

Sp1 特异性调控先天性心脏病 相关基因钙调磷酸酶调节蛋白 1 基因亚型的转录

李晓勇, 宋来春, 陶超, 金晶, 许铭*

(武汉科技大学附属武汉亚洲心脏病医院 心外科 职业危害识别与控制湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 探索先天性心脏病相关基因钙调磷酸酶调节蛋白 1 基因(RCAN1)两个亚型(RCAN1-1 和 RCAN1-4)组织特异性表达的机制。方法 通过生物信息学预测 RCAN1-1 和 RCAN1-4 各自启动子区的转录因子结合位点,分析比对并筛选出具有差异的位点,通过定点突变及荧光素酶报告基因系统检测筛选出的位点活性。将鉴定的转录因子的抑制剂与 RCAN1 表达载体作用,分为实验组(抑制剂+)和对照组(抑制剂-),通过实时荧光定量 PCR 检测 RCAN1 亚型 mRNA 的表达量。结果 在 RCAN1-1 启动子区-138GCCCCCGCC-129 处检测出一个新的、未报道过的具有活性的转录因子 Sp1 结合位点。实验组 RCAN1-1 mRNA 表达量低于对照组($P<0.001$),而两组 RCAN1-4 mRNA 的表达量无差异。结论 Sp1 特异性调控 RCAN1-1 的转录,增强其表达,而对 RCAN1-4 无影响,提示其可作为将来基因治疗或检测的一个潜在靶点。

关键词: 先天性心脏病; Sp1; RCAN1; 转录; 基因

中图分类号: R654.2 文献标志码: A

Sp1 specifically regulates the transcription of congenital heart disease associated gene RCAN1 isoform 1

LI Xiao-yong, SONG Lai-chun, TAO Chao, JIN Jing, XU Ming*

(Department of Cardiac Surgery, Hubei Province Key Laboratory of Occupational Hazard Identification and Control, Wuhan Asia Heart Hospital, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: Objective To investigate the regulatory mechanism of regulator of calcineurin 1 (RCAN1), which is associated with congenital heart disease and has a tissue-specific expression pattern. **Methods** The transcription factor binding sites were predicted and compared in promoter of RCAN1. The site directed mutation and luciferase assay were used to detect the activity of the binding site. Then the transcriptional regulation of RCAN1 by Sp1 was evaluated by real-time quantitative PCR under physiological condition (control group) or Sp1 inhibitor (experimental group). **Results** The Sp1 binding site-138GCCCCCGCC-129 was predicted and identified. The RCAN1-1 mRNA was more decreased in experimental group than the control group ($P<0.001$). There was no significant difference in RCAN1-4 mRNA between the two groups. **Conclusions** Sp1 specifically regulates the transcription of RCAN1-1 isoform, which demonstrates that Sp1 is a potential target molecule for genetic testing and clinical intervention for congenital heart disease.

Key words: congenital heart disease; Sp1; RCAN1; transcription; gene

收稿日期: 2020-01-06 修回日期: 2020-04-30

基金项目: 湖北省卫生健康科研基金(WJ2019H238); 武汉市卫生计生科研基金(WX18Q33, WX17B19); 武汉中青年医学骨干人才培养工程

* 通信作者 (corresponding author): xu_ming83@126.com

先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD) 占儿童出生缺陷率的首位, 发病率高, 危害大, 其病因仍然不明^[1]。近期研究表明, 基因异常在其发病机制中起重要作用。唐氏综合征是最常见的导致 CHD 的遗传性疾病, 其 21 号染色体上的钙调磷酸酶调节蛋白 1 基因 (regulator of calcineurin 1, RCAN1) 被证明是先天性心脏缺陷相关的致病基因^[2-3]。RCAN1 主要有 2 个亚型, RCAN1-1 主要在中枢神经系统表达, RCAN1-4 主要在心肌、胎儿肾脏中表达, 这种组织特异性表达的机制不清^[4]。因此本课题拟从转录调控入手, 研究 RCAN1 基因不同亚型的启动子区转录因子结合位点的差异, 探索其在人体内特异性表达的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

RCAN1 基因及其上游的序列参照 RefSeq (NG-007071.1) 以及 UCSC、LOVD、千人基因组计划等数据库。定点突变试剂盒 (KOD-Plus-Mutagenesis Kit, TOYOBO 公司)。荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega 公司)。荧光定量 PCR 试剂盒 (GoTaq qPCR Master Mix, Promega 公司)。光辉霉素 (18378-89-7, Amresco 公司)。RNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分子克隆及定点突变: RCAN1-1 和 RCAN1-4 分别通过两个不同的启动子来转录, 两个启动子区分别位于第 1 和第 4 外显子的上游。在 TRANSFAC 数据库中通过在线生物信息学软件 AliBaba 2.1 预测两个启动子区所有可能的转录因子结合位点 (<http://www.gene-regulation.com>), 结合既往文献报道及物种属性 (只在人体内表达), 再对比分析两个启动子区的差别, 初步筛选出一个具有差异性的候选转录因子结合位点: Sp1, 位于第 1 外显子上游 -129 至 -138 碱基位置, 符合 Sp1 经典结构 $nyCCGCCsmC$ 。

本课题组前期已克隆出 RCAN1 的两个启动子^[5]。通过限制性内切酶 *Mlu* I 和 *Xho* I 将 RCAN1-1 启动子区 -498 +153 克隆至 pGL3-basic 载体中荧光素酶报告基因的上游, 构建质粒 pRCAN1-Luc-1, 通过 RCAN1-1 启动子启动荧光素

酶基因的表达。同样的方法将 RCAN1-4 启动子区 -1 059 至 -28 构建质粒 pRCAN1-Luc-4。设计突变引物 (表 1), pRCAN1-Luc-1 作为模板, 分别定点突变筛选出 Sp1 结合位点的关键碱基, 构建一系列突变质粒。PCR 条件同说明书。通过测序验证突变体。将 pRCAN1-Luc-1 和 7 个突变体分别转染到 HEK293T 细胞中, 孵育 24 h 后裂解, 检测荧光素酶活性来间接测定启动子活性。

表 1 突变引物

Table 1 Mutation primer

primer	sequence (5'-3')
-129 mutation forward	GCCCGCCGATGCCCGCGCGATTCCGAG
-132 mutation forward	GCCCGC AG CCTGCCCGCGCGATTCCGAG
-133 mutation forward	GCCCGA CG CCTGCCCGCGCGATTCCGAG
-134 mutation forward	GCCCA CCG CCTGCCCGCGCGATTCCGAG
-135 mutation forward	GCCAGCC GC TGCCCGCGCGATTCCGAG
-136 mutation forward	GCACGCC CT GCCCGCGCGATTCCGAG
single base Mut reverse	GGGAAAAAAAAAGTCAGCTTCCA
Sp1 mutation forward	AAAAAT GCCCGCGCGATTCCGAGGGGTTA
Sp1 mutation reverse	TTTTTT TGTCAGCACTCTCCACGACACGGCCT

Mutation sites are shown in bold; -129 single base mutation; -132 to -136 single base mutation and the whole Sp1 mutation respectively.

1.2.2 荧光定量 PCR 检测 RCAN1 mRNA: 进一步研究转录因子 Sp1 是否特异性调控 RCAN1-1 亚型的转录。本课题组前期已经构建了包含启动子区的 RCAN1-1 和 RCAN1-4 表达载体: pCMV-RCAN1-1 和 pCMV-RCAN1-4 质粒^[6], 将质粒转染到心肌细胞细胞系 H9c2 内, 实验组加 Sp1 抑制剂 (mithramycin A, 光辉霉素), 对照组加溶剂 PBS, 培养 24~48 h 后, 提取总 RNA, 并反转录为 DNA。通过荧光定量 PCR 定量检测两个亚型的 mRNA 的量。简要步骤如下: 引物参照前期结果^[6]。反应体系 (20 μ L) 包含: GoTag qPCR Master Mix ($\times 2$) 10 μ L, 引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, DNA 3 μ L, 双蒸水 6.2 μ L。扩增条件: Stage1: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 1 个循环。Stage2: 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。Stage3: 溶解曲线。每个样品都做 3 个平行孔。通过标准曲线的绘制得到的 RCAN1 和 β -actin 的扩增效率分别为 94.2% 与 96%, 最后实验结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量。

1.3 统计学分析

用 SPSS19.0 软件进行统计学分析, 所有实验均

重复 3 次,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组之间的比较采用两独立样本均数 t 检验。

2 结果

2.1 转录因子结合位点活性

分别突变单个碱基都可导致启动子区活性明显降低($P<0.001$),初步证明筛选出的 Sp1 结合位点是有功能的且每个碱基都是不可或缺的(图 1)。构建一个 Sp1 突变体,将此突变体和对照(pRCAN1-Luc-1)分别转染不同的细胞系,结果显示启动子活性均有显著下降(均 $P<0.001$),进一步证明该转录因子结合位点是有活性和功能的(图 2)。

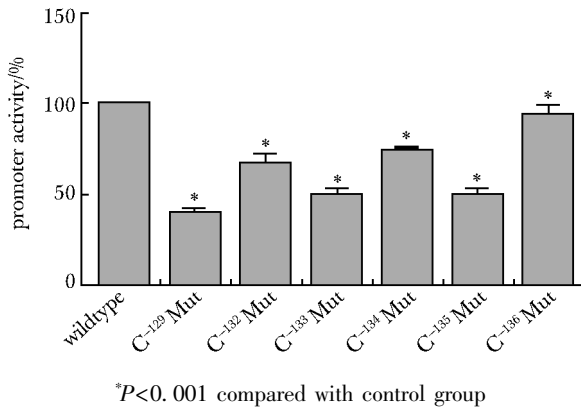


图 1 单个碱基突变均使启动子活性下降

Fig 1 Single base mutation decreased the promoter activity ($\bar{x}\pm s, n=3$)

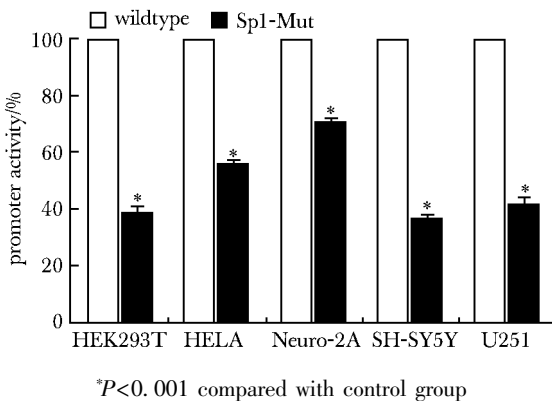


图 2 在不同的细胞系中都可见 Sp1 突变使启动子活性下降

Fig 2 Mutation of Sp1 decreased promoter activity in different cell lines ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.2 Sp1 对 RCAN1 转录的调控

实验组 RCAN1-1 mRNA 表达量低于对照组

($P<0.001$),而两组 RCAN1-4 mRNA 的表达量无差异(图 3)。

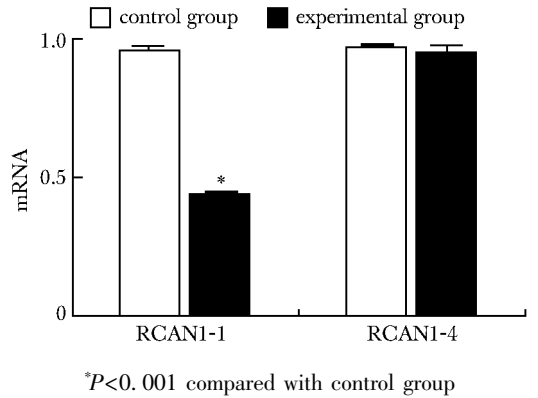


图 3 实验组 RCAN1-1 的表达量明显降低,而 RCAN1-4 无差别

Fig 3 RCAN1-1 decreased in experimental group; RCAN1-4 showed no difference ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3 讨论

先天性心脏病(CHD)发病率在活产婴儿中占 0.93%,占出生畸形的 40.95%,其不仅发病率高,且严重危害健康,给家庭和社会造成了巨大的影响^[7]。然而,CHD 的发病机制仍然不明,目前研究表明基因异常是其重要的致病因素^[1, 8]。

唐氏综合征是最常见的染色体病之一,其突出的临床表现就是智力缺陷和先天性心脏畸形^[9]。唐氏综合征在 21 号染色体上的关键致病区域(down syndrome critical region, DSCR)已经被确定,而 DSCR1(2007 年被更名为 RCAN1)是该区域上最重要的致病基因之一^[9]。RCAN1 是最可能的导致唐氏综合征患者出现先天性心脏畸形的候选基因^[9]。胚胎学实验表明 RCAN1 在心血管形成时就有表达,心脏发育过程中在动脉干、心球及原始室间隔等组织中集中高表达^[10],而这些部位的分化及形成异常构成了绝大多数先天性心脏病发病的胚胎学基础。NF-ATc (nuclear factor of activated T cells) 在心脏间隔及瓣膜的发育形成中的作用是必不可少的^[11]。RCAN1 直接抑制钙调蛋白磷酸酶,而后者通过对 NF-ATc 脱磷酸化而促进其表达。因此 RCAN1 过度表达对 NF-ATc 起间接抑制作用,可能是导致心脏间隔发育异常的原因。

RCAN1 在人体内有很强的组织表达特异

性^[3,12]。根据生物学能量最低原则,转录调控是基因表达调控的核心,而启动子又是转录调控的主要原件。目前已证明 RCAN1-1 和 RCAN1-4 分别由不同的启动子启动转录^[3,4,9]。两个启动子区域都有很多潜在的转录因子结合位点,但是真正起主要作用的位点及与其结合的转录因子仍未完全阐明。本研究通过系统分析两个启动子区域,鉴定出一个之前未报到过的有活性的转录因子结合位点及相应的转录因子,初步证明其可能与 RCAN1 的组织特异

性表达相关。本研究的主要局限是以体外实验为主,所用心肌细胞只是提供质粒表达的环境。进一步的动物或人体实验,检测 Sp1 在不同组织中的表达差异,能够更充分地证明 Sp1 对 RCAN1 表达的特异性调节作用。总之,本研究新发现的 Sp1 位点有可能作为将来 CHD 基因筛查或治疗的潜在靶点,为探索 RCAN1 在 CHD 发病机制中的作用提供理论基础。

参考文献:

- [1] Lynch Á, Ng L, Lawlor P, *et al.* Cyanotic congenital heart disease modes of presentation and prenatal detection [J]. *Ir Med J*, 2019, 112:1019.
- [2] Baraona F, Gurvitz M, Landzberg MJ, *et al.* Hospitalizations and mortality in the United States for adults with down syndrome and congenital heart disease [J]. *Am J Cardiol*, 2013, 111: 1046-1051.
- [3] Wu Y, Song W. Regulation of RCAN1 translation and its role in oxidative stress-induced apoptosis [J]. *FASEB J*, 2013, 27: 208-221.
- [4] Peiris H, Keating DJ. The neuronal and endocrine roles of RCAN1 in health and disease [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2018, 45: 377-383.
- [5] Li X, Wang G, An Y, *et al.* Association between sequence variations in RCAN1 promoter and the risk of sporadic congenital heart disease in a Chinese population [J]. *Pediatr Cardiol*, 2015, 36: 1393-1399.
- [6] Li X, Shi L, Xu M, *et al.* RCAN1 mutation and functional characterization in children with sporadic congenital heart disease [J]. *Pediatr Cardiol*, 2018, 39: 226-235.
- [7] Nappi F, Singh SSA. Gene therapy and regenerative tissue engineering in congenital heart disease [J]. *Transl Pediatr*, 2019, 8:356-359.
- [8] 王凤. 先天性心脏病相关致病基因调控区变化的研究进展 [J]. *国际儿科学杂志*, 2017, 44: 77-79.
- [9] Sario ğlu T, Ereğ E, Yalçınbaş YK. Why national databases are necessary for pediatric and congenital heart surgery practice? [J]. *Turk Gogus Kalp Damar Cerrahisi Derg*, 2019, 27:418-422.
- [10] Cheng L, Li P, Wang H, *et al.* Decreased activity of RCAN1.4 is a potential risk factor for congenital heart disease in a Han Chinese population [J]. *Protein Cell*, 2018, 9:1039-1044.
- [11] 欧阳娜, 田鹤锋, 刘玲娟, 等. HIF-1 α 基因启动子-1946 位点基因多态性与紫绀型先天性心脏病低氧耐受的相关性分析 [J]. *基础医学与临床*, 2017, 37: 355-359.
- [12] Villahoz S, Yunes-Leites PS, Méndez-Barbero N, *et al.* Conditional deletion of Rcan1 predisposes to hypertension-mediated intramural hematoma and subsequent aneurysm and aortic rupture [J]. *Nat Commun*, 2018, 9:4795.