

## 综述

## DNA甲基化与脂肪组织生长发育

高媛 孙婴宁 李辉 王宁\*

(东北农业大学动物科学技术学院, 农业部鸡遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150030)

**摘要** DNA甲基化作为一种重要的表观遗传学修饰方式, 在维持正常细胞功能、遗传印记、胚胎发育以及人类肿瘤发生中起着重要作用。DNA甲基化最重要的作用是调控基因表达, 它是细胞调控基因表达的重要表观遗传机制之一。近年来的研究发现, DNA甲基化在脂肪组织生长发育以及肥胖症发生过程中发挥着重要作用。DNA甲基化通过调控脂肪细胞分化转录因子、转录辅助因子以及其他脂肪代谢相关基因的表达, 从而调控脂肪组织的生长发育。该文综述了脂肪组织生长发育过程中DNA甲基化的最新研究进展, 探讨了脂肪组织DNA甲基化的研究趋势和未来发展方向。

**关键词** DNA甲基化; 基因表达; 脂肪组织; 生长发育

DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的催化下, 以S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体, 选择性地甲基添加到特定核苷酸碱基上的过程。DNA甲基化并不改变DNA的序列, 哺乳动物DNA甲基化发生于胞嘧啶, 主要出现在CpG二核苷酸的胞嘧啶上, 形成5-甲基胞嘧啶; 另外, 还有些非CpG甲基化, 这种非CpG甲基化发生在CpHpG(H=A、T、C)序列的胞嘧啶上<sup>[1]</sup>。与哺乳动物不同, 细菌DNA甲基化可发生在胞嘧啶和腺嘌呤。DNA甲基化能改变染色质的结构和构象, 影响蛋白质与DNA的结合, 从而导致基因表达改变。一般来说, 基因启动子区DNA高甲基化意味着基因的沉默, 而低甲基化意味着基因激活。DNA甲基化在基因表达的表观遗传调控中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。近年来的研究发现<sup>[3]</sup>, DNA甲基化在脂肪组织生长发育过程中也发挥了重要作用: DNA甲基化可以调控脂肪细胞分化转录因子、转录辅助因子以及很多脂肪组织特异性基因的表达, 从而调控脂肪组织的生长发育。DNA甲基化的异常可能会导致II型糖尿病的发生<sup>[4]</sup>。

## 1 脂肪组织的发育

哺乳动物的脂肪组织包括白色脂肪组织和棕色脂肪组织。脂肪组织中除了含有成熟脂肪细胞之外还含有许多其他类型的细胞, 包括前脂肪细胞、

内皮细胞、毛细血管基质细胞、单核细胞和巨噬细胞等, 这些细胞对于脂肪组织内环境的稳定起到了非常重要的作用。脂肪组织不仅能够储存能量, 还是一个重要的内分泌器官, 它能分泌多种细胞因子, 这些因子被统称为脂肪细胞因子, 包括瘦素、脂联素、抵抗素、炎症细胞因子等<sup>[5-7]</sup>。这些脂肪细胞因子不仅参与调节能量的动态平衡、葡萄糖水平、脂类代谢、免疫、神经内分泌系统等生理过程, 还参与胰岛素分泌异常、代谢紊乱、血管病变等许多病理过程<sup>[6,8]</sup>。

脂肪组织的发育是一个复杂的生理过程, 包括间充质干细胞与前脂肪细胞的增殖、分化、脂质同化(lipid assimilation)、脂肪细胞的肥大以及血管发生等过程<sup>[9]</sup>。脂肪细胞来源于胚胎干细胞, 依次经过多能干细胞、脂肪母细胞、前脂肪细胞和成熟脂肪细胞几个阶段, 最终发育为成熟脂肪细胞(主要是指白色脂肪细胞)。从前脂肪细胞到成熟脂肪细胞的分化过程中, 转录因子及其调控网络发挥了重要作用。转录因子和转录辅助因子等的表达和活性变化决定了脂肪细胞的分化过程, 这些因子按照一定

收稿日期: 2012-04-19 接受日期: 2012-05-31

国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(No.2009CB941604)、黑龙江省高等学校科技创新团队建设项目和现代农业产业技术体系建设专项资金(No.CARS-42)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0451-55191770, E-mail: ningwang2001@yahoo.com

的时间顺序激活或抑制基因表达, 最终导致前脂肪细胞分化为脂肪细胞。

PPAR $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)和C/EBP $\alpha$ [CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP),  $\alpha$ ]是前脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化的关键调控因子, 两者协同促进脂肪细胞分化。在脂肪细胞分化过程中, PPAR $\gamma$ 特异性结合于其靶基因启动子区的PPRE(PPAR $\gamma$  response element)作用元件, 调控其靶基因的表达<sup>[10]</sup>。PPAR $\gamma$ 主要通过视黄醇类X受体(RXR)结合以异源二聚体的形式发挥作用<sup>[11]</sup>; 还可通过与辅助共激活因子PGC-1或辅助共抑制因子RIP140等结合<sup>[12]</sup>调控糖代谢相关基因的表达, 促进甘油三酯积累。C/EBP $\alpha$ 能直接结合于PPAR $\gamma$ 、FABP4(fatty acid-binding protein 4)、GLUT4(glucose transporter 4)、瘦素(*leptin*)等脂肪细胞标志基因的启动子区, 激活这些基因的表达, 从而启动脂肪细胞特异表达基因的转录。C/EBP $\beta$ 和C/EBP $\delta$ 是脂肪细胞分化早期的调控因子, 它们诱导PPAR $\gamma$ 和C/EBP $\alpha$ 基因的表达, 从而启动脂肪细胞分化。p160辅助共激活因子家族成员SRC3(steroid receptor coactivator 3)能与C/EBP $\beta$ 和C/EBP $\delta$ 相互作用, 提高C/EBP $\beta$ 和C/EBP $\delta$ 的转录活性, 从而间接调控PPAR $\gamma$ 基因表达, 促进脂肪细胞分化<sup>[13]</sup>。PRDM16(PRDI-BFI-RIZ1 homologous domain containing protein 16)是棕色脂肪细胞分化的关键转录调控因子<sup>[14]</sup>, 它主要通过结合C末端结合蛋白1和2(C terminus binding protein 1 and 2)抑制白色脂肪细胞的基因表达; 通过与PPAR $\gamma$ 及辅助共激活因子PGC-1的相互作用促进线粒体生成和适应性产热基因的表达<sup>[15]</sup>。此外, 已发现KLF(Kruppel-like factors)转录因子家族、CREB结合蛋白(CBP/p300)、PCAF(CBP/p300相关因子)、周期素D1(cyclin D1)、Rb家族等多种转录因子和转录辅助因子在脂肪细胞分化过程中发挥重要的作用<sup>[16-17]</sup>。

## 2 脂肪生长发育过程中的DNA甲基化

近年的研究表明, DNA甲基化也在脂肪组织生长发育过程中发挥重要作用。DNA甲基化调控脂肪细胞分化转录因子、转录辅助因子以及其他脂肪生长发育相关基因的表达, 从而调控脂肪组织的生长发育。

### 2.1 脂肪组织的DNA甲基化

同一组织在不同生长发育阶段其DNA甲基化

水平是不同的, 大多数脊椎动物的组织中基因组DNA甲基化程度随着年龄的增加逐渐下降<sup>[18]</sup>。人的血液中, 5-甲基-胞嘧啶的含量与年龄呈现一定程度的负相关<sup>[19]</sup>, 但是, 有一些基因的启动子区CpG二核苷酸随着年龄的增长而被甲基化<sup>[20]</sup>。热量限制(caloric restriction)常用于肥胖的治疗, 但是减肥治疗效果个体差异很大。最近, Bouchard等<sup>[21]</sup>采用热量限制方法治疗绝经后期的超重或肥胖妇女, 比较了减肥效果好(高应答者)与减肥效果差(低应答者)的腹部脂肪组织基因组DNA甲基化, 结果发现在热量限制前, 高应答者和低应答者的基因组有35个显著差异的甲基化区域; 而热量限制后两者仅有3个显著的DNA甲基化区域。其中一些DNA甲基化差异区域中包含与控制体重和胰岛素分泌相关的基因<sup>[21]</sup>, 其他DNA甲基化差异区域位于基因组印记区域。这些数据提示, DNA甲基化参与了脂肪的生长发育和肥胖。

鼠皮下脂肪组织的DNA甲基化分析发现, 10周龄野生型小鼠皮下脂肪组织PPAR $\gamma$ 启动子的两个CpG位点(分别位于-437 bp和-247 bp)DNA甲基化水平高于20周龄的野生型小鼠(DIO型小鼠)和糖尿病模型小鼠(*db/db*型小鼠)<sup>[22]</sup>。与野生型小鼠相比, 糖尿病模型小鼠的皮下脂肪组织厚, 且皮下脂肪组织的脂肪细胞数也多, 因此推测鼠的年龄和已分化细胞的数量影响皮下脂肪组织PPAR $\gamma$ 启动子的DNA甲基化程度。另外, 研究还发现, 肥胖模型小鼠的内脏脂肪组织PPAR $\gamma$ 2启动子的甲基化水平高于正常野生型小鼠, 而其PPAR $\gamma$ 基因mRNA的表达低于正常鼠<sup>[22]</sup>。本实验室比较了东北农业大学高、低脂系肉鸡脂肪组织DNA甲基化的差异, 发现高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织PPAR $\gamma$ 基因启动子的DNA甲基化程度存在差异, 低脂系DNA甲基化水平高于高脂系DNA甲基化水平; 而且随着年龄的增加, 高、低脂系鸡的脂肪组织PPAR $\gamma$ 基因启动子的DNA甲基化水平逐渐下降(未发表)。

肥胖的母亲妊娠期饮食补充甲基供体, 可降低后代肥胖的发生, 说明DNA甲基化在肥胖发生过程中有重要作用<sup>[23]</sup>。刘新丽等<sup>[24]</sup>检测到, 正常鼠和高脂饲料诱导的肥胖鼠性腺周围的脂肪组织中, *leptin*基因启动子区的16个CpG位点甲基化水平在60%~95%, 二者平均甲基化率分别为73%和77%, 两者之间无明显差异; 比较单个CpG位点的甲基化率,

在这16个CpG位点中,每个CpG位点的甲基化率在肥胖鼠与正常小鼠之间都未见明显差异,这些结果表明肥胖鼠*leptin*基因的mRNA表达增加与其启动子区甲基化无关。对人和小鼠的腹部脂肪组织的比较显示,小鼠*leptin*基因启动子甲基化水平要显著高于人类<sup>[25]</sup>。另有研究发现,机体不同部位脂肪组织的甲基化水平也不同。对猪的几种不同部位脂肪组织的基因组DNA甲基化比较发现,不同部位脂肪组织间的DNA甲基化水平差异极显著( $P<0.01$ ),其中皮下外层脂肪和肌间脂肪甲基化水平较高,大网膜、小网膜、皮下内层脂肪甲基化水平较低(刘健. 四川农业大学硕士研究生学位论文, 2009)。

通常情况下, DNA的甲基化程度与基因表达呈负相关, 启动子的高甲基化能抑制基因表达。Fujiki等<sup>[22]</sup>发现, 10周龄小鼠皮下脂肪组织的DNA甲基化会导致PPAR $\gamma$ 基因的表达下降。但也有研究表明, 基因甲基化水平与基因表达无直接的关系。Kozs等<sup>[26]</sup>研究发现, 10周龄正常小鼠(饲喂正常饲料)附睾脂肪组织*Mest/Peg1*(mesoderm specific transcript或paternally expressed gene 1)基因启动子区(-175~+88) 15个CpG位点的平均甲基化水平为33%~61%; 高脂饲料诱导的肥胖鼠的平均甲基化水平为35%~69%。正常小鼠(饲喂正常饲料)和高脂饲料诱导的肥胖小鼠的平均DNA甲基化率无明显差异, 但肥胖小鼠附睾脂肪组织中*Mest/Peg1*基因mRNA的表达量却明显高于正常鼠的表达量。另有实验比较了6~21周龄正常小鼠和高脂饲料诱导的肥胖小鼠附睾的脂肪组织*Mest/Peg1*基因的DNA甲基化水平, 结果发现, *Mest/Peg1*基因的DNA甲基化水平不受高脂饲料诱导的影响。该研究还分析了10周龄正常小鼠(饲喂正常饲料)和高脂饲料诱导的肥胖鼠附睾的脂肪组织中*sFRP5*(secreted frizzled-related protein 5)基因启动子区(-209~+94, +138~+361) 16个CpG位点的平均甲基化水平, 结果发现, 正常小鼠附睾脂肪组织中, *sFRP5*基因启动子区16个CpG位点的平均甲基化水平为2%~36%, 而高脂饲料诱导的肥胖鼠的平均甲基化水平为0%~47%, 二者平均甲基化水平无显著差异。但是, 肥胖鼠附睾脂肪组织中*sFRP5*基因的mRNA表达量明显高于正常鼠的表达量<sup>[26]</sup>。从以上实验结果可见, 在小鼠附睾脂肪组织中, *Mest/Peg1*和*sFRP5*基因的表达与DNA甲基化没有直接关系<sup>[27-29]</sup>。

综上所述, DNA甲基化在脂肪组织生长发育过

程中发挥了重要作用, 脂肪组织中PPAR $\gamma$ 启动子的DNA甲基化程度在不同发育阶段是不同的, 且健康动物和肥胖动物PPAR $\gamma$ 启动子的DNA甲基化存在差异。脂肪组织PPAR $\gamma$ 启动子DNA甲基化的升高导致其mRNA表达下降。健康动物和肥胖动物之间*leptin*、*Mest/Peg1*及*sFRP5*基因表达存在差异, 但这些基因的启动子DNA甲基化并没有差异。

## 2.2 脂肪细胞分化过程中的DNA甲基化

DNA甲基化在脂肪细胞分化过程中同样发挥着重要的作用<sup>[3]</sup>。研究发现, 在脂肪细胞分化过程中DNA甲基化是动态变化的<sup>[30]</sup>。用DNA甲基化抑制剂5-氮杂胞苷处理小鼠胚胎间充质干细胞系C3H/10T1/2细胞, 能促进C3H/10T1/2细胞向脂肪细胞分化<sup>[31]</sup>。鼠的3T3-L1细胞系来源于白色脂肪组织, 是广泛使用的体外脂肪细胞分化的细胞模型<sup>[32]</sup>。用DNA甲基化抑制剂5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷处理3T3-L1细胞, 可抑制3T3-L1细胞的分化<sup>[30]</sup>。这些数据表明, DNA甲基化在脂肪细胞分化中发挥了重要作用。最近的研究表明, 3T3-L1细胞的分化与基因组水平的DNA甲基化和去甲基化的比例有关。而且, 在细胞分化过程中, DNA甲基化和去甲基化的比例维持在一个稳定的水平<sup>[30]</sup>。Sakamoto等<sup>[30]</sup>发现, 在脂肪细胞分化过程中, 部分基因组DNA甲基化发生了改变(低甲基化或高甲基化), 并且这种甲基化情况的改变是单向的、暂时的。这提示, 在脂肪细胞分化过程中, 甲基化情况的改变是一个复杂的动态过程。研究发现, 3T3-L1脂肪细胞分化程序的建立需要经历两个过程: 第一个过程是接触抑制期的细胞分化的准许(licensing); 另一个是细胞分化的执行过程, 执行过程不依赖于细胞周期。3T3-L1细胞分化的准许过程与DNA甲基化及组蛋白修饰等有关, 在此阶段如果用DNA甲基化抑制剂或RNA干扰处理细胞, 打乱细胞的表观遗传学修饰, 会显著降低脂肪形成或脂肪细胞的效率。在非分化或者只用胰岛素(insulin)处理的条件下, 重新培养获得分化准许的3T3-L1细胞, 发现3T3-L1细胞定向分化为脂肪细胞的能力可以从一代传到下一代, 一旦细胞受到脂肪细胞分化因素的诱导, 这些获得分化准许的细胞就会被激活, 并且此过程不依赖于细胞周期<sup>[33]</sup>。脂肪细胞分化受到转录因子调控网络的精细调控, 目前已发现DNA甲基化能调控多个脂肪细胞分化的转录因子、转录辅助因子基因的表达。

2.2.1 基因组水平上的DNA甲基化 Zhu等<sup>[34]</sup>最近采用MIRA-Chip方法,分析了人前脂肪细胞和成熟脂肪细胞的全基因组DNA甲基化,发现脂肪细胞分化后,有2 701个基因发生了低甲基化,1 070个基因发生了高甲基化<sup>[34]</sup>。这提示,脂肪细胞分化过程中基因组DNA甲基化有非常显著的变化,DNA甲基化参与脂肪细胞分化的调控。进一步的分析发现,这些发生甲基化改变的基因主要是参与脂肪细胞炎症细胞因子信号通路、Wnt信号通路、MAPK信号通路和胰岛素信号通路中与免疫应答相关的基因<sup>[34]</sup>。信号网络分析显示,肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ )、细胞分裂素(cytokinin)、白细胞介素8(interleukin 8)是这个网络中重要的组成部分<sup>[35]</sup>。

2.2.2 *C/EBP $\alpha$* 基因 *C/EBP $\alpha$* 是脂肪细胞分化的重要转录调控因子之一。研究发现,在3T3-L1前脂肪细胞中,*C/EBP $\alpha$* 基因启动子是低甲基化的,但在3T3-L1成熟脂肪细胞中,*C/EBP $\alpha$* 基因启动子却是高甲基化的<sup>[35]</sup>。表明3T3-L1前脂肪细胞在分化为成熟脂肪细胞的过程中,*C/EBP $\alpha$* 基因启动子区的CpG甲基化水平是升高的。进一步的研究发现,在3T3-L1细胞接触抑制48 h后*C/EBP $\alpha$* 基因启动子区(-340 bp~-116 bp)的DNA甲基化水平升高。但是,当细胞接触抑制48 h后,用MDI(isobutylmethylxanthine, dexamethasone and insulin, 即异丁基甲基黄嘌呤、地塞米松和胰岛素)诱导处理汇合的细胞24 h,结果发现,*C/EBP $\alpha$* 基因启动子区(-340 bp~-116 bp)的CpG的甲基化水平是下调的。但是同样的情况下,单独用胰岛素处理汇合细胞24 h后,该启动子区域的CpG仍保持着高甲基化状态。表达检测显示,只有MDI处理的细胞可见*C/EBP $\alpha$* 表达的升高,而胰岛素单独处理细胞未见其表达增加。经过胰岛素处理的细胞再用MDI处理后,细胞的分化效率与常规MDI诱导细胞分化的效率相似<sup>[34]</sup>。这些结果表明,在细胞接触抑制期,3T3-L1细胞分化的准许与DNA甲基化有关,而且这种细胞分化准许的表观遗传可以随细胞的分裂而遗传。

2.2.3 *PPAR $\gamma$* 基因 *PPAR $\gamma$* 是脂肪细胞分化的最重要的转录因子。研究发现,间充质干细胞*PPAR $\gamma$* 基因的启动子是低甲基化的,表明间充质干细胞在分化前是处于低甲基化状态的<sup>[36]</sup>。在3T3-L1前脂肪细胞中,*PPAR $\gamma$* 基因启动子是高甲基化的,甲基化的*PPAR $\gamma$* 启动子抑制其转录表达。但随着脂肪分化的继续,*PPAR $\gamma$* 基因的启动子逐渐去甲基化,其mRNA

表达增加<sup>[22]</sup>,这提示*PPAR $\gamma$* 启动子的去甲基化会促进前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞。用DNA甲基化抑制剂5-氮杂胞苷处理培养的细胞,能提高细胞中*PPAR $\gamma$* 基因的表达,而且DNA甲基化抑制剂的作用呈剂量依赖性。分别将甲基化和未甲基化的*PPAR $\gamma$* 启动子报告基因载体转染NIH/3T3细胞、前脂肪细胞及成熟脂肪细胞,检测报告基因的表达量,发现*PPAR $\gamma$* 启动子的甲基化抑制了荧光素酶报告基因的表达。这些实验都表明,DNA甲基化抑制*PPAR $\gamma$* 基因的表达。染色质免疫共沉淀实验表明,在前脂肪细胞形成之初(第0天),CpG结合蛋白2(MeCP2)便与甲基化的*PPAR $\gamma$* 启动子相结合,而在前脂肪细胞形成的第2天,*PPAR $\gamma$* 启动子区的组蛋白H3乙酰化水平才开始增加<sup>[37]</sup>,并且组蛋白去乙酰化酶能替代MeCP2结合到甲基化的CpG位点<sup>[38]</sup>。因此,随着诱导分化的进行(第1天和第2天),组蛋白乙酰化的增加可能是由于MeCP2逐渐被降解造成的。这说明,在影响mRNA表达方面,启动子DNA甲基化的作用强于组蛋白乙酰化。

在人类不同的细胞类型中,*PPAR $\gamma$* 2基因转录起始位点上游的CpG位点的甲基化状态是不同的。在脂肪组织分离出来的基质血管细胞(stromal vascular cells)中,*PPAR $\gamma$* 2基因转录起始位点上游的CpG是低甲基化的<sup>[39]</sup>。但是在T细胞中,*PPAR $\gamma$* 2基因启动子区是超甲基化的,而且在基质血管细胞和T细胞中,*PPAR $\gamma$* 2都不表达<sup>[40]</sup>。在由间充质干细胞向脂肪细胞分化的过程中,*PPAR $\gamma$* 基因启动子的甲基化情况没有明显改变<sup>[40]</sup>。人和鼠*PPAR $\gamma$* 2基因启动子序列的比对显示,绝大多数*PPAR $\gamma$* 2基因启动子的甲基化位点都是保守的,或者说两者的甲基化位点的相对位置在上下游25 bp的范围内<sup>[22]</sup>,推测这些CpG位点的DNA甲基化也调控了人*PPAR $\gamma$* 2基因的表达。研究发现,人类*PPAR $\gamma$* 2基因的转录起始位点上游500 bp左右还存在一些CpG位点,但是鼠*PPAR $\gamma$* 2基因的相应位点却没有这些CpG位点<sup>[22]</sup>,这提示同一个基因在不同物种中的DNA甲基化存在差异。

2.2.4 *leptin*基因 *leptin*是一种主要由脂肪细胞分泌的蛋白质类激素,它能抑制动物的食欲、调节机体能量代谢等。研究发现,*leptin*的表达受其启动子区甲基化的调节。在间充质细胞中*leptin*基因的启动子是低甲基化的<sup>[36]</sup>;而在3T3-L1前脂肪细胞中,*leptin*基因启动子区的CpG位点呈现高度甲基化状

态,且细胞中也无*leptin*基因表达。Okada等<sup>[26]</sup>的研究也显示,在3T3-L1前脂肪细胞中,甲基化抑制剂处理并不能使细胞*leptin*基因mRNA的表达增加。在由前脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化的过程中,*leptin*基因的启动子是逐渐去甲基化的,*leptin*基因mRNA的表达增加<sup>[41-42]</sup>。Milagro等<sup>[43]</sup>对高脂饲料诱导的肥胖大鼠的研究发现,在腹膜后脂肪组织的脂肪细胞中,*leptin*基因启动子区甲基化程度有轻微升高,表现在其中一个CpG位点甲基化率高于正常鼠,这可能与*leptin*的表达变化相关。

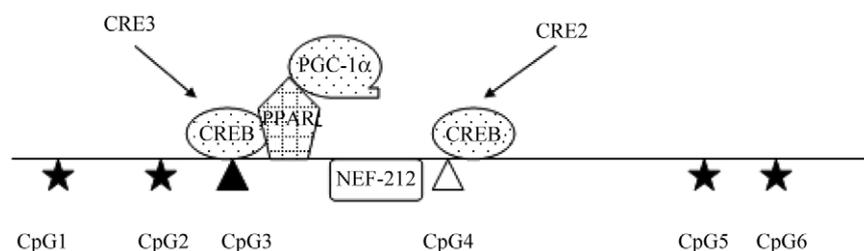
**2.2.5 WGEF基因** WGEF(Rho guanine nucleotide exchange factor 19, ARHGAP19或WGEF)是Rho鸟嘌呤核苷酸交换因子(RhoGEFs)家族中的一员,RhoGEFs促进GDP转换为GTP,进而产生激活型的GTP酶。RhoGEFs在许多生理和病理学过程中发挥重要作用,WGEF主要在肠、肝、心脏和肾脏中表达,它可以激活RhoA<sup>[44]</sup>。RhoA通过RhoA-Rho激酶(ROCK)信号通路调节细胞支架的张力(cytoskeletal tension)来抑制脂肪形成<sup>[45]</sup>。Wang等<sup>[44]</sup>在2009年应用基于微阵列技术的MIAMI,从全基因组角度分析3T3-L1脂肪细胞分化过程中DNA甲基化的情况,发现了WGEF基因的DNA甲基化呈动态变化。通过比较分化和未分化的3T3-L1细胞的WGEF基因启动子区DNA甲基化情况(转录起始位点定义为+1),发现WGEF基因(-81、-40、+120位置的三个CpG位点)在分化的细胞中是去甲基化的。WGEF基因第一外显子起始位点下游120 bp(+120的CpG位点)处在未分化细胞中总是完全甲基化的,并且该基因呈高表达;但是分化培养5天后(细胞尚未完全分化)是去甲基化的,此时,它的表达减少至50%<sup>[46]</sup>。这说明,DNA甲基化可能调控了WGEF基因启动子区的转录活动。在脂肪细胞分化过程中,WGEF基因的甲基化改变先于其基因表达抑制。WGEF基因启动子区CpG的甲基化能上调WGEF的转录,这种现象似乎与DNA甲基化抑制基因表达的说法相矛盾。但是,有报道指出,基因的5'端或3'端区域甲基化会激活基因的表达。例如,人类的类成骨细胞MG63中,PDPN基因启动子区的甲基化会使转录效率提高<sup>[47]</sup>。目前已经发现,锌指结构蛋白Kaiso以序列特异性的方式结合到特异的甲基化位点并且激活转录<sup>[48]</sup>,表明存在促进转录的甲基化依赖性蛋白。

**2.2.6 UCP1基因** 解偶联蛋白1(uncoupling pro-

tein 1, UCP1)是棕色脂肪细胞线粒体的一个蛋白,它能使葡萄糖和脂肪酸分解产生的能量只转化为热能,以维持机体体温。UCP1基因的增强子位于其启动子区,在小鼠的细胞系和脂肪组织中,UCP1增强子的CpG位点甲基化呈现出位置专一性和脂肪组织特异性,并且UCP1增强子的甲基化在调控其表达方面起着重要的作用。用DNA甲基化抑制剂(5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷)处理3T3-L1细胞,能降低UCP1增强子的甲基化,显著提高UCP1基因的基础表达和forskolin诱导的UCP1表达。与3T3-L1细胞不同,5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷处理HIB-1B细胞可以提高UCP1的基础表达,但是抑制forskolin诱导的UCP1表达。将甲基化的UCP1启动子(全长3.1 Kb,包含启动子和增强子)的荧光素酶报告基因载体转染3T3-L1细胞或来源于棕色脂肪组织的HIB-1B细胞则抑制了启动子的转录活性<sup>[49]</sup>。上述这些数据都表明,DNA甲基化调控着UCP1基因的表达。

虽然用forskolin处理或未处理处于分化过程中的3T3-L1细胞、HIB-1B细胞,UCP1基因表达都升高,但是UCP1增强子的CpG甲基化状态都没有发生变化。比较各CpG的甲基化状态发现,HIB-1B细胞在CpG1、CpG4、CpG6三个位点的甲基化水平高于3T3-L1细胞(图1)。相反,在CpG3这个位点,HIB-1B细胞的甲基化水平低于3T3-L1细胞。人们也开展了类似的体内组织的UCP1甲基化研究,结果发现,在白色脂肪组织和肝脏中,CpG1-4的DNA甲基化水平高于棕色脂肪组织<sup>[49]</sup>;增强子的CpG3和CpG4甲基化在所有组织中都是最低的。分析发现,CpG4的甲基化会降低其与转录因子CREB的结合,而CpG3和CpG4的低甲基化能促进转录因子与UCP1增强子的结合。

**2.2.7 其他基因** 除上述基因外,在脂肪细胞分化过程中,葡萄糖转运蛋白4(glucose transporter 4, GLUT4)、脂肪酸结合蛋白4(fatty acid-binding protein 4, FABP4)、脂蛋白酯酶(lipoprotein lipase, LPL)、线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)、Mest/Peg1等基因也发生了DNA甲基化的改变。葡萄糖转运蛋白4是脂肪细胞和骨骼肌细胞协助葡萄糖转运的主要蛋白质,分布于细胞内,在胰岛素或运动等的刺激下转位至细胞膜上。在前脂肪细胞中,GLUT4基因的启动子区是甲基化的,而在脂肪细胞分化过程中,GLUT4启动子甲基化水平



*UCPI*增强子的转录起始位点以及CpG1-6的相对位置。转录因子包括CREB、PPAR、PGC-1 $\alpha$ 、视黄酸(retinoic acid, RA)、视黄醇类X受体(retinoid X receptor, RXR)、棕色脂肪反应元件(brown fat response element, BRE)和NFE-212(nuclear factor erythroid derived 212)<sup>[49]</sup>。

Location of CpG1-6 and transcription factor binding sites within *UCPI* enhancer are shown in their relative positions. The transcription factors include CREB, PPAR, PGC-1 $\alpha$ , RA(retinoic acid), RXR(retinoid X receptor), BRE(brown fat response element) and NFE-212(nuclear factor erythroid derived 212)<sup>[49]</sup>。

图1 *UCPI*增强子示意图(根据参考文献[49]修改)

Fig.1 Schematic structure of *UCPI* enhancer(modified from reference [49])

是降低的,并且启动子区特定的CpG位点发生甲基化会抑制细胞核因子与启动子的结合,导致*GLUT4*的表达减少<sup>[2]</sup>。*FABP4*基因和*LPL*基因均在脂肪组织中有较高表达。成脂基因*FABP4*、*LPL*、*PPAR $\gamma$* 及*leptin*的启动子区在新分离的间充质干细胞、经过培养的间充质干细胞以及分化的间充质干细胞中都是低甲基化的<sup>[39]</sup>。表达分析显示,在未分化的间充质干细胞中成脂基因的甲基化模式与它们的转录表达没有关系,另外,成脂基因的甲基化模式也不能反映出它们在细胞分化中的表达潜力<sup>[39]</sup>。分别用0, 0.05, 0.5, 5  $\mu\text{mol/L}$ 四个浓度的5-氮杂胞苷处理小鼠的3T3-L1细胞,发现甲基化抑制剂浓度为0.5  $\mu\text{mol/L}$ 和5  $\mu\text{mol/L}$ 时,3T3-L1细胞中*Mest/Peg1*基因的表达增加,并且在处理后的第4天*Mest/Peg1*基因表达增加得最为明显,表明DNA甲基化调控了*Mest/Peg1*基因的表达(刘健.四川农业大学硕士研究生学位论文,2009)。总体来说,脂肪细胞分化过程中的DNA甲基化十分复杂,脂肪形成相关基因的DNA甲基化分析及其表达调控机制是目前研究的重点。

### 3 展望

DNA甲基化作为一种重要的表观遗传修饰方式,在动物脂肪组织发育和脂肪细胞分化过程中起着重要的调节作用。DNA甲基化与组蛋白修饰、染色质重塑关系密切,揭示它们之间的关系对于了解基因表达的表观遗传调控机制具有重要意义,这将是未来重要的研究方向。目前,脂肪生长发育过程中的DNA甲基化研究主要集中于人和鼠,而针对许多重要农业经济动物的脂肪生长发育中DNA甲基

化的研究却不多,这些动物具有不同的进化地位、独特的生物学特性和经济价值,开展这些物种脂肪的DNA甲基化研究,比较人、鼠与这些动物的脂肪组织发育和脂肪细胞分化过程中的DNA甲基化将有助于揭示脂肪组织发育的表观遗传调控机制。转录谱表达分析显示,不同种(品系)以及机体不同部位的脂肪组织的表达谱不同<sup>[24]</sup>。因此,深入研究不同部位、不同品种之间脂肪组织生长发育过程中的DNA甲基化差异,将有助于揭示动物脂肪组织生长发育的遗传和表观遗传调控机制,并将为动物品种分子改良、人类肥胖症及其相关疾病的防治等提供理论依据。另外,DNA甲基化过程是非常复杂的,目前我们有许多现象还无法解释,未来我们不仅要关注单个基因或CpG位点的DNA甲基化,还需从基因组水平研究DNA甲基化,并要同时分析脂肪组织和脂肪细胞的转录组表达谱、蛋白组表达谱等,采用系统生物学的方法,研究DNA甲基化在脂肪生长发育中的作用及其机制。相信随着DNA甲基化研究的不断深入,脂肪组织生长发育的表观遗传机制将被逐渐阐明。

### 参考文献 (References)

- 1 Henderson IR, Jacobsen SE. Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 2007; 447(7143): 418-24.
- 2 Barres R, Zierath JR. DNA methylation in metabolic disorders. *Am J Clin Nutr* 2011; 93(4): 897-900.
- 3 D'Alessio AC, Weaver IC, Szyf M. Acetylation-induced transcription is required for active DNA demethylation in methylation-silenced genes. *Mol Cell Biol* 2007; 27(21): 7462-74.
- 4 Toperoff G, Aran D, Kark JD, Rosenberg M, Dubnikov T, Nissan B, et al. Genome-wide survey reveals predisposing diabetes type 2-related DNA methylation variations in human peripheral blood.

- Hum Mol Genet 2012; 21(2): 371-83.
- 5 Avram MM, Avram AS, James WD. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: From stem cell to fat cell. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56(3): 472-92.
  - 6 Ahima RS, Lazar MA. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Mol Endocrinol* 2008; 22(5): 1023-31.
  - 7 Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: the new endocrine organ. *Science* 2009; 54(9): 1847-56.
  - 8 Miehle K, Stepan H, Fasshauer M. Leptin, adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. *Clin Endocrinol* 2012; 76(1): 2-11.
  - 9 Yu X, Mei JZ, Dodson MV, Du M. Developmental programming of fetal skeletal muscle and adipose tissue development. *J Genomics* 2012; 1: 29-38.
  - 10 鞠大鹏, 詹丽杏. 脂肪细胞分化及其调控的研究进展. *中国细胞生物学报*(Ju Dapeng, Zhan Lixing. Developments in regulation of adipocytes differentiation. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2010; 32(5): 690-5.
  - 11 Chandra V, Huang P, Hamuro Y, Raghuran S, Wang Y, Burris TP, *et al.* Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-alpha nuclear receptor complex on DNA. *Nature* 2008; 456(7220): 350-6.
  - 12 Lin JD, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 2005; 1(6): 361-70.
  - 13 王宁, 闫晓红. 脂肪细胞分化辅助调节因子的研究进展. *生理科学进展*(Wang Ning, Yan Xiaohong. Research advances on coregulators in adipocyte differentiation. *Progress in Physiological Sciences*) 2009; 40(4): 308-12.
  - 14 Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, *et al.* PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 2008; 454(7207): 961-7.
  - 15 Kajimura S, Seale P, Tomaru T, Erdjument-Bromage H, Cooper MP, Ruas JL, *et al.* Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Gene Dev* 2008; 22(10): 1397-409.
  - 16 Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrin Metab* 2009; 20(3): 107-14.
  - 17 Siersbæk R, Nielsen R, Mandrup S. Transcriptional networks and chromatin remodeling controlling adipogenesis. *Cell* 2011; 10(1): 56-64.
  - 18 Bollati V, Schwartz J, Wright R, Litonjua A, Tarantini L, Suh H, *et al.* Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mech Ageing Dev* 2009; 130(4): 234-9.
  - 19 Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, Sugimoto J, Oda T, Miura K, *et al.* Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: An HPLC-based study. *Ann Hum Genet* 2004; 68(3): 196-204.
  - 20 Ahuja N, Issa JP. Aging, methylation and cancer. *Histol Histo-pathol* 2000; 15(3): 835-42.
  - 21 Bouchard L, Rabasa-Lhoret R, Faraj M, Lavoie ME, Mill J, Pe'russe L, *et al.* Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 309-20.
  - 22 Fujiki K, Kano F, Shiota K, Murata M. Expression of the peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes. *BMC Biol* 2009; 7: 38.
  - 23 Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG, Rached MT, Mirza S. Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *Int J Obesity (Lond)* 2008; 32(9): 1373-9.
  - 24 刘新丽, 樊超男, 田春雨, 申文雯, 齐可民. 饮食诱导肥胖小鼠瘦素及瘦素受体基因启动子甲基化探讨. *中国儿童保健杂志*(Liu Xinli, Fan Chaonan, Tian Chunyu, Shen Wenwen, Qi Keming. Investigation on the methylation of leptin and leptin receptor promoters in diet induced obese mice. *Chinese Journal of Child Health Care*) 2010; 18(10): 772-5.
  - 25 Stoger R. *In vivo* methylation patterns of the leptin promoter in human and mouse. *Epigenetics* 2006; 1(4): 155-62.
  - 26 Okada Y, Sakaue H, Nagare T, Kasuga M. Diet-induced up-regulation of gene expression in adipocytes without changes in DNA methylation. *Kobe J Med Sci* 2009; 54(5): E241-9.
  - 27 Koza RA, Nikonova L, Hogan J, Rim JS, Mendoza T, Faulk C, *et al.* Changes in gene expression foreshadow diet-induced obesity in genetically identical mice. *PLoS Genet* 2006; 2(5): e81.
  - 28 Takahashi M, Kamei Y, Ezaki O. Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes and is a marker of adipocyte size. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288(1): E117-24.
  - 29 Keila N, Lopez MD, Jarrod D, Knudson MD. Obesity: From the agricultural revolution to the contemporary pediatric epidemic. *Congenit Heart Dis* 2012; 7(2): 189-99.
  - 30 Sakamoto H, Kogo Y, Ohgane J, Hattori N, Yagi S, Tanaka S, *et al.* Sequential changes in genome-wide DNA methylation status during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366(2): 360-6.
  - 31 Bowers RR, Kim JW, Otto TC, Lane MD. Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: Role of the BMP-4 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(35): 13022-7.
  - 32 Avram MM, Avram AS, James WD. Subcutaneous fat in normal and diseased states: 3. Adipogenesis: From stem cell to fat cell. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56(3): 472-92.
  - 33 Guo W, Zhang KM, Tu K, Li YX, Zhu L, Xiao HS, *et al.* Adipogenesis licensing and execution are disparately linked to cell proliferation. *Cell Res* 2009; 19(2): 216-23.
  - 34 Zhu JG, Xia L, Ji CB, Zhang CM, Zhu GZ, Shi CM, *et al.* Differential DNA methylation status between human preadipocytes and mature adipocytes. *Cell Biochem Biophys* 2012; 63(1): 1-15.
  - 35 Li HX, Xiao L, Wang C, Gao JL, Zhai YG. Epigenetic regulation of adipocyte differentiation and adipogenesis. *J Zhejiang Univ Sci B* 2010; 11(10): 784-91.
  - 36 Noer A, Sorensen AL, Boquest AC, Collas P. Stable CpG hypomethylation of adipogenic promoters in freshly isolated, cultured, and differentiated mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Mol Biol Cell* 2006; 17(8): 3543-56.
  - 37 Salma N, Xiao H, Mueller E, Imbalzano AN. Temporal recruitment of transcription factors and SWI/SNF chromatin remodeling enzymes during adipogenic induction of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol* 2004; 24(11): 4651-63.
  - 38 Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006; 31(2): 89-97.
  - 39 Noer A, Sorensen AL, Boquest AC, Collas P. Stable CpG hypom-

- ethylation of adipogenic promoters in freshly isolated, cultured, and differentiated mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Mol Biol Cell* 2006; 17(8): 3543-56.
- 40 Noer A, Boquest AC, Collas P. Dynamics of adipogenic promoter DNA methylation during clonal culture of human adipose stem cells to senescence. *BMC Cell Biol* 2006; 8: 18.
- 41 Melzner I, Scott V, Dorsch K, Fischer P, Wabitsch M, Brüderlein S. Lepin gene expression in human preadipocytes is switched on by maturation-induced demethylation of distinct CpGs in its proximal promoter. *J Biol Chem* 2002; 277(47): 45420-7.
- 42 Kussmann M, Krause L, Siffert W. Nutrigenomics: Where are we with genetic and epigenetic markers for disposition and susceptibility. *Nat Rev* 2010; 68(S1): 38-47.
- 43 Milagro FI, Campión J, GarcaDaz DF, Goyenechea E, Paterlain L, Martínez JA. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem* 2009; 65(1): 1-9.
- 44 Wang Y, Suzuki H, Yokoo T, Tada-Iida K, Kihara R, Miura M. WGEF is a novel RhoGEF expressed in intestine, liver, heart, and kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324(3): 1053-8.
- 45 McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 2004; 6(4): 483-95.
- 46 Horii T, Morita S, Kimura M, Hatada I. Epigenetic regulation of adipocyte differentiation by a Rho guanine nucleotide exchange factor, WGEF. *PLoS One* 2009; 4(6): 1-10.
- 47 Hantusch B, Kalt R, Krieger S, Puri C, Kerjaschki D. Sp1/Sp3 and DNA-methylation contribute to basal transcriptional activation of human podoplanin in MG63 versus Saos-2 osteoblastic cells. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 20.
- 48 Rodova M, Kelly KF, VanSaun M, Daniel JM, Werle MJ. Regulation of the rapsyn promoter by kaiso and delta-catenin. *Mol Cell Biol* 2004; 24(16): 7188-96.
- 49 Shore A, Karamitri A, Kemp P, Speakman JR, Lomax MA. Role of Ucp1 enhancer methylation and chromatin remodelling in the control of Ucp1 expression in murine adipose tissue. *Diabetologia* 2010; 53(6): 1164-73.

## DNA Methylation and Adipose Tissue Development

Gao Yuan, Sun Yingning, Li Hui, Wang Ning\*

(College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Harbin 150030, China)

**Abstract** DNA methylation is an important epigenetic modification and plays crucial roles in maintaining normal cellular functions, gene imprinting, embryonic development and human tumorigenesis. The key role of DNA methylation is the regulation of gene expression, and DNA methylation is one of several epigenetic mechanisms that cells use to regulate gene expression. Accumulating evidence has showed that DNA methylation plays an important role in adipose tissue development and obesity. DNA methylation regulates the expression of transcription factors, transcriptional cofactors, and other genes involved in adipose development and adipocyte differentiation. This article reviews recent advances in research on DNA methylation of adipose tissue development, and discusses the ongoing trends and future research directions of DNA methylation in adipose tissue.

**Key words** DNA methylation; gene expression; adipose tissue; growth and development

Received: April 19, 2012 Accepted: May 31, 2012

This work was supported by the National Basic Research Program of China (No.2009CB941604), Program for Innovation Research Team in University of Heilongjiang Province and the Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (No.CARS-42)

\*Corresponding author. Tel: 86-451-55191770, E-mail: ningwang2001@yahoo.com