DOI:10.16016/j.1000-5404.201602018

CBP/P300 介导的组蛋白 H3K9 乙酰化修饰对 GATA4 表达的影响

蒋大贵[1,2],刘玲娟[2],吕铁伟[1],田 杰[1],孙慧超[1] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:心脏内科[1],儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室[2])

[摘要] **目的** 明确 GATA4 在小鼠胚胎心脏发育过程中的时序表达,并阐明其组蛋白修饰调控机制。**方法** 选取胎龄 11.5 d (E11.5)至新生 0.5 d 胎鼠心脏,RT-PCR 检测胎鼠心肌细胞中 GATA4 mRNA 表达水平, CHIP-QPCR 检测 GATA4 启动子区组蛋白 H3K9ac 水平及与 CBP/P300 的结合水平。用 CBP30 干预心肌祖细胞,RT-PCR 检测心肌祖细胞在不同浓度 CBP30(0.5、1、2、4 μmol/L)干预不同时间点(6、12、24、36 h)后 GATA4 mRNA 表达水平,CHIP-QPCR 检测心肌祖细胞中 GATA4 启动子区组蛋白 H3K9ac 水平及与 CBP/P300 的结合水平。**结果** ①小鼠胚胎心脏发育过程中 GATA4 表达量,E14.5 明显高于 E11.5($P<0.05$);CHIP 结果显示 E14.5GATA4 启动子区组蛋白 H3K9ac 水平高于 E11.5($P<0.05$);E14.5 与 CBP/P300 的结合水平亦高于 E11.5($P<0.05$)。②CBP30 干预心肌祖细胞后,GATA4 表达量较对照组明显降低($P<0.05$)。CHIP 结果显示 CBP30 组 GATA4 启动子区组蛋白 H3K9ac 水平及与 CBP/P300 的结合水平较对照组显著降低($P<0.05$)。**结论** CBP/P300 可通过介导组蛋白 H3K9 乙酰化修饰参与调控 GATA4 在小鼠胚胎心脏发育过程中的时序表达。

[关键词] GATA4;CBP/P300;组蛋白乙酰化;心脏发育;表观遗传学
[中图法分类号] R321.5;R322.11;R394.2 [文献标志码] A

Effect of CBP/P300-mediated H3K9 acetylation on GATA4 expression in fetal mouse myocardocytes

Jiang Dagui[1,2], Liu Lingjuan[2], Lyu Tiewei[1], Tian Jie[1], Sun Huichao[1] ([1]Department of Cardiology, [2]Key Laboratory of Developmental Disease in Childhood of Ministry of Education, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the temporal expression of GATA4 in the development process of mouse embryonic heart and elucidate the underlying mechanism of histone modification. **Methods** RT-PCR was used to detect the expression of GATA4 in fetal mouse hearts from gestational age E11.5 d to postnatal 0.5 d. ChIP-QPCR was employed to the expression level of histone marker H3K9ac in GATA4 promoter region and the binding level of CBP/P300. After the cardiac progenitor cells were treated with CBP30 at different concentrations (0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 μmol/L) for different time periods (6, 12, 24 and 48 h), the expression levels of GATA4 mRNA and H3K9ac, and the binding level were measured again. **Results** ①The expression level of GATA4 mRNA was significantly higher at E11.5 than at E14.5 ($P<0.05$). ChIP assay demonstrated that the expression level of H3K9ac in GATA4 promoter region was higher at E14.5 than at E11.5 ($P<0.05$), and the binding of CBP/P300 to GATA4 promoter region was stronger at E14.5 than at E11.5 ($P<0.05$). ②Compared with control group, CBP30 resulted in an obvious decrease in

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81300129);重庆市教委科学基金(渝教科[2014]12 号-KJ1400213)
[通信作者] 孙慧超,E-mail:cathy8224@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160601.0839.002.html(2016-06-01)

GATA4 expression in cardiac progenitor cells ($P<0.05$). In CBP30 treated cells group, all the tested markers above mention were decreased dramatically, compared to control group ($P<0.05$). **Conclusion** CBP/P300 is involved in the GATA4 regulation through mediating H3K9 acetylation during the heart development in mice.

[**Key words**] GATA4;CBP/P300;histone acetylation;heart development; epigenetics

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholar of China (81300129) and the Science Foundation of Chongqing Municipal Education Commission (KJ1400213). Corresponding author: Sun Huichao, E-mail: cathy8224@163.com

心脏发育是一个极其复杂的过程,整个过程依赖一系列心脏发育核心转录因子如 GATA4、MEF2C、Nkx2.5、Tbx5 等的精确调控[1-2]。GATA4 在心脏发育早期便开始表达,其缺失、突变、表达异常均将导致先天性心脏病的发生。

CBP/P300 作为组蛋白乙酰化酶的两个亚型,广泛表达于多种组织,并介导组蛋白的乙酰化修饰,参与基因表达调控。CBP/P300 可在心肌祖细胞中表达,且其活性受到抑制后可导致多种心脏发育核心转录因子表达的降低[3-4],提示 CBP/P300 可能通过介导组蛋白乙酰化修饰参与调控 GATA4 的表达。为验证这一科学假说,本研究利用小鼠胚胎心脏组织研究正常胚胎心脏发育过程中 GATA4 的时序表达及其基因启动子区组蛋白 H3K9 乙酰化修饰水平的变化规律,并利用 CBP/P300 的特异性抑制剂 CBP30 干预心肌祖细胞,证实 CBP/P300 介导的组蛋白 H3K9 乙酰化修饰可调控 GATA4 的表达,通过探讨其具体作用机制,为进一步阐明胚胎心脏发育过程中 GATA4 的表观遗传调控网络奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年健康 SPF 级昆明小鼠,由重庆医科大学实验动物中心提供。实验细胞:心肌祖细胞,由美国芝加哥大学分子肿瘤实验惠赠[5]。

1.1.2 主要试剂 高纯度总 RNA 提取试剂盒(百泰克,北京),Real-time PCR 逆转录试剂盒(TaKaRa,日本),SYBR Green 试剂盒(KAPA,美国),CHIP 试剂盒(Abcam,英国),核染色质提取试剂盒(Abcam,英国),CBP30(Selleck,美国),CHIP 级抗 H3K9ac 抗体、抗 CBP 抗体(Abcam,英国),CHIP 级抗 P300 抗体(Millipore,英国),胎牛血清和 DMEM-F12 培养基(HyClone,美国),胰蛋白酶(Gibco,澳大利亚),荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad,美国),超声仪(Diagenode,美国)。

1.2 方法

1.2.1 胎鼠心脏标本提取 下午 5:00 按雌:雄 = 2:1 合笼,次日早上检查阴栓,以观察到阴栓者计为胎龄 0.5 d(E0.5)。用二氧化碳处死孕鼠,取 E11.5 到新生 0.5 d 胎鼠心脏,并冻存于 -80 ℃冰箱中。

细胞培养及干预:复苏心肌祖细胞,所用培养基为含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素的 DMEM/F12 培养基,在 CO_2 浓度为 5% 的 37 ℃恒温培养箱中培养。在 6 孔板和直径 100 mm 培养皿中干预心肌祖细胞,分为空白对照组(正常对照组),阴性对照组(DMSO 组)和处理组(CBP30 组),其中处理组又分为不同浓度组(0.5、1、2 μmol/L 和 4 μmol/L)和不同时间组(6、12、24 h 和 36 h)。

1.2.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成 取 E11.5 到新生 0.5 d 胎鼠心脏组织 50 mg 于 1.5 mL EP 管中,加入 1 mL 组织裂解液,放入组织匀浆器中匀浆 5 min,按照 RNA 提取试剂盒说明书操作,提取心脏组织总 RNA。CBP30 干预心肌祖细胞后,向 6 孔板中加入 1 mL 组织裂解液,按照 RNA 提取试剂盒说明书操作,提取细胞总 RNA。经核酸蛋白测定仪测定 $D(260)/D(280)$ 比值确定总 RNA 浓度,取 800 ng RNA 按照 TaKaRa 逆转录试剂盒操作说明将 RNA 逆转录为 cDNA,反应体系为 20 μL,反应条件为:42 ℃ 30 min,85 ℃ 5 s,4 ℃保存,所得 cDNA 冻存于 -20 ℃备用。

1.2.3 染色质免疫共沉淀(CHIP) 分别取 E11.5、E14.5、E17.5 胎鼠心脏组织 50 ~ 70 mg,1% 甲醛交联;对培养在 100 mm 培养皿中的心肌祖细胞进行 CBP30 干预后(2 μmol/L,6 h),1% 甲醛对细胞进行交联。用超声破碎仪切割 DNA,通过琼脂糖凝胶电泳检测,使切割的 DNA 片段长度在 200 ~ 1 000 bp 之间。分别用 CHIP 级抗 H3K9ac、P300、CBP 抗体进行染色质免疫共沉淀,得到的纯化 DNA 冻存于 -20 ℃备用。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(Q-PCR) 分别以 RNA 逆转录产物 cDNA 和 CHIP 产物纯化 DNA 为模板进行 Q-PCR 反应,按 SYBR Green 说明书进行操作。Q-PCR

反应体系为 10 μL(2×SYBR qPCR Master Mix solution:5 μL,正向引物:0.1 μL,反向引物:0.1 μL,DNA 模版:1 μL,ddH_2O:3.8 μL)。引物均由 Primer Premier 5 软件设计,由上海生工生物工程股份有限公司合成。GATA4 基因引物序列为:上游 5′-CCCTCCCGCACGATTTCT-3′,下游 5′-AGAGGCCCAACTCGCTCAA-3′;β-actin 基因引物序列为:上游 5′-CACACCCGCCACCAGTTCG-3′,下游 5′-GTCCTTCTGACCCATTCCCACC-3′;GATA4 基因启动子区引物序列为:上游 5′-CACTGACGCCGACTCCAAACTAA-3′,下游 5′-CGACTGGGGTCCAATCAAAAGG-3′。Q-PCR 反应条件为:预变性 95℃ 2 min,变性 95 ℃ 10 s,退火 60 ℃ 10 s,延伸 72 ℃ 15 s,45 个循环,每个样品均重复 3 次。所得数据由实时荧光定量 PCR 仪自带基于 pfaffl 原理的相对定量数据分析软件分析。

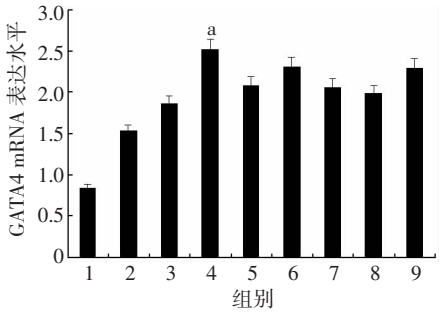
1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间比较,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 心脏发育核心转录因子 GATA4 在小鼠胚胎心脏发育过程中的动态表达水平

GATA4 在胚胎心脏发育过程中呈由低到高的动态表达,GATA4 mRNA 表达水平,E14.5 组高于 E11.5 组,两两比较差异具有统计学意义($P<0.05$,图 1)。



1:E11.5 组;2:E12.5 组;3:E13.5 组;4:E14.5 组;5:E15.5 组;6:E16.5 组;7:E17.5 组;8:E18.5 组;9:新生 0.5 d 组
a:$P<0.05$,与 E11.5 组比较

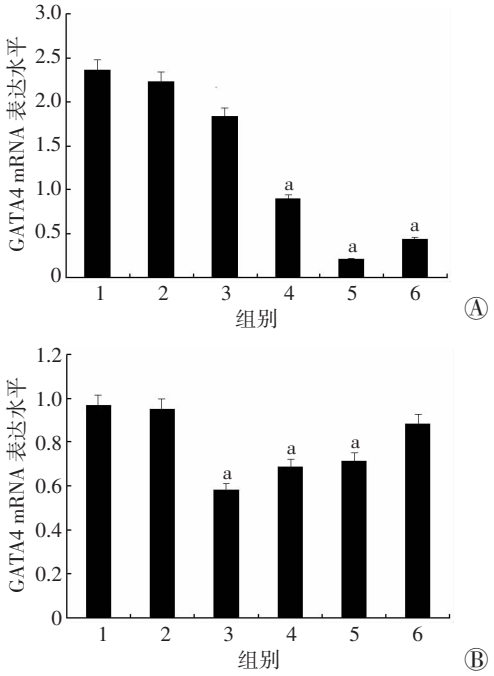
图 1 RT-PCR 检测小鼠胚胎心脏发育过程中 GATA4 mRNA 时序表达水平

2.2 胚胎心脏发育过程中 GATA4 启动子区组蛋白 H3K9ac 水平及与 CBP/P300 结合水平

CHIP-QPCR 结果显示,E14.5 组(1.168 0±0.073 4)GATA4 启动子区抗 H3K9ac 抗体的 CHIP 沉淀 DNA 量明显高于 E11.5 组[(0.813 6±0.018 9),$P<0.05$]。E14.5 组抗 P300(1.822 2±0.304 7)和抗 CBP 抗体(1.382 2±0.124 3)的 CHIP 沉淀 DNA 量明显高于 E11.5 组[分别为(0.978 7±0.036 9)、(0.879 4±0.171 6),$P<0.05$]。

2.3 CBP30 干预心肌祖细胞对 GATA4 表达的影响

经 RT-PCR 检测,不同浓度(0.5、1、2、4 μmol/L)CBP30 分别使心肌祖细胞 GATA4 表达量较正常对照组降低,且以 2 μmol/L 降低最明显($P<0.05$,图 2A)。2 μmol/L CBP30 干预心肌祖细胞 6、12、24、36 h 后,GATA4 表达量较正常对照组降低,且以 6 h 降低最明显($P<0.05$,图 2B)。



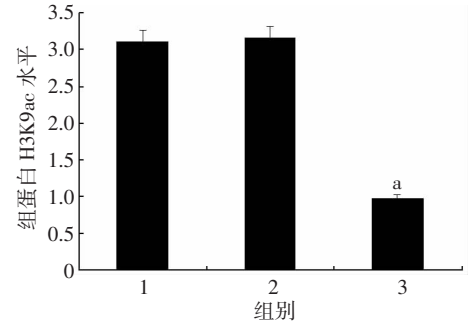
A:RT-PCR 检测不同浓度 CBP30 处理心肌祖细胞后 GATA4 表达水平 1:DMSO 组;2:正常对照组;3:0.5 μmol/L CBP30 组;4:1 μmol/L CBP30 组;5:2 μmol/L CBP30 组;6:4 μmol/L CBP30 组;B:RT-PCR 检测不同时间 CBP30 处理心肌祖细胞后 GATA4 表达水平 1:DMSO 组;2:正常对照组;3:6 h 组;4:12 h 组;5:24 h 组;6:36 h 组 a:$P<0.05$,与正常对照组比较

图 2 RT-PCR 检测 CBP30 处理心肌祖细胞后 GATA4 表达情况

2.4 CBP30 干预心肌祖细胞后 GATA4 启动子区组蛋白 H3K9ac 水平及与 CBP/P300 结合水平

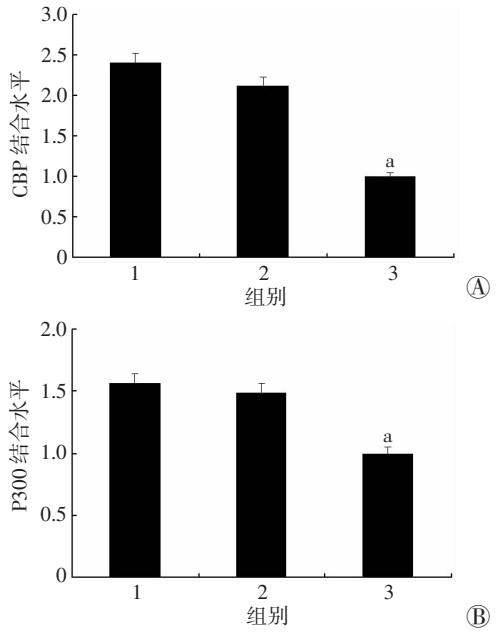
CHIP-QPCR 结果显示,CBP30 组 GATA4 启动子区抗 H3K9ac 抗体的 CHIP 沉淀 DNA 量明显低于正常

对照组($P<0.05$,图3)。CBP30组抗P300和抗CBP抗体的CHIP沉淀DNA量明显低于正常对照组($P<0.05$,图4)。



1:DMSO组;2:正常对照组;3:CBP30组 a:$P<0.05$,与正常对照组比较

图3 CHIP-QPCR检测心肌祖细胞中GATA4启动子区组蛋白H3K9ac水平



1:DMSO组;2:正常对照组;3:CBP30组 A:CHIP-QPCR检测GATA4启动子区与CBP结合水平;B:CHIP-QPCR检测GATA4启动子区与P300结合水平 a:$P<0.05$,与正常对照组比较

图4 CHIP-QPCR检测心肌祖细胞中GATA4启动子区与CBP/P300结合水平

3 讨论

先天性心脏病是人类最常见的出生缺陷性疾病,报道显示,全球每1 000个新生儿中,有10~12个患有先天性心脏病[6]。在众多的先天性心脏病患儿中,发生基因突变或染色体变异的仅占20%,其余80%患儿的基因与染色质无异常,提示表观遗传修饰在很大程度上影响着心脏发育[7]。研究表明,胚胎期间GATA4的缺失或突变均可引起心脏发育异常[8-9],而胚胎后期或生后GATA4失活,则可引起严重心功能缺陷,导致心衰发生[10]。本研究发现,GATA4表达量在胚胎心脏发育早期和中期随着心脏发育成熟而增加,在E14.5天达到峰值,文献[11]报道此时心脏正处于腔室特化和生长期,表明GATA4与心脏发育成熟密切相关。本研究还发现,随着GATA4在胎鼠心脏中表达量增加,GATA4启动子区组蛋白H3K9ac水平及与CBP/P300结合水平也随之升高,提示GATA4在胎鼠心脏中表达可能受到组蛋白H3K9和CBP/P300的调控。GATA4的正确时序表达及正常活性是心脏结构发育及功能维持的基础。表观遗传是调控基因时序表达的主要机制[12],但针对GATA4的具体表观遗传调控方式尚不清楚。

组蛋白乙酰化修饰由组蛋白乙酰化酶催化,可使染色质的空间结构变得疏松,利于基因表达。CBP/P300属于组蛋白乙酰化酶的两个亚型,广泛参与各种组蛋白的乙酰化修饰。如抑制P300的乙酰化酶活性可降低组蛋白H3乙酰化水平[13]。本课题组前期研究发现,用酒精干预孕鼠可提高胎鼠心肌细胞中组蛋白H3K9的整体乙酰化水平,促进GATA4表达,表明组蛋白H3K9的乙酰化修饰对GATA4的表达有调控作用,但其具体调控机制不清。本研究从介导组蛋白乙酰化修饰的CBP/P300入手,通过使用CBP/P300特异性抑制剂CBP30干预心肌祖细胞。CBP30可竞争性与CBP/P300的布罗莫结构域结合[14],阻碍CBP/P300与其辅助因子CREB结合形成转录复合物,从而抑制CBP/P300与基因启动子区结合。本研究发现,在CBP30干预组,伴随心肌祖细胞GATA4表达量的下降,GATA4启动子区的CBP/P300结合水平明显降低,表明CBP/P300在GATA4启动子区受到了抑制,而此时GATA4启动子区组蛋白H3K9乙酰化水平也有显著降低。上述结果表明CBP/P300可通过介导启动子区组蛋白H3K9乙酰化调控GATA4的表达。

本研究明确了GATA4在小鼠胚胎心脏发育过程中的时序表达趋势,从表观遗传学组蛋白乙酰化修饰的角度探讨了GATA4的调控机制,为GATA4异常表达导致的心脏发育障碍提供了新的治疗靶点。

参考文献:

[1] Kodo K, Yamagishi H. A decade of advances in the molecu-

lar embryology and genetics underlying congenital heart defects[J]. Circ J, 2011, 75(10): 2296 – 2304. DOI: 10.1253/circj.cj-11-0636

[2] Nemer M. Genetic insights into normal and abnormal heart development[J]. Cardiovasc Pathol, 2008, 17(1): 48 – 54. DOI: 10.1016/j.carpath.2007.06.005

[3] Pan B, Zhu J, Lv T, *et al*. Alcohol consumption during gestation causes histone3 lysine9 hyperacetylation and an alternation of expression of heart development-related genes in mice [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2014, 38(9): 2396 – 2402. DOI: 10.1111/acer.12518

[4] Sun H, Yang X, Zhu J, *et al*. Inhibition of p300-HAT results in a reduced histone acetylation and down-regulation of gene expression in cardiac myocytes[J]. Life Sci, 2010, 87(23/26): 707 – 714. DOI: 10.1016/j.lfs.2010.10.009

[5] Zhu G H, Huang J, Bi Y, *et al*. Activation of RXR and RAR signaling promotes myogenic differentiation of myoblastic C2C12 cells[J]. Differentiation, 2009, 78(4): 195 – 204. DOI: 10.1016/j.diff.2009.06.001

[6] Miranovic V. The incidence of congenital heart disease: previous findings and perspectives[J]. Srp Arh Celok Lek, 2014, 142(3/4): 243 – 248. DOI: 10.2298/sarh1404243m

[7] Blue G M, Kirk E P, Sholler G F, *et al*. Congenital heart disease: current knowledge about causes and inheritance [J]. Med J Aust, 2012, 197(3): 155 – 159. DOI: 10.5694/mja12.10811

[8] Jay P Y, Bielinska M, Erlich J M, *et al*. Impaired mesenchymal cell function in Gata4 mutant mice leads to diaphragmatic hernias and primary lung defects[J]. Dev Biol, 2007, 301(2): 602 – 614. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.09.050

[9] Watt A J, Battle M A, Li J, *et al*. GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(34): 12573 – 12578. DOI: 10.1073/pnas.0400752101

[10] Oka T, Maillet M, Watt A J, *et al*. Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability[J]. Circ Res, 2006, 98(6): 837 – 845. DOI: 10.1161/01.RES.0000215985.18538.c4

[11] Olson E N, Schneider M D. Sizing up the heart: development redux in disease[J]. Genes Dev, 2003, 17(16): 1937 – 1956. DOI: 10.1101/gad.1110103

[12] Zhou Y, Kim J, Yuan X, *et al*. Epigenetic modifications of stem cells: a paradigm for the control of cardiac progenitor cells[J]. Circ Res, 2011, 109(9): 1067 – 1081. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243709

[13] 孙慧超, 朱静, 吕铁伟, 等. 姜黄素对小鼠心脏发育相关基因表达的影响及其表观遗传调控机制[J]. 基础医学与临床, 2011, 31(9): 959 – 964.

[14] Hammitzsch A, Tallant C, Fedorov O, *et al*. CBP30, a selective CBP/p300 bromodomain inhibitor, suppresses human Th17 responses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(34): 10768 – 10773. DOI: 10.1073/pnas.1501956112

(**收稿**:2016-02-04;**修回**:2016-04-25)

(编辑 黄 超)