

斑马鱼 *hoxb4a* 在心脏发育中的功能

顾叶丹, 王冰琦, 王宏杰, 胡沛男, 祖尧

Functional exploration of *hoxb4a* regulating cardiac development in zebrafish

GU Yedan, WANG Bingqi, WANG Hongjie, HU Peinan, ZU Yao

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210503453>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基因编辑酪氨酸酶(*TYR*)基因不同功能区对鱼类体色的影响

Fish coloration change from disrupting different functional regions in tyrosinase (*TYR*) gene by gene editing technology

上海海洋大学学报. 2020, 29(6): 811 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191202872>

糖原贮积症 V 型斑马鱼疾病模型的构建及其表型分析

Construction and phenotypic analysis of zebrafish disease model of glycogen storage disease type V

上海海洋大学学报. 2021, 30(1): 11 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190502644>

miR-210-5p 对南极独角雪冰鱼心脏发育的作用机制研究

Functional mechanism researches of the *Chionodraco hamatus* miR-210-5p on the cardiac development

上海海洋大学学报. 2016, 25(4): 481 <https://doi.org/10.12024/jsou.20160101630>

斑马鱼 *nos2a* 基因的生长调控作用

Role of *nos2a* in regulating the growth of zebrafish (*Danio rerio*)

上海海洋大学学报. 2021, 30(4): 573 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200703099>

斑马鱼肿瘤坏死因子(*tnf α*)及其受体(*tnfrsf1a*)应答细菌和病毒感染的表达

Expression analysis of zebrafish tumor necrosis factor (*tnf α*) and its receptor (*tnfrsf1a*) in response to bacterial and viral infections

上海海洋大学学报. 2020, 29(2): 171 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190302560>

文章编号: 1674-5566(2022)06-1342-09

DOI:10.12024/jsou.20210503453

斑马鱼 *hoxb4a* 在心脏发育中的功能

顾叶丹^{1,2,3}, 王冰琦^{1,2,3}, 王宏杰^{1,2,3}, 胡沛男^{1,2,3}, 祖尧^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 科技部海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 斑马鱼 (*Danio rerio*) 转录因子 *hoxb4a* 在心脏中的功能未见研究报道, 为了阐明 *hoxb4a* 在心脏发育中的作用, 利用基因沉默技术和 mRNA 基因过表达方法, 分别在斑马鱼中敲降和过表达 *hoxb4a* 基因, 发现抑制或过表达 *hoxb4a* 的胚胎在第 3 天出现心包腔肿大、心脏环化异常的表型。通过原位杂交技术对野生型及 *hoxb4a* 敲降胚胎进行心肌特异基因的原位杂交染色比较, 测量结果显示 *hoxb4a* 敲降胚胎的心脏环化角度增大。接着利用转基因鱼系, 发现敲降 *hoxb4a* 后的胚胎存在鳃弓异常、心内膜畸形的表型。进一步使用 qPCR 检测 *hoxb4a* 沉默后心脏相关基因的表达量变化, 结果显示 *hoxb4a* 敲降后, 多数心脏发育关键基因出现显著性下调, 而调控心脏腔室分化的关键基因 *nppa* 明显上调。研究表明斑马鱼 *hoxb4a* 沉默会导致心脏结构畸形、环化异常, 并且调控了早期心脏发育基因的变化。研究发现 *hoxb4a* 在斑马鱼早期心脏发育中发挥了作用, 并通过原位杂交及 qPCR 结果初步探索 *hoxb4a* 调控心脏腔室的分化及心脏环化过程, 深化人们对心脏发育调控网络的认识。

关键词: *hoxb4a*; 基因敲降; 心脏发育; 斑马鱼

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

斑马鱼 (*Danio rerio*) 早期胚胎透明^[1], 其循环系统与包括人类在内的其他脊椎动物发育相似^[2], 因而斑马鱼是研究心血管遗传学和基因功能的优势模型^[3]。斑马鱼心脏起源于侧板中胚层两侧的心脏原基^[4], 然后延伸形成心管 (heart tube)^[5]。胚胎在受精后 24 小时 (24 hours post fertilization, hpf) 形成一个没有瓣膜 (leaflets) 的原始线状心管结构^[6]。在 36 ~ 48 hpf 时的心脏环化过程中, 心脏腔体开始形成^[7], 这一阶段对内外因素非常敏感^[8]。接着在 100 hpf 后, 心脏在房室管 (AV canal, AVC) 形成一个瓣膜^[9]。心脏环化是必要且高度保守的形态发生过程, 将脊椎动物心脏管的不同区域置于它们最终的位置。此外, 在鸟类和哺乳动物中, 心脏神经嵴细胞 (cardiac neural crest cells, cNCCs) 参与心脏流出道 (outflow tract, OFT) 的形成, 并产生 OFT 远端周围的平滑肌细胞^[10]。

心脏发育是一个复杂而周密的过程, 并且受到遗传因素的严格调控, 包括诸多与形态发生相关的基因。其中, *Hox* 转录因子在脊椎动物早期发育过程中起着重要作用^[11]。*Hox* 基因编码一类包含同源结构域的转录因子家族, 几乎在所有真核细胞中都存在^[12]。其中, *Hox* 基因在影响神经嵴细胞分化能力方面起着重要作用^[13]。通过影响神经嵴细胞的分化, 几种 *Hox* 蛋白和共结合因子被认为对咽弓动脉和心脏的发育具有重要意义^[11]。*Hox* 基因的表达谱具有时空共线性的特点, 即位于基因组上 3' 端的基因表达区域靠近躯体的头部, 且表达时间比 5' 端的基因早^[14]。心脏作为躯体前部的器官, 也可能受到前端 *Hox* 基因的影响。MAKKI 等^[15] 在小鼠中发现, *Hoxa1* 缺失会导致晚期胚胎心脏流出道和大动脉畸形。斑马鱼 *hoxb5b* 的基因敲降会导致心脏房室分化异常, 心房数量增加, 心房变大^[16]。

收稿日期: 2021-05-24 修回日期: 2021-06-04

基金项目: 国家自然科学基金(32170423, 31501166); 上海市科学技术委员会扬帆计划(15YF1405000)

作者简介: 顾叶丹(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为遗传与发育生物学。E-mail: 964496004@qq.com

通信作者: 祖尧, E-mail: yzu@shou.edu.cn

hoxb4a 基因仅在造血功能方面有少量研究^[17],与心脏发育的关系未见报道。

为了研究 *hoxb4a* 在斑马鱼胚胎发育中的作用,本文首先使用基因沉默技术对 *hoxb4a* 进行敲降,发现 *hoxb4a* 在 3 dpf 时出现心包腔肿大、心脏环化异常的表型,进而利用 qPCR 检测心脏相关基因在 *hoxb4a* 沉默后的表达量变化。qPCR 结果显示,敲降 *hoxb4a* 后,第一心域、第二心域和心脏神经嵴细胞的部分关键基因均出现显著性表达量下调,为深入发掘 *hoxb4a* 在心脏发育中的调控机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 斑马鱼鱼系的来源与养殖

所用野生型斑马鱼均为 AB 品系。转基因野生型斑马鱼 Tg(*myl7*-GFP) 和 Tg(*kdr1*-GFP) 为北京大学张博教授惠赠。本实验对斑马鱼的养殖和科研技术处理,均按照上海海洋大学动物伦理相关规定进行(IACUC SHOU-DW-2021-042)。

斑马鱼养殖在循环水系统中,循环水经过紫外消毒和曝气处理,水温 28.5 °C, pH 为 7.0 ~ 8.0。斑马鱼产卵在配鱼缸中进行,胚胎收集后养殖在纯净水中,于 28.5 °C 恒温箱中培养,并保持

每天换水。一般在受精后第 3 天开始破膜,到第 5 天投喂草履虫,第 20 天开始少量投喂昆虫,持续喂养至第 30 天,可将幼鱼放到循环水系统中养殖。雄鱼和雌鱼交配后产生的 I 细胞期受精卵用于显微注射。

1.1.2 质粒与载体来源

pXT7 质粒由北京大学张博教授惠赠,过表达载体 *hoxb4a* CDS-pXT7 由本实验室克隆构建。

1.1.3 仪器和试剂

本实验所用仪器包括 PCR 仪(Bio-rad, 美国, C1000 Touch)、荧光定量 PCR 仪(Roche, 德国, LightCycler⁴⁸⁰ II)、正置荧光显微镜(ZEISS, 德国, Axio Imager2)。

实验所用试剂主要包括体外转录试剂盒(Life Technologies, 美国)、FastStartTM 通用 SYBR Green 预混液(Roche, 德国)、NBT/BCIP 即用型显色液(Roche, 德国)。

1.2 实验方法

1.2.1 整体胚胎原位杂交

在斑马鱼基因编码区(CDS)跨内含子的区域设计探针引物,在下游引物前加上 T7 启动子。以野生型斑马鱼的 cDNA 为模板 PCR, PCR 产物纯化之后准备进行体外转录,合成整体胚胎原位杂交所需的探针(表 1)。

表 1 探针引物序列

Tab. 1 Sequence of probe primers

| 引物名称 Primers | 序列(5'-3') Sequences(5'-3') |
|------------------|--|
| <i>hoxb4a</i> -F | CCTAAGTTTCCACCCTGCGA |
| <i>hoxb4a</i> -R | <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGATGCTCATCAGTGGAGGGCTA</u> |
| <i>myl7</i> -F | TTGGCTGCATAGATCAGAACC |
| <i>myl7</i> -R | <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTGCTGATGTGAATGTTGAAC</u> |

注:下划线为 T7 启动子序列。

Notes: The underline is sequence of T7 promoter.

第一步将斑马鱼胚胎固定。若要收集超过 48 hpf 的胚胎,需要在 24 hpf 时加入 PTU(1-苯基-2-硫脲)抑制斑马鱼生长黑色素。收集胚胎到 1.5 mL 离心管中,尽量吸去离心管中的养殖水,然后加入 1 mL 4% 多聚甲醛,4 °C 摇床过夜。第 2 天用 1 × PBST 清洗 2 次,每次 5 min,然后用体积分数为 30%、50%、70%、100% 的乙醇依次进行脱水。用体积分数为 70%、50%、30% 的乙醇依次复水,然后在 PBST 中洗 2 次,每次 5 min。

使用 10 μg/mL 蛋白酶 K(Roche, 德国)处理 20 min 后,置于不加探针的杂交液中,放入 65 °C 杂交炉中孵育 4 ~ 5 h,然后加入含有 1 ng/μL 探针的杂交液,在杂交炉中杂交过夜。杂交配制 5% 羔羊血清和 2 mg/mL BSA 的封闭液,加入离心管中在室温下对胚胎进行封闭 3 ~ 4 h。封闭结束后,按体积比 1:5 000 的比例加入抗地高辛的抗体,在 4 °C 的摇床过夜。用 PBST 室温清洗 6 次,每次 15 min。Staining Buffer 洗 5 min。然后开始

准备显色,每个样品中加入 1 mL 的 NBT/BCIP,铝箔纸包裹以避光显色,其阳性信号呈蓝色。信号强度、角度等数据通过 Image J 软件测量。测量标准:以流出道中点作为起点,以房室间隔中点作为终点,两者之间距离作为心室长度。以房室间隔中点作为起点,以流入道中点作为终点,经过两点组成的直线与心室线段的夹角作为心脏环化倾角。

1.2.2 基因敲降

从 GeneTools 公司订购 *hoxb4a* 基因的反义核酸,将其溶解于 RNase-free 的水中使其终浓度为 1 mmol/L。所用的 morpholino (MO) 序列为 *hoxb4a*: 5'-AGCTGCACTTACCGATGTTTACGTG-3'。其中,*hoxb4a* MO 所用注射质量浓度为 8 ng/胚胎,每枚胚胎注射量为 1 nL。

1.2.3 基因过表达

首先克隆 *hoxb4a* 的编码区(CDS),并连接到斑马鱼中可表达的 pXT7 质粒载体中,测序正确后,在 37 °C 摇菌扩大培养。使用快速小提质粒试剂盒提取基因过表达质粒,并使用紫外分光光度计测得质粒的质量浓度。使用 *Xba* I 酶将过表达质粒线性化以用于转录。纯合后的线性质粒片段通过 Mmessage mMACHINE T7 Ultra 试剂盒体外转录合成 *hoxb4a* 的 mRNA,整个过程保证 RNase-free。*hoxb4a* mRNA 所用注射质量浓度为 20 pg/胚胎,每枚胚胎注射量为 1 nL。

1.2.4 qPCR 检测基因表达量变化

采用 Roche® 480 进行 qPCR 检测基因表达量变化。相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$,利用 GraphPad 6.0 进行数据作图和显著性差异分析。

表 2 qPCR 引物序列
Tab.2 Sequence of qPCR primers

| 基因号 Gene ID | 基因名称 Genes | 正向引物序列(5'-3') Forward primers(5'-3') | 反向引物序列(5'-3') Reverse primers(5'-3') |
|----------------|----------------|---|---|
| 57934 | <i>β-actin</i> | TTCCTTCCTGGGTATGGAATC | GCACTGTGTTGGCATAACAGG |
| 321442 | <i>nppa</i> | ATTATGAAGACAGCAACACC | GTCAAATCCATCCGAGGG |
| 30253 | <i>tbx2b</i> | GCGAACCAACAACACTGCCAGAGATG | GTCCTCACTCCTCGACCTGAATGG |
| 30071 | <i>tbx5a</i> | CGGCGTTTCCAGCACATCTCA | ACACTCGTCTCCACTTTCTCTTT |
| 30696 | <i>nkx2.5</i> | TCCAACCTTCACAGTCCAACAGCAA | TCACCAAGCTCTGATGCCATGTAGT |
| 30483 | <i>gata4</i> | CGCACTTCGACAGCTCCGTAAT | AGTCCACAGGCATTGCACAGGTAA |
| 58150 | <i>hand2</i> | GACGCCAAAGAAGAAAGGCG | TCAGTCCAATGCCAAACA |
| 57936 | <i>tbx20</i> | TCTCCATAGCCGCACTCATGTCAA | TGCTGAAGTCGCTGTGGGTCTC |
| 30612 | <i>bmp4</i> | AGCCGATCATCTCAACTCCACCAA | TCAGCACCACCCTGTCCGTTTC |
| 368206 | <i>tbx1</i> | AGCAGGCGAGAATATGACCGTGAC | GTGCGAGCGAAGTTCGTGAGGT |
| 30538 | <i>fgf8a</i> | GTGCAAGTTCGCGCAACAAG | CTTGCCAATCAGTTTCCCCC |
| 30147 | <i>islet1</i> | GTCTGACATGGGAGAGCAACA | TGCAGGACTCGTCCAGAAAC |

1.2.5 显微镜成像

胚胎用 2% 的甲基纤维素固定,利用 Zeiss Axio Imager M2 正置荧光显微镜成像。目镜倍数:1×,物镜放大倍数:10×。

2 结果

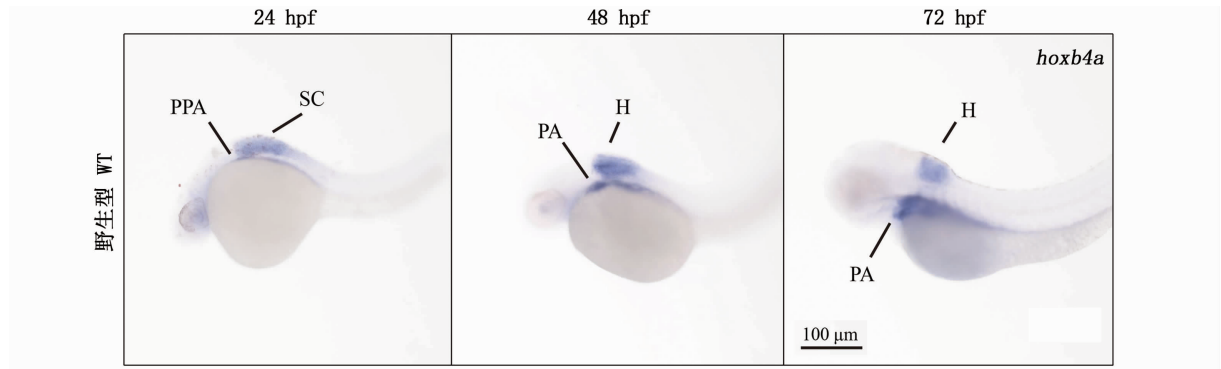
2.1 斑马鱼胚胎发育过程 *hoxb4a* 基因的表达

利用原位杂交技术,对 *hoxb4a* 在野生型胚胎中多个时期进行表达定位。实验发现 24 hpf 时,*hoxb4a* 表达在后脑、脊髓、神经管位置。48 hpf 和 72 hpf 时,*hoxb4a* 的表达均集中在后脑和鳃弓(图 1)。从 48 hpf 到 72 hpf 可以观察到:*hoxb4a*

在鳃弓的表达范围扩大、表达量增强;在后脑的表达范围缩小、表达量降低。

2.2 斑马鱼 *hoxb4a* 基因敲降导致心脏结构异常

敲降 *hoxb4a* 基因后,72 hpf 光镜下观察斑马鱼胚胎的心包腔开始肿大(图版 I)。后续使用 *myl7*(心肌细胞标记的探针)对 3 dpf 的斑马鱼胚胎进行原位杂交,发现敲降 *hoxb4a* 后,心脏无法正常环化,且心房和心室的腔室缩小(图 2)。*hoxb4a* 基因 mRNA 过表达的斑马鱼胚胎,在 72 hpf 心脏环化异常,心房和心室紧缩的表型见图版 I。



PPA. 后鳃弓; PA. 鳃弓; SC. 脊髓; H. 后脑。

PPA. posterior pharyngeal arch; PA. pharyngeal arch; SC. spinal cord; H. hindbrain.

图1 斑马鱼 *hoxb4a* 基因在野生型胚胎 24 hpf、48 hpf 和 72 hpf 时的原位杂交表达图

Fig. 1 *in situ* hybridization expression map of *hoxb4a* in wild-type embryos at 24 hpf, 48 hpf and 72 hpf

2.3 斑马鱼 *hoxb4a* 基因敲降导致心脏环化异常表型

整体胚胎原位杂交检测显示, 72 hpf 时, 野生型对照组的心室心房环化角度为 $89^{\circ} \sim 96^{\circ}$, 而敲降斑马鱼 *hoxb4a* 基因后, 心室心房环化倾角均为 $99^{\circ} \sim 126^{\circ}$, 总体明显增大 ($P < 0.05$), 但心室长度未表现明显异常 ($P > 0.05$)。见图 2b。

2.4 *hoxb4a* 基因敲降导致鳃弓和心内膜异常

为了进一步分析 *hoxb4a* 基因沉默后的心脏表型, 利用血管内皮及心内膜特异性标记基因 *kdrl* 的转基因鱼系对 morphant 进行对比观察。结果显示: 72 hpf 时, 相比于野生型对照组, 注射了 8 ng morpholino 的 *hoxb4a* morphant 胚胎出现鳃弓缢缩、心内膜外缘形态畸形(图版 II)。

2.5 斑马鱼 *hoxb4a* 基因沉默后导致多个心脏相关基因表达下调

利用 qPCR 探究 *hoxb4a* 调控的心脏相关下游基因, 发现腔室分化关键基因 *nppa* 上调 ($P < 0.05$), 房室间隔形成关键基因 *tbx2b* 下调 ($P < 0.05$), 腔室形成激活因子 *tbx20* 下调 ($P < 0.05$), 神经嵴关键基因 *islet1* 下调 ($P < 0.05$), 见图 3。

3 讨论

3.1 *hoxb4a* 影响心脏环化的发育

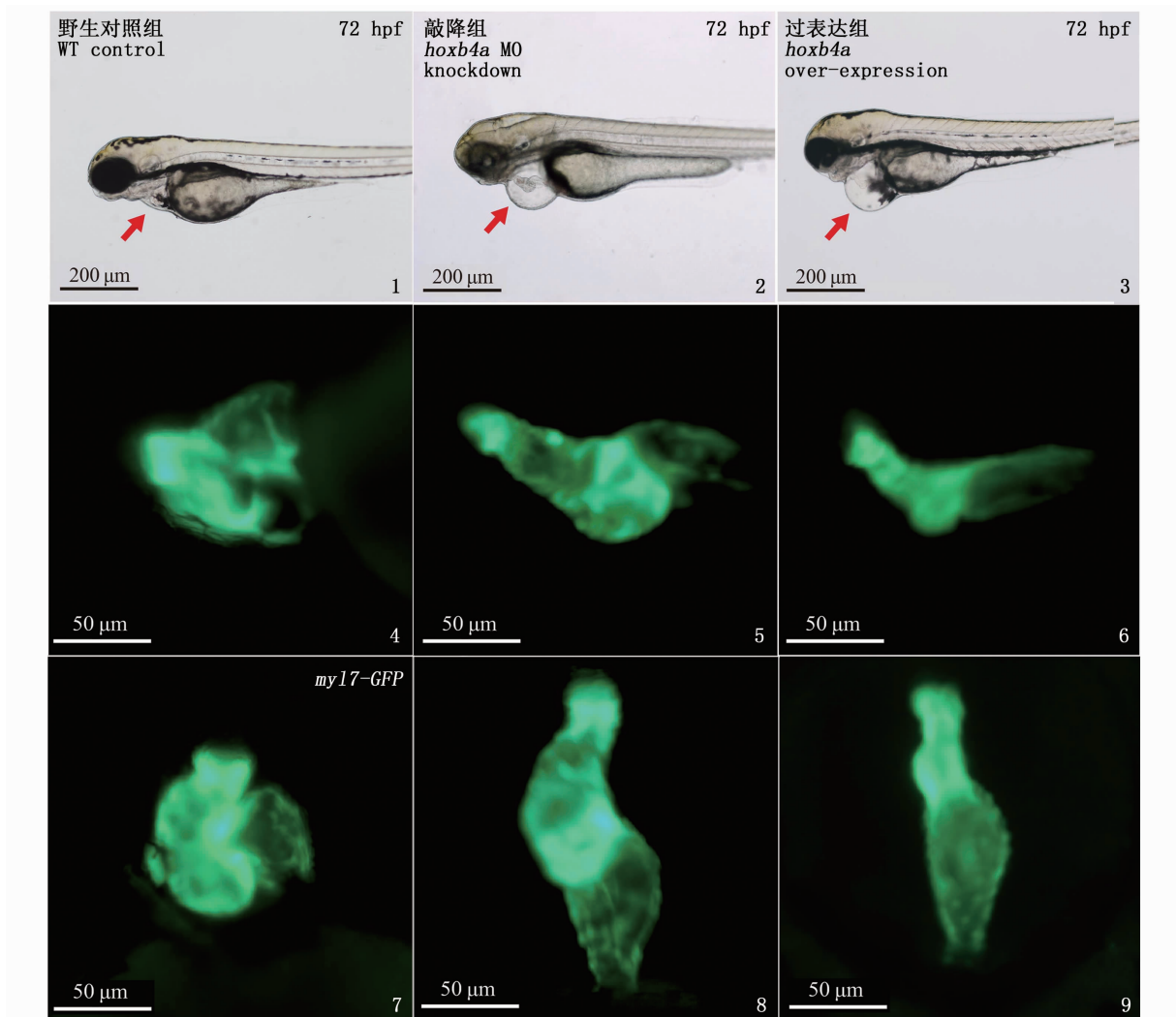
心脏环化是个复杂的过程。在斑马鱼中抑制心脏神经嵴细胞会导致心脏环化受损^[18]。小鼠中, pSHF (posterior SHF) 的部分细胞决定了心脏的环化方式^[19], 其 SHF 衍生物的损失会导致心脏环化失败^[20]。综上所述, FHF、SHF、cNCCs

均参与心脏环化。本文中利用基因敲降与过表达实验, 均证实 *hoxb4a* 的异常表达会导致心脏环化异常, 并且 *hoxb4a* 可能以基因剂量依赖性方式^[21]调节心脏发育^[22]。结合 qPCR 结果显示, 当斑马鱼 *hoxb4a* 沉默时, 各心脏谱系中部分基因均受到影响, 其中, *tbx20*、*tbx2b* 显著下调, *nppa* 明显上调。在小鼠中, GAVRILOV 等^[23]发现 *Tbx20* 突变可导致心脏环化失败、房室分化异常。2002 年, HABETS 等^[24]报道了在人类和大鼠的心脏发育过程中, *NPPA* 基因的表达是心脏腔室形成的首要标志之一, 且小鼠中 *Tbx2* 可抑制 *Nppa* 活性。因此, 猜测斑马鱼中 *hoxb4a* 基因沉默后的 *tbx2b* 表达下调是引起 *nppa* 上调的原因。总体上, *tbx20*、*tbx2b* 和 *nppa* 的表达量变化可能是导致心脏环化异常的因素之一。

3.2 *hoxb4a* 参与心脏发育的方式

2015 年, CAVANAUGH 等以神经嵴转基因斑马鱼进行谱系追踪, 发现神经嵴在两个不同的发育阶段均参与了心脏的发生。神经嵴细胞通过第 1 和第 2 鳃弓 (pharyngeal arches, PA) 迁移进入心管参与心肌的发生。直到 50 hpf 时, 第二波神经嵴细胞开始沿鳃弓迁移至心脏并参与心脏形态发生, 而 *hox* 基因在神经嵴细胞分化迁移规范上起着重要作用^[25]。本研究显示, *hoxb4a* 在 48 hpf 至 72 hpf 内在鳃弓处存在持续高表达的现象(图 1)。通过转基因鱼系结果, *hoxb4a* 基因敲降后会导致鳃弓异常表型(图版 II)。同时, 根据 qPCR 数据(图 3), 作为心脏神经嵴细胞的标记基因, *islet1* 的表达量在 *hoxb4a* 沉默后显著下调。综上所述, 猜测 *hoxb4a* 可能通过影响神经嵴细胞

参与斑马鱼心脏发育。

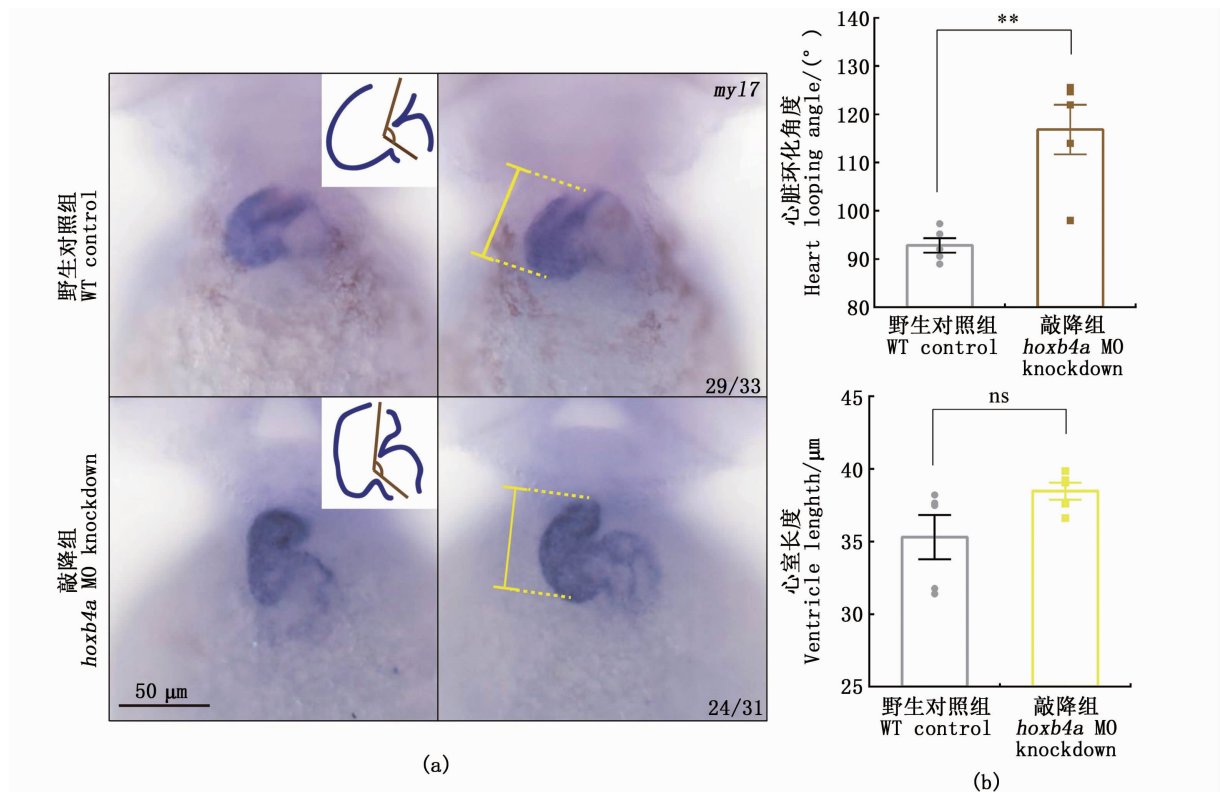


1-3. 3 dpf时,野生型对照组、敲降组(注射了8 ng morpholino)、过表达组(注射了20 pg *hoxb4a* mRNA)胚胎光镜图(侧面观,头在左),红色箭头指示心脏部位。4-6. 在转基因斑马鱼系 Tg (*myl7*: GFP)(心肌细胞被 GFP 标记)背景下,野生型对照组、敲降组(注射了8 ng morpholino)、过表达组(注射了20 pg *hoxb4a* mRNA)胚胎在3 dpf时的荧光光镜图片(侧面观,头在左)。7-9. 在转基因斑马鱼系 Tg (*myl7*: GFP)背景下,野生型对照组、敲降组(注射了8 ng morpholino)、过表达组(注射了20 pg *hoxb4a* mRNA)胚胎在3 dpf时期的荧光光镜图片(腹面观,头在上)。

1-3. At 3 dpf, the light microscopic images of wild-type control group, knockdown group (injected with 8 ng morpholino) and overexpression group (injected with 20 pg *hoxb4a* mRNA) embryos (side view with head on the left), with red arrows indicating the heart site. 4-6. In the background of transgenic zebrafish line TG (*myl7*: GFP) (myocardial cells labeled with GFP), the fluorescence microscope images of wild-type control group, knockdown group (injected with 8 ng morpholino) and overexpression group (injected with 20 pg *hoxb4a* mRNA) embryos at 3 dpf (side view, head on the left). 7-9. In the background of transgenic zebrafish line Tg (*myl7*: GFP), fluorescent microscope images of wild-type control group, knockdown group (injected 8 ng morpholino) and overexpression group (injected 20 pg *hoxb4a* mRNA) embryos at 3 dpf (ventral view with head on top).

图版 I 斑马鱼 *hoxb4a* 异常表达会导致心脏发育畸形

Plate I Zebrafish *hoxb4a* misexpression leading to abnormal cardiac development



(a) 72 hpf 时,野生型对照组、敲降组(注射了 8 ng morpholino 实验组)胚胎原位杂交表达图(腹面观,头在上),棕色线段指示在环化角度。(b)野生型对照组、注射了 8 ng *hoxb4a* morpholino 实验组心脏环化角度、心室长度差异,黄色线段指示心室长度。* . $P < 0.05$; ** . $P < 0.01$ 。

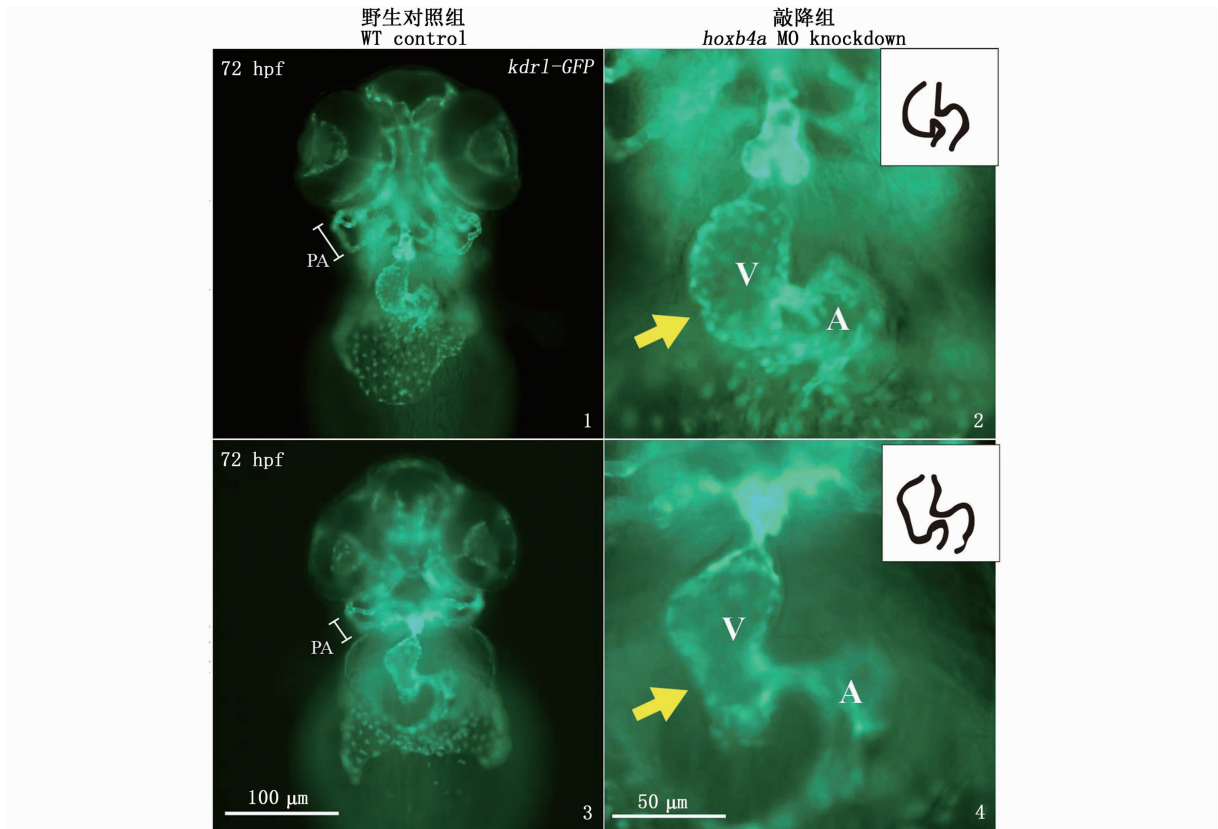
(a) At 72hpf, in situ hybridization expression map of wild-type control group, knockdown group (injected 8 ng morpholino) embryos (ventral view with head on top), The brown line segment indicates the angle of looping. (b) There were significant differences in looping angle and ventricular length between wild-type control group and experimental group. The yellow line segment indicates the length of the ventricle. * . $P < 0.05$; ** . $P < 0.01$ 。

图 2 心肌标记基因原位杂交观察 *hoxb4a* morphant 表型

Fig. 2 *in situ* hybridization of myocardial marker gene to observe the phenotype of *hoxb4a* morphant

本文通过基因沉默和 mRNA 基因过表达技术,高效快速地在斑马鱼 F_0 探索了 *hoxb4a* 的功能,并未改变其基因型,发现 *hoxb4a* 基因的敲低或过表达均会在斑马鱼胚胎发育至 3 dpf 时产生心脏环化失败的异常表型,表明 *hoxb4a* 基因在调控心脏早期发育中发挥作用。本研究进一步通过原位杂交和 qPCR 技术对 *hoxb4a* 基因敲低胚胎进行分析,发现 *hoxb4a* 可能通过影响心脏神经

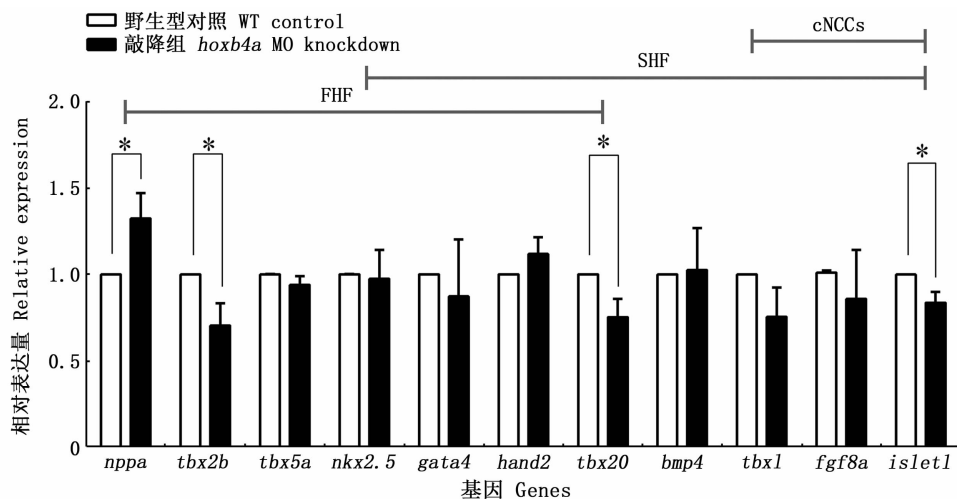
嵴基因 *islet1* 参与心脏调控,进而干预腔室分化基因 *nppa* 和心脏环化相关基因 *tbx20*、*tbx2b* 的表达,最终导致了心脏发育的畸形。本研究为进一步通过 CRISPR 技术敲除 *hoxb4a* 研究其在心脏发育中的作用奠定了良好的基础,为挖掘 *hoxb4a* 基因调控心脏发育的机制及加深对心脏调控网络的认识都具有重要意义。



1-2. 3 dpf时,在转基因斑马鱼系 Tg (*kdr1*: GFP)背景下,野生型对照组、敲降组(注射了 8 ng morpholino)胚胎的荧光光镜图片(腹面观,头在上),白色箭头指示鳃弓部位。3-4. 3 dpf时,在转基因斑马鱼系 Tg (*kdr1*: GFP)背景下,野生型对照组、敲降组(注射了 8 ng morpholino)胚胎的荧光光镜图片(腹面观,头在上),黄色箭头指示心内膜部位。PA. 鳃弓; V. 心室; A. 心房。
 1-2. At 3dpf, under the background of transgenic zebrafish line Tg (*kdr1*: GFP), the fluorescent microscope images of wild-type control group and knockdown group (injected 8 ng morpholino) embryos (ventral view with head on the top), the white arrow indicates the pharyngeal arch. 3-4. At 3dpf, under the background of transgenic zebrafish line Tg (*kdr1*: GFP), the fluorescent microscope images of wild-type control group and knockdown group (injected 8 ng morpholino) embryos (ventral view with head on the top), the yellow arrow indicates the endocardium. PA. pharyngeal arch; V. ventricle; A. atrium.

图版 II 斑马鱼 *hoxb4a* 基因沉默会导致鳃弓和心内膜畸形

Plate II Silencing of *hoxb4a* in zebrafish leading to pharyngeal arch and endocardial malformation



* 为有显著性差异, $P < 0.05$, 3 组独立生物学重复实验 ($n = 3$)。

* There was significant difference ($P < 0.05$), three groups of independent biological repeated experiments ($n = 3$).

图 3 心脏相关基因在 *hoxb4a* morphant 中的表达量变化
 Fig. 3 Expression of heart-related genes in *hoxb4a* morphant

参考文献:

- [1] STAINER D Y, LEE R K, FISHMAN M C. Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation[J]. *Development*, 1993, 119(1): 31-40.
- [2] HOVE J R, KÖSTER R W, FOROUHAR A S, et al. Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis [J]. *Nature*, 2003, 421 (6919): 172-177.
- [3] BARK D L JR, JOHNSON B, GARRITY D, et al. Valveless pumping mechanics of the embryonic heart during cardiac looping: pressure and flow through micro-PIV[J]. *Journal of Biomechanics*, 2017, 50: 50-55.
- [4] PRUMMEL K D, NIEUWENHUIZE S, MOSIMANN C. The lateral plate mesoderm[J]. *Development*, 2020, 147(12): dev175059.
- [5] GLICKMAN N S, YELON D. Cardiac development in zebrafish: coordination of form and function [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2002, 13(6): 507-513.
- [6] FOROUHAR A S, LIEBLING M, HICKERSON A, et al. The embryonic vertebrate heart tube is a dynamic suction pump[J]. *Science*, 2006, 312(5774): 751-753.
- [7] BAKKERS J. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease [J]. *Cardiovascular Research*, 2011, 91(2): 279-288.
- [8] JOHNSON B, BARK D JR, VAN HERCK I, et al. Altered mechanical state in the embryonic heart results in time-dependent decreases in cardiac function [J]. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 2015, 14 (6): 1379-1389.
- [9] VERMOT J, FOROUHAR A S, LIEBLING M, et al. Reversing blood flows act through *klf2a* to ensure normal valvulogenesis in the developing heart [J]. *PLoS Biology*, 2009, 7(11): e1000246.
- [10] JIANG X, ROWITCH D H, SORIANO P, et al. Fate of the mammalian cardiac neural crest [J]. *Development*, 2000, 127(8): 1607-1616.
- [11] MALLO M, ALONSO C R. The regulation of Hox gene expression during animal development [J]. *Development*, 2013, 140(19): 3951-3963.
- [12] AMORES A, FORCE A, YAN Y L, et al. Zebrafish *hox* clusters and vertebrate genome evolution [J]. *Science*, 1998, 282(5394): 1711-1714.
- [13] ROUX M, LAFOREST B, EUDES N, et al. *Hoxa1* and *Hoxb1* are required for pharyngeal arch artery development [J]. *Mechanisms of Development*, 2017, 143: 1-8.
- [14] PEARSON J C, LEMONS D, MCGINNIS W. Modulating Hox gene functions during animal body patterning [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(12): 893-904.
- [15] MAKKI N, CAPECCHI M R. Cardiovascular defects in a mouse model of *HOXA1* syndrome [J]. *Human Molecular Genetics*, 2012, 21(1): 26-31.
- [16] WAXMAN J S, KEEGAN B R, ROBERTS R W, et al. *Hoxb5b* acts downstream of retinoic acid signaling in the forelimb field to restrict heart field potential in zebrafish [J]. *Developmental Cell*, 2008, 15(6): 923-934.
- [17] KROSL J, AUSTIN P, BESLU N, et al. *In vitro* expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein [J]. *Nature Medicine*, 2003, 9(11): 1428-1432.
- [18] BERNDT C, POSCHMANN G, STÜHLER K, et al. Zebrafish heart development is regulated via glutaredoxin 2 dependent migration and survival of neural crest cells [J]. *Redox Biology*, 2014, 2: 673-678.
- [19] DOMÍNGUEZ J N, MEILHAC S M, BLAND Y S, et al. Asymmetric fate of the posterior part of the second heart field results in unexpected left/right contributions to both poles of the heart [J]. *Circulation Research*, 2012, 111(10): 1323-1335.
- [20] HINITS Y, PAN L Y, WALKER C, et al. Zebrafish *Mef2ca* and *Mef2cb* are essential for both first and second heart field cardiomyocyte differentiation [J]. *Developmental Biology*, 2012, 369(2): 199-210.
- [21] MCFADDEN D G, BARBOSA A C, RICHARDSON J A, et al. The *Hand1* and *Hand2* transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner [J]. *Development*, 2005, 132(1): 189-201.
- [22] COLLINS E M, THOMPSON A. *HOX* genes in normal, engineered and malignant hematopoiesis [J]. *The International Journal of Developmental Biology*, 2018, 62(11/12): 847-856.
- [23] GAVRILOV S, HARVEY R P, PAPAIOANNOU V E. Lack of genetic interaction between *Tbx20* and *Tbx3* in early mouse heart development [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e70149.
- [24] HABETS P E M H, MOORMAN A F M, CLOUT D E W, et al. Cooperative action of *Tbx2* and *Nkx2.5* inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation [J]. *Genes & Development*, 2002, 16(10): 1234-1246.
- [25] CAVANAGH A M, HUANG J, CHEN J N. Two developmentally distinct populations of neural crest cells contribute to the zebrafish heart [J]. *Developmental Biology*, 2015, 404(2): 103-112.

Functional exploration of *hoxb4a* regulating cardiac development in zebrafish

GU Yedan^{1,2,3}, WANG Bingqi^{1,2,3}, WANG Hongjie^{1,2,3}, HU Peinan^{1,2,3}, ZU Yao^{1,2,3}

(1. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The function of zebrafish transcription factor *hoxb4a* in the heart has not been reported. In order to clarify the role of *hoxb4a* in heart development, gene silencing and mRNA overexpression were used to knock down and overexpress *hoxb4a* gene in zebrafish, respectively. It was found that the embryo with inhibition or overexpression of *hoxb4a* had the phenotype of pericardial enlargement and abnormal cardiac looping at 3 days poster fertilization. Compared with wild-type and *hoxb4a* knockdown embryos by in situ hybridization, the measurement results showed that the heart looping angle of *hoxb4a* knockdown embryos increased. Then, using transgenic fish lines, we found abnormal endocardial abnormalities of pharyngeal arch in embryos after knockdown of *hoxb4a*. Furthermore, qPCR was used to detect the expression changes of heart-related genes after *hoxb4a* silencing. The results showed that most of the key genes of heart development were significantly down-regulated after *hoxb4a* knockdown, while the key gene *nppa* regulating cardiac differentiation was significantly up-regulated. This study shows that silencing of *hoxb4a* in zebrafish can lead to abnormal cardiac structure and looping, and regulate the changes of early cardiac development genes. In this study, we found that *hoxb4a* plays a role in the early cardiac development of zebrafish, and preliminarily explored the regulation of *hoxb4a* on the differentiation of cardiac chambers and cardiac looping through in situ hybridization and qPCR results, which deepened the understanding of the regulatory network of cardiac development.

Key words: *hoxb4a*; knock-down; cardiac development; zebrafish