

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.13.001

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20230410.1430.002.html\(2023-04-10\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20230410.1430.002.html(2023-04-10))心肌祖细胞中 Tbx5 启动子区的组蛋白乙酰化调控机制研究^{*}孙慧超¹,周 薇²,吕铁伟¹,刘玲娟²,田 杰¹

(1. 重庆医科大学附属儿童医院心血管科/儿童发育疾病研究教育部重点实验室/国家儿童健康与疾病临床医学研究中心/儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地/儿科学重庆市重点实验室 400014;
2. 重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所 400014)

[摘要] **目的** 研究心肌祖细胞中 Tbx5 启动子区 p300 和 CBP 介导的组蛋白乙酰化修饰对 Tbx5 表达的调控及其修饰位点,探讨 Tbx5 的组蛋白乙酰化修饰调控网络。**方法** 体外培养胚胎心肌祖细胞,分为对照组、二甲基亚砜(DMSO)组和姜黄素组,对照组不给予额外干预,DMSO 组给予 DMSO 干预,姜黄素组给予 30 mmol/L 姜黄素干预。同时,采用慢病毒载体转染胚胎心肌细胞 48 h,分为对照组、GFP 组和 p300-RNAi 组,对照组不转染,GFP 组采用 GFP 慢病毒载体转染,p300-RNAi 组采用 p300-RNAi 慢病毒载体转染。Western blot 方法检测各组的组蛋白 H3 的乙酰化水平;实时荧光定量逆转录 PCR 检测各组 Tbx5 和 p300 mRNA 水平的表达;染色质免疫共沉淀(CHIP)-实时荧光定量逆转录 PCR 检测 Tbx5 启动子区组蛋白 H3 不同位点 H3K4、H3K9 和 H3K27 的乙酰化水平及 Tbx5 启动子结合的 p300 和 CBP 水平。**结果** 姜黄素组 Tbx5 mRNA 相对表达水平及 H3ac 水平较对照组和 DMSO 对照组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。p300-RNAi 组 p300 mRNA 相对表达水平、H3ac 水平较 GFP 组和对照组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);3 组 Tbx5 mRNA 相对表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 GFP 组和对照组比较,p300-RNAi 组 H3ac、H3K4ac、H3K27ac 水平降低,H3K9ac 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。p300、CBP 均与 Tbx5 启动子区域相结合。与 GFP 组和对照组比较,p300-RNAi 组 p300 结合水平降低,CBP 结合水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** Tbx5 启动子区组蛋白乙酰化修饰受 p300 和 CBP 的双重调控,p300-RNAi 介导的 H3K4 和 H3K27 低乙酰化对 Tbx5 表达的抑制作用,可被 CBP 介导的 H3K9 高乙酰化代偿,保证 Tbx5 的正确表达。

[关键词] Tbx5;组蛋白乙酰化;p300;CBP;心肌祖细胞**[中图分类号]** R329.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)13-1921-05Study of regulatory mechanism of histone acetylation in Tbx5 promoter region of cardiac progenitor cells^{*}SUN Huichao¹,ZHOU Wei²,LYU Tiewei¹,LIU Lingjuan²,TIAN Jie¹

(1. Department of Angiocardiopathy, Affiliated Children's Hospital of Chongqing Medical University/Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders/National Clinical Research Center for Child Health and Disorders/China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders/Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China; 2. Institute of Pediatrics, Affiliated Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

[Abstract] **Objective** To study the regulation of histone acetylation in Tbx5 promoter region mediated by p300 and CBP in cardiac progenitor cells and their modification sites, and to explore the histone acetylation regulatory network of Tbx5. **Methods** Embryonic myocardial progenitor cells were cultured in vitro and divided into the control group, DMSO group and curcumin group. The control group was not given the additional intervention. The DMSO group was given the DMSO intervention. The curcumin group was given 30 mmol/L curcumin intervention. At the same time, the lentiviral vector was adopted to transfect to embryo myocardial cells for 48 h. They were divided into the control group, GFP group and p300-RNAi group. The control group

^{*} **基金项目:**重庆市科技局面上项目(cstc2019jcyj-msxmX0866)。 **作者简介:**孙慧超(1982—),副教授,博士,主要从事儿童心脏发育及先天性心脏病表观遗传学机制研究。

had no transfection, the GFP group adopted the GFP lentiviral vector transfection, and the p300-RNAi group adopted the p300-RNAi lentiviral vector transfection. Western blot was used to detect the acetylation level of histone H3 in each group. The mRNA expression levels of Tbx5 and p300 were detected by RT-PCR. CHIP-RT-PCR was used to detect the acetylation levels of histone H3 different sites of H3K4, H3K9 and H3K27 in the Tbx5 promoter region and the levels of p300 and CBP combined with Tbx5 promoter region.

Results The Tbx5 mRNA relative expression level and H3ac level in the curcumin group were significantly reduced compared with the control group and DMSO group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The p300 mRNA relative expression level and H3ac level in the p300-RNAi group were significantly decreased compared with GFP group and control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The Tbx5 mRNA relative expression level had no statistical difference among the three groups ($P > 0.05$). Compared with the GFP group and control group, the H3ac, H3K4ac and H3K27ac levels in the p300-RNAi group were decreased, the H3K9ac level was increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). p300 and CBP were combined with the Tbx5 promoter region. Compared with the GFP group and control group, the p300 combination level in the p300-RNAi group was decreased, the CBP combination level was increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The histone acetylation modification in the Tbx5 promoter region is regulated by both p300 and CBP. The low acetylation of H3K4 and H3K27 mediated by p300-RNAi has the inhibiting effect on the Tbx5 expression, and could be compensated by CBP mediated H3K9 high acetylation for ensuring the Tbx5 correct expression.

[Key words] Tbx5; histone acetylation; p300; CBP; cardiac progenitor cell

Tbx5 基因位于人类染色体 12q24.1, 属于 T-box 转录因子家族, 是参与哺乳动物心脏发育的重要调控因子。目前研究已经证实, Tbx5 在胚胎心脏发育过程中呈动态表达, 正确的动态表达是胚胎心脏结构正常发育的基础, 而 Tbx5 低表达可导致心脏间隔缺损、传导障碍和前肢畸形(如 Holt-Oram 综合征), 高表达则可导致心室形成障碍^[1-3]。本课题组前期研究发现, 表观遗传修饰, 尤其是组蛋白乙酰化修饰, 在多个胚胎心脏发育相关转录因子的动态表达中具有重要作用, 且可能调控 Tbx5 的动态表达, 但具体调控机制尚不明确^[4-6]。本研究拟分别采用组蛋白乙酰化酶 p300/CBP 抑制剂姜黄素和 p300 RNA 干扰载体干预胚胎心肌细胞, 观察 Tbx5 的表达变化及启动子区组蛋白乙酰化修饰改变, 探讨胚胎心肌细胞中 Tbx5 的组蛋白乙酰化调控机制, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及 p300-RNAi 载体

胚胎心肌祖细胞 CP10 由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室提供, p300-RNAi 慢病毒载体由上海汉恒技术服务中心合成并提供。

1.1.2 主要试剂

姜黄素和二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司, RNA 提取试剂盒购自北京百泰克公司, 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, 染色质免疫共沉淀(CHIP)试剂盒、核染色质提取试剂盒、CHIP 级抗乙酰化 H3(H3ac)抗体、抗乙酰化 H3K4(H3K4ac)抗体、抗乙酰化 H3K9(H3K9ac)抗体、抗乙酰化 H3K27(H3K27ac)抗体、抗

PCAF 抗体、抗 CBP 抗体均购自英国 Abcam 公司, CHIP 级抗 p300 抗体购自美国 Millipore 公司, 胎牛血清、DMEM-F12 细胞培养基购自美国 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及干预

复苏胚胎心肌祖细胞, 用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素的 DMEM/F12 培养基, CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中 37 °C 恒温培养, 分为对照组、DMSO 组和姜黄素组, 对照组不给予额外干预, DMSO 组给予 DMSO 干预, 姜黄素组给予 30 mmol/L 姜黄素干预, 24 h 后收集细胞并用蛋白印迹法(Western blot)检测 H3ac 表达情况。同时, 采用慢病毒载体转染胚胎心肌细胞 48 h, 分为对照组、GFP 组和 p300-RNAi 组, 对照组不转染, GFP 组采用 GFP 慢病毒载体转染, p300-RNAi 组采用 p300-RNAi 慢病毒载体转染。

1.2.2 蛋白提取及 Western blot

在上述时间点分别收集各组细胞, 提取蛋白, 以 40 μg 上样量进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 分离蛋白后再将蛋白电转到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 封闭后分别加入抗 H3ac 和内参抗 β-actin 一抗及二抗孵育, 显影后得到目的蛋白条带, 检测 H3ac 表达情况, 采用 Image Lab 软件进行分析。

1.2.3 CHIP

胚胎心肌祖细胞中加入 1% 浓度的甲醛进行交联后收集细胞, 用超声破碎仪切割细胞 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, 分别用 CHIP 级抗 H3ac 抗体、抗 H3K4ac 抗体、抗 H3K9ac 抗体、抗 H3K27ac 抗体、抗 p300 抗

体、抗 CBP 抗体进行 CHIP,检测 Tbx5 启动子区组蛋白 H3 总乙酰化水平及 H3K4、H3K9、H3K27 这 3 个位点的乙酰化水平,以及 Tbx5 启动子区域 p300 和 CBP 结合水平,然后分离并纯化 DNA 用于实时荧光定量逆转录 PCR 检测。

1.2.4 RNA 提取及实时荧光定量逆转录 PCR

按照 RNA 提取试剂盒说明书,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,并将 RNA 逆转录为 cDNA 后用于实时荧光定量逆转录 PCR 检测。以 GAPDH 为内参,分别使用上述 RNA 逆转录产物 cDNA 和 CHIP 产物纯化 DNA 进行实时荧光定量逆转录 PCR,检测 Tbx5 mRNA、p300 mRNA 相对表达水平,引物序列见表 1。PCR 反应条件:95 ℃ 2 min 预变性,95 ℃ 10 s 变性,60 ℃ 30 s 退火,共 40 个循环,所得数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

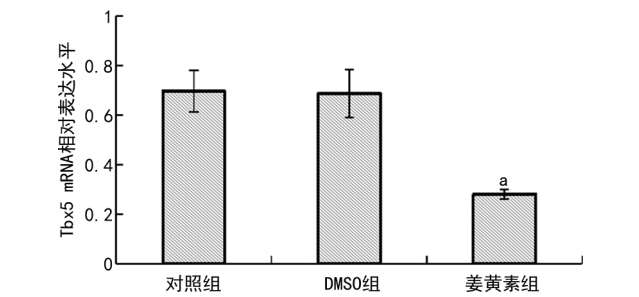
2 结 果

2.1 姜黄素对 Tbx5 表达及其启动子区组蛋白乙酰化修饰的影响

姜黄素组 Tbx5 mRNA 相对表达水平及 H3ac 水平较对照组和 DMSO 组明显降低,差异有统计学意

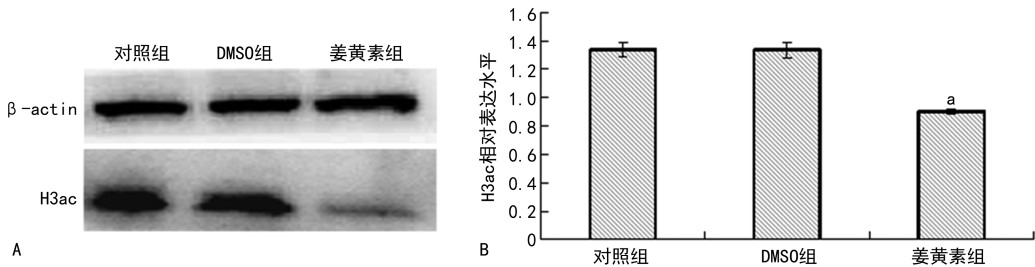
义($P<0.05$),见图 1、2。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列	
基因名	引物序列
Tbx5	正向:5'-CCAAAGACAGGTCTTGCGATTCG-3'
	反向:5'-TTCTCCTCCCTGCCTTGGTGAT-3'
Tbx5 启动子区	正向:5'-TCTAAGCCGTCTTGAGCCCGACA-3'
	反向:5'-AGAGCCTCCACGCGACTGCCAC-3'
p300	正向:5'-GCCCTGGATTAAGTTTGA-3'
	反向:5'-TGAGTAGGACCCTGATTTG-3'
GAPDH	正向:5'-GGCATCTTGGGCTACAC-3'
	反向:5'-TACCAGAAATGAGCTTGA-3'



^a: $P<0.05$,与对照组和 DMSO 组比较。

图 1 胚胎心肌祖细胞 Tbx5 mRNA 相对表达水平



A:Western blot 检测 3 组胚胎心肌祖细胞 H3ac 表达情况;B:H3ac 水平柱状图;^a: $P<0.05$,与对照组和 DMSO 组比较。

图 2 胚胎心肌祖细胞 H3ac 表达水平

2.2 p300-RNAi 对 Tbx5 表达及其启动子区组蛋白乙酰化修饰的影响

p300-RNAi 组 p300 mRNA 相对表达水平、H3ac 水平较 GFP 组和对照组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);3 组 Tbx5 mRNA 相对表达水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3、4。

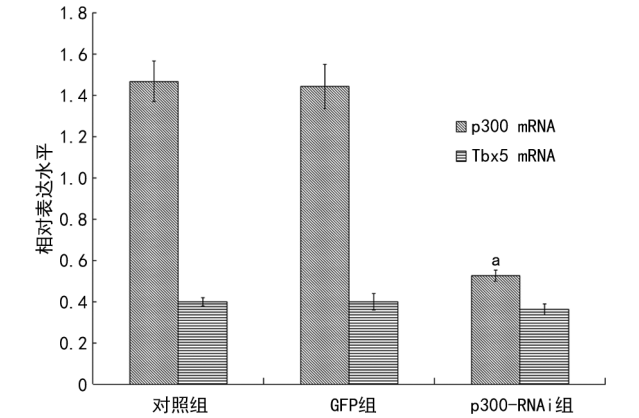
2.3 Tbx5 启动子区 H3 不同位点乙酰化水平比较

与 GFP 组 and 对照组比较,p300-RNAi 组 H3ac、H3K4ac、H3K27ac 水平降低,H3K9ac 水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 5。

2.4 参与调控 Tbx5 启动子区组蛋白乙酰化修饰的组蛋白乙酰化酶亚型分析

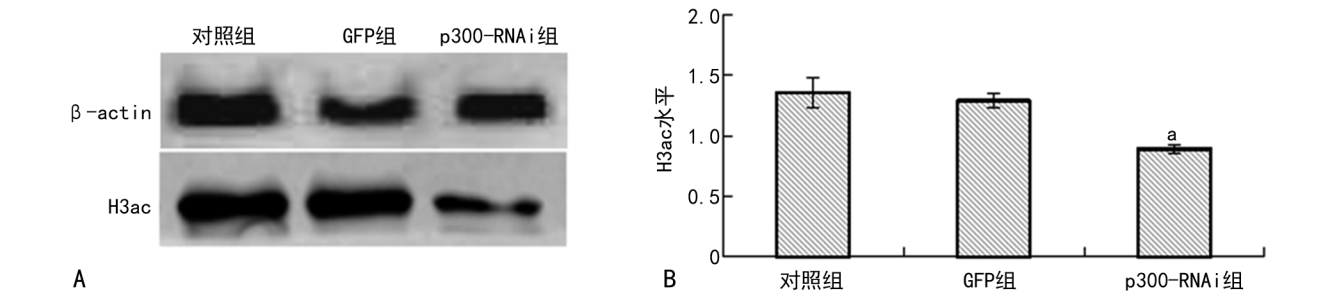
p300、CBP 均与 Tbx5 启动子区域相结合。与 GFP 组和对照组比较,p300-RNAi 组 p300 结合水平降低,CBP 结合水平升高,差异有统计学意义($P<$

0.05),见图 6。



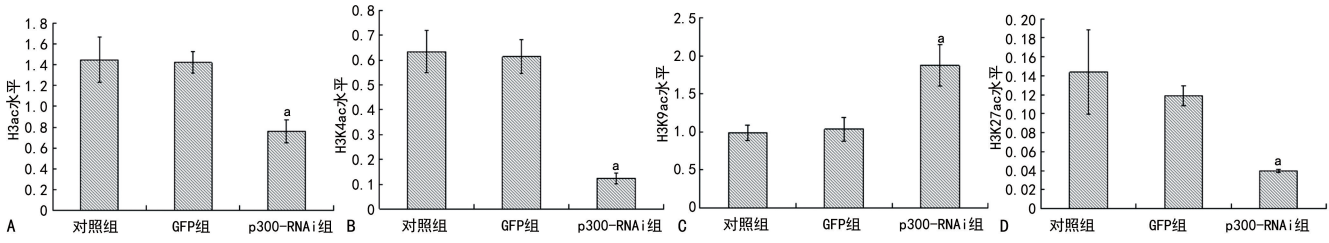
^a: $P<0.05$,与对照组和 GFP 组比较。

图 3 慢病毒载体转染后 p300 mRNA 及 Tbx5 mRNA 相对表达水平



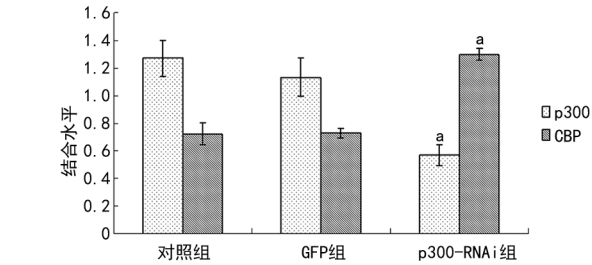
A: Western blot 检测 3 组慢病毒载体转染后 H3ac 表达情况; B: H3ac 水平柱状图; ^a: $P < 0.05$, 与对照组和 GFP 组比较。

图 4 慢病毒载体转染后 H3ac 水平变化



A: H3 总乙酰化水平; B: H3K4 位点乙酰化水平; C: H3K9 位点乙酰化水平; D: H3K27 位点乙酰化水平; ^a: $P < 0.05$, 与对照组和 GFP 组比较。

图 5 慢病毒载体转染后 3 组 H3 不同位点乙酰化水平比较



^a: $P < 0.05$, 与对照组和 GFP 组比较。

图 6 慢病毒载体转染后 Tbx5 启动子区 p300 和 CBP 结合水平比较

3 讨 论

表观遗传调控指不改变基因序列的情况下改变基因表达水平,是调控基因在不同时空呈动态表达的重要方式,目前研究较多的表观遗传修饰方式主要有组蛋白修饰、DNA 甲基化和非编码 RNA^[4-5]。组蛋白乙酰化修饰是一种重要的表观遗传修饰方式,由组蛋白乙酰化酶和组蛋白去乙酰化酶共同介导,其中 p300 和 CBP 是目前研究较多的组蛋白乙酰化酶亚型,二者结构非常同源,故通称为 p300/CBP^[6-8]。本课题组前期研究发现,p300/CBP 介导的组蛋白乙酰化修饰在胚胎心脏发育过程中具有重要调控作用,可以调控 GATA4、Nkx2.5、Mef2c 等多种转录因子的动态表达,p300-RNAi 介导的组蛋白低乙酰化水平可以降低 GATA4、Nkx2.5、Mef2c 的表达水平,导致胚胎心脏发育异常^[9-11]。

Tbx5 作为 T-box 转录因子家族中的一员,可以与 Mef2c、Nkx2.5 等转录因子相互作用,共同调节胚胎心脏发育的基因网络。研究发现,胚胎小鼠 Tbx5

基因缺失可引起严重心脏畸形而导致死胎,Tbx5 基因突变可引起 Holt-Oram 综合征,包括房室间隔缺损、心脏传导障碍等,而 Tbx5 单倍体剂量不足,也会引起先天性心脏病的发生^[1-2,12-14]。另有研究发现,Tbx5 还在出生后的心脏电生理中具有重要调控作用,Tbx5 表达异常与心房颤动、房室传导阻滞、QRS 增宽有关,且与心力衰竭患者发生心律失常和心源性猝死有关^[15]。

Tbx5 在胚胎心脏发育及心血管疾病中的重要作用已得到公认,其复杂的时间和空间表达贯穿整个胚胎心脏发育过程中。本课题组前期研究发现,胎鼠发育期间组蛋白乙酰化失衡可以引起 Tbx5 表达异常,而国外亦有报道,组蛋白去乙酰化酶 HDAC4 和 HDAC5 可以抑制 Tbx5 的表达,这些结果提示组蛋白乙酰化修饰参与调控 Tbx5 的表达^[9,16-17],但其具体调控机制仍不清楚。本研究首先利用组蛋白乙酰化酶 p300/CBP 抑制剂姜黄素干预心肌细胞^[18-19],结果发现心肌细胞组蛋白 H3 乙酰化水平降低,同时,Tbx5 表达水平下降,提示 Tbx5 的表达受组蛋白 H3 的乙酰化修饰调控。

为了进一步研究调控 Tbx5 表达的具体组蛋白乙酰化酶亚型及修饰位点,本课题组用 p300-RNAi 水平干扰载体干预心肌细胞,特异性抑制 p300 表达后研究 Tbx5 的表达和组蛋白乙酰化修饰改变。结果发现,p300-RNAi 干扰后胚胎心肌细胞中组蛋白 H3 的总乙酰化水平、Tbx5 启动子区 H3ac、H3K4ac、H3K27ac 水平均有降低,但 H3K9ac 水平升高,Tbx5 的表达水平无明显变化。提示 p300 可以影响 Tbx5

启动子区组蛋白乙酰化修饰,参与调控 Tbx5 的表达,但不是唯一调控因素,可能有其他组蛋白乙酰化酶亚型共同调控。考虑 p300 和 CBP 的同源性,分别利用 p300 和 CBP 抗体对心肌细胞进行 CHIP 检测,结果发现 p300-RNAi 干扰后 Tbx5 启动子区域 p300 的结合水平明显降低,但 CBP 的结合水平较对照有明显升高,证实了 p300 和 CBP 共同参与组蛋白乙酰化修饰对 Tbx5 表达的调控,当 p300 表达降低时 CBP 与 Tbx5 启动子区的结合可以代偿性增加,保证 Tbx5 的正常表达,但 p300 和 CBP 在 Tbx5 启动子区的修饰位点不同,p300-RNAi 干扰后主要是 H3K4 和 H3K27 位点的乙酰化水平降低,CBP 的代偿作用主要是让 H3K9 的乙酰化水平升高。

综上所述,Tbx5 表达受组蛋白 H3 的乙酰化修饰调控,但不是由单一乙酰化酶介导的,而是受 p300 和 CBP 的双重调控,p300-RNAi 干扰导致的组蛋白 H3K4、H3K27 低乙酰化对 Tbx5 表达的抑制作用可以由 CBP 介导的 H3K9 高乙酰化代偿,这种双重调控可能也是保证胚胎心脏正常发育的重要基础。但组蛋白乙酰化修饰是一个非常复杂的调控网络,除了 p300 和 CBP 外,越来越多的组蛋白乙酰化酶已经被发现;由于组蛋白去乙酰化酶异常也会破坏正常的组蛋白乙酰化修饰水平,每个基因可能会受到多种修饰方式的共同调节,相关方面还需要更多的研究。

参考文献

- [1] STEIMLE J D, MOSKOWITZ I P. TBX5: a key regulator of heart development[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2017, 122: 195-221.
- [2] XU H, XIANG M, QIN Y, et al. Tbx5 inhibits hedgehog signaling in determination of digit identity[J]. *Hum Mol Genet*, 2020, 29(9): 1405-1416.
- [3] ZHU T, QIAO L, WANG Q, et al. T-box family of transcription factor-TBX5, insights in development and disease[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(2): 442-453.
- [4] ZHANG L, LU Q, CHANG C. Epigenetics in health and disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1253: 3-55.
- [5] PEIXOTO P, CARTRON P F, SERANDOUR A A, et al. From 1957 to nowadays: a brief history of epigenetics[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7571.
- [6] SHEN Y, WEI W, ZHOU D X. Histone acetylation enzymes coordinate metabolism and gene expression[J]. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(10): 614-621.
- [7] XIA C, TAO Y, LI M, et al. Protein acetylation and deacetylation: an important regulatory modification in gene transcription (review)[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(4): 2923-2940.
- [8] DUTTA R, TIU B, SAKAMOTO K M. CBP/p300 acetyltransferase activity in hematologic malignancies[J]. *Mol Genet Metab*, 2016, 119(1): 37-43.
- [9] ZHOU W, JIANG D, TIAN J, et al. Acetylation of H3K4, H3K9, and H3K27 mediated by p300 regulates the expression of GATA4 in cardiocytes[J]. *Genes Dis*, 2019, 6: 318-325.
- [10] 蒋大贵, 刘玲娟, 吕铁伟, 等. CBP/P300 介导的组蛋白 H3K9 乙酰化修饰对 GATA4 表达的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2016, 38(18): 2018-2022.
- [11] SUN H, ZHU J, LU T, et al. Curcumin-mediated cardiac defects in mouse is associated with a reduced histone H3 acetylation and reduced expression of cardiac transcription factors[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2014, 14(2): 162-169.
- [12] KATHIRIYA I S, RAO K S, IACONO G, et al. Modeling human TBX5 haploinsufficiency predicts regulatory networks for congenital heart disease[J]. *Dev Cell*, 2021, 56(3): 292-309.
- [13] VARELA D, VARELA T, CONCEIÇÃO N, et al. Functional analysis of two novel TBX5 variants present in individuals with Holt-Oram syndrome with different clinical manifestations[J]. *Mol Genet Genomics*, 2021, 296(4): 809-821.
- [14] MAHFUZ A M U B, KHAN M A, DEB P, et al. Identification of deleterious single nucleotide polymorphism (SNP) s in the human TBX5 gene & prediction of their structural & functional consequences: an in silico approach[J]. *Biochem Biophys Rep*, 2021, 28: 101179.
- [15] RATHJENS F S, BLENKLE A, IYER L M, et al. Preclinical evidence for the therapeutic value of TBX5 normalization in arrhythmia control[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(8): 1908-1922.
- [16] GHOSH T K, APARICIO-SÁ-(下转第 1931 页)