

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01451

5-氮脱氧胞苷及曲古抑菌素 A 影响供核细胞 H19 基因表达的时间依赖性 及浓度依赖性

杨晓煜^{1,2,3,△*}, 姚建凤^{1,2,△}, 黄燕芳⁴, 张 更¹, 徐榕清¹, 郑 鸣¹

1. 福建医科大学基础医学院人体解剖学与组织胚胎学系, 福州 350004

2. 福建医科大学细胞与发育工程研究中心, 福州 350004

3. 福建省生殖医学(工程)中心, 福州 350004

4. 福建医科大学附属第一医院体检中心, 福州 350005

[摘要] **目的:**探讨甲基转移酶抑制剂——5-氮脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dC)和组蛋白去乙酰基酶抑制剂——曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)影响供核细胞 H19 基因表达的时间依赖性和浓度依赖性。**方法:**用不同浓度 5-aza-dC 及 TSA 按不同作用时间处理供核细胞(鼠尾尖成纤维样细胞),利用实时定量 PCR 法检测处理后 H19 基因的表达。**结果:**不同浓度的 5-aza-dC 处理组之间 H19 的表达无明显差异,但延长作用时间可使 H19 表达增强;TSA 使 H19 的表达下降,但无时间依赖性。**结论:**长时间低浓度的 5-aza-dC 能增强供核细胞中 H19 基因的表达,而 TSA 则使 H19 的表达减弱,为体细胞克隆中表观遗传修饰抑制剂的选择及后续基因印迹研究提供了依据。

[关键词] H19 基因;甲基转移酶抑制剂;组蛋白脱乙酰基酶抑制剂;5-aza-dC;TSA;供核细胞

[中图分类号] R 321 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)12-1451-04

Time- and concentration-dependent effect of 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A on H19 gene expression in nuclear donor cells

YANG Xiao-yu^{1,2,3,△*}, YAO Jian-feng^{1,2,△}, HUANG Yan-fang⁴, ZHANG Geng¹, XU Rong-qing¹, ZHENG Ming¹

1. Department of Anatomy, Histology & Embryology, College of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

2. Center of Cell and Developmental Biology, Fujian Medical University, Fuzhou 350004

3. Fujian Reproductive Medicine Center, Fuzhou 350004

4. Physical Examination Center, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005

[ABSTRACT] **Objective:** To study the time- and concentration-dependent effect of DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine(5-aza-dC) and histone deacetylase inhibitor trichostatin A(TSA) on the expression of H19 gene in nuclear donor cells. **Methods:** Donor cells (fibroblast-like cells from tail tip of mice) were treated with 5-aza-dC and TSA at different concentrations for different time periods. The expression of H19 was determined by real-time PCR after treatment. **Results:** The expression of H19 was not significantly different between groups treated with different concentrations of 5-aza-dC, but the expression of H19 was increased with the increase of treatment time. TSA decreased H19 expression, but not in a time-dependent manner. **Conclusion:** Long time exposure to low concentration of 5-aza-dC can increase the expression of H19; TSA can decrease the expression of H19, which provides a basis for selection of epigenetic modification inhibitor and later study on imprinting in somatic cell nuclear transfer.

[KEY WORDS] H19 gene; methyltransferases inhibitors; histone deacetylases inhibitors; 5-aza-dC; TSA; nuclear donor cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(12):1451-1454]

[收稿日期] 2008-07-07 **[接受日期]** 2008-10-22

[基金项目] 国家自然科学基金(30500282),福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划(NCETFJ-0603),福建省青年人才创新项目(2005J044). Supported by National Natural Science Foundation of China(30500282), New Century Excellent Talents of Fujian Province University(NCETFJ-0603) and Projects for Young Scientific and Technological Talents Innovation of Fujian Province(2005J044).

[作者简介] 杨晓煜,博士,副教授;姚建凤,硕士生, E-mail: yjf06017@163.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0591-83569021, E-mail: yxyfj@163.com

随着多莉羊的诞生,体细胞克隆(核移植)由于在治疗性克隆和动物疾病模型等方面广泛深远的应用而备受关注。供核细胞是影响体细胞克隆效率的关键因素之一,选择合适的供核细胞是提高克隆效率的有效方向之一^[1]。在体细胞克隆中,供体核来自高度分化的体细胞,体细胞在分化过程中,细胞核获得了高度特异的 DNA 和染色质的表观遗传修饰(epigenetic modification),但当供体细胞核被移入去核的卵母细胞后,供体核必须经过重编程(reprogramming),去除特定的表观修饰,使重构胚具有与受精卵相同的核等价性(nuclear equivalency),从而获得发育的全能性^[2]。因此,预先存在于供核细胞中的表观修饰将影响随后的重编程和重构胚的发育,通过药物去除预先存在于供核细胞中的表观遗传标记将有助于重编程效率的提高。DNA 甲基化和组蛋白乙酰化是表观遗传修饰的重要组成部分。甲基转移酶抑制剂——5-氮脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dC)和组蛋白去乙酰基酶抑制剂——曲古霉素 A(trichostatin A, TSA)是目前体细胞克隆研究中去除表观遗传标记最常用的两种药物,并取得一定的效果^[3-4]。

H19 是最早发现的印迹基因,是一种生长调节基因,在胚胎和胎盘组织中高度表达^[5]。H19 的异常表达被认为是克隆胚胎出现异常表型的重要原因之一,鼠尾尖成纤维样细胞是常用的供核细胞。Grandjean 等^[6]用半定量的方法显示 TSA 影响胚胎成纤维细胞 H19 的表达,而本研究将利用实时定量 PCR 法检测不同浓度 5-aza-dC 及 TSA 作用不同时间对鼠尾尖成纤维样细胞 H19 基因表达的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 C57BL/6 和 DBA/2 小鼠购自国家啮齿类实验动物种子中心上海分中心,逆转录试剂购自 Toyobo 公司,实时定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex TaqTM 购自大连 TaKaRa 公司,KSOM(K⁺-modified simplex optimized medium)胚胎培养液购自美国 Specialty Media 公司,其余试剂无特别说明均购自美国 Sigma 公司。

1.2 成纤维样细胞的培养及给药 从出生后 8~9 周的 B6D2F1(C57BL/6×DBA/2)雌鼠取下部分尾尖,进行原代培养和传代,培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中^[7]。在细胞密度约 50% 时给予不同浓度(0、0.01、0.08、0.3 和 1.25 μmol/L)5-aza-dC 处理 24 h 后进行总 RNA 的抽提;或给予 0.33 μmol/L 的 TSA 分别处理 0、6、12、18 和 24 h 后进行总 RNA

的抽提;或给予 1.25 μmol/L 5-aza-dC 处理 24 h 后继续在 0.3 μmol/L 5-aza-dC 处理 48 h 后进行总 RNA 的抽提(5-aza-dC-long),或撤去 5-aza-dC,继续常规培养 1 周后再进行总 RNA 的抽提(1W)。以未做任何药物处理的细胞作为对照(Un-treated)。

1.3 总 RNA 的抽提和 cDNA 的合成 1 ml TRIzol 试剂加入 1×10⁶ 个细胞,按常规方法抽提细胞总 RNA。以 oligoT20 为引物,每份加入 RNA 0.5 μg 为模板,按逆转录试剂盒操作说明合成 cDNA。

1.4 Real-time PCR 定量检测 H19 的相对表达 取上述 cDNA 产物 1 μl 做模板,以 GAPDH 作为内参照,利用 SYBR Green I 染料实时定量 PCR 检测 H19 基因在不同处理组中的相对表达。H19 上游引物:5'-GTC CCC AGC CGC CAC AAC ATC-3',下游引物:5'-GGG CCC TTT CCG CAC CAG TC-3';GAPDH 上游引物:5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',下游引物:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。实时 PCR 反应条件为:95℃ 预变性 10 s;95℃ 5 s,60℃ 40 s,40 个循环。每个样品重复 3 次取平均值,以未处理组成纤维样细胞中 H19 基因的表达量为基准样品(Calibrator)计算相对表达量^[8]。

1.5 重构胚的形成及体外培养 参照文献^[9],以 B6D2F1 卵母细胞为胞质受体,分别以 TSA 处理 0 h 和 12 h 的鼠尾尖成纤维样细胞为核供体进行体细胞克隆,形成的重构胚用 KSOM 进行体外培养,记为 TSA0 组和 TSA12 组。

1.6 统计学处理 应用 SAS 6.12 统计分析软件对实验数据进行统计分析,P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 5-aza-dC 处理对 H19 表达的影响 结果表明:不同浓度的 5-aza-dC 处理组之间以及与未处理组间 H19 的表达无明显差异(图 1)。

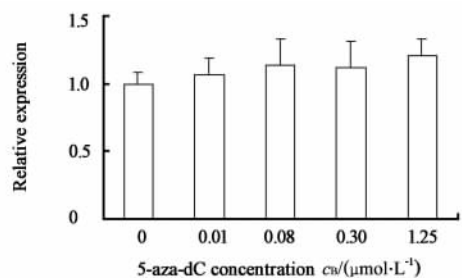


图 1 不同浓度 5-aza-dC 处理 24 h 后供核细胞中 H19 的相对表达

Fig 1 Relative expression of H19 in donor cells treated with 5-aza-dC

2.2 TSA 处理不同时间对 H19 表达的影响 结果表明:在 TSA 的处理下,H19 的表达显著下降,但随着处理时间的延长,下降程度无明显改变(图 2)。

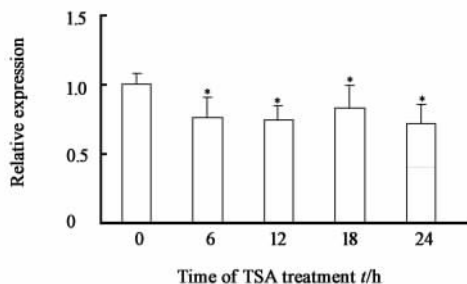


图 2 TSA 处理不同时间后供核细胞中 H19 的相对表达

Fig 2 Relative expression of H19 in donor cells treated with TSA

* $P < 0.05$ vs 0 h group (No TSA treatment)

2.3 低剂量 5-aza-dC 处理不同时间对 H19 表达的影响 结果表明:用低剂量 5-aza-dC 延长作用时间能使 H19 的表达发生显著升高;H19 的表达升高在撤药后进行 1 周常规培养,表达无明显改变(图 3)。

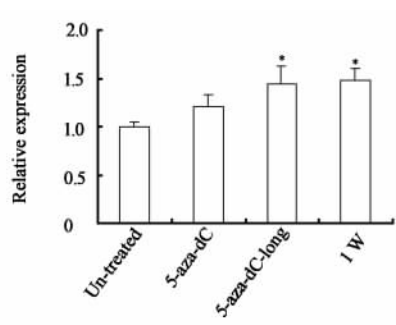


图 3 不同处理条件下供核细胞中 H19 的相对表达

Fig 3 Relative expression of H19 in donor cells treated under different conditions

Un-treated: Without 5-aza-dC; 5-aza-dC: Treated with 1.25 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-dC for 24 h; 5-aza-dC-long: After treated with 1.25 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-dC for 24 h, 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-dC for an additional 48 h; 1W: After treated with 5-aza-dC-long, in normal medium without 5-aza-dC for one week. * $P < 0.05$ vs Un-treated group

2.4 TSA 处理后重构胚的形成情况 结果表明:TSA0 组和 TSA12 组重构胚在卵裂率上无明显差异,但在随后的体外发育率上,TSA12 组的发育率较高(表 1)。

表 1 供核细胞经 TSA 处理后重构胚的体外发育

Tab 1 *In vitro* development of embryos reconstructed with donor cells treated with TSA

Group	Reconstructed embryos(<i>n</i>)	PN formed [<i>n</i> (%)]	Two-cell embryos [<i>n</i> (%)]	Developeda [<i>n</i> (%)]
TSA0	87	83(95)	75(90)	17(20)
TSA12	76	71(93)	66(93)	25(35)*

* $P < 0.05$ vs TSA0 group; ^aEmbryos of the morula or blastocyst stage

3 讨论

本研究运用不同浓度和(或)不同作用时间的甲基转移酶抑制剂 5-aza-dC 和组蛋白去乙酰基酶抑制剂 TSA 处理供核细胞,结果表明:低浓度较长时间的 5-aza-dC 处理使供核细胞中 H19 基因的表达增强,而 TSA 则使 H19 的表达减弱,为体细胞克隆中表观遗传修饰抑制剂的选择及后续的基因印迹研究提供实验依据。

H19 是最早发现的印迹基因之一,具有调节生长功能。H19 被敲除的小鼠出生时的体质量呈增长的趋势,这与当前哺乳动物克隆胚胎出现的异常表型如胎盘肥大、胚胎过重等相似;在死亡的克隆动物中 H19 常是双等位基因表达的^[10]。结果说明供体核中的 H19 基因没有正确的重新编程可能是引起克隆胚胎异常表型的重要原因之一。对核移植中 H19 基因的系统研究,将有助于理解体细胞克隆的

可能机制。

哺乳动物体细胞核移植是利用核质关系理论,使重构胚具有与受精卵相同的核等价性,促使重构胚发育形成个体^[2]。核质关系对重构胚的影响主要表现在诱导已分化的供核去分化、重编程、恢复全能性。已有研究表明克隆胚胎显示出特异于供核细胞的特征,利用甲基转移酶抑制剂和组蛋白去乙酰基酶抑制剂去除存在于供核细胞上的表观遗传标记将使供体核更易获得正确的重编程^[11]。Ding 等^[4]将 5-aza-dC 和 TSA 作用于供核细胞和克隆胚胎显著改善克隆胚的发育;Kishigami 等^[3]获得经 TSA 处理后的克隆鼠。

DNA 甲基化是基因组的主要表观遗传修饰方式,是基因表达精确调控的方式之一。细胞通过 DNA 甲基转移酶维持其在分裂增生中 DNA 甲基化的稳定。DNA 甲基转移酶抑制剂则抑制 DNA 甲基转移酶的作用使细胞甲基化水平降低。5-aza-

dC是一种常用的DNA甲基转移酶抑制剂。体细胞克隆所用的供体细胞,如成纤维细胞以及其他高度分化的体细胞中,基因组具有较高的甲基化水平,具有体细胞的典型特征。在本研究中,我们用不同浓度的5-aza-dC来处理供核细胞,却发现供核细胞H19基因的表达没有明显改变。其原因可能为5-aza-dC的浓度较低所致。由于5-aza-dC具有一定的细胞毒性^[12],而在体细胞克隆中,供体核还必须保持活力并指导重构胚的发育,因此体细胞克隆研究中使用5-aza-dC的浓度较低,本研究采用的浓度均为目前体细胞克隆研究报道中使用5-aza-dC的浓度^[4,8]。此外,本研究还尝试在较低浓度下延长5-aza-dC的处理时间,引起H19基因表达增强,可能为由于时间的延长累积了微小的改变达到了检测的灵敏度。并且我们还观察到,升高的H19表达,即使在撤去5-aza-dC后仍保持不变,这一结果支持了以前的研究,认为DNA的甲基化在体细胞的一些印迹基因座上,能产生可遗传的表观遗传修饰^[13]。另一可能原因是除DNA甲基化外,还有其他表观修饰调控H19基因的表达,如组蛋白乙酰化等。

TSA是一种去乙酰基酶抑制剂,它能够抑制去乙酰基酶(HDAC)的活性,使组蛋白高度乙酰化,以此调节基因的表达。但在本研究中,我们用不同作用时间的TSA来处理供核细胞时,却发现供核细胞H19基因的表达是下降的,随着作用时间的延长,下降的程度无明显改变,提示TSA对H19的表达有明显的抑制作用,但无时间依赖性。TSA处理能够改善供核细胞重构胚的体外发育。

[参考文献]

[1] Yang X Y, Li H, Ma Q W, Yan J B, Zhao J G, Li H W, et al. Improved efficiency of bovine cloning by autologous somatic cell nuclear transfer[J]. *Reproduction*, 2006, 132: 733-739.
 [2] 杨晓煜, 戴博. 基因的重新编程与哺乳动物克隆[J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23: 18-22.

[3] Kishigami S, Bui H T, Wakayama S, Tokunaga K, Van Thuan N, Hikichi T, et al. Successful mouse cloning of an outbred strain by trichostatin A treatment after somatic nuclear transfer[J]. *J Reprod Dev*, 2007, 53: 165-170.
 [4] Ding X, Wang Y, Zhang D, Wang Y, Guo Z, Zhang Y. Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A[J]. *Theriogenology*, 2008, 70: 622-630.
 [5] Charalambous M, Menheniott T R, Bennett W R, Bennett W R, Kelly S M, Dell G, et al. An enhancer element at the Igf2/H19 locus drives gene expression in both imprinted and non-imprinted tissues[J]. *Dev Biol*, 2004, 271: 488-497.
 [6] Grandjean V, O'Neill L, Sado T, Turner B, Ferguson-Smith A. Relationship between DNA methylation, histone H4 acetylation and gene expression in the mouse imprinted Igf2-H19 domain[J]. *FEBS Lett*, 2001, 488: 165-169.
 [7] Ogura A, Inoue K, Takano K, Wakayama T, Yanagimachi R. Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells[J]. *Mol Reprod Dev*, 2000, 57: 55-59.
 [8] La Salle S, Mertineit C, Taketo T, Moens P B, Bestor T H, Trasler J M. Windows for sex-specific methylation marked by DNA methyltransferase expression profiles in mouse germ cells[J]. *Dev Biol*, 2004, 268: 403-415.
 [9] Kishigami S, Wakayama S, Thuan N V, Ohta H, Mizutani E, Hikichi T, et al. Production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1: 125-138.
 [10] Zhang S, Kubota C, Yang L, Zhang Y, Page R, O'Neill M, et al. Genomic imprinting of H19 in naturally reproduced and cloned cattle[J]. *Biol Reprod*, 2004, 71: 1540-1544.
 [11] Billewicz R, Wang Z, Meissner A, Pollard S, Smith A, Jaenisch R. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus[J]. *Stem Cells*, 2006, 24: 2007-2013.
 [12] Enright B P, Kubota C, Yang X, Tian X C. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine[J]. *Biol Reprod*, 2003, 69: 896-901.
 [13] Tucker K L, Beard C, Dausmann J, Jackson-Grusby L, Laird P W, Lei H, et al. Germ-line passage is required for establishment of methylation and expression patterns of imprinted but not of nonimprinted genes[J]. *Genes Dev*, 1996, 10: 1008-1020.

[本文编辑] 贾泽军