河南农业科学,2014,43(11):126-131
Journal of Henan Agricultural Sciences

5-Aza-dC 对奶牛乳腺上皮细胞 *PPARγ* 表达的影响

边艳杰,王　杰,王春梅,李庆章*
(东北农业大学,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:为阐明 DNA 甲基化对奶牛乳腺泌乳功能调控的机制,研究了甲基化抑制剂 5-氮杂-2′-脱氧胞苷(5-Aza-dC)对奶牛乳腺上皮细胞中 *PPARγ* 基因启动子甲基化状态及其表达的影响,以体外培养的奶牛乳腺上皮细胞为模型,采用 0.1、0.5、1.0、5.0 μmol/L 的 5-Aza-dC 对奶牛乳腺上皮细胞进行处理,用 EpiQuik™ DNA methyltransferase assay 试剂盒进行甲基转移酶活性检测,采用 CASY 细胞分析仪检测细胞活力和增殖能力,利用亚硫酸氢盐测序(BSP)技术检测了 *PPARγ* 启动子的甲基化特征,qRT-PCR 法检测 *PPARγ* mRNA 表达的变化,Western blot 检测 PPARγ 蛋白表达的变化。结果显示:与空白对照组相比,0.1 μmol/L 的 5-Aza-dC 对奶牛乳腺细胞生长无毒性,处理 96 h 甲基转移酶活性极显著降低,奶牛乳腺细胞的 *PPARγ* 基因启动子甲基化程度降低,PPARγ 表达升高。表明 5-Aza-dC 可降低奶牛乳腺细胞中 *PPARγ* 启动子区域的甲基化程度,促进 *PPARγ* 表达。

关键词:5-氮杂-2′-脱氧胞苷;奶牛乳腺上皮细胞;*PPARγ* 基因;DNA 甲基化
中图分类号:S823.9　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1004-3268(2014)11-0126-06

The Effect of 5-Aza-2′-Deoxycytidine on the Expression of *PPARγ* in Dairy Cow Mammary Epithelial Cells *in vitro*

BIAN Yan-jie, WANG Jie, WANG Chun-mei, LI Qing-zhang*
(Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: This experiment was to explore the influences of 5-aza-2′-deoxycytidine (5-Aza-dC) on the methylation status of promoter region of *PPARγ* gene and its expression in dairy cow mammary epithelial cells (DCMECs). DCMECs were cultured *in vitro* and treated with 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 μmol/L 5-Aza-dC, methyltransferase activity was measured by EpiQuik™ DNA methyltransferase assay kit; CASY®-technology was applied to measure cell viability and proliferation; bisulphite genomic sequencing PCR (BSP) technique was applied to detect the methylation state of the promoter region of *PPARγ* gene in DCMECs; qRT-PCR was applied to detect *PPARγ* mRNA expression; the protein expression level of PPARγ was determined by Western blot. Results showed that 0.1 μmol/L 5-Aza-dC had no significante effect on cell viability and proliferation of DCMECs, and methyltransferase activity was significantly decreased at 96 h; compared with control group, methylation level of promoter region of *PPARγ* gene in DCMECs was partially reduced after treating with 5-Aza-dC, and the mRNA and protein expression of

收稿日期:2014-06-26
基金项目:国家重点基础研究发展(973)计划项目(2011CB100804)
作者简介:边艳杰(1985-),女,河南周口人,博士,主要从事泌乳生物学及乳腺功能调控。E-mail:bianjie.033@163.com
*通讯作者:李庆章(1953-),男,河北保定人,教授,博士,主要从事泌乳生物学及乳腺功能调控。E-mail:qzli@neau.edu.cn

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

PPARγ were increased significantly. Our results suggests that 5-Aza-dC can reduce methylation level of *PPARγ promoter region*, *and promote the* mRNA *and protein expression of PPARγ* gene in DCMECs.

Key words: 5-aza-2′-deoxycytidine; daily cows mammary epithelial cells; *PPARγ* gene; methylation

表观遗传是目前生命科学领域的研究热点，在生物个体发育、细胞分化、增殖、凋亡以及疾病的发生中起着重要的调控作用[1-5]。DNA 甲基化作为重要的表观遗传修饰方式之一，参与许多重要生理及病理现象的调控，与细胞的凋亡、增殖、癌变等有着重大关系[6-7]。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基化转移酶的作用下，在基因组 CpG 二核苷酸的胞嘧啶 5′碳位以共价键结合一个甲基基团。DNA 甲基化与组蛋白修饰、染色质重组等共同作用，在不改变 DNA 的碱基序列情况下调控基因在细胞和组织中的表达[8]。

研究表明，乳腺组织中某些基因表达与 DNA 甲基化水平呈现为负关联，在乳腺组织中 αS1-酪蛋白[9]、β-酪蛋白和 γ-酪蛋白[10]、κ-酪蛋白[11]等乳蛋白基因的表达受到 DNA 甲基化的调控；Plachot 等[12]发现，全基因组甲基化程度调控乳腺上皮细胞的分化；Fan 等[13]发现，JAK-STAT 信号通路都受到甲基化的调节；Lee 等[14]研究结果表明，小鼠乳腺由妊娠期向泌乳期发育的过程中 *Elf5* 基因启动子区域甲基化程度降低，mRNA 和蛋白表达量增加。这些研究结果表明，DNA 甲基化在乳腺的生长发育及泌乳过程中有着重要的调控作用。

过氧化物酶增殖物激活受体 γ(PPARγ)作为奶牛乳腺泌乳中极为关键的转录因子，在奶牛乳脂合成中具有主导作用[15]。PPARγ 属Ⅱ型核受体超家族成员，主要在脂肪细胞内表达，泌乳期在乳腺中的表达上调，对奶牛乳脂合成中相关基因的表达具有调控作用。在癌症发生过程中的 *PPARγ* 基因启动子甲基化频繁出现[16]，但在奶牛乳腺发育及泌乳相关的研究中 *PPARγ* 的表达是否受到其启动子区域 DNA 甲基化水平的调控还不清楚。为此，本研究以奶牛乳腺上皮细胞为模型，研究了甲基化抑制剂 5-氮杂-2′-脱氧胞苷(5-Aza-dC)对奶牛乳腺上皮细胞中 *PPARγ* 基因启动子甲基化状态及其表达的影响，为奶牛乳腺生长发育及泌乳中的表观遗传调控研究提供参考。

1　材料和方法

1.1　材料

奶牛乳腺上皮细胞来自东北农业大学动物生物化学实验室。5-Aza-dC、胰蛋白酶购自 Sigma 公司，胎牛血清、DMEM/F12 培养基购自 Gibco 公司，EpiQuik™ DNA methyltransferase assay 试剂盒购自 Epigentek 公司，NE-PER(R)核蛋白-胞浆蛋白抽提试剂盒购自 Thermo 公司，Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司，DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司，DNA 聚合酶、实时荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR® Primx Ex *Taq*、Prime Script RT reagent 试剂盒、pMD-19T 载体购自 TaKaRa 公司，感受态细胞 Top10 购自博迈得公司，EpiTect Bisulfite 试剂盒购自 Qiagen 公司，DNA 胶回收试剂盒购自 Axygen 公司，CASY® ton 缓冲液购自德国 Scharfe 公司，PPARγ 兔多克隆抗体购自 Abcam 公司，β-actin 鼠多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司，HRP 标记的羊抗兔、羊抗鼠的二抗均购自北京金杉公司，超敏发光液购自普利莱公司。

1.2　奶牛乳腺上皮细胞培养

在含 10%优质胎牛血清和抗菌素(100 IU/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)的 DF12 培养基中于 5%CO_2、37 ℃条件下培养奶牛乳腺上皮细胞，倒置显微镜观察细胞生长状况。

1.3　奶牛乳腺上皮细胞甲基转移酶活性及细胞生长活力的检测

取对数生长期乳腺上皮细胞，调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL，接种于 6 孔板中，添加终浓度分别为 0(空白对照)、0.1、0.5、1.0、5.0 μmol/L 的 5-Aza-dC，每间隔 12 h 更换 1 次培养液，分别收集处理 24、48、72、96 h 转染的细胞样品，用 NE-PER(R)核蛋白-胞浆蛋白抽提试剂盒提取细胞核蛋白，BCA 法检测蛋白质浓度，将等量的 0.1 μg 的细胞核提取物用 EpiQuik™ DNA methyltransferase assay 试剂盒检测甲基转移酶活性，具体操作步骤按说明书进行。细胞活力检测试验中，用胰蛋白酶将奶牛乳腺上皮细胞消化成单细胞悬液，细胞悬液用 CASY® ton 缓冲液进行 100 倍稀释、混匀，用 CASY 细胞活力分析仪进行细胞活力的检测，以确定对细胞生长影响最小(即对细胞无毒性)同时对甲基转移酶有明显抑制作用的 5-Aza-dC 最佳浓度及作用时间。

1.4　BSP 检测 *PPARγ* 启动子的甲基化

根据 DNA 提取试剂盒说明书提取细胞总基因

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

组，琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 DNA 质量和浓度。取 0.4 μg DNA，按照 EpiTect Bisulfite 试剂盒厂家说明书进行操作，甲基化后得到亚硫酸氢盐修饰单链 DNA，保存于－20 ℃备用。应用 Epi-Designer 和 BiSearch 工具在目的基因启动子的 CpG 岛区域进行引物设计。利用巢式 PCR 技术扩增目的序列，利用普通引物进行第 1 轮 PCR 扩增，*PPARγ* 上游引物：5′-GAAGAAATTYGTTTAT-TGAGAAAAG-3′，下游引物：5′-AAAAATAC-CCCCACATAAAA-3′；巢式引物进行第 2 轮 PCR 扩增，*PPARγ* 上游引物：5′-GTAAAGTTTTT-TATTGAGAAGA-3′，下游引物：5′-AACTCAT-CATCCTACAAAAA-3′；扩增产物长度为 373 bp。将 PCR 产物进行胶回收后连接到 pMD-19T 载体上，转化到 Top10 感受态细胞中进行涂板培养，从平板上分别挑取转化子，用 PCR 法进行鉴定，阳性菌进行测序。测序结果用 BiQ_Analyzer 分析软件进行比对分析。

1.5 qRT-PCR 技术检测 *PPARγ* 的 mRNA 表达

用 5-Aza-dC 处理细胞 96 h 后，用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。使用 Primer Premier 5.0 软件设计 *PPARγ* 基因和内参基因 *β-actin* 的上、下游引物。引物序列如下：*PPARγ* 上游引物：5′-TCAAAGTGGAGCCTGTATC-3′，下游引物：5′-CATAGTGGAACCCTGACG-3′；*β-actin* 上游引物：5′-CCGCAAGGACCTCTACGC-3′，下游引物：5′-CATGCCAATCTCATCTCGTTTT-3′，引物由北京六合华大基因公司合成。按 Prime Script RT reagent 试剂盒和 SYBR® Primx Ex *Taq* 试剂盒操作说明进行逆转录和 qRT-PCR 的检测，结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 相对定量的方法计算目的基因的 mRNA 的相对表达量[17]。

1.6 细胞总蛋白提取及 Western blot 检测

用 5-Aza-dC 处理细胞 96 h 后收取样品，然后用 4 ℃预冷的 D-hanks 冲洗细胞样品 3 遍，加入细胞裂解液冰上裂解抽提细胞总蛋白。利用 BCA 法检测蛋白质浓度，按 40 μg/孔蛋白质量上样，进行 SDS-PAGE 电泳。在润湿的半干转移电泳槽中将蛋白质转到醋酸纤维膜上，根据目的蛋白分子量选择适当的转膜时间，恒压 20 V 转膜 90 min。5%脱脂乳封闭 1.5 h 后加入一抗（PPARγ 兔多克隆抗体购自 Abcam 公司和 β-actin 鼠多克隆抗体），4 ℃过夜；TBST 洗膜 3 次，每次 5 min；分别加入二抗（HRP 标记的羊抗兔、羊抗鼠的二抗）孵育 1 h；TBST 洗膜 3 次，每次 5 min；在自封袋中加入配置好的超敏发光液（普利莱），并将 NC 膜装入其中，在暗室中用 X 光片曝光，X 光片显影，定影，扫描结果，用 Bandscan 5.0 图像分析软件进行灰度分析，最后计算出目的蛋白的相对表达含量。

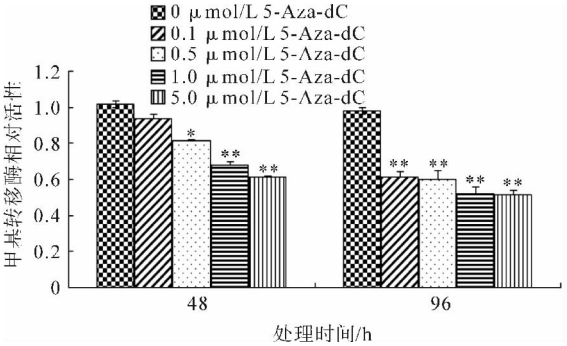
1.7 统计学处理

采用 SPSS 13.0 进行统计分析，组间比较用单因素方差分析，组内比较用 *t* 检验，试验数据以平均数±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 5-Aza-dC 对奶牛乳腺上皮细胞甲基转移酶相对活性的影响

由图 1 可以看出，5-Aza-dC 处理奶牛乳腺上皮细胞 48 h，与空白对照组相比，0.5、1.0、5.0 μmol/L 5-Aza-dC 处理组的细胞甲基转移酶活性显著降低，0.1 μmol/L 处理组的甲基转移酶活性无显著变化；5-Aza-dC 处理细胞 96 h 后，各组甲基转移酶活性均极显著降低。表明，0.1、0.5、1.0、5.0 μmol/L 5-Aza-dC 作用奶牛乳腺上皮细胞 96 h，均能显著抑制细胞中甲基转移酶的活性。



*、** 表示与对照组相比差异显著（$P<0.05$）、极显著（$P<0.01$），下图同

图 1 5-Aza-dC 对奶牛乳腺上皮细胞甲基转移酶相对活性的影响

2.2 5-Aza-dC 对奶牛乳腺上皮细胞活力和增殖的影响

由图 2 可以看出，与空白对照组相比，0.1 μmol/L 5-Aza-dC 处理奶牛乳腺上皮细胞 48、96 h，处理组细胞活力均无明显变化；0.5 μmol/L 处理组 48 h 细胞活力显著下降，96 h 极显著下降；1.0 μmol/L、5.0 μmol/L 处理组在 48、96 h 均极显著下降。

由图 3 可以看出，0.1 μmol/L 5-Aza-dC 处理奶牛乳腺上皮细胞 48、96 h，对细胞增殖均无明显影响；0.5、1.0 μmol/L 处理组 48 h 细胞增殖能力显著下降；5.0 μmol/L 处理组 48 h，0.5、1.0、

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

5.0 μmol/L 处理组 96 h 细胞增殖能力极显著下降。可见，0.1 μmol/L 5-Aza-dC 对奶牛乳腺上皮细胞生长增殖无毒性。本研究选择 0.1 μmol/L 5-Aza-dC 处理奶牛乳腺上皮细胞 96 h，进行 DNA 甲基化对 *PPARγ* 表达影响的研究。

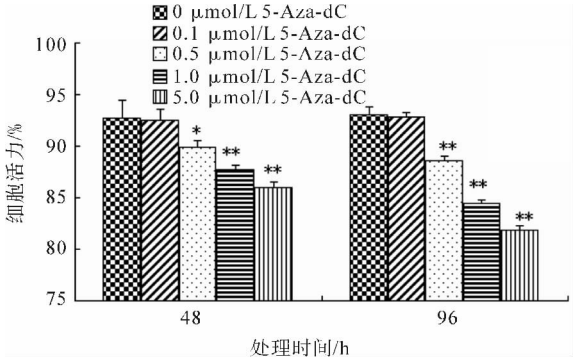


图 2　5-Aza-dC 对奶牛乳腺上皮细胞活力的影响

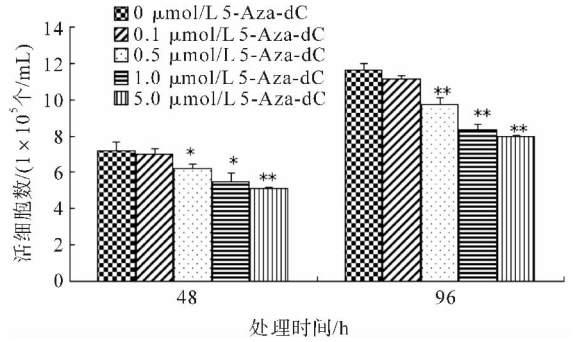


图 3　5-Aza-dC 对奶牛乳腺上皮细胞增殖能力的影响

2.3　5-Aza-dC 对奶牛乳腺上皮细胞 *PPARγ* 启动子甲基化状态的影响

由图 4 可以看出，0.1 μmol/L 5-Aza-dC 处理的奶牛乳腺细胞中 *PPARγ* 启动子区 7 个 CpG 位点的平均 DNA 甲基化水平为 21.43%，与空白对照组相比，降低 15.71 个百分点。*PPARγ* 启动子区域原本存在甲基化的 CpG 位点被去甲基化。

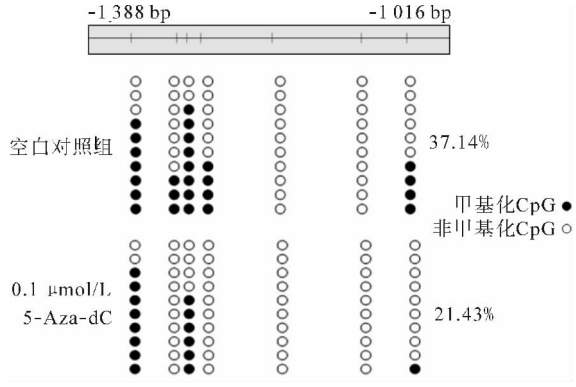


图 4　5-Aza-dC 对奶牛乳腺上皮细胞 *PPARγ* 启动子甲基化状态的影响

2.4　5-Aza-dC 对奶牛乳腺上皮细胞 *PPARγ* mRNA 表达的影响

选择 0.1 μmol/L 5-Aza-dC 处理细胞 96 h 收样，采用 qRT-PCR 技术检测奶牛乳腺上皮细胞 *PPARγ* 基因的相对表达量，结果如图 5 所示。与空白对照组相比，0.1 μmol/L 5-Aza-dC 试验组细胞中 *PPARγ* 基因的表达量极显著升高。

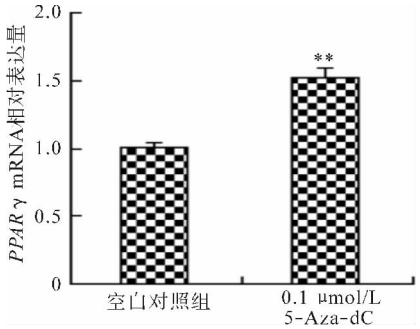


图 5　5-Aza-dC 对奶牛乳腺上皮细胞 *PPARγ* mRNA 表达的影响

2.5　5-Aza-dC 对奶牛乳腺上皮细胞 PPARγ 蛋白表达的影响

0.1 μmol/L 5-Aza-dC 处理奶牛乳腺上皮细胞 96 h 后收取细胞蛋白样，采用 Western blot 检测奶牛乳腺上皮细胞 PPARγ 蛋白的相对表达量。将 Western blot 结果（图 6）用 Bandscan 5.0 软件分析，结果显示，与空白对照组相比，0.1 μmol/L 5-Aza-dC 处理组的乳腺上皮细胞组中 PPARγ 蛋白表达量极显著上调（图 7）。

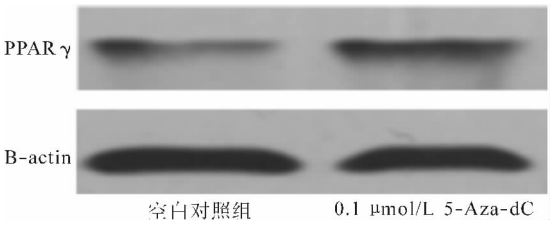


图 6　5-Aza-dC 处理奶牛乳腺上皮细胞 PPARγ 蛋白表达量的影响

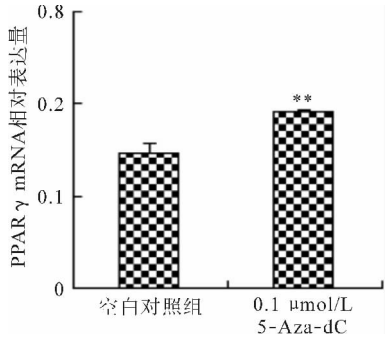


图 7　5-Aza-dC 对奶牛乳腺上皮细胞 PPARγ 蛋白表达量的影响

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 结论与讨论

DNA甲基化在奶牛乳腺泌乳功能的调控中有着极为精细和复杂的重要作用[18-19]，DNA的甲基化程度能影响某些基因的表达水平，本研究探讨了DNA甲基化是否对奶牛乳腺上皮细胞中乳脂合成的关键转录因子PPARγ的表达具有调节作用，通过添加甲基转移酶抑制剂建立了低甲基化的奶牛乳腺上皮细胞模型。5-Aza-dC能有效抑制甲基转移酶的活性，是细胞中常用的DNA甲基转移酶抑制剂，但由于它本身对细胞具有较大的毒性作用，本研究首先对5-Aza-dC作用奶牛乳腺上皮细胞的最佳浓度及作用时间进行了筛选，最后确定了0.1 μmol/L 5-Aza-dC作用细胞96 h作为较佳的作用浓度和时间，即与对照组相比对细胞活力和增殖无明显影响，且对甲基转移酶有明显抑制作用。

甲基化的发生是一个复杂的动态过程，5-Aza-dC可使基因启动子区域甲基化失活从而抑制基因表达[20]，PPARγ作为泌乳过程中的核心转录因子，对奶牛泌乳中包括胆固醇调控元件结合蛋白(SREBP1)在内的多种脂肪酸代谢相关基因有调控作用，对奶牛乳脂合成具有主导作用[21]。Fujiki等[22]研究发现，小鼠皮下脂肪组织中DNA高甲基化能导致*PPARγ*基因表达的下降，同样的研究结果在结直肠癌和脂肪细胞的研究中也有报道[23-24]。在奶牛乳腺中关于DNA甲基化对*PPARγ*的调节机制并不清楚，本试验对甲基化抑制剂5-Aza-dC在体外对奶牛乳腺上皮细胞中*PPARγ*的影响进行了研究，结果显示，0.1 μmol/L 5-Aza-dC处理奶牛乳腺上皮细胞后，*PPARγ*基因启动子区(1 016～1 388 bp)DNA甲基化水平与空白对照组相比明显降低，原本存在甲基化的CpG位点被去甲基化；qRT-PCR和Western blot检测结果发现，0.1 μmol/L 5-Aza-dC处理96 h后极显著增加了乳腺上皮细胞中PPARγ的mRNA和蛋白水平的表达，这与在人和小鼠中关于DNA甲基化调控*PPARγ*的报道相符合。

本研究结果表明，在奶牛乳腺上皮细胞中*PPARγ*基因的表达受DNA甲基化因素的调控，5-Aza-dC通过使*PPARγ*基因发生去甲基化作用，上调其mRNA和蛋白水平的表达。本研究结果提示，甲基化抑制剂5-Aza-dC能使奶牛乳腺上皮细胞中*PPARγ*基因的甲基化程度降低，促进其mRNA和蛋白的表达进而调控奶牛乳脂的合成影响乳腺泌乳功能。本研究结果为奶牛泌乳的表观基因组研究提供了强有力的理论支持，有关DNA甲基化对乳腺泌乳过程中重要功能基因调控的研究，对进一步揭示泌乳功能调控机制具有重要科学理论意义，为今后乳腺泌乳生物学的研究提供新的参考。

参考文献：

[1] Cui K, Zang C, Roh T Y, *et al*. Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4: 80-93.

[2] Okano H, Temple S. Cell types to order: Temporal specification of CNS stem cells[J]. Curr Opin Neurobiol, 2009, 19: 112-119.

[3] Haumaitre C, Lenoir O, Scharfmann R. Directing cell differentiation with small-molecule histone deacetylase inhibitors: The example of promoting pancreatic endocrine cells[J]. Cell Cycle, 2009, 8: 536-544.

[4] Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals[J]. Nat Genet, 2003, 33(Suppl): 245-254.

[5] Bromfield J, Messamore W, Albertini D F. Epigenetic regulation during mammalian oogenesis[J]. Reprod Fertil Dev, 2008, 20: 74-80.

[6] Waterland R A, Kellermayer R, Rached M T, *et al*. Epigenomic profiling indicates a role for DNA methylation in early postnatal liver development[J]. Hum Mol Genet, 2009, 18: 3026-3038.

[7] Broske A M, Vockentanz L, Kharazi S, *et al*. DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction[J]. Nat Genet, 2009, 41: 1207-1215.

[8] Cheng X, Blumenthal R M. Mammalian DNA methyltransferases: A structural perspective[J]. Structure, 2008, 16(3): 341-350.

[9] Johnson M L, Levy J, Supowit S C, *et al*. Tissueand cell-specific casein gene expression. Ⅱ. Relationship to sitespecific DNA methylation[J]. J Biol Chem, 1983, 258: 10805-10811.

[10] Vanselow J, Yang W, Herrmann J, *et al*. DNA-remethylation around a STAT 5-binding enhancer in the α S1-casein promoter is associated with abrupt shutdown of α S1-casein synthesis during acute mastitis[J]. J Mol Endocrinol, 2006, 37: 463-477.

[11] Thompson M D, Nakhasi H L. Methylation and ex-

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

pression of rat κ-casein gene in normal and neoplastic rat mammary gland[J]. Cancer Res, 1985, 45: 1291-1295.

[12] Plachot C, Lelievre S A. DNA methylation control of tissue polarity and cellular differentiation in the mammary epithelium[J]. Exp Cell Res, 2004, 298(1): 122-132.

[13] Fan G, Martinowich K, Chin M H, *et al*. DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling[J]. Development, 2005, 132(15): 3345-3356.

[14] Lee H J, Hinshelwood R A, Bouras T, *et al*. Lineage specific methylation of the Elf5 promoter in mammary epithelial cells[J]. Stem Cells, 2011, 29(10): 1611-1619.

[15] Kadegowda A K, Bionaz M, Piperova L S, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents[J]. J Dairy Sci, 2009, 92(9): 4276-4289.

[16] Pancione M, Sabatino L, Fucci A, *et al*. Epigenetic silencing of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a biomarker for colorectal cancer progression and adverse patients' outcome[J]. PloS One, 2010, 5(12): e14229.

[17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\triangle\triangle C_T}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[18] Rijnkels M, Kabotyanski E, Montazer-Torbati M B, *et al*. The epigenetic landscape of mammary gland development and functional differentiation[J]. J Mammary Gland Biol and Neoplasia, 2010, 15(1): 85-100.

[19] Singh K, Erdman R A, Swanson K M, *et al*. Epigenetic regulation of milk production in dairy cows[J]. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2010, 15(1): 101-112.

[20] Numoto K, Yoshida A, Sugihara S, *et al*. Frequent methylation of RASSF1A in synovial sarcoma and the anti-tumor effects of 5-aza-2'-deoxycytidine against synovial sarcoma cell lines[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(1): 17-25.

[21] Bionaz M, Loor J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle[J]. BMC Genomics, 2008, 9(1): 366.

[22] Fujiki K, Kano F, Shiota K, Murata M. Expression of the peroxisome proliferator activated receptor γ gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes[J]. BMC Biol, 2009, 7: 38.

[23] Pancione M, Sabatino L, Fucci A, *et al*. Epigenetic silencing of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a biomarker for colorectal cancer progression and adverse patients' outcome[J]. PloS One, 2010, 5(12): e14229.

[24] Noer A, Sorensen A L, Boquest A C, *et al*. Stable CpG hypomethylation of adipogenic promoters in freshly isolated, cultured, and differentiated mesenchymal stem cells from adipose tissue[J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(8): 3543-3556.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net