王茂春,段维旺,李凯,等.小鼠后肢特异表达基因的筛选及验证[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 1-6.
Wang MC, Duang WW, Li K, et al. Screening and verification of mouse hind limb-specific gene expression [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(1): 1-6.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.01.001

小鼠后肢特异表达基因的筛选及验证

王茂春,段维旺,李凯,周宇荀,肖君华*

(东华大学生物研究所,上海 201620)

【摘要】 目的 对比小鼠前后肢基因表达谱的变化,筛选小鼠后肢特异表达的基因。**方法** 通过 NCBI GEO 数据库查找小鼠前后肢基因表达芯片,使用 Transcriptome Analysis Console 软件对原始数据(5 个前肢 E10.5 d 芯片及 4 个后肢 E10.5 d 芯片)进行质控,利用差异倍数为 2 倍以上或 0.5 倍以下及 *P* 值小于 0.05 进行数据过滤,绘制差异表达基因的火山图,并进行聚类分析,构建后肢特异表达基因的相互作用分子网络图。**结果** 小鼠胚胎 E10.5 d 后肢相较于前肢的差异表达的基因共有 275 个,其中上调的基因 45 个,下调的基因 230 个,构建了后肢特异表达的差异基因分子网络图,找到后肢特异表达核心基因,使用 qPCR 检测部分后肢特异表达的基因,结果与芯片结果一致。**结论** 应用小鼠表达谱芯片成功筛选出后肢特异表达的基因,为哺乳动物肢体发育的研究提供基础。

【关键词】 基因芯片;肢体发育;后肢特异表达;小鼠
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 01-0001-06

Screening and verification of mouse hind limb-specific gene expression

WANG Maochun, DUAN Weiwang, LI Kai, ZHOU Yuxun, XIAO Junhua*

(Institute of Biology, Donghua University, Shanghai 201620, China)
Corresponding author: XIAO Junhua. E-mail: xiaojunhua@dhu.edu.cn

【Abstract】 Objective To compare the gene expression profiles of fore and hind limbs in mice and screen out genes specifically expressed in hind limbs. **Methods** Mouse fore and hind limb gene expression chip data were obtained from the NCBI GEO database. The raw data (five forelimb E10.5 day chips and four hind limb E10.5 day chips) were quality-controlled using the Transcriptome Analysis Console software. The data were filtered to identify differentially expressed genes (DEGs) using the criteria: difference > 2 times or < 0.5 times and *P*-value. We drew volcano maps and performed cluster analysis with the DEGs. A gene interaction network map was constructed with the hind limb-specific genes. **Results** There were 275 DEGs in the hind limbs of mouse E10.5 embryos, of which 45 genes were upregulated and 230 genes were downregulated. The hind limb-specific DEGs were mapped to the gene network and the core node genes of hind limbs were identified. qPCR was used to investigate some of the hind limb-specific genes, and the results were consistent with the chip results. **Conclusions** Mouse expression microarrays are successfully used to screen the genes specifically expressed in hind limbs, which provide a basis for the study of mammalian limb development.

【Keywords】 gene chip; limb development; hind limb-specific expression; mouse
Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

[**基金项目**]国家自然基金面上项目(31772550);上海市科委关键项目(16140901300,16140901302)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (31772550), and Key Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (16140901300, 16140901302).
[**作者简介**]王茂春(1992—),男,博士研究生,研究方向:分子遗传学。Email: wangmaochun0815@163.com
[**通信作者**]肖君华(1968—),男,教授,研究方向:分子遗传学。Email: xiaojunhua@dhu.edu.cn

哺乳动物的肢体发育是一个自身基因按时空被严格调控表达的过程,涉及细胞增殖、分化、迁徙和凋亡[1-6]。其中,*Hox*、*Fgfs* 和 *Shh* 等信号通路发挥着重要作用。模式动物的研究表明,这些通路相关基因突变会造成的肢体发育缺陷。*Hoxd*12、13 突变小鼠表现出前肢腕骨、掌骨和指骨不同程度的畸形[7-8]。小鼠 *Hoxa* 和 *Hoxd* 基因簇发生缺失突变时,小鼠肢体在发育早期停止发育,表现出严重的肢体远端组织的缺失,并且 *Shh* 的信号通路无法生成[9]。在人类中存在因肢体发育异常造成的出生缺陷,美国疾病控制中心(CDC)调查数据显示,在美国每年约有 1500 例上肢缺陷和 700 例下肢缺陷新生儿,发病率达到了 0.02% ~ 0.04%[10]。对于肢体发育的研究越来越受到生物学和医学的重视。

关于前后肢发育是如何被分别调控的,相关的研究目前较少。Logan 等[11]通过鸡胚模型研究表明,将该后肢发育的信号来源极化活性区移植到前肢,会诱导异位的后肢结构。已有的文献表明,通过鸡胚和小鼠等模型的研究发现前后肢的形态分别受 *Tbx*5/4 基因所影响,*Tbx*5 基因的产物与前肢发育有关,而 *Tbx*4 基因产物与后肢的发育相关[12-14]。Nemec 等[15]研究表明后肢特异表达的 *Pitx*1 基因对于后肢形态的形成起着重要的作用。

本研究通过小鼠前后肢基因表达谱芯片差异基因的聚类分析及信号通路分析,获得后肢特异表达核心基因,并通过 qPCR 验证部分基因,为哺乳动物肢体发育研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级 C57BL/6 J 小鼠(3 只雄鼠,体重 24 ~ 26 g;6 只雌鼠,体重 18 ~ 20 g),购自上海斯莱克实验动物有限公司【SCXK(沪)2017-0005】,饲养于东华大学实验动物房【SYXK (沪) 2014-0022】,环境温度 20 ~ 24℃,相对湿度 40% ~ 70%,期间给予充足的饲料及洁净饮用水。小鼠饲料为上海普路腾生物科技有限公司生产的辐照大小鼠繁殖料【沪饲证(2014)04001】。所有动物实验操作均得到东华大学实验动物委员会批准(编号:东华伦审[2018] 6 号)。

1.1.2 主要试剂及仪器

Trizol 试剂(Invitrogen 公司,美国),First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific 公司,美国),SuperReal PreMix Plus qPCR 试剂(天根生化科技有限公司,中国)。

Nanodrop 2000c 核酸定量仪(Thermo Fisher Scientific 公司,美国),PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国),7500 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 RNA 抽提

实验鼠采用一雄两雌的方式合笼,次日清晨通过观察阴栓判定孕期,如果见栓记为 0.5 d,在雌鼠怀孕 10.5 d 时,使用脊椎脱臼法牺牲母鼠,剖取胎小鼠,使用 Trizol 试剂抽提胎鼠前后肢胚芽 RNA,使用 Nanodrop 2000c 进行 RNA 浓度及纯度的检测,RNA 保存在-80℃备用。

1.2.2 芯片数据下载

小鼠前后肢基因表达芯片数据下载于 National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus(NCBI GEO)数据库(GSE30138)。

1.2.3 基因表达验证

采用 Thermo Fisher Scientific 公司的 First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒,按照操作说明进行 1 μg RNA 逆转录,包括 3 个前肢胚芽 RNA 及 3 个后肢胚芽 RNA。使用 ddH_2O 将得到的 cDNA 进行 5 倍稀释。按照下列体系进行 qRT-PCR 检测,包括:10 μL SuperReal PreMix Plus,0.4 μL Rox,2.5 μL cDNA 模板,300 nmol/L 的上下游引物,补水至 20 μL,同时设置阴性对照。采用两步法 PCR 反应程序进行反应:95℃ 预变性 2 min;95℃ 15 s,62℃ 32 s,40 个循环,每个样本做 3 个重复。结果使用相对定量的方法进行分析,数据以平均值±标准误差表示,采用 *t* 检验进行组间差异统计分析,$P< 0.001$ 差异有显著性。

1.3 数据分析

使用 Transcriptome Analysis Console 软件对原始数据(5 个前肢 E10.5 d 芯片及 4 个后肢 E10.5 d 芯片)进行质控,利用差异倍数为 2 倍以上或 0.5 倍以下及 *P* 值小于 0.05 进行数据过滤,使用软件的 Volcano Plot 及 Hierarchical Clustering 功能进行差异表达基因的火山图绘制及聚类分析。根据聚类分析结果将后肢特异表达的差异基因导入 DAVID 数据库,进行 Gene Ontology(GO)功能分析,将后肢特异表达的差异基因导入 Geneminia 数据库,进行基

因分子网络绘制。

2　结果

2.1　小鼠前后肢差异表达基因及功能分析

为了了解哺乳动物前后肢基因表达谱差异及差异基因的生物学功能,我们首先将芯片数据进行质量检查及标准化,对比分析前肢及后肢组间差异表达的基因。差异基因分析结果如图 1 所示,以差异倍数为 2 倍以上或 0.5 倍以下及 P 值小于 0.05 进行数据过滤,小鼠胚胎 E10.5 d 后肢相较于前肢差异表达的基因共有 275 个:其中红色的点表示上调的基因,共 45 个;蓝色的点表示下调的基因,共 230 个。将差异基因列表导入 David 数据库,进行 GO 分析,结果如表 1 所示,这些差异表达的基因主要涉及基因的转录翻译调控、多器官的发育、骨骼系统的发育、细胞粘连和细胞分化等方面的功能。

表 1　差异表达基因参与的前 15 个生物过程

Table 1　Top 15 biological processes involving the differentially expressed genes

序号 No.	项目名称 Items	基因数 Counts	百分比 %
1	GO:0006355 基于 DNA 的转录调控 GO:0006355 Regulation of transcription, DNA-templated	55	0.1722
2	GO:0006351 基于 DNA 的翻译过程 GO:0006351 Transcription, DNA-templated	51	0.1597
3	GO:0045944 基于 RNA 酶 II 启动子区翻译的正调控 GO:0045944 Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	44	0.1378
4	GO:0007275 多器官发育 GO:0007275 Multicellular organism development	41	0.1284
5	GO:0010628 基因表达的正调控 GO:0010628 Positive regulation of gene expression	26	0.0814
6	GO:0008284 细胞增殖的正调控 GO:0008284 Positive regulation of cell proliferation	26	0.0814
7	GO:0045893 基于 DNA 的翻译正调控 GO:0045893 Positive regulation of transcription, DNA-templated	23	0.0720
8	GO:0000122 基于 RNA 酶 II 启动子区翻译的负调控 GO:0000122 Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	23	0.0720
9	GO:0045892 基于 DNA 翻译的负调控 GO:0045892 Negative regulation of transcription, DNA-templated	22	0.0689
10	GO:0001501 骨骼系统的发育 GO:0001501 Skeletal system development	16	0.0500
11	GO:0030154 细胞分化 GO:0030154 Cell differentiation	16	0.0500
12	GO:0007155 细胞粘连 GO:0007155 Cell adhesion	15	0.0470
13	GO:0043066 细胞凋亡过程的负调控 GO:0043066 Negative regulation of apoptotic process	13	0.0406
14	GO:0042593 葡萄糖稳态 GO:0042593 Glucose homeostasis	12	0.0376
15	GO:0051216 软骨发育 GO:0051216 Cartilage development	11	0.0344

2.2　聚类分析

为了进一步确认后肢特异表达的基因,我们将差异表达的基因进行了层次聚类分析。层次聚类分析结果如图 2 所示,我们可以看到前后肢差异表达基因可以分为 4 个 cluster, cluster 1 显示前肢和后肢表达量都较高,cluster 2 显示前肢和后肢表达量都较低,cluster 3 显示前肢表达量较高,后肢表达量较低,cluster 4 显示后肢表达量高,前肢表达量低。同一天相较于前肢,后肢在特异表达的基因对于后肢发育起到更突出的作用。

2.3　分子网络图

为了了解后肢特异表达的差异基因在分子层

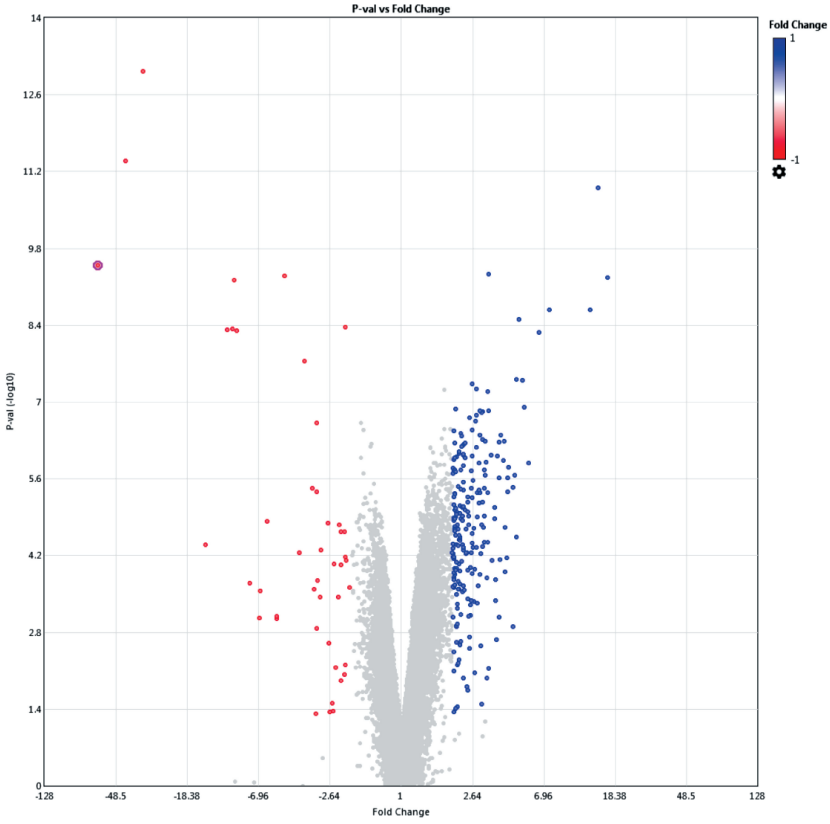


图 1 前后肢差异表达基因的火山图

Figure 1 Volcanic map of the differentially expressed genes in the fore and hind limbs

面相互作用关系,我们通过聚类分析,将 cluster 4 仅在后肢特异表达的基因进行基因相互作用分子网络图的绘制(图 3)。共表达前十个基因为:*Upk3b*、*Aldh1a2*、*Hoxb9*、*Hoxc9*、*Tcf3*、*Gata6*、*Prrx2*、*Crmp1*、*Pitx1*、*Agrp*;基因相互作用核心节点前十个基因:*Ifi204*、*Skor1*、*Tle1*、*Rxra*、*Rarb*、*Lhx3*、*Ldb1*、*Lbx1*、*Isl1*、*Gata6*。

2.4 qPCR 验证

我们从基因相互作用分子网络图中,随机挑选了 *Hoxc10*、*Hoxc9*、*Pitx1* 基因进行 qPCR 检测,以及在 cluster3 中前肢特异表达的 *Tbx5* 基因作为阴性对照。qPCR 结果如图 4 所示,在小鼠胚胎期 E10.5 d,后肢特异的 *Hoxc10*、*Hoxc9*、*Pitx1* 基因的表达量相较于前肢分别提高了 397.4 倍、5.5 倍及 59.2 倍,阴性对照前肢特异的 *Tbx5* 基因,后肢表达量仅仅为前肢的 0.03 倍,结果表明 qPCR 结果真实可靠。再与芯片结果比较,后肢相较于前肢 *Hoxc10*、*Hoxc9*、*Pitx1* 及 *Tbx5* 基因的 Fold Change 值分别为 42.5(上调)、4.9(上调)、33.7(上调)及 -16.7(下降),qPCR 结果与芯片结果一致,说明芯片结果可靠。

3 讨论

小鼠在胚胎发育过程中,在胚胎期 E10.5 d 开始出现后肢的胚芽形态,多种基因及信号因子的开始表达,调控后续肢体的位置及形态[16-17]。利用这一特征,我们通过小鼠胚胎期 E10.5 d 前后肢表达谱芯片筛选出 275 个差异表达的基因,而这些基因在基因的转录翻译调控、多器官的发育、骨骼系统的发育、细胞粘连和细胞分化等方面发挥着重要的功能。其中,大部分生物学功能集中于基因的转录翻译调控中,包括基于 DNA 的转录过程和基于 DNA 的翻译过程等,表明之所以后肢相对于前肢位置及形态上会有差别,是因为后肢发育还受到多种基因转录过程中转录因子及基因翻译过程中信号因子的表达调控。

将差异表达的基因进行了层次聚类分析,其中后肢特异表达的 cluster 4 中的基因,通过 MGI 人类/小鼠疾病模型数据库的搜索,我们发现 *Aldh1a2*、*Hoxc9*、*Gata6*、*Pitx1* 等 14 个基因都与肢体、骨骼发育缺陷的疾病模型相关(数据未显示)。

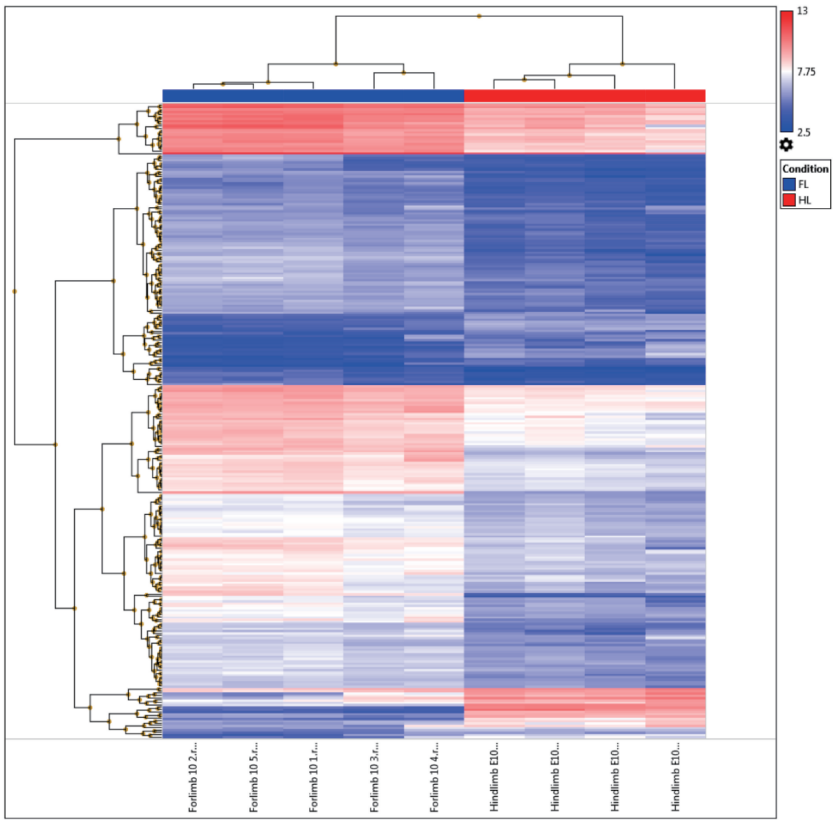


图 2　前后肢差异表达基因层次聚类分析热图

Figure 2　Heat map of hierarchical analysis of the differentially expressed genes between the fore and hind limbs

Niederreither 等[18]研究发现 *Aldh*1*a*2 基因的突变会导致小鼠后肢的完全缺失。Kozhemyakina 等[19]研究发现条件敲除 *Gata*6 基因的小鼠后肢的前端会发生 *Shh* 信号及下游基因紊乱表达，并在后肢前端出现多趾头的性状。Marcil 等[20]研究发现 *Pitx*1 和 *Pitx*2 基因的纯合突变会导致小鼠后肢股骨缩短、腓骨及胫骨形态的异常、以及脚趾缺失。

为了更好的认识后肢区别于前肢分子水平的表达变化及重要的核心基因，我们对后肢特异表达的基因进行了分子网络图的绘制。从图 3 中，我们可以看出这些基因在分子网络上的相互作用关系，机制复杂，大部分基因涉及基因的转录调控过程。其中，我们挑选了在基因转录调控上具有代表性的 *Hoxc*10、*Hoxc*9、*Pitx*1 这 3 个基因，在表达水平上进行 qPCR 验证，其结果与芯片结果一致，表明芯片结果可靠。并通过已有研究显示 *Tbx*4 和 *Pitx*1 基因都是已知的特异调控后肢形态的转录因子[11,15]。因此，分子网络中的这些基因将为哺乳动物后肢形态形成的发育调控研究提供重要的依据。

综上所述，本研究通过小鼠前后肢基因表达谱

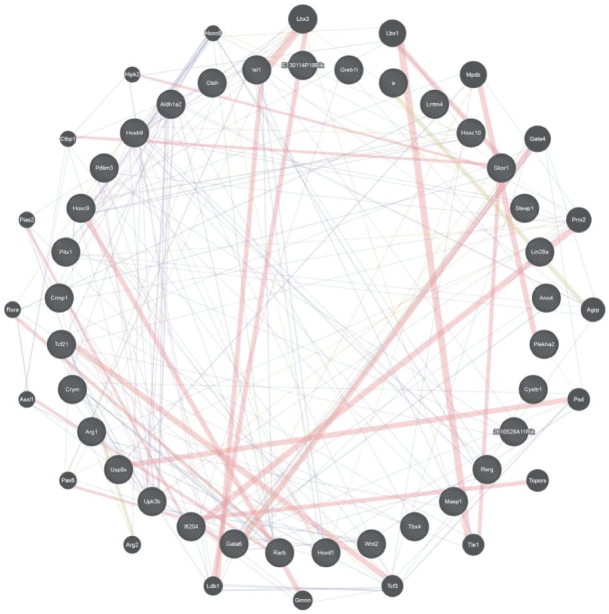
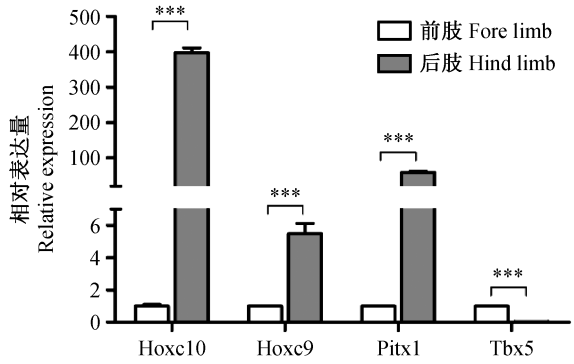


图 3　后肢特异表达的基因相互作用分子网络图

Figure 3　Network diagram of the gene interaction molecules specifically expressed in the hind limbs

芯片差异基因的聚类分析及信号通路分析，获得后肢特异表达核心基因，并通过 qPCR 验证部分基因，

为哺乳动物肢体发育研究提供基础。



注:后肢特异的 *Hoxc*10、*Hoxc*9、*Pitx*1 基因的表达量相较于前肢分别提高了 397.4 倍、5.5 倍及 59.2 倍,而前肢特异的 *Tbx*5 基因,后肢表达量仅为前肢的 0.03 倍。$P< 0.001$。

图 4 qPCR 检测前后肢 *Hoxc*10、*Hoxc*9、*Pitx*1 及 *Tbx*5 基因相对表达水平

Note. The expression levels of hindlimb-specific *Hoxc*10, *Hoxc*9, and *Pitx*1 genes were 397.4-fold, 5.5-fold, and 59.2-fold higher than those in the forelimbs, respectively, while the forelimb-specific *Tbx*5 gene was only 0.03 times in the hind limbs than in the fore limbs. $P< 0.001$.

Figure 4 Relative expression levels of *Hoxc*10, *Hoxc*9, *Pitx*1 and *Tbx*5 genes between the fore and hind limbs with qPCR detection

参 考 文 献(References)

[1] Hill RE, Lettice LA. Limb Development. In: Kaufman's Atlas of Mouse Development Supplement [M]. UK: Elsevier, 2015: 193-205.

[2] Petit F, Sears KE, Ahituv N. Limb development: a paradigm of gene regulation [J]. Nat Rev Genet, 2017, 18(4): 245-253.

[3] Sheeba CJ, Logan MP. The roles of T-Box genes in vertebrate limb development [J]. Curr Top Dev Biol, 2017, 122: 355-381.

[4] Taher L, Collette NM, Murugesh D, et al. Global gene expression analysis of murine limb development [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28358.

[5] Hiscock TW, Tschopp P, Tabin CJ. On the formation of digits and joints during limb development [J]. Dev Cell, 2017, 41(5): 459-465.

[6] Havis E, Bonnin MA, Olivera-Martinez I, et al. Transcriptomic analysis of mouse limb tendon cells during development [J]. Development, 2014, 141(19): 3683-3696.

[7] Kondo T, Dollé P, Zákány J, et al. Function of posterior HoxD genes in the morphogenesis of the anal sphincter [J]. Development, 1996, 122(9): 2651-2659.

[8] Johnson KR, Sweet HO, Donahue LR, et al. A new spontaneous mouse mutation of Hoxd13 with a polyalanine expansion and phenotype similar to human synpolydactyly [J]. Hum Mol Genet, 1998, 7(6): 1033-1038.

[9] Kmita M, Tarchini B, Zàkàny J, et al. Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function [J]. Nature, 2005, 435(7045): 1113-1116.

[10] Parker SE, Mai CT, Canfield MA, et al. Updated national birth prevalence estimates for selected birth defects in the United States, 2004-2006[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2010, 88(12): 1008-1016.

[11] Logan M, Tabin CJ. Role of pitx1 upstream of tbx4 in specification of hindlimb identity [J]. Science, 1999, 283(5408): 1736-1749.

[12] Nishimoto S, Wilde SM, Wood S, et al. RA acts in a coherent feed-forward mechanism with Tbx5 to control limb bud induction and initiation [J]. Cell Rep, 2015, 12(5): 879-891.

[13] Rodriguez-Esteban C, Tsukui T, Yonei S, et al. The T-box genes Tbx4 and Tbx5 regulate limb outgrowth and identity [J]. Nature, 1999, 398(6730): 814-818.

[14] Takeuchi JK, Koshiba-Takeuchi K, Matsumoto K, et al. Tbx5 and Tbx4 genes determine the wing/leg identity of limb buds [J]. Nature, 1999, 398(6730): 810-814.

[15] Nemec S, Luxey M, Jain D, et al. Pitx1 directly modulates the core limb development program to implement hindlimb identity [J]. Development, 2017, 144(18): 3325-3335.

[16] Wanek N, Muneoka K, Holler-Dinsmore G, et al. A staging system for mouse limb development [J]. J Exp Zool, 1989, 249(1): 41-49.

[17] Sheeba CJ, Andrade RP, Palmeirim I. Getting a handle on embryo limb development: Molecular interactions driving limb outgrowth and patterning [J]. Semin Cell Dev Biol, 2016, 49: 92-101.

[18] Niederreither K, Subbarayan V, Dollé P, et al. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development [J]. Nat Genet, 1999, 21(4): 444-458.

[19] Kozhemyakina E, Ionescu A, Lassar AB. GATA6 is a crucial regulator of Shh in the limb bud [J]. PLoS Genet, 2014, 10(1): e1004072.

[20] Marcil A, Dumontier E, Chamberland M, et al. Pitx1 and Pitx2 are required for development of hindlimb buds [J]. Development, 2003, 130(1): 45-55.

[收稿日期] 2018-09-04