

Connexin43 基因抑制对斑马鱼心血管系统发育的影响*

刘东¹⁾ 王跃祥¹⁾ 胡晶莹¹⁾ 孙淑娜²⁾ 宋后燕^{1)**}

(¹⁾复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学系, 分子医学教育部重点实验室, 上海 200032; (²⁾复旦大学附属儿科医院, 上海 200032)

摘要 为了研究 cx43 基因抑制对斑马鱼胚胎心血管系统发育的影响, 针对 cx43 的翻译起始位点设计两个吗啉修饰的反义寡核苷酸抑制其表达, 在斑马鱼受精卵一到两细胞期混合注射并且验证其有效性. 注射后用原位杂交和原位免疫荧光检测心脏标志基因的表达以及心脏的表型, 同时利用显微荧光造影和原位杂交检测血管的发育情况. 用心室心房的标志基因 vmhc 和 amhc 反义 RNA 探针进行的原位杂交结果显示, vmhc 表达抑制, 而 amhc 表达上调. 原位免疫荧光显示与原位杂交一致的结果表明: 心房扩张心室缩小, 并且心脏环化不全. 用血管标志基因 flk-1 的 RNA 探针原位杂交和显微荧光造影表明, cx43 基因抑制的斑马鱼胚胎血管无明显缺陷. 此外, cx43 基因抑制的斑马鱼胚胎心脏功能也有明显改变, 包括心脏搏动无力, 有血液回流现象. 抑制 cx43 的表达可能通过影响两个细胞群的迁移导致斑马鱼胚胎心脏的发育缺陷, 从而影响了心脏的功能, 但是未发现胚胎血管系统发育的明显缺陷.

关键词 connexin43, 斑马鱼, 心脏发育, 整体原位杂交

学科分类号 Q3, Q7

连接蛋白(connexin, cx)是由多基因家族编码的一类结构相似、相对分子质量不同的蛋白质, 目前已发现至少 21 种连接蛋白存在于哺乳动物, 通常根据其分子质量来命名. 在细胞膜上, 每 6 个相同或不同的连接蛋白围绕中央孔(直径 1.5~2.0 nm)排列形成一个连接子(connexon), 相邻细胞膜上的连接子相互对接形成间隙连接(gap junction). 间隙连接是一种重要的通讯连接, 它不仅是细胞间代谢耦联、冲动传导的结构基础, 而且可以通过介导与细胞的迁移、分化、增生和器官形成有关的信号物质, 而在胚胎发育中起重要作用. 间隙连接的生理特性主要是由组成它的连接蛋白决定的^[1,2].

Cx43 是第一个在心肌和其他组织发现并且是表达最广泛的一个连接蛋白. 已经发现 cx43 的基因突变与许多人类的发育缺陷有关, 包括耳聋、外周神经病和先天性的心脏病. 对 cx43 基因在发育中的研究有助于理解各种相关先天性疾病特别是心

血管疾病的发生机制, 为治疗提供新的思路^[3~5].

已有的研究证实, cx43 的基因敲除小鼠在胚胎期表现出明显的心脏发育缺陷, 主要是右心室和流出道的畸形^[6,7], 但是其确切的分子机制还有待于进一步阐明.

由于 cx43 的基因敲除导致哺乳动物的胚胎致死或出生后不久死亡, 且哺乳动物胚胎内发育, 因此不利于对心血管系统的研究和观察. 而斑马鱼是近年来出现的一种良好的模式生物, 其体型较小, 可以通过渗透作用提供氧气和营养, 即使心血管有严重的畸形也可以存活较长的时间. 此外, 斑马鱼胚胎发育期通体透明便于观测, 且心脏发育在进化

* 国家自然科学基金资助项目(30600489).

** 通讯联系人.

Tel: 021-54237092, E-mail: hysong@shmu.edu.cn

收稿日期: 2007-12-03, 接受日期: 2008-03-03

上与哺乳动物具有高度的保守性, 因此被认为是研究心血管早期发育的良好的模式生物. 利用斑马鱼研究 cx43 对心血管系统发育的影响具有独特的优势. 本文利用吗啉类似物修饰的反义寡核苷酸全胚胎显微注射方法, 建立了 cx43 基因抑制的斑马鱼模型, 与哺乳动物 cx43 敲除模型相比, 其存活时间更长且便于观察, 有利于后续研究. 利用原位 RNA 印迹和原位免疫荧光等方法首次系统报道了 cx43 抑制后斑马鱼心血管系统的发育状况, 以及相关标志基因的表达情况, 为 cx43 对心血管发育影响的相关机制研究提供了重要基础.

1 材料和方法

1.1 实验动物

斑马鱼(AB 系)喂养方案根据 Westerfield 的方法进行^[8], 照明 14 h 黑暗 10 h 交替, 雌雄两组分别饲养. 定时喂以鱼饵外加咸水丰年虫(Artemien, Salina), 直到雌雄体发育到可以产卵后, 把一雌三雄放在装有产卵箱的水族箱内, 次日清晨 6~8 h 产卵. 收集鱼卵培养于 28℃ 培养液, 根据形态特征区分发育阶段^[9].

1.2 显微注射

为了有效地抑制 cx43 基因表达, 针对 cx43mRNA 翻译起始位点设计了两条吗啉修饰的反义寡核苷酸(Morpholino-modified antisense oligonucleotides), cx43-MO-1: 5' TCCAGTCACC-CATCTTGAGGGGAGTT 3', 针对的位点为从 ATG 上游 12 bp 到其下游 13 bp, cx43-MO-2: 5' AA-AGAAGTAAAGAGTGGAGAGCCCT 3' 针对的位点为从 ATG 上游 45 bp 到 ATG 上游 20 bp, 一条标准对照为 5' CCTCTTACCTCAGTTACAATTATA 3' (均购于 Gene Tools, LLC). 稀释在 Danieau's 溶液中后, 在一到两细胞期的野生型胚胎中注射, 注射量为每个胚胎 0.25~5 ng. 为了验证吗啉抑制 cx43 表达的有效性, 我们构建了 cx43-EGFP 的融合质粒, 把一个 347 bp cx43 的基因片段融入 pEGFP-N1 载体, 其中包括 44 bp 5' UTR 和其附近编码区域编码起始 101 个氨基酸.

1.3 整体原位杂交

取不同发育时期的胚胎, 用 1×PBST 溶液洗去多余的甲醇溶液, 蛋白酶 K 消化, 将胚胎置于 65℃ 水浴进行预杂交 3 h, 然后加入所合成的反义

RNA 探针 65℃ 水浴杂交过夜. 多余的探针用 0.2×SSC 溶液洗去, 加入 anti-Dig-AP (购于 Roche 公司) 与反义 RNA 探针结合过夜. 未结合的抗体用 1×PBST 溶液洗去, 再加入 BCIP/NBT/NTMT 溶液显色 30 min, 迅速用 1×PBST 溶液洗去多余的显色液, 在显微镜下观察并记录结果^[10].

1.4 全胚胎原位免疫荧光

全胚胎原位免疫荧光的试验方法参照参考文献[11], 用单克隆抗体 CH1. 单克隆抗体从美国爱荷华大学(the Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa)获得.

1.5 荧光显微造影

斑马鱼胚胎 0.02% tricaine(0.02% tricaine 溶于 Ringer's 溶液, tricaine 购于 Sigma-Aldrich 公司)麻醉后, 转移到 1.5%的琼脂糖凝胶槽中固定, 胚胎浸入 Ringer's 溶液. 从静脉窦显微注入 FITC-dextran (相对分子质量 10 000, 购于 Sigma-Aldrich 公司). 用 Olympus BX61 显微镜观察, DP70 数码相机拍照.

1.6 数据处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示. 数据统计应用 spss11.5 软件, 均值之间的差异显著性用双侧 t 检验.

2 结果与分析

2.1 Cx43 蛋白的结构和功能在进化上高度保守

Cx43 的 4 个跨膜区在脂双层结构上形成亲水的跨膜结构域, 与其他结构域形成间隙连接的连接子, 调节通道的选择性并且对胞浆 pH 值做出反应. 比较人类、小鼠、大鼠、鸡和斑马鱼的 cx43 蛋白序列(图 1)发现, 在 4 个跨膜区几乎没有改变(大约位于第 120 个氨基酸残基之前). 几个组氨酸残基被认为在调节哺乳动物间隙连接起重要作用, 而在小鼠、大鼠、人、鸡和斑马鱼中多个位点上也完全一致. Cx43 多肽的 N 端高度保守, C 端在不同的区域高度一致, 一些假定的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化位点也非常保守. Cx43 蛋白的氨基酸序列来自数据库 UniProtKB/Swiss-Prot, 初始登陆号分别为 P17302、O57474、P23242、P08050 和 P14154. 序列比对采用序列比对工具 T-COFFEE^[12], 比对后的编辑用 BOXSHADE 3.21.

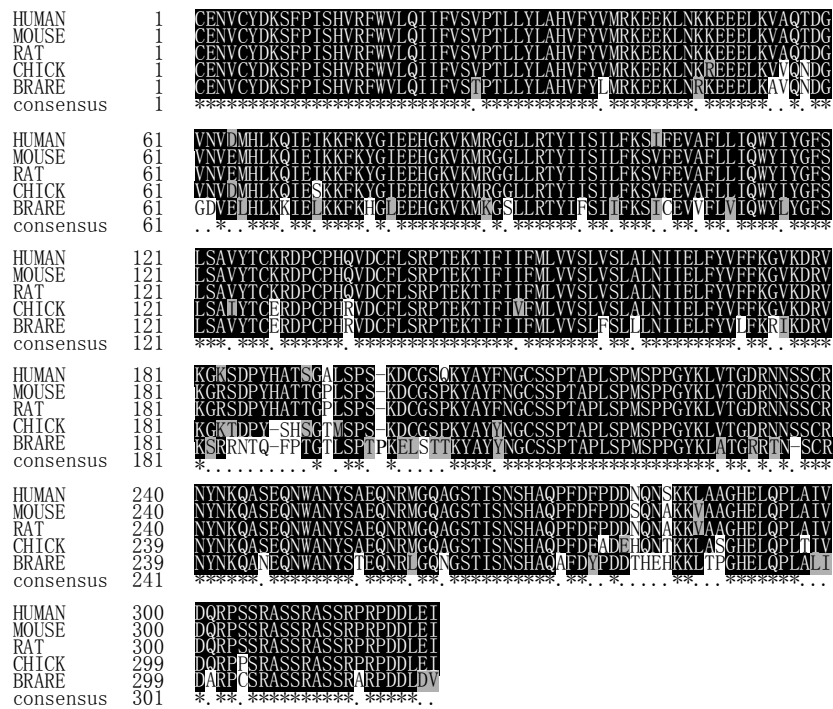


Fig. 1 T-COFFEE sequence alignment of cx43 proteins

Selected cx43 protein sequences were analyzed using T-COFFEE followed by boxshading using the BOXSHADE server. The cx43 protein of *Danio rerio* (ZEBRAFISH) is compared with orthologs from *Homo sapiens* (HUMAN), *Mus musculus* (MOUSE), *Rattus norvegicus* (RAT), *Gallus gallus* (CHICK). Identities between all three sequences are highlighted in black, grey boxed residues are similar. Dashes show gaps inserted to maximize the alignment.

2.2 Cx43 的表达抑制对斑马鱼心脏表型的影响

注射吗啉修饰的反义寡核苷酸是一种已经建立的良好干扰目标 mRNA 翻译的方法^[3]. 为了研究 cx43 基因对斑马鱼心血管系统发育的影响, 设计了两个吗啉修饰的反义寡核苷酸干扰 cx43 翻译起始位点, 两个分别单独注射并以 1 : 1 的比例混合注射, 结果显示 3 种注射胚胎表型完全一致. 为了验证吗啉修饰的反义寡核苷酸的有效性, 我们将其与编码 cx43-EGFP 融合蛋白的 cx43-EGFP DNA 共注射, 结果显示, cx43-MO 抑制了 cx43-EGFP 融合蛋白的表达(图 2)(n > 100), 从而也验证了 cx43-MO 能够有效抑制内源性 cx43 的表达. 注射后发现, 受精后 60 h cx43 抑制的斑马鱼胚胎心脏

与对照相比心房偏大、心室偏小、环化不完全、心前区水肿, 根据表型的严重程度我们将其分为 4 类(表 1): a. 正常组几乎没有变型; b. 表型较轻组

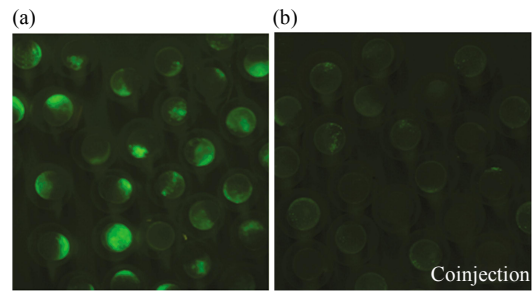


Fig. 2 Effect of cx43 expression down regulation

(a) Injection of cx43-EGFP DNA at 200 pg produced green fluorescence. (b) Coinjection of 5 ng cx43-MO with the 200 pg cx43-EGFP DNA inhibited production of the cx43-EGFP fusion production.

Table 1 Phenotypes of wild-type embryos injected with cx43 MO mix and standard control MO

mo (ng injected)	n	Phenotype			
		Normal	Phenotype A	Phenotype B	Phenotype between A and B
5 cx43-MO-1	100	5(5%)	47(47%)	36(36%)	12(12%)
5 cx43-MO-2	100	3(3%)	35(35%)	46(46%)	16(16%)
5(2.5cx43-MO-1 2.5 cx43-MO-2)	200	12(6%)	104(52%)	68(34%)	16(8%)
5(control MO)	50	48(96%)	2(4%)	0	0

The total number of scored animals (n) including only the embryos that were healthy at 36 h after injection, phenotypes scored at 72 hpf and separated into four categories: normal, phenotype A showing enlarged atrium and retrenched ventricle, phenotype B showing more severe phenotype than A, and phenotype between A and B.

(图 3b); c. 表型严重组(图 3c); d. 表型介于较轻和严重之间, 难于将其归于 b 和 c 两组. 到了 72 h 更加明显, 部分严重表型心脏已经无血液循环(图 3d).

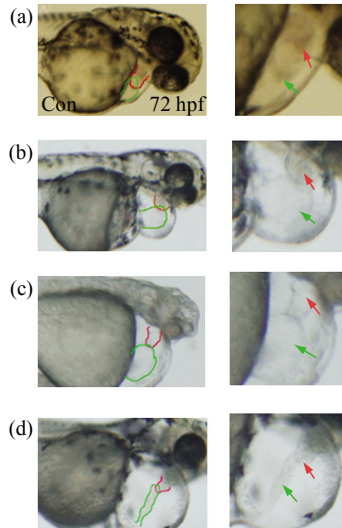


Fig. 3 Cx43 knockdown causing enlarged atrium and retrenched ventricle

Representative photographs of morpholino injection trial illustrated, (a, b) Wild-type embryos injected with 5 ng of standard control morpholino. (c, d) Wild-type embryos injected with 5 ng of cx43-mo. The left column (heart) shows the heart morphology phenotype at 72 hpf. The atrium is outlined in green, and the ventricle is outlined in red. The right column shows higher magnification views of the hearts in the left column. Green arrows pointing to the sites of atriums, red arrows pointing to the sites of ventricles.

此外, 通过心室心房的标志基因 *vmhc* 和 *amhc* 的反义 RNA 探针原位杂交显示, *vmhc* 表达明显抑制, 相反 *amhc* 表达上调(图 4a, b). 全胚胎原位免疫荧光的结果也显示心室变小和心房扩大,

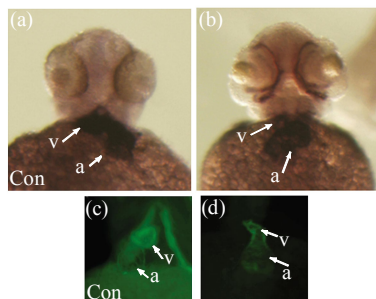


Fig. 4 The analysis of cx43 morphants heart by whole mount in situ hybridization and whole-mount immunofluorescence

Wild-type embryos injected with 5ng of cx43-mo. Whole mount in situ hybridization showing that *vmhc* expression cell domain was reduced and *amhc* expression cell domain was increased in cx43 morphant (b), control (a) at 72 hpf. Whole-mount immunofluorescence with the anti-tropomyosin antibody CH1 (FITC) showing the evidence that down regulation of cx43 resulted in enlarged atrium and retrenched ventricle(d), control (c). Arrows pointing to the sites of ventricles and atriums, v: ventricle; a: atrium.

并且明显伴有环化不全(图 4c, d). 通过与对照组相比的活体观察, 还发现 cx43 抑制的斑马鱼血液循环血流变弱, 且伴有回流现象, 提示心室流出道有先天畸形.

对照组在胚胎孵育的 24 h 出现心脏搏动, 心率(99 ± 8)次/min($n=20$), 随心脏发育心率逐渐加快. Cx43 抑制的心脏搏动无力, 心率为(89 ± 7)次/min($n=22$), 和正常组相比有明显差异, $P < 0.05$ (图 5); 心脏发育到 48 h 后心率差异更加明显, 野生型心率变快为(139 ± 9)次/min($n=20$), cx43抑制组的心率为(77 ± 19)次/min($n=20$). 处理组心率有随心脏发育逐渐减慢的趋势, 部分表型严重的心脏到 96 h 心率几乎为 0.

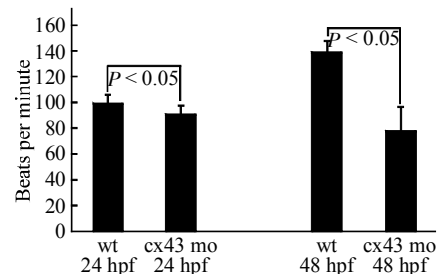


Fig. 5 Comparison of the heart rate in cx43 knock-down and control embryos at 24 hpf

2.3 Cx43 的表达抑制对斑马鱼血管发育的影响

Flk-1 是在血管内皮细胞上特定表达的血管内皮生长因子 (vascular endothelium growth factor, VEGF) 的受体, 是血管内皮的标志物. 用 flk-1 探针原位杂交检测血管的发育情况, 发现对照组胚胎血管完整、清晰、连续, cx43 抑制组的血管与对照组相比也无明显差异. 但是同时也发现, cx43 抑制组的内细胞团位置呈现出不同程度的中空, 此位置的 flk-1 的表达与对照组相比减少(图 6a, b).

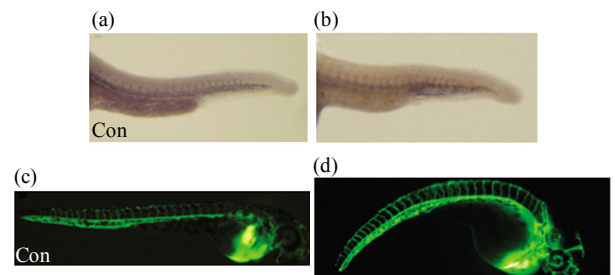


Fig. 6 Whole-mount in situ hybridization and microangiography showing a nearly normal vascular pattern Wild-type embryos injected with 5ng of cx43-mo. Whole-mount in situ hybridization with flk1 RNA probes showing almost normal flk-1 expression pattern in the trunk of cx43 morphants (b), compared with control(a) at 36 hpf. Microangiography showing apparently normal trunk blood vessel and almost the same intersomite vascular pattern (d) compared with the control(c) at 72 hpf.

与此同时,通过荧光显微造影的结果显示了整个胚胎的血管与对照相比同样清晰可见未见异常(图 6 c, d),此外 cx43 抑制组的躯干略显弯曲.

3 讨 论

心脏的发育是一个复杂的过程,需要许多事件的参与,包括细胞增殖、迁移、分化和不同起源的细胞之间的相互作用.心脏的发育与多种基因的表达与调控有关.心脏是胚胎发育过程中最早发生并发挥功能的器官,完善的循环功能对于胚胎的正常发育起着关键作用.

先心病的发生率在新生儿中大约为 0.5%~1%,在死婴中的发生率更高,大约为 10.2%.近来 cx43 基因的变异也被认为是导致先心病的原因之一.在本实验研究中发现, cx43 抑制组斑马鱼的心房偏大,而心室与对照相比明显变小.在小鼠上的研究提示, cx43 与多种心脏的发育畸形有关,包括心室畸形、心脏圆锥干畸形(conotruncal heart malformation)和心脏流出道畸形等^[6,7]. Huang 等^[14]利用神经嵴体外培养,分别研究了 cx43 KO 小鼠、FC 转基因小鼠、CMV 43 转基因小鼠神经嵴细胞以及直接抑制 GJC 的非转基因神经嵴细胞的迁移和增殖情况.结果发现,神经嵴细胞迁移速率与 cx43 功能水平呈正相关,而其增殖则不受 cx43 影响.利用 CMV 43 转基因小鼠及 cx43 KO 小鼠进行研究发现,前者富集于心脏流出道的神经嵴细胞数量增多,同时伴有心肌细胞增殖的增加,后者则呈相反变化.以上结果证明, cx43 对心脏神经嵴细胞的迁移具有调节作用,这可能是其影响心脏特定部位发育的重要机制. Li 等^[15]的最新研究表明, cx43 不仅影响心脏神经嵴细胞的迁移,而且与心脏发育中的另外一个细胞群——前心外膜细胞群的迁移有关.在哺乳动物中的研究提示,本研究中小心室大心房的表型可能也与神经嵴细胞的迁移有关.斑马鱼在进化过程上属于脊椎动物的鱼纲,只有单心房和单心室,本研究没有直接证明 cx43 抑制后的心脏流出道畸形,但其心脏泵血功能的减退和血液的回流提示其流出道畸形的存在,这也从功能上进一步证明 cx43 基因在进化上的保守性.

目前 cx43 缺陷引起心脏环化障碍,以及这种改变导致发育异常的确切机制尚不清楚.心脏发育早期,纵直心管的右旋环化对于心脏各腔室及大血管的正确定向和排列具有重要意义.内脏异位综合征及某些单纯心脏畸形均可能与环化异常有关.心

脏发育中最早的行为是沿着 3 个垂直轴,即前后轴、左右轴、背腹轴的正确定位过程,前后轴的定位又是其中最早、最复杂的行为^[16].心脏前体沿前后轴的发育和排列使心房和心室具备了各自独特的遗传、生化调控途径和各自独特的表型,使得它们从共同的前体中分化出来,流入道、心房、心室和流出道得以具有不同的收缩能力和收缩频率,可以有效地避免血液反流^[17].斑马鱼胚胎发育过程中,受精后 36 h 心脏环化完成,到 48 h 功能型的瓣膜已形成. cx43 抑制的斑马鱼的心脏环化不全与哺乳动物具有类似的表型.此外,斑马鱼的心脏功能也受到明显影响,这可能与心脏结构的缺陷有直接关系.

本文利用模式生物斑马鱼研究 cx43 基因抑制对心血管系统发育的影响.研究发现, cx43 表达的抑制导致斑马鱼心脏的畸形与高等哺乳动物非常相似,提示 cx43 在胚胎心血管发育中的作用在进化上具有高度保守性,从而为利用斑马鱼研究 cx43 导致心脏发育畸形的确切机制以及先天性心脏病的分子机理的研究打下基础.

致谢 感谢蒋璆同学对文稿进行了发表前的阅读.

参 考 文 献

- 1 Bruzzone R, White T W, Paul D L. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem*, 1996, **238**(1): 1~27
- 2 Sohl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res*, 2004, **62**(2): 228~232
- 3 Bergoffen J, Scherer S S, Wang S, *et al.* Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science*, 1993, **262**(5142): 2039~2042
- 4 Shiels A, Mackay D, Ionides A, *et al.* A missense mutation in the human connexin50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant bzonular pulverulentQ cataract, on chromosome 1q. *Am J Hum Genet*, 1998, **62**(3): 526~532
- 5 Kelsell D P, Dunlop J, Stevens H P. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 1997, **387**(6628): 80~83
- 6 Jing Y, Erdtsieck-Ernste E B, Piet A J, *et al.* Heart defects in connexin43-deficient mice. *Circ Res*, 1998, **82**(3): 360~366
- 7 Susanne K, Sun J K, Andreas H, *et al.* Abnormal cardiac conduction and morphogenesis in connexin40 and connexin43 double-deficient mice. *Circ Res*, 2000, **87**(5): 399~405
- 8 Westerfield M. *The Zebrafish Book: A Guide for The Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. Oregon: University of Oregon Press, 1995
- 9 Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, *et al.* Stages of embryonic

- development of the zebrafish. *Dev Dyn*, 1995, **203**(3): 253~310
- 10 Yelon D, Home S A, Stainier D Y. Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish. *Dev Biol*, 1999, **214**(1): 23~37
 - 11 Berdoudo E, Coleman H, Lee D H, *et al.* Mutation of weak atrium/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish. *Development*, 2003, **130**(24): 6121~6129
 - 12 Notredame C, Higgins D, Heringa J. T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignment. *J Mol Biol*, 2000, **302**(1): 205~217
 - 13 Nasevicius A, Ekker S C. Effective targeted gene knockdown in zebrafish. *Nat Genet*, 2000, **26**(2): 216~220
 - 14 Huang G Y, Cooper E S, Waldo K, *et al.* Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. *J Cell Biol*, 1998, **143**(6): 1725~1734
 - 15 Li W E, Waldo K, Linask K L, *et al.* An essential role for connexin43 gap junctions in mouse coronary artery development. *Development*, 2002, **129**(8): 2031~2042
 - 16 Xavier-Neto J, Rosenthal N, Silva F A, *et al.* Retinoid signaling and cardiac anteroposterior segmentation. *Genesis*, 2001, **31**(3): 97~104
 - 17 Kilner P J, Yang G Z, Wilkes A J, *et al.* Asymmetric redirection of flow through the heart. *Nature*, 2000, **404**(6779): 759~761

The Effects of Connexin43 Down Regulation on The Development of The Embryonic Heart and Vasculature in Zebrafish*

LIU Dong¹⁾, WANG Yue-Xiang¹⁾, HU Jing-Ying¹⁾, SUN Shu-Na²⁾, SONG Hou-Yan^{1)**}

¹⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai Medical College and Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²⁾ Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract To study the effects of connexin43 down regulation on the development of the embryonic heart and vasculature in zebrafish, two types of well designed morpholino oligonucleotide antisenses were injected into zebrafish embryos to block the translation of cx43 at one or two cells stage. After injection, the phenotypes of heart and vasculature were monitored by whole mount in situ hybridization, whole-mount immunofluorescence and microangiography. Whole-mount in situ hybridization with vmhc and amhc RNA probes showed that the vmhc expression cell domain was reduced; meanwhile, amhc expression cell domain was increased in cx43 down regulation group. Whole-mount immunofluorescence provided the evidence that down regulation of cx43 resulted in enlarged atrium and retrenched ventricle. Both in situ hybridization and microangiography indicated that vasculature pattern of cx43 morphants are almost normal compared with wildtype. Besides, the function of heart was affected obviously. Down regulation of cx43 caused the development defects of zebrafish embryonic heart, which may be involved in the wrong destination of two migratory cell populations, but it did not nearly affect vascular development.

Key words connexin43, zebrafish, heart development, whole mount in situ hybridization

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(30600489).

**Corresponding author .

Tel: 86-21-54237092, E-mail: hysong@shmu.edu.cn

Received: December 3, 2007 Accepted: March 3, 2008