

MSCs 心肌样细胞分化过程中 GCN5 募集 促分化相关蛋白的筛选

周娜¹ 朱静^{1*} 田杰² 李娅莎¹ 邓兵¹ 张亚兰¹ 智深深¹

(重庆医科大学附属儿童医院,¹儿科研究所,²心血管内科,重庆 400014)

摘要 筛选并分析间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)诱导分化为心肌样细胞过程中 GCN5 招募促分化相关蛋白集合体的组成。免疫荧光细胞化学、实时荧光定量 PCR 鉴定 MSCs 经 5-氮杂胞苷(5-azacytidine, 5-azaC)诱导分化为心肌样细胞;免疫共沉淀技术分离、串联质谱鉴定 GCN5 募集蛋白集合体组成,并从心肌细胞分化角度筛选、验证分化相关蛋白因子。MSCs 经 5-azaC 诱导分化的心肌样细胞表达心肌特异性基因 GATA4、MEF2C 和心肌细胞结构、功能蛋白 cTnt、MHC 和 Cx43;筛选、验证出心肌细胞分化相关 GCN5 招募蛋白归类为:(1) DNA 结合蛋白 Sp1/KLF;(2)转录辅激活子 PGC-1 α 和 Rb1;(3)转录延伸复合体组成成分以及信号通路蛋白 Akt。通过筛选获得 MSCs 经诱导向心肌样细胞分化过程中心肌分化相关蛋白因子,为进一步研究干细胞分化信号传导途径、特异性生物靶点干预以及提高干细胞分化效率打下了基础。

关键词 间充质干细胞;分化;组蛋白乙酰转移酶 GCN5; Co-IP; MS/MS

基于5-氮杂胞苷(5-azacytidine, 5-azaC)诱导间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)分化为心肌样细胞的实验研究,前期成功构建了干扰 MSCs 分化过程中组蛋白乙酰基转移酶 GCN5 表达的质粒,转染该重组质粒至 5-azaC 诱导的 MSCs 后,发现 GCN5 和心肌特异性基因 GATA4 表达阴性;与未转染组相比 GCN5 和心肌特异性蛋白 Cx43 和 MHC 的沉默效率分别为 86%、58% 和 67%,表明 GCN5 参与了 MSCs 分化为心肌样细胞过程中的转录调控及组蛋白乙酰化调控^[1-3]。本文筛选心肌分化相关的 GCN5 招募蛋白因子,明确 MSCs 分化为心肌样细胞过程中以乙酰化调控蛋白因子为靶点的转录调控机制,剖析 MSCs 分化心肌样细胞过程中的转导途径和转录调控网络,为提高 MSCs 的分化率及其在临床上的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级 Wistar 大鼠,100~150 g,购于重庆医科大学实验动物中心;胎牛血清、DMEM/F12 培养基(Hyclone 公司);5-azaC、考马斯亮蓝 G250、预染蛋白 marker (Sigma 公司);抗 GCN5-N18 抗体、抗 Akt1/2 抗体、Protein A/G plus-agarose (Santa Cruz 公司);Nuclear Extract Kit (美国 Active Motif 公司);

SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、化学发光试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);正常山羊 IgG、抗心肌钙蛋白 T (cTnT)抗体、抗肌球蛋白重链(MHC)抗体、抗 Connexin 43 抗体、抗 α -actinin-4 抗体(Abcam 公司);抗 SP1 抗体(Bioworld 公司);RNA 提取试剂盒(百泰克生物技术有限公司);反转录试剂盒(TaKaRa 公司);SYBR Green 试剂盒(Tiangen 公司)。

1.2 MSCs 经 5-azaC 诱导分化为心肌样细胞的鉴定

1.2.1 MSCs 纯化、扩增及诱导 8 周龄 Wistar 大鼠,分离股骨与胫骨骨髓,贴壁法换液纯化原代 MSCs 细胞,传至第 4 代,吸出原培养基,加入含 5-azaC 工作液(10 μ mol/L)及等体积血清、抗生素的培养基进行 5-azaC 诱导,24 h 后用无 5-azaC、血清浓度为 10% 的完全培养基换液,以后每 3 天换液 1 次。

1.2.2 显微镜动态观察 MSCs 形态变化 光学显微镜观察比较 5-azaC 诱导的 MSCs 和未经诱导的 MSCs 细胞形态的变化和差异。

1.2.3 免疫荧光细胞化学检测心肌特异性蛋白 取出细胞爬片,冷丙酮固定, Triton 通透,封闭血清封闭,分别用抗 cTnT/MHC/Connexin 43 抗体 4 $^{\circ}$ C 温育

收稿日期:2009-09-03 接受日期:2010-01-08

国家自然科学基金资助项目(No.30973219)

*通讯作者。Tel: 023-63630294, E-mail: zhujing310@yahoo.com.cn

过夜,二抗 FITC 荧光显色,并用 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI 复染细胞核,封片,摄像记录实验结果。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测心肌特异性基因 参照各试剂盒说明书依次提取细胞 RNA、反转录成 cDNA,实时荧光定量 PCR 检测 MSCs 经 5-azaC 诱导后心肌特异性基因 GATA4、MEF2C 的时序性表达。以 β -肌动蛋白作内参,分析产物表达量。基因引物序列如下: GATA4: 5'-ctgtggcctctaccacaagatgaa-3' (Upper) and 5'-gtctggcagattggcacagga-3' (Lower); MEF2C: 5'-gcgaaagtcggattgatgaaga-3' (Upper) and 5'-gtggatgctcagtgctggcgta-3' (Lower); β -肌动蛋白: 5'-ggagattactgcctgctccta-3' (Upper) and 5'-gactcatcgtactcctgcttctg-3' (Lower)。结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm SE$ 表示。

1.3 MSCs 分化过程中心肌分化相关 GCN5 募集蛋白筛选

1.3.1 免疫荧光细胞化学对 GCN5 细胞定位 MSCs 经 5-azaC 诱导一周诱导组及未诱导组免疫荧光细胞化学检测 GCN5 定位。冷丙酮固定细胞爬片, Triton 通透,封闭血清封闭,多克隆山羊抗鼠 GCN5-N18 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜,二抗 TRITC 荧光显色,DAPI 复染细胞核,封片,激光共聚焦显微镜记录实验结果。

1.3.2 Western 印迹检测 GCN5 表达量以确定免疫共沉淀核蛋白提取时间 提取 5-azaC 诱导组及未诱导组细胞核蛋白,经不连续凝胶电泳、半干法转膜、杂交、化学发光显色等步骤进行 Western 印迹分析、利用 UVI 光密度扫描仪测定 GCN5 各图像峰面积,以 β -肌动蛋白为内参,分析 GCN5 诱导前后的时序性表达变化; 5-azaC 诱导组 GCN5 蛋白表达量最高时间点为免疫共沉淀时间点。

1.3.3 免疫共沉淀-聚丙烯酰胺凝胶电泳-考马斯亮蓝染色分离 GCN5 相互作用蛋白 提取 MSCs 经 5-azaC 诱导一周的新鲜核蛋白,实验组加入多克隆山羊抗鼠 GCN5-N18 抗体,对照组加入正常山羊 IgG, 4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜后加入 Protein A/G plus-agarose 琼脂糖珠 4 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜,离心收集免疫沉淀复合物,蛋白裂解液/PBS 清洗琼脂糖珠 5 遍, SDS-PAGE 缓冲液重悬沉淀, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮样品释放蛋白,离心收集上清液,将上清液进行不连续凝胶电泳,凝胶经固定、考马斯亮蓝染色、脱色至背景清晰终止^[4]。

1.3.4 高效液相色谱芯片纳流电喷雾串联质谱联用技术(HPLC-CHIP-NanoSpray-ESI-MS/MS)鉴定相互作用蛋白 从胶上切下目标带,放到微量离心管, 1 ml 50% 乙腈洗两次,胰蛋白酶消化胶中蛋白质,洗脱肽段。将肽段洗脱液进行质谱分析,质谱分析结

果用 Agilent Technologies 公司的 Spectrum Mill MS Proteomics Workbench 软件分析,分析软件版本号是 Rev A.03.03.083SR 3。

1.3.5 Western 印迹验证心肌分化相关 GCN5 招募蛋白因子 实验组和对照组同免疫共沉淀分组,参考 1.3.3; 5-azaC 诱导组和未诱导组核蛋白作为阳性对照组。上述 4 组标本经不连续凝胶电泳、半干法转膜、与待验证蛋白抗体杂交、ECL 系统化学发光显色等步骤进行 Western 印迹验证。

1.3.6 统计学分析 采用 SPSS11.5 统计软件分析处理测定结果,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验对结果进行统计学分析, $P < 0.05$ 判定为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 MSCs 纯化、扩增及诱导前后细胞形态的变化

MSCs 传至第四代,倒置显微镜示细胞形态均一、成纤维样,如图 1A 箭头所示。经 5-azaC 诱导,细胞体积明显增大、形态由长梭形变为短棒状、排列方向渐趋一致、细胞之间出现连接,图 1B 箭头所示。

2.2 MSCs 诱导后心肌特异性蛋白表达

MSCs 经 5-azaC 诱导后免疫荧光细胞化学检测心肌特异性蛋白表达。如图所示, MHC 在诱导前原代第 4 代 MSCs 中几乎不表达(图 2A), 在 5-azaC 诱导 2 周的 MSCs 中明显表达(图 2B); Cx43 在诱导前表达较低(图 2C), 在诱导后 8 周表达明显(图 2D); cTnT 在诱导前不表达(图 2E), 经 5-azaC 诱导后 4 周在胞核胞浆中均有表达,图 2F 箭头所示。

2.3 MSCs 经 5-azaC 诱导后心肌特异性基因的表达

实时荧光定量 PCR 方法检测心肌特异性基因 GATA4 和 MEF2C 的时序性表达,结果如表 1 所示。图 3 柱状图示 GATA4 和 MEF2C 的相对表达量, MSCs 经 5-azaC 诱导后 3 天, GATA4 和 MEF2C 表达量高于

Table 1 Temporal expression pattern of mRNA levels of cardiac specific genes after 5-azaC induction ($n=5$, $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm SE$)

Group	GATA4/ β -actin	MEF2C/ β -actin
0 d	0.2025 \pm 0.0299	0.3631 \pm 0.0319
1 d	0.1956 \pm 0.0274	0.2844 \pm 0.012
3 d	0.3229 \pm 0.0197	0.8602 \pm 0.0492
5 d	0.2038 \pm 0.0439	0.7499 \pm 0.0537
7 d	1.1095 \pm 0.1671*	0.6810 \pm 0.0171
9 d	0.4309 \pm 0.0413	1.0363 \pm 0.0578*

0 d: the day before 5-azaC treatment; 1-9 d: days after 5-azaC treatment; * $P < 0.05$, compared with a 0 d group.

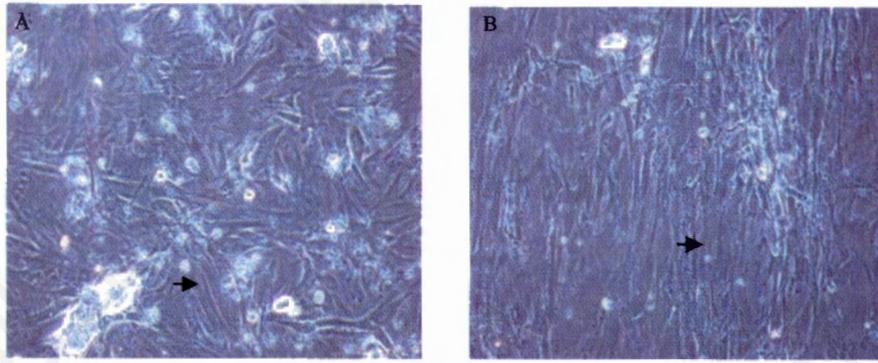


Fig.1 Morphological observation of MSCs detected with inverted microscope (400×)

A: control group of MSCs without 5-azaC induction treatment; B: 5-azaC induction treatment.

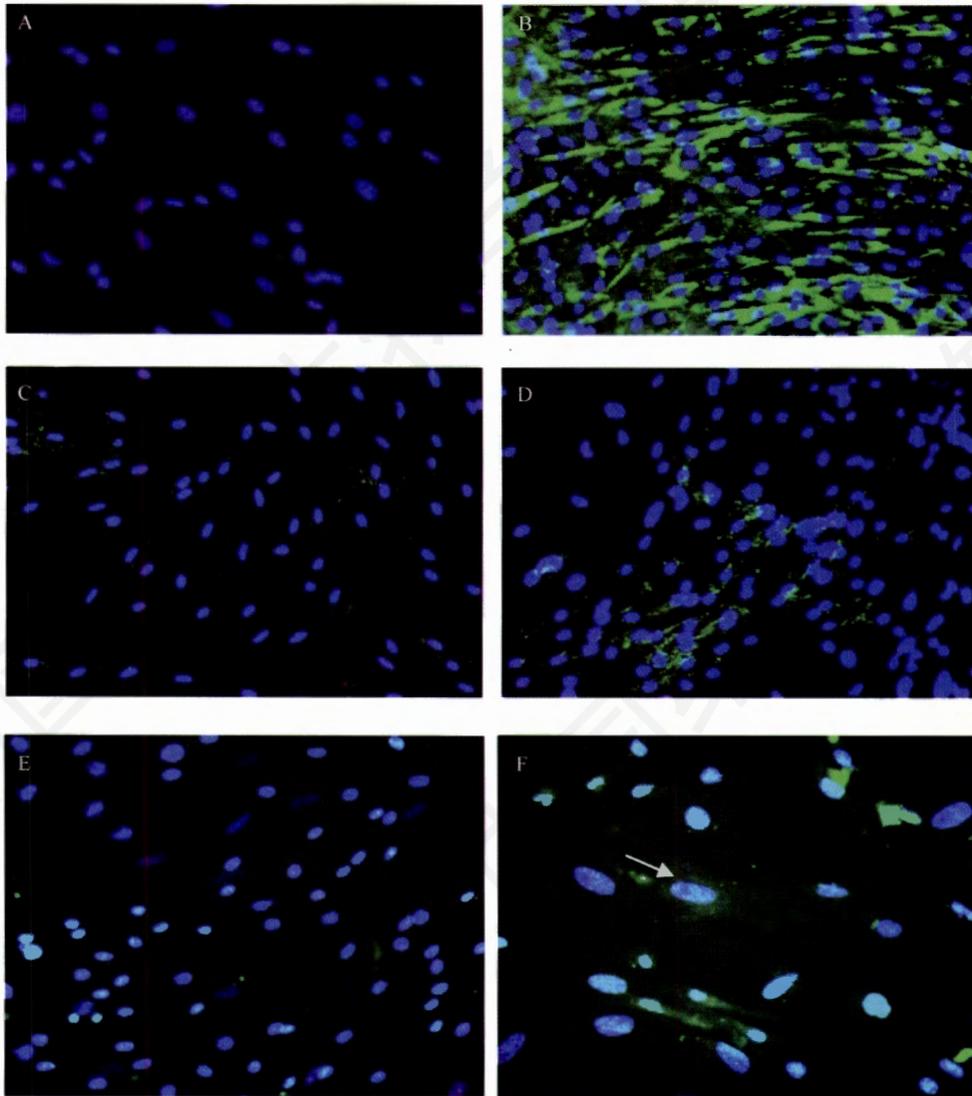


Fig.2 Expression of cardiomyocyte-specific proteins

A, C, E: expression of MHC/Cx43/cTnt and DAPI staining of nucleus in F4 before 5-azaC treatment (200×) compared to pictures in B, D, F; B: expression of MHC and DAPI staining of nucleus two weeks after 5-azaC treatment (200×); D: expression of Cx43 and DAPI staining of nucleus eight weeks after 5-azaC treatment (200×); F: expression of cTnt and DAPI staining of nucleus four weeks after 5-azaC treatment (400×).

诱导前; GATA4在诱导后7天表达量明显高于诱导前0天, 差异有显著性变化($P<0.05$); MSCs 经 5-azaC 诱导后9天, MEF2C 表达量高于诱导前0天, 差异有显著性变化($P<0.05$)。

2.4 免疫荧光细胞化学检测 GCN5 在细胞中的定位

红色荧光标记的为 GCN5 的细胞定位(图 4A、图 4D), 蓝色荧光标记的为细胞核定位(图 4B、图 4E), 实验组和对照组分别是同一细胞视野, 且红色荧光标记区与蓝色荧光标记区可重叠(图 4C、图 4F)。

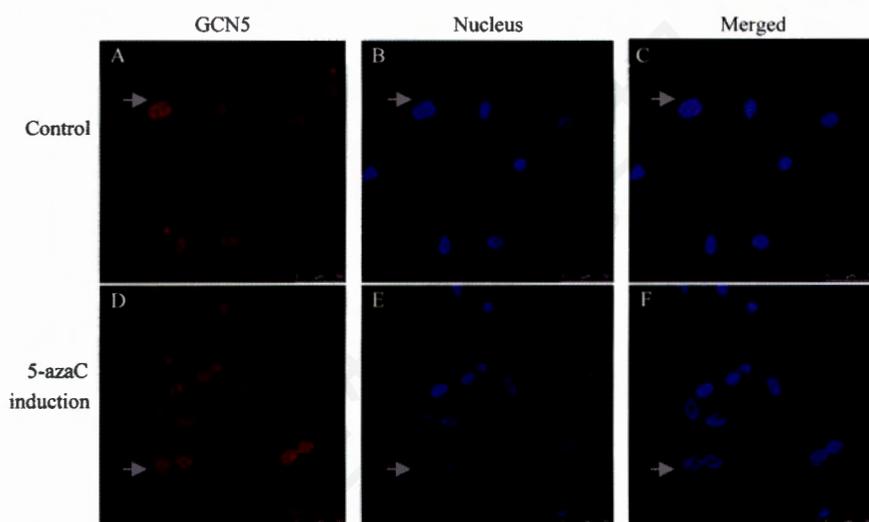


Fig.4 Cell location of GCN5 (×200)

A: GCN5 location in uninduced MSCs; B: DAPI staining of nucleus compared to A; C: overlapping picture about A and B; D: GCN5 location in 5-azaC induced MSCs; E: DAPI staining of nucleus compared to D; F: overlapping picture about D and E.

2.5 Western 印迹检测 GCN5 表达量以确定免疫共沉淀核蛋白提取时间

图 5A、图 5B 分别为实验组和对照组 GCN5 和 β -肌动蛋白的时序蛋白表达图。GCN5 灰度值与对应 β -肌动蛋白的灰度值相除进行标准化, 得出 5 组标本中 GCN5 平均表达值的时序性变化, 如表 2 所示。数据经 SPSS11.5 统计软件分析表明, 实验组及对照组组间和组内各时段的平均 GCN5 蛋白表达量差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.6 免疫共沉淀 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 - 考马斯亮蓝染色分离和纯化 GCN5 结合蛋白

如图 6A 所示, 在分子量为 90 kDa 处, 阳性对照组均有 GCN5 蛋白表达, 实验组有 GCN5 蛋白表达, 对照组无 GCN5 蛋白表达。表明免疫共沉淀技术可行, 对照组起到了排除非特异性干扰的作用。

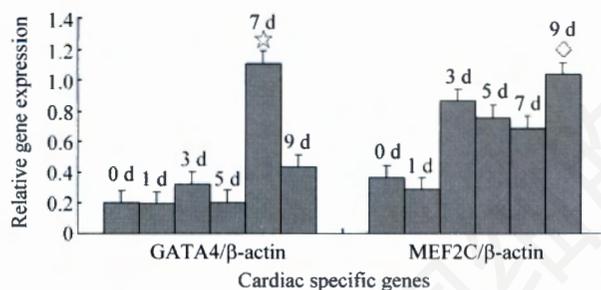


Fig.3 Temporal expression pattern of cardiac specific genes
0 d: the day before 5-azaC treatment; 1–9 d: days after 5-azaC treatment. * $P<0.05$, compared to 0 day of GATA4; ◊ $P<0.05$, compared to 0 day of MEF2C.

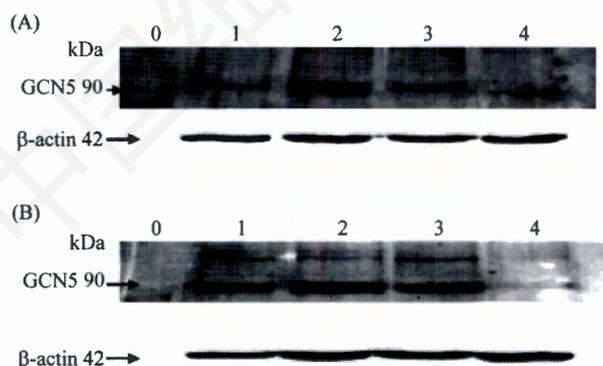


Fig.5 Temporal expression pattern of GCN5

A: temporal expression pattern of GCN5 and β -actin after 5-azaC induction. 0: marker; 1: one week after induction; 2: two weeks after induction; 3: three weeks after induction; 4: four weeks after induction. B: temporal expression pattern of GCN5 and β -actin in uninduction groups. Lane 0 to 4 represent the same time with A, but uninduction.

Table 2 Temporal expression pattern of GCN5 between induction and uninduction groups ($n=5, \bar{x} \pm s$)

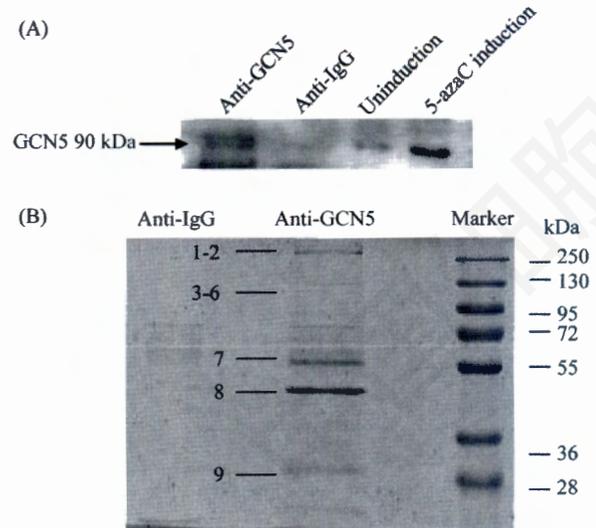
Group	5-azaC induction	Uninduction
1 w	0.1406±0.0611	0.1083±0.0283
2 w	0.1758±0.0616	0.1716±0.0492
3 w	0.1098±0.0667	0.1468±0.0431
4 w	0.0882±0.0210	0.0450±0.0105

1-4 w: note weeks after 5-azaC induction and uninduction.

图 6B 中, 中间泳道是实验组, 左侧泳道是对照组, 右边泳道为 marker, 对照组排除非特异性结合, 中间泳道左侧标线 1~9 条带为质谱分析条带。

2.7 高效液相色谱芯片纳流电喷雾串联质谱联用技术(HPLC-CHIP-NanoSpray-ESI-MS/MS)鉴定 GCN5 结合蛋白

利用 HPLC-CHIP-NanoSpray-ESI-MS/MS 鉴定图 6B 中 1~9 质谱分析的条带, 其质谱结果用 Agilent Technologies 公司的 Spectrum Mill MS Proteomics Workbench 软件分析, 结果如表 3 所示, 各蛋白质谱图如图 7 所示。

**Fig.6 Western blot and SDS-PAGE of combined proteins of GCN5**

A: feasibility of co-ip strategy, the control group has played a role in excluding non-specific interference. anti-GCN5 lane is experiment group; anti-IgG lane is control group; the other two lanes are input groups. B: the SDS-PAGE gel after co-ip; anti-GCN5 lane is experiment group; anti-IgG lane is control group.

Table 3 GCN5 binding partners

Band number	Protein name	Gene name	Molecular weight (kDa)	Accession number in Swiss-Prot database	Distinct Summed MS/MS Search Score	%AA Coverage
1	Striated muscle-specific serine/threonine protein kinase – Rattus norvegicus (Rat)	Speg	354	Q63638	26.05	2
2	PDZ domain-containing protein 2 – Rattus norvegicus (Rat)	Pdzd2	293	Q9QZR8	33.30	4
3	Myosin-Id – Rattus norvegicus (Rat)	Myo1d	116	Q63357	27.58	4
4	α -actinin-4 – Rattus norvegicus (Rat)	ACTN4	110	Q9QXQ0	106.22	18
4	Retinoblastoma-associated protein – Rattus norvegicus (Rat)	Rb1	106	P33568	11.18	4
5	Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α – Rattus norvegicus (Rat)	Ppargc1a	90	Q9QYK2	9.09	4
5	Zinc finger protein 148 – Rattus norvegicus (Rat)	Znf148	88	Q62806	19.24	11
6	Transcription factor Sp1 – Rattus norvegicus (Rat)	Sp1	80	Q01714	9.09	7
7	Smarca5_predicted SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5 – Rattus norvegicus (Rat)	Smarca5	69	B2RYQ9	6.14	1
7	RAC- α serine/threonine-protein kinase – Rattus norvegicus (Rat)	Akt1	55	P47196	21.05	10
8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F – Rattus norvegicus (Rat)	Hnrnpf	45	Q794E4	7.07	8
8	Actin, α cardiac muscle 1 – Rattus norvegicus (Rat)	actin	42	P68035	154.44	49
9	Transcription elongation factor A protein 1 – Rattus norvegicus (Rat)	Tcea1	33	Q4KLL0	8.15	9

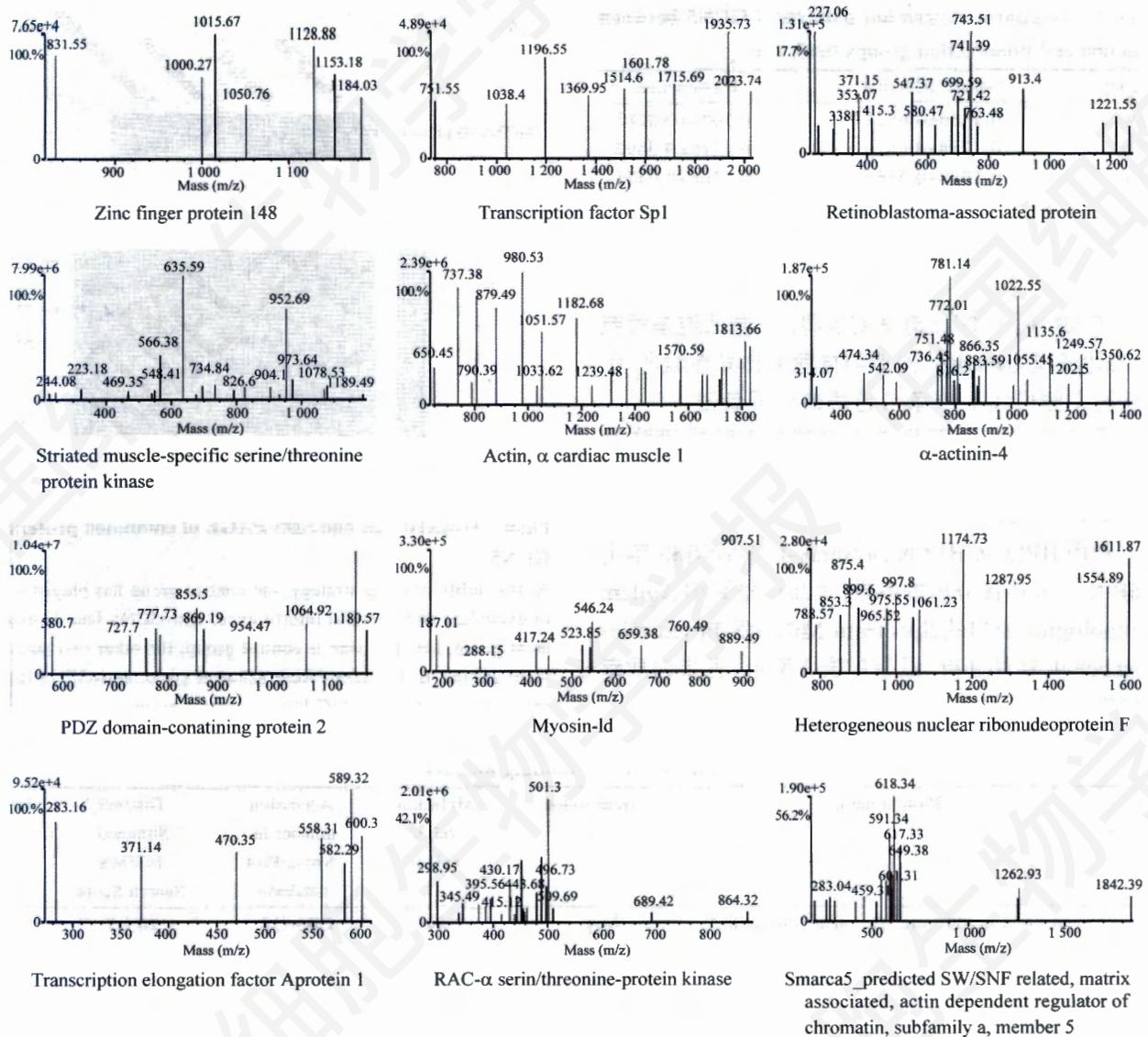


Fig.7 Mass spectrum of GCN5 binding partners

2.8 蛋白质组免疫印迹验证部分心肌分化相关蛋白

选取上述结果中心肌分化相关的蛋白质, 分别进行质谱结果验证, 结果如图 8 所示; 4 个结合分析显示 IP-MS/MS 方案筛选结合蛋白的有效性。

3 讨论

MSCs 经 5-azaC 诱导后, 形态出现心肌样细胞改变, 心肌特异性基因、心肌结构和功能蛋白较诱导前表达明显增加, 表明 5-azaC 能够诱导 MSCs 分化成心肌样细胞。基于 GCN5 参与了 5-azaC 诱导 MSCs 分化为心肌样细胞过程的基因转录调控及组蛋白乙酰化调控^[1-3], 本研究以 GCN5 为靶点的 Co-ip-SDS-PAGE-MS/MS 结果表明, GCN5 募集蛋白复合体参与

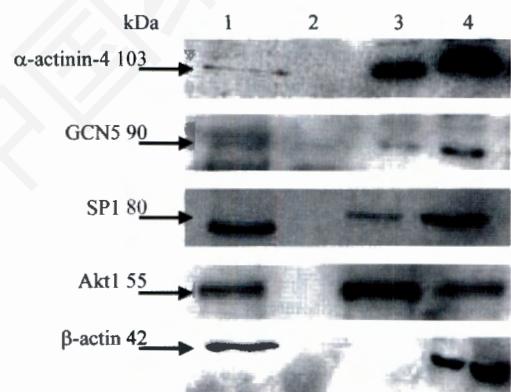


Fig.8 Western blotting identify interacting proteins with GCN5

1: Co-IP strategy of experiment group with anti-GCN5; 2: Co-IP strategy of control group with anti-IgG; 3: positive group of uninduction; 4: positive group of 5-azaC induction.

5-azaC 诱导 MSCs 心肌样细胞分化过程中的转录调控, 筛选的心肌分化相关 GCN5 乙酰化调控因子为 DNA 结合蛋白 Sp1/KLF、转录辅激活子 PGC-1 α 和 Rb1、转录延伸复合体组成成分以及信号通路蛋白 Akt。

GCN5 无 DNA 结合域, 可被有 DNA 结合域的蛋白因子招募形成转录复合体, 调控基因转录。转录因子 Sp1/KLF 调控细胞的增殖和分化, 在胚胎发育早期发挥重要的生物学功能^[5], 这一蛋白家族的共同特点是在 C 端含有可以结合 DNA-GC 框的 C2H2 锌指结构域^[6], CBP/p300 和 PCAF 通过乙酰化 Sp1/KLF 增强其 DNA 结合活性, 进而调控转录过程^[7]。大多数心肌特异性基因和结构蛋白基因含有 GC/GT 框, GATA4、BNP、connexin43 启动子区域均含 GC 框 -Sp1 结合位点^[8-10], Sp1/KLF 可与 MEF2、GATA4 协同作用调控心肌肌钙蛋白 cTNI 基因的表达^[11]; 因此, GCN5 通过乙酰化 Sp1/KLF 并增强其 DNA 结合活性调控 MSCs 的分化。

染色质和 RNA 免疫共沉淀研究表明, 细胞核肌动蛋白、细胞核肌球蛋白、不均一核糖核蛋白和组蛋白乙酰转移酶 PCAF 聚集在 RNA 聚合酶 II 转录基因的启动子或基因编码区域, 参与转录延伸过程^[12]。本实验免疫共沉淀和质谱分析结果证实, GCN5 招募蛋白中有细胞核肌动蛋白、细胞核肌球蛋白 I (myosin-I α)、不均一核糖核蛋白 hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F)、转录延伸因子(transcription elongation factor A protein 1)、ATP 依赖性染色体变构复合物成份 Snf2h (Smarca5)-ISWI 类, 上述招募蛋白因子与 GCN5 形成转录复合体调控 MSCs 分化为心肌样细胞的转录延伸过程。

质谱分析和免疫反应表明, 细胞核肌动蛋白是 β -肌动蛋白, 细胞质中的肌动蛋白与信号转导途径有关, 细胞核肌动蛋白调控基因转录过程; 细胞质肌动蛋白感应细胞外界刺激将信号转导至细胞核, 由胞浆转入至核的信号通过细胞核肌动蛋白 β -肌动蛋白介导, 调控细胞核内的转录^[13,14]。

Akt 亦称 PKB, 承接胞外环境因素刺激和胞内信号转导通路调控, 肌动蛋白是 Akt 信号通路的作用靶点。Akt 可被 PI-3K 磷酸化, BMP 通过提高 PI-3K 的活性磷酸化 Akt, 活化的 Akt 进入胞核通过转录因子和肌动蛋白复合体参与转录调控^[15]。研究表明, BMP-PI3K-PDK1-Akt-MEF2A-MHC 通路促进干细胞向心肌细胞终末分化^[16]; BMP-PI3K-PDK1-Akt-GATA4-ANP 途径可引起心衰的发生^[17]。

PGC-1 α 和 pRb 是 GCN5 招募蛋白中的转录辅激活子。PGC-1 α 是参与调控心肌关键基因 MEF2C、ANF、BNF、Myh6 表达的重要辅激活子^[18,19]; PGC-1 α 与 DNA 结合蛋白和乙酰化组蛋白 HAT 酶结合聚集在转录活性基因启动子区域, 参与转录调控^[20]。pRb 在肌细胞终末分化过程中参与调控肌肉特异基因 MRF4、MCK、 α -cardiac actin、myogenin、MHC 的表达^[21,22]。

免疫共沉淀和质谱分析能够全面、深入地鉴别出 GCN5 招募蛋白因子, 通过对心肌分化相关蛋白因子的分析, 可以以点带面探讨干细胞分化为心肌样细胞的机制。虽然免疫共沉淀技术检测不到低亲和力和瞬间蛋白质间的相互作用, 蛋白质的结合可能是间接结合, 但是相互作用的蛋白质都是经翻译后修饰处于天然状态, 且蛋白的相互作用是在自然状态下进行, 从而避免了人为的影响。

以往研究中 GCN5 相关 shRNA 重组质粒转染细胞, 证实了干细胞分化过程中 GCN5 对基因转录调控的必要性^[1-3]。本研究证实 GCN5 与募集蛋白因子形成的转录延伸复合体通过细胞核肌动蛋白和 Akt 的胞核胞浆转移, 承接胞外信号传导通路信息, 协同转录辅激活子, 调控具有 Sp1 结合位点的基因的转录。筛选出的心肌分化相关乙酰化调控因子解释了 GCN5 复合体调控 MSCs 分化为心肌样细胞的转录调控机制, 为进一步研究干细胞分化信号传导途径、特异性生物靶点干预以及提高干细胞分化效率打下了基础。

参考文献(References)

- 1 朱 静, 王应雄, 张晓萍, 王金菊, 张小飞, 田 杰. Gcn5 基因 shRNA 的载体构建及其对干细胞分化中组蛋白乙酰化修饰的干扰作用. 中华医学遗传学杂志 2006; 23(1): 43-6.
- 2 朱 静, 邓 兵, 王金菊, 田 杰, 王应雄. 5-aza 诱导干细胞经乙酰化特异 RNAi 后心肌细胞发育相关基因检测. 第三军医大学学报 2006; 28(6): 535-8.
- 3 朱 静, 冯 川, 李 莉, 邓 兵, 田 杰, 张晓萍. 干扰组蛋白乙酰化引发间充质干细胞心肌定向分化特定蛋白的异常表达. 第三军医大学学报 2008; 30(4): 303-6.
- 4 Yu M, Wang J, Li W, Yuan YZ, Li CY, Qian XH, et al. Proteomic screen defines the hepatocyte nuclear factor 1 α -binding partners and identifies HMGB1 as a new cofactor of HNF1 α . Nucleic Acids Research 2008; 36(4): 1209-19.
- 5 Bieker JJ. Kruppel-like factors: Three fingers in many pies. J Biol Chem 2001; 276(37): 34355-8.
- 6 Philipsen S, Suske G. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. Nucleic Acids Res 1999; 27(15): 2991-3000.
- 7 Song CZ, Keller K, Murata K, Asano H, Stamatoyannopoulos G. Functional interaction between coactivators CBP/p300, PCAF, and transcription factor FKL2F2. J Biol Chem 2002; 277(9): 7029-36.
- 8 Mazaud Guittot S, Tetu A, Legault E, Pilon N, Silversides DW, Viger RS. The proximal Gata4 promoter directs reporter gene

- expression to Sertoli Cells during mouse gonadal development. *Biol Reprod* 2007; 76(1): 85-95.
- 9 Hernandez M, Shao Q, Yang XJ, Luh SP, Kandouz M, Batist G, *et al.* A histone deacetylation dependent mechanism for transcriptional repression of the gap junction gene *cx43* in prostate cancer cells. *Prostate* 2006; 66(11):1151-61.
 - 10 Rahmutula D, Cui J, Chen S, Gardner DG. Transcriptional regulation of type B human natriuretic peptide receptor gene promoter: dependence on Sp1. *Hypertension* 2004; 44(3): 283-8.
 - 11 Di Lisi R, Millino C, Calabria E, Altruda F, Schiaffino S, Ausoni S. Combinatorial *cis*-acting elements control tissue-specific activation of the cardiac troponin I gene *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 1998; 273(39): 25371-80.
 - 12 Obrdlik A, Kukalev A, Louvet E, Farrants AK, Caputo L, Percipalle P. The histone acetyltransferase PCAF associates with actin and hnRNP U for RNA Polymerase II transcription. *Mol Cell Biol* 2008; 28(20): 6342-57.
 - 13 Hofmann WA, Stojiljkovic L, Fuchsova B, Vargas GM, Mavrommatis E, Philimonenko V, *et al.* Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 2004; 6(11): 1094-101.
 - 14 Percipalle P, Visa N. Molecular functions of nuclear actin in transcription. *J Cell Biol* 2006; 172(7): 967-71.
 - 15 Vandermoere F, El Yazidi-Belkoura I, Demont Y, Slomianny C, Antol J, Lemoine J, *et al.* Proteomics exploration reveals that actin is a signaling target of the kinase Akt. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6(1): 114-24.
 - 16 Sako K, Fukuhara S, Minami T, Hamakubo T, Song H, Kodama T, *et al.* Angiopoietin-1 induces kruppel-like factor 2 expression through a phosphoinositide 3-kinase/AKT-dependent activation of myocyte enhancer factor 2. *J Biol Chem* 2009; 284(9): 5592-601.
 - 17 Chandrasekar B, Mummidi S, Mahimainathan L, Mestril R, Nemer M. Interleukin-18 is a pro-hypertrophic cytokine that acts through a phosphatidylinositol 3-kinase-phosphoinositide-dependent kinase-1-Akt-GATA4 signaling pathway in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2005; 280(6): 4553-67.
 - 18 Lai L, Leone TC, Zechner C, Schaeffer PJ, Kelly SM, Flanagan DP, *et al.* Transcriptional coactivators PGC-1 α and PGC-1 β control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart. *Genes Dev* 2008; 22(14): 1948-61.
 - 19 Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelman G, Lehman JJ, *et al.* Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(7): 3820-5.
 - 20 Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 2003; 24(1): 78-90.
 - 21 Zacksenhaus E, Jiang Z, Hei YJ, Marth JD, Phillips RA, Gallie BL. pRb controls proliferation, differentiation, and death of skeletal muscle cells and other lineages during embryogenesis. *Genes Dev* 1996; 10(23): 3051-64.
 - 22 Melcon G, Kozlov S, Cutler DA, Sullivan T, Hernandez L, Zhao P, *et al.* Loss of emerin at the nuclear envelope disrupts the Rb1/E2F and MyoD pathways during muscle regeneration. *Hum Mol Genet* 2006; 15(4): 637-51.

Screening Differentiation Related GCN5 Recruitment Proteins during Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Cardiac Like Myocytes

Na Zhou¹, Jing Zhu^{1*}, Jie Tian², Ya-Sha Li¹, Bing Deng¹, Ya-Lan Zhang¹, Shen-Shen Zhi¹

(¹Pediatric Research Institute, ²Department of Cardiology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract Screening and analysing the recruitment of protein complexes with GCN5 during the process of mesenchymal stem cells (MSCs) differentiating into cardiac myocytes have been designed to identify unknown proteins that were recruited by histone acetyltransferase GCN5. Immunofluorescence cytochemistry and real-time PCR analysis identify that MSCs can differentiate into cardiomyocyte-like cells after 5-azaC induction treatment. We then developed co-immunoprecipitation strategy to separate recruitment proteins with GCN5, and tandem mass spectrometry to identify recruitment proteins. Furthermore, we analyzed functions of GCN5 recruitment proteins from the degree of differentiation of cardiac. MSCs can express higher cardiac-specific genes GATA4 and MEF2C after 5-azaC induction treatment. GCN5 physically interacts with the following proteins which can be categorized as: (1) DNA-binding protein of Sp1/KLF; (2) transcriptional co-activators of PGC-1 α and Rb1; (3) components of transcription elongation complex, and finally signaling pathway component of protein Akt. This experiment screens GCN5 recruitment proteins for regulation. We will further study differentiating signal transduction pathway of stem cells, as well as the specific biological target for intervention to improve the ratio of differentiation of stem cells on the basis of experiments.

Key words mesenchymal stem cells; differentiation; histone acetyltransferase GCN5; Co-IP; MS/MS

Received: September 3, 2009 Accepted: January 8, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30973219)

*Corresponding author. Tel: 86-23-63630294, E-mail: zhujing310@yahoo.com.cn