

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00744

组蛋白乙酰化转移酶亚型类固醇受体共激活因子1在发育心脏的时空表达

陈国珍¹, 田杰^{1*}, 朱静², 吕铁伟¹, 孙慧超¹, 杨雪芳¹

- 1. 重庆医科大学附属儿童医院心脏内科, 重庆 400014
- 2. 重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所, 重庆 400014

[摘要] **目的** 研究组蛋白乙酰化转移酶亚型类固醇受体共激活因子1(SRC1)在小鼠心脏中的时空表达规律,初步探讨其与心脏发生发育的关系。**方法** 取胎龄 E7.5~18、出生 1 d 和 3 个月成年小鼠正常心脏,每个时间点选 9 个标本,采用免疫组织化学 SP 法观察 SRC1 蛋白在不同发育阶段心脏的空间表达;每个时间点选 6 组标本,利用蛋白质印迹分析技术检测其在小鼠心脏发育过程中时序性表达变化。**结果** 免疫组织化学结果显示, SRC1 蛋白在 E7.5 胚胎心脏原基中不表达; E8.5~E9.5 心管中微弱表达; E10.5 后心脏发育各时期,小梁弱表达,心脏其他区域均有较强而广泛表达。蛋白质印迹分析结果显示, E10.5 以后的心脏发育阶段, SRC1 蛋白在 E10.5 较低表达,与 E11.5、E12.5 相比表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$),与其他发育时间点相比表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); E11.5~E12.5 达到表达高峰,此两个发育时间点相比表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),与其他发育时间点相比表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$);此后表达下降并持续低表达至成年鼠期,此阶段表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** SRC1 蛋白广泛表达于 E8.5 后的发育心脏,并呈时空动态变化,提示其参与了心脏发育的整体调控,可能与心脏间隔早期的诱导形成关系更为密切。

[关键词] 组蛋白酰基转移酶;类固醇受体共激活因子1;心脏;发育

[中图分类号] R 321.54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)07-0744-04

Spatiotemporal expression patterns of histone acetyltransferase steroid receptor coactivator-1 in developing mouse heart

CHEN Guo-zhen¹, TIAN Jie^{1*}, ZHU Jing², LÜ Tie-wei¹, SUN Hui-chao¹, YANG Xue-fang¹

- 1. Department of Cardiology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China
- 2. Pediatric Institute, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

[Abstract] **Objective** To study the spatiotemporal expression pattern of histone acetyltransferase steroid receptor coactivator-1 (SRC1) in developing mouse heart, so as to explore the relationship of SRC1 with heart development. **Methods** The normal mouse hearts were collected at E7.5~E18 and 1 day and 3 months after birth; 9 specimens were chosen for each time point to observe the spatial expression of SRC1 by immunohistochemistry technique, and 6 specimens of each time point were used to examine the temporal expression of SRC1 protein by Western blotting technique and to plot the time-dose curve. **Results** Immunohistochemistry showed no expression of SRC1 in the heart primordium at E7.5; only very weak SRC1 expression was found in the cardiac tube at E8.5~E9.5. Weak SRC1 expression was found in the trabeculae after E10.5 and relatively strong and widespread expression was found in other heart regions. Western blotting results demonstrated that SRC1 protein expression at E10.5 was significantly lower than those at E11.5 and E12.5 ($P < 0.05$), and was not significantly different with those of other time points after E10.5 ($P > 0.05$). SRC1 expression reached the peak at E11.5~E12.5, and there was no significant difference between the two time points ($P > 0.05$). SRC1 expression gradually decreased after E11.5~E12.5 till the adulthood, and there were no significant differences in the expression after E13.5 ($P > 0.05$). **Conclusion** Widespread distribution of SRC1 is present in the developing mouse heart after E8.5, and the expression is in a dynamical spatiotemporal pattern, suggesting that SRC1 may take part in the overall regulation of the heart development, and it might has a closer relationship with the early induction of the heart septa.

[Key words] histone acetyltransferases; steroid receptor coactivator-1; heart; development

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(7):744-747]

[收稿日期] 2009-12-21 **[接受日期]** 2010-04-14

[基金项目] 国家自然科学基金(30770889),高等学校博士学科点专项科研基金(20060631004). Supported by National Natural Science Foundation of China (30770889) and Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China(20060631004).

[作者简介] 陈国珍, 博士生. E-mail: chenguozen7954@yahoo.com.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 023-68486767, E-mail: jietian@cqmu.edu.cn

心脏发育复杂而精密,涉及相关基因在不同时间和空间上的顺序表达及众多转录因子和转录辅助因子的调控^[1]。转录辅助因子包括转录激活因子和转录抑制因子。大部分组蛋白乙酰化转移酶(histone acetyltransferases, HATs)同时也是转录激活因子,参与了心脏发育的调控,并且研究证实 HATs 引起的组蛋白乙酰化修饰是心脏发育的关键“调控环节”^[2]。目前,已鉴定的 HATs 有六大类^[3],类固醇受体共激活因子1(steroid receptor coactivator-1, SRC1)是其中重要的一个亚型^[4],其在心脏发育过程中的表达规律及相关功能,尚未见报道。本研究详细检测了 SRC1 蛋白在发育心脏中的时空表达规律,为探讨 SRC1 在正常和异常心脏发育过程中的作用及调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 胎龄计算及标本制备 成年健康昆明小鼠,雌性:6周龄,体质量 28~32 g;雄性:8周龄,体质量 38~40 g,清洁级,由重庆医科大学实验动物中心提供[实验动物生产许可证号:SCXK(渝)2009-0001,使用许可证号:SYXK(渝)2009-0005]。按雌雄 2:1 比例合笼,次晨检查阴栓,以观察到阴栓脱落的最早时间计为胎龄 0.5 d,即 E0.5。孕鼠分笼饲养,分别于孕期 7.5~18 d 处死孕鼠,每日龄选不同窝别 9 只胎鼠, E7.5~E9.5 全胚固定, E10.5~E18 全心脏固定。取不同窝别生后 1 d 仔鼠、3 个月小鼠各 9 只,脱颈处死后立即取全心脏固定。标本于 10% 中性甲醛溶液固定 3~48 h,常规石蜡包埋切片,厚 7 μ m,用于免疫组织化学检测。取 E10.5~E18 胎鼠心脏、生后 1 d 仔鼠和成年鼠新鲜心脏,提取核蛋白,用于蛋白质印迹分析。

1.2 主要试剂及仪器 SRC1 兔多克隆抗体(Abcam 公司,货号 ab2859);GAPDH 兔多克隆抗体(Abcam 公司,货号 ab9485);HRP 标记山羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);免疫组织化学试剂盒(上海晶美生物技术有限公司,货号 LHK612);蛋白提取试剂盒(Activemotif 公司,货号 40010);荧光显微镜(Nikon 公司);凝胶自动成像分析仪(Bio-Rad 公司)。

1.3 免疫组织化学染色 参照免疫组织化学 SP 法试剂盒说明书并改良,各步骤间用 PBS 漂洗 5 min \times 3,主要步骤为:3% H_2O_2 -甲醇室温孵育 10 min;枸橼酸盐缓冲液微波修复煮沸 3 次,每次间隔 8 min,室温冷却 20 min;0.3% Triton X-100 室温浸泡 10 min;10% 正常山羊血清室温孵育 10 min;一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜(SRC1,1:300);生物素化二抗 37 $^{\circ}$ C 温育

30 min;HRP 标记链霉亲和素 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min;DAB 显色液,镜下控制显色;蒸馏水终止反应,苏木精复染核,常规脱水透明,封片,光镜下观察摄片。PBS 代替一抗作阴性对照。结果判定:阳性颗粒定位于细胞核,呈棕黄色,复染阳性表达细胞核为蓝黑色,复染阴性表达细胞核为淡蓝色。

1.4 蛋白质印迹分析检测 SRC1 蛋白表达 选择与 1.1 项相同的时间点,每个时间点采集 6 组心脏标本。采集的心脏标本置预冷的 PBS 中洗涤,去 PBS 后严格按试剂盒说明书提取心脏组织核蛋白,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。每个样品取 20 μ l 蛋白加入 5 μ l 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 一起煮沸 5 min,定性 SDS-PAGE 后移至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭 1 h,PVDF 膜分别与 SRC1(1:1 000)和管家基因 GAPDH(1:1 000)抗体孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 漂洗后与 HRP 标记二抗(1:5 000)室温下孵育 2 h,TBST 漂洗后 ECL 反应 2 min,Bio-RAD 图像分析仪进行图像扫描并用 Quantity One 分析软件对扫描结果进行灰度值测定,SRC1 与 GAPDH 灰度值之比表示 SRC1 蛋白校正后的相对表达量。

1.5 统计学处理 全部数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 9.0 软件进行统计学分析。对蛋白质印迹分析结果,用重复测量设计资料的方差分析进行各组内数据比较。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色结果 SRC1 在 E7.5 胚胎心脏原基中不表达(图 1A),在 E8.5~E9.5 的心管中微弱表达(图 1B、1C);E10.5 后心脏发育各个阶段,小梁弱表达,心脏其他区域均较强而广泛表达(图 1D~1J);阴性对照切片中无棕黄色颗粒,只有均一的浅黄色背景染色(图 1K),复染细胞核为淡蓝色(图 1L)。

2.2 蛋白质印迹分析结果 E10.5 以后的发育阶段,心脏组织中 SRC1 蛋白表达水平呈现动态变化(图 2):SRC1 蛋白在 E10.5 较低表达,与 E11.5、E12.5 相比表达差异有统计学意义($P < 0.05$),与其他发育时间点相比,表达差异无统计学意义($P > 0.05$);E11.5~E12.5 达到表达高峰,此两个发育时间点相比,表达差异无统计学意义($P > 0.05$),与其他发育时间点相比,表达差异有统计学意义($P < 0.05$);此后表达下降并持续低表达至成年鼠期,此阶段表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

研究心脏发育过程中关键调控因子的时空表达规律及功能特点对阐明正常和异常心脏形态发生的

分子机制非常必要。近年来,报道了几种 HATs 亚型对心脏发育的调控至关重要^[5-7]。SRC1 作为 HATs 的一个重要亚型,最初被鉴定为能够提高核内类固醇激素受体转录活性的辅助因子^[8],参与多种基因转录调节,后来发现 SRC1 主要通过影响器官对激素的反应性而调控胚胎发育。缺失 SRC1 蛋白的小鼠可正常成长生育,但表现出类固醇激素抵

抗^[9]。敲除 SRC1 基因的小鼠可顺利出生,并只表现出明显的甲状腺素抵抗^[10]。2008 年, Mödder 等^[11]还报道 SRC1 基因敲除雌鼠表现出骨骼对雌激素反应能力的下降。Nishihara 等^[12]研究发现 SRC1 对体外培养的神经干细胞向神经细胞转化具有重要作用。但 SRC1 在心脏发育中的表达及功能研究报道甚少。

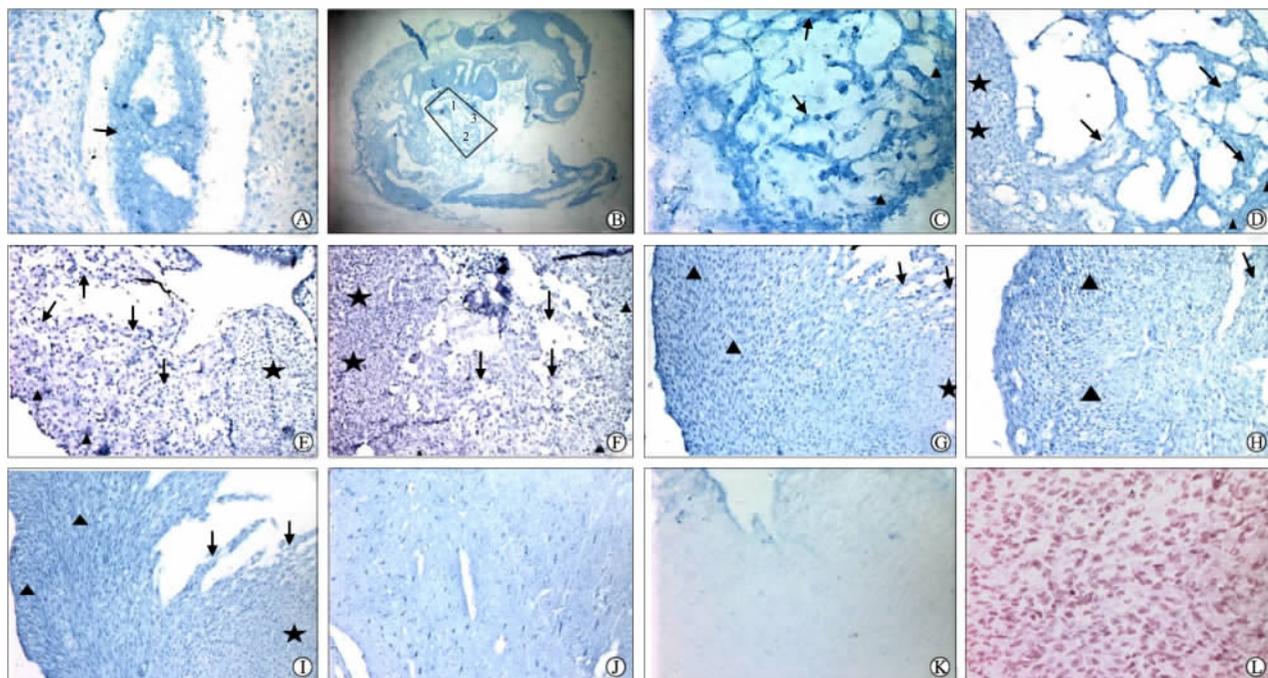


图 1 SRC1 在不同发育阶段心脏的表达

Fig 1 Immunohistochemical examination of SRC1 expression in developing hearts (SP)

A; Embryo at E7.5. Arrowhead indicates cardiac crescent, showing no expression of SRC1; B; Embryo at E9.5. □ indicates looping cardiac tube(1:outflow tract; 2:ventricle; 3:atrium); C; Cardiac tube at E9.5, weakly positive expression of SRC1. ▲ indicate myocardium and epicardium; arrowheads indicate endocardium primordium; D; Embryo heart at E10.5, weak expression of SRC1 in the trabeculae (indicated by arrowhead), relatively strong expression of SRC1 in the myocardium of ventricle (indicated by ▲) and muscular interventricular septum primordium(indicated by ★); E; Embryo heart at E11.5, weak expression of SRC1 in the trabeculae (indicated by arrowheads), relatively strong expression of SRC1 in myocardium of ventricle (indicated by ▲) and muscular interventricular septum primordium(indicated by ★); F; Embryo heart at E12.5, weak expression of SRC1 in the trabeculae (indicated by arrowheads), relatively strong expression of SRC1 in the myocardium of ventricle (indicated by ▲) and muscular interventricular septum(indicated by ★); G; Embryo heart at E15.5, weak expression of SRC1 in the trabeculae (indicated by arrowhead), relatively strong expression of SRC1 in the myocardium of ventricle (indicated by ▲) and muscular interventricular septum(indicated by ★); H; Embryo heart at E16.5, weak expression of SRC1 in the trabeculae (indicated by arrowhead), relatively strong expression of SRC1 in myocardium of ventricle (indicated by ▲); I; Embryo heart at E18, weak expression of SRC1 in the trabeculae (indicated by arrowheads),relatively strong expression of SRC1 in myocardium of ventricle (indicated by ▲) and muscular interventricular septum(indicated by ★); J; Ventricular wall of adult mouse, weak expression of SRC1 in the myocardium of ventricle; K; Negative control, uniform buff in background; L; Negative control and re-stained nucleus by hematoxylin, light blue granulo-nucleus. Original magnification: × 100(B), × 200(A), × 400(C-L)

为了阐明 SRC1 对心脏发育的影响,本研究首先检测了该蛋白在心脏发育过程中的时空表达规律,发现 SRC1 广泛表达于 E8.5 后的心脏,与以往研究报道一致^[13]。本研究还进一步观察到 SRC1 在 E8.5~E9.5 心管中微弱表达,E10.5 后心脏发育各个阶段,小梁弱表达,心脏其他区域均较强表达。且

SRC1 蛋白在 E11.5~E12.5 出现表达高峰,该时期是心脏间隔形成早期,这提示其参与了心脏发育整个过程的调控,可能与心脏间隔早期的诱导形成关系更为密切。SRC1 极有可能通过调控心脏特异性发育基因或调节激素对心脏的反应性而发挥作用,那么进一步研究其在心脏发育过程中的具体调控功

能及其在心脏的表达异常对心脏发育的影响,具有重要的科学意义。

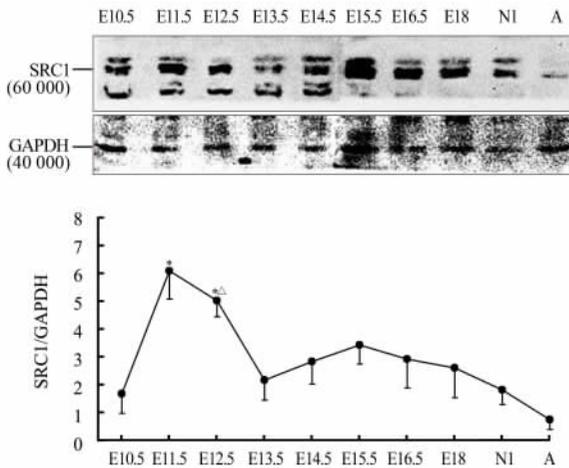


图2 E10.5到成年鼠期小鼠发育心脏组织中SRC1蛋白表达

Fig 2 Expression of SRC1 protein

in mouse developmental heart from E10.5 to adult

NI; 1 d neonate mouse heart; A; Adult mouse heart. * $P < 0.05$ vs E10.5; $\Delta P < 0.05$ vs E13.5; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

有研究表明 SRC1 与其他 HATs 亚型 p300、CBP(CREB binding protein) 及 PCAF(p300/CREB binding protein-associated factor) 存在相互作用^[4,14], 在本课题组前期研究中, 报道了 HATs 亚型 p300、CBP、GCN5 和 PCAF 在小鼠心脏发育过程中有不同时空表达规律^[15-16]。可见, 心脏发育过程中有多个 HATs 亚型共同表达, 它们也必将共同发挥作用。研究不同 HATs 亚型在心脏发育中的个体和相互作用, 阐明心脏发育过程中多基因时序表达的染色质重塑调控模式, 这将是当前国内外热点重大课题“心脏发育及先心病发生表观遗传调控”的首要目标和前沿方向。

[参考文献]

[1] Mitchell M E, Sander T L, Klinkner D B, Tomita-Mitchell A. The molecular basis of congenital heart disease[J]. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 19: 228-237.

[2] Nagy Z, Tora L. Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation[J]. *Oncogene*, 2007, 26: 5341-5357.

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

[4] Spencer T E, Jenster G, Burcin M M, Allis C D, Zhou J, Mizzen C A, et al. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase[J]. *Nature*, 1997, 389: 194-198.

[5] Yao T P, Oh S P, Fuchs M, Zhou N D, Chng L E, Newsome D, et al. Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300[J]. *Cell*, 1998, 93: 361-372.

[6] Bu P, Evrard Y A, Lozano G, Dent S Y. Loss of Gen5 acetyltransferase activity leads to neural tube closure defects and exencephaly in mouse embryos[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 3405-3416.

[7] Shikama N, Lutz W, Kretzschmar R, Sauter N, Roth J F, Marino S, et al. Essential function of p300 acetyltransferase activity in heart, lung and small intestine formation[J]. *EMBO J*, 2003, 22: 5175-5185.

[8] Onate S A, Tsai S Y, Tsai M J, O'Malley B W. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily[J]. *Science*, 1995, 270: 1354-1357.

[9] Xu J, Li Q. Review of the *in vivo* functions of the p160 steroid receptor coactivator family[J]. *Mol Endocrinol*, 2003, 17: 1681-1692.

[10] Weiss R E, Xu J, Ning G, Pohlenz J, O'Malley B W, Refetoff S. Mice deficient in the steroid receptor co-activator-1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone[J]. *EMBO J*, 1999, 18: 1900-1904.

[11] Mödder U I, Sanyal A, Xu J, O'Malley B W, Spelsberg T C, Khosla S. The skeletal response to estrogen is impaired in female but not in male steroid receptor coactivator (SRC)-1 knock out mice[J]. *Bone*, 2008, 42: 414-421.

[12] Nishihara E, O'Malley B W, Xu J. Nuclear receptor coregulators are new players in nervous system development and function [J]. *Mol Neurobiol*, 2004, 30: 307-325.

[13] Misiti S, Koibuchi N, Bei M, Farsetti A, Chin W W. Expression of steroid receptor coactivator-1 mRNA in the developing mouse embryo: a possible role in olfactory epithelium development[J]. *Endocrinology*, 1999, 140: 1957-1960.

[14] Waters L, Yue B, Veverka V, Renshaw P, Bramham J, Matsuda S, et al. Structural diversity in p160/CREB-binding protein coactivator complexes[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 14787-14795.

[15] Chen G, Zhu J, Lv T, Wu G, Sun H, Huang X, et al. Spatiotemporal expression of histone acetyltransferases, p300 and CBP, in developing embryonic hearts[J]. *J Biomed Sci*, 2009, 16: 24.

[16] 陈国珍, 田杰, 朱静, 吴晓云, 吴刚, 孙慧超. 小鼠心脏发育中组蛋白乙酰化酶 GCN5 和 PCAF 的时空表达特征[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2009, 18: 273-278.

[本文编辑] 商素芳