

精氨酸甲基转移酶 CARM1 shRNA 慢病毒表达质粒的构建及稳定敲低 CARM1 的小鼠畸胎瘤 P19 细胞系的建立

冯 炯 杨光辉 沈翊珩 张 业

摘 要 **目的** 构建慢病毒表达小鼠 CARM1 基因 shRNA 的质粒,观察其在小鼠畸胎瘤 P19 细胞中对 CARM1 的表达抑制效率。验证 CARM1 shRNA 慢病毒表达质粒,进一步筛选得到稳定敲低 CARM1 的小鼠畸胎瘤 P19 细胞系。**方法** 设计并且合成针对小鼠 CARM1 mRNA 不同部位的 4 组 shRNA 序列,以 Age I 和 EcoR I 克隆入 pLKO.1 慢病毒载体中,得到含 shRNA 的慢病毒表达质粒。氨苄青霉素筛选后,DNA 测序鉴定结果。鉴定正确的质粒大量制备后,与慢病毒包装辅助质粒 psPAX2、pMD2. G 共同转染 HEK293T 细胞,包装得到具有感染能力的慢病毒。将含病毒的培养基上清感染 P19 细胞后,经嘌呤霉素筛选获得 CARM1 稳定敲低的 P19 细胞系,并用 Western blot 法和实时荧光定量 PCR 进行鉴定。**结果** 测序鉴定表明 4 组 CARM1 shRNA 慢病毒表达质粒构建成功。Western blot 法检测和实时荧光定量 PCR 分析结果显示 4 组 CARM1 shRNA 慢病毒表达载体中的 2 组可有效地抑制小鼠畸胎瘤 P19 细胞中 CARM1 基因的表达,即 pLKO.1/CARM1 shRNA2、pLKO.1/CARM1 shRNA3 有明显的抑制效果。**结论** 成功构建了针对 CARM1 基因的 shRNA 的慢病毒表达质粒并筛选得到稳定敲低 CARM1 表达的 P19 细胞系,为进一步研究 CARM1 基因的功能奠定了基础。

关键词 CARM1 shRNA 慢病毒 小鼠畸胎瘤 P19 细胞

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Construction of CARM1 - shRNA Lentiviral Expression Plasmids and the Establishment of Stable - P19 Cell Lines with CARM1 - Knock-down. Feng Jiong, Yang Guanghui, Shen Yufei, et al. Institute of Basic Medical Sciences, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005 China

Abstract Objective To design the small hairpin RNA (shRNA) targeting CARM1 and insert into the lentiviral expression vectors and to identify their inhibition efficacy on CARM1 in teratocarcinoma P19 Cells. To establish P19 cell line stable knockdown of CARM1 gene by transduced the cells with constructed viral products. **Methods** Four different shRNA sequences targeting CARM1 gene were designed. The corresponding DNA fragments were synthesized in vitro, annealed and then cloned into the pLKO.1 vector. The lentiviral plasmids were confirmed by DNA sequencing, then transfected into HEK293T cells to package into lentiviral particles. The harvested supernatant with lentiviral particles was transduced into P19 cells and selected by puromycin. Western blot and Quantitative real-time PCR analysis were carried out to analyze the suppression of CARM1 in P19 Cells. **Results** DNA sequencing showed CARM1 shRNA lentiviral plasmids were successfully constructed. Western blot and Quantitative real-time PCR analysis confirmed the effective knock-down of CARM1 by two shRNA. **Conclusion** A stable P19 cell line has been successively established, in which CARM1 expression is significantly inhibited.

Key words CARM1; shRNA; Lentivirus; Teratocarcinoma cells P19

共激活因子相关的精氨酸甲基转移酶 1 (coactivator - associated arginine methyltransferase 1, CARM1) /

基金项目:教育部博士点(博导类)基金资助项目(20111106110024)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生物化学与分子生物学系

通讯作者:沈翊珩,电子信箱:yfshen@imicams.ac.cn;张业,电子信箱:yezhang@pumc.edu.cn

精氨酸甲基转移酶 4 (protein arginine methyltransferase 4, PRMT4) 是 PRMTs 家族成员之一,PRMT 家族分为两个类型,其中 CARM1 属于 PRMTs 家族中的类型一,催化底物产生不对称的二甲基^[1,2]。体外实验证明 CARM1 甲基化组蛋白 H3,这被认为是其激活基因转录的基础^[3]。更多的实验证据表明 CARM1 是一个高度特殊的精氨酸甲基转移酶,可甲基化一类独特的底物,这些底物不被 PRMT1、PRMT-3、PRMT

-5 或者 PRMT-6 所识别^[4]。CARM1 的反应底物有组蛋白 H3、多聚腺苷酸结合蛋白 1 (poly A binding protein 1, PABP1)、CREB 结合蛋白 (CREB-binding protein, p300/CBP)、Hu 家族抗原 R (Hu antigen R, HuR)、胸腺细胞环化 AMP 磷酸化调节蛋白 (thymocyte cyclic AMP-regulated phosphoprotein, TARPP)、小细胞核核糖核蛋白结合蛋白 B (small nuclear ribonucleoprotein associated protein B, SmB) 等^[5,6]。近期有研究报道在四细胞胚胎卵裂球时期, 组蛋白 H3 的精氨酸被 CARM1 甲基化, 而且这种表观遗传学修饰调节了胚胎干细胞的多能性^[7]。

为了探究 CARM1 在分化发育过程中的作用, 笔者基于 TRC (RNAi consortium) 提供的高通量慢病毒 RNA 干扰文库和相应的方法学^[8], 采用 pLKO.1 慢病毒体系建立针对小鼠 CARM1 基因的 shRNA 慢病毒表达载体, 并将其组装产生的病毒颗粒感染小鼠畸胎瘤细胞 P19, 沉默 CARM1 基因的表达。利用 Western blot 法以及实时荧光定量 PCR, 我们筛选出有明显干扰效果的 CARM1 shRNA 慢病毒载体并构建得到相应的稳定敲低 CARM1 表达的小鼠畸胎瘤 P19 细胞系, 为进一步研究 CARM1 基因的功能奠定了基础。

材料与方法

1. 材料: 小鼠畸胎瘤细胞系 P19 购自美国标准生物品典藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC), 细胞培养基 DMEM、 α -MEM 购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自 Biochrom 公司, 胰酶购自 Amresco 公司。CARM1 抗体、EZH2 抗体购自 Millipore 公司, PRMT1 抗体、PRMT5 抗体购自 Upstate 公司, GAPDH 抗体购自 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠以及山羊抗兔 IgG 购自 MBL 公司。Polybrene、puromycin 购自 Sigma 公司, 细胞转染试剂 Vigofect 购自威格拉斯公司。Age I、EcoR I 限制性内切酶购自 New England Biolabs 公司, T4 DNA 连接酶, 重组 RNA 酶抑制剂 (recombinant RNase inhibitor, RRI), SYBR[®] Premix Ex Taq 购自 Takara Biotech 公司, 反转录酶购自 Promega 公司。RNA 提取 TriPure Isolation Reagent 试剂购自 Roche 公司, 质粒 DNA 小量制备试剂盒购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司, 质粒 DNA 大量制备试剂盒购自美国 Axygen 公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司, Pierce[®] BCA Protein Assay Kit 购自 Thermo 公司。pLKO.1, psPAX2, pMD2.G 为笔者单位董文吉老师课题组惠赠, 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自全式金公司。参考 TRC 数据库 (<http://www.broadinstitute.org/rnai/public/>), 由立菲生物技术有限公司合成以下序列: (1) 作用靶点对应于小鼠 CARM1 基因编码区 1016 ~ 1036nt 的 shRNA 正义链: 5' - CCGGAACAGCTCTACATGGAGCACTCTCGAGACT-

GCTCCATGTAGAGCTGTTTTTTTG - 3'; 反义链: 5' - AATTCAAAAAACAGCTCTACATGGAGCACTCTCGAGACTGCTCCATGTAGAGCTGTT - 3'。由以上序列构建所得干扰质粒命名为 pLKO.1/CARM1 shRNA1。(2) 作用靶点对应于小鼠 CARM1 基因编码区 1176 ~ 1196nt 的 shRNA: 正义链: 5' - CCGGAAGTACACAGTGAACCTCTTACTCGAGTAAGAAAGTTCA-CTGTGTA-CTTTTTTTTG - 3'; 反义链: 5' - AATTCAAAAAAGTACACAGTGAACCTCTTACTCGAG TAAGAAGTCACTGTGTACTT - 3'。由以上序列构建所得干扰质粒命名为 pLKO.1/CARM1 shRNA2。(3) 作用靶点对应于小鼠 CARM1 基因编码区 1616 ~ 1636nt 的 shRNA: 正义链: 5' - CCGGAAGCACCTATAATCTCAGCAGCTCGAGCTGCTGAGATTATAGGTGCTTT-TTTTG - 3'; 反义链: 5' - AATTCAAAAAAGCACCTATAATCTCAGCAGCTCGAGCTGCTGAGATTATAGGTGCTT - 3'。由以上序列构建所得干扰质粒命名为 pLKO.1/CARM1 shRNA3。(4) 作用靶点对应于小鼠 CARM1 基因编码区 334 ~ 354nt 的 shRNA: 正义链: 5' - CCGGGCCATGAAGATGTGTGTGTTTCTCGAG-AAACACACACATCTTCATGGCTTTTTTG - 3'; 反义链: 5' - AATTCAA-AAAGCCATGAAGATGTGTGTGTTTCTCGAGAAACACACACATCTTCATGGC - 3'。由以上序列构建所得干扰质粒命名为 pLKO.1/CARM1 shRNA4。(5) 作用于与哺乳动物非同源的无关序列 (shRNA 阴性对照) 的 Scramble shRNA: 正义链: 5' - CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTGTTTTTG - 3'; 反义链: 5' - AATTCAAAAACAACAA-GATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTG-TTG - 3'。由以上序列构建所得干扰质粒命名为 pLKO.1/scramble shRNA。(6) 小鼠 CARM1 实时荧光定量 PCR: 上游引物: 5' - AGTACTTCCGGCAACCTGTG - 3'; 下游引物: 5' - TCCTGTGCAAATCGCCTTCT - 3'。(7) 鼠源 GAPDH 实时荧光定量 PCR: 上游引物: 5' - GCACAGTCAAGGCCGAGAAT - 3'; 下游引物: 5' - GCCTTCTCCATGCTGCTGAA - 3'。

2. 实验方法: (1) 细胞培养: P19 培养基为 α -MEM, 含 10% 胎牛血清和双抗 (青霉素、链霉素各 100U/ml), 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。(2) 精氨酸甲基转移酶 CARM1 shRNA 慢病毒载体的构建及鉴定: 将每对单链 DNA 片段混合, 进行退火反应, 退火后形成带发卡结构的短双链 DNA, 并在 5' 及 3' 端分别形成带有 Age I 和 EcoR I 酶切位点的黏性末端, 插入到 pLKO.1 载体中。其反应体系如下: 5 μ l (浓度为 10 μ mol/L) 模板 DNA 片段第一链 (正义链) 与 5 μ l (浓度为 10 μ mol/L) 模板 DNA 片段第二链 (反义链) 混合后加 40 μ l 1 $\times$ DNA 退火缓冲液, 90℃ 5min, 待自然冷却至室温。用 T4 连接酶将上述 5 对退火产物分别连入用 Age I 和 EcoR I 双酶切的 pLKO.1 载体中, 将含有 CARM1 目的基因干扰片段的质粒通过热激法转化入大肠杆菌 E. coli DH5 α 进行氨苄青霉素 (Amp) 抗性单克隆培养。随机挑选在 Amp⁺ LB 平板上生长的克隆, 进行质粒 DNA 的提取后直接送立菲生物技术有限公司进行测序鉴定, 测序引物采用 U6 Promoter。(3) 质粒的转染: 293T 细胞铺

板待细胞汇合度为 70% 时用于转染。转染过程按照 Vigofect 说明书进行,转染 6h 后换液,继续培养 48h。将 4 μ g CARM1-shRNA pLKO.1, 4 μ g psPAX2, 2 μ g pMD2. G, 用阳离子非脂质试剂 Vigofect 联合转染 293T 细胞,培养 48h 后,收集上清液,800r/min 离心 5min 收集上清,0.45 μ m 滤膜过滤,即得到含重组病毒上清。(4) 细胞总 RNA 的制备:收集 10⁶ 细胞于 1.5ml Ep 管中,加入 1ml TriPure Isolation Reagent,反复吹打,加 200 μ l 氯仿颠倒混匀,4℃、12000r/min 离心 15min,取上清,加入等体积异丙醇,室温放置 20min 后,4℃、12000r/min 离心 5min。将沉淀用 75% 乙醇洗 2 次,12000r/min 离心 5min,弃上清,室温晾干,20 μ l DEPC 水溶解。紫外分光光度计测定 RNA 浓度。(5) 反转录和实时荧光定量 PCR 条件:1 μ l dNTP (各 10mmol/L), 2 μ l 50 μ mol/L Oligo dT₁₈, 2 μ g 细胞总 RNA 加 DEPC 水至 12 μ l, 65℃ 加热 5min,迅速置冰上加 4 μ l M-MLV RT 5 $\times$ buffer, 0.5 μ l RRI (40U), 0.5 μ l M-MLV (200U) 反转录酶, 20 μ l 反应体系进行反应, 37℃ 反应 50min, 70℃ 加热 15min 灭活反转录酶。以反转录产物 cDNA 为模板,在 Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research) 上进行实时荧光定量 PCR 扩增。PCR 扩增体系: 10 μ l 2 $\times$ SYBR[®] Premix Ex Taq (TaKaRa Biotech), 10 μ mol/L 5' 及 3' 引物各 0.25 μ l, 0.2 μ l 反转录产物,加灭菌双蒸水至 20 μ l。PCR 反应条件: 95℃ 10s, 95℃ 5s, 58℃ 10s, 72℃ 15s, 40 个循环;每项试验重复 3 次。域值 (threshold) 选定在扩增曲线的线性范围内 (the linear range, Qt)。以每个样品组的目的基因/管家基因的比值代表相应基因表达水平的变化。(6) 蛋白样品的准备和 Western blot 检测:收集细胞,将细胞重悬于约 10 倍细胞压积体积的预冷的 RIPA 缓冲液 (50mmol/L HEPES, 1% TritonX-100, pH 7.5, 150mmol/L NaCl, 2mmol/L EGTA, 2mmol/L EDTA, 50mmol/L NaF, 5mmol/L Sodium Pyrophosphate, 50mmol/L Sodium β -glycerophosphate, 1mmol/L Sodium Ortho-vanadate, 1mmol/L PMSF, 1mmol/L DTT, 10 μ g/ml Aprotinin, 10 μ g/ml Leupeptin)。4℃ 混合 1h, 12000r/min 离心 10min。取上清于 -80℃ 储存。取一小份用 BCA 蛋白分析试剂盒测定蛋白浓度,方法见公司说明书。取等量的蛋白样品 (每个泳道 30 μ g) 于 12% SDS-PAGE 中电泳,将凝胶中的蛋白转移到硝酸纤维素膜上,5% 牛奶 TBST 封闭 1h 后,加入 CARM1 抗体 (稀释浓度为 1:2000), PRMT1 抗体 (稀释浓度为 1:2000), PRMT5 抗体 (稀释浓度为 1:2000), EZH2 抗体 (稀释浓度为 1:5000), GAPDH 抗体 (稀释浓度为 1:5000) 与相应的膜在 4℃ 杂交过夜, TBST 洗膜 3 次后,加入相应的二抗 (稀释浓度为 1:5000) 与膜杂交 1h, TBST 洗膜 3 次后用 ECL 显色, X 线片曝光显影。

3. 统计学方法:实验中的所有比较各组间数据用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. CARM1 shRNA 慢病毒载体的鉴定:从 NCBI 上获得小鼠 CARM1 基因编码区 (cDNA) 完全序列 (NCBI accession number: NM_021531.6)。人工合成

针对 CARM1 基因的 4 组不同靶序列,并在正义链的 5' 端引入 Age I 酶切位点、在反义链的 5' 端引入 EcoR I 酶切位点,获得的 4 个针对不同靶序列的 CARM1 shRNA 以及阴性对照表达质粒。分别将其命名为 pLKO.1/CARM1 shRNA1、pLKO.1/CARM1 shRNA2、pLKO.1/CARM1 shRNA3、pLKO.1/CARM1 shRNA4、pLKO.1/scramble shRNA。送至立菲生物技术有限公司进行 DNA 测序,结果显示 4 组 CARM1 shRNA 慢病毒表达质粒以及 Scramble shRNA 慢病毒表达质粒构建成功 (图 1)。

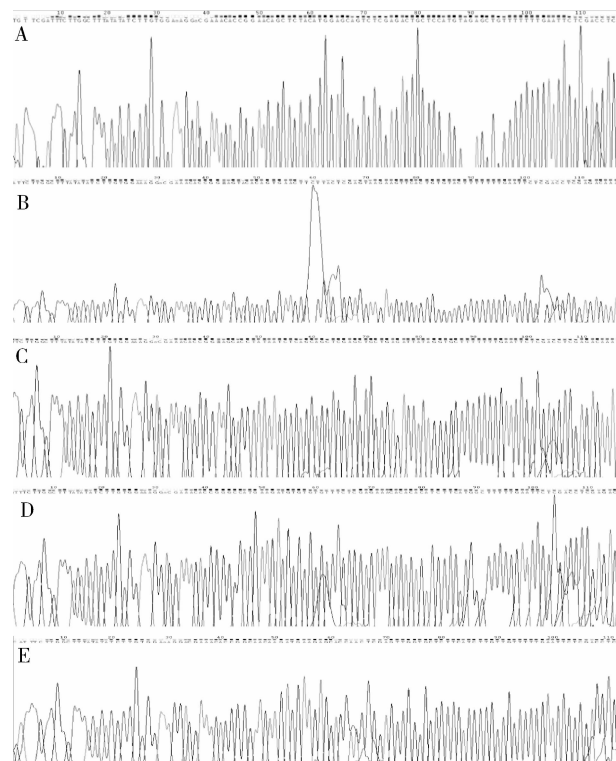


图 1 4 个 CARM1 shRNA 及 shRNA 阴性对照表达载体插入目的片段后的测序结果

A. pLKO.1/CARM1 shRNA1; B. pLKO.1/CARM1 shRNA2; C. pLKO.1/CARM1 shRNA3; D. pLKO.1/CARM1 shRNA4; E. pLKO.1/scramble shRNA

2. P19 细胞嘌呤霉素最小致死剂量筛选:6 孔板接种 P19 细胞,细胞汇合度 80% 时,加入嘌呤霉素至终浓度浓度分别为 0、0.25、0.5、1、2、4 μ g/ml 的完全培养基。培养 2 天后,由细胞的死亡程度,筛选确定 P19 的最小致死剂量 (2 μ g/ml,图 2)。

3. 慢病毒的包装、扩增:慢病毒质粒以及慢病毒包装辅助质粒共转染 293T 细胞,培养 48h 后用荧光显微镜观察带有 GFP 报告基因的慢病毒表达载体。转染 48h 后,在荧光显微镜下观察,可见 95% 以上的

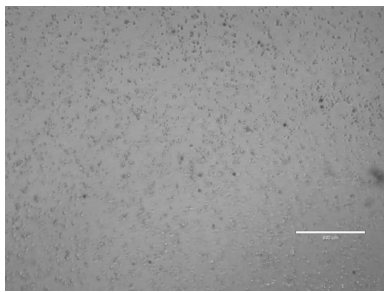


图2 荧光显微镜下观察加嘌呤霉素
2天的P19细胞(×40)

嘌呤霉素浓度为2μg/ml,2天后细胞都死亡。由结果确定P19细胞嘌呤霉素最小致死剂量为2μg/ml

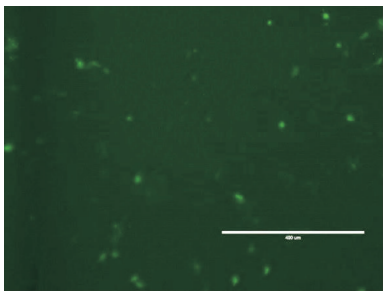


图4 荧光显微镜下用包装得到的慢病毒
颗粒感染P19细胞(×100)

慢病毒感染过程中荧光蛋白(GFP)的表达,结果显示重组病毒感染可以感染约5%~10%的P19细胞

293T有GFP的表达(图3)。这表明慢病毒质粒以及慢病毒包装辅助质粒的转染效率大于95%,可保证重组病毒的有效获得。

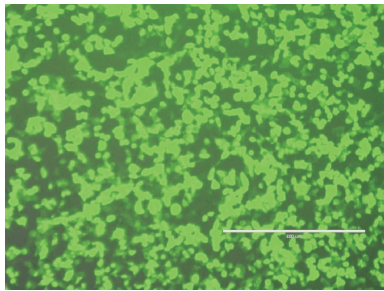


图3 荧光显微镜下观察带有GFP报告基因的慢病毒
表达载体在293T细胞中的扩增与包装(×100)

4. 病毒感染P19细胞的转染效率检测:收集含重组病毒的培养基上清后取5ml与5ml新鲜的α-MEM完全培养基混合,并添加polybrene至终浓度8μg/ml以增强其感染效率。将此含重组病毒的混合培养基加入汇合度约50%的生长状态良好的P19细胞,对其进行感染。感染48h后,观察表达GFP的重组病毒对P19的感染效果,以确定重组病毒的感染效率。由结果显示重组病毒感染可以感染约5%~10%的P19细胞,足够进行下一步的筛选工作(图4)。

5. Western blot法分析初步筛选CARM1 shRNA各表达载体对CARM1基因表达的抑制作用:用含有慢病毒颗粒的培养基上清感染P19细胞后,12h换无嘌呤霉素的培养基,感染48h后换含有2μg/ml嘌呤霉素的培养基,嘌呤霉素筛选7天后,收集细胞,Western blot法检测CARM1、PRMT1、PRMT5、果蝇Zeste基因增加子同源物2(enhancer of zeste homolog 2, EZH2)的表达情况(图5),结果显示pL-

KO.1/CARM1 shRNA2、pLK0.1/CARM1 shRNA3明显降低了CARM1的表达,但是对PRMT1、PRMT5和EZH2的表达没有影响,证明这两组shRNA没有脱靶效应。pLK0.1/CARM1 shRNA2、pLK0.1/CARM1 shRNA3有很好的干扰效率和特异性,可以继续培养并筛选稳定敲低CARM1的P19单克隆细胞系。

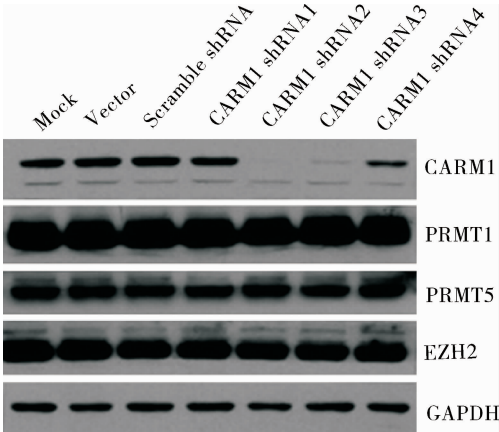


图5 Western blot法初步检测P19细胞感染慢病毒
CARM1 shRNA和shRNA阴性对照后,CARM1、
PRMT1、PRMT5、EZH2以及GAPDH的表达

6. 实时荧光定量PCR鉴定稳定敲低CARM1表达的小鼠畸胎瘤P19细胞系:分别挑取感染pLK0.1/CARM1 shRNA2,pLK0.1/CARM1 shRNA3,pLK0.1/Scramble shRNA慢病毒的P19细胞单克隆至6孔板,待其长满转移至直径为10cm的平皿中,用正常培养基进行培养,冻存细胞,获得3种P19细胞系。收集3种细胞,提取细胞总RNA,反转录,实时荧光定量PCR检测细胞内CARM1基因mRNA的水平。结果显示pLK0.1/CARM1 shRNA2,pLK0.1/CARM1 shRNA3能显著降低CARM1基因mRNA的表达水平(P

<0.01, 图6)。

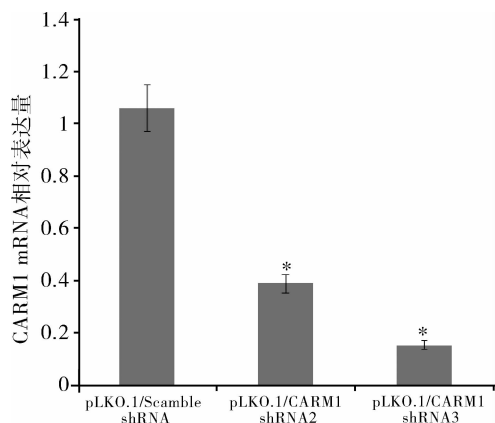


图6 实时荧光定量PCR检测目的基因

CARM1的mRNA水平

由图可知 pLKO.1/CARM1 shRNA2, pLKO.1/CARM1 shRNA3 有明显的干扰效果
与 PLKO.1/Scramble shRNA 相比, * $P < 0.01$

7. Western blot 法分析鉴定稳定敲低 CARM1 表达的小鼠畸胎瘤 P19 细胞系: 复苏上述已得到的 CARM1 敲低相关的 3 株细胞系, 用正常培养基培养并收集全细胞裂解液, 进行 Western blot 实验检测 CARM1、PRMT1、PRMT5、EZH2 等的表达情况 (图7), 结果显示 pLKO.1/CARM1 shRNA2、pLKO.1/CARM1 shRNA3 明显降低了 CARM1 的表达, 但是对 PRMT1、PRMT5 和 EZH2 的表达没有影响, 从而证明 pLKO.1/CARM1 shRNA2、pLKO.1/CARM1 shRNA3 有很好的干扰效率和特异性, 笔者已经获得了稳定敲低 CARM1 的 P19 单克隆细胞系。

相差显微镜观察稳定敲低 CARM1 的各个 P19 单克隆细胞系, 并未发现显著的形态变化。之后, 我们利用 Western blot 法, 在各细胞系中, 对干性维持相关基因的表达水平进行了检测, 只得到比较细微的表达差异。这些结果暗示 CARM1 可能在 P19 细胞命运动态变化的过程中发挥作用, 而非用于维持 P19 细胞的稳态。

讨 论

精氨酸甲基转移酶 CARM1 最初在酵母双杂实验中发现与糖皮质激素受体结合蛋白 1 (glucocorticoid receptor interacting protein 1, GRIP1) 发生强烈的相互作用, 其中 GRIP1 是类固醇受体共激活剂^[3]。小鼠胚胎敲除 CARM1 后发现胚胎大小明显小于野生型的小鼠胚胎, 小鼠在围生期就死亡。在 CARM1^{-/-}的成纤维细胞和胚胎中进一步的观察发

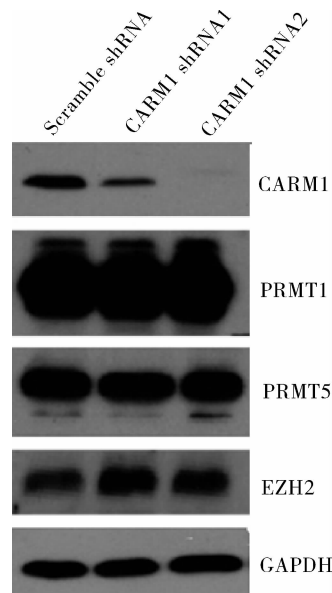


图7 Western blot 法检测 P19 细胞感染 CARM1

shRNA 和 shRNA 阴性对照慢病毒后挑选的
细胞单克隆 CARM1、PRMT1、PRMT5、
EZH2 及 GAPDH 的表达

现其对雌性激素有响应的基因表达出现了混乱, 这就提示 CARM1 在雌性激素介导的转录激活中起到很重要的作用^[9,10]。进一步研究显示, CARM1^{-/-}小鼠的胸腺不能正常发育^[11]。近期有研究报道在四细胞胚胎卵裂球时期, 组蛋白 H3 的精氨酸残基被 CARM1 甲基化, 这种表观遗传学修饰调节了胚胎干细胞的多能性^[7]。在胚胎发育的二细胞卵裂球时期, 选取其中一个细胞过表达 CARM1, 可促使该细胞向具有多能性的内细胞团发展。而在胚胎干细胞中敲除 CARM1 使得其失去其多能性, 这些结果都表明 CARM1 对胚胎干细胞的多能性具有重要的调控作用^[12]。然而, CARM1 如何维持多能性尤其是在早期胚胎中其维持多能性的机制仍然不是很明晰。

pLKO.1 是 TRC 开发的一套成熟的慢病毒体系^[13]。作为慢病毒, 其巨大优势是能够有效地感染多种宿主细胞, 包括原代细胞以及干细胞。此外, TRC 经分析验证后发布了丰富的 shRNA 数据库, 对目的基因干扰效率高。利用 pLKO.1 系统, 可以容易地包装得到病毒颗粒, 从而将 shRNA 片段插入基因组, 进行稳定有效地干扰。P19 畸胎瘤细胞来自于小鼠畸胎瘤胚胎细胞衍生的细胞, 具备多能性的特点, 有能化成 3 个胚层的不同细胞类型的潜力^[14]。本实验室有成熟的 P19 分化模型, 即在 RA 诱导下, P19 细胞可向神经样细胞分化。笔者用 CARM1 shRNA

慢病毒载体转染 293T 细胞,在该细胞中成功包装得到含有 CARM1 shRNA 的慢病毒颗粒,利用其感染 P19 细胞,有效地沉默了 CARM1 的表达。借助 Western blot 法以及实时荧光定量 PCR,我们筛选出有明显干扰效果的 CARM1 shRNA 慢病毒载体,并且验证了 CARM1 shRNA 慢病毒载体的干扰效率及特异性。利用 pLKO.1 shRNA 慢病毒体系,笔者最终成功构建得到稳定敲低 CARM1 表达的小鼠畸胎瘤 P19 细胞系。尽管各个稳定敲低 CARM1 表达的 P19 细胞系在形态上并没有发生明显变化,而且干性维持相关基因的表达也没有显著的改变,但是结合 P19 分化模型,参考 CARM1 在细胞分化过程的研究报道,笔者认为 CARM1 有可能在 P19 细胞命运改变过程中,发挥重要的动态调控功能。

参考文献

- 1 Bedford MT, Richard S. Arginine methylation an emerging regulator of protein function [J]. *Molecular cell*, 2005, 18(3): 263 - 272
- 2 Ahmad A, Cao X. Plant PRMTs broaden the scope of arginine methylation [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2012, 39(5): 195 - 208
- 3 Chen D. Regulation of transcription by a protein methyltransferase [J]. *Science*, 1999, 284(5423): 2174 - 2177
- 4 Frankel A. The novel human protein arginine N - methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(5): 3537 - 3543
- 5 McBride AE, Silver PA. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age [J]. *Cell*, 2001, 106(1): 5 - 8
- 6 Pal S, Vishwanath SN, Erdjument - Bromage H, et al. Human SWI/ SNF - associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and nega-

- tively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(21): 9630 - 9645
- 7 Wu Q. CARM1 is required in embryonic stem cells to maintain pluripotency and resist differentiation [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(11): 2637 - 2645
- 8 Root DE, Hacohen N, Hahn WC, et al. Genome - scale loss - of - function screening with a lentiviral RNAi library [J]. *Nature Methods*, 2006, 3(9): 715 - 719
- 9 Pawlak MR, Scherer CA, Chen J, et al. Arginine N - methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(13): 4859 - 4869
- 10 Yadav N. Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator - associated arginine methyltransferase 1 - deficient mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(11): 6464 - 6468
- 11 Kim J. Loss of CARM1 results in hypomethylation of thymocyte cyclic AMP - regulated phosphoprotein and deregulated early T cell development [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(24): 25339 - 25344
- 12 Torres - Padilla ME, Parfitt DE, Kouzarides T, et al. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo [J]. *Nature*, 2007, 445(7124): 214 - 218
- 13 Moffat J. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high - content screen [J]. *Cell*, 2006, 124(6): 1283 - 1298
- 14 van der Heyden MA, Defize LH. Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation [J]. *Cardiovascular Research*, 2003, 58(2): 292 - 302

(收稿日期:2014 - 01 - 17)

(修回日期:2014 - 01 - 21)

银杏叶提取物对 1 型糖尿病心肌病大鼠心肌 Bcl - 2、Bax 和 caspase - 3 表达的影响

袁凤菊 卢 璐 刘根林 李 鹏 郑靖宇 杨开颜 李剑敏

摘 要 目的 探讨银杏叶提取物(extract of *Ginkgo biloba*, EGB)对 1 型糖尿病心肌病大鼠心肌 Bcl - 2、Bax 和 caspase - 3 表达的影响。**方法** 将 30 只 SD 雄性大鼠随机分成 3 组:正常对照组(Con 组, $n = 10$)、糖尿病模型组(DM 组, $n = 10$)和银杏叶提取物治疗组(EGB 组, $n = 10$)。用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)进行腹腔注射,建立 1 型糖尿病动物模型后用银杏叶提取物注射液腹腔注射建立 EGB 组,其余两组给予相同体积的生理盐水。于 12 周末用超声心动图仪测定左心室舒张末期容积

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170204);浙江省温州市科技局对外合作项目(H20090008)

作者单位:325003 温州医科大学附属第一医院病理科

通讯作者:杨开颜,电子信箱:1220235004@qq.com;李剑敏,电子信箱:wzyxyljmin@163.com