

李丽芳,陈露西,贾顺姬,等.Smad2/3a对斑马鱼神经嵴细胞标记基因 *crestin* 表达的影响[J].中国实验动物学报, 2019,27(4): 415 - 422.

Li LF,Chen LX,Jia SJ, et al. Effect of Smad2/3a on the expression of the neural crest cell marker *crestin* in zebrafish [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):415 - 422.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.001

Smad2/3a对斑马鱼神经嵴细胞标记基因 *crestin* 表达的影响

李丽芳^{1#},陈露西^{2#},贾顺姬^{2*},颜光玗^{1*}

(1. 南方医科大学基础医学院,发育生物学教研室,广州 510515;
2. 清华大学生命科学学院,膜生物学国家重点实验室,北京 100084)

【摘要】 目的 探讨 Smad2/3a 对脊椎动物神经嵴细胞发育的影响。**方法** 通过在斑马鱼胚胎单细胞时期显微注射 *smad2/3* 吗啉环修饰的反义寡核苷酸的方法,特异性敲降 *smad2/3* 基因的表达,至胚胎发育至 6 体节,利用整胚原位杂交检测神经嵴细胞特异性标记基因 *snail1b*,*sox10*,*foxd3* 和 *crestin* 的表达情况;通过 *casmad2* mRNA 和 *smad3a* mRNA 显微注射的方法过表达 *smad2* 和 *smad3a*,同样利用整胚原位杂交检测神经嵴细胞特异性标记基因 *crestin* 的表达情况;通过过表达 *casmad2* 及 *smad3a* 对下调 *smad2* 和 *smad3a* 的胚胎进行挽救。**结果** *smad2/3a* 被敲低后,*crestin* 的表达量显著降低,而 *snail1b*,*sox10* 和 *foxd3* 的表达量无明显变化。*smad3b* 被敲低后,*crestin*,*snail1b*,*sox10* 和 *foxd3* 的表达量均无明显变化;过表达 *casmad2* 和 *smad3a* 均可导致 *crestin* 的表达量增高;过表达 *casmad2* 和 *smad3a* 可挽救由于 *smad2/3a* 敲降所造成 *crestin* 的低表达量。**结论** Smad2 和 Smad3a 对神经嵴细胞标记基因 *crestin* 的表达具有重要作用。

【关键词】 Smad2/3a;斑马鱼;神经嵴细胞;*crestin*

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0415-08

Effect of Smad2/3a on the expression of the neural crest cell marker *crestin* in zebrafish

LI Lifang^{1#}, CHEN Luxi^{2#}, JIA Shunji^{2*}, YAN Guangyu^{1*}

(1. Department of Developmental Biology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China.

2. State Key Laboratory of Membrane Biology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084)

Corresponding author: JIA Shunji. E-mail: jiasj@mail.tsinghua.edu.cn; YAN Guangyu. E-mail:kuangyuyen@smu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the function of Smad2/3a on vertebrate neural crest cell development. **Methods** Knock-down of *smad2/3* and overexpression of *casmad2* and *smad3a* were achieved by microinjection of antisense morpholino (MO) and mRNA into one-cell stage embryos, respectively. Then, the expression of *snail1b*, *sox10*, *foxd3*, and *crestin* in MO-injected embryos and *crestin* in mRNA-injected embryos at the 6-somite stage were detected using whole-mount *in situ* hybridization. *casmad2* mRNA and *smad3a* mRNA were used to rescue *smad2* and *smad3a* morphants. **Results** Knockdown of *smad2* and *smad3a* resulted in a remarkable downregulation of *crestin*, while there were no obvious changes in the expression of *snail1b*, *sox10*, or *foxd3* in the *smad2/3a* morphants. Knockdown of *smad3b* did not inhibit the expression of

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(31522035,31371460,31522031,31571526)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31522035, 31371460, 31522031, 31571526).

【作者简介】李丽芳(1993—)女,硕士研究生。研究方向为斑马鱼胚胎早期发育。Email:lilf_16@163.com;陈露西(1989—)女,博士。研究方向为斑马鱼胚胎早期发育。Email:lucychen1234@hotmail.com。#共同第一作者

【通信作者】贾顺姬(1982—)女,副研究员。研究方向为斑马鱼胚胎发育。Email:jiasj@mail.tsinghua.edu.cn; 颜光玗(1975—)女,教授,博士生导师。研究方向为表观遗传、造血发育。Email:kuangyuyen@smu.edu.cn。*共同通讯作者

crestin, *snail1b*, *sox10*, or *foxd3*. Overexpression of *casmad2* and *smad3a* led to an upregulation of *crestin*. Overexpression of *smad2* and *smad3a* restored the reduction of *crestin* expression caused by *smad2* and *smad3a* depletion. **Conclusions** Smad2 and Smad3a play key roles in the regulation of expression levels of *crestin* during neural crest cell development.

【Keywords】 Smad2/3a; zebrafish; neural crest cell; *crestin*

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

TGF- β 超家族参与调控细胞的生长、增殖、分化、凋亡,在胚胎发生以及组织器官稳态维持的过程中发挥了至关重要的作用^[1]。TGF- β 信号传递可以通过 SMAD 信号通路^[2]和/或 DAXX 信号通路^[3]。SMAD 信号通路的转导主要是通过膜外的 TGF- β 配体结合位于膜上的 TGF- β II 型受体,活化的 TGF- β II 型受体招募、结合并磷酸化 TGF- β I 型受体,激活的 TGF- β I 型受体磷酸化下游的受体调控型 Smads (R-Smads),磷酸化的 R-Smads 与 Smad4 形成复合体进入细胞核,与各种转录因子结合来调节下游目的基因的表达^[4]。哺乳动物中,R-Smads 包括 Smad1、Smad2、Smad3、Smad5 和 Smad8,这些蛋白包含两个保守的结构域,MH1 和 MH2。N 端的 MH1 结构域主要与 DNA 结合,C 端的 MH2 结构域对于互作蛋白的结合至关重要^[5]。TGF- β 超家族包括 TGF β 1、TGF β 12、TGF β 13、激活素(activins)、抑制素(inhibins)、Nodal、骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)和生长分化因子(GDFs)等^[1],其中 Nodal 信号在脊椎动物中内胚层诱导、神经诱导和神经板的前后分化、左右不对称以及背腹轴的形成过程中具有非常重要的作用^[6]。Nodal 信号的转导依赖于下游效应因子 Smad2 和 Smad3。在小鼠中,Smad2 缺失的小鼠不能形成前端内脏内胚层(AVE)^[7],不能形成 A-P 轴^[8]。smad3 突变小鼠体型偏小,有前肢畸形的表型^[9],存在黏膜免疫缺陷,但仍可存活至成年^[10]。小鼠胚胎成纤维细胞中 smad3 缺失导致其不能形成 Smad-DNA 复合物,进而不能响应 TGF- β 信号,从而调控下游基因的转录^[9]。smad2 和 smad3 双纯合突变体不能形成中胚层和进行原肠作用^[11]。在斑马鱼中,目前没有 smad2/3 纯合突变体,但表达其显性抑制形式(*dnsmad2*、*dnsmad3a* 和 *dnsmad3b*)会导致中内胚层发育缺陷,过表达 smad3 会促进神经诱导以及神经外胚层的后部化^[12]。目前这些研究主要集中在 Smad2 和 Smad3 在中内胚层诱导以及前后轴线形成中的作用,但 Smad2/3 是否在神经嵴的发育过程中起作用,目前尚无相关报道。

神经嵴起源于神经外胚层和表皮外胚层交界

的两侧结构域。当神经外胚层汇聚到中线形成神经管后,神经嵴细胞经历上皮-间充质细胞转换,在沿着神经管的背外侧形成一个离散的间充质细胞群,随后以固定的时间和空间模式向特定组织部位迁移,最终形成多种分化的细胞类型,包括周围神经元、胶质细胞、色素细胞和颅面骨骼细胞等^[13]。神经嵴细胞的诱导发生主要受到 BMP、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、Wnt、Notch 等多种信号的调节^[14]。这些信号以及其他转录因子,共同组成基因调控网络,调控神经嵴的早期诱导发生、神经嵴祖细胞的维持、神经嵴祖细胞的上皮间充质转换以及通过不同通路向特定细胞的分化过程等。其中,Foxd3 和 Snail 在早期诱导完成到神经嵴边界祖细胞确定过程中发挥了重要作用,同时其与 Sox9 共同在神经嵴祖细胞多能性维持以及祖细胞从神经管分离过程有一定的功能。此外,Sox9 还与 Sox10 在神经嵴细胞终末分化过程中有作用^[15]。这些转录因子是神经嵴细胞的标记基因,仅在迁移前神经嵴细胞中表达^[16]。与这些基因不同,*crestin* 在神经嵴前体细胞以及分化细胞中均有表达,其可以被用来较灵敏地评估神经嵴细胞或多或少的变化^[13]。

目前,有一些研究结果提示 Smad2 以及 Smad3 可能在神经嵴细胞的发育中存在一定的功能,如:斑马鱼胚胎中 *smad3a* 在迁移的躯干神经嵴细胞中表达^[17],小鼠胚胎中 *smad2* 杂合突变可导致颅面缺损^[18]等。本研究以斑马鱼作为模式动物,利用吗啉环修饰的反义寡核苷酸(antisense morpholino oligonucleotide, MO)技术敲降斑马鱼 *smad2* 和 *smad3* 基因的表达,通过原位杂交检测神经嵴细胞标记基因的表达来初步探究 Smad2/3 在神经嵴细胞发育过程中的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验中所用到的斑马鱼品系为 Tuebingen (TU)。野生型胚胎置于 Holtfreter 水(0.025 g/L 碳

酸氢钠,0.1 g/L 无水氯化钙,0.05 g/L 氯化钾,3.5 g/L 氯化钠,pH 值 6.8~7.2)中,于 28.5℃ 培养至特定期时。

1.1.2 主要试剂和仪器

RNeasy Mini 纯化回收试剂盒(Qiagen,# 74104,美国),DNA 纯化回收试剂盒(# DP214,天跟生化科技有限公司,北京),GoScript 随机引物反转录试剂盒(Promega,# A2790,北京照生莱博商贸有限公司),mMESSAGE mMACHINE T7/SP6 转录酶试剂盒(Ambion,# AM1345/AM1340,美国),地高辛标记 RNA 试剂盒(Roche,# 11175025910,美国),BamH I (NEB,# R3136S,美国),Not I (NEB,# R3189S,美国),封闭剂(Roche,# 11096176001 美国),左旋咪唑(Sigma,# 16595-80-5,美国),地高辛抗体(Roche,# 11093274910),BM Purple AP (Roche,# 11442074001,美国),徕卡体视显微镜(M125 C,德国)。

1.2 方法

1.2.1 反义寡核苷酸的设计与合成

根据 *smad2* 的前体 mRNA 序列设计 2 个反义寡核苷酸,其中 MO1 序列位于第 4 个外显子和第 4 个内含子的交接处,MO2 序列位于第 4 个内含子和第 5 个外显子交接处。序列分别为 *smad2*-MO1(简称 *smad2* SM1): 5'-CAATTTCCATACCTGGTG TCTCCAC-3', *smad2*-MO2(简称 *smad2* SM2):5'-AAGAACTACAGGAGAGAAGATTAAA-3'。MO 由 GeneTools 公司合成,合成好的 MO 粉末用无核酸酶的纯水溶解成 20 μg/μL 的贮液,-80℃ 冻存。使用时将 MO 稀释到合适浓度进行显微注射。*smad3a/b* MO 和 *p53* MO 的序列和信息详见已报道的文献^[12]。

1.2.2 检测 MO 效率的引物设计

根据斑马鱼 *smad2* 基因的核酸序列,分别在 MO 所在区域的上下游约 150 bp 处设计检测引物。同时为了确定 *smad2* SM1 和 *smad2* SM2 共同注射是否会使得敲降效率更高,上游引物设计在第 3 个外显子,下游引物位于第 6 个外显子。阳性对照引物位于第 2 个外显子上。序列信息如表 1 所示。

1.2.3 胚胎总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

本研究使用 RNeasy Mini 试剂盒提取胚胎总 RNA,其后使用随机引物反转录试剂盒制备 cDNA。提取总 RNA 需取 15~30 枚处于 6 体节时期经过不同处理的胚胎,用蛋白酶脱去绒毛膜,再用 DEPC 水

清洗两次后,加入 600 μL 裂解液 RLT 和 24 μL 二硫苏糖醇(DTT,1 mol/L),涡旋振荡使细胞充分裂解,直至无肉眼明显可见的颗粒。后续的详细步骤以及 cDNA 合成步骤参见产品说明书。

表 1 *smad2* MO 有效性验证的引物名称及序列

MO validity detection	
引物名称 Primer names	核酸序列(5' to 3') Nucleic acid sequences
SM1-FP	GACGGGCGTTTGCAAGTGCTCTC
SM1-RP	GAGACAAGTGACGTCAACCTCAATAATGGG
SM2-FP	TAGAGCAACTGCGCCGTCATAGCAATG
SM2-RP	GCTCGATCCCTGTTGGGAAGTTGG
MO-FP	CGATAGAACAGTGGGATACCTCAGG
MO-RP	GATTCATTGCTGCTCACTGGCC
ctrl-FP	CTCCCCATTCTCTAGCCTCCATCTG
ctrl-RP	TGGTGTTCGCGTTTGTGTGTTG
<i>actin</i> -FP	ATGGATGATGAAATTGCCGCAC
<i>actin</i> -RP	ACCATCACCAGAGTCCATCACG

1.2.4 体外合成 mRNA 及纯化回收

用于体外合成 *casmad2* mRNA 和 *smad3a* mRNA 的质粒信息详见之前的报道^[12, 19]。提取 12 μg 质粒用相应的限制性内切酶切割,纯化后获得线性化 DNA 模板,然后体外合成 mRNA,并将 mRNA 纯化回收,于-80℃ 保存。体外合成 mRNA 及 mRNA 的纯化回收的具体步骤参见产品说明书。

1.2.5 MO 和 mRNA 的显微注射

smad2 SM1 的注射剂量为 5 ng,SM2 的注射剂量为 5 ng;*smad3a/b* MO 的注射剂量均为 5 ng;*p53* MO 的注射剂量为 5 ng;*casmad2* mRNA 的注射剂量为 5 pg;*smad3a* mRNA 的注射剂量为 20 pg。将合成的 MO 及 mRNA 注射到斑马鱼单细胞时期的受精卵中,待胚胎发育至 6 体节时,用蛋白酶脱去绒毛膜,甲醛固定过夜后,梯度脱水(25%,50%,100%,100%)于甲醇中,-20℃ 保存备用。

1.2.6 斑马鱼整胚原位杂交

选取 *crestin*, *snail1b* 和 *foxd3* 基因靠近 3' UTR 区域的一段 cDNA 序列作为探针的模板。设计引物用于模板的扩增,其中下游引物 5' 端有 T7 启动子序列,序列信息如表 2 所示。扩增后的产物经回收后可直接用于合成地高辛标记的反义 RNA 探针。合成的探针用原位杂交液 HYB⁺(50% 甲酰胺,5 × SSC,0.1% Tween-20,0.5 mg/mL 酵母 RNA,0.05 mg/mL 肝素)稀释到 1.5% 使用。探针使用之前,需于 72℃ 变性处理 10 min。*sox10* 探针的序列信息详见已报道的文献^[20]。

杂交第 1 天,取大约 30 枚胚胎到无核酸酶的 EP 管中,用配制在 DEPC 水中的 PBST 溶液梯度水化,水化后置换成 1 mL 4%多聚甲醛,室温固定 20 min。然后用 1 mL PBST 溶液洗涤二次,每次 5 min。吸走 PBST 溶液,加入 300 μ L 65℃预热的 HYB⁻ (50%甲酰胺,5 $\times$ SSC,0.1% Tween-20) 溶液,65℃放置 5 min;再置换成 300 μ L HYB⁺ 溶液,65℃预杂交 3~4 h。将探针稀释,于 72℃变性 10 min 后,立即置于冰上,用 100 μ L 探针稀释液置换 HYB⁺ 溶液,65℃水浴杂交 12~16 h。第 2 天吸出探针,-20℃保存并可重复使用。胚胎用洗液 I (50%甲酰胺,2 $\times$ SSC,0.1% Tween-20) 65℃洗 2 次,每次 30 min,之后置换成 2 $\times$ SSCT 溶液于 65℃洗涤胚胎 15 min。然后依次用 0.2 $\times$ SSCT 溶液和 0.02 $\times$ SSCT 溶液洗涤胚胎 4 次,每个浓度两次,每次 30 min。然后置换成 MABT 溶液,室温放置 5 min,重复一次后,换成封闭液(灭活山羊血清、10%封闭剂和 MABT 按照

1:2:7比例混合),室温孵育 1 h。之后,置换成抗体孵育液(碱性磷酸酶标记的地高辛抗体按 1:3000 的比例稀释于封闭液中),4℃孵育 12~16 h。第 3 天,吸走抗体孵育液,加入含 10%灭活山羊血清的 MABT 溶液,室温摇动 30 min;置换成 MABT 溶液,摇动 30 min,再重复 2 次,时间依次为 1 h 和 30 min。之后置换成染色缓冲液(100 mmol/L 氯化钠,50 mmol/L 氯化镁,100 mmol/L Tris-Cl,1 mmol/L 左旋咪唑和 0.1% Tween-20),室温放置 5 min,重复 3 次。然后将胚胎转移至 48 孔板中,除去染色缓冲液,加入 200 μ L 底物,用锡箔纸包裹后于室温反应。每 30 min 取出观察显色结果。待显色充分后,吸走底物,用 PBST 溶液洗涤两次,然后置换成 4%多聚甲醛,4℃放置过夜以终止反应。用 PBST 溶液洗涤胚胎两次后,置换成甘油,待胚胎完全浸润后在徕卡体式显微镜下进行拍照。

表 2 合成探针模板的引物名称及序列

Table 2 Primer names and sequences of the synthetic probe templates

引物名称 Primer names	核酸序列(5' to 3') Nucleic acid sequences
<i>crestin</i> -FP	GAGAAGCCCTCATCAGAGAGTTTG
<i>crestin</i> -RP	TAATACGACTCACTATAGGGGTTCCTGTGCAGGCAGAATCAGG
<i>snail1b</i> -FP	CGAGGGGATATTACAAAGATGCCACGCTCATTTCTTG
<i>snail1b</i> -RP	TAATACGACTCACTATAGGGCATTTAGTCACTGAGGCGGTGTGTGTCCAC
<i>foxd3</i> -FP	AGCGACAGTCCCTGCGAGAGCAAC
<i>foxd3</i> -RP	TAATACGACTCACTATAGGGATTGAGAAGGCCATTTGCATACCGCTGCT

2 结果

2.1 利用 MO 抑制 *smad2* 的表达

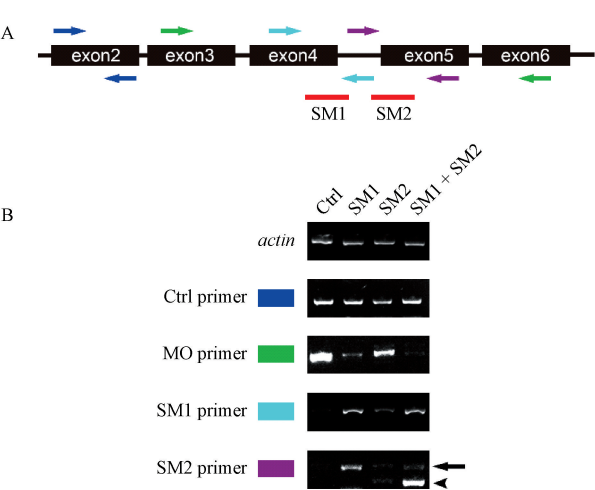
根据 *smad2* 的基因结构,本研究设计了两条针对性干扰 *smad2* 第 4、5 外显子剪接的 MO,分别命名为 SM1 和 SM2。为了确定 *smad2* SM1 和 SM2 是否可以干扰其正确剪接过程,从而下调 *smad2* 基因的表达,我们提取了未注射和不同注射组胚胎的总 RNA,反转录得到 cDNA,并通过不同位置的检测引物对目的片段扩增(引物位置如图 1A 所示)。

核酸凝胶电泳显示注射 SM1 和 SM2 后,*smad2* 前体 mRNA 的剪接被破坏。其中,*actin* 引物扩增的目的条带大小和亮度在各个样品中一致,表明各样品间总 RNA 的量一致;阳性对照引物扩增的条带在各处理组间基本一致,表明 *smad2* mRNA 的总量变化不大;与未注射组相比,在不同 MO 注射组中,MO 引物扩增的目的条带相对较少,表明 *smad2* 第 4 和 5 号外显子正确剪接的比率降低,其中 SM1 的效率

高于 SM2,并且 SM1 与 SM2 共注几乎可以阻止 *smad2* 进行正确剪接;在 MO 注射组中,SM1 与 SM2 引物扩增出非正确剪接的条带,表明 4 号内含子被保留下来,从而干扰正常 *smad2* mRNA 的表达(如图 1B 所示)。

2.2 *p53* MO 不会影响神经嵴细胞的发育

由于注射 MO 可能会引起 *p53* 信号通路的激活,进而导致细胞凋亡等非特异性表型的出现^[21]。并且之前的文献表明与 *p53* MO 共同注射可以挽救 *smad3* MO 引起的凋亡表型^[12]。为此,我们注射 *p53* MO 至单细胞受精卵中,通过原位杂交检测神经嵴细胞标记基因 *snail1b*,*sox10*,*foxd3* 及 *crestin* 的表达情况。结果显示,与野生型胚胎相比,注射 *p53* MO 的胚胎 *snail1b*,*sox10*,*foxd3* 和 *crestin* 的表达量均无明显变化(图 2),表明 *p53* 的敲低并不会影响神经嵴细胞的发育。因此,在接下来的研究中,为了避免非特异的调亡现象,我们注射 *smad2* MO 以及 *smad3a/b* MO 的同时,均会与同浓度的 *p53* MO 共注射。



注:A. *smad2* SM1/2 有效性验证引物设计示意图。青色引物和紫色引物分别用于检测单独注射 SM1 和 SM2 的有效性,绿色引物用于检测 SM1 和 SM2 共同注射的有效性,蓝色引物作为阳性对照。红色短线标明 SM1 和 SM2 的结合位置。B. DNA 电泳结果显示 SM1/2 对 *smad2* mRNA 剪接正确性的影响。箭头表示目的条带,三角箭头表示新出现的剪接体。

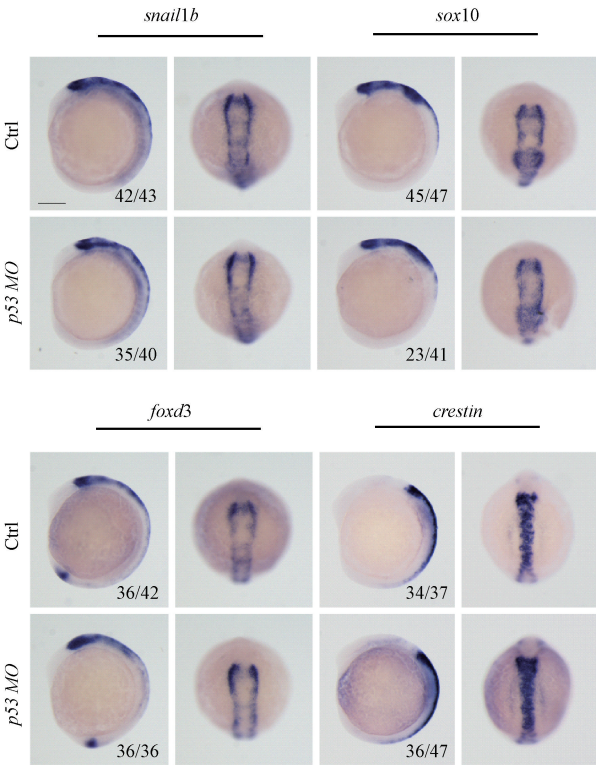
图 1 *smad2* SM1 和 SM2 有效性检测

Note. A. Schematic design of the *smad2* SM1/2 primer validation. Cyan primers and purple primers were used to detect the effectiveness of SM1 and SM2 injection alone, green primers were used to detect the effectiveness of SM1 and SM2 injection together, and blue primers were used as positive control. The red short line indicated the combination position of SM1 and SM2. B. DNA electrophoresis results showed that SM1/2 affected the splicing accuracy of *smad2* mRNA. The arrow represented the target band, and the triangular arrow showed the emerging splice.

Figure 1 Validity detection of the *smad2* SM1 and SM2

2.3 敲低 *smad2/3* 对不同神经嵴细胞标记基因的影响

为了探究 Smad2/3 对神经嵴细胞发育的影响,我们分别将 *smad2* SM1、*smad2* SM2、*smad3a* MO 和 *smad3b* MO 注射到野生型斑马鱼单细胞期的受精卵中,待胚胎发育至 6 体节时通过原位杂交检测神经嵴细胞标记基因 *snail1b*、*sox10*、*foxd3* 和 *crestin* 的表达情况。原位杂交结果显示,*smad2/3a* 被敲低后,*crestin* 的表达量显著降低,*snail1b*、*sox10* 和 *foxd3* 的表达量无明显变化;*smad3b* 被敲低后,*snail1b*、*sox10*、*foxd3* 和 *crestin* 的表达量均无明显变化(图 3)。*crestin* 是斑马鱼中特异标记所有神经嵴细胞的标志基因,其表达量的显著降低预示 *smad2/3a* 敲低使得神经嵴细胞发育异常。因此,在接下来的实验中,我们选择神经嵴细胞标记基因 *crestin* 作为研究对象探究 Smad2/3a 对神经嵴细胞发育的影响。



注:6 体节时期神经嵴细胞标记基因的原位杂交结果 (bar = 200 μ m)。(下图同)

图 2 *p53* MO 不会影响神经嵴细胞的发育

Note. In situ hybridization of marker genes of neural crest cells at 6-somite stage (bar = 200 μ m). (The same in the following figures)

Figure 2 *p53* MO does not affect the development of neural crest cells

2.4 敲低 *smad2/3a* 会特异抑制 *crestin* 表达

为了探究 Smad2 和 Smad3a 对神经嵴细胞发育的影响,我们分别将 *smad2* SM1/SM2 和 *smad3a* MO 注射到野生型斑马鱼单细胞期的受精卵中,待胚胎发育至 6 体节时检测 *crestin* 的表达情况。原位杂交结果表明 *smad2/3a* 敲低使 *crestin* 表达下降,与前面的结果保持一致(图 4)。为了进一步确定 Smad2 和 Smad3a 对 *crestin* 的影响是否特异,本研究通过体外合成了 *casmad2* mRNA 和 *smad3a* mRNA,分别在单细胞时期注入野生型胚胎,6 体节时通过原位杂交检测 *crestin* 的表达情况。*caSmad2* 是持续激活形式的 Smad2,该突变体不含有 MH1 结构域,其位于羧基端的丝氨酸-甲硫氨酸-丝氨酸(SMS)基序被突变为天冬氨酸-甲硫氨酸-天冬氨酸(DMD)基序,以此来模拟 Smad2 被受体激活的磷酸化状态。之前的研究表明在斑马鱼中,过表达全长的 *smad2* 不会对胚胎造成任何影响,但过表达 *casmad2* 则导致严重的背部化和第二体轴的形成^[17],表明 *caSmad2* 是

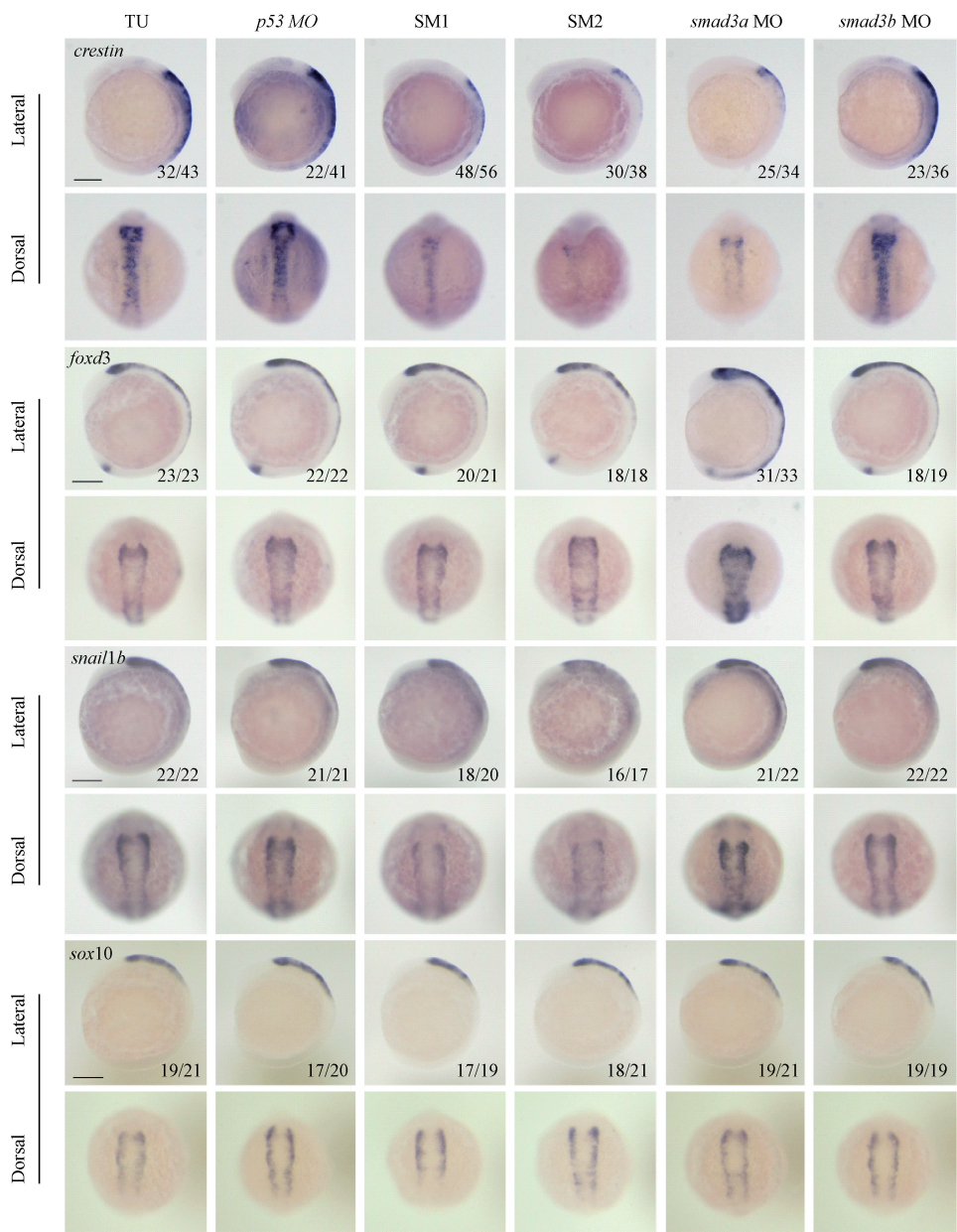


图 3 敲低 *smad2/3a* 对不同神经嵴细胞标记基因的影响

Figure 3 Effect of *smad2/3* knockdown on the expression of marker genes in different neural crest cells

Smad2 的持续激活形式,可以更有效的激活下游信号传导。结果显示,注射了 *casmad2* mRNA 和 *smad3a* mRNA 后,*crestin* 的表达量升高(图 4)。敲低和过表达 *smad2/3a* 对 *crestin* 的表达产生相反的结果,由此我们推测 Smad2/3a 特异性地调控 *crestin* 的表达。

2.5 过表达 *casmad2* 和 *smad3a* 可拯救 *smad2/3a* 敲降所导致 *crestin* 的低表达

为了确定 *crestin* 的低表达是由 *smad2* 及 *smad3a* 基因敲降直接造成的,我们分别将 *smad2* SM1/SM2 和 *casmad2* mRNA 及 *smad3a* MO 和

smad3a mRNA 共注射到野生型斑马鱼单细胞期的受精卵中。待胚胎发育到 6 体节时,通过原位杂交检测 *crestin* 的表达是否被挽救。结果显示,与单独注射 MO 的胚胎相比,MO 和 mRNA 共注射胚胎中 *crestin* 的表达量基本可以回归到野生型胚胎的水平(图 5),进一步表明 Smad2 和 Smad3a 在神经嵴细胞的发育过程中特异性地调控 *crestin* 的表达。

3 讨论

神经嵴起源于神经板的边界,其诱导发生、分化和迁移受到一系列转录因子的调控,如 Snail,

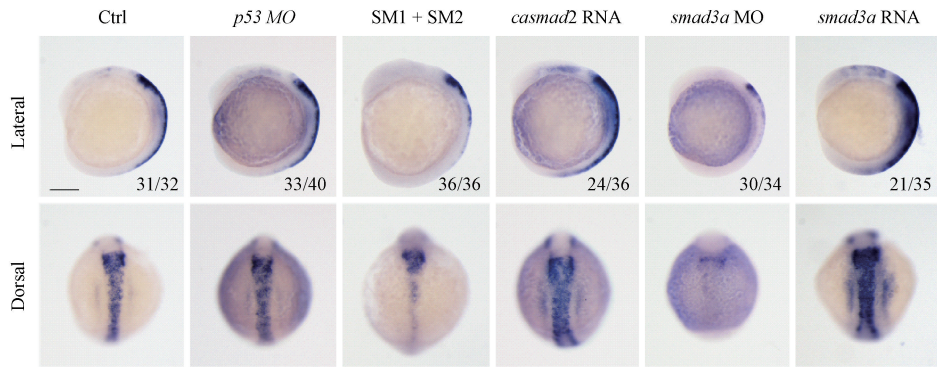


图 4 *smad2/3a* 特异性地调控 *crestin* 的表达
Figure 4 *smad2/3a* specifically regulates the expression of *crestin*

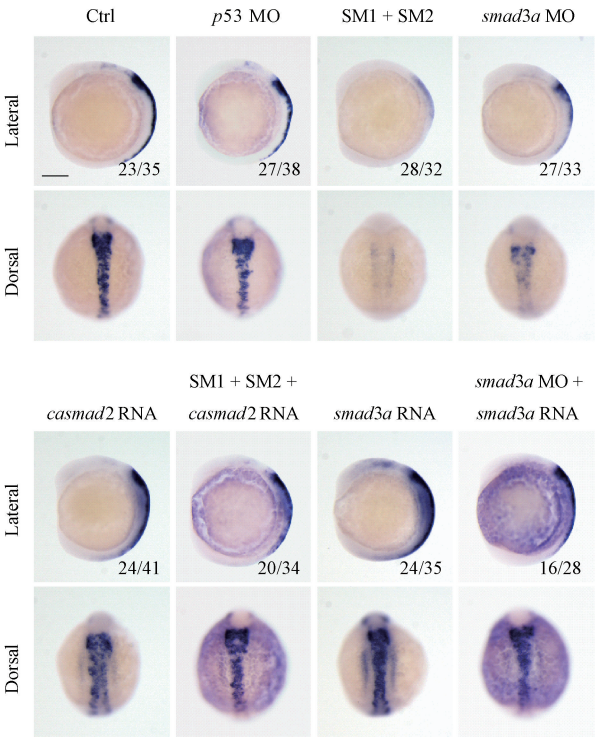


图 5 过表达 *casmad2* 和 *smad3a* 可拯救 *smad2/3a* 敲降所导致 *crestin* 的低表达
Figure 5 Overexpression of *casmad2* and *smad3a* rescues the down-regulation of *crestin* caused by *smad2/3a* MO injection

Sox9, Sox10, Foxd3 等^[16]。Foxd3 在维持神经嵴细胞祖细胞未分化状态发挥了重要作用, *foxd3* 突变体胚胎存在严重的颅面畸形、色素较少的表型, 其缺失导致 *sox10*, *sox9b*, *snail1b* 和 *crestin* 的表达均下调^[22]。Sox9b 对颅骨神经嵴细胞迁移过程有影响, 缺失 *sox9b* 导致胚胎仅有较少的软骨细胞, 而且 *sox9b* 的表达减少或增加都会影响 *sox10*, *snail1b*, *foxd3* 和 *crestin* 的正常表达^[23]。Sox10 在躯干和迷走神经嵴细胞分化迁移过程中有一定的作用, 缺失 *sox10* 的突变体胚胎缺乏色素, 神经嵴细胞在迁移过

程中凋亡^[24]。Snail1b 表达量的增加或减少导致神经嵴区域增加或神经嵴细胞分化迁移受阻, 同时 *snail1b* 可直接调控神经嵴细胞的上皮间充质转换过程, 进而影响神经嵴细胞的发育^[25]。本研究结果显示敲低 *smad2/3a* 后, 6 体节时期胚胎中 *foxd3*, *snail1b* 和 *sox10* 的表达量变化并不明显, 可能是因为 Smad2/3a 对于这些转录因子并没有直接调控作用, 或者是需要其他信号通路的协同作用, 单一信号通路的抑制并不会使这些转录因子的表达受到明显影响。而 *crestin* 有可能可以受到 *smad2/3a* 的直接调控。当然, 要更进一步探究 Smad2/3a 对神经嵴细胞发育的影响, 如对色素细胞、软骨细胞等形成的调控, 我们需收集 10~12 体节甚至更晚时期 *smad2/3a* 敲低、甚至是相应基因敲除的胚胎, 检测上述神经嵴细胞标记基因及下游分化细胞标记基因的表达, 确定 Smad2/3a 在神经嵴细胞发育中的功能。

smad2/3a 的表达被敲低后, *crestin* 的表达显著降低, 而且这种低表达可以被 *smad2/3a* 的过表达所挽救, 意味着 *smad2/3a* 调控 *crestin* 的表达是特异地, 为此我们通过生物信息学手段分析了 *crestin* 的启动子序列, 发现 *crestin* 启动子序列中存在着 Smad2/3a 的潜在结合区, 说明 Smad2/3a 可能通过与 *crestin* 启动子直接相互作用, 从而调控 *crestin* 的表达, 这种相互作用需要进一步的 ChIP 实验来验证。此外, 之前的研究表明在 *crestin* 的启动子区域存在包含 *sox10* 在内的多个转录因子结合位点, 突变 *sox10* 结合位点导致转基因鱼 *Tg(crestin:EGFP)* 的绿色荧光表达显著降低, 说明 *crestin* 受到 *sox10* 等多种神经嵴转录因子的调控^[26]。经过分析, 我们确实发现在 *crestin* 启动子区还存在 Sox 家族蛋白的潜在结合位点, 说明 Sox 可能作为上游调控因子参与调控 *crestin* 的表达。在爪蟾中, Smad3 与含有高迁移率 (HMG) 结构域的淋巴增强剂结合因子 1/T 细胞特异性因子 (LEF1/

TCF)存在物理相互作用^[27],而 Sox9 是含有 HMG 域的转录因子,提示 Smad3a 可能与 Sox9b 存在相互作用,共同调控 *crestin* 的表达,但这需要通过免疫共沉淀实验来证明。

斑马鱼胚胎神经嵴细胞的发育受一系列信号通路和转录因子的调控,其中任何一因子功能的缺失都会导致胚胎发育异常。本研究首次证实 Smad2/3a 对神经嵴细胞特异性标记基因 *crestin* 的表达有调控作用,这为后续进一步研究 Smad2/3a 或其介导的 TGF- β 信号通路在神经嵴细胞发育过程中的功能奠定了基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Keller B, Yang T, Chen Y, et al. Interaction of TGF β and BMP signaling pathways during chondrogenesis [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16421.
- [2] Heldin CH, Miyazono K, Ten Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins [J]. Nature, 1997, 390(6659): 465-471.
- [3] Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, et al. TGF- β -induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation [J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(8): 708-714.
- [4] Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease [J]. N Engl J Med, 2000, 342(18): 1350-1358.
- [5] Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus [J]. Cell, 2003, 113(6): 685-700.
- [6] Shen MM. Nodal signaling: developmental roles and regulation [J]. Development, 2007, 134(6): 1023-1034.
- [7] Brennan J, Lu CC, Norris DP, et al. Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo [J]. Nature, 2001, 411(6840): 965-969.
- [8] Waldrup WR, Bikoff EK, Hoodless PA, et al. Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo [J]. Cell, 1998, 92(6): 797-808.
- [9] Datto MB, Frederick JP, Pan L, et al. Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(4): 2495-2504.
- [10] Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, et al. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta [J]. EMBO J, 1999, 18(5): 1280-1291.
- [11] Dunn NR, Vincent SD, Oxburgh L, et al. Combinatorial activities of Smad2 and Smad3 regulate mesoderm formation and patterning in the mouse embryo [J]. Development, 2004, 131(8): 1717-1728.
- [12] Jia S, Ren Z, Li X, et al. smad2 and smad3 are required for mesendoderm induction by transforming growth factor - β /nodal signals in zebrafish [J]. J Biol Chem, 2008, 283(4): 2418-2426.
- [13] Luo R, An M, Arduini BL, et al. Specific pan-neural crest expression of zebrafish Crestin throughout embryonic development [J]. Dev Dyn, 2001, 220(2): 169-174.
- [14] Huang X and Saint-Jeannet JP. Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge [J]. Dev Biol, 2004, 275(1): 1-11.
- [15] Sauka-Spengler T, Bronner-Fraser M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(7): 557-568.
- [16] Gammill LS, Bronner-Fraser M. Neural crest specification: migrating into genomics [J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(10): 795-805.
- [17] Dick A, Mayr T, Bauer H, et al. Cloning and characterization of zebrafish smad2, smad3 and smad4 [J]. Gene, 2000, 246(1-2): 69-80.
- [18] Nomura M, Li E. Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development [J]. Nature, 1998, 393(6687): 786-790.
- [19] Liu X, Xiong C, Jia S, et al. Araf kinase antagonizes Nodal-Smad2 activity in mesendoderm development by directly phosphorylating the Smad2 linker region [J]. Nat Commun, 2013, 4: 1728.
- [20] Zheng X, Yang S, Han Y, et al. Loss of zygotic NUP107 protein causes missing of pharyngeal skeleton and other tissue defects with impaired nuclear pore function in zebrafish embryos [J]. J Biol Chem, 2012, 287(45): 38254-38264.
- [21] Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, et al. p53 activation by knockdown technologies [J]. PLoS Genet, 2007, 3(5): e78.
- [22] Montero - Balaguer M, Lang MR, Sachdev SW, et al. The mother superior mutation ablates foxd3 activity in neural crest progenitor cells and depletes neural crest derivatives in zebrafish [J]. Dev Dyn, 2006, 235(12): 3199-3212.
- [23] Yan YL, Willoughby J, Liu D, et al. A pair of Sox: distinct and overlapping functions of zebrafish sox9 co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development [J]. Development, 2005, 132(5): 1069-1083.
- [24] Dutton KA, Pauliny A, Lopes SS, et al. Zebrafish colourless encodes sox10 and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates [J]. Development, 2001, 128(21): 4113-4125.
- [25] Gammill LS, Bronner-Fraser M. Neural crest specification: migrating into genomics [J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(10): 795-805.
- [26] Kaufman CK, Mosimann C, Fan ZP, et al. A zebrafish melanoma model reveals emergence of neural crest identity during melanoma initiation [J]. Science, 2016, 351(6272): aad2197.
- [27] Labbé E, Letamendia A, Attisano L. Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor- β and Wnt pathways [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2000, 97(15): 8358-8363.

[收稿日期] 2019-03-04