

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.04.008

TET2 在帕金森病细胞模型中的表达及机制研究 *

吴婷婷¹ 刘 特² 陈天骄¹ 陈雅静¹ 李 璇¹ 朱潇颖¹ 吴云成^{1Δ}

(1 上海交通大学附属第一人民医院 神经内科 上海 200080;

2 上海中医药大学中医老年医学研究所 中心实验室 上海 200031)

摘要 目的:迄今为止,帕金森病(PD)发生的分子机制尚未完全阐明,本研究旨在体外细胞模型中寻找 PD 新型表观遗传标志物,探索其发病机制。**方法:**本次研究使用的细胞为神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y。首先,我们用 CCK-8 检测细胞活力,选取合适浓度的 MPP+ 构建 PD 细胞损伤模型。再用 PBS 和 MPP+ 分别处理 SH-SY5Y 细胞,用 RT-qPCR 检测了几个甲基化酶与去甲基化酶 DNMT1, DNMT3A, DNMT3B 及 TET1, TET2, TET3 的 mRNA 的表达水平,并用蛋白印迹检测 TET2 蛋白水平,免疫荧光检测了 TET2 蛋白定位。进一步用慢病毒转染 SH-SY5Y 细胞敲低 TET2 后,检测细胞增殖。**结果:**本研究发现, MPP+ 对 SH-SY5Y 细胞增殖的抑制具有时间与浓度依赖性, 我们最终选择 2.5 mM MPP+ 作为后续的细胞处理浓度。与对照组相比, MPP+ 处理细胞 TET2 的 mRNA 及蛋白水平表达均增加,且蛋白进入细胞核增加;同时发现,敲低 TET2 表达可以延缓 MPP+ 对 SH-SY5Y 细胞增殖的抑制作用。**结论:**在当前的研究中,我们报道了 TET2 蛋白可能是 PD 新型的表观遗传学标志物,提示我们将来也许可以使用 TET2 抑制剂来治疗 PD,因此本研究有可能为 PD 提供新的治疗方向和靶点。

关键词: 帕金森病; TET2; DNA 羟甲基化; 中脑多巴胺能神经元

中图分类号: R-33; R742.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)04-638-05

The Expression and Mechanism of TET2 in the Pathogenesis of Parkinson's Disease*

WU Ting-ting¹, LIU Te², CHEN Tian-jiao¹, CHEN Ya-jing¹, LI Xuan¹, ZHU Xiao-ying¹, WU Yun-cheng^{1Δ}

(1 Department of Neurology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China;

2 Shanghai Geriatric Institute of Chinese Medicine, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200031, China)

ABSTRACT Objective: Currently, the underlying mechanisms of Parkinson's disease (PD) still remain unknown. This study mainly investigated the novel epigenetic markers and explored the pathogenesis of PD in the cellular model. **Methods:** The neuroblastoma cell line SH-SY5Y were used in this study. Firstly, we used CCK-8 to detect cell viability and select the optimal concentration of MPP+ for SH-SY5Y cells. Next, SH-SY5Y cells were treated with PBS and MPP+ respectively, then the mRNA expression levels of several methylases and demethylases, such as DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2 and TET3 were detected by RT-qPCR, and level of TET2 protein was detected by western blot. Finally, the protein localization of TET2 was detected by immunofluorescence. Furthermore, we knockdown TET2 with a lentivirus to detect cell proliferation. **Results:** With the increase of time period or concentration, the cell inhibition rates increased, we finally select a concentration at which the cell inhibition rate was about 50 %, which turned out to be 2.5 mM. We observed that TET2 was significantly upregulated and recruited to the nuclear bodies of SH-SY5Y cells after MPP+ treatment. And the CCK-8 assays showed that MPP+ inhibited the proliferation of SH-SY5Y cell lines, while downregulation of TET2 promoted proliferation. **Conclusions:** In the present study, we reported the functions of TET2 proteins in the pathogenesis of PD as novel epigenetic markers, suggesting that we could use TET2 inhibitors to treat PD in the future, so this study may provide us a new direction and target for PD treatment.

Key words: Parkinson's disease; TET2; DNA hydroxymethylation; Midbrain dopaminergic neuron

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R742.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)04-638-05

前言

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是中老年人第二大常见的神经退行性疾病,以静止性震颤、运动迟缓、肌强直和姿势失

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81671251)

作者简介:吴婷婷(1992-),硕士研究生,主要研究方向:神经退行性疾病, E-mail: 1362132564@qq.com

Δ 通讯作者:吴云成(1972-),主任医师,教授,博士生导师,主要研究方向:神经变性疾病和脑血管病, E-mail: yunchw@medmail.com.cn

(收稿日期:2019-05-29 接受日期:2019-06-25)

衡等运动症状以及便秘、嗅觉减退、快动眼睡眠行为障碍等非运动症状为其主要临床特征。PD 主要的病理特征是路易小体形成、 α -突触核蛋白(α -synuclein)异常聚集以及黑质多巴胺能神经元进行性丧失^[1]。帕金森病严重影响了患者的生活质量,给患者家庭及社会带来了严重负担。然而,迄今为止,导致 PD 发生的分子机制尚未完全阐明,尚缺乏逆转或延缓病程进展的预防和治疗手段。越来越多的研究显示,表观遗传学(Epigenetics)调控在 PD 发病中可能发挥重要作用。其中,DNA 甲基化是最常研究的表观遗传的主要修饰方式。2009 年一项研究提示,TET 酶可以催化 DNA 羟甲基化,催化氧化 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)生成 5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5-hmC)进而逆转 DNA 的甲基化^[2]。哺乳动物体内 TET 酶有 TET1,2,3 三种亚型,研究显示 5hmC 和 TET 酶在大脑中表达很丰富,而 TET2 在中枢神经系统中稳定而持续表达,并与神经元的存活密切相关^[3]。然而,TET2 在 PD 多巴胺能神经元损伤中的作用尚未明确,目前国内外尚未见相关研究。本研究从表观遗传学角度进一步研究 TET2 在帕金森病的可能作用机制,有助于发现帕金森病的潜在生物标记物,为帕金森病等神经变性疾病的治疗提供新的实验依据和治疗靶点,具有重要的科学价值和临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验使用的 DMEM 培养基、胎牛血清、青-链霉素双抗均购自美国 Gibco 公司。PD 造模药 MPP+ (1-甲基-4-苯基-吡啶离子) 购自美国 Sigma 公司。TET2 抗体购自荧光 abcam 公司, β -actin 抗体购自美国 proteintech 公司。凝胶配置试剂盒及 cck-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。反转录及 RT-PCR 试剂盒购自美国 Toyobo 公司。慢病毒购买于诺百生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

将神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 接种于培养皿中,培养基为含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基。置于含 5%二氧化碳的细胞培养箱中培养,培养箱温度设置为 37℃。每日在镜下观察细胞,发现培养基变黄时要及时更换新鲜培养基。细胞长至 80~90%左右时需传代。新复苏的细胞需培养三代后才可以开展后续实验;细胞给药或其他处理一般在细胞处于对数生长期时实施。

1.3 PD 细胞模型的构建

我们的实验使用 MPP+ 作为神经毒素来处理 SH-SY5Y 细胞构建 PD 细胞损伤模型。MPP+ 全称为 1-甲基-4-苯基-吡啶离子,被广泛应用于各种细胞损伤模型及 PD 模型的构建^[4-6]。当细胞长至 70%时给予浓度梯度的 MPP+ 干预相应时间,后根据细胞活性检测的结果,选取细胞活性下降约 50%的浓度作为造模浓度。

1.4 慢病毒转染

实验前首先接种 SH-SY5Y 细胞至培养皿中。待细胞长至密度约 70%时,进行病毒感染。培养基中加入病毒混合液,再加入 polybrene 使其终浓度为 5 μ g/mL,以提高病毒的感染效率。放于细胞培养箱(37℃,5%CO₂)中孵育 4-6 小时后换成常

规培养基。从第三天开始,每天观察细胞,如载体带有荧光,则注意观察荧光,如有必要进行换液,以保证细胞良好的生长状态。用杀稻瘟菌素连续给药 10-14 天筛选稳转株。

1.5 CCK-8 检测细胞活力

计数后,将 SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔板中,分为不同实验组,每组至少设置 3 个副孔,每孔接种 5000 个细胞,每孔加入 100 μ L 的培养基。待细胞长至对数增长长期时(80%左右时),加 100 μ L 含对应浓度的 MPP+ 的培养基处理相应时间。后取新鲜培养基和 CCK-8 按 9:1 比例充分混匀,放于细胞培养箱中孵育 1-3 个小时,用酶标仪测定 450 nm 波长下的吸光度值。

1.6 qRT-PCR

细胞样品处理相应时间后,抽提总 RNA。选取 OD 260 / OD 280 比值在 1.8-2.2 之间的 RNA 样品,将 RNA 反转录为 cDNA,以反转录 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应总由变性-退火-延伸三个步骤组成,每个样品重复至少三次。

1.7 Western blot

将细胞收集于 EP 管中,往管中加入一定体积的 Western 及 IP 裂解液提取细胞总蛋白。而后用 BCA 检测各样品蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳、转膜后将蛋白转到 PVDF 膜上,然后用 5% BSA 在室温下孵育 2 小时封闭。进一步将膜裁剪,分别对应用 TET2 抗体及 β -actin 抗体于 4℃冰箱中孵育过夜。第二天,将膜用 TBST 洗三遍,将目标条带按照抗体种属放入对应的二抗中,室温下孵育 1.5 小时。再 TBST 洗涤三遍,用显影仪进行检测。

1.8 免疫荧光

将灭过菌的细胞爬片提前置于 24 孔板中,用多聚赖氨酸包被 6 小时后,接种 SH-SY5Y 细胞。当细胞长至对数生长期时,加入一定浓度的 MPP+ 处理相应时间,对照组加入同等体积的 PBS 处理相同时间。用 4%多聚甲醛固定后,于免疫荧光封闭液中常温孵育 2 小时,后加入 TET2 抗体于 4℃冰箱中孵育过夜。第二天,用 PBS 洗 3 遍后加入免疫荧光二抗,室温下孵育 1.5 小时。PBS 洗 3 遍后 4℃避光保存,使用激光共聚焦显微镜观察并拍照。

1.9 统计学分析

统计学分析使用 SPSS 22.0 软件和 GraphPad Prism 5.0 软件。数据以平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SEM)表示,并且使用 t 检验或方差分析(one-way repeated measures ANOVA)评估差异。P 值小于 0.05 被认为是统计学显著性。作图使用 Adobe Illustrator CS5 绘图软件。

2 结果

2.1 MPP+ 抑制 SH-SY5Y 细胞增殖

本实验使用 MPP+ 作为神经毒素来处理 SH-SY5Y 细胞构建 PD 细胞损伤模型。首先选取不同浓度 MPP+, 利用 CCK-8 法测定细胞活性确定 SH-SY5Y 细胞的最佳造模浓度。选用 0 mM、1 mM、1.5 mM、2 mM、2.5 mM、3 mM、5 mM 分别处理 SH-SY5Y 细胞,分别处理 24 h,随后进行 CCK-8 检测。结果显示,与对照组(0 mM)相比,MPP+ 处理能显著抑制细胞增殖、降低细胞活力,且随着 MPP+ 浓度的不断增加,对细胞活性的抑制程度也随之增强。我们发现,2.5 mM 的 MPP+ 处理细胞的活力接近 50%(图 1A),且有显著统计学差异,因此,我们选择

2.5 mM 作为后续的细胞处理浓度。为了进一步检测 MPP⁺ 不同处理时间对细胞活力的影响,我们选用 2.5 mM 浓度分别处理细胞 0 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h,随后用 CCK-8 检测

细胞活性,结果显示,随着作用时间的延长,MPP⁺ 的细胞抑制率增加,细胞增殖活力明显减弱(图 1B)。

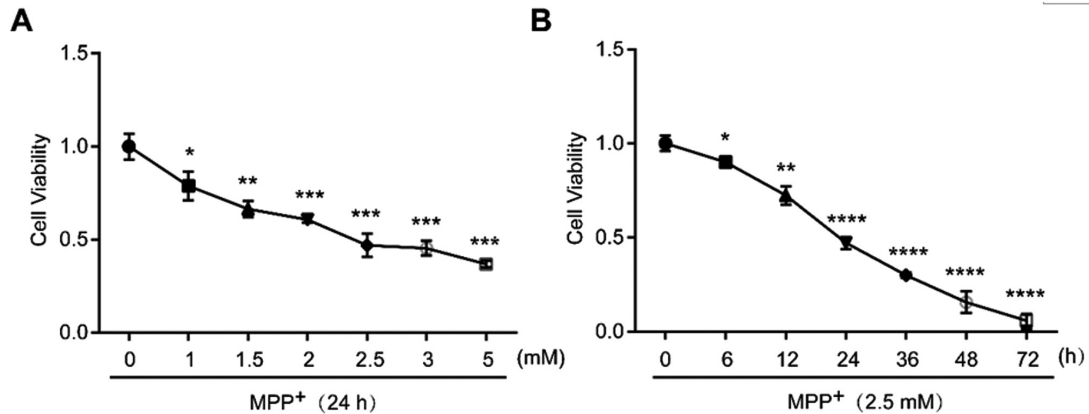


图 1 MPP⁺ 抑制 SH-SY5Y 细胞增殖情况 CCK-8 分别检测(A)不同浓度、(B)不同时间的 MPP⁺ 处理对细胞增殖的影响;数据表示为平均数±标准误差,与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$

Fig.1 MPP⁺ inhibit the proliferation of SH-SY5Y cells. We used CCK-8 to evaluate the proliferation rate of SH-SY5Y cells with (A) various concentrations (B) and various time periods of MPP⁺ treatment; Data are shown as the mean ± standard error, compared to control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

2.2 MPP⁺ 诱导的帕金森病细胞模型中 TET2 表达增加

我们进一步检测在 MPP⁺ 诱导的帕金森细胞模型中几个关键甲基化酶 DNMT1, DNMT3A, DNMT3B 与去甲基化酶 TET1, TET2, TET3 基因的转录水平的表达。结果显示,在 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞中,这些基因的 mRNA 水平均高于对照组,特别是羟甲基化酶 TET2 基因较对照组增加约 70 倍(图

2A)。然后,我们观察不同时间点(0 h、12 h、24 h、36 h 及 48 h) TET2 蛋白水平的变化,结果发现在 12 h 及 48 h 时 TET2 表达显著上调,尤其是 48 h 时,TET2 蛋白表达增加 1 倍(图 2B)。综上,MPP⁺ 能诱导 SH-SY5Y 细胞的 TET2 在 mRNA 和蛋白水平显著上调。

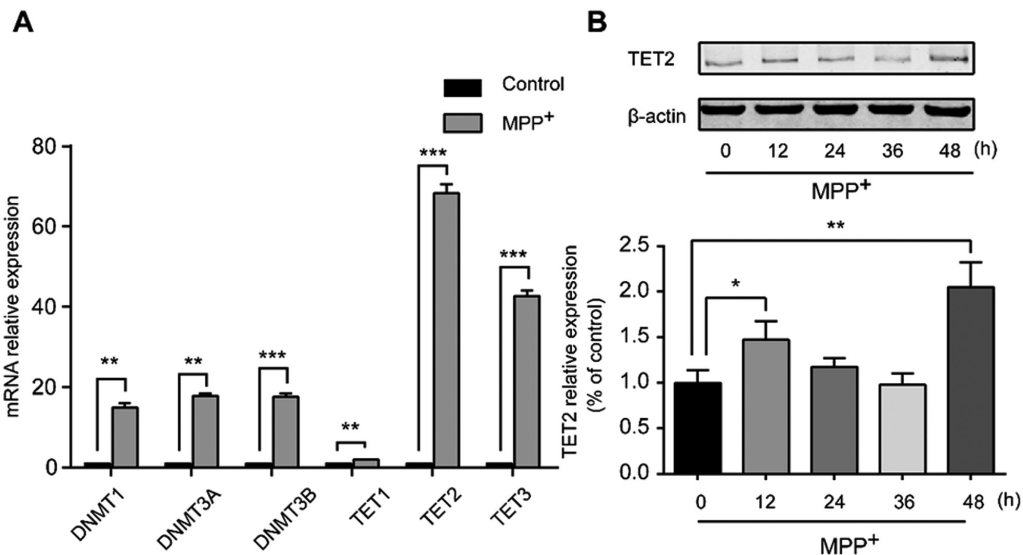


图 2 MPP⁺ 诱导的帕金森病细胞模型中 TET2 表达增加(A)PCR 检测与 DNA 甲基化相关的几个基因的 mRNA 水平;数据表示为平均数±标准误差,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ (B)Western Blot 检测 MPP⁺ 处理不同时间 TET2 的蛋白含量变化及统计结果图;数据表示为平均数±标准误差,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Fig.2 Increased expression of TET2 in MPP⁺-induced Parkinson's disease cell model. (A) We examined the expression levels of DNA methylation-related enzyme genes using qRT-PCR; Data are shown as the mean ± standard error; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. (B) TET2 proteins expression after MPP⁺ treatment at different time points were performed by western blot analysis and quantification; Data are shown as the mean ± standard error; * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.3 MPP⁺ 诱导的帕金森病细胞模型中 TET2 入核增加

考虑到 TET2 是一种核蛋白,它主要在细胞核中催化

5-mC 羟基化为 5-hmC,进而使甲基化 CpG 二核苷酸达到去甲基化^[9]。那么 MPP⁺ 对 TET2 的定位有什么影响呢?我们进一步

使用免疫荧光分析检测,与对照组相比,我们发现 MPP⁺ 处理可以将 TET2 募集到 SH-SY5Y 的细胞核中,显示出较好的核聚集(图 3)。

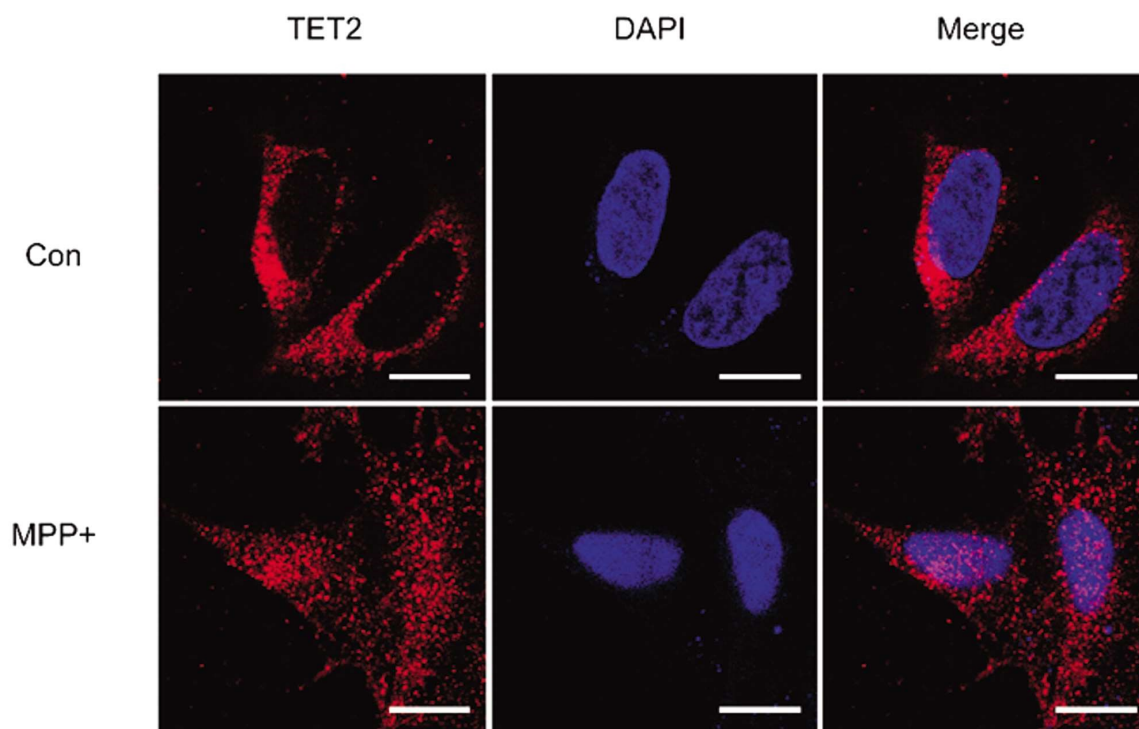


图3 MPP⁺ 诱导的帕金森病细胞模型中 TET2 入核增加 - 免疫荧光检测 TET2 蛋白的定位;标尺 =25 μ m

Fig.3 MPP⁺ treatment could recruit TET2 to the nuclear bodies of SH-SY5Y cells - The localization of TET2 protein was detected by Immunofluorescence; scale bar=25 μ m

2.4 TET2 敲低可以延缓 MPP⁺ 的细胞毒性

我们接下来转染慢病毒,并通过 Western Blot(图 4A)验证 SH-SY5Y 细胞中 TET2 的敲低效率。发现,与对照组相比,shTET2 组 TET2 蛋白表达显著下调。然后我们,通过 CCK-8 评

估 TET2 敲低对 SH-SY5Y 细胞活力的影响,如图 4B 所示, CCK-8 的结果显示 MPP⁺ 处理组的细胞活力下降,而 shTET2 敲低可以部分延缓 MPP⁺ 对 SH-SY5Y 的细胞毒性。

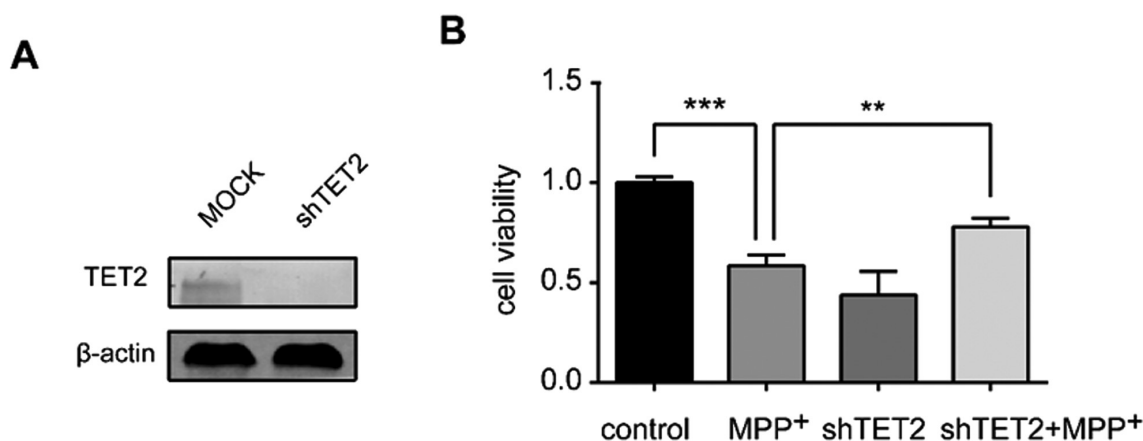


图4 TET2 敲低可以减轻 MPP⁺ 的细胞毒性(A)Western Blot 检测 shRNA 处理组中 TET2 的表达(B)通过 CCK-8 检测在 PD 体外模型中 TET2 敲低对细胞增殖的影响;数据表示为平均数 $\pm$ 标准误,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

Fig.4 This toxic effect of MPP⁺ was noticeably weaker after knockdown of TET2 (A) Expression levels of TET2 in shRNA-treated and mock groups in SH-SY5Y cell lines were detected by western blotting (B) Effects of shTET2 on proliferation using an in vitro PD model of SH-SY5Y cell lines, as detected by a CCK-8 assay. Data are shown as the mean $\pm$ standard error; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

3 讨论

PD 严重影响了患者的生活质量,给患者家庭及社会带来了严重负担。然而,迄今为止,导致 PD 发生的分子机制尚未完

全阐明,尚缺乏有效的逆转或延缓病程进展的预防和治疗手段。MPP⁺ 是常用的 PD 体外模型的造模药物,可诱发细胞内能量耗竭而造成细胞死亡^[6]。本实验使用 MPP⁺ 处理神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 构建 PD 体外细胞模型。为了选取最佳的造

模浓度,我们设立了不同的浓度梯度,最终选取了 2.5 mM 作为我们的造模浓度。进一步我们证实了随着 MPP+ 浓度与作用时间的延长,细胞增殖活力明显减弱,MPP+ 的作用具有时间和浓度依赖性。

表观遗传机制在包括 PD 在内各种神经退行性疾病中发挥重要作用^[7]。DNA 甲基化是研究最多的表观遗传修饰机制,已经被发现与许多疾病的发生发展相关。此外,在其他与 PD 发病密切相关的基因中也观察到特异性的 DNA 甲基化的变化^[8]。TET 家族是最近发现的一类 5-mC 羟甲基化酶,包括 TET1, 2,3 三种亚型,可以催化 5-mC 到 5-hmC 进而逆转 DNA 甲基化^[9,10]。其中,TET2 是研究最深入的亚型^[11]。有研究检测到 TET2 和 5hmC 水平在老年海马中是下降的^[12],此项研究确定了 TET2 与神经源性再生相关。此外,大脑中也高表达 TET2 和 5-hmC。因此,我们有理由认为 TET2 与神经系统密切相关。迄今为止,TET2 是否参与调节神经退行性疾病尚未见文献报道。本研究主要是为了探讨 PD 模型中 TET2 表达情况以及机制研究。在本项研究中,我们阐述了 MPP+ 诱导的 PD 细胞模型中,TET2 的 mRNA 及蛋白水平明显增加。TET2 主要与细胞核中 DNA 结合并调节基因的表达,而 TET2 入核减少会影响其功能^[13]。免疫荧光结果显示 MPP+ 可以促进 TET2 蛋白进入细胞核内,这提示 MPP+ 还可以促进 TET2 酶进入细胞核内发挥催化作用。因此,我们推测“高水平的 TET2”可能是 PD 独特的表观遗传生物标志物,TET2 可能是 PD 进展中的特定分子标志物。过去的研究显示 TET2 是一个关键的肿瘤抑制因子,特别是在髓系肿瘤中。人类遗传学研究发现,随着年龄的增长,体细胞 TET2 突变频率增加,这与老年相关疾病(如癌症,心血管疾病和中风)的风险升高有关^[14,15],而 PD 也是一个老年人常见的神经退行性疾病^[1],这进一步暗示了 TET2 与 PD 之间的关系。在这项研究中,我们首次揭露了羟甲基化酶 TET2 可能是 PD 的新型表观遗传学标志物。

为了进一步探讨 TET2 在 PD 发生发展中的作用。我们构建了 TET2 敲低的慢病毒并感染 SH-SY5Y 细胞,再用 MPP+ 处理该稳转细胞株建立 PD 模型。结果表明,MPP+ 诱导的 SH-SY5Y 的细胞活力下降可以被 TET2 敲低而逆转。过去研究显示 TET2 突变与髓系恶性肿瘤中异常的 DNA 甲基化模式相关,被认为与早期髓系恶性肿瘤的发生发展相关。大多数白血病相关的 TET2 错义突变会导致该基因失活,进而抑制或消除其催化活性^[16]。而我们的实验提示 MPP+ 的细胞毒性作用可能是通过 TET2 来介导的,我们将来也许可以使用 TET2 抑制剂来治疗 PD。

综上所述,我们的研究首次阐述了 TET2 在 PD 模型中显著上调,从表观遗传学角度提示 TET2 可能在 PD 的发病机制中发挥重要作用,为 PD 等神经变性疾病的治疗提供新的实验依据和治疗靶点,具有重要的科学意义和临床应用前景。

参考文献(References)

- [1] Wu Y, Le W, Jankovic J. Preclinical biomarkers of Parkinson disease [J]. Arch Neurol, 2011, 68(1): 22-30
- [2] Feng Y, Jankovic J, WU Y C. Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease[J]. J Neurol Sci, 2015, 349(1-2): 3-9
- [3] Mi Y, Gao X, Dai J, et al. A Novel Function of TET2 in CNS: Sustaining Neuronal Survival[J]. International journal of molecular sciences, 2015, 16(9): 21846-21857
- [4] An J, Rao A, Ko M. TET family dioxygenases and DNA demethylation in stem cells and cancers[J]. Exp Mol Med, 2017, 49(4): e323
- [5] Friedemann T, Ying Y, Wang W, et al. Neuroprotective Effect of Cop-tis chinensis in MPP [Formula: see text] and MPTP-Induced Parkinson's Disease Models[J]. Am J Chin Med, 2016, 44(5): 907-925
- [6] Li X, Cui X X, Chen Y J, et al. Therapeutic Potential of a Prolyl Hydroxylase Inhibitor FG-4592 for Parkinson's Diseases in Vitro and in Vivo: Regulation of Redox Biology and Mitochondrial Function [J]. Front Aging Neurosci, 2018, 10(121)[Epub ahead of print]
- [7] Amma Kaidery N, Tarannum S, Thomas B. Epigenetic landscape of Parkinson's disease: emerging role in disease mechanisms and therapeutic modalities[J]. Neurotherapeutics, 2013, 10(4): 698-708
- [8] Miranda-Morales E, Meier K, Sandoval-Carrillo A, et al. Implications of DNA Methylation in Parkinson's Disease [J]. Front Mol Neurosci, 2017, 10(225)[Epub ahead of print]
- [9] Koivunen P, Laukka T. The TET enzymes[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(8): 1339-1348
- [10] Sardina J L, Collombet S, Tian T V, et al. Transcription Factors Drive Tet2-Mediated Enhancer Demethylation to Reprogram Cell Fate [J]. Cell Stem Cell, 2018, 23(5): 727-41e9
- [11] Couronne L, Bastard C, Bernard O A. TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma[J]. N Engl J Med, 2012, 366(1): 95-96
- [12] Gontier G, Iyer M, Shea J M, et al. Tet2 Rescues Age-Related Regenerative Decline and Enhances Cognitive Function in the Adult Mouse Brain[J]. Cell Rep, 2018, 22(8): 1974-1981
- [13] Huang Y, Wang G, Liang Z, et al. Loss of nuclear localization of TET2 in colorectal cancer[J]. Clin Epigenetics, 2016, 8: 9
- [14] Burgess D J. Human genetics: somatic mutations linked to future disease risk[J]. Nat Rev Genet, 2015, 16(2): 69
- [15] Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes [J]. N Engl J Med, 2014, 371(26): 2488-2498
- [16] Ko M, Huang Y, Jankowska A M, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2 [J]. Nature, 2010, 468(7325): 839-843
- [17] Muller T, Kohlhepp W. Hypomethylation in Parkinson's disease: An epigenetic drug effect?[J]. Mov Disord, 2016, 31(4): 605
- [18] Pavlou M A S, Pinho R, Paiva I, et al. The yin and yang of alpha-synuclein-associated epigenetics in Parkinson's disease[J]. Brain, 2017, 140(4): 878-886
- [19] Yao B, Christian K M, He C, et al. Epigenetic mechanisms in neurogenesis[J]. Nat Rev Neurosci, 2016, 17(9): 537-549
- [20] Domcke S, Bardet A F, Adrian Ginno P, et al. Competition between DNA methylation and transcription factors determines binding of NRF1[J]. Nature, 2015, 528(7583): 575-579
- [21] Fernandez-Santiago R, Carballo-Carbajal I, Castellano G, et al. Aberrant epigenome in iPSC-derived dopaminergic neurons from Parkinson's disease patients[J]. EMBO Mol Med, 2015, 7(12): 1529-1546
- [22] Mellen M, Ayata P, Dewell S, et al. MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system [J]. Cell, 2012, 151(7): 1417-1430

- [21] Liu M L, Wang J L, Wei J, et al. Tri-ortho-cresyl phosphate induces autophagy of rat spermatogonial stem cells [J]. *Reproduction*, 2015, 149(2): 163-170
- [22] Gao D, Li Z, Wang H, et al. An overview of phthalate acid ester pollution in China over the last decade: Environmental occurrence and human exposure[J]. *Sci Total Environ*, 2018, 645: 1400-1409
- [23] Li H L, Ma W L, Liu L Y, et al. Phthalates in infant cotton clothing: Occurrence and implications for human exposure [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 683: 109-115
- [24] Lim M, Park J Y, Lim J E, et al. Receptor-based aggregate exposure assessment of phthalates based on individual's simultaneous use of multiple cosmetic products [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 127: 163-172
- [25] Souza N P, Arnold L L, Pennington K L, et al. Isolation and molecular characterization of spermatogonia from male Sprague-Dawley rats exposed in utero and postnatally to dibutyl phthalate or acrylamide[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2019: 1-11
- [26] de Souza N P, Cardoso A F, Gomide L, et al. Experimental cryptorchidism enhances testicular susceptibility to dibutyl phthalate or acrylamide in Sprague-Dawley rats [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2019: 960327119845040
- [27] Radke E G, Braun J M, Meeker J D, et al. Phthalate exposure and male reproductive outcomes: A systematic review of the human epidemiological evidence[J]. *Environ Int*, 2018, 121(Pt 1): 764-793
- [28] Rashad M M, Galal M K, El-Behairy A M, et al. Maternal exposure to di-n-butyl phthalate induces alterations of c-Myc gene, some apoptotic and growth related genes in pups' testes [J]. *Toxicol Ind Health*, 2018, 34(11): 744-752
- [29] Choudhry S, Baskin L S, Lammer E J, et al. Genetic polymorphisms in ESR1 and ESR2 genes, and risk of hypospadias in a multiethnic study population[J]. *J Urol*, 2015, 193(5): 1625-1631
- [30] Zhao R, Bei X, Yang B, et al. Endothelial cells promote metastasis of prostate cancer by enhancing autophagy [J]. *J. Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 221
- [31] Yang B Y, Jiang C Y, Dai C Y, et al. 5-ARI induces autophagy of prostate epithelial cells through suppressing IGF-1 expression in prostate fibroblasts[J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(3): e12590

(上接第 642 页)

- [23] Hahn M A, Qiu R, Wu X, et al. Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in Mammalian neurogenesis [J]. *Cell Rep*, 2013, 3(2): 291-300
- [24] Zhang K, Tang Y, Meng L, et al. The Effects of SNCA rs894278 on Resting-State Brain Activity in Parkinson's Disease [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13(47)
- [25] Kinde B, Gabel H W, Gilbert C S, et al. Reading the unique DNA methylation landscape of the brain: Non-CpG methylation, hydroxymethylation, and MeCP2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(22): 6800-6806
- [26] Ma Q, Xu Z, Lu H, et al. Distal regulatory elements identified by methylation and hydroxymethylation haplotype blocks from mouse brain[J]. *Epigenetics Chromatin*, 2018, 11(1): 75
- [27] Huang Q, Xu S, Mo M, et al. Quantification of DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease mouse model using LC-MS/MS[J]. *J Mass Spectrom*, 2018, 53(7): 590-594
- [28] Kremer E A, Gaur N, Lee M A, et al. Interplay between TETs and microRNAs in the adult brain for memory formation [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1678
- [29] Yang H, Liu Y, Bai F, et al. Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation [J]. *Oncogene*, 2013, 32(5): 663-669
- [30] Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(22): 2289-2301
- [31] Langemeijer S M, Kuiper R P, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes [J]. *Nat Genet*, 2009, 41(7): 838-842
- [32] Madala H R, Punganuru S R, Arutla V, et al. Beyond Brooding on Oncometabolic Havoc in IDH-Mutant Gliomas and AML: Current and Future Therapeutic Strategies[J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(2): 49
- [33] Xu W, Yang H, Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(1): 17-30
- [34] Solary E, Bernard O A, Tefferi A, et al. The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases[J]. *Leukemia*, 2014, 28(3): 485-496