

文章编号:1000-0615(2008)06-0965-06

· 综述 ·

鱼类解偶联蛋白(UCP)基因研究新进展

梁旭方, 王琳, 马旭

(暨南大学生命科学技术学院, 广东 广州 510632)

关键词: 鱼类; UCP 基因家族; 表达调控; 活性氧; 细胞凋亡; 脂肪酸氧化

中图分类号: S 917

文献标识码: A

通过生理性解偶联调节氧化磷酸化效率, 兼顾 ATP 的有效合成与抑制呼吸链活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的过量生成, 可能是进化早期发展起来对生命存在至关重要的一种普遍策略, 其分子机理是目前国内外研究的热点^[1]。解偶联蛋白 (uncoupling protein, UCP) 领域研究正快速发展, 并不断有新的家族成员被发现, 其功能不仅涉及氧化代谢、ATP 合成、细胞毒作用等最基本生命活动, 而且被证实与肥胖、糖尿病等严重危害人类健康的疾病有关。

1 UCP 基因家族与结构特征

1.1 UCP 基因家族

UCP1 基因结构在小鼠、大鼠、人和鱼中高度保守, 均由 6 个外显子构成, 每个外显子都有编码序列, 均编码一个跨膜结构域。UCP1 基因定位于小鼠染色体 8、大鼠染色体 19、人染色体 4 和斑马鱼染色体 1。人 UCP1 基因编码 307 个氨基酸, 斑马鱼和鲤鱼 UCP1 基因编码 309 个氨基酸, 红鳍东方鲀 UCP1 基因编码 303 个氨基酸。

UCP2 和 UCP3 基因位点在哺乳类和鱼类中都非常靠近, 均有 6 个外显子有编码功能。此外, UCP2 和 UCP3 基因 5' 端还各有 2 个和 1 个非翻译外显子, 因此 UCP2 和 UCP3 基因分别由 8 个

和 7 个外显子组成。人和小鼠 UCP2 基因均位于 UCP3 终止密码子下游 7~20 kb, 二者的形成可能是基因加倍的结果。UCP3-UCP2 位点分别位于小鼠染色体 7、人染色体 11(11q13, 在遗传标记 D11S916 和 D11S911 之间)、大鼠染色体 1、猪染色体 9 和斑马鱼染色体 10。我们的研究发现, 虽然鱼类 UCP2 基因结构与人类、小鼠的非常相似, 各外显子长度也几乎一样, 但鱼类 UCP2 基因内含子长度比哺乳类短^[2]。人 UCP2 基因编码 309 个氨基酸, 斑马鱼和鲤 UCP2 基因编码 310 个氨基酸, 红鳍东方鲀 UCP2 基因编码 297 个氨基酸。

人 UCP3 基因编码 312 个氨基酸, 斑马鱼 UCP3 基因编码 305 个氨基酸, 红鳍东方鲀 UCP3 基因编码 292 个氨基酸。人的 UCP3 基因有两种剪接体^[3], 由最后一个内含子选择性剪接产生。此外, 小鼠、人 UCP2 基因在外显子 2 里有一个开放阅读框, 编码一段 36 个氨基酸的肽链, 其可能功能现为关注热点。

脑中 UCP 同源物包括 UCP4 与 UCP5 (即 BMCP1, brain mitochondrial carrier protein-1)。人 UCP4 定位于 6p11.2-q12, 靠近遗传标记 SHGC-34952。人 UCP5 定位于 X 染色体 (Xq25-26), 在遗传标记 DXS1206 和 DXS1047 之间。UCP4 和 UCP5 也被报道有不同长度的异构体, 不同异构体在组织中表达的丰度不同。目

收稿日期: 2007-09-21

资助项目: 国家自然科学基金(30670367); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2007AA09Z437); 广东省自然科学基金(031886); 教育部留学回国人员科研启动基金项目

作者简介: 梁旭方(1965), 男, 湖北武汉人, 博士, 教授, 从事鱼类功能基因研究。E-mail: tliangxf@jnu.edu.cn

前,UCP4在鱼类等变温动物中也被证实存在,但UCP5目前仅在哺乳类中被发现。

1.2 UCP 结构特征

UCP是完整的膜蛋白,相对分子质量介于31~34 ku,其中UCP4和UCP5肽链的C端多出一段,是较大的蛋白质,相对分子质量为36~38 ku。所有UCP都是碱性蛋白质,等电点在9左右,均具有三重结构,每个重复都有两个疏水区域与跨膜 α -螺旋相对应。多肽链跨越脂双层6次,N端和C端则伸入线粒体膜间隙。每个重复中的两个螺旋均由一个长亲水性环连接,长亲水性环位于线粒体的基质侧。只有两个同样的UCP形成的同源二聚体才有功能^[4]。

UCP的线粒体定位序列并不在N端。有研究表明,UCP1第一个带正电荷的基质环可能是线粒体定位序列,该环可以和hTom20相互作用,hTom20已被证实是线粒体外膜输入复合体(outer mitochondrial membrane import complex)中的一个重要受体蛋白UCP1另含有两个hTom20结合位点,在第二个跨膜结构域和第二个基质环上,而第二个基质环上的位点对于定位和插入线粒体内膜至关重要。

UCP等线粒体转运蛋白显示出载体蛋白的一般属性,包括高底物特异性和低转换数。二羧酸载体蛋白似乎是与UCP最相近的载体蛋白,因为它含有部分的UCP标签序列。UCP1第三个基质环缺失9个氨基酸即呈现孔道状态,可允许相对分子质量至少为1000 u的分子渗透,表明UCP1的这一突变体更像是通道蛋白而不是载体蛋白。载体和通道的双重行为在许多其他载体蛋白中也被观察到,可能暗示载体蛋白和通道蛋白有共同的起源和共同的基本运输机制。从结构上来看,UCP1核心有一亲水性转运通道,进入该通道由特定的阀门控制。目前的观点认为,UCP1的跨膜 α -螺旋束形成亲水性通道,而基质环则形成可以开启和关闭的阀门。

UCP的第一个、第二个、第四个 α -螺旋和第二个基质环均含有标签序列,第一个 α -螺旋和第二个基质环中的标签序列也许与脂肪酸结合转运位点有关^[5]。对UCP序列基元进行分析表明,所有UCP都含有在UCP1中被鉴定认为对嘌呤核苷酸结合非常重要的残基。

2 UCP 家族的表达调控与功能

2.1 UCP1 的表达调控与功能

UCP1是哺乳类褐色脂肪组织的解偶联蛋白,它允许质子重新回到基质,使呼吸与ATP合成解偶联,从而使生物氧化产生的能量以热的形式散发。这种产热机制被认为是1.4亿年前出现的恒温有胎盘哺乳动物的一个单起源特征,对冷环境中生命的存在十分重要^[6,7]。褐色脂肪组织UCP1 mRNA水平在冷暴露仅15 min即开始上升。大鼠、小鼠、人UCP1基因5'侧翼区均发现有顺式作用元件,其中有一200 bp作用很强的增强子被认为与UCP1组织特异性表达和激素调节有关。增强子是个多元件的复合体,包括cAMP、视黄酸、甲状腺激素、噻唑烷二酮类药物及其它一些调节因子的应答元件。在鲤鱼中,UCP1基因主要在肝脏中表达,暴露于冷环境则表达量急剧减少,这与哺乳动物UCP1的表达调控正好相反。此外,鲤鱼UCP1基因也发现在脑中表达,冷诱导后表达量提高2倍,线粒体质子泄漏特征与哺乳动物相似,但鱼类等冷血动物UCP1的生理意义尚需进一步研究^[6-7]。

UCP1蛋白质功能的调节机制已经被很好地研究确立。UCP1的两个关键配体控制其活性:核苷酸和脂肪酸。嘌呤核苷酸从胞质侧与UCP1蛋白质结合,抑制质子通过。核苷酸的抑制作用可以被其协同因子等调节。 Mg^{2+} 、碱性pH及脂肪酸均可阻止核苷酸对UCP1的抑制作用。去甲肾上腺素可促进脂肪降解,这样产生的脂肪酸不仅是氧化呼吸的底物,也可激活UCP1,因而在功能上脂肪酸相当于去甲肾上腺素的第二信使。

2.2 UCP2 的表达调控与功能

由于UCP2与UCP1存在较高同源性,所以最初对于UCP2的研究集中于与UCP1相似的参与生热作用的生理功能^[8-9]。UCP2基因在南极鱼*Pachycara brachycephalum*抵抗极端环境低温胁迫过程中可能发挥关键作用^[10]。然而,UCP2基因在斑马鱼和鲤鱼等热带、温带鱼类普遍存在并高水平表达,说明UCP2可能还具有除了生热作用以外的其它生理功能。

UCP2启动子不含TATA盒而富含GC,并另含有转录因子Sp1、AP-1、AP-2、CREB、肌肉调节素(MyoD)、糖皮质激素受体等的潜在结

合基序。计算机软件分析(in silico 分析)预示 UCP2 启动子有 BAT 调节元件、CCAAT box、Y box 等,后两个可能与 UCP2 在动物组织的普遍表达有关。UCP2 启动子(-86/-44 bp)对 PPAR γ 起反应,该区域还包含 Sp1 结合位点及固醇应答元件(SRE)、双 E 盒等顺式调控元件^[11]。对 UCP2 启动子-879 到-839 bp 进行分析,发现存在芳香烃受体核转位因子(ARNT)与芳香烃受体(AHR)的异源二聚体以及 ARNT 同源二聚体与组织缺氧可诱导因子 1a(HIF1a)聚合物的结合位点,HIF1a 结合位点的存在表明组织缺氧和有毒信号与 UCP2 表达之间有关联。此外,有研究表明位于 UCP2 外显子 2 中的开放阅读框可顺式下调 UCP2 的翻译水平,但确切分子机制尚待进一步研究。

瘦素可上调 UCP2 的转录,瘦素过量表达使胰岛 UCP2 mRNA 增加 6 倍,提高线粒体和过氧化物酶体氧化酶的 mRNA 含量,同时减少脂肪合成酶类的 mRNA^[12]。瘦素处理使得白色脂肪组织 UCP2 mRNA 上调为原来的 10 倍,而对瘦素受体有缺陷的肥胖大鼠则不起作用,这表明 UCP2 可能与脂质代谢有关。UCP2 过量表达能抑制葡萄糖激活的胰岛素分泌,UCP2 基因敲除小鼠的 β -细胞对葡萄糖做出应答时分泌更多的胰岛素,同时 ATP 的水平也较高^[13]。由于 ATP 产量增加 1%将使脂肪每年增加~1 kg,因而 UCP2 可能涉及体重调节。UCP2 基因启动子已经发现一个多态性位点-866 G/A,与肥胖风险减小显著相关。肥胖风险减小与机体脂肪组织 UCP2 mRNA 表达升高有关^[14]。

在虹鳟中,发现了 UCP2A 和 UCP2B 两个基因,其氨基酸序列同源性高达 93%。UCP2B 与其他脊椎动物 UCP2 表达模式相似,在禁食初期肌肉中 UCP2B mRNA 表达量升高,在继续喂食后表达量降低。然而,肌肉组织中 UCP2A 的 mRNA 量则在禁食后减少。由此推断,UCP2A 可能是 UCP2B 基因的复本,由于经历了不同的进化过程,形成了不同的表达模式,并可能在代谢中发挥不同的作用。两个基因在氨基酸序列上的差异和在启动子区域中顺式作用元件的不同,以及胚胎发育过程中表达相似而孵化后出现越来越大的不同,也进一步证实该结论^[15-16]。我们对具 2 种不同贮脂器官之海水鱼类真鲷研究结果表

明,其 UCP2 基因在氧化活性高的肝脏大量表达,且表达十分稳定,而在氧化活性低的腹腔肠系膜脂肪组织则仅有痕迹量表达,真鲷肝脏和腹腔肠系膜脂肪组织 UCP2 基因表达水平的强烈反差,与两种贮脂器官完全不同的氧化活性相一致。真鲷肝脏由于富含脂肪,通过诱导 UCP2 基因表达可促进脂质底物消耗,同时抑制胞内 ROS 的过量生成与肝细胞凋亡的发生^[17]。

肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)和其它“致热”细胞因子引起的 UCP2 转录上调支持其作为产热效应物的观点。脂多糖使肝脏 UCP2 mRNA 水平增加 28 倍,肌肉和白色脂肪组织增加 5 倍,而这一效应能被解热剂(吲哚美辛)所抑制。IL-1 β 和 TNF α 分别使肝脏 UCP2 mRNA 增加 4 倍和 3 倍。由于 TNF α 能激活 NF- κ B 途径,使谷胱甘肽减少细胞内 ROS 的生成,因而 UCP2 水平的上调可能是抑制 ROS 的过量产生。UCP2 基因敲除小鼠的巨噬细胞活性增强,这些小鼠对刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)感染有强抵抗力,表明缺失 UCP2 导致巨噬细胞 ROS 合成增加,杀灭病原活性增强。我们的研究发现,UCP2 基因在鱼类微囊藻毒素(可通过产生大量 ROS 而对肝脏具有强致毒作用)去毒代谢中可能具有重要功能。在 5 种主养中国鲤科鱼中,肝脏 UCP2 表达水平随其所摄食物中微囊藻毒素含量升高而升高,尼罗罗非鱼腹腔注射微囊藻毒素 24 h 后 UCP2 基因 mRNA 表达水平也显著上调^[2,18]。

2.3 UCP3 的表达调控与功能

UCP3 和 UCP2 在染色体上连锁,因而它们的调节也有某些相似之处,但它们的组织分布不同。UCP3 mRNA 主要发现存在于骨骼肌、心脏、褐色脂肪组织,在人的甲状腺、骨髓中也发现有痕量表达。骨骼肌 UCP3 基因的转录受到严格调控,但其控制的分子机理还没有完全研究清楚。人 UCP3 基因邻近 5'侧翼区发现含有 E 盒、肌细胞增强因子-2(myocyte enhancer factor-2, MEF2)基序及 PPAR、甲状腺激素应答元件,但这些元件的调控作用尚待进一步研究^[1]。

三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T₃)处理使褐色脂肪组织和骨骼肌中 UCP3 mRNA 表达均上调,而冷处理只能使褐色脂肪组织中 UCP3 基因表达上调。在喂食油酸或禁食的小鼠骨骼肌

UCP3 mRNA 表达水平提高, BRL49653 处理 C2C12 细胞也促进其 UCP3 表达, 上述诱导作用均与过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 及脂质作为能源供体有关。Gustafsson 等^[19]发现胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor type 1, IGF-1) 被发现能上调 UCP3 表达, 而瘦素对其表达则有抑制作用, 在缺乏瘦素的 *ob/ob* 小鼠骨骼肌中 UCP3 表达增加。有关冷血动物 UCP3 研究尚少, UCP3 mRNA 仅在鲤鱼的骨骼肌中发现, 禁食状况下其表达水平增加 5 倍, 这与禁食后脂质作为能源主要供体相一致^[6-7]。

UCP3 基因敲除小鼠没有发现肥胖现象, 血清胰岛素、甘油三酯、瘦素水平正常, 体温、运动生理节律正常, 对禁食、T₃ 处理及冷暴露体温应答反应亦正常。其骨骼肌线粒体 H⁺ 泄漏减少 (与肝脏 UCP2 泄漏无变化相对照), 基本代谢率和呼吸交换率与对照小鼠相同, 而骨骼肌 ROS 产量极大地增加^[20-21]。上述 UCP3 基因敲除小鼠研究结果证实, UCP3 敲除不影响体重调节、运动耐力、脂肪酸氧化及冷诱导产热, 但可能尚无法排除某些补偿机制的存在。UCP3 基因敲除小鼠研究还提供了 UCP3 体内解偶联活性的更好证据。Cline 等^[22]的研究表明, UCP3 基因敲除小鼠整体能量支出没有变化, 三羧酸循环速率也没有改变, 但由于 UCP3 敲除使骨骼肌 ATP 合成能量损耗消除, 其骨骼肌 ATP 合成速率增加 4 倍, 导致 ATP:ADP 比率由 4.5 增至 5.9。

3 UCP4 和 UCP5 研究进展

UCP4 和 UCP5 同 UCP 家族的核心成员关系较远, 虽然其功能还不完全清楚, 但很可能与 UCP2 和 UCP3 的功能相似^[1]。UCP4 最有可能是祖先 UCP 的原型, 其它动植物 UCP 由它变异而来。到目前为止, 比较基因组学、系统发生及基因表达分析等方法研究结果表明, 除 UCP5 之外的所有 UCP 均存在于变温硬骨鱼类中。这一发现否定了 UCP1 在有胎盘哺乳动物中的单一起源性质, 表明 UCP 家族至少 4 个成员在大约 4.2 亿年前辐鳍脊椎动物和叶鳍脊椎动物支系分支前就已经存在^[6-7]。

UCP4 可能在哺乳动物脑细胞抗凋亡过程中起作用, 在简单的多细胞生物体中 UCP4 同源物

的早早出现支持这一猜测。正如其它 UCP, UCP4 和 UCP5 的温和解偶联可能三个基本作用: 轻微加快呼吸速率和代谢率, 抑制 ROS 过量形成, 同时还必然会伴随温和产热。

线粒体对于满足突触的 ATP 需求和调节钙离子动态平衡起关键作用, 线粒体功能紊乱可引起突触功能障碍和退化, 甚至引起神经细胞死亡。神经元线粒体 UCP4 通过抑制氧自由基产生并稳定细胞内钙离子动态平衡, 从而避免 ROS 诱发的神经元凋亡而保护神经系统。此外, UCP4 和 UCP5 还可能与脑神经元的分化有关。

参考文献:

- [1] Krauss S, Zhang C Y, Lowell B B, *et al.* The mitochondrial uncoupling-protein homologues [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6 (3): 248-261.
- [2] Liao W Q, Liang X F, Wang L, *et al.* Structural Conservation and Food Habit-related Liver Expression of Uncoupling Protein 2 Gene in Five Major Chinese Carps [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2006, 39(4): 346-354.
- [3] McLeod C J, Aziz A, Hoyt R F, *et al.* Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(39): 33470-33476.
- [4] Yamaguchi H, Jelokhani-Niaraki M, Kodama H. Second transmembrane domain of human uncoupling protein 2 is essential for its anion channel formation [J]. *FEBS Lett*, 2004, 577(1-2): 299-304.
- [5] Ježek P. Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins UCPn [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002, 34 (10): 1190-1206.
- [6] Jastroch M, Wuertz S, Kloas W, *et al.* Uncoupling protein 1 in fish uncovers an ancient evolutionary history of mammalian nonshivering thermogenesis [J]. *Physiol Genomics*, 2005, 22 (2): 150-156.
- [7] Jastroch M, Buckingham J A, Helwig M, *et al.* Functional characterisation of UCP1 in the common carp: uncoupling activity in liver mitochondria and cold-induced expression in the brain [J]. *J Comp Physiol B*, 2007, 177: 743-752.
- [8] Stuart J A, Harper J A, Brindle K M, *et al.* Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1413: 50-54.
- [9] Alexander P K, Randy W R, Adrian K W, *et al.*

- Shive-ring, muscle tone, and uncoupling proteins in a developing marsupial, the *Tasmanian bettong* (*Bettongia gaimardi*) [J]. *J Thermal Biol*, 2007, 32: 282 - 292.
- [10] Mark F C, Lucassen M, Pärtner H O, *et al.* Thermal sensitivity of uncoupling protein expression in polar and temperate fish [J]. *Comp Biochem Physiol D*, 2006, 1: 365 - 374.
- [11] Esterbauer H, Schneitler C, Oberkofler H, *et al.* A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans [J]. *Nat Genet*, 2001, 28 (2): 178 - 183
- [12] Gnanalingham M G, Mostyn A, Wang J, *et al.* Tissue - specific effects of leptin administration on the abundance of mitochondrial proteins during neonatal development [J]. *J Endocrinol*, 2005, 187 (1): 81 - 88.
- [13] Lee S H, Lee H Y, Kim S Y, *et al.* Enhancing effect of taurine on glucose response in UCP2-overexpressing beta cells [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2004, 66 (1):69 - 74.
- [14] Esterbauer H, Oberkofler H, Linnemayr V, *et al.* Peroxi-some proliferator activated receptor gamma coactivator-1 (PPARGC1/PGC1) gene locus: association with obesity indices in middle-aged women [J]. *Diabetes*, 2002, 51:1281 - 1286.
- [15] Issa C, Scott A G, Yniv Palti, *et al.* Genomic structure and expression of uncoupling protein 2 genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *BMC Genomics*, 2006, 7: 203 - 216.
- [16] Coulibaly I, Gahr S A, Yao J, *et al.* Embryonic expression of UCP2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2006, 32: 249 - 253.
- [17] Liang X F, Ogata H Y, Oku H, *et al.* Abundant and constant expression of uncoupling protein 2 in the liver of red sea bream *Pagrus major* [J]. *Comp Biochem Physiol A*, 2003, 136 (3): 655 - 661.
- [18] Wang L, Liang X F, Liao W Q, *et al.* Structural and functional characterization of microcystin detoxification-related liver genes in a phytoplanktivorous fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2006, 144: 216 - 227.
- [19] Gustafsson H, Tamm C, Forsby A. Signalling pathways for insulin-like growth factor type 1-mediated expression of uncoupling protein 3 [J]. *J Neurochem*, 2004, 88, 462 - 468.
- [20] MacLellan J D, Gerrits M F, Gowing A, *et al.* Physio-logical increases in uncoupling protein 3 augment fatty acid oxidation and decrease reactive oxygen species production without uncoupling respiration in muscle cells [J]. *Diabetes*, 2005, 54 (8): 2343 - 2350.
- [21] Talbot D A, Brand M D. Uncoupling protein 3 protects aconitase against inactivation in isolated skeletal muscle mitochondria [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2005, 1709 (2): 150 - 156.
- [22] Cline G W, Vidal-Puig A J, Dufour S, *et al.* In vivo effects of uncoupling protein-3 gene disruption on mitochondrial energy metabolism [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 20240 - 20244.

Recent research progress in fish uncoupling protein gene

LIANG Xu-fang, WANG Lin, MA Xu

(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The regulation of energetic efficiency through the physiological uncoupling of oxidative phosphorylation may be a common strategy developed early in evolution. Uncoupling protein families are transporters in mitochondrial inner membrane. There are five *UCP* homologs in mammalian genome. *UCP1* - 3 are closely related with each other, while *UCP4* and *UCP5* (also called brain mitochondrial carrier protein - 1, *BMCP1*) differ from them greatly. *UCP1* - 4 were discovered not only in endotherms such as mammals and birds, but also in ectothermic vertebrates such as fish and amphibia. *UCP5* was identified only in mammals. *UCP1*, which is only expressed in mammalian brown adipose tissue, mediates proton leakage of the proton gradient that is generated by the respiratory chain, and as a result, the oxidative energy is dissipated as heat. *UCP2* and *UCP3* function both in fever, ROS inhibition, fatty acid oxidation, the development of obesity and type 2 diabetes mellitus and so on. Their expression regulations are complex. *UCP4* and *UCP5* diverge from other *UCP* further. *UCP4* is uniquely expressed in brain, whilst *UCP5* transcripts are present in multiple tissues, with an especially high abundance in brain. Their functions are still unclear, but they have been implicated in processes similar to those suggested for *UCP2* and *UCP3*.

Key words: fish; uncoupling protein (*UCP*) ; gene family; expression regulation; reactive oxygen species (*ROS*); apoptosis; fatty acid oxidation