

干细胞心肌分化的表观遗传学机制

朱洪, 刘义, 张震

(湖南大学生物学院生物医学工程系, 长沙 410082)

[摘要] 表观遗传学是一门新兴的遗传学分支, 研究细胞核内 DNA 序列没有改变的情况下, 基因功能的可逆的、可遗传的改变。表观遗传学调控机制涉及 DNA 甲基化、组蛋白翻译后修饰、染色质重塑和微小 RNA 调控等领域。有研究表明干细胞心肌分化过程中伴随着表观遗传学的改变, 促进干细胞表观遗传修饰发生改变的药物可以诱导干细胞心肌分化, 表观遗传学机制已成为目前研究干细胞心肌分化机制的热点, 为干细胞在发育生物学、遗传学和再生医学等领域的应用提供了新的理论依据和手段。

[关键词] 干细胞; 心肌分化; 表观遗传学

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.12.016

Epigenetic mechanism of cardiac differentiation of stem cells

ZHU Hong, LIU Yi, ZHANG Zhen

(Department of Biomedical Engineering, School of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: Epigenetics is a new branch of genetics which studies reversible and heritable changes of gene function that do not involve alterations in DNA sequence of nucleus. The epigenetic mechanism includes DNA methylation, post-translational histone modification, chromatin remodeling, microRNA regulation and so on. Some investigations have shown that epigenetic phenomena changes occur in the cardiac differentiation of stem cells. Drugs causing epigenetic modifications have been shown to induce the cardiac differentiation of stem cells. Epigenetics becomes a hot subject of research on the cardiac differentiation mechanism of stem cells providing new theories and methods for stem cell application in developmental biology, genetics and regenerative medicine.

Key words: stem cell; cardiac differentiation; epigenetics

干细胞是一类具有无限的或者永生的自我更新能力的细胞, 能够产生至少一种类型的、高度分化的子代细胞。干细胞按照发生来源分为胚胎干细胞和

成体干细胞。心肌梗死是冠状动脉粥样硬化时血管腔阻塞导致心肌缺血缺氧而引起的心肌缺血性坏死, 是当前严重危害人类健康的主要疾患之一, 即使

收稿日期 (Date of reception) 2011-03-31

作者简介 (Biography) 朱洪, 博士, 副教授, 主要从事干细胞分化机制的研究。

通信作者 (Corresponding author) 朱洪, E-mail: zhuh6477@126.com

基金项目 (Foundation item) 湖南省自然科学基金(10JJ2015)。 This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province, P. R. China(10JJ2015).

在医学高度发达的美国,每年 110 万新发生的心肌梗死当中,至少有一半人在还没送到医院或发病后 1 h 内就已经死亡,存活的患者近 2/3 不能完全康复,其中有近一半的病人会在 6 年内发生心力衰竭,年病死率可达 20%,5 年存活率不到 50%,比癌症的病死率要高出很多。干细胞移植修复心肌梗死后损伤心肌(即心肌再生)是目前医学界重点研究课题,体外诱导干细胞心肌分化是心肌再生的重要步骤。大量研究显示干细胞心肌分化过程与表观遗传学现象密切相关,主要包括 DNA 甲基化状况、组蛋白翻译后修饰、染色质重塑和微小 RNA 调控。

1 表观遗传学概述

表观遗传学是在研究与经典孟德尔遗传学法则不相符的许多生命现象过程中逐步发展起来的。早在 1939 年,生物学家 Waddington^[1]首先在《现代遗传学导论》中提出了表观遗传学(epigenetics)这一术语,并于 1942 年定义表观遗传学为“生物学的分支,研究基因与决定表型的基因产物之间的因果关系”^[2]。1957 年,Waddington^[3]将多细胞生物体在发育过程中细胞与细胞之间的表型差异描述成“表观遗传学全貌”。1994 年 Holliday^[4]从不同的角度给出表观遗传学的两种定义:一是研究在已分化的成体细胞中,基因表达改变模式的有丝分裂遗传;二是不基于 DNA 序列变化的核遗传。1999 年 Wolffe 等^[5]通过系列研究总结提出“表观遗传学是研究没有 DNA 序列变化的、可遗传的表达改变”,这是最为简明也是目前被其他学者应用得最多的定义。DNA 双螺旋结构的破译是生命科学领域的重要里程碑,几十年来人们一直认为基因序列决定着生命过程中所需要的各种蛋白质,决定着生物体的表型。但随着研究的不断深入,科研人员也发现一些并不符合经典遗传学理论预期的情况:从干细胞到完全分化的内、中、外三胚层衍生物细胞,它们的 DNA 序列一致,但它们的基因表达和功能却相差甚远;同卵双生的两人具有完全相同的基因组,在同样的环境中长大后,他们在性格、健康等方面会有较大的差异。这说明在相应的 DNA 序列没有发生变化的情况下,一些生物体的表型却发生了改变。这些非 DNA 变化但可遗传的现象与生物体的发育、衰老和癌症等紧密相关,备受关注。当代遗传学中的前沿领域表观遗传学,为人们解答这些问题提供了理论依据。

2 干细胞心肌分化与 DNA 甲基化

DNA 甲基化是研究得较透彻,并且是最重要的表观遗传调节形式之一,主要是指在 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferase, Dnmt)的作用下,基因组 DNA 上的胞嘧啶第 5 位碳原子和甲基间的共价结合,由此形成 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)。在结构基因的 5'端调控区域,CpG(C 为胞嘧啶核苷酸;p 为磷酸酯键;G 为鸟嘌呤核苷酸)二核苷酸常常以成簇串联形式排列,这种富含 CpG 二核苷酸的区域称为 CpG 岛。在脊椎动物中 CpG 二核苷酸是 DNA 甲基化发生的主要位点。基因启动子区域所含 CpG 岛中的 5mC 会阻碍转录因子复合体与 DNA 的结合或募集某些转录抑制因子与 DNA 结合。基因启动子区域 DNA 甲基化一般与基因沉默或抑制相关联,而去甲基化往往与一个沉默基因的重新激活有关。

DNA 甲基转移酶 1(DNA methyltransferase 1, Dnmt1)维持 DNA 甲基化,参与转录控制和染色质的重塑,Dnmt1 在小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)心肌分化过程中起至关重要的作用。Jackson 等^[6]发现 Dnmt1 缺失小鼠 ESC 在分化过程中发生凋亡,最终不能分化形成心肌细胞。在干细胞心肌分化的过程中,多能性特征因子被抑制,心肌分化相关因子被激活,人为地改变 DNA 甲基化状况可以激活某些心肌分化相关因子的表达,促进干细胞心肌分化。胞嘧啶类似物 5-氮胞苷(5-azacytidine, 5-aza)是一种去甲基化药物,它能改变某些基因的表达并调节细胞分化。Xu 等^[7]的实验研究证实,5-aza 可以诱导人源胚胎干细胞分化成心肌细胞,明显地提高人源胚胎干细胞心肌特异性基因 α -心肌肌球蛋白重链(cardiac myosin heavy chain α , α -MHC)的表达水平。Choi 等^[8]报道 5-aza 可以诱导单层融合培养的胚胎癌细胞 P19 细胞心肌分化,激活心肌特异性转录因子 NK2 同源异型框基因 5(NK2 homeobox 5, Nkx2.5)、GATA(G 为鸟嘌呤核苷酸;A 为腺嘌呤核苷酸;T 为胸腺嘧啶核苷酸)结合蛋白 4(GATA binding protein 4, GATA-4)、心肌特异性蛋白基因 β -MHC 及心肌特异性肌钙蛋白 T(Troponin T)的表达,并且上调心肌分化相关骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)信号分子 BMP2 和 BMP4 的表达水平。

3 干细胞心肌分化与组蛋白翻译后修饰

组蛋白翻译后修饰是以基因组为模板的各种生命进程调节的核心机制,参与染色质相关的许多重要的生物学过程,如 DNA 复制、修复、转录和基因组的稳定性等。组蛋白与缠绕的 DNA 组成核小体,组蛋白的 N 端是不稳定的、无一定组织的亚单位,它延伸至核小体以外,会受到不同的化学修饰,这些修饰可以影响组蛋白与 DNA 的亲合性而改变染色质的状态,也可以影响转录因子与 DNA 序列的结合,这些修饰往往与基因的表达调控密切相关。组蛋白翻译后修饰包括甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化和苏素化。组蛋白翻译后修饰是通过与染色质相关的酶来完成的。乙酰化修饰酶也称为组蛋白乙酰化酶 (histone acetylase, HAT),催化组蛋白特定赖氨酸残基的乙酰化,其逆向修饰酶为组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC)。组蛋白乙酰化酶包括 3 大家族,即 GNAT, MYST 和 CBP/p300 家族,特定残基的乙酰化是转录激活所必需的。去乙酰化酶有 4 类,即 I 类、II 类、III 类和 IV 类,归类如下:I 类为 Ia (HDAC1, 2), Ib (HDAC3), Ic (HDAC 8); II 类为 IIa (HDAC4, 5, 7, 9), IIb (HDAC6, 10); III 类为 surtinin; IV 类为 HDAC11。去乙酰化酶的作用为抑制基因转录。甲基化修饰酶主要有组蛋白精氨酸甲基转移酶 (protein arginine methyltransferase, PRMT) 和组蛋白赖氨酸甲基转移酶 (histone lysine methyltransferase, HKMT),精氨酸可被单 (me1)、双 (me2) 甲基化,赖氨酸可被单 (me1)、双 (me2) 和三 (me3) 甲基化,甲基化位点中研究比较清楚的有 H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 和 H4K20, 其中 H3K4, H3K36 和 H3K79 的甲基化与转录激活相关,其余的与抑制相关。

干细胞心肌分化过程中被研究较多的是组蛋白乙酰化,至今发现组蛋白乙酰化是干细胞心肌分化的主要表观遗传学机制之一,其中以组蛋白 H3 和 H4 的乙酰化机制最为明确,另一方面抑制组蛋白去乙酰化酶 HDAC 也可以诱导干细胞心肌分化。Liu 等^[9]发现:利用二甲亚砷诱导 P19CL6 细胞心肌分化的过程中,心前体细胞标志物 Nkx2.5 的表达上调,其启动子区域甲基化修饰没有明显变化,但组蛋白 H3 和 H4 的乙酰化水平增高,同时 HDAC1 的表达水

平显著降低,运用共转染 β -链蛋白 (β -catenin) 和淋巴样增强因子-1 (lymphoid enhancer-binding factor 1, Lef1) 表达质粒的实验方法抑制 HDAC1 的表达可诱导 P19CL6 心肌分化。Illi 等^[10]证实:运用急剧压可诱导小鼠 ESC 心肌分化,激活心肌标志物 MEF2C (myocyte-specific enhancer factor 2C) 和 α -横纹肌肌动蛋白 (α -sarcomeric actin, α -SMA) 的表达,并检测到组蛋白翻译后修饰,修饰位点为 H3K14Ac 和 H3K79Me1,与 HDAC 抑制剂曲古柳菌素 A (trichostatin A, TSA) 合用可促进 H4 的乙酰化。另有研究者发现 24 h TSA 处理可以增强猴 ESC 心肌分化效率,激活组蛋白乙酰化酶 p300 的表达,促进 H3/H4 乙酰化^[11]。Kawamura 等^[12]证实:p300 在 ESC 心肌分化过程中通过组蛋白 H3 和 H4 的乙酰化调控心肌分化相关基因的转录。Feng 等^[13]的实验证实:HDAC 抑制剂伏立诺他可以诱导大鼠骨髓间充质干细胞心肌分化,表达心肌特异性转录因子 GATA-4, Nkx2.5, MEF2C 和 Troponin T,且分化细胞数与伏立诺他剂量呈正相关。有研究者发现 TSA 可以诱导小鼠诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPS) 心肌分化,激活 Nkx2.5 的表达^[14],而在 TSA 处理后的人源 iPS 中可检测到 Nkx2.5, GATA-4, MHC, α -心肌肌动蛋白 (α -actin)、肌钙蛋白 I 和缝隙连接蛋白 43 等心肌标志物的表达^[15]。Karamboulas 等^[16]发现:用 TSA 处理 P19 细胞类胚体可以诱导 P19 细胞发生心肌分化,用免疫荧光染色和 RT-PCR 的实验方法可以检测到心肌标志物 Nkx2.5, MEF2C, GATA-4 和心肌 α -actin 的表达,同时运用稳定表达 HDAC4 的 P19 细胞株发现 HDAC4 可以抑制 P19 细胞心肌分化过程。

4 干细胞心肌分化与染色质重塑

染色质重塑是表观遗传的重要内容之一,它是指染色质位置和结构的变化,是在能量驱动下真核细胞核小体在 DNA 上重新定位或排列的过程,它改变了核小体在基因启动子区的排列,增加了基因转录装置和启动子的可接近性。染色体重塑主要有 2 种类型,一是依赖 ATP 的物理修饰,通过 ATP 水解所释放的能量改变核小体和组蛋白构型;二是通过对核心组蛋白 N 端尾部进行共价性化学修饰,包括组蛋白末端乙酰化、磷酸化、甲基化和泛素化等,直接影响核小体的结构,并为其他蛋白提供 DNA 结合位点。依赖 ATP 的染色质重塑常通过激活活性染色质

修饰酶来实现,这些染色质修饰酶分为两大类:SNF2H(sucrose nonfermenting protein 2 homolog)/ISWI(imitation switch)家族和婆罗门(Brahma)/SWI(SWIch)/SNF(sucrose nonfermenting protein)家族。

染色质修饰和重塑在干细胞心肌分化过程中起举足轻重的作用。Gao等^[17]研究者曾报道Brahma/SWI/SNF染色质重塑复合物成分之一Brahma-related gene 1(BRG-1)-associated factor 250a(BAF250a)缺失的ESC不能分化成具有功能的心肌细胞,显示Brahma/SWI/SNF染色质重塑复合物在干细胞心肌分化过程中的重要作用。另有研究发现:p300通过组蛋白H3和H4的乙酰化调控ESC心肌分化过程^[12]。

5 干细胞心肌分化与微小RNA

微小RNA(microRNA, miRNA)是非编码RNA的一种,作为内源性的非编码的miRNA,是一类广泛地存在于动植物和人类细胞中对基因表达进行负调控的分子,人类基因组编码约1 000个miRNA,已鉴定的miRNA有600余个。miRNA是21~25核苷酸长的单链小分子RNA,由具有发夹结构的约70~90个碱基大小的单链RNA前体经过Dicer酶加工后生成,它阻遏靶基因的翻译,也可以导致mRNA降解,即在转录水平和翻译水平起作用,miRNA在机体发育过程中起重要作用,它调节内源基因表达,作用于靶基因mRNA的3'非翻译区,具有组织特异性,miRNA的调控是机体自身正常的调节机制。

miRNA在干细胞心肌分化过程中起关键调控作用,在众多的调节miRNA中,以miR-1和miR-133的作用比较突出,作用机制也较清楚,另外还有其它的miRNA参与干细胞心肌分化过程。Ivey等^[18]发现肌肉特异性微小RNA miR-1和miR-133调节作用的实现依赖于血清反应因子(serum response factor, SRF),用病毒作为载体在小鼠和人源ESC中高表达miR-1可以促进ESC心肌分化,而且发现miR-1可以替代SRF促进SRF无效ESC形成中胚层细胞,miR-133促进小鼠和人源ESC向中胚层细胞分化,但阻止中胚层细胞进一步分化成心肌细胞。Takaya等^[19]证实了miR-1和miR-133在小鼠ESC心肌分化过程中的重要作用,在2维培养的自发分化体系中,miR-1和miR-133表达上调,而在TSA诱导分化的体系中,两者均表达下调。Li等^[20]报道miR-1和miR-133抑制非肌肉基因的表达,诱导ESC向中胚层和

心肌细胞分化。Wilson等^[21]研究发现:miR-1,miR-133,miR-208和miR-499在人源H7胚胎干细胞分化成心肌细胞的过程中表达上调,且将稳定表达miR-1或miR-499的H7细胞株制成胚胎小体进行培养,即可分化成心肌细胞,表达心肌特异性基因 α -MHC和 β -MHC。单志新等^[22]在用5-aza诱导人源间充质干细胞向心肌细胞分化的过程中,发现miR-143和miR-181的表达被激活,运用人源间充质干细胞与大鼠心肌细胞非接触共培养的心肌分化诱导方法可激活miR-143,miR-181,miR-206和miR-208的表达。

6 展 望

干细胞心肌分化机制涉及表观遗传学的诸多领域,随着表观遗传学日新月异地发展,新的理论突破和技术手段将不断出现。尽管大量研究已表明DNA甲基化状况、组蛋白翻译后修饰、染色质重塑和miRNA在干细胞心肌分化过程中起至关重要的作用,它们对于心肌细胞的发育与功能的正常发挥都是必要的,但还有很多问题有待深入研究,如组蛋白甲基化在干细胞心肌分化过程中是否扮演重要角色及如何发挥作用;染色质重塑修饰酶SNF2H/ISWI家族对于干细胞心肌分化过程有无影响;除了HDAC1和HDAC4,与干细胞心肌分化有关的HDAC还有哪些等都是值得探讨的方向。干细胞心肌分化过程表观遗传学调控机制的研究,无疑是当今医学和生命科学的重点研究方向,有利于寻找人类心脏疾患具有潜力的预测、诊断指标和治疗靶标。对干细胞心肌分化过程表观遗传学调控机制的深入研究,将提高对人和动物发育过程中心肌发育机制的认识,并提高对干细胞实行心肌定向诱导分化的能力,为干细胞在发育生物学、遗传学和再生医学等领域的应用提供完善坚实的理论基础。

参考文献:

- [1] Waddington C H. An introduction to modern genetics [M]. New York: Macmillan, 1939:154-156.
- [2] Waddington C H. The epigenotype [J]. Endeavour, 1942, 1(1):18-20.
- [3] Waddington C H. The strategy of the genes [M]. London: George Allen & Unwin, 1957:151.
- [4] Holliday R. Epigenetics: an overview [J]. Dev Genet, 1994, 15(6): 453-457.
- [5] Wolffe A P, Matzke M A. Epigenetics: regulation through re-

- pression[J]. *Science*, 1999, 286(5439): 481-486.
- [6] Jackson M, Krassowska A, Gilbert N, et al. Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(20): 8862-8871.
- [7] Xu C, Police S, Rao N, et al. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells[J]. *Circ Res*, 2002, 91(6): 501-508.
- [8] Choi S, Yoon J, Shim W, et al. 5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells[J]. *Exp Mol Med*, 2004, 36(6): 515-523.
- [9] Liu Z, Li T, Liu Y, et al. WNT signaling promotes Nkx2.5 expression and early cardiomyogenesis via downregulation of Hdac1[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(2): 300-311.
- [10] Illi B, Scopece A, Nanni S, et al. Epigenetic histone modification and cardiovascular lineage programming in mouse embryonic stem cells exposed to laminar shear stress[J]. *Circ Res*, 2005, 96(5): 501-508.
- [11] Hosseinkhani M, Hasegawa K, Ono K, et al. Trichostatin A induces myocardial differentiation of monkey ES cells[J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2007, 356(2): 386-391.
- [12] Kawamura T, Ono K, Morimoto T, et al. Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(20): 19682-19688.
- [13] 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(17): 3044-3051.
- [14] Kaichi S, Hasegawa K, Takaya T, et al. Cell line-dependent differentiation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes in mice[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 88(2): 314-323.
- [15] Choi Y S, Dusting G J, Stubbs S, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes[J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(4): 878-879.
- [16] Karamboulas C, Swedani A, Ward C, et al. HDAC activity regulates entry of mesoderm cells into the cardiac muscle lineage[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(20): 4305-4314.
- [17] Gao X, Tate P, Hu P, et al. ES cell pluripotency and germ-layer formation require the SWI/SNF chromatin remodeling component BAF250a[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(18): 6656-6661.
- [18] Ivey K N, Muth A, Arnold J, et al. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(3): 219-229.
- [19] Takaya T, Ono K, Kawamura T, et al. MicroRNA-1 and microRNA-133 in spontaneous myocardial differentiation of mouse embryonic stem cells[J]. *Circ J*, 2009, 73(8): 1492-1497.
- [20] Li Q, Gregory R I. MicroRNA regulation of stem cell fate[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(3): 195-196.
- [21] Wilson K D, Hu S, Venkatasubrahmanyam S, et al. Dynamic microRNA expression programs during cardiac differentiation of human embryonic stem cells: role for miR-499[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010, 3(5): 426-435.
- [22] 单志新, 林秋雄, 余细勇, 等. 微小 RNA 可在人骨髓间充质干细胞分化来源的心肌样细胞中表达[J]. *南方医科大学学报*, 2007, 27(12): 1813-1816.
- SHAN Zhixin, LIN Qiuxiong, YU Xiyong, et al. MicroRNAs can be expressed in cardiomyocyte-like cells differentiated from human mesenchymal stem cells[J]. *Journal of Southern Medical University*, 2007, 27(12): 1813-1816.

(本文编辑 傅希文)