

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520121153206

UDC _____

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

**Brg1 在正常与疾病状态下眼表组织中的
表达与功能研究**

**The expression and function of Brg1 in ocular surface
tissues under normal and disease situation**

刘婷婷

指导教师姓名: 李炜教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2015年4月

论文答辩日期: 2015年5月

2015年4月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(李炜教授)课题(组)的研究成果,获得(李炜教授)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学眼科研究所)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 刘婷婷

2015 年 5 月 19 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：刘婷婷

2015年5月19日

摘 要

背景: Brahma 相关基因 1 (Brahma-related gene 1, Brg1) 是染色质重塑复合物 SWI/SNF 的 ATP 酶亚基之一, 广泛存在于真核细胞中。以往的研究表明, Brg1 结合复合物参与不同类型细胞的细胞周期控制、凋亡和细胞分化。到目前为止, 没有关于眼表上皮细胞 Brg1 表达以及功能的报道。

方法: 对小鼠、兔以及人眼表组织的 Brg1 表达和定位进行免疫荧光染色和蛋白质印迹检测。人角膜上皮细胞株 (HCE), 小鼠角膜上皮细胞系 (TKE2), 小鼠原代培养的角膜上皮细胞 (mCEC) 分别在 DMEM/F12 + 10%FBS, KSM, 和 CNT-20 培养基中培养。兔角膜缘上皮细胞进行克隆培养。采用 0.9mM Ca²⁺, 10%FBS 或 Brg1 siRNA 处理 TKE2, 探讨 Brg1 在角膜上皮细胞分化中的作用。另外, 对翼状胬肉组织的 Brg1 表达进行免疫荧光染色及 PCR 检测。

结果: 在小鼠出生后第 0-7 天, 角膜上皮未见 Brg1 表达, 第 2 周开始在角膜上皮基底层有少量细胞表达, 第 3 周见阳性细胞扩展至基底上层, 至第 4 周中央角膜上皮呈全层表达。角膜缘处均无表达。Brg1 在人角膜缘上皮细胞基底层无表达, 而在角膜缘上层、外周和中央角膜上皮细胞全层表达。在兔角膜缘和角膜组织中, Brg1 呈现类似的表达模式。免疫荧光染色显示, TKE2 细胞系、HCE 细胞系和 mCEC 细胞核中均有 Brg1 表达, 但在核中的表达分布不同。兔角膜缘上皮细胞克隆未见 Brg1 表达, 而在原代培养的兔角膜缘上皮细胞和兔中央角膜上皮细胞中, Brg1 均呈核表达。TKE2 在 0.9mM Ca²⁺或 10%FBS 诱导分化后, 细胞中 Brg1 表达水平没有明显改变, 但在细胞核中的分布方式发生变化。TKE2 细胞转染 Brg1 siRNA 后, 经过实时荧光定量 PCR 检测发现, Brg1 表达水平下降, 而 p63、K14 等干细胞特异性蛋白表达水平增高, 同时与上皮细胞分化相关的转录因子 Klf4 表达水平降低。人及兔正常结膜组织只在上皮表层有少量 Brg1 表达, 但翼状胬肉上皮层全层细胞高表达 Brg1。

结论: Brg1 可能与角膜上皮细胞的成熟和分化有关; 也可能参与翼状胬肉的发生发展过程。

关键词: Brg1; 角膜; 结膜; 上皮细胞; 翼状胬肉

Abstract

Background: Brahma-related gene 1 (Brg1) is the catalytic ATPase subunit of SWI/SNF which is one of the five chromatin remodeling complexes exist in eukaryotic cells. Previous studies have shown that Brg1 binding complex is involved in cell cycle control, apoptosis and cell differentiation in different cell types, while there is no report about the function of Brg1 in cornea epithelial cell differentiation as well as ocular surface diseases.

Methods: The expression of Brg1 in mouse, rabbit and human ocular surface tissues was detected by immunofluorescent staining, quantitative real time PCR or Western blot analysis. Human corneal epithelial cell line (HCE), mouse limbal epithelial cell line (TKE2), and mouse primary corneal epithelial cells were cultured in DMEM/F12+10%FBS, KSM, SSM and CnT-20 medium, respectively. Rabbit limbal epithelial cells were seeded on 3T3 feeder layers for clonal culture. TKE2 cells were treated with 0.9 mM Ca^{2+} , 10%FBS or Brg1 siRNA to explore the function of Brg1 on the differentiation of cornea epithelial cells. The expression of Brg1 on mouse corneas from postnatal day 0 to 8 weeks was evaluated.

Results: Brg1 was negative in mouse corneal epithelium from postnatal D0 to D7, commenced at 2 weeks, gradually increased from 3 weeks, and showed full thickness expression in the central corneal epithelium on 4 weeks. There was no Brg1 expression in mouse limbal epithelium. Brg1 was absent in the basal layer of the human limbal epithelium, while was expressed in the superficial layer of the limbal and peripheral corneal epithelium and full-thickness of the central corneal epithelial cells. The similar expression pattern was found in rabbit limbal and corneal tissues. Brg1 was negative in rabbit limbal epithelial clones, but positive in both primary cultured rabbit limbal and central corneal epithelial cells. Brg1 nuclear expression was found in HCE cell line and TKE2 cell line. After treated with 0.9 mM Ca^{2+} or 10% FBS, the Brg1 level in TKE2 cells did not decrease, while the protein distribution pattern in the nuclear changed. After Brg1 siRNA treatment, the Brg1 in TKE2 was down-regulated, while p63 and K14 was up-regulated, and Klf4 was down-regulated.

Brg1 was positive in the superficial cell layer of the normal human conjunctival tissues, while was expressed in the full thickness of pterygium epithelium.

Conclusions: Brg1 expression is associated with corneal epithelial maturation and differentiation. Brg1 may be involved in the development of pterygium.

Key words: Brg1; cornea; conjunctiva; epithelial cell; pterygium

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘要.....	I
英文摘要	II
第一章 前言	1
1.1 Brg1 概述.....	1
1.1.1 Brg1 概念.....	1
1.1.2 Brg1 的生物学作用.....	2
1.1.2.1 Brg1 在基因转录过程中的调控.....	2
1.1.2.2 Brg1 与 DNA 损伤修复.....	3
1.1.2.3 Brg1 与细胞周期的调控.....	3
1.2 Brg1 对干细胞的影响	4
1.2.1 Brg1 对胚胎干细胞的影响.....	4
1.2.2 Brg1 对成体干细胞的发育和分化的影响.....	6
1.2.2.1 Brg1 间充质干细胞的影响.....	6
1.2.2.2 Brg1 对神经干细胞的影响.....	7
1.2.2.3 Brg1 对表皮外胚层发育的影响.....	8
1.2.2.3 Brg1 对眼部发育的影响.....	9
1.1.2.5 其他成体干细胞.....	9
1.3 Brg1 在肿瘤发生中的作用	9
1.4 技术路线.....	11
第二章 材料与方法	12
2.1 实验材料.....	12
2.1.1 主要仪器.....	12
2.1.2 主要试剂.....	13
2.1.3 常用试剂配制.....	14
2.1.3.1 免疫荧光试剂配制.....	14
2.1.3.2 蛋白质印迹用试剂配制:	14
2.1.3.3 实时定量 PCR 反应相关试剂.....	15

2.1.3.4 细胞培养试剂配制.....	17
2.2 实验内容与方法.....	18
2.2.1 免疫荧光.....	18
2.2.1.1 组织标本的获取.....	18
2.2.1.2 冰冻切片的制备.....	18
2.2.1.3 免疫荧光染色步骤.....	19
2.2.2 细胞培养.....	19
2.2.2.1 HCE 细胞的培养.....	19
2.2.2.2 TKE2 细胞的培养.....	20
2.2.2.3 滋养层 3T3 的培养.....	21
2.2.2.4 小鼠角膜上皮细胞的原代培养.....	22
2.2.2.5 兔角膜缘上皮细胞、结膜上皮细胞克隆培养.....	23
2.2.3 TKE2 细胞转染 (GenePharma siRNA-Mate™ 试剂盒说明书).....	24
2.2.4 RNA 含量的测定.....	25
2.2.4.1 RNA 提取.....	25
2.2.4.2 反转录.....	25
2.2.4.3 实时荧光定量 PCR.....	25
2.2.5 蛋白质含量的测定.....	26
2.2.5.1 蛋白质提取.....	26
2.2.5.2 BCA 法检测蛋白浓度.....	26
2.2.5.3 蛋白质印迹.....	26
第三章 结果.....	29
3.1 Brg1 在眼表上皮中的表达.....	29
3.1.1 Brg1 在角膜上皮发育中的表达.....	29
3.1.2 Brg1 在成体眼表上皮组织中的表达情况.....	30
3.1.2 Brg1 在眼表上皮细胞中的表达情况.....	33
3.1.3 Brg1 在角膜上皮细胞分化中的作用.....	36
3.2 Brg1 在翼状胬肉中的表达.....	40
第四章 讨论.....	43
4.1 Brg1 在角膜上皮细胞分化中的作用.....	43
4.1.1 Brg1 在角膜上皮发育过程中的表达.....	43

4.1.2 Brg1 在成体角膜上皮中的表达.....	44
4.2 Brg1 在翼状胬肉的发生发展中的作用	46
第五章 结论	50
第六章 问题与展望	51
参考文献	52
附 录	66
致谢.....	68

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Brg1	1
1.1.1 Brief introduction of Brg1	1
1.1.2 The biological function of Brg1	2
1.1.2.1 The regulation of Brg1 on the gene transcription	2
1.1.2.2 The relationship between Brg1 and DNA repair.....	3
1.1.2.3 The relationship between Brg1 and cell cycle	3
1.2 The effect of Brg1 on stem cells	4
1.2.1 The effect of Brg1 on embryonic stem cells	4
1.2.2 The effect of Brg1 on adult stem cells	6
1.2.2.1 The effect of Brg1 on mesenchymal stem cells	6
1.2.2.2 The effect of Brg1 on neural stem cells	7
1.2.2.3 The effect of Brg1 on the epidermal development.....	8
1.2.2.4 The effect of Brg1 on eye development	9
1.1.2.5 The effect of Brg1 on other adult stem cells	9
1.3 The relationship between Brg1 and cancer development	9
1.4 Technical route	11
Chapter 2 Materials and Methods	12
2.1 Materials	12
2.1.1 Instruments.....	12
2.1.2 Reagents	13
2.1.3 Preparation of solutions	14
2.1.3.1 Immunofluorescent reagents preparation.....	14
2.1.3.2 Western Blot reagents preparation	15

2.1.3.3 Real time quantitative PCR related reagents	17
2.1.3.4 Cell culture reagents preparation	17
2.2 Methods	18
2.2.1 Immunofluorescent staining.....	18
2.2.1.1 Obtain tissue samples.....	18
2.2.1.2 Frozen section	18
2.2.1.3 Immunofluorescent staining procedure.....	19
2.2.2 Cell culture.....	19
2.2.2.1 The culture of HCE	19
2.2.2.2 The culture of TKE2	20
2.2.2.3 The culture of 3T3feeder layers	21
2.2.2.4 The clone culture of rabbit limbal epithelial cell and conjunctival epithelial cell.....	22
2.2.3 The transfection of TKE2 (GenePharma siRNA-Mate™ kit introduction)	23
2.2.4 RNA detection.....	24
2.2.4.1 RNA extraction	24
2.2.4.2 Inverse transcription.....	24
2.2.4.3 Quantitative Real time PCR.....	25
2.2.5 Protein detection	25
2.2.5.1 Protein extraction.....	25
2.2.5.2 Detect protein concentration with BCA.....	25
2.2.5.3 Western Blot.....	26
Chapter 3 Results.....	29
3.1 The expression of Brg1 in the ocular surface epithelium.....	29
3.1.1 The expression of Brg1 during cornea epithelium development	30
3.1.2 The expression of Brg1 in the adult ocular surface epithelia.....	33
3.1.3 The expression of Brg1 in the ocular surface epithelial cells	36
3.1.4 The function of Brg1 on cornea epithelial differentiation	39
3.2 The expression of Brg1 in pterygium	40
Chapter 4 Discussion	43
4.1 The function of Brg1 on the corneal epithelial differentiation.....	43

4.1.1 The expression of Brg1 on eye development.....	43
4.1.2 The function of Brg1 on the cornea epithelial differentiation.....	44
4.2 The relationship between Brg1 and pterygium.....	46
Chapter 5 Conclusions.....	50
Chapter 6 Problems and prospects	51
References	52
Appendix	66
Acknowledgements	68

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

1.1 Brg1 概述

1.1.1 Brg1 概念

染色质重塑过程是由多亚基复合物完成的, 这些复合物可共价修饰组蛋白或者 DNA, 分为两大类: 一种是组蛋白乙酰转移酶 (HATs) 复合物, 它通过对核心组蛋白的可逆修饰来调控核心组蛋白的乙酰化水平, 进而调控基因的激活或者抑制; 另一种是 ATP 依赖的染色质重塑复合物, 它通过利用 ATP 水解时所释放的能量来改变核小体的结构, 从而改变转录调节因子等对染色质的可接近性, 以实现基因的表达等过程的调节^[1, 2]。

SWI/Sucrose NonFermentable (SWI/SNF) 复合物是真核细胞中存在的一种 ATP 依赖性的细胞染色质重塑复合物^[3]。目前在哺乳动物已经发现有 BAF-A、BAF-B、P-BAF 三种 SWI/SNF 复合物。人的 SWI/SNF 复合物中包含 Brahma-related gene 1 (Brg1) 或 Brahma (Brm) 来专一地催化 ATPase 亚单位来改变 DNA 核小体的结构进而调节基因的转录^[4-6]。这两种基因具有很高的序列同源性 (74%), 而且在体外的生化反应中也起着相似的作用^[7-9]。尽管如此, Brg1 和 Brm 在许多细胞的增殖分化中也发挥着不同的功能。研究发现, Brg1 比 Brm 更早在胚胎中表达, 在维持胚胎干细胞的全能性方面起着重要作用^[10, 11], 破坏 Brg1 会引起胚胎在胚泡阶段的死亡, 但破坏 Brm 却不会引起胚胎死亡^[12]。

Brg1 的同源体 Swi2 首先在酵母中被发现^[13], 随后在线虫、果蝇和小鼠等其他多种生物中也发现了该基因^[14, 15]。人的 Brg1 基因位于染色体 19p 上, 由 35 个外显子、34 个内含子构成, 所编码的蛋白质相对分子量为 205kDa。Brg1 蛋白含有多个保守功能结构域: ATP 水解酶活性区域, N 末端的谷氨酰胺基序 (QLQ)、HAS、BRK 结构域, 以及 C 末端的溴基区域、AT-hook 基序^[5, 16, 17] (图 1)。其中, QLQ 参与蛋白间的相互作用, 或者促进蛋白质重构^[18, 19]; HAS 和 BRK 结构域可能具有解螺旋酶功能, 并且参与了与 DNA 以及其他转录因子的结合过程; C 末端的溴基区域参与乙酰化赖氨酸以及组蛋白 H3、H4 的尾部识别过程, AT-hook 基序可以辅助 DNA 绑定或辅助 SWI/SNF 复合物募集到组蛋白尾部去乙

酰化的赖氨酸上^[20]。

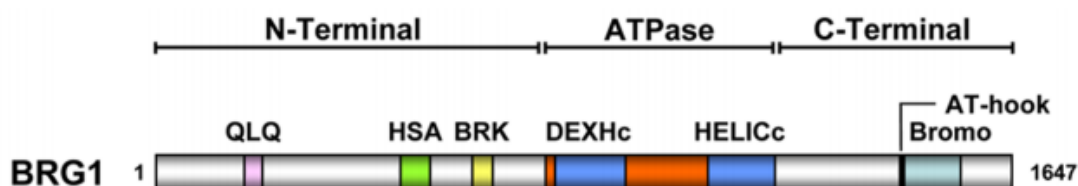


图1 Brg1 结构域图示

Brg1 能与多种蛋白质如 SWI/SNF 复合物亚基成分、转录相关蛋白、核受体类蛋白、肿瘤抑制因子、染色质修饰酶复合物以及维持基因稳定的核心蛋白等相结合，参与 DNA 的复制和修复、基因转录、基因表达和基因重组等过程的调控。

1.1.2 Brg1 的生物学作用

1.1.2.1 Brg1 在基因转录过程中的调控

1、募集目的基因

Brg1 上存在许多不同的基序，通过 SWI/SNF 复合物与转录因子、共调解因子或转录相关蛋白结合并相互作用，这些基序可将 SWI/SNF 复合物募集到特异基因的启动子上，影响了重塑复合物的活性从而增强了它与特异基因序列的结合，以便有效地结合和染色质重塑。大量研究结果表明，募集 SWI/SNF 复合物并使它稳定结合在基因特异的启动子上这一过程是多种因子共同作用的结果，并有一种或多种重塑复合物亚基参与调控。研究表明，SWI/SNF 重塑复合物与 DNA 的结合是非特异性的，但可以通过与转录因子的基因特异活化结构域相协作来提高重塑效率^[21]。

2、介导转录激活

Brg1 能通过与多种蛋白质形成复合物从而激活转录过程，核受体是一种配体依赖的转录因子。研究表明，Brg1 介导的染色质重塑是通过与核受体相互作用从而影响着配体依赖的转录激活。分子报告模型分析显示，Brg1 是核受体参与转录激活的关键成分^[22]。小鼠受精卵基因的活化和转录需要 Brg1，Brg1 敲除的卵母细胞形成的受精卵转录水平明显下降，胚胎干细胞的转录启动子处聚集有大量的 Brg1，说明它是转录激活必需的因子^[23]。

3、介导转录抑制和基因沉默

虽然 Brg1 可激活基因的转录，但也有研究发现，当它与转录抑制因子相结

合时，也可以介导基因沉默抑制转录^[24, 25]。已有研究证明 Brg1 与视网膜母细胞瘤的抑制有关，这种作用是通过形成一种抑制复合物来阻止细胞周期的正常进行来介导的^[26, 27]。另外，对从哺乳动物中分离纯化得到的 Brg1 复合物进行分析发现它们是 mSin3A/HDAC 复合物家族的一员，这种复合物在许多基因沉默中发挥作用，这也提示着 SWI/SNF 复合物也可能参与基因沉默的调控^[28]。近期研究发现 SWI/SNF 复合物以及和它相关的组蛋白修饰酶在许多细胞发育中起抑制基因转录的作用，如对细胞周期的调控^[29]。也有大量研究证明 Brg1 的激活是 mSin3A/HDAC 抑制复合物的关键成分，它通过与一些转录调控因子、辅阻遏因子和组蛋白修饰酶结合而作用于染色质，从而导致基因沉默^[30]。

1.1.2.2 Brg1 与 DNA 损伤修复

DNA 在复制时会因受病毒基因的整合和某些物化因子（如紫外线、电离辐射和化学诱变等）的影响，破坏 DNA 的双螺旋结构即引起 DNA 损伤，从而影响 DNA 复制，并使 DNA 的转录和翻译过程也跟着变化，最终导致生物突变的发生。但是细胞内有许多 DNA 损伤修复系统，如错配修复、直接修复、切除修复、重组修复和易错修复等，使 DNA 复制的正常进行，减小突变概率。

有研究发现，组蛋白修饰和 ATP 依赖的染色质重塑过程在由紫外辐照等因素引起的 DNA 双链损伤 (DSB) 的修复和损伤应答中起着重要作用^[31]。一些 ATP 依赖的染色质重塑复合物可直接修复 DNA 双链损伤。如在酵母中，INO80、SWR1、SWI/SNF 和 RSC 复合物都可以通过在 DNA 双链损伤附近重组核小体来促进 DNA 修复，或者调节检验点的激活从而促进 DNA 正常复制^[32-34]。在哺乳动物体内也发现 SWI/SNF 在 DNA 双链损伤附近的核小体内的集聚来发挥 DNA 修复的作用，且已证明 SWI/SNF 是通过调控 DNA 损伤修复蛋白来修复 DNA^[35]。也有研究表明 Brg1 是通过促进同源重组修复来进行 DNA 修复的，BRG1-RAD52 (RAD 蛋白家族同细菌中的 Rec 蛋白家族，酵母菌中的 RAD 蛋白家族同源，它们是同源重组修复 DNA 损伤和 DNA 链转移过程中的关键蛋白)，复合物使 RAD51 代替 RPA 结合在单链 DNA 上从而阻止其他单链 DNA 的错误入侵。Brg1 的缺失使 RAD51 不能结合在单链 DNA 上，就会引发异常的同源重组修复，也会加重 DNA 双链损伤所带来的破坏力^[36]。

1.1.2.3 Brg1 与细胞周期的调控

细胞周期是指细胞从一次分裂结束开始到下一次分裂结束所经历的过程。这个过程是一个严密的过程，需要许多因子共同调节控制。细胞周期的正确调控是生物体得以正常发育存活所必需的。调控细胞周期的相关机制失活，会导致细胞不受限制无限增殖。

调控细胞周期的蛋白质主要有三种类型：细胞周期蛋白（Cyclins）、细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶(CDKs)和细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶的抑制蛋白(CKIs)。细胞增殖过程中，生长因子刺激细胞周期蛋白的表达从而促进有丝分裂的进行；而细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶的减少则会阻止细胞周期的进行从而导致细胞停止生长。

在细胞增殖过程中，DNA 的复制是细胞有丝分裂间期的重要任务。前面已提到，在真核细胞的细胞核中 DNA 缠绕在组蛋白八聚体上，这种组蛋白-DNA 复合体在 DNA 的转录、复制和修复过程中都起到选择屏障的功能。它可以引导转录因子结合到目的基因上，这个过程需要组蛋白的乙酰化修饰和染色质重塑复合体介导。

细胞周期可以分为细胞分裂间期和细胞分裂期（M 期），其中细胞分裂间期又可分为 G1、S 和 G2 三个时期。G1 期主要合成细胞周期中所需的各种蛋白质和酶类，S 期则是 DNA 进行复制的时期，从而使遗传基因可以通过细胞分裂从母细胞传给子代细胞。Cyclin E 是在细胞周期 G1 期合成的，它与 CDK2 结合即可激活 G1/S 的转化过程^[37, 38]。哺乳动物中的 Brg1 和 BAF155，以及酵母中它们的同源物 SWI2 和 SWI3 存在于 Cyclin E/CDK2 复合物中，研究发现在细胞增殖过程中它们被 Cyclin E 相关激酶磷酸化。过表达 Brg1 可以导致细胞生长停滞和诱发衰老相关的 β -半乳糖苷酶的活性，这表明染色质的重组对于维持有丝分裂后期的稳定具有重要作用。CDK2 的缺失也可引起细胞衰老现象，表明 Cyclin E/CDK2 复合体可以调控 SWI/SNF 的活性从而使染色质处于一种可以促进细胞间期 S 期的 DNA 转录的状态，从而维持细胞周期的正常进行^[39]。

1.2 Brg1 对干细胞的影响

1.2.1 Brg1 对胚胎干细胞的影响

胚胎干细胞（Embryonic stem cell, ESCs）是从原始生殖细胞（primary germ

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.