硒缺乏对鸡肌肉组织DNA甲基化水平的影响

徐世文, 蒋智慧, 王超, 曹野

(东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 选取健康1日龄雏鸡200只, 随机分为2组, 低硒组(饲料硒含量为 $0.033 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和对照组(饲料硒含量为 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 分别于0、15、25、35、45、55日龄取胸肌、翅肌、腿肌组织, 高效液相色谱法检测DNA总甲基化水平, 实时荧光定量PCR方法检测DNA甲基转移酶1(DNMT1)、DNA甲基转移酶3A(DNMT3A)、DNA甲基转移酶3B(DNMT3B)mRNA表达水平。结果表明, DNA总甲基化水平整体呈降低趋势, 低硒组与对照组相比DNMT1、DNMT3A mRNA表达量先增加后减少, DNMT3B各组均低于正常组并且随日龄增加组内呈降低趋势。硒缺乏可导致鸡肌肉组织DNA甲基化水平降低。

关键词: 鸡; 硒缺乏; 肌肉组织; 甲基化

中图分类号: S856.9

文献标志码: A

文章编号: 1005-9369(2012)09-0042-05

Effect of selenium deficiency on DNA methylation in muscle tissue of chickens/XU Shiwen, JIANG Zhihui, WANG Chao, CAO Ye(School of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of selenium (Se) deficiency on the DNA methylation in the muscle tissue of chickens. Two hundred 1-day-old chickens were randomly allocated to two groups. The low-Se group was fed a Se-deficient basal diet (containing $0.033 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Se). Control group was fed a medium-Se diet (containing $0.15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Breast muscle, flight muscle and Leg muscle was collected when the chickens were 15, 25, 35, 45 and 55 days old. DNA methylation levels were detected by HPLC, while the expression levels of DNA-methyltransferase 1(DNMT1) DNA-methyltransferase 3A(DNMT3A) and DNA-methyltransferase 3B(DNMT3B) mRNA were determined by real-time PCR. The total levels of DNA methylation were decreasing. Selenium deficiency group expression of DNMT1, DNMT3A mRNA increased compared with control group and then it expression decreased. The expression of DNMT3B in each group was lower than the control group with age increased. Selenium can down-regulate the levels of DNA methylation in chicken muscle tissue.

Key words: chicken; selenium (Se) deficiency; muscle tissue; DNA methylation

DNA甲基化是已知最早被发现的与基因抑制相关的表观遗传机制, 在酵母以外的所有真核生物中都有不同程度的存在, 是哺乳动物遗传外修饰的重要调控方式, 也是脊椎动物DNA唯一的自然化学修饰方式。DNA的甲基化修饰参与基因表

达调控、胚胎发育、细胞分化、基因组印迹、X染色体灭活和细胞记忆等诸多重要生物学过程^[1-2]。通常情况下, 甲基化水平同基因表达呈负相关, 甲基化程度越高, 基因表达活性越低, 甲基化程度越低, 基因表达越活跃。DNA异常甲基化可能导致

收稿日期: 2012-03-06

基金项目: 国家自然科学基金(30871902, 31272626); 黑龙江省教育厅基金(11551030)

作者简介: 徐世文(1966-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为禽类营养代谢病与中毒病理与综合防治研究。E-mail: shiwenxu@neau.edu.cn

基因的不稳定性和癌症的发生^[3-5]。含量高低也与DNA甲基化异常改变相关。Davis实验证明，饮食中硒的缺乏导致小鼠Caco-2细胞系及肝和结肠组织的低甲基化^[3]。

目前，微量元素的补充已经广泛应用于饲料工业中，但畜禽缺硒病仍时有发生。硒缺乏对禽类生长性能有重要影响，禽类硒缺乏时主要引起肌营养不良，心肌、骨骼肌变性、坏死为特征的白肌病。缺硒性骨骼肌损伤与DNA甲基化水平的关系未见报道，本试验通过饲喂缺硒饲料复制鸡缺硒性骨骼肌损伤模型，检测肌肉甲基化水平和甲基转移酶mRNA表达水平，从DNA甲基化角度探讨其与缺硒性骨骼肌损伤的关系，为硒缺乏病深入研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

7500 Real Time PCR System (美国 Applied Biosystems)；高效液相色谱仪(日本岛津)；低温高速离心机(BECKMAN公司)；电泳仪(DYY-6C,北京市六一仪器厂)；PCR扩增仪(2720,美国ABI公司)；紫外分光光度计(Gene Quant 1300/100,美国GE公司)；凝胶成像系统(ChampGelTM3000,北京赛智创业科技有限公司)；DNA甲基化标准品、DEPC、DMSO、EB、 Na_2SeO_3 (购自Sigma公司)；Tris饱和酚、异丙醇、三氯甲烷、无水乙醇、磷酸二氢钾、磷酸等为国产分析纯；氢氟酸为国产优级纯，甲醛为国产分析纯；RNAase固相清除剂(购自北京天恩泽基因科技有限公司)；TRIzol、M-MLV反转录试剂(购自北京 Invitrogen公司)；RNase A、蛋白酶K(购自美国NEB公司)。

1.2 实验动物与饲养

健康1日龄雏鸡(购于哈尔滨市先锋孵化场)200只，随机分2组，每组100只，雌雄各半，即：低硒组饲喂缺硒日粮(饲料来源于黑龙江省严重缺硒地区龙江县，日粮总含硒量为 $0.033\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)；对照组饲喂全价日粮(将缺硒组日粮添加 Na_2SeO_3 ，使日粮含硒量为 $0.15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。各组雏鸡常规饲养，自由采食和饮水。分别于0、15、25、35、45、55日龄时，心脏采血致死，采集胸肌、翅肌、腿肌组织迅速冷冻备用。

1.3 基因组DNA总甲基化水平检测

1.3.1 组织DNA提取及样品处理

酚-氯仿法提取组织总DNA，溶于 $100\ \mu\text{L}$ 灭菌水中，应用紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 的比值和琼脂糖凝胶电泳来判定DNA的完整性与纯度。取 $50\ \mu\text{g}$ DNA用40%的氢氟酸溶解，调整DNA浓度为 $1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。 $100\ ^\circ\text{C}$ 水浴3 h使DNA水解。氮气吹干备用。

1.3.2 高效液相色谱法检测DNA总甲基化水平

色谱柱为DIKMA SpursilC18-EP($250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}\times 5\ \mu\text{m}$)；紫外检测波长 $280\ \text{nm}$ ；流动相 $0.05\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾，磷酸调pH 3.5；流速为 $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。上样前将处理好的DNA样品加入 $200\ \mu\text{L}$ 新鲜配制的 $0.05\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液溶解后过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜并超声脱气。标准品处理方法同样品，15 min进样一次，每个标准品或样品上样量为 $20\ \mu\text{L}$ 。采用外标准法，通过比较样品和标准品的积分面积确定胞嘧啶(C)和5-甲基胞嘧啶(5mC)的含量，并根据公式 $5\text{mC}/(\text{C}+5\text{mC})\times 100\%$ 计算样品DNA甲基化的水平。

1.4 肌肉组织DNMT1、DNMT3A、DNMT3B基因mRNA表达的检测

1.4.1 组织总RNA抽提及反转录

肌肉组织样品，采用Trizol试剂按照试剂说明书操作抽提组织总RNA，室温干燥，加入 $30\ \mu\text{L}$ 无RNAase水溶解；应用紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 的比值和琼脂糖凝胶电泳来判定RNA的完整性与纯度。按照反转录试剂盒操作将RNA反转录成cDNA，然后 $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.4.2 荧光定量PCR扩增

根据已知基因序列应用Primer Premier5.0软件设计引物，验证引物特异性。采用SYBR Green I荧光染料法进行实时扩增。 $20\ \mu\text{L}$ 反应体系如下：

SYBR Premix Ex Taq $10\ \mu\text{L}$ ，Rox Reference Dye II $0.4\ \mu\text{L}$ ，上游引物($10\ \text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.4\ \mu\text{L}$ ，下游引物($10\ \text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.4\ \mu\text{L}$ ，cDNA模板 $2.0\ \mu\text{L}$ ，灭菌双蒸水 $6.8\ \mu\text{L}$ 。反应在ABI 7500 Real Time PCR System上进行。反应条件为： $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性30 s， $95\ ^\circ\text{C}$ 5 s， $60\ ^\circ\text{C}$ 34 s，40个循环，最后为融解反应。

1.5 统计学分析

数据采用平均值 $\pm$ 标准误表示，应用t检验统

计分析。

2 结果与分析

2.1 DNA总甲基化水平的检测

应用高效液相色谱法检测5-甲基胞嘧啶的含量进而反应DNA总甲基化水平的变化。检测的所有基因组DNA均在相同试验条件下进行，DNA经色谱柱均得到清晰、平稳的波峰图谱，各种核苷酸之间分离得很好。结果显示，硒缺乏对DNA总

甲基化水平的影响因组织不同有差异，但整体呈降低趋势(见表1)。

胸肌DNA总甲基化水平低硒组各时间点均低于对照组，且差异均显著。翅肌DNA总甲基化水平15日龄低硒组高于对照组，其余各时间点均低于对照组且差异显著。腿肌DNA总甲基化水平低硒组各时间点显著低于对照组。各肌肉组织低硒组组内随着缺硒日龄的增加，DNA甲基化水平整体呈降低趋势。

表1 肌肉组织中DNA总甲基化水平的检测结果

Table 1 Results of total DNA methylation level in muscle tissue

组别 Group	胸肌 Breast muscle	翅肌 Hight muscle	腿肌 Leg muscle	
对照组 Control group	15d	7.414±0.538	5.376±0.412	7.108±0.444
	25d	6.867±0.609	7.668±0.712	7.533±0.636
	35d	7.264±0.593	7.053±0.313	6.232±0.491
	45d	6.461±0.597	6.565±0.658	5.701±0.250
	55d	6.141±0.494	5.835±0.489	6.269±0.277
低硒组 Low-Se group	15d	6.577±0.667*	6.508±0.585*	6.396±0.348*
	25d	6.182±0.710*	6.979±0.712*	5.268±0.179*
	35d	6.257±0.372*	6.151±0.430*	5.287±0.351*
	45d	5.287±0.469*	5.646±0.465*	4.200±0.335*
	55d	4.470±0.418*	4.760±0.401*	4.192±0.396*

注：*代表显著水平(P<0.05)。下同。

Note: denotes significant difference at 0.05 level. The same as below.

2.2 硒对肌肉组织DNMT1、DNMT3A、DNMT3B基因mRNA表达量影响的检测结果

应用实时荧光定量PCR方法检测肌肉组织中DNMTs mRNA的相对表达量。结果显示饮食中硒

缺乏影响肌肉组织中甲基转移酶基因的表达，并且各基因对不同肌肉组织的影响程度有差异。硒缺乏对DNMT1mRNA表达量的影响如表2所示。

表2 硒缺乏对肌肉组织DNMT1基因mRNA表达影响的检测结果

Table 2 Effect of Se deficiency on expression of DNMT1 mRNA in muscle tissue

基因 Gene	组别 Group	胸肌 Breast muscle	翅肌 Hight muscle	腿肌 Leg muscle	
DNMT1	对照组 Control group	0d	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
		15d	0.525±0.025	0.163±0.012	0.349±0.023
		25d	0.613±0.073	0.285±0.031	0.491±0.016
		35d	0.748±0.063	0.343±0.032	0.565±0.016
		45d	0.306±0.025	0.210±0.010	0.465±0.032
	低硒组 Low-Se group	55d	0.252±0.035	0.159±0.013	0.353±0.004
		15d	0.781±0.069*	0.263±0.012*	0.582±0.011*
		25d	0.575±0.035*	0.223±0.012*	0.439±0.014*
		35d	0.605±0.041*	0.236±0.021*	0.428±0.019*
		45d	0.267±0.019*	0.168±0.011*	0.385±0.036*
55d	0.137±0.010*	0.105±0.007*	0.275±0.021*		

低硒组与对照组相比，15日龄各肌肉组织中 DNMT1mRNA 表达量显著高于对照组，25日龄以后均低于对照组，且差异显著。低硒组组内 DNMT1mRNA 表达量整体呈下降趋势；如表3所

示，硒对 DNMT3A mRNA 表达量的影响整体趋势同 DNMT1。硒对 DNMT3BmRNA 表达量的影响见表4，几种肌肉组织低硒组各时间点表达量均低于对照组，且同时间点两组间差异显著。

表3 硒缺乏对肌肉组织 DNMT3A 基因 mRNA 表达影响的检测结果
Table 3 Effect of Se deficiency on expression of DNMT3A mRNA in muscle tissue

基因 Gene	组别 Group	胸肌 Breast muscle	翅肌 Hight muscle	腿肌 Leg muscle	
DNMT3A	对照组 Control group	0d	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
		15d	0.543±0.034	0.290±0.009	0.594±0.029
		25d	0.810±0.056	0.556±0.017	0.843±0.045
		35d	0.816±0.042	0.595 ±0.049	0.831±0.028
		45d	0.594±0.035	0.525±0.028	0.566±0.020
	缺硒组 Low-Se group	55d	0.515±0.022	0.459±0.031	0.438±0.017
		15d	0.964±0.132*	0.459±0.034*	0.857±0.049*
		25d	0.691±0.0042*	0.428±0.001*	0.726±0.037*
		35d	0.480±0.031*	0.365±0.021*	0.709±0.041*
		45d	0.419±0.023*	0.272±0.021*	0.432±0.023*
55d	0.283±0.021*	0.209±0.021*	0.118±0.015*		

表4 硒缺乏对肌肉组织 DNMT3B 基因 mRNA 表达影响的检测结果
Table 4 Effect of Se deficiency on expression of DNMT3B mRNA in muscle tissue

基因 Gene	组别 Group	胸肌 Breast muscle	翅肌 Hight muscle	腿肌 Leg muscle	
DNMT3A	对照组 Control group	0d	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
		15d	0.543±0.034	0.290±0.009	0.594±0.029
		25d	0.810±0.056	0.556±0.017	0.843±0.045
		35d	0.816±0.042	0.595 ±0.049	0.831±0.028
		45d	0.594±0.035	0.525±0.028	0.566±0.020
	缺硒组 Low-Se group	55d	0.515±0.022	0.459±0.031	0.438±0.017
		15d	0.964±0.132*	0.459±0.034*	0.857±0.049*
		25d	0.691±0.0042*	0.428±0.001*	0.726±0.037*
		35d	0.480±0.031*	0.365±0.021*	0.709±0.041*
		45d	0.419±0.023*	0.272±0.021*	0.432±0.023*
55d	0.283±0.021*	0.209±0.021*	0.118±0.015*		

3 讨论与结论

作为具存营养、毒性、解毒三重生物学功能，硒具有影响机体抵抗疾病的能力，其缺乏伴

随癌症发生率的增加^[5]，包括前列腺癌、子宫颈癌、直肠癌、胃癌及乳腺癌等。缺硒加重甲状腺肿大，加速甲状腺组织碘的消耗，影响甲状腺素的分泌，可引发甲状腺素代谢疾病，如甲状腺功

能减退性侏儒症以及免疫应答功能低下等。同时, 机体硒含量高与DNA甲基化水平相关。一些疾病发生的同时往往都伴随着DNA甲基化水平的改变, 近年来从DNA甲基化角度研究营养代谢病与中毒病的发病机理已成为新的研究热点。曹哲明等发现鲤鱼急性镉中毒时肌肉基因组DNA甲基化变化发生在DNA损伤之前^[6]。饮食中叶酸缺乏可导致动物机体广泛低甲基化。长期慢性维生素B₁₂缺乏, 也可引发基因组DNA低甲基化, 与食管鳞状细胞癌和胃贲门腺癌的高发有关^[7]。在小鼠, 硒缺乏导致结肠普遍性的低甲基化和P53、P16基因启动子区的高甲基化^[3]。本试验中, 高效液相色谱法检测结果显示, 胸肌、翅肌、腿肌3种肌肉组织低硒组与对照组比较整体呈降低趋势, 说明饮食硒缺乏能够降低鸡肌肉组织基因组DNA总甲基化水平。这可能是硒缺乏引起骨骼肌疾病发生的潜在因素。

基因组中甲基化CpG岛通过DNMTs维持。DNA甲基转移酶分为两种。一种为从头甲基转移酶, 这种酶催化在发育过程中去甲基化的CpG位点重新甲基化。在哺乳动物体内, DNMT3A、DNMT3B表现为此酶活性。另一种为维持甲基转移酶, 对于哺乳动物即DNMT1, 其主要是催化复制后的半甲基化, 也就是在DNMT1的作用下根据亲链上的甲基化位点进行相应的甲基化修饰的过程, 使DNA分子未甲基化的那一条子链甲基化, 从而保持子链与亲链有完全相同的甲基化形式, 重新甲基化完成后由维持甲基化来维持其稳定的甲基化状态^[8]。本试验中硒缺乏时鸡肌肉组织DNMT1、DNMT3A、DNMT3B基因mRNA表达整体均呈降低趋势, 说明硒缺乏可引起鸡肌肉组织DNA甲基转移酶表达的减少, 可能是导致DNA总甲基化水平降低的因素之一。细胞衰老过程中, 基因组的总体甲基化水平降低, 基因组的稳定性降低, 对于肿瘤的发生和

发展具有促进作用。但是, 在癌细胞株中, 将DNMT1和DNMT3b一同剔除, 可诱导p16、p21等抑癌基因的表达和抑制癌细胞的生长^[9]。所以, DNA甲基转移酶活性的改变所造成的变化, 须根据不同的细胞组织, 不同的发育时期作进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting[J]. *Nature*, 1993, 366: 362-5.
- [2] Li E, Beard C, Forster A, Bestor T, Jaenisch R. DNA methylation, genomic imprinting, and mammalian development[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1993, 58: 297-305.
- [3] Davis C D, Uthus E O, Finley J W. Dietary selenium and arsenic affect DNA methylation *in vitro* in caco-2 cells and *in vivo* in rat liver and colon[J]. *J Nutr*, 2000, 130(120): 2903-2909.
- [4] Yoshizawa K, Willett W C, Moms J S, et al. Study of prediagnostic selenium level in toenails and the risk of advanced prostate cancer [J]. *J Natl Cancer Instit*, 1998, 90(9): 1219-1224.
- [5] Howard E G. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: Complexities with thioredoxin reductase[J]. *Carcinogenesis*, 1999, 20(9): 113-120.
- [6] 曹哲明, 杨健. 不同浓度Cd²⁺对鲤鱼基因组DNA的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2010, 16(4): 457-461.
- [7] Weatherspoon L J, Worthen H D, Handu D. Nutrition risk and associated factors in congregational participants in northern Florida role of Elder Care Services(ECS) [J]. *J Nutr Elder*, 2004, 24(2): 37-45.
- [8] Siedlecki P, Zielenkiewicz P. Mammalian DNA methyl transferases [J]. *Acta Biochim Pol*, 2006, 53(2): 245.
- [9] Rhee I, Bachman K E, Park B H, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells[J]. *Nature*, 2002, 416: 552-556.