文章编号:1000-5404(2010)08-0735-04

论著

RNA 解旋酶 p68 在真皮多能干细胞增殖调控中的作用

王少军[1],粟永萍[1],刘知人[1,2],史春梦[1] (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆市纳米医药工程技术研究中心[1];30303 USA Atlanta Georgia, Georgia State University, Department of Biology[2])

[摘要] **目的** 研究 RNA 解旋酶 p68 在真皮多能干细胞(dermal multipotent stem cells, DMSCs)增殖过程中的表达特点,并探讨其在创伤愈合中的意义。**方法** 通过免疫细胞化学和 Western blot 方法检测 p68 在 DMSCs 不同生长状态的表达特点,早期伤口液刺激对 DMSCs 中 p68 表达的影响并通过 MTT 法检测 DMSCs 增殖的变化,进一步通过 RNAi 抑制 p68 表达之后检测细胞增殖的变化特点。**结果** 增殖活跃的 DMSCs 中 p68 表达较强,饥饿以后,p68 表达降低;伤后 1 d 伤口液可明显促进 DMSCs 中 p68 的表达及细胞增殖($P<0.01$);RNAi 抑制 p68 表达之后 DMSCs 增殖明显受抑($P<0.01$)。**结论** RNA 解旋酶 p68 参与 DMSCs 的增殖调控,创伤微环境在修复细胞的启动中可能发挥作用。

[关键词] RNA 解旋酶 p68;真皮多能干细胞; 创伤愈合; 伤口液
[中图法分类号]R322.991;R329.28;R394.3 **[文献标志码]** A

RNA helicase p68 is involved in proliferation regulation of dermal multipotent stem cells

Wang Shaojun[1], Su Yongping[1], Liu Zhiren[1,2], Shi Chunmeng[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing Engineering Research Center for Nanomedicine, Chongqing, 400038; [2]Department of Biology, Georgia State University, Atlanta, Georgia 30303, USA)

[Abstract] **Objective** To study the function of RNA helicase p68 in the proliferation of dermal multipotent stem cells (DMSCs). **Methods** The expression of p68 protein in DMSCs at different growth states and pre-treated with wound fluid was detected by immunocytochemical assay and Western blot analysis. After the down-regulation of p68 expression by sequence specific siRNA, the proliferation of DMSCs was evaluated by MTT assay. **Results** p68 expression was higher in DMSCs of exponential growth than that of cells in contact inhibition. The wound fluid induced the p68 expression and proliferation of DMSCs. When p68 was down-regulated by siRNA, the proliferation of DMSCs was significantly inhibited. **Conclusion** The expression of p68 in DMSCs is involved in the regulation of DMSCs proliferation, and the microenvironment of wound may play a crucial role in the initiation of proliferation of wound repair cells.

[Key words] RNA helicase p68; dermal multipotent stem cells; wound repair; wound fluid

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2005CB522605), the Foundation for Excellent Doctoral Dissertation of China (200777); the National Natural Science Foundation of China (30870966), and the Intramural Funding from State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury (SKLLZZ200810). Corresponding author: Shi Chunmeng, Tel: 86-23-68752280, E-mail: shicm1010@yahoo.com.cn

真皮多能干细胞(dermal multipotent stem cells, DMSCs)具有多向分化潜能性,是创伤修复启动过程中的一种重要的、较为原始的间充质干细胞,对其早期启动的机制深入研究有望为阐明创伤修复的分子机制提供重要依据[1-4]。创伤修复启动前,组织修复相关细胞多处于静息状态,在创伤微环境作用下,这些组织修复细胞出现特异性基因表达,通过多种途径启动组织修复过程,并通过增殖、迁移、分化等途径参与创伤修复过程[5]。RNA 解旋酶 p68 是细胞转录过程中必需的核转录激活因子,在转录、翻译、核糖体发生和 RNA 传递等众多生物过程中起调控作用。p68 还具有很多新的生物学功能(如与组织的发育、分化、成熟密切相关)[6]。文献[7]提示 RNA 解旋酶 p68 可能在创伤愈合中发挥作用。因此,本实验以前期分离培养的具有多向分化潜能的 DMSCs 为基础,进一步研究 RNA 解旋酶 p68 在 DMSCs 增殖过程中的作用,探讨 DMSCs 参与创伤修复的早期启动机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

采用本室前期分离建系的具有多向分化潜能的 DMSCs 用

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划,2005CB522605);教育部高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金(200777);国家自然科学基金(30870966);创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室自主研究课题(SKLZZ200810)

[通信作者] 史春梦,电话:(023) 68752280, E-mail: shicm1010@yahoo.com.cn

于研究[3]。细胞培养体系为含100 ml/L的胎牛血清和标准双抗的IMDM培养基,上述细胞培养试剂均购自HyClone公司。细胞以1×10^5/ml的密度传至预先放入圆玻璃爬片的孔板内,分别在指数增长期和发生接触抑制的平台期以4%中性甲醛固定细胞爬片,同时提取相应时间的细胞总蛋白,用于检测p68蛋白。

1.2 大鼠皮肤伤口液的分离

参考文献[8]的方法,6只3月龄SPF级SD大鼠由第三军医大学实验动物中心提供,雌雄不拘,体质量(200±20)g;经3%戊巴比妥钠麻醉后,在背部脊柱两侧制备6 cm长的皮肤全层切口,植入蒸汽灭菌的海绵条块,缝合切口。伤后1 d取出海绵条,收获组织液,2 500 r/min离心10 min,取上清过滤除菌,即为伤后1 d的伤口液,冻存于-20 ℃备用。

1.3 伤口液对DMSCs增殖的影响

DMSCs接种培养于96孔板,每孔细胞数量为1×10^4;伤口液作用前,先用含0.1%血清的IMDM培养基对细胞进行血清饥饿培养48 h,使细胞同步化[9],而后分别换为含1%、5%和10%伤口液的IMDM培养基;每个浓度设6个孔,对照仍为含0.1%血清的IMDM培养基,在37 ℃、含CO_2(体积分数为5%)的孵箱中培养24 h;CCK-8试剂盒(碧云天)检测伤口液刺激细胞增殖情况以检测伤口液对DMSCs的反应性。

1.4 伤口液刺激p68表达

DMSCs以1×10^5/ml的密度接种于预先放入灭菌的圆玻璃爬片的孔板内,12 h后细胞换用含0.1%血清的IMDM培养基对细胞进行无血清饥饿,正常对照组的细胞培养条件为含10%血清的IMDM培养基。细胞饥饿48 h后换以含有10%伤口液的IMDM培养基,应用免疫细胞化学技术和Western blot检测伤口液刺激0、2、16 h及24 h后p68表达变化情况。

1.5 免疫细胞化学法(S-P法)检测p68蛋白的表达

按照试剂盒说明书步骤进行免疫细胞化学显色:0.01 mol/L PBS漂洗细胞爬片;3% H_2O_2封闭,室温30 min,漂洗后5%正常山羊血清封闭,室温30 min;滴加兔抗p68多抗(1∶200稀释,由美国佐治亚州立大学生物系刘知人教授馈赠),4 ℃冰箱过夜;漂洗后滴加山羊抗兔IgG抗体-HRP多聚体,37 ℃孵育0.5 h,漂洗后DAB显色1 min,自然风干后梯度酒精脱水,二甲苯透明,DPX封片,采集图片。

1.6 Western blot检测p68蛋白的表达

按照RIPA试剂盒说明书(Pierce公司)操作步骤提取细胞总蛋白,取等量标准化后的蛋白溶液加入等体积的2×SDS上样缓冲液并沸水煮5 min变性。取25 μl变性的蛋白溶液,行SDS-聚丙烯酰胺凝胶(5%积层胶和10%分离胶)电泳,并以半干电转膜仪将蛋白转移至PVDF膜上,以5% BSA封闭,加一抗(1∶3 000兔抗p68多抗,1∶5 000小鼠抗β-actin单抗)及二抗(羊抗兔IgG-HRP,羊抗小鼠IgG-HRP)行免疫印迹检测,ECL试剂盒发光,胶片曝光。

1.7 RNAi抑制p68表达对DMSCs增殖的影响

参考文献[10]合成p68 siRNA序列(正义链,5′-GCAAGUAGCUGCUGAAUAUUU-3′,反义链,5′-pAUAUUCAG-CAGCUACUUGCUU-3′)。DMSCs传至6孔板,待细胞长满50%时按照Invitrogen公司Lipofectin 2000的说明书开始转染siRNA,浓度为100 nmol/L,同时设空白转染组为对照组,转染24 h后提取细胞蛋白检测抑制效率。同时检测DMSCs检测增殖情况,DMSCs以1×10^4个/孔传至96孔板,接种12 h后开始转染siRNA,同时设空白转染组为对照组,每组6个孔,转染24 h后CCK-8试剂盒检测细胞增殖情况。

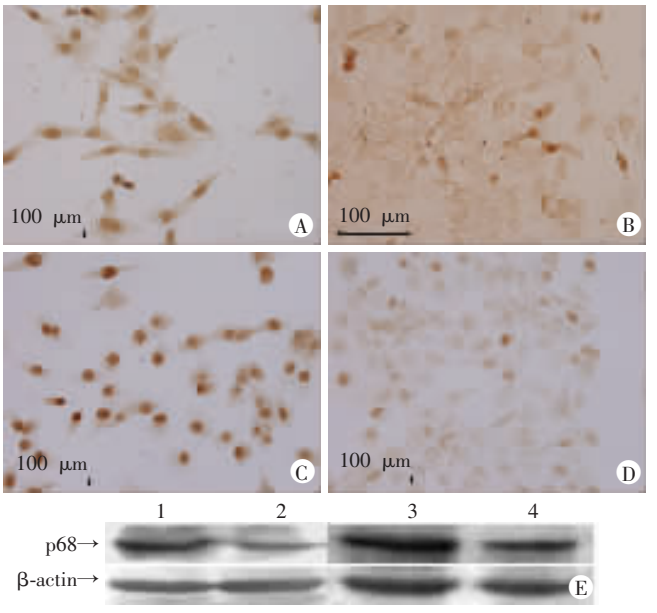
1.8 统计学处理

采用SPSS 16.0统计软件,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,伤口液刺激DMSCs增殖及RNAi抑制DMSCs增殖行独立样本t检验。

2 结果

2.1 p68表达与DMSCs增殖状态的关系

DMSCs体外培养时形态主要为梭形,RNA解旋酶p68蛋白主要定位在DMSCs的细胞核,且表达强度与细胞所处的增殖状态有关。p68在处于增殖活跃的指数增长期DMSCs中的表达水平明显高于发生接触抑制的平台期DMSCs(图1A、B、E)。与正常培养的DMSCs相比较,血清饥饿培养后细胞形态未发生明显变化,p68表达明显下降,说明p68的表达与细胞增殖有关(图1C、D、E)。p68的表达水平改变可能与创伤修复过程的细胞增殖有关。



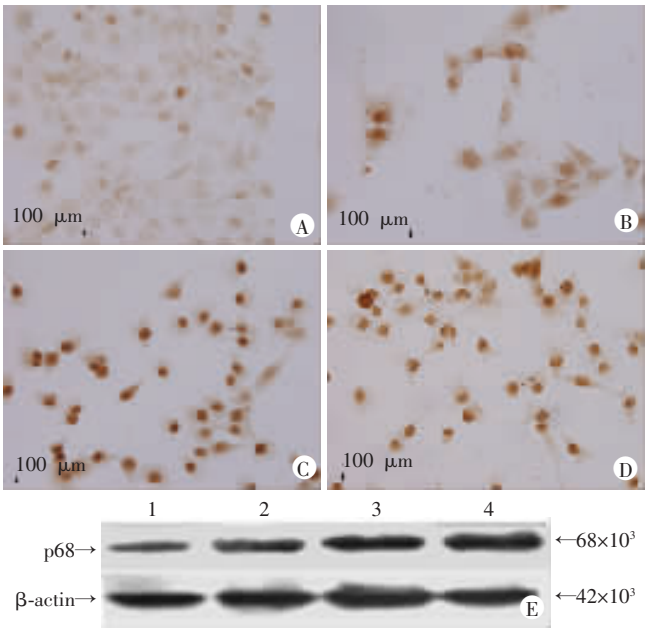
A~D:免疫细胞化学观察结果(S-P);E:Western blot检测结果
A:指数增长期DMSCs;B:平台期DMSCs;C:饥饿前DMSCs;D:饥饿48 h后的DMSCs;1~4:分别为指数增长期DMSCs、平台期DMSCs、饥饿前DMSCs、饥饿48 h后的DMSCs

图1 p68在不同生长状态的DMSCs表达特点

2.2 伤口液刺激DMSCs增殖和p68的表达

应用伤后1 d,伤口液刺激DMSCs,伤口液能明显促进DMSCs增殖,且随着伤口液浓度的增加,伤口液对DMSCs的增殖作用也逐渐增强,10%浓度的伤后1 d伤口液对DMSCs具有明显的促增殖作用[11]。因此我们采用10%浓度伤后1 d的伤口液研究DMSCs血清饥饿后细胞增殖以及与p68的表达改变的关系。血清饥饿培养48 h后DMSCs处于静止期,细胞形态未发生明显变化,10%浓度伤后1 d伤口液刺激DMSCs之后,胞核内p68表达强度明显升高,16 h左右出现表达高峰,然后逐渐下降,但表达水平仍高于静止期,说明早期伤口液能刺激静止的DMSCs进入细胞周期开始分裂增殖,p68的表达水平也逐渐升高,提示p68表达水平变化与细胞进入细胞周期启动增

殖有关。见图 2。

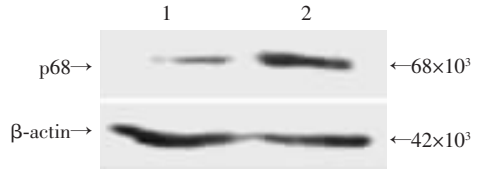


A ~ D:免疫细胞化学观察结果(S-P);E:Western blot 检测结果 A:饥饿 48 h 后;B:饥饿 48 h 后加 10 % 伤口液 2 h;C:饥饿 48 h 后加 10% 伤口液 16 h;D:饥饿 48 h 后加 10 % 伤口液 24 h;1 ~ 4:分别为饥饿 48 h 后、饥饿 48 h 后加 10% 伤口液 2 h、饥饿 48 h 后加 10% 伤口液 16 h、饥饿 48 h 后加 10% 伤口液 24 h

图 2　伤后 1 d 伤口液刺激 DMSCs p68 变化情况

2.3　抑制 p68 表达对 DMSCs 增殖的影响

通过饥饿及伤口液诱导实验表明,p68 的表达水平与 DMSCs 增殖密切相关,为进一步检测 p68 的表达在 DMSCs 增殖中的作用,应用化学合成的 siRNA 序列特异性抑制 p68 的表达,检测对细胞增殖的影响。Western blot 检测结果表明,siRNA 序列能有效抑制 p68 表达,抑制效率为 80%,且细胞形态未发生明显变化。与对照组相比,RNAi 组的 DMSC 增殖速度明显受到抑制($P<0.01$),说明 p68 在 DMSCs 的增殖调控中发挥重要作用。见图 3。



1:RNAi 组;2:对照组

图 3　Western blot 检测 RNAi 抑制 p68 表达后对 DMSCs 增殖的影响

3　讨论

创伤愈合分为 3 个互相联系的过程,包括炎症反应期、增殖期及组织重建期,包括多种细胞、细胞因子和细胞外基质错综复杂的相互作用,其中伤后早期是创伤修复启动的关键时期。伤口液中含有包括多种细胞因子在内的复杂成分,是组成创伤微环境的重要组成部分[12]。本室前期研究表明伤后早期伤口液可刺激 DMSCs 增殖[11]。DMSCs 是存在于皮肤创面局部的一种较为原始的间充质干细胞,在创伤微环境的作用下分化为成纤维细胞和血管内皮细胞等组织修复细胞,在创伤修复启动中具有重要意义。组织修复的核心问题是修复细胞的功能调控,在难愈性创面中早期启动 DMSCs 参与修复具有重要意义。RNA 解旋酶 p68 属于 DEAD-box 家族,是一个依赖于 ATP 的 RNA 解旋酶,同时具有依赖于 RNA 的 ATPae 活性,与 SV40 大 T 抗原具有交叉免疫反应。RNA 解旋酶 p68 调控 RNA 的剪接、翻译以及 rRNA 的合成等生化过程。近年研究表明,RNA 解旋酶 p68 与组织发育成熟以及肿瘤发生转移密切相关[6,13]。Kahlina 等[7]在体外细胞模型发现血清、生长因子和炎性因子等能诱导表皮基底细胞 p68 表达水平上调,而且在切割伤模型中发现 p68 与组织修复相关。RNA 解旋酶 p68 调控多种增殖相关分子而参与调控细胞增殖,p68 通过与 ERα、p53、cyclin D_1 等转录因子相互作用调控基因表达[14-17]。深入研究[16]表明,p68 能够与 cyclin D_1 的启动子结合从而调控 cyclin D_1 的表达水平,进而细胞增殖。p68 在调控细胞分化中发挥重要作用,p68 可与 MyoD 作用,调控 C2C12 细胞分化为肌细胞的过程;p68 还参与调控 3T3-L1 细胞分化为脂肪细胞的过程[18]。研究 p68 在调控 DMSCs 参与创伤修复过程中的作用具有重要意义,因此我们主要在细胞水平研究 RNA 解旋酶 p68 在 DMSCs 增殖启动中的重要作用。本实验结果提示 p68 的表达水平与 DMSCs 增殖状态有关,处于指数增长期的 DMSCs 表达强度高于平台期的 DMSCs,静止的 DMSCs 低表达 p68 仅维持细胞的生存。在伤口液刺激下 DMSCs 进入细胞周期开始增殖,p68 的表达水平随之升高,提示创伤微环境在刺激 DMSCs 增殖,参与创伤修复过程中发挥重要作用。RNAi 抑制 p68 表达后,DMSCs 增殖明显受到抑制,证实 p68 在DMSCs 增殖启动中的重要作用。

综上所述,DMSCs 是创伤愈合,特别是创伤修复启动过程中的一种重要的、较为原始的间充质干细胞,以 p68 为重点对其深入研究有望为阐明创伤修复启动的分子机制提供依据。

参考文献:

[1] Toma J G, Akhavan M, Fernandes K J, *et al*. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(9): 778 - 784.

[2] Young H E, Steele T A, Bray R A, *et al*. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors[J]. Anat Rec, 2001, 264(1): 51 - 62.

[3] 史春梦, 程天民. 大鼠真皮多能间充质干细胞的分离培养[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(9): 1068 - 1070.

[4] 屈纪富, 史春梦, 麦跃, 等. 真皮多能干细胞在创伤愈合中的作用[J]. 中国临床康复, 2004, 8(11): 2034 - 2035.

[5] 史春梦，程天民. 创伤局部微环境对大鼠真皮多能干细胞生物学性状的影响[J]. 中华创伤杂志，2003，19(4)：199－202.
[6] Fuller-Pace F V, Ali S. The DEAD box RNA helicases p68 (Ddx5) and p72 (Ddx17): novel transcriptional co-regulators[J]. Biochem Soc Trans, 2008, 36(Pt 4): 609－612.
[7] Kahlina K, Goren I, Pfeilschifter J, *et al*. P68 DEAD box RNA helicase expression in keratinocytes. Regulation, nucleolar localization, and functional connection to proliferation and vascular endothelial growth factor gene expression[J]. J Biol Chem, 2004, 279(43): 44872－44882.
[8] Pricolo V E, Caldwell M D, Mastrofrancesco B, *et al*. Modulatory activities of wound fluid on fibroblast proliferation and collagen synthesis [J]. J Surg Res, 1990, 48(6): 534－538.
[9] Iyer V R, Eisen M B, Ross D T, *et al*. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum[J]. Science, 1999, 283(5398): 83－87.
[10] Yang L, Lin C, Zhao S, *et al*. Phosphorylation of p68 RNA helicase plays a role in platelet-derived growth factor-induced cell proliferation by up-regulating cyclin D1 and c-Myc expression[J]. J Biol Chem, 2007, 282(23): 16811－16819.
[11] 屈纪富，江德鹏，郑怀恩，等. 创伤早期伤口液对体外培养真皮多能干细胞增殖迁移特性的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28(24)：2393－2395.
[12] Marikovskyx M, Rosenblum C I, Faltin Z, *et al*. Appearance of leptin in wound fluid as a response to injury[J]. Wound Repair Regen, 2002, 10(5): 302－307.
[13] Stevenson R J, Hamilton S J, MacCallum D E, *et al*. Expression of the "dead box" RNA helicase p68 is developmentally and growth regulated and correlates with organ differentiation/maturation in the fetus [J]. J Pathol, 1998, 184(4): 351－359.
[14] Shin S, Rossow K L, Grande J P, *et al*. Involvement of RNA helicases p68 and p72 in colon cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(16): 7572－7578.
[15] Bates G J, Nicol S M, Wilson B J, *et al*. The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor [J]. EMBO J, 2005, 24(3): 543－553.
[16] Endoh H, Maruyama K, Masuhiro Y, *et al*. Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(8): 5363－5372.
[17] Clark E L, Coulson A, Dalgliesh C, *et al*. The RNA helicase p68 is a novel androgen receptor coactivator involved in splicing and is overexpressed in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(19): 7938－7946.
[18] Kitamura A, Nishizuka M, Tominaga K, *et al*. Expression of p68 RNA helicase is closely related to the early stage of adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287: 435－439.

(收稿:2009-11-15;修回:2009-12-28)
(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2010)08-0738-01

产前子痫合并脑疝前期脑水肿1例

谭运福 (410013 长沙,中南大学湘雅附三医院妇产科)

[关键词] 产前子痫;脑疝前期;脑水肿
[中图法分类号] R714.245 [文献标志码] B

1 临床资料

患者24岁,因停经7个月余,抽搐后昏迷12 h,于2009年2月18日21时22分入院,既往血压、末次月经不详。停经30多天尿HCG阳性,停经后无明显早孕反应。停经4个月自觉胎动,活跃至今。孕期未定期产检,2009年2月18日晨起后7点左右突发头痛、呕吐,抽搐1次,即到当地医院就诊,发现血压高,最高达200/120 mmHg,尿蛋白不详,予以降压、镇静、解痉等对症治疗(具体用药不详),病情逐渐加重,随后出现意识改变,昏迷不醒,急诊转入我院,转院途中仍昏迷不醒,抽搐1次,静滴液:5%葡萄糖250 ml+硫酸镁30 ml;另一组:5%葡萄糖250 ml+哌替啶50 mg+异丙嗪25 mg,急诊以"①宫内妊娠7个月余,单活胎,未临产;②产前子痫;③昏迷查因:颅内出血?④发热查因"收入院。入院后查体:体温38.4 ℃,脉搏104/min,呼吸20/min,血压187/126 mmHg,神志昏迷,瞳孔左侧4 mm,右侧3.5 mm,双侧对光反射迟钝,球结膜水肿明显,心肺未见明显异常,疼痛刺激有反应,双膝腱反射减退,Kernig征(+),Brudzinski征(+),Babinski征(+)。产科检查:宫高24 cm,腹围100 cm。胎心音180/min。急诊CT示脑组织弥漫性肿胀并颅内多发低密度灶(图1A)。

肝肾功能:A/G 1.2,丙氨酸氨基转氨酶61 U/L,天冬氨酸氨基转氨酶129 U/L,尿酸535 μmol/L,高密度脂蛋白胆固醇1.77 mmol/L,总胆固醇13.4 mmol/L,甘油三酯16.85 mmol/L,凝血功能、3P试验正常,小便常规示:葡萄糖(－),蛋白(+++),隐血(+),白细胞(++++)。诊断考虑:"①产前子痫;②宫内妊娠7个月余,单活胎,未临产;③昏迷查因:高血压脑病?④发热查因",于2009年2月18日23时30分在急诊全麻插管下行子宫下段剖宫产术。术中见羊水Ⅲ度污染,新生儿体质量500 g,1 min Apgar评分1分,5 min Apgar评分1分,患儿病情危重,成活困难,向家属交代病情,家属签字后放弃抢救,术中血压波动在120～160/70～110 mmHg。术毕回ICU继续观察。患者仍处昏迷状态,予以积极镇静、控制血压、利尿等对症治疗。2月22日患者病情明显好转,查体:体温36.5 ℃,脉搏66/min,呼吸14/min,血压156/95 mmHg,血氧饱和度:95%。2009年2月21日24 h入量5 668 ml,出量11 690 ml,2009年2月22日晨起中心静脉压9～10 cmH_2O。神志清楚,双侧瞳孔等大等圆,直径3 mm,对光反射灵敏,球结膜水肿基本消退。双肺呼吸音粗,未闻及干湿啰音。心率:66/min,律齐。伤口愈合好。肠鸣音4/min,病理征未引出。血气分析:pH 7.450,$p(CO_2)$31.8 mmHg,

(下转743页)

[通信作者] 谭运福,电话:(0731)88618023,E-mail: myredgirl@163.com