

小鼠 α -synuclein 基因内含子 1 甲基化定量检测方法 的建立及不同脑区甲基化水平的比较研究

陆 璐, 张 兰, 王丹慧, 蔡彦宁

(首都医科大学宣武医院药物研究室, 神经变性病教育部重点实验室, 北京 100053)

【摘要】 目的 建立一种定量检测小鼠 α -突触核蛋白基因(α -syn)内含子 1 甲基化水平的方法, 分析不同脑区该区域甲基化水平的差异。**方法** 使用 MSPPrimer 确定小鼠 α -syn 内含子 1 的 CpG 岛区域。使用 PyroMark assay design 2.0 针对该 CpG 岛设计焦磷酸扩增及测序引物。采用焦磷酸测序法分析成年小鼠海马、皮质、纹状体及中脑四个脑区该区域甲基化水平。**结果** 小鼠 α -syn 内含子 1 存在 CpG 岛。成功优化定量该 CpG 岛甲基化水平的焦磷酸测序方法。焦磷酸测序表明各脑区该区域甲基化均低于 2%。**结论** 建立了定量检测小鼠 α -syn 基因内含子 1CpG 岛甲基化水平的方法。该 CpG 岛甲基化对于成年小鼠各脑区中 α -syn 的表达不起主要调控作用。

【关键词】 α -突触核蛋白; DNA 甲基化; 焦磷酸测序; 小鼠; 脑; 中脑; 海马; 纹状体; 皮质

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 04-0023-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 004. 006

Establishment of a method to measure the methylation level of mouse α -synuclein intron-1 and comparison of its methylation at different brain regions

LU Lu, ZHANG Lan, WANG Dan-hui, CAI Yan-ning

(Department of Pharmacology, Xuanwu Hospital, Capital Medical University; Key Laboratory for
Neurodegenerative Diseases of Ministry of Education, Beijing 100053, China)

【Abstract】 Objective To establish a quantitative method to examine the methylation level of CpG island located in the intron 1 of mouse α -synuclein, and analyze the difference of methylation in various brain regions. **Methods** CpG island in the intron 1 of mouse α -synuclein was identified using an online software MSPprimer. Pyrosequencing assay was designed using PyroMark assay design 2.0. DNA methylation was quantified in mouse hippocampus, cortex, striatum and midbrain using pyrosequencing assay. **Results** There was a CpG island in the intron 1 of mouse α -synuclein. Pyrosequencing assay measuring methylation level of this CpG island was optimized. It indicated that all of the brain regions were hypomethylated with a methylation rate of 2% or less. **Conclusion** DNA methylation does not play a major role in the transcription regulation of mouse α -synuclein in the brain.

【Key words】 α -synuclein; DNA methylation; Pyrosequencing; Brain; Cortex; Midbrain; Striatum; Hippocampus; Mouse

【基金项目】 国家自然科学基金(编号:81274120);北京市自然科学基金(编号:7132110);北京市新世纪百千万人才工程项目(编号:008-0014)。

【作者简介】 陆璐(1986-),女,硕士,研究方向:药理学。E-mail: lulululuhappy@163.com。

【通讯作者】 张兰(1972-),女,研究方向:神经退行性疾病药理机制研究。E-mail: lanizhg@hotmail.com。

众多研究表明, α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)与神经退行性疾病密切相关。例如,异常聚集和纤维化的 α -syn 是构成路易体的主要成分,而后者是帕金森病(PD)和路易体痴呆的主要标志^[1]。又如, α -syn 基因突变可以导致家族性 PD^[2-4]。此外, α -syn 的过度表达能够引起细胞内氧化应激水平的提高,进而促进 α -syn 的聚集和一系列的病理变化^[5]。

α -syn 的转录调控极为复杂并且与疾病相关。研究表明, α -syn 启动子区多态性能够通过影响 α -syn 的转录,增加发生 PD 的风险^[6]。而 α -syn 的二倍体、三倍体均能增强其转录,并使罹患 PD 风险增加^[7, 8]。最近, α -Syn 的另一种转录调控方式逐渐被揭示并受到重视。多项研究显示,人 α -Syn 内含子 1 存在一个 CpG 岛。PD 患者脑组织以及 PD 患者外周血淋巴细胞中,该 CpG 岛的甲基化水平显著下降^[9, 10]。该 CpG 岛的低甲基化能够导致 α -Syn 的高表达^[9, 11, 12]。这些结果提示,CpG 岛的甲基化程度参与人调控 α -Syn 的表达,并与 PD 的发生相关。研究还显示,正常脑组织中,该 CpG 岛在皮层、纹状体、黑质中均高度甲基化;而 PD 患者脑组织中,该 CpG 岛在皮层、纹状体高度甲基化;在黑质中几乎不存在甲基化^[9]。这一结果提示该 CpG 岛的甲基化可能与 PD 中多巴胺能神经元特异性损伤相关。啮齿类动物中, α -Syn 内含子 1 区段同样发挥着重要的转录调控作用,并且该区段同样富含 CpG 位点^[13]。目前仍不明确,小鼠 α -syn 的转录是否也受内含子 1 区段甲基化水平调控。阐明这一问题将有助于解析 PD 小鼠模型与 PD 患者间的异同,有助于辅助正确解读基于 PD 小鼠模型的研究成果。本研究分析了小鼠 α -Syn 内含子 1 的 CpG 岛,建立了定量分析其甲基化水平的检测方法,检测了不同脑区小鼠 α -Syn 基因 CpG 岛甲基化水平。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 C57BL/6 雄性小鼠,2 月龄 10 只,由斯贝福(北京)实验动物科技有限公司提供,动物合格证号:SCXK(京)2011-0004。饲养条件:每日光照 12 h,黑暗 12 h,室温 23℃,任意摄取水食。相同时间全部处死后取小鼠新鲜脑组织并按解剖结构分离皮质、海马、纹状体及中脑并冻存于 -80℃ 待用。实验全过程对动物的饲养与取材均遵守实验动物

管理与保护的有关政策和规定。

1.2 主要试剂和仪器

QIAamp DNA mini 试剂盒(德国 Qiagen 公司), Wizard DNA 纯化试剂盒(美国 Promega 公司), HS Taq(日本 Takara 公司), PyroMark gold Q96 reagents(德国 Qiagen 公司), Streptavidin Sepharose™ Beads(美国 GE 公司), Nanodrop 2000 分光光度计(美国 Thermo 公司), PTC-100 基因扩增仪(美国 MJ research 公司), PyroMark Q96 ID 焦磷酸测序仪(德国 Qiagen 公司)。

1.3 基因组 DNA 的提取和偏重亚硫酸氢盐处理

按照 QIAamp DNA mini 试剂盒说明书提取冻存的不同脑区小鼠组织基因组 DNA。使用偏重亚硫酸氢钠和对苯二酚对基因组 DNA 进行处理,通过该处理,未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶保持不变。处理过程如下,1 μ g 基因组 DNA 使用 0.3 mol/L 的 NaOH 进行变性。而后使用新鲜配置的偏重亚硫酸氢钠(终浓度 3.0 mmol/L, pH 5.0)与对苯二酚的混合溶液(终浓度 0.5 mmol/L, pH 5.0)与基因组 DNA 混合,石蜡油覆盖,避光 50℃ 孵育 16 h。继而使用 Wizard DNA 纯化试剂盒纯化 DNA。最后加入 0.3 mol/L 的 NaOH 在 37℃ 孵育 15 min 结束反应,并乙醇沉淀。

1.4 小鼠 α -syn 内含子 1 区段 CpG 岛分析

使用在线软件 MSPPrimer (<http://www.mspprimer.org/cgi-bin/design.cgi>)^[14] 分析小鼠 α -syn 基因内含子 1 及其侧翼序列。

1.5 焦磷酸测序引物设计

使用 PyroMark assay design 2.0(德国 Qiagen 公司)设计扩增引物和测序引物。正向扩增引物为: 5'-GGGGAGAGGAGTTGATAAATTAGTTG-3'; 反向扩增引物使用 Biotin 标记: 5'-TCCTAATTTCCCCAATCTAATTTCA-3'; 测序引物为: 5'-GTGAAGGAGTTAGGGA-3'。引物由上海生工生物技术有限公司合成。扩增产物长度 160 bp,可以定量分析 3 个 CpG 位点的甲基化水平。待分析序列为: GTTAGAGYGTTYGGTAGTAGGTAGTAGAYGGTA,其中 Y 代表 CpG 位点。

1.6 聚合酶链反应

经亚硫酸氢盐处理的基因组 DNA 作为模板,使用 HS Taq 进行扩增。扩增条件为: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 20 s, 58℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 20 s, 共 50 循环;最后 72℃ 延伸 5 min。

1.7 焦磷酸测序 (Pyrosequencing)

将生物素标记的 PCR 产物与亲和素标记的微粒相混合,利用真空预处理装置使分离纯化生物素标记的单链 DNA,转移入 PyroMark Q96 ID 测序仪中。生物素标记的单链 DNA 作为模版,使用 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 测序引物,按照 PyroMarkQ96 使用说明书进行测序操作。

2 结果

小鼠 $\alpha\text{-syn}$ 基因内含子 1 长度为 674 bp,连同其上下游的外显子 1 和 2 共计 1 131 bp。经在线软件 MSPPrimer 分析,与人 $\alpha\text{-syn}$ 基因相似,该区段存在一个 CpG 岛,该 CpG 岛覆盖了内含子 1 的后半段和外显子 2 的大部分(图 1A)。设计焦磷酸测序检测,扩增片段长度为 160 bp,电泳显示扩增产物与预期片段大小一致。使用 SssI 甲基转移酶处理并经亚硫酸氢盐处理的基因组 DNA 作为模板,同样扩增获得 160 bp 扩增子。而使用未经亚硫酸氢盐处理的基因组 DNA 作为模板,无扩增产物。表明扩增条件特异(图 2)。通过焦磷酸测序能够定量检测 3 个

CpG 位点的甲基化水平。焦磷酸测序结果如图 1B 所示,灰色区域为 CpG 位点。根据焦磷酸测序中胞嘧啶的数目与胞嘧啶和胸腺嘧啶之和的数目相比即可获得该位点甲基化百分比。每个 CpG 位点的甲基化百分比由仪器自动计算并显示于 CpG 位点顶部的蓝色区域。使用焦磷酸测序法对不同脑区的甲基化水平进行检测,如图 3 所示,成年小鼠皮质、中脑、纹状体、海马等四个脑区该 CpG 岛平均甲基化水平均低于 2%,不同脑区间无明显差别。

3 讨论

DNA 甲基化通过调控基因表达,影响生物生理与行为,是表观遗传学研究的一个重要方面^[15]。近年来发展和建立了多种 DNA 甲基化的检测手段,最常见的是甲基化特异性 PCR 和克隆测序。焦磷酸测序是一种基于即时测序的技术,可以对甲基化程度进行精确定量。相比其他 DNA 甲基化检测手段,焦磷酸测序操作简便、结果重复性高也更加准确^[16]。因此本研究选择建立基于焦磷酸测序的 DNA 甲基化检测方法。



注:(A)小鼠内含子 1 及其侧翼区域。其中上层方框代表外显子,上层直线代表内含子 1;中层灰框代表 CpG 岛区域,灰框上方灰色竖条代表内含子 1 中的 CpG 位点;下层双箭头直线为焦磷酸测序扩增的区域。(B)焦磷酸测序示意图,其中灰色区域为 CpG 位点,蓝底数字显示每个位点的甲基化百分比。

图 1 小鼠 $\alpha\text{-syn}$ 内含子 1 区段 CpG 岛及其焦磷酸测序图

Note : (A) Mouse $\alpha\text{-synuclein}$ intron 1 and the flanking region. Upper panel; horizontal line indicates intron 1; boxes indicate exons. Middle panel; grey box indicates CpG island, vertical lines indicate CpG sites in the intron region. Lower panel; line with arrows at both end indicate region being amplified. (B) A representing pyrosequencing assay, wherein the gray area is CpG sites, blue figures on the top show the methylation percentage at each locus.

Fig. 1 Pyrosequencing assay for CpG island located in mouse $\alpha\text{-synuclein}$ intron 1 region



注:不同小鼠脑区基因组 DNA 经偏重亚硫酸氢盐处理,而后作为模板进行扩增。扩增产物 160 bp。SssI 甲基转移酶处理的基因组 DNA 作为阳性对照,未经偏重亚硫酸氢盐处理的基因组 DNA 为阴性对照。

图 2 焦磷酸测序聚合酶链反应电泳图。

Note: The bisulfite treated genomic DNA from different brain regions was used as a template for polymerase chain reaction. The expected size of amplicon was 160 bp. SssI methyltransferase enzyme-treated genomic DNA was used as a positive control, genomic DNA without bisulfite treatment was used as a negative control.

Fig. 2 Electrophoresis of amplicons in the pyrosequencing reactions

多项研究均表明人 α -syn 内含子 1 区存在 CpG 岛,人 α -syn 的表达受到该 CpG 岛甲基化水平的调控,并且正常脑组织中多个脑区均呈高甲基化状态^[9-12]。我们的研究表明,尽管小鼠 α -syn 内含子 1 区也存在 CpG 岛,但该 CpG 岛在所检测的四个脑区中均呈低甲基化状态,甲基化水平均不超过 2%。这一结果与人脑组织中 40-100% 的甲基化水平差异明显^[9]。提示小鼠脑组织中 α -syn 的转录调控机制与人类存在明显差异。与此相吻合,人及灵长类动物脑组织中 α -syn 表达水平随增龄而增加^[17],而在啮齿类中 α -syn 表达量随增龄而减少^[18]。这种差异很可能与 α -syn 内含子 1CpG 岛甲基化调控存在关联。本研究对于指导选择合适的动物和细胞模型也具有重要意义。例如,有研究显示 DNA 甲基化酶抑制剂能够上调 α -syn 的表达,从而加强 MPP⁺ 以及 6-OHDA 等毒素的毒性^[12]。研究者认为 DNA 甲基化酶抑制剂可能是治疗 PD 的靶点。而我们的结果提示小鼠以及小鼠来源的细胞,由于其中 α -syn 的表达不受 DNA 甲基化的调控,可能不适合该项目的后续研究。

总之,本研究建立了定量分析小鼠 α -syn 内含子 1CpG 岛甲基化水平的焦磷酸测序方法。本研究还提示小鼠与人 α -syn 的表观遗传调控存在明显差异。



图 3 不同小鼠脑区 α -syn 内含子 1CpG 岛甲基化百分比

Fig. 3 Methylation level of mouse α -synuclein intron 1 at different brain regions.

参考文献:

- [1] Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, et al. Alpha-synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(11): 6469-6473.
- [2] Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease [J]. Science, 1997, 276(5321):2045-2047.
- [3] 张丽,陈炜,张旭,等. 携带 A53T 突变人 α 突触核蛋白转基因帕金森病大鼠模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(10): 1-6.
- [4] Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia [J]. Ann Neurol, 2004, 55(2):164-173.
- [5] 张丽,张连峰. α -synuclein 致病机制和转基因帕金森疾病模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(11): 63-67.
- [6] Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, et al. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease [J]. JAMA, 2006, 296(6):661-670.
- [7] Ross OA, Braithwaite AT, Skipper LM, et al. Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism [J]. Ann Neurol, 2008, 63(6):743-750.
- [8] Miller DW, Hague SM, Clarimon J, et al. Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication [J]. Neurology, 2004, 62(10):1835-1838.
- [9] Matsumoto L, Takuma H, Tamaoka A, et al. CpG demethylation enhances alpha-synuclein expression and affects the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. PLoS One, 2010, 5(11):e15522.
- [10] Tan YY, Wu L, Zhao ZB, et al. Methylation of α -synuclein and leucine-rich repeat kinase 2 in leukocyte DNA of Parkinson's disease patients [J]. Parkinsonism Relat Disord, 2013, doi: 10.1016/j.parkreldis.2013.12.002. [Epub ahead of print].
- [11] Jowad A, Schmitt I, Kaut O, et al. Methylation regulates alpha-

- synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains [J]. *Neurosci*, 2010, 30(18): 6355–6359.
- [12] Wang Y, Wang X, Li R, et al. A DNA methyltransferase inhibitor, 5-aza-2'-deoxycytidine, exacerbates neurotoxicity and upregulates Parkinson's disease-related genes in dopaminergic neurons[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2013, 19(3):183–190.
- [13] Clough RL, Dermentzaki G, Stefanis L. Functional dissection of the alpha-synuclein promoter: transcriptional regulation by ZSCAN21 and ZNF219 [J]. *J Neurochem*, 2009, 110(5): 1479–1490.
- [14] Brandes JC, Carraway H, Herman JG. Optimal primer design using the novel primer design program: MSPprimer provides accurate methylation analysis of the ATM promoter [J]. *Oncogene*, 2007, 26(42):6229–6237.
- [15] Johnson AA, Akman K, Calimport SR, et al. The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease [J]. *Rejuvenation Res*, 2012, 15(5):483–494.
- [16] Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(9):2265–2275.
- [17] Xuan Q, Xu SL, Lu DH, et al. Increased expression of α -synuclein in aged human brain associated with neuromelanin accumulation [J]. *Neural Transm*, 2011, 118(11): 1575–1583.
- [18] Mak SK, McCormack AL, Langston JW, et al. Decreased alpha-synuclein expression in the aging mouse substantia nigra [J]. *Exp Neurol*, 2009, 220(2):359–365.

[修回日期]2014-02-19

《中国比较医学杂志》论文书写格式要求

论文包括中文题目、作者、单位(单位所在地和邮编)、中文摘要以及英文题目、作者、单位与摘要、中文关键词(3~8个)、中图分类号、英文关键词(与中文关键词对应)、正文、参考文献。

1. 题目应简明扼要、准确地反映文章的主题,避免使用非公知公用的缩略语符号和代号。一般以 20 个字内为限,英文题名不宜超过 10 个实词。中英文题名含义应一致。
2. 作者姓名之间以逗号隔开,姓字母全部大写,名第一个字母大写,双名之间加连字符(-)。作者单位要求同中文,后面加 China。不同单位的作者,应在姓名右上角标上角码。作者单位另起一行在作者姓名之下,包括单位全称,所在城市名称和邮编,两端加圆括号。不同单位的作者,应在单位名称前加上与作者名字相同的标识。如:

链脲佐菌素诱导 1 型糖尿病大鼠模型稳定性观察

蒋 升¹, 谢自敬¹, 张 莉²

(1. 新疆医科大学第一临床医学院内分泌科, 乌鲁木齐 830054; 2. 武警新疆总队医院眼科, 乌鲁木齐 830000)

Observation of Stability of Type I Diabetic Rat Models Induced by Streptozotocin

JIANG Sheng¹, XIE Zi-jing¹, ZHANG Li²

(1. Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;

2. Xinjiang General Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Urumqi 830091, China)

3. 摘要和关键词

中文摘要应包括目的、方法、结果(应有主要数据)、结论四部分内容。篇幅一般 300 字左右。摘要不分段。英文摘要应有英文题目、作者、作者单位、邮政编码、正文和关键词。英文摘要正文的内容与中文摘要基本相同,可更为详细些,但不宜过长。英文摘要置于中文摘要下方。

关键词是反映文章最主要内容的术语。中英文的意思要相同。关键词之间用分号隔开。

4. 脚注(文章首页左下方):(1)基金项目(论文所受资助的课题基金来源及编号);(2)作者简介(第一作者);(3)通讯作者。第一作者和通讯作者简介包括:姓名(生年-)、性别、职称、学位、研究方向。
5. 正文:格式和层次结构按照引言、材料和方法、结果、讨论 4 部分撰写。各层次标题应简明扼要,同一级标题应反映同一层次的内容(格式为 1.1.1 1.2.2……2.2.1 2.2.2……)。

凡在文中出现的生物名称请用正确的中文学名,并在第一次使用时提供其完整的拉丁学名。

凡可用文字说明者均不用图表。每个图表均应有图表题。图表题及其文字说明及注释采用中英文两种文字,先中文后英文。图、表按照在文中出现的顺序编号,图表序号一律用阿拉伯数字。表格一律采用三线表。图表置于正文中。如是彩图,按照顺序统一置于文章参考文献后,作彩版使用。

参考文献采用顺序编码标注,按照引文先后顺序,用阿拉伯数字连续编号。参考文献格式如下:

(1) 期刊:著者(一、二、三名作者全列,三名以上只列前三名后加“等”或“,et al.”). 文题[文献标识码]. 刊名,出版年,卷:起-止页。

(2) 专著:著者(一、二、三名作者全列,三名以上只列前三名后加“等”或“,et al.”). 书名(版次)[文献标识码]. 出版地:出版者,出版年:起-止页。

(3) 论文集:著者(一、二、三名作者全列,三名以上只列前三名后加“等”或“,et al.”). 文题[文献标识码]. 见(In):著者(一、二、三名作者全列,三名以上只列前三名后加“等”或“,et al.”). 论文集,出版地:出版者,出版年:起-止页。

文献标识码按:期刊[J]、专著[M]、论文集[C]、标准[S]、学位论文[D]。