

绵羊不同组织细胞中 *Marco* 基因启动子甲基化与转录表达水平的关联性分析

薛嘉熹¹, 王 钢², 顾兰英¹, 张秦川¹, 赵广新¹, 孙延鸣¹, 贺 笋^{2*}, 张彦兵^{1*}

(1. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832003; 2. 天康制药股份有限公司, 新疆乌鲁木齐 830000)

摘 要: 本研究旨在揭示绵羊胶原样结构巨噬细胞受体 (Macrophage Receptor with Collagenous Structure, *Marco*) 组织特异性表达的机制, 探讨 *Marco* 表达水平与其启动子甲基化的相关性。通过检测肺组织、肺泡巨噬细胞及脾脏细胞中 *Marco* mRNA 表达量, 利用亚硫酸氢盐测序法 (BSP) 测定 *Marco* 启动子甲基化水平, 进一步测定 *Marco* 启动子活性, 分析 DNA 甲基化酶处理对 *Marco* 启动子活性的影响。结果显示, 脾脏组织中 *Marco* mRNA 表达量最高, 肺脏次之, 肺泡巨噬细胞表达量极低; 甲基化测定结果显示, *Marco* 启动子甲基化水平在肺泡巨噬细胞最高 (96.4%), 肺脏处于中等 (60.7%), 脾脏最低 (55.4%)。荧光素酶活性检测表明, *Marco* 启动子具有较高的活性, 且启动子区域甲基化抑制 *Marco* 启动子活性; 初步证实 *Marco* 启动子甲基化水平与其在组织中的限制表达存在密切联系。本研究为后续深入探究 *Marco* 基因的转录调控机理提供了重要参考依据。

关键词: DNA 甲基化; 胶原样结构巨噬细胞受体; 启动子; 肺泡巨噬细胞

中图分类号: S826.2

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.20250205-04

清道夫受体 (Scavenger Receptors, SRs) 是一类在巨噬细胞表面大量表达的受体家族^[1-3], 根据其独特的功能结构特点, 可细致地分为 8 种不同类别 (A~H)。其中, 胶原样结构巨噬细胞受体 (Macrophage Receptor with Collagenous Structure, *Marco*) 属于 A 类清道夫受体 (Scavenger Receptors class A, SRAs)^[4]。目前, 已发现 A 类清道夫受体包含 SR-AI、SR-AII 以及 *Marco*。值得注意的是, SR-AI 和 SR-AII 由同一基因编码, 通过基因产物的交替剪接产生不同形式, 而 *Marco* 的结

构与 SR-AI 最为相似^[5]。

Marco 的表达具有显著物种和组织差异性。例如, 猪 *Marco* 在肺组织、脾脏及淋巴结中高表达, 但在肺泡巨噬细胞中几乎不表达^[6], 人源 *Marco* 表达模式与猪类似, *Marco* 主要高表达于淋巴结、脾脏等组织, 在肺泡巨噬细胞中表达量极低。研究资料预测, 绵羊 *Marco* 呈现肺组织高表达、肺泡巨噬细胞低表达的特征^[7]。

DNA 甲基化是 DNA 分子上的一种化学修饰过程, 主要是指在 DNA 甲基转移酶 (DNMTs) 的作用下, 选择性地甲基基团添加到 DNA 分子的胞嘧啶 (C) 上, 特别是 CpG 二核苷酸的胞嘧啶 5' 碳位上, 从而转变为 5- 甲基胞嘧啶 (5-Methylcytosine, 5-mC)^[8]。当外界因素如环境改变、疾病发生或衰老作用于机体时, 在 DNA 甲基转移酶 (DNMTs) 的作用下某些基因发生 DNA 甲基化, 招募转录抑制蛋白, 影响 DNA 与转录因子的结合, 从而调控基因的表达^[9]。同时, 通过从头甲基化和去甲基化的作用, 基因组的甲基化修饰呈现动态变化^[10-11]。这种修饰能够通过改变染色质的结构和与蛋白质的相互作用, 进而影响基因转录的激活或抑制状态。已有大量研究证实, DNA 甲基化参与了众多生物学过

收稿日期: 2025-02-05; 修回日期: 2025-04-13

资助项目: 国家自然科学基金项目 (32360901); 兵团指导性科技计划项目 (2023ZD042); 新疆维吾尔自治区两区项目 (2023 LQ03003); 新疆维吾尔自治区科学基金项目 (2022D01B197); 石河子大学高层次人才科研启动项目 (RCZK202043)

作者简介: 薛嘉熹 (2001-), 男, 甘肃金昌人, 本科生, 研究方向为动物医学, E-mail: 19190249702@163.com; 并列第一作者: 王钢 (1986-), 男, 湖南人, 硕士, 兽医师, 主要从事临床兽医学研究, E-mail: wanggang@tecon-bio.com

* 通信作者: 张彦兵 (1991-), 男, 副教授, 主要从事临床兽医学研究, E-mail: zhangyanbing@shzu.edu.cn; 贺笋 (1980-), 男, 兽医师, 硕士研究生, 研究方向为预防兽医学, E-mail: hesun@tecon-bio.com

程，如胚胎发育、细胞分化以及疾病的发生发展等。然而，DNA 甲基化与 *Marco* 的表达是否存在联系并未得到证实。鉴于此，本研究旨在深入探究 DNA 甲基化对 *Marco* 表达的影响，为揭示 *Marco* 基因的转录调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 大肠埃希氏菌 DH5 α 感受态细胞由生工生物工程股份有限公司提供；pGL3-Basic 质粒由中国农业科学院上海兽医研究所邱亚峰研究员馈赠；pGL3-*Marco*、HEK293T 细胞保存于石河子大学动物科技学院临床兽医实验室。

1.2 试剂与仪器 Trizol 试剂、氯仿购自上海凌峰化学试剂有限公司；异丙醇、乙醇、DEPC 水和海肾荧光素酶载体 pRL-TK 由生工生物工程股份有限公司提供；DL2000 DNA Marker 及 DNA 提取试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司；移液器、离心机为德国 Eppendorf 公司产品；LB 培养基购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司；电泳仪（DYY11 型）购自北京六一生物科技有限公司；胶回收试剂盒购于天根生化科技（北京）有限公司。

1.3 方法

1.3.1 绵羊不同组织 *Marco* mRNA 表达量检测 采集健康绵羊完整肺脏和脾脏，使用 PBS 缓冲液对肺脏进行灌洗，充分揉搓后收集灌洗液，灌洗液 800 rpm 离心 10 min，收集肺泡巨噬细胞沉淀备用；脾脏取一块在超净台剪碎，加入 PBS，过 100 目筛，滤液 800 rpm 离心 10 min，收集脾脏细胞沉淀备用；将肺泡巨噬细胞、脾脏细胞和肺脏组织置于 1.5 mL EP 管中，利用 Trizol 法提取总 RNA。采用逆转录试剂盒合成 cDNA，以得到的 cDNA 为模板，根据 qPCR SYBE Green Master Mix 说明书配制反应体系及设置反应程序，引物如表 1 所示。设定阴性对照，获得 Ct 值。所有处理组均重复检测 3 次。反应条件设定为：95℃ 预变性 3 min；95℃ 变性 10 s，62℃ 退火，共进行 40 个循环，采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算相对表达量。

1.3.2 绵羊 *Marco* 基因启动子区域甲基化检测 使用 DNA 提取试剂盒提取绵羊肺脏、脾脏细胞和肺泡巨噬细胞的 DNA，并对基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐修饰。其原理是：基因组 DNA 中甲基化的胞嘧啶碱基保持不

表 1 荧光定量引物

引物名称	引物序列（5'→3'）
<i>Marco</i> -qpcr-F	GATTATCGGCTCTAGGAA
<i>Marco</i> -qpcr-R	AGTTGTCATCACAGATTG
β -actin-qpcr-F	GCGGCATTACGAAACTA
β -actin -qpcr-R	TGTTGGCGTAGAGGTCTT

变，而未甲基化的胞嘧啶脱氨基并转变为尿嘧啶，经亚硫酸氢盐硫化 PCR（Bisulphite Sequencing Polymerase Chain Reaction, BSP）扩增后转变为胸腺嘧啶，以此区分甲基化与未甲基化的胞嘧啶。BSP 引物由在线软件 MethPrimer 14.0 设计，扩增引物为：*Marco*-bsp-F: GTTTTTTTTAAGGGGTTTAGATTTTATTGGGATTA；*Marco*-bsp-R: CTTTAAACTCATCCTAACTACACAAAATAT。PCR 反应程序为：95℃ 预变性 5 min；95℃ 变性 10 s，60℃ 15 s，72℃ 45 s，共 35 个循环；最后 72℃ 延伸 7 min。PCR 纯化产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离后进行胶回收，回收产物送公司测序比对正确后，扩增片段与 pMD19-T 载体连接，转化后挑选阳性克隆测序，每组 20 个克隆送至生工生物工程（上海）股份有限公司测序。利用在线网站 QUMA（QUantification tool for Methylation Analysis, <http://quma.cdb.riken.jp/>）分析甲基化水平，利用 Fisher's exact test 进行统计学分析。

1.3.3 甲基化修饰酶处理 pGL3-*Marco* 质粒 提取 pGL3-*Marco* 质粒，利用甲基化修饰试剂盒修饰质粒，将 *Marco* 启动子质粒使用体外甲基化酶处理，同时设立对照（不添加 Methyltransferase），具体反应体系如下：Supplied Methyltransferase Reaction Buffer（10X）5 μ L，Diluted SAM（1 600 μ mol/L）5 μ L，质粒 5 μ L，Methyltransferase 1 μ L，无酶水 34 μ L。反应体系于 37℃ 水浴孵育 1 h，65℃ 水浴孵育 20 min，采用天根生化科技（北京）有限公司 PCR 产物回收试剂盒回收质粒。

1.3.4 启动子活性分析 将 HEK-293T 细胞复苏传代后接种于 12 孔板，每孔接种 1 $\times$ 10⁶ 个细胞。待细胞生长到 80%~90% 后进行转染。利用 Hieff Trans[®] 脂质体核酸转染试剂 2 μ L/孔将 pGL3-*Marco* 质粒 500 ng/孔和 pRL-TK 质粒 10 ng/孔共转染 HEK293T 细胞，同时设置转染 pGL3-Basic 质粒 500 ng/孔和 pRL-TK 质粒 10 ng/孔作为对照，每组设置 3 个重复。甲基化酶修饰启动子活性检测方法与活性检测一致。转染 24 h 后，用双荧光素酶报告基因检测试剂盒处理细胞，高灵敏管

式发光检测仪检测荧光素酶活性。GraphPad Prism 7.0 软件进行数据分析绘图, 2 组间比较用 T.TEST 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 绵羊肺巨噬细胞和脾脏细胞中 *Marco* mRNA 表达分析 *Marco* 基因 mRNA 表达检测结果 (图 1) 显示, 脾脏 *Marco* 的 mRNA 表达量极显著高于肺泡巨噬细胞的表达量, 肺脏 *Marco* 的 mRNA 表达量显著高于肺泡巨噬细胞的表达量。

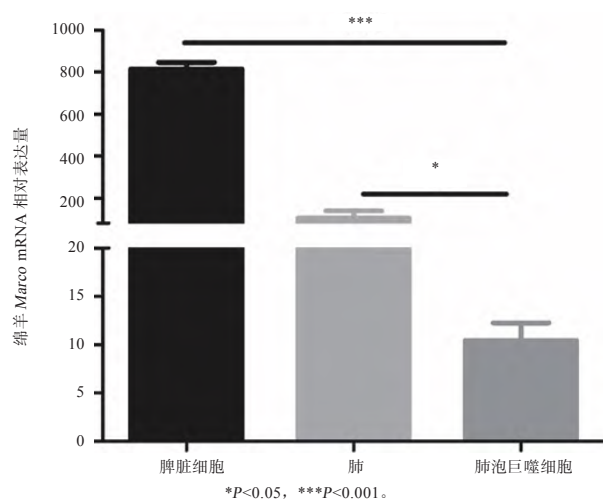


图 1 *Marco* mRNA 在绵羊脾脏、肺脏及肺泡巨噬细胞中的相对表达量

2.2 *Marco* 启动子 CpG 位点分析 利用在线预测软件分析 *Marco* 启动子甲基化位点及启动子活性区域, 结果表明: 在 *Marco* 启动子区域存在散在分布的 7 个 CpG 位点, 但不存在 CpG 岛; *Marco* 启动子区含有 TATA-box, 有一个潜在活性区域 (图 2)。基于此, 成功设计出 *Marco* 甲基化检测引物, Bsp 检测区域包含 4 个 CpG 位点。

2.3 *Marco* 启动子区域内的零散 CpG 位点甲基化 利用 QUMA 软件将测序序列与 *Marco* 基因组序列进行比对分析甲基化水平, 结果显示: 绵羊肺泡巨噬细胞 *Marco* 启动子甲基化水平 (96.4%) 显著高于脾脏 (55.4%) 和肺脏 (60.7%), 与其 mRNA 低表达趋势一致 (图 3)。

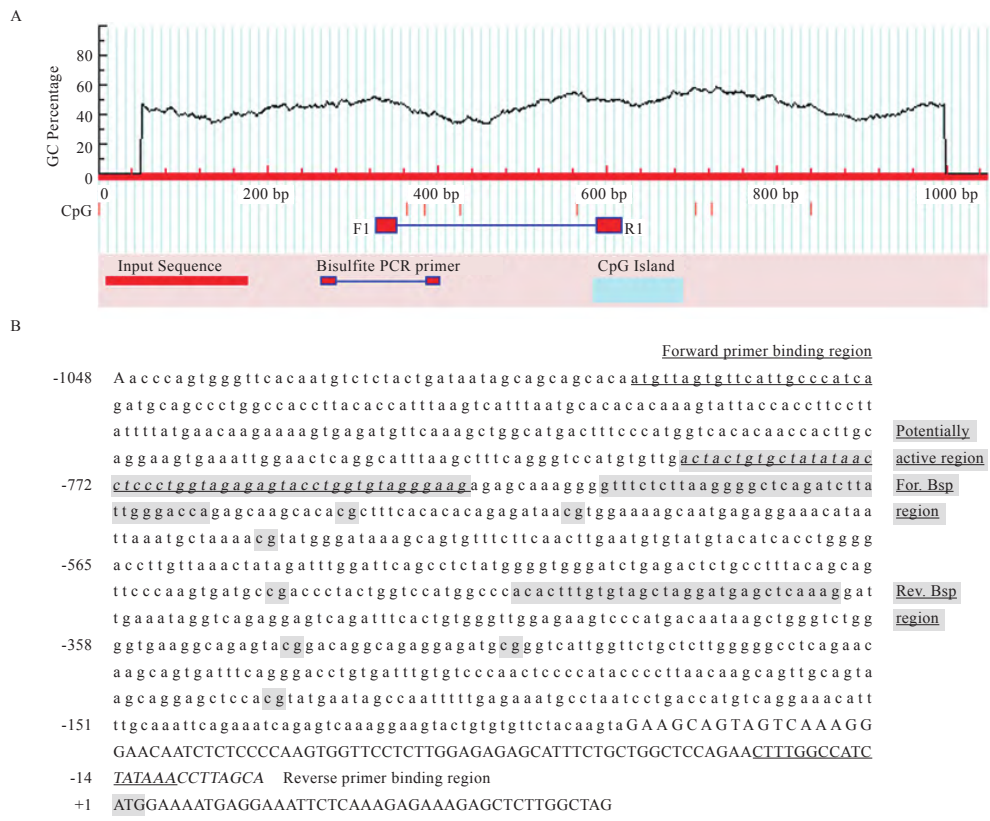
2.4 *Marco* 启动子荧光素酶报告基因活性分析 相比于 pGL3-Basic 质粒, 转染 pGL3-*Marco* 质粒组荧光素酶活性显著升高, 表明 *Marco* 启动子具有较强的活性 (图 4A)。而相比于未甲基化的 pGL3-*Marco* 质粒组, 经甲基化酶修饰后的 *Marco* 启动子活性受到显著抑制, 这说明 DNA 甲基化影响 *Marco* 启动子激活 (图 4B)。

3 讨论

DNA 甲基化作为表观遗传修饰的关键形式之一, 对基因表达调控起着关键作用, 而且 DNA 甲基化可稳定遗传^[12]。当机体受到外界因素, 如环境变化、疾病侵袭或衰老进程的影响时, 在 DNA 甲基转移酶 (DNMTs) 的作用下, 基因组特定区域会发生甲基化修饰。*Marco* 作为 A 类清道夫受体的重要成员, 在巨噬细胞吞噬细菌、抵御病原菌入侵的过程中发挥着关键作用。不同物种的 *Marco* 在肺泡巨噬细胞中均呈限制性表达^[7]。然而, *Marco* 被限制表达的机制未见报道。因此, 本研究以肺组织、肺泡巨噬细胞和脾脏细胞为模型, 证实 DNA 甲基化能够调控绵羊 *Marco* 基因的表达, 其在肺泡巨噬细胞中的表达受 DNA 甲基化抑制, 且该抑制效应与启动子活性的降低有关。

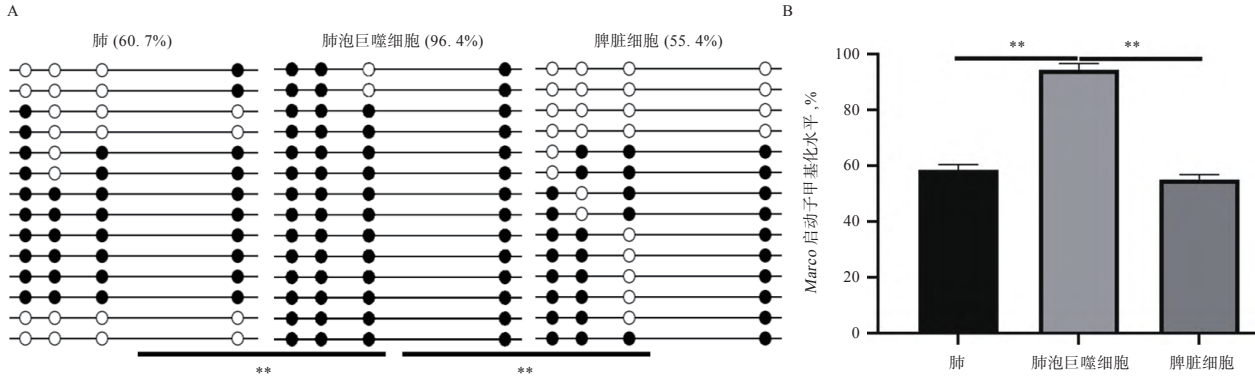
基因启动子区、第 1 外显子及 5'UTR 区 DNA 高甲基化影响基因转录表达^[13]。但是, 基因组的甲基化修饰并非一成不变, 通过从头甲基化和去甲基化的动态平衡过程, 呈现出动态变化的特征^[10]。这种动态变化在生物个体的发育进程中发挥着重要的调控作用, 精确地控制着细胞的分化和组织器官的形成。而且, 越来越多的研究表明, DNA 甲基化异常与多种疾病的发生发展密切相关, 如癌症、神经系统疾病以及心血管疾病等^[11]。在健康绵羊体内肺泡巨噬细胞中 *Marco* 启动子甲基化水平极高, 在脾脏细胞中甲基化较低, 这种甲基化模式可能与其表达水平存在密切关系; 关于绵羊 *Marco* 基因启动子区甲基化影响表达的研究是首次报道, 这为研究人、猪等其他物种 *Marco* 在肺泡巨噬细胞低表达提供了重要参考。

在癌症研究领域, 癌症发展相关基因 DNA 甲基化的变化被视为重要的生物标志物。例如, 在前列腺癌的发生发展过程中, 特定基因的超甲基化事件频繁出现, 这些变化不仅影响了基因的正常表达, 还参与了肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移等关键过程^[14]。在神经系统疾病方面, DNA 甲基化的异常与抑郁症、阿尔茨海默病等疾病的发病机制紧密相连^[15]。绵羊 *Marco* 蛋白在脾脏、各级淋巴结中高表达, 在肺泡巨噬细胞中几乎测不到蛋白表达^[16], 这再一次说明 *Marco* 启动子高甲基化抑制其转录表达, 从而影响了 *Marco* 蛋白表达。在绵羊处于某些细菌感染状态下, 绵羊 *Marco* 基因甲基化



A: CpG 位点分析; B: 启动子及其活性区域预测。

图 2 绵羊 *Marco* 基因启动子及其活性区域预测



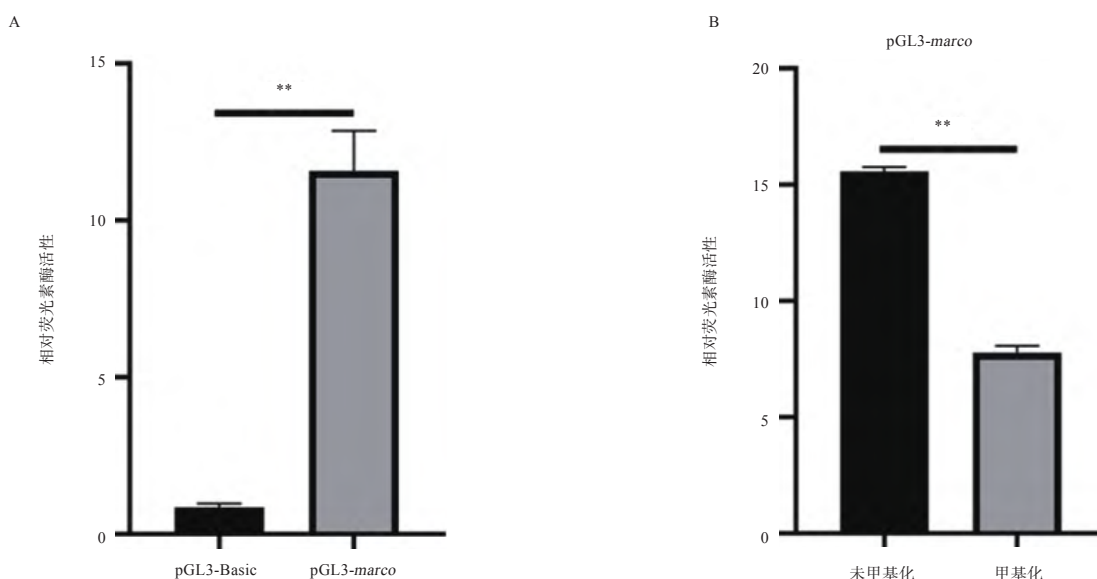
A: 利用 Bsp 方法测定羊只肺组织、肺泡巨噬细胞及脾脏细胞 *Marco* 基因启动子甲基化水平, 每行代表一个阳性克隆, 每列代表一个 CpG 位点; ● 代表 CpG 位点发生甲基化, ○ 代表 CpG 位点未发生甲基化。B: 羊肺组织、肺泡巨噬细胞及脾脏细胞 *Marco* 基因启动子甲基化水平 ($n=3$)。** 表示 $P<0.01$ 。

图 3 绵羊 *Marco* 基因启动子甲基化水平检测结果

高低是否可以早期提示某些病原感染, 肺泡巨噬细胞 *Marco* 基因启动子区甲基化水平是否会发生变化, 进而导致 *Marco* 蛋白高表达于肺泡巨噬细胞, 需要进一步研究。

荧光素酶报告实验结果进一步证实, 甲基化后的 *Marco* 启动子活性显著降低, 说明 *Marco* 启动子高甲基化显著抑制其转录活性, 提示 DNA 甲基化是调控 *Marco* 组织特异性表达的关键表观遗传机制。在此基

础上, 进一步的研究方向得以明确, 例如: *Marco* 启动子区哪些甲基化位点起作用, 哪些 DNMTs 直接调控 *Marco* 启动子甲基化等。此外, 目前对于 *Marco* 基因表达调控的研究仍处于初级阶段, 除了 DNA 甲基化之外, 可能还存在其他多种调控机制, 如转录因子的调控、非编码 RNA 的影响以及组蛋白修饰等^[17]。这些调控机制之间可能相互作用、协同影响 *Marco* 基因的表达。未来的研究需要进一步深入探索这些潜在的调控机制, 全



A: 绵羊 *Marco* 启动子相对荧光素酶活性; B: 甲基化修饰后 *Marco* 启动子相对荧光素酶活性。

图 4 *Marco* 启动子活性分析及甲基化酶对其影响作用分析

面揭示 *Marco* 基因在不同组织中限制表达的分子机制, 为深入理解巨噬细胞的免疫功能以及相关疾病的发病机制提供更丰富的理论依据。

4 小 结

本研究通过检测绵羊肺组织、肺泡巨噬细胞和脾脏细胞中 *Marco* mRNA 的表达量及甲基化水平, 证实肺泡巨噬细胞 *Marco* 启动子高甲基化与其转录低表达密切相关, 脾脏细胞中 *Marco* mRNA 较高丰度表达与其启动子低甲基化水平有关, DNA 甲基化抑制 *Marco* 启动子激活。本研究首次揭示 *Marco* 基因的组织限制性表达与启动子甲基化水平负相关, 为深入解析其转录调控及巨噬细胞免疫功能研究提供了新视角。

参考文献:

- [1] 郭旺, 彭光众, 黄宏奥, 等. 鸡 marco 稳转巨噬细胞系的构建与鉴定 [J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55(11): 5310-5316.
- [2] Gough P J, Gordon S. The role of scavenger receptors in the innate immune system[J]. Microbes Infect, 2000, 2(3): 305-311.
- [3] Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)[J]. Annu Rev Biochem, 1994, 63: 601-637.
- [4] 陈佳阔, 曹鑫艳, 魏立翔, 等. 绵羊清道夫受体 MARCO 基因启动子克隆及生物信息学分析 [J]. 动物医学进展, 2022, 43(12): 56-60.
- [5] Kraal G, van der Laan L J, Elomaa O, et al. The macrophage receptor MARCO[J]. Microbes Infect, 2000, 2(3): 313-316.
- [6] 相笑. PRRSV 感染下调猪肺泡巨噬细胞清道夫受体 A 表达的机制研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [7] Jiang Y, Xie M, Chen W, et al. The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism[J]. Science, 2014, 344(6188): 1168-1173.
- [8] 张晶, 刘瑞, 米浩源. DNA 甲基化在法医个体年龄推断中的研究进展 [J]. 生命科学, 2025, 37(4): 1-15.
- [9] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory[J]. Genes Dev, 2002, 16(1): 6-21.
- [10] Lucibelli F, Valoroso M C, Aceto S. Plant DNA methylation: an epigenetic mark in development, environmental interactions, and evolution[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(15): 8299.
- [11] Nishiyama A, Nakanishi M. Navigating the DNA methylation landscape of cancer[J]. Trends Genet, 2021, 37(11): 1012-1027.
- [12] Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function[J]. Neuropsychopharmacology, 2013, 38(1): 23-38.
- [13] 周文健, 崔晓楠, 施威扬. DNA 甲基转移酶在表观遗传学中的应用研究进展 [J]. 生物技术通报, 2025, 41(2): 1-10.
- [14] Goering W, Kloth M, Schulz W A. DNA methylation changes in prostate cancer[J]. Methods Mol Biol, 2012, 863: 47-66.
- [15] 罗海丽, 洪青晓, 刘惠芬, 等. DNA 甲基化在抑郁症中的作用 [J]. 生命的化学, 2025, 45(1): 8-17.
- [16] 鲁子岳, 王钢, 范文雨, 等. 绵羊清道夫受体 MARCO 原核表达及组织表达分析 [J]. 石河子大学学报 (自然科学版), 2025, 43(5): 648-654.
- [17] Li Y. Modern epigenetics methods in biological research[J]. Methods, 2021, 187: 104-113.

(责任编辑: 赵楠)