

· 论 著 ·

慢性尼古丁成瘾大鼠脑组织中 Tet1 蛋白水平及 Npas4 基因甲基化水平研究

张明谦 李艳 邓虹 陆爽 薛洁蕊 王锦

【摘要】目的 探讨慢性大鼠尼古丁成瘾过程中 Tet1 蛋白表达水平及 Npas4 基因甲基化水平变化及意义。**方法** 通过背部连续注射尼古丁酒石酸氢盐构建大鼠慢性尼古丁成瘾动物模型,应用 Western blot 对各组实验大鼠脑组织 Tet1 蛋白表达水平进行测定;应用选择性化学标记 SMRT 测序对大鼠海马区及大脑皮质中 5-羟甲基胞嘧啶 (5hmC) 与 5-甲基胞嘧啶 (5mC) 水平进行测定,获得 5hmC 与 5mC 在脑内的动态变化;应用甲基化特异性 PCR (MSP) 结合 RT-PCR 对大鼠海马区、大脑皮质中 Npas4 基因甲基化、mRNA 和蛋白表达情况进行测定;应用荧光分光光度法对慢性尼古丁成瘾大鼠脑内神经递质多巴胺 (DA)、乙酰胆碱 (AC)、阿啡肽 (EOPs) 及五羟色胺 (5-HT) 含量进行测定。**结果** 通过构建慢性尼古丁成瘾大鼠动物模型应用 Western-blot 对各组大鼠脑内 Tet1 蛋白表达水平测定结果发现,在大鼠海马区中尼古丁成瘾组大鼠 Tet1 蛋白表达水平明显低于非尼古丁成瘾大鼠 ($P<0.05$),进一步对 5hmC 与 5mC 水平测定发现,大鼠海马区中尼古丁成瘾大鼠组出现 5hmC 显著下降而 5mC 明显升高 ($P<0.05$);通过对 Npas4 基因甲基化及 mRNA 及蛋白表达水平进行测定发现,在大鼠海马区域中尼古丁成瘾大鼠脑内 Npas4 基因呈现高甲基化情况,而 Npas4 基因 mRNA 及蛋白表达水平下调 ($P<0.05$);对各组大鼠脑内神经递质浓度检测发现,大鼠海马区中尼古丁成瘾组大鼠脑内神经递质浓度多巴胺 (DA)、乙酰胆碱 (AC)、内啡肽 (EOPs) 及五羟色胺 (5-HT) 均高于非尼古丁成瘾大鼠组 ($P<0.05$)。**结论** 在大鼠慢性尼古丁成瘾形成过程中大鼠脑组织海马区 Tet1 蛋白表达水平下降,且可以影响大鼠脑组织中 5hmC 与 5mC 水平,进而影响 Npas4 基因甲基化程度及神经递质变化从而参与尼古丁成瘾的形成。

【关键词】 Tet1 蛋白; Npas4 基因; 尼古丁成瘾; DNA 甲基化

中图分类号: R741 文献标识码: A 文章编号: 1006-351X (2020) 02-0116-05

Expression of Tet1 protein and methylation of Npas4 gene in brain tissue of rats with chronic nicotine addiction

Zhang Mingqian, Li Yan, Deng Hong, Lu Shuang, Xue Jierui, Wang Jin. Department of Emergency, the Yunnan Hospital Affiliated of Kunming Medical University, Yunnan 650051, China

Corresponding author: Wang Jin, Email: wangjin0121@hotmail.com

【Abstract】Objective To investigate the changes and significance of Tet1 protein expression and Npas4 gene methylation in chronic nicotine addiction in rats. **Methods** the rat model of chronic nicotine addiction was constructed by continuous injection of nicotine tartaric acid on back muscles, Western blot was used to determine the expression of Tet1 protein in the brain tissue of the rats, The levels of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) and 5-methylcytosine (5mC) in the hippocampus and cerebral cortex of rats were determined by selective chemical marker SMRT sequencing, the methylation and expression of Npas4 gene in hippocampus and cerebral cortex of rats were detected by methylation-specific PCR (MSP) combined with RT-PCR, The contents of dopamine (DA), acetylcholine (AC), enkephalin (EOPs) and serotonin (5-HT) in the brain of rats with chronic nicotine addiction were determined by fluorescence spectrophotometry. **Results** The expression level of Tet1 protein in the brain of rats with chronic

基金项目: 云南省应用基础研究 (昆医联合专项) 2017FE468 (-094); 昆明医科大学附属延安医院院内基金资助项目 (yyky015-018); 昆明市卫生科技人才培养项目 (2018-sw-107)

作者单位: 650051 云南, 昆明医科大学附属延安医院急诊医学科 (张明谦、邓虹、陆爽、薛洁蕊); 昆明医科大学附属第一医院急救医学部 (王锦); 昆明云桥医院急诊医学科 (李艳)

通信作者: 王锦, Email: wangjin0121@hotmail.com

nicotine addiction was determined by Western blot. The results showed that the expression level of Tet1 protein in the hippocampus of rats with nicotine addiction was significantly lower than that of non-nicotine addiction rats ($P<0.05$). The nicotine addicted rats in hippocampus showed a significant decrease of 5hmC and significant increase of 5mC ($P<0.05$). The Npas4 gene was hypermethylated in the hippocampus of nicotine addicted rats, while the expression of Npas4 gene was down-regulated ($P<0.05$). The concentration of neurotransmitters in the hippocampus of nicotine addicted rats was higher than that of non-nicotine addicted rats ($P<0.05$), including dopamine (DA), acetylcholine (AC), enkephalin (EOPs) and serotonin (5-HT). **Conclusion** The expression of Tet1 protein in hippocampus of rats decreased, which could affect the levels of 5hmC and 5mC in brain tissue of rats, and then affect the methylation level of Npas4 gene and the changes of neurotransmitters, thus participating in the formation of nicotine addiction.

【Key words】: Tet1 protein; Npas4 gene; Nicotine addiction; DNA methylation.

烟草危害现已成为一个最严重的公共卫生问题,是造成肺癌、慢性支气管炎和肺气肿等疾病发生的独立危险因素之一^[1-2]。尽管目前已采取了多种戒烟手段,但遗憾的是烟草复吸率仍高达 75%,其主要原因是烟草中所含尼古丁具有强烈的成瘾性,但具体机制尚不明确。近年来研究发现 DNA 甲基化与尼古丁成瘾关系密切^[3-4],因此,深入开展尼古丁成瘾表观遗传研究对于阐明其具体的发病机制有着重要意义。

Tet1 蛋白是甲基胞嘧啶双加氧酶家族(ten-eleven translocation family)中的一员,具有将 5mC 进一步转化为 5hmC 从而启动 DNA 去甲基化过程^[5-6],其关键上游神经元活动调节基因 Npas4 基因(神经元 PAS 域蛋白 4)是大脑特有活动依赖性转录因子,调节记忆形成和恢复的重要基因^[7-8]。作者通过构建大鼠慢性尼古丁依赖动物模型,并对在尼古丁成瘾过程中的大鼠脑组织中 Tet1 蛋白表达水平、5hmC 与 5mC 水平及 Npas4 基因甲基化情况进行了检测。

材料与方法

1. 实验材料

实验所用 Wistar 雄性大鼠(250 ± 15g) 100 只均购自昆明医科大学动物研究所,实验动物按美国国立卫生研究院的指导方针进行护理及饲养并符合动物伦理学规定。

2. 主要试剂和仪器

实验设备包括:荧光分光光度仪(上海棱光 F97),选择性化学标记 SMRT 测序仪(Sequel PacBio 公司),全自动生化分析仪(西门子 e164471),Tet1 蛋白抗体(上海瑶韵生物科技有限公司),BD MAX 全自动核酸提取及荧光 PCR 分析系统(美国 BD 公司)

3. 慢性尼古丁成瘾大鼠动物模型建立

8w Wistar 雄性大鼠(250 ± 15g)共 100 只,实验进行前让大鼠自由进食及饮水适应环境 7d,后由计算机随机分配序列并随机分配为 3 组,其中空白组(blank group) 20 只,对照组(control group) 40 只,

尼古丁成瘾组(nicotine group) 40 只。通过连续背部连续注射尼古丁酒石酸氢盐构建大鼠慢性尼古丁成瘾动物模型,具体方法为尼古丁成瘾组大鼠分别在每天 5:00, 13:00 和 21:00 背部皮下注射尼古丁酒石酸氢盐(0.02mg.kg⁻¹.d⁻¹x20d),在第 20 天末次注射结束后 60min,给予皮下注射美加明 1mg.kg⁻¹,观察动物 15min 内出现戒断症状,如咀嚼/错齿、扭体/喘气、颤抖/震颤等。若尼古丁成瘾组动物明显出现上述症状,即表明大鼠尼古丁成瘾模型造模成功。对照组大鼠分别于每天 5:00, 13:00 和 21:00 背部皮下注射等剂量 0.9% 氯化钠注射液,连续 20d。空白组大鼠不做任何干预处理,自由进食及饮水饲养。

4. 各组大鼠脑内神经递质含量测定

实验第 10 天、20 天分别处死大鼠,获取大鼠脑组织,通过荧光分光光度法对各组大鼠脑组织内神经递质多巴胺(dopamine, DA)、乙酰胆碱(acetylcholine, AC)、内啡肽(endogenous opioids, EOPs)及五羟色胺(five hydroxytryptamine, 5-HT)含量进行测定。

5. 各组大鼠脑组织 Tet1 蛋白表达水平及 5hmC 与 5mC 水平进行测定,

实验第 10 天、20 天分别通过 Western blot 对大鼠脑组织 Tet1 蛋白表达水平进行测定,并通过选择性化学标记 SMRT 测序对各组大鼠脑组织中 5hmC 与 5mC 水平进行测定。

6. Tet1 蛋白上游基因 Npas4 基因甲基化情况检测

实验第 20 天,处死大鼠获取大鼠脑组织,应用 DNA 提取试剂盒对各组大鼠脑组织(包括海马区域及大脑皮质)DNA 进行提取,琼脂凝胶电泳对提取物进行验证,DNA methylation-gold kit 试剂对产物修饰处理后进行 PCR 扩增。具体引物如下(表 1)。

表 1 Npas4 甲基化特异 PCR(MSP)引物设计

引物名称	引物设计	长度	退火温度
甲基化引物	上游 5' -TCGTTGAGTTCGAGGTTTTTC-3'	118bp	55°C
非甲基化引物	下游 5' -CGACTCACCTAATCGATAACGA-3'	92bp	55°C
甲基化引物	上游 5' -TGTGAGTTTCAGGTTTTTTGG-3'	117bp	53°C
非甲基化引物	下游 5' -CAACTCACCTAATCAATAACAAA-3'	92bp	53°C

7. Npas4 基因蛋白表达及 mRNA 表达情况检测

Trizol 法提取大鼠脑组织总 RNA，测定 OD260/OD280 值，经逆转录为 cDNA 后储存在 -20℃ 冰箱待用。RT-PCR 产物使用 2.5% 的琼脂糖胶进行电泳检测，qPCR 使用荧光定量仪器进行测定，结果分析使用 2^{-ΔΔCT} 法计算。引物如下（表 2）

表 2 实时定量基因扩增荧光检测系统 (qPCR) 引物设计

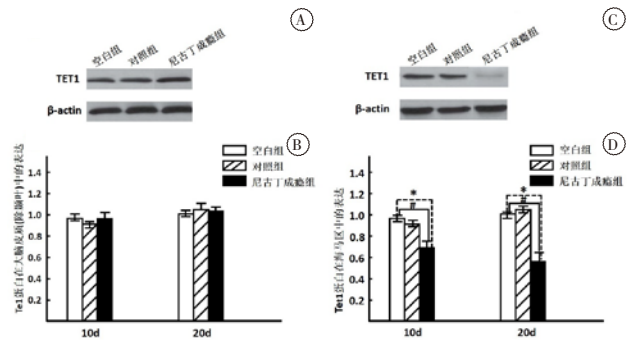
引物名称	引物设计
Npas4 上游引物	5'-GTAAATTGCTAGAGGATTAAGTTTTTTTTTATT TTTTG-3'
Npas4 下游引物	5'-TATCTCACACAAATCCAATACTAAAAC TC-3'
β-actin 上游引物	5'-CCACGAACTACCTTCAACTCC-3'
β-actin 下游引物	5'-GTGATCTCCTTCTGCATCTGT-3'

8. 统计学方法

采用 SPSS 18.0(美国 IBM SPSS Software 公司) 分析实验数据，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组均数间比较采用 *t* 检验；构成比或率之间比较采用 χ^2 检验，以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结果

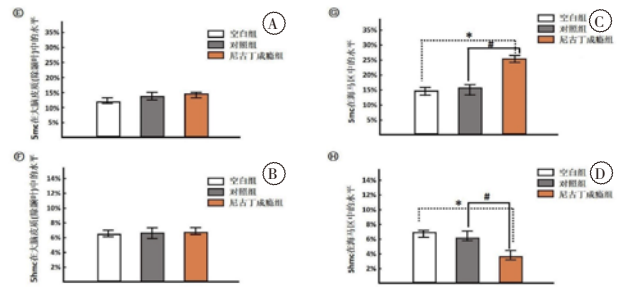
1. 各组大鼠脑组织 Tet1 蛋白表达水平及 5hmC 与 5mC 水平检测 (图 1-2)



①-②: 大鼠大脑皮质 (除颞叶) 中 Tet1 蛋白的表达水平;
③-④: 大鼠海马区域中 Tet1 蛋白的表达水平; 尼古丁组与空白组比较 ^a*P* < 0.05, 尼古丁组与对照组比较 ^b*P* < 0.05

图 1 Tet1 蛋白在脑组织中的表达水平情况比较

通过 Western-blot 对各组大鼠大脑皮质 (除颞叶外) 及海马区域 Tet1 蛋白表达水平进行测定发现大鼠大脑皮质区域内 Tet1 蛋白表达水平无明显变化 *P* > 0.05, 而大鼠海马区域内尼古丁成瘾组大鼠 Tet1 蛋白表达水平较对照组及空白组大鼠 Tet1 蛋白表达水平明显下降 *P* < 0.05。

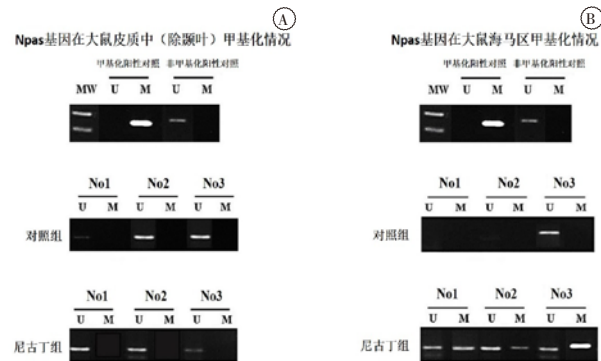


A: 大鼠大脑皮质中 (除颞叶) 5mC 及 5hmC 水平测定;
B: 大鼠海马区域中 5mC 及 5hmC 水平测定; 尼古丁组与空白组比较 ^a*P* < 0.05, 尼古丁组与对照组比较 ^b*P* < 0.05.

图 2 各组大鼠脑组织 5mC 及 5hmC 水平测定

进一步通过选择性化学标记 SMRT 测序对各组大鼠脑组织中 5hmC 与 5mC 水平进行测定结果发现, 在皮质区域内 (除颞叶) 5hmC 与 5mC 水平变化无统计学意义 *P* > 0.05, 而在海马区域内尼古丁成瘾组大鼠较对照组大鼠 5mC 水平升高而 5hmC 水平下降 *P* < 0.05。

2. 大鼠脑组织中 Npas4 基因甲基化情况检测 (图 3)



注: ①: 甲基化; ②: 非甲基化

图 3 各组大鼠脑组织中 Npas4 基因甲基化 (MSP) 情况检测

实验 20d 处死大鼠并获取大鼠脑组织, 通过 MSP 法对 Npas4 基因甲基化情况进行检查发现, 结果发现大鼠大脑皮质 (除颞叶) Npas4 基因在尼古丁成瘾组和对照组中均未发生甲基化情况, 而在海马区域尼古丁成瘾组大鼠较对照组大鼠 Npas4 基因明显出现高甲基化情况。

3. Npas4 基因蛋白表达及 mRNA 表达情况检测 (图 4)

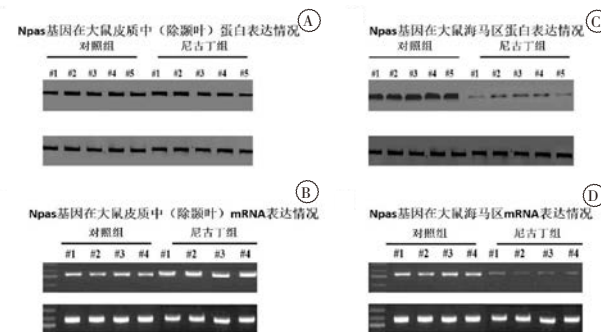


图 4 各组大鼠脑组织 Npas4 基因蛋白表达水平和 mRNA 水平检测结果

通过 qPCR 及 RT-PCR 对大鼠脑组织中 Npas4 基因蛋白表达水平和 mRNA 水平进行检查发现, 在大鼠皮质区域中 (除颞叶) Npas4 基因蛋白表达水平和 mRNA 水平与对照组比较无明显变化^{(A)-(B)}, 而在海马区中尼古丁成瘾组大鼠 Npas4 基因蛋白表达水平和 mRNA 水平与对照组比较均出现了表达水平下降情况^{(C)-(D)}。

4. 各组大鼠脑内神经递质含量测定 (表 3~4)

表 3 各组大鼠大脑皮质 (除颞叶) 神经递质含量比较 ($\bar{x} \pm s$) ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)

组别	项目	空白组	对照组	尼古丁组	P 值
		n=20	n=20	n=20	
10d (n=10)	多巴胺	1238.17 ± 161.14	1310.28 ± 153.27	1398.51 ± 160.23	0.171
	乙酰胆碱	2101.14 ± 243.56	2098.56 ± 197.69	2057.89 ± 178.54	0.243
	内啡肽	50.45 ± 6.47	45.69 ± 7.85	52.31 ± 3.58	0.251
	五-羟色胺	844.63 ± 102.98	829.34 ± 101.71	902.15 ± 90.31	0.352
20d (n=10)	多巴胺	1287.71 ± 159.83	1295.21 ± 140.39	1401.67 ± 160.56	0.258
	乙酰胆碱	2221.31 ± 213.46	2147.51 ± 206.46	2469.27 ± 223.74	0.351
	内啡肽	48.57 ± 5.82	47.54 ± 5.87	52.89 ± 4.23	0.195
	五羟色胺	812.14 ± 96.26	860.54 ± 91.33	921.49 ± 94.03	0.187

表 4 各组大鼠海马区神经递质含量比较 ($\bar{x} \pm s$) ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)

组别	项目	空白组	对照组	尼古丁组	P 值
		n=20	n=20	n=20	
10d (n=10)	多巴胺	1238.17 ± 165.43	1301.42 ± 134.17	2415.59 ± 217.45	0.035
	乙酰胆碱	2214.01 ± 235.71	2187.25 ± 209.58	3723.51 ± 310.17	0.019
	内啡肽	49.26 ± 5.16	48.15 ± 6.59	70.14 ± 7.01	0.016
	五-羟色胺	832.17 ± 99.21	856.47 ± 95.12	1201.15 ± 102.38	0.031
20d (n=10)	多巴胺	1301.47 ± 102.53	1288.23 ± 142.12	4821.12 ± 312.47	0.024
	乙酰胆碱	2198.42 ± 198.57	2354.47 ± 186.24	6124.17 ± 510.51	0.020
	内啡肽	50.93 ± 4.14	46.35 ± 5.19	120.15 ± 10.16	0.023
	五羟色胺	859.65 ± 94.21	901.24 ± 89.26	1863.22 ± 216.79	0.013

实验第 10 天、第 20 天通过荧光分光光度法分别对各组大鼠脑组织内神经递质包括多巴胺、乙酰胆碱、内啡肽及五-羟色胺含量进行测定, 结果发现各组大鼠大脑皮质区域内 (除颞叶) 神经递质含量无明显统计学差别 $P>0.05$, 但在海马区域内神经递质含量尼古丁成瘾组大鼠明显高于对照组大鼠 $P<0.05$ 。

讨论

尼古丁被认为是导致烟草依赖的最主要成分之一, 常通过改变生物自身神经生物学基础能力和细胞可塑性, 从而产生强烈而持久的影响而成瘾^[9]。尽管目前已针对因尼古丁成瘾采取了多种干预措施,

如药物、运动等措施^[10-11], 但依然难以完全戒断, 其原因是对尼古丁成瘾的具体机制尚未阐明, 现有研究证实大脑海马内记忆相关脑区的强烈活化与尼古丁成瘾有关^[12]。因此深入对尼古丁成瘾的分子机制研究, 对有效控制烟草危害有着重要意义。

Tet1 蛋白存在于所有脊椎动物中, 通过调节 5mC 转化为 5hmC 从而参与生物体内的甲基化过程, 在多种生物学过程中发挥作用, 包括基因表达的表观遗传调控, 胚胎发生, 干细胞功能和药物成瘾等^[13]。其上游基因 Npas4 基因是大脑特有活动依赖性转录因子, 调节记忆形成和恢复的重要基因^[14]。已有研究表明在 Tet1-/- 小鼠中 Npas4 转录被抑制而表达下降^[15], 因此我们推测 Tet1 可以通过介导 Npas4 甲基

化状态参与药物成瘾过程,有进一步深入研究的价值。

作者通过构建大鼠慢性尼古丁成瘾动物模型对大鼠脑组织中的 Tet1 蛋白表达情况进行了检测,发现在尼古丁成瘾大鼠大脑海马区 Tet1 蛋白表达水平明显下降,同时对 5hmC 与 5mC 水平检测发现,尼古丁成瘾大鼠海马区 5mC 水平升高而 5hmC 水平下降。由于 Tet1 可以通过介导 Npas4 甲基化状态,因此进一步对尼古丁成瘾大鼠大脑组织中 Npas4 基因甲基化水平、蛋白及 mRNA 表达水平进行了检测,结果发现在成瘾大鼠海马区域中 Npas4 基因明显出现了高甲基化情况同时 Npas4 蛋白及 mRNA 表达水平下降,证实 Tet1 参与了尼古丁成瘾形成过程且影响 Npas4 基因甲基化状态。最后对尼古丁成瘾大鼠脑组织中神经递质进行了检测,结果发现在海马区域中多巴胺、乙酰胆碱、阿啡肽及五羟色胺等神经递质均出现了水平升高,推测可能机制为 Npas4 基因调控下游基因进而影响成瘾神经递质水平从而参与成瘾过程,但具体机制有待进一步研究证实。

综上所述,在慢性尼古丁成瘾大鼠成瘾过程中, Tet1 蛋白表达下降影响 5hmC 与 5mC 水平,介导 Npas4 基因高甲基化状态而影响 Npas4 蛋白表达及 mRNA 表达,进而影响成瘾神经递质水平参与尼古丁成瘾过程。深入研究 Tet1 及 Npas4 表观遗传有助于阐明尼古丁成瘾的具体机制,为有效降低烟草复吸提供帮助。

参 考 文 献

- [1] Vannimenu C, Bricout H, Le Rouzic O, et al. Compared characteristics of current vs. past smokers at the time of diagnosis of a first-time lung or head and neck cancer: a cross-sectional study[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1):372.
- [2] Kotz D, Viechtbauer W, Simpson C, et al. Cardiovascular and neuropsychiatric risks of varenicline: a retrospective cohort study[J]. Lancet Respir Med, 2015, 3(10):761-768.
- [3] Xu H, Wang F, Kranzler HR, et al. Alcohol and nicotine codependence-associated DNA methylation changes in promoter regions of addiction-related genes[J]. Sci Rep, 2017, 7:41816.
- [4] Brown AN, Feng J. Drug Addiction and DNA Modifications[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 978:105-125.
- [5] Lu F, Liu Y, Jiang L, et al. Role of Tet proteins in enhancer activity and telomere elongation[J]. Genes Dev, 2014, 28(19):2103-2119.
- [6] 刘玉莹, 张芳林. TET1 蛋白去甲基化作用及其对肿瘤影响的研究进展[J]. 南昌大学学报(医学版), 2018, 58(04):95-98+102.
- [7] Weng FJ, Garcia RI, Lutz S, et al. Npas4 is a critical regulator of learning-induced plasticity at mossy fiber-CA3 synapses during contextual memory formation[J]. Neuron, 2018, 97(5):1137-1152.
- [8] Heroux NA, Osborne BF, Miller LA, et al. Differential expression of the immediate early genes c-Fos, Arc, Egr-1, and Npas4 during long-term memory formation in the context preexposure facilitation effect (CPFE) [J]. Neurobiol Learn Mem, 2018, 147:128-138.
- [9] Gorwood P, Le Strat Y, Ramoz N. Genetics of addictive behavior: the example of nicotine dependence [J]. Dialogues Clin Neurosci, 2017, 19(3):237-245.
- [10] Brynildsen JK, Lee BG, Perron IJ, et al. Activation of AMPK by metformin improves withdrawal signs precipitated by nicotine withdrawal [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(16):4282-4287.
- [11] 周跃辉, 周成林. 运动对尼古丁戒断大鼠学习与记忆能力的影响及机制[J]. 中国运动医学杂志, 2018, 37(3):224-232.
- [12] Kutlu MG, Connor DA, Tumolo JM, et al. Nicotine modulates contextual fear extinction through changes in ventral hippocampal GABAergic function [J]. Neuropharmacology, 2018, 141:192-200.
- [13] Li D, Guo B, Wu H, et al. TET family of dioxygenases: crucial roles and underlying mechanisms[J]. Cytogenet Genome Res, 2015, 146(3):171-180.
- [14] Wang Q, Wang Q, Song XL, et al. Fear extinction requires ASIC1a-dependent regulation of hippocampal-prefrontal correlates[J]. Sci Adv, 2018, 4(10):eaau3075.
- [15] Rudenko A, Dawlaty MM, Seo J, et al. Tet1 is critical for neuronal activity-regulated gene expression and memory extinction[J]. Neuron, 2013, 79(6):1109-1122.