

小鼠不同细胞间组蛋白修饰变化对 MafA 基因转录表达的影响

李明岳, 鲍世韵, 刘嘉林, 郑锦锋, 林宝行, 余小舫

(暨南大学第二临床医学深圳市人民医院, 深圳 518020)

【摘要】 目的 通过比较不同细胞类型之间 MafA 基因转录起始区的组蛋白修饰差异, 探讨组蛋白修饰对 MafA 基因转录表达的作用。方法 采用染色质免疫共沉淀-实时定量 PCR 法检测小鼠胰岛素瘤 β 细胞 (NIT-1)、NIH 小鼠成纤维细胞 (NIH3T3) 及小鼠胚胎干细胞 (mES) 三者中的 MafA 和 MLH1 基因转录起始区组蛋白修饰 (H3K4m3、H3K9m3 和 H3 乙酰化) 的状况。同时采用实时定量 RT-PCR 检测上述三种细胞各基因 mRNA 表达水平。分析基因的 H3K4m3、H3K9m3 和 H3 乙酰化修饰与基因表达之间的相互关系。结果 (1) 以 mES 细胞为参照, NIT-1 细胞 MafA 基因的转录起始区的 H3K4m3 修饰水平明显增高 ($P < 0.05$), H3K9m3 修饰水平明显降低 ($P < 0.05$); NIH 3T3 细胞 MafA 基因的转录起始区的 H3K9m3 修饰水平明显增高 ($P < 0.05$), H3K4m3 修饰水平明显降低 ($P < 0.05$); (2) MafA 基因的仅在 NIT-1 细胞表达, 其表达与 H3K4m3 修饰存在直线相关 (相关系数 0.995); 与 H3K9m3 修饰存在直线负相关 (相关系数 -0.751); (3) 管家基因 MLH1 的表达与所检测组蛋白修饰无相关性。结论 H3K9m3 与 H3K4m3 修饰能相互协调, 共同调控 MafA 基因的表达, 对胚胎干细胞向 β 细胞分化具有重要的意义。

【关键词】 组蛋白修饰; H3K4m3; H3K9m3; MafA 基因; 分化

【中图分类号】 R349.64 R332

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-7856(2011)01-0054-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2011.01.012

Effect of Histone Modification Change on MafA Gene Transcription in Different Mouse Cells

LI Ming-yue, BAO Shi-yun, LIU Jia-lin, ZHENG Jin-feng, LIN Bao-hang, YU Xiao-fang

(Jinan University Second Affiliated Medical College, Shenzhen People Hospital, Shenzhen 518020, China)

【Abstract】 Objective To explore the role of histone modification in the MafA gene transcription expression and to comparing the differences of histone modifications of MafA genes promoter in various cell types of mouse. **Method** The promoter histone modification status of MafA and MLH1 genes in NIT-1 cells, NIH3T3 cells and mouse embryonic stem cells were measured by chromatin immunoprecipitation-real time PCR methods. The expression of these genes in the three cell lines were measured by realtime RT-PCR. The relation between histone modifications and genes expressions were analysed. **Result** (1) Compared with mES cell, there were higher H3K4m3 and lower H3K9m3 modification levels in the promoter of MafA gene in NIT-1 cell ($P < 0.05$). There were higher H3K9m3 and lower H3K4m3 modification levels in the promoter of MafA gene in NIH3T3 cells ($P < 0.05$). (2) MafA gene transcription expressed only in NIT-1 cells. There was the Pearson correlation between MafA gene expression and H3K4m3 modification (Coef. 0.995). And Pearson correlation was also between MafA gene expression and H3K9m3 modification (Coef. -0.751). (3) There was not correlation between

【作者简介】 李明岳 (1972 -), 男, 副主任医师, 博士生, 主要胰腺疾病方面的研究。

【通讯作者】 余小舫。E-mail: yuxfshui@hotmail.com。

housekeeper MLH1 genes expression and histone modification. **Conclusion** H3K4m3 and H3K9m3 modification could coordinated participate to regulation and control expression of MafA gene. It is great significant to the differentiation of β cells from ES cells.

【Key words】 Modification; Histone 3 lysine 4 trimethylation; Histone 3 lysine 9 trimethylation; MafA gene; Differentiation

组蛋白在翻译后的修饰中会发生改变,从而提供一种识别的标志,为其它蛋白与 DNA 的结合产生协同或拮抗效应,是一种动态转录调控成分^[1]。染色质免疫共沉淀-实时定量 PCR 法(chromatin immunoprecipitation-real time quantitative PCR methods, CHIP-PCR)技术可以检测特定 DNA 序列染色质的结构,能够充分反映生理条件下的 DNA 与蛋白质相互作用的真实情况^[2]。MafA 基因又称亮氨酸拉链蛋白 Maf 家族 A (ν -maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family protein A, MafA),是一个关键的基因特异性表达的调节器,对于胰腺生长和 β 细胞的分化及 β 细胞正常功能的维持起重要作用^[3]。本研究采用 CHIP-PCR 技术比较小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, mES)、NIH 小鼠成纤维细胞(NIH 3T3)和小鼠胰岛素瘤 β 细胞(NIT-4)之间 MafA 基因转录起始区的组蛋白修饰变化,以管家基因 MLH1 为对照,探讨组蛋白修饰对 MafA 基因转录表达的作用。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

(1) 129/J 小鼠胚胎干细胞(40 XY)和 γ 射线照射处理的第 3 代昆明小鼠胚胎成纤维细胞由赛业(广州)生物科技有限公司提供。小鼠成纤维细胞株 NIH3T3 细胞和小鼠 β 细胞株 NIT-4 细胞由中山大学动物实验中心细胞库提供,上述两细胞均来自美国 ATCC 细胞库;(2) 组蛋白 H3K4 三甲基化(histone 3 lysine 4 trimethylation, H3K4m3)抗体(Abcam)、组蛋白 H3K9 三甲基化(histone 3 lysine 9 trimethylation, H3K9m3)抗体(Abcam)、组蛋白 H3 乙酰化抗体(Upstate)、抗小鼠 Ig-G 磁珠(BioLabs);(3) 超声仪器 Bioruptor (Diagenode)、Nanodrop (Agilent)、TaKaRa PCR Thermal Cycler(宝生生物工程有限公司)、ABI 7700 Realtime PCR 仪(ABI);(4) 引物设计软件:Primer 5.0。

1.2 细胞的准备

1.2.1 mES 细胞的培养:预先准备由明胶包被的六孔板培养器皿,饲养层细胞是经 γ 射线照射处理

的第 3 代昆明小鼠胚胎成纤维细胞。加入解冻后的 mES 细胞悬液和 129/J 小鼠胚胎干细胞完全培养基,在 37℃、5% CO₂、80% 相对湿度的培养箱中培养。复苏后的第 2 天换用 DMEM 完全培养液,定期更换培养液,当 mES 细胞克隆较大或克隆间出现融合时,予传代。培养时间为 2 周。

1.2.2 NIT-4 细胞的培养:将解冻后细胞悬液移入培养器皿中,加入足量的 DMEM 完全培养基,置于 37℃、5% CO₂、80% 相对湿度的培养箱中培养。复苏后第 2 天更换培养液,待细胞长满培养器皿 80% 后进行传代。培养时间为 2 周。

1.2.3 NIH 3T3 细胞的培养:方法同 NIT-4 细胞。

1.3 实验方法

1.3.1 CHIP-PCR 技术检测组蛋白修饰

CHIP-PCR 技术是研究蛋白与 DNA 之间在染色质环境下相互作用的一种常用方法,用于检测每个候选靶基因的启动子区域是否存在能与组蛋白及特定转录因子结合的特定 DNA 序列。一般有两种方法,一种是使用标准微球菌核酸酶来消化细胞核;另一种是在细胞中加入甲醛或将细胞暴露在紫外射线使得染色质发生交联。接着用超声波将染色质切成 300 bp 到 1000 bp 之间的小片段,然后加入组蛋白修饰抗体以及偶联 II 抗磁珠进行孵育反应,利用磁铁的吸引力将组蛋白修饰的 DNA 片段从待测样品分离出来,采用酚-氯仿法纯化 DNA 片段。最后用定量 PCR 法扩增 DNA 片段,其扩增产物的量即可反映该启动子区中组蛋白修饰水平。

1.3.1.1 组蛋白修饰检测样本的制备:将 3 种细胞(1×10^7 个细胞/瓶)分别用胰酶消化,用 Bioruptor 进行超声处理后于 2% 琼脂糖凝胶电泳,结果见图 1。将断裂后的 DNA 片段分成两份,一份进行免疫共沉淀反应,一份作为 input 对照(不做任何处理直接进行 PCR 反应)。在第一份 DNA 样品中其余依次加入组蛋白 H3K4m3 抗体(或组蛋白 H3K9m3 抗体,或组蛋白 H3 乙酰化抗体)、G 蛋白磁珠、抗小鼠 IgG 磁珠(磁珠偶联 II 抗),孵育后,缓冲液洗涤,去除未结合的 DNA 片段,蛋白酶 K 消化抗体,用酚-氯仿溶液进行 DNA 纯化后, Nanodrop 测 DNA 浓度。

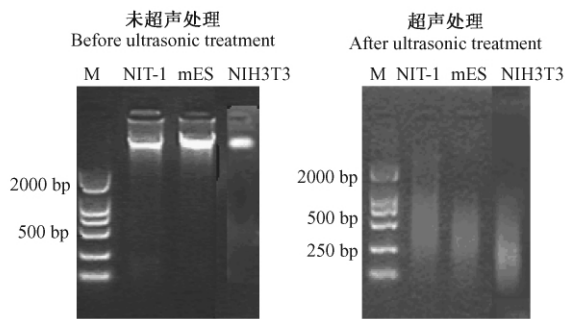


图 1 DNA 超声处理后电泳图

Fig. 1 DNA after ultrasonic treatment Electrophoresis

注: M:DL2000 Marker

Note: M:DL2000 Marker

1.3.1.2 实时荧光定量聚合酶链反应扩增目的基因启动子区:将 3 种细胞纯化的 DNA 进行实时定量 PCR。采用 ABI 7700 Realtime PCR 仪对免疫沉淀中 MafA 基因和 MLH1 基因的 DNA、input control 和阴性对照进行扩增。测定标准曲线和熔解曲线,确保扩增的准确性和专一性,用 Ct 值表示样品中模板的相对含量,数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析。引物设计如下: MafA (mm9_cpgIslandExt_CpG: 187. chr15: 75576482-75578594. 长度 185bp): 5'-CCTTGTACAGGTCCCGCTC-3', 5'-GGAGGTCATCCGACTGAAAC-3'; MLH1 (mm9_cpgIslandExt_CpG: 117. chr9: 11117496 4-11175156. 长度 193 bp): 5'-TTAACCGAGCCAGGGACTTT-3', 5'-GCTTCCAG AATTGCCGACAT-3'。所有基因 PCR 程序一致,均如下: 95℃、10 min, 40 个 PCR 循环 (95℃、15 s, 60℃、60 s, 收集荧光)。为了建立 PCR 产物的熔解曲线,扩增反应结束后, 95℃、2 min, 60℃、20 s, 99℃、10 s, 并从 60℃ 缓慢加热到 99℃, 退火温度 59℃。实验重复 3 次。

1.3.2 实时定量逆转录 PCR:检测 3 种细胞 MafA 和 MLH1 基因的表达水平。Trizol 抽提 RNA, 鉴定 RNA 纯度及定量后, RNA 逆转录成 cDNA。以 GAPDH 基因作为内参。设计引物序列如下: MafA: 5'-AAAGCGGTGCTGGAGGAT-3', 5'-GGTTCAGGTG GTGCTGGTA-3'; MLH1: 5'-GC GGTAGTTCGAGAAC TGATA-3', 5'-AGTGAACCTCGTGCTTGCTG-3'; GAP DH: 5'-GTCCAT GCCATCACTGCCAC-3', 5'-ATGA CCTTGCCCACAGCCTT-3'。荧光定量 PCR 反应体系及扩增条件与前相同。测定标准曲线和熔解曲线, 确保扩增的准确性和专一性, 用 Ct 值表示样品中模板的相对含量, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析。实验重复 3 次。

1.3.3 统计学分析:数据经 SPSS 软件 13.0 统计, 采用单因素方差分析, 两两比较则用 t 检验, 进行相关分析。

2 结果

2.1 组蛋白修饰的检测结果

用染色质免疫共沉淀法检测 3 种细胞中基因的组蛋白修饰的状况。以 mES 细胞为参照, 结果提示: NIT-1 细胞中 MafA 基因转录起始区的 H3 乙酰化和 H3K4m3 修饰水平明显增高 ($P < 0.05$), H3K9m3 修饰水平明显降低 ($P < 0.05$); 基因 MLH1 转录起始区的 H3 乙酰化修饰水平降低而 H3K4m3 修饰水平增高, 但无统计学意义 ($P < 0.05$)。在 NIH 3T3 细胞中, MafA 基因转录起始区的 H3 乙酰化和 H3K9m3 修饰水平明显增高 ($P < 0.05$), H3K4m3 修饰水平明显降低 ($F = 0.277, P = 0.013$); 管家基因 MLH1 转录起始区的 H3K9m3 修饰水平增高 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 基因在不同细胞中组蛋白修饰的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Tab. 1 Gene histone modifications in different cells comparisons ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组蛋白修饰 Histone modification	基因 Genes	小鼠胚胎干细胞 mES cell	NIT-1 细胞 NIT-1 cell	NIH3T3 细胞 NIH3T3 cell
H3 乙酰化修饰水平 (%)	MafA	0.42 ± 0.02 ^{a, b}	1.10 ± 0.07	0.93 ± 0.17
Levels of H3 acetylation acetylation modification (%)	MLH1	2.47 ± 0.35	1.91 ± 0.29	1.69 ± 0.19
H3K4m3 修饰水平 (%)	MafA	1.69 ± 0.14 ^{a, b}	10.64 ± 0.87	0.94 ± 0.10
Levels of H3K4m3 modification (%)	MLH1	8.37 ± 0.49	12.91 ± 1.63	7.87 ± 1.41
H3K9m3 修饰水平 (%)	MafA	0.17 ± 0.003 ^{a, b}	0.03 ± 0.005	0.39 ± 0.06
Levels of H3K9m3 modification (%)	MLH1	0.66 ± 0.06 ^b	0.48 ± 0.08	2.36 ± 0.43

注: a. $P < 0.05$ 与 NIT-1 细胞比较; b. $P < 0.05$ 与 NIH3T3 细胞比较
Note: a. $P < 0.05$ vs NIT-1 cell. b. $P < 0.05$ vs NIH3T3 cell

2.2 基因 mRNA 的表达水平

实时定量逆转录 PCR 检测基因表达, MafA 在

NIT-1 细胞表达,而在 NIH 3T3 和 mES 细胞基本不表达,前者与后两者存在统计学差异($P < 0.05$)。

MLH1 在 3 种细胞均表达,3 者之间的表达水平无统计学差异(表 2)。

表 2 基因在不同细胞中 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Tab.2 mRNA expression level of gene in different cells comparisons($\bar{x} \pm s, n = 3$)

基因 Genes	小鼠胚胎干细胞 mES cell	NIT-1 细胞 NIT-1 cell	NIH3T3 细胞 NIH3T3 cell
MafA	4.89E-05 ± 0.24E-05	4.72E-03 ± 0.17E-03 *	1.15E-04 ± 0.19E-04
MLH1	1.10E-03 ± 0.22E-03	1.21E-03 ± 0.27E-03	0.97E-03 ± 0.25E-03

注:★ $P < 0.05$ 3 者之间存在统计学差异
Note:★ $P < 0.05$ statistical differences among three type cells

2.3 相关分析

对基因的组蛋白修饰和基因表达进行相关分析。结果表明,MafA 基因的表达与 H3K4m3 修饰存在直线相关(相关系数 0.995, $P < 0.01$);与 H3K9m3 修饰存在直线负相关(相关系数 -0.751, $P < 0.05$),与 H3 乙酰化修饰无相关性。管家基因 MLH1 的表达与所检测的组蛋白修饰无相关性。

3 讨论

NIT-1 细胞来源于 NOD 小鼠,是由 SV40 和大鼠胰岛素基因的启动子经转基因方式产生永生化的 β 细胞系,具有与正常 β 细胞相似的基因表型,在葡萄糖的刺激下能够分泌胰岛素^[6]。由于大量高纯度的 β 细胞在获取上存在困难,本实验采用 NIT-1 细胞代替正常 β 细胞作为研究对象。

组蛋白修饰是表观遗传学的重要组成部分,可在基因的 DNA 序列不发生改变时,使特异性基因的表达发生改变,并且这种改变还能通过有丝分裂和减数分裂进行遗传^[6]。在机体中,细胞基本生命活动所必需的管家基因可在各个细胞中表达;特异性基因 MafA 虽存在于所有的细胞,随着胰腺的发育,其表达最终仅局限在 β 细胞^[6],提示组蛋白修饰可能参与其中的调控。

组蛋白有多种共价修饰方式,其中 H3 乙酰化、H3K4m3 和 H3K9m3 是修饰基因转录调控的重要机制^[7]。H3 乙酰化修饰使 DNA 与组蛋白间的静电引力和空间位阻增大,两者间的相互作用减弱,DNA 易于解聚,染色质呈转录活性结构,进而激活基因转录。H3K4m3 使组蛋白和 DNA 的结构由紧变松,靶基因才能和转录复合物相互作用,基因得以转录。H3K9m3 能使组蛋白形成一个异染色质蛋白 HP1(heterochromatin protein 1)或其他抑制性染色质因子的结合位点,HP1 的结合进而会导致 DNA 分子上特定 CpG 岛的甲基化和稳定的基因沉默。不

同组蛋白修饰可依次发挥作用或组合在一起,形成一个修饰的级联,它们通过协同或拮抗来共同发挥作用^[8]。本研究发现,MafA 基因在 mES、NIT-1 和 NIH 3T3 三种细胞中的差异表达与 H3K9m3 修饰存在直线负相关;与 H3K4m3 修饰存在直线相关。MafA 基因的表达与 H3 乙酰化修饰无相关性,这可能跟 H3K9m3 和 H3 乙酰化修饰两者间存在竞争性有关^[9]。而 MLH1 基因的表达与组蛋白修饰不存在相关性。结果表明,H3K9m3 与 H3K4m3 修饰能协同作用于 MafA 基因转录起始区,调控其表达。

MafA 基因的表达可在 β 细胞分化的最后阶段检测到,其除了与 Pdx-1 和 BE-TA2 一起协同刺激胰岛素基因表达^[10],还参与 Pdx-1 基因的表达调控,是一个关键的基因特异性表达的调节器^[11]。Zhao 等^[12]发现 MafA 基因敲除小鼠出生时的胰岛在形态学上是正常的,但随着年龄的增长,小鼠表现为葡萄糖刺激胰岛素分泌受损和胰岛组织结构的异常。可见,MafA 基因与 β 细胞的分化密切相关。在胚胎干细胞分化过程中,随着转录起始区 H3K9m3 与 H3K4m3 修饰水平的改变,MafA 基因选择性转录,胚胎干细胞能向 β 细胞定向分化;当 MafA 基因选择性失活时,胚胎干细胞则失去向 β 细胞定向分化的能力。因而,在胚胎干细胞向 β 细胞分化过程中,MafA 基因的 H3K4m3 与 H3K9m3 修饰调控机制具有重要的作用。

综上所述,H3K4m3 与 H3K9m3 修饰能相互协调,共同调控 MafA 基因的表达,对胚胎干细胞向 β 细胞分化具有重要的意义。

参考文献:

[1] SternerDE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription related factors [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64 (2): 435-45
[2] Kuras L. Characterization of protein-DNA association *in vivo* by chromatinimmunoprecipitation. [J]. Methods Mol Bio, 2004,

- 284:147 – 162.
- [3] Coolen M, Sii-Felice K, Bronchain O, et al. Phylogenomic analysis and expression pattern of large Maf genes in *Xenopus tropicalis* provide new insights into the functional evolution of the gene family in osteichthyans. [J]. Dev Genes Evol, 2005, 215 (7):327 – 329.
- [4] Hamaguchi K, Gaskins HR, Leiter EH, et al. NIT-1, a pancreatic beta – cell line established from a transgenic NOD/Ltmouse [J]. Diabetes, 1991, 40(7): 842 – 849.
- [5] Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications [J]. Curr Biol, 2004, 14 (14): 546 – 551.
- [6] Matsuoka TA, Artner I, Henderson E, et al. The MafA transcription factor appears to be responsible for tissuespecific expression of insulin. [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101 (9):2930 – 2933.
- [7] Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code [J]. Science, 2001, 293(5532): 1074 – 1080.
- [8] Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications [J]. Nature, 2000, 403 (6765): 41 – 45.
- [9] Litt MD, Simpson M, Gaszner M, et al. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta – globin locus [J]. Science, 2001, 293 (5539): 2453 – 2455.
- [10] Aramata S, Han SI, Yasuda K, et al. Synergistic activation of the insulin gene promoter by the β cell enriched transcription factors MafA, Beta2, and Pdx1 [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1730: 41 – 46.
- [11] Samaras SE, Zhao L, Means A, et al. The islet beta cell-enriched RIPE3b1/Maf transcription factor regulates pdx-1 expression [J]. Biol Chem, 2003, 278: 12263 – 12270.
- [12] Zhao L, Gao M, Matsuoka TA, et al. The islet beta cell-enriched MafA cativator is a key regulator of insulin gene transcription [J]. J Biol Chem, 2005, 280 (12): 11887 – 11894.

修回日期) 2010-06-22