

转基因动物在动物营养研究中的应用

李建凡

(中国农业科学院畜牧研究所, 北京, 100094)

摘要 本文综述了转基因动物在动物营养中的应用。包括两个主要部分, 一是用转基因动物做模型, 研究外源基因对动物生长和代谢的调控作用, 说明外源基因对动物生长速度、饲料利用率及其胴体的组成均有影响。与此同时, 还可以导入新的代谢体系中的主要基因, 使动物本身获得对某些必需物质的合成能力, 从而达到提高生产性能的目的。另一部分是日粮的营养成分对动物某些基因表达的调控作用, 从基因表达水平说明营养成分对动物某些物质的合成、代谢的调控作用。这两个方面都为在分子水平上研究动物营养学提供了有效的手段和方法。

关键词 转基因动物 动物营养 生物化学

分子生物学理论和技术的发展已经使人们已能通过把单个或多个基因转移到动物体内, 改变动物或动物产品的性状, 使之满足人们的需要。同时, 转基因动物也为动物营养研究提供了新的模型。

1 基因对动物生长和代谢的调控

自从 Palmiter 等 (1982) 用小鼠金属硫蛋白-1 基因启动子与大鼠生长激素基因融合, 获得“超级小鼠”以来, 许多实验室已得到各种类型的转基因动物。随后又得到了转基因家畜, 如兔、猪、羊、牛等等。由于这一技术的成熟和完善, 为外源基因对动物生长代谢调控的研究创造了有利的条件。主要表现在以下三方面:

1.1 对动物生长和胴体组成的调控

生长是一个非常复杂的过程, 它受到各种激素、主动因子、辅助因子间相互作用的影响, 也受到营养条件 and 环境因素的影响, 其中由基因编码的蛋白激素显得特别重要。这种串联作用因素开始于下丘脑和脑垂体, 包括肝脏, 并最终作用于各器官。Wolf 等 (1991) 提出的模型如图 1 所示。

下丘脑受许多因素的控制, 特别是受到血清中具生长效能作用的激素, 如生长激素(GH)、类胰岛素促生长因子-1(IGF-1)、生长激素释放素(GHRH)和生长激素释放素抑制因子(SRIF)等的控制。

GHRH 是一种由 43 或 44 个氨基酸组成的肽, 它由下丘脑分泌。猪和人的 GHRH 仅有 3 个氨基酸不同; 而鼠和人的 GHRH 则有 14 个氨基酸不同。SRIF 有两种不同的分子, 长度分别是 14 个和 28 个氨基酸, 其序列在不同种间相当保守, 它在下丘脑合成, 也可在胰脏和肠道

收稿日期: 1996-01-02

中合成。

GH 在垂体前叶促生长细胞中合成, 由 190 或 191 个氨基酸组成。它有两个二硫桥键, 一部分以 22KD 分子形式存在; 另一部分为 20、45、80 至 90KD 分子, 这几种也存在于人体中。最重要的几种蛋白质激素的氨基酸序列和基因都已弄清, 基因已经得到了克隆。

生长激素 C, 即 IGF-1, 是一种能促进细胞分裂的碱性多肽, 含有 70 个氨基酸, 分子量为 7.5KD。它主要在肝中合成, 但在其它器官如肾、肺、心、睾丸、乳腺和骨松果体中也能合成。IGF-1 是一种内源激素, 但也表现出自发性和辅助的功能。IGF-1 来自原 IGF-1A 和 IGF-1B 两个不同的前体。

生长激素的释放取决于 GHRH 和 SRIF 的浓度, 并在一天中表现出明显的波动峰。生长激素经过血液循环分布到组织中, 并与肝以及脂肪、肌肉、肾、心、骨松果体等其他组织中的 GH 受体相结合。

转 GH 基因的小鼠产生于 1982 年, 这些转基因鼠生长速度为对照鼠的 4 倍, 终体重增加 2 倍。其它类型的生长激素基因, 如 GHRH 和 IGF-1 基因都曾用于产生转基因鼠。与上面的结果相反, 有些转生长激素基因动物并不表现出促生长的效应。Hammer 等 (1985) 指出, 转基因猪和兔的生长速率并不增加。此时, 饲喂含 16% 粗蛋白饲料的转基因猪的增重效果不如对照组。若以富含蛋白质 (18%) 的饲料饲喂转基因猪的后代, 并补饲 0.25% 的赖氨酸和维生素, 其日增重可提高 15%, 而饲料 / 增重比也从对照的 3.12 降至 2.46, 饲料利用率提高 21%。转 GH 基因猪, 和对照相比, 在生长主要阶段第 2 和第 6 月龄不能表现出增重的提高。但到第 8 月龄时, 体重比对照提高 28%。据 Vize 等 (1988) 报道, 一头转 PGH 的转基因猪, 日增重可达 1273g, 而同期对照猪仅为 781g。使用生长激素猪的采食量减少 20%, 但转基因猪的饲料利用率可提高 18%。转基因猪最明显的变化是脂肪减少了, 其背脂厚度可从 18~20mm 减少至 7~8mm。为了避免生长激素的过量表达, 可以使用其它的调节因子, 将它调节到生理需要量。Wieghart 等 (1990) 用肝脏特异性大鼠磷酸烯醇丙酮酸羧激酶基因的 460bp 的 5 端序列, 减缓了这种过量表达, 使猪的背脂厚度降低了 40%~45%。Polge 等 (1989) 的实验表明, 牛催乳素启动子可用来控制牛生长激素基因的表达。用 Sulpiride (β -肾上腺素能激动剂 β -adrenergic agonist) 处理, 或用甲状腺激素释放素 (TRH) 处理, 可使 bGH 阶段性释放, 说明了这一基因的表达受制于与牛催乳素分泌调控相关联的正反馈机制的作用。转 GH 和 GHRH 基因羊的生长激素水平有所提高, 但生产性能并未得到改进。转生长激素基因的羊也表现出生长激素水平的提高, 虽然它们的生长速度并未改变; 但是体脂含量却从对照的 25%~30% 降低至 5%~7%。

1.2 动物体内生化途径的改变

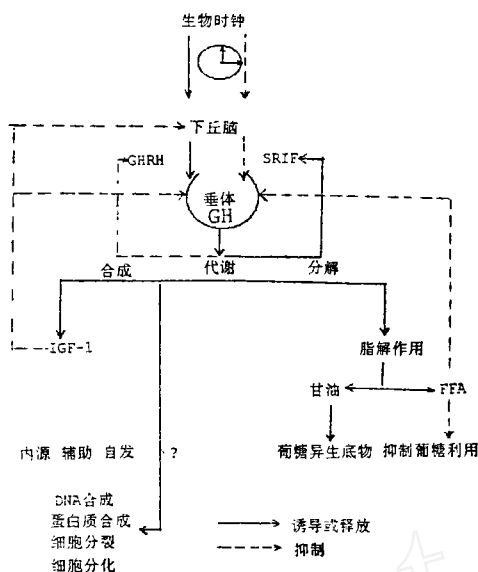
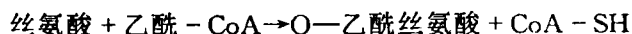


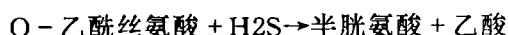
图 1 生长激素作用和调控模式

Fig. 1 Models of action and regulation of the growth hormone cascade

改变动物的代谢途径以提高经济动物的产量是一个很有前途的方法。Wand 等 (1986) 提出, 这种方法有两个方向, 一是重建某些丢失的代谢途径; 二是导入目前在动物体内尚未发现的代谢途径。采用外来其它基因, 加工后用于哺乳动物的表达。研究的重点是设法导入代谢途径中的关键因素。如半胱氨酸是羊毛合成的限制性氨基酸。由于半胱氨酸在羊瘤胃中降解, 饲料中加入半胱氨酸时并不能提高它在羊血清中的水平。如果能得到一种能自身合成半胱氨酸的转基因羊, 将会大大提高羊毛产量。为此, 可将大肠杆菌中编码丝氨酸转乙酰酶和 O-乙酰丝氨酸硫氢化酶基因, 和适当的调控元件重组后导入羊体内, 并在其中表达。这一转基因羊的胃上皮细胞就能利用胃中的硫化氢合成半胱氨酸, 其过程如下式所示:



丝氨酸转乙酰酶



O-乙酰丝氨酸硫氢化酶

Wand 等 (1990~1991) 将这些基因与金属硫蛋白基因 (MT) 启动子联接, 并在 3' 端装上 GH 基因的序列, 用这一构件得到了转基因小鼠。令人吃惊的是, 不含内含子的构件也可得到满意的表达。将含有目的基因编码区, SV40 后续启动子、SV40 多聚腺苷信号的重组构件转移之后, 在转基因羊和小鼠中均得到了表达。这一事实说明, 细菌的基因在羊的某些组织中也可以正确的转录和翻译。

另一个建立新代谢途径的例子是导入乙醛酸途径。经此途径, 转基因山羊便可利用乙酸合成葡萄糖。这一途径很令人感兴趣, 因为反刍动物需要能量来供给机体各部分, 尤其是大脑和胎儿。葡萄糖可经葡萄糖异生作用由低级脂肪酸 (如丙酸) 和氨基酸合成。这一途径示意于图 2。

异柠檬酸由乙酸和草酰乙酸合成。它在异柠檬酸裂解酶作用下产生乙醛酸和琥珀酸。在每一循环中两个乙酸分子可产生一个琥珀酸分子。具有活性的异柠檬酸裂解酶和苹果酸合成酶的存在已由转染细胞和转基因小鼠所证实。

Rees 等 (1990) 提出了这样一个设想, 即把苏氨酸和赖氨酸在微生物中生物合成的途径导入哺乳动物, 使哺乳动物自己就能合成苏氨酸和赖氨酸等必需氨基酸。通过分子生物学途径可大大降低畜禽日粮中必需氨基酸的含量。为达此目的, 他首先研究了苏氨酸和赖氨酸在大肠杆菌中生物合成的途径。下面以苏氨酸为例加以说明。

苏氨酸可由大肠杆菌利用天门冬氨酸经 5 个酶反应步骤而合成 (见图 3)。这一转化起始于天门冬氨酸的磷酸化作用 (天门冬氨

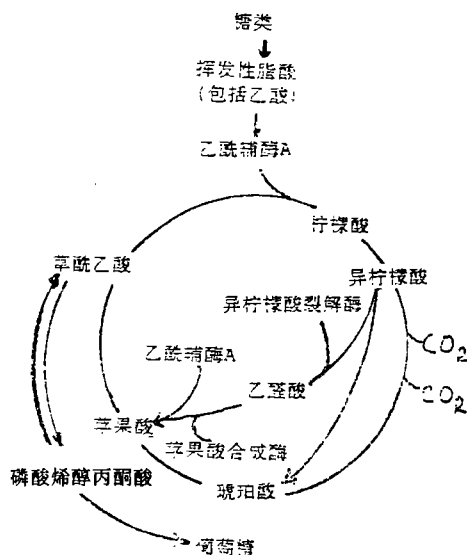


图 2 乙醛酸循环途径 (Ward 等, 1991)

Fig. 2 Biochemical reaction of the glyoxylate cycle (Ward and Nuncarrow, 1991) PEP, phosphoenol pyruvate

酸激酶), 然后它被还原(天门冬氨酸脱氢酶)产生同型丝氨酸。同型丝氨酸的羟基重排再经两步反应生成苏氨酸。第一步是在同型丝氨酸激酶作用下, 经磷酸化生成磷酸同型丝氨酸; 第二步是经过脱磷酸, 在苏氨酸合成酶作用下重排后得到苏氨酸。

大肠杆菌苏氨酸合成途径中的酶由 4 个基因编码, 其中 3 个基因位于受一个单启动子控制的操纵子上。天门冬氨酸激酶 1 和同型丝氨酸脱氢酶是由同一多肽链所携带, 因而只需 1 个基因控制这两个步骤。天门冬氨酸半缩醛脱氢酶基因同时可控制赖氨酸和苏氨酸生物合成途径, 并位于苏氨酸操纵子的外端。这些基因来自大肠杆菌, 已克隆并测定了序列。在这些基因转入动物之前, 应考虑在动物细胞中建立这种代谢途径的可能性。最大的困难来自动物原有的酶, 它们可以改变代谢的流向, 即可使代谢朝向另外途径, 也可使之返回到原来的中间产物。在哺乳动物细胞中进行的生物合成反应中, 必须知道氧化反应是否会大大降低苏氨酸的生成率。有报导描述了在鼠肝匀浆中同型丝氨酸经 2-氧-丁酸进行氧化和脱氨的反应。同型丝氨酸的脱氨作用明显地被同型半胱氨酸抑制, 因而认为有胱硫醚 γ -裂解酶参与。

为建立哺乳动物氧化代谢与微生物合成相互关系的数学模型, W. D. Rees 等(1990)利用 ^{14}C -同型丝氨酸在鼠肝匀浆中转变成为 2-氧-丁酸的反应过程, 研究了同型丝氨酸氧化动力学。结果表明, 产物的分布主要取决于同型丝氨酸激酶的总量。

因为日粮中含有苏氨酸, 所以由合成途径所提供的最大苏氨酸量应低于总的苏氨酸需要量。苏氨酸的平衡调控及时地由正常的降解途径和苏氨酸合成的变构抑制而保持高的水平。当日粮中缺乏苏氨酸时, 新的生物合成途径就能供给苏氨酸而使动物正常生长。

这些结果不能预测大肠杆菌中酶对动物细胞正常生长的影响, 现在进行的试验旨在研究大肠杆菌苏氨酸操纵基因导入大鼠 3T3 细胞的效果以及这些细胞的代谢。Rees 等(1992)将同型丝氨酸激酶编码区(0.9kb)克隆到 SV40 基本结构的真核表达载体上, 并用新霉素抗性基因进行标记。同时也将苏氨酸合成酶编码区(1.6kb)也克隆到 SV40 基本结构的真核表达载体上。然后分别对鼠肝 3T3 细胞进行转染, 并用 G418 抗性进行筛选, 测定筛选出的细胞中同型丝氨酸激酶和苏氨酸合成酶的活性。在缺乏苏氨酸时, 对细胞进行生长能力的筛选, 得到了表现两种酶活性并能在缺乏苏氨酸时正常生长的细胞克隆。这些实验表明, 使用类似技术可将合成苏氨酸的能力转至动物细胞。

和苏氨酸的合成过程相比, 在动物细胞中从天门冬氨酸合成赖氨酸存在更加复杂的情况, 因为它涉及到大量的基因和许多不完全的特殊步骤。大肠杆菌生物合成基因图谱说明, 它们至少位于两个区域。这暗示没

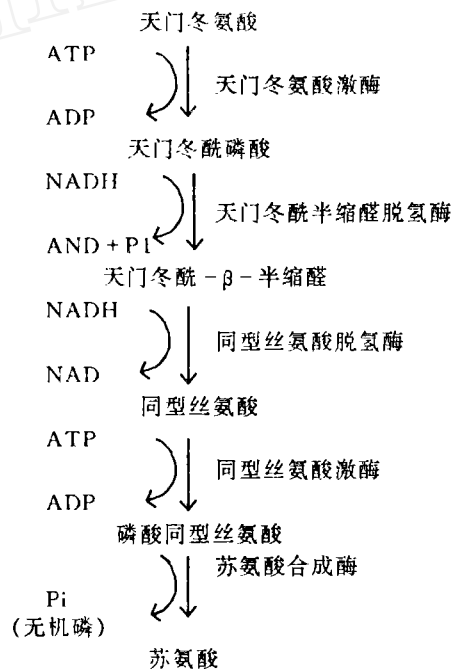


图3 苏氨酸在大肠杆菌中的合成途径
(以天门冬氨酸为前体)

Fig. 3 The *E. coli* pathway for the synthesis of threonine using aspartic acid as precursor

有单个操纵子。虽然某些必需的酶可由哺乳动物的酶所代替,但如在转氨酶一步,仍需转入8个基因。天门冬氨酸半缩醛将再次形成一个分支点,并有相似的代谢情况。从天门冬氨酸半缩醛至赖氨酸的唯一其它步骤,会干扰哺乳动物代谢途径的是那些环状中间物,它们类似赖氨酸代谢物L-哌啶酸。L-哌啶酸是赖氨酸氧化物的对映体,它以低于氨基己二酸氧化50倍的速率产生。有人认为哌啶酸是神经传导物质,但它的作用尚未研究清楚。通过哌啶酸氧化酶的氧化损失很少,如果这一环化物干扰神经传导,那么产生这一环化中间物基因组织特异性表达就是必需的了。最近国外有人研究了二氨基庚酸脱羧酶在COS-7-细胞中的表达。大肠杆菌赖氨酸合成途径有9个步骤,最后一步是在二氨基庚酸脱羧酶的作用下将内消旋的二氨基庚酸(DAPA)转化为赖氨酸。他们用Accl和Acal两种酶从质粒pLV17切下一个2.4kb的大肠杆菌基因组片段,它可编码赖氨酸A基因。然后将它联接到真核表达载体pSVPoly上,再用pKS22转染COS细胞。筛选表达细胞,将细胞提取物与 ^3H ——二氨基庚酸保温。用纤维素薄层层析法测定反应产物,用茚三酮显色定位。在相同的位置可检测到放射性。而对照细胞则未检出赖氨酸,这些数据说明DAPA脱羧酶在pKS22转染的细胞中得到了表达。

由上可见,将苏氨酸和赖氨酸生物合成基因导入动物细胞最终形成转基因动物,看来是可行的。对始于天门冬氨酸的大肠杆菌途径的代谢分析说明有其它酶产生的中间产物,生物合成酶的有效表达使反应向合成方向进行。显然困难是存在的,特别是要找到适合E. coli基因的启动子并把它们组装到基因组中以达到有效的表达更为困难。启动子的选择及与它有关的上游区也将决定组织特异性和基因表达的激素调控。也有必要避免它在某些组织(如大脑)中的合成,在那里生成的产物有副作用。这些问题还在进行深入研究。相信在不久的将来,可自身合成某些必需氨基酸的转基因动物将会面世。

1.3 动物产品成分的改变和质量控制

导入适当的外源基因以改变奶的成分,也是人们感兴趣的一个重要课题。动物奶中蛋白质组成如表1。

Mercler等(1987)曾建议,将乳腺特异性启动子控制下的乳糖酶基因导入牛或羊,使之表达,可使奶中的乳糖分解成葡萄糖和半乳糖。这种奶可供因缺乏乳糖酶而不能利用乳糖的病人饮用。这对发展中国家具有特殊意义。另一方面,是使用反义RNA进行表达,阻断某些酶蛋白的合成,抑制乳腺中脂肪的合成以达到降低乳脂率调节奶组成的目的。Bremel等(1989)提出了利用基因工程改变奶成分的主要途径,如表2。

如上所述,用基因工程可以改变动物奶的成分,使之接近人乳的成分,更适于喂养婴幼儿。

2 日粮营养成分对基因表达的调控

营养成分对基因转录也有调控作用,也即多种转录因子受到日粮组分的影响而对基因表达进行调控,并影响代谢过程。这一点已越来越引起人们的兴趣,越来越多的与代谢有关的基因得到克隆,启动子序列已弄清,并得到了确认。而这种调控起始于日粮,它可促进某些代谢调节因子的产生,使目标组织中某些酶蛋白浓度达到峰值。例如磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK),它是肝和肾中糖元异生作用的关键酶。它的启动子上基因转录区起始位点上游500bp内含有许多调控单元,可与代谢信号相呼应。这些单元以一种复杂的反应方式与组织特异性转录因子相结合,协同对磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因的表达进行调控。这些调控作用已

表1 反刍动物和啮齿动物奶中蛋白质的组成

Table 1. Endogenous milk proteins of ruminants and rodents

编码蛋白质 Encoded protein	浓 度 Concentration(ug / ml)
酪蛋白(反刍动物)	
αS1	10000~12000
αS2	3200~3800
β	10000~16000
K	3900~4600
主要乳清蛋白质(反刍动物)	
α-乳清蛋白	800~1000
β-乳球蛋白	2800~3000
乳清酸性蛋白(WAP)(啮齿动物)	2000

表2 基因工程改变奶成分的可能途径

Table 2. Potential changes in milk through genetic engineering

基因 Gene	变化 Change
酪蛋白基因	增加酪蛋白
工程酪蛋白基因	改变酪蛋白的加工特性
反义-β-乳球蛋白基因	减少或除去乳球蛋白
反义-乙酰 COA - 羧化酶基因	减少或除去乳脂
β-半乳糖苷酶,	增加固形物
乳糖酶基因	生产安全食品和
病原抗体基因	预防乳腺炎

经在培养细胞和转基因鼠中得到证实。下面将讨论 PEPCK 启动子转录的激素和日粮调控。

PEPCK 在动物组织中的浓度可受到日粮成分的调节。当进食含有大量糖类的饲料时, 肝中 PEPCK 水平大幅度下降。如果禁食或给以高蛋白低糖的饲料, 则可使其水平得以控制。由此可见, 动物的营养状态与基因的表达有直接的联系。

2.1 PEPCK 基因表达的生理学基础

PEPCK 活性主要存在于肝、肾皮质、脂肪组织、空肠和乳腺。它的合成速度与酶的 mRNA 水平密切相关, 而 mRNA 又受到基因转录和 mRNA 稳定化的控制。胰高血糖素(通过 cAMP 作用)、甲状腺激素、糖皮质激素、视黄酸可诱导基因的转录; 而胰岛素可抑制它的转录。PEPCK、mRNA 的半衰期很短, 只有 30 分钟, 但 cAMP 可使它稳定。PEPCK 基因的即时调节取决于 cAMP 和胰岛素的相对水平, 而它们又受到食入饲料中糖类的影响。

2.2 PEPCK 基因启动子结构功能特点

在鼠和鸡中已分离出胞质型 PEPCK 基因, 并测定了它的核苷酸序列。鼠 PEPCK 启动子位于 -460 至 +73 片段处, 它包含了大多数组织特异性和基因转录激素调控所必需的元件。PEPCK 基因转录调控图是相当复杂的, 它集中在启动子上相当小的 500bp 的片段上, 这当中包含 3 个功能区, 每一区由蛋白质结合位点群构成, 如图 4 所示。

区域 1 包含了基本 PEPCK 基因转录必需的元件和 cAMP 调控区, 它可与 PEPCK 启动子交换瞬时转录信号。区域 2 由一系列蛋白结合位点组成, 它可以通过与结合在区域 1 上的转录因子的互相作用来调节 PEPCK 基因的过量转录。其中命名为 P3(1)的调控元件对 PEPCK 肝脏特异表达具有重要意义, 并为 PEPCK 启动子和 cAMP 的充分作用所必需。甲状腺激素结合位点也在这一启动子区。区域 3 含有一套复杂的调控元件, 包括糖皮质激素、视黄酸对基因转录的正调控和胰岛素对基因转录的抑制作用, 其中最重要的是 CRE(-37 至 -74) 和 P3(1)(-248 至 -230)。

2.3 cAMP 对 PEPCK 基因转录的调控及与其它调节因子的相互作用

Roesler 等 (1988) 使用各种基因研究了 cAMP 调节基因转录的机理, 发现所有受 cAMP

调控的基因,其转录都受到离转录起始位点很近的含有 CRE(s)的一种蛋白质的调控。一个名叫 cAMP 调控元件结合蛋白的蛋白质 (CREB) 已用亲和层析法从脑组织和胎盘中分离出来。CREB 以二聚体的方式起作用,其亚基分子量为 43000, 它的二聚作用和转录效率在体外可依赖 cAMP 的一种蛋白激酶的磷酸化而得到促进。在蛋白质的 N 端有一串蛋白激酶 A、蛋白激酶 C 和酪蛋白激酶 II 识别位点。这说明,在蛋白激酶间存在复杂的相互作用,以调控 CREB 的转录活性。

CREB 是转录因子家族中的一员,在蛋白质 α -螺旋区含有亮氨酸拉链的超二级结构。这种结构使得家族中亚基间形成同质或异质的二聚体。这种形成异质二聚体的能力为每一基因提供了更广泛的转录调控的作用范围。CAAT / 增强子结合蛋白 (C / EBP α 和 C / EBP β)、早期过度基因 (Fos 和 Jun) 及 CRE - 结合蛋白 (CREB 和 ATF - 1 至 ATF - 8) 都能影响蛋白质与 DNA 的相互作用。只有在特殊情况下,这些蛋白质才形成同质或异质二聚体。例如, CREB 可与它自身或与 ATF - 1 形成二聚体,但不能与 ATF - 2、Fos、Jun 或 C / EBP α 、 β 形成二聚体。然而, ATF - 2 可识别与 CREB ('5 - TGACGTCA - 3') 相似的 DNA 调控序列,并可与 Jun 形成异质二聚体。转录因子的相互作用、同质或异质二聚体与 CRE 结合的能力,以及蛋白激酶 A 亚基催化各个因子磷酸化的程度,共同体现了 cAMP 可调控特异基因转录的机理。

上面讨论过的许多转录因子都已被弄清,它们结合在 PEPCK 启动子 -550 至 +73 片段的特殊元件上。如 CREB 结合在 CRE - 1 上; C / EBP α 和 C / EBP β 结合在 CRE - 1 和 P3(1) 上。当表达载体含有编码这些蛋白质的基因并导入肝细胞时,这些因子也可激活 PEPCK 启动子的转录作用。另外, Jun 是一种结合在 PEPCK 启动子 -340 至 -280 段 AP - 1 区上的转录因子,它可受到佛波醇十四烷酸 (PMA) 的调控。当它与 PEPCK - CAT 基因共同转录至肝细胞时,可使 PEPCK 的转录作用提高 30 倍。但由 Jun 引发的基因转录的增强作用又可受到 Fos 的完全遏止,它可与 Jun 形成异质二聚体而控制许多基因的转录。c - Fos 基因可受到 cAMP、胰岛素和钒酸盐的快速诱发,它也可以调节 PEPCK 基因的转录。因此, Fos 和 Jun 复合物可能具有调节 PEPCK 在肝中表达的功能。此外蛋白激酶 C 可以消除 cAMP 对 PEPCK 启动子转录的诱导。

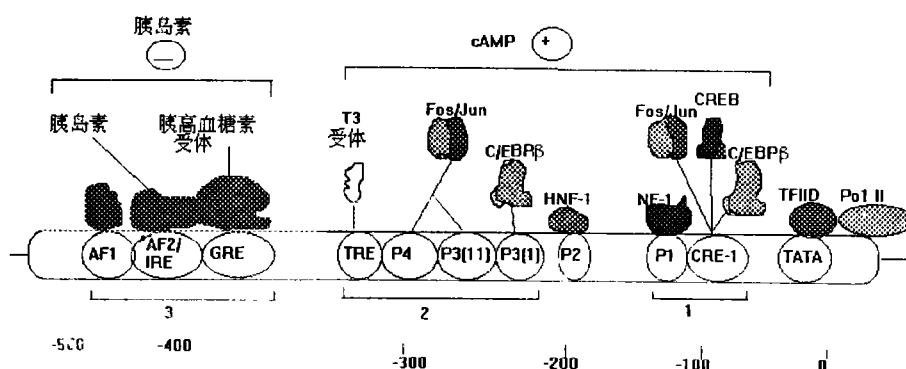


图 4 PEPCK 启动子的转录调控

Fig. 4 Transcriptional regulation of the PEPCK promoter

2.4 转录因子调节 PEPCK 基因对日粮和激素信号对代谢的应答

图 5 是 PEPCK 基因的调控模式图。在第一区域中的关键元件包括 CRE 和 P-1 结合蛋白 (CREB 或 C/EBP, Fos/Jun 和 NF-1), 它们可与 TATA 框相作用而调节 PEPCK 基因的转录。这里也是 cAMP 作用的主要位点, CRE 和 P-1 都是 PEPCK 基因在发育过程中进行表达和转录激素调控的主要作用点。在启动子第二区域内有几个蛋白质功能区, 它们可与 CRE 作用, 促进 PEPCK 基因转录对激素的应答作用。其中最重要的是 P3(1), 它与下游区的元件 CRE 协同作用, 以保证 PEPCK 启动子对 cAMP 充分的反应。此外, P3(II)、P4 和甲状腺激素响应元件 (TRE) 都影响 PEPCK 转录的水平。P3(II) 和 P4 都可与 Jun/Jun 同质二聚体相结合, 可使 PEPCK 启动子在肝癌细胞中的转录提高 30 倍; 而当与 Fos/Jun 异质二聚体相结合时, 则可完全遏止转录的诱导作用。此外, 甲状腺激素也可刺激 PEPCK 启动子在肝癌细胞中的转录作用。

特异性转录因子的活性依赖于日粮和激素生理信号的激发。按上面的模式, 核蛋白对信号的识别决定了 PEPCK 启动子被激素激活或抑制的程度。例如, Jun 对转录的正调节作用可被存在的 Fos 所取消。虽然 CREB 通过与 CRE 作用可刺激转录, 但其转录活化作用的能力取决于这一蛋白质的磷酸化状态。甲状腺受体的结合, 可通过放大初级转录因子, 如 CREB 和 EBP 的功能而增加转录的总效率。这一模型适用于对胰岛素敏感的蛋白质与 PEPCK 启动子直接结合而引起的转录调节作用。

Fober 等 (1993) 使用渗透性肝癌细胞说明了 PEPCK 启动子上 CRE 通常被结合在这一位点上的蛋白质所占据。他们认为, CRE 显然是通过调整结合因子 CREB 而参与转录作用。Quinn 等 (1990) 也报道, CREB 磷酸化状态不影响它与 CRE 的结合, 但它的转录活性不受 cAMP 影响。他们认为, 这一蛋白与 PEPCK 启动子上的 CRE 可高水平地结合。最近, Chvivia 等 (1993) 分离到一种 CREB 结合蛋白, 只有当它被磷酸化时才能与 CREB 相结合。这一蛋白可以联接 CREB 键与 PEPCK 启动子上的 CRE 与 TATA 框架结合蛋白, 因而可能参与 cAMP 存在下肝中 PEPCK 基因转录的中介诱导作用。配对蛋白对 PEPCK 基因转录的调控作用由 Austin 等 (1994) 的发现所证实, 即腺病毒早期响应蛋白 E1A, 它不直接与 PEPCK 启动子结合, 但明显地受到 PEPCK 启动子的转录。

2.5 PEPCK 启动子在转基因小鼠中的作用

当 PEPCK 启动子 (-490 至 +73) 与一个可变结构基因相连接, 并导入转基因鼠的生殖系中, 它将按上述天然 PEPCK 基因的生理功能而起作用。例如, 嵌合的 PEPCK/bGH (牛生长激素) 基因可在鼠的肝、肾、脂肪组织和空肠中表达, 并具有与内源 PEPCK 基因相似的发育方式。高糖日粮 (血清中高水平胰岛素) 可降低鼠血清中 bGH 水平, 仅为喂饲这一饲料之前的 5%。相反, 当日粮中含较多的蛋白质而缺乏糖类时, bGH 在血清中的浓度可提高 30 倍。如果将二乙酰 cAMP (Bt2cAMP) 直接注入动物体内, 在 90 分钟之内可使血清 bGH 提高 2~3 倍。若对糖尿病动物注射胰岛素, 则可降低这一基因的转录。PEPCK 启动子在很短的 -470 到 +73 片段中, 集中了对日粮和激素的反应性能, 说明了这一区域对转录调控至关重要, 它包含了转录调控的必要元件。

2.6 日粮脂肪对某些基因表达的调控作用

Douglas 等(1994)研究了低蛋白日粮对大鼠神经肽基因表达的调控作用。神经肽 Y (NPY) 是一个含 36 个氨基酸的多肽, 主要存在于中枢和外周神经系统中。神经肽可进入脑脊髓或下丘脑, 以刺激动物的采食量。用神经肽长期处理动物, 可增加体脂的积累。因而认为进食量与神经肽有关。为此他们进行了系统的研究, 给大鼠以不同蛋白水平和能量水平的饲料, 发现低蛋白日粮可提高 NPY 基因的表达水平, 导致动物肥胖并积累大量的体脂。

日粮中三酰甘油脂的含量和种类也可调节胰脏脂肪酶基因的表达。Ricketts 等(1994)研究了日粮中油脂类型(红花油和猪油)和含量(50g/kg 日粮和 174g/kg 日粮)对鼠胰脏脂肪酶活性和 mRNA 水平的影响。在喂以中等含量脂肪的日粮时, 含多不饱和脂肪酸的红花油组和猪油相比, 脂酶活性提高了 80%; 但在低脂肪水平时的脂酶活性, 红花油组则比猪油组低 50%。

喂以中等含量的红花油和猪油时, 大鼠胰脂酶(rPL-3)mRNA 水平比低脂肪日粮分别提高 163% 和 212%。在使用不同类型油脂时的 rPL-3 mRNA 水平, 喂以红花油组比喂猪油组提高 45%。rPL-3 mRNA 水平与上面有类似的情况, 但油脂类型似乎对它无多大影响。

综上所述, 很显然今后动物营养学的主要领域将集中在转录因子在调控代谢过程中的关键酶水平时所起的作用以及受日粮影响的调控蛋白因子的功能上。最引人注目的几个转录因子, CREB、C/EBP α 和 β 已被弄清是调控代谢重要基因的主要因子。此外, 那些把转录和激素及日粮信号联接起来的调控蛋白也将逐渐被确定, 这将进一步扩展我们对代谢在分子水平调控的了解, 弄清代谢物对基因转录调控的机理。

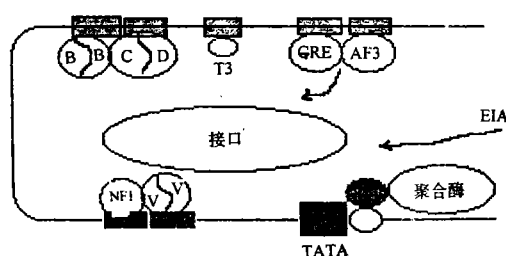


图 5 PEPCK 基因转录调控模式图

Fig. 5 Model for the regulation of transcription from the PEPCK promoter

NF1——核因子; B——CAAT / 增强子结合蛋白 (C / EBP); C——Jun; D——Fos; V——可变因子, 包括 C / EBP α , C / EBP β , FFos, Jun, cAMP 响应元件结合蛋白 (CREB); T₃——甲状腺激素受体; GRE——糖皮质激素受体; AF——辅助因子

参考文献

- Austin L G, Edwards A P, Jinsong L, Warta G, Mary M M, Yashomita M P, Deborah R C, Steven E N, Summer S, Richard W H. 1994. Metabolic Regulation of Gene Transcription. *J Nutr.*, 124:1533s-1539s
- Bremel R D, Yom H C, Blech G T. 1989. Alteration of milk composition using molecular genetic. *J Dairy Sci.*, 72:2826-2833
- Chivia J C, Kwok R P S, Lamb N, Gagiwara M, Montminy M R, Googman M C. 1993. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CRP. *Nature (lond)*, 365:855-860
- Douglas W B, Bin H, Roger G D, Roy J M. 1994. Low Protein Diets Increase Neuropeptide Y Gene Expression in the Basomedial Hypothalamus of Rats. *J Nutr.*, 124:1152-1160
- Faber S, O'Brien R M, Imai E, Granner D K, Chalkely R. 1993. Dynamic aspects of DNA / protein interactions in the transcriptional initiation complex and the hormone-sensitive domains of the PEPCK pro-

- moter in vivo. *J Biol. Chem.*, 268:24976~24985
- Hammer R E, Pursel V G, Rexroad C E, Wall R J, Bolt D J, Ebert K M, Palmiter R D, Brinster R L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature.*, 315:680~683
- Mercier J C. 1987. Genetic engineering applied to milk producing animals: some expectations, in: *Exploiting new Technologies in Animal Breeding* (Smith C. King J W, McKay J C, Eds.), PP.122~131, Oxford University Press
- Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E, Trumbauer M E, Rosenfeld M G, Birnberg N C, Evans R M. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein - growth hormone fusion genes. *Nature.*, 300:611~615
- Polge E J C, Boston S C, Surani M A H, Miller J R, Wagner T, Rottman F, Camper S A, Elson K, Davis A J, Good J A, Foxcroft G R, Heap R B. 1989. Induced expression of a bovine growth hormone construct in transgenic pigs, in: *Biotechnology in growth regulation* (Heap R B, Prosser C G, Lamming G E, Eds.), pp. 189~199, London; Butterworth
- Quinn P G, Granter D L. 1990. Cyclic AMP - dependent protein kinase regulates transcription of the P - enolpyruvate carboxykinase gene but not binding of nuclear factors to the cAMP regulatory element. *Mol. Cell Biol.*, 7:3357~3364
- Rees W D, Flint H J, Fuller M F. 1990. A molecular biological approach to reducing dietary amino acid needs. *Biotechnology.* 8:629~633
- Rees W D, Hay M, Flint J. 1992. Expression of Escherichia Coli homoserine Kinase in mouse 3T3 cells. *Biochem J.*, 281
- Ricketts J, Brannon P M. 1994. Amount and type of dietary fat regulate pancreatic lipase gene expression in rats. *J Nutr.*, 124:
- Roesler W J, Vandenbark G R, Hanson R W. 1988. Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J Biol. Chem.*, 263:9063 - 9068
- Vize P D, Michalska A E, Ashman R, Lloyd B, Stone B A, Quinn P, Wells J R E, Seamark R F. 1988. Introduction of growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth. *J Cell Sci.*, 90: 295~300
- Ward K A, Nancarrow C D, Byrne C R, Shanahan C M, Murray J D, Leish Z, Townbow C R, Rigby N W, Wilson B W, Hunt C L. 1990. The potential of transgenic animals for improved agricultural productivity. *Rev. Sci. Tech. Off. Epiz.*, 9:847~864
- Ward K A, Byrne C R, Wilson B W, Leish Z, Rigby N W, Townbow C R, Hunt C L, Murray J D, Nancarrow C D. 1991. The regulation of wool growth in transgenic animals. *Adv. Dermatol.*, 1:70~76
- Ward K A, Franklin I R, Murray J D, Nancarrow C D, Raphael K A, Rigby N W, Byrne C R, Wilson B W, Hunt C L. 1986. The direct transfer of DNA by embryo microinjection. in: *Proc. 3rd World Congress Genetics Applied to Livestock Production* (Dickerson G E, Johnson R K, Eds.), Lincoln, Nebraska, Vol. X II, pp. 6~12, University of Nebraska
- Wiegert M, Hoover J L, McGrane M M, Hanson R W, Rottman F M, Holtzman S H, Wagner T E, Pinkert C A. 1990. Production of transgenic pigs harbouring a rat phosphoenolpyruvate carboxykinase - bovine growth hormone fusion gene. *J Reprod. Fert. Suppl.*, 41:89~96.066
- Wolf E, Rapp K, Brem G. 1991. Expression of metallothionein - human growth hormone fusion genes in transgenic mice results in disproportionate skeletal gigantism. *Growth.*, 55:117~127

USE OF TRANSGENIC ANIMALS IN ANIMAL NUTRITION

Li Jianfan

(Institute of Animal Science, CAAS, Beijing, 100094)

ABSTRACT

This paper reviewed the use of transgenic animal in animal nutrition. As a model, transgenic animal can be used to investigate the promotional acting of growth and metabolism of foreign gene to the animal. The gene can promote the growth rate, efficiency of feed utilization and the composition of the animal carcass, another way is to introduce a new metabolic pathways, by this way new substance can be biosynthesized so that the animal performance can be improved. In another respect, nutrients also regulate the expression of some genes which can affect animal growth.

Key words: Transgenic animal, Animal nutrition, Biochemistry