

结蛋白对非洲爪蛙胚胎早期发育的影响

袁芳,刘佳,李卉,袁栋*

(南京医科大学生物化学与分子生物学,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨结蛋白对非洲爪蛙胚胎早期发育的影响。方法:利用实时定量 RT-PCR 和原位杂交方法检测结蛋白在胚胎发育各阶段的表达;通过显微注射特异性反义寡核苷酸进行敲降,利用原位杂交和实时定量 RT-PCR 方法检测各胚层标志基因表达的变化。结果:结蛋白低水平表达起始于囊胚期,自神经胚期起表达量增加,在随后的发育阶段持续高表达;结蛋白敲降导致胚孔闭合延迟,胚层相关标志基因的表达受抑制。结论:结蛋白自囊胚期起表达于非洲爪蛙胚胎发育各阶段,敲降结蛋白导致胚胎发育迟缓,胚层分化受抑。

[关键词] 结蛋白;非洲爪蛙;胚胎发育;胚层

[中图分类号] Q132

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)04-439-06

doi:10.7655/NYDXBNS20150401

Desmin is required for embryogenesis of *Xenopus laevis*

Yuan Fang, Liu Jia, Li Hui, Yuan Li*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of desmin on embryo development of *Xenopus laevis*. **Methods:** The expression of desmin during embryogenesis was detected by real-time RT-PCR and the whole mount *in situ* hybridization. The specific antisense oligonucleotides was performed to knockdown the expression of desmin by microinjection. The expression of marker genes was tested during germ layer formation by whole mount *in situ* hybridization and quantitative RT-PCR. **Results:** The weak expression of desmin starts from the early blastula stage and then detected through all periods of organogenesis. Knockdown of desmin inhibited the blastopore closure, and suppressed the expression of the endodermal, mesodermal and exodermal marker genes. **Conclusion:** The expression of desmin starts from the blastula during embryogenesis of *Xenopus laevis*. Loss function of desmin leads to embryonic growth retardation and depressed germ-layer formation.

[Key words] desmin; *Xenopus laevis*; embryogenesis; germ layer

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(04):439-444]

结蛋白(desmin)基因位于人类染色体 2q35^[1], 编码的结蛋白分子量为 52 000。结蛋白作为一种细胞骨架蛋白,是Ⅲ型中间纤维的重要成员之一^[2-3], 主要存在于肌细胞中,如平滑肌、骨骼肌、心肌^[4-6]以及神经肌肉接头处,如突触后膜、肌腱接点和肌纤维膜附着点^[7-8]。结蛋白除在细胞内起到机械性的支撑作用外,还与信号转导、心肌细胞收缩、再生、线粒体功能调节等功能有关^[9-10]。

结蛋白参与多种心脏相关疾病,例如结蛋白基

因突变可以导致扩张型心肌病、结蛋白相关心肌病等^[11-13];过表达突变型的结蛋白可造成肌浆膜内异常结蛋白积聚、排列紊乱,使心肌肥厚、功能受损,导致充血性心力衰竭;结蛋白表达异常出现于不同原因导致的心力衰竭过程中^[14-15]。

在利用基因敲除小鼠进行的研究中发现,结蛋白基因敲除小鼠在胚胎发育期没有明显异常表型,但是小鼠出生后发生骨骼肌、心肌和平滑肌功能障碍^[10],组织学分析显示肌结构严重破坏和退化,平滑肌发育不全和退化,心肌细胞进行性退化和坏死^[16]。其他研究也证实,结蛋白是骨骼肌和心肌发育过程中重要的标志和功能蛋白^[11,17]。但是,结蛋白是否仅在出生后影响肌肉组织的发育,在胚胎早期发育中

[基金项目] 国家自然科学基金(81200125);江苏省自然科学基金(BK2012648);江苏省“青蓝工程”(JX2161015061)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:yuanli@njmu.edu.cn

是否也发挥作用,目前尚未阐明。本文利用非洲爪蛙作为模式动物,研究结蛋白对早期胚胎发育中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG, Sigma 公司, 美国), DNase I、限制性核酸内切酶、T7 聚合酶、T4 连接酶和 RevertAid™ first strand cDNA synthesis kit (Thermo Fermentas 公司, 美国), RNA 纯化试剂盒 RNeasy Mini Kit (QIAGEN 公司, 德国), Dig-UTP、anti-Dig-AP、BM Purple (Roche 公司, 瑞士), RNA 合成试剂 SP6 mMessage™ Kit (Ambion 公司, 美国), Taq DNA 聚合酶、PrimeSTAR® HS DNA 聚合酶、SYBR® Premix Ex Taq™ 定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司, 日本)。

1.1.2 引物和反义吗啉代寡核苷酸

结蛋白克隆引物序列为: 上游引物: 5'-CCGGGAATTC CAACCATGAGCCAGTCCTAC -3'; 下游引物: 5'-AATTGGTCCGCTTCCTGTGTAG-3', 定量 PCR 引物为: 上游引物: 5'-GGCACGTGTGGAGGTAGAAA-3', 下游引物: 5'-GCGTCTCTCCAGGTCTATGC-3', 其他定量 PCR 引物参见文献^[18]。

根据结蛋白基因 5' 端序列设计特异性封闭结蛋白的反义吗啉代寡核苷酸 (morpholino oligonucleotide, MO), 命名为 desmin MO, 序列为: 5'-GGTTGCTTGAATAGGATGGCTCAT-3', 由美国 Gene Tools 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建

根据结蛋白基因序列 (GenBank Accession No: BC077922.1) 设计克隆 PCR 引物, 通过 RT-PCR 对结蛋白的编码区进行扩增, 双酶切 PCR 产物并将其连接至 pCS²⁺质粒上, 命名为 pCS²⁺-desmin。

1.2.2 胚胎操作及显微注射

试验前 12 h 左右注射 300~600 U hCG 诱导雌性爪蛙排卵。体外受精 30 min 后, 去除受精卵外的胶质膜, 在 0.1×MBSH [1×MBSH: 88 mmol/L NaCl、2.4 mmol/L Na₂CO₃、1 mmol/L KCl、0.82 mmol/L MgSO₄、0.41 mmol/L CaCl₂、0.33 mmol/L Ca(NO₃)₂、10 mmol/L HEPES, pH7.4] 中培养至相应发育阶段。胚胎发育阶段的划分依照 Nieuwkoop 和 Faber 分期^[19]。

将 50 ng desmin MO 在胚胎 4 细胞期时注入 4 个细胞中, 以实现对接蛋白的敲降, 将胚胎置于恒温培

养箱中进行培养, 用于表型观察及基因表达分析。

1.2.3 逆转录和实时定量 PCR

收集胚胎并提取 RNA, 以 DNase I 消化并用 RNeasy Mini kit 纯化。取 1 μg 各胚胎总 RNA 用 RevertAid™ first strand cDNA synthesis kit 逆转录为 cDNA。以逆转录的 cDNA 为模板, 采用 TaKaRa 的 SYBR Green 试剂盒进行实时定量 PCR。

1.2.4 整胚原位杂交

将 pCS²⁺-desmin 用 EcoR I, pCS²⁺-xbra 用 Sal I, pCS²⁺-Sox17α 用 Cla I, pCS²⁺-Sox2 用 EcoR I 单酶切, 随后使用 T7 RNA 聚合酶制备反义探针, 反应体系中加入 Dig-UTP 作为探针标记。

收集并固定爪蛙胚胎, 用梯度浓度乙醇进行再水化, 用蛋白酶 K 处理后进行预杂交和杂交, 加入 anti-DIG-AP 抗体后, 与底物液 BM purple 进行显色反应。

1.2.5 Western blot

收集目标胚胎, 利用全蛋白试剂盒 (南京凯基) 提取蛋白, 经 10% SDS-PAGE 电泳分离后, 转移至 PVDF 膜上, 依次孵育一抗和二抗, 最后利用发光液显色。β-actin (鼠源) 抗体由美国 Santa Cruz 公司生产, 结蛋白 (兔源) 抗体购自美国 abcam 公司, 抗体稀释比例均为 1:1 000。

1.3 统计学方法

定量 RT-PCR 所得数据采用平均值 ± 标准误 ($\bar{x} \pm s_x$) 表示, 利用 SPSS 软件进行重复测量设计的方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结蛋白在不同物种间的序列比对

针对人、小鼠、大鼠、鸡以及热带爪蛙结蛋白的蛋白序列, 采用 clustalx2 进行氨基酸序列对比。结果显示, 结蛋白在 6 个不同物种间存在高度同源性, 非洲爪蛙结蛋白氨基酸序列与人类以及小鼠的相似性为 79%, 与鸡和大鼠的相似性为 80%, 与热带爪蛙的相似性为 97%。在结蛋白 3 个主要功能区域中^[3], rod 区与 C 末端 tail 区在 6 个物种间具有高度的相似性, 只是 head 区物种之间的差异较大, 但各物种结蛋白在此区域都有 1 个保守区段, 由 7 个芳香族氨基酸残基和氨基末端保守的九肽 ('SSYRRTFGG') 组成 (图 1)。

2.2 结蛋白在非洲爪蛙胚胎发育不同时期的表达

为研究结蛋白在非洲爪蛙胚胎发育过程中不同时期的表达, 收取受精卵期 (st.1)、卵裂期 (st.4)、



A: 各物种结蛋白氨基酸序列对比; B: 结蛋白在不同物种间氨基酸序列的同源性分析。Hu: 人类; Ms: 小鼠; Rat: 大鼠; Chk: 鸡; Xt: 非洲爪蛙; Xt: 热带爪蛙。

图 1 结蛋白氨基酸序列对比

Figure 1 Amino acid sequence alignment of desmin

囊胚期(st.7)、原肠胚期(st.11)、神经胚期(st.13、st.18)、尾芽期(st.28、st.32)、蝌蚪期(st.42)的胚胎,提取了不同时期胚胎的总 RNA 进行实时定量 RT-PCR 检测,结果显示,结蛋白的微弱表达起始于囊胚期,在神经胚早期(st.13)出现明显表达,随后在神经胚期、尾芽期以及蝌蚪期持续高表达(图 2A)。

随后利用原位杂交技术对结蛋白在胚胎发育过程中的表达部位进行检测,结果显示,在 st.11 时结蛋白表达于外胚层以及中胚层区域,内胚层未检测到其表达;st.18 时表达于主干区域、肌、轴旁中胚层以及肌节;st.32 主要表达于肌节和心脏等肌肉组织,在神经脊、后脑等神经组织中也有表达(图 2B)。

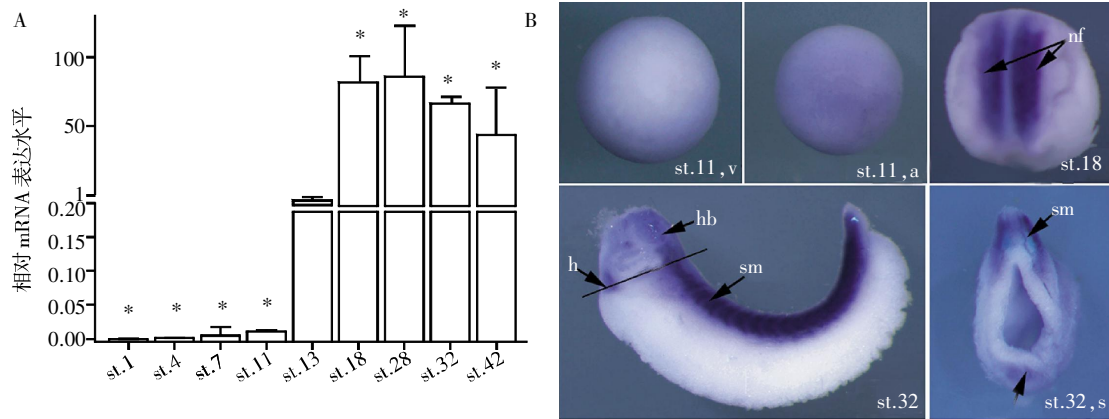
2.3 敲降结蛋白影响胚胎早期发育

通过敲降实验来研究结蛋白在早期发育中的作用时,首先利用 Western blot 验证 desmin MO 的敲降效率。结果显示,与对照胚胎相比,注射 desmin MO 的胚胎中结蛋白的表达量显著减少(图 3A)。

胚胎发育过程中,在 st.12 时对照胚胎形成胚孔,而注射 desmin MO 的胚胎发育迟缓,其胚孔尚未形成。当发育至 st.32,与正常胚胎相比,敲降胚胎前后体轴明显缩短,头部以及眼也明显变小(图 3B、C)。

2.4 敲降结蛋白影响胚层分化

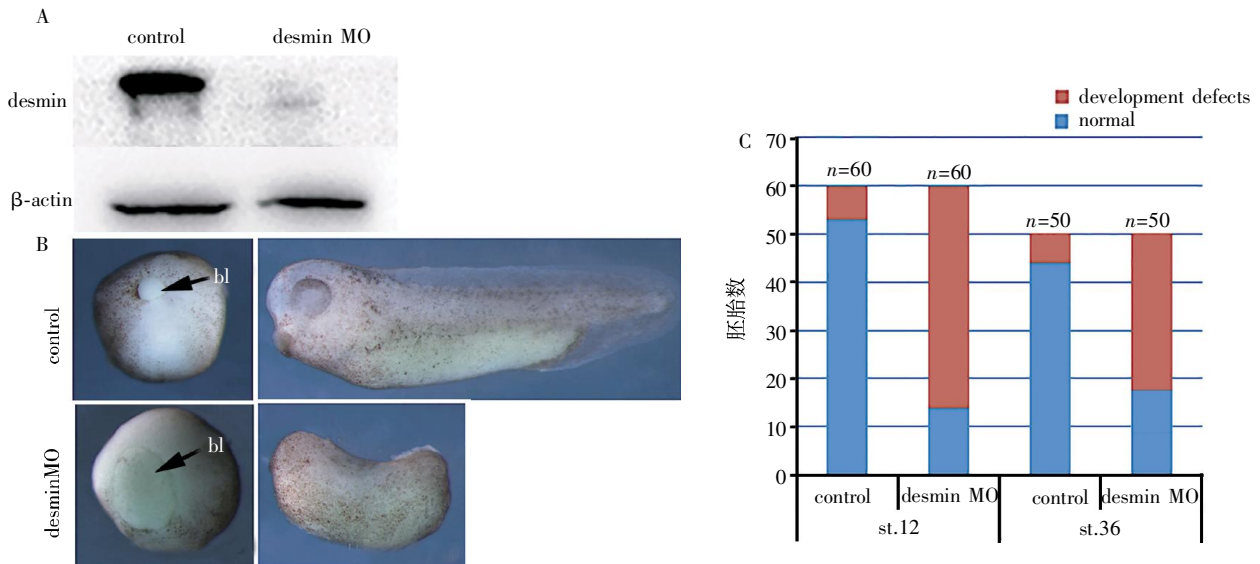
为研究结蛋白敲降后对胚层分化的影响,利用原位杂交技术检测内、中、外胚层标志基因的表达。



A:实时定量PCR检测结蛋白表达,与st.13比较,* $P < 0.01$;B:原位杂交检测结蛋白表达(整胚 $\times 20$;纵切面 $\times 60$),a:动物极;h:心脏;hb:后脑;nf:神经褶;s:纵切面;sm:肌节;v:植物极。

图2 结蛋白在胚胎发育不同时期的表达

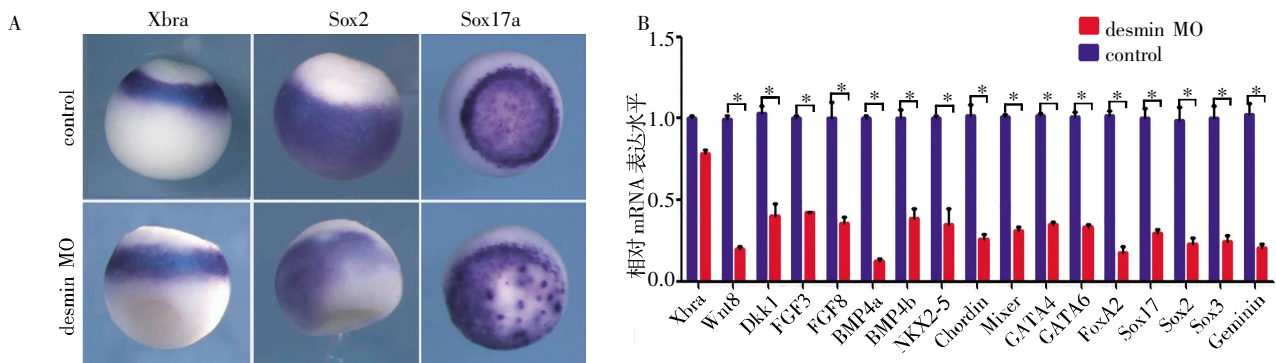
Figure 2 Expression pattern of desmin during embryonic development



A:结蛋白敲降效率验证;B:结蛋白敲降导致胚胎发育迟缓($\times 20$),bl:胚孔;C:对B图胚胎表型的数量统计。

图3 结蛋白对胚胎早期发育的影响

Figure 3 The effects of desmin knockdown on embryonic development



A:结蛋白敲降在st.11对内、中、外胚层标志基因的影响($\times 20$);B:结蛋白敲降胚胎st.11内、中、外胚层基因的表达,与Control比较,* $P < 0.05$ 。

图4 敲降结蛋白对各胚层标志基因的影响

Figure 4 The effects of desmin knockdown on expression of marker genes of germ-layer formation

结果显示,注射 desmin MO 的胚胎,其内胚层标志基因 Sox17 α , 外胚层标志基因 Sox2 的表达量都明显下降,然而泛中胚层基因 Xbra 的表达量无明显变化(图 4A)。利用实时定量 RT-PCR 检测其他标志性基因的表达,发现中胚层基因 FGF3、FGF8、NKX2-5、BMP4a、BMP4b、Chordin、DKK₁、Wnt8,内胚层标志基因 Mixer、Sox17 α 、GATA4、GATA6,以及外胚层标志基因 Sox2、Sox3、Geminin 均受到不同程度的抑制(图 4B)。

3 讨 论

细胞骨架包括微丝、微管和中等纤维,在细胞中具有多种重要的生物学功能。结蛋白是肌细胞中主要的中等纤维,在维持细胞内结构和胞外基质联结中起重要的作用。文献报道,结蛋白基因敲除小鼠在胚胎发育期没有明显异常表型,仅在出生后发生肌肉功能障碍。但是,出生后小鼠肌结构严重破坏和退化,平滑肌发育不全和退化,心肌细胞进行性退化和坏死^[16],结合其他文献报道表明结蛋白在肌肉发育中发挥重要作用^[10,20]。但是结蛋白是否在胚胎发育早期发挥作用尚未阐明。本文利用非洲爪蛙作为模式动物,研究了结蛋白在胚胎发育中的表达模式及其对早期胚层分化的影响。

首先,通过多重序列比对发现在不同物种间结蛋白的氨基酸序列是高度保守的,提示结蛋白功能的保守性。进而对结蛋白的表达模式进行进一步的鉴定。因为以往实验条件的限制,已有的关于结蛋白在细胞分化过程中表达的报道,无论是在体内还是在体外培养条件下的观察,都是从较晚的时期开始,如 7 d 以上的鸡胚,8.25 d 以上的鼠胚,或是十几天以上的鸡、鼠胚胎的肌肉所做的原代培养细胞^[21-24],非洲爪蛙结蛋白的表达开始于 st.14,高表达于 st.28^[25]。本研究利用原位杂交技术检测其表达模式,发现原肠胚期之前的结果与以往报道类似,几乎观察不到阳性染色,但是从 st.18 期已观察到明显表达。进而利用较为灵敏的实时定量 PCR 检测出结蛋白在 st.7 已有微弱的表达,在神经胚早期即开始有明显表达。这提示结蛋白可能在胚胎发育早期阶段发挥作用。

在获得了结蛋白表达于胚胎发育早期的结果后,利用敲降方法进一步研究其功能,发现结蛋白敲降导致胚胎发育迟缓,同时各胚层标志基因均受到不同程度的抑制,胚层分化受到影响。研究报道,结蛋白缺陷引起心肌相关疾病^[12],而心肌细胞起源于中胚层,同时也受到内胚层信号的影响^[26]。进一步检测

中胚层、内胚层中心脏发育相关标志基因的表达发现,中胚层基因 FGF3、FGF8、NKX2-5、BMP4a、BMP4b,内胚层基因 GATA4、GATA6 也随着结蛋白的敲降而受到了抑制,而这些基因在早期参与或影响了心脏的发育。以上心脏发育相关基因表达受抑的结果提示,虽然结蛋白缺失小鼠在胚胎期没有明显表型,仅在出生后出现心肌的发育异常,但结蛋白可能在胚胎发育早期阶段即开始发挥作用,最终导致了出生后的发育缺陷,但是对于这一结论还需要进一步的实验来验证。

综上所述,在非洲爪蛙胚胎发育过程中,结蛋白的低水平表达起始于囊胚期,敲降结蛋白阻碍了胚层分化,抑制心脏发育相关标志基因的表达。

[参考文献]

- [1] Quax W, Meera Khan P, Quax-Jeuken Y, et al. The human desmin and vimentin genes are located on different chromosomes[J]. *Gene*, 1985, 38(1-3): 189-196
- [2] Kampf C, Olsson I, Ryberg U, et al. Production of tissue microarrays, immunohistochemistry staining and digitalization within the human protein atlas[J]. *J Vis Exp*, 2012(63):
- [3] Bär H, Strelkov SV, Sjöberg G, et al. The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation?[J]. *J Struct Biol*, 2004, 148(2): 137-152
- [4] Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease[J]. *Annu Rev Biochem*, 1994, 63: 345-382
- [5] Sejersen T, Lendahl U. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development[J]. *J Cell Sci*, 1993, 106(4): 1291-1300
- [6] Kachinsky AM, Dominov JA, Miller JB. Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart[J]. *J Histochem Cytochem*, 1995, 43(8): 843-847
- [7] Sealock R, Murnane AA, Paulin D, et al. Immunocytochemical identification of desmin in Torpedo postsynaptic membranes and at the rat neuromuscular junction[J]. *Synapse*, 1989, 3(4): 315-324
- [8] Askanas V, Bornemann A, Engel WK. Immunocytochemical localization of desmin at human neuromuscular junctions[J]. *Neurology*, 1990, 40(6): 949-953
- [9] Hnia K, Rampacher C, Vermot J, et al. Desmin in muscle and associated diseases: beyond the structural function [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, [Epub ahead of print]
- [10] Li Z, Mericskay M, Agbulut O, et al. Desmin is essential

for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle[J]. *J Cell Biol*, 1997, 139(1): 129-144

[11] Goldfarb LG, Olive M, Vicart P, et al. Intermediate filament diseases: desminopathy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 642: 131-164

[12] Lorenzon A, Boffagna G, Bauce B, et al. Desmin mutations and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy[J]. *Am J Cardiol*, 2013, 111(3): 400-405

[13] Otten E, Asimaki A, Maass A, et al. Desmin mutations as a cause of right ventricular heart failure affect the intercalated disks[J]. *Heart Rhythm*, 2010, 7(8): 1058-1064

[14] Klauke B, Kossmann S, Gaertner A, et al. De novo desmin-mutation N116S is associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(23): 4595-4607

[15] Diwan A, Dorn GW. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2007, 22: 56-64

[16] Sam M, Shah S, Friden J, et al. Desmin knockout muscles generate lower stress and are less vulnerable to injury compared with wild-type muscles[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 279(4): C1116-C1122

[17] Kishi A, Yamamoto M, Kikuchi A, et al. Gene and protein expressions of vimentin and desmin during embryonic development of the mylohyoid muscle[J]. *Anat Sci Int*, 2012, 87(3): 126-131

[18] 殷晨阳, 袁芳, 刘佳, 等. ETS1 对非洲爪蛙早期胚胎发育的影响[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2014, 34(3): 291-296

[19] Nieuwkoop PD. The "organization centre". Segregation and pattern formation in morphogenetic fields[J]. *Acta Biotheor*, 1967, 17(4): 178-194

[20] Pawlak A, Gil RJ, Kulawik T, et al. Type of desmin expression in cardiomyocytes - a good marker of heart failure development in idiopathic dilated cardiomyopathy[J]. *J Intern Med*, 2012, 272(3): 287-297

[21] Li Z, Marchand P, Humbert J, et al. Desmin sequence elements regulating skeletal muscle-specific expression in transgenic mice[J]. *Development*, 1993, 117(3): 947-959

[22] Mayo ML, Bringas P, Santos V, et al. Desmin expression during early mouse tongue morphogenesis[J]. *Int J Dev Biol*, 1992, 36(2): 255-263

[23] Tamiolakis D, Papadopoulos N, Sivridis E, et al. Expression of the intermediate filament vimentin and fibrillar proteins of the extracellular matrix related to embryonal heart development[J]. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2001, 28(3): 193-195

[24] Schaart G, Viebahn C, Langmann W, et al. Desmin and titin expression in early postimplantation mouse embryos[J]. *Development*, 1989, 107(3): 585-596

[25] Herrmann H, Fouquet B, Franke WW. Expression of intermediate filament proteins during development of *Xenopus laevis*. II. Identification and molecular characterization of desmin[J]. *Development*, 1989, 105(2): 299-307

[26] Holtzinger AG, Rosenfeld E, Evans T. Gata4 directs development of cardiac-inducing endoderm from ES cells[J]. *Dev Biol*, 2010, 337(1): 63-73

[收稿日期] 2014-12-10

