

鸡 Heme oxygenase 1 基因克隆、结构功能预测及组织表达特性分析

江秀清¹, 王丽丽¹, 曹嫦妤¹, 李楠¹, 葛延松¹, 张颖^{2*}, 李金龙^{1*}

(1. 东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 旨在克隆鸡 Heme oxygenase 1(HO-1)基因, 探明其蛋白结构、功能及组织表达特性。以海兰白鸡(W-36)为材料, 利用 RT-PCR 技术克隆鸡 HO-1 基因 CDS 区, 利用生物信息学方法预测蛋白结构与功能, 应用 qRT-PCR 检测组织表达特性。结果表明, 鸡 HO-1 基因的 CDS 为 891 bp, 编码 296 个氨基酸, 其核苷酸和氨基酸序列与其他种属间的差异较大。鸡 HO-1 为跨膜非分泌蛋白, 具有 HO 家族的结构域, 酶分类为 EC1. 14. 99. 3, 能够结合 HEM、BLA、OXN、Q80、SUC、TRE 和 Na⁺ 等分子。鸡 HO-1 基因在组织内广泛表达, 在动脉、脑干、大脑、坐骨神经、十二指肠及小肠等组织表达量较高。预测 HO-1 蛋白具有调控糖类和盐类等相关分子功能作用, 其在组织中广泛表达, 在循环系统、神经系统和消化系统中具有重要的生物学功能。

关键词: 鸡; Heme oxygenase 1; 基因克隆; 蛋白结构与功能; 组织表达特性

中图分类号: S856.5; S831.7

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)01-0031-07

Gene Cloning, Analysis of Bioinformatics and Tissue Specific Expression Profile of Heme Oxygenase 1 Gene in Chicken

JIANG Xiu-qing¹, WANG Li-li¹, CAO Chang-yu¹, LI Nan¹, GE Yan-song¹, ZHANG Ying^{2*}, LI Jin-long^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The aim of this study was to clone the chicken Heme oxygenase 1 (HO-1) gene, predict its protein structure and function, and reveal its expression characteristics in tissues. In this study, Hailan White fowl (W-36) was used as experimental animal, the CDS region of chicken HO-1 gene was cloned by qRT-PCR, the protein structure and function were predicted by using bioinformatics, RT-PCR was used to analyze the expression characteristics in tissues. These results showed that the CDS of chicken HO-1 gene was 891 bp, encoding 296 amino acids. The conservation of its nucleotide and amino acid sequences were not high compared with other species. The protein of chicken HO-1 was transmembrane and non-secretory, it had a domain of the HO family, it is classified in EC1. 14. 99. 3. It could bind to HEM, BLA, OXN, Q80, SUC, TRE and Na⁺ molecules, the HO-1 was expressed widely in tissues, and the expression level was higher in the brain, brain stem, artery, sciatic nerve, duodenum and small intestine. HO-1 protein is predicted that it can regulate the sugar and salt function, and is expressed widely in tissues, with impor-

收稿日期: 2013-6-26

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(30901088); 教育部新世纪优秀人才培养计划(NECT-1207-02); 黑龙江省普通高等学校新世纪优秀人才培养计划(1252-NCET-009); 中国博士后科学基金项目(2012T50301 和 20110491021); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12511031); 国家科技重大专项项目(2012ZX07201003)

作者简介: 江秀清(1990-), 女, 河南杞县人, 硕士生, 主要从事动物营养代谢病与中毒病, 环境毒理学研究, E-mail: ja9075@163.com; 王丽丽(1986-), 女, 河北沧县人, 硕士生, 主要从事动物营养代谢病与中毒病, 环境毒理学研究, E-mail: iamwanglili1003@163.com

* 通信作者: 张颖, 教授, E-mail: zhangyingghr@hotmail.com; 李金龙, 副教授, E-mail: jinlongli@neau.edu.cn

tant biological function in the circulatory system, nervous system and digestive system.

Key words: chicken; Heme oxygenase 1; gene cloning; structure and function of protein; tissue specific expression

血红素加氧酶(Heme oxygenase, HO)于1968年首次被描述,当时认为它是催化血红素降解为胆绿素的酶。随后的研究表明,HO-1是一种诱导酶,为热休克蛋白32,主要存在于肝、脾和骨髓等降解衰老红细胞的组织器官。HO-1具有细胞保护作用,某些全身性刺激如低氧/高热,脑部创伤、出血等均可激活HO-1的表达^[1-4]。HO-1的诱导激活快速而短暂^[5],在血红素代谢中居重要地位,其生物合成可被其底物血红素迅速激活,以及时清除循环系统中的血红素。血红素降解过程生成的3种产物在生理条件下对保持内环境稳态具有重要作用。HO-1具有抗凋亡、抗炎、调控抗氧化功能的作用,并参与机体多种生理和病理过程^[6]。然而,目前关于HO-1的相关研究仍然处于起步阶段,特别是禽类HO-1结构与功能的研究未见报道。本研究旨在揭示鸡HO-1的结构与功能,为进一步研究鸡HO-1的生物学功能提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与试剂

1.1.1 试验动物与组织 于哈尔滨市先锋种鸡

表1 靶基因及内参基因的引物信息

Table 1 The information of primers used in the study

| 基因名称 Gene name | 引物序列(5'-3')Primer sequence | 产物长度/bp Length of product | 用途 Purpose |
|----------------|---|---------------------------|------------|
| HO-1 | F-ATGGAACTTCGCGCCACAC R-TCACATGGCAAATAAGCCCAC | 891 | CDS区克隆 |
| HO-1 | F-GTCATTGGCAAGAAGCATCCAG R-GGTGAAGAAAGCCAACCCCTT | 194 | 组织表达特性分析 |
| GAPDH | F-AGAACATCATCCCAGCGT R-AGCCTTCACTACCCTCTTG | 182 | 组织表达特性分析 |

1.2 鸡HO-1基因CDS区扩增及产物的克隆与测序

按照RNAout试剂盒提取鸡肝脏组织的总RNA,根据TransGen试剂盒进行反转录,并利用RT-PCR方法扩增目的片段,在95℃5min;94℃30s,60℃30s,72℃30s,35个循环;72℃7min;4℃终止反应。用PCR产物5μL进行凝胶电泳。用DNA回收试剂盒切胶回收目的片段,回收产物与pEASY™-T1 Simple Cloning Vector连接,转化Trans1-T1感受态,Amp⁺平板挑取阳性菌落,液体LB培养基增菌后,提取质粒并进行PCR鉴定,阳性

场购得1日龄海兰白鸡(W-36),自由采食和饮水,常规饲养。35日龄时颈静脉放血处死,采集大脑、丘脑、小脑、脑干、脊髓、垂体、坐骨神经、食道、嗉囊、腺胃、肌胃、十二指肠、回肠、盲肠、直肠、胰腺、肝、胸肌、翅肌、腿肌、心肌、胸腺、法氏囊、脾、睾丸、卵巢、动脉、静脉、肾和肺,经过RNA locker处理,然后保存于-80℃,用于组织表达特性分析。

1.1.2 主要试剂 RNAase固相清除剂、RNA locker、RNAout购自于北京天恩泽基因科技有限公司;M-MLV反转录试剂、TransTap-T DNA Polymerase、Trans1-T1感受态细胞、Peasy-T1 Cloning Kit、PCR产物胶回收试剂盒、小量质粒抽提试剂盒均购自于TransGen Biotech公司。

1.1.3 引物设计与合成 根据GenBank上鸡HO-1基因序列(HM237181.1)^[7],利用Oligo7.22软件设计克隆鸡HO-1基因CDS区的PCR引物。同时根据克隆获得的鸡HO-1基因序列和鸡GADPH基因序列(K01458),利用Oligo7.22软件设计荧光定量PCR引物,由北京六合华大基因公司合成,引物序列信息见表1。

结果送往北京六合华大基因公司测序。

1.3 脊椎动物物种间HO-1进化分析

应用DNASar软件对9个脊椎动物物种HO-1核苷酸及氨基酸序列进行同源性比对,构建HO-1基因序列的进化关系树,HO-1核苷酸及氨基酸序列信息来源于GenBank,具体信息为牛(BT020968.1)、斑马鱼(JF731041.1)、山羊(BC061954.1)、鲈鱼(EF139130.1)、人(BT019785.1)、小鼠(BC010757.1)、高原鼠兔(JX035934.1)和褐家鼠(BC091164.1)。

1.4 鸡 HO-1 蛋白结构与功能的预测

用 ExPASy-ProtParam Tool 工具对鸡 HO-1 蛋白基本理化性质进行包括氨基酸组成、元素组成、等电点、分子量等的预测,应用 ProtScale 的网络版本对鸡 HO-1 蛋白质进行疏水区域预测,应用 TM-PRED 在线软件分析鸡 HO-1 蛋白的跨膜区,应用 SignalP 在线软件进行鸡 HO-1 的信号肽分析,应用 PHD 在线软件对鸡 HO-1 的二级结构进行预测,应用 InterProScan 在线软件对鸡 HO-1 蛋白结构域进行预测,应用 RASMOL 软件对鸡 HO-1 蛋白的空间结构进行预测,应用 I-TASSER 在线软件预测鸡 HO-1 蛋白高级结构、功能及结合分子。

1.5 鸡 HO-1 基因组织表达特性分析

1.5.1 cDNA 合成 取鸡 30 个组织分别进行总 RNA 的提取,测得总 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8~2.0 既符合要求,并根据 TransGen 试剂盒进行反转录,RNA 5.0 μg,反应体系为 20 μL,得到 cDNA 产物。

1.5.2 荧光定量 PCR 反应 根据试剂盒说明,在 ABI 7500 Real Time PCR System 上进行反应。以提取的 cDNA 为模板,取 GoTaq[®] qPCR Master Mix, 2×10 μL,上下游引物(10 μmol L⁻¹)各 0.4 μL, Nuclease-Free Water 7.2 μL, qPCR 反应总体积为 20 μL。反应条件为 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。

1.5.3 灵敏度与标准曲线的绘制 用 Nuclease-Free Water 做阴性对照,用 cDNA 做标准品,5 倍逐级稀释后,进行荧光定量 PCR,得到标准曲线,重复 3 次试验,并对结果进行线性回归分析,同时得到扩增曲线、熔解曲线和 Slpoe 值,以便进行下一步分析。

1.5.4 计算方法 在测定组织中 HO-1 mRNA 的表达水平变化时,以肾脏的 Ct 值为对照进行计算。以 GAPDH 为参照进行 HO-1 mRNA 表达水平的相对定量分析。计算采用 Pfaffl 法,计算公式如下:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{GAPDH}})^{\Delta C_{\text{GAPDH}}(\text{control-sample})}}$$

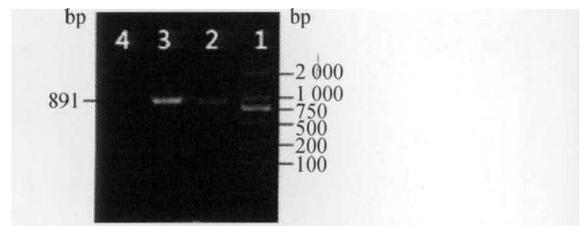
$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

2 结果

2.1 鸡 HO-1 基因 CDS 扩增及克隆测序

鸡肝组织中总 RNA 提取后,测得 OD 值在 1.8~2.0,符合要求。反转录后,进行 PCR,产物经凝胶电泳显示获得了长度为 891 bp 的片段(图 1)。

将 PCR 产物与克隆载体连接后,选取阳性重组质粒进行测序,结果表明,鸡 HO-1 基因 CDS 长度为 891 bp(图 1),经 BLAST 在线比对,与 GenBank 中 Gallus HO-1 基因同源性为 99.33%,与预期结果一致。利用 Gen Runner 软件分析显示,鸡 HO-1 由 296 个氨基酸组成,BLAST 在线比对结果显示与 GenBank 中 Gallus HO-1 氨基酸序列相差 5 个氨基酸(图 2)。



1. DNA 相对分子质量标准 DL2000; 2. 肝; 3. 重组质粒; 4. 双蒸水空白对照
1. DNA Marker DL2000; 2. Liver; 3. Recombinant plasmid; 4. Double distilled water blank control

图 1 鸡肝组织和重组质粒 PCR 结果

Fig. 1 The RT-PCR results of the chicken liver tissue and the recombinant plasmid

2.2 脊椎动物物种间 HO-1 的进化分析

利用 DNASTar 软件,对鸡与斑马鱼、鲈鱼、小鼠、褐家鼠、牛、羊、人、高原鼠兔的 HO-1 核苷酸及氨基酸序列进行对比,结果如图 3 所示,核苷酸序列,鸡与斑马鱼的同源性为 35.7%,与鲈鱼、小鼠、褐家鼠、牛、羊、人和高原鼠兔的同源性分别为 8.3%、8.7%、8.7%、5.9%、6.6%、8.0% 和 9.3%;氨基酸序列,鸡与牛的同源性为 29.4%,与羊、斑马鱼、鲈鱼、人、小鼠、高原鼠兔和褐家鼠的同源性分别为 25.3%、27.2%、26.1%、25.8%、25.3%、24.4% 和 25.7%。

2.3 鸡 HO-1 蛋白结构与功能的预测结果

利用在线软件分析可知,鸡 HO-1 蛋白由 296 个氨基酸组成,分子质量为 33.451 2 ku,分子式为 C₁₄₉₆H₂₃₅₉N₄₀₉O₄₄₁S₁₀,原子总数为 4 715,理论等电点为 8.71。蛋白 C 端亲水性较强,而 N 端疏水性较强,而该蛋白在 16、20、49~64、78~83、121、132~137、145~146、150、153~154、156~157、164~174、210~221、223、269、271~296 等位点具有疏水性;HO-1 的跨膜序列为 278~296 位氨基酸,序列为 LVRWLLALGFIATT,该蛋白为跨膜蛋白;鸡 HO-1 蛋白中不存在信号肽,为非分泌蛋白;HO-1 包括 α 螺旋 163 个,百分比为 55.07%,β 折叠 11

| | |
|---|-----|
| ATG GAA ACT TCG CAG CCA CAC AAC GCT GAA AGC ATG TCC CAG GAC | |
| M E T S Q P H N A E S M S Q D | 15 |
| CTG TCG GAG CTC CTG AAG GAA GCC ACC AAG GAG GTG CAC GAG CAG | |
| L S E L L K E A T K E V H E Q | 30 |
| GCG GAG AAC ACA CCC TTC ATG AAG AAC TTC CAG AAG GGA CAG GTG | |
| A E N T P F M K N F Q K G Q V | 45 |
| TCC CTC CAC GAG TTC AAG CTG GTC ACG GCG TCC CTG TAC TTC ATC | |
| S L H E F K L V T A S L Y F I | 60 |
| TAC TCT GCT CTG GAG GAA GAG ATC GAA CGT AAC AAG GAC AAC CCT | |
| Y S A L E E E I E R N K D N P | 75 |
| GTC TAT GCT CCT GTT TAT TTT CCG ATG GAG CTG CAC CGG AAA GCT | |
| V Y A P V Y F P M E L H R K A | 90 |
| GCC CTG GAG AAA GAC TTG GAG TAC TTC TAT GGC AGC AAC TGG AGG | |
| A L E K D L E Y F Y G S N Y R | 105 |
| GCA GAG ATC CCA TGT CCT GAG GCT ACT CAG AAA TAC GTT GAG AGG | |
| A E I P C P E A T Q K Y V E R | 120 |
| CTC CAC GGC GTT GGC AAG AAG CAT CCA GAG CTG TTG GTG GCC CAT | |
| L H A V G K K H P E L L V A H | 135 |
| GCC TAC ACC CGC TAT TTG GGA GAC CTG TCT GGG GGG CAG GTG CTG | |
| A Y T R Y L G D L S G G Q V L | 150 |
| AAG AAA ATC GCC CAA AAG GCC CTC CAG CTG CCC AGC ACT GGA GAA | |
| K K I A Q K A L Q L P S T G E | 165 |
| GGG TTG GCT TTC TTC ACC TTC GAT GGA GTC TCC AAC GCC ACC AAG | |
| G L A F F T F D G V S N A T K | 180 |
| TTC AAA CAG CTC TAT CGG TCC CGA ATG AAT GCC CTT GAG ATG GAT | |
| F K Q L Y R S R M N A L E M D | 195 |
| CAT GCT ACT AAG AAA AGA GTC TTG GAG GAA GCC AAG AAA GCA TTC | |
| H A T K K R V L E E A K K A F | 210 |
| CTG CTA AAT ATA CAG GTA TTT GAG GCG CTG CAG AAG CTG GTG TCC | |
| L L N I Q V F E A L Q K L V S | 225 |
| AAG AGC CAG GAG AAC GGT CAT GCT GTA CAG CCA AAG GCA GAG CTT | |
| K S Q E N G H A V Q P K A E L | 240 |
| CGC ACA AGG AGT GTT AAC AAA TCG CAT GAA AAC GGT CCA GCA GCT | |
| R T R S V N K S H E N G P A A | 255 |
| GGG AAG GAG AGT GAG AGG ACG AGC AGG ATG CAG GCA GAC ATG CTG | |
| G K E S E R T S R M Q A D M L | 270 |
| ACC ACC TCT CCC CTG GTG CGG TGG CTC CTG GCG CTC GGC TTC ATC | |
| T T S P L V R W L L A L G F I | 285 |
| GCC ACC ACA GTC GCC GTG GGC TTA TTT GCC ATG TGA | |
| A T T V A V G L F A M END | 296 |

图 2 鸡 HO-1 基因 CDS 及氨基酸序列

Fig. 2 The CDS sequence and amino acid sequence of chicken HO-1

个,百分比为 3.72%,不规则卷曲 122 个,百分比为 41.22%,蛋白的空间结构如图 4-I 所示。

2.4 鸡 HO-1 功能的预测结果

HO-1 蛋白含有 HO 家族的结构域,在 132~142 位氨基酸,酶分类号为 EC1.14.99.3。蛋白活性中心位于 28、61、138-139、142~143 及 146~147 位氨基酸(图 4-II)。该蛋白能够结合 HEM、BLA、OXN、Q80、SUC、TRE 和 Na⁺ 等多种分子,其中

SUC 和 TRE 为甘露糖和海藻糖,Na⁺ 为无机盐离子,结合形式如图 4-III 所示。

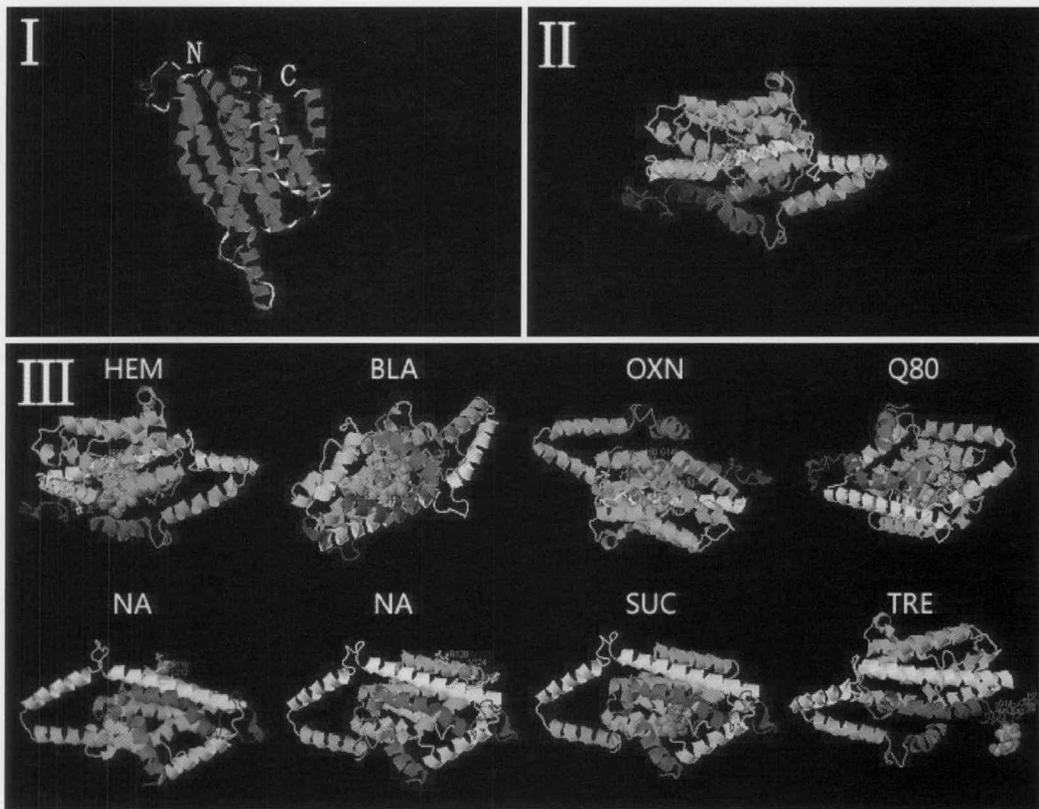
2.5 鸡 HO-1 mRNA 组织表达特性

荧光定量 PCR 检测结果表明,鸡 HO-1 在组织中广泛表达,且存在组织间表达差异(图 5)。在动脉、脑干、大脑、坐骨神经、十二指肠及小肠中基因表达量显著高于其他组织($P < 0.01$),而在肺、静脉、卵巢小脑及胸肌中表达量较低。组织表达谱为动

| | | 氨基酸同源性/% Amino acid identity | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|---|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|-----------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | |
| 核苷酸同源性/% Nucleotide identity | 1 | | 5.9 | 6.6 | 35.7 | 8.3 | 8.0 | 8.7 | 9.3 | 8.7 | 1 | <i>Gallus gallus</i> |
| | 2 | 29.4 | | 8.0 | 5.5 | 6.1 | 8.0 | 15.9 | 9.7 | 15.9 | 2 | <i>Bos taurus</i> |
| | 3 | 25.3 | 24.3 | | 7.4 | 7.6 | 84.7 | 74.7 | 76.7 | 71.9 | 3 | <i>Capra hircus</i> |
| | 4 | 27.2 | 25.6 | 25.6 | | 8.1 | 7.7 | 7.0 | 8.5 | 7.0 | 4 | <i>Danio rerio</i> |
| | 5 | 26.1 | 24.8 | 22.4 | 29.9 | | 6.5 | 7.2 | 7.9 | 6.5 | 5 | <i>Dicentrarchus labrax</i> |
| | 6 | 25.8 | 23.3 | 85.7 | 26.6 | 24.3 | | 75.3 | 78.1 | 72.9 | 6 | <i>Homo sapiens</i> |
| | 7 | 25.3 | 25.3 | 24.5 | 25.1 | 26.9 | 25.5 | | 74.0 | 93.4 | 7 | <i>Mus musculus</i> |
| | 8 | 24.4 | 29.1 | 25.6 | 25.2 | 25.0 | 24.5 | 68.2 | | 71.6 | 8 | <i>Ochotona curzoniae</i> |
| | 9 | 25.7 | 26.4 | 23.3 | 24.6 | 28.9 | 24.6 | 30.2 | 25.0 | | 9 | <i>Rattus norvegicus</i> |
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | |

图 3 9 种动物 HO-1 核苷酸与氨基酸序列的同源性比对结果

Fig. 3 Homology of nucleotide sequences and deduced amino acid sequences among HO-1 from nine species

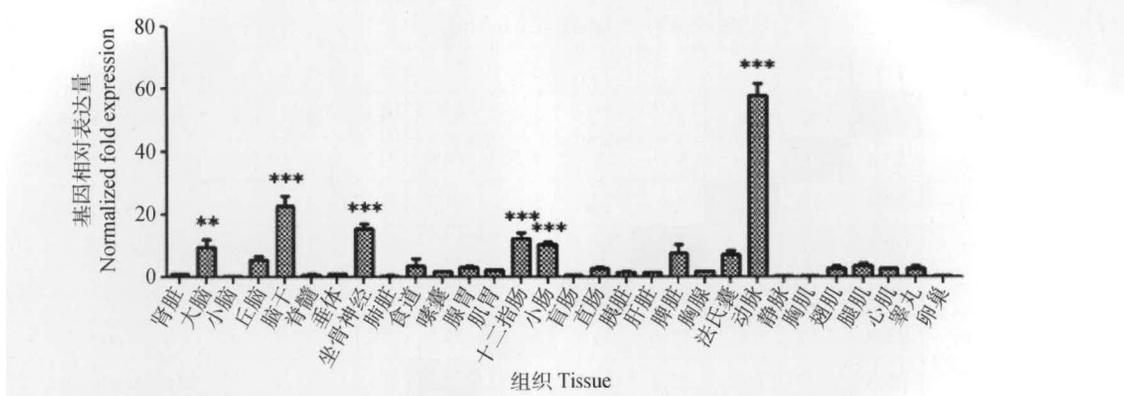


I. 蛋白空间结构; II. 蛋白的活性中心; III. 蛋白结合分子的预测结果,其中 HEM、BLA、OXN、Q80 为血红素催化分解中间产物,NA 为 Na⁺,SUC 和 TRE 为 2 个糖类分子

I. The space structure of HO-1; II. The active center of HO-1; III. Prediction results of protein binding molecules, and HEM, BLA, OXN, Q80 as the heme catalysis decomposition products, NA for the Na⁺ ion, SUC and TRE are two carbohydrate molecules

图 4 鸡 HO-1 蛋白空间结构、活性中心和结合分子预测图

Fig. 4 Prediction maps of space structure, active center and combining with molecular of chicken HO-1 protein



柱状图中上标 * * 表示组织 HO-1 表达量之间存在极显著差异 ($P < 0.01$), * * * 表示组织 HO-1 表达量之间存在极显著差异 ($P < 0.001$)

Standard deviation is denoted with lower case letters above each bar. * * is significantly different ($P < 0.01$) among the relative mRNA expression levels of HO-1 in chicken different tissues, * * * is significantly different ($P < 0.001$)

图 5 鸡 HO-1 mRNA 组织表达特性结果

Fig. 5 The distribution of HO-1 mRNA in chicken tissue

脉>脑干>坐骨神经>十二指肠>小肠>大脑>脾>法氏囊>丘脑>食道>腿肌>腺胃>直肠>翅肌>睾丸>心肌>肌胃>胸腺>嗉囊>胰>肝>垂体>肾>脊髓>盲肠>肺>静脉>卵巢>小脑>胸肌。

3 讨论

HO-1 蛋白是一种公认的应激反应蛋白,在多种组织和器官中参与着生化和生理的氧化应激反应^[8]。HO-1 通过抗氧化、抗凋亡和抗炎作用减缓细胞损伤,因此该蛋白在各种病理状态(如缺氧性肺疾病和血管损伤等)中广泛存在^[9-14]。

人 HO-1 cDNA 长约 1.5 kb,编码 1 个由 288 个氨基酸残基组成的蛋白^[15-16],大鼠 HO-1 cDNA 长约 1.5 kb,编码 1 个由 285 个氨基酸残基组成的蛋白^[17],小鼠的 HO-1 编码 1 个由 289 个氨基酸残基组成的蛋白^[18]。本研究显示,鸡 HO-1 蛋白由 296 个氨基酸组成,分子质量约为 33 ku,具有 15 个亲水区,属于跨膜非分泌蛋白,由此可推断,HO-1 可能存在膜结合形式,并作为某种机制的载体通道。本研究显示,HO-1 基因的保守性很高^[19-20],通过不同脊椎动物物种间 HO-1 基因的同源性对比,发现禽类与其他物种间的同源性较低,表明 HO-1 在不同物种间的保守性不高。

HO-1 蛋白可被底物血红素快速而准确的激活,生成胆绿素、重金属 Fe^{2+} 和 CO 3 种机体重要的调节产物。胆绿素是鸟类蓝壳蛋的主要色素,因此,HO-1 在鸟类蓝色蛋壳形成过程中发挥着重要作用^[7,21]。本研究结果显示,鸡 HO-1 能够与 HEM、

BLA、OXN、TIL、Q80、SUC、TRE 和 Na 分子相结合,由此表明鸡 HO-1 功能的多样性和重要性。SUC 和 TRE 为糖类,Na 为盐类,该蛋白可以结合无机盐和糖类等机体最基本最重要的物质,表明鸡 HO-1 可能参与钠离子的运输和调控,或者参与钠离子平衡稳态的调节以调节机体内稳态;而与糖类的结合,可能是 HO-1 与碳水化合物之间存在着某种联系,或者作为载体,或者作为通道,或者作为某种机制的催化酶。BLA 和 HEM 是 HO-1 催化血红素时的中间代谢产物,在 HO-1 发挥催化作用时,是必不可少的物质。鸡 HO-1 功能具有多样性,并且涉猎广泛,但具体机制有待后续进一步研究。

在哺乳动物中,HO-1 主要分布于肝脏和脾脏,参与肝、脾组织细胞的抗损伤和抗凋亡作用。本研究结果显示,HO-1 基因在鸡动脉组织中表达量最高,其次是在神经系统和消化系统中,表明 HO-1 mRNA 表达量不同物种间存在较大差异性,而鸡 HO-1 在神经系统和消化系统中是否具有重要的生物学功能,具体发挥作用的机制有待进一步的研究。

4 结论

本研究成功克隆了鸡 HO-1 基因的 CDS 区,分析表明其种属间保守性不高。鸡 HO-1 为跨膜非分泌蛋白,含 HO 家族结构域,酶分类为 EC1.14.99.3,属于血红素加氧酶家族成员,可与 SUC、TRE、Na、HEM、BLA、OXN、Q80 等分子结合,推测该蛋白具有调控糖类和盐类等相关分子功能作用。鸡 HO-1 在组织中广泛表达,在动脉、脑

干、大脑、坐骨神经、十二指肠及小肠等表达量较高,表明其在循环系统、神经系统和消化系统中具有重要的生物学功能。

参考文献:

- [1] LIU Y, MOËNNE-LOCCOZ P, LOEHR T M, et al. Heme oxygenase-1, intermediates in verdoheme formation and the requirement for reduction equivalents [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(11): 6909-6917.
- [2] MATERA K M, TAKAHASHI S, FUJII H, et al. Oxygen and one reducing equivalent are both required for the conversion of alpha-hydroxyhemin to verdoheme in heme oxygenase [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(12): 6618-6624.
- [3] EWING J F, MAINES M D. In situ hybridization and immunohistochemical localization of heme oxygenase-2 mRNA and protein in normal rat brain: Differential distribution of isozyme 1 and 2 [J]. *Mol Cell Neurosci*, 1992, 3(6): 559-570.
- [4] TURNER C P, BERGERON M, MATZ P, et al. Heme oxygenase-1 is induced in glia throughout brain by subarachnoid hemoglobin [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998, 18(3): 257-273.
- [5] MATZ P G, WEINSTEIN P R, SHARP F R. Heme oxygenase-1 and heat shock protein 70 induction in glia and neurons throughout rat brain after experimental intracerebral hemorrhage [J]. *Neurosurgery*, 1997, 40(1): 152-160.
- [6] GOZZELINO R, JENEY V, SOARES M P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1 [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2010, 50: 323-354.
- [7] WANG Z P, LIU R F, WANG A R, et al. Expression and activity analysis reveal that heme oxygenase (decycling) 1 is associated with blue egg formation [J]. *Poult Sci*, 2011, 90(4): 836-841.
- [8] CUI W, FU G, WU H, et al. Cadmium-induced heme oxygenase-1 gene expression is associated with the depletion of glutathione in the roots of *Medicago sativa* [J]. *Biometals*, 2011, 24(1): 93-103.
- [9] YET S F, TIAN R, LAYNE M D, et al. Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice [J]. *Circ Res*, 2001, 89(2): 168-173.
- [10] HAMID T, GU Y, ORTINES R V, et al. Divergent tumor necrosis factor receptor-related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor-kappaB and inflammatory activation [J]. *Circulation*, 2009, 119(10): 1386-1397.
- [11] LUO J, HILL BG, GU Y, et al. Mechanisms of acrolein-induced myocardial dysfunction: implications for environmental and endogenous aldehyde exposure [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(6): H3673-3684.
- [12] LI Q, GUO Y, TAN W, et al. Cardioprotection afforded by inducible nitric oxide synthase gene therapy is mediated by cyclooxygenase-2 via a nuclear factor-kappaB dependent pathway [J]. *Circulation*, 2007, 116(14): 1577-1584.
- [13] SRIVASTAVA S, CHANDRASEKAR B, GU Y, et al. Downregulation of CuZn-superoxide dismutase contributes to beta-adrenergic receptor-mediated oxidative stress in the heart [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 74(3): 445-455.
- [14] SRIVASTAVA S, VLADYKOVSKAYA E, BARSKI O A, et al. Aldose reductase protects against early atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-null mice [J]. *Circ Res*, 2009, 105(8): 793-802.
- [15] KEYSE S M, TYRRELL R M. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(1): 99-103.
- [16] YOSHIDA T, BIRO P, COHEN T, et al. Human heme oxygenase cDNA and induction of its mRNA by hemin [J]. *Eur J Biochem*, 1988, 171(3): 457-461.
- [17] SHIBAHARA S, MÜLLER R, TAGUCHI H, et al. Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(23): 7865-7869.
- [18] KAGEYAMA H, HIWASA T, TOKUNAGA K, et al. Isolation and characterization of a complementary DNA clone for a Mr 32,000 protein which is induced with tumor promoters in BALB/c 3T3 cells [J]. *Cancer Res*, 1988, 48(17): 4795-4798.
- [19] MAINES M D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997, 37: 517-554.
- [20] ELBIRT K K, BONKOVSKY H L. Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role [J]. *Proc Assoc Am Physicians*, 1999, 111(5): 438-447.
- [21] WANG Z, LIU R, WANG A. Comparison of HMOX1 expression and enzyme activity in blue-shelled chickens and brown-shelled chickens [J]. *Genet Mol Biol*, 2013, 36(2): 282-286.

(编辑 郭云雁)