

isthmin 1 对斑马鱼胚胎汇聚延伸运动的影响

王 政^{2#}, 李金鹏^{2#}, 闫一芳^{1*}, 王 强^{1*}

(1. 中国科学院动物研究所, 膜生物学国家重点实验室, 北京 100101; 2. 河北省安国中学, 河北 保定 071200)

【摘要】 目的 在原肠期, 斑马鱼胚胎细胞进行着外包 (epiboly)、内卷 (involution) 以及汇聚延伸 (convergence and extension) 运动, 对于胚胎的形态发生起关键作用。本文旨在研究 *isthmin 1* (*ism1*) 在斑马鱼胚胎发育中的表达图谱, 并进一步探讨其在原肠期胚胎汇聚延伸运动中的功能。**方法** 通过原位杂交技术, 检测 *ism1* 在斑马鱼早期胚胎发育中的表达图谱; 利用过表达和特异敲降等实验技术, 活体拍照及原位杂交检测 *ism1* 对胚胎汇聚延伸运动的影响。**结果** 整胚原位杂交实验结果显示 *ism1* 是合子表达的基因, 在 30% 外包时期开始表达于胚胎背部, 原肠期表达在整个胚胎边缘区, 尤其在胚盾部位表达更为明显。活体拍摄及原位杂交结果表明, 与野生型斑马鱼胚胎相比, 过表达或敲低 *ism1* 均会使胚胎的汇聚延伸运动受到影响。**结论** *ism1* 是调控斑马鱼胚胎原肠期汇聚延伸运动的重要基因。

【关键词】 *ism1*; 汇聚延伸运动; 原肠作用; 斑马鱼

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 02-0040-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.02.007

ism1 regulates convergence and extension movements during zebrafish gastrulation

WANG Zheng^{2#}, LI Jinpeng^{2#}, YAN Yifang^{1*}, WANG Qiang^{1*}

(1. State Key Laboratory of Membrane Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. Hebei Anguo Middle School, Anguo, Baoding 071200)

【Abstract】 Objective During zebrafish embryo gastrulation, the embryonic body plan is established by coordinated movements, including epiboly, involution, and convergence and extension (CE) movements. The aim of this study was to examine the expression patterns and the developmental functions of *isthmin 1* (*ism1*) during zebrafish gastrulation. **Methods** First, the expression of *ism1* was examined using whole mount *in situ* hybridization during zebrafish embryonic development. Next, antisense morpholino oligonucleotide against *ism1* and *ism1* mRNA were injected into zebrafish embryos, respectively, to investigate its role in CE movements. **Results** *ism1* is an early zygotic gene that is expressed in the dorsal side at 30% epiboly stage and in the blastoderm margin with the highest level in the dorsal organizer at shield stage as revealed by whole-mount *in situ* hybridization experiments. Compared with the wild-type embryos, either gain- or loss-of-function of *ism1* leads to severe defects of CE movements. **Conclusions** *Isml* plays an essential role in CE movements during zebrafish embryo gastrulation.

【Key words】 *Isml*; convergence and extension movements; gastrulation; zebrafish

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(31571501)。

【作者简介】 王政(2001—), 男, 高中生。E-mail: 1024397554@qq.com。

李金鹏(2000—), 男, 高中生。E-mail: nmjlsq@126.com。#共同第一作者

【通信作者】 闫一芳(1989—), 女, 博士研究生, 主要从事发育信号转导的研究。E-mail: yanyifangyanyf@hotmail.com。

王强(1975—), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事发育信号转导的研究。E-mail: qiangwang@ioz.ac.cn。* 共同通信



斑马鱼胚胎原肠期是一个重要发育时期,胚胎经历一系列复杂的事件如细胞分裂、细胞运动(迁移和重排)、胚层诱导、背腹分化等建立个体的雏形。在原肠期,胚胎细胞进行包括外包,内卷和汇聚延伸运动在内的大规模的、协调一致的形态发生运动,促进胚胎胚层的形成和空间上的分离,确立了胚胎的体轴,为胚胎进一步发育勾勒出蓝图^[1-2]。其中,独立且同时进行的汇聚和延伸运动对于胚胎的形态发生起关键作用。汇聚运动指的是上胚层和下胚层细胞向预定的胚胎背部区域迁移,进而引起中轴-侧轴方向变窄,而延伸运动是指背部细胞沿着前后轴伸展变长^[1-2]。随着汇聚延伸运动的进行,原本位于胚胎腹部及侧边和边缘区域的细胞向背部汇集,从而在胚胎背部形成加厚的结构,称为胚盾^[3]。同时,轴向和轴旁的细胞也发生重排和迁移,使得背腹轴变窄,沿前后轴发生延伸^[4]。随着汇聚延伸运动的进行,胚胎的形状发生改变,预定发育成脊索、体节以及神经板的细胞也会向背部迁移^[3]。自从 Wilson 在 1991 年通过爪蟾细胞移植实验观察到汇聚和延伸运动以来^[5],人们对汇聚延伸运动的作用有了更加深入的了解,但其调控机制还没有得到清晰的阐释。

Ism 蛋白是新型分泌蛋白家族的成员^[6],包含保守的血小板反应蛋白 I 型重复结构域(thrombospondin type 1 repeats domain, TSRs domain)和 AMOP(adhesion-associated domain in MUC4 and other proteins)结构域,在人类和小鼠内均有很强的保守性^[7]。Ism 基因首先在爪蟾中被鉴定出来,表达在胚胎腹部胚孔唇,脊索和中后脑边界等区域^[7-8]。在斑马鱼中,ism 有两个同源基因,分别是 *ism1* 和 *ism2*。*ism2* 特异表达在斑马鱼胚胎耳泡中,表明其没有参与胚胎原肠作用。近些年来,研究发现 *ism1* 是一个 Nodal 信号通路调控基因,与很多 Nodal 信号相关基因如 *squint*、*lefty1*、*lefty2*、*mixer* 等共表达^[8-11],但其在胚胎发育中的功能还不清楚。近来,我们通过流式细胞分选技术在 30% 外包期的 Tg(*gsc*:GFP)转基因鱼胚胎中分离富集了背部 GFP 阳性细胞,并进行了 RNA 深度测序,鉴定了一批特异在胚胎背部表达的基因,其中就包括 *ism1*^[12]。在本研究中,我们发现 *ism1* 是合子表达的基因,30% 外包时期表达于胚胎背部,原肠期表达在整个胚胎边缘区。进一步的研究表明,过表达或敲低 *ism1* 均抑制了胚胎的汇聚延伸运动。因

此,*ism1* 参与了对胚胎原肠期汇聚延伸运动的调控。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所用到的野生型斑马鱼胚胎均为 Tuebingen 品系;胚胎在 Holtfreter 水(3.5 g/L NaCl, 0.05 g/L KCl, 0.25 g/L NaHCO₃, 0.1 g/L CaCl₂, pH 7.0)中,28.5℃ 恒温培养。

Morpholino(简称 MO)是根据碱基互补配对原则设计、吗啉环修饰的反义寡核苷酸类似物。MO 可以通过碱基互补配对的方式与 mRNA 分子结合,干扰 mRNA 的正常剪切(splicing MO)或者抑制其翻译(ATG MO),最终降低特定基因的表达^[13]。本研究使用的是 *ism1* ATG MO,序列为 5'-CTCCGCC GCCAGACGCACCATCCTC-3',由 Gene Tools 公司设计并合成。

1.2 主要试剂及仪器

DNA 快速纯化回收试剂盒(EP101, TIANGEN);mMessage mMachine mRNA 转录合成试剂盒(AM1344, Ambion);RNA 纯化试剂盒(DP412, TIANGEN);MEGAscript 原位杂交探针体外转录试剂盒(AM1330, Ambion)。

1.3 实验方法

1.3.1 整胚原位杂交

胚胎成长至所需时期,4% 多聚甲醛固定 24 h 后剥膜过度到无水甲醇中脱水,于 -20℃ 保存。原位杂交开始时,所有试剂及耗材均需 DEPC 处理,先梯度过渡到室温 PBST 中复水,每次 5 min;随后置换成 100% PBST,放置 5 min 且重复一次。随后在杂交液里进行预杂交 2 h 以上,再加入相应 RNA 探针,65℃ 杂交过夜。随后,65℃ 杂交缓冲液洗涤胚胎,然后杂交阻断液室温封闭 1 h。SSCT 洗脱,抗地高辛抗体孵育过夜,MABT 洗脱,NBT/BCIP 显色。样品 4℃ 保存于 90% 甘油中。

1.3.2 mRNA 的合成及原位杂交 RNA 探针的制备

限制性内切酶 Not I 将质粒 DNA 线性化,酶切过夜,再使用 DNA 快速纯化回收试剂盒回收线性化的 DNA 模板。然后用 mMessage mMachine 试剂盒体外转录合成 mRNA。最后利用 RNA 纯化试剂盒纯化回收 mRNA,以无核酸酶水溶解,使用分光光度计测定得到的 mRNA 的浓度,分装后于 -80℃ 保存。



使用 MEGAscript 试剂盒体外转录合成地高辛标记的原位杂交 RNA 探针,然后通过 RNA 纯化试剂盒纯化回收, -20℃ 保存。

1.3.3 拍照

本研究中活体拍照均在 2% 甲基纤维素中固定拍照;原位杂交的胚胎用 90% 的甘油通透后, Leica M165C 体视显微镜进行拍照。

2 结果

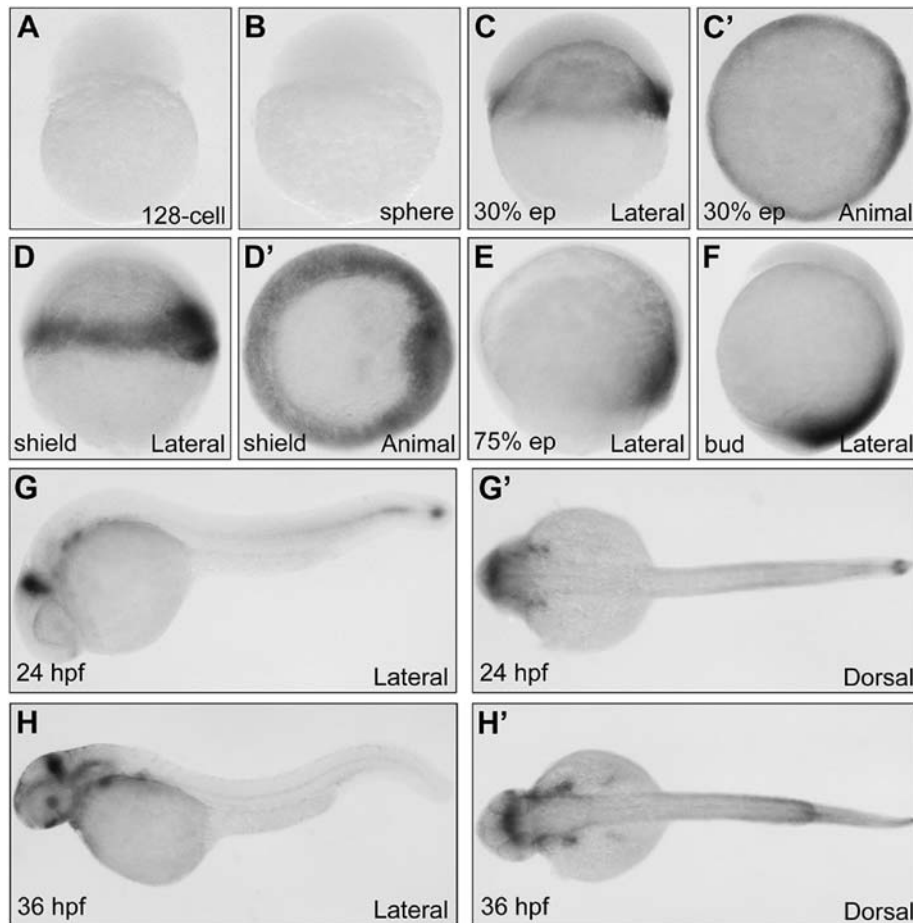
2.1 *ism1* 在斑马鱼原肠期胚胎胚盘边缘表达

基因在胚胎发育中的时空表达图谱,对于揭示其潜在的发育生物学功能具有重要的作用。因此,我们首先通过整胚原位杂交技术检测了 *ism1* 在斑马鱼胚胎早期发育中的表达。实验结果表明,在

30% 外包时期之前,没有检测到 *ism1* 的表达(图 1 A 和 1B),说明 *ism1* 不是一个母源基因。在 30% 外包时期, *ism1* 开始表达于胚胎背部预定胚盾部位(图 1C 和 1C')。在胚盾时期,可观测到 *ism1* 表达在整个胚胎边缘区,尤其在胚盾部位有较强表达(图 1D 和 1D')。在 75% 外包和尾芽期, *ism1* 主要表达在前体节中胚层(presomitic mesoderm)(图 1E 和 1F),而 24 h 和 36 h 则主要表达在中后脑边界和尾部脊索区域(图 1G ~ 1H')。因此, *ism1* 是一个表达于胚胎早期发育时期的合子基因,在原肠期特异表达在胚盘边缘。

2.2 过表达 *ism1* 引起汇聚延伸运动缺陷

原肠作用中的汇聚延伸运动是胚胎内多细胞协同定向迁移,处于迁移前沿,即胚盘边缘的细胞



注:A:128 细胞期;B:半球期;C 和 C':30% 外包期;D 和 D':胚盾期;E:75% 外包期;F:尾芽期;G 和 G':24 h 期;H 和 H':36 小时期;A ~ F 为侧面观,动物极向上;C' 和 D' 为背部观;G 和 H 为侧面观,背部向上;G' 和 H' 为背部观。

图 1 *ism1* 在斑马鱼胚胎的时空表达图谱

Note. A, 128-cell stage. B, Sphere stage. C and C', 30% epiboly stage. D and D', Shield stage. E, 75% epiboly stage. F, Bud stage. G and G', 24 h stage. H and H', 36 h stage. Embryos in panel A to F were shown in lateral views with the animal pole at the top, while embryos in panel C' and D' were shown in dorsal views. Embryos in panel G and H were shown in lateral views with the dorsal to the top, while embryos in panel G' and H' were shown in dorsal views.

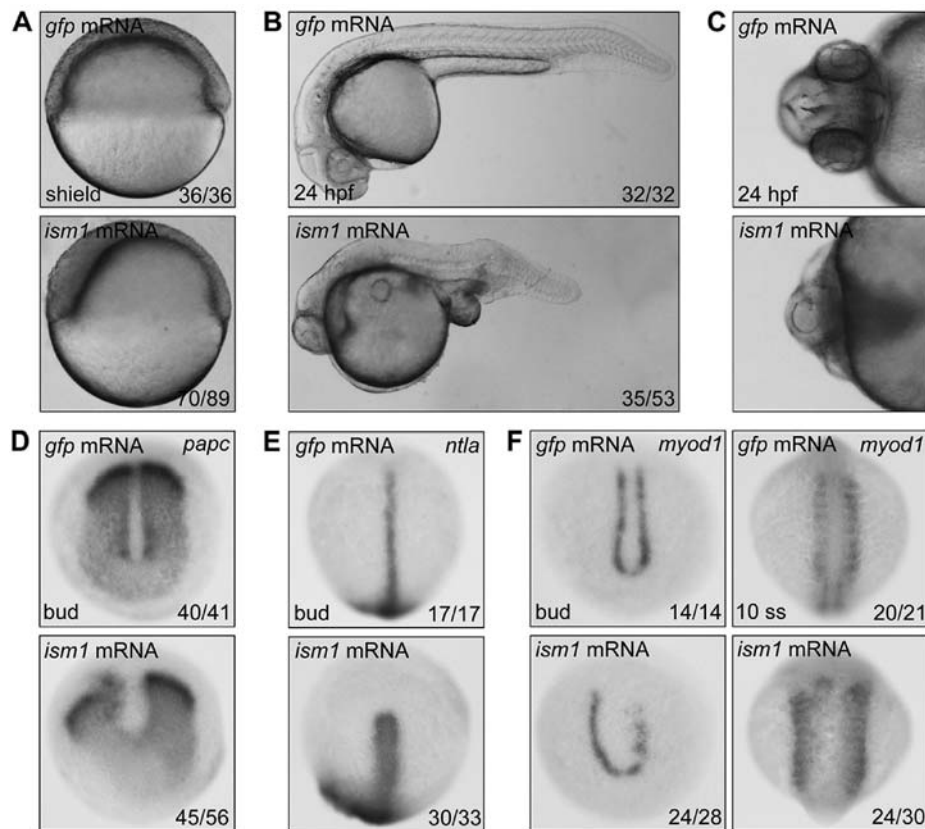
Fig. 1 Temporal and spatial expression pattern of *ism1*

在调控汇聚延伸运动中发挥着主导作用。*ism1* 在原肠期胚盘边缘区域的表达,提示其可能参与了胚胎的汇聚延伸运动。因此,我们首先检测了过表达 *ism1* 对胚胎汇聚延伸运动的影响。我们体外合成了 *ism1* mRNA,并在单细胞时期显微注射至斑马鱼胚胎中。结果表明,在胚盾期,与野生型胚胎相比,注射 200 pg *ism1* mRNA 的胚胎腹侧细胞较多,而背侧胚盾不能形成,说明过表达 *ism1* 抑制了腹部细胞向背部区域的迁移(图 2 A)。在受精后 24 h(hours post fertilization, hpf),过表达 *ism1* 的胚胎前后轴明显变短(图 2B),而且眼睛融合在一起,形成独眼的表型(图 2C)。这些现象均为汇聚延伸运动缺陷的

特征^[14]。另外,我们还进一步通过原位杂交技术检测了汇聚延伸运动相关基因表达图式的变化。研究发现,过表达 *ism1* 迟滞了轴旁中胚层(*papc*)向体轴中线的迁移(图 2D),并导致轴向中胚层(*ntla*)沿前后轴向变短、沿背腹轴向变宽(图 2E)。进一步的结果揭示,过表达 *ism1* 还引起体节(*myod1*)生成的类似缺陷(图 2F)。因此,*ism1* 过表达干扰了斑马鱼胚胎汇聚延伸运动。

2.3 敲降 *ism1* 同样导致胚胎汇聚延伸运动缺陷

为了探讨内源性 *Ism1* 在胚胎汇聚延伸运动中的功能,我们在单细胞时期,将 2 ng *ism1* MO 注射到斑马鱼胚胎中,抑制 *ism1* 的表达。在胚盾期,与过



注:A~C:单细胞时期注射 200 pg *ism1* mRNA 后,活体拍照观察过表达 *ism1* 后胚胎的表型;A:胚盾期;B和C:24 h 期;C为B的放大版图;A为侧面观,胚盾在右侧;B为背部朝上侧面拍照;C是为头部腹侧观特写;D~F:*ism1* 过表达后原位杂交检测标记基因表达水平的变化;D是 *papc* 的尾部观,腹部向上;E是 *ntl* 的背部观,头部向上;F左侧是 *myod1* 的尾部观,腹部向上;F右侧是 *myod1* 的背部观,头部向上。

图 2 *ism1* 过表达影响胚胎汇聚延伸运动

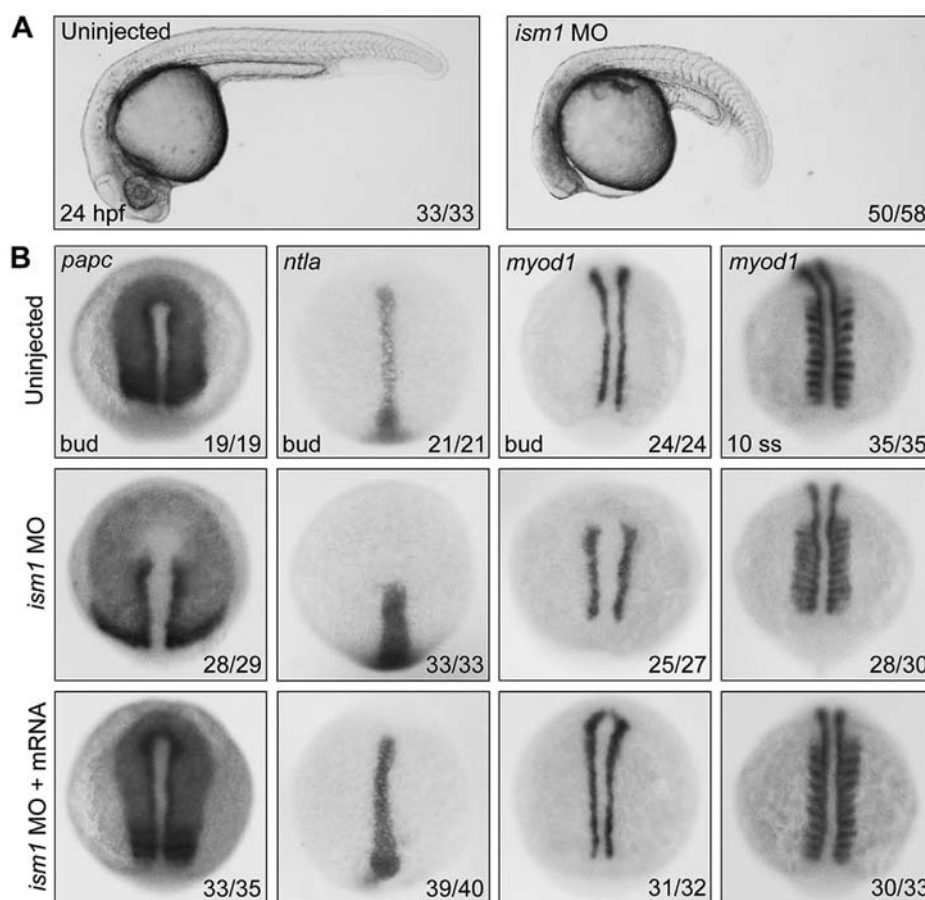
Note. A, *ism1*-overexpressed embryos showed CE movement defects compared with the uninjected control, after 200 pg *ism1* mRNA was injected at the one-cell stage. The stages were indicated; Figure C images were presented at a higher magnification in the corresponding Figure B images. A, shield-stage embryos were shown in lateral views with the animal pole at the top. B, lateral views with the dorsal to the top; C, embryos were viewed ventrally with anterior to the left. D to F, Expression patterns of marker genes in control and *ism1*-overexpressed embryos at the tailbud and 10 ss stages. D, posterior views with the ventral at the top; E, dorsal view with head at the top; The left panel in Figure F, posterior views with the ventral at the top. The right panel in Figure F, dorsal view with head at the top.

Fig. 2 Over-expression of *ism1* leads to severe defects of convergence and extension (CE) movements



表达 *ism1* 的胚胎不同,注射 *ism1* MO 的胚胎背侧胚盾没有明显缺陷,可能是由于内源性 *Isml* 表达较晚,不参与胚盾的形成。在受精后 24 h,与野生型胚胎相比,注射 *ism1* MO 的胚胎前后轴变短,体节由正常的“V”字形变为“U”字形(图 3 A),类似于以前报导的汇聚延伸运动缺陷^[15]。为了进一步证明 *ism1* 的功能,我们检测了汇聚延伸运动相关的基因表达。在注射 *ism1* MO 的胚胎中,与过表达 *ism1* 类似,轴旁中胚层(*papc*)、轴向中胚层(*ntla*)和体节

(*myod1*)同样呈现了前后轴向变短、背腹轴向变宽的特征(图 3B)。为了排除注射 *ism1* MO 可能引起的对其他基因的非特异性抑制,我们将 *ism1* mRNA 与 *ism1*-MO 共同注射,来检测 *ism1* mRNA 对汇聚延伸运动缺陷的拯救作用。如图 3B 所示,通过检测 *papc*, *ntla* 和 *myod1* 的表达,表明注射 200 pg *ism1* mRNA 可以较好的拯救 *ism1* 功能缺失引起的汇聚延伸运动缺陷。以上结果充分表明,*ism1* 对斑马鱼胚胎的汇聚延伸运动是必需的。



注:A:活体拍照观察敲降 *ism1* (2 ng *ism1* MO) 后胚胎的表型,胚胎在 24 h 观察拍照,侧面观背部向上;B:原位杂交检测敲降 *ism1* 后标记基因的变化。MO 注射引起的缺陷可以被 *ism1* mRNA 特异性地拯救。标记基因从左到右依次是 *papc*, *ntlA* 和 *myoD1*。尾芽期的 *papc* 为尾部观,腹部向上;尾芽期的 *ntlA* 是背部观,头部向上;左侧是尾芽期的 *myoD1* 的尾部观,腹部向上;右侧是 10 体节的 *myoD1* 的背部观,头部向上。

图 3 敲降 *ism1* 引起汇聚延伸运动缺陷

Note. A: Morphological characterization of *ism1* morphants, the eye spaces were narrowed in *ism1* morphants, lateral view were shown, with dorsal side to the top. The numbers indicated in the lower lefthand corner of each picture are the number (left) of affected embryos with phenotype similar to what is shown in the picture and the total number (right) of observed embryos. B: The expression patterns of *papc*, *ntlA*, and *myoD1* in *ism1* morphants and control embryos at the tailbud (10 hpf) and 6 somite stages. Injection of *ism1* mRNA could rescue CE defects of *ism1* morphants. *papc*, posterior views with the ventral at the top; *ntlA*, and dorsal view with head at the top. The left panel of *myoD1*, posterior views with the ventral at the top. The right panel of *myoD1*, dorsal view with head at the top.

Fig. 3 *ism1*-knockout leads to *ism1*-deficient embryos exhibiting severe CE defects



3 讨论

本研究以斑马鱼为模式动物,发现 *ism1* 是一个合子表达基因,在原肠期及其之前就开始表达,是维持斑马鱼的汇聚延伸运动所必需的。近年来的研究表明, *Ism* 是一种分泌型蛋白,通过和血管内皮细胞膜上的 $\alpha v\beta 5$ 整合素蛋白结合,稳定细胞间的连接,干扰 VEGF 诱导的内皮细胞增殖并触发细胞凋亡,抑制血管新生,从而起到抗肿瘤作用^[9,16]。另外, *Ism* 高表达于小鼠肺部血管内皮细胞,结合另一种膜表面受体 GRP78,从而增强 GRP78 对胞内 Src 的招募并激活其激酶活性,促进内皮细胞凋亡,诱发肺部血管血液渗漏^[17]。在斑马鱼早期胚胎发育过程中, *ism1* 与 *squint*, *lefty1*, *lefty2*, *mixer* 等具有类似的表达图式,且其表达受到 Nodal 信号调控^[4,9]。我们以前的研究结果揭示, Nodal 信号通过其下游的 *mir-206* 调控胚胎的汇聚延伸运动^[1-2]。 *Ism1* 是否可以通过结合 Nodal 受体蛋白调控 Nodal 信号活性,在胚胎汇聚延伸运动中发挥作用,还有待于进一步的研究。

多个研究表明,胚胎的汇聚延伸运动必需受到严密的调控,相关信号通路的过度激活或抑制,以及相关基因的过表达或失活,均致使胚胎发生汇聚延伸运动缺陷^[1,2,15]。我们的研究结果显示,过表达或敲降 *ism1* 同样抑制了胚胎汇聚延伸运动。由于 *Ism1* 是一种分泌型蛋白,我们推测其对汇聚延伸运动的影响可能是非细胞自主性的。综上所述,我们的研究阐明了 *ism1* 在斑马鱼胚胎汇聚延伸运动中的功能,将有助于增加我们对相关发育事件调控机制的理解。

参考文献:

- [1] Liu X, Ning G, Meng A, et al. MicroRNA-206 regulates cell movements during zebrafish gastrulation by targeting prickle1a and regulating c-Jun N-terminal kinase 2 phosphorylation [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(14): 2934-2942.
- [2] Liu X, Ma Y, Zhang C, et al. Nodal promotes mir206 expression to control convergence and extension movements during zebrafish gastrulation [J]. *J Genet Genomics*, 2013, 40(10): 515-521.
- [3] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. *Dev Dyn*, 1995, 203(3): 253-310.
- [4] Trinkaus JP, Trinkaus M, Fink RD. On the convergent cell movements of gastrulation in *Fundulus* [J]. *J Exp Zool*, 1992, 261(1): 40-61.
- [5] Wilson P, Keller R. Cell rearrangement during gastrulation of *Xenopus*: direct observation of cultured explants [J]. *Development*, 1991, 112(1): 289-300.
- [6] Niehrs C, Pollet N. Synexpression groups in eukaryotes [J]. *Nature*, 1999, 402(6761): 483-487.
- [7] Pera EM, Kim JI, Martinez SL, et al. Isthmin is a novel secreted protein expressed as part of the Fgf-8 synexpression group in the *Xenopus* midbrain-hindbrain organizer [J]. *Mech Dev*, 2002, 116(1-2): 169-172.
- [8] Bennett JT, Joubin K, Cheng S, et al. Nodal signaling activates differentiation genes during zebrafish gastrulation [J]. *Dev Bio*, 2007, 304(2): 525-540.
- [9] Xiang W, Ke Z, Zhang Y, et al. Isthmin is a novel secreted angiogenesis inhibitor that inhibits tumour growth in mice [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(2): 359-374.
- [10] Araki I, Raible F, Lohrs C, et al. Isthmin1 regulates Nodal signaling in zebrafish blastula and gastrula [J]. *Mech Dev*, 2005, 122: S43-S43.
- [11] Weidinger G, Thorpe CJ, Wuennenberg-Stapleton K, et al. The Sp1-related transcription factors sp5 and sp5-like act downstream of Wnt/beta-catenin signaling in mesoderm and neuroectoderm patterning [J]. *Curr Biol*, 2005, 15(6): 489-500.
- [12] 万传璐, 闫一芳, 王强. 斑马鱼胚胎胚盾特异表达基因的鉴定 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(5): 441-447.
- [13] Summerton J, Weller D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties [J]. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1997, 7(3): 187-195.
- [14] Seo J, Asaoka Y, Nagai Y, et al. Negative regulation of wnt11 expression by Jnk signaling during zebrafish gastrulation [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(4): 1022-1037.
- [15] Heisenberg CP, Tada M, Rauch GJ, et al. Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation [J]. *Nature*, 2000, 405(6782): 76-81.
- [16] Zhang Y, Chen M, Venugopal S, et al. Isthmin exerts pro-survival and death-promoting effect on endothelial cells through $\alpha v\beta 5$ integrin depending on its physical state [J]. *Cell Death Dis*, 2011, 2: e153.
- [17] Venugopal S, Chen M, Liao W, et al. Isthmin is a novel vascular permeability inducer that functions through cell-surface GRP78-mediated Src activation [J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 107(1): 131-142.

[收稿日期]2017-09-08