

Hsp60 基因在小鼠腭和肢正常与异常发生过程中的表达

Expression of Hsp60 in Normal and Abnormal Limb and Palate Development in Mice Induced by Retinoic Acid during Embryogenesis

朱勇飞¹/朱江波²/万旭英²/

朱玉平²/张天宝^{2,*}

(1 杭州师范大学医药卫生管理学院, 浙江 杭州 310018; 2 第二军医大学卫生毒理学教研室, 上海 200433)

ZHU Yong-fei¹, ZHU Jiang-bo², WAN Xu-ying²,
ZHU Yu-ping², ZHANG Tian-bao^{2,*}

(1. School of Pharmacy and Health Management, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310018, Zhejiang;
2. Department of Health Toxicology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【摘要】背景与目的: 研究热休克蛋白 60 基因 (heat shock protein 60 gene, *Hsp60*) 在小鼠胚胎腭、前肢正常和异常发育过程中的表达情况。材料与方法: 将受孕后 ICR 小鼠随机分为实验组和对照组 2 组, 每组各 64 只, 于孕 10 d (gestational day 10, GD10), 分别经口一次给予实验组孕鼠 80 mg/kg 的全反式视黄酸, 对照组孕鼠给予等体积的大豆油, 并分别于 GD11~GD18 取 2 组胎鼠的前肢, 于 GD15~GD17 取 2 组胎鼠的腭, 利用实时荧光定量 PCR 检测 *Hsp60* 的表达丰度。结果: *Hsp60* 在正常、异常肢和腭中均有表达。对照肢的表达丰度在 GD14 和出生前呈高表达, 而实验肢的表达在各胚龄无明显差异 ($P > 0.05$); 实验肢 *Hsp60* 在 GD11~GD18 的表达水平高于同一胚龄的对照肢 ($P < 0.05$)。在正常腭中, *Hsp60* 恒定表达, 在异常腭中, *Hsp60* 的表达随胚龄增大而降低, 在 GD15~GD17 的表达丰度为实验腭低于同胚龄的对照腭 ($P < 0.05$)。结论: 全反式视黄酸所致的短肢中, *Hsp60* 的表达呈应激性升高; 而在异常腭中, *Hsp60* 的表达受到抑制。

【关键词】 *Hsp60*; 胚胎; 肢; 腭; 发育

中图分类号: Q343.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2007)04-0294-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To study the expression of heat shock protein 60 gene (*Hsp60*) in normal forelimbs and short forelimb malformations, normal palates and cleft palates during embryogenesis in mice. MATERIALS AND METHODS: At gestational day 10 (GD10), mice in the treatment group and the control group were given 80 mg/kg of all-trans retinoic acid and the same volume of soybean oil, respectively. The forelimbs of all embryos were harvested during GD11-GD18 and the palates were obtained during GD15-GD17. The expression levels of *Hsp60* in all samples was measured by real-time quantity reverse transcript polymerase chain reaction (QRT-PCR). RESULTS: *Hsp60* was expressed in all samples. In the normal forelimbs high expressions were found on GD14, GD17 and GD18, and same in the short forelimb malformations, with no difference among all the samples ($P > 0.05$). The expression of *Hsp60* in the abnormal limbs was stronger than that in the normal limbs during GD11-GD18 ($P < 0.05$). The expression of *Hsp60* in the normal palates was stable during GD15-GD17. In the cleft palates, the expression of *Hsp60* decreased with age during GD15-GD17. The expression of *Hsp60* in the normal palates was stronger than that of the cleft palates during GD15-GD17 ($P < 0.05$). CONCLUSION: During embryogenesis in mice, the expression level of *Hsp60* in all-trans retinoic acid-induced short limb malformations was increased by stress, but that in cleft palates was suppressed.

【KEY WORDS】 heat shock protein 60 gene (*Hsp60*); embryo; limb; palate; development

近年来, 热休克蛋白 (heat shock proteins, Hsps) 在生殖发育中的作用受到人们的重视, 被认为是细胞与生

物体形态发育的伴侣, 与胚胎的正常生长发育和畸形的发生都有密切的关系^[1]。Hsp60 是一种高亲和性、高密度

收稿日期: 2007-02-27; 修订日期: 2007-04-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070662, 30400360)

作者简介: 朱勇飞 (1970-) 男, 江西人, 博士, 研究方向: 分子毒理学。

* Correspondence to: ZHANG Tian-bao, Tel: 021-25070325, E-mail: tzbzhang@

toxsmmu.com

的脂多糖结合蛋白,主要定位于线粒体和细胞质中^[2],能促进蛋白的折叠、组装和转运,具有 ATPase 活性,对 ATP 有高度亲和力,许多应激原可以诱导其表达^[3],它在所有的原核和真核细胞中均存在,是细胞最保守的保护机制之一。但目前有关 Hsps 在胚胎发育过程中的表达研究还很少。本室以往的研究表明,在孕期第 10 d 给予小鼠全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, RA)可诱导胎鼠腭裂和双前肢短肢畸形,发生率几乎 100%^[4]。由于该模型具有异常表型明确、相对单一、发生率高等特点,因此非常适宜用于肢或腭发育的研究。本研究利用 RA 诱导的双前肢短肢发育异常和腭裂模型,研究了 Hsp60 在小鼠腭和肢正常与异常发生过程中的表达情况。

表 1 Hsp60及β-actin的QRT-PCR引物序列

Table 1 Primers of Hsp60 and β-actin for QRT-PCR

Genes	Forward primer sequences	Reverse primer sequences
Hsp60	5'CATCGGAAGCCATTGGTCATAA 3'	5'CGTGCTTAGAGCTTCTCCGTCA 3'
βactin	5'GTCCCTGTATGCCCTCTGGTC 3'	5'GGTCTTTACGGATGTCACAG 3'

1.2 实验动物及样品收集

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。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 d(GD0),并将孕鼠随机分为实验组和对照组,每组各 64 只。将 RA 用大豆油为溶剂配制成混悬液,浓度为 8 mg/ml,于 GD10 经口给予实验组孕鼠 RA 混悬液,给药体积为 0.1 ml/10 g 体重,对照组给予同样体积的大豆油。分别于 GD11~GD18 将实验组和对照组孕鼠颈椎脱臼处死,每次 8 只,剖取子宫,肉眼检查妊娠情况,从子宫内取出胎鼠,每窝取 1 只胎鼠用于实验,解剖显微镜下分离其前肢,用同样方法取得 GD15~GD17 对照组和实验组胎鼠的腭,迅速用液氮冷冻保存。

1.3 正常及异常腭的 HE 染色

参照文献[5]提供的方法。取腭组织,经固定后,常规石蜡包埋,4 μm 切片;切片常规用二甲苯脱蜡,经各级乙醇至水洗;苏木素染色 5 min,自来水冲洗,盐酸乙醇分化 30 s;自来水浸泡 15 min 或温水(约 50 ℃)5 min;置伊红液 2 min,常规脱水,透明,封片。

1.4 总 RNA 提取、实时荧光定量 PCR 及其数据分析

将收集的对照、实验组的肢和腭用 Trizol 裂解,按试剂盒的说明提取总 RNA,溶于无核酸酶水中。取约 1 μg 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。具体操作如下:取约 1 μg 总 RNA 于 EP 管,加无 RNA 酶水至 5 μl 体积,70 ℃温浴 5

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

解剖显微镜(XTL-3 型,重庆光学仪器厂),高速冷冻离心机(HERMLE ZK400,德国 EPENDORF 公司),BioSpecmini 型核酸/蛋白分析仪(日本岛津公司),7900HT 型高通量荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

全反式视黄酸(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(英国 ABgene 公司),基因 Hsp60 和内参照 β-actin 的荧光定量 PCR 引物均由上海博亚公司合成(引物序列见表 1),其余试剂均为国产分析纯。

min,迅速冰浴 5 min 以上,短暂离心,置冰上;取无 RNA 酶水 3.7 μl,5×buffer 4.0 μl, MgCl₂ 4.8 μl, dNTP 1.0 μl,重组 RNA 酶抑制剂 0.5 μl,RT 酶 1.0 μl 于上述装有 RNA 的 EP 管中,置 25 ℃ 5 min,再 42 ℃ 60 min,70 ℃ 15 min,即得所需 cDNA,置于 -20 ℃ 保存。

将所得 cDNA 进行 PCR 扩增反应,反应体系如下:SYBR buffer 2.5 μl, cDNA 0.5 μl,上游引物 0.3 μl,下游引物 0.3 μl, Mili Q 水 6.4 μl。反应条件为:95 ℃ 15 min,95 ℃ 5 s,60 ℃ 1 min(40 个循环)。Hsp60 和内参照 β-actin 的反应体系和反应条件完全一致,Hsp60、β-actin 的产物分别为 58 bp 和 458 bp。

根据文献[6]提供的方法,分别用 -ΔΔCt 作图、2^{-ΔΔCt}(假定实时荧光定量 PCR 的扩增效率为 2.0)列表来表示 Hsp60 的相对定量。

1.5 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用方差分析法统计分析所有结果。

2 结果

2.1 胎鼠腭裂和短肢发生情况及正常肢和短肢的形态学比较

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。图 1 显示,给予 RA 后,于 GD16 胎鼠体形和对照组相比无明显差异,但双前肢有明显的短肢发生。

2.2 镜下正常腭及腭裂的比较

图 2 显示,于 GD15 正常腭双侧腭突发生接触、融



合,但在中线处可见一明显的腭突中嵴上皮缝。腭裂的腭突由于双侧腭突体积较小,不能达到中线处进行接触、融合,双侧腭突之间有一明显的空隙。



图 1 GD16 正常肢(右)和短肢(左)胎鼠

Figure 1 Mouse embryos with normal forelimbs(right) and short forelimb malformations(left) at GD16

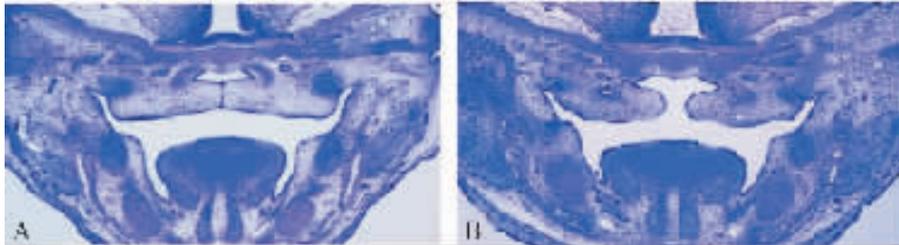


图 2 GD15 正常腭(A)及腭裂(B)小鼠腭突

Figure 2 Palatine processes of normal palates(A) and cleft palates(B) at GD15

2.4 *Hsp60* 在正常和异常腭中表达丰度的比较

图 3 显示,在正常腭中,*Hsp60* 恒定表达;在异常腭中,*Hsp60* 的表达有随胚龄增大而降低的趋势。*Hsp60* 在 GD15~GD17 的表达丰度为实验腭低于同胚龄的对照腭($P < 0.05$)。

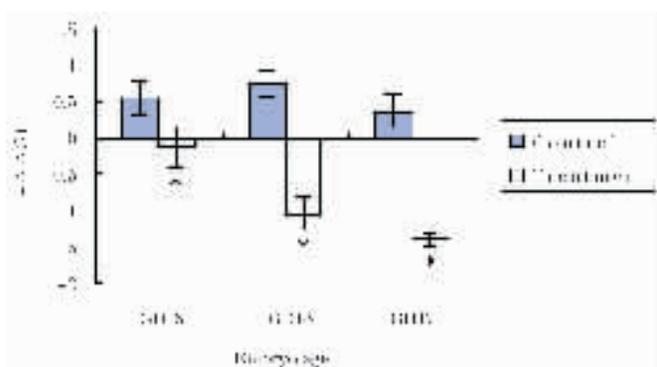


图 3 实验腭和对照腭中 *Hsp60* 表达丰度

Figure 3 Expression level of *Hsp60* in the control palates and the treatment palates. Compared with control, * $P < 0.05$

3 讨论

本研究分别于 GD11~GD18 观察了胎鼠前肢,

2.3 *Hsp60* 在正常和异常肢中表达丰度的比较

表 2 显示,在 GD11~GD18,*Hsp60* 在对照和实验肢中均有表达。对照肢的表达丰度在 GD14 和出生前呈高表达,而实验肢的表达在各胚龄间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验肢 *Hsp60* 的表达水平高于同一胚龄的对照肢($P < 0.05$)。

表 2 *Hsp60* 在对照和实验肢中的表达 ($n = 8$)

Table 2 Expression of *Hsp60* in the control limbs and the treatment limbs ($n = 8$)

Embryo age	Control limbs	Treatment limbs
GD11	0.18294 ± 0.02761	0.63993 ± 0.09430 ^a
GD12	0.17064 ± 0.02162	0.60213 ± 0.02174 ^a
GD13	0.18106 ± 0.01460	0.70233 ± 0.03010 ^a
GD14	0.31244 ± 0.05420	0.68990 ± 0.03670 ^a
GD15	0.19011 ± 0.03942	0.79949 ± 0.15030 ^a
GD16	0.16980 ± 0.03213	0.62038 ± 0.07394 ^a
GD17	0.38671 ± 0.05031	0.89897 ± 0.15640 ^a
GD18	0.48372 ± 0.03425	0.97678 ± 0.16320 ^a

Compared with the control limbs of the same embryo age, a: $P < 0.05$.

GD15~GD17 观察了胎鼠腭组织中 *Hsp60* 的表达情况。尽管在 GD11~GD14,从外形上尚不能完全辨别胎鼠肢和腭有无畸形,但根据本研究室以往的研究结果 RA 所致腭裂的发生率几乎为 100%,短前肢畸形的发生率与腭裂几乎完全一致。本研究实验组在 GD15 以后,所有胎鼠均观察到腭裂及短肢发生,由此推测 GD11~GD14 肢和腭畸形的发生率应近似 100%。

Hsp60 作为热休克蛋白家族中重要的一员,已成为研究的热点。然而,以往的研究主要侧重于 *Hsp60* 及其基因在免疫方面的作用,而对 *Hsp60* 在哺乳动物胚胎、胎仔及新生幼仔发育过程中的表达研究得极少。

正常条件下,*Hsp60* 以稳定状态存在于细胞质和线粒体基质中;应激条件下,*Hsp60* 迅速从胞质中转移到线粒体基质以修复线粒体基质中的变性蛋白^[2]。已知在体外应激(如冷、热、外源化学物、缺血、缺氧等的作用)和体内病理生理应激(如组织创伤、微生物感染等)条件下,热休克蛋白表达明显增加。在本研究中,*Hsp60* 在正常及异常肢、腭中均有表达。但经口给予实验组孕鼠 RA 混悬液后,实验肢 *Hsp60* 的表达水平高于同一胚龄

的对照肢(见表 2),提示 RA 可诱导 *Hsp60* 在肢异常发育时的表达,由此推测,该基因在 RA 所致的异常肢中主要表现为应激保护作用。

由于小鼠的腭在 GD14.5~GD16.5 是发育高峰期,因此我们选取 GD15~GD17 小鼠的腭来研究。*Hsp60* 在正常和异常腭发育中的表达模式明显不同,且在 GD15~GD17 的表达丰度为实验组低于对照组($P < 0.05$),提示 *Hsp60* 可能在 RA 诱导的腭异常发育中受到抑制,且与腭异常发育有关并可能在腭发育时起特殊的作用。

本研究尚不能阐明 *Hsp60* 在 RA 引起的小鼠短肢和腭裂模型中所起作用的具体机制。因此,在以后的研究中,需要通过原位杂交的方法对 *Hsp60* 在胎鼠肢和腭中的表达进行精确定位;利用蛋白印迹、免疫组化等手段研究 *Hsp60* 在小鼠腭和肢正常与异常发生过程中的表达情况;并将 *Hsp60* 与其它发育有关的基因联系起来,以阐明其在胎鼠肢和腭发育过程中的作用机制。

参考文献:

- [1] 朱勇飞. 热休克蛋白与胚胎发育的关系[J]. 国外医学卫生学分册, 2004, 31(5): 287-292.
- [2] Itoh H, Komatsuda A, Ohtani H, et al. Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269 (23): 5931-5938.
- [3] Henderson BR, Pfister G, Boeck G, et al. Expression levels of heat shock protein 60 in human endothelial cells *in vitro* are unaffected by exposure to 50 Hz magnetic fields[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2003, 8(2): 172-182.
- [4] 朱江波, 张天宝, 印木泉, 等. 甲基 N2 硝基亚硝基胍和视黄酸致 ICR 小鼠腭裂发育模型的建立 [J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(1): 58-60
- [5] 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: 29-31.
- [6] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

召开中国环境诱变剂学会第五届会员代表大会暨第十三届学术交流会会议通知(第二轮)

中国环境诱变剂学会决定在 2007 年 11 月 2 日~6 日在广州市召开我会第五届全国会员代表大会暨第十三届全国学术交流会。会议有关内容如下:

1. 中国环境诱变剂学会第五届全国会员代表大会进行换届, 选举产生新一届的理事会和学会领导机构。
2. 中国环境诱变剂学会第十三届全国学术交流会同时举行, 会议邀请国内有关知名专家和院士就本领域范围内的热点问题和最新进展做大会演讲。大会征集学术论文:

- ① 环境中致癌物、生殖毒物、致突变物等方面研究的新进展、新方法、新规范。
- ② 环境因素致肿瘤的分子机理与毒理基因组学研究。
- ③ 食品、药品、化妆品、农药和化学品等有关物质的安全性和有效性评价。
- ④ 相关的临床和基础研究的其它试验方法、检测报告、试验研究和综述性论文。

论文(限 4 000 字)或摘要(限 800 字)应为尚未发表过的研究成果。写作格式要求: 必须用 Microsoft Word 软件录入, 宋体, 行间距 22 磅, 顺序为: 题目(三号字加粗)、作者、单位、摘要或全文(均小四号字)。稿件以 Email 的附件形式发送给中国环境诱变剂学会办公室。

会议设青年优秀论文奖。评选条件为: 40 岁以下(1967 年以后出生), 我学会会员(注明会员证号), 尚未公开发表过的论文全文(限 4 000 字), 写作格式要求同上一致, 同时邮寄纸质全文一篇(首页右上角注明青年优秀论文评选)。

接受论文及摘要的截止日期为 2007 年 8 月 10 日。论文及摘要将全部刊登在我学会主办的《中国肿瘤基础与临床》杂志第三、四期。论文及摘要恕不退还, 请作者自留底稿。获得青年优秀论文奖的将进行大会报告并推荐我学会《癌变·畸变·突变》杂志优先刊出。欢迎踊跃投稿。

3. 会议收取注册费 650 元/人, 本学会会员报到时凭本人会员证收取注册费 600 元/人, 本会学生会会员报到时凭本人会员证和学生证收取注册费 500 元/人(不包括礼品)。

4. 会议食宿自理, 提供标准间 160 元/间, 还有价格优惠的 3 人或 4 人间。

5. 会议期间, 于 11 月 5 日学会免费组织肇庆一日游, 包括著名风景区七星岩、鼎湖山景区。

6. 学会委托旅游公司于 11 月 6 日~9 日自费报名四天三夜香港、澳门游, 优惠全包参考价格 1 480 元左右, (根据季节变化价格有所浮动), 行程附后。会议报到时在大厅设台咨询、登记。

7. 会议回执邮寄或 Email 返回, 截止日期 2007 年 9 月 20 日。第三轮通知将根据回执地址在 10 月上旬发给每位参会代表。

8. 会议联系人: 刁京晶, 电话: (010)82335754, Email: iaems-cn@163.com 通信地址: 100083 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部公共卫生学院 中国环境诱变剂学会办公室收

咨询联系人: 林飞, 电话: 010-67095576, E-mail: linfeibj@yahoo.com.cn

中国环境诱变剂学会
2007 年 6 月 14 日

