

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00502

# 水平回转培养对斑马鱼血管发育的影响

孙婷<sup>1</sup>, 谢翔<sup>1</sup>, 张剑卿<sup>1</sup>, 包静<sup>1</sup>, 汤川政<sup>1</sup>, 雷道希<sup>1</sup>, 邱菊辉<sup>1,2</sup>, 王贵学<sup>1</sup>

1. 重庆大学生物工程学院力-发育生物学研究室, 生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆市血管植入物工程实验室, 重庆 400044;
2. 清华大学生命科学学院, 生物膜与膜工程国家重点实验室, 北京 100084

**摘要:** 随着空间生命科学的发展, 微重力对生命体的影响已成为科学家们日益关注的问题。多数研究表明, 微重力对生物体胚胎早期发育有着重要影响, 而血管系统作为胚胎最早行使功能的系统备受关注。目前关于微重力对血管发育影响的研究大多来自对离体培养细胞的体外回转模拟实验, 在体实验相对较少。文章利用斑马鱼作为模式动物, 在体探究水平回转培养环境下斑马鱼胚胎早期发育及水平回转培养对其血管系统发育的影响。在斑马鱼受精后 24 h(24 hpf)时进行水平回转培养处理, 至 36 hpf 时收集胚胎, 通过体视显微镜观察斑马鱼表型变化, 通过半定量 RT-PCR、qPCR 及全胚原位杂交等手段对比水平回转培养环境下与对照组血管相关因子的表达情况, 并通过 BrdU 掺入及 TUNEL 法进行斑马鱼全胚细胞凋亡及增殖检测。结果表明, 在 90 r/min 水平回转培养环境下, 斑马鱼死亡数量没有差异, 24 hpf 时破壳数量显著降低( $10.3 \pm 0.41$  vs.  $0.0$ ,  $P < 0.05$ ), 心率显著加快( $223.5 \pm 2.32$  vs.  $185.0 \pm 3.23$ ,  $P < 0.05$ ), 黑色素明显增加, 动静脉发育紊乱, 且在 120 r/min 转速下, 胚胎血管特异性表达因子 *flk1*、*flt4* 及 *ephrinB2* 的表达均显著降低, 斑马鱼细胞凋亡明显增加, 而细胞增殖无显著差异, 提示水平回转培养对斑马鱼胚胎发育特别是早期血管发育具有重要影响。

**关键词:** 斑马鱼; 水平回转培养; 血管发育

## Effect of horizontal rotary culture on zebrafish vascular development

SUN Ting<sup>1</sup>, XIE Xiang<sup>1</sup>, ZHANG Jian-Qing<sup>1</sup>, BAO Jing<sup>1</sup>, TANG Chuan-Zheng<sup>1</sup>, LEI Dao-Xi<sup>1</sup>, QIU Ju-Hui<sup>1,2</sup>, WANG Gui-Xue<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Biorheological Science and Technology (Chongqing University), Ministry of Education; Chongqing Engineering Laboratory in Vascular Implants; Laboratory of Mechano-developmental Biology, Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400044, China;
2. The State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

收稿日期: 2012-11-01; 修回日期: 2013-01-01

基金项目: 国家重大科学研究计划项目(编号: 2012CB945101)和重庆国家生物产业基地公共实验中心建设项目(编号: 发改办高技【2008】1692号)资助

作者简介: 孙婷, 硕士研究生, 专业方向: 力-发育生物学。Tel: 023-65112675; E-mail: suntg\_01@126.com;

通讯作者: 王贵学, 教授, 博士, 研究方向: 生物力学、生物材料与生物技术。E-mail: wanggx@cqu.edu.cn

致谢: 转基因斑马鱼材料由清华大学孟安明教授实验室提供, 实验过程中得到北京大学张博教授的帮助, 在此一并感谢。

网络出版时间: 2013-2-1 8:34:26

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130201.0834.001.html>

**Abstract:** With the development of space life science, a study on the influence of microgravity on organism has been an increasingly concerned topic. Lots of studies indicate that microgravity plays an important role in the early development of embryos. The vascular system as the first-function system of embryos provides an interesting topic for many researchers. However, those studies were mostly carried out *in vitro* by rotary cell culture system (RCCS), while few experiments were done *in vivo*. Using zebrafish as a model, this research investigated the effects of horizontal rotary culture on the vascular development *in vivo*. Zebrafish embryos at 24 hpf (hour post-fertilization) were selected and divided into two groups. One group was cultured by the shaker, and the other was cultured normally as the control. After 12 h, all the embryos were collected and detected. The phenotype of zebrafish was observed by stereo microscope. Then, the expression of vascular specific expression factor, *flkl*, *flt4*, and *ephrinB2* was compared by RT-PCR, qPCR, and *in situ* hybridization, respectively. Cell apoptosis and proliferation *in situ* were observed using TUNEL assay and bromodeoxyuridine incorporation. The results demonstrated that horizontal rotary culture at 90 r/min decreased the hatching of embryos ( $10.3 \pm 0.41$  vs.  $0.0$ ,  $P < 0.05$ ), accelerate the heart rate ( $223.5 \pm 2.32$  vs.  $185.0 \pm 3.23$ ,  $P < 0.05$ ) and increased the content of melanin in zebrafish significantly. At the same time, we found some differences in the vascular system of zebrafish after horizontal rotary culture which caused a down regulation of *flkl*, *flt4*, and *ephrinB2*. On the other hand, horizontal rotary culture accelerated the apoptosis of cells in zebrafish, but showed no significance in proliferation. In conclusion, horizontal rotary culture has a significant influence on the vascular development in zebrafish.

**Keywords:** zebrafish; horizontal rotary culture; vascular development

近年来,随着航空科技的发展,以微重力环境为核心的发育生物学研究已成为新的研究热点<sup>[1]</sup>。通过对“奋进”号上受精鸡蛋的发育情况观察, Suda等<sup>[2]</sup>发现微重力环境对鸡蛋胚胎存活率具有重要影响。不仅如此,在模拟微重力环境下的牛卵细胞具有较低的体外受精成功率且受精后受精卵发育相对迟缓<sup>[3]</sup>。目前对于模拟微重力对细胞的影响大多用回转培养装置进行,回转培养一定程度上实现了微重力的模拟。在对小鼠胚胎干细胞的研究中发现,回转培养不仅可使小鼠胚胎干细胞粘附性降低、凋亡率增加、DNA 修复延迟<sup>[4]</sup>,还可以使胚胎干细胞在没有白血病抑制因子的状态下保持其全能性<sup>[5]</sup>,通过离体培养和诱导,回转培养可以促进胚胎干细胞向拟胚体的分化<sup>[6]</sup>。大量体外实验表明,回转模拟造成的微重力对生物体的发育具有一定影响。

航天员对失重环境的适应及返回着陆后出现的立位耐力下降,与心血管机能有着密切联系。太空环境中航天员所受的力学环境发生急剧改变,开展受力环境改变时血管生成研究,具有重要意义。在胚胎发育过程中,血管形成是最早的事件之一。内皮细胞的形成是血管发育的一项重要指标,近来对内皮细胞的体外研究发现,回转培养可以促进血

管内皮细胞的凋亡、抑制内皮细胞增殖、使内皮细胞微丝骨架分布的有序性降低<sup>[7-9]</sup>,且与血管内皮生长因子也有一定的相关性<sup>[10]</sup>。对内皮细胞的研究大多停留在体外阶段,相关的在体实验目前报道较少。然而,也有在体研究显示悬挂饲养可降低兔子动脉肌球蛋白的表达且降低血管的机械性能<sup>[11]</sup>,但其具体分子机制尚未清楚。

近年来,斑马鱼以其与人体基因相似度高、胚胎透明、个体小、可迅速大量繁殖等优点备受研究者们青睐<sup>[12]</sup>。利用转基因斑马鱼作为模型,可以很直观地在体观察血管的发育情况,观察水平回转培养环境对其发育和基因表达等的影响。为了初步探索水平回转培养影响斑马鱼血管发育的机制,本研究用转基因斑马鱼(*flkl*: *GFP*)为实验对象,通过体视显微镜表型观察、半定量 RT-PCR、实时荧光定量 PCR (qPCR)、全胚原位杂交(*In situ* hybridization)、全胚增殖及凋亡等手段,来研究水平回转培养对斑马鱼血管发育的影响,为空间生命科学的研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验用斑马鱼为将血管绿色荧光标记的转基因

斑马鱼 *Tg(flk1 : GFP)*, 选自血管绿色荧光标记且血细胞红色荧光标记的双转基因斑马鱼 *Tg(flk1 : GFP×gata1 : Dsred)*。将双转基因斑马鱼(杂合)与野生型斑马鱼(WT)交配, 受精之后 2~3 d, 用体视荧光显微镜将只有血管绿色荧光而血细胞没有红色荧光的斑马鱼胚胎(即 *flkl : GFP* 斑马鱼)选出, 培养至 3 个月之后便可产卵。将其每日定时喂以咸水丰年虫, 照明 14 h 黑暗 10 h 交替, 至其能够产出健康卵后, 将雌雄斑马鱼放入交配缸中, 第 2 d 早上 8~10 时产卵, 将胚胎收集至有小小鱼水的培养皿中, 于 28℃ 培养。

## 1.2 方法

### 1.2.1 观察水平回转培养对斑马鱼表型的影响

张蕊等<sup>[13]</sup>通过对水平回转生物反应器进行力学模拟分析, 发现水平回转反应器达到稳定状态时, 类似于太空的微重力环境。本实验利用水平回转的摇床(QYC-200 恒温培养摇床)来进行实验, 通过调整转速来进行不同程度力学环境的调节, 旋转半径  $r=5\text{ cm}$ 。对于本次实验, 主要是观察选择一个转速, 使斑马鱼胚胎在存活率没有显著差异的条件下, 表型出现不一致。我们选择了 3 个转速进行实验: 60 r/min、90 r/min 和 120 r/min, 每次实验设定一个转速, 培养 3 组胚胎, 分别于 36 hpf、48 hpf 和 60 hpf 时取出观察胚胎发育情况, 每个转速设计 3 次重复。由于斑马鱼血管在 24 hpf 时, 血管生成(Angiogenesis)开始, 所以我们选择在受精后 24 h 开始进行回转培养处理。即在胚胎 24 hpf 时, 挑选状态较好的放入培养皿中, 每皿 60 个胚胎, 在 28℃ 下分别以表 1 中的方式培养。

表 1 水平回转培养转速和时间设定

水平回转 培养时间 \ 转速	60 r/min	90 r/min	120 r/min
36 hpf	1(第一次)	1(第二次)	1(第三次)
48 hpf	2(第一次)	2(第二次)	2(第三次)
60 hpf	3(第一次)	3(第二次)	3(第三次)

水平回转培养处理培养之后, 用奥林巴斯体视荧光显微镜观察斑马鱼表型以及血管发育的状况。主要包括外部形态、破壳率、死亡率、黑色素生成、心跳速率以及尾部血管丛发育情况。

### 1.2.2 半定量 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR(qPCR)

取 30 枚斑马鱼于 1.5 mL EP 管中, 用 RNA 提取试剂盒(TaKaRa)提取样品的总 RNA。随后进行琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外分光光度计测定提取总 RNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  值, 经计算浓度在  $1\sim 2\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$  内, 反转录为 cDNA, 反应体系为:  $\lambda$  RNA  $1\text{ }\mu\text{L}$ ,  $50\text{ }\mu\text{L}$  Oligo(dT)18 Primer  $1\text{ }\mu\text{L}$ , RNase free ddH<sub>2</sub>O  $5\text{ }\mu\text{L}$ ,  $5\times$  M-MLV Buffer  $2\text{ }\mu\text{L}$ ,  $10\text{ mmol/L}$  dNTP Mixture 各  $0.5\text{ }\mu\text{L}$ ,  $40\text{ U}/\mu\text{L}$  RNase Inhibitor  $0.25\text{ }\mu\text{L}$ ,  $200\text{ U}/\mu\text{L}$  RNase M-MLV(RNase H-)  $0.25\text{ }\mu\text{L}$ 。在 NCBI 中查找斑马鱼 *flt4*(NM\_130945.1)、*ephrinB2*(NM\_131023.1)和 *flkl*(AF487829.1)mRNA 序列, 用 Prime 5.0 设计引物, 本实验设计 4 对引物(表 2), 由 Invitrogen(上海)公司合成。以斑马鱼胚胎 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 克隆目的基因。鉴别引物时 PCR 扩增程序如下: 95℃ 预变性 4 min; 95℃ 变性 30 s, 60℃ (*flt4*)、46℃ (*ephrinB2*)、60℃ (*flkl*)复性 30 s, 72℃ 延伸 50 s, 34 个循环。半定量 RT-PCR 扩增程序如下: 95℃ 预变性 4 min; 95℃ 变性 30 s, 60℃ (*flt4*)、46℃ (*ephrinB2*)、60℃ (*flkl*)复性 30 s, 72℃ 延伸 50 s, 24 个循环。qPCR 扩增程序如下: 95℃ 预变性 4 min; 95℃ 变性 30 s, 60℃ (*flt4*)、46℃ (*ephrinB2*)、60℃ (*flkl*)复性 20 s, 72℃ 延伸 40 s, 40 个循环。qPCR 反应体系为  $10\text{ }\mu\text{L}$ , 用 bio-red 实时荧光定量 PCR 仪进行扩增并分析数据, 实验结果均重复 3 次。

表 2 RT-PCR 和 qPCR 所用引物序列

基因名称	引物序列(5' → 3')
<i>ephrin B2</i>	F: CAAGGACAGCAAATCGAATG
	R: TGAGCCAATGACTGATGAGG
<i>flkl</i>	F: GAGAACGGAACCAACAAGATCCACGAG
	R: CCCTCCAGCAGAACTGACTCCTTAC
<i>flt4</i>	F: TCTGGCATCTCGTAAGTGTAT
	R: TGACCGTATTTCGTTGTTGTAG
$\beta$ -actin	F: CTGTCTTCCCATCCATCGTGGGTC
	R: CTCCATATCATCCAGTTGGTGACA

### 1.2.3 RNA 探针制备

用 Prime 5.0 设计引物序列, 以斑马鱼 cDNA 为模板, 采用 *flkl*、*flt4*、*ephrinB2* 特异性引物(表 3)进行 PCR 扩增, 回收纯化后连接至 PMD-20T 载体中, 经转化、扩大培养, 获得重组质粒, 由 Invitrogen 公

司进行测序鉴定，酶切线性化后作为合成探针的模板。按地高辛 RNA 标记试剂盒进行操作，合成地高辛标记的相应反义 RNA 探针。

表 3 探针制作所用引物序列

基因名称	引物序列(5' →3' )
<i>flkl</i>	F: TGCCCAGATTATGGTGATG
	R: CCAAGTCAGCCTATCGTAG
<i>flt4</i>	F: TTCTGGCATCTCGTAAAGTGTAT
	R: GATGACCGTATTTCGTTGTTGTA
<i>ephrinB2</i>	F: AGGAAGTGAGTGGATACGACGAG
	R: TAAAGGACCCAAACGGACAAG

1.2.4 斑马鱼全胚原位杂交(*In situ* hybridization)

在胚胎 24 hpf 时处理斑马鱼，先将对照组和处理组胚胎剥去卵壳，至 36 hpf 时收集至 1.5 mL RNA-Free 的 EP 管中，每管 30 个胚胎。4% PFA/PBS 固定过夜之后进行全胚原位杂交实验。原位杂交第 1 d：杂交(步骤包括：复水；消化；终止消化；再固定；漂洗；预杂交；杂交)。第 2 d：漂洗、封闭(步骤包括：回收探针；漂洗；封闭；抗体孵育)。第 3 d：显色(步骤包括：回收抗体；漂洗；显色)。经显色结束后，用奥林巴斯体视显微镜拍照，实验结果均重复 3 次。

1.2.5 全胚细胞凋亡检测

利用野生型斑马鱼，在胚胎 24 hpf 时 120 r/min 处理斑马鱼，至 36 hpf 时将胚胎收集至 1.5 mL EP 管中，每管 30 个胚胎，4% PFA/PBS 室温固定 1 h。经 PBT 清洗 3 次，3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇溶液室温孵育 30 min；10 μg/mL 蛋白酶 K 消化 15 min。用 *In situ* cell death detection kit, Fluorescein(Roche)按照说明书进行细胞凋亡检测，用奥林巴斯体式荧光显微镜观察并拍照，实验结果均重复 3 次。

1.2.6 全胚细胞增殖检测

利用野生型斑马鱼，在胚胎 24 hpf 时 120 r/min 处理斑马鱼，同时用含 0.1 μg/mL BrdU 抗原的小鱼水培养。至胚胎发育至 36 hpf 时，同上收集胚胎之后用 4% PFA/PBS 室温固定 1 h，用 2N HCl、37 °C 孵育 30 min。用含 3% 绵羊血清与 0.3% Triton-X100 的 PBS 溶液室温封闭 2 h。随后，用绿色荧光标记的

BrdU 抗体(1：200) 37 °C 孵育 1 h。用奥林巴斯体视荧光显微镜观察并拍照。

1.3 数据处理

所有数据以均数±标准差表示。数据统计应用 SPSS 软件，处理组与对照组均值之间的差异显著性用 Student's *t* 检验，*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 水平回转培养环境对斑马鱼胚胎发育的影响

通过摇床进行不同转速的水平回转培养之后，收集数据。经统计分析发现，在水平回转培养环境下，斑马鱼破壳明显受到抑制(图 1：A1~A3)，在 60 r/min、90 r/min 和 120 r/min 转速下，在 48 hpf 时对照组与水平回转培养处理组破壳率均有显著性差异，在 60 hpf 时表现出极显著差异。水平回转培养对死亡率影响的分析结果(图 1：B1~B3)表明，斑马鱼胚胎死亡率并没有明显受到水平回转培养环境的影响，即在 60 r/min、90 r/min 和 120 r/min 转速下，胚胎死亡率没有出现显著变化。从图 1 的 C1~C3 中发现，水平回转培养处理后，在 60 r/min 转速时心率没有显著性差异，在 90 r/min 转速时表现为显著性差异，而在 120 r/min 时，表现为极显著差异，即随着转速增加，斑马鱼胚胎心率显著增大。同时，对斑马鱼胚胎中黑色素形成的观察结果表明，水平回转培养环境可以促进胚胎黑色素的形成，如图 1 中所示，以 120 r/min 的转速培养至 36 hpf 时(即水平回转培养处理 12 h)，处理组的黑色素形成和对照组相比有明显变化(图 1：D1 和 D2)，至 48 hpf 时黑色素增加更加明显(图 1：D3 和 D4，E1 和 E2)，60 hpf 时也可明显观察到处理组中黑色素的增加(图 1：D5 和 D6)。由于在 120 r/min 转速条件下心率已表现为极显著差异，故可考虑采用 120 r/min 作为后续的实验参数。

通过用体视荧光显微镜对斑马鱼血管发育的观察，在胚胎 36 hpf 时，水平回转培养组与对照组可观察到明显的发育区别：水平回转培养组斑马鱼尾部血管丛发育紊乱，动脉及静脉血管发育出现异常，且心率加快至极显著水平，而胚胎存活率没有显著差异，故本实验选择在胚胎 24 hpf 时用 120 r/min 水平回转培养 12 h 作为水平回转培养处理的实验参数。

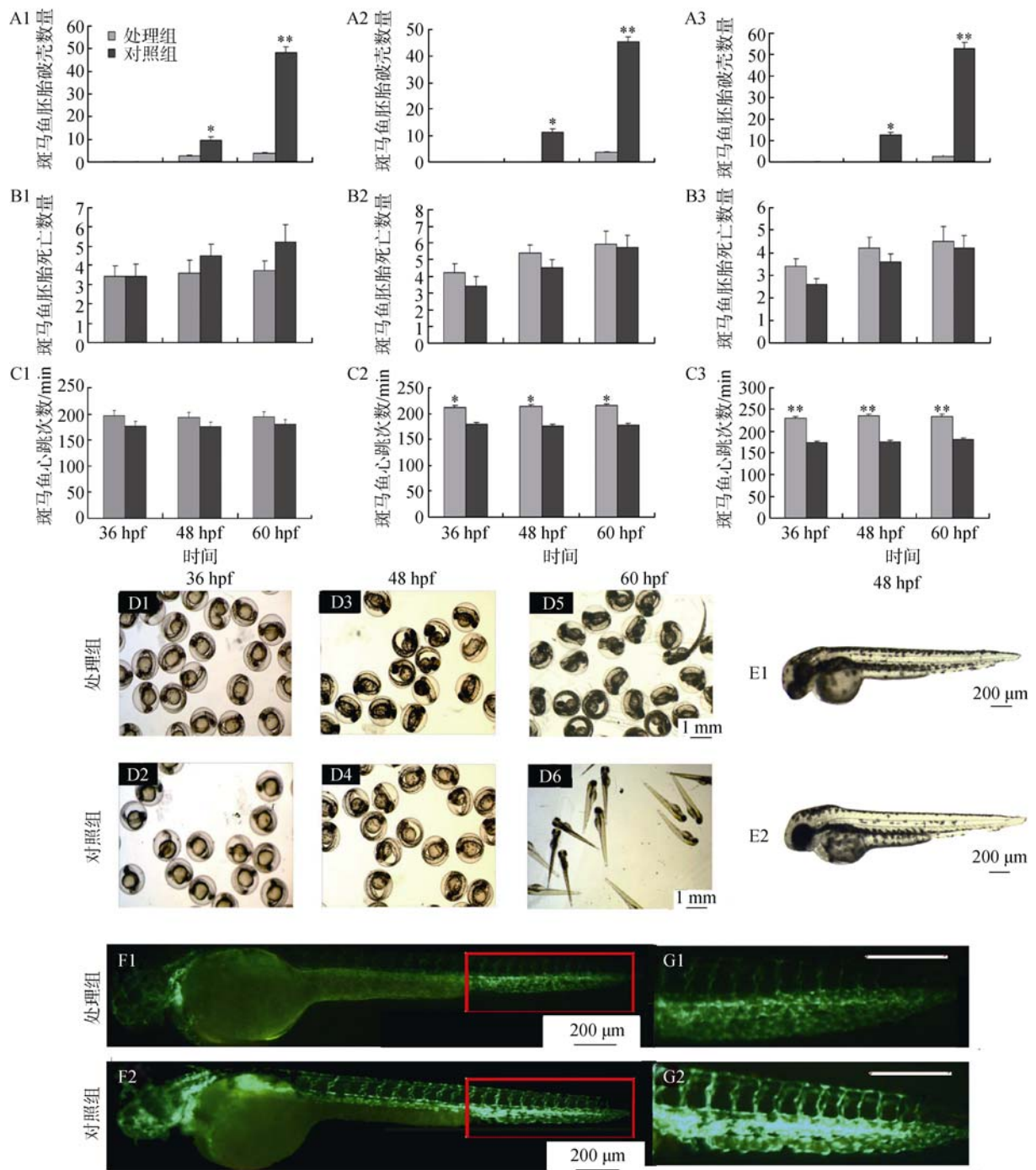


图 1 水平回转培养对斑马鱼表型的影响

A: 表示水平回转培养对斑马鱼破壳率(数量)的影响, 其中 A1~A3 分别为 60 r/min、90 r/min 和 120 r/min 下的破壳率(数量)统计值( $n=60$ )。t 测验中, \*表示具有显著性差异( $P<0.05$ ); \*\*表示具有极显著差异( $P<0.01$ )。B: 表示水平回转培养对斑马鱼死亡率(数量)的影响, 其中 B1~B3 分别为 60 r/min、90 r/min 和 120 r/min 下的死亡率(数量)统计值( $n=60$ )。t 测验分析表明, 处理组与对照组间均无显著性差异。C: 表示水平回转培养对斑马鱼心率的影响, 其中 C1~C3 分别为 60 r/min、90 r/min 和 120 r/min 下的心率统计值( $n=60$ )。t 测验中, \*表示具有显著性差异( $P<0.05$ ), \*\*表示具有极显著差异( $P<0.01$ )。D: 表示 120 r/min 转速度下水平回转培养对黑色素沉积的影响, 其中 D1、D2 为 36 hpf 时期, D3、D4 为 48 hpf 时期, D5、D6 为 60 hpf 时期。E: 为在 120 r/min 转速度下 48 hpf 斑马鱼的黑色素沉积情况。F 和 G 表示水平回转培养对血管发育的影响, 用奥林巴斯体视荧光显微镜拍摄, 其中 F1、F2 分别为 36 hpf 时对照组和处理组的整体血管发育情况, G1 和 G2 分别为其尾部血管放大图( $n=30$ )。



## 2.2 RT-PCR、qPCR 及全胚原位杂交探究水平回转培养对斑马鱼血管发育的影响

### 2.2.1 斑马鱼总 RNA 的提取及 RT-PCR

收集水平回转培养处理组和对照组的 36 hpf 斑马鱼胚胎, 分别进行总 RNA 的提取, 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 2A 所示。利用  $\beta$ -actin 为内参, 分别进行半定量 RT-PCR 检测 *flk1*、*flt4*、*ephrinB2* 在 mRNA 水平的表达情况, 结果(图 2B)表明, 内参  $\beta$ -actin 表达一致的情况下, 水平回转培养处理组 *flk1*、*flt4*、*ephrinB2* 的表达均相对降低, 提示 *flk1*、*flt4* 及 *ephrinB2* 的表达均与水平回转培养有密切联系。

### 2.2.2 qPCR 检验水平回转培养对斑马鱼血管发育的影响

用统计学软件分析 qPCR 结果发现, 胚胎经水平回转培养处理后, *flt4*、*flk1*、*ephrinB2* 相对表达量均明显低于对照组, 经统计分析, 差异显著(图 2C)。这与半定量 RT-PCR 结果相一致, 提示水平回转培养影响了斑马鱼血管发育相关基因的表达。

### 2.2.3 全胚原位杂交验证水平回转培养对斑马鱼血管发育的影响

为了进一步确定水平回转培养处理组与对照组的斑马鱼中 *flk1*、*flt4* 和 *ephrinB2* 的表达差异情况, 选择两者的 36 hpf 胚胎进行全胚原位杂交实验, 结

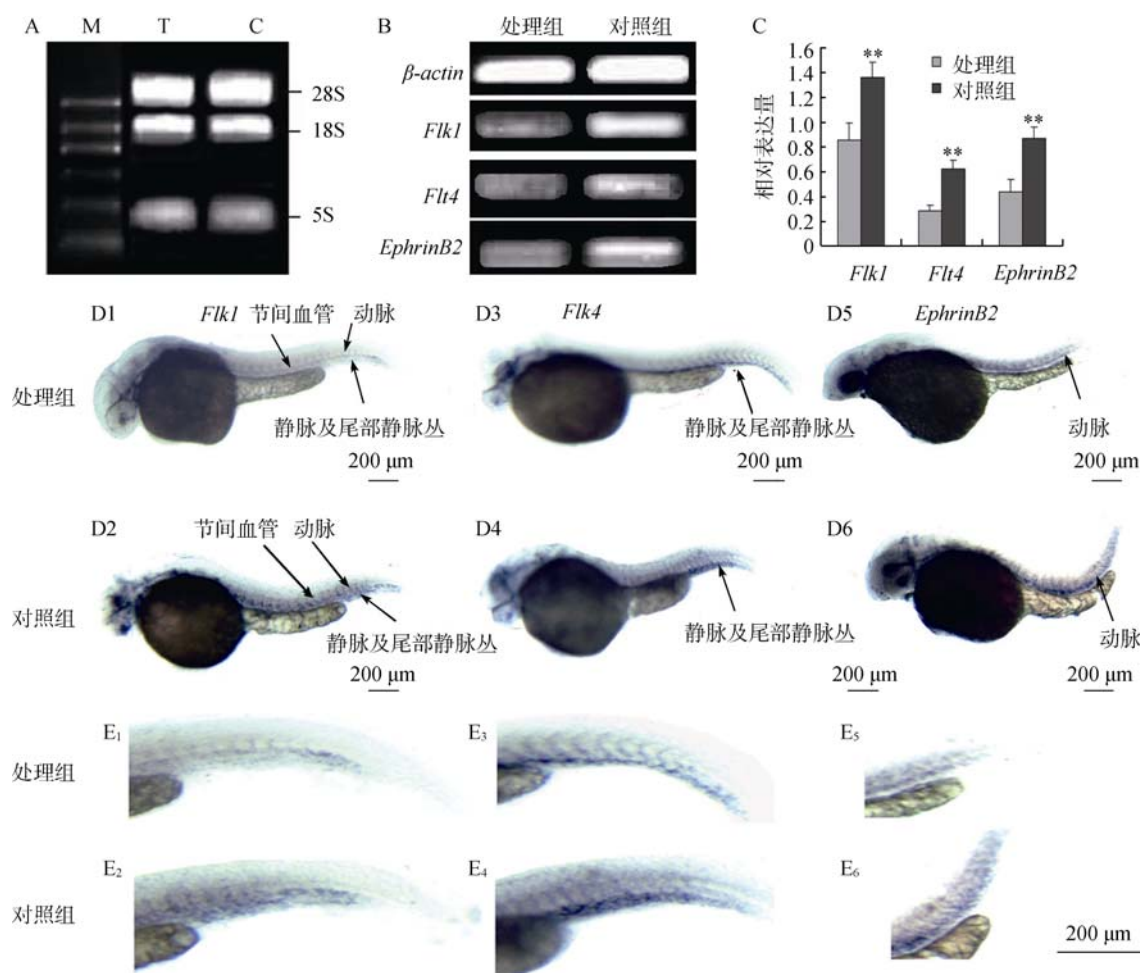


图2 水平回转培养处理对斑马鱼血管发育的影响

A: 120 r/min 处理组和对照组总 RNA 提取的琼脂糖凝胶电泳图。其中 M 为 Marker, T 为处理组, C 为对照组; B: 半定量 RT-PCR 实验结果。由上至下依次为  $\beta$ -actin、*flk1*、*flt4* 和 *ephrinB2* 表达的琼脂糖凝胶电泳图; C: qPCR 实验结果。纵坐标为基因的相对表达量; *t* 检验中, \*表示具有显著差异( $P < 0.05$ ), \*\*表示具有极显著差异( $P < 0.01$ ); D: 全胚原位杂交实验结果。上面一行分别为 120 r/min 水平回转培养处理组的 *flk1*、*flt4* 和 *ephrinB2* 的表达情况, 下面一行 of 对照组。E: 分别系 D 图相应的尾部放大结果。

果如图 2D 所示。对于 *flk1*, 图中所示结果(图: D1 和 D2)表明, *flk1* 在斑马鱼整个血管系统(动脉, 静脉, 节间血管)中均有表达(图 2: D2), 且水平回转培养组中, *flk1* 在动脉、静脉及节间血管中的表达均较弱于对照组, 且表现出血管系统的发育异常( $n=23/30$ ); *flt4* 在斑马鱼静脉系统中大量表达(图 2: D3、D4), 在对照组中, 经杂交表现出了完整的静脉轮廓且有发育较完善的血管尾部静脉丛(图 2: D4), 而在水平回转培养处理组中, 图示显示静脉发育断断续续, 出现异常, 且未发现规则的尾部静脉丛的形成(图 2: D3)( $n=21/30$ ); *ephrinB2* 则在动脉系统中大量表达(图 2: D5、D6), 在对照组中出现完整的动脉及节间血管轮廓(图 2: D6), 而经水平回转培养处理后, 斑马鱼 *ephrinB2* 表达部位分布较为异常, 动脉形成出现异常( $n=20/30$ )。

#### 2.2.4 水平回转培养对斑马鱼细胞凋亡及增殖的影响

经斑马鱼原位细胞凋亡及增殖检测, 用奥林巴斯体视荧光显微镜观察。对比处理组与对照组的细胞凋亡情况, 发现处理组细胞凋亡较对照组明显增加(图 3: A 和 C)( $n=28/30$ )。在细胞增殖方面, 经荧光体视显微镜观察, 发现对照组与处理组细胞增殖

差异不明显(图: 3B 和 D)( $n=25/30$ )。

### 3 讨论

力学环境的改变对血管生成有着重要影响, Duttetal 等<sup>[14]</sup>第一次提出水平回转生物反应器对血管形成所需的生长因子的表达具有重要影响。Siamwala 等<sup>[15]</sup>研究发现水平回转生物反应器可以促进大血管内皮细胞中依赖于 NO 途径的血管生成。而 Infanger 等<sup>[10,16]</sup>研究发现, 回转模拟微重力处理 4 h 即可观察到内皮细胞表现出凋亡样形态及生化特征, 72 h 后内皮细胞凋亡现象更为明显。

本研究通过水平回转的摇床对斑马鱼进行水平回转培养, 在体观察了培养对斑马鱼胚胎早期发育的影响。研究发现, 水平回转培养后力学环境的改变可以使斑马鱼心率加快, 破壳率降低, 但停止水平回转培养之后则会迅速破壳, 表现出对力学环境变化的迅速适应, 这与 Hargens 等<sup>[17]</sup>对太空飞行后血管适应性的发现相一致。Tank 等<sup>[18]</sup>经微重力环境下对心率的研究提出设想: 作为心血管系统的一个指标, 心率与血管之间应该也有可能存在一些联系。本研究发现, 水平回转培养环境下, 心率明显加

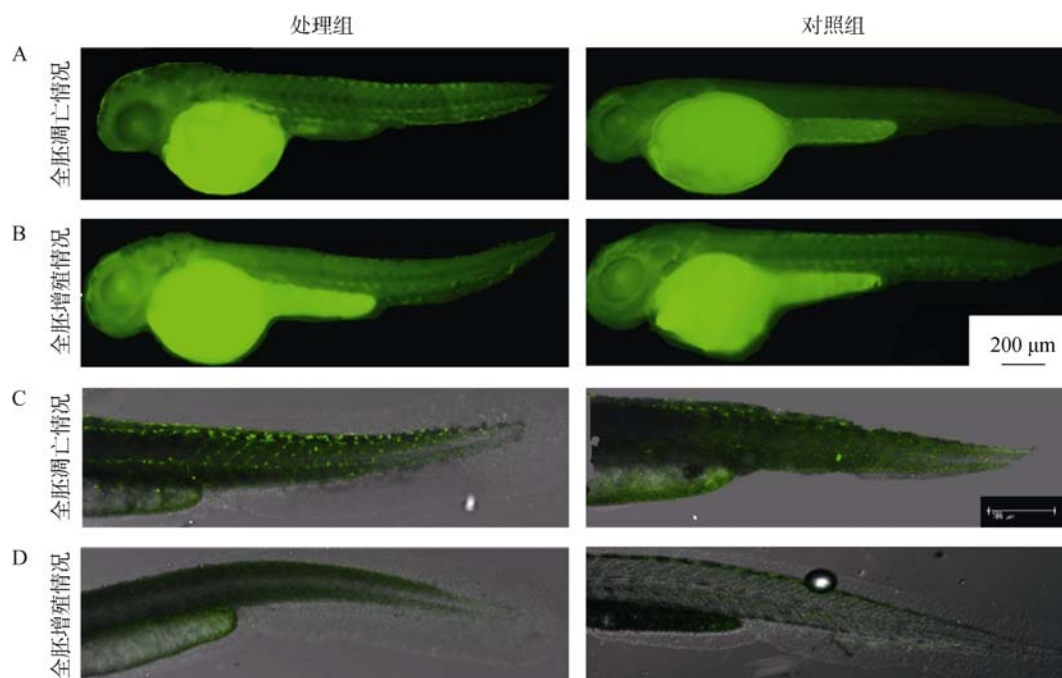


图 3 水平回转培养对斑马鱼原位细胞凋亡及增殖的影响

A: 斑马鱼全胚凋亡情况, 处理组的凋亡荧光信号强度明显较高, 而对照组几乎没有凋亡荧光信号; B: 斑马鱼全胚增殖情况, 处理组的增殖荧光信号强度于对照组相比没有明显差异; C, D 分别为相应的激光共聚焦显微镜拍摄的尾部图片。Scale bar: 200  $\mu\text{m}$ 。

快, 进一步验证了这一想法。此外, 研究发现水平回转培养之后, 斑马鱼黑色素明显增加, 其具体机制有可能是使控制黑色素的基因提前表达或者是促进了控制黑色素相关基因的表达。

大量体外研究发现, 回转培养对血管内皮细胞的机械性能、增殖、凋亡及基因表达等均有显著影响<sup>[11,19,20]</sup>, 但是在体关于回转培养下血管发育的研究还较少, 本文在体研究斑马鱼血管发育发现, 水平回转培养处理的斑马鱼胚胎尾部血管丛发育较缓慢, 经过 RT-PCR、qPCR 定量分析, *flkl*、*flt4*、*ephrinB2* 的表达均明显降低, 全胚原位杂交结果进一步验证了该结果。经原位细胞增殖及细胞凋亡检测, 发现水平回转培养可以促进斑马鱼细胞的凋亡, 而对增殖无显著影响, 提示水平回转培养可能是通过促进斑马鱼细胞凋亡影响其血管发育。

本研究利用转基因斑马鱼(*flkl*: *GFP*)及野生型斑马鱼为模式动物, 在体研究了水平回转培养环境对斑马鱼血管系统早期发育的影响。通过表型观察, 发现水平回转培养对斑马鱼心率、破壳率、黑色素形成等均有一定影响, 且水平回转培养会导致斑马鱼胚胎尾部血管丛发育迟缓。分别通过 RT-PCR、qPCR 及全胚原位杂交等手段进行鉴定, 实验结果表明, 水平回转培养对斑马鱼胚胎发育有重要影响。通过全胚原位凋亡及增殖, 发现水平回转培养对斑马鱼胚胎发育的影响有可能是通过促进细胞凋亡引起。这一结果将为回转培养影响血管发育的机制提供参考。

#### 参考文献(References):

- [1] Crawford-Young SJ. Effects of microgravity on cell cytoskeleton and embryogenesis. *Int J Dev Biol*, 2006, 50(2-3): 183-191. DOI
- [2] Suda T, Abe E, Shinki T, Katagiri T, Yamaguchi A, Yokose S, Yoshiki S, Horikawa H, Cohen GW, Yasugi S, Naito M. The role of gravity in chick embryogenesis. *FEBS Lett*, 1994, 340(1-2): 34-38. DOI
- [3] Jung SY, Bowers SD, Willarda ST. Simulated microgravity influences bovine oocyte *in vitro* fertilization and preimplantation embryo development. *J Anim Vet Adv*, 2009, 8(9): 1807-1814. DOI
- [4] Wang YL, An LL, Jiang YD, Hang HY. Effects of simulated microgravity on embryonic stem cells. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29214. DOI
- [5] Kawahara Y, Manabe T, Matsumoto M, Kajiume T, Matsumoto M, Yuge L. LIF-free embryonic stem cell culture in simulated microgravity. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6343. DOI
- [6] 刘卫生, 王英杰, 刘涛, 张世昌. 模拟微重力条件下小鼠拟胚体形成及分化的初步观察. 第三军医大学学报, 2008, 30(17): 1594-1597. DOI
- [7] Kang CY, Zou L, Yuan M, Wang Y, Li TZ, Zhang Y, Wang JF, Li Y, Deng XW, Liu CT. Impact of simulated microgravity on microvascular endothelial cell apoptosis. *Eur J Appl Physiol*, 2011, 111(9): 2131-2138. DOI
- [8] Sanford GL, Ellerson D, Melhado-Gardner C, Sroufe AE, Harris-Hooker S. Three-dimensional growth of endothelial cells in the microgravity-based rotating wall vessel bioreactor. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2002, 38(9): 493-504. DOI
- [9] 张华, 王强, 贾秀志, 唐建民, 郭涛, 王丽群, 赵育莹, 张凤蕴. 模拟微重力对人脐静脉内皮细胞微丝骨架的影响. 哈尔滨医科大学学报, 2008, 42(6): 553-555. DOI
- [10] Infanger M, Kossmehl P, Shakibaei M, Baatout S, Witzing A, Grosse J, Bauer J, Cogoli A, Faramarzi S, Derradji H, Neefs M, Paul M, Grimm D. Induction of three-dimensional assembly and increase in apoptosis of human endothelial cells by simulated microgravity: impact of vascular endothelial growth factor. *Apoptosis*, 2006, 11(5): 749-764. DOI
- [11] Hwang S, Shelkovich SA, Purdy RE. Simulated microgravity effects on the rat carotid and femoral arteries: role of contractile protein expression and mechanical properties of the vessel wall. *J Appl Physiol*, 2007, 102(4): 1595-1603. DOI
- [12] 全珊珊, 吴新荣. 斑马鱼, 人类疾病研究的理想模式动物. 生命的化学, 2008, 28(3): 260-262. DOI
- [13] 张蕊, 黄华. 水平旋转生物反应器的微重力环境分析. 技术与市场, 2009, 19(7): 37-38. DOI
- [14] Dutt K, Sanford G, Harris-Hooker S, Brako L, Kumar R, Sroufe A, Melhado C. Three-dimensional model of angiogenesis: coculture of human retinal cells with bovine aortic endothelial cells in the NASA bioreactor. *Tissue Eng*, 2003, 9(5): 893-908. DOI
- [15] Siamwala JH, Majumder S, Tamilarasan KP, Muley A, Reddy SH, Kolluru GK, Sinha S, Chatterjee S. Simulated microgravity promotes nitric oxide-supported angiogenesis via the iNOS-cGMP-PKG pathway in macrovascular endothelial cells. *FEBS Lett*, 2010, 584(15): 3415-3423. DOI
- [16] Infanger M, Ulbrich C, Baatout S, Wehland M, Kreutz R, Bauer J, Grosse J, Vadrucchi S, Cogoli A, Derradji H, Neefs M, Küsters S, Spain M, Paul M, Grimm D. Modeled



- gravitational unloading induced downregulation of endothelin-1 in human endothelial cells. *J Cell Biochem*, 2007, 101(6): 1439–1455. [DOI](#)
- [17] Hargens AR, Richardson S. Cardiovascular adaptations, fluid shifts, and countermeasures related to space flight. *Respir Physiol Neurobiol*, 2009, 169(Suppl 1): S30–S33. [DOI](#)
- [18] Tank J, Baevsky RM, Funtova II, Diedrich A, Slepchenkova IN, Jordan J. Orthostatic heart rate responses after prolonged space flights. *Clin Auton Res*, 2011, 21(2): 121–124. [DOI](#)
- [19] Grimm D, Bauer J, Ulbrich C, Westphal K, Wehland M, Infanger M, Aleshcheva G, Pietsch J, Ghardi M, Beck M, El-Saghire H, de Saint-Georges L, Baatout S. Different responsiveness of endothelial cells to vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor added to culture media under gravity and simulated microgravity. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(5): 1559–1573. [DOI](#)
- [20] Grosse J, Wehland M, Pietsch J, Ma X, Ulbrich C, Schulz H, Saar K, Hübner N, Hauslage J, Hemmersbach R, Braun M, van Loon J, Vagt N, Infanger M, Eilles C, Egli M, Richter P, Baltz T, Einspanier R, Sharbati S, Grimm D. Short-term weightlessness produced by parabolic flight maneuvers altered gene expression patterns in human endothelial cells. *FASEB J*, 2012, 26(2): 639–655. [DOI](#)

## •科学新闻•

### 小麦 A 基因组测序完成

2013 年 3 月 24 日 18 时,国际著名学术刊物《自然》(Nature, <http://www.nature.com/nature>)在线发表了题为“Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*”的研究论文。该项研究首次完成了小麦 A 基因组的测序和草图绘制,比较全面地揭示了 A 基因组的结构和表达特征,对未来深入和系统地研究麦类植物结构与功能基因组学以及进一步推动栽培小麦的遗传改良具有重要理论意义和实用价值。该项研究由中国科学院遗传与发育生物学研究所植物细胞与染色体工程国家重点实验室小麦研究团队发起,通过与深圳华大基因研究院和美国加州大学戴维斯分校合作顺利完成。

小麦是全球最重要的粮食作物,养活了世界上 40%的人口,提供全球 20%的人类营养所需热能和蛋白质。生产上广泛种植的普通小麦是一个异源六倍体,含有 A、B 和 D 三个基因组。追本溯源,普通小麦是由祖先野生的一粒小麦(乌拉尔图小麦,含 AA 基因组)与拟斯卑尔托山羊草(*Aegilops speltoides*,含 BB 基因组)杂交形成四倍体小麦(*Triticum turgidum*,含有 AABB 基因组)。大约在 8000 年前,四倍体小麦与粗山羊草(*Aegilops tauschii*,含 DD 基因组)再一次自然杂交,经自然和人类的选择形成如今广泛栽培的普通小麦(*Triticum aestivum*,含 AABBDD 基因组)。由于普通小麦基因组大(17000 Mb,是水稻基因组的 40 倍)而复杂,85%以上序列为重复序列,致使基因组测序研究困难重重,进展缓慢,成为了限制小麦基础和应用研究进一步发展的一个瓶颈。含有 A 基因组的乌拉尔图小麦是小麦 A 基因组的原始二倍体供体种,也是小麦进化的基础性基因组(世界上所有小麦包括二、四、六倍体小麦、*Timopheevii* 和 *Zhukovskiyi* 小麦等都含有 A 基因组),在小麦进化过程中起着核心作用。

研究团队利用新一代测序技术,对二倍体乌拉尔图小麦 G1812 系的基因组进行了测序、组装、注释及相关分析。鉴定出了 34,879 个编码蛋白基因,其基因数量与已知禾本科植物基因组的基因数相似。基因组比较研究发现,在进化过程中由于大量反转座子重复序列在基因间的插入,导致了小麦 A 基因组的剧烈扩增。与已知禾本科作物基因组比较分析,鉴定出了 3,425 个 A 基因组特异基因和 24 个新小 RNA,并发现含 NB-ARC 功能域的抗病基因在小麦 A 基因组明显增多。这些基因和小 RNA 的扩张可能是赋予小麦抵御恶劣生存环境和广适性的主要原因。通过同源基因的比对和关联分析,还鉴定出了一批控制重要农艺性状的基因,如控制籽粒长度和千粒重的 *TuGASR7* 基因。此外,该研究还筛选出大量的遗传分子标记,将有助于重要数量农艺性状基因的克隆及基因组选择,促进小麦的分子育种。

(摘自 [http://www.genetics.ac.cn/xwzx/kyjz/201303/t20130322\\_3803355.html](http://www.genetics.ac.cn/xwzx/kyjz/201303/t20130322_3803355.html))