

PP1 γ 基因 DNA 甲基化在学习记忆中的作用

侯林^{1,2#}, 许晟迪^{1,2#}, 张柱霞^{1,2}, 田小莉^{1,2}, 姜树原^{1,2},
刘友^{1,2}, 巴德仁贵^{1,2}, 黄丽华^{1,2*}, 邵国^{1,2,3*}

- (1. 包头医学院中心实验室生物医学研究中心, 基础学院, 包头医学院神经科学研究所, 内蒙古 包头 014010;
2. 内蒙古自治区低氧转化医学重点实验室, 内蒙古 包头 014010;
3. 首都医科大学 宣武医院 低氧适应转化医学北京重点实验室, 北京 100053)

【摘要】 目的 研究蛋白磷酸酶 1 γ (protein serine/threonine phosphatase, PP1 γ) 和 DNA 甲基化在学习记忆中的作用。方法 通过 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs) 抑制剂 5-aza-cdR 处理小鼠, 观察小鼠学习记忆情况及其 PP1 γ 表达变化, 通过水迷宫测定小鼠的学习记忆能力, Real-time PCR 检测小鼠海马区 DNMTs 和 PP1 γ mRNA 转录水平以及 Western-Blot 测定 PP1 γ 的蛋白质表达水平。为了进一步探讨 5-aza-cdR 对小鼠学习记忆的影响是否与细胞增殖和凋亡有关, 用 5-aza-cdR 处理 NG108-15 神经细胞, 流式细胞仪、xCelligence 系统和荧光素酶报告基因分别检测 5-aza-cdR 对细胞增殖、凋亡和 PP1 γ 的转录活性的影响。结果 侧脑室注射了 5-aza-cdR 的小鼠空间学习记忆能力增加, 同时小鼠海马区的 DNMTs 和 PP1 γ 的表达降低; 10 μ mol/L 5-aza-cdR 抑制细胞增殖, 降低 PP1 γ 的转录活性, 但是没有诱导细胞凋亡。结论 5-aza-cdR 对 PP1 γ 的表达抑制与小鼠学习记忆有关。

【关键词】 蛋白磷酸酶 1 γ ; 5-aza-cdR; 海马; 学习记忆

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 02-0146-07

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.02.006

Effect of expression of PP1 γ and DNA methylation on learning and memory in mice

HOU Lin^{1,2#}, XU Sheng-di^{1,2#}, ZHANG Zhu-xia^{1,2}, TIAN Xiao-li^{1,2}, JIANG Shu-yuan^{1,2},
LIU You^{1,2}, BADE Rengui^{1,2}, HUANG Li-hua^{1,2*}, SHAO Guo^{1,2,3*}

- (1. Biomedicine Research Center, Basic Medical College and Neuroscience Institute, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014010, China; 2. Inner Mongolia Key Laboratory of Hypoxic Translational Medicine, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014010; 3. Beijing Key Laboratory of Hypoxia Adaptation Translational Medicine, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053)

【Abstract】 Objectives To study the role of protein serine/threonine phosphatase 1 γ (PP1 γ) and DNA methylation in learning and memory. **Methods** The mice and cells were treated with 5-aza-cdR, a DNA methyltransferase (DNMT) inhibitor, and to observe the changes of ability of learning and memory and expression levels of PP1 γ in mice. The ability of learning and memory in mice was assessed by Morris Water maze test. The mRNA expression levels of DNMTs and PP1 γ in the mouse hippocampus were determined by real-time PCR and the protein level of PP1 γ was measured by Western blot. To further investigate their role, NG108-15 cell line was treated with 5-aza-cdR. Flow cytometry, xCelligence and luciferase were used to detect the effects of 5-aza-cdR on the proliferation, apoptosis and PP1 γ transcription in the NG108-15 cells. **Results** The ability of learning and memory was enhanced in the mice after administration of 5-aza-cdR injection. The expressions of

【基金项目】 国家自然科学基金(Nos: 81460283, 81660307); 内蒙古自然科学基金(No: 2014MS0810)。

【作者简介】 侯林(1992-), 男, 硕士研究生, 专业: 公共卫生与预防医学, E-mail: holy.lin@foxmail.com; 许晟迪(1992-), 女, 硕士研究生, 专业: 神经生物学, E-mail: 2219984188@qq.com。#共同第一作者

【通讯作者】 邵国, 男, 教授, 研究方向: 神经生物学, E-mail: shao_guo_china@163.com; 黄丽华, 女, 副教授, 研究方向: 神经毒理学, E-mail: huanglihua858@163.com

DNMTs and PP1 γ were decreased in the mouse hippocampus after injection of 5-aza-cdR. On the other side, 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-cdR inhibited cell proliferation and decreased PP1 γ transcription without inducing apoptosis. **Conclusions** Our data demonstrate that 5-aza-cdR inhibits the expression of PP1 γ which is related to learning and memory in mice.

【Key words】 PP1 γ ; 5-aza-cdR; Hippocampus; Learning and memory

Corresponding author: SHAO Guo, E-mail: shao_guo_china@163.com; HUANG Li-hua, E-mail: huanglihua858@163.com

神经元的基因转录在学习和记忆的形成中是必须的^[1]。而控制该转录的分子机制非常复杂,其中包括蛋白激酶和蛋白磷酸酶的转录调控^[2]。蛋白磷酸酶 1 γ (protein serine/threonine phosphatase, PP1) 在调节染色体重塑过程中控制转录依赖性记忆调节行为发挥着至关重要的作用^[3]。它是大脑中的第二丰富的酶,包含 4 个表达不同的亚基(α , β , γ 和 δ)。其中 PP1 α 主要表达在细胞质中,PP1 β 和 PP1 δ 在胞质和胞核中均有表达,PP1 γ 显著表达于细胞核中^[4]。这 4 种亚基依赖它们的亚细胞定位和相互作用基因,而定位作用于不同底物。PP1 γ 的研究最为广泛,不仅在大脑中神经元信号和突触强度发挥负向调节作用^[5-7],同时被认为是学习和记忆抑制性分子^[8]。但是,PP1 γ 在调节学习记忆中的表达调控的分子机制到目前为止还没有完全明确。

学习记忆的形成涉及一系列细胞和分子的变化^[9],包括基因转录、蛋白质合成和突触可塑性。DNA 甲基化是表观遗传学中主要形式之一,在基因转录中发挥重要调节作用。Day 等^[10]的研究发现 DNA 甲基化显著促进学习记忆的形成。催化 DNA 甲基化的形成的酶称为 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT),主要包括 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B,与非催化亚基 DNMT3L 在配子、胚胎和体细胞组织的形成与发展中建立特定的 DNA 甲基化模型。同时,富含 GC 的 PP1 γ 启动子区的甲基化水平影响其表达^[11]。

5-aza-cdR 是一种核苷酸类的甲基化抑制剂,它主要通过抑制 DNA 甲基化的转录表达而影响 DNA 的表达水平,而被广泛的应用于研究 DNA 甲基化^[12-14]。DNA 甲基化在神经发育和分化、学习记忆中的突触可塑性都扮演重要角色^[15-18],因此本研究通过 5-aza-cdR 处理小鼠和细胞来探讨 PP1 γ 的甲基化和学习记忆之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8 周龄 SPF 级雄性 ICR 小鼠,体重(18~22) g,86 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司

[SCXK(京)2011-0012]。无菌手术在包头医学院低氧转化医学内蒙古重点实验室进行^[19][SYXK(蒙)2016-1017]。

1.2 试剂仪器

5-aza-cdR (美国 Sigma-Aldrich 公司),牛血清白蛋白(中国上海晨达医药科技有限公司),巴比妥钠(中国重庆化学试剂厂),Trizol (日本 Takara 公司),Superscript III 试剂盒(美国 Invitrogen 公司),RIPA(中国上海碧云天生物技术有限公司),BCA 试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司),DMEM 完全培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司),青链霉素(美国 Gibco 公司),FITC annexin V Apoptosis Detection Kit II(美国 BD 公司),pGL-3 载体(美国 Promega 公司),Dual-Glo 荧光素酶报告基因检测系统(美国 Promega 公司),大脑立体定位注射仪(中国瑞沃德生命科学技术有限公司),水迷宫装置(中国北京众实迪创科技发展有限公司),核酸蛋白分析仪 NanoDrop 2000(美国 Thermo Fisher 公司),实时荧光定量 Real-time PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司),酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司),凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),荧光倒置显微镜 TE2000-U(日本 Nikon 公司),细胞培养箱(美国 Thermo Fisher 公司),xCELLigence 系统(中国杭州艾森生物公司),流式细胞仪 BD FACSCantoTM II(美国 BD 公司)

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠侧脑室注射

小鼠侧脑室注射方法改进于 Haley 和 McCormick 的方法^[20]。5-aza-cdR 溶解在无菌的磷酸盐缓冲液(PBS)中,使用前稀释至 10 $\mu\text{mol/L}$ 。1%戊巴比妥钠麻醉小鼠,固定于大脑立体定位注射仪上,头顶部去毛,消毒皮肤,在头顶部正中切口,暴露前囟。依据小鼠立位解剖图谱,于前囟后 0.5 mm,中线右侧 1 mm,垂直进针,深度 2.5 mm。实验组向右侧脑室缓慢注入 5 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-cdR,每次注射时间为 5 min,留针 2 min,保证药物充分被吸收,缓慢退针。对照组注射等体积的 0.1% 的牛血清白蛋白^[21]。皮肤切口处用青霉素抗菌,缝合伤口。

1.3.2 水迷宫测试

水迷宫实验方法模仿其他课题组的操作^[22],连续训练 5 d。训练完成后,小鼠随机分成 2 组,每组 43 只,分别侧脑室注射 5-aza-cdR 和 BSA,休息 1 d 后,再次进行水迷宫测试,水下平台移至前一阶段放置位置的对面象限,连续训练 5 d,每天 4 个象限,记录每只小鼠找到平台的时间,检测小鼠的学习记忆能力。

1.3.3 Real-time PCR 检测小鼠海马中 DNMTs 和 PP1 γ 的 mRNA 表达水平

Trizol 法分离小鼠海马中的总 RNA 并利用逆转录试剂盒逆转录成为 cDNA,于 -20 °C 保存。引物由 Invitrogen 公司合成,引物序列参见 Zhang^[23] 的文章。Q-PCR 结果利用 $\Delta\Delta CT$ 法进行分析, $\Delta CT = CT_{\text{目标基因}} - CT_{\text{beta-actin}}$, mRNA 相对丰度值 $F = \Delta\Delta CT = 2^{-\Delta CT}$ 。

1.3.4 蛋白印迹

RIPA 法提取小鼠海马中的总蛋白。BCA 试剂盒检测总蛋白质的浓度,上样量为 20 μg 。Western-blot 检测 PP1 γ 和 beta-actin 在小鼠海马中的含量,方法如同本课题组 Zhang^[23] 等。最后通过蛋白质凝胶成像系统扫描图像并分析其灰度值。

1.3.5 细胞培养和 5-aza-cdR 处理

0.6% 青霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基培养小鼠神经细胞 NG108-15,培养箱培养条件为 37 °C、95% 湿度和 5% CO_2 。细胞融合度达到 60% 左右时,去掉旧培养基,重新补加含有 5-aza-cdR 或 BSA 的新培养基,孵育 24 h。

1.3.6 xCELLigence 系统(RTCA)实时监测细胞增殖

NG108-15 细胞株在进行细胞增殖实验前一天进行细胞传代,当细胞融合度在 60% ~ 80% 之间,从培养箱中取出细胞,悬浮细胞,调整细胞浓度达每孔 8000 个,接种在 16 孔板中。E-plate 置于仪器检测台上测试培养基的基线。上室孔中加入细胞悬液,室温放置 30 min。测定 24 h 内细胞贴壁生长情况。0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza-cdR 药物分别处理细胞,每 15 min 记录一次细胞的增殖指数(CI),连续监测 5 d。

1.3.7 流式细胞仪监测细胞凋亡

收集 6 孔板中的细胞,冰冷的 PBS 洗 2 遍,1 mL 的 1 \times binding 缓冲液悬浮细胞,转移 100 μL 细胞悬液至 BD 管中,然后每个 BD 管中加入 2 μL 的 FITC annexin V 和 2 μL PI 严格按照说明书的方法

进行操作,最后使用流式细胞仪监测细胞的凋亡变化情况。

1.3.8 荧光素酶报告基因检测

PP1 γ 启动子区(-1 bp 至 -420 bp)插入 pGL-3 载体,然后转染细胞。通过 Dual-Glo 荧光素酶报告基因检测系统检测其活性表达,Renilla 标准化其活性。

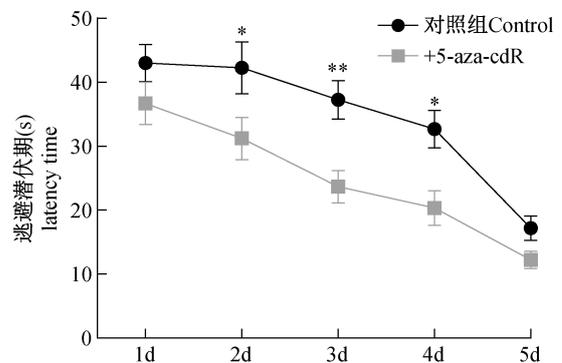
1.3.9 统计学处理

所有数据结果以均值 \pm 标准差表示,用 SPSS 10.0 数据统计软件 ANOVA 和 Tukey 对组间数据进行处理和分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 5-aza-cdR 增加小鼠空间学习记忆能力

通过水迷宫方法检测 5-aza-cdR 对小鼠学习记忆能力的影响。记录小鼠在 2 min 内找到水下 1 cm 隐藏平台的时间,我们发现:与对照组相比,大脑立体定位注射了 5-aza-cdR 的小鼠找到平台的时间明显缩短,尤其是在第 2、3、4 天,差异有显著性($P < 0.05$) (如图 1),而其游泳的速度没有变化,表明 5-aza-cdR 明显提高了小鼠学习记忆能力。



注: * $P < 0.05$, $n = 43$ 。

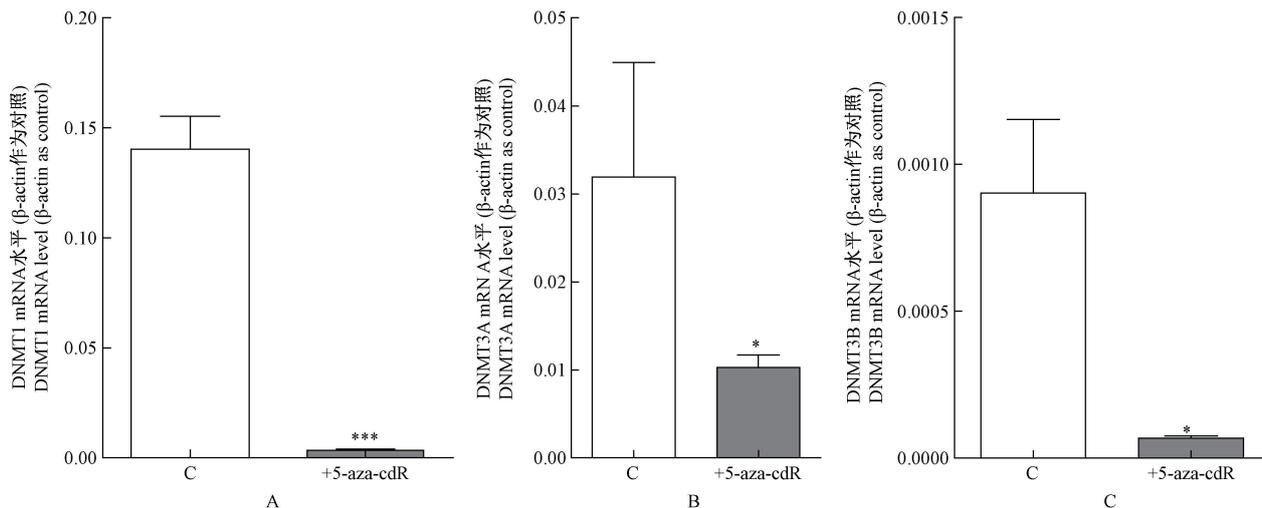
图 1 水迷宫测定小鼠空间学习记忆能力

Note. * $P < 0.05$, $n = 43$ for each group.

Fig. 1 The results of Morris water maze tests show that 5-aza-cdR decreased the escape latency for mice, as a criterion for spatial memory

2.2 5-aza-cdR 下调小鼠海马中 DNMTs 的 mRNA 转录水平

DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 的 mRNA 转录水平变现情况如图 2 所示。与对照组相比,5-aza-cdR 处理的小鼠海马中 DNMTs 的转录水平明显降低($P < 0.05$)。



注:A; DNMT1 (* $P=8.0E-4 < 0.05$); B; DNMT3A (* $P=1.5E-2 < 0.05$); C; DNMT3C (* $P=2.9E-2 < 0.05$); $n=4$ 。

图 2 Real-time PCR 分析小鼠海马中 DNMTs 的表达变化情况

Note. A; DNMT1; B; DNMT3A; C; DNMT3C; $n=4$.

Fig. 2 Real-time PCR analysis for the expression of DNMTs in the mouse hippocampus

2.3 5-aza-cdR 下调小鼠海马中 PP1 γ 的转录和表达水平

小鼠大脑立体定位注射了 5-aza-cdR 后,检测海马中 PP1 γ 的 mRNA 和蛋白质表达水平,结果如图 3 所示。图 3A 显示:5-aza-cdR 明显下调 PP1 γ 的 mRNA 转录水平,差异有显著性 ($P < 0.05$);图 3B 显示:5-aza-cdR 明显降低 PP1 γ 的蛋白质表达水平,差异有显著性 ($P < 0.05$)。

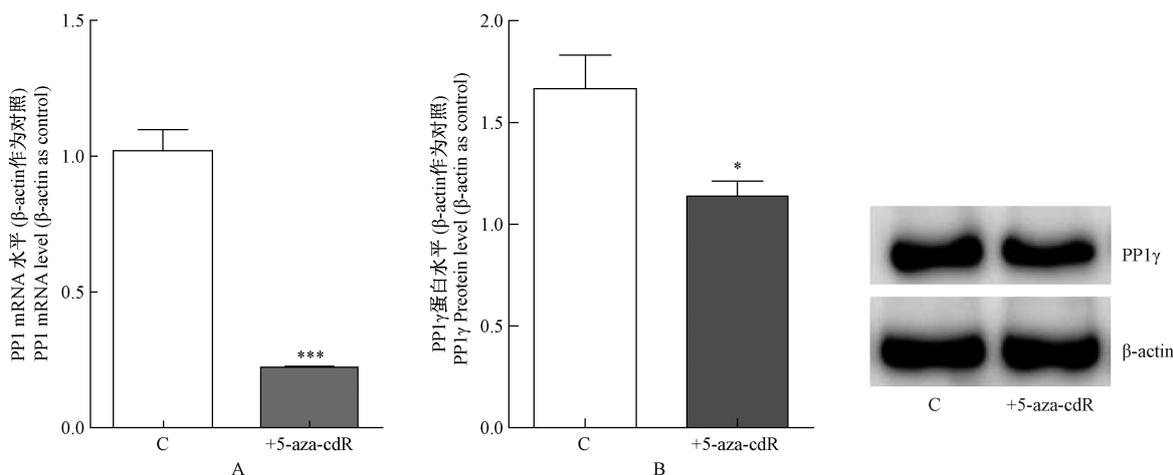
2.4 RTCA 检测细胞增殖

xCELLigence RTCA 检测 5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 5-aza-cdR 对 NG108-15 细胞增殖的抑制作用。

我们发现 5-aza-cdR 对细胞增殖有明显的抑制作用,且表现为浓度依赖性,如图 4A 所示。当 5-aza-cdR 的浓度达到 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,NG108-15 细胞增殖基本完全被抑制,因此此浓度作为该实验的最佳选择浓度。与对照组相比,5-aza-cdR 明显抑制 NG108-15 细胞增殖,差异有显著性 ($P < 0.05$),如图 4B 所示。

2.5 5-aza-cdR 促进 NG108-15 细胞的凋亡

为了进一步验证 5-aza-cdR 对细胞增殖的影响,我们通过流式细胞仪检测 5-aza-cdR 对细胞凋亡影响,结果显示 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza-cdR 对早期和晚期凋亡的影响没有显著性 (图 5, $P > 0.05$)。



注:A; * $P=5.0E-4 < 0.05$, $n=3$; B; * $P=3.1E-2 < 0.05$, $n=3$ 。

图 3 PP1 γ mRNA 表达变化情况和小鼠海马区 PP1 γ 蛋白质表达变化

Note. A; * $P=5.0E-4 < 0.05$, $n=3$; B; * $P=3.1E-2 < 0.05$, $n=3$ 。

Fig. 3 Expression of PP1 γ mRNA and Western blot analysis of PP1 γ expression in the mouse hippocampus

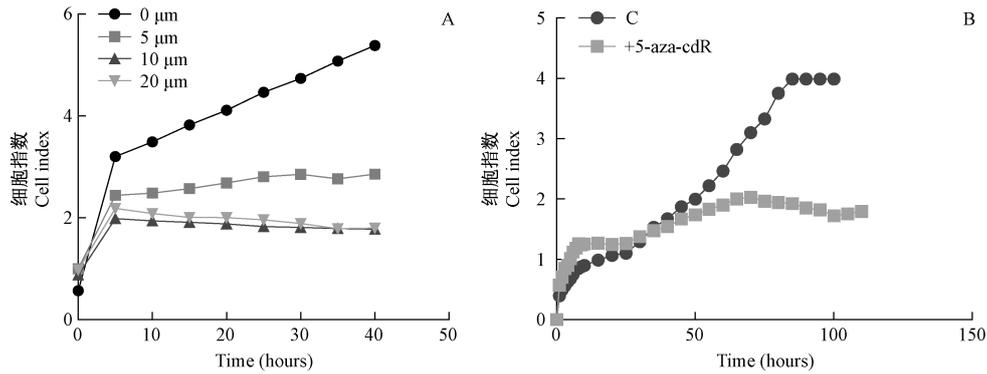
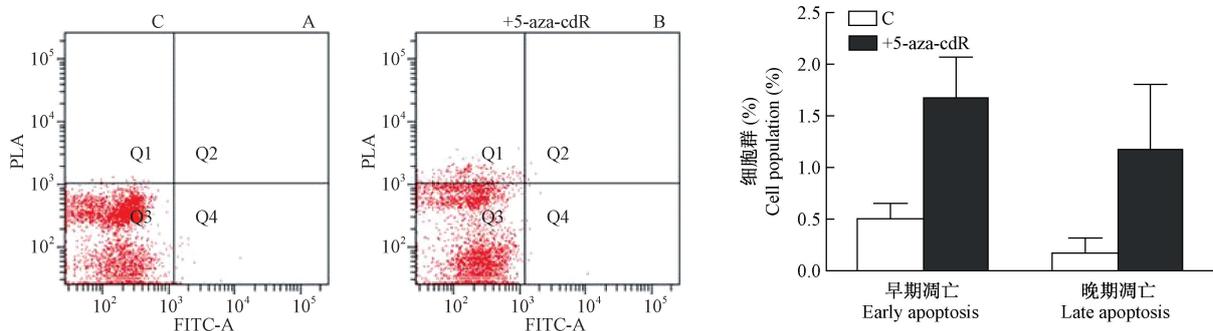


图 4 RTCA 分析 5-aza-cdR 对神经细胞 NG108-15 细胞增殖的抑制作用

Fig. 4 RTCA analysis for the proliferation of NG108-15 cells treated with different concentrations of 5-aza-cdR



注: A: 表示对照组细胞的凋亡变化情况; B: 表示的 5-aza-cdR 处理后细胞的凋亡变化情况; C: 表示的是两组处理情况下细胞的早期和晚期凋亡的柱状图。

图 5 流式细胞仪检测细胞的凋亡变化情况

Note. The upper panels show the apoptosis in NG108-15 cells in the control group (A) and test group (B); C: Apoptosis in NG108-15 cells.

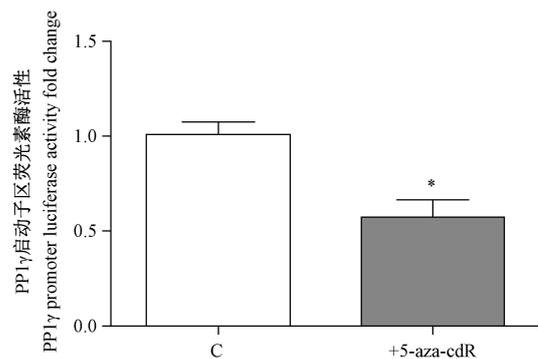
Fig. 5 FCM analysis for the apoptosis in 5-aza-cdR-treated NG108-15 cells

2.6 5-aza-cdR 抑制 NG108-15 细胞中 PP1γ 的转录活性

研究 5-aza-cdR 对 PP1γ 启动子区(-1 bp 到 -420 bp) 转录活性的影响, PP1γ 启动子区和 pGL-3 质粒转入到 pRL-TK。海肾荧光素酶活性作为对照来检测 PP1γ 启动子区 荧光素酶活性。如图 6 所示, 与对照组相比, 5-aza-cdR 可以明显的降低 PP1γ 启动子区的活性($P < 0.05$)。

3 讨论

表观遗传学修饰是影响大脑突触可塑性形成的关键因素, 其中 DNA 甲基化的研究最为广泛。DNA 甲基化在学习记忆的形成中发挥着重要的作用^[24]。Sweatt^[25]和他的同事已经证明 DNA 甲基化的动态改变在长时记忆形成中是必须的。研究显示 DNA 甲基化在调节突触可塑性和学习记忆中发挥着举足轻重的作用^[26]。DNA 甲基化影响神经元的



注: * $P = 5.0E - 2 < 0.05, n = 3$ 。

图 6 5-aza-cdR 下调 PP1γ 启动子区活性

Note. * $P = 5.0E - 2 < 0.05, n = 3$ 。

Fig. 6 5-aza-cdR down-regulates PP1γ promoter activity

可塑性, 注射了甲基化抑制剂后动物恐惧水平降低^[11]。随着研究的不断进展, 发现 DNA 甲基化在大脑发育和神经元功能中发挥着关键的作用^[23,27]。这些研究进一步证明了 DNA 甲基化在学习记忆中

的关键作用。本研究发现 DNA 甲基化抑制剂 5-aza-cdR 明显抑制 DNA 甲基化转移酶的 mRNA 转录水平,同时它对小鼠的空间学习记忆能力明显提高。结果显示了 DNA 甲基化可能是与学习记忆能力关系密切。

本研究发现小鼠侧脑室注射 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza-cdR 可以增加小鼠空间学习记忆能力,显示这种变化可能与某些分子甲基化的改变有关。前期的研究中我们发现, DNMTs 的降低伴随着 PP1 γ 的表达降低^[28]。PP1 与学习记忆的形成有关,可能涉及与学习记忆相关的靶基因启动子区的转录或调节,被认为是海马中突触强度和突触可塑性负性调节因子和成年鼠中潜在的记忆抑制剂^[8,26]。我们的研究结果发现,在成年小鼠海马和细胞模型中, DNA 甲基化抑制剂 5-aza-cdR 抑制 PP1 γ 的表达和转录活性。另一方面, PP1 γ 可能通过其磷酸化作用影响某些高级特殊行为的突触传输。虽然 PP1 γ 的 DNA 甲基化的机制还没有完全阐述明白,但是我们已经明确 PP1 γ 表达降低可能与提高学习记忆能力有关。

为了进一步明确 5-aza-cdR 对学习记忆的影响与细胞的增殖和凋亡的关系。我们进一步选择了 NG108-15 细胞作为体外模型进行研究。通过增殖曲线,我们发现当 5-aza-cdR 的浓度达到 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞增殖基本完全被抑制。由于 5-aza-cdR 没有明显促进细胞的早期和晚期凋亡。因此我们推断 5-aza-cdR 促进小鼠学习记忆与新神经元的形成无关和凋亡无关。荧光素酶报告基因结果显示, 5-aza-cdR 明显降低了 NG108-15 细胞中 PP1 γ 的转录活性。结合体外细胞实验和小鼠体内实验, 5-aza-cdR 促进小鼠学习记忆可能与 PP1 γ 的改变有关。5-aza-cdR 作为 DNMTs 抑制剂,能够降低 DNA 的甲基化程度。有研究发现低甲基化是保持大脑内基因表达稳定的需要^[22]。但是我们发现 5-aza-cdR 降低了小鼠海马区 PP1 γ 的表达和神经细胞的转录活性,其中可能涉及一些分子机制的改变。通过该研究,我们还不能确定 5-aza-cdR 对 PP1 γ 的影响是否是 DNMTs 有关。

PP1 γ 甲基化变化和学习记忆的关系还未见到相关的报道。我们的研究首次报道了成年小鼠海马 PP1 γ 在 5-aza-cdR 对学习记忆和突触可塑性的形成中扮演着重要的角色。因此 PP1 γ 低表达对学习记忆的影响可能与 DNA 甲基化有很大关系。

参 考 文 献

[1] Capitano F, Gargiuli C, Angerilli A, et al. RNA polymerase I

transcription is modulated by spatial learning in different brain regions [J]. J Neurochem, 2016, 136(4): 706–716.

- [2] Chagniel L, Bergeron Y, Bureau G, et al. Regulation of tyrosine phosphatase STEP61 by protein kinase A during motor skill learning in mice [J]. Plos One, 2014, 9(1): e86988.
- [3] Day JJ, Sweatt JD. DNA methylation and memory formation [J]. Nature Neurosci, 2010, 13(11): 1319–1323.
- [4] Desjobert C, El Mai M, Gérard-Hirne T, et al. Combined analysis of DNA methylation and cell cycle in cancer cells [J]. Epigenetics, 2015, 10(1): 82–91.
- [5] Einstein F, Thompson R F, Bhagat T D, et al. Cytosine methylation dysregulation in neonates following intrauterine growth restriction [J]. Plos One, 2010, 5(1): e8887.
- [6] Frühwald MC, Plass C. Global and gene-specific methylation patterns in cancer: aspects of tumor biology and clinical potential [J]. Mol Genet Metab, 2002, 75(1): 1–16.
- [7] Genoux D, Haditsch U, Knobloch M, et al. Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory [J]. Nature, 2002, 418(6901): 970–975.
- [8] Gräff J, Koshibu K, Jouvenceau A, et al. Protein phosphatase 1-dependent transcriptional programs for long-term memory and plasticity [J]. Learn Mem, 2010, 17(7): 355–363.
- [9] Gros A, Veyrac A, Laroche S. [Brain and memory: new neurons to remember] [J]. Biologie Aujourd'hui, 2015, 209(3): 229–248.
- [10] Hédou GF, Koshibu K, Farinelli M, et al. Protein phosphatase 1-dependent bidirectional synaptic plasticity controls ischemic recovery in the adult brain [J]. J Neurosci, 2008, 28(1): 154–162.
- [11] Isaac J. Protein phosphatase 1 and LTD: synapses are the architects of depression [J]. Neuron, 2002, 32(6): 963–966.
- [12] Kennedy A J, Sweatt J D. Drugging the methylome: DNA methylation and memory. [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2016; 51(3): 185–194
- [13] Li S, Goorha S, Ballou LR, et al. Intracerebroventricular interleukin-6, macrophage inflammatory protein-1beta and IL-18: pyrogenic and PGE(2)-mediated? [J]. Brain Res, 2003, 992(1): 76–84.
- [14] Miller CA, Campbell SL, Sweatt JD. DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity [J]. Neurobiol Learn Mem, 2008, 89(4): 599–603.
- [15] Miller CA, Sweatt JD. Covalent modification of DNA regulates memory formation [J]. Neuron, 2007, 53(6): 857–869.
- [16] Morishita W, Connor JH, Xia H, et al. Regulation of synaptic strength by protein phosphatase 1 [J]. Neuron, 2002, 32(6): 1133–1148.
- [17] Nelson ED, Kavalali ET, Monteggia LM. Activity-dependent suppression of miniature neurotransmission through the regulation of DNA methylation [J]. J Neurosci, 2008, 28(2): 395–406.
- [18] Nguyen S, Konstantinos Meletis, Fu D, et al. Ablation of de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in the nervous system leads to

- neuromuscular defects and shortened lifespan [J]. *Dev Dyn*, 2007, 236(6): 1663–1676.
- [19] 张建军, 隋欣, 吕国蔚, 等. 化学预处理对低氧预处理模型小鼠的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 46: 8698–8702.
- [20] Noguchi H, Kimura A, Murao N, et al. Expression of DNMT1 in neural stem/precursor cells is critical for survival of newly generated neurons in the adult hippocampus [J]. *Neurosci Res*, 2015, 95: 1–11.
- [21] Nugent BM, Wright CL, Shetty AC, et al. Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation [J]. *Nature Neurosci*, 2015, 18(5): 1823–1824.
- [22] Rajendran G, Shanmuganandam K, Bendre A, et al. Epigenetic regulation of DNA methyltransferases; DNMT1 and DNMT3B in gliomas [J]. *J Neurooncol*, 2011, 104(2): 483–494.
- [23] Zhang S, Zhang Y, Jiang S, et al. The effect of hypoxia preconditioning on DNA methyltransferase and PP1 γ in hippocampus of hypoxia preconditioned mice [J]. *High Altitude Med Biol*, 2014, 15(4): 483–490.
- [24] 姚志刚, 秦川. 表观遗传修饰在学习和记忆中的调节作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(5): 441–445.
- [25] Strack S, Kini S, Ebner FF, et al. Differential cellular and sub-cellular localization of protein phosphatase 1 isoforms in brain [J]. *J Comp Neurol*, 1999, 413(3): 373–384.
- [26] Ulke-Lemée A, Trinkle-Mulcahy L, Chaulk S, et al. The nuclear PP1 interacting protein ZAP3 (ZAP) is a putative nucleoside kinase that complexes with SAM68, CIA, NF110/45, and HNRNP-G [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1774(10): 1339–1350.
- [27] Zhang D, Li Q, Rao L, et al. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on odontogenic differentiation of human dental pulp cells [J]. *J Endodont*, 2015, 41(5): 640–645.
- [28] Zhou R, Chen F, Chang F, et al. Persistent overexpression of DNA methyltransferase 1 attenuating GABAergic inhibition in basolateral amygdala accounts for anxiety in rat offspring exposed perinatally to low-dose bisphenol A [J]. *J Psychiat Res*, 2013, 47(10): 1535–1544.

[收稿日期] 2016–08–30

(上接第 137 页)

- [3] Head E. A canine model of human aging and Alzheimer's disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(9): 1384–1389.
- [4] Pawlik M, Fuchs E, Walker LC, et al. Primate-like amyloid-beta sequence but no cerebral amyloidosis in aged tree shrews [J]. *Neurobiol Aging*, 1999, 20(1): 47–51.
- [5] 徐林, 张云, 梁斌, 等. 实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述 [J]. *动物学研究*, 2013, 34(02): 59–69.
- [6] 周广龙, 朱勤, 李振宇, 等. 树鼩在眼科学的基础研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(06): 652–655.
- [7] 李树清, 李凡, 何亮, 等. 缺血后适应促进树鼩血栓性脑缺血时紧密连接 occludin/ZO-1 蛋白表达及抑制脑水肿的机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(3): 477–484.
- [8] Schmelting B, Corbach-Sohle S, Kohlhaase S, et al. Agomelatine in the tree shrew model of depression: effects on stress-induced nocturnal hyperthermia and hormonal status [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2014, 24(3): 437–447.
- [9] Lin N, Xiong LL, Zhang RP, et al. Injection of Abeta1-40 into hippocampus induced cognitive lesion associated with neuronal apoptosis and multiple gene expressions in the tree shrew [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(5): 621–640.
- [10] Yamashita A, Fuchs E, Taira M, et al. Somatostatin-immunoreactive senile plaque-like structures in the frontal cortex and nucleus accumbens of aged tree shrews and Japanese macaques [J]. *J Med Primatol*, 2012, 41(3): 147–157.
- [11] Fan Y, Yu D, Yao YG. Tree shrew database (TreeshrewDB): a genomic knowledge base for the Chinese tree shrew [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 7145.
- [12] Nicolas G, Charbonnier C, Campion D. From common to rare variants: the genetic component of Alzheimer disease [J]. *Hum Hered*, 2016, 81(3): 129–141.
- [13] Tew J, Goate AM. Genetics of beta-amyloid precursor protein in Alzheimer's disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, a024539.
- [14] Cuccaro ML, Carney RM, Zhang Y, et al. SORL1 mutations in early- and late-onset Alzheimer disease [J]. *Neurol Genet*, 2016, 2(6): e116.
- [15] Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K. Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(2): 1510–1517.
- [16] Izumi R, Yamada T, Yoshikai S, et al. Positive and negative regulatory elements for the expression of the Alzheimer's disease amyloid precursor-encoding gene in mouse [J]. *Gene*, 1992, 112(2): 189–195.

[收稿日期] 2017–01–04