

文章编号:1000-5404(2012)07-0585-04

论著

转录辅助因子 PC4 参与大鼠骨髓间充质干细胞体外衰老过程的调控

彭毅,王涛,粟永萍,程天民,史春梦 (400038 重庆,第三军医大学预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆市纳米医药工程技术研究中心)

[摘要] **目的** 研究转录辅助因子 PC4(transcriptional positive coactivator 4)在骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)体外传代衰老过程中的表达变化特点,初步探讨其在 MSCs 增殖和衰老中的可能作用。**方法** 通过 CCK-8 法检测并绘制 MSCs 生长曲线,流式细胞术检测 MSCs 免疫表型,通过 RT-PCR 和 Western blot 检测 PC4 在 MSCs 长期体外培养中的表达特点,并检测细胞衰老标志物 β -半乳糖苷酶活性的变化,进一步通过 RNA 干扰抑制 PC4 表达,检测其对 MSCs 增殖和衰老的影响。**结果** 本实验分离培养的 MSCs 早期具有成体干细胞特性,长期体外连续传代后出现细胞衰老, β -半乳糖苷酶染色呈阳性,PC4 在衰老细胞中的表达明显降低,RNA 干扰抑制 PC4 表达后,MSCs 增殖受到抑制, β -半乳糖苷酶染色阳性率增加[转染后 48 h 阴性对照组(8.8 ± 2.5)%,空白对照组(5.7 ± 1.8)%,siRNA 组(56.3 ± 4.9)%, $P < 0.05$]。**结论** 转录辅助因子 PC4 可能参与了体外连续传代培养过程中 MSCs 增殖活性降低和衰老过程的调控。

[关键词] 转录辅助因子 PC4;间充质干细胞;细胞衰老;RNA 干扰

[中图分类号] R329-33;R329.28;R394.2

[文献标志码] A

Transcriptional positive coactivator 4 is involved in senescence of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells

Peng Yi, Wang Tao, Su Yongping, Cheng Tianmin, Shi Chunmeng (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Chongqing Engineering Research Center for Nanomedicine, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the potential role of transcriptional positive coactivator 4 (PC4) in the senescence of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods** The expression of PC4 in MSCs was detected by RT-PCR and Western blotting. After the downregulation of PC4 expression by sequence specific siRNA, the proliferation of MSCs was assayed by CCK-8 and the senescence of MSCs was characterized by beta-galactosidase staining. **Results** After long-term *in vitro* culture, MSCs underwent replicative senescence and the expression of PC4 was significantly decreased. Downregulation of PC4 expression by RNA interference significantly inhibited the proliferation of MSCs and resulted in cellular senescence. **Conclusion** Transcriptional positive coactivator 4 may play a modulatory role in the proliferation and senescence of rat bone marrow-derived MSCs.

[Key words] transcriptional positive coactivator 4; mesenchymal stem cells; cellular senescence; RNA interference

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2012CB518103). Corresponding author: Shi Chunmeng, Tel: 86-23-68752280, E-mail: shicm1010@yahoo.com.cn

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是广泛存在于骨髓基质、脂肪组织、皮肤真皮等间质组织中的一类成体干细胞,具有高度的自我更新能力和多向分化潜能,在组织工程、创伤修复、基因治疗等领域展现广阔的应用前景^[1]。细胞衰老(cellular senescence)是 MSCs 体外培养过程中常见的问题之一,对

MSCs 衰老等生物学过程的分子机制深入研究能够为有效地开展 MSCs 临床治疗应用提供重要的理论基础^[2]。转录辅助因子 PC4 (Transcriptional positive coactivator 4)是一个 15 kDa 的多功能核蛋白,在基因表达转录、复制、DNA 修复、异染色质化等过程中发挥调控作用^[3],但对其生物学功能还有待进一步研究。我们前期发现,PC4 在恶性转化后的大鼠真皮干细胞中表达升高,可能是参与干细胞体外恶性转化过程的

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划,2012CB518103)

[通信作者] 史春梦,电话:(023)68752280, E-mail: shicm1010@yahoo.com.cn

重要标志^[4]。本研究以原代培养的大鼠骨髓来源 MSCs 为基础,进一步研究 PC4 在大鼠骨髓间充质干细胞体外传代后细胞衰老过程中可能的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

4周龄 SPF 级 SD 大鼠 3只,雌雄不拘,体质量(70±10)g,由第三军医大学实验动物中心提供。DMEM/F12 培养基,胎牛血清(FBS),SA-β-Gal Staining Kit(Cell Signaling, USA),ReverTra Dash™ RT-PCR Kit(Toyobo, Japan),T-PER 蛋白裂解液(Pierce, USA),Lipofectamine2000(Invitrogen, USA),Cell Counting Kit-8(Dojindo, Japan),PC4 抗体,β-actin 抗体(Santa Cruz, USA),CD14、CD34、CD45、CD73、CD90、CD105 抗体(BD, USA),siRNA 序列由上海吉玛公司合成。

1.2 细胞培养与传代

采用本室前期建立的 MSCs 体外培养的方法从大鼠胫骨骨髓中分离培养 MSCs 并鉴定^[5]。在此基础上本研究对分离培养的 MSCs 的增殖活性和表面标志进行了检测。从原代培养的 MSCs 开始,细胞长满约 80% 进行传代,用 0.25% 胰蛋白酶消化,种植密度为 1.0×10⁵/ml,记为 MSCs 第 1 代,维持培养条件不变,连续往下传代。

1.3 细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色

按照 SA-β-Gal Staining Kit 操作方法染色 MSCs,在 37℃ 无 CO₂ 条件下孵育过夜,用普通倒置显微镜观察,随机计数 500 个细胞,计算阳性细胞的百分比,实验重复 3 次。

1.4 RT-PCR 检测 PC4 mRNA 的表达

MSCs 传代过程中选取典型代数第 5 代,第 15 代,第 25 代,用 Trizol 按照说明书步骤分别提取总 RNA,逆转录反应采用 ReverTra Dash™ RT-PCR Kit 按操作步骤进行。PC4 引物序列上游:5'-ACCAAGCTTTCTTCGAGCT CTCAGGCAGTG-3',下游:5'-ATGGGATCCATCA GCTTTCTTACTGCGTCATCT-3',产物长度为 340 bp;GAPDH 引物序列上游:5'-GCAAGTTCA ACGGCA-CAGTCA-3',下游:5'-TCACCCCATTTGATGT TAGCG-3',产物长度为 106 bp。PCR 反应条件为 94℃ 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,扩增 30 个循环;72℃ 5 min。反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳,用 Bio-Rad 凝胶成像系统采集图片,实验重复 3 次。

1.5 Western blot 检测 PC4 蛋白的表达

MSCs 代数选取同上,用 T-PER 按照说明书步骤分别提总蛋白,取等量标准化后的蛋白溶液加入等体积的 2×SDS 上样缓冲液,沸水煮 5 min 变性。取 20 μl 变性的蛋白溶液(50 μg),行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(5% 积层胶和 12% 分离胶)电泳,Bio-Rad 半干转印仪将蛋白转移至 PVDF 膜(Millipore, USA)。5% 脱脂奶粉 37℃ 封闭 1 h 后,加入一抗 PC4(1:500)及 β-actin(1:10 000),4℃ 过夜,复温洗膜 3 次,10 min/次。加入 HRP 标记二抗(1:1 500),37℃ 摇床内孵育 1 h 后,洗膜 3 次,20 min/次。用 ECL 发光试剂盒检测杂交信号,Bio-Rad 凝胶成像系统采集图片,实验重复 3 次。

1.6 RNA 干扰抑制 PC4 基因的表达

参考文献^[6]化学合成 PC4 特异性 siRNA 序列:正义链,

5'-ACAGAGCAGCAGCAGCAGATT-3',反义链,5'-UCUGCUGC-UGCUGCUCUGUTT-3';非特异性阴性对照 siRNA 序列:正义链,5'-UUCUCCGAACGU GUCACGUTT-3',反义链,5'-ACGUGA-CACGUU CGGAGAATT-3',另设未转染的 MSCs 为空白对照组。选取 MSCs 第 4 代传代至 6 孔板,1.0×10⁵/ml,2 ml/孔,待细胞长满约 50% 时采用 Lipofectamine2000 按照说明书操作步骤转染 siRNA,转染后 48 h 提取 MSCs 总蛋白通过 Western blot 检测 PC4 抑制效率。

1.7 CCK-8 试剂盒检测 MSCs 增殖变化

MSCs 增殖实验采用 Cell Counting Kit-8 按照说明书步骤进行。选取 MSCs 第 4 代消化收集后,配成 2.5×10⁴/ml 细胞悬液,接种 96 孔板,200 μl/孔,设 6 个复孔,放于 37℃,5% CO₂ 孵箱中培养 6 d,用 Bio-Rad 酶标仪每 24 h 测量 1 次吸光度值,绘制细胞生长曲线。siRNA 转染同上,对照设空白对照组和阴性对照组。转染 24 h 消化并收集细胞,接种 96 孔板,1.0×10⁴/孔,每组 6 个孔,置于 37℃,5% CO₂ 孵箱中培养 3 d,分别检测接种后 24、48、72 h 的吸光度值。

1.8 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 MSCs 的分离培养与鉴定

第 5 代 MSCs 的生长曲线,如图 1 所示,第 0~1 天是 MSCs 生长的滞留期,第 1~4 天是增殖活跃的对数生长期,第 4~6 天是发生接触抑制的平台期。流式细胞检测结果表明,第 5 代 MSCs 低表达 CD14、CD34、CD45,高表达 CD73、CD90、CD105,阳性率见表 1。上述结果表明第 5 代 MSCs 仍然具有成体干细胞的基本生物学特性。

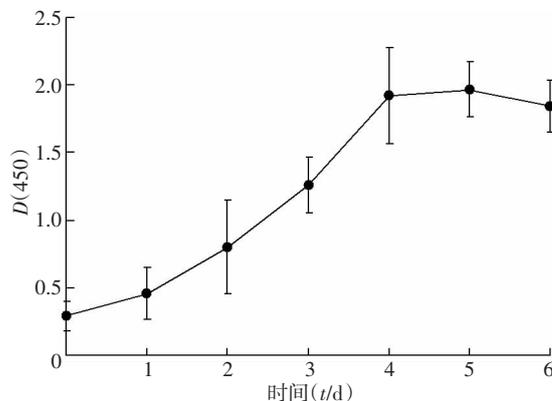


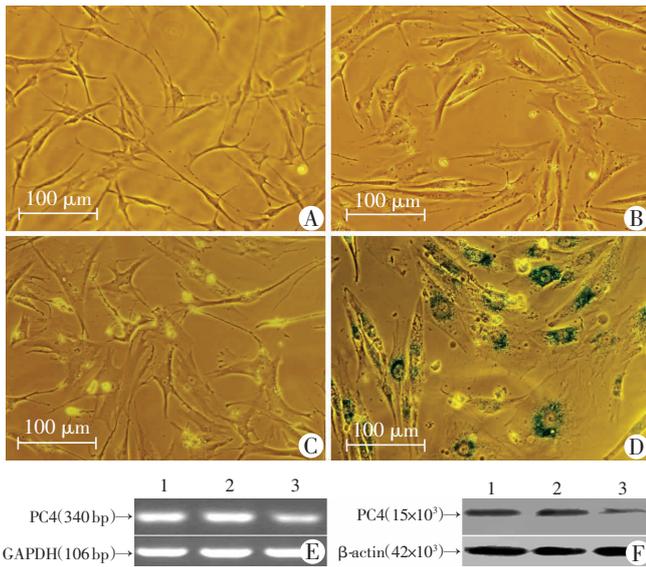
图 1 第 5 代 MSCs 生长曲线分析

表 1 流式细胞仪检测第 5 代 MSCs 免疫表型结果[n=3, ($\bar{x} \pm s$) %]

MSCs 表面标志	阳性率
CD14	0.73 ± 0.12
CD34	0.89 ± 0.08
CD45	1.83 ± 0.06
CD73	98.34 ± 0.96
CD90	96.98 ± 1.17
CD105	97.37 ± 1.25

2.2 PC4 表达与 MSCs 体外传代的关系

体外培养的 MSCs 早期主要为成纤维细胞样的梭形细胞(图 2A),长期连续传代后 MSCs 形态学有较大变化:至第 15 代细胞形状变大,逐渐不规则(图 2B),至第 25 代细胞松散肥大,出现部分悬浮细胞(图 2C),且 β -半乳糖苷酶染色呈阳性(图 2D),提示 MSCs 经体外长期连续传代后走向细胞衰老。检测发现 PC4 基因的表达强度与 MSCs 体外传代过程相关,与第 5 代和第 15 代 MSCs 相比较,第 25 代 MSCs PC4 在 mRNA 和蛋白水平的表达均显著降低(图 2E、F,表 2, $P < 0.01$),提示 PC4 基因可能参与了 MSCs 体外增殖和衰老的生物学过程。



A~D:普通倒置显微镜观察 MSCs 形态学变化;E:RT-PCR 检测结果;F:Western blot 检测结果 A:第 5 代 MSCs;B:第 15 代 MSCs;C:第 25 代 MSCs;D:第 25 代 MSCs β -半乳糖苷酶染色;1~3:分别为第 5 代 MSCs、第 15 代 MSCs、第 25 代 MSCs

图 2 MSCs 长期体外连续传代对 PC4 表达的影响

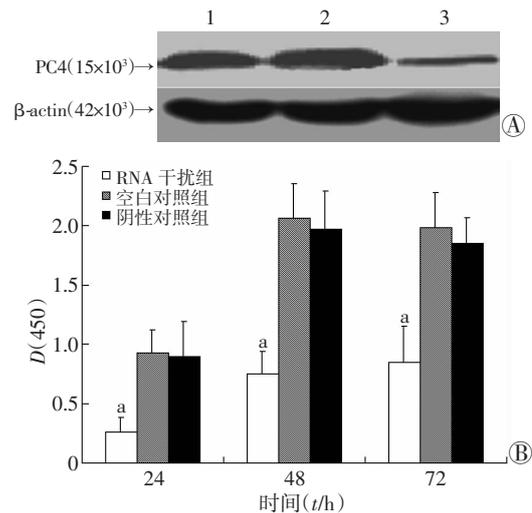
表 2 MSCs 典型代数 PC4 mRNA 和蛋白的相对表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

MSCs 代数	PC4 mRNA / GAPDH	PC4 蛋白 / β -actin
第 5 代	0.613 \pm 0.037	0.337 \pm 0.041
第 15 代	0.689 \pm 0.028	0.381 \pm 0.045
第 25 代	0.309 \pm 0.019 ^a	0.126 \pm 0.036 ^a

a: $P < 0.01$, 与 MSCs 第 5 代、第 15 代比较

2.3 RNA 干扰抑制 PC4 表达对 MSCs 增殖的影响

MSCs 经过体外长期连续传代,PC4 基因表达下调,说明 PC4 的表达水平可能与 MSCs 体外增殖有关,为进一步研究 PC4 表达在 MSCs 增殖中的作用,我们采用化学合成的 PC4 特异性 siRNA 序列瞬时转染第 5 代 MSCs,抑制该基因的表达,检测 MSCs 增殖速度的变化。Western blot 结果表明,PC4 特异性 siRNA 序列转染 MSCs 后 48 h,该基因的表达能够被有效地抑制(图 3A);增殖实验结果显示,RNA 干扰组接种 96 孔板 24 h、48 h 和 72 h 所测的 OD 值均显著低于空白对照组和阴性对照组(图 3B, $P < 0.01$),说明 RNA 干扰组 MSCs 的增殖受到抑制,提示 PC4 可能在 MSCs 增殖调控中发挥作用。



A:PC4 特异性 siRNA 转染 48 h Western blot 检测结果 1~3:分别为阴性对照组、空白对照组、RNA 干扰组;B:MSCs 增殖实验检测结果 a: $P < 0.01$, 与同时相点空白对照组和阴性对照组比较

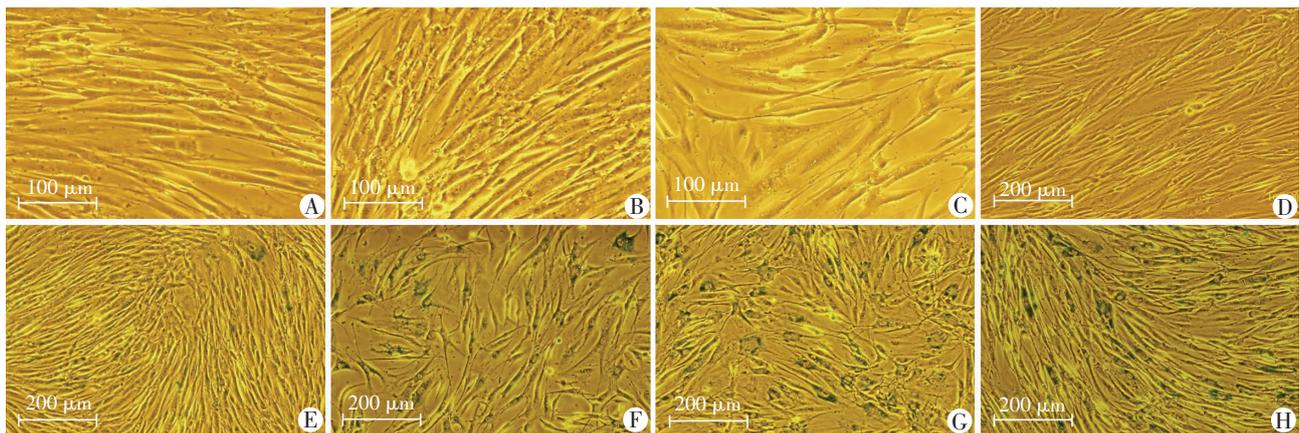
图 3 RNA 干扰抑制 PC4 表达对 MSCs 增殖的影响

2.4 下调 PC4 基因对 MSCs 衰老的影响

鉴于 MSCs 传代至第 25 代时出现明显的细胞衰老,且 PC4 基因在 mRNA 和蛋白水平的表达均显著降低,提示 PC4 的表达强度可能与 MSCs 衰老密切相关。我们进一步采用 RNA 干扰的方法下调 PC4 基因的表达,以观察其对 MSCs 衰老的影响。结果显示,空白对照组和阴性对照组 MSCs 细胞形态均一,生长状况良好,而 siRNA 组 MSCs 转染后 48 h 形态不规则,部分细胞出现衰老细胞的形态改变(图 4A、B、C)。 β -半乳糖苷酶染色显示,siRNA 组转染后 24 h 阳性率为 $(33.7 \pm 3.8)\%$,转染后 48 h 阳性率为 $(56.3 \pm 4.9)\%$,转染后 72 h 阳性率为 $(38.7 \pm 2.4)\%$,高于空白对照组 $[(5.7 \pm 1.8)\%]$ 和阴性对照组 $[(8.8 \pm 2.5)\%]$ (图 4D、E、F、G、H, $P < 0.05$),表明通过下调 PC4 基因的表达可诱导 MSCs 发生衰老,提示 PC4 可能在 MSCs 衰老的生物学过程中发挥调控作用。

3 讨论

2005 年, Vacanti 等^[7] 研究发现,体外培养的 MSCs 经历有限次分裂后停止生长,这些细胞体积增大,形态变得扁平, β -半乳糖苷酶活性增加等特征,将其定义为 MSCs 的衰老。MSCs 衰老是生物体抑制肿瘤的一种方式,同时也是机体老化和衰老相关疾病发生的潜在原因^[8-9]。目前,关于 MSCs 衰老的机制尚不明确,Ksiazek 等^[10] 认为 MSCs 衰老的机制可能与端粒缩短,p53-p21 信号途径和 p16-pRb 信号通路的激活,氧化应激等有关^[11]。机体内 MSCs 的数量是有限的,需要在体外大量扩增后才能得以应用。目前, MSCs 体外传代面临的主要问题有:多次传代导致细胞自动分化;细胞增殖达到极限走向衰老;长期连续传代自发恶性转化等,上述问题给 MSCs 有效扩增和安全应用提出了严峻考验^[12-13]。



A~C:普通倒置显微镜观察第5代MSCs转染PC4特异性siRNA后的形态学变化;D~H:第5代MSCs转染后 β -半乳糖苷酶染色结果 A:空白对照组48 h;B:阴性对照组转染后48 h;C:siRNA组转染后48 h;D:空白对照组48 h;E:阴性对照组转染后48 h;F:siRNA组转染后24 h;G:siRNA组转染后48 h;H:siRNA组转染后72 h

图4 PC4表达下调对MSCs衰老过程的影响

PC4属于转录共活化因子家族成员,最早由Ge和Roeder从人上游因子刺激活性相关USA碎片中纯化获得,是127个残基组成的单链DNA结合蛋白,介导II型转录辅助因子的活化^[14]。1996年,Pan等^[15]研究发现PC4能与HSSB形成复合体,促进SV40 T抗原催化的解链反应,在SV40 DNA复制过程中发挥抑制和激动的双重作用。近年来研究表明,PC4通过刺激同源或非同源的DNA末端连接,激活DNA双链断裂修复^[16]。我们前期的研究表明,PC4可能是一个干细胞恶性转化相关基因,在真皮干细胞体外长期传代自发恶性转化过程中起重要作用^[17]。本实验采用原代培养的大鼠骨髓来源MSCs,经长期体外连续传代后出现细胞衰老,在这个生物学过程中PC4表达降低,进一步采用RNA干扰的方法抑制PC4表达后,MSCs增殖明显受到抑制, β -半乳糖苷酶染色阳性率显著增加,提示PC4可能作为一个MSCs衰老相关基因,参与了MSCs增殖和衰老过程的调控。因此,进一步深入研究PC4对MSCs功能的调控作用与机制,有望为阐明MSCs体外扩增有效性和临床应用的安全性提供理论依据。

参考文献:

- [1] Schraufstatter I U, Discipio R G, Khaldoynidi S. Mesenchymal stem cells and their microenvironment[J]. *Front Biosci*, 2011, 17: 2271-2288.
- [2] Fehrer C, Lepperdinger G. Mesenchymal stem cell aging[J]. *Exp Gerontol*, 2005, 40(12): 926-930.
- [3] Conesa C, Acker J. SubI/PC4 a chromatin associated protein with multiple functions in transcription[J]. *RNA Biol*, 2010, 7(3): 287-290.
- [4] Shi C, Zhu Y, Zhou H E, et al. PC4, a novel marker for stem cell transformation and cancer progression[J]. *J Biotechnol*, 2008, 136(Suppl): S189.
- [5] 冯一梅, 徐辉, 邹仲敏, 等. hPDGF-A/hBD2双基因转染对大鼠骨

髓间充质干细胞生物学特性的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(6): 472-476.

- [6] Das C, Hizume K, Batta K, et al. Transcriptional coactivator PC4, a chromatin-associated protein, induces chromatin condensation[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(22): 8303-8315.
- [7] Vacanti V, Kong E, Suzuki G, et al. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture[J]. *J Cell Physiol*, 2005, 205(2): 194-201.
- [8] Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism[J]. *Trends Cell Biol*, 2001, 11(11): 27-31.
- [9] Stenderrup K, Justesen J, Clausen C, et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells[J]. *Bone*, 2003, 33(6): 919-926.
- [10] Ksiazek K. A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence[J]. *Rejuvenation Res*, 2009, 12(2): 105-116.
- [11] Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells[J]. *Ageing Res Rev*, 2006, 5(1): 91-116.
- [12] 黄炜, 吕安林, 刘博武, 等. 人骨髓间充质干细胞的衰老机制及其"永生"技术[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(14): 2619-2623.
- [13] 程天民, 史春梦, 粟永萍, 等. 成体干细胞在体外培养扩增中的自发恶性转化[J]. *中华医学杂志*, 2005, 85(27): 1883-1884.
- [14] Ge H, Roeder, R G. Purification, cloning, and characterization of a human coactivator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes[J]. *Cell*, 1994, 78(3): 513-523.
- [15] Pan Z Q, Ge H, Amin A A, et al. Transcription-positive cofactor 4 forms complexes with HSSB (RPA) on single-stranded DNA and influences HSSB-dependent enzymatic synthesis of simian virus 40 DNA[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(36): 22111-22116.
- [16] Batta K, Yokokawa M, Takeyasu K, et al. Human transcriptional coactivator PC4 stimulates DNA end joining and activates DSB repair activity[J]. *J Mol Biol*, 2009, 385(3): 788-799.
- [17] Shi C, Zhu Y, Chung L W, et al. PC4 is a novel oncogenic gene for mesenchymal stem cell transformation and mediates the reciprocal actions between mesenchymal stem cells and prostate cancer cells[J]. *Exp Hematol*, 2008, 36(Suppl 1): 82-83.

(收稿:2011-12-02;修回:2012-01-11)

(编辑 王红)