



TEAD1 转录本的鉴定及其在鸡前脂肪细胞中的功能研究*

彭 敏 徐 虎 贾子秋 杨清竹 潘 林 王维禹 孔令喆 孙婴宁**

(齐齐哈尔大学生命科学与农林学院生物技术系, 齐齐哈尔 161006)

摘要 **目的** TEAD1 转录因子 1 (TEAD1) 在前脂肪细胞中表达, 但是功能还不清楚。本研究旨在探讨 TEAD1 的两个转录本对永生鸡前脂肪细胞系 (immortalized chicken preadipocyte 1, ICP1) 细胞增殖、迁移、凋亡和分化的影响。**方法** 克隆 *TEAD1* 基因的全长序列, 对获得的两个转录本进行生物信息学分析。利用间接免疫荧光分析 TEAD1 转录本的亚细胞定位。通过 RT-qPCR、CCK-8 和 EdU 等方法, 检测过表达 TEAD1 转录本对 ICP1 细胞增殖的影响。利用划痕实验检测 TEAD1 转录本对 ICP1 细胞迁移的影响。利用细胞凋亡-Hoechst 染色和 RT-qPCR, 分析过表达 TEAD1 转录本对 ICP1 细胞凋亡的影响。通过 RT-qPCR 检测 TEAD1 转录本在不同组织、不同细胞系和 ICP1 细胞分化过程中的表达。利用油红 O 染色、BODIPY 染色、RT-qPCR、Western blot 和双荧光素酶报告基因技术, 分析过表达 TEAD1 转录本对 ICP1 细胞脂滴积累及成脂相关基因转录的影响。最后, 测定过表达 TEAD1 转录本的 ICP1 细胞中甘油三酯 (TG) 含量。**结果** 克隆 *TEAD1* 全长编码区, 鉴定出两个 TEAD1 转录本。TEAD1-V1 主要定位于细胞核, TEAD1-V2 定位于细胞质与细胞核。过表达 TEAD1-V1 和 TEAD1-V2 均抑制 ICP1 细胞增殖。过表达 TEAD1-V1 促进 ICP1 细胞迁移, 而过表达 TEAD1-V2 对 ICP1 细胞迁移没有影响。且过表达 TEAD1-V1 和 TEAD1-V2 均促进 ICP1 细胞凋亡。两个转录本在不同组织和细胞系中的表达模式相似, 在前脂肪细胞分化过程中的表达先下降后上升。过表达 TEAD1-V1 能显著减少 ICP1 细胞中脂滴的积累 ($P<0.05$), 抑制 C/EBP α 表达; 而过表达 TEAD1-V2 对脂滴积累和成脂相关基因的蛋白质表达水平没有明显作用 ($P>0.05$)。过表达 TEAD1-V1 能显著降低 ICP1 细胞中甘油三酯的含量 ($P<0.05$), 而过表达 TEAD1-V2 对 ICP1 细胞中甘油三酯含量没有影响 ($P>0.05$)。**结论** 本研究首次克隆并鉴定了鸡 *TEAD1* 基因的两个转录本。过表达转录本 TEAD1-V1 和 TEAD1-V2 抑制鸡前脂肪细胞增殖并且促进鸡前脂肪细胞凋亡; TEAD1-V1 抑制前脂肪细胞分化并促进前脂肪细胞迁移, 而 TEAD1-V2 对前脂肪细胞分化和迁移没有影响。

关键词 TEAD 转录因子 1, 鸡, 转录本, ICP1**中图分类号** Q291, Q786**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0020

脂肪组织不仅是生物体的主要组成部分, 也是重要的内分泌器官和能量储存组织^[1]。脂肪堆积过多会导致肥胖^[2], 同时引起多种肥胖相关疾病, 包括 2 型糖尿病、代谢综合征、癌症、神经性疾病和心血管疾病^[3] 等。脂肪细胞起源于中胚层多能干细胞。中胚层多能干细胞先分化成脂肪母细胞, 接着脂肪母细胞向前脂肪细胞分化, 前脂肪细胞通过增殖、分化形成成熟脂肪细胞, 大量成熟脂肪细胞构成脂肪组织^[4]。前脂肪细胞的增殖和脂肪细胞中的脂质过度积累是导致肥胖的主要原因^[5]。鸡是研究人类肥胖和肥胖相关疾病的潜在模型^[6]。深入了解肉鸡脂肪沉积的分子机制, 不仅有助于控

制鸡体内脂肪的过度沉积, 对于控制人类肥胖发生也具有一定参考。

TEAD 转录因子家族 (TEAD transcription factors family, TEADs) 在各种生物过程和人类疾病中发挥重要作用^[7]。该家族成员均包含一个 N 端 TEA 结构域和一个 C 端 YAP 结合域 (YBD), 其

* 国家自然科学基金 (31402061), 黑龙江省自然科学基金 (YQ2019C025) 和黑龙江省省属高等学校基本科研业务费 (145109211) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 13796882551, E-mail: SunYN@qqhru.edu.cn

收稿日期: 2023-01-15, 接受日期: 2023-04-10

中TEA结构域在家族成员中非常保守,能够与下游基因的M-CAT结合并且调控下游基因的表达^[8]。TEAD转录因子4 (TEAD transcription factor 4, TEAD4)在脂肪形成过程中,直接靶向脂肪形成的关键因子过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)的表达,并且通过辅助因子VGLL4和CtBP2募集到转录复合物中来抑制小鼠脂肪形成^[9]。TEAD转录因子1 (TEAD transcription factor 1, TEAD1)又名TEF-1,最初是在鉴定与SV40增强子结合并激活转录的核蛋白时被发现的^[10]。TEAD1在小鼠前脂肪细胞诱导分化过程中呈先升高再降低的表达模式。目前TEAD1的功能还不清楚。为此,本研究克隆了TEAD1基因的全长CDS区序列,发现并鉴定了两个转录本TEAD1-V1和TEAD1-V2。本研究进一步揭示了TEAD1两个转录本的亚细胞定位,及其在鸡前脂肪细胞增殖、迁移、凋亡和分化中的功能。研究结果有助于深入了解TEAD家族功能,并且为进一步完善鸡脂肪组织发育的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物组织和细胞系

麻鸡购自中国黑龙江齐齐哈尔兴鸡场。饲养至7周龄时被宰杀,收集腹部脂肪、心脏、胸肌、肾脏、肌胃、腿肌、肝脏、肌胃周围脂肪、腺胃、胰腺、卵巢、十二指肠、脾脏、脑、空肠和回肠等16种组织,液氮速冻并储存于-80℃,直到RNA提取。动物工作遵循中华人民共和国科学技术部制定的法规,并经齐齐哈尔大学实验动物管理委员会批准(批准号:2006-398)。

永生鸡前脂肪细胞1 (immortalized chicken preadipocyte 1, ICP1)细胞系及鸡胚成纤维细胞系 (chicken embryo fibroblast cells line, DF-1)由东北农业大学农业农村部鸡遗传育种重点实验室惠赠。ICP1细胞系利用带有鸡端粒酶逆转录酶 (chicken telomerase reverse transcriptase, *chTERT*)基因的逆转录病毒感染鸡原代前体脂肪细胞,而后通过药物筛选培养获得^[11]。ICP1细胞系具有与原代前脂肪细胞相同的形态和分化特征,已被广泛用于研究鸡脂肪形成研究^[12]。鸡原代肌内前脂肪细胞^[13] (intramuscular preadipocytes, IMP)和肌卫星细胞^[14] (muscle satellite cells, MuSCs)通过细胞体外分离培养方法获得。

1.2 鸡TEAD1转录本克隆及载体构建

pCMV-HA质粒购自美国Clontech公司。根据NCBI网站Genbank数据库提供的鸡TEAD1基因 (NM_001199405.1)序列,以ICP1细胞系cDNA为模板,克隆鸡TEAD1基因编码区片段,引物信息见表1。反应体系为:模板cDNA 5 μ l,上、下游引物 (10 μ mol/L)各2 μ l, DNA Buffer 25 μ l, dNTP 1 μ l, ddH₂O 14 μ l, Taq酶1 μ l。反应条件为:预变性95℃, 3 min;变性95℃, 15 s;退火72℃, 15 s;延伸72℃, 30 s;进行35个循环。利用同源重组试剂盒 (Vazyme, 南京),将PCR扩增的产物连接在pCMV-HA载体上,构建真核表达载体pCMV-HA-TEAD1-V1和pCMV-HA-TEAD1-V2。

1.3 细胞培养与转染

ICP1细胞系使用添加10%胎牛血清 (Biological Industries, 以色列)和1%青霉素-链霉素溶液 (Beyotime, 上海)的DMEM/F-12培养基 (Gibco, 美国),于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。待细胞汇合度至70%~75%时进行转染,转染按照Lipofectamin™ 8000转染试剂 (Beyotime)说明书进行操作。转染6 h后更换1次培养基,48 h后收集细胞。

1.4 间接免疫荧光

将细胞接种于底部放置爬片的6孔板中,37℃、5% CO₂培养。待细胞汇合度为60%~80%时,分别转染pCMV-HA-TEAD1-V1、pCMV-HA-TEAD1-V2和空载体pCMV-HA。48 h后,4%的多聚甲醛固定30 min。采用0.3% Triton X-100的PBS透化5~10 min。500 μ l 5% BSA封闭液室温封闭1 h。一抗anti-HA (CST, #3724, 稀释比例1:20)置于爬片上倒扣,室温孵育2 h。二抗anti-Rabbit (LI-COR, 680LT, 稀释比例1:50),室温孵育1 h。Hoechst33342染核10 min。滴入抗荧光猝灭剂,制片,用激光共聚焦显微镜 (Leica, 德国)观察。

1.5 RNA提取、反转录和RT-qPCR

采用Trizol (Takara, 日本)法提取ICP1细胞系和各组织总RNA。反转录按照HiScript® II Q Select RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (Vazyme)说明书进行操作。第一步反应体系为:模板1 pg~1 μ g, 4 $\times$ gDNA去除剂4 μ l, 低聚核苷酸 (Oligo) 1 μ l, 低聚六聚体引物 (random hexamers) 1 μ l, ddH₂O至16 μ l, 42℃反应2 min。第一步反应液16 μ l, 反应程序为:50℃, 15 min; 80℃,

15 s。第二步反应体系为 5×HiScript II Select qRT SuperMix II 4 μl, RT-qPCR 反应按照 ChamQ™SYBR®qPCR Master Mix (Without ROX) (Vazyme) 说明书进行操作。反应体系为: 2×ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10 μl, cDNA 模板 2 μl, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μl,

ddH₂O 7.2 μl, 反应程序为: 95°C 预变性 30 s, 95°C 变性 10 s, 55°C 退火延伸 30 s, 40 个循环。每个样品设置 3 个重复, 以 *NONO* 或 *TBP* 为内参基因, 利用 2^{-ΔΔC_t} 算法将原始 C_t 值转换为基因相对表达量。所用引物信息详见表 1 和表 S1。

Table 1 Primer sequences

Gene name	Reference	Primer sequence (5'→3')
<i>TEAD1</i>	NM_001199405.1	F: atggccatggaggccaagcttGAAGACATCGAAAGAATGAGCG R: ggccgcggtacctcgagCTGCTCAGTCCTTTACAAGCCT
<i>TEAD1-V1</i>	XM_025150625.2	F: GGAATGAATTGATAGCCAGATAC R: TCTCGAAGTTTCTTTCTTGCTA
<i>TEAD1-V2</i>	XM_025150629.2	F: GTGTGGGAGGAGGAAAATCA R: TACCTGCTTCCTGGTCCGT

Lowercase: homologous sequence on pCMV-HA vector. Underlined lowercase: restriction enzyme cutting site.

1.6 EdU检测

使用 BeyoClick™ EdU-488 细胞增殖检测试剂盒 (Beyotime) 按照试剂盒说明书对 ICP1 细胞系增殖情况进行检测。将真核表达载体 pCMV-TEAD1-V1 和 pCMV-TEAD1-V2 以及空载体 pCMV-HA 转染至 ICP1 细胞系 48 h 后, 每孔吸走 1 ml 细胞培养基后加入 1 ml 37°C 预热的 2×EdU-DMEM/F-12 细胞培养基, 摇匀后于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 2 h。使用倒置荧光显微镜 (Zeiss, 德国) 进行观察并拍照, 使用 Image J 进行细胞计数。

1.7 CCK-8检测

将 ICP1 细胞系接种至 96 孔板, 每个实验组设置 5 个孔重复, 将真核表达载体 pCMV-TEAD1-V1 和 pCMV-TEAD1-V2 以及空载体 pCMV-HA 转染至 ICP1 细胞系, 于 0、24、48 和 72 h 向每孔中避光加入 10 μl CCK-8 试剂 (Apexbio, 美国), 摇匀后于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 2 h, 使用酶标仪 (帝肯, 上海) 测定在 450 nm 处的吸光值 (A₄₅₀)。

1.8 划痕实验

将 ICP1 细胞接种于 6 孔板内, 待汇合度达 70%~80% 时, 用无菌的 10 μl 白色微量移液器吸头划痕, 弃培养基, 用 PBS 洗去划掉的细胞, 加入新的培养基。然后分别转染 pCMV-HA-TEAD1-V1 和 pCMV-HA-TEAD1-V2 以及空载体 pCMV-HA, 培养 0、24 和 48 h, 于倒置显微镜 (Zeiss) 下观察拍照。

1.9 Hoechst33342染色

将 ICP1 细胞接种于 6 孔板内, 培养过夜。分别转染 pCMV-HA-TEAD1-V1 和 pCMV-HA-TEAD1-V2 以及空载体 pCMV-HA 至 ICP1 细胞系, 48 h 后, 0.5 ml 固定液固定 10 min。PBS 清洗后, 0.5 ml Hoechst33342 染色液 (Beyotime) 染色 5 min。PBS 清洗后, 采用抗荧光猝灭封片液封片, 荧光显微镜 (Zeiss) 进行观察并拍照。

1.10 诱导分化及油红O染色

采用 160 μmol/L 油酸 (Sigma, 美国) 对 6 孔板中培养的 ICP1 细胞系进行诱导分化, 分别诱导 0、12、24、48、72 和 96 h 提取总 RNA。检测过表达 TEAD1 两个转录本对于 ICP1 细胞分化的影响时, 将 ICP1 细胞系接种于 6 孔板内, 待细胞 60%~70% 汇合, 转染真核表达载体 pCMV-HA-TEAD1-V1、pCMV-HA-TEAD1-V2 或空载体 pCMV-HA, 24 h 后更换含 160 μmol/L 油酸的诱导培养基, 培养至 48 h, 10% 多聚甲醛固定 30 min, 用油红 O 染液避光染色 50 min, 60% 异丙醇洗去浮色, 倒置显微镜 (Olympus, 北京) 观察拍照。用 100 μl 异丙醇室温孵育 15 min 后, 加入 3 倍体积的异丙醇稀释后提取染料, 采用酶标仪 (帝肯, 上海) 测量 510 nm 处吸光值 (A₅₁₀)。

1.11 BODIPY493/503染色

向 5 mg BODIPY493/533 粉末 (GlpBio, 美国, CA, GC42969) 中避光加入 4 ml 二甲基亚砜 (DMSO), 混匀后 4°C 冰箱中避光保存。分化后的 ICP1 细胞采用 4% 多聚甲醛固定 40 min; 加 1 ml

60%异丙醇后立即吸出; 1 ml BODIPY 493/503 (1 : 1 250) 染液室温避光染色 15 min; 1 ml Hoechst33342染液 (1 : 1 000 稀释) 室温避光染核 10 min, 采用倒置荧光显微镜 (Zeiss) 观察拍照。

1.12 蛋白质印迹 (Western blot) 分析

将 ICP1 细胞系接种至 6 孔板, 分别转染 pCMV-HA-TEAD1-V1、pCMV-HA-TEAD1-V2 及 pCMV-HA 质粒, 诱导分化 48 h 后, 使用 RIPA 裂解液 (含 1% PMSF) (Beyotime) 提取细胞中总蛋白质。SDS-PAGE 电泳分离样品, 将蛋白质样品转移至聚偏二氟乙烯膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 一抗 4°C 过夜孵育, 二抗室温孵育 1 h。使用 Western blot 一抗二抗去除液 (Beyotime) 洗膜, 与 β -actin 抗体重新杂交。使用 Odyssey 双色红外荧光成像 (LI-COR, 美国) 扫膜。所用一抗包括: anti-HA (CST, 美国, #3724)、C/EBP α (Abmart, 上海, 6223-1)、FAS (Beyotime, AF6861)、PPAR γ (Beyotime, AF7797)、FABP4 (Beyotime, AF6843)、 β -actin (Beyotime, AF0003)。对应二抗除 β -actin 抗体为 anti-Mouse (LI-COR, 美国, 680RD), 其余抗体均为 anti-Rabbit (LI-COR, 680LT)。

1.13 荧光素酶活性检测

荧光素酶报告基因载体 pGL3-promoter-C/EBP α ^[15]、pGL3-promoter-FABP4^[16]、pGL3-promoter-FAS^[17] 和 pGL3-promoter-PPAR γ ^[18] 参考文献方法构建。将 ICP1 细胞接种至 24 孔板, 分别将上述双荧光素酶报告基因载体与海肾荧光素酶报告基因载体 pRL-TK 以及真核表达载体 pCMV-HA-TEAD1-V1、pCMV-HA-TEAD1-V2 或 pCMV-HA 质粒共转染, 转染比例为 50 : 50 : 1, 转染 48 h 后, 使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Promega, 美国) 按照说明书测定荧光素酶活性。相对表达量为萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性。

1.14 甘油三酯 (TG) 检测

将 ICP1 细胞系接种至 6 孔板, 分别转染 pCMV-HA-TEAD1-V1、pCMV-HA-TEAD1-V2 及 pCMV-HA 质粒, 转染 24 h 后油酸钠诱导分化 48 h, 采用甘油三酯 (TG) 测试盒 (建成, 南京) 利用酶标仪 (帝肯) 测量 A_{510} , 测量方法参照试剂盒说明书。

1.15 生物信息学预测分析及网址

采用 Clustal Omega ([https://www.ebi.ac.uk/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)

[Tools/msa/clustalo/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)) 在线工具进行多序列比对。在线预测网站 SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/>) 预测信号肽。在线预测网站 Prosite (<https://prosite.expasy.org/>) 预测蛋白质功能位点。在线预测软件 PSORTII (<https://www.genscript.com/psort.html>) 预测核定位序列 (NLS)。在线预测网站 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 预测亚细胞定位。

1.16 统计学分析

使用 GraphPad prism5.0 进行作图分析, 实验数据以 ($mean \pm SEM$) 表示。数据分布正态性采用 Shapiro-Wilk 检验, 利用 Minitab17 Box-Cox 将非正态分布数据转换为正态分布数据再进行下一步统计分析。两组比较采用 Student's t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 并进行 Duncan's 多重比较。除特殊注明外, 体外实验均进行 3 次独立重复实验, 每次实验设置 3 个生物学重复。

2 结 果

2.1 鸡 TEAD1 转录本克隆与鉴定

以 ICP1 细胞的 cDNA 为模板, 克隆鸡 TEAD1 基因全长编码区片段。通过 Sanger 测序和双酶切鉴定, 与 NCBI 网站鸡 TEAD1 基因序列对比, 鉴定出两个转录本, 分别命名为 TEAD1-V1 和 TEAD1-V2。转录本 TEAD1-V1 长度为 1 239 bp, 转录本 TEAD1-V2 长度为 1 176 bp (图 1a)。Western blot 分析显示 TEAD1-V1 和 TEAD1-V2 的真核表达载体构建成功 (图 1b)。转录本 TEAD1-V2 与转录本 TEAD1-V1 相比缺失一个外显子, 缺失长度为 63 bp (图 1c)。

2.2 鸡 TEAD1 转录本的生物信息学分析及亚细胞定位

转录本 TEAD1-V1 和 TEAD1-V2 分别编码 412 个氨基酸和 391 个氨基酸。将两个转录本和鼠 TEAD1 (AAH60138.1) 的氨基酸序列进行比对, 通过 NCBI 上蛋白质结构域 (conserved domains) 分析, 发现两个转录本都在 N 端含有 1 个 TEA 结构域, 但是 TEAD1-V2 比 TEAD1-V1 缺少 8 个氨基酸, 并且存在 1 个外显子的序列差异 (图 2)。利用在线预测网站 SignalP 5.0 对 TEAD1 转录本编码的蛋白质进行信号肽预测, 结果显示 TEAD1 两个转录本均无信号肽。通过 Prosite 预测 TEAD1 两个转录本表达蛋白的功能位点。发现 TEAD1 两个转录本表达蛋白都含有 5 类功能活性位点, 包括酪蛋白

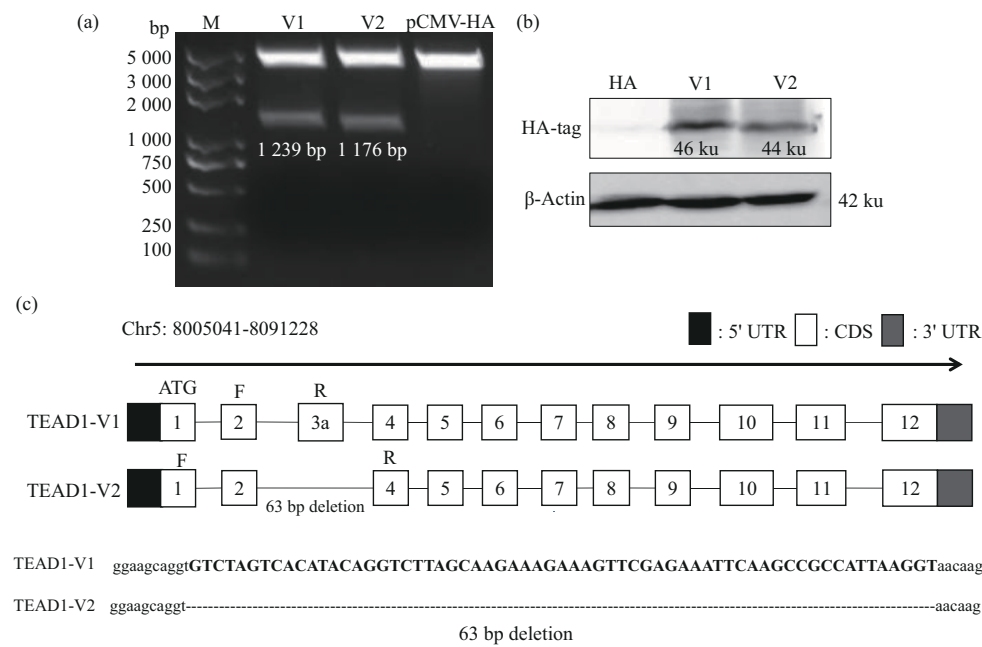


Fig. 1 Identification and cloning of TEAD-V1/V2 in chicken

(a) Identification of the recombinant expression plasmids pCMV-HA-TEAD1-V1 and pCMV-HA-TEAD1-V2. (b) Detection of chicken TEAD1-V1/V2 overexpression by Western blot. (c) Gene structures of *TEAD1*-V1/V2. UTR, untranslated region; CDS, DNA coding sequence. F and R: RT-qPCR primer sites.



Fig. 2 The TEA domain of the TEAD1-V1/V2 proteins

Alignment of the amino acid sequences of the chicken TEAD1-V1/V2 and mouse TEAD1 proteins. The TEA domain is framed by solid lines. Positions of the same amino acids in all three proteins are indicated by asterisks.

激酶II磷酸化位点、酰胺化位点、蛋白激酶C磷酸化位点、N-肉豆蔻酰化位点和N-糖基化位点, 其中TEAD1-V1在199~201位氨基酸处比TEAD1-V2多一个蛋白激酶C磷酸化位点TaK(表S2)。利用PSORTII在线软件对TEAD1两个转录本表达蛋白中存在的假定NLS进行预测, 结果显示: TEAD1-V1蛋白有3条假定的核定位序列pNLS1、pNLS2和pNLS3; TEAD1-V2蛋白有2条假定的核定位序列pNLS1和pNLS2(表S3)。

在WOLF PSORT网站对TEAD1转录本表达蛋

白进行亚细胞定位分析, 结果显示, TEAD1-V1蛋白定位于细胞核(nucl: 32), TEAD1-V2蛋白定位于细胞质、细胞核和细胞质膜(cyto: 18, nucl: 9, plas: 5)。为了验证这一结果, 采用间接免疫荧光在激光共聚焦显微镜下观察, 实验组转染重组质粒pCMV-HA-TEAD1-V1的ICP1细胞主要在细胞核中观察到绿色荧光, 转染pCMV-HA-TEAD1-V2的ICP1细胞在细胞质与细胞核内均观察到绿色荧光(图3)。

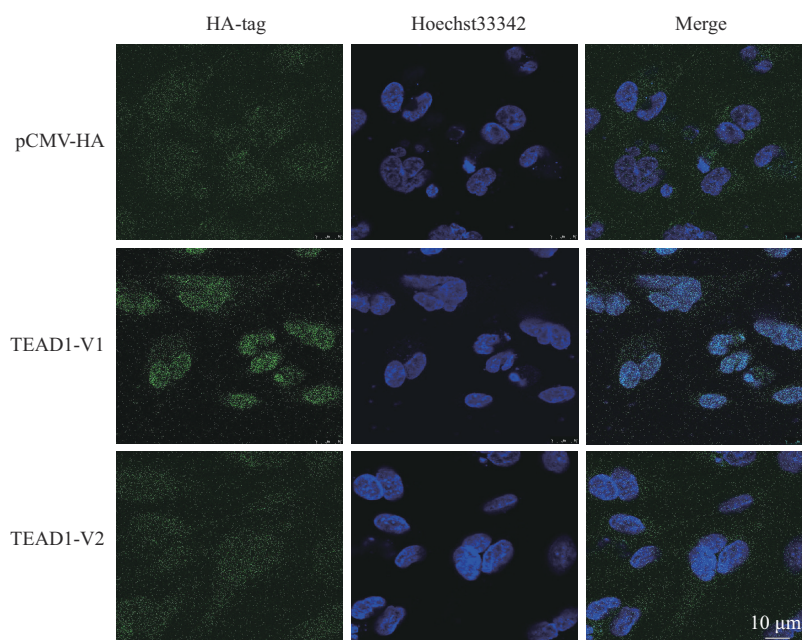


Fig. 3 Subcellular localization of TEAD1-V1/V2

Laser confocal microscopy was used to observe the localization of TEAD1-V1/V2 proteins in ICP1 cells transfected with pCMV-HA in the control group and pCMV-HA-TEAD1-V1/V2 in the experimental group. HA-tag: green fluorescence. Hoechst33342: blue fluorescence. $n=6$.

2.3 TEAD1转录本对前脂肪细胞增殖的影响

RT-qPCR结果显示：过表达TEAD1-V1能下调*Ki67*、*Cyclin E*、*Cyclin D1*和*PCNA*基因mRNA表达，其中*Ki67*和*Cyclin E*显著下调（ $P<0.05$ ，图4a）；过表达TEAD1-V2同样下调*Ki67*、*Cyclin E*、*Cyclin D1*和*PCNA*基因mRNA表达，其中*Cyclin E*显著下调（ $P<0.05$ ，图4b）。CCK-8和EdU结果显示，与对照组相比，转染TEAD1-V1和TEAD1-V2过表达载体能显著抑制ICP1细胞系增殖（ $P<0.05$ ，图4c~e）。

2.4 TEAD1转录本对鸡前脂肪细胞迁移的影响

在划痕试验中，转染48 h后，过表达TEAD1-V1能显著促进ICP1细胞迁移（ $P<0.01$ ），而TEAD1-V2对ICP1细胞迁移没有影响（ $P>0.05$ ，图5）。

2.5 TEAD1转录本对鸡前脂肪细胞凋亡的影响

Hoechst33342染色结果显示，过表达TEAD1-V1和TEAD1-V2的ICP1细胞大多呈致密浓染，或呈碎块状致密浓染。而转染pCMV-HA空载体的ICP1细胞核呈椭圆形蓝色，提示TEAD1两个转录本能显著促进ICP1细胞凋亡（ $P<0.001$ ，图6a）。对凋亡相关基因检测，过表达TEAD1-V1和

TEAD1-V2均能上调*Caspase-3*、*Caspase-9*、*Bax*和*BCL-2*基因mRNA表达（ $P<0.05$ ，图6b, c）。

2.6 鸡TEAD1转录本在不同组织、细胞及脂肪形成过程的表达分析

利用RT-qPCR检测7周龄麻鸡各组织中TEAD1-V1和V2的mRNA表达水平，引物扩增区域如图1c所示。结果显示，鸡TEAD1转录本在16种组织中普遍表达，并且TEAD1-V1和TEAD1-V2的表达模式相似，两个TEAD1转录本在心脏、胰腺、肝脏和脾脏的表达最高，在腹部脂肪、肌胃脂肪、胸肌和肾脏等11种组织检测到中等水平表达，在卵巢中的表达最低（ $P<0.05$ ，图7a, b）。检测TEAD1转录本在ICP1细胞系^[11]、DF-1细胞系^[19]、MuSCs细胞^[20]和IMP细胞^[21]中的表达水平，发现两个转录本均在ICP1细胞中表达最高，在其他3种细胞表达相对较低（ $P<0.05$ ，图7c, d）。检测TEAD1转录本在鸡ICP1细胞诱导分化过程中的mRNA水平，结果发现，TEAD1-V1和TEAD1-V2的mRNA水平在0~72 h表达呈下降趋势，但在96 h表达量显著升高（ $P<0.05$ ，图7e, f）。提示两个转录本可能在ICP1细胞系过程中发挥作用。

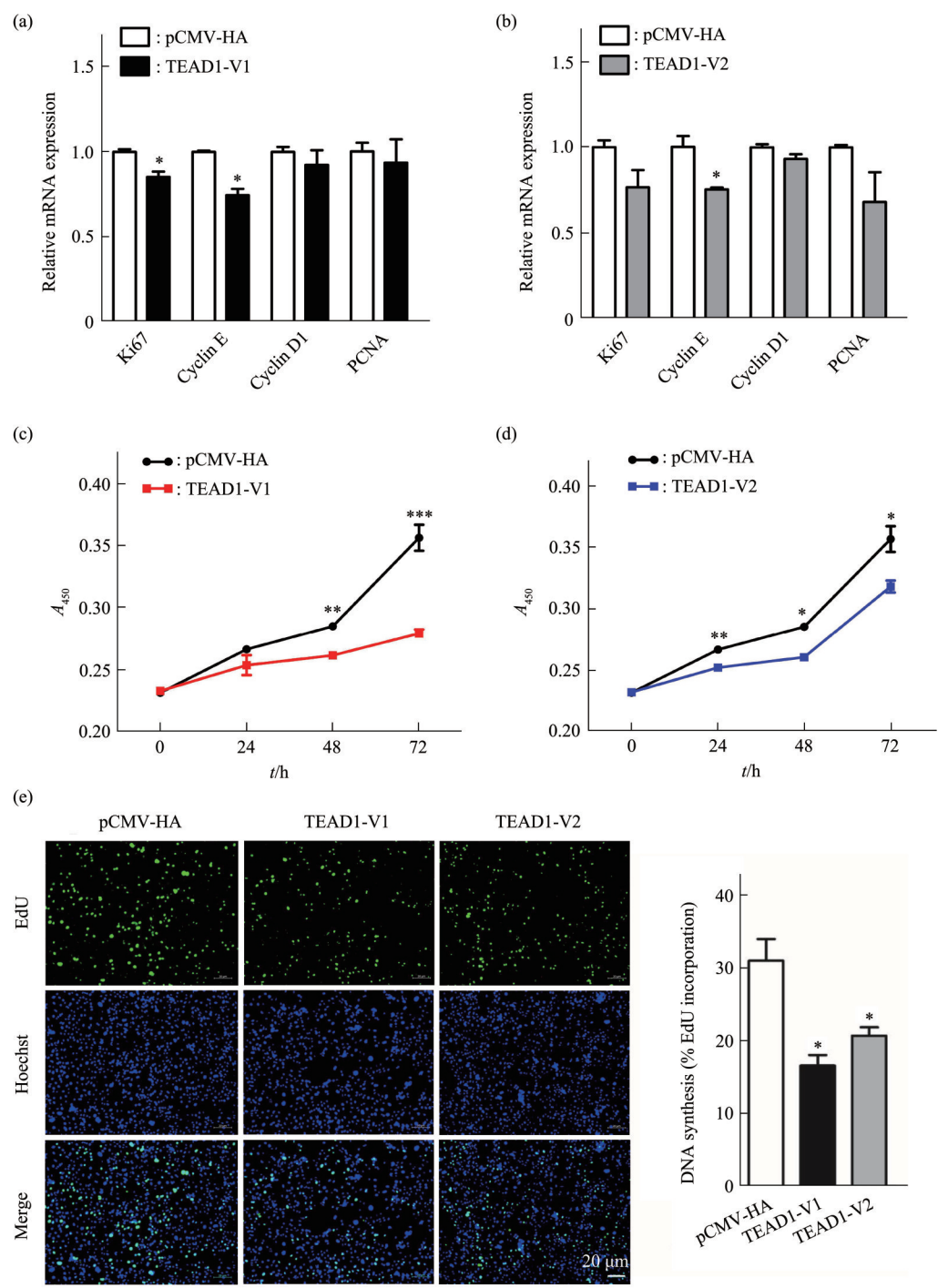


Fig. 4 Effects of TEAD1-V1/V2 overexpression on ICP1 cell proliferation

(a, b) Determination of the effects of TEAD1-V1/V2 overexpression on the expression of cells proliferation-related genes in the ICP1 cells line by RT-qPCR. *NONO* was used as internal control. (c, d) CCK-8 assay of the effects of TEAD1-V1/V2 overexpression on ICP1 cell proliferation. The line chart shows the absorbance at 450 nm. (e) Determination of the effects of TEAD1-V1/V2 overexpression on ICP1 cells proliferation based on the 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) assay, and its quantification. The green fluorescence was generated by Alexa Fluor labeling after EdU incorporation during DNA synthesis, and the blue fluorescence was generated by Hoechst33342. The bar chart shows the percentage of proliferating cells among the total cells. Values are presented as the *means*±*SEM* of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences (Student's *t* test), **P*<0.05, ** *P*<0.01, ****P*<0.001, *n*=6.

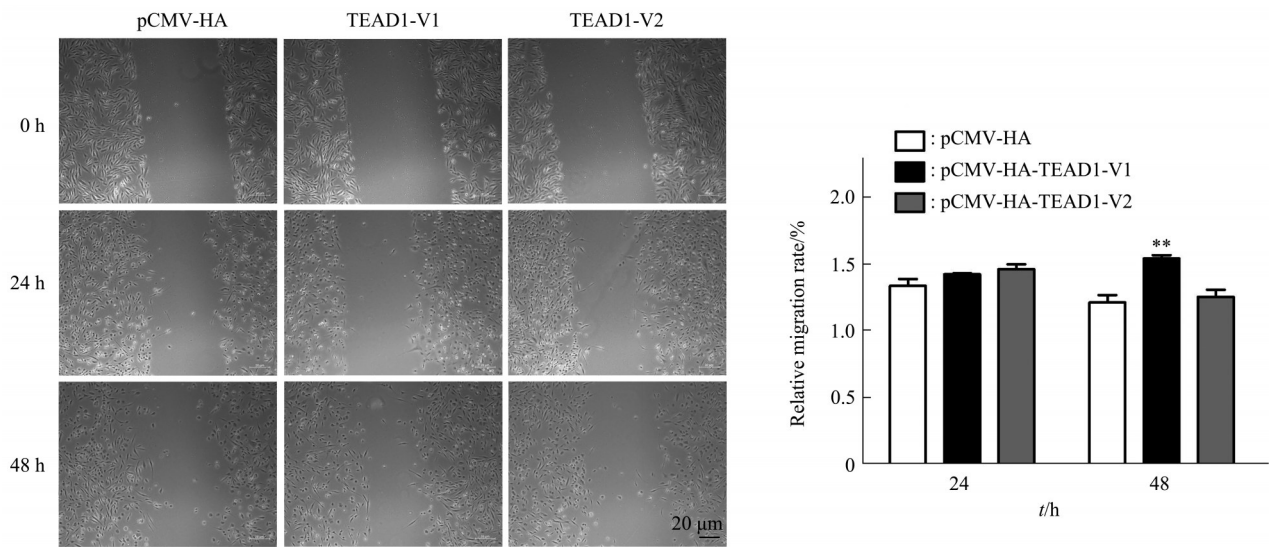


Fig. 5 Effects of TEAD1-V1/V2 overexpression on ICP1 cell migration

A scratch test was used to determine the effects of TEAD1-V1/V2 on ICP1 cells migration. Values are presented as the *means*±*SEM* of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences (Student's *t* test), ***P*<0.01, *n*=6.

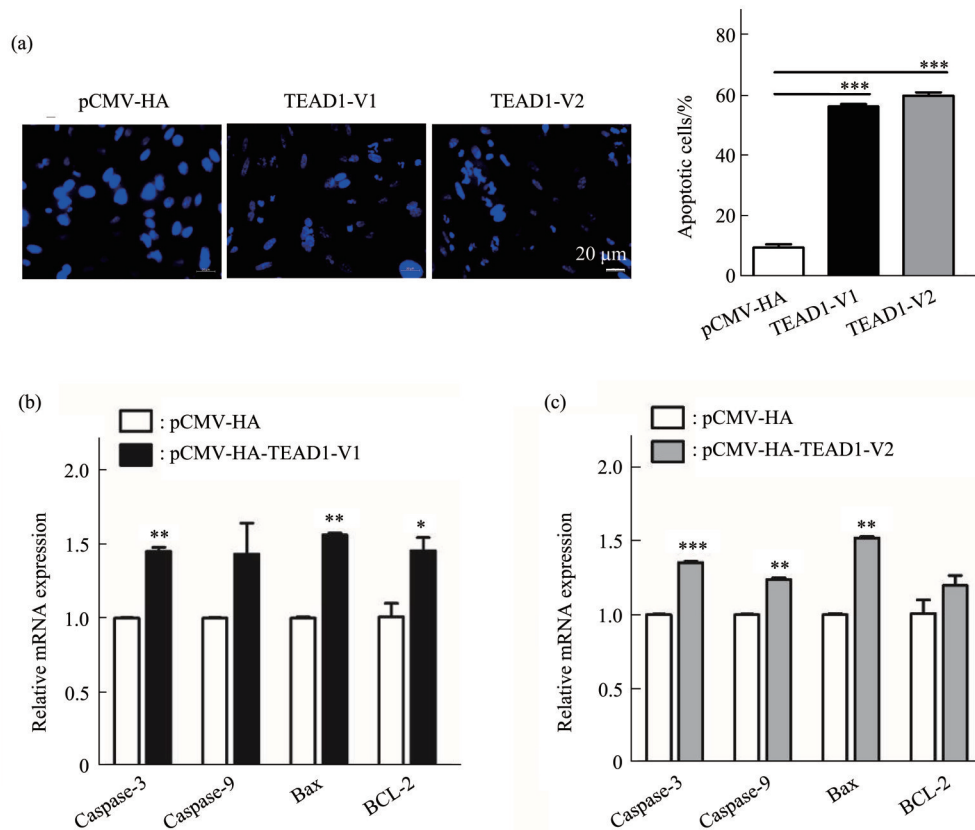


Fig. 6 Effects of TEAD1-V1/V2 overexpression on ICP1 cell apoptosis

(a) Nuclei were stained with apoptotic-Hoechst33342 (blue) and extraction colorimetry of ICP1 cells transfected with pCMV-HA or pCMV-HA-TEAD1-V1/V2 was carried out. *n*=6. (b, c) Determination of the effects of TEAD1-V1/V2 overexpression on the expression of cells apoptosis-related genes in ICP1 cells by RT-qPCR. *NONO* was used as internal control. Values are presented as the *means*±*SEM* of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences (Student's *t* test), **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001.

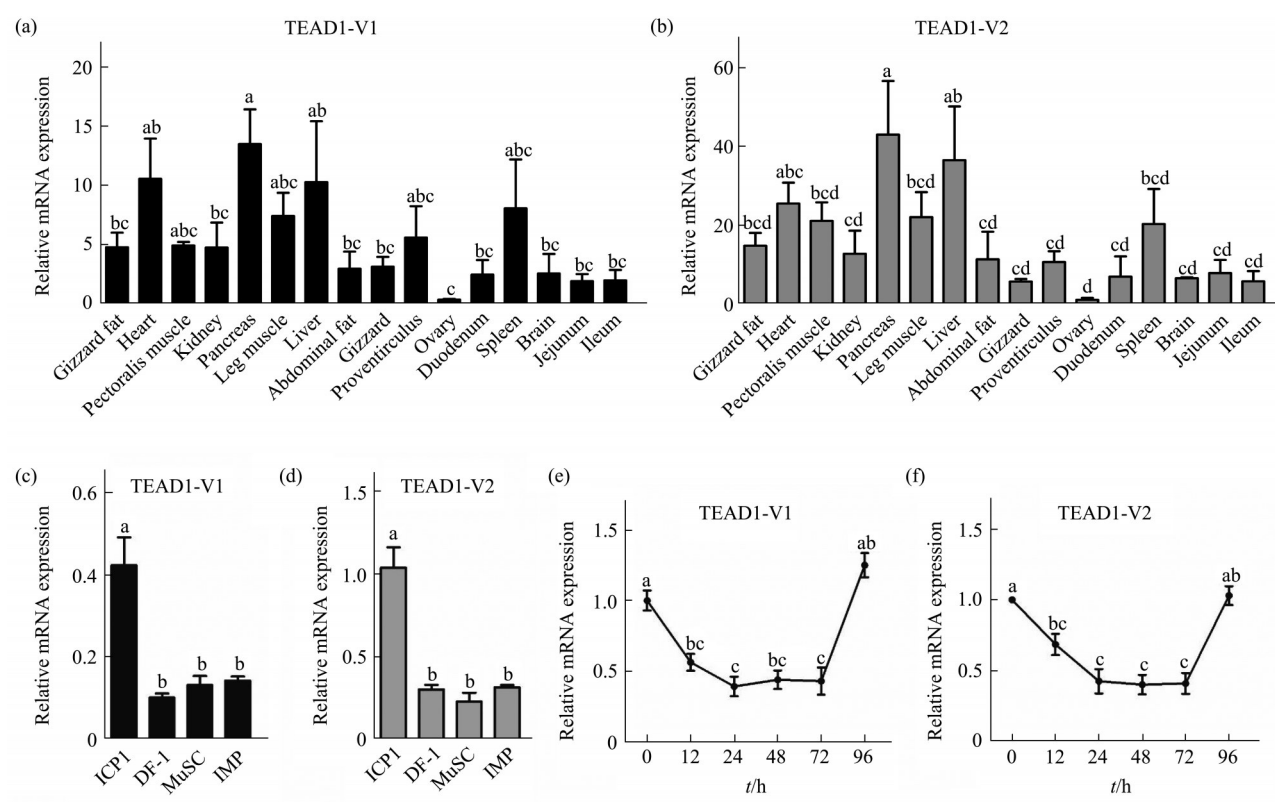


Fig. 7 Relative RNA expression of TEAD1-V1/V2

Expression of *TEAD1*-V1/V2 in chicken tissues, cells, and during a time course of adipogenesis. (a, b) RT-qPCR was performed to examine the levels of *TEAD1*-V1/V2 mRNA in chicken tissues at 7 weeks of age ($n=4$). *TBP* was used as internal control. (c, d) RT-qPCR was performed to detect the expression of *TEAD1*-V1/V2 in ICP1, DF-1, MuSC, and IMP cells. *NONO* was used as internal control. (e, f) ICP1 cells were induced to differentiate for 96 h, and the expression of *TEAD1*-V1/V2 was detected by RT-qPCR at 0, 12, 24, 48, 72, and 96 h. *NONO* was used as internal control. Data are presented as the means $\pm$ SEM of three independent experiments ($n=3$). Different lowercase letters indicate a significant difference ($P<0.05$), whereas the same letters indicate no significant difference ($P>0.05$).

2.7 TEAD1转录本对前脂肪细胞分化的影响

为了明确两个 TEAD1 转录本在鸡前脂肪细胞分化过程中的作用, 利用油红 O 和 BODIPY 检测过表达 TEAD1-V1 和 TEAD1-V2 对 ICP1 细胞系脂滴积累的影响, 结果显示: 过表达 TEAD1-V1 能显著减少 ICP1 细胞中脂滴的积累 ($P<0.05$); 而过表达 TEAD1-V2 对脂滴积累没有显著影响 ($P>0.05$, 图 8a, b)。再通过 RT-qPCR、Western blot 和双荧光素酶报告基因检测过表达 TEAD1 转录本对成脂相关基因的 mRNA 和蛋白质表达水平及启动子荧光素酶报告基因活性影响。RT-qPCR、Western blot 和双荧光素酶报告基因结果显示: 过表达 TEAD1-V1 能显著下调 *C/EBP α* 的 mRNA 和蛋白质表达水

平 ($P<0.01$), 抑制 *C/EBP α* 的启动子活性 ($P<0.01$, 图 8c, e, g); 过表达 TEAD1-V2 能显著下调 *C/EBP α* 的 mRNA 表达 ($P<0.01$) 和启动子活性 ($P<0.01$), 同时显著上调 *FAS* 基因 mRNA 表达和启动子活性 ($P<0.05$, 图 8d, f), 但是对成脂标志基因的蛋白质表达水平没有明显作用 ($P>0.05$, 图 8g)。过表达 TEAD1-V1 能显著降低 ICP1 细胞中甘油三酯的含量 ($P<0.05$), 而过表达 TEAD1-V2 对 ICP1 细胞中甘油三酯含量没有影响 ($P>0.05$, 图 8h)。这些结果提示, TEAD1-V1 能抑制鸡前脂肪细胞分化, 而 TEAD1-V2 对鸡前脂肪细胞分化没有显著影响。

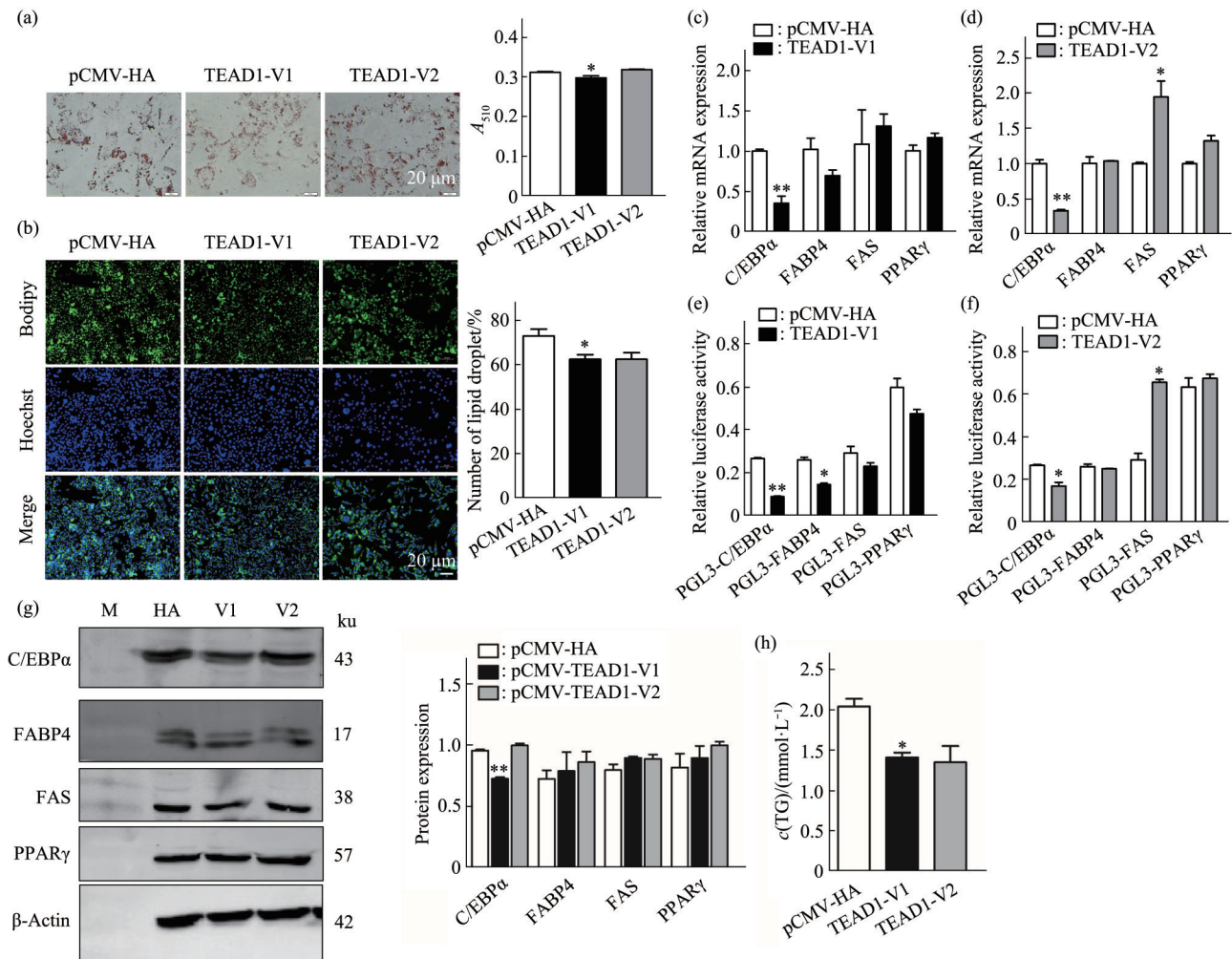


Fig. 8 Effects of TEAD1-V1/V2 overexpression on ICP1 cell differentiation

(a) Oil Red O staining and extraction colorimetry of ICP1 cells transfected with pCMV-HA or pCMV-HA-TEAD1-V1/V2. (b) Staining with the fluorescent dye BODIPY493/503 (green) to detect hepatic lipid droplets. Nuclei were stained with Hoechst33342 (blue). $n=6$. (c, d) At 48 h after transfection with pCMV-HA or pCMV-HA-TEAD1-V1/V2, the expression of adipogenic-related genes in ICP1 cells was measured by RT-qPCR. *NONO* was used as internal control. (e, f) Reporter gene analysis of the effects of TEAD1 transcript overexpression on the promoter activity of adipogenic genes. Luciferase activity of different adipogenic gene promoters co-transfected with pCMV-HA or pCMV-HA-TEAD1-V1/V2 was detected at 48 h after transfection. Relative luciferase activity was calculated as the ratio of firefly to *Renilla* luciferase activity. (g) At 48 h after transfection with pCMV-HA or pCMV-HA-TEAD1-V1/V2, the protein expression of adipogenic genes in ICP1 cells was assessed based on Western blot analysis. (h) Determination of triglyceride content. Values are presented as the *means*±*SEM* of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences (Student's *t* test), * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

3 讨 论

TEAD1 是一种转录激活因子, 最初在人类 HeLa 细胞中鉴定, 并特异性结合 SV40 增强子序列中的 GT-IIC 和 Sph 基序^[22]. TEAD1 在乳腺癌和膀胱癌的发生中发挥重要作用^[23]. 另外, TEAD1 是维持成人心肌细胞功能所必需的, 其缺失导致致死性扩张型心肌病^[24]. 小鼠 *TEAD1* 基因的缺失导致

心脏畸形, 甚至胚胎死亡^[25]. 鸡 *TEAD1* 突变能降低骨骼肌 α 肌动蛋白启动子功能^[26]. TEAD1 在小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中表达先升高后降低^[9], 提示该基因在脂肪形成中也发挥作用. 本研究在鸡 ICP1 细胞中首次克隆 *TEAD1* 基因编码区全长序列, 并成功地鉴定出两个转录本, *TEAD1-V1* 和 *TEAD1-V2*. 此外, 本文发现这两个 *TEAD1* 转录本在鸡体内各组织中及不同的细胞中具有相似的表达模式. TEAD1-V1 转录本能抑制前脂肪细胞

分化和迁移, 而TEAD1-V2对前脂肪细胞分化和迁移没有明显作用, 同时, 两个转录本均抑制细胞增殖和促进凋亡。研究结果为深入研究TEAD1在鸡体内的功能和作用机制奠定基础。鸡是研究脂肪组织和肥胖的潜在模型^[27], 本研究也为进一步控制鸡体内脂肪过度沉积和人类肥胖提供理论参考。

TEAD转录因子是几种致癌信号通路的核效应因子, 包括Hippo、WNT、TGF- β 和EGFR通路, TEAD家族的亚细胞定位调节了这些影响肿瘤的通路的功能输出^[28]。Hou等^[29]实验证明, TEAD1亚细胞定位在细胞核来影响心肌细胞发生病变。本研究通过生物信息学预测和间接免疫荧光分析发现, 转录本TEAD1-V1主要定位于细胞核, 转录本TEAD1-V2定位于细胞质与细胞核。TEAD1-V1有3条假定的NLS; TEAD1-V2只有2条假定的NLS。TEAD1-V2比TEAD1-V1缺少63个氨基酸, 核定位序列pNLS3位于这一区域。因此推测pNLS3是导致TEAD1两个转录本核定位不同的因素之一。

目前研究发现, TEAD家族的表达在许多癌症类型中上调, 包括胃癌、结肠直肠癌、乳腺癌和前列腺癌^[30]。除了它在癌症中的公认作用外, Osman等^[31]实验结果已经证实, TEAD1能促进平滑肌细胞增殖。本研究过表达TEAD1转录本V1和V2能够下调细胞增殖重要的标志基因*Ki67*、*Cyclin E*、*Cyclin D1*和*PCNA*基因的表达, 同时EdU和CCK-8等试验证明TEAD1两个转录本能够抑制鸡前脂肪细胞增殖。上述结果表明, TEAD1对不同细胞增殖的调控作用可能是细胞或组织特异性引起的。今后有必要利用流式细胞术, 进一步探究TEAD1转录本对前脂肪细胞周期的影响。

本研究发现, 鸡TEAD1转录本抑制鸡前脂肪细胞增殖, 并促进细胞凋亡。TEAD1是Hippo信号通路的主要效应子, Hippo信号通路通过控制这些过程的关键调控基因来调控细胞生长、增殖和凋亡^[32]。在哺乳动物中, 当Hippo途径关闭时, TEAD1和其他转录因子相互作用, 以调节下游效应物的表达, 促进细胞增殖并抑制凋亡^[33]。可以推测, TEAD1转录本可能通过调控Hippo信号通路, 抑制鸡前脂肪细胞增殖、促进细胞凋亡。Yuan等^[34]和Grelet等^[35]实验证实, 不同转录本之间具有不同的生物学功能。而Zhang等^[36]实验发现, LncFAM200B的4个转录本在抑制牛前脂肪细胞增殖方面具有相似的功能。在本研究中, TEAD1的两种转录本在鸡前脂肪细胞增殖和凋亡

方面中也具有相似的功能, 具体的作用机制需要进一步研究。本文的发现提示, TEAD1及其转录本可能是鸡脂肪过度沉积和人类肥胖的潜在治疗靶点。

TEAD1基因在人的多种组织中广泛表达, 包括骨骼肌、胰腺、胎盘、肺和心脏^[37]。这与本研究的结果相一致, 两个TEAD1转录本均在各组织中大量表达, 其中包括胰腺、心脏和脂肪组织等, 这表明TEAD1转录本在多种组织中发挥功能。两个TEAD1转录本在ICP1细胞中高表达, 但是随着诱导分化的进行, 表达量显著下降, 提示两个转录本可能对前脂肪细胞分化存在抑制作用。TEAD1在小鼠3T3-L1前脂肪细胞分化过程中表达先升高后降低^[9], 这与本研究TEAD1-V1/V2在鸡ICP1诱导分化过程中的表达模式不同。推测这与鸡和哺乳动物的脂肪形成存在差异^[38]有关。

脂肪细胞分化是一个复杂的过程, 在适当的刺激下, 前脂肪细胞会发生细胞形态变化并最终分化为圆形成熟脂肪细胞^[1]。脂肪细胞分化涉及PPAR γ 与C/EBP α 转录因子的相互作用^[39]。C/EBP α 是分化“开关”的组成部分^[40]。Hop2与转录因子C/EBP α 相互作用并抑制脂肪细胞分化^[41]。本研究发现, TEAD1-V1能下调C/EBP α 启动子活性, 并且调控C/EBP α 基因mRNA和蛋白质水平表达。C/EBP α 能够结合并激活许多脂肪特异性基因的启动子活性, 例如, 在前脂肪细胞分化的早期, 活化的C/EBP α 能够正反馈促进PPAR γ 表达, PPAR γ 又能进一步激活脂滴包被蛋白(lipid-drop coated protein, PLIN1)^[42]和脂肪酸结合蛋白(fatty acid-binding protein 4, FABP4)的表达, 最终引起脂滴积累增大, 前脂肪细胞分化成脂肪细胞^[43]。结合上述数据, 本研究推测, TEAD1-V1可能通过调控C/EBP α 转录来抑制鸡前脂肪细胞分化。真核细胞基因表达调控存在转录水平调控、转录后水平调控和翻译后水平调控, 而mRNA水平的变化可能跟转录后水平调控有关, 翻译受到严谨调控, 多出来的mRNA不一定会被翻译^[44]。TEAD1-V2能引起分化标志基因C/EBP α 的转录水平变化, 但是对蛋白质水平没有影响, 推测可能受到一些microRNA和LncRNA的转录后水平调控。另外, 两个转录本过表达之后影响的标志基因不同。TEAD1-V1转录本TEA结构域比TEAD1-V2长9 bp, 这个结构域能够与下游靶基因结合^[45]。两个转录本TEA结构域不一样, 因此结合调控的下游基因不同。本

研究因缺少鸡 TEAD1 抗体, 并未开展蛋白质水平的研究。今后有必要制备鸡 TEAD1 转录本抗体, 开展染色质免疫共沉淀 (ChIP) 及免疫共沉淀 (Co-IP) 研究, 进一步分析 TEAD1 转录本在前脂肪细胞中的作用机制。

4 结 论

综上所述, 本研究首次鉴定出了鸡 *TEAD1* 基因的两个转录本, TEAD1-V1 和 TEAD1-V2。通过亚细胞定位分析 TEAD1-V1 转录本主要定位于细胞核, TEAD1-V2 转录本定位于细胞质和细胞核。过表达转录本 TEAD1-V1 和 TEAD1-V2 均能够抑制鸡前脂肪细胞增殖并促进鸡前脂肪细胞凋亡; TEAD1-V1 能抑制前脂肪细胞分化并促进前脂肪细胞迁移, 而 TEAD1-V2 对前脂肪细胞分化和迁移没有影响。

附件 见本文网络版 (<http://www.pibb.ac.cn> 或 <http://www.cnki.net>):

PIBB_20230020_Table_S1.pdf

PIBB_20230020_Table_S2.pdf

PIBB_20230020_Table_S3.pdf

参 考 文 献

- [1] Tang Q Q, Lane M D. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem*, 2012, **81**: 715-736
- [2] Khalilpourfarshbafi M, Gholami K, Murugan D D, *et al*. Differential effects of dietary flavonoids on adipogenesis. *Eur J Nutr*, 2019, **58**(1): 5-25
- [3] Ginsberg H N, MacCallum P R. The obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus pandemic: part I. Increased cardiovascular disease risk and the importance of atherogenic dyslipidemia in persons with the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *J Cardiometab Syndr*, 2009, **4**(2): 113-119
- [4] Aggarwal S, Pittenger M F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 2005, **105**(4): 1815-1822
- [5] Bu S, Yuan C Y, Xue Q, *et al*. Bilobalide suppresses adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes via the AMPK signaling pathway. *Molecules*, 2019, **24**(19): 3503
- [6] Li H, Deeb N, Zhou H, *et al*. Chicken quantitative trait loci for growth and body composition associated with transforming growth factor-beta genes. *Poult Sci*, 2003, **82**(3): 347-356
- [7] Liu R, Jagannathan R, Sun L, *et al*. Tead1 is essential for mitochondrial function in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020, **319**(1): H89-H99
- [8] Yasunami M, Suzuki K, Ohkubo H. A novel family of TEA domain-containing transcription factors with distinct spatiotemporal expression patterns. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **228**(2): 365-370
- [9] Zhang W, Xu J, Li J, *et al*. The TEA domain family transcription factor TEAD4 represses murine adipogenesis by recruiting the cofactors VGLL4 and CtBP2 into a transcriptional complex. *J Biol Chem*, 2018, **293**(44): 17119-17134
- [10] Xiao J H, Davidson I, Ferrandon D, *et al*. One cell-specific and three ubiquitous nuclear proteins bind *in vitro* to overlapping motifs in the domain B1 of the SV40 enhancer. *EMBO J*, 1987, **6**(10): 3005-3013
- [11] Wang W, Zhang T, Wu C, *et al*. immortalization of chicken preadipocytes by retroviral transduction of chicken TERT and TR. *PLoS One*, 2017, **12**(5): e0177348
- [12] Jia Z, Jin Z, Shao S, *et al*. KLF7 promotes preadipocyte proliferation via activation of the Akt signaling pathway by Cis-regulating CDKN3. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2022, **54**(10): 1486-1496
- [13] Zhang M, Li F, Ma X F, *et al*. Identification of differentially expressed genes and pathways between intramuscular and abdominal fat-derived preadipocyte differentiation of chickens *in vitro*. *BMC Genomics*, 2019, **20**(1): 743
- [14] Cui H X, Guo L P, Zhao G P, *et al*. Method using a co-culture system with high-purity intramuscular preadipocytes and satellite cells from chicken pectoralis major muscle. *Poult Sci*, 2018, **97**(10): 3691-3697
- [15] Wiper-Bergeron N, Wu D, Pope L, *et al*. Stimulation of preadipocyte differentiation by steroid through targeting of an HDAC1 complex. *EMBO J*, 2003, **22**(9): 2135-2145
- [16] Zhang Z W, Wu C Y, Li H, *et al*. Expression and functional analyses of Kruppel-like factor 3 in chicken adipose tissue. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, **78**(4): 614-623
- [17] 陈衍, 刘文超, 秦鸿雁, 等. 脂肪酸合成酶启动子在乳腺癌细胞中的转录活性分析. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, **23**(5): 429-431+435
- [18] Chen Y, Liu W C, Qin H Y, *et al*. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2007, **23**(5): 429-431+435
- [19] Duan K, Sun Y, Zhang X, *et al*. Identification and characterization of transcript variants of chicken peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Poult Sci*, 2015, **94**(10): 2516-2527
- [20] Himly M, Foster D N, Bottoli I, *et al*. The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses. *Virology*, 1998, **248**(2): 295-304
- [21] Guo L, Cui H, Zhao G, *et al*. Intramuscular preadipocytes impede differentiation and promote lipid deposition of muscle satellite cells in chickens. *BMC Genomics*, 2018, **19**(1): 838
- [22] Sun G R, Zhang M, Sun J W, *et al*. Kruppel-like factor KLF9 inhibits chicken intramuscular preadipocyte differentiation. *Br Poult Sci*, 2019, **60**(6): 790-797
- [23] Xiao J H, Davidson I, Matthes H, *et al*. Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1.

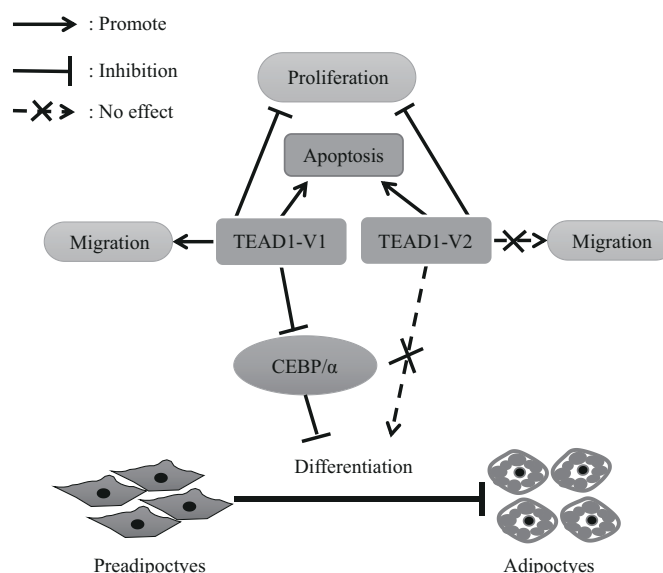
- Cell, 1991, **65**(4): 551-568
- [23] Zinatizadeh M R, Miri S R, Zarandi P K, *et al.* The Hippo tumor suppressor pathway (YAP/TAZ/TEAD/MST/LATS) and EGFR-RAS-RAF-MEK in cancer metastasis. *Genes Dis*, 2021, **8**(1): 48-60
- [24] Liu R, Lee J, Kim B S, *et al.* Tead1 is required for maintaining adult cardiomyocyte function, and its loss results in lethal dilated cardiomyopathy. *JCI Insight*, 2017, **2**(17): e93343
- [25] Chen Z, Friedrich G A, Soriano P. Transcriptional enhancer factor 1 disruption by a retroviral gene trap leads to heart defects and embryonic lethality in mice. *Genes Dev*, 1994, **8**(19): 2293-2301
- [26] Carson J A, Schwartz R J, Booth F W. SRF and TEF-1 control of chicken skeletal alpha-actin gene during slow-muscle hypertrophy. *Am J Physiol*, 1996, **270**(6 Pt 1): C1624-C1633
- [27] Peng M, Li S, He Q, *et al.* Proteomics reveals changes in hepatic proteins during chicken embryonic development: an alternative model to study human obesity. *BMC Genomics*, 2018, **19**(1): 29
- [28] Drexler R, Fahy R, Kuchler M, *et al.* Association of subcellular localization of TEAD transcription factors with outcome and progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatol*, 2021, **21**(1): 170-179
- [29] Hou N, Wen Y, Yuan X, *et al.* Activation of Yap1/Taz signaling in ischemic heart disease and dilated cardiomyopathy. *Exp Mol Pathol*, 2017, **103**(3): 267-275
- [30] Zhou Y, Huang T, Cheng A S, *et al.* The TEAD family and its oncogenic role in promoting tumorigenesis. *Int J Mol Sci*, 2016, **17**(1): 138
- [31] Osman I, He X, Liu J, *et al.* TEAD1 (TEA domain transcription factor 1) promotes smooth muscle cell proliferation through upregulating SLC1A5 (solute carrier family 1 member 5) - mediated glutamine uptake. *Circ Res*, 2019, **124**(9): 1309-1322
- [32] Zhang L, Ren F, Zhang Q, *et al.* The TEAD/TEF family of transcription factor scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev Cell*, 2008, **14**(3): 377-387
- [33] Chai J, Xu S, Guo F. TEAD1 mediates the oncogenic activities of Hippo-YAP1 signaling in osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, **488**(2): 297-302
- [34] Yuan J H, Liu X N, Wang T T, *et al.* The MBNL3 splicing factor promotes hepatocellular carcinoma by increasing PXN expression through the alternative splicing of lncRNA-PXN-AS1. *Nat Cell Biol*, 2017, **19**(7): 820-832
- [35] Grelet S, Link L A, Howley B, *et al.* A regulated PNUTS mRNA to lncRNA splice switch mediates EMT and tumour progression. *Nat Cell Biol*, 2017, **19**(9): 1105-1115
- [36] Zhang S, Kang Z, Cai H, *et al.* Identification of novel alternative splicing of bovine lncRNA lncFAM200B and its effects on preadipocyte proliferation. *J Cell Physiol*, 2021, **236**(1): 601-611
- [37] Yasunami M, Suzuki K, Houtani T, *et al.* Molecular characterization of cDNA encoding a novel protein related to transcriptional enhancer factor-1 from neural precursor cells. *J Biol Chem*, 1995, **270**(31): 18649-18654
- [38] Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, *et al.* A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **321**(4): 967-974
- [39] Wu Z, Rosen E D, Brun R, *et al.* Cross-regulation of C/EBPalpha and PPARgamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*, 1999, **3**(2): 151-158
- [40] Umek R M, Friedman A D, Mcknight S L. CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science*, 1991, **251**(4991): 288-292
- [41] Lin T, Zhang Y, Zhang T, *et al.* Hop2 interacts with the transcription factor CEBPalpha and suppresses adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 2021, **297**(5): 101264
- [42] Sun Y, Zhai G, Li R, *et al.* RXRalpha positively regulates expression of the chicken PLIN1 gene in a PPARgamma-independent manner and promotes adipogenesis. *Front Cell Dev Biol*, 2020, **8**: 349
- [43] Garin-Shkolnik T, Rudich A, Hotamisligil G S, *et al.* FABP4 attenuates PPARgamma and adipogenesis and is inversely correlated with PPARgamma in adipose tissues. *Diabetes*, 2014, **63**(3): 900-911
- [44] Johnson J M, Edwards S, Shoemaker D, *et al.* Dark matter in the genome: evidence of widespread transcription detected by microarray tiling experiments. *Trends Genet*, 2005, **21**(2): 93-102
- [45] Jacquemin P, Hwang J J, Martial J A, *et al.* A novel family of developmentally regulated mammalian transcription factors containing the TEA/ATTS DNA binding domain. *J Biol Chem*, 1996, **271**(36): 21775-21785

Identification of TEAD1 Transcripts and Functional Analysis in Chicken Preadipocytes*

PENG Min, XU Hu, JIA Zi-Qiu, YANG Qing-Zhu, PAN Lin, WANG Wei-Yu,
KONG Ling-Zhe, SUN Ying-Ning**

(Department of Biotechnology, College of Life Science and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Although expression of the TEAD1 protein in preadipocytes has been established, its function remains unclear. In this study, we sought to detect transcripts of TEAD1 in chicken and to examine the effects of this protein on the proliferation, migration, apoptosis, and differentiation of immortalized chicken preadipocyte cell lines (ICP1). **Methods** The full-length sequence of the TEAD1 gene was cloned and the two transcripts were subjected to bioinformatics analysis. The subcellular localization of TEAD1 transcripts was determined based on indirect immunofluorescence. The effects of TEAD1 transcripts overexpression on the proliferation of ICP1 cells were examined by RT-qPCR, CCK-8, and EdU assays; the effects of TEAD1

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31402061), the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (YQ2019C025), and the Basic Scientific Research Operating Expenses of Heilongjiang Provincial Institutions of Higher Learning (145109211).

** Corresponding author.

Tel: 86-13796882551, E-mail: SunYN@qqhru.edu.cn

Received: January 15, 2023 Accepted: April 10, 2023

transcripts on ICP1 cells migration were examined based on the scratch test; and the effects of TEAD1 transcripts overexpression on ICP1 cells apoptosis were analyzed using apoptosis-Hoechst staining and RT-qPCR. The expression of TEAD1 transcripts in different tissues, cells lines, and ICP1 at different periods of differentiation was analyzed by RT-qPCR. The effects of TEAD1 transcripts overexpression on lipid droplet accumulation and adipogenic-related gene expression in ICP1 cells were analyzed based on Oil Red O and BODIPY staining, RT-qPCR, Western blot, and dual-luciferase reporter gene assays. Finally, the content of triglyceride (TG) was measured in TEAD1 overexpressed ICP1 cells. **Results** The full-length TEAD1 was cloned and two TEAD1 transcripts were identified. The TEAD1-V1 protein was found to be localized primarily in the cell nucleus, whereas the TEAD1-V2 protein is localized in the cell cytoplasm and nucleus. The overexpression of both TEAD1-V1 and TEAD1-V2 significantly inhibited the proliferation of ICP1 cells. Whereas the overexpression of TEAD1-V1 promoted ICP1 cell migration, the overexpression of TEAD1-V2 had no significant effects on ICP1 migration; the overexpression of both TEAD1-V1 and TEAD1-V2 significantly promoted the apoptosis of ICP1 cells. We found that the different transcripts of TEAD1 have similar expression pattern in different tissues and cells lines. During induced preadipocyte differentiation, the expression of these genes initially declined, although subsequently increased. Overexpression of TEAD1-V1 promoted a significant reduction in lipid droplet formation and inhibited C/EBP α expression during the differentiation of ICP1 cells ($P<0.05$). However, the overexpression of TEAD1-V2 had no significant effect on lipid droplet accumulation or the expression of adipogenic-related proteins ($P>0.05$). Overexpression of TEAD1-V1 significantly decreased triglyceride content in ICP1 cells ($P<0.05$), while overexpression of TEAD1-V2 had no effect on triglyceride content in ICP1 cells ($P>0.05$). **Conclusion** In this study, for the first time, identified two TEAD1 transcripts. Overexpressed transcripts TEAD1-V1 and TEAD1-V2 both inhibited the proliferation of chicken preadipocytes and promoted apoptosis of chicken preadipocytes. TEAD1-V1 inhibited the differentiation of preadipocytes and promoted the migration of preadipocytes, while TEAD1-V2 had no effect on the differentiation and migration of preadipocytes.

Key words TEAD1, chicken, transcript, ICP1

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0020