.com

Received: 2022-09-04; Accepted: 2023-01-13

# Cloning, identification and functional analysis of the goat transcription factor *c-fos*

HU Tingting<sup>1,2</sup>, WANG Yong<sup>1,2</sup>, CHEN Dingshuang<sup>1,2</sup>, GONG Chengsi<sup>1,2</sup>, LI Yanyan<sup>1,2</sup>, XIONG Yan<sup>1,2</sup>, WANG Jianmei<sup>1,2</sup>, LI Zhixiong<sup>1,2</sup>, LIN Yaqui<sup>1,2\*</sup>

1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

2 Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Protection and Utilization of Ministry of Education, Sichuan Province, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

**Abstract:** *C-fos* is a transcription factor that plays an important role in cell proliferation, differentiation and tumor formation. The aim of this study was to clone the goat *c-fos* gene, clarify its biological characteristics, and further reveal its regulatory role in the differentiation of goat subcutaneous adipocytes. We cloned the *c-fos* gene from subcutaneous adipose tissue of Jianzhou big-eared goats by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and analyzed its biological characteristics. Using real-time quantitative PCR (qPCR), we detected the expression of *c-fos* gene in the heart, liver, spleen, lung, kidney, subcutaneous fat, longissimus dorsi and subcutaneous adipocytes of goat upon induced differentiation for 0 h to 120 h. The goat overexpression vector pEGFP-*c-fos* was constructed and transfected into the subcutaneous preadipocytes for induced differentiation. The morphological changes of lipid droplet accumulation were observed by oil red O staining and bodipy staining. Furthermore, qPCR was used to test the relative mRNA level of the *c-fos* overexpression on adipogenic differentiation marker genes. The results showed that the cloned goat *c-fos* gene was 1 477 bp in length, in which the coding sequence was 1 143 bp, encoding a protein of 380 amino acids. Protein structure analysis showed that goat FOS protein has a basic leucine zipper structure, and subcellular localization prediction suggested that it was mainly distributed in the nucleus. The relative expression level of *c-fos* was higher in the subcutaneous adipose tissue of goats ( $P < 0.05$ ), and the expression level of *c-fos* was significantly increased upon induced differentiation of subcutaneous preadipocyte for 48 h ( $P < 0.01$ ). Overexpression of *c-fos* significantly inhibited the lipid droplets formation in goat subcutaneous adipocytes, significantly decreased the relative expression levels of the *AP2* and *C/EBP $\beta$*  lipogenic marker genes ( $P < 0.01$ ). Moreover, *AP2* and *C/EBP $\beta$*  promoter are predicted to have multiple binding sites. In conclusion, the results indicated that *c-fos* gene was a negative regulatory factor of subcutaneous adipocyte differentiation in goats, and it might regulate the expression of *AP2* and *C/EBP $\beta$*  gene expression.

**Keywords:** transcription factor; *c-fos*; goat; subcutaneous fat; cell differentiation

肌肉脂肪(intramuscular fat, IMF)和皮下脂肪(subcutaneous fat, SAT)与肉类品质性状相关,适当的 IMF 含量可以提高肉产品的嫩度、多汁性和风味,而皮下脂肪沉积过多会造成异位脂

肪沉积和分泌失调<sup>[1-2]</sup>。因此,提高羊肉肌肉脂肪沉积程度和减少皮下脂肪沉积是当前肉羊产业的重要研究内容。动物脂肪沉积是脂肪细胞数量增加以及脂肪细胞肥大共同作用的结果,

而脂肪细胞分化则是脂肪沉积的重要途径,受许多关键基因以及转录因子的精确调控<sup>[3-4]</sup>。因而,阐明关键转录因子在山羊脂肪细胞分化过程中调控的分子机制具有重要意义。

转录因子 FOS 家族与 JUN 家族以及活化转录因子 ATF 家族一起构成激活蛋白-1 (activator protein-1, AP-1) 转录因子复合物,参与体内多种生物发生过程<sup>[5-8]</sup>。转录因子 FOS 家族包括 C-FOS、V-FOS、FOSB、FRA1 和 FRA2, C-FOS 是由原癌基因 *c-fos* 编码的一个具有碱性亮氨酸拉链的类核蛋白,与软骨<sup>[9]</sup>和破骨细胞<sup>[10]</sup>分化、肿瘤形成<sup>[11]</sup>以及癌症发生<sup>[12]</sup>有密切关系。有研究表明,*c-fos* 参与调节脂肪细胞生长和分化<sup>[13]</sup>,敲除 *c-fos* 基因,减少脂滴积聚,显著抑制 3T3-L1 细胞的分化<sup>[14]</sup>。先天性全身性脂肪营养不良(congenital generalized lipodystrophy, CGL) 是一种脂肪细胞发育障碍综合征,在 CGL 患者中 *c-fos* 基因启动子发生突变,导致 *c-fos* 的表达减少,从而干扰前脂肪细胞分化<sup>[15]</sup>。全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)刺激维甲酸受体  $\gamma$  (retinoic acid receptor  $\gamma$ , RAR $\gamma$ )与 C-FOS 蛋白相互作用,阻碍 C-FOS 与过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ 2 (proxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 2, PPAR $\gamma$ 2)的结合,导致 PPAR $\gamma$ 2 的表达降低,从而抑制 3T3-L1 脂肪细胞分化<sup>[16]</sup>。多发性对称性脂肪增多症(multiple symmetric lipomatosis, MSL)的病理特征是面部、颈部、腹部等部位皮下脂肪组织过度生长。通过测序分析发现,MSL 患者脂肪组中 *FOSB* 和 C-FOS 表达水平平均下调,而 *PPAR $\gamma$*  和 CCAAT 增强子结合蛋白  $\beta$  (CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$ , *C/EBP $\beta$* )的表达显著上调<sup>[17]</sup>,推测这些基因的表达改变可能导致 MSL 的发生。综上所述,在人、小鼠和 3T3-L1 脂肪细胞系中研究表明,*c-fos* 与脂肪细胞分化有关,但尚未见在山羊中的报道。

本团队前期通过高通量测序分析 *c-fos* 可能

是差异调控山羊脂肪细胞分化的关键候选基因。本试验以简州大耳羊为研究对象,用 RT-PCR 技术克隆 *c-fos* 基因序列并分析其生物学性质,用过表达手段揭示山羊 *c-fos* 基因对皮下脂肪细胞分化的调控作用。研究结果为明确 *c-fos* 对山羊皮下脂肪细胞分化的影响及其可能的作用途径提供基础数据,并为进一步揭示 *c-fos* 调控山羊皮下脂肪细胞分化的分子网络提供重要支撑。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验动物和样品

动物研究获得西南民族大学实验动物伦理委员会的批准(No. 2020086)。成年简州大耳羊( $n=5$ )购自四川天地羊生物工程有限公司,屠宰后采集心、肝、脾、肺、肾、背最长肌和皮下脂肪 7 个组织样品,磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)清洗后用锡纸包住并装入冻存管,立即冻存于液氮中待后续使用。本试验的原代细胞取自实验室前期液氮保存的 7 日龄简州大耳羊背部皮下前体脂肪细胞。

### 1.2 主要试验试剂

反转录试剂盒、转染试剂(TurboFect Transfection Reagent)购自 Thermo 公司;T 载体(pClone007 Versatile Simple Vector Kit)和大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞购自成都擎科生物技术有限公司;胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA Marker D2000、DNA Marker III 购自天根生化科技有限公司;氨苄青霉素钠(ampicillin)、卡那霉素(kanamycin)购自 Biosharp 公司;*Kpn* I、*Hind* III、TB Green Premix Ex *Taq* II、Primer STAR Max DNA Polymerase 和 TRIzol 均购自 TaKaRa 公司;青链霉素双抗、胰蛋白酶、胎牛血清及 DEME/F12 培养基购自 Gibco 公司;油酸购自 Sigma 公司。

### 1.3 总 RNA 提取及 cDNA 合成

山羊各组织和皮下脂肪细胞总 RNA 采用

TRIzol 法提取, cDNA 的获取按照反转录试剂说明操作, 并于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

#### 1.4 山羊 *c-fos* 基因序列的获取和生物信息学分析

根据 NCBI 上预测山羊 *c-fos* 基因的碱基序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1)。模板为山羊皮下脂肪组织的 cDNA, RT-PCR 扩增体系: cDNA 2  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 2  $\mu\text{L}$ , Primer STAR Max Premix (2 $\times$ ) 25  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 预变性 98  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 变性 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 退火 60  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 延伸 72  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 延伸 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 35 个循环。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后回收目的条带, 并与 007 VS 克隆载体于金属浴 25  $^{\circ}\text{C}$  连接 5 min, 转化于 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 取适量菌液涂抹于含有氨苄青霉素的平板中, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱培养过夜, 挑取单克隆菌落扩大培养 10 h, 将经 PCR 鉴定为阳性的菌液(至少 3 管)送至生工生物工程

(成都)有限公司测序。生物信息学分析见表 2。

#### 1.5 山羊 *c-fos* 过表达载体的构建

根据克隆获得的 *c-fos* 基因编码区序列选择 *Kpn* I 和 *Hind* III 作为上下游酶切位点设计过表达引物(表 1), 将亚克隆获得的山羊 *c-fos* 质粒和 pEGFP-N1 载体分别进行双酶切后回收纯化, 连接并转化于 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中扩大培养。将 PCR 鉴定为阳性的菌液扩繁并提取质粒, 进行酶切鉴定之后送至生工生物工程(成都)有限公司测序。

#### 1.6 细胞培养与转染

在无菌细胞间分离背部皮下脂肪组织, 并在含有 1%青链霉素双抗的 PBS 中洗涤 3 次, 剪成 1  $\text{mm}^3$  的组织块后加入 I 型胶原酶消化, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴消化 1.5 h, 期间不断轻轻晃动, 然后以等体积的完全培养基终止消化, 经 400 目滤网过滤后 2 000 r/m 离心 5 min, 弃上清后加入红细胞裂解液裂解 30 min, 随后离心去除上清

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
(PCR) <i>c-fos-S</i>	CAGCGAGCAAGCTTAAGGAG	1 477
(PCR) <i>c-fos-A</i>	ACTTGAGTCCACACGGGGAT	
<i>c-fos-S</i>	GCTTCAACGCCGACTACGAG	97
<i>c-fos-A</i>	AAGGAGTCTGCCGGTGAGTG	
<i>OE-c-fos-S</i>	CCCAAGCTTATGATGTTCTCTGGCTTCAACG	1 143
<i>OE-c-fos-A</i>	CCGGGTACCCACAGGGCCAGCAGTGTGG	
<i>C/EBP<math>\beta</math>-S</i>	CAAGAAGACGGTGGACAAGC	204
<i>C/EBP<math>\beta</math>-A</i>	AACAAGTTCCGCAGGGTG	
<i>C/EBP<math>\alpha</math>-S</i>	CCGTGGACAAGAAGCAGCAAC	142
<i>C/EBP<math>\alpha</math>-A</i>	AGGCGGTCATTGTCACTGGT	
<i>PPAR<math>\gamma</math>-S</i>	AAGCGTCAGGGTTCCACTATG	197
<i>PPAR<math>\gamma</math>-A</i>	GAACCTGATGGCGTTATGAGAC	
<i>AP2-S</i>	TGAAGTCACTCCAGATGACAGG	143
<i>AP2-A</i>	TGACACATTCCAGCACCAGC	
<i>UXT-S</i>	GCAAGTGGATTTGGGCTGTAAC	180
<i>UXT-A</i>	ATGGAGTCCTTGGTGAGGTTGT	
<i>TBP-S</i>	AACAGCCTCCCACCTTATGC	155
<i>TBP-A</i>	TGCTGCTCCTCCAAAATAGAC	

S: Sense primer; A: Antisense primer.

表 2 生物信息学分析内容及分析工具

Table 2 Contents and tools of bioinformatics analysis

Analysis content	Analysis software or online website
Open reading frame analysis	NCBI ORF Finder
Amino acid sequence analysis	DNAMAN
Prediction of functional domain	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi</a>
Prediction of protein secondary structure	ExpASy
Subcellular localization	PSORT II
Analysis of protein interaction	<a href="http://www.string-db.org/">http://www.string-db.org/</a>
Conserved binding motif prediction	JASPAR
Promoter binding site prediction	AnimalTFDB3.0

液, 加入适量完全培养基使细胞沉淀悬浮, 并接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 即获得原代皮下前体脂肪细胞, 冻存备用。

复苏山羊皮下前体脂肪细胞并使用含有 10%胎牛血清和 1%青链霉素双抗的 DEME/F12 培养基培养至 F2 代, 胰酶消化并细胞计数, 分别接种于 24 孔和 6 孔细胞培养板并设置 3 个生物学重复, 待细胞融合至 70%左右, 按照转染试剂说明书计算转染试剂加样量和 pEGFP-*c-fos* 过表达质粒加样量, 配置预混液, 室温孵育 15 min 后均匀加入细胞培养液中, 于 16 h 之后换成油酸诱导液诱导分化 48 h 后收集 6 孔板细胞样品用于提取 RNA。

### 1.7 形态学观察

将上述 24 孔板细胞培养基弃掉, 用 PBS 洗涤 2 次后加入 10%组织固定液固定 30 min, 弃掉固定液再用 PBS 洗涤 2 次, 每孔分别加入 200  $\mu$ L 的油红工作液和 Bodipy 染料, 避光染色 15 min, 用 PBS 洗涤 2 次后, 再次加入 200  $\mu$ L PBS 作为背景, 置于显微镜下观察脂滴形状并拍照。拍照结束后每孔加入 1 mL 异丙醇溶解对照组和实验组的油红, 使用酶标仪检测两组在 490 nm 处的吸光值。

### 1.8 荧光定量 RT-qPCR

组织和细胞时序表达分析分别以 *TBP* 和 *UXT* 作为内参基因来矫正基因的相对表达水

平, 利用 qPCR 技术检测 *c-fos* 基因在山羊心、肝和皮下脂肪等 7 个组织以及在皮下前体脂肪细胞诱导分化后 0、24、48、72、96 和 120 h 以及过表达 *c-fos* 基因后山羊皮下脂肪细胞中 *AP2*、*PPAR $\gamma$* 、*C/EBP $\alpha$*  和 *C/EBP $\beta$*  成脂标志基因的相对表达情况(以上基因引物序列见表 1)。qPCR 的反应体系: SYBR Premix Ex Taq (2 $\times$ ) 5  $\mu$ L, 上、下游引物各 0.5  $\mu$ L, cDNA 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L, 总体积为 10  $\mu$ L; 反应条件: 预变性(95  $^{\circ}$ C 3 min); 变性(95  $^{\circ}$ C 10 s), 退火(60  $^{\circ}$ C 10 s), 延伸(72  $^{\circ}$ C 15 s), 共 39 个循环。

### 1.9 数据分析

采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>T</sub></sup> 法分析, 以平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ ) 展示 qPCR 数据, 使用 SPSS 26.0 软件选择单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)法和 *t* 检验法分析数据的显著性, 以 Duncan 法进行多重比较。当  $P<0.05$  时认为有统计学意义。\*表示差异显著( $P<0.05$ ), \*\*表示差异极显著( $P<0.01$ )。利用 GraphPad Prism 8 绘制 qPCR 结果图。

## 2 结果与分析

### 2.1 山羊 *c-fos* 基因结构及其氨基酸序列

以山羊皮下脂肪组织为模板, RT-PCR 扩增条带符合预期片段(图 1A), 结合测序结果确定成功获得山羊 *c-fos* 基因序列 1 477 bp, 编码区

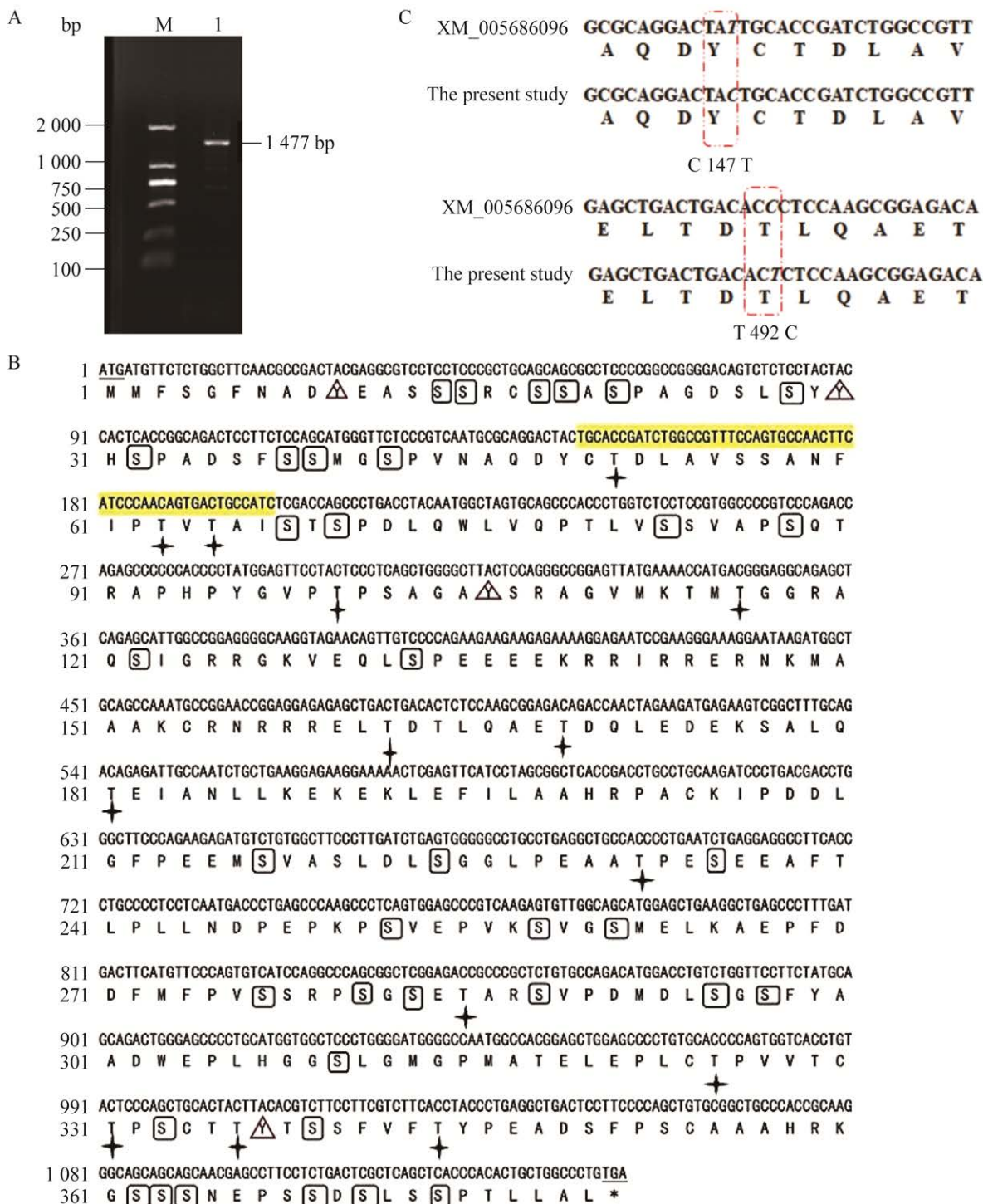


图 1 山羊 *c-fos* 基因结构

Figure 1 The *c-fos* gene structure of goat. A: Amplification electrophoresis bands of goat *c-fos* gene. M: DL2000 DNA Marker; 1: *c-fos*. B: The nucleotide sequences and amino acid sequences of goat *c-fos* gene. Stars: Tyrosine phosphorylation sites; Square: Serine phosphorylation site; Triangles; ATG: Start codon; TGA: Stop codon; Solid box: Functional domain. C: Comparison of the predicted sequence of the goat *c-fos* gene (XM\_005686096) with the nucleotide sequence cloned in this study, potential polypeptide positions (C147T and T492C) are shown in dashed boxes with no changes in amino acid sequence.

(coding sequence, CDS)序列为 1 143 bp (上传 NCBI 基因登录号: ON787959), 编码 380 个氨基酸(图 1B), 与山羊 *c-fos* 的预测序列(GenBank 登录号: XM\_005686096)比对发现第 147 位点的 T>C, 492 位点的 C>T, 但氨基酸序列没有发生改变, 属于同义突变(图 1C)。

## 2.2 山羊 *c-fos* 基因的生物信息学分析

分析 C-FOS 氨基酸序列, 发现该蛋白包含一个碱性亮氨酸拉链结构, 位于 147–200 位点之间(图 2A); 利用 ExPASy 软件预测 C-FOS 二级结构, 该蛋白结构组成的  $\alpha$ -螺旋占总氨基酸的 31.05% (118 个氨基酸)、延伸链占 10.79% (41 个氨基酸)、无规卷曲占 57.37% (218 个氨基酸)、 $\beta$ -转角占 0.79% (3 个氨基酸) (图 2B); 蛋白互作分析结果显示, C-FOS 蛋白与 DUSP1、FOSL1、JUNB、JUN、FOSB 等蛋白存在相互作用(图 2C); 亚细胞定位预测 C-FOS 蛋白大部分分布于细胞

核内(73.9%)、其次分布在囊泡(4.3%)、细胞骨架(13.0%)、线粒体(4.3%)、细胞质(4.3%) (图 2D)。

## 2.3 *c-fos* 基因在各种组织中的表达

以心的表达水平为对照来分析试验结果, qPCR 结果表明, *c-fos* 基因在山羊皮下脂肪组织表达水平较高( $P<0.05$ ), 在肾脏中表达水平较低( $P<0.05$ ) (图 3A)。 *c-fos* 基因在山羊皮下前体脂肪细胞分化的 0–120 h 之间呈现上升-下降-上升-下降的趋势, 在 48 h 表达水平最高, 极显著高于其他时间段( $P<0.01$ ) (图 3B)。

## 2.4 山羊皮下脂肪细胞过表达 *c-fos* 对细胞分化的影响

### 2.4.1 山羊 pEGFP-*c-fos* 过表达载体特征

琼脂糖凝胶电泳结果出现两条符合 pEGFP-N1 (4 700 bp)和 *c-fos* (1 143 bp)的条带(图 4), 与测序结果相符, 表明成功构建山羊 pEGFP-*c-fos* 过表达载体。

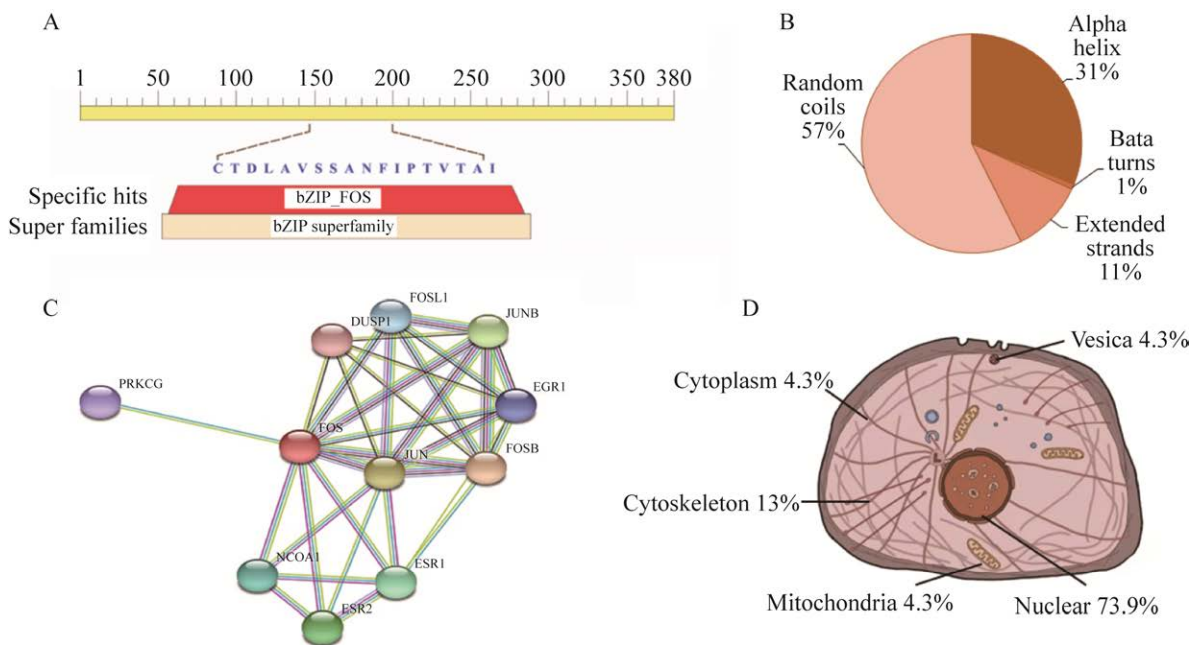


图 2 预测的山羊 C-FOS 蛋白质结构及亚细胞定位

Figure 2 Structure and subcellular localization of C-FOS protein in goat by prediction. A: Prediction of C-FOS functional domain in goat. B: Prediction of secondary structure composition of the C-FOS protein of goat. C: Interaction analysis in the goat C-FOS protein. D: The predicted subcellular localization in the goat C-FOS protein.

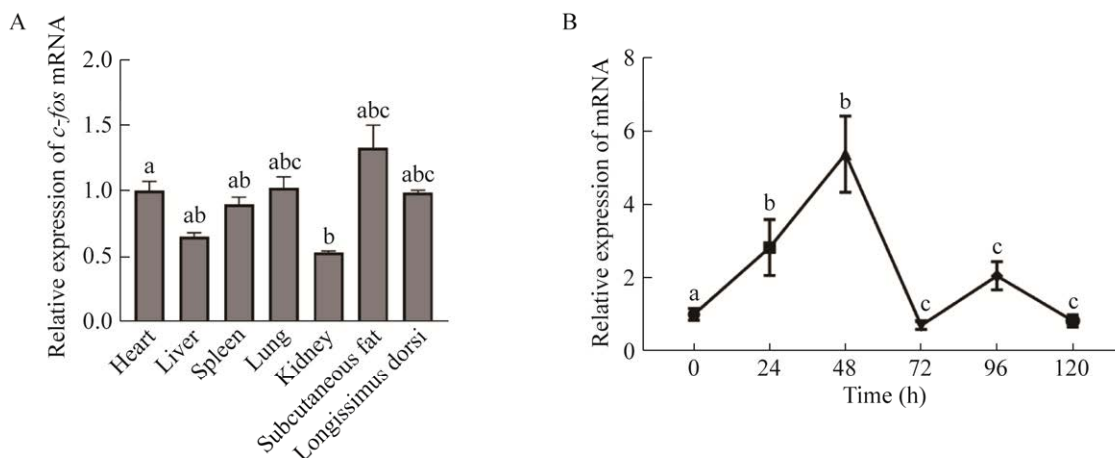


图3 *c-fos* 基因在山羊不同组织和皮下前体脂肪细胞分化各个阶段的相对表达水平

Figure 3 Relative expression level of the *c-fos* gene in different tissues and different stages of subcutaneous preadipocytes differentiation in goats. A: Goat *c-fos* gene tissue expression profile. B: Temporal expression profiles of the goat *c-fos* gene. Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

#### 2.4.2 山羊皮下脂肪细胞过表达 *c-fos* 对脂滴聚积的影响

qPCR 结果显示, 与 NC 组相比, OE-*c-fos* 组的 *c-fos* 基因的相对表达水平上调了 571 倍 ( $P < 0.01$ ) (图 5A); 油红 O 染色结果显示, OE-*c-fos* 实验组的脂滴聚积减少, Bodipy 染色结果也呈现相同的趋势(图 5B); 利用异丙醇溶解并检测两组细胞在 490 nm 处的吸光值, 结果显示, 与

NC 组相比, OE-*c-fos* 实验组的  $OD_{490}$  值极显著下调(图 5C) ( $P < 0.01$ )。

#### 2.4.3 过表达 *c-fos* 对山羊皮下脂肪细胞分化标志基因的影响

收集山羊皮下前体脂肪细胞成脂诱导分化 48 h 后的细胞样品, 利用 qPCR 技术检测 NC 组和 OE-*c-fos* 组成脂分化标志基因的变化。结果显示, 过表达山羊 *c-fos* 基因之后, *C/EBP $\beta$*  和 *AP2* 基因的表达水平极显著下调 ( $P < 0.01$ ) (图 6A); 利用软件预测 C-FOS DNA 保守结合域如图所示(图 6B), 并且与 *C/EBP $\beta$*  和 *AP2* 启动子存在多个结合位点(图 6C)。

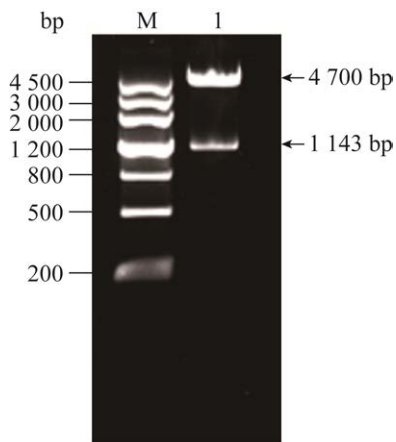


图4 pEGFP-*c-fos* 双酶切产物电泳图谱

Figure 4 Digestion identification of pEGFP-*c-fos*. M: DNA Marker; 1: pEGFP-*c-fos*.

## 3 讨论

转录因子 *c-fos* 是一种即时早期基因, 在响应各种细胞信号和应激时上调, 参与调节细胞的增殖、分化与凋亡<sup>[8,18]</sup>。目前关于 *c-fos* 在脂肪方面的研究大多数集中在细胞系、小鼠以及人上<sup>[14-17]</sup>, 最近研究指出, microRNA29c 通过抑制 FOS 蛋白的表达来减轻非酒精性脂肪肝炎<sup>[19]</sup>, 而其在山羊脂肪细胞分化方面的调控作



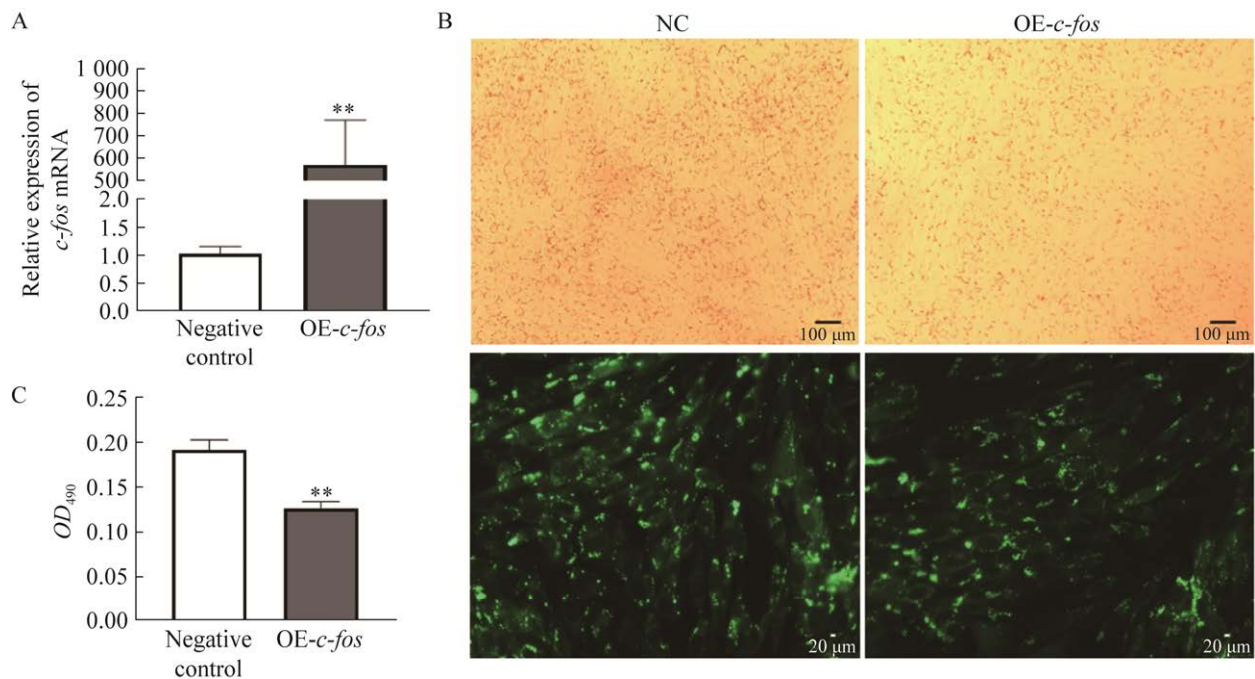


图5 山羊皮下脂肪细胞过表达 *c-fos* 的脂滴聚积

Figure 5 Lipid droplet accumulation of *c-fos* overexpression in goat subcutaneous adipocyte. A: The overexpression efficiency of the goat *c-fos* gene. B: Oil red O (upper) (100 $\times$ ) and Bodipy staining analysis (lower) (400 $\times$ ). C: Oil red o staining detection  $OD_{490}$  value. \*\*:  $P < 0.01$ .

用尚未报道。因此,为了探究 *c-fos* 在山羊皮下脂肪细胞分化过程中的调控作用,本研究克隆得到山羊 *c-fos* 基因序列 1 477 bp,其中 CDS 区全长为 1 143 bp,共编码 380 个氨基酸。与宋兴超等利用电子克隆得到山羊 *c-fos* 基因序列相符<sup>[20]</sup>。研究发现,在 COS-1 (非洲绿猴 SV40 转化的肾细胞)细胞中,C-FOS 蛋白在细胞核中的占比为 95%,在细胞质中的占比为 5%<sup>[21]</sup>。本试验亚细胞定位预测结果表明,C-FOS 主要分布于细胞核中,少数分布在细胞质中,进一步证实 C-FOS 是一个类核蛋白,我们推测山羊 C-FOS 蛋白可能主要在细胞核中发挥其生物学作用。对山羊 C-FOS 进行功能结构域预测,结果显示,该蛋白包含一个碱性亮氨酸拉链结构,属于 B-ZIP 超家族<sup>[5,22]</sup>。B-ZIP 转录因子组成同二聚体或异二聚体的形式去结合特定的 DNA

序列来调控靶基因的转录<sup>[23]</sup>。蛋白质的二级结构预测山羊 C-FOS 蛋白主要以无规卷曲、 $\alpha$ -螺旋、延伸链的形式存在,蛋白互作预测分析显示,山羊 C-FOS 蛋白可能与 DUSP1、FOSL1、JUNB、JUN、FOSB 等蛋白存在相互作用。研究表明,C-FOS 蛋白与 DUSP1 蛋白存在相互作用,是促肾上腺皮质激素(adrenocortical hormones, ACTH)非依赖性大结节样肾上腺增生发病机制的潜在标志物<sup>[24]</sup>。FOSL1、FOSB、JUN 和 JUNB 蛋白均是 AP-1 的家族成员,参与调节细胞增殖和分化<sup>[25]</sup>。小鼠脂肪细胞中 C-FOS 与 JUN 蛋白家族 JUND、C-JUN、JUNB 相互结合,增加 PPAR $\gamma$  的转录活性,从而导致非酒精性脂肪肝<sup>[26]</sup>。而 Fra-1 (由 *fos11* 基因编码)与 C-JUN 蛋白结合,则会抑制 PPAR $\gamma$  的转录活性<sup>[26]</sup>。

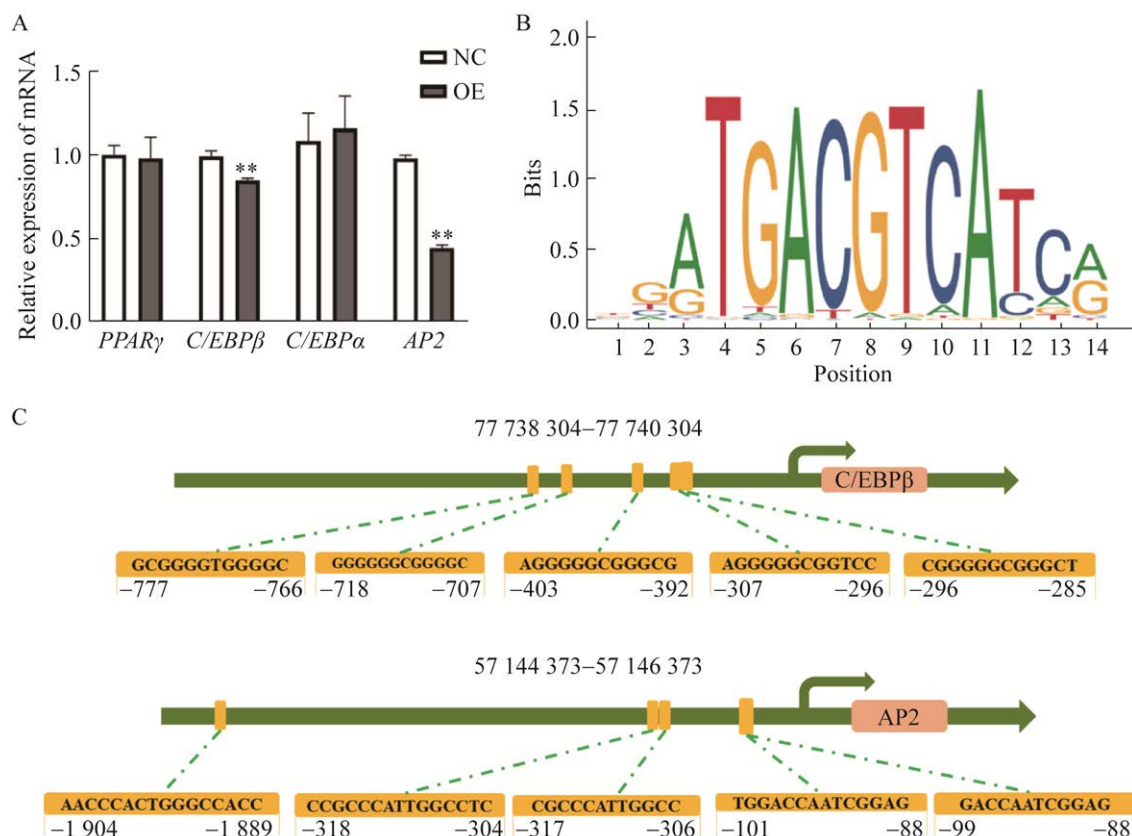


图 6 *c-fos* 调控山羊皮下脂肪细胞分化的作用途径

Figure 6 *c-fos* regulating the differentiation of subcutaneous adipocytes in goats. A: Expression levels of adipocyte differentiation marker genes. B: C-FOS DNA-binding domain prediction. C: Prediction of *c-fos*-binding sites with the *C/EBPβ* and *AP2* promoters. \*\*:  $P < 0.01$ .

为了明确 *c-fos* 在山羊各组织中的表达规律,本研究检测了 *c-fos* 基因在山羊的心、肝、脾、肺、肾、皮下脂肪、背最长肌 7 个组织样品的表达情况,结果表明, *c-fos* 基因在山羊皮下脂肪组织的相对表达水平较高,在肝和肾中表达较低。而在 NCBI 收录的成年小鼠(基因 ID: 14281) *c-fos* 基因在结肠、十二指肠、小肠等组织表达较高,在肾、肝等组织中表达较低;猪(基因 ID: 100144486) *c-fos* 基因在肺、皮下脂肪、背最长肌、腰肌等组织表达较高。与本研究存在相似及差异之处,我们推测该基因在不同物种的组织表达模式不同。此外,利用油酸诱导山羊皮下前体脂肪细胞,收集分化后 0、

24、48、72、96 和 120 h 的细胞样品,之后利用 qPCR 技术检测 *c-fos* 基因的表达情况,研究结果显示,山羊 *c-fos* 基因在皮下脂肪细胞分化的 0–120 h 之间存在持续表达,提示该基因可能对山羊皮下脂肪细胞分化存在一定的影响。

在明确了 *c-fos* 在山羊各组织及皮下脂肪细胞分化表达情况的基础上,本研究构建 pEGFP-*c-fos* 过表达载体,转染至山羊皮下前体脂肪细胞,使其过表达,结果表明,与对照组相比,过表达 *c-fos* 组的脂滴聚集减少。Xiao 等<sup>[14]</sup>研究表明,敲除 *c-fos* 基因显著抑制 3T3-L1 细胞脂滴积聚,这与本研究结果存在差异,我们推测该基因在不同物种的脂肪细胞分化过程

中发挥的作用途径有所差异。为进一步探究过表达 *c-fos* 抑制山羊皮下脂肪细胞脂滴聚集的可能机制,本研究还检测成脂标志基因 *PPAR $\gamma$* 、*C/EBP $\beta$* 、*C/EBP $\alpha$*  和 *AP2* 相对表达情况,结果表明,过表达 *c-fos* 极显著下调 *AP2* 和 *C/EBP $\beta$*  基因的表达,并且通过 AnimalTFDB3.0 软件预测结果显示, C-FOS 与 *AP2* 和 *C/EBP $\beta$*  启动子序列存在多个结合位点,因此,我们推测,过表达山羊 *c-fos* 可能是通过调控 *AP2* 和 *C/EBP $\beta$*  基因的表达,从而抑制山羊皮下脂肪细胞分化。在成脂过程中脂肪酸结合蛋白 4 基因(fatty acid binding protein 4, *AP2*)的转录活性增加, *AP2* 基因包含一个调控元件(fat specific elements, FSE2)又称为脂肪特异性元件,细胞中 C-FOS 直接参与的核蛋白复合物与该调控元件结合并负调节前脂肪细胞中 *AP2* 基因活性<sup>[13]</sup>。研究报道,过表达 FOS 以及其家族成员 Fra-1、FosB 时会通过抑制 C/EBP 的活性来影响脂质生成<sup>[27-28]</sup>。总之,结合本试验形态学染色结果以及过表达山羊 *c-fos* 皮下脂肪细胞成脂标志基因的相对表达情况,明确了 *c-fos* 是山羊皮下脂肪细胞分化的负调控因子,但其在山羊皮下脂肪细胞分化过程中发挥的具体作用机制需要进一步深入研究。

## 4 结论

本研究克隆得到包含完整开放阅读框 1 143 bp、具有一个碱性亮氨酸拉链结构、主要定位于细胞核的山羊 *c-fos* 基因序列,共编码 380 个氨基酸;*c-fos* 在皮下脂肪组织中表达较高,在山羊皮下脂肪细胞诱导成脂分化后 48 h 的相对表达水平最高;过表达 *c-fos* 基因抑制山羊皮下前体脂肪细胞分化,是通过下调 *AP2* 和 *C/EBP $\beta$*  成脂标志基因的表达来发挥作用。

## REFERENCES

- [1] 朱武政, 林亚秋, 江明锋, 王永, 廖红海, 李倩, 朱江江. 肉用山羊脂代谢相关基因与肌内脂肪含量的相关性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(7): 1333-1341. ZHU WZ, LIN YQ, JIANG MF, WANG Y, LIAO HH, LI Q, ZHU JJ. Association analysis of intramuscular fat content and the expression of genes related to lipid metabolism in meat goat[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2016, 47(7): 1333-1341 (in Chinese).
- [2] GUSTAFSON B, SMITH U. Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk[J]. Atherosclerosis, 2015, 241(1): 27-35.
- [3] HOCQUETTE JF, GONDRET F, BAÉZA E, MÉDALE F, JURIE C, PETHICK DW. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers[J]. Animal: an International Journal of Animal Bioscience, 2010, 4(2): 303-319.
- [4] LIU S, HUANG J, WANG X, MA Y. Transcription factors regulate adipocyte differentiation in beef cattle[J]. Animal Genetics, 2020, 51(3): 351-357.
- [5] MILDE-LANGOSCH K. The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis[J]. European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990), 2005, 41(16): 2449-2461.
- [6] 韩畅畅, 万福生. AP-1 的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(10): 1357-1362. HAN CC, WAN FS. Research progress on AP-1[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2017, 39(10): 1357-1362 (in Chinese).
- [7] CHOI Y, ROSEWELL KL, BRÄNNSTRÖM M, AKIN JW, CURRY TE, JO M. FOS, a critical downstream mediator of PGR and EGF signaling necessary for ovulatory prostaglandins in the human ovary[J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2018, 103(11): 4241-4252.
- [8] DALHÄUSSER AK, RÖSSLER OG, THIEL G. Regulation of *c-fos* gene transcription by stimulus-responsive protein kinases[J]. Gene, 2022, 821: 146284.
- [9] IWATSUKI M, MATSUOKA M. Fluoride-induced C-FOS expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells[J]. Toxicology Mechanisms and Methods, 2016, 26(2): 132-138.
- [10] TONG XS, CHEN MM, SONG RL, ZHAO HY, BIAN JC, GU JH, LIU ZP. Overexpression of C-FOS reverses

- osteoprotegerin-mediated suppression of osteoclastogenesis by increasing the Beclin1-induced autophagy[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021, 25(2): 937-945.
- [11] RACCA AC, PRUCCA CG, CAPUTTO BL. Fra-1 and C-FOS N-terminal deletion mutants impair breast tumor cell proliferation by blocking lipid synthesis activation[J]. *Frontiers in Oncology*, 2019, 9: 544.
- [12] INOUE S, IDE H, MIZUSHIMA T, JIANG GY, KAWAHARA T, MIYAMOTO H. ELK1 promotes urothelial tumorigenesis in the presence of an activated androgen receptor[J]. *American Journal of Cancer Research*, 2018, 8(11): 2325-2336.
- [13] DISTEL RJ, RO HS, ROSEN BS, GROVES DL, SPIEGELMAN BM. Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation: direct participation of C-FOS[J]. *Cell*, 1987, 49(6): 835-844.
- [14] XIAO HY, LEBLANC SE, WU Q, KONDA S, SALMA N, MARFELLA CGA, OHKAWA Y, IMBALZANO AN. Chromatin accessibility and transcription factor binding at the PPAR $\gamma$ 2 promoter during adipogenesis is protein kinase A-dependent[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2011, 226(1): 86-93.
- [15] KNEBEL B, KOTZKA J, LEHR S, HARTWIG S, AVCI H, JACOB S, NITZGEN U, SCHILLER M, MÄRZ W, HOFFMANN MM, SEEMANOVA E, HAAS J, MULLER-WIELAND D. A mutation in the *c-fos* gene associated with congenital generalized lipodystrophy[J]. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2013, 8: 119.
- [16] WANG X, YANG P, LIU JZ, WU H, YU WH, ZHANG T, FU H, LIU Y, HAI CX. RAR $\gamma$ -C-FOS-PPAR $\gamma$ 2 signaling rather than ROS generation is critical for all-trans retinoic acid-inhibited adipocyte differentiation[J]. *Biochimie*, 2014, 106: 121-130.
- [17] CHEN K, WANG LH, YANG WJ, WANG CF, HU G, MO ZH. Profiling of differentially expressed genes in adipose tissues of multiple symmetric lipomatosis[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(5): 6570-6579.
- [18] RAY JD, KENER KB, BITNER BF, WRIGHT BJ, BALLARD MS, BARRETT EJ, HILL JT, MOSS LG, TESSEM JS. Nkx6.1-mediated insulin secretion and  $\beta$ -cell proliferation is dependent on upregulation of C-FOS[J]. *FEBS Letters*, 2016, 590(12): 1791-1803.
- [19] CAI C, CHEN DZ, TU HX, CHEN WK, GE LC, FU TT, TAO Y, YE SS, LI J, LIN Z, WANG XD, XU LM, CHEN YP. MicroRNA-29c acting on FOS plays a significant role in nonalcoholic steatohepatitis through the interleukin-17 signaling pathway[J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 597449.
- [20] 宋兴超, 赵园园, 孟金柱, 吴震洋, 安清明. 山羊原癌基因 *c-fos* 电子克隆与生物信息学分析[J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(3): 68-73.
- SONG XC, ZHAO YY, MENG JZ, WU ZY, AN QM. *In silico* cloning and bioinformatics analysis of *Capra hircus c-fos* gene[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2022, 50(3): 68-73 (in Chinese).
- [21] CAMPOS MA, KROON EG, GENTZ R, FERREIRA PC. Protein domains involved in nuclear transport of Fos[J]. *Cell Biology International*, 1999, 23(1): 81-88.
- [22] 涂冬萍, 马小军, 莫长明, 覃喜军, 黄杰. FOS 蛋白的研究进展及生物信息学分析[J]. *湖北农业科学*, 2015, 54(7): 1537-1542.
- TU DP, MA XJ, MO CM, QIN XJ, HUANG J. Progress and bioinformatics analysis of FOS protein[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2015, 54(7): 1537-1542 (in Chinese).
- [23] ACHARYA A, RISHI V, MOLL J, VINSON C. Experimental identification of homodimerizing B-ZIP families in *Homo sapiens*[J]. *Journal of Structural Biology*, 2006, 155(2): 130-139.
- [24] LI JW, WANG YH, LI QK, ZHANG RG. Exploration of core genes in ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia[J]. *Hormone and Metabolic Research*, 2022, 54(5): 288-293.
- [25] XIE LJ, ZOU LY, CHEN J, LIU YX. All-trans retinoic acid inhibits bone marrow mesenchymal stem cell commitment to adipocytes via upregulating FRA1 signaling[J]. *International Journal of Endocrinology*, 2020, 2020: 6525787.
- [26] HASENFUSS SC, BAKIRI L, THOMSEN MK, WILLIAMS EG, AUWERX J, WAGNER EF. Regulation of steatohepatitis and PPAR $\gamma$  signaling by distinct AP-1 dimers[J]. *Cell Metabolism*, 2014, 19(1): 84-95.
- [27] LUTHER J, DRIESSLER F, MEGGES M, HESS A, HERBERT B, MANDIC V, ZAISS MM, REICHARDT A, ZECH C, TUCKERMANN JP, CALKHOVEN CF, WAGNER EF, SCHETT G, DAVID JP. Elevated Fra-1 expression causes severe lipodystrophy[J]. *Journal of Cell Science*, 2011, 124(Pt 9): 1465-1476.
- [28] KVEIBORG M, SABATAKOS G, CHIUSAROLI R, WU ML, PHILBRICK WM, HORNE WC, BARON R. DeltaFosB induces osteosclerosis and decreases adipogenesis by two independent cell-autonomous mechanisms[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(7): 2820-2830.

(本文责编 郝丽芳)