

CD-1 小鼠海马 H3K9 三甲基化水平的年龄化改变 及其与认知功能改变的相关性研究

吴子幸¹, 曹磊², 王芳^{1*}, 陈贵海^{3*}

(1. 安徽医科大学第一附属医院神经内科, 合肥 230022; 2. 安徽医科大学第二附属医院神经内科, 合肥 230601;
3. 安徽医科大学附属巢湖医院睡眠障碍科, 合肥 238000)

摘要: 探讨年龄对 CD-1 小鼠海马组蛋白 H3K9 三甲基化 (H3K9me3) 含量的影响及其与空间学习记忆能力改变的相关性。结果发现, 18 月和 12 月龄鼠在放射状水迷宫中学习期和记忆期的潜伏期、错误数均高于 6 月龄鼠 ($P_s < 0.05$); 18 月龄鼠学习期及记忆期的错误数还高于 12 月龄鼠 ($P_s < 0.05$)。18 月龄鼠海马 DG 和 CA1 区 H3K9me3 水平高于 12 月龄鼠 ($P_s < 0.05$), 12 月龄鼠也高于 6 月龄鼠 ($P_s < 0.05$)。DG 和 CA1 区 H3K9me3 相对含量与学习期的潜伏期和错误数以及记忆期错误数呈正相关 ($P_s < 0.05$), 而 CA3 区 H3K9me3 相对含量与学习期和记忆期的错误数、潜伏期之间无明显相关性 ($P_s > 0.05$)。以上结果提示, CD-1 小鼠年龄相关空间学习记忆损害可能与海马组蛋白 H3K9me3 升高有关。

关键词: 小鼠; 衰老; H3K9 三甲基化; 学习记忆

中图分类号: R339.38; S865.13

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)01-0045-05

Changes of age-related H3K9 trimethylation in hippocampus and its correlation with cognitive impairment in CD-1 mice

WU Zixing¹, CAO Lei², WANG Fang¹, CHEN Guihai³

(1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

2. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

3. Departments of Sleep Disorders, the Affiliated Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Hefei 238000)

Abstract: In this study, we explored the effect of age on trimethylation of histone 3 in the lysine 9 site (H3K9me3) and its correlation with the impairment of spatial learning and memory in CD-1 mice. The results showed that the number of errors and latency during learning and memory phases in the radial arm water maze (RAWM) in the mice aged at 18- and 12-month old was significantly longer or more than those in the 6-month old mice ($P_s < 0.05$), with more number of errors in the learning and memory phases in the 18-month old mice compared to the 12-month old mice ($P_s < 0.05$). A significantly higher level of H3K9me3 in the hippocampal DG and CA1 subregions was found in the 18-month old mice relative to the 12-month old mice ($P_s < 0.05$), and so did in the 12-month group relative to the 6-month group ($P_s < 0.05$). The H3K9me3 levels in the DG and CA1 were positively correlated with the learning errors and latency, and the memory errors in the RAWM ($P_s < 0.05$). There was no significant correlation between the performance of RAWM and the levels of H3K9me3 in CA3 ($P_s > 0.05$). Our results suggested that the increased hippocampal H3K9me3 might be involved in the age-related impairment of spatial learning and memory in CD-1 mice.

Key words: mouse; aging; H3K9me3; learning and memory

衰老标志性特征之一是认知功能衰退。其中海马依赖性空间学习记忆能力减退是突出表现^[1]。证

收稿日期: 2017-06-07

基金项目: 国家青年自然科学基金 (81301094) 和国家自然科学基金 (81370444) 共同资助。

作者简介: 吴子幸, 硕士研究生。E-mail: 799285457@qq.com

* 通信作者: 王芳, 博士, 副教授。E-mail: doctorwangfang2006@163.com

陈贵海, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: doctorcgh@163.com

据已表明表观遗传信息变化对衰老过程产生影响。表观遗传信息的变化包括 DNA 甲基化、组蛋白翻译后修饰及非编码 RNA 水平改变等^[2]。组蛋白(H)是构成染色体的结构与功能组分,通常包括 H1、H2A、H2B、H3 和 H4^[3]。对 H 的常见修饰方式有乙酰化、磷酸化和甲基化。这些修饰可以影响基因的转录与表达^[4]。组蛋白甲基化修饰方式在正常衰老过程中的变化及与衰老相关认知功能改变的相关性报告甚少。部分文献显示早衰小鼠学习记忆能力缺陷与 H4K20 单甲基化和 H3K36 二甲基化的减少相关^[5]。本研究旨在探讨年龄对 CD-1 小鼠海马 H3K9 三甲基化(H3K9me3)含量的影响及其与年龄相关性空间学习记忆能力减退的相关性。

1 材料与方法

1.1 供试动物

CD-1 小鼠购自北京维通利华实验动物公司。随机分为 6、12 和 18 月龄 3 组,每组 16 只(雌雄各半)。适应性喂养 2 周,自由饮食,室温(23±1)℃,湿度(55±5)%,明暗周期 12 h。实验前排除有脱毛、运动障碍及体表肿块的小鼠。

1.2 行为学检测

采用六臂辐射状水迷宫(RAWM)检测空间性学习记忆能力。每次实验分为 4 次连续的记忆获得测试(学习期)和 1 次记忆保留测试(记忆期)。在首次记忆获得开始前,小鼠在平台上停留 30 s。之后每次小鼠按当天抽签顺序从 4 个泳道入水(平台所在泳道及对面泳道除外)。入水后小鼠若在 10 s 内进入错误泳道或未选择任何泳道,即被拉回起始处并记一次错误。第 4 次记忆获得结束后,小鼠返回饲养笼,烘干皮毛。30 min 后完成记忆期测试。实验连续进行 10 d。记录每次错误数和发现平台的潜伏期。每天学习期的错误数和潜伏期取平均值进入统计学分析。

1.3 标本制备

为避免学习记忆测试对蛋白表达的影响,行为学检测后 14 d,小鼠引颈脱臼处死,在冰上迅速取出脑组织,右侧大脑于 4%的多聚甲醛溶液中固定,脱水浸蜡,石蜡包埋。-20℃冷冻蜡块后,4 μm 连续冠状切片(LEICA RM 2135 型)。最终进入免疫组化分析的蜡块共 48 个,其中 6、12 和 18 月龄各 16 个(雌雄各半)。

1.4 免疫组织化学染色及摄片

采用链霉亲和素-生物素复合素法(SABC)进行免疫组化检测。用低倍镜(4×10 倍)摄海马整

体,然后用 10×20 倍显微镜分别对海马 DG、CA1 区和 CA3 区的细胞层进行拍摄。应用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件进行图像分析。各亚区平均光密度值(average optical density, AOD)作为 H3K9me3 相对含量进行统计分析。

1.5 统计学处理

所有数据均符合正态分布。数据采用均数±标准差表示。不同年龄段 CD-1 小鼠海马各亚区 H3K9me3 水平的组间差异采用方差分析,RAWM 检测结果采用重复测定方差分析。多重比较采用 Fisher 最小显著性差异检验。相关性分析采用 Pearson 相关分析法。显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。所有分析由 SPSS 16.0 统计软件完成。

2 结果与分析

2.1 RAWM

2.1.1 学习期 潜伏期 ($F_{(9,405)} = 63.307, P < 0.01$; 图 1A)和错误数($F_{(9,405)} = 51.517, P < 0.01$; 图 1B)均随天数的增加而下降。两两比较显示:18 和 12 月龄鼠潜伏期均显著长于 6 月龄鼠($P_s < 0.01$),但前两者间的潜伏期无显著性差异($P = 0.331$)。18 和 12 月龄鼠的错误数均多于 6 月龄鼠($P = 0.039, P < 0.01$),18 月龄鼠也多于 12 月龄鼠($P < 0.01$)。

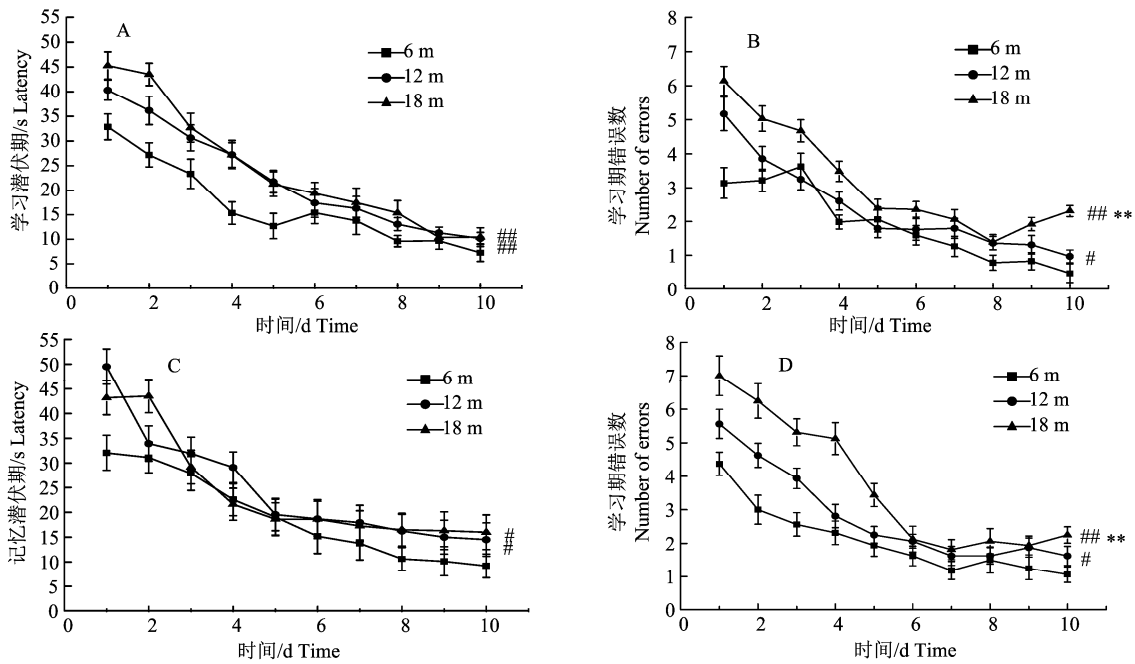
2.1.2 记忆期 潜伏期 ($F_{(9,405)} = 24.862, P < 0.01$; 图 1C)和错误数($F_{(9,405)} = 21.793, P < 0.01$; 图 1D)也随天数的增加而下降。两两比较显示:18 和 12 月龄鼠潜伏期均长于 6 月龄鼠($P = 0.025, P = 0.044$),而 18 和 12 月龄间无显著性差异($P = 0.816$)。18 和 12 月龄鼠的错误数均多于 6 月龄鼠($P = 0.027, P < 0.01$),18 月龄鼠也多于 12 月龄鼠($P < 0.01$)。

2.2 海马不同亚区 H3K9 三甲基化水平

光镜下见特异性 H3K9me3 免疫着色在海马 DG、CA1 和 CA3 细胞层中,其他各亚层呈少量散在分布(图 2)。3 组小鼠 H3K9me3 水平在海马 DG ($F_{(2,45)} = 15.082, P < 0.01$)和 CA1 ($F_{(2,45)} = 18.173, P < 0.01$)区有显著性差异,但在 CA3 区无显著性差异($F_{(2,45)} = 0.189, P = 0.828$)。两两比较显示:18 和 12 月龄鼠海马 DG 和 CA1 区 H3K9me3 水平均显著高于 6 月龄鼠($P_s < 0.05$),18 月龄鼠这两个亚区的 H3K9me3 水平也高于 12 月龄鼠($P = 0.033, P < 0.01$) (如图 3)。

2.3 空间学习记忆能力与海马 H3K9me3 含量相关性

将 RAWM 的平均潜伏期和错误数与 CD-1 小鼠海马各亚区 H3K9me3 相对含量进行相关性分析结果(表 1)显示。在海马 DG 和 CA1 区, H3K9me3



(A)、(B)分别为学习期的潜伏期和错误数; (C)、(D)分别为记忆期的潜伏期和错误数

(A) latency and (B) number of the errors for different-age mice during the learning phase; and (C) latency and (D) number of the errors for different-age mice during the memory phase

与 6 月龄组比较 Compared to the 6-month group, # $P_s < 0.05$, ## $P_s < 0.01$; 与 12 月龄组比较 Compared to the 12-month group, * $P_s < 0.05$, ** $P_s < 0.01$ 。

图 1 CD-1 鼠在六臂辐射状水迷宫任务中的空间学习记忆能力评估曲线

Figure 1 Curve of spatial learning and memory ability assessed by radial six-arm water maze task in CD-1 mice

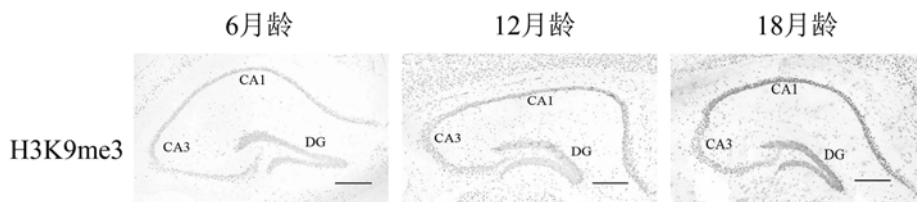
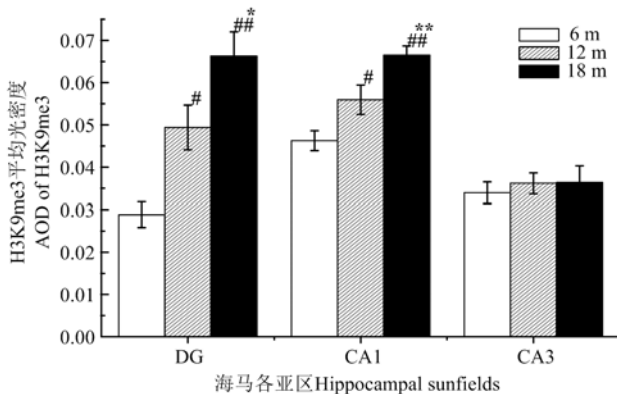


图 2 不同月龄 CD-1 小鼠海马 H3K9me3 的免疫组化结果(×40)

Figure 2 The immunohistochemical results of H3K9me3 levels in the hippocampus of CD-1 mice at different ages(×40)



与 6 月龄组比较 Compared to the 6-month group, # $P_s < 0.05$, ## $P_s < 0.01$; 与 12 月龄组比较 Compared to the 12-month group, * $P_s < 0.05$, ** $P_s < 0.01$

图 3 不同月龄 CD-1 小鼠海马各亚区 H3K9me3 相对含量
Figure 3 The H3K9me3 levels in the hippocampal subregions of CD-1 mice at different ages

相对含量与学习期的潜伏期、错误数和记忆期的错误数均呈正相关 ($P_s < 0.05$)。

3 讨论与结论

衰老是生物体随着年龄增长, 在形态结构和生理功能方面出现的一系列慢性、进行性及退化性改变, 表现为认知功能减退和一系列神经生物学改变。大量研究已经证实海马与记忆形成有着密不可分的关系。衰老所致的记忆能力改变最先涉及海马区^[6]。RAWM 是目前被广泛应用于啮齿动物的一种空间学习记忆能力检测方法, 对早期记忆能力的损害有较高的敏感性^[7]。本实验选取 3 个年龄段 CD-1 小鼠, 采用 RAWM 检测其空间学习记忆能力的年龄效应。结果发现, 18 月龄和 12 月龄鼠学习期和记忆期的错误数、潜伏期均高于 6 月龄鼠, 而 18 月龄鼠学

习期和记忆期错误数也高于 12 月龄,表明 CD-1 小鼠中年期开始即出现空间学习记忆能力损害,老年期更为显著。这与既往的研究结果一致^[8-9]。

目前,对于衰老所致年龄相关性认知功能下降的机制并不明了。其主要假说有表观遗传学说^[10]、氧化应激学说^[11]和神经内分泌学说^[12]等。其中,表观遗传学说是目前关注的热点。表观遗传是指在 DNA 序列不发生改变的情况下,基因表达发生改变。组蛋白修饰是最常见的一种修饰方式^[13]。组蛋白是构成核小体的关键成分,而核小体是染色质基本结构单位。可见,组蛋白的翻译后修饰对于基因的转录与表达起关键作用^[14]。实验室前期研究表明海马组蛋白乙酰化水平的变化与年龄相关性认知功能下降密切相关^[8,15-16]。不同于组蛋白乙酰化对基因转录的激活作用,组蛋白甲基化既可以激活基因转录,也可以抑制基因转录。这取决于被修饰的位点

及程度^[17]。组蛋白精氨酸残基甲基化伴随转录的激活,赖氨酸残基甲基化则因赖氨酸所在的位置不同而有差别。在酵母和哺乳动物细胞中,H3K4 和 H3K36 甲基化可以激活转录,而 H3 之 K9、K27 和 K79 以及 H4 之 K20 甲基化可抑制转录^[18]。近年来,越来越多研究揭示组蛋白甲基化可能参与记忆形成过程。比如, Jarome 等研究发现恐惧记忆能触发海马 CA1 区 H3K4 三甲基化和 H3K9 二甲基化增加^[19]。对软体动物食物回避行为模型的研究发现,在长时记忆巩固阶段,中枢神经系统内 H3K4 和 H3K9 甲基化参与了软体动物长时记忆的形成^[20]。人类前额叶皮质 H3K4 甲基转移酶 Mll1 缺失,会使 Camk2aCre+, Mll1 flox/flox 条件突变体小鼠空间工作记忆严重障碍^[21]。可见,组蛋白甲基化对调节记忆形成有着重要作用。

表 1 CD-1 小鼠海马各亚区 H3K9me3 相对含量与 RAWM 行为学相关性分析

Table 1 The correlations between H3K9me3 levels in different subregions of hippocampus and spatial memory performances in RAWM

任务 Assignment	时期 Phase	成绩 Grade	H3K9me3		
			DG <i>r(p)</i>	CA1 <i>r(p)</i>	CA3 <i>r(p)</i>
RAWM	学习期 Learning phase	潜伏期 Latency	0.531(0.000)**	0.357(0.013)*	-0.011(0.941)
		错误数 Number of errors	0.288(0.047)*	0.375(0.009)**	0.105(0.479)
	记忆期 Memory phase	潜伏期 Latency	0.117(0.428)	0.104(0.480)	0.046(0.757)
		错误数 Number of errors	0.389(0.006)**	0.325(0.024)*	0.088(0.550)

注: * $P_s < 0.05$, ** $P_s < 0.01$

本研究就正常衰老过程中,海马组蛋白甲基化水平变化进行研究。选取了 H3K9me3 这种常见的修饰方式,用免疫组化法分析 CD-1 小鼠海马 DG、CA1 和 CA3 区 H3K9me3 年龄相关性变化。结果发现:18 和 12 月龄鼠海马 DG 和 CA1 区 H3K9me3 水平均高于 6 月龄鼠。H3K9me3 水平与学习记忆成绩的相关分析结果显示:在海马 DG 和 CA1 区,H3K9me3 相对含量分别与学习期的潜伏期、错误数和记忆期错误数呈正相关。这提示海马 H3K9me3 水平的升高可能是 CD-1 小鼠年龄相关性空间学习记忆能力损害的一个重要机制。

总之,结果表明 CD-1 小鼠年龄相关性空间学习记忆能力损害可能与海马 DG、CA1 区 H3K9me3 升高有关。

参考文献:

[1] REICHEL J M, BEDENK B T, CZISCH M, et al. Age-related cognitive decline coincides with accelerated volume loss of the dorsal but not ventral hippocampus in mice[J]. *Hippocampus*, 2017, 27(1): 28-35.

[2] PAL S, TYLER J K. Epigenetics and aging [J]. *Sci Adv*, 2016, 2(7): e1600584.

[3] STRAHL B D, ALLIS C D. The language of covalent histone modifications[J]. *Nature*, 2000, 403(6765): 41-45.

[4] MARSIT C J. Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation[J]. *J Exp Biol*, 2015, 218(1): 71-79.

[5] HARGREAVES D C, HORNG T, MEDZHITOV R. Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation[J]. *Cell*, 2009, 138(1): 129-145.

[6] FOSTER T C. Dissecting the age-related decline on spatial learning and memory tasks in rodent models: N-methyl-D-aspartate receptors and voltage-dependent Ca^{2+} channels in senescent synaptic plasticity[J]. *Prog Neurobiol*, 2012, 96(3): 283-303.

[7] PAUL C M, MAGDA G, ABEL S. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents[J]. *Behav Brain Res*, 2009, 203(2): 151-164.

[8] LI X W, CAO L, WANG F, et al. Maternal inflammation linearly exacerbates offspring age-related changes of spatial learning and memory, and neurobiology until senescence[J]. *Behav Brain Res*, 2016, 306(1): 178-196.

[9] CHEN G H, WANG H, YANG Q G, et al. Acceleration of age-related learning and memory decline in middle-aged

- CD-1 mice due to maternal exposure to lipopolysaccharide during late pregnancy[J]. *Behav Brain Res*, 2011, 218(2): 267-279.
- [10] PENNER M R, ROTH T L, BARNES C A, et al. An epigenetic hypothesis of aging-related cognitive dysfunction[J]. *Front Aging Neurosci*, 2010, 2(9):1-11.
- [11] MIGLIORE L, COPPEDE F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging[J]. *Mutat Res-Gen Tox En*, 2009, 674(1): 73-84.
- [12] GONCHAROVA N D, LAPIN B A, KHAVINSON V K. Age-associated endocrine dysfunctions and approaches to their correction[J]. *B Exp Biol Med*, 2002, 134(5): 417-421.
- [13] BRUNET A, BERGER S L. Epigenetics of aging and aging-related disease[J]. *J Gerontol A-Biol*, 2014, 69(Suppl 1): S17-S20.
- [14] BANNISTER A J, KOUZARIDES T. Regulation of chromatin by histone modifications[J]. *Cell Res*, 2011, 21(3): 381-395.
- [15] LI X Y, WANG F, CHEN G H, et al. Inflammatory insult during pregnancy accelerates age-related behavioral and neurobiochemical changes in CD-1 mice[J]. *Age*, 2016, 38(3): 1-16.
- [16] JIANG W, CAO L, WANG F, et al. Accelerated reduction of serum thyroxine and hippocampal histone acetylation links to exacerbation of spatial memory impairment in aged CD-1 mice pubertally exposed to bisphenol-a[J]. *Age*, 2016, 38(5/6): 405-418.
- [17] RICE J C, ALLIS C D. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13(3): 263-273.
- [18] MELLOR J, DUDEK P, CLYNES D. A glimpse into the epigenetic landscape of gene regulation[J]. *Curr Opin Genet De*, 2008, 18(2): 116-122.
- [19] JAROME TJ, THOMAS JS, LUBIN F D. The epigenetic basis of memory formation and storage [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2014, 128: 1-27.
- [20] GUPTA S, KIM S Y, ARTIS S, et al. Histone methylation regulates memory formation[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(10): 3589-3599.
- [21] JAKOVCEVSKI M, RUAN H, SHEN E Y, et al. Neuronal Kmt2a/Mll1 histone methyltransferase is essential for prefrontal synaptic plasticity and working memory[J]. *J Neurosci*, 2015, 35(13): 5097-5108.