

Islet-1 促 MSCs 心肌特化过程中 Nkx2.5 启动子区域 DNA 甲基化水平变化*

尹耐靖¹ 杨春梅¹ 谭彬¹ 张春敏¹ 燕莎¹ 崔建邦¹ 田杰² 朱静¹

[摘要] 目的:研究 Islet-1 诱导 C3H10T1/2 细胞定向分化为心肌样细胞过程中表达增加的心肌早期发育相关基因 Nkx2.5 启动子区域 DNA 甲基化水平的变化情况。方法:高表达 Islet-1 基因的慢病毒载体转染间充质干细胞 C3H10T1/2,免疫荧光检测 Islet-1 表达情况,在 Nkx2.5 表达达高峰的时间点,通过甲基化特异性 PCR 技术检测其启动子区域 DNA 甲基化水平,比较 C3H10 组(空白对照组)、阴性对照组(转染慢病毒空载体)和实验组(转染高表达 Islet-1 基因的慢病毒载体)上述基因启动子区域的 DNA 甲基化水平。结果:实验组 Nkx2.5 基因启动子区域 DNA 甲基化水平低于其他两组(均 $P < 0.05$)。结论:高表达 Islet-1 促 C3H10T1/2 细胞特异性向心肌细胞方向分化过程中,心肌早期发育相关基因启动子区域 DNA 甲基化水平降低,促进其表达增加。

[关键词] Islet-1;心肌发育;DNA 甲基化;间充质干细胞;心肌细胞

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2014.06.019

[中图分类号] R541.4 **[文献标志码]** A

DNA methylation of Nkx2.5 level during Islet-1 promotes cardiac specific differentiation of mesenchymal stem cells

YIN Naijing¹ YANG Chunmei¹ TAN Bin¹ ZHANG Chunmin¹
YAN Sha¹ CUI Jianbang¹ TIAN Jie² ZHU Jing¹

(¹Ministry of Education Key Laboratory of Developmental Diseases in Childhood, Chongqing, 400014, China; ²Cardiovascular Department, Children's Hospital, Chongqing Medical University)

Corresponding author: ZHU Jing, E-mail: jingzhu@cqmu.edu.cn

Abstract Objective: To investigate the DNA methylation changes of cardiac relative gene Nkx2.5 during the process Islet-1 promotes cardiac specific differentiation of C3H10T1/2 cells. **Method:** Lentiviral vectors that expressed Islet-1 (Lenti-Islet-1) were constructed and used for C3H10T1/2 cells transduction. Flow cytometry was used to detect the transfection efficiency of C3H10T1/2 cells transfected with lentiviral vectors. Fluorescence microscope was used to observe Islet-1 expression. Methylation specific PCR was used to detect the DNA methylation differences of Nkx2.5 among C3H10 group, negative control group and experiment group. **Result:** DNA methylation of cardiac relative gene Nkx2.5 in experiment group was much lower than that in C3H10 group and negative control group (both $P < 0.05$). **Conclusion:** DNA methylation of cardiac relative genes reduce to promote these genes' expressions during the process mesenchymal stem cells are specific differentiated into cardiomyocyte-like cells.

Key words Islet-1; cardiac differentiation; DNA methylation; mesenchymal stem cell; cardiomyocyte

随着生活环境的改变和人口老龄化问题的加重,各种因素导致的心肌细胞损伤性疾病已成为影响许多国家地区老年人群生活质量的主要原因^[1]。在此类疾病的诸多治疗方法中,特异性诱导后的干细胞替代治疗是一种非常具有前景的治疗方法。多种干细胞都具备向心肌细胞分化的能力,其中,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)由于具有多向分化潜能、自我更新能力、低免疫原性和

易获得性等特征,被认为是进行干细胞替代治疗的首选细胞^[2-4]。本课题组前期研究证实,高表达 Islet-1 可以促进 MSCs 向心肌细胞方向特异性分化,组蛋白乙酰化修饰在此过程中发挥着重要的调控作用^[5-6]。但与组蛋白乙酰化关系密切的表观遗传学调控机制--DNA 甲基化调控机制是否也发挥作用尚未明确。本研究拟向小鼠胚胎来源间充质干细胞 C3H10T1/2 中转染高表达 Islet-1 的慢病毒载体促其向心肌方向分化,通过甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MS-PCR) 技术检测转染后在心脏早期发育中对心肌细胞的分化、整个心血管的形成与环化起到重要调控作用的基因 Nkx2.5 启动子区域 DNA 甲基化水平的变化,探

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81370261)

¹重庆医科大学儿科研究所 儿童发育与疾病研究教育部重点实验室 儿科学重庆市重点实验室(儿童发育重大疾病诊治与预防)国际科技合作基地(重庆,400014)

²重庆医科大学附属儿童医院心血管内科

通信作者:朱静, E-mail: jingzhu@cqmu.edu.cn

讨 Islet-1 表达与 Nkx2.5 启动子区域 DNA 甲基化水平的相互关系。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

C3H10T1/2 细胞株(美国芝加哥大学分子肿瘤实验室),胎牛血清(HyClone),DMEM/F12 培养基(Corning cellgro),polybrene(翊圣生物),胰酶(Gibco),Islet-1 单克隆抗体(Epitomics),山羊抗兔荧光二抗(Cy3,康为世纪),正常山羊血清封闭液(Boster),DAPI(凯基生物),抗荧光淬灭封片剂(碧云天生物),DNA 提取试剂盒(百泰克),DNA 亚硫酸盐处理试剂盒(ZYMO),PCR 聚合酶预混液(百泰克),琼脂糖粉(TaKaRa),DNA 染料(百泰克),DNA ladder marker(DL-5000, TaKaRa),MSP 引物(使用 MethPrimer 软件设计,由三博远志公司合成)。

1.2 实验方法

1.2.1 高表达 Islet-1 的慢病毒载体构建 小鼠来源的 Islet-1 基因获取、目的基因 PCR 产物双酶切纯化、连接反应、纯化、阳性克隆鉴定和重组质粒抽提、慢病毒载体的包装、纯化、鉴定、生产及病毒滴度测定由重庆威斯腾生物技术中心完成,实验方法参考文献^[7-8]。

1.2.2 C3H10T1/2 细胞培养及实验分组 从液氮存储罐中取出冻存的 C3H10T1/2 细胞,置入 37℃ 水浴箱中快速解冻,75%酒精消毒后将冻存管移至生物安全柜内,吸取细胞悬液 1 ml 至离心管中,向离心管中按照先慢后快的速度滴加 5 ml 含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,室温下以 $1\,000\times g$ 的转速离心 5 min,弃去上清液,加入 5 ml 完全培养基吹打混匀后移入培养瓶,放入 CO₂ 含量为 5%的 37℃ 培养箱中培养,24 h 后观察细胞生长状态并换液。待培养瓶中细胞铺满 70%~80%后,将仍处于对数生长期的细胞用胰酶消化、传代。本实验包含 3 个实验组,分别是 C3H10 组(未经处理的 C3H10T1/2 细胞,空白对照)、阴性对照组(转染慢病毒空载体的 C3H10T1/2 细胞)和实验组(转染高表达 Islet-1 基因的慢病毒载体的 C3H10T1/2 细胞)。

1.2.3 慢病毒载体转染 C3H10T1/2 细胞、转染率检测及转染后细胞形态学观察 按照细胞数目为 4×10^4 /孔将 C3H10T1/2 细胞铺于 24 孔板内,待细胞生长至密度达 60%时,分别向各孔中加入 polybrene 使其最终浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$,按照病毒感染复数 MOI=20 向各孔内加入相应数量的病毒,培养 12 h 后更换为完全培养基,72 h 后通过荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达情况。取转染后 96 h 的细胞通过流式细胞术检测阴性对照组及实验组的转染效率。倒置显微镜下观察 C3H10 组、阴性对照

组和实验组细胞之间的形态学差异。

1.2.4 免疫荧光显微镜观察转染后 Islet-1 表达情况 1 cm $\times$ 1 cm 盖玻片泡酸过夜,冲洗干净后 95%乙醇浸泡过夜,双蒸水清洗后烘干,高压蒸汽灭菌备用。处理好的盖玻片置入 24 孔板,将处于对数生长后期的细胞用胰酶消化后吹打混匀滴入各孔,使每孔细胞量为 $(1.0\sim 1.5)\times 10^4/\text{ml}$,经过细胞爬片、4%多聚甲醛固定、1%Triton 处理、血清封闭、Islet-1 单克隆抗体孵育、复温、Cy3 荧光二抗孵育、DAPI 染色、抗荧光淬灭封片剂封片后,置于荧光显微镜下观察并采集图像。

1.2.5 各组细胞基因组 DNA 提取 慢病毒载体转染后 2 周,将处于对数生长后期的 C3H10 组、阴性对照组和实验组细胞消化下来,移入离心管内,室温下以 $1\,000\times g$ 的转速离心 5 min 后弃去上清液,加入 1 ml 培养基将细胞重悬并移入 1.5 ml 去酶离心管中,按照 DNA 提取试剂盒的操作步骤,分别提取各组细胞基因组 DNA,使用 NanoDrop ND-1000 型紫外分光光度计检测浓度后将各组 DNA 置于 -20℃ 保存。

1.2.6 各组细胞基因组 DNA 亚硫酸盐处理 根据浓度计算亚硫酸盐处理过程中 C3H10 组、阴性对照组和实验组基因组 DNA 的上样体积,确保各组 DNA 的上样量均为 350 ng,上样体积不足 20 μl 者加无菌三蒸水补足。按照 DNA 亚硫酸盐处理试剂盒的操作步骤,向 20 μl DNA 样品中加入 130 μl 亚硫酸盐处理试剂,以 98℃ $\times$ 10 min、64℃ $\times$ 2.5 h 的条件孵育样品,孵育后将样品置于 4℃ 避光保存至 20 h,缓冲液洗涤、去亚硫酸盐反应后,获得亚硫酸盐处理后的基因组 DNA,储存于 -80℃ 备用。

1.2.7 甲基化特异性 PCR 及 DNA 凝胶电泳 MS-PCR 采用 10 μl 体系:PCR 聚合酶预混液 5 μl ;亚硫酸盐处理后的模板 DNA 3 μl ,上下游引物分别为 0.5 μl ;三蒸水 1 μl 。PCR 反应条件如下:预变性 95℃ $\times$ 7 min,变性 95℃ $\times$ 30 s,退火 62℃ $\times$ 30 s,延伸 72℃ $\times$ 10 s,扩增 36 个循环,最终延伸 72℃ $\times$ 10 min。MS-PCR 引物采用 MethPrimer 软件设计,方法参考文献^[9]。Nkx2.5 基因甲基化及非甲基化引物序列如下:甲基化上游 5'-ATTAG-GTGACGTAGAATTGTTTCGTC-3',甲基化下游 5'-CGCCTCTCTACCCTAAATATAACG-3';非甲基化上游 5'-TAGGTGATGTAGAATTGTTTGT-TGT-3',非甲基化下游 5'-CCACCTCTCTACCCTAAATATAACAC-3'。Nkx2.5 基因甲基化引物产物长度为 154 bp,非甲基化引物产物长度为 153 bp。配制 0.25 $\times$ TAE 琼脂糖电泳缓冲液,向锥形瓶中加入 0.24 g 琼脂糖粉及 16 ml 0.25 $\times$ TAE 电泳缓冲液,加热使琼脂糖充分均匀溶解,待溶液冷却至 60℃ 加入 0.16 μl 核酸染料轻摇混匀

后倒入制胶模中,室温放置使琼脂糖充分凝固。将琼脂糖凝胶放入电泳槽中,使电泳液没过凝胶表面约 1 mm, DNA marker 上样量为 $5 \mu\text{l}$, 甲基化特异性 PCR 产物上样量为 $9 \mu\text{l}$, 以 120 V 电压电泳 45 min, 使用 G:BOX 荧光化学发光凝胶成像系统 (SYNGENE 公司) 观察琼脂糖凝胶电泳结果并使用 Quantity One 软件对电泳条带灰度值进行分析。

1.3 统计学处理

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 17 (SPSS 公司) 软件进行数据统计分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

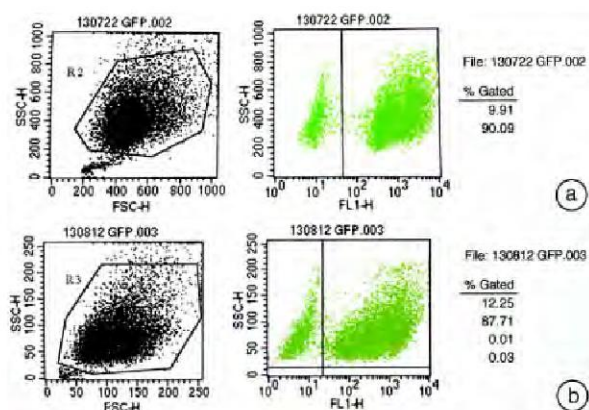
2 结果

2.1 高表达 Islet-1 的慢病毒载体构建

高表达 Islet-1 基因的慢病毒载体构建过程中, 将获得的阳性克隆进行测序, 测序结果和克隆模板序列比对结果表明目的基因号克隆为鉴定正确的阳性克隆。高表达 Islet-1 的慢病毒载体滴度为 1.9×10^8 TU/ml, 慢病毒空载体滴度为 5×10^8 TU/ml。

2.2 高表达 Islet-1 的慢病毒载体转染间充质干细胞 C3H10T1/2

流式细胞术检测转染效率, 阴性对照组转染效率为 90.09% (图 1a), 实验组转染效率为 87.71% (图 1b)。慢病毒载体转染后 5 d, 荧光显微镜下可观察到阴性对照组和实验组细胞有明显的绿色荧光蛋白 (GFP) 表达 (图 2)。



a: 阴性对照组; b: 实验组。

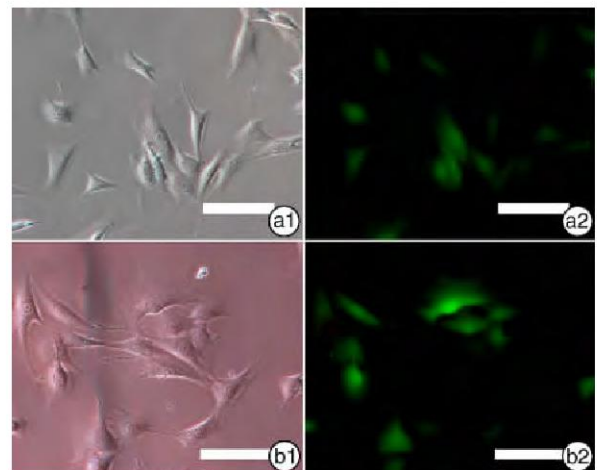
图 1 流式细胞术检测慢病毒载体转染效率

Figure 1 Lentiviral vector transfection efficiency detected by flow cytometry

2.3 细胞形态学改变

慢病毒载体转染 4 周后, C3H10 组 (图 3a) 和阴性对照组 (图 3b) 细胞排列无序, 形态未见明显差异。实验组 (图 3c、d) 多个区域可见细胞排列相对紧密、趋向于同一方向, 形态大致呈梭型, 与 C3H10

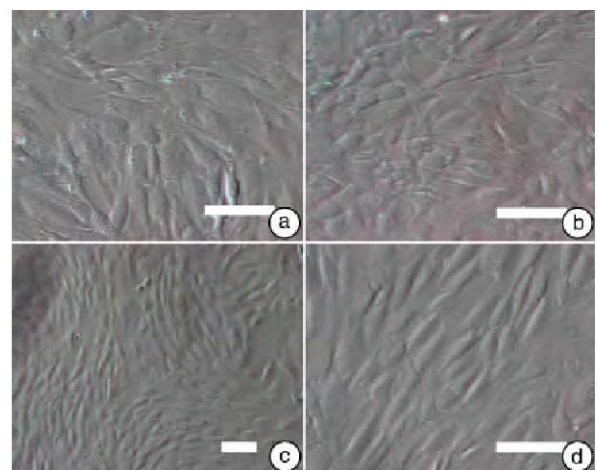
组和阴性对照组细胞差异明显。



a1、a2: 阴性对照组; b1、b2: 实验组。标尺为 100 μm 。

图 2 荧光显微镜观察 GFP 表达情况 ($\times 200$)

Figure 2 GFP expression observed by fluorescence microscopy ($\times 200$)



a: C3H10 组; b: 阴性对照组; c、d: 实验组。a、b、d 为 200 倍, c 为 100 倍, 标尺为 100 μm 。

图 3 慢病毒载体转染后细胞的形态学改变

Figure 3 Cell morphology changes after lentiviral vector transfection

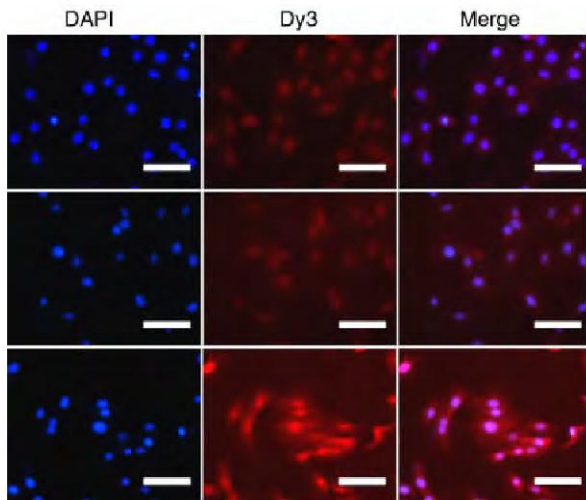
2.4 Islet-1 表达检测

荧光显微镜检测各组细胞 Islet-1 蛋白表达, 结果显示转染高表达 Islet-1 的慢病毒载体后, 实验组细胞 Islet-1 蛋白表达明显, 且 Islet-1 多表达于细胞核内, C3H10 组和阴性对照组未见明显 Islet-1 蛋白表达 (图 4)。

2.5 高表达 Islet-1 的慢病毒载体转染后心肌早期发育相关基因启动子区域甲基化水平检测

转染高表达 Islet-1 的慢病毒载体后, 在心肌早期发育相关基因表达达高峰的两周时间点, 实验组 Nkx2.5 基因启动子区域甲基化水平较 C3H10 组

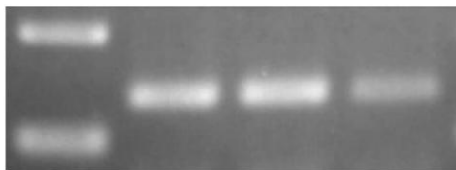
和阴性对照组降低(此处补充数值,删去条形图),其差异具有统计学意义($P < 0.05$,图5),非甲基化引物各组均未见扩增产物。



DAPI 将细胞核染成蓝色,Islet-1 蛋白呈现红色荧光。第 3 行为实验组;第 2 行为阴性对照组;第 1 行为 C3H10 组。标尺为 100 μm 。

图 4 Islet-1 蛋白表达检测($\times 200$)

Figure 4 Islet-1 protein expression($\times 200$)



从左至右依次为 marker、C3H10 组、阴性对照组和实验组,marker 条带自上而下依次为 250 和 50 bp。

图 5 心肌早期发育相关基因 Nkx2.5 启动子区域 DNA 甲基化水平

Figure 5 DNA methylation levels in Nkx2.5 promoter region

3 讨论

MSCs 向心肌方向分化过程中受多层次的调节,存在一个由遗传和表观遗传修饰有机结合的调控网络^[10]。课题组前期研究发现,Islet-1 具有调节 MSCs 向心肌样细胞分化的作用,并且这种调控作用具有心肌组织特异性^[8]。高表达 Islet-1 后心肌特异性基因启动子区域组蛋白乙酰化水平升高,使基因表达水平升高,证实 Islet-1 可以通过调节心肌早期发育相关基因组蛋白乙酰化水平来发挥诱导 MSCs 向心肌方向特异性分化的作用^[11-12]。

然而,调整多种影响组蛋白乙酰化水平的因素后,课题组仍未获得可用于替代治疗的心肌细胞。基因组 DNA 甲基化水平和特异基因 DNA 甲基化水平改变与心血管系统的发育及多种心血管疾病都存在着密切联系^[13]。我们推测,在特异性调控基

因表达方面,Islet-1 介导的组蛋白乙酰化调控机制可特异性识别心肌早期发育相关基因,使相应基因的启动子区域结构变疏松以利于转录因子结合;而促进 MSCs 向心肌样细胞高分化的重要条件——心肌细胞发育相关基因的时序表达,则主要依靠时序性调控基因的启动和沉默来实现,在这个过程中,DNA 甲基化调控机制可能发挥着重要的作用。

本研究发现,C3H10T1/2 细胞转染高表达 Islet-1 的慢病毒载体后,心肌早期发育相关基因 Nkx2.5 启动子区域 DNA 甲基化水平低于 C3H10 组和阴性对照组。表明在高表达 Islet-1 的细胞内,心肌早期发育相关基因启动子区域甲基化水平降低可促进相应基因表达,加之基因上结合的组蛋白乙酰化水平升高使染色质结构变疏松利于转录复合物结合^[8,11-12]。二者的共同作用促进心肌早期发育相关基因表达,使间充质干细胞向心肌方向特异性分化。综上所述,本实验充分表明 Islet-1 可以通过降低心肌早期发育相关基因启动子区域 DNA 甲基化水平来促进基因的表达,为进一步研究高表达 Islet-1 特异性促进间充质干细胞向心肌样细胞分化过程中 DNA 甲基化调控机制的作用,以及 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化调控机制的相互关系提供一定的实验基础,以期为干细胞诱导后移植治疗心肌损伤性疾病提供合理的诱导途径。

参考文献

- [1] GO A S, MOZAFFARIAN D, ROGER V L, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics—2013 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2013, 127: 143—152.
- [2] BIANCO P, ROBEY P G, SIMMONS P J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays[J]. Cell Stem Cell, 2008, 2: 313—319.
- [3] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284: 143—146.
- [4] 秦佳佳,洗绍祥,黄习文,等. 体外诱导间充质干细胞向心肌样细胞分化的研究: 药物、微环境及方法[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(1): 139—142.
- [5] FENG C, ZHU J, ZHAO L, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid promotes cardiomyocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells[J]. Exp Cell Res, 2009, 315: 3044—3051.
- [6] CHEN G, 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—24.
- [7] TOSCANO M G, FRECHA C, ORTEGA C, et al. Efficient lentiviral transduction of Herpesvirus saimiri immortalized T cells as a model for gene therapy in

白细胞介素-37介导炎症反应平衡保护小鼠 心肌缺血再灌注损伤的机制*

吴帮卫¹ 孟凯¹ 赵晓琦¹ 刘宇宙¹ 俞坤武¹ 钟禹成¹ 吉庆伟² 曾秋棠¹

[摘要] 目的:探讨外源性重组人源性白细胞介素(IL)-37对小鼠心肌缺血再灌注损伤的影响。方法:8~10周雄性c57BL/6小鼠为实验对象,随机分为假手术组、缺血再灌注(I/R)对照组和I/R+IL-37干预组,每组6只。观察各组小鼠I/R后心肌坏死面积及心功能(24 h后),检测缺血心肌处中性粒细胞募集(MPO),以及缺血心肌和血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-1 β 、IL-6、IL-10、转化生长因子- β (TGF- β)表达(4 h后)。结果:与假手术组比较,I/R对照组心功能明显下降,TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平明显增高。IL-37干预组可以明显抑制TNF- α 、IL-1 β 和IL-6表达,增加IL-10与TGF- β 水平,减轻MPO,减少心肌坏死面积并改善心功能。结论:IL-37减轻小鼠心肌I/R损伤,可能与抑制MPO、降低促炎因子表达以及上调抗炎因子表达相关。

[关键词] 白细胞介素-37; 缺血再灌注损伤; 中性粒细胞; 炎症反应

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2014.06.020

[中图分类号] R542.2 **[文献标志码]** A

Mechanism of interleukin-37 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by balancing inflammatory response in mice

WU Bangwei¹ MENG Kai¹ ZHAO Xiaochi¹ LIU Yuzhou¹
YU Kunwu¹ ZHONG Yucheng¹ JI Qingwei¹ ZENG Qiutang¹

(¹Department of Cardiology, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China; ²Department of Cardiology, The people's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region)

Corresponding author: ZENG Qiutang, E-mail: zengqutang@gmail.com

Abstract Objective: To investigate the effect of IL-37 on myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. **Method:** Sham or I/R operations were performed on male C57BL/6J mice, and I/R mice were randomly divided into control group and IL-37 treated group (each group: $n=6$). Then the infarct size and cardiac function were detected in 24 hours after reperfusion, the MPO activity was measured as an indicator of neutrophil infiltration in the ischemic myocardium 4 hours after reperfusion, and the expressions of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF- β) in heart tissue and serum were measured 4 hours after reperfusion. **Result:** Compared with sham group, I/R mice showed a decreased cardiac function accompanying with an increased level of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6). However, compared with I/R control mice, IL-37 treated I/R mice significantly reversed the process as demonstrated by reduced infarct size, improved

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No:81270354,81160045)

¹华中科技大学附属协和医院心内科(武汉,430022)

²广西壮族自治区人民医院心内科

通信作者:曾秋棠, E-mail: zengqutang@gmail.com

- primary immunodeficiencies[J]. Gene Ther, 2004, 11: 956-961.
- [8] 智深深,田杰,刘官信,等. 小鼠 Islet-1 基因慢病毒表达载体的构建及其诱导 C3H10T1/2 细胞向心肌细胞特异性分化[J]. 基础医学与临床, 2011, 31(7): 740-745.
- [9] 张艳,陈彬,陈敏,等. DNA 甲基化 PCR 引物的设计[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(3): 268-269.
- [10] YANG G, TIAN J, FENG C, et al. Trichostatin A promotes cardiomyocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells after 5-azacytidine induction or during co-culture with neonatal cardiomyocytes via a mechanism independent of histone deacetylase inhibition[J]. Cell Transplantation, 2012, 21: 985-996.
- [11] 鲁荣,朱静,田杰,等. Islet-1 诱导 C3H10T1/2 细胞向心肌样细胞分化过程中对心肌特异蛋白基因上组蛋白乙酰化的促进作用[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(10): 938-942.
- [12] 林建萍,田杰,刘官信,等. Islet-1 在乙酰化调控网络中特异性辅助 C3H10T1/2 细胞向心肌样细胞分化[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(4): 363-368.
- [13] GEELHOED J J, JADDOE V W. Early influences on cardiovascular and renal development[J]. Eur J Epidemiol, 2010, 10: 677-692.

(收稿日期:2013-11-07)