

· 基础研究 ·

DNA 甲基化修饰对非洲爪蛙胚层分化的影响

曹青¹, 李卓璇¹, 倪帅¹, 李铁梅¹, 刘晨^{2*}¹河南科技大学基础医学院医学遗传学教研室, 河南 洛阳 471000; ²南京医科大学医学遗传学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:探讨DNA甲基化修饰对非洲爪蛙三个胚层分化的影响。方法:用30 μmol/L的5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-AZA-CdR)处理胚胎,抑制早期胚胎细胞内DNA甲基化转移酶1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)的活性,观察胚胎的表型,并收集原肠期胚胎通过原位杂交检测三胚层标记基因的表达情况;显微注射DNMT1特异的反义寡核苷酸(DNMT1MO)以敲降胚胎细胞内DNMT1的表达,然后通过原位杂交检测胚层标记基因的表达情况。结果:5-AZA-CdR处理导致胚胎早期发育异常,抑制中胚层标记基因Xbra的表达。敲降DNMT1促进背部中胚层标记基因GSC和Chordin的表达,抑制腹部中胚层标记基因Wnt8的表达。结论:DNA甲基化转移酶参与调节非洲爪蛙三胚层分化形成的过程。

[关键词] 5-AZA-CdR; DNMT1; 非洲爪蛙; 胚层分化

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)12-1756-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20201203

Effects of DNA methylation on germ layer differentiation of *Xenopus laevis*

CAO Qing¹, LI Zhuoxuan¹, NI Shuai¹, LI Tiemei¹, LIU Chen^{2*}¹Department of Medical Genetics, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000; ²Department of Medical Genetics, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effects of DNA methylation on germ layer differentiation of *Xenopus laevis*. **Methods:** Embryos were treated with 30 μmol/L 5-aza-2'-deoxycytidine(5-AZA-CdR) to inhibit DNA methyltransferase 1(DNMT1) in early embryonic cells, then observe the phenotype. Gastrula embryos were collected and the expression of three germ-layer marker genes was detected via in situ hybridization. To knock down endous DNMT1, the specific DNMT1 antisense oligonucleotide (DNMT1MO) were injected into 2-cell stage embryos, and then the expression of three germ-layer marker genes was detected by in situ hybridization. **Results:** 5-AZA-CdR treatment led to abnormal development of embryos and inhibited the expression of the mesoderm marker gene Xbra. Knockdown of DNMT1 promotes expression of the dorsal mesodermal marker genes GSC and Chordin, and inhibits the expression of the ventral mesoderm marker gene Wnt8. **Conclusion:** DNA methyltransferase is involved in the regulation of the differentiation of the three germ layers of *Xenopus laevis*.

[Key words] 5-AZA-CdR; DNMT1; *Xenopus laevis*; germ-layer differentiation

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(12): 1756-1760]

DNA甲基化是一种重要的表观遗传学修饰,是由DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)

[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项目(BK20171053);国家自然科学基金青年基金项目(81702747)

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

介导的。甲基化主要发生在富含GC二核苷酸(CpG)的区域。DNMT主要包括DNMT1、DNMT3A和DNMT3B,它们能够催化S-腺苷甲硫氨酸(SAM)上的甲基转移到CpG胞嘧啶上,形成m⁵CpG,进而改变染色质的构象引起基因沉默^[1]。DNA的甲基化作为真核生物中一种重要的基因表达调控方式,在早期胚胎发育、器官形成、遗传印记以及癌症的发生发展中发挥至关重要的作用^[2-5]。在小鼠和非洲爪

蛙的早期胚胎中许多组织特异性基因的启动子被甲基化而不表达^[6],故推测在胚胎早期发育的过程中可能存在基因沉默机制以确保胚胎发育的正确进行。

DNMT1 是主要的维持性 DNA 甲基转移酶, DNMT1 表达水平的降低可导致小鼠、青蛙和斑马鱼的早期胚胎死亡^[6-8],这一现象可能是由于多种发育缺陷造成的。在动物个体发育中,第一个关键步骤是三胚层的分化形成,这一过程是通过严格而精密的基因表达调控实现的。虽然已有文献报道在早期胚胎中改变 DNA 甲基化的水平,会造成胚胎发育缺陷和致死,但是对于 DNA 甲基化在胚胎发育,特别是在三胚层分化形成过程中的作用了解得还不够清楚,还需要进一步研究。

5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-AZA-CdR)是一种特异的 DNMT1 抑制剂,通过 5-AZA-CdR 处理能够抑制细胞中 DNMT1 的活性。为研究 DNA 甲基化修饰对非洲爪蛙三胚层形成的影响,本研究用 5-AZA-CdR 处理胚胎以抑制 DNMT1 的活性,观察胚胎的发育情况以及三胚层特异标记基因的表达情况。另外,在胚胎中敲降 DNMT1 研究 DNA 甲基化修饰对非洲爪蛙三胚层分化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

将 5-AZA-CdR 粉末(A3656, Sigma-Aldrich 公司,美国)溶解于二甲亚砜(DMSO)中,储存浓度为 30 mmol/L, -20 °C 下避光保存。

1.2 方法

1.2.1 胚胎培养

通过体外受精获得大量同步分裂的胚胎,将胚胎置于 0.1×MBSH 溶液中,14 °C 恒温培养,详细方法见参考文献^[9]。

用 30 μmol/L 的 5-AZA-CdR 处理胚胎,抑制胚胎内 DNA 甲基转移酶的活性,处理方法如下:将 2 细胞期(st.2)胚胎置于含 5-AZA-CdR 的 0.1×MBSH 溶液中培养至原肠期后,更换不含 5-AZA-CdR 的培养液继续培养至所需时期。对照组胚胎用加入等体积 DMSO 的 0.1×MBSH 溶液培养。待对照组胚胎发育至尾芽期(st.30),将对照组和 5-AZA-CdR 处理组的胚胎用 4% 甲醛固定后拍照。

1.2.2 反义寡聚核苷酸(morpholino, MO)序列和显微注射

向 2 细胞期的胚胎中显微注射 30 ng DNMT1MO,

以敲降胚胎内 DNMT1 的表达。该 DNMT1MO 的有效性和特异性已有文献报道^[6]。另外,注射人 β-globin 基因的 MO(ctrlMO)作为对照。ctrlMO 和 DNMT1MO 均购自美国 Gene Tools 公司,MO 序列如下,ctrlMO: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'; DNMT1MO: 5'-GGACAGGCGTGAAACAGACTCGGC-3'。

1.2.3 探针制备和原位杂交

将制备探针用的质粒 pSC2+xSox2、pSC2+Xbra、pSC2+xSox17α、pCS2+GSC、pCS2+dnWnt8 以及 pCS2+Chordin 用限制性内切酶进行线性化。pSC2+xSox2、pCS2+GSC 和 pCS2+Chordin 用 *EcoR* I 酶切, pSC2+Xbra 用 *Sal* I 酶切, pSC2+xSox17α 用 *Cla* I 酶切, pCS2+dnWnt8 用 *Bam*H I 酶切。以线性化的质粒为模板,使用 T7 RNA 聚合酶(Fermentas 公司,加拿大)体外转录制备探针。探针制备完成后使用 RNA 纯化试剂盒(Qiagen 公司,德国)纯化。将纯化后的探针加入杂交液后, -20 °C 保存。

收集原肠期(st.10.5)的胚胎到 2 mL 离心管中,加入 HEMFA 固定 2~3 h。弃去溶液,加入无水乙醇脱水 2 次,每次 10 min,最后加入新的无水乙醇,保存于 -20 °C 等待进行原位杂交实验。原位杂交参照文献报道的步骤进行^[10]。原位杂交显色结束后,用体式显微镜进行拍照,根据基因显色区域以及显色深浅的变化来判断基因的表达是否发生改变。

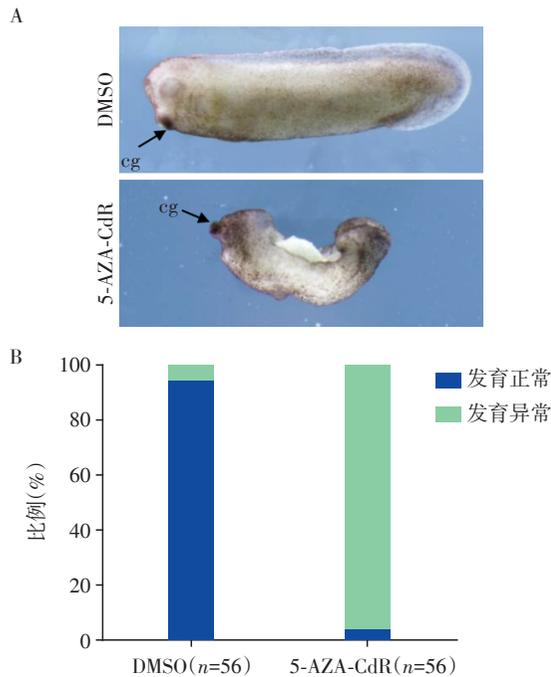
2 结果

2.1 5-AZA-CdR 处理对胚胎早期发育的影响

为了研究 DNA 甲基化修饰在胚层分化形成中的作用,首先用 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-AZA-CdR 处理胚胎,观察胚胎的发育情况。对照组胚胎发育至尾芽期时,5-AZA-CdR 处理的胚胎发育异常,体轴变短,神经管未闭合,胚胎内组织外露(图 1A)。对照组胚胎中 94.83% 发育正常,而 5-AZA-CdR 处理后,96.43% 的胚胎发育异常(图 1B)。该结果说明用 5-AZA-CdR 处理抑制 DNA 甲基转移酶的活性,胚胎的早期发育受到影响。

2.2 5-AZA-CdR 处理对胚层分化的影响

收集对照组和 5-AZA-CdR 处理组的原肠期胚胎,通过原位杂交检测三胚层标记基因的表达情况。5-AZA-CdR 处理后中胚层标记基因 Xbra 的表达明显下降,神经外胚层标记基因 Sox2 和内胚层标记基因 Sox17α 的表达不受影响(图 2)。该结果说明 5-AZA-CdR 处理后,中胚层的分化受到抑制。



A: 对照组与5-AZA-CdR处理组胚胎的发育情况(eg: 黏液腺); B: 对照组与5-AZA-CdR处理组中发育情况的百分比分析(n: 胚胎总数)。

图1 5-AZA-CdR处理对胚胎早期发育的影响

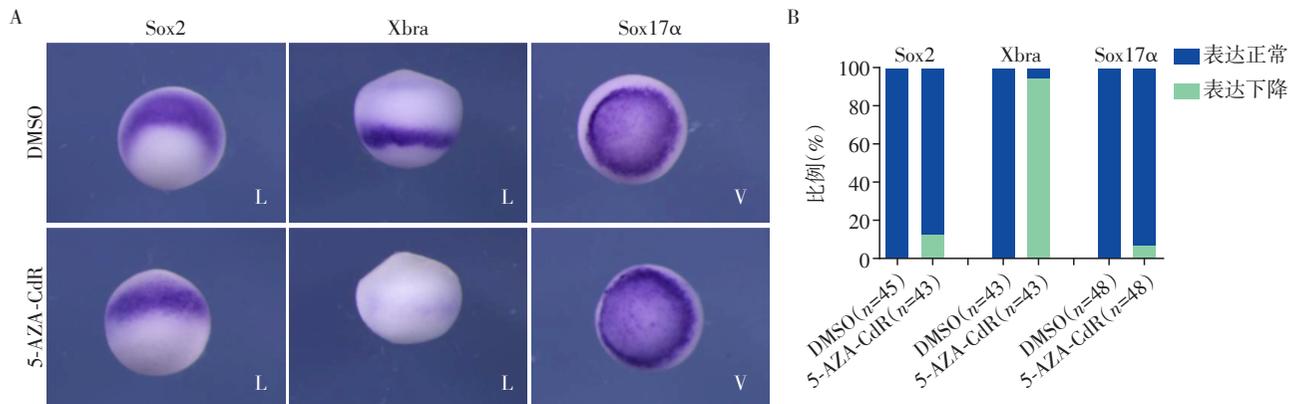
Figure 1 Effect of 5-AZA-CdR treatment on early embryogenesis

2.3 敲降DNMT1对胚层分化的影响

为了进一步证实DNMT1在胚层分化形成中的作用,向2细胞胚胎中显微注射30 ng DNMT1MO来敲降细胞内源的DNMT1,注射30 ng ctrlMO的胚胎作为对照,然后通过原位杂交检测对照组和敲降组胚胎中三胚层标记基因的表达情况。该DNMT1MO的序列来自于已发表的文献,敲降效果已被证实,显微注射入胚胎后能够实现DNMT1的敲降。敲降DNMT1后中胚层标记基因Xbra的表达下降,神经外胚层标记基因Sox2和内胚层标记基因Sox17 α 的表达变化不大(图3)。该结果说明敲降DNMT1也抑制中胚层的分化形成。

2.4 敲降DNMT1对中胚层分化的影响

中胚层包括背部中胚层和腹部中胚层,为了更加深入地研究DNMT1对中胚层分化的影响,通过原位杂交检测敲降DNMT1后背部中胚层和腹部中胚层的标记基因的表达情况。敲降DNMT1后背部中胚层的标记基因GSC和Chordin表达上升,而腹部中胚层的标记基因Wnt8表达下降(图4)。该结果提示敲降DNMT1后,促进了背部中胚层的分化形成,但是抑制了腹部中胚层的形成。



A: 对照组与5-AZA-CdR处理组胚胎三胚层标记基因的表达情况(L: 侧面观; V: 植物极观); B: 对照组与5-AZA-CdR处理组胚胎三胚层标记基因表达情况的百分比分析(n: 胚胎总数)。

图2 5-Aza-CdR处理对胚层分化的影响

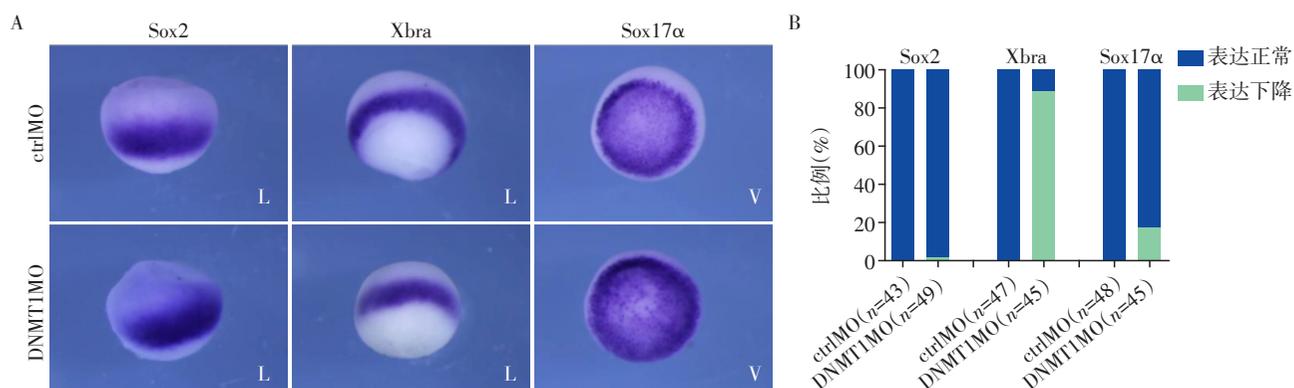
Figure 2 Effect of 5-AZA-CdR treatment on germ-layer differentiation

3 讨论

DNA甲基化修饰是调节基因表达、细胞分化和发育的主要表观遗传机制之一,在包括癌症在内的很多人类疾病中都观察到DNA甲基化的破坏。在脊椎动物中,DNA甲基化由DNMT的成员DNMT1、DNMT3A和DNMT3B所催化,它们共同建立起组织特异性的甲基化模式。其中DNMT1的含量最丰

富,它负责DNA复制过程中甲基化的维持。

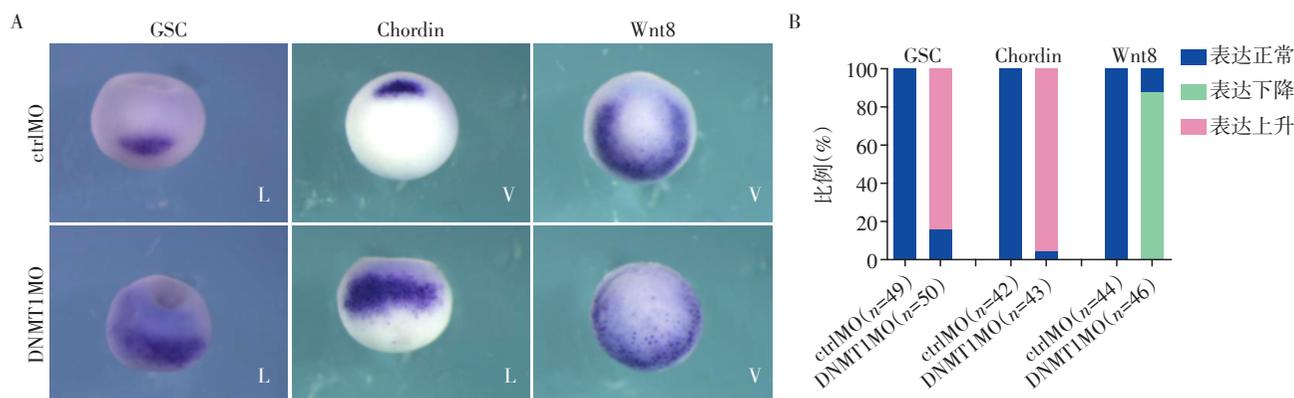
作为维持DNA复制过程中表观遗传重编程和基因组稳定性的重要调节因子,DNMT1的缺失会导致细胞特异性基因表达的变化^[4],影响印迹基因的表达、细胞周期调控、信号转导途径等,进而影响细胞的增殖和分化。研究发现DNMT1能够促进肿瘤发生发展,在多种肿瘤细胞中用DNMT1的抑制剂5-AZA-CdR抑制DNMT1的活性,肿瘤细胞向



A: 对照组和敲降组胚胎中三个胚层标记基因的表达情况(L:侧面观;V:植物极观);B: 对照组和敲降组胚胎中三个胚层标记基因的表达情况的百分比分析(n:胚胎总数)。

图3 敲降DNMT1对胚层分化的影响

Figure 3 Effect of knockdown of DNMT1 on germ-layer differentiation



A: 对照组和敲降组胚胎中背部中胚层以及腹部中胚层标记基因的表达情况(L:侧面观;V:植物极观);B: 对照组和敲降组胚胎中背部中胚层以及腹部中胚层标记基因表达情况的百分比分析(n:胚胎总数)。

图4 敲降DNMT1对中胚层分化的影响

Figure 4 Effect of knockdown of DNMT1 on mesoderm differentiation

着神经元的方向分化并丧失恶性增殖和侵袭的能力^[11]。细胞的多能性维持以及分化成为特定细胞是由外部信号以及转录调控和表观遗传调控共同决定的。DNMT1对于维持所有细胞类型中的整体甲基化水平非常重要,对人胚胎干细胞的研究发现,敲除DNMT1后,多能性基因POU5F1、CD24等的表达下降且NODAL信号通路相关的基因NODAL, CER1, LEFTY1/2的表达被激活^[12]。在小鼠中敲除DNMT1,胚胎发育至原肠期时发育停滞,DNA甲基化几乎完全缺失,胚胎很快死亡^[8]。在非洲爪蛙中敲降DNMT1,当胚胎发育至神经胚(st.15)时,与正常胚胎相比,胚孔不能正常闭合,缺少神经褶^[6]。

综上所述, DNMT1不仅参与胚胎干细胞和肿瘤细胞分化命运的决定,而且对于胚胎早期发育的过程非常重要,但是对于DNMT1在早期胚胎发育过程中三胚层分化形成这一重要环节的作用还不清楚。

为了研究DNA甲基化在三胚层分化形成中的作用,采用5-AZA-CdR处理胚胎和在2细胞胚胎中显微注射DNMT1MO的方法,降低胚胎细胞中DNMT的活性,然后通过原位杂交检测胚层标记基因的变化。结果显示5-AZA-CdR处理胚胎后,胚胎发育异常,中胚层的形成受到抑制。敲降DNMT1后,中胚层的形成也受到抑制,但是抑制作用没有5-AZA-CdR处理的明显,推测是因为在胚胎中存在母源表达的DNMT1,而注射DNMT1MO不能影响已存在的母源DNMT1蛋白。进一步分析发现,敲降DNMT1促进了背部中胚层的分化形成,但是抑制了腹部中胚层的形成。这些结果表明DNA甲基化转移酶参与调节非洲爪蛙三胚层分化形成的过程。

另外,之前发现在爪蛙胚胎中抑制HDAC1(histone deacetylase 1, HDAC1),中胚层的形成也受到了抑制,这一结果与抑制DNMT1相同。而且,已有的

很多研究发现HDAC1和DNMT1在调节基因表达和决定细胞命运上具有协同作用^[13-15],因而推测在诱导胚层分化的过程中,HDAC1和DNMT1或许也存在同样的机制,但是具体的作用机制还需要更加深入的研究。

[参考文献]

- [1] REN W,GAO L,SONG J. Structural basis of DNMT1 and DNMT3A-mediated DNA methylation[J]. *Genes*, 2018, 9(12):620-640
- [2] LI Y,ZHANG L, LI Y, et al. Dynamics of DNA methylation and DNMT expression during gametogenesis and early development of scallop *patinopecten yessoensis* [J]. *Mar Biotechnol*, 2019, 21(2):196-205
- [3] PAN Y,LIU G,ZHOU F, et al. DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics [J]. *Clin Exp Med*, 2017, 18(1):1-14
- [4] KAJI K,FACTOR V M, ANDERSEN J B, et al. DNMT1 is a required genomic regulator for murine liver histogenesis and regeneration [J]. *Hepatology*, 2016, 64(2):582-598
- [5] WONG K K,LAWRIE C H, GREEN T M. Oncogenic roles and inhibitors of DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in acute myeloid leukaemia [J]. *Biomarker Insights*, 2019, 14(1):1-12
- [6] DUNICAN D S,RUZOV A,HACKETT J A, et al. xDnmt1 regulates transcriptional silencing in pre-MBT *Xenopus* embryos independently of its catalytic function [J]. *Development*, 2008, 135(7):1295-1302
- [7] RAI K,NADAULD L D, CHIDESTER S, et al. Zebra fish Dnmt1 and Suv39h1 regulate organ-specific terminal differentiation during development [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(19):7077-7085
- [8] TAKEBAYASHI S I,TAMURA T, MATSUOKA C, et al. Major and essential role for the DNA methylation mark in mouse embryogenesis and stable association of DNMT1 with newly replicated regions [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(23):8243-8258
- [9] 曹青,赵晓,康雅菲,等. 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 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(8):1130-1134
- [10] CAO Q,SHEN Y,ZHENG W, et al. Tcf7l1 promotes transcription of Kruppel-like factor 4 during *Xenopus* embryogenesis [J]. *J Biomed Res*, 2018, 32(3):215-221
- [11] 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
- [12] TSANKOV A M,WADSWORTH MH 2nd, AKOPIAN V, et al. Loss of DNA methyltransferase activity in primed human ES cells triggers increased cell-cell variability and transcriptional repression [J]. *Development*, 2019, 146(19):174722
- [13] ZHANG P,TAO F, LI Q, et al. 5-Azacytidine and trichostatin A enhance the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells isolated from steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in rabbit [J]. *J Biosci*, 2019, 44(4):87
- [14] SAMANTA S,ZHOU Z, RAJASINGH S, et al. DNMT and HDAC inhibitors together abrogate endotoxemia mediated macrophage death by STAT3-JMJD3 signaling [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 102:117-127
- [15] PATHANIA R, RAMACHANDRAN S, MARIAPPAN G, et al. Combined inhibition of DNMT and HDAC blocks the tumorigenicity of cancer stem-like cells and attenuates mammary tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(11):3224-3235

[收稿日期] 2020-04-30