文章编号:1000-5404(2006)06-0535-04

论著

5-aza诱导干细胞经乙酰化特异RNAi后心肌细胞发育相关基因检测

朱 静[1],邓 兵[1],王金菊[2],田 杰[2],王应雄[3] (重庆医科大学:[1]儿童医院儿科研究所,重庆市儿科学重点实验室,[2]儿童医院心血管内科,[3]公共卫生学院,重庆 400014)

提 要:目的 通过组蛋白乙酰化作用相关shRNA质粒转染5氮杂胞苷(5-azacytidine,5-aza)诱导后不同时间段间充质干细胞心肌发育基因的检测,探讨乙酰化修饰在干细胞特化心肌样细胞转录调控中的作用。**方法** 选择7条组蛋白乙酰化修饰关键因子Gcn5基因片段,用带有绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)基因的pGenesil-1作为载体,构建相应7个shRNA质粒。5-aza诱导大鼠间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)24 h、2、4、7 d,分别用重组shRNA质粒脂质体共转染后提取RNA,逆转录PCR检测Gcn5基因和心肌早期发育基因GATA4的表达。**结果** 经特异性限制性内切酶酶切分析和DNA序列测定,质粒构建与设计符合;各个时间段对照组Gcn5和GATA4均有表达,而实验组却无相应表达。**结论** 通过实验提示封阻干细胞染色质组蛋白乙酰化可以达到抑制干细胞特化心肌细胞转录过程的作用,这为进一步研究组蛋白末端乙酰化修饰与干细胞分化调节机制奠定实验室基础。

关键词:间充质干细胞;心肌细胞;乙酰化修饰;RNA干扰
中图法分类号:R322.11;R394-33;R394.8 **文献标识码**:A

Detection of cardiac development gene after RNA interference for histone acetylation to MSCs induced by 5-azacytidine

ZHU Jing[1], DENG Bing[1], WANG Jin-ju[2], TIAN Jie[2], WANG Ying-xiong[3] ([1]Pediatric Institute, [2]Department of Cardiovascular Diseases, Children's Hospital, [3]College of Public Health, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To construct 7 shRNA plasmids targeted to Gcn5 and to explore their role on histone acetylation in regulating MSCs differentiation into cardiomyocytes. **Methods** MSCs were isolated and passaged. Seven shRNA plasmids were constructed by pGenesil-1 (4.9 kb) vector with GFP gene. MSCs were treated with 10 μmol/L 5-azacytidine respectively for 24 h, 2, 4 and 7 d and transfected with the plasmids *via* lipofectamine™2000. Gcn5, as the marker of the acetylation, and GATA4, as the marker of cardiomyocytes, were detected in MSCs during differentiation with or without shRNA plasmids transfection by RT-PCR. **Results** MSCs were fibroblast-like but changed morphologically after induction. Seven Gcn5 shRNA plasmids were constructed and identified by restriction endonucleases *Pst* Ⅰ/*Sal* Ⅰ and DNA sequencing. The expression of Gcn5 and GATA4 could be detected in MSCs without shRNA plasmids tranfection, but no expression after shRNA plasmids transfection. **Conclusion** Gcn5 plays a very important role in MSCs differentiation into cardiomyocytes, which lays the basis for further research of the importance of acetylation in the regulation of cell differentiation.

Key words: mesenchymal stem cell; myocardial cell; acetylation; RNA interference

利用干细胞进行受损心肌修复,已经成为心血管疾病治疗的研究热点[1,2]。怎样才能保证种子细胞的定向分化,真正达到临床应用,除了必要的诱导因子的引入以外,是否可以从染色质组蛋白修饰的角度探讨可控转录通道的开关机制,以便利用表遗传修饰诱导更加完善的转录,表达所需功能蛋白,达到替代受损心肌细胞的最终目的。本研究基于这种构想,在体外诱导MSCs向心肌样细胞分化,并利用组蛋白乙酰基转移酶特异的shRNA质粒转染诱导细胞,以检测心肌发育相关基因的表达。从而明确乙酰化修饰作用在MSCs向心肌样细胞转化过程中所起的作用。

1 对象与方法

1.1 分离原代MSCs

参照Pittenger等[3]的方法,采用贴壁筛选法分离、培养并

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471837)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30471837)
作者简介:朱 静(1967-),女,四川省内江市人,博士研究生,副主任,检验师,主要从事儿科疾病分子遗传方面的研究。电话:(023)63612114,E-mail:zhujing310@yahoo.com.cn
收稿日期:2005-10-27;**修回日期**:2006-02-24

扩增成年大鼠 MSCs。取 8 周龄健康成年 Wistar 大鼠，水合氯醛过量麻醉后颈椎脱臼法处死，分离股骨与胫骨，剪除长骨两端以暴露骨髓腔，无菌注射器吸取培养基反复冲洗骨髓腔，收集入离心管，离心 1 000 r/min，10 min，弃上清，完全培养基重悬沉淀，接种入 50 ml 培养瓶，置入 37 ℃、5% CO_2 孵箱培养。36 h 后首次换液，以后每 3 d 换液，至 80% ~90% 融合时按 1∶2 传至第 4 代。

1.2 5-aza 诱导 MSCs

细胞在诱导前 1 d，用含血清及抗生素的培养基换液 1 次；吸出原培养基，加入含 5-aza 工作液（浓度 10 μmol/L），24 h 后，再用无 5aza 的血清浓度小于 10% 的完全培养基换液；以后每 3 d 换液 1 次。

1.3 shRNA 质粒构建和鉴定

针对组蛋白乙酰化酶转录辅激活酶 Gcn5 基因，选取处于编码 N-乙酰基转移酶功能蛋白（GNAT）和参与染色质重塑的转录因子两个区域的 7 条基因片段，由武汉晶赛生物工程技术有限公司合成 7 个编码 shRNA 的重组质粒，载体类型 pGenesil-1，结构：*BamH* Ⅰ + Sense + Loop + Antisense + 终止信号 + *Sal* Ⅰ + *Hind* Ⅲ寡核苷酸序列分别为：

ZJ1 AGGGCTTCACGGAAATCGT 1 814 ~1 832
ZJ2 CACGGAAATCGTCTTCTGT 1 821 ~1 839
ZJ3 GCACCCACCTGATGAATCA 1 874 ~1 892
ZJ4 AAGCTCTTTGTAGCCGACCTG 2 473 ~2 493
ZJ5 CAACTGCCGGGAGTACAAT 2 508 ~2 526
ZJ6 GCTACTATGTGACCCGGAA 2 456 ~2 474
ZJ7 GCTGTATACGACCGTCAAA 2 298 ~2 316

分别用 *Pst* Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 酶切重组质粒，并进行 DNA 测序鉴定。

1.4 shRNA 质粒脂质体质粒共转染

5-aza 诱导时间分别选取 24 h、2、4、7 d。将培养细胞 3 瓶为 1 组，随机分为实验组（共转染全部 7 个 shRNA）；试剂对照（转染通用的 dsRNA 质粒 HK）；阴性对照组（仅用 5-aza 诱导）。脂质体转染试剂购于 Invitrogen life tech。实验组 7 个质粒以同样的浓度共转染，根据转染流程的具体要求，进行质粒和脂质体比例的换算（用无血清培养基做基础液）并按相应量加入培养瓶，置 CO_2 培养箱（37 ℃，5% CO_2）6 h，换 DMEM 培养基（10% 血清），24 h 后，PBS 洗涤，用 Tripure RNA 提取试剂提取总 RNA。另外提取大鼠心肌组织作为检测阳性对照。

1.5 RT-PCR 检测 Gcn5/GATA4 的表达情况

1.5.1 引物设计与合成 选择 GCN5 基因中乙酰化酶合成高保守区设计引物；参照张文等[4]研究中的 GATA4 引物序列；β-actin 作为参照。各组引物序列见表 1 所示。

表 1 RT-PCR 引物序列及扩增片段长度

基因	引物序列	基因长度
GCN5	上游：5′- ctg gcc ttg atc aag gat-3′	248 bp
	下游：5′-acc ttg atg tcc ttg gag-3′	
GATA4	上游：5′-ctg tca tct cac tat ggg ca-3′	275 bp
	下游：5′-acc aag gtc ttg gca gcg at-3′	
β-actin	上游：5′-aca ctg tgc cca tct acg agg-3′	642 bp
	下游：5′-tca tac tgc tca ggc cgg gga-3′	（作为内参）

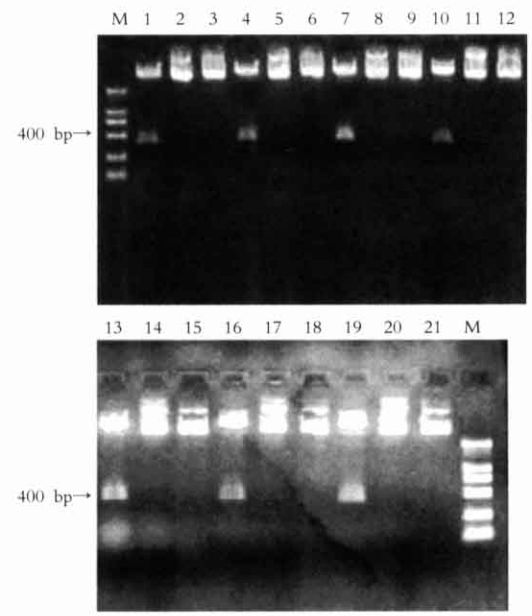
由华大基因-上海鼎安生物科技有限公司合成，扩增试剂 RNA PCR（AMV）Ver. 3.0 购置于宝生物基因工程有限公司。

1.5.2 逆转录 PCR 检测 针对实验组、试剂对照组、阴性对照组和心肌组织提取液阳性对照 RNA，进行逆转录 PCR，检测 Gcn5 和 GATA4 的表达。制备 cDNA 体系为：$MgCl_2$ 2 μl，DEPC 处理水 2.25 μl，5 × Buffer 1 μl，4 × dNTP（各 10 mmol/L）1 μl，OligdT 0.5 μl，RNAase 抑制剂 0.25 μl，AMV 逆转录酶 0.5 μl，RNA 2.5 μl，充分混合后，42 ℃ 30 min，产物可 -20 ℃保存备用。PCR 反应体系为：总体积为 50 μl，包括灭菌水 28.75 μl，10 × Buffer 10 μl，目的基因上游引物 0.5 μl，目的基因下游引物 0.5 μl，β-actin 上游引物 0.5 μl，β-actin 下游引物 0.5 μl，*Taq* 酶 0.25 μl（4 U），cDNA 10 μl。反应参数为：预变性 94 ℃ 4 min，变性 94 ℃ 30 s，退火 60 ℃ 30 s，延伸 72 ℃ 60 s，最后 72 ℃ 延伸 7 min。电泳分析扩增结果：制备 1.5% 琼脂糖凝胶，取 10 μl 扩增反应液上样电泳，EB 染色，凝胶图像分析系统采集图像并照相记录。

2 结果

2.1 经酶切、DNA 测序鉴定质粒

2.1.1 酶切鉴定 小量提取质粒，用 *Pst* Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 酶切，1% 琼脂糖凝胶电泳，见图 1 显示。质粒 Pgenesil-1 带有 *Pst* Ⅰ 酶切位点的，当插入目的基因片段之后，*Pst* Ⅰ 酶切位点被取代，故不能被 *Pst* Ⅰ 所酶切。其 pGenesil-1 的多克隆位点如下：*Hind* Ⅲ—*Xba* Ⅰ—*Sal* Ⅰ—*Pst* Ⅰ—*BamH* Ⅰ—U6 Promotor—*EcoR* Ⅰ—*Sal* Ⅰ—*Xba* Ⅰ—*Dra* Ⅲ 在插入的目的基因片段里，由于设计了 1 个 *Sal* Ⅰ 的酶切位点，插入在质粒 Pgenesil-1 的 *BamH* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ之间，如若插入正确，就能被 *Sal* Ⅰ 酶切出 1 条约 400 bp 的 DNA 小带。经酶切，重组质粒 ZJ11、ZJ21、ZJ31、ZJ41、ZJ51、ZJ61、ZJ71 均符合设计要求。



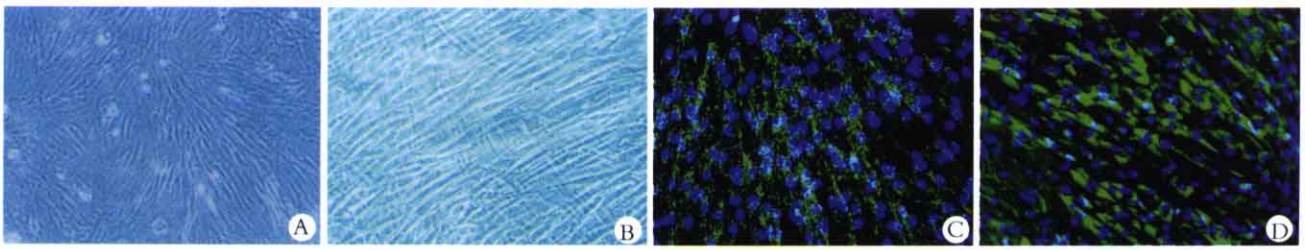
M：分子量标准 DL2000；1，4，7，10，13，16，19：*Sal* Ⅰ 酶切图谱；2、5，8，11，14，17，20：*Pst* Ⅰ 酶切图谱；3，6，9，12，15，18，21：1-7 号质粒图谱

图 1 质粒酶切电泳图谱

2.1.2　测序鉴定　　经测序，结果显示 7 条目的基因片段均装入 pGenesil-1 载体。

2.2　诱导前后 MSCs 的形态

相差显微镜观察，诱导前贴壁生长的细胞呈梭型，互相融合后，成纤维细胞样，通过传代，可以纯化细胞，整体显现均一的形态；诱导后，细胞形态出现体积增大，有棒状或球型改变，1 周时细胞之间有连接，排列方向趋于一致，图 2 中 A，B 显示；通过细胞免疫组化，检测心肌细胞特异性结构蛋白 MHC 和功能蛋白 Cx43，结果显示在 5-aza 诱导后，荧光显微镜 BX51TR-32FB3E01 检测，无论是心肌的结构蛋白还是功能蛋白均有极强的表达[4]（图 2C，D）。

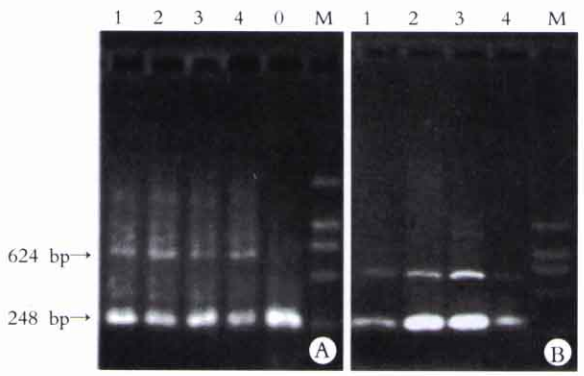


A：5-aza 诱导前的 MSCs（相差显微镜 ×200）；B：5-aza 诱导后 1 周的 MSCs（相差显微镜 ×200）；C：5-aza 诱导后的细胞免疫组化荧光显示 MHC 的表达（×200）；D：5-aza 诱导后的细胞免疫组化荧光显示 Cx43 的表达（×200）

图 2　MSCs 细胞形态观察

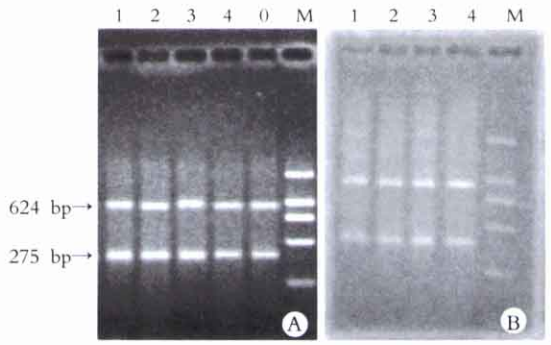
2.3　乙酰化作用基因 Gcn5 和心肌发育特异性基因 GATA-4 的表达

实验结果显示：心肌组织提取 RNA 经 RT-PCR 可以检测到 Gcn5 和 GATA4 基因的表达；试剂对照组和阴性对照组细胞，经 5-aza 诱导后，在实验选取的 4 个时间点所提取的 RNA 进行逆转录扩增，均能检测到 Gcn5 和 GATA4 特异的扩增带（图 3、4）。但是，实验组经 5-aza 诱导的 MSCs 在 24 h，2，4 d 和 7 d 4 个时间点分别进行乙酰化特异性 shRNA 转染，再进行 Gcn5 和 GATA4 逆转录基因扩增，均为阴性结果（图 5）。



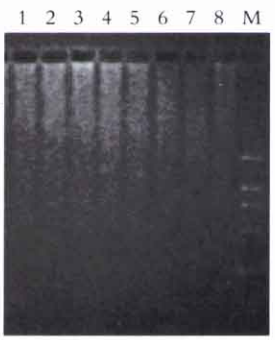
A：试剂对照组；B：阴性对照组；0：心肌组织提取 RNA 的 RT-PCR 结果；1，2，3，4：5-aza 诱导 24 h，2，4 d 和 7 d 后提取 RNA 的 RT-PCR；M：分子量标准

图 3　对照组 RT-PCR 检测基因 Gcn5 表达



A：试剂对照组；B：阴性对照组；0：心肌组织；1，2，3，4：5-aza 诱导 24 h，2，4 d 和 7 d 后提取 RNA RT-PCR 结果；M：分子量标准

图 4　对照组 RT-PCR 检测基因 GATA4 表达



1，2，3，4：5-aza 诱导 24 h，2 d，4 d 和 7 d 后提取 RNA RT-PCR 检测基因 Gcn5 表达结果；5，6，7，8：5-aza 诱导 24 h，2 d，4 d 和 7 d 提取 RNA RT-PCR 检测基因 GATA4 表达结果；M：分子量标准

图 5　实验组 Rt-PCR 检测相关基因的表达

3 讨论

表观遗传学(epigenetics)研究转录前基因在染色质水平的结构修饰对基因功能的影响,这种修饰可以通过细胞分裂和增殖周期进行传递。染色质核小体组蛋白可以共价修饰而发生乙酰化、甲基化和磷酸化,由此构成多种多样的组蛋白密码。组蛋白一旦发生乙酰化作用,DNA 的构型开始松解,转录因子得以和核小体中相应的顺式激活部位结合,同时,招募一类可与之结合的反式激活因子,启动基因转录,因此,有学者将乙酰化作为基因转录的标志[5]。本研究中将 Gcn5 基因作为 shRNA 阻断乙酰化作用的直接检测指标[6],通过乙酰化的特异性抗体识别靶蛋白的乙酰化形式,可以反映出靶蛋白的活性水平,达到研究蛋白功能和调节的目的。在 MSCs 诱导分化为心肌样细胞的过程中,受到各种细胞因子及基因的调控。目前研究表明转录因子 Nk2.5、GATA-4 对心脏的早期发育至关重要[7,8]。GATA-4 作为 GATA 转录因子家族的成员,具有两个锌指结构域,在心脏中特异表达,它除了直接参与调节心肌细胞结构基因和相关调控基因的表达以外,还可与几种心肌基因调控区域的基因结合,参与心肌细胞的分化过程,抑制 GATA-4 的生成或应用 RNA 干扰技术可使心肌细胞分化受阻。GATA-4 在心肌细胞发育的早期即出现表达,可促进正常心肌细胞的特化、分化和成熟。本课题组前期相关研究中已经证实:MSCs 经 5-aza 诱导分化为心肌细胞的过程中,有明显的表达,且强度和时间曲线相吻合,诱导后 1 d 表达开始增强,1 周达高峰,以后维持在高水平,显示在 MSCs 特化过程中有一定的调控作用,亦进一步证实 MSCs 已经向心肌细胞转化。RNA 干扰(RNA interference,RNAi)最主要的功能特色在于,它可以调节和关闭基因的表达,进而调控细胞的各种高级生命活动,近年来,RNAi 已被发展成为一个新的强有力的工具,在反向基因组学、基因治疗、抗病毒感染等方面显示出了巨大的潜力。本研究中,选择抑制的时间段在 1 ~ 7 d,从结果分析,对照组无论 Gcn5 还是 GATA4 基因均显示较强的表达,而一经转染 shRNA 质粒,即无法检测到相应基因的表达,提示在转录的调节中,乙酰化转移酶修饰组蛋白活性的招募有其特异的作用。理论上推测[9-11],转录活性时染色质应处于舒展状态,而此时,如果阻断参与转录启动的活性因子复合物的链接,抑制子蛋白与核小体的相互作用从沉默子元件扩延,出现与复合物竞争 DNA 上的结合位点,导致转录停滞。因此,整合在基因调节过程中的激活或抑制元件通过不同的修饰机制,对基因进行正负调节,控制着转录通道,对细胞的分化显现一定的作用。本研究利用 shRNA 特异阻断招募蛋白链接中的乙酰化转移酶关键因子 Gcn5,从实验结果提示对照表达的心肌细胞早期发育基因 GATA4 无表达,这对我们在利用诱导干细胞移植修复受损心肌组织的临床应用有及其重要的意义。

参考文献:

[1] REINLIB L, FIELD L. Cell transplantation as future therapy for cardiovascular disease: A workshop of the National Heart, Lung, and Blood Institute [J]. Circulation, 2000, 101(18): E182 - E187.

[2] GULBINS H, MEISER B M, REICHENSPURNER H, *et al*. Cell transplantation--a potential therapy for cardiac repair in the future [J]? Heart Surg Forum, 2002, 5(4): E28 - E34.

[3] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143 - 147.

[4] 张 文, 田 杰, 江德勤, 等. 骨髓间充质干细胞体外分化为心肌样细胞相关调控基因的时序表达[J]. 中华心血管病杂志, 2004, 32(11): 1004 - 1008.

[5] FLETCHER T M, HANSEN J C. The nucleosomal array: structure/function relationships [J]. Crit Rev Eukaryote Gene Expr, 1996, 6(2-3): 149 - 188.

[6] BROWNELL J E, ZHOU J, RANALLI T, *et al*. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast GCN5p linking histone acetylation to gene activation[J]. Cell, 1996, 84(6): 843 - 851.

[7] VENTURA C, MAIOLI M. Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent stem cells[J]. Circ Res, 2000, 87(3): 189 - 194.

[8] NEMER G, NEMER M. Regulation of heart development and function through combinatorial interactions of transcription factors [J]. Ann Med, 2001, 33(9): 604 - 610.

[9] KINGSTON R E, BUNKER C A, IMBALZANO A N. Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure[J]. Gnnes Dev, 1996, 10(8): 905 - 920.

[10] VOLPE T A, KIDNER C, HALL I M, *et al*. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi[J]. Science, 2002, 297(5588): 1833 - 1837.

[11] HALL I M, SHANKARANARAYANA G D, NOMA K, *et al*. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain[J]. Science, 2002, 297(5590): 2232 - 2237.

(编辑 陈聪连)