

PRMT3 介导的甲基化修饰在胚胎干细胞分化过程中的作用及机制研究

钱佳婷, 贾志浩

(苏州大学苏州医学院剑桥-苏大基因组资源中心, 江苏省苏州市 215123)

摘要: 精氨酸甲基化是一种常见的蛋白质翻译后修饰方式, 由蛋白精氨酸甲基转移酶 (Protein arginine methyltransferases, PRMTs) 家族蛋白催化完成。PRMTs 通过甲基化其胞质或细胞核内的特异性底物, 调控细胞分化、胚胎发育和糖脂代谢等多种生物学过程。近年来的研究表明, PRMT 的表达异常与多种癌症发生发展密切相关, 因此受到广泛关注。PRMT3 作为一种独特的 PRMT, 其广泛表达于多种细胞类型, 但 PRMT3 在胚胎干细胞 (Embryonic Stem Cells, ESCs) 中调控分化过程的生物学功能仍然未知。本研究以小鼠胚胎干细胞 (mouse ESCs, mESCs) 分化为拟胚体 (Embryoid Body, EB) 为研究模型, 探究 PRMT3 在 ESCs 分化过程中的作用及具体分子机制。研究结果表明, 在诱导 ESCs 分化为 EB 的过程中抑制 PRMT3, 将会特异性下调神经外胚层相关标志蛋白 NESTIN、SOX2 和 PAX6 的表达水平, 同时降低糖脂代谢相关酶 FASN、SCD1 和 PKM1/2 的表达水平。相反, 过表达 PRMT3 则可上调 NESTIN、FASN 和 SCD1 的表达水平。综上所述, 本研究结果暗示 PRMT3 可能通过调控糖脂代谢, 进而影响 ESCs 向神经外胚层的分化过程。

关键词: 细胞生物学; 胚胎干细胞; PRMT3; NESTIN; FASN; 糖脂代谢

中图分类号: Q28

The role and mechanism of PRMT3-mediated methylation modification in the differentiation of embryonic stem cells

QIAN Jiating, JIA Zhihao

(Cambridge-Su Genomic Resource Center, Soochow Medical College, Soochow University, Suzhou, Jiangsu, 215123)

Abstract: Arginine methylation is a common post-translational modification of proteins, catalyzed by the Protein arginine methyltransferases (PRMTs) family of proteins. PRMTs regulate a variety of biological processes such as cell differentiation, embryonic development, and glycolipid metabolism, through methylation of their cytoplasmic or nucleus-specific substrates. biological processes. As a unique PRMT, PRMT3 is widely expressed in various cell types, but the biological function of PRMT3 in regulating differentiation processes in Embryonic Stem Cells (ESCs) remains unknown. In this study, we used the differentiation of mouse ESCs (mESCs) into Embryoid Body (EB) as a research model to investigate the role of PRMT3 in the differentiation process of ESCs and the specific molecular mechanism. The results showed that inhibition of PRMT3 during the induction of ESCs differentiation into EBs would specifically down-regulate the expression levels of the neural ectoderm-related marker proteins NESTIN, SOX2, and PAX6, as well as decrease the expression levels of the enzymes related to glycolipid metabolism FASN, SCD1, and PKM1/2. In contrast, overexpression of PRMT3 upregulated the expression levels of NESTIN, FASN, and SCD1. Taken together, the results of the present study imply that PRMT3 may affect the differentiation process of ESCs to neural ectoderm through the regulation of glycolipid metabolism, and then affect the differentiation process of ESCs to neural ectoderm.

Key words: Cell biology; Embryonic stem cell; PRMT3; NESTIN; FASN; Glucolipid metabolism

作者简介: 钱佳婷 (1998 年), 女, 主要研究方向: 胚胎干细胞

通信联系人: 贾志浩 (1991 年), 男, 硕导, 主要研究方向: 糖脂代谢. E-mail: zhjia@suda.edu.cn

0 引言

蛋白质的翻译后修饰是在蛋白质的氨基酸残基上添加不同化学基团的过程。PTM 可以通过直接改变蛋白质的功能调控诸多细胞过程[1]。精氨酸甲基化是一种常见的 PTM 形式，主要是由 PRMTs 讲 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)上的甲基添加到精氨酸侧链的胍基基团中[2, 3]。50 目前，从哺乳动物中共鉴定出 9 个 PRMTs 家族成员[4]，根据它们催化形成甲基精氨酸类型的不同，可将 PRMTs 分为三种亚型[5]（图 1）：I 型 PRMT（PRMT1、PRMT2、PRMT3、CARM1/PRMT4、PRMT6、PRMT8）催化精氨酸残基生成单甲基精氨酸（MMA）中间体，该中间体随后转化为不对称二甲基精氨酸（ADMA）[6]；II 型 PRMT（PRMT5 和 PRMT9）也催化 MMA，并进一步将 MMA 转化为对称的二甲基精氨酸（SDMA）；而 III 型 PRMT 55（PRMT7）仅生成 MMA[7-9]。

近年来，PRMTs 家族成员因其在多种癌症类型中的异常表达得到了极大关注。多项研究报道 PRMTs 的异常表达会导致多种癌症（如乳腺癌、肺癌、白血病等）发生[10]。PRMT3 作为一个特殊的 PRMTs 家族成员，具有独特的结构特征和以细胞质为主的表达谱，提示其可能具有特定的功能和调控机制。研究表明，PRMT3 与肿瘤细胞代谢密切相关。例如，PRMT3 60 通过增强 LDHA 的精氨酸甲基化促进糖酵解和肝细胞癌（hepatocellular carcinoma, HCC）生长，且抑制 PRMT3 可以降低 HCC 患者奥沙利铂耐药性[11, 12]。此外，动物实验及人群研究数据提示，PRMTs 不仅参与调控细胞的糖脂代谢、影响代谢器官的发育过程，同时也与肥胖[13]、糖尿病[14]以及非酒精性脂肪肝的发生发展密切相关[15-17]。

ESCs 因其自我更新和多能性的能力，可以分化得到几乎体内所有的细胞类型，这种独特的能力使其成为研究胚胎发育、基因表达调控以及疾病发生机制和治疗的重要模型[18, 65 19]。已有研究表明，PRMTs 通过精氨酸甲基化调控 ESCs 的干性维持和分化过程[3]，例如 PRMTs 参与调节决定 ESCs 分化方向和谱系特异性的关键信号通路，包括 Wnt[20, 21]、Notch[22]和 TGF- β [23]等，促使 ESCs 向特定的细胞谱系分化[24]。研究表明，Prmt4 的缺失导致 ES 细胞核心转录因子 Oct4、Sox2 和 Nanog 的下调，最终引导 ESC 分化成各种谱系[25, 70 26]。PRMT5 与 MEP50 结合甲基化组蛋白 H2A（H2AR3me2s），从而抑制 ESCs 中的分化相关基因的表达，同时 PRMT5 可能与 LIF/Stat3 通路协同从而抑制分化[27]。然而，尽管 PRMT3 广泛表达于多种细胞类型，但 PRMT3 是否参与调控 ESCs 分化仍未知。

基于上述背景，本研究以 mESCs 分化为研究对象，旨在探究 PRMT3 在 ESCs 分化过程中的作用及具体分子机制。研究结果不仅能阐明 PRMT3 在 ESCs 分化过程中的全新的翻译 75 后水平和代谢水平的调控机制，也为揭示糖脂代谢在分子和代谢物水平上维持机体代谢健康提供新的理论基础。因此，深入探讨 PRMT3 如何调控 ESCs 的功能，特别是在细胞命运决定、分化诱导以及表观遗传学层面的作用，对于理解胚胎发育机制及其在再生医学中的应用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 胚胎干细胞的培养与拟胚体 (Embryoid body, EB) 形成

80 本实验所用细胞为小鼠胚胎干细胞 (mESCs) E14 细胞系。冻存细胞离心后弃冻存液，加入新鲜的 mESCs 培养基 (10%胎牛血清 (依科赛, FSP500)，1% 1×L-谷氨酰胺补充剂 (索莱宝, G0200)，1%PS (Gibco, 15140-122)，0.2% β-巯基乙醇 (Sigma, M3148)，10ng/mL mLif (金斯瑞, Z03077)，高糖 DMEM (源培, L110KG)) 重悬细胞，转移细胞
85 悬液至 0.1%明胶 (Sigma, ES-006) 处理的培养皿中，37℃、5%CO₂ 培养箱中培养数小时。期间进行换液，待细胞密度达到 70%时，进行传代。EB 形成：0.5%胰蛋白酶 (Gibco, C25300-062) 消化 mESCs，离心后用 EB 培养基 (不含 mLif 的 mESCs 培养基) 重悬，转移至低吸附细胞培养皿中并将培养体系补至 3mL，培养 24 小时，细胞开始聚集形成 EB，每 2 天更换培养基。培养 3 天后收集 EBs 用于后续实验。

1.2 蛋白免疫印迹 (Western Blot)

90 细胞消化离心后弃培养基，PBS 清洗，离心后弃上清。根据细胞沉淀量加入适量 RIPA 裂解液 (含 1%蛋白酶抑制剂 PI 和 1%磷酸酶抑制剂 PPI) (碧云天, P0013B; Selleck, B14002/B15002)，吹打混匀后转移至 1.5mL EP 管中，4℃旋转混匀仪上摇晃裂解 30min，于 4℃离心机 (Scilogex, CF1524R) 中 12000rpm 离心 15min，转移上清至新的 EP 管中。
95 使用 BCA 定量试剂盒 (Thermo, 23225) 测定样品的总蛋白浓度。根据目标蛋白的大小配制合适浓度的 SDS-PAGE 胶 (雅酶, PG212)，搭建电泳装置 (Bio-Rad, 1658033)。将蛋白 marker 和 10μg 的蛋白样品按顺序加入至上样孔中，90V 恒压运行 30min。当样品压成一条细线后，调整电压至 120V，目的蛋白电泳至凝胶中部时停止运行。电泳结束后，取出凝胶制成“三明治”转膜模型，200mA 恒流转膜 2 小时。将转膜完成的 PVDF 膜依次浸泡于：
100 封闭液 (5%脱脂奶粉，1×TBST) 室温孵育 1 小时、一抗稀释液 4℃孵育 12-16 小时、二抗稀释液室温孵育 1 小时，每次浸泡之间使用 TBST 充分清洗 PVDF 膜。避光环境下，将显影液均匀滴在 PVDF 膜上，于化学发光成像系统 (勤翔科学仪器有限公司, ChemiScope S6) 中完成显影。

1.3 实时荧光定量 PCR (quantitative real time PCR, qPCR)

105 待细胞密度 80%时，消化离心后按照 HLINGENE kit 试剂盒 (慧凌生物, NG3001S) 提取细胞总 RNA。取 1μL 检测浓度 (Thermo, NanoDrop2000)，随后将 RNA 稀释至同一浓度，按照逆转录试剂 (诺唯赞, R323-01-AC) 将所有 RNA 样本逆转录成 cDNA，并通过 PCR 仪 (Thermo, A37834) 扩增至 500ng 或 1μg。将得到的 cDNA 稀释 5 倍后用于后续 qPCR 实验 (Thermo, ViiA7)。

1.4 慢病毒构建 PRMT3 过表达稳转细胞系

110 提前一天将细胞生长状态良好的 E14 细胞铺于 35mm 的培养皿中培养 16-24 小时，至细胞汇合度为 20-30%，设置阴性对照组和空白对照组 (确保 24 小时后细胞数量是铺板时的两倍)。参照 ES 细胞的 MOI 值及病毒滴度，加入 60μL 的病毒 (吉凯基因, 中国)，培养 16 小时后更换为普通培养基，继续培养 3-4 天，中途可适时更换培养基以维持细胞活性。感染
115 4 天左右时通过荧光显微镜评估感染效率。当感染效率达到约 70%且细胞生长状况良好时，

使用 1 μ g/mL 的嘌呤霉素 (Puromycin) 溶液 (Biosharp, BL528A) 筛选培养 7-8 天, 获得过表达 PRMT3 的 ES 稳转细胞系。

1.5 siRNA 转染细胞

待 ES 细胞长至 80% 并细胞状态较好时, 可用于转染。取 2 个无菌的 1.5mL EP 管, 分别加入 125 μ L Opti-MEM 培养基 (Gibco, 31985062) 和 100pmol siRNA (设实验组和 NC 对照组), 用移液器轻轻吹打混匀, 随后加入 4 μ L LipoRNAi™ 转染试剂 (碧云天, C0535) 并吹打混匀, 室温孵育 20min。等待期间参照 1.1 中 EB 的诱导过程, 对 ES 细胞进行传代。最后将转染复合物均匀地加入至相应的培养皿中, 轻轻混匀后放入培养箱中继续培养 48 小时。使用 qPCR 检测 siRNA (吉玛基因, 中国) 对靶基因表达的抑制效果。

1.6 CCK-8 实验

取生长状态良好的 mESCs 培养至密度为 70%-80% 时, 按照 1.1 中方法进行传代。每孔 1×10^4 个细胞 (100 μ L 细胞悬液) 接种于 96 孔板, 空白孔仅加入同体积的培养基 (作为 blank 组)。实验组共设置 4 组不同的 SGC707 浓度, 分别为 20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M, 对照组加入相同体积的 DMSO, 每个浓度设置 5 个复孔, 铺设两个 96 孔板, 分别于 24h 和 48h 后检测吸光度。检测吸光度前分别加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液 (Elabscience, E-CK-A362), 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 3.5h, 随后使用酶标仪 (美谷分子仪器公司, SpectraMax® iD3) 分别测定其在 450nm 和参比波长 650nm 处的吸光度值, 根据说明书提供的公式计算细胞的存活率。

1.7 数据统计

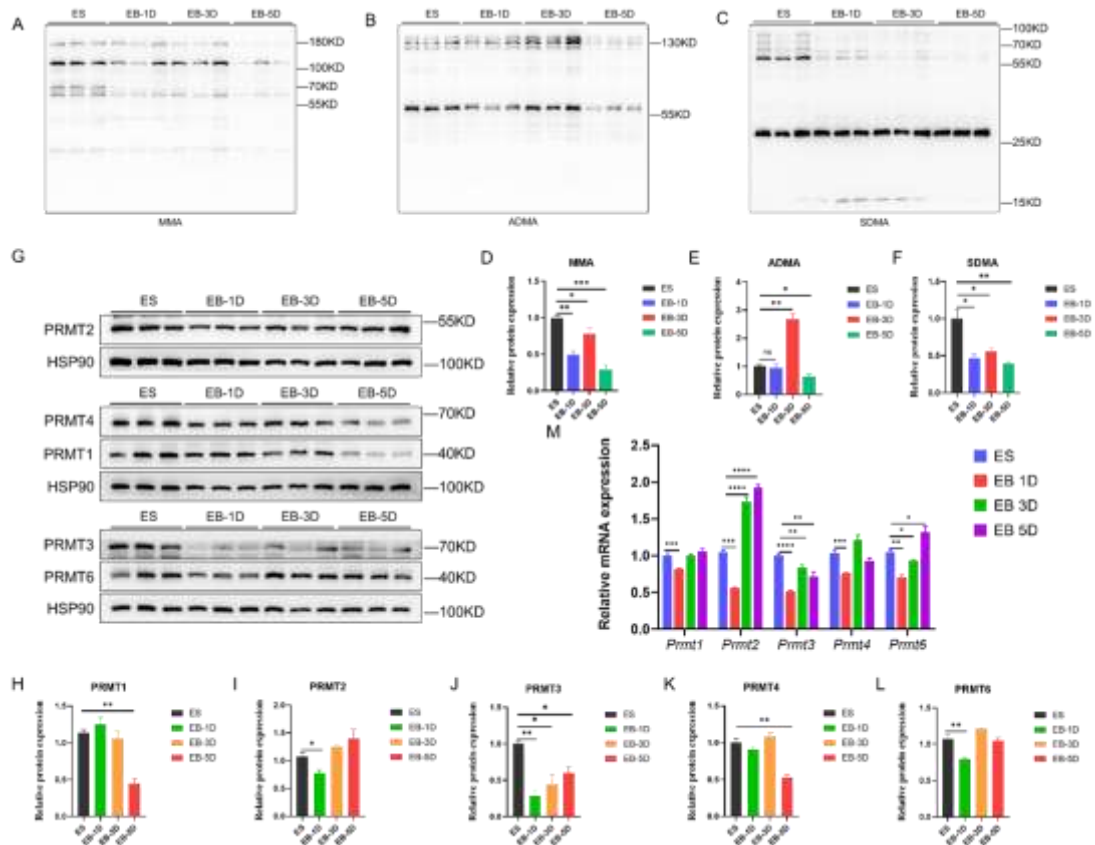
数据分析及可视化主要使用 GraphPad Prism 8.01 完成, WB 实验的灰度值通过 ImageJ 进行统计, 数据整理使用 Excel 处理。统计学分析采用非配 t 检验, 显著性水平设定为 $p < 0.05$ 具有统计学差异。其中, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$, 实验数据均采用平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SEM) 表示。

2 结果

2.1 PRMT3 在 ESCs 分化过程中发挥重要作用

为了明确精氨酸甲基化修饰在 ESC 到 EB 过程中的变化情况。我们首先将 ES 诱导分化成 EB, 并在第 0、1、3 和 5 天收取细胞样本提取了其 RNA 和蛋白。随后通过 WB 实验检测了 ES 和 EB 中蛋白甲基化修饰情况, 即对 MMA、ADMA 和 SDMA 的蛋白水平进行了检测并进行灰度值统计。结果表明, MMA 和 SDMA 在 ES 分化成 EB 后显著下调, ADMA 在分化一天后有下降趋势而三天后又显著上调, 分化五天后则又显著下调 (图 1A-F), 这也暗示着 ADMA 修饰在 ES 分化成 EB 过程中发挥着重要作用且第三天这个时间节点较为突出。由于 ADMA 修饰所对应的是 I 型 PRMTs, 我们又通过 WB 检测了 PRMT1、PRMT2、PRMT3、PRMT4 和 PRMT6 这几种 I 型 PRMT 的蛋白表达情况, 结果显示 PRMT3 的表达水平在 ES 到 EB 的分化过程中持续下调 (图 1G-L)。此外, 我们又通过 qPCR 实验在 RNA 水平上检测了 I 型 PRMTs 的表达情况, 结果与 WB 结果相一致, *Prmt3* 在 ES 分化成 EB 过程中显著下调 (图 1M)。鉴于 PRMT3 作为一种 I 型 PRMTs 催化 MMA 和 ADMA 的形成且在 ES 分化成 EB 后下调最为显著, 因此我们推测 PRMT3 可能在 ES 分化成为 EB 的过程

中发挥重要作用。

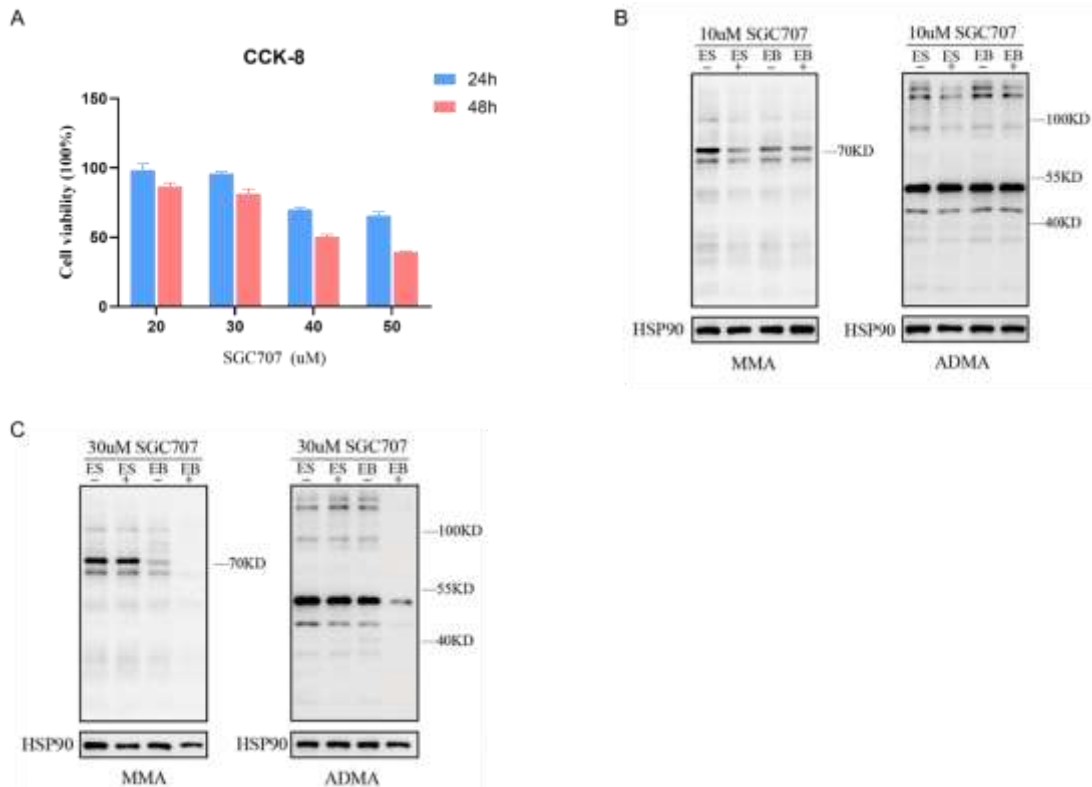


155 图 1. PRMTs 及甲基化修饰在 ESCs 分化过程中蛋白和 RNA 水平上的表达情况。(A-F) WB 检测 MMA、ADMA、SDMA 蛋白表达水平及灰度值分析；(G-L) WB 检测 I 型 PRMTs 蛋白表达水平及灰度值分析；(M) qPCR 检测 I 型 PRMTs 在 RNA 水平的表达情况。qPCR 每组 $n=3-4$, WB 每组 $n=3$, 数据均以 Mean \pm SEM 表示, 采用非配对 t 检验进行分析, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$ 。

160 Figure 1. Expression of PRMTs and methylation modifications at the protein and RNA levels during differentiation of ESCs. (A-F) WB detection of MMA, ADMA, and SDMA protein expression levels and gray value analysis; (G-L) WB detection of type I PRMTs protein expression levels and gray value analysis; (M) qPCR detection of type I PRMTs expression at the RNA level. qPCR with $n = 3-4$ per group, WB with $n = 3$ per group, data are presented as Mean \pm SEM. Analysis was performed using unpaired t-test, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$.

165 **2.2 EB 中抑制 PRMT3 后影响 ADMA 和 MMA 修饰**

170 随后我们利用一种已报道的 PRMT3 小分子抑制剂 SGC707, 来探究 PRMT3 在 ESCs 分化过程中的潜在作用。首先我们分别对 ES 和 EB 进行了处理, 并通过 CCK-8 实验以探究在不影响细胞存活能力的前提下抑制 PRMT3 的最大浓度实验结果显示 30 μ M 为 SGC707 的最高适用浓度 (图 2A)。随后我们分别利用 10 μ M 和 30 μ M 的 SGC707 对 ES 和 EB 进行处理, 结果发现 10 μ M 处理组的 MMA 和 ADMA 修饰并没有发生改变 (图 2B)。而使用 30 μ M SGC707 处理 ES 和 EB 细胞后, 仅在 EB 中特异性的下调 MMA 和 ADMA, 但对 ESCs 并没有影响 (图 2C), 提示 PRMT3 特异性地在 EB 中发挥功能。因此, 后续的实验我们也采用了 30 μ M 的 SGC707 作为处理浓度。



175 图2. EB中抑制PRMT3后影响ADMA和MMA修饰。(A)CCK-8实验探究最大抑制浓度。(B)10 μ M SGC707
 180 处理ES、EB细胞后对MMA、ADMA蛋白表达情况的影响。(C)30 μ M SGC707处理ES、EB细胞后对
 MMA、ADMA蛋白表达情况的影响。CCK-8每组n=5, WB每组n=3, 数据均以Mean \pm SEM表示。
 Figure2. Inhibition of PRMT3 in EB affected ADMA and MMA modifications. (A) CCK-8 experiments were
 performed to explore the maximum inhibitory concentration. (B) Effect of 10 μ M SGC707 on MMA and ADMA
 protein expression after treatment of ES and EB cells. (C) Effect on MMA, ADMA protein expression after 30 μ M
 SGC707 treatment of ES, EB cells. CCK-8 with n = 5 per group, WB with n = 3 per group, data are presented as
 Mean \pm SEM.

2.3 EB中抑制PRMT3下调神经外胚层相关基因和蛋白的表达

185 我们首先用qPCR的方法检测了30 μ M SGC707处理了EB后与ESCs三胚层分化
 (Differentiation)和神经外胚层(Neuroectoderm)相关基因的mRNA表达水平变化。结果
 表明,与外胚层分化相关的*Fgf5*、*Otx2*和*Pou3f1*的表达量在抑制PRMT3后均下调。而中
 胚层相关的T以及内胚层相关的*Cdx2*的表达量上调(图7A)。与神经外胚层相关的*Nestin*
 和*Pax6*的表达量显著下调(图7B)。随后,我们利用siRNA敲低PRMT3的方法验证了上
 述结果。qPCR结果表明,与神经外胚层相关的*Nestin*和*Ncam1*的表达量均显著下调(图
 190 7C)。为了验证mRNA水平的表达结果,我们利用了WB的方法检测了抑制PRMT3后与
 神经外胚层相关蛋白NESTIN、PAX6和SOX2的表达。结果表明,SGC707处理后可以在
 EB中显著特异下调NESTIN、PAX6和SOX2的表达(图7D-F)。据研究报道,NESTIN、
 PAX6、SOX2作为神经外胚层的标志物均能调控神经外胚层的分化,确保神经干细胞在分
 化前保持未分化状态;在适当条件下,PAX6能促进分化从而影响神经元的形成与迁移,
 195 SOX2促进分化为神经元或胶质细胞。以上结果暗示我们抑制PRMT3可能阻碍ESCs向神
 经外胚层的分化。

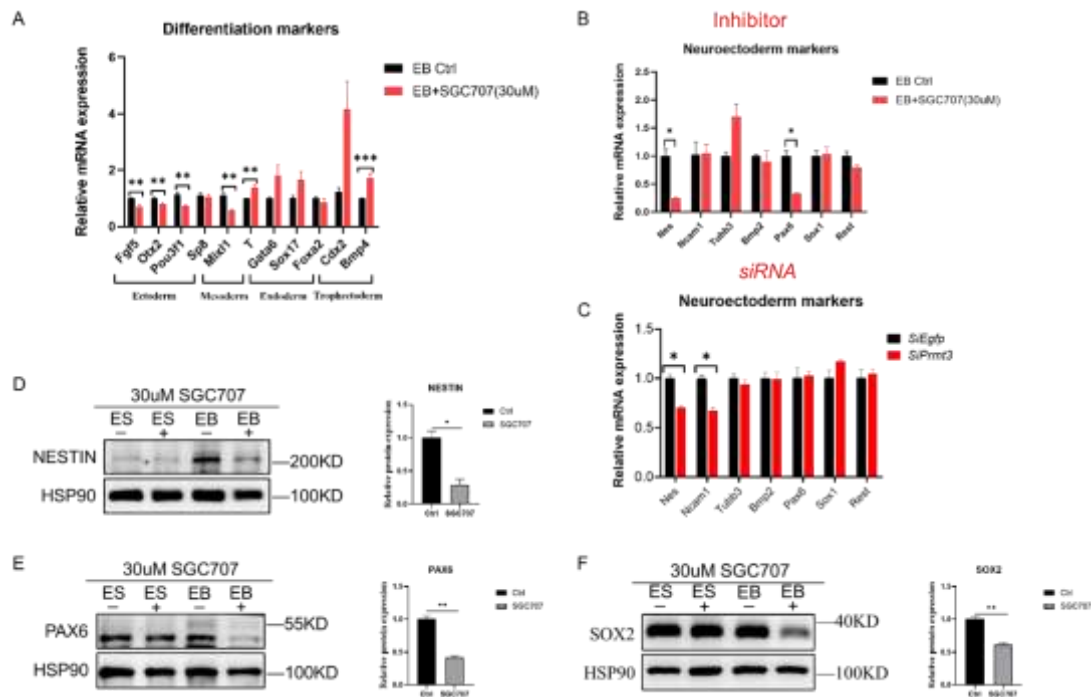


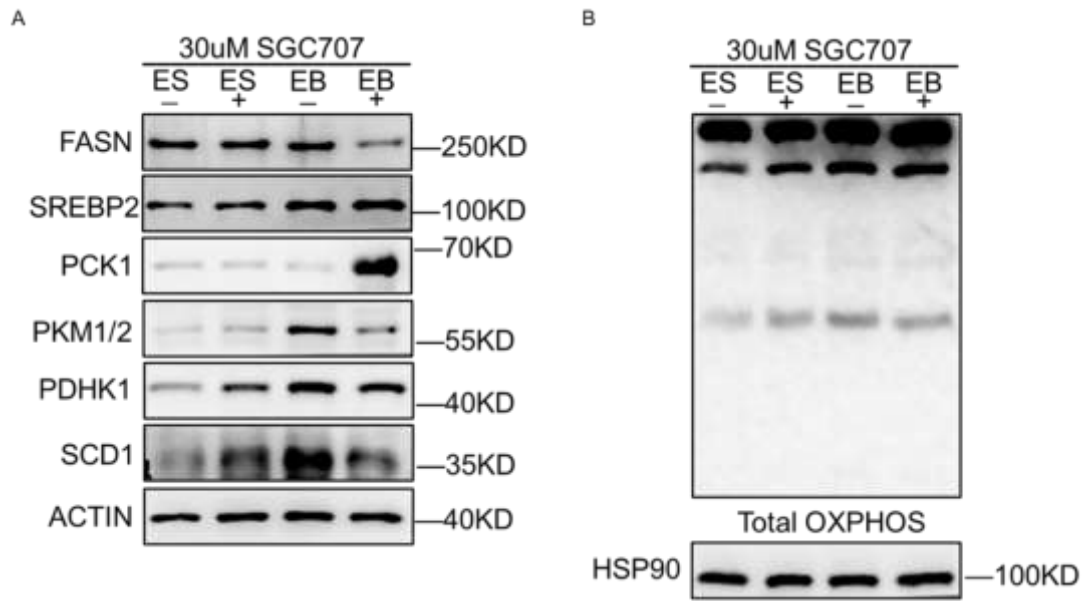
图3. EB 中抑制 PRMT3 下调神经外胚层相关基因和蛋白的表达。(A) qPCR 检测抑制 PRMT3 后 EB 中各个胚层分化相关基因的表达水平。(B) qPCR 检测抑制 PRMT3 后 EB 中神经外胚层相关基因的表达水平。(C) qPCR 检测 siRNA 敲低 PRMT3 后 EB 中神经外胚层相关基因的表达水平。(D-F) WB 检测抑制 PRMT3 后 EB 中神经外胚层相关蛋白的表达水平及灰度值分析。qPCR 每组 $n=2\sim5$, WB 每组 $n=2$, 数据均以 Mean \pm SEM 表示, 采用非配对 t 检验进行分析, $*p<0.05$, $**p<0.01$ 。

Figure3. Inhibition of PRMT3 in EB downregulates the expression of neural ectoderm-related genes and proteins.

(A) qPCR detection of the expression levels of individual germ layer differentiation-related genes in EB after inhibition of PRMT3. (B) qPCR assay to detect the expression level of neural ectoderm-related genes in EB after suppression of PRMT3. (C) qPCR assay for siRNA knockdown of expression levels of neural ectoderm-related genes in EB after PRMT3. (D-F) WB detection of the expression level of neural ectoderm-related proteins in EB after inhibition of PRMT3 and gray value analysis. qPCR with $n = 2$ per group, WB with $n = 2$ per group, data are presented as Mean \pm SEM. Analysis was performed using unpaired t-test, $*p<0.05$, $**p<0.01$.

2.4 EB 中抑制 PRMT3 后影响 ADMA 和 MMA 修饰

研究表明 PRMT3 通过调节糖脂代谢过程影响癌细胞的增殖和分化。鉴于 ESCs 与癌细胞高度相似, 均能在体外无限增殖和自我更新, 且 ESCs 的糖脂代谢调控与其多能性的建立、维持和退出至关重要^[28]。因此, 我们探究了 PRMT3 对糖脂代谢相关蛋白表达的影响。结果显示, SGC707 处理显著下调 EB 中与脂肪酸合成相关的 FASN 和 SCD1 以及与糖酵解相关的 PKM1/2 的表达量, 而与糖异生相关的 PCK1 的蛋白表达则显著上调 (图 4A); 但是线粒体复合体相关蛋白的表达并没有发生改变 (图 4B)。因此, 结果表明抑制 PRMT3 会导致 EB 中与糖脂代谢相关蛋白表达的改变, 提示我们 PRMT3 在 ESCs 分化进程中通过糖脂代谢发挥重要作用。

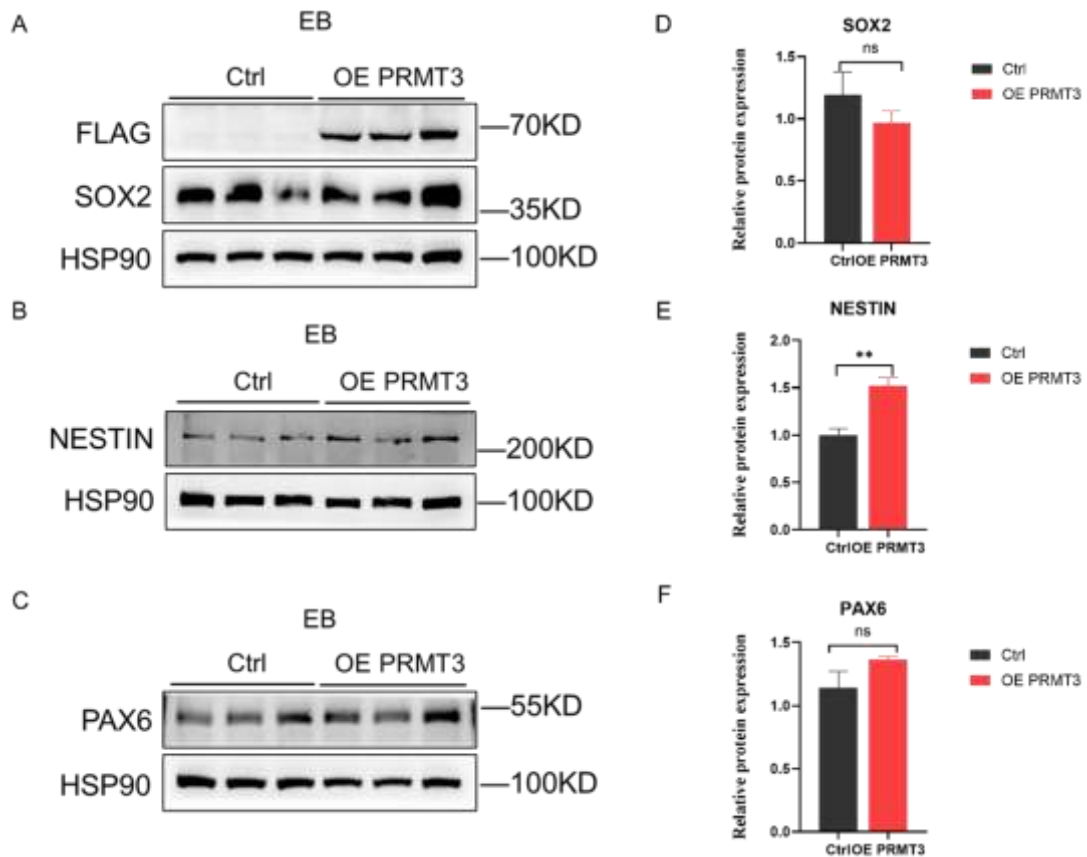


220 图4. 抑制 PRMT3 影响 EB 中与糖脂代谢相关蛋白的表达。(A) SGC707 处理之后利用 WB 检测 EB 中与糖脂代谢相关蛋白的表达。(B) SGC707 处理之后利用 WB 检测 EB 中线粒体复合体的表达。

Figure3. Inhibition of PRMT3 affects the expression of proteins related to glycolipid metabolism in EB. (A) Expression of proteins related to glycolipid metabolism in EB was detected using WB after SGC707 treatment. (B) Expression of mitochondrial complex in EB was detected using WB after SGC707 treatment.

225 **2.5 EB 中过表达 PRMT3 上调 NESTIN 的表达**

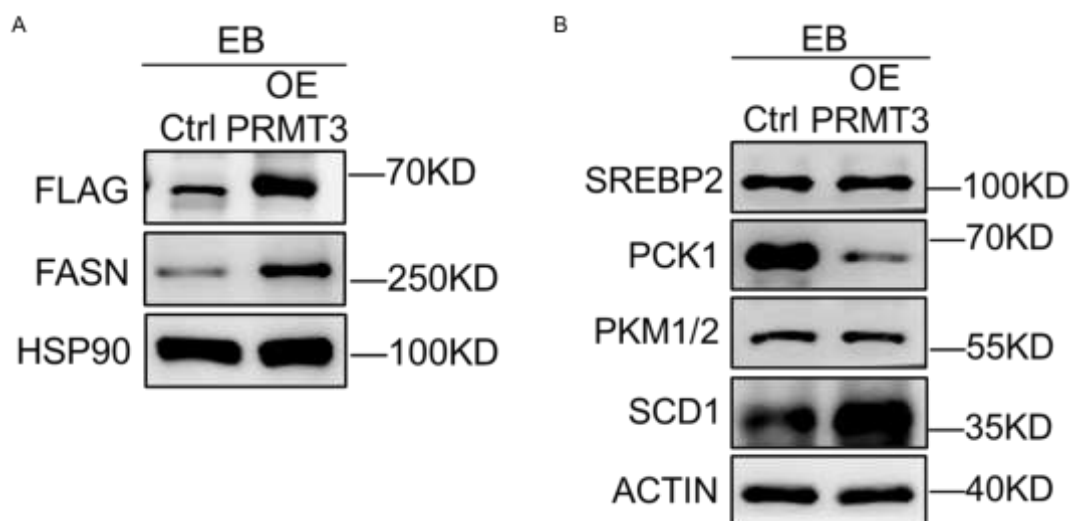
230 为了进一步验证 PRMT3 在 ESCs 分化到 EB 中的作用,我们利用可特异性过表达 PRMT3 的慢病毒感染 mESCs, 构建了 PRMT3 稳定过表达的 ES 细胞系。经嘌呤霉素 (puromycin) 筛选一周后得到能够过表达 PRMT3 的 ES 稳转细胞系。将稳转细胞诱导分化成 EB 三天后, 通过 WB 实验检测标签 FLAG 的蛋白表达情况, 确定了稳转细胞系的成功构建 (图 5A)。随后我们通过 WB 实验对相关蛋白的表达进行检测分析。结果与抑制 PRMT3 结果相反, PRMT3 过表达后与神经外胚层相关的蛋白 NESTIN 的表达显著上调 (图 5A-5B)。NESTIN 作为神经干细胞的 marker, 在 ESCs 分化过程发挥重要功能。以上结果, 进一步确认了 PRMT3 可能作为 ESCs 分化到神经外胚层的关键调节因子。



235 图 5. EB 中过表达 PRMT3 上调 NESTIN 的表达。(A) WB 检测细胞系构建成功且检测 SOX2 的蛋白表达量。
 240 (B) WB 检测过表达 PRMT3 后 NESTIN 的蛋白表达量。(C) WB 检测过表达 PRMT3 后 PAX6 的蛋白表达量。
 (D-F)灰度值分析。每组 $n=3$, 数据均以 $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ 表示, 采用非配对 t 检验进行分析, $**p < 0.01$ 。
 Figure 5. Overexpression of PRMT3 in EB upregulates NESTIN expression. (A) WB assay for successful cell line
 construction and detection of SOX2 protein expression. (B) WB detection of protein expression of NESTIN after
 overexpression of PRMT3. (C) WB detection of protein expression of PAX6 after overexpression of PRMT3. (D-F)
 Grayscale value analysis using Image J. Each group $n=3$, data are presented as $\text{Mean} \pm \text{SEM}$. Analysis was
 performed using unpaired t-test, $**p < 0.01$.

2.6 EB 中过表达 PRMT3 上调 FASN、SCD1 的表达, 下调 PCK1 的表达

245 前述实验结果发现抑制 PRMT3 后会影响糖脂代谢, 为了进一步验证 PRMT3 对 ESCs 的分化过程中糖脂代谢相关蛋白表达的影响。我们通过 WB 检测了 PRMT3 过表达对糖脂代谢相关蛋白的表达的影响。结果显示, 与抑制 PRMT3 结果相反, 过表达 PRMT3 后与脂合成相关的 FASN 和 SCD1 显著上调 (图 6A), 而与糖异生相关的 PCK1 的表达量下调 (图 6B)。以上结果表明, PRMT3 可能通过影响 ESCs 分化过程中的糖脂代谢过程参与调控 ESCs 的分化进程。



250

图 6. EB 中过表达 PRMT3 上调 FASN、SCD1 的表达，下调 PCK1 的表达。(A) WB 检测过表达 PRMT3 后 FASN 的蛋白表达量。(B) WB 检测过表达 PRMT3 后 PCK1、PKM1/2、SCD1、SREBP2 的蛋白表达量。

255

Figure6. Overexpression of PRMT3 in EB upregulated the expression of FASN, SCD1 and downregulated the expression of PCK1. (A) WB detection of protein expression of FASN after overexpression of PRMT3. (B) WB detection of protein expression of PCK1, PKM1/2, SCD1, SREBP2 after overexpression of PRMT3.

3 结论

260

265

270

PRMTs 作为精氨酸甲基化修饰的关键调控因子，广泛参与多种细胞信号通路的调节。通过其介导的表观遗传修饰，PRMTs 不仅参与维持胚胎干细胞的多能性，还在神经、心脏等多种谱系的分化过程中发挥了重要作用。研究报道 CARM1 (PRMT4) 在维持 ES 细胞多能性中发挥重要作用[29]。Prmt5 敲除影响胚胎发育早期细胞团的形成[27]。Prmt8 在 mESCs 中表达且其启动子活性由多能性转录因子 Oct4、Sox2 和 Nanog 诱导[30]。这些结果均强调了 PRMTs 在早期胚胎发育和 ESCs 中的重要性。PRMT3 作为 PRMT 家族中的一个特殊的 PRMTs 家族成员，在结构上包含一个独特的 C2H2 锌指结构域，主要定位于细胞质，暗示了其可能具有转录调控之外的特定的功能和机制。目前关于 PRMT3 的研究主要集中在肿瘤细胞代谢领域[31, 32]，例如 PRMT3 通过甲基化其特定的底物增强肿瘤细胞的糖酵解能力促进肝癌和胶质母细胞瘤 (Glioblastoma, GBM) 的发生和发展[33]。尽管 PRMT3 广泛分布在不同的细胞类型中，但其在 ESCs 分化的生物学功能未知。mESCs 作为一种非常重要的多能干细胞，其特点是能够在体外进行无限增殖和自我更新，且具有多向分化的潜能，是较好的研究模型。因此，本研究利用 mESCs 分化为模型，通过诱导成 EB 后也能模拟 ESCs 在体内的分化过程。随后进行 WB 实验检测蛋白精氨酸甲基化修饰 (ADMA、MMA、SDMA) 情况及 I 型 PRMTs 蛋白的表达情况，结果表明 PRMT3 在 ES 分化成 EB 过程中的表达发生显著改变。

275

我们利用 PRMT3 的抑制剂 SGC707 在诱导 EB 过程中抑制 PRMT3 的表达，结果表明抑制 PRMT3 下调 EB 中与神经外胚层相关的 NESTIN、SOX2 和 PAX6 的表达水平。有文献报道 PRMT3 通过增强 LDHA 的精氨酸甲基化促进糖酵解和 HCC 生长，SGC707 的给药有效减弱了 PRMT3 诱导的 HCC 糖酵解和肿瘤生长[34]。鉴于 ESCs 与癌细胞高度相似，可能存在相同的代谢过程，因此抑制 PRMT3 后检测糖脂代谢相关的蛋白，结果显示抑制 PRMT3

280 会导致 EB 中与脂肪酸合成相关的 FASN 和 SCD1 以及与糖酵解相关的 PKM1/2 的表达量下
调, 而与糖异生相关的 PCK1 的蛋白表达则显著上调, 结果提示 PRMT3 在 ESCs 分化进
程中可能通过糖脂代谢发挥作用。此外, 我们通过 EB 中过表达 PRMT3, 利用同样的方法
285 检测了相关蛋白的表达, 结果显示会上调 NESTIN、FASN、SCD1 蛋白的表达, 下调 PCK1
蛋白的表达, 以上结果提示 PRMT3 可能作为 ESCs 分化过程中调控糖脂代谢的一个重要调
节因子影响 ESCs 的神经外胚层的分化进程。然而, NESTIN 只是神经干细胞的标志物的一
种, 未能上调其余标志物, 如 SOX2 和 PAX6, 这也暗示 NESTIN 可能是关键因子, 其中具
体是 NESTIN 影响糖脂代谢, 还是某个糖脂代谢产物影响 NESTIN, 我们还未可知, 还
需要进一步探索。

290 综上, 此研究结果不仅能探索 PRMT3 在 ESCs 分化过程中的全新的翻译后水平和代谢
调控机制, 为揭示糖脂代谢在分子和代谢物水平上维持机体代谢健康提供新的理论基础。随
着对 PRMTs 调控机制的深入研究, 我们可能能够更好地理解 ESCs 的发育过程。PRMT3 通
过调控代谢重编程, 增强 PD-L1 的表达, 进一步促进肿瘤免疫逃逸[35], 未来这些酶类家
族成员也有望成为 ESCs 治疗以及肿瘤相关疾病的潜在靶点, 可以研究 PRMT3 在 GBM 细胞
增殖、侵袭和免疫逃逸中的作用机制, 以及其与现有治疗方法(如放疗、化疗和免疫治疗)
295 的协同效应。因此, PRMT3 可以为多种癌症的干预提供思路及潜在靶点并开发出新的干
细胞治疗策略, 推动再生医学和临床应用的发展。

[参考文献] (References)

- [1] LI W J, HE Y H, YANG J J, et al. Profiling PRMT methylome reveals roles of hnRNPA1 arginine methylation in RNA splicing and cell growth [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1946.
- 300 [2] GUCCIONE E, RICHARD S. The regulation, functions and clinical relevance of arginine methylation [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(10): 642-57.
- [3] LI A S M, LI F, ERAM M S, et al. Chemical probes for protein arginine methyltransferases [J]. Methods, 2020, 175: 30-43.
- 305 [4] DAI W, ZHANG J, LI S, et al. Protein Arginine Methylation: An Emerging Modification in Cancer Immunity and Immunotherapy [J]. Front Immunol, 2022, 13: 865964.
- [5] WANG Y, BEDFORD M T. Effectors and effects of arginine methylation [J]. Biochem Soc Trans, 2023, 51(2): 725-34.
- 310 [6] YOSHIMATSU M, TOYOKAWA G, HAYAMI S, et al. Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers [J]. Int J Cancer, 2011, 128(3): 562-73.
- [7] KIM H, RONAI Z A. PRMT5 function and targeting in cancer [J]. Cell Stress, 2020, 4(8): 199-215.
- 315 [8] WANG B, ZHANG M, LIU Z, et al. PRMT7: A Pivotal Arginine Methyltransferase in Stem Cells and Development [J]. Stem Cells Int, 2021, 2021: 6241600.

- 320 [9] HALABELIAN L, BARSYTE-LOVEJOY D. Structure and Function of Protein Arginine Methyltransferase PRMT7 [J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(8).
- [10] JIN J, MARTIN M, HARTLEY A V, et al. PRMTs and miRNAs: functional cooperation in cancer and beyond [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(15): 1676-86.
- 325 [11] SHI Y, NIU Y, YUAN Y, et al. PRMT3-mediated arginine methylation of IGF2BP1 promotes oxaliplatin resistance in liver cancer [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 1932.
- [12] SHI Y, WU Z, LIU S, et al. Targeting PRMT3 impairs methylation and oligomerization of HSP60 to boost anti-tumor immunity by activating cGAS/STING signaling [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 7930.
- 330 [13] CHOI S, CHOI D, LEE Y K, et al. Depletion of Prmt1 in Adipocytes Impairs Glucose Homeostasis in Diet-Induced Obesity [J]. *Diabetes*, 2021, 70(8): 1664-78.
- [14] IWASAKI H. Activities of asymmetric dimethylarginine-related enzymes in white adipose tissue are associated with circulating lipid biomarkers [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2012, 4(1): 17.
- 335 [15] HAN H S, CHOI B H, JANG S Y, et al. Regulation of hepatic lipogenesis by asymmetric arginine methylation [J]. *Metabolism*, 2024, 157: 155938.
- 340 [16] PARK M J, KIM D I, LIM S K, et al. Thioredoxin-interacting protein mediates hepatic lipogenesis and inflammation via PRMT1 and PGC-1 α regulation in vitro and in vivo [J]. *J Hepatol*, 2014, 61(5): 1151-7.
- [17] HAN H S, CHOI D, CHOI S, et al. Roles of protein arginine methyltransferases in the control of glucose metabolism [J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2014, 29(4): 435-40.
- 345 [18] HUANG G, YE S, ZHOU X, et al. Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency network [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(9): 1741-57.
- [19] PARROTTA E I, SCALISE S, SCARAMUZZINO L, et al. Stem Cells: The Game Changers of Human Cardiac Disease Modelling and Regenerative Medicine [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22).
- 350 [20] AULICINO F, PEDONE E, SOTTILE F, et al. Canonical Wnt Pathway Controls mESC Self-Renewal Through Inhibition of Spontaneous Differentiation via β -Catenin/TCF/LEF Functions [J]. *Stem Cell Reports*, 2020, 15(3): 646-61.
- 355 [21] WANG S, HUANG H, XIANG H, et al. Wnt Signaling Modulates Routes of Retinoic Acid-Induced Differentiation of Embryonic Stem Cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(19): 1334-45.
- [22] BAIN L J, LIU J T, LEAGUE R E. Arsenic inhibits stem cell differentiation by altering the interplay between the Wnt3a and Notch signaling pathways [J]. *Toxicol Rep*, 2016, 3: 405-13.
- 360 [23] LIU C, PENG G, JING N. TGF- β signaling pathway in early mouse development and embryonic stem cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, 50(1): 68-73.
- [24] SIMANDI Z, CZIPA E, HORVATH A, et al. PRMT1 and PRMT8 regulate retinoic acid-dependent neuronal differentiation with implications to neuropathology [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(3): 726-41.
- 365

- [25] ZHAO H Y, ZHANG Y J, DAI H, et al. CARM1 mediates modulation of Sox2 [J]. PLoS One, 2011, 6(10): e27026.
- 370 [26] CHOI S, JO J, SEOL D W, et al. Regulation of Pluripotency-related Genes and Differentiation in Mouse Embryonic Stem Cells by Direct Delivery of Cell-penetrating Peptide-conjugated CARM1 Recombinant Protein [J]. Dev Reprod, 2013, 17(1): 9-16.
- 375 [27] TEE W W, PARDO M, THEUNISSEN T W, et al. Prmt5 is essential for early mouse development and acts in the cytoplasm to maintain ES cell pluripotency [J]. Genes Dev, 2010, 24(24): 2772-7.
- [28] DONG Q, ZHANG Q, YANG X, et al. Glycolysis-Stimulated Esrrb Lactylation Promotes the Self-Renewal and Extraembryonic Endoderm Stem Cell Differentiation of Embryonic Stem Cells [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(5).
- 380 [29] WU Q, BRUCE A W, JEDRUSIK A, et al. CARM1 is required in embryonic stem cells to maintain pluripotency and resist differentiation [J]. Stem Cells, 2009, 27(11): 2637-45.
- [30] SOLARI C, ECHEGARAY C V, LUZZANI C, et al. Protein arginine Methyltransferase 8 gene is expressed in pluripotent stem cells and its expression is modulated by the transcription factor Sox2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 473(1): 194-9.
- 385 [31] WANG Y, WANG C, GUAN X, et al. PRMT3-Mediated Arginine Methylation of METTL14 Promotes Malignant Progression and Treatment Resistance in Endometrial Carcinoma [J]. Adv Sci (Weinh), 2023, 10(36): e2303812.
- 390 [32] HSU S H, HUNG W C. Protein arginine methyltransferase 3: A crucial regulator in metabolic reprogramming and gene expression in cancers [J]. Cancer Lett, 2023, 554: 216008.
- [33] LIAO Y, LUO Z, LIN Y, et al. PRMT3 drives glioblastoma progression by enhancing HIF1A and glycolytic metabolism [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(11): 943.
- 395 [34] LEI Y, HAN P, CHEN Y, et al. Protein arginine methyltransferase 3 promotes glycolysis and hepatocellular carcinoma growth by enhancing arginine methylation of lactate dehydrogenase A [J]. Clin Transl Med, 2022, 12(1): e686.
- 400 [35] DING C H, YAN F Z, XU B N, et al. PRMT3 drives PD-L1-mediated immune escape through activating PDHK1-regulated glycolysis in hepatocellular carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2025, 16(1): 158.