

· 基础研究 ·

组蛋白去乙酰化修饰对非洲爪蛙胚胎发育及胚层分化的影响

曹 青¹, 赵 晓¹, 康雅菲¹, 徐西兵¹, 刘 浩¹, 刘 晨^{2*}¹河南科技大学医学遗传学教研室, 河南 洛阳 471023; ²南京医科大学医学遗传学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:探讨组蛋白乙酰化修饰对非洲爪蛙胚胎早期发育以及三胚层分化的影响。方法:用400 nmol/L的曲古抑菌素A(trichostatin A, TSA)处理2细胞时期的胚胎,观察胚胎发育的情况,并通过整体原位杂交的方法检测胚层标记基因的表达;通过显微注射组蛋白去乙酰化酶1(histone deacetylase 1, HDAC1)特异性的反义寡核苷酸(HDAC1MO)实现HDAC1基因的敲降,利用整体原位杂交检测胚层标记基因的表达。结果:TSA处理造成胚胎发育异常,TSA处理和敲降HDAC1影响胚层标记基因的表达。结论:组蛋白去乙酰化酶在胚胎早期发育的过程中参与胚层的分化。

[关键词] TSA; HDAC1; 非洲爪蛙; 胚层分化**[中图分类号]** R384.1**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)08-1130-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190807

Effects of histone deacetylation modification on early embryogenesis and germ-layer differentiation of *Xenopus*Cao Qing¹, Zhao Xiao¹, Kang Yafei¹, Xu Xibing¹, Liu Hao¹, Liu Chen^{2*}¹Department of Medical Genetics, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023; ²Department of Medical Genetics, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of histone deacetylation modification on early embryogenesis and three germ-layer differentiation of *Xenopus laevis*. **Methods:** Two-cell embryos were treated with 400 nmol/L Trichostatin A (TSA) to observe early embryogenesis and expression of three germ layer marker genes by whole-mount in situ hybridization. Micro-injection of histone deacetylase 1 (HDAC1) specific antisense oligonucleotide (HDAC1MO) was performed to knockdown HDAC1. The expression of three germ layer marker genes was detected by whole-mount in situ hybridization. **Results:** Embryos treated with 400 nmol/L TSA showed developmental defects. The expression of three germ layer marker genes were affected in embryos treated with TSA or knockdown of HDAC1. **Conclusion:** Histone deacetylase is involved in germ-layer differentiation during early embryogenesis.

[Key words] TSA; HDAC1; *Xenopus laevis*; germ layer differentiation

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(08): 1130-1134]

动物个体是由单一的受精卵经过高度有序、复杂

[基金项目] 河南科技大学博士启动基金(13480027);南京医科大学科技发展基金重点项目(2015NJMUZD002);江苏省高校自然科学研究面上项目(16KJB180020);江苏省自然科学基金青年基金(BK20171053);国家自然科学基金青年基金(81702747)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: liuchen@njmu.edu.cn

的选择性表达。组蛋白乙酰化与去乙酰化是调控基因表达的一种重要的表观遗传修饰方式,通过改变组蛋白的乙酰化状态来影响基因的转录。染色质中的组蛋白在组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT)的作用下发生乙酰化,使基因的转录处于活跃状态;与乙酰化作用相反,组蛋白在组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)的作用下发生去乙酰化导致基因转录抑制。HDAC家族共有18个成员,分为4类: I类包括HDAC1、HDAC2、

HDAC3 和 HDAC8; II 类包括 HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC9 和 HDAC10; III 类与酵母的 Sir2 同源,包括 SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6 和 SIRT7; IV 类包括 HDAC11,其中对 I 类和 II 类组蛋白去乙酰化酶研究的较多。在 小鼠胚胎中敲除 HDAC1,胚胎发育滞后并伴有严重的增殖缺陷,在胚胎期 10.5 d 前死亡^[1]。另外,有研究表明 HDAC1 在非洲爪蛙早期发育过程中通过调节神经胶质细胞的增殖参与中神经系统的形成^[2-3]。上述研究表明 HDAC1 可能参与胚胎早期发育的过程,但其作用尚不完全清楚。

在早期胚胎发育过程中,一个至关重要的步骤就是外胚层、中胚层和内胚层的分化,进而由 3 个胚层分化出各种组织和器官。组蛋白去乙酰化修饰是否参与胚层分化的过程和调节分化基因的表达尚不清楚。曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)是一种广谱的抑制组蛋白去乙酰化酶的一种药物,能够抑制 I 类和 II 类组蛋白去乙酰化酶的活性,并对多种癌症的发生发展起抑制作用^[4-5]。非洲爪蛙作为一种经典的模式动物,是研究早期胚胎发育特别是三胚层分化的良好模型,因此我们以非洲爪蛙为模式动物,通过 TSA 处理胚胎抑制 HDAC 的活性后观察胚胎早期发育和胚层分化的影响,从而探讨组蛋白乙酰化修饰在胚层形成中的作用。另外,通过基因敲降(gene knockdown)的方法来进一步探讨 HDAC1 对胚层分化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

将购买的 TSA 粉末(T8552, Sigma-Aldrich 公司,美国)溶解在二甲基亚砜(DMSO)里,配制成 1 mmol/L 的母液,-20℃条件下避光保存。

1.2 方法

1.2.1 体外受精和胚胎培养

实验前 12~14 h 向雌性爪蛙的背部淋巴囊中注射 300~800 U 的人绒毛膜促性腺激素(hCG)诱导其排卵。实验前处死雄性爪蛙,分离两侧睾丸放入 1×MBSH [88 mmol/L NaCl, 2.4 mmol/L NaHCO₃, 1 mmol/L KCl, 0.82 mmol/L MgSO₄, 0.41 mmol/L CaCl₂, 0.33 mmol/L Ca(NO₃)₂, 10 mmol/L HEPES, pH7.4] 中, 4℃保存。收集卵细胞,取 1 小块睾丸组织剪碎进行体外受精,受精约 30 min 后,用 2%半胱氨酸溶液处理去除受精卵外的胶质膜。蒸馏水清洗几次去除半胱氨酸残留,然后将胚胎放入 0.1×MBSH 中继续培养。

为了抑制胚胎内 HDAC 的活性,将 2 细胞期(st.2)或 4 细胞期(st.3)的胚胎放入含有 400 nmol/L TSA 的 0.1×MBSH 中进行培养。因 TSA 溶解于 DMSO 中,故用加入等体积 DMSO 的 0.1×MBSH 做为对照。待对照组胚胎发育至原肠期(st.10.5)时,换上正常的培养液继续培养。待胚胎发育至尾芽期时,对胚胎的表型进行观察并拍照。

1.2.2 反义寡聚核苷酸(morpholino, MO)和显微注射

为了敲降胚胎中内源 HDAC1 基因的表达,通过显微注射的方法向 2 细胞期或 4 细胞期胚胎中注射 50 ng 的 HDAC1 MO,该 MO 用于敲降 HDAC1 的效率和特异性已有文献报道^[2]。敲降人 β -globin 基因的 MO 用做对照 ctrlMO。所有的 MO 都购买自美国 Gene Tools 公司,MO 序列如下,ctrlMO: 5'-CCTCT-TACCTCAGTTACAATTTATA-3'; HDAC1MO: 5'-TCAGCGCCATTTTCCTTCCGCGTCT-3'。

1.2.3 探针制备和原位杂交

pSC2+xSox2、pSC2+xSox17 和 pSC2+Xbra 的质粒分别用 EcoR I、Cla I 和 Sal I 酶切,纯化后用 T7 RNA 聚合酶((Fermentas 公司,加拿大)进行转录,转录完成后用 RNA 纯化试剂盒(Qiagen 公司,德国)进行纯化。

收集原肠期(st.10.5)的胚胎,固定后进行原位杂交,原位杂交按照之前文献报道的标准步骤进行^[6]。

2 结果

2.1 TSA 处理导致胚胎发育畸形

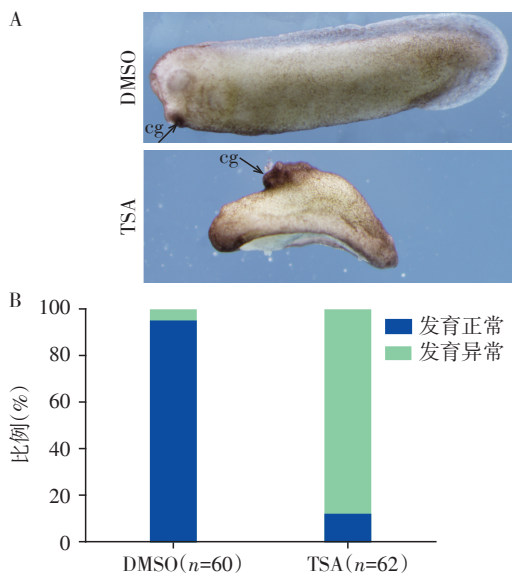
用 400 nmol/L 的 TSA 处理 2 细胞期(st.2)的胚胎,DMSO 处理的胚胎用做对照(ctrl),结果显示,95%的对照组胚胎发育正常,而 TSA 处理的胚胎中 90.32%发育缺陷(图 1),表现为体轴明显变短,黏液腺变大,神经管不闭合,造成胚胎内部组织外露。这说明 HDAC 在胚胎早期发育中起作用,其活性被抑制以后,造成胚胎发育不正常。

2.2 TSA 处理影响三胚层的分化

为进一步研究 HDAC 对三胚层分化的影响,通过原位杂交的方法检测 TSA 处理后三胚层标记基因的变化。结果显示,TSA 处理后神经外胚层的标记基因 Sox2 以及中胚层标记基因 Xbra 的表达明显下降,内胚层标记基因 Sox17 α 的表达略有下降。这一结果提示,HDAC 的活性被抑制以后,能够影响三胚层的分化(图 2)。

2.3 HDAC1 对三胚层形成的影响

为了进一步研究 HDAC 对三胚层分化的影响,



A: 对照组与 TSA 处理组胚胎发育至尾芽期(st.30)的表型(cg: 黏液腺); B: 对照组与 TSA 处理组中发育正常的胚胎以及发育缺陷的胚胎占胚胎总数的百分比分析(n: 胚胎总数)。

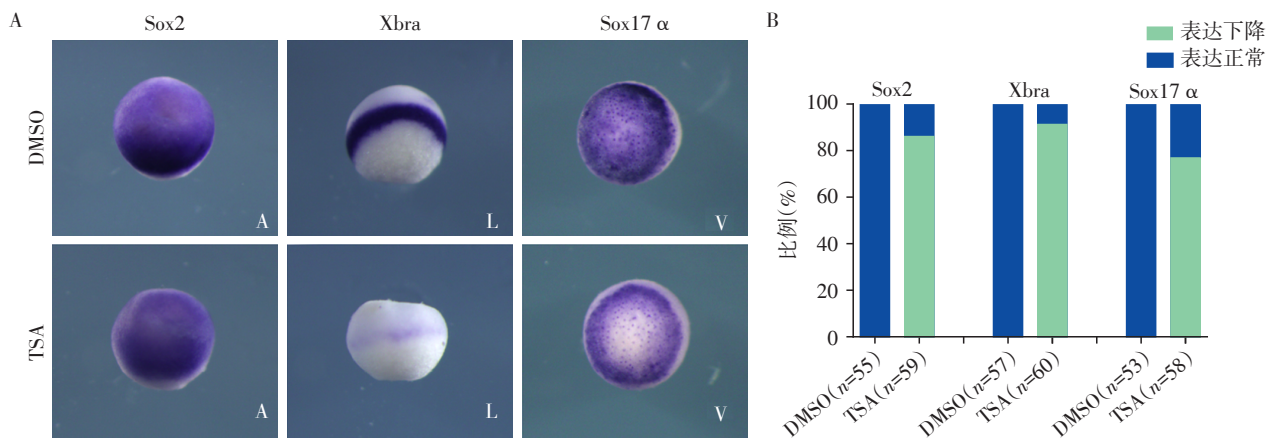
图 1 TSA 处理对胚胎发育的影响

Figure 1 Effect of TSA treatment on embryogenesis

对 HDAC1 进行基因敲降。已有相关文献报道了 HDAC1 的特异性 MO, 该 MO 的敲降效果已被验证, 注射该 MO 后胚胎中内源的 HDAC1 的表达明显下降^[2]。通过显微注射的方法, 向胚胎中注射特异性的 HDAC1 的 MO, 敲降细胞中内源的 HDAC1。然后收集原肠期的胚胎通过原位杂交检测 Sox2、Xbra 以及 Sox17 α 的表达。结果显示敲降 HDAC1 后, Sox2、Xbra 的表达下降, Sox17 α 的表达变化不大(图 3)。这一结果与 TSA 处理后对三胚层表达变化的影响基本一致, 说明 HDAC1 参与了三胚层的分化, 敲降 HDAC1 之后胚层的分化受到影响。

2.4 敲降 HDAC1 能够促进 Spemann 组织者中表达的基因

TSA 处理后的尾芽期胚胎表现出大黏液腺的表型, 黏液腺是胚胎最前端的结构, 这提示胚胎可能发生了前部化和背部化。在胚胎发育过程中, 前部化和背部化的发生, 需要 Spemann 组织者中特异性表达的基因 Goosecoid(GSC)、Chordin 等的表达^[7],



A: 原位杂交检测神经外胚层(Sox2)、中胚层(Xbra)以及内胚层(Sox17 α)标记基因的表达(A: 动物极观; L: 侧面观; V: 植物极观); B: 对照组与 TSA 处理组中 Sox2、Xbra 以及 Sox17 α 表达量正常以及下降的百分比分析(n: 胚胎总数)。

图 2 TSA 处理对胚层分化的影响

Figure 2 Effect of TSA treatment on germ-layer specification

这些基因表达的产物会抑制后部化和腹部化信号(如 BMP 信号、Wnt 信号), 从而使胚胎发生前部化和背部化。因此进一步检测了敲降 HDAC1 之后对 GSC、Chordin 和 Wnt 信号通路的配体 Wnt8 表达的影响。在原肠期(st.10.5)时, GSC 和 Chordin 特异地背部中胚层表达, Wnt8 则在腹部中胚层表达。从胚胎植物极观察这 3 个基因的表达, 结果发现敲降 HDAC1 后, GSC 和 Chordin 的表达增加而腹部化信号 Wnt8 的表达下降(图 4)。因此推测 TSA 对胚胎早期发育的影响与激活组织者基因 GSC、Chordin 的

表达以及抑制腹部化信号 Wnt8 的表达有关。

3 讨论

染色质中的组蛋白在 HDAC 的作用下去乙酰化, 从而使染色质的结构更加紧密, 导致基因转录的抑制。TSA 属于羟肟酸类, 是链霉素代谢的产物, 能够抑制 I 型和 II 型 HDAC, 进而改变组蛋白的乙酰化水平, 影响基因表达。研究发现 TSA 能够促进细胞重编程^[8], 抑制细胞增殖、诱导分化和凋亡等^[9-10], 目前 TSA 已作为抑制癌症发生发展的一种药

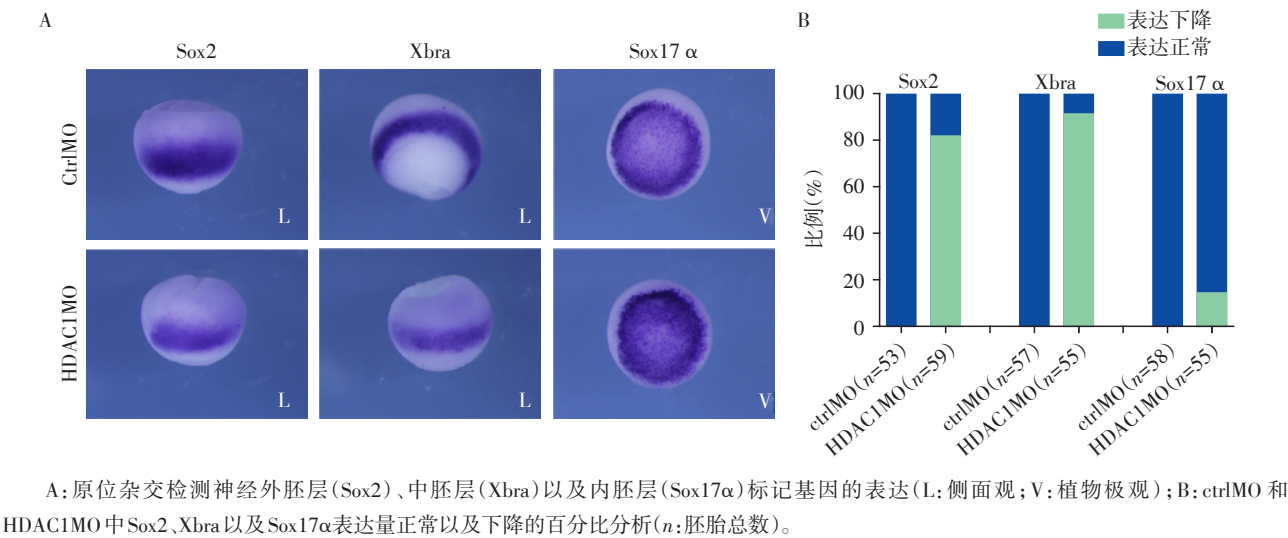


图3 敲降HDAC1对胚层分化的影响
Figure 3 Effect of knockdown of HDAC1 on germ-layer specification

物进行临床前试验^[11]。癌症的发生是细胞增殖和细胞分化异常的结果,TSA能够影响细胞的增殖和分化,而这种作用是通过抑制HDAC的活性来实现的。HDAC1、HDAC2和HDAC3在非洲爪蛙神经胚中特异性地在神经板、神经脊、神经褶和神经管中表达^[12],并且在中枢神经系统形成的过程中参与细胞分化^[2,12]。

目前对于组蛋白去乙酰化修饰在发育早期三胚层形成中的作用还尚未有报道,非洲爪蛙作为一种模式生物,其受精卵直径大,便于在显微镜下进行操作和进行药物处理,因此为了探讨HDAC在胚胎发育中的作用,我们用HDAC抑制剂TSA处理爪蛙胚胎。TSA处理后,导致胚胎发育异常,黏液腺增

大,体轴变短,神经管不闭合。这一结果表明在胚胎发育早期的时候需要HDAC参与对染色质结构的重塑从而调节基因的表达。经原位杂交检测,TSA处理后神经外胚层的标记基因Sox2和中胚层的标记基因Xbra表达明显下降,而内胚层的标记基因Sox17α的表达略有下降。这一结果说明经TSA处理,HDAC的活性受到抑制以后,影响了3个胚层的分化。

对HDAC1的研究较多,在小鼠中敲除HDAC1,胚胎在10.5 d前死亡^[1],这一结果提示了HDAC1可能在早期胚胎发育的过程中尤其是胚层分化中发挥重要作用,因而敲除HDAC1之后,胚胎无法存活。为了进一步探讨HDAC1在胚层分化中的作用,

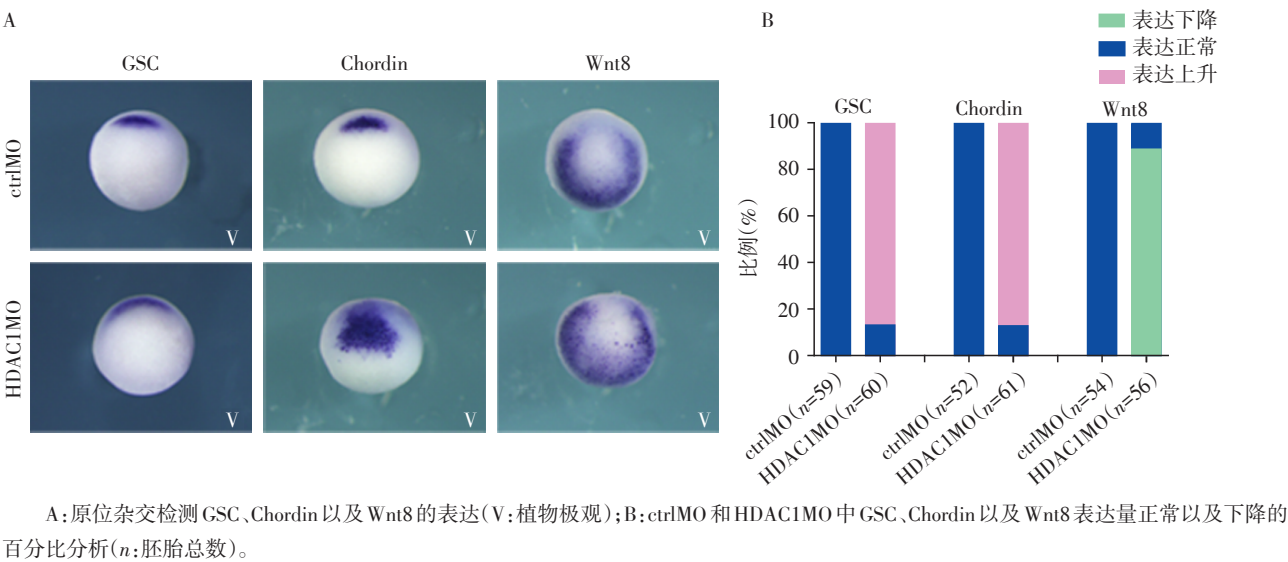


图4 敲降HDAC1对组织者中特异性表达基因的影响
Figure 4 Effect of knockdown of HDAC1 on specific genes expression in organizer

通过显微注射反义寡核苷酸的方法对HDAC1进行基因敲降,结果发现敲降HDAC1后,三胚层的分化确实受到了影响。敲降HDAC1后,神经外胚层Sox2和中胚层Xbra表达下降,说明HDAC1影响神经外胚层和中胚层的分化;而内胚层Sox17 α 表达变化不大,前文所述TSA处理后Sox17 α 的表达下降,推测可能是HDAC家族的其他成员参与对Sox17 α 的调节,因而单独敲降HDAC1后对Sox17 α 的表达影响不大,具体作用机制还需要进一步探讨。在胚层分化的过程中,Spemann组织者中特异表达的基因如GSC、DKK1、Chordin等对背-腹体轴的形成起关键作用,这些基因通过抑制腹部化信号(如Wnt、BMP、Nodal等)来促使胚胎发生前部化和背部化。接着进一步分析了HDAC1在背-腹体轴形成中的作用,结果发现敲降HDAC1可以促进在Spemann组织者中特异表达的基因GSC和Chordin的表达,而对腹部Wnt信号的配体Wnt8的表达起抑制作用。GSC和Chordin是背部中胚层的标记基因而Wnt8是腹部中胚层标记基因,这一结果说明HDAC1可能参与了背-腹体轴的调节,同时TSA处理后胚胎发育异常,黏液腺增大,黏液腺是胚胎最前端的组织,说明TSA处理后使胚胎发生前部化,而GSC和Chordin表达的增加会促使胚胎发生前部化,这一结果为揭示TSA处理后胚胎的表型提供了一定依据。本研究发现HDAC参与早期胚胎发育过程中三胚层的分化,进一步分析发现HDAC1参与调节中胚层和神经外胚层的分化以及背-腹体轴的形成,该结果为了了解组蛋白乙酰化修饰在单个合子发育成一个完整有机个体中所起的作用提供很好的借鉴。

[参考文献]

- [1] Lager G, O'Carroll D, Rembold M, et al. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression [J]. *Embo J*, 2002, 21 (11) : 2672-2681
- [2] Blum R, Tao Y, Ruan H, et al. HDAC1 regulates the proliferation of radial glial cells in the developing *Xenopus tectum* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0120118
- [3] Ruan H, Gao J, Qi X, et al. Visual experience dependent regulation of neuronal structure and function by histone deacetylase 1 in developing *Xenopus tectum in vivo* [J]. *Dev Neurobio*, 2017, 77(8):947-962
- [4] Wu N, Zhu Y, Xu X, et al. The anti-tumor effects of dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 and histone deacetylase inhibitor Trichostatin A on inducing autophagy in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Cancer*, 2018, 9(6): 987-997
- [5] Wang X, Xu J, Wang H, et al. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, reverses epithelial - mesenchymal transition in colorectal cancer SW480 and prostate cancer PC3 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 456 (1):320-326
- [6] Cao Q, Shen Y, Zheng W, et al. Tcf7l1 promotes transcription of Kruppel-likefactor 4 during *Xenopus* embryogenesis [J]. *J Biomed Res*, 2018, 32(3):215-221
- [7] Cao Q, Zhang X, Lu L, et al. Klf4 is required for germ-layer differentiation and body axis patterning during *Xenopus* embryogenesis [J]. *Development*, 2012, 139 (21) : 3950-3961
- [8] Kim K, Doi A, Wen B, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2010, 467 (7313):285-290
- [9] Zhang XF, Huang FH, Zhang GL, et al. Novel biomolecule lycopene-reduced graphene oxide-silver nanoparticle enhances apoptotic potential of trichostatin A in human ovarian cancer cells (SKOV3) [J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12:7551-7575
- [10] Shao Y, Liu Z, Liu J, et al. Expression and epigenetic regulatory mechanism of BNIP3 in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2018, 54(1):348-360
- [11] Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, et al. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7):1414
- [12] Zhang Z, Lei A, Xu L, et al. Similarity in gene-regulatory networks suggests that cancer cells share characteristics of embryonic neural cells [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292 (31):12842-12859

[收稿日期] 2018-07-07