基础研究 文章编号:0253-3626(2010)07-0961-04

小鼠胚胎心脏发育过程中组蛋白乙酰化酶亚型 p300 调控心脏特异转录因子的动态表达

杨雪芳[1],田 杰[1],陈国珍[1],孙慧超[1],钟立霖[1],吴晓云[1],朱 静[2]
(重庆医科大学附属儿童医院 1. 心脏内科;2. 儿科研究所,重庆 400014)

【摘 要】目的:观察小鼠胚胎心脏发育过程中 GATA4、Nkx2.5、MEF2C、Tbx5 基因的动态表达和这些基因的启动子区域组蛋白 H3 乙酰化修饰状态的变化,以及组蛋白乙酰化酶亚型 p300 对这些基因启动子的直接调控作用,为进一步研究先天性心脏疾病的发生机制奠定基础。方法:选取胎龄(Embryo day,E)10.5d 和 16.5d 小鼠正常胚胎心脏,用实时荧光定量 PCR(Real Time PCR)的方法观察上述基因 mRNA 的动态表达;采用染色质免疫沉淀技术(Chromatin immunoprecipitation,ChIP),用 ChIP 级抗乙酰化 H3 和抗 p300 抗体免疫沉淀与其所结合的 DNA,采用 Real Time PCR 扩增抗体所富集的上述基因启动子的 DNA 量,观察胚胎心脏发育过程中乙酰化组蛋白及组蛋白乙酰化酶亚型 p300 是否参与调控上述四种心脏特异转录因子的表达。结果:①胎龄 E10.5d 和 E16.5d 小鼠胚胎心脏的 GATA4、Nkx2.5、MEF2C、Tbx5 基因的 mRNA 表达水平都有明显差异($P<0.05$),其中 GATA4 和 MEF2C mRNA 相对 β-actin 的表达水平,E10.5 明显低于 E16.5,而 Nkx2.5 和 Tbx5 mRNA 相对表达水平,E10.5 明显高于 E16.5;并且 ChIP 结果显示这些基因启动子的乙酰化水平也随着时间而改变,但差异无统计学意义。②E10.5 和 E16.5 胚胎小鼠心脏中,p300 抗体均能免疫沉淀 GATA4、Nkx2.5、MEF2C、Tbx5 基因启动子,其沉淀的基因量在这两个小鼠心脏发育的关键时间点有所不同,但差异无统计学意义。结论:小鼠胚胎心脏发育过程中,心脏发育相关基因 GATA4、Nkx2.5、MEF2C、Tbx5 呈现动态表达,提示这些基因在心脏发育不同阶段具有重要作用。ChIP 结果提示 p300 介导的组蛋白乙酰化修饰可能为调节这些基因动态表达的机制之一。

【关键词】p300;组蛋白乙酰化;转录因子;心脏发育;染色质免疫沉淀;
【中国图书分类法分类号】R725.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-06

Temporal regulation of p300 on heart-specific transcription factors during mouse cardiogenesis

YANG Xue-fang, et al
(*Department of Heart Centre, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Cardiogenesis is a precise process controlled by sequential gene regulatory steps. Heart-specific transcription factors (TFs) GATA4, Nkx2.5, MEF2C and Tbx5 play critical roles in controlling heart development. But the genetic basis for the temporal expression of genes during heart development still remains unclear. Substantial studies displayed gene regulation partly attributes to histone acetylation. However, the functions of individual histone acetyltransferases (HATs) in specific developmental transcription programs are not well elucidated. p300, a histone acetyltransferase and coactivator, plays key role in many physiological processes, moreover our previous study suggests that expression of p300 is developmentally regulated during mouse cardiogenesis, but the underlying molecular mechanism remains elusive. *Methods*: The whole hearts from embryonic mice on embryonic days (E) 10.5 and 16.5 were collected accordingly, and then total RNA was extracted. Heart-specific TFs GATA4, Nkx2.5, MEF2C and Tbx5 mRNA from mouse myocardium at differential embryonic days during cardiac development were analyzed by quantitative (Q)-PCR. The levels of histone H3 acetylation on these heart-specific TFs promoter and transcription factor binding sites of p300 to these genes were identified by chromatin immunoprecipitation assays (ChIP). *Results*: The present study furnishes a comparative temporal expression map of cardiac transcriptional factors, during murine heart development (E10.5 and E16.5). The mRNA levels of these genes present dynamic change. On E10.5, the expressions of GATA4 and MEF2C were remarkable lower than those on E16.5 ($P<0.01$). While Nkx2.5 and Tbx5 gene expression levels were remarkable higher on E10.5 ($P<0.05$). Accordingly, ChIP analysis revealed there exist difference on levels of histone H3 acetylation of these heart-specific TFs promtor between E10.5 and E16.5. Meanwhile, binding of p300 to GATA4, Nkx2.5, MEF2C and Tbx5 promoter was detected by ChIP assay. *Conclusion*: Data suggests that heart-specific TFs expression could be regulated by promoter activation through histone H3

作者介绍:杨雪芳(1983-),女,硕士,
研究方向:心脏发育与先心病发生机制。
通讯作者:田 杰,男,教授,E-mail: jietian@cqmu.edu.cn。
基金项目:国家自然科学基金(编号:30770889);重庆市自然科学基金(编号:CSTC,2007BB5311)。

acetylation activation, which might be dependent on the cooperation with co-activator p300. These results implicate p300 is an important component of heart development and provides an insight into the mechanisms of the dynamic expression of cardiac transcriptional factors during mouse cardiogenesis.

[Key words]p300; Histone acetylation; Transcription factors; Heart development; Chromatin immunoprecipitation(ChIP)

心脏发育是一个极其复杂的过程,它涉及胚胎发育过程中众多基因在不同时间和空间上的顺序精确表达,并受多种转录因子的调控。在各个发育特定时间点心脏发育相关基因的顺序激活与表达是建造正常心脏的发育生物学基础[1]。在过去的十余年中,心脏发育的分子机制研究有了极为迅速的发展,目前研究人员已发现非常保守的心脏发育基因调控网络:其中 GATA4、MEF2C、Nkx2.5 和 Tbx5 是影响心脏发育最为重要的 4 个转录因子,它们相互协同作用,调控许多相关下游基因的正确表达[2,3]。而这些基因按时序性有规律的激活,并不是只由基因序列所决定,很大程度上由染色质的构象所决定。组蛋白乙酰化修饰引起的染色质重塑(Chromatin remodeling)是调控基因转录的重要途径之一。组蛋白乙酰化酶(Histone acetyltransferases,HATs)使组蛋白 N- 末端乙酰化,形成"开放"的染色质结构,便于转录进行。组蛋白乙酰化酶亚型 p300 是 HATs 中重要的一类大分子量蛋白,参与许多生理过程,包括发育,分化和凋亡等[4]。本课题前期的研究表明[5],在胚胎心脏发育过程中 p300 的表达具有空间性和时序性, 其中 mRNA 表达水平结果提示 p300 在小鼠胚胎心脏发育的较早期 E10.5 表达量最高,随后逐渐降低,提示其可能对胚胎心脏发育起着重要作用,但其作用机制仍不清楚,它可能通过调控上述心脏特异转录因子的动态表达而起作用。本研究在此基础上通过实时荧光定量 PCR(Real time PCR)检测心脏特异转录因子 GATA4、MEF2C、NKX2.5、Tbx5 在小鼠胚胎心脏发育中的表达,并通过染色质免疫沉淀(Chromatin immunoprecipitation,ChIP)检测小鼠胚胎心脏发育中上述基因启动子区域组蛋白乙酰化水平和 p300 与这些基因的关系,为进一步研究先天性心脏病的发生机理奠定形态学基础。

1 材料与方法

1.1 胎龄计算和标本制备

取成年健康昆明小鼠(重庆医科大学实验动物中心提供),按雌雄比例 2:1 合笼,次晨检查阴栓,以观察到阴栓脱落的最早时间计为胎龄 0.5 d,对孕鼠分笼饲养。分别取孕龄 10.5 d,16.5 d 孕鼠,断颈处死后立即剖腹取出胎鼠,并分离出完整的胚胎心脏组织于液氮中保存。

1.2 主要试剂及仪器

总 RNA 提取试剂盒(北京百泰克),cDNA 逆转录试剂盒(Takara 日本),SYBR I 荧光定量 PCR 试剂盒(北京天根),ChIP 试剂盒(Upstate,17-295,美国),ChIP 级抗乙酰化组蛋白 H3(Ac-H3)抗体(Abcam,ab10812,英国),ChIP 级抗 p300 单克隆抗体(Upstate,05-257,美国),SYBR I 荧光定量 PCR 试剂盒(Bio-Rad,iQ Supermix,美国),荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad,CFX96,美国),Eppendorf 梯度 PCR 仪,JY92-II 型超声破碎仪(宁波新芝科器研究所)。

1.3 研究方法

1.3.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 分别取 E10.5 和 E16.5 小鼠胚胎心脏冻存组织 50~100 mg,置于液氮预冷的研磨器内,将组织研磨成粉并转移至匀浆器中加入 1 ml 组织裂解液匀浆,按照试剂操作说明提取总 RNA,经核酸蛋白测定仪测定 A_{260nm}/A_{280nm} 比值和琼脂糖凝胶电泳以确定总 RNA 的纯度及完整性。按 TaKaRa 逆转录试剂盒操作说明对已提取的总 RNA 进行逆转录合成 cDNA,取 2 μl 总 RNA 加入已配制好的试剂混和液中进行逆转录反映,反应体系 20 μl,反应条件 42℃ 15 min,85℃ 5 s,所得 cDNA 于 -20℃冻存备用。

1.3.2 Real Time RT- PCR(引物序列及退火温度见表 1) 引物由 Primer Premier 5 序列应用软件设计,上海鼎安生物基因有限公司合成。将各个基因的 RT-PCR 产物稀释 10^4 倍后,以此为母液做 7 个梯度稀释,运用 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪进行扩增,得到相对标准曲线,R^2 值,扩增效率 E。反应条件:预变性 95℃ 2 min,变性 95℃ 10 s,退火(温度见表 1)15 s,延伸 68℃,20 s,共 40 个循环,每个样品均重复 3次,反应完毕行溶解曲线以明确产物的特异性。所得数据由 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪自带基于 pfaffl 原理的相对定量数据分析软件分析。

1.3.3 染色质免疫沉淀 分别取 E10.5 和 E16.5 新鲜小鼠胚胎心脏组织约 0.03 g(大约 E10.5 胚胎心脏 20 个,或 E16.5 胚胎心脏 6 个),用锋利的刀片切碎,按照 Upstate 公司 ChIP 试剂盒操作说明加入新配置的 1%甲醛交联,用超声破碎仪切割 DNA,超声处理 DNA 产物用琼脂糖凝胶电泳确定其长度为 500~1 000 bp,分别用 ChIP 级抗 Ac-H3 抗体和抗 p300 抗体进行染色质免疫沉淀,最后提取和纯化 DNA,用核酸蛋白测定仪测定 A_{260nm}/A_{280nm} 比值,以确定 ChIP 产物 DNA 的纯度和浓度,于 -20℃保存。

1.3.4 ChIP-Real Time PCR(引物序列和退火温度见表 2) 选取 GATA4、MEF2C、Nkx2.5、Tbx5 和 β-actin DNA 序列第一外显子 5'端前 1 000 bp DNA 序列视为启动子区,对其进行引物设计。引物均用 Primer Premier 5 软件设计,由上海鼎安生物基因有限公司合成。将各个基因的 PCR 产物稀释 10^4 倍后,以此为母液做 7 个梯度稀释,按 Bio-Rad SYBR I iQ Supermix 试剂盒操作说明书加入相应试剂,引物和模板,运用 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪进行扩增,得到相对标准曲线,R^2 值,扩增效率 E,反应条件:预变性 98℃ 30 s,变性95℃ 10 s,退火(温度见表 2) 10 s,延伸 72℃,15 s,45 个循环,每个样品均重复 3 次,反应完毕行溶解曲线以明确产物的特异性。所得数据由 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪自带基于

pfaffl 原理的相对定量数据分析软件分析。

1.4 统计学处理

实验数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，应用 SPSS16.0 进行统计学分析，然后用两个样本独立 t 检验进行比较，以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Real Time PCR 的特异性

溶解曲线分析显示，目的、内参基因曲线均呈单一峰，峰形锐利，在反应曲线的其他位置未见到波形，说明扩增产物为特异性产物。

2.2 GATA4、MEF2C、Nkx2.5、Tbx5 mRNA 表达的时间动态变化

2.2.1 相对标准曲线 7 个稀释样品分别进行定量 PCR，扩增结果显示，在 7 个数量级范围内其对数值与相应的循环阈值（Ct）有良好的线性相关性，$R^2>0.99$（98%~100%），E^{GATA4}=97.9%，E^{MEF2C}=95.8%，$E^{Nkx2.5}$=87.8%，E^{Tbx5}=92.7%，$E^{\beta\text{-actin}}$=92.1%（80%~110%），符合 pfaffl 相对定量分析法的前提，检测所得 Ct 值可按 pfaffl 法分析。

2.2.2 心脏特异转录因子在小鼠胚胎心脏发育过程中的动态表达 E10.5 和 E16.5 小鼠胚胎心脏均表达 GATA4、MEF2C、Nkx2.5 和 Tbx5 mRNA，其中 GATA4、MEF2C 相对 β-actin 的 mRNA 表达水平，E10.5 明显低于 E16.5，而 Nkx2.5、Tbx5 相对 β-actin 的 mRNA 表达水平，E10.5 明显高于 E16.5，差异均具有统计学意义（$n=5$，$P<0.05$，图 1）。

2.3 ChIP 沉淀 GATA4、MEF2C、Nkx2.5、Tbx5 基因启动子的 DNA 分析

2.3.1 相对标准曲线 7 个稀释样品分别进行定量 PCR，扩增结果显示，在 7 个数量级范围内其对数值与相应的循环阈值（Ct）有良好的线性相关性，$R^2>0.99$（98%~100%），E^{GATA4}=82.2%，E^{MEF2C}=85.1%，$E^{Nkx2.5}$=93.4%，E^{Tbx5}=90.6%，$E^{\beta\text{-actin}}$=93.6%（80%~110%），检测所得 Ct 值可按 pfaffl 法分析。

2.3.2 GATA4、MEF2C、Nkx2.5、Tbx5 基因启动子区域组蛋白乙酰化水平变化 E10.5 和 E16.5 小鼠胚胎心脏，Ac-H3 抗体 ChIP 沉淀产物都能检测到 GATA4、MEF2C、Nkx2.5、Tbx5 的启动子，其中 GATA4、Nkx2.5、Tbx5 启动子相对 β-actin 的启动子 ChIP 沉淀量，E10.5 高于 E16.5，而 MEF2C 启动子相对 β-actin 的启动子 ChIP 沉淀量，E10.5 低于 E16.5，差异无统计学意义（$n=3$，$P>0.05$，图 2）。

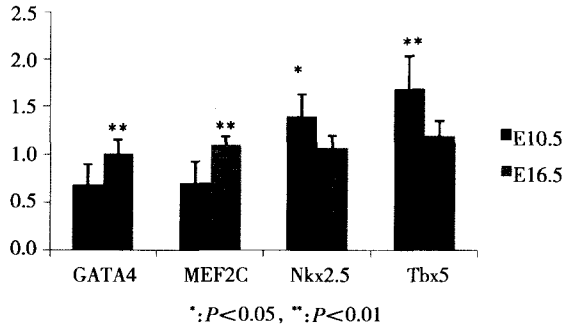
2.3.3 HATs 亚型 p300 和 GATA4、MEF2C、Nkx2.5、Tbx5 基因的结合情况 E10.5 和 E16.5 小鼠胚胎心脏，抗 p300 抗体 ChIP 沉淀产物中都能检测到 GATA4、MEF2C、Nkx2.5、Tbx5 的启动子，其中 GATA4、Tbx5 启动子相对 β-actin 的启动子 ChIP 沉淀 DNA 量，E10.5 高于 E16.5，而 MEF2C、Nkx2.5 启动子相对 β-actin 的启动子 ChIP 沉淀量，E10.5 低于 E16.5，差异无统计学意义（$n=3$，$P>0.05$，图 3）。

表 1 GATA4、MEF2C、Nkx2.5、Tbx5 和 β-actin 基因 Real Time RT-PCR 引物序列

基因	上游引物	下游引物	退火温度
GATA4	5'-CCCTCCCGCACGATTTCT-3'	5'-AGAGGCCCAACTCGCTCAA-3'	60℃
MEF2C	5'-GCGCAGGGAATGGATACGG-3'	5'-TGCCAGGTGGGATAAGAACG-3'	60℃
Nkx2.5	5'-CCGCCAACAGCAACTTCGTG-3'	5'-GAGGGTGGGTGTGAAATCTGAGG-3'	63.7℃
Tbx5	5'-CCAAAGACAGGTCTTGCGATTCG-3'	5'-TTCTCCTCCCTGCCTTGGTGAT-3'	60℃
β-actin	5'-CACACCCGCCACCAGTTCG-3'	5'-GTCCTTCTGACCCATTCCCACC-3'	60℃

表 2 GATA4、MEF2C、Nkx2.5、Tbx5 和 β-actin 基因 ChIP-Real Time PCR 引物序列

基因	上游引物	下游引物	退火温度
GATA4	5'-CACTGACGCCGACTCCAAACTAA-3'	5'-CGACTGGGGTCCAATCAAAAGG-3'	60℃
MEF2C	5'-CACGCATCTCACCGCTTGACG-3'	5'-CACCAGTGCCTTTCTGCTTCTCC-3'	68℃
Nkx2.5	5'-TCAGGCTAACGAGGAGCAATCT-3'	5'-CAGGAGCGACGGGCAGTT-3'	60℃
Tbx5	5'-TCTAAGCCGTTCTGGAGCCCGACA-3'	5'-AGAGCCTCCCAGCGACTGCCCAC-3'	68℃
β-actin	5'-GATGCTGACCCTCATCCACT-3'	5'-ATGAAGAGTTTTGGCGATGG-3'	60℃



*:$P<0.05$，**:$P<0.01$

图 1 小鼠心脏发育过程中心脏转录因子 mRNA 的表达

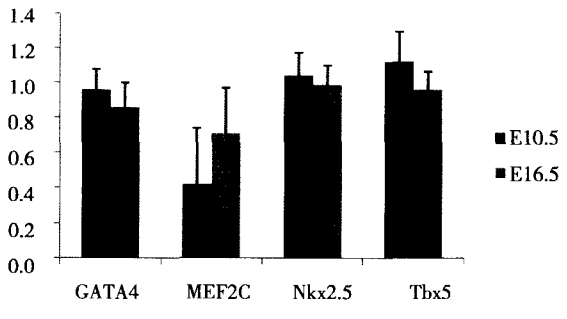


图 2 GATA4、MEF2C、Nkx2.5、Tbx5 启动子区组蛋白乙酰化水平变化

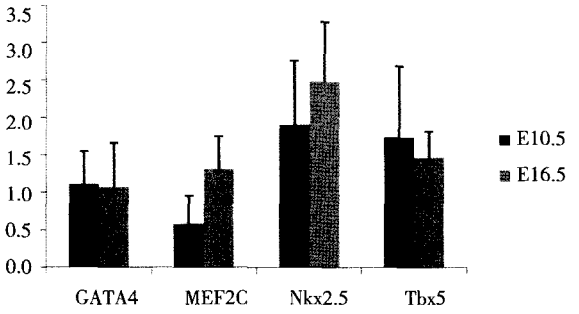


图 3 p300 抗体 ChIP 沉淀 GATA4、MEF2C、Nkx2.5、Tbx5 启动子的 DNA 量

3 讨 论

先天性心脏病(Congenital heart disease,CHD)是由于胎儿时期心脏和大血管发育受阻和异常造成的心脏缺陷,多发生于受孕后 3~8 周,是小儿时期最常见的心血管畸形,也是人类所有出生缺陷中最常见的疾病之一。新生儿中的发病率约为 4‰~50‰,在流产儿和死胎中则高达 10%[6]。研究先天性心脏病的发生机制进而找出预防和治疗其发生的途径,有着重要的临床意义。

在过去的十余年中,对心血管的研究从传统的生理学功能转变到在遗传和分子水平上研究,即心血管发育和功能的分子机制的调控[7,8]。模式动物的发展极大地推动了心血管发生发育的基因调控研究。目前常用的模式动物,如果蝇、斑马鱼、非洲爪蟾、鸡和小鼠都被用来进行这方面的研究,其中小鼠与人在基因上有高达 90%的同源性且两者的心血管系统极为相似[9],小鼠心脏发育是一个极其复杂的过程,它经过原始心管的形成和复杂的形态发生,最后形成四腔室结构的心脏。上述过程受一个核心转录因子调控网络控制,包括 NK2、MEF2、GATA、Tbx 等基因,该调控网络将上游诱导信号与下游调控基因联系起来,控制心肌分化和生长、心脏发育的模式化及形态发生和心脏收缩[2]。目前我们已知为数众多的转录因子和基因决定心脏发育的关键过程,但对这些转录因子的上游调控信号通路以及这些心脏特异转录因子是如何在时序上精确表达则知之甚少,有待进一步的研究。

本研究选取昆明小鼠 E10.5(房室管形成)和 E16.5(四腔室结构的心脏完全形成)这两个小鼠胚胎心脏发育过程中重要的时间点,观察心脏特异转录因子 GATA4、Nkx2.5、MEF2C、Tbx5 基因表达是否呈现动态变化,结果表明,这些基因的表达心脏发育过程中都有一定的时间规律。在心脏发育的不同阶段,几种不同转录因子包括 GATA4、Nkx2.5、MEF2C、Tbx5 等[10]分别起不同的作用,而且能相互作用,相互调节。GATA4 是目前研究最多的与心脏发育密切相关的转录调控因子之一,是胚胎发育过程中心脏细胞发育的早期标记。研究发现,GATA4 直接参与心脏发育,在发育的心脏组织中表达,并在发育过程中发挥作用,影响心脏形态发育,是心脏发育所必需的。该基因突变可导致基因产物的转录活性下降,并影响其他心脏发育相关因子发挥作用,从而影响了心脏发育,导致先天性心脏病。研究人员发现 GATA4 表达水平的改变也会影响胚胎心脏形态发育和功能[11]。本研究通过检测 GATA4 在小鼠胚胎心脏中的 mRNA 表达,结果表明 GATA4 表达随着心脏发育成熟,表达量明显增加,提示 GATA4 可能与室间隔及心室发育关系密切。MEF2C 对心肌细胞分化、心肌成熟、心脏环化及右心室的发育有重要作用。MEF2C 通常在心房和心室腔均表达,MEF2C 缺陷小鼠表现出严重的左右心室发育不全,导致胚胎发育早期便死亡[12],提示 MEF2C 可能是一个或多个心室特异调控蛋白的共同作用因子。MEF2 家族成员与 GATA4 直接相互作用激活下游基因的表达,GATA4 招募 MEF2 蛋白至 GATA 结合位点,MEF2 是 GATA 的协同激活因子。本研究结果显示 MEF2C 与 GATA4 的动态表达规律保持一致,间接证明 MEF2C 与 GATA4 的相互协同作用。同源盒基因 Nkx2.5,是动物心脏发育最早的标志性基因,是心肌细胞终末分化,包括建立和维持心室基因表达程序所必需的[10]。Tbx5 是近几年发现的、在心脏发育过程中起重要作用的一个转录因子。研究表明,Tbx5 在早期心脏发育过程中的表达方式是动态的,这种动态的表达方式对于房室腔初始分化和间隔的正确形成是十分关键的。本研究显示 Tbx 5 与 Nkx2.5 的表达,在心脏发育的早期(E10.5)明显高于后期(E16.5),提示其在心脏发育的早期阶段起关键作用。

组蛋白的乙酰化通常与基因的转录激活状态相关联,通过各基因 DNA 序列调控区的不同时间组蛋白乙酰化水平的不同,来调控各基因的时序表达。本研究中在 E10.5 和 E16.5 胚胎心脏,以 Ac-H3 抗体 ChIP 沉淀的 MEF2C,Nkx2.5 和 Tbx5 启动子区 DNA 量变化趋势与其 mRNA 水平的表达量变化规律相同,说明这些基因启动子区组蛋白乙酰化水平变化趋势与其 mRNA 水平的表达量变化规律相同,由前面理论推断在小鼠胚胎心脏发育过程中 MEF2C、Nkx2.5 和 Tbx5 的动态表达可能主要由组蛋白乙酰化修饰参与调控。但由于组蛋白普遍结合于 DNA 上,它们并不能单独决定哪些基因选择性表达,只有能决定哪些基因上组蛋白被乙酰化的因子,才是决定胚胎心脏正常发育的关键。p300 是一类大分子组蛋白乙酰化酶,是重要的基因调控酶。我们前期研究表明 p300 在心脏的表达水平和分布区域随着心脏的发育出现时空变化,这种变化对调节心脏发育的众多相关基因起重要作用[4]。本研究以 p300 抗体沉淀与之交联 DNA 后 定量 PCR 结果显示,p300 通过某种方式与 GATA4、MEF2C、Nkx2.5 和 Tbx5 基因启动子相互作用,并且,p300 抗体沉淀的 GATA4、MEF2C 和 Tbx5 基因启动子区的 DNA 量在小鼠胚胎心脏 E10.5 和 E16.5 变化趋势与 Ac-H3 抗体 ChIP 沉淀的这些基因启动子 DNA 量变化趋势相同,提示 p300 可能通过乙酰化基因启动子区的组蛋白而调控这些基因的表达。由此我们推论在心脏发育过程中 p300 调控心脏发育特异转录因子动态表达的机制之一是通过乙酰化这些基因启动子区的组蛋白,来调控心脏发育相关基因在时间上的精确表达,从而保证心脏的正常发育。然而 p300 是如何发挥这一作用的呢?是不是有特异的关键因子在特定时间点招募 p300 而使其发挥作用?这是一个更深层次机制的探讨,也是本课题需要解决的关键问题。

心脏从开始发育到最终成熟,再到成熟后的功能维护,

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)07-0965-05

当归多糖照射前后给药对放射损伤小鼠造血功能恢复的比较研究

张 雁,吴 宏,关雪晶,周 玥
(重庆医科大学干细胞与组织工程研究室、基础医学院组胚教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究和比较当归多糖(Adhesion molecule,APS)2 种不同给药方式对放射损伤小鼠造血功能的修复作用。方法:外周血 WBC、RBC、PLT 及 BMNC 计数;流式细胞术检测 APS 对放射损伤小鼠 Sca-1⁺BMNC 粘附分子 CD44 和 CD49d 表达、BMNC 细胞周期的影响;MTT 法测定 APS 对放射损伤小鼠骨髓细胞增殖活性的影响。结果:与正常组比较,各 NS 组外周血 WBC、RBC、PLT 及 BMNC 计数明显减少,Sca-1⁺BMNC CD44、CD49d 表达、骨髓细胞增殖活性明显下降,BMNC G_0/G_1 期细胞比例显著增加。各 APS 预处理组能在更早期促进外周血各系和 BMNC 数目恢复、更早促进 Sca-1⁺BMNC 表面 CD44 和 CD49d 的表达下降使放射损伤小鼠造血功能较同时间点、同等剂量 APS 治疗组恢复快。各 APS 预处理组骨髓细胞增殖活性、BMNC G_0/G_1 期细胞比例较同时间点、同等剂量 APS 治疗组差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:APS 对放射损伤小鼠造血功能具有修复作用,初步观察 APS 预处理组优于 APS 治疗组。

【关键词】当归多糖;粘附分子;Sca-1;CD44;CD49d
【中国图书分类法分类号】R146 【文献标识码】A 【收稿时间】2009-11-23

Compared study of hematopoietic recovery of angelica polysaccharides dosaged pre-irradiation and post irradiation on radiation injured mice

ZHANG Yan, et al
(*Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of Angelica polysaccharides on hematopoietic type of acute radiation sickness in mice. *Methods*: Techniques of peripheral blood cells and BMNC count were made; flow cytometry detected the expression of CD49d, CD44 on Sca-1⁺BMNC and the cell cycle on BMNC, the proliferation of BMNC were evaluated by MTT assay. *Results*: As

作者介绍:张 雁(1982-),女,硕士,
研究方向:造血干细胞生物学与中药药理学。
通讯作者:吴 宏,女,教授,E-mail:wuhong6368@126.com。
基金项目:重庆市自然科学基金计划项目(编号:2007BB5284)。

这是一个整体的、动态的过程。我们只有认识了整个过程中大量基因所起的作用和基因精确表达的调控机制,才能从根本上预防和解决心脏疾患。组蛋白乙酰化修饰正是除了基因本身的相互作用之外的一个全新角度,这也将为心脏发育的研究注入新的热点。p300 在心脏发育基因中的重要作用使它可能成为先天性心脏病临床干预预防的关键点,这些将为探明先天性心脏病的发生机理并施以干预进行临床预防提供强有力的基础理论依据。

参 考 文 献

[1] Christoffels V M, Habets P E, Franco D, el al. Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart[J]. Dev Biol, 2000, 223(2): 266-278.
[2] Olson E N. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart[J]. Science, 2006, 313(5795): 1922-1927.
[3] Harvey R P. Patterning the vertebrate heart[J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(7): 544-556.
[4] Chan H M, La Thangue N B. p300/CBP proteins: HATs for trseciptional bridges and scaffolds[J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 13): 2363-2373.
[5] Chen G Z, Zhu J, Lv T, et al. Spatiotemporal expression of histone acetyltransferases, p300 and CBP, in developing embryonic hearts[J]. J Biomed Sci, 2009, 16: 24.
[6] Kim Y, Nirenberg M. Drosophila NK-homeobox gene[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(20): 7716-7720.
[7] Sadoul K, Boyault C, Pabion M, et al. Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases[J]. Biochimie, 2008, 90(2): 306-312.
[8] Phan H M, Xu A W, Coco C, et al. GCN5 and p300 share essential functions during early embryogenesis[J]. Dev Dyn, 2005, 233(4): 1337-1347.
[9] Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome[J]. Nature, 2002, 420(6915): 520-562.
[10] Bruneau B G. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis [J]. Circ Res, 2002, 90(5): 509-519.
[11] Pu W T, Ishiwata T, Juraszek A L, et al. GATA4 is a dosage-sensitive regulator of cardiac morphogenesis[J]. Dev Biol, 2004, 275(1): 235-244.
[12] Lin Q, Schwarz J, Bucana C, et al. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C[J]. Science, 1997, 276(5317): 1404-1407.

(责任编辑:冉明会)