

cdh5-mRNA 在野生型斑马鱼胚胎发育过程中的表达模式*

吴西军^{1,2}, 姚冬静^{1,3}, 刘庆⁴, 杨小燕^{1,5}, 王念雪^{1,2}, 王一慧^{1,5}, 舒莉萍^{1,2}, 何志旭^{1,5**}

(1. 贵州医科大学 组织工程与干细胞实验中心, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 免疫学教研室, 贵州 贵阳 550004; 3. 河北省人民医院 儿科, 河北 石家庄 050057; 4. 贵州医科大学附院 呼吸与危重症医学科, 贵州 贵阳 550004; 5. 贵州医科大学附院 儿童血液肿瘤科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨 *cdh5*-mRNA 在野生型斑马鱼胚胎期发育过程中的表达模式。方法: 收取 tuebingen 野生型斑马鱼多个发育时间节点的胚胎, 提取其总 RNA, 体外逆转录后 RT-PCR 扩增 *cdh5* 基因片段, 将 *cdh5* 基因片段插入 *pCS²⁺* 质粒载体中, 挑选阳性单克隆菌落, 通过双酶切、测序等方法鉴定 *pCS²⁺-cdh5* 重组质粒; 重组质粒单酶切后用 T3RNA 体外转录体系制备地高辛标记的 *cdh5* 基因的反义 mRNA 探针, 对斑马鱼全胚胎进行原位杂交, 显微镜下观察各发育节点胚胎 *cdh5*-mRNA 杂交信号并拍照。结果: 构建并鉴定了 *pCS²⁺-cdh5* 重组质粒, 各发育节点胚胎经全胚胎原位杂交后发现在 tuebingen 野生型斑马鱼胚胎发育至 3.7 ~ 12 hpf 时 *cdh5*-mRNA 呈低丰度泛在表达, 18 ~ 36 hpf 时在后脑及血管处表达、在造血系统高表达, 48 hpf 后仅在脑部和血管处低表达。结论: 在野生型斑马鱼胚胎期发育过程中可以检测到 *cdh5*-mRNA 在后脑和血管处有表达, 并且在造血组织高表达。

[关键词] 斑马鱼; 胚胎发育; *cdh5* 基因; 基因表达; 遗传载体; 全胚胎原位杂交

[中图分类号] R318.1; Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)11-1241-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.11.001

Expression Pattern of *cdh5*-mRNA during the Development of Wild-type Zebrafish Embryos

WU Xijun^{1,2}, YAO Dongjing^{1,3}, LIU Qing⁴, YANG Xiaoyan^{1,5}, WANG Nianxue^{1,2},
WANG Yihui^{1,5}, SHU Liping^{1,2}, HE Zhixu^{1,5}

(1. Department of Tissue Engineering and Stem Cell Experiment, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Immunology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Pediatrics, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050057, Hebei, China; 4. Department of Critical Care Medicine, The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 5. Department of Childhood Oncology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To investigate the expression pattern of *cdh5* gene during embryogenesis of wild-type zebrafish. **Methods:** Total RNA was extracted from the embryos with several developmental phases of Tuebingen wild type zebrafish, and the *cdh5* gene fragment was amplified by RT-PCR after reverse transcription. The *cdh5* gene fragment was ligated into the *pCS²⁺* plasmid vector. The *pCS²⁺-cdh5* recombinant plasmid was verified by double enzyme digestion and sequencing. Digoxin labeled antisense *cdh5* mRNA was obtained by using linearized *pCS²⁺-cdh5* as a template by T3RNA transcription system, and served as a probe for whole-mount in situ hybridization of zebrafish embryos.

*[基金项目] 国家自然科学基金地区项目(81760025); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2017PT31042, 2018PT31048); 贵阳市科技计划项目(筑科合同201500103); 贵州省教育厅青年成长基金[黔教合(2018)192]

**通信作者 E-mail: hzx@gmc.edu.cn

网络出版时间: 2019-11-21 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20191120.2125.001.html>

The *cdh5*-mRNA hybridization signal of embryos at all developmental phases were observed under microscope and photographed. **Results:** The recombinant plasmid pCS^{2+} -*cdh5* was constructed and verified. In situ hybridization showed that the *cdh5*-mRNA was lowly but ubiquitously expressed at 3.7 ~ 12 hpf, highly expressed in the hematopoietic system at 18 ~ 36 hpf, highly expressed in tritocerebrum and blood vessels, while only low expressed in tritocerebrum and blood vessels after 48 hpf. **Conclusion:** During the embryonic development of wild zebrafish, *cdh5*-mRNA can be detected in tritocerebrum vessels, and was highly expressed in hematopoietic tissues.

[**Key words**] zebrafish; embryonic development; *cdh5* gene; gene expression; genetic vector; whole-mount in situ hybridization

cdh5 在胚胎发育早期成体血管发生、血管重塑、内皮连接及血管通透性调节等过程中有重要的作用^[1-3],同时在胚胎期造血发育过程中也有重要作用^[4-6]。目前对 *cdh5* 的研究中,多采取的是断面研究的方法,不能系统地展示 *cdh5* 基因在急剧变化的发育过程中的表达模式,而基因的正常表达模式是研究基因功能的基础,因此研究 *cdh5* 基因的正常表达模式就显得很有必要。由于大的模式生物多为体内受精、宫内发育,给持续、系统地观察胚胎期基因的变化情况带来了很多的限制^[7]。本研究以野生型斑马鱼胚胎作为研究对象,利用其体外受精、宫外发育且系统发育高度保守的特性^[8],通过全胚胎原位杂交技术(whole-mount in situ hybridization, WISH)检测 *cdh5* 基因在 *tübingen* 野生型斑马鱼胚胎早期发育过程中的表达,获得 *cdh5*-mRNA 的表达谱,探究 *cdh5*-mRNA 的表达模式,为探讨 *cdh5* 基因在斑马鱼血管发生、发育及早期造血发育中的作用提供基因表达谱参照。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 野生型 *tübingen* 斑马鱼系养殖在恒温(28 ± 0.5)℃的循环水系统,光照时间 14 h/d,斑马鱼胚胎由课题组自行繁育。

1.1.2 实验试剂 pCS^{2+} 真核生物表达质粒和 DH5 α 工程菌株由贵州医科大学组织工程与干细胞实验中心保存,Trizol 试剂、逆转录试剂 first-strand plus kit 购于 invitrogen 公司,小提质粒试剂盒购于 Axyren 公司,DNA 凝胶回收试剂盒、DNA marker 购于北京天根生物公司,PCR 引物由上海捷瑞生物有限公司合成,EcoR1 和 Xba1 内切酶、T4 连接酶均购于 fermentas 公司,KOD DNA 聚合酶购于 TOYOBO 公司,地高辛 RNA 标记和检测试剂

盒及 NucAwayTM Spin Columns 购自 Ambion 公司,BCIP/NBT 购自 VECTORLab。

1.2 实验方法

1.2.1 野生型斑马鱼总 RNA 的提取及 *cdh5* 基因克隆 以受精后小时数(hours-post-fertilization, hpf)作为斑马鱼胚胎发育时点的单位。收集 *Tübingen* 野生型斑马鱼 0.75、3.75、9、12、18、30、36、48、72 hpf 多个时相点的胚胎,每个时相点取 5 枚,置于 1.5 mL 的 Epp 管中,加入 Trizol 1 mL 充分匀浆处理,提取其总 RNA、按 SuperScriptTM 111 First-Strand Synthesis System kit 试剂盒步骤进行反转录。根据斑马鱼 *cdh5* 的基因序列(NM_001003983.1),用 primer5.0 软件自行设计引物,同时引入 EcoR1 以及 Xba I 酶切位点以及保护碱基,*cdh5* 基因上游引物为 5'CGGAATTCCTCCAATCAGGGAAAACGAC-3',下游引物为 5'GCTCTAGACA GCTTTGCAAGGCAACAA-3',由上海捷瑞生物有限公司合成。以逆转录得到的 cDNA 为模板,进行 *cdh5* 的 RT-PCR 扩增,扩增条件为 94 ℃ 预变性 2 min,94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,68 ℃ 延伸 2 min,共 30 个循环,最后 68 ℃ 后延伸 10 min,产物大小为 378 bp,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,电泳鉴定完毕后将目的条带割胶回收备用。

1.2.2 pCS^{2+} -*cdh5* 重组质粒的构建与鉴定 将 *cdh5* 基因的 RT-PCR 产物和 pCS^{2+} 质粒 EcoR I 和 Xba I 双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳后割胶回收,用 T4 酶连接回收的酶切片段,将连接产物运用钙转法转入 E. coli DH5 α 感受态菌中,经氨苄抗性筛选出阳性克隆并扩增后,运用碱裂解法提取 pCS^{2+} -*cdh5* 重组质粒。鉴定 pCS^{2+} -*cdh5* 重组质粒,(1) 酶切,用 Xba I 单酶切或 EcoR I 及 Xba I 双酶切 pCS^{2+} -*cdh5* 重组质粒,通过琼脂糖凝胶电泳,判断酶切产物大小;(2) 菌落 PCR, pCS^{2+} -*cdh5* 重组质粒转染大肠杆菌,PCR 扩增后行琼脂糖凝胶电泳,

判断扩增产物大小;(3)序列测定,将重组质粒送至北京诺赛生物技术公司进行序列测定,得到测定序列后进行序列比对。

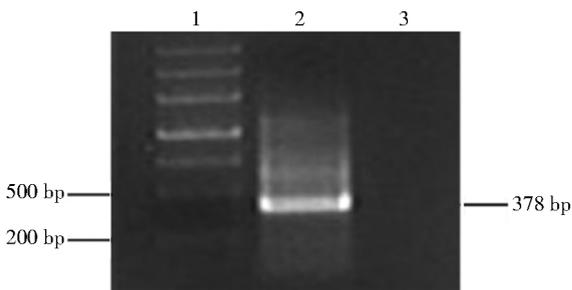
1.2.3 *cdh5* 反义 mRNA 探针制备 将 pCS^{2+} -*cdh5* 重组质粒用 EcoR I 酶切,DNA 纯化试剂盒割胶回收得到线性化的 DNA 片段。以线性化的 pCS^{2+} -*cdh5* DNA 片段为模板,以地高辛标记的寡核苷酸为原料,经 T3RNA 体外转录体系转录得到的 *cdh5* 反义 mRNA 探针;用 NucAway™ Spin Columns 纯化吸附柱回收 *cdh5* 反义 mRNA 探针,经琼脂糖凝胶电泳鉴定,分装后于 -70°C 保存备用。

1.2.4 野生型斑马鱼胚胎原位杂交 选取 0.75、3.7、6.9、12、18、24、30、36、48 及 72 hpf 的 Tuebingen 野生型斑马鱼胚胎进行 WISH,首先用 $1\times$ PBST 溶液洗去固定液,不同浓度的甲醇进行梯度脱水后,胚胎 68°C 预杂交 1 h,加入 *cdh5* 反义 mRNA 探针,于 68°C 杂交过夜,不同浓度的含吐温 20 的柠檬酸钠与氯化钠缓冲液洗去过量的探针,加入地高辛抗体后过夜,含吐温的马来酸缓冲液(MABT)洗去过量的抗体,加入 BCIP/NBT 染液进行染色,用固定液对杂交胚胎进行固定并照相,记录结果。

2 结果

2.1 *cdh5* 基因片段 RT-PCR 扩增

以收集的斑马鱼胚胎总 RNA 为模板,体外逆转录得到 cDNA,RT-PCR 扩增后经琼脂糖凝胶电泳分析显示,在对应泳道可见一清晰的条带,大小与预期 378 bp 相符。见图 1。



注:1 为 DNA marker,2 为 *cdh5* PCR 产物,3 为空白对照。

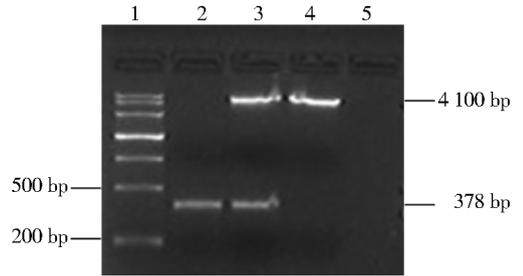
图 1 *cdh5* 基因 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 RT-PCR product analysis of *cdh5* gene

2.2 pCS^{2+} -*cdh5* 重组质粒酶切鉴定

pCS^{2+} -*cdh5* 重组质粒经 Xba I 单酶切及 Xba I 和 EcoR I 双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳显示,在 pCS^{2+} -*cdh5* 和 pCS^{2+} 泳道均可见一条带,大小约

4 100 bp,在 *cdh5* 基因片段及 pCS^{2+} -*cdh5* Xba I 和 EcoR I 双酶切泳道均可见约 378 bp 大小的条带,与目的基因条带相符,表明目的基因 *cdh5* DNA 片段成功插入 pCS^{2+} 载体中。见图 2。



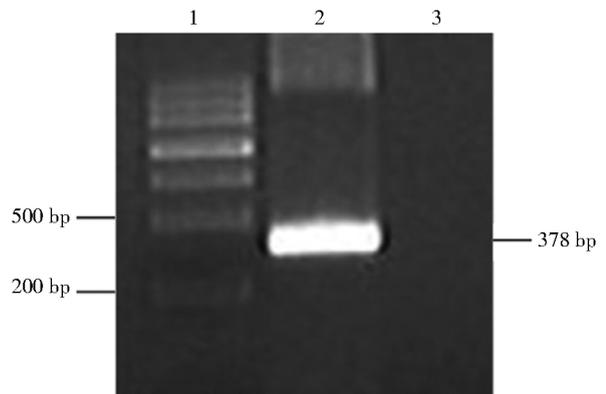
注:1 为 DNA marker,2 为 *cdh5* PCR 产物,3 为 pCS^{2+} -*cdh5* 双酶切产物,4 为 pCS^{2+} 酶切产物,5 为空白对照。

图 2 pCS^{2+} -*cdh5* 重组质粒 EcoR I、Xba I 双酶切产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 Digestion products of pCS^{2+} -*cdh5* recombinant plasmid by EcoR I and Xba I

2.3 pCS^{2+} -*cdh5* 重组质粒菌落 PCR 鉴定

以 pCS^{2+} -*cdh5* 重组质粒转染后菌液为模板,PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,电泳结果显示,对应泳道可见约 378 bp 大小的特异性扩增条带,与预期相符,表明 *cdh5* 基因片段成功插入了 pCS^{2+} 质粒中。见图 3。



注:1 为 DNA Marker,2 为重组质粒 PCR 产物,3 为空白对照。

图 3 pCS^{2+} -*cdh5* 重组质粒菌落 PCR 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 3 Colony PCR analysis of recombinant plasmid pCS^{2+} -*cdh5*

2.4 pCS^{2+} -*cdh5* 重组质粒测序鉴定

pCS^{2+} -*cdh5* 重组质粒 DNA 经序列测序,将测序结果在 Genbank 中进行比对,证实得到的序列与 *cdh5* 基因序列完全一致。见图 4。

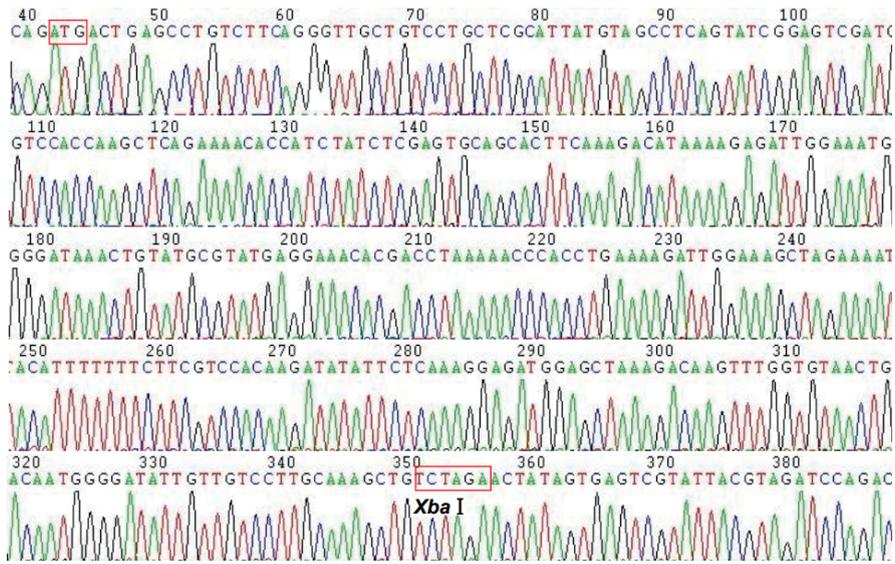


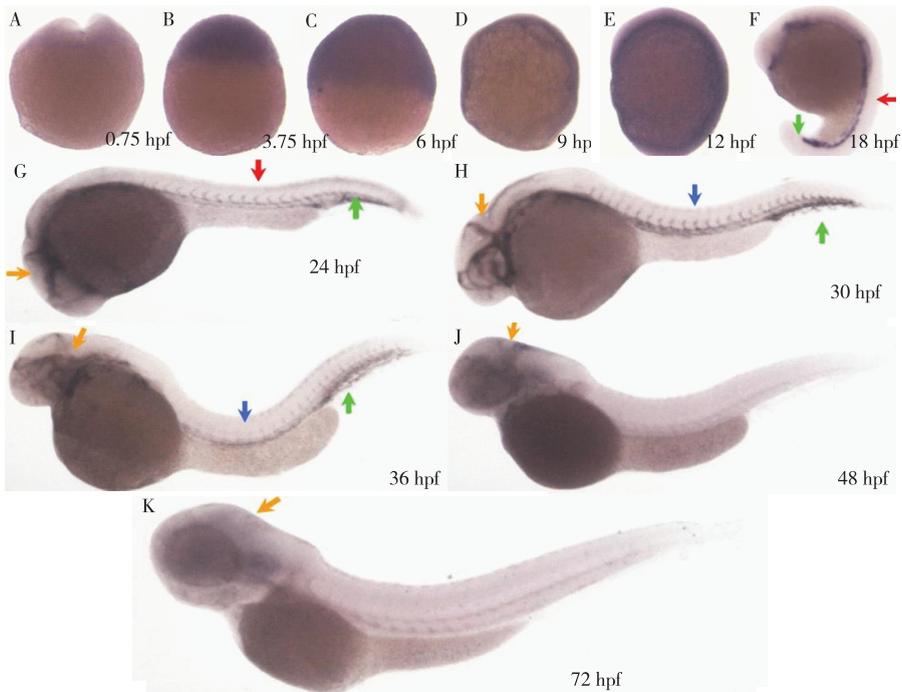
图 4 pCS^{2+} -*cdh5* 重组质粒测序结果

Fig. 4 DNA sequencing analysis of recombinant plasmid pCS^{2+} -*cdh5*

2.5 野生型斑马鱼 *cdh5* 基因 mRNA 全胚胎原位杂交

野生型斑马鱼 *cdh5*-mRNA 原位杂交结果显示, 0.75 hpf 的胚胎未见阳性杂交信号, 3.7 ~ 12 hpf 的胚胎可见 *cdh5*-mRNA 无特异性表达, 18 ~ 36 hpf 的胚胎 *cdh5*-mRNA 开始在血管和脑部高表达, 特别是胚胎造血组织高表达, 在 18 ~ 24 hpf 胚胎造血

组织的中间细胞群、18 ~ 36 hpf 胚胎尾部血岛、30 ~ 36 hpf 胚胎主动脉-性腺-中肾区及 24 ~ 72 hpf 胚胎的脑部组织中均可以观察到 *dh5*-mRNA 阳性杂交信号。提示在野生型斑马鱼胚胎发育过程中, *cdh5*-mRNA 除在脑部和血管表达外, 在造血组织中表达量亦较高, 18 hpf 已有明显表达, 30 hpf 为其表达高峰, 后逐渐减少。见图 5。



注: A ~ K 示 0.75 ~ 72 hpf, 红色箭头所指为中间细胞群, 蓝色箭头所指为主动脉-性腺-中肾区, 绿色箭头所指为尾部血岛, 黄色箭头所指为脑部。

图 5 0.75 ~ 72 hpf 野生型斑马鱼胚胎 *cdh5*-mRNA 全胚胎原位杂交结果

Fig. 5 Whole-mount in situ hybridization using antisense *cdh5*-mRNA in zebrafish at different hours post-fertilization

3 讨论

模式生物斑马鱼作为桥梁模式生物,具有体外受精、宫外发育、胚胎早期通体透明等特点,这些重要特征为研究生物体胚胎早期的生长发育以及组织器官的发生、发育提供了便利条件,可以对活体胚胎发育情况进行系统的、连续的观察和科学研究,是发育生物学和遗传学等学科极为理想的模式生物^[9-10]。WISH 利用灵敏度较高的探针进行标记,技术简单可靠性高,可以反映在胚胎发育整体水平中基因表达的三维时空性,被用于替代免疫组织化学研究和基于基因表达的胚胎期发育调控研究。

1990 年在禽类研究中首先发现 *cdh5* (*CD144*、*VE-cadherin*),随后在人和小鼠的血管内皮细胞也发现了 *cdh5* 的存在,*cdh5* 在进化中是高度保守的^[11-12]。*cdh5* 是一种跨膜蛋白,其胞外氨基端与相邻血管内皮细胞上 *cdh5* 同型胞外结构域互相黏附,胞内梭基端与膜内蛋白 P120、斑珠蛋白(plakoglobin)及 β -catenin 结合,可在所有类型的血管内皮细胞中持续表达,一定程度上具有血管内皮特异性。通过介导细胞间的黏附连接在胚胎发育早期阶段的血管发生和重塑过程中起关键作用^[13-14]。

已有研究发现成血管细胞(*flk1*⁺ *cdh5*⁻)和已经定向了的内皮细胞(*flk1*⁺ *cdh5*⁺)都具有分化成造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)的能力,而 *flk1*⁺ *Cdh5*⁺ 的内皮细胞被认为是 HSC 的直接来源^[15]。在体外培养时 *cdh5*⁺ 的细胞也可以发育为各系的造血细胞,体内的研究也发现 *cdh5*⁺ 的细胞在体内可以发育成 HSC,并可以迁移到胎肝、骨髓等造血组织中^[16-18]。通过对免疫缺陷小鼠进行细胞移植的相关研究表明, *cdh5*⁺ 的细胞群比 *cdh5*⁻ 细胞群显示了更加出色的自我更新、增殖及分化潜能^[19-20]。

本实验提取了不同发育节点 Tuebingen 野生型斑马鱼胚胎总 RNA,通过 *cdh5* 基因特异性引物,扩增出了 *cdh5* 基因特异性的 DNA 片段,通过酶切、连接、转化、质粒提取等环节,得到了 *pCS2*⁺-*cdh5* 重组质粒;将重组质粒进行双酶切、质粒菌落 PCR 及序列测定等方法鉴定,所得到的基因序列与 *cdh5* 基因序列完全一致;制备了 *cdh5* 基因特异性片段地高辛标记的反义 mRNA 探针,用 WISH 检测,结果表明 *cdh5*-mRNA 除在后脑和血管处表达

外,在造血组织高表达,30 hpf 为其表达高峰,后逐渐减少。

综上所述,本研究明确了野生型斑马鱼 *cdh5*-mRNA 的表达模式,为研究 *cdh5*-mRNA 表达模式提供了参照,同时为研究 *cdh5* 在胚胎期发育调控中的作用提供支撑。但是 mRNA 的表达模式并不能完全代表蛋白质的表达模式,利用带标记的 *cdh5* 抗体示踪其表达情况将更为精确,但是目前尚未见斑马鱼 *cdh5* 抗体的相关报道,因此斑马鱼 *cdh5* mRNA 的表达模式研究在目前就非常必要。

4 参考文献

- [1] RHO S S, ANOD K, FUKUHARA S. Dynamic regulation of vascular permeability by vascular endothelial cadherin-mediated endothelial cell-cell junctions [J]. Journal of Nippon Medical School, 2017, 84(4):148-159.
- [2] JIN Y, YANG C, SUI X, et al. Endothelial progenitor cell transplantation attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via regulating miR-10a/b-5p [J]. Lipids in Health and Disease, 2019, 18(1):136.
- [3] ARAGON-SANABRIA V, POHLER S E, Eswar V J, et al. VE-cadherin disassembly and cell contractility in the endothelium are necessary for barrier disruption induced by tumor cells [J]. Scientific Reports, 2017, 10(7):45835.
- [4] GENTEK R, GHIGO C, HOEFFEL G, et al. Hemogenic endothelial fate mapping reveals dual developmental origin of mast cells [J]. Immunity, 2018, 48(6):1160-1171.
- [5] ZHANG Y Y, CLAY D, MITJAVILA-GARCIA M T, et al. VE-cadherin and ACE co-expression marks highly proliferative hematopoietic stem cells in human embryonic liver [J]. Stem Cells and Development, 2019, 28(3):165-185.
- [6] PADRON-BARTHE L, TEMINO S, VILLA DEL CAMPO C, et al. Clonal analysis identifies hemogenic endothelium as the source of the blood-endothelial common lineage in the mouse embryo [J]. Blood, 2014, 124(16):2523-2532.
- [7] GARCIA-LOPEZ J P, VILOS C, FEIJOO C G. Zebrafish, a model to develop nanotherapeutics that control neutrophils response during inflammation [J]. Journal of Controlled Release, 2019, 313:14-23.
- [8] SASINE J P, YEO K T, CHUTETE J P. Concise review: paracrine functions of vascular niche cells in regulating hematopoietic stem cell fate [J]. Stem Cells Translational Medicine, 2017, 6(2):482-489.

- [9] YANG F, HU H, LIU Y, et al. Cul4a promotes zebrafish primitive erythropoiesis via upregulating scl and gata1 expression[J]. *Cell Death & Disease*, 2019,10(6):388.
- [10] KERSTIN H, MATTHEW D, CLARK, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. *Nature*, 2013, 496(7446):498-503.
- [11] HU Z, WU Y, ZHOU M, et al. Generation of reporter hESCs by targeting EGFP at the CD144 locus to facilitate the endothelial differentiation[J]. *Development Growth & Differentiation*, 2018, 60(4):205-215.
- [12] SWAIN A, INOUE T, TAN K S, et al. Intrinsic and extrinsic regulation of mammalian hematopoiesis in the fetal liver[J]. *Histol Histopathol*, 2014,29(9):1077-1082.
- [13] GIANNOTTA M, TRANI M, DEJANA E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity[J]. *Development Cell*, 2013, 26(5):441-454.
- [14] DARTCH N, SCHULTE D, HAGERLING R, et al. Fusing VE-Cadherin to β -Catenin impairs fetal liver hematopoiesis and lymph but not blood vessel formation[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2014,34(9):1634-1648.
- [15] UENISHI G I, JUNG H S, KUMAR A. NOTCH signaling specifies arterial-type definitive hemogenic endothelium from human pluripotent stem cells[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1):1828.
- [16] ZOVEIN A C, HOFMANN J J, LYNCH M, et al. Fate tracing re-veals the endothelial origin of hematopoietic Stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(6):625-636.
- [17] SLUKVININ I I. Generating human hematopoietic stem cells in vitro: exploring endothelial to hematopoietic transition as a portal for stemness acquisition[J]. *Febs Letters*, 2016, 590(22):4126-4143.
- [18] BLASER B W, ZON L I. Making HSCs in vitro: don't forget the hemogenic endothelium[J]. *Blood*, 2018, 132(13):1372-1378.
- [19] LI H, SHI X, LIU J, et al. The soluble fragment of VE-cadherin inhibits angiogenesis by reducing endothelial cell proliferation and tube capillary formation[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2010, 17:700-707.
- [20] OTTERSBUCH K. Endothelial-to-haematopoietic transition: an update on the process of making blood[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2019,47(2):591-601.

(2019-09-06 收稿,2019-10-21 修回)
中文编辑:周 凌;英文编辑:张启芳