

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00832

Miox 基因在爪蟾胚胎发育中的时间和空间表达谱分析

傅小娟¹, 陈雪梅², 周 钦³, 杜晓刚^{1*}

1. 重庆医科大学第一附属医院肾脏内科, 重庆 400016

2. 重庆医科大学第一附属医院急诊科, 重庆 400016

3. 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室遗传工程与小鼠中心, 成都 610000

[摘要] **目的** 研究肌醇加氧酶(myo-inositol oxygenase, Miox)基因在物种进化及爪蟾胚胎发育过程中的时间和空间表达的分布特点。**方法** 利用半定量 RT-PCR 观察 Miox 在爪蟾胚胎发育过程中的时间表达模式, 利用整体原位杂交方法观察 Miox 在爪蟾胚胎发育过程中的空间表达模式。**结果** RT-PCR 结果显示 Miox 基因在胚胎发育第 26 期以前都没有表达, 至胚胎发育第 28 期开始有微量表达, 随着胚胎的发育其表达量逐渐增高; 胚胎发育第 40 期表达明显升高, 第 41 期时达到最高, 第 45 期时表达有所下降。与胚胎发育第 28、34 期相比, 第 40、41、45 期表达上调($P < 0.05$); 与胚胎发育第 40 期相比, 第 41 期表达上调($P < 0.05$); 然而, 同胚胎发育第 41 期相比, 第 45 期表达下调($P < 0.05$)。整体原位杂交方法发现在胚胎发育 30 期以前均没能检测到 Miox 在爪蟾任何器官中的表达, 从 33 期开始, Miox 在爪蟾前肾有很微弱的表达, 且 Miox 的表达随着发育的进展逐渐升高。整体原位杂交方法结果同 RT-PCR 结果相类似, 直至第 39~40 期, Miox 的表达才明显升高, 并且在随后的时期都以同样高的水平表达。另外, Miox 基因在爪蟾胚胎发育过程中均仅仅在原肾小管表达。**结论** Miox 是一个肾脏特异性基因, 对于研究肾脏发育可能提供一个特异性标记。

[关键词] 肌醇加氧酶; 光滑爪蟾; 胚胎发育; 肾; 表达模式**[中图分类号]** R 394.1**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2014)08-0832-05

Analysis of temporal and spatial expression patterns of Miox gene during development of *Xenopus laevis* embryos

FU Xiao-juan¹, CHEN Xue-mei², ZHOU Qin³, DU Xiao-gang^{1*}

1. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

3. Center of Gene Engineered Mice, State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610000, Sichuan, China

[Abstract] **Objective** To explore the molecular evolution of myo-inositol oxygenase (Miox) gene and its temporal and spatial expression patterns during the development of *Xenopus laevis* embryos. **Methods** The temporal and spatial expression patterns of Miox gene were analyzed by semi-quantitative RT-PCR and whole-mount *in situ* hybridization technique, respectively. **Results** RT-PCR results showed that Miox gene was hardly found before stage 26; slight expression was found at stage 28, which gradually increased thereafter, reaching a high level at stage 40 and peaked at stage 41; and then it had a decrease at stage 45. Compared with stages 28, 34, stages 40, 41, and 45 had a significantly higher Miox gene expression ($P < 0.05$). Compared with stage 40, stage 41 had a significantly higher Miox gene expression ($P < 0.05$). But stage 45 had a significantly lower expression compared with stage 41 ($P < 0.05$). The results of whole-mount *in situ* hybridization showed no Miox expression before stage 30; at stage 33 weak expression was found in the pronephros, and the expression gradually

[收稿日期] 2014-01-26 **[接受日期]** 2014-04-01**[基金项目]** 国家自然科学基金(81202318, 81370816), 国家重点基础研究发展计划("973"计划, 2011CB944002), 重庆自然科学基金(cstc2012jjA10136). Supported by National Natural Science Foundation of China (81202318, 81370816), National Key Basic Research Program of China ("973" Project, 2011CB944002), and Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2012jjA10136).**[作者简介]** 傅小娟, 硕士生. E-mail: fxjsen20100216@sina.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-89012316, E-mail: dxgxm@163.com

increased as time went by. The results of whole-mount *in situ* hybridization were consistent with that of RT-PCR, with *Miox* expression notably increased at stage 39-40, and then remained at that level. We also found that *Miox* was only expressed in the pronephros tubules during the whole embryo development period. **Conclusion** *Miox* is a kidney-specific gene during *Xenopus laevis* pronephros development, and it may serve as a marker for later pronephros development in organogenesis.

[Key words] inositol oxygenase; *Xenopus laevis*; embryonic development; kidney; expression pattern

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(8): 832-836]

肌醇加氧酶(myo-inositol oxygenase, *Miox*)最初在大鼠肾脏提取物中发现并纯化,但从大鼠肾脏中分离得来的 *Miox* 蛋白并不稳定,因此关于 *Miox* 的机制及特性研究进展很慢。直至 20 世纪 80 年代,有人用电泳分离的方法才得到纯度较高的蛋白^[1]。肌醇(myo-inositol, MI)是生理肌醇的异构体,在许多组织和细胞中作为第二信使合成的前体被使用,同时其还可以作为一种有机渗透物质参与渗透压调节^[2]。MI 代谢的第一个限速步骤即是受到 *Miox* 加单氧酶的催化,这个过程主要在肾皮质的近端小管发生^[3]。*Miox* 催化 MI 分解的酶促反应主要氧化裂解 MI 环状分子的第 6 位和第 1 位碳原子之间的键并产生 D-葡糖醛酸,D-葡糖醛酸在随后的一系列步骤中逐步分解,并最终进入磷酸戊糖途径进行循环代谢。研究发现,*Miox* 在小鼠肾小管近端小管中表达明显高于其他器官。此外,*Miox* 在糖尿病并发症器官(如神经组织、视网膜等)中也有少量表达^[4-7]。然而关于 *Miox* 在胚胎发育中的作用至今尚未见报道。本研究通过半定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)和整胚原位杂交的方法观察 *Miox* 在爪蟾胚胎发育过程中的时间和空间表达谱,为以后研究 *Miox* 在肾脏发育过程中的作用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 实验所需爪蟾由四川大学华西医院遗传工程小鼠中心馈赠。RT-PCR 试剂盒、*Hind* III 和 *Bam*H I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、T3 和 T7 RNA 聚合酶均购于 Fermentas 公司。地高辛标记的 UTP、Anti-digoxigenin-AP 及 Purple AP Substrat 均购于 Roche 公司。TRIzol 购于 Invitrogen 公司,PCR 引物合成和 DNA 测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司

完成。羊抗地高辛碱性磷酸酶标记的抗体及封闭用正常羊血清购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 爪蟾胚胎的获取及制备 于成熟的非洲爪蟾背部注射 500~800 IU 的人绒毛膜促性腺激素(HCG)促进排卵。体外受精后,胚胎用 2% 盐酸半胱氨酸(pH 7.8~8.0)进行脱膜,将脱膜后的胚胎培养在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)缓冲液中。将用于原位杂交的胚胎固定在 4% 多聚甲醛中,4℃ 过夜。然后将胚胎经 25%、50%、75%、100% 浓度的甲醇各处理 5 min,梯度脱水。脱水后的胚胎保存在 -20℃ 的冰箱中。

1.3 RT-PCR 检测 *Miox* 表达 分别收集爪蟾第 1、3、7、11、17、20、22、26、28、34、38、40、41、45 期共 14 个时期的胚胎,将收集的胚胎放入研钵,加入少量液氮迅速研磨后转入 1.5 mL 离心管,按 50~100 mg 组织/1 mL TRIzol 混匀,反复吹打,室温放置 5 min 使其充分裂解;4℃,1 000×g 离心 10 min;将上清液转移到新的离心管中,加入 200 μL 氯仿,振荡混匀,室温放置 15 min;4℃,1 000×g 离心 15 min;吸取上层水相至新的离心管中;加入 500 μL 异丙醇混匀,室温放置 5~10 min;4℃,以不超过 1 000×g 的速度离心 10 min,可在管底见微小白色沉淀,丢弃上清液;加入 1 mL 75%乙醇,温和振荡,悬浮沉淀;4℃,以不超过 7 500×g 的速度离心 5 min,丢弃上清;重复 1 次;室温干燥 RNA 5~10 min,用 30 μL DEPC 水溶解沉淀,测定浓度并于 -20℃ 保存。将 RNA 反转录为 cDNA,采用 PCR 扩增包含大部分编码区及部分 3' 端非翻译区的 *Miox* 基因 cDNA 序列(扩增片段长度为 896 bp)。引物序列:上游引物 5'-GCA AGC TTG TGT TCA GTG ACA CCA-3',下游引物 5'-GCG GAT CCA ATC TTC ACA ATC CTC-3'。扩增条件:95℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸

1 min,共35个循环;最后72℃延伸10 min。将扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后,在凝胶成像系统下观察 *Miox* 基因在各个时期的表达情况。用 Image J 对凝胶图像进行灰度扫描,并进行统计学分析。RNA 反转录成 cDNA 以后的 cDNA 产物作为阳性对照,未反转录成 cDNA 的 RNA 作为阴性对照。

1.4 胚胎整体原位杂交检测 *Miox* 表达 将 *Miox* cDNA 的 PCR 扩增片段克隆在 pBST-II 载体的 *Hind* III 和 *Bam*H I 多克隆位点之间,并对重组质粒进行测序和鉴定。重组质粒经 T3 RNA 聚合酶体外转录获得反义 RNA 探针,并用地高辛标记。胚胎整体原位杂交方法参照 Harland [8] 报道的方法,在 5 mL 玻璃小瓶中收集 15~20 个包含胚胎发育各个时期的胚胎,将探针稀释到杂交缓冲液中,浓度为 100 ng/500 μL,并在 65℃ 水浴锅中孵育过夜。经过一系列洗涤过程,用羊抗地高辛碱性磷酸酶抗体 1:12 000 稀释,4℃ 孵育过夜。用 Purple AP Substrate 显色底物避光显色,待染色清晰即可停止染色。染色后的胚胎经 30% 蔗糖处理 24 h,使用 OTC 包埋剂包埋胚胎,进行冠状位切片,切片厚度 30 μm。

切下来的组织转移到圆盖玻片上,放置于 24 孔板中,90% 甘油封片。在 ZEISS AxioCam MRc5 体视显微镜镜下观察并拍照。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组资料比较采用单因素方差分析,两组资料比较采用 *t* 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 *Miox* 基因在爪蟾胚胎发育过程中的时间表达模式 运用半定量 RT-PCR 检测 *Miox* 基因在爪蟾胚胎发育过程中的时间表达模式发现,*Miox* 基因在爪蟾胚胎发育第 26 期前均无表达。当胚胎发育至第 28 期开始 *Miox* 基因有很微量表达,随着胚胎发育的进展,胚胎发育第 34、38 期其表达水平继续轻微上调,但是差异仍无统计学意义($P > 0.05$)。与胚胎发育第 28、34 期相比,第 40、41、45 期 *Miox* 表达上调($P < 0.05$);与胚胎发育第 40 期相比,第 41 期表达上调($P < 0.05$);然而,与胚胎发育第 41 期相比,第 45 期表达下调($P < 0.05$)。见图 1。

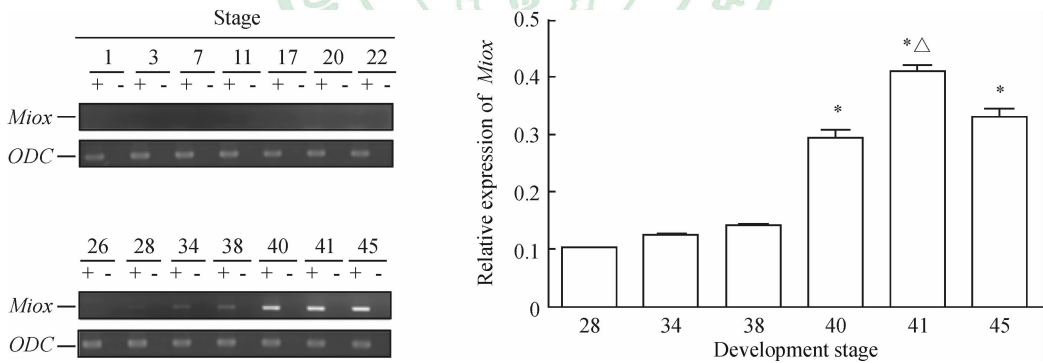


图 1 RT-PCR 分析 *Miox* 基因在爪蟾胚胎发育过程中的时间表达模式

Fig. 1 Temporal expression patterns of myo-inositol oxygenase(*Miox*) gene during development of *Xenopus laevis* embryos at different stages

ODC: Ornithine decarboxylase; +: With reverse transcription; -: Without reverse transcription. * $P < 0.05$ vs stage 28 or stage 34; ^ $P < 0.05$ vs stage 40 or stage 45. $n = 50, \bar{x} \pm s$

2.2 *Miox* 基因在爪蟾胚胎发育过程中的空间表达模式 运用整体原位杂交方法测 *Miox* 基因在爪蟾胚胎发育过程中的空间表达模式,结果(图 2)发现:胚胎发育 30 期以前均未能在爪蟾的任何器官检测到 *Miox* 表达,从 33 期开始,*Miox* 在爪蟾前肾有很

微弱的表达,随着胚胎发育的进展,*Miox* 的表达逐渐升高。与 RT-PCR 结果相类似,直至胚胎发育第 39~40 期,*Miox* 的表达达到最高,并且在随后的时期都以同样高的水平表达。另外我们还发现,*Miox* 基因在爪蟾胚胎发育过程中均仅仅在原肾小管表达。

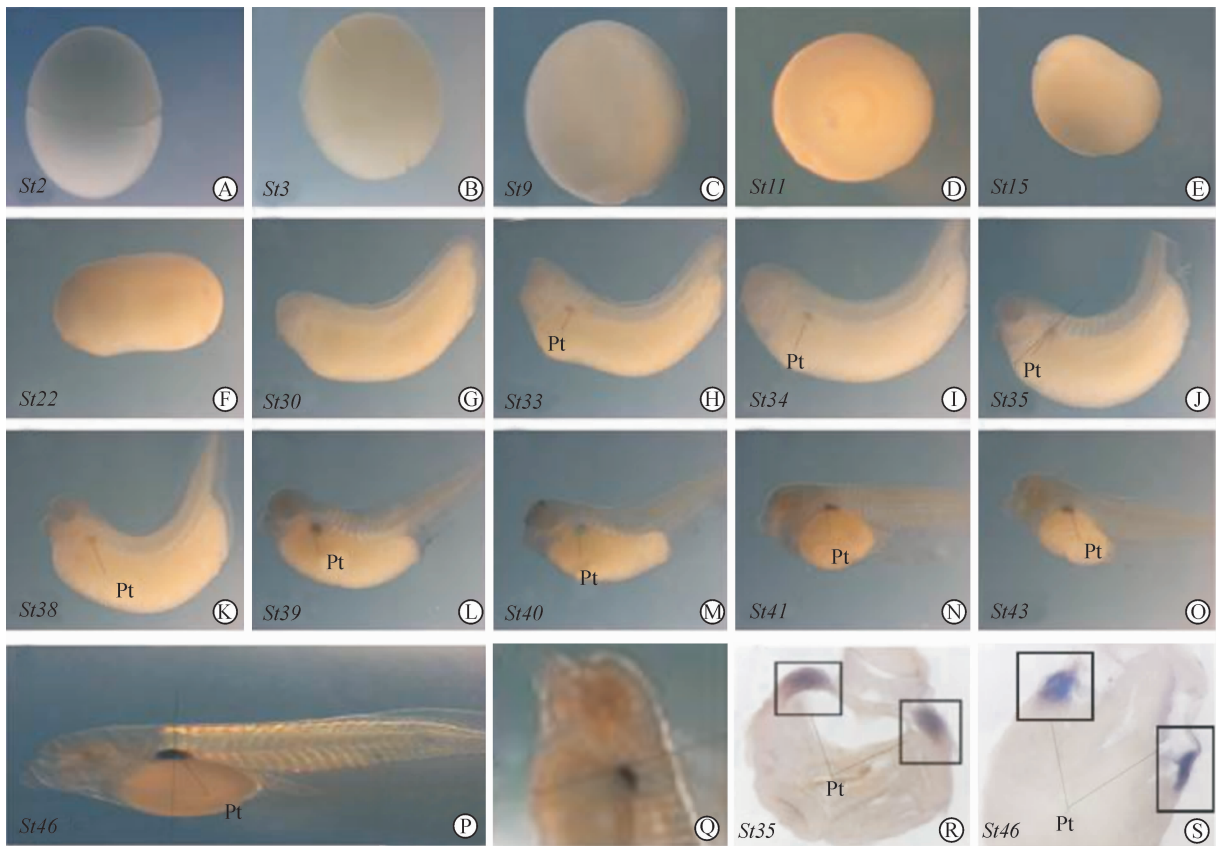


图 2 原位杂交检测 *Miox* 基因在爪蟾胚胎发育过程中的空间表达谱

Fig. 2 Spatial expression patterns of myo-inositol oxygenase (*Miox*) gene during development of *Xenopus laevis* embryos as analyzed by whole-mount *in situ* hybridization

Picture Q is a larger version of *Xenopus laevis* head of picture P; The directions of sections of picture R and S are along the line of picture J and P, respectively. Pt: Pronephros tubule; St: Stage. Original magnification: $\times 90$ (A-Q), $\times 200$ (R-S)

3 讨论

前肾的发育可以分为以下几个阶段:前肾原基的形成 (initiation of pronephric anlage, 第 12.5 期), 肾发生 (nephrogenesis, 第 20 期), 细胞定向分化 (cellular differentiation, 第 25 期), 器官成熟及终末分化 (maturation and terminal differentiation, 第 29/30~第 35/36 期), 泌尿功能的形成 (formation of excretory function, 第 40 期以后)^[9-10]。

间质上皮转化 (mesenchymal-epithelial transition, MET) 在肾脏发育特别是肾小管发生中发挥着重要作用。肾脏间充质细胞经过 MET 后最终分化形成原肾小管。转化生长因子 β (TGF- β) 是调节 MET 的一个关键因子^[11-12]。有研究发现, *Miox* 的过度表达可以诱导 TGF- β 表达和活性的增加, 间质部分特异性标记基因如 *Vimentin* 表达的增加和部分上皮特异性标记基因如 *E-cadherin* 表达的降低^[6], 提示 *Miox* 发挥着抑制 MET 过程的作用。另

一方面, *Miox* 是催化肌醇代谢的限速酶。作为一个渗透调节物, 肌醇耗竭可以改变 Na^+/K^+ -ATP 酶^[5]。而 Na^+/K^+ -ATP 酶在肾脏发育后期功能形成阶段发挥着重要作用, 它通过吸收水分及离子在细胞内外形成电化学梯度从而维持肾脏的渗透调节功能^[13-14]。因此我们推测 *Miox* 在肾脏发育后期的渗透调节中发挥着重要作用。

作为一个肾脏特异性表达基因, *Miox* 在肾脏发育过程中发挥的作用迄今还未见报道。我们用 RT-PCR 和整胚原位杂交的方法对 *Miox* 在胚胎发育过程中的表达作了时间和空间上的表达谱分析。RT-PCR 结果显示, 至胚胎发育第 26 期均未检测到 *Miox* 基因在爪蟾胚胎中的表达; 胚胎发育第 28 期 *Miox* 在胚胎前肾有很微量表达; 随着胚胎的发育 *Miox* 表达逐渐升高, 第 41 期时 *Miox* 表达达到顶峰, 在胚胎发育第 45 期, 表达明显下调。整体原位杂交结果显示, 胚胎发育第 33 期才检测到 *Miox* 表达 (这可能是因为 RT-PCR 的灵敏度优于整体原位

杂交技术),并且 *Miox* 在爪蟾胚胎发育过程中仅仅在前肾小管表达。从 *Miox* 的时间和空间表达模式来看,*Miox* 基因很可能在肾脏发育的成熟及终分化(29/30 期到 35/36 期)阶段以及肾脏开始排泄阶段(40 期以后)发挥着作用,然而这方面还尚未有研究。

综上所述,本研究在肾脏发育领域观察了 *Miox* 的表达,分析了 *Miox* 在经典模式生物爪蟾胚胎发育过程中的时间和空间表达模式,发现 *Miox* 在胚胎发育过程中始终都在原肾小管表达。提示 *Miox* 可能成为肾脏特别是原肾小管的一个特异性标记基因。从 *Miox* 的表达模式推测 *Miox* 基因很可能在肾脏发育的成熟及终分化阶段以及肾脏开始排泄阶段发挥作用。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

(志谢 感谢四川大学华西医院遗传工程与小鼠中心的全体成员为本实验提供的支持和帮助!)

[参考文献]

[1] Arner R J, Prabhu K S, Thompson J T, Hildenbrandt G R, Liken A D, Reddy C C. myo-Inositol oxygenase, molecular cloning and expression of a unique enzyme that oxidizes myo-inositol and D-chiro-inositol[J]. *Biochem J*, 2001, 360: 313-320.

[2] Holub B J. Metabolism and function of myo-inositol and inositol phospholipids [J]. *Annu Rev Nutr*, 1986, 6: 563-597.

[3] Prabhu K S, Arner R J, Vunta H, Reddy C. Up-regulation of human myo-inositol oxygenase by hyperosmotic stress in renal proximal tubular epithelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 19895-19901.

[4] Lu Y, Liu C, Miao X, Xu K, Wu X, Liu C. Increased expression of myo-inositol oxygenase is involved in the tubulointerstitial injury of diabetic nephropathy [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2009, 117: 257-265.

[5] Yang B, Hodgkinson A, Millward B A, Demaine A G. Polymorphisms of myo-inositol oxygenase gene are associated with type 1 diabetes mellitus [J]. *J Diabetes Complications*, 2010, 24: 404-408.

[6] Xie P, Sun L, Oates P J, Srivastava S K, Kanwar Y S. Pathobiology of renal-specific oxidoreductase/myo-inositol oxygenase in diabetic nephropathy: its implications in tubulointerstitial fibrosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 298: F1393-F1404.

[7] Arner R J, Prabhu K S, Krishnan V, Johnson M C, Reddy C C. Expression of myo-inositol oxygenase in tissues susceptible to diabetic complications [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 339: 816-820.

[8] Harland R M. *In situ* hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos [J]. *Methods Cell Biol*, 1991, 36: 685-695.

[9] Vize P D, Seufert D W, Carroll T J, Wallingford J B. Model systems for the study of kidney development: use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning [J]. *Dev Biol*, 1997, 188: 189-204.

[10] Raciti D, Reggiani L, Geffers L, Jiang Q, Bacchion F, Subrizi A E, et al. Organization of the pronephric kidney revealed by large-scale gene expression mapping [J]. *Genome Biol*, 2008, 9: R84.

[11] Brandli A W. Towards a molecular anatomy of the *Xenopus* pronephric kidney [J]. *Int J Dev Biol*, 1999, 43: 381-395.

[12] Herzlinger D. Inductive interactions during kidney development [J]. *Semin Nephrol*, 1995, 15: 255-262.

[13] Uochi T, Takahashi S, Ninomiya H, Fukui A, Asashima M. The Na⁺, K⁺-ATPase alpha subunit requires gastrulation in the *Xenopus* embryo [J]. *Dev Growth Differ*, 1997, 39: 571-580.

[14] Eid S R, Brändli A W. *Xenopus* Na, K-ATPase: primary sequence of the beta2 subunit and *in situ* localization of alpha1, beta1, and gamma expression during pronephric kidney development [J]. *Differentiation*, 2001, 68(2-3): 115-125.

[本文编辑] 徐佳,孙岩