

# 高、低脂鸡腹部脂肪组织DNA甲基化的差异分析

张天目,段 逵,王守志,闫晓红,李 辉,王 宁\*

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

**摘 要:**实验选取东北农业大学高、低脂双向选择系(NEAUHLF)第18世代的4周至7周龄肉鸡为实验材料,采用Real-Time RT-PCR方法检测鸡腹部脂肪组织中DNA甲基转移酶(*DNMT1*、*DNMT3A*和*DNMT3B*)的表达量;采用基因组甲基化检测试剂盒检测分析鸡腹部脂肪组织基因组DNA甲基化的差异。结果表明:低脂鸡腹部脂肪组织中的*DNMT1*和*DNMT3A*表达量均显著高于高脂鸡( $P<0.05$ );除5周龄鸡之外,低脂鸡脂肪组织中*DNMT3B*的表达量也显著高于高脂鸡( $P<0.05$ )。基因组DNA甲基化分析发现,低脂鸡腹部脂肪组织基因组DNA甲基化的总体水平高于高脂鸡( $P<0.05$ )。结果提示,DNA甲基化调控鸡脂肪组织生长发育,DNA甲基化差异可能是高、低脂鸡腹脂性状差异的原因之一。

**关键词:**鸡;脂肪组织;DNA甲基化;DNA甲基转移酶;基因表达

中图分类号:S831.2

文章编号:A

文章编号:0258-7033(2016)07-0022-05

收稿日期:2015-04-20;修回日期:2015-05-27

资助项目:国家973计划课题(2009CB941604);国家863课题(2011AA100301)

作者简介:张天目,男,黑龙江哈尔滨人,硕士研究生,主要从事动物遗传育种与繁殖研究,E-mail:gf\_fzhang@163.com

\*通讯作者:王宁,教授,博士生导师,从事动物遗传育种与繁殖研究,E-mail:wangning@neau.edu.cn

DNA甲基化是指通过DNA甲基转移酶(*DNMTs*)的催化,以S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,选择性的将甲基添加到特定核苷酸碱基上的过程。DNA甲基化参与基因组印记、基因表达调控和发育调节等多种生物学过程。一般来讲,DNA的甲基化水平与基因表达程度呈负相关<sup>[1]</sup>。

脂肪组织的发育包括间充质干细胞与前脂肪细

germplasm characteristics. This study used fortran 90 to simulate and rebuild the classical Buri's Drosophila experiment's conservation process, and utilize measure index - Gene frequency, F-statistics, Heterozygosity to measure the variation of within and between populations genetic diversity in the process of specific gene in the storage generation. Subsequently, OMPG (one-migration-per-generation) rule was used to research the maintaining effect that migration affects the livestock conservation groups' genetic diversity. The overall trend in conservation groups genetic diversity, with the extension of conservation generations, is reducing gradually, Specifically, the degree in population differentiation increased: Fst, Fit, from the initial generation: 0.0421, 0.0011, rising to 19 generations: 0.3885, 0.3305, rises as high as 89.16% and 99.67%; heterozygosity reduction: hi, hs, from the initial generation: 0.4994, 0.4790, declining to 19 generation: 0.3347, 0.3057, decreases to 32.98% and 36.18% respectively; then by utilizing the OMPG principles to operate species groups and found that the degree of population differentiation weaken: Fst, Fit, from the initial generation after operating the OMPG principle: 0.3667, 0.3504, declining to 19 generations after operating OMPG principle 0.2341, 0.1944, decreases to 36.16% and 44.52%, respectively; Heterozygosity rised: hi, hs, from the initial generation after operating the OMPG principle: 0.3248, 0.3166, rising to 19 generations after operating OMPG principle: 0.4025, 0.3826, rises as high as 23.92% and 20.84%, respectively Effect of genetic drift leads to a loss of genetic diversity within populations, The OMPG principle inputting effect can offset the genetic recession of the small conservation groups, and maintain the stability of the genetic diversity in the conservation groups.

**Key words:** computer simulation; genetic diversity; conservation; livestock germplasm resources

胞的增殖、分化等过程<sup>[2]</sup>。近年的研究表明,DNA甲基化在脂肪组织发育中发挥重要的作用<sup>[3-5]</sup>。Miles等<sup>[6]</sup>研究表明,与正常人相比,通过胃绕路手术进行减肥的人,其脂肪组织中与脂肪发育相关的基因的DNA甲基化情况会发生变化。Li等<sup>[7]</sup>实验发现,猪脂肪组织发育相关基因(如*HEXB*和*HTR2A*)启动子区不同区域的DNA甲基化造成了这些基因的表达抑制,从而导致了显著肥胖。本实验室在研究鸡脂肪发育的过程中,对高、低脂鸡腹脂中*PPAR $\gamma$* 和*C/EBP $\alpha$* 基因的启动子区进行了分析,发现这2个基因启动子区DNA甲基化在高、低脂鸡间存在差异,其中,*PPAR $\gamma$* 基因的表达与其启动子区甲基化呈负相关<sup>[8]</sup>。

为了全面了解鸡脂肪组织基因组DNA的甲基化及其作用,本课题组开展了东北农业大学高、低脂双向选择系第18世代4~7周龄肉鸡腹部脂肪组织中甲基转移酶的表达及其基因组DNA甲基化差异的分析。本研究结果将为进一步了解DNA甲基化在脂肪组织生长发育中的作用及其作用机制研究奠定基础。

## 1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 7500 Real-Time RT-PCR System(美国Applied Biosystem);低温高速离心机(德国Eppendorf公司);酶标仪(美国Biotek公司);电泳仪(北京市六一仪器厂);凝胶分析系统(UVP公司);PCR仪(德国Biometra公司);移液器(德国Eppendorf公司);DEPC;总RNA提取试剂盒(OMEGA公司);基

因组DNA总体甲基化检测试剂盒(Epigentek公司);反转录试剂盒(Promega公司)。

1.2 实验动物与饲养实验动物为东北农业大学高、低脂双向选择系第18世代4~7周龄肉鸡,两品系肉鸡的养殖条件一致,按照国家实验动物饲养要求进行饲养。每个周龄的高、低脂肉鸡分别随机选择5只,实验用鸡共40只,采集鸡腹部脂肪组织并迅速冷冻,-80℃中保存。

1.3 腹部脂肪组织*DNMT1*、*DNMT3A*及*DNMT3B*基因mRNA表达的检测

1.3.1 腹部脂肪组织总RNA的提取及反转录 采用OMEGA公司总RNA提取试剂盒(Total RNA Kit II, R6934-01),提取腹部脂肪组织样品的总RNA,具体方法按照试剂盒说明书操作,提取的总RNA溶于DEPC水,利用琼脂糖凝胶电泳检测RNA的质量。电泳时可以观测到3个条带,分别为28S、18S和5S,其中28S是18S的2倍,5S相对较弱,证明RNA质量较好。利用紫外分光光度计测定 $A_{260}/A_{280}$ 的比值,比值在1.8~2.0的RNA质量较高,取高质量的RNA,利用反转录试剂盒(Promega公司)进行反转录,具体操作按照说明书进行,将反转录的cDNA置于-20℃保存。

1.3.2 Real-Time RT-PCR*DNMT1*、*DNMT3A*及*DNMT3B*基因的引物 参照文献<sup>[9]</sup>设计合成,使用*NONO*作为内参基因,*NONO*引物序列使用Primer5设计合成,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算表达的结果。引物序列参见表1。利用SYBR Green Master(ROX)荧光染料法进行扩增。反

表1 Real-Time RT-PCR 引物序列

GenBank序列号	基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
NM_206952	<i>DNMT1</i>	TGTCCATCTTCGACGCCAAC CATAGATGGGCTTCACGGCA	176
NM_001024832	<i>DNMT3A</i>	GGGTGAGCGACAAAAGGGAC TGGAGTTGGAGCGAGTGCTG	234
NM_001024828	<i>DNMT3B</i>	ACCAGCCAAGAGGAGACCCA TGGCGAGCGAGAGGTCATTA	269
NM_00131532.1	<i>NONO</i>	AGAAGCAGCAGCAAGAAC TCCTCCATCCTCCTCACT	151

应体系(10  $\mu$ L):SYBR Green Master 5  $\mu$ L,cDNA模板1.0  $\mu$ L,上、下游引物(10 pmol/ $\mu$ L)各0.2  $\mu$ L,灭菌超纯水3.6  $\mu$ L。利用ABI 7500 Real Time PCR System进行检测。反应条件:95℃预变性10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,40个循环。然后进行溶解反应,反应条件为95℃ 15 s,60℃ 10 min,95℃ 15 s。

1.4 高、低脂鸡脂肪组织基因组DNA总体甲基化水平的检测

1.4.1 高、低脂鸡脂肪组织基因组DNA的提取 利用北京康为世纪公司生产的基因组DNA提取试剂盒(CW2298A)提取鸡脂肪组织基因组DNA,严格按照试剂盒说明书操作。利用琼脂糖凝胶电泳检测基因

组DNA的提取质量,并利用紫外分光光度计测定 $A_{260}/A_{280}$ 的比值,比值在1.7~1.9为高质量DNA,选择质量较高的DNA置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4.2 检测基因组DNA总体甲基化水平采用基因组总体甲基化水平检测试剂盒(Methyl Flash™ Methylated DNA Quantification Kit, P-1034, Epigentek公司)检测高、低脂鸡腹部脂肪组织基因组DNA总体甲基化水平,使用试剂盒提供的阴性和阳性对照做出标准曲线,利用酶标仪在450nm处读取样品OD值(Sample OD),阴性对照OD值(ME3 OD),阳性对照OD值(ME4 OD),根据公式:

$$5\text{-mC}\% = \frac{(\text{Sample OD} - \text{ME3 OD}) + 100}{(\text{ME4 OD} - \text{ME3 OD}) \times 2 + 5} \times 100\%$$

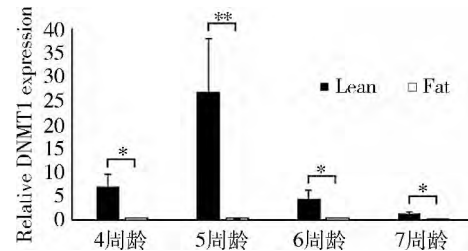
计算5-甲基胞嘧啶的相对含量,从而比较基因组DNA的甲基化水平。

1.5 统计分析 采用 $t$ 检验对数据进行统计分析,数据采用平均值 $\pm$ 标准差表示。

## 2 结果与分析

2.1 高、低脂肉鸡脂肪组织中DNA甲基转移酶表达情况的检测 RT-PCR表达分析显示,在4、5、6、7周龄高、低脂肉鸡的脂肪组织中, $DNMT1$ 在低脂鸡中的表达量显著高于高脂鸡( $P<0.05$ ),且在5周龄时表达量差异达到极显著水平( $P<0.01$ )(图1); $DNMT3A$ 在低脂鸡中的表达量也显著高于高脂鸡( $P<0.05$ ),且在4周龄和5周龄时表达量的差异达极显著水平( $P<0.01$ )(图2)。 $DNMT3B$ 在高、低脂双向选择系中的表达量均相对较低,5周龄低脂肉鸡中没有检测到 $DNMT3B$ 的表达,除此之外, $DNMT3B$ 在4、6、7周龄低脂鸡脂肪组织中的表达均显著高于高脂鸡( $P<0.05$ )(图3)。同时,可以观察到,在低脂鸡脂肪组织中, $DNMT1$ 和 $DNMT3A$ 的相对表达量比 $DNMT3B$ 的要高,且都表现为随鸡年龄的增加有较大的增长,均在5周龄时达到最大值,但随着鸡年龄的进一步增大,到6周龄和7周龄时,开始有较大幅度的下降,而 $DNMT3B$ 的表达量在6周龄时达到最大。在高脂鸡脂肪组织中, $DNMT1$ 、 $DNMT3A$ 及 $DNMT3B$ 3种DNA甲基转移酶的表达量随着鸡龄的增加变化不明显( $P>0.05$ )。

2.2 高、低脂鸡腹部脂肪组织基因组DNA的总体甲基化分析 图4显示,与甲基化酶表达模式相似,在鸡脂肪组织生长发育过程中,脂肪组织基因组DNA的甲基化也呈动态变化。与高脂肉鸡相比,低



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

图1 高、低脂肉鸡腹部脂肪组织 $DNMT1$ 表达分析

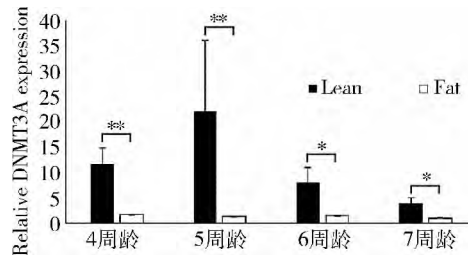


图2 高、低脂肉鸡腹部脂肪组织 $DNMT3A$ 表达分析

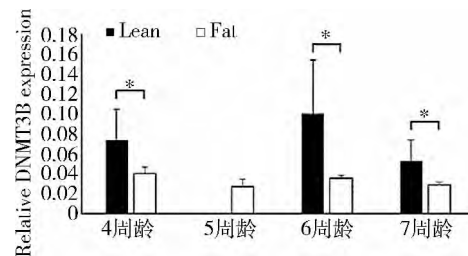


图3 高、低脂肉鸡腹部脂肪组织 $DNMT3B$ 表达分析

脂肉鸡腹部脂肪组织基因组DNA的总体甲基化水平显著高于高脂肉鸡的( $P<0.05$ ),且在5周龄达到最高( $P<0.01$ ),并且,随鸡年龄的增长呈下降趋势。低脂鸡腹部脂肪组织基因组DNA的总体甲基化水平的这种变化趋势与低脂鸡腹部脂肪组织中 $DNMT1$ 和 $DNMT3A$ 的表达模式一致。而高脂鸡脂肪组织的基因组DNA甲基化水平则一直维持在一个相对较低的水平。

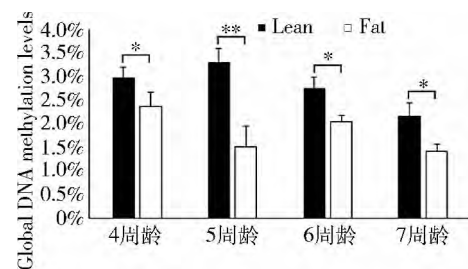


图4 高、低脂肉鸡腹部脂肪组织基因组DNA甲基化水平的差异分析

## 3 讨论

脂肪组织生长发育的表观遗传学是近年来研究

的一个热点。很多学者在多种哺乳动物中的研究都证实DNA甲基化参与动物脂肪组织的生长发育<sup>[3-8]</sup>。东北农业大学高、低脂双向选择系肉鸡在腹脂率和腹脂含量上存在极为显著的差异<sup>[8]</sup>。本研究发现,低脂肉鸡腹部脂肪组织的3个DNA甲基转移酶的表达水平普遍显著高于高脂。Londono等<sup>[10]</sup>通过对小鼠脂肪组织的研究发现,*DNMT1*的表达能够抑制与脂肪发育相关基因的表达,并能在早期脂肪发育过程中抑制脂肪沉积。与此相一致,我们发现低脂鸡脂肪组织*DNMT1*基因高表达,推测鸡和鼠脂肪组织中*DNMT1*可能发挥相同作用。Kamei等<sup>[11]</sup>发现,在对鼠进行饮食诱导肥胖后,肥胖鼠*DNMT3A*的表达量高于正常鼠*DNMT3A*的表达量,这与本实验得到的结果相反,出现这个差异的原因可能是鸡和鼠*DNMT3A*的作用可能不同,但这有待于进一步的实验验证。*DNMT1*、*DNMT3A*和*DNMT3B*3种DNA甲基转移酶中,鸡脂肪组织中*DNMT3B*的表达量最低,推测*DNMT3B*可能在脂肪生长发育中作用不大。有报道*DNMT3B*主要在胚胎发育期发挥作用<sup>[12]</sup>。

Kim等<sup>[13]</sup>对人类DNA甲基转移酶进行的研究表明,DNA甲基转移酶对于建立和维持基因组DNA甲基化是非常重要的。DNA甲基转移酶负责基因组DNA的甲基化,低脂鸡脂肪组织高表达DNA甲基化酶,提示低脂鸡腹部脂肪组织中DNA甲基化的水平可能高于高脂鸡。DNA甲基化试剂盒检测结果与上述推测相一致,低脂鸡腹部脂肪组织DNA的总体甲基化水平比高脂鸡高。*PPAR $\gamma$* 是脂肪细胞分化最关键的基因,王丽等<sup>[14]</sup>实验证实,7周龄高脂鸡腹部脂肪组织中*PPAR $\gamma$* 的表达量比低脂鸡高,并且在体外培养鸡原代前脂肪细胞时,通过抑制*PPAR $\gamma$* 的表达能够显著增强其增殖能力,减弱分化能力,说明*PPAR $\gamma$* 是调控鸡脂肪细胞增殖与分化的关键因子。高媛等<sup>[2]</sup>发现,低脂肉鸡腹部脂肪组织中*PPAR $\gamma$* 基因启动子区的DNA甲基化程度高于高脂鸡,这与本研究的高、低脂腹脂DNA总体甲基化检测结果是一致的。

在高、低脂系鸡脂肪组织DNA甲基化酶表达分析中,本研究发现低脂系鸡中*DNMT1*和*DNMT3A*的表达水平在4周龄时较低,5周龄时达到最高,6、7周龄呈下降趋势。低脂系鸡脂肪组织DNA的总体甲基化水平也呈现出与*DNMT1*和*DNMT3A*表达相似的变化趋势,而在高脂系鸡中DNA甲基转移酶和基因组

DNA甲基化水平均维持较低的水平。Jin等<sup>[15]</sup>通过检测幼年和中年猪的不同组织的DNA甲基转移酶和基因组DNA甲基化差异证实,心脏等组织的基因组DNA甲基化总体水平随年龄增长而降低,并且这种变化与*DNMT3B*的表达量呈负相关,这与本研究结果类似,提示脂肪组织DNA甲基化在生长发育中是动态变化的。

Yu等<sup>[16]</sup>研究发现,叶酸能促进鸡前脂肪细胞的增殖能力而降低脂滴沉积,进一步的DNA甲基化分析发现,与对照相比,添加叶酸后,脂肪细胞分化转录因子*C/EBP $\alpha$* 基因启动子区被高甲基化,同时伴随着其表达下降。Xing等<sup>[17]</sup>发现,添加甜菜碱能够略微提高肉鸡的日增重和腹脂含量,基因表达分析发现肉鸡腹部脂肪组织*LPL*基因的表达下降,同时启动子区DNA甲基化分析显示,*LPL*基因启动子CpG位点甲基化模式发生改变。这些研究结果结合本研究结果,提示DNA甲基化在鸡脂肪组织生长发育和脂肪沉积中发挥着重要调控作用,DNA甲基化的差异可能是高、低脂系肉鸡腹脂性状差异的重要原因之一。

本研究采用ELISA法分析高、低脂系肉鸡脂肪组织基因组DNA甲基化差异,但该方法只能检测全基因组中5-甲基胞嘧啶的含量,无法确定是哪些特定基因或区域发生了甲基化,未来将采用重亚硫酸盐处理,结合基因组重测序,了解并确定高、低脂系肉鸡基因组甲基化差异区域,分析这些甲基化差异区域在鸡脂肪生长中的作用和作用机制。

#### 4 结 论

本研究证实,高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织基因组DNA甲基化存在差异,其中低脂系鸡脂肪组织DNA的甲基化水平偏高。本研究结果提示,DNA甲基化参与脂肪组织的发育调控。

#### 参考文献:

- [1] Mohn F, Weber M, Rebhan M, et al. Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors[J]. Mol Cell, 2008, 30(6): 755-766.
- [2] 高媛,孙婴宁,李辉,等. DNA甲基化与脂肪组织生长发育[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, (9): 73-80.
- [3] Shore A, Karamitri A, Kemp P, et al. Role of Ucp1 enhancer methylation and chromatin remodelling in the control of Ucp1 expression in murine adipose tissue [J]. Diabetologia, 2010, 53(6): 1164-1173.

- [4] Bowers R R, Kim J W, Otto T C, *et al.* Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: role of the BMP-4 gene [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(35): 13022–13027.
- [5] Noer A, Boquest A C, Collas P. Dynamics of adipogenic promoter DNA methylation during clonal culture of human adipose stem cells to senescence[J]. *BMC Cell Biol*, 2007, 8: 18.
- [6] Benton M C, Johnstone A, Eccles D, *et al.* An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss[J]. *Genome Biol*, 2015, 16: 8.
- [7] Li M, Wu H, Luo Z, *et al.* An atlas of DNA methylomes in porcine adipose and muscle tissues [J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 850.
- [8] Sun Y N, Gao Y, Qiao S P, *et al.* Epigenetic DNA methylation in the promoters of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in chicken lines divergently selected for fatness [J]. *J Anim Sci*, 2014, 92(1): 48–53.
- [9] Lee J Y, Jeong W, Lim W, *et al.* Hypermethylation and post-transcriptional regulation of DNA methyltransferases in the ovarian carcinomas of the laying hen [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): 392–392.
- [10] Londono G T, Lu C, Lodato P M, *et al.* DNMT1 is regulated by ATP-citrate lyase and maintains methylation patterns during adipocyte differentiation[J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(19): 3864–3878.
- [11] Kamei Y, Suganami T, Ehara T, *et al.* Increased expression of DNA methyltransferase 3a in obese adipose tissue: studies with transgenic mice[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2010, 18(2): 314–321.
- [12] Okano M, Bell D W, Haber D A, *et al.* DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development[J]. *Cell*, 1999, 99(3): 247–257.
- [13] Kim G D, Ni J, Kelesoglu N, *et al.* Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases [J]. *EMBO J*, 2002, 21(15): 4183–4195.
- [14] 王丽, 那威, 王宇祥, 等. 鸡PPAR $\gamma$ 基因的表达特性及其对脂肪细胞增殖分化的影响[J]. *遗传*, 2012, (4): 76–86.
- [15] Jin L, Jiang Z, Xia Y, *et al.* Genome-wide DNA methylation changes in skeletal muscle between young and middle-aged pigs [J]. *Bmc Genom*, 2014, 15(1): 1–12.
- [16] Yu X, Liu R, Zhao G, *et al.* Folate supplementation modifies CCAAT/enhancer-binding protein alpha methylation to mediate differentiation of preadipocytes in chickens [J]. *Poult Sci*, 2014, 93(10): 2596–2603.
- [17] Xing J, Kang L, Jiang Y. Effect of dietary betaine supplementation on lipogenesis gene expression and CpG methylation of lipoprotein lipase gene in broilers [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(3): 1975–1981.

### Comparison of DNA Methylation in Abdominal Adipose Tissue between Chicken Lines Divergently Selected for Fatness

ZHANG Tian-mu, DUAN Kui, WANG Shou-zhi, YAN Xiao-hong, LI Hui, WANG Ning\*

(Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province, College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Heilongjiang Harbin 150030, China)

**Abstract:** The fat and lean broilers of the 18th generation of Northeast Agricultural University broiler lines divergently selected for abdominal fat content (NEAUHLF) from 4 to 7 weeks of age were used to detect the expression of DNA methyltransferases (*DNMT1*, *DNMT3A* and *DNMT3B*) and global DNA methylation in the abdominal adipose tissues using real-time RT-PCR and MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit. The results showed that the expression levels of *DNMT1* and *DNMT3A* genes were significantly higher in the lean line than in the fat line ( $P < 0.05$ ). *DNMT3B* gene expression was lowly expressed in chicken adipose tissue, comparatively, it was higher expressed in the lean line at 4, 6 and 7 weeks of age than in the fat line ( $P < 0.05$ ). Consistently, DNA methylation analysis showed that the global DNA methylation levels in abdominal adipose tissue were significantly higher in lean line than in fat line in all tested ages ( $P < 0.05$ ). Our results indicated that DNA methylation is involved in chicken adipose development and the DNA methylation difference may contribute to the fatness trait difference in NEAUHLF.

**Key words:** chicken; adipose tissue; DNA methylation; DNA methyltransferase; gene expression