文章编号:1000-5404(2008)04-0303-04

论著

干扰组蛋白乙酰化引发间充质干细胞心肌定向分化特定蛋白的异常表达

朱 静[1],冯 川[2],李 莉[2],邓 兵[1],田 杰[2],张晓萍[1] (重庆医科大学:[1]儿科研究所,[2]儿童医院心血管内科,重庆 400014)

摘 要:目的 利用组蛋白乙酰化修饰关键因子 Gcn5 shRNA 重组质粒转染经 5-氮杂胞苷(5-azacytidine,5-aza)诱导后的间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)并检测心肌早期发育相关结构和功能蛋白表达情况,探讨组蛋白乙酰化修饰在 MSCs 定向分化过程中的调控作用。**方法** ①以组蛋白乙酰化修饰关键因子 Gcn5 为靶点,用带绿色荧光蛋白(green fluorescence protein,GFP)基因的 pGenSil-1 作为载体,构建 Gcn5 shRNA 质粒。②MSCs 体外扩增,5-aza 诱导后,不同的时间点用脂质体包载 Gcn5 shRNA 共转染大鼠 MSCs,24 h 后相差显微镜下观察细胞生长状况,电镜下观察染色质的形态变化,采用 Western blot 法分别检测 Gcn5、心肌结构重链蛋白(myosin heavy chain,MHC)和连接蛋白(Connexin 43,Cx43)的表达状况。**结果** 电镜示经通用阴性质粒 HK 转染的 MSCs 细胞,形态与正常 MSCs 无明显差别,染色质仍以边集状态为主;经干扰质粒转染的 MSCs 细胞在形态上与正常 MSCs 细胞无明显差别,但其染色质出现明显的浓缩紧密现象。以 β-actin 为内参,比较干扰组和阴性对照组 Gcn5、Cx43、MHC 蛋白,计算出沉默效率分别为 86%、58% 和 67%。**结论** 转染 Gcn5 shRNA 质粒可干扰组蛋白乙酰化平衡,进而影响 MSCs 体外分化中心肌发育特定蛋白的表达。

关键词: 乙酰化修饰;RNA 干扰;质粒;间充质干细胞;分化
中图法分类号: R329.2;R341;R394.3 **文献标识码:** A

ShRNA on histone acetylation induces unusual cardiac-specific protein expression in MSCs differentiation into cardiomyocytes

ZHU Jing[1], FENG Chuan[2], LI Li[2], DENG Bing[1], TIAN Jie[2], ZHANG Xiao-ping[1] ([1]Pediatric Research Institute, [2]Department of Cardiology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To construct recombinant plasmid that can inhibit acetyltransferase Gcn5 expression through RNA interference, then transfect it into MSCs induced by 5-azacytidine (5-aza), and analyze the role of acetylases in the process of MSCs differentiation. **Methods** MSCs were isolated from bilateral thigh bones and tibias of Wistar rats, then treated with 5-aza. Gcn5 shRNA recombinant plasmid vector was transfected into MSCs *via* lipofectin. The expressions of Gcn5, myosin heavy chain (MHC) and Connexin 43 (Cx43) were investigated by Western blot. **Results** Under electron microscope, MSCs transfected with Gcn5 shRNA recombinant plasmid displayed obvious heterochromatin, but MSCs and MSCs transfected HK plasmid showed euchromatin. The expressions of Gcn5, Cx43 and MHC decreased significantly after Gcn5 shRNA recombinant plasmid transfection. Taking β-actin as inner criterion, the silent ratio of Gcn5, MHC and Cx43 were 86%, 58% and 67%, respectively. **Conclusion** The Gcn5 shRNA plasmids we constructed block acetylation during the process of MSCs differentiation into cardiomyocytes. Acetylation plays a very important role in the regulation of MSCs differentiation.

Key words: acetylation; RNA interference; plasmid; mesenchymal stem cells; differentiation

如何高效率地诱导间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)定向分化,其调控的因素十分复杂,其中起着关键作用的是哪些环节?本课题组前期从心肌发育相关基因的角度进行了干细胞定向分化的微环境研究[1-4],并成功构建了组蛋白乙酰化酶作用关键因子 Gcn5 shRNA 干扰质粒[5]。本研究基于前期研究,通过检测 Gcn5 shRNA 干扰 5-氮杂胞苷(5-azacytidin,5-aza)诱导的 MSCs 后染色质的变化以及组蛋白乙酰化酶、心肌发育相关蛋白的表达,探讨干细胞定向分化中乙酰化修饰所起的作用,进而找寻参与干细胞定向分化的"开关"关键因子及其相互作用,最终达到干预调节分化,为 MSCs 作为替代治疗的种子细胞的相关研究奠定可靠的实验基础。

基金项目: 国家自然科学基金(30471837)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30471837)
作者简介: 朱 静,女,四川省内江市人,博士,副研究员,主要从事分子遗传学方面的研究,发表论文 20 余篇。电话:(023)63630294,E-mail:zhujing310@yahoo.com.cn
收稿日期: 2007-09-14;**修回日期:** 2007-12-12

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 Wistar 大鼠,体质量 180 ~ 200 g,雌雄不限,购于重庆医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 Lipofectamine™ 脂质体(Invitrogen, 美国),Nuclear Extract Kit(深圳晶美),PVDF 膜(北方同正生物技术有限公司),化学发光试剂盒(Santa Cruz,美国)。

1.2 方法

1.2.1 MSCs 纯化、扩增、定向诱导 8 周龄健康成年 Wistar 大鼠,分离股骨与胫骨骨髓,培养、纯化原代 MSCs 细胞,传至第 3 代,进行 5-aza 诱导。在诱导前 1 d,用含血清及抗生素的培养基 DMEM 换液 1 次;吸出原培养基,加入含 5-aza 工作液(100 μmol/L)及等体积血清、抗生素的培养基;24 h 后,再用无 5-aza、血清浓度小于 10% 的完全培养基换液;以后每 3 天换液 1 次。

1.2.2 脂质体 shRNA 质粒共转染 根据本课题组已有的研究[1],选定转染时间点为诱导后 24 h、2 d、4 d、7 d,对 MSCs 进行脂质体 shRNA 质粒共转染:以转染 HK 为阴性对照组,7 条质粒相等终浓度比混合作为实验组;根据 Lipofectamine™ 脂质体使用说明书和转染流程的具体要求,进行质粒和脂质体比例的换算;将 2 种混合液充分混匀后,室温放置 20 min,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),再培养 24 h 后,进行后续分析。

1.2.3 电镜观察细胞染色质的状态 选取质粒转染前后的 MSCs 细胞,胰酶消化后,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;加入无血清的基础培养基悬浮细胞,转入 Eppendorf 管,2 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,戊二醛固定,送重庆医科大学电镜室检测。

1.2.4 Western blot 法测定干扰后心肌发育相关蛋白沉默效率

利用 Nuclear Extract Kit,提取阴性对照组和实验组培养瓶中细胞核蛋白,经过不连续凝胶电泳、半干法转膜、杂交、化学发光显色等步骤进行 Western blot 分析,最后利用 UVI 光密度扫描仪测定出 Gcn5、连接蛋白(Connexin 43, Cx43)、心肌结构重链蛋白(myosin heavy chain, MHC)和 β-actin 各图像的峰面积,以 β-actin 为内参,比较干扰组和阴性对照组的结果,计算出各自的沉默效率。

2 结果

2.1 MSCs 纯化、扩增后 5-aza 诱导

对经过骨髓腔冲洗获得的细胞进行培养,4 h 后可见 MSCs 贴壁,其中悬浮的圆形细胞为幼稚的红细胞。24 h 后大部分的 MSCs 均已贴壁,其形态为梭形或短棒状,经过几次换液,大部分血细胞被弃掉,而 MSCs 形态则变为典型的梭形或纤维状,立体感强,折光性好。传至第 4 代,整个视野细胞形态均一,呈成纤维细胞样,几乎无折光性(图 1)。用 5-aza 诱导后 2 周,相差显微镜示细胞体积明显增大,集落内部细胞之间和邻近集落细胞之间出现连接,排列方向趋于一致(图 2)。

2.2 电镜下观察细胞染色质的状况

经通用阴性质粒 HK 转染的 MSCs 细胞(图 3B),其形态与正常 MSCs(图 3A)无明显差别,染色质仍以边集状态、常染色质为主;经干扰质粒转染的 MSCs 细胞(图 3C)在形态上与正常 MSCs 细胞无明显差别,但其染色质出现明显的浓缩紧密现象,以异染色质为主。

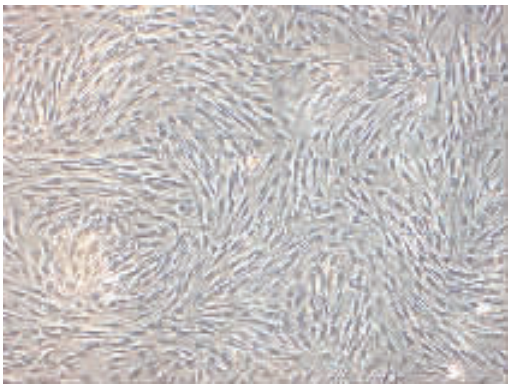


图 1 第 4 代 MSCs 形态学观察 (相差显微镜 ×200)

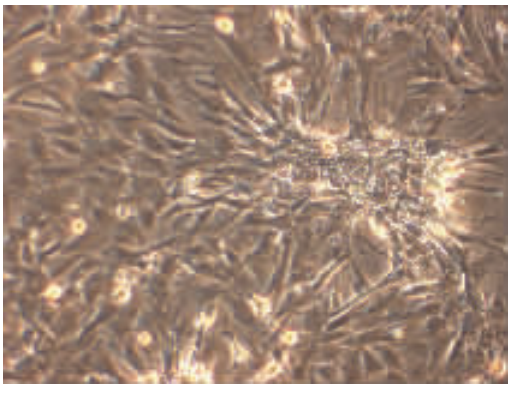
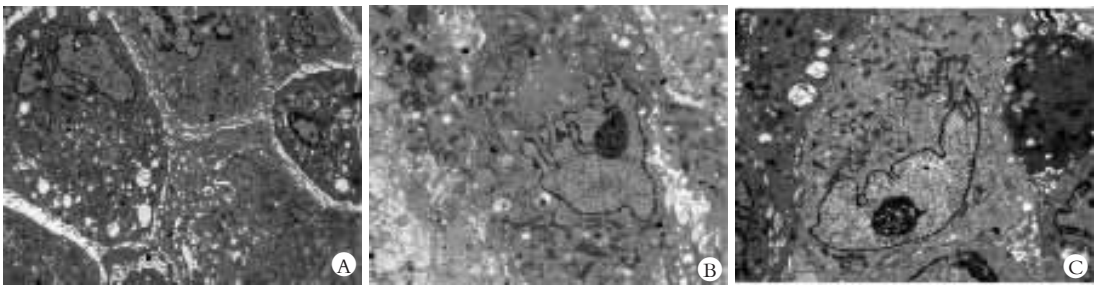


图 2 MSCs 经 5-aza 诱导后的形态 (相差显微镜 ×200)

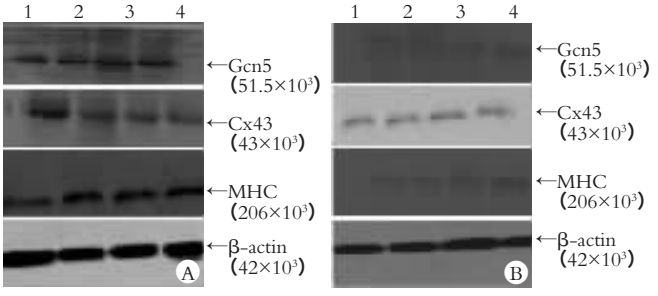


A:正常对照组,未做任何干扰的 MSCs (×4 000);B:阴性对照组,转染通用质粒 HK 的 MSCs (×6 000);C:实验组,转染干扰质粒的 MSCs(×6 000)

图 3 各组 MSCs 电镜观察

2.3　Western blot 法测定干扰后心肌发育相关蛋白异常表达

MSCs 经 5-aza 诱导 24 h、2 d、4 d、7 d 后进行脂质体质粒共转染,24 h 后提取核蛋白经 Western blot、化学发光图像分析。实验组和阴性对照组比较,Gcn5、Cx43、MHC 条带显示有明显减弱(图 4)。利用 UVI 光密度扫描仪测定出 Gcn5、Cx43、MHC 和 β-actin 各图像的峰面积,以各组 β-actin 为内参,计算出 Gcn5、Cx43、MHC 蛋白表达的沉默效率分别为 86%、58% 和 67%。



A：阴性对照组；B：实验组　1～4：分别为诱导后 24 h、2 d、4 d、7 d

图 4　2 组心肌发育相关蛋白 Western blot 检测结果

3　讨论

本研究前期从 GenBank 中查找到 Gcn5 mRNA,根据功能划分,选取处于两个区域“Acetyltransferase (GNAT) family”和“chromatin remodeling”的 7 条基因片段作为靶点,经过 BLAST 软件进行同源性分析后,成功构建针对组蛋白乙酰化酶转录辅激活酶 Gcn5 基因 7 个编码 shRNA 质粒。载体类型选用带有绿色荧光蛋白 GFP 的 pGenSil-1。以通用阴性对照 dsRNA 质粒 HK 作为实验阴性对照[5]。

MSCs 具有多能干细胞的特点,并含有完整的遗传物质,在一定条件下可能表达其他体细胞特异性蛋白,并定向分化。启动信号提供给 MSCs 后,引起调控 MSCs 分化的关键基因表达改变,决定干细胞的定向分化方向[6]。新近研究表明组蛋白尾部的修饰作用是一种染色质结构调控蛋白结合的“识别信号”[7,8]。它可以通过影响组蛋白与 DNA 双链的亲和性来改变染色质的疏松或凝聚状态,调控 DNA 的静止、复制及转录程序;或通过影响其他转录因子与结构基因启动子的亲和性发挥基因调控的作用,因此有人将组蛋白编码称之为“第二套遗传密码”。常见的有组蛋白的磷酸化、甲基化、乙酰化、泛素化等,其中尤以乙酰化和去乙酰化平衡为典型,甚至有人认为核小体组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase,HAT)中 N 末端区域上保守的 Lys 的乙酰化是染色质具有转录活性的标志之一。

研究提示[9]:组蛋白甲基化修饰和乙酰化平衡常常为协同作用。当 Bdnf 等一些调控突触可塑性基因的启动子被甲基化时,甲基结合蛋白如 MeCP2 等可以识别并结合在这些启动子上,与甲基化转移酶(DNMT1)、组蛋白去乙酰化酶(HDAC1/2)、组蛋白甲基化转移酶(HMT)以及转录协同抑制子(sin3A)形成抑制转录复合体,修饰染色质形成非转录结构。

MHC 是心脏特异的组成性蛋白,在心脏发育的过程中受到基因 GATA4 的调控而表达,对心脏的形成有极其重要的作用。Cx43 是哺乳动物心脏中最主要的连接蛋白,它不仅对心脏电传导功能的建立具有重要作用,而且可以介导与细胞迁移、分化、增生和器官形成有关的信号物质,在胚胎发育中起重要作用。有研究表明,Cx43 缺陷将导致先天性心脏病的发生[10]。

资料显示[11,12],转录活性时染色质应处于舒展状态,当 siRNA 进入细胞内引起一系列 RNA 降解的级联反应,尽管 RNA 已经出现不同程度的降解,在 RT-PCR 过程基因特异性引物仍然有可能寻找到同源序列并且扩增,但总体来讲,对相应蛋白的表达都会出现有效的抑制。本研究结果,乙酰化作用特异 shRNA 质粒转染后,直接干扰了乙酰化转移酶蛋白的表达,推测是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,对心肌细胞的分化显现一定的抑制作用。

本研究设计的质粒靶向序列选择了 HAT 中 GNAT 超家族 Gcn5 亚基 2 个特定区域,主要功能集中对核心组蛋白分子 N-末端 25～40 个氨基酸范围内的赖氨酸残基进行乙酰化修饰[13,14],由此导致染色质空间构象的改变,使转录启动必需的因子无法在空间上形成接触,导致整个转录的沉默。所以,乙酰化修饰特异的 RNA 干扰带来的并不仅仅是对应基因表达的抑制,更重要的是其“瀑布效应”,引起其后发生的细胞分化作用的停滞,这为将来的研究设计提供了一个模板,特别对于先天性疾病发生的机制、程度、部位的差异等研究拓展了一条可用的途径。

参考文献:

[1] 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.

[2] 江德勤, 田　杰, 白永虹, 等. 骨髓间充质干细胞移植对心力衰竭大鼠心肌结构和功能的影响[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(6): 617－622.

[3] 吕铁伟, 田　杰, 朱　静, 等. 骨髓间充质干细胞体内诱导分化为心肌细胞的实验研究[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(2): 197－203.

[4] 朱　静, 邓　兵, 王金菊, 等. 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[J]. 第三军医大学学报,

2006, 28(6): 535 - 538.
[5] 朱 静, 王应雄, 张晓萍, 等. Gcn5基因shRNA的载体构建及其对干细胞分化中组蛋白乙酰化修饰的干扰作用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2006, 23(1): 43 - 46.
[6] Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering [J]. Artif Organs, 2001, 25(3): 187 - 193.
[7] 罗惠霞, 王玉炯. 组蛋白乙酰化/去乙酰化在真核基因转录调控中的作用[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(2): 19 - 21.
[8] Bu P, Evrard Y A, Lozano G, *et al*. Loss of Gcn5 acetyltransferase activity leads to neural tube closure defects and exencephaly in mouse embryos[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(9): 3405 - 3416.
[9] Kikuchi H, Barman H K, Nakayama M, *et al*. Participation of histones, histone modifying enzymes and histone chaperones in vertebrate cell functions[J]. Subcell Biochem, 2006, 40: 225 - 243.
[10] 张 陈, 黄国英. Cx43、心脏发育与先天性心脏病[J]. 国外医学: 遗传学分册, 2003, 26(1): 31 - 34.
[11] Shukla A, Bajwa P, Bhaumik S R. SAGA-associated Sgf73p facilitates formation of the preinitiation complex assembly at the promoters either in a HAT-dependent or independent manner *in vivo*[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(21): 6225 - 6232.
[12] 杜梅君, 刘德培, 梁植权. RNA干扰与染色质沉默——生物体内精密的网络调控机制[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(3): 204 - 208.
[13] Schuetz A, Bernstein G, Dong A, *et al*. Crystal structure of a binary complex between human GCN5 histone acetyltransferase domain and acetyl coenzyme A[J]. Proteins, 2007, 68(1): 403 - 407.
[14] Knoepfler P S, Zhang X Y, Cheng P F, *et al*. Myc influences global chromatin structure[J]. EMBO J, 2006, 25(12): 2723 - 2734.

(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)04-0306-01

双源螺旋CT冠状动脉成像扫描的护理

刘丽娟,王 霞,胡珊珊,刘 畅 (第三军医大学西南医院放射科,重庆 400038)

CT冠状动脉成像是无创伤性检查,双源螺旋CT是目前冠状动脉成像的最佳设备[1]。要发挥双源螺旋CT在冠状动脉成像方面的最大优势,消除不利因素的影响,使患者能主动配合检查,护理工作特别重要。现将我们的护理体会报告如下。

1 资料与方法

1.1 主要仪器

西门子64层双源螺旋CT,型号:SIEMENS SOMATOM Definition;双筒高压注射器,型号:MeoRao STELLANT。

1.2 受试对象

选取本院2007年7-9月疑有冠状动脉粥样硬化的心脏病患者100例,由心血管内科和老年科送检。其中男性65例,女性35例,年龄35~81岁。

1.3 方法

安放电极:右上电极(红色)放右锁骨中线,左上电极(黄色)放左锁骨中线,左下电极(绿色)放心尖处,右下电极(黑色)放右锁骨中点下方第10肋弓处。选择R波高的导联为门控心电图,以利于R波的检测以及图像后期处理。呼吸训练:训练患者平静呼吸状态下闭气,观察心电图的变化,调整呼吸动度,选择合适的吸气程度和闭气时机。静脉穿刺[2]:用16 G静脉输液留置针,穿刺肘部头静脉、贵要静脉或肘正中静脉,以利于造影剂快速流入心脏。扫描前5~10 min,舌下含硝酸甘油片0.5 mg,以利于冠状动脉扩张。试注射:注射生理盐水20 ml,注射速度6 ml/s。用食指轻压针尖前方目标血管的皮肤,指尖有液体流动感。观察进针处无异常,手指触摸无硬结,表示试注射成功。注射碘剂造影剂:注射非离子造影剂(碘的质量浓度37 g/100 ml),注射速度5~6 ml/s,每例患者注射总量50~70 ml。随后以相同速度注射生理盐水50 ml。我们应告之患者注射造影剂过程中,全身有发热感,属正常现象。

1.4 留置观察

扫描完成后,立刻观察患者有无药物反应。保留静脉输液留置针,观察15 min,预防造影剂延迟反应,以方便抢救。拔针后,用棉签轻压注射处10 min,防止静脉穿刺处渗血。

2 结果

在100例冠状动脉成像中,有96例成功,图像质量优良,4例失败。其中2例造影剂部分渗漏皮下,冠状动脉内造影剂不足,造成冠状动脉与心肌的密度差较小,不能形成足够的对比;另1例患者呼吸控制较差,冠状动脉错层不连续;还有1例患者由于配合不当,导致成像失败。

3 讨论

3.1 冠状动脉成像

参照文献[3]进行,用高压注射器快速静脉注射造影剂,冠状动脉灌注充盈,心肌与冠状动脉形成高对比,双源螺旋CT在5~7 s完成数据采集,利用三维软件获得三维优良图像。与数字减影相比,CT冠状动脉成像具有无创伤性的优点,冠状动脉更接近生理状态。

3.2 冠状动脉成像的护理

3.2.1 身体护理 护士要搀扶患者上下检查床,帮助调整体位,身体各部位既要放置舒适,又要有利于检查的进行。

(下转309页)

作者简介:刘丽娟,女,重庆市人。电话:(023)68754424,E-mail: daimd@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2007-10-16;修回日期:2007-11-15