

张久盘, 宋雅萍, 姜超, 等. 牛 *LATS2* 基因启动子克隆及转录调控分析[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(3): 753-761.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2023.03.016

## 牛 *LATS2* 基因启动子克隆及转录调控分析

张久盘<sup>1</sup>, 宋雅萍<sup>2</sup>, 姜超<sup>2</sup>, 王锦<sup>1</sup>, 魏大为<sup>2</sup>

(1. 宁夏农林科学院动物科学研究所, 宁夏 银川 750002; 2. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021)

**摘要:** 本研究旨在探究牛 *LATS2* 基因组织表达规律, 利用相对荧光素酶活性数值确定其启动子核心区域并初步鉴定其核心区域关键转录因子, 以阐明牛 *LATS2* 基因的转录调控机制。利用 RT-qPCR 检测牛 *LATS2* 基因在心、脾、肝、肾、肺、背最长肌、皮下脂肪、皱胃、大肠及睾丸等中的相对表达量, 构建 *LATS2* 蛋白进化树。克隆 *LATS2* 基因 5' 端非翻译区上游 1.7 kb 序列, 利用逐段缺失引物, 巢式扩增其 7 个启动子区不同截断体缺失片段 (-1 792~+179、-1 475~+179、-1 098~+179、-727~+179、-515~+179、-248~+179 和 -56~+179), 并将不同截断体构建至双荧光素酶报告载体 pGL3-Basic 上。重组的 *LATS2* 基因启动子双荧光素酶载体分别转染小鼠成肌细胞 (C2C12) 和小鼠脂肪细胞 (3T3-L1) 细胞系, 鉴定其启动子核心区域。进一步借助在线软件 JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) 和 Genomatix (<http://www.genomatix.de/cgi-bin//mat-inspector>) 分析启动子核心区域序列特征, 并预测关键转录因子结合位点。结果显示, *LATS2* 基因在肝和背最长肌中表达量极显著高于脾 ( $P < 0.01$ ); *LATS2* 蛋白构建的进化树显示反刍动物单独聚为 1 支, 表明 *LATS2* 基因在反刍动物进化过程中保守性较高; 蛋白质互作分析筛选出的与 *LATS2* 蛋白互作紧密的前 10 种蛋白质均为 Hippo 信号通路中的关键蛋白质。*LATS2* 基因启动子核心区域位于 -248~-56, 预测其启动子核心区域有与肌肉发育相关的转录因子 TEAD1、MEF2A、FOSL1、MyoG 和 Myod1 的结合位点, 表明 *LATS2* 基因在牛肌肉生长发育中扮演重要角色。以上结果为探究牛 *LATS2* 基因在肌肉生长发育中转录调控机制奠定基础。

**关键词:** 牛; *LATS2* 基因; 组织表达; 启动子; 转录调控

中图分类号: S823.8<sup>+</sup>1 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2023)03-0753-09

## Promoter cloning and transcriptional regulation of bovine *LATS2* gene

ZHANG Jiu-pan<sup>1</sup>, SONG Ya-ping<sup>2</sup>, JIANG Chao<sup>2</sup>, WANG Jin<sup>1</sup>, WEI Da-wei<sup>2</sup>

(1. Institute of Animal Science, Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, China; 2. School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** The purpose of this study was to explore the tissue expression of bovine *LATS2* gene, and identify its core promoter region and key transcription factors, so as to clarify the transcriptional regulation mechanism of bovine *LATS2* gene. The relative expression levels of bovine *LATS2* were detected in heart, spleen, liver, kidney, lung, longissimus dorsi muscle, subcutaneous fat, abomasum, large intestine and testis by RT-qPCR, and the evolutionary tree of *LATS2* protein was constructed. The 1.7 kb sequence upstream of the 5'-untranslated region of *LATS2* gene was cloned, and the promoter

sequence regions of seven segments with -1 792~+179, -1 475~+179, -1 098~+179, -727~+179, -515~+179, -248~+179 and -56~+179 missing segments were amplified, and the dual-luciferase reporter vector pGL3-Basic was constructed respectively. The recombinant *LATS2* gene promoter vectors were transfected into C2C12 and 3T3-L1 cell lines, respectively, and the core promoter regions were identified. With the help of online software

收稿日期: 2022-06-15

基金项目: 宁夏自然科学基金项目 (2021AAC05007); 宁夏重点研发计划项目 (2020BEB04011); 宁夏青年科技人才托举工程项目 (TJGC2019076)

作者简介: 张久盘 (1985-), 女, 河南商丘人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为动物遗传育种。(E-mail) zhangjiupan@163.com

通讯作者: 魏大为, (E-mail) weidaweiwdw@163.com

Genomatix and JASPAR, the sequence characteristics of core promoter were analyzed to predict the binding sites of key transcription factors. The results showed that the expression of bovine *LATS2* gene in liver and longissimus dorsi muscle was significantly higher than that in spleen ( $P < 0.01$ ). Ruminants were clustered into one branch in the evolutionary tree constructed according to *LATS2* protein, which indicated that *LATS2* gene was highly conserved in the evolutionary process of ruminants. The top ten proteins closely interacting with *LATS2* protein screened by protein interaction analysis were the key proteins in Hippo signaling pathway. The core region of the *LATS2* gene promoter was located at -248--56. It was predicted that the core promoter region of bovine *LATS2* gene had binding sites of transcription factors TEAD1, MEF2A, FOSL1, MyoG and Myod1 related to muscle development. It showed that *LATS2* gene played an important role in the growth and development of bovine muscle. The above results lay a foundation for exploring the transcriptional regulation mechanism of bovine *LATS2* gene in muscle growth and development.

**Key words:** cattle; *LATS2* gene; tissue expression; promoter; transcriptional regulation

骨骼肌是动物躯体最重要的组成部分,其生长发育直接影响甚至决定家畜的产肉量,骨骼肌的生物学特性是衡量家畜潜在经济性能的标准<sup>[1]</sup>,另外,骨骼肌是动物体动作和能量代谢的主要参与者,在机体的代谢平衡维持中起十分重要的作用<sup>[2]</sup>。骨骼肌发生发育过程极其复杂精细,从静息肌卫星细胞的激活、成肌细胞的增殖分化,到肌纤维形成的终末阶段<sup>[3-4]</sup>,全过程除了受遗传、环境及营养水平调控外,更多取决于基因的控制<sup>[5]</sup>,且细胞信号分子、转录因子、非编码 RNA 等诸多调节因子精准地参与其中复杂的网络调控<sup>[6-11]</sup>。目前,为促进骨骼肌的生长发育以改善肉质从而实现肉牛的遗传改良,基因的功能鉴定和筛选已成为一种热门且有效的手段。

哺乳动物中调节细胞生长的 Hippo 信号通路十分保守,通过关键因子 *Salvador1* (*Sav1*)、*MST1*/*MST2*、*Yap* 等相关基因及大肿瘤抑制基因 1/2 (*LATS1*/*LATS2*) 调控细胞的增殖、分化、凋亡以及干细胞的自我更新,从而实现对器官体积大小的控制<sup>[12-13]</sup>。*LATS2* 基因作为 Hippo 信号通路的核心成员之一,与通路中的其他关键因子共同调控动物体器官的生长发育,主要表现在影响心脏肌肉的发育<sup>[14-15]</sup>。目前,关于 *LATS2* 基因功能研究主要集中在其参与肿瘤细胞发生及调控细胞增殖的机理方面<sup>[16-18]</sup>,但 *LATS2* 基因对动物体骨骼肌生长发育中的调控有重要作用且研究较少。王利宏等<sup>[19]</sup>、鲍建军等<sup>[20]</sup>发现 *LATS2* 基因多态性与湖羊肌肉生长发育有显著关联,同时还发现 *YAP1* 基因在正常表型羊和双肌臀羊中的表达存在差异,且 *LATS1*/*LATS2* 基因可与 *YAP1* 基因互作抑制肌肉生长发育<sup>[21]</sup>。

此外,我们前期研究发现 *LATS1* 基因在牛背最长肌等多个组织中高表达,且其核心启动区结合了

肌肉生长发育相关的 Myod1 和 MEF2A 转录因子并调控其转录活性,初步阐明了 *LATS1* 基因参与牛的肌肉生长发育转录调控机制<sup>[22]</sup>。*LATS2* 基因与 *LATS1* 基因同属 *LATS* 基因家族,其分子序列及结构相似,因此我们推测 *LATS2* 在牛肌肉生长发育中扮演重要角色,但其转录机制不清。鉴于此,本研究拟构建 *LATS2* 基因在牛不同肌肉组织或器官中的表达谱,克隆并鉴定其启动子核心区域,预测 *LATS2* 基因启动子核心区域的关键转录因子,以期探究牛 *LATS2* 基因在肌肉生长发育过程中的转录调控机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验样品

采集 3 头 20 月龄秦川牛公牛的肝(右叶)、背最长肌、睾丸、肺(中叶)、肾(皮质)、皮下脂肪、心(心房)、皱胃(胃壁)、大肠(盲肠段)、脾(实质)和颈部静脉血样,迅速置于液氮带回实验室备用。

### 1.2 主要试剂

pMD-19T (Simple) 载体、PrimeSTAR<sup>®</sup> GXL Premix、基因组 DNA 提取试剂盒、DH5 $\alpha$  感受态细胞、DNA 凝胶回收试剂盒、限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶、RNA 提取试剂盒、反转录及荧光定量试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司;去内毒质粒提取试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司;Dual-Luciferase 双荧光素酶报告系统购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;DMEM 培养基、磷酸缓冲盐溶液(PBS)、OPTI-MEM、Lipofectamine 3000 Reagent 脂质体转染试剂盒及胎牛血清(FBS)购自赛默飞世尔科技公司;双荧光检测试剂盒购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;pGL3-Basic 及 pRL-

TK 载体、小鼠成肌细胞 (C2C12) 和小鼠脂肪细胞 (3T3-L1) 为本实验室保存。

### 1.3 RT-qPCR 检测

首先提取不同组织或器官总 RNA, 并按照反转录试剂盒说明书将各个 RNA 进行反转录, 检测 cDNA 质量。利用 Primer 5.0 软件设计 RT-qPCR 引物, 以 *GAPDH* 作为内参基因 (引物见表 1), 使用 7500 Fast Real Time 仪器 (美国应用生物系统公司产品) 进行定量 PCR。反应总体系为 20.0  $\mu$ l, 其中上/下游引物各 0.8  $\mu$ l (引物浓度为 10  $\mu$ mol/L)、cDNA 模板 2.0  $\mu$ l (模板质量浓度为 50 ng/ $\mu$ l)、Primix *Ex Taq* II 10.0  $\mu$ l、ROX Reference Dye II 0.4  $\mu$ l, 剩余用 ddH<sub>2</sub>O 补齐。RT-qPCR 反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 34 s, 循环 40 次, 生物学重复 3 次, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法处理分析相对表达量数据<sup>[23]</sup>, 数据采用 SPSS 20.0 软件进行单因素差异性分析。

### 1.4 生物信息学分析

结合 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 及 UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>) 网站参考牛基因组信息, 确定 *LATS2* 基因启动子区域。利用 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 和 MEGA 5.0 (<https://www.megasoftware.net/index.php>) 构建出 *LATS2* 蛋白进化树, 使用 ExcertSy ProtParm (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线程序进行蛋

白质序列分析, 使用 String (<http://string-db.org/>) 预测与 *LATS2* 蛋白互作的蛋白质。

### 1.5 启动子克隆及逐段缺失片段扩增

根据牛 *LATS2* 基因启动子序列信息, 设计其启动子全长扩增引物 *LATS2*-PF/PR (表 1), 引物长度为 1 972 bp, 包括 -1 792 ~ +179 序列。以基因组 DNA 为模板, 参考 PrimeSTAR<sup>®</sup> GXL Premix 操作手册进行 PCR, 总体系 20.0  $\mu$ l, 其中, 4.0  $\mu$ l dNTP Mixture, 10.0  $\mu$ l 2 $\times$ PrimeSTAR GXL Buffer, 上/下游引物各 0.8  $\mu$ l (浓度为 10  $\mu$ mol/L), 1.0  $\mu$ l PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶, 底物 1.0  $\mu$ l (质量浓度为 50 ng/ $\mu$ l), 2.4  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O。PCR 扩增程序使用 3 步法: 98  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 20 s, 68  $^{\circ}$ C 15 s, 循环 35 次。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 预期片段纯化回收后与 pMD-19T (Simple) 载体连接, 转化后筛选阳性克隆进行测序鉴定。

根据测序结果, 设计 5' 端逐段缺失片段的上游引物 (F1~F7) 和 1 条固定的下游引物 (R), 在引物 5' 端添加 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切位点 (表 1), 以 *LATS2* 基因 -1 792 ~ +179 序列为模板进行缺失片段的 PCR 扩增反应 (扩增体系、程序同上), 将扩增片段分别连接 pMD-19T (Simple) 载体进行测序鉴定。得到的逐段缺失片段分别命名为: *LATS2*-P1、*LATS2*-P2、*LATS2*-P3、*LATS2*-P4、*LATS2*-P5、*LATS2*-P6 和 *LATS2*-P7。

表 1 引物信息

Table 1 Primers used in these experiments

项目	引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度 (°C)	扩增片段长度 (bp)	扩增区域	收录号
荧光定量 PCR	<i>GAPDH</i> -F	CCAACGTGTCTGTTGTGGAT	60.0	80	320~521	NM_001034034.2
	<i>GAPDH</i> -R	CTGCTTCACCACTTCTTGA				
启动子区域克隆	<i>LATS2</i> -F	AGGACGGCAGTGAGGACAGC	60.0	131	3 213~3 344	XM_025000092.1
	<i>LATS2</i> -R	GCATCGGAACGGGTGACCATTG				
	<i>LATS2</i> -PF	AGACCCAGAGCAACCAATAAT	65.5	1 972	-1 792~+179	NC_037336.1
	<i>LATS2</i> -PR	GCACAGAAATCCCAACTAACT				
	<i>LATS2</i> -F1	GGGGTACCCGACTGAGCGACTGAAG	61.0	1 972	-1 792~+179	NC_037336.1
	<i>LATS2</i> -F2	GGGGTACCTAAGTGGATCGCCAGTGTGC	60.5	1 655	-1 475~+179	NC_037336.1
	<i>LATS2</i> -F3	GGGGTACCCTTCCCCTAAGAACGAACACCC	61.5	1 278	-1 098~+179	NC_037336.1
	<i>LATS2</i> -F4	GGGGTACCAGACAGAAATGTCAATCTTGGAT	64.0	907	-727~+179	NC_037336.1
	<i>LATS2</i> -F5	GGGGTACCGGGAGTGCTTGATACTGAGAA	62.5	695	-515~+179	NC_037336.1
	<i>LATS2</i> -F6	GGGGTACCTCACTACTCCCCACAGAGAAC	60.0	428	-248~+179	NC_037336.1
	<i>LATS2</i> -F7	GGGGTACCACATTGCACAGCGGCTCGG	59.5	236	-56~+179	NC_037336.1
	<i>LATS2</i> -R	CCGCTCGAGGCACAGAAATCCCAACTAACT				NC_037336.1

F 为上游引物, R 为下游引物, 斜体碱基表示 *Kpn* I (GGGGTACC) 和 *Xho* I (CCGCTCGAG) 酶切位点。

## 1.6 双荧光素报告载体构建

使用内切酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 将 *LATS2*-P1 ~ *LATS2*-P7 片段和 pGL3-Basic 载体在 37 °C 条件下酶切 1 h, 酶切完成后进行目的片段纯化回收。进一步将 *LATS2*-P1 ~ *LATS2*-P7 片段分别和 pGL3-Basic 载体用 T4 DNA 连接酶(16 °C 条件下)连接 1 h。将产物转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞培养后筛选阳性克隆并鉴定, 进一步使用去内毒质粒提取试剂盒提取质粒, 备用。

## 1.7 细胞培养、转染及测定酶活性

复苏 C2C12 和 3T3-L1, 培养基为 10% 胎牛血清(FBS)+90% DMEM 培养基, 待其生长状态良好且密度达到 70%~80% 后进行传代培养。传代生长后选择形态良好的细胞进行 24 孔板铺板, 按照 Lipofectamine 3000 Reagent 脂质体转染试剂盒说明书, 分别将构建好的双荧光素报告载体 *LATS2*-pGL3-P1 ~ *LATS2*-pGL3-P7 800 ng 重组质粒和 20 ng 内参质粒 pRL-TK 共转染至 C2C12 和 3T3-L1, 进行 3 次重复, 阴性对照为 pGL3-Basic 质粒。在转染 48 h 后进行细胞收集, 利用双荧光检测试剂盒进行荧光素酶和海肾荧光素酶活性测定, 计算二者的比值, 确定 *LATS2* 基因的启动子核心区域。

## 1.8 关键转录因子预测

通过 JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) 和 Genomatix (<http://www.genomatix.de/cgi-bin/mat-inspector>) 在线软件分析启动子核心区域序列, 预测阈值设置为 90% 以上, 选取 2 个网站预测结果的部分, 筛选 *LATS2* 基因的启动子核心区域关键的转录因子结合位点。

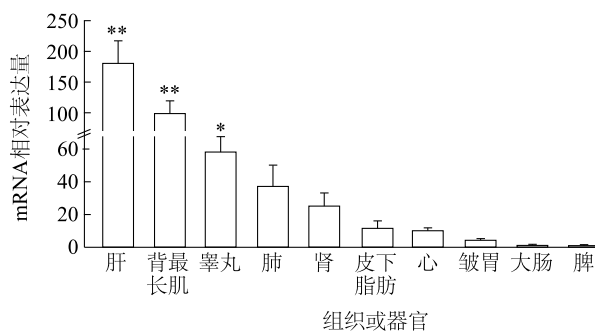
## 1.9 数据分析

数据结果以平均值 $\pm$ 标准差表示, 数据显著性检验使用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析( $P < 0.01$  为差异极显著;  $P < 0.05$  为差异显著)。

# 2 结果与分析

## 2.1 *LATS2* 基因组织表达规律

RT-qPCR 结果(图 1)显示, *LATS2* 基因在肝、背最长肌、睾丸、肺、肾、皮下脂肪、心、皱胃、大肠和脾中均检测出表达信号, 以脾中的表达量作为对照, 该基因在肝和背最长肌中的表达极显著地高于脾( $P < 0.01$ ), 其次在睾丸中高表达( $P < 0.05$ ), 在肺、肾、皮下脂肪、心、皱胃、大肠和脾中表达量较低。



\* 表示差异显著( $P < 0.05$ ); \*\* 表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

图 1 *LATS2* 基因在牛不同组织或器官中的 mRNA 相对表达量

Fig.1 The relative expression of *LATS2* gene in different tissues or organs of cattle

## 2.2 牛 *LATS2* 基因的结构特征及进化树构建

*LATS2* 基因位于第 12 号染色体, 全长 51 096 bp, 包括 9 个外显子和 8 个内含子, 共转录 3 048 bp 的 mRNA 序列, 可编码 1 015 个氨基酸(图 2), *LATS2* 蛋白分子式为  $C_{4\ 882}H_{7\ 628}N_{1\ 418}O_{1\ 425}S_{35}$ , 其相对分子质量为 110 110, 等电点( $pI$ )为 8.84。

以 *LATS2* 蛋白序列为对象, 利用 MEGA 5.0 软件构建牛、绵羊、山羊、马、猪、小鼠等物种的系统进化树(图 3)。构建出的系统进化树表明 *LATS2* 蛋白在牛、绵羊、山羊、马、猪、小鼠等物种中进化较为保守, 反刍动物在进化过程中单独聚为 1 支, 上述结果表明 *LATS2* 具有重要功能且在反刍动物进化过程中极度保守。

## 2.3 牛 *LATS2* 蛋白互作分析

使用 String (<http://string-db.org/>) 预测与 *LATS2* 蛋白互作的蛋白质, 得到图 4 所示的蛋白质互作网络。网络中与 *LATS2* 蛋白互作紧密的前 10 种蛋白质分别为 YAP1、MOB1A、MOB1B、SAV1、AMOTL2、WWC1、WWTR1、AMOT、AMOTL1、NF2, 分析其信息, 与 KEGG 收录的 Hippo 信号通路成员及 Biogrid 收录的与 YAP1 互作的蛋白质进行比对后, 发现筛选出的上述蛋白质均为 Hippo 信号通路中的关键蛋白质。

## 2.4 *LATS2* 基因启动子核心区域鉴定

通过 PCR 扩增到牛 *LATS2* 基因启动子 1.7 kb 序列, 根据逐段缺失引物进行 PCR 扩增, 获得 7 个逐段缺失的 *LATS2* 基因启动子片段(逐段缺失片段扩增电泳见图 5)。进一步连接 pGL3-Basic 载体, 构建得到了逐段缺失重组质粒, 将其命名为: p*LATS2* -1 792~+179、p*LATS2* -1 475~+179、p*LATS2* -1 098~+179、p*LATS2*



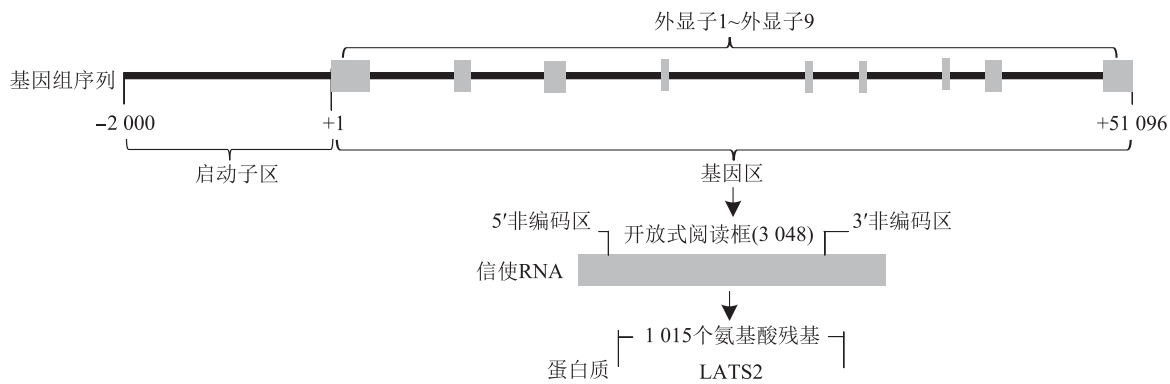


图 2 牛 *LATS2* 基因结构示意图  
Fig.2 The schematic diagram of bovine *LATS2* gene structure

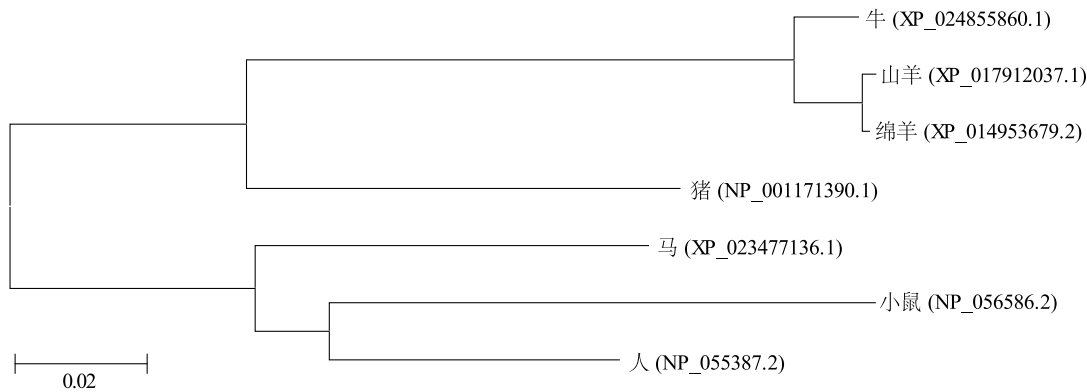


图 3 基于牛 *LATS2* 蛋白序列构建进化树  
Fig.3 Evolutionary tree based on bovine *LATS2* protein sequence

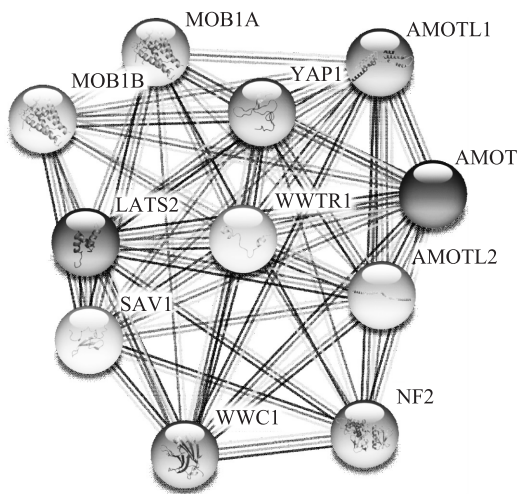
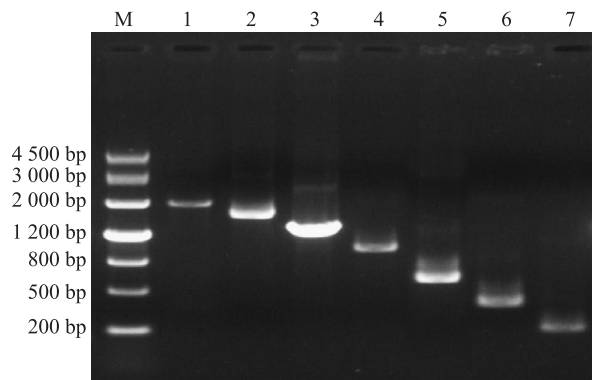


图 4 牛 *LATS2* 蛋白相互作用预测  
Fig.4 Prediction of proteins interacting with *LATS2* in cattle



M:DL4500 DNA marker;泳道 1~7 分别为 *LATS2* -1 792~+179、*LATS2*-1 475~+179、*LATS2*-1 098~+179、*LATS2* -727~+179、*LATS2* -515~+179、*LATS2* -248~+179、*LATS2* -56~+179扩增片段电泳图,片段长度分别为1 972 bp、1 655 bp、1 278 bp、907 bp、695 bp、428 bp、236 bp。

图 5 牛 *LATS2* 基因启动子逐段缺失片段扩增电泳图  
Fig.5 Gel electrophoresis of bovine *LATS2* gene promoter

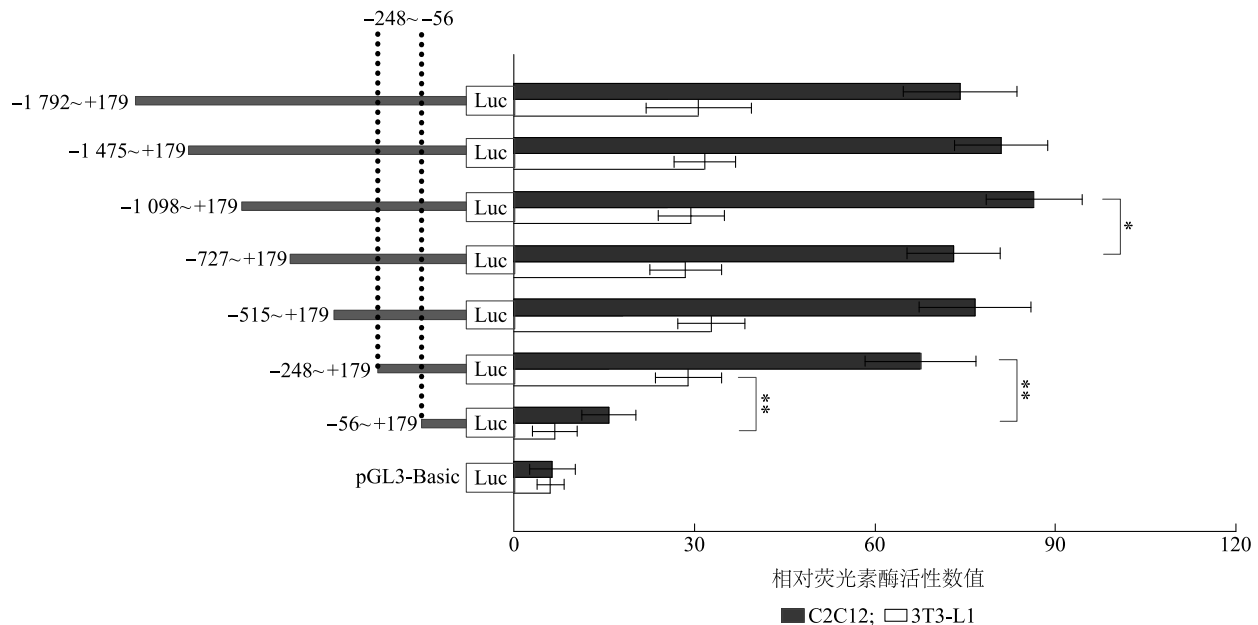
-727~+179、p*LATS2* -515~+179、p*LATS2* -248~+179和 p*LATS2* -56~+179。测序鉴定后,使用 Lipofectamine 3000 Reagent 脂质体分别将 pGL3-Basic 质粒和 7 个重

组质粒转染至 3T3-L1 和 C2C12 细胞系,检测启动子的活性。相对荧光素酶活性数值(图 6)显示,*LATS2* 基因

启动子区域的 1.7 kb 序列在 C2C12 和 3T3-L1 细胞系中均有较高的转录活性。当缺失-1 098~-727 片段后, *pLATS2* -727~+179 较 *pLATS2* -1 098~+179 酶活性在 C2C12 细胞系中显著下降 ( $P<0.05$ ); 进一步缺失启动子片段-248~-56, 发现 *pLATS2* -56~+179 较 *pLATS2* -248~+179 酶活性在 C2C12 和 3T3-L1 细胞系中均极显著下降 ( $P<0.01$ ), 分别下降了 79.4% 和 75.6%。上述研究结果表明, *LATS2* 基因启动子区域的 1.7 kb 序列活性较高, 具备调控基因转录活性的功能; -248~-56 为 *LATS2* 基因启动子核心区域; *LATS2* 基因在 C2C12 细胞系的转录活性高于 3T3-L1。

## 2.5 启动子核心区域的关键转录因子鉴定

利用 Genomatix 和 JASPAR 软件对 *LATS2* 基因启动子区和核心区域 (-248~-56) 进行分析并对潜在的关键转录因子进行预测, 结果 (图 7) 显示, *LATS2* 基因启动子核心区域包含转录增强因子 TEF1 (TEAD1)、肌肉细胞特异性增强因子 2A (MEF2A)、FOS 样抗原 1 (FOSL1)、肌细胞生成素 (Myog) 和生肌决定因子 (Myod1), 初步推测转录因子 TEAD1、MEF2A、FOSL1、Myog 和 Myod1 可能对 *LATS2* 基因的转录活性有重要的调控作用。



左边为 *LATS2* 基因启动子双荧光素逐段缺失片段示意图, 右边为酶活性检测数值。Luc 表示双荧光素酶报告载体。C2C12 表示小鼠成肌细胞; 3T3-L1 表示小鼠脂肪细胞。\* 表示差异显著 ( $P<0.05$ ); \*\* 表示差异极显著 ( $P<0.01$ )。

图 6 *LATS2* 基因启动子核心区域缺失片段报告载体相对荧光素酶活性

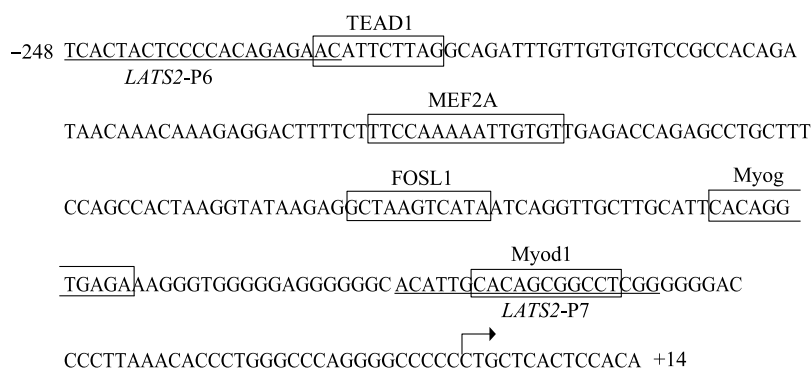
Fig.6 Relative luciferase activity of *LATS2* gene core promoter deletion fragment reporter vector

## 3 讨论

骨骼肌是动物躯体最重要的组成部分, 占胴体质量的 40% 左右, 其发育程度直接影响甚至决定家畜的产肉量, *LATS2* 基因对细胞的增殖、凋亡以及骨骼肌的形成有重要的调控作用, 而调控机制并不清楚。已有文献报道, *LATS1* 基因<sup>[21]</sup>、*LATS2* 基因<sup>[19]</sup>与湖羊肌肉生长发育显著相关。因此, 本试验开展了牛 *LATS2* 基因有关研究, 成功克隆了牛 *LATS2* 基因启动子, 检测了启动子活性并鉴定到启动子核心

区域, 预测到该基因启动子核心区域中的重要转录因子, 为探究牛 *LATS2* 基因在肌肉生长发育中的转录调控机制奠定基础。

本研究中, 牛 *LATS2* 基因在肝、背最长肌、睾丸、肺、肾、皮下脂肪、心、皱胃、大肠和脾等不同组织或器官中均有表达, 在肝中的表达量最高, 背最长肌其次, 在心、肺、皮下脂肪、肾、皱胃、大肠和脾等组织或器官中相对表达量较低。上述研究结果表明 *LATS2* 基因在牛不同组织或器官中的相对表达量有差异, 该基因的高表达可能影响肝以及肌肉组织的



下划线为引物序列,方框表示相对应的转录因子结合位点,箭头指示转录起始位点。FEAD1:转录增强因子 TEF1;MEF2A:肌肉细胞特异性增强因子 2A;FOSL1:FOS 样抗原 1;Myog:肌细胞生成素;Myod1:生肌决定因子。

图 7 牛 *LATS2* 基因启动子核心区域的转录因子预测

Fig.7 Prediction of transcription factors in the core region of bovine *LATS2* gene promoter

正常发育,这同 *LATS2* 基因表达量与湖羊肌肉生长发育显著相关<sup>[19]</sup>的结果一致。系统进化树结果显示,*LATS2* 基因在反刍动物进化过程中保守性较高;预测出的前 10 种互作蛋白质均为 Hippo 信号通路中重要的转录调控因子。Hippo 通路的核心是一个激酶级联反应,其中,SAV1 和 MOB1 形成一种复合体并在细胞质中被磷酸化来调控 *LATS1/2* 表达,待 *LATS1/2* 被激活后,其激酶反过来去磷酸化并抑制转录共激活因子 YAP 和 TAZ。去磷酸化的 YAP/TAZ 进入细胞核后与 TEAD1-4 等多种转录因子发生互作,从而抑制凋亡的基因表达并诱导细胞增殖<sup>[24-25]</sup>。研究发现 *LATS1/2* 和 *Mst1/2* 可通过 KIBRA、NF2、RASSF 等多种上游信号分子调控 Hippo 信号通路的活性,如 AMOT 等因子通过结合 *LATS1/2* 将 YAP/TAZ 等因子紧密连接在细胞质中,YAP/TAZ 的磷酸化可进行细胞信号调控。YAP/TAZ 和 *LATS1/2* 的稳定性可通过蛋白质泛素化进行调控<sup>[26]</sup>。综上,*LATS2* 基因在细胞信号转导及细胞增殖分化中起重要作用。

通过启动子逐段缺失载体活性检测,发现牛 *LATS2* 基因启动子核心区域位于-248~-56,进一步预测牛 *LATS2* 基因启动子核心区域有 TEAD1、MEF2A、FOSL1、Myog 和 Myod1 等转录因子结合位点。研究结果表明,TEAD1 可调控肌肉特异性基因 *TNNT2*、*Mhc*、 $\alpha$ -actin<sup>[27]</sup> 和 *COL1A1*<sup>[28]</sup> 的表达,在心肌、骨骼肌、平滑肌的发育方面有至关重要的调控作用<sup>[27-29]</sup>。TEAD1 蛋白还可以与 Hippo 信号通路中 YAP 蛋白形成蛋白质复合物,从而抑制细胞增殖、

促进细胞凋亡<sup>[30]</sup>。MEF2A 作为肌肉发生的重要核心因子,对骨骼肌和心肌细胞的增殖和分化有重要调控作用<sup>[31]</sup>,同时能够促进生长因子、肌球蛋白重链及胶原对损伤骨骼肌的修复<sup>[32]</sup>;该因子能够特异性识别并结合大多数肌肉基因启动子中的 A/T 序列,从而增强相关基因的表达<sup>[33]</sup>。FOSL1 是转录因子 AP-1 复合体的组分之一,参与细胞的增殖和分化,抑制细胞凋亡,可介导 Kras 通路调控细胞周期蛋白质,诱导骨骼的发育<sup>[34]</sup>。Myog 和 Myod1 作为调控肌肉细胞增殖、分化及肌纤维形成的关键基因<sup>[35]</sup>,突变会显著影响肌肉纤维和肉质特性<sup>[36]</sup>。其中,Myod1 对发育初级阶段肌肉的可塑性和再生起关键作用<sup>[35]</sup>,当 Myod1 与 PAX7 共表达时,可激活基底膜静息的肌肉卫星细胞使其增殖<sup>[37]</sup>;Myog 通过调节肌肉肌酸激酶影响骨骼肌的发生发育<sup>[38]</sup>,研究结果表明,敲除小鼠 Myog 基因后骨骼肌发育受损,出生后肌肉会出现萎缩现象<sup>[39]</sup>。以上研究结果表明,TEAD1、MEF2A、FOSL1、Myog 和 Myod1 转录因子在个体生长发育以及肌肉形成过程中起重要作用,结合本研究关于转录因子结合位点的预测,我们可以推断出上述 5 种转录因子对 *LATS2* 基因的转录可能起重要调控作用。但对于这一推断将来还需要结合定点突变、凝胶迁移(EMSA)、染色质免疫共沉淀(ChIP)等技术手段进行深入研究。

## 4 结论

牛 *LATS2* 基因启动子核心区域位于-248~-56,启动子核心区域预测到 TEAD1、MEF2A、

FOSL1、Myog 和 Myod1 转录因子结合位点。*LATS2* 基因的组织表达规律、启动子核心区域的转录因子结合位点预测及 *LATS2* 蛋白互作分析结果均表明 *LATS2* 基因在牛肌肉生长发育中扮演重要角色。以上结果为探究牛 *LATS2* 基因在肌肉生长发育中的转录调控机制奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] BERRY D P, WALL E, PRYCE J E. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle[J]. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 2014, 8(1):105-121.
- [2] HJORTH M, POURTEYMOUR S, GÖRGENS S W, et al. Myostatin in relation to physical activity and dysglycaemia and its effect on energy metabolism in human skeletal muscle cell[J]. *Acta Physiologica*, 2016, 217(1):45-60.
- [3] FRONTERA W R, OCHALA J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function[J]. *Calcified Tissue International*, 2015, 96(3):183-195.
- [4] TAJBAKHS S. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis[J]. *Journal of Internal Medicine*, 2009, 266(4):372-389.
- [5] BOUKHA A, BONFATTI V, CECCHINATO A, et al. Genetic parameters of carcass and meat quality traits of double muscled Piemontese cattle[J]. *Meat Science*, 2011, 89(1):84-90.
- [6] WEI D W, FENG L S, ZHANG W Z, et al. Characterization of the promoter region of bovine *SIX4*: roles of E-box and MyoD in the regulation of basal transcription[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 496(1):44-50.
- [7] WEI D W, MA X Y, ZHANG S, et al. Characterization of the promoter region of the bovine *SIX1* gene: roles of MyoD, PAX7, CREB and MyoG[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1).DOI:10.1038/S41598-017-12787-5.
- [8] WEI D W, GUI L S, RAZA S H A, et al. NRF1 and ZSCAN10 bind to the promoter region of the *SIX1* gene and their effects body measurements in Qinchuan cattle[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1).DOI:10.1038/S41598-017-08384-1.
- [9] RAZA S H A, KASTER N, KHAN R, et al. The role of microRNAs in muscle tissue development in beef cattle[J]. *Genes*, 2020, 11(3).DOI:10.3390/genes11030295.
- [10] YUE B L, LI H, LIU M, et al. Characterization of lncRNA-miRNA-mRNA network to reveal potential functional ceRNAs in bovine skeletal muscle[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10. DOI:10.3389/fgene.2019.00091.
- [11] FU Y Y, LI S, TONG H L, et al. WDR13 promotes the differentiation of bovine skeletal muscle-derived satellite cells by affecting PI3K/AKT signaling[J]. *Cell Biology International*, 2019, 43(7):799-808.
- [12] LIAN L, KIM J, OKAZAWA H, et al. The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation[J]. *Genes & Development*, 2010, 24(11):1106-1118.
- [13] ZHANG L, YUE T, JIANG J. Hippo signaling pathway and organ size control[J]. *Fly (Austin)*, 2009, 3(1):68-73.
- [14] YI J, LU L, YANG K, et al. Large tumor suppressor homologs 1 and 2 regulate mouse liver progenitor cell proliferation and maturation through antagonism of the coactivators YAP and TAZ[J]. *Hepatology*, 2016, 64(5):1757-1772.
- [15] FURTH N, AYLYON Y. The *LATS1* and *LATS2* tumor suppressors: beyond the Hippo pathway[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2017, 24(9):1488-1501.
- [16] 姚春和, 张荣. miR-372 靶向 *LATS2* 对结肠癌 SW620 细胞增殖、迁移侵袭的影响[J]. *广西医科大学学报*, 2021, 38(10):1906-1911.
- [17] MCNEILL H, REGINENSI A. *Lats1/2* regulate Yap/Taz to control nephron progenitor epithelialization and inhibit myofibroblast formation[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2017, 28(3):852-861.
- [18] 冯瑞军, 郑远航, 盛智梅. 外泌体 miR-574-5P 通过下调大肿瘤抑制基因 2 促进胶质瘤增殖、侵袭和迁移[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2021, 38(11):1520-1527.
- [19] 王利宏, 王庆增, 鲍建军, 等. Hippo 信号通道中 *Lats2* 基因表达与湖羊肌肉生长发育的关系[J]. *南京农业大学学报*, 2018, 41(3):519-525.
- [20] 鲍建军, 苏锐, 王庆增, 等. Smads 与 Hippo 通道中 *YAP1* 基因在湖羊肌肉组织中时空表达研究及关联分析[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(11):2203-2213.
- [21] 张玉龙. Hippo 信号通道中 *Lats1* 基因对湖羊肌肉生长性状遗传调控的初步研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2013.
- [22] WEI D, RAZA S H A, WANG X, et al. Tissue expression analysis, cloning, and characterization of the 5'-regulatory region of the bovine *LATS1* gene[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9. DOI:10.3389/fvets.2022.853819.
- [23] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [24] BADOUEL C, MCNEILL H. SnapShot: the hippo signaling pathway[J]. *Cell*, 2011, 145(3).DOI:10.1016/j.cell.2011.04.009.
- [25] ZHAO B, TUMANENG K, GUAN K L. The hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal[J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(8):877-883.
- [26] O'HAYRE M, DEGESE M S, GUTKIND J S. Novel insights into G protein and G protein-coupled receptor signaling in cancer[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2014, 27:126-135.
- [27] LIU F, WANG X, HU G, et al. The transcription factor TEAD1 represses smooth muscle-specific gene expression by abolishing myocardin function[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(6):3308-3316.
- [28] AMBROSINO C, IWATA T, SCAFOGLIO C, et al. TEF-1 and C/EBP $\beta$  are major p38 $\alpha$  MAPK-regulated transcription factors in



- proliferating cardiomyocytes[J]. The Biochemical Journal, 2006, 396(1):163-172.
- [29] WEN T, LIU J H, HE X Q, et al. Transcription factor TEAD1 is essential for vascular development by promoting vascular smooth muscle differentiation[J]. Cell Death & Differentiation, 2019, 26(12):2790-2806.
- [30] HURASKIN D, EIBER N, REICHEL M, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling via Axin2 is required for myogenesis and, together with YAP/Taz and Tead1, active in IIa/IIx muscle fibers[J]. Development, 2016, 143(17):3128-3142.
- [31] NING L, NELSON B R, BEZPROZVANNAYA S, et al. Requirement of MEF2A, C, and D for skeletal muscle regeneration[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(11):4109-4114.
- [32] SCHIAFFINO S, DYAR K A, CALABRIA E. Skeletal muscle mass is controlled by the MRF4-MEF2 axis[J]. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 2018, 21(3):164-167.
- [33] TAYLOR M V, HUGHES S M. Mef2 and the skeletal muscle differentiation program[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2017, 72:33-44.
- [34] VALLEJO A, PERURENA N, GURUCEAGA E, et al. An integrative approach unveils FOSL1 as an oncogene vulnerability in KRAS-driven lung and pancreatic cancer[J]. Nature Communications, 2017, 8.DOI:10.1038/ncomms14294.
- [35] ZAMMIT P S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2017, 72:19-32.
- [36] COLES C A, WADESON J, LEYTON C P, et al. Proliferation rates of bovine primary muscle cells relate to liveweight and carcass weight in cattle[J]. PLoS One, 2015, 10(4).DOI:10.1371/journal.pone.0124468.
- [37] BUCKINGHAM M, RIGBY P W. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis[J]. Developmental Cell, 2014, 28(3):225-238.
- [38] XU D Q, WANG L, JIANG Z Z, et al. A new hypoglycemic mechanism of catalpol revealed by enhancing MyoD/MyoG-mediated myogenesis[J]. Life Sciences, 2018, 209:313-323.
- [39] BODINE S C, LATRES E, BAUMHUETER S, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy[J]. Science, 2001, 294(5547):1704-1708.

(责任编辑:陈海霞)