Wdr82调控小鼠胚胎干细胞体外的增殖和分化

张薇^{1,2} 刘露露² 惠心慧¹ 万晓玲² 周培培² 张岩^{2*} 陈红霞^{1*} (¹上海大学生命科学学院,上海 200444; ²中国科学院上海巴斯德研究所,上海 200031)

摘要 Setdla复合物和Setdlb复合物(Setdla/b)是进化上功能高度保守的表观遗传调控因子, 主要包括Setdla/b、Wdr82、Wdr5、Rbbp5、Ash2L、Dpy-30、Hcf-1等,催化组蛋白H3第4位赖氨 酸(H3K4)的甲基化,进而激活基因转录。Wdr82是Setdla/b复合物中特有的非催化亚基,其在胚胎 发育过程中的作用尚不清楚。该研究利用小鼠胚胎干细胞(moue embryonic stem cells, mESCs)的 体外培养和分化系统发现,在mESCs分化过程中,Wdr82的表达水平显著降低。在mESCs中敲低 Wdr82后,mESCs的增殖速度显著减缓,而其多能性不受影响。利用拟胚体分化体系发现,Wdr82 敲低后,拟胚体的形成速度变慢,自主搏动的时间明显滞后。综上所述,该结果揭示了Wdr82在 mESCs体外增殖和分化过程中的重要作用。

关键词 Wdr82; 小鼠胚胎干细胞; 细胞增殖; 细胞分化; 多能性

Wdr82 Regulates the Proliferation and Differentiation of mESCs

Zhang Wei^{1,2}, Liu Lulu², Hui Xinhui¹, Wan Xiaoling², Zhou Peipei², Zhang Yan^{2*}, Chen Hongxia^{1*} (¹School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China; ²Institut Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Setd1a complex and Setd1b complex (Setd1a/b) are evolutionarily conserved histone-modifying enzymes that play critical roles in transcriptional activation by promoting methylation of histone H3 on Lysine 4 (H3K4). Setd1a/b complex includes Setd1a/b, Wdr82, Wdr5, Rbbp5, Ash2L, Dpy-30, Hcf-1. Wdr82 is a conserved non-catalytic subunit of Setd1a/b complex, however, the role of the Wdr82 during embryonic stem cells differentiation remains poorly understood. In this study, by moue embryonic stem cells (mESCs) cell culture and differentiation *in vitro* system, we found that *Wdr82* mRNA level was decreased during mESCs differentiation. Wdr82 knockdown inhibited proliferation but not pluripotency of mESCs. Wdr82 knockdown slowed down embryoid body formation rate and contractile activity. Therefore, our results uncovered a vital role of Wdr82 in mESCs proliferation and differentiation.

Keywords Wdr82; mouse embryonic stem cells; proliferation; differentiation; pluripotency

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)是从 早期胚胎(原肠胚期之前)或原始性腺中分离出来 的一类细胞,它具有体外培养无限增殖、自我更新 和多向分化的特性^[1]。鉴于ESCs具有多向分化潜 能,可以体外模拟胚胎的发育过程,因此,成为胚胎 发育、疾病模型和再生医学等研究的重要研究模 型。表观遗传调控在胚胎的发育过程中发挥了重 要的作用。Trithorax家族是一类重要的表观遗传调

收稿日期: 2018-04-02 接受日期: 2018-05-25

Received: April 2, 2018 Accepted: May 25, 2018

国家自然科学基金项目(批准号: 31670906、31471207)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 021-54923137, E-mail: yan_zhang@sibs.ac.cn; Tel: 021-66137539, E-mail: hxchen@shu.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31670906, 31471207)

^{*}Corresponding authors. Tel: +86-21-54923137, E-mail: yan_zhang@sibs.ac.cn; Tel: +86-21-66137539, E-mail: hxchen@shu.edu.cn

网络出版时间: 2018-07-25 10:41:46 URL: http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180725.1041.002.html

控因子,在进化上高度保守,其成员均含有一个SET 结构域,催化H3K4的甲基化,对基因转录起激活作 用。Trithorax家族有六个成员: Mll1、Mll2、Mll3、 Mll4、Setd1a和Setd1b^[2],它们分别与多种蛋白形成 复合物,参与组蛋白H3K4的甲基化修饰。以往的研 究表明, Setd1a/b复合物催化H3K4甲基化, 影响胚胎 的早期发育^[3]。Wdr82是Setd1a/b复合物中特有的非 催化亚基,在进化过程中比较保守,含有7个重复的 WD40结构域。WD40结构域由40个左右的氨基酸 残基组成,具有保守的色氨酸--天冬氨酸和甘氨酸--组氨酸序列^[45]。Wdr82通过与RNA聚合酶II羧基末 端结构域磷酸化的Ser5结合,将Setd1a/b复合物招募 至基因转录起始位点,催化邻近核小体组蛋白H3K4 的三甲基化,进一步激活相应基因的转录60。在本项 研究中,我们利用小鼠胚胎干细胞的体外培养和分 化系统发现, Wdr82参与调控mESCs体外增殖, 不参 与胚胎干细胞多能性的维持;利用拟胚体分化体系 我们发现, Wdr82主要参与调控中胚层细胞的分化 过程。总之,本项研究发现了Wdr82在胚胎干细胞 体外的增殖与分化中的重要作用,为进一步深入研 究胚胎干细胞增殖分化的表观遗传调控提供了新的 实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠胚胎干细(mESCs)E14细胞株由实验室保存。所需的材料有:GMEM(GIBCO公司)、FITC-BrdU Flow Kit(BD公司)、Alkaline Phosphatase Detection Kit(Millipore公司)、Anti-H3K4me3 antibody(ab8580, Abcam公司)、Anti-β-Actin antibody(A5316, Sigma公司)、Anti-Oct4 antibody(2840, Cell Signaling公司)、Anti-Nanog antibody(ab80892, Abcam公司)、Anti-H3 antibody(ab1791, Abcam公 司)、Anti-p53 antibody(ab26, Abcam公司)、Antip21 antibody(ab109199, Abcam公司)、Anti-Wdr82 antibody(A1212, Santa Cruz Biotechnology公司)。

1.2 小鼠胚胎干细胞E14细胞系的培养和分化

提前半小时用0.1%明胶包被培养皿, E14细胞 培养于GMEM完全培养基(20% FBS、1% NEAA、1% 双抗、1% Glutamine、74% GMEM、0.02% β-巯基 乙醇、10 ng/mL LIF)中。当撤去LIF并加入2 μmol/L 反式视黄酸, E14会定向往神经分化。通过悬滴法可 以将干细胞凝聚成拟胚体(embryoid body, EB), 使其自由分化, 隔天换液。从第6天开始, 陆续就能观察 到EB的搏动。

1.3 ShRNA的构建和感染

我们在Exon2以及3′UTR上设计了2对shRNA 序列,分别为sh-Wdr82-Exon2-s: CCG GTG CAG CCA ACA CAG TCG TTT AGG ATC CTA AAC GAC TGT GTT GGC TGC ATT TTT G, sh-Wdr82-Exon2as: AAT TCA AAA ATG CAG CCA ACA CAG TCG TTT AGG ATC CTA AAC GAC TGT GTT GGC TGC A; sh-Wdr82-3' UTR-s: CCG GCT GAT GCT GCT GGG CTA TTT AGG ATC CTA AAT AGC CCA GCA GCA TCA GTT TTT G, sh-Wdr82-3' UTR-as: AAT TCA AAA ACT GAT GCT GCT GGG CTA TTT AGG ATC CTA AAT AGC CCA GCA GCA TCA G。利用 EcoR I和Age I酶切pLKO.1-puro质粒, 连接shRNA序 列,测序鉴定后,将该质粒与pMD2.G和pSPAX2质粒 共转于HEK293T, 48 h后收集细胞培养上清, 0.45 μm 滤膜过滤,收集病毒,感染E14细胞。用2 µg/mL的嘌 呤霉素进行药筛,连续药筛5天后,细胞用于后续实 验。

1.4 碱性磷酸酶染色实验

将4 000个E14细胞均匀铺于用0.1%明胶包被的 6孔板中,使用完全培养基每天换液,培养4天,弃培 养液,1×PBS洗1次,随后使用碱性磷酸酶试剂盒检 测。

1.5 细胞增殖与流式分析

第1天将3×10⁵细胞均匀铺于明胶包被的6孔板, 第2天实验前1h更换新鲜的E14完全培养基,随后 加入BrdU,培养20 min后消化,离心收集细胞。用 FITC-BrdU Flow Kit(559619, BD Pharmingen公司)试 剂盒检测细胞的增殖。

1.6 RNA的抽提、反转录和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

用Trizol(15596026, Invitrogen公司)提取细胞 总RNA,取2µg RNA加入oligo dT, 70 ℃退火,加入 M-MLV反转录酶(2641Q, TaKaRa公司)和dNTPs mix 反转录得到的cDNA,反应条件为: 42 ℃ 1 h, 70 ℃ 15 min。qRT-PCR用iTaqTM Universal SYBR[®] Green supermix(1725121, Bio-Rad公司)体系在ABI 7900HT(Applied Biosystems公司)仪器上进行,扩增 条件为: 95 ℃预变性5 min; 95 ℃变性10 s, 60 ℃退

火延伸1 min, 共40个循环。

1.7 Western blot

用2×蛋白质上样缓冲液裂解细胞,95℃煮样5 min, 13 000 r/min离心5 min。用10% SDS-PAGE胶分离 样品,湿转至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗4℃孵育过夜,加入HRP标记的二抗室温孵 育1 h, ECL化学发光显影检测。

1.8 免疫荧光

细胞铺在爬片上,过夜培养后,PBS洗2遍,4%的多聚甲醛固定15 min,0.1% Triton X-100破膜,1% BSA封闭,一抗、二抗孵育,DAPI染色后加入抗淬 灭剂并封片,避光保存。

1.9 统计学分析

定量数据用平均值±方差(mean±S.D.)表示,两 组间的显著性分析通过Student's *t*-test完成。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Wdr82表达水平在mESCs分化过程中显著降低

白细胞抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF) 对于维持ESCs的多能性起着重要的作用, LIF能够 抑制小鼠胚胎干细胞的分化^[7]。培养基中不添加 LIF, E14会逐渐分化。此外, 通过悬滴法形成拟胚体, ESCs细胞可以向多个胚层自由分化。我们利用这两 种分化方法检测Wdr82表达水平的变化发现, *Wdr82* mRNA水平在mESCs分化过程中显著下降(图1A和



Differentiation through EB formation

Differentiation through LIF withdrawal

A:实时定量PCR检测Wdr82在EB形成过程中mRNA表达变化; B:实时定量PCR检测Wdr82在不加LIF条件下E14细胞分化过程中mRNA表达变化,Gapdh为内参,误差线代表S.E.M.。

A: qRT-PCR analysis of *Wdr82* mRNA level in mESCs during the EBs formation; B: qRT-PCR analysis of *Wdr82* mRNA level in mESCs wihout LIF, results normalized to *Gapdh*, data A, B are means±S.E.M..

图1 Wdr82的表达水平在mESCs的分化过程中显著降低 Fig.1 Decreased Wdr82 mRNA level during mESCs differentiation

图1B),提示Wdr82可能参与调控ESCs的分化过程。

2.2 Wdr82的敲低导致mESCs增殖速度减慢

为进一步研究Wdr82在mESCs增殖过程中的 作用,我们在Wdr82的Exon2以及3'UTR分别设计了 shRNA1、shRNA2对Wdr82的mRNA进行敲低。两 条shRNA都可以有效敲低mESCs中Wdr82的表达(图 2A和图2E)。通过细胞连续计数法我们发现, Wdr82 敲低的mESCs增殖速度显著减慢(图2B)。我们进一 步通过BrdU掺入法对Wdr82敲低后的细胞周期进 行检测发现, Wdr82敲低的mESCs G1期的比例显著 升高, S期的比例显著下降(图2C)。我们进而检测参 与细胞周期调控的基因如Rbl2、Lats2、Cdkn1a的 表达发现,它们在Wdr82敲低后也明显上调(图2D)。 同时我们发现,在Wdr82敲低的细胞中,细胞周期依 赖性激酶抑制因子p21和抑癌基因蛋白p53表达明显 上调, 而总体H3K4me3甲基化水平显著降低(图2E)。 以上结果表明, Wdr82敲低后, 造成mESCs滞留在G1 期导致细胞增殖速度变慢。此外, Wdr82敲低后, 细 胞总体H3K4me3甲基化水平的降低,显示了Wdr82 蛋白对Set1A/B复合体催化H3K4甲基化修饰功能至 关重要。

2.3 Wdr82对mESCs多能性的维持是非必需的

转录因子Nanog、Oct4在ESCs自我更新、多能性的维持过程中起着至关重要的作用,是ESCs多能性的重要标志^[8]。我们利用Western blot及免疫荧光实验发现,在Wdr82敲低的mESCs中,Oct4、Nanog





A: qRT-PCR检测*Wdr82* shRNA敲低效率; B: Wdr82敲低后, 细胞的增殖曲线; C: BrdU流式分析细胞周期; D: 细胞周期相关基因的检测; E: Western blot检测p53、p21、H3K4me3的表达, H3、Actin为内参。

A: qRT-PCR analysis of *Wdr82* mRNA level after shRNA mediated knockdown in E14 cell line; B: proliferation curves of control and Wdr82-knockdown mESCs; C: flow cytometry analysis of BrdU incorporation in Wdr82-knockdown cells; D: qRT-PCR analysis of genes related to cell cycle; E: Western blot analysis of p53, p21, H3K4me3 in Wdr82-knockdown mESCs. H3 and Actin were used as loading control.



的蛋白水平没有显著变化(图3A和图3B),说明了 Wdr82对mESCs多能性的维持是非必需的。碱性磷 酸酶在未分化的ESCs细胞中高表达,随着分化,其 表达水平逐步降低,因此,是检测ESCs分化的重要 指标^[9]。我们利用碱性磷酸酶染色实验发现,尽管 Wdr82敲低的mESCs克隆数变少且克隆较小,但碱 性磷酸酶染色颜色较深,而且mESCs克隆圆且富有 立体感,说明Wdr82敲低不影响的mESCs的多能性 维持(图3C)。当培养基中撤掉LIF,正常mESCs开 始分化,Wdr82敲低的mESCs分化速度明显减慢(图 3D)。以上结果表明,Wdr82不参与维持mESCs的多 能性,但可能在mESCs分化过程中起作用。

2.4 Wdr82的敲低阻碍了mESCs的分化

ESCs体外培养条件下,能诱导拟胚体(embryoid body, EB)的形成,逐渐向外胚层、中胚层、内胚层分化,这样的一个体系模拟了体内胚胎的发育过程^[10]。

我们利用拟胚体分化系统,研究Wdr82在mESCs分 化过程中的作用发现,Wdr82敲低的mESCs形成EB 的体积明显变小(图4A)。EB的发育也有明显滞缓, 自发搏动性显著延后(图4B)。我们收取第0天、第 2天、第4天、第6天、第8天、第10天的EB样品, 检测三胚层的分化情况发现,Wdr82敲低不影响内 胚层标记基因(如Gata4、Foxa1)和外胚层标记基 因(如Fgf5)的表达。然而,中胚层早期标记基因[如 Brachyury(T)、Mixl1]的表达在第4天显著上升,而中 胚层晚期标记基因(如SMA)的表达在6~10天却显著 降低(图4C)。上述结果表明,Wdr82在中胚层分化过 程中有重要的调控作用。

3 讨论

H3K4甲基化促进基因的转录激活,在胚胎干 细胞增殖分化和胚胎生长发育过程中起到非常关键



A、B: Western blot(A)和免疫荧光(B)检测Oct4和Nanog表达变化; C: mESCs克隆碱性磷酸酶活性染色(40×); D: 加LIF或者不加LIF培养条件下, mESCs克隆碱性磷酸酶活性染色(40×)。

A, B: Western blot (A) and immunofluorescence (B) analysis of Oct4 and Nanog expression in control and Wdr82-knockdown mESCs; C: representative images of alkaline phosphatase (AP) staining of control and Wdr82-knockdown mESCs; D: representative morphologies of control and Wdr82-knockdown mesCs; D: representative morphologies; D: representative morphologies; D: representative morphologies

图3 Wdr82对mESCs多能性的维持是非必需的 Fig.3 Wdr82 is dispensable for maintenance of pluripotency in mESCs

的作用。哺乳动物中H3K4甲基转移酶包括: Mll1、 Mll2、Mll3、Mll4、Setd1a和Setd1b^[11-13],它们都是 以复合物的形式发挥作用。Setd1a/b是哺乳动物中 最主要的H3K4甲基转移酶^[14]。Setd1a或者Setd1b完 全基因敲除的小鼠胚胎致死,说明Setd1a、Setd1b 在胚胎发育过程中发挥着重要的作用^[15]。Wdr82 是Setd1a/b复合物中特有的非催化亚基,其在H3K4 甲基化调控及胚胎发育过程中的作用之前未见有 研究。本项研究中, Wdr82敲低的mESCs H3K4me3 水平显著下降,说明Wdr82影响H3K4me3的甲基 化水平,此外,也说明Wdr82对Setd1a/b复合物甲基 转移酶功能的调控是必需的。H3K4me3下降是由 于Setd1a还是Setd1b的功能异常引起, 需要我们进 一步的验证。Wdr82敲低的mESCs仍然可以检测 到H3K4me3,可能是其他甲基转移酶Mll1、Mll2、 Mll3、Mll4等的代偿作用,也说明Mll1等甲基转移 酶作用并非冗余。

Wdr82敲低的mESCs大量停滞在G₁期导致增 殖速度减慢,同时我们发现,细胞周期依赖性激酶 抑制因子p21和抑癌基因蛋白p53表达明显上调,说 明Wdr82敲低后抑制细胞周期是通过p53-p21通路 实现的。然而,Wdr82如何调控p21、p53进而调控 mESCs的细胞周期仍然需要进一步的研究。Wdr5 是Setd1a/b复合物中的另外一种非催化亚基,Wdr5 与Wdr82结构类似,都是由WD40结构域组成的。之 前的报道发现,*Wdr5*缺失后,ESCs的自我更新能力 变弱^[16]。因此,Wdr82与Wdr5都调控ESCs的增殖, 显示了Setd1a/b复合物为调控mESCs的增殖所必需。

有文献报道, Setd1a/b复合物中另外一个亚基 Ash2l, 参与了ESCs多能性的调控。Ash2l缺失后, mESCs中Nanog、Oct4转录因子的蛋白表达显著下 降^[9]。在本项研究中我们发现, Wdr82并不参与ESCs 多能性的维持。由于Wdr82是Setd1a/b复合物的特 有亚基,在MII-MII4复合物中不存在。而Ash21作为



A: 正常与Wdr82敲低mESCs形成EB第3天、第6天的形态图(40×); B: 不同时间点EB自发搏动性的检测; C: EB形成过程中三个胚层分化标志分子的表达变化检测, Gapdh作为内参。

Fig.4 Wdr82 knockdown hinder lineage differentiation of mESCs

通用亚基, 普遍存在于所有的H3K4甲基转移酶复合体中。因此, Mll-Mll4复合物可能在调控mESCs的多能性维持过程中, 比Setd1a/b复合物发挥更大的作用。

在本项研究中,我们还进一步分析了Wdr82敲 低后对ESCs分化的影响。在拟胚体分化过程中,我 们通过qRT-PCR的方法检测各个胚层的标记物的表 达变化。结果显示,在Wdr82敲低后,外胚层与内胚 层的发育没有受到影响。与此相反,Wdr82敲低后, 中胚层的发育过程发生改变。中胚层早期标记基因 [如Brachyury(T)、Mix11]的表达在第4天显著上升, 而中胚层晚期标记基因(如SMA)的表达却显著降低, 显示Wdr82的缺失并不影响ESCs分化进入到中胚 层,但影响了细胞在中胚层进一步向下分化。相应 地,我们发现,Wdr82敲低后的mESCs形成的拟胚体 体积较小,而且拟胚体产生自主搏动的时间显著后 移,说明拟胚体中心肌样细胞的分化受到抑制。上 述结果说明,Wdr82不参与调控mESCs向外胚层与内胚层的分化,但参与了向中胚层的分化。

综上所述,本项研究中,我们首次证明了Wdr82 在mESCs体外增殖和分化过程中的重要作用。后续 利用构建与分析Wdr82基因敲除小鼠模型,以及通 过组学方法研究Wdr82的下游调节基因,将有助于 更加深入地研究Wdr82的体内生理功能。

参考文献 (References)

- Lorzadeh N, Kazemirad N. Embryonic stem cells and infertility. Am J Perinatol 2018; doi:10.1055/s-0038-1632367.
- 2 Yang W, Ernst P. Distinct functions of histone H3, lysine 4 methyltransferases in normal and malignant hematopoiesis. Curr Opin Hematol 2017; 24(4): 322-8.
- 3 Sze CC, Cao K, Collings CK, Marshall SA, Rendleman EJ, Ozark PA, *et al.* Histone H3K4 methylation-dependent and -independent functions of Set1A/COMPASS in embryonic stem cell self-renewal and differentiation. Genes Dev 2017; 31(17): 1732-7.

- 4 Wu M, Shu HB. MLL1/WDR5 complex in leukemogenesis and epigenetic regulation. Chin J Cancer 2011; 30(4): 240-6.
- 5 Trievel RC, Shilatifard A. WDR5, a complexed protein. Nat Struct Mol Biol 2009; 16(7): 678-80.
- 6 Lee JH, Skalnik DG. Wdr82 is a C-terminal domainbinding protein that recruits the Setd1A histone H3-Lys4 methyltransferase complex to transcription start sites of transcribed human genes. Mol Cell Biol 2008; 28(2): 609-18.
- 7 Leary AG, Wong GG, Clark SC, Smith AG, Ogawa M. Leukemia inhibitory factor differentiation-inhibiting activity/ human interleukin for DA cells augments proliferation of human hematopoietic stem cells. Blood 1990; 75(10): 1960-4.
- 8 Chen TY, Lee SH, Dhar SS, Lee MG. Protein arginine methyltransferase 7-mediated microRNA-221 repression maintains Oct4, Nanog, and Sox2 levels in mouse embryonic stem cells. J Biol Chem 2018; 293(11): 3925-36.
- 9 Stoller JZ, Huang L, Tan CC, Huang F, Zhou DD, Yang J, et al. Ash21 interacts with Tbx1 and is required during early embryogenesis. Exp Biol Med (Maywood) 2010; 235(5): 569-76.
- 10 Lai YL, Lin CY, Jiang WC, Ho YC, Chen CH, Yet SF. Loss of heme oxygenase-1 accelerates mesodermal gene expressions during embryoid body development from mouse embryonic stem cells. Redox Biol 2018; 15: 51-61.

- 11 Lee JH, Skalnik DG. CpG-binding protein (CXXC finger protein 1) is a component of the mammalian Set1 histone H3-Lys4 methyltransferase complex, the analogue of the yeast Set1/ COMPASS complex. J Biol Chem 2005; 280(50): 41725-31.
- 12 Lee JH, Tate CM, You JS, Skalnik DG. Identification and characterization of the human Set1B histone H3-Lys4 methyltransferase complex. J Biol Chem 2007; 282(18): 13419-28.
- 13 Shilatifard A. Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. Curr Opin Cell Biol 2008; 20(3): 341-8.
- 14 Wu M, Wang PF, Lee JS, Martin-Brown S, Florens L, Washburn M, et al. Molecular regulation of H3K4 trimethylation by Wdr82, a component of human Set1/COMPASS. Mol Cell Biol 2008; 28(24): 7337-44.
- 15 Bledau AS, Schmidt K, Neumann K, Hill U, Ciotta G, Gupta A, *et al.* The H3K4 methyltransferase Setd1a is first required at the epiblast stage, whereas Setd1b becomes essential after gastrulation. Development 2014; 141(5): 1022-35.
- 16 Ang YS, Tsai SY, Lee DF, Monk J, Su J, Ratnakumar K, *et al.* Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network. Cell 2011; 145(2): 183-97.