

TSA 处理供体细胞对组蛋白乙酰化和核重编程效果的影响

张东, 杨鹭, 王勇胜, 刘根胜, 刘利杰, 万敏, 张涌*

(西北农林科技大学生物工程研究所, 杨凌 712100)

摘要: 克隆胚胎基因组的不完全重编程是克隆动物成功率低的主要原因。试验中以第 5 代牛胎儿成纤维细胞作为供体核, 以牛卵母细胞作为受体胞质进行体细胞核移植, 用 $75 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 曲古抑菌素 A (Trichostatin A, TSA) 分别处理供体细胞 6、12 和 24 h, 通过核移植检测克隆胚胎发育率, 并应用激光共聚焦显微镜技术和流式细胞术检测处理细胞和克隆囊胚组蛋白 H3K18 乙酰化水平和细胞周期。结果显示: 随着 TSA 处理时间的延长, 供体细胞组蛋白 H3K18 乙酰化水平不断提高; 以 $75 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSA 处理供体细胞 12 h 的克隆胚的囊胚发育率显著高于未处理组 (23.5% vs 15.7%, $P < 0.05$); 供体细胞经 TSA 处理的克隆囊胚组蛋白 H3K18 乙酰化水平与未处理组相比差异不显著 ($P > 0.5$); 处理组和对照组细胞 G_0/G_1 期和 S 期比例间存在显著差异 ($P < 0.05$)。结论: TSA 对核供体细胞的处理存在时间效应, $75 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSA 处理 12 h 的牛胎儿成纤维细胞更易被卵母细胞重编程, 显著提高了克隆胚的体外发育能力, 初步证实 TSA 是通过提高供体细胞组蛋白乙酰化水平来促进供体细胞重编程的。

关键词: 核移植; 曲古抑菌素 A; 重编程; 激光共聚焦显微镜

中图分类号: S823; S814.8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)07-1007-06

Effect of Trichostatin A on Reprogramming of Bovine Fetal Fibroblast Cells

ZHANG Dong, YANG Lu, WANG Yong-sheng, LIU Gen-sheng, LIU Li-jie, WAN Min, ZHANG Yong*
(Bioengineering Institute, Northwest Agricultural & Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: It has been widely suggested that poor ability of oocyte cytoplasmic factors to globally erase the epigenetic modifications of a somatic cell is the major reason of the inefficiency of nuclear transfer. In this study, bovine fetal fibroblasts passaged 5 times were seeded into DMEM plus 10% FBS containing $75 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ of TSA for 6, 12, 24 h, respectively. These levels were selected to produce time-dependent effects. Cells were subsequently subjected to assay for histone acetylation of H3K18 levels by confocal microscope. The effect of Trichostatin A treatment donor cells on *in vitro* development of bovine nuclear transfer (NT) embryos which were constructed with bovine fetal fibroblast cells and cell cycle was investigated. These results showed that TSA increased the levels of histone acetylation of H3K18 after bovine fetal fibroblast cells treated with $75 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSA for 12 or 24 h ($P < 0.05$); $75 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSA treatment of donor cells for 12 h promoted blastocyst development compared to control (23.5% vs 15.7%, $P < 0.05$); Marked difference existed in the percentage of cells at G_0/G_1 and S stages between treated and control groups ($P < 0.05$). It was concluded that TSA enhances the reprogramming in terms of high histone acetylation of doner cells.

Key words: nuclear transfer; Trichostatin A; reprogramming; confocal microscope

最新研究表明,克隆动物胚胎基因组的不完全重编程可能是克隆动物成功率低的主要原因^[1-3]。核重编程是指核移植后哺乳动物卵母细胞擦除已分化的体细胞的表观遗传,恢复为胚胎发育所必需的胚胎化基因表达程序的过程^[4]。在停止供体细胞本身的基因表达,恢复胚胎发育所需的基因表达模式的过程中,除 DNA 去甲基化和转录因子等外,由组蛋白乙酰化所引起的染色质重塑也起着至关重要的作用^[5]。乙酰化/去乙酰化是最早被发现的与基因转录有关的组蛋白修饰方式,试验发现组蛋白乙酰化程度和基因的转录活性呈正相关^[6],组蛋白 H3 和 H4 在转录活跃的基因处高度乙酰化,与此相反,在沉默基因处是去乙酰化的^[7]。组蛋白乙酰化/去乙酰化是分别由组蛋白乙酰基转移酶(HAT)和组蛋白去乙酰基酶(HDAC)催化完成的。HAT 与 HDAC 二者之间的动态平衡控制着染色质的结构。曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)是一种去乙酰化酶(HDAC)抑制剂,其通过抑制去乙酰化酶(HDACs)的活性来提高组蛋白的乙酰化程度。目前有关 TSA 处理核供体细胞对克隆胚胎重编程影响的研究较少。Kishigami 等用 TSA 处理小鼠重构胚其囊胚发育率提高 2~5 倍^[8]。Enright 等用 TSA 处理供体细胞使牛重构胚的囊胚率提高了 10%^[9]。TSA 是通过何种机制来促进供体细胞的重编程目前还不清楚。本研究初步探讨了 TSA 处理供体细胞对克隆胚的发育率的影响,并检测了 TSA 处理的细胞和克隆囊胚组蛋白 H3K18 乙酰化水平。为 TSA 应用于牛核移植技术提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养液、M199 培养液、SOF 培养液、胎牛血清(FBS)均购自 GIBCO 公司;Trichostatin A、离子霉素(Ionomycin)、细胞松弛素 B(CCB)、透明质酸酶、胰蛋白酶、矿物油均购自 Sigma 公司;抗乙酰化组蛋白 H3K18 抗体、偶联 FITC 的二抗均购自 ABCAM 公司。

1.2 牛胎儿成纤维细胞制备

将牛胎儿放入 75%酒精中灭菌,然后再放入含 400 IU·mL⁻¹青霉素和 400 IU·mL⁻¹链霉素的 PBS 中洗 3 次。将牛胎儿去掉四肢和头尾后取其皮肤并再次用 PBS 清洗,皮肤组织块剪碎(2~3 mm²)

后贴于组织培养瓶,加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液,放入 37.5 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中,每 3 d 换液 1 次。当原代细胞长至汇合时,进行传代培养,传代时尽量吸出培养液,用 D-Hanks 清洗后,加入 1 mL 0.25%胰蛋白酶消化液,在显微镜下观察细胞形态变化,当细胞变圆时立即加入含有血清的培养液终止消化。本试验所用的为第 5 代传代细胞。

1.3 牛卵母细胞的体外成熟

牛卵巢采自西安屠宰场,采集到的卵巢用外科手术剪剔除卵巢表面的结缔组织及附着的输卵管后,用 30 °C 生理盐水洗 3 次。用一次性注射器从大小为 2~6 mm 卵泡中吸取卵母细胞,选至少带有 3 层以上卵丘细胞且胞质均匀的卵丘卵母细胞复合物(COCs)放入直径 30 mm 培养皿中成熟培养,培养皿放入 38.5 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中成熟培养 20~22 h。成熟培养液为 TCM199 加 10% 胎牛血清(FBS)、10 μg·mL⁻¹、促卵泡激素(FSH, Vetrepharm, Canada)、10 μg·mL⁻¹促黄体素(LH, Bioniche, Canada)和 1 μg·mL⁻¹ 17β-雌二醇。

1.4 牛卵母细胞核移植

体外成熟 20~22 h 的 COCs 移入 0.1%透明质酸酶溶液中消化,用移液枪反复吹打去掉卵母细胞表面的卵丘细胞,再用成熟液洗 3 次。将脱掉卵丘细胞的卵母细胞置于体视显微镜下挑选有第一极体的卵母细胞作为胞质受体。将挑选用于胞质受体的卵母细胞放入含 0.5 μg·mL⁻¹ Hoechst33334 和 7.5 μg·mL⁻¹细胞松弛素 B 的操作液微滴中,上覆矿物油平衡 15 min。在显微操作仪下,用内径 15~20 μm 去核针去除第一极体及附近的胞质,在荧光显微镜下观察去核效果,去核完全的用做受体胞质,用注射针吸入供体细胞,然后将供体细胞注射到去核卵母细胞的卵周隙内。采用针式电极在显微操作仪上进行电融合,以 35 V, 10 μs, 一次脉冲融合, 30 min 后检测融合情况。

1.5 重构胚的激活及体外培养

融合后的重组胚在 H-M199 培养液中培养 2~3 h 激活。在含 5 μmol·L⁻¹离子霉素(ionomycin)的激活液中作用 5 min, 培养液洗 3 遍,然后在 2 mmol·L⁻¹ 6-DMAP(6-dimethylaminopurine)的培养液中孵育 4 h。洗 3 次后转移到 35 mm 培养皿中的 SOFaa 培养液(SOF+2%必需氨基酸+1%非必需氨基酸+1 mmol·L⁻¹谷氨酰胺+8 g·L⁻¹ BSA)微

滴中。将微滴放入 38.5 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中进行培养,隔 48 h 换液,72 h 后加入 10% (v/v) FBS 继续培养,换液时观察并记录胚胎发育情况。

1.6 免疫荧光染色

参考文献[10-11]对 TSA 不同处理时间的细胞进行固定和免疫荧光染色。细胞放入 4% 多聚甲醛中固定 4 h,固定好的细胞用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min 左右。然后将细胞放入 0.5% TritonX-100 中透化 20 min。之后在 3% BSA 的 PBS 中封闭 3 h。细胞与抗乙酰化组蛋白 H3K18 的一抗(ABCAM, 1:400 dilution)孵育过夜,充分洗涤后,再与偶联 FITC 的二抗(ABCAM, 1:800)孵育 3 h。再用 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 碘化丙锭(propidium iodide, PI)复染 20 min 以标记 DNA,以上都是在室温进行的。克隆囊胚的免疫荧光染色步骤、方法、抗体浓度、孵育时间与细胞免疫荧光染色相同。为了得到科学的数据,在用激光共聚焦显微镜对细胞进行观察时选用的是相同的 Confocol 参数,激发波长为 488 (FITC) 和 568 nm (PI)。

1.7 细胞周期分析

0.25% 的胰蛋白酶消化用于细胞周期分析的培养细胞,D-MEM/F-12 重悬后移至 1.5 mL 离心管中,D-PBS 离心清洗 3 遍后,加入 D-PBS 配制的 75% 冰乙醇,4 °C 固定 2 h 或过夜,D-PBS 再离心清洗 1 遍后,用 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNA 酶 37 °C 消化 20~30 min,D-PBS 离心清洗 2 遍,300 目尼龙网过滤,0.2~0.3 mL D-PBS 重悬,PI 染色 5 min 后流式细胞仪测定细胞周期。

1.8 试验设计

以国内外的研究为基础^[8-9],选择 75 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为 TSA 处理供体细胞的浓度。设计了以下试验:①不同时间的 TSA 处理对供体细胞组蛋白 H3K18 乙酰化水平的影响。分别用 TSA 处理第 5 代牛成纤维细胞 0、6、12 和 24 h,用激光共聚焦显微镜分析经免疫组化染色的细胞组蛋白乙酰化水平;②供体细胞经 TSA 处理不同时间对克隆胚的体外发育能力的影响。分别用 TSA 处理供体细胞 0、6、12 和 24 h,记录克隆胚的体外发育情况;③经 TSA 处理供体细胞对克隆囊胚细胞组蛋白 H3K18 乙酰化水平的影响。供体细胞经 TSA 处理 12 h 作细胞周期分析和核移植,对所得的囊胚进行免疫组化染色,用激光共聚焦显微镜分析细

胞组蛋白乙酰化水平,用未经 TSA 处理的供体细胞所得克隆胚作为对照。

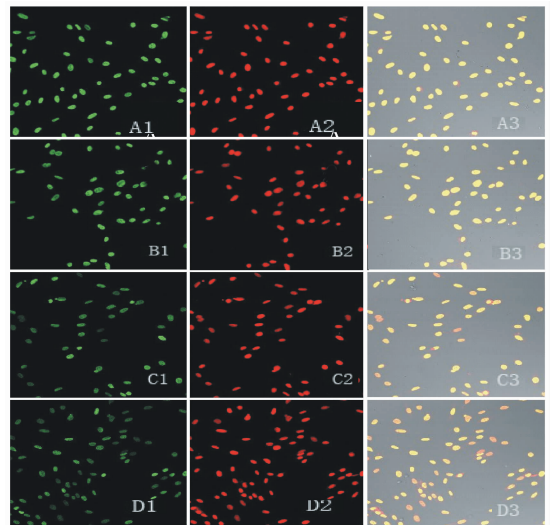
1.9 试验数据统计分析

所有试验组至少重复 3 次以上,所得的数据用 χ^2 进行显著性分析。除非特殊说明,否则 $P < 0.05$ 时认为差异显著。本研究应用激光共聚焦显微镜自带软件分析样品荧光强度,并生成相对定量数据。

2 结果

2.1 TSA 不同处理时间对供体细胞组蛋白 H3K18 乙酰化水平的影响

图 1、图 2 可以看出,TSA 处理 6 h 的细胞组蛋白 H3K18 的乙酰化荧光强度与对照组相比,差异不显著($P > 0.05$),TSA 处理 12 和 24 h 的细胞组蛋白 H3K18 的乙酰化荧光强度都显著高于对照组($P < 0.05$)。



A1, A2, A3~D1, D2, D3. TSA 分别处理 24、12、6、0 h 细胞(绿色染组蛋白;红色染细胞核)

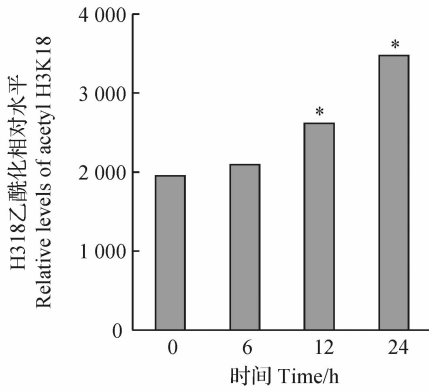
A1, A2, A3-D1, D2, D3. Donor cells treated with TSA 24、12、6、0 h, respectively (histone stained blue; DNA stained red)

图 1 TSA 处理的供体细胞的激光扫描共聚焦显微镜图(200 \times)

Fig. 1 Donor cells treated with TSA confocal microscope picture(200 \times)

2.2 供体细胞经 TSA 处理对克隆胚胎发育能力的影响

表 1 可以看出,随 TSA 处理时间的延长,细胞融合率逐渐降低;TSA 处理供体细胞 24 h 的重构



*. $P < 0.05$

图2 TSA处理供体细胞乙酰化相对定量荧光
Fig.2 Donor cells relative levels of acetyl

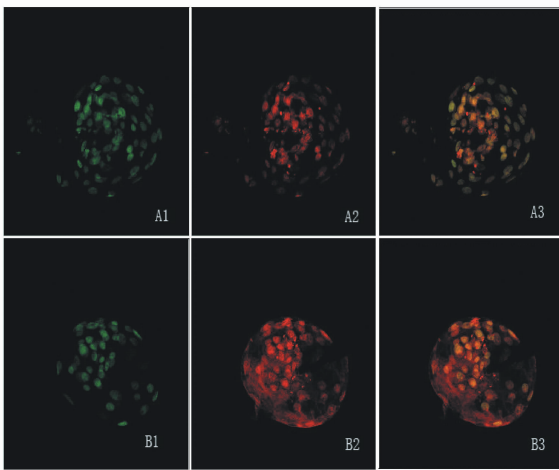
表1 核供体细胞经不同时间TSA处理对克隆胚胎发育的影响

Table 1 Development of embryos cloned from donor cells after treatment with TSA

时间/h Time	去核卵数 No. of enucleated oocytes	融合率/% Fused embryos rate	2-细胞率/% 2-cell rate	8-细胞率/% 8-cell rate	桑葚胚率/% Morula rate	囊胚率/% Blastocyst rate
0	621	60.2 (374/621) ^a	65.2 (244/374) ^a	34.7 (130/374) ^a	27.0 (101/374) ^a	15.7 (59/374) ^a
6	251	59.3 (149/251) ^a	65.1 (97/149) ^a	34.8 (52/149) ^a	27.5 (41/149) ^a	16.1 (24/149) ^a
12	269	58.3 (157/269) ^a	68.7 (108/157) ^a	43.9 (69/157) ^b	35.6 (56/157) ^b	23.5 (37/157) ^b
24	242	52 (126/242) ^b	49.2 (62/126) ^b	24.6 (31/126) ^c	18.2 (23/126) ^c	8.7 (11/126) ^c

同一栏内标相同字母表示组间差异不显著($P > 0.05$),不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

Values with the same superscript insignificantly differ $P > 0.05$, values with the different superscripts significantly differ $P < 0.05$



A₁, A₂, A₃. 处理组; B₁, B₂, B₃. 对照组(绿色染组蛋白; 红色染细胞核)

A₁, A₂, A₃. The treated groups; B₁, B₂, B₃. The control groups(histone stained blue; DNA stained red)

图3 克隆囊胚的激光扫描共聚焦显微镜图(200×)

Fig.3 NT blastocyst confocal microscope picture(200×)

胚的各期发育率显著低于对照组($P < 0.05$);以TSA处理供体细胞12h的重构胚的囊胚发育率显著高于对照组($P < 0.05$);以TSA处理供体细胞6h的重构胚的囊胚发育率与对照组差异不显著。结果说明TSA处理供体细胞12h可以提高重构胚的囊胚发育率。

2.3 供体细胞经TSA处理对克隆囊胚组蛋白H3K18乙酰化水平的影响

图3、图4可以看出,TSA处理供体细胞12h的克隆囊胚组蛋白H3K18的乙酰化荧光强度与对照组差异不显著($P > 0.05$)。

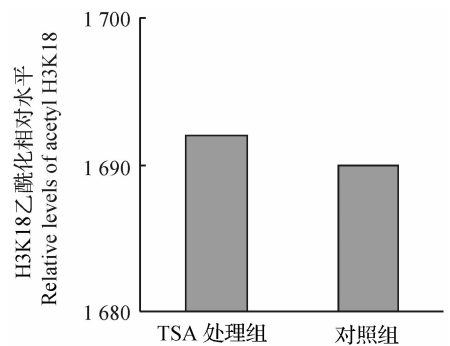


图4 TSA处理的克隆囊胚乙酰化相对定量荧光强度

Fig.4 NT blastocyst relative levels of acetyl H3K18

2.4 TSA对供体细胞周期的影响

流式细胞仪测定了TSA处理12h细胞和对照组细胞的细胞周期(表2,图5),结果显示,TSA处理后的细胞,G₀/G₁期细胞所占的比例上升,S期和G₂/M期细胞所占的比例则相应降低。G₀/G₁期和S期细胞比例在2组间差异达到了显著水平($P < 0.05$)。

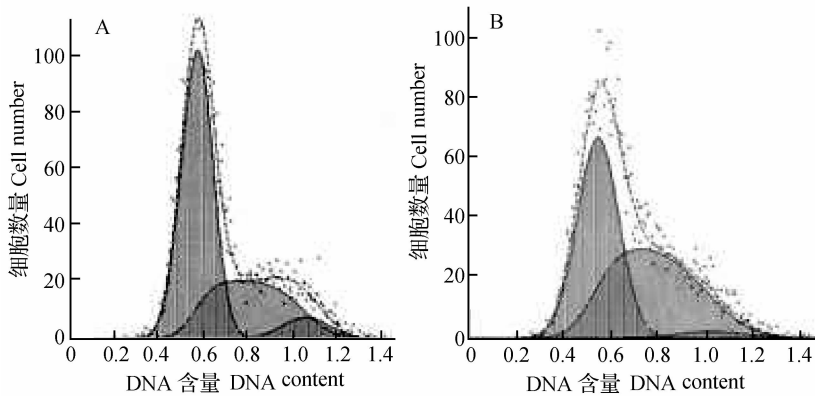
表 2 TSA 处理的牛胎儿成纤维细胞的细胞周期

Table 2 Cell cycle-stage distribution of donor cells after treated with TSA

组别 Group	G ₀ + G ₁	S	G ₂ + M
处理组 Treatment	61.1 ^a	31.9 ^b	7.8 ^a
对照组 Control	47.6 ^b	49.7 ^a	2.7 ^a

同列不同上标表示两者差异显著($P < 0.05$),相同上标表示差异不显著($P > 0.05$)

Values with the same superscript insignificantly differ $P > 0.05$, values with the different superscripts significantly differ $P < 0.05$, in the same row



A. TSA 处理组; B. 对照组

A. The treated group; B. The control group

图 5 TSA 处理细胞的细胞周期

Fig. 5 Donor cells treated with TSA cell cycle-stage distribution picture

3 讨论

以国内外的研究为基础^[8,12-13],用 75 nmol · L⁻¹ 曲古抑菌素 A (Trichostatin A, TSA) 处理供体细胞,随着 TSA 处理时间的延长,细胞组蛋白乙酰化荧光强度逐渐增强,表明组蛋白乙酰化水平不断增高,与 Enright 等^[9]的试验结果一致。

随 TSA 处理时间的延长,细胞融合率逐渐降低,原因是 TSA 抑制了广泛存在于细胞胞质中的 HDAC6,使非组蛋白的乙酰化水平升高。HDAC6 的抑制将会导致微管蛋白的乙酰化升高,进一步导致细胞膜流动性下降^[14-15],进而影响细胞融合。经 TSA 处理供体细胞 12 h 克隆胚的囊胚发育率显著高于对照组,说明了组蛋白乙酰化所引起的染色质重塑有助于克隆胚的重编程。其原理是供体细胞核疏松的染色质有利于重编程因子的进入,染色质组蛋白高乙酰化的疏松状态类似于雄原核进入卵母细胞内,鱼精蛋白被卵内源性组蛋白置换过程所形成的疏松状态;经 TSA 处理 24 h 的胎牛成纤维细胞的死亡率很高,研究发现 TSA 通过以下途径使细胞

死亡:HDAC 可通过改变 p21、p53 等基因的乙酰化程度来改变基因的表达^[16]。研究发现核损伤是导致核移植效率的下降的一个主要原因^[17]。供体细胞经 TSA 处理的克隆囊胚乙酰化水平与对照组差异不显著,原因是供体细胞的乙酰化水平无论高低在核移植后的一段时间内都会被擦除,重新建立新的乙酰化模式。本研究证实了供体细胞的乙酰化水平在核移植后的 6 h 内被完全擦除(数据未发表)。

本研究所用 TSA 处理浓度与 Kishigami 等^[8]的试验浓度有别,与核质重组胚种属间的后成性修饰的动力学变化状态的复杂多样性有关^[18-19],小鼠卵母细胞受精后的最初几个卵裂时期,母源 DNA 胞嘧啶甲基化全部去除,胚泡期基因组重新发生甲基化;而绵羊、猪、奶牛则在受精后只发生了有限的去甲基化,而且在胚泡期并没有发现胚胎基因组范围内的重新甲基化,而 Dean 等观察到牛正常受精获得的胚胎基因组新生甲基化开始于 8~16 细胞期^[19]。TSA 处理的克隆胚与对照组的基因表达差异有待进一步研究。

参考文献:

- [1] LI E, BESTOR TH, JAENISCH R, et al. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality[J]. *Cell*, 1992,69: 915-918.
- [2] WILMUT I, BEAUJIEAN N, DESOUSA PA, et al. Somatic cell nuclear transfer[J]. *Nature*, 2002, 419: 583-586.
- [3] DNEA W, SANTOS F, STOJKOVIC M, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development; aberrant reprogramming in cloned embryos[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001,98: 13734-13738.
- [4] BOIANI M, GENTILE L, GAMBLES V, et al. Variable reprogramming of the pluripotent stem cell marker Oct4 in mouse clones; distinct developmental potentials in different culture environments[J]. *Stem Cells*, 2005,23(8):1089-1104.
- [5] ALLFREY V G, FAULKNER R, MIRSKY A E. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1964,51:786-794.
- [6] CIARKE DJ, NEILL L P, TURNER B M. Selective use of H4 acetylation sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochem J*, 1993,294: 557-561.
- [7] NSEN J C, TSE C, WOLFFE A P. Structure and function of the core histone N-termini; more than meets the eye[J]. *Biochemistry*, 1998, 37: 17637-17641.
- [8] KISHIGAMI S, MIZUTANI E, WAKAYAMA T, et al. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 340(1): 183-189.
- [9] ENRIGHT B P, KUBOTA C, YANG X, et al. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by Trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine reproductive [J]. *Biol Reprod*, 2003,69: 896-901.
- [10] BEAUJIEAN N, HARTSAHOME G, CVILLA J, et al. Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics [J]. *Curr Biol*, 2004, 14: R266-267.
- [11] BAEUJEANL N, TAYLOR J, GARDNER J, et al. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer[J]. *Biol Reprod*, 2004,71: 185-193.
- [12] NAKAJIMA H, KIM Y B, TERANO H, et al. a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor [J]. *Exp Cell Res*, 1998,241: 126-133.
- [13] AKIYAMA T, NAGATA M, AOKI F. Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice [J]. *PNAS*, 2006,103(19):7339-7344.
- [14] HUBBERT A, GUARDIOLA A, SHAO R, et al. HDAC6 is a microtubule-associated Deacetylase [J]. *Nature*, 2002, 417: 455-458.
- [15] PALALAZZO A, ACKERMAN B, GUNDERSEN G. Tubulin acetylation and cell motility [J]. *Nature*, 2003,421:230.
- [16] GLOZAK M A, SENGUPT N, ZHANG X, et al. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins [J]. *Gene*, 2005, 363(1): 15-23.
- [17] CHO S R, OCKS A, YOO J G, et al. Effects of confluent roscovitine treatment and serum starvation on the cell-cycle synchronization of bovine foetal fibroblasts [J]. *Reprod Dom Anim*, 2005,40(2): 171-176.
- [18] YOUNG L E, BEAUJEAN N. DNA methylation in the preimplantation embryos; the deferring stories of the mouse and sheep [J]. *Animal Reproduction Science*, 2004, 82-83: 61-78.
- [19] DEAN W, SANTOS F, STOJKOVIC M, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development; aberrant reprogramming in cloned embryos [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 13734-13738.