

# 藏羚羊 *PGC-1 $\alpha$* 基因编码区的克隆与分析

马燕 常荣 祁玉娟 格日力\*

青海大学医学院 高原医学研究中心 西宁 810001

**摘要:**以藏羚羊(*Pantholops hodgsonii*)及同海拔分布的藏系绵羊(Tibetan Sheep)的心肌组织为材料,提取总 RNA,利用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术扩增出过氧化物酶体增生物激活受体 $\gamma$ 辅激活因子-1 $\alpha$ (*PGC-1 $\alpha$* )的基因编码区 cDNA 片段,与载体连接构建重组质粒,经转化、扩增培养、鉴定后测序。利用生物信息学方法分析显示,藏羚羊和藏系绵羊的 *PGC-1 $\alpha$*  基因编码区长度均为 2 349 bp,编码 797 个氨基酸(GenBank 登录号分别为:JF449959 和 JF449960);与其他脊椎动物 *PGC-1 $\alpha$*  基因的核苷酸及氨基酸序列相似性达到 90% 以上;其包含 RNA/DNA 结合位点、RNA 识别基序(RRM)、与核呼吸因子 1(NRF-1)及肌细胞增强因子 2C(MEF2C)相互作用的区域、富含丝氨酸/精氨酸的结构域、负调节功能结构域、LXXLL 模体以及 TPPTTPP 和 DHDYCQ 两个保守序列,14 个氨基酸差异性位点位于以上部分功能结构域中;此外,磷酸化位点的预测提示藏羚羊可能存在一个潜在的蛋白激酶 G 的磷酸化位点(第 329 位的苏氨酸)。本研究成功克隆出了藏羚羊 *PGC-1 $\alpha$*  基因的编码区序列,为从能量代谢角度深入探讨藏羚羊适应高原的分子生物学机制提供了新的思路。

**关键词:**cDNA 克隆;*PGC-1 $\alpha$* ;能量代谢;藏羚羊

**中图分类号:**Q781 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2012)01-25-11

## Molecular Cloning and Sequence Analysis of *PGC-1 $\alpha$* cDNA in Tibetan Antelope

MA Yan CHANG Rong QI Yu-Juan GE Ri-Li\*

Research Center for High Altitude Medicine, Medical School of Qinghai University, Xining 810001, China

**Abstract:**Total RNAs were extracted from myocardium of Tibetan Antelope (*Pantholops hodgsonii*) and Tibetan Sheep, both inhabiting on Tibetan Plateau (altitude 4 300 m). *PGC-1 $\alpha$*  coding cDNA sequences were cloned with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and the sequences were confirmed by DNA sequencing. The cloning and sequencing results confirmed that the *PGC-1 $\alpha$*  gene coding sequences of both Tibetan Antelope and Tibetan sheep showed above 90% identity with other species. In addition, the cloned sequences contained the RNA/DNA binding sites, RRM (RNA recognition motif), the domains involved in the interaction with NRF-1 and MEF2C, Arg/Ser rich domain, negative regulatory domain, LXXLL motif, as well as conserved sequences like TPPTTPP and DHDYCQ, which are present in all *PGC-1* family members. Fourteen variable amino acid sites were identified in the functional domains mentioned above. Additionally, analysis of generic phosphorylation sites and kinase specific phosphorylation prediction sites indicated that the 329-threonine amino acid site could be phosphorylated by PKG, which may be unique to Tibetan Antelope. Secondary

**基金项目** 国家 973 计划项目(No. 2012CB518200),国家自然科学基金项目(No. 31161861);

\* 通讯作者, E-mail: geriligao@hotmail.com;

**第一作者介绍** 马燕,女,硕士研究生;研究方向:高原医学;E-mail:mayer-my630@hotmail.com。

**收稿日期:**2011-07-31, **修回日期:**2011-11-11

structures of *PGC-1 $\alpha$*  protein from Tibetan Antelope and Tibetan Sheep were also predicted in this study. In summary, the *PGC-1 $\alpha$*  gene coding regions from Tibetan antelope and Tibetan Sheep have been successfully cloned, which may provide fundamental data for further investigating high altitude adaptation related to genetics in the future.

**Key words:** cDNA cloning; *PGC-1 $\alpha$* ; Energy metabolism; Tibetan Antelope (*Pantholops hodgsonii*)

转录因子能够通过序列特异性的方式结合在 DNA 上,进而调节基因的表达。然而由于转录因子普遍缺乏以下 3 种酶活性:(1)修饰染色质;(2)使 DNA 双链解螺旋;(3)招募 RNA 聚合酶 II,因此转录因子对基因表达的调控,实际上是依赖其与具有以上酶活性转录共调节因子(包括转录共激活和共抑制因子)对接后共同完成的。其中转录共激活因子不仅是基因表达的调节者,也是激素调控和生理信号转导通路作用的重要靶点,参与了许多生物学过程<sup>[1-2]</sup>。近年来,在高原适应研究领域,作为转录共激活因子之一的过氧化物酶体增生物激活受体  $\gamma$  辅激活因子-1 $\alpha$ (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , *PGC-1 $\alpha$* ) 越来越多地受到了人们的关注,它通过直接或间接的方式与过氧化物酶体增生物激活受体  $\alpha$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$ , *PPAR $\alpha$* )、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, *VEGF*)、低氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, *HIF-1*)、低氧诱导因子 2 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$ , *HIF-2 $\alpha$* ) 等低氧相关基因相互作用<sup>[3-4]</sup>;还参与了线粒体生物合成、糖脂代谢、氧化磷酸化、呼吸链电子传递等过程<sup>[1-2,5-6]</sup>,并与肌纤维类型的转换<sup>[4,7-8]</sup>及适应性产热有关<sup>[9]</sup>。

藏羚羊(*Pantholops hodgsonii*)是国家 I 级重点保护野生动物,主要分布在我国的西藏羌塘、青海可可西里和新疆阿尔金山保护区,栖息于海拔 3 500 ~ 5 500 m 的区域,尤以 4 500 ~ 5 500 m 的高原无人区常见,能以 80 km/h 的速度奔跑,瞬间速度可达 100 ~ 120 km/h<sup>[10-11]</sup>。藏羚羊在高海拔高寒低氧环境下所表现出的卓越奔跑能力,提示它作为高原适应性物种在氧的结合、转运以及能量代谢等方面都具有自身

独特的优势。因此,为了从转录共激活因子的角度出发,探讨藏羚羊能量代谢方面的特点,本研究克隆并分析了藏羚羊以及同海拔分布的藏系绵羊(Tibetan Sheep) *PGC-1 $\alpha$*  基因的编码区序列。

## 1 材料与方法

**1.1 材料来源** 经国家林业局批准(林护许准[2009]46号),2009年4月在青海省可可西里国家级自然保护区(海拔4 300 m)捕获雄性藏羚羊9只。在青海省海西州野牛沟(海拔4 300 m)购得雄性藏系绵羊10只。随后立即运至格尔木市实验基地(海拔2 800 m),进行相关生理学指标的采集后,取心肌组织迅速投入液氮中,低温保存并运回西宁。

**1.2 主要试剂** Trizol (Invitrogen 公司); cDNA 第一链合成试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、PCR Magic Mix、DNA 分子量标准、柱式 DNABACK 及柱式质粒 DNAOUT 试剂盒 (TANZ 公司); Trans109 化学感受态细胞 (TransGen 公司); PGEM-T Easy 载体和限制性内切酶 *EcoR* I (Promega 公司)。

**1.3 引物设计** *PGC-1 $\alpha$*  在许多脊椎动物间具有相对保守的序列<sup>[2]</sup>,故根据 NCBI 中核酸数据库里已公布的牛 (*Bos taurus*, NM\_177945.3)、山羊 (*Capra hircus*, EU304457.1)、人 (*Homo sapiens*, NM\_013261.3)、小鼠 (*Mus musculus*, BC066868.1)、猪 (*Sus scrofa*, NM\_213963.1) 和兔 (*Oryctolagus cuniculus*, XM\_002709377.1) 的 *PGC-1 $\alpha$*  cDNA 序列,利用 DNAMAN 6.0 软件找出 *PGC-1 $\alpha$*  在以上各物种间的保守区,结合 Primer 5.0 软件设计引物(表1)。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

表 1 *PGC-1 $\alpha$*  的引物序列及 PCR 扩增反应条件  
Table 1 The primers of the *PGC-1 $\alpha$*  and the TM, cycles in PCR reactions

引物名称 Primer	引物序列 Sequences (5'→3')	对应核苷酸位点* Nucleotide site	预计 片段大小 Size (bp)	退火温度(°C) Temperature		循环数 Cycles
				藏羚羊 Tibetan Antelope	藏系绵羊 Tibetan Sheep	
				PGC-1 $\alpha$ Forward 1	TGAGTGTGCTCTGTGTCA	
PGC-1 $\alpha$ Reverse 1	TCAAGTTCAGGAAGATCTGG	193				
PGC-1 $\alpha$ Forward 2	AGTGTGCTGCTCTGGTTGGT	136	174	53.9	55.4	37
PGC-1 $\alpha$ Reverse 2	TGTTTGAAGGCTCGTTGTG	309				
PGC-1 $\alpha$ Forward 3	AGTGACCAATCAGAAATAA	258	613	50.0	50.0	38
PGC-1 $\alpha$ Reverse 3	TCAGAGGAAGAGATAAAGT	870				
PGC-1 $\alpha$ Forward 4	TCGCAGTCGCAACATTTACAAGC	819	173	58.3	59.0	37
PGC-1 $\alpha$ Reverse 4	TTATGAGGAGGAGTGGTGGGTGG	992				
PGC-1 $\alpha$ Forward 5	CCCACAACCTCTCCTATAAAG	972	488	55.5	58.3	36
PGC-1 $\alpha$ Reverse 5	ATTTCCTGGTCTFTGGAGCTGT	1 459				
PGC-1 $\alpha$ Forward 6	AATCCGAGCTGAGCTGAATA	1 457	257	54.3	54.3	38
PGC-1 $\alpha$ Reverse 6	AAGAAGAACAAGAAGGCGACA	1 713				
PGC-1 $\alpha$ Forward 7	TGACGACAAAGCAGACAAG	1 506	623	52.0	52.6	35
PGC-1 $\alpha$ Reverse 7	TCCCAACATAAATCACACG	2 134				
PGC-1 $\alpha$ Forward 8	CTCAAGAGGGAAGAATACCGCA	2 026	488	56.0	56.0	38
PGC-1 $\alpha$ Reverse 8	GTCATCCTTAGCCAGGAACAT	2 492				

\* 参照黄牛 *PGC-1 $\alpha$*  cDNA 序列。

\* Contrast with *PGC-1 $\alpha$*  cDNA sequence of *Bos taurus*.

**1.4 总 RNA 的提取** 藏羚羊和藏系绵羊心肌组织总 RNA 的提取采用 Trizol 试剂一步抽提法进行。用 Eppendorf BioPhotometer 核酸蛋白测定仪检测总 RNA 的浓度及  $A_{260}$  与  $A_{280}$  的比值,1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量, -80°C 冰箱保存备用。

### 1.5 RT-PCR 扩增及序列测定

**1.5.1 cDNA 第一链的合成** 根据 DNA 第一链合成试剂盒,取总 RNA 1  $\mu$ g、Oligo dT 1  $\mu$ l (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) 混匀后置于 PCR 仪内 70°C 反应 5 min,然后置于冰上快速冷却 2 min,再按顺序加入 5  $\times$  逆转录缓冲液 4  $\mu$ l、RNA 酶抑制剂 1  $\mu$ l (40 U/ $\mu$ l)、dNTP Mix 2  $\mu$ l (10 mmol/L each),MMLV 反转录酶 1  $\mu$ l (200 U/ $\mu$ l),混匀后置于 PCR 仪内 42°C 反应 60 min,70°C 反应 10 min,完成后 -20°C 冰箱保存备用。

**1.5.2 PCR 扩增反应** 反应体系 25  $\mu$ l:PCR Magic Mix 12.5  $\mu$ l、cDNA 模板 1  $\mu$ g、上下游引物各 1  $\mu$ l (10 pmol)、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l,最后补灭菌超纯水至 25  $\mu$ l。PCR 扩增条件为:94°C 3 min;94°C 30 s,退火 50 s (各引

物退火温度见表 1),72°C 1.5 min,不同引物的循环次数见表 1;最后 72°C 延伸 10 min。扩增产物分别按预测片段大小的不同,采用 1.2% 或 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

**1.5.3 PCR 产物的回收、纯化及序列测定** 根据柱式 DNABACK 试剂盒说明,回收纯化特异性扩增片段,将回收纯化的片段连接到 pGEM-T Easy 载体上,连接产物转化感受态 Trans109 细胞,用含氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的 LB 培养基 37°C 过夜培养。从转化平板上挑取单克隆白斑,37°C 摇菌过夜。提取质粒,用 *EcoR* I 进行酶切鉴定,选出含有目的片段的克隆,送上海英潍捷基贸易有限公司测序。

**1.6 数据处理与分析** 将获得的序列拼接后,利用 NCBI 数据库的 BLAST 工具对测序结果进行比对分析;NCBI 数据库 ORF finder 工具及 www. expasy. org 网站的相关生物信息学软件用于预测开放阅读框;Bioedit 软件用于翻译出与核酸序列相对应的氨基酸序列;NCBI 的 BLAST 工具及 DNAMAN 6.0 软件用于序列相似性分析;MEGA 5.0 软件生成系统进化树;Clustal W

程序用于进行多重序列比对;NCBI 的 CDD 数据库、Smart 软件及 Pfam 数据库用于分析蛋白质功能域;磷酸化位点的预测利用丹麦生物信息数据库的 NetPhos 2.0 Server 和 NetPhosK 1.0 Server 程序;PHD、SOPMA、DSC 3 种方式结合预测蛋白质二级结构。

## 2 结果

**2.1 总 RNA 的提取** 提取的藏羚羊及藏系绵羊心肌组织总 RNA,  $A_{260}/A_{280} > 1.8$ , 电泳后可见完整清晰的 18S 和 28S 条带, 说明所得 RNA 分子质量较高, 可以作为逆转录模板用于 RT-PCR。

**2.2 PCR 扩增结果** 藏羚羊及藏系绵羊 *PGC-1 $\alpha$*  基因的 PCR 扩增产物片段经琼脂糖凝胶电泳后在紫外灯下观察, 得到与预期片段大小一致的特异性条带。回收纯化的 PCR 产物经连接、转化、筛选、培养并鉴定后测定。

## 2.3 测序结果及序列分析

### 2.3.1 cDNA 序列拼接和开放阅读框的预测

测序后对序列进行拼接, 得到长度为 2 474 bp 的藏羚羊 *PGC-1 $\alpha$*  基因部分 cDNA 序列 (GenBank 登录号分别为: JF449959) 和长度为 2 475 bp 的藏系绵羊 *PGC-1 $\alpha$*  基因部分 cDNA 序列 (GenBank 登录号为: JF449960)。根据预测结果推测出藏羚羊和藏系绵羊 *PGC-1 $\alpha$*  基因编码区的核苷酸长度均为 2 394 bp, 可编码 797 个氨基酸。

### 2.3.2 序列相似性分析和系统进化树的构建

将所得藏羚羊和藏系绵羊 *PGC-1 $\alpha$*  基因 cDNA 序列及氨基酸序列与其他物种进行序列相似性比较, 结果表明不同物种间该基因具有高度的保守性 (表 2)。通过系统进化树可以看出, 藏羚羊和藏系绵羊与山羊、牛的亲缘关系较近, 与猪、人、小鼠等哺乳动物的亲缘关系相对较远 (图 1)。

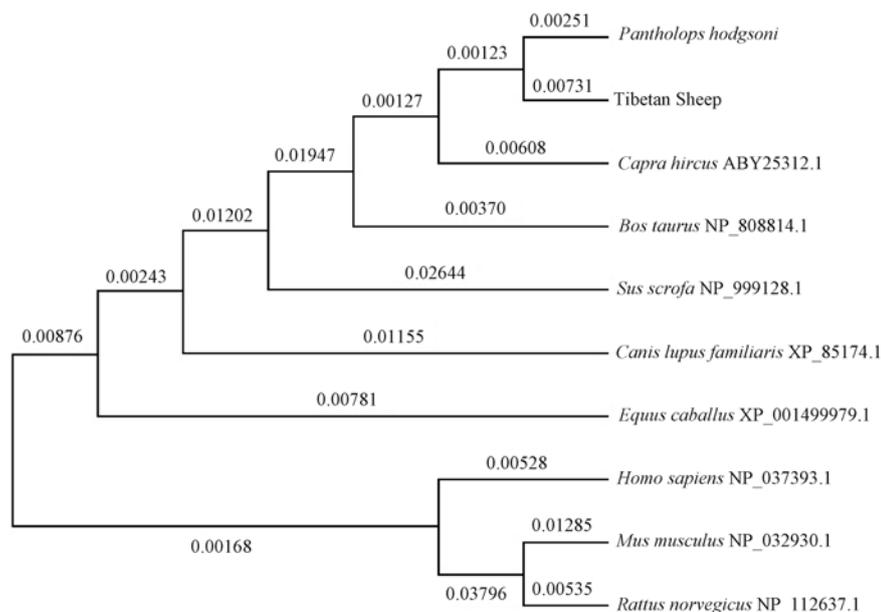


图 1 以不同物种 *PGC-1 $\alpha$*  氨基酸序列为基础构建的 ML 系统进化树

Fig. 1 Maximum Likelihood Tree based on amino acid sequences of *PGC-1 $\alpha$*  from different species

枝上数字: 不同物种间 *PGC-1 $\alpha$*  氨基酸系统进化距离。

The numbers above the branches are phylogenetic branch distance of *PGC-1 $\alpha$*  between different species.

*Pantholops hodgsonii*: 藏羚羊; Tibetan Sheep: 藏系绵羊; *Capra hircus*: 山羊; *Bos taurus*: 牛; *Sus scrofa*: 猪; *Equus caballus*: 马; *Canis lupus familiaris*: 犬; *Homo sapiens*: 人; *Mus musculus*: 小鼠; *Rattus norvegicus*: 大鼠。

表 2 藏羚羊和藏系绵羊与其他物种 PGC-1 $\alpha$  基因编码区核苷酸及氨基酸序列的相似性比较Table 2 Homologous comparison of PGC-1 $\alpha$  gene nucleotide and amino acid sequences between Tibetan Antelope, Tibetan Sheep and other species

物种 Species	GenBank 登录号 Accession No.		核酸序列相似性 Identities (%)		氨基酸序列相似性 Identities (%)	
	核苷酸 Nucleotide	氨基酸 Amino acid	藏羚羊	藏系绵羊	藏羚羊	藏系绵羊
			<i>Pantholops hodgsonii</i>	Tibetan Sheep	<i>Pantholops hodgsonii</i>	Tibetan Sheep
山羊 <i>Capra hircus</i>	EU304457.1	ABY25312.1	98	99	99	99
绵羊 <i>Ovis aries</i>	AY957611.1 <sup>◆</sup>	AA39782.1 <sup>◆</sup>	98	98	98	98
牛 <i>Bos taurus</i>	NM_177945.3	NP_808814.1	98	98	98	98
马 <i>Equus caballus</i>	XM_001499929.1	XP_001499979.1	95	94	96	96
猪 <i>Sus scrofa</i>	NM_213963.1	NP_999128.1	95	95	95	95
人 <i>Homo sapiens</i>	NM_013261.3	NP_037393.1	94	94	95	95
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NM_008904.2	NP_032930.1	90	90	92	92

◆◆ NCBI 核酸及氨基酸数据库中仅有绵羊 (*Ovis aries*) PGC-1 $\alpha$  的部分序列。

◆◆ There are no *Ovis aries* complete mRNA sequence and amino acid sequence in NCBI.

**2.3.3 PGC-1 $\alpha$  保守结构分析** 结合 NCBI 的 CDD 数据库、Smart 软件、Pfam 数据库并参考相关文献<sup>[2,9,12-16]</sup> 综合分析后发现,藏羚羊和藏系绵羊的 PGC-1 $\alpha$  氨基酸序列中包含了 TPPTTPP 与 DHDYCQ 2 个典型的 PGC-1 $\alpha$  家族保守序列,还包含 LXXLL 基序、RNA 识别基序 (RNA recognition motif, RRM)、富含丝氨酸/精氨酸的结构域、RNA/DNA 结合位点、负调节功能结构域、PGC-1 $\alpha$  与核呼吸因子 1

(nuclear respiratory factor-1, NRF-1) 及肌细胞增强因子 2C (myocyte enhancer factor 2C, MEF2C) 相互作用的区域 (图 2)。不同物种在这些区域内的氨基酸差异性分析见表 3,其中第 240、243、249、329、330、332 和 391 位氨基酸位于 PGC-1 $\alpha$  与 NRF-1 相互作用的区域及负调节功能结构域内,第 433、457 和 459 位氨基酸位于 PGC-1 $\alpha$  与 MEF2C 相互作用的区域内,第 707 位氨基酸位于 RNA 识别基序内。

表 3 不同物种间 PGC-1 $\alpha$  氨基酸差异性分析Table 3 Analysis of the amino acid sites of PGC-1 $\alpha$  from different species

物种 Species	氨基酸位点 Amino acid site <sup>*</sup>													
	5	240	243	249	329	330	332	391	433	457	459	617	699	707
藏羚羊 <i>Pantholops hodgsonii</i>	M	K	D	T	A	K	T	V	P	D	E	N	R	C
藏系绵羊 Tibetan Sheep	M	N	D	S	A	K	A	I	L	A	G	N	S	C
山羊 <i>Capra hircus</i>	L	K	A	T	A	E	A	I	P	D	E	S	S	Y
牛 <i>Bos taurus</i>	M	K	A	T	S	K	A	I	P	D	E	N	R	C
猪 <i>Sus scrofa</i>	M	K	A	S	S	K	T	I	Q	D	E	N	R	C
人 <i>Homo sapiens</i>	M	K	S	S	S	K	P	I	Q	D	E	N	R	C
小鼠 <i>Mus musculus</i>	M	K	S	S	T	K	A	L	Q	D	E	N	R	C

\* 表中所示的氨基酸位点为以上各物种进行多序列比对时的相对位置。

\* The amino acid sites in table 3 are based on the results of multiple alignment.

**2.3.4 广泛磷酸化位点以及特定激酶磷酸化位点的预测** 通过 NetPhos 2.0 Server 进行 PGC-1 $\alpha$  广泛磷酸化位点预测,发现藏系绵羊比藏羚羊多了 2 个丝氨酸磷酸化位点 (第 246 和第 666 位),藏羚羊比藏系绵羊多了 2 个酪氨酸磷酸化位点 (第 384 和第 432 位)。通过 NetPhosK 1.0 Server 进行 PGC-1 $\alpha$  特定激酶磷

酸化位点的预测,提示藏羚羊可能存在于一个独有的蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG) 磷酸化位点 (第 329 位苏氨酸),见表 4。

**2.3.5 PGC-1 $\alpha$  蛋白质二级结构预测** 通过 PHD、SOPMA 及 DSC 3 种方式分析后显示,藏羚羊和藏系绵羊 PGC-1 $\alpha$  蛋白的主体结构为无规则卷曲,其余为  $\alpha$  螺旋及少量的延伸链 (表 5)。

```

1 MAWDMCNQDS--VWSDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSD
2 MAWDMCNQDS--VWSDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSD
3 MAWDMCNQDS--VWSDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSD
4 MAWDMCNQDS--VWSDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSD
5 MAWDMCNQDS--VWTDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSD
6 MAWDMCNQDS--VWSDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSD
7 MAWDMCSQDS--VWSDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLGGLKWCSD
****. * *** ** .*****
1 QSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLVPDEEDGLPSFDALTDGDVTE
2 QSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLVPDEEDGLPSFDALTDGDVTE
3 QSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLVPDEEDGLPSFDALTDGDVTE
4 QSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLVPDEEDGLPSFDALTDGDVTE
5 QSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLVPDEEDGLPSFDALTDGDVTE
6 QSEIISNQYNNEPSNIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLVPDEEDGLPSFDALTDGDVTTD
7 QSEIISNQYNNEPANIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLVPDEEDGLPSFDALTDGAVTTD
*****. *****
1 NEASPSSMPDGTTPPPQEAEEPSILKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHAN-HNHRIRTN
2 NEASPSSMPDGTTPPPQEAEEPSILKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHAN-HNHRIRTN
3 NEASPSSMPDGTTPPPQEAEEPSILKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHAN-HNHRIRTN
4 NEASPSSMPDGTTPPPQEAEEPSILKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHAN-HNHRIRTN
5 NEASPSSMPDGTTPPPQEAEEPSILKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHAN-HNHRIRTN
6 NEASPSSMPDGTTPPPQEAEEPSILKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHAN-HNHRIRTN
7 NEASPSSMPDGTTPPPQEAEEPSILKLLLAPANTQLSYNECSGLSTQNHAANTHRIRTN
*****. * *****
1 PAVVKTENSWSNKAKSICQQQKQRRPCSELLKYLTTNDPPHTKPTENRNSRDKCTSK
2 PAVVKTENSWSNKAKSICQQQKQRRPCSELLKYLTTNDPPHTKPTENRNSRDKCTSN
3 PAVVKTENSWSNKAKSICQQQKQRRPCSELLKYLTTNDPPHTKPTENRNSRDKCTSK
4 PAVVKTENSWSNKAKSICQQQKQRRPCSELLKYLTTNDPPHTKPTENRNSRDKCTSK
5 PAVVKTENSWSNKAKSICQQQKQRRPCSELLKYLTTNDPPHTKPTETRNSSRDKCTSK
6 PAIVKTENSWSNKAKSICQQQKQRRPCSELLKYLTTNDPPHTKPTENRNSRDKCTSK
7 PAIVKTENSWSNKAKSICQQQKQRRPCSELLKYLTTNDPPHTKPTENRNSRDKASK
** .*****. *
-----
1 KKDHTQSQTQHLQAKPTTSLPLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPTT
2 KKDHTQSQSQHLQAKPTTSLPLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPTT
3 KKAHTQSQTQHLQAKPTTSLPLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPTT
4 KKAHTQSQSQHLQAKPTTSLPLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPTT
5 KKAHTQSQSQHLQAKPTSLPLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPTT
6 KKSHTQSQSQHLQAKPTTSLPLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPTT
7 KKSHTQPSQHAQAKPTTSLPLTPESPNDPKGSPFENKTIERTLSVELSGTAGLTPPTT
** *** * ** *****
-----
1 PPHKANQDNPFRA SPKLPKPSCKTVVPPPAKRYSESSGTQGSNSTKKGPEQSELYAQLS
2 PPHKANQDNPFRA SPKLPKPSCKTVVPPPAKRYSESSGTQGSNSTKKGPEQSELYAQLS
3 PPHKANQDNPFRA SPKLPKPSCKTVVPPPAEKARYSESSGTQGSNSTKKGPEQSELYAQLS
4 PPHKANQDNPFRA SPKLPKPSCKTVVPPPSKKARYSESSGTQGSNSTKKGPEQSELYAQLS
5 PPHKANQDNPFRA SPKLPKPSCKTVVPPPSKKRYSESSGTQGSNSTKKGPEQSELYAQLS
6 PPHKANQDNPFRA SPKLPKPSCKTVVPPPSKKRYSESSGTQGSNSTKKGPEQSELYAQLS
7 PPHKANQDNPFRA SPKLPKPSCKTVVPPPKRARYSESSGTQGSNSTKKGPEQSELYAQLS
*****. *****. *****. *****. * * * *****
-----
1 KTSVLTSGHEERKAKRPSLRLFCDHDYQCSINSKTEILVSIQELHDSRQLENKDA PSSN
2 KTSVLTSGHEERKAKRPSLRLFCDHDYQCSINSKTEILVSIQELHDSRQLENKDA PSSN
3 KTSVLTSGHEERKAKRPSLRLFCDHDYQCSINSKTEILVSIQELHDSRQLENKDA PSSN
4 KTSVLTSGHEERKAKRPSLRLFCDHDYQCSINSKTEILVSTIQELHDSRQLENKDA PSSN
5 KTSALGGGHEERKARRPSLRLFCDHDYQCSINSKAEILINISQELHDSRQLDSKDAAS-D
6 KSSVLTGGHEERKTRPSLRLFCDHDYQCSINSKTEILINISQELQDSRQLENKDVSS-D
7 KSSGLSRGHEERKTRPSLRLFCDHDYQCSLNSKTDILINISQELQDSRQLDFKDA SC-D
* * * *****. *****. *****. * * * *****
-----
1 GPGQIHSSDSDPCYLRETAEVSQVSPGSTRKQLQDQEI RAELNKHFGHPSQAVFDDKA
2 GPGQIHSSDSDPCYLRETAEVSQVSPGSTRKQLQDQEI RAELNKHFGHPSQAVFDDKA
3 GPGQIHSSDSDPCYLRETAEVSQVSPGSTRKQLQDQEI RAELNKHFGHPSQAVFDDKA
4 GPGQIHSSDSDPCYLRETAEVSQVSPGSTRKQLQDQEI RAELNKHFGHPSQAVFDDKA
5 WQRQMCSSDSDQSYLTETSEASQVSPGSTRKQLQDQEI RAELNKHFGHPSQAVFDDKA
6 WQGICSSDSDQCYLRETLEASKQVSPGSTRKQLQDQEI RAELNKHFGHPSQAVFDDKA
7 WQHICSSDSDGQCYLRETLEASKQVSPGSTRKQLQDQEI RAELNKHFGHPSQAVFDDKA
*****. * * * * * *****. * * * * * *****. *****. *****
-----

```



图 2 不同物种 PGC-1 $\alpha$  氨基酸序列多重比对

Fig. 2 Multiple amino acid sequence alignment of PGC-1 $\alpha$  from different species

1:藏羚羊; 2:藏系绵羊; 3:山羊; 4:牛; 5:猪; 6:人; 7:小鼠; “\*” :同源序列; “.” :非同源序列; “-” :缺失序列; “□” :保守序列; “■■■■■■” :负调节功能结构域; “~~~~~” :与 NRF-1 对接的区域; “- - - - -” :与 MEF2C 对接的区域; “■■■■■” :富含丝氨酸/精氨酸的结构域; “====” :RNA 识别基序; “○” :RNA/DNA 结合位点。  
 1: *Pantholops hodgsonii*; 2: Tibetan Sheep; 3: *Capra hircus*; 4: *Bos taurus*; 5: *Sus scrofa*; 6: *Homo sapiens*; 7: *Mus musculus*; “\*” : The homologous regions; “.” : The heteroideous regions; “-” : The deletion sequences; “□” : conserved sequences; “■■■■■■” : negative regulatory domain; “~~~~~” : domain involved in the interaction with NRF-1; “- - - - -” : domain involved in the interaction with MEF2C; “■■■■■” : Ser/Arg-rich domain; “====” : RNA recognition motif; “○” : RNA/DNA binding sites.

表 4 藏羚羊和藏系绵羊部分 PGC-1 $\alpha$  特定激酶磷酸化位点与其他物种的比较

Table 4 Comparison of some specific phosphorylation sites of PGC-1 $\alpha$  between Tibetan Antelope, Tibetan Sheep and other species

特定激酶磷酸化位点 Specific phosphorylation sites	激酶种类 Type of kinase						
	藏羚羊 <i>Pantholops hodgsonii</i>	藏系绵羊 Tibetan Sheep	山羊 <i>Capra hircus</i>	牛 <i>Bos taurus</i>	猪 <i>Sus scrofa</i>	人 <i>Homo sapiens</i>	小鼠 <i>Mus musculus</i>
246 丝氨酸 Serine	—	+ ( DNAPK)	—	—	+ ( DNAPK)	+ ( DNAPK)	+ ( DNAPK)
425 丝氨酸 Serine	+ (CKII)	—	+ (CKII)	+ (CKII)	+ (PKC,cdc2)	+ (PKC,cdc2)	+ (PKC)
666 丝氨酸 Serine	—	+ (DNAPK, ATM,PKC)	+ (DNAPK, ATM,PKC)	—	—	—	—
329 苏氨酸 Serine	+ ( PKG)	—	—	—	—	—	—

+ 表示该物种在该位点可被某种蛋白激酶磷酸化; 括号内为蛋白激酶的种类; — 表示该物种在该位点不能被某种蛋白激酶磷酸化; DNAPK: DNA 依赖性蛋白激酶; CK II : 酪蛋白激酶 2; PKC: 蛋白激酶 C; PKG: 蛋白激酶 G; ATM: 共济失调性毛细血管扩张症突变蛋白激酶; cdc2: 细胞周期依赖性蛋白激酶。

+ Shows certain amino acid sites that can be phosphorylated by specific kinase; parenthesis shows name of specific kinase; — Shows certain amino acid sites that can not be phosphorylated by specific kinase; DNAPK: DNA-dependent protein kinase; CK II : casein kinase 2; PKC: protein kinase C; PKG: protein kinase G; ATM: ataxia-telangiectasia-mutated kinase; cdc2: cell division cycle 2 kinase.

表 5 藏羚羊和藏系绵羊 PGC-1 $\alpha$  蛋白质二级结构预测 (%)

Table 5 The prediction of the protein secondary structure of PGC-1 $\alpha$  in Tibetan Antelope and Tibetan Sheep

	藏羚羊 <i>Pantholops hodgsonii</i>			藏系绵羊 Tibetan Sheep		
	PHD	SOPMA	DSC	PHD	SOPMA	DSC
$\alpha$ 螺旋 Alpha helix	13. 80	21. 58	19. 07	17. 94	26. 73	19. 57
延伸链 Extended strand	2. 01	4. 14	12. 05	2. 76	5. 27	10. 66
无规则卷曲 Random coil	84. 19	72. 40	68. 88	79. 03	65. 62	69. 76
$\beta$ 转角 Beta turn	0. 00	0. 00	0. 00	0. 00	2. 38	0. 00

### 3 讨论

低氧和寒冷是影响高原动物能量代谢的主要因素。一些转录因子和转录共激活因子通过调节控制能量代谢的相关基因动态表达,来应对一些能量供需变化的情况,使机体达到长期适应<sup>[17]</sup>。PGC-1 $\alpha$  作为转录共激活因子,选择性地高表达于高氧化性组织器官,如心、骨骼肌、脂肪组织、肝等。当环境发生变化时,PGC-1 $\alpha$  能够激发细胞内的一系列生物学反应,如增加线粒体生物合成<sup>[5]</sup>、加快细胞呼吸率<sup>[2,9]</sup>、提高能源物质的摄取及利用<sup>[18]</sup>,以保证机体对能量的需求。这些生物学反应都是通过 PGC-1 $\alpha$  特异性地共激活控制细胞新陈代谢的细胞核受体及非核受体转

录因子后实现的<sup>[1-2,15]</sup>。

PGC-1 $\alpha$  共激活的细胞核受体转录因子之一 PPAR $\alpha$ ,不仅是线粒体脂肪酸氧化的重要调节者<sup>[6]</sup>,还是藏族人适应高原的正选择基因之一<sup>[19]</sup>。PPAR $\alpha$  可被 PGC-1 $\alpha$  结合后激活,以此增强对脂肪酸氧化通路上 PPAR $\alpha$  应答基因的调控,从而对脂肪酸的摄取和氧化产生影响<sup>[6,20]</sup>。LXXLL 模体是 PGC-1 $\alpha$  与 PPAR $\alpha$  等细胞核受体转录因子相互作用的部位,位于 PGC-1 $\alpha$  的转录激活域内<sup>[3,12,21]</sup>。本实验通过同源序列比对发现 LXXLL 模体在各物种之间高度保守,然而不同物种间对 PGC-1 $\alpha$  转录激活区具有调控作用的负调节功能结构域<sup>[14]</sup>,却有着明显的氨基酸序列差异性。在本研究进行的氨基酸差异性位点分析中,

所比较物种的 14 个氨基酸差异性位点中有 6 个位点(第 240、243、249、329、330 和 332)可能导致各物种在调节 *PGC-1 $\alpha$*  与 *PPAR $\alpha$*  等细胞核受体转录因子相互作用方面产生差异,进而对下游基因的调控造成影响。我们的最新研究结果显示,*PPAR $\alpha$*  基因单倍型与藏族人血清甘油三酯和游离脂肪酸水平呈显著正相关<sup>[22]</sup>。此外,张雪峰等对藏羚羊与藏系绵羊血液内分泌激素水平的研究发现,藏羚羊血液中皮质醇含量明显高于藏系绵羊<sup>[23]</sup>。生理性的高皮质醇水平可以使血清游离脂肪酸浓度增加 60%<sup>[24]</sup>,而血清游离脂肪酸的浓度与脂肪酸的利用具有线性关系<sup>[25]</sup>。这从一个层面上反映出,与移居高原的人和动物相比,世居高原的藏羚羊和藏族人对脂肪酸氧化利用的能力可能更强,这或许是对高原遗传性适应的一种表现。

*PGC-1 $\alpha$*  的负调节功能结构域、*PGC-1 $\alpha$*  与细胞核受体转录因子 *PPAR $\gamma$* 、*NRF-1* 的相互作用区域,三部分互相重叠<sup>[9,14]</sup>。*PPAR $\gamma$*  主要调节脂质的储存和脂肪的形成<sup>[20]</sup>。*NRF-1* 可被 *PGC-1 $\alpha$*  结合后激活,调控影响线粒体呼吸功能的下游基因(如线粒体转录因子 A, *Tfam*),调节编码线粒体呼吸传递链亚单位、氧化磷酸化相关核基因的表达以及线粒体的生物合成<sup>[5,14,26]</sup>。前期研究表明,藏羚羊心肌内不仅线粒体的含量比藏系绵羊丰富,而且线粒体嵴的数目也明显多于藏系绵羊<sup>[27]</sup>,这意味着藏羚羊进行有氧氧化能力可能更强。结合本文所比较的物种,在 *PGC-1 $\alpha$*  与 *NRF-1* 相互作用的区域内所显示出的氨基酸差异性,以及藏羚羊在运动耐力及爆发力方面所表现出的特点,提示藏羚羊的 *PGC-1 $\alpha$*  基因在调节自身线粒体功能方面可能有着重要的作用。

另外,*PGC-1 $\alpha$*  通过刺激葡萄糖转运、抑制糖原分解、下调糖原磷酸化酶和磷酸激酶  $\alpha$  来增加糖原的储存<sup>[18]</sup>,这有利于机体在应激状态下对能量物质的动员。*PGC-1 $\alpha$*  可以结合并激活非核受体转录因子 *MEF2C* 来增加葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter type 4, *GLUT4*) 的

表达<sup>[16]</sup>。本研究发现藏系绵羊在 *PGC-1 $\alpha$*  与 *MEF2C* 相互作用的区域有 3 处(第 433、457 和 459 位)同其他所比较的牛科动物均不相同的氨基酸位点。

通过对特定激酶磷酸化位点的预测,提示了藏羚羊可能存在一个独有的 *PKG* 磷酸化位点(第 329 位苏氨酸)。有文献指出 *PKG* 依赖的 *PGC-1 $\alpha$*  的下调与一氧化氮(nitric oxide, *NO*)诱导的内皮迁移及 *NO* 对线粒体活性氧(reactive oxygen species, *ROS*)解毒系统的活性调节作用有关<sup>[28-29]</sup>。伴随着线粒体功能的增强,电子传递链过程中电子的漏出会导致 *ROS* 增加,为了消除多余的 *ROS*,使其保持动态平衡并阻止 *ROS* 诱发的不良效应,*PGC-1 $\alpha$*  在对 *ROS* 解毒系统的调节中也起到了非常重要的作用<sup>[30]</sup>。

*PGC-1 $\alpha$*  处于调节众多能量代谢相关转录因子的关键位置,而且与心肌收缩功能<sup>[31]</sup>、肌纤维类型转化<sup>[6]</sup>、II 型糖尿病胰岛素抵抗<sup>[15]</sup>和慢性阻塞性肺疾病<sup>[32]</sup>等也有着密切的关系。

本研究通过对藏羚羊和藏系绵羊 *PGC-1 $\alpha$*  基因编码区的克隆与分析,提出了藏羚羊可能存在一个独有的 *PKG* 磷酸化位点,以及不同物种间 *PGC-1 $\alpha$*  的氨基酸序列差异性可能影响 *PGC-1 $\alpha$*  与部分转录因子的相互作用。这些推论与 *PGC-1 $\alpha$*  基因在藏羚羊能量代谢方面的作用有待进一步研究证实。

**致谢** 承蒙青海大学高原医学研究中心的白振忠博士、杨应忠博士、芦殿香博士、马兰博士、刘芳博士、乌仁塔娜硕士、张淑娜硕士、嘎琴老师等在实验过程中给予的支持和帮助,特此致谢!

## 参 考 文 献

- [1] Spiegelman B M, Heinrich R. Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell*, 2004, 119(2): 157 - 167.
- [2] Lin J D, Handschin C, Spiegelman B M. Metabolic control through the *PGC-1* family of transcription coactivators. *Cell Metabolism*, 2005, 1(6): 361 - 370.

- [ 3 ] Shoag J, Arany Z. Regulation of hypoxia-inducible genes by PGC-1 $\alpha$ . *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2010, 30(4) : 662 – 666.
- [ 4 ] Rasbach K A, Gupta R K, Ruas J L, et al. PGC-1 $\alpha$  regulates a HIF2 $\alpha$ -dependent switch in skeletal muscle fiber types. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(50) : 21866 – 21871.
- [ 5 ] Scarpulla R C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological Review*, 2008, 88(2) : 611 – 638.
- [ 6 ] Vega R B, Huss J M, Kelly D P. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(5) : 1868 – 1876.
- [ 7 ] Handschin C, Chin S, Li P, et al. Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1 $\alpha$  muscle-specific knock-out animals. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(41) : 30014 – 30021.
- [ 8 ] Lin J D, Wu H, Tarr P T, et al. Transcriptional co-activator PGC-1  $\alpha$  drives the formation of slow-twitch muscle fibers. *Nature*, 2002, 418(6899) : 797 – 801.
- [ 9 ] Puigserver P, Wu Z D, Park C W, et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 1998, 92(6) : 829 – 839.
- [ 10 ] Xu S Q, Yang Y Z, Zhou J, et al. A mitochondrial genome sequence of the Tibetan antelope (*Pantholops hodgsonii*). *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2005, 3(1) : 5 – 17.
- [ 11 ] 张会斌, 李维东, 刘志虎. 藏羚 (*Pantholops hodgsonii*). *动物学杂志*, 2003, 38(5) : 74.
- [ 12 ] Lin J D, Puigserver P, Donovan J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(3) : 1645 – 1648.
- [ 13 ] Monsalve M, Wu Z D, Adelmant G, et al. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Molecular Cell*, 2000, 6(2) : 307 – 315.
- [ 14 ] Puigserver P, Adelmant G, Wu Z D, et al. Activation of PPAR $\gamma$  coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*, 1999, 286(5443) : 1368 – 1371.
- [ 15 ] Finck B N, Kelly D P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116(3) : 615 – 622.
- [ 16 ] Michael L F, Wu Z D, Cheatham R B, et al. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(7) : 3820 – 3825.
- [ 17 ] Kodde I F, van der Stok J, Smolenski R T, et al. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2007, 146(1) : 26 – 39.
- [ 18 ] Wednde A R, Schaeffer P J, Parker G J, et al. A role for the transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  in muscle refueling. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(50) : 36642 – 36651.
- [ 19 ] Simonson T S, Yang Y Z, Huff C D, et al. Genetic evidence for high-altitude adaptation in Tibet. *Science*, 2010, 329(5987) : 72 – 75.
- [ 20 ] Huss J M, Kelly D P. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circulation Research*, 2004, 95(6) : 568 – 578.
- [ 21 ] Puigserver P, Spiegelman B M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1  $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews*, 2003, 24(1) : 78 – 90.
- [ 22 ] Ge R L, Simonson T S, Cooksey R C, et al. Metabolic insight into mechanisms of high-altitude adaptation in Tibetans. *Journal of Clinical Investigation* (Submitted).
- [ 23 ] 张雪峰, 杨应忠, 裴志伟, 等. 藏羚羊和藏系绵羊血液内分泌激素水平的比较研究. *生理学报*, 2011, 63(4) : 342 – 346.
- [ 24 ] Djurhuus C B, Gravholt C H, Nielsen S, et al. Effects of cortisol on lipolysis and regional interstitial glycerol levels in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2002, 283(1) : E172 – E177.
- [ 25 ] 张媛, 漆正堂, 郭维, 等. 耐力训练对高脂膳食大鼠骨骼肌线粒体脂肪氧化及 PGC-1 $\alpha$  基因表达的影响. *天津体育学院学报*, 2010, 25(3) : 193 – 196.
- [ 26 ] Wu Z D, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 1999, 98(1) : 115 – 124.
- [ 27 ] 常荣, 杨应忠, 马祁生, 等. 藏羚羊和藏系绵羊左心室收缩功能的比较研究. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(8) : 1498 – 1502.
- [ 28 ] Borniquel S, Valle I, Cadenas S, et al. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the

- transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$ . The FASEB Journal, 2006, 20(11): 1889 – 1891.
- [29] Borniquel S, García-Quintáns N, Valle I, et al. Inactivation of Foxo3a and subsequent downregulation of PGC-1 $\alpha$  mediate nitric oxide-induced endothelial cell Migration. Molecular and Cell Biology, 2010, 30(16): 4035 – 4044.
- [30] Feige J N, Auwerx J. Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. Trends Cell Biology, 2007, 17(6): 292 – 301.
- [31] Arany Z, He H M, Lin J D, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. Cell Metabolism, 2005, 1(4): 259 – 271.
- [32] Li J, Dai A G, Hu R C, et al. Positive correlation between PPAR $\gamma$ /PGC-1 $\alpha$  and  $\gamma$ -GCS in lungs of rats and patients with chronic obstructive pulmonary disease. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2010, 42(9): 603 – 614.