

## MIA 影响非洲爪蟾胚胎中胚层的形成

冯娇娇,殷晨阳,李昕昕,徐校佩,郭 静,王学军,王 宁,袁 栋\*

(南京医科大学生化与分子生物学系,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨黑色素瘤抑制蛋白(melanoma inhibitory activity, MIA)在非洲爪蟾早期胚胎发育中的作用。方法:根据热带爪蟾 MIA 序列在非洲爪蟾 EST 数据库中找到 MIA 序列,利用 RT-PCR 扩增全长序列并克隆至 pCS<sup>2+</sup>,用于测序。利用 RT-PCR 检测胚胎发育各阶段 MIA mRNA 的表达。通过显微注射特异的反义寡核苷酸 morpholino(MO)敲降 MIA;利用整胚原位杂交检测胚层标志性基因的表达。结果:克隆出非洲爪蟾 MIA 全长序列。在胚胎发育过程中 MIA 从受精卵开始持续表达。敲降 MIA 导致胚胎胚孔闭合延缓,中胚层标志基因 *xbra* 表达明显受抑,而内胚层标志性基因 *sox17 $\alpha$*  表达无明显改变。结论:MIA 表达于非洲爪蟾胚胎发育各阶段,敲降 MIA 抑制中胚层的形成。

**[关键词]** 黑色素瘤抑制蛋白;非洲爪蟾;胚胎发育;中胚层

**[中图分类号]** Q132

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)04-426-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20130402

## The effect of MIA on mesoderm formation during embryo development of *Xenopus laevis*

Feng Jiaojiao, Yin Chenyang, Li Xinxin, Xu Xiaopei, Guo Jing, Wang Xuejun, Wang Ning, Yuan Li\*

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

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of melanoma inhibitory activity (MIA) on mesoderm formation during the embryogenesis of *Xenopus laevis*. **Methods:** The MIA sequence of *Xenopus laevis* was verified in EST database, and then cloned into pCS<sup>2+</sup> for sequencing. The expression of MIA was detected during embryo development by RT-PCR analysis. The micro-injection of morpholino (MO) was used to knockdown MIA. The expression of marker genes was detected during germ layer formation by whole mount *in situ* hybridization. **Results:** The MIA sequence of *Xenopus laevis* was precisely cloned. The expression of MIA was detected at all the stages during embryogenesis. The knockdown of MIA by MO injection caused the delayed blastopore closure, inhibited the expression of mesodermal marker gene *xbra* compared to normal embryos. **Conclusion:** MIA is expressed during embryogenesis of *Xenopus laevis*, and MIA could play an important role in the mesoderm formation.

**[Key words]** MIA; *Xenopus laevis*; embryogenesis; mesoderm

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(4): 426-431]

黑色素瘤抑制蛋白(melanoma inhibitory activity, MIA)是 Bogdahn<sup>[1]</sup>在研究黑素瘤细胞株 HTZ-19 时分离到的一个能够抑制黑素瘤细胞增殖的分泌蛋白。MIA 编码基因定位于人染色体 19q13.32~q13.33, 编码蛋白的分子量为 11 000。MIA 分子中含有保守的半胱氨酸残基及 src 同源 3(SH3)样结构域<sup>[2-3]</sup>。开始 MIA 鉴定为黑色素瘤细胞增殖抑制因

子,进一步研究发现 MIA 在恶性黑色素瘤细胞中表达增高<sup>[4]</sup>,而且血清中高水平的 MIA 与黑色素瘤的进展阶段一致<sup>[5]</sup>,并提示术后的不良预后<sup>[6]</sup>。此外, MIA 在正常胰腺组织未检测到表达,但在胰腺癌中高表达,并参与肿瘤转移<sup>[7]</sup>。在比较正常及维甲酸处理的牛软骨细胞时,发现了 MIA 的鼠同源体——软骨衍生的维甲酸敏感蛋白(cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein, CD-RAP)。CD-RAP 在软骨形成起始期即有表达,并在软骨整个发育过程中保持着高表达<sup>[8-9]</sup>。新近研究表明, MIA 高表达于早期肺形成时期的上皮细胞<sup>[10]</sup>。

虽然 MIA 在软骨及肺的发育中检测到高表达,

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30971680);江苏高校优势学科建设工程资助项目;江苏省“青蓝工程”(2010)

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

但其生理功能仍不清楚。越来越多的实验研究证实了早期胚胎发育和肿瘤发生存在密切的相关性,在细胞的增殖、分化、迁移等方面都具相似之处<sup>[11-12]</sup>。MIA 促进肿瘤细胞增殖、转移;非洲爪蟾胚胎原肠形成时期细胞不断分裂增生,中胚层细胞发生定向迁移粘附而形成三个胚层。但是 MIA 在早期胚胎发育中的表达及功能未见报道,本文利用非洲爪蟾作为模式动物,研究 MIA 在胚胎发育中的表达及对胚层形成的影响。

## 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) 购自美国 Sigma 公司, DNase I、限制性核酸内切酶、逆转录试剂盒 RevertAid™ first strand cDNA synthesis kit 购自加拿大 MBI Fermentase 公司, RNA 纯化试剂盒 RNeasy kit 购自德国 Qiagen 公司。Dig-UTP、anti-Dig-AP、BM purple 购自瑞士 Roche 公司。anti-MIA(兔源多克隆抗体)购自美国 Santa Cruz 公司。

#### 1.1.2 引物及 MO

克隆爪蟾 MIA 的引物序列为:上游:5'-CCGGGAATTCTGAGCAGAACAGTCATGTTTTGG-3', 下游:5'-CCGGCTCGAGTCAGTGGCAGGT-AAAATCC-CATT-3'。检测 MIA 表达的引物序列为:上游:5'-T-GAGCAGAACAGTCATGTTTTGG-3', 下游:5'-TCAG-TGGCAGGTAAAATC-3'。参照基因 H4 的引物序列为:上游:5'-CGGGATAACATTCAGGGTATCACT-3', 下游:5'-ATCCATGGCGGTAAGTCTTCTCCT-3'。反义寡核苷酸 morpholino (MO) 由美国 Gene Tools 公司合成。根据 MIA 5'端序列设计特异性封闭 MIA 的 MO 命名为 MIA MO, 其序列为:5'-CAAGACA-CACTGCCTTCCAAAACAT-3'。对照 MO 序列为:5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 载体构建

根据热带爪蟾 MIA 序列 (NM\_001142244), 在非洲爪蟾 EST 数据库中找到高度同源序列序列 (Xt7.1-CBTC1303.5), 鉴定为非洲爪蟾 MIA。根据此序列设计引物, 扩增爪蟾 MIA 编码区, 并将其克隆至 pCS<sup>2+</sup>载体上, 命名为 pCS<sup>2+</sup>-MIA, 用于测序。

#### 1.2.2 胚胎操作及显微注射

实验前 12 h 左右注射 300~600 U hCG 诱导雌

性个体排卵, 体外受精半小时后, 去除受精卵外的胶囊, 在 0.1 × MBSH (1 × MBSH: 88 mmol/L NaCl, 2.4 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 1 mmol/L KCl, 0.82 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 0.41 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mmol/L Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 10 mmol/L Hepes, pH7.4) 中培养至相应发育阶段。胚胎的分期依照 Nieuwkoop 和 Faber 分期<sup>[15]</sup>。在胚胎四细胞期将 50 ng MIA MO 及对照 MO (CoMO) 注入 4 个细胞中, 用于观察表型及标志基因表达分析。

#### 1.2.3 RT-PCR 分析 MIA 表达

收集胚胎, 提取总 RNA, 以 DNase I 消化并用 RNeasy kit 纯化 RNA。取 1 μg 各组胚胎总 RNA 利用 RevertAid™ first strand cDNA synthesis kit 逆转录为 cDNA。以 H4 作为参照, 取 2 μl 逆转录产物进行 PCR 扩增检测 MIA。反应条件为: 94℃ 5 min 变性, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环, 72℃ 10 min 终末延伸。

#### 1.2.4 Western blot 检测 MIA 表达

收集胚胎, 提取总蛋白, SDS-PAGE 电泳分离后将胶转移至 PVDF 膜上, 加入 anti-MIA (1:800) 作为一抗, IgG-HRP (1:1 000) 作为二抗, 将 ECL 化学发光底物作用于 PVDF 膜上, 对 X 线片进行曝光、显影和定影处理。

#### 1.2.5 探针制备

将 pBS-xbra 以 Sal I 酶切, pCS<sup>2+</sup>-Sox17α 以 Cla I 酶切, T7 RNA 聚合酶进行体外转录, 合成反义 RNA 探针, 反应体系中加入 Dig-UTP 以标记探针。

#### 1.2.6 整体胚胎原位杂交

收集、固定相应发育阶段的胚胎, 进行梯度乙醇复水处理, 在蛋白酶 K 处理 30 min 后进行预杂交和杂交, 加入 anti-Dig-AP 抗体后加入底物液 BM purple 进行显色反应。

### 1.3 统计学方法

用捷达凝胶图象处理系统分析目标条带的光密度值。数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 利用 SPSS10.0 统计软件进行配对 *t* 检验分析。P ≤ 0.05 认为差异具有统计学意义。

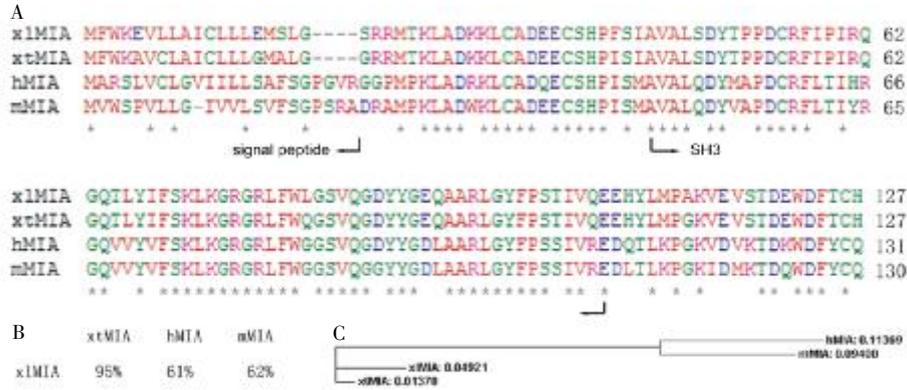
## 2 结果

### 2.1 MIA 序列分析

对非洲爪蟾 MIA 序列分析发现 (图 1A), 爪蟾 MIA 全长 384 bp, 编码 127 个氨基酸, 与热带爪蟾同源性高达 95%, 而与哺乳动物同源性相对较低。与人 MIA 序列同源性为 61%; 与小鼠相比, 同源性为 62% (图 1B)。进化树分析结果表明, 人和小鼠

MIA 蛋白有较为接近的进化来源, 热带爪蟾和非洲爪蟾进化来源较近, 而爪蟾与人及小鼠在进化距离上相距较远(图 1C)。各物种 MIA 中均含有

1 段信号肽序列, 并含有 1 段 62 个氨基酸的 SH3 样结构域, 保守性高, 在人、小鼠、热带爪蟾、非洲爪蟾中氨基酸同源性达 74%。



A: 多物种 MIA 蛋白序列比对; B: 蛋白序列比对结果统计; C: 进化树分析。

图 1 MIA 氨基酸序列比对

Figure 1 Amino acid sequence alignment of MIA

### 2.2 MIA 在爪蟾不同发育阶段的表达

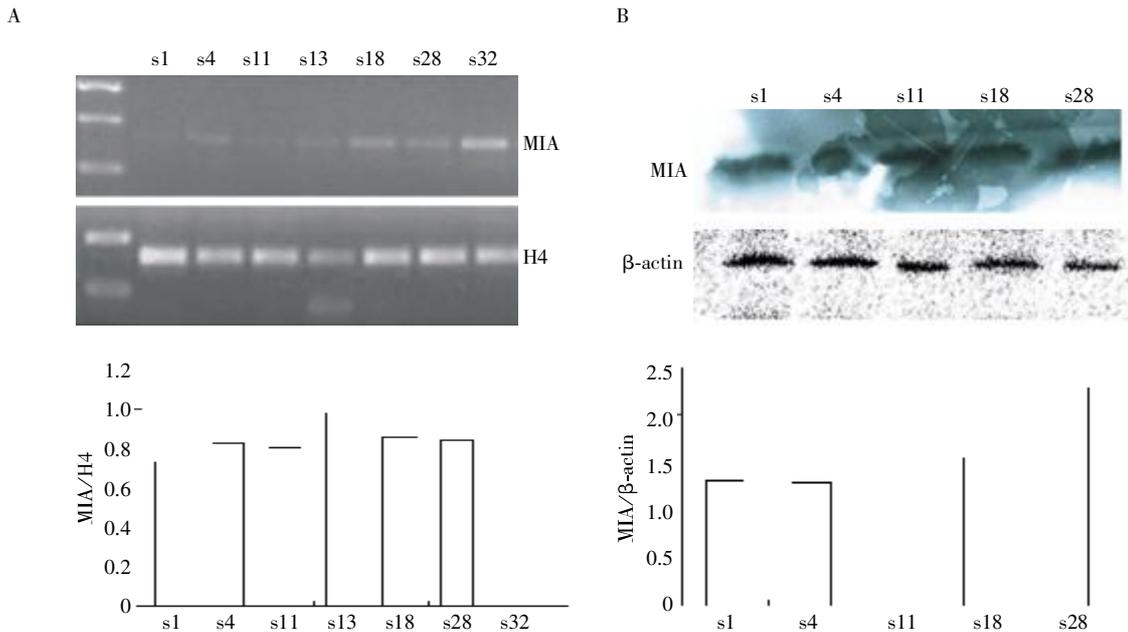
为研究 MIA 在爪蟾不同发育阶段的表达, 收集不同发育阶段, 包括受精卵期(s1)、卵裂期(s4)、原肠胚期(s11)、神经胚期(s13、s18)、尾芽期(s28、s32)的胚胎, 利用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测 MIA 的表达。结果显示, 从受精卵开始, MIA 的 mRNA 和蛋白表达即可检测, 并持续表达于胚胎发育各阶段(图 2)。

### 2.3 MO 功能检测

为研究 MIA 对爪蟾胚胎发育的影响, 需要利用 MO 进行敲降。首先利用 RT-PCR 和 Western blot 方法对 MO 的敲降效果进行检测。如图 3 所示, 注射 MIA MO 对 MIA 的 mRNA 无明显影响, 而对其蛋白表达有明显抑制作用(图 3)。

### 2.4 敲降 MIA 导致胚胎发育迟缓

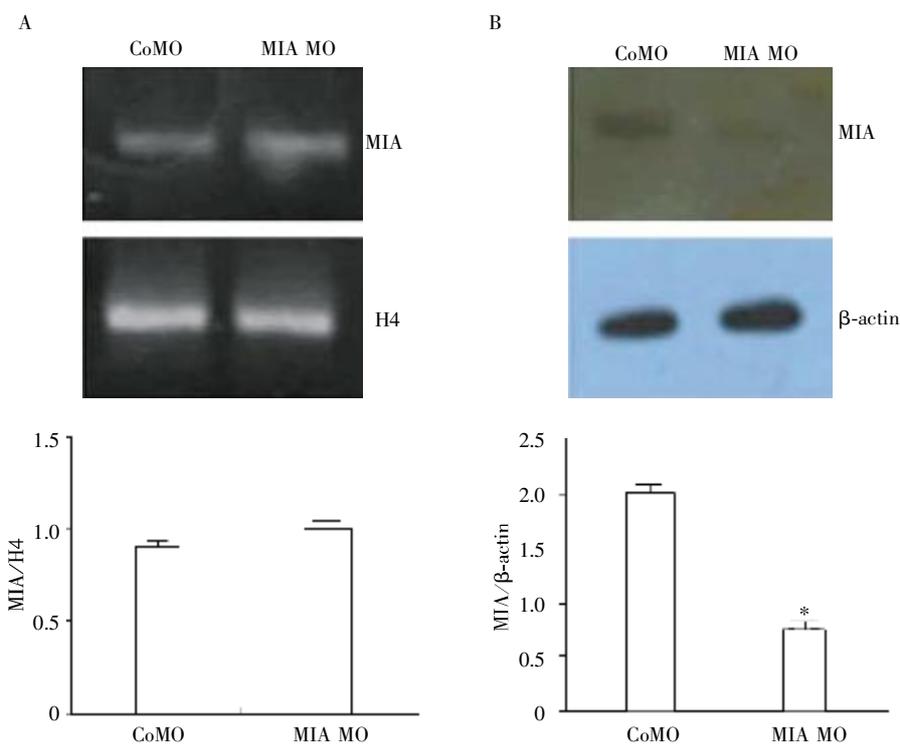
在胚胎四细胞期注射 MO 用以敲降 MIA, 观察



A: RT-PCR 检测 MIA 表达; B: Western blot 检测 MIA 表达。

图 2 MIA 在爪蟾不同发育阶段的表达

Figure 2 Expression pattern of MIA during development



A: RT-PCR 检测; B: Western blot 检测。与对照组相比, \* $P < 0.05$ 。

图 3 MIA MO 特异性检测

Figure 3 Specificity of MIA MO

胚胎表型。结果显示,敲降后的胚胎出现发育迟缓。在胚胎发育的第 13 期(s13),随着细胞迁移内陷形成内胚层,正常胚胎胚孔明显缩小(图 4A);而注射 50 ng MO 后的胚胎胚孔明显大于正常(图 4B)。

### 2.5 敲降 MIA 影响中胚层形成

在观察到敲降 MIA 影响胚胎发育的表型后,进一步利用原位杂交检测敲降 MIA 对胚层形成的影响。如图 5 所示,在正常胚胎发育至 s11,中胚层标志基因 *xbra* 表达呈环形;内胚层标志基因 *sox17 $\alpha$*  表达于胚孔内部的内胚层处。与正常胚胎相比,以 50 ng MO 敲降 MIA 的胚胎中 *sox17 $\alpha$*  染色无明显改变,而 *xbra* 染色几乎检测不到。

### 3 讨论

人 MIA 是一种小分子量的分泌性蛋白,最初翻译产物为含有 131 个氨基酸的前体,继而去除 N 端疏水性信号肽成为成熟蛋白,信号肽控制了 MIA 向内质网的运输和向细胞外的释放。MIA 分子中含有 SH3 样结构域,而 SH3 域通常在细胞内的蛋白质中被发现,它通过识别聚脯氨酸单环来介导蛋白质相互作用<sup>[14]</sup>,而 MIA 被认为是第一个拥有 SH3 样结构域的细胞外蛋白质。本文根据热带爪蟾 MIA EST 序列获得非洲爪蟾 MIA 全序列,通过多重序列比对发现非洲爪蟾和热带爪蟾的 MIA 基因

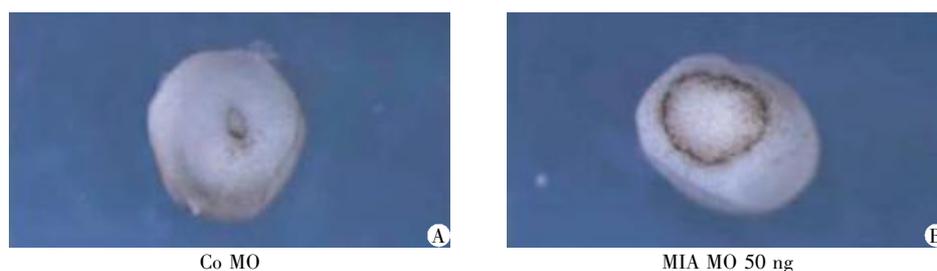
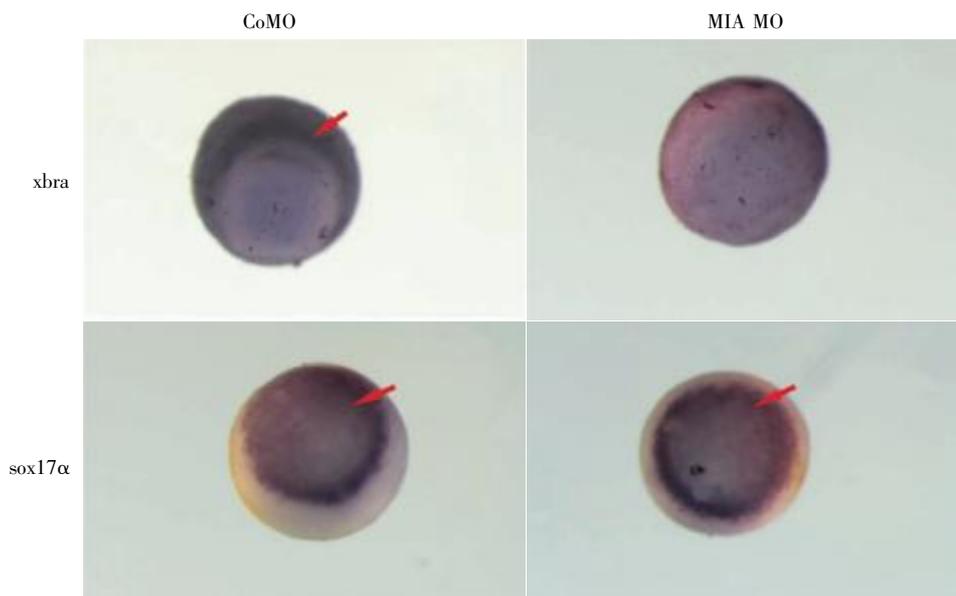


图 4 敲降 MIA 导致发育迟缓( $\times 20$ )

Figure 4 Knockdown of MIA caused developmental defect( $\times 20$ )



箭头所示为染色阳性部位( $\times 20$ )。

图 5 敲降 MIA 影响中胚层形成

Figure 5 Mesoderm formation is inhibited in response to MIA knockdown in whole embryos

序列同源性高,而与哺乳动物亲缘关系较远。但是其中的 SH3 样结构域在各物种中保守性较高,提示 MIA 功能的保守性。

MIA 最早分离自黑色素瘤细胞,后发现在多种肿瘤中发挥作用<sup>[9,15-16]</sup>。早期研究报道,MIA 在正常组织中仅特异性表达于软骨组织<sup>[10-11]</sup>。而 Lin<sup>[10]</sup>研究表明在肺上皮发育过程中可检测到 MIA 表达。目前对 MIA 功能的报道多集中在参与肿瘤细胞的增殖和(或)转移、软骨形成和肺形成<sup>[10-12]</sup>,表明其主要影响细胞的增殖、迁移,但 MIA 对胚胎发育的影响目前尚未见文献报道。

本文检测了非洲爪蟾不同发育阶段中 MIA 的表达,发现其 mRNA 及蛋白均从受精卵开始持续表达,提示该基因是母源性基因,可能在胚胎发育中发挥一定的作用。为进一步检测这一肿瘤相关基因在早期发育中的作用,本文利用 MO 对 MIA 进行敲降。MO 特异性与 mRNA 5'端结合,从而封闭蛋白质的翻译过程。本文在显微注射 MIA 特异性 MO 后检测了 MIA 蛋白的表达,发现 MO 明显抑制了 MIA 蛋白的表达。进而观察敲降后的表型,发现敲降 MIA 导致胚胎发育迟缓,表现在胚层形成时,细胞迁移延缓致使胚孔闭合延迟,从而证实 MIA 确实影响了胚胎的发育。进一步检测 MIA 对胚层形成的影响时发现,敲降 MIA 不影响内胚层标志基因,但明显影响中胚层标志基因的表达,提示 MIA 可能影响中胚层的形成。MIA 影响肿瘤转移是通过促进细胞分离,

通过与整合素结合而发挥作用<sup>[17]</sup>;而 MIA 影响中胚层形成的具体机制仍需进一步探讨。

#### [参考文献]

- [1] Bogdahn U, Apfel R, Hahn M, et al. Autocrine tumor cell growth-inhibiting activities from human malignant melanoma[J]. *Cancer Res*, 1989, 49(19): 5358-5363
- [2] Loughheed JC, Holton JM, Alber T, et al. Structure of melanoma inhibitory activity protein, a member of a recently identified family of secreted proteins[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(10): 5515-5520
- [3] Stoll R, Renner C, Zweckstetter M, et al. The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold [J]. *EMBO J*, 2001, 20(3): 340-349
- [4] Bosserhoff AK, Moser M, Hein R, et al. In situ expression patterns of melanoma-inhibiting activity(MIA) in melanomas and breast cancers[J]. *J Pathol*, 1999, 187(4): 446-454
- [5] Stahlecker J, Gauger A, Bosserhoff A, et al. MIA as a reliable tumor marker in the serum of patients with malignant melanoma [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(6D): 5041-5044
- [6] Guba M, Steinbauer M, Ruhland V, Schütz A, et al. Elevated MIA serum levels are predictors of poor prognosis after surgical resection of metastatic malignant melanoma [J]. *Oncol Rep*, 2002, 9(5): 981-984
- [7] El Fitori J, Kleeff J, Giese NA, et al. Melanoma Inhibitory Activity (MIA) increases the invasiveness of pancreatic

- cancer cells[J]. *Cancer Cell Int*, 2005, 5(1):3
- [8] Dietz UH, Sandell LJ. Cloning of a retinoic acid-sensitive mRNA expressed in cartilage and during chondrogenesis [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(6):3311-3316
- [9] Bosserhoff AK, Kondo S, Moser M, et al. Mouse CD-RAP/MIA gene: structure, chromosomal localization, and expression in cartilage and chondrosarcoma [J]. *Dev Dyn*, 1997, 208(4):516-525
- [10] Lin S, Ikegami M, Xu Y, et al. Misexpression of MIA disrupts lung morphogenesis and causes neonatal death[J]. *Dev Biol*, 2008, 316(2):441-455
- [11] Lengerke C, Daley GQ. Caudal genes in blood development and leukemia [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1266: 47-54
- [12] Tian T, Zhang, Y, Wang, S, et al. Sox2 enhances the tumorigenicity and chemoresistance of cancer stem-like cells derived from gastric cancer [J]. *J Biomed Res*, 2012, (5):336-345
- [13] Nieuwkoop PD, Faber J. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin)[M]. 2nd ed, Elsevier/ North Holland, Amsterdam, 1967
- [14] Loughheed JC, Domaille PJ, Handel TM. Solution structure and dynamics of melanoma inhibitory activity protein[J]. *J Biomol NMR*, 2002, 22(3):211-223
- [15] Hau P, Apfel R, Wiese P, et al. Melanoma-inhibiting activity (MIA/CD-RAP) is expressed in a variety of malignant tumors of mainly neuroectodermal origin [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22 (2A):5775-5783
- [16] De Martino I, Visone R, Palmieri D, et al. The Mia/Cd-rap gene expression is downregulated by the high-mobility group A proteins in mouse pituitary adenomas [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2007, 14(3):875-886
- [17] Bauer R, Humphries M, Fässler R, et al. Regulation of integrin activity by MIA [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(17): 11669-11677

[收稿日期] 2012-06-21

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。