

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.23.006

# 质谱检测叶酸缺乏人胚肾细胞中低组蛋白 H3 赖氨酸 79 甲基化修饰 \*

张勤<sup>1</sup> 薛鹏<sup>2</sup> 白宝玲<sup>1</sup> 李会莉<sup>1△</sup> 杨福全<sup>2△</sup>

(1 首都儿科研究所 儿童发育营养组学北京市重点实验室 北京 100020;

2 中科院生物物理研究所 蛋白质组学实验室 北京 100101 )

**摘要 目的:**探讨叶酸(Folic acid,FA)缺乏在培养的人胚肾细胞(HEK-293)中对细胞组蛋白修饰水平的影响。**方法:**人胚肾细胞分两组培养,一组正常培养,一组无叶酸培养。细胞提取组蛋白后通过高效液相色谱一线性离子阱 / 静电场轨道阱高分辨质谱(HPLC-LTQ/Orbitrap Ms)检测组蛋白的修饰以比较叶酸缺乏对人胚肾细胞组蛋白修饰的影响。**结果:**用高分辨质谱方法成功检测到人胚肾细胞的五个组蛋白变体 H1, H3, H4, H2a 和 H2b 上的 33 个组蛋白修饰位点,其中 23 个修饰位点为 uniprot 数据库上已经报道的组蛋白修饰位点,而其余 10 个为未报道修饰位点。通过质谱比较正常和叶酸缺乏组人胚肾细胞修饰谱发现 H3K79me1 和 H3K79me2 在叶酸缺乏培养组中检出率较低。进一步用蛋白免疫印迹的方法也证明了在叶酸缺乏的人胚肾细胞中 H3K79me1 水平低于正常培养组。**结论:**细胞中叶酸缺乏影响组蛋白甲基化包括 H3K79me2 和 H3K79me1 修饰水平,提示细胞外营养因素叶酸水平可影响组蛋白修饰水平从而参与疾病如神经管畸形(Neural tube defect, NTD)的发生。

**关键词:**H3K79; 甲基化修饰; 质谱; 叶酸缺乏; 人胚肾细胞

中图分类号:R392.12 文献标识码:B 文章编号:1673-6273(2014)23-4420-05

## Low Histone H3 Lysine 79 Methylation in Folic Acid Deficiency HEK-293 Cells by Mass Spectrometry\*

ZHANG Qin<sup>1</sup>, XUE Peng<sup>2</sup>, BAI Bao-ling<sup>1</sup>, LI Hui-li<sup>1△</sup>, YANG Fu-quan<sup>2△</sup>

(1 Beijing Municipal Key Laboratory of Child Development and Nutriomics, Capital Institute of Pediatrics, Beijing, 100020, China;

2 Laboratory of Proteomics, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101, China)

**ABSTRACT Objective:** To explore the roles of Folic acid (FA) in cultured human embryonic kidney cells (HEK-293) on histone modification levels. **Methods:** The cultured human embryonic kidney cells were divided into two groups. One group was cultured with normal DMEM, while the other group was cultured with Folate-free culture medium. Histone modification level was detected and compared by HPLC linear ion trap/Orbitrap high-resolution mass spectrometry (HPLC-LTQ/Orbitrap Ms) between two groups. **Results:** 33 Modification sites were found in the H1, H3, H4, H2a and H2b variants by HPLC-LTQ/Orbitrap Ms in the human embryonic kidney cells. And the level of H3K79me1 and H3K79me2 were found significantly lower in FA deficiency group than in the control group. And the western-blot confirmed that the H3K79me1 level was lower in Folate-free group. **Conclusion:** The FA deficiency in cell environment affects histone methylation modifications which suggests neural tube defects (NTDs) may be partly due to lack of nutrition factors such as FA.

**Key words:** H3K79 methylation; HPLC-LTQ/Orbitrap Ms; FA deficiency; HEK-293

**Chinese Library Classification(CLC): R392.12 Document code: B**

**Article ID:1673-6273(2014)23-4420-05**

### 前言

神经管畸形(Neural tube defects, NTDs)是由于神经管闭合或过早闭合失败引起的基因和环境交互作用的多基因先天复杂畸形,是一种重度高发出生缺陷<sup>[1]</sup>。流行病资料显示 NTDs 发生与母体叶酸水平密切相关,母体在孕前期和孕早期补充叶酸可有效预防 NTD 的发生,但是叶酸异常诱发 NTDs 的发生及补充叶酸预防神经管畸形发生的机制并不清楚<sup>[2]</sup>。组蛋白修饰

是一种非常重要的表观遗传机制,广泛调控基因转录和功能<sup>[3]</sup>。组蛋白位于细胞核内,人的组蛋白包括由 H2a, H2b, H3 和 H4 组成的组蛋白 8 聚体和连接蛋白 H1<sup>[4,5]</sup>。组蛋白常见的修饰包括甲基化、乙酰化、泛素化和磷酸化等,各种修饰水平与环境、饮食、遗传等因素相关,也往往是癌症、神经系统疾病等一些疾病的病因。

本实验建立了高效液相色谱一线性离子阱 / 静电场轨道

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81300489)

作者简介:张勤,女,硕士,助理研究员,主要研究方向为蛋白修饰,电话:010-85638400, E-mail:maureenzq@hotmail.com

△通讯作者:李会莉,E-mail:lihuili2011@gmail.com;

杨福全,E-mail:fqyang@ibp.ac.cn

(收稿日期:2014-05-04 接受日期:2014-05-28)

阱高分辨质谱快速检测组蛋白修饰的方法，并在此基础上比较正常叶酸培养细胞和无叶酸培养人胚肾细胞的组蛋白修饰差异。结果表明叶酸缺乏组组蛋白 H3K79 甲基化水平降低，提示叶酸缺乏可能通过影响组蛋白修饰水平从而参与神经管畸形的发生。

## 1 材料和方法

### 1.1 人胚肾细胞(HEK-293)培养及分组

人胚肾细胞系购买自医科院基础所。培养基以不含叶酸的 DMEM(Sigma, D2429)培养液为基础，再补充一定量叶酸(Sigma, F8758)和胎牛血清(Gibco, 16000-044)。细胞实验分两组进行，无叶酸组中培养基不加叶酸；正常培养组中则补充 4 mg/L 叶酸到正常水平。两组细胞传代培养 4 天后，胰酶消化收集细胞。

### 1.2 组蛋白提取

细胞样品用酸提取法提取组蛋白<sup>[6]</sup>。简言之，细胞在裂解缓冲液(10 mL 溶液含 10 mM Tris-Cl, pH 为 8.0, 1 mM 氯化钾, 1.5 mM 氯化镁和 1 mM 二硫苏糖醇(DTT))中充分裂解(裂解缓冲液临用前需加蛋白酶和磷酸酶抑制剂)。随后通过离心(1500 g, 10 分钟)获得细胞核。核提取物加入 0.2 N 的硫酸(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)4℃过夜。离心(12,000×g, 20 分钟)，取上清液加入 33%三氯乙酸(终浓度)以沉淀蛋白，所获得的沉淀以冷丙酮洗涤后溶解于双蒸水中并贮存于 -80℃ 以备用。

### 1.3 蛋白溶液酶解

参考本课题组以往发表文章<sup>[7]</sup>，10 μg 提纯组蛋白中加入 10 mM(终浓度)的 DTT 于 37℃ 反应 60 分钟以打开二硫键，然后加入 40 mM(最终浓度)碘乙酰胺于暗室室温作用 60 分钟以进行烷基化反应。随后通过 40 mM 的 DTT 作用 15 分钟以终止烷基化反应。将尿素稀释到小于 1 M 后，随即加入胰蛋白酶进行酶解。酶解比例为 1:50(酶:总蛋白)，于 37℃ 酶解 18 小时后加入 1.0 % 的三氟乙酸以终止酶解反应。最后高速离心(13,000×g, 10 分钟)以除去不溶性物质。上清液取 2 μg 进行质谱检测。

### 1.4 质谱检测

LTQ Orbitrap XL 液相色谱 / 静电场轨道阱高分辨质谱联用仪质谱库均自美国 Thermo 公司。质谱条件如下：离子化方式：电喷雾电离负离子模式(ESI)；喷雾电压：2.2 kV；最大离子注入时间：一级全扫描 50 ms, 多级扫描 150 ms。扫描方式：真离子扫描。通过 lockmass 462.146577 进行质量实时校正；扫描范围 m/z 300-1800, 扫描分辨率 60 000。对全扫描中响应最强的 TOP10 离子做二级质谱扫描；碎裂方式：诱导解离碰撞(CID)，归一化的能量 35 %。

### 1.5 质谱结果的检索

Thermo Proteome Discoverer 数据库搜索，Percolator 取 PSM(peptide spectrum match)假阳性 1 % 数据过滤方法，其中 q 值和 Xcorr 为主要的质谱数据可靠性筛选指标，q 值越接近 0 表示质谱图可靠性越高；而 Xcorr 为同时测量质量和强度可信的标准，与电荷有关，以 1 电荷状态 XC≥ 1.5, 2 电荷状态 XC≥ 2.0 和 3 电荷状态 XC≥ 2.5 为筛选标准<sup>[8]</sup>。数据库包含所有已知的人类组蛋白变体。修饰参数的设定为，单甲基化修饰

位于精氨酸和赖氨酸上，相差 14.016 Da，二甲基化位于精氨酸和赖氨酸上，相差 28.031 Da；乙酰化位于赖氨酸上，相差 42.011 Da；三甲基化位于赖氨酸上，相差 42.047 Da。

### 1.6 蛋白免疫印迹检测

酸提取的细胞组蛋白样品 5 μg 于 15 % 的 SDS-PAGE 胶中 80 V 恒压跑胶，随后用硝酸纤维素膜转膜，条件为 150 mA 恒流转 1 小时。抗组蛋白 H3K79me1 抗体(abcam, ab2886)和 H3 抗体(abcam, ab61251-100)均购买自 Abcam 公司，一抗孵育条件为 1:1000 摆床孵育，4℃ 过夜，二抗为羊抗兔辣根过氧化物酶标记抗体(中杉金桥公司, ZB-2301)，1:5000 室温孵 1 小时，随后用 ECL 法显色后暗室曝光。

### 1.7 统计学分析

试验中免疫印迹结果的统计分析采用 Excel 自带的 TTEST 软件分析，独立的免疫印迹实验重复 3 次，结果用 Bio-rad 公司的 Quantity one 软件计算灰度，TTEST 选项为双尾分布，成对检验方法计算 P 值，P<0.05 提示差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 细胞组蛋白提取

细胞组蛋白用酸提取法提取后，以 15 % PAGE 胶进行蛋白电泳，考马斯亮蓝染色后可见明显 H3, H4, H2a, H2b 和 H1 条带，表明酸提取法可成功提取组蛋白各主要组分，具体见图 1。

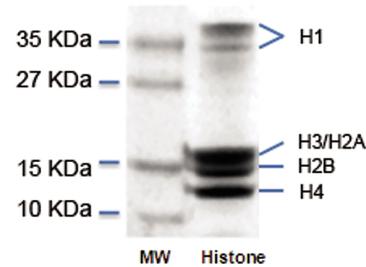


图 1 人胚肾细胞组蛋白酸提取结果的考马斯亮蓝染色

Fig.1 Coomassie Blue-stained SDS gel with the HEK-293 samples for MS  
注：15 % 的 SDS-PAGE 跑胶，上样量为 5 μg。其中组蛋白的 5 个主要组成成分 H1, H3, H2b, H2a 和 H4，标记如图示。

Note: SDS-PAGE separation of acid extracted histone from HEK-293 cells. Five microliters of acid-extracted proteins were loaded on a 15 % protein gels and stained with Coomassie Blue dye. The locations of the linker histone protein H1 and the core histone proteins H3, H2B, H2A and H4 were noted.

### 2.2 质谱检测到的人胚肾细胞修饰谱

高分辨 orbi 质谱检测到五大组蛋白变体，H1, H3, H2a, H2b 和 H4。一共检测到 33 个组蛋白修饰，包括 9 个单甲基化位点，7 个二甲基化位点，6 个三甲基化位点和 11 个乙酰化位点。其中 23 个检测到的修饰位点与 uniprot(<http://www.uniprot.org/uniprot>) 数据库中报道的人类组蛋白修饰位点相同，而 H3K14me3, H4K23me2, H3K467me1, H2aR88me1, H2aK95me1, H2bK34me1, H2bK57me3, H2bR72me1 和 H1K74me3, H1K89Ac 为数据库中未报道组蛋白修饰位点。本次质谱检测到的组蛋白肽段覆盖率分别为 H2b, 89.68 %; H3, 83.82 %; H4, 76.70 %。

%; H2a, 68.46 % 和 H1, 64.79 %。肽段覆盖率比较高, 修饰检出比较全面。将可靠肽段修饰整理到 5 个组蛋白组分中, 获得如图 2 所示的人胚肾细胞质谱检测所得组蛋白修饰谱。我们将其中的组蛋白 H3K79me1 修饰, 提取出质谱图见图 3, 表明在肽段 EIAQDFKTDLR 上, 存在着单甲基化修饰, 一系列 b 和 y 一甲基化片段的离子不仅提供自身序列信息, 而且还表示在这个肽段上存在一个明确的单甲基化位点, 表明这个修饰是可靠的。

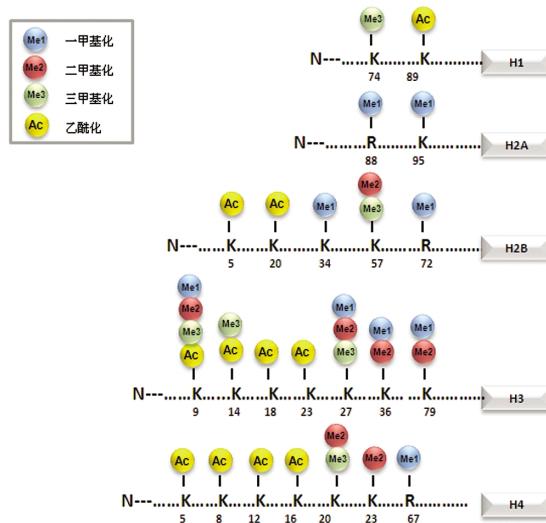


图 2 质谱检测人胚肾细胞组蛋白修饰谱

Fig.2 A summary of the PTM sites identified in the HEK-293 cells

注: 图示标记了质谱检测到的人胚肾细胞组蛋白的 5 个主要组成成分 H1, H3, H2B, H2A 和 H4 上的主要组蛋白修饰位点, 包括一甲基化, 二甲基化, 三甲基化和乙酰化。

Note: The modifications of histone H1, H3, H2B, H2A and H4 were noted including monomethylation, dimethylation, trimethylation and acetylation.

### 2.3 叶酸缺乏与正常培养人胚肾细胞中组蛋白修饰水平比较

为明确叶酸缺乏组和正常组中是否存在组蛋白修饰变化, 我们酸提取不同叶酸条件处理 4 天的细胞组蛋白进行质谱以比较其修饰。两组均鉴定到 5 个主要组蛋白变体, 其肽段覆盖率和修饰检出率也基本一致, 结果具有可比性。比较结果表明大部分的修饰在两组中没有明显差异, 其中 H3 的修饰肽段总结后如表 2 所示, 可见 H3K79me2 和 H3K79me1 在叶酸缺乏组中明显检出降低。

### 2.4 免疫印迹比较 H3K79me1 在正常组和叶酸缺乏组水平

为验证 H3K79me1 在叶酸缺乏人胚肾细胞中是否确实降低, 我们提取不同叶酸条件处理 4 天的细胞组蛋白进行免疫印迹实验, 以细胞内 H3 的水平为对照, 结果见图 4。表明 H3K79me1 修饰水平在叶酸缺乏组是降低的,  $P=0.02$ 。

## 3 讨论

NTDs 包含无脑儿、颅脊柱裂、脊柱裂、脑膨出、脊髓脊膜膨出等多种疾病表型, 是一种多基因、环境与遗传因素交互作用的先天性复杂疾病。除了遗传因素外, 环境营养因素对 NTDs 的形成密切相关, 异常水平的叶酸、维生素 B12 和维生素 C 均可增加发生 NTDs 的风险<sup>[9-12]</sup>。流行病学研究表明, 妊娠早期叶酸缺乏是神经管畸形发生的重要危险因子, 补充 0.4-4.0 mg/d 的叶酸能预防大约 50 %-70 % 的神经管畸形的发生, 但是叶酸异常诱发 NTDs 的发生及补充叶酸预防神经管畸形发生的机制并不清楚。国内外学者普遍认为叶酸参与的一碳代谢循环在其中起重要作用<sup>[13]</sup>。已有文献报道, 敲除叶酸转运及叶酸代谢中的相关酶可以导致 NTDs 的发生, 这些基因包括叶酸受体, 还原性叶酸载体, 5,10- 亚甲基四氢叶酸还原酶, 甲硫氨酸和酶, 亚甲基四氢叶酸脱氢酶和甲基转移酶等<sup>[14-16]</sup>。

#	b <sup>+</sup>	b <sup>-</sup>	b <sup>1+</sup>	b <sup>2+</sup>	Seq.	y <sup>+</sup>	y <sup>-</sup>	y <sup>1+</sup>	y <sup>2+</sup>	#
1	130.04988	65.52858	44.02148	E		1220.66342	610.83535	407.55932	11	
2	243.13395	122.07061	81.71617	I		1107.57935	554.29331	369.86463	9	
3	314.17107	157.58917	105.39521	A		1036.54223	518.77475	346.18559	8	
4	442.22965	221.61846	148.08140	Q		908.53396	454.42265	306.15765	7	
5	557.22050	279.71316	186.42226	D		793.44760	397.23199	246.15706	6	
6	704.20502	350.85465	230.64652	F		645.38823	323.69778	216.13428	5	
7	845.43564	433.71446	282.81673	K-Methyl		504.27766	252.64247	168.76407	4	
8	947.43332	474.24530	316.49929	T		403.22998	202.11863	135.08151	3	
9	1062.51027	531.75877	354.84161	L		288.20303	144.60515	96.73919	2	
10	1175.59434	588.30081	392.53630	R		175.11896	88.06312	59.04450	1	

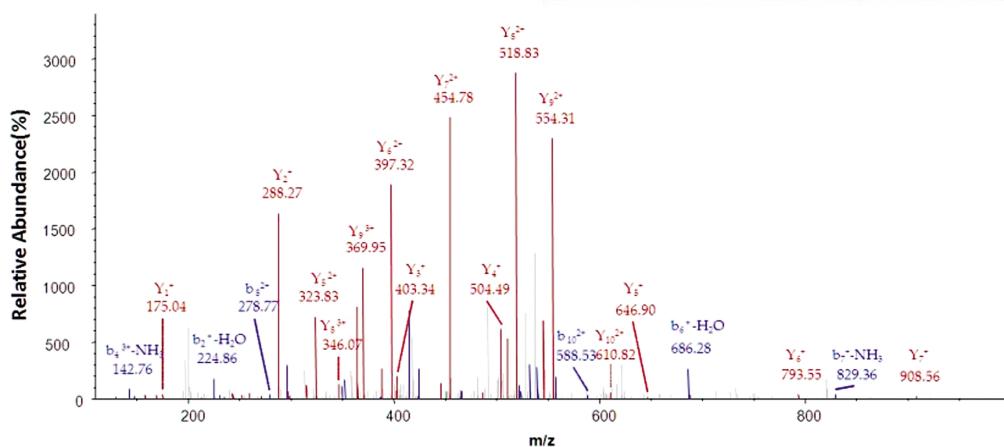


图 3 组蛋白 H3K79me1 的典型质谱图

Fig.3 A typical mass spectrum to identify H3K79me1

注: 图示为带单个甲基化修饰的肽段 EIAQDFKTDLR 的质谱检测图, 图中标记的一系列 y- 离子和 b- 离子, 不仅表明了肽段 EIAQDFKTDLR 的可靠性, 也表示修饰的可靠性。

Note: Mass spectrum of the lysine monomethylated HEK-293 H3 peptide EIAQDFKTDLR. Fragment ions assigned to both y-ions and b-ions are labeled.

表 1 质谱比较人胚肾细胞 H3 组蛋白修饰差异

Table 1 Comparison of post-translational modifications of histone H3 between folate-free and folate-normal treated HEK-293 cells

PTMs	Peptide	Modifications in the peptide	Folate-normal		5 Folate-free				
			●	○	●	●	○	○	○
K79(Methyl)	EIAQDFKTDLR	K79(Methyl)	●	○	●	●	○	○	●
K79(Dimethyl)	EIAQDFKTDLR	K79(Dimethyl)	○	●	●	●	○	○	●
K36(Dimethyl)	ATGGVKKPHR	K36(Dimethyl)	●	○	●	●	●	○	●
	KSAPATGGVKKPHR	K27(Trimethyl); K36(Dimethyl)	○	○	○	●	○	○	●
	KSAPATGGVKKPHR	K27(Dimethyl); K36(Dimethyl)	○	○	●	●	○	○	●
K36(methyl)	KSAPATGGVKKPHR	27(Dimethyl); K36(Methyl)	○	○	●	●	○	○	●
K14(Acetyl)	KSTGGKAPR	K14(Acetyl)	●	○	●	●	●	○	●
	STGGKAPR	K14(Acetyl)	●	○	○	○	○	○	●
	KSTGGKAPR	K9(Methyl); K14(Acetyl)	○	○	●	●	○	○	●
	KSTGGKAPR	K9(Dimethyl); K14(Acetyl)	●	○	○	○	●	○	●
	KSTGGKAPR	K9(Trimethyl); K14(Acetyl)	●	○	●	●	●	○	●
	KSTGGKAPR	K9(Acetyl); K14(Acetyl)	○	○	●	●	●	●	○
K23(Acetyl)	KQLATKAAR	K23(Acetyl)	●	○	●	●	●	●	●
	QLATKAAR	K23(Acetyl)	●	○	●	●	●	○	●
	KQLATKAAR	K18(Acetyl); K23(Acetyl)	●	●	●	●	○	●	●
K9(Methyl)	KSTGGKAPR	K9(Methyl); K14(Acetyl)	○	○	●	●	○	○	●
K9(Dimethyl)	KSTGGKAPR	K9(Dimethyl); K14(Acetyl)	●	○	○	○	●	○	●
K9(Trimethyl)	KSTGGKAPR	K9(Trimethyl); K14(Acetyl)	●	○	●	●	●	○	●
K9(Acetyl)	KSTGGKAPR	K9(Acetyl); K14(Acetyl)	○	○	●	●	●	●	○
K27(Methyl)	KSAPATGGVK	K27(Methyl)	○	●	●	○	●	●	●
K27(Dimethyl)	KSAPATGGVK	K27(Dimethyl)	○	●	○	○	○	○	○
	KSAPATGGVKKPHR	K27(Dimethyl); K36(Methyl)	○	○	●	●	○	○	●
	KSAPATGGVKKPHR	K27(Dimethyl); K36(Dimethyl)	○	○	●	●	○	○	●
K27(Trimethyl)	KSAPATGGVK	K27(Trimethyl)	●	●	●	●	●	●	●
	KSAPATGGVKKPHR	K27(Trimethyl); K36(Dimethyl)	○	○	○	●	○	○	●
K18(Acetyl)	KQLATKAAR	K18(Acetyl); K23(Acetyl)	●	●	●	●	○	●	●

注: PTMs: 组蛋白 H3 上检测到的修饰; Peptide: 质谱检测到的带修饰的肽段; Modifications in the peptide: 在这个肽段上检测到的所有组蛋白修饰; Folate-normal: 正常叶酸培养的人胚肾细胞组蛋白修饰, 独立 4 次实验检测到的修饰统计; Folate-free: 无叶酸培养的人胚肾细胞的组蛋白修饰, 独立 4 次实验检测到的修饰统计; ● : 表示检测到了此修饰; ○ : 表示没有检测到此修饰; Methyl 表示甲基化; Dimethyl 表示二甲基化; Trimethyl 表示三甲基化; Acetyl 表示乙酰化。

Note: PTMs: Modifications in histone H3; Peptide: The sequence with modifications which detected by MS; Modifications in the peptide: all the modifications in this peptide; Folate-normal: modifications of normal folate treated HEK-293 cells; Folate-free: modifications of no folate treated HEK-293 cells; ● : modifications detected in this peptide; ○ : modifications not detected; Methyl: monomethylation; Dimethyl: dimethylation; Trimethyl: trimethylation; Acetyl: acetylation.

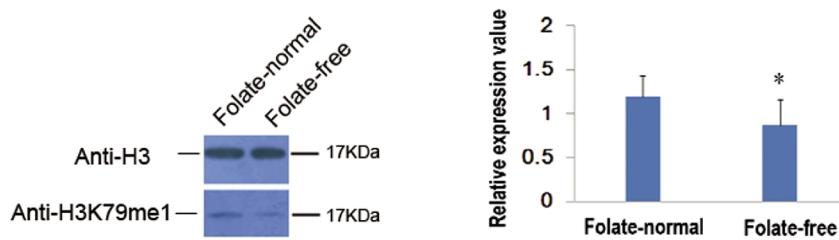


图 4 免疫印迹比较组蛋白 H3K79me1 在叶酸正常组和叶酸缺乏组的修饰水平

Fig.4 Comparison of histone H3K79me1 level

between normal and folate-free treated HEK-293 by western blot

注: 左图为 H3K79me1 的免疫印迹结果, 右图为对独立的 3 次 H3K79me1 免疫印迹实验统计的结果, 以细胞总的 H3 水平为参照物, \*, 表示无叶酸培养组与正常对照组比较,  $P < 0.05$ 。

Note: Left panel showed the expression of H3K79me1 by western blot analysis and the right column showed the results of densitometric analyses of western blot of H3K79me1. Total histone H3 was used as a loading control. \*: Compared the Folate-free treated group to the control group,  $P < 0.05$ .

组蛋白修饰是一种非常重要的表观遗传机制,广泛调控基因转录和功能。人类标本的研究证明神经系统疾病与组蛋白异常相关。组蛋白的修饰异常可导致神经系统疾病的发生,如H3K9组蛋白甲基转移酶(SETDB1)在Huntington's纹状体中表达明显升高,并导致H3K9的甲基化明显升高,而这种升高与Huntington's神经系统功能障碍相关<sup>[17]</sup>。另外SMCX基因(编码H3K4三甲基化去甲基化酶)的突变与智力低下和孤独症相关<sup>[18]</sup>。还有研究证明H3K4甲基化转移酶-MLL1与精神分裂患者的大脑皮层功能异常相关<sup>[19]</sup>。另有研究表明,组蛋白甲基化修饰在神经干的发育中也起着非常重要的作用<sup>[20]</sup>。这些都提示组蛋白修饰水平与脑组织发育和脑功能正常密切相关,而一旦组蛋白修饰水平异常,则可能诱发神经系统疾病的发生。

本实验利用高分辨质谱比较了正常培养和叶酸缺乏人胚肾细胞的组蛋白修饰,发现组蛋白H3K79修饰,包括H3K79me2和H3K79me1均明显降低。H3K79甲基化酶为DOT1L,最早发现于2002年,也是目前发现的组蛋白H3K79的唯一甲基转移酶,在不同种属中非常保守<sup>[21]</sup>。DOT1L缺失在细胞和小鼠的试验中表明H3K79甲基化主要参与了细胞的增殖、凋亡和细胞周期调控。在盘基网柄菌中将DOT1L/KMT4同源体敲除证明它是H3K79甲基化的唯一转移酶,细胞缺失DOT1L表现为发育迟缓和生长缓慢<sup>[22]</sup>。小鼠胚胎干细胞诱导分化的早期,缺失DOT1L的细胞停止增殖,细胞被阻滞于G2/M期,并导致非整倍体细胞数目增加。相关的转录组学研究表明DOT1L缺乏导致包括细胞周期调控和细胞增殖调控在内的大量基因表达异常也表明在小鼠胚胎发育的早期分化阶段,H3K79甲基化修饰是必不可少的<sup>[23]</sup>。进一步小鼠基因敲除DOT1L显示多发性发育障碍,包括生长迟缓,心脏血管发育异常并于胚胎9.5至10.5天死亡。这些都提示H3k79甲基化在胚胎发育中起着必不可少的重要调控作用。这些也提示我们NTDs发生的部分原因可能是因为环境营养因素叶酸缺乏并通过影响组蛋白的修饰水平所导致。本文在组蛋白修饰水平揭示叶酸干预NTDs发生的可能表观遗传机制,从而对NTDs这一高发的先天性疾病治疗提供可靠的基础性和临床性相结合的实验依据。

#### 参考文献(References)

- [1] Detrait ER, George TM, Etchevers HC, et al. Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics [J]. Neurotoxicol Teratol, 2005, 27(3): 515-524
- [2] Wallingford JB, Niswander LA, Shaw GM, et al. The continuing challenge of understanding, preventing, and treating neural tube defects[J]. Science, 2013, 339(6123): 1222002
- [3] Zhou VW, Goren A, Bernstein BE. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes [J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(1): 7-18
- [4] Bonaldi T, Imhof A, Regula JT. A combination of different mass spectroscopic techniques for the analysis of dynamic changes of histone modifications[J]. Proteomics, 2004, 4(5): 1382-1396
- [5] Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code [J]. Science, 2001, 293(5532): 1074-1080
- [6] Hake SB, Shechter D, Dormann HL, et al. Extraction, purification and analysis of histones[J]. Nat Protoc, 2007, 2(6): 1445-1457
- [7] Zhang Q, Xue P, Li H, et al. Histone modification mapping in human brain reveals aberrant expression of histone H3 lysine 79 dimethylation in neural tube defects[J]. Neurobiol Dis, 2013, 54: 404-413
- [8] Hou JJ, Cui ZY, Xie ZS, et al. Phosphoproteome Analysis of Rat L6 Myotubes Using Reversed-Phase C18 Prefractionation and Titanium Dioxide Enrichment[J]. J Proteome Res, 2010, 9(2): 777-788
- [9] Mulinare J, Cordero JF, Erickson JD, et al. Periconceptional use of multivitamins and the occurrence of neural tube defects[J]. JAMA, 1988, 260(21): 3141-3145
- [10] Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, et al. Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation[J]. Arch Dis Child, 1981, 56(12): 911-918
- [11] Bower C, D'Antoine H, Stanley FJ. Neural tube defects in Australia: trends in encephaloceles and other neural tube defects before and after promotion of folic acid supplementation and voluntary food fortification[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2009, 85(4): 269-273
- [12] Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects[J]. Arch Dis Child, 1976, 51(12): 944-950
- [13] Blom HJ. Folic acid, methylation and neural tube closure in humans [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2009, 85(4): 295-302
- [14] Volcik KA, Shaw GM, Zhu HP, et al. Associations between polymorphisms within the thymidylate synthase gene and spina bifida [J]. Birth Defects Res A, 2003, 67(11): 924-928
- [15] Barber RC, Shaw GM, Lammer EJ, et al. Lack of association between mutations in the folate receptor-alpha gene and spina bifida [J]. Am J Med Genet, 1998, 76(4): 310-317
- [16] Finnell RH, Greer KA, Barber RC, et al. Neural tube and craniofacial defects with special emphasis on folate pathway genes [J]. Crit Rev Oral Biol M, 1998, 9(1): 38-53
- [17] Yang L, Xia L, Wu DY, et al. Molecular cloning of ESET, a novel histone H3-specific methyltransferase that interacts with ERG transcription factor[J]. Oncogene, 2002, 21(1): 148-152
- [18] Shi Y. Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease[J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(11): 829-833
- [19] Akbarian S, Huang HS. Epigenetic regulation in human brain-focus on histone lysine methylation[J]. Biol Psychiatry, 2009, 65(3): 198-03
- [20] 周翔, 汪泱, 邓志峰. 组蛋白修饰与神经干细胞分化 [J]. 国际脑血管病杂志, 2012, 20: 717-720  
Zhou Xiang, Wang Yang, Deng Zhi-feng. Histone modification and neural stem cell differentiation[J]. Int J Cerebrovasc Dis, 2012, 20: 717-720
- [21] Feng Q, Wang H, Ng HH, et al. Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain [J]. Curr Biol, 2002, 12(12): 1052-1058
- [22] Muller-Tauberberger A, Bonisch C, Furbringer M, et al. The histone methyltransferase Dot1 is required for DNA damage repair and proper development in Dictyostelium [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404(4): 1016-1022
- [23] Barry ER, Krueger W, Jakuba CM, et al. ES cell cycle progression and differentiation require the action of the histone methyltransferase Dot1L[J]. Stem Cells, 2009, 27(7): 1538-1547