

间充质干细胞向心肌样细胞特异分化过程中Akt与Islet-1/GCN5蛋白质复合体关系的研究

陈雪妮 朱静* 田杰 易勤 黄月

(重庆医科大学附属儿童医院, 儿童发育与疾病研究教育部重点实验室,
儿童泌尿生殖发育与组织工程重点实验室, 重庆 400014)

摘要 该文研究了Islet-1诱导间充质干细胞C3H10T1/2向心肌样细胞特异分化过程中Akt与Islet-1/GCN5(general control of amino acid biosynthesis protein 5)蛋白质复合体的关系, 进一步探讨了间充质干细胞诱导分化的调控机制。该文用过表达Islet-1基因的慢病毒感染小鼠间充质干细胞C3H10T1/2, 倒置显微镜观察细胞形态, 免疫荧光检测Islet-1、cTnT(cardiac troponin T)、Connexin43蛋白质水平, 免疫共沉淀技术(CoIP)检测激活或抑制Akt的情况下Islet-1与GCN5的结合情况。结果表明, 感染过表达Islet-1基因慢病毒的C3H10T1/2细胞形态出现心肌样变, Islet-1、cTnT、Connexin43蛋白质水平均高于未感染组。在Islet-1蛋白质高峰的第三周时间点, 激活或抑制Akt的情况下, Islet-1与GCN5的结合量分别低于或高于未加药处理的细胞组($P < 0.05$)。该研究结果表明, 在诱导间充质干细胞C3H10T1/2向心肌样细胞特异分化过程中Akt的活性与Islet-1/GCN5蛋白质的结合量存在相互拮抗的关系。

关键词 Islet-1; Akt; GCN5; 免疫共沉淀; 间充质干细胞; 心肌细胞

Study of the Interaction between Akt and Islet-1/GCN5 Protein Complex during Mesenchymal Stem Cells Specific Differentiation into Cardiomyocytes

Chen Xueni, Zhu Jing*, Tian Jie, Yi Qin, Huang Yue

(The Children's Hospital Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Developmental Disease in Childhood and Chongqing Key Laboratory of Children Urogenital Development and Tissue Engineering, Chongqing 400014, China)

Abstract This study has investigated the interaction between Akt and Islet-1 in GCN5 (general control of amino acid biosynthesis protein 5) protein complex during C3H10T1/2 cells specific differentiation into cardiomyocytes, and has further clarified the regulatory mechanism of differentiation of mesenchymal stem cells (C3H10T1/2). The mouse marrow mesenchymal stem cells C3H10T1/2 was infected with the lentiviral vector containing *Islet-1* gene. The morphology of cells was observed by microscope, immunofluorescence was applied to detect the levels of Islet-1, cTnT (cardiac troponin T), Connexin43, coimmunoprecipitation (CoIP) was applied to detect the interaction between Akt and Islet-1-GCN5 protein complex. The morphology of C3H10T1/2 cell group infected with *Islet-1* lentivirus showed cardiomyocyte-like cell, and the protein levels of Islet-1, cTnT

收稿日期: 2017-10-05 接受日期: 2018-01-24

国家自然科学基金(批准号: 81670270)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63633340, E-mail: jingzhu@cqmu.edu.cn

Received: October 5, 2017 Accepted: January 24, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81670270)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63633340, E-mail: jingzhu@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2018-05-15 18:09:49 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180515.1809.010.html>

and Connexin43 were higher than that in the uninfected group. At the peak time (the third week) of the protein level of Islet-1, the binding capacity of Islet-1 and GCN5 was lower and higher than that of the untreated group under the situation of activation and inhibition of Akt, respectively ($P < 0.05$). The results suggested that when Islet-1 promotes cells into cardiac-specific differentiation process, the activity of Akt is antagonistic to the protein binding capacity of Islet-1 and GCN5 during induction of mesenchymal stem cell C3H10T1/2 into cardiomyocyte cells.

Keywords Islet-1; Akt; GCN5; CoIP; mesenchymal stem cells; cardiomyocyte cells

心脏病的发病率随着人们生活水平的提高呈逐年上升的趋势, 由于心肌细胞没有自我更新能力、心肌损伤的不可逆等原因, 并且越来越多的普通疗法已经不能彻底治愈心脏疾病, 所以找到一种安全有效的替代疗法尤为重要^[1]。随着越来越多研究者着眼于干细胞研究, 人们发现利用干细胞的多向分化与自我更新能力, 施以不同的刺激因子可将其诱导分化为功能性心肌细胞, 这种以干细胞为基础的替代疗法近年来成为热点^[2-4]。而在各种干细胞中, 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)因其易获得、低免疫原性、无伦理问题等优点, 作为研究对象被广泛应用于组织工程领域^[5]。然而, 将干细胞替代治疗由理论研究完全运用于临床还需解决干细胞注入体内的低分化率、低存活率等关键问题^[5]。所以探讨干细胞定向分化为心肌样细胞的机制, 对于干细胞替代疗法的进一步研究和临床应用都有十分重要的指导意义。

在诱导MSCs特化为心肌样细胞的各种因素中, Islet-1作为一个调控心肌组织特异性和心肌发育必备的因子而备受瞩目^[6-8]。据文献报道, Islet-1作为心肌祖细胞标志物之一, 含有一个DNA结合结构域与两个LIM结构域, 它们可以分别与特异基因上的DNA和乙酰基转移酶相结合, 而组蛋白乙酰化修饰可以开启基因的表达早已得到证实^[9-10]。本课题组前期研究发现, 在诱导MSCs特化为心肌样细胞的过程中, 组蛋白乙酰基转移酶GCN5可以与Islet-1形成蛋白质复合物, 协作间充质干细胞诱导分化为心肌样细胞^[11-12]。有文献报道, Akt是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 它通过被磷酸化来激活或抑制下游靶蛋白从而引起信号转导, 而干细胞是维持干性还是进入分化状态很大程度上是通过外来信号及胞内应答来决定的^[13]。有研究表明, 一些Akt下游因子, 如Oct4、Sox2、Nanog作为胚胎干细胞标志物, 对胚胎的早期发育、干细胞自我更新与定

向分化能力的维持有着重要作用^[14-16], 而这些胚胎干细胞标志物是Akt信号通路参与干细胞干性维持的重要靶点。但Akt与GCN5/Islet-1形成的蛋白质复合物之间的关系还无相关报道。本研究将采用过表达Islet-1基因的慢病毒感染小鼠间充质干细胞C3H10T1/2, 探讨在诱导MSCs特化为心肌样细胞的过程中Akt与Islet-1/GCN5形成的蛋白质复合物的关系, 为进一步明确MSCs诱导分化的调控机制、提高MSCs分化率、实现广泛的临床应用打下坚实的实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

DMEM/F12培养基、胎牛血清购自Gibco公司; 胰蛋白酶购自Solarbio公司; MK-2206(Akt1/Akt2/Akt3蛋白激酶抑制剂, dihydrochloride)购自Cayman公司; 小鼠胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)购自Prospec公司; 抗 β -actin鼠单克隆抗体购自北京四正柏生物科技有限公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG、山羊抗鼠IgG均购自ATGene公司; Islet-1单克隆抗体、Connexin43单克隆抗体、cTnT单克隆抗体、GCN5单克隆抗体、p-Akt单克隆抗体、T-Akt单克隆抗体均购自Abcam公司; 总蛋白质提取试剂盒、ECL发光试剂盒均购自南京凯基生物科技发展有限公司; CoIP蛋白裂解液购自ThermoFisher公司; CoIP试剂盒购自Millipore公司; SDS-PAGE蛋白质上样缓冲液购自碧云天生物技术有限公司。

荧光显微镜购自Nikon公司; 流式细胞仪购自BD公司; 蛋白质转印系统转印槽、PCR仪均购自Bio-Rad公司。

1.2 实验细胞

小鼠间充质干细胞C3H10T1/2细胞系由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室惠赠。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组 将本实验分成三组: 实验组(转染过表达Islet-1慢病毒载体的C3H10T1/2细胞)、阴性对照组(转染慢病毒空载体的C3H10T1/2细胞)、空白对照组(未经处理的C3H10T1/2细胞)。

1.3.2 Islet-1慢病毒载体的构建 小鼠过表达Islet-1慢病毒的构建、制备、纯化方法见参考文献[14]。

1.3.3 小鼠间充质干细胞C3H10T1/2的培养 解冻冻存细胞, 然后1 000 r/min离心5 min, 弃去原有培养基, 加入新鲜培养基重悬细胞, 置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养。

1.3.4 慢病毒载体感染C3H10T1/2细胞及荧光蛋白的观察 待细胞汇合度为20%~30%时感染细胞(Moi=20), 以4:1的比例分别加入无血清培养基和感染增强溶液(enhanced infection solution, ENi.S.), 并加入polybrene, 使其最终浓度为5 mg/L, 置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养24 h后, 将无血清培养基更换为完全培养基。48 h后通过荧光显微镜观察荧光蛋白的表达。

1.3.5 细胞形态的观察及感染率检测 倒置相差显微镜观察各组细胞形态学差异, 96 h后通过流式细胞术检测各组的感染效率。

1.3.6 免疫荧光检测感染后, Islet-1、cTnT、Connexin43蛋白质的定位及表达 将细胞接种于24孔板中, 每孔 2×10^4 个细胞, 置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养, 待细胞增殖至70%汇合度时, 以4%多聚甲醛固定15 min, 0.5% Triton X-100处理10 min, 5% BSA封闭30 min, 加入Islet-1、cTnT、Connexin43一抗, 4 °C孵育12~14 h。25 °C复温30 min, 根据一抗来源分别加入对应的羊抗鼠荧光二抗或羊抗兔荧光二抗, 37 °C避光孵育1 h。37 °C DAPI染色30 min, PBS洗去DAPI后加入荧光猝灭剂封片, 于荧光显微镜下观察各组细胞Islet-1、cTnT、Connexin43的定位与表达情况。

1.3.7 Western blot检测Islet-1蛋白质水平及药物处理的最适浓度 用总蛋白质提取试剂盒提取各组蛋白质, BCA法测定各组蛋白质浓度。配置8% SDS-PAGE上样, 目的蛋白质湿转10 h到PVDF膜上, 3%脱脂牛奶封闭1.5 h后加入一抗Islet-1(1.5:4 000)、p-Akt(1:5 000)、T-Akt(1:1 000)、 β -actin(1:10 000), 于4 °C摇床孵育9~10 h, PBST洗膜3次后根据一抗

来源加入对应的羊抗鼠二抗(1:6 000)或羊抗兔二抗(1:4 000), 室温下孵育1 h, PBST清洗3次后加入适量ECL显色剂显影并采集图像。以 β -actin为内参, 比较各组Islet-1、p-Akt、T-Akt蛋白质水平。

1.3.8 免疫共沉淀技术CoIP沉淀不同条件下Islet-1与GCN5的结合情况 按照CoIP蛋白裂解液说明书提取各组蛋白质, BCA法测定各组蛋白质浓度。取1 000 μ g蛋白质用于后续实验, 剩余蛋白质用于Input阳性对照。移除旋转柱的底部并保存, 以备后续使用, 并将旋转柱其插入一个捕获柱, 5 000 r/min离心30 s, 去除树脂浆缓冲液。用400 μ L 1 \times 洗脱液清洗两次树脂, 清空捕获管, 把底部重新插回去。将1 000 μ g蛋白质平均分为两部分, 分别作为沉淀Islet-1实验组与阴性对照IgG组。依次按以下顺序将组分加入旋转柱使其总体积为500 μ L: 1 \times 洗脱液、细胞裂解液、分别加入Islet-1抗体或者阴性对照IgG抗体、抗体捕获亲和配体10 μ L, 于4 °C摇床上孵育14~16 h。把旋转柱放入捕获柱, 加入400 μ L洗脱液, 5 000 r/min离心30 s, 共3次, 去除非特异蛋白。加入70 μ L 1 \times 变性洗脱液进入旋转柱, 5 000 r/min离心30 s, 洗去目的蛋白质, 收集离心下来的液体用作后续Western blot分析。

配置8% SDS-PAGE上样, 目的蛋白质湿转10 h到PVDF膜上, 3%脱脂牛奶封闭1.5 h后加入一抗GCN5(1:5 000)、 β -actin(1:10 000), 于4 °C摇床孵育9~10 h, PBST洗膜3次后根据一抗来源加入对应的羊抗鼠二抗(1:6 000)或羊抗兔二抗(1:4 000), 室温下孵育1 h, PBST清洗3次后加入适量ECL显色剂显影并采集图像。以 β -actin为内参, 比较各组Islet-1与GCN5的蛋白质结合量的情况。

1.3.9 qRT-PCR检测早期心肌特异基因GATA4、Nkx2.5、Mef2c mRNA时序性表达情况 用RNA提取试剂盒提取各组细胞总RNA并进行逆转录, 扩增逆转录产物cDNA, 反应条件为: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 40 s, 共40个循环, 65 °C 5 s, 95 °C 0.5 s。每组均设3个复孔, 以 β -actin为内参, 2^{- $\Delta\Delta$ CT}为基因的相对表达量, 基因引物序列见表1。

1.4 数据处理及统计学分析

用SPSS 18.0统计软件对实验数据进行分析和处理, 实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组之间比较采用单因素方差分析, 两独立样本均数之间的比较采用t检验, $P < 0.05$ 则记为有统计学意义。

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequence of target genes

靶基因 Target genes	上游引物 Forward primers	下游引物 Reverse primers
<i>GATA4</i>	5'-CAT CAA CCG GCC CCT CAT TA-3'	5'-AGG TTC TTG GGC TTC CGT TT-3'
<i>Nkx2.5</i>	5'-GAG CCT GGT AGG GAA AGA GC-3'	5'-GGT GGG TGT GAA ATC TGA GG-3'
<i>MEF2C</i>	5'-TGC TGT GCG ACT GTG AGA TT-3'	5'-ATC GTC TGC ATC GGG ATC TG-3'
<i>β-actin</i>	5'-GGA GAT TAC TGC CCT GGC TCC TA-3'	5'-GAC TAT CGT ACT CCT GCT TGC TG-3'

2 结果

2.1 过表达*Islet-1*慢病毒感染C3H10T1/2细胞模型的构建

2.1.1 过表达*Islet-1*慢病毒感染C3H10T1/2细胞后荧光蛋白的表达和感染效率的检测 感染慢病毒48 h后, 实验组和阴性对照组均可观察到有明显的荧光蛋白GFP的表达(图1)。96 h后检测各组慢病毒感染效率, 结果显示, 阴性对照组*Islet-1*慢病毒感染效率为96.6%, 实验组感染效率为91.7%, 空白对照组感染效率为0, 实验组和阴性对照组感染效率高于空白对照组(图2)。

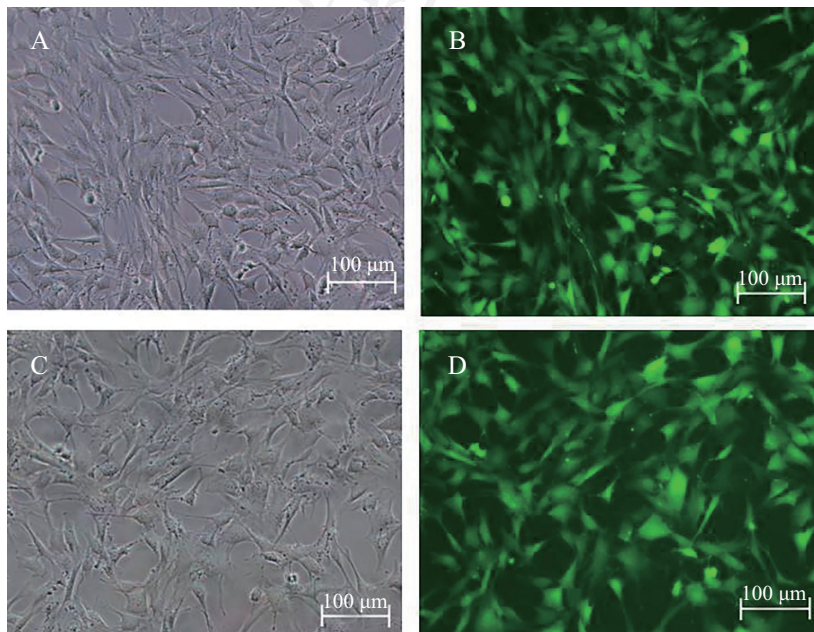
2.1.2 C3H10T1/2细胞过表达*Islet-1*后*Islet-1*蛋白的表达 经过提取三组细胞蛋白质后, 采用Western blot技术检测各组细胞*Islet-1*水平。结果显示, 过表达组细胞的*Islet-1*蛋白质水平明显高于阴性对照组

与空白对照组($P < 0.05$)。

2.2 *Islet-1*对C3H10T1/2细胞分化的影响

2.2.1 C3H10T1/2细胞过表达*Islet-1*后细胞形态学的改变 细胞形态学结果显示, 空白对照组和阴性对照组细胞排列紊乱, 形态不规则, 呈星形或圆形(如图4A和图4B箭头所示)。过表达*Islet-1*组细胞形态逐渐走向一致, 排列紧密, 形态均一, 呈梭形或纤维细胞样(如图4C箭头所示)。

2.2.2 C3H10T1/2细胞过表达*Islet-1*后Connexin43与cTnT的表达 为了进一步验证C3H10T1/2细胞过表达*Islet-1*后是否有心肌结构和功能的蛋白质表达, 我们用免疫荧光技术检测了各组细胞Connexin43、cTnT蛋白质的表达情况。结果显示, 过表达*Islet-1*组细胞Connexin43蛋白、cTnT蛋白荧光表达均明显高于阴性对照组和空白对照组(图5和图6)。

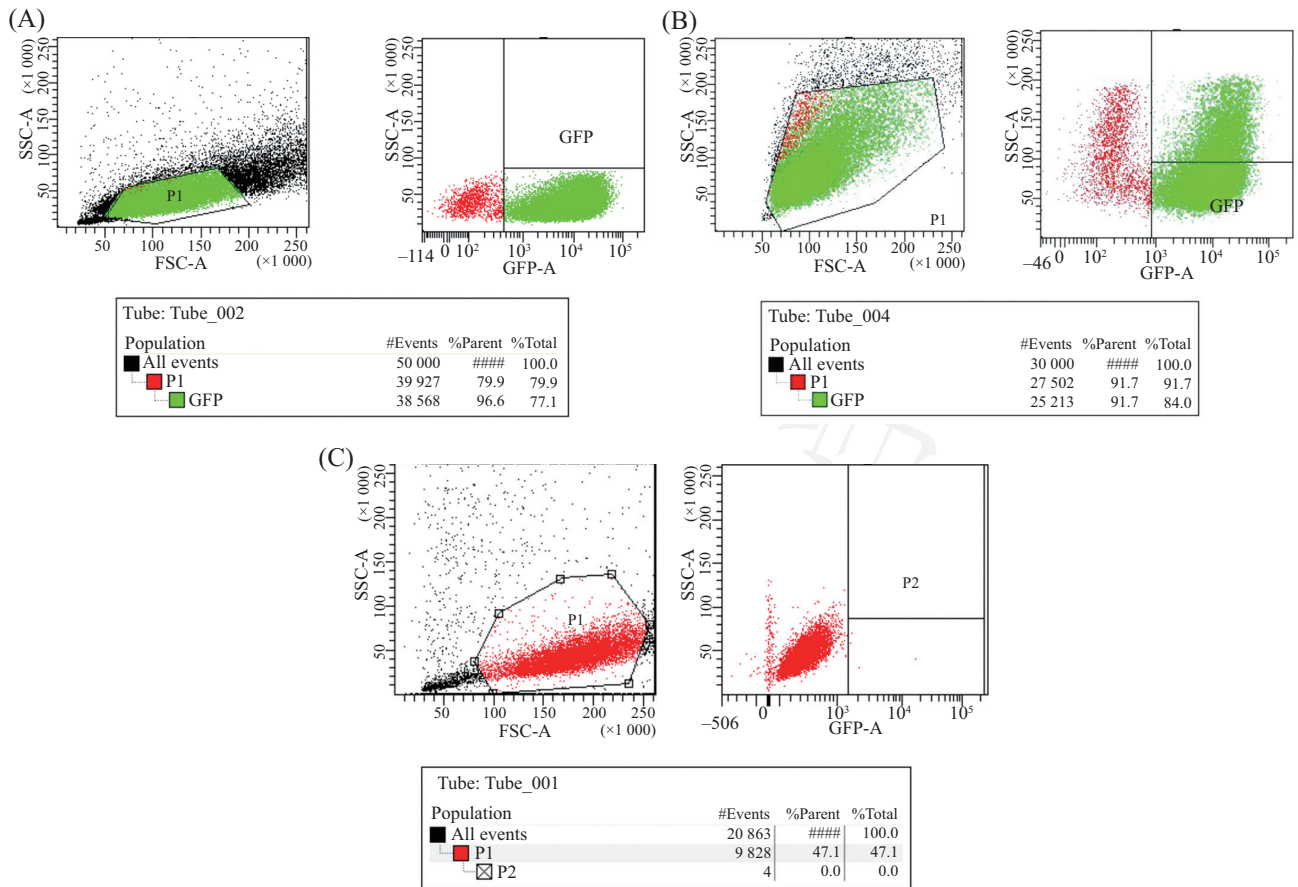


A、B: 实验组分别在白光及荧光下观察到的细胞形态; C、D: 阴性对照组分别在白光及荧光下观察到的细胞形态。

A,B: the cell morphology observed under white light and fluorescence of the experimental group; C,D: the cell morphology observed under white light and fluorescence of the negative control group.

图1 荧光显微镜观察荧光蛋白GFP的表达情况

Fig.1 Expression of GFP fluorescence observed under fluorescence microscope

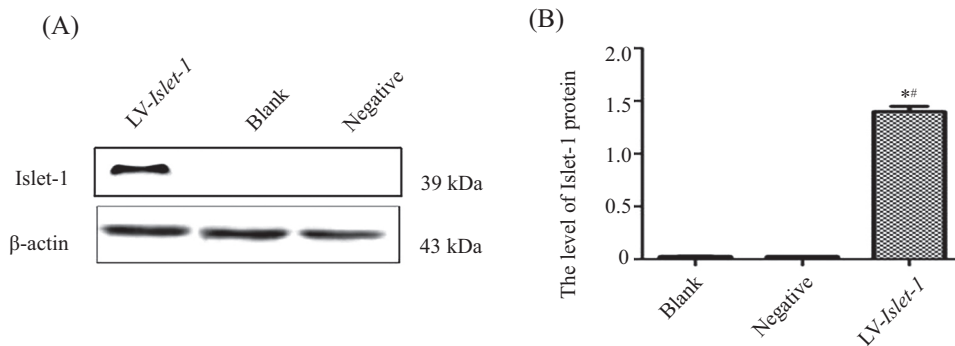


A: 阴性对照组 $Islet-1$ 慢病毒的感染效率; B: 实验组 $Islet-1$ 慢病毒的感染效率; C: 空白对照组 $Islet-1$ 慢病毒的感染效率。

A: the transfection efficiency of $Islet-1$ lentivirus in negative control group; B: the transfection efficiency of $Islet-1$ lentivirus in experimental group; C: the transfection efficiency of $Islet-1$ lentivirus in blank control group.

图2 流式细胞术检测各组 $Islet-1$ 慢病毒的感染效率

Fig.2 The infection efficiency of lentiviral vector containing $Islet-1$ gene detected by flow cytometry



A: Western blot检测各组细胞蛋白质水平; B: A图为蛋白质水平的柱状图。* $P < 0.05$, 与空白组比较; # $P < 0.05$, 与阴性对照组比较。

A: the level of $Islet-1$ protein in each group detected by Western blot; B: the quantitative graph of the $Islet-1$ protein level. * $P < 0.05$ compared with blank group; # $P < 0.05$ compared with negative control group.

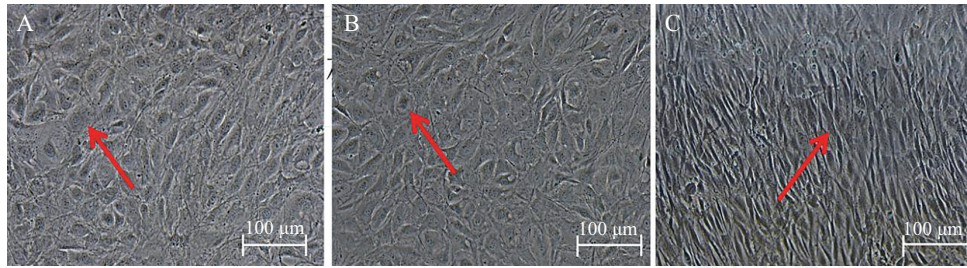
图3 Western blot检测各组细胞 $Islet-1$ 蛋白质水平

Fig.3 The level of $Islet-1$ protein detected by Western blot

2.3 C3H10T1/2向心肌样细胞特异分化过程中Akt活性与 $Islet-1$ /GCN5复合体的关系

2.3.1 不同浓度IGF-1或IGF-1+MK-2206联合用药处理 $Islet-1$ 感染后细胞p-Akt蛋白质水平 如图

7所示, 随着IGF-1浓度的逐渐增加, 感染后细胞的p-Akt蛋白表达水平依次增高, 在浓度为220 ng/mL时p-Akt/T-Akt最高, 表明IGF-1对感染后细胞Akt活性的最佳激活浓度为220 ng/mL。我们选择220 ng/mL



A: 空白对照组, 细胞形态呈圆形(箭头); B: 阴性对照组, 细胞形态呈圆形(箭头); C: 过表达组, 细胞形态呈梭形(箭头)。

A: the blank control group, the cell morphology is round (arrow); B: the negative control group, the cell morphology is round (arrow); C: the LV-Islet-1 group, the cell morphology is spindle (arrow).

图4 倒置显微镜观察Islet-1对C3H10T1/2细胞形态的影响

Fig.4 Effects of Islet-1 on C3H10T1/2 cells morphology observed under inverted microscope

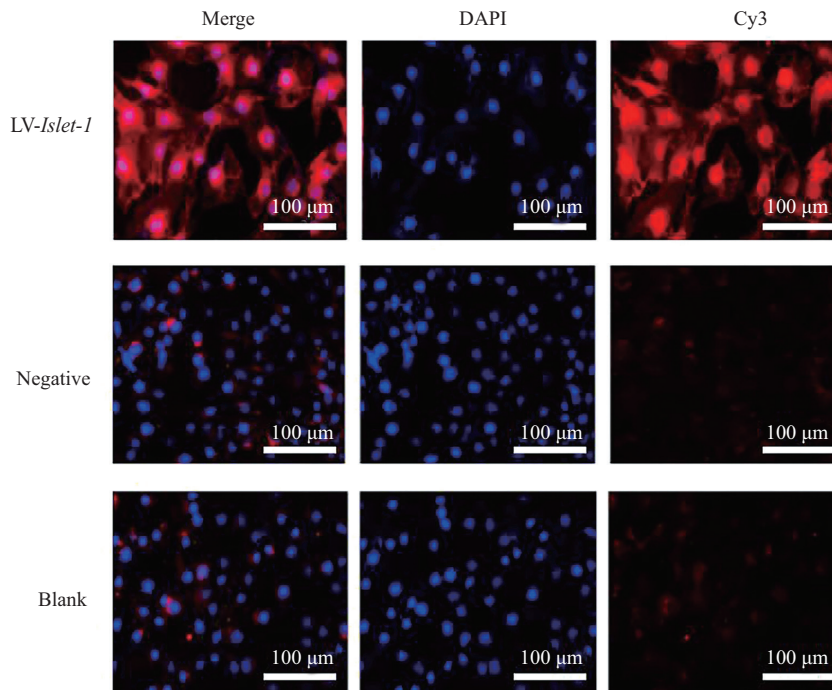


图5 荧光显微镜观察转染Islet-1后心肌结构性蛋白质Connexin43定位及表达

Fig.5 The localization and expression of cardiac structural protein Connexin43 after infected by Islet-1 observed by fluorescence microscopy

的IGF-1药物浓度和不同浓度的MK-2206共同作用处理细胞,随着药物浓度的逐渐增加,感染后细胞的p-Akt水平依次降低(图8)。当浓度为220 ng/mL的IGF-1和浓度为15 nmol/L的MK-2206联合用药时,p-Akt/T-Akt最低,表明此药物浓度对感染后细胞Akt活性有最佳的抑制效果。

2.3.2 各组Islet-1表达定位及诱导组Islet-1最高表达时间点以确定共沉淀蛋白提取时间 荧光显微镜、Western blot检测各组Islet-1蛋白的定位及表达情况。免疫荧光结果显示,Islet-1蛋白多表达于细胞核,且过表达Islet-1组荧光表达高于阴性对照组和空白对照组(图9)。Western blot结果显示,诱导组Islet-1表

达量于第3周最高,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图10),故我们选择在Islet-1蛋白质水平最高峰时间点第3周作为免疫共沉淀蛋白的提取时间点。

2.3.3 经IGF-1或MK-2206+IGF-1处理细胞后Islet-1与GCN5的结合情况 C3H10T1/2细胞过表达Islet-1后,在Islet-1表达高峰的第3周时间点用Islet-1抗体沉淀GCN5蛋白质,如图11所示,第1、3、5泳道分别是未加药处理的诱导组、用Akt激活剂IGF-1处理的诱导组、用Akt激活剂IGF-1与Akt特异性抑制剂MK-2206联合用药处理的诱导组;第2、4、6泳道均为阴性对照IgG。用Islet-1一抗做IP沉淀Islet-1蛋白质,用GCN5一抗做Western blot,免疫共沉淀结果

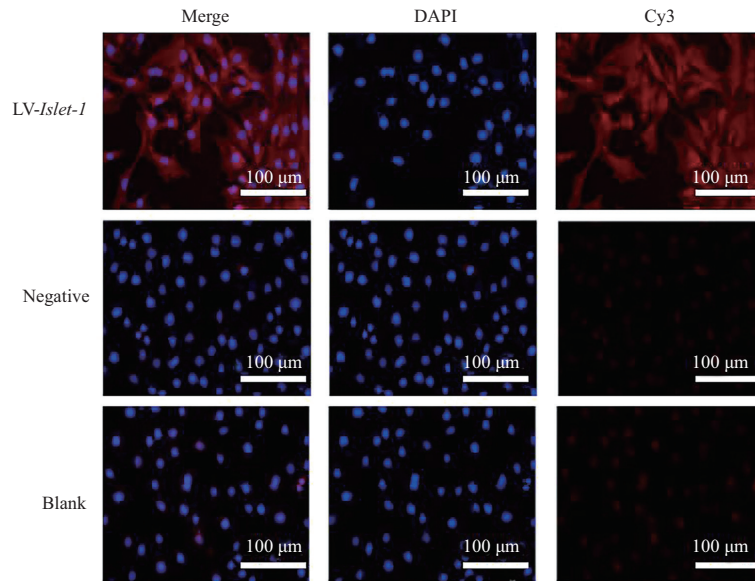
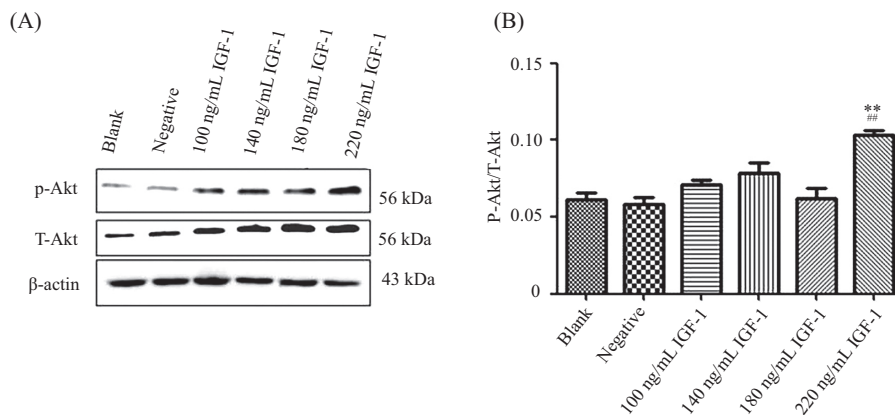


图6 荧光显微镜观察转染Islet-1后心肌功能性蛋白质cTnT定位及表达

Fig.6 The localization and expression of cardiac protein cTnT after infected by Islet-1 observed by fluorescence microscopy

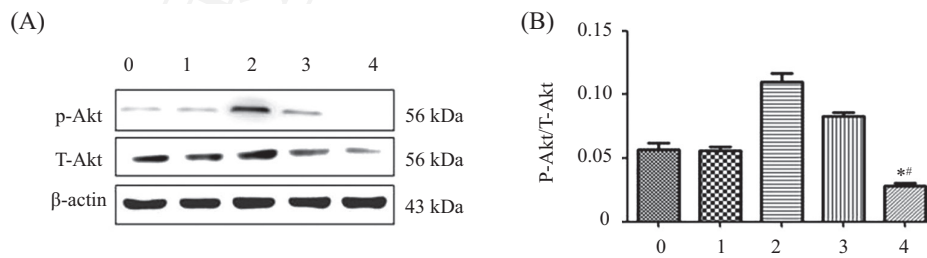


A: Western blot检测各组细胞蛋白质水平; B: A图为蛋白质水平的柱状图。** $P < 0.05$, 与空白组比较; # $P < 0.05$, 与阴性对照组比较。

A: the protein levels in each group detected by Western blot; B: the relative quantitative graph of the protein level. ** $P < 0.05$ compared with blank group; # $P < 0.05$ compared with negative control group.

图7 Western blot检测各浓度IGF-1作用下细胞p-Akt蛋白质水平

Fig.7 Effects of IGF-1 on the protein levels of p-Akt detected by Western blot



A: Western blot检测各组细胞蛋白质水平; B: A图为蛋白质水平的柱状图。0: 阴性对照组; 1: 空白对照组; 2: IGF-1(220 ng/mL); 3: IGF-1(220 ng/mL)+MK-2206(10 nmol/L); 4: IGF-1(220 ng/mL)+MK-2206(15 nmol/L)。* $P < 0.05$, 与空白组比较; # $P < 0.05$, 与阴性对照组比较。

A: the protein levels in each group detected by Western blot; B: the relative quantitative graph of the protein level. 0: negative control group; 1: blank control group; 2: IGF-1(220 ng/mL); 3: IGF-1(220 ng/mL)+MK-2206(10 nmol/L); 4: IGF-1(220 ng/mL)+MK-2206(15 nmol/L)。* $P < 0.05$ compared with blank group; # $P < 0.05$ compared with negative control group.

图8 Western blot检测220 ng/mL IGF-1与不同浓度MK-2206作用下细胞p-Akt蛋白质水平

Fig.8 Effects of 220 ng/mL IGF-1 with different concentrations of MK-2206 on the protein levels of p-Akt

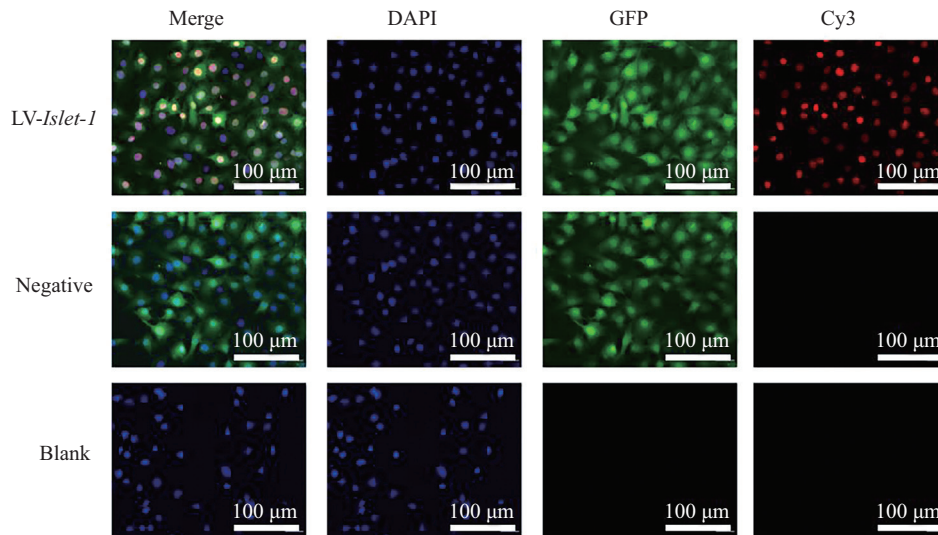
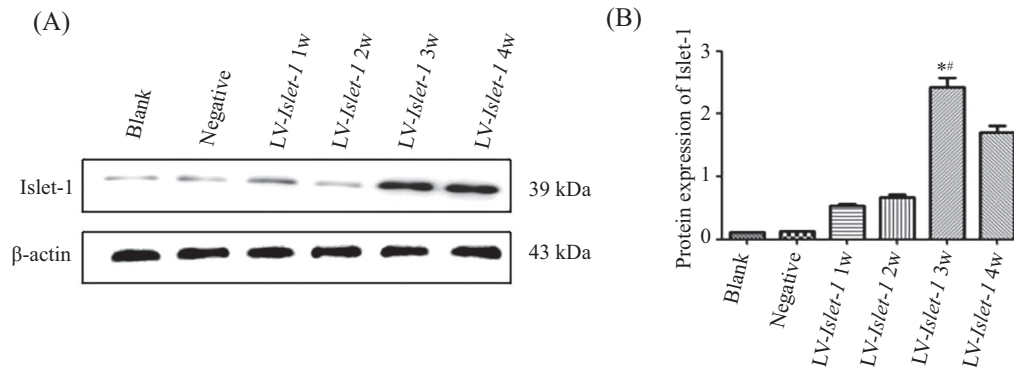


图9 荧光显微镜观察各组Islet-1蛋白质定位及表达

Fig.9 The localization and expression of Islet-1 observed by fluorescence microscopy

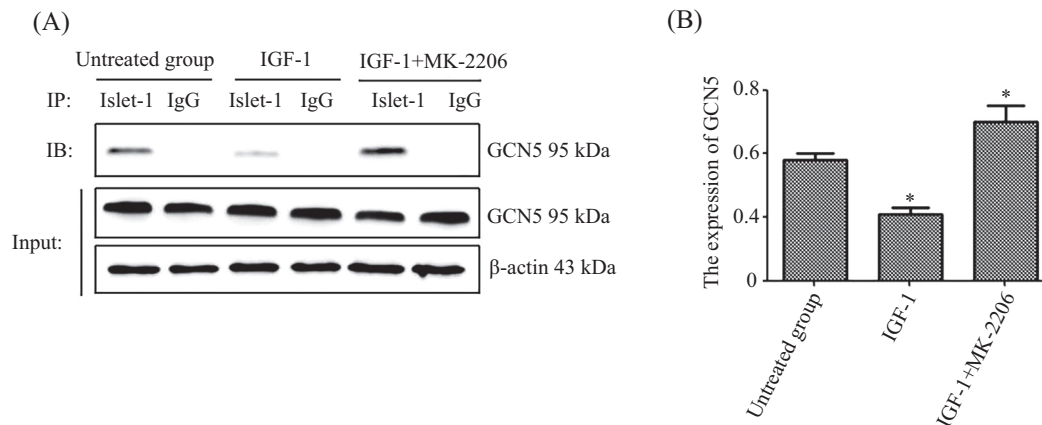


A: Western blot检测各组细胞蛋白质水平; B: A图为蛋白质水平的柱状图。* $P < 0.05$, 与空白组比较; # $P < 0.05$, 与阴性对照组比较。

A: the protein levels in each group detected by Western blot; B: the relative quantitative graph of the protein level. * $P < 0.05$ compared with blank group; # $P < 0.05$ compared with negative control group.

图10 Western blot检测各组细胞Islet-1蛋白质水平

Fig.10 The protein levels of Islet-1 detected by Western blot

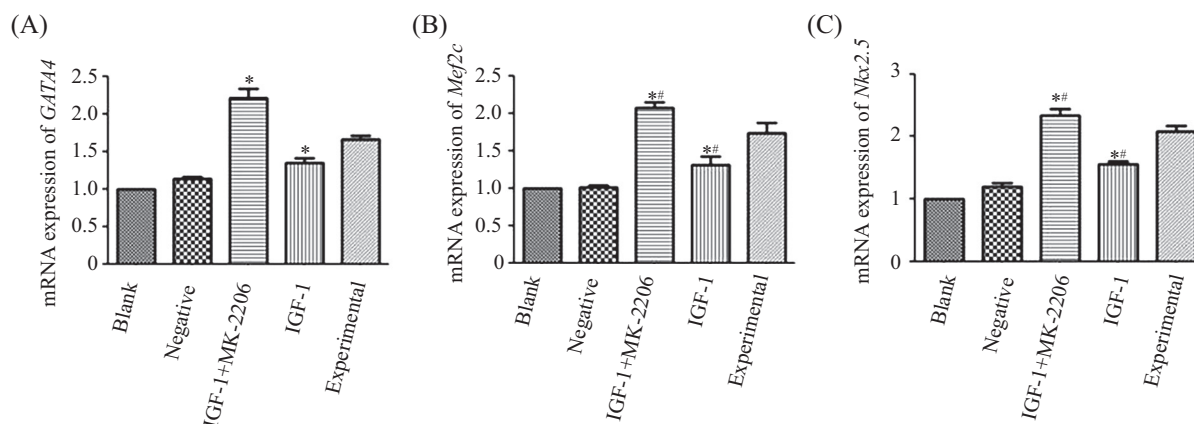


A: Western blot检测各组细胞蛋白质水平; B: A图为蛋白质水平的柱状图。* $P < 0.05$, 与未处理组比较。

A: the protein levels in each group detected by Western blot; B: the relative quantitative graph of the protein level. * $P < 0.05$ compared with untreated group.

图11 Western blot检测各组细胞GCN5蛋白质水平

Fig.11 The protein levels of GCN5 detected by Western blot



A~C: 各组心肌早期转录因子的mRNA量水平。* $P < 0.05$, 与空白组比较; # $P < 0.05$, 与阴性对照组比较。

A-C: the mRNA levels of cardiac transcription factors. * $P < 0.05$ compared with blank group; # $P < 0.05$ compared with negative control group.

图12 各组心肌早期转录因子的mRNA量水平

Fig.12 The mRNA levels of cardiac transcription factors

显示, 激活和抑制Akt的情况下, Islet-1与GCN5的蛋白质结合量分别低于和高于未加药处理的细胞组($P < 0.05$)。阳性对照Input组均有蛋白质存在, 证实了CoIP技术的可行性; 阴性对照IgG组均无蛋白印迹, 排除了非特异性结合。

2.3.4 经IGF-1或MK-2206+IGF-1处理后细胞心肌早期特异基因GATA4、Nkx2.5、Mef2c的表达情况如图12所示, 经IGF-1处理激活Akt和经MK-2206与IGF-1联合用药抑制Akt的情况下, 心肌早期转录因子GATA4、Nkx2.5、Mef2c的mRNA表达量分别低于和高于未加药处理的细胞组($P < 0.05$); 且各组细胞的mRNA表达均高于空白对照组和阴性对照组细胞($P < 0.05$)。

3 讨论

间充质干细胞诱导分化为心肌样细胞过程中存在一个复杂而精确的调控网络。在众多的调控因素中, 组蛋白乙酰化修饰是一项重要的表观遗传调控, 而参与其中的乙酰基转移酶发挥着重要作用^[17], 包括GCN5、P300/CBP家族等, 其中GCN5是最早发现的乙酰基转移酶, 它能调控基因的转录与表达^[18-19]。课题组前期研究已经证实, 若在MSCs特化为心肌样细胞过程中抑制GCN5, 心肌早期特异基因和心肌相关结构和功能蛋白的表达将被下调。然而, 大量研究表明, 以上这些乙酰基转移酶大多没有DNA结合结构域, 它们并不能识别心肌特异基因DNA从而影响相关基因表达, 所以间充质干细胞特化为心肌样细胞的过程并不是由它们独立完成的,

而是通过结合其他蛋白质或者分子从而形成具有乙酰基转移酶活性的蛋白质复合体来调节心肌特异基因DNA来使其转录和表达^[20-21]。本课题组前期通过CoIP技术募集与GCN5结合的蛋白质, 发现了LIM-HD亚家族蛋白中的Islet-1。据文献报道, Islet-1大量存在于胚胎生心二区, 它的缺失可导致心脏的发育异常, 并且它含有一个DNA结合结构域和两个LIM结构域^[22]。我们围绕Islet-1作了大量前期研究发现, Islet-1可诱导MSCs特化为心肌样细胞, 其DNA结构域与心肌特异基因相结合使其DNA上的组蛋白被乙酰化从而相关基因得到表达; 其LIM结构域与乙酰基转移酶结合, 使其复合物具有乙酰化酶活性^[23]。由此我们得知, Islet-1与GCN5形成蛋白复合体, 协同作用共同调节间充质干细胞向心肌样细胞的分化。有研究指出, Akt通过作用于下游信号因子mTOR, 对蛋白质合成和细胞生长有重要调节作用, 其作为信号通路蛋白质, 承接胞外信号转导刺激^[24-25], 并且也是调控干细胞自我更新能力的重要因子, 如Akt可以促进Oct4-T235位点磷酸化, 从而激活Akt1的转录, 使Oct4稳定性增加, 促进干细胞的自我更新, 并且抑制细胞的分化^[26]。然而尚无研究证实, 维持干细胞多能性和自我更新有密切关系的Akt与Islet-1/GCN5形成的蛋白质复合体之间的关系, 本研究将基于此进行探讨。

本研究通过过表达Islet-1基因的慢病毒感染小鼠间充质干细胞C3H10T1/2, 成功诱导间充质干细胞分化为心肌样细胞。结果可见: 过表达Islet-1组与阴性对照组及空白对照组相比, 心肌肌钙蛋白

cTnT、细胞间连接蛋白Connexin43表达都明显增加。cTnT只存在于心肌细胞中,有组织特异性,是鉴定MSCs成功诱导为心肌样细胞的重要标志物;Connexin43是细胞间信息传递、肌肉收缩同步的重要保证。为了探讨Akt与Islet-1/GCN5形成的蛋白质复合体的关系,我们设计施以细胞适当浓度的Akt激动剂IGF-1或Akt特异性抑制剂MK-2206,来分别检测Islet-1与GCN5的结合情况。据文献报道,生长因子IGF-1可以激活Akt,而MK-2206是一种高度选择性的Akt抑制剂,它可以特异性地抑制Akt的磷酸化作用。但由于IGF-1可以激活众多通路,如PI3K/Akt通路和MAPK通路等,使Akt被磷酸化,继而发挥相关作用^[27-28]。所以我们选择IGF-1与Akt特异性抑制剂MK-2206联合作用作为Akt抑制组的用药。随后,我们检测在细胞培养的1~4周里,Islet-1表达的最高时间点为第3周,于是我们选择其为随后CoIP实验的蛋白质提取时间点。通过检测各组GCN5与Islet-1的结合情况,我们发现,激活和抑制Akt的情况下,Islet-1与GCN5的结合量分别低于和高于未加药处理的细胞组。qRT-PCR结果表明:激活Akt后,心肌早期特异基因的表达将降低;抑制Akt后,心肌早期特异基因的表达将升高。由此,我们认为:在过表达Islet-1之前,GCN5与Akt二者共同调节MSCs的干性。在过表达Islet-1诱导MSCs向心肌样细胞特异分化过程中,当MSCs内Akt活性较高时,将抑制Islet-1与GCN5的结合,使MSCs维持干性,降低分化;当MSCs内Akt活性较低时,将上调Islet-1与GCN5的结合,促进MSCs的分化。综上所述,Akt的活性与GCN5和Islet-1的结合量相互拮抗。所以,调控它们三者之间的关系便可以更好地促进干细胞的定向分化。然而它们三者之间是怎样构成一个复杂而精确的网络共同调控干细胞向心肌样细胞诱导分化需要我们进一步探讨。

本研究初步证实了Akt与Islet-1/GCN5蛋白质复合体的关系,为诱导间充质干细胞特化为心肌样细胞过程中的调控机制提供了理论基础,为心肌损伤性疾病的细胞替代治疗以及组织再生工程提供新思路。

参考文献 (References)

- Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008; 2(4): 313-9.
- Huang L, Ma W, Ma Y, Feng D, Chen H, Cai B. Exosomes in mesenchymal stem cells, a new therapeutic strategy for cardiovascular diseases. *Int J Biol Sci* 2015; 11(2): 238-45.
- Pasini A, Bonafè F, Govoni M, Guarnieri C, Morselli PG, Sharma HS, *et al*. Epigenetic signature of early cardiac regulatory genes in native human adipose-derived stem cells. *Cell Biochem Biophys* 2013; 67(2): 255-62.
- Aldahmash A, Zaher W, Al-Nbaheen M and Kassem M. Human stromal (mesenchymal) stem cells: Basic biology and current clinical use for tissue regeneration. *Ann Saudi Med* 2012; 32(1): 68-77.
- Chou SH, Lin SZ, Kuo WW, Pai P, Lin JY, Lai CH, *et al*. Mesenchymal stem cell insights: prospects in cardiovascular therapy. *Cell Transplant* 2014; 23(4/5): 513-29.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1999; 103(5): 697-705.
- Yin N, Lu R, Lin J, Zhi S, Tian J, Zhu J. Islet-1 promotes the cardiac-specific differentiation of mesenchymal stem cells through the regulation of histone acetylation. *Int J Mol Med* 2014; 33(5): 1075-82.
- Brade T, Gessert S, Kühl M, Pandur P. The amphibian second heart field: *Xenopus islet-1* is required for cardiovascular development. *Dev Biol* 2007; 311(2): 297-310.
- Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, Caron L, Zhu S, Shao Y, *et al*. Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature* 2009; 460(7251): 113-7.
- Yang L, Cai CL, Lin L, Qyang Y, Chung C, Monteiro RM, *et al*. Isl1Cre reveals a common Bmp pathway in heart and limb development. *Development* 2006; 133(8): 1575-85.
- 周娜,朱静,田杰,李娅莎,张亚兰,邓兵,等. MSCs心肌样细胞分化过程中GCN5募集分化相关蛋白的筛选. *中国细胞生物学学报*(Zhou Na, Zhu Jing, Tian Jie, Li Yasha, Zhang Yalan, Deng Bing, *et al*. Screening of GCN5 related proteins involved in MSCs during cardiomyocyte differentiation. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2010; 32(1): 61-8.
- 林建萍,田杰,刘官信,鲁荣,刘建平,智深深,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. *基础医学与临床*(Lin Jianping, Tian Jie, Liu Guanxin, Lu Rong, Lin Jianping, Zhi Shenshen, *et al*. Islet-1 specifically regulates the differentiation of C3H10T1/2 cells into cardiomyocytes like cells in the regulatory network of acetylation. *Basic Medicine & Clinic*) 2012; 32(4): 740-5.
- Lee D, Goldberg AL. Muscle wasting in fasting requires activation of NF-kappaB and inhibition of AKT/mechanistic target of rapamycin (mTOR) by the protein acetylase, GCN5. *J Biol Chem* 2015; 290(51): 30269-79.
- Chen J, Crawford R, Chen C, Xiao Y. The key regulatory roles of the PI3K/Akt signaling pathway in the functionalities of mesenchymal stem cells and applications in tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2013; 19(6): 516-28.
- Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(1): 204.
- Liu TM, Wu YN, Guo XM, Hui JH, Lee EH, Lim B. Effects of ectopic Nanog and Oct4 overexpression on mesenchymal stem

- cells. *Stem Cells Dev* 2009; 18(7): 1013-22.
- 17 智深深, 田杰, 刘官信, 鲁荣, 林建平. 小鼠 *Islet-1* 基因慢病毒表达载体的构建及其诱导C3H10T1/2细胞向心肌样细胞特异性分化. *基础医学与临床* (Zhi Shenshen, Tian Jie, Liu Guanxin, Lu Rong, Lin Jianping. Promotion effects of islet-1-induced C3H10T1/2 cells differentiation into myocardial cells on histone acetylation of cardiac-specific genes. *Basic Medicine & Clinic*) 2011; 34(10): 740-5.
- 18 Sewack GF, Elis TW, Hansen U. Binding of TATA binding protein to a naturally positioned nucleosome is facilitated by histone acetylation. *Mol Cell Bio* 2001; 21(4): 1404-15.
- 19 管晓翔, 陈龙邦. 组蛋白乙酰化修饰在基因表达调控中的作用机制. *中华肿瘤防治杂志* (Guan Xiaoxiang, Chen Longbang. The mechanism of histone acetylation modification in gene expression regulation. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*) 2007; 17(20): 307-10.
- 20 Hu Z, Song N, Zheng M, Liu X, Liu Z, Xing J, Ma J, Guo W, *et al.* Histone acetyltransferase GCN5 is essential for heat stress-responsive gene activation and thermotolerance in arabidopsis. *Plant J* 2015; 84(6): 1178-91.
- 21 Peng C, Zhu J, Sun HC, Huang XP, Zhao WA, Zheng M, *et al.* Inhibition of histone H3K9 acetylation by anacardic acid can correct the over-expression of Gata4 in the hearts of fetal mice exposed to alcohol during pregnancy. *PLoS One* 2014; 9(8): 104-15.
- 22 Laugwitz KL, Moretti A, Caron L. Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? *Development* 2008; 135(2): 193-205.
- 23 Charlotte L, Claire-Angélique R. Interaction and functional cooperation between the LIM protein FHL2, CBP/p300, and β -Catenin. *Mol Cell Bio* 2004; 24(24): 10689-702.
- 24 Singh AM, Reynolds D, Cliff T. Signaling network crosstalk in human pluripotent cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 2012; 10(3): 312-26.
- 25 Lee D, Goldberg AL. Muscle wasting in fasting requires activation of NF-kappaB and inhibition of AKT/mechanistic target of rapamycin (mTOR) by the protein acetylase, GCN5. *J Biol Chem* 2015; 290(51): 30269-79.
- 26 Klemm JD, Rould MA, Aurora R. Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules. *Cell* 1994; 77(1): 21-32.
- 27 周俊, 曹江, 孟凡静, 冯浩, 徐开林. Akt特异性抑制剂MK2206诱导U937及RS4;11细胞凋亡及其机制. *中国实验血液学杂志* (Zhou Jun, Cao Jiang, Meng Fanjing, Feng Hao, Xu Kailin. Inducing effect of Akt MK2206 on apoptosis in U937 and RS4; 11-and its mechanism. *Journal of Experimental Hematology*) 2015; 23(3): 627-32.
- 28 雷璐璐, 王珊, 刘苗, 冯瑞华. PI3K/AKT信号通路在SK-N-SH细胞中对增殖和分化的影响. *重庆医科大学学报* (Lei Lulu, Wang Shan, Liu Miao, Feng Ruihua. Role of PI3K/AKT signaling pathway in cell proliferation and differentiation in neuroblastoma. *Journal of Chongqing Medical University*) 2015; 40(8): 1089-94.