

BHC80 基因抑制对斑马鱼胚胎 红细胞发育的影响

侯嘉云 蒋 璆 张 洁 谭 理 宋后燕*

(复旦大学分子医学教育部重点实验室, 上海 200032)

摘要 胚胎整体 RNA 原位杂交显示, *BHC80* 基因表达主要集中在中枢神经系统部位. 应用吗啡啉修饰的反义寡核苷酸技术抑制 *BHC80* 基因表达, 显示胚胎红细胞减少并堆积在 PBI 区, 用胚胎期红细胞标志 $\beta e3$ globin 以及造血过程中的重要转录因子 *gata1*、*c-myb*、*lmo2* 的胚胎整体 RNA 原位杂交实验显示, *BHC80* 基因表达下调使 *gata1* 标记胚胎红系前体细胞增殖增多并且分化延迟, 导致红细胞减少和 PBI 区红细胞堆积. 血管内皮标志基因 *flk-1* 的 RNA 探针原位杂交和荧光显微造影显示, *BHC80* 基因表达下调组血管与对照组相比清晰可见无明显差异.

关键词 斑马鱼, *BHC80*, 红细胞发育, 整体原位杂交
学科分类号 Q3, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00301

BHC80 是组蛋白去乙酰基酶复合物(histone deacetylase complex, BHC)的一个约 80 ku 的组分, BHC 复合物参与非神经细胞中神经特异性基因的转录抑制, 使靶基因启动子从转录活化状态向转录抑制状态转变, 该过程包括组蛋白赖氨酸 H3K9 去乙酰化、H3K4 去甲基化和 H3K9 甲基化. BHC80 含有三种结构域: 亮氨酸拉链结构域(leucine zipper domains)、AT 钩状结构域(AT hook domain)和 PHD 结构域(plant homeodomain /leukemia-associated protein domain). BHC80 的 PHD 结构域能够结合 BHC 复合物的其他组分而成为该复合物的骨架蛋白, 组织 BHC 复合物的转录抑制功能^[1]. 组蛋白甲基化是一个动态调节过程, 甲基化酶和去甲基化酶在不同条件下可以结合同一个靶基因启动子^[2]. BHC80 通过 PHD 结构域结合 H3K4me1/2 去甲基后的产物 H3K4me0, 帮助维持组蛋白赖氨酸特异性去甲基酶 1(lysine specific demethylase 1, LSD1)与靶基因启动子的结合而阻止 H3K4me0 重新甲基化成 H3K4me1/2, 因而 BHC80 参与 BHC 复合物基因转录抑制功能^[3].

BHC80 主要表达于小鼠的整个中枢神经系统和睾丸的精母细胞中^[4], *BHC80* 基因敲除导致哺乳动物胚胎出生后不久死亡^[4], 无法深入研究其生理

功能, 而斑马鱼体型较小, 可通过渗透作用提供氧气和营养, 即使心血管和造血系统严重障碍也可以存活较长时间, 斑马鱼造血相关转录因子与哺乳动物具有高度的同源性, 而斑马鱼胚胎有在母体外发育、胚胎透明、便于实时观察血细胞发育的全过程等优势, 特别适合于胚胎缺血的研究^[5,6].

血细胞发育是一个极其复杂的过程, 脊椎动物有两次胚胎造血: 原始造血和定向造血, 两次造血的转换伴随着造血解剖位置的改变. 斑马鱼原始造血中的原始造血细胞不经过多能祖细胞阶段而直接成为成熟的血细胞, 原始造血发生在两个区域: 第一个区域位于胚胎前部的侧板中胚层; 第二个区域在脊索和躯干中胚层之间, 称为中间细胞群(intermediate cell mass, ICM). 原始巨噬细胞是第一个出现的造血细胞, 起源于斑马鱼胚胎前部的侧板中胚层, 然后迁移到卵黄囊, 最后在受精后 18 h (18 hours post-fertilization, 18 hpf)遍及胚胎全身. ICM 相当于哺乳动物的卵黄囊, 呈带状结构, 起源于腹侧及外侧中胚层, ICM 含有的原始红细胞

* 通讯联系人.

Tel: 021-54237739, E-mail: hysong@shmu.edu.cn

收稿日期: 2009-05-08, 接受日期: 2009-08-03

在 24 hpf 进入血液循环。斑马鱼的定向造血发生在两个区域：第一个区域位于尾部血岛 (posterior blood island, PBI)，第二个区域位于大动脉 - 性腺 - 中肾区 (aorta, gonads and mesonephros, AGM)。最初的定向造血是 PBI 区产生红系髓系祖细胞 (erythromyeloid progenitors, EMPs)，而且 EMPs 一过性出现于 24~48 hpf 斑马鱼胚胎。定向造血的顶峰是 AGM 区产生多能造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs)^[7]。

我们用吗啡啉修饰的反义寡核苷酸技术抑制 *BHC80* 基因表达，用 *o*-邻联茴香胺 (*o*-dianisidine) 染色的方法观察胚胎红细胞的分布，用胚胎期红细胞标志 *β e3 globin* 以及造血过程中的重要转录因子 *gata1*、*c-myb*、*lmo2*，通过胚胎整体 RNA 原位杂交实验观察 *BHC80* 基因表达下调对斑马鱼血细胞发育的影响，对阐明 *BHC80* 在血细胞发育方面的机制有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物

野生型斑马鱼 (AB* 品系) 从国际斑马鱼资源中心引进，斑马鱼养殖系统从美国 Aquatic Habitats 公司引进，喂养方案按照 Zebrafish Book 描述进行^[8]。

1.2 显微注射

为了有效抑制 *BHC80* 基因表达，针对斑马鱼 *BHC80* 第 9 内含子和第 10 外显子区域序列设计出的剪接吗啡啉修饰的反义寡核苷酸 (MO, morpholino-modified antisense oligonucleotides)，*BHC80*-MO：5' AGTTTCTGATGGAAACAGCAAA GGA 3' (与美国 GENE TOOLS, LLC 公司共同设计和制备)，能够与第 9 内含子和第 10 外显子交界区域结合，使剪接后的 *BHC80* 缺少第 10 外显子，而第 10 外显子是其 PHD 功能结构域的重要组成部分，从而使 *BHC80* 肽链缺少 PHD 结构域。*BHC80*-MO 稀释在 1×Danieau 缓冲液中，在单细胞或双细胞期的野生型胚胎中注射，注射量为每个胚胎 8 ng。为了验证吗啡啉抑制 *BHC80* 的有效性，我们用 RT-PCR 方法验证 *BHC80*-MO 的效果。PCR 反应条件：94℃ 5 min；94℃ 45 s，55℃ 45 s，72℃ 45 s，30 个循环；72℃ 7 min。反应结束后取 10 μl，2% 琼脂糖凝胶电泳，鉴定 PCR 产物。正向引物：5' TGTGAAACCACAG GGAGGAC 3'，逆向引物：5' CTCTTCCTGGTGCCTTGATG 3'。

1.3 形态学观察

在 Olympus 解剖显微镜下观察斑马鱼胚胎发育的全过程，并进行活体摄影。在各观察时点计数胚胎存活情况及畸形数，观察胚胎发育及血液循环情况。

1.4 *o*-dianisidine 染色

o-dianisidine 染色用于检测胚胎血红蛋白表达。将胚胎去除绒毛膜，置于固兰染液 (0.6 g/L 固兰、0.01 mol/L 醋酸钠、0.65% 过氧化氢、40% 乙醇) 中避光显色 5 min，放于显微镜下观察。

1.5 整体原位杂交

取不同发育时期的胚胎，用 1×PBST 溶液洗去多余的甲醇溶液，蛋白酶 K 消化，将胚胎置于 65℃ 水浴进行预杂交 3 h，然后加入所合成的反义 RNA 探针 65℃ 水浴杂交过夜。多余的探针用 0.2×SSC 溶液洗去，加入 anti-Dig-AP (购于 Roche 公司) 与反义 RNA 探针结合过夜。未结合的抗体用 1×PBST 溶液洗去，再加入 BCIP/NBT/NTMT 溶液显色 30 min，迅速用 1×PBST 溶液洗去多余的显色液，在显微镜下观察拍照并记录结果。

1.6 荧光显微造影

斑马鱼胚胎 0.02% tricaine (0.02% tricaine 溶于 Ringer's 溶液，tricaine 购于 Sigma-Aldrich 公司) 麻醉后，转移到 1.5% 琼脂糖凝胶槽中固定，胚胎浸入 Ringer's 溶液。从静脉窦显微注入荧光素 (fluorescein isothiocyanate dextran)。用 Olympus BX61 显微镜观察，DP70 数码相机拍照。

2 结果与分析

2.1 *BHC80* 基因的表达

为了研究 *BHC80* 基因的功能，我们首先检测其在斑马鱼发育过程中的表达谱。胚胎整体原位杂交显示，*BHC80* 基因 12 hpf 开始在斑马鱼脊索表达，18 hpf 开始在前脑、中脑、小脑和后脑表达，24 hpf 开始在眼睛的视上皮有明显表达 (图 1)。总之，*BHC80* 基因主要表达于中枢神经系统部位。

2.2 *BHC80* 基因表达下调使斑马鱼胚胎红细胞减少

注射吗啡啉修饰的反义寡核苷酸是一种已经建立的良好干扰目标 mRNA 翻译的方法^[9]。为了研究 *BHC80* 基因对斑马鱼胚胎发育的影响，用 *BHC80*-MO 注射斑马鱼胚胎，结果显示注射胚胎几乎无血液流动。为了验证吗啡啉修饰的反义寡核苷酸的有效性，用 RT-PCR 方法验证 *BHC80*-MO

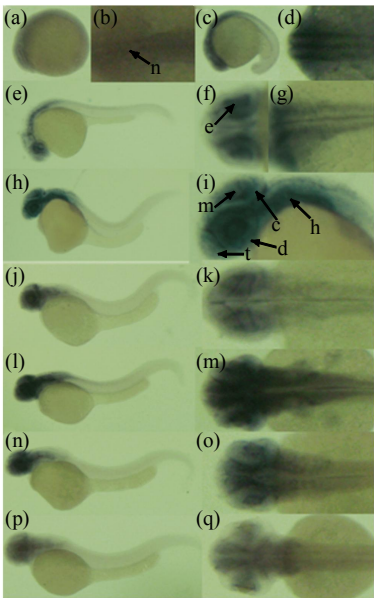


Fig. 1 Expression pattern of *BHC80* during zebrafish embryogenesis
(a, b) 12 hpf wildtype embryos. n: Notochord. (c, d) 18 hpf wildtype embryos. (e~g) 24 hpf wildtype embryos. e: Eyes. (h, i) 30 hpf wildtype embryos. t: Telencephalon; d: Diencephalon; m: Tectum; c: Cerebellum; h: Hindbrain. (j, k) 36 hpf wildtype embryos. (l, m) 48 hpf wildtype embryos. (n, o) 60 hpf wildtype embryos. (p, q) 72 hpf wildtype embryos.

的效果(图 2): 300 bp PCR 产物反映的是正常内源性 *BHC80* cDNA 片段(第 9 外显子~第 12 外显子), 249 bp PCR 产物反映的是剪切掉 *BHC80* 第 10 外显子(51 bp)后的 *BHC80* cDNA 片段, 说明 *BHC80*-MO 能有效干扰内源性 *BHC80* 表达。

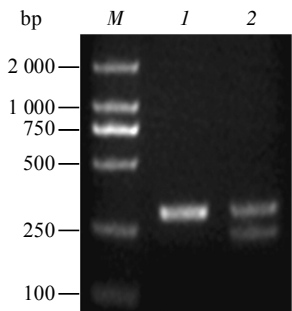


Fig. 2 RT-PCR analysis of *BHC80* expression down regulation
1: Injection of standard control-MO at 8 ng per embryo produced 300 bp band. 2: Injection of *BHC80*-MO at 8 ng per embryo produced 300 bp band and 249 bp band. M: D2000 DNA marker.

用 o-dianisidine 染色检测 36 hpf 胚胎的红细胞数量^[10], 结果表明 *BHC80* 吗啡淋注射组与对照组相比缺乏明显着色的红细胞(表 1, 图 3). 对照组红细胞遍布胚胎全身: 卵黄囊血管, 躯干血管和 PBI 区. *BHC80* 基因表达下调组: 卵黄囊血管区有少量红细胞分布, 躯干血管区缺乏红细胞, PBI 区出现红细胞堆积. *BHC80* 基因表达下调, 使红细胞减少, 可能与 *BHC80* 基因功能受抑导致红系干细胞或其前体细胞增殖受抑或分化延迟相关。

Table 1 Phenotypes of wild-type embryos injected with <i>BHC80</i> -MO and standard control-MO				
MO(8 ng)	n	Phenotypes		
		Normal	Abnormal	Death
<i>BHC80</i> -MO(%)	120	4(3.3)	93(77.5)	23(19.2)
Con-MO(%)	120	116(96.7)	1(0.8)	3(2.5)

The total number of animals (n) was scored at 36 hpf, and phenotypes (o-dianisidine staining of globin) were separated into three categories: normal (showing erythrocytes throughout the embryo), abnormal (showing both decrease and accumulation of erythrocytes) and death.

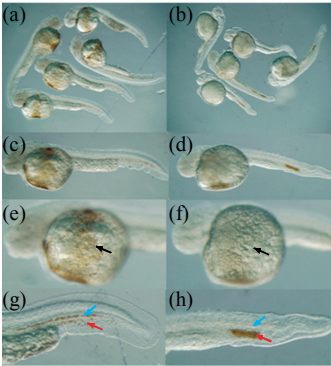


Fig. 3 *BHC80* knockdown cause decrease and accumulation of erythrocytes
All showed o-dianisidine staining of globin (representing erythrocytes) in embryos at 36 hpf. Erythrocytes of *BHC80* knockdown embryos(b, d, f, g) were far less than control (a, c, e, h). Erythrocytes of control migrated throughout the embryo, while those of *BHC80* knockdown embryos decreased at the yolk sac circulation valley (black arrows), disappeared at the trunk axial vasculature (blue arrows) and were limited at the posterior blood island(PBI) (red arrows).

2.3 *BHC80* 基因表达下调对斑马鱼胚胎造血的影响
抑制 *BHC80* 基因功能引起的红细胞数量减少可能与造血细胞的减少相关, 为了证明这种可能性, 我们通过胚胎整体 RNA 原位杂交的方法检测了 *βe3* globin、*gata1*、*c-myb* 和 *lmo2* 在受精卵发育过程中 24 hpf 和 36 hpf 的表达情况。

$\beta e3$ globin 是胚胎期红细胞标志, 分布在原始造血 ICM 区、定向造血 AGM 区、定向造血 PBI 区和脉管系统^[11, 12], *BHC80* 基因表达下调组的 24 hpf 胚胎 $\beta e3$ globin 表达无明显变化. *BHC80* 基因表达下调组的 36 hpf 胚胎卵黄囊循环中 $\beta e3$ globin 有很少量的表达, 而 PBI 区的 $\beta e3$ globin 表达相对较多(图 4).

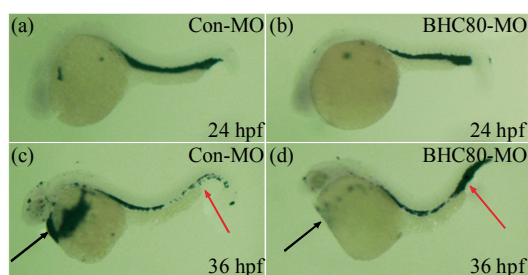


Fig. 4 *BHC80* knockdown show altered $\beta e3$ globin expression

(a, b) 24 hpf $\beta e3$ globin expression was normal in *BHC80* knockdown embryos. (c, d) 36 hpf $\beta e3$ globin expression scattered throughout the control embryo, while those of *BHC80* knockdown embryos were limited in the ICM, AGM, PBI and trunk axial vasculature (red arrows). Black arrows pointed to the yolk sac circulation valley.

gata1 是红系分化的标志, 分布在斑马鱼胚胎红系的原始造血 ICM 区、定向造血 AGM 和 PBI 区^[7, 13]. *BHC80* 基因表达下调组的 24 hpf 胚胎 *gata1* 表达无明显变化, *BHC80* 基因表达下调组的 36 hpf 胚胎 *gata1* 仍有明显表达, 而对照组已无表达(图 5).

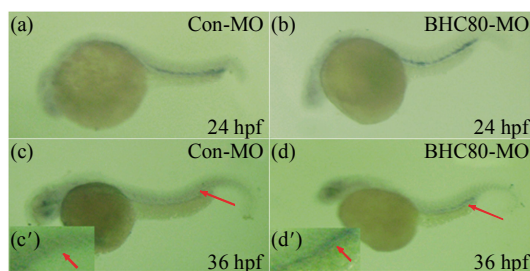


Fig. 5 *BHC80* knockdown show altered *gata1* expression
(a, b) 24 hpf *gata1* expression was normal in *BHC80* knockdown embryos. (c, d) Persistent *gata1*-expressing cells in 36 hpf *BHC80* knockdown embryos. (c', d') Higher magnification views of (c) and (d). Red arrows pointed to the ICM, AGM, PBI.

c-myb 是 HSCs 标志, 分布在斑马鱼胚胎定向造血区 AGM 和 PBI 区^[14], *BHC80* 基因表达下调组 *c-myb* 表达无明显变化(图 6).

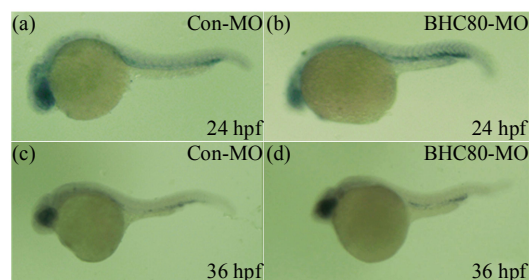


Fig. 6 *BHC80* knockdown show normal *c-myb* expression

lmo2 是造血 - 血管前体细胞标志, 分布在斑马鱼胚胎血管和定向造血 AGM 区^[15], *BHC80* 基因表达下调组 *lmo2* 表达无明显变化(图 7).

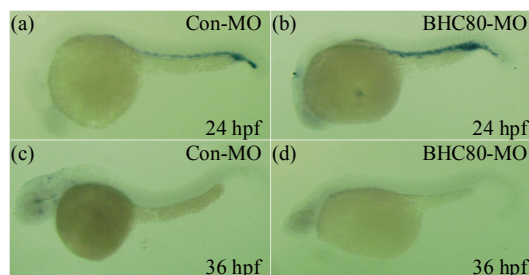


Fig. 7 *BHC80* knockdown show normal *lmo2* expression

总之, 造血细胞标志 *gata1*、*c-myb* 和 *lmo2* 在 *BHC80* 基因表达下调组 24 hpf 之前表达无明显变化. 对照组胚胎 *gata1* 表达从 30 hpf 开始逐渐下降^[9], 36 hpf 对照组胚胎的 *gata1* 已检测不到表达, 而 *BHC80* 基因表达下调组尚有表达, 这与 PBI 区的 $\beta e3$ globin 表达增多和红细胞堆积一致, 提示 *BHC80* 基因表达下调使 *gata1* 标记红系前体细胞增殖增多. 结合 o-dianisidine 染色的 *BHC80* 基因表达下调使红细胞减少的结果, 说明 *BHC80* 基因表达下调使红系分化延迟.

2.4 *BHC80* 基因表达下调对斑马鱼血管发育的影响

Flk-1 是在血管内皮细胞上特定表达的血管内皮生长因子 (vascular endothelium growth factor, VEGF) 的受体, 是血管内皮标志. 用 *flk-1* 的 RNA 探针原位杂交检测血管发育情况, 结果显示, *BHC80* 基因表达下调组血管与对照组相比清晰可见无明显差异(图 8a, b). 而荧光显微造影的结果显示, *BHC80* 基因表达下调组血管与对照组相比同样未见明显异常(图 8c, d).

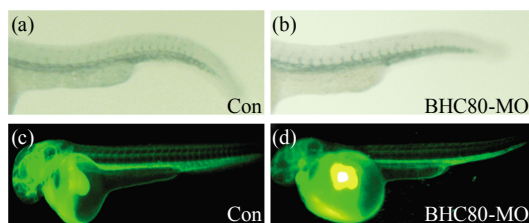


Fig. 8 Whole-mount *in situ* hybridization and microangiography showing a nearly normal vascular pattern

Whole mount *in situ* hybridization with *flk-1* RNA probes showing almost normal *flk-1* expression pattern in the trunk of *BHC80* knockdown embryos (b), compared with control (a) at 36 hpf. Microangiography showing apparently normal trunk blood vessel (d) compared with the control(c) at 48 hpf.

3 讨 论

我们首次系统观察了 *BHC80* 基因在斑马鱼的表达部位及其表达下调引起斑马鱼胚胎红细胞发育异常: *gatal* 标记红系前体细胞增殖增多并且分化延迟, 红细胞减少和 PBI 区红细胞堆积. 未见 *BHC80* 基因表达于红细胞分布区域, 原因可能是 *BHC80* 基因在红细胞的表达量较少, 不足以检测出来, 也可能 *BHC80* 基因并不直接作用于红细胞, 尚有其他因子的介导. BHC 转录抑制复合物中的 LSD1 影响细胞周期调控, 是细胞增殖所需, *LSD1* 基因表达下调的细胞系, G1 期细胞减少, 停滞于 G2/M 期的细胞增加, 使细胞异常增殖和分化^[16, 17]. 我们认为: BHC80 作为 BHC 复合物的骨架蛋白, 其表达下调可使 BHC 复合物的转录抑制功能下降, *gatal* 标记红细胞前体细胞异常增殖和分化, 因而红细胞生成减少和堆积. 然而, 以下问题需要进一步研究: a. *BHC80* 基因表达下调导致红细胞减少有关的细胞周期开关基因; b. *BHC80* 基因在造血细胞生成方面的分子机制.

参 考 文 献

- Iwase S, Januma A, Miyamoto K, *et al.* Characterization of BHC80 in BRAF-HDAC complex, involved in neuron-specific gene repression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **322**(2): 601~608
- Garcia-Bassets I, Kwon Y S, Telese F, *et al.* Histone methylation-dependent mechanisms impose ligand dependency for gene

- activation by nuclear receptors. *Cell*, 2007, **128**(3): 505~518
- Lan F, Collins R E, De Cegli R, *et al.* Recognition of unmethylated histone H3 lysine 4 links BHC80 to LSD1-mediated gene repression. *Nature*, 2007, **448**(7154): 718~U14
- Iwase S, Shono N, Honda A, *et al.* A component of BRAF-HDAC complex, BHC80, is required for neonatal survival in mice. *Febs Letters*, 2006, **580**(13): 3129~3135
- Brownlie A, Donovan A, Pratt S J, *et al.* Positional cloning of the zebrafish sauternes gene: a model for congenital sideroblastic anaemia. *Nature Genetics*, 1998, **20**(3): 244~250
- Liao E C, Paw B H, Peters L L, *et al.* Hereditary spherocytosis in zebrafish riesling illustrates evolution of erythroid beta-spectrin structure, and function in red cell morphogenesis and membrane stability. *Development*, 2000, **127**(23): 5123~5132
- Bertrand J Y, Kim A D, Violette E P, *et al.* Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo. *Development*, 2007, **134**(23): 4147~4156
- Westerfield M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. 3rd ed. Eugene, Ore: University of Oregon Press; 2000
- Nasevicius A, Ekker S C. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature Genetics*, 2000, **26**(2): 216~220
- Detrich H W, Kieran M W, Chan F Y, *et al.* Intraembryonic hematopoietic-cell migration during vertebrate development. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1995, **92**(23): 10713~10717
- Quinkertz A, Campos-Ortega J A. A new beta-globin gene from the zebrafish, beta (E1), and its pattern of transcription during embryogenesis. *Development Genes and Evolution*, 1999, **209**(2): 126~131
- Galloway J L, Wingert R A, Thisse C, *et al.* Loss of Gata1 but not Gata2 converts erythropoiesis to myelopoiesis in zebrafish embryos. *Developmental Cell*, 2005, **8**(1): 109~116
- Lyons S E, Lawson N D, Lei L, *et al.* A nonsense mutation in zebrafish *gatal* causes the bloodless phenotype in vlad tepes. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2002, **99**(8): 5454~5459
- Bertrand J Y, Kim A D, Teng S, *et al.* CD41(+) cmyb(+) precursors colonize the zebrafish pronephros by a novel migration route to initiate adult hematopoiesis. *Development*, 2008, **135**(10): 1853~1862
- Zhu H, Traver D, Davidson A J, *et al.* Regulation of the lmo2 promoter during hematopoietic and vascular development in zebrafish. *Develop Biol*, 2005, **281**(2): 256~269
- Scoumanne A, Chen X B. The lysine-specific demethylase 1 is required for cell proliferation in both p53-dependent and -independent manners. *J Biol Chem*, 2007, **282**(21): 15471~15475
- Chau C M, Deng Z, Kang H, *et al.* Cell cycle association of the retinoblastoma protein Rb and the histone demethylase LSD1 with the Epstein-Barr virus latency promoter Cp. *J Virol*, 2008, **82**(7): 3428~3437

The Effects of *BHC80* Down Regulation on Embryonic Erythropoiesis in Zebrafish

HOU Jia-Yun, JIANG Qiu, ZHANG Jie, TAN Li, SONG Hou-Yan*

(Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract Whole mount *in situ* hybridization with *BHC80* RNA probe showed that *BHC80* was expressed in zebrafish central nervous system. Morpholino-modified antisense oligonucleotide was injected into zebrafish zygotes to knock down *BHC80* expression. *BHC80* knockdown resulted in striking decrease of erythrocytes and accumulation of erythrocytes at PBI. Further investigation of embryonic erythrocytes marker $\beta e3$ globin and hematopoiesis transcription factors *gata1*, *c-myb* and *lmo2* by *in situ* hybridization showed that the erythroid progenitors marked with *gata1* in *BHC80* knockdown embryos were high proliferation and their differentiation were delayed, which led to decrease of erythrocytes and accumulation of erythrocytes at PBI. Both *in situ* hybridization and microangiography indicated that vasculature pattern of *BHC80* knockdown embryos were almost normal.

Key words zebrafish, *BHC80*, erythropoiesis, *in situ* hybridization

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00301

*Corresponding author.

Tel: 86-21-54237739, E-mail: hysong@shmu.edu.cn

Received: May 8, 2009 Accepted: August 3, 2009