

FLASH 基因在野生型斑马鱼早期表达以及与 *HoxB4* 基因的关系*

金璐^{1,2}, 丁可军², 孙琮杰^{1,3}, 陈露^{1,3}, 周艳华¹, 舒莉萍^{1,3,4**}, 何志旭^{1,2**}
(1. 贵州医科大学 组织工程和干细胞实验中心, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 儿童医学中心, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 基础医学院 免疫学教研室, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州医科大学 实验动物中心, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 观测 *FLASH* 基因在 *Tuebingen* 野生型斑马鱼胚胎早期的表达及与 *HoxB4* 基因的关系。方法: 以 *HoxB4* 转基因斑马鱼系为研究对象, 分为实验组、实验对照组和空白对照组, 实验组为 *HoxB4* 转基因斑马鱼系与 *Cre* 鱼系交配所得的过表达 *HoxB4* 的带有 EGFP 荧光的胚胎 (*Tg; Lmo2-Cre, Lmo2-LDEL-Hoxb4-EGFP*), 实验对照组为 EGFP 转基因斑马鱼系与 *Cre* 鱼系交配所得的表达 EGFP 荧光的胚胎 (*Tg; Lmo2-Cre, Lmo2-LDEL-EGFP*), 空白对照组为 *Tuebingen* 野生型斑马鱼的胚胎; 采用 *FLASH* 反义 mRNA 探针做原位杂交并观察其表达。结果: 观察到 *Tuebingen* 组中 3.7、9 ~ 24 hpf 的神经外侧板、头部和脊索及 18 ~ 30 hpf 的原肾管可见黑色的阳性杂交信号, 36 hpf 后未见; 18 ~ 72 hpf 的空白对照组与实验对照组间 *FLASH* 表达水平无差异, 实验组 18 ~ 30 hpf 神经系统、造血系统 *FLASH* 的表达下调。结论: *FLASH* 基因可能是 *HoxB4* 基因的下游靶基因。

[关键词] 斑马鱼; *HoxB4* 基因; *FLASH* 基因; 转基因; 原位杂交

[中图分类号] Q75 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)10-1178-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.10.012

The Early Expression of *FLASH* Gene in Wild Zebrafish and the Relationship with *HoxB4* Gene

JIN Lu^{1,2}, DING Kejun², SUN Congjie^{1,3}, CHEN Lu^{1,3}, ZHOU Yanhua¹, SHU Liping^{1,3,4}, HE Zhixu^{1,2}
(1. Tissue Engineering and Stem Cell Research Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;
2. Department of Pediatrics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Immunology, Basic Medical College, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;
4. Laboratory Animal Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression of *FLASH* gene in the early stage of embryos of *Tuebingen* wild zebrafish and its relationship with *HoxB4* gene. **Methods:** *HoxB4* transgenic zebrafish lines were divided into three groups. The *Tg; (Lmo2-Cre; Lmo2-LDEL-Hoxb4-EGFP)* zebrafish were selected as experimental group; the *Tg; (Lmo2-Cre; Lmo2-LDEL-EGFP)* transgenic zebrafish were selected as experimental control group; the *Tuebingen* wild type zebrafish were selected as blank control group. *FLASH* antisense mRNA probe was used for hybridization in situ and its expression was observed. **Results:** For the *Tuebingen* wild type zebrafish, the black positive hybridization signal was observed in nerve lateral plate, head and sagittal in 3.7 hpf and 9 ~ 24 hpf, and so did in protonephridia in 18 ~ 30 hpf. There was no expression after 36 hpf. There was no significant difference between the blank control group and the experimental control group in 18 ~ 72 hpf. And in the experimental group, the expression of *FLASH* gene in the nervous system and hematopoietic system was down-regulated in

*[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (31360285)
** 通信作者 E-mail: hzx@gmc.edu.cn; gyslp-456@163.com
网络出版时间: 2018-10-10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181010.2224.016.html>

18 ~ 30 hpf. **Conclusion:** The *FLASH* gene may be the downstream target gene of *HoxB4* gene and it is helpful to understand the expression of *FLASH* gene in the early stage of wild-type zebrafish and lay a foundation for the study of *FLASH* gene-related functions.

[**Key words**] zebrafish; *HoxB4* gene; *FLASH* gene; transgenesis; hybridization in situ

Hoxb4 被认为是造血发育的重要调节因子^[1]。本课题组前期通过建立可示踪的造血干细胞自我更新的斑马鱼模型^[2],在斑马鱼体内特异性过表达 *Hoxb4* 基因,研究发现 *HoxB4* 与增殖和凋亡相关,能够在体内外促进造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)扩增,增加了 HSC 自我更新的机率,但又不影响 HSC 分化成正常的成熟的各系血细胞^[3-4]。*FLASH* 基因是一个高度保守的基因,其表达产物广泛分布于多种生物细胞中,具有半胱天冬酶催化活性、与死亡受体结合调节细胞凋亡,有转录抑制作用。人 *FLSAH* 基因与斑马鱼 *FLASH* 基因同源性超过 80%,在爪蟾的神经系统中 *FLASH* 基因可能是 *HoxB4* 的下游靶基因^[5-7],遂推测在造血系统中,*HoxB4* 是否有可能通过 *FLASH* 基因实现对 HSC 调控。故本实验研究通过了解 *FLASH* 基因在野生型斑马鱼胚胎发育过程中表达、以及在 *Hoxb4* 基因异位表达时相与组织的变化,初步分析 *FLASH* 基因作为 *Hoxb4* 基因下游靶基因的可能性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Tuebingen 野生型斑马鱼由本实验室繁殖培育,转基因斑马鱼系 *zLmo2-Cre*、*zLmo2-LDEL-EGFP* 及 *zLmo2-LDEL-HoxB4-EGFP* 均由本实验小组前期建系^[7],实验动物养殖在带有过滤消毒系统及 (28 ± 2) °C 恒温的循环水系统中,光照时间 12 h/d。待斑马鱼发育至性成熟,按雌雄 1:2 的比例配对,在次日 0.5 h 后收集胚胎,并置于 28 °C 生化培养箱培养,根据斑马鱼生长发育图谱分别收集各时相斑马鱼胚胎。以 *HoxB4* 转基因斑马鱼系为研究对象,分为实验组、实验对照组和空白对照组,实验组为 *HoxB4* 转基因斑马鱼系与 *Cre* 鱼系交配所得的过表达 *HoxB4* 的带有 EGFP 荧光的胚胎 (*Tg*: *Lmo2-Cre*, *Lmo2-LDEL-Hoxb4-EGFP*),实验对照组为 EGFP 转基因斑马鱼系与 *Cre* 鱼系交配所得的表达 EGFP 荧光的胚胎 (*Tg*: *Lmo2-Cre*, *Lmo2-LDEL-EGFP*),空白对照组为 Tuebingen 野生型斑马鱼的胚胎。*FLASH* 基因反义 mRNA 探针由本课

题组前期制备,并于 -80 °C 储存。

1.2 全胚胎原位杂交

收集 3 组 0.75 ~ 72 hpf 的胚胎进行原位杂交,用 1 × PBST 溶液洗去固定液,甲醇梯度脱水,用 Protease K 使胚胎通透,将胚胎置于 68 °C 杂交炉中进行预杂交 1 h,加入制备好的地高辛标记的 *FLASH* 反义 mRNA 探针,于 68 °C 杂交炉中过夜,用不同浓度的 SSCT 将多余的探针洗去,加入地高辛标记的抗体后过夜,用 MABT 将多余的探针洗掉;加入 BCIP/NBT 染液对杂交胚胎进行染色,在体视显微镜下观察并记录结果后,用固定液对杂交胚胎进行再固定并且照相。

2 结果

2.1 *FLASH* 基因在 Tuebingen 野生型斑马鱼全胚胎原位杂交结果

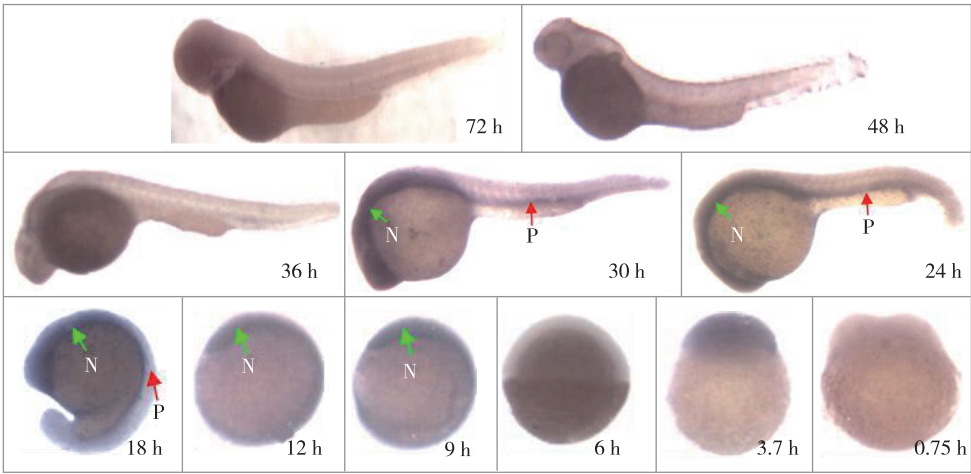
在 Tuebingen 野生型斑马鱼 3.7、9、12 hpf 的脊索和神经外侧板,18 ~ 30 hpf 的头部、部分的脊索及造血区域可观察到 *FLASH* 基因黑色阳性杂交信号,但与神经系统表达相比,*FLASH* 基因在造血区域表达是比较低的,0.75、36 hpf 后未见 *FLASH* 基因在 Tuebingen 野生型斑马鱼体内明显表达,由此可见 *FLASH* 基因在 Tuebingen 野生型斑马鱼神经系统中是高表达的,而在造血系统中是低表达(图 1)。

2.2 *FLASH* 基因在 3 组不同品系的 18、24 hpf 斑马鱼全胚胎原位杂交结果

从杂交结果来看,空白对照组与实验对照组 (*TG*: *zLmo2-Cre*, *TG*: *zLmo2-LDEL-EGFP*) 在 18 ~ 24 hpf 未见明显差别、而 *FLASH* 基因在实验组 (*TG*: *zLmo2-Cre*, *TG*: *zLmo2-LDEL-HoxB4-EGFP*) 18 ~ 24 hpf 胚胎中的神经系统和原肾管的表达较空白对照组 18 ~ 24 hpf 胚胎及实验对照组 (*TG*: *zLmo2-Cre*, *TG*: *zLmo2-LDEL-EGFP*) 18 ~ 24 hpf 的胚胎明显减弱(图 2)。

2.3 *FLASH* 基因在 3 组不同品系的 30、36 hpf 斑马鱼全胚胎原位杂交结果

空白对照组与实验对照组 (*TG*: *zLmo2-Cre*, *TG*: *zLmo2-LDEL-EGFP*) 在 30 ~ 36 hpf 未见明显差



注:N 为脊索,P 为原肾管,绿箭头所示在 *FLASH* 神经系统的表达信号,红箭头所示 *FLASH* 在造血系统的表达信号

图 1 *FLASH* 基因在 *Tubingen* 野生型斑马鱼全时相胚胎原位杂交结果

Fig. 1 Expression pattern of *FLASH* gene in 0.75 ~ 72 hpf of wild type zebrafish embryo



注:N 为脊索,P 为原肾管,绿箭头所示 *FLASH* 在神经系统的表达信号,红箭头所示 *FLASH* 在造血系统的表达信号

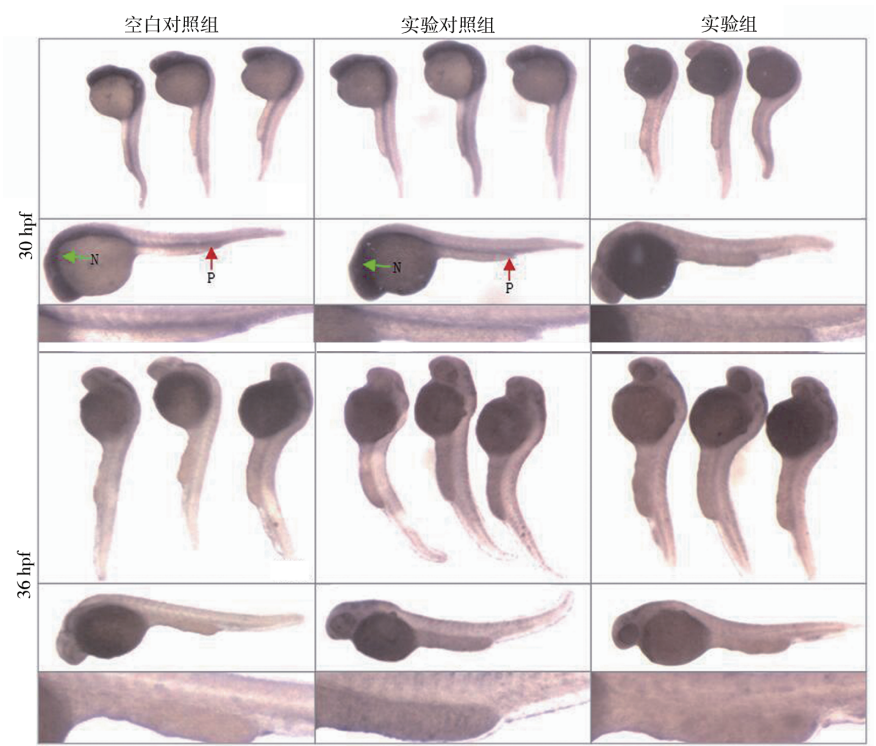
图 2 *FLASH* 基因在 3 组不同品系的 18、24 hpf 斑马鱼全胚胎原位杂交结果

Fig. 2 Expression pattern of *FLASH* gene in 18 hpf, 24 hpf of three different types zebrafish embryo

别、而 *FLASH* 基因在实验组 (*TG*: *zLmo2-Cre*, *TG*: *zLmo2-LDEL-HoxB4-EGFP*) 30 hpf 胚胎中的神经系统和原肾管的表达较空白对照组 30 hpf 胚胎及实验对照组 (*TG*: *zLmo2-Cre*, *TG*: *zLmo2-LDEL-EGFP*) 30 hpf 的胚胎明显减弱。*FLASH* 基因在实验组 (*TG*: *zLmo2-Cre*, *TG*: *zLmo2-LDEL-HoxB4-EGFP*)

30 hpf 胚胎中未见明显表达,而在 36 hpf 后各组之间未见明显差别,*FLASH* 基因也未见明显表达 (图 3)。
2.4 *FLASH* 基因在 3 组不同品系的 48hpf、72hpf 斑马鱼全胚胎原位杂交结果

从图 4 可以观察:在 48 ~ 72 hpf 各组之间未见明显差别,*FLASH* 基因也未见明显表达。



注:N 为脊索,P 为原肾管,绿箭头所示 *FLASH* 在神经系统的表达信号,红箭头所示 *FLASH* 在造血系统的表达信号
图 3 *FLASH* 基因在 3 组不同品系的 30 hpf、36 hpf 斑马鱼全胚胎原位杂交结果

Fig. 3 Expression pattern of *FLASH* gene in 30 hpf、36 hpf of three different types zebrafish embryo

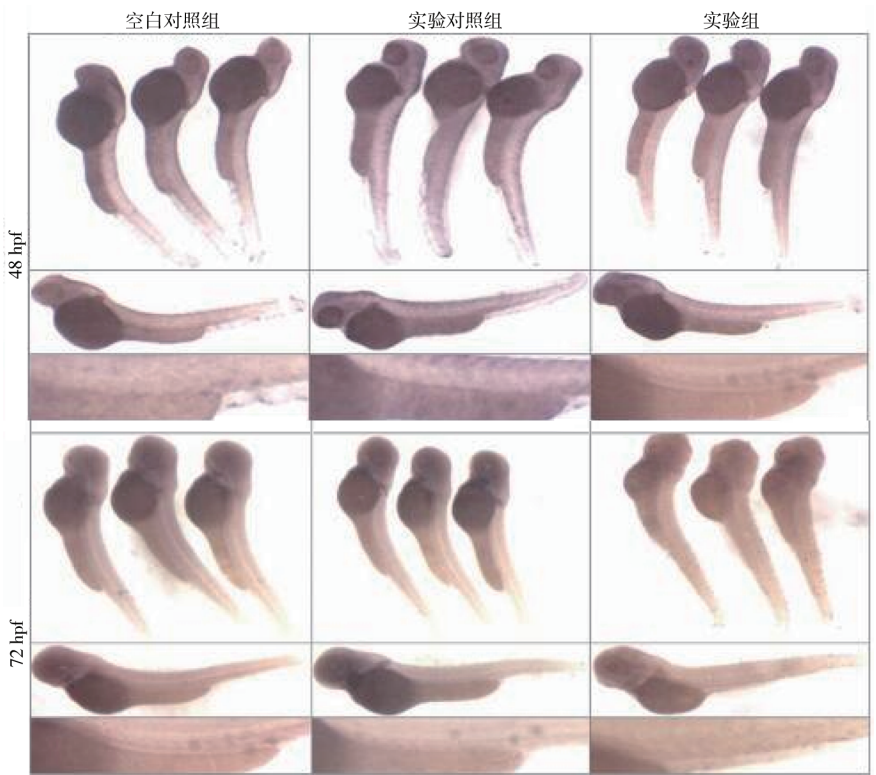


图 4 *FLASH* 基因在 3 组不同品系的 48、72 hpf 斑马鱼全胚胎原位杂交结果

Fig. 4 Expression pattern of *FLASH* gene in 48 hpf、72 hpf of three different types zebrafish embryo

3 讨论

斑马鱼作为一种新兴的动物模型是研究基因功能的有效载体,相比较于其他模式生物,其优势在于体外受精,生殖周期短、生殖能力强、高产卵量、体积小、发育快且胚胎透明,经济适用等优点,并且发现斑马鱼基因与人类基因保守度约 85%^[8-10]。*FLASH* 基因作为一种促凋亡基因,是 Fas-caspase8 凋亡通路中的一个组成部分,起传导信号的作用^[11-12]。本实验对 *FLASH* 在斑马鱼胚胎发育早期的原位杂交结果显示,早在斑马鱼胚胎的 3.7 hpf 就能观察到杂交信号,揭示 *FLASH* 可能参与了胚系细胞的自我更新;而 6 hpf 未见表达的具体原因尚不清楚,可能与母体基因表达开始减少,自体基因开始表达有关。3.7、9~12 hpf 观察到 *FLASH* 基因脊索和神经外侧板、18~30 hpf 的头部,部分的脊索及造血区域可观察到 *FLASH* 基因黑色阳性杂交信号,斑马鱼胚胎至 9 hpf 时,是脊索、肌肉及后脑特异性神经系统发育的关键时期,12 hpf 是原始造血形成的关键时期,18 hpf 是原始造血的高峰时期,而斑马鱼 24 hpf 后,主要的组织器官原基已形成,各个脑室、血细胞、体节等均清楚可见,30 hpf 时原始造血基本停止。36 hpf 后未见 *FLASH* 明显表达,表明 *FLASH* 在神经系统发生、成熟,原始造血等早期胚胎发育过程中可能发挥重要作用。异位表达 *Hoxb4* 能加强 HSC 的自我更新和增殖的能力,而且未导致血液系统的恶性肿瘤^[13-15],本实验室前期的实验结果也证明了这一点^[7]。据文献报道在爪蟾神经系统中 *FLASH* 基因是 *HoxB4* 的下游靶基因^[4],遂推测在造血系统中,*HoxB4* 是有可能通过 *FLASH* 基因实现对 HSC 的调控的。本实验利用本课题组前期制备并保存完好的 *FLASH* 基因反义 mRNA 探针^[16],通过斑马鱼全胚胎原位杂交技术观察 *FLASH* 基因在斑马鱼的神经系统和造血系统的表达情况。本研究结果显示实验组(*TG; zLmo₂-Cre, TG; zLmo₂-LDEL-HoxB4-EGFP*) 18~30 hpf 与空白对照组相比较,在神经系统和造血系统表达发生了下调,而 36 hpf 后未见 *FLASH* 基因明显表达。实验对照组(*TG; zLmo₂-Cre, TG; zLmo₂-LDEL-EGFP*) *FLASH* 基因表达与空白对照组未见明显差异,而 18 hpf 是斑马鱼原始造血的高峰时期,30 hpf 斑马鱼原始造血基本停止,故本研究推测 *FLASH* 基因在斑马鱼胚胎神经系统早期和原始造

血过程中发挥了重要作用,并且在 *HoxB4* 异位表达转基因鱼系中 *FLASH* 基因在神经系统和造血系统中的表达发生了下调,在神经系统和造血系统在早期发育的过程中,存在大量的细胞凋亡和分化,*FLASH* 基因作为促凋亡基因参与了这一过程,结合 *HoxB4* 基因与 *FLASH* 基因都分别在神经系统中高表达,在造血系统中低表达,故推测在 HSC 经原肾管迁移到成体造血器官的过程中,异位表达 *HoxB4* 基因可能导致了 *FLASH* 基因在斑马鱼体内的表达水平发生了下调,可能减少了 HSC 的凋亡数目,从而可能使 HSC 的生存时间发生了延长。

4 参考文献

- [1] YASUNAGA S, OHNO Y, SHIRASU N, et al. Role of Geminin in cell fate determination of hematopoietic stem cells (HSCs) [J]. *Int J Hematol*, 2016, 104(3): 324 - 329.
- [2] SHU L P, ZHOU Z W, ZHOU T, et al. Ectopic expression of Hoxb4a in hemangioblasts promotes hematopoietic development in early embryogenesis of zebrafish [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015, 42(12): 1275 - 1286.
- [3] JACKSON M, MA R, TAYLOR A H, et al. Enforced expression of HOXB4 in human embryonic stem cells enhances the production of hematopoietic progenitors but has no effect on the maturation of red blood cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(8): 981 - 990.
- [4] XIN C, ZHAO C, YIN X, et al. Bioinformatics analysis of molecular mechanism of the expansion of hematopoietic stem cell transduced by HOXB4/HOXC4 [J]. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, 2016, 21(8): 462 - 469.
- [5] MORGAN R, NALLIAH A, MORSI EL-KADI A S. FLASH, a component of the FAS-CAPSASE8 apoptotic pathway, is directly regulated by Hoxb4 in the notochord [J]. *Developmental Biology*, 2004, 265(1): 105 - 112.
- [6] ALM-KRISTIANSEN A H, NORMAN I L, MATRE V, et al. SUMO modification regulates the transcriptional activity of FLASH [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 387(3): 494 - 499.
- [7] KIRIYAMA M, KOBAYASHI Y, SAITO M, et al. Interaction of FLASH with arsenite resistance protein 2 is involved in cell cycle progression at S phase [J]. *Molecular and cellular biology*, 2009, 29(17): 4729 - 4741.
- [8] JING L, LEONARD I Z. Zebrafish as a model for normal and malignant hematopoiesis [J]. *Disease Models and Mechanisms*, 2011, 16(4): 433 - 438.

(下转第 1191 页)