

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.04.013

调控 *SUV39H1/2* 对水牛乳腺细胞增殖及 *STAT5a* 表达的影响

原茜, 古景开, 薛青松, 石德顺, 李湘萍

亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西大学, 南宁 530004

摘要: 为了解 *SUV39H1/2* 基因对水牛 *STAT5a* 基因表达的调控作用, 首先克隆不同长度水牛 *STAT5a* 启动子区, 采用双荧光素酶方法检测启动子活性. 利用 *SUV39H1/2-shRNA* 慢病毒感染水牛乳腺上皮细胞, 检测细胞增殖及相关基因表达变化, 并分析 DNA 甲基化水平. 结果显示: 克隆获得的 2 190 bp, 355 bp, 417 bp *STAT5a* 启动子片段均具有活性, 2 190 bp 片段活性显著高于其他两个片段 ($p < 0.05$), 2 190 bp 启动子区存在 *sp1*, *p300*, *p53*, *NF- κ B* 等转录结合位点. 下调 *SUV39H1/2* 基因表达后, 乳腺上皮细胞周期阻滞在 S 期, G0/G1 期细胞比例无显著差异, G2 期比例显著减少 ($p < 0.05$). qRT-PCR 结果显示, 抑制 *SUV39H1/2* 基因表达使乳腺上皮细胞分化及乳蛋白合成相关基因 *STAT5a*, *mTOR*, 且乳脂合成相关基因 *sreb1*, *fabp3* 表达水平均显著降低 ($p < 0.05$); *STAT5a* 启动子区甲基化程度为 31.5%, 高于对照组 15.5%. 结果表明: 抑制 *SUV39H1/2* 基因表达能够促进水牛乳腺上皮细胞增殖; *SUV39H1/2* 基因可能通过调控 *STAT5a* 启动子甲基化水平, 进而调控乳腺上皮细胞增殖分化、乳汁和乳蛋白合成相关基因表达.

关键词: 水牛; 乳腺上皮细胞; 细胞增殖; *STAT5a*;
启动子甲基化

中图分类号: S823.8⁺3 文献标志码: A 开放科学(资源服务)标识码(OSID): 

文章编号: 1673-9868(2023)04-0126-10

Effects of Regulating *SUV39H1/2* Expression on Proliferation of Mammary Epithelial Cells and the Expression of *STAT5a* Gene in Buffalo

YUAN Xi, GU Jingkai, XUE Qingsong,
SHI Deshun, LI Xiangping

State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agricultural Biological Resources,
Guangxi University, Nanning 530004, China

Abstract: To understand the regulatory effect of *SUV39H1/2* gene on the expression of *STAT5a* gene in buffalo, the different lengths of buffalo *STAT5a* promoter region were cloned. The double luciferase method was used to detect the activity of promoter. Buffalo mammary epithelial cells infected with *SUV39H1/2-shRNA* lentivirus were used to detect cell proliferation and related gene expression, and analyze DNA methylation levels. The results showed that the cloned 2, 190 bp, 355 bp and 417 bp of *STAT5a* promoter fragments were all active, and the activity of the 2, 190 bp fragment was significantly higher than that of the other two fragments ($p < 0.05$). There were some transcriptional binding sites such as *sp1*, *p300*, *p53*, *NF- κ B* in the 2, 190 bp promoter region. After downregulating the expression of *SUV39H1/2* gene, the breast epithelial cell cycle was blocked in the S phase, there was no significant difference in the proportion of cells in the G0/G1 phase, and the proportion in the G2 phase decreased significantly ($p < 0.05$). qRT-PCR results showed that the expression of *SUV39H1/2* gene was inhibited, while the expression levels of breast epithelial cell differentiation, milk protein synthesis-related genes *STAT5a* and *mTOR*, milk lipid synthesis-related genes *srebp1* and *fabp3* were significantly reduced ($p < 0.05$). The degree of methylation of *STAT5a* promoter region was 31.5%, which was higher than that of the control group by 15.5%. The above results showed that inhibiting the expression of *SUV39H1/2* gene could promote the proliferation of buffalo mammary epithelial cells. The *SUV39H1/2* gene may regulate the proliferation and differentiation of breast epithelial cells and the expression of genes related to milk and milk protein synthesis by regulating the level of methylation of *STAT5a* promoter.

Key words: buffalo; breast epithelial cells; cell proliferation; *STAT5a*; promoter methylation

乳腺是哺乳动物周期性变化器官,不仅随动物年龄变化,还受到激素及相关信号因子的调控。动物性成熟后经历妊娠期、泌乳期和退化期,对于哺育后代有着重要的作用^[1]。STAT5 是信号转导和转录激活子(STATs)家族中的一类蛋白,有研究表明其在细胞生长、代谢和泌乳等方面有着重要的影响^[2]。Kang 等^[3]指出,STAT5 可以影响乳腺上皮细胞的生长和泌乳功能,在乳腺上皮分化过程中,STAT5 与 H3K9me3 结合,通过激活特异性基因表达在激素调控中发挥作用。

STAT5a 和 *STAT5b* 是 STAT5 的两个亚型,结构同源性虽然在 90% 以上,但是从不同的基因序列转录后,翻译得到的蛋白功能也不同。当单敲除小鼠 *STAT5a* 基因时,产生的雌性小鼠后代在妊娠期间乳腺小泡生长被抑制,终末分化失败,导致分娩后乳腺无法正常泌乳^[4]。在乳腺上皮细胞中,*STAT5a* 对 Janus 激酶 2(Jak2)介导的磷酸化、二聚化和易位到细胞核的催乳素泌乳过程作出反应^[5-6]。*STAT5a* 与乳蛋白基因调控序列中的干扰素激活序列(GAS)元件结合,从而启动基因转录和乳蛋白合成。通过单核苷酸多态性(SNP)分析,发现 *STAT5a* 有一个新的 SNP(A/G),并分为 AA/AG/GG 基因型,不同基因型与奶牛的产奶量及奶品质息息相关^[7]。此外,*STAT5a* 还是奶牛健康泌乳的关键基因^[8]。因此,基于 *STAT5a* 在以上研究中的关键作用,深入地了解 *STAT5a* 的调控机制尤为重要。

花斑抑制因子同源物(*SUV39H1/2*)是组蛋白甲基化转移酶,在哺乳动物染色质形成方面发挥重要作用^[9]。*SUV39H1/2* 能够介导组蛋白 3 赖氨酸 9 三甲基化(H3K9me3)重编程障碍,导致染色质浓缩形成异染色质^[10]。Chen 等^[11]发现 *SUV39H1* 减少与慢性阻塞性肺疾病(COPD)的异常炎症有关,COP39 患者原代人小气道上皮细胞中过表达 *SUV39H1* 提高了 H3K9me3 水平并抑制了炎症,在 COPD 小鼠中,使用 chaetocin 抑制 *SUV39H1/H3K9me3* 水平时,炎症反应增强。Carvalho 等^[12]发现慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 的表达与染色体异常相关。

目前,尚不清楚 *STAT5a* 在水牛乳腺发育和泌乳中的作用及 *SUV39H1/2* 对其的调控机制。为此,本研究首先克隆水牛 *STAT5a* 基因启动子,利用双荧光素酶法对启动子活性进行分析,然后采用 RNA 干扰技术抑制 *SUV39H1/2* 基因表达,探讨其对水牛乳腺上皮细胞增殖及 *STAT5a* 启动子甲基化程度的影响,

以期进一步了解水牛产奶特性，并阐明 *STAT5a* 在水牛乳腺发育和泌乳方面的分子机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

本试验所用水牛乳腺组织均来自广西本地屠宰场，采用组织块培养法得到原代水牛乳腺上皮细胞。广西本地水牛 *SUV39H1/H2* 基因的 *shRNA* 序列采用林浪^[13]、代小丽^[14] 的方法。pSico-GFP-*SUV39H1-shRNA*，pSico-GFP-*SUV39H2-shRNA* 以及其他慢病毒包装质粒均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

基因克隆引物(上海生工公司)；兔多克隆 H3K9me3 抗体(CST 公司)；POLY-L-Lysine 多聚赖氨酸，二抗 TRITC goat-anti-rabbit IgG(武汉三鹰)；细胞转染试剂购自全式金生物；细胞培养所用试剂及药品购自 Sigma 公司。

1.1.3 主要仪器及设备

c-1000 Touch PCR 仪、CKX41 倒置显微镜(日本 OLYMPUS)；BioSpec-nano 微量分光光度计(日本岛津)；Gel DocTM XR+凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成

利用 Oligo 6.0 软件设计扩增上游启动子引物序列(表 1)。

表 1 *STAT5a* 启动子及 CpG 岛克隆引物

引物名称	正向和反向引物序列	退火温度/℃	用途
<i>STAT5a</i> -2K F	5'-CTCGAGCACCCCCTAGTCAAGCCCAGT-3'	60	启动子克隆
<i>STAT5a</i> -2K R	5'-AAGCTTGAGCCGAGAGCAGCGATTTCC-3'	60	启动子克隆
<i>STAT5a</i> -0.3K F	5'-CTCGAGCGCGCGCACACACACACAC-3'	65	启动子克隆
<i>STAT5a</i> -0.3K R	5'-AAGCTTAGCCTCGGTCGCTCTCTCCCC-3'	65	启动子克隆
<i>STAT5a</i> -0.4K F	5'-CTCGAGCCCTCTTGCCAGCACGGTCT-3'	65	启动子克隆
<i>STAT5a</i> -0.4K R	5'-AAGCTTCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG-3'	65	启动子克隆
<i>STAT5a</i> -BSP-0.3K F	5'-GTAGTTGATTTTTGAGGAGGAAAT-3'	60	BSP 测序
<i>STAT5a</i> -BSP-0.3K R	5'-AACAACAACAACAACAACAAAATAC-3'	60	BSP 测序

注：BSP 测序表示亚硫酸氢盐处理测序。

1.2.2 *STAT5a* 启动子克隆和生物信息学分析

提取水牛卵巢组织的 DNA，以水牛卵巢基因组 DNA 为模板扩增 *STAT5a* 启动子片段，然后进行 PCR 产物鉴定、胶回收、转化、重组质粒鉴定及质粒提取。

利用启动子结合位点分析软件 TFSEARCH，Promoter SCAN，TSSW 分析克隆得到序列启动子各个启动元件的位置及潜在的转录因子结合位点。利用 Meth Primer 软件在线分析克隆得到序列的甲基化情况，在线预测 *STAT5a* 启动子区甲基化 CpG 岛。

1.2.3 *STAT5a* 启动子表达载体构建及活性分析

将 pMD-18T-*STAT5a*-0.3K，pMD-18T-*STAT5a*-0.4K，pMD-18T-*STAT5a*-2K 和 pGL3-Basic 酶切纯化后，分别与 pGL 3-Basic 载体进行 T4 连接，然后进行重组质粒鉴定和去内毒素质粒提取。转染至 293T 细胞进行启动子活性分析，荧光素检测依照 Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) II 说明书进行。

1.2.4 慢病毒感染广西本地水牛乳腺上皮细胞

通过双酶切来鉴定质粒大小的正确性后，参考林浪^[13] 的方法采用 3 质粒系统进行病毒包装，包括包

膜质粒 VSVG、包装质粒 NRF 和目的质粒 pSicoR-GFP-SUV39H1-shRNA/pSicoR-GFP-SUV39H2-shRNA/pSicoR-GFP-control. 细胞增殖及周期检测采用 CCK8 试剂盒绘制细胞生长曲线, 通过流式细胞仪检测细胞周期分布情况.

1.2.5 荧光定量 PCR

采用 Trizol 法提取乳腺上皮细胞(对照组和病毒感染组)总 RNA, 并用 RT-PCR 法反转录为 cDNA. 以稀释后的 cDNA 为模板, 加入特异性定量 PCR 引物(表 2). 反应体系: SYBR Premix EX Taq™ 10 μL、Rox 0.4 μL、上下游引物各 0.3 μL、cDNA 1.0 μL、8.0 μL ddH₂O. 反应程序为: 95 ℃, 5 min; 95 ℃, 30 s; 60 ℃, 30 s; 72 ℃ 30 s, 循环 40 次. 每个样品均重复 3 个反应, 生物学重复 3 次. 以 *Histone* 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 相对定量值.

表 2 实时荧光定量 PCR 引物

引物名称	正向和反向引物序列
<i>B-Histone F</i>	5'-AAAGGGAAGTATGCCGAGCG-3'
<i>B-Histone R</i>	5'-CTTGTTGAGCTCCTCGTCGT-3'
<i>Suv39H1 R</i>	5'-AAGGATGCAGTGTGTGTTGC-3'
<i>Suv39H1 F</i>	5'-CCTGTTTCGCGATCTTTTAA-3'
<i>Suv39H2 R</i>	5'- GCAGGACGAAGTCAACAGAA -3'
<i>Suv39H2 F</i>	5'- CAACCAAAGGTGGCTTCATT -3'
<i>STAT5a F</i>	5'- ACCTGCTCATCA ACA AGC CC-3'
<i>STAT5a R</i>	5'- GATAGTTCAGGTCCCCCAACC -3'
<i>mTOR F</i>	5'-GCTGACCGAAATGAGGGC-3'
<i>mTOR R</i>	5'-AGAATCAGACAGGCACGAA-3'
<i>Elf5 F</i>	5'-CACCTATTCTCAGCCCTTAT-3'
<i>ELf5 R</i>	5'-AACCTTCATTGACACCTTCAC-3'
<i>Csn1s1 F</i>	5'-AGTGCCCTATCCCCAG-3'
<i>Csn1s1 R</i>	5'-AAGGATTGAAAAGTTGCC-3'
<i>Srebpl F</i>	5'-CCAGCTGACAGCTCCATTGA-3'
<i>Srebpl R</i>	5'-TGCGCGCCACAAGGA-3'
<i>Fabp3 F</i>	5'-GAACTCGACTCCCAGCTTGAA-3'
<i>Fabp3 R</i>	5'-AAGCCTACCACAATCATCGAAG-3'

1.2.6 免疫荧光法检测细胞 H3K9me3 水平

分别消化第 5 代未处理的水牛乳腺上皮细胞和慢病毒感染的乳腺上皮细胞, 配置成 1.5×10^3 的细胞悬液, 传入 48 孔板中每组 3 个重复. 细胞生长到 80%时, 换液, 用 PBS 洗 3 遍. 加入 4 mL/L 多聚甲醛 1 mL, 4 ℃固定 30 min. 吸去废液, 用 PBS 清洗 3 次, 每次 3 min. 加入 1 mL/L Triton X-100 中透化 20 min. 用 PBS 清洗 3 次, 每次 3 min. 每个孔细胞加入 1 mL/L BSA 封闭 10 h. 弃废液, 用 PBS 清洗 3 次, 每次 30 s, 加入比值为 1:200 的 H3K9me3 一抗使液面完全铺满细胞表面, 孵育 1 h. 回收一抗, 用 PBS 清洗 3 次, 每次 3 min. 加入 200 μL 比值为 1:200 的二抗中孵育 45 min. 然后用 DAPI 染核 15 min, PBS 清洗 3 次. 封片后用荧光显微镜进行观察拍照.

1.3 数据分析

试验结果采用 SPSS Statistics V22.0 软件进行分析. 每个试验重复至少 3 次, $p<0.05$ 表示差异具有统计学意义, $p>0.05$ 表示差异不具有统计学意义.

2 结果

2.1 *STAT5a* 启动子克隆及生物信息学分析

从加州大学旧金山分校(UCSC)数据库中导出牛 *STAT5a* 基因上游 2 000 bp 序列, 利用 Oligo 6.0 软

件设计两对特异性 PCR 引物, 扩增得到 *STAT5a* 启动子约 2 000 bp 序列, 克隆连接到 pMD-18T 载体, 获得的阳性重组质粒命名为 pMD-18T-*STAT5a*-2k. 将质粒送华大基因测序, 结果显示序列同源性达 99%.

利用 Methprimer 在线分析 *STAT5a* 启动子区 CpG 岛情况. 分析标准为 Window>100 bp, GC%>50%, Obs/Exp>0.6. 结果显示, *STAT5a* 启动子序列存在 2 个 CpG 岛(图 1). 利用启动子在线分析软件 TFSEARCH, Promoter SCAN, TSSW, 推测克隆得到的 2 190 bp 片段存在两个启动子区, 且转录因子以 *Sp1*, *p53*, *AP1* 为主(表 3).

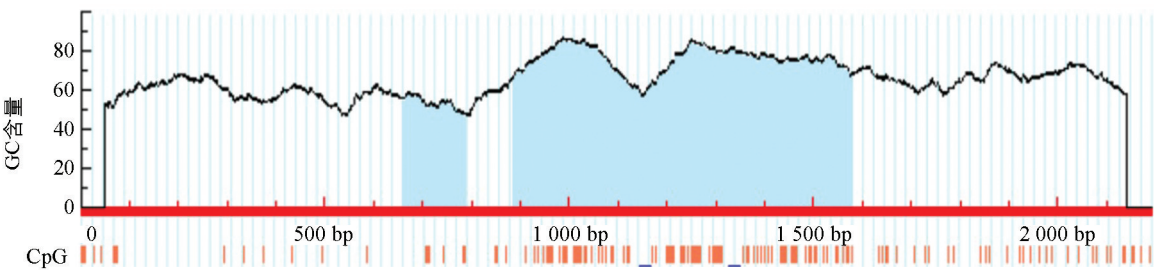
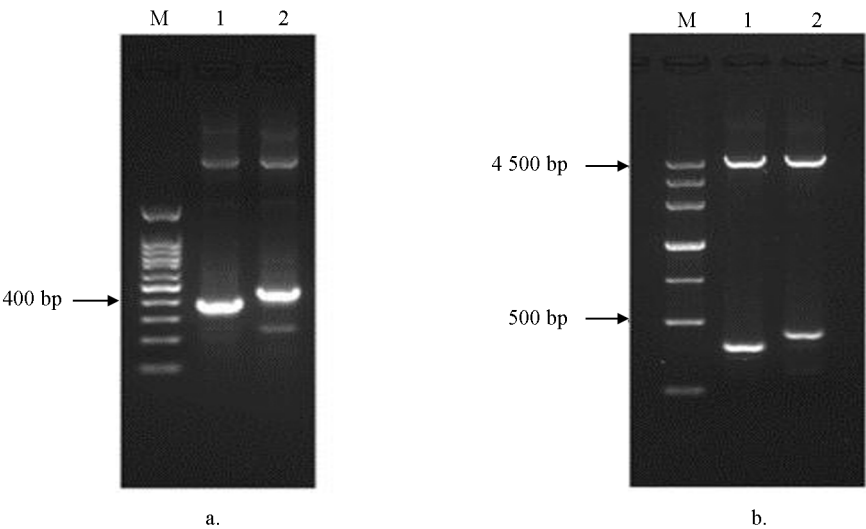


图 1 *STAT5a* 启动子序列甲基化预测图谱

表 3 水牛 *STAT5a* 基因启动子转录因子结合分析

转录因子	阈值	共有序列	信号序列
<i>SP1</i>	0.876 644	NGGGGGCGGGGYN	TTGGGGAGGGGGC
<i>AP1</i>	0.857 465	NNTGACTCANN	TGTGACCCAGG
<i>P53</i>	0.847 011	NGRCWTGYCY	GGACCAGCCT
<i>STAT</i>	0.876 905	TTCCCRKAA	TTCCGGCAA
<i>P300</i>	0.839 809	NNNRGGAGTNNNS	CAGGGGAGTGCACA
<i>NFKB</i>	0.815 900	NGGGACTTTCCA	AGGGCAATTCCA

根据在线软件分析获得 *STAT5a* 启动子活性区为 754~1 004 bp 和 1 025~1 275 bp, 通过 Oligo 6.0 软件设计两对特异性 PCR 引物. 以获得的 *STAT5a* 前 2 000 bp 序列为模板, 扩增得到 *STAT5a* 前体上游两个特异性片段. 电泳条带与预期一致(图 2). 将 PCR 产物纯化后, 分别与 pMD-18T 载体连接, 筛选得到阳性重组质粒, 命名为 pMD-18T-*STAT5a*-0.3K 和 pMD-18T-*STAT5a*-0.4K. 经酶切鉴定后送华大基因测序获得 355 bp 和 417 bp 两段序列.



M: Mark III ; 1: *STAT5a*-0.3K; 2: *STAT5a*-0.4K.

图 2 *STAT5a* 启动子 PCR 扩增结果及重组质粒双酶切鉴定结果

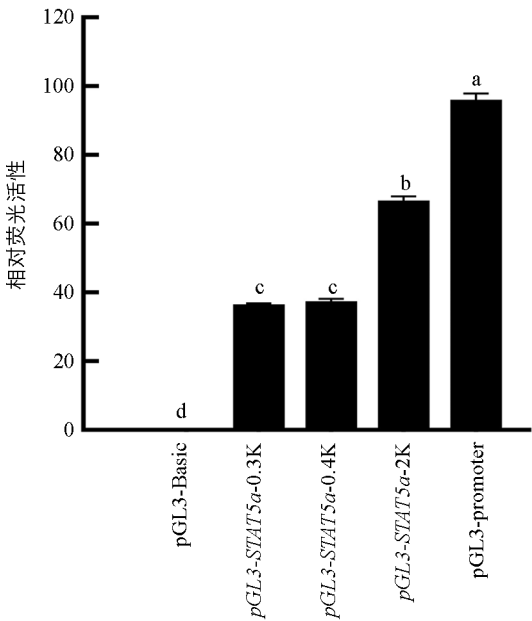
通过 Promega 公司 Dual Luciferase Reporter Assay System II 报告系统检查荧光素酶的表达水平。结果显示, 与阴性对照组相比 pGL3-*STAT5a*-0.3K, pGL3-*STAT5a*-0.4K 和 pGL3-promoter 组表达均显著上调($p<0.05$), pGL3-*STAT5a*-0.3K 与 pGL3-18T-*STAT5a*-0.4K 组相比表达差异不明显($p>0.05$), 而 pGL3-148a-2K 和 pGL3-promoter 组表达显著高于 pGL3-*STAT5a*-0.3K 组($p<0.05$), 说明 355 bp、417 bp 和 2 190 bp 均具有启动子活性, 2 190 bp 活性显著高于其他两条片段(图 3)。

2.2 *SUV39H1/2* 基因表达及对组蛋白 H3K9me3 水平的影响分析

免疫荧光结果显示, 与空白对照组和阴性对照组相比, 实验组的水牛乳腺上皮细胞中, 组蛋白 H3K9me3 水平显著降低($p<0.05$)(图 4)。

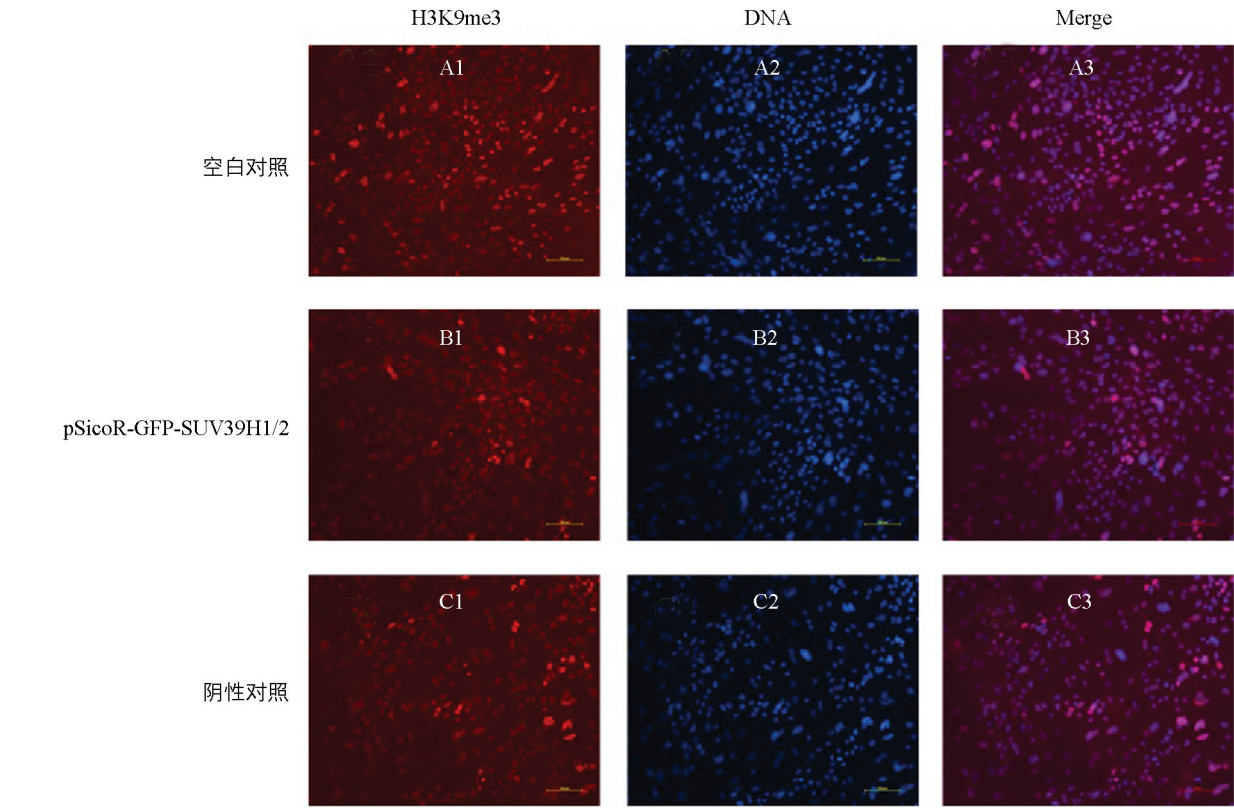
2.3 *SUV39H1/2* 基因表达下调对水牛乳腺上皮细胞增殖及泌乳相关基因表达的影响

本研究发现, 慢病毒感染抑制 *SUV39H1/2* 基因表达可促进乳腺上皮细胞增殖, 与空白对照组和阴性对照组相比, 实验组(MOI 1000)有显著差异($p<0.05$)(图 5)。流式细胞仪检测发现, 与空白对照组和阴性对照组相比, 实验组细胞周期阻滞在 S 期, G0/G1 期细胞比例无显著差异($p>0.05$), G2/M 期比例显著减少($p<0.05$)(图 6)。



图中不同小写字母表示差异具有统计学意义($p<0.05$)。

图 3 启动子活性检测结果



A1-A3: 空白对照组; B1-B3: *SUV39H1/2-shRNA* 组; C1-C3: 阴性对照组; A1-C1: 染 H3K9me3; A2-C2: 染 DAPI; A3-C3: 通道合并。

图 4 全基因组 H3K9me3 水平检测结果

qRT-PCR 结果显示,与空白对照组和阴性对照组相比,实验组乳腺上皮细胞分化基因 *STAT 5a*, *mTOR* 表达显著降低($p<0.05$);乳蛋白合成相关基因 *ELF5*, *Csn1s1* 表达极显著降低($p<0.01$); *ELF5*, *csn1s1* 及乳脂合成相关基因 *sreb1*, *fabp3* 的表达极显著降低($p<0.01$)(图 7)。

2.4 *SUV39H1/2* 基因表达下调对 *STAT5a* 启动子区甲基化水平的影响

STAT5a 启动子区甲基化情况如图 8 所示,未处理组 *STAT5a* 启动子区甲基化程度为 15.5%,抑制 *SUV39H1/2* 表达组 *STAT5a* 启动子区甲基化程度为 31.5%,表明 *SUV39H1/2* 能够通过影响 *STAT5a* 启动子区甲基化,从而影响 *STAT5a* 基因的表达。

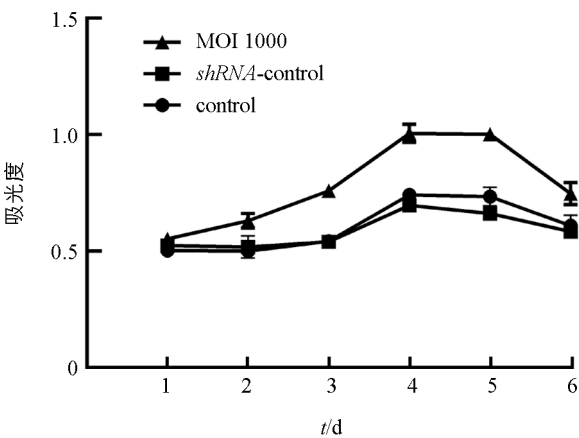


图 5 *SUV39H1/2*-shRNA 慢病毒感染水牛乳腺上皮细胞的生长曲线

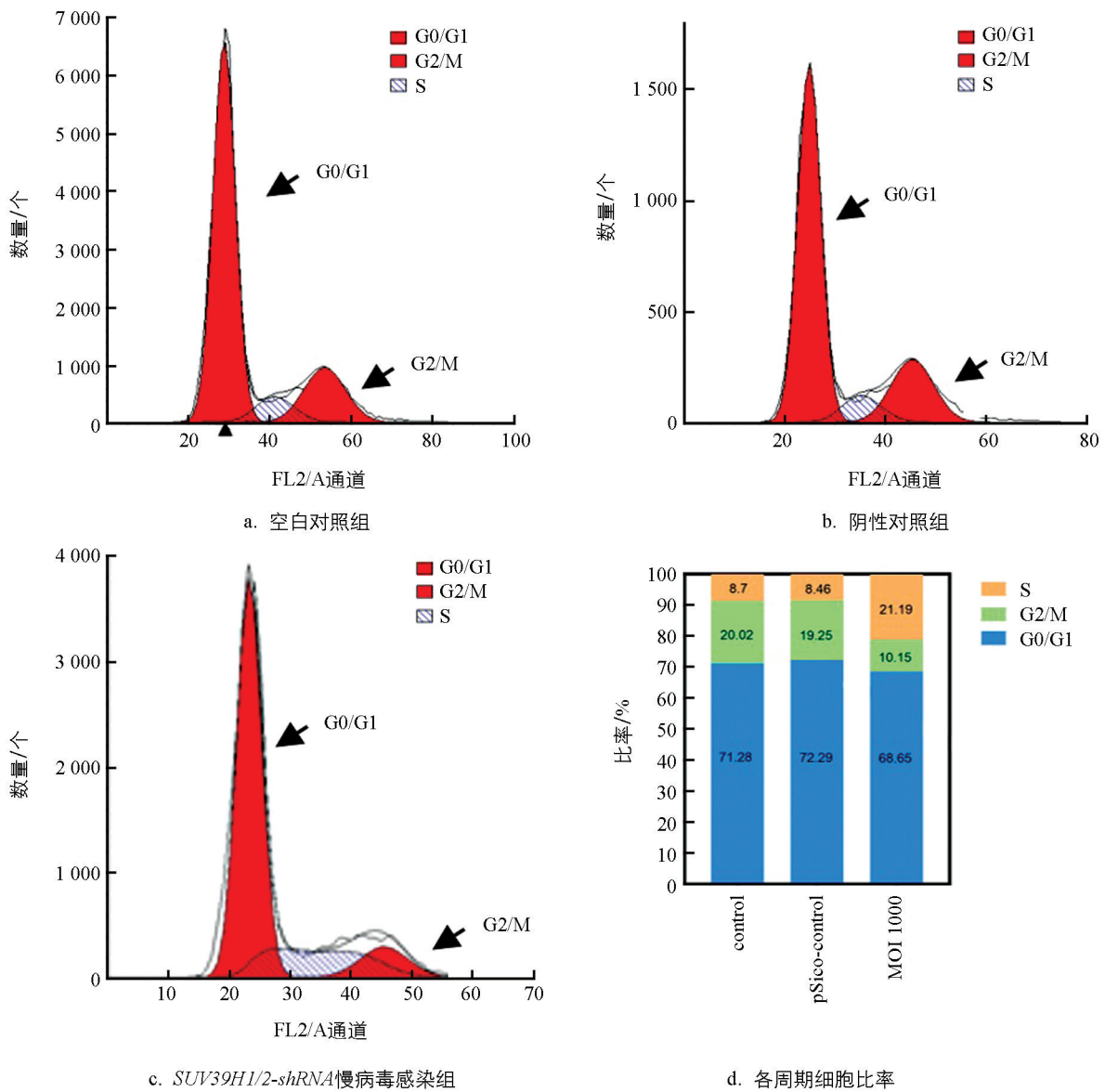


图 6 *SUV39H1/2*-shRNA 慢病毒感染对水牛乳腺上皮细胞周期的影响

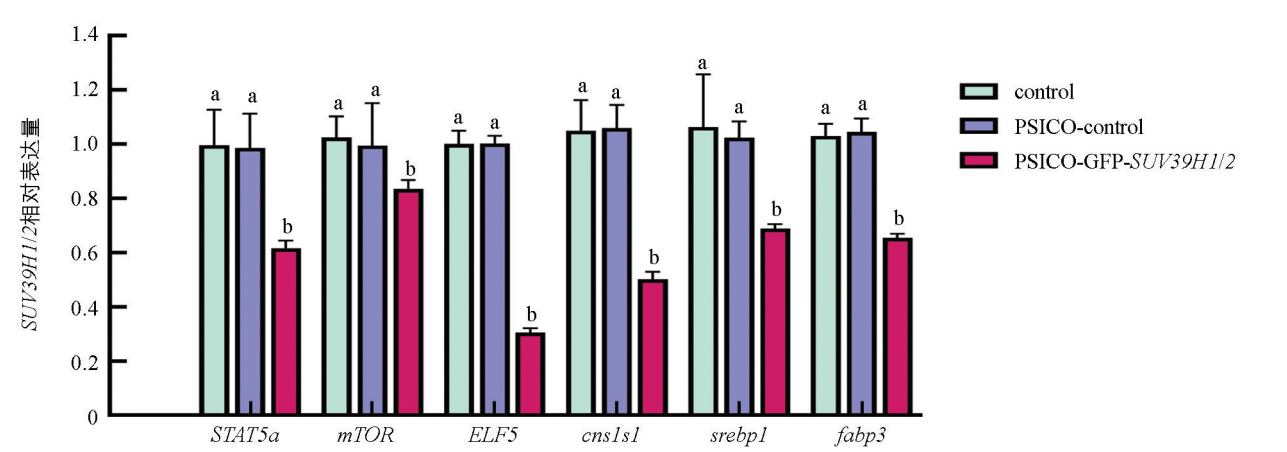


图 7 *SUV39H1/2* shRNA 慢病毒处理对 *STAT5a*, *mTOR*, *ELF5*, *csn1s1*, *fabp3*, *srebp1* 表达的影响

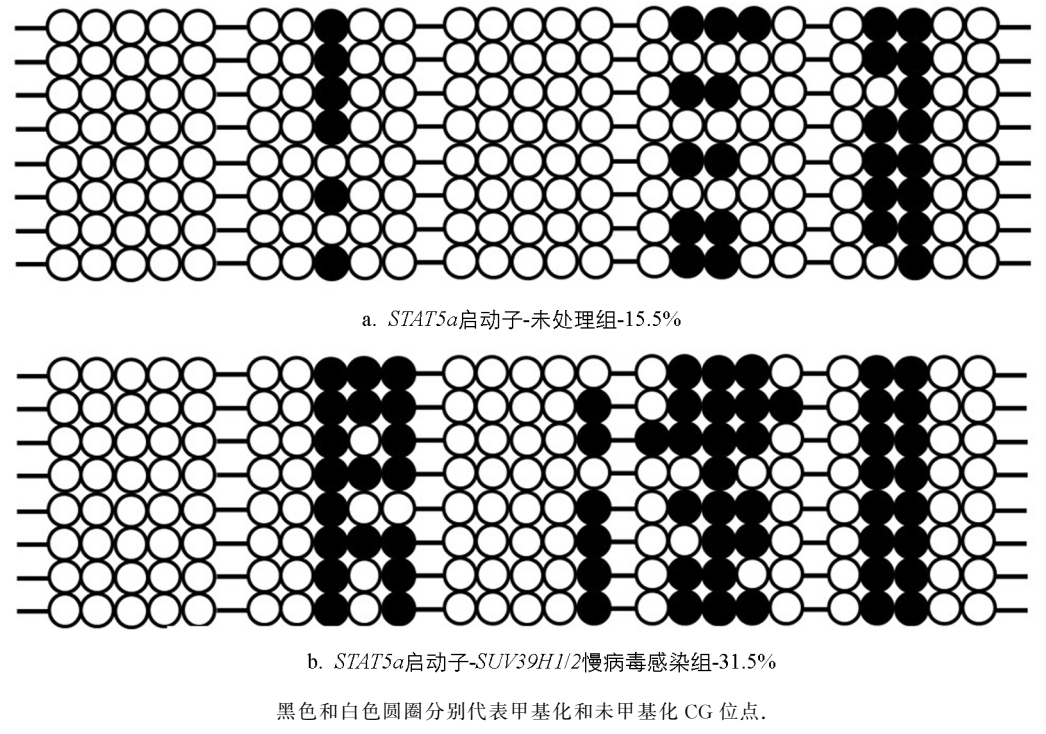


图 8 *SUV39H1/2* 慢病毒感染对 *STAT5a* 启动子甲基化水平的影响

3 讨论

对哺乳动物乳腺 *STAT5a* 的研究发现, 其转录起始位点的上游 - 679 ~ 0 bp 处存在一个 CpG 岛, DNA 甲基化可能是通过这些位点的甲基化水平来调控表达, 其中包括 *P300* 和 *SP1* 转录因子的多个结合位点^[15-16]. 吴贤锋^[17]在对山羊的研究中发现, *STAT5a* 基因内含子 CpG 岛的甲基化状态影响了山羊的体质量、产奶量和乳密度. 本试验通过克隆的方法得到了水牛 *STAT5a* 基因前 2 190 bp 启动子区序列, 通过序列比对, 发现与黄牛 *STAT5a* 基因启动子区的相似度达 97%. 采用生物信息学分析序列, 发现其含 2 个 CpG 岛, 存在多个高甲基化位点. 另外, 在 *STAT5a* 启动子区, 本研究还发现了多个转录因子结合位点 *SP1*, *p53*, *p300* 等, 表明 *STAT5a* 受多种基因调控. 为了找到 *STAT5a* 核心启动子区, 采用软件分析得到 *STAT5a* 启动子区无典型的启动子元件, 根据预测评分较高的两个启动子区域克隆获得 355 bp 和 417 bp 片段, 构建双荧光素酶载体, 验证启动子活性, 结果发现 355 bp, 417 bp, 2 190 bp 片段均具有启动子活性, 且 2 190 bp 活性最高 ($p < 0.05$).

组蛋白 H3K9me3 与表观遗传转录抑制有关. 很多研究发现, *SUV39H1/2* 基因协同调控癌细胞

H3K9me3 在体内的动态变化来发挥其生物调节功能。通过雷公藤甲素对前列腺癌(PCa)细胞的甲基化影响,人们发现其通过下调 *JMJD3* 和 *UTX* 来增强 H3K27me3 水平,同时还通过上调 *SUV39H1* 来增强 H3K9me3,促进异染色质形成和在 *E2F1* 靶基因启动子上的沉积,降低细胞活力,诱导细胞衰老表型^[18]。有研究报道了 *SUV39H1* 通过与 Rb 协同作用于 *E2F*,使细胞周期在 G0/G1 期和 S 期转换^[19]。本研究中抑制 *SUV39H1/2* 基因表达,同样看到细胞周期阻滞在 S 期,且 G2/M 期比例减少。

SUV39H1 与 Rb1 结合并通过 H3K9me3 对细胞周期蛋白基因启动子区域进行 DNA 甲基化富集,从而使细胞周期蛋白基因抑制。与之相似的研究发现,*SUV39H1* 缺失的成纤维细胞中细胞周期蛋白 E (CCNE1)和细胞周期蛋白 A2(CyclinA2)基因的活性升高^[20]。起源识别复合体(ORC)的大亚基 ORC1 与 *SUV39H1* 和 Rb 蛋白协同抑制 *CCNE1* 转录,从而抑制组蛋白 H3K9me3 标记。*CCNE1* 延迟表达使新一代细胞可以选择增殖或退出细胞周期^[21]。为了研究 *SUV39H1* 诱导的异染色质调节是否会影响哺乳动物的发育,在小鼠胚胎发生早期过表达 *SUV39H1*,转基因小鼠生长发育迟缓,骨骼转化能力弱及红细胞分化受损。在离体培养成红细胞表现出异常的细胞周期特征,表现为较低的 G0/G1 期和较高的 S 期^[22]。本研究采用广西本地水牛乳腺上皮细胞,运用干扰 RNA 慢病毒感染技术抑制 *SUV39H1/2* 基因表达,使 *SUV39H1* 和 *SUV39H2* 基因表达均显著下调($p < 0.05$),组蛋白 H3K9me3 的表达也显著下调($p < 0.05$),并且促进细胞增殖,使细胞周期被阻滞在 S 期,G0/G1 期细胞比例无显著差异,G2/M 期比例显著减少($p < 0.05$)。

定量 PCR 结果显示,与对照组相比,实验组中乳腺上皮细胞生长分化相关基因、乳蛋白合成相关基因、乳脂合成相关基因均显著下调($p < 0.05$)。其中,乳蛋白合成相关基因 *ELF5* 及功能性酪蛋白基因 *Csn1s1* 表达极显著下调($p < 0.01$)。本研究推测可能与乳腺上皮细胞的细胞特异性有关。与对照组(15.5%)相比,实验组(31.5%)*STAT5a* 启动子区甲基化程度显著升高($p < 0.05$),表明组蛋白 H3K9me3 下调对水牛乳腺上皮细胞 *STAT5a* 基因的作用,可能是通过改变 *STAT5a* 基因启动子区的 DNA 甲基化修饰,从而影响 *STAT5a* 基因的表达。

4 结论

抑制 *SUV39H1/2* 基因表达能够促进水牛乳腺上皮细胞增殖,并显著下调 *STAT5a*,*mTOR*,*ELF5*,*Csn1s1*,*abp3*,*srebpl* 等与乳腺生长发育及泌乳相关基因的表达。

参考文献:

- [1] HOVEY R C, TROTT J F, VONDERHAAR B K. Establishing a Framework for the Functional Mammary Gland: From Endocrinology to Morphology [J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2002, 7(1): 17-38.
- [2] BOLE-FEYSOT C, GOFFIN V, EDERY M, et al. Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice [J]. Endocrine Reviews, 1998, 19(3): 225-268.
- [3] KANG K, YAMAJI D, YOO K H, et al. Mammary-Specific Gene Activation is Defined by Progressive Recruitment of STAT5 during Pregnancy and the Establishment of H3K4me3 Marks [J]. Mol Cell Biol, 2014, 34(3): 464-473.
- [4] LIU X, ROBINSON G W, WAGNER K U, et al. Stat5a is Mandatory for Adult Mammary Gland Development and Lactogenesis [J]. Genes Dev, 1997, 11(2): 179-186.
- [5] BURDON T G, DEMMER J, CLARK A J, et al. The Mammary Factor MPBF is a Prolactin-Induced Transcriptional Regulator which Binds to STAT Factor Recognition Sites [J]. FEBS Letters, 1994, 350(1/2): 177-82.
- [6] GRONER B, GOUILLEUX F. Prolactin-Mediated Gene Activation in Mammary Epithelial Cells [J]. BioMed Research International, 1995, 5(5): 587-594.
- [7] BRYM P, KAMIŃSKI S, RUŚC A. New SSCP Polymorphism within Bovine STAT5A Gene and Its Associations with

Milk Performance Traits in Black-and-White and Jersey Cattle [J]. Journal of Applied Genetics, 2004, 45(4): 445-452.

[8] USMAN T, YU Y, LIU C, et al. Genetic Effects of Single Nucleotide Polymorphisms in JAK2 and STAT5A Genes on Susceptibility of Chinese Holsteins to Mastitis [J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(12): 8293-8301.

[9] PETERS A H, KUBICEK S, MECHTLER K, et al. Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin [J]. Molecular Cell, 2003, 12(6): 1577-1589.

[10] STEWART M D, LI J, WONG J. Relationship between Histone H3 Lysine 9 Methylation, Transcription Repression, and Heterochromatin Protein 1 Recruitment [J]. Molecular and Cellular Biology, 2005, 25(7): 2525-2538.

[11] CHEN T T, WU S M, HO S C, et al. SUV39H1 Reduction is Implicated in Abnormal Inflammation in COPD [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 46667.

[12] CARVALHO A J, DO AMARAL R D, OLIVEIRA B M, et al. Aberrant Levels of SUV39H1 and SUV39H2 Methyltransferase are Associated with Genomic Instability in Chronic Lymphocytic Leukemia [J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2017, 58(9): 654-661.

[13] 林浪. 水牛 *SUV39H1* 基因 *shRNA* 片段的筛选及对外源转基因表达效率的影响 [J]. 南宁: 广西大学, 2013.

[14] 代小丽. *SUV39H1/H2* 基因表达抑制对猪体细胞克隆胚胎发育潜能影响的初步研究 [J]. 南宁: 广西大学, 2016.

[15] 郝文艳. GABRP 对水牛乳腺上皮细胞增殖以及泌乳相关基因表达的影响 [J]. 南宁: 广西大学, 2016.

[16] 郑宜文. 奶牛泌乳性状相关基因启动子甲基化分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.

[17] 吴贤锋. 山羊 *STAT3* 和 *STAT5A* 基因 SNPs、mRNA 表达及甲基化对生产性能的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.

[18] TAMGUE O, LEI M. Triptolide Promotes Senescence of Prostate Cancer Cells through Histone Methylation and Heterochromatin Formation [J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2017, 18(9): 2519-2526.

[19] VANDEL L, NICOLAS E, VAUTE O, et al. Transcriptional Repression by the Retinoblastoma Protein through the Recruitment of a Histone Methyltransferase [J]. Molecular and Cellular Biology, 2001, 21(19): 6484-6494.

[20] NIELSEN S J, SCHNEIDER R, BAUER U M, et al. Rb Targets Histone H3 Methylation and HP1 to Promoters [J]. Nature, 2001, 412(6846): 561-565.

[21] HOSSAIN M, STILLMAN B. Opposing Roles for DNA Replication Initiator Proteins ORC1 and CDC6 in Control of Cyclin E Gene Transcription [J]. eLife, 2016, 5: e12785.

[22] CZVITKOVICH S, SAUER S, PETERS A H, et al. Over-Expression of the SUV39H1 Histone Methyltransferase Induces Altered Proliferation and Differentiation in Transgenic Mice [J]. Mechanisms of Development, 2001, 107(1/2): 141-153.

责任编辑 夏娟