

## 不同品系肉鸡 *Gimap5* 基因的表达与功能

张婉婷, 吴官县, 徐思凡, 王秋媛, 刘洋, 满朝来

哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025

张婉婷, 吴官县, 徐思凡, 等. 不同品系肉鸡 *Gimap5* 基因的表达与功能. 生物工程学报, 2020, 36(2): 259–266.

Zhang WT, Wu GX, Xu SF, et al. Expression and function characterization of *Gimap5* gene from different breeds of broilers. Chin J Biotech, 2020, 36(2): 259–266.

**摘要:** GTP 酶免疫相关蛋白 5 (GTPase immune-associated protein 5, *Gimap5*) 参与 T 细胞稳态调控, 在免疫和炎症反应等过程中发挥重要作用, 但其在禽类中的功能与特性研究未见报道。文中以 AA<sup>+</sup>肉鸡和三黄鸡为模式动物, 利用 RT-PCR 克隆 *Gimap5* 基因全长编码序列并进行生物信息学分析, RT-qPCR 技术分析 *Gimap5* 基因的组织表达分布特性及其在炎症反应中的功能特性。AA<sup>+</sup>肉鸡和三黄鸡 *Gimap5* 基因全长编码序列均为 771 bp, 编码 256 个氨基酸, 在不同物种间保守性较低。*Gimap5* 蛋白 N-末端 AIG-1 结构域和 C-末端跨膜序列的  $\alpha$ -螺旋结构分别在蛋白功能和细胞定位中可能发挥重要作用。*Gimap5* 基因在 AA<sup>+</sup>肉鸡和三黄鸡各组织中均有表达且变化规律相似, 但两品系鸡之间或同一品系鸡不同组织间表达活性存在差异。在炎症反应中, *Gimap5* 基因在血和肝脏中活性均显著下调 ( $P < 0.05$ ), 而在法氏囊中显著上调 ( $P < 0.01$ )。推测 *Gimap5* 是一个参与机体发育和炎症免疫反应的多功能基因, 并具有炎症反应诊断标记物的潜在应用价值。

**关键词:** *Gimap5* 基因, AA<sup>+</sup>肉鸡, 免疫, 发育, 炎症

## Expression and function characterization of *Gimap5* gene from different breeds of broilers

Wanting Zhang, Guanxian Wu, Sifan Xu, Qiuyuan Wang, Yang Liu, and Chaolai Man

College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, Heilongjiang, China

**Abstract:** GTPase immune-associated protein 5 (*Gimap5*), a key factor in maintaining T cell homeostasis, plays important roles in immune and inflammatory processes. However, its function and characteristics in poultry have not been reported. In this study, AA<sup>+</sup> and Sanhuang broilers were used as models. The full-length coding sequence of the *Gimap5* gene was cloned by RT-PCR and analyzed using bioinformatic methods. Tissue expression and distribution characteristics of the *Gimap5* gene and its functional characteristics in inflammatory response were analyzed by RT-qPCR, respectively. The full-length coding sequences of the *Gimap5* gene from AA<sup>+</sup> and Sanhuang broilers were 771 bp, encoding 256 amino acids, and presented low

**Received:** May 29, 2019; **Accepted:** August 16, 2019

**Supported by:** Science Foundation of Heilongjiang Province (No. LH2019C073), Master's Innovation Program of Harbin Normal University (No. HSDSSCX2018-55).

**Corresponding author:** Chaolai Man. Tel: + 86-451-88060576; E-mail: manchaolai@126.com

黑龙江省科学基金 (No. LH2019C073), 哈尔滨师范大学硕士研究生创新项目 (No. HSDSSCX2018-55) 资助。

网络出版时间: 2019-09-09

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190909.0944.001.html>

conservative among different species. The AIG-1 domain of N-terminal and alpha-helix structure of C-terminal transmembrane sequence of might play important roles in the *Gimap5* protein function and cell localization, respectively. The *Gimap5* gene was widely distributed and expressed in various tissues and the pattern of its expression change was basically similar between AA<sup>+</sup> and Sanhuang broilers. However, there were some differences in expression activity between the two breeds or various tissues of the same breed. In inflammatory response, the expression activities of the *Gimap5* gene were down-regulated in blood and liver ( $P < 0.05$ ), but up-regulated in the bursa of Fabricius ( $P < 0.01$ ). It is speculated that *Gimap5* is a multifunctional gene involved in the development of the body and inflammatory response, and has potential application value for diagnostic marker of inflammatory response.

**Keywords:** *Gimap5* gene, AA<sup>+</sup> broiler, immune, development, inflammation

GTP 酶免疫相关蛋白 (GTPase of the immune-associated protein, *Gimap*), 曾命名为免疫相关核苷酸结合蛋白 (Immune-associated nucleotide-binding protein, Ians), 家族成员众多, 该家族蛋白特征是 N-端含有 AIG-1 结构域, 主要表达于淋巴细胞和造血系统细胞<sup>[1-2]</sup>。*Gimap5* 是 GTP 酶免疫相关蛋白家族成员之一<sup>[3]</sup>, 在促进 T 细胞存活方面发挥关键调控作用。例如, 糖尿病大鼠模型的淋巴细胞减少症是由 *Gimap5* 基因移码突变引起的<sup>[4-6]</sup>, 即 *Gimap5* 蛋白羧基端的 215 个氨基酸被 19 个其他氨基酸取代, 导致跨膜区肽链部分缺失, 引发 T 细胞凋亡<sup>[7-8]</sup>。Chen 等<sup>[9]</sup>研究发现维持 T 细胞静息状态需要抑制 mTORC1 通路活性, 当 *Gimap5* 基因缺失时会导致 AKT/mTORC1 通路的组成性激活, 促进 T 细胞减少; Nitta 等<sup>[10]</sup>在小鼠中发现 *Gimap5* 与抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xL 有关, 可能通过与 Bcl-2 家族成员相互作用, 调节胸腺发育与 T 淋巴细胞存活。此外, *Gimap5* 基因突变还会导致大鼠易患炎症性肠病 (Inflammatory bowel disease, IBD)<sup>[11]</sup>, 相似的情况在小鼠中也有发生, 即 *Gimap5* 基因突变小鼠易患结肠炎, 原因可能是机体淋巴细胞减少会诱导 CD<sup>4+</sup>T 细胞增殖和发挥效应, 进而诱发肠道炎症<sup>[12]</sup>。

目前, 鸡免疫和炎症性肠病仍是困扰禽业生产的主要问题, 而关于鸡 *Gimap5* 基因的相关研究未见报道。虽然研究已确凿表明, *Gimap5* 基因是参与细胞免疫和肠道炎症的重要基因<sup>[9-12]</sup>, 但是 *Gimap5* 基因调控淋巴细胞存活和肠炎的作用机制仍不明晰<sup>[13]</sup>。

本研究首次克隆 AA<sup>+</sup>肉鸡和三黄鸡 *Gimap5* 基因全长编码序列, 并进行组织表达谱分析和功能鉴定, 以期为深入研究 *Gimap5* 基因功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与试剂

本研究所用 AA<sup>+</sup>肉雏鸡和三黄鸡购自哈尔滨市香坊养鸡场; 所用 TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒 (FSQ301) 购自 TOYOBO 公司 (上海); 高保真聚合酶 (Pyrobest DNA polymerase) 和 pMD18-T 载体购自宝生物 (大连) 有限公司; 大肠杆菌脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 购自普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司。

### 1.2 *Gimap5* 基因克隆及生物信息学分析

本研究所用引物利用 Primer Premier 5.0 软件设计, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。根据红原鸡 (*Gallus gallus*) *Gimap5* 基因预测序列 (GenBank 登录号: XM\_015281120.2) 设计 PCR 引物 P1 和 P2, 引物序列信息见表 1。采用 TRIzol 试剂提取脾脏总 RNA, 利用逆转录试剂盒 (FSQ301) 合成 cDNA (方法参照试剂说明书)。PCR 反应体系 (25  $\mu$ L) 如下: 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ Taq DNA 聚合酶缓冲液, 2.0  $\mu$ L dNTPs (2.5 mmol/L), 0.8  $\mu$ L 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L), 0.1  $\mu$ L Taq 酶, 0.5  $\mu$ L cDNA (20 ng/ $\mu$ L) 和灭菌去离子水 18.3  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 4 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min, 4  $^{\circ}$ C 终止反应。将 PCR 产物纯化后克隆到 pMD18-T 载体上, 鉴定为阳性的 3 个重组子交由华大基因科技服务

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primer used in this study

Primer name	Sequences (5'-3')
<i>Gimap5</i> primer (P1)	ACCGACAGGCCGTGCTCCTTTGACT
<i>Gimap5</i> primer (P2)	TGTGCCATGTGGGGACTGTGGGATT
<i>Gimap5</i> primer (P3)	TGGTGCAGGAGAACGAGGGCAAGTA
<i>Gimap5</i> primer (P4)	CTCTGCTTTTCCTATCTTCTCTGTA
$\beta$ -actin primer (P5)	GGCACCACACTTTCTACAAT
$\beta$ -actin primer (P6)	TAACACCATCACCAGAGTCCATCAC

(上海)有限公司测序。利用 SOPMA、SWISS-MODEL 和 DNAMAN 等软件对 *Gimap5* 基因的核苷酸序列和氨基酸序列进行生物信息学分析。

### 1.3 *Gimap5* 基因组织表达特性分析

分别随机选取和采集 10 只 14 日龄健康 AA<sup>+</sup>和三黄鸡的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胸腺、大肠、小肠、肌胃、腺胃、皮肤、骨骼肌、脂肪、脑、血和法氏囊等 16 种组织, 迅速置于液氮中冷冻, 并于 -80 °C 保存备用。采用 TRIzol 试剂提取各组织的总 RNA 并合成 cDNA (方法同 1.2)。利用实时定量 PCR (Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) 技术检测 *Gimap5* 基因在 AA<sup>+</sup>雏鸡和三黄鸡各组织中转录表达特性。根据 *Gimap5* 基因编码区设计 RT-qPCR 引物 P3 和 P4。以  $\beta$ -actin (GenBank 登录号: No. NM\_205518) 为内参基因, 内参引物为 P5 和 P6。目的基因 *Gimap5* 与内参基因  $\beta$ -actin 的 RT-qPCR 反应体系剂量以及反应程序相同。20  $\mu$ L 反应体系为: 2  $\mu$ L cDNA (20 ng/ $\mu$ L)、0.6  $\mu$ L 上游引物 (10  $\mu$ mol/L)、0.6  $\mu$ L 下游引物 (10  $\mu$ mol/L)、10  $\mu$ L SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, 上海)、0.4  $\mu$ L 50 $\times$ ROX reference dye 和 6.4  $\mu$ L H<sub>2</sub>O; 反应程序为: 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 4 °C 终止反应。

### 1.4 *Gimap5* 基因在炎症反应中表达特性分析

随机选取健康状况良好、体重相近的 11 日龄 AA<sup>+</sup>雏鸡分为 2 组: 即对照组 (生理盐水接种组) 和试验组 (LPS 接种组), 每组 10 只, 自由采食和饮水。试验组雏鸡从 11 d 开始连续 3 d 腹腔注射 LPS 生理盐水稀释液, LPS 注射量分别为: 50  $\mu$ g/kg (12 d)、50  $\mu$ g/kg (13 d) 和 500  $\mu$ g/kg (14 d), 对照组注射相同剂量的生理盐水。分别收集 14 d 雏鸡 (LPS 处理 72 h) 肝脏、胸腺、法氏囊和脾脏等组织脏器迅速置于液氮中, 并 -80 °C 保存备用<sup>[14]</sup>。分别提取炎症雏鸡模型的血液、肝脏、脾脏、胸腺、法氏囊等几种免疫相关组织总 RNA, 利用 RT-qPCR 技术定量分析 *Gimap5* 基因在各组织脏器中转录活性变化, 具体 RT-qPCR 反应条件同 1.4。

### 1.5 统计分析

本实验随机选取 3 只雏鸡进行定量分析, 每个样品进行 3 次技术重复。RT-qPCR 采用 2<sup>- $\Delta$ Ct</sup> 方法定量分析 *Gimap5* 组织表达谱的相对表达活性, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法定量计算 *Gimap5* 在炎症反应组织中的相对表达活性, 利用 SPSS 20.0 软件对所得数据进行单因素方差分析, 数据利用 GraphPad Prism 5.0 软件进行作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Gimap5* 基因的克隆与序列分析

本实验克隆获得两品系肉鸡 *Gimap5* 基因全长编码序列 771 bp, 每个品系鸡的 3 个重组子测序结果均一致, 编码 256 个氨基酸 (AA<sup>+</sup>肉鸡 GenBank 登录号: MK214432; 三黄鸡 GenBank 登录号: MK214433), 定位于 2 号染色体, 包含 2 个外显子和 1 个内含子。ProtParam 软件分析表明, *Gimap5* 蛋白等电点为 8.10, 分子量为 29 053.33 Da, 不含信号肽。TragetP1.1 软件预测 *Gimap5* 蛋白具有线粒体作用位点 (SP), 这与 Daheron 等<sup>[15]</sup>在线粒体中检测到 *Gimap5* 蛋白结果相一致。利用 ExPaSy-prosite、SMART 和 Predict protein 等软件分析发现 *Gimap5* 蛋白存在 AIG-1 结构域 (1-201 AA)、

跨膜序列 (233–252 AA) 和 3 类功能位点 (1 个 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点、6 个酪蛋白激酶磷酸化位点和 3 个 N-肉豆蔻酰化位点) (图 1)。SOPMA 软件分析表明, *Gimap5* 蛋白二级结构包含  $\alpha$ -螺旋占 51.95% (133 AA)、无规卷曲占 30.86% (79 AA)、延伸链占 14.06% (36 AA) 和  $\beta$  折叠占 3.12% (8 AA) 等几种结构形式。

```

1  ATGCGTCTGCTCCTGGTTGGGAAGACCGGGGGGACGAAGTCCACAGGGAATCCATT
1  M R L L L L V G K T G G G R S A T G N S I
61  CTGGGGGATGTGCCTTCGAGTCCAAGCTGGCCACCAACCAAGTACCCTGAGCTGCCAG
21  L G R C A F E S K L A T K P V T L S C Q
121  AAGCAGACGGGCTCTGGAATGGCCAAGACATCAGATGATCGACACGGCCACATCTTC
41  K A D G L W N G Q D I T V I D T A N I F
181  TATCTGTGGGATGACAAATGCTCCGGTGACAAAGAAATCTTGCACCTGCGTCAAGCTGCTC
61  Y L W D D N A P V H K E I L H C V R L S
241  TTCCCGGGCCCCACGCTCTGCTGTTGGTCACCAACTGGGCGGCTTCAACCAGGAGGAC
81  F P G P H A L L L V T Q L G R F T Q E D
301  CAGGAGCCGTGAAGGCGTGCAGGACGCTTCCGATCCAGCGTGTCCAGATACACGATC
101  Q E A V K G V Q D V F G S S V L R Y T I
361  GTGGTGTTCACCCGTGGAGAGAGCTGGTGTCCAGGACCTGGATGACTACGTGACCTAC
121  V V F T R G E E L V S G T L D D Y V T Y
421  ACTGACACAGAGCTCTGCGTGTGATGATCCAGAGTCCGGGTACAGGTACTGACGATC
141  T D N R A L R D V I Q S C G Y R Y C S I
481  AACACCGGGCCACCAGCGCCGACGGGACCAAGCAGGTCCAGCAGCTGATGGAGAAGTC
161  N N R A T S A E R D Q Q V Q Q L M E K V
541  GTCCAAATGGTGCAGGAGAACGAGGGAAGTACTACAGCAACGAGATGTACCTGGATCCC
181  V Q M V Q E N E G K Y Y S N F M V I D P
601  GGCTTAACGGAAGAGAGGTGATGATCACGTGAAGATGTACAGAGAAGATAGGAAAAGC
201  G L T E E E V M Y H V K M Y R E D R K S
661  AGAGAGCTGCCCTGGTGGAGAAATACTCGAAGTGCCTCATGTTGTTGGGGGGGTGC
221  R E L P W W R K Y S K C L M V V G G G V
721  ATTCTCAGCGCTGTGGTCTCTCAATTTTGCCTTACCCGATGGAAGCCGCTGA
241  I L T A V V L S F C L T R W K P *

```

图 1 AA<sup>+</sup>肉鸡 *Gimap5* 基因核苷酸和氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of the *Gimap5* gene of AA<sup>+</sup> broiler. Initiation codon is shadowed; Asterisk indicates the stop codon; AIG-1 domain (1–220 AA) (single underline) is indicated; Transmembrane sequence (233–252 AA) is indicated with double underline; cAMP and cGMP dependent protein kinase phosphorylation site (227-RKYS-230AA); Casein kinase phosphorylation sites (52-TVID-55AA, 97-TQED-100AA, 124-TRGE-127AA, 133-TLDD-136AA, 139-TYTD-142AA, 165-TSAE-168AA); N-myristoylation sites (9-GGGRSA-16AA, 44-GLWNGQ-49AA, 239-GVILTA-244AA) are boxed; · indicate SNP site. Based on the predicted sequence of the *Gallus gallus Gimap5* gene (XM\_015281120.2), the SNP of AA<sup>+</sup> broilers is 165 nt (T to C), and Sanhuang broiler SNPs are 165 nt (T to C) and 616 nt (A to G), respectively.

利用 SWISS-MODEL 软件对 *Gimap5* 蛋白的三级结构进行模拟预测, 发现 *Gimap5* 蛋白序列 (1–199 AA) 与 3zjc.2 蛋白部分结构 (14–213 AA) 相似 (图 2)。通过比较 13 个物种 *Gimap5* 基因核苷酸编码序列同源性, 结果表明, *Gimap5* 基因在不同物种间同源性较低 (图 3)。*Gimap5* 基因在鸟类 (69%以上) 和哺乳动物类 (67%以上) 各自内部同源性相对较高, 但二类之间的同源性偏低 (55%以上)。*Gimap5* 氨基酸序列进化树分析表明, 鹌鹑和鸡等鸟类形成一簇, 而人、小鼠、猪、大鼠和马等哺乳动物组成另一簇 (图 4)。

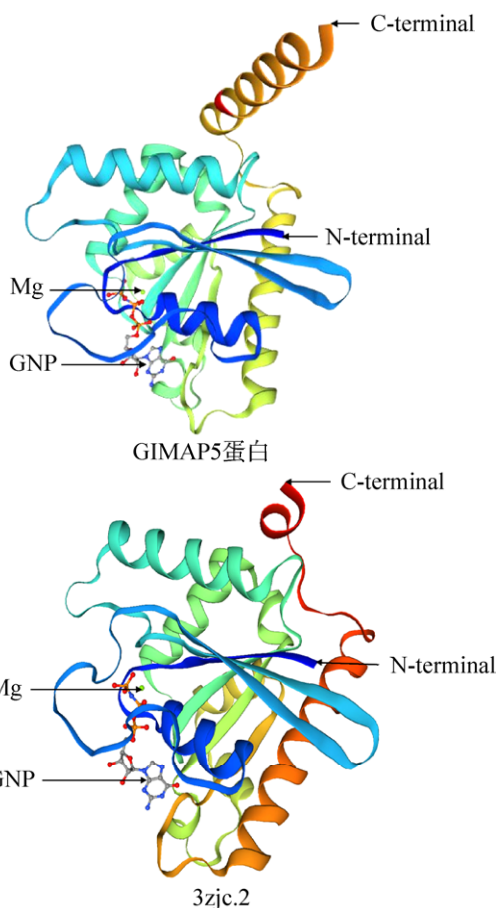


图 2 *Gimap5* 基于 3zjc.2 晶体结构同源性建模

Fig. 2 Homology modeling of the chicken *Gimap5* based on the crystal structure of 3zjc.2. 3zjc.2: GMPPNP-bound human GIMAP7 L100Q variant. *Gimap5* and 3zjc.2 all contain the Mg and GNP (phosphor amino phosphonic acid-guanylate ester) ligands with similar structures, but their structures change at the C-terminal.

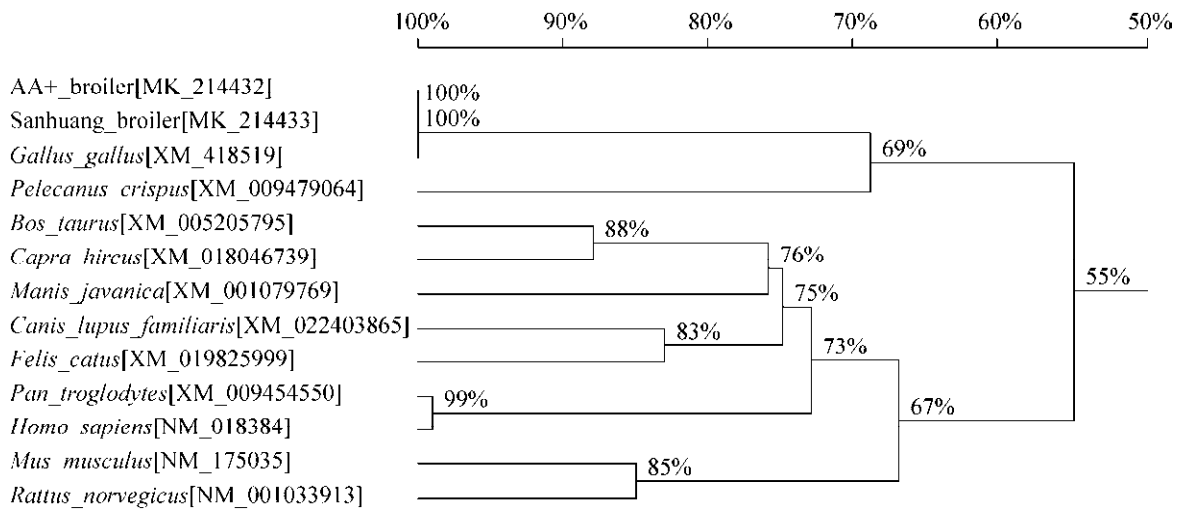


图3 *Gimap5* 核苷酸序列同源性分析

Fig. 3 Homology analysis of the poultry *Gimap5* genes. Analysis was done using the DNAMAN software (<http://www.lynon.com>). Numbers on the branches represent percentage of homology.

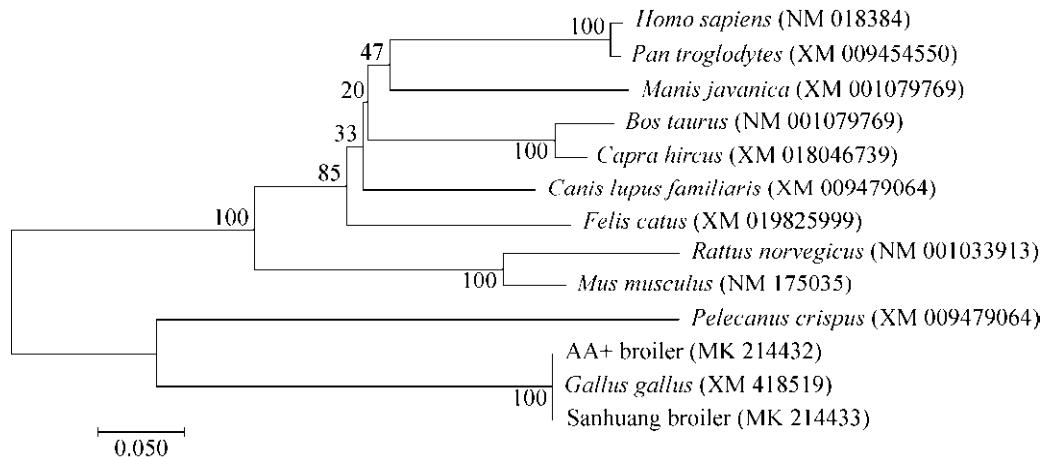


图4 *Gimap5* 氨基酸序列进化性分析

Fig. 4 Evolutionary analysis of *Gimap5* amino acid sequences. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining (N-J) method within MEGA7.0. Numbers on the branches represent bootstrap values for 1 000 replications.

## 2.2 *Gimap5* 基因组织表达谱分析

组织转录表达谱分析表明, AA<sup>+</sup>和三黄鸡 *Gimap5* 基因表达于各个组织脏器, 并且二者间表达变化规律基本相似。例如, *Gimap5* 基因在两品系鸡的胸腺、小肠、大肠、血液和脂肪等器官中转录活性均较高, 而在肝脏、脾脏、肾脏、脑、肌肉、肌胃、皮肤、腺胃等器官中均较低 (图 5)。 *Gimap5* 基因在 AA<sup>+</sup>肉鸡血液中表达活性显著高

于其他组织, 而在三黄鸡小肠中表达活性高于其他组织。

## 2.3 炎症反应中 *Gimap5* 基因的表达活性分析

结果表明, *Gimap5* 基因在实验组雏鸡的血、肝脏和法氏囊等组织中表达活性呈现显著变化, 即在 AA<sup>+</sup>肉鸡的血和肝脏中活性均显著下调 ( $P<0.05$ ), 而在法氏囊中显著上调 ( $P<0.01$ ); *Gimap5* 基因在脾脏和胸腺中的转录活性变化不显著 (图 6)。

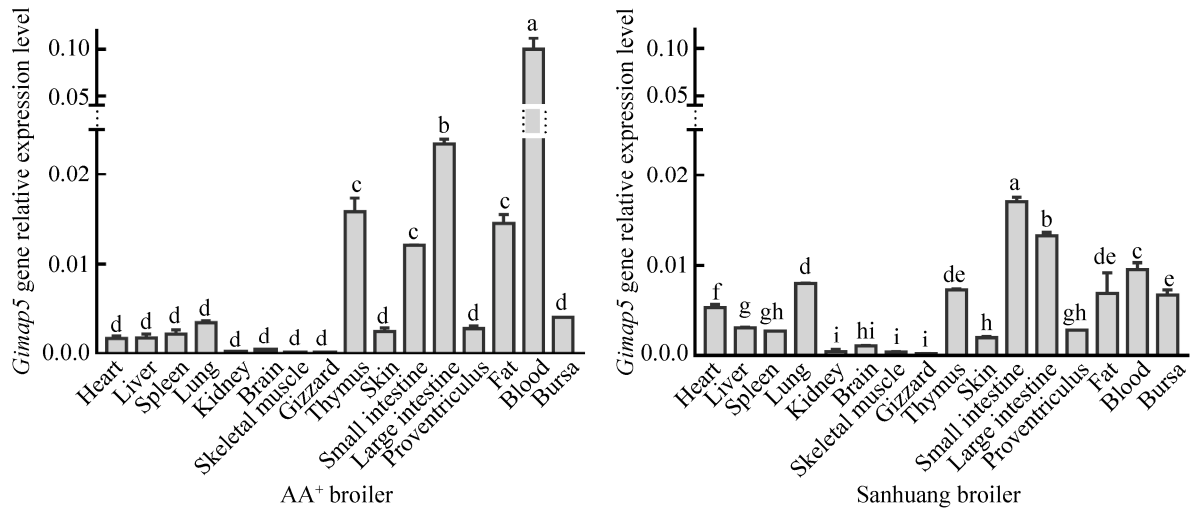


图5 *Gimap5* 在 AA<sup>+</sup>和三黄鸡不同组织中的表达模式

Fig. 5 Expression patterns of *Gimap5* in different tissues of AA<sup>+</sup> and Sanhuang broiler. The internal reference gene is  $\beta$ -actin; Significant difference ( $P < 0.05$ ). Same letters indicate no significant different. Different letters indicate significant difference.

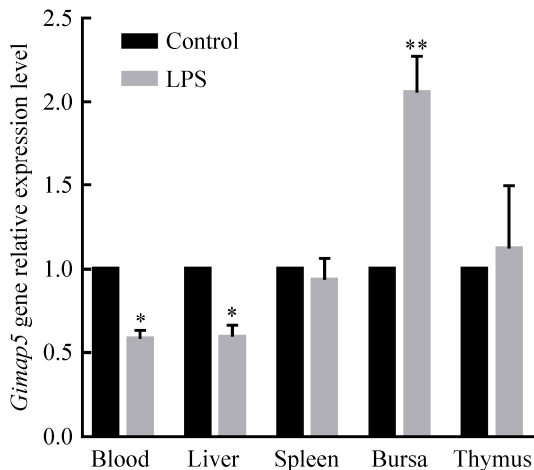


图6 *Gimap5* 基因在炎症反应中的相对表达活性

Fig. 6 Relative expression activity of the *Gimap5* gene in inflammatory response. \* and \*\* indicate differences that are statistically significant at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

### 3 讨论

肉鸡因其生长速度快和饲养周期短等优势已经成为禽业生产的主力军。三黄鸡与 AA<sup>+</sup>肉鸡在生长速率、抗病能力以及肉质风味等方面存在较大差异,这种品系间的天然差异可能为靶基因的表达与功能特性研究提供方便。

将 AA<sup>+</sup>肉鸡和三黄鸡 *Gimap5* 基因测序结果与红原鸡 *Gallus gallus* 进行同源性比较,结果显示两种品系肉鸡均在 165 位核苷酸存在 1 个 SNP 位点 (T→C),同时三黄鸡在 616 位核苷酸存在另一个 SNP 位点 (A→G),但这些 SNP 位点都未导致相应氨基酸改变,表明 *Gimap5* 基因在鸡的不同品系进化过程中高度保守。蛋白结构分析表明鸡 *Gimap5* 蛋白 C-端的  $\alpha$ -螺旋区域即为跨膜序列 (233–252 AA),提示鸡 *Gimap5* 蛋白通过跨膜序列锚定于细胞器膜上,进而通过 N-端的 AIG-1 结构域发挥功能,这与 Dallberg 和 Daheron 等<sup>[15-16]</sup>发现 *Gimap5* 蛋白主要定位于内质网、线粒体和高尔基体等具有膜结构细胞器中检测到结果相印证。3D 结构同源模拟分析,表明 *Gimap5* 与 3zjc.2 空间结构间存在高度相似性, *Gimap7* 蛋白 (3zjc.2 的突变体) 能够激活 *Gimap2* 蛋白 GTP 酶,进而在淋巴细胞存活中发挥作用<sup>[17-18]</sup>, *Gimap5* 是否具有 *Gimap7* 相似的作用有待后续研究。大部分前体蛋白需要经过翻译后修饰才能成为活性蛋白,而 *Gimap5* 具有多个磷酸化位点和肉豆蔻酰化位点,这些位点对 *Gimap5* 蛋白活化和调控机制有

待深入研究。同源性和进化性分析表明, *Gimap5* 在鸟类和陆生哺乳动物间的亲缘和进化关系存在一定距离, 暗示鸡 *Gimap5* 基因可能在功能和特性等方面与哺乳动物同源基因存在一定的差异。

组织转录表达特性分析发现, *Gimap5* 基因在 AA<sup>+</sup>肉鸡血液中表达活性显著高于其他组织, 并在三黄鸡血液中也具有较高活性, *Gimap5* 基因在 AA<sup>+</sup>肉鸡血液中表达量大约是三黄鸡的 10 倍。研究表明 *Gimap5* 是小鼠造血母细胞 (Hematopoietic progenitor cells, HPCs) 存活的重要稳定因子<sup>[19]</sup>, *Gimap5* 基因的高表达是否与 AA<sup>+</sup>肉鸡血细胞的更新代谢和功能相关, 有待进一步研究。*Gimap5* 基因在 AA<sup>+</sup>肉鸡和三黄鸡的胸腺组织中均具有较高转录活性, AA<sup>+</sup>肉鸡的表达量大约是三黄鸡的 2 倍。Chen 等<sup>[20]</sup>研究表明, *Gimap5* 基因表达活性与免疫调控呈正相关, 推测 AA<sup>+</sup>肉鸡和三黄鸡间的免疫力存在差异, *Gimap5* 基因在雏鸡胸腺中表达与 T 细胞增殖分化的相关性值得研究。此外, *Gimap5* 基因在 AA<sup>+</sup>肉鸡和三黄鸡脂肪中均具有较高表达活性。*Gimap5* 通过调节脂肪细胞线粒体 Ca<sup>2+</sup>摄取, 进而调节脂肪细胞的增殖与分化<sup>[21]</sup>。*Gimap5* 基因在 AA<sup>+</sup>鸡的表达量大约是三黄鸡的 2 倍, 暗示 *Gimap5* 基因可能是导致不同品系鸡脂肪差异沉积的因素之一。*Gimap5* 基因在两品系鸡的大肠和小肠中也具有较高的表达活性, 研究表明, *Gimap5* 基因突变会损害免疫耐受和促进淋巴细胞凋亡, *Gimap5* 基因突变小鼠会发生重度结肠炎<sup>[12,22]</sup>。*Gimap5* 基因在 AA<sup>+</sup>肉鸡中的表达量大约是三黄鸡的 2 倍, 推测 *Gimap5* 基因在肠道中的差异表达可能与不同品系鸡肠道免疫状态相关。此外, *Gimap5* 基因在两品系鸡其他组织中的表达活性整体偏低, *Gimap5* 基因是否发挥类似管家基因的功能有待后续研究。

炎症雏鸡模型分析表明, 鸡 *Gimap5* 是炎症反应相关基因。血液 *Gimap5* 基因显著下调 ( $P < 0.05$ ) 可能与机体炎症反应中血液应激状态相关, 同时暗示, *Gimap5* 基因在炎性疾病的诊断标

记物中可能具有潜在应用价值。研究表明雏鸡接种 LPS 后会影响到肝脏和脾脏功能<sup>[23-24]</sup>, 小鼠 *Gimap5* 基因功能缺失会导致 T、B 淋巴细胞减少<sup>[12,25]</sup>。炎症雏鸡模型中, *Gimap5* 基因在肝脏和脾脏中表达下调, 可能与这两种外周免疫器官的炎症应激状态有关, 而 *Gimap5* 基因在胸腺和法氏囊中表达上调, 可能分别与 T、B 细胞增殖分化的活性上调有关。诚然, 本研究仅进行了 mRNA 水平的转录活性分析, 蛋白水平变化是否与 mRNA 水平一致以及 *Gimap5* 基因表达改变的详细机制有待后续研究。

本研究选用 AA<sup>+</sup>肉鸡与三黄鸡作为实验动物, 首次克隆了肉鸡 *Gimap5* 基因全长编码序列, 分析 *Gimap5* 组织表达分布特性和炎症反应功能。实验表明, *Gimap5* 基因在不同品系肉鸡间表达活性存在差异, 在炎症反应的免疫相关组织中呈显著性变化。*Gimap5* 可能是一个参与组织功能、机体发育和炎症免疫反应的多功能基因, 并在炎症反应诊断标记物中具有潜在应用价值。

## REFERENCES

- [1] Krücken J, Schroetel RMU, Müller IU, et al. Comparative analysis of the human *Gimap* gene cluster encoding a novel GTPase family. *Gene*, 2004, 341: 291-304.
- [2] Chen XL, Serrano D, Ghobadi F, et al. TCR and IL-7 signaling are altered in the absence of functional GTPase of the immune associated nucleotide binding protein 5 (GIMAP5). *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151837.
- [3] Nitta T, Takahama Y. The lymphocyte guard-IANs: regulation of lymphocyte survival by IAN/GIMAP family proteins. *Trends Immunol*, 2007, 28(2): 58-65.
- [4] Wong VWY, Saunders AE, Hutchings A, et al. The autoimmunity-related GIMAP5 GTPase is a lysosome-associated protein. *Self Nonself*, 2010, 1(3): 259-268.
- [5] Rutledge EA, Fuller JM, van Yserloo B, et al. Sequence variation and expression of the *Gimap* gene family in the BB rat. *Exp Diabetes Res*, 2009, 2009: 835650.
- [6] Wallis RH, Wang KS, Marandi L, et al. Type 1 diabetes

- in the BB rat: a polygenic disease. *Mol Immunol*, 2009, 58(4): 1007–1017.
- [7] Fuller JM, Bogdani M, Tupling TD, et al. Genetic dissection reveals diabetes loci proximal to the *gimap5* lymphopenia gene. *Physiol Genomics*, 2009, 38(1): 89–97.
- [8] Lang JA, Kominski D, Bellgrau D, et al. Partial activation precedes apoptotic death in T cells harboring an IAN gene mutation. *Eur J Immunol*, 2004, 34(9): 2396–2406.
- [9] Chen XL, Serrano D, Mayhue M, et al. *Gimap5* deficiency is associated with increased AKT activity in T lymphocytes. *PLOS One*, 2015, 10(10): e0139019.
- [10] Nitta T, Nasreen M, Seike T, et al. IAN family critically regulates survival and development of T lymphocytes. *PLoS Biol*, 2006, 4(4): e103.
- [11] Cousins L, Graham M, Tooze R, et al. Eosinophilic bowel disease controlled by the BB rat-derived *lymphopenia/Gimap5* gene. *Gastroenterology*, 2006, 131(5): 1475–1485.
- [12] Barnes MJ, Aksoylar H, Krebs P, et al. Loss of T cell and B cell quiescence precedes the onset of microbial flora-dependent wasting disease and intestinal inflammation in *Gimap5*-deficient mice. *J Immunol*, 2010, 184(7): 3743–3754.
- [13] Patterson AR, Endale M, Lampe K, et al. *Gimap5*-dependent inactivation of GSK3 $\beta$  is required for CD4<sup>+</sup> T cell homeostasis and prevention of immune pathology. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 430.
- [14] Mu WT, Chang Y, Zhao DX, et al. Differential expression analysis of inflammatory response related genes through LPS induction in different-breed chicken. *Chin J Vet Sci*, 2016, 36(6): 944–949 (in Chinese).  
穆卫涛, 常杨, 赵冬雪, 等. LPS 诱导不同品系雏鸡炎症反应相关基因的差异表达分析. *中国兽医学报*, 2016, 36(6): 944–949.
- [15] Dahéron L, Zenz T, Siracusa LD, et al. Molecular cloning of *Ian4*: a BCR/ABL-induced gene that encodes an outer membrane mitochondrial protein with GTP-binding activity. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(6): 1308–1316.
- [16] Dalberg U, Markholst H, Hornum L. Both *Gimap5* and the diabetogenic BBDP allele of *Gimap5* induce apoptosis in T cells. *Int Immunol*, 2007, 19(4): 447–453.
- [17] Schwefel D, Fröhlich C, Eichhorst J, et al. Structural basis of oligomerization in septin-like GTPase of immunity-associated protein 2 (GIMAP2). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(47): 20299–20304.
- [18] Schwefel D, Arasu BS, Marino SF, et al. Structural insights into the mechanism of GTPase activation in the GIMAP family. *Structure*, 2013, 21(4): 550–559.
- [19] Chen YH, Yu M, Dai XZ, et al. Critical role for *Gimap5* in the survival of mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *J Exp Med*, 2011, 208(5): 923–935.
- [20] Chen XL, Serrano D, Mayhue M, et al. GTPase of the immune-associated nucleotide-binding protein 5 (GIMAP5) regulates calcium influx in T-lymphocytes by promoting mitochondrial calcium accumulation. *Biochem J*, 2013, 449(2): 353–364.
- [21] Wang CH, Chen YF, Wu CY, et al. *Cisd2* modulates the differentiation and functioning of adipocytes by regulating intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(18): 4770–4785.
- [22] Endale M, Aksoylar HI, Hoebe K. Central role of *Gimap5* in maintaining peripheral tolerance and T cell homeostasis in the gut. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 436017.
- [23] Wan YH, Freeswick PD, Khemlani LS, et al. Role of lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor, and dexamethasone in regulation of LPS-binding protein expression in normal hepatocytes and hepatocytes from LPS-treated rats. *Infect Immun*, 1995, 63(7): 2435–2442.
- [24] Groeneveld PH, van Rooijen N. Localization of intravenously injected lipopolysaccharide (LPS) in the spleen of the mouse. An immunoperoxidase and histochemical study. *Virchows Arch B*, 1985, 48(3): 237–245.
- [25] Schulteis RD, Chu HY, Dai XZ, et al. Impaired survival of peripheral T cells, disrupted NK/NKT cell development, and liver failure in mice lacking *Gimap5*. *Blood*, 2008, 112(13): 4905–4914.

(本文责编 郝丽芳)