

· 实验研究 ·

叶酸拮抗剂甲氨喋呤导致斑马鱼心脏发育异常及 *BMP2b* *HAS2* 表达下调

孙淑娜¹, 桂永浩¹, 宋后燕², 钟涛³, 王跃祥², 蒋璆¹

(1. 复旦大学儿科医院, 上海 200032, 2. 复旦大学分子医学教育部重点实验室, 上海 200032;
3. 美国 Vanderbilt 大学医学院细胞生物学实验室)

[摘要] 目的 该研究利用叶酸拮抗剂甲氨喋呤(MTX)构建叶酸生物学活性受抑制的斑马鱼模型后,观察叶酸生物学活性受抑后对斑马鱼心脏发育的干扰作用以及对斑马鱼心脏发育相关基因 *BMP2b* 及 *HAS2* 表达的影响。方法 用不同浓度的 MTX 处理不同发育时段的斑马鱼胚胎,于 48 hpf(hours post fertilization)观察胚胎心脏发育情况并计数各组心脏发育异常个体的百分比及心率,评定 MTX 对斑马鱼心脏发育的影响程度。用 1.5×10^{-3} M 的 MTX 处理 6~10 hpf 发育时段的斑马鱼胚胎作为 MTX 处理组。于 24 hpf 及 48 hpf 在显微镜下观察 MTX 处理组斑马鱼胚胎心脏发育情况。借助胚胎整体原位杂交和 Real-time PCR 的方法检测 *BMP2b* 和 *HAS2* 在正常对照组及 MTX 处理组胚胎的表达水平。结果 胚胎早期发育阶段 6~12 hpf 是斑马鱼胚胎对 MTX 的敏感时期。显微镜下观察结果显示 MTX 处理组斑马鱼心脏发育延迟,并有心脏形态发育明显异常。胚胎整体原位杂交结果显示 MTX 处理组斑马鱼心脏发育相关基因 *BMP2b* 及 *HAS2* 在心脏的表达于 36 hpf 及 48 hpf 下调。Real-time PCR 结果显示 MTX 处理组斑马鱼 *BMP2b* 的相对表达量在 12, 24, 36 及 48 hpf 减少, *HAS2* 的相对表达量在 24, 36 及 48 hpf 减少。结论 叶酸生物学活性受抑对早期胚胎的心脏发育影响较大,可导致斑马鱼心脏发育延迟及心脏形态异常,并下调斑马鱼心脏发育相关基因 *BMP2b* 及 *HAS2* 的表达,这可能是叶酸生物学活性受抑后导致心脏发育异常的机制之一。

[中国当代儿科杂志, 2007, 9(2):159-163]

[关键词] 叶酸;甲氨喋呤;心脏发育;*BMP2b*;*HAS2*;斑马鱼

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)02-0159-05

Folic acid antagonist methotrexate causes the development malformation of heart and down-regulates the *BMP2b* and *HAS2* expressions in zebrafish

SUN Shu-Na, GUI Yong-Hao, SONG Hou-Yan, ZHONG Tao, WANG Yue-Xiang, JIANG Qiu. Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 200032, China (Gui Y-H, Email: yhgui@shmu.edu.cn)

Abstract: **Objective** To study the effect of methotrexate (MTX), a folic acid antagonist which can lead to folic acid deficient, on the cardiac development and on the expressions of *BMP2b* and *HAS2* in zebrafish. **Methods** The zebrafish embryos at 6-48 hrs post fertilization (hpf) were treated with various concentrations of MTX (0.5×10^{-3} , 1.0×10^{-3} and 2.0×10^{-3} M). At 48 hpf, the percentage of cardiac malformation and heart rate were recorded. The zebrafish embryos at 6-10 hpf treated with 1.5×10^{-3} M MTX were used as the MTX treatment group. At 24 and 48 hpf the cardiac morphology was observed under a microscope. The expressions of *BMP2b* and *HAS2* in zebrafish were detected by *in situ* antisense RNA hybridization and real-time PCR. **Results** 6-12 hpf, the early embryonic developmental stage, was a sensitive period that MTX affected cardiac formation of zebrafish. The retardant cardiac development and the evidently abnormal cardiac morphology was found in the MTX treatment group. The results of *in situ* antisense RNA hybridization showed that the expressions of *BMP2b* and *HAS2* in the zebrafish heart were reduced in the MTX treatment group at 36 and 48 hpf. The real-time PCR results demonstrated that the *BMP2b* expression decreased at 12, 24, 36 and 48 hpf, and that the *HAS2* expression decreased at 24, 36 and 48 hpf in the treatment group compared with the control group without MTX treatment. **Conclusions** The inhibition of folic acid function may affect cardiac development of early embryos, resulting in a retardant development and a morphological abnormality of the heart in zebrafish, possibly by down-regulating the expressions of *BMP2b* and *HAS2*.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(2):159-163]

[收稿日期] 2006-08-03; [修回日期] 2006-09-27

[基金项目] 上海市科委专项课题资助(054119512)

[作者简介] 孙淑娜, 女, 博士研究生。主攻方向: 先天性心脏病的发病机制研究。

[通讯作者] 桂永浩, 教授, 博士生导师, 复旦大学儿科医院, 邮编: 200032。

Key words: Folic acid; Methotrexate; Cardiac development; *BMP2b*; *HAS2*; Zebrafish

先天性心脏病(CHD)是严重危害儿童生命和健康的疾病,在其诸多发病原因中,维生素缺乏不容忽视。大量的流行病学调查研究结果显示,孕妇怀孕前及怀孕时摄入叶酸过少或服用一些拮抗叶酸的药物可导致胎儿发生先天性心脏病、神经管发育缺陷、颌面部畸形等^[1,2]。母亲孕期适当补充叶酸可以有效地预防这些先天性畸形的发生^[3]。以这些调查研究的结果为依据,利用叶酸拮抗剂甲氨喋呤(MTX)构建叶酸生物学活性受抑的斑马鱼模型,观察MTX对斑马鱼心脏发育的影响,并检测叶酸生物学活性受抑后对斑马鱼心脏发育相关基因*BMP2b*及*HAS2*表达的影响,初步探讨叶酸生物学活性受抑导致先天性心脏病的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

野生型斑马鱼(AB系)购自美国Oregon大学,养殖系统从美国Aquatic Habitats公司引进。受精卵按照Zebrafish Book中的描述以及图谱对发育阶段进行分期,并判定实验各组斑马鱼心脏的形态学发育状况^[4]。用于原位杂交的胚胎在24 hpf开始用0.3%苯硫脲(PTU)处理以防止黑色素的形成。

1.2 实验试剂

MTX (methotrexate hydrate)购自美国Sigma公司,构建基因探针及原位杂交所用试剂购自Takara公司或美国罗氏公司。

1.3 主要实验仪器

GHP-9160 隔水式恒温培养箱、OLYMPUS SZX12 显微镜及显微摄像系统。

1.4 胚胎整体原位杂交

采用Primer3软件设计实验所需基因探针片段的引物,由Sangon生物公司合成。*BMP2b*上游引物5'-ATTCCCCGAGATCGACCGAC-3',下游引物5'-AAGTCTTCATTGGGGAGATTGTT-3'。*HAS2*上游引物5'-AGGAAACATAAACTTAAAGCGTC-3',下游引物5'-TTTTATTCCATAGATTTGCCTT-3'。构建含有斑马鱼*BMP2b* cDNA片段的重组质粒和含有*HAS2*片段的重组质粒,重组质粒线性化后,用RNA聚合酶Sp6体外转录地高辛标记的反义RNA探针。胚胎固定及原位杂交按照Zebrafish Book中相关描述进行^[4]。

1.5 Real-time PCR

采用Primer3软件设计用于Real-time PCR实验的*BMP2b*和*HAS2*引物,由Sangon生物公司合成。*BMP2b*上游引物5'-CTTCCTCCTCCGAGGCTT-3',下游引物5'-ACTGGCATCTCCGAGAACTT-3'。*HAS2*上游引物5'-TGGATGCAGGTTTGTGATTC-3',下游引物5'-CTCCTCCAACATTGGGATCT-3'。抽提斑马鱼12,24,36及48 hpf各时间点的mRNA,逆转录为cDNA,然后以此cDNA为模板和上述引物进行Real-time PCR实验。每个样品重复3个孔,以 β -actin做为内参对照。

1.6 统计分析

每组实验各重复5次($n=50$),各指标皆以均值 $\pm$ 标准差表示,用SPSS 10.0统计分析软件进行统计分析。Real-time PCR实验结果采用ABI7000荧光定量PCR仪提供的分析软件进行分析。

2 结果

2.1 叶酸拮抗剂MTX干扰斑马鱼心脏发育

选取 0.5×10^{-3} , 1.0×10^{-3} , 2.0×10^{-3} 三种浓度的MTX,对6~48 hpf区间内不同发育时段的斑马鱼胚胎进行处理后,在48 hpf于显微镜下进行观察。我们发现,随MTX干扰时段的向后推移,斑马鱼胚胎心脏发育异常的百分比渐减少,存活胚胎的心率渐增加。在每一干扰时段内,随MTX干扰浓度的增加,心脏发育异常的百分比渐增加,存活胚胎的心率逐渐下降。与其他处理时段相比,6~12 hpf是斑马鱼胚胎对MTX的相对敏感时期($P<0.05$)见图1,2。继而又发现6~10 hpf是斑马鱼胚胎对MTX的主要敏感期。在6~10 hpf予以斑马鱼胚胎 1.5×10^{-3} M MTX后于24 hpf在显微镜下观察,正常对照组斑马鱼原始心管已出现有规律的跳动,而MTX处理组斑马鱼约有 $(67 \pm 2.4)\%$ ($n=50$)的胚胎在原始心管处未观察到搏动,提示MTX处理组斑马鱼有心脏发育延迟。48 hpf显微镜下观察结果发现MTX处理组约有 $(82 \pm 1.9)\%$ ($n=50$)的斑马鱼胚胎心脏发育明显异常。筛选出的心脏发育异常表型,与正常对照组相比,心房心室扩张、心房心室发育不良、心房心室位置异常、心前区不同程度水肿(见图3),并伴有心率下降、心脏跳动无力及循环障碍(显微镜下观察发现血细胞生成减少、血流速度减慢及血细胞积聚于心脏流入道处)。

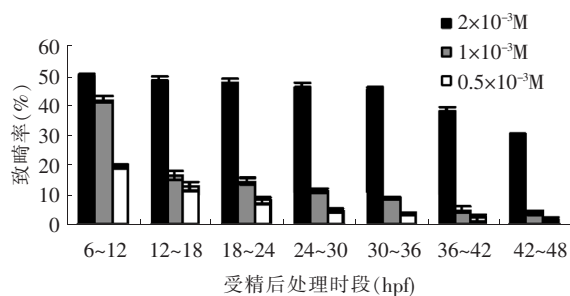


图1 各MTX处理组心脏发育异常个体的统计

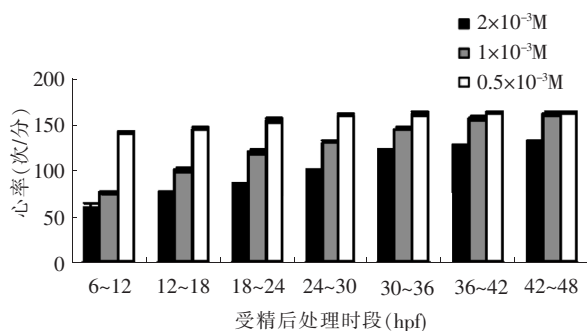


图2 各MTX处理组心率的统计

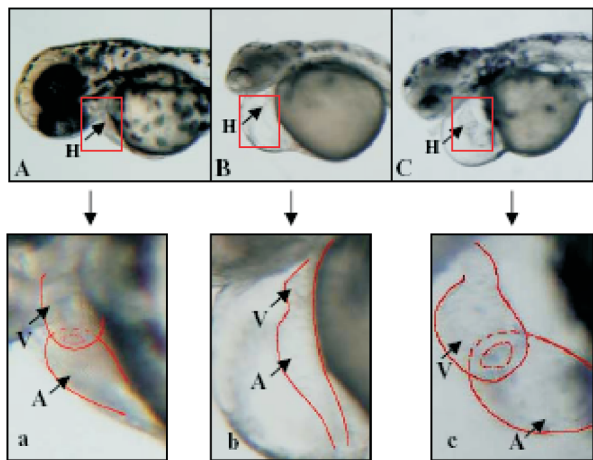


图3 MTX干扰后斑马鱼心脏发育的异常表现。(以 1.5×10^{-3} M MTX在6~12 hpf处理斑马鱼胚胎,于48 hpf在显微镜下进行观察) A,a:正常对照组斑马鱼;B,b:心房、心室发育不良,心房、心室位置偏移并伴有心前区明显水肿;C,c:心房、心室扩张,伴有心房和心室的位置异常及心前区明显水肿。a,b,c分别为A,B,C的示意图。(图中箭头所示,V:ventricle,心室 A:atrium,心房)

2.2 叶酸生物学活性受抑制后对斑马鱼 *BMP2b*, *HAS2* 表达的影响

2.2.1 原位杂交结果显示叶酸生物学活性受抑下调了斑马鱼 *BMP2b*, *HAS2* 的表达 在6~10 hpf 斑马鱼胚胎发育区间内予以 1.5×10^{-3} M MTX后,于36 hpf和48 hpf在显微镜下观察并筛选出心脏发育异常的胚胎,将其与对照组胚胎进行原位杂交实

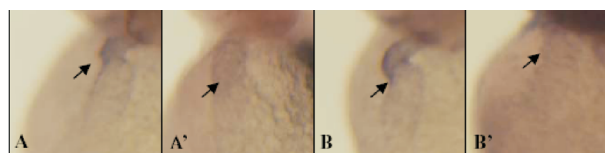


图4 原位杂交结果显示正常对照组与MTX干扰组36 hpf及48 hpf *BMP2b* 的表达情况。A为36 hpf正常对照组;A'为36 hpf MTX处理组;B为48 hpf正常对照组;B'为48 hpf MTX处理组。正常对照组斑马鱼 *BMP2b* 于36 hpf和48 hpf在心脏有较清晰表达;MTX处理组斑马鱼与对照组相比,*BMP2b* 于36 hpf和48 hpf在心脏的表达明显减弱。

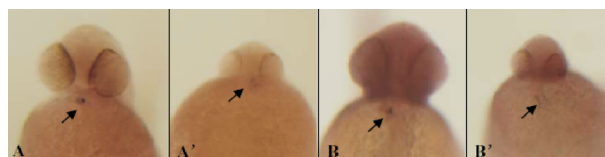


图5 原位杂交结果显示正常对照组与MTX干扰组36 hpf及48 hpf *HAS2* 的表达情况。A为36 hpf正常对照组;A'为36 hpf MTX处理组;B为48 hpf正常对照组;B'为48 hpf MTX处理组。正常对照组斑马鱼 *HAS2* 于36 hpf和48 hpf在心脏的房室交界处有强表达,MTX处理组斑马鱼与对照组相比,*HAS2* 于36 hpf和48 hpf在房室交界处的表达区域扩大且表达明显减弱。

验,结果发现在正常对照组斑马鱼中,*BMP2b* 于36 hpf和48 hpf在斑马鱼心脏均有较强的表达。与对照组相比,*BMP2b* 在MTX处理组胚胎心脏的表达于36 hpf和48 hpf下调(见图4)。*HAS2* 在36 hpf及48 hpf正常对照组中局限表达于斑马鱼心脏房室交界处,MTX处理组胚胎与正常对照组相比,*HAS2* 的表达在此两个时间点均下调并且表达区域扩大(见图5)。

2.2.2 Real-time PCR 结果显示叶酸生物学活性受抑后斑马鱼 *BMP2b*, *HAS2* 的表达相对量下降

在6~10 hpf 斑马鱼胚胎发育区间内予以 1.5×10^{-3} M MTX后,分别于12,24,36和48 hpf在显微镜下筛选出发育异常的胚胎作为各时间点的MTX处理组胚胎,与同期正常对照组胚胎进行Real-time PCR实验,检测两组之间*BMP2b*和*HAS2*相对表达量的差异情况。结果显示*BMP2b*和*HAS2*在正常对照组于12 hpf已检测到有表达,随后*BMP2b*在12~48 hpf区间内其表达量逐渐增加,*HAS2*的表达在12~36 hpf区间内渐增加,48 hpf的相对表达量较36 hpf略下降,但仍高于12 hpf和24 hpf。MTX处理组胚胎与正常对照组相比,在12,24,36和48 hpf各时间点*BMP2b*的表达量均明显下降。两组12 hpf *HAS2*的表达量无显著差异,在24,36f和48 hpf各时间点MTX处理组*HAS2*的表

达量与正常对照组相比明显下降。(见图6,7)。

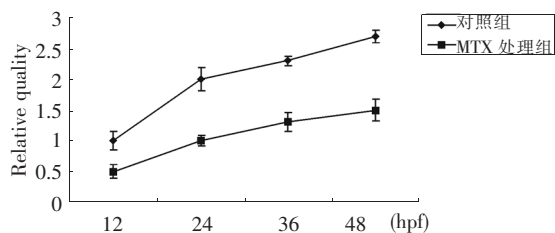


图6 Real-time PCR 结果显示正常对照组与 MTX 干扰组 *BMP2b* 的相对表达量

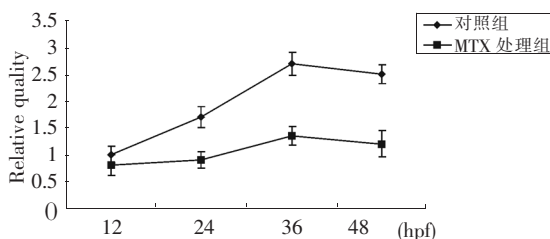


图7 Real-time PCR 结果显示正常对照组与 MTX 干扰组 *HAS2* 的相对表达量

3 讨论

叶酸是十分重要的B族维生素,生物体内缺乏叶酸或其生物学活性受抑制可导致许多先天性发育异常疾病的发生。二氢叶酸向四氢叶酸转化是叶酸向其生物学活性物质转化的关键步骤之一,此反应受抑制将影响四氢叶酸的生成,进而造成5,10-亚甲基四氢叶酸合成不足。5,10-亚甲基四氢叶酸是一碳单位的载体,转运一碳单位参与生物体内许多重要反应和重要物质的合成,在生物体内合成量下降会干扰组织的正常分化、发育。公认的叶酸拮抗剂MTX能够不可逆的与二氢叶酸还原酶结合而抑制其活性,从而阻止二氢叶酸向四氢叶酸转化,阻断了叶酸的生物学活性,影响胚胎发育^[5]并导致畸形发生^[6]。孕妇服用二氢叶酸还原酶拮抗剂(如MTX)可导致胎儿发生先天性心脏病等^[7]。我们结合上述原理和依据,应用叶酸拮抗剂MTX构建本实验中叶酸生物学活性受抑制的动物模型。新兴模式生物斑马鱼的胚胎发育周期短,心血管系统于24 hpf即出现心管搏动,36 hpf完成心管扭曲,48 hpf心脏即已发育完全。而且,斑马鱼的胚胎透明,便于对心脏发育全过程进行动态观察,是本实验进行心血管研究的理想生物模型^[8]。

在实验中,我们发现叶酸拮抗剂MTX对斑马鱼

胚胎心脏发育的负性作用有剂量依赖性和时相差异性。MTX导致斑马鱼胚胎心脏发育形态异常和心率减慢,这说明MTX不仅干扰了斑马鱼心脏的形态学发育,还对斑马鱼胚胎的心脏功能产生了影响。MTX在6~10 hpf予以 1.5×10^{-3} M的MTX后,于48 hpf可观察到82%左右的斑马鱼胚胎心脏发育明显异常。已有研究明确斑马鱼6~10 hpf处于原肠胚期(5.25~10 hpf),这一时期对于各胚层细胞在前后轴、背腹轴的定位十分重要,一部分晚期囊胚细胞与后期心房和心室的分化和形成相关^[4],因此也是心脏原始发育和分化的关键时期,这一时期外界的干扰因素将特异地影响心脏发育。我们在实验中所获得的MTX影响斑马鱼心脏发育的最特异时段即6~10 hpf与其相吻合。本研究进而对叶酸生物学活性受抑导致斑马鱼心脏发育异常的分子机制进行了初步探讨。

MTX造成的叶酸生物学活性受抑有可能影响了一系列调节心脏发育的关键因子而造成斑马鱼心脏发育异常。*BMP2b*是TGF- β 家族的成员,其对于前中内胚层的早期发育和心肌祖细胞的分化及一些心脏发育相关基因如NKX2.5, GATA4, GATA5, 和GATA6等的表达十分重要^[9,10]。国外学者发现用*BMP2b*的抑制剂Noggin抑制*BMP2b*的功能后^[11],上述心脏发育相关基因的表达受到抑制^[9,10]。*BMP2b*不仅表达于胚胎发育早期,还调控一系列心脏发育相关基因的表达。因此,我们提出假设,是否叶酸生物学活性受抑后影响了*BMP2b*因子的功能而导致斑马鱼胚胎心脏发育异常。通过原位杂交及Real-time PCR的方法检测了正常对照组与MTX处理组*BMP2b*的表达情况。原位杂交可以对基因的表达进行心脏定位观察,Real-time PCR则对基因在胚胎中的整体表达水平进行检测。斑马鱼的心脏在36 hpf完成心管扭曲,48 hpf心脏即已发育完全,此两个时间点显微镜下可清晰地对斑马鱼心脏的形态进行观察。原位杂交实验结果表明与正常对照组相比,MTX处理组*BMP2b*在斑马鱼心脏部位的表达在36 hpf和48 hpf时减弱。Real-time PCR结果显示MTX处理组与正常对照组相比,*BMP2b*的表达量不仅在36 hpf和48 hpf时下降,早在12 hpf和24 hpf时*BMP2b*的表达量就已减少。上述结果表明叶酸生物学活性受抑后,自斑马鱼胚胎发育早期至心脏发育完成时*BMP2b*的表达下调可能与斑马鱼胚胎心脏发育异常有关。

近年来研究表明,*BMP2b*对于*HAS2*在心肌的表达十分重要^[12]。透明质烷合酶(*HAS2*)是透明质

酸(HA)生成的关键物质,HA是心胶质中的重要组成成分。原始心管的内皮细胞向间充质细胞的转化对于房室管及心脏的分隔和瓣膜的形成十分关键^[13]。*HAS2*及其合成产物HA对于此过程的发生十分重要,从而与心脏的发育密切相关。鼠*HAS2*基因缺失胚胎的心脏缺少HA,有严重的心脏和血管发育异常在出生后9.5~10 d死亡。斑马鱼*HAS2*在36 hpf及48 hpf特异地表达于房室交界处,我们通过检测*HAS2*的表达情况观察房室交界的发育状况,并探讨其是否与叶酸生物学活性受抑导致的心脏发育异常有关。原位杂交结果显示MTX处理组与正常对照组相比,*HAS2*于36 hpf和48 hpf在房室交界处的表达范围增大,提示心脏房室交界处扩张,而且*HAS2*表达强度下降。Real-time PCR结果显示MTX处理组与正常对照组相比,*HAS2*的表达量在12 hpf差异无显著性,在24,36和48 hpf不同程度下降。这提示我们叶酸生物学活性受抑造成斑马鱼房室交界处扩张,并在胚胎发育中晚期下调*HAS2*的表达,这可能是叶酸生物学活性受抑导致斑马鱼心脏发育异常的另一机制。*HAS2*表达下调的原因可能与叶酸生物学活性受抑后导致*BMP2b*表达下降有关,也可能生物学活性受抑后直接影响了*HAS2*的表达,具体的分子机制有待进一步研究。

目前国内外就叶酸与CHD的关联性研究主要集中于人群的调查研究,利用模式生物开展叶酸生物学活性受抑或叶酸缺乏导致CHD的发生机制研究尚少。在斑马鱼中开展此领域研究目前尚无报道。本实验利用模式生物斑马鱼开展此领域研究,有助于阐明人类叶酸生物学活性受抑导致CHD的机制,并指导孕期保健。

[参 考 文 献]

- [1] Botto LD, Mulinare J, Erickson JD. Do multivitamin or folic acid supplements reduce the risk for congenital heart defects? Evidence and gaps[J]. Am J Med Genet A, 2003, 121(2):95-101.
- [2] Hernandez-Diaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects[J]. N Engl J Med, 2000, 343(22):1608-1614.
- [3] Botto LD, Mulinare J, Erickson JD. Occurrence of congenital heart defects in relation to maternal multivitamin use[J]. Am J Epidemiol, 2000, 151(9):878-884.
- [4] Westerfield M. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio) [M]. 4th ed. Eugene: University of Oregon Press, 1993, Chapters 3-9.
- [5] Pellizzer C, Bello E, Adler S, Hartung T, Bremer S. Detection of tissue-specific effects by methotrexate on differentiating mouse embryonic stem cells[J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2004, 71(5):331-341.
- [6] Botto LD, Olney RS, Erickson JD. Vitamin supplements and the risk for congenital anomalies other than neural tube defects[J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2004, 125(1):12-21.
- [7] Bailey LB, Berry RJ. Folic acid supplementation and the occurrence of congenital heart defects, orofacial clefts, multiple births, and miscarriage[J]. Am J Clin Nutr, 2005, 81(5):1213S-1217S.
- [8] Heideman W, Antkiewicz DS, Carney SA, Peterson RE. Zebrafish and cardiac toxicology[J]. Cardiovasc Toxicol, 2005, 5(2):203-214.
- [9] Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis [J]. Genes Dev, 1997, 11(4):451-462.
- [10] Schlange T, Andree B, Arnold HH, Brand T. BMP2 is required for early heart development during a distinct time period [J]. Mech Dev, 2000, 91(1-2):259-270.
- [11] Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4 [J]. Cell, 1996, 86(4):599-606.
- [12] Ma L, Lu MF, Schwartz RJ, Martin JF. Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning [J]. Martin JF Development, 2005, 132(24):5601-5611.
- [13] Camenisch TD, Schroeder JA, Bradley J, Klewer SE, McDonald JA. Heart-valve mesenchyme formation is dependent on hyaluronan-augmented activation of ErbB2-ErbB3 receptors [J]. Nat Med, 2002, 8(8):850-855.
- [14] Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A Jr, et al. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme[J]. J Clin Invest, 2000, 106(3):349-360.

(本文编辑:吉耕中)