

Expression of *HSP47* in Cleft Palates and Short Limb Malformations, Induced by Retinoic Acid During Mouse Embryogenesis

HSP47 在小鼠腭裂和短肢发生过程中的表达

朱勇飞/朱江波/周宏元/张天宝*

(第二军医大学卫生毒理学教研室,

上海 200433)

ZHU Yong-fei, ZHU Jiang-bo, ZHOU Hong-yuan, ZHANG Tian-bao*
(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 47 基因(Heat shock protein 47, *HSP47*)在小鼠胚胎腭、前肢正常和异常的发育过程中的表达情况。材料与方法: 在 GD10 经口一次分别给予各实验组孕鼠 80 mg/kg 的全反式视黄酸, 对照组孕鼠给予等体积的植物油, 并分别于 GD11~GD18 取两组胎鼠的前肢, 于 GD15~GD17 取两组胎鼠的腭, 利用 RT-PCR 方法半定量检测 *HSP47* 的表达丰度。结果: *HSP47* 在所有样品中均有表达, 其在 GD11~GD18 正常、异常发育肢的表达均呈随胚龄增大而增加的趋势, 对照肢和实验肢分别于 GD16、GD17 达到高峰, 以后基本恒定; 其在 GD15~GD17 正常腭中恒定表达、异常腭中以 GD16 表达最高; 异常肢的表达丰度在 GD11~GD18 均高于正常肢, 正常腭和异常腭的表达丰度在 GD15 无差异, 但在 GD16~GD17 异常腭的表达丰度则高于正常腭。结论: 全反式视黄酸所致的短肢和腭裂中, *HSP47* 的表达呈应激性升高。

【关键词】热休克蛋白 47; 胚胎; 肢; 腭; 发育

中图分类号: Q954.48

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2005)05-0257-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To study the expression of heat shock protein 47 (*HSP47*) in normal forelimbs and short forelimb malformations, normal palates and cleft palates during mouse embryogenesis. MATERIAL AND METHODS: At GD10, gestational mice of the treatment and the control groups were administered with 80 mg/kg all-trans retinoic acid and the same volume vegetable oil separately. The forelimbs of embryos were harvested in GD11-GD18, and the normal palates and cleft palates were obtained in GD15-GD17. The relative abundance of *HSP47* of all samples was measured by reverse transcript polymerase chain reaction (RT-PCR). RESULTS: *HSP47* was expressed in all samples. To the normal forelimbs and short forelimb malformations, with the embryos aging, there was the increasing tendency of the expressional abundance of *HSP47* in GD11-GD18, their peaks of expression were especially at GD16 and GD17, and kept stable in the following age. The expressional abundance of *HSP47* of the normal palates was stable in GD15-GD17, and the peak of that of the cleft palates was at GD16. The expression of *HSP47* of the abnormal limbs was stronger than that of the normal limbs in GD11-GD18. The expression of *HSP47* of the cleft palates has no difference with that of the normal palates in GD15, but it was stronger than that of the cleft palates in GD16-GD17. CONCLUSION: The expressional abundance of *HSP47* in normal limbs and short limb malformations, normal palates and cleft palates induced by all-trans retinoic acid during mouse embryogenesis was increased by stress action.

【KEY WORDS】 heat shock protein 47; embryo; limbs; palates; development

收稿日期: 2004-11-29; 修订日期: 2005-03-12

基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (No. 30070662, No. 30400360)

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

* Correspondence to: ZHANG Tian-bao Tel: 86-21-25070325, E-mail: tbzhang@

toxsmmu.com

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。热休克蛋白 47(Heat shock proteins, HSP47)是位于内质网上的一种胶原特异性分子伴侣。研究表明,HSP47是小鼠发育过程中的一种必需的分子伴侣,因为它对内质网上胶原分子的成熟来说是必不可少的^[1];在胚胎发育过程中,HSP47主要在中胚层及起源于中胚层的组织中表达,如结缔组织、软骨、骨、脊索和体节^[2]。由于目前有关HSPs在胚胎发育过程中作用的研究刚刚起步,因此,对HSP47的相关研究仍然需要加强。我们研究利用全反式视黄酸(All-trans retinoic acid, RA)诱导的双前肢短肢发育异常和腭裂模型,研究HSP47在正常、异常肢发育过程中的表达情况。

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),PCR仪(GeneAmp2400型,美国PEKIN ELMER公司),电泳仪(LKB-GPS200/400型,瑞典Pharmacia公司),Tanon cis-1000凝胶成像系统(上海天能公司)。

全反式视黄酸(上海第六制药厂,沪卫药准字(1995),第006020号),组织总RNA提取试剂盒TRIZOL reagent(Invitrogen公司),RT-PCR试剂盒(Promega公司),HSP47和内参照 β -actin的引物均由上海博亚公司合成(引物序列及扩增产物大小见表1),其余试剂均为国产分析纯。

表 1 各基因引物序列及扩增产物长度

Table 1 Primers and expected amplification length of genes

Genes	Forward primer sequences	Reverse primer sequences	Expected amplification length(bp)
HSP47	5' GACAAGAACAAGGCAGACC 3'	5' TGTTCAGGCAGATTGGAT 3'	545
β -actin	5' GTCCCTGTATGCCCTCTGGTC 3'	5' GGTCTTTACGGATGTCAACG 3'	458

将RT-PCR扩增产物进行电泳,所得图像用天能凝胶成像分析系统进行光密度分析,所得的光密度值经内参照 β -actin校正,以校正值作为基因的表达丰度。

1.2 统计分析

实验组内、对照组内结果差异的比较采用方差分析法,用 t 检验分析同一胎龄实验和对照组之间结果的差异。

2 结 果

2.1 胎鼠正常肢和短肢的形态学比较

图1显示,给予RA后,胎鼠体形和对照组相比无

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25~30g,雄鼠体重30~35g。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0d(GD0),并将孕鼠随机分组。将RA用植物油为溶剂配制成混悬液,浓度为8mg/ml,于GD10经口按0.01ml/g给予实验组孕鼠RA混悬液,对照组给予同样体积的植物油。分别于GD11~GD18将实验、对照组孕鼠颈椎脱臼处死,剖取子宫,肉眼检查确定妊娠情况,从子宫内取出胎鼠,解剖显微镜下分别取得对照组和实验组的前肢,用同样方法取得GD15~GD17对照组和实验组的腭,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[3]提供的方法。

1.4 总RNA提取和RT-PCR

将收集的所有的对照、实验组肢和腭用TRIZOL裂解,依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PCR扩增反应,反应体系参照试剂盒说明书,

反应条件为:HSP47(94 $^{\circ}$ C 30s, 51 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 32个循环,其后72 $^{\circ}$ C 7min), β -actin(94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 25个循环,其后72 $^{\circ}$ C 7min)。为确保扩增特异性,设计了3种对照,对照1用无核酸酶水替代RNA样品进行RT-PCR,对照2不加逆转录酶进行RT-PCR,对照3为RNA样品不经逆转录直接进行PCR。

1.5 RT-PCR扩增产物分析

明显差异,但双前肢有明显的短肢发生。

2.2 光镜下正常腭及腭裂的比较

图2显示,正常腭的两侧腭突发生接触、融合,但在中线处可见一明显的腭突中嵴上皮缝。腭裂的腭突由于两侧腭突体积较小,不能达到中线处进行接触、融合,两侧腭突之间有一明显的空隙。

2.3 HSP47在正常腭和异常腭中表达丰度比较

由图3可见,在GD15~GD17,HSP47在实验、对照组均有明显表达,对照组的表达基本恒定,实验组以GD16最高;在GD15,两组的表达丰度无差别($P > 0.05$),但在GD16~GD17,实验组腭的表达丰度均

高于对照组腭($P < 0.05$)。



图 1 GD16 正常肢(左)和短肢(右)胎鼠
Figure 1 Mouse embryos with normal forelimbs(left)and short forelimb malformations (right) at GD16

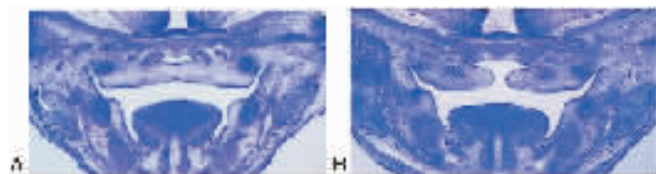


图 2 GD15 正常腭(A)及腭裂(B)小鼠腭突
Figure 2 Palatine processes of normal palates(A) and cleft palates(B) at GD15

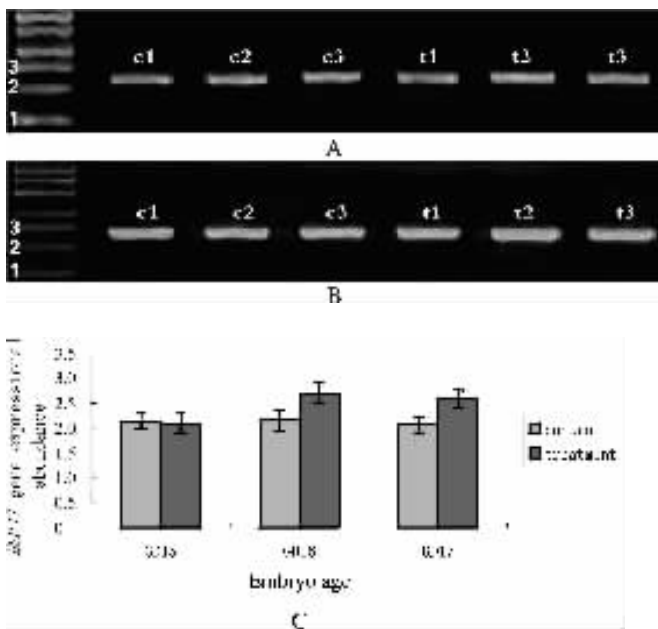


图 3 *HSP47* 在不同胚龄实验、对照组腭的表达 ($n = 6$)。A: β -actin 电泳图; B: *HSP47* 电泳图; C: *HSP47* 表达丰度直方图; 电泳图中的 marker 自下而上第 1 条为 200 bp, 第 2 条为 400 bp, 第 3 条为 600 bp c1、c2、c3、t1、t2、t3 分别代表对照组的 GD15、GD16、GD17 和实验组的 GD15、GD16、GD17

Figure 3 Expression of *HSP47* in the treatment and the control groups palates of different embryo age ($n = 6$). A: Electrophoretogram of β -actin; B: Electrophoretogram of *HSP47*; C: Histogram of *HSP47* expressional abundance; In electrophoretogram, line 1, 2, 3 of marker means 200 bp, 400 bp, 600 bp, c1, c2, c3 means GD15, GD16, GD17 of the control group; t1, t2, t3 means GD15, GD16, GD17 of the treatment group

2.4 *HSP47* 在正常肢和短肢中表达丰度的比较

由图 4 可见, 对照组和实验组肢中的 *HSP47* 表达丰度均有随胚龄增长而增加的趋势, 对照组和实验组分别于 GD16、GD17 达到高峰, 以后基本恒定。在 GD11 ~ GD18, 实验组肢的表达丰度均高于对照组肢 ($P < 0.05$)。

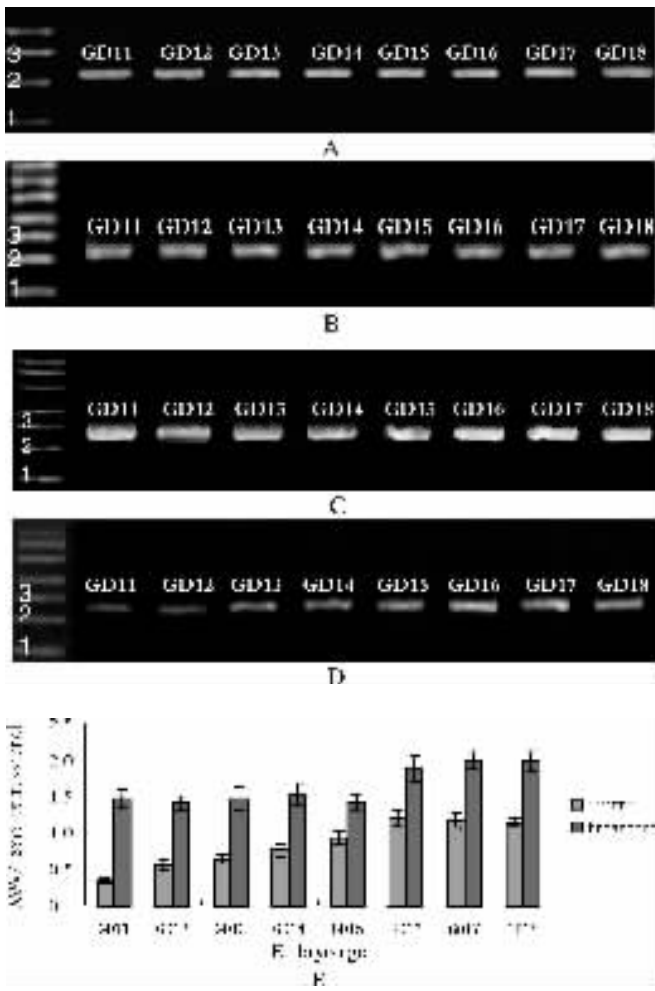


图 4 *HSP47* 在不同胚龄实验、对照组肢中的表达 ($n = 6$)。A: 实验组 β -actin 电泳图; B: 对照组 β -actin 电泳图; C: 实验组 *HSP47* 电泳图; D: 对照组 *HSP47* 电泳图; E: *HSP47* 表达丰度直方图; 电泳图中的 marker 自下而上第 1 条为 200 bp, 第 2 条为 400 bp, 第 3 条为 600 bp
Figure 4 Expression of *HSP47* in the treatment and the control groups' limbs of different embryo age ($n = 6$). A: Electrophoretogram of β -actin of the treatment group; B: Electrophoretogram of β -actin of the control group; C: Electrophoretogram of *HSP47* of the treatment group; D: Electrophoretogram of *HSP47* of the control group; E: Histogram of *HSP47* expressional abundance. In electrophoretogram, line 1, 2, 3 of marker means 200 bp, 400 bp, 600 bp

3 讨 论

在非应激条件下, *HSP47* 是一种胶原特异性分子伴侣, 能促进细胞内前胶原多肽的合成以及结缔组织中三螺旋的装配; 在应激条件下, 作为应激反应的一部分, *HSP47* 表达上调, 以缓和有害因素 (如高温、重金属、氧

化应激)对细胞的损伤^[4]。

本研究结果表明:HSP47在正常、异常肢和正常、异常腭中均有表达。在GD11~GD18,正常、异常肢HSP47的表达均有随胚龄增大而增加的趋势,对照肢和实验肢分别于GD16、GD17达到高峰,以后基本恒定;异常肢的表达丰度在GD11~GD18均高于正常肢。HSP47在GD15~GD17正常腭中恒定表达、异常腭中以GD16最高;正常腭和异常腭的表达丰度在GD15无差异,但在GD16~GD17异常腭的表达丰度则高于正常腭。

Ferreira等^[5]的研究发现,用RA刺激F9畸胎瘤细胞,可以使HSP47的水平升高。由此我们推测,在RA的作用下,HSP47的表达上调,参与由其引起的应激反应。通常情况下,HSP47的升高会引起前胶原、胶原的表达升高,然而,在本研究中,RA作用于孕鼠却引起了胎鼠双前肢短肢和腭裂这两种缺失性畸形,其原因可能是:HSP47的过度表达干扰了包括胶原蛋白在内的其它蛋白的表达;HSP47诱导持续炎症并引发自身免疫反应^[6]。

本研究尚不能阐明HSP47在RA引起的小鼠短肢和腭裂模型中所起的作用,因此,仍需作深入研究,以明晰其作用机制。

参考文献:

- [1] Nagata K. HSP47 as a collagen-specific molecular chaperone: function and expression in normal mouse development [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2003, 14(5):275-282.
- [2] Masuda H, Hosokawa N, Nagata K. Expression and localization of collagen-binding stress protein HSP47 in mouse embryo development: comparison with types I and II collagen [J]. *Cell Stress Chaperones*, 1998, 3(4):256-264.
- [3] 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.
- [4] Hart DA, Reno C, Hellio LE, et al. Expression of heat shock protein 47(HSP47) mRNA levels in rabbit connective tissues during the response to injury and in pregnancy [J]. *Biochem Cell Biol*, 2000, 78(4):511-518.
- [5] Ferreira LR, Velano CE, Braga EC, et al. Sec61alpha synthesis is enhanced during translocation of nascent chains of collagen type IV in F9 teratocarcinoma cells after retinoic acid treatment [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2003, 36(1):29-37.
- [6] 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.

《癌变·畸变·突变》杂志 2006 年征订启事

《癌变·畸变·突变》杂志是中国科学技术协会主管、中国环境诱变剂学会主办、科学出版社出版、由汕头大学医学院承办的国家级学术期刊。系“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)。设有“专家述评”、“论著”、“专题研究”、“肿瘤防治”、“检测研究”、“相关医学基础与临床”、“技术与方法”和“文献综述”等栏目。主要报道环境因子与肿瘤发生、胎儿畸形、基因突变的关系以及癌变机制、抗癌物与抗突变物开发利用、环境风险因子评价和其他医学基础与临床研究成果。读者对象为从事肿瘤学、遗传学、毒理学、药理学研究与肿瘤防治、环境保护、卫生防疫、计划生育、药品及生物制品研制的科技人员、高校师生与临床医生。本刊被《中国科技论文与引文数据库》(CSTPC)、《中国学术期刊综合评价数据库》等 10 家国内著名数据库与 3 家学术文摘期刊作为收录刊源之一。根据《中国科技期刊引证报告》(2004 年版)的统计,本刊 2003 年度影响因子为 0.379,在中国科技论文统计源肿瘤学类期刊中排序第 4。

本刊为双月刊,大 16 开,进口铜版纸印刷。2006 年起增加彩色图版,内页由 64 页增加至 80 页。著名科学家的专题述评、内容丰富的研究论文、高质量的装帧与印刷将使本刊成为您从事科学研究的得力助手与展示您研究成果的理想园地。

国内刊号: CN 44-1063/R, 邮发代号: 80-285, 北京市报刊发行局发行。国际刊号: ISSN 1004-616X, 国外代号: 6364(BM), 中国国际图书贸易总公司发行。国内定价每期 10.00 元, 全年订价: 60.00 元。漏订者可在当地邮局订阅,也可直接向编辑部订阅(免邮寄费)。

编辑部地址: 广东省汕头市新陵路 22 号(汕头大学医学院内), 邮编: 515041。

电话及传真: (0754)8900267。E-mail: cemsctm@stu.edu.cn

《癌变·畸变·突变》编辑部