

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520121153158

UDC\_\_\_\_\_

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

**Rbm24 对心肌相关基因的调控机制的研究**

**Studies of the regulatory mechanism on myocardial related  
genes of Rbm24**

杨 康

指 导 教 师: 徐秀琴教授

专 业 名 称: 生理学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

学位授予日期: 2015 年 6 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2015 年 6 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（ 徐秀琴 ）  
课题（组）的研究成果，获得（ 徐秀琴 ）课题（组）  
经费或实验室的资助，在（ 干细胞与再生医学 ）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）：

年 月 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）：

年 月 日

## 摘要

### 实验目的

研究在心肌细胞分化和发育过程中, Rbm24 蛋白发挥功能和产生的影响。寻找 Rbm24 结合的相关基因的不同水平的 RNA, 以及结合目的 RNA 后所发挥的功能, 为降低 Rbm24 的表达导致扩张性心肌病等一系列心肌受损和功能紊乱相关疾病探究原因, 寻找相关的信号通路, 提供一定的实验及理论依据, 为成功解决心脏疾病难题寻找重要的攻克点。

### 方法

通过 Western blot 免疫印迹检测 Rbm24 和其他心肌相关蛋白在 C2C12 细胞分化中蛋白的表达情况, 并用 western blot 免疫印迹法来观察各种心肌细胞系中 Rbm24 的蛋白水平表达情况, 通过在心肌细胞中用 siRNA 干扰技术在在心肌细胞中敲低 Rbm24, 观察敲低后的心肌细胞结构和功能的变化及影响。构建 Rbm24 的过表达细胞系, 利用 rip-chip 技术寻找 Rbm24 结合的靶基因 mRNA, 并用荧光素酶报告系统和 GFP 报告系统进行寻求 Rbm24 的结合区域。

### 结果

在 C2C12 分化的过程中, Rbm24 和一些心肌结构蛋白如 ACTN2 和 TNNT2 开始表达, 在小鼠心肌细胞 HL1 中, 我们敲低 Rbm24 后发现 ACTN2 和 TNNT2 表达量都有降低, 并在 H9C2 中过表达 Rbm24 利用 RIP-chip 技术进一步验证了 Rbm24 蛋白的靶基因 Chrm2, 同时, 在心肌细胞中敲低 Rbm24 后, Chrm2 mRNA 表达上升。我们还通过 GFP 报告基因系统和荧光素酶报告基因系统找出 Rbm24 蛋白结合在 Chrm2 mRNA 分子的 CDS 区的大致区域。

### 结论

在 C2C12 细胞分化为过程中表达, 并促进其分化, Rbm24 是一个至关重要的基因, 影响心肌相关蛋白的表达稳定以及正常的心肌收缩功能, 这表明 Rbm24 是心脏早期分化的一个标志, 在心脏细胞和肌节稳定中扮演重要角色。Rbm24

能够通过结合 mRNA 调节下游基因的表达来对心脏分化以及心肌细胞的功能进行调控。

**关键词** :Rbm24,靶标 mRNA, 心肌结构蛋白

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

### Purpose

The goal of this project is to investigate the function of Rbm24 in cardiac myocytes and the influences on cardiac differentiation. We search the target RNA of Rbm24 to investigate the function of them. Then we reveal the related signaling pathways in Rbm24 knockdown model that result cardiomyopathy, provide theory basis and an important approach to the treatment of cardiomyopathy.

### Methods

Western blotting was used to detect the expression of Rbm24 protein and other myocardial related proteins in the process of C2C12 differentiation. Analyze the influences on cardiac structural proteins and cardiac contraction according to knocking down Rbm24 with RNA interference technology in myocardial cells. Use RIP-CHIP technology to find the target RNA of Rbm24 in Rbm24-DDK overexpressing cells. Seek the binding site of Rbm24 with luciferase assay and GFP reporter.

### Results

With C2C12 differentiation, Rbm24 started expression with myocardial structural proteins such as ACTN2 and TNNT2. On the other side, knocking down Rbm24 resulted in lower expression of myocardial structural proteins. We found that the mRNA of Chrm2 binds with Rbm24. Meanwhile, knocking down Rbm24 would promote the expression of Chrm2 mRNA. Besides, according to luciferase assay and GFP reporter to verify the binding site of Rbm24 is CDS.

### Conclusions

Rbm24 protein is expressed in the process of C2C12 differentiation to promote myocardial differentiation. Rbm24 influenced the expression of myocardial related proteins. These suggest that Rbm24 is an early marker of cardiac differentiation and act as an important role in cardiac cells and maintenance of sarcomere, Rbm24 have

the function to regulate cardiac differentiation and the function of myocardial cells through binding target mRNA to adjust the expression of downstream gene .

**Keywords:**Rbm24; target mRNA, myocardial structural proteins

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 前言 .....	1
1.1 干细胞向心肌分化的调控 .....	3
1.2 RNA 结合蛋白 (RNA binding protein) .....	6
1.3 Rbm24 基因 .....	13
第二章 材料与方法.....	17
2.1 实验材料 .....	17
2.1.1 细胞株.....	17
2.1.2 感受态和载体质粒.....	17
2.1.3 PCR 引物 .....	17
2.2 主要仪器与耗材 .....	17
2.3 主要试剂 .....	19
2.4 实验内容与方法 .....	22
2.4.1 构建基因真核表达质粒.....	22
2.4.2 细胞培养.....	28
2.4.3 细胞转染.....	30
2.4.4 提取细胞蛋白.....	31
2.4.5 BCA 法检测蛋白浓度 .....	32
2.4.6 Western Blot 免疫印迹分析 .....	33
2.4.7 细胞免疫荧光染色.....	34
2.4.8 RIP-PCR.....	35
2.4.9 定量逆转录-聚合酶链反应 qRT-PCR.....	37
2.4.10 Dual-Luciferase® 报告基因检测系统.....	37
2.4.11 统计学分析.....	38
第三章 结果与分析.....	39
3.1 Rbm24 在心脏中的表达.....	39



3.1.1 Rbm24 在 C2C12 细胞分化过程中表达量的变化.....	39
3.1.2 Rbm24 在心肌细胞中的表达及敲低 Rbm24 后对心肌的影响 .....	40
3.2 用 RIP-CHIP 寻找与 Rbm24 相结合的 mRNA.....	41
3.3 寻找 Rbm24 结合区域.....	42
3.4 荧光素酶报告系统进一步寻找 Rbm24 的结合部位.....	43
3.5 GFP 报告系统进一步寻找 Rbm24 的结合部位.....	44
第四章 讨论.....	46
第五章 结论.....	49
参考文献.....	50
致 谢 .....	55

## Contents

摘要 .....	I
Abstract.....	III
目录 .....	V
第一章 前言 .....	1
1.1 干细胞向心肌分化的调控 .....	3
1.2 RNA 结合蛋白 (RNA binding protein) .....	6
1.3 Rbm24 基因 .....	13
第二章 材料与方法 .....	17
2.1 实验材料 .....	17
2.1.1 细胞株.....	17
2.1.2 感受态和载体质粒.....	17
2.1.3 PCR 引物 .....	17
2.2 主要仪器与耗材 .....	17
2.3 主要试剂 .....	19
2.4 实验内容与方法 .....	22
2.4.1 构建基因真核表达质粒.....	22
2.4.2 细胞培养.....	28
2.4.3 细胞转染.....	30
2.4.4 提取细胞蛋白.....	31
2.4.5 BCA 法检测蛋白浓度 .....	32
2.4.6 Western Blot 免疫印迹分析.....	33
2.4.7 细胞免疫荧光染色.....	34
2.4.8 RIP-PCR .....	35
2.4.9 定量逆转录-聚合酶链反应 qRT-PCR.....	37
2.4.10 Dual-Luciferase® 报告基因检测系统.....	37
2.4.11 统计学分析.....	38
第三章 结果与分析 .....	39
3.1 Rbm24 在心脏中的表达.....	39

3.1.1 Rbm24 在 C2C12 细胞分化过程中表达量的变化 .....	39
3.1.2 Rbm24 在心肌细胞中的表达及敲低 Rbm24 后对心肌的影响 .....	40
3.2 用 RIP-CHIP 寻找与 Rbm24 相结合的 mRNA .....	41
3.3 构建报告基因质粒, 寻找 Rbm24 结合区域 .....	42
3.4 构建报告基因质粒, 进一步寻找 Rbm24 的结合部位 .....	43
3.5 构建报告基因质粒, 进一步寻找 Rbm24 的结合部位 .....	44
第四章 讨论 .....	46
第五章 结论 .....	49
参考文献 .....	50
致 谢 .....	55
References .....	50
Acknowledgments .....	55

## 第一章 前言

人和脊椎动物身体中，心脏是最重要的一个器官，它属于循环系统，是一个腔体肌肉器官。心脏的主要生理功能是提供压力，把血液运行至身体各个部，主要是通过心肌细胞的自发性搏动，带动心肌纤维的节律性收缩，以此为动力，将富含氧气的血液通过各种大小血管输送到全身各处，为全身各器官组织提供氧气，维持细胞的正常呼吸，并将呼吸产生的二氧化碳等体内代谢产物通过血液循环系统排出体外。

胚胎早期 22 天左右由胚胎腹面两侧的原基所形成的两个血管源性管状结构在胚胎中轴两侧向中线融合，形成原始心管。胎龄 22~24 天，在一系列基因的调控下，由头至尾，形成了动脉干、心球、心室、心房与静脉窦等结构，与此同时心管发生扭转，心球转至右尾侧位，心管逐渐扭曲旋转，心室的扩展和伸张较快，因此渐渐向腹面突出，这样使出自心球、原来处于心管前后两端的动脉总干和静脉窦都位于心脏的前端。心脏的流入及排出孔道并列在一端，四组瓣膜环也连在一起，组成纤维支架。至胚胎 29 天左右，心脏外形基本形成，原始心脏于胚胎第 2 周开始形成后，约于第 4 周起有循环作用，至第 8 周房室间隔已完全长成，即成为四腔心脏。先天性心脏畸形的形成主要就是在这一时期。

心血管疾病是全球的头号死因：每年死于心血管疾病的人数多于任何其它死因。估计在 2008 年有 1730 万人死于心血管疾病，占全球死亡总数的 30%。这些死者中，估计 730 万人死于冠心病，620 万人死于中风。低收入和中等收入国家受到的影响尤甚：超过 80% 的心血管疾病死亡发生在低收入和中等收入国家，男性和女性的情况几尽相同。到 2030 年，死于心血管疾病（主要是心脏病和中风）的人数将增加至 2330 万人。预计心血管疾病将继续成为单个首要死因。大多数心血管疾病都可以通过解决诸如烟草使用、不健康饮食和肥胖、缺乏身体活动、高血压、糖尿病和血脂升高等危险因素而得到预防。每年有 940 万例死亡，或所有死亡数的 16.5% 可能由高血压造成。这包括 51% 因中风造成的死亡以及 45% 因冠心病造成的死亡<sup>[1]</sup>。

常见的心血管疾病包括动脉粥样硬化、冠心病、高血压、心力衰竭、心律失常等。心血管疾病是由于机体内因和环境外因共同作用造成的结果。主要是因为一系列体内外刺激引起的血管堵塞,使得血液无法顺利流入心脏与大脑以及全身各组织器官,从而引起心脏或大脑等各组织器官供血、供氧不足,从而引发一系列心血管疾病。心血管疾病的发病率及致死率很高,血管的堵塞会导致具有正常收缩功能的心肌细胞数减少,而其中因冠状动脉的堵塞引起的急性心肌梗死及继发性大量心肌细胞凋亡或坏死,而导致的不可逆性的心脏结构和功能的破坏是致死的主要原因。

心血管疾病有药物治疗、介入治疗、激光心肌血运重建术以及冠状动脉旁路移植术等。介入治疗(Interventional treatment),是介于外科、内科治疗之间的新兴治疗方法,包括血管内介入和非血管介入治疗<sup>[2]</sup>。经过 30 多年的发展,现在已和外科、内科一道称为三大支柱性学科。简单的讲,介入治疗就是不开刀暴露病灶的情况下,在血管、皮肤上作直径几毫米的微小通道,或经人体原有的管道,在影像设备(血管造影机、透视机、CT、MR、B超)的引导下对病灶局部进行治疗的创伤最小的治疗方法。虽然这些治疗方法能够将堵塞的血管进行一定疏通,使得血液能够正常流动,部分恢复心脏的供血能力,缓解全身各组织器官缺氧不能得到充分供应的症状,但是这些只是缓兵之计,不能从根本上解决问题。主要因为维持心脏正常供血功能的心肌细胞位于分化末端,基本上没有了分裂增殖能力,无法对心脏损坏的部分进行自我修复和功能补偿,因此,冠心病,心肌病等一系列心血管疾病成为当今世界上难以根治的疑难杂症。经过近年来研究发现,成熟的心脏中依然有一小部分细胞具有自我分裂增殖能力,我们称之为心肌前体细胞。但是,心肌前体细胞在成熟心脏的心肌细胞中比重很小,依靠这么少量的细胞来对受损的心肌进行组织功能修复是无法完全修复心脏的,所以无法对心脏功能的衰竭进行补救。外科手术治疗主要依赖心脏移植技术,用其他工体的心脏来替换掉受损的心脏来恢复正常的心脏功能,是治疗心脏疾病的一种有效途径。但是,这种途径面临着心脏提供者数目太少,难以配型,以及存在免疫排斥反应等困难,使得这一治疗手段得到大规模推广应用遇到巨大障碍。

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESCs, 简称 ES、EK 或 ESC 细胞。)是早期胚胎(原肠胚期之前)或原始性腺中分离出来的一类细胞,它具有体外培养

无限增殖、自我更新和多向分化的特性。无论在体外还是体内环境，ES 细胞都能被诱导分化为机体几乎所有的细胞类型。正因为胚胎干细胞具有分化为各种类型细胞的全能型，所以通过诱导胚胎干细胞定向分化为三胚层细胞，并进一步分化为心房肌、心室肌房室结、窦房结样细胞和蒲肯野氏细胞等各种心肌组织细胞，实现心脏组织器官的再生。目前治疗各种心脏损伤坏死疾病最有效的手段是心脏的心肌细胞的修复和更新，干细胞的不断再生和多元性分化能力为此提供了可能性，因此干细胞定向分化技术成为攻克心肌梗塞、心脏功能衰竭的重要途径，同时也是寻求心脏发育成熟与心脏疾病分子机制的理想研究模型<sup>[3]</sup>。

当今对于动物胚胎发育成熟个体的研究发现，由胚胎干细胞分化成各种类型细胞组织器官是一个多元化的调节过程，此过程受各种基因的调控，以及各种信号通路参与此分化过程，在分化的不同时间空间，不同基因和信号通路共同发挥其功能，联合起来诱导干细胞向相应细胞组织器官分化。研究发现，RNA 结合蛋白在此过程中发挥着至关重要不可忽视的作用，形态发生，功能成熟各个阶段来参与调控。目前的研究对于这些 RNA 结合蛋白的具体功能和作用机制了解的还是很有限，深入对 RNA 结合蛋白的结构和功能机制研究，对于寻求促进干细胞定向分化为心肌细胞的方法以及心肌缺陷的相关分子机制提供了美好的前景<sup>[4]</sup>。

近年来研究发现，Rbm24 是心肌特异性表达蛋白，参与心脏的发生和成熟，对于心脏收缩功能也至关重要。

## 1.1 干细胞向心肌分化的调控

胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 具有无限增殖和分化成各种细胞的全能性，从而在一定条件下可以分化为心脏的三胚层细胞，寻找干细胞定向分化为心肌细胞的机制对于了解心脏发育形成的调控机制至关重要。胚胎干细胞分化成成熟的心脏，首先要分化成中胚层细胞。然后再由中胚层细胞分化为前体细胞，最后分化为位于终末端的心肌成体细胞。此过程遵循着基因表达的基本法则，即生物体中的遗传信息从染色体上的 DNA 开始，转录酶和转录因子的辅助下转录为 RNA，经过运输剪切形成成熟的 mRNA，再在细胞质的核糖体中，经过翻译形成前体氨基酸，最后通过内质网和高尔基体进行糖基化，磷酸化，折叠

等一系列修饰生成成熟的蛋白质<sup>[5]</sup>。因此，在心脏发育发生的过程中，心脏相关的基因、转录因子、酶、生长因子、细胞因子和 RNA 结合蛋白，修饰蛋白等会从心肌细胞基因转录，翻译，修饰各个阶段来参与调控。

决定心肌细胞发育形成的因素包括很多方面，例如 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号转导通路、成纤维细胞生长因子 (FGF)、Hedgehog 蛋白及转化生长因子  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) 超家族成员，如骨形态发生蛋白 (BMPs)、二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)。这些诱导因子能够激活重要的启动心肌表达的转录因子 Nkx、TBX、GATA 和 MEF2 家族等，从而促进干细胞向心肌细胞分化。

### 1.1.1 心肌分化的转录因子

在干细胞向心肌细胞分化的过程中，启动心肌表达早期的转录因子调控着心肌特异性基因和结构蛋白和功能蛋白的表达，诱导起始干细胞的心肌终末分化。启动心肌表达早期的转录因子如 Nkx2.5、Tbx5、GATA-4、GATA-5、GATA-6、Mef2c、Myocardin A 和 HAND 家族等相互协同，共同调控心肌特异性基因和结构蛋白和功能蛋白的表达，启动胚胎干细胞向心肌细胞分化。

Nkx2.5 在心前区的中胚层表达，是心肌发育过程中最早表达的转录因子之一。Nkx2.5 早期心肌发育过程中，通诱导 MEF-2c (myocyte enhance factor, 肌细胞增强因 2c) 的表达，主要参与调控心室肌基因的表达。Nkx2.5 蛋白的同源区域能以单体或双体的形式结合到心房利钠多肽 (ANF) 启动子上。

GATA-4 在心脏前体中胚层、心管的心内膜和心肌层中表达，直接影响着心脏结构的形成，参与调控很多心脏结构基因的表达。GATA4 是具有锌指结构的转录因子，参与原始心血管的形成。研究表明，GATA4 突变可导致先天性房室间隔缺损等心脏疾病。GATA-5、GATA-6 和 GATA-4 共同表达于心前区中胚层，GATA-5、GATA-6 可促进心肌细胞分化并弥补 GATA-4 的缺失。神经调节蛋白-1 (NRG-1) 能够促进 Nkx2.5 和 GATA-4 的表达，进而促进干细胞向心肌细胞的分化<sup>[7]</sup>。Tbx5 最先在线性心管表达，后期在心房和左心室局限表达，与 GATA-4、GATA-6 协同调在心内膜与心肌的发育过程。

MEF-2 家族调控有关肌细胞的细胞形态结构的特异基因的启动表达。MEF-2 促进心肌特异性基因的表达，如 MLC-2、cTnT、 $\alpha$ -MHC、MEF-2c 能够促进 Brachyury T、骨形态形成蛋白-4 (bone morphogenetic protein-4)，

BMP-4)、Nkx2.5、GATA-4、 $\alpha$ -CA 和 MLC-2 的表达, 这些蛋白是中胚层的标志蛋白, 进而直接影响着中胚层的发育。其中 Mef2c 通过启动心脏结构基因, 影响早期心管的形成和心室肌的分化。

HAND 包括 dHAND(HAND2)和 eHAND(HAND1), 属于心脏发育中的螺旋一环一螺旋家族, HAND2 主要在右心室表达, HAND1 只在左心室表达。HAND 基因在胚胎发育时期能够启动 HLH 基因家族的表达, 在心室和心腔的形成过程中起重要作用, 对心室细胞几乎没有什么特化作用。在胚胎干细胞向心肌细胞分化过程中 HAND 与 GATA4 协同启动心肌特异性下游基因 ANF、BNP 和  $\alpha$ -MHC 等基因的表达。。HAND 和 Nkx2.5 共同调控心室肌的发生和成熟。

血清反应因子(serum reactive factor, SRF)在骨骼肌、心肌和平滑肌中特异性表达, 能够与 Nkx2.5、GATA-4 协同作用, 共同调控心房利钠多肽的表达<sup>[8]</sup>。

### 1.1.2 心脏发育相关的细胞因子

胚胎干细胞向心肌分化受各种生长因子的调控, 如转化生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ )、骨形态生成蛋白(BMP)、成纤维细胞生长因子(FGF)、Wnt 家族蛋白(Wnt families)、血小板源性生长因子(PDGF)和具有表皮生长因子受体样结构的 Cfipto-1 等。此外, 胰岛素样生长因子(IGF)和促红细胞成素(EPO)等也可诱导胚胎干细胞向心肌细胞的定向分化。在胚胎干细胞表面均有表达这些细胞因子的受体。TGF- $\beta$  和 BMP-2 通过与胚胎干细胞表面受体结合, 激活 TAKI 和 PI3K 等信号分子, 启动 GATA4、MEF-2、等心肌相关转录因子的表达, 增加心房利钠多肽等心脏终末分化基因的表达, 促进干细胞向心肌分化<sup>[9]</sup>。研究表明, TGF- $\beta$  通过自分泌或旁分泌定向诱导干细胞向心肌分化, 如果 TGF- $\beta$  信号通路的受体及 FGF 信号通路的受体缺失, 将会降低干细胞向心肌细胞分化的效率。BMP 会减少心脏的搏动, 对心肌分化具有抑制作用。生长因子家族成员神经调节蛋白 21 能够诱导心脏前体细胞的成熟, 完善肌小梁的结构, 促进心脏传导系统的发育。

### 1.1.3 化学诱导剂

维生素 C、维甲酸(RA)、二甲基亚砷(DMSO)和 5-氮杂胞苷等化学试剂在体外可促进胚胎干细胞向心肌细胞分化。在心肌分化的早期阶段, RA 可诱导心肌特异性蛋白 $\alpha$ -MHC( $\alpha$ -肌球蛋白重链)和 MLC-2v(心室肌特异性肌球蛋白轻链)在干细胞中表达, 增加心室肌细胞的分化数量。。DMSO 是一种硫化物通过 Wnt3a



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.