

室间隔缺损 ALK3 下游相关基因的初步研究

杨德业^{1*} 宋后燕² 张怀勤¹ 黄晓燕¹ 官孝群²

¹(温州医学院附属第一医院心内科,温州 325000)

²(复旦大学教育部分子医学重点实验室,上海 200032)

摘 要 了解 ALK3 在心脏发育中的作用,探索室间隔缺损的特异相关基因及其信号传导途径。应用 α -MHC-Cre/lox P 系统,建立了心脏 ALK3 基因敲除小鼠模型,利用 PCR 选择性 cDNA 差异显示法和基因芯片扫描(RNA microarray)的方法,比较对照组和试验组 mRNA 表达水平,筛选 ALK3 下游基因。对照组的 mRNA 来自 α -MHC-Cre^{+/-} ALK3^{F/+} 的 11.5d 小鼠胚胎心脏,试验组的 mRNA 来自 α -MHC Cre^{+/-} ALK3^{F/-} 的 11.5d 小鼠胚胎心脏。心脏特异的 ALK3 基因敲除后,血小板激活因子乙酰水解酶及转录因子 Pax-8 等基因的表达水平下降, β 亚类 14-3-3 蛋白及蛋白酪氨酸激酶等基因的表达水平上调。血小板激活因子乙酰水解酶及转录因子 Pax-8 等基因可能是 ALK3 重要的下游基因,与室间隔缺损的形成有关, β 亚类 14-3-3 蛋白及蛋白酪氨酸激酶等基因是骨形态形成蛋白信号传导途径的调控因子。

关键词 室间隔缺损,基因,骨形态形成蛋白受体

中图分类号 Q786 + R541.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)03-0267-05

室间隔缺损是一种常见的先天性心脏病,至今对其致病因素及发病机理仍然知之甚少。近几年来,国内外学者十分关注心脏发育的调控基因,尤其是与室间隔缺损相关的基因。Schlange 等学者发现,骨形态形成蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)和骨形态形成蛋白受体 IA(Receptor IA of bone morphogenetic protein,又名 ALK3)是转化生长因子(Transforming growth factor- β , TGF- β)超家族成员,在心肌细胞分化、心脏发育过程中起重要作用^[1-3]。Behringer 利用小鼠进行 ALK3 基因敲除实验,发现 ALK3 基因敲除的纯合子小鼠死于原胚胎形成早期(Early gastrulation)^[4]。1995 年, Schneider 等报道,应用心脏器官特异性基因敲除系统(α -MHC Cre/lox P 系统),进行心脏 ALK3 基因敲除实验,发现 ALK3 基因敲除的纯合子小鼠死于胚胎发育中期,心脏发育但伴有心内膜垫和肌小梁发育不全、室间隔缺损^[5-6]。ALK3 不是心脏特异性基因,为此,我们应用 α -MHC-Cre/lox P 系统,建立了心脏特异的 ALK3 基因敲除小鼠模型,同时利用 PCR 选择性 cDNA 差异显示法和基因芯片扫描(Microarray)的方法,探索

与室间隔缺损相关的 ALK3 下游基因及其信号传递途径。

1 材料和方法

1.1 动物

由 Michael D. Schneider 教授提供 α -MHC-Cre^{+/-} ALK3^{+/-} C57 小鼠(含 α 肌球蛋白重链启动子启动的 Cre 重组酶转基因杂合子即 ALK3 基因敲除杂合子小鼠)和 ALK3^{F/F} C57 小鼠(在 ALK3 基因第 2 个外显子两端插入 loxP 序列)两者交配,可得到 ALK3 基因敲除的纯合子(α -MHC-Cre^{+/-} ALK3^{F/-})和杂合子(α -MHC-Cre^{+/-} ALK3^{F/+})小鼠胚胎。

1.2 总 RNA 和 mRNA 的提取

收集试验组和对照组的 11.5 d 的胚胎心脏,用总 RNA 和 mRNA 试剂盒(美国加利福尼亚州 Valencia 市 QIAGEN 公司)提取总 RNA 和纯化 mRNA。

1.3 用 PCR 选择性 cDNA 差异显示法比较两组 mRNA 表达水平

试验组的 mRNA 来自 α -MHC-Cre^{+/-} ALK3^{F/-} 的 11.5 d 小鼠胚胎心脏,对照组的 mRNA 来自 α -MHC-

Cre^{+/-} ALK3^{F/+} 的 11.5 d 小鼠胚胎心脏。以 mRNA 为模板逆转录合成 cDNA。运用 PCR 选择性 cDNA 差异显示试剂盒(美国加利福尼亚州 Paloalto 市 Clontech 公司)根据该公司提供的使用方法^[7]获得一些基因的克隆。有的仅在试验组表达,而在对照组不表达;另一些克隆正好相反。

1.4 基因芯片扫描^[8]

用含小鼠 25 000 个基因的基因芯片(德国生产)比较上述两组小鼠胚胎心脏总 RNA 表达水平。试验组总 RNA 来自 11.5d 的 α -MHC-Cre^{+/-} ALK3^{F/-} 小鼠胚胎心脏,对照组总 RNA 来自 11.5d 的 α -MHC-Cre^{+/-} ALK3^{F/+} 小鼠胚胎心脏。

1.5 实时定量 RT-PCR^[9-10]

定量 RT-PCR 试剂盒 Taq Man One step PCR core 购自美国加利福尼亚州 Foster 市 Perkin-Elmer 公司。每个 PCR 反应中加入 100ng 总 RNA,在 48℃ 条件下逆转录 30min 合成第一链 cDNA,然后以该 cDNA 为模板进行 PCR,每种 RNA 做 3 复孔。初始变性条件为 95℃、10min;PCR 扩增时 95℃ 变性 15s,60℃ 退火 + 延伸 1min,循环 40 次。PCR 结束后,用 ABI PRISM 7700 序列检测仪(Perkin-Elmer, Foster, 加利福尼亚州,美国)定量检测 RT-PCR 产物。转录因子 Pax-8 的荧光素探针序列是:5'...6FAM TGT CCC CAG TGT CAG CTC CAT CAA CA TAMRA...3'。Pax-8 的正向引物序列是:5'...CAG AAG GCG TTT GTG ACA ATG A...3'。Pax-8 的逆向引物序列是:5'...GCA CTT TGG TCC GGA TGA TT...3'。定量 RT-PCR 内对照为基因 36B4,荧光素探针序列是:5'...6FAM CCA GGC TTT GGG CAT CAC CAC G TAMRA...3'。36B4 的正向引物序列是:5'...GGA CCC GAG AAG ACC TCC TT...3',36B4 逆向引物序列是:5'...TCA ATG GTG CCT CTG GAG ATT...3'。

2 结 果

2.1 制备心脏 ALK3 基因敲除小鼠

雌性 α -MHC-Cre^{+/-} ALK^{+/-} 小鼠和雄性 ALK3^{F/F} 小鼠交配,获得 α -MHC-Cre^{+/-} ALK3^{F/-} 和 α -MHC-Cre^{+/-} ALK3^{F/+} 的小鼠胚胎,如图 1 所示。

2.2 PCR 选择性 cDNA 差异显示法分析 ALK3 下游候选基因

血小板激活因子乙酰水解酶等基因在 α -MHC-Cre^{+/-} ALK3^{F/-} 小鼠胚胎心脏中表达下调(表 1), β 亚类 14-3-3 蛋白等基因表达上调(表 2)。

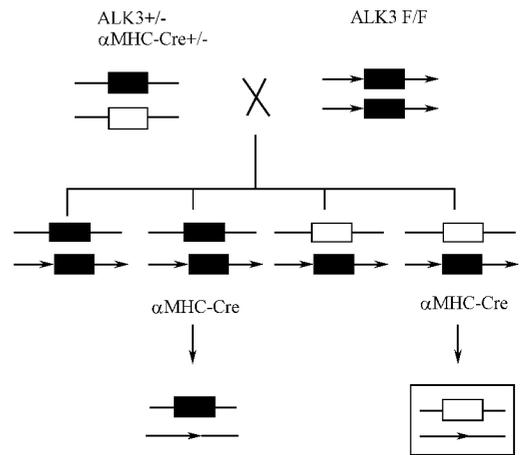


图 1 小鼠心脏 ALK3 基因敲除示意图

Fig. 1 Sketch map of cardiac-specific deletion of ALK3 gene

■ ALK3 gene sequence; □ ALK3 gene knock-out;
— lox P Sequence

表 1 ALK3 下游部分基因表达下调(cDNA 差异显示法)
Table 1 The downstream genes of ALK3 down-regulated by PCR-select cDNA subtraction

Name of gene	Name of clone
Platelet-activating factor acetylhydrolase	R-D12
Rat testis-specific farnesyl pyrophosphate synthetase	R-B4
MCM protein	R-D1
EST	R-A8
EST	R-B2

表 2 ALK3 下游部分基因表达上调(cDNA 差异显示法)
Table 2 The downstream genes of ALK3 up-regulated by PCR-select cDNA subtraction

Name of gene	Name of clone
14-3-3 protein beta subtype	F-A8
Serine/threonine protein phosphatase type 1 alpha	F-A1
Phospholipase C-alpha	F-G4
Retinoblastoma-binding protein	F-H2
Ruv B like protein 2	F-A2
EST	F-H5

2.3 基因芯片扫描的方法分析 ALK3 下游候选基因

比较 α -MHC-Cre^{+/-} ALK3^{F/-} 小鼠(试验组)和 α -MHC-Cre^{+/-} ALK3^{F/+} 小鼠(对照组)25000 个基因的表达水平,依据基因表达水平增加或减少 2 倍以上者判定为候选基因。按此标准分析,试验组小鼠胚胎心脏中有 12 个基因表达下调(表 3),16 个基因表

达上调(表 4)。

表 3 ALK3 下游部分候选基因表达下调(基因芯片扫描法)

Table 3 The downstream genes of ALK3 down-regulated by microarray

Name of gene	Fold down-regulated
Myoglobin	46.2
Pax-8	5.7
Phospholamban	10.1
Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2	4.4
Ring Zinc Finger protein	4.7
G Protein-Coupled Receptor	5.5
Deoxycytidine Kinase	4.0
Pasminogen Activator Inhibitor	4.1
Rab11b	2.7
Hox-3.5	4.0
Transcription factor HIF β subunit	2.7
Musculus Growth/differentiation factor 1	2.7

表 4 ALK3 下游部分候选基因表达上调(基因芯片扫描法)

Table 4 The downstream genes of ALK3 up-regulated by microarray

Name of gene	Fold up-regulated
Ras-Related protein Rab-5b	7.0
EPS 8 protein	2.4
A Protein-Tyrosine Kinase of the Focal Adhesion Kinase subfamily	5.4
Galectin-9	4.9
K-glypican	4.7
WNT-2 Protein Precursor	4.5
Plakoglobin	4.2
Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Substrate	4.0
Interferon Regulatory Factor 1	5.7
Mdm2	2.5
Ras-related protein RAC1	2.0
Ras-related protein(Krev-1)	2.3
Transcriptional activator FE65	2.5
Suppressor of MIF2 Mutations	2.5
Elongation Factor 1 - γ	4.0
Regulator of G-protein signaling 16	13.2

2.4 RT-PCR 确认候选基因

用等量试验组和对照组总 RNA 逆转录成 cDNA 利用每个基因特异的 PCR 引物进行 PCR 扩增,比较 PCR 产物量,内对照为 GAPDH 基因。结果表明:试验组血小板激活因子乙酰水解酶(Platelet-activating factor acetylhydrolase, PAF)在第 21 个 PCR 周期、转录因子 Pax-8 在第 27 个 PCR 周期的 PCR 产物明显低于对照组,说明试验组中这些基因表达水平下调(图 2),而试验组 β 亚类 14-3-3 蛋白在第 23 个 PCR 周期、蛋白酪氨酸激酶在第 21 个 PCR 周期的 PCR 产物明显高于对照组,说明试验组中这些基因表达水平上调(图 3)。

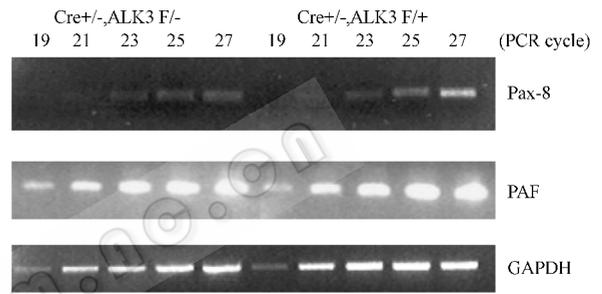


图 2 试验组和对照组中 Pax-8、PAF 和 GAPDH 基因的表达

Fig. 2 The Pax-8, PAF and GAPDH genes expression level in test and control group

Cre^{+/-}, ALK3^{F/-} is named test group;

Cre^{+/-}, ALK3^{F/+} is named control group

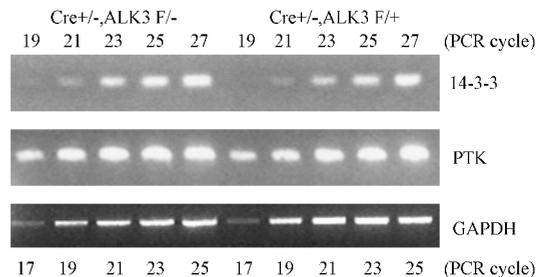


图 3 试验组和对照组中 14-3-3、PTK 和 GAPDH 基因的表达

Fig. 3 The 14-3-3, PTK and GAPDH genes expression level in test and control group

Cre^{+/-}, ALK3^{F/-} is named test group;

Cre^{+/-}, ALK3^{F/+} is named control group

2.5 实时定量 RT-PCR

采用定量 RT-PCR 方法分析小鼠转录因子 Pax-8 基因表达。结果显示,内对照 36B4 基因的表达水平在两组间无显著差异,试验组小鼠 Pax-8 基因表达明显低于对照组 ($P < 0.001$) (图 4)。

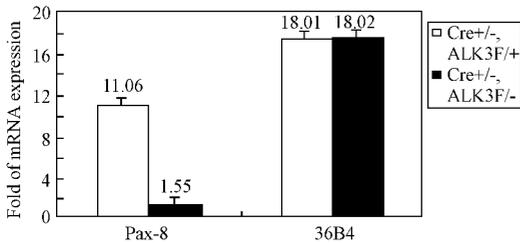


图 4 采用定量 RT-PCR 的方法比较转录因子 pax-8 基因表达水平

Fig.4 Compare the Pax-8 gene expression level using quantitative RT-PCR

1. White color columns show the data from α -MHC Cre^{+/+} ALK3 F^{+/+} mice ;
2. Black color columns show the data from α -MHC Cre^{+/+} ALK3 F^{-/-} mice ;

3. 36B4 is a quantitative RT-PCR internal control gene

3 讨 论

骨形态形成蛋白(BMP)是属于转化生长因子 β (TGF- β)超家族成员中的一种分泌型的信号分子。它们的生理功能包括细胞的增殖、分化、凋亡和组织、器官的形态形成。BMP 是通过结合骨形态形成蛋白受体复合体,这复合体是由受体 I 和受体 II 组成,执行其功能的。ALK3 是一种骨形态形成蛋白受体 IA。近几年国内外学者十分关注骨形态形成蛋白受体 IA (ALK3) 基因在心脏发育过程中的作用。心脏特异的 α -MHC 被用作为 Cre 重组酶的启动子,并被使用在 Cre + lox P 系统,创建了心脏特异的 ALK3 基因敲除的小鼠模型。初步结果显示 ALK3 基因与心脏室间隔缺损密切相关。ALK3 是上游的信号传递分子,ALK3 基因在多种组织和脏器中表达,尤其是心脏。利用 PCR 选择性 cDNA 差异显示法和基因芯片扫描方法,初步获得一些候选基因,它们位于 ALK3 基因下游。ALK3 基因敲除后,这些基因表达水平下调或上调,如血小板激活因子乙酰水解酶及转录因子 Pax-8 等基因表达水平明显降低, β 亚型 14-3-3 蛋白及蛋白酪氨酸激酶等基因表达水平显著升高。PCR 选择性 cDNA 差异法和基因芯片扫描的方法是目前世界上最先进、最快捷的比较两组

基因库基因差异表达的方法,但由于存在一些操作误差和对表达水平很低的基因的敏感性不够,这两种方法仍有一定的假阳性和假阴性。所以,RT-PCR 和定量 RT-PCR 被用于排除一些假阳性候选基因。这些被证实的候选基因在心脏的表达部位、表达时间以及相互之间的调控机理还不清楚,有待于进一步研究。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Schlange T, Andree B, Arnold H *et al.* BMP2 is required for early heart development during a distinct time period. *Mech Dev*, 2000, **91**: 259 - 270
- [2] Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y *et al.* Bone Morphogenetic Proteins Induce Cardiomyocyte Differentiation Through the Mitogen-Activate Protein Kinase Kinase Kinase TAK1 and Cardiac Transcription Factors Csx/NKx-2.5, GATA-4. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(10): 7096 - 7105
- [3] Beppu H, Kawabata M, Hamamoto T *et al.* BMP Type II Receptor is required for Gastrulation and Early Development of Mouse Embryos. *Dev Biol*, 2000, **221**: 249 - 258
- [4] Mishina Y, Suzuki A, Ueno N *et al.* BMPR encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes Dev*, 1995, **9**: 3027 - 3037
- [5] Fukushige S, Ikoda J. Trapping of Mammalian promoters by Cre-lox site-specific recombination. *DNA Res*, 1996, **3**(2): 73 - 80
- [6] Gausin V, Van de putte T, Mishina Y *et al.* Endocardial cushion and myocardial defects after cardiac myocyte-specific conditional deletion of the bone morphogenetic protein receptor ALK3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(5): 2878 - 2883
- [7] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P *et al.* Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **3**: 6025 - 6030
- [8] Pollak E S, Feng L, Ahadian H *et al.* Microarray-based genetic analyses for studying susceptibility to arterial and venous thrombotic disorders. *Ital Heart J*, 2001, **3**(8): 568 - 572
- [9] Gibson U E M, Heid C A, Williams P M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 1996, **6**: 995 - 1001
- [10] Rodriguez-Jimenez F J, Krause A, Schulz S *et al.* Distribution of new human beta-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. *Genomics*, 2003, **81**(2): 175 - 183

Preliminary Study of ALK3 Downstream Genes Related to Ventricular Septum Defect

YANG De-Ye^{1*} SONG Hou-Yan² ZHANG Huai-Qin¹ HUANG Xiao-Yan¹ GUAN Xiao-Qun²

¹(Department of Cardiology , The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College , Wenzhou 325000 ,China)

²(The Key Lab of Molecular Medicine , Ministry of Education , Fudan University , Shanghai 200032 ,China)

Abstract To investigate the function of ALK3 gene , the gene regulation and the signaling pathway related to ventricular septum defect during heart development . The model mice with ALK3 gene knock-out via α -MHC-Cre/lox P system were bred . The mRNA expression level of control group was compared with that of experiment group and ALK3 downstream genes were screened using PCR-select cDNA subtraction microarray . The mRNA of control group was extracted from E11.5 normal mouse hearts , and that of experiment group , from E11.5 hearts of mice with α -MHC Cre^{+/-} ALK3^{F/+} genotype . It was found that the mice with ALK3 gene knock-out produced heart defects involving the interventricular septum . The platelet-activating factors acetylhydrolase and the transcription factor Pax-8 and so on , were down-regulated . However , the Protein Tyrosine Kinase (PTK) of Focal Adhesion Kinase (FAK) subfamily and beta subtype protein 14-3-3 were up-regulated in the α -MHC Cre^{+/-} ALK3^{F/+} mice . These data provide support that ALK3 gene played an important role during heart development . The platelet-activating factors acetylhydrolase and Pax-8 genes could be important ALK3 downstream genes in the BMP signaling pathway during interventricular septum development . PTK and beta subtype protein 14-3-3 might be regulatory factors in this pathway .

Key words ventricular septum defect , gene , bone morphogenetic protein receptor

Received : 01-02-2003

* Corresponding author . Tel 86-577-88863212 ; Fax : 86-577-88863555 ; E-mail : Deyeyang@hotmail.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>