

沈建英,梁文娜,陈惠芳,等. 围绝经期抑郁症大鼠海马 *Notch1* 信号通路基因的表达与甲基化水平研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(9): 1133-1139.

Shen JY, Liang WN, Cheng HF, et al. Expression and methylation level of hippocampal *Notch1* signaling pathway genes in perimenopausal depression rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(9): 1133-1139.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2023. 09. 004

围绝经期抑郁症大鼠海马 *Notch1* 信号通路
基因的表达与甲基化水平研究

沈建英^{1,2}, 梁文娜^{1,2}, 陈惠芳^{1,2}, 张凌媛^{1,2}, 庄垸荧¹, 陈晓阳¹,
陈雅茹¹, 肖琼琼¹, 杨敏^{1,2}, 闵莉^{1,2*}, 龚琳^{1,2*}

(1. 福建中医药大学 中医证研究基地,福州 350122;2. 福建省中医健康状态辨识重点实验室,福州 350122)

【摘要】 目的 从表观遗传学之基因启动子 DNA 甲基化角度探讨围绝经期抑郁症对大鼠海马 *Notch1* 信号通路关键基因表达及其启动子 DNA 甲基化的影响。**方法** 将 12 月龄雌性围绝经期 SD 大鼠随机分为对照组和模型组。分别采用旷场实验和糖水消耗实验进行焦虑样及抑郁样的行为学评价。采用实时荧光定量 PCR 法 (real time quantitative PCR, RT-qPCR) 检测大鼠海马 *Notch1* 信号通路关键基因的表达。运用重亚硫酸氢盐测序 (bisulfite sequencing PCR, BSP) 法分析 *Notch1* 信号通路关键基因启动子区的甲基化位点及其甲基化水平。**结果** 围绝经期抑郁症大鼠旷场实验水平得分和垂直得分及糖水消耗率均显著下降;围绝经期抑郁症大鼠海马组织中 *Notch1* 信号通路关键基因 *Jagged1*、*Notch1* 和 *Hes5* 的表达均显著下调 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);其中 *Hes5* 基因的部分甲基化位点及其甲基化率均显著增加,而 *Jagged1* 和 *Notch1* 基因的甲基化位点及其甲基化率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 围绝经期抑郁症大鼠海马 *Notch1* 信号通路关键基因表达显著下调,其中 *Hes5* 基因表达下调可能与其启动子 DNA 甲基化水平上升有关。

【关键词】 围绝经期;抑郁症;海马;*Notch1* 信号通路;DNA 甲基化
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 09-1133-07

Expression and methylation level of hippocampal *Notch1* signaling
pathway genes in perimenopausal depression rats

SHEN Jianying^{1,2}, LIANG Wenna^{1,2}, CHEN Huifang^{1,2}, ZHANG Lingyuan^{1,2}, ZHUANG Yuanying¹,
CHEN Xiaoyang¹, CHEN Yaru¹, XIAO Qiongqiong¹, YANG Min^{1,2}, MIN Li^{1,2*}, GONG Lin^{1,2*}

(1. Research Base of TCM Syndrome, Fujian University of Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China.
2. Fujian Key Laboratory of TCM Health State, Fujian University of Chinese Medicine, Fuzhou 350122)

Corresponding author: MIN Li. E-mail:44072083@qq.com;
GONG Lin. E-mail:418376652@qq.com

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (82174248, 82274409), 福建省自然科学基金项目 (2022J01362), 福建中医药大学校管课题 (X2021024), 福建中医药大学基础类学科科研提升计划项目 (XJC2022012), 2022 年大学生创新创业训练计划 (202210393004, S202210393009, S202210393026)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82174248, 82274409), Natural Science Foundation of Fujian Province (2022J01362), Project of Fujian University of Traditional Chinese Medicine (X2021024), Basic Scientific Research Promotion Program of Fujian University of TCM (XJC2022012), 2022 College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (202210393004, S202210393009, S202210393026).

【作者简介】 沈建英 (1982—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 精神应激的生物学机制研究。Email: 25739559@qq.com
【通信作者】 闵莉 (1978—), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 内分泌疾病的临床与基础研究。Email: 44072083@qq.com;
龚琳 (1989—), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 内分泌疾病的基础研究。Email: 418376652@qq.com。
* 共同通信作者

【Abstract】 Objective To investigate the effect of perimenopausal depression on the expression of important genes in the *Notch1* signaling pathway and DNA methylation of their promoters in the rat hippocampus from the perspective of DNA methylation of epigenetics. **Methods** Twelve-month-old female SD rats were randomly divided into control and model groups. Anxiety- and depression-like behavioral evaluations were conducted on rats using open field and sugar consumption tests, respectively. Real time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to measure the expression of important genes in the *Notch1* signaling pathway in the hippocampal dentate gyrus. Bisulfite sequencing was used to analyze methylation sites and levels in the promoter regions of important genes in the *Notch1* signaling pathway. **Results** In perimenopausal depression rats, horizontal and vertical scores of the open field test and the rate of sucrose consumption were decreased significantly. Expression of important genes *Jagged1*, *Notch1*, and *Hes5* in the *Notch1* signaling pathway was significantly downregulated in the hippocampus of perimenopausal depression rats ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Some methylation sites and rates of the *Hes5* gene were increased significantly, whereas the methylation sites and rates of *Jagged1* and *Notch1* genes were not significantly different ($P > 0.05$). **Conclusions** The expression of important genes in the *Notch1* signaling pathway in the hippocampal dentate gyrus of perimenopausal depression rats is significantly downregulated, and downregulation of the *Hes5* gene may be related to the increase in the promoter DNA methylation level.

【Keywords】 perimenopausal; depression; hippocampus; *Notch1* signaling pathway; DNA methylation
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

据世界卫生组织统计,截至 2020 年,抑郁症已成为全球第二大疾病。同时女性抑郁症的发病率大约是男性的两倍,到了围绝经期患病率甚至更高^[1]。近年来,表观遗传学在应激相关精神疾病研究领域中的应用已得到了国内外学者的广泛重视^[2]。DNA 甲基化修饰是最经典的表观遗传调控机制之一^[3-4]。现代医学研究发现 DNA 甲基化可能通过调控成年海马神经再生参与抑郁症神经病理生理调节机制^[5]。其中 *Notch* 信号通路与成年海马神经再生密切相关。目前研究发现抑郁症患者 *Notch1* 信号通路活性显著下降^[6],但是具体的调控机制尚不清楚。因此,本研究将采用重亚硫酸氢盐修饰 PCR (bisulfite sequencing PCR, BSP) 联合 TA 克隆测序法分别检测围绝经期抑郁大鼠海马 *Notch1* 信号通路关键基因 *Jagged1*、*Notch1* 和 *Hes5* 基因启动子区部分片段的 CpG 位点甲基化水平,采用实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR) 检测基因 mRNA 表达情况,探讨 *Notch1* 信号通路活性改变及其关键基因启动子 DNA 甲基化对围绝经期抑郁症的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

35 只 8 月龄雌性 SPF 级 SD 健康大鼠,体重 360 ~ 400 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2019-0008】。所有大鼠于福建中医药大学实验动物中心【SYXK(闽)2019-0007】正常

饲养 4 个月,饲养温度为 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 40% ~ 60%,光/暗周期为 12 h / 12 h 交替(光照时间 6 : 00 ~ 18 : 00),自由摄食和饮水。饲养至 12 月龄后,进行连续 10 d 阴道脱落细胞检测。本实验已经通过福建中医药大学伦理委员会审查(伦理字[2020]081 号)。

1.1.2 主要试剂与仪器

DNA 提取试剂盒 (Qiagen, 69506), 亚硫酸氢盐 DNA 修饰试剂盒 (Qiagen, 59124), TRIzol[®] 试剂 (Invitrogen, 15596-026), 逆转录试剂盒 (TaKaRa, RR037A), SYBR[®] Green PCR Master Mix 试剂盒 (TaKaRa, RR420A); 感受态细胞制备试剂盒 (生工, SK9307), 无内毒素质粒 DNA 小量抽提试剂盒 (生工, SK8161), PCR 产物纯化回收试剂盒 (生工, SK1141), Pfu DNA 聚合酶 (生工, SC0014)。

台式冷冻离心机 (Eppendorf 5415R, 德国), 梯度 PCR 扩增仪 (ABI Veriti[™], 美国), 超微量紫外分光光度计 (Thermo NanoDrop 2000, 德国), 荧光定量 PCR 仪器 (ABI Veriti[™], 美国), 化学发光成像系统 (Bio-Rad ChemiDoc XRS +, 美国), 基因分析仪 (ABI 3130xl, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备

将动情周期紊乱的 34 只大鼠随机分为模型组 ($n = 18$) 和对照组 ($n = 16$)。采用慢性不可预见性温和应激结合孤养法制备围绝经期抑郁症大鼠模型,造模时间为 6 周。造模期间内每天随机采用 1 种应激源,包括潮湿垫料 (24 h)、冰水游泳 (4℃,

5 min)、束缚 6 h、鼠笼倾斜(24 h)、热烘(15 min)、夹尾 5 min、足底电击(30 V,5 s,间歇 5 s,共 300 s)。造模结束后,采用旷场实验剔除应激抵抗及个体差异较大的大鼠,最终纳入分析的模型组和对照组大鼠各 12 只。

1.2.2 旷场实验检测

于造模第 39 天,对大鼠进行旷场实验。采用长×宽×高=100 cm×100 cm×40 cm 的黑色敞箱,底面用白线平均划分为 25 个等边方格,外周 16 个方格为边缘区域,中间 9 个方格为中心区域。实验时将大鼠置于中央格。拍摄并记录大鼠 5 min 内的水平穿越格数(水平得分)及两前爪腾空或攀附墙壁次数(垂直得分)。

1.2.3 糖水消耗实验

于造模结束前 3 d,对大鼠进行含糖饮水训练,在造模第 42 天进行糖水消耗率检测。分别给予每只大鼠约 200 mL 的 1%蔗糖水和自来水,位置随机放置,通过称量饮水瓶的重量变化计算 2 h 的蔗糖水及自来水的消耗量,并根据以下公式计算糖水消耗率,糖水消耗率(%)=糖水消耗量/(糖水消耗量+自来水消耗量)×100%。

1.2.4 样本采集

于行为学检测结束后第 2 天,将各组大鼠依次用 20%乌拉坦(0.6 mL/kg)进行腹腔注射麻醉。腹主动脉取血后立即处死,快速分离脑组织并置于冰盘上,迅速剥取海马,置于液氮中进行速冻;血液于室温静置 30 min 后离心 10 min(3000 r/min,4℃),收集上层血清并分装。所有样本最终转移至-80℃超低温冰箱保存备用。

1.2.5 RT-qPCR 法检测 Notch1 信号通路关键基因 mRNA 的表达

采用 TRIzol 法提取海马总 RNA,并利用反转录试剂盒将 RNA 逆转录合成 cDNA,采用 SYBR Master Mix 试剂盒检测 Notch1 信号通路相关基因 mRNA 的表达,以 Gapdh 作为内参,引物序列见表 1。反应参数:预变性 95℃ 30 s;循环反应 40 次(95℃ 30 s,60℃ 30 s);每对样本每对引物做 3 个平行复孔,取其 CT 平均值进行实验数据分析,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各基因 mRNA 的相对表达量。

1.2.6 BSP 检测 Notch1 信号通路关键基因的甲基化水平

(1)DNA 提取与亚硫酸氢盐修饰

为了检测 Notch1 信号通路上关键基因启动子

表 1 Notch1 信号通路关键基因实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequences of key genes in

Notch1 signaling pathway		
引物 Primers	序列(5'-3') Sequences(5'-3')	长度(bp) Size(bp)
Jagged1	F:GCTTGGGTCTGTTGCTTGGT R:TGTGTGGTGTGTTGCTCTCA	106
Notch1	F:GTGAGATCAACACGGACGAG R:ATCCACGTCATACTGGCACA	131
Hes5	F:CCGCATCAACAGCAGCATTG R:ATCTCCAGGATGTCGGCCTT	102
Gapdh	F:GACATGCCCGCTGGAGAAAC R:AGCCAGGATGCCCTTTACT	92

的甲基化水平,各组随机挑选 4 例样本进行重亚硫酸氢盐测序 PCR 实验。利用 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,测定 DNA 的浓度和纯度后,取 2 μg DNA,按重亚硫酸氢盐 DNA 修饰试剂盒说明书进行亚硫酸氢钠修饰与转化,然后进行柱式脱盐脱硫,洗脱并回收硫化的 DNA。

(2)CpG 岛的预测

从 UCSC 数据库获得大鼠 Jagged1、Notch1 和 Hes5 的基因序列。应用 MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer>) 工具软件在线分析预测各基因启动子区或第一外显子的 CpG 岛,选取单位长度内包含 CpG 位点数量最多的片段作为 BSP 实验的检测区域。

(3)重亚硫酸氢盐测序 PCR

以重亚硫酸氢盐处理后的 DNA 为模板,利用降落聚合酶链反应法检测 Notch1 信号通路关键基因启动子区 DNA 甲基化水平。BSP 甲基化特异性引物序列见表 2,循环反应参数如下:98℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 45 s,66℃ 复性 45 s(每个循环降温 0.5℃),72℃ 延伸 1 min,共 20 个循环;94℃ 变性 45 s,56℃ 复性 45 s,72℃ 延伸 1 min,共 20 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min;4℃ 保存。BSP 扩增产物纯化后与质粒载体 pUCm-T 连接,制备感受态细胞,将连接产物进行转化,将细菌涂布在预先用 IPTG 和 X-gal 涂布的含有氨苄抗青霉素的平板上,于蓝白斑筛选后进行 SanPrep 无内毒素质粒 DNA 小量抽提,最后进行质粒测序与分析,每一个基因的检测片段挑选 10 个克隆进行测序。使用 Chromas 软件获取原始序列峰图信息,使用 SeqMan 分析软件进行序列比对分析。特异位点的甲基化率以甲基化位点数÷测序克隆数(10)×100%计算。测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

表 2 *Notch1* 信号通路关键基因 BSP 引物序列

Table 2 BSP primer sequences of key genes in *Notch1* signaling pathway

引物 Primers	序列(5'-3') Sequences(5'-3')	长度(bp) Size(bp)
<i>Jagged1</i>	F:TATGGATTGGGATTGGGAAG R:CCCTAACTCTAAAAACRCCTA	396
<i>Notch1</i>	F:AGAGATAGGGTTTATAAGGGGAGTA R:CAACAACRTTAAACAAAACAAAAC	414
<i>Hes5</i>	F:GGTTTGGGAAAAGGTAGTATATTGA R:ATACTTAAACCATACCTAAACCTCTAAA	384

1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,对所有数据做正态性检验和方差齐性检验,符合正态分布的计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。其中旷场实验的水平得分、糖水消耗率及 *Notch* 信号通路关键基因的 mRNA 表达水平符合正态分布和方

差齐性,垂直得分符合正态分布但是方差不齐。以上数据均采用独立样本 *T* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 围绝经期抑郁症大鼠的行为学评价

为了对围绝经期抑郁症大鼠进行模型评价,本研究利用旷场实验进行了焦虑样行为的检测,利用糖水消耗实验进行了抑郁样行为的检测。与围绝经期对照组比较,围绝经期抑郁症模型组旷场实验的水平得分和垂直得分均发生显著下降 ($P < 0.01$),糖水消耗实验中的糖水消耗率也发生显著下降 ($P < 0.05$),差异具有显著性(表 3)。提示慢性不可预见性温和应激结合孤养法能有效复制围绝经期抑郁症大鼠模型。

表 3 各组大鼠造模结束后行为学比较

Table 3 Behavioral comparison of rats in each group after modeling

组别 Groups	旷场实验 Open field test		糖水消耗实验 Sucrose consumption test
	水平得分 Horizontal score	垂直得分 Vertical score	
对照组 Control group	80.92 ± 17.84	13.25 ± 5.33	81.98 ± 15.43
模型组 Model group	40.17 ± 15.74**	4.25 ± 1.96**	58.31 ± 25.42*

注:与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下表同)
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following tables)

2.2 围绝经期抑郁症大鼠 *Notch1* 信号通路相关基因表达水平

为了检测围绝经期抑郁大鼠海马组织中 *Notch1* 信号通路活性,本研究利用 RT-qPCR 法检测了 *Notch1* 信号通路相关基因 mRNA 的表达水平。与围绝经期对照组比较,围绝经期抑郁症模型组大鼠海马 *Jagged1*、*Notch1* 及 *Hes5* mRNA 的表达显著下降 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),差异具有显著性(表 4),提示围绝经期抑郁大鼠 *Notch1* 信号通路活性下降。

表 4 不同组别大鼠 *Notch1* 信号通路相关基因 mRNA 表达水平

Table 4 mRNA expression level of *Notch1* signal pathway related genes in different groups

组别 Groups	<i>Jagged1</i>	<i>Notch1</i>	<i>Hes5</i>
对照组 Control group	1.08 ± 0.12	1.02 ± 0.14	1.01 ± 0.10
模型组 Model group	0.60 ± 0.30**	0.65 ± 0.26*	0.62 ± 0.25**

2.3 *Notch1* 信号通路相关基因的 CpG 岛分布

为了探讨 *Notch1* 信号通路的表现遗传调控作用,本研究利用 BSP 法对 *Jagged1*、*Notch1* 和 *Hes5* 基因的启动子的 DNA 甲基化进行检测。利用 MethPrimer 在线分析启动子区 CpG 位点、CpG 岛的数量。CpG 岛指的是长度大于 100 bp,GC 含量 > 50%,CG 核苷酸比 > 0.6 的 DNA 片段。*Notch1* 信号通路的 3 个基因中,*Jagged1* 基因的 CpG 岛分布最广,几乎覆盖了整个启动子区,在 *Notch1* 及 *Hes5* 基因的启动子区也分别发现一个 CpG 岛(图 1)。

2.4 围绝经期抑郁症大鼠 *Notch1* 信号通路相关基因启动子 CpG 岛甲基化水平

每个样品均做 10 个克隆测序,用 10 条横向的圆圈串表示。每个圆圈串上的 44 个圆圈对应扩增目的片段上的 44 个 CpG 位点,其中黑色实心圈代表该 CpG 位点上的胞嘧啶发生甲基化,白色空心圆圈代表该 CpG 位点上的胞嘧啶未发生甲基化。BSP 检测结果显示,模型组的海马组织中 *Notch1* 和



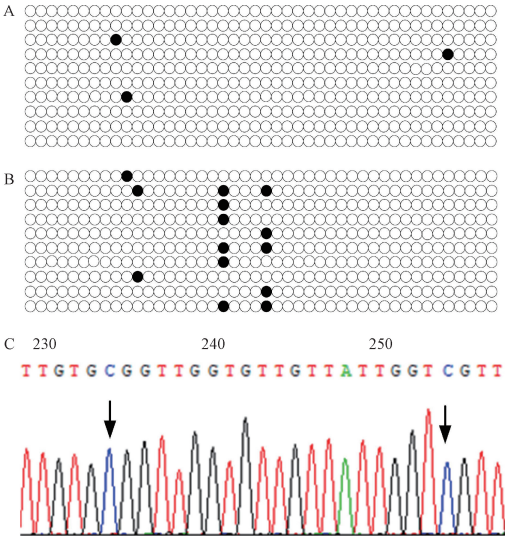
注:A: *Jagged1* 的 CpG 岛;B: *Notch1* 的 CpG 岛;C: *Hes5* 的 CpG 岛。
图 1 *Notch1* 信号通路相关基因 CpG 岛及测序 CG 位点示意图
Note. A. CpG island of *Jagged1*. B. CpG island of *Notch1*. C. CpG island of *Hes5*.

Figure 1 Schematic diagram of CpG island and sequencing CG sites of *Notch1* signal pathway related genes

Jagged1 基因的大多数 CpG 位点为无甲基化或低甲基化状态,差异无显著性(数据未列出)。然而, *Hes5* 基因的某些位点呈高甲基化状态。 *Hes5* 基因 BSP 扩增的目的片段共包含 44 个 CpG 位点(图 2A ~ 2B)。与对照组相比,模型组海马组织 *Hes5* 基因启动子 DNA 甲基化的位点数均有较明显的增加,其中 CpG19 和 CpG23 两个甲基化位点的甲基化率显著增高,差异具有显著性($P < 0.05$)(表 5),发生甲基化的胞嘧啶经 BSP 测序后碱基序列不变,依然是胞嘧啶(图 2C)。提示 *Hes5* 基因上的 CpG19 和 CpG23 两个甲基化位点的高甲基化可能是围绝经期抑郁症大鼠海马 *Hes5* 基因表达下调的部分原因之一。

表 5 不同组别大鼠海马 *Hes5* 基因启动子区部分甲基化位点的甲基化率

Table 5 Methylation rates of partial methylation sites in <i>Hes5</i> gene promoter region of hippocampus in different groups		
组别 Groups	CpG19(%)	CpG23(%)
对照组 Control group	5.00 ± 5.77	2.50 ± 5.00
模型组 Model group	40.00 ± 14.14**	27.50 ± 17.09*



注:A:对照组 CpG 岛的甲基化程度;B:模型组 CpG 岛的甲基化程度;C: *Hes5* 基因启动子部分序列 CpG 位点测序示意图,↓:发生甲基化的胞嘧啶。

图 2 重亚硫酸氢盐测序(BSP)检测 *Hes5* 基因启动子 DNA 甲基化水平

Note. A. Degree of methylation of CpG islands in the control group. B. Degree of methylation of CpG islands in the model group. C. Schematic diagram of CpG site sequencing of *Hes5* gene promoter partial sequence. ↓. Methylated cytosine.

Figure 2 Bisulfite sequencing (BSP) to detect DNA methylation level of *Hes5* gene promoter

3 讨论

DNA 甲基化的表观遗传调控机制在抑郁及应激相关精神疾病中发挥了重要的作用^[7]。目前与应激相关的 DNA 甲基化研究大多集中在 HPA 轴相关的基因^[8]及与神经再生均密切相关的神经营养因子等^[9]。表观基因组关联研究 (epigenome-wide association study, EWAS) 对同卵双胞胎抑郁患者的 DNA 甲基化阵列数据进行分析发现了数百个不同组间的甲基化位,其中包括 *Notch* 信号通路上的多个关键基因^[10]。本研究采用 BSP 法,探讨了围绝经期抑郁症大鼠的海马在慢性应激条件下 *Notch1* 信号通路相关基因甲基化状态的改变。结果表明, *Jagged1* 和 *Notch1* 基因启动子总体呈现低甲基化状态,仅模型组 *Hes5* 基因的两个甲基化位点的甲基化率有明显的增加趋势。提示围绝经期抑郁症大鼠海马组织中 *Hes5* 基因启动子 DNA 甲基化可能与海马组织的 *Hes5* 基因表达下调有一定的相关性。

Notch 信号通路不仅是神经再生的重要调节通路,同时也与突触可塑性密切相关^[11]。在抑郁症自杀患者及动物慢性应激实验研究中均在脑组织中发现 *Notch* 信号通路相关基因如 *Dll4*、*Jagged1*、*Jagged2*、*Hes1* 和 *Hes5* 的表达出现明显的改变^[5,12]。本研究发现围绝经期抑郁症大鼠海马 *Jagged1*、*Notch1* 及 *Hes5* 基因的 mRNA 表达均有发生显著下降。DNA 甲基化在与情绪、认知行为相关的变化中具有非常重要的作用^[13]。研究发现应激相关基因启动子区的 CpG 岛发生高甲基化,是导致基因转录沉默的重要原因。基因启动子区的 DNA 甲基化是应激发生过程中的早期事件,DNA 甲基化是一种可逆过程,使用 DNA 甲基化抑制剂可以使基因发生去甲基化,恢复其基因的正常表达。现已在动物实验及临床研究中发现有多个应激相关基因启动子区 CpG 岛上特定的 CpG 位点发生甲基化而导致基因表达沉默,基因的表达与 DNA 甲基化呈负相关^[14-15]。本研究在运用 BSP 技术分析围绝经期抑郁症大鼠海马 *Notch1* 信号通路基因启动子 CpG 岛甲基化状态时发现,模型组 *Hes5* 基因的 CpG19 和 CpG23 位点呈现高甲基化状态,提示 *Notch* 信号通路上 *Hes5* 基因启动子 CpG 位点甲基化状态发生改变,可能与围绝经期抑郁症的发生、发展密切相关。

值得注意的是 *Jagged1* 和 *Notch1* 在本研究中并未发现明显的甲基化改变。与本研究结果相似,在

一些动物和临床研究中也未发现应激相关基因的表达与 DNA 甲基化有关。如抑郁症患者海马及前额叶皮质中 *Dlg4* 及 *Gja1* 基因甲基化水平非常低,大约在 1% ~ 3%^[16]。Le François 等^[17]发现抑郁小鼠模型 5HT_{1A} 受体基因启动子区被检测的 24 个 CpG 位点中大部分 CpG 位点甲基化率为零或者低于 5%,仅有一个 CpG 位点的甲基化率在前额叶皮质及中脑中显著升高。以上这些研究虽然检测的目的基因不尽相同,但是在慢性应激条件下,首先,大多数 DNA 启动子的 CpG 位点未发生甲基化或者呈现低甲基化状态。其次,导致围绝经期抑郁症大鼠 *Notch1* 信号通路关键基因启动子 DNA 低甲基化的原因可能有以下 3 个方面:(1) *Notch* 信号通路上存在多个配体和受体影响其通路活性的改变,本研究仅涉及 1 个配体和 1 个受体;(2) 启动子区包含多个 CpG 岛或者跨度比较长,BSP 检测范围相对较小,仅能检测 CpG 岛上的部分片段,未能覆盖全部 CpG 位点;(3) 启动子的甲基化可能存在细胞特异性,海马上存在多种类型的神经细胞,发生甲基化的细胞可能占少数,从而导致甲基化位点被掩盖。最后,在海马组织中是否有其他表观遗传机制如组蛋白乙酰化,miRNA 参与围绝经期抑郁症 *Notch* 信号通路相关基因表达的调控,尚需进一步深入研究。

综上所述,本研究表明围绝经期抑郁症大鼠 *Notch1* 信号通路相关基因表达下调,仅 *Hes5* 基因的两个甲基化位点的甲基化率出现显著升高,其他基因目标扩增区域甲基化位点的甲基化率总体呈现较低的水平。这可能与基因启动子 DNA 甲基化存在组织、细胞及发育阶段的特异性^[18-20]密切相关。相信随着显微切割及单细胞甲基化组测序分析等技术的广泛应用,将会大大降低组织样本的异质性。最后,本研究初次从表观遗传学之 DNA 甲基化角度观察了围绝经期抑郁症大鼠海马 *Notch1* 信号通路关键基因的甲基化水平,部分揭示了可能影响 *Notch1* 信号通路相关基因表达的调控因素,为进一步从 DNA 甲基化水平阐明围绝经期抑郁症 *Notch1* 信号通路基因表达的表观调控机制提供了重要的实验依据。

参 考 文 献 (References)

- [1] 高占,高明周,高冬梅,等.基于数据挖掘的围绝经期抑郁症动物模型研究[J].中国实验动物学报,2022,30(7):887-896.
- Gao Z, Gao MZ, Gao DM, et al. Animal model of perimenopausal depressive disorder based on data mining [J].

- Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 887–896.
- [2] Starnawska A, Demontis D. Role of DNA methylation in mediating genetic risk of psychiatric disorders [J]. Front Psychiatry, 2021, 12: 596821.
- [3] Begum N, Mandhare A, Tryphena KP, et al. Epigenetics in depression and gut-brain axis: a molecular crosstalk [J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14: 1048333.
- [4] Yousefi PD, Suderman M, Langdon R, et al. DNA methylation-based predictors of health: applications and statistical considerations [J]. Nat Rev Genet, 2022, 23(6): 369–383.
- [5] Wang Z, Tang B, He Y, et al. DNA methylation dynamics in neurogenesis [J]. Epigenomics, 2016, 8(3): 401–414.
- [6] Monsalve EM, García-Gutiérrez MS, Navarrete F, et al. Abnormal expression pattern of Notch receptors, ligands, and downstream effectors in the dorsolateral prefrontal cortex and amygdala of suicidal victims [J]. Mol Neurobiol, 2014, 49(2): 957–965.
- [7] Bakusic J, Schaufeli W, Claes S, et al. Stress, burnout and depression: a systematic review on DNA methylation mechanisms [J]. J Psychosom Res, 2017, 92: 34–44.
- [8] Chmielewska N, Szyndler J, Maciejak P, et al. Epigenetic mechanisms of stress and depression [J]. Psychiatr Pol, 2019, 53(6): 1413–1428.
- [9] Park C, Rosenblat JD, Brietzke E, et al. Stress, epigenetics and depression: a systematic review [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2019, 102: 139–152.
- [10] Wang W, Li W, Wu Y, et al. Genome-wide DNA methylation and gene expression analyses in monozygotic twins identify potential biomarkers of depression [J]. Transl Psychiatry, 2021, 11(1): 416.
- [11] Ables JL, Breunig JJ, Eisch AJ, et al. Notch just development: Notch signalling in the adult brain [J]. Nat Rev Neurosci, 2011, 12(5): 269–283.
- [12] Guo YJ, Zhang ZJ, Wang SH, et al. Notch1 signaling, hippocampal neurogenesis and behavioral responses to chronic unpredicted mild stress in adult ischemic rats [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2009, 33(4): 688–694.
- [13] Fan S, Sun A, Liu L. Epigenetic modulation during hippocampal development [J]. Biom Rep, 2018, 9(6): 463–473.
- [14] Nantharat M, Wanitchanon T, Amesbutr M, et al. Glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) promoter is hypermethylated in Thai females with major depressive disorder [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 19071–19079.
- [15] van der Doelen RH, Arnoldussen IA, Ghareh H, et al. Early life adversity and serotonin transporter gene variation interact to affect DNA methylation of the corticotropin-releasing factor gene promoter region in the adult rat brain [J]. Dev Psychopathol, 2015, 27(1): 123–135.
- [16] Kaut O, Sharma A, Schmitt I, et al. DNA methylation of *DLG4* and *GJA-1* of human hippocampus and prefrontal cortex in major depression is unchanged in comparison to healthy individuals [J]. J Clin Neurosci, 2017, 43: 261–263.
- [17] Le François B, Soo J, Millar AM, et al. Chronic mild stress and antidepressant treatment alter 5-HT1A receptor expression by modifying DNA methylation of a conserved Sp4 site [J]. Neurobiol Dis, 2015, 82: 332–341.
- [18] Liu H, Zhou J, Tian W, et al. DNA methylation atlas of the mouse brain at single-cell resolution [J]. Nature, 2021, 598(7879): 120–128.
- [19] Lan Y, Banks KM, Pan H, et al. Stage-specific regulation of DNA methylation by TET enzymes during human cardiac differentiation [J]. Cell Rep, 2021, 37(10): 110095.
- [20] Zhou M, Coruh C, Xu G, et al. The CLASSY family controls tissue-specific DNA methylation patterns in *Arabidopsis* [J]. Nat Commun, 2022, 13: 244.

[收稿日期] 2023-03-24