DOI:10.16016/j.2097-0927.202307024

叶酸缺乏影响胚胎干细胞 H3K9 巴豆酰化和神经发育相关基因表达

陈 晨[1],何学佳[2],王 珊[1] 100020 北京,首都儿科研究所,生物化学与免疫学研究室[1];北京大学首都儿科研究所教学医院,生物化学与免疫学研究室[2]

[摘要] **目的** 采用染色质免疫共沉淀测序技术(chromatin immunoprecipitation sequencing,ChIP-seq)分析叶酸正常小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)与叶酸缺乏 mESCs 组蛋白 H3K9 巴豆酰化(H3K9cr)修饰的全基因图谱,以期探究叶酸缺乏条件下 mESCs 中 H3K9cr 全基因组状态变化以及受到调控的通路基因。**方法** mESCs 分为叶酸正常组(FA=4 mg/L,FA4)和叶酸缺乏组(FA=0 mg/L,FA0),利用 Western blot 和免疫组织化学染色分别检测叶酸缺乏 mESCs 和神经管畸形(neural tube defects,NTDs)小鼠胚脑组织中 H3K9cr 蛋白表达水平;利用 ChIP-seq 技术对获得的特异性结合的 DNA 片段展开序列鉴定,对差异表达基因进行基因本体论(gene ontology,GO)以及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路分析并可视化,分析叶酸缺乏条件下 mESCs 全基因组并对受调控基因进行验证。**结果** 叶酸缺乏 mESCs 和 NTDs 小鼠胚脑组织中整体 H3K9cr 水平降低($P<0.05$),叶酸缺乏 mESCs 中 *Bdnf*、*Pax6*、*App* 等神经发育相关基因下调($P<0.05$),FA4 与 FA0 两组差异富集基因的 KEGG 通路富集于轴突引导、神经活性配体-受体相互作用、谷氨酸能突触等与神经系统相关的通路。**结论** 胚胎干细胞中叶酸缺乏通过 H3K9cr 修饰参与调控神经发育相关基因,提示组蛋白巴豆酰化修饰可能参与叶酸缺乏引起的神经发育类疾病。

[关键词] 叶酸缺乏;组蛋白巴豆酰化;ChIP-seq;神经发育

[中图法分类号] Q563.8; R321.5; R322.8 [文献标志码] A

Folic acid deficiency affects H3K9 crotonylation and neurodevelopment-related gene expression in embryonic stem cells

CHEN Chen[1], HE Xuejia[2], WANG Shan[1] [1]Labaratory of Biochemistry and Immunology, Capital Institute of Pediatrics, Beijing, 100020; [2]Labaratory of Biochemistry and Immunology, Capital Institute of Pediatrics, Peking University Teaching Hospital, Beijing, 100020, China

[**Abstract**] **Objective** To analyze the genome-wide profiles of H3K9 crotonylation (H3K9cr) in mouse embryonic stem cells (mESCs) in normal or deficient folic acid (FA) by chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) in order to observe the genome-wide changes in H3K9cr status and the regulated pathway genes under FA deficiency condition. **Methods** The mESCs were divided into normal FA group (4 mg/L, FA4) and FA deficient group (0 mg/L, FA0). Western blotting and immunohistochemical (IHC) assay were used to detect the protein level of H3K9cr in the FA deficient mESCs and the embryonic brain tissues of neural tube defects (NTDs) mice, respectively. ChIP-seq technology was carried out for sequence identification of the obtained specific binding DNA fragments. Differentially expressed genes (DEGs) were analyzed and visualized by gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82071690);首都儿科研究所所级基金(FX-2020-05,CXYJ-2-21-09)

[通信作者] 王 珊,E-mail: wsaquarius@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议( )

genomes (KEGG) pathways, with the aim of analyzing the whole genome of mESCs with FA deficiency and validating the regulated genes. **Results** Overall H3K9cr level was significantly lower in the FA deficient mESCs and the embryonic brain tissues of NTDs mice than in the corresponding normal FA mESCs and mice ($P<0.05$). Neurodevelopmental-related genes such as *Bdnf*, *Pax*6, and *App* were down-regulated in the FA deficient mESCs ($P<0.05$). The KEGG pathway analysis indicated that the DEGs were concentrated in axon-guiding, neuroactive ligand-receptor interaction, glutaminergic synapses and other nervous system-related pathways. **Conclusion** FA deficiency in embryonic stem cells participates in the regulation of neurodevelopmental genes through modification of H3K9cr, suggesting that the modification of histone crotonylation may be involved in neurodevelopmental diseases induced by FA deficiency.

[**Key words**] folic acid deficiency; histone crotonylation; ChIP-seq; neurogenesis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82071690) and the Fund of Capital Institute of Pediatrics (FX-2020-05, CXYJ-2-21-09). Corresponding author: WANG Shan, E-mail: wsaquarius@163.com

表观遗传学被定义为在 DNA 序列没有变化的情况下发生的基因功能的可遗传变化,包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和染色质重塑等。组蛋白的翻译后修饰参与转录调控、染色质动力学和发育等多种生物事件,是重要表观遗传学机制[1]。常见的组蛋白翻译后修饰有组蛋白甲基化、乙酰化、磷酸化、ADP-核糖基化、泛素化[2]。随着质谱技术的发展,越来越多的组蛋白修饰(尤其是赖氨酸酰基化修饰)被发现,如苯甲酰化修饰、乳酰化修饰、巴豆酰化修饰等,极大拓宽了人们对表观遗传领域的认识。组蛋白赖氨酸巴豆酰化(lysine crotonylation,Kcr)是由组蛋白巴豆酰转移酶(histone crotonyltransferases,HCTs)以巴豆酰辅酶 A(crotonyl-coenzymeA,crotonyl-CoA)为底物,催化巴豆酰基团转移到赖氨酸残基上的一种修饰[3]。组蛋白 Kcr 修饰被证实与基因转录调控、生殖调控、DNA 损伤修复等生物学过程相关[4]。另外,组蛋白 Kcr 也在多种临床研究中发挥着重要作用,比如急性肾损[5]、抑郁症[6]、HIV 感染[7]和恶性肿瘤[8]等。

叶酸属于维生素 B 族,主要以被还原后生成的四氢叶酸发挥生物学功能。四氢叶酸作为一碳单位的运载体,在嘌呤和嘧啶合成、氨基酸相互转化中具有重要作用;叶酸参与血红蛋白结构的形成,是骨髓造血过程不可缺少的物质;在甲硫氨酸循环中,叶酸缺乏导致同型半胱氨酸升高和 S-腺苷甲硫氨酸减少,后者是体内重要的甲基供体。

染色质免疫共沉淀测序技术(chromatin immunoprecipitation sequencing,ChIP-seq)是近几年发展起来的基因组学研究领域的重要技术,被广泛地应用于表观遗传学的研究中。ChIP-seq 可以全面、准确地检测与组蛋白、转录因子等结合的 DNA 片段。

本课题组前期研究通过低叶酸饮食结合腹腔内注射抗叶酸药物甲氨蝶呤(methotrexate,MTX)构建了低叶酸致神经管畸形(neural tube defects,NTDs)小鼠模型,免疫组化发现相比于正常组织,低叶酸致 NTDs 小鼠胚胎脑组织中 crotonyl-CoA 合成酶-酰基辅酶 A 合成酶短链家族成员 2(acyl-CoA synthetase short-chain family member 2,ACSS2)和泛巴豆酰化修饰(Kcr)表达均发生显著变化,说明叶酸代谢对组蛋白 Kcr 修饰具有调控作用。本实验利用叶酸缺乏组(0 mg/L;FA0)和叶酸正常组(4 mg/L;FA4)小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells,mESCs)模型,基于 ChIP-seq 技术从基因组范围内对组蛋白 H3K9cr 全面的进行分析,对叶酸缺乏调控组蛋白 H3K9cr 修饰进行深入探讨,为神经系统发育性疾病机制的进一步研究提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 6~8 周龄 32 只雌 C57BL/6J 小鼠、16 只雄 C57BL/6J 小鼠均购自北京维通利华生物科技有限公司,体质量 19~22 g 在特定的无病原体条件下保持标准的光/暗循环。

1.1.2 细胞来源 mESCs Sv/129 细胞系来自首都儿科研究所细胞库[9]。

1.2 NTDs 小鼠模型制备

随机选取 16 只雌性、8 只雄性小鼠为实验组,其余小鼠为对照组。实验组雌性小鼠喂食低叶酸饲料,实验组雄性小鼠和对照组小鼠喂食正常饲料,持续 4 周。雌、雄鼠按 2∶1的比例合笼夜间交配(12 h)后在早上 8:00 检查阴道栓并定为孕 0.5 d(E0.5)。于孕

7.5 d(E7.5)腹腔注射 1.5 mg/kg 的 MTX 建立 NTDs 小鼠模型,对照组小鼠腹腔注射等量无菌注射用水。孕鼠交配后于孕 13.5 d(E13.5)剖取 NTDs 胚胎和正常胚胎。本研究中使用的所有方案经过首都儿科研究所伦理委员会批准(批件号:DWLL2021011),涉及动物处理的程序符合实验动物护理机构的指南。具体方法可参考文献[10]。

1.3 组蛋白的提取

培养皿洗涤 3 次后向其中加入 800 μL 的 Hypotonic Buffer,将细胞刮下后转移到离心管中,以 4 ℃,18 895×*g*,5 min 的条件离心,弃上清,向沉淀中加入 600 μL 浓度为 0.2 mol/L 的硫酸,同样条件离心,360°旋转 12 h 后再次离心,将上清液转移至新 EP 管中,加入 198 μL 的 TCA,冰上放置 30 min 后离心,18 895×*g*,5 min,弃上清,向每个 EP 管中加入 1 mL 的丙酮,重复离心,弃上清,将含有沉淀的 EP 管放置在冰上 30 min,用超纯水进行溶解。

1.4 Western blot

组蛋白萃取物先在 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶上通过电泳分离(先 80 V 后 120 V),后通过湿转法(220 mA)转到 PVDF 膜上,封闭 1 h 后 TBST 洗膜,10 min/次,3 次,将膜孵育在一抗(PTM-516RM,景杰,1∶2 000)中 4 ℃过夜,TBST 洗 3 次后用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的二抗(ab205718,Abcam,1∶5 000)室温孵育 1 h,再用 TBST 洗 3 次,最后进行条带显影和图像采集。

1.5 免疫组织化学

用 4%多聚甲醛固定胎鼠脑组织。48 h 后,PBS 洗涤,脱水,石蜡包埋,切片,再次洗涤。随后,将这些组织溶解在乙醇中洗涤。组织抗原修复。用 5%山羊血清阻断。H3K9cr(稀释度 1∶100;基因)作为一抗,4 ℃过夜。对载玻片进行质量评估,包括阴性对照。一抗用 10%正常山羊血清代替,排除非特异性信号。

1.6 叶酸缺乏细胞模型制备

制备叶酸缺乏组细胞的培养基,命名为 FA0 组:在 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基中添加 15%胎牛血清、0.1 mmol/L β-巯基乙醇、0.1 mmol/L 非必需氨基酸、0.1 mmol/L 谷氨酸、1 000 U/mL 小鼠白血病抑制因子。叶酸正常组细胞的培养基需额外添加浓度为 4 mg/L 叶酸,命名为 FA4 组。

将 mESCs 复苏后放入提前涂有浓度为 0.2%明胶的 T25 细胞培养瓶,放置在 37 ℃、5%CO_2 的加湿培养箱中,每 2~3 天传代 1 次,传至 6 代后收集细胞并提取组蛋白。具体方法可参考文献[11]。

1.7 实时定量聚合酶链式反应

使用 Trizol 试剂(Invitrogen,美国)提取叶酸正常和叶酸缺乏 mESCs 的 RNA。用 Blas*Taq* 2×Qpcr MasterMix(ABM,加拿大)进行 RNA 到 cDNA 的反转录。采用 Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(ABM,加拿大)进行 qPCR。使用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算相对表达量。

1.8 ChIP 实验

使用 ChIP 试剂盒(CST#9005):在含培养基的培养皿中加入甲醛交联细胞,加入甘氨酸以终止,清洗细胞后加入 2 mL 的 PBS+PIC,以 252×*g* 的速度在 4 ℃下离心 5 min;重悬于 1 mL 的 1×Buffer A+1×DTT+1×PIC,在冰上孵育 10 min,以 1 007×*g* 的速度离心后重悬于 1×Buffer B+1×DTT 中,每 4×10^6 个细胞用 0.5 μL 的 Micrococcal Nuclease,多次颠倒试管混合,在 37 ℃下孵育 20 min,使 DNA 消化至 150~900 bp 的片段。加入 EDTA 以终止消化,在 4 ℃下,以 18 895×*g* 的速度离心 1 min 使胞核沉淀,去除上清液,将沉淀物于 100 μL 的 1×ChIP Buffer+1×PIC 中重悬,冰上孵育 10 min 后用脉冲对进行声波处理以破坏胞膜。离心后取上清,每 100 μL 加入 400 μL 的 1×ChIP 缓冲液,取 10 μL 染色质样品作为 2%input,剩余的加入 H3K9cr 抗体,4 ℃下转动孵育过夜,向过夜后的样品中加入 Protein G Magnetic Beads 并在 4 ℃下转动孵育 2 h,将试管置于 Magnetic Separation Rack 上使 Protein G Magnetic Beads 沉淀,将染色质洗脱下来并解交联,纯化 DNA。

1.9 ChIP 样品测序和生物学信息分析

对纯化的 DNA 进行定量,制备文库并进行质控。在 Illumina NovaSeq 测序仪上对合格的文库进行 150 bp 的测序。高质量 clean reads 用 cutadapt[12] 软件获得。然后,将 clean reads 使用 bowtie2[13] 软件比对到小鼠参考基因组上,参数默认;显著富集峰通过 MACS[14] 软件获得,使用 diffReps[15] 软件进行差异富集峰(differentially enriched peaks,DEPs)鉴定,并利用 UCSC RefSeq[16] 数据库对进行注释。进行 DEPs 相关基因的基因本体论(gene ontology,GO)以及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路分析并可视化分析。

1.10 统计学方法

采用 GraphPad Prism 软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 进行统计描述,使用方差齐性检验,两组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料采用频次(%)进

行统计描述。$P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 H3K9cr 修饰在叶酸缺乏 mESCs 及 NTDs 小鼠中降低

Western blot 结果显示叶酸缺乏 mESCs 相较于叶酸正常 mESCs,其 H3K9cr 表达显著降低($P<0.05$,图 1A、B)。免疫组化结果显示低叶酸致 NTDs 小鼠神经管组织中 H3K9cr 蛋白表达量减少($P<0.01$,图 1C、D)。

2.2 NTDs 胎鼠模型建造情况

利用体式显微镜对胎鼠进行观察,可见:正常饲喂组小鼠胚胎外观饱满光滑,脑室发育良好,神经管闭合完全。低叶酸联合 MTX 诱导的 NTDs 组小鼠体积较小伴随着发育迟缓,并可见到小眼、脊柱裂的表型(图 2A)。图中背面观虚线框出的部位为神经管,可以观察到 NTDs 组小鼠神经管未完全闭合。HE 染色结果可见:正常饲喂组小鼠神经管管腔规整,低叶酸联合 MTX 诱导的 NTDs 组小鼠神经管管腔畸形,弯曲过多(图 2B)。

2.3 质控及测序 Reads 统计

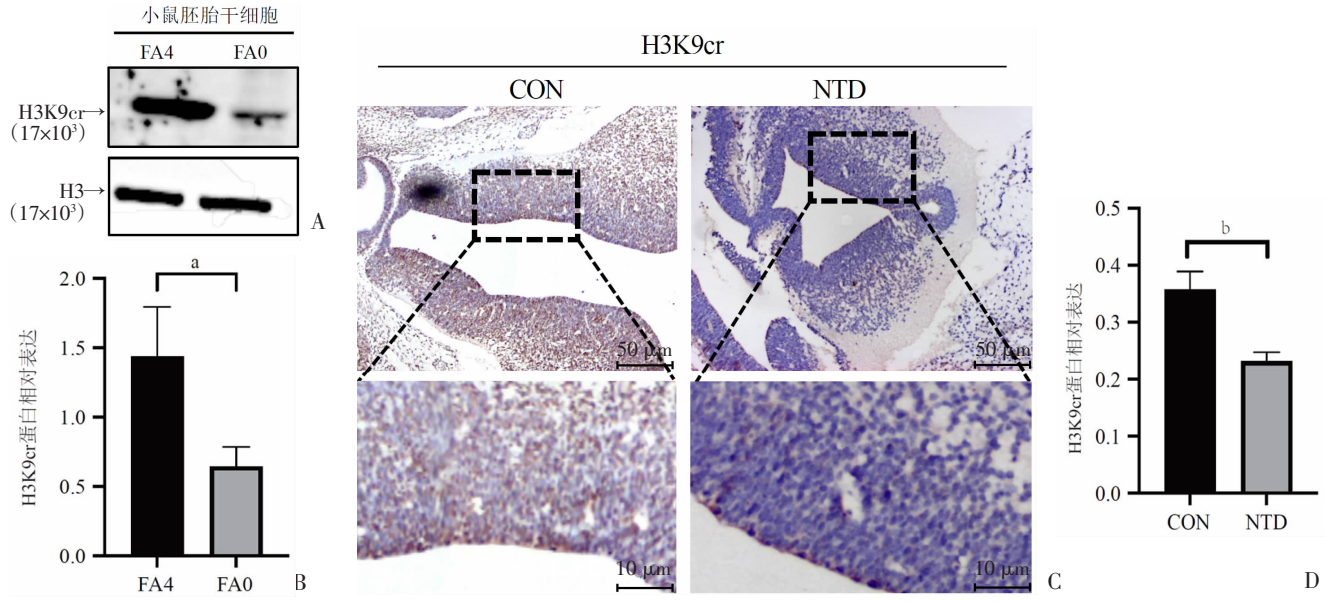
Q30>80% 表示测序质量良好。将高质量 clean reads 比对到小鼠参考基因组(UCSC mm10)上,表 1 是 FA0 与 FA4 ChIP-seq 测序序列统计结果。

2.4 全基因组 Peak 差异分析

富集峰用 MACS 软件进行识别,得到 FA4 组与 FA0 组 Peak 的信息。FA4 共有 6 883 个富集峰,总长度 1 143 749,平均长度 166;FA0 共有 21 309 个富集峰,总长度 4 574 212,平均长度 214;DEPs 用 diffReps 软件进行鉴定,结果表明叶酸缺乏细胞相对于叶酸正常细胞有 114 253 个基因位点呈上调趋势,有 98 387 个基因位点呈下调趋势。将各样本比对到小鼠基因组上,结果显示叶酸缺乏细胞的组蛋白 H3K9cr 引起全基因组变化,其中,启动子区发生变化最大,占 32.10%,内含子区和外显子区分别占 26.50%和 1.70%,13.50% 发生在基因间隔区,26.20%发生在上游峰(图 3)。分别统计 2 组细胞的启动子区域占富集峰的比例,叶酸正常细胞的启动子占比 35.4%,叶酸缺乏细胞的启动子占比 32.8%,结果表明叶酸缺乏情况下,基因表达水平下降。

表 1 FA0 与 FA4 ChIP-seq 测序序列统计

组别	原始序列	过滤后序列	比对序列	比对率/%
FA0	32,402,714	32,392,994	30,473,407	94.07
FA0-input	32,080,910	32,066,656	30,488,440	95.08
FA4	31,822,730	31,800,822	19,916,030	62.63
FA4-input	31,989,534	31,976,318	30,289,833	94.73



a:$P<0.05$;b:$P<0.01$

A、B:Western blot 检测 mESCs 在叶酸正常和缺乏情况下 H3K9cr 表达与定量分析;C、D:正常组小鼠与 NTDs 小鼠神经管组织 H3K9cr 免疫组化结果与统计分析

图 1 叶酸缺乏 mESC 及 NTDs 小鼠 H3K9cr 蛋白水平表达 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

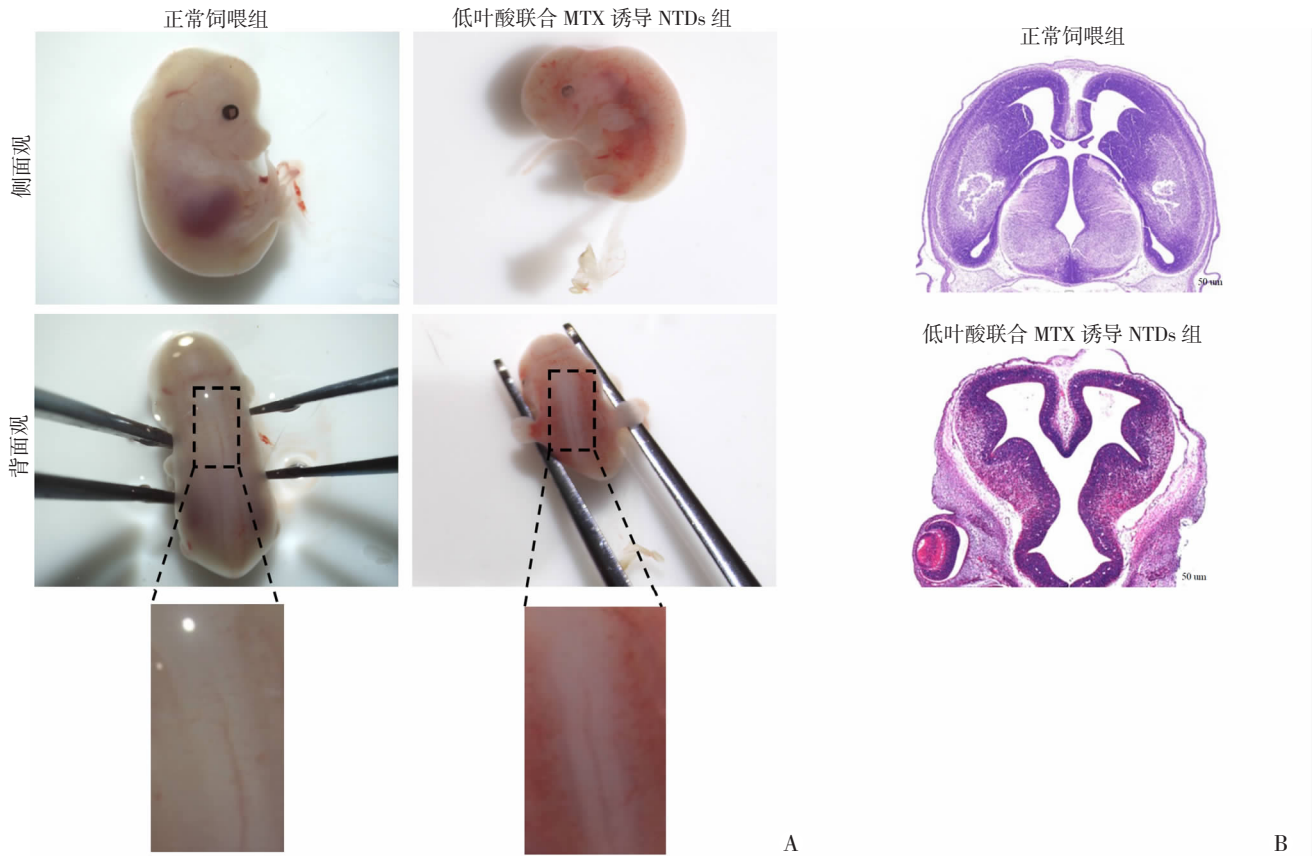


图 2 正常饲喂组及低叶酸联合 MTX 诱导 NTDs 组胎鼠背侧面观(A)及大脑 HE 染色(B)观察结果

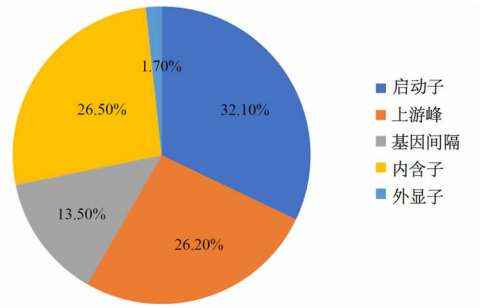


图 3 H3K9cr 差异富集峰基因结合峰功能区域分布图

2.5 GO 分析结果

对 FA0 组和 FA4 组进行 H3K9cr 差异富集峰相关基因的 GO 分析,以鉴定显著差异基因中富集的生物学进程(biology progress,BP)、细胞组分(cellular component,CC)和分子功能(molecular function,MF)。根据 fisher 精确测试的 *P*-values,叶酸缺乏细胞相对于叶酸正常细胞上调基因富集的条目中,生物学进程排名前三位的是:细胞代谢过程、代谢过程、有机物代谢过程;细胞组分排名前三位的是细胞内、细胞内部分、细胞器;分子功能排名前三位的是:结合、蛋白质结合、杂环化合物结合(图 4)。

叶酸缺乏细胞相对于叶酸正常细胞下调的与神经系统相关的生物学进程排名前六位的是:神经系统发育、神经发生、神经元的产生、神经元分化、神经元发育、神经系统发育的调节;与神经系统相关的细胞组分排名前六的是突触、神经元部分、突触部分、神经元投射、突触膜、轴突(图 5)。FA0 组较 FA4 组下调的生物学进程涉及多条神经发育相关通路,使用微生信绘图软件绘制了 2 组间具有显著差异的通路基因以及与通路对应关系(图 6)。实时定量聚合酶链式反应显示,FA0 组中与神经发育相关的基因下调,包括 *App*、*Pax*6、*Bdnf*(图 7)。表 2 是 RT-qPCR 实验涉及的引物序列,以 *Gapdh* 为对照($n=3$, $\bar{x}\pm s$)。

2.6 KEGG 通路分析结果

差异具有统计学意义($P<0.05$)的通路共有 82 个。上调的有 42 个,主要富集在溶酶体、细胞周期、癌症通路;下调的有 40 个,其中包含轴突引导、神经活性配体-受体相互作用、谷氨酸能突触等与神经系统相关的信号通路(图 8)。表 3 是通路中差异表达基因情况统计结果。

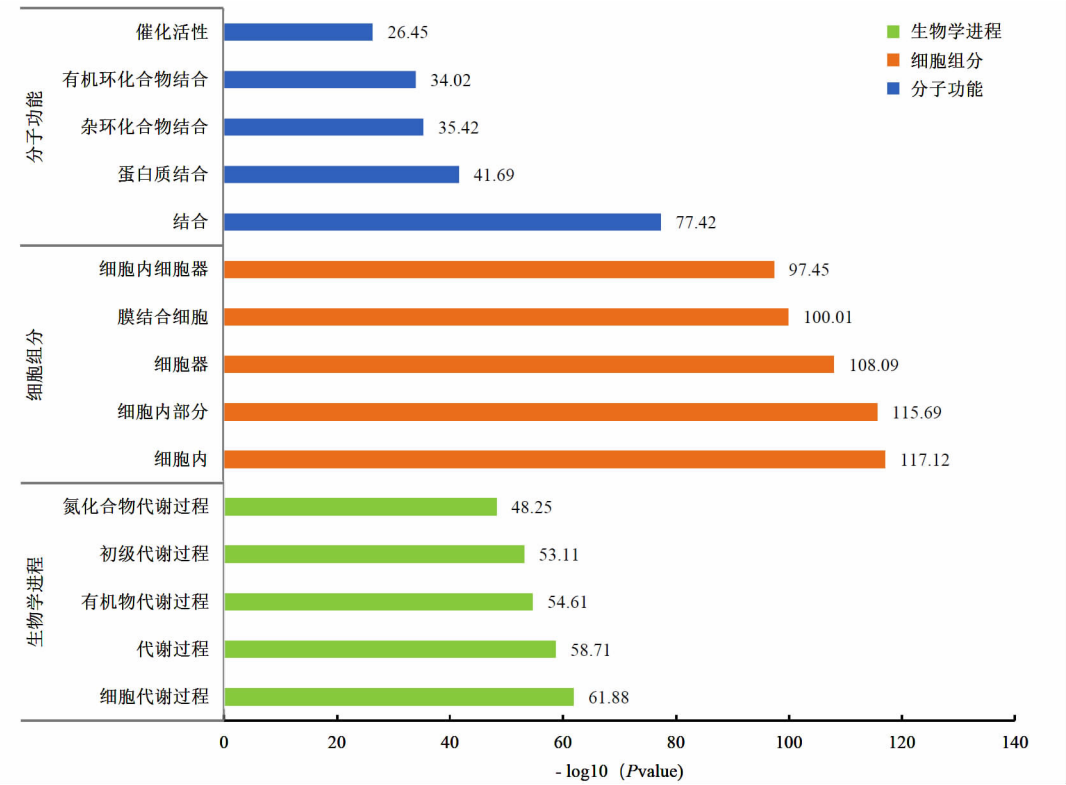


图 4 FA0 上调基因的 GO 功能分类

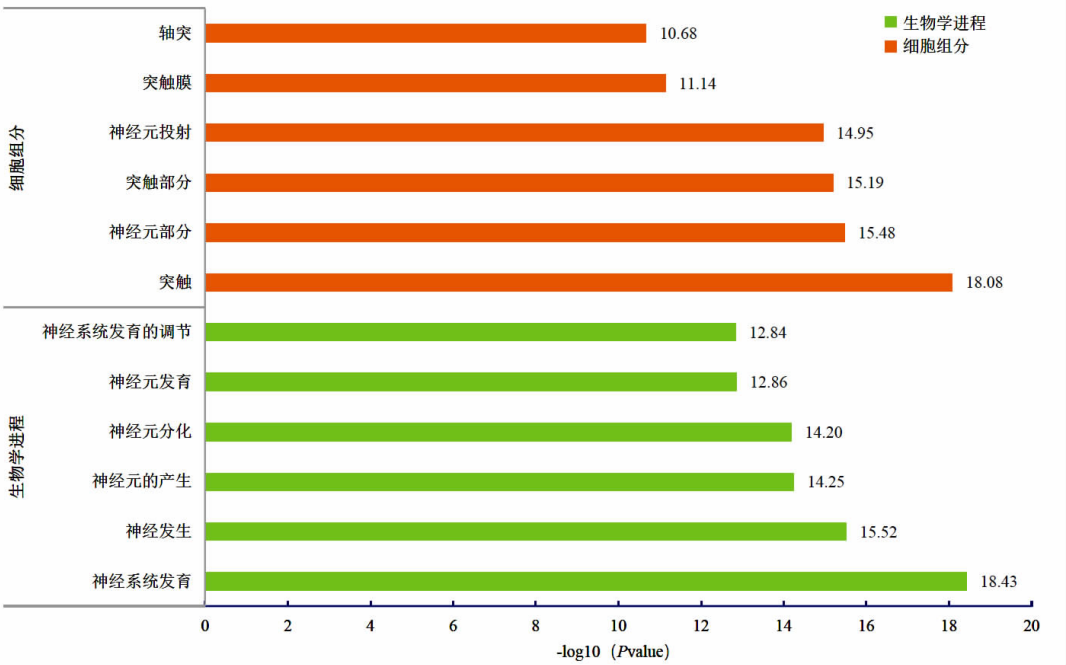


图 5 FA0 下调基因的 GO 功能分类

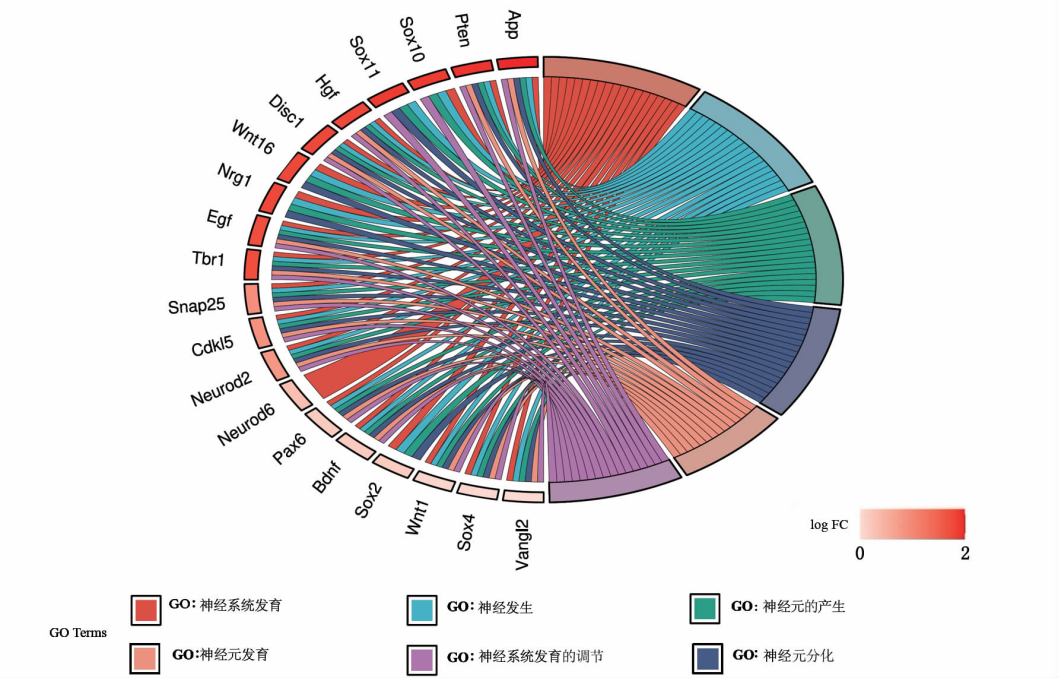
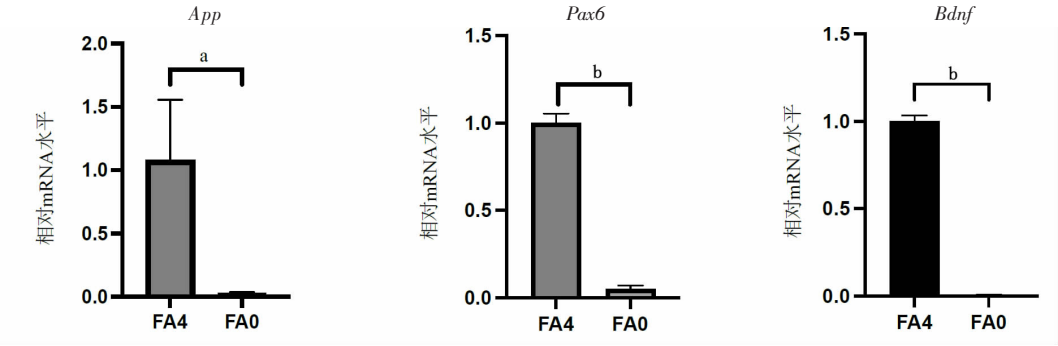


图 6 神经系统相关生物学进程中显著差异通路基因与通路对应关系弦图



a:$P<0.05$; b:$P<0.000\ 1$

图 7 RT-qPCR 检测 FA4 与 FA0 的神经系统相关基因的 mRNA 水平 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

表 2 神经系统相关基因和内参引物序列

引物名称	正向	反向
Bdnf	CTGAGCGTGTGTGACAGTATTAGC	GGTAGTTCGGCATTGCGAGTTC
*Pax*6	TCTAACGGAGAAGACTCGGATGAAG	GCTGCTGCTGATAGGAATGTGAC
App	GCAGCGAGAAGAGCACTAACTTG	TCCTCCACATCCTCATCATCATCAG
Gapdh	TCCATGACAACTTTGGCATC	TCCATGACAACTTTGGCATC

表 3 H3K9cr 差异富集峰相关基因显著富集的通路分析

通路 ID	通路名称	差异基因	总差异基因	通路基因	总通路基因	*P*	错误发现率
mmu04142	溶酶体	48	1 789	124	7 810	0.000 0	0.009 356 551
mmu04110	细胞周期	48	1 789	125	7 810	0.000 0	0.009 356 551
mmu05200	癌症通路	120	1 789	397	7 810	0.000 3	0.029 760 28
mmu04360	轴突引导	33	968	129	7 810	0.000 0	0.008 568 267
mmu04080	神经活性配体-受体相互作用	53	968	285	7 810	0.001 4	0.039 906 68
mmu04724	谷氨酸能突触	26	968	115	7 810	0.001 5	0.039 906 68

2.7 富集峰相关基因的模体分析

模体(motif)是特定碱基序列的模式,字母的相对大小表示各个碱基出现的频率。利用软件(homer)从ChIP-seq数据中得到了FA4和FA0组的motif(图9)。H3K9cr结合motif的发现表明,叶酸缺乏时motif发生了改变。

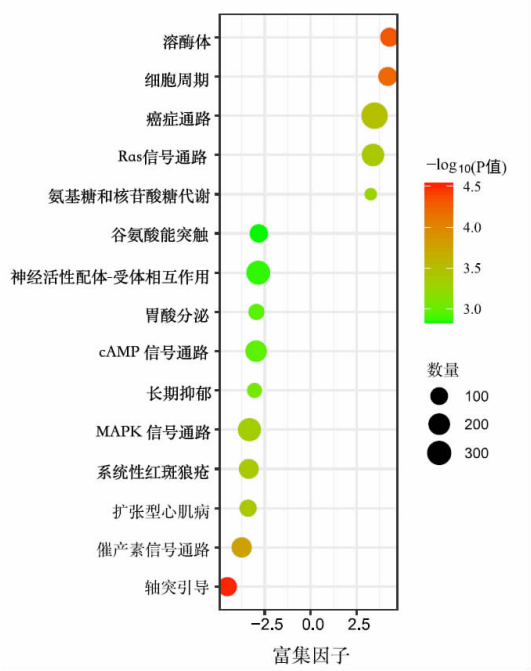


图8 H3K9cr差异富集峰相关基因的KEGG分析

3 讨论

3.1 叶酸通过调控脂肪酸代谢参与组蛋白Kcr

叶酸在机体代谢过程中起着重要作用,叶酸缺乏会诱导脂质代谢相关基因的表达[17]。在缺血性脑卒中,叶酸通过调控脂肪酸代谢起保护作用[18]。短链脂肪酸的代谢物crotonyl-CoA是组蛋白Kcr的底物,crotonyl-CoA的合成酶ACSS2是脂肪酸代谢的重要组成部分,在脂质稳态中发挥重要作用[19]。最近有研究显示,肠道微生物产生的短链脂肪酸促进组蛋白Kcr,并影响宿主结肠中的基因转录[20-21]。

3.2 叶酸缺乏通过组蛋白Kcr调控发育

组蛋白Kcr可能在神经元成熟和迁移中起作用,染色质域Y蛋白(chromodomain Y-like,CDYL)是一种巴豆酰辅酶A水合酶,敲低CDYL会导致神经元异常迁移[22]。在神经干细胞中,组蛋白Kcr通过激活二价启动子重塑其转录组,使其从增殖的干性状态向神经元转化并分化成更多的神经元,体内同样观察到组蛋白Kcr和神经元分化的正相关性[23]。在mESCs中,多能调控因子基因和胚层谱系基因的表达受组蛋白Kcr修饰调控,从而促进mESCs分化,研究还发现,发生在组蛋白H4K77和H4K91上的组蛋白Kcr修饰促进人胚胎干细胞向内胚层分化,增强内胚层的基因表达[24]。本研究发现叶酸缺乏mESCs相对于叶酸正常mESCs下

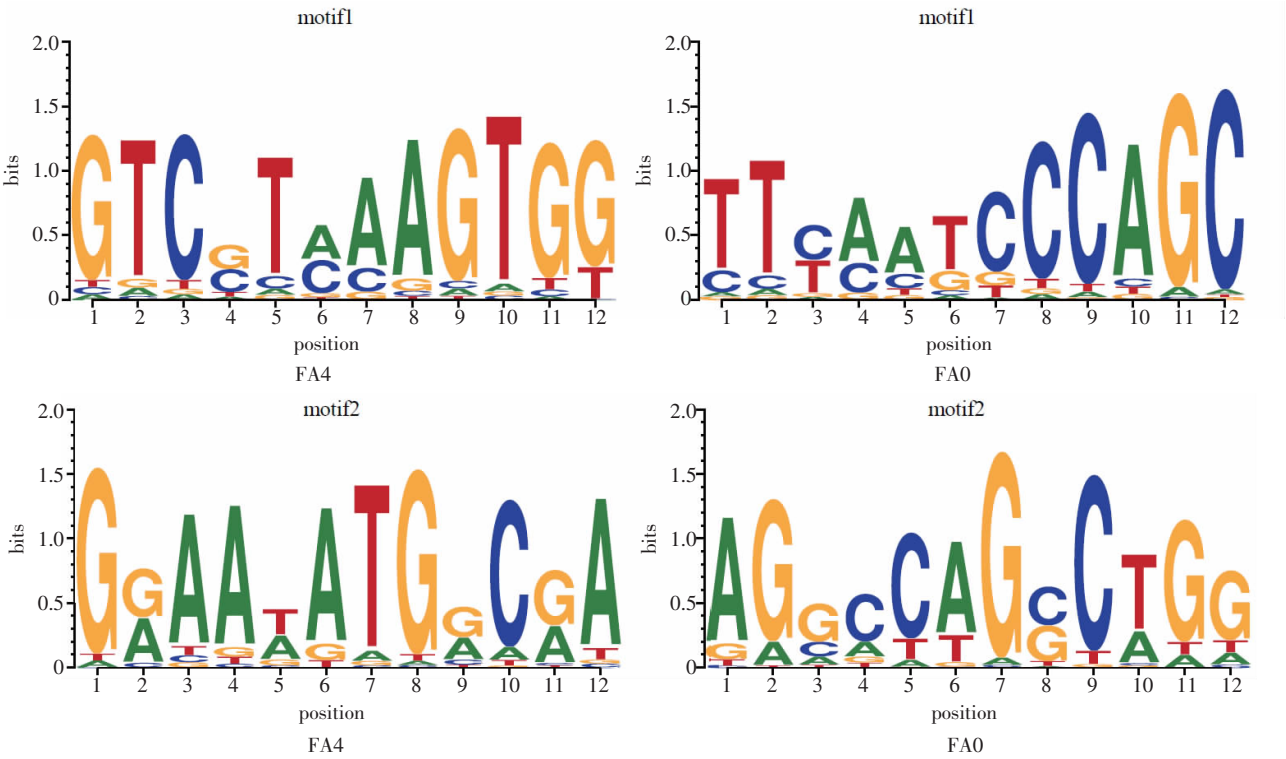


图9 FA4和FA0 H3K9cr结合motif特点

调的生物过程涉及神经系统发育、神经发生、神经元的产生、神经元分化、神经元发育、神经系统的发育调节等神经发育相关通路,其中两组间有显著差异的通路基因包括 *Bdnf*、*App*、*Pten*、*Pax*6、*Wnt*1、*Wnt*16、*Sox*4、*Sox*10、*Hoxd*1、*Neurod*2 等。脑源性神经营养因子(Bdnf)对神经元的生存和生长至关重要,Bdnf 及其受体发起的信号级联是突触可塑性的关键调节剂,在学习和记忆形成中发挥着重要作用[25]。Pax6 的缺失影响了小鼠的神经突伸长率、轴突初始段的位置和长度以及它们的电生理特性,表明它可能对神经元结构和功能发育具有细胞自主作用[26]。

3.3 叶酸对组蛋白修饰具有广泛影响以及神经发育受表观遗传修饰的调节

研究发现缺乏叶酸会对精子的组蛋白 H3K4 三甲基化(H3K4me3)产生影响,并且这种改变会引起子代发育异常[27]。叶酸的中间代谢产物同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)通过修饰组蛋白 H3K79 参与 NTDs 的发生,补充叶酸降低 Hcy 水平可以减少 NTDs 的发病[28]。本课题组前期研究中,相比于正常叶酸(4 mg/L) mESCs,不含叶酸(0 mg/L)的 mESCs 中 ACSS2 表达上调,接下来向无叶酸培养基中添加叶酸,这种叶酸回补减弱了由叶酸缺乏引起的 ACSS2 升高。对无叶酸的 mESCs 的 Kcr 底物进行研究,在 16 340 个蛋白质中鉴定出 22 277 个 Kcr 位点,占整个 mESCs 蛋白组的 70%[29]。本研究结果显示,叶酸缺乏 mESCs 中 H3K9cr 表达水平下调,上述研究均说明叶酸对组蛋白修饰的广泛影响。N6-腺苷酸甲基化(N6-methyladenosine,m6A)是一种 mRNA 上普遍存在的碱基修饰行为,m6A 的 eraser 蛋白 FTO[30]、m6A 的 reader 蛋白 YTHDF1 和 YTHDF2 调控 mRNA 的局部翻译,进而调控轴突生长[31]。长链非编码 RNA(long non-coding,lncRNA)Dubr 的 m6A 修饰调控神经元轴突生长和迁移[32]。本研究利用 ChIP-seq 技术比较叶酸正常和叶酸缺乏 mESC 与组蛋白 H3K9cr 结合的下游靶基因,并对两组细胞差异富集区相关基因进行 GO 分析和 KEGG 通路分析。结果表明,叶酸缺乏细胞中下调的的信号通路主要有轴突引导、神经活性配体-受体相互作用、谷氨酸能突触等与神经系统相关的信号通路。上述研究均说明神经发育受表观遗传修饰的调节。

综上,本次研究首次利用 ChIP-seq 技术研究叶酸缺乏 mESCs 中 H3K9cr 的全基因组状态变化,阐明了在 mESCs 中叶酸缺乏通过 H3K9cr 修饰参与调控神经发育相关基因;该研究进一步明确了组蛋白巴豆酰化修饰在神经系统发育过程中的重要作用,为神经系统发育性疾病机制的深入研究、疾病诊断和治疗提供了科学的理论依据。

参考文献:

[1] STRAHL B D, ALLIS C D. The language of covalent histone modifications[J]. Nature, 2000, 403(6765): 41-45. DOI: 10.1038/47412.

[2] HUANG H, SABARI B R, GARCIA B A, *et al*. SnapShot: histone modifications[J]. Cell, 2014, 159(2): 458-458.e1. DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.037.

[3] TAN M J, LUO H, LEE S, *et al*. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification[J]. Cell, 2011, 146(6): 1016-1028. DOI: 10.1016/j.cell.2011.08.008.

[4] 刘芳远, 苏丽娅. 巴豆酰化修饰在恶性肿瘤中的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2023, 50(2): 195-201. DOI: 10.3971/j.issn.1000-8578.2023.22.0770.
LIU F Y, SU L Y. Research progress on crotonylation in malignant tumor[J]. Cancer Res Prev Treat, 2023, 50(2): 195-201. DOI: 10.3971/j.issn.1000-8578.2023.22.0770.

[5] BERGER K, MOELLER M J. Mechanisms of epithelial repair and regeneration after acute kidney injury[J]. Semin Nephrol, 2014, 34(4): 394-403. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2014.06.006.

[6] LIU Y Q, LI M H, FAN M H, *et al*. Chromodomain Y-like protein-mediated histone crotonylation regulates stress-induced depressive behaviors[J]. Biol Psychiatry, 2019, 85(8): 635-649. DOI: 10.1016/j.biopsych.2018.11.025.

[7] JIANG G C, NGUYEN D, ARCHIN N M, *et al*. HIV latency is reversed by ACSS2-driven histone crotonylation[J]. J Clin Invest, 2018, 128(3): 1190-1198. DOI: 10.1172/JCI98071.

[8] WAN J H, LIU H Y, MING L. Lysine crotonylation is involved in hepatocellular carcinoma progression[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111: 976-982. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.12.148.

[9] WANG S, ZENG Y B, PEI P, *et al*. Abnormal transcriptome-wide DNA demethylation induced by folate deficiency causes neural tube defects[J]. Front Genet, 2022, 13: 987210. DOI: 10.3389/fgene.2022.987210.

[10] 裴培, 崔小岱, 张霆, 等. 低叶酸联合甲氨蝶呤诱导神经管畸形小鼠模型的建立[J]. 中华神经外科杂志, 2019, 35(2): 193-196. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2019.02.020.
PEI P, CUI X D, ZHANG T, *et al*. Methotrexate-induced neural tube defects mouse model under folate deficient condition[J]. Chin J Neurosurg, 2019, 35(2): 193-196. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2019.02.020.

[11] PEI P, CHENG X Y, YU J, *et al*. Folate deficiency induced H2A ubiquitination tolead to downregulated

expression of genes involved in neural tube defects[J]. Epigenetics Chromatin, 2019, 12(1): 69. DOI: 10.1186/s13072-019-0312-7.

[12] MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. EMBnet J, 2011, 17(1): 10. DOI: 10.14806/ej.17.1.200.

[13] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. Nat Methods, 2012, 9(4): 357-359. DOI: 10.1038/nmeth.1923.

[14] ZHANG Y, LIU T, MEYER C A, *et al*. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS)[J]. Genome Biol, 2008, 9(9): R137. DOI: 10.1186/gb-2008-9-9-r137.

[15] SHEN L, SHAO N Y, LIU X C, *et al*. diffReps: detecting differential chromatin modification sites from ChIP-seq data with biological replicates[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65598. DOI: 10.1371/journal.pone.0065598.

[16] PRUITT K D, TATUSOVA T, MAGLOTT D R. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(Database issue): D61-D65. DOI: 10.1093/nar/gkl842.

[17] POOYA S, BLAISE S, MORENO GARCIA M, *et al*. Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1α hypomethylation and decreased ER-α, ERR-α, and HNF-4α in the rat liver[J]. J Hepatol, 2012, 57(2): 344-351. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.03.028.

[18] YANG Y H, LEI L, BAO Y P, *et al*. An integrated metabolomic screening platform discovers the potential biomarkers of ischemic stroke and reveals the protective effect and mechanism of folic acid[J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 783793. DOI: 10.3389/fmolb.2022.783793.

[19] CAREY B W, FINLEY L W, CROSS J R, *et al*. Intracellular α-ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells[J]. Nature, 2015, 518(7539): 413-416. DOI: 10.1038/nature13981.

[20] FELLOWS R, DENIZOT J, STELLATO C, *et al*. Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 105. DOI: 10.1038/s41467-017-02651-5.

[21] 赵奕涵, 王晨, 曹田宇, 等. 基于 CiteSpace 的结直肠癌肿瘤微环境近十年研究热点分析[J]. 空军军医大学学报, 2023, 44(2): 160-165. DOI:10.13276/j.issn.2097-1656.2023.02.013.
ZHAO Y H, WANG C, CAO T Y, *et al*. Analysis of research hotspots in colorectal cancer microenvironment in recent 10 years based on CiteSpace[J]. J Air Force Univ, 2023, 44(2): 160-165. DOI: 10.13276/j.issn.2097-1656.2023.02.013.

[22] QIN R, CAO S, LYU T J, *et al*. CDYL deficiency disrupts neuronal migration and increases susceptibility to epilepsy[J]. Cell Rep, 2017, 18(2): 380-390. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.043.

[23] DAI S K, LIU P P, DU H Z, *et al*. Histone crotonylation regulates neural stem cell fate decisions by activating bivalent promoters[J]. EMBO Rep, 2021, 22(10): e52023. DOI: 10.15252/embr.202052023.

[24] FANG Y, XU X J, DING J, *et al*. Histone crotonylation promotes mesoendodermal commitment of human embryonic stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2021, 28(4): 748-763.e7. DOI: 10.1016/j.stem.2020.12.009.

[25] AZMAN K F, ZAKARIA R. Recent advances on the role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in neurodegenerative diseases[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(12): 6827. DOI: 10.3390/ijms23126827.

[26] TIAN T, QUINTANA-URZAINQUI I, KOZIĆ Z, *et al*. Pax6 loss alters the morphological and electrophysiological development of mouse prethalamic neurons[J]. Development, 2022, 149(6): dev200052. DOI: 10.1242/dev.200052.

[27] LISMER A, DUMEAUX V, LAFLEUR C, *et al*. Histone H3 lysine 4 trimethylation in sperm is transmitted to the embryo and associated with diet-induced phenotypes in the offspring[J]. Dev Cell, 2021, 56(5): 671-686.e6. DOI: 10.1016/j.devcel.2021.01.014.

[28] ZHANG Q, BAI B L, MEI X Y, *et al*. Elevated H3K79 homocysteinylation causes abnormal gene expression during neural development and subsequent neural tube defects[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 3436. DOI: 10.1038/s41467-018-05451-7.

[29] WANG S, ZENG Y B, HE X J, *et al*. Folate-deficiency induced acyl-CoA synthetase short-chain family member 2 increases lysine crotonylome involved in neural tube defects[J]. Front Mol Neurosci, 2022, 15: 1064509. DOI: 10.3389/fnmol.2022.1064509.

[30] YU J, CHEN M X, HUANG H J, *et al*. Dynamic m6A modification regulates local translation of mRNA in axons[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(3): 1412-1423. DOI: 10.1093/nar/gkx1182.

[31] YU J, SHE Y C, YANG L X, *et al*. The m6A readers YTHDF1 and YTHDF2 synergistically control cerebellar parallel fiber growth by regulating local translation of the key Wnt5a signaling components in axons[J]. Adv Sci, 2021, 8(22): e2101329. DOI: 10.1002/advs.202101329.

[32] HUANG J S, JIANG B W, LI G W, *et al*. m6A-modified lincRNA Dubr is required for neuronal development by stabilizing YTHDF1/3 and facilitating mRNA translation[J]. Cell Rep, 2022, 41(8): 111693. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111693.

(收稿:2023-07-05;修回:2023-09-25)

(编辑 栾 嘉)