

· 基础研究 ·

组蛋白去甲基酶KDM3A介导小鼠骨骼肌细胞中活性氧诱导的E2F1表达

邵 靖¹, 许慧慧^{2*}, 徐 涌²

¹江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122; ²南京医科大学病理生理学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 研究在小鼠骨骼肌细胞凋亡过程中E2F1表达上调的表观遗传机制。方法: 利用H₂O₂处理C2C12细胞, 利用干扰RNA和瞬时转染相关因子, 用实时定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)与Western blot检测E2F1基因表达水平, 染色质免疫沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)检测蛋白质与DNA的结合。结果: E2F1表达水平上调, 同时伴随E2F1基因启动子上H3K9甲基化水平的下降。进一步研究发现, 活性氧促进H3K9去甲基酶KDM3A结合到E2F1启动子上促进E2F1转录。相反, 使用干扰RNA敲减KDM3A显著减弱活性氧引起的E2F1表达上调。KDM3A干扰同时降低了E2F1启动子上乙酰化H3与H3K4甲基化水平并恢复了H3K9甲基化水平。结论: KDM3A可能通过改变组蛋白修饰参与活性氧诱导的E2F1转录激活。

[关键词] 活性氧; 骨骼肌细胞; 转录调控; 表观遗传学机制; 组蛋白去甲基酶

[中图分类号] R364

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)10-1409-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20191001

Induction of E2F1 expression by ROS in murine skeletal muscle cells is mediated by the histone demethylase KDM3A

Shao Jing¹, Xu Huihui^{2*}, Xu Yong²

¹Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122; ²Department of Pathophysiology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** Accumulation of reactive oxygen species (ROS) in skeletal muscle cells promotes apoptosis, which represents a key mechanism underlying the loss of muscle mass during aging. Previously we have demonstrated that the transcription factor E2F1 promotes the transcription of the pro-apoptotic gene PERP in skeletal muscle cells (C2C12). In the present study we investigated the epigenetic mechanism whereby E2F1 expression is stimulated by ROS in C2C12 cells. **Methods:** Real-time qPCR and Western blotting were used to examine gene expression levels. Chromatin immunoprecipitation was used to determine the interaction between protein and DNA. **Results:** We report that E2F1 levels were up-regulated in C2C12 exposed to H₂O₂. Up-regulation of E2F1 expression by H₂O₂ treatment was accompanied by erasure of dimethyl H3K9 from the E2F1 promoter. Further study revealed that H₂O₂ treatment promoted the binding of KDM3A, a histone demethylase, on the E2F1 promoter. In contrast, KDM3A depletion by siRNA significantly dampened the induction of E2F1 expression by H₂O₂ treatment. Concomitantly, KDM3A knockdown decreased the levels of acetylated H3 and trimethylated H3K4 but restored the levels of dimethylated H3K9 on the E2F1 promoter. **Conclusion:** Our data suggest that KDM3A may participate in H₂O₂ treatment-induced E2F1 trans-activation by modulating histone modifications on the E2F1 promoter.

[Key words] reactive oxygen species; skeletal muscle cell; transcriptional regulation; epigenetic mechanism; histone demethylase

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(10): 1409-1414]

[基金项目] 国家自然科学基金(81500441, 81800520)
*通信作者(Corresponding author), E-mail: xuhh@njmu.edu.cn

肌肉减少症是导致老年人行动不便的主要原因之一^[1], 表现为骨骼肌纤维数目减少和(或)体积减小。这一过程既反映了肌肉细胞自身的变化, 也

受到机体其他组织细胞的调控^[2]。就肌肉细胞而言,其凋亡加速以及自我更新速度变慢促进了肌肉减少症。有报道发现,老年(约30月龄)大鼠骨骼肌中促凋亡基因(如Bax、Bak、XIAP)较年轻(约6月龄)大鼠显著上升,而抗凋亡基因(如Bcl-2)则显著下调^[3-5]。多种因素参与了衰老过程中骨骼肌细胞凋亡^[6],包括氧化应激、炎症、代谢异常等。例如,Mecocci等^[7]发现衰老引起骨骼肌氧化损伤加重。与此相应,H₂O₂处理可促进凋亡相关基因的表达,诱导体外培养的骨骼肌细胞凋亡^[8]。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)诱导的凋亡相关基因表达由转录因子介导。E2F1属于E2F转录因子家族,在许多病理生理学过程中发挥作用。前期研究表明E2F1参与细胞凋亡过程。Tanaka等^[9]报道,E2F1通过抑制NF- κ B介导的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)表达从而促进细胞中ROS积聚与凋亡。Wang等^[10]发现在心肌缺血状态下E2F1通过激活miR-421转录,从而靶向PINK1蛋白引起线粒体破碎及心肌细胞凋亡增加。有意思的是,E2F1的表达在多个不同细胞中可以被ROS激活,但其中的表观遗传机制并不明确^[11-12]。

在真核生物中,基因转录调控无一例外总是需要表观遗传机器(epigenetic machinery)参与。表观遗传机器包括不同分支,组蛋白修饰是其中研究最深入的一个。核心组蛋白(H2A/H2B/H3/H4)的N末端尾巴上的氨基酸残基可以发生不同修饰,例如乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化等,从而对靶基因转录进行调控,即通常所说的“组蛋白码”^[13]。一般而言,组蛋白H3赖氨酸乙酰化及H3第4位赖氨酸(H3K4)三甲基化与转录激活相关。相反,组蛋白H3第9位赖氨酸(H3K9)二甲基化与转录抑制相关。H3K9的甲基化水平由甲基转移酶与去甲基酶共同控制。甲基转移酶G9a、GLP等催化H3K9二甲基化合成从而抑制基因转录,而去甲基酶JMJD1A/KDM3A通过移除H3K9二甲基化激活基因转录。本研究探讨了KDM3A参与骨骼肌细胞中ROS诱导E2F1表达的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠骨骼肌细胞系C2C12(ATCC公司,美国);高糖DMEM、胎牛血清(Gibco公司,美国);青链霉素(Hyclone公司,美国);KDM3A小干扰RNA(上海吉玛公司),序列为:5'-GCAAGUCUUCUGA-GAAUAA-

3';瞬时转染试剂Lipofectamine RNAiMax(Thermo公司,美国);细胞总RNA提取试剂盒(北京天根生化公司);逆转录反应试剂盒、SYBR Green qPCR Master Mix试剂盒(南京诺维赞生物公司);E2F1抗体、KDM3A抗体(武汉Proteintech公司);H₂O₂、多聚甲醛、甘氨酸、 β -actin抗体(Sigma公司,美国);乙酰化H3(AcH3)抗体、二甲基化H3K9(H3K9Me2)抗体、三甲基化H3K4(H3K4Me3)抗体(Millipore公司,美国);Supersignal化学发光试剂(Thermo公司,美国);凝胶成像系统(Bio-Rad公司,美国),Bioruptor Pico水平式超声仪(Diagenode公司,德国);STEPPLUS实时定量PCR仪(Thermo公司,美国);引物序列为:KDM3A上游5'-AAATACGGTTTCGGGATG-3',下游5'-TACGGGTTTCTCGCTTCT-3';E2F1上游5'-GAG-GCTGGATCTGGAGACTG-3',下游5'-AAGAAGC-GTTTGGTGGTCAG-3';actin上游5'-TGGAATCCTGTGGCATCCAT-3',下游5'-TAAAACGCAGCTCAG-TAACA-3'。

1.2 方法

1.2.1 C2C12细胞的培养与预处理

用含10%胎牛血清与1%青链霉素的DMEM培养基,在37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下常规培养,待细胞至对数生长期用于实验^[14]。细胞使用无血清培养基预处理过夜,再使用相同培养基稀释H₂O₂(终浓度为0.5 mmol/L)处理。

1.2.2 干扰RNA与瞬时转染

选择生长状态良好的细胞,以胰酶EDTA消化液消化后,接种于细胞培养板,细胞数量为2×10⁵个/mL,生长24 h,细胞生长至约70%接触时进行转染。将干扰RNA与Lipofectamine RNAiMax分别准备,比例为1 μ g:3 μ L,分别溶于100 μ L Opti-MEM培养基中,静置5 min后将两种液体轻轻混匀,室温下静置20 min。细胞培养板中更换无血清培养液,再将以上质粒和脂质体混合物滴加至每孔中,轻轻混匀,将细胞置于37℃、5% CO₂培养箱中生长,6 h后更换完全培养液。

1.2.3 实时定量PCR(real-time quantitative PCR, qPCR)

处理后细胞提取细胞总RNA,逆转录为cDNA后进行qPCR反应,反应体系(2×PCR SYBR Green Master Mix 10 μ L,上下游引物各1 μ L,无核酸酶水3 μ L, cDNA 5 μ L,总体积20 μ L)加入96孔PCR反应板中,1 500 r/min离心2 min,STEPPLUS荧光定量PCR仪扩增,反应条件如下:50℃ 2 min,95℃ 10 min后;

95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40个循环, 目标基因C_t值使用actin基因C_t值校正。

1.2.4 蛋白免疫印迹分析

处理后细胞使用RIPA缓冲液(50 mmol/L Tris pH7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100)裂解获得全蛋白。蛋白使用BCA试剂定量。取等量蛋白10%SDS-PAGE电泳分离并转至硝酸纤维膜上。5%脱脂奶粉封闭2 h, 加入E2F1抗体、KDM3A抗体或β-actin抗体4 °C孵育过夜。次日加入相应二抗室温孵育1 h。最后加入Supersignal化学发光试剂利用凝胶成像系统成像。

1.2.5 染色质免疫沉淀(ChIP)

处理后细胞使用1%多聚甲醛室温交联10 min并用1.25%甘氨酸终止。交联后细胞使用Bioruptor Pico水平式超声仪将DNA粉碎到约200 bp大小。提取核蛋白并使用BCA试剂定量。取100 mg蛋白加入AcH3抗体、H3K4Me3抗体、H3K9Me2抗体, 或KDM3A抗体进行ChIP反应。洗脱后的DNA加入相应的启动子引物使用qPCR扩增。10%起始材料作为input校正。

1.3 统计学方法

所有数据分析使用SPSS13.0软件进行, 定量资料以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用Post-hoc检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H₂O₂处理诱导E2F1在骨骼肌细胞中表达

用H₂O₂处理C2C12细胞并在处理后不同时间点收集细胞, qPCR和Western blot检测E2F1表达水平。结果提示, H₂O₂处理显著提升E2F1 mRNA(图1A)和蛋白质(图1B)水平并呈时间依赖性变化。H₂O₂处理1 h后E2F1水平即发生显著上升, 处理3 h后E2F1水平持续上升并保持到6 h。

2.2 H₂O₂处理促进组蛋白H3K9去甲基酶KDM3A与E2F1启动子的结合

由于转录水平的改变通常伴随启动子上特征性组蛋白修饰的改变, 因此我们使用ChIP技术检测了H₂O₂处理是否影响E2F1启动子上组蛋白修饰水平。H₂O₂处理C2C12细胞后不同时间点收集细胞, 分别使用AcH3抗体、H3K4Me3抗体、H3K9Me2抗体、KDM3A抗体进行ChIP实验。沉淀后的DNA使用E2F1启动子引物或GADPH启动子引物进行扩增。结果提示, H₂O₂处理后伴随着E2F1转录水平的

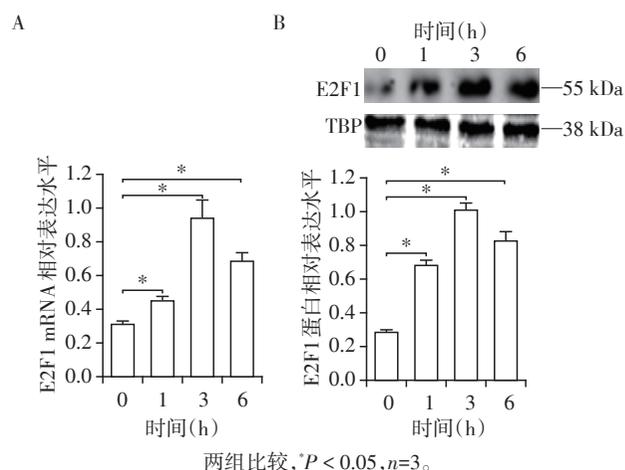


图1 H₂O₂处理促进E2F1表达

Figure 1 H₂O₂ treatment stimulates E2F1 expression

上升, 其启动子区AcH3水平呈显著上升趋势(图2A)。同时, 另一种与转录激活相关的组蛋白修饰H3K4Me3水平也表现出上升态势(图2B)。与此相反, 与转录抑制相关的组蛋白H3K9Me2水平则明显下降(图2C)。与此一致的是, H₂O₂处理显著促进组蛋白H3K9去甲基酶KDM3A在E2F1启动子上的结合(图2D)。

2.3 KDM3A干扰抑制H₂O₂处理诱导的E2F1表达上升

分别使用针对KDM3A的小干扰RNA(siKDM3A)或对照小干扰RNA(SCR)转染C2C12细胞, 24 h后用H₂O₂处理细胞3 h, 用qPCR和Western blot检测E2F1表达水平。结果显示, siKdm3a显著下调KDM3A水平超过60%。与此同时, E2F1表达水平也下降了约50%(图3A)。Western blot结果也显示KDM3A敲减抑制了H₂O₂处理诱导的E2F1蛋白质水平上升(图3B)。

2.4 KDM3A干扰影响E2F1启动子区组蛋白修饰

用针对KDM3A的小干扰RNA或对照小干扰RNA(SCR)分别转染C2C12细胞, 24 h后用H₂O₂处理细胞3 h, 分别用AcH3抗体、H3K4Me3抗体、H3K9Me2抗体进行ChIP实验。沉淀后DNA使用E2F1启动子引物或GADPH启动子引物进行扩增。结果显示, KDM3A沉默后显著降低了H₂O₂处理诱导的AcH3(图4A)与H3K4Me3(图4B)在E2F1启动子区的聚集。相反, H₂O₂处理引起的E2F1启动子区的H3K9Me2丢失随着KDM3A的沉默在很大程度上得以恢复(图4C)。因此, 我们得出结论: KDM3A通过影响E2F1启动子区组蛋白修饰介导H₂O₂处理诱导的E2F1表达上升。

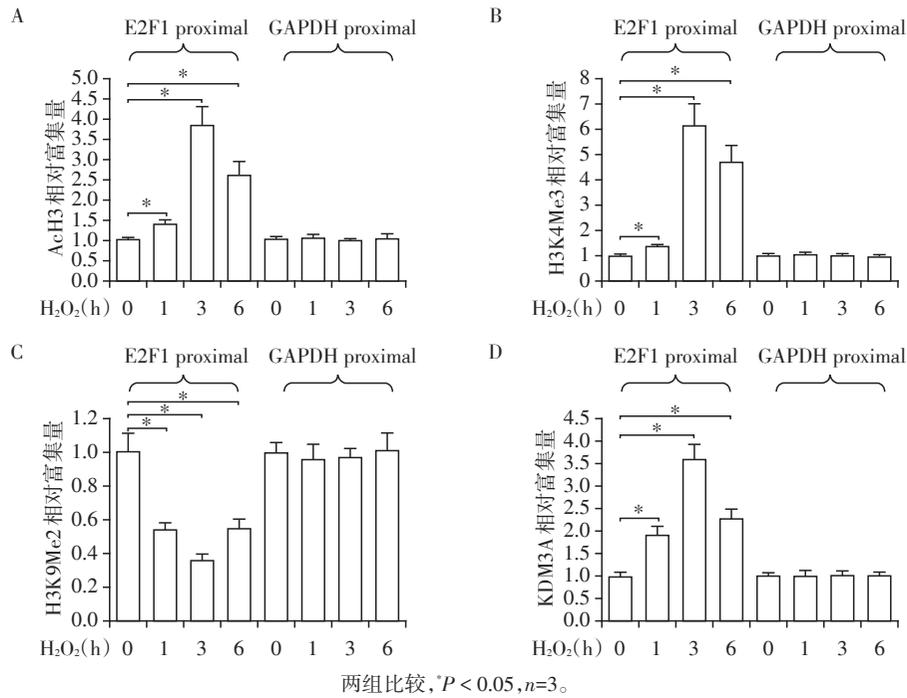


图2 H₂O₂处理改变E2F1启动子染色质结构

Figure 2 H₂O₂ treatment alters the chromatin structure surrounding the E2F1 promoter

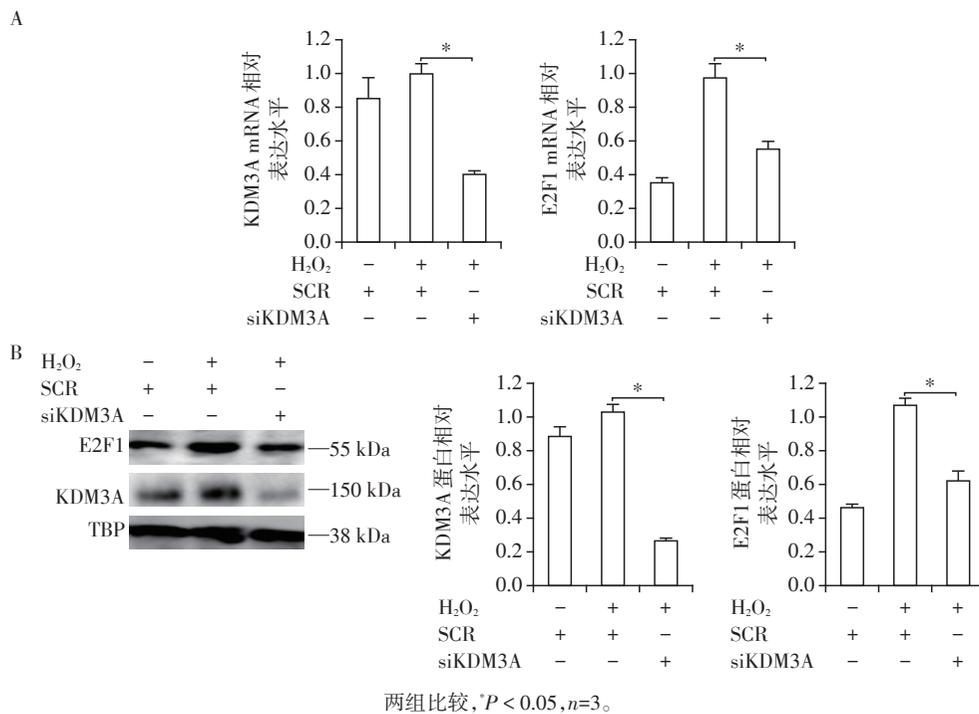


图3 KDM3A介导H₂O₂诱导E2F1表达增高

Figure 3 KDM3A mediates E2F1 expression induction by H₂O₂

3 讨论

基因转录的表观遗传学调控在众多病理生理学过程发挥重要作用。本研究的结果提示,组蛋白

H3K9去甲基酶KDM3A参与调控氧化应激诱导的骨骼肌细胞中E2F1表达上调。本研究发现,在H₂O₂处理诱导下KDM3A直接结合到E2F1启动子上。相反,干扰KDM3A则显著抑制E2F1的诱导表达。有

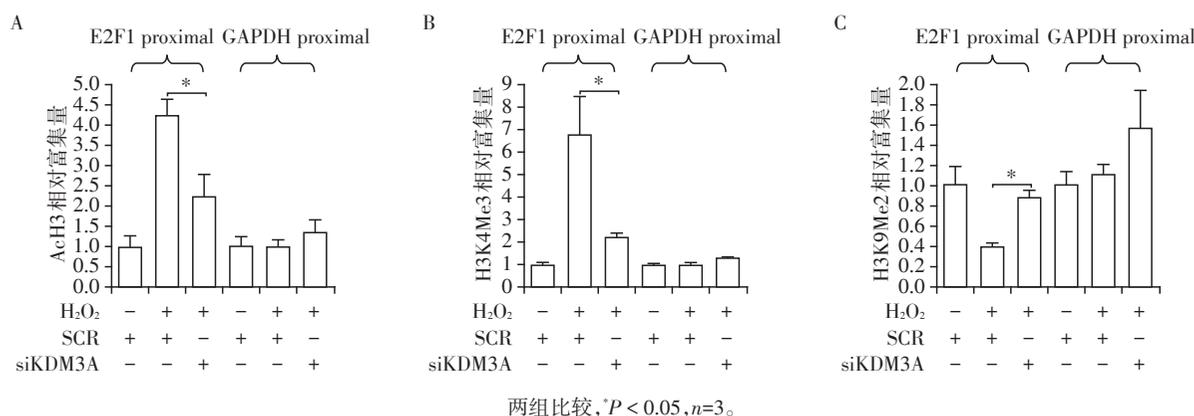


图4 KDM3A介导H₂O₂诱导的染色质重构

Figure 4 KDM3A mediates the changes in chromatin structure induced by H₂O₂

意思的是, KDM3A 干扰不仅恢复了 E2F1 启动子区组蛋白 H3K9Me2 水平, 并且引起了 AcH3 及 H3K4Me3 水平的下降, 提示 KDM3A 可能与其他组蛋白修饰酶发生对话, 共同调控 E2F1 转录。既往研究发现, KDM3A 通过移除 H3K9 二甲基化从而协助组蛋白乙酰转移酶 CBP/p300 结合到 PPAR γ 反应元件 (PPRE) 进而促进代谢相关基因转录^[15]。我们前期的研究也发现, KDM3A 可以和组蛋白 H3K4 三甲基转移酶 SET1A 互相作用共同促进血管紧张素诱导的血管内皮细胞中集落刺激因子 (CSF1) 的转录激活^[16]。但是, CBP/p300 或者 SET1A 是否参与了骨骼肌细胞中 E2F1 的转录调控还有待进一步研究。

组蛋白修饰不仅受到去甲基酶调控, 还受到甲基转移酶的调控。本研究主要集中在 KDM3A 对 E2F1 的转录激活上。另一种可能的解释是甲基转移酶 G9a 对 E2F1 的抑制作用在氧化应激过程中被解除。有报道证实, G9a 表达水平在动物组织中^[17]以及培养的细胞中均可被氧化应激所调控^[18]。与此相一致的是, G9a 在多种细胞中均可抑制凋亡^[19]。G9a 可以和 E2F1 相互作用共同调控基因转录^[20], 但目前尚不清楚 G9a 是否参与了氧化应激诱导的 E2F1 转录调控以及骨骼肌细胞凋亡。

综上所述, 本研究结果表明 KDM3A 可能通过调控 E2F1 转录参与氧化应激诱导的骨骼肌细胞凋亡, 提示可以通过抑制 KDM3A 表达或酶活性阻止骨骼肌细胞衰老及肌肉减少症的发生, 但这一假说还有待进一步实验验证。KDM3A 敲除小鼠按照孟德尔比例出生, 提示 KDM3A 对胚胎发育并不是必需的^[15]。有意思的是, KDM3A 缺陷小鼠成年后可发生自发肥胖及胰岛素抵抗, 提示系统性抑制 KDM3A 有可能造成代谢紊乱。因此, 进一步研究 KDM3A

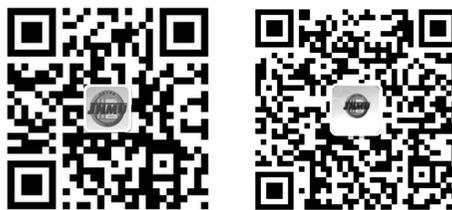
调控细胞氧化应激反应的机制将有助于制定更加合理的干预策略。

[参考文献]

- [1] Frontera WR, Hughes VA, Fielding RA, et al. Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study [J]. *J Appl Physiol*, 2000, 88(4): 1321-1326
- [2] Demontis F, Piccirillo R, Goldberg AL. Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from Drosophila and mammalian models [J]. *Dis Model Mech*, 2013, 6(6): 1339-1352
- [3] Song W, Kwak HB, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(3/4): 517-528
- [4] Siu PM, Pistilli EE, Ryan MJ, et al. Aging sustains the hypertrophy-associated elevation of apoptotic suppressor X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in skeletal muscle during unloading [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2005, 60(8): 976-983
- [5] Siu PM, Pistilli EE, Alway SE. Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 289(4): R1015-R1026
- [6] Marzetti E, Leeuwenburgh C. Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age [J]. *Exp Gerontol*, 2006, 41(12): 1234-1238
- [7] Mecocci P, Fano G, Fulle S, et al. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle [J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(3/4): 303-308
- [8] Siu PM, Wang Y, Alway SE. Apoptotic signaling induced by H₂O₂-mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes [J]. *Life Sci*, 2009, 84(13/14): 468-481

- [9] Tanaka H, Matsumura I, Ezoe S, et al. E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination [J]. *Mol Cell*, 2002, 9(5):1017-1029
- [10] Wang K, Zhou LY, Wang JY, et al. E2F1-dependent miR-421 regulates mitochondrial fragmentation and myocardial infarction by targeting Pink1 [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:7619
- [11] Castillo DS, Campalans A, Belluscio LM, et al. E2F1 and E2F2 induction in response to DNA damage preserves genomic stability in neuronal cells [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(8):1300-1314
- [12] Kim YJ, Jung JK, Lee SY, et al. Hepatitis B virus X protein overcomes stress-induced premature senescence by repressing p16 (INK4a) expression via DNA methylation [J]. *Cancer Lett*, 2010, 288(2):226-235
- [13] Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code [J]. *Science*, 2001, 293(5532):1074-1080
- [14] 方明明, 吴晓燕, 李平, 等. 炎症因子 IFN- γ 调控小鼠成肌细胞 FoxO1 乙酰化及活性的机制研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(11):1316-1320
- [15] Tateishi K, Okada Y, Kallin EM, et al. Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance [J]. *Nature*, 2009, 458(7239):757-761
- [16] Shao J, Weng XY, Zhuo LL, et al. Angiotensin II induced CSF1 transcription is mediated by a crosstalk between different epigenetic factors in vascular endothelial cells [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019, 1862(1):1-11
- [17] Lei WJ, Long YJ, Li S, et al. Homocysteine induces collagen I expression by downregulating histone methyltransferase G9a [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7):e0130421
- [18] Chervona Y, Costa M. The control of histone methylation and gene expression by oxidative stress, hypoxia, and metals [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(5):1041-1047
- [19] Casciello F, Windloch K, Gannon F, et al. Functional role of G9a histone methyltransferase in cancer [J]. *Front Immunol*, 2015, 6:487
- [20] Rao VK, Ow JR, Shankar SR, et al. G9a promotes proliferation and inhibits cell cycle exit during myogenic differentiation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(17):8129-8143

[收稿日期] 2019-03-12

**欢迎关注本刊微博、微信公众号!**