

TERE1 基因在小鼠胚胎双前肢正常发育和异常发生中的表达

朱勇飞^{1,2}, 朱江波², 王飞², 张天宝^{2*}, 红凌^{1*}

摘要: [目的] 观察移行上皮反应基因(*TERE1*)在小鼠胚胎双前肢正常发育和异常发生中的表达,探讨 *TERE1* 在短肢发生中的作用。[方法] ICR 小鼠受孕后,将其随机分为实验、对照两组,各 64 只。于孕第 10 天(GD10),经口灌胃一次给予实验组孕鼠 80 mg/kg 的全反式视黄酸(atRA)、对照组孕鼠给予等体积的大豆油,并分别于 GD11~GD18 取两组胎鼠的双前肢。于 GD12 取下小鼠胚胎双前肢,以 atRA 诱导,培养 72 h 后收获肢。利用实时荧光定量聚合酶链反应方法检测 *TERE1* 在各样本中的表达情况。[结果] 在整体动物试验中,atRA 可诱致小鼠胚胎明显的短肢畸形;在体外试验中,atRA 可诱致小鼠胚胎前肢多种骨骼发育异常。*TERE1* 在正常、异常肢及培养肢芽中均有表达。在正常和异常肢中,*TERE1* 的表达模式一致;除 GD15 外,实验肢中 *TERE1* 的表达均低于相同时点正常肢的表达水平。在体外培养肢,各组的表达量随培养时间的延长而增加。实验组在培养 24 h, atRA 各剂量组的表达量均低于对照组($P < 0.05$);培养 48 h 和 72 h,在 2.5×10^{-6} mol/L~ 1.0×10^{-5} mol/L 剂量范围有随剂量增加表达量增加的趋势,但在高剂量组(2.0×10^{-5} mol/L)表达又下降。[结论] *TERE1* 与小鼠胚胎前肢的发育过程有关,atRA 在诱致小鼠前肢异常发生中可引起 *TERE1* mRNA 的表达改变。

关键词: 小鼠胚胎; *TERE1* 基因; 前肢; 发育

Expression of *TERE1* in Normal Forelimbs Development and Retinoic Acid-induced Short Limb Malformations in Mouse Embryogenesis ZHU Yong-fei^{1,2}, ZHU Jiang-bo², WANG Fei², ZHANG Tian-bao^{2*}, HONG Ling^{1*} (1. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China; 2. Department of Health Toxicology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China). *Address correspondence to ZHANG Tian-bao; E-mail: tbzhang2001@yahoo.com.cn; HONG Ling; E-mail: lhong@mail.hust.edu.cn

Abstract: [Objective] To observe transitional epithelial response gene1 (*TERE1*) in normal forelimbs development and retinoic acid-induced short limb malformations in mouse embryogenesis, and to explore the relationship between *TERE1* and the short limbs. [Methods] At gestational day 10 (GD10), the gestational mice of the treatment group were administered with 80 mg/kg all-trans retinoic acid (atRA), and those of the control group were administered with the same volume soybean oil. The forelimbs of all embryos were harvested during GD11-GD18. Mice embryonic forelimbs were explanted on GD12 and harvested after cultured for 24 h, 48 h and 72 h induced by atRA in various concentrations. The expressional abundance of *TERE1* in all samples was measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (QRT-PCR). [Results] During the whole animal experiments, short limb malformations of mice embryos were induced apparently by atRA, and a variety of skeletal abnormalities of mice embryo forelimbs were also induced by atRA. *TERE1* was expressed in all samples. The expression of *TERE1* in the short limbs was lower than that in normal limbs on GD11-GD14 and GD16-GD18, but showed no difference between each other on GD15. In the limbs cultured in vitro, the expression of *TERE1* was increased with the cultured times. In the treatment group, the expression that affected by different dose atRA was lower than that of the control group at cultured for 24 h ($P < 0.05$). At cultured for 24 h and 48 h, the expression of this gene increased with the increasing dose of atRA from 2.5×10^{-6} mol/L to 1.0×10^{-5} mol/L, but decreased in the highest dose of atRA (2.0×10^{-5} mol/L) group. [Conclusion] *TERE1* may play a role during the development of the mice embryo forelimbs, and the mRNA expression of *TERE1* changed in the forelimb malformations induced by atRA during mouse embryogenesis.

Key Words: mice embryos; *TERE1* gene; forelimb; development

[基金项目] 上海市公共卫生重点学科建设项目(编号: 08GZX0301);
国家自然科学基金项目(编号: 30571587, 30671774)

[作者简介] 朱勇飞(1970-), 男, 博士; 研究方向: 发育毒理学;
E-mail: njzhu70@163.com

[*通信作者] 张天宝教授; E-mail: tbzhang2001@yahoo.com.cn; 红凌教授;
E-mail: lhong@mail.hust.edu.cn

[作者单位] 1. 华中科技大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074;
2. 第二军医大学卫生毒理学教研室, 上海 200433

移行上皮反应基因(transitional epithelial response gene1, *TERE1*) (UbiA prenyltransferase domain containing 1, *UBIAD1*) 是一个广泛表达于人体各组织的强有力肿瘤抑制因子。有研究显示 *TERE1* 在大多数侵袭性肌肉移行细胞癌中表达水平显著下降甚至缺失; 而通过基因转染在膀胱癌和前列腺癌细胞中强度表达 *TERE1*, 发现 *TERE1* 对泌尿系统肿瘤具有抑制作用^[1-2]。

该基因在果蝇中的同源基因是 *heix* 基因, 在果蝇胚胎和

幼虫的发育过程中, *heix* 突变可导致果蝇幼虫出现黑色素瘤, 从而引起其死亡^[1]。另外, 胚胎发育与肿瘤发生的关系甚密, 如肿瘤的发生过程中的 Wnt、FGF、Notch、Hedgehog、TGF- β 、Ras-MAPK 等几条重要的信号通路, 在胚胎发育过程中对调控胚胎发育也起重要作用。因此, 我们推测 *TERE1* (*UBIAD1*) 可能在哺乳动物胚胎发育中起调控作用。

由于脊椎动物肢体特殊的形态, 其被认为不但是研究肢体发育本身而且是研究胚胎发育过程中其他形态学模式的细胞和分子机制相互作用的非常有价值的模型系统^[3]。为此, 本项目拟采用全反式视黄酸 (all-trans retinoic acid, atRA) 诱导的小鼠短肢和少指模型、视黄酸诱导的体外小鼠肢芽发育异常模型来观察该基因在小鼠胚胎前肢正常发育和异常发生过程中的表达情况, 以期为进一步研究其在正常肢发育和短肢发生机制中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物

ICR 小鼠 (上海必凯实验动物有限公司提供), 8~10 周龄, 雌鼠体重 25~30 g, 雄鼠体重 30~35 g, 动物合格证号为 SCXK (沪 2003-0002)。

1.2 主要仪器和试剂

解剖显微镜 (XTL-3 型, 中国重庆光学仪器厂), 高速冷冻离心机 (HERMLE ZK400, 德国 EPENDORF 公司), 核酸-蛋白分析仪 (BioSpecmini 型, 日本岛津公司), 荧光定量 PCR 仪 (7300 型, 美国 ABI 公司), 旋转培养器 (WH361 型, 中国太仓科教仪器厂), 恒温培养箱 (3110 型, 美国 Thermo 公司), 混合供气系统 (自制)。

BGJb 培养基 (美国 Invitrogen 公司), Hanks 液, atRA (美国 Sigma 公司), Trizol 总 RNA 提取试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒 (美国 Promega 公司), SYBR kit (美国 ABI 公司)。基因 *TERE1* 和内参照基因 β -actin 的实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, QRT-PCR) 引物均由上海英骏公司合成, 引物序列如下: *TERE1* 上游引物为 GGCCATTCTCCATTCCAACA, 下游引物为 GCCAGCCTCTCGGTCAGA; β -actin 上游引物为 GTCCCTGTATGCCTCTGGTC, 下游引物为 GGTCTTTACGGATGTCAACG。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 样品收集

小鼠适应性饲养 1 周后, 雌、雄按 2:1 的比例合笼交配, 查到阴栓之日为孕期 (gestational day, GD) 第 0 天 (GD0), 并将孕鼠随机分为实验、对照两组, 各 64 只。将 atRA 以大豆油为溶剂配制成混悬液, 浓度为 8 g/L, 于 GD10 经口灌胃给予实验组孕鼠 atRA 混悬液, 给药体积为 0.01 mL/g (按体重计), 对照组给予同样体积的大豆油。分别于 GD11~GD18 将实验、对照孕鼠分批颈椎脱臼处死, 剖取子宫, 肉眼检查确定妊娠情况, 从子宫内取出胎鼠。在 GD11~GD18, 每天各组取 8 窝胎鼠, 由于 atRA 诱导的短肢发生率接近 100%, 故每窝随机选取一只胎鼠用于 QRT-PCR 实验, 解剖显微镜下分离其双前肢, 迅速用液氮冷冻保存。其余胎鼠立即拍照, 而后迅即用茜素红染色并拍照。

1.4 体外肢芽培养

先配制盐溶液, 配方为: NaCl 7.0 g/L, KCl 0.42 g/L, CaCl₂ 0.67 g/L; 培养基在临用前现配, 配方为 75% BGJb 培养基、25% 盐溶液、0.85 mmol/L 维生素 C、100 IU/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素, 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤除菌^[4]。

将 atRA 溶于二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 中, 制成浓度为 8×10^{-3} mol/L 的贮备液, 避光保存。分别将生理盐水、DMSO、不同浓度 atRA 加入培养基中。实验分为阴性对照组 (加生理盐水)、DMSO 组 [终浓度 (体积比) 为 0.5%], 低剂量组 (终浓度 2.5×10^{-6} mol/L atRA)、中剂量组 (终浓度 5.0×10^{-6} mol/L atRA)、次高剂量组 (终浓度 1.0×10^{-5} mol/L atRA)、高剂量组 (终浓度 2.0×10^{-5} mol/L atRA)。

参考文献 [5] 提供的方法, 进行肢芽培养和样品处理。将 GD12 的孕鼠脱颈椎处死, 在无菌条件下打开腹腔, 取出子宫, 分离胚胎于盛有无菌 Hanks 溶液的培养皿中, 在解剖显微镜下选取 52~55 体节数的胚胎, 切下其前肢芽。每个培养瓶约放入 6 mL 培养基、15 个肢芽; 用每隔 24 h 充混合气体一次的浸没旋转式培养法, 在 $(37.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 培养 3 d。混合气体由 45% O₂、50% N₂ 和 5% CO₂ 组成。72 h 后收获肢芽。培养后的肢芽部分用 Bouins' 液固定, 0.75% 阿利新蓝 (美国 Sigma 公司) 染色, 75% 乙醇脱水, 二甲苯透明, 保存于松木油中, 拍照; 另一部分肢芽冻存于 -80°C 低温冰箱, 各组分别取 8 个肢芽用于 *TERE1* 的定量检测。

1.5 总 RNA 提取、TERE1 检测

将收集的样品用 Trizol 裂解, 按试剂盒的说明提取总 RNA, RNA 溶于无核酸酶水中。取约 1 μ g 总 RNA 进行逆转录, 合成 cDNA, 反应体系和反应条件均参照试剂盒的说明。

将所得 cDNA 进行 QRT-PCR 反应, 反应体系如下: SYBR buffer 6.5 μ L, cDNA 1.0 μ L, 上下游引物各 0.75 μ L, Mili Q 水 16.0 μ L。反应条件为: 95°C 10 min, 95°C 15 s, 60°C 1 min (40 个循环)。

通过目标基因 (*TERE1*) 的 PCR 扩增曲线 *Ct* 值与所设内参照基因 (β -actin) 的 *Ct* 值相比较 (即 ΔCt 值) 来对各基因的原始拷贝数进行相对定量分析: ΔCt = 目标基因 *Ct* - 内参照基因 *Ct*, 通过内均一化处理之后, 目标基因相对于内参照基因的量 $Y = 2^{-\Delta Ct}$ 。

1.6 正常及异常肢的茜素红染色

参考文献 [6] 提供的方法。

1.7 统计分析

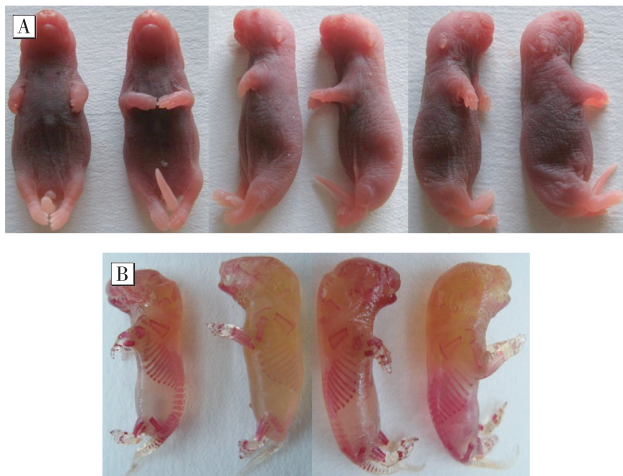
运用统计分析软件 SPSS 13.0, 采用方差分析法统计分析所有结果, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 胎鼠正常肢和短肢的形态学比较 (图 1)

实验组在 GD15 以后, 所有胎鼠均观察到腭裂及短肢发生; 在 GD11~GD14, 尚不能辨别胎鼠肢和腭外观畸形。于 GD10 给予实验组母鼠 atRA, 胎鼠体形和对照组相比无明显差异, 主要以前肢畸形为主, 其肱骨、桡骨、尺骨均较正常胎鼠短, 后肢与正常对照无差异; 用游标卡尺测量胎鼠前肢长

度, 对照组左前肢和右前肢的平均长度为 (10.96 ± 0.51) mm 和 (10.68 ± 0.48) mm, 实验组左前肢和右前肢的平均长度为 (8.68 ± 0.37) mm 和 (8.66 ± 0.50) mm, 经统计检验 $P < 0.05$, 表明实验组胎鼠双前肢明显较对照组胎鼠短。



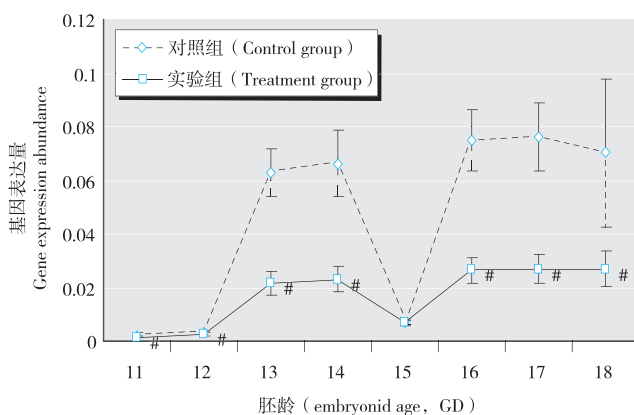
A: 刚从母鼠子宫取出的胎鼠 (Fetuses just removed from maternal uterus); B: 茜素红染色后的骨骼 (Skeleton stained with alizarin red)

图 1 GD18 正常肢 (右) 和短肢 (左) 胎鼠

Figure 1 Mice embryos on GD18 with normal forelimbs (right) and short forelimb malformations (left)

2.2 实验组和对照组 *TERE1* 表达量的比较

图 2 显示, *TERE1* 在正常和异常肢中均有表达。实验肢除 GD15 外, *TERE1* 的表达量均低于相同时点正常肢的表达水平 ($P < 0.05$), 但正常肢和异常肢中表达趋势相近。



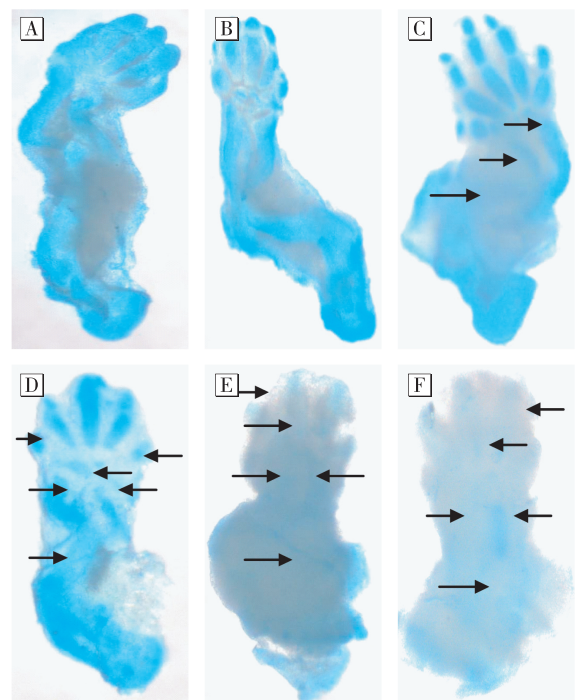
[注]: 低于同时点对照组 (Lower than that of the control group at the same time), $P < 0.05$ 。

图 2 实验肢和对照肢中 *TERE1* 表达量 ($n=8$)

Figure 2 Expression of *TERE1* in the control limbs and the treated limbs

2.3 atRA 对外培养肢骨骼的影响 (图 3)

阴性对照组和溶剂 DMSO 组显示肢芽的骨骼在表型上无明显差异; 低剂量组的肱骨、桡骨、尺骨等比阴性对照组发育差; 中剂量组长骨明显发育不良, 掌骨、指骨发育也受到影响; 次高剂量组和高剂量组, 肱骨、桡骨、尺骨、掌骨、指骨的发育均表现异常。



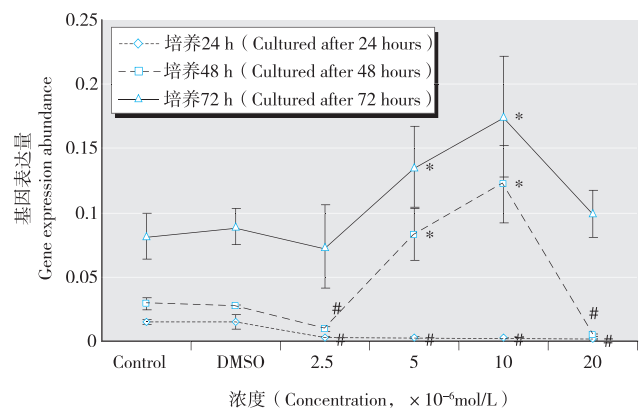
A: 阴性对照组 (NS group); B: 溶剂 DMSO 组 (DMSO group); C: 低剂量组 (low-dose group); D: 中剂量组 (middle-dose group); E: 次高剂量组 (sub-high-dose group); F: 高剂量组 (high-dose group)

图 3 atRA 对外培养小鼠肢芽骨骼形态的影响

Figure 3 Effect of the atRA on skeletal morphology of mouse forelimb bud *in vitro* culture model

2.4 不同浓度 atRA 对培养肢中 *TERE1* 表达量的影响

图 4 显示, 培养不同时间后, 对照组和溶剂 DMSO 组中 *TERE1* 的表达量有随培养时间的延长而增加的趋势。同样, 实验组的表达量也有随培养时间的延长而增加的趋势; 实验组在培养 24 h, atRA 各剂量组的表达量均低于对照组 ($P < 0.05$); 培养 48 h 和 72 h, 在 $2.5 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ mol/L 剂量范围有随剂量增加表达量增加的趋势, 但在高剂量组 (2.0×10^{-5} mol/L) 表达又下降。



[注]: * 高于同时点的对照组 (Higher than that of the control group at the same time), $P < 0.05$; # 低于同时点的对照组 (Lower than that of the control group at the same time), $P < 0.05$ 。

图 4 不同浓度 atRA 对培养肢中 *TERE1* 表达量的影响 ($n=8$)

Figure 4 Effects of atRA with different concentration on abundance of *TERE1* in cultured forelimbs

3 讨论

人类 *TERE1* 定位于染色体 1p36.11-36.33。该基因的开放读码框编码一个包含 338 个氨基酸的蛋白质(该蛋白质相对分子质量为 3.68×10^4)，该蛋白和果蝇的 heix 蛋白同源，且 heix 蛋白控制果蝇的生长发育^[1]。最近的研究表明，*TERE1* (*UBIAD1*) 突变可致角膜胆固醇沉积，引起施奈德结晶状角膜营养不良(Schnyder crystalline corneal dystrophy, SCCD)^[7]。ORR 等^[8]认为 *TERE1* (*UBIAD1*) 可能在其他蛋白通过异戊烯化进行细胞间定位时起作用。*TERE1* (*UBIAD1*) 的异戊烯转移酶区域的突变可以干扰胞内运输，导致多种代谢物(如脂质)的聚集，从而引起脂质代谢异常。

迄今，尚未见 *TERE1* 在小鼠中的表达或作用的报道。本研究在整体动物试验的结果显示，对照组和实验组均有 *TERE1* 的表达，而且表达模式一致；但实验组的表达量均低于对照组，表明在肢异常的发生发展过程中 *TERE1* 的表达受到一定抑制。体外实验显示，无论是对照组还是实验组 *TERE1* 的表达量有随培养时间的延长而增加的趋势，表明在肢的发生发展过程中该基因有持续的表达，这与整体动物试验结果一致。但培养 24 h，各 atRA 剂量组 *TERE1* 的表达量均低于对照组，培养 48 h 和 72 h，在 $2.5 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ mol/L 剂量范围有随剂量增加表达量增加的趋势，但在高剂量组 (2.0×10^{-5} mol/L) 表达又降低。通常基因的表达或随着受试物剂量增加表达增加，在达到一定剂量后出现表达抑制现象，抑或在低剂量出现兴奋效应的表达增加，达到一定剂量出现表达抑制现象。本试验结果与这两种现象均不一致，似很难解释是一种特殊的表达现象还是由于 mRNA 的定量误差或干扰因素导致试验误差所致，故尚有待于进一步研究。尽管如此，本研究的整体与离体实验结果仍提示，该基因在小鼠前肢正常发育和异常发生发展过程中均起一定作用。

参考文献：

- [1] McGARVEY TW, NGUYEN T, TOMASZEWSKI JE, et al. Isolation and characterization of the *TERE1* gene, a gene down-regulated in transitional cell carcinoma of the bladder[J]. *Oncogene*, 2001, 20(9): 1042-1051.
- [2] McGARVEY TW, NGUYEN T, PUTHIYAVEETIL P, et al. *TERE1*, a novel gene affecting growth regulation in prostate carcinoma[J]. *Prostate*, 2003, 54(2): 144-155.
- [3] COHN MJ, BRIGHT PE. Molecular control of vertebrate limb development, evolution and congenital malformations[J]. *Cell Tissue Res*, 1999, 296(1): 3-17.
- [4] KWASIGROCH TE, SKALKO RG, CHURCH JK. Mouse limb bud development in submerged culture: quantitative assessment of the effects of in vivo exposure to retinoic acid[J]. *Teratog Carcinog Mutagen*, 1984; 4(3): 311-326.
- [5] De VALCK D, LUYTEN FP. Caspase inhibition supports proper gene expression in ex vivo mouse limb cultures[J]. *Cell Death Differ*, 2001, 8(10): 985-994.
- [6] 李勇, 张天宝. 发育毒理学研究方法和实验技术[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2000.
- [7] YELLORE VS, KHAN MA, BOURLA N, et al. Identification of mutations in *UBIAD1* following exclusion of coding mutations in the chromosome 1p36 locus for Schnyder crystalline corneal dystrophy[J]. *Mol Vis*, 2007, 13: 1777-1782.
- [8] ORR A, DUBÉ MP, MARCADIÉ J, et al. Mutations in the *UBIAD1* gene, encoding a potential prenyltransferase, are causal for Schnyder crystalline corneal dystrophy[J]. *PLoS One*, 2007, 2(1): e685.

(收稿日期: 2009-11-24)

(英文编审: 黄建权; 编辑: 王晓宇; 校对: 徐新春)

【精彩预告】

广义相加模型在 2010 年上海世博会园区医疗站 就诊人数预测中的应用

陶芳芳, 虞慧婷, 林庆能, 等

为探讨应用广义相加模型进行 2010 年上海世博会园区医疗站就诊人数预测的可行性。上海市疾病预防控制中心研究人员采用时间序列的广义相加模型，在控制星期效应的基础上，对 2010 年 5 月 1 日 -8 月 8 日开园 100 d 的每日世博园区就诊人数资料、入园人数和气象因素进行模型拟合。结果显示园区就诊人数存在周末效应，就诊人数随入园总人数的增加而增加；风速对就诊人数的影响趋势是随风速的增加，就诊人数先增加后减少；随着气温上升和日温差增加，就诊人数呈上升趋势 ($P < 0.01$)。利用模型对每日就诊人数进行预测，预测的平均相对误差为 10.44%。表明广义相加模型能较好拟合世博园区医疗站就诊人数的趋势，可用于大型活动中的预测研究。

此文将于近期刊出，敬请关注！