

LIM 蛋白 KyoT 在小鼠胚胎发育中的表达

李 荣^{1)*} 程轶梦²⁾ 陈 蕾³⁾ 胡 静³⁾ 孙 强¹⁾ 黄红艳¹⁾ 王 键¹⁾ 韩 骅^{1)*}

(¹⁾ 第四军医大学医学遗传学与发育生物学教研室, 西安 710032;

(²⁾ 西北农林科技大学生命科学院生物化学与分子生物学教研室, 杨凌 712100;

(³⁾ 第四军医大学组织学与胚胎学教研室, 西安 710032)

摘要 LIM 结构域蛋白 KyoT 可与转录因子 RBP-J 相互作用而修饰 Notch 信号途径. 以往发现 KyoT 在成年小鼠肺脏、肾脏和睾丸中有特异性表达, 为进一步明确 KyoT 在小鼠胚胎阶段的表达, 故分析了 KyoT 在小鼠不同胚胎阶段的表达水平变化和胚胎 17 天时各组织的表达分布. 采用 RNA 印迹发现 KyoT 在小鼠胚胎的各阶段均表达, 而且胚胎 17 天时表达水平最高. 进一步 RNA 印迹和免疫组织化学检测发现, KyoT mRNA 和蛋白质在胚胎 17 天小鼠的肺、肾以及肌肉中均有高水平的表达. 上述结果提示, KyoT 在小鼠胚胎发育过程中有特异性表达, 且在胚胎 17 天时 KyoT 表达器官分布与成年小鼠相似, 特异性定位于肺、肾和肌肉等脏器.

关键词 LIM 结构域, KyoT, 小鼠, 胚胎发育

学科分类号 Q785, Q789

KyoT 是一种 LIM 结构域蛋白, 是以转录因子 RBP-J 作为诱饵蛋白通过酵母双杂交系统被克隆的. 由于 mRNA 的不同拼接, 可产生两种不同形式的 KyoT 蛋白: KyoT1、KyoT2. KyoT1 和 KyoT2 是由位于 X 染色体上基因组的同一基因编码^[1], 其中 KyoT2 可与 RBP-J 相互作用. 当 KyoT2 在细胞内过表达时, 可抑制由 Notch 胞内区或 EBNA2 激活的转录, 提示 KyoT 可能为 RBP-J 的抑制物^[2]. 另一方面, KyoT1 定位于胞浆, 而 KyoT2 定位于细胞核内, 提示 KyoT2 可能与转录调节及细胞分化有关. 但 KyoT 在体内的功能目前所知甚少. 以往我们发现 KyoT 在成年小鼠的肺、肾和睾丸等脏器中有特异性表达, 而且特异性定位于睾丸的间质细胞^[3], 我们通过酵母双杂交还筛选到了 KyoT 相互作用的分子^[4]. 为进一步对 KyoT 表达的时间进行定位, 明确其在体内的功能, 本研究采用 RNA 印迹、免疫组织化学等方法观察 KyoT 在不同胚胎发育阶段和胚胎 17 天时各组织中表达, 为今后进一步研究 KyoT 在体内功能提供一定依据.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 各孕龄阶段的 Balb/c 孕鼠由第四军医大学实验动物中心提供. 将孕鼠脱颈处死后, 立即取出胎鼠和 17 天胎鼠的各种组织, 用于提取总 RNA. 另外取 17 天的胎鼠全胚胎和各种组织置于 Bouin's 液中 4℃ 固定过夜, 石蜡包埋, 切成 4 μm 厚的切片, 贴于涂有 AES (3-aminopropyltriethoxy-

silane, Sigma 公司) 的载玻片上, 以备免疫组织化学染色.

1.1.2 主要试剂和仪器: RNA 提取试剂 Trizol 为 Gibco 公司产品. α-[³²P]-dCTP 购自北京亚辉公司, 兔抗 KyoT2 多克隆抗体由本教研室制备并保存, 生物素标记的羊抗兔 IgG 抗体为 Santa Cruz 公司产品. ABC (avidin biotin-peroxidase complex) 复合物试剂盒购自 Dakopatts 公司. DAB (diaminobenzidine) 为 Sigma 公司产品. 影像分析仪 Storm 860 为 Pharmacia 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取: 参照 Gibco Trizol Reagent 说明书提取总 RNA. 每 50 mg 组织中加入 1 ml Trizol, 高速混悬器将组织打碎后, 室温放置 10 min, 加入 300 μl 氯仿混悬后, 4℃ 14 000 r/min 离心 15 min. 收集上清加入 500 μl 异丙醇混悬后, 4℃ 14 000 r/min 离心 10 min. 沉淀用 75% 乙醇洗涤一次. 用适量水 (DEPC 处理) 溶解, 并用紫外分光光度仪定量, -70℃ 保存待用.

1.2.2 RNA 印迹: 用所提取的总 RNA 5 μg 进行甲醛变性电泳后转移于尼龙膜上, α-[³²P]-dCTP 标记的全长 KyoT2 cDNA 为探针进行 55℃ 杂交过夜, 洗膜后磷屏压膜 5 h 曝光扫描. 重新洗膜后, 用 β-actin 的 cDNA 作探针重新杂交作为内参照, 并利用影像分析仪 Storm 860 系统进行放射性同位

* 通讯联系人.

Tel: 029-3674490, E-mail: lr_mailbox@sina.com

收稿日期: 2002-06-13, 接受日期: 2002-08-02

素计数分析表达的水平。

1.2.3 免疫组织化学反应: 石蜡切片梯度酒精脱水后, 置入 0.03% 甲醇- H_2O_2 室温孵育 30 min, 以封闭内源性过氧化物酶, 然后按免疫组织化学 ABC 法程序进行染色。第一抗体分别为兔抗 KyoT 抗体 (1:100 稀释), 4℃ 冰箱孵育过夜, 生物素标记的羊抗兔 IgG 抗体 (1:200 稀释) 室温孵育 2 h, ABC 复合物 (1:100 稀释) 室温孵育 1 h。以上各步骤之间均用 0.01 mol/L PBS, pH 7.3 洗 3 次 (每次 10 min)。DAB 显色 10 min, 脱水、透明, DPX 封片。用 Olympus BH-2 型光学显微镜观察并摄像。阴性对照用 0.01 mol/L PBS 和免疫前血清取代一抗进行孵育, 其余步骤、条件均相同。

2 结 果

2.1 KyoT mRNA 在小鼠不同胚胎发育阶段的表达

从小鼠不同胚胎发育阶段提取全胚胎的总 RNA 进行 RNA 印迹发现, KyoT 在胚胎第 8 天 (8 dpc) 时就有表达, 并有持续上升的趋势, 但在胚胎第 12 天 (12 dpc) 时, 其表达突然明显下降, 但此后表达水平又继续上升, 至胚胎第 17 天 (17 dpc) 即将出生时表达水平达到最高 (图 1)。

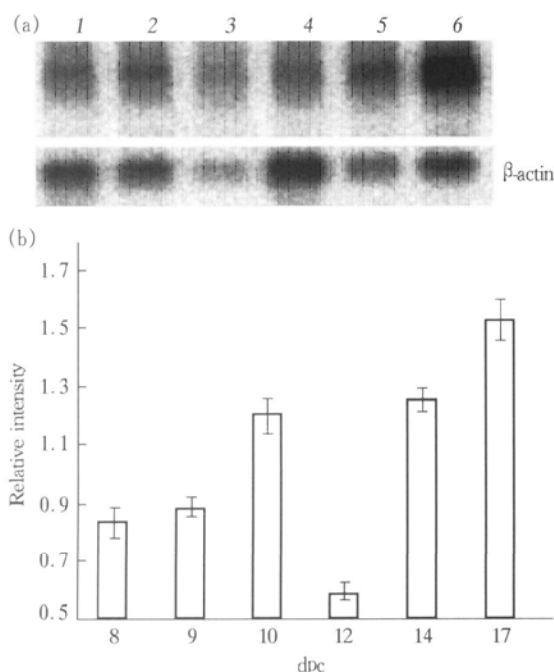


Fig. 1 Analysis of KyoT mRNA expression by Northern blot in different stage of embryo

(a) Northern blot of analysis of KyoT mRNA. The same membrane was reprobed with a β -actin probe as the internal control of amounts of RNA. 1: 8 dpc; 2: 9 dpc; 3: 10 dpc; 4: 12 dpc; 5: 14 dpc; 6: 17 dpc. (b) quantitative analysis of the image. Signal of KyoT was calibrated with signal of β -actin.

2.2 KyoT 在胚胎 17 天小鼠体内的表达分布

小鼠胚胎的不同发育阶段 RNA 印迹结果提示, KyoT 在胚胎第 17 天时表达水平最高。我们以往报道发现 KyoT 在成年小鼠的肺、肾和睾丸等脏器中有特异性表达。为进一步明确在胚胎第 17 天时 KyoT 在各组织的表达状况, 我们又提取了胚胎第 17 天小鼠的各种组织的总 RNA 进行 RNA 印迹 (图 2), 结果显示, KyoT 在肺、脑、小肠、肾以及肌肉中表达量均很高, 而在其他组织中表达较低。

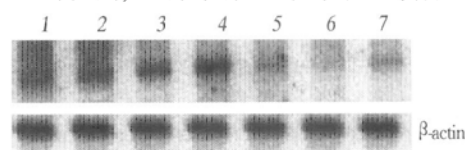


Fig. 2 Analysis of KyoT mRNA expression by Northern blot in tissues of 17 dpc mice

1: brain; 2: muscle; 3: kidney; 4: lung; 5: heart; 6: liver; 7: testine.

为进一步明确 KyoT 蛋白在胚胎 17 天小鼠体

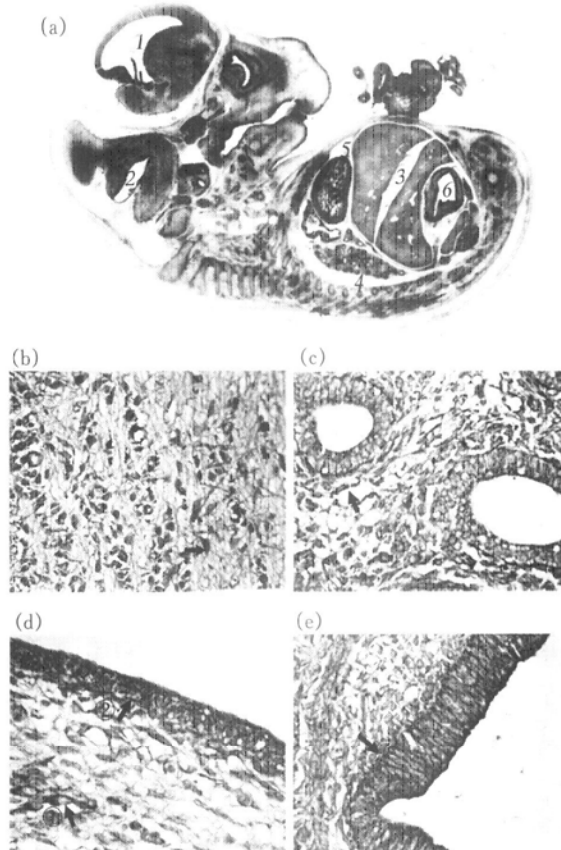


Fig. 3 Analysis of KyoT protein expression by immunohistochemistry in tissues of 17 dpc mice

(a) The whole embryo ($\times 10$). 1: telencephalon; 2: metencephalon; 3: liver; 4: lung; 5: ventricle; 6: intestine; (b) brain. $\Rightarrow$: glial cell. (c) lung. $\Rightarrow$: alveolus cell. (d) skin and muscle. ① $\Rightarrow$: muscle cell, ② $\Rightarrow$: keratinocyte. (e) testine. $\Rightarrow$: absorptive cell.

内的表达分布, 我们利用自制的兔多克隆 KyoT2 抗体对胚胎第 17 天小鼠全胚胎进行免疫组化检测^[4]. 结果显示, KyoT 蛋白在脑、肌肉、肺等多种组织中均表达, 这与 RNA 印迹结果相似 (图 3a). 进一步检测 KyoT 在脑、肺、小肠、皮肤和肌肉的表达, 结果显示脑胶质细胞、肺泡细胞、小肠粘膜的吸收细胞、肌细胞和上皮角化细胞呈阳性反应, 为均一的深棕色, 阳性物质分布于细胞浆内, 胞核呈阴性 (图 3b), PBS 阴性对照试验呈阴性反应 (结果未显示). 这些结果进一步说明在蛋白质水平上, KyoT 在这些组织的细胞中有特异性表达.

3 讨 论

LIM 结构域是一种含锌的蛋白质结构域, 它可作为相互识别的界面介导蛋白质之间的相互作用^[5]. 目前已发现多种含有这种结构域的蛋白质, 将它们统称为 LIM 蛋白. 在结构上, LIM 蛋白可分为四类: 既含有 LIM 结构域又含有同源异型框 (homeodomain) 的 LIM-HD 蛋白、仅含有重复的 LIM 结构域的 LIMO (LIM only) 蛋白、在 C 端有激酶结构域的 LIM 激酶和其他 LIM 蛋白. 因此, 这些蛋白质虽同属于 LIM 家族, 但功能差别却很大. LIM-HD 作为转录因子在机体组织细胞的分化和发育中发挥着重要作用. 用基因剔除技术建立这些 LIM 蛋白的突变小鼠后常见有关神经元的身份发生改变, 因而提出 LIM 结构域可能与细胞身份的编码有关^[6,7]. LIMO 蛋白主要参与血细胞的发育^[8], 而 LIM 激酶在细胞骨架的重组上发挥着不可替代的作用^[9].

KyoT 在结构上有别于上述 LIM 蛋白. 虽然 KyoT1 是单纯 LIM 蛋白, 但 KyoT2 的 C 端可通过与 DNA 结合蛋白 RBP-J 的相互作用, 而被募集于下游基因的启动子上, 所以 KyoT 蛋白从功能上更接近于 LIM-同源 (异型) 框蛋白, 因而除了在神经系统外, 可能还在其他系统发挥作用. 我们以往的研究发现 KyoT 在成年小鼠的肺、肾等重要脏器中有高表达, 提示它可能在这些器官中发挥重要作用. 我们还发现 KyoT 在成年小鼠睾丸的间质细胞中特异性表达^[3], 进一步利用本室拥有的 KyoT 基因剔除小鼠分析发现, KyoT 基因剔除小鼠的睾丸发育异常 (未发表), 提示 KyoT 可能在雄性小鼠的生殖和精子成熟中发挥着重要作用.

本研究从胚胎小鼠的 KyoT 表达入手, 研究和分析了 KyoT 在胚胎发育中的表达, 自胚胎第 8 天

开始, KyoT 在各个胚胎发育阶段均有表达, 但表达水平并不相同, 在胚胎第 12 天时表达水平较低, 胚胎第 17 天时表达水平最高. 胚胎第 12 天是小鼠足趾发育和软骨形成的关键阶段^[10], 这时 KyoT 水平降低可能是因为 KyoT 在这些器官的发育中不是非常重要所致. 而胚胎第 17 天时, 小鼠各器官的分化发育已经完成, 主要是各器官的进一步成熟, 这时 KyoT 表达水平很高, 提示 KyoT 可能在器官的成熟中发挥着重要作用. 进一步检测胚胎第 17 天时 KyoT 的表达发现, KyoT 在脑、肺、小肠、皮肤和肌肉等器官的表达很高, 这与在成年小鼠表达分布相似, 提示 KyoT 可能在胚胎至成年小鼠的这些器官的发育中发挥重要作用. 因此我们对 KyoT 基因在体内的分布进行时空定位, 掌握正常情况下 KyoT 在组织器官中和发育阶段的表达状况, 为今后进一步研究其在体内的作用提供了一定的依据.

参 考 文 献

- 1 Tani S, Taniwaki M, Taniguchi Y, *et al.* Chromosome mapping of two RBP-J-regulated genes: KyoT and RBP-L. *J Hum Genet*, 1999, **4** (1): 73~75
- 2 Taniguchi Y, Furukawa T, Tun T, *et al.* LIM protein KyoT2 negatively regulates transcription by association with RBP-J DNA-binding protein. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (2): 644~654
- 3 李 荣, 黄威权, 王冀姝, 等. LIM 结构域蛋白 KyoT 在成年小鼠睾丸中的表达. *生物物理与生物化学学报*, 2001, **33** (4): 401~404
Li R, Huang W Q, Wang J S, *et al.* *Acta Biochemica et Biophysica*, 2001, **33** (4): 401~404
- 4 李 荣, 王冀姝, 孙 强, 等. LIM 结构域蛋白 KyoT 相互作用分子的筛选. *遗传学报*, 2002, **16** (2): 174~177
Li R, Wang J S, Sun Q, *et al.* *Acta Genetics*, 2002, **29** (2): 175~180
- 5 Michelsen J M, Schmeichel K L, Beckerle M C, *et al.* The LIM motif defines a specific zinc-binding protein domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (10): 4404~4408
- 6 Thor S, Andersson S G, Tomlinson A, *et al.* A LIM-homeodomain combinatorial code for motor neuron pathway selection. *Nature*, 1999, **397** (6714): 76~80
- 7 Sharma K, Sheng H S, Lettieri K, *et al.* LIM homeodomain factors Lhx3 and Lhx4 assign subtype identities for motor neurons. *Cell*, 1998, **95** (6): 817~828
- 8 Mead P E, Deconinck A E, Huber T L, *et al.* Primitive erythropoiesis in the *Xenopus* embryo: the synergistic role of LMO-2, SCL and GATA-binding proteins. *Development*, 2001, **128** (12): 2301~2308
- 9 Matsui S, Matsumoto S, Adachi R, *et al.* LIM kinase 1 modulates opsonized zymosan-triggered activation of macrophage-like U937 cells. Possible involvement of phosphorylation of cofilin and reorganization of actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 2002, **277** (1): 544~549
- 10 Rugh R. *The Mouse*. New York: Oxford University Press, 1990. 171~176

Expression of LIM Protein KyoT in Mice Embryogenesis

LI Rong^{1)*}, CHENG Yi-Meng²⁾, CHEN Lei³⁾, HU Jing³⁾,
SUN Qiang¹⁾, HUANG Hong-Yan¹⁾, WANG Jian¹⁾, HAN Hua^{1)*}

¹⁾ *Department of Medical Genetics and Developmental Biology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;*

²⁾ *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Life Science Institute,*

Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China;

³⁾ *Department of Histology and Embryology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)*

Abstract LIM domain protein KyoT interacts with transcription factor RBP-J and modulates Notch signaling pathway. It was previously found that KyoT was specifically expressed in lung, kidney and testis of mice. To investigate the level of the expression of KyoT in mice embryogenesis and the distribution of the expression the 17 dpc (days of gestation), Northern blot and immunohistochemical SABC methods were used in the experiments. Northern blot showed that KyoT was expressed in almost all stages of embryos of mice and the level was highest in the 17 dpc. Moreover, Northern blot and immunohistochemical SABC showed that the mRNA and protein of KyoT were expressed at the high level in lung, kidney and muscle of 17 dpc mice. These results suggest that KyoT was expressed in mice embryogenesis and the distribution of the expression of KyoT in 17 dpc. was similar to that in adult mice and located in lung, kidney and muscle etc.

Key words LIM domain, KyoT, mouse, embryogenesis

* Corresponding author. Tel: 86-29-3674490, E-mail: lr_mailbox@sina.com

Received: June 13, 2002 Accepted: August 2, 2002