

A型肉毒素重链干预神经细胞组蛋白3乙酰化水平的初步研究

兰婧¹, 刘福¹, 高扬², 李志强², 刘雅², 赵明伟², 袁海霞², 李夏青^{1*}

(1. 山西医科大学病理生理教研室, 太原 030001; 2. 山西医科大学第一临床医学院, 太原 030001)

【摘要】目的 通过对离体神经细胞培养及大鼠在体脊髓损伤模型施予 BoNT/A 重链, 观察损伤局部组蛋白乙酰化水平的变化, 为探讨 BoNT/A 重链干预神经细胞再生的分子机制提供实验依据。**方法** 将 BoNT/A 重链加入细胞培养液或在脊髓损伤模型基础上局部给予小剂量 BoNT/A 重链; 收集细胞及损伤局部脊髓组织, 采用免疫荧光、SDS-PAGE 和 Western blot 等方法对细胞和脊髓组织内选择性组蛋白亚类的乙酰化水平进行检测。**结果** 不论是体内应用还是培养液内加入 BoNT/A 重链, 细胞和组织内组蛋白3的乙酰化水平皆明显增多; BoNT/A 重链所致的 Neuro-2a 细胞组蛋白3乙酰化水平的增高与神经突起的增长相匹配, 即同一时间点组蛋白乙酰化水平显著增高的同时, 神经突起的生长也呈显著增长; 脊髓损伤基础上给予 BoNT/A 重链所显示的组蛋白3乙酰化的表达量增高呈现双时相高峰(2 h 和 48 h)。**结论** BoNT/A 重链可促进组蛋白3的乙酰化; 在同一时间点, 组蛋白3的乙酰化水平与神经突起增长的长度相一致; 组蛋白3乙酰化可能是 BoNT/A 重链促神经突起生长的相关机制之一。

【关键词】 A型肉毒素; A型肉毒素重链; 组蛋白乙酰化; 乙酰化/去乙酰化; 神经突起再生; 脊髓损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 06-0004-06

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-7856. 2018. 06. 002

Botulinum neurotoxin serotype A heavy chain intervenes in the H3 acetylation: A preliminary study

LAN Jing¹, LIU Fu¹, GAO Yang², LI Zhiqiang², LIU Ya², ZHAO Mingwei², YUAN Haixia², LI Xiaqing^{1*}

(1. Department of Pathophysiology, Taiyuan 030001, China; 2. The First Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

【Abstract】 Objective To investigate the effect and molecular mechanism of botulinum neurotoxin serotype A (BoNT/A) heavy chain on neuron regeneration. **Methods** Cell culture, rats, immunofluorescence, SDS-PAGE and western blot, etc. were adopted in this study to explore the alterations of histone-3 acetylation (acetyl-H3) by local treatment of BoNT/A heavy chain to spinal cord injury (SCI) in rats (*in vivo*) or by adding it into cell culture (*in vitro*). Meanwhile, the relevance of acetyl-H3 to neurite out-growth based on SCI and cell culture with BoNT/A heavy chain application was approached as well. **Results** The application of BoNT/A heavy chain to cultured Neuro-2a cells increased the level of H3 acetylation. The increase of H3 acetylation was paralleled with the growth of neuritogenesis. Also, the neuronal treatment of BoNT/A heavy chain to SCI promoted the re-growth of neuronal processes surrounding the lesions. The growth of neuronal processes was positively correlated to the level of H3 acetylation. During the periods of BoNT/A

【基金项目】 国家自然科学基金(81171178); 山西医科大学大学生创新创业基金(20170105)。

【作者简介】 兰婧(1990—), 女, 硕士生, 助教, 研究方向: 脊髓损伤后的干预机制。E-mail: lanjing0@qq.com

【通信作者】 李夏青(1958—), 女, 博士, 研究方向: 神经损伤与再生机制。E-mail: xqli2013@sxmu.edu.cn

heavy chain treatment in vivo or in vitro, the increase of H3 acetylation showed two peaks. **Conclusions** BoNT/A heavy chain increased the H3 acetylation, which might be one of its neurotogenic mechanisms.

【Key words】 botulinum neurotoxin serotype A, BoNT/A; BoNT/A heavy chain; histone acetylation; acetylation/deacetylation; neurogenesis; spinal cord injury, SCI

A 型肉毒素 (botulinum neurotoxin serotype A, BoNT/A) 是目前研究较为广泛、也是临床作为药物应用的主要生物毒素制剂之一,例如:利用 BoNT/A 阻止神经突触前膜神经递质释放的毒性机制将其用于缓解或治疗某些与肌肉收缩过度有关的临床疾患 (斜颈、面肌痉挛、尿失禁、偏头痛、簇集性头痛、多汗症、皮肤除皱等)。BoNT/A 分子由一条重链 (heavy chain-HC, 分子量为 100×10^3) 和一条轻链 (light chain-LC, 分子量为 50×10^3) 构成,由二硫键相互连接。重链的羧基端含有与突触前膜蛋白受体结合的位点,可与膜受体结合形成毒素-受体复合物,轻链随重链内吞进入细胞发挥毒性作用^[1]。本研究团队的前期研究结果显示人工重组的 BoNT/A 重链可促进体外培养的神经细胞突起生长;在体实验也进一步证实 BoNT/A 重链可干预脊髓损伤后局部多种分子量水平的蛋白表达^[2-3]。然而,就目前而言,BoNT/A 的很多功能并不能单独用毒素的致毒机理解释。毒素分子中的重链与宿主细胞膜受体结合所引起的细胞内信号系统的改变及其影响已受到重视。

经典遗传学信息提供了各种蛋白 (包括表观遗传学修饰蛋白在内)、RNA 的结构信息,而表观遗传学信息则提供何时、何处合成何种蛋白及 RNA 的指令,从而严密地控制着蛋白及 RNA 的功能^[4]。组蛋白乙酰化属于组蛋白表观修饰的表现之一,组蛋白的乙酰化/去乙酰化相互作用可形成特殊的密码而影响其他蛋白因子的活动^[5]。在所有的组蛋白中,组蛋白 3 (H3) 和组蛋白 4 (H4) 的乙酰化对基因表达调控及随后的蛋白合成表达的影响已有较为广泛的研究^[4]。

神经损伤后的再生修复依赖于蛋白合成、尤其是生长相关蛋白的合成。有文献报道^[6], BoNT/A 重链可以促进体外培养的运动神经细胞突起增长,本研究团队的前期实验也观察到在体应用 BoNT/A 重链可以使脊髓损伤局部蛋白表达出现多种变化。这些研究提示:BoNT/A 重链可干预蛋白合成相关的细胞内各种信号途径。基于组蛋白乙酰化对蛋白合成及表达的重要作用,本研究拟通过离体和体两种方法观察 BoNT/A 对组蛋白亚型 3 的乙酰

化水平的影响,旨在对 BoNT/A 重链的生物学作用有更进一步的认识。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 48 只,雄性,体重 200 ~ 220 g,6 周龄,来源于北京海淀兴旺实验动物养殖场 [SCXK (京) 2014 - 0013],饲养于本实验室独立动物房 [SYXK (晋) 2015 - 0001]。动物模型的手术操作按照山西医科大学动物使用伦理委员会的规定执行 (IACUC2017 - 001)。

1.2 主要试剂与仪器

Neuro-2a 细胞购自中国科学院上海细胞库; BoNT/A 重链、A 型肉毒素重链购自美国 List Biological Laboratories, Inc; Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒 (Sangon Biotech, C503031, China); EasySee Western blot kit (TRAN, DW101, China); 10% 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); 兔抗乙酰化-H3 抗体 (1:1000, monoclonal, CST, USA); HRP 标记的 goat anti rabbit 二抗 (1:500, 上海生工); 凝胶成像系统 (Bio-Rad, USA); 多功能酶标仪 (Molecular Devices, SpectraMax[®] 190, USA); 多功能电泳仪 (Bio-Rad, USA)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

将 Neuro-2a 细胞悬浮含有 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM-HG 培养液后,接种于用 0.01% 多聚赖氨酸铺板的培养板内,置于 37℃ 5% CO₂ 的孵箱内进行培养。用于蛋白表达测定的细胞接种密度为 1×10^6 /mL,置于 24 孔培养板内,每 6 孔为一组,分为 4 组:(1) 正常对照组;(2) BoNT/A 重链处理 24 h 组;(3) BoNT/A 重链处理 48 h 组;(4) BoNT/A 重链处理 72 h 组。根据前期实验结果,BoNT/A 给予剂量为:1 ng/L (终浓度)。待细胞完全贴壁生长后 (4 h 左右) 加入 BoNT/A 重链,用于神经突起测定的细胞接种密度为每孔 1×10^5 ,置于 96 孔培养板内,分组和 BoNT/A 重链剂量同上。

1.3.2 神经突起测定

BoNT/A 重链作用后 Neuro-2a 细胞突起测定:

细胞接种后随机分为对照组和实验组(0.1 nmol/L 组和 1 nmol/L 组) 每组 8 个孔,于细胞贴壁生长后 4 h 时,实验组加入不同浓度的 BoNT/A 重链,阴性对照组加入等剂量的 DMEM 基础培养液,分别于给药后 24 h、48 h 和 72 h 将细胞置于相差倒置显微镜摄影,每孔随机视野拍摄 2~3 张图片,每组共 20 张图片,用于细胞突起的测定,包括:(1)具有突起的细胞占细胞总数的比例(%),细胞计数采用 Photoshop CS 软件;(2)测量神经突起长度,采用 ImageJ 软件进行。

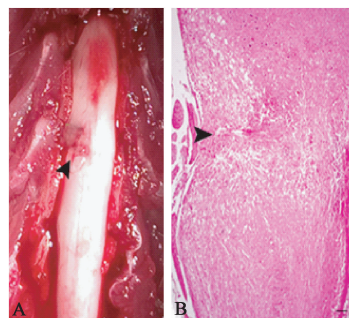
1.3.3 脊髓损伤及 BoNT/A 重链给药

采用鞘内注射给药:6 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$, BoNT/A 重链 + 生理盐水,收取不同时间点脊髓组织。经皮腰骶部鞘内给药的方法参考文献^[3] 略作改动,具体方法如下:1% 的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,0.4 mL/100 g。将全身麻醉后的脊髓损伤模型大鼠后背位固定于鼠台,大鼠腰骶部下方放置直径约为 3~5 cm 圆柱状筒物体,使 L6~S1 间隙充分张开便于实验操作。剪毛,碘伏消毒穿刺中心皮肤,拇指和中指触摸大鼠双侧髂嵴并向两侧绷紧皮肤,食指于两侧髂嵴连线同一水平触摸大鼠脊椎,触及最高点即为 L6 棘突,在 L6~S1 间隙采用 20 G 穿刺针垂直刺入皮肤、皮下肌层,当出现落空感、同时看到大鼠甩尾,证明针尖已经进入蛛网膜下腔,此时将针头旋转 180°,同时刺针向尾侧倾斜约 30°,继续向前推进 1 mm 左右。随后将充满生理盐水的经改造的 PE-10 聚乙烯导管从穿刺针内部缓慢插入约 1 cm,导管插入过程中可出现脑脊液流出、动物甩尾等显著特征以充分证明导管置入成功。此时用微量注射器将 6 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$, BoNT/A 重链 + 生理盐水沿 PE-10 管缓慢注射到鞘内,注射完成后停留片刻再将 20 μL 的生理盐水沿 PE-10 管注入鞘内,以保证 BoNT/A 重链制剂全部进入鞘内。单独脊髓损伤动物注射相同剂量生理盐水。在注射后保持头低足高位约 5 min。给药后每只单独饲养,分别于给药后 2 h、12 h、24 h、48 h、4 d、8 d 收取大鼠脊髓标本,每组 6 只。

模型动物术后的大体解剖及组织学观察皆显示明显的脊髓单侧损伤(图 1)。

1.3.4 Western blot

组织和细胞样本经 Bradford protein assay 确定蛋白含量后,每个样本上量样为 30 μg 。进行 SDS-PAGE 后转至 PVDF 膜,将膜浸于 5% 脱脂奶粉溶液内封闭 1 h,加入兔抗乙酰化-H3 抗体(1:1000,



注:箭头:损伤部位。

图 1 脊髓损伤的大体及组织学观察(Bar = 100 μm)

Note. The arrow heads indicate the injury sites.

Fig. 1 Gross and histological changes of spinal cord injury in a rat

monoclonal, CST, USA), 4°C 摇床过夜,次日用 TBST 液充分洗涤(5 次 $\times$ 5 min),HRP 标记的 goat anti rabbit 二抗(1:500)孵育 1 h, TBST 洗膜(5 次 $\times$ 5 min),发光液作用 3 min,暗室曝光, Bio-Rad 图像处理。

1.4 统计学方法

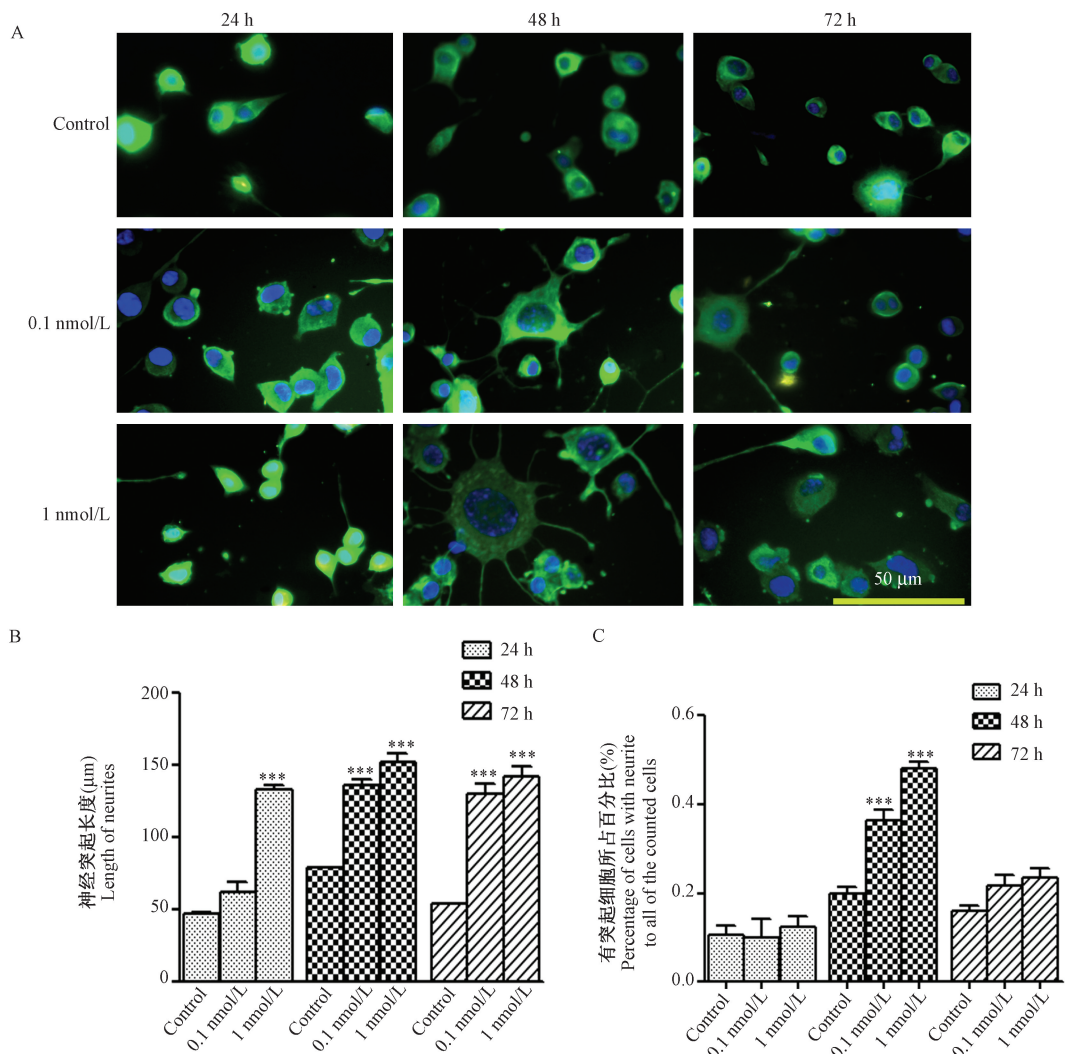
实验数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。蛋白条带的量化采用 Image J 软件进行,多组间均数差异采用 GraphPad Prism 5.0, one-way ANOVA 进行分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 BoNT/A 重链的促神经突起生长与细胞内 H3 乙酰化水平相匹配

将不同浓度的 BoNT/A 重链加入 Neuro-2a 细胞培养不同时间可见细胞突起生长明显增长,尤以浓度为 1 nmol/L 时作用最为显著。24, 48, 72 h 三个时间点的突起测定结果显示,1 nmol/L 浓度时神经突起增长的长度约是对照组细胞突起长度的 2 倍以上($P < 0.001$)。但是,1 nmol/L 浓度各时间点所测得的神经突起长度之间的差异无显著性。除此外,在重链作用下,具有突起的细胞占所计数细胞的百分比对照明显增加,以浓度为 1 nmol/L、作用 24 h 最为明显,其百分比约为对照组的 2.5 倍($P < 0.001$)。(图 2)

SDS-PAGE 和 Western blot 结果显示:给予 BoNT/A 重链后,在不同时间段(短时程 1~8 h;长时程 48~72 h),H3 的乙酰化呈现双时相增多现象(图 3)。第一个 H3 乙酰化水平增高的时间出现于重链作用后的 1 h 和 2 h,此时 H3 乙酰化水平是对



注:与同一时间段对照组相比,*** $P < 0.001$ 。

图2 不同浓度 BoNT/A 重链对 Neuro-2a 细胞生长的影响及 β -tubulin 免疫荧光染色 (Bar = 50 μm)

Note. Compared with the control group at the same time point, *** $P < 0.001$.

Fig. 2 The effect of BoNT/A heavy chain on the growth of Neuro-2a cells and the immunofluorescence staining of β -tubulin

照组的 2 倍($P < 0.001$);第二个 H3 乙酰化高峰时间为 BoNT/A 重链作用后 48 h,Neuro-2 细胞的组蛋白 H3 乙酰化水平也达到对照组的 2 倍($P < 0.001$)。

从神经突起的生长及 H3 乙酰化水平的变化趋势及程度可以推测,BoNT/A 重链引起的 Neuro-2a 细胞乙酰化水平增高似乎与细胞突起生长之间有一定的内在联系。

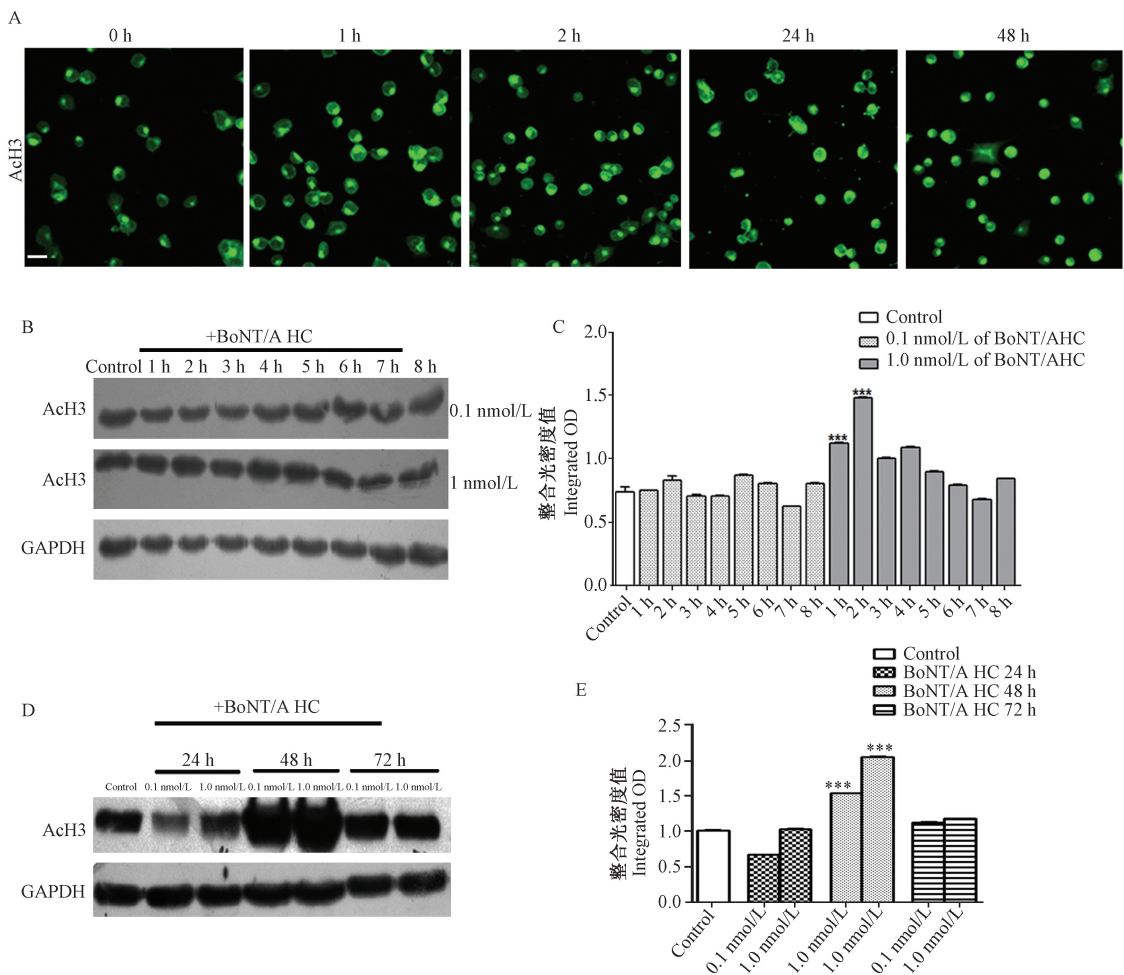
2.2 在体应用 BoNT/A 重链促进脊髓损伤局部 H3 乙酰化

结果显示:脊髓损伤同时给予 BoNT/A 重链的动物其损伤局部 H3 乙酰化水平较单纯损伤组明显

升高。同细胞培养结果相似,脊髓组织的乙酰化水平也呈现两个时相的高峰,第一个处于给药后的 2 h,第二个处于给药后 2 d(48 h),其升高水平为对照组的 1.5~2 倍($P < 0.05$)。(图 4)

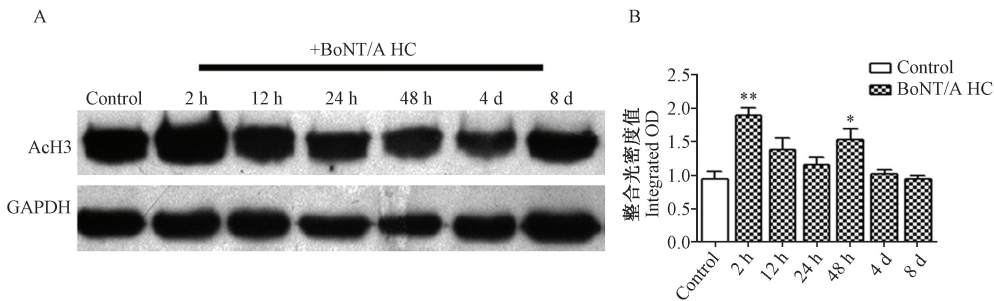
3 讨论

组蛋白是真核生物染色体的基本结构蛋白,是一类小分子碱性蛋白质,有 6 种类型: H1、H2A、H2B、H3、H4 及古细菌组蛋白,由于其结构中多为碱性氨基酸,因此可以同 DNA 中带负电荷的磷酸基团相互作用。H3、H4 的乙酰化可打开一个开放的染色质结构,增加基因的表达。更重要的是组蛋白



注:BoNT/A HC 为 A 型肉毒素重链;AcH3 为乙酰化的组蛋白 3; 与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。
图 3 BoNT/A 重链对 Neuro-2 细胞组蛋白 H3 乙酰化水平的影响 (Bar = 50 μm)
Note. BoNT/A HC; Botulinum neurotoxin serotype A heavy chain. AcH3; Acetylated histone 3. Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

Fig.3 The effect of BoNT/A heavy chain on the acetylation of H3 in the Neuro-2a cell cultures



注:BoNT/A HC 为 A 型肉毒素重链;与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。
图 4 脊髓损伤基础上给予 BoNT/A 重链后不同时间脊髓组织 H3 乙酰化变化
Note. BoNT/A HC; Botulinum neurotoxin serotype A heavy chain. Compared with the control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

Fig.4 Alterations in the acetylation of histone 3 after treated with BoNT/A heavy chain based on the spinal cord injury model

的乙酰化/去乙酰化可形成一种特殊的密码,被其他蛋白质识别,故可影响多种蛋白因子的功能活动^[5]。研究表明^[7-8],组蛋白通过乙酰化/去乙酰化相互作用参与神经系统蛋白功能的调节,组蛋白乙酰化的增强可促进某些胞内蛋白质的合成。还有研究者认为,细胞内组蛋白乙酰化,尤其是 H3 的乙

酰化过程增强有助于神经再生^[9]。

神经突起生长或损伤后的轴突再生是以胞浆内生长相关蛋白合成增加为基础的。本实验的结果表明:BoNT/A 促神经轴突增长的同时,神经细胞及其组织内组蛋白 3 乙酰化水平同时增高,因此可以推测,组蛋白的乙酰化增强可能是 BoNT/A 重链促进神经突起再生的核内机制之一,通过组蛋白 3 的乙酰化增强机制或间接干预胞浆内多种蛋白质的合成,从而促使神经突起延长再生。然而,由于组蛋白本身在核酸序列的分布及种类不同,发生乙酰化后所涉及的表现遗传改变复杂多样,H3 乙酰化与去乙酰化密切相关,因此,BoNT/A 重链干预组蛋白乙酰化的途径还需通过探讨其他组蛋白的亚类(H4, H9 等)进一步证实。不同组蛋白乙酰化与神经突起再生之间的确切内在联系还需进一步澄清。

根据本实验的结果,可以推论:BoNT/A 重链可促进组蛋白 3 的乙酰化;在同一时间点,组蛋白 3 的乙酰化水平与神经突起增长的长度相一致;组蛋白 3 乙酰化可能是 BoNT/A 重链促神经突起生长的相关机制之一。

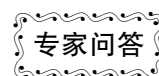
参考文献:

[1] Tsai YC, Maditz R, Kuo CL, et al. Targeting botulinum neurotoxin persistence by the ubiquitin-proteasome system [J].

Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(38): 16554 – 16559.

- [2] 高美玲,王红,张彩云,等. 血清型 A 肉毒杆菌神经毒素重链对 Neuro-2a 细胞的促神经突起再生作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(12): 2221 – 2227.
- [3] Whitemarsh RC, Tepp WH, Johnson EA, et al. Persistence of botulinum neurotoxin A subtypes 1 – 5 in primary rat spinal cord cells [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e90252.
- [4] 师明磊,赵志虎. 表观遗传、环境与疾病 [J]. 中国医药生物技术, 2013, 8(5): 362 – 367.
- [5] 孙开胜,徐克前. 组蛋白乙酰化/去乙酰化与基因表达调控 [J]. 生命科学研究, 2004, (S1): 102 – 105.
- [6] Coffield JA, Yan X. Neuritogenic actions of botulinum neurotoxin A on cultured motor neurons [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009, 330(1): 352 – 358.
- [7] Passacuale G, Phinikaridou A, Warboys C, et al. Aspirin-induced histone acetylation in endothelial cells enhances synthesis of the secreted isoform of netrin-1 thus inhibiting monocyte vascular infiltration [J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(14): 3548 – 3564.
- [8] Lin S, Sterling NA, Junker IP, et al. Effects of α TAT1 and HDAC5 on axonal regeneration in adult neurons [J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177496.
- [9] Ganai SA, Ramadoss M, Mahadevan V. Histone deacetylase (HDAC) Inhibitors-emerging roles in neuronal memory, learning, synaptic plasticity and neural regeneration [J]. Curr Neuropharmacol, 2016, 14(1): 55 – 71.

[收稿日期]2017 – 11 – 27



问:胚胎干细胞在培养过程中操作注意事项

答:(1)定期将未分化的细胞集落从已分化的细胞中分离出来并接种到新的培养基上。

(2)转移细胞时尽量快,以免细胞发生解离和死亡。

(3)分离细胞集落时使每个部分含 5 ~ 10 个细胞,否则细胞过多将导致分化,细胞过少则克隆的效率低。

(4)由于 ESCs 是对各种内毒素最为敏感的细胞,故要重视培养液和血清的质量。

(5)重视原始饲养层细胞的质量,没有原始饲养层细胞所在的胚胎干细胞将在 7 ~ 10 d 内分化或死亡,若原始饲养层细胞质量差,则不能有效地抑制 ESCs 的分化而导致培养增殖失败。