

## BEND6 过表达对小鼠神经干细胞基因转录表达的影响

周梦杰, 孙倩倩, 于洋\*

中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 生物化学与分子生物学系, 北京 100005

**摘要:**目的 探究在小鼠神经干细胞(NSCs)中过表达 BEND6 对其基因转录表达的影响,分析 BEND6 在小鼠神经发育过程中潜在的生物学功能。方法 在贴壁培养的小鼠 NSCs 中分别瞬时转染 pCMV-mScarlet(对照组)和 pCMV-mScarlet-BEND6(实验组)质粒,24 h 后在显微镜下观察细胞中红色荧光的表达以确认 mScarlet 和 mScarlet-BEND6 蛋白的表达。分别提取两组细胞的总 RNA,通过全转录组二代测序并对测序数据进行质控、参考基因组比对、定量分析、差异基因表达分析和富集分析,从而表征 BEND6 过表达对小鼠 NSCs 基因转录表达的影响及其在小鼠神经发育中的潜在功能。结果 成功获取并贴壁培养小鼠 NSCs。全转录组测序分析发现,与对照组相比,过表达 BEND6 的神经干细胞中有 165 个差异表达基因,其中有 102 个基因上调,63 个基因下调。富集分析显示这些差异表达基因主要与膜电位改变,突触传递,刺激反应,生长发育等生物学过程的调节有关。结论 BEND6 过表达能够调控小鼠 NSCs 中的特定基因的转录水平,可能具有调控特定生物学过程及小鼠生长发育的功能。

**关键词:** BEN 结构域;BEND6 蛋白;神经干细胞

中图分类号:R34 文献标志码:A

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2023.02.246

## Effect of BEND6 over-expression on transcriptional expression of mouse neural stem cells

ZHOU Mengjie, SUN Qianqian, YU Yang\*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences,  
School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

**Abstract: Objective** To investigate the role of BEND6 in regulating gene expression in mouse neural stem cells (NSCs) and to explore its biological function during neural development. **Methods** pCMV-mScarlet (control group) and pCMV-mScarlet-BEND6 (experimental group) plasmids were transiently transfected into mouse NSCs, respectively. After 24 hours, the expression of mScarlet and mScarlet-BEND6 proteins was confirmed by the presence of red fluorescence. Total RNA was then extracted from the two groups of cells for RNA-seq. Through reference genome alignment, quantitative analysis, differential gene expression analysis and enrichment analysis of the sequencing data, we were able to profile the transcriptome of NSCs upon BEND6 overexpression and to suggest a function for mouse neural development. **Results** Mouse NSCs were successfully isolated for primary culture. Whole transcriptome sequencing analysis revealed 165 differentially expressed genes after force-expressing BEND6, among

收稿日期:2022-10-24 修回日期:2022-11-22

基金项目:国家自然科学基金(32170550)

\*通信作者(corresponding author):yuy@ibms.pumc.edu.cn

which 102 genes were up-regulated and 63 genes were down-regulated. Enrichment analysis showed that these differentially expressed genes were highly related to the regulation of membrane potential change, synaptic transmission, stimulation response, growth and development and other biological processes. **Conclusions** BEND6 regulates the expression of genes related to neuronal functions in mouse NSCs, which suggests a potential mechanism in regulating neuron specific biological processes during development.

**Key words:** BEN domain; BEND6 protein; neural stem cells

近年来,随着生物信息学的发展,越来越多未知的蛋白结构域被预测出来。BEN 结构域<sup>[1]</sup>是 2008 年首次预测出的一个新的蛋白结构域。在该结构域被预测后不久,果蝇 INSV 蛋白的 BEN 结构域被发现能够直接与 DNA 结合,并抑制其结合基因的表达<sup>[2]</sup>。近年来对 BEN-solo 蛋白<sup>[3-5]</sup>和其他含有 BEN 结构域的相关蛋白<sup>[6-11]</sup>的研究表明,该类蛋白具有抑制或隔离基因表达以及调节染色质结构的功能,但是目前该类蛋白中许多成员的生物学功能及其发挥功能的分子机制尚未阐明。BEND6 蛋白与 INSV 蛋白类似,因其只含有一个 BEN 结构域而不含有其它可识别结构域,又被叫做 BEN-solo 蛋白。小鼠的 BEND6 蛋白在细胞核中表达,并且具有促进神经细胞在小鼠大脑皮层中向上迁移的功能<sup>[3]</sup>,但 BEND6 可能发挥的生物学功能尚不清楚。本研究旨在通过对 BEND6 过表达的小鼠神经干细胞进行全转录组测序并分析 BEND6 对其基因转录表达的影响,从而推测 BEND6 在小鼠发育中的潜在功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒: pCMV-mScarlet, pFRT-FH-BEND6 (北京协和医学院基础学院,生物化学与分子生物学系,于洋实验室)。

1.1.2 小鼠神经干细胞:取自 P14 小鼠(C57)侧脑室周围组织。实验小鼠来自北京协和医学院基础学院动物中心。

1.1.3 试剂和试剂盒: NeuroCult™ Proliferation Kit (Mouse & Rat) (Stem Cell 公司); PCR 引物合成与质粒测序(北京诺赛基因组研究中心有限公司); Trizol (Thermo Fisher 公司); SYBR (YESEN 公司); 全转录组测序(北京诺禾致源生物技术有限公司); Poly-D-Lysine (PDL) 和 Laminin (Sigma-Aldrich 公司); Lipofectamine Stem Reagent (Invitrogen 公司);

mCherry 抗体( Abbkine 公司); 荧光二抗( Abcam 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 质粒的构建:从 pFRT-FH-BEND6 质粒中克隆 BEND6 片段并将其插入 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切的 pCMV-mScarlet 载体中。将连接好的质粒转化到感受态细菌中进行克隆,用卡那霉素进行筛选,测序确认 pCMV-mScarlet-BEND6 质粒是否构建成功。获取 BEND6 片段的上游引物:5'-CGAGCTCAAGCTTCGAATTCTATGCAGAAGATCTTGCAGAC-3', 下游引物:5'-TATCTAGATCCGGTGGATCC TTTAAGATACCATCCTGAGAGTTC-3'。

1.2.2 小鼠神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的获取与培养:参照 NeuroCult™ Proliferation Kit 中描述的方法。

1.2.3 细胞免疫荧光染色验证蛋白表达:将 pCMV-mScarlet 和 pCMV-mScarlet-BEND6 质粒转染到贴壁培养的神经干细胞中,24 h 后使用 4% PFA 溶液将细胞固定,然后依次用 mCherry 抗体和荧光二抗进行孵育,封片后在莱卡倒置显微镜下成像。

1.2.4 RNA 样品的制备:分别收集对照组和实验组细胞于 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL Trizol 吹打混匀,室温静置 10 min,然后加入 200  $\mu$ L 氯仿充分混匀后于 4  $^{\circ}$ C 离心 10 min。吸取上层液体于新的 RNase-free 的 1.5 mL 离心管中,加入等体积的异丙醇,混匀,室温静置 5 min 后 4  $^{\circ}$ C 离心 10 min。弃上清,用 700  $\mu$ L 75%乙醇清洗 RNA 沉淀 2 次,用适量 RNAase-free 的水溶解室温干燥的 RNA 沉淀。

1.2.5 q-PCR 实验验证基因转录水平:反转录对照组和实验组细胞的 RNA 得到相应的 cDNA,以 cDNA 为模板进行 q-PCR 扩增反应,分别检测两组细胞中目标基因的 Ct 值,反应体系为 20  $\mu$ L,每组设置 3 个生物学重复,内参基因为 m18srRNA,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法得到两组细胞中目标基因的相对表达量。

1.2.6 测序数据分析:使用 HISAT2 软件对质控后的测序数据进行比对,然后通过基因表达定量分析获得实验组和对照组样本的基因表达矩阵。采用 DESeq2 软件获得实验组中有差异表达的基因,并对差异基因进行生物功能富集分析。差异表达基因的筛选条件为  $P \leq 0.05$ ,  $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ 。

表 1 q-PCR 引物序列

Table 1 Sequences of q-PCR primers

gene	sequence(5'-3')
m18srRNA	F:GTAACCCGTTGAACCCCAT
	R:CCATCCAATCGGTACTAGCC
mScarlet	F:AAGACCACCTACAAGGCCAAG
	R:CTGTTCCACCACGGTGTAGT
BEND6	F:CCTCAGGCAGTCACACAGTT
	R:CCTCAGGCAGTCACACAGTT

## 2 结果

### 2.1 小鼠神经干细胞的获取

成功获得小鼠神经干细胞(图 1B),并将其在细胞培养板中贴壁培养(图 1A)。

### 2.2 在小鼠神经干细胞中过表达 mScarlet 和 mScarlet-BEND6

分别将 pCMV-mScarlet 和 pCMV-mScarlet-BEND6 质粒(图 1C)转染到贴壁培养的神经干细胞

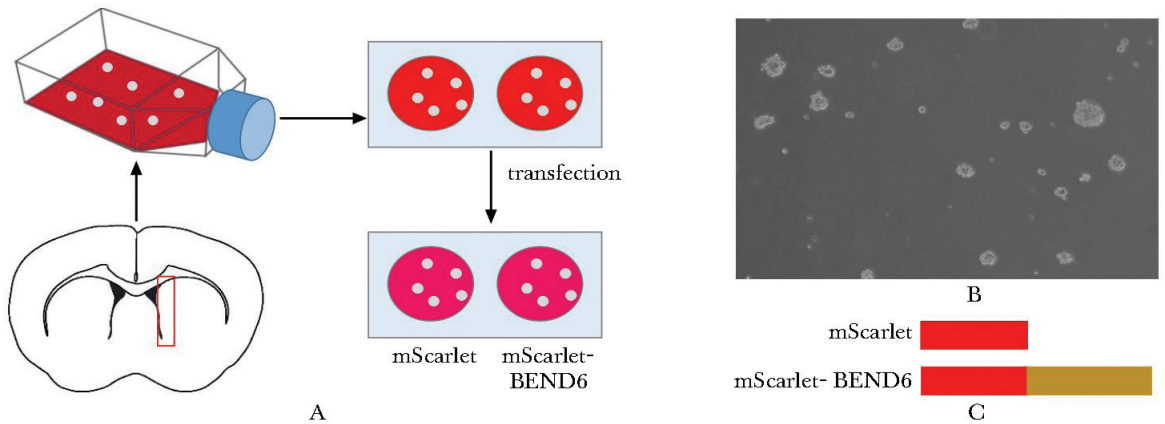
中(图 1A)。转染 24 h 后,mScarlet 在两组细胞中的转录水平相差不大(图 2C),而 BEND6 在实验组细胞中的表达明显高于在对照组中的表达(图 2D)。此外,mScarlet 在神经干细胞的细胞核和细胞质中均有表达(图 2A),而 mScarlet-BEND6 仅在细胞核中有明显表达(图 2B)。

### 2.3 BEND6 过表达对小鼠神经干细胞基因转录的影响

与过表达 mScarlet 的神经干细胞相比,过表达 mScarlet-BEND6 的细胞中共有 165 个基因的表达发生了变化。其中上调的基因有 102 个,如 *Mx1*、*Mx2*、*Socs1*、*Map1b*、*Kcnq3*、*Ppp1r13l*、*Stmn4*、*Cd274*、*Tgtp1* 等;下调的基因有 63 个,如 *Timp1*、*Cd68*、*Otx2*、*Casp12*、*Fn1*、*Gxylt2*、*Cryab*、*Acta2* 等(图 3A,B)。

### 2.4 差异表达基因的生物学功能富集分析

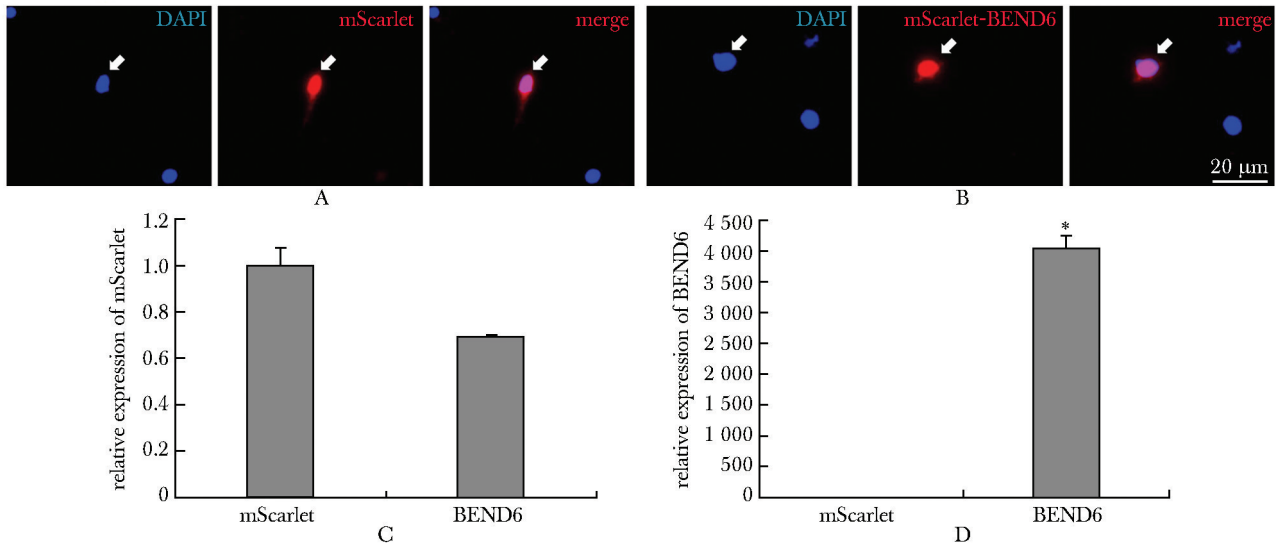
在过表达 mScarlet-BEND6 的神经干细胞中筛选出的差异表达基因主要与生长发育调控,生物代谢过程、免疫过程、细胞内生物学过程及种间互相作用等多种生物学过程相关(图 4A)。这些生物学过程主要包括膜电位的调节、细胞对于干扰素的反应、肽基丝氨酸磷酸化的正调控、炎症反应、内肽酶活性的调节、化学突触传递、多巴胺能神经发生、正向调节神经元分化、2 型免疫反应的调节、细胞分化的负调控、神经系统过程的调节、胰岛素受体信号通路的调节、微管聚合或解聚的调节等(图 4B)。



A. flow chart of culture and transfection of mouse neural stem cells; B. neural stem cells in suspension culture( $\times 100$ ); C. schematic of mScarlet and mScarlet-BEND6 proteins

图 1 小鼠神经干细胞的培养与转染

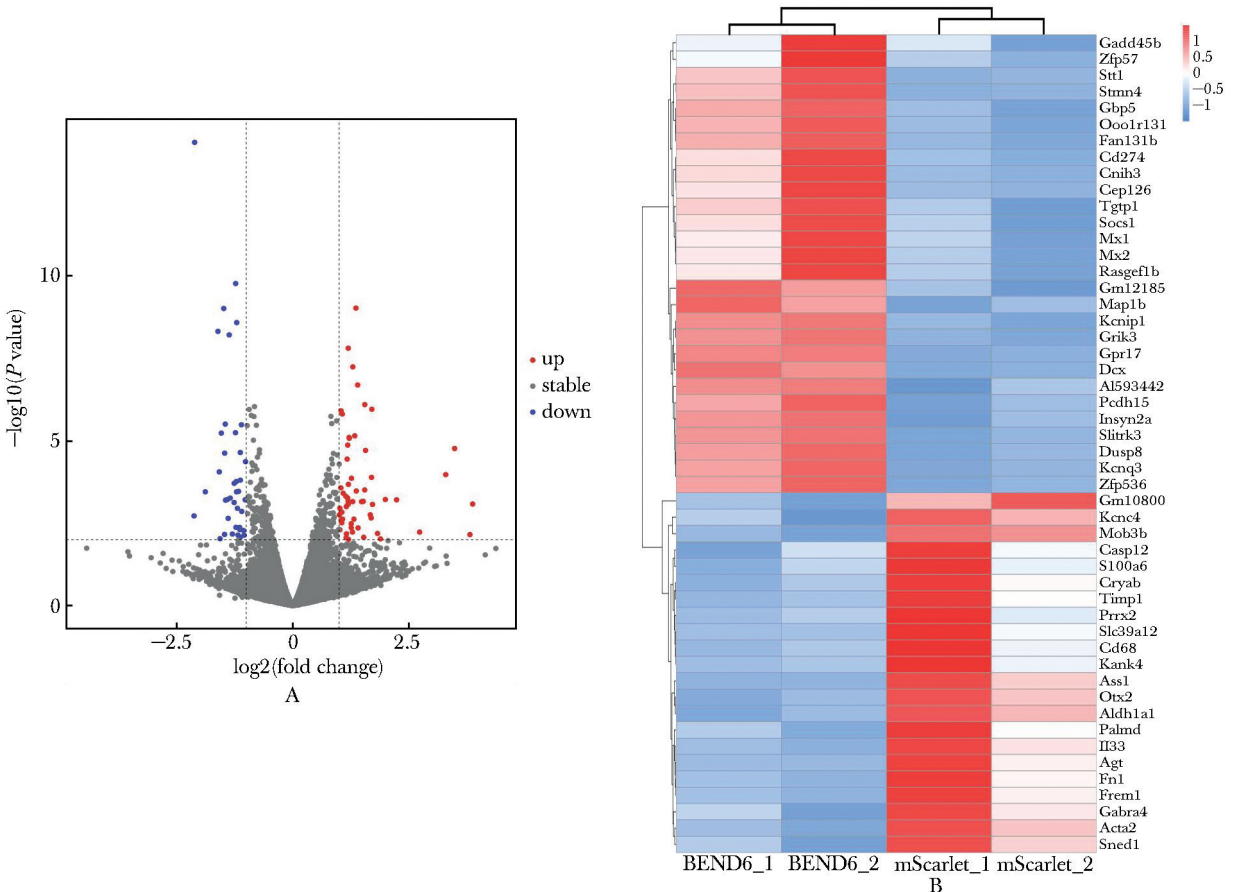
Fig 1 Culture and transfection of mouse neural stem cells



A. mScarlet was expressed in the nucleus and cytoplasm of mouse neural stem cells; B. mScarlet-BEND6 was restricted in the nucleus of mouse neural stem cells; C. there was no significant difference in the expression of mScarlet between control and experimental group; D. the expression of mScarlet-BEND6 in the experimental group was significantly higher than that in the control group; \* $P < 0.001$  compared with mScarlet

图 2 mScarlet 和 mScarlet-BEND6 在实验组和对照组细胞中的表达

Fig 2 Expression of mScarlet and mScarlet-BEND6 in experimental and control group

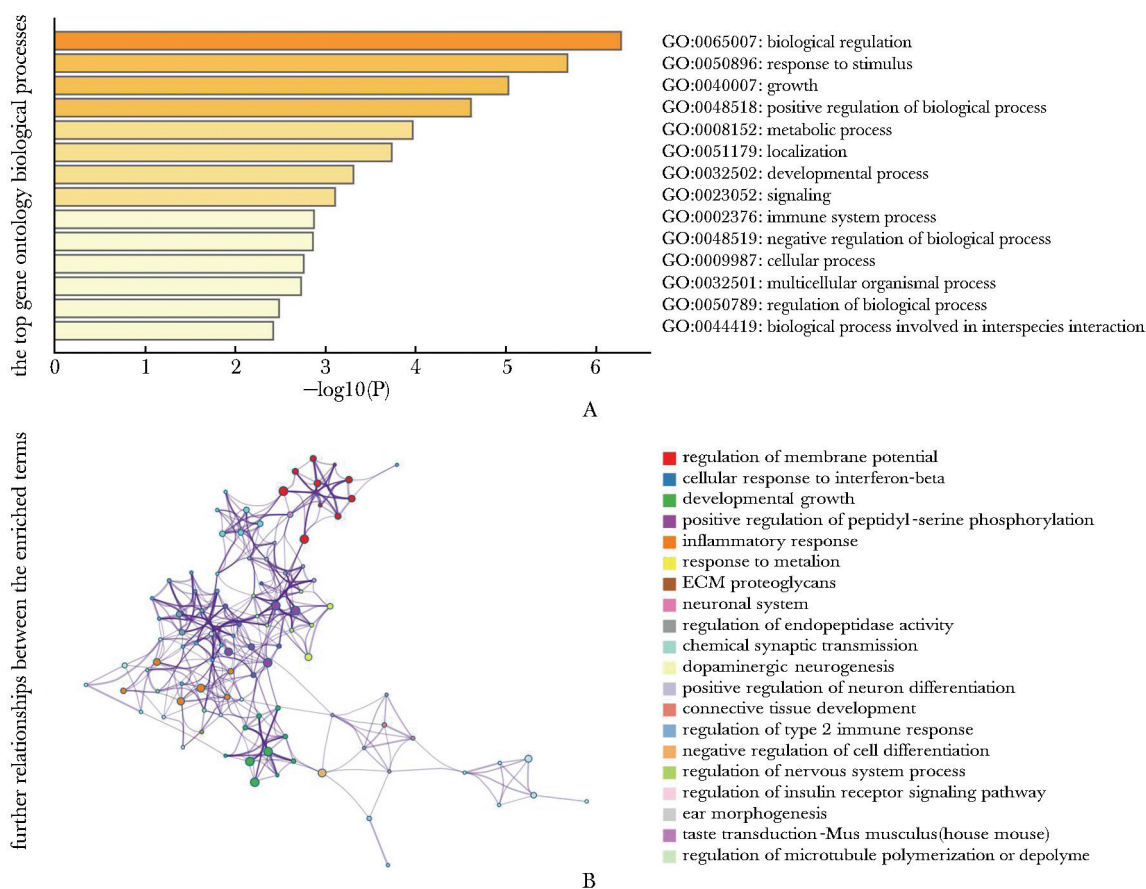


A. the volcano plot showing differentially expressed genes upon BEND6 overexpression; B. heatmap showing differentially expressed genes regulated by BEND6

图 3 实验组细胞中的差异表达基因

Fig 3 BEND6 over-expression leads to differential gene expression





A. functional annotation of differentially expressed genes upon BEND6 over-expression; B. biological relationship between the enriched terms

图 4 差异表达基因的功能富集分析

Fig 4 Functional enrichment analysis of differentially expressed genes

### 3 讨论

在本研究中,与过表达 mScarlet 的小鼠神经干细胞相比,过表达 mScarlet-BEND6 的细胞中有 165 个基因的转录水平发生了变化。这些差异表达基因与神经系统的调节和多种生物学过程相关。差异表达分析发现过表达 mScarlet-BEND6 的小鼠神经干细胞中 *S100a6* 基因下调,该蛋白可能是成年小鼠海马体亚颗粒区神经干细胞和星形胶质细胞的新型标志物<sup>[12]</sup>。有趣的是,实验组中 *Fnl* 基因的转录水平也呈现下调,该基因参与轴突延伸的正向调节,而对神经分化有负向调节作用的 *Zfp536* 基因的转录水平出现了上调。此外,与调节微管聚合和神经元投射发展相关的 *Slc39a12* 基因呈现下调,而同样参与调节微管聚合或解聚及神经元投射发育的 *Stmn4* 基因确实呈现上调。这表明,小鼠神经元的成熟和轴突

形成是一个十分复杂的过程,BEND6 在小鼠神经干细胞向神经元发育的过程中可能并不是起到单向促进作用,而是促进神经干细胞进入某个神经元分化成熟过程中的特殊状态。值得注意的是,差异表达基因中下调的 *Prrx2* 具有 DNA 结合转录激活剂活性,上调的 *Zfp57* 具有结合染色质和双链甲基化 DNA 的活性。这提示 BEND6 在小鼠神经干细胞中可能通过调节其他具有转录因子从而调节神经分化过程。

BEND6 过表达除了对神经分化调节相关的基因转录产生影响,也导致很多参与其他生物学过程的基因转录水平发生了变化。例如与突触膜电位调节及神经递质分泌相关的基因中 *Kcnc4*、*Gabra4* 呈现转录下调,*Kcnq3* 和 *Insyn2a* 基因呈现上调;下调的 *Timp1*、*Cd68*、*Il33*、*Cryab* 基因和上调的 *Tgtp1*、*Gbp5*、*Cd274*、*Gpr17*、*Mx2*、*Mx1* 基因主要

与免疫反应、炎性反应和伤口愈合等生物学过程相关。

本研究通过对过表达 BEND6 的神经干细胞进行转录组测序和分析发现, BEND6 过表达会导致参

与神经分化和多种生物学过程的基因转录水平发生变化, 为 BEND6 生物学功能的探究提供方向。但 BEND6 具体的生物学功能及其发挥作用的分子机制还有待进一步的研究去探索。

#### 参考文献:

- [1] Abhiman S, Mlyer L, Aravind L. BEN: A novel domain in chromatin factors and DNA viral proteins[J]. *Bioinformatics*, 2008, 24: 458-461.
- [2] Dai Q, Ren A, Westholm JO, *et al.* The BEN domain is a novel sequence specific DNA-binding domain conserved in neural transcriptional repressors [J]. *Genes Dev*, 2013, 27: 602-614.
- [3] Dai Q, Celia AA, Lnsolera R, *et al.* BEND6 is a nuclear antagonist of Notch signaling during self-renewal of neural stem cells[J]. *Development*, 2013, 140: 1892-1902.
- [4] Dai Q, Ren A, Westholm JO, *et al.* Common and distinct DNA-binding and regulatory activities of the BEN-solo transcription factor family[J]. *Genes Dev*, 2015, 29: 48-62.
- [5] Ueberschär M, Wang HZ, Zhang C, *et al.* BEN-solo factors partition active chromatin to ensure proper gene activation in *Drosophila*[J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 5700. doi: 10.1038/s41467-019-13558-8.
- [6] Zheng LQ, Liu JJ, Niu LJ, *et al.* Distinct structural bases for sequence-specific DNA binding by mammalian BEN domain proteins[J]. *Genes Dev*, 2022, 36: 225-240.
- [7] Grand RS, Burger L, Gräwe C, *et al.* BANP opens chromatin and activates CpG-island-regulated genes [J]. *Nature*, 2021, 596: 133-137.
- [8] Sathyan KM, Shen Z, Tripathi V, *et al.* A BEN-domain-containing protein associates with heterochromatin and represses transcription [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124: 3149-3163.
- [9] Khan A, Prasanth SG. BEND3 mediates transcriptional repression and heterochromatin organization [J]. *Transcription*, 2015, 6: 102-105.
- [10] Zhang J, Zhang Y, You QL, *et al.* Highly enriched BEND3 prevents the premature activation of bivalent genes during differentiation[J]. *Science*, 2022, 375: 1053-1058.
- [11] Shi G, Bai YF, Zhang XY, *et al.* Bend family proteins mark chromatin boundaries and synergistically promote early germ cell differentiation [J]. *Protein Cell*, 2022, 13: 721-741.
- [12] Yamada J, Jinno S. S100A6 (calcyclin) is a novel marker of neural stem cells and astrocyte precursors in the subgranular zone of the adult mouse hippocampus [J]. *Hippocampus*, 2014, 24: 89-101.