### BAZ-2和SET-6通过BLMP-1调控秀丽隐杆线虫衰老

康心蕾<sup>1,2</sup> 常思源<sup>1</sup> 马力<sup>3</sup> 魏刚<sup>3</sup> 蔡时青<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心,神经科学研究所,神经科学国家重点实验室,上海 200031; <sup>2</sup>复旦大学,生命科学学院,上海 200438;<sup>3</sup>中国科学院营养与健康研究所,上海 200031)

摘要 该文使用秀丽隐杆线虫作为模式动物,探讨了两个表观遗传因子BAZ-2和SET-6通过 BLMP-1调控编码线粒体功能蛋白核基因的表达,进而调控线虫衰老。利用JASPAR数据库,分析 了baz-2和set-6突变体线虫中表达上调基因的启动子区域DNA序列,发现转录因子BLMP-1的特征 结合位点在这些序列中富集。随后分别在baz-2和set-6突变体线虫中敲除blmp-1基因,检测blmp-1;baz-2和blmp-1;set-6双敲除突变体线虫的寿命、咽喉肌肉跳动能力、基础型和增强型食物诱导的 缓慢运动反应、抗氧化应激能力和线粒体功能相关基因的表达水平,发现敲除blmp-1消除了baz-2 和set-6突变体线虫寿命较长,咽喉肌肉跳动、基础型和增强型食物诱导的缓慢运动反应和抗氧化 能力较好的行为表型,以及线粒体功能相关基因表达上调的现象。该研究阐明了BAZ-2和SET-6通 过BLMP-1调控线虫衰老的机制。

关键词 秀丽隐杆线虫; blmp-1; baz-2; set-6; 衰老

### BAZ-2 and SET-6 Modulate Aging via BLMP-1 in C. elegans

KANG Xinlei<sup>1,2</sup>, CHANG Siyuan<sup>1</sup>, MA Li<sup>3</sup>, WEI Gang<sup>3</sup>, CAI Shiqing<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Neuroscience, State Key Laboratory of Neuroscience, Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; <sup>2</sup>School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200438, China; <sup>3</sup>Shanghai Institute of Nutrition and Health, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** This study aims to explore whether two epigenetic regulators, BAZ-2 and SET-6, modulate aging via BLMP-1 by regulating the expression of nuclear genes encoding mitochondrial protein in *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*). Through data analysis in JASPAR database, the binding site of the transcription factor BLMP-1 was found to be enriched in the sequence of promoter region of up-regulated expression genes found in both *baz-2* and *set-6* mutant worms. By knocking out *blmp-1* in *baz-2* and *set-6* mutant worms respectively, *blmp-1;baz-2* and *blmp-1;set-6* double mutant worms were obtained and their lifespan, pharyngeal pumping, basal and enhanced slowing responses, capacity of oxidative resistance and the expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins were analyzed. The results show that ablation of *blmp-1* abolishes the lifespan extension, behavioral preservation and up-regulated expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in aging *baz-2* or *set-6* mutant worms. This study suggests that BAZ-2 and SET-6 modulate aging via BLMP-1 in *C. elegans*.

**Keywords** *C. elegans; blmp-1; baz-2; set-6;* aging

收稿日期: 2020-12-07 接受日期: 2021-05-17

中国科学院战略性科技先导专项资金(批准号: XDB32020100)资助的课题

<sup>\*</sup>通讯作者。Tel: 021-54921822, E-mail: sqcai@ion.ac.cn

Received: December 7, 2020 Accepted: May 17, 2021

This work was supported by the "Strategic Priority Research Program" of the Chinese Academy of Sciences (Grant No.XDB32020100)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-21-54921822, E-mail: sqcai@ion.ac.cn

衰老是随着时间的流逝, 生物个体各项生理功 能逐渐发生退化的过程, 人类在衰老的过程中伴有 行为和认知功能的退化。同时, 衰老也是很多疾病发 生发展的风险因素, 老年人口更容易罹患神经退行 性疾病、癌症、心血管疾病和糖尿病等<sup>[1-2]</sup>。随着医 学的发展和人们生活水平的提高, 人类平均寿命逐渐 延长<sup>[3]</sup>。然而, 寿命的延长并不意味着同时也延缓了 行为和认知功能的退化<sup>[1,48]</sup>, 因此研究如何保持老龄 时期的健康对于个人和社会都有着重要的意义, 但目 前对于健康衰老(healthy aging)背后的机制尚不清晰。

秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans, C. elegans, 以下简称线虫)作为一种模式动物,广泛应用于衰老的 研究中<sup>19</sup>。近期的研究表明,在线虫和哺乳动物中保 守的两个表观遗传调控因子BAZ-2和SET-6负向调控 线虫衰老。BAZ-2和SET-6通过调控H3K9甲基化水平, 抑制编码线粒体功能蛋白核基因的表达,下调线粒体 的功能,加速线虫衰老<sup>[10]</sup>。我们利用JASPAR数据库<sup>[11]</sup>, 分析了baz-2和set-6突变体线虫中表达上调基因的启动 子区域DNA序列,发现转录因子BLMP-1的特征结合位 点在这些序列中富集。在线虫中,BLMP1调节发育[12-13], 调控性腺细胞迁移[14]和蜕皮[15],以及dauer形成[16]。线 虫BLMP-1与哺乳动物PRDM1/BLIMP-1同源[14-15], 蛋 白结构高度保守,暗示该基因在哺乳动物中的功能具 有保守性。目前,还未有报道BLMP-1在个体衰老过 程中的作用。本研究探讨了表观遗传调控因子BAZ-2 和SET-6是否通过转录因子BLMP-1调控线虫衰老,为 衰老机制研究提供新的线索。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 秀丽隐杆线虫品系 野生型N2、set-6敲除 突变体set-6(ok2195)、eor-1敲除突变体eor-1(cs28) 线虫购自美国线虫保藏中心(Caenorhabditis Genetics Center, CGC), baz-2敲除突变体baz-2(tm235)和blmp-1 敲除突变体blmp-1(tm548)来自于日本国家生物资源 库(National Bioresource Project for the Experimental Animal "Nematode C. elegans", NBP)。实验中所使用 的线虫均为雌雄同体。

通过将*blmp-1(tm548)*分别与*baz-2(tm235*)和set-6(ok2195)杂交,得到*blmp-1;baz-2*和*blmp-1;set-6*双敲 除突变体线虫;将eor-1(cs28)分别与*baz-2(tm235*)和 set-6(ok2195)杂交,得到eor-1;*baz-2*和eor-1;*set-6*双敲

### 除突变体线虫。

1.1.2 主要试剂 Agar购自Millipore公司; Peptone、 CaCl<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和Catalase购自Sigma公司; TRIzol试剂 购自Invitrogen公司; QuantiTect Reverse Transcription Kit购自QIAGEN公司; TB Green<sup>TM</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Tli RNaseH Plus)购自TaKaRa公司; SYBR Green *Pro Taq* HS qPCR Kit购自湖南艾科瑞生物工程有限公司, 其余生化试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 线虫生长培养基 (Nematode growth medium, NGM)的配制 称取2.1 g NaCl、11.9 g Agar、1.8 g
Peptone, 加入683 mL ddH<sub>2</sub>O于1 L锥形瓶中, 锡箔纸封 住瓶口, 经121 °C高压蒸汽灭菌30 min。待培养基冷却 至65 °C后, 加入1 mol/L KPO<sub>4</sub> 17.5 mL、1 mol/L MgSO<sub>4</sub>
0.7 mL、1 mol/L CaCl<sub>2</sub> 0.7 mL和5 mg/mL胆固醇(溶解 于无水乙醇) 0.7 mL, 混匀后倒入60 mm细菌培养皿 中。NGM平板室温放置2天后, 滴加大肠杆菌OP50, 室温放置2天后, NGM培养板即可用于线虫培养。

1.2.2 线虫的同步化培养 使用M9缓冲液收集 NGM培养板上已成年含有卵的线虫,转移至1.5 mL EP管中, 3 000 r/min离心 2 min后去除上清。加入 1 mL NaClO消毒液,不断摇晃混匀管内的液体与线 虫沉淀直至在显微镜下观察到大部分线虫虫体被裂 解为2段, 立即于3000 r/min离心1.5 min。快速去除上 清, 加入1 mL M9缓冲液混匀虫卵, 3 000 r/min离心 1.5 min, 重复洗涤3次。最后加入1 mL M9缓冲液, 放 置于混匀仪过夜。第2天待虫卵孵化到达L1时期,即 可接种到含有大肠杆菌OP50的NGM培养板菌斑边 缘。M9缓冲液配置方法:称取3gKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、15.12g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、5gNaCl, 最后用ddH<sub>2</sub>O定容至1L。 经121 °C高压蒸汽灭菌30 min, 冷却至室温后, 加入 1 mol/L MgSO41 mL, 混合均匀即可使用。NaClO消毒 液(4 mL)配置方法: 加入10 mol/L NaOH 0.2 mL、1 mL 84消毒液,最后用ddH2O定容至4 mL,该溶液在使用 时新鲜配置,配置后需避光保存。

1.2.3 线虫寿命分析 线虫经同步化在20℃环境下 培养,每个品系线虫准备90条,平均饲养于3个60 mm NGM培养板中。在线虫的生殖期间(成年后第2~4天) 需要每天更换培养板,避免隔代幼虫引起的实验误 差。之后每隔4天更换培养板,保持线虫食物新鲜。 每天用铂金丝针轻轻触碰线虫头部,检查其死亡情 况。多次触碰后均没有发生摆动反应的线虫判定为 死亡,同时将死亡线虫移除。寿命分析实验以线虫 L4时期为实验初始,记录为第0天(Day 0),以最后一 只线虫死亡的时间作为实验终点<sup>[17]</sup>,每天记录线虫 死亡情况及数目,意外死亡线虫(线虫爬至培养板边 缘干死)不计入死亡结果,以此绘制存活曲线。

1.2.4 线虫抗氧化胁迫实验 线虫经同步化在20℃ 环境下培养至成年后第5天,挑取20条线虫转移至加 入新鲜配置含有0.8 mL用S-basal缓冲液配置的不同 浓度H2O2溶液的12孔细胞培养孔板中。线虫样品在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中培养4 h, 然后加入200 U的过氧化氢酶(Catalase)起到终止H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的作用。用铂金丝针轻轻触碰线 虫头部,多次触碰后均没有发生摆动反应的线虫判 定为死亡。记录线虫的存活数目,统计时数据换算 为存活比例。S-basal缓冲液配置方法:称取5.85g NaCl、1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 加入5 mg/mL胆固 醇(溶解于无水乙醇)1mL,最后用ddH2O定容至1L, 121 °C高压蒸汽灭菌30 min。Catalase配置方法:称 取50 mg Catalase粉末(2 000~5 000 U/mg蛋白活性)溶 解于5 mL的1 mol/L KPO₄缓冲液中, 混匀后4 ℃保存。 1.2.5 咽喉肌肉跳动行为 经同步化的线虫在20 °C 环境下培养,于线虫成年后第1天即开始检测咽喉肌 肉跳动行为,每品系随机取样各检测20条,之后每隔 1天检测1次,直至线虫成年后第9天。实验开始前, 将待检测的线虫从培养箱中取出,放于20℃室温静 置10 min, 然后在解剖显微镜下计数10 s内正在进食 的线虫咽喉肌肉跳动次数。数据统计时,换算为每 分钟跳动次数。

1.2.6 线虫基础型和增强型食物诱导的缓慢运动行 为 在20°C环境下,将同步化的线虫培养至成年 后第1天和成年后第9天,检测线虫基础型食物诱导的 缓慢运动反应(basal slowing responses, BSR)和增强型 食物诱导的缓慢运动反应(enhanced slowing responses, ESR)。BSR指的是饱食的线虫在遇到食物(大肠杆菌) 后会减慢运动速度; ESR指的是饥饿处理后的线虫 遇到食物会进一步减慢运动速度。实验方法参照之 前的实验[18],实验中使用的NGM板均为60 mm大小。 实验开始前,在未加有菌的NGM板上滴加0.2 mL HB101菌液呈环形菌斑。将滴加HB101菌液的NGM 板以及未加有菌的对照NGM板置于37°C培养箱、3h 后取出,在室温中冷却30 min然后用于实验。挑取 40条待检测品系线虫转移至未加有菌的NGM板上, 线虫自由爬行去除自身携带的大肠杆菌OP50。BSR 实验:将线虫分别转移到滴加HB101菌环或未加有 菌的NGM板中央空白区域,静置5 min后,记录20 s 内线虫身体扭曲超过身体长度一半时的摆动次数。 ESR实验:将线虫转移至未加有菌的NGM板,进行 30 min饥饿处理,然后将饥饿处理后的线虫分别转 移至滴加有HB101菌环或未加有菌的NGM板中央 空白区域,静置5 min,然后记录20 s内线虫身体扭曲 超过身体长度一半时的摆动次数。

1.2.7 实时荧光定量PCR(RT-qPCR) 用M9缓冲液 将约200条经同步化培养至检测时期的线虫样品收 集至1.5 mL EP管中, M9缓冲液清洗3次以去除线虫 携带的大肠杆菌OP50,然后沉淀线虫样品并去除上 清。在线虫沉淀中加入1 mL TRIzol试剂和研磨珠,使 用组织研磨仪(净信)经60 Hz研磨90 s, 将线虫彻底裂 解。将已裂解的线虫样品上清转移至另一个1.5 mL EP管中,参照TRIzol试剂说明书进行线虫RNA提取, 然后使用 QuantiTect Reverse Transcription Kit将 RNA 反转录为cDNA。在blmp-1基因和ero-1基因表达水平 检测实验中,线虫样品为成年后第3天和成年后第9天 的野生型N2线虫, cDNA样品通过TB Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)扩增;在线粒体功能相关 基因表达水平检测实验中,线虫样品为L4时期的野 生型N2线虫、baz-2、set-6、blmp-1、blmp-1;baz-2和 blmp-1;set-6突变体, cDNA样品通过SYBR Green Pro Taq HS qPCR Kit扩增。荧光信号均由LightCycler® 480(Roche)检测记录。每个样品进行3个复孔,至少重 复3次实验。引物序列见表1,内参基因为pmp-3。

### 1.3 统计学处理方法

所有数据均采用Prism Graphpad 7.0软件进行 制图及生物学统计分析。针对不同类型数据所选用 的统计分析方法如下所示: (1) 基因表达水平数据采 用*t*-test分析,以平均值±标准误(*x*±s)表示; (2) 线虫 抗氧化胁迫实验、咽喉肌肉跳动行为以及基础型和 增强型食物诱导的缓慢运动行为数据采用ANOVA with Dunnett's test分析,以平均值±标准误(*x*±s)表示; (3) 线虫寿命数据采用Two-Sided log-rank test分析。 *P*<0.05表示差异具有统计学意义。

### 2 结果与分析

## 2.1 *baz-2*和*set-6*突变体中表达上调基因的启动子 区域富集BLMP-1特征结合位点

我们先前的研究发现,有292个基因在baz-2和

set-6两种突变体线虫中的表达量均上调<sup>[10]</sup>。为了探 讨表观遗传调控因子BAZ-2和SET-6如何调控其下 游基因的表达,我们利用JASPAR数据库<sup>[11]</sup>对这些表 达量上调基因的启动子区域DNA序列进行了分析, 参照Score和Percent score的数值,发现BLMP-1和 EOR-1的特征结合位点在这些序列中有富集(表2)。

#### 2.2 blmp-1基因表达水平在线虫衰老过程中下调

实时荧光定量PCR检测结果显示, *blmp-1*基因的 表达水平在线虫成年后第9天与成年后第3天相比显 著降低(*P*<0.01), 而*eor-1*基因的表达水平在衰老过程 中显著上升(*P*<0.01, 图1)。这一结果说明, 转录因子 BLMP-1和EOR-1可能参与线虫衰老过程的调控。 **2.3** BAZ-2和SET-6通过BLMP-1调控线虫抵抗 氧化胁迫

衰老过程中的一个显著特征是机体对氧化压力的耐受程度降低。相比于野生型N2线虫, baz-2和 set-6突变体在衰老过程中对氧化胁迫具有更强的抵抗能力<sup>[10]</sup>, 那么我们推测, 敲除blmp-1和eor-1可能会影响baz-2和set-6突变体抗氧化胁迫能力。我们在 baz-2和set-6突变体中分别敲除blmp-1和eor-1, 检测 在不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理下的突变体的存活情况。结果 显示, 在不同浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理下, baz-2和set-6突变体 存活率均显著高于对照组野生型N2线虫(P<0.05, 图 2A和图2B); blmp-1; baz-2和 blmp-1; set-6双敲除突变

Table 1 Triner sequences					
基因名称	序列(5'→3')				
Gene name	Sequence $(5' \rightarrow 3')$				
pmp-3	Forward: TGG CCG GAT GAT GGT GTC GC				
	Reverse: ACG AAC AAT GCC AAA GGC CAG C				
blmp-1	Forward: GAA TGC AGA ATG GAG GAG GT				
	Reverse: TCA GGA AGC CTA TGA ATC CC				
eor-1	Forward: TGG ACC TGA AGG ATC AGA CA				
	Reverse: TGC TGT TGT TGT GGA TCA GA				
F58F12.1	Forward: CTT GAT GCT GCC CAA AGA G				
	Reverse: TGA TCA ATG CTT CAG CAA CTT				
mrps-7	Forward: TAG ACC CAT TTC TTG TTG CG				
	Reverse: GAA ATG GAA CCT GAT AGG TGG T				
ddp-1	Forward: AAC AAG TGC ACA CGC TCA C				
	Reverse: AGT GCT CGA CCA TGA AGT TG				
mrpl-47	Forward: CGA CGA CGA TGC CTA CGT GA				
	Reverse: ACT CGT GGA GCT CCT CTC TTG A				
mrps-14	Forward: CGA TCA TCC TCG TCT GAT TC				
	Reverse: TTG GAC TCC ACT GAG AGC TG				

表1 引物序列

### 表2 292个表达上调基因启动子富集的转录调控因子结合位点

 Table 2
 Transcription factor binding site motifs shared in 292 co-upregulated genes' promoter

基因	家族	分值	百分比分值	序列标志
Gene	Family	Score	Percent score	Sequence logo
eor-1	Beta beta alpha-zinc finger	21.81	77.89	2 m 1 2 4 6 8 10 12 14 Position
blmp-1	Beta beta alpha-zinc finger SET domain	15.48	77.38	$\underbrace{\operatorname{sm}^{2}}_{1}^{2} \xrightarrow{1}_{3} \xrightarrow{5}_{\operatorname{Position}}^{7} \xrightarrow{9}_{11}^{9}$

体与blmp-1突变体的存活率均无显著差异(P>0.05, 图2A); 而eor-1;baz-2和eor-1;set-6双敲除突变体存活 率均高于eor-1突变体(图2B)。以上实验结果表明, BLMP-1参与baz-2和set-6突变体线虫抵抗氧化胁迫, 而EOR-1则不参与该过程,提示BLMP-1在BAZ-2和 SET-6调控衰老中起重要作用。

## 2.4 BAZ-2和SET-6通过BLMP-1调控线虫行为 退化

生物个体的衰老伴随着行为和认知能力的降

低。相比于野生型N2线虫, baz-2和set-6突变体在年 老时仍能保持较好的行为表现, 这些行为包括进食、 BSR和ESR<sup>[10]</sup>。接下来我们探讨敲除blmp-1是否会 影响衰老baz-2和set-6突变体的行为表现。检测咽喉 肌肉跳动行为结果显示, 在线虫老年时期(成年后第 7天和第9天), baz-2和set-6突变体线虫咽喉肌肉跳动 速率显著高于野生型N2线虫(P<0.001, 图3A); 而敲 除blmp-1则很大程度上消除了老年baz-2和set-6突变 体线虫咽喉肌肉跳动能力较强的表型(图3B)。



在成年后第3天和第9天的野生型N2线虫中blmp-1和eor-1基因的表达水平。\*\*P<0.01。

The expression levels of *blmp-1* and *eor-1* in Day 3 and Day 9 of adulthood in N2 worms.  $**P \le 0.01$ .

图1 blmp-1和eor-1基因的表达水平在衰老过程的变化





A: 野生型N2线虫、baz-2、set-6、blmp-1、blmp-1;baz-2和blmp-1;set-6突变体线虫在不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理下的存活情况。B: 野生型N2线虫、baz-2、set-6、eor-1、eor-1;baz-2和eor-1;set-6突变体线虫在不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理下的存活情况。\*P<0.05,\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001,\*\*\*\*P<0.0001,n.s.: 无显著性差异。

A: the percentage of survival of N2, *baz-2*, *set-6*, *blmp-1*, *blmp-1*;*baz-2* and *blmp-1*;*set-6* mutant worms under oxidative. B: the percentage of survival of N2, *baz-2*, *set-6*, *eor-1*;*baz-2* and *eor-1*;*set-6* mutant worms under oxidative. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001, \*\*\*\**P*<0.000 1, n.s.: no significant difference.

图2 baz-2和set-6突变体抵抗氧化胁迫能力依赖于blmp-1

Fig.2 The abilities to resist the oxidative stress in baz-2 or set-6 mutant worms require blmp-1

检测年轻和年老线虫BSR和ESR行为结果显示,年轻时期的野生型N2线虫、baz-2、set-6、blmp-1、blmp-1;baz-2和blmp-1;set-6突变体均具有BSR和ESR行为,在饱食或饥饿的状态下均能表现出遇到食物后显著减慢运动速度的行为(P<0.001,图3C和图3D);在线虫老年时期,baz-2和set-6突变体相比于

野生型N2线虫仍能维持较好的BSR和ESR两种行为 (P<0.001, 图3E和图3F); 而在baz-2和set-6突变体中 敲除blmp-1则很大程度上消除了年老baz-2和set-6突 变体线虫的BSR和ESR行为(P>0.05, 图3E和图3F)。 以上结果说明, BAZ-2和SET-6调控线虫衰老过程中 的行为退化需要BLMP-1的参与。



A: 野生型N2线虫、baz-2和set-6突变体线虫咽喉肌肉跳动速率在衰老过程中的变化。\*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001, 与野生型N2线虫比较。B: blmp-1, blmp-1; baz-2和blmp-1; set-6突变体线虫咽喉肌肉跳动速率在衰老过程中的变化。\*P<0.05, \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001, 与blmp-1;突变体线虫咽喉肌肉跳动速率在衰老过程中的变化。\*P<0.05, \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001, 与blmp-1;突变体线虫U较。C、D: 年轻时期野生型N2线虫、baz-2、set-6、blmp-1、blmp-1; baz-2和blmp-1; set-6突变体线虫BSR和ESR。E、F: 年老时期野生型N2线虫、baz-2、set-6、blmp-1、blmp-1; set-6突变体线虫BSR和ESR。括号里数据为实验次数, n为实验线虫数目。\*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001, n.s.: 无显著性差异。

A: age-related deterioration of pharyngeal pumping in N2, baz-2 and set-6 worms. \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.000 1 vs N2. B: age-related deterioration of pharyngeal pumping in blmp-1;baz-2 and blmp-1;set-6 mutant worms. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs blmp-1 C,D: BSR and ESR in young N2, baz-2, set-6, blmp-1; blmp-1;baz-2 and blmp-1;set-6 mutant worms. E,F: BSR and ESR in aged N2, baz-2, set-6, blmp-1; blmp-1;baz-2 and blmp-1;set-6 mutant worms. E,F: BSR and ESR in aged N2, baz-2, set-6, blmp-1; blmp-1;baz-2 and blmp-1;set-6 mutant worms. n is the numbers of independent assays. The numbers of independent assays are indicated in parentheses, n is the number of tested hermaphrodites.\*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.000 1, n.s.: no significant difference.

图3 baz-2和set-6调控衰老相关的行为退化需要blmp-1参与 Fig.3 The regulation of age-related behavior deterioration by baz-2 and set-6 requires blmp-1



野生型N2线虫、baz-2、set-6、blmp-1、blmp-1;baz-2和blmp-1;set-6突变体的生存曲线。数据代表所有实验对象的结果总和,独立实验次数和 实验所用的线虫数目标注在括号中。\*\*\*\*P<0.0001。

Lifespan curve of N2, baz-2, *set-6*, *blmp-1*, *blmp-1;baz-2* and *blmp-1;set-6* mutant worms. Data represent the sum of animals in multiple experiments; the number of independent experiments and tested hermaphrodites are indicated in parentheses. \*\*\*\**P*<0.000 1.



图4 baz-2和set-6调控寿命需要blmp-1参与 Fig.4 The regulation of longevity by baz-2 and set-6 requires blmp-1

RT-qPCR检测野生型N2线虫、baz-2、set-6、blmp-1、blmp-1;baz-2和blmp-1;set-6突变体线虫中编码线粒体功能蛋白核基因的表达水平 \*P<0.05, \*\*P<0.01, n.s.: 无显著性差异。

RT-qPCR analysis the expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in N2, *baz-2*, *set-6*, *blmp-1*, *blmp-1*;*baz-2* and *blmp-1*;*set-6* mutant worms at the L4 stage. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, n.s.: no significant difference.

图5 突变体baz-2和set-6线虫中编码线粒体功能蛋白核基因表达的提高依赖于blmp-1

Fig.5 The upregulation of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in *baz-2* and *set-6* mutant worms requires *blmp-1* 

### 2.5 BAZ-2和SET-6通过BLMP-1调控线虫寿命

接下来我们检测了野生型N2线虫、baz-2、set-6、blmp-1、blmp-1;baz-2和blmp-1;set-6突变体线虫的 寿命。检测结果显示,baz-2突变体和set-6突变体的 平均寿命分别为21天和20天,野生型N2线虫的平均 寿命为18天,baz-2和set-6突变体的平均寿命相比于 野生型N2线虫均有延长(P<0.0001);而blmp-1;baz-2 和blmp-1;set-6双敲除突变体寿命并不比blmp-1突变 体寿命长(图4),表明BAZ-2和SET-6对线虫寿命的调 控需要BLMP-1参与。

# 2.6 BAZ-2和SET-6通过BLMP-1调控线粒体功能相关基因表达

前文报道BAZ-2和SET-6调控线粒体相关基因的表达<sup>[10]</sup>。为了探讨BLMP-1是否参与上述调控过

程,我们检测了*blmp-1;baz-2和blmp-1;set-6*双敲除突 变体中线粒体功能相关基因的表达情况,发现和野 生型N2线虫相比,*baz-2和set-6*突变体中的编码线粒 体功能蛋白的核基因表达水平显著提高(*P*<0.05); 而在*blmp-1;baz-2、blmp-1;set-6和blmp-1*突变体中, 这些基因的表达水平无显著差异(*P*>0.05)(图5),表 明BAZ-2和SET-6调控线粒体功能相关基因表达确 实需要BLMP-1参与。

### 3 讨论

在本研究中,我们利用生物信息学,分析了baz-2 和set-6突变体线虫中表达上调基因的启动子区域 DNA序列,发现转录因子BLMP-1的特征结合位点 在这些序列中富集。为了探究转录因子BLMP-1

在BAZ-2和SET-6调控线虫衰老中的作用,我们在 baz-2和 set-6突变体中分别敲除 blmp-1 基因, 检测 blmp-1;baz-2和blmp-1;set-6双敲除突变体线虫的寿 命、老年时咽喉肌肉跳动能力、基础型和增强型食 物诱导的缓慢运动反应和抗氧化应激能力,发现敲 除blmp-1消除了baz-2和set-6敲除突变体线虫寿命延 长、老年时期维持较好的咽喉肌肉跳动行为和较 强的抗氧化能力等表型,提示BLMP-1参与BAZ-2和 SET-6对线虫寿命及行为退化的调控。为了进一步 明确BLMP-1参与BAZ-2和SET-6调控线虫衰老的可 能机制,本研究通过RT-qPCR检测野生型N2线虫、 baz-2、set-6、blmp-1、blmp-1;baz-2和blmp-1;set-6 突变体线虫中编码线粒体功能蛋白核基因的表达水 平,发现转录因子BLMP-1抑制这些基因的表达;并 且, blmp-1基因的表达水平在线虫衰老过程中下调。 这些结果表明,表观遗传因子BAZ-2和SET-6调控线 粒体功能、衰老过程中的行为退化需要转录因子 BLMP-1的参与。

线粒体是重要的细胞器,不仅是氧化磷酸化和产 生ATP的主要场所,而且还参与钙稳态调节、先天免 疫反应和细胞程序性死亡等生物学过程<sup>[19-20]</sup>。我们前 期工作发现,BAZ-2和SET-6抑制线粒体功能相关基因 的表达,下调线粒体功能,加速线虫衰老<sup>[10]</sup>。在本研 究中,我们发现BAZ-2和SET-6调控线粒体功能相关 基因需要BLMP-1参与,并且我们也发现BLMP-1调控 这些基因的表达。因此,BLMP-1通过调控线粒体功 能相关基因的表达进而调控线虫衰老。

在本研究中,我们发现BAZ-2和SET-6调控线 虫衰老需要转录因子BLMP-1参与,但是BAZ-2和 SET-6是否直接调节BLMP-1,或是间接通过其他因 子调节转录因子BLMP-1还有待进一步研究。

综上所述,本研究结果表明,表观遗传因子 BAZ-2和SET-6调控衰老过程中的线粒体功能,以及 行为退化需要转录因子BLMP-1的参与。然而在哺 乳动物中该调控机制能否作为改善衰老过程行为退 化和延长寿命的潜在药物靶标还需进一步研究。

### 参考文献 (References)

- GUARENTE L. Aging research-where do we stand and where are we going [J]? Cell, 2014, 159(1): 15-9.
- [2] LÓPEZ-OTÍN C, BLASCO M A, PARTRIDGE L, et al. The

hallmarks of aging [J]. Cell, 2013, 153(6): 1194-217.

- [3] CRIMMINS E M. Lifespan and healthspan: past, present, and promise [J]. Gerontologist, 2015, 55(6): 901-11.
- [4] HANSEN M, KENNEDY B K. Does longer lifespan mean longer healthspan [J]? Trends Cell Biol, 2016, 26(8): 565-8.
- YIN J A, GAO G, LIU X J, et al. Genetic variation in glia-neuron signalling modulates ageing rate [J]. Nature, 2017, 551(7679): 198-203.
- [6] YIN J A, LIU X J, YUAN J, et al. Longevity manipulations differentially affect serotonin/dopamine level and behavioral deterioration in aging *Caenorhabditis elegans* [J]. J Neurosci, 2014, 34(11): 3947-58.
- [7] BANSAL A, ZHU L J, YEN K, et al. Uncoupling lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* longevity mutants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(3): E277-86.
- [8] BEARD J R, OFFICER A, DE CARVALHO I A, et al. The world report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing [J]. Lancet, 2016, 387(10033): 2145-54.
- [9] BRENNER S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 1974, 77(1): 71-94.
- [10] YUAN J, CHANG S Y, YIN S G, et al. Two conserved epigenetic regulators prevent healthy ageing [J]. Nature, 2020, 579(7797): 118-22.
- [11] SANDELIN A, ALKEMA W, ENGSTRÖM P, et al. JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(Database issue): D91-4.
- [12] HORN M, GEISEN C, CERMAK L, et al. DRE-1/FBX011dependent degradation of BLMP-1/BLIMP-1 governs *C. elegans* developmental timing and maturation [J]. Dev Cell, 2014, 28(6): 697-710.
- [13] STEC N, DOERFEL K, HILLS-MUCKEY K, et al. An epigenetic priming mechanism mediated by nutrient sensing regulates transcriptional output during *C. elegans* development [J]. Curr Biol, 2021, 31(4): 809-26,e6.
- [14] HUANG T F, CHO C Y, CHENG Y T, et al. BLMP-1/Blimp-1 regulates the spatiotemporal cell migration pattern in *C. elegans* [J]. PLoS Genet, 2014, 10(6): e1004428.
- [15] YANG J, FONG H T, XIE Z, et al. Direct and positive regulation of *Caenorhabditis elegans bed-3* by PRDM1/BLIMP1 ortholog BLMP-1 [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1849(9): 1229-36.
- [16] HYUN M, KIM J, DUMUR C, et al. BLIMP-1/BLMP-1 and metastasis-associated protein regulate stress resistant development in *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 2016, 203(4): 1721-32.
- [17] ZHAO Y, GILLIAT A F, ZIEHM M, et al. Two forms of death in ageing *Caenorhabditis elegans* [J]. Nat Commun, 2017, 8: 15458.
- [18] SAWIN E R, RANGANATHAN R, HORVITZ H R. C. elegans locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway [J]. Neuron, 2000, 26(3): 619-31.
- [19] SPINELLI J B, HAIGIS M C. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism [J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(7): 745-54.
- [20] SORRENTINO V, MENZIES K J, AUWERX J. Repairing mitochondrial dysfunction in disease [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2018, 58: 353-89.