

# 拟南芥根端干细胞DNA甲基化的动态变化及其对 $\gamma$ -氨基丁酸响应的模式研究

王圣洁 崔国鹏 覃瑞 刘虹 龚汉雨 李刚 余光辉\*

(武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 南方少数民族地区资源保护综合利用联合工程中心, 中南民族大学生命科学院, 武汉 430074)

**摘要** 为探讨 $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)对DNA胞嘧啶(C)甲基化(5mC)可能的调节机制, 该研究以拟南芥的根和愈伤组织为研究材料, 分析了经 $\gamma$ -氨基丁酸处理后, 5mC的含量及其对GABA信号的响应规律。结果表明, GABA处理显著降低了拟南芥根中DNA 5mC的含量, 增加了5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)含量; 但GABA处理增加了根愈伤组织中5mC含量, 降低了5mC的去甲基化过程。这一现象在愈伤组织来源的静止中心细胞(*pWOX5*-GFP特异性标记)及其周围的干细胞(surrounding stem cells)的继代培养的愈伤组织中得到了进一步验证。研究结果证实了外源性GABA信号触发的DNA甲基化的动态变化在拟南芥的根及其愈伤组织的生长中对GABA的响应具有不同的调节模式, 这种模式可能与GABA对干细胞的分裂和干细胞命运的维持有关。

**关键词**  $\gamma$ -氨基丁酸; 静止中心; 5-甲基胞嘧啶; 5-羟甲基胞嘧啶; 干细胞

## Dynamic Changes of DNA Methylcytosine in *Arabidopsis* Root Stem Cells and Their Responses to $\gamma$ -aminobutyric Acid

Wang Shengjie, Cui Guopeng, Qin Rui, Liu Hong, Gong Hanyu, Li Gang, Yu Guanghui\*

(Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plants in Wuling Area of China, Engineering Research Centre for the Protection and Utilization of Bioresource in Ethnic Area of Southern China, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

**Abstract** In order to study  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) on cytosine methylation (5mC) in genomic DNA and its possible regulatory mechanisms, we use *Arabidopsis* roots and root calluses as the research materials to analyze 5mC content and its responding mechanism to GABA signal. The results showed that GABA (1.0 mmol/L) treatment significantly decreased 5mC content in *Arabidopsis* root, and concurrently increased 5-hydroxymethyl cytosine (5hmC) content. In contrast, GABA had increased the content of 5mC in the calluses arising from roots, and reduced the product of 5mC demethylation (via 5hmC). This phenomenon was also observed and validated in the subculture of callus deriving from quiescent centre cells (*pWOX5*-GFP marker) and their surrounding stem cells. Our results demonstrated time that the dynamic changes of DNA methylation triggered by exogenous GABA signal had different patterns in *Arabidopsis* growing roots and their calluses. These different patterns are possibly linked with cell division and the maintenance of stem cell fate.

**Keywords**  $\gamma$ -aminobutyric acid; quiescent center; 5-methylcytosine; 5-hydroxyl methylcytosine; stem cell

收稿日期: 2015-04-26 接受日期: 2015-07-13

国家自然科学基金(批准号: 31270361)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 027-67842689, E-mail: yusheen@163.com

Received: April 26, 2015 Accepted: July 13, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31270361)

\*Corresponding author. Tel: +86-27-67842689, E-mail: yusheen@163.com

网络出版时间: 2015-08-03 11:14:48

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150803.1114.001.html>

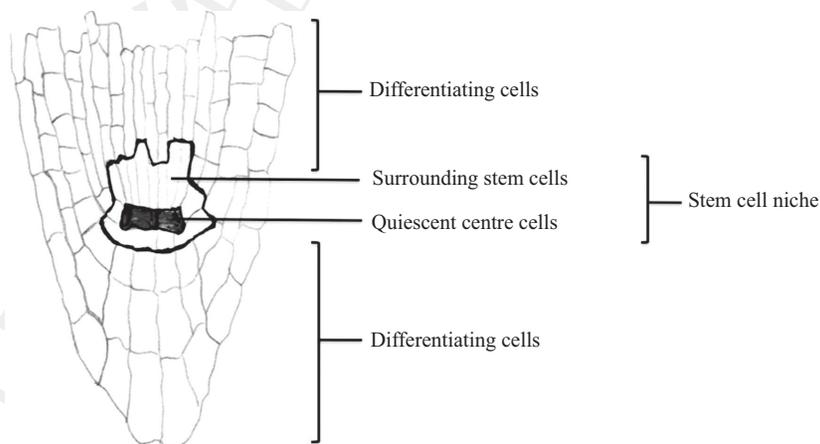
在拟南芥根尖中, 静止中心细胞(quiescent centre cells, QCs)通常为2~4个, 其分裂比较缓慢, 周围为静止中心细胞初始形成的干细胞, 由于这些干细胞围绕在静止中心周围, 故命名为周围干细胞(surrounding stem cells, SSCs)(图1)。由静止中心细胞及其周围的干细胞共同组成了干细胞龛(stem cell niche)。植物根的表皮、皮层细胞、根冠层细胞以及维管束细胞都是由干细胞龛细胞分化形成的(图1)<sup>[1-2]</sup>。

DNA甲基化通常指DNA胞嘧啶第5位碳原子上甲基基团的添加(5mC)。DNA甲基化能引起染色质结构、DNA构象、DNA稳定性及DNA与蛋白质相互作用方式的改变, 从而控制基因表达。DNA的甲基化在植物发育过程中起着重要的调节作用, 多种环境因子如逆境胁迫和植物的内/外源性因子会触发DNA甲基化的动态变化<sup>[3]</sup>。

离体培养的植物细胞命运的转换在很大程度上取决于染色质结构的改变。细胞去分化或转分化重新进入细胞周期的过程伴随着较大范围的染色质去压缩的过程<sup>[4]</sup>。在植物细胞的愈伤组织诱导和培养过程中, 细胞周期的重新激活通常需要植物生长调节剂的添加, 但植物细胞全能性的维持似乎又不单纯依赖于生长调节剂的诱导<sup>[5]</sup>。研究表明, 细胞全能性的实现涉及到细胞的重编程过程, 基因组DNA的甲基化和去甲基化发挥着重要的调节作用<sup>[6]</sup>。

$\gamma$ -氨基丁酸(GABA)是一种非蛋白组分的氨基酸, GABA源于谷氨酸, 在谷氨酸脱羧酶

(glutamic acid decarboxylase, GAD)与转氨酶(GABA transaminase, GABA-T)的作用下转化成琥珀酸半醛(succinic acid semialdehyde, SSA), 然后在琥珀酸半醛脱氢酶(succinic acid half aldehyde dehydrogenase, SSADH)的作用下进入三羧酸循环。研究表明, GAD存在于细胞质基质中, 而GABA-T和SSADH存在于线粒体, 因此存在着GABA的跨线粒体膜的转运<sup>[7-9]</sup>。GABA可以作为植物的临时氮源, 维持C/N平衡、调节胞质的pH、应对逆境胁迫等; 还可以作为信号分子, 在植物的发育中起着重要的调节作用<sup>[7-9]</sup>。研究表明, 植物在生存环境变化时, GABA可以作为一种信号分子, 响应植物受到的胁迫, 尤其是当植物遭受高盐、寒冷、高温、干旱胁迫时, GABA在植物中的含量会成倍增加<sup>[10]</sup>。前期的研究表明, GABA可以作为一种外源性信号促进花粉管的生长并且可以调节Ca<sup>2+</sup>和K<sup>+</sup>的流向<sup>[11-12]</sup>。神经干细胞的研究表明, GABA可以通过受体介导的信号通路促进组蛋白H2AX的磷酸化作用, 从而导致胚胎干细胞(embryonic stem cell)和神经管嵴干细胞(neural crest stem cell)停滞在S期<sup>[13]</sup>。但GABA是否可以作为一种外源性信号触发DNA甲基化的动态变化参与对植物干细胞命运的调节尚未见报道。本研究以拟南芥的根及其愈伤组织以及静止中心细胞和周围干细胞的愈伤组织为研究对象, 探讨了根端干细胞分化和去分化过程中DNA甲基化的动态模式对GABA信号响应的规律, 为深入解析GABA在植物根端干细胞分裂分化中的调控机制提



拟南芥根尖中由静止中心细胞和周围干细胞组成的干细胞龛(黑色轮廓线标注)分化形成各种组织。

In *Arabidopsis* root tip, stem cell niche (marked by black outline) constituting of quiescent centre cells and surrounding stem cells differentiated into surrounding different tissues.

图1 拟南芥根尖纵切面示意图(根据参考文献[1-2]修改)

Fig.1 Schematic longitudinal section of the *Arabidopsis* root tip (modified from references [1-2])

供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 拟南芥根愈伤组织的诱导和培养

种子用氯气消毒氧化杀菌3~4 h。在超净工作台中,用灭菌的竹签将种子点种在含有MS培养基(不含蔗糖, pH5.8)的方形塑料培养皿(10 cm×10 cm)上,用封口膜密封,放置于4 °C冰箱春化3 d,然后取出放置于温室中培养(16/8光、暗循环,温度为22 °C)。

愈伤组织的诱导:取7 d龄的无菌幼苗,在超净工作台上,切取含根尖的小段(3~4 mm),将其置于愈伤组织诱导的培养基上,用封口膜密封后在25 °C恒温培养箱中培养。根愈伤组织的诱导培养基为:MS+0.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT+2%蔗糖+1%琼脂(195.2 mg/L MES, pH5.8)。

### 1.2 静止中心细胞的剥离与纯化

用激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM700, 德国Zeiss公司)观察7 d龄的拟南芥根的静止中心细胞,并拍照。静止中心细胞中用*pWOX5*-GFP特异性标记[稳定转染的种子由Ben Scheres教授(Wageningen University Research)惠赠]。在荧光体式显微镜(SMZ1500, NiKon公司)下,用解剖针将根愈伤组织中根端绿色的细胞进行剥离,然后在诱导培养基(成分同前)上进行继代培养,使细胞扩增,达到实验要求的量。

### 1.3 $\gamma$ -氨基丁酸处理

将带有绿色荧光的静止中心愈伤组织块在添加1.0 mmol/L GABA(Sigma公司)的培养基中继代培养2周。

### 1.4 DNA甲基化和羟甲基化含量测定

拟南芥7 d龄根、根愈伤组织以及分离纯化含有静止中心和周围干细胞的愈伤组织用新型快速植物基因组DNA提取试剂盒(离心柱型, BioTeke公司)进行DNA抽提,提取步骤按照说明书进行操作。DNA的浓度用NanoDrop2000(Thermo Scientific公司)进行检测。上述组织以及愈伤组织继代培养的细胞中添加 $\gamma$ -氨基丁酸(1.0 mmol/L GABA)作为实验的处理组,其DNA也按照上述方法进行抽提。

甲基化以及羟甲基化检测:DNA甲基化(5mC)和羟甲基化(5hmC)的定量测定用试剂盒(Epigenetek公司)进行比色法检测,检测用Tecan Infinite M200 Pro多功能酶标仪(Tecan公司)在450 nm处进行比色

测定。5mC和5hmC的含量严格按照说明书的方法进行操作和计算。

### 1.5 数据统计分析

每个数据为2~3次独立实验的平均值±标准差,差异显著性用*t*学生实验进行分析, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

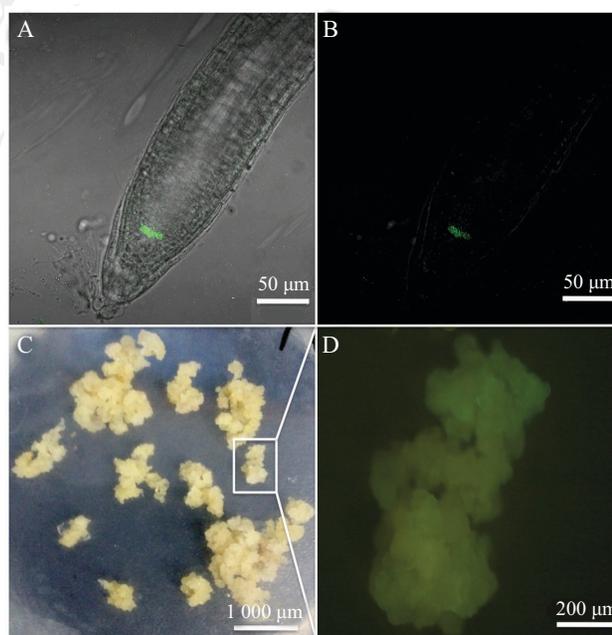
## 2 结果

### 2.1 *pWOX5*-GFP标记静止中心细胞的分离与纯化

用*pWOX5*-GFP特异性标记拟南芥根端静止中心细胞,证实根部含有GFP标记细胞(图2A和图2B)。将这些愈伤组织诱导培养3周后,出现明显的带有GFP的愈伤组织块(图2C);经多次分离继代后,得到纯化的静止中心细胞的愈伤组织(图2D)。绿色细胞的相对绿色深浅代表着静止中心细胞特征的维持(绿色较深)以及其分化的过程(绿色较浅)。

### 2.2 GABA处理对根和愈伤组织DNA甲基化影响模式

在 $\gamma$ -氨基丁酸添加到培养基2周后,分析静止中

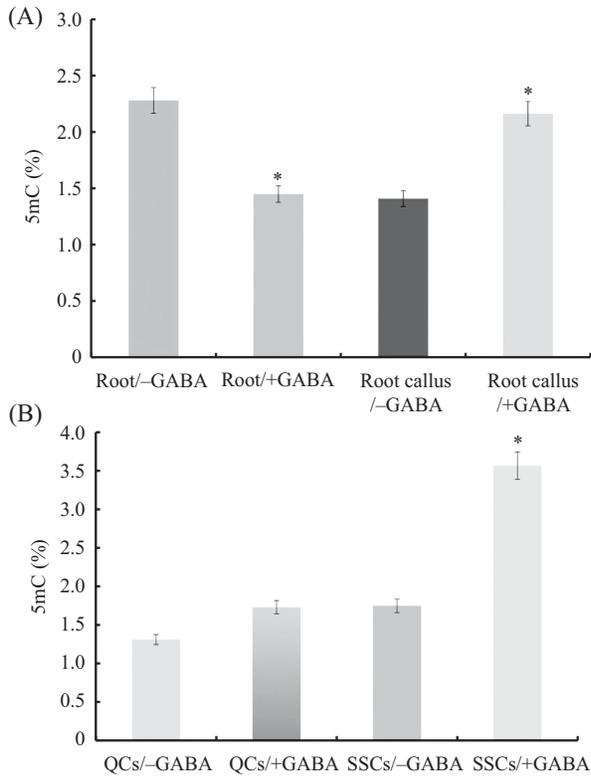


A: 明视野和荧光下的拟南芥根; B: 拟南芥根的荧光观察; C: 明视野下根的愈伤组织; D: 根的愈伤组织的荧光观察。其中绿色部分为*pWOX5*-GFP标记。

A: *Arabidopsis* root under bright and fluorescence field; B: *Arabidopsis* root under fluorescence field; C: calluses of root under bright field; D: callus of root under fluorescence field. Green fluorescence is the label of *pWOX5*-GFP marker.

图2 拟南芥静止中心细胞的分离与继代培养

Fig.2 Isolation and subculture of *Arabidopsis* quiescent center cells

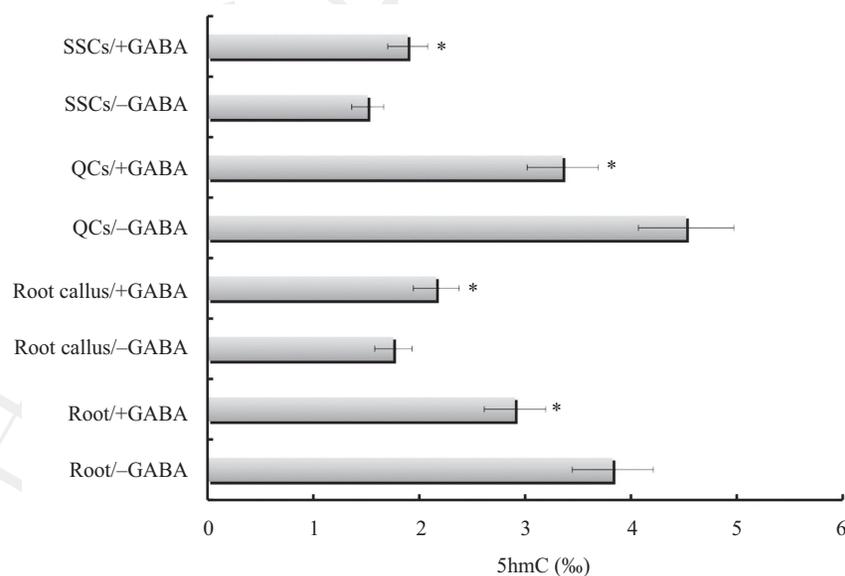


A: 拟南芥根及其愈伤组织的5mC水平; B: QCs及其周围干细胞的5mC水平。\* $P < 0.05$ , 施加GABA与未施加GABA相比较。

A: the DNA methylation levels of root and root callus; B: the DNA methylation levels of QCs and SSCs. \* $P < 0.05$ , GABA treated group vs untreated group.

图3 根和根的愈伤组织基因组DNA甲基化(5mC)的水平及其对GABA信号的响应

Fig.3 DNA methylation (5mC) of root and root callus and their methylation levels respond to GABA signal



\* $P < 0.05$ , 施加GABA与未施加GABA相比较。

\* $P < 0.05$ , GABA treated group vs untreated group.

图4 根和根愈伤组织基因组DNA羟甲基化(5hmC)的水平及其对GABA信号的响应

Fig.4 DNA hydroxymethylation (5hmC) of root and root callus and their hydroxymethylation levels respond to GABA signal

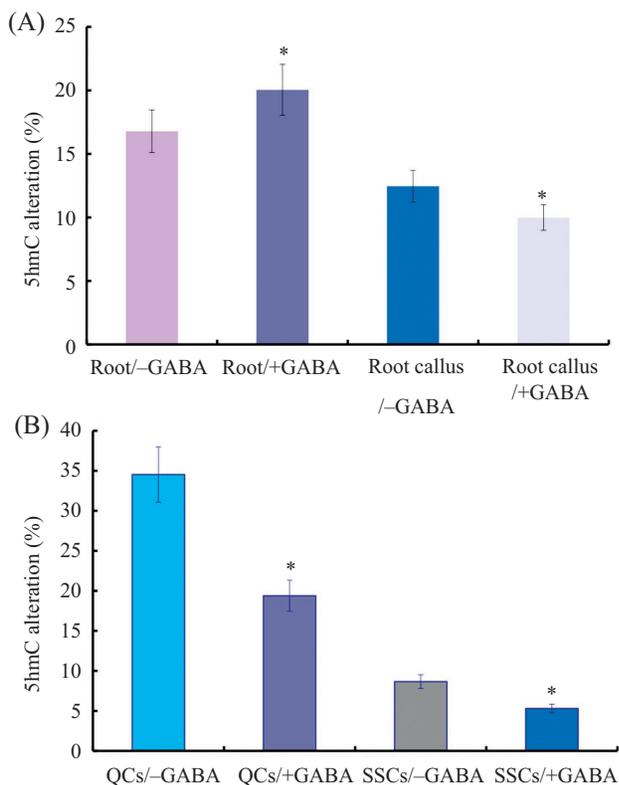
心细胞及其周围的干细胞中甲基化的动态变化。结果表明, 对照的根细胞内DNA甲基化占基因组碱基的含量为2.28%(图3A)。在添加GABA(1.0 mmol/L)处理后, 基因组DNA的甲基化含量为1.45%(图3A), 表明GABA降低了根部细胞基因组DNA的甲基化水平。

7 d龄根的愈伤组织DNA甲基化含量为1.45%(图3A); 有趣的是, GABA(1.0 mmol/L)添加到培养基后, 并没有降低根的愈伤组织基因组的甲基化水平, 而是增加了愈伤组织中DNA甲基化的水平, 达到了2.16%(图3A)。这表明, GABA对拟南芥根和根愈伤组织生长的甲基化模式影响不同。

GABA处理后, 影响了QCs和SSCs的甲基化水平, QC中DNA甲基化达到了1.73%, 比对照组高32%(图3B); 而在GABA处理的SSCs干细胞中, DNA甲基化水平增加了1倍(图3B)。上述结果表明, 根和愈伤组织的生长对GABA信号响应具有不同的甲基化变化模式。

### 2.3 GABA处理对根和根愈伤组织DNA去甲基化影响模式

拟南芥根、根的愈伤组织(包括QCs和SSCs)在生长过程中, 5hmC水平发生不同程度的变化, 其平均含量在4%左右; 值得注意的是, 在培养基中添加GABA, 不同程度地降低了根、QC细胞中的5hmC水平, 但增加了根愈伤组织和SSCs的5hmC水平(图4)。



A: 拟南芥根及其愈伤组织的5hmC水平; B: QCs及其周围干细胞的5hmC水平。\* $P < 0.05$ , 施加GABA与未施加GABA相比较。

A: the 5hmC levels of root and root callus; B: the 5hmC levels of QCs and SSCs. \* $P < 0.05$ , GABA treated group vs untreated group.

图5 GABA对根和根的愈伤组织基因组DNA甲基化的动态变化(变为5hmC)的影响

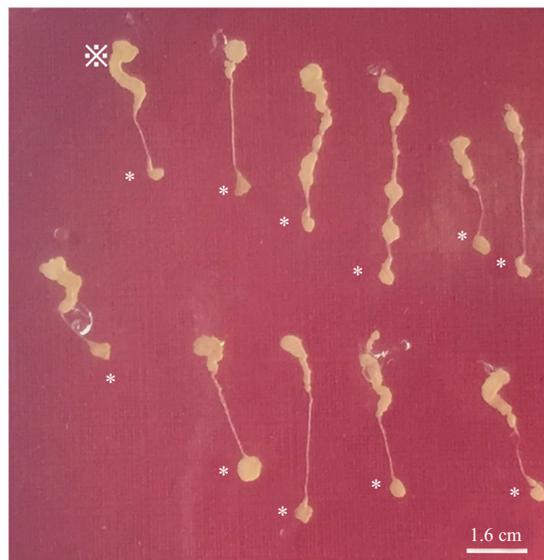
Fig.5 Effect of GABA on the dynamic methylation (change to 5hmC from 5mC) in root and root calluses

#### 2.4 5hmC在根和愈伤组织相对变化量不同

计算5hmC在整个基因组中5mC百分含量的结果,在一定程度上能反映DNA甲基化的变化规律。结果表明,拟南芥根在生长过程中,基因组DNA的甲基化(5mC)16.79%发生了去甲基化(首先变成了5hmC),即5hmC的含量增加了16.79%(图5A),GABA处理后,5hmC的含量又增加了3.25%( $P < 0.05$ )。在根愈伤组织中,5hmC变化量只有12.46%,培养基添加GABA后5hmC的含量下降到9.99%(图5A),达到显著差异水平( $P < 0.05$ )。在愈伤组织的QCs和SSCs中也得到相似的结果(图5B),其中,GABA处理的QCs和SSCs的5hmC含量分别下降了15.14%和3.36%,前者达到显著差异水平( $P < 0.05$ )(图5B)。

### 3 讨论

根生长的过程是一个细胞分裂和分化的过程,而来源于根的愈伤组织生成则是一个转分化的过



※为根的形态学上端; \*为根的形态学下端。

※ denotes the morphological top of roots, \* denotes the morphological bottom of roots.

图6 拟南芥根愈伤组织(膨大部分)诱导的模式示意图  
Fig.6 Sketch map of *Arabidopsis* root calluses (swollen parts) induction

程<sup>[14]</sup>。在细胞分裂和分化过程中涉及到基因组DNA不同的甲基化动态调节。本研究发现,根愈伤组织中DNA的甲基化水平低于根生长过程的甲基化水平(图3A),这可能与去分化过程中更多的基因表达有关。在愈伤组织的诱导过程中,愈伤组织块首先是从愈伤组织切口处(形态学上端)和根尖处(形态学下端)长出(图6),这些部位可能是植物激素反应最为敏感的部位,同时也是基因表达最活跃的部位。这一特性也为根端静止中心细胞的分离(用*pWOX5-GFP*标记)提供了容易识别的方法和途径(图2),同时也为静止中心细胞的甲基化动态变化的分析提供了方便。

拟南芥根在生长过程中涉及到DNA甲基化的动态变化(图3和图4)。培养基中GABA的添加降低了根中DNA的甲基化5mC的水平(图3),与此同时增加了5hmC的含量(图4)。5hmC是5mC氧化去甲基化过程中的一个中间产物,羟甲基化与甲基化之比反映了DNA甲基化的动态变化。上述结果表明,GABA信号触发了DNA通过5hmC途径的去甲基化过程。根端干细胞的分裂和分化与根的生长密切相关,深入理解GABA和基因甲基化变化的直接对应关系,将有助于解析GABA在这一细胞事件中的调控角色。

与根的生长效应相反,在拟南芥根来源的愈

伤组织中, 我们发现了GABA的添加却增加了愈伤组织中DNA的甲基化即5mC的水平(图3), 与此相一致, GABA降低了愈伤组织DNA中5hmC的水平(图4)。由于愈伤组织的诱导是由生长素和细胞分裂素启动的, 由此推测, 在愈伤组织生长过程中, GABA的添加可能起到与植物激素功能相反的作用。这一结果表明了DNA甲基化的动态变化在不同的组织中对GABA信号的响应具有不同的模式。

研究表明, 干细胞在分化过程中可以运用各种不同的代谢底物进行与表观遗传相关的重编程<sup>[15]</sup>。代谢物的变化在很大程度上影响着干细胞的命运<sup>[16-17]</sup>。与上述结果相一致, GABA在静止中心细胞和其周围的干细胞的甲基化的动态调节中也起着重要的调节作用(图3和图4)。从整体趋势看, GABA的添加增加了静止中心和周围干细胞基因组DNA的甲基化水平(图3), 抑制了DNA中5mC去甲基化(经由5hmC中间产物)的过程(图5), 表明GABA可能具有维持干细胞特征的作用。值得注意的是, 与干细胞特征维持相适应, 分离纯化的拟南芥根端静止中心细胞在继代培养过程中生长缓慢, 其继代培养周期为3~4周。与此相反, 拟南芥叶片来源的愈伤组织, 在继代后的前两周的生长较快, 但在第3周后代谢变得缓慢, 逐步出现褐化死亡现象(源于实验观察)。上述现象表明, 根端干细胞的分裂分化较为缓慢, 而GABA的添加似乎参与了这一过程的维持。寻找这一过程受控于GABA调节的相关的基因对于理解这一事件中GABA信号响应的机制具有重要的意义。

### 参考文献 (References)

- Scheres B. Stem-cell niches: Nursery rhymes across kingdoms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(5): 345-54.
- Yu GH, Tan YP, He X, Qin YH, Liang J. CLAVATA3 dodecapeptide modified CdTe nanoparticles: A biocompatible quantum dot probe for *in vivo* labeling of plant stem cells. *PLoS One* 2014; 9(2): e89241.
- Baulcombe DC, Dean C. Epigenetic regulation in plant responses to the environment. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6(9): a019471.
- Miguel C, Marum L. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: Somaclonal variation and beyond. *J Exp Bot* 2011; 62(11): 3713-25.
- Su YH, Liu YB, Zhang XS. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Mol Plant* 2011; 4(4): 616-25.
- Li W, Liu H, Cheng ZJ, Su YH, Han HN, Zhang Y, *et al.* DNA methylation and histone modifications regulate *de novo* shoot regeneration in *Arabidopsis* by modulating WUSCHEL expression and auxin signaling. *PLoS Genet* 2011; 7(8): e1002243.
- 马兆武, 杨旭红, 余光辉.  $\gamma$ -氨基丁酸对烟草MAPK和ACSI基因表达的分叉调节. 武汉植物学研究(Ma Zhaowu, Yang Xuhong, Yu Guanghui. Bifurcate regulation of MAPK and ACSI gene expression by  $\gamma$ -aminobutyric acid in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Wuhan Botanical Research*) 2008; 26(5): 520-3.
- Liu CL, Zhao L, Yu GH. The dominant glutamic acid metabolic flux to produce  $\gamma$ -aminobutyric acid over proline in *Nicotiana tabacum* leaves under water stress relates to its significant role in antioxidant activity. *J Integr Plant Biol* 2011; 53(8): 608-18.
- 张瑞琦, 赵丽, 覃永华, 徐鑫, 余光辉.  $\gamma$ -氨基丁酸促进拟南芥开花的机理研究. 中国农学通报(Zhang Ruiqi, Zhao Li, Qin Yonghua, Xu Xin, Yu Guanghui. Mechanism study of  $\gamma$ -aminobutyric acid on flowering time promotion in *Arabidopsis*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*) 2012; 28(15): 142-7.
- Bouché N, Fromm H. GABA in plants just a metabolite? *Trends Plant Sci* 2004; 9(3): 110-5.
- 赵丽, 赵志龙, 龚汉雨, 覃永华, 余光辉. GABA对烟草花粉管Ca<sup>2+</sup>和K<sup>+</sup>的动态调节表明离子通道参与了花粉管生长的调控. 中国细胞生物学学报(Zhao Li, Zhao Zhilong, Gong Hanyu, Qin Yonghua, Yu Guanghui, *In vivo* dynamic Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> oscillation responding to GABA reveals ion channels participating in tobacco pollen tube growth regulation. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(5): 668-75.
- Yu GH, Zou J, Feng J, Peng XB, Wu JY, Wu YL, *et al.* Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) affects pollen tube growth via modulating putative Ca<sup>2+</sup>-permeable membrane channels and is coupled to negative regulation on glutamate decarboxylase. *J Exp Bot* 2014; 65(12): 3235-48.
- Andäng M, Hjerling-Leffler J, Moliner A, Lundgren TK, Castelo-Branco G, Nanou E, *et al.* Histone H2AX-dependent GABA(A) receptor regulation of stem cell proliferation. *Nature* 2008; 451(7117): 460-4.
- Sugimoto K, Gordon SP, Meyerowitz EM. Regeneration in plants and animals: Dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol* 2011; 21(4): 212-8.
- Emily N. Stem cell metabolic and epigenetic reprogramming. *Nat Genet* 2015; 47(3): 198.
- Diaz-Ruiz A, Gonzalez-Freire M, Ferrucci L, Bernier M, de Cabo R. SIRT1 synchs satellite cell metabolism with stem cell fate. *Cell Stem Cell* 2015; 16(2): 103-4.
- Ryall JG, Dell'Orso S, Derfoul A, Juan A, Zare H, Feng X, *et al.* The NAD<sup>+</sup>-dependent SIRT1 deacetylase translates a metabolic switch into regulatory epigenetics in skeletal muscle stem cells. *Cell Stem Cell* 2015; 16(2): 171-83.