

NSD2 及 H3K36 甲基化 在小鼠胚胎干细胞向神经细胞分化中的表达*

孙芳¹ 王红红² 张姣² 邰通³ 李艳^{2Δ}

(¹ 济宁医学院基础医学院, 济宁 272067; ² 大理大学基础医学院, 大理 671000;

³ 杭州市第一人民医院, 杭州 310006)

摘要 目的 在体外建立小鼠胚胎干细胞(mESCs)向神经细胞(NCs)方向分化体系,观察组蛋白甲基化转移酶 NSD2 及其相关的组蛋白修饰 H3K36 二甲基化(H3K36me2)、H3K36 三甲基化(H3K36me3)在 NCs 发育过程中的表达变化。**方法** 用维甲酸(RA)诱导 mESCs 向 NCs 方向分化,通过观察细胞形态和 RT-qPCR 检测分子标志物来验证 mESCs 诱导分化效果,用 Western Blot 方法检测 NSD2 以及其相关的组蛋白甲基化修饰在诱导分化过程中的蛋白水平变化。**结果** 与 mESCs 状态相比,在 mESCs 向 NCs 方向分化的过程中,NSD2 蛋白表现出先升高后下降的变化,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$),而其相关的组蛋白甲基化标记 H3K36me2 和 H3K36me3 蛋白表达总体变化不大,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** ESCs 向 NCs 分化过程中 NSD 蛋白表达量的改变与相关组蛋白修饰变化趋势不完全一致,组蛋白甲基化修饰总量的变化比较小,这可能是因为在同时受到其他甲基化转移酶与去甲基化酶综合作用的结果。

关键词 NSD2; H3K36 甲基化; 组蛋白甲基转移酶; 胚胎干细胞; 神经细胞

中图分类号: R329.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2018)06-158-05

The expression of NSD2 and H3K36 methylation during the differentiation of stem cells towards neural cells

SUN Fang¹, WANG Honghong², ZHANG Jiao², XUN Tong³, LI Yan^{2Δ}

(¹ College of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China;

² College of Basic Medicine, Dali University, Dali 671000, China;

³ Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, China)

Abstract; Objective To establish an in vitro system of differentiating mouse embryonic stem cells (mESCs) into neural cells (NCs) and observe the change of the level of histone methyltransferase NSD2 and its related histone modification H3K36 di-methylation (H3K36me2) and H3K36 tri-methylation (H3K36me3) in the development of the neural cells. **Methods** mESCs were induced to differentiate towards NCs in vitro by retinoic acid (RA). The efficiency of mESCs differentiation was verified by cell morphology and real-time quantitative RT-PCR test of related molecular markers. The level of NSD2 protein and its related histone methylation modifications were examined during the process of differentiation by western blot. **Results** We observed that the level of NSD2 protein showed a sharp increase and then decreased, and the change was statistically significant ($P < 0.05$). While no significant change was seen in its related histone methylation modifications such as H3K36me2 and H3K36me3 ($P > 0.05$). **Conclusion** We observed that the change of NSD2 protein was not in conformity with its related histone methylation markers in the differentiation of mESCs towards NCs, and the histone methylation markers changed very little that may be affected by other histone methyltransferases or demethylases.

Keywords: NSD2; H3K36 methylation; Histone methyltransferase; Embryonic stem cells; Neural cells

* [基金项目] 国家自然科学基金地方项目(31260270)

Δ [通信作者] 李艳, E-mail: bigbigmile04@aliyun.com

组蛋白赖氨酸甲基转移酶 (nuclear receptor SET domain containing protein 2, NSD2) 也作 MMSET 或者 WHSC1, 是 NSD 蛋白家族的成员之一, 利用其含有的 SET 结构域, 主要催化组蛋白 H3 赖氨酸第 36 号位的二甲基化 (H3K36me2), 进一步发挥基因调控作用^[1]。NSD2 与多种疾病尤其是肿瘤关系密切^[2]。如: NSD2 的过表达与前列腺癌、头颈部鳞癌的高分级、肿瘤细胞增殖密切相关^[3-4], 与肝细胞癌^[5]、卵巢癌^[6]、子宫内膜癌^[7]、子宫颈癌^[8]的分期、分级以及不良预后密切相关, 与骨肉瘤^[9]细胞增殖、转移以及不良预后密切相关等。另外, NSD2 单倍体不足可以导致以脑部发育过小为特点的沃尔夫综合征^[10], 在神经母细胞瘤中, NSD2 高表达与肿瘤不良临床病理特征联系, 与转移和不良预后密切相关^[11]。目前 NSD2 的生理功能和致癌机制大部分仍不清楚, 我们在体外诱导了小鼠胚胎干细胞 (mESCs) 向神经细胞 (NCs) 方向分化, 观察 NSD2 和相关组蛋白修饰 H3K36me2、H3K36me3 在 mESCs 向 NCs 分化过程中的蛋白表达变化, 旨在为进一步研究 NSD2 在神经系统发育中的生理功能和作用机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 E14Tg2A.4 小鼠胚胎干细胞由首都师范大学张伟伟教授实验室赠送。

1.1.2 试剂 DMEM 培养基、非必需氨基酸、L-谷氨酰胺、核苷酸、β-巯基乙醇、青霉素-链霉素、明胶、1000 U/ml 白血病抑制因子 (LIF) 均为 Millipore 公司产品; 胎牛血清 (Hyclone 公司); 维甲酸 (RA, sigma 公司); 逆转录酶试剂盒 (Fermentas 公司); Taq 酶 (Roche 公司); β-actin 一抗 (60008-1, DATASHEET 公司); NSD2 一抗 (ab75359, abcam 公司); H3K36me2 一抗 (39891, Active Motif 公司); H3K36me3 一抗 (4909S, Cell Signaling 公司); H3 (ab1791, abcam 公司); 二抗 (ab6709, abcam 公司)。

1.1.3 仪器 倒置显微镜 (ZEISS 公司); 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad 公司); 垂直电泳和转印系统 (Bio-Rad 公司); 蛋白印迹检测系统 (ImageQuant LAS4000)。

1.2 方法

1.2.1 维甲酸 (RA) 法诱导 ESCs 向 NCs 分化

mESCs 用含有 15% 胎牛血清、各 1% 非必需氨基酸、L-谷氨酰胺、β-巯基乙醇、核苷酸、青霉素-链霉素、1000U/ml LIF 的 DMEM 完全培养基进行培养, 将细胞按照培养天数 (D0 ~ D5) 分组, 将 D0 细胞作为对照组, 其他作为实验组, 收集细胞进行后续实验。具体如下: 当培养至细胞数 18×10^6 , 收取 3×10^6 细胞, 当作第 0 天 (标记为 D0, 其中 1/3 细胞沉淀备用用于 RIPA 裂解提取总蛋白做 Western Blot, 1/3 备用于酸提取组蛋白做 Western Blot, 1/3 备用于提 RNA)。其余细胞按照 $1.5 \times 10^6/10\text{cm}$ 培养皿的密度种植到 10 个培养皿, 用不加 LIF 的 DMEM 完全培养基, 加入 RA (浓度 $5 \times 10^{-7} \text{mol/L}$) 进行诱导, 其间每天进行细胞换液, 观察细胞形态并拍照保存, 于 D5 诱导结束。于诱导分化的 D1 ~ D5 分别收集细胞 2 盘, 同样的, 其中 1/3 细胞沉淀备用用于提取总蛋白做 Western Blot, 1/3 细胞沉淀备用用于提取组蛋白做 Western Blot, 1/3 备用于提 RNA。

1.2.2 RT-qPCR 法检测 mESCs 标记物、NCs 早期分化标记物 mRNA 的表达 在细胞分化过程中, 按固定时间收获细胞, Trizol 试剂提取 RNA, 逆转录 cDNA, 进行 Real-Time PCR。相应小鼠引物设计如下 (华大基因合成)。见表 1。

表 1 引物序列

引物	上游	下游
β-actin	5'-GAACGGTGAAGGCGACA-3'	5'-GAGGGACTTCCTGTAACCACT-3'
Sox2	5'CCACCAATCCCATCCA-3'	5'-ACCGCCTAACGTACCACT-3'
Oct3/4	5'-TCATCACATCGCCAATCA-3'	5'-GTAGCCTCATACTCTTCTCGTT-3'
Nanog	5'-GGCAGCCCTGATCTTCTAC-3'	5'-CGCTTGCACTTTCCTTT-3'
Nestin	5'-TGAGAACTCTCGCTTCGACAG-3'	5'-GTATCCCAAGGAAATGCAGC-3'
NeuroD	5'-TCGGCCGATGGTTCCT-3'	5'-TCGGCCGATGCTTCGT-3'
Tuj-1	5'-CACATATGGGACCTCAACC-3'	5'-AGCCATCATGTTCTTGGCATC-3'

1.2.3 Western Blot 检测 NSD2 及相关组蛋白修饰的蛋白表达 总蛋白 Western Blot 分析 NSD2 表达: 将收获的细胞沉淀, 每管加入 100μl 碧云天的强 RIPA 裂解液, 冰上裂解 30min, 用 Biosafar 1000 细胞超声破碎机破碎细胞, 4℃, 16000r, 离心 10min, 取上清, 测定蛋白浓度, 按照 60μg 的上样量进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 4℃, 360mA, 60min 转膜, 3% 脱脂奶粉封闭 1h, 一抗 β-actin (1: 10000)、NSD2 (1: 3000) 室温孵育 1h, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 ~ 10 min, 二抗 (1: 10000) 室温孵育 1h, 再用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 ~ 10 min, ECL 化学发

光,蛋白印迹检测系统显影,利用 Image Quant TL 软件分析条带灰度值,以 β -actin 为内参,计算相对蛋白含量。

组蛋白 Western Blot 分析 H3K36me2、H3K36me3 的表达:采用酸提取法,即 0.2N HCl 4℃ 过夜处理细胞沉淀,4℃,16000r,离心 10min,取上清,1/5 体积的 1M NaOH 中和,测定蛋白浓度,按照 20 μ g 的上样量进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,4℃,360mA,20min 转膜,3% 脱脂奶粉封闭 1h,一抗 H3K36me2(1:1000)、H3K36me3(1:2000)室温孵育 1h,后续操作同上。

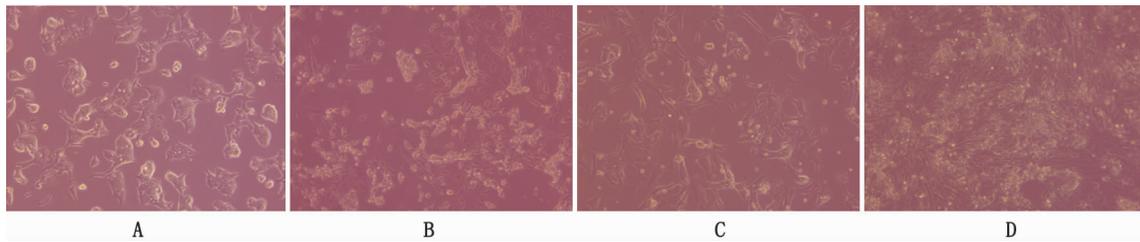
1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件统计包进行统计分析。

2 结果

2.1 细胞形态观察

mESCs 细胞呈圆或卵圆形,胞核相对比较大并且核仁比较明显。加入 RA 诱导 1 天时(D1),细胞增殖明显,逐渐向外扩展,并且发生明显的形状改变,RA 诱导 3 天时(D3)细胞开始伸出突起,变细变长,在诱导第 5 天(D5)时,细胞形态已趋于一致,胞体圆亮,多呈双极性,逐渐连接成神经样网络。见图 1。



注:A,mESCs ;B,诱导分化第 1 天;C,诱导分化第 3 天;D,诱导分化第 5 天

图 1 mESCs 向 NCs 诱导分化过程中细胞形态的观察(100 \times)

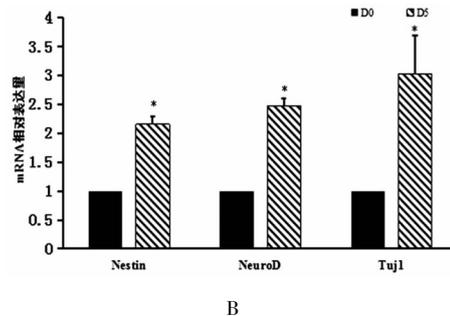
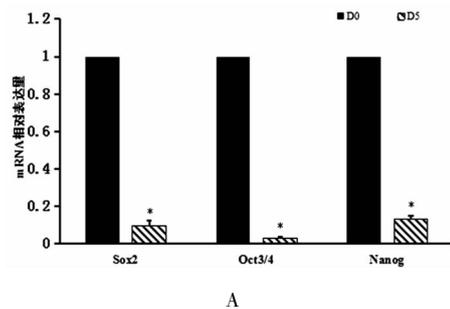
2.2 mESCs 标记物、NCs 早期分化标记物的 mRNA 表达情况

与初始胚胎干细胞状态(D0)相比,在诱导分化结束时(D5),干细胞标记物 Sox2、Oct3/4、Nanog 的 mRNA 水平显著下降,NCs 早期分化标记物 Nestin、NeuroD、Tuj1 的 mRNA 水平显著上升,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 2。综合细胞形态学上的变化和 mRNA 表达水平变化,可以基本确定体外 mESCs 经 RA 诱导向 NCs 方向分化成功。

2.3 mESCs 向 NCs 分化过程中 NSD2 蛋白表达量变化

通过 Western Blot,本实验检测到 I 型 NSD2(75kd)和 II 型 NSD2(150kd)在 mESCs 向 NCs 分化过程中的蛋白特异性表达变化,II 型 NSD2 因具备甲基转移酶活性,所以更有意义。结果显示:NSD2 在 mESCs 状态(D0)相对蛋白水平表达较低,在加入 RA 诱导向 NCs 分化 1 天后(D1),突然升高,随后在诱导分化的第 2 天(D2)开始下降,并于第 3 天(D3)开始直到观察结束几乎消失,即先升高后下降的变化,与 D0 相比,差异具有统计学

意义(均 $P < 0.05$)。见图 3。

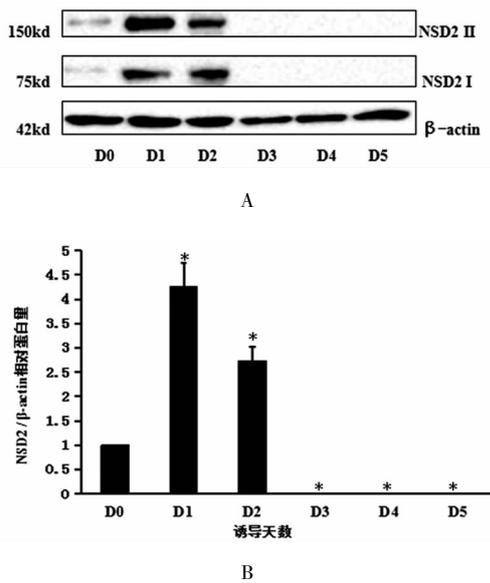


注:与 D0 组比较,* $P < 0.05$;

A,mESCs 标记物在 D0 和 D5 时 mRNA 的表达;

B,NCs 早期分化标记物在 D0 和 D5 时 mRNA 的表达

图 2 mESCs 标记物和 NCs 早期分化标记物在 D0 和 D5 时 mRNA 的表达



注:与 D0 组比较, * $P < 0.05$

图3 NSD2 在 ESCs 向 NCs 分化过程中蛋白表达量的变化

2.4 mESCs 向 NCs 分化过程中 NSD2 相关组蛋白甲基化标记的表达变化

本实验观察了在 mESCs 向 NCs 分化过程中, NSD2 直接催化的组蛋白标记 H3K36me2 的表达变化, NSD2 表达量与 H3K36me2 变化趋势不完全一致。以总体的组蛋白 H3 为内参, H3K36me2 的相对蛋白表达量未有显著变化。另外, 本实验还观察了以 H3K36me2 为底物的 H3K36me3, 其变化也不明显。总的来说组蛋白甲基化总量变化较小, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4。

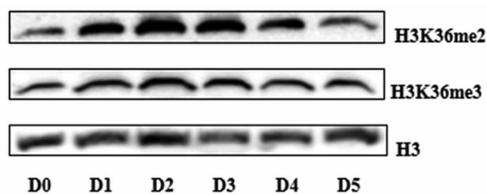


图4 ESCs 向 NCs 分化过程中 NSD2 相关组蛋白甲基化标记的表达变化

3 讨论

作为表观遗传学研究的一个重要内容, 组蛋白修饰与疾病的关系越来越受到人们的重视, 成为当前研究的一个热点。组蛋白甲基转移酶 NSD2 与神经系统疾病尤其是肿瘤的发生发展关系密切, 然而, NSD2 在神经系统发育中的生理功能以及致癌机制大部分仍不清楚。本文在体外成功地诱导了

ESCs 向 NCs 的分化, 观察 NSD2 及相关组蛋白修饰的蛋白表达变化, 以期为进一步研究提供依据。

早就有研究表明 NSD2 单倍体不足可以导致沃尔夫综合征 (Wolf Hirschhorn syndrome), 而 NSD2 缺陷的小鼠出生后死于心脏异常和类似于沃尔夫综合征的表型^[10]。沃尔夫综合征儿童具有脑部生长过小和智力发育不全特点, 即神经细胞数量减少的情况, 推测 NSD2 的一个生理功能是促进 NCs 增殖作用。同时, Hudlebusch 等^[11]研究表明, NSD2 在神经母细胞瘤中的表达水平是升高的, 高表达的 NSD2 与患者预后差相关, 并且高表达的 NSD2 是神经母细胞瘤细胞增殖所必需的, 这与 NSD2 促进 NCs 增殖的作用是一致的。

本实验采用 RA 诱导法, 在体外成功的诱导了 ESCs 向 NCs 的分化, 观察到 NSD2 在 mESCs 向 NCs 分化过程中特异性的蛋白表达变化, 这与我们先前用拟胚体分化法诱导 mESCs 向 NCs 的分化过程中观察到的总体结果是一致的^[12]。实验中观察到: RA 作用的早期 (D1), 细胞的增殖明显, 而后期 (D2-D5) 主要是向 NCs 的分化。我们将整个诱导分化过程分为三个阶段, 发现 NSD2 蛋白发生了特异性的表达变化, 第一阶段: 即 mESCs (D0), NSD2 蛋白水平比较低; 第二阶段: 即在 RA 作用下细胞明显增殖阶段 (D1), NSD2 蛋白水平迅速升高, 显示出与细胞增殖速度的密切相关; 第三阶段: 即在 RA 持续作用下, 细胞停止增殖, 开始向 NCs 方向持续分化阶段 (D2-D5), NSD2 蛋白水平是显著下降的。由此, 我们推测 NSD2 可能具有促进神经细胞增殖, 抑制细胞分化的作用, 但值得进一步研究。总的来说, NSD2 蛋白水平发生的显著变化, 可能提示 NSD2 在调控 mESCs 向 NCs 发育中, 具有重要的生理功能。在之前我们的另一个研究中, 甲基化转移酶 EZH2, 在 mESCs 向 NCs 的分化过程中也呈现下降趋势的蛋白表达变化, 这或许提示了 EZH2 和 NSD2 在调控 NCs 发育中, 有一定功能上的协同性^[13], 有研究也报道过 EZH2 和 NSD2 可能通过 microRNA 存在着密切联系^[14], 下一步我们将通过沉默和转染 NSD2 和 EZH2, 观察其对神经细胞发育的影响, 深入研究 NSD2 和 EZH2 在神经系统发育中的生理功能, 并进一步研究 NSD2 和 EZH2 的相互作用机制。

NSD2 主要通过催化 H3K36me2 进一步调控

基因转录激活,研究表明,在某些肿瘤比如在多发性骨髓瘤中,NSD2 的过表达可以引起整个基因组的 H3K36me2 水平升高^[15],然而本实验观察到 ESCs 向 NCs 分化过程中 NSD 蛋白表达量的改变与其催化的组蛋白修饰 H3K36me2 变化趋势不完全一致,组蛋白甲基化修饰总量的变化比较小,这可能是由于同时受到其他甲基化转移酶与去甲基化酶综合作用的结果,NSD2 的变化不一定改变总体的 H3K36me2 水平,可能只是影响局部少量基因区。尽管如此,NSD2 对局部关键基因的调控,可以引起基因的转录激活,仍具有重要意义。

综上所述,本实验在体外成功建立了 mESCs 向 NCs 分化体系,观察到了与神经系统发育密切相关的组蛋白甲基化修饰酶 NSD2 以及相关的组蛋白修饰的表达变化,为下一步研究 NSD2 在神经系统发育中的生理功能和在肿瘤发生发展中的作用机制打下了基础。

参考文献:

- [1] Li Y, Trojer P, Xu CF, et al. The target of the NSD family of histone lysine methyltransferases depends on the nature of the substrate [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 34283-34295. DOI:10.1074/jbc.M109.034462.
- [2] 邰通,潘云,李艳. NSD 家族组蛋白甲基化转移酶与肿瘤发生[J]. *中国细胞生物学学报*, 2015, 35(5): 728-733. DOI:10.11844/cjcb.2015.05.0369.
- [3] Yang P, Guo L, Duan ZJ, et al. Histone methyltransferase NSD2/MMSET mediates constitutive NF- κ B signaling for cancer cell proliferation, survival, and tumor growth via a feed-forward loop [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(15):3121-3131. DOI:10.1128/MCB.00204-12.
- [4] Saloura V, Cho HS, Kiyotani K, et al. WHSC1 promotes oncogenesis through regulation of NIMA-related kinase-7 in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Mol Cancer Res*, 2015, 13(2):293-304. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-14-0292-T.
- [5] Zhou P, Wu LL, Wu KM, et al. Overexpression of MMSET is correlation with poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Pathol Oncol Res*, 2013, 19(2): 303-309. DOI:10.1007/s12253-012-9583-z.
- [6] Yang S, Zhang Y, Meng F, et al. Overexpression of multiple myeloma SET domain (MMSET) is associated with advanced tumor aggressiveness and poor prognosis in serous ovarian carcinoma [J]. *Biomarkers*, 2013, 18(3): 257-263. DOI:10.3109/1354750X.2013.773082.
- [7] Xiao M, Yang S, Chen J, et al. Overexpression of MMSET in endometrial cancer: a clinicopathologic study [J]. *J Surg Oncol*, 2013, 107(4):428-432. DOI: 10.1002/jso.23234.
- [8] Yin Z, Sun Y, Ge S, et al. Epigenetic activation of WHSC1 functions as an oncogene and is associated with poor prognosis in cervical cancer [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(4):2286-2294. DOI:10.3892/or.2017.5463.
- [9] Lu MH, Fan MF, Yu XD, et al. NSD2 promotes osteosarcoma cell proliferation and metastasis by inhibiting E-cadherin expression [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(5):928-936.
- [10] Izumi K, Okuno H, Maeyama K, et al. Interstitial microdeletion of 4p16.3: contribution of WHSC1 haploinsufficiency to the pathogenesis of developmental delay in Wolf-Hirschhorn syndrome [J]. *Am J Med Genet A*, 2010, 152A(4): 1028-1032. DOI: 10.1002/ajmg.a.33121.
- [11] Hudlebusch HR, Skotte J, Santoni-Rugiu E, et al. MMSET is highly expressed and associated with aggressiveness in neuroblastoma [J]. *Cancer research*, 2011, 71(12):4226-4235. DOI: 10.1158/0008-5472.CCR-10-3810.
- [12] 邰通,潘云,李艳. NSD1 与 NSD 在神经干细胞发育过程中的不同角色 [J]. *医学信息*, 2014, 10(2):29-30.
- [13] 孙芳,邰通,潘云,等. EZH2 蛋白在神经细胞发育中的表达变化 [J]. *大理学院学报*, 2015, 10(14):9-12. DOI:10.3969/j.issn.1672-2345.2015.10.003.
- [14] Asangani IA, Ateeq B, Cao Q, et al. Characterization of the EZH2-MMSET histone methyltransferase regulatory axis in cancer [J]. *Mol Cell*, 2013, 49(1):80-93. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.10.008.
- [15] 孙芳,潘云,李艳. 组蛋白修饰在常见血液系统肿瘤中作用的研究进展 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(4):1184-1189.

(收稿日期 2018-03-22)

(本文编辑:石俊强)