

二氢叶酸还原酶基因在斑马鱼咽弓发育过程中作用的研究*

孙淑娜¹⁾ 桂永浩^{1)**} 蒋 璆²⁾ 钱林溪²⁾ 宋后燕²⁾

(¹⁾复旦大学儿科医院, 上海 201102; (²⁾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)

摘要 叶酸缺乏可导致胚胎先天性发育异常, 二氢叶酸还原酶是叶酸生物学作用通路中的关键因子, 其功能阻抑将抑制叶酸生物学作用的发挥. 咽弓是脊椎动物胚胎发育中头面部结构、心脏流出道等的共同前体. 在模式生物斑马鱼中, 利用基因表达阻抑以及过表达技术, 探讨二氢叶酸还原酶基因(*DHFR*)在斑马鱼咽弓发育过程中的作用. 石蜡切片以及软骨染色结果显示, *DHFR* 表达阻抑导致斑马鱼咽弓以及腭发育明显异常, 而 *DHFR* 过表达可部分挽救上述发育异常表型. *TBX1* 和 *HAND2* 在咽弓发育中有重要作用. 通过胚胎整体原位杂交以及 Real-time PCR 技术检测 *TBX1* 和 *HAND2* 表达水平. *DHFR* 表达阻抑后 *TBX1* 和 *HAND2* 的表达降低, *DHFR* 过表达可使 *TBX1* 和 *HAND2* 的表达增加. 上述结果表明, *DHFR* 在斑马鱼咽弓发育过程中扮演重要角色, *DHFR* 通过影响 *TBX1* 和 *HAND2* 的表达而调控咽弓的形成和分化.

关键词 二氢叶酸还原酶基因, 咽弓, 斑马鱼, *TBX1*, *HAND2*

学科分类号 Q3, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00409

叶酸是 B 族维生素的一种, 四氢叶酸是叶酸发挥生物学作用的主要活性物质, 其在一系列复杂的反应中作为载体转运一碳单位参与体内许多重要反应, 对于生物体内的核苷酸合成以及 DNA 甲基化等十分重要. 二氢叶酸必须在二氢叶酸还原酶(*DHFR*)的作用下, 由 NADPH^+ 传递 H^+ 才能生成四氢叶酸. 因此, 在叶酸的代谢通路中, *DHFR* 对于叶酸发挥生物学作用尤其重要, *DHFR* 的功能下调将导致叶酸的生物学活性发挥受到抑制. 近年来研究表明, 叶酸缺乏会导致人群中唇腭裂、先天性心脏病等先天性发育异常的发生率增加^[1-3]; 叶酸在预防先天发育畸形中所起的作用已越来越受到人们的关注和重视^[4-5]. 咽弓是脊椎动物胚胎发育中的重要结构, 是头面部结构、心脏流出道、胸腺和甲状旁腺的共同前体. 在我们前期实验中, 已发现二氢叶酸还原酶功能异常导致斑马鱼胚胎心脏^[6-7]、颅面部以及神经系统发育明显异常, 但二氢叶酸还原酶功能异常是否导致咽弓发育紊乱尚不明确. 本研究在新兴模式生物斑马鱼中开展二氢叶酸还原酶基因(*DHFR*)在咽弓发育过程中的作用研究, 并初步对 *DHFR* 调控咽弓发育的机制进行了探讨.

1 材料和方法

1.1 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 mg/L 海盐) 28℃ 孵化, 出绒毛膜后在胚胎培养液内养育, 每天更换胚胎培养液. 用于原位杂交的胚胎受精后 24 h (24 hpf, 24 h post fertilization)始用 0.003% 苯硫脲(PTU)处理以防止黑色素的形成.

1.2 吗啡啉修饰的反义核苷酸(Morpholino oligonucleotides, MO) 以及 *DHFR-GFP* 融合质粒的设计、合成

阻抑 *DHFR* 表达的 MO 以及 Con MO 由美国 GENE TOOLS 公司设计以及合成. *DHFR* MO: 5' ACGGCTCTGCCTTCTTCCCGCCAAG 3', 对照

* 国家教育部博士点基金资助项目(200802461111).

** 通讯联系人.

Tel: 021-64931990, E-mail: yhgui@shmu.edu.cn

收稿日期: 2009-07-08, 接受日期: 2009-12-28

MO: 5' CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA 3', *DHFR* MO 以及对照 MO 溶解于 30% 的 Danieau 溶液中. 构建 *DHFR-GFP* (绿色荧光蛋白基因) 融合质粒时, 首先扩增 *DHFR* 翻译起始位点附近 cDNA 序列(包含有 5' UTR 以及 *DHFR* MO 作用的靶序列相关区), 将此序列以及 pEGFP-N1-*GFP* 载体进行双酶切后进行连接, 形成 pEGFP-N1-*DHFR-GFP* 融合质粒. 将其定量后溶于 30% 的 Danieau 溶液中, 置于 -70°C 备用.

1.3 *DHFR-GFP* mRNA 以及 *DHFR* mRNA 的合成

抽提 48hpf 斑马鱼胚胎的总 mRNA, 经逆转录获得全长 cDNA. 经 PCR 扩增 *DHFR* 全长 cDNA, 将扩增的 *DHFR* cDNA 以及 pT7Ts-*GFP* 载体经双酶切后连接, 获得含有 *DHFR* 全长 cDNA 的重组 pT7Ts-*DHFR-GFP* 质粒. 将扩增的 *DHFR* cDNA 以及 pT7Ts 载体经双酶切后连接, 获得含有 *DHFR* 全长 cDNA 的重组 pT7Ts-*DHFR* 质粒. 应用 Ambion 公司的 mMGSSAGE mMACHINE T7 试剂盒从重组质粒中体外转录 *DHFR-GFP* mRNA 以及 *DHFR*-mRNA, 将它们定量后溶于 30% 的 Danieau 溶液中, 置于 -70°C 备用.

1.4 显微注射

在显微镜下挑选发育至 1~2 个细胞期的受精卵进行注射, 注射剂量为 1.5 nl 0.05 mmol/L Con MO、1.5 nl 0.05 mmol/L *DHFR* MO、1.5 nl 0.05 mmol/L *DHFR* MO+6 nl 50 mg/L *DHFR-GFP* 融合质粒、6 nl 40 mg/L *DHFR-GFP* mRNA、6 nl 40 mg/L *DHFR* mRNA. 每组注射 50 个受精卵, 重复注射 3 次.

1.5 石蜡切片与软骨染色

胚胎在 96hpf 由 4% 多聚甲醛进行固定后, 制作成蜡块, 然后将蜡块进行横向切片后, 在显微镜下观察咽弓并进行拍照. 胚胎在 96hpf 同样由 4% 多聚甲醛进行固定后, 进行阿辛蓝软骨(alcian blue)染色, 在显微镜下观察咽弓软骨染色情况.

1.6 基因探针制备及胚胎整体原位杂交

抽提斑马鱼胚胎 48hpf 总 RNA 后, 经 RT-PCR 逆转录获得 cDNA. 采用 Primer3 软件设计引物, 以逆转录获得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增特异性基因序列作为原位杂交的探针片段. 将 PCR 产物切胶回收, 克隆入 PGEM-T 载体中, 经测序验证后, 获得含有 *TBX1* cDNA 片段或 *HAND2* cDNA 片段的质粒, 利用内切酶将其线性化后, 体外转录反义 RNA 探针(地高辛标记). 胚胎的固定及原位

杂交按照已完善的步骤进行^[8]. 每组 50 枚胚胎, 实验重复 3 次.

1.7 Real-time PCR

采用 Primer3 软件设计用于 Real-time PCR 实验的引物, 由 Sangon 生物公司合成. *TBX1* 引物, F: 5' GAGACTGTGATCCCGAGGAC 3', R: 5' TCATGATTTGTAGCGAGCCT 3'. *HAND2* 引物, F: 5' GGAGAAACAGAGGCCTTCAA 3', R: 5' ATTGCTGCTCCCTGAACTTT 3'. 抽提斑马鱼 24hpf、36hpf 以及 48hpf mRNA, 逆转录为 cDNA, 然后以此 cDNA 为模板进行 Real-time PCR 实验, 以 β -actin 做为内参对照. 每个样品重复 3 个孔, 实验结果采用 ABI 7000 荧光定量 PCR 仪提供的分析软件进行分析.

1.8 数据处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据统计应用 spss11.5 软件进行单因素方差分析, 取 $P < 0.05$ 为显著差异.

2 结果与分析

2.1 *DHFR* 表达阻抑的效率验证

本实验应用显微注射吗啡啉修饰反义 RNA (MO) 的方法进行斑马鱼胚胎体内 *DHFR* 表达阻抑. 在实验中我们设计了 *DHFR* 表达阻抑的效率验证, 在胚胎发育至 6hpf 时荧光显微镜下对胚胎进行观察, Con MO 注射组胚胎未被观察到有 *GFP* 表达(图 1a, d), *DHFR-GFP* 融合质粒显微注射组胚胎有较强 *GFP* 表达($90.7 \pm 3.1\%$) (图 1b, e), *DHFR* MO+*DHFR-GFP* 融合质粒显微注射组胚胎 *GFP* 的表达明显减少($83.3 \pm 6.4\%$) (图 1c, f), 证实 *DHFR* MO 可对 *DHFR* 的表达进行有效阻抑.

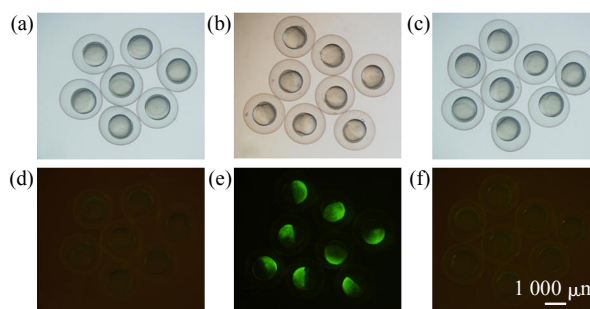


Fig. 1 The effectiveness of *DHFR* knock-down (6hpf)

Comparing with controls (a and d), *DHFR-GFP* plasmid injected group had strong *GFP* expression (b and e). The expression of *GFP* was obviously reduced in *DHFR* MO + *DHFR-GFP* plasmid injected group. a, c, d and f were observed by light microscope. b and e were observed by fluorescence microscope.

2.2 DHFR 过表达的效率验证

在 6hpf 时荧光显微镜下观察结果显示，Con MO 注射组胚胎未被观察到有 GFP 表达(图 2a, c)，DHFR-GFP mRNA 注射组胚胎有较强 GFP 表达(95.3 ± 3.1%)(图 2b, d)，提示酶切、连接以及体外转录的有效性。在 19hpf 进行原位杂交的结果显示，DHFR 在 Con MO 注射组胚胎中表达于中枢神经系统、眼以及 ICM 区(intermediate cell mass)(图 2e)，与 Con MO 相比，DHFR 在 DHFR mRNA 注射组胚胎中的表达水平明显增强(85.3 ± 5.0%)(图 2f)。上述结果证实 DHFR 被有效过表达。

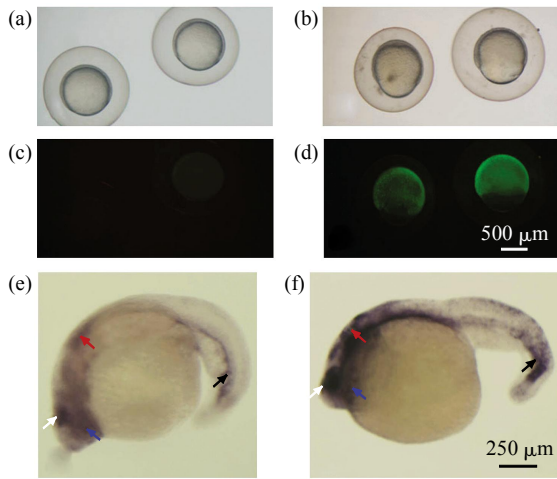


Fig. 2 The effectiveness of DHFR over-expression

Comparing with controls (a and c), DHFR-GFP mRNA injected group had strong GFP expression (b and d). a and b were observed by light microscope. c and d were observed by fluorescence microscope. In controls, DHFR expresses in eyes (blue arrow), central nervous system (red arrows) and intermediate cell mass (black arrows). The expression of DHFR in DHFR mRNA injected group was increased. (a)~(d) 6hpf, (e), (f) 19hpf. Scale bar: a, b, c and d 500 μm; e and f 250 μm.

2.3 DHFR 对胚胎颅面部以及咽弓和腭软骨发育的影响

对 Con MO 注射组、DHFR MO 注射组以及 DHFR MO+DHFR mRNA 注射组胚胎颅面部、咽弓以及腭软骨的发育情况进行观察的结果如下。发育正常的胚胎颅面部发育无畸形(图 3a)；石蜡切片显示上下腭以及咽弓组织清晰可见(图 3d, g)；软骨染色显示腭以及咽弓左右对称，染色良好(图 3j, m)。发育异常胚胎按严重程度分为重度异常(Class I)以及轻度异常(Class II)。重度异常胚胎光镜下存在明显的颅面部发育异常(图 3b)，包括头颅形状改变以及眼耳发育不良等；石蜡切片显示胚胎的咽弓发育严重畸形，部分咽弓缺失，腭软骨发育不良(图 3e, h)；

软骨染色显示胚胎的咽弓失去左右对称性，发育紊乱且染色欠佳，上腭软骨形态异常(图 3k, n)。轻度异常胚胎颅面部整体发育情况(图 3c)、咽弓以及腭软骨发育状况较重度异常型明显改善(图 3f, i, l, o)。

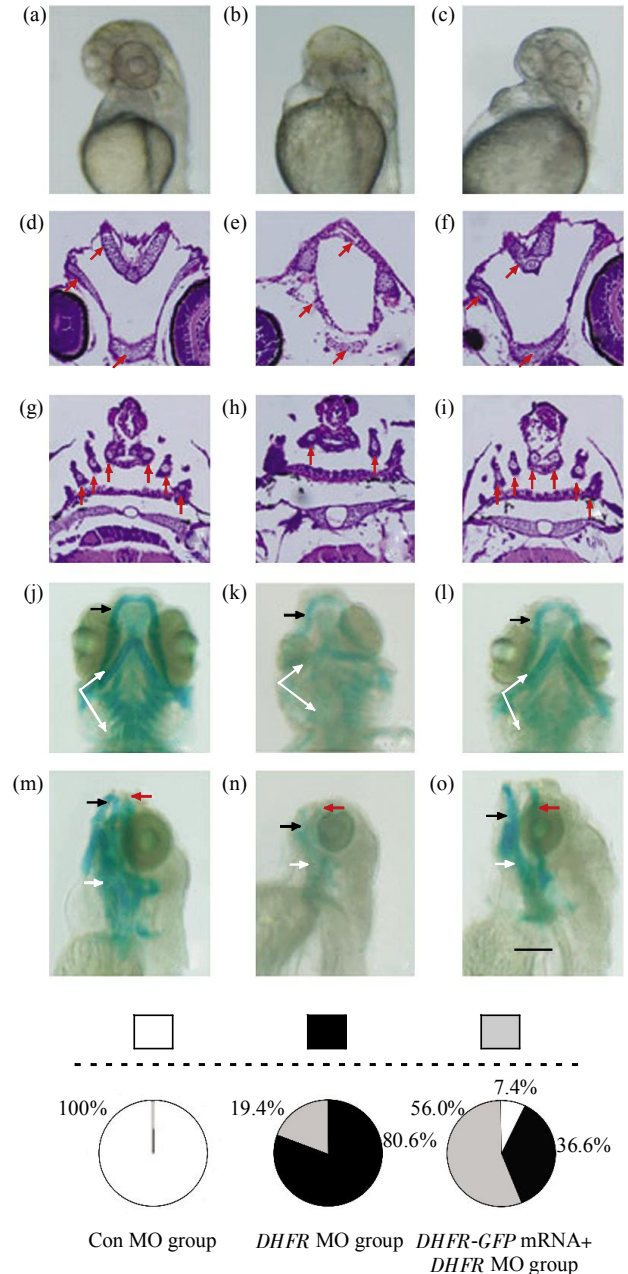


Fig. 3 Effects of DHFR on the craniofacial formation and the developments of pharyngeal arches and palates

The developments of heads were observed by microscope at 60hpf(a~c). Pharyngeal arches and palates were showed by the paraffin section(d~i) and the alcian blue staining at 96hpf(j~o). The abnormal embryos were divided into Class I and Class II according to severity. Class I was more severe than Class II. All Con MO injected embryos normally developed. DHFR MO injected embryos had obvious malformations. Comparing with DHFR MO injected group, the developments in DHFR mRNA +DHFR MO injected group were improved. Scale bar: a~c 350 μm, d~i 125 μm, j~o 250 μm.

将发育正常、重度异常以及轻度异常胚胎在 Con MO 注射组、*DHFR* MO 注射组以及 *DHFR* MO+*DHFR* mRNA 注射组中所占比例进行统计, 结果表明 Con MO 注射组胚胎发育完全正常. *DHFR* MO 注射组胚胎有(80.6 ± 6.4)%发育为重度异常, 有(19.4 ± 6.4)%发育为轻度异常. *DHFR* MO+*DHFR* mRNA 注射组胚胎有(36.6 ± 1.2)%发育为重度异常, 有(56.0 ± 4.0)%发育为轻度异常, 有(7.4 ± 3.1)%发育正常. 上述结果显示, *DHFR* MO+*DHFR* mRNA 注射组胚胎较 *DHFR* MO 注射组胚胎发育情况明显改善.

2.4 *TBX1* 和 *HAND2* 表达水平的检测

胚胎整体原位杂交结果显示, 在对照组中, *TBX1* 在 24hpf 表达于胚胎的第 1~3 对咽弓

(图 4a), 36hpf 表达于第 1~4 对咽弓(图 4b), 48hpf 在第 1~6 对咽弓有较强表达(图 4c).

HAND2 在 24hpf 表达于胚胎的第 1~4 对咽弓(图 5a), 36hpf 表达于第 1~5 对咽弓(图 5b), 48hpf 在第 1~6 对咽弓有较强表达(图 5c). Real-time PCR 结果显示在对照组中, *TBX1* 和 *HAND2* 的表达量在 24、36 以及 48hpf 逐渐增加(图 4j, 图 5j).

胚胎整体原位杂交和 Real-time PCR 结果皆显示, *TBX1* 和 *HAND2* 在 *DHFR* MO 注射组胚胎中的表达水平降低(图 4d~f, j, 图 5d~f, j), 与 *DHFR* MO 注射组胚胎相比, *TBX1* 和 *HAND2* 在 *DHFR* MO+*DHFR* mRNA 注射组胚胎中的表达水平升高(图 4g~i, j, 图 5g~i, j).

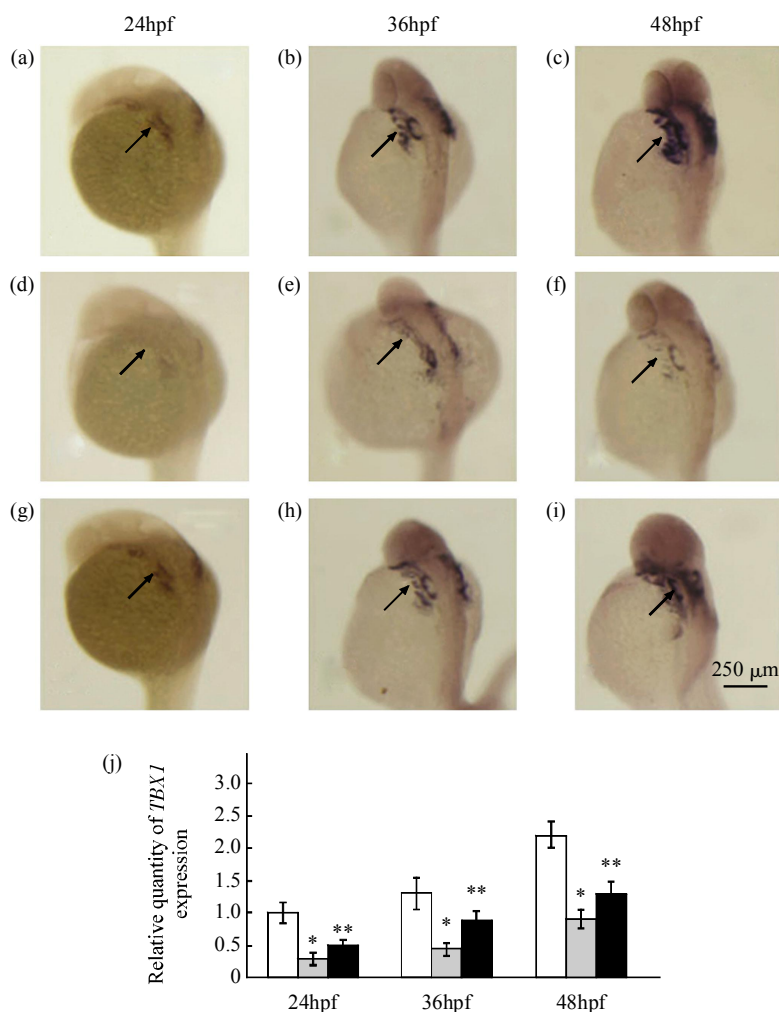


Fig. 4 The effects of *DHFR* on the expression of *TBX1*

The results of whole-mount *in-situ* antisense RNA hybridization and Real-time PCR showed that in control MO groups, *TBX1* expressed in pharyngeal arches (a~c). Compared with control MO groups, the expressions of *TBX1* were reduced in *DHFR* knock-down groups (d~f) (j, **P* < 0.05). *DHFR* over-expression rescued the expressions of *TBX1*(g~i) (j, ***P* < 0.05). □: Con MO; ▤: *DHFR* MO; ■: *DHFR* MO+*DHFR* mRNA.

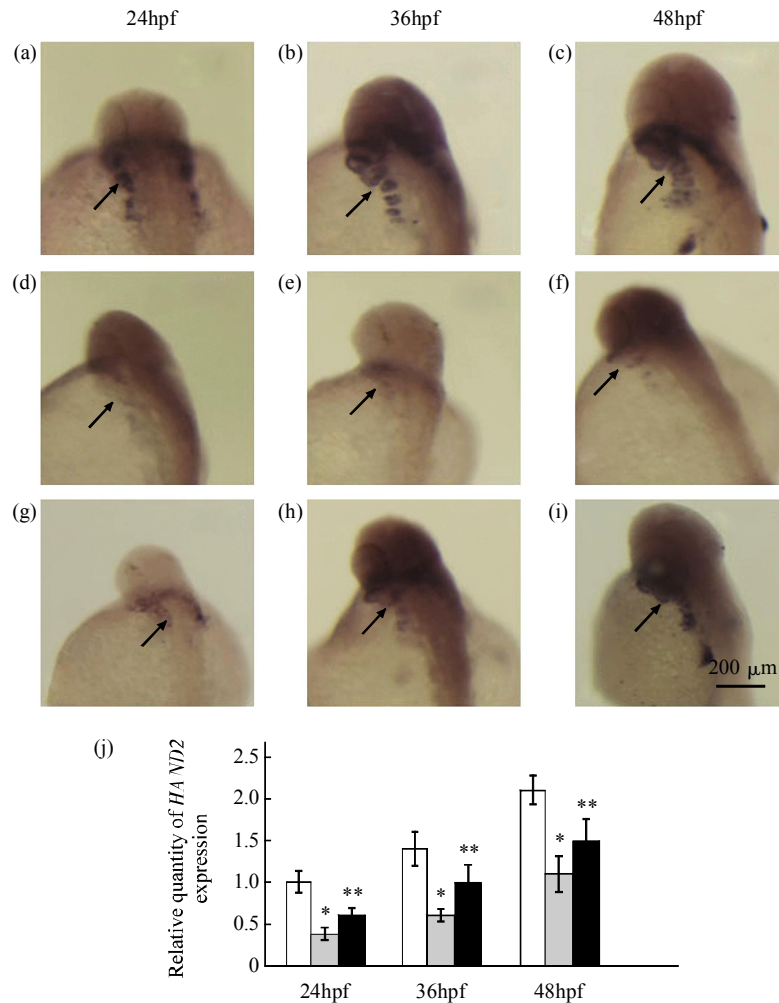


Fig. 5 The effects of *DHFR* on the expression of *HAND2*

The results of whole-mount *in-situ* antisense RNA hybridization and Real-time PCR showed that in control MO groups, *HAND2* expressed in pharyngeal arches (a~c). *DHFR* knock-down results in reducing expressions of *HAND2* (d~f) (j, * $P < 0.05$). *DHFR* over-expression can increase *HAND2* expressions (g~i) (j, $P < 0.05$). □: Con MO; ▨: *DHFR* MO; ■: *DHFR* MO+*DHFR* mRNA.

3 讨 论

二氢叶酸还原酶基因(*DHFR*)在进化中高度保守,在斑马鱼、小鼠、鸡以及人类中,*DHFR*的蛋白质序列有很高的同源性。在*DHFR*的蛋白质结构中,叶酸结合位点和NADP结合位点是*DHFR*的主要功能区。值得注意的是,在斑马鱼和人类中,*DHFR*的叶酸结合位点和NADP结合位点的蛋白质氨基酸序列的同源性较高(*DHFR*蛋白序列均来自GenBank:斑马鱼NP_571850,小鼠NP_034179,鸡NP_001006584,人类NP_000782)(图6)。因此,在斑马鱼中开展发育生物学相关研究可以为预防和治疗人类相关疾病提供有力线索。

本实验采用显微注射吗啡啉修饰的反义RNA(MO)的方法进行斑马鱼胚胎体内*DHFR*功能阻抑^[4]。斑马鱼是研究脊椎动物发育生物学、发育遗传学的理想模式生物。近年来,向斑马鱼受精卵显微注射MO已被证实是一种简单、有效的阻抑目的基因功能的方法,由于斑马鱼有繁殖量大、发育周期短、体外受精、受精卵易于获得并透明、进行显微注射操作简单等优点,利用模式生物斑马鱼借助MO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^[9-11]。实验中用于*DHFR*功能阻抑的MO由美国Gene Tool公司设计并合成,可特异地作用于*DHFR*翻译起始位点ATG附近的5'UTR区,阻断*DHFR*的翻译过程,从而达到*DHFR*功能阻抑的

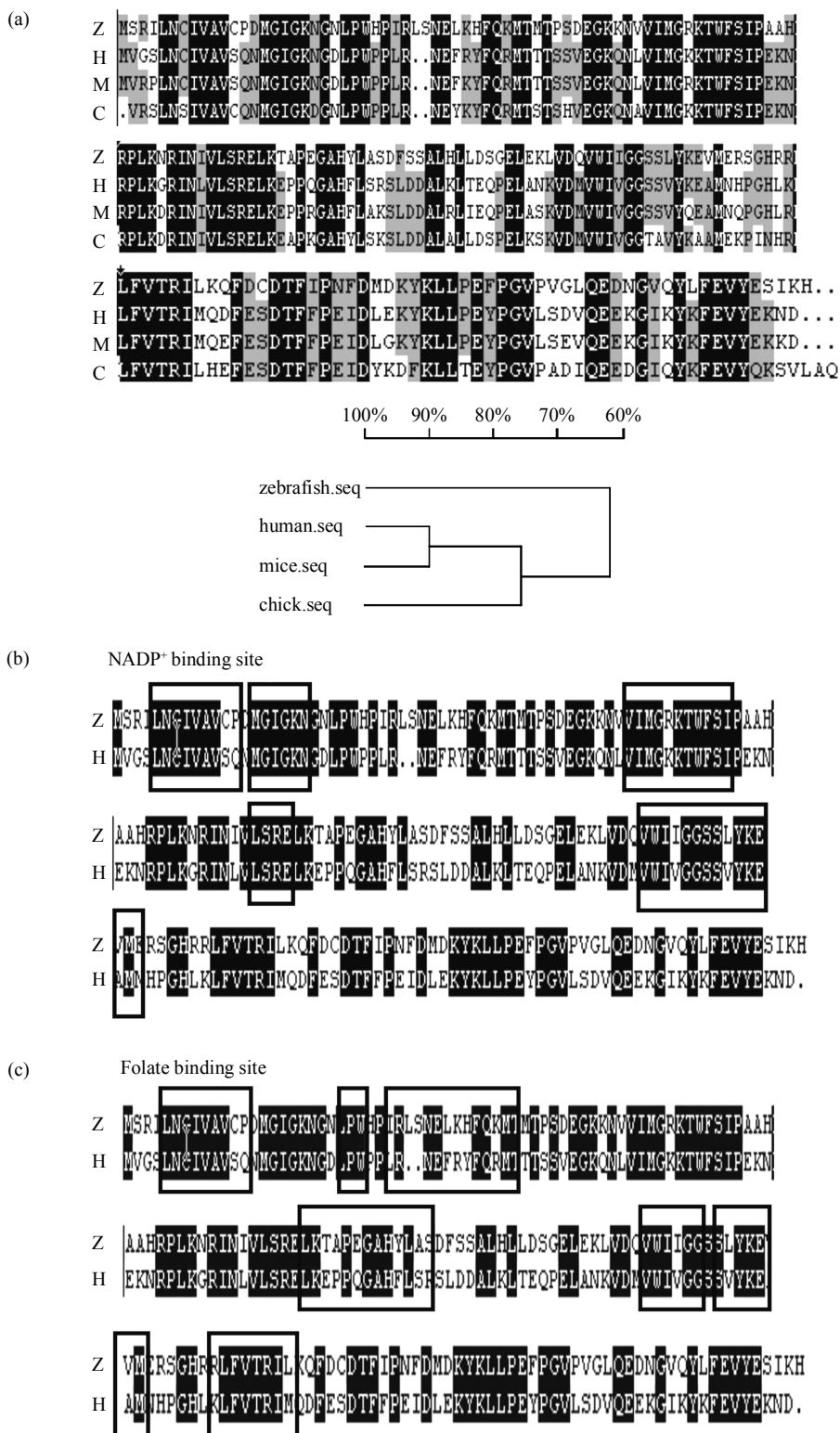


Fig. 6 Sequence alignment of DHFR protein

(a) Comparison of DHFR proteins from zebrafish, human, mice and chicken. (b) Comparison of NADP binding site in DHFR proteins from zebrafish and human. (c) Comparison of folate binding site in DHFR proteins from zebrafish and human.

目的(图 7a, b). 为验证 DHFR 功能阻抑的有效性, 我们设计了如下实验. 扩增包含有 DHFR 翻译起

始位点附近的 cDNA 序列(包含有 5' UTR 以及 DHFR MO 作用靶序列相关区), 将其连接入

pEGFP-N1-*GFP* 载体中, 构建 pEGFP-N1-*DHFR-GFP* 融合质粒. 此质粒被显微注射入受精卵后可表达 *DHFR-GFP* 融合蛋白(图 7c), 在荧光显微镜下可观察到绿色荧光. *DHFR* MO 与 pEGFP-N1-*DHFR* 融合质粒被共同显微注射入受精卵后, 若 *DHFR* MO

阻抑 *DHFR-GFP* 融合蛋白的表达(图 7d), 则荧光显微镜下观察到绿色荧光明显减弱. 实验中观察到 *DHFR* MO 与 pEGFP-N1-*DHFR* 融合质粒共同注射组胚胎几乎无绿色荧光, 证实 *DHFR* MO 可有效阻抑 *DHFR* 表达.

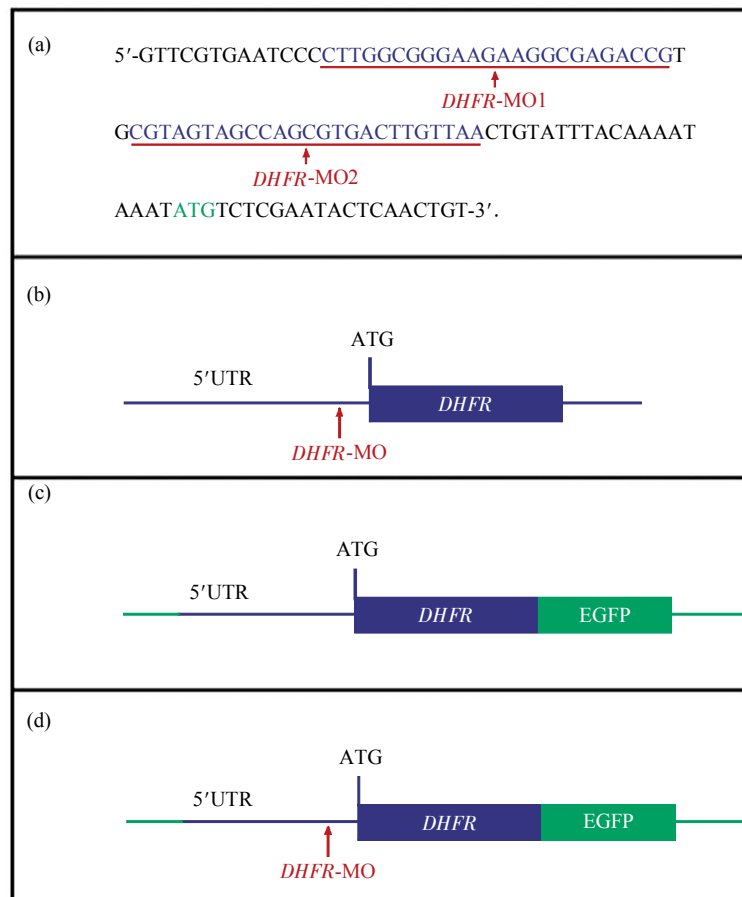


Fig. 7 The sketch map of the experiment that proved *DHFR* knock-down

(a) and (b) The sequences of *DHFR* mRNA which *DHFR* MO acted on. (c) The *DHFR-GFP* fused construct. (d) The blocked translation of *DHFR-GFP* protein.

利用 pT7Ts 载体体外转录目的基因 mRNA 后将其显微注射入斑马鱼受精卵内, 而使目的基因过表达的方法被广泛应用于基因功能研究中^[12-13]. 本实验利用 pT7Ts-*GFP* 载体体外转录 *DHFR-GFP* mRNA, 并将其显微注射入斑马鱼胚胎内, 在荧光显微镜下观察到 GFP 表达, 证实 *DHFR* 全长 cDNA 可与 pT7Ts-*GFP* 载体成功经双酶切后连接以及体外转录的可行性. 继而将 *DHFR* 全长 cDNA 插入 pT7Ts 载体中, 体外转录 *DHFR* mRNA 而使 *DHFR* 过表达. 我们应用 *DHFR* 反义 mRNA 探针通过原位杂交的方法对 *DHFR* 的表达情况进行了

检测. 实验结果发现, 显微注射 *DHFR* mRNA 后 *DHFR* 的表达水平增加, 确定了 *DHFR* 被有效过表达的有效性. *DHFR* 表达阻抑以及过表达有效性的验证为实验的继续进行奠定基础.

DHFR 功能阻抑组胚胎被观察到有明显的颅面部、咽弓以及腭软骨发育异常, 而 *DHFR* 过表达可使 *DHFR* 功能阻抑组胚胎咽弓发育的异常状况被改善, 说明 *DHFR* 与咽弓的发育密切相关. 为了初步探讨 *DHFR* 在咽弓发育过程中的作用, 我们选择在咽弓发育过程中扮演重要角色的因子 *TBX1* 与 *HAND2* 进行研究. *TBX1* 属于 T-盒基因,

是在咽弓发育中发挥关键作用的转录因子之一^[14-15]. DiGeorge/del22q11 综合征是人类最常见的先天性遗传病, 其发病主要是由于胚胎形成过程中咽弓发育异常所导致的, *TBX1* 已被证实是 DiGeorge/del22q11 综合征最重要的候选基因^[16].

HAND2 作为转录因子对胚胎的咽弓以及头面部软骨发育十分重要, *HAND2* 功能异常胚胎存在明显的咽弓和颅面部发育畸形^[17-18]. 斑马鱼 24hpf 至 48hpf 是咽弓发育的关键时期, 本实验结果显示, *TBX1* 和 *HAND2* 在 24hpf、36hpf 以及 48hpf 在斑马鱼的咽弓有较强表达, 进一步证实 *TBX1* 和 *HAND2* 与斑马鱼咽弓的发育密切相关. 胚胎整体原位杂交和 Real-time PCR 结果显示, *TBX1* 与 *HAND2* 在 *DHFR* 功能阻抑组斑马鱼胚胎中的表达减弱, 而 *DHFR* 过表达可部分挽救 *TBX1* 与 *HAND2* 在 *DHFR* 功能阻抑组斑马鱼胚胎中的减弱表达情况. 这些实验结果提示 *DHFR* 可通过调控 *TBX1* 与 *HAND2* 的表达而影响斑马鱼咽弓发育.

本实验利用模式生物斑马鱼开展 *DHFR* 在斑马鱼胚胎咽弓发育过程中作用的初步研究, 旨在为叶酸缺乏导致胚胎咽弓发育异常的研究提供依据, 并期望能为临床上预防和治疗叶酸缺乏所致的先天性发育异常提供线索.

参 考 文 献

- [1] Jenkins K J, Correa A, Feinstein J A, *et al.* Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation*, 2007, **115**(23): 2995-3014
- [2] Bailey L B, Berry R J. Folic acid supplementation and the occurrence of congenital heart defects, orofacial clefts, multiple births, and miscarriage. *Am J Clin Nutr*, 2005, **81**(5): 1213-1217
- [3] Mills J L, Molloy A M, Parle-McDermott A, *et al.* Folate-related gene polymorphisms as risk factors for cleft lip and cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2008, **82**(9): 636-643
- [4] Wilson R D, Johnson J A, Wyatt P, *et al.* Pre-conceptional vitamin/folic acid supplementation 2007: the use of folic acid in combination with a multivitamin supplement for the prevention of neural tube defects and other congenital anomalies. *J Obstet Gynaecol Can*, 2007, **29**(12): 1003-1026
- [5] Bower C, Miller M, Payne J, *et al.* Folate intake and the primary prevention of non-neural birth defects. *Aust N Z J Public Health*, 2006, **30**(3): 258-261
- [6] Sun S, Gui Y H, Wang Y X, *et al.* Effects of methotrexate on the development of heart and vessel in zebrafish. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2009, **41**(1): 86-96
- [7] Sun S N, Gui Y H, Wang Y X, *et al.* Effect of dihydrofolate reductase gene knock-down on the expression of heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 in zebrafish cardiac development. *Chin Med J (Engl)*, 2007, **120**(13): 1166-1171
- [8] Berdugo 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
- [9] Heasman J. Morpholino oligos: making sense of antisense?. *Dev Biol*, 2002, **243**(2): 209-214
- [10] Corey D R, Abrams J M. Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. *Genome Biol*, 2001, **2**(5): 1015
- [11] Ekker S C. Morphants: a new systematic vertebrate functional genomics approach. *Yeast*, 2000, **17**(4): 302-306
- [12] Wang Y X, Qian L X, Liu D, *et al.* Bone morphogenetic protein-2 acts upstream of myocyte-specific enhancer factor 2a to control embryonic cardiac contractility. *Cardiovasc Res*, 2007, **74**(2): 290-303
- [13] Wang Y, Qian L, Dong Y, *et al.* Myocyte-specific enhancer factor 2A is essential for zebrafish posterior somite development. *Mech Dev*, 2006, **123**(10): 783-791
- [14] Vitelli F V, Taddei I, Morishima M, *et al.* Tbx1 mutation causes multiple cardiovascular defects and disrupts neural crest and cranial nerve migration pathways. *Hum Mol Genet*, 2002, **11**(8): 915-922
- [15] Pioerowski T, Alin D, Schilling T, *et al.* The zebrafish van gogh mutation disrupts Tbx1, which is involved in the DiGeorge deletion syndrome. *Development*, 2003, **130**(20): 5043-5052
- [16] Théveniau-Ruissy M, Dandonneau M, Mesbah K, *et al.* The del22q11.2 candidate gene Tbx1 controls regional outflow tract identity and coronary artery patterning. *Circ Res*, 2008, **18**, **103**(2): 142-148
- [17] Miller C T, Yelon D, Stainier D Y, *et al.* Two endothelin 1 effectors, hand2 and bapx1, pattern ventral pharyngeal cartilage and the jaw joint. *Development*, 2003, **130**(7): 1353-1365
- [18] Yanagisawa H, Clouthier D E, Richardson J A, *et al.* Targeted deletion of a branchial arch-specific enhancer reveals a role of dHAND in craniofacial development. *Development*, 2003, **130**(6): 1069-1078

The Effects of Dihydrofolate Reductase Gene on The Development of Pharyngeal Arches*

SUN Shu-Na¹⁾, GUI Yong-Hao^{1)**}, JIANG Qiu²⁾, QIAN Lin-Xi²⁾, SONG Hou-Yan²⁾

¹⁾ Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 201102, China;

²⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai Medical College and Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract Folic acid deficiency induces congenital malformations. Dihydrofolate reductase (DHFR) plays key roles in folic acid metabolism. The dysfunction of DHFR results in the inhibiting of folic acid. In vertebrate, pharyngeal arches are the progenitor of craniofacial structure and cardiac out flow tract. By using zebrafish as the animal model and coupling with gene knock-down and over-expression technologies, the role of dihydrofolate reductase gene (*DHFR*) in the development of pharyngeal arches were explored. In *DHFR* knock-down embryos, the malformations of pharyngeal arches and palates were showed by paraffin section and alcian blue staining. *DHFR* over-expressing can rescue these malformations. *TBX1* and *HAND2* are two key transcription factors in the development of pharyngeal arches. Whole-mount *in situ* hybridization and Real-time PCR were performed to detect the expression levels of *TBX1* and *HAND2*. The expressions of *TBX1* and *HAND2* were reduced in *DHFR* knock-down group. *DHFR* over-expression can increase expressions of *TBX1* and *HAND2*. These results demonstrated that *DHFR* was essential for the development of pharyngeal arches and *DHFR* regulated the development of pharyngeal arches by effecting the expressions of *TBX1* and *HAND2*.

Keywords *DHFR*, pharyngeal arches, zebrafish, *TBX1*, *HAND2*

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00409

*This work was supported by a grant from Doctoral Fund of Ministry of Education of China (200802461111).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-64931990, E-mail: yhgui@shmu.edu.cn

Received: July 8, 2009 Accepted: December 28, 2009