

# 鸡胚发育早期Sonic Hedgehog在脊髓中的异位表达 对形态结构及相关蛋白表达的影响

李小英<sup>1</sup> 杨慈清<sup>1,2\*</sup> 王聪睿<sup>2</sup> 付苏雷<sup>1</sup> 李 晗<sup>1</sup> 林俊堂<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>新乡医学院生命科学技术学院, 新乡 453003; <sup>2</sup>河南省医用组织再生重点实验室, 新乡 453003)

**摘要** 该文主要分析音猬因子(Sonic Hedgehog, Shh)在鸡胚发育过程中对脊髓形态结构的形成和相关蛋白表达的影响。实验过程采用鸡胚带壳开窗培养技术,待胚胎发育至第3 d,将2 μg/μL pCAGGS-Shh和0.25 μg/μL pCAGGS-GFP质粒以1:8浓度混合,将0.1~0.5 μL混合液准确地注射到神经管,在电压18 V、每次脉冲60 ms、间隔100 ms、电脉冲6次的条件下进行定时定位活体电转基因,电转后6 h开始到5 d分别收集胚胎,冰冻切片,采用荧光免疫组化和DAPI染色观察组织形态结构及相关蛋白的变化。结果表明,电转后6 h便可以观察到GFP的表达,24 h时Shh在脊髓中的异位表达能够诱导转录因子Nkx2.2(NK2 homeobox 2)的表达,并且能够抑制Pax7(paired-type homeobox 7)的表达,而Shh异位表达时脊髓的结构发生了明显的改变;说明Shh作为脊髓发育过程重要的信号分子,其异位表达能够诱导和抑制相关蛋白的表达,影响脊髓正常发育。

**关键词** Sonic Hedgehog; 鸡胚; 脊髓; Nkx2.2; Pax7

## Sonic Hedgehog Ectopic Expression Affects the Structure and Protein Expression of the Spinal Cord During Chicken Early Embryonic Development

Li Xiaoying<sup>1</sup>, Yang Ciqing<sup>1,2\*</sup>, Wang Congrui<sup>2</sup>, Fu Sulei<sup>1</sup>, Li Han<sup>1</sup>, Lin Juntang<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Henan Province for Medical Tissue Regeneration, Xinxiang 453003, China)

**Abstract** This research mainly analyzes the effect of Sonic Hedgehog (Shh) on the formation of the morphological structure of spinal cord and expression of related proteins during the chicken embryonic development. Using *in ovo* electroporation, 2 μg/μL pCAGGS-Shh and 0.25 μg/μL pCAGGS-GFP plasmid were mixed by 1:8 and then with 0.1~0.5 μL accurately injected into the spinal cord on E3 embryo. The condition of *in ovo* electroporation was voltage 18 V, each pulse 60 ms, interval 100 ms and total 6 times pulses. The positive embryos were collected after electroporation from 6 h to 5 d, for frozen sections. Fluorescent immunohistochemistry and DAPI staining were carried out to observe the change of the morphological structure and the related proteins expression. The results show that GFP expression was observed in 6 h after *in ovo* electroporation. After 24 h of electroporation, it was detected that the Shh ectopic expression induces the expression of Nkx2.2 (NK2 homeobox 2) in the spinal cord, however Pax7 (paired-type homeobox) expression was inhibited, furthermore, Shh ectopic expression leads

收稿日期: 2014-03-28 接受日期: 2014-07-08

国家自然科学基金(批准号: 31000475)、河南省教育厅科学技术研究重点项目(批准号: 13A320866)和新乡医学院重点研究领域招标项目(批准号: ZD2011-26)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0373-3831667, E-mail: yangciqing@126.com

Received: March 28, 2014 Accepted: July 8, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31000475), the Science and Technology Research Projects Fund of Henan Province Education Department (Grant No.13A320866) and the Key Research Areas Funded Project of Xinxiang Medical University (Grant No.ZD2011-26)

\*Corresponding author. Tel: +86-373-3831667, E-mail: yangciqing@126.com

网络出版时间: 2014-07-25 17:16 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.08.0099.html>

to a change of the spinal cord structure. As an important signaling molecule, ectopic expression of Shh induces or inhibits the expression of related proteins, and leads to the spinal cord malformations.

**Key words** Sonic Hedgehog; chicken embryo; spinal cord; Nkx2.2; Pax7

胚胎发育过程中脊髓的形成受到众多因素的影响,在神经板形成神经管过程中存在一部分细胞的大量增殖和一部分细胞的增殖受限才会产生凹陷和弯曲,尤其是在脊椎动物脊髓发育过程中,前-后轴和背-腹轴的形成至关重要。音猬因子(Sonic Hedgehog, Shh)是一种分泌性蛋白,在早期胚胎发育过程中具有许多功能,包括神经管模式的形成<sup>[1]</sup>、前-后轴及背-腹轴的建立和体节的形成等<sup>[2]</sup>。在脊髓发育过程中,Shh信号通路和Wnt信号通路相互作用,严格调控其他蛋白在脊髓中的表达和定位。有研究报道,在鸡胚早期发育过程,Shh能够调控Cadherin7的表达<sup>[3]</sup>;在胚胎发育的早期,Shh异位高表达会导致畸形胚,如脑、眼睛和脸等的畸变<sup>[4]</sup>。本研究利用鸡胚活体原位电转基因技术,在鸡胚发育早期实现Shh在脊髓中的异位表达,进一步借助显微镜观察和荧光免疫组化分析其异位表达后对脊髓结构形成及相关蛋白表达的影响,为Shh在胚胎发育过程在活体内对脊髓发育及相关蛋白调控功能的研究提供科学参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与amp;仪器

pCAGGS-Shh和pCAGGS-GFP(绿色荧光蛋白)质粒由本实验室保存;一抗鼠抗Nkx2.2单克隆抗体(DSHB抗体)、一抗鼠抗Shh单克隆抗体(DSHB抗体)、一抗鼠抗Pax7(DSHB抗体)、二抗山羊抗鼠Cy3标记均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;DAPI购自Roche公司;质粒DNA大量提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;种鸡蛋购自本地种鸡场;CUY-21(BEX)型多功能活体电转仪购自日本NEPA公司;M205FA型倒置体视荧光显微镜购自德国Leica公司;Nikon ECLIPSE 80i荧光显微镜购自日本NIKON公司;CM1850冰冻切片机购自德国Leica公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 原位电转基因方法** 转染具体过程:鸡胚带壳开窗培养,待胚胎发育到第3 d时取出鸡蛋,侧面开口2~3 cm直径大小,在体视显微镜下,将2 μg/μL pCAGGS-Shh质粒和0.25 μg/μL pCAGGS-GFP以1:8

混合液0.1~0.5 μL准确地注射到脊柱,在电压18 V、每次脉冲60 ms、间隔100 ms、电脉冲6次的条件下进行定时定位活体电转基因,整个过程在无菌操作工作台内完成,电转后6 h开始到5 d分别收集胚胎,各组至少取出3个转染胚胎,在倒置体视荧光显微镜下观察结果,电转部位呈现绿色荧光(绿色荧光蛋白GFP的颜色)者视为阳性。

**1.2.2 取材及切片** 倒置体视荧光显微镜下观察阳性表达的胚胎,采用尖头镊子划破卵黄膜,取出整个胚胎,转移至4 °C预冷处理的PBS液漂洗2~3次,置于4% PFA(多聚甲醛)中,置保温盒冰块中,摇床摇晃过夜;取出组织,吸干液体,转移到18%蔗糖溶液置冰盒中摇晃过夜;等组织沉淀到管底时取出组织吸干液体,根据组织大小,用锡箔纸做好模型,用冰冻切片包埋剂(optimum cutting temperature compound, OCT)包埋,注意头朝上尾朝下,确定好位置,置于液氮中冷冻后放入-80 °C冰箱保存;切片时取出已包埋的组织,在冰冻切片机上连续切片,一次10张载玻片,切片厚度为20 μm,每张图片根据组织大小循环贴2~3行,5~10列,切片后置烤片机37 °C烤片30 min,于-80 °C冰箱保存备用。

**1.2.3 荧光免疫组织化学染色** 从-80 °C低温冰箱中取出的冰冻切片,于40 °C干燥20 min,4 °C下4% PFA中固定15 min,用1×TBS清洗3次,每次5 min,在含0.1% Triton X-100的1×TBS中再孵育5 min。每张载玻片上加1 mL免疫组化封闭液,湿盒中孵育1 h。去除封闭液后每张载玻片加300 μL经用封闭液稀释的合适浓度鼠抗Shh(1:100)检测Shh的表达、鼠抗Nkx2.2和鼠抗Pax7一抗分别检测诱导转录因子Nkx2.2和细胞核转录因子Pax7的表达,对照组一抗稀释液中不加抗体,每种抗体重复3张图片,4 °C孵育过夜后,1×TBS清洗3次,每次5 min,然后每张图片加300 μL用封闭液稀释的Cy3标记的山羊抗小鼠二抗,室温孵育1 h后,用1×TBS清洗3次,每次5 min。最后滴加DAPI封片剂染色10 min,加盖玻片,在荧光显微镜下观察拍照。

**1.2.4 Shh探针合成** 常规基因克隆获得鸡源Shh的CDS区后,链接到pCR-TOPII载体中,用合适的限

制性内切酶切割pCR-TOPII-Shh质粒使之线性化, 取1  $\mu\text{g}$ 线性化的质粒为模板, 加入2  $\mu\text{L}$  10 $\times$ RNA聚合酶缓冲液, 2  $\mu\text{L}$ (40 U) SP6或T7 RNA聚合酶, 2  $\mu\text{L}$  10 $\times$ 地高辛标记核糖核酸底物混合物(Roche公司), 0.5  $\mu\text{L}$  RNA酶抑制剂, 加不含RNA酶高等级水到终体积20  $\mu\text{L}$ , 轻微混合, 37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h。然后加入1  $\mu\text{L}$  DNA酶(1 U)孵育20 min消化DNA模板。最后加入80  $\mu\text{L}$  pH8.0 TE缓冲液终止反应, 并加入10  $\mu\text{L}$  3mol/L醋酸钠、250  $\mu\text{L}$  无水乙醇, 混合后于-80  $^{\circ}\text{C}$ 沉淀cRNA至少2 h。4  $^{\circ}\text{C}$ 下13 000 r/min离心30 min, 去上清后加入400  $\mu\text{L}$  70%乙醇, 同样条件再离心30 min, 去上清后室温干燥30 min。向有沉淀的Eppendoff管中加入60  $\mu\text{L}$  不含RNA酶的纯净水, 混匀后加入6  $\mu\text{L}$  酵母tRNA保护cRNA探针。合成好的探针存放于-80  $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱备用。

**1.2.5 原位杂交** 取出-80  $^{\circ}\text{C}$ 保存的切片, 50  $^{\circ}\text{C}$ 干燥1 h, 然后4  $^{\circ}\text{C}$ 下4%多聚甲醛固定30 min, PBS洗涤2次, 每次5 min, 蛋白酶K消化5 min, PBS洗涤5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 下4%多聚甲醛再次固定30 min, 随后用DEPC处理过的去离子水洗涤5 min, 再用三乙醇胺-乙酸酐溶液处理20 min, PBS洗涤2次, 每次5 min, 最后分别加入处理过的RNA探针, 并用硅化干烤过的盖玻片覆盖载玻片后放入加有原位杂交平衡液的湿盒中, 70  $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜。然后于5 $\times$ SSC中去除盖玻片, 并将载玻片在5 $\times$ SSC中室温放置10 min, 60  $^{\circ}\text{C}$ 下5 $\times$ SSC中洗涤30 min, 接着60  $^{\circ}\text{C}$ 下50%(V/V)甲酰胺加2 $\times$ SSC洗涤1 h, 37  $^{\circ}\text{C}$ 下1 $\times$ NTE清洗3次, 每次10 min, 再用RNA酶溶液37 $^{\circ}\text{C}$ 下消化30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ 下1 $\times$ NTE洗片10 min, 再次60  $^{\circ}\text{C}$ 下50%甲酰胺加2 $\times$ SSC洗涤40 min, 60  $^{\circ}\text{C}$ 下2 $\times$ SSC洗涤30 min, 0.1 $\times$ SSC室温洗涤30 min, PBS洗涤2次, 每次5 min, 最后用0.1%(V/V)绵羊血清封闭30 min。加1:2 500碱性磷酸酶标记的地高辛抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。TBS洗涤3次, 每次20 min, Tris碱-NaCl缓冲液洗涤10 min, 最后每张载玻片加含有NBT和BCIP的原位杂交显色液300  $\mu\text{L}$ , 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光显色, 视信号强弱终止显色。显色终止后, 先用DEPC处理过的去离子水洗涤5 min, 再用Tris碱-EDTA洗涤5 min后视显色深浅适当脱水、透明, 中性树胶封片。片子晾干后, 显微镜下观察照相分析结果。

**1.2.6 图像处理分析** 用Photoshop CS3软件处理图片, 可将两种染色同位叠加在一起, 从而分析不同

蛋白质的表达定位。

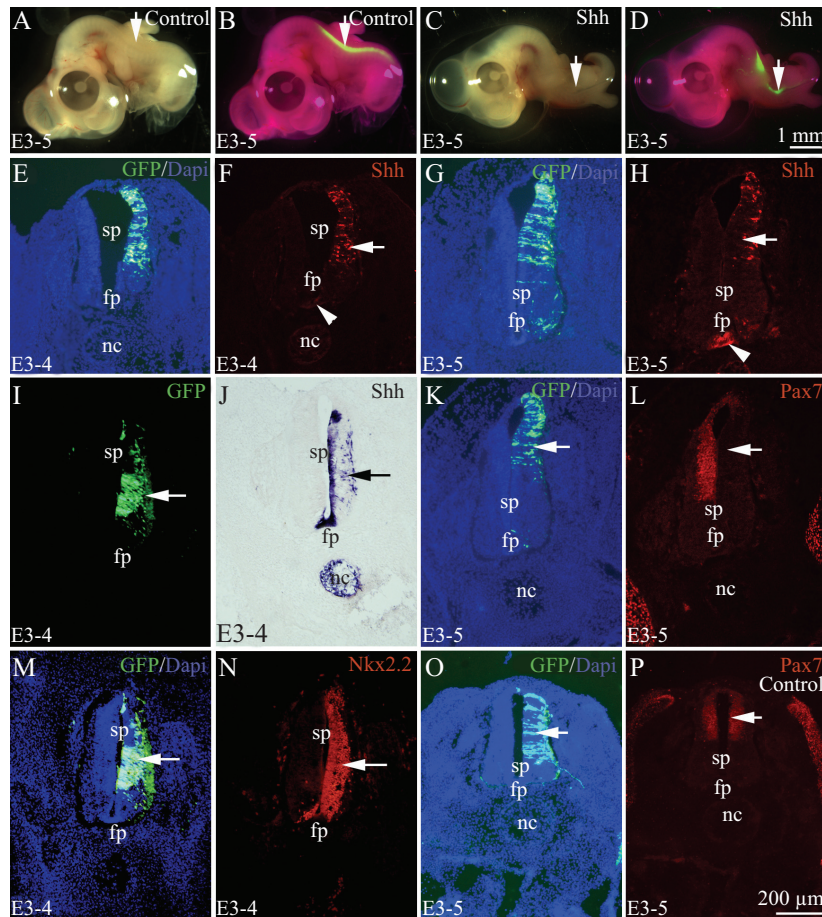
## 2 结果

### 2.1 Shh在脊髓中的异位表达及对脊髓形态结构的影响

在胚胎发育过程, 转染Shh质粒的胚胎与对照组(图1A和图1B)相比, 在胚胎发育过程转染Shh超表达组(图1C和图1D)脊髓出现明显的畸形, 出现神经管的非生理性弯曲。进一步通过切片后, 对不同时期的组织切片进行染色观察。从早期胚胎组织切片中可以看到, 在胚胎发育过程脊髓中Shh的主要表达在脊索(notochord, nc)和基板(floor plate, fp)(图1F和图1H中的无尾箭头)。鸡胚活体电转能够实现基因的定时和定位表达, 在转染过程中能够准确地转染到一侧脊髓(图1所示GFP), 而另外一侧可以直接作为对照组。在本实验中, 利用其单侧转染特点, 实现Shh在鸡胚发育早期脊髓一侧异位表达, 即原本在脊索和基板表达的蛋白表达在脊髓一侧(图1F、图1H和图1J箭头所示)。在图1F和图1H中, 无尾箭头所示为胚胎发育过程内源性Shh的表达结果, 箭头所示为采用活体电转后实现的Shh异位表达的结果; 从图1E和图1F可以看到, 在胚胎发育的E3时转染Shh表达质粒24 h后, Shh表达的一侧明显的发生弯曲, 而这种弯曲的结果不是由于取材或个体差异而导致的, 是由于Shh的表达影响的细胞的增殖而导致的结果, 而这一点在E5时表现的更为突出, 在图1G和图1H中体现地更为明显, 在Shh表达的一侧与对侧相比明显发生了形态结构的改变, 为了探讨其影响形态改变的机制, 实验中对相关蛋白的表达进行了检测。

### 2.2 Shh的异位表达对Nkx2.2和Pax7的影响

实现Shh异位表达后, 脊髓发育的形态结构明显发生了变化, 因此, 我们进一步对胚胎发育早期脊髓中表达的相关蛋白进行检测, 以探讨其机制。图1J中表示的为Shh异位表达原位杂交检测结果, 在Shh表达的一侧脊髓转录因子Nkx2.2的表达也发生了变化, 与对侧相比, 其在不表达的部位却实现了表达(图1N箭头), 但是对侧(图1N)中检测不到红色的荧光; 更有趣的是, Shh异位表达后抑制了转录因子Pax7的表达, 从图1K和图1L中可以看到, 有报告基因GFP表达的区域(也代表Shh异位表达的区域, 因为是将pCAGGS-Shh和pCAGGS-GFP进行共转染) Pax7的表达消失(图1H箭头所示), 而同样在对照组



A~D为全胚胎观察结果;其中,A、B示对照组;C、D示实验组,结构发生异常。E~J为Shh异位表达结果;其中,E、G、K、M、O为报告基因GFP(绿色)表达结果和DAPI细胞核染色(蓝色)结果的叠加;F、H为Shh荧光免疫组化(红色);I为报告基因GFP(绿色)表达结果;J为Shh原位杂交结果(蓝色)。K~N为Shh异常表达对相关蛋白表达产生的影响;L为Pax7荧光免疫组化(红色);N为Nkx2.2荧光免疫组化(红色)。O~P为单纯转染GFP质粒的对照组;P为Pax7荧光免疫组化(红色)。A~D标尺=1 mm;E~P标尺=200  $\mu$ m;GFP:绿色荧光蛋白;sp:脊髓;fp:基板;nc:脊索。

A~D for the whole embryo observed result. A and B show control group, while C and D show the experiment group which have abnormal morphology. E~J for Shh ectopic expression results. E,G,K,M,O show the merge results of the report gene GFP (green) expression and DAPI staining nuclei (blue). F and H is the result of Shh fluorescent immunohistochemistry (red) at E3-4 respectively. I shows the results of the report gene GFP (green) expression. J is the result of in situ hybridization for Shh (blue). K-N for the effect of Shh ectopic expression on related protein. L is the result of Pax7 fluorescent immunohistochemistry (red). N is the result of Nkx2.2 immunostaining (red). O-P for the control group. P is the result of Pax7 fluorescent immunohistochemistry (red). The scale bar is 1 mm in D, 200  $\mu$ m in P for E~P. GFP: green fluorescent protein; sp: spinal cord; fp: floor plate; nc: notochord.

图1 Shh异位表达对脊髓形态结构及相关蛋白表达的影响

Fig.1 The effect of sonic hedgehog ectopic expression on spinal cord morphology and relation protein expression

中(图1O和图1P)有GFP表达的区域Pax7的表达和对称是对称的。

### 3 讨论

*Shh*基因属于Hedgehog(*Hh*)基因家族中的一种。*Hh*基因家族的表达产物是一系列的分泌蛋白,可作用于邻近或远隔的细胞,调节相关基因表达水平。在脊椎动物中,存在3种*Hh*的同源基因,分别为Dessert hedgehog(*Dhh*)、Indian hedgehog(*Ihh*)和Sonic hedgehog(*Shh*)。在3种*Hh*基因中,人们对*Shh*基因功能的研究最多<sup>[4]</sup>。*Shh*通路参与众多的组织器官

的发育,如眼、四肢、中枢神经系统、皮肤、毛发、牙齿、耳蜗和肺等<sup>[5]</sup>,尤其是在组织极性的确定上起到了不可或缺的作用<sup>[6]</sup>。脊椎动物胚胎发育过程神经管的形成受到*Shh*的重要影响,研究表明,*Shh*在脊髓腹侧模式的建立及诱导基板 and 运动神经元的形成过程中扮演重要角色<sup>[2]</sup>。

有研究报道,在鸡胚脊髓中*Shh*的异位高表达能够下调脊髓发育过程形态结构形成的重要蛋白Cadherin7的表达,而且Pax7对Cadherin7的表达调控机制和*Shh*具有相似之处<sup>[3]</sup>。因此,本实验中特意设计了*Shh*的表达对Pax7以及另一种转录因子Nkx2.2

表达的影响, 从实验结果中可知, 在鸡胚发育的E3转染Shh表达质粒48 h后, 从全胚胎观察结果可以看到, 转染Shh表达组的胚胎明显地发生脊髓非生理性弯曲, 而通过与对照组的比较说明, 这种弯曲不是由于实验操作过程的损伤造成的, 而是由于Shh的表达导致的结果。进一步从组织切片上也验证形态畸变的结果, 在胚胎发育的E3时转染Shh质粒24 h后, 组织切片染色结果表明, 在Shh表达的一侧脊髓发生弯曲, 进而对相关蛋白的表达检测结果更清晰地说明Shh诱导Nkx2.2在原来不表达的部位进行表达。Nkx2.2基因是一种调控细胞分化的同源结构域转录因子, 因此说明Shh的表达与调控细胞的分化和增殖有着非常重要的关系, 相关研究也充分说明Shh促进胚胎发育过程细胞的增殖和肿瘤发生过程中的细胞增殖<sup>[7-8]</sup>, 与本实验推测的结果保持一致。在实验中更为明显的是, Shh的异位表达部位Pax7的表达受到抑制, Pax7在脊髓中的表达具有明显的区域性, 而这种典型的区域性也与脊髓背腹轴基因表达的差异有关, 从实验结果中明显可以看到, 实验组P中Pax7表达两侧都是对称的, 并且只局限在脊髓背侧区域, 在腹侧没有表达, 但是在实验组(图1L)中, Shh异位表达的区域Pax7的表达消失, 这种结果也说明Pax7的表达受到Shh的调控。有研究报道, Pax6的表达可能受到Shh的调控, 但是Shh的表达却不受Pax6表达的调控, 其转录过程主要依靠体节形成的影响<sup>[9]</sup>, 虽然Shh基因在哺乳动物中发现已经有几十年的时间<sup>[10]</sup>, 但对于其功能的研究有待进一步深入, Shh不仅在神经系统发育过程中具有非常重要的功能, 而且在其他组织器官的形成和发育过程也具有重要作用<sup>[11]</sup>。本实验结果说明, Shh在胚胎发育过程对于神经系统结构的形成和相关蛋白的表达具有重要的调控作用, 而只有在正确的表达部位表达, 才能够正确调控其结构的形成, 如果在异位表达, 将会导致胚胎发育

过程发生异常, 因此, 也说明Shh异常表达与神经系统发育畸形有关, 对其深入的研究将可能对神经系统发育异常的机理提供有用资料和为临床治疗提供新的靶点。

### 参考文献 (References)

- 1 Nasrallah I, Golden JA. Brain, eye, and face defects as a result of ectopic localization of Sonic hedgehog protein in the developing rostral neural tube. *Teratology* 2001; 64(2): 107-13.
- 2 Ekker SC, Ungar AR, Greenstein P, von Kessler DP, Porter JA, Moon RT, *et al.* Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. *Curr Biol* 1995; 5(8): 944-55.
- 3 Luo J, Ju MJ, Redies C. Regionalized cadherin-7 expression by radial glia is regulated by Shh and Pax7 during chicken spinal cord development. *Neuroscience* 2006; 142(4): 1133-43.
- 4 陈志强, 韩新焕, 曹新. Sonic Hedgehog信号通路与内耳发育调控. *遗传*(Chen Zhiqiang, Han Xinhuan, Cao Xin. Sonic Hedgehog signaling pathway and regulation of inner ear development. *Hereditas*) 2013; 35(9): 1058-64.
- 5 Hu J, He L. Patterning mechanisms controlling digit development. *J Genet Genomics* 2008; 35(9): 517-24.
- 6 Clément R, Blanc P, Mauroy B, Sapin V, Douady S. Shape self-regulation in early lung morphogenesis. *PLoS One* 2012; 7(5): e36925.
- 7 Ulloa F, Briscoe J. Morphogens and the control of cell proliferation and patterning in the spinal cord. *Cell Cycle* 2007; 6(21): 2640-9.
- 8 Wan J, Zhou J, Zhao H, Wang M, Wei Z, Gao H, *et al.* Sonic hedgehog pathway contributes to gastric cancer cell growth and proliferation. *Biores Open Access* 2014; 3(2): 53-9.
- 9 Pituello F, Medevielle F, Foulquier F, Duprat AM. Activation of Pax6 depends on somitogenesis in the chick embryo cervical spinal cord. *Development* 1999; 126(3): 587-96.
- 10 Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, *et al.* Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 1993; 75(7): 1417-30.
- 11 周昱男, 胡波. Shh基因在胚胎发育过程中的调控作用. *中国病理生理杂志*(Zhou Yu'nan, Hu Bo. Function of Shh gene in the development of embryos. *Chinese Journal of Pathophysiology*) 2008; 24(6): 1240-3.