

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.21.007  
文章编号: 1005-8982 (2024) 21-0043-09

实验研究·论著

## 组蛋白去乙酰化酶2在帕金森病中的作用及机制研究\*

刘韵<sup>1</sup>, 冯丹<sup>1</sup>, 刘纷纷<sup>1</sup>, 左方娅<sup>1</sup>, 郭修红<sup>2</sup>, 刘钰淇<sup>1</sup>, 陈兰兰<sup>3</sup>, 王玉洁<sup>1</sup>, 田锦勇<sup>4</sup>  
(1. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550001; 2. 清镇市第一人民医院 重症医学科, 贵州 贵阳 551400; 3. 遵义医科大学, 贵州 遵义 563000; 4. 贵州省人民医院 全科医学科, 贵州 贵阳 550002)

**摘要:** **目的** 旨在探究组蛋白去乙酰化酶2(HDAC2)通过类甲基化转移酶3(METTL3)/细胞因子信号抑制因子3(SOCS3)轴调控帕金森病(PD)中神经元死亡的作用机制。**方法** SH-SY5Y细胞分组: Control组、MPP<sup>+</sup>组、MPP<sup>+</sup>+HDAC2抑制剂组、MPP<sup>+</sup>+HDAC2抑制剂+sh-NC组、MPP<sup>+</sup>+HDAC2抑制剂+sh-METTL3组。观察各组细胞在细胞死亡、细胞活性、HDAC2、METTL3、SOCS3、组蛋白H3赖氨酸18乳酸化(H3K18la)方面的差异。比较oe-NC组及oe-METTL3两组SOCS3的m6A修饰水平、METTL3在SOCS3上的富集程度、METTL3表达、SOCS3表达、SOCS3 mRNA稳定性。**结果** MPP<sup>+</sup>组与Control组相比, HDAC2基因和蛋白相对表达量升高( $P < 0.05$ ), 细胞死亡率升高( $P < 0.05$ ), 细胞活性及H3K18la在METTL3上的富集程度降低( $P < 0.05$ ), METTL3、H3K18la、SOCS3均下调( $P < 0.05$ )。MPP<sup>+</sup>+HDAC2抑制剂组与MPP<sup>+</sup>组相比, 细胞死亡率降低( $P < 0.05$ ), 细胞活性及H3K18la在METTL3上的富集程度升高( $P < 0.05$ ), METTL3、H3K18la、SOCS3上调( $P < 0.05$ )。MPP<sup>+</sup>+HDAC2抑制剂+sh-NC组与MPP<sup>+</sup>+HDAC2抑制剂组在细胞死亡率、细胞活性、METTL3表达、SOCS3表达上无差异( $P > 0.05$ )。MPP<sup>+</sup>+HDAC2抑制剂+sh-METTL3组与MPP<sup>+</sup>+HDAC2抑制剂+sh-NC组相比, 细胞死亡率升高( $P < 0.05$ ), 细胞活性降低( $P < 0.05$ ), METTL3及SOCS3表达下调( $P < 0.05$ )。Oe-METTL3与oe-NC组比较, SOCS3的m6A修饰水平及METTL3在SOCS3上的富集程度升高( $P < 0.05$ ), METTL3及SOCS3升高( $P < 0.05$ ), SOCS3 mRNA稳定性升高( $P < 0.05$ )。**结论** 在PD中HDAC2通过诱导METTL3组蛋白去乙酰化抑制METTL3表达, 这一机制引起SOCS3的m6A修饰水平降低, 并导致SOCS3表达下调, 进而促进PD发病。

**关键词:** 帕金森病; 组蛋白去乙酰化酶2; 类甲基化转移酶3; 细胞因子信号抑制因子3

**中图分类号:** R741

**文献标识码:** A

## Study on the role and mechanism of histone deacetylase 2 in Parkinson's disease\*

Liu Yun<sup>1</sup>, Feng Dan<sup>1</sup>, Liu Fen-fen<sup>1</sup>, Zuo Fang-ya<sup>1</sup>, Guo Xiu-hong<sup>2</sup>, Liu Yu-qi<sup>1</sup>,  
Chen Lan-lan<sup>3</sup>, Wang Yu-jie<sup>1</sup>, Tian Jin-yong<sup>4</sup>

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550001, China; 2. Department of Medicine, The First People's Hospital of Qingzhen City, Guiyang, Guizhou 551400, China; 3. Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China; 4. Department of General Medicine, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

收稿日期: 2024-05-27

\* 基金项目: 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(No: QZYY-2021-011); 贵州省科技厅2020年基础研究重大项目(No: 黔科合基础[2020]1Z059)

[通信作者] 田锦勇, E-mail: tjy8877@163.com; Tel: 13809418877

**Abstract: Objective** To explore the role of histone deacetylase 2 (HDAC2) in modulating the neuron death during Parkinson's disease (PD) via methyltransferase-like 3 (METTL3)/ suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) axis. **Methods** SH-SY5Y cells were divided into: control, MPP<sup>+</sup>, MPP<sup>+</sup> + HDAC2 inhibitor, MPP<sup>+</sup> + HDAC2 inhibitor + sh-NC and MPP<sup>+</sup> + HDAC2 inhibitor + sh-METTL3 group, and the alterations in cell death, cell viability, HDAC2, METTL3, SOCS3 and the lacylation of Lsy in histone 3 (H3K18la) were compared; oe-NC and oe-METTL3 group, and the differences in SOCS3, m6A-modified SOCS3, METTL3 and the enrichment of METTL3 in SOCS3 between the two groups were compared. **Results** Compared to control group, MPP<sup>+</sup> group showed the enhancement of cell death and HDAC2, the decline in METTL3, H3K18la, SOCS3, cell viability and enrichment of H3K18la in METTL3 ( $P < 0.05$ ). Compared to MPP<sup>+</sup> group, MPP<sup>+</sup> + HDAC2 inhibitor group displayed the decreases of cell death, and the increases of METTL3, H3K18la, SOCS3, cell viability and enrichment of H3K18la in METTL3 ( $P < 0.05$ ). There were no significant changes in cell death, METTL3, SOCS3 and cell viability between MPP<sup>+</sup> + HDAC2 inhibitor and MPP<sup>+</sup> + HDAC2 inhibitor + sh-NC group ( $P > 0.05$ ). Compared to MPP<sup>+</sup> + HDAC2 inhibitor + sh-NC group, MPP<sup>+</sup> + HDAC2 inhibitor + sh-METTL3 group showed the elevation of cell death, and the reduction of METTL3, SOCS3 and cell viability ( $P < 0.05$ ). Compared to oe-NC group, oe-METTL3 group developed the rise in METTL3, SOCS3, SOCS3 stability, m6A-modified SOCS3 and enrichment of METTL3 in SOCS3 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** In PD, HDAC2 inhibited METTL3 via inducing the de-lactylation of METTL3, which led to the decrease of m6A-modified SOCS3 and SOCS3 expression. Downregulation of SOCS3 contributed to the occurrence of PD.

**Keywords:** Parkinson's disease; histone deacetylase 2; methyltransferase-like 3; suppressor of cytokine signaling 3

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经退行性疾病,临床主要表现为运动迟缓、肌肉强直、姿势和步态不稳定、运动功能障碍及静止性震颤<sup>[1]</sup>。此外,新近研究指出PD患者还具有认知障碍、情绪改变等非运动性症状<sup>[2]</sup>。因此PD对患者造成严重的身体及心理损害。PD伴随有神经元 $\alpha$ -突触核蛋白积累、多巴胺能神经元缺陷等神经病理学特征,然而其具体机制仍不明确。

细胞因子信号抑制因子3(suppressor of cytokine signaling 3, SOCS3)是SOCS蛋白家族的主要成员,参与抑制细胞内白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)介导的炎症信号转导。神经退行性疾病多伴随有SOCS3表达下调,而激活SOCS3可阻断IL-6介导的炎症信号通路,从而改善神经退行性病变<sup>[3-5]</sup>。SOCS3在PD中发挥至关重要的调控作用。新近研究证实SOCS3在PD大鼠模型中表达下调,并发现激活SOCS3导致HMGB1/RAG/NF- $\kappa$ B通路活性降低,从而抑制PD大鼠的神经炎症,改善多巴胺耗竭及运动障碍等PD样症状<sup>[6]</sup>。由此可见,SOCS3失活是促进PD发生、发展的重要因素,理清导致SOCS3失活的原因对PD干预及治疗至关重要。

N<sup>6</sup>-腺苷甲基化修饰(N<sup>6</sup>-Methyladenosine, m6A)修饰是最常见的RNA修饰方式,在RNA剪接、翻译、稳定性、易位中发挥重要的调控作用。在

m6A过程中,类甲基化转移酶3(methyltransferase-like 3, METTL3)是首个被发现的甲基化转移酶,介导细胞内目标RNA的甲基化连接。SOCS3的表达受METTL3介导的m6A修饰调控。新近研究指出, METTL3与SOCS3 mRNA上的m6A位点结合,增强了SOCS3 mRNA稳定性,进而导致SOCS3表达上调<sup>[7]</sup>。由此可见,SOCS3表达受METTL3正向调控, METTL3表达异常也可能对SOCS3表达产生同向影响。曾有证据指出METTL3在PD小鼠模型中表达下调<sup>[8]</sup>。因此, METTL3下调可能影响SOCS3表达,从而促进PD发病机制。

乳酸化是一种新发现的翻译后修饰,可参与调控蛋白质功能和疾病发生。在乳酸化机制中,组蛋白去乙酰化酶2(histone deacetylase 2, HDAC2)负责组蛋白的去乳酸化修饰<sup>[9]</sup>。HDAC2下调可能引起靶标的乳酸化水平升高,继而影响靶标表达水平。HDAC2在PD患者的大脑黑质组织中表达上调<sup>[10]</sup>,而抑制HDAC2活性有助于抑制PD诱导的神经元细胞死亡<sup>[11]</sup>,提示HDAC2在PD发病机制中起重要的调控作用。对METTL3而言,HDAC2可能通过去乳酸化作用调控METTL3表达。有研究证实, METTL3的组蛋白上携带乳酸化修饰,促进METTL3表达上调<sup>[12]</sup>。鉴于此,本研究推测HDAC2可能通过促进METTL3组蛋白去乳酸化导致METTL3表达下调,从

而引起下游基因的 m6A 修饰失调。

目前,尚无研究证实 HDAC2 通过 METTL3 抑制 SOCS3 表达促进 PD 中神经元细胞死亡的作用机制。因此,本研究拟制备 PD 体外神经元细胞模型,旨在阐明 HDAC2/METTL3/SOCS3 轴对 PD 神经元细胞死亡的调控机制,为 PD 干预及治疗提供可能靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

SH-SY5Y 细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司), Calcein/PI 染色试剂盒(C2015S,上海碧云天生物技术有限公司), MTT 检测试剂盒, SDS-PAGE 一步法凝胶配制试剂盒(P0901,上海碧云天生物技术有限公司), 一步法逆转录-荧光定量 PCR 试剂盒[FP313,天根生化科技(北京)有限公司], 细胞裂解液(P0013C,上海碧云天生物技术有限公司), Western blotting 封闭液(P0023B,上海碧云天生物技术有限公司), 10X TBST 缓冲液(T1081,北京索莱宝科技有限公司), 10X PBS 溶液(P1022,北京索莱宝科技有限公司), 放线菌素 D (HY-17559,美国 MedChemExpress 生物科技公司,纯度 99.04%), meRIP-qPCR 试剂盒(Bes5203,广州伯信生物科技有限公司), RIP-PCR 试剂盒(KT102-01,广州赛诚生物科技有限公司), ChIP-PCR 试剂盒(Bes5104,广州伯信生物科技有限公司), METTL3 抗体[ab195352, 1:1 000,艾博抗(上海)贸易有限公司], 组蛋白 H3 赖氨酸 18 乳酸化(histone h3 lysine 18 lactylation, H3K181a) 抗体(PTM-1406RM, 1:1 000,美国 PTM BIO 公司), Pan-K1a 抗体(A18831, 1:1 000,武汉爱博泰克生物科技有限公司), Histon H3 抗体[ab176840, 1:1 000,艾博抗(上海)贸易有限公司],  $\beta$ -actin 抗体[ab8227, 1:1 000,艾博抗(上海)贸易有限公司], TRIzol 试剂(R0016,上海碧云天生物技术有限公司), HDAC2 抑制剂(HY-151248,美国 Med Chem Express 生物科技公司), 1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP<sup>+</sup>) (HY-W008719,美国 MedChemExpress 生物科技公司), HRP 交联的 2 抗(7074,美国 Cell signaling technology 公司,稀释度 1:1 000), Lipofectamine 3000 试剂盒(美国赛默飞世尔科技公司)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 RNA 干扰载体及过表达载体** 从 NCBI 数据库获取 METTL3 序列基因,基于 RNA 干扰技术设计并合成 METTL3 shRNA (sh-METTL3) 及阴性对照 shRNA (sh-NC)。以 pcDNA3.1 为骨架,构建 METTL3 过表达载体(oe-METTL3)及阴性对照(oe-NC)。

**1.2.2 细胞培养及药物处理** 采用含 10% 胎牛血清及 1% 链霉素的高糖 DEME 培养基孵育细胞, 37 °C、5% 二氧化碳 CO<sub>2</sub> 条件下培养。待细胞生长状况良好后进行药物处理。MPP<sup>+</sup> 诱导:向细胞培养基中加入 MPP<sup>+</sup> 试剂,最终浓度为 50  $\mu$ mol/L, 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 下孵育 24 h。HDAC2 抑制剂:细胞接受 MPP<sup>+</sup> 诱导前,加入 10  $\mu$ mol/L HDAC2-IN-7 (HDAC2 抑制剂) 处理 48 h。sh-NC、sh-METTL3、oe-NC 及 oe-METTL3 组处理:结合 Lipofectamine 3000 试剂盒将 sh-NC、sh-METTL3、oe-NC、oe-METTL3 转染至细胞,转染 48 h 后细胞还需进行 MPP<sup>+</sup> 诱导及抑制剂处理。

**1.2.3 活死细胞染色检测细胞死亡(Calcein/PI 染色)** 取 96 孔板,每孔接种 5 000 个细胞,贴壁后进行分组实验。随后采用 Calcein/PI 染色试剂盒行活死细胞染色。通过荧光显微镜检测观察细胞染色情况,其中 Calcein AM 标记活细胞,发绿光, Ex/Em = 494/517 nm, PI 标记死细胞,发红光, Ex/Em = 535/617 nm。

**1.2.4 MTT 法检测细胞活性** 取 96 孔板,每孔培养 5 000 个细胞以进行分组实验。实验后每孔加入 10  $\mu$ L MTT 检测工作液,37 °C 下继续孵育 1 h。采用酶标仪检测样品 490 nm 处的光密度(optical density, OD),计算细胞活性。

**1.2.5 实时荧光定量聚合酶链反应(real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)** 本研究通过 qRT-PCR 定量 HDAC2、SOCS3、METTL3 表达。取实验处理过的细胞样品,加入 1 mL TRIzol 试剂以提取细胞总 RNA。采用一步法逆转录荧光定量 PCR 试剂盒及荧光定量 PCR 仪将总 RNA 逆转录为 cDNA 并进行荧光定量,获取 Ct 值。以 GAPDH 为内参基因,用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算 HDAC2、SOCS3、METTL3 目的基因的相对表达量。qRT-PCR 反应条件:50 °C 逆转录 15 min;95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 15 s,60 °C 退火/延伸 30 s,重复变性和退火/延伸步骤,共 40 个循环;熔解曲线分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	序列	长度/bp
GAPDH	正向: 5'-CCAGGTGGTCTCCTCTGA-3'	18
	反向: 5'-GCTGTAGCCAAATCGTTGT-3'	19
SOCS3	正向: 5'-CACTAGGATGCCCGCTTTA-3'	20
	反向: 5'-TCAGGTGGTACTCCCCTTC-3'	20
METTL3	正向: 5'-GAGTGCATGAAAAGCCACTGA-3'	20
	反向: 5'-CTGGAATCACCTCCGACACT-3'	20
HDAC2	正向: 5'-ATAGCCCCATAAAGCCACT-3'	20
	反向: 5'-ACTGAACCGCCAGTTGAGAG-3'	20

**1.2.6 Western blotting 检测 METTL3、H3K18la、Pan-Kla 蛋白相对表达量** 移除细胞培养基,加入细胞裂解液,冰上裂解,至细胞充分裂解后 4 ℃、12 000 r/min 离心 5 min,取上清液用于后续 Western blotting 检测 METTL3、H3K18la、Pan-Kla 蛋白。H3K18la 以 Histon H3 为内参,其余蛋白均以  $\beta$ -actin 为内参,计算各蛋白的相对表达量。

**1.2.7 ChIP-qPCR 检测 METTL3 在 H3K18la 上的富集程度** 取细胞样品,经多聚甲醛固定、甘氨酸孵育、胞核沉淀、超声破碎后,结合 H3K18la 抗体及 ChIP-PCR 试剂盒进行免疫沉淀,获取并分离蛋白质-DNA 复合物。解交联、DNA 纯化后采用荧光定量 PCR 技术定量 METTL3 表达水平。

**1.2.8 meRIP-qPCR 检测 SOCS3 m6A 表达** 采用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA。向 RNA 样品中加入 450  $\mu$ L IP 缓冲液 2 及 2  $\mu$ L RNA 酶抑制剂,超声破碎 15 ~ 30 次,通过琼脂凝胶电泳检测 RNA 片段大小并回收。取 50  $\mu$ L RNA 样品作为 Input 组,其余样品为 IP 组。向 IP 组样品中加入 20  $\mu$ L IP 缓冲液 2、4  $\mu$ g m6A 抗体或 IgG 抗体,4 ℃ 下于垂直孵育器中孵育 4 h。向 IP 组样品中加入接肢蛋白 A/G 磁珠,4 ℃ 下于垂直孵育器中孵育 1 h,收集磁珠,洗涤缓冲液洗涤 3 次后通过酚氯仿法抽提 RNA,结合荧光定量 PCR 法检测 SOCS3 m6A 表达。

**1.2.9 放线菌素 D 检测 SOCS3 mRNA 稳定性** 取 6 孔板,分别设置孔 1、2、3、4、5、6,每孔接种 30 000 个细胞,贴壁后给予相应的实验处理。实验后,向孔 1 加入 10  $\mu$ g/mL 放线菌素 D 试剂,并通过 qRT-PCR 检测 SOCS3 mRNA 相对表达量。随后,依次在 1、2、4、6、8 h 取出孔 2、3、4、5、6 的细胞样品加入 10  $\mu$ g/mL 放线菌素 D 试剂,并通过 qRT-PCR 检测

SOCS3 mRNA 相对表达量。计算 SOCS3 mRNA 的半衰期。

**1.2.10 RIP-PCR 检测 SOCS3 基因相对表达量** 收集细胞,加入 RIP 裂解液处理细胞。取磁珠,使用 RIP 洗涤缓冲液洗涤后离心,并加入 RIP 洗涤缓冲液重悬磁珠。将磁珠悬浮液与 METTL3 抗体或 IgG 抗体混匀,孵育结束后收集磁珠。取 RNA 细胞样品,离心后收集 RNA 样品,并与磁珠-抗体复合物混匀,4 ℃ 孵育过夜后收集磁珠,与蛋白酶 K 溶液混匀并孵育。经 RNA 抽提及纯化后对 RNA 进行 RIP-PCR 检测,确定 SOCS3 基因相对表达量。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 23.0 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组间比较用独立样本  $t$  检验,3 组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较用 LSD- $t$  检验;不同时间点的比较采用重复测量设计的方差分析;使用 Excel 拟合工具对 SOCS3 变化曲线行非线性拟合。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MPP<sup>+</sup>组与 Control 组 HDAC2 基因相对表达量的比较

MPP<sup>+</sup>组与 Control 组 HDAC2 基因相对表达量比较,经  $t$  检验,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );MPP<sup>+</sup>组 HDAC2 基因相对表达量高于 Control 组。两组 HDAC2 蛋白相对表达量比较,经  $t$  检验,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );MPP<sup>+</sup>组 HDAC2 蛋白相对表达量高于 Control 组。见表 2 和图 1。

表 2 两组 HDAC2 基因和蛋白相对表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	HDAC2 基因	HDAC2 蛋白
Control 组	1.00 $\pm$ 0.04	0.30 $\pm$ 0.02
MPP <sup>+</sup> 组	1.49 $\pm$ 0.14	0.78 $\pm$ 0.06
$t$ 值	4.823	10.200
$P$ 值	0.009	0.001

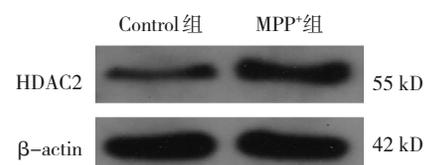


图 1 HDAC2 蛋白表达

## 2.2 Control 组、MPP<sup>+</sup>组、MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组细胞死亡率及细胞活性的比较

Control 组、MPP<sup>+</sup>组、MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组细胞死亡率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。MPP<sup>+</sup>组细胞死亡率高于 Control 组 ( $P < 0.05$ ), MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组细胞死亡率低于 MPP<sup>+</sup>组 ( $P < 0.05$ )。见表 3 和图 2。

Control 组、MPP<sup>+</sup>组、MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组细胞活性比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。MPP<sup>+</sup>组细胞活性低于 Control 组 ( $P < 0.05$ ), MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组细胞活性高于 MPP<sup>+</sup>组 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 各组细胞死亡率和细胞活性的比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞死亡率	细胞活性
Control 组	4.66 ± 0.63	98.34 ± 4.35
MPP <sup>+</sup> 组	22.70 ± 1.77 <sup>①</sup>	43.41 ± 4.88 <sup>①</sup>
MPP <sup>+</sup> +HDAC2 抑制剂组	12.87 ± 1.51 <sup>②</sup>	84.53 ± 4.22 <sup>②</sup>
F 值	84.330	37.460
P 值	0.000	0.000

注: ①与 Control 组比较,  $P < 0.05$ ; ②与 MPP<sup>+</sup>组比较,  $P < 0.05$ 。

## 2.3 Control 组、MPP<sup>+</sup>组、MPP<sup>+</sup>+HDAC2 抑制剂组的 METTL3 乳酸化水平的比较

Control 组、MPP<sup>+</sup>组、MPP<sup>+</sup>+HDAC2 抑制剂组的 METTL3 的乳酸化水平比较(通过 METTL3 基因上的 H3K18la 水平评估 METTL3 的乳酸水平, IgG 抗体为 ChIP 实验的阴性对照), 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。MPP<sup>+</sup>组低于 Control 组

( $P < 0.05$ ), MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组高于 MPP<sup>+</sup>组 ( $P < 0.05$ )。各组 METTL3 及 H3K18la 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Control 组 METTL3 及 H3K18la 蛋白相对表达量均低于 Control 组 ( $P < 0.05$ ), MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组 METTL3 及 H3K18la 蛋白相对表达量均高于与 MPP<sup>+</sup>组 ( $P < 0.05$ )。见图 3 和表 4、5。

## 2.4 Control 组、MPP<sup>+</sup>组、MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组 SOCS3 基因和蛋白相对表达量的比较

Control 组、MPP<sup>+</sup>组、MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组的 SOCS3 基因相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。MPP<sup>+</sup>组低于 Control 组 ( $P < 0.05$ ), MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组高于 MPP<sup>+</sup>组 ( $P < 0.05$ )。各组 SOCS3 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。MPP<sup>+</sup>组低于 Control 组 ( $P < 0.05$ ); MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组高于 MPP<sup>+</sup>组 ( $P < 0.05$ )。见图 4 和表 6。

## 2.5 oe-NC 组与 oe-METTL3 组 SOCS3 富集度的比较

oe-NC 组与 oe-METTL3 组 SOCS3 富集度比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); oe-METTL3 组 SOCS3 富集度高于 oe-NC 组 ( $P < 0.05$ )。见表 7。

## 2.6 oe-NC 组与 oe-METTL3 组 SOCS3 基因相对表达量的比较

oe-NC 组与 oe-METTL3 组 METTL3 和 SOCS3 基因相对表达量比较, 经 *t* 检验, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); oe-METTL3 组 METTL3 和 SOCS3 基因表

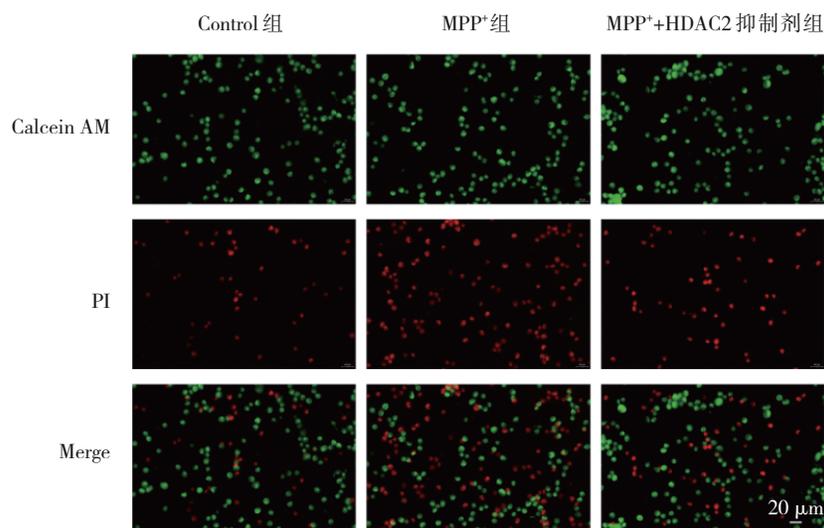


图 2 活死细胞染色检测细胞死亡率

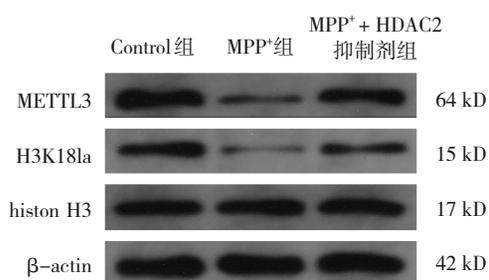


图3 METTL3及H3K181a蛋白表达

表4 各组METTL3的乳酸化水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	IgG抗体	H3K181a抗体
Control组	0.00 ± 0.00	0.47 ± 0.10
MPP <sup>+</sup> 组	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.04 <sup>①</sup>
MPP <sup>+</sup> + HDAC2抑制剂组	0.00 ± 0.00	0.40 ± 0.06 <sup>②</sup>
F值	-	26.670
P值	-	0.001

注：①与Control组比较,  $P < 0.05$ ; ②与MPP<sup>+</sup>组比较,  $P < 0.05$ 。

表5 各组METTL3、H3K181a蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	METTL3	H3K181a
Control组	0.86 ± 0.05	0.83 ± 0.06
MPP <sup>+</sup> 组	0.18 ± 0.04 <sup>①</sup>	0.20 ± 0.03 <sup>①</sup>
MPP <sup>+</sup> + HDAC2抑制剂组	0.61 ± 0.06 <sup>②</sup>	0.44 ± 0.09 <sup>②</sup>
F值	35.240	52.480
P值	0.000	0.000

注：①与Control组比较,  $P < 0.05$ ; ②与MPP<sup>+</sup>组比较,  $P < 0.05$ 。

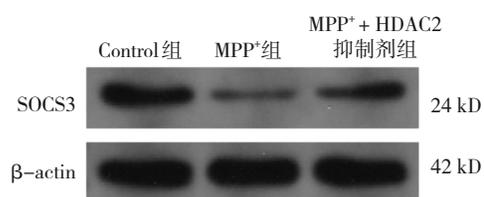


图4 SOCS3蛋白表达

达量均高于 oe-NC 组。见表 8。

oe-NC 组与 oe-METTL3 组不同时间点 SOCS3 基因相对表达量比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间 SOCS3 基因相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $F = 38.130, P = 0.000$ ); ②oe-NC 组与 oe-METTL3 组 SOCS3 基因相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $F = 20.150, P = 0.011$ ), oe-METTL3 组高于 oe-NC 组; ③oe-NC

表6 各组SOCS3基因和蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	SOCS3基因	SOCS3蛋白
Control组	1.00 ± 0.03	0.71 ± 0.06
MPP <sup>+</sup> 组	0.49 ± 0.05 <sup>①</sup>	0.16 ± 0.05 <sup>①</sup>
MPP <sup>+</sup> + HDAC2抑制剂组	0.93 ± 0.05 <sup>②</sup>	0.37 ± 0.05 <sup>②</sup>
F值	79.130	54.710
P值	0.000	0.000

注：①与Control组比较,  $P < 0.05$ ; ②与MPP<sup>+</sup>组比较,  $P < 0.05$ 。

表7 两组SOCS3富集度比较 (% input,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	meRIP-PCR	RIP-PCR
oe-NC组	0.50 ± 0.08	0.31 ± 0.06
oe-METTL3组	0.81 ± 0.07	0.61 ± 0.07
t值	3.975	4.514
P值	0.017	0.011

表8 两组METTL3及SOCS3基因相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	METTL3	SOCS3
oe-NC组	1.01 ± 0.04	1.00 ± 0.05
oe-METTL3组	1.89 ± 0.15	1.56 ± 0.13
t值	7.843	5.605
P值	0.001	0.005

组与 oe-METTL3 组 SOCS3 基因相对表达量随时间变化趋势比较, 差异有统计学意义 ( $F = 8.945, P = 0.000$ ) (见表 9)。对两组的 SOCS3 表达量变化曲线行非线性拟合, 结果表明, SOCS3 mRNA 半衰期为  $t = 1.32$  h, oe-METTL3 组 SOCS3 mRNA 半衰期为  $t = 1.49$  h。

## 2.7 敲低 METTL3 逆转 HDAC2 抑制剂的神经保护作用

MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组、MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-NC 组、MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-METTL3 组细胞死亡率及细胞活性比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-METTL3 组细胞死亡率高于 MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-NC 组 ( $P < 0.05$ ), 细胞活性低于 MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-NC 组 ( $P < 0.05$ )。见图 5 和表 10。

表 9 放线菌素 D 实验验证 SOCS3 mRNA 稳定性 ( $\bar{x} \pm s$ )

	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h
oe-NC 组	1.00 ± 0.08	0.51 ± 0.06	0.17 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02
Oe-METTL3 组	1.00 ± 0.06	0.74 ± 0.11	0.43 ± 0.06	0.11 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.02

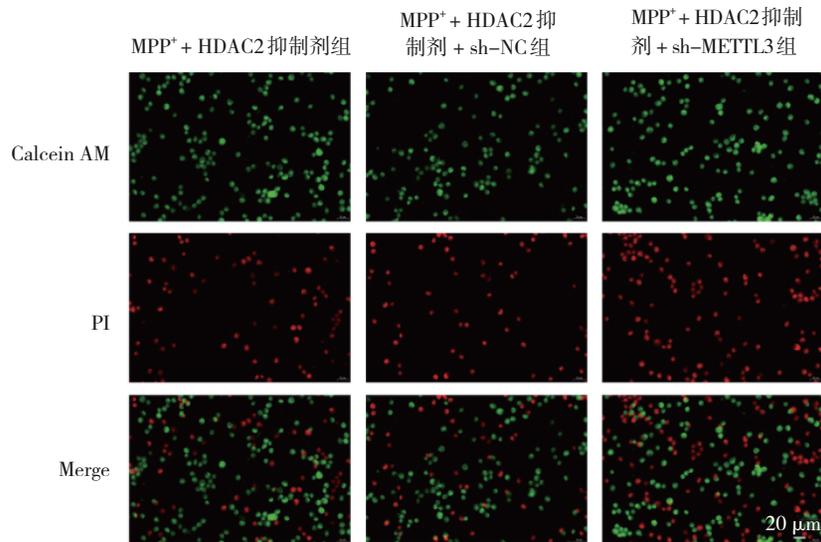


图 5 活死细胞染色检测细胞死亡率 (标尺: 20 μm)

表 10 各组细胞死亡率及细胞活性比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞死亡率	细胞活性
MPP <sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组	10.22 ± 1.09	99.69 ± 7.25
MPP <sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-NC 组	11.29 ± 0.75	98.09 ± 5.87
MPP <sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-METTL3 组	16.81 ± 1.14 <sup>†</sup>	45.68 ± 4.25 <sup>†</sup>
F 值	24.670	53.920
P 值	0.001	0.000

注: †与 MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-NC 组比较,  $P < 0.05$ 。

### 2.8 敲低 METTL3 逆转 HDAC2 抑制剂对 METTL3 及 SOCS3 的调控作用

MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组、MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-NC 组、MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-METTL3 组的 METTL3 和 SOCS3 基因相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-METTL3 组 METTL3 及 SOCS3 基因相对表达量均低于 MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-NC 组 (均  $P < 0.05$ )。见表 11。

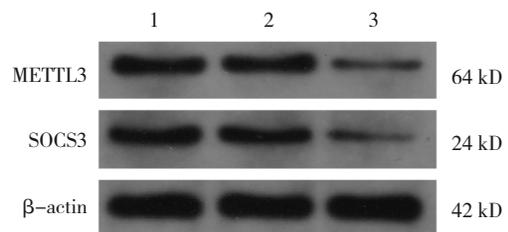
MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组、MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-NC 组、MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-METTL3 组的 METTL3 和 SOCS3 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。MPP<sup>+</sup> +

表 11 各组 METTL3、SOCS3 基因相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	METTL3	SOCS3
MPP <sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组	1.04 ± 0.14	0.99 ± 0.07
MPP <sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-NC 组	1.03 ± 0.13	0.99 ± 0.06
MPP <sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-METTL3 组	0.44 ± 0.06 <sup>†</sup>	0.43 ± 0.09 <sup>†</sup>
F 值	26.490	56.670
P 值	0.001	0.000

注: †与 MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-NC 组比较,  $P < 0.05$ 。

HDAC2 抑制剂 + sh-METTL3 组 METTL3 和 SOCS3 蛋白相对表达量低于 MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-NC 组 ( $P < 0.05$ )。见图 6 和表 12。



1: MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组; 2: MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-NC 组; 3: MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-METTL3 组。

图 6 METTL3 及 SOCS3 的蛋白表达

表 12 各组 METTL3 及 SOCS3 蛋白相对表达量比较  
( $\bar{x} \pm s$ )

组别	METTL3 蛋白	SOCS3 蛋白
MPP <sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂组	0.69 ± 0.08	0.71 ± 0.10
MPP <sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-NC 组	0.66 ± 0.09	0.70 ± 0.07
MPP <sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-METTL3 组	0.18 ± 0.06 <sup>†</sup>	0.19 ± 0.07 <sup>†</sup>
F 值	40.720	40.200
P 值	0.000	0.000

注：†与 MPP<sup>+</sup> + HDAC2 抑制剂 + sh-NC 组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

SOCS3 对维持神经元发育和成长至关重要。MISHRA 等<sup>[13]</sup>研究表明,过表达 SOCS3 可诱导神经干细胞向神经元分化,并促进神经元细胞的存活与生长。PD 是伴随有神经退行性病变的神经系统疾病,SOCS3 表达下调与 PD 的神经退行及变性密切相关。PD 动物及细胞模型显示,SOCS3 在 PD 中表达下调,上调 SOCS3 可抑制神经毒性,从而减少神经元细胞死亡并改善 PD 症状<sup>[6,14]</sup>。本研究证实,经 MPP<sup>+</sup> 处理后的神经元细胞中 SOCS3 表达显著下调。由此可见,SOCS3 表达下调是 PD 中神经元细胞的重要表现。

本研究证实在 MPP<sup>+</sup> 处理后的神经元细胞中抑制 HDAC2 可导致 SOCS3 表达上调,表明 HDAC2 与 SOCS3 表达密切相关。HDAC2 对多巴胺能神经元变性具有重要影响。GUO 等<sup>[15]</sup>认为,HDAC2 可诱导 PD 小鼠小胶质细胞激活,从而促进神经炎症,推动 PD 小鼠多巴胺能神经元的进行性变性。HDAC2 的异常表达可导致神经可塑性改变,进而引起神经退行性病变<sup>[16]</sup>。本研究结果同样证实,HDAC2 在 MPP<sup>+</sup> 处理后的神经元细胞中表达升高,且抑制 HDAC2 可降低神经元细胞死亡率,并提高细胞活性。由此可见,HDAC2 对 PD 发病机制至关重要。HDAC2 对 SOCS3 表达的影响也提示了 HDAC2 在 PD 中的潜在机制,即:HDAC2 可能通过促进 SOCS3 下调引起神经细胞死亡,进而推动 PD 发生。

本研究进一步发现,HDAC2 可能通过 METTL3 调控 SOCS3 表达。METTL3 是 m6A 甲基转移酶复合物的催化子单元,负责催化甲基组从供体转移至受体 RNA 亚基<sup>[17-20]</sup>。METTL3 与 SOCS3 转录表达中发挥重要作用。已有证据证实,在其他细胞类型中

METTL3 介导 SOCS3 mRNA 的 m6A 修饰<sup>[1,21]</sup>。本研究探讨了 METTL3 与 SOCS3 在 PD 中的重要联系,结果证实,经 MPP<sup>+</sup> 处理后的神经元细胞中 METTL3 同样介导 SOCS3 的 m6A 修饰,这一结果也提示 METTL3 在 PD 中是调控 SOCS3 表达的重要因子。组蛋白乳酸化是新发现的蛋白质修饰方式,可激活靶基因的转录过程,从而促进基因表达<sup>[22-24]</sup>。METTL3 表达受乳酸化的正向调控<sup>[9,25]</sup>,HDAC2 是乳酸化的关键调控因子,可移除目标蛋白的乳酸修饰基团,因此 HDAC2 影响 METTL3 的乳酸化修饰。本研究结果发现,MPP<sup>+</sup> 处理的神经元细胞模型表现为 METTL3 乳酸化水平降低,HDAC2 抑制剂导致 METTL3 乳酸化水平及表达升高,而敲低 METTL3 可抵消 HDAC2 的影响。以上结果说明,在 PD 中 HDAC2 可能通过去乳酸化抑制 METTL3 表达。在此基础上,本研究又进一步证实,在 MPP<sup>+</sup> 处理的神经元细胞中敲低 METTL3 可逆转 HDAC2 抑制剂的神经保护作用,及其对 SOCS3 的促表达效应,这反向说明在 PD 中 HDAC2 可能通过 METTL3/SOCS3 轴引起神经元细胞死亡,抑制细胞存活。

本研究结果虽然证实 HDAC2/METTL3/SOCS3 轴对 PD 中神经元细胞死亡及存活的调控机制,但未能通过 PD 大鼠模型验证以上机制,这是本研究的不足之处。此外 SOCS3 是 IL-6 炎症通路的关键调控因子,在神经炎症中发挥重要作用,然而本研究仅从神经元细胞死亡及存活展开研究和讨论,未能进一步探究 HDAC2/METTL3/SOCS3 轴对 PD 神经炎症的影响,这也是本研究的另一不足之处。后续研究将通过 MPTP 诱导法复制 PD 大鼠模型,在动物水平上进一步验证 HDAC2/METTL3/SOCS3 轴对神经元细胞死亡、存活、炎症反应的确切影响。

综上所述,本研究证实了在 PD 中 HDAC2 通过诱导 METTL3 组蛋白去乳酸化抑制 METTL3 表达,这一机制引起 SOCS3 的 m6A 修饰水平降低并导致 SOCS3 表达下调,进而促进 PD 发病。本研究为 PD 患者提供了可能的治疗靶点。

### 参 考 文 献 :

- [1] PACCOSI E, PROIETTI-de-SANTIS L. Parkinson's disease: from genetics and epigenetics to treatment, a miRNA-based strategy[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(11): 9547.
- [2] HAN Y L, HE Z H. Concomitant protein pathogenesis in Parkinson's disease and perspective mechanisms[J]. Front Aging

- Neurosci, 2023, 15: 1189809.
- [3] WU Y, LIANG S L, ZHU H, et al. Analysis of immune-related key genes in Alzheimer's disease[J]. Bioengineered, 2021, 12(2): 9610-9624.
- [4] SHEN H P, HE Z M, PEI H Y, et al. Aurantiamide promotes M2 polarization of microglial cells to improve the cognitive ability of mice with Alzheimer's disease[J]. Phytother Res, 2023, 37(1): 101-110.
- [5] IWAHARA N, HISAHARA S, KAWAMATA J, et al. Role of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in altering activated microglia phenotype in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice[J]. J Alzheimers Dis, 2017, 55(3): 1235-1247.
- [6] RABIE M A, ABD EL FATTAH M A, NASSAR N N, et al. Correlation between angiotensin 1-7-mediated mas receptor expression with motor improvement, activated STAT3/SOCS3 cascade, and suppressed HMGB-1/RAGE/NF- $\kappa$ B signaling in 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rats[J]. Biochem Pharmacol, 2020, 171: 113681.
- [7] LI Z J, MENG X Y, CHEN Y, et al. N6-methyladenosine (m6A) writer METTL3 accelerates the apoptosis of vascular endothelial cells in high glucose[J]. Heliyon, 2023, 9(3): e13721.
- [8] YU Z Y, HUANG L S, XIA Y Y, et al. Analysis of m6A modification regulators in the substantia nigra and striatum of MPTP-induced Parkinson's disease mice[J]. Neurosci Lett, 2022, 791: 136907.
- [9] XIONG J, HE J, ZHU J, et al. Lactylation-driven METTL3-mediated RNA m6A modification promotes immunosuppression of tumor-infiltrating myeloid cells[J]. Mol Cell, 2022, 82(9): 1660-1677.e10.
- [10] TAN Y Y, DELVAUX E, NOLZ J, et al. Upregulation of histone deacetylase 2 in laser capture nigral microglia in Parkinson's disease[J]. Neurobiol Aging, 2018, 68: 134-141.
- [11] CHOONG C J, SASAKI T, HAYAKAWA H, et al. A novel histone deacetylase 1 and 2 isoform-specific inhibitor alleviates experimental Parkinson's disease[J]. Neurobiol Aging, 2016, 37: 103-116.
- [12] MORENO-YRUELA C, ZHANG D, WEI W, et al. Class I histone deacetylases (HDAC1-3) are histone lysine delactylases[J]. Sci Adv, 2022, 8(3): eabi6696.
- [13] MISHRA K K, GUPTA S, BANERJEE K. SOCS3 induces neurite differentiation and promotes neuronal cell survival[J]. IUBMB Life, 2016, 68(6): 468-476.
- [14] CHEN C M, YEN C Y, CHEN W L, et al. Pathomechanism characterization and potential therapeutics identification for Parkinson's disease targeting neuroinflammation[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(3): 1062.
- [15] GUO X Y, CHEN L K, LI J X. Plantamajoside alleviates substantia nigra damage in Parkinson's disease mice by inhibiting HDAC2/MAPK signaling and reducing microglia polarization[J]. ACS Chem Neurosci, 2023, 14(6): 1119-1125.
- [16] BEAVER M, BHATNAGAR A, PANIKKER P, et al. Disruption of tip60 HAT mediated neural histone acetylation homeostasis is an early common event in neurodegenerative diseases[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 18265.
- [17] FAN Y S, LV X Y, CHEN Z H, et al. m6A methylation: critical roles in aging and neurological diseases[J]. Front Mol Neurosci, 2023, 16: 1102147.
- [18] LI G L, SUN Z B, DENG W H, et al. METTL3 plays a crucial function in multiple biological processes[J]. Acta Histochem, 2022, 124(6): 151916.
- [19] MALDONADO LÓPEZ A, CAPELL B C. The METTL3-m<sup>6</sup>A epitranscriptome: dynamic regulator of epithelial development, differentiation, and cancer[J]. Genes (Basel), 2021, 12(7): 1019.
- [20] 邓丽娇, 张纪岩. 类甲基化转移酶 3(METTL3)在免疫细胞和造血干细胞中的作用研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(6): 557-562.
- [21] ZHANG Y P, WANG L X, YAN F R, et al. Mettl3 mediated m6A methylation involved in Epithelial-Mesenchymal transition by targeting SOCS3/STAT3/SNAI1 in cigarette Smoking-Induced COPD[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2023, 18: 1007-1017.
- [22] ZHANG D, TANG Z Y, HUANG H, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation[J]. Nature, 2019, 574(7779): 575-580.
- [23] WANG J Z, YANG P L, YU T Y, et al. Lactylation of PKM2 suppresses inflammatory metabolic adaptation in pro-inflammatory macrophages[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(16): 6210-6225.
- [24] XIN Q, WANG H, LI Q L, et al. Lactylation: a passing fad or the future of posttranslational modification[J]. Inflammation, 2022, 45(4): 1419-1429.
- [25] ZHANG L, WANG X Y, CHE W Q, et al. METTL3 silenced inhibited the ferroptosis development via regulating the TFRC levels in the Intracerebral hemorrhage progression[J]. Brain Res, 2023, 1811: 148373.

(张西倩 编辑)

**本文引用格式:** 刘韵, 冯丹, 刘纷纷, 等. 组蛋白去乙酰化酶 2 在帕金森病中的作用及机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(21): 43-51.

**Cite this article as:** LIU Y, FENG D, LIU F F, et al. Study on the role and mechanism of histone deacetylase 2 in Parkinson's disease[J]. China Journal of Modern Medicine, 2024, 34(21): 43-51.