

# TCF21 基因对鸡前脂肪细胞增殖的影响

李嘉煜, 张心扬, 李辉\*, 原辉\*

(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, 黑龙江哈尔滨 150030)

**摘要:** 实验旨在研究 *TCF21* 基因在鸡前脂肪细胞增殖过程中的功能。以鸡永生化前脂肪细胞系 (ICP1) 和体外分离培养的鸡原代前脂肪细胞为实验材料, 首先利用 qRT-PCR 实验方法分析 *TCF21* 在 ICP1 细胞和鸡原代前脂肪细胞增殖过程中的表达规律, 其次利用 CCK-8 比色法研究过表达和干扰 *TCF21* 基因对鸡前脂肪细胞增殖过程中细胞数的影响, 最后利用 qRT-PCR 实验方法分析细胞增殖过程中标志基因 *PCNA*、*cyclinD1* 和 *Ki67* 的表达情况。结果表明: *TCF21* 基因在 ICP1 细胞和体外分离培养的鸡原代前脂肪细胞的增殖过程中均呈下降趋势; 过表达 *TCF21* 基因抑制鸡前脂肪细胞的增殖, 且细胞增殖标志基因 *PCNA*、*cyclinD1* 和 *Ki67* 的 mRNA 表达水平下调; 干扰 *TCF21* 基因对鸡前脂肪细胞增殖无明显影响。综上所述, *TCF21* 可能对鸡前脂肪细胞的增殖有一定的抑制作用。

**关键词:** *TCF21*; 增殖; 前脂肪细胞; 鸡

**中图分类号:** S831.2

**文献标识码:** A

**DOI 编号:** 10.19556/j.0258-7033.2018-09-045

在肉鸡繁育过程中, 鸡腹脂率过高严重影响种鸡的受精率、产蛋率和孵化率<sup>[1-2]</sup>。研究脂肪沉积的分子遗传机制对防止肉鸡体脂过度沉积, 提高肉鸡的饲料转化效率具有深远意义。脂肪沉积并非受单一因素影响, 在细胞水平上, 脂肪沉积的主要原因是脂肪细胞的数目增加和体积变大<sup>[3]</sup>。

转录因子 21 (Transcription Factor 21, *TCF21*) 又名 *POD1*、*bHLHa23*, 属于碱性螺旋-环-螺旋 (bHLH)

家族。在哺乳动物上已发现多个具有 bHLH 结构特点的转录因子在脂肪生成和脂类代谢过程中起重要作用<sup>[4-6]</sup>。*TCF21* 作为肿瘤抑制基因, 已被证明在多种癌细胞中呈低表达状态<sup>[7]</sup>。体外研究证实, *TCF21* 可抑制肺癌细胞 A549 和卵巢癌细胞的增殖<sup>[8-9]</sup>。在禽类上, *TCF21* 在鸡胚胎发育过程中的多种组织中均有表达<sup>[10]</sup>, 在鸡心脏发育过程中扮演重要角色<sup>[11]</sup>。迄今为止, 未见 *TCF21* 基因在鸡前脂肪细胞增殖过程中作用的相关报道。

本课题组前期研究显示, *TCF21* 基因的表达水平与睾丸重和睾丸比例显著相关<sup>[12]</sup>。脂肪沉积能够影响公鸡的繁殖性能, 人和小鼠上的研究表明, 肥胖会抑制睾丸组织的发育<sup>[13]</sup>, 因此影响繁殖性状的基因也可能和脂肪组织的生长发育密切相关。本研究针对 *TCF21* 是否影响鸡前脂肪细胞的增殖展开相关实验。

收稿日期: 2018-03-15; 修回日期: 2018-03-21

资助项目: 国家自然科学基金 (31772586)

作者简介: 李嘉煜 (1993-), 女, 哈尔滨人, 硕士, 主要从事家禽遗传育种研究, E-mail: ljy19930617@163.com

\* 通讯作者: 李辉, E-mail: lihui@neau.cn; 原辉, E-mail: huiyuan@neau.edu.cn

*FTO* gene was performed using the corresponding software. Eight SNPs were selected in the exon region of *FTO* gene, Exon2-C139T, Exon3-A242G, Exon3-T282A, Exon3-C339T, Exon3-G387T, Exon3-T399C, Exon9-C1615G, and Exon9-G1718A. The analysis showed that mutations in Exon3-A242G, Exon3-T282A, Exon3-C339T, Exon3-G387T, and Exon3-T399C sites were within the CDS region, in which Exon3-A242G (Gln-His) and Exon3-G387T caused changes in mRNA secondary structure. Among them, the Exon3-C339T and Exon3-G387T mutations resulted in the increase of the minimum free energy of the mRNA secondary structure, ie, the decrease of the secondary structure stability. The bioinformatics analysis of the *FTO* gene sequence revealed that *FTO* is a non-secreting hydrophilic protein and that there is no transmembrane region. The main site of biological function is cytoplasm, there are 7 Ser sites, 5 at the Thr site, 5 Tyr sites, the number of helium helix structures in the secondary structure was the most.

**Keywords:** Qianbei Ma goat; *FTO* gene; Bioinformatics; SNPs

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 实验所用原代前脂肪细胞由11日龄罗斯308肉仔鸡腹部脂肪直接分离而来；细胞系为实验室前期构建的鸡前脂肪细胞系（命名为ICP1）<sup>[14]</sup>；所用的pCMV-HA-TCF21和pCMV-HA转染质粒为本实验室保存，si-TCF21和si-nc干扰片段由上海吉玛生物公司合成。

1.2 鸡原代前脂肪细胞的体外分离培养 以11日龄的罗斯308肉仔鸡腹部脂肪为实验材料，超净台下采集腹部脂肪组织，用1%双抗的PBS清洗组织2次，将剪碎后的组织转入含有消化液的50 mL离心管中，于37°C培养箱中消化65 min后，加入与消化液等体积的全培养基终止反应，分别经100目和600目筛网过滤，将滤液分装入15 mL离心管，2 000 r/min，离心10 min，弃上清。沉淀用红细胞裂解液重悬，室温孵育10 min后2 000 r/min离心10 min，沉淀用全培养基重悬，2 000 r/min离心7 min，加入全培养基重悬。计数后按 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个/mL的密度接种培养瓶中，于37°C 5%的CO<sub>2</sub>培养箱中培养，48 h后换液洗去未贴壁的细胞<sup>[15]</sup>。

1.3 细胞转染 将细胞按照 $1 \times 10^5$ 个/mL的密度接种于细胞培养板中，传板的同时进行反向转染，具体步骤按照转染试剂Lipofectamine®2000说明书进行，同时设置EGFP转染的阳性对照组，确定转染效率。将pCMV-HA-TCF21和pCMV-HA分别瞬时转染至ICP1细胞中，转染后24、48、72、96 h分别收集细胞，提取细胞总蛋白，利用HA标签抗体进行Western Blot，以验证pCMV-HA-TCF21在本实验所有时间点是否均能正确表达。将si-TCF21和si-nc分别瞬时转染至ICP-1细胞中，转染后24、48、72、96 h收集细胞，提取细胞总RNA，利用qRT-PCR的方法，以TBP为内参基因，检测TCF21基因在干扰组和对照组的表达量，验证si-TCF21在本实验所有时间点均能达到干扰效果。每个处理组内设置3个重复。

1.4 CCK-8法检测细胞增殖 分别在细胞增殖24、48、72、96 h向每孔中加入培养基体积10%的CCK-8溶液，用锡纸包好培养板，于培养箱中避光培养，2 h后用酶标仪测定450 nm波长下的吸光度。每个处理组内设置6个重复。

1.5 qRT-PCR检测基因表达 Trizol法提取细胞的总

RNA，反转录按照PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa)说明书操作。qRT-PCR反应按照Fast Start Universal SYBR Green Master(ROX)说明书操作。反应体系：ROX (2×) 5 μL，上、下游引物 (10 μmol/L) 各0.2 μL，cDNA模板1 μL，ddH<sub>2</sub>O 3.6 μL。反应条件：预变性95°C 10 min，变性95°C 15 s，复性延伸60°C 60 s，共40个循环。每个样品设3个技术重复。以TBP为内参基因，利用2<sup>-ΔCt</sup>的方法将原始Ct值转换为相对基因表达量。所用引物序列见表1。

表1 qRT-PCR引物

基因名称	GenBank 登录号	序列 (5'→3')
TCF21	NM_001277711.1	F: ACGCTGCCAACGCAAGGG R: TGTTCACTTCTTTCAGGTCCTC
Cyclin D1	NM_205381	F: AGAAGTGCGAAGAGGAAGT R: TGATGGAGTTGTGCGGTGTA
PCNA	NM_204170	F: GTGCTGGACCTGGGTT R: CGTATCCGCATTGTCTTCT
KI67	NM_205505	F: AGGTCGGTCCCTCGTT R: CATTGTCGTCTGGGTCATC
TBP	NM_205103.1	F: GCGTTTTGCTGCTGTTATTATGAG R: TCCTTGCTGCCAGTCTGGAC

1.6 统计分析 利用JMP 7.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC)软件对实验数据进行t检验，P<0.05为差异显著，P<0.01为差异极显著。

## 2 结果

2.1 TCF21基因在鸡原代前脂肪细胞增殖过程中的表达 分别于细胞增殖的24、48、72、96 h在显微镜下观察细胞，细胞形态正常，且处于增殖状态 (图1)；CCK-8分析显示，细胞处于对数生长期 (表2)。qRT-PCR结果显示，TCF21在鸡原代前脂肪细胞和ICP1细

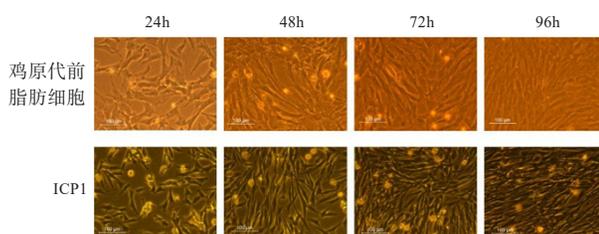


图1 体外分离培养鸡原代前脂肪细胞和ICP1细胞增殖过程中显微镜下形态观察

胞的增殖过程中均呈下降趋势，且在相同时间点原代前脂肪细胞中的表达量均高于 ICP1 细胞（表 3）。

表 2 体外分离培养鸡原代前脂肪细胞和 ICP1 细胞增殖过程中细胞数的变化

细胞类型	450 nm OD 值			
	24 h	48 h	72 h	96 h
ICP1	0.62±0.60	1.08±0.23	1.33±0.38	1.53±0.32
鸡原代前脂肪细胞	0.44±0.01	0.71±0.02	0.95±0.05	1.32±0.07

表 3 TCF21 在体外分离培养鸡原代前脂肪细胞和 ICP1 细胞增殖过程中 mRNA 水平的变化

细胞类型	24 h	48 h	72 h	96 h
ICP1	0.0022±0.00022 <sup>A</sup>	0.0015±0.000438 <sup>B</sup>	0.0010±0.000904 <sup>B</sup>	0.00042±0.000625 <sup>C</sup>
鸡原代前脂肪细胞	0.25±0.056 <sup>A</sup>	0.14±0.0027 <sup>B</sup>	0.08±0.0059 <sup>BC</sup>	0.038±0.00083 <sup>C</sup>

注：同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（ $P < 0.05$ ），不同大写字母表示差异极显著（ $P < 0.01$ ），无字母表示差异不显著（ $P > 0.05$ ）。下表同

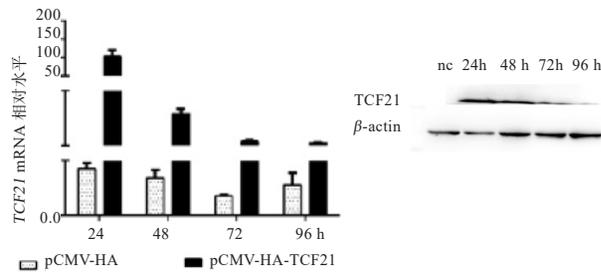


图 2 利用 qRT-PCR 和 Western Blot 方法在 mRNA 水平（左）和蛋白水平（右）验证 TCF21 过表达效果

表 4 过表达 TCF21 对 ICP1 细胞增殖过程中细胞数的影响

转染质粒	450 nm OD 值			
	24 h	48 h	72 h	96 h
pCMV-HA	0.63±0.04	1.25±0.11	1.64±0.13	2.10±0.17
pCMV-HA-TCF21	0.56±0.60	1.17±0.097	1.55±0.12	1.97±0.25

过表达组的 PCNA 表达量显著低于对照组（ $P < 0.05$ ）。

2.3 干扰 TCF21 基因对鸡前脂肪细胞增殖的影响 分别瞬时转染 si-TCF21 和 si-nc 至 ICP1 细胞中，在 mRNA 水平上验证 si-TCF21 的干扰效率（图 3）。对转染了 si-TCF21 和 si-nc 的鸡前脂肪细胞同时进行 CCK-8 检

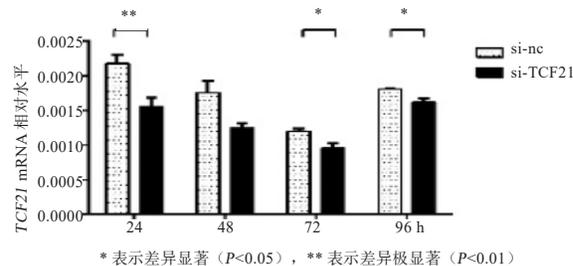


图 3 利用 qRT-PCR 方法在 mRNA 水平验证 TCF21 干扰效果

2.2 过表达 TCF21 基因对鸡前脂肪细胞增殖的影响 分别瞬时转染 pCMV-HA-TCF21 和 pCMV-HA 至 ICP1 细胞中，建立能够过表达 TCF21 组细胞和对照组细胞，通过 qRT-PCR 和 Western Blot 方法分别从 mRNA 水平和蛋白水平证明 pCMV-HA-TCF21 能够在 ICP1 细胞中正确表达（图 2）。由表 4 可知，在增殖过程中各个时间点，TCF21 过表达组的细胞数均略低于对照组。qRT-PCR 结果显示（表 5），在转染后 72 h，TCF21

测所示，干扰 TCF21 基因对鸡前脂肪细胞增殖过程中细胞数的影响不大（表 6）。qRT-PCR 结果表明，转染后 24 h 和 48 h CyclinD1 和 Ki67 的 mRNA 水平表达量略有升高，但整体变化不大（表 7）。

表 5 过表达 TCF21 对 ICP1 细胞增殖过程中重要基因表达的影响

转染质粒	时间	pCMV-HA	pCMV-HA-TCF21
PCNA	24 h	10.62±1.92	10.79±1.21
	48 h	14.73±4.78	9.81±0.95
	72 h	14.33±1.73 <sup>a</sup>	8.08±1.67 <sup>b</sup>
	96 h	4.99±2.02	2.61±0.34
CyclinD1	24 h	4.03±0.27	4.26±0.51
	48 h	4.40±0.46	3.87±0.60
	72 h	1.95±0.15	1.64±0.48
	96 h	3.20±0.10	3.33±0.17
Ki67	24 h	3.50±0.20	3.24±0.31
	48 h	2.78±0.41	2.48±0.25
	72 h	2.80±0.32	2.67±0.60
	96 h	2.27±0.38	2.11±0.21

表 6 干扰 TCF21 对 ICP1 细胞增殖过程中细胞数的影响

转染干扰片段	450 nm OD 值			
	24 h	48 h	72 h	96 h
si-nc	0.66±0.05	1.23±0.12	1.74±0.19	2.13±0.27
si-TCF21	0.62±0.034	1.23±0.15	1.67±0.10	2.10±0.15

### 3 讨论

在哺乳动物上，TCF21 基因已被证明参与心脏、肾脏、肌肉等组织的生长发育<sup>[16-18]</sup>，但 TCF21 基因对

表7 干扰 *TCF21* 对 ICP1 细胞增殖过程中重要基因表达的影响

mRNA 相对表达量	时间	si-nc	si-TCF21
PCNA	24 h	12.40±2.40	11.91±0.68
	48 h	9.52±0.60	9.12±0.99
	72 h	8.95±0.15	8.06±0.35
	96 h	3.15±0.20	3.13±0.29
CyclinD1	24 h	2.39±0.17	2.87±0.35
	48 h	2.58±0.10	2.67±0.51
	72 h	1.20±0.13	1.08±0.15
	96 h	3.02±0.27	2.70±0.53
Ki67	24 h	7.59±0.71	8.15±0.51
	48 h	6.58±0.58	7.39±0.53
	72 h	7.40±0.39	6.86±0.12
	96 h	5.18±1.19	6.02±0.38

鸡脂肪组织生长发育的影响未见报道。本实验显示,在体外分离培养的原代前脂肪细胞和 ICP1 细胞的增殖过程中, *TCF21* 的表达量均呈下降趋势,且在不同时间点之间 *TCF21* 的表达量存在极显著差异,表明 *TCF21* 可能抑制鸡前脂肪细胞的增殖。

为验证这一结论,首先通过构建 *TCF21* 过表达载体,结果显示在细胞增殖过程中 *TCF21* 过表达组的细胞数低于对照组。谭婧宇等<sup>[19]</sup>发现,在 SMMC-7721 肝癌细胞中过表达 *TCF21* 基因也会导致细胞数降低;Gooskens 等<sup>[20]</sup>的体外过表达实验发现,在肾癌细胞系 786-O 中过表达 *TCF21* 基因细胞数略有降低,但不显著。上述实验结果与本研究结果大体一致。此外,本实验中 *TCF21* 过表达组 *PCNA* 基因的表达量在增殖的 72 h 显著下降, *Ki67* 基因的表达量在增殖过程中均略低于对照组。*PCNA* 与细胞 DNA 合成密切相关,对细胞增殖的启动有重要作用, *Ki67* 是一种与细胞增殖相关的核抗原,其对细胞的有丝分裂具有重要的调节作用,二者均是反映细胞增殖状态良好的指标<sup>[21-22]</sup>。本实验中, *PCNA* 和 *Ki67* 表达量的下调同样暗示过表达 *TCF21* 基因可能抑制鸡前脂肪细胞增殖。

为了更充分证明 *TCF21* 对鸡前脂肪增殖的抑制作用,本实验利用 RNAi 技术从反方向进行验证,结果显示,干扰 *TCF21* 基因对鸡前脂肪的细胞数无影响,且细胞增殖基因的表达量变化不大,原因可能是 *TCF21* 在鸡前脂肪细胞 ICP1 中的本体表达量较低,干扰效果不明显,基因下调产生的影响不足以影响细胞增殖变化。

综上所述,本研究在体外实验条件下首次发现过表

达 *TCF21* 基因会抑制鸡前脂肪细胞的增殖。鸡脂肪组织生长发育是一个非常复杂的过程, *TCF21* 基因在鸡体内脂肪组织发育中的生物学功能仍有待于基因敲除动物的建立和研究。

#### 参考文献:

- [1] Zerehdaran S, Vereijken A L J, Van Arendonk J A M, et al. Estimation of genetic parameters for fat deposition and carcass traits in broilers[J]. *Poult Sci*, 2004, 83(4): 521-525.
- [2] 樊红平, 侯水生. 家禽体内脂肪沉积调控的研究进展[J]. *动物营养学报*, 2004, 16(4): 1-6.
- [3] 鞠大鹏, 詹丽杏. 脂肪细胞分化及其调控的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2010(5): 690-695.
- [4] Jin M, Wu Y, Wang J, et al. MicroRNA-24 promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation by directly targeting the MAPK7 signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 474(1): 76-82.
- [5] Horton J D, Goldstein J L, Brown M S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(9): 1125-1131.
- [6] Fujimoto Y, Nakagawa Y, Satoh A, et al. TFE3 controls lipid metabolism in adipose tissue of male mice by suppressing lipolysis and thermogenesis.[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(10): 3577-3588.
- [7] 郑末. *TCF21* 基因与肿瘤关系的研究进展[J]. *现代诊断与治疗*, 2016, 27(2): 228-229.
- [8] 胡松, 阳诺, 陈铭伍, 等. 抑癌基因 *TCF21* 对肺癌细胞 A549 增殖、凋亡和迁移的影响[J]. *中国肺癌杂志*, 2014, 4(17): 302-307.
- [9] 朱清华. *TCF21* 对卵巢癌细胞增殖和凋亡的作用[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016: 32-35.
- [10] Buermans H P J, Wijk B V, Hulsker M A, et al. Comprehensive gene-expression survey identifies wif1 as a modulator of cardiomyocyte differentiation[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15504.
- [11] Torlopp A, Schlueter J, Brand T. Role of fibroblast growth factor signaling during proepicardium formation in the chick embryo[J]. *Dev Dyn*, 2010, 239(9): 2393-2403.
- [12] Zhang H, Na W, Zhang H L, et al. *TCF21*, is related to testis growth and development in broiler chickens[J]. *Genet Sel Evol*, 2017, 49(1): 25.
- [13] 李云雷, 孙研研, 陈继兰, 等. 脂肪沉积对家禽繁殖性状影响的研究进展[J]. *中国家禽*, 2016, 38(13): 36-41.
- [14] Wang W, Zhang T, Wu C, et al. Immortalization of chicken preadipocytes by retroviral transduction of chicken TERT and TR[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177348.
- [15] Wang Y, Mu Y, Li H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene: a key regulator of adipocyte differentiation in chickens[J]. *Poult Sci*, 2008, 87(2): 226-232.
- [16] Tandon P, Miteva Y V, Kuchenbrod L M, et al. Tcf21 regulates the specification and maturation of proepicardial cells[J]. *Development*, 2013, 140(11): 2409-2421.
- [17] França M M, Ferraz-De-Souza B, Santos M G, et al. POD-1 binding to the E-box sequence inhibits SF-1 and StAR expression in human adrenocortical tumor cells[J]. *Mol Cell*

- Endocrinol, 2013, 371(1-2): 140-147.
- [18] Funato N, Ohyama K, Kuroda T, *et al.* Basic helix-loop-helix transcription factor epicardin/capsulin/Pod-1 suppresses differentiation by negative regulation of transcription[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(9): 7486-7493.
- [19] 谭婧宇, 张国庆, 刘锐, 等. 过表达转录因子 21 抑制 SMMC-7721 肝癌细胞的增殖和迁移并促进其凋亡 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(7): 884-888.
- [20] Gooskens S L, Klasson T D, Gremmels H, *et al.* TCF21 hypermethylation regulates renal tumor cell clonogenic proliferation and migration[J]. *Mol Oncol*, 2018, 12(2): 166-179.
- [21] Dietrich D R. Toxicological and pathological applications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a novel endogenous marker for cell proliferation[J]. *Crit Rev Toxicol*, 1993, 23(1): 77-109.
- [22] Sánchez-Muñoz A, Yessica Plata-Fernández M D, Ana Jaén M D, *et al.* Proliferation determined by ki67 marker and pcr in locally advanced breast cancer patients treated with neo-adjuvant chemotherapy[J]. *Breast J*, 2013, 19(6): 685-686.

### Effect of *TCF21* on Proliferation of Chicken Pre-adipocytes

LI Jia-yu, ZHANG Xin-yang, LI Hui\*, YUAN Hui\*

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

**Abstract:** The purpose of this study was to investigate the role of *TCF21* gene in the proliferation of chicken pre-adipocytes. Two kinds of materials, immortalized chicken pre-adipocyte lines (ICP1) and chicken pre-adipocytes cultured in vitro were chosen in this experiment. The first step was to analyze the expression pattern of *TCF21* in chicken pre-adipocyte proliferation by qRT-PCR. Next, CCK-8 colorimetric method was implemented, in order to find the impact of over-expression and knock-down of *TCF21* in chicken pre-adipocytes on variation of cell numbers during pre-adipocyte proliferation progress. In the last step of this experiment, qRT-PCR was used again to analyze the mRNA expression result of marker genes, *PCNA*, *CyclinD1*, and *Ki67* during cell proliferation. The results showed that the expression of *TCF21* gene was found a noticeable trend of decreasing during the pre-adipocyte proliferation progress. In addition, over-expression of *TCF21* attenuated the proliferation of chicken pre-adipocyte and also reduced the mRNA expression level of marker genes *PCNA*, *CyclinD1* and *Ki67* during cell proliferation, while there is no significant evidence to show that knock-down of *TCF21* gene had effect on pre-adipocyte proliferation. In conclusion, *TCF21* may have certain inhibitory effect on the proliferation of chicken pre-adipocytes.

**Keywords:** *TCF21*; Proliferation; Pre-adipocyte; Chicken