

NOMO1 基因在大鼠胚胎心脏发育过程中的表达

徐春阳, 杨 荣*, 张 浩*, 盛燕辉, 孔祥清

(南京医科大学第一附属医院心血管内科, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:** 检测 NOMO1 基因在 SD 大鼠胚胎心脏发育过程中 mRNA 表达变化及定位, 并探讨其在胚胎心脏发育的意义。**方法:** 24 只孕鼠随机分为 6 组, 每组 4 只, 分别于妊娠 12 d(D12)、15 d(D15)、16 d(D16)、17 d(D17)、19 d(D19)、21 d(D21) 时取出胎鼠, 取其心脏, 采用实时定量 PCR(real-time PCR) 技术检测心脏组织中 NOMO1 基因 mRNA 的表达丰度, 并应用荧光原位杂交(FISH)的方法对其进行定位分析。**结果:** 在妊娠 D12、D15、D16、D17、D19、D21 的胚胎心脏中 NOMO1 基因 mRNA 均有表达, 且呈由弱到强再减弱趋势, 表达高峰出现在 D16; 该基因主要表达于心外膜中, 而在心肌层、心内膜、心瓣膜等处未见表达。**结论:** NOMO1 基因的表达随大鼠胚胎的心脏发育呈动态表达, 可能与心脏发育相关。

[关键词] NOMO1 基因; 大鼠; 胚胎; 心脏; 发育

[中图分类号] Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)06-728-04

doi:10.7655/NYDXBNS20130603

Expression of nodal modulator 1 gene during development of rat embryonic hearts

Xu Chunyang, Yang Rong*, Zhang Hao*, Sheng Yanhui, Kong Xiangqing

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the change of nodal modator 1 (NOMO1) gene mRNA expression and its location during the development of rat embryonic hearts, and to explore its significance in embryonic heart development. **Methods:** Twenty-four pregnant Sprague-Dawley rats were randomly divided into 6 groups (n=4), embryonic hearts were obtained on the 12th, 15th, 16th, 17th, 19th, 21th day in pregnancy. Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (real-time PCR) was used to reveal NOMO1 gene mRNA expression, and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was used for its positioning analysis. **Results:** With the development of rat embryonic hearts, the expression levels of NOMO1 gene mRNA were from weak to strong signs of abating and its peak was on 16th day. NOMO1 gene was mainly expressed in the epicardium, while it was not detected in the myocardium, endocardium and heart valves. **Conclusion:** The expression of NOMO1 gene is dynamic, and it may play an important role in the fetal heart development.

[Key words] NOMO1 gene; rats; embryos; heart; development

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(6): 728-731]

心脏从开始发育到最终发育成熟, 是一个整体的、动态的极其复杂的过程, 由最初的多细胞系的特化, 到心管的形成, 再经过心脏环化、分化成熟、房室分隔及血管重建等阶段^[1], 整个过程需要特定基因的精确表达, 涉及多条信号通路、转录因子的调控, 任何一个细微的改变都可能导致心脏发育缺陷^[2], 因此筛选心脏发育相关基因对进一步了解先天性心脏病的发病机制具有重要意义。先

前研究中运用抑制性差减杂交技术发现 NOMO1 基因在室间隔缺损(VSD)患者心肌组织中低表达^[3], 提示其与 VSD 的发生发展密切相关。因此本研究拟通过 real time-PCR、FISH 技术对 NOMO1 基因在胚胎心脏的定位及表达变化进行了解, 以探讨 NOMO1 基因与心脏发育的关系。大鼠胚胎组织是胚胎发育研究领域广泛采用的实验材料, 有研究认为妊娠 12 d(D12)、15 d(D15)、19 d(D19) 为心脏发育的关键时间点^[4], 因此本研究除选取以上几个关键点, 还选取了 16 d(D16)、17 d(D17)、21 d(D21) 作为检测时间点, 以更详细地阐明该基因

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(30901473)

* 通信作者 (Corresponding author), E-mail: yr@njmu.edu.cn; haozhangh@hotmail.com

的表达情况。

1 材料和方法

1.1 材料

健康成年 SD 大鼠 48 只,由南京医科大学实验动物中心提供,将大鼠随机分为 6 组,每组雌雄各 4 只。雌雄鼠按 1:1 比例,于 18:00 合笼,次日凌晨检查阴栓,阳性者记为妊娠第 0 天(D0)。随后分别在妊娠 D12、D15、D16、D17、D19、D21 时,10%水合氯醛麻醉下剖宫取胚胎,取其心脏,不同孕期胎鼠心脏一半标本用作 real-time PCR 检测,液氮速冻后存放于-80℃冰箱待用;另一半用作 FISH 检测,经过 OCT 包埋后存放于-80℃冰箱待用。real-time PCR 实验试剂:TRIzol(Invitrogen 公司,美国),逆转录试剂盒、SYBR Green PCR Master Mix (Roche 公司,瑞士),引物由 Invitrogen 公司合成,DEPC 水(Sigma 公司,美国)。FISH 实验试剂:FITC(异硫氰酸荧光素)标记的寡核苷酸探针由上海闪晶公司设计合成,胃蛋白酶、预杂交液、DAPI 染色液、原位杂交专用 PBS、SSc(博士德公司,武汉),OCT 包埋剂(SAKURA 公司,美国),抗荧光淬灭封片液(碧云天公司,南通)。

1.2 方法

1.2.1 寡核苷酸探针及引物设计

NOMO1 寡核苷酸探针序列:5'-FITC + TAGACAGATACTCGGAGGAAGTGATTACATT-3'。引物序列:NOMO1 上游引物:5'-CTACGTCCTGCGCAAGTGT-3',下游引物:5'-CGCGATGCTTGCTCAGGTA-3',PCR 产物 100 bp;GAPDH(内参照)上游引物:5'-GGGCTGGCATTGCTCTCA-3',下游引物:5'-CTGTAGCCATATTCATTGTCATACCA-3',PCR 产物 70 bp。以上引物经过验证后使用。

1.2.2 总 RNA 提取及逆转录

采用 TRIzol 试剂进行总 RNA 提取,逆转录体系为 20 μ l,按照试剂盒说明书操作,用 One Drop Spectrophotometer 检测 RNA 水平: $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 比值为 1.8~2.0 较佳, $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 比值 > 2.0 较佳,应用 DEPC 水调整 RNA 浓度。

1.2.3 real-time PCR

反应体系为 25 μ l 包括 cDNA 2 μ l,SYBR Green Mix 12.5 μ l,上游引物 0.75 μ l,下游引物 0.75 μ l,DEPC 水 9 μ l。以 GAPDH 为内参照,采用 ABI 7500 System 进行反应,反应条件为 50℃ 2 min; 95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min (40 个循环);

95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s,60℃ 15 s (收集溶解曲线)。PCR 的结果用 Cycle threshold (Ct) 进行计算,而 mRNA 的相对表达量则用 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ 进行比较 [$\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}} - \text{某个相同值}$ (一般为第一组的 Ct 平均值)]。

1.2.4 FISH 检测

胚胎心脏经过 4%多聚甲醛固定,20%~30%蔗糖脱水,OCT 包埋后用冰冻切片机进行连续切片,片厚约 4 μ m。荧光原位杂交简要过程:切片于 4%多聚甲醛固定,DEPC 水漂洗,胃蛋白酶消化,原位杂交专用 PBS 漂洗,DEPC 水漂洗,1%多聚甲醛后固定,DEPC 水漂洗,70%甲醛/2 \times SSc 80℃变性 2 min,乙醇梯度脱水,40℃预杂交 2 h,40℃杂交过夜,杂交后洗涤(SSc 液体),DAPI 核染色,原位杂交专用 PBS 漂洗,抗荧光淬灭封片液封片。另以预杂交液代替杂交液作为阴性对照,最后尽快在荧光显微镜下观察。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.0 软件对数据进行统计学分析,数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组均数间比较用单因素方差分析,均数间两两比较采用 q 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 real-time PCR 方法检测 NOMO1 基因在大鼠妊娠不同时期胚胎心脏组织中的表达丰度

NOMO1 基因 mRNA 在妊娠 D12、D15、D16、D17、D19、E21 的胚胎心脏中均有表达,其表达水平在 D12 开始逐渐升高,D16 达高峰,D17、D19 逐渐下降(图 1)。NOMO1 基因 mRNA 相对表达量(NOMO1/GAPDH)为 D12(1.02 \pm 0.25),D15(1.60 \pm 0.18),D16(1.96 \pm 0.37),D17(1.43 \pm 0.27),D19(1.13 \pm 0.16),D21(1.23 \pm 0.27),D19 与 D21 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),余各组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 FISH 检测 NOMO1 基因在大鼠妊娠不同时期胚胎心脏组织中的定位表达

FISH 结果显示,在大鼠妊娠 D12、D15、D16、D17、D19、D21 胚胎心脏组织中,NOMO1 基因均有表达,主要表达于心外膜中,而在心肌层,心内膜,心瓣膜等处未见表达(图 2)。

3 讨论

先天性心脏病是胚胎发育时期心脏及血管组织

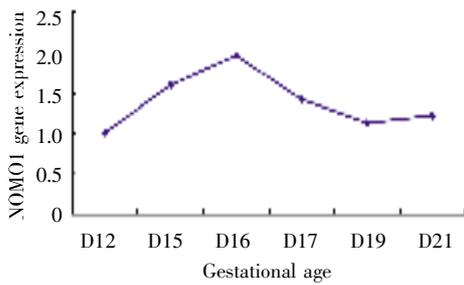
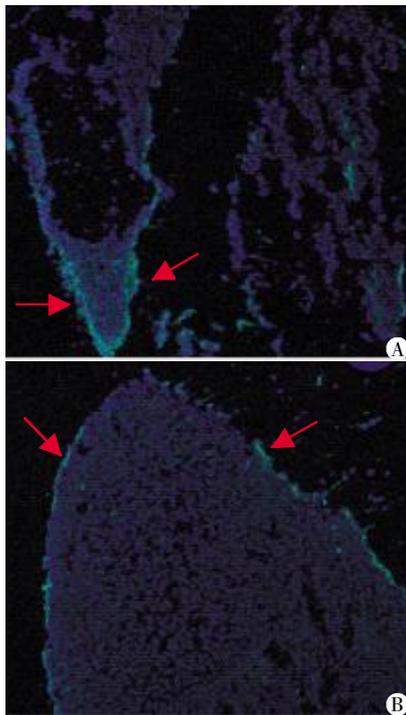


图1 大鼠胚胎心脏 NOMO1 基因 mRNA 动态表达趋势

Figure 1 mRNA expression of NOMO1 gene in embryonic heart of rats



A: D19 胚胎心脏的心房; B: D19 胚胎心脏的心室。红色箭头所指的绿色荧光代表探针与基因结合的部位, 蓝色荧光代表细胞核染色。

图2 NOMO1 基因在大鼠妊娠 D19 胚胎心脏中的表达

Figure 2 Expression of NOMO1 gene in pregnancy D19 embryonic heart of rat

发育异常而形成的先天畸形, 为目前婴幼儿死亡的首要原因^[5], 因此, 从心脏发育生物学角度, 特别是基因和分子水平研究将为先天性心脏病的发病机制提供新的线索和理论依据。心脏发育过程涉及多条信号通路的调控, 如 BMP 通过 Smad 和 TAK1 两条信号途径来诱导一些心脏特异基因的表达和心肌的终末分化, EGF 通过激活 Ras 和 MAPK 途径来促进血管形成及心脏小梁、瓣膜的发育, 另外 Crescent、Shh/Ihh 等信号通路都是通过相关的心脏转录因子表达而促进心脏中胚层的形成, 而 WNT、Notch 和

Chordin 等信号通路则产生抑制信号来影响心脏发育^[6-7]。心脏都是起源于其早期胚胎中胚层的前侧盘细胞^[1], Nodal 通过激活 ActR II B、ALK4 及 EGF-CFC 共受体而激活 Smad2、Smad4 产生生物学效应, 从而在脊椎动物胚胎发育的中胚层和内胚层诱导形成中起着重要的作用^[8-9], 由此可看出 Nodal 信号通路的心脏发育密切相关^[10]。研究发现, NOMO1 基因编码的蛋白是新发现的参与调控 Nodal 信号通路蛋白复合体的组成部分, 具有调控 Nodal 信号通路的作用。NOMO1 在中胚层和内胚层的发育过程中抑制 Nodal 信号通路^[11-12]。因此, NOMO1 基因表达与 Nodal 信号通路调控相关, 但其对心肌细胞的生长和发育以及在心脏发育过程中的作用仍不清楚。

本课题小组运用抑制性差减杂交技术成功构建了差减文库, 并获得大量室间隔缺损患者心肌组织差异表达基因, 发现 NOMO1 基因在室间隔缺损患者心肌组织中低表达, 还发现在 P19 细胞中沉默表达 NOMO1 基因后, 显著下调 α -MHC 的表达, 而 α -MHC 是反映向中胚层(心肌分化早期)分化的标志基因, 提示 NOMO1 可能通过抑制 α -MHC 等基因表达而影响 P19 细胞向心肌细胞的分化^[13]。目前尚未见到有关 NOMO1 基因与心脏发育的相关文献报道, 因此, 本研究运用 real-time PCR 及 FISH 技术分析 NOMO1 基因在大鼠胚胎心脏中的表达情况。结果发现, FISH 技术提示 NOMO1 基因 mRNA 主要表达于心外膜中, 而在心肌层, 心内膜, 心瓣膜等处未见表达, 心外膜被覆于心肌的表面, 向内与心肌相连, 外表覆以间皮、中间为薄层的结缔组织, 其中含血管、神经及数量不等的脂肪细胞, 现由于所用技术的限制并不能准确定位。研究表明在心膜发育的早期, 心外膜就是与心肌的最外层细胞直接相连的, 只有被前心外膜浆膜起源的心外膜覆盖的原始心肌才有可能形成四腔室的的心脏。胚胎心管的流出道的末梢部分的心肌在发育过程中消失, 这部分心肌被一个不同来源的心外膜层所包裹^[1]。这些发现均提示了心外膜对于心肌的形成至关重要, 在心脏发育过程中是必不可少的, 且与先心的发生密切相关。real-time PCR 技术提示 NOMO1 基因 mRNA 在妊娠各时期的胚胎心脏中均有表达, 其表达水平刚开始逐渐升高, D16 达高峰, 之后又逐渐下降。心脏是胚胎发育过程中最早形成的器官, D12 时第一房间隔, 室间隔肌部刚出现, 心房心室壁稍变厚, 心肌小梁略增多, 之后, 心脏继续逐渐增大, 心房心室壁逐渐增厚, 心肌小梁逐渐增多增粗。其中 D16 时心脏四腔基本

分隔完成,且是胚胎心房心室壁致密变厚、心肌细胞增多、心脏体积增大最明显的时期^[14]。由此可推测 *NOMO1* 基因在心脏发育过程中表达的动态趋势及在心外膜表达的特异性表明该基因与心脏发育密切相关,其表达异常可能会导致心脏发育异常。该基因参与 *Nodal* 信号通路的调控,*Nodal* 信号通路又与胚胎发育密切相关,那 *NOMO1* 基因又是如何调控 *Nodal* 信号通路,并影响其下游基因以及心肌特异转录因子的表达,这些机制尚有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 吴秀山,李永青,王跃群,等. 心脏发育概论[M]. 北京:科学出版社,2006:80-195
- [2] Clark KL, Yutzey KE, Benson DW. Transcription factors and congenital heart defects [J]. *Annu Rev Physiol*, 2006, 68(3):97-121
- [3] Zhang H, Zhou L, Yang R, et al. Identification of differentially expressed genes in human heart with ventricular septal defect using suppression subtractive hybridization [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342 (1):135-144
- [4] Ulger H, Ozdamar S, Unur E, et al. The effect of vascular endothelial growth factor on in vitro embryonic heart development in rats[J]. *Anat Histol Embryol*, 2004, 33(6): 334-338
- [5] Van der Bom T, Zomer AC, Zwinderman AH, et al. The changing epidemiology of congenital heart disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2011, 8(1):50-60
- [6] 吴秀山,李永青,王跃群,等. 信号调控与心脏发育[M]. 北京:化学工业出版社,2006:279-350
- [7] Brand T. Heart development; molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis[J]. *Dev Biol*, 2003, 258(1):1-19
- [8] Schier AF. *Nodal* signaling in vertebrate development[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19(8):589-621
- [9] Aoki TO, David NB, Minchiotti G, et al. Molecular integration of *casanova* in the *Nodal* signalling pathway controlling endoderm formation [J]. *Development*, 2002, 129 (2):275-286
- [10] Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart[J]. *Science*, 2006, 313 (5795): 1922-1927
- [11] Haffner C, Frauli M, Topp S, et al. *Nicalin* and its binding partner *Nomo* are novel *Nodal* signaling antagonists[J]. *EMBO Journal*, 2004, 23(15):3041-3050
- [12] Haffner C, Dettmer U, Weiler T, et al. The *Nicastrin*-like protein *Nicalin* regulates assembly and stability of the *Nicalin-nodal* modulator (*NOMO*) membrane protein complex[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(14):10632-10638
- [13] 沈震,陈欢欢,张浩,等. 小鼠 *NOMO1* 基因 RNA 干扰载体的构建及其功能的初步研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2012, 32(12):1661-1665
- [14] 范文艳,武俊芳,王坦,等. 胚胎大鼠心脏发育中转化生长因子 $\beta 1$ /*Smad3* 信号通路的意义 [J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(13):1042-1056

[收稿日期] 2013-03-03

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》在第三届中国学术期刊评价中被评为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”! 本次共有 6448 种中文学术期刊参与评价, 经过综合评价后得到期刊相应的等级, 共计 1939 种学术期刊进入核心期刊区。