基础研究 文章编号:0253-3626(2010)05-0652-05

nesprins 基因在胚胎干细胞分化为心肌细胞过程中的表达

王芳洁[1],易岂建[1],郭鹏飞[1],刘晓燕[1],张秋萍[2],Shanahan C[2]
(1. 重庆医科大学附属儿童医院心脏中心,重庆 400014;2. 剑桥大学心血管实验室,英国剑桥)

【摘 要】目的:探讨 nesprins 基因在小鼠胚胎干细胞(Embryonic stem cell,ESC)分化为心肌细胞过程中的表达及作用。方法:体外培养小鼠 ESC,采用 5- 氮杂胞苷为诱导剂诱导 ESC 分化为心肌细胞,并进行心肌细胞鉴定;RT-PCR 检测分化过程中各时间点(d7、d7+3、d7+6、d7+9、d7+20)nesprin-1、nesprin-2 基因 mRNA 的表达;免疫荧光检测各时间点 nesprin-1 蛋白的细胞定位。结果:nesprin-1、nesprin-2 基因 mRNA 在 ESC 分化为心肌细胞过程中均有表达;nesprin-1 基因 mRNA 在 d7、d7+3、d7+6 均表达较高,无显著性差异,随后表达呈下降趋势,在 d7+20 时表达最低($P<0.05$);nesprin-2 基因 mRNA 在 d7 时表达最高,与 d7+3、d7+6 组间均有显著性差异($P<0.05$),且随着分化时间的延长表达逐渐下降,在 d7+20 时表达最低;nesprin-1 蛋白在 ESC 分化过程中均有表达,定位于核被膜及核周间隙。结论:nesprin-1、nesprin-2 基因表达高峰在生心细胞的诱导和特化时期,推测 nesprins 对维持心肌细胞发育,使 ESC 更完全的向心肌细胞分化起重要作用。

【关键词】nesprins;胚胎干细胞;心肌细胞;分化;小鼠
【中国图书分类法分类号】R322.11;R394-33;R394.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-01-18

Study on expression of nesprins gene during mouse embryonic stem cells differentiation into cardiomyocytes in vitro

WANG Fang-jie, et al
(*Heart Center, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate expression and role of nesprins gene during mouse embryonic stem cell (ESC) differentiation into cardiomyocyte in vitro. *Methods*: Mouse ESC cultrued in combining 5-azacytidine as inducer with hanging drop cultures and the differentiated cells were identified with cardiac special genes and proteins;The mRNA expression of nesprin-1 and nesprin-2 genes were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and sub-cellular location of nesprin-1 protein in nucleus was detected by immunofluorescence in d7, d7+3, d7+6, d7+9 and d7+20. *Results*: The expression of nesprin-1 and nesprin-2 genes mRNA can be found in the period of mouse ESC differentiation into cardiomyocyte.There is expression peak of nesprin-1 gene mRNA in d7, d7+3, d7+6, then declined gradually to the lowest in d7+20;expression peak of nesprin-2 gene mRNA in d7, then also declined gradually to the lowest in d7+20;The protein of nesprin-1 can be detected in the period of mouse ESC differentiation into cardiomyocyte, and mainly located in nuclear envelope and space around nuclei. *Conclusion*: The expression peak of nesprin-1 and nesprin-2 gene mRNA is interrelated with the phase of inducing and specialization of ESC differentiation into cardiac muscle cell, it can be speculated that nesprin genes has an important role in maintaining ESC differentiation into cardiac muscle cell.

【Key words】Nesprins;Embryonic stem cell;Cardiomyocyte;Differentiation;Mouse

nesprins 是一种新的Ⅱ型跨膜蛋白家族,有较多亚型,包括 nesprins 1-4[1],参与组成 LINC(Link the nucleoskeleton with the cytoskeleton)复合物[2]。有研究发现 nesprin-1、nesprin-2 与埃德二氏肌营养不良(Emery dreifuss muscular dystrophy,EDMD)发病机制有关[3],且 nesprin-1 基因突变可致 EDMD[4]。Nesprin-1、nesprin-2 主要在骨骼肌、心肌肌小节中呈高表达。本课题组前期已证实 nesprin-1、nesprin-2 在小鼠胚胎心脏发育过程中(孕 12.5 d~ 新生鼠)表达呈动态变化,表达高峰与心脏传导系统、心肌细胞增殖发育时期一致(待发表)。本研究观察在小鼠胚胎干细胞(Embryonic stem cell,ESC)体外诱导分化为心肌细胞过程中 nesprins 的表达并进一步探

作者介绍:王芳洁(1973-),女,硕士,
研究方向:小儿心血管疾病。现工作单位:郑州市儿童医院。
通讯作者:易岂建,男,教授,E-mail:qjyi2003@yahoo.com.cn。
基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(教技发中心函[2005]216 号文 20050631005);留学回国人员科研启动基金(教外司留[2007]24 号文)。

讨其在心肌细胞发育过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 129 小鼠 ESC 系购自 Cyagen Biosciences，15~20 代。

1.1.2 动物 昆明小鼠(6~8 周龄)购自重庆医科大学实验动物中心。

1.1.3 试剂 高糖 DMEM 培养基、非必需氨基酸(NEAA)购自英国 Gibco 公司；特级胎牛血清(FBS)购自美国 Hyclone 公司；白血病抑制因子(Leukaemia Inhibitory Factor，LIF)购自美国 Chemicon 公司；β－巯基乙醇(β－Me)、5－氮杂胞苷(5-azacytidine，5-aza)、胰蛋白酶、明胶均购自美国 Sigma 公司；一抗抗小鼠心肌肌小节特异性蛋白 α 辅肌动蛋白(α－actinin)、一抗抗小鼠心肌肌球蛋白(myosin)、一抗抗兔肌动蛋白(α－actin)、SABC 免疫组化试剂盒购自武汉博士德公司；一抗抗兔 nesprin-1 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司；FITC 标记山羊抗兔 IgG、10%山羊血清购自北京中杉；RNA 提取试剂盒购自北京百泰克；RT-PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.1.4 仪器 相差倒置显微镜(日本 Olympus IX-70)，CO_2 细胞培养箱(美国 Sheldon)，PCR 仪(德国 Eppendorf)，凝胶自动成像分析仪(美国 Bio-Rad)，荧光显微镜及摄像系统(日本 OlympusBX51)。

1.2 方法

1.2.1 原代小鼠胚胎成纤维细胞饲养层的制备 取孕 12.5～14.5 d 的昆明小鼠胚胎，无菌条件下去除头、四肢、尾巴和内脏，并将其充分剪碎后 0.05%胰酶－0.02%EDTA 分阶段消化，每次 10 min。取上清液 1 000 r/min 离心 10 min 收集细胞，弃去上清液使细胞重悬于含 10% FBS 的高糖 DMEM 中，以 5×10^4~6×10^4 个 /cm^2 的细胞密度接种于培养瓶中，置 37℃、5%CO_2 及饱和湿度的细胞培养箱内培养。当细胞铺满瓶底(80%~100%)时，传代培养。取第 3 代成纤维细胞，用 10 μg/ml 的丝裂霉素 C 溶液处理 1~2 h，PBS 处理后 0.25%胰酶消化并接种于 0.1%明胶包被的六孔板中即制成饲养层，饲养层 1 周内使用，用前更换 ESC 培养液。

1.2.2 ESC 的培养 复苏 ESC 于制备好的饲养层中，加入 ESC 高糖 DMEM 培养基(20%FBS、0.1 mmol/L β－Me、1%NEAA 及 1×10^6 U/L LIF)后置 37℃、5%CO_2 及饱和湿度的细胞培养箱内培养。当细胞均匀铺满六孔板底部 80%左右，0.25%胰酶－0.04%EDTA(用前 PBS 1∶1 稀释)200 μl/孔，消化 100～120 s 后，适量培养基终止消化，即可按一定比例传代或冻存。

1.2.3 ESC 的诱导分化[5] 将生长在饲养层上的 ESC 细胞用胰酶消化成单细胞悬液后重新置入培养皿中，入培养箱中静置 30 min 后，饲养层细胞即可贴壁去除。吸取上层细胞悬液，以 20 μl/滴(内含 400～600 个细胞)接种到 10 cm 的培养皿盖子内面，培养皿内加入 10 ml PBS 后小心翻转盖子，使其形成倒挂的悬滴。悬滴培养 2 d 后将形成的拟胚体(Embryoid bodies，EBs)加置去 LIF 的 ESC 高糖 DMEM 培养基中悬浮培养 2 d。将经过悬滴－悬浮培养 4 d 形成的 EBs 接种到 0.1%明胶包被的 24 孔板中(每孔放置 1 个 EB)，加入少量的培养基置培养箱中 4～6 h，待 EBs 贴壁后加入去 LIF 培养基，3 d 后加入 0.1 μmol/L 的 5-aza 诱导分化培养。

1.2.4 心肌细胞鉴定 与课题组前期实验方法一致[5]。

1.2.5 RT-PCR 检测各分化时间点 neprin-1、nesprin-2 基因 mRNA 的表达 分别收集 ESC 时期，分化培养 d7、d7+3、d7+6、d7+9、d7+20 的细胞，按照总 RNA 抽提试剂盒说明书提取总 mRNA。引物序列如下：β－actin(5'-ACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATC-3'，5'-TAGCCACGCTCGGTCAGGATCTTCAT-3'370 bp)；nesprin-1(5'-GCATTCTTGRCTGGCTCACA-3'，5'-GTCTGAGCTCGTCCAGTTCC-3'225 bp)；nespr in-2 (5'-CCACGATTACGACCTCAGT-3'，5-GCAGCTTCATGTAGCCCTT-3' 269 bp)。PCR 反应体系为 95℃ 7 min 预变性，94℃ 1 min 变性，72℃ 1 min 延伸，β－actin、nesprin-1、nesprin-2 退火温度分别为 58℃、60℃、58℃ 40 s，各 30，35，35 个循环，末次循环后 72℃ 延伸 5 min，4℃保存。PCR 产物于 1.5 %琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像及分析系统下对凝胶照相。

1.2.6 免疫荧光检测 nesprin-1 蛋白定位 将不同分化时间点(d7、d7+3、d7+6、d7+9、d7+20)的细胞取出，冷丙酮固定 30 min，PBS 冲洗后，10%山羊血清封闭内源性抗原，室温下作用 10 min 甩去多余血清。滴加 PBS 稀释 1 000 倍的一抗抗兔 nesprin-1，放入湿盒内，4℃过夜。PBS 冲洗后，滴加 PBS 稀释 100 倍的二抗 FITC 标记的羊抗兔 IgG，37℃温育 30 min，避光。PBS 冲洗后，DAPI 复染细胞核。PBS 冲洗后，50%缓冲甘油封片。采用 Olympus BX51 荧光显微镜及摄像系统监测。

1.2.7 统计学分析 采用 SPSS11.0 软件，所有数据采用计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用方差分析，以 $P\leq0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 大体观察

与课题组前期实验结果一致[5]。

2.2 心肌细胞的鉴定

见课题组前期研究结果[5]。

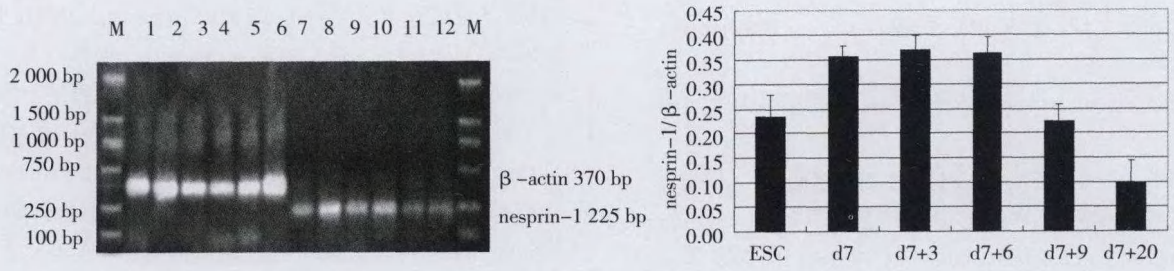
2.3 nesprin-1、nesprin-2 基因 mRNA 的表达

nesprin-1、nesprin-2 基因的 mRNA 在 ESC 分化为心肌细胞过程中均有表达。nesprin-1 基因 mRNA 在 ESC 到 d7+6 时期表达增高，其中 d7，d7+3，d7+6 3 个时间点之间表达无显著性差异，但与 ESC 时期与显著性差异($P<0.05$)，随后呈下降趋势，在 d7+20 时表达最低($P<0.05$)(图 1)；nesprin-2 基因 mRNA 在 d7 时表达最高与其它各组间均有显著性差异($P<0.05$)，且随着分化时间的延长表达逐渐下降，到 d7+20

时最低(图 2)。

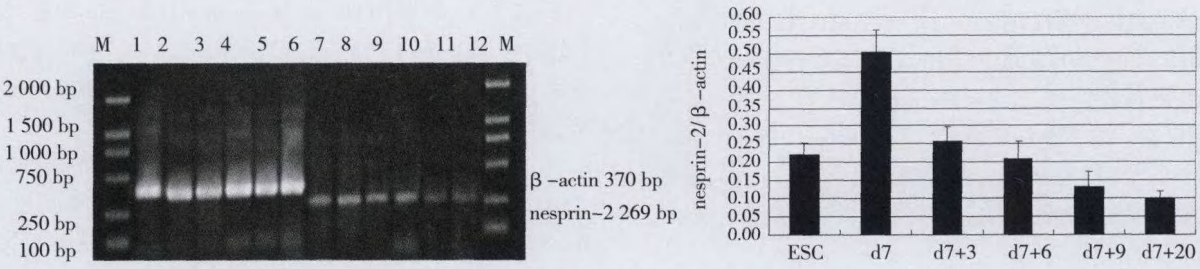
2.4　nesprin-1 蛋白在 ESC 分化为心肌细胞过程中的定位表达

nesprin-1 蛋白在 ESC 向心肌细胞分化过程中均有表达。这与 nesprin-1 基因 mRNA 表达的 RT-PCR 检测结果一致。nesprin-1 蛋白的亚细胞定位主要位于核被膜及核周间隙(图 3)。



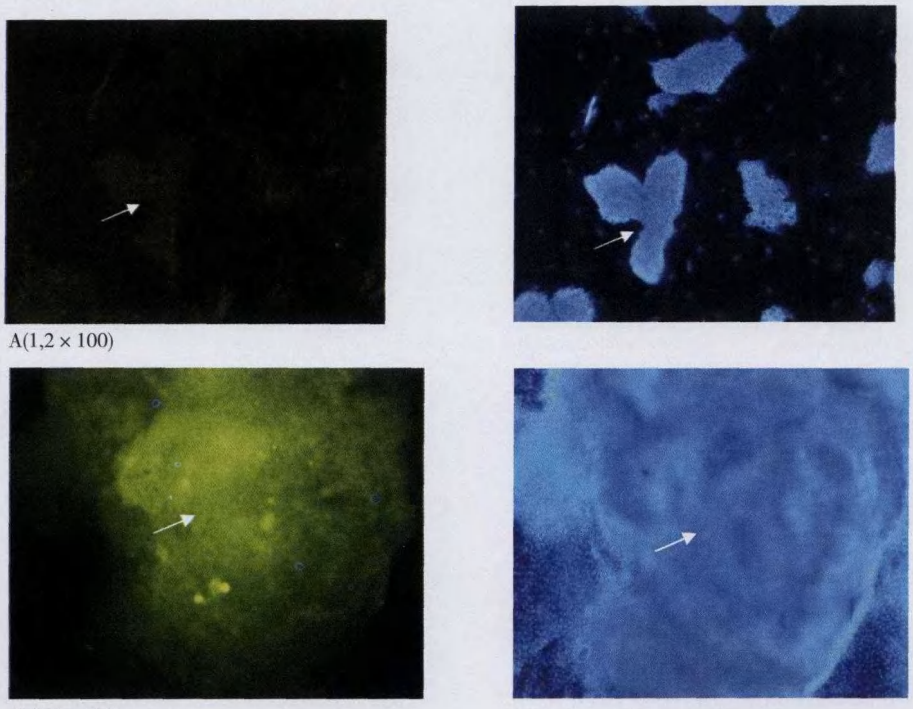
A. nesprin-1 基因的 RT-PCR 凝胶电泳图；B. nesprin-1 基因相对表达的半定量分析(以 β-actin 为内参)；1-6，7-12 分别为 β-actin，nesprin-1 在 ESC、d7、d7+3、d7+6、d7+9、d7+20 的 PCR 产物；M.DNA marker

图 1　nesprin-1 基因 mRNA 在 ESC 分化为心肌细胞过程中的表达(n=3, $\bar{x} \pm s$)



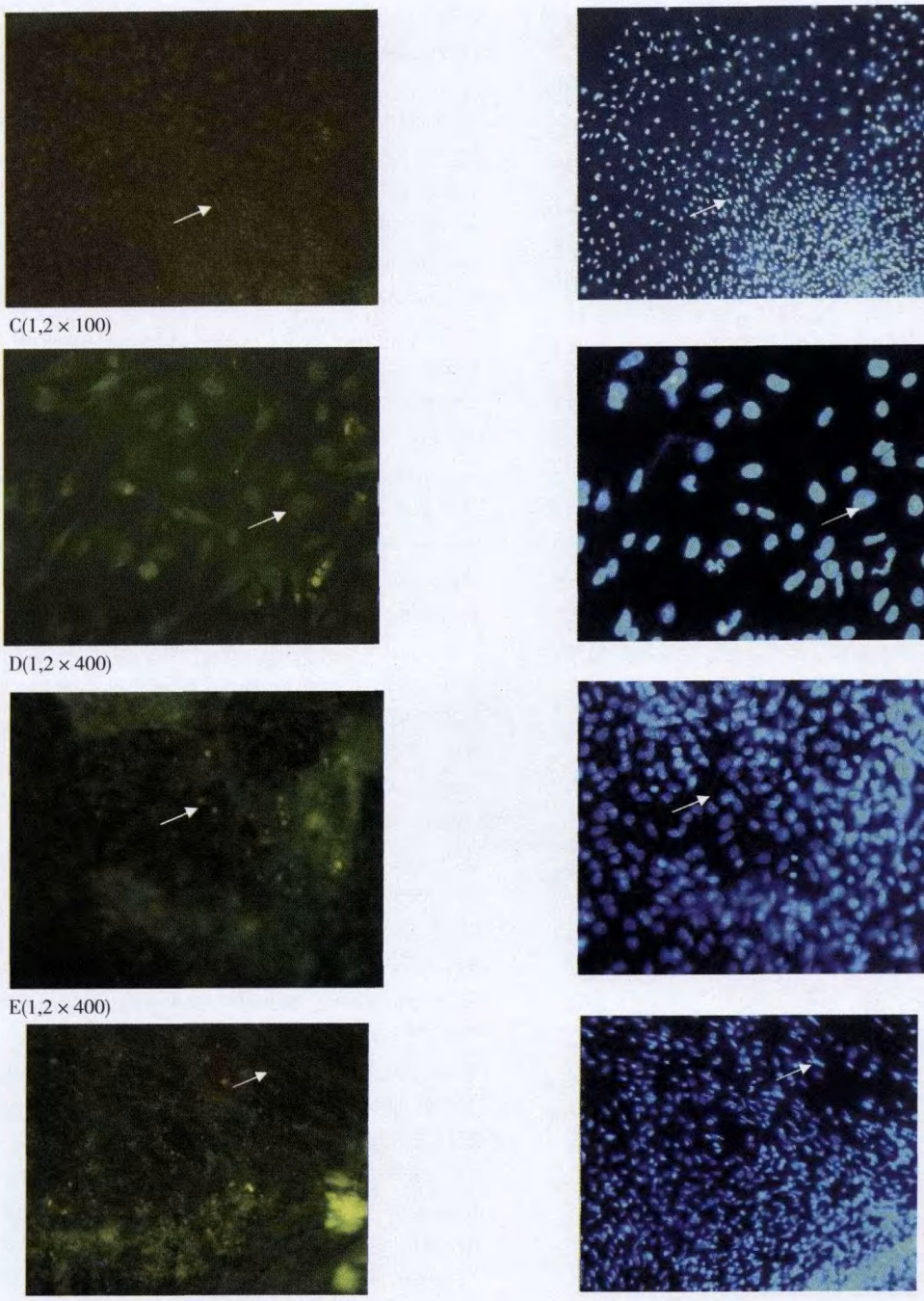
A. nesprin-2 基因的 RT-PCR 凝胶电泳图；B. nesprin-2 基因相对表达的半定量分析(以 β-actin 为内参)；1-6，7-12 分别为 β-actin，nesprin-1 在 ESC、d7、d7+3、d 7+6、d7+9、d7+20 的 PCR 产物；M.DNA marker

图 2　nesprin-2 基因 mRNA 在 ESC 分化为心肌细胞过程中的表达(n=3, $\bar{x} \pm s$)



A(1,2 × 100)

B(1,2 × 100)



C(1,2 × 100)

D(1,2 × 400)

E(1,2 × 400)

F(1,2 × 200)

A. ESC 时期;B,d7;C,d7+3;D. d7+6;E. d7+9;F. d7+20 (使用 FITC 标记的荧光二抗(绿色)显示 nesprin-1 蛋白的表达,如白色箭头所示;DAPI 复染细胞核显示蓝色荧光)

图 3 免疫荧光检测 nesprin-1 蛋白的亚细胞定位

3 讨 论

LINC 复合物由 nesprins、laminA/C、emerin、SUN 蛋白相互连接组成(即 lamin-SUN-nesprin 复合物[2]),其完整性对维持细胞膜的机械性能至关重要[6]。Dr.Vergnes 等[7]发现 laminB 在小鼠 ESC 发育全过程中表达,而 laminA 在 ESC 时期缺失,其只表达在已定型的分化细胞中[8]。推测在 ESC 时期,SUN 蛋白未与 laminA 连接,LINC 复合物不完整,细胞膜机械性能的变化适合 ESC 向心肌细胞细胞分化。将携带 Lmnb1(编码 laminB1)突变的 ESC 注入到小鼠胚泡,小鼠在出生时肺脏和骨骼畸形而心脏发育无异常,说明缺失 laminB1 时,对 ESC 发育为心肌细胞无影响。本实验结果显示 nesprin-1、nesprin-2 在 ESC 整个分化过程中均表达,推测 nesprins 在维持 ESC 分化成心肌细胞过程中起重要作用。

有研究发现,laminA/C 的缺乏会影响细胞核的机械性能和动力传导[9]。Les JS 发现 laminA/C 的缺乏也会影响细胞的机械性能,极性和迁移,即细胞缺失 laminA/C,细胞活力下

降,细胞核稳定性降低脆性增强,细胞核畸形等[10]。ESC 时期缺乏 laminA/C,在出生的胚胎中才检测得到 laminA/C 在心脏中的表达[11],而 laminB1 不能维持细胞核的机械性能[12],因此我们推测,nesprins 能维持 ESC 及分化过程中细胞的机械性能,保持 ESC 的未分化状态并使 ESC 进行正常的细胞分化。

本实验 RT-PCR 结果显示 nesprin-1、nesprin-2 mRNA 在 ESC 分化为心肌细胞过程中呈动态表达。nesprin-1 mRNA 在 d7 即有较高表达,推测可能与这一时期为 EBs 贴壁培养初期细胞内部增殖,向外生长的区域出现特异性心肌细胞分化有关[13];随着分化时间的推移,EBs 向外生长区域逐渐扩大,分化的心肌细胞数量越来越多,nesprin-1 mRNA 表达稍增加并稳定在这一高水平;在分化终末期,nesprin-1 mRNA 表达有所下降,此时 EBs 内大部分细胞已分化为心肌细胞,且心肌细胞发育逐渐成熟。有研究发现[14],nesprin-2 的巨大亚型在真皮细胞中与核膜的组建有关。本实验发现 nesprin-2 mRNA 在培养 d7 有较高表达,推测其可能参与生心细胞的诱导和特化,使 ESC 更完全的向心肌细胞分化。

在 ESC 分化为心肌细胞全过程中均有 nesprins 基因表达,若该基因表达异常,将引起 LINC 复合物相互连接错乱,影响核膜的稳定,导致染色体排列紊乱,最终导致临床疾病。如 EDMD 主要表现为传导障碍的扩张型心肌病、心律失常等[15]。其发生与 LINC 复合物中编码 laminA/C 的基因 LMNA 突变、编码 emerin 的基因 STA 突变以及编码 nesprin-1 基因突变有关[3,4]。因此,弄清楚 nesprins 的结构、分布及功能对研究与核膜蛋白相关疾病发病机制有重要临床意义。

参 考 文 献

[1] Roux K J,Crisp M L,Liu Q,et al.Nesprin 4 is an outer nuclear membrane that can induce kinesin-mediated cell polarization[J].Proc Nati Acad Sci U S A,2009,106(7):2194-2199.

[2] Crisp M,Liu Q,Roux K,et al. Coupling of the nucleus and cytoplasm:role of the LINC complex[J]. J Cell Biol,2006,172(1):41-53.

[3] Zhang Q,Bethmann C,Worth N F,et al. Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity[J].Hum Mol Genet,2007,16(23):2816-2833.

[4] Puckelwartz M J,Kessler E,Zhang Y, et al.Disruption of nesprin-1 produces an Emery Dreifuss muscular dystrophy-like phenotype in mice [J]. Hum Mol Genet,2009,18(4):607-620.

[5] 王芳洁,易岂建,郭鹏飞.小鼠胚胎干细胞分化为心肌细胞的体外实验[J].第四军医大学学报,2009,30(9):808-811.

[6] Stewart-Hutchinson P J,Hale C M,Wirtz D,et al.Structural requirements for the assembly of LINC complexes and their function in cellular mechanical stiffness[J].Exp Cell Res,2008,314(8):1892-1905.

[7] Vergnes L,Péterfy M,Bergo M O,et al.Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity[J].Proc Nati Acad Sci USA, 2004,101(28):10428-10433.

[8] Constantinescu D,Gray H L,Sammak P J,et al.LaminA/C expression is a maker of mouse and human embryonic stem cell differentiation[J].Stem Cells,2006,24(1):177-185.

[9] Lammerding J,Schulze P C,Takahashi T,et al.LaminA/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction[J].J Clin Invest,2004, 113(3)370-379.

[10] Les J S,Hale C M,Panorchan P,et al.Nuclear laminA/C deficiency induces defects in cell mechanics,polarization, and migration[J]. Biophys J,2007,93(7): 2542-2552.

[11] RÖber R A,Weber K,Osborn M.Differential timing of nuclear laminA/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal:a developmental study[J].Development,1989,105(2):365-378.

[12] Lammerding J,Fong L G,Ji J Y,et al.LaminA and C but not laminB1 regulate nuclear mechanics[J].J Biol Chem,2006,281(35):25769-25780.

[13] Wei H,Juhasz O,Li J,et al. Embryonic stem cells and cardiomyocyte differentiation:Phenotypic and molecular analyses[J].J Cell Mol Med,2005,9(4): 804-817.

[14] Lüke Y, Zaim H, Karakesisoglou I, et al.Nesprin-2 Giant(NUANCE) maintains nuclear envelope architecture and composition in skin [J].J Cell Sci,2008,121(pt 11):1887-1898.

[15] Cuneo A,Holdt L M,Klingel K,et al.Cardiologic findings in Hauptmann-Thannhauser muscular dystrophy (autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy) [J].Dtsch Med Wochenschr,2007, 132(39):2006-2009.

(责任编辑:冉明会)