论著

文章编号:1000-5404(2010)03-0250-03

nesprin-1 基因在小鼠心脏发育过程中的表达

李小莉[1],易岂建[1],张秋萍[2],李娅莎[3] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院心血管内科[1];英国 剑桥,剑桥大学心血管实验室[2];400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所[3])

[摘要] **目的** 检测小鼠心脏发育过程中 nesprin-1 基因 mRNA 和蛋白的表达及亚细胞定位。**方法** 取小鼠胚胎 12.5 d(embryo 12.5day,E12.5)、E14.5、E16.5、E18.5 以及新生鼠、成年小鼠心脏,应用 RT-PCR、Western blot、免疫荧光技术检测胚胎各时间点、新生鼠、成年鼠心脏 nesprin-1 基因 mRNA 和蛋白表达及细胞定位。**结果** 在小鼠胚胎 E12.5、E14.5、E16.5、E18.5 以及新生鼠、成年小鼠心脏组织中,nesprin-1 基因 mRNA 及蛋白均有表达,其表达量随着心脏的发育而逐渐增加,E16.5 和 E18.5 表达最高,成年鼠表达最低。免疫荧光显示,nesprin-1 的分布在各个时期均位于核被膜及核周间隙中。**结论** nesprin-1 在小鼠心脏发育过程中表达呈动态变化,在心脏传导系统和心肌细胞发育成熟时期呈高表达,因此推测 nesprin-1 可能在心脏传导系统和心肌细胞的发育中有重要作用。

[关键词] nesprin-1;小鼠;心脏发育;传导;心肌细胞

[中图法分类号] R322.11; R394-33; R394.1 **[文献标志码]** A

Expression of nesprin-1 gene in development of mouse heart

Li Xiaoli[1], Yi Qijian[1], Zhang Qiuping[2], Li Yasha[3] ([1]Department of Cardiovascular Medicine, Affiliated Children's Hospital, Chongqing Medical University Chongqing, 400014; [2]Division of Cardiovascular Medicine, University of Cambridge, UK; [3]Institute of Pediatrics, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[Abstract] **Objective** To detect the expression of nesprin-1 gene mRNA and protein and to localize the sub-cellular protein during the development of mouse heart. **Methods** Samples of embryonic heart tissue were collected from postnatal and adult mice on embryo 12.5 days (E12.5), E14.5, E16.5, and E18.5, respectively. Expression levels of nesprin-1 mRNA and protein and the protein sub-cellular location in samples of embryonic heart tissue from mice were detected by reverse transcriptase PCR, Western blot analysis and immunofluorescence at different time points. **Results** The expression level of nesprin-1 mRNA and protein in samples of embryonic heart tissue from postnatal and adult mice was measured on E12.5, E16.5 and E18.5, respectively, which increased with the development of mouse heart, reached it peak on E16.5 and E18.5. The lowest expression level of nesprin-1 mRNA and protein was found in adult mice. Immunofluorescence showed that nesprin-1 was distributed in nuclear envelope and in spaces around the nuclei. **Conclusion** nesprin-1 is dynamically expressed during the development of mouse heart, and highly expressed in the mature period of cardiac conduction system and cardiac muscle cells, indicating that it plays an important role in the development of cardiac conduction system and cardiac muscle cells.

[Key words] nesprin-1; mouse; heart development; conduction; cardiac muscle cell

Supported by the Doctorial Foundation of High-Educational Colleges and Universities (20050631005) and the Starting Funds for Personnel Resturning From Overseas of Ministry of Education(2007). Corresponding author: Yi Qijian, Tel: 86-23-63624344, E-mail: qjyi2003@yahoo.com.cn

nesprins(nuclear envelop spectrin repeat)是近年来发现的一个新的保守的蛋白家族。是细胞骨架的主要组成部分,具有维持细胞结构,协调细胞功能的作用[1-4]。已发现的 nesprins 有 nesprin-1(又称 syne-1/ENAPTIN)、nesprin-2(又称 syne-2/NUANCE)和 nesprin-3 三个蛋白亚型[1]。有研究表明 nesprins 在多种组织中广泛表达,其中 nesprin-1 在骨骼肌、心肌、血管平滑肌中呈高表达。nesprin-1 突变将导致埃德二氏肌营养不良综合征(emery-dreifuss muscular dystrophy, EMDM)[5]。该病在心脏主要表现为传导障碍的扩张型心肌病。目前 nesprin-1 在心脏发育中的表达及作用尚少见报道,本实验通过 RT-PCR、western blot、免疫荧光方法对 nesprin-1 在胚胎心脏的定位及表达进行观察,为深入认识其在胚胎心脏发育中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

成年昆明小鼠 90 只,6~8 周龄。雄性小鼠 30 只,28~32 g;雌性小鼠 60 只,26~28g,由重庆医科大学实验动物中心提供。总 RNA 抽提试剂盒购自 Gememega 公司;随机引物、

[基金项目] 高等学校博士学科点专项基金(20050631005);教育部留学回国人员科研启动基金(2007)

[通信作者] 易岂建,电话:(023)63624344, E-mail:qjyi2003@yahoo.com.cn

dNTP、M-MLV 逆转录酶、*Taq* 酶购于 Promega 公司(美国);DEPC、PCR Marker 购于 TaKaRa 公司(日本);引物由百瑞生物技术有限公司合成;蛋白提取试剂盒购于 Activemotif 公司(美国);BCA 蛋白测定试剂盒购于 Pierce 公司(美国);5 × SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液购于凯基(中国);抗 nesprin-1 兔多克隆抗体购于 abcam 公司(英国);抗 GAPDH 兔多克隆抗体购于 abcam 公司(英国);羊抗兔 HRP 二抗购于中杉(中国);化学发光试剂盒购于 santa cruz 公司(美国)。

1.2 方法

1.2.1 取材　选取小鼠 10 只雌性小鼠与 5 只雄性小鼠为 1 组。雌雄按 2∶1合笼,见栓当日为 0.5 d,分别在 E12.5、E14.5、E16.5、E18.5 取胚胎心脏以及新生鼠、成年鼠心脏。-80 ℃保存待检。

1.2.2 RT-PCR 检测　总 RNA 抽提试剂盒抽提 RNA,以随机引物、M-MLV 逆转录酶和 DEPC 进行逆转录反应,逆转录体系 20 μl;nesprin-1 上游引物:5′-GCATTCTTGTCTGGCTCACA-3′,下游引物:5′-GTCTGAGCTCGTCCAGTTCC-3′,产物 225 bp。nesprin-1 PCR 条件:95 ℃ 7 min(预变性);95 ℃ 1 min(变性);60 ℃ 40 s(退火);72 ℃ 1 min(延伸);共 35 循环;72 ℃ 5 min(终末延伸)。取 9 μl PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,图像分析仪进行图像扫描与灰度值分析,结果以 nesprin-1/β-actin 的灰度值之比进行半定量分析。实验重复 3 次。

1.2.3 免疫荧光检测　冰冻切片丙酮固定 10 min,PBS 洗 5 min/次 ×3 次,10% 山羊血清封闭 10 min,PBS 以 1∶500 稀释一抗孵育 4 ℃过夜,PBS 洗 5 min/次 ×3 次,滴加羊抗兔 FITC 荧光二抗,37 ℃温育 30 min,PBS 洗 5 min/次 ×3 次,DAPI 复染细胞核,37 ℃温育 10 min,PBS 洗 5 min/次 ×3 次,加 50% 缓冲甘油封片。以 PBS 代替一抗为阴性对照。采用 Olympus BX51 荧光显微镜及摄像系统检测。

1.2.4 Western blot 检测　参照蛋白提取试剂盒提取心脏组织全细胞蛋白,BCA 法测蛋白浓度。取 24 μg 总蛋白加 5 × SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液煮沸 5 min 后进行 8% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。半干转移仪中以 1 mA/cm^2 恒流电转将蛋白电转移至 PVDF 膜上(nesprin-1, 120×10^3, 105 min; GAPDH, 36×10^3, 30 min)。5% 脱脂奶粉 TTBS 溶液(封闭液)室温封闭 1 h,封闭液以 1∶1 000 浓度稀释 nesprin-1 一抗,1∶1 000 浓度稀释 GAPDH 一抗 4 ℃孵育过夜,TTBS 洗涤 15 min ×3 次,封闭液以 1∶5 000 稀释 HRP 二抗室温孵育 1 h,TTBS 洗涤 15 min ×3 次,化学发光 2 min 显色。凝胶自动成像分析仪进行图像扫描并用 Quantity One 软件进行灰度值分析。以 nesprin-1 与 GAPDH 的灰度值之比进行半定量分析。实验重复 3 次。

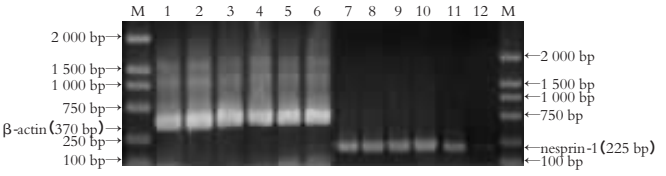
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SAS 9.0 统计软件分析,方差齐性检验后选择 t 检验。

2 结果

2.1 nesprin-1 基因 mRNA 在胎鼠各时间点以及新生鼠、成年小鼠心脏组织中的表达

在胎鼠 E12.5 已出现 nesprin-1 基因 mRNA 表达,以后其表达水平呈逐渐上调,在 E16.5 和 E18.5 时达峰值,成年鼠其相对表达量最低(表 1,图 1)。

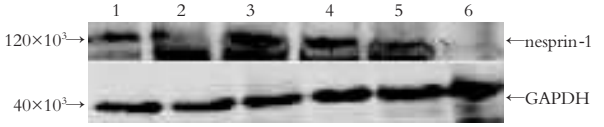


M:DNA 分子量标准;1 ~6:分别为 E12.5、E14.5、E16.5、E18.5、新生鼠、成年鼠心脏组织 β-actin 的 PCR 产物;7 ~12:分别为 E12.5、E14.5、E16.5、E18.5、新生鼠、成年鼠心脏组织 nesprin-1 的 PCR 产物

图 1 nesprin-1 基因 mRNA 的 RT-PCR 产物电泳结果

2.2 nesprin-1 蛋白质在胎鼠 E12.5、E14.5、E16.5、E18.5 以及新生鼠、成年小鼠心脏组织中的表达

在胎鼠 E12.5 已出现 nesprin-1 蛋白质表达,以后其表达水平呈逐渐上调,在 E16.5 和 E18.5 时达峰值,成年鼠其相对表达量最低(表 1,图 2)。与 nesprin-1 基因 mRNA 在小鼠心脏表达结果一致。



1 ~4:分别为 E12.5、E14.5、E16.5、E18.5 d;5:新生鼠心脏;6:成年鼠心脏

图 2 nesprin-1 蛋白在胎鼠各时间点以及新生鼠、成年小鼠心脏组织中的表达

2.3 nesprin-1 蛋白在胎鼠各时间点以及新生鼠、成年鼠心脏中的定位表达

免疫荧光显示:nesprin-1 在小鼠各时期心脏组织均有表达,其亚细胞定位主要位于核被膜及其核周间隙,在 E12.5 到成年鼠这一过程中无核迁移现象;胚胎 E12.5 d 细胞排列相对稀疏,随着细胞增殖分化,在 E16.5、E18.5、新生鼠时心肌细胞排列较紧密,出生后心肌细胞从多边形逐渐过渡到成年鼠期的短柱状,细胞排列紧密(图 3)。

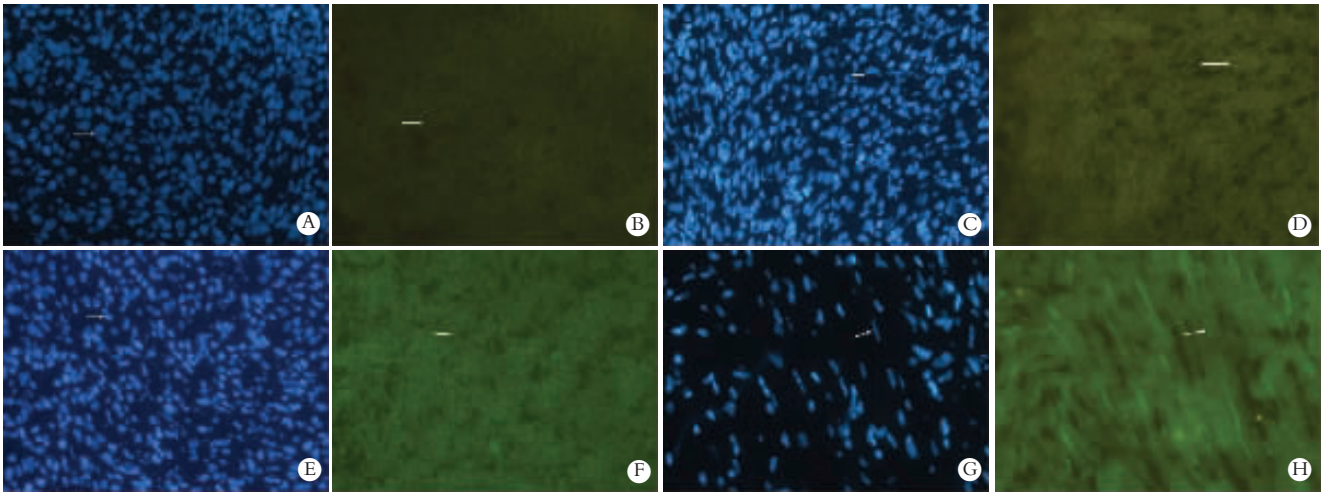
3 讨论

nesprins 是英国剑桥大学医学系 Zhang 等[6]用差异 cDNA 筛选和同源检索,在寻找血管平滑肌细胞分化标记物过程中发现的Ⅱ型完整膜蛋白新家族。nesprins 有 nesprin-1(又称 syne-1/ENAPTIN)、nesprin-2(又称 syne-2/NUANCE)和 nesprin-3 三个蛋白亚型。有研究表明 nesprins 在多种组织中广泛表达,其中 nesprin-1 在骨骼肌、心肌、血管平滑肌中呈高表达。nesprin-1 突变将导致 EMDM[5,7]。该病在心脏主要表现为传导障碍的扩张型心肌病。研究表明[8],心脏是胚胎发育过程中最早形成的器官。在 E8.5(8 ~9 体节)

表 1 nesprin-1 基因在胎鼠、新生鼠、成年鼠心脏组织中的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

nesprin-1	E12.5	E14.5	E16.5	E18.5	新生鼠	成年鼠
mRNA	0.357 5 ±0.065 5	0.430 0 ±0.066 8	0.575 0 ±0.077 2[a]	0.515 0 ±0.052 5[a]	0.430 0 ±0.057 2	0.190 0 ±0.066 8
蛋白质	0.951 0 ±0.254 6	1.163 5 ±0.321 0	2.077 3 ±0.617 2[b]	2.430 5 ±0.564 0[b]	1.503 5 ±0.584 0	0.693 0 ±0.536 6

a:$P<0.05$, 与其他各时间点比较;b: $P<0.05$, 与其他各时间点比较



A、C、E、G:分别为胎鼠E12.5、E16.5 d、新生鼠、成年鼠心脏组织切片,DAPI选择性与DNA双链中的A-T碱基对结合,使细胞核显示蓝色(箭头);B、F、D、H:分别为胎鼠E12.5、E16.5 d、新生鼠、成年鼠心脏组织切片,使用FITC标记荧光二抗,绿色显示心肌细胞中nesprin-1分布(箭头)

图3 nesprin-1蛋白在胎鼠、新生鼠和成年鼠心肌细胞的免疫荧光定位 (×400)

时期开始出现节律性的收缩,使心脏具有振动泵的功能。E12.5时胚胎心脏房室隔始基形成,E16.5前胚胎心脏的房室间隔形成,其中E16.5、E18.5是胚胎心肌细胞增殖,细胞体积增大,心房心室壁致密变厚,心脏体积增大最明显的时期,心肌结构和功能逐步成熟,心脏传导系统进一步完善,到出生时心肌细胞增殖趋于稳定,心脏体积逐渐增大,只需少量的增生代替凋亡的细胞,到成年鼠时心脏功能已经发育成熟,心肌细胞由出生时的多边形逐渐过渡到短柱状,细胞排列紧密[9,10]。

本研究显示,nesprin-1基因在小鼠心脏发育过程中的表达呈动态变化。免疫荧光结果显示在心脏发育的各个时期nesprin-1均分布在核被膜和核周间隙,这与其他实验室的研究结果一致[11-13]。nesprin-1在E12.5的心脏组织即有较高表达,随着胚胎心脏发育,其表达量逐渐增多,在E16.5和E18.5其相对表达量达最高峰,随后表达逐渐下降,到成年鼠时期表达最低。因此推测核膜蛋白nesprin-1可能与心肌细胞增殖以及心脏传导系统形成及成熟有关。其具体机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Warren D T, Zhang Q, Weissberg P L, *et al*. Nesprins: intracellular scaffolds that maintain cell architecture and coordinate cell function? [J]. Expert Rev Mol Med, 2005, 7(11): 1-15.

[2] Hodzic D M, Yeater D B, Bengtsson L, *et al*. Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein[J]. J Biol Chem, 2004, 279(24): 25805-25812.

[3] Libotte T, Zaim H, Abram S, *et al*. Lamin A/C-dependent localization of nesprin-2, a giant scaffolder at the nuclear envelope[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(7): 3411-3424.

[4] Crisp M, Liu Q, Roux K, *et al*. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex[J]. J Cell Biol, 2006, 172(1): 41-53.

[5] Zhang Q, Bethmann C, Worth N F, *et al*. Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity[J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(23): 2816-2833.

[6] Zhang Q, Skepper J N, Yang F, *et al*. Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues[J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 24): 4485-4498.

[7] Broers J L, Peeters H A, Kuijpers H J, *et al*. Decreased mechanical stiffness in LMNA-/- cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies[J]. Hum Mol Genet, 2004, 13(21): 2567-2580.

[8] Mikawa T, Hurtado R. Development of the cardiac conduction system [J]. Semin Cell Dev Biol, 2007, 18(1): 90-100.

[9] Dominguez J N, de-la-Rosa A, Navarro F, *et al*. Tissue distribution and subcellular localization of the cardiac sodium channel during mouse heart development[J]. Cardiovasc Res, 2008, 78(1): 45-52.

[10] Gough L L, Fan J, Chu S, *et al*. Golgi localization of syne-1[J]. Mol Biol Cell, 2003, 14(6): 2410-2424.

[11] Zhang Q, Ragnauth C D, Skepper J N, *et al*. Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle[J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 4): 673-678.

[12] Padmakumar V C, Libotte T, Lu W, *et al*. The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope[J]. J cell Sci, 2005, 118(Pt 15): 3419-3430.

[13] Worman H J, Gundersen G G. Here come the SUNs: a nucleocytoskeletal missing link[J]. Trends Cell Biol, 2006, 16(2): 67-69.

(收稿:2009-09-24;修回:2009-11-09)

(编辑 王 红)