

A β 通过 Ash1l 上调 H3K4 二甲基化水平抑制 BDNF 表达并介导海马神经元损伤

刘 琪 徐志伟 王立群 朱宗红

摘 要 **目的** 在 A β 处理海马神经元后,观测 H3K4 甲基化水平的变化,以及 BDNF 表达和神经元死亡的变化。**方法** 在 A β 处理后,用蛋白免疫印迹以及染色质免疫共沉淀方法检测神经元中总 H3K4 甲基化水平和 BDNF 启动子 H3K4 甲基化水平。在 siRNA 敲减 Ash1l 后,通过荧光定量 PCR 和酶联免疫吸附的方法检测 BDNF 表达。同时,使用 MTT 实验检测敲减 Ash1l 后 A β 诱导海马神经元损伤的改变。**结果** 在 A β 处理海马神经元后,BDNF 启动子和总 H3K4 甲基化水平均显著上升,而敲减 Ash1l 可以阻止这一现象。另外,在敲减 Ash1l 后,A β 诱导的 BDNF 表达下调被抑制,同时海马神经元损伤也得到缓解。**结论** Ash1l 蛋白被发现可以在 A β 多肽下游调节 BDNF 启动子区的 H3K4Me2 水平,通过抑制 BDNF 的表达促进神经元的死亡。

关键词 A β 多肽 H3K4 二甲基化 脑源性神经营养因子 海马神经元 阿尔茨海默病

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.08.008

Upregulation of Ash1l – dependent H3K4Me2 Level to Inhibit BDNF Expression and Mediate Hippocampal Neuron Damage. Liu Qi, Xu Zhiwei, Wang Liqun, et al. PLA Navy General Hospital, Beijing 100048, China

Abstract **Objective** To explore the level of H3K4Me2, BDNF expression and the damage of hippocampal neurons after administration of A β . **Methods** The levels of H3K4Me2 in neurons and BDNF promoter were analyzed by Western blot and chromatin immunoprecipitation after treatment with A β . And the level of BDNF expression was measured by real – time quantitative PCR and ELISA after knocking down Ash1l by siRNAs. Moreover, the survival of hippocampal neurons was analyzed by MTT assays. **Results** A β increased the levels of H3K4Me2 in neurons and BDNF promoter, which were inhibited by Ash1l knock – down. Additionally, the reduction of mRNA and protein levels of BDNF by A β was also prevented after knocking down Ash1l. Moreover, Ash1l knock – down significantly improved the survival of hippocampal neurons after administration of A β . **Conclusion** A β up – regulates the H3K4Me2 level via Ash1l to inhibit BDNF expression and further mediate hippocampal neuron damage.

Key words A β ; H3K4Me2; BDNF; Hippocampal neuron; Alzheimer' disease

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最常见的神经退行性疾病,其临床特征表现为认知和记忆的退行性损伤。而老年斑和神经原纤维缠结则作为 AD 的主要病理特征通常用于 AD 的辅助诊断^[1]。其中,老年斑主要由 β – 淀粉样蛋白 (amyloid – β /A β peptides) 在细胞外聚集而成。据报道,遗传或环境的因素可引起 A β 在患者脑内大量积累并聚集,而寡聚体形式的 A β 具有显著的细胞毒性,导致突触和神经元的功能失常以及死亡,被认为参与 AD 的发病过程^[2, 3]。然而,对于 A β 参与 AD 患者的神

经元损伤的具体机制目前研究得还不是很透彻。

脑源性神经营养因子 (brain – derived neurotrophic factor, BDNF), 是一种广泛分布在脑中并具有神经营养作用的蛋白质,其功能主要为调节神经元的发育和生存^[4]。因此,BDNF 的表达水平的改变抑或其与受体 TrkB 相互作用所介导的信号通路的失常很可能导致神经元及突触的损伤,并进一步造成认知功能障碍。而在 AD 患者体内,BDNF 的 mRNA 及其蛋白质的表达有显著地降低^[5, 6]。另外,BDNF 基因 Val66Met 的位点改变会降低机体 BDNF 的表达水平,增加罹患 AD 风险^[7]。这些事实表明 BDNF 的水平在 AD 的发病机制中起重要作用,并很有可能成为 AD 治疗的潜在靶点。

作为基因组表观遗传修饰的一种,组蛋白的甲基化在调控染色质形态以及基因表达中发挥着重要作用。其中,组蛋白 H3 的第 4 个赖氨酸残基 (histone 3

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81271206)

作者单位:100048 北京,中国人民解放军海军总医院 (刘琪,朱宗红);100850 北京,中国人民解放军军事医学科学院 (徐志伟);210002 南京,中国人民解放军南京军区南京总医院 (王立群)

通讯作者:朱宗红,电子信箱:labsci64532718@sina.com

lysine 4, H3K4), 在全基因组范围内的标记与启动子和增强子序列的转录调控和表观遗传标记广泛相关^[8]。迄今为止, 编码 H3K4 特异性赖氨酸甲基转移酶或脱甲基酶的 5 个基因中的突变已经与发育障碍和认知受损有关^[9]。此外, 有证据表明, 人类大脑皮质中的 H3K4 甲基化的水平在神经系统疾病中发生改变^[10]。然而, 对于 H3K4 位点的甲基化是否参与 BDNF 在脑内表达水平的调控进而参与 AD 的发生、发展还未有研究。

Ash11 是一类组蛋白甲基转移酶, 被报道参与基因组通过 H3K4 甲基化的水平的调控^[11]。通过小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 的方法敲减 Ash11 表达可以显著抑制其在细胞中的下游信号^[12]。本研究通过在海马神经元中孵育 A β 多肽探究其对于 BDNF 启动子区组蛋白 H3 甲基化水平的影响, 并通过 siRNA 敲减 Ash11 蛋白表达检测 BDNF 的表达以及 A β 多肽介导的海马神经元存活变化。

材料与方法

1. 细胞培养: 原代培养的海马神经元取材于孕 16.5 天的 SD 大鼠。在胰酶消化海马组织后, 细胞被接种于 DMEM + 20% 胎牛血清 (美国 Gibco 公司) 培养液中。待细胞贴壁后, 将培养液换为 Neurobasal (美国 Invitrogen 公司) 培养液。实验前, 在含有 5% 的 CO₂ 的培养箱中 37℃ 培养 7~9 天。

2. 海马神经元的药物处理及转染: A β 多肽在给药实验中的处理浓度为 5 μ mol/L, 处理时间分别为 4、8、12、24 和 48h。siRNA 的转染浓度为 100nmol/L, 在与 lipofectamine 2000 充分混匀后, 室温静置 20min, 滴加在海马神经元中。在 siRNA 的敲减 48h 后, 进行蛋白质检测或加药实验。

3. 染色质免疫共沉淀: 神经元在 A β 多肽处理 24h 后, 使用甲醛进行交联。随后, 将细胞裂解并超声断裂基因组, 再在裂解液中加入 H3K4Me2 抗体 (2 μ g), 4℃ 孵育过夜。第 2 天, 加入 protein A/G 的磁珠, 继续 4℃ 孵育 2h。通过洗涤去除非特异结合后, 将蛋白和 DNA 复合物从磁珠上洗脱下来, 并解交联、消化蛋白。DNA 通过氯仿法抽提后, 通过实时荧光定量 PCR 分析。

4. 反转录和实时荧光定量 PCR: 海马神经元由 Trizol (美国 Sigma 公司) 收集, 并通过酚氯仿法提取出细胞中的总 RNA。RNA 通过随机引物 (美国 Promega 公司) 和反转录酶 (美国 Promega 公司) 反转为 cDNA, BDNF 的 mRNA 通过 SYBR Green 法进行荧光

实时定量。BDNF 的引物为: 上游引物: 5' - CTACGAGACCAAGTGCAATCC - 3'; 下游引物: 5' - AATCGCCAGCCAATTCTCTTT - 3'。BDNF 启动子的引物为: 上游引物: 5' - GTACATAAAATCTGGGGGT-TCTGGG - 3'; 下游引物: 5' - AGTCTTAAAGCAAG-GAACAACGTATTT - 3'。 β -actin 的引物为: 上游引物: 5' - CCTCGCCTTTGCCGATCCG - 3'; 下游引物: 5' - ATGCCGGAGCCGTTGTCTG - 3'。

5. 蛋白免疫印迹: 海马神经元经过裂解缓冲液 (碧云天) 处理后得到总蛋白。蛋白先通过 12% SDS-PAGE 分离电泳, 再将蛋白从胶上转移至 PVDF 膜上。H3K4Me2、H3K3Me2、H3K27Me2 以及 H3 抗体的稀释比例均为 1:1000, 孵育条件为 4℃ 过夜。再经过 PBS 漂洗后, 室温孵育二抗 (比例为 1:5000) 2h。再次经过 PBS 漂洗后进行显色反应。

6. 酶联免疫吸附实验: 海马神经元上清中的 BDNF 蛋白由 BDNF 酶联免疫吸附试剂盒 (英国 Abcam 公司) 检测, 实际 BDNF 蛋白质量通过建立的标准曲线计算得出。

7. MTT 实验: 在 A β 多肽处理 72h 后, 将神经元培养液置换为 PBS, 并加入 MTT 试剂 37℃ 孵育 6~8h。随后加入 DMSO 溶剂细胞表面结晶, 通过酶标仪检测各个样品的 570nm 吸收峰, 并计算神经元的存活率。

8. 试剂与抗体: A β 多肽 (英国 Tocris 公司 1428), Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司 11668019), H3K4Me2 抗体 (英国 Abcam 公司 ab7766), H3K9Me2 抗体 (英国 Abcam 公司 ab1220), H3K27Me2 抗体 (英国 Abcam 公司 ab24684), H3 抗体 (英国 Abcam 公司 ab18521), siRNA (美国 Santa Cruz 公司 sc-105100)。

9. 统计学方法: 所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示, 采用 GraphPad Prism 5.0 进行统计学分析。多组之间的比较使用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 或者双因素方差分析 (two-way ANOVA)。单因素方差事后分析采用 Tukey's 法进行两两组的比较, 而双因素方差事后分析采用 Bonferroni 法进行两两组的比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. A β 导致海马神经元 H3K4 甲基化水平增高: 为了研究在 AD 发展过程中神经元中 H3K4 甲基化水平的变化, 笔者给予原代培养的海马神经元 A β 多肽刺激。实验结果显示, 随着 A β 处理时间的增加, 海马神经元的 H3K4 二甲基化 (H3K4Me2) 水平逐渐

上升,并在 24h 达到峰值(图 1 中 A 和 B)。而在此期间,H3K9 的二甲基化(H3K9Me2)以及 H3K27 的二

甲基化(H3K27Me2)水平并没有发生显著改变(图 1 中 A、C 和 D)。

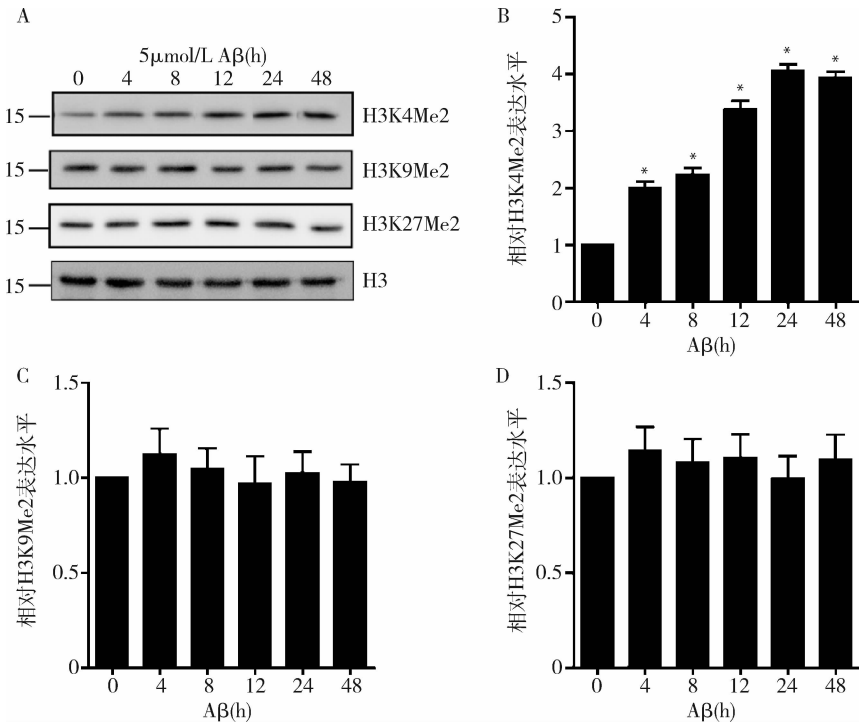


图 1 Aβ上调海马神经元中 H3K4 二甲基化水平

A. Western blot 法检测结果;B. H3K4Me2 Western blot 法灰度值分析;C. H3K9Me2 Western blot 法灰度值分析;D. H3K27Me2 Western blot 法灰度值分析。与 0h 组比较,**P* = 0.000

2. 敲减 Ash1l 蛋白显著抑制 Aβ 诱导的 H3K4 甲基化水平增高:为了探究 Ash1l 蛋白是否参与 Aβ 诱导的神经元中 H3K4 二甲基化的修饰,在细胞中导入 siRNA 以敲减 Ash1l 的表达水平。如图 2A 和 C 示,在海马神经元中导入 siAsh1l-1 和 siAsh1l-2 的 48h 后,Ash1l 的

蛋白质表达水平显著下调。单独敲减 Ash1l 蛋白并不显著改变海马神经元中 H3K4 二甲基化的修饰(图 2 中 B 和 D)。然而,相对于对照 siRNA (siNC),siAsh1l-1 在转入神经元后则可以在很大程度上阻止 Aβ 诱导的 H3K4Me2 水平的上升(图 2 中 B 和 D)。

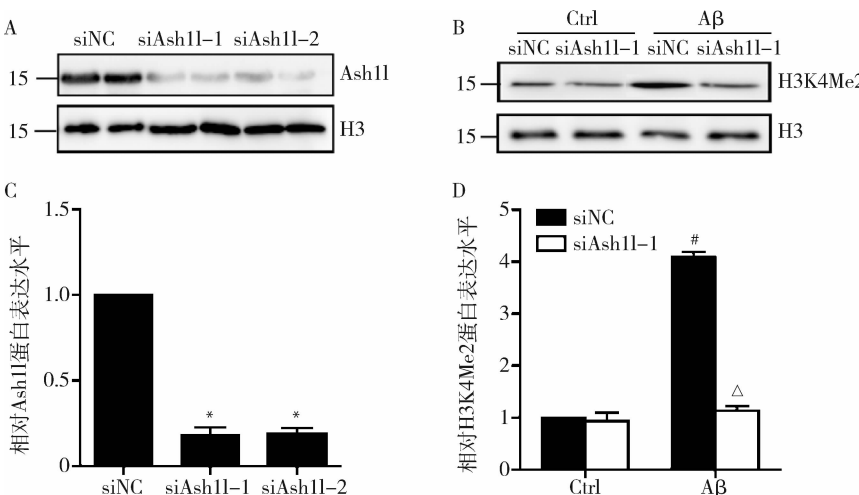


图 2 敲减 Ash1l 抑制 Aβ 诱导的 H3K4 二甲基化水平增高

A ~ B. Western blot 法检测结果;C. Ash1l 敲减 Western blot 法灰度值分析;D. 敲减 Ash1l 后 Aβ 诱导 H3K9Me2 Western blot 法灰度值分析。与 siNC 比较,**P* = 0.000;与 siNC - Ctrl 比较,#*P* = 0.000;与 siNC - Aβ 比较,Δ*P* < 0.01

3. 敲减 Ash11 蛋白介导海马神经元中 BDNF 表达上升:为了探究 A β 是否会引起 BDNF 启动子区 H3K4 的甲基化修饰的增加,笔者通过染色质免疫共沉淀的方法检测了 BDNF 启动子区的 H3K4Me2 水平。实验结果显示,在给予海马神经元 A β 处理后,由 H3K4Me2 抗体共沉淀下来的 BDNF 启动子区片段显著增加(图 3A)。同时,在神经元导入 siAsh11-1 敲减 Ash11 蛋白后,A β 多肽引起的 BDNF 启动子区

的 H3K4Me2 水平升高则被显著抑制(图 3A)。另外,为了探明 H3K4 的甲基化修饰对于 BDNF 表达水平的影响,笔者分别通过去实时荧光定量 PCR 和酶联免疫吸附法测定 BDNF 的 mRNA 和蛋白质的水平。如图 3B 和 C 示,在 A β 处理后,BDNF 的 mRNA 和蛋白质的水平有显著地降低,而在进一步敲减 Ash11 蛋白后,BDNF 的 mRNA 和蛋白质的水平的降低则被有效抑制(图 3 中 B 和 C)。

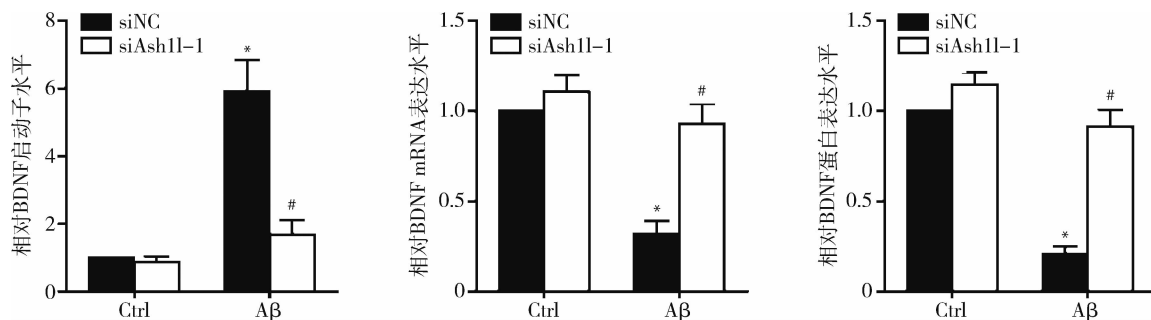


图 3 敲减 Ash11 抑制 A β 诱导 BDNF 表达降低

A. BDNF 启动子染色质免疫共沉淀结果;B. BDNF 的 qPCR 结果;C. BDNF 的 ELISA 结果;

与 siNC - Ctrl 比较,* $P=0.000$;与 siNC - A β 比较,# $P=0.000$

4. 敲减 Ash11 蛋白抑制 A β 诱导海马神经元的死亡:为进一步探究 A β 多肽所调节 BDNF 的表达的功能,笔者通过 MTT 法检测了在给予 A β 处理以及敲减 Ash11 蛋白之后海马神经元的存活情况。MTT 的结果显示,在 A β 处理 72h 之后,神经元的死亡率显著上升。另外,单独敲减 Ash11 蛋白并不影响海马神经元的存活。然而,在 A β 多肽处理的神经元中导入 siAsh11-1 后,则可以极大程度上阻止 A β 诱导的神经元损伤(图 4)。

内最为广泛存在的神经营养因子,对于神经元存活的维持尤为重要。而在 AD 患者的脑部,其表达水平却显著下降。更值得关注的是,组蛋白的甲基化调控同样也在神经系统疾病中发挥重要功能。因而,探究甲基化水平是否可以调控 BDNF 的表达对于认识 AD 的发生、发展过程中 BDNF 的水平降低,进而理解神经元死亡机制具有重要意义。

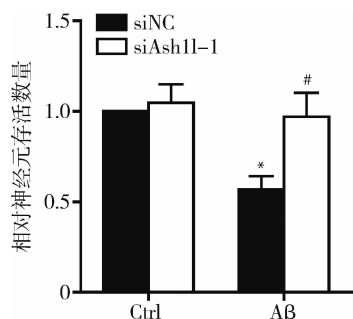


图 4 敲减 Ash11 抑制 A β 诱导神经元死亡

与 siNC - Ctrl 比较,* $P<0.01$;与 siNC - A β 比较,# $P<0.05$

讨 论

A β 介导的神经元损伤被认为在 AD 的发生、发展过程中具有重要作用,但是对于其参与 AD 患者神经元损伤的机制目前还未明晰。另外,BDNF 作为脑

本次研究中笔者通过给予海马神经元 A β 多肽处理建立了 AD 细胞模型。在实验过程中笔者发现,神经元中 H3K4 的二甲基化水平随着 A β 多肽处理时间逐渐上升,而敲减 Ash11 蛋白则可以抑制这一现象。另外,BDNF 启动子区的 H3K4Me2 的水平也被 A β 多肽诱导增加。在敲减 Ash11 蛋白之后,A β 介导 BDNF 的表达水平降低被极大程度抑制,同时 A β 介导的神经元死亡也得到缓解。这些结果提示,A β 多肽可通过 Ash11 蛋白调节 BDNF 启动子区的 H3K4 二甲基化水平,进而抑制 BDNF 的表达,导致神经元的死亡,提示可以通过调节甲基化水平影响 BDNF 等神经营养因子的表达,达到延缓 AD 发展的目的。

氧化应激及其作用早在 MCI 患者中就已经被发现。在 MCI 的受试者脑中,蛋白质氧化/硝化的氧化应激标志物,如蛋白质羰基和 3-硝基酪氨酸的水平显著升高^[13]。同时,A β 多肽的寡聚体可以插入细胞

膜的脂质双分子层并成为诱导过氧化物酶的来源,引发脂质过氧化。另外,基因组中组蛋白的甲基化水平也受到细胞氧化应激的调控^[14~16]。因此,探究细胞氧化应激是否参与 A β 多肽调节 BDNF 启动子的 H3K4 甲基化对于理解 AD 患者中 BDNF 水平的变化具有重要意义。另外,笔者发现 A β 多肽可以通过启动子区的甲基化水平调节 BDNF 的表达,但是被 A β 调节的 BDNF 是如何影响神经元死亡目前还不是很清楚。根据文献报道,BDNF 的生物学功能一般通过与其受体 TrkB 相互作用实现^[17,18]。而 TrkB 的激活则可影响包括 MEK、PI₃K 和 PLC γ 等信号途径进而调控神经元的生长、分化及存活,为后续实验工作提供了理论依据^[19,20]。

本研究中 Ash11 蛋白首次被发现可以在 A β 多肽下游调节 BDNF 启动子区的 H3K4Me2 水平,通过抑制 BDNF 的表达促进神经元的死亡,促进进一步理解甲基化对于基因调节的功能,同时为临床靶向 BDNF 改善 AD 病症提供了理论基础。

参考文献

- Wang L, Benzinger TL, Hassenstab J, *et al.* Spatially distinct atrophy is linked to beta - amyloid and tau in preclinical Alzheimer disease [J]. *Neurology*, 2015, 84(12):1254 - 1260
- Sevigny J, Chiao P, Bussière T, *et al.* The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2016, 537(7618): 50 - 56
- Yan R, Vassar R. Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy [J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(3): 319 - 329
- Adachi N, Numakawa T, Richards M, *et al.* New insight in expression, transport, and secretion of brain - derived neurotrophic factor; implications in brain - related diseases [J]. *World J Bio Chem*, 2014, 5(4): 409
- Nagata T, Kobayashi N, Shinagawa S, *et al.* Plasma BDNF levels are correlated with aggressiveness in patients with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2014, 121(4):433 - 441
- Phillips HS, Hains JM, Armanini M, *et al.* BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease [J]. *Neuron*, 1991, 7(5):695 - 702
- Boiocchi C, Maggioli E, Zorretto M, *et al.* Brain - derived neurotrophic factor gene variants and Alzheimer disease; an association study in an Alzheimer disease Italian population [J]. *Rejuvenation Res*, 2013, 16(1):57 - 66
- Cao F, Townsend E, Karatas H, *et al.* Targeting MLL1 H3K4 methyltransferase activity in mixed - lineage leukemia [J]. *Mol cell*, 2014, 53(2): 247 - 261
- Ronan JL, Wu W, and Crabtree GR. From neural development to cognition: unexpected roles for chromatin [J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(5):347 - 359
- Shulha HP, Cheung I, Whittle C, *et al.* Epigenetic signatures of autism: trimethylated H3K4 landscapes in prefrontal neurons [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2012, 69(3):314 - 324
- Xia M, Liu J, Wu X, *et al.* Histone methyltransferase Ash11 suppresses interleukin - 6 production and inflammatory autoimmune diseases by inducing the ubiquitin - editing enzyme A20 [J]. *Immunity*, 2013, 39(3):470 - 481
- Bei Y, Tianqian H, Fanyuan Y, *et al.* ASH1L suppresses matrix metalloproteinase through mitogen - activated protein kinase signaling pathway in pulpitis [J]. *J Endodontics*, 2017, 43(2):306 - 314
- Barone E, Di Domenico F, Cenini G, *et al.* Oxidative and nitrosative modifications of biliverdin reductase - A in the brain of subjects with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment [J]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 25(4):623 - 633
- Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, *et al.* Evidence that amyloid beta - peptide - induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death [J]. *Neurobiol Aging*, 2002, 23(5):655 - 664
- Niu Y, DesMarais TL, Tong, Z, *et al.* Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation [J]. *Free Rad Biol Med*, 2015, 82(1): 22 - 28
- Kang KA, Hyun JW. Oxidative stress, Nrf2, and epigenetic modification contribute to anticancer drug resistance [J]. *Toxicol Res*, 2017, 33(1):1
- Ding YX, Xia Y, Jiao XY, *et al.* The TrkB - positive dopaminergic neurons are less sensitive to MPTP insult in the substantia nigra of adult C57/BL mice [J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(10):1759 - 1766
- Andero R, Choi DC, Ressler KJ. BDNF - TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2014, 122(1): 169 - 192
- Réus GZ, Abaleira HM, Titus SE, *et al.* Effects of ketamine administration on the phosphorylation levels of CREB and TrkB and on oxidative damage after infusion of MEK inhibitor [J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 68(1): 177 - 184
- Luo L, Liu XL, Li J, *et al.* Macranthol promotes hippocampal neuronal proliferation in mice via BDNF - TrkB - PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 762(1):357 - 363

(收稿日期:2017 - 07 - 17)

(修回日期:2017 - 09 - 02)