

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00477

Rbb4l 促进 TGF- β /Nodal 信号转导和斑马鱼胚胎的背部发育

佟静媛, 柳星峰, 贾顺姬

清华大学生命科学学院, 北京 100084

摘要: TGF- β /Nodal 信号通路在斑马鱼胚胎背腹分化过程中发挥重要作用。为了进一步探究该信号通路的功能及作用机制, 文章采用酵母双杂交的方法, 以斑马鱼 Smad2/3a 为诱饵蛋白筛选得到一系列 Smad2/3a 的互作蛋白, 其中之一为 Rbb4l (Retinoblastoma binding protein 4, like)。已有的报道表明, Rbb4l 的人类同源蛋白 RBBP4 (Retinoblastoma binding protein 4) 是染色质修饰相关的复合体的组成成分, 但它在脊椎动物胚胎发育过程中的作用还知之甚少。文章通过体外及体内的一系列实验表明, Rbb4l 能直接与 Smad3a 互作, 增强 TGF- β /Nodal 信号。在斑马鱼胚胎中过表达 *rbb4l* 导致胚胎的背部化, 伴随着背部标记基因表达区域的扩大和腹部标记基因表达区域的缩小。相反, 在胚胎中下调 *rbb4l* 的表达, 可以导致胚胎在 24 hpf(hours post-fertilization)左右出现腹部化的表型。文章进一步通过一系列的挽救实验, 证明在缺少 Nodal 信号的情况下, *rbb4l* 的过表达不能引起胚胎的背部化。综上所述, Rbb4l 可以增强 Nodal/Smad2/3 信号, 并且这种正向调节的功能依赖于 Nodal 信号本身。

关键词: 斑马鱼; Rbb4l; TGF- β /Nodal; Smad2/3; 背腹分化

Rbb4l enhances TGF- β /Nodal signaling and promotes zebrafish embryonic dorsolization

TONG Jing-Yuan, LIU Xing-Feng, JIA Shun-Ji

School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: The TGF- β /Nodal signaling pathway plays an important role in the zebrafish dorsoventral patterning process. To further explore the function and mechanism of this signaling pathway, we identified a set of Smad2/3a interacting proteins by the yeast two-hybrid screen. Rbb4l (Retinoblastoma binding protein 4, like) is one of the identified proteins. Human RBBP4 (Retinoblastoma binding protein 4), the homolog of zebrafish Rbb4l, has been shown to form complexes with other chromatin modifiers, but its roles in embryonic development remain unknown. In this study, we showed that Rbb4l

收稿日期: 2012-11-02; 修回日期: 2012-12-19

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(编号: 2011CB943800), 国家自然科学基金项目(编号: 30830068)和创新研究群体科学基金项目(编号: 30921004)资助

作者简介: 佟静媛, 硕士研究生, 专业方向: 发育生物学。Tel: 010-62771164; E-mail: tongjy10@mails.tsinghua.edu.cn;

柳星峰, 博士研究生, 专业方向: 发育生物学。Tel: 010-62771164; E-mail: liu-xf06@mails.tsinghua.edu.cn

佟静媛和柳星峰同为第一作者。

通讯作者: 贾顺姬, 副研究员, 研究方向: 发育生物学。E-mail: jiasj@mail.tsinghua.edu.cn

网络出版时间: 2013-1-29 17:31:30

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130129.1731.003.html>

directly interacted with Smad3a and enhances TGF- β /Nodal signaling. In zebrafish embryos, *rbb4l* overexpression resulted in an expanded expression of dorsal markers with a reduction of ventral markers expression, suggesting a dorsalizing function. On the contrary, *rbb4l* knockdown caused ventralized phenotype of the embryos at 24 hours post-fertilization (hpf). Furthermore, a series of rescue experiments showed that *rbb4l* failed to cause embryonic dorsalization in the absence of Nodal signal. Together, our data suggested that Rbb4l acts as an enhancer of Nodal/Smad2/3 signaling during embryogenesis, and depends on the existence of Nodal signaling.

Keywords: zebrafish; Rbb4l; TGF- β /Nodal; Smad2/3; dorsoventral patterning

Nodal 信号作为 TGF- β 超家族中的成员之一^[1], 在斑马鱼中其配体主要有 Squint、Cyclops 和 Southpaw 3 种^[2]。EGF-CFC 家族蛋白 Oep (One-eyed pinhead) 是其关键的辅助受体, 它可以通过与 I 型受体 Taram/Acvr1b 的相互作用介导配体与受体复合物的形成^[3~5]。激活后的 I 型受体磷酸化下游的 Smad2/3, 导致他们与 Smad4 结合形成复合体, 这些复合体转运到细胞核中, 调控下游目标基因的转录^[6,7]。

斑马鱼中胚层形成之后, 还要经历背腹分化这一重要过程, 最背部的中胚层分化为前脊索板和脊索, 最腹部的中胚层分化为血细胞等。在此过程中, TGF- β /Nodal 信号通路发挥着重要的作用, 过量表达高浓度的 Squint 可以诱导背部中胚层标记基因 *gsc* 的异位表达。因此认为 Squint 具有指导胚胎背腹分化的作用。此外, 这种背腹分化可能与 Nodal 信号的起始时间以及作用时间长短有关。Nodal 信号发挥作用开始越早, 持续时间越长, 就越倾向于形成背部中胚层组织^[8]。

为了进一步研究 TGF- β /Nodal 信号通路在影响斑马鱼背腹分化过程中的作用, 本研究采用酵母双杂交的方法, 以其特异的下游效应因子 Smad2 和 Smad3a 为诱饵蛋白, 从斑马鱼多个时期的 cDNA 文库中筛选到了一些与之互作的蛋白因子, Rbb4l (NM_212610.1) 是其中之一。Rbb4l 的人类同源蛋白是 RBBP4, 因其与 RB (Retinoblastoma protein) 互作而得名^[9]。RBBP4 可以参与多种与染色质修饰相关的复合体的形成, 包括 NuRD、NURF、Sin3、CAF-1、PRC2 等等, 这些复合体调控组蛋白甲基化、乙酰化水平、HDACs 活性、核小体重构、DNA 合成等过程, 影响基因转录水平^[10~16]。此外, RBBP4 在小鼠的多种组织中高表达, 可以参与调控细胞周期、Ras 信

号通路、细胞骨架以及肿瘤的发生^[17~21]。在斑马鱼中, 关于 Rbb4l 的报道目前仅限于 ZFIN 上的表达谱信息^[22], 本文重点研究了该基因对 TGF- β /Nodal 信号通路的调控, 及其在斑马鱼背腹分化中的具体作用。

1 材料和方法

1.1 材料

酵母双杂交实验所使用的大部分试剂材料都来自 BD Biosciences Clontech 公司的 MATCHMAKER 文库构建和筛选试剂盒 (MATCHMAKER Library Construction & Screening Kit)。实验中所用到的野生型斑马鱼为 Tuebingen 品系, *MZoe*p 突变体为 AB 品系^[23]。胚胎均在 Holfreter 培养液 (0.05 g/L KCl, 0.1 g/L CaCl₂, 0.025 g/L NaHCO₃, 3.5 g/L NaCl, pH 值为 7.0) 中 28.5 $^{\circ}$ C 培养至所需时期^[24]。体外细胞实验主要使用了 HEK293T、Hep3B 及 HeLa 3 种不同的细胞系, 并利用转染试剂聚乙烯亚胺 (Polyethyleneimine, PEI) 进行质粒转染。

1.2 质粒构建、mRNA 的制备、Morpholino 序列及显微注射方法

以斑马鱼 cDNA 文库为模板, 利用 P1、P2 引物扩增 *rbb4l* 编码框 (Open reading frame, ORF) 序列, *Nde* / *Xba* 酶切连入 pCMV5-HA 载体, 构建其真核表达载体 pCMV5-HA-rbb4l; 用 P3、P4 引物扩增 *rbb4l* ORF 序列, *EcoR* / *EcoR* 酶切连入 pXT7, 构建其 mRNA 体外表达载体 pXT7-rbb4l; 用 P5、P6 引物扩增 *rbb4l* 5'UTR 及 186 bp 的编码区序列, *BamH* / *Kpn* 酶切连入 pEGFP-N3, 构建反义寡核苷酸有效性的检测载体 rbb4l-5'UTR-GFP。引物序列见表 1。

表 1 本研究所使用的引物及序列信息

引物名称	序列(5'→3')
P1	GGAATCCATATGGCCGATAAAGAAGTGTAC
P2	GCTCTAGAGAGATCAATTATGATGCCTGTC
P3	GGAATTCATGGCCGATAAAGAAGTGTAC
P4	CGGATATCGAGATCAATTATGATGCCTGTC
P5	GGGGTACCCCGTTTTCGCTTGTGAGA
P6	CGGGTCCGGAGAACACATAGTCCTTC
gata2-5	CTCCTCAGCGGATCCGCTTCCAGC
gata2-3	GGTCGTGGTTGTCTGGCAGTTTCGC
chd-5	AGACTGCTGTAAGGAGTGTCTCT
chd-3	CCATGAAGTCTCTATGCATTCCG
eve1-5	GCGAACTGGCGGCAGCCCTTAAC
eve1-3	GTAGGTCGATGGAGGCAGGTGCAAAG
flh-5	GAAGAGCTTACGAACTTATGGAC
flh-3	TACACAGCTCCACGACATGTTGT
gsc-5	GAGACGACACCGAACCATTT
gsc-3	CCTCTGACGACGACCTTTTC
actin-5	ATGGATGATGAAATTGCCGCAC
actin-3	ACCATCACCAGA GTCCATCACG

*Bam*HI 酶切 pXT7-rbb4l, 制备合成 mRNA 的模板, 回收纯化, 用 Ambion 公司的 mMESSAGE mMACHINE 体外转录试剂盒制备 mRNA。用 QIAGEN 公司的 RNeasy Mini RNA 试剂盒回收纯化 mRNA, 并通过琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测获得的 mRNA 质量和浓度。

文中所用的吗啉环修饰的反义寡核苷酸 (Morpholino, MO) 由 GENETOOLS 公司合成, Morpholino 序列见表 2。

胚胎在 1~2 细胞期时进行显微注射, 每种 MO 或者 mRNA 的注射量大约为 1.5~2 nL, 当两种 MO 或 mRNA 需要共注射时, 采取先后顺序注射的策略。文中所提到的注射剂量均为每一枚胚胎最终实际得到的 MO 或 mRNA 的量。

1.3 免疫印迹实验

预冷的 PBS 溶液漂洗细胞表面 2 次后, 加入适量预冷的 TNE 细胞裂解液(10 mmol/L Tris-HCl

pH7.4, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 可根据需要加入蛋白酶抑制剂), 冰上放置。刮取细胞, 4 旋转裂解 10 min, 4 、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 加入适量 SDS-PAGE 上样缓冲液, 混合均匀, 沸水浴 5 min, 电泳。用湿转法将蛋白样品从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上转移至硝酸纤维素膜上, TBST 溶液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20)漂洗 2 次, 加封闭液(5%脱脂奶粉, TBST), 室温 1 h。去除封闭液, 加入相应的一抗, 室温孵育 2 h(或 4 孵育过夜)。TBST 溶液漂洗 3 次, 每次 10 min。去除 TBST, 加入相应的 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h。TBST 溶液漂洗 3 次, 每次 10 min。最后利用化学发光试剂 ECL 进行显色, X 光胶片显影。

1.4 免疫共沉淀实验

转染后 36~48 h, 收集细胞并充分裂解, 离心取上清至新的 1.5 mL 离心管中, 加入 2 μ g 相应抗体, 4 缓慢转动混合 1 h 以上, 加入 1/20 体积的 Protein A/G-Sepharose Beads, 4 继续缓慢转动混合 4~10 h。4 、3 000 r/min 离心 3 min, 吸除上清, 加入 1 mL 预冷的 TNE, 于 4 缓慢转动漂洗 3 min, 4 、3 000 r/min 离心 3 min, 吸除上清, 重复漂洗 3 次。漂洗完成后, 吸干残留的 TNE, 加入 30~50 μ L 2 \times SDS-PAGE 上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 即可上样检测。

表 2 本研究所使用的 MO 及序列信息

MO 名称	序列(5'→3')
sqMO	ATGTCAAATCAAGTAATAATCCAC
rbb4lMO1	TCGTACACTTCTTTATCGGCCATTT
rbb4lMO2	CCACTGAATGGACCAGGGATATAGA
ctrMO	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA

1.5 GST 沉降实验

转染后 36~48 h, 收集细胞并充分裂解, 离心取上清至新的 1.5 mL 离心管中。取 50 μ L 的细胞裂解液, 加入 10 μ L 6 \times SDS-PAGE 上样缓冲液, 沸水浴 5 min 后通过免疫印迹实验进行蛋白表达检测。取剩下约 1 mL 的靶蛋白细胞裂解液, 加入 20 μ L Glutathione Sepharose 4B, 于 4 $^{\circ}$ C 继续缓慢转动混合 4 h。4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 3 min, 吸除上清, 加入 1 mL 预冷的 TNE, 于 4 $^{\circ}$ C 缓慢转动漂洗 3 min, 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 3 min, 吸除上清, 重复漂洗 3 次。加入表达与靶蛋白可能存在直接相互作用蛋白质的真核细胞裂解液, 于 4 $^{\circ}$ C 继续缓慢转动混合 4 h。4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 3 min, 吸除上清, 加入 1 mL 预冷的 TNE, 于 4 $^{\circ}$ C 缓慢转动漂洗 3 min, 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 3 min, 吸除上清, 重复漂洗 3 次。小心吸除上清, 加入 30~50 μ L 2 \times SDS-PAGE 上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 进行免疫印迹实验。

1.6 双荧光素酶报告基因实验

将完成转染的 Hep3B 细胞培养 24 h 后, 用 PBS 将 24 孔板中的细胞漂洗两遍, 去除残留的培养基。在每个孔中加入 100 μ L PLB 细胞裂解液(1 \times Passive lysis buffer :50 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L DTT, 0.01% Triton X-100, pH 7.4), 室温下均匀摇晃裂解 20~30 min。待每个孔中的细胞均匀裂解后用荧光检测仪进行测量即可。每次实验结果均为 3 次独立实验的平均值, 并且分析其方差以及是否有显著差异。

1.7 细胞免疫荧光实验

PBS 漂洗盖玻片上的细胞 2 次, 加入 37 $^{\circ}$ C 预热的 4%多聚甲醛溶液, 室温固定 20 min, PBS 漂洗 3 次。加入 0.4% Triton X-100 的 PBS 溶液, 室温通透 5 min, PBS 漂洗 3 次。加入 3%的 BSA 溶液, 室温封闭 20 min。去除封闭液, 加入相应的一抗, 室温孵育 1~2 h, PBST(1 \times PBS、0.1%Tween)漂洗 3 次。加入相应的二抗, 避光, 室温孵育 1 h, PBST 漂洗 5 min。加入含有 DAPI(1 μ g/mL)的 PBST, 室温染色 2 min, PBST 漂洗 2 次。封片拍照即可。

1.8 胚胎原位杂交

当斑马鱼的胚胎发育到所需时期时, 用 4%多

聚甲醛固定过夜, 并用甲醇脱水, -20 $^{\circ}$ C 放置 2 h。分别用含 50%、25%甲醇的 PBST 溶液处理 5 min, PBST 漂洗 2 次重新水化。4%多聚甲醛的 PBS 溶液固定 20 min, PBST 漂洗 2 次。HYB-溶液, 65 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, HYB+溶液预杂交 4 h 以上。吸去 HYB+溶液, 加入 100 μ L 探针溶液, 65 $^{\circ}$ C 温浴 12 h 以上。回收探针, SSCT 溶液梯度洗脱, MABT 洗 2 次。加入封闭液 1 h, 置换为 Fab-AP 抗地高辛抗体溶液, 4 $^{\circ}$ C 过夜。MABT 溶液洗脱, 染色缓冲液洗脱, BM Purple AP Substrate 室温下显色后, 观察结果, 拍照即可。

1.9 实时荧光定量 PCR

取约 50 枚 shield 时期目标胚胎, 脱膜处理后, 用 Qiagen 公司 RNA 提取试剂盒提取总 RNA 并用 DNase I 处理。检测样品浓度和纯度后, 反转录合成 cDNA 作为定量分析的模板。实验中所用试剂盒为 RealMasterMix (SYBR Green)(天根公司), 所用仪器为 Opticon 2 定量 PCR 仪(BIO-RAD 公司), 以该 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR, 具体引物序列见表 1。每个 cDNA 样品中的待测基因与 *actin* 同时平行检测, 以后者为内参消除总 cDNA 量不同带来的非特异性偏差。实验结果为 3 次独立实验的平均值, 并分析其方差。显著性检测采用 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 Rbb41 与 Smad3a 具有直接的相互作用

Nodal 信号作为 TGF- β 信号超家族中的成员, 在胚胎早期发育过程中的背腹分化、中内胚层诱导等过程中都发挥着重要的作用。本实验室一直关注 Nodal 信号对于胚胎早期发育的影响, 因此本研究利用酵母双杂交系统分别构建了含有诱饵表达载体 pGBKT7-smad2 或 pGBKT7-smad3a 的 Y187 酵母菌, 以及含有斑马鱼母源 cDNA 的 AH109 酵母表达文库。将含有 pGBKT7-Smad3a 的 Y187 酵母菌与 AH109 酵母表达文库融合, 30 $^{\circ}$ C 轻摇培养 24 h, 当在显微镜下看到三叶草形状的融合酵母产生后, 在含 5 mmol/L 3-AT 和 X-gal 的四缺选择性培养基 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade(QDO)上铺板, 筛选得到一系列阳性酵母菌落。分别从这些阳性酵母菌落中提取质粒, 并转化到细菌 *E.coli* 中测序分析, 与 GenBank 中

的蛋白序列比对得到其相关信息。通过功能分类发现, 54%的互作蛋白与转录调控或 DNA 结合相关(图 1), Smad3a 的互作因子 Rbb4l 为其中之一。

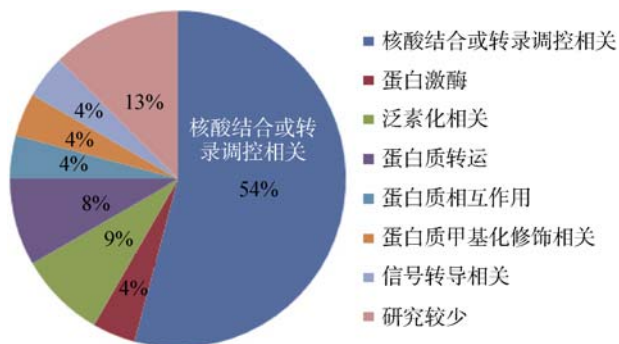


图 1 酵母双杂交阳性结果对应蛋白的功能分析
将这些基因依据它们已知的功能, 并按照图中显示的功能类别进行分类分析, 各类所占比例显示在饼图中。

为了验证 Rbb4l 与 Smad3a 之间的相互作用, 将 Rbb4l 与 Smad3a 分别克隆到带有 HA 或 Myc 标签的真核表达载体中, 得到 HA-Rbb4l 及 Myc-Smad3a。

在 HEK293T 细胞中过表达 HA-Rbb4l 及 Myc-Smad3a, 通过免疫共沉淀的实验检测, 发现 Rbb4l 与 Smad3a 之间确实存在相互作用(图 2A)。

为了进一步验证 Rbb4l 是否直接与 Smad3a 互作, 将 Rbb4l 克隆到带有 GST 标签的真核表达载体中, 得到 GST-Rbb4l。在 HEK293T 细胞中过表达 GST-Rbb4l 及 Myc-Smad3a, 通过 GST 沉降实验检测, 发现 Rbb4l 与 Smad3a 之间确实存在直接的相互作用(图 2B)。

此外, 在 HeLa 细胞中共表达 HA-Rbb4l 和 Myc-Smad3a, 通过免疫荧光染色实验, 发现 Rbb4l 在细胞核与细胞质中都存在, 并且与 Smad3a 具有一定的共定位(图 2C), 也提示 Rbb4l 可与 Smad3a 结合。

2.2 Rbb4l 能够增强 Smad3 所介导的 TGF- β /Nodal 信号通路

为了研究 Rbb4l 对 TGF- β /Nodal 信号通路的影响

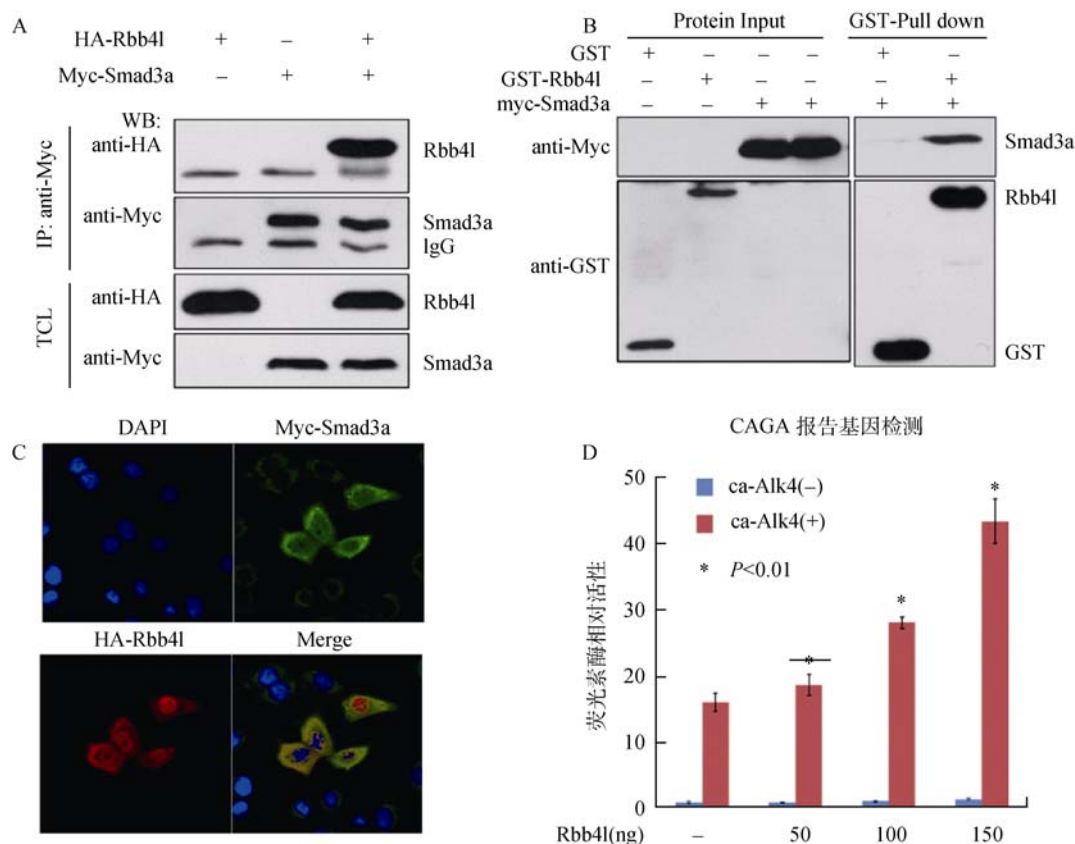


图 2 Rbb4l 与 Smad3a 直接相互作用

A: HEK293T 细胞中的免疫共沉淀; B: GST 沉降实验; C: HeLa 细胞中的免疫荧光实验(其中蓝色为 DAPI 染色, 标记细胞核; 绿色为

Myc-Smad3a 的染色; 红色为 HA-Rbb4l 的染色; Merge 表示 3 个图层叠加后的效果); D: 在 Hep3B 细胞系中, 双荧光素酶报告系统检测结果(其中 *ca-Alk4* 为 TGF- β /Nodal 信号通路持续激活型受体, *表示 $P < 0.01$, 即与对照组相比存在显著差异)。

响, 本研究利用双荧光素酶报告系统, 在 Hep3B 细胞系中过量表达 *rbb4l*。结果表明, Rbb4l 对于细胞本底水平的 TGF- β /Nodal 信号通路存在一定的上调作用; 当用 TGF- β /Nodal 信号通路的持续激活受体 *ca-Alk4* 刺激时, Rbb4l 可以进一步显著提高该信号通路的活性, 表现为 Smad3 所介导的下游报告基因 CAGA-Luc 的表达水平进一步增加, 并且这种调控作用是呈剂量依赖型的。由此表明, Rbb4l 在 Hep3B 细胞系中确实可以进一步增强 Smad3 所介导的 TGF- β /Nodal 信号通路(图 2D)。

2.3 斑马鱼胚胎中过表达 *rbb4l* 导致胚胎的背部化表型

为了研究 Rbb4l 在斑马鱼胚胎发育中的具体作用, 首先使用原位杂交的方法检测了 *rbb4l* 在胚胎发育中的时空表达情况。结果表明, *rbb4l* 为母源、合子期均广泛表达的基因, 其表达位置没有明显的特异性(图 3: A~G)。

斑马鱼中 Nodal 信号通路对于中内胚层诱导及背腹分化有重要的作用。鉴于 Rbb4l 在体外培养的

细胞系中表现为增强 TGF- β /Nodal 信号通路, 我们推测在斑马鱼胚胎中过量表达 *rbb4l* mRNA 可能会增强 Nodal 信号通路, 从而影响胚胎的背腹分化, 导致背部化表型。因此, 选择在斑马鱼胚胎单细胞期注射 400 pg *rbb4l* mRNA, 待胚胎发育至 24 hpf, 观察胚胎发育情况。结果表明, *rbb4l* mRNA 过表达的胚胎 24 hpf (hours post-fertilization) 出现躯干变短, 尾部变细, 腹部组织减少等表型(图 3: H~I), 与背部化的表型类似。

为了验证以上结论, 本研究在胚盾期(Shield stage)收取 400 pg *rbb4l* mRNA 注射过的胚胎, 并以野生型胚胎及注射同等剂量 *mCherry* mRNA 的胚胎作为对照, 检测一系列背腹分化的标记基因, 其中包括背部组织的标记基因 *gsc*、*chd* 和 *flh*, 腹部组织的标记基因 *gata2* 和 *eve1*。结果表明, 过表达 *mCherry* mRNA 的胚胎与野生型相比并没有明显差异, 而过表达 *rbb4l* mRNA 的胚胎与这两组对照相比, 均表现为背部标记基因 *gsc*、*chd* 和 *flh* 表达区域扩大, 而腹部标记基因 *gata2* 和 *eve1* 表达区域缩小和表达水平减弱(图 3: J~X)。同时, 荧光定量 PCR

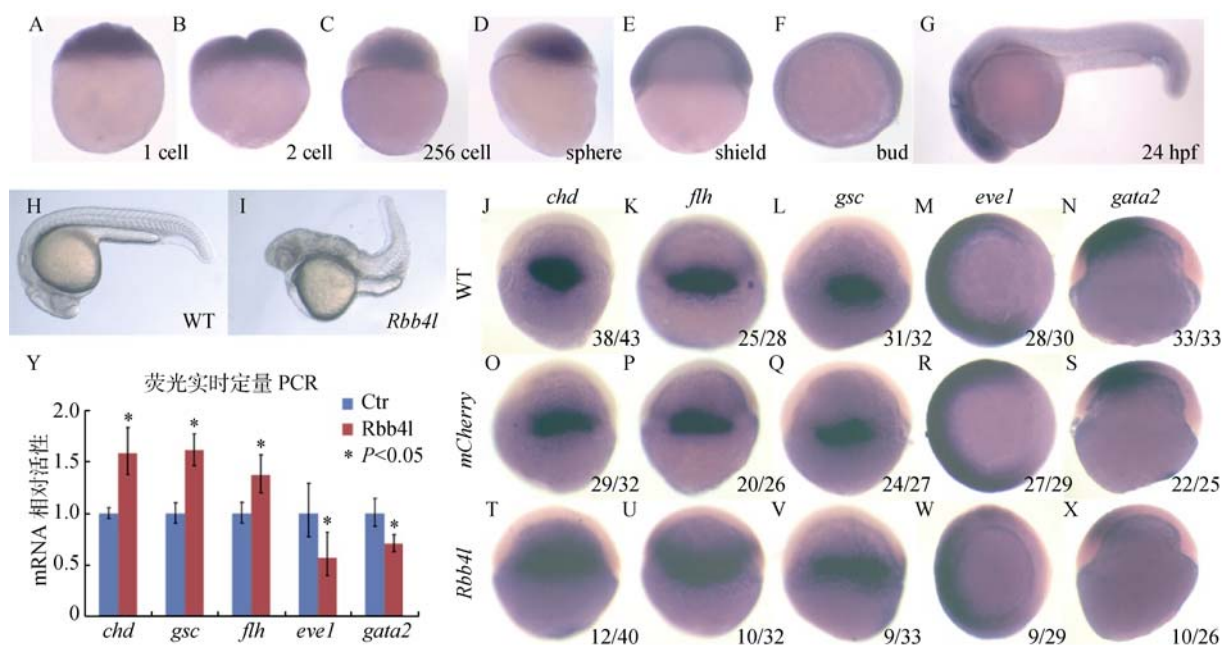


图 3 *rbb4l* 的过表达可引起胚胎的背部化表型

A~G: *rbb4l* 在斑马鱼胚胎各发育时期的原位杂交表达谱; H, I: 400 pg *rbb4l* mRNA 注射后胚胎表现为背部化表型(胚胎发育时期为 24 hpf, 拍照方向为侧面观, 头部向左); J~X: 400 pg *rbb4l* mRNA 注射后胚胎在胚盾期背腹标记基因的检测(其中 J~L、O~Q、T~V 为背面观, 动物极向上; M、R、W 为动物极观, 背部向右; N、S、X 为侧面观, 背部向右, 动物极向上; 右下标数字分别表示图中所

示表型的胚胎数/观察胚胎总数); Y :用荧光定量 PCR 的方法检测 (J ~ X) 中背腹分化相关基因的表达变化(*表示 $P < 0.05$, 即与对照组相比存在显著差异)。

检测结果也证明了这个结论(图 3Y)。因此, 在斑马鱼胚胎中过表达 *rbb4l* 可以导致胚胎出现背部化的表型。

2.4 Rbb4l 的胚胎背部化作用依赖于 Nodal 信号

Rbb4l 具有增强 Nodal 信号转导的作用, 那么其调节胚胎背腹分化的能力与 Nodal 信号本身有何关系呢? 为此, 本研究做了以下 3 个方面的遗传互作实验进行检验。

首先, 通过注射 sqtMO 的方式抑制 Nodal 信号的配体之一 Squint 的表达水平^[25], 从而减弱 Nodal 信号的强度。在胚盾期检测背腹标记基因的表达发

现, 背部标记基因 *gsc*、*chd* 和 *flh* 的表达减弱, 而腹部标记基因 *gata2* 的表达增强(图 4 :A ~ D, I ~ L), 胚胎为腹部化表型。如果在注射 sqtMO 的同时注射 400 pg *rbb4l* mRNA, 背腹标记基因的表达仍表现为与单独注射 sqtMO 后类似的变化(图 4 :I ~ P)。作为严格的对照, 利用标准的 ctrMO 替换 sqtMO, 重复此部分实验。结果表明, 注射等量 ctrMO 的胚胎与野生型相比并没有显著差异, 而 ctrMO 与 400 pg *rbb4l* mRNA 共注射后, 背腹标记基因的表达并没有呈现与单独注射 sqtMO 后一样的变化, 而是表现为与单独注射 400 pg *rbb4l* mRNA 类似的变化(附图 1: A ~ L)。因此, 本研究的数据表明, 过表达 *rbb4l* 不能挽

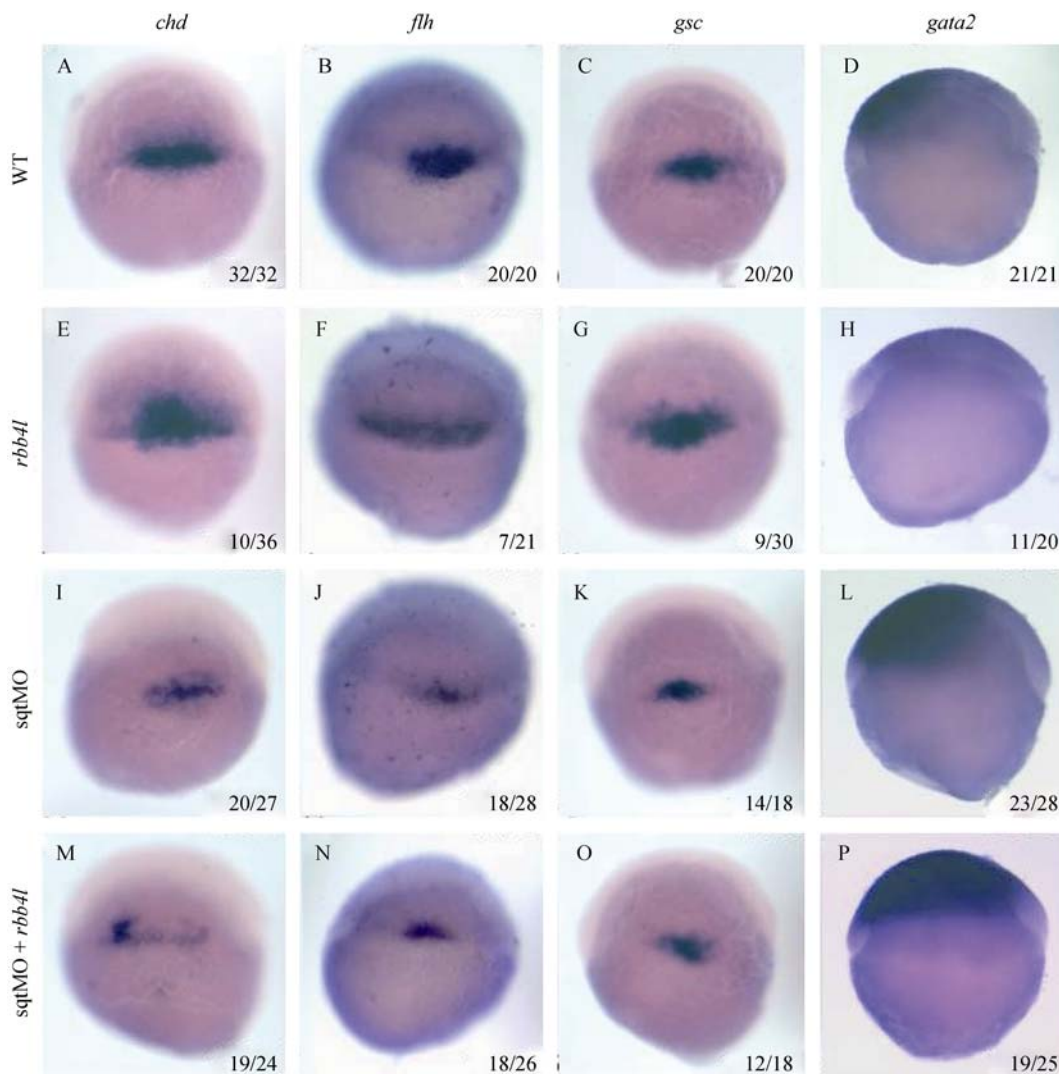


图 4 *rbb4l* 过表达不能挽救抑制 Sqt 表达所导致的胚胎腹部化表型

A ~ P: 均为整胚原位杂交, 分别检测 *chd*、*flh*、*gsc*、*gata2* 的表达情况, 胚胎发育时期为胚盾期。A ~ D: 野生型胚胎; E ~ H: 注射 400 pg *rbb4l* mRNA 的胚胎; I ~ L: 注射 5 ng *sqtMO* 的胚胎; M ~ P: 共注射 400 pg *rbb4l* mRNA 与 5 ng *sqtMO* 的胚胎。右下标数字分别表示图中所示表型的胚胎数/观察胚胎总数。

救 Nodal 信号通路中配体表达缺失所引起的胚胎腹部化表型。

其次, 尝试在受体水平下调 Nodal 信号。因此, 利用在母源合子基因 *oep* 均缺失的突变体 *MZoep*^[23]。对该突变体胚盾期的背腹标记基因的检测可见, 背部标记基因 *gsc*、*chd* 和 *flh* 表达减弱, 腹部标记基因 *gata2*、*eve1* 表达增强(图 5: A ~ E, K ~ O)。如果在 *MZoep* 的胚胎中注射 400 pg *rbb4l* mRNA, 仍在胚盾期检测这些背腹的标记基因, 结果发现与 *MZoep* 的胚胎相比并没有发生明显的变化(图 5: K ~ T), 说明过表达 *rbb4l* 也不能挽救 Nodal 信号通路中受体表达缺失所引起的胚胎腹部化表型。

最后, 利用斑马鱼 *Smad2/3a/3b* 的特异性显性抑制形式(Dominant-negative forms)dn*Smad3b* 来抑制内源的 *Smad2/3* 活性, 从而在效应因子水平上抑制 Nodal 信号通路的活性^[26]。注射 400 pg *dnsmad3b*

mRNA 后, 背部标记基因 *gsc*、*chd* 和 *flh* 的表达减弱, 腹部标记基因 *gata2* 的表达增强(图 6: A ~ D, I ~ L), 胚胎表现为腹部化。将 *dnsmad3b* mRNA 与 400 pg *rbb4l* mRNA 共注射, 相关标记基因表达的变化与单独注射 *dnsmad3b* 后的相同(图 6: I ~ P), 说明 Nodal 信号通路中的效应因子活性被抑制时过表达 *rbb4l* 也不能挽救其腹部化表型。

综上所述, *Rbb4l* 促进胚胎的背部化需要 Nodal 信号的正常转导, 说明它对于 Nodal/*Smad2/3* 信号转导起增强因子的作用。

3 讨论

研究 *rbb4l* 在斑马鱼胚胎发育中的具体作用时, 本研究首先利用 *rbb4l* mRNA 过表达的方式, 通过表型分析及标记基因检测等实验证明 *Rbb4l* 参与调控了斑马鱼胚胎的背腹分化过程。当 Nodal 信号通

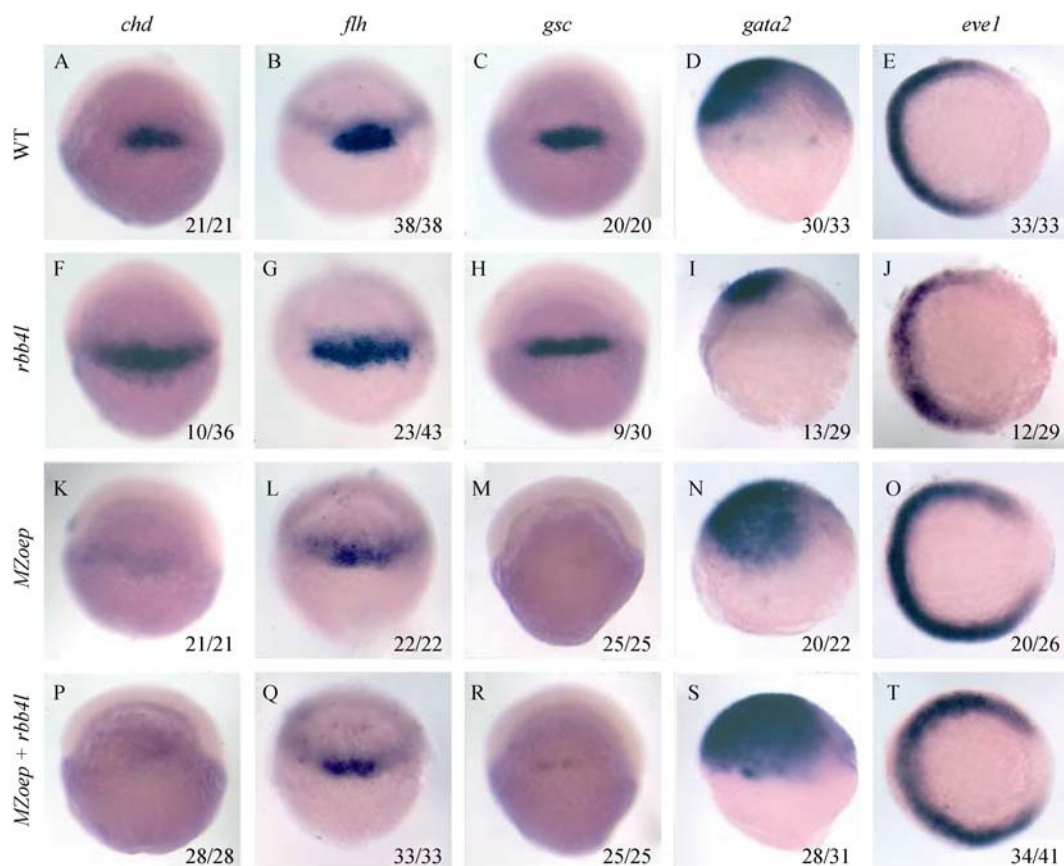


图 5 *rbb4l* 过表达不能挽救 *MZoep* 突变体胚胎的腹部化表型

A~T: 均为整胚原位杂交, 分别检测 *chd*、*flh*、*gsc*、*gata2*、*eve1* 的表达情况, 胚胎发育时期为胚盾期。A~E: 野生型胚胎; F~J: 注射 400 pg *rbb4l* mRNA 的胚胎; K~O: *MZoep* 突变体胚胎; P~T: 注射 400 pg *rbb4l* mRNA 的 *MZoep* 突变体胚胎。右下标数字分别表示图中所示表型的胚胎数/观察胚胎总数。

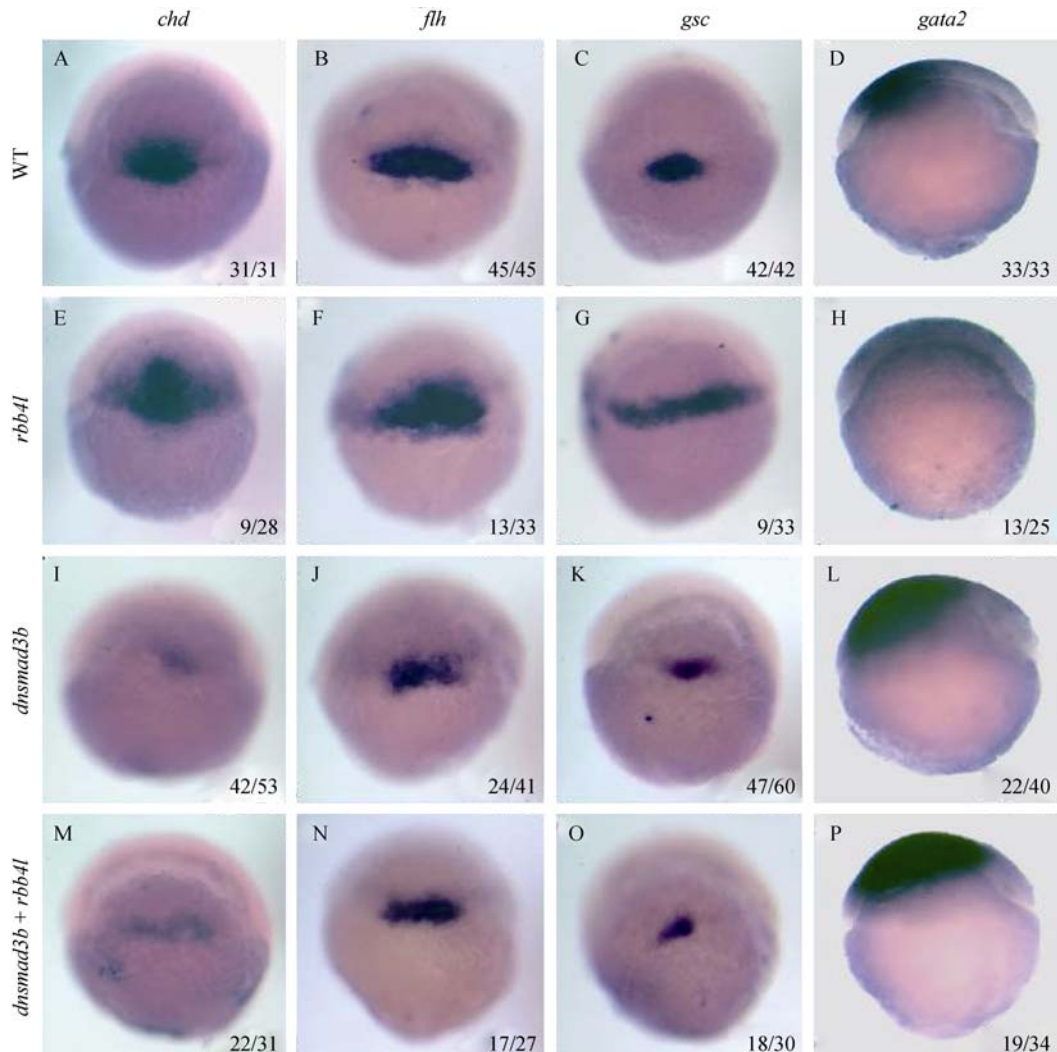


图 6 Rbb4l 过表达不能挽救抑制 Smad2/3 活性所导致的胚胎腹部化表型

A~P: 均为整胚原位杂交, 分别检测 *chd*、*flh*、*gsc*、*gata2* 的表达情况, 胚胎发育时期为胚盾期。A~D: 野生型胚胎; E~H: 注射 400 pg *rbb4l* mRNA 的胚胎; I~L: 注射 400 pg *dnsmad3b* mRNA 的胚胎; M~P: 共注射 400 pg *rbb4l* mRNA 与 400 pg *dnsmad3b* mRNA 的胚胎。右下标数字分别表示图中所示表型的胚胎数/观察胚胎总数。

路的配体、受体或关键的下效应因子 Smad2/3 的活性受到抑制时, 胚胎表现为腹部化, 而分别同时过表达 *rbb4l* mRNA 均不能挽救该表型特征。说明 Rbb4l 对于 Nodal 信号的增强作用, 需要在 Nodal 信号本身激活的情况下进行, 否则 Rbb4l 对于 Nodal 信号通路的正向调节作用可能会受 Nodal 信号的关键效应因子 Smad2/3 的活性限制而无法表现出来。此外, 本研究检测了 Nodal 水平发生改变后, *rbb4l*

的表达水平。结果表明 *rbb4l* mRNA 的表达水平并不受 Nodal 信号调控(附图 2)。因此, 我们更倾向于认为, Rbb4l 是依赖于 Nodal 信号通路本身的一个辅助调节因子, 而并非关键的介导因子。

为了进一步验证 Rbb4l 的作用, 合成了 *rbb4l* 基因的 3' 非翻译区修饰的反义寡核苷酸 *rbb4l*MO1 及 *rbb4l*MO2, 并证明其有效性(附图 3)。实验表明, 通过注射 20 ng *rbb4l*MO1 或 *rbb4l*MO2 降低 *rbb4l* 在斑

马鱼体内的蛋白表达水平, 可以导致胚胎在 24 hpf 左右出现头部变小, 眼睛变小等腹部化表型(附图 4), 与 *rbb4l* mRNA 过表达所导致的背部化表型(图 3: H~I)正好相反。因此, 结果印证了 Rbb4l 对 Nodal 信号正调控这一结论。

已有的报道表明 Rbb4l 的同源基因 RBBP4 可参与到多种与染色体表观遗传学修饰相关的复合体的形成之中, 例如 NuRD、Sin3 等等, 调控 HDACs 活性、组蛋白乙酰化水平, 影响基因的表观遗传学修饰, 从而影响其转录水平^[10~16]。除了本文中的 Rbb4l 之外, 本实验室同时还发现了另外一个 Smad 互作蛋白 Ppp4c(Protein phosphatase 4), 它也可以通过与 Smad 互作, 下调 HDAC3 的磷酸化水平, 从而解除 HDAC3 对基因转录的抑制作用, 通过表观遗传修饰的方式参与上调 TGF- β /Nodal 以及 TGF- β /BMP 信号通路。因此, 我们推测 Rbb4l 可能与 Ppp4c 类似, 对于 TGF- β /Nodal 信号的调控作用很可能是依赖于与 Smad 蛋白互作这一特性, 并且极有可能是通过形成与表观遗传学修饰相关的复合体来执行其功能, 这些推测还需要进一步的实验验证。此外, 由于 Smad2/3 与 Smad1/5 存在结构及功能上的相似性, 而且 *rbb4l* mRNA 在胚盾期的斑马鱼胚胎中广泛表达, 并没有背腹分布的特异性^[22], 因此对于 Rbb4l 是否可能与 Ppp4c 类似同时参与到 TGF- β /BMP 信号通路的调节过程中, 我们还不得而知, 同样也需要进一步的实验证据。

附 录: 附图 1~4 见文章电子版(WWW.Chinagene.cn)。

参考文献(References):

- [1] Schmierer B, Hill CS. TGF β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(12): 970–982. DOI
- [2] Schier AF. Nodal signaling in vertebrate development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19(1): 589–621. DOI
- [3] Shen MM, Schier AF. The EGF-CFC gene family in vertebrate development. *Trends Genet*, 2000, 16(7): 303–309. DOI
- [4] Yeo CY, Whitman M. Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms. *Mol Cell*, 2001, 7(5): 949–957. DOI
- [5] Yan YT, Liu JJ, Luo Y, E CS, Haltiwanger RS, Abate-Shen C, Shen MM. Dual roles of Cripto as a ligand and coreceptor in the nodal signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(13): 4439–4449. DOI
- [6] Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf- β signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21(1): 659–693. DOI
- [7] Shen MM. Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development*, 2007, 134(6): 1023–1034. DOI
- [8] Lee MA, Heasman J, Whitman M. Timing of endogenous activin-like signals and regional specification of the *Xenopus* embryo. *Development*, 2001, 128(15): 2939–2952. DOI
- [9] Qian YW, Wang YC, Hollingsworth RE Jr, Jones D, Ling N, Lee EYHP. A retinoblastoma-binding protein related to a negative regulator of Ras in yeast. *Nature*, 1993, 364(6438): 648–652. DOI
- [10] Schmit F, Korenjak M, Mannefeld M, Schmitt K, Franke C, von Eyss B, Gargic S, Hanel F, Brehm A, Gaubatz S. LINC, a human complex that is related to pRB-containing complexes in invertebrates regulates the expression of G₂/M genes. *Cell Cycle*, 2007, 6(15): 1903–1913. DOI
- [11] Philpott A, Krude T, Laskey RA. Nuclear chaperones. *Semin Cell Dev Biol*, 2000, 11(1): 7–14. DOI
- [12] Cao R, Wang LJ, Wang HB, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*, 2002, 298(5595): 1039–1043. DOI
- [13] Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the enhancer of Zeste protein. *Genes Dev*, 2002, 16(22): 2893–2905. DOI
- [14] Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V. *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell*, 2002, 111(2): 185–196. DOI
- [15] Hennig L, Taranto P, Walser M, Schönrock N, Grussem W. *Arabidopsis* MSII is required for epigenetic maintenance of reproductive development. *Development*, 2003, 130(12): 2555–2565. DOI
- [16] Loyola A, Almouzni G. Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1677(1-3): 3–11. DOI
- [17] Qian YW, Lee EYHP. Dual retinoblastoma-binding proteins with properties related to a negative regulator of ras in yeast. *J Biol Chem*, 1995, 270(43): 25507–25513. DOI
- [18] Kong L, Yu XP, Bai XH, Zhang WF, Zhang Y, Zhao WM,

- Jia JH, Tang W, Zhou YB, Liu CJ. RbAp48 is a critical mediator controlling the transforming activity of human papillomavirus type 16 in cervical cancer. *J Biol Chem*, 2007, 282(36): 26381–26391. [DOI](#)
- [19] Pacifico F, Paolillo M, Chiappetta G, Crescenzi E, Arena S, Scaloni A, Monaco M, Vascotto C, Tell G, Formisano S, Leonardi A. RbAp48 is a target of nuclear factor- κ B activity in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(4): 1458–1466. [DOI](#)
- [20] Song H, Xia SL, Liao C, Li YL, Wang YF, Li TP, Zhao MJ. Genes encoding Pir51, Beclin 1, RbAp48 and aldolase b are up or down-regulated in human primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(4): 509–513. [DOI](#)
- [21] Scuto A, Zhang HL, Zhao HY, Rivera M, Yeatman TJ, Jove R, Torres-Roca JF. RbAp48 regulates cytoskeletal organization and morphology by increasing K-Ras activity and signaling through mitogen-activated protein kinase. *Cancer Res*, 2007, 67(21): 10317–10324. [DOI](#)
- [22] Thisse B, Thisse C. Fast release clones: a high throughput expression analysis. ZFIN Direct Data Submission, 2004: <http://zfin.org>. [DOI](#)
- [23] Gritsman K, Zhang JJ, Cheng S, Heckscher E, Talbot WS, Schier AF. The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell*, 1999, 97(1): 121–132. [DOI](#)
- [24] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dynam*, 1995, 203(3): 253–310. [DOI](#)
- [25] Fan X, Hagos EG, Xu B, Sias C, Kawakami K, Burdine RD, Dougan ST. Nodal signals mediate interactions between the extra-embryonic and embryonic tissues in zebrafish. *Dev Biol*, 2007, 310(2): 363–378. [DOI](#)
- [26] Jia S, Ren Z, Li X, Zheng Y, Meng A. Smad2 and smad3 are required for mesendoderm induction by transforming growth factor-beta/nodal signals in zebrafish. *J Biol Chem*, 2008, 283(4): 2418–2426. [DOI](#)

•综合信息•

第一届全国斑马鱼 PI 大会在武汉召开

“第一届全国斑马鱼 PI 大会”于 2012 年 10 月 10~12 日在中国科学院水生生物研究所召开。来自中国大陆、香港、台湾和美国等地的近 90 名斑马鱼 PI 参加首届全国斑马鱼 PI 大会, 其中 39 名是首次参加全国性的斑马鱼会议。大会分为 6 场报告, 共安排 37 个口头报告, 参会 PI 数和报告数目均为历次全国斑马鱼会议之最。与会者从信号通路、早期发育、器官发育、凋亡与再生、疾病模型、环境健康、生物技术等方面报告了各自实验室与斑马鱼研究相关的待发表成果。这些报告从总体上代表了我国目前的斑马鱼研究领域和研究水平。

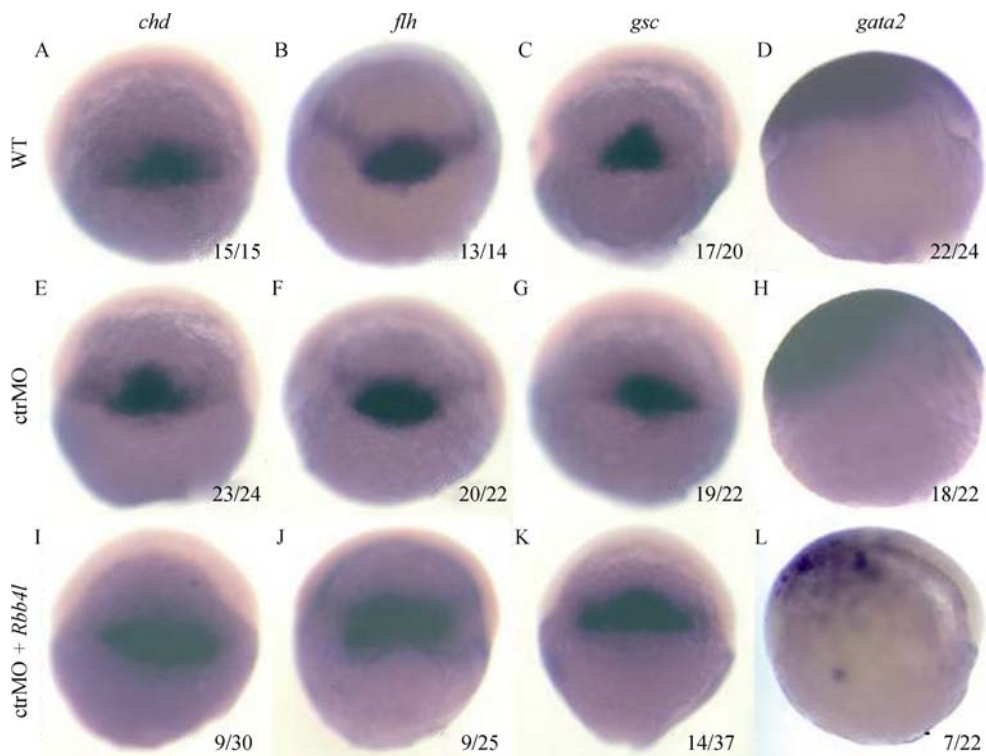
在孟安明院士主持的大会开幕式上, 通过了国家斑马鱼资源中心理事会成员名单。在报告会举行的 PI 自由讨论会上, 参会 PI 重点讨论了在我国发起斑马鱼“万基因敲除计划”的可操作性。

斑马鱼是开展生命科学等相关科学工作的重要模式动物。据不完全统计, 我国现有超过 250 家实验室利用斑马鱼开展有关科研工作, 其中有 80 多家是纯粹的斑马鱼实验室(即以斑马鱼为唯一或主要实验动物的实验室)。根据国际惯例, 这些斑马鱼实验室的负责人被称为“斑马鱼 PI(Principle Investigator)”。

我国全国性的斑马鱼会议由清华大学孟安明院士和浙江大学彭金荣教授等人发起。在“第一届全国斑马鱼 PI 大会”举办之前, 已举办了两次全国性的斑马鱼会议, 即 2010 年 4 月在杭州举行的“第一届全国斑马鱼学术研讨会”, 和 2011 年 11 月在广州举行的“第二届全国斑马鱼学术研讨会”。这两次会议分别有 40 多位和 60 多位斑马鱼 PI 携实验室成员参会。

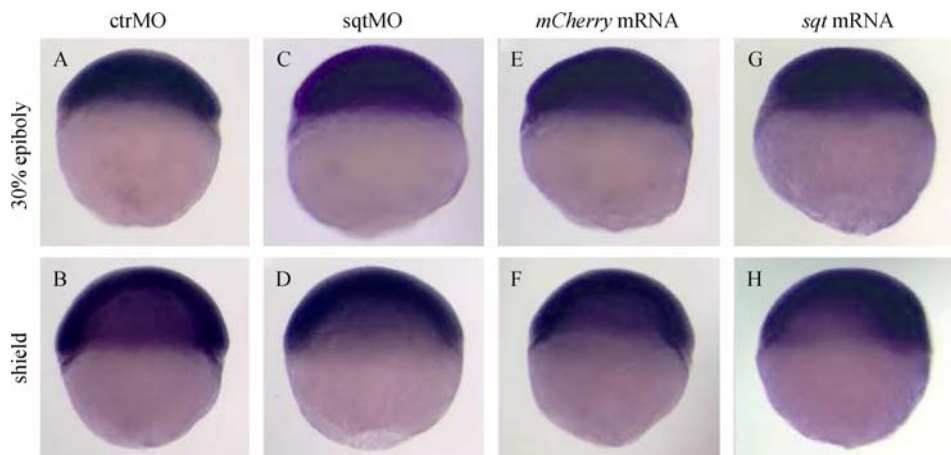
2011 年在广州举行的“第二届全国斑马鱼学术研讨会”商定, 今后的全国性斑马鱼会议采取“PI 大会”和“研究大会”的形式交替隔年举行。“PI 大会”定位于全国斑马鱼 PI 的学术聚会, 原则上不接受其他实验室成员的参会。在 PI 大会上, 参会 PI 除开展学术交流外, 还会讨论全国斑马鱼学界的规范和制度建设等事宜。“研究大会”则可接受 PI 携实验室成员参会, 并鼓励实验室成员的报告。参会 PI 同时集体商定, 全国斑马鱼 PI 大会将固定在中国科学院水生生物研究所举行, 时间为公元偶数年的 10 月 10~13 日前后, 以利于大家提前安排好工作, 更加踊跃参会。

(孙永华)



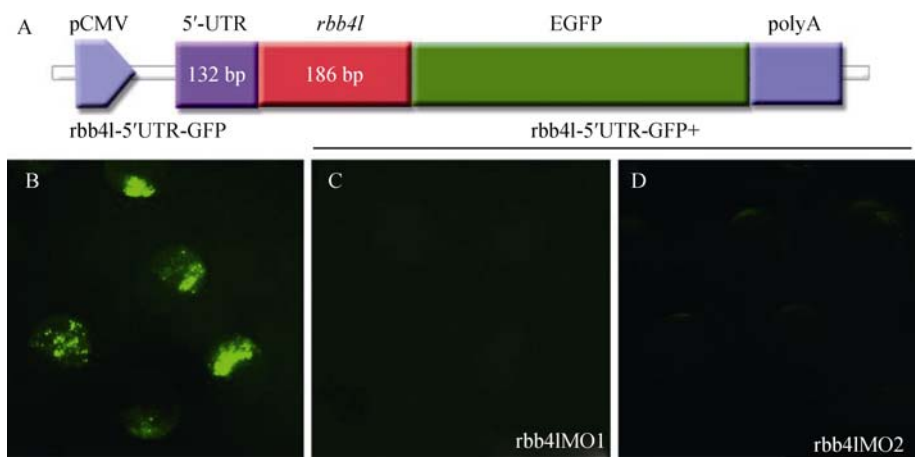
附图 1 注射 ctrMO 不影响 *rbb4l* mRNA 过表达所导致的胚胎背部化表型

A-L :均为整胚原位杂交, 分别检测 *chd*, *flh*, *gsc*, *gata2* 的表达情况, 胚胎发育时期为胚盾期。A-D :野生型胚胎; E-H :注射 5 ng ctrMO; I-L : 5 ng ctrMO 与 400 pg *rbb4l* mRNA 共注射。右下标数字分别表示图中所示表型的胚胎数/观察胚胎总数。



附图 2 改变 Nodal 信号强度不影响 *rbb4l* mRNA 的表达量

A-B : 5 ng ctrMO; C-D : 5 ng sqtMO; E-F : 1.5 pg *mCherry* mRNA; G-H : 1.5 pg *sqt* mRNA 注射后胚胎中 *rbb4l* mRNA 的表达水平。胚胎时期分别为 30% 外包期(A, C, E, G) 和胚盾期(B, D, F, H)。拍照方向为侧面观, 背部向右, 动物极向上。



附图 3 *rbb4l*MOs 的有效性检测
A: *rbb4l*-5'UTR-GFP 重组载体示意图; B: 单细胞注射 100 pg *rbb4l*-5'UTR-GFP 重组载体质粒, 胚盾期观察 GFP 绿色荧光表达; C-D: 分别将 20 ng *rbb4l*MO1 或 20 ng *rbb4l*MO2 与 100 pg *rbb4l*-5'UTR-GFP 共注射, 可以抑制其 GFP 绿色荧光蛋白的表达。



附图 4 下调胚胎中 *rbb4l* 的表达导致胚胎出现腹部化表型
A: 野生型胚胎; B: 注射 20 ng *rbb4l*MO1 的胚胎; C: 注射 20 ng *rbb4l*MO2 的胚胎; D-E: 分别为 A-C 的局部放大。胚胎发育时期为 24 hpf, 拍照方向为侧面观, 头部向左。