

# 甜菜碱对鹅胚原代肝细胞脂肪代谢和 DNA 甲基化的影响及调控机制

杨 芷<sup>1</sup> 杨 雨<sup>2</sup> 阳金金<sup>2</sup> 王志跃<sup>1,2</sup> 杨海明<sup>2\*</sup>

(1.扬州大学农业科技发展研究院,扬州 225009;2.扬州大学动物科学与技术学院,扬州 225009)

**摘要:** 本试验旨在研究甜菜碱对鹅胚原代肝细胞脂肪代谢和 DNA 甲基化的影响及调控机制。以鹅胚原代肝细胞为试验对象,试验 1:研究不同浓度[0(对照)、2.5、5.0 和 10.0 mmol/L]甜菜碱培养液对鹅胚原代肝细胞 DNA 甲基化相关酶活性和泛酰巯基乙胺酶-1(VNN-1)启动子区域 DNA 甲基化的影响;试验 2:研究不同处理[正常培养液(对照)、5.0 μmol/L DNA 甲基化酶抑制剂(AZA)、5.0 mmol/L 甜菜碱、5.0 μmol/L AZA+5.0 mmol/L 甜菜碱]培养液对鹅胚原代肝细胞 VNN-1 和脂肪酸合成酶(FAS)基因表达的影响,探索 VNN-1 启动子区域甲基化调控基因表达的分子机制。结果表明:1)2.5、5.0 和 10.0 mmol/L 甜菜碱组肝细胞的低密度脂蛋白(LDL)含量显著低于对照组( $P<0.05$ )。2)S-腺苷甲硫氨酸/S-腺苷同型半胱氨酸(SAM/SAH)比值随着甜菜碱浓度的增加呈上升趋势,呈显著一次线性关系( $P<0.05$ )。3)5.0 和 10.0 mmol/L 甜菜碱组肝细胞 VNN-1 基因表达量显著低于对照组和 2.5 mmol/L 甜菜碱组( $P<0.05$ );5.0 和 10.0 mmol/L 甜菜碱组肝细胞 VNN-1 启动子区域 DNA 甲基化水平显著高于对照组( $P<0.05$ )。4)AZA 处理 96 h 时,AZA 组和 AZA+甜菜碱组肝细胞中 VNN-1 基因表达量显著高于对照组( $P<0.05$ )。与对照组相比,处理 48 h 时,AZA 处理显著提高了肝细胞中 FAS 基因表达量( $P<0.05$ )。综上所述,鹅胚原代肝细胞培养液中添加甜菜碱能抑制肝细胞的脂质积累,提高细胞总体的 DNA 甲基化水平,且 VNN-1 启动子区域的甲基化负反馈调节其基因表达。AZA 抑制 DNA 甲基化后发现 VNN-1 和 FAS 的高表达与 DNA 去甲基化相关。

**关键词:** 甜菜碱;鹅胚原代肝细胞;VNN-1;脂质代谢;DNA 甲基化

中图分类号:S816.7

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2021)05-2918-09

随着家禽集约化养殖的快速推进,我国肉鹅生产水平得到了巨大提高,但获得较快生长速度的同时,营养过剩和体脂、腹脂比例偏高的问题也日益突出。家禽的肝脏是机体脂肪代谢的主要场所,大约 90%的脂肪代谢发生在肝脏,肝细胞增殖及肝细胞内脂肪合成的强弱直接影响家禽体内脂肪的沉积。因此,以鹅胚原代肝细胞做模型,研究甜菜碱对其脂质代谢的作用具有很好的指导作用。国内外大量研究均表明,甜菜碱(三甲基甘氨酸)

属季胺型生物碱,能参与脂肪代谢,改善胴体组成,显著降低动物肝脏中脂肪含量和体内脂肪<sup>[1]</sup>。目前,甜菜碱作为饲料添加剂在畜禽生产中得到了大量的推广和应用,甜菜碱也是机体中非常重要的甲基供体,其通过控制甲基化反应的程度参与表观遗传调控,说明外源摄入甲基供体甜菜碱能改变机体的表观遗传学特征<sup>[2]</sup>。

泛酰巯基乙胺酶-1(VNN-1)能催化辅酶 A 和酰基载体蛋白的异化途径中 D-泛酰巯基乙胺

收稿日期:2020-11-06

基金项目:江苏现代农业(水禽)产业技术体系(JATS[2020]443);江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20190897);扬州市自然科学基金青年基金项目(YZ2019080);江苏省研究生科研与实践创新计划(SJ CX20\_1382)

作者简介:杨 芷(1990—),女,江苏铜山人,助理研究员,博士,主要从事家禽生产研究。E-mail: zhiyang@yzu.edu.cn

\* 通信作者:杨海明,教授,硕士生导师,E-mail: yhmldp@qq.com

的水解,产生泛酸(维生素 B<sub>5</sub>)和巯基乙胺<sup>[3]</sup>,其在脂类代谢中发挥重要作用,Rommelaere 等<sup>[4]</sup>对 VNN-1 缺陷小鼠进行基因芯片分析,发现了一系列差异表达基因富集在脂肪酸代谢、甘油酯类代谢和类固醇生物合成等途径,说明 VNN-1 基因甲基化水平及其通路在介导甜菜碱调控鹅脂肪酸合成方面起关键作用<sup>[5]</sup>。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶(DNMT)的催化下,以 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体,将甲基添加到胞嘧啶的第 5 位碳原子(5mC)的过程<sup>[6]</sup>。甜菜碱作为甲基供体在鹅中调控脂肪代谢与 DNA 甲基化的关系及其机制仍不明确。VNN-1 基因的表达调控是否受其 DNA 甲基化的水平的调控,需进一步验证研究。

本研究以鹅胚原代肝细胞为试验对象,研究不同浓度甜菜碱培养液对鹅胚原代肝细胞 DNA 甲基化相关酶活性和 VNN-1 启动子区域 DNA 甲基化的影响,通过 DNA 甲基化酶抑制剂(AZA)探索 VNN-1 启动子区域 DNA 甲基化调控基因表达的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 试验动物

试验所用江南白鹅种蛋购自常州市四季禽业有限公司。种蛋孵化温度为 37.5 ℃,相对湿度为 75%~80%,转蛋周期为 2 h/次。

#### 1.1.2 试剂

RNA 提取试剂盒、反转录 PCR 试剂盒和实时定量 PCR(Real-time qPCR)试剂盒购自北京天根科技生化有限公司;试验用甜菜碱、甲基化酶抑制剂购自美国 Sigma 公司,外观为白色至浅黄色粉末或微颗粒,分散性好,纯度 ≥ 98%;EZ DNA Methylation-Gold™、BigDye Terminator v1.1、POP-7TM Polymer 和 HiDiFormamide 购自 ThermoFisher 公司;胎牛血清(FBS)、胶原酶消化液、DMEM 培养基购自 Gibco 公司;引物、Taq Plus DNA 聚合酶购自上海生工生物有限公司;其余一般化学试剂均为国产分析级。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 鹅胚肝细胞分离与培养

采用 23 胚龄受精种鹅蛋分离原代肝细胞,原代细胞的分离采用胶原酶消化法进行,分离和培

养参照本实验室前期建立的方法<sup>[7]</sup>。获取鹅原代肝细胞后于 5% CO<sub>2</sub>、40 ℃培养,收集处于指数生长期的细胞,以 1×10<sup>8</sup> 个/L 接种于培养板,隔天换液。使用倒置生物显微镜观察细胞,分别选取培养 12、24 和 36 h 的原代肝细胞进行拍照并记录细胞形态及生长状况。

#### 1.2.2 试验设计

##### 1.2.2.1 试验 1:甜菜碱对鹅胚原代肝细胞 DNA 甲基化相关酶活性和 VNN-1 启动子区域 DNA 甲基化的影响

以鹅原代肝细胞为研究对象,获取鹅原代肝细胞后于 5% CO<sub>2</sub>、40 ℃培养,分别以 0(对照)、2.5、5.0 和 10.0 mmol/L 甜菜碱的培养液继续培养 48 h。每组 6 个重复,每个孔为 1 个重复,培养液中甜菜碱的浓度参照杨雨等<sup>[8]</sup>。采用全自动生化分析测定肝细胞中高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白(LDL)含量(由扬州诺明哲天医学检测实验室测定)。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)方法检测肝细胞中 DNA 甲基转移酶活性(ELISA 试剂盒购自上海钰博生物科技有限公司,货号:YB-DNMT-Gu)。采用 ELISA 方法检测肝细胞中 SAM 和 S-腺苷同型半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine,SAH)含量(ELISA 试剂盒购自上海钰博生物科技有限公司,货号:YB-SAM-Gu 和 YB-SAH-Gu),计算 SAM/SAH 比值。采用 Real-time qPCR 方法检测肝细胞中 VNN-1 的基因表达量。采用亚硫酸氢盐处理(bisulfite sequencing PCR, BSP)后,测序检测 VNN-1 启动子区域 DNA 甲基化水平。

##### 1.2.2.2 试验 2:AZA 对鹅胚原代肝细胞 VNN-1 和脂肪酸合成酶(FAS)基因表达的影响

以鹅原代肝细胞为研究对象,获取鹅原代肝细胞后于 5% CO<sub>2</sub>、40 ℃培养,分为 4 个组,每组 6 个重复,每个孔为 1 个重复,分别以正常培养液(对照组)、含 5 μmol/L 的 AZA 培养液(AZA 组)、含 5.0 mmol/L 甜菜碱培养液(甜菜碱组)、含 5 μmol/L 的 AZA 和 5.0 mmol/L 甜菜碱培养液(AZA+甜菜碱组)继续培养 96 h。AZA 5-氮杂-2-脱氧胞苷(A3656, Sigma 公司)配制成 5 μmol/L 的培养基,AZA 浓度参考 Wu 等<sup>[9]</sup>,分别在处理后的 0、24、48、96 h,采用 Real-time qPCR 方法检测肝细胞中 VNN-1 和 FAS 的基因表达量。

### 1.3 测定方法

#### 1.3.1 细胞总 RNA 的提取与反转录

根据微量总 RNA 提取试剂盒操作说明提取试验处理后的鹅胚原代肝细胞总 RNA。加入 1 mL Trizol 充分匀浆,室温静置 5 min。加入 0.2 mL 氯仿,振荡 15 s,静置 2 min。4 °C 12 000×g 离心 15 min,弃上清。加入 0.5 mL 异丙醇,将管中液体轻轻混匀,室温静置 10 min。4 °C 12 000×g 离心 10 min,弃上清。加入 1 mL 75% 乙醇,轻轻洗涤沉淀。4 °C 7 500×g 离心 5 min,弃上清。晾干,加入适量 ddH<sub>2</sub>O 溶解。将部分总 RNA 溶液稀释成 300 ng/μL 工作液,于 -20 °C 保存,剩余总 RNA 原液于 -70 °C 保存备用。RNA 反转录为 cDNA 于 -20 °C 保存备用。

#### 1.3.2 Real-time qPCR 检测

以 β-肌动蛋白(β-actin)基因为内参,采用 SYBR-Green 法对肝脏基因表达量进行相对定量分析。反应体系为 20 μL: SYBR Premix Ex Taq (2×) 10 μL,上、下游引物和 ROX Reference Dye II (50×) 各 0.4 μL, DNA 模板 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 6.8 μL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 30 s 后, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 共 40 个循环。熔解曲线绘

制: 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。基因引物信息见表 1。

#### 1.3.3 DNA 亚硫酸氢钠修饰法检测基因启动子区域 DNA 甲基化水平

首先采用亚硫酸氢钠处理样品,PCR 纯化产物连接到 pUC18-T 载体 10 个克隆,连接反应体系: 18 °C 连接过夜。连接产物转化后制备感受态细胞,将细菌涂布在预先用 20 μL 100 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)和 100 μL 20 mg/mL X-gal 涂布的氨苄青霉素平板上,倒置培养过夜。蓝白斑筛选: 选择在 IPTG/X-gal 平板上生长的白色菌落,用牙签挑至含氨苄青霉素的液体培养基,37 °C 培养过夜。目的片段 TA 克隆,3% 糖凝胶电泳检测菌落 PCR 鉴定。质粒提取和质粒测序 M13+/-引物测序。采用软件 DNASTar 分析基因序列,采用 SeqMan 软件进行序列比对,采用 QUMA 做甲基化圆点图。检测的 VNN-1 基因片段中含有 13 个 CpG 位点。在序列中的位置如下: 34、78、141、160、203、244、258、271、279、304、316、328、362。编号为 1~13 位。基因引物信息见表 1。

表 1 基因引物信息

Table 1 Gene primer information

基因 Gens	引物序列 Primer sequence	产物大小 Product size/bp	登录号 Accession No.
实时定量 PCR Real-time qPCR			
β-肌动蛋白 β-actin	F: 5'-ACGTCCTCTCAGGTGGTACG-3' R: 5'-GCCACCGATCCATACAGAGT-3'	159	M26111
脂肪酸合成酶 FAS	F: 5'-CATGGTGAAGTGTCTCCGCC-3' R: 5'-ATGGATGGGACAGCCGATGA-3'	93	XM_013197939.1
泛酰巯基乙胺酶-1 VNN-1	F: 5'-CTACCCGTACCTGGAGGACA-3' R: 5'-GTGGTAACGAGCCACCAGTT-3'	275	XM_013175488.1
DNA 亚硫酸氢钠修饰法 DNA sodium bisulfite modification			
泛酰巯基乙胺酶-1 VNN-1	F: 5'-GTAGTTTGTGGTATTTTTGTTGTGA-3' R: 5'-TATCCCTAAAACTCAAACATCAAA-3'	391	XM_013175488.1

### 1.4 数据统计分析

采用 Excel 2017 建立数据库,SPSS 17.0 统计对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。方差分析采用一般线性模型,显著性检验采用 LSD 法,以  $P < 0.05$  作为差异显著性判断标准,数据以平均值和均值标准误(SEM)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度甜菜碱对鹅胚原代肝细胞 HDL 和 LDL 含量的影响

由表 2 可知,2.5、5.0 和 10.0 mmol/L 甜菜碱组肝细胞 LDL 含量显著低于对照组( $P < 0.05$ )。

培养液中甜菜碱浓度对 HDL 含量无显著影响 ( $P > 0.05$ )。

表 2 不同浓度甜菜碱对鹅胚原代肝细胞 HDL 和 LDL 含量的影响

Table 2 Effects of different concentrations of betaine on HDL and LDL contents in primary germinal hepatocytes of geese

项目 Items	甜菜碱浓度 Betaine concentration/(mmol/L)				SEM	P 值 P-value		
	0 (对照 Control)	2.5	5.0	10.0		甜菜碱 Betaine	线性 Linear	二次 Quadratic
高密度脂蛋白 HDL	0.030	0.023	0.030	0.020	0.003	0.582	0.411	0.789
低密度脂蛋白 LDL	0.067 <sup>a</sup>	0.043 <sup>b</sup>	0.037 <sup>b</sup>	0.013 <sup>c</sup>	0.006	<0.010	<0.010	1.000

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 相同或无字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ( $P > 0.05$ ). The same as below.

## 2.2 不同浓度甜菜碱对鹅胚原代肝细胞 DNA 甲基转移酶活性的影响

随着甜菜碱浓度的增加呈上升趋势, 呈显著一次线性关系 ( $P < 0.05$ )。甜菜碱浓度对鹅肝细胞中 DNA 甲基转移酶活性无显著影响 ( $P > 0.05$ )。

由表 3 可知, 鹅肝细胞中 SAM/SAH 比值随

表 3 不同浓度甜菜碱对鹅胚原代肝细胞 SAM/SAH 比值和 DNA 甲基转移酶活性的影响

Table 3 Effects of different concentrations of betaine on SAM/SAH and DNA methyltransferase activity in primary germinal hepatocytes of geese

项目 Items	甜菜碱浓度 Betaine concentration/(mmol/L)				SEM	P 值 P-value		
	0 (对照 Control)	2.5	5.0	10.0		甜菜碱 Betaine	线性 Linear	二次 Quadratic
S-腺苷甲硫氨酸/S-腺苷同型半胱氨酸 SAM/SAH	1.09	1.49	1.37	1.56	1.210	0.092	0.041	0.397
DNA 甲基转移酶 DNMT/(U/L)	82.95	80.07	88.41	94.34	3.466	0.744	1.763	0.280

## 2.3 不同浓度甜菜碱对鹅胚原代肝细胞 VNN-1 基因表达的影响

由图 1 可知, 5.0 和 10.0 mmol/L 甜菜碱组肝细胞 VNN-1 基因表达量显著低于对照组和 2.5 mmol/L 甜菜碱组 ( $P < 0.05$ )。

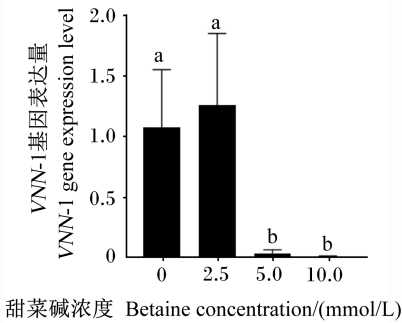
由图 2 可知, 5.0 和 10.0 mmol/L 甜菜碱组肝细胞 VNN-1 基因启动子区域 DNA 甲基化水平显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

## 2.4 AZA 对鹅胚原代肝细胞 VNN-1 和 FAS 基因表达的影响

由图 3-a 可知, 与对照组相比, AZA 处理 0 h 时, 不同处理对鹅胚原代肝细胞 VNN-1 基因表达量无显著影响 ( $P > 0.05$ )。处理 24 和 48 h 时, VNN-1 基因表达量趋势相同, AZA 组 VNN-1 基因

表达量与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 甜菜碱组和 AZA+甜菜碱组 VNN-1 基因表达量相比对照组显著下降 ( $P < 0.05$ ); AZA 处理 96 h 时, 各组 VNN-1 基因表达量差异显著, AZA 组和 AZA+甜菜碱组肝细胞中 VNN-1 基因表达量显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 甜菜碱组 VNN-1 基因表达量相比对照组显著降低 ( $P < 0.05$ )。

由图 3-b 可知, 与对照组相比, AZA 处理后 0 和 24 h, 不同处理对鹅胚原代肝细胞 FAS 基因表达量无显著影响 ( $P > 0.05$ ); 处理 48 h 时, 肝细胞中 AZA 组 FAS 基因表达量相比对照组显著升高 ( $P < 0.05$ ); 处理 96 h 时, AZA 组和 AZA+甜菜碱组 FAS 基因表达量相比对照组显著升高 ( $P < 0.05$ )。

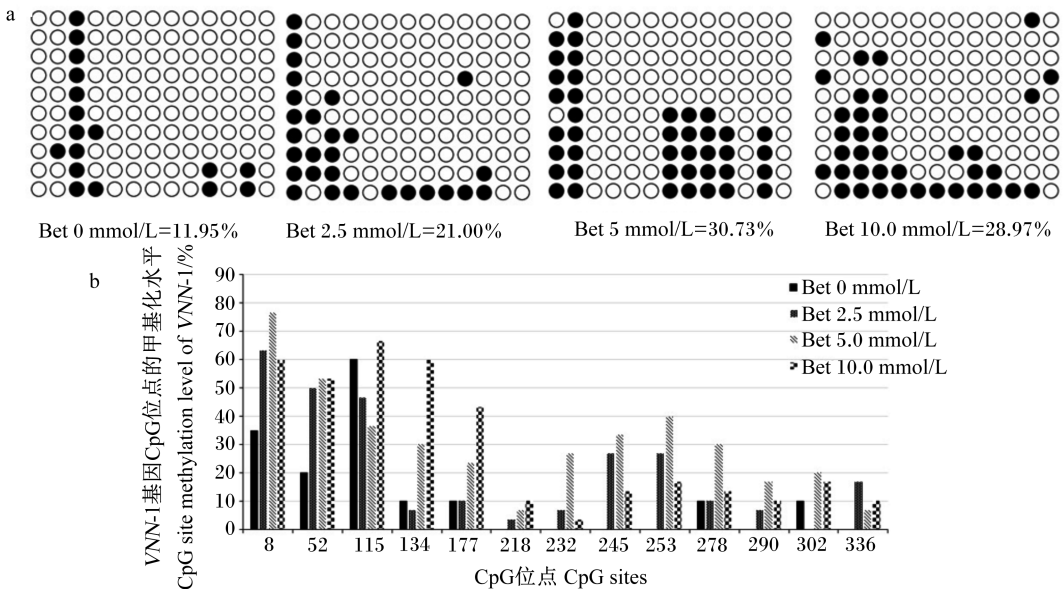


数据柱形标注不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

Data columns with different small letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ). The same as below.

图1 不同浓度甜菜碱对鹅胚原代肝细胞 VNN-1 基因表达量的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of betaine on VNN-1 gene expression level in primary germinal hepatocytes of geese



Bet: 甜菜碱浓度 betaine concentration。圆孔关闭表明该位点发生甲基化,圆孔打开表明该位点没有发生甲基化。每个 CpG 位点的甲基化以 10 个克隆计算。图 a 为不同浓度甜菜碱对肝细胞 VNN-1 基因启动子区域总甲基化图谱;图 b 为不同浓度甜菜碱对肝细胞 VNN-1 基因启动子区域各 CpG 位点甲基化水平的影响。

Closed and open circles represent methylated and unmethylated cytosines, respectively. Each bar represents methylation level of each CpG site. Methylation at each CpG site of the promoter region was calculated by analyzing 10 clone. Figure.a shows the total methylation profile of VNN-1 gene promoter region in hepatocytes by different concentrations of betaine. Figure.b shows effects of different concentrations of betaine on the methylation status of each CpG site in the promoter region of VNN-1 gene in hepatocytes.

图2 不同浓度甜菜碱对鹅胚原代肝细胞 VNN-1 基因启动子区域 DNA 甲基化的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of betaine on DNA methylation of VNN-1 gene promoter in primary germinal hepatocytes of geese

### 3 讨论

#### 3.1 甜菜碱对鹅胚原代肝细胞 DNA 甲基化相关酶活性和 VNN-1 启动子区域 DNA 甲基化的影响

大量研究均表明,甜菜碱作为营养调节剂在降低动物肝脏中脂肪含量和体内脂肪有重要作用<sup>[10-11]</sup>。本试验研究发现,甜菜碱处理鹅胚原代肝细胞后,其 LDL 含量显著降低,LDL 是富含胆固醇的脂蛋白,是运载胆固醇进入外周组织细胞的脂蛋白颗粒,说明甜菜碱能抑制肝细胞的脂质积累。Zhan 等<sup>[12]</sup>发现肉仔鸡饲料中添加甜菜碱可显著降低血清甘油三酯和尿酸含量,甜菜碱能通过自身代谢循环,加速动物体内磷脂合成,完善细胞膜的形成,促进肝脏中载脂蛋白的合成,使甘油三酯的迁移速度加快,降低血清甘油三酯含量<sup>[13]</sup>。由此可见,甜菜碱在促进肝脏脂肪代谢方面有重要作用。

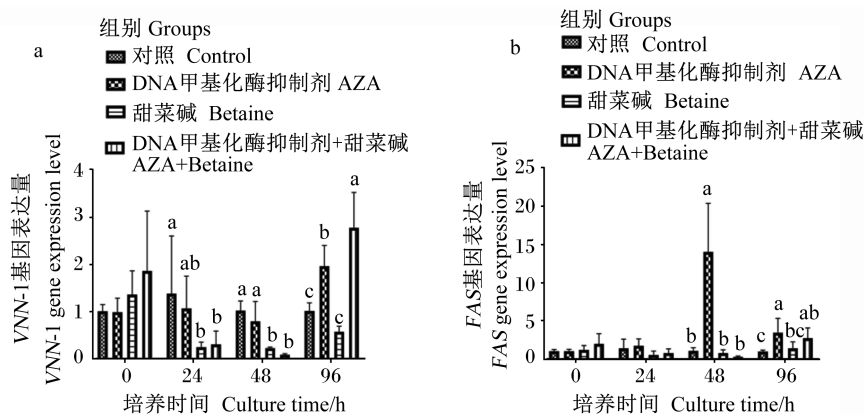


图3 AZA对鹅胚原代肝细胞VNN-1和FAS基因表达的影响

Fig.3 Effects of AZA on VNN-1 and FAS gene expression in primary germinal hepatocytes of geese

甲基供体 SAM 提供一碳单位后产生 SAH, SAH 经转变后产生高半胱氨酸 (Hcy)。SAM/SAH 比值会影响 DNA 甲基化, DNMT 的活性依赖于 SAM 的生成量和 SAH 的消耗量。当 SAM/SAH 比值升高会伴随着全身 DNA 高甲基化<sup>[14]</sup>。所以, SAM/SAH 比值被认为是判断 DNA 甲基化程度的关键指标<sup>[15]</sup>。本试验研究发现, 鹅胚原代肝细胞中添加甜菜碱能提高 SAM/SAH 比值, 提高细胞整体的 DNA 甲基化水平, 表明甜菜碱作为甲基供体能够促进鹅胚原代肝细胞甲基化水平, Abobaker 等<sup>[16]</sup>也发现了相似的结果, 母猪饲料中添加甜菜碱显著提高子代胆固醇和皮质类固醇基因表达, 且伴随着启动子区域的低甲基化, 甜菜碱可以通过表遗传机制调节新生仔猪肝脏中的胆固醇代谢基因的表达。

VNN-1 是泛酰巯基乙胺的水解酶, 大鼠和小鼠基因芯片分析均发现 VNN-1 与肝脏脂肪变性密切相关, 其在脂质代谢过程中有重要的调控作用<sup>[17-18]</sup>。李洁等<sup>[19]</sup>扩增鹅 Vanin 基因亚型 (VNN-1) 基因的 cDNA 序列时发现, 鹅 VNN-1 基因 (GenBank 登录号: KY399733) cDNA 全长为 1 924 bp, 该基因在肝脏中高表达, 共编码 491 个氨基酸。VNN 的表达调控与肝脏脂肪代谢相关基因过氧化物酶体增殖体激活受体  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) 密切相关<sup>[20-21]</sup>。禁食和饲喂降脂药的野生型小鼠 VNN-1 的表达量明显升高, 而在 PPAR $\alpha$  缺陷小鼠中没有提高, PPAR $\alpha$  可以通过与 VNN-1 启动子上的特异性结合为点结合促进 VNN-1 基因表达, 揭示其潜在的脂质代谢调控作用<sup>[22]</sup>。本试验研究发现, 甜菜碱能提高肝细胞中 VNN-1 基因启动子区域

DNA 甲基化水平, 但其基因表达量显著降低, 表明基因的高甲基化会干扰基因的转录水平, DNA 甲基化是由 DNA 甲基酶催化的表观遗传因素, 基因启动子区域的 DNA 甲基化与基因表达水平一般呈负反馈调节, 甜菜碱作为公认的甲基供体, 能提高 VNN-1 基因启动子区域的甲基化, 且负反馈调节其基因表达。

### 3.2 AZA 对鹅胚原代肝细胞 VNN-1 和 FAS 基因表达的影响

为进一步研究 DNA 甲基化对 VNN-1 基因表达的调控机制, 本试验还研究了 AZA 和甜菜碱处理对 VNN-1 和 FAS 基因表达的影响。AZA 是一种脱氧胞苷, 其在 DNA 复制过程中加入到 DNA 链中, 另一端能与 DNMT 结合, 影响 DNMT 发生作用, 影响 DNA 甲基化水平, 是一种 AZA<sup>[23-24]</sup>。本试验中, AZA 处理 96 h 时, VNN-1 和 FAS 基因表达量均发生显著变化, AZA 组和 AZA+甜菜碱组 VNN-1 基因表达显著提高, 进一步验证了 VNN-1 的高表达与 DNA 去甲基化相关。FAS 是脂肪酸合成的主要调节酶, 能够催化乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 生成长链脂肪酸, 对脂肪酸合成有重要作用<sup>[25]</sup>。处理 48 h 时, AZA 组的 FAS 基因表达量比对照组显著上升, 也说明了 FAS 基因的高表达与 DNA 去甲基化相关。本研究结果与 Shen 等<sup>[26]</sup>研究结果相一致。Li 等<sup>[27]</sup>也发现, 母猪饲料中添加甜菜碱可以通过改变胰岛素生长因子 2 (insulin-like growth factors 2, IGF2) 的 DMR 甲基化状态来影响海马神经元的增殖。Ling 等<sup>[28]</sup>发现基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) 启动子区含有多种去甲基化的 CpG 位点,

高糖能通过去甲基化介导 *MMP9* 表达。Nishizawa 等<sup>[29]</sup>发现, AZA 处理通过去甲基化增强 5-氟脲嘧啶的表达, 以上结果说明 DNA 去甲基化通常都伴随着基因表达的提高, 均与本试验结果趋势一致。

## 4 结 论

鹅胚原代肝细胞培养液中添加甜菜碱能抑制肝细胞的脂质积累, 提高细胞总体的 DNA 甲基化水平, 且 *VNN-1* 启动子区域的甲基化负反馈调节其基因表达。AZA 抑制 DNA 甲基化后发现 *VNN-1* 和 *FAS* 的高表达与 DNA 去甲基化相关。

## 参考文献:

- [ 1 ] ALIREZAEI M, GHEISARI R H, RANJBAR R V, et al. Betaine: a promising antioxidant agent for enhancement of broiler meat quality [ J ]. *British Poultry Science*, 2012, 53 ( 5 ) : 699-707.
- [ 2 ] YANG S, ZHAO N N, SUN B, et al. Grandmaternal betaine supplementation enhances hepatic *IGF2* expression in F2 rat offspring through modification of promoter DNA methylation [ J ]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100 ( 4 ) : 1486-1494.
- [ 3 ] PITARI G, MAURIZI G, FLATI V, et al. Enzymatic synthesis of S-aminoethyl-L-cysteine from pantetheine [ J ]. *Biochimica et Biophysica Acta ( BBA ) : General Subjects*, 1992, 1116 ( 1 ) : 27-33.
- [ 4 ] ROMMELAERE S, MILLET V, MANH T P V, et al. Sox17 regulates liver lipid metabolism and adaptation to fasting [ J ]. *PLOS One*, 2014, 9 ( 8 ) : e104925.
- [ 5 ] NAQUET P, PITARI G, DUPRÈ S, et al. Role of the *Vnn1* pantetheinase in tissue tolerance to stress [ J ]. *Biochemical Society Transactions*, 2014, 42 ( 4 ) : 1094-1100.
- [ 6 ] JELTSCH A. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases [ J ]. *ChemBioChem*, 2002, 3 ( 4 ) : 275-293.
- [ 7 ] 洪胜辉, 张军, 张蕊, 等. 鹅原代肝细胞的简易、高纯分离及培养 [ J ]. *江苏农业科学*, 2012, 40 ( 4 ) : 56-58.
- [ 7 ] HONG S H, ZHANG J, ZHANG R, et al. Simple and high purity isolation and culture of goose primary hepatocytes [ J ]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2012, 40 ( 4 ) : 56-58. ( in Chinese )
- [ 8 ] 杨雨, 阳金金, 万雨, 等. 饲料中添加甜菜碱对仔鹅生长性能及其调控因子的影响 [ J ]. *动物营养学报*, 2020, 32 ( 9 ) : 4140-4147.
- [ 8 ] YANG Y, YANG J J, WAN Y, et al. Effects of dietary betaine on growth performance, and its regulating factors of geese [ J ]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32 ( 9 ) : 4140-4147. ( in Chinese )
- [ 9 ] WU X, OUYANG Y, WANG B, et al. Hypermethylation of the *IRAK3*-activated MAPK signaling pathway to promote the development of glioma [ J ]. *Cancer Management and Research*, 2020, 7 ( 12 ) : 7043-7059.
- [ 10 ] YANG Z, WANG Z Y, YANG H M, et al. Effects of dietary methionine and betaine on slaughter performance, biochemical and enzymatic parameters in goose liver and hepatic composition [ J ]. *Animal Feed Science and Technology*, 2017, 228 : 48-58.
- [ 11 ] ZHANG L F, QI Y L, ALUO Z, et al. Betaine increases mitochondrial content and improves hepatic lipid metabolism [ J ]. *Food & Function*, 2018, 10 ( 1 ) : 216-223.
- [ 12 ] ZHAN X A, LI J X, XU Z R, et al. Effects of methionine and betaine supplementation on growth performance, carcass composition and metabolism of lipids in male broilers [ J ]. *British Poultry Science*, 2006, 47 ( 5 ) : 576-580.
- [ 13 ] SAUNDERSON C L, MACKINLAY J. Changes in body-weight, composition and hepatic enzyme activities in response to dietary methionine, betaine and choline levels in growing chicks [ J ]. *British Journal of Nutrition*, 1990, 63 ( 2 ) : 339-349.
- [ 14 ] SINGHAL N K, STERNBACH S, FLEMING S, et al. Betaine restores epigenetic control and supports neuronal mitochondria in the cuprizone mouse model of multiple sclerosis [ J ]. *Epigenetics*, 2020, 15 ( 8 ) : 871-886.
- [ 15 ] WEICKHMANN A K, KELLER H, WURM J P, et al. The structure of the SAM/SAH-binding riboswitch [ J ]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47 ( 5 ) : 2654-2665.
- [ 16 ] ABOBAKER H, HU Y, OMER N A, et al. Maternal betaine suppresses adrenal expression of cholesterol trafficking genes and decreases plasma corticosterone concentration in offspring pullets [ J ]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2019, 10 ( 1 ) : 87-97.
- [ 17 ] JONES P A, LIANG G N. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained [ J ]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10 ( 11 ) : 805-811.
- [ 18 ] CHEN S Y, ZHANG W X, SUN C, et al. Systemic nanoparticle-mediated delivery of pantetheinase Vanin-

- l regulates lipolysis and adiposity in abdominal white adipose tissue [ J ]. *Advanced Science*, 2020, 7 ( 14 ): 2000542.
- [ 19 ] 李洁,周浩,郁建锋,等.鹅 *VNN1* 基因的克隆及组织表达分析 [ J ]. *南京农业大学学报*, 2018, 41 ( 1 ): 140–146.
- LI J, ZHOU H, YU J F, et al. Cloning and tissue expression analysis of *VNN1* gene in geese [ J ]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2018, 41 ( 1 ): 140–146. ( in Chinese )
- [ 20 ] VAN DIEPEN J A, JANSEN P A, BALLAK D B, et al. PPAR-alpha dependent regulation of vanin-1 mediates hepatic lipid metabolism [ J ]. *Journal of Hepatology*, 2014, 61 ( 2 ): 366–372.
- [ 21 ] CHEN S Y, ZHANG W X, TANG C Q, et al. Vanin-1 is a key activator for hepatic gluconeogenesis [ J ]. *Diabetes*, 2014, 63 ( 6 ): 2073–2085.
- [ 22 ] ROMMELAERE S, MILLET V, GENSOLLEN T, et al. PPARalpha regulates the production of serum Vanin-1 by liver [ J ]. *FEBS Letters*, 2013, 587 ( 22 ): 3742–3748.
- [ 23 ] CHEN X, XING M. Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine on hormone secretion and epigenetic regulation in sika deer ovarian granulosa cells [ J ]. *Reproduction In Domestic Animals*, 2021, 56 ( 2 ): 360–369.
- [ 24 ] CARVALHO C D S, FERNANDES M N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus* [ J ]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2008, 151 ( 3 ): 437–442.
- [ 25 ] 王昕源,张雨,杨楠,等. DNMT3a 通过提升基因内部甲基化介导紫杉醇诱导的 *LINE-1* 异常表达 [ J ]. *遗传*, 2020, 42 ( 1 ): 100–111.
- WANG X Y, ZHANG Y, YANG N, et al. DNMT3a mediates paclitaxel-induced aberrant *LINE-1* expression through elevated internal gene methylation [ J ]. *Genetics*, 2020, 42 ( 1 ): 100–111. ( in Chinese )
- [ 26 ] SHEN J, LIU Y L, REN X C, et al. Changes in DNA methylation and chromatin structure of pro-inflammatory cytokines stimulated by LPS in broiler peripheral blood mononuclear cells [ J ]. *Poultry Science*, 2016, 95 ( 7 ): 1636–1645.
- [ 27 ] LI X, SUN Q W, LI X, et al. Dietary betaine supplementation to gestational sows enhances hippocampal *IGF2* expression in newborn piglets with modified DNA methylation of the differentially methylated regions [ J ]. *European Journal of Nutrition*, 2015, 54 ( 7 ): 1201–1210.
- [ 28 ] LING L, CHEN L B, ZHANG C N, et al. High glucose induces podocyte epithelial-to-mesenchymal transition by demethylation-mediated enhancement of MMP9 expression [ J ]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17 ( 4 ): 5642–5651.
- [ 29 ] NISHIZAWA Y, IKEDA R, YAMAMOTO M, et al. 5-aza-2-deoxycytidine enhances the sensitivity of 5-fluorouracil by demethylation of the thymidine phosphorylase promoter [ J ]. *Anticancer Research*, 2019, 39 ( 8 ): 4129–4136.



## Effects and Regulating Mechanism of Betaine on Lipid Metabolism and DNA Methylation in Primary Germinal Hepatocytes of Geese

YANG Zhi<sup>1</sup> YANG Yu<sup>2</sup> YANG Jingjing<sup>2</sup> WANG Zhiyue<sup>1,2</sup> YANG Haiming<sup>2\*</sup>

(1. Institutes of Agricultural Science and Technology Development, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** This experiment was conducted to study the effects and regulating mechanism of betaine on lipid metabolism and DNA methylation in primary germinal hepatocytes of geese. Geese primary germinal hepatocytes were used as the research material in this experiment. Experiment 1: this experiment was studied the effects of different concentrations [0 (control), 2.5, 5.0 and 10.0 mmol/L] of betaine on DNA methylation related enzyme activity and DNA methylation in promoter region of *VNN-1* (pantetheinase) in geese primary germinal hepatocytes. Experiment 2: this experiment was investigated the effects of different treatments [normal culture medium (control), 5.0  $\mu$ mol/L DNA methylation enzyme inhibitor (AZA), 5.0 mmol/L betaine, 5.0  $\mu$ mol/L AZA+5.0 mmol/L betaine] on the expression of *VNN-1* and fatty acid synthase (*FAS*) genes in geese primary germinal hepatocytes, and explored the molecular mechanism of *VNN-1* promoter region methylation regulates the molecular mechanism of gene expression. The results showed as follows: 1) the content of low-density lipoprotein (LDL) in betaine culture medium containing 2.5, 5.0 and 10.0 mmol/L was significantly lower than that in the control group ( $P<0.05$ ). 2) The S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine (SAM/SAH) ratio showed an increasing trend with increasing betaine concentration, with a significant primary linear relationship ( $P<0.05$ ). 3) The expression of *VNN-1* gene in hepatocytes of 5.0 and 10.0 mmol/L betaine groups was significantly lower than that of control group and 2.5 mmol/L betaine group ( $P<0.05$ ); DNA methylation in *VNN-1* promoter region of hepatocytes of 5.0 and 10.0 mmol/L betaine groups was significantly higher than that of control group ( $P<0.05$ ). 4) The expression of *VNN-1* gene in hepatocytes of AZA group and AZA+betaine group was significantly higher than that of the control group at 96 h of AZA treatment ( $P<0.05$ ). AZA treatment significantly increased the expression of *FAS* gene in hepatocytes at 48 h of treatment compared with the control group ( $P<0.05$ ). In conclusion, adding betaine to the primary germinal hepatocyte culture medium of goose can inhibit the lipid accumulation of hepatocytes and improve the overall DNA methylation level of the cells. In addition, negative feedback of methylation in the promoter region of *VNN-1* gene regulates gene expression. AZA inhibite DNA methylation and find that the high expression of *VNN-1* and *FAS* are associated with DNA demethylation. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33 (5): 2918-2926]

**Key words:** betaine; geese primary germinal hepatocytes; *VNN-1*; lipid metabolism; DNA methylation