



鸡脂肪组织 *TCF21* 基因启动子区 DNA 甲基化与其表达的关系

刘雨萌^{1,2,3}, 马艳艳^{1,2,3}, 姜海煦^{1,2,3}, 张心扬^{1,2,3}, 武春艳^{1,2,3}, 程博涵^{1,2,3}, 李 辉^{1,2,3*}

(1. 农业农村部鸡遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江普通高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室, 哈尔滨 150030; 3. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 旨在研究鸡脂肪组织中 *TCF21* 基因启动子区 DNA 甲基化水平与其表达的关系。以东北农业大学高、低脂肪双向选择品系(简称高、低脂系)第 24 世代 7 周龄肉鸡为试验材料, 利用 RT-qPCR 检测高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织中 *TCF21* 基因的 mRNA 表达水平; 利用生物信息学和双荧光素酶报告系统分析 *TCF21* 基因启动子的结构与功能; 利用 Sequenom MassARRAY 飞行质谱检测高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织中 *TCF21* 基因启动子区 CpG 位点的甲基化水平; 利用 CpG 甲基转移酶处理 *TCF21* 启动子报告基因质粒, 分析 DNA 甲基化对 *TCF21* 基因启动子活性的影响。结果显示, 高脂系肉鸡腹部脂肪组织中 *TCF21* 基因的 mRNA 表达水平极显著高于低脂系 ($P < 0.001$); *TCF21* 基因的启动子区存在 40 个 CpG 位点, 且在启动子的近端和远端均有分布, 但不存在 CpG 岛; 将 *TCF21* 基因的启动子划分为 5 个功能区域, 分别为 R1 区域(-2 000~-1 500 bp)、R2 区域(-1 500~-1 000 bp)、R3 区域(-1 000~-500 bp)、R4 区域(-500~-200 bp)和 Core 区域(-200~-100 bp); 高脂系 R2、R3 和 R2+R3 区域的 DNA 甲基化水平显著或极显著高于低脂系 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$); R2、R3、R2+R3 区域的 DNA 甲基化水平与 *TCF21* 基因 mRNA 表达水平呈显著正相关(R2 区域: $r = 0.438, P < 0.05$; R3 区域: $r = 0.371, P < 0.05$; R2+R3 区域: $r = 0.489, P < 0.05$); R2 区域的 DNA 甲基化显著抑制其转录活性 ($P < 0.05$)。综上所述, *TCF21* 基因在高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织中的表达水平主要与其启动子 R2 区域的 DNA 甲基化水平有关。

关键词: 鸡; *TCF21* 基因; 启动子; DNA 甲基化; 基因表达; 脂肪组织

中图分类号: S831

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2021)12-3375-15

The Relationship between Promoter Region DNA Methylation of *TCF21* Gene and Its Expression in Chicken Adipose Tissue

LIU Yumeng^{1,2,3}, MA Yanyan^{1,2,3}, JIANG Haixu^{1,2,3}, ZHANG Xinyang^{1,2,3},
WU Chunyan^{1,2,3}, CHENG Bohan^{1,2,3}, LI Hui^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Harbin 150030, China; 2. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province, Harbin 150030, China; 3. College of Animal Sciences and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the relationship between DNA methylation of *TCF21* gene promoter region and its expression in chicken adipose tissue. The mRNA expression levels of *TCF21* in abdominal adipose tissues of chickens which were at 7 weeks of age and from

收稿日期: 2021-09-10

基金项目: 国家自然科学基金(31772586); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-41)

作者简介: 刘雨萌(1996-), 女, 黑龙江桦南人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: joe.74@qq.com

* 通信作者: 李 辉, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: lihui@neau.edu.cn

24th generation of Northeast Agricultural University broiler lines divergently selected for abdominal fat content (NEAUHLF) were detected by RT-qPCR. The structure and function of *TCF21* promoter were analyzed by bioinformatics and luciferase reporter system. The methylation level of CpG sites in the promoter region of *TCF21* in the abdominal adipose tissues of the fat and lean broilers was detected by Sequenom MassARRAY platform. The *TCF21* promoter reporter gene plasmid was treated with CpG methyltransferase to analyze the effect of DNA methylation on the activity of *TCF21* promoter. The results showed that the mRNA expression levels of *TCF21* in the abdominal adipose tissue of fat broilers were extremely significantly higher than those of lean broilers ($P < 0.001$). There were 40 CpG sites in the promoter region, which were distributed in the proximal and distal parts of the promoter, but there was no CpG island in the promoter region of chicken *TCF21* gene. The promoter of *TCF21* gene was divided into 5 functional regions, namely R1 region (-2 000 ~ -1 500 bp), R2 region (-1 500 ~ -1 000 bp), R3 region (-1 000 ~ -500 bp), R4 region (-500 ~ -200 bp) and Core region (-200 ~ -100 bp), respectively. The DNA methylation levels in the R2, R3 and R2+R3 regions of *TCF21* promoter in the fat broilers were significantly or extremely significantly higher than those of the lean broilers ($P < 0.05$ or $P < 0.001$). The DNA methylation levels in the R2, R3 and R2+R3 regions of *TCF21* promoter were significantly positively correlated with *TCF21* mRNA expression levels (R2 region: $r = 0.438$, $P < 0.05$; R3 region: $r = 0.371$, $P < 0.05$; R2+R3 region: $r = 0.489$, $P < 0.05$). DNA methylation significantly inhibited the transcriptional activity of R2 region of *TCF21* promoter ($P < 0.05$). In summary, the expression level of *TCF21* gene in abdominal adipose tissue of fat and lean broilers was mainly related to the DNA methylation level of R2 region of *TCF21* promoter.

Key words: chicken; *TCF21* gene; promoter; DNA methylation; gene expression; adipose tissue

* **Corresponding author:** LI Hui, E-mail: lihui@neau.edu.cn

脂肪组织不仅是能量储存库,也是机体最大的内分泌器官,通过分泌各种内分泌和旁分泌因子来调节多种生理过程^[1-2]。脂肪组织生长发育的细胞学基础是脂肪细胞数量的增多和体积的增大^[3]。其中,脂肪细胞的数量主要受多潜能干细胞向前脂肪细胞定向及前脂肪细胞增殖的调控,而脂肪细胞的体积则与其分化程度及甘油三酯积累量有关^[4-5]。脂肪组织的生长发育主要受转录因子构成的网络调控,如过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)^[6]、CCAAT 增强子结合蛋白(C/EBPs)^[7]、固醇调节元件结合蛋白(SREBPs)^[8]、Kruppel 样转录因子(KLFs)^[9]和 GATA 结合蛋白(GATAs)^[10]等。此外,不断有研究发现新的转录因子在调控脂肪组织生长发育过程中发挥重要的作用,如碱性螺旋-环螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)家族中的转录因子 TFE3、Ids 等^[11-12]。

TCF21(transcription factor 21)是 bHLH 家族成员之一,在心、血管、肺、肾、脾、肌肉等组织发育过

程中扮演重要角色,并且对细胞增殖、分化和凋亡具有至关重要的作用^[13-15]。截至目前,在人等哺乳动物上没有发现 *TCF21* 调控脂肪组织生长发育的系统性研究报道,但有一些零散的相关报道。Timmons 等^[16]首次发现,*TCF21* 基因在白色脂肪细胞中特异性表达,在棕色脂肪细胞中不表达;用 PPAR γ 激动剂罗格列酮诱导小鼠白色前脂肪细胞向棕色脂肪细胞转变,在这一过程中 *TCF21* 基因的表达下调^[17];用 BMP4 重组蛋白处理人白色脂肪细胞,可诱导其向棕色脂肪细胞转变,在这个过程中也发现 *TCF21* 基因表达下降的现象^[18],上述结果提示,*TCF21* 可被用作白色前脂肪细胞特异的分子标记。Zhang 等^[19]以维吾尔族人群为研究对象,发现肥胖人群腹部内脏脂肪组织中 *TCF21* 基因的表达量显著高于正常人群;敲入 *IFI202b* 基因的肥胖转基因小鼠皮下白色脂肪组织中 *TCF21* 基因的表达量显著高于野生型小鼠^[20],上述研究结果提示,*TCF21* 在人和小鼠肥胖的形成过程中具有重要作

用。本实验室前期研究发现, *TCF21* 是鸡前脂肪细胞分化的正调控因子, 它通过直接上调 *LPL* 基因的表达发挥其促进鸡前脂肪细胞分化的作用^[21]。因此, *TCF21* 在脂肪组织的生长发育过程中发挥关键的作用, 其表达调控机理的研究极为重要。

DNA 甲基化是一种重要的调控基因表达的表观遗传学机制, 其调节基因表达的主要方式为改变 DNA 的稳定性、构象以及与蛋白质之间的相互作用^[22-23]。DNA 甲基化一般导致基因沉默^[24-25]; 而 DNA 去甲基化则相反, 往往会重新激活沉默基因的表达^[26]。近年来一些研究结果显示, DNA 甲基化在脂肪组织生长发育过程中发挥关键的调控作用^[27-28]。Li 等^[29]发现, 在诱导分化的小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞中, *C/EBP α* 基因的启动子呈高甲基化状态, 而在未分化的 3T3-L1 前脂肪细胞中却没有检测到这种高甲基化信号增加。有研究表明, 用 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷 (5-Aza-dC) 处理小鼠 C3H/10T1/2 干细胞后, 会增加其定向分化为脂肪细胞的能力^[30]。Li 等^[31]利用 Me-DIP-seq 技术绘制了猪不同部位脂肪组织 (背部浅表脂肪组织和背部深层脂肪组织) 的 DNA 甲基化图谱, 发现与深层脂肪组织相比, 浅表脂肪组织中的 DNA 甲基化程度更高, 表明不同部位脂肪组织的甲基化程度不同。以上研究表明, DNA 甲基化在脂肪组织的生长发育中扮演重要角色。近年来, 对 *TCF21* 基因 DNA 甲基化的研究主要集中在癌症上面。在多种癌症中发现 *TCF21* 基因的表达与其启动子区 DNA 甲基化的状态密切相关^[32-35]。到目前为止, 尚未发现脂肪组织中 *TCF21* 基因 DNA 甲基化水平与其表达关系的研究报道。

本实验室以腹脂率和血浆极低密度脂蛋白为选择指标, 构建了东北农业大学肉鸡高、低腹脂双向选择品系 (Northeast Agricultural University broiler lines divergently selected for abdominal fat content, NEAUHLF)^[36]。目前, 这两个品系已经选育了 24 个世代, 两品系肉鸡之间腹脂率差异极显著。本课题组前期研究发现, *TCF21* 基因在第 19 世代高脂系肉鸡腹部脂肪组织中的表达水平显著高于低脂系肉鸡^[21], 但其潜在的调控机制还不清楚。鉴于此, 本研究将在前期研究的基础上, 探究鸡脂肪组织中 *TCF21* 基因启动子区 DNA 甲基化与其表达之间的关系。研究结果将有助于揭示高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织中 *TCF21* 基因差异表达的原因, 为

深入研究鸡 *TCF21* 基因的表达调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以高、低脂系第 24 世代 7 周龄肉鸡 (来自于东北农业大学阿城畜牧基地鸡场) 为试验材料 (每个品系 15 只鸡)。禁食 12 h 后称量体重 (BW) 并屠宰, 屠宰后称量腹脂重 (AFW), 并计算腹脂率 (AFP = AFW/BW)。采集的腹部脂肪组织样品于 0.75% 氯化钠中清洗, 剪成小块, 放置于 5 mL 采样管中, 并于液氮中速冻, -80°C 保存待用。需要说明的是, 高、低脂系肉鸡第 24 世代每个品系各组建了 40 个半同胞家系, 定向输精、系谱孵化。每个品系孵化出 1 000 只左右的雏鸡, 公母各半。所有公鸡按照肉仔鸡的饲养方式饲养至 7 周龄屠宰。在挑选用于组织样品采集的鸡只时, 要符合以下两个条件: 1) 每个品系的 15 只鸡生长发育正常; 2) 每个品系的 15 只鸡来源于不同的半同胞家系。

1.2 载体和细胞系

海肾荧光素酶报告基因载体 pRL-TK 和萤火虫荧光素酶报告基因载体 pGL3-basic 由本实验室留存; 不含 CpG 位点的萤火虫荧光素酶报告基因载体, pCpGL-basic 由扬州大学戴超辉惠赠^[37]; 永生鸡前脂肪细胞 (ICP1、ICP2 细胞) 由本实验室构建^[38]。

1.3 主要试剂

TRIzol RNA 分离试剂、DMEM/F12 培养基、Opti-MEM 无血清培养基、LipofectamineTM 3000 Transfection Reagent、Penicillin-Streptomycin Liquid 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 0.25% Trypsin-EDTA (1 \times) 购自 Gibco 公司; PBS 缓冲液粉末购自北京中杉金桥生物科技有限公司; PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 购自 TaKaRa 公司; Fast Start Universal SYBR Green Master 购自 Roche 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自 Biological Industries 公司; CpG 甲基转移酶 (M. SssI) 购自 NEB 公司; 质粒小提试剂盒购自 Axygen 公司; 双荧光素酶报告基因试剂盒 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System 购自 Promega 公司。

1.4 生物信息学预测

利用 JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>)、TRANSFAC (<http://gene-regulation.com/pub/>)

databases. html)、AnimalTFDB (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/AnimalTFDB>)预测转录因子结合位点。利用 MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 预测鸡 *TCF21* 基因启动子区 CpG 位点、CpG 岛的数量和分布。将片段长度大于 200 bp, CG 含量超过 50%, CG 核苷酸比率大于 0.6 的片段定义为 CpG 岛。

1.5 引物设计和合成

本研究所用引物均根据鸡的全基因组序列 (<http://genome.ucsc.edu>, UCSC) Mar. 2018 (GRCg6a/galGal6)来设计,并委托北京英潍捷基公司

进行合成。*TCF21* 基因表达检测引物使用 Primer Premier 5.0 软件设计,其中 *TCF21*-P1 扩增片段长度为 264 bp、*TBP*-P1 扩增片段长度为 122 bp。*TCF21* 基因启动子区 DNA 甲基化检测引物使用 Agena Epi-Designer 程序设计,其中 *TCF21*-P2 引物扩增片段长度为 487 bp(-1 961~-1 475 bp)、*TCF21*-P3 引物扩增片段长度为 467 bp(-1 455~-989 bp)、*TCF21*-P4 引物扩增片段长度为 423 bp(-1 013~-590 bp)、*TCF21*-P5 引物扩增片段长度为 490 bp(-676~-187 bp)、*TCF21*-P6 引物扩增片段长度为 334 bp(-170~+164 bp)。引物信息见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物用途 Application	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence
基因表达检测 Gene expression detection	<i>TCF21</i> -P1	F: ACGCTGCCAACGCAAGGG R: TGTTCACTACTTCTTTTCAGGTCCTC
	<i>TBP</i> -P1	F: GCGTTTTGCTGCTGTTATTATGAG R: TCCTTGCTGCCAGTCTGGAC
DNA 甲基化检测 DNA methylation detection	<i>TCF21</i> -P2	F: AGGAAGAGAGTTTGATATGTTGATAATTTGTTTGG R: CAGTAATACGACTCTACTATAGGGAGAAGGCTCACAC- AATAACTCTAAAATTAATCCAT
	<i>TCF21</i> -P3	F: AGGAAGAGAGGGTTGTGGGGTTGTATGAATAAGTA R: CAGTAATACGACTCTACTATAGGGAGAAGGCTT- ACCCACAACATAACCAATCCTCAA
	<i>TCF21</i> -P4	F: AGGAAGAGAGTGTTTTAGGAAGGGAGTATTTGGAT R: CAGTAATACGACTCTACTATAGGGAGAAGGCTTAC- TTATTCATACAACCCACAACC
	<i>TCF21</i> -P5	F: AGGAAGAGAGTAGTGGGAAGTTTGAAAAAGGTAG R: CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTTCA- CAAACCTCTACACAAAACAAAA
	<i>TCF21</i> -P6	F: AGGAAGAGAGGTTTGGAAGATGTTAAAGGGTTGG R: CAGTAATACGACTCTACTATAGGGAGAAGGCTAA- AACCCCTCCCCTAAACTAAATC

1.6 RT-qPCR

采用 TRIzol 试剂提取脂肪组织的总 RNA,并反转录成 cDNA。Real-Time PCR 反应液的组成: SYBR 5 μL,上/下游引物各 0.2 μL, H₂O 3.6 μL, cDNA 1 μL, 总体系为 10 μL。反应条件: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。以 TATA 盒结合蛋白(TATA-box binding protein, *TBP*)为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 *TCF21* 基

因的相对表达水平^[39],其中 $\Delta Ct = Ct(TCF21) - Ct(TBP)$ 。*TCF21* 基因表达检测引物序列见表 1。

1.7 Sequenom MassARRAY 检测 DNA 甲基化

采用 QIAamp DNA Mini Kit 提取鸡腹部脂肪组织 DNA。采用 EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit 说明书对 DNA 进行亚硫酸氢盐处理。以上述亚硫酸氢盐处理的 DNA 为试验材料,利用 Sequenom MassARRAY 飞行质谱技术进行 *TCF21* 基因启动

子区 CpG 单元的甲基化水平检测(委托上海欧易生物医学科技有限公司完成)。一个 CpG 单元表示一个单独的 CpG 位点或者是多个联合的 CpG 位点^[40-41]。*TCF21* 基因启动子区 DNA 甲基化检测引物见表 1。

1.8 启动子荧光素酶报告基因载体的构建

委托金唯智生物技术公司合成鸡 *TCF21* 基因启动子(将 5'-UTR 对应的基因组区域及 5'-UTR 上游 2 000 bp 定义为 *TCF21* 基因启动子)及 5' 端截短的启动子片段并连接至 pGL3-Basic 载体,构建含有 *TCF21* 基因启动子及 5' 端截短的启动子片段的萤火虫荧光素酶报告基因载体,分别命名为 pGL3-2000/+165、pGL3-1500/+165、pGL3-1000/+165、pGL3-500/+165、pGL3-200/+165、pGL3-100/+165,并将鸡 *TCF21* 基因 5'-UTR 对应的基因组区域及 5'-UTR 上游 2 000 bp 定义为鸡 *TCF21* 基因启动子。委托金唯智生物技术公司合成 *TCF21* 基因启动子 R2+R3 区域(-1 500~-500 bp)、R2 区域(-1 500~-1 000 bp)、R3 区域(-1 000~-500 bp)DNA 片段并连接至 pCpGL-Basic 载体(该载体骨架不含 CG 位点),构建含有 *TCF21* 基因启动子重要区域的萤火虫荧光素酶报告基因载体,分别命名为 pCpGL-1500/-500、pCpGL-1500/-1000 和 pCpGL-1000/-500。

1.9 细胞转染及荧光素酶活性检测

将永生鸡前脂肪细胞接种于 24 孔板,当细胞 70%~90% 汇合时,采用 Lipofectamine 3000 转染试剂将构建好的萤火虫荧光素酶报告基因质粒和海肾荧光素酶报告基因质粒以 100:1 的比例转染至细胞中。转染后 48 h 收集细胞,根据 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) 试剂盒说明书分别检测萤火虫荧光素酶活性(Fluc)和海肾荧光素酶活性(Rluc)。*TCF21* 基因启动子活性用相对荧光素酶活性(Fluc/Rluc)表示。

1.10 DNA 甲基化转移酶处理启动子报告基因载体

甲基化组:用 CpG 甲基转移酶(M. SssI)在 37 °C 条件下对 pCpGL-*TCF21*-1500/-500、pCpGL-*TCF21*-1500/-1000、pCpGL-*TCF21*-1000/-500 质粒及阳性对照质粒 pGL3-P1 和阴性对照质粒 pCpGL-basic 处理 4 h。CpG 甲基化酶(M. SssI)反应体系:10 × NEBuffer 230 μL, S-adenosylmethionone

(1 600 μmol · L⁻¹) 30 μL,质粒 15 μg,甲基转移酶 3.75 μL,补充 Nuclease-free water 至 150 μL。非甲基化组:反应体系中用 Nuclease-free water 代替甲基转移酶,其它操作与甲基化组相同。质粒处理 4 h 后,利用 PCR 纯化试剂盒对甲基化组与非甲基化组的质粒进行纯化,-20 °C 保存待用。

1.11 统计分析

所有数据结果都表示为“平均值(Mean)±标准差(SD)”。采用 Student's *t*-test 进行两组数据的差异显著性分析。利用 Pearson 相关系数分析 DNA 甲基化水平与基因表达水平之间的相关性。 $P < 0.05$ 表示差异显著或相关性显著, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ 表示差异极显著或相关性极显著。统计分析所用软件为 JMP 11.0 (SAS Institute)。

2 结果

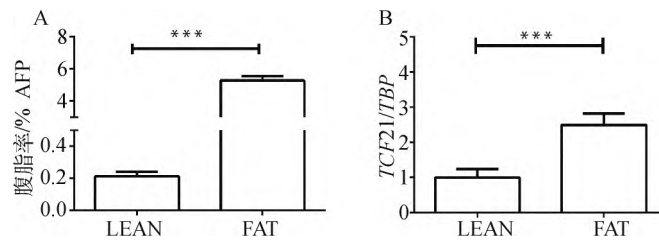
2.1 高、低脂系肉鸡脂肪组织中 *TCF21* 基因表达水平的比较分析

结果显示,高脂系肉鸡的腹脂率极显著高于低脂系肉鸡($P < 0.001$,图 1A)。高脂系肉鸡腹部脂肪组织中 *TCF21* 基因 mRNA 表达水平极显著高于低脂系肉鸡($P < 0.001$,图 1B)。

2.2 鸡 *TCF21* 基因启动子结构与功能的初步分析

Methprimer 在线软件分析结果显示,鸡 *TCF21* 基因的启动子区(5'-UTR 对应的基因组区域及 5'-UTR 上游 2 000 bp)不存在 CpG 岛,但存在 40 个 CpG 位点,这些 CpG 位点在启动子的近端和远端均有分布(图 2)。

启动子报告基因活性分析结果显示,当 *TCF21* 基因启动子从 -2 000 bp 截短到 -1 500 bp 时,启动子活性降低,暗示 *TCF21* 基因启动子 -2 000~-1 500 bp 之间存在重要的正调控元件,将该区域命名为“R1”(图 3A、B、C);当 *TCF21* 基因启动子从 -1 500 bp 截短到 -1 000 bp 时,启动子活性上升,暗示 *TCF21* 基因启动子 -1 500~-1 000 bp 之间存在重要的负调控元件,将该区域命名为“R2”(图 3A、B、C);当 *TCF21* 基因启动子从 -1 000 bp 截短到 -500 bp 时,启动子活性上升,暗示 *TCF21* 基因启动子 -1 000~-500 bp 之间存在重要的负调控元件,将该区域命名为“R3”(图 3A、B、C);当 *TCF21* 基因启动子从 -500 bp 截短到 -200 bp 时,启动子活性降低,暗示 *TCF21* 基因启动子 -500~

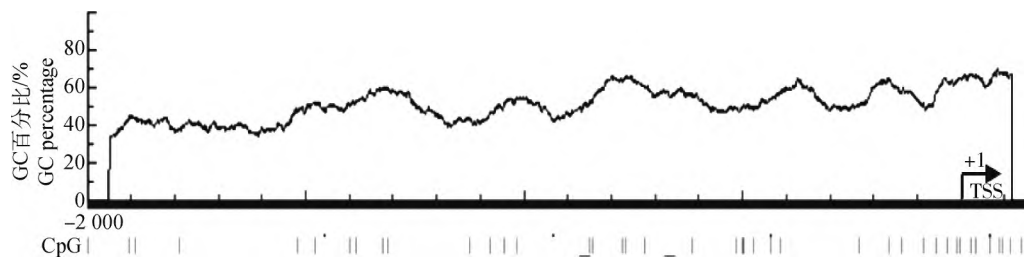


A. 第 24 世代 7 周龄高、低脂系肉鸡腹脂率的比较;B. 第 24 世代 7 周龄高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织中 *TCF21* 基因的 mRNA 表达情况。LEAN 代表低脂系肉鸡($n=15$),FAT 代表高脂系肉鸡($n=15$);***. $P<0.001$,下同

A. Comparison of abdominal fat percentage between lean and fat line broilers at 7 weeks of age from the 24th generation of NEAUHLF; B. Expression of *TCF21* mRNA in abdominal adipose tissue of fat and lean broilers at 7 weeks of age from the 24th generation of NEAUHLF. LEAN represent lean line broilers ($n=15$), FAT represent fat line broilers ($n=15$). ***, $P<0.001$, the same as below

图 1 高、低脂系肉鸡第 24 世代 7 周龄腹脂率及腹部脂肪组织中 *TCF21* 基因的 mRNA 表达情况

Fig. 1 Comparison of AFP and the expression of *TCF21* mRNA in abdominal adipose tissue of fat and lean broilers at 7 weeks of age from the 24th generation of NEAUHLF



每条竖线代表一个 CpG 位点

Each vertical line represents a CpG site

图 2 鸡 *TCF21* 基因启动子区 CpG 位点分布

Fig. 2 Distribution of CpG sites in the promoter region of chicken *TCF21*

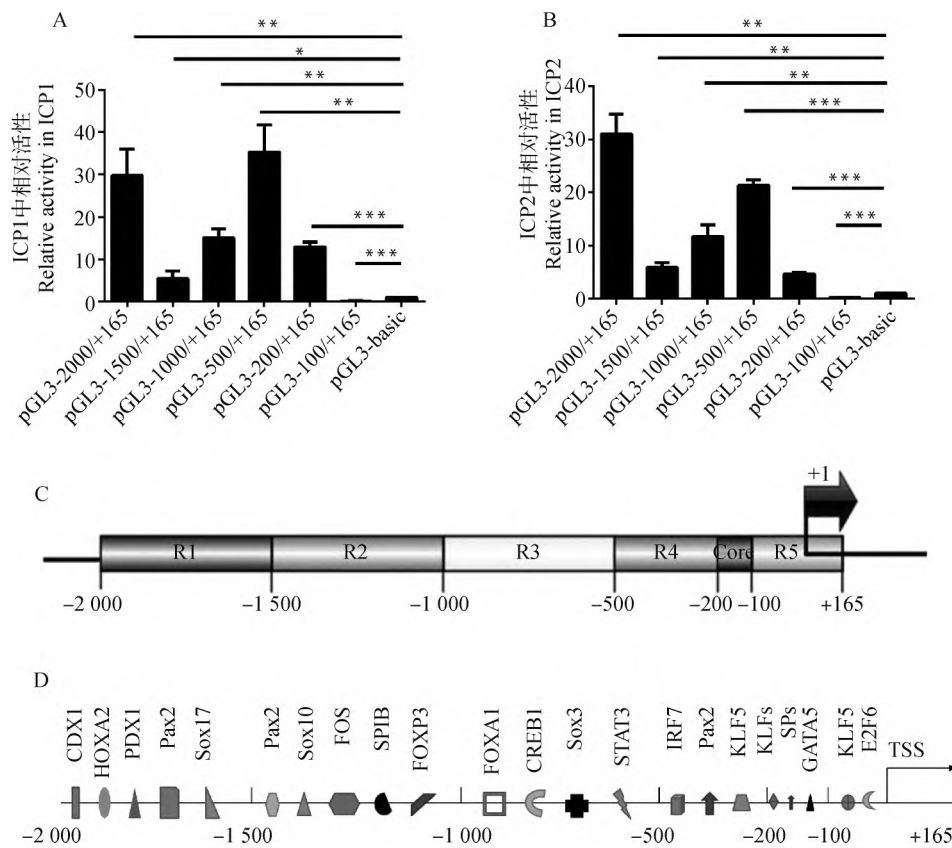
-200 bp 之间存在重要的正调控元件,将该区域命名为“R4”(图 3A、B、C);当 *TCF21* 基因启动子从 -200 bp 截短到 -100 bp 时,启动子活性消失,说明 *TCF21* 基因启动子 -200~-100 bp 之间具有维持 *TCF21* 基因转录活性的基本元件,该区域是 *TCF21* 基因启动子的核心区域,将该区域命名为“Core”(图 3A、B、C)。此外,将 *TCF21* 启动子 -100~+165 bp 的区域命名为 R5(图 3C)。

为明确哪些转录因子可能参与调控鸡 *TCF21* 基因启动子的活性,本研究利用 JASPAR、TRANSFAC 和 AnimalTFDB 在线软件分析了鸡 *TCF21* 基因启动子各个区域内潜在的转录因子结合位点。结果显示,鸡 *TCF21* 基因启动子 R1 区域(-2 000~-1 500 bp)存在 CDX1、HOXA2、PDX1、Pax2 及 Sox17 的结合位点;R2 区域(-1 500~-1 000 bp)存在 Pax2、Sox10、FOS、SPIB 及 FOXP3 的结合位点;R3 区域(-1 000~-500 bp)存在 FOXA1、CREB1、Sox3 及 STAT3 的结合位点;R4 区域

(-500~-200 bp)存在 IRF7、KLF5 及 Pax2 的结合位点;Core 区域(-200~-100 bp)存在 KLFs (KLF4、KLF5、KLF16),Sps(Sp1、Sp2、Sp3)及 GATA5 的结合位点(图 3D)。

2.3 *TCF21* 基因启动子区 DNA 甲基化分析

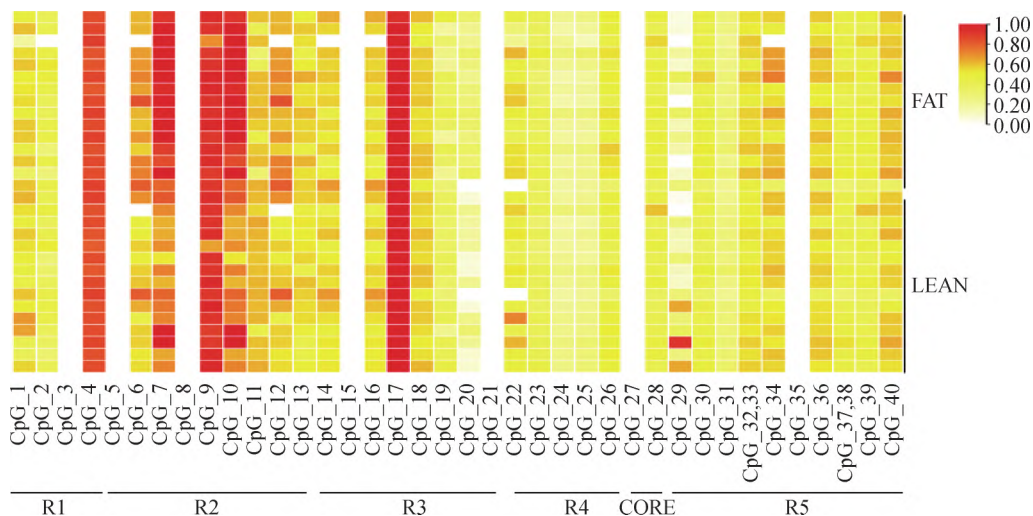
利用 Sequenom MassARRAY 飞行质谱技术检测高、低脂系肉鸡 7 周龄腹部脂肪组织中 *TCF21* 基因启动子区(-2 000~+165 bp)40 个 CpG 位点的甲基化程度。需要说明的是:一个 CpG 单元表示一个单独的 CpG 位点或者是多个联合的 CpG 位点。据此,将 40 个 CpG 位点划分为 38 个 CpG 单元(CpG_32 与 CpG_33 合并、CpG_37 与 CpG_38 合并,图 4)。本研究成功检测到 31 个 CpG 单元的甲基化,其中 3 个 CpG 单元位于 R1 区域,7 个 CpG 单元位于 R2 区域,6 个 CpG 单元位于 R3 区域,5 个 CpG 单元位于 R4 区域,1 个 CpG 单元位于 Core 区域,9 个 CpG 单元位于 R5 区域(图 4)。



A. ICP1 细胞中鸡 *TCF21* 基因启动子的报告基因分析; B. ICP2 细胞中鸡 *TCF21* 基因启动子的报告基因分析; C. *TCF21* 基因启动子重要区域; D. 鸡 *TCF21* 基因启动子区潜在的转录因子结合位点。*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, 下同

图 3 鸡 *TCF21* 基因启动子的结构和功能的初步分析

Fig. 3 Structure and function analysis of chicken *TCF21* promoter



每一行表示一个样本,每一列表示一个 CpG 单元。从浅黄色到红色的变化显示甲基化水平的升高,白色表示甲基化水平为 0 或缺失值

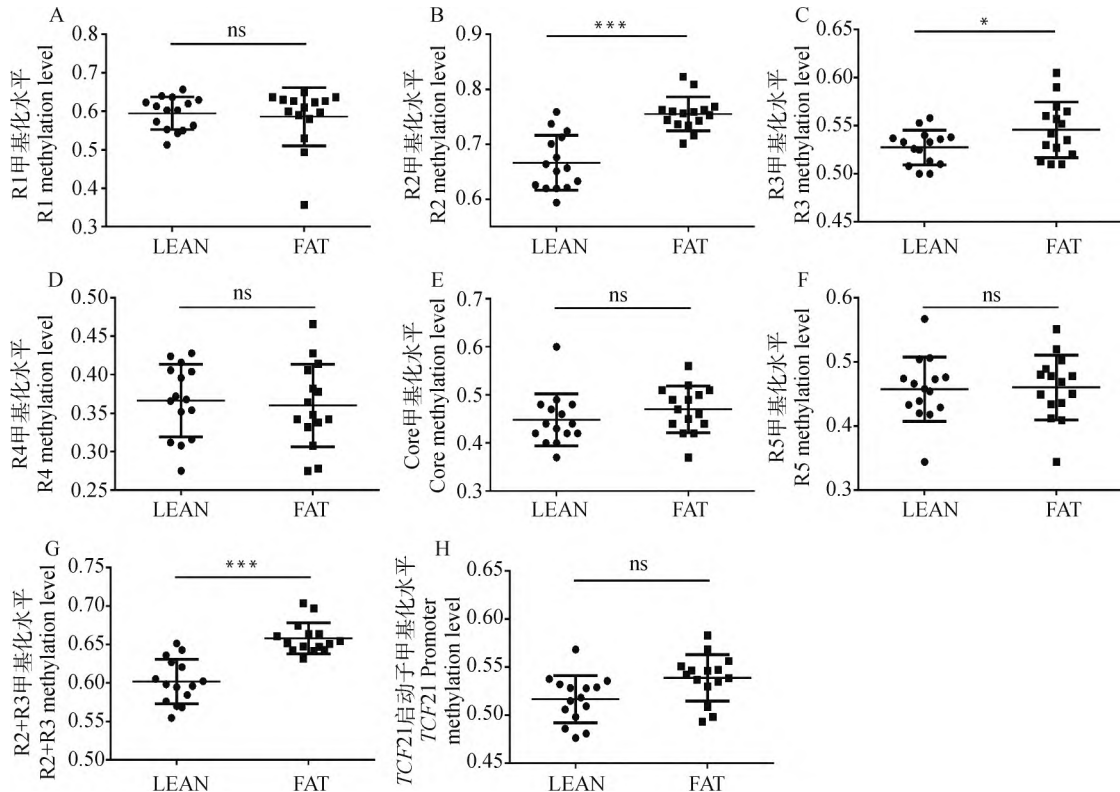
Each sample is shown in one row, each CpG unit is shown in a column. The methylation degree is shown as a gradient varying from yellow to red. White indicates that methylation level of the CpG unit is 0 or missing data

图 4 高、低脂系肉鸡脂肪组织中 *TCF21* 基因启动子区 CpG 单元分布及其甲基化状态

Fig. 4 The distribution and methylation status of CpG units in the promoter region of *TCF21* in adipose tissue of fat and lean line broilers

根据检测得到的 DNA 甲基化情况,本研究首先从整体水平分析了高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织中 *TCF21* 基因启动子及启动子各个区域的 DNA 甲基化程度(用每个区域内所有成功检测的 CpG 单元的平均甲基化水平来代表该区域的 DNA 甲基化水平,图 5)。结果显示, *TCF21* 基因启动子的 DNA 甲

基化水平在高、低脂系间差异不显著($P > 0.05$; 图 5H),高脂系 R2、R3 及 R2+R3 的区域 DNA 甲基化水平显著或极显著高于低脂系($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$; 图 5B、C、G),其他区域(R1 区域、R4 区域、Core 区域、R5 区域)的 DNA 甲基化水平在高、低脂系间差异不显著($P > 0.05$; 图 5A、D、E、F)。



A~G. *TCF21* 基因启动子 R1、R2、R3、R4、Core、R5 和 R2+R3 区域的 DNA 甲基化分析; H. *TCF21* 基因启动子 DNA 甲基化分析。ns. 差异不显著

A-G. DNA methylation analysis of R1, R2, R3, R4, Core, R5 and R2+R3 regions of *TCF21* promoter, respectively; H. DNA methylation analysis of promoter of *TCF21*. ns. Not significant

图 5 高、低脂系肉鸡脂肪组织中 *TCF21* 基因启动子区 DNA 甲基化水平的比较

Fig. 5 Comparison of DNA methylation level of *TCF21* promoter in adipose tissue between fat and lean broilers

另外,本研究还分析了高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织中 *TCF21* 基因启动子区每个 CpG 单元的 DNA 甲基化水平。结果显示,高、低脂系肉鸡间存在甲基化水平差异的 CpG 单元有 8 个,包括 CpG_6、CpG_7、CpG_10、CpG_11、CpG_12、CpG_20、CpG_29、CpG_32、33,其中高脂系 CpG_6、CpG_7、CpG_10、CpG_12、CpG_20、CpG_32、33 单元的甲基化水平显著或极显著高于低脂系,而高脂系 CpG_11 和 CpG_29 单元的甲基化水平显著低于低脂系(表 2)。

2.4 *TCF21* 基因启动子区 DNA 甲基化水平与其 mRNA 表达水平的相关性分析

首先,从整体水平分析高、低脂系肉鸡腹部脂肪

组织中 *TCF21* 基因启动子及启动子各个区域的 DNA 甲基化水平与其 mRNA 表达水平的相关性。结果显示, *TCF21* 基因启动子 R2 区域、R3 区域及 R2+R3 区域 DNA 甲基化水平与 *TCF21* 基因 mRNA 表达水平呈显著的正相关(R2 区域: $r = 0.438$, $P < 0.05$; R3 区域: $r = 0.371$, $P < 0.05$; R2+R3 区域: $r = 0.489$, $P < 0.05$; 图 6B、C、G)。以上结果表明, *TCF21* 基因启动子 R2 和 R3 区域的 DNA 甲基化对于调控 *TCF21* mRNA 的表达可能具有重要作用。

除此之外,本研究还分析了单个 CpG 单元的甲基化水平与 *TCF21* 基因 mRNA 表达水平的相关性,结果见表 2。高、低脂系肉鸡中显著差异的 8 个

表 2 *TCF21* 基因启动子区 DNA 甲基化状态以及单个 CpG 单元甲基化水平与其 mRNA 表达水平的相关性Table 2 The DNA methylation status of *TCF21* promoter region and the correlation of the levels of individual CpG unit methylation with *TCF21* mRNA expression

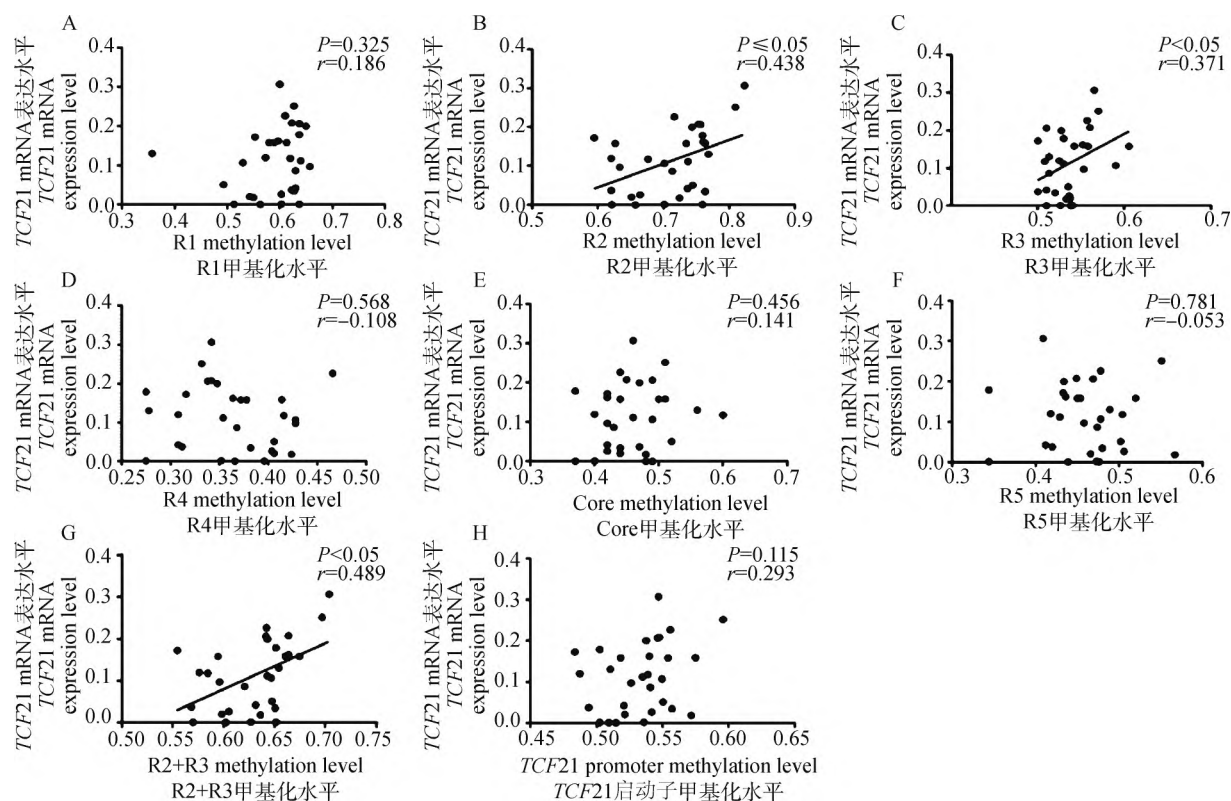
启动子区域 Promoter region	CpG 单元 CpG unit	甲基化水平 Methylation level		P^1	相关分析($n=30$) Correlation analysis ($n=30$)	
		高脂系($n=15$) Fat line ($n=15$)	低脂系($n=15$) Lean line ($n=15$)		r	P^2
		R1	CpG_1			
R1	CpG_2	0.389±0.126	0.402±0.061	0.729	0.143	0.451
R1	CpG_4	0.857±0.021	0.848±0.020	0.222	0.0903	0.635
R2	CpG_6	0.681±0.079	0.576±0.092	0.003**	0.297	0.125
R2	CpG_7	0.958±0.067	0.734±0.130	<0.001***	0.494	0.006**
R2	CpG_9	0.917±0.064	0.913±0.074	0.854	0.098	0.605
R2	CpG_10	0.958±0.067	0.734±0.130	<0.001***	0.494	0.006**
R2	CpG_11	0.527±0.116	0.600±0.047	0.031*	-0.161	0.394
R2	CpG_12	0.681±0.079	0.576±0.092	0.003**	0.297	0.125
R2	CpG_13	0.551±0.052	0.520±0.051	0.106	0.200	0.289
R3	CpG_14	0.556±0.064	0.545±0.058	0.631	0.176	0.363
R3	CpG_16	0.556±0.064	0.545±0.064	0.631	0.176	0.363
R3	CpG_17	0.993±0.016	1.00±0.000	0.091	-0.132	0.488
R3	CpG_18	0.564±0.038	0.567±0.034	0.839	0.035	0.855
R3	CpG_19	0.325±0.095	0.369±0.057	0.140	-0.104	0.585
R3	CpG_20	0.280±0.090	0.147±0.090	<0.001***	0.378	0.039*
R4	CpG_22	0.479±0.112	0.507±0.084	0.452	-0.464	0.013*
R4	CpG_23	0.397±0.049	0.391±0.040	0.716	-0.189	0.317
R4	CpG_24	0.216±0.045	0.229±0.035	0.399	-0.217	0.249
R4	CpG_25	0.231±0.062	0.251±0.041	0.286	-0.260	0.165
R4	CpG_26	0.491±0.062	0.471±0.056	0.346	-0.098	0.607
Core	CpG_28	0.470±0.048	0.448±0.054	0.251	0.141	0.456
R5	CpG_29	0.172±0.119	0.326±0.253	0.049*	-0.354	0.049*
R5	CpG_30	0.467±0.053	0.445±0.043	0.218	0.048	0.801
R5	CpG_31	0.227±0.035	0.286±0.030	0.489	-0.365	0.048*
R5	CpG_32,33	0.534±0.0329	0.519±0.032	0.044*	0.059	0.756
R5	CpG_34	0.580±0.100	0.547±0.066	0.297	0.208	0.279
R5	CpG_36	0.559±0.060	0.544±0.058	0.503	0.138	0.466
R5	CpG_37,38	0.458±0.060	0.439±0.049	0.318	0.043	0.820
R5	CpG_39	0.470±0.048	0.448±0.054	0.251	0.141	0.456
R5	CpG_40	0.580±0.079	0.552±0.071	0.316	0.193	0.305

P^1 表示高、低脂系甲基化水平差异的显著性, P^2 表示甲基化水平与表达水平相关的显著性

P^1 indicates the significance of the difference in methylation levels between fat and lean chickens, and P^2 indicates the significance of the correlation between the methylation level and the expression level

CpG 单元的甲基化水平与 *TCF21* mRNA 表达水平相关分析的结果显示: CpG_7、CpG_10、CpG_20 的甲基化水平与 *TCF21* mRNA 表达水平呈显著或极

显著正相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), CpG_29 的甲基化水平与 *TCF21* mRNA 表达水平呈显著负相关 ($P < 0.05$)。



A. *TCF21* 基因启动子 R1 区域 DNA 甲基化与其 mRNA 表达的相关性; B. *TCF21* 基因启动子 R2 区域 DNA 甲基化与其 mRNA 表达的相关性; C. *TCF21* 基因启动子 R3 区域 DNA 甲基化与其 mRNA 表达的相关性; D. *TCF21* 基因启动子 R4 区域 DNA 甲基化与其 mRNA 表达的相关性; E. *TCF21* 基因启动子 Core 区域 DNA 甲基化与其 mRNA 表达的相关性; F. *TCF21* 基因启动子 R5 区域 DNA 甲基化与其 mRNA 表达的相关性; G. *TCF21* 基因启动子 R2+R3 区域 DNA 甲基化与其 mRNA 表达的相关性; H. *TCF21* 基因启动子 DNA 甲基化与其 mRNA 表达的相关性

A. The correlation between DNA methylation level of R1 region and *TCF21* mRNA expression level; B. The correlation between DNA methylation level of R2 region and *TCF21* mRNA expression level; C. The correlation between DNA methylation level of R3 region and *TCF21* mRNA expression level; D. The correlation between DNA methylation level of R4 region and *TCF21* mRNA expression level; E. The correlation between DNA methylation level of Core region and *TCF21* mRNA expression level; F. The correlation between DNA methylation level of R5 region and *TCF21* mRNA expression level; G. The correlation between DNA methylation level of R2+R3 region and *TCF21* mRNA expression level; H. The correlation between DNA methylation level of promoter of *TCF21* gene and *TCF21* mRNA expression level

图 6 肉鸡腹部脂肪组织中 *TCF21* 基因启动子区 DNA 甲基化水平与其 mRNA 表达水平的相关性

Fig. 6 Correlation between *TCF21* promoter DNA methylation level and mRNA expression in abdominal adipose tissue of broilers

2.5 DNA 甲基化对鸡 *TCF21* 基因启动子活性的影响

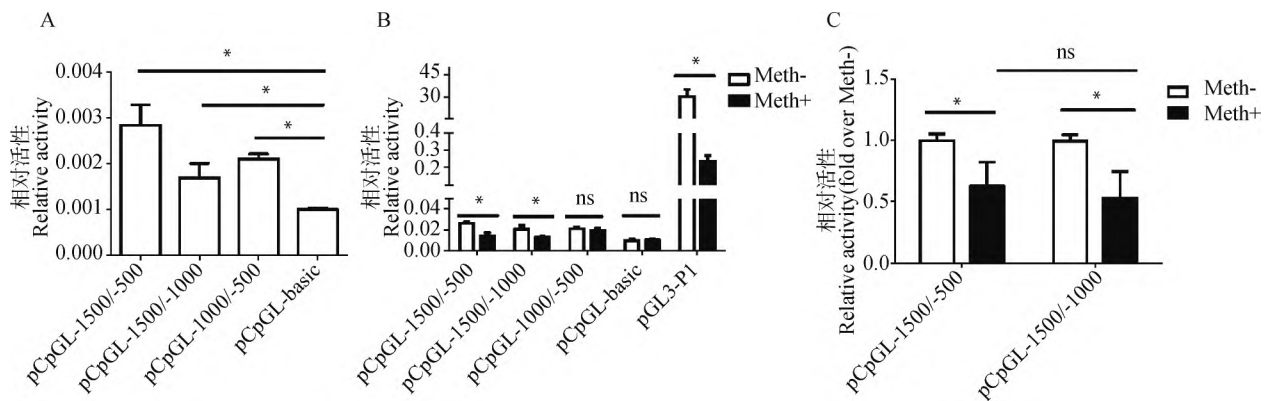
本研究发现 *TCF21* 基因启动子 R2、R3 及 R2+R3 的区域 DNA 甲基化水平在高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织之间差异显著, 且 R2 区域、R3 区域及 R2+R3 区域 DNA 甲基化水平与 *TCF21* 基因 mRNA 表达水平显著相关, 提示 *TCF21* 启动子这些区域的 DNA 甲基化可能影响其 mRNA 表达。

为进一步分析 *TCF21* 启动子 R2 区域、R3 区域及 R2+R3 区域的 DNA 甲基化是否影响其转录活性, 首先将鸡 *TCF21* 基因启动子 R2 区域、R3 区域及 R2+R3 区域分别克隆到无 CpG 位点的荧光素酶报告基因载体 pCpGL-basic 上, 将上述 3 个质粒及 pCpGL-basic 分别与 pRL-TK 共转染于鸡 ICP1 细胞中, 转染 48 h 后收集细胞, 检测报告基因活性。结果显示, pCpGL-1500/-500 (*TCF21* 基因启动子

R2+R3 区域)、pCpGL-1500/-1000(*TCF21* 基因启动子 R2 区域)、pCpGL-1000/-500(*TCF21* 基因启动子 R3 区域)的报告基因活性显著高于 pCpGL-basic($P < 0.05$, 图 7A), 说明 *TCF21* 启动子 R2 区域、R3 区域、R2+R3 区域在鸡 ICP1 细胞中具有转录活性。

随后, 将以上 3 个鸡 *TCF21* 启动子报告基因质粒、阳性对照质粒 pGL3-P1(该阳性对照质粒是包含鸡 *PPAR γ* 基因 P1 启动子的报告基因载体, 本实验室前期发现 DNA 甲基化能显著抑制 pGL3-P1 的报告基因活性^[42])。因此, 本研究用该阳性对照质粒来证实 DNA 甲基化酶处理质粒实验系统的有效性)及阴性对照质粒 pCpGL-basic 利用 CpG 甲基转移酶 *M. SssI* 处理, 作为甲基化组; 而未甲基化组则是用 RNase Free H₂O 处理这 5 种质粒。将甲基化的质粒 pCpGL-1500/-500、pCpGL-1500/-1000、pCpGL-1000/-500、pGL3-P1 和 pCpGL-basic 以及他们对应的未甲基化质粒分别与 pRL-TK 共转染于鸡 ICP1 细胞中。报告基因活性分析结果显示,

甲基化的 pGL3-P1 的报告基因活性显著低于其对应的未甲基化的报告基因活性($P < 0.05$, 图 7B), 说明 DNA 甲基化酶处理报告基因质粒这一试验系统是有效的。此外, 甲基化的 pCpGL-1500/-500(*TCF21* 基因启动子 R2+R3 区域)和 pCpGL-1500/-1000(*TCF21* 基因启动子 R2 区域)的报告基因活性显著低于其对应的未甲基化的报告基因活性, 报告基因活性分别下调 37% 和 47% ($P < 0.05$, 图 7B), 而 pCpGL-1000/-500(*TCF21* 基因启动子 R3 区域)在甲基化酶处理前后报告基因活性没有显著差异($P > 0.05$, 图 7B)。尽管 R2+R3 区域的 DNA 甲基化对报告基因活性的抑制作用略弱于单独的 R2 区域的 DNA 甲基化对报告基因活性的抑制作用, 但差异并不显著($P > 0.05$, 图 7C)。以上结果说明 R2 区域的 DNA 甲基化会显著抑制其转录活性, 而无论是 R3 区域单独存在还是与 R2 区域共同存在, R3 区域的 DNA 甲基化均不会对其转录活性造成影响。



A. *TCF21* 基因启动子报告基因活性; B. *TCF21* 基因启动子甲基化和未甲基化报告基因活性; C. *TCF21* 基因启动子 R2+R3 区域及 R2 区域甲基化和未甲基化报告基因活性

A. Reporter activity of *TCF21* promoter; B. Reporter activity of methylation and unmethylation *TCF21* promoter; C. Reporter activity of methylation and unmethylation R2+R3 and R2 regions of *TCF21* promoter

图 7 DNA 甲基化对 *TCF21* 基因启动子活性的影响

Fig. 7 Effect of DNA methylation on promoter activity of *TCF21*

3 讨论

DNA 甲基化作为一种重要的表观遗传学修饰, 启动子区发生的 DNA 甲基化通常与基因的转录沉默有关^[43]。越来越多的研究表明, *TCF21* 基因启动子区 DNA 甲基化水平与其表达水平密切相关。人类上的研究发现, 与癌旁组织相比, 胃癌组织中 *TCF21* 启动子区 DNA 甲基化水平显著升高, 同时

其基因表达水平显著降低, 用 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-AZA-2'-脱氧-胞嘧啶处理胃癌细胞可以上调 *TCF21* 的表达^[44]。在头部和颈部鳞状细胞癌中, *TCF21* 基因的 DNA 甲基化及基因表达状态与在胃癌中相同, 启动子区的高甲基化抑制了该基因的表达^[45]。到目前为止, 尚未发现鸡 *TCF21* 基因启动子区 DNA 甲基化与其表达关系相关的研究报道。本研究发现 *TCF21* 基因在第 24 世代高、低脂

系肉鸡 7 周龄腹部脂肪组织中差异表达(图 1),这与该群体第 19 世代的研究结果一致^[21]。由于 DNA 甲基化与基因表达之间存在很强的联系,这促使本课题组探究鸡 *TCF21* 基因在高、低脂系腹部脂肪组织的差异表达是否受到其启动子区 DNA 甲基化的调控。因此,本研究检测了鸡腹部脂肪组织中 *TCF21* 基因启动子区的甲基化状态,结果显示,在高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织中 *TCF21* 基因启动子 R2、R3、R2+R3 区域的 DNA 甲基化水平存在显著差异(图 5),提示 *TCF21* 基因在高、低脂系脂肪中的差异表达与 R2 和 R3 区域的 DNA 甲基化水平有关。随后的研究发现 *TCF21* 基因启动子 R2、R3、R2+R3 区域的 DNA 甲基化水平与 *TCF21* 基因 mRNA 表达水平确实有关。但值得注意的是,*TCF21* 基因启动子上述区域的 DNA 甲基化水平与其 mRNA 表达水平呈显著的正相关(图 6)。这一结果与通常所熟知的 DNA 甲基化抑制基因的表达并不一致。推测原因可能是鸡脂肪组织中 *TCF21* 基因的 mRNA 水平除了受 DNA 甲基化调控外,还受转录因子、组蛋白修饰、染色质重塑等其它因素的调控。前人相关研究也发现了此类现象。在人的肝癌(HCC)和胃肠道癌(GI)细胞系中,*TP73* 基因的表达就是通过 DNA 甲基化来激活的,当 *TP73* 基因启动子区 DNA 未甲基化时,转录因子 CTCF 和 p53 与 *TP73* 启动子不结合,*TP73* 基因的转录受到抑制;当 *TP73* 基因启动子区 DNA 发生甲基化后,CTCF 和 p53 可以与之结合,从而激活 *TP73* 基因的表达^[46]。研究发现,*FoxA2* 基因启动子区 DNA 未甲基化时, Polycomb Group (PcG) 蛋白作为转录抑制复合物可与 *FoxA2* 启动子区结合,引起 *FoxA2* 启动子区组蛋白 H3K27 me3 修饰,进而抑制 *FoxA2* 启动子活性与基因表达;当 *FoxA2* 基因启动子区 DNA 发生甲基化后,阻碍了 PcG 蛋白与 *FoxA2* 启动子的结合,解除了 PcG 蛋白对 *FoxA2* 基因转录的抑制作用,使 *FoxA2* 表达水平增加^[47]。类似的研究发现,*RHOC* 基因启动子区 DNA 未甲基化时,转录因子 KLF4 与 *RHOC* 启动子不结合,*RHOC* 启动子处于高度浓缩状态,*RHOC* 基因的转录受到抑制;当 *RHOC* 基因启动子区 DNA 发生甲基化后,KLF4 可以与之结合,引起 *RHOC* 启动子区的染色质发生重塑,染色质由原来高度浓缩的状态变为疏松且开放的状态,从而激活 *RHOC* 基因的表达^[48]。因此,推测高脂系肉鸡腹部脂肪组织中

TCF21 基因启动子 R2 和 R3 区域的高甲基化可能改变了某些转录因子与该区域的结合,影响了该区域组蛋白的修饰水平,增强了染色质可及性,进而促进了 *TCF21* 基因的表达,但具体机制有待进一步研究。

本研究在分析鸡前脂肪细胞中 DNA 甲基化是否影响 *TCF21* 基因启动子的转录活性时发现,鸡 *TCF21* 基因启动子 R2 区域和 R2+R3 区域的 DNA 高甲基化导致了报告基因活性的显著降低,而鸡 *TCF21* 基因启动子 R3 区域的 DNA 高甲基化没有改变报告基因活性(图 7B)。这一结果与鸡腹部脂肪组织中 *TCF21* 基因启动子 R2、R3、R2+R3 区域的 DNA 甲基化水平与 *TCF21* 基因 mRNA 表达水平呈显著正相关的结果并不一致,分析其原因可能有 4 个:1)两个试验所用的试验材料不同。检测 *TCF21* 基因启动子区 DNA 甲基化水平及 mRNA 表达水平时所用的试验材料为鸡脂肪组织,而检测 DNA 甲基化对 *TCF21* 基因启动子的转录活性的影响时所用的试验材料为鸡前脂肪细胞(ICP1 细胞)。脂肪组织除了包含成熟脂肪细胞和前脂肪细胞外,还含有成纤维细胞、血管内皮细胞和多种免疫细胞^[49],而 ICP1 细胞是单纯的前脂肪细胞。2)两个试验中,*TCF21* 基因启动子 DNA 所处环境不同。脂肪组织中 *TCF21* 基因的启动子是由组蛋白包裹的 DNA 片段,而在荧光素酶报告基因载体中,*TCF21* 基因的启动子是裸露的 DNA 片段。3) *TCF21* 基因在鸡脂肪组织中可能受增强子的调控,而本研究在构建荧光素酶报告基因时只是连接了鸡 *TCF21* 基因的启动子,并没有连接增强子到报告基因载体中。4)两个试验中,*TCF21* 基因启动子的 DNA 甲基化模式不同。体内脂肪组织中 *TCF21* 启动子区 CpG 位点的甲基化状态受 DNA 甲基转移酶、DNA 去甲基化酶等表观修饰因子的动态调控,而体外 DNA 甲基转移酶处理报告基因质粒是对 *TCF21* 启动子区的 CpG 位点进行强行甲基化,这与体内脂肪组织中 *TCF21* 基因的甲基化模式是不一样的。

有研究表明,CpG 位点的甲基化会影响 DNA 序列与转录因子的结合状态,进而影响基因的表达^[50-52]。本项研究报告基因结果显示,鸡 *TCF21* 基因启动子 R2 区域及 R2+R3 区域的 DNA 甲基化会抑制其转录活性,而无论是 R3 区域单独存在还是与 R2 区域共同存在,R3 区域的 DNA 甲基化

均不会影响其转录活性(图 7B、7C)。因此,本研究将目光聚焦在了 TCF21 基因启动子的 R2 区域。将 R2 区域内潜在的转录因子(Pax2、Sox10、FOS、SPIB 与 FOXP3)与该区域内的与 TCF21 基因表达显著相关的 CpG 位点(CpG_7 和 CpG_10)进行联合分析发现 CpG_7 位于 Pax2 的结合位点内,提示 CpG_7 位点的甲基化可能通过改变转录因子 Pax2 与 TCF21 基因启动子 R2 区域的结合来影响 TCF21 基因的转录。

综上所述,组织水平的研究结果显示 TCF21 基因启动子 R2 和 R3 区域的 DNA 甲基化水平与其 mRNA 表达水平显著相关;细胞水平的研究结果显示 TCF21 基因启动子 R2 区域的 DNA 甲基化会影响其转录活性,但 R3 区域的 DNA 甲基化对其转录活性没有影响。

4 结 论

结合组织水平、细胞水平的研究结果,本研究表明:TCF21 基因在 7 周龄高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织中的差异表达主要与其启动子 R2 区域的 DNA 甲基化水平有关,但具体调控机制有待进一步深入的研究。

参考文献(References):

- [1] RAFOLS M E. Adipose tissue; cell heterogeneity and functional diversity [J]. *Endocrinol Nutr*, 2014, 61 (2):100-112.
- [2] TRIM W, TURNER J E, THOMPSON D. Parallels in immunometabolic adipose tissue dysfunction with ageing and obesity [J]. *Front Immunol*, 2018, 9:169.
- [3] HIRSCH J, BATCHELOR B. Adipose tissue cellularity in human obesity [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 1976, 5(2):299-311.
- [4] FUJIWARA K, HASEGAWA K, OHKUMO T, et al. Necdin controls proliferation of white adipocyte progenitor cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1):e30948.
- [5] LAFOREST S, LABRECQUE J, MICHAUD A, et al. Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2015, 52(6):301-313.
- [6] GRIMALDI P A. The roles of PPARs in adipocyte differentiation [J]. *Prog Lipid Res*, 2001, 40 (4): 269-281.
- [7] TANAKA T, YOSHIDA N, KISHIMOTO T, et al. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP β and/or C/EBP δ gene [J]. *EMBO J*, 1997, 16 (24):7432-7443.
- [8] MADSEN L, PETERSEN R K, KRISTIANSEN K. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids [J]. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Basis Dis*, 2005, 1740(2):266-286.
- [9] ROSEN E D, MACDOUGALD O A. Adipocyte differentiation from the inside out [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(12):885-896.
- [10] LEE J E, SCHMIDT H, LAI B B, et al. Transcriptional and epigenomic regulation of adipogenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 2019, 39 (11): e00601-18.
- [11] 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.
- [12] PATIL M, SHARMA B K, SATYANARAYANA A. Id transcriptional regulators in adipogenesis and adipose tissue metabolism [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2014, 19(8):1386-1397.
- [13] MILLER C L, ANDERSON D R, KUNDU R K, et al. Disease-related growth factor and embryonic signaling pathways modulate an enhancer of TCF21 expression at the 6q23.2 coronary heart disease locus [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(7):e1003652.
- [14] SKINNER M K, RAWLS A, WILSON-RAWLS J, et al. Basic helix-loop-helix transcription factor gene family phylogenetics and nomenclature [J]. *Differentiation*, 2010, 80(1):1-8.
- [15] 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.
- [16] TIMMONS J A, WENNMALM K, LARSSON O, et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(11):4401-4406.
- [17] PETROVIC N, WALDEN T B, SHABALINA I G, et al. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (10):

- 7153-7164.
- [18] ELSEN M, RASCHKE S, TENNAGELS N, et al. BMP4 and BMP7 induce the white-to-brown transition of primary human adipose stem cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014, 306 (5): C431-C440.
- [19] ZHANG J, ZHANG Z W, DING Y L, et al. Adipose tissues characteristics of normal, obesity, and type 2 diabetes in Uygurs population[J]. *J Diabetes Res*, 2015, 2015:905042.
- [20] STADION M, SCHWERBEL K, GRAJA A, et al. Increased Ifi202b/IFI16 expression stimulates adipogenesis in mice and humans[J]. *Diabetologia*, 2018, 61(5):1167-1179.
- [21] ZHANG X Y, CHENG B H, LIU C, et al. A novel regulator of preadipocyte differentiation, transcription factor TCF21, functions partially through promoting LPL expression[J]. *Front Physiol*, 2019, 10:458.
- [22] MOORE L D, LE T, FAN G P. DNA methylation and its basic function[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(1):23-38.
- [23] JONES P A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(7):484-492.
- [24] SCHMITZ R J, LEWIS Z A, GOLL M G. DNA methylation: shared and divergent features across eukaryotes[J]. *Trends Genet*, 2019, 35(11):818-827.
- [25] LAW P P, HOLLAND M L. DNA methylation at the crossroads of gene and environment interactions[J]. *Essays Biochem*, 2019, 63(6):717-726.
- [26] ANGELONI A, BOGDANOVIC O. Enhancer DNA methylation: implications for gene regulation[J]. *Essays Biochem*, 2019, 63(6):707-715.
- [27] BUZZETTI E, PINZANI M, TSOCHATZIS E A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. *Metabolism*, 2016, 65(8):1038-1048.
- [28] CHENG Z Y, ZHENG L, ALMEIDA F A. Epigenetic reprogramming in metabolic disorders: nutritional factors and beyond[J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 54:1-10.
- [29] LI J, ZHANG N, HUANG X, et al. Dexamethasone shifts bone marrow stromal cells from osteoblasts to adipocytes by C/EBPalpha promoter methylation[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(10):e832.
- [30] 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.
- [31] LI M Z, WANG T, WU H L, et al. Genome-wide DNA methylation changes between the superficial and deep backfat tissues of the pig[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6):7098-7108.
- [32] DAI Y Y, DUAN H X, DUAN C J, et al. Down-regulation of TCF21 by hypermethylation induces cell proliferation, migration and invasion in colorectal cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469(3):430-436.
- [33] IDOGAWA M, OHASHI T, SASAKI Y, et al. Identification and analysis of large intergenic non-coding RNAs regulated by p53 family members through a genome-wide analysis of p53-binding sites[J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(11):2847-2857.
- [34] JEONG H W, HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ B, KIM J M, et al. Transcriptional regulation of endothelial cell behavior during sprouting angiogenesis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):726.
- [35] SELVAM S P, ROTH B M, NGANGA R, et al. Balance between senescence and apoptosis is regulated by telomere damage-induced association between p16 and caspase-3[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(25):9784-9800.
- [36] 孟和, 李志辉, 于赫, 等. 白羽肉鸡双向选择系杂交效果研究[J]. *中国家禽*, 2001, 23(14):11-13.
- MENG H, LI Z H, YU H, et al. Studies on crossing experiments in chicken of fat and lean line[J]. *China Poultry*, 2001, 23(14):11-13. (in Chinese)
- [37] 戴超辉, 冯海悦, 宗秋芳, 等. TLR5 基因启动子区甲基化修饰与苏太断奶仔猪 *E. coli* F18 抗性的关系[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(5):897-906.
- DAI C H, FENG H Y, ZONG Q F, et al. Relationship between methylation in promoter region of TLR5 gene and resistance to *Escherichia coli* F18 of Suta weaned piglets[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(5):897-906. (in Chinese)
- [38] WANG W, ZHANG T M, WU C Y, et al. Immortalization of chicken preadipocytes by retroviral transduction of chicken TERT and TR[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5):e0177348.
- [39] NA W, WANG Y X, GONG P F, et al. Screening of reference genes for RT-qPCR in chicken adipose tissue and adipocytes[J]. *Front Physiol*, 2021, 12:676864.

- [40] EHRICH M, NELSON M R, STANSSENS P, et al. Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(44):15785-15790.
- [41] WU C Y, WANG Y X, GONG P F, et al. Promoter methylation regulates ApoA-I gene transcription in chicken abdominal adipose tissue[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(16):4535-4544.
- [42] CUI T T, HUANG J X, SUN Y N, et al. KLF2 inhibits chicken preadipocyte differentiation at least in part via directly repressing PPAR γ transcript variant 1 expression [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:627102.
- [43] JANSZ N. DNA methylation dynamics at transposable elements in mammals [J]. *Essays Biochem*, 2019, 63(6):677-689.
- [44] YANG Z, LI D M, XIE Q, et al. Protein expression and promoter methylation of the candidate biomarker TCF21 in gastric cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(2):211-220.
- [45] WEISS D, STOCKMANN C, SCHRÖDTER K, et al. Protein expression and promoter methylation of the candidate biomarker TCF21 in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2013, 36(3):213-224.
- [46] YAO Z X, DI POTO C, MAVODZA G, et al. DNA methylation activates TP73 expression in hepatocellular carcinoma and gastrointestinal cancer [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):19367.
- [47] HALPERN K B, VANA T, WALKER M D. Paradoxical role of DNA methylation in activation of FoxA2 gene expression during endoderm development [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(34):23882-23892.
- [48] WAN J, SU Y J, SONG Q F, et al. Methylated cis-regulatory elements mediate KLF4-dependent gene transactivation and cell migration [J]. *eLife*, 2017, 6:e20068.
- [49] NAWAZ A, TOBE K. M2-like macrophages serve as a niche for adipocyte progenitors in adipose tissue[J]. *J Diabetes Investig*, 2019, 10(6):1394-1400.
- [50] YANG X J, HAN H, DE CARVALHO D D, et al. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(4):577-590.
- [51] PEI L R, CHOI J H, LIU J M, et al. Genome-wide DNA methylation analysis reveals novel epigenetic changes in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Epigenetics*, 2012, 7(6):567-578.
- [52] HAN H, CORTEZ C C, YANG X J, et al. DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(22):4299-4310.

(编辑 范子娟)