

5-羟甲基胞嘧啶在神经发育和神经退行性疾病中的作用

于美华 包金凤

010110 呼和浩特, 内蒙古医科大学基础医学院

通信作者: 包金凤, Email: jinfengbao66@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2021.07.014

【摘要】 DNA 甲基化是表观遗传学主要的修饰模式之一。5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)作为一种 DNA 去甲基化产物, 已成为新的表观遗传标志。由于 5hmC 在中枢神经系统中分布较高并且在神经发育过程中不断变化, 因此, 5hmC 对于正常神经发育和神经功能至关重要。近年来的研究发现, 老化或环境应激导致的 5hmC 失调在神经退行性疾病发生、发展中起重要作用。现就近年来 5hmC 在神经发育以及神经退行性疾病发生、发展中的作用进行综述。

【关键词】 DNA 甲基化; 5-羟甲基胞嘧啶; 神经发育; 神经退行性疾病

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金(2018MS08101)

The role of 5-hydroxymethylcytosine in neurodevelopment and neurodegenerative diseases

Yu Meihua, Bao Jinfeng

Basic Medical College, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China

Corresponding author: Bao Jinfeng, Email: jinfengbao66@126.com

【Abstract】 DNA methylation is one of the main modification modes in epigenetics. 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), as a product of DNA demethylation, has become a new epigenetic marker. Due to the high distribution of 5hmC in the central nervous system and the constant changes in the process of neurodevelopment, it is very important for normal neurodevelopment and neurological function. Recent studies have found that 5hmC imbalance caused by aging or environmental stress may play an important role in the occurrence and development of diseases. Therefore, this article reviews the role of 5hmC in neurodevelopment and neurodegenerative diseases in recent years.

【Key words】 DNA methylation; 5-hydroxymethylcytosine; Neurodevelopment; Neurodegenerative diseases

Fund program: Natural Science Foundation of Inner Mongolia (2018MS08101)

DNA 甲基化(DNA methylation)是重要的表观遗传调控机制之一, 在遗传印记、转录调控以及组织特异性基因沉默中发挥着重要的作用, 而且在哺乳动物正常的生长发育过程中起关键作用^[1-2]。近年来的研究发现, DNA 甲基化还参与了神经元分化、大脑皮层发育以及突触可塑性形成等过程^[3]。5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5hmC)作为关键的 DNA 去甲基化产物, 在基因表达中具有重要的调控作用。因此, 本文就最新的 5hmC 的形成过程、5hmC 在中枢神经系统的分布情况、5hmC 在中枢神经发育以及神经退行性疾病中作用的研究进行总结。

一、5hmC 的产生和去甲基化

DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)作用下, 在胞嘧啶 5'-碳上结合 1 个甲基, 生成 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)的过程, 通常发生在胞嘧啶/鸟嘌呤(cytosine-phosphate-guanosine, CpG)二核苷酸上, CpG 高度聚集的 DNA 片段被称作 CpG 岛, CpG 岛通常包含基因启动子或外显子, 通常 CpG 岛甲基化后通过抑制转录因子与 DNA 的结合抑制基因转录^[4]。早期认为, DNA 甲基化是一种稳定的表观遗传修饰, 随着 TET 蛋白家族(ten-eleven translocation proteins, TETs)的发现, 科学家逐渐意识到 DNA 甲

基化和去甲基化是一个动态平衡的过程。

TETs是一组 α -酮戊二酸(α -KG)和 Fe^{2+} 依赖性单加氧酶,包括TET1、TET2和TET3。在TETs作用下,将5mC转化为5hmC,然后TETs进一步将5hmC氧化成5-甲酰基胞嘧啶(5-formylcytosine, 5fC)和5-羧基胞嘧啶(5-carboxycytosine, 5caC),胸腺嘧啶DNA糖基化酶(thymine DNA glycosylase, TDG)利用5hmC下游的碱基切除修复途径产生未修饰的胞嘧啶,从而完成DNA主动去甲基化过程^[5];而DNMT1/环指域蛋白1(ubiquitin-like containing PHD and ring finger 1, UHRF1)复合物在DNA复制过程中在半甲基化的CpG基序处识别5mC,并对新合成的DNA链上未修饰的胞嘧啶进行甲基化。但是, DNMT1/UHRF1复合物无法识别氧化的5hmC,从而导致新DNA链上的胞嘧啶无法被修饰,完成被动去甲基化^[6]。因此, DNA去甲基化的机制可迅速改变DNA甲基化水平。作为去甲基化过程的关键中间产物,5hmC通过TETs氧化作用以及影响DNMT1/UHRF1复合物识别参与DNA的去甲基化过程。因此,5hmC异常表达与甲基化和去甲基化平衡紧密相关。研究发现,5hmC在中枢神经系统发育以及神经退行性疾病发生、发展中扮演重要角色^[7-8]。

二、5hmC在中枢神经系统中的分布

在哺乳动物所有组织和细胞类型中均检测到5hmC,但在不同组织中含量差异较大,中枢神经系统组织5hmC的含量最丰富,显著高于其他器官。液相色谱-串联质谱法分析表明,5hmC占哺乳动物脑组织所有胞嘧啶的0.4%~0.9%,相当于5mC的10%~20%,尤其在下丘脑、大脑皮层和海马中5hmC较为丰富^[9]。此外,不同的神经元类型中5hmC的含量也有所不同。比如,小脑浦肯野神经元中5hmC的含量是颗粒细胞的2倍多,而且5hmC含量是随着发育不断变化的^[10],这提示5hmC的含量差异在神经细胞功能方面起着重要调节作用。

5hmC基因组分布特点决定5hmC对于基因表达的作用。来自小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)的高通量测序显示,5hmC含量在外显子和转录起始位点(transcription start site, TSS)附近有较强富集,并且在其他基因转录调控元件区如增强子、启动子等富集^[11-12]。最新研究证实,5hmC优先分布在基因区域而不是基因间区域^[13],提示5hmC在转录调控中发挥重要作用。

三、5hmC在中枢神经系统发育中的作用

神经元是神经系统的基本结构和功能单位,神

经发生(neurogenesis)是指新的神经元生成的过程,包括神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的增殖分化、突触可塑性的形成以及最后产生成熟神经元的过程。5hmC在神经元中有较高水平,并且伴随着神经发生和神经元的成熟而增加。研究发现,胎儿脑中5hmC总体水平较低,但在大脑发育过程中5hmC水平随时间发生显著变化^[14]。而且,在ESCs向神经祖细胞(neural progenitor cells, NPCs)的分化过程伴随着整体5hmC的减少,且在外显子和启动子中最显著,这可能和分化成熟相关基因在分化后期通过去甲基化完成基因激活有关^[7]。NSCs通过自我更新和分化不仅维持正常中枢神经系统的形态和功能,而且在神经发育和损伤修复中发挥重要作用。5hmC的去甲基化可调节NSCs的增殖和神经发生以及促进成年哺乳动物神经系统中的轴突再生^[15]。5hmC显示出在突触相关功能基因附近富集,如神经胶质瘤相关癌基因同源蛋白3(glioma-associated oncogene homolog 3, Gli3)^[16]。也有研究证实,5hmC可以通过调控神经细胞分化过程中的重要基因,如神经元素1(neurogenin 1, Ngn1)的表达促进向神经元的分化^[17]。这些结果说明5hmC参与神经发育过程。

TET蛋白家族是DNA去甲基化的关键酶,其介导的5hmC修饰参与调控神经发育以及神经元分化。配对盒基因6(paired box6, PAX6)是ESCs分化和人类早期发育过程中作为启动神经外胚层分化的主要转录因子^[18]。敲除TET1的人类ESCs中的PAX6表达显著降低,且PAX6启动子的5hmC修饰减少,通过使用CRISPR系统使TET1的催化活性失活,进而使ESCs保持多能性,但向神经外胚层和神经元的分化受损。TET1催化域的过表达能挽救分化过程中ESCs中的5hmC水平和PAX6表达的缺陷,证明TET1催化5mC向5hmC转化的能力对于支持ESCs分化为神经外胚层和神经元具有关键作用^[19]。在成年人神经发生和发育过程中,TET2通过与叉头框转录因子O3a(transcription factor forkhead box O3a, FoxO3a)相互作用调节5hmC的水平,从而参与成体神经干细胞(adult neural stem cells, aNSCs)增殖有关的基因表达的调控,如神经源分化因子1(neurogenic differentiation factor 1, NeuroD1)^[20]。研究发现,TET3通过维持DNA甲基化调控神经元分化,其在神经分化过程上调,敲低NPCs中TET3能够使多能性相关基因表达上调,进而导致NPCs的去分化,此过程也伴随5hmC的表达降低^[21]。研究发现,TET3

在 5hmC 表达最丰富的成熟的神经元和少突胶质细胞中高表达,在成年小鼠的成熟神经元中,敲除 TET3 可以使小鼠海马依赖性空间定向受损^[22]。最新研究显示, TET3 缺乏症患者也表现出智力缺陷和发育迟缓等特征^[23]。总之,这些研究表明 TET 介导的 5hmC 修饰在发育过程中具有重要作用,且 5hmC 失调可能导致疾病的发生。

5hmC 在分布和动态变化方面与神经发育密切相关。研究发现, 5hmC 能够和多种神经系统相关蛋白质结合,如甲基-CpG 结合蛋白 2(methyl-CpG binding protein 2, MeCP2) 和类泛素样含 PHD 和环指域蛋白 2(ubiquitin-like containing PHD and ring finger, UHRF2) 等^[24]。MeCP2 是 DNA 甲基化结合蛋白(methylation binding proteins, MBDs) 家族在大脑中表达最高的一员, MeCP2 识别并且结合甲基化的 DNA 参与转录抑制,并且通过调节染色质结构影响可塑性所必需的基因表达,如脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF),进而参与神经发育。Rett 综合征是一种严重的神经发育障碍, MeCP2 基因突变导致 MeCP2 功能丧失是 Rett 综合征的主要病因^[25]。研究发现, MeCP2 通过与 5hmC 的相互作用和组蛋白修饰的表观遗传变化调节神经元 mRNA 剪接,其中剪接的精确调控对于调节蛋白质多样性和神经元发育的各个方面至关重要^[26]。UHRF2 是体内 5hmC 特异性识别蛋白^[27]。而且,敲除 UHRF2 小鼠出现海马依赖性学习和空间记忆损伤^[28]。麻醉剂七氟醚通过抑制 UHRF2 导致海马和杏仁核中 5hmC 水平降低,进而导致参与神经保护基因表达减少,如 BDNF 和 UHRF2 通过参与 DNA 甲基化调控基因表达而参与神经发育过程^[29]。综上所述, 5hmC 与其结合蛋白之间的相互作用影响神经发育。

四、5hmC 与神经退行性疾病

1. 5hmC 与阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD): AD 是最常见的神经退行性疾病,其发病机制尚未完全明确。目前,病因学说主要有 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β) 毒性学说、Tau 蛋白过度磷酸化学说和神经原纤维缠结学说等。近年来的研究发现,多数 AD 发病不是源于遗传基因缺陷,而与表观遗传修饰密切相关。大量研究显示,在不同类型 AD 以及 AD 患者的不同脑区都发现了 DNA 甲基化失调现象^[30],而作为重要的 DNA 去甲基化产物, 5hmC 在 A β 形成过程中具有重要作用。

在 AD 病例中,编码淀粉样蛋白前体蛋白(amyloid

precursor protein, APP) 和早老素 1(presenilin, PS1) 基因突变会在衰老过程中改变 APP 的转录加工产生有毒的 A β ,从而影响脑功能^[31]。动物实验研究发现,正常小鼠海马中 5hmC 随衰老而增加,而过表达 APP/PS1 的转基因 AD 模型小鼠随着年龄增长,海马中 5hmC 未发现显著变化,表明 A β 的异常加工会影响小鼠衰老过程中海马 DNA 甲基化和羟甲基化之间的平衡^[32]。Li 等^[33]的研究也发现,老年 APP/PS1 双转基因小鼠海马中的 5hmC 和 TET2 水平较对照组显著下降,并出现海马依赖性学习和记忆障碍,恢复小鼠海马 NSCs 中 TET2 的表达可增加 5hmC 水平并提高 NSCs 再生能力。在人类脑基因组测序中,患有早发性 AD 的患者中存在广泛的 TET2 基因突变使其功能丧失^[34]。

Tau 蛋白的主要生物功能是促进微管形成以确保细胞骨架稳定性,进而确保正常的轴突运输和突触可塑性。当 Tau 蛋白过度磷酸化时,对微管的亲和力会降低。目前, Tau 蛋白过度磷酸化被认为是 AD 发病的关键病因。研究发现, TETs 介导的 DNA 去甲基化作用影响 Tau 磷酸化^[35]。Zhang 等^[8]使用羟甲基化 DNA 免疫沉淀测序(hydroxymethylated DNA immunoprecipitation sequencing, hMeDIP-seq) 发现,在微管相关蛋白 tau(microtubule associated protein tau, MAPT)/APP/PS1 三转基因 AD 模型小鼠神经元中 5hmC 降低,并且尸检结果表明 AD 患者脑中 TETs 酶活性也降低,从而使 TETs 催化域过表达则减少 A β 积累以及 tau 蛋白过度磷酸化,并改善 AD 小鼠大脑的突触功能障碍。研究表明,在此过程中 TETs 的催化产物发挥作用。但关于 5hmC 的降低如何导致 AD 病理学两个基本特征(A β 积累以及 tau 蛋白过度磷酸化)仍需进一步研究。

研究发现,差异羟甲基化区域(differential hydroxymethylation regions, DhMRs) 在与神经元发育和神经元功能相关的多种信号通路中富集^[36]。最近的一项研究人类 AD 患者脑中 5hmC 的全基因组高通量测序发现了与神经炎症斑块显著相关的 517 个 DhMRs 以及与神经原纤维缠结相关的 60 个 DhMRs,很多已被证明是参与认知、记忆和学习相关基因,如钾电压门控性通道亚家族 A 成员 5(potassium voltage-gated channel subfamily A member 5, KCNA5) 和脑丰富的膜附着信号蛋白 1(brain abundant membrane attached signal protein 1, BASP1); 与 A β 降解或清除相关基因,如 ATXN1(ataxin 1); tau 磷酸化相关基因,如酪蛋白激酶 2 α 1(casein kinase 2 α 1,

CSNK2A1)也富集DhMRs^[37]。在与神经元功能有关的基因cGMP依赖的蛋白激酶2(protein kinase cGMP-dependent 2, Prkg2)和基因中5hmC修饰降低并伴随着这些基因的mRNA水平降低,表明5hmC修饰可能通过激活与神经元功能有关的基因的转录和表达而发挥作用^[38]。因此,5hmC可能通过影响这些关键基因表达参与AD的病理过程。

2. 5hmC与帕金森病(Parkinson disease, PD): PD为老龄人群神经系统退行性疾病,主要的病理改变是黑质多巴胺能神经元和纹状体突起的进行性丧失及路易小体的形成,其中 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -Syn)的异常聚集是路易小体形成的关键成因^[39]。有研究发现,健康雄性小鼠纹状体和黑质致密区(substantia nigra, SN)在老化过程中的5hmC与5mC的比率随着老化而增加,并且5hmC优先在多巴胺能神经元中增加^[40]。另一项研究发现,PD患者的TET1基因外显子发生基因突变,并推测TET1可能通过调节5hmC的水平而增加PD风险,导致基因表达的变化^[41]。

已知维生素C(vitamin C, VC)是神经系统正常运行所必需的营养物质,且在诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)转化为NPCs和多巴胺神经元的过程中发挥作用,VC可以提高TET2/3和VC转运蛋白表达,提高5hmC水平,并促进iPSC分化为多巴胺神经元^[42]。体外PD细胞模型全基因组测序显示,5hmC在与细胞周期相关的基因区域富集,特别是基因细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂2A(gene-cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, Cdkn2A),敲低TET2可以显著减少细胞损伤和细胞周期停滞,进而挽救多巴胺能神经元损伤^[43]。Marshall等发现,在PD患者神经元的增强子上TET2和5hmC水平升高,而且小鼠体内的TET2失活可以防止炎症引起的多巴胺能神经元丢失^[44]。SNCA是编码 α -Syn的基因,也是PD最重要的风险基因之一,受DNA甲基化的调节。SNCA内含子1处CpG岛的低甲基化可导致 α -Syn的过表达^[45]。PD患者的皮质切片包含大量5mC,而5hmC则在小脑白质中大量积累^[46]。因此,5hmC作为TETs介导的去甲基化产物在PD病理过程中可能具有重要作用。

3. 5hmC与亨廷顿病(Huntington disease, HD): HD是一种常染色体显性遗传的神经退行性疾病,其由编码亨廷顿蛋白(Huntingtin, HTT)的基因外显子内三核苷酸(CAG)重复序列突变导致,这种突变产生突变蛋白(mutant Huntingtin protein, mHtt),导致蛋白质错误折叠使神经元功能障碍和细胞死亡。

mHtt表达显著降低了纹状体神经元中内源性腺苷A2A受体(adenosine A2a receptor, ADORA2A)的转录水平,刺激A2A受体能够减少由mHtt蛋白引起的聚集^[47]。研究发现,ADORA2A基因5'-UTR末端5mC表达增加而5hmC表达减少,且通过Ingenuity Pathway Analysis(IPA)软件发现DhMRs还在Wnt/ β -catenin/Sox信号通路富集,已知该通路通过激活NeuroD1既调节NPCs的增殖,又调节神经元的分化^[48]。研究发现,在将HD成纤维细胞重新编程为iPSCs以及随后的神经元分化过程中,全基因组5hmC增加且与DNA修复基因表达增加相一致^[49]。

4. 5hmC与肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS): ALS也是一种神经退行性疾病,其特征是脑和脊髓内运动神经元选择性缺失。近年来的研究发现,位于C9ORF72基因内的GGGGCC六核苷酸重复扩增突变是ALS发生的最常见原因^[50]。研究发现,C9ORF72基因重编程过程中基因启动子低甲基化,并且在iPSC衍生的运动神经元中富含5hmC^[51],之后的研究也得出了类似的结果。与C9ORF72基因重复扩增突变的ALS患者相似,使用细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)将人重复序列扩增引入小鼠基因组的C9-BAC小鼠,在皮层中的C9ORF72基因启动子位点显示5hmC水平升高^[52]。TAR DNA结合蛋白43(TAR DNA-binding protein 43, TDP-43)是由TARDBP基因编码的DNA和RNA结合蛋白,TARDBP基因突变以及TDP-43聚集物的累积都增加了ALS风险^[53]。在ALS中,DNA甲基化水平升高,但神经细胞中发生TDP-43聚集时5mC和5hmC会明显下降,提示TDP-43影响DNA甲基化水平较低的神经细胞的功能^[54]。表达突变型人超氧化物歧化酶1(superoxide dismutase 1, SOD1)的ALS模型小鼠脑5hmC水平显著高于对照组小鼠,并且研究发现5hmC水平改变和与ALS有关的免疫系统以及肠道微生物之间异常变化存在关联^[55]。

综上所述,大量的研究表明,5hmC在中枢神经系统中起至关重要的作用。5hmC作为一种DNA去甲基化产物,通过调控基因转录影响神经发育,并且,在神经退行疾病发生发展中发挥重要作用。但其确切机制仍在探索,许多研究仍停留在5hmC与基因异常表达存在相关性而缺少具体调控机制的探讨,未来的研究应该发现更多识别5hmC的蛋白质揭示5hmC在神经系统中的作用机制,同时也能为神经系统疾病的治愈提供更有效可行的方法和新的靶点。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 资料收集与整理及论文撰写为于美华, 选题设计及论文修改为包金凤

参 考 文 献

- [1] Greenberg MVC, Bourc'his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(10): 590-607. DOI: 10.1038/s41580-019-0159-6.
- [2] Sallustio F, Gesualdo L, Gallone A. New findings showing how DNA methylation influences diseases[J]. *World J Biol Chem*, 2019, 10(1): 1-6. DOI: 10.4331/wjbc.v10.i1.1.
- [3] Stricker SH, Götz M. DNA-methylation; master or slave of neural fate decisions?[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 5. DOI: 10.3389/fnins.2018.00005.
- [4] Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(1): 23-38. DOI: 10.1038/npp.2012.112.
- [5] Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond[J]. *Nat Rev Genet*, 2017, 18(9): 517-534. DOI: 10.1038/nrg.2017.33.
- [6] Lio CJ, Rao A. TET enzymes and 5hmC in adaptive and innate immune systems[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 210. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00210.
- [7] Tan L, Xiong L, Xu W, et al. Genome-wide comparison of DNA hydroxymethylation in mouse embryonic stem cells and neural progenitor cells by a new comparative hMeDIP-seq method[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(7): e84. DOI: 10.1093/nar/gkt091.
- [8] Zhang Y, Zhang Z, Li L, et al. Selective loss of 5hmC promotes neurodegeneration in the mouse model of Alzheimer's disease[J]. *FASEB J*, 2020, 34(12): 16364-16382. DOI: 10.1096/fj.2020.01271R.
- [9] Münzel M, Globisch D, Brückl T, et al. Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, 49(31): 5375-5377. DOI: 10.1002/anie.201002033.
- [10] Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain[J]. *Science*, 2009, 324(5929): 929-930. DOI: 10.1126/science.1169786.
- [11] Pastor WA, Pape UJ, Huang Y, et al. Genome-wide mapping of 5-hydroxy -methylcytosine in embryonic stem cells[J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 394-397. DOI: 10.1038/nature10102.
- [12] Yu M, Hon GC, Szulwach KE, et al. Base-resolution analysis of 5-hydroxy -methylcytosine in the mammalian genome[J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1368-1380. DOI: 10.1016/j.cell.2012.04.027.
- [13] Cui XL, Nie J, Ku J, et al. A human tissue map of 5-hydroxymethylcytosines exhibits tissue specificity through gene and enhancer modulation[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6161. DOI: 10.1038/s41467-020-20001-w.
- [14] Spiers H, Hannon E, Schalkwyk LC, et al. 5-hydroxymethylcytosine is highly dynamic across human fetal brain development[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 738. DOI: 10.1186/s12864-017-4091-x.
- [15] Weng YL, An R, Cassin J, et al. An intrinsic epigenetic barrier for functional axon regeneration[J]. *Neuron*, 2017, 94(2): 337-346.e6. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.03.034.
- [16] Khare T, Pai S, Koncevicius K, et al. 5-hmC in the brain is abundant in synaptic genes and shows differences at the exon-intron boundary[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19(10): 1037-1043. DOI: 10.1038/nsmb.2372.
- [17] López V, Fernández AF, Fraga MF. The role of 5-hydroxymethylcytosine in development, aging and age-related diseases[J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 37: 28-38. DOI: 10.1016/j.arr.2017.05.002.
- [18] Thakurela S, Tiwari N, Schick S, et al. Mapping gene regulatory circuitry of Pax6 during neurogenesis[J]. *Cell Discov*, 2016, 2: 15045. DOI: 10.1038/celldisc.2015.45.
- [19] Li H, Hu Z, Jiang H, et al. TET1 deficiency impairs morphogen-free differentiation of human embryonic stem cells to neuroectoderm[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 10343. DOI: 10.1038/s41598-020-67143-x.
- [20] Li X, Yao B, Chen L, et al. Ten-eleven translocation 2 interacts with forkhead box O3 and regulates adult neurogenesis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15903. DOI: 10.1038/ncomms15903.
- [21] Santiago M, Antunes C, Guedes M, et al. Tet3 regulates cellular identity and DNA methylation in neural progenitor cells[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(14): 2871-2883. DOI: 10.1007/s00018-019-03335-7.
- [22] Antunes C, Da Silva JD, Guerra-Gomes S, et al. Tet3 ablation in adult brain neurons increases anxiety-like behavior and regulates cognitive function in mice[J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(5): 1445-1457. DOI: 10.1038/s41380-020-0695-7.
- [23] Beck DB, Petracovici A, He C, et al. Delineation of a human mendelian disorder of the DNA demethylation machinery: TET3 Deficiency[J]. *Am J Hum Genet*, 2020, 106(2): 234-245. DOI: 10.1016/j.ajhg.2019.12.007.
- [24] MacArthur IC, Dawlaty MM. TET enzymes and 5-Hydroxymethylcytosine in neural progenitor cell biology and neurodevelopment[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 645335. DOI: 10.3389/fcell.2021.645335.
- [25] Gulmez Karaca K, Brito DVC, Oliveira AMM. MeCP2: a critical regulator of chromatin in neurodevelopment and adult brain function[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4577. DOI: 10.3390/ijms20184577.
- [26] Cheng TL, Chen J, Wan H, et al. Regulation of mRNA splicing by MeCP2 via epigenetic modifications in the brain[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42790. DOI: 10.1038/srep42790.
- [27] Liu Y, Zhang B, Kuang H, et al. Zinc finger protein 618 regulates the function of UHRF2 (Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 2) as a specific 5-Hydroxymethylcytosine reader[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(26): 13679-13688. DOI: 10.1074/jbc.M116.717314.
- [28] Chen R, Zhang Q, Duan X, et al. The 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) reader UHRF2 is required for normal levels of 5hmC in mouse adult brain and spatial learning and memory[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(11): 4533-4543. DOI: 10.1074/jbc.M116.754580.
- [29] Zhong J, Xu W. Characterization of DNA hydroxymethylation in the hypothalamus of elderly mice with post-operative cognitive dysfunction[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(5): 4002-4010. DOI: 10.3892/etm.2019.8056.
- [30] Nikolac Perkovic M, Videtic Paska A, Konjevod M, et al. Epigenetics of Alzheimer's disease[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(2): 195. DOI: 10.3390/biom11020195.

- [31] Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of Amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 25. DOI: 10.3389/fnins.2018.00025.
- [32] Chouliaras L, Lardenoije R, Kenis G, et al. Age-related disturbances in DNA (hydroxy)methylation in APP/PS1 mice [J]. *Transl Neurosci*. 2018, 9: 190-202. DOI: 10.1515/tnsci-2018-0028.
- [33] Li L, Qiu Y, Miao M, et al. Reduction of Tet2 exacerbates early stage Alzheimer's pathology and cognitive impairments in 2 × Tg-AD mice [J]. *Hum Mol Genet*, 2020, 29(11): 1833-1852. DOI: 10.1093/hmg/ddz282.
- [34] Cochran JN, Geier EG, Bonham LW, et al. Non-coding and loss-of-function coding variants in TET2 are associated with multiple neurodegenerative diseases [J]. *Am J Hum Genet*, 2020, 106(5): 632-645. DOI: 10.1016/j.ajhg.2020.03.010.
- [35] Yu CC, Jiang T, Yang AF, et al. Epigenetic modulation on tau phosphorylation in Alzheimer's disease [J]. *Neural Plast*, 2019, 2019: 6856327. DOI: 10.1155/2019/6856327.
- [36] Shu L, Sun W, Li L, et al. Genome-wide alteration of 5-hydroxymethyl cytosine in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 381-391. DOI: 10.1186/s12864-016-2731-1.
- [37] Zhao J, Zhu Y, Yang J, et al. A genome-wide profiling of brain DNA hydroxymethylation in Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2017, 13(6): 674-688. DOI: 10.1016/j.jalz.2016.10.004.
- [38] Zhang Y, Gao C, Chen D, et al. Tuina massage improves cognitive functions of hypoxic-ischemic neonatal rats by regulating genome-wide DNA hydroxymethylation levels [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 1282085. DOI: 10.1155/2019/1282085.
- [39] Indrieri A, Pizzarelli R, Franco B, et al. Dopamine, alpha-synuclein, and mitochondrial dysfunctions in Parkinsonian eyes [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 567129. DOI: 10.3389/fnins.2020.567129.
- [40] Fasolino M, Liu S, Wang Y, et al. Distinct cellular and molecular environments support aging-related DNA methylation changes in the substantia nigra [J]. *Epigenomics*, 2017, 9(1): 21-31. DOI: 10.2217/epi-2016-0084.
- [41] Shu L, Qin L, Min S, et al. Genetic analysis of DNA methylation and hydroxy -methylation genes in Parkinson's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2019, 84: 242.e13-242.e16. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.02.025.
- [42] Xiang L, Huang G, Shu W, et al. Role of Chromatin remodeling genes and TETs in the development of human midbrain dopaminergic neurons [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2020, 16(4): 718-729. DOI: 10.1007/s12015-020-09972-x.
- [43] Wu TT, Liu T, Li X, et al. TET2-mediated Cdkn2A DNA hydroxymethylation in midbrain dopaminergic neuron injury of Parkinson's disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2020, 29(8): 1239-1252. DOI: 10.1093/hmg/ddaa022.
- [44] Marshall LL, Killinger BA, Ensink E, et al. Epigenomic analysis of Parkinson's disease neurons identifies Tet2 loss as neuroprotective [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(10): 1203-1214. DOI: 10.1038/s41593-020-0690-y.
- [45] Tan YY, Wu L, Zhao ZB, et al. Methylation of α -synuclein and leucine-rich repeat kinase 2 in leukocyte DNA of Parkinson's disease patients [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2014, 20(3): 308-313. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2013.12.002.
- [46] Kaut O, Kuchelmeister K, Moehl C, et al. 5-methylcytosine and 5-hydroxy methylcytosine in brains of patients with multiple system atrophy and patients with Parkinson's disease [J]. *J Chem Neuroanat*, 2019, 96: 41-48. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2018.12.005.
- [47] Blum D, Chern Y, Domenici MR, et al. The role of adenosine tone and adenosine receptors in Huntington's disease [J]. *J Caffeine Adenosine Res*, 2018, 8(2): 43-58. DOI: 10.1089/caff.2018.0006.
- [48] Wang F, Yang Y, Lin X, et al. Genome-wide loss of 5-hmC is a novel epigenetic feature of Huntington's disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(18): 3641-3653. DOI: 10.1093/hmg/ddt214.
- [49] Mollica PA, Zamponi M, Reid JA, et al. Epigenetic alterations mediate iPSC-induced normalization of DNA repair gene expression and TNR stability in Huntington's disease cells [J]. *J Cell Sci*, 2018, 131(13): jcs215343. DOI: 10.1242/jcs.215343.
- [50] Rademakers R. C9orf72 repeat expansions in patients with ALS and FTD [J]. *Lancet Neurol*, 2012, 11(4): 297-298. DOI: 10.1016/S1474-4422(12)70046-7.
- [51] Esanov R, Belle KC, van Blitterswijk M, et al. C9orf72 promoter hypermethylation is reduced while hydroxymethylation is acquired during reprogramming of ALS patient cells [J]. *Exp Neurol*, 2016, 277: 171-177. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.12.022.
- [52] Esanov R, Cabrera GT, Andrade NS, et al. A C9ORF72 BAC mouse model recapitulates key epigenetic perturbations of ALS/FTD [J]. *Mol Neurodegener*, 2017, 12(1): 46-56. DOI: 10.1186/s13024-017-0185-9.
- [53] Scotter EL, Chen HJ, Shaw CE. TDP-43 proteinopathy and ALS: insights into disease mechanisms and therapeutic targets [J]. *Neurotherapeutics*, 2015, 12(2): 352-363. DOI: 10.1007/s13311-015-0338-x.
- [54] Appleby-Mallinder C, Schaber E, Kirby J, et al. TDP43 proteinopathy is associated with aberrant DNA methylation in human amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2021, 47(1): 61-72. DOI: 10.1111/nan.12625.
- [55] Figueroa-Romero C, Guo K, Murdock BJ, et al. Temporal evolution of the microbiome, immune system and epigenome with disease progression in ALS mice [J]. *Dis Model Mech*, 2019, 13(2): dmm041947. DOI: 10.1242/dmm.041947.

(收稿日期: 2020-12-17)

(本文编辑: 赵金鑫)