文章编号:1000-5404(2010)11-1141-04

论著

p300 特异性 siRNA 载体的构建及其对心肌细胞 GATA4 表达的影响

孙慧超[1],田 杰[1], 朱 静[2], 吕铁伟[1], 陈国珍[1],李娅莎[2] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:心脏中心[1],儿科研究所[2])

[摘要] **目的** 构建并筛选小鼠 p300 特异性 siRNA 载体,并观察 p300 表达降低对心脏特异性转录因子的调控作用,为进一步研究 p300 介导的组蛋白乙酰化失衡对心脏发育的影响奠定基础。**方法** 针对小鼠 p300 基因的保守序列区域设计并构建 3 个重组质粒 p300 RNAi1,p300 RNAi2 和 p300 RNAi3。利用阳离子脂质体将其分别转染入体外培养的乳鼠心肌细胞,分别利用 RT-PCR 和免疫荧光从 mRNA 和蛋白水平检测 p300 表达,判断抑制效率,并检测心脏特异性转录因子 GATA4 的表达水平。**结果** pSOS-HUS 组和 p300 RNAi2 组中 p300 mRNA 水平表达较正常对照组无明显降低,而 p300 RNAi1 组和 p300 RNAi3 组中 p300 mRNA 表达量较正常组有明显降低(分别为 0.220 8 ± 0.020 0,0.170 8 ± 0.040 0, *vs* 0.509 5 ± 0.030 0),且差别有统计学意义($P < 0.05$),抑制率分别为 56.7% 和 66.5%。转染 p300RNAi1 组和转染 p300RNAi3 组的 GATA4 mRNA 表达水平(分别为 0.423 1 ± 0.110 0,0.262 7 ± 0.080 0)明显低于正常组(0.856 4 ± 0.070 0)和阴性对照组(0.841 5 ± 0.040 0),差别有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** p300 特异性 siRNA 质粒载体构建成功,p300 RNAi1 和 p300 RNAi3 具有确切阻断 p300 蛋白表达的作用,并下调 GATA4 的表达。

[关键词] RNA 干扰; p300; 心脏;GATA4 ;表观遗传学;组蛋白乙酰化
[中图法分类号] R322.11;R394-33; R394.3 **[文献标志码]** A

Construction of p300 specific siRNA vector and its effect on GATA4 expression in cardiac muscle cells

Sun Huichao[1], Tian Jie[1], Zhu Jing[2], Lu Tiewei[1], Chen Guozhen[1], Li Yasha[2] ([1]Centre of Cardiology, [2] Institute of Pediatrics, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[Abstract] Objective To construct the p300 specific siRNA vector in mice and observe its effect on cardiac transcription factor, GATA4, for further study of the effect of p300-mediated histone acetylation on heart growth. Methods Three recombinant plasmid vectors (p300 RNAi1, p300 RNAi2, and p300 RNAi3s), designed and constructed according to the conservative sequence of mice p300, were respectively tansfected into in vitro cultured cardiac muscle cells of suckling mice. Expression of p300 and GATA4 at mRNA and protein levels was detected by RT-PCR and immunofluorescence, respectively. Results The expression level of p300 mRNA was not significantly decreased in pSOS-HUS and p300 RNAi2 groups, but significantly decreased in p300 RNAi1 and p300 RNAi3 groups (0.220 8 ± 0.020 0 and 0.170 8 ± 0.040 0 *vs* 0.509 5 ± 0.030 0, $P < 0.05$), with an inhibition rate of 56.7% and 66.5%, respectively. The expression level of GATA4 mRNA was significantly lower in transfected p300RNAi1 and p300RNAi3 groups than in normal and negative control groups (0.423 1 ± 0.110 0 and 0.262 7 ± 0.080 0 *vs* 0.856 4 ± 0.070 0 and 0.841 5 ± 0.040 0, $P < 0.05$). Conclusion A p300 specific siRNA vector is successfully constructed. Both p300 RNAi1 and p300 RNAi3 can effectively block the expression of p300 and GATA4.

[Key words] RNA interference; p300; heart; GATA4; epigenetics; histone acetylation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672266) and the National Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB5311).
Corresponding author: Tian Jie, Tel: 86-23-68486767, E-mail: jietian@cqmu.edu.cn

p300 是一种转录辅激活因子,也是一种重要的组蛋白乙酰化酶(histone acetyltransferase, HATs),可以使核小体中的组蛋白发生乙酰化,改变染色体状态,从而对靶基因进行表观遗传调控,"启动"或"关闭"靶基因的表达,对细胞的增殖、分化,以及器官的发育形成有重要作用[1,2]。近年来,越来越多的研究报道,p300 基因敲除小鼠出现心脏、肺等多个器官发育异常[3],而且成年后 p300 的表达失衡还与小鼠心肌肥厚、心衰等后天性心脏疾病的发生有关。但胚胎心脏发育期间

[基金项目] 国家自然科学基金(30672266);重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5311)
[通信作者] 田 杰,电话:(023)68486767,E-mail: jietian@cqmu.edu.cn

p300的瞬时表达失衡与先心病发生的关系尚少见报道,本研究拟构建并筛选有效的p300特异性siRNA载体,并观察p300特异性RNA干扰后对心脏特异性转录因子GATA4的调控作用,为进一步研究p300介导的一过性组蛋白乙酰化修饰失衡,即表突变,与先天性心脏病发生的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与载体 克隆用DH-5α大肠杆菌由本研究所保存,pSOS-HUS双启动子真核表达质粒由本研究所罗庆老师惠赠,含增强绿色荧光蛋白(enhance green fluorescent protein, EGFP)及卡那霉素抗性基因[4]。

1.1.2 主要试剂 T_4连接酶购于美国Promega公司,各种限制性内切酶、质粒提取及纯化试剂盒、RT-PCR试剂盒均购于日本TAKARA公司,RNA提取试剂盒购于北京Bioteck公司,脂质体转染试剂Lipofectamine 2000购于美国Invitrogen公司。小鼠p300单克隆抗体购于美国Abcom公司,TRITC-羊抗小鼠多克隆抗体购于北京中杉公司。

1.2 方法

1.2.1 设计合成dsRNA(double-strand RNA)的DNA序列 查阅国内外文献未发现针对小鼠p300的有效RNA干扰序列的报道,故根据Genebank中提供的p300核苷酸序列(Gene bank ID:NM_177821),参考invitrogen公司在线设计工具的设计策略,针对小鼠p300的3个不同靶点(960~980,3947~3967,6625~6645)分别设计3对短的双链DNA序列。每条DNA链5'端加一个A,与SfiⅠ酶切后的粘性末端相对应,3'端加有转录终止信号TTTT。经BLAST软件进行同源性分析后,交上海生工公司合成。3对序列的正义链分别如下:p300 RNAi1: 5′-AGGGAAACAGTTATGCACAATCTTTT-3′; p300 RNAi2: 5′-AGCAATGGACAAGGGATAATGCTTTT-3′; p300 RNAi3:5′-AGGTGCTTAGTATCCTTCATGCTTTT-3′。

1.2.2 小鼠p300特异性siRNA表达载体的构建 将合成的寡核苷酸链分别用灭菌去离子水稀释为100 mmol/L,各取等量互补链,95 ℃温浴10 min,然后自然冷却退火,得到3对短双链DNA。将得到的DNA双链与经SfiⅠ酶切的pSOS-HUS质粒载体在T_4连接酶作用下进行连接,16 ℃过夜,得到针对小鼠p300的特异性siRNA重组表达载体p300 RNAi 1,p300 RNAi 2和p300 RNAi 3。转化感受态细菌DH-5α,利用抗生素抗性筛选出阳性克隆后,提取质粒进行*Eco*RⅠ和*Not*Ⅰ双酶切,初步筛选正确重组克隆,并进行DNA测序加以确定。

1.2.3 原代乳鼠心肌细胞培养及转染 取日龄3 d以内的新生KM小鼠,无菌条件下取出心脏,小心剔除心包等纤维组织及血凝块,剪碎至1 mm^3,0.1 % Ⅱ型胶原酶37 ℃多次短时消化至组织块被全部消化,细胞悬液经细胞筛过滤后接种于培养瓶中,5% CO_2,37 ℃条件下差速贴壁1 h除去大部分的成纤维细胞,吸出细胞悬液重新接种到新的培养瓶中5% CO_2,37 ℃条件下继续培养,第3天进行转染。

1.2.4 RT-PCR检测转染后p300及心脏特异性基因GATA4的表达 转染后24 h,收集细胞提取总RNA,逆转录成cDNA。针对靶基因保守序列设计引物进行PCR扩增。引物序列分别为:p300正义链:5′-GCCAAGTATGCCAACCCTAA-3′,反义链:5′-TGTTCATTTGCTGAGCTTGG-3;GATA4正义链:5′- AAGACGCCAGCAGGTCCTGCTGGT-3′, 反义链:5′- CGCGGTGATTATGTCCCCATGACT-3′; β-actin正义链: 5′-ACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATC-3′, 反义链: 5′-TAGCCACGCTCGGTCAGGATCTTCAT-3′。扩增后PCR产物凝胶电泳成像,以β-actin为内参,利用Quantity One软件进行半定量分析。

1.2.5 免疫荧光检测转染后p300蛋白的表达 转染后24 h,用PBS冲洗细胞,冷丙酮固定10 min,0.1% triton渗透破膜,10%山羊血清封闭后,一抗(1∶250稀释)4 ℃孵育过夜。次日PBS冲洗掉多余一抗,TRITC标记的二抗室温孵育45 min,PBS冲洗后50%缓冲甘油封片,然后进行免疫荧光检测及IPP分析。

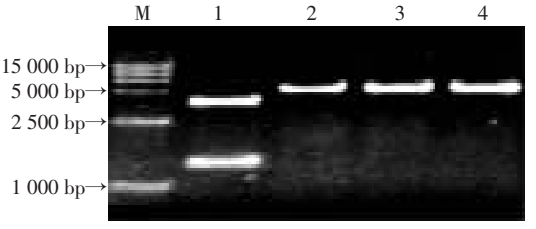
1.3 统计学分析

所有数值都以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 11.0软件进行统计分析,两样本比较用t检验。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

pSOS-HUS质粒序列中含有*Not*Ⅰ和*Eco*RⅠ内切酶位点,但经重组后*Not*Ⅰ位点丢失,故用*Not*Ⅰ和*Eco*RⅠ进行双酶切,凝胶电泳成像时,pSOS-HUS出现两个条带(1 325 bp和3 620 bp),而重组质粒只出现1个条带(4 920 bp),如图1所示。经酶切初步筛选正确的重组质粒送重庆医科大学分子生物重点实验室,进一步用DNA测序方法证实插入片段无误,重组质粒载体构建成功。

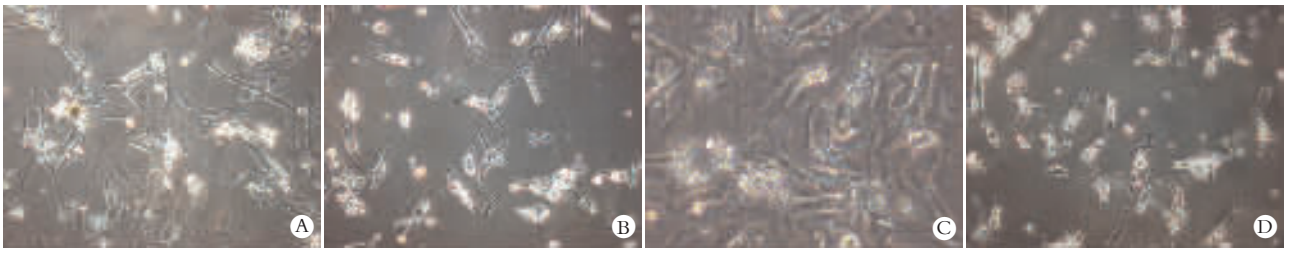


M:DNA标准(DL15,000);1~4:分别为pSOS-HUS,p300 RNAi1,p300 RNAi2,p300 RNAi3双酶切产物

图1 质粒双酶切电泳结果

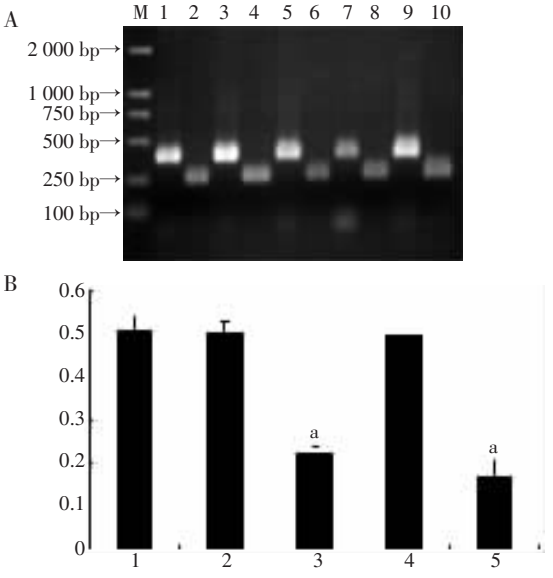
2.2 siRNA载体能有效抑制p300 mRNA的表达

转染后24 h,pSOS-HUS组和p300 RNAi2组细胞形态无明显变化,而p300 RNAi1组和p300 RNAi3组细胞体积缩小,由原来的宽大多边形变为长条状或梭形(图2),分别收集细胞提取RNA做RT-PCR,结果显示pSOS-HUS组和p300 RNAi2组中p300 mRNA水平表达较正常对照组无明显降低[分别为(0.502 3±0.030 0),(0.495 4±0.010 0) *vs* (0.509 5±0.030 0),$P>0.05$],而p300 RNAi1组和p300 RNAi3组中p300 mRNA表达量较正常组有明显降低[分别为(0.220 8±0.020),(0.170 8±0.040 0) *vs* (0.509 5±0.030 0),且差别有统计学意义($P<0.05$)],抑制率分别为56.7%和66.5%(图3)。



A:转染 pSOS-HUS 组;B:转染 p300 RNAi1 组;C:转染 p300 RNAi2 组;D:转染 p300 RNAi3 组

图 2　转染重组 RNAi 载体 24 h 后细胞形态变化　(光镜 ×200)



A: RT-PCR 产物凝胶电泳结果　M:标准;1,3,5,7,9:分别为空白组、转染 pSOS-HUS、p300RNAi1,p300RNAi2,p300RNAi3 的β-actin;2,4,6,8,10:分别为相应的 p300

B: RT-PCR 半定量分析结果　1:空白对照组;2:pSOS-HUS;3:p300RNAi1;4:p300RNAi2;5:p300RNAi3;a:$P<0.05$,与空白组比较

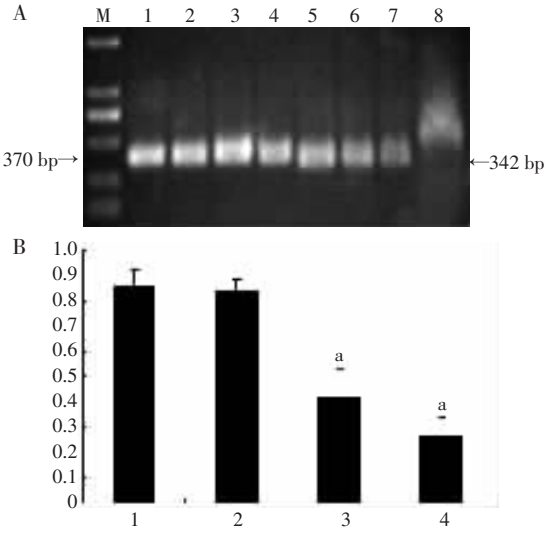
图 3　转染后 24 h RT-PCR 检测 p300 mRNA 的表达

2.3　siRNA 载体能有效抑制 p300 蛋白的表达

免疫荧光 IPP 分析结果显示,转染了 pSOS-HUS 和 p300RNAi2 的细胞中 p300 蛋白表达较正常对照细胞无明显降低[分别为(0.557 7 ±0.140 0),(0.626 7 ±0.250 0) *vs* (0.640 9 ±0.090 0),$P>0.05$],而转染了 p300RNAi1 和 p300RNAi3 的细胞中 p300 表达较正常对照细胞明显降低[分别为(0.116 7 ±0.100 0),(0.100 3 ±0.070 0) *vs* (0.640 9 ±0.090 0),且差别有统计学意义($P<0.05$)],抑制率分别为 82.0% 和 85.5%(图 4)。

2.4　p300RNAi 后心肌特异性转录因子 GATA4 表达降低

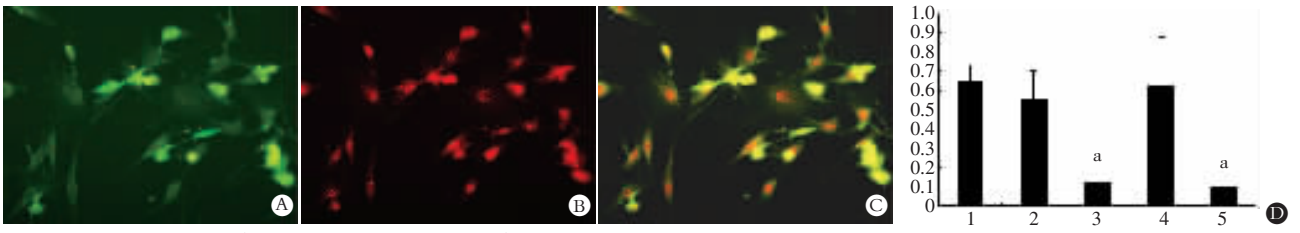
将筛选出的有效干扰载体分别转染体外培养的心肌细胞,24 h 后提取总 RNA 进行 RT-PCR 半定量分析,结果显示转染 p300RNAi1 组和转染 p300RNAi3 组的 GATA4 mRNA 表达水平[分别为(0.423 1 ±0.110 0),(0.262 7 ±0.080 0)明显低于正常组(0.856 4 ±0.070 0)和阴性对照组(0.841 5 ±0.040 0),差别有统计学意义($P<0.05$)](图 5)。且转染 p300RNAi3 组的 GATA4 表达比转染 p300RNAi1 组有更低的趋势,虽然差别经分析后无统计学意义($P=0.052$ 4),但变化趋势与两个干扰载体的抑制效率一致。



A:RT-PCR 产物凝胶电泳结果　M:标准;1 ~ 4:分别为空白组、pSOS-HUS 组、p300RNAi1 组和 p300RNAi3 组的 β-actin;5 ~ 8:分别为相应的 GATA4

B:RT-PCR 半定量分析结果　1:空白组;2:pSOS-HUS 组;3:p300RNAi1 组;4:p300RNAi3 组;a:$P<0.05$, 与空白组比较

图 5　转染有效 RNAi 载体后 RT-PCR 检测 GATA4 的表达



A: 转染后 24hGFP 表达;B: TRITC 标记的 p300 表达;C: A 与 B 的荧光叠加图;D: IPP 分析结果　1:空白对照组;2:pSOS-HUS;3:p300RNAi1;4:p300RNAi2;5:p300RNAi3;a:$P<0.05$,与空白组比较

图 4　转染后 24 h 免疫荧光检测 p300 蛋白的表达　(荧光显微镜 ×400)

3 讨论

组蛋白乙酰化是一种重要的表观遗传修饰方式，本课题组在前期研究中已经证明，在干细胞向心肌细胞分化过程中，组蛋白的正常乙酰化修饰具有重要作用[5]。在体内，组蛋白的乙酰化修饰是由组蛋白乙酰化酶(histone acetyltransferase, HATs)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDACs)共同维持的[6]。目前研究将HATs分为5个家族[7]，其中p300是研究较多的一种，它可以乙酰化组蛋白和一些重要的非组蛋白，调控基因表达[8]，并参与胚胎器官的正常发育。国外研究报道，基因敲除或基因敲入破坏p300的HAT活性均可引起心脏发育缺陷，并导致胚胎期或新生鼠期死亡[3,9]。本课题前期研究发现，在几种重要的HATs亚型中p300在胚胎心脏的表达量最高，且在整个发育过程中存在动态表达，在E10.5～E11.5，即心内膜垫和房室间隔形成的关键时期达到表达高峰[10]，提示p300的正常表达可能与心脏结构的正常发育有关。此外，许多研究发现p300还与心肌肥厚[11]、心肌梗死后左室重构[12]等多种后天性心脏病的发生有关。而GATA4是心脏发育过程中的重要转录因子[13]，也是心肌肥厚的特异性因子，是多个心肌肥厚相关基因转录活化所必需的，在心肌肥厚动物模型中可以检测到GATA4表达水平的升高[14]，那么p300介导的组蛋白乙酰化修饰是否能直接调控GATA4的表达？在心脏发育和心肌肥厚疾病过程中，GATA4的表达改变是否是由p300介导的组蛋白乙酰化修饰改变而导致的，目前还少见报道。

目前大多数研究都是通过基因敲除或敲入的方法来研究目的基因在胚胎发育中的功能，但p300是一个全身广泛表达、胚胎发育所必需的基因，基因敲除可致多个器官发育异常，并导致胚胎早期死亡，不能研究p300的时序表达对心脏发育相关基因的时间性调控，并且不能研究p300暂时性表达失衡对胚胎心脏发育的影响及其与先心病发生的关系。

本研究成功构建了p300特异性的siRNA重组载体，并从mRNA和蛋白两个水平证明p300 RNAi1和p300 RNAi3都有明确的基因沉默作用，进一步将两个有效RNA干扰载体转染体外培养的小鼠原代心肌细胞，发现心脏特异性转录因子GATA4的mRNA水平表达降低，证明p300介导的组蛋白乙酰化修饰可以调控GATA4的转录水平，而转染p300 RNAi3组GATA4表达趋势比p300 RNAi1组更低，提示p300对GATA4表达的调控作用存在剂量依赖性。该研究结果提示，心脏发育过程中组蛋白乙酰化修饰失衡可能导致心脏发育相关基因的异常表达，从而影响心脏的正常发育，此机制可能是$p300^{(-/-)}$胚胎死亡和心脏发育异常的原因。本实验结果为进一步研究体内p300沉默导致的组蛋白乙酰化修饰失衡对心脏发育相关基因的时间性调控奠定了实验基础。

参考文献：

[1] Sadoul K, Boyault C, Pabion M, *et al*. Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases[J]. Biochimie, 2008, 90(2): 306－312.

[2] Yang Y, Wolf L V, Cvekl A. Distinct embryonic expression and localization of CBP and p300 histone acetyltransferases at the mouse alphaA-crystallin locus in lens[J]. J Mol Biol, 2007, 369(4): 917－926.

[3] Shikama N, Lutz W, Kretzschmar R, *et al*. Essential function of p300 acetyltransferase activity in heart, lung and small intestine formation [J]. EMBO J, 2003, 22(19): 5175－5185.

[4] Luo Q, Kang Q, Song W X, *et al*. Selection and validation of optimal siRNA target sites for RNAi-mediated gene silencing[J]. Gene, 2007, 395(1－2): 160－169.

[5] 朱静，冯川，李莉，等. 干扰组蛋白乙酰化引发间充质干细胞心肌定向分化特定蛋白的异常表达[J]. 第三军医大学学报，2008, 30(4): 303－306.

[6] Clayton A L, Hazzalin C A, Mahadevan L C. Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective[J]. Mol Cell, 2006, 23(3): 289－296.

[7] Roth S Y, Denu J M, Allis C D. Histone acetyltransferases[J]. Annu Rev Biochem, 2001, 70: 81－120.

[8] Berger S L. Histone modifications in transcriptional regulation[J]. Curr Opin Genet Dev, 2002, 12(2): 142－148.

[9] Yao T P, Oh S P, Fuchs M, *et al*. Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300 [J]. Cell, 1998, 93(3): 361－372.

[10] 陈国珍，朱静，田杰，等. 组蛋白乙酰化酶p300和CREB结合蛋白在小鼠胚胎心发育中的时序表达[J]. 解剖学杂志，2008，31(4): 480－482.

[11] Backs J, Olson E N. Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation[J]. Circ Res, 2006, 98(1): 15－24.

[12] Miyamoto S, Kawamura T, Morimoto T, *et al*. Histone acetyltransferase activity of p300 is required for the promotion of left ventricular remodeling after myocardial infarction in adult mice *in vivo*[J]. Circulation, 2006, 113(5): 679－690.

[13] Olson E N. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart[J]. Science, 2006, 313(5795): 1922－1927.

[14] Bisping E, Ikeda S, Kong S W, *et al*. Gata4 is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(39): 14471－14476.

（收稿：2009-11-18；修回：2009-12-16）

（编辑　王　红）