

Uhrf1 对肠上皮发育的影响

王芯悦^{1,3}, 李亮^{2,3}, 段秋慧², 李大力², 陈金联³

1. 安徽理工大学医学院, 淮南 232000

2. 华东师范大学生命科学院, 上海市调控生物学重点实验室, 上海 200241

3. 上海交通大学附属第六人民医院南院消化内科, 上海 201499

摘要: 作为一种常见的表观遗传修饰类型, DNA 甲基化对哺乳动物发育起着重要作用。Uhrf1 作为重要的表观遗传调控因子, 在 DNA 合成过程中可结合半甲基化的 DNA 同时招募 DNA 甲基转移酶 1 参与 DNA 甲基化的维持, 保证遗传信息在细胞分裂前后的稳定传递。目前关于 Uhrf1 介导的 DNA 甲基化是否影响肠上皮发育过程尚不清楚。为探索 Uhrf1 在肠上皮发育中的作用, 本研究成功构建了肠上皮特异性敲除 *Uhrf1* 的小鼠模型, 利用 HE 染色对肠上皮组织形态学观察发现, 与正常小鼠相比, 敲除 *Uhrf1* 的小鼠肠上皮发育异常, 主要表现为绒毛变短, 数量减少, 隐窝萎缩; 通过表型分析发现, 在小鼠肠上皮中特异性敲除 *Uhrf1* 后, 细胞增殖明显受到抑制、凋亡细胞增加、细胞分化异常, 同时肠干细胞相关基因表达降低。进一步对可能的分子机制进行初步探索发现 Uhrf1 缺失后 DNA 甲基化水平大幅下降, 诱发 DNA 损伤。本研究结果表明 Uhrf1 介导的 DNA 甲基化对肠上皮的正常发育成熟具有重要作用, 有望丰富 Uhrf1 介导的 DNA 甲基化在体内的生物学功能, 并为进一步明确 Uhrf1 介导的表观遗传调控机制提供实验依据。

关键词: DNA 甲基化; Uhrf1; 肠上皮发育

Effect of Uhrf1 on intestinal development

Xinyue Wang^{1,3}, Liang Li^{2,3}, Qihui Duan², Dali Li², Jinlian Chen³

1. School of Medicine, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232000, China

2. School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai Key Laboratory of Regulatory Biology, Shanghai 200241, China

3. Department of Gastroenterology, South Campus of Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201499, China

Abstract: As a best-characterized epigenetic modification, DNA methylation plays an important role in mammalian development. Uhrf1 is a critical epigenetic regulator that can bind to hemimethylated DNA and recruit DNA methyltransferase 1 to maintain DNA methylation. So far, the role of Uhrf1-mediated DNA methylation in intestinal development is still unknown. In order to investigate the impact of Uhrf1 deletion in intestinal development, we have successfully constructed the epithelial-specific *Uhrf1* knockout mouse model. After Uhrf1 ablation, we found the mutant

收稿日期: 2020-11-26; 修回日期: 2020-12-22

基金项目: 上海市自然科学基金项目(编号: 16ZR1429100)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of Shanghai(No. 16ZR1429100)]

作者简介: 王芯悦, 在读硕士研究生, 专业方向: 消化内科学。E-mail: 1294008801@qq.com

通讯作者: 李大力, 博士, 研究员, 研究方向: 基因编辑。E-mail: dlli@bio.ecnu.edu.cn

陈金联, 博士, 主任医师, 研究方向: 消化道肿瘤与肝病。E-mail: wqj_021002@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.20-337

网络出版时间: 2021/1/8 14:13:16

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20210107.1324.006.html>

mice exhibited abnormal epithelial structure with less and shorter villi and shrunk crypts compared with wild type mice via hematoxylin-eosin staining. Further analysis showed that Uhrf1 deletion in the intestinal epithelium significantly decreased the cell proliferation and induced cell apoptosis. In addition, Uhrf1 deletion inhibited the normal epithelial differentiation and the expression of intestinal stem cell marker genes. Preliminary mechanism study revealed that loss of Uhrf1 caused global DNA hypomethylation which induced DNA damage in crypt cells. Taken together, our data suggested that DNA methylation mediated by Uhrf1 is vital for the normal intestinal development. Our results enriched the *in vivo* role of Uhrf1 and laid the foundation for further epigenetic regulatory mechanism exploration.

Keywords: DNA methylation; Uhrf1; intestinal development

DNA 甲基化作为一种动态的和可逆的表观遗传修饰,是由甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)介导的对胞嘧啶的第 5 位碳原子进行甲基修饰,形成 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC),主要发生在 CpG 二核苷酸位点上^[1]。DNA 甲基化在个体发育、基因表达调控及基因组稳定性等多种生物学过程中发挥重要作用^[2~5]。

肠上皮作为人体更新较快的组织,上皮细胞的正常增殖与分化无论是在空间还是时间上都受到严格调控,增殖与分化间的失衡将会破坏上皮的完整性及其屏障功能,甚至引发肿瘤的形成。肠上皮细胞这种快速的更新速率与不同类型细胞自身的表观遗传状态密切相关,目前关于 DNA 甲基化如何调控肠上皮的早期发育和稳态建立仍不是很清楚。

UHRF1 (ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 1)是泛素样含植物同源化结构域(plant homeodomain domain, PHD)和环指域蛋白家族的主要成员之一,对 DNA 甲基化的维持至关重要^[6]。UHRF1 作为一种多结构域蛋白,SRA 结构域(set and ring associated domain)可以识别半甲基化的 DNA,并招募 DNMT1 到复制叉处,保证在细胞复制时遗传信息由亲代向子代的稳定传递^[7]; PHD 及 Tudor 结构域与甲基化组蛋白 H3K9 特异性地结合,参与异染色质的形成和维持,同时有利于 DNMT1 的正确定位,将组蛋白修饰与 DNA 甲基化紧密联系起来^[8,9]。此外 UHRF1 的 RING(really interesting new gene)结构域被证明是一种泛素连接酶,可以催化组蛋白 H3K23 等位点发生泛素化修饰,并被 DNMT1 所识别,促进 DNMT1 招募进而参与 DNA 甲基化的维持^[10,11]。除了参与 DNA 甲基化外, UHRF1 还与细胞周期调控及 DNA 损伤修复等诸多生物学过程

相关^[12,13]。随着 UHRF1 生物化学功能的不断阐明,关于由 UHRF1 介导的 DNA 甲基化在体内的生物学功能也得到研究学者的广泛关注。研究发现 Uhrf1 决定卵母细胞质量,影响卵母细胞成熟,对胚胎着床前的发育至关重要^[14];在斑马鱼(*Danio rerio*)中, Uhrf1 的突变导致整体 DNA 甲基化水平降低,肝脏体积缩小,组织发育不全^[15];在对胸腺细胞的研究中表明,敲除 *Uhrf1* 造成胸腺细胞数量明显降低, Uhrf1 介导的表观遗传调控对胸腺细胞的正常发育必不可少^[16];而在大脑皮层的研究中却发现 Uhrf1 的缺失对早期发育作用较小,不影响细胞的增殖^[17]。为探讨 Uhrf1 及其介导的 DNA 甲基化在肠上皮发育中的作用,本研究构建了在肠上皮中特异性敲除 *Uhrf1* 的小鼠模型,并对表型及可能的分子机制进行分析,初步揭示了 Uhrf1 介导的 DNA 甲基化在肠组织系统中的功能。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用的小鼠遗传背景均 C57BL/6J 品系,饲养于华东师范大学实验动物中心 SPF 级清洁实验动物房。动物实验的设计与操作均符合华东师范大学动物伦理委员会相关规定并被授权,严格遵守实验动物 3R 原则。

1.2 实验试剂

苏木精和伊红染液购自南京建成生物工程研究所;免疫组化二抗试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自德国 VECTOR 公司;免疫组化及苏木精-伊红染色相

关的无水酒精、二甲苯、甲醇等购自上海国药集团; EB 染液、dNTP 混合物、ExTaq DNA 聚合酶和 6×DNA loading buffer 等购自北京天根生化科技有限公司; RNA 反转录试剂盒和 Trizol 等购自日本 TaKaRa 公司; SYBR green 购自上海翊圣生物科技有限公司; DNA marker 购自美国 Thermo Fisher 公司; Ki67 抗体(RM9106, 美国 Thermo Fisher 公司); Cleaved Caspase3 抗体 (9664#, 美国 Cell Signaling Technology 公司); Muc2 (Mucin 2)抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); Dcl1(Doublecortin-like kinase 1)抗体(ab31704, 英国 Abcam), ChgA (Chromogranin A)抗体(ab15160, 英国 Abcam); Uhrf1 抗体(61341, 美国 Active Motif 公司); 5mC 抗体(39769, 美国 Active Motif 公司); γ H2AX (phosphorylation of histone H2AX)抗体(05636#, 美国 Millipore 公司)。

1.3 *Uhrf1* 条件性敲除小鼠的构建

通过基因打靶技术, 在 *Uhrf1* 基因的第 3 号外显子和第 4 号外显子之间的内含子区域插入可以表达 β -半乳糖苷酶(LacZ)和 neo 抗性蛋白以及 polyA, 同时两端还有 2 个同向的 FRT (short flippase recognition target)序列, 另外在第 4 号外显子两侧插入了同向的 loxp 序列。通过移植该 ES 细胞到假孕小鼠的子宫, 获得可以条件性敲除 *Uhrf1* 的小鼠。取 *Uhrf1*-LacZ 小鼠与 Flp 工具鼠交配, Flp(flippase)重组酶发挥作用, 切除 FRT 之间序列, 得到仅在第 4 号外显子两侧插入同向的 loxp 序列的小鼠, 使用此小鼠与在肠上皮中特异性表达重组酶 Cre 的 *Villin-Cre* 工具鼠杂交, 切割 *Uhrf1* 的第 4 号外显子, 导致 Uhrf1 蛋白的翻译出现移码, 从而敲除 *Uhrf1* 基因。

1.4 聚合酶式反应(polymerase chain reaction, PCR)

剪取小鼠脚趾并标记放入 1.5 mL 无菌 EP 管中, 按 1:500 比例加入蛋白酶 K 与消化液, 置于 55 度水浴锅中消化过夜, 次日 100 度煮沸 5 分钟后离心, 进行 PCR 扩增。引物由上海铂尚生物技术有限公司合成, 序列 Uhrf1(F): 5'-ACTCTTGATCTGTGCC-CTGC-3'和 Uhrf1(R): 5'-ATCCCAGGCCTCCATAC-ACT-3'。扩增体系(总体积为 20 μ L): 2 μ L 10×buffer, 2 μ L dNTP 混合物, 2 μ L 引物, 3 μ L 模板, 0.2 μ L Easy

Taq 酶, 11 μ L ddH₂O。反应条件: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 40 s; 循环 35 次。扩增后进行凝胶电泳, 凝胶自动成像仪记录电泳图像, 比对条带大小, 确定小鼠基因型。

1.5 肠组织切片及苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)

采用颈椎脱臼法将小鼠处死后, 分离小鼠肠组织, 制成“瑞士卷”, 用 4%多聚甲醛固定过夜, 包埋后将蜡块放入-20℃冰箱中保存, 包埋好的组织制成 5 μ m 切片, 62℃烤片 2 h, 待干燥后进行脱蜡复水, 具体过程为二甲苯 I: 7 min→二甲苯 II: 7 min→二甲苯: 乙醇(1:1): 7 min→100%乙醇: 4 min→95%乙醇: 4 min→85%乙醇: 4 min→75%乙醇: 4 min→纯水: 3 min→苏木精: 5 min(具体视苏木精浓度而定)→1%盐酸酒精分色: 10~30 s→蒸馏水中返蓝: 15 min→伊红染色: 30 s~1min→脱水及中性树脂封片→显微镜下拍照。

1.6 免疫组织化学染色

组织切片脱蜡复水同 HE 染色→3%的过氧化氢避光处理 13 min→抗原修复液置于 100℃处理 20 min→PBST 润洗 3 次, 每次 5 min→封闭液室温封闭 30 min 以上→滴加一抗于 4℃孵育过夜→回收一抗, PBST 润洗 3 次→滴加 HRP 室温避光反应 30 min→PBST 润洗 3 次→显色 3~5 min, 深度适宜后蒸馏水中终止显色反应→苏木精复染→盐酸酒精分色→自来水中返蓝 15 min→脱水封片同 HE 染色。

1.7 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)分析

小鼠脱颈椎处死后取出肠组织液氮研磨后加入 1 mL Trizol, 按 RNA 抽提试剂盒说明书提取总 RNA, 利用反转录试剂盒合成 cDNA。qRT-PCR 扩增体系为 25 μ L, 包括: 12.5 μ L (2×) SYBR Premix ExTaq, 2 μ L 引物, 1 μ L cDNA, 9.5 μ L RNase Free H₂O。扩增条件: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 40 个循环, 每个样进行 3 次重复。根据每个样品与内参基因 β -actin 所得的 Ct 值, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式分析目的基因相对表达量。基因的扩增引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 The primer sequences of qRT-PCR

基因	引物序列(5'→3')
<i>Lgr5</i>	F: CAGTGTGTGCATTTGGGGG R: CAAGGTCCCCTCATCTTGA
<i>Sox9</i>	F: CACAAGAAAGACCACCCGA R: GGACCCTGAGATTGCCAGA
<i>Ascl2</i>	F: CGTGAAGCTGGTGAATTGG R: GGATGTACTCCACGGCTGAG
<i>Olfm4</i>	F: TCTTGGGCAGAAGGTGGGACT R: GGACCGTCAGGTTCAAGAGC
<i>Uhrf1</i>	F: ACGGTGCCTACTCATTGGTC R: GCTTCTGGTCAGAGGACTGG
β -actin	F: CAGCCTTCCTTCTTGGGTAT R: TGATCTTGATCTTCATGGTGC

1.8 统计方法

用 Graphpad Prism 6 软件进行统计学分析, 各组之间的比较用平均数±标准差表示, $P<0.05$ 被认为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 *Uhrf1* 基因条件性敲除小鼠的构建与鉴定

Uhrf1^{fl/fl} 小鼠是以 *Uhrf1* 基因的第 4 号外显子为靶基因, 在其两端插入 loxp 位点, 与表达 Cre 酶的

Villin-Cre 工具鼠交配后获得 *VillinCre-Uhrf1^{fl/fl}* 小鼠, 从而切除相同方向的两个 loxp 位点间第 4 号外显子序列, 导致 UHRF1 蛋白翻译时出现移码, 从而实现 *Uhrf1* 靶基因的敲除(图 1A)。设计引物针对 loxp 序列进行 PCR, 对子代进行基因型鉴定。如图 1B 所示, 仅扩增出 305 bp 条带者为 *Uhrf1^{fl/fl}*, 扩增出 305 bp 和 106 bp 两条带的为 *Uhrf1^{fl/+}*, 仅扩增出 106 bp 条带者为 *Uhrf1^{+/+}*。通过对子代小鼠进行基因型的鉴定, 观察发现 *VillinCre-Uhrf1^{fl/fl}* 小鼠可以正常出生, 但是出生率低于理论预期, 部分小鼠在断奶前后出现显著死亡情况, 很难发育到成年阶段, 因此后续实验选取出生后 3 周小鼠作为实验研究对象。

2.2 *Uhrf1* 基因条件性敲除小鼠的敲除效果

为了探索 *Uhrf1* 在肠发育及稳态建立中的作用, 首先采用免疫组织化学染色法对 *Uhrf1* 表达量及位置进行检测, 如图 2A(左)染色结果显示, 着色区域阳性细胞仅定位于肠隐窝部位, 肠的其他部位未见有表达, 说明 *Uhrf1* 主要存在于肠隐窝增殖性细胞中, 即主要包含小肠干细胞及快速增殖的祖细胞。进一步采用 Cre-loxp 重组技术构建肠上皮中特异性敲除 *Uhrf1* 的突变小鼠, 并采用免疫组织化学染色和 qRT-PCR 方法检测 *Uhrf1* 在肠组织中的表达情况, 免疫组织化学技术结果显示在条件性敲除 *Uhrf1* 小鼠的肠隐窝底部区域并未检测到 *Uhrf1* 的表达(图 2A, 右); 由图 2B 结果可见, *Uhrf1* 基因敲除小

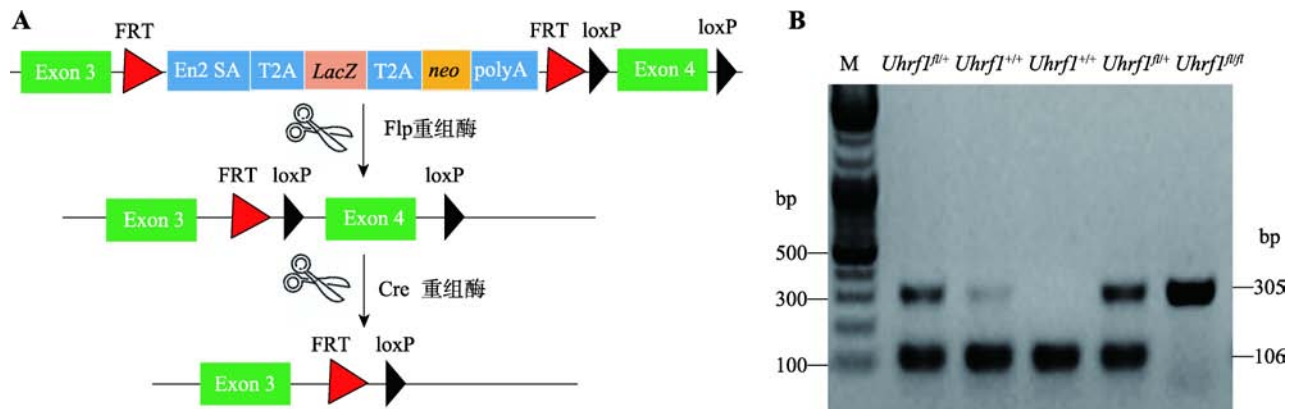


图 1 *Uhrf1* 基因条件性敲除小鼠的构建与鉴定

Fig. 1 The construction and identification of epithelial-specific *Uhrf1* knockout mouse

A: *Uhrf1* 基因条件性敲除小鼠构建示意图。B: PCR 鉴定 *Uhrf1* 基因敲除结果。M: DNA marker。

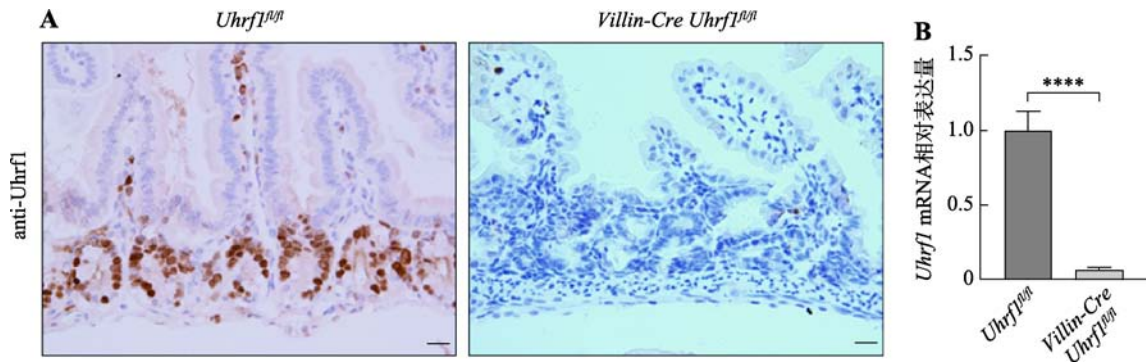


图 2 *Uhrf1* 在肠组织中的表达情况

Fig. 2 The expression of *Uhrf1* in intestinal tissue

A: 野生型和突变型小鼠肠组织中 *Uhrf1* 抗体免疫组织化学染色。标尺: 20 μ m。B: 野生型与突变型小鼠肠组织中 *Uhrf1* mRNA 表达量对比。****: $P < 0.0001$ 。

鼠肠组织中 *Uhrf1* mRNA 表达水平低于对照组小鼠。结果表明 Cre 重组酶可以发挥正常功能, 导致 *Uhrf1* 基因敲除, 证实 *Uhrf1* 基因条件性敲除小鼠构建成功。

2.3 敲除 *Uhrf1* 造成肠上皮组织形态异常

为探究 *Uhrf1* 对肠上皮组织形态学的影响, 选

取出生后 3 周的野生型与敲除 *Uhrf1* 小鼠, 脱颈椎处死后取小肠组织制作石蜡切片, 通过 HE 染色进行组织形态学分析发现, 与对照组小鼠相比(图 3A), *Uhrf1* 的缺失导致肠绒毛长度明显变短, 隐窝发生萎缩, 同时两者数量减少, 表明敲除 *Uhrf1* 后肠上皮发育过程受阻(图 3B), 肠上皮组织形态的建立依赖于 *Uhrf1*。

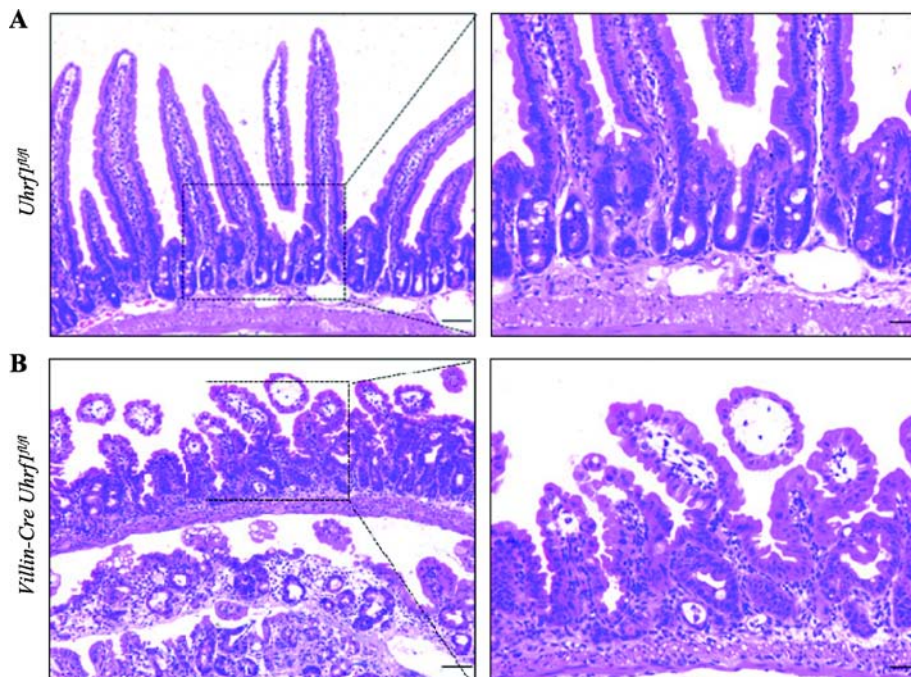


图 3 野生型及突变型小鼠肠组织 HE 染色

Fig. 3 HE staining of intestinal tissue from wild type and *Uhrf1* mutant mice A: 野生型小鼠肠组织切片观察。B: 突变型小鼠肠组织切片观察。右图均是左图虚线区域的放大示意图。标尺左: 50 μ m, 标尺右: 20 μ m。

2.4 Uhrf1 的缺失影响肠上皮细胞的增殖与分化能力, 诱导细胞凋亡

隐窝作为肠上皮的功能单位, 负责维持细胞增殖与分化的平衡。Uhrf1 特异性表达隐窝底部区域, 暗示其可能影响上皮细胞的增殖和分化。因此选取 3 周龄 *VillinCre-Uhrf1^{fl/fl}* 小鼠, 同时选取同窝 *Uhrf1^{fl/fl}* 小鼠作为对照, 采用免疫组织化学染色方法检测

肠上皮细胞的增殖、凋亡和分化情况, 并进一步对凋亡细胞及各类分化细胞数量进行检测, 在 20 倍显微镜视野下拍照, 随机选取 3 个形态相似视野, 统计每个视野阳性细胞数。结果显示: 与对照组小鼠相比, 胚胎期敲除 *Uhrf1* 导致增殖标记蛋白 Ki67 阳性细胞数量显著减少(图 4A), 说明肠上皮细胞的正常增殖受到明显抑制。而凋亡相关蛋白 Caspase3 阳性细胞数量明显增加, 并且主要集中在隐窝底部区

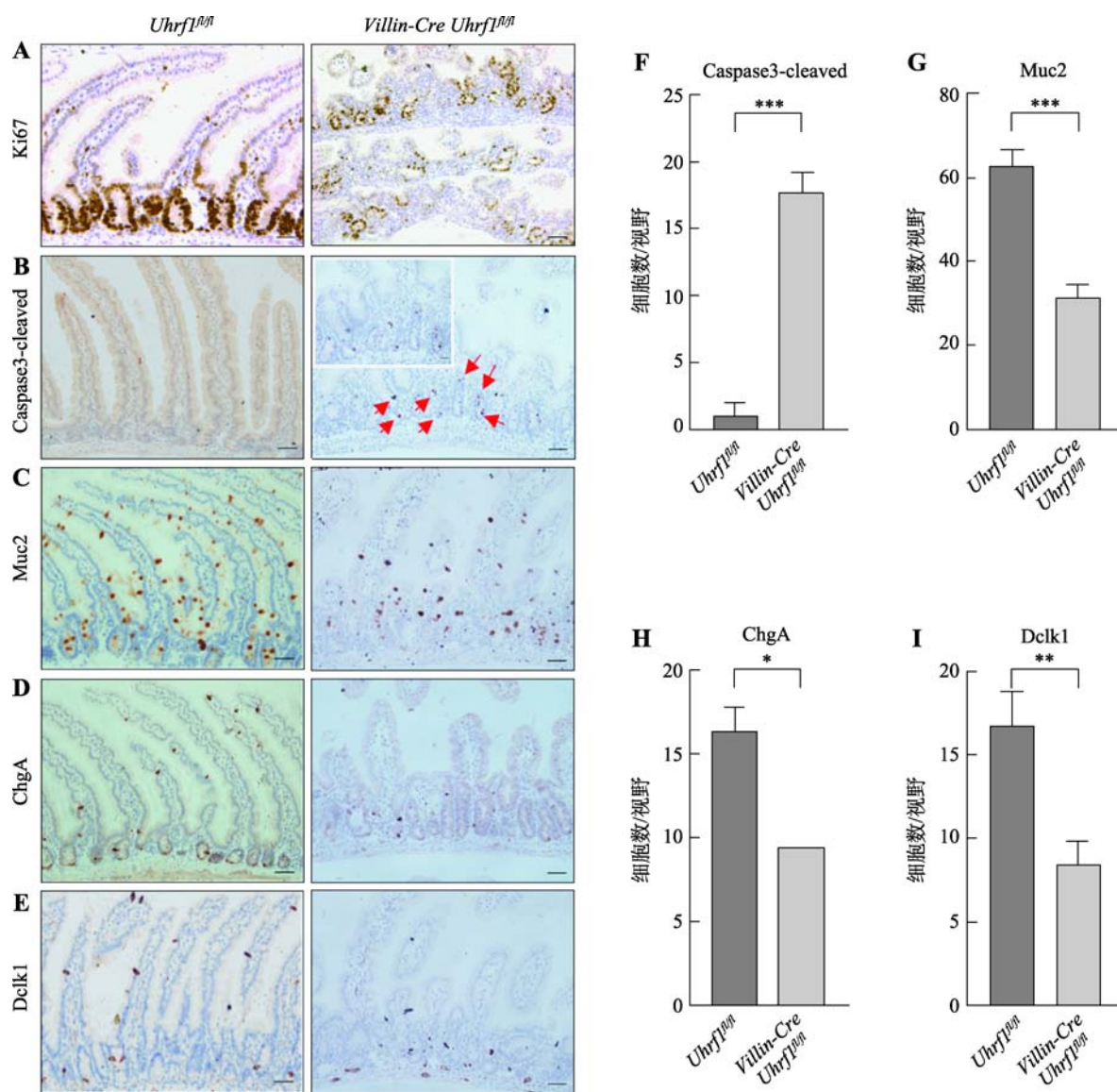


图 4 *Uhrf1^{fl/fl}* 和 *VillinCre-Uhrf1^{fl/fl}* 小鼠肠组织中的表型分析

Fig. 4 The phenotypic analysis of wild type and *Uhrf1* mutant intestine

A: 肠组织增殖标记蛋白 Ki67 免疫染色。B: 肠组织凋亡标志蛋白 Caspase3-cleaved 免疫染色。红色箭头指示凋亡阳性细胞, 左上角为红色箭头区域放大图。C: 杯状细胞标记蛋白 Muc2 免疫染色。D: 内分泌细胞标记蛋白 ChgA 免疫染色。E: Tuft 细胞标记蛋白 Dclk1 免疫染色。标尺: 50 μ m F-I: 野生型与突变型小鼠 Caspase3-cleaved、Muc2、ChgA、Dclk1 阳性细胞统计结果。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$ 。

域(图 4, B 和 F), 表明 *Uhrf1* 的缺失不仅影响了细胞增殖, 而且促使肠上皮细胞发生凋亡。敲除 *Uhrf1* 后肠上皮细胞增殖受到抑制以及凋亡增加暗示分化过程可能也受到影响, 因此为进一步了解 *Uhrf1* 对肠上皮分化细胞的影响, 对杯状细胞-*Muc2*、内分泌细胞-*ChgA*、Tuft 细胞-*Dclk1* 标记阳性细胞数目进行检测, 结果发现 *VillinCre-Uhrf1^{fl/fl}* 小鼠肠组织 *Muc2* (图 4, C 和 G)、*ChgA* (图 4, D 和 H) 和 *Dclk1* (图 4, E 和 I) 阳性细胞数减少, 表达下降, 说明敲除 *Uhrf1* 明显影响了肠上皮细胞的正常分化过程。因此, 这些研究结果表明 *Uhrf1* 是调节肠上皮细胞增殖与分化的关键因子。

2.5 敲除 *Uhrf1* 肠干细胞标志基因的表达降低

Lgr5⁺ 肠干细胞作为一种快速增殖的细胞, 对肠组织生理功能及稳态的维持起着重要的作用, 因此为了解 *Uhrf1* 基因敲除鼠中 *Lgr5⁺* 干细胞有没有受到影响, 本研究进一步在分子水平上对 *Lgr5⁺* 干细胞相关的基因: *Lgr5*、*Olfm4*、*Ascl2* 和 *Sox9* 表达情况进行检测, 结果发现, 与对照组小鼠相比, *Uhrf1* 在肠组织中特异性敲除后, 造成肠干细胞相关标志基因的表达降低(图 5), 表明 *Uhrf1* 可能对肠干细胞数量具有一定的影响。

2.6 敲除 *Uhrf1* 导致 DNA 甲基化水平下降, 诱导 DNA 损伤

如前所述, *UHRF1* 作为表观遗传调控因子, 在 DNA 甲基化维持中起着关键作用。为确定 *Uhrf1* 的

缺失是否会导致肠上皮基因组甲基化的丢失, 采用免疫组织化学染色方法对 5mC 表达水平进行检测发现, 与对照组小鼠相比, 条件性敲除小鼠的肠组织中 5mC 水平明显降低, 表明敲除 *Uhrf1* 会造成肠上皮组织甲基化水平显著下降(图 5A)。研究发现 DNA 甲基化水平降低会引起 DNA 损伤应答反应, 因此对 DNA 损伤标志物 γ H2AX 进行免疫组织化学染色, 发现敲除 *Uhrf1* 后在肠隐窝部位可以看到明显的 DNA 损伤(图 5B), 说明 *Uhrf1* 的缺失导致肠上皮组织 DNA 损伤增加。

3 讨论

DNA 甲基化作为最稳定的表观遗传修饰, 对体内多个自我更新组织中基因的表达调控至关重要, DNA 甲基化的异常将造成基因表达的改变, 从而导致疾病的发生^[18,19]。多项研究证明 *Uhrf1* 可招募 *Dnmt1*, 在增殖性细胞中维持 DNA 甲基化信息在细胞分裂前后的稳定传递, 缺失 *Uhrf1* 将会导致细胞内的 DNA 甲基化水平大幅下降^[20]。本研究发现 *Uhrf1* 主要表达在肠隐窝底部区域主要是肠干细胞和快速增殖的祖细胞, 而在绒毛等其他部位未见有表达, 进一步证明 *Uhrf1* 在增殖性细胞中表达丰富, 这与之前报道的 *Uhrf1* 在其他组织系统中的表达相一致^[21]。

研究表明 *Uhrf1* 可以影响不同组织细胞的增殖和分化并与凋亡过程相关。在对结肠调节性 T 细胞的研究中发现 *Uhrf1* 缺陷的小鼠表现为细胞增殖和正常发育成熟过程受阻, 免疫功能降低, 并自发形成结肠炎^[22]。在斑马鱼肝脏中, 敲减 *Uhrf1* 可显著抑制肝细胞增殖, 造成凋亡增加^[23]。在四肢间充质细胞中敲除 *Uhrf1* 后, 由于破坏了软骨细胞增殖及分化过程, 造成小鼠肢体明显缩短^[24]。同样, 本研究结果发现 *Uhrf1* 的缺失抑制了肠上皮细胞的增殖与分化, 诱导细胞凋亡, 导致肠上皮发育异常, 并造成肠干细胞相关标记基因表达水平的降低。已有研究证明 DNA 甲基化水平的降低将会导致基因组不稳定, 突变率增加, 从而引起 DNA 损伤反应^[25-27]。Amy 等^[28]在结肠癌细胞系 HCT116 中敲减 *Uhrf1* 发现, *Uhrf1* 的丢失导致 DNA 损伤反应的激活, 主要

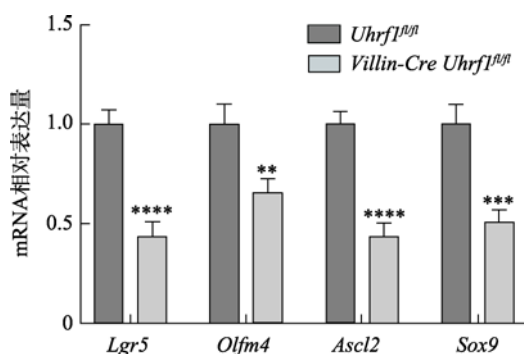


图 5 肠干细胞相关标志基因的表达

Fig. 5 The expression of intestinal stem cell marker genes

: $P < 0.01$; *: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

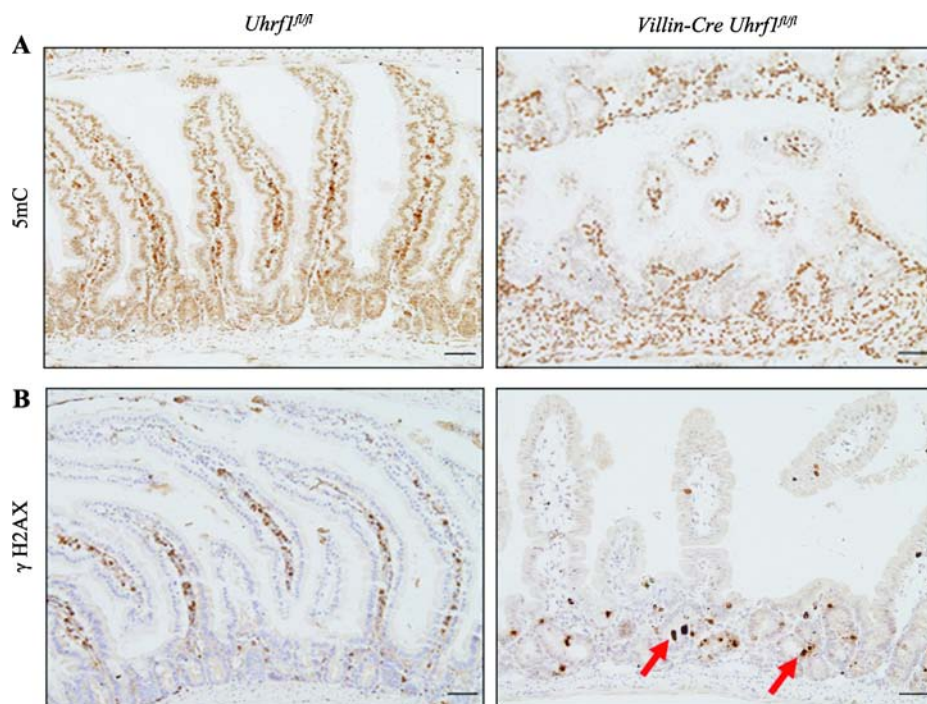


图 6 Uhrf1 介导的 DNA 甲基化对肠上皮细胞影响

Fig. 6 The effect of Uhrf1-mediated DNA methylation in intestinal epithelial cells

A: 野生型与条件性敲除 Uhrf1 小鼠肠上皮中 5mC 免疫组织化学染色。B: 野生型与条件性敲除 Uhrf1 小鼠肠上皮中 DNA 损伤标志物 γ H2AX 免疫组织化学染色。红色箭头表示 DNA 损伤阳性细胞。标尺: 50 μ m。

表现为组蛋白 H2AX 在第 139 位丝氨酸的磷酸化以及细胞周期检测点激酶 2 (checkpoint kinase 2, CHK2) 第 68 位苏氨酸的磷酸化等, 并造成细胞通过 caspases 8 和 3 途径发生凋亡。为进一步探索 *Uhrf1* 基因是如何诱发细胞凋亡, 通过免疫组织化学染色方法对肠上皮组织甲基化水平及 DNA 损伤标志物 γ H2AX 进行检测, 结果显示与对照组小鼠相比, *Uhrf1* 的缺失导致肠上皮组织整体甲基化水平降低, DNA 损伤增加, 因此初步推测可能是 *Uhrf1* 的缺失造成 DNA 甲基化水平大幅下降, 诱发 DNA 损伤, 进而引起肠上皮细胞增殖分化减缓, 凋亡增加。目前已有研究表明 DNA 甲基化可以通过调控发育过程中细胞增殖和分化间的平衡来调节肠上皮稳态的建立。Sheaffer 等^[29-31]研究发现 *Dnmt1* 介导的维持性 DNA 甲基化对肠上皮细胞分化过程中的基因表达调控起着关键作用, 胚胎期敲除 *Dnmt1* 发现 *Dnmt1* 的缺失导致小鼠肠上皮细胞增殖下降、绒毛数量减少、基因组甲基化水平降低, 并采用转录组学测序技术分析发现与 DNA 损伤及细胞周期相关的基因表达升高, 造成细胞周期阻滞, 从而引起细

胞死亡, 这与本研究中小鼠胚胎期肠上皮细胞中特异性敲除 *Uhrf1* 的表型相类似; 进一步在成体小鼠中的研究发现, 尽管短期内敲除 *Dnmt1* 可导致小鼠体重下降, 基因组稳定性及甲基化水平降低, 但两个月左右由于 *Dnmt3b* 的激活, DNA 甲基化水平及肠上皮完整性可以逐渐恢复到正常水平, *Dnmt1* 和 *Dnmt3b* 共同负责成体小鼠肠上皮甲基化的维持, 目前关于 *Uhrf1* 在成体小鼠肠组织中的功能还有待建立动物模型进行下一步的研究。据报道 *Uhrf1* 可以通过靶向多个信号通路发挥生物学功能。例如 Chen 等^[32]证明 *Uhrf1* 可以通过影响细胞周期抑制蛋白 CDKN1A (cyclin dependent kinase inhibitor 1A) 以及调节 B 细胞增殖和衰老家族的 *Schlafen 1/2* (*Slfn1/2*) 表达水平来促进 B 细胞增殖, 进一步应用亚硫酸盐测序分析发现 *Cdkn1a* 基因的 CpG 位点的 DNA 甲基化水平在 *Uhrf1* 敲除后明显降低。Xiang 等^[33]发现 *Uhrf1* 的缺失导致基底细胞阻滞在 G_1 期, 损害了气道再生过程, 并表明 *Uhrf1* 可能影响了与 G_1/S 期转变相关的细胞周期蛋白依赖性激酶的活性。在自然杀伤性 T 细胞中 *Uhrf1* 被证明可以通过调节蛋白激

酶 B/哺乳动物雷帕霉素白蛋白(protein kinase B/mammalian target of rapamycin, Akt-mTOR)信号轴来控制细胞的分化,影响细胞的发育^[34]。目前关于 Uhrf1 介导的 DNA 甲基化对肠上皮发育具体调控机制尚不清楚,考虑到 Uhrf1 和 Dnmt1 在甲基化维持中的作用, Uhrf1 和 Dnmt1 是否具有类似的功能与机制,需要更进一步的探索。

综上所述,本研究通过构建在肠上皮中特异性敲除 *Uhrf1* 的小鼠模型,发现在胚胎期敲除 *Uhrf1* 后,肠上皮发育异常,上皮稳态失衡, Uhrf1 的缺失导致 DNA 甲基化的维持过程被破坏,诱发 DNA 损伤反应,造成肠上皮细胞的增殖与分化受阻,细胞凋亡增加,首次揭示了 Uhrf1 介导的 DNA 甲基化在肠上皮发育中的重要作用,为进一步明确 Uhrf1 介导的表观遗传机制提供了实验依据。

参考文献(References):

- [1] Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(3): 204–220. [DOI]
- [2] Greenberg MVC, Bourc'h D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(10): 590–607. [DOI]
- [3] Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature*, 2015, 517(7534): 321–326. [DOI]
- [4] Smith ZD, Sindhu C, Meissner A. Molecular features of cellular reprogramming and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(3): 139–154. [DOI]
- [5] Newkirk SJ, An WF. Uhrf1: a jack of all trades, and a master epigenetic regulator during spermatogenesis. *Biol Reprod*, 2020, 102(6): 1147–1152. [DOI]
- [6] Xue BS, Zhao JS, Feng PH, Xing J, Wu HL, Li Y. Epigenetic mechanism and target therapy of Uhrf1 protein complex in malignancies. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 549–559. [DOI]
- [7] Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, Tajima S, Mitsuya K, Okano M, Koseki H. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature*, 2007, 450(7171): 908–912. [DOI]
- [8] Xie S, Qian CM. The growing complexity of Uhrf1-mediated maintenance DNA methylation. *Genes (Basel)*, 2018, 9(12): 600. [DOI]
- [9] Cheng JD, Yang Y, Fang J, Xiao JX, Zhu TT, Chen F, Wang P, Li Z, Yang HR, Xu YH. Structural insight into coordinated recognition of trimethylated histone H3 lysine 9 (H3K9me3) by the plant homeodomain (PHD) and tandem tudor domain (TTD) of Uhrf1 (ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1) protein. *J Biol Chem*, 2013, 288(2): 1329–1339. [DOI]
- [10] Nishiyama A, Yamaguchi L, Sharif J, Johmura Y, Kawamura T, Nakanishi K, Shimamura S, Arita K, Kodama T, Ishikawa F, Koseki H, Nakanishi M. Uhrf1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication. *Nature*, 2013, 502(7470): 249–253. [DOI]
- [11] Harrison JS, Cornett EM, Goldfarb D, DaRosa PA, Li ZM, Yan F, Dickson BM, Guo AH, Cantu DV, Kaustov L, Brown PJ, Arrowsmith CH, Erie DA, Major MB, Klevit RE, Krajewski K, Kuhlman B, Strahl BD, Rothbart SB. Hemi-methylated DNA regulates DNA methylation inheritance through allosteric activation of H3 ubiquitylation by Uhrf1. *eLife*, 2016, 5: e17101. [DOI]
- [12] Jeanblanc M, Mousli M, Hopfner R, Bathami K, Martinet N, Abbady AQ, Siffert JC, Mathieu E, Muller CD, Bronner C. The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle. *Oncogene*, 2005, 24(49): 7337–7345. [DOI]
- [13] Tian YY, Paramasivam M, Ghosal G, Chen D, Shen X, Huang YL, Akhter S, Legerski R, Chen JJ, Seidman MM, Qin J, Li L. Uhrf1 contributes to DNA damage repair as a lesion recognition factor and nuclease scaffold. *Cell Rep*, 2015, 10(12): 1957–1966. [DOI]
- [14] Maenohara S, Unoki M, Toh H, Ohishi H, Sharif J, Koseki H, Sasaki H. Role of Uhrf1 in de novo DNA methylation in oocytes and maintenance methylation in preimplantation embryos. *PLoS Genet*, 2017, 13(10): e1007042. [DOI]
- [15] Jacob V, Chernyavskaya Y, Chen XT, Tan PS, Kent B, Hoshida Y, Sadler KC. DNA hypomethylation induces a DNA replication-associated cell cycle arrest to block hepatic outgrowth in Uhrf1 mutant zebrafish embryos. *Development*, 2015, 142(3): 510–521. [DOI]
- [16] Zhang YW, Chen YS, Ma R, Jiang YW, Liu J, Lin YT, Chen SQ, Xia MY, Zou F, Zhang JS, Pan T, Wang L, Wei L, Zhang H. Uhrf1 controls thymocyte fate decisions through the epigenetic regulation of EGR1 expression. *J Immunol*, 2020, 204(12): 3248–3261. [DOI]
- [17] Ramesh V, Bayam E, Cernilogar FM, Bonapace IM, Schulze M, Riemenschneider MJ, Schotta G, Götz M.

- Loss of Uhrf1 in neural stem cells leads to activation of retroviral elements and delayed neurodegeneration. *Genes Dev*, 2016, 30(19): 2199–2212. [DOI]
- [18] Sen GL, Reuter JA, Webster DE, Zhu L, Khavari PA. DNMT1 maintains progenitor function in self-renewing somatic tissue. *Nature*, 2010, 463(7280): 563–567. [DOI]
- [19] Yang XD, Han W, Liu F. DNA methylation in vertebrate embryogenesis. *Hereditas (Beijing)*, 2012, 34(9): 1108–1113.
杨晓丹, 韩威, 刘峰. DNA 甲基化与脊椎动物胚胎发育. 遗传, 2012, 34(9): 1108–1113. [DOI]
- [20] Bostick M, Kim JK, Estève PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. Uhrf1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*, 2007, 317(5845): 1760–1764. [DOI]
- [21] Blanchart A, Navis AC, Assaife-Lopes N, Usoskin D, Aranda S, Sontheimer J, Ernfors P. Uhrf1 licensed self-renewal of active adult neural stem cells. *Stem Cells*, 2018, 36(11): 1736–1751. [DOI]
- [22] Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Atarashi K, Nakayama M, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M, Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Tajima S, Masumoto H, Ohara O, Honda K, Hori S, Ohno H, Koseki H, Hase K. The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2014, 15(6): 571–579. [DOI]
- [23] Sadler KC, Krahn KN, Gaur NA, Ukomadu C. Liver growth in the embryo and during liver regeneration in zebrafish requires the cell cycle regulator, Uhrf1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(5): 1570–1575. [DOI]
- [24] Yamashita M, Inoue K, Saeki N, Ideta-Otsuka M, Yanagihara Y, Sawada Y, Sakakibara I, Lee J, Ichikawa K, Kamei Y, Iimura T, Igarashi K, Takada Y, Imai Y. Uhrf1 is indispensable for normal limb growth by regulating chondrocyte differentiation through specific gene expression. *Development*, 2018, 145(1): dev157412. [DOI]
- [25] Jenkins Y, Markovtsov V, Lang W, Sharma P, Pearsall D, Warner J, Franci C, Huang B, Huang JN, Yam GC, Vistan JP, Pali E, Vialard J, Janicot M, Lorens JB, Payan DG, Hitoshi Y. Critical role of the ubiquitin ligase activity of Uhrf1, a nuclear RING finger protein, in tumor cell growth. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(12): 5621–5629. [DOI]
- [26] Ma HH, Chen H, Guo X, Wang ZT, Sowa ME, Zheng LJ, Hu SB, Zeng PY, Guo R, Diao JB, Lan F, Harper JW, Shi YG, Xu YH, Shi Y. M phase phosphorylation of the epigenetic regulator Uhrf1 regulates its physical association with the deubiquitylase USP7 and stability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(13): 4828–4833. [DOI]
- [27] Loughery JEP, Dunne PD, O'Neill KM, Meehan RR, McDaid JR, Walsh CP. Dnmt1 deficiency triggers mismatch repair defects in human cells through depletion of repair protein levels in a process involving the DNA damage response. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(16): 3241–3255. [DOI]
- [28] Tien AL, Senbanerjee S, Kulkarni A, Mudbhary R, Goudreau B, Ganesan S, Sadler KC, Ukomadu C. Uhrf1 depletion causes a G2/M arrest, activation of DNA damage response and apoptosis. *Biochem J*, 2011, 435(1): 175–185. [DOI]
- [29] Sheaffer KL, Kim R, Aoki R, Elliott EN, Schug J, Burger L, Schübeler D, Kaestner KH. DNA methylation is required for the control of stem cell differentiation in the small intestine. *Genes Dev*, 2014, 28(6): 652–664. [DOI]
- [30] Elliott EN, Sheaffer KL, Schug J, Stappenbeck TS, Kaestner KH. Dnmt1 is essential to maintain progenitors in the perinatal intestinal epithelium. *Development*, 2015, 142(12): 2163–2172. [DOI]
- [31] Elliott EN, Sheaffer KL, Kaestner KH. The 'de novo' DNA methyltransferase Dnmt3b compensates the Dnmt1-deficient intestinal epithelium. *eLife*, 2016, 5: e12975. [DOI]
- [32] Chen C, Zhai SL, Zhang L, Chen JJ, Long XH, Qin J, Li JH, Huo R, Wang XM. Uhrf1 regulates germinal center B cell expansion and affinity maturation to control viral infection. *J Exp Med*, 2018, 215(5): 1437–1448. [DOI]
- [33] Xiang HD, Yuan LF, Gao X, Alexander PB, Lopez O, Lau C, Ding Y, Chong MY, Sun T, Chen R, Liu SQ, Wu HY, Wan Y, Randell SH, Li QJ, Wang XF. Uhrf1 is required for basal stem cell proliferation in response to airway injury. *Cell Discov*, 2017, 3: 17019. [DOI]
- [34] Cui Y, Chen XF, Zhang JL, Sun X, Liu HF, Bai L, Xu CQ, Liu XL. Uhrf1 controls iNKT cell survival and differentiation through the Akt-mTOR axis. *Cell Rep*, 2016, 15(2): 256–263. [DOI]