

hand2 基因对斑马鱼胚胎发育影响的实验研究

孙淑娜¹ 桂永浩^{1Δ} 宋后燕² 蒋 璆² 王跃祥²

(¹ 复旦大学附属儿科医院心内科 上海 200032; ² 复旦大学分子医学教育部重点实验室 上海 200032)

【摘要】 目的 观察 *hand2* 在斑马鱼胚胎内的表达情况,验证显微注射吗啡啉修饰的反义寡核苷酸(Morpholino oligonucleotides,MO)使 *hand2* 表达下调的有效性。观察 *hand2* 表达下调后斑马鱼胚胎发育的异常表型,初步探讨 *hand2* 在斑马鱼胚胎发育中的作用,为利用斑马鱼开展 *hand2* 的功能研究提供线索。**方法** 采用胚胎整体原位杂交的方法观察 *hand2* 在斑马鱼胚胎内的表达情况。利用向斑马鱼受精卵显微注射 MO 的方法使 *hand2* 表达下调,并进行 *hand2* 表达下调的效率验证。将斑马鱼单细胞受精卵分为 4 组进行显微注射,即对照 MO(Con MO)注射组、*hand2* MO 注射组、*hand2*-GFP mRNA 注射组和 *hand2*-GFP mRNA + *hand2* MO 注射组。在荧光显微镜下观察 *hand2*-GFP mRNA 注射组和 *hand2*-GFP mRNA + *hand2* MO 注射组的荧光表达情况以验证 *hand2* 表达下调的效率。在显微镜下观察 *hand2* MO 注射组斑马鱼胚胎的各器官发育情况并进行评定。**结果** *hand2* 在斑马鱼胚胎的侧板中胚层、咽弓、心脏和鳍有较强表达。*hand2*-GFP mRNA 注射组在 8 hpf (hours post fertilization)时胚胎有较强的荧光表达,而 *hand2*-GFP mRNA + *hand2* MO 注射组胚胎几乎无荧光表达。与 Con MO 注射组相比,*hand2* MO 注射组斑马鱼胚胎的心脏、血管、血细胞、鳍以及体节有明显的发育异常。**结论** 向斑马鱼受精卵显微注射 *hand2* MO 的方法可有效的使 *hand2* 表达下调。*hand2* 在斑马鱼胚胎的心脏、血管、血细胞、鳍以及体节的发育过程中有重要作用。

【关键词】 *hand2*; 斑马鱼; 胚胎发育; 吗啡啉修饰的反义核苷酸

【中图分类号】 Q 959.483 **【文献标识码】** A

The effects of *hand2* knock-down on the zebrafish embryonic development

SUN Shu-na¹, GUI Yong-hao^{1Δ}, SONG Hou-yan², JIANG Qiu², WANG Yue-xiang²

(¹ Department of Cardiology, Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China;

² Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education-Department of Molecular Genetics, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Objective To detect the *hand2* expressing pattern in zebrafish embryos, and to demonstrate that microinjecting morpholino oligonucleotides (MO) would be an effective method to block the *hand2* expression and observe the abnormal phenotypes induced by *hand2* knock-down. The present study is expected to provide the clue for the functional study on *hand2*. **Methods** Whole-mount *in situ* hybridization was performed to detect the expression pattern of *hand2*. Zebrafish fertilized eggs were divided into four groups (Con MO microinjected group, *hand2* MO microinjected group, *hand2*-GFP mRNA microinjected group and *hand2*-GFP mRNA + *hand2* MO microinjected group). The GFP expression of *hand2*-GFP mRNA microinjected group and *hand2*-GFP mRNA + *hand2* MO microinjected group were detected by fluorescent microscope to evaluate the efficiency of *hand2* knock-down. The development of Con MO microinjected embryos and *hand2* MO microinjected embryos were observed under microscope. **Results** The *hand2* expression were observed in lateral mesoderm, pharyngeal arches, heart and fins. Strong GFP expression was observed in *hand2*-GFP mRNA microinjected group at 8 hpf(hours post fertilization). Compared with *hand2*-GFP mRNA microinjected group, the expression of GFP in *hand2*-GFP mRNA + *hand2* MO microinjected group was obviously reduced. Compared with Con MO group, the *hand2* MO injected group showed apparent malformation at the heart, the vessel, the blood cells, the fin and the somite. **Conclusions** Microinjecting *hand2* MO can effectively

knock-down *hand2*. *hand2* plays an important role in the development of the heart, the vessel, the blood cell, the fin and the somite in zebrafish.

【Key words】 *hand2*; zebrafish; embryonic development; morpholino oligonucleotides

hand2 是 B 族 bHLH 基因, 定位于人类的 5q33 染色体。近年来研究发现 *hand2* 对于胚胎发育十分重要, 其功能异常与人类一些先天性异常综合征相关 (如 22q11 缺失综合征、DGS 综合征、CATCH-22 综合征等)^[1-3]。明确 *hand2* 在胚胎发育过程中的作用, 对于预防和治疗先天性发育异常有重要意义。目前已有学者在小鼠、鸡胚等模式生物中开展 *hand2* 的功能研究, 发现 *hand2* 在对于胚胎的心脏、血管发育意义重大。但这些研究缺乏对胚胎整体发育状况的观察, 亦未就 *hand2* 如何调控胚胎发育开展基因水平的进一步研究。斑马鱼是近年来新兴进行基因功能研究的首选模式生物, 已日益成为进行基因功能研究的有利工具^[4,5]。另外, 斑马鱼的胚胎透明, 也十分有利于进行胚胎各系统发育的观察。目前在斑马鱼中开展 *hand2* 的功能研究还为之甚少。本实验以斑马鱼为模式生物, 通过有效使 *hand2* 表达下调后观察胚胎发育的异常情况而初步研究 *hand2* 对胚胎发育的影响, 旨在为进一步阐明 *hand2* 在胚胎发育中的作用提供线索和依据。

材料和方法

实验动物 野生型斑马鱼 (AB 系) 购自美国 Oregon 大学, 养殖系统从美国 Aquatic Habitats 公司引进。受精卵置于孵化液 (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 海盐) 28 $^{\circ}\text{C}$ 孵化, 出绒毛膜后在胚胎培养液 (embryo medium) 内养育。按照 Kimmel 等人^[6,7] 描述对受精卵进行发育阶段分期。

实验仪器 GHP-9160 隔水式恒温培养箱、OLYMPUS SZX12 显微镜及显微摄像系统、NARISHIGE IM 300 显微注射仪。

吗啡啉修饰的反义核苷酸 (morpholino oligonucleotides, MO) 的设计与合成 *hand2* MO 以及 Con MO 由美国 GENE TOOLS 公司设计以及合成。*hand2* MO: 5'-GGAAACCCTCCAACCTAACTCATGG-3', Con MO: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3', *hand2* MO 以及 Con MO 分别溶解于 30% Danieau 溶液中至 4 mmol/L, 置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

***hand2*-GFP mRNA 的合成** 抽提 48 hpf (hours post fertilization) 斑马鱼胚胎的总 mRNA, 经逆转录获得全长 cDNA。使用 Primer 3 设计软件设计如

下引物, F: 5'-CGGATATCATGAGTTTAGTTG-GAGGGTT-3', R: 5'-CGACTAGTTCATTGCTTCAGTTCCAATG-3'。应用上述引物从全长 cDNA 中经 PCR 扩增 *hand2* cDNA 片段, 并同时扩增的 *hand2* cDNA 片段两端引入 *Eco* V 和 *Spe* I 的酶切位点。将扩增的 *hand2* cDNA 片段以及 T7Ts-GFP 载体经 *Eco* V 和 *Spe* I 双酶切后, 应用 T₄ DNA 连接酶进行连接, 获得含有 *hand2* cDNA 片段的重组 T₇Ts-GFP 质粒。应用 Ambion 公司的 mMGSSAGE mMACHINE T₇ 试剂盒从重组质粒中体外转录 *hand2*-GFP mRNA^[8]。定量 *hand2*-GFP mRNA 后溶于 30% 的 Danieau 溶液中至 2 mmol/L, 置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

显微注射 将 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冻存的 Con MO、*hand2* MO 以及 *hand2*-GFP mRNA 稀释于 30% 的 Danieau 溶液中。在显微镜下挑选发育至 1~2 个细胞期的受精卵, 按以下 4 组进行注射, 分别注入 1.5 nL 0.05 mmol/L Con MO、1.5 nL 0.1 mmol/L *hand2* MO、1.5 nL 0.2 mmol/L *hand2*-GFP mRNA 以及 1.5 nL 0.1 mmol/L *hand2* MO + 1.5 nL 0.2 mmol/L *hand2*-GFP mRNA。每组注射 100 个受精卵。

胚胎固兰染色 将 60 hpf 的胚胎去除绒毛膜, 置于固兰染液 (0.6 mg/mL 固兰、0.01 mol/L 醋酸钠、0.65% 过氧化氢、40% 乙醇) 中避光显色 10~15 min, 放于显微镜下观察。

斑马鱼胚胎发育的观察 在显微镜下观察 Con MO 以及 *hand2* MO 注射组胚胎的心脏、鳍以及体节的发育情况; 向上述两组胚胎心脏内注射 3 nL 荧光素, 在荧光显微镜下观察血管的发育情况; 利用固兰染色观察血红蛋白的表达情况。

结 果

***hand2* 在斑马鱼胚胎内有较强表达** 胚胎整体原位杂交的结果显示, 在胚胎发育至 18 hpf 时, *hand2* 在侧板中胚层有较强表达 (图 1 A)。在 24 hpf 时, *hand2* 表达于胚胎的第 1~2 对咽弓 (图 1 B, C)。当胚胎发育至 36 hpf 时, *hand2* 在咽弓的表达区域扩展到第 1~3 对咽弓 (图 1 D, E)。至 48 hpf 时, *hand2* 不仅在咽弓区域有较强表达, 还表达于心脏和鳍芽 (图 1 F, G)。

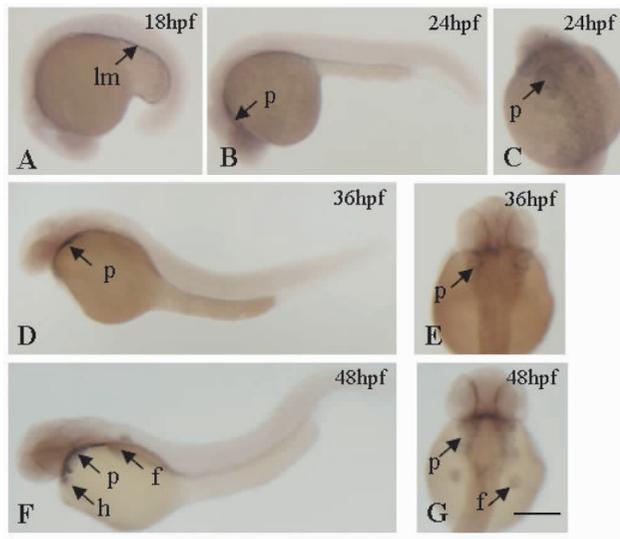


图 1 *hand2* 在斑马鱼中的表达谱(原位杂交)

Fig 1 The expression of *hand2* in zebrafish (in situ hybridization)

A: Lateral mesoderm; B, C: 1-2 pharyngeal arches; D, E: 1-3 pharyngeal arches; F, G: The whole pharyngeal arches, the heart and the fins; A, B, D, F: Lateral view (anterior towards the left); C, E, G: Dorsal view (anterior towards the top). (Scale bar: 200 μ m)

与 *hand2*-GFP mRNA 注射组相比, *hand2*-GFP mRNA + *hand2* MO 注射组胚胎几乎无荧光表达。在 8 hpf 时, *hand2*-GFP mRNA 注射组胚胎内有较强的绿色荧光蛋白(GFP)表达(图 2 B), 提示显微注射的 *hand2*-GFP mRNA 在斑马鱼体内可表达外源性 *hand2*。 *hand2*-GFP mRNA + *hand2* MO 注射组胚胎内绿色荧光蛋白的表达量明显下降(图 2 C), 说明 *hand2* MO 可有效的阻断 *hand2* 表达, 从而绿色荧光蛋白的表达减少。

hand2 MO 注射组胚胎心脏和血管发育异常。显微镜下对 48 hpf *hand2* MO 注射组胚胎心脏观

察的结果发现, 与 Con MO 注射组相比, *hand2* MO 注射组胚胎的心室发育不良, 如心室腔体积缩小、心室搏动无力, 心房略扩张(图 3 B)。48 hpf *hand2* MO 注射组胚胎的心率明显减慢, 心室收缩指数明显下降, 但心房收缩指数无明显差异(图 4 A)。在 60 hpf 时, 与 Con MO 相比, *hand2* MO 注射组胚胎的心率、心室收缩指数及心房收缩指数都不同程度的降低(图 4 B)。这显示 *hand2* 表达下调组胚胎心脏的形态和功能都发生了异常。在 60 hpf 时在荧光显微镜下观察血管发育情况的结果表明, Con MO 注射组胚胎的背主动脉、体轴静脉以及体节间血管显影清晰(图 3 C)。与 Con MO 注射组相比, *hand2* MO 注射组胚胎的体节间血管显影模糊甚至缺失, 但这些胚胎的背主动脉和体轴静脉显影清晰(图 3 D)。

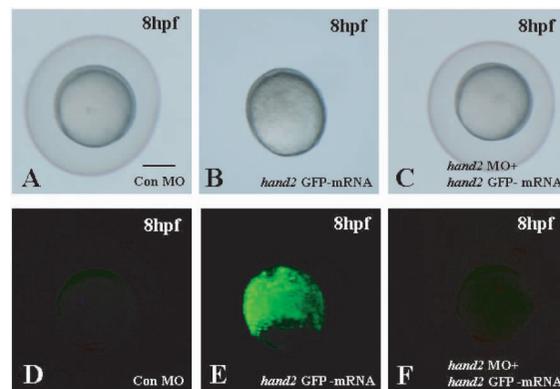


图 2 显微注射 *hand2* MO 可有效抑制 *hand2* 的表达

Fig 2 Microinjecting *hand2* MO can effectively inhibit *hand2* expression

A and D: Con MO injected group, no fluorescence. B and E: *hand2*-GFP mRNA injected group, GFP fluorescence was observed. C and F: *hand2* MO + *hand2*-GFP mRNA injected group, no fluorescence. (D, E, F: Fluorescent field. A, B, C: Bright field.) (Scale bar: 200 μ m)

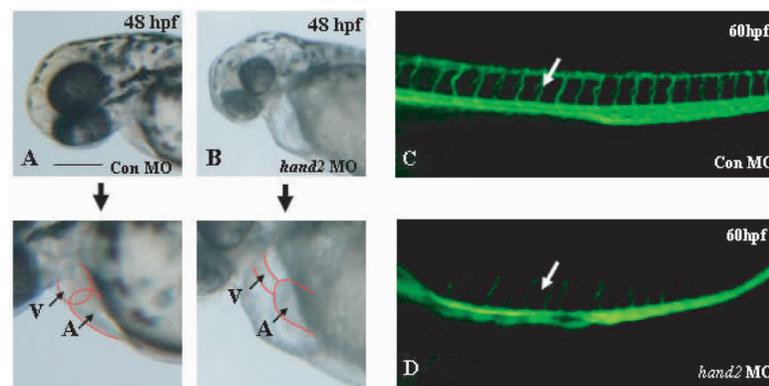


图 3 *hand2* K-D 对胚胎心脏及血管发育影响的观察

Fig 3 The effects of *hand2* K-D on the development of hearts and vessels

A, B, C, D: Lateral view (anterior towards the left). Compared with Con MO injected embryo (A and C), *hand2* MO injected embryo had obvious malformations in heart (B), and the image of vessels were not clear and even lost (D). (C and D: Fluorescent field) (Scale bar: 200 μ m)

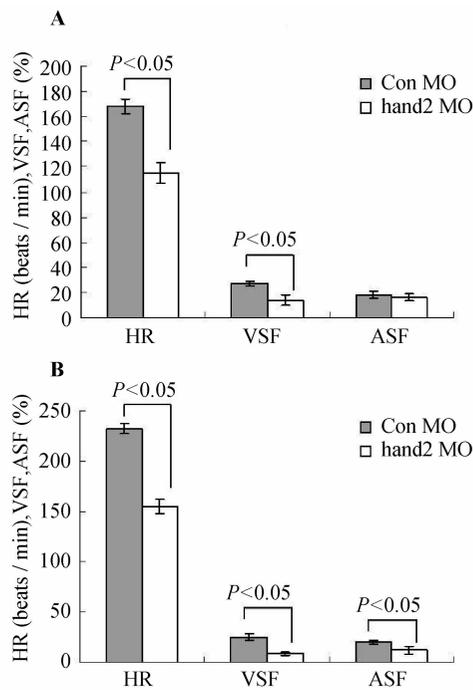


图4 *hand2* K-D对胚胎心率、VSF及ASF的影响
Fig 4 The effects of *hand2* K-D on the HR, VSF and ASF
A: 48 hpf; B: 60 hpf

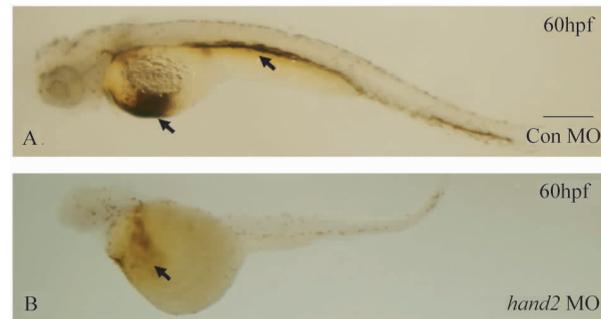


图5 *hand2* K-D导致胚胎体内血红蛋白含量减少
Fig 5 The production of hemoglobin was reduced in *hand2* K-D embryos
(Arrows indicate the hemoglobin) (Scale bar: 200 μm)

hand2 MO注射组胚胎血细胞内血红蛋白生成明显减少。通过固兰染色观察48 hpf胚胎内血红蛋白含量的结果表明:与Con MO注射组相比,*hand2* MO注射组胚胎体内的血红蛋白含量明显下降(图5)。这提示*hand2* MO注射组胚胎造血干细胞向红细胞分化的过程可能受到干扰。

hand2 MO注射组胚胎体节和鳍发育异常。与Con MO注射组相比,60 hpf *hand2* MO注射组胚

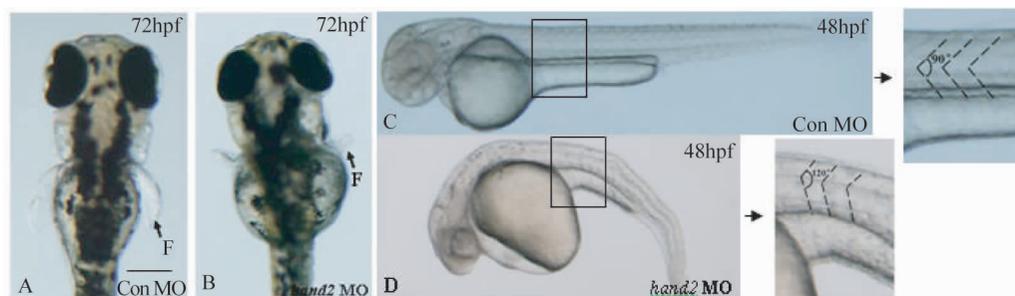


图6 *hand2* K-D对胚胎鳍及体节发育影响的观察

Fig 6 The effects of *hand2* K-D on the development of fins and somites

A and B: Dorsal view (anterior towards the top). C and D: Lateral view (anterior towards the left). Injection of *hand2* MO results in dysplasia of fins and the chevron-shaped somites with an angle of 120°, while that angle in Con MO injected embryo was 90°. (Scale bar: 200 μm)

胎的鳍发育延迟并有明显畸形(图6 B);体节明显短小,体节各分节的长度缩短,角度增大(图6 D)。

讨 论

目前许多研究都表明 *hand2* 与胚胎发育密切相关。在人类中,*hand2* 与 *TBX1* 和 *END1* 之间有相互作用,与人类 DGS 的发病有关^[3]。*UFD1L* 是人类 22q11 缺失综合征的候选基因,其定位于人类 22q11 染色体,*hand2* 可 *UFD1L* 功能而与人类 22q11 缺失综合征有关联^[1]。另有在鸡胚和鼠胚中的研究表明,*hand2* 在胚胎心脏^[9,10]、血管^[11]、肢

体^[12-14]等发育过程中扮演重要角色,但 *hand2* 如何调节这些器官发育的机制尚未明了。在斑马鱼中,*hand2* 在原肠胚形成后即表达于侧板中胚层^[15],是胚胎发育过程中的早期表达基因。我们的实验中发现 *hand2* 不仅在胚胎发育早期在侧板中胚层有较强表达,随着胚胎发育时间的推移,还表达于胚胎的咽弓、心脏和鳍芽。*hand2* 通过参与多种信号通路以及与其他基因之间通过复杂的相互作用参与调节胚胎不同器官和系统的发育。本研究旨在通过有效 knock-down *hand2* 后,观察斑马鱼胚胎发育的异常表型,为在斑马鱼中开展 *hand2* 的功能研究提供线索。

近年来利用模式生物斑马鱼,借助显微注射吗啡啉修饰反义寡核苷酸的方法已被证实是一种简单、有效的阻抑目的基因功能的方法^[16]。吗啡啉修饰的反义寡核苷酸可在靶基因的翻译起始位点ATG附近有效的阻断靶基因的翻译从而阻断靶基因的表达。由于斑马鱼体外受精,容易获得受精卵并进行显微注射操作,因此利用模式生物斑马鱼借助显微注射吗啡啉修饰反义寡核苷酸而阻断目的基因功能的方法已被国内外许多科研机构所采用。在实验中,我们通过显微注射 *hand2* MO 的方法来 knock-down *hand2*, 并进行了效率验证。我们向受精卵显微注射体外合成的 *hand2*-GFP mRNA 可以在受精卵内同时表达 *hand2* 和荧光蛋白。若 *hand2* MO 可以有效的阻断 *hand2* 的表达,则显微注射的 *hand2*-GFP mRNA 的表达也会被 *hand2* MO 阻断,从而造成荧光蛋白的生成减少。在实验中我们发现与 *hand2*-GFP mRNA 注射组相比, *hand2*-GFP mRNA + *hand2* MO 注射组胚胎几乎无荧光表达,说明 *hand2* MO 可以高效的 knock-down *hand2*。在进行了 *hand2* MO 的效率验证后,我们观察了 *hand2* MO 注射组胚胎的发育情况。

与 Con MO 注射组相比, *hand2* MO 注射组的胚胎存在心脏、血管、血细胞、鳍以及体节的发育异常,这说明 *hand2* 在上述器官的发育和分化过程中扮演重要角色。与在斑马鱼中开展其他基因功能研究时所观察到的异常表型相比, *hand2* MO 注射组胚胎上述各器官的异常表型又具有特征性, *hand2* MO 注射组胚胎的心室发育异常程度大于心房、背主动脉的发育未受到干扰,血细胞生成减少,体节间血管的发育明显异常、体节发育的异常以短小为主,伴有单个体节“V”字型角度的增大。这些特异的表型提示我们 *hand2* 在斑马鱼胚胎发育过程中有独特的作用,在后续的研究中,我们将利用先进的分子生物学技术逐步阐明 *hand2* 在斑马鱼胚胎发育中扮演的特殊角色。

参 考 文 献

- [1] Chung MY, Lu JH, Weng YY, *et al.* Absence of mutations in human ubiquitin fusion-degradation protein gene in tetralogy of Fallot[J]. *J Mol Med*, 2001, 79(5-6):338-342.
- [2] Thomas T, Kurihara H, Yamagishi H. A signaling cascade involving endothelin-1, dHAND and msx1 regulates development of neural-crest-derived branchial arch mesenchyme[J]. *Dev*, 1998, 125(16):3 005-3 014.
- [3] Piotrowski T, Ahn DG, Schilling TF. The zebrafish van gogh mutation disrupts *tbx1*, which is involved in the Di-George deletion syndrome in humans [J]. *Development*, 2003, 130(20):5 043-5 052.
- [4] Teraoka H, Dong W, Hiraga T. Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology [J]. *Congenit Anom*, 2003, 43(2):123-132.
- [5] Sehnert AJ, Huq A, Weinstein BM, *et al.* Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility [J]. *Nat Genet*, 2002, 31(1):106-110.
- [6] Westerfield MA. Guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) [M]. The Zebrafish Book. Eugene OR: Univ. of Oregon Press, 1995, 3. 1-4. 6.
- [7] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. *Dev Dyn*, 1995, 203(3): 253-310.
- [8] Wang Y, Qian L, Dong Y, *et al.* Myocyte-specific enhancer factor 2A is essential for zebrafish posterior somite development [J]. *Mech Dev*, 2006, 123(10):783-791.
- [9] Meilhac SM, Esner M, Kerszberg M, *et al.* Oriented clonal cell growth in the developing mouse myocardium underlies cardiac morphogenesis [J]. *J Cell Biol*, 2004, 164(1):97-109.
- [10] Togi K, Kawamoto T, Yamauchi R, *et al.* Role of Hand1/eHAND in the dorso-ventral patterning and interventricular septum formation in the embryonic heart [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(11):4 627-4 635.
- [11] Murakami M, Kataoka K, Tominaga J, *et al.* Differential cooperation between dHAND and three different E-proteins [J]. *Biophys Res Commun*, 2004, 8:323(1):168-174.
- [12] Firulli BA, Krawchuk D, Centonze VE, *et al.* Altered twist1 and *hand2* dimerization is associated with Saethre-Chotzen syndrome and limb abnormalities [J]. *Nat Genet*, 2005, 37(4):373-381.
- [13] te Welscher P, Fernandez-Teran M, Ros MA, *et al.* Mutual genetic antagonism involving GLI3 and dHAND prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to SHH signaling [J]. *Genes Dev*, 2002, 15:16(4):421-426.
- [14] Fernandez-Teran M, Piedra ME, Kathiriyi IS, *et al.* Role of dHAND in the anterior-posterior polarization of the limb bud: implications for the sonic hedgehog pathway [J]. *Dev*, 2000, 127(10):2 133-2 142.
- [15] Angelo S, Lohr J, Lee KH. Conservation of sequence and expression of *Xenopus* and zebrafish dHAND during cardiac, branchial arch and lateral mesoderm development [J]. *Mech Dev*, 2000, 95(1-2):231-237.
- [16] Heasman J. Morpholino oligos: making sense of antisense [J]. *Dev Biol*, 2002, 243(2):209-214.

(收稿日期:2007-11-30;编辑:张秀峰)