

SETD8^{-/-}抑制人胚胎干细胞向造血分化

王鼎 李亚朴 黄鑫 马艺戈 郭青 赵艳红 王冰蕊 徐长禄 张英楠 石莉红*

(中国医学科学院北京协和医学院血液病医院(血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

摘要 表观遗传调控作为一种广泛的基因表达调控方式, 已被报道可以参与干细胞多能性、谱系分化等生物学过程。虽然许多表观遗传调控因子的功能已被解析, 但仍有一些并未被深入研究。SETD8(赖氨酸甲基转移酶5A, lysine methyltransferase 5A)作为一种甲基化转移酶, 已被证实能够介导组蛋白H4第20位赖氨酸的单甲基化, 并且可以参与细胞周期、P53介导的DNA损伤等过程。但是, SETD8是否可以直接调控人胚胎干细胞的多能性及其谱系分化还没有报道。该研究首先利用CRISPR/Cas9基因编辑技术在人的胚胎干细胞中敲除SETD8。功能研究表明, 敲除SETD8显著降低了多能性基因OCT4和NANOG的表达水平, 并且抑制了体外造血发育过程。接着利用了siRNA在造血发育不同时期敲低SETD8, 发现均可以抑制造血发育过程, 进一步证实了SETD8可以在各个阶段调控体外造血发育。

关键词 CRISPR/Cas9技术; H1细胞; SETD8; 多能性; 单层分化

SETD8^{-/-} Inhibit Hematopoietic Differentiation in Human Embryonic Stem Cells

Wang Ding, Li Yapu, Huang Xin, Ma Yige, Guo Qing, Zhao Yanhong, Wang Bingrui,
Xu Changlu, Zhang Yingnan, Shi Lihong*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020 China)

Abstract Epigenetic regulation is a well-known way to control gene expression. It has been reported that epigenetic regulation could participate in a variety of biological processes such as stem cell pluripotency, cell cycle, lineage differentiation and the functions of many epigenetic factors have been elucidated. However, there are still some epigenetic factors has not been thoroughly studied. SETD8 (KMT5A, lysine methyltransferase 5A) is a protein-lysine N-methyltransferase which can monomethylate Lys-20 of histone H4 and also involve in the regulation of cell cycle, p53-mediated DNA damage and other processes. But, whether it can directly regulate the pluripotency and lineage differentiation of human embryonic stem cells (hESCs) has not been reported. In this study, we used CRISPR/Cas9 gene editing technology to knock out SETD8 in hESCs. Functional studies showed that the knockout of SETD8 significantly reduced the expression levels of pluripotent genes OCT4 and

收稿日期: 2019-03-18 接受日期: 2019-04-29

国家重点研发计划(批准号: 2016YFA0102300、2017YFA0103102)、国家自然科学基金(批准号: 81870089、81700105)、中国医学科学院医学与健康科技创新工程(批准号: 2016-I2M-1-018、2016-I2M-3-002、2017-I2M-1-015)、中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费(批准号: 2018PT31033)和国家重点实验室自主课题(批准号: 157-z18-07)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-23909446, E-mail: shilihongxys@ihcams

Received: March 18, 2019 Accepted: April 29, 2019

This work was supported by the National Key Research and Development Program (Grant No.2016YFA0102300, 2017YFA0103102), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81870089, 81700105), the Medical and Health Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Medical Sciences (Grant No.2016-I2M-1-018, 2016-I2M-3-002, 2017-I2M-1-015), Basic Scientific Research Service Fee of Central-level Public Welfare Research Institute of Chinese Academy of Medical Sciences (Grant No.2018PT31033) and the National Key Laboratory Independent Project (Grant No.157-z18-07)

*Corresponding author. Tel: +86-21-23909446, E-mail: shilihongxys@ihcams

网络出版时间: 2019-09-12 15:07:20 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190912.1507.040.html>

NANOG, and inhibited the hematopoietic development process of hESCs in vitro. We also used siRNAs to knock down *SETD8* during different stages of hematopoietic development, and found that the hematopoietic development process was inhibited. This result confirmed that *SETD8* could regulate hematopoietic development in vitro at various stages.

Keywords CRISPR/Cas9; H1; *SETD8*; Pluripotency; monolayer differentiation

人胚胎干细胞是一群具有无限增殖、自我更新、多向分化能力的细胞,可以通过体外定向诱导分化形成各种组织特异性细胞。人类胚泡衍生的多能细胞系——人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESC),于1998年被Thomson等^[1]首次构建出来。目前来说, hESC可以定向分化成如内胚层神经祖细胞^[2-3]、心肌细胞和中胚层内皮细胞^[4-5]、以及外胚层的肝细胞和胰腺细胞^[6-8]等。

研究表明,某些因子可以将人胚胎干细胞在体外诱导成为具有多系分化潜能的造血干祖细胞。目前已有北京大学邓宏魁实验室的单层造血分化体系体外诱导人多能干细胞,可以模拟体内早期造血过程。在体外单层造血分化过程中,人多能干细胞经历两天的分化,部分分化为表面标志物为APLN⁺阳性的侧板中胚层亚型细胞^[9]。然后再经历2~3天,分化成具有表面标志物CD31、CD34双阳性的人生血内皮细胞。生血内皮细胞再经历内皮一造血的转换过程(EHT过程)成为CD31、CD43双阳性的造血前体细胞^[10]。目前此模型是研究造血分化机制的有效细胞模型^[11],广泛被研究者使用。

造血分化过程经历着严格的时间和空间的调控,一直以来对造血分化的调控研究主要集中在对转录因子的调控,目前已经证明许多转录因子如GATA2、SCL、RUNX1等参与造血分化早期的发生和发展^[10,12]。在EHT转换过程中,转录因子RUNX1、SCL等同样发挥着重要作用。随着对造血领域探索的逐步加深,近年来的研究显示,除转录因子有序调控hESC向造血方向分化,表观遗传修饰也在造血发育进程中发挥着重要作用。Kuvardina等^[13]证明, RUNX1可以与蛋白质精氨酸甲基转移酶6共同作用,结合在*KLF1*启动子区域控制*KLF1*基因的表达,使得红系分化能力下降,巨核分化进程顺利进行; *GATA1*是红系、巨核系分化的关键基因, Hopper和ELagib等^[14-15]观察到,在hESC中*GATA1*启动子区域附近及转录区相关的表观修

饰H3K4me3、H3K27me3等表达水平较低,然而在hESC向红系、巨核系分化过程中,研究者们观察到在*GATA1*启动子区域有H3K4me3较明显的聚集,这种甲基化修饰促进*GATA1*表达水平上调,使得红系、巨核系分化过程顺利进行。此外表观修饰在hESC向造血系统早期的调控也有非常重要的作用。例如Yu等^[16]发现,组蛋白去甲基化酶LSD1敲除的小鼠胚胎致死, *LSD1*条件性敲除抑制小鼠的造血谱系分化; Kamminga等^[17]发现,在hESC中敲除组蛋白甲基转移酶EZH2后会导致hESC自我更新能力受损,终末分化能力下降。目前已有诸多证据显示表观修饰调控对于机体发生发育的重要性,但很多表观修饰基因以及调控机制正等待进一步的挖掘与研究。

*SETD8*属于组蛋白赖氨酸甲基转移酶家族成员,它含有催化结构域SET,其能够使组蛋白H4K20发生单甲基化修饰,也能对非组蛋白进行修饰^[18]。*SETD8*在DNA复制、DNA损伤反应、转录调控、细胞周期的进展及发育中均发挥着重要的调控作用^[19]: *SETD8*可以影响细胞周期,使得G₂/M期细胞比例增加, S期细胞比例降低^[20]; 研究表明, *SETD8*的异常会使得p53的活性被抑制^[19,21-22],这意味着它极有可能参与肿瘤的发生、发展过程; 研究证明, *SETD8*在前列腺癌中表达水平异常增高^[23]; *SETD8*的功能性单核苷酸多态性对乳腺癌的预后具有重要意义^[24]; 在非小细胞肺癌中, mir-382通过靶向*SETD8*,抑制肿瘤进展^[25]。此外该基因对于胚胎发育至关重要,纯合缺失*Setd8*(小鼠中标记为小写)的小鼠胚胎致死^[26]。研究人员证明, *SETD8*在红系谱系发育中至关重要,红系特异的条件敲除小鼠胚胎致死, *SETD8*是红系分化终末成熟阶段所必须的基因。虽然已经有报道称甲基转移酶*SETD8*对红细胞存活和成熟至关重要^[27],但是关于其是否参与早期人多能干细胞向造血方向的分化并没有研究。

为了探究*SETD8*是否参与早期人多能干细胞

向造血方向的分化。利用CRISPR/Cas9技术,在hESCs中成功实现了SETD8基因的敲除。然后检测SETD8敲除后是否影响多能性因子的表达,以及敲除株是否由于SETD8的缺失影响单层造血分化进程。同时siRNA敲低也证实SETD8可能对早期造血分化多个阶段都有功能。综上所述本文验证SETD8能够参与早期造血调控,参与方式可能是通过影响多能性因子OCT4、NANOG的表达水平从而影响造血分化进程。

1 材料与amp;方法

1.1 材料试剂与amp;仪器

HEK293T细胞系由本实验室传代并amp;冻存,原代细胞购自美国ATCC;PCR supermix和感受态菌株DH5 α 购自全式金生物技术公司(北京);lenticrisprv2(14873bp)质粒载体购自美国Addgene公司;慢病毒包装质粒psPAX2、pMD2G由周家喜实验室(中国医学科学院血液学研究所,天津)惠赠;胎牛血清、DMEM、丙酮酸钠、青霉素-链霉素抗生素、L-谷氨酰胺、Accutase等细胞培养相关试剂均购自Gibco公司;costom TESR、mTESR购自stem cell公司;Polybrene、嘌呤霉素购自美国Sigma公司;Y27632购自Calbiochem公司;Fugene HD转染试剂、pGEMT、Easy Vector System试剂均购自美国Promega公司;胶回收试剂盒、提质粒试剂盒购自中国CW BIO公司;PCR产物纯化试剂盒购自Thermo公司;SETD8抗体购自Abcam;GAPHD抗体购自Bioworld;APLN R抗体购自R&D公司;CD31、CD34、CD43抗体、Growth Factor Reduced Matrigel购自BD公司;所有寡核苷酸序列合成及测序均有由华大基因(北京)完成;所有流式检测均由流式细胞仪Canto II完成。

1.2 细胞培养

HEK 293T细胞的培养液:DMEM基础培养液包含10%胎牛血清、1% L-谷氨酰胺、1%丙酮酸钠以及1%青霉素-链霉素。

H1细胞培养:ES细胞培养基(mTesR)加入整瓶

5 \times 补充试剂,再添加1%的双抗,分装储存于-20 $^{\circ}$ C。每次使用时取出所需要的体积并利用37 $^{\circ}$ C水浴锅加热。采用单细胞传代以及克隆传代交叉进行的方式进行培养。

1.3 针对SETD8设计特异性向导RNA(sgRNA)

利用CRISPR/Cas9设计工具(<http://crispr.mit.edu>),针对SETD8基因编码区域Exon1和Exon2分别设计特异性sgRNA。选取2条评分较高的sgRNA,并在sgRNA的5'端前添加CACC,互补链前加5'端添加AAAC,最终分别合成四条寡核苷酸链(表1)。两条寡核苷酸链退火形成的双链可与Bmsb1酶切后形成的黏性末端互补。退火方法:分别取1 μ L上游链和1 μ L下游链(浓度100 μ mol/L),加8 μ L的水混合终浓度为10 μ mol/L,95 $^{\circ}$ C 5 min,之后以5 $^{\circ}$ C/min的速率降温至25 $^{\circ}$ C。

1.3.1 质粒构建 Bmsb1限制性内切酶在NEB buffer 3.1中,55 $^{\circ}$ C切割lenticrisprv2质粒2 h。用1%琼脂糖凝胶,130 V恒压水平电泳25 min后,按照胶回收试剂盒说明书进行切胶回收。回收的酶切载体与退火形成的sgRNA寡核苷酸双链进行连接。连接体系为:lenticrisprv2质粒酶切产物200 ng、sgRNA退火产物1 μ L、10 \times T4 DNA连接酶缓冲液1 μ L、T4连接酶1 μ L,补水至10 μ L,16 $^{\circ}$ C连接过夜。连接产物转化DH5 α 感受态细胞,将转化后的细胞均匀地涂布在氨苄抗性琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C过夜培养筛选,挑取单克隆,少量摇菌后,将菌液送到华大基因(北京)进行测序鉴定。

1.3.2 慢病毒包装 HEK 293T细胞的准备:传代铺种HEK 293T细胞,以备病毒包装。用含10%胎牛血清的DMEM培养,观察细胞生长密度约70%时进行慢病毒包装。脂质体包装体系(10 cm皿为例):688 μ L Opti-MEM、345 μ L Fugene HD、45 μ g 包装质粒psPAX2、1.5 μ g pMD2G、6 μ g lenticrisprv2 sgRNA质粒。混合液轻轻混匀后,室温静置20 min。然后将混合液均匀地滴加到HEK 293T细胞中,将混合液晃匀后置于37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中培养。培养12 h后更换为含30%

表1 sgRNA序列

Table 1 sgRNA sequence

名称 Name	序列 Sequence
sgRNA1-F-5'	CAC CGG GGA AAC CAT TAG CCG GAA
sgRNA1-R-5'	AAA CAC AGA GCC TCC CGT TTC TTG
sgRNA2-F-5'	CAC CCC ATG GCT AGA GGC AGG AAG
sgRNA2-R-5'	AAA CAG AGC ATT TGT TCG GGC TCA

表2 siRNA序列
Table 2 siRNA sequence

名称 Name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
siRNA1 sense	CGA AGG AGC UCC AGG AAG A
siRNA1 anti sense	UCU UCC UGG AGC UCC UUC G
siRNA2 sense	GAU CAA AGA CGC CAG GAAA
siRNA2 anti sense	UUU CCU GGC GUC UUU GAU C

胎牛血清的DMEM。更换病毒包装培养液48 h后,收集上清培养液并超高速离心(20 000 ×g) 2.5 h进行慢病毒浓缩。

1.3.3 ES细胞感染病毒 待ES细胞长至小克隆时,每孔(6孔板)加入慢病毒30 μL,同时添加Polybrene(终浓度8 μg/mL)。培养48 h后添加Puromycin(终浓度1 μg/mL)筛选带有抗性的细胞。

1.3.4 稳定敲除*SETD8* H1细胞株的筛选及鉴定 将药筛后的H1细胞以低密度进行单细胞传代,待细胞长至小克隆状态后,将每个小克隆挑出并单独培养。待细胞扩增起来后,分别收取蛋白样品及基因组DNA进行后续鉴定。*SETD8*蛋白水平鉴定通过Western blot实验来完成;基因组DNA水平鉴定:通过PCR特异性扩增一段含有sgRNA序列的片段,PCR产物与T载体连接后转化到DH5α感受态细胞中,经挑菌获得单菌落,随后进行摇菌扩增及测序比对鉴定。

1.4 RNA干扰(RNAi)技术介导靶基因*SETD8*的序列特异性沉默

利用网站设计siRNA。选择评分较高的siRNA,合成了两对siRNA序列,具体序列见表2。

1.5 单层造血分化模型

将细胞以3.5万(12孔板)/1.6万(24孔板)的密度种至铺好GFR-Matigel的培养板上,所用培养基为mTesR,并添加5 μmol/mL的Y-27632促进细胞贴壁。20 h后更换为costom TesR培养基,并添加因子BMP4和Activin A,终浓度分别为40 ng/mL以及50 ng/mL,换液后即造血分化的day0。造血分化day1不换液,day2更换因子为bFGF和VEGF,使用浓度分别为50 ng/mL、40 ng/mL。此后每天更换培养基并添加bFGF和VEGF直到day5,day5-day8添加因子为bFGF、VEGF以及SB,使用浓度分别为50 ng/mL、40 ng/mL、20 ng/mL。单层分化全程添加抗支原体药物。

1.6 流式细胞术检测

分别在day2、day5、day8将分化过程中的细胞

用消化酶消化3 min,然后用PBS终止消化。离心收集细胞,弃上清,用PBS洗1遍,用100 μL含2% FBS的PBS重悬细胞,添加1 μL流式抗体后,避光4 °C孵育30 min。抗体孵育完毕后,直接加1 mL PBS洗1遍细胞,随后用300 μL重悬细胞,利用canto II流式细胞分析仪进行分析检测。

1.7 统计学分析

利用Graph Pad Prism 6.0软件统计实验数据并分析后制作图表。以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)来表示数据,采用t检验进行统计学分析,统计数据组间差异,以 $P < 0.05$ 为差异界定有统计学意义。

2 结果

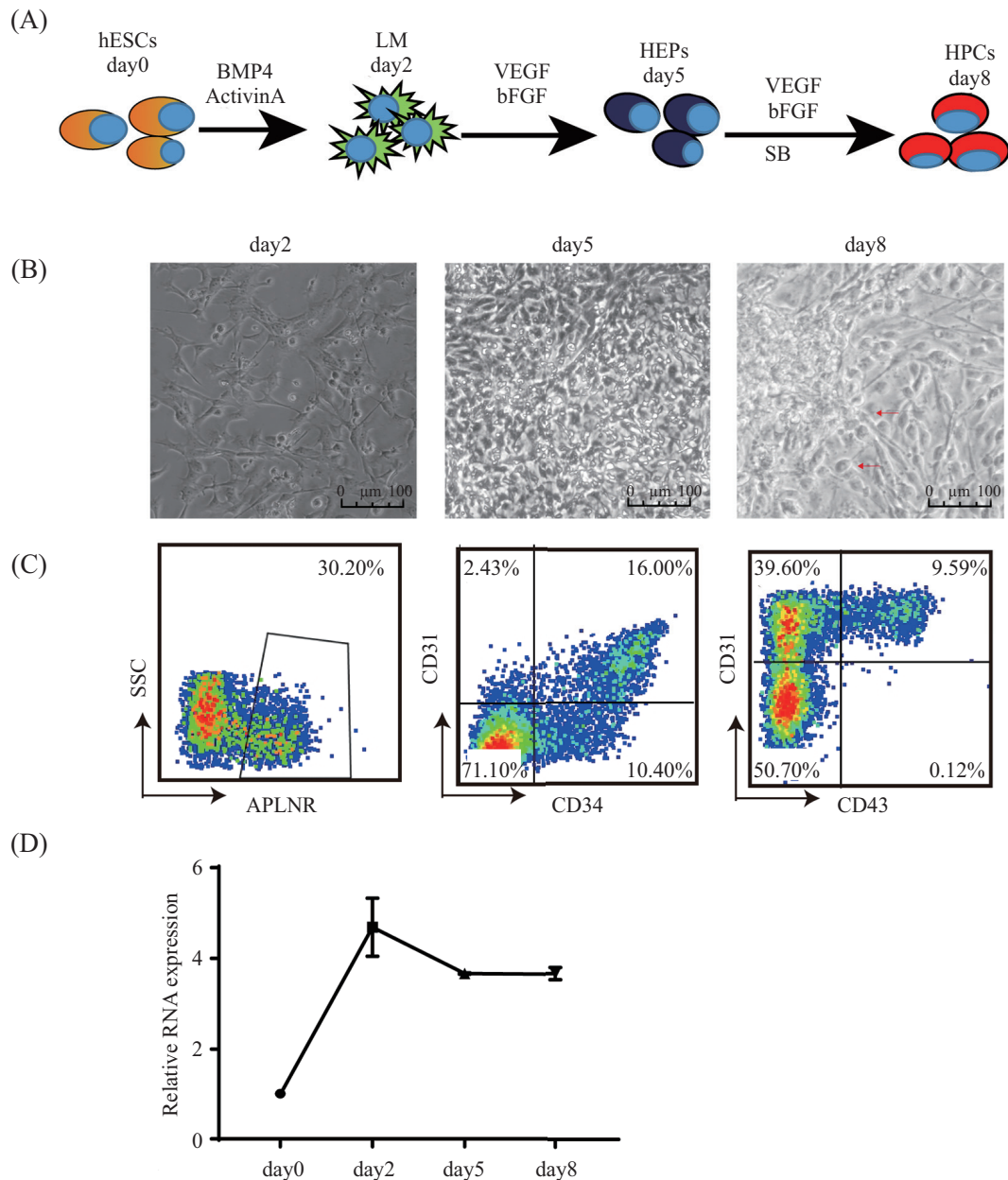
2.1 单层造血分化体系中*SETD8*表达呈动态变化

选择健康的hESCs,基于单层诱导人胚胎干细胞向造血分化模型进行诱导分化(图1A)。添加细胞因子BMP4、ActivinA后,细胞经历2天的生长铺展开(图1B),此时已经有部分细胞表达APLN⁺(比例为30.2%),代表侧板中胚层细胞已有部分形成(图1C)。然后细胞更换因子为bFGF、VEGF(图1A),再经历3天的分化形成表面标志物为CD31、CD34的生血内皮细胞(比例为16%)(图1B和图1C)。添加细胞因子SB继续培养,在day 8时可以检测到球形状的CD43标志的造血干祖细胞的产生(比例为9.59%)(图1B和图1C)。

基于此模型,分别在day0、day2、day5、day8收集总体细胞后提取RNA,做RT-qPCR验证。分析数据结果显示,*SETD8*在单层造血分化过程中成动态变化,总体成上升趋势。第0到2天,*SETD8*基因表达水平明显升高(较day0相比约4.6倍)(图1D)。综上所述表明,*SETD8*可能参与早期造血的发生过程。

2.2 利用CRISPR/Cas9技术建立敲除*SETD8*基因的H1细胞株

针对*SETD8*基因编码区域Exon1和Exon2分别设计特异性sgRNA(图2A)。Western blot验证H1细



A: 单层造血分化模式图; B: 单层造血分化光镜图, 箭头表示球型的造血干细胞; C: 造血分化流式图; D: RT-qPCR检测*SETD8*表达情况。

A: monolayer hematopoietic differentiation model; B: monolayer hematopoietic differentiation, arrow directs hematopoietic stem and progenitor cells; C: flow cytometry analyses of hematopoietic differentiation; D: *SETD8* mRNA relative expression in hematopoietic differentiation was measured by RT-qPCR.

图1 单层造血分化体系及*SETD8*的表达情况

Fig.1 Monolayer hematopoietic differentiation system and expression of *SETD8*

胞株*SETD8*基因的敲除情况(图2B)。测序鉴定确定*SETD8*基因移码突变, 成功敲除。最终得到两株*SETD8*^{-/-}细胞株。测序鉴定结果(图2C)显示两株均为纯合敲除株, CRISPR/Cas9技术敲除策略有效。

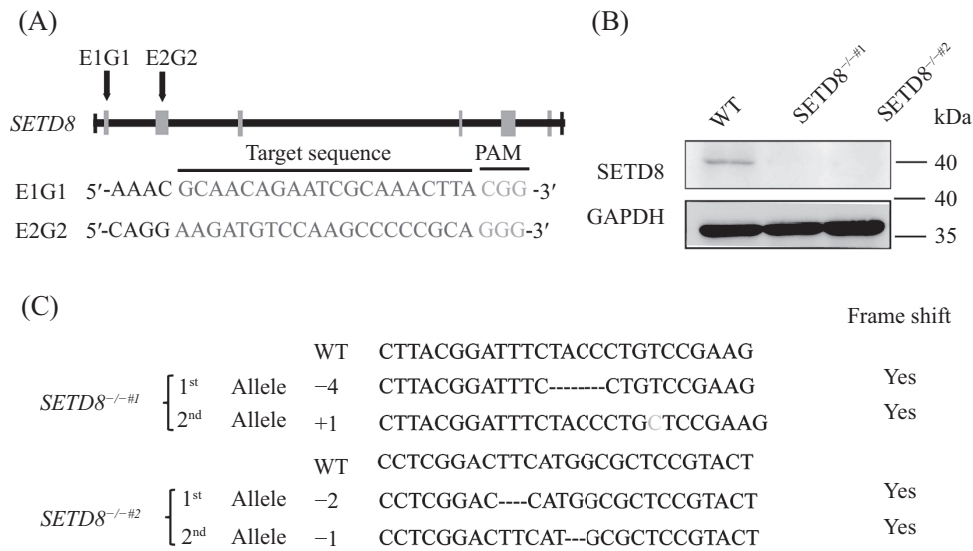
2.3 敲除*SETD8*后影响hESC的多能性

为了探究*SETD8*敲除后是否对维持胚胎干细胞多潜能性有影响。我们检测了*SETD8*敲除细胞

株中*OCT4*、*SOX2*、*NANOG*的表达。RT-qPCR结果证明*SETD8*敲除后的细胞, 其*OCT4*和*NANOG*表达量明显减少(图3A)。这与Western blot结果一致(图3B)。可以证明*SETD8*敲除后会导致多潜能性维持的关键基因受到影响。

2.4 敲除*SETD8*抑制hESC向造血分化进程

为了探究*SETD8*的敲除是否会影响中胚层的形成及内皮生血过程, 利用获得的两株*SETD8*^{-/-}

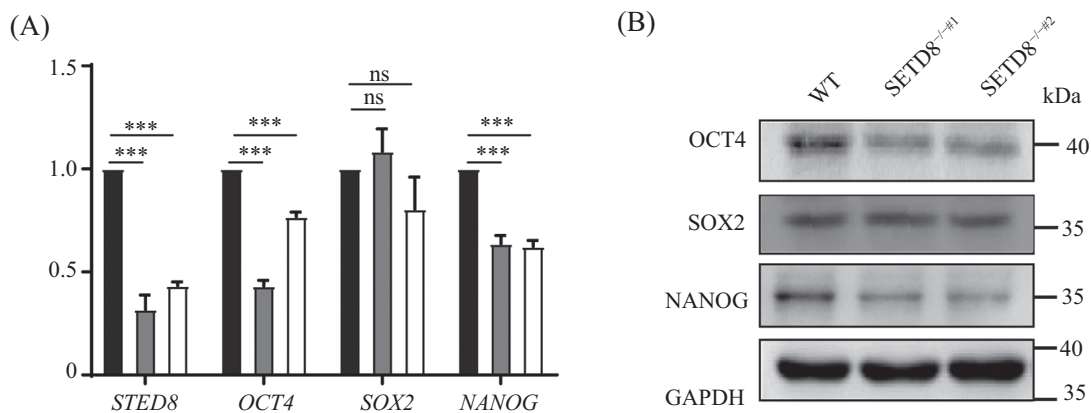


A: *SETD8*基因敲除株构建策略; B: Western blot检测SETD8蛋白表达; C: *SETD8*基因测序结果, 碱基缺失后产生移码突变。

A: the strategy of *SETD8* knockout cell line construction; B: SETD8 protein expression in *SETD8*^{-/-} cells was measured by Western blot; C: the sequencing result of *SETD8*, both alleles generated frameshift mutation.

图2 *SETD8*敲除策略及*SETD8*敲除结果

Fig.2 *SETD8* knockout strategy and *SETD8* knockout results



A: RT-qPCR结果; ****P*<0.001, ns 代表无统计学差异; B: Western blot验证结果, 由上至下分别是OCT4、SOX2、NANOG及GAPDH。

A: *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* mRNA relative expression level was measured by RT-qPCR analysis, ****P*<0.001, ns represents no statistical difference; B: OCT4, SOX2, NANOG protein relative expression level was measured by Western blot.

图3 检测SETD8敲除株的多能性

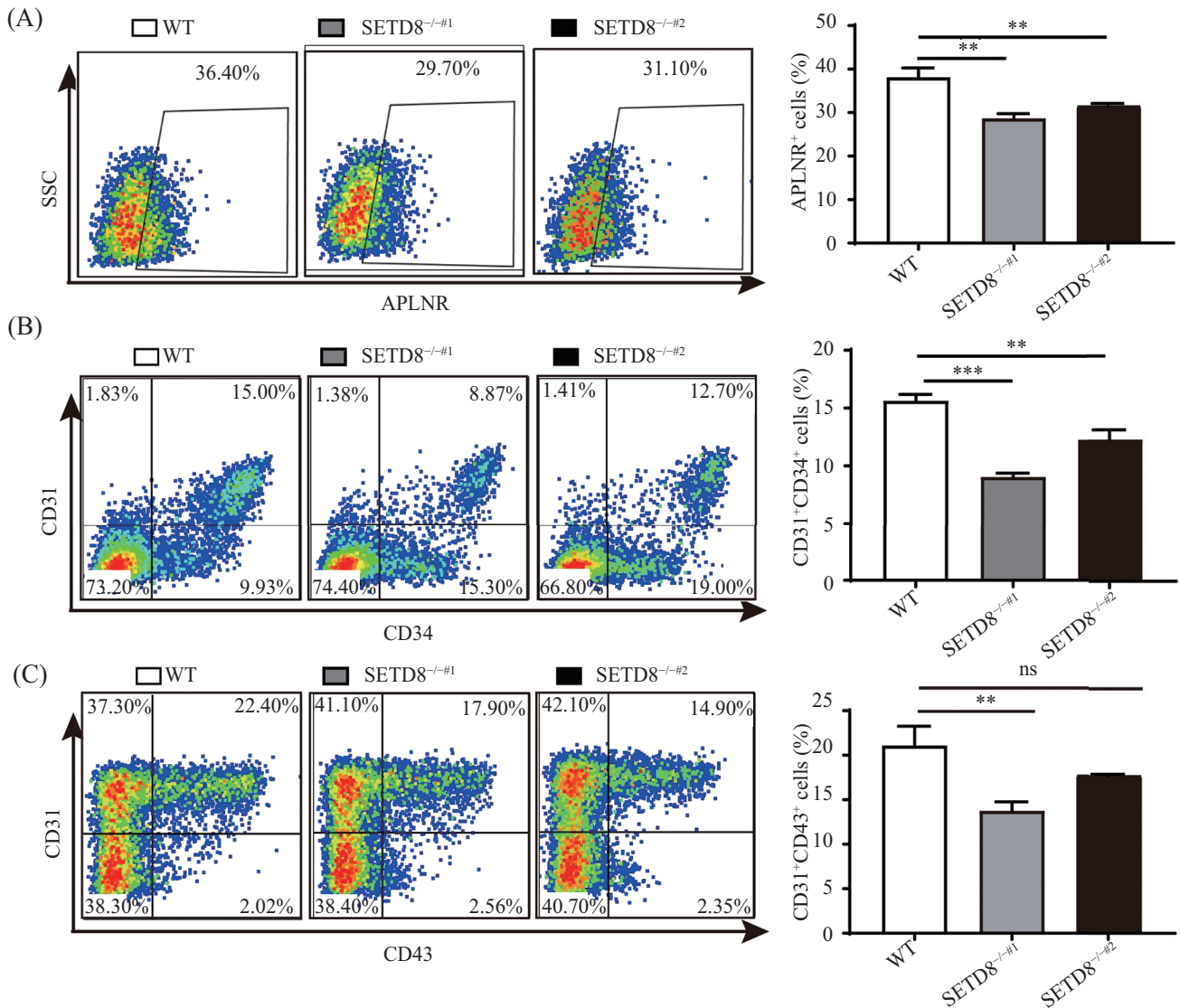
Fig.3 Pluripotency of *SETD8* knockout cells

细胞株进行单层造血分化实验。我们利用流式分析技术分别检测day2、day5、day8表面标志物的表达情况, 结果显示与对照组相比, *SETD8*敲除株产生的侧板中胚层阳性细胞比例平均降低6%(图4A); *SETD8*敲除后会导致生血内皮细胞(CD31、CD34双阳性细胞)比例由15%下降至10%左右(图4B); *SETD8*敲除后也导致造血前体细胞(CD31、CD43双阳性细胞)比例下降5%~8%(图4C)。综上所述, *SETD8*敲除后影响了胚胎干细胞向造血分化

的进程。

2.5 *SETD8*调控生血内皮及造血干祖细胞的产生

为了探究*SETD8*对于造血分化进程的影响是由于影响中胚层(day2)后导致后期分化受限制, 还是参与整个单层造血分化过程。我们选择跨越中胚层发生后, 利用RNA干扰(RNAi)技术敲减*SETD8*, 探究*SETD8*的敲减是否还会影响造血分化进程。目前该技术已经广泛用于基因功能研究^[29]。首先我们在H1细胞系中添加siRNA, 证实所用的siRNA



A: 流式分析检测野生型、SETD8^{-/-}#1、SETD8^{-/-}#2中APLNR⁺细胞比例; B: 流式分析检测野生型、SETD8^{-/-}#1、SETD8^{-/-}#2中CD31⁺CD34⁺细胞的比例; C: 流式分析检测野生型、SETD8^{-/-}#1、SETD8^{-/-}#2中CD31⁺CD43⁺细胞的比例, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: flow cytometry analysis of APLNR⁺ expression of WT, SETD8^{-/-}#1 and SETD8^{-/-}#2 cell lines; B: flow cytometry analysis of CD31⁺ and CD34⁺ expression of WT, SETD8^{-/-}#1 and SETD8^{-/-}#2 cell lines; C: flow cytometry analysis of CD31⁺ and CD43⁺ expression of WT, SETD8^{-/-}#1 and SETD8^{-/-}#2 cell lines, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图4 野生型细胞及SETD8敲除株的早期造血分化能力比较

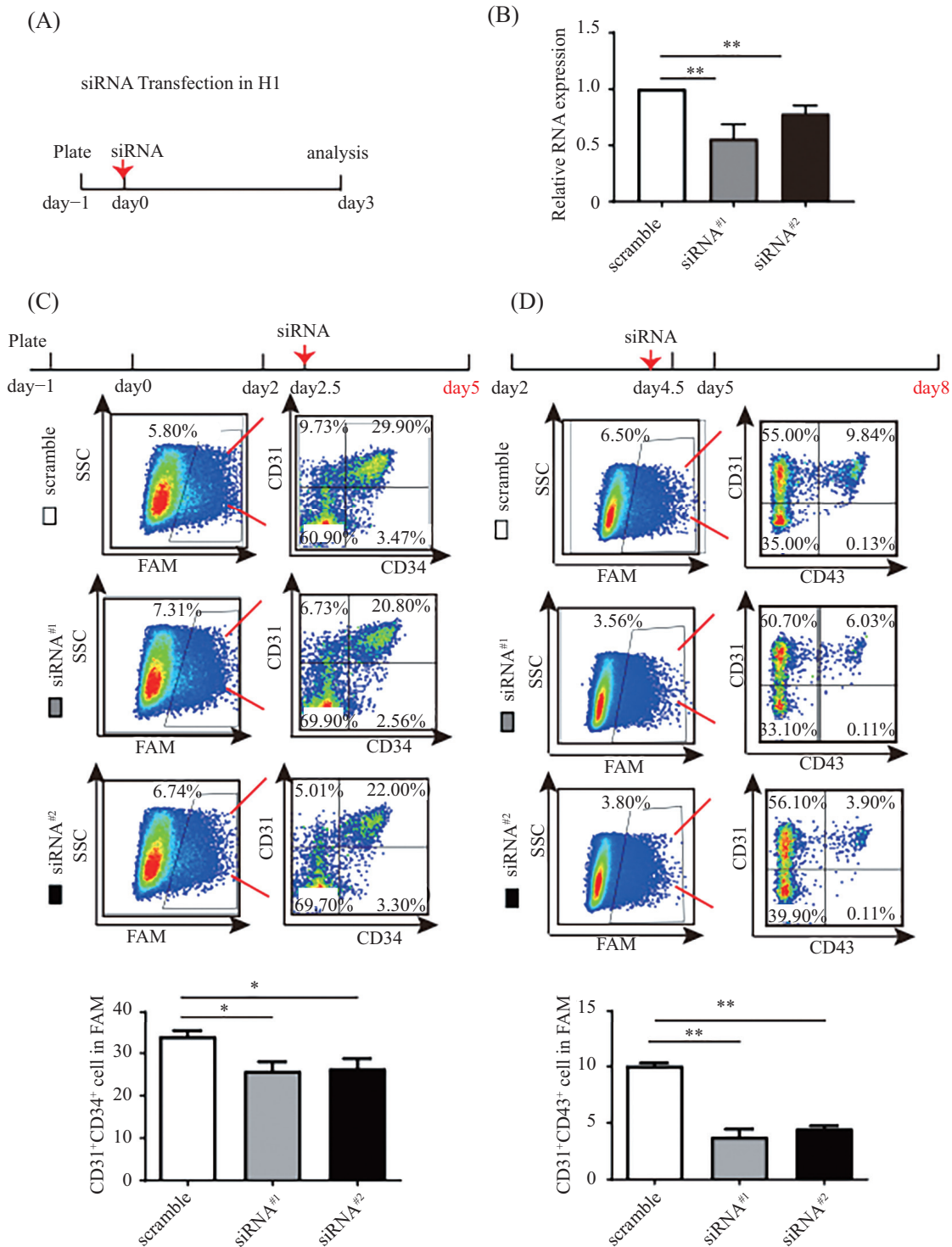
Fig.4 Comparison of hematopoietic differentiation ability in WT and SETD8^{-/-}

可以使SETD8达到敲减的效果(图5A和图5B)。选择在第2.5天添加siRNA后检测生血内皮细胞(图5C),选择FAM为阳性的细胞群体进行分析。结果显示,当在内皮生血阶段抑制SETD8后,说明会抑制SETD8基因的表达,会导致生血内皮细胞产生受到抑制,比例由29%降至21%(图5C)。在第4.5天添加siRNA后检测造血干祖细胞的产生(图5D),选择FAM为阳性的细胞群体进行分析。结果显示,当SETD8基因在EHT阶段表达降低时,会影响单层分

化中造血干祖细胞的比例,比例由9%降至4.5%(图5D),这说明SETD8调控生血内皮及造血干祖细胞的产生,缺少SETD8对造血分化的影响很可能是伴随整个分化进程的,而不是仅仅影响某一个阶段。

3 讨论

表观遗传修饰包括组蛋白修饰、DNA甲基化等,近年来其强大功能逐渐被解析,更多表观相关基因的功能亟待挖掘。SETD8作为组蛋白赖氨酸甲基转



A: 在H1中添加siRNA示意图; B: RT-qPCR检测scramble、siRNA^{#1}、siRNA^{#2}中SETD8表达情况; C: 上图为在造血分化进程中添加siRNA示意图, 中图为检测CD31⁺、CD34⁺标志物表达情况的流式数据图, 下为scramble、siRNA^{#1}、siRNA^{#2}中生血内皮细胞比例统计图; D: 上图为在造血分化进程中添加siRNA示意图, 中图为检测CD31⁺、CD43⁺标志物表达情况的流式数据图, 下为scramble、siRNA^{#1}、siRNA^{#2}中造血干祖细胞比例统计图, **P*<0.05, ***P*<0.01。

A: siRNA was added in H1 cell line; B: *SETD8* mRNA relative expression level was measured by RT-qPCR analysis, ***P*<0.01; C: above the picture is the sketch of add siRNA in hematopoiesis differentiation, the middle is flow cytometry analysis of CD31⁺ and CD34⁺ expression of scramble, siRNA^{#1} and siRNA^{#2} cell lines, the bottom is the statistic of HEPs expression of scramble, siRNA^{#1} and siRNA^{#2} cell lines; D: above the picture is the sketch of add siRNA in hematopoiesis differentiation, the middle is flow cytometry analysis of CD31⁺ and CD43⁺ expression of scramble, siRNA^{#1} and siRNA^{#2} cell lines, the bottom is the statistic of HPCs of scramble, siRNA^{#1} and siRNA^{#2} cell lines, **P*<0.05, ***P*<0.01.

图5 阶段性敲减SETD8对早期造血分化的影响

Fig.5 Knockdown *SETD8* influences hematopoietic differentiation

移酶家族的重要成员,其是否参与细胞早期命运决定作用仍然未知。为了研究该基因是否在造血过程中起作用,我们首先利用RT-qPCR实验证实,*SETD8*在人胚胎干细胞向造血干祖细胞发育过程中基因表达动态变化。因此我们猜测,*SETD8*可能对于造血发育过程有重要作用。为了证实这个猜测,本研究利用目前得到研究者的广泛认可的CRISPR/Cas9技术作为基因组编辑工具。基于此技术,本研究中构建了*SETD8*^{-/-}细胞株后,首先对敲除*SETD8*的H1细胞系进行细胞多能性检测。检测中发现,*SETD8*敲除后很有可能导致多能性关键基因*OCT4*、*NANOG*的表达水平下降。暗示*SETD8*对维持人胚胎干细胞的多能性具有重要作用。由于*SETD8*在造血发育过程动态表达,我们猜测*SETD8*敲除影响多能性基因表达可能会导致造血发育过程的异常。功能研究表明,敲除*SETD8*导致造血发育各个阶段标志性基因的表达量均降低。这个结果暗示*SETD8*敲除影响造血分化进程,可能是通过调控多能性基因的表达实现的。由于*SETD8*直接的敲除已经导致干细胞的多能性改变,造血分化第一阶段侧板中胚层的产生已经被抑制,后续生血内皮和造血干祖细胞产生很可能是由于层板中胚层产生减少导致的,我们并不能确定*SETD8*是否能够直接调控生血内皮和造血干祖细胞的产生。为了确定这个问题,我们利用了siRNA分别在造血发育生血内产生时期或者造血干祖细胞产生时期敲低*SETD8*,发现生血内皮和造血干祖细胞的产生依然受抑制。

以上结果表明,*SETD8*可以直接调控多能性基因的表达,已有研究证实,*SETD8*可以通过甲基化*LIN28A*使其滞留在核仁从而抑制*pri-let7*转变为成熟的*let7*,通过抑制*let7*的表达来间接调控人胚胎干细胞多能性^[29]。wang等^[30-31]发现,*OCT4*的缺失会导致如*T*、*EOMES*、*TBX18*等重要中胚层基因表达水平的下降。Guo等^[32]发现,*NANOG*可以与*YBX1*和*ILF3*结合,正向调控*YBX1*和*ILF3*的表达,而*YBX1*和*ILF3*的下调会导致中胚层标志物的减少,因此*NANOG*也间接参与中胚层的调控。不过*SETD8*是否通过甲基化*OCT4*和*NANOG*来调控其表达量需要进一步验证;*SETD8*敲低和敲除实验证明其可以调控人胚胎干细胞来源的体外造血发育的各个阶段,不过目前结论停留在侧板中胚层细胞、生血内皮细胞、造血前体细胞的比例降低,并未研究三类细胞的功能是否有缺陷,这值得我们进行更加深入的研究和探讨。

Kim等^[29]发现,*SETD8*可以通过甲基化多能性因子*LIN28A*进而影响与胚胎干细胞自我更新相关的基因*let-7*的表达。*SETD8*在H1细胞系中敲除后是否影响H1的自我更新能力本文未做研究。由于人胚胎干细胞向造血干祖细胞发育的过程是一个严格有序且精密的调控过程,*SETD8*如何调控早期造血分化,以及是否通过其甲基化修饰,其具体作用机制有待进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Thomson JA, Itskovitz EJ, Shapiro S, Waknitz M, Swiergiel J, Marshall V, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- 2 Benhur T, Idelson M, Khaner H, Pera M, Reinhartz E, Itzik A, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats. *Stem Cells* 2004; 22(7): 1246-55.
- 3 Schulz TC, Noggle SA, Palmarini GM, Weiler DA, Lyons IG, Pensa KA, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to dopaminergic neurons in serum-free suspension culture. *Stem Cells* 2004; 22(7): 1218-38.
- 4 Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitzeldor J, Langer R. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *PNAS* 2002; 99(7): 4391-6.
- 5 Laflamme MA, Chen KY, Aumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 2007; 25(9): 1015-24.
- 6 Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* 2007; 45(5): 1229-39.
- 7 Shim JH, Kim SE, Woo DH, Kim SK, McKay R, Kim JH, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate. *Diabetologia* 2007; 50(6): 1228-38.
- 8 Wang P, Rodriguez RT, Wang J, Ghodasara A, Kim SK. Targeting SOX17 in human embryonic stem cells creates unique strategies for isolating and analyzing developing endoderm. *Cell Stem Cell* 2011; 8(3): 335-46.
- 9 Zhang P, Li J, Tan Z, Wang C, Liu T, Chen L, et al. Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood* 2008; 111(4): 1933-41.
- 10 Rafii S, Kloss CC, Butler JM, Ginsberg M, Gars E, Lis R, et al. Human ESC-derived hemogenic endothelial cells undergo distinct waves of endothelial to hematopoietic transition. *Blood* 2013; 121(5): 770-80.
- 11 Choi KD, Vodyanik MA, Togarrati PP, Suknutha K, Kumar A, Samarjeet F, et al. Identification of the hemogenic endothelial progenitor and its direct precursor in human pluripotent stem cell differentiation cultures. *Cell Rep* 2012; 2(3): 553-67.
- 12 Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, Allen T, Kouskoff V, Lacaud G. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 2009; 457(7231): 892-5.

- 13 Kuvardina ON, Herglotz J, Kolodziej S, Kohrs N, Herk S, Wojcik B, *et al.* RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation. *Blood* 2015; 125(23): 3570-9.
- 14 Hopfer O, Nolte F, Mossner M, Komor M, Kmetsch A, Benslasfer O, *et al.* Epigenetic dysregulation of GATA1 is involved in myelodysplastic syndromes dyserythropoiesis. *Eur J Haematol* 2012; 88(2): 144-53.
- 15 Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, Goldfarb AN. RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood* 2003; 101(11): 4333-41.
- 16 Yu BD, Hess JL, Horing SE, Brown GA, Korsmeyer SJ. Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* 1995; 378(6556): 505-8.
- 17 Kamminga LM, Bystrykh LV, Deboer A, Houwer S, Douma J, Weersing E, *et al.* The Polycomb group gene *Ezh2* prevents hematopoietic stem cell exhaustion. *Blood* 2006; 107(5): 2170-9.
- 18 Nishioka K, Rice JC, Sarma K, Chuikov S, Werner J, Wang Y, *et al.* PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell* 2002; 9(6): 1201-13.
- 19 Milite C, Feoli A, Viviano M, Rescigno D, Mai A, Castellano S, *et al.* Progress in the Development of Lysine Methyltransferase SETD8 Inhibitors. *Chem Med Chem* 2016; 11(16): 1680-5.
- 20 Wu S, Rice J. A new regulator of the cell cycle: the PR-Set7 histone methyltransferase. *Cell Cycle* 2011; 10(1): 68-72.
- 21 Zhu J, Dou Z, Sammons MA, Levine AJ, Berger SL. Lysine methylation represses p53 activity in teratocarcinoma cancer cells. *PNAS* 2016; 113(35): 9822-7.
- 22 Veschi V, Thiele CJ. High-SETD8 inactivates p53 in neuroblastoma. *Onco science* 2017; 4(3-4): 21-2.
- 23 Hou L, Li Q, Yu Y, Li M, Zhang D. SET8 induces epithelialmesenchymal transition and enhances prostate cancer cell metastasis by cooperating with ZEB1. *Mol Med Rep* 2016; 13(2): 1681-8.
- 24 Liu B, Zhang X, Song F, Liu Q, Dai H, Zheng H, *et al.* A functional single nucleotide polymorphism of SET8 is prognostic for breast cancer. *Onco targets* 2016; 7(23): 34277-87.
- 25 Chen T, Ren H, Thakur A, Yang T, Li Y, Zhang S, *et al.* miR-382 inhibits tumor progression by targeting SETD8 in non-small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother* 2017; 86: 248-53.
- 26 Oda H, Okamoto I, Murphy N, Chu J, Price SM, Shen MM, *et al.* Monomethylation of histone H4-lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development. *Mol Cell Biol* 2009; 29(8): 2278-95.
- 27 Malik J, Lillis JA, Couch T, Getman M, Steiner LA. The Methyltransferase *Setd8* Is Essential for Erythroblast Survival and Maturation. *Cell Rep* 2017; 21(9): 2376-83.
- 28 Fischer S. RNA Interference and MicroRNA-Mediated Silencing. *Curr Protoc Mol Biol* 2015; 112(26): 11-5.
- 29 Kim SK, Lee H, Han K, Kim SC, Choi Y, Park SW, *et al.* SET7/9 methylation of the pluripotency factor LIN28A is a nucleolar localization mechanism that blocks let-7 biogenesis in human ESCs. *Cell Stem Cell* 2014; 15(6): 735-49.
- 30 Wang Z, Oron E, Nelson B, Razis S, Ivanova N. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2012; 10(4): 440-54.
- 31 Babaie Y, Herwig R, Greber B, Brink TC, Wruck W, Groth D, *et al.* Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007; 25(2): 500-10.
- 32 Guo C, Xue Y, Yang G, Yin S, Shi W, Cheng Y, *et al.* Nanog RNA-binding proteins YBX1 and ILF3 affect pluripotency of embryonic stem cells. *Cell Biol Int* 2016; 40(8): 847-60.