

利用模式生物果蝇研究人类心脏发育的基因调控

吴秀山

(湖南师范大学生命科学学院,教授、博士生导师 长沙 410081)

〔摘要〕 心脏病已成为威胁人类生命和健康的“第三号杀手”。研究表明,先天性心脏病的发生主要是由于控制心脏发育的基因产生突变,或是由这些基因的时空表达失误引起的。果蝇由于具有其它模式生物所不可比拟的优势,再一次成为心脏发育和基因功能研究的先驱;与此相关的研究成果使心脏发育的基因调控研究取得“零”的重大突破,从而推动了脊椎动物心脏发育基因控制研究的迅速发展。目前,对于人类心脏早期发育的调控机制仍知之甚少,本文讨论了利用果蝇模型研究人类心脏早期发育基因调控的优点与不足。

〔关键词〕 心脏发育 果蝇 基因调控 **〔中图分类号〕** Q81 R3

心脏与人的生命休戚相关。通过严格规律性的搏动,心脏及其周围的血管系统将有氧的血液运送至身体各个需要的部位,又把代谢废物从各个组织收集回来,排出体外。心血管系统这种精巧的功能是与其完美的结构分不开的。复杂的心脏是如何发育而来的?心脏的发育是如何受到遗传基因的调控的?这些问题多年来一直是发育生物学家们渴望寻求答案的研究难题。

近年来,随着人们生活水平的提高,心血管疾病的发病率和死亡率也在逐年增高。例如,1994年,全世界因疾病死亡的总人数为5200万,而其中因心血管疾病死亡的就有1530万,占死亡人数的29%。到2000年,全球死于心血管疾病的人数更增至1700万,意味着每3个死亡的人中,就有1人死于心血管疾病(根据世界卫生组织对全球各种疾病死亡的统计)。预计这一死亡人数比例到2020年将增加到50%。可见,心血管疾病已越过恶性肿瘤,成为威胁人类生命和健康的“头号杀手”,其中仅心脏病导致的死亡率即已排位第三。

研究表明,心血管疾病尤其是先天性心脏病的发生主要是由于控制心脏发育的基因产生突变,或是由这些基因时空表达失误引起的。例如,房间隔缺损是一种先天性的心脏病,患者心脏的心房与心室之间的隔膜部分缺失,从而表现心悸、气促、乏力、咳嗽、咯血等症状,晚期面部、双手出现绀紫,最后会因心力衰竭而死亡。研究已经证实,这种疾病就是由于人类的一个心脏发育基因NKx2.5突变导致的^[5]。因此,要想探明心血管疾病发病的分子机理,寻找有针对性的预防和治疗措施,也要求我们必须尽快阐明心脏发育的基因控制机理。

但是,心脏本身结构的复杂性,以及人体不能作为实验材料的局限性,使得心脏发育的基因调控研究长期处于停滞不前的境地。直到上世纪90年代初,由于模式生物果蝇的引入,心脏发育的基因调控研究才取得“零”的突破,并在短期内得到迅猛的发展^[4,7,12]。

笔者在美国做博士后期间,有幸参与了这一心脏发育研究领域的先驱性的工作,取得了一些突破性的研究进展。利用在果蝇模型上所取得的成就,笔者探索了一套利用果蝇模型研究人类心脏发育基因调控的研究思路,基于该思路在国内开展了人类心脏发育基因调控的研究。

一、模式生物果蝇是进行基因功能研究的理想动物模型

果蝇具有生活周期短、后代群体大、遗传背景清楚、饲养条件简单等许多优点,自上世纪初摩尔根将它引入进行基因定位研究以来,作为遗传学研究的经典模式动物,有关果蝇的研究已经走过了100年的历程,取得了辉煌的成就。如今,由于具有其它模式生物所不可比拟的优势,果蝇再一次受到发育生物学和基因功能研究的青睐。

1. 独特的P因子插入诱变法,可以大规模诱发单基因突变

在经典的遗传学研究中,基因的功能主要是通过反向遗传学的方法而确定的。即先使某个基因产生突变,通过分析基因突变后的异常表型从而再反推正常基因的正常表型。传统的基因诱变主要是通过物理和化学诱变的方法而实现的。

P因子是果蝇中的一种自主转座因子,由转座基因和转座酶两个基因组成。当转座基因和转座酶基因两者都存在时,P因子转座,从而引起插入位点及其附近的基因产生突变;但如果转座酶基因缺失,转座便不能发生。因此只要建立两个品系,其中一个含有正常的转座基因,而转座酶基因异常;另一个含有正常的转座酶基因,而转座基因异常,则在品系内,转座不能发生。但若让两个品系杂交,则F1代可以发生转座,从而大规模地引起插入位点的单基因产生突变。这就是果蝇P因子诱发基因突变的方法。由于P因子的插入位点可以通过染色体原

位杂交的方法检测到,而 P 因子插入位点两侧的基因又可以通过质粒获救的方法克隆出来,因此果蝇的 P 因子诱变与其它生物只能通过化学诱变的方法相比,不仅诱变效率高,而且诱发的主要是单基因突变,并且诱变基因容易分离和克隆,使后续的研究更加方便和容易^[8,9]。

2. 致死基因可以通过稳定遗传的隐性致死平衡系来保存

早在上世纪 30 年代, Muller 就在果蝇中建立了一种巧妙的保存致死基因的方法,即平衡致死系。在进行果蝇诱变的研究中,他发现许多控制果蝇性状的基因都是隐性致死基因,即纯合体是致死的,意味着这些基因只能以杂合体的形式保存。但杂合体的后代会出现分离,造成筛选的困难。于是他想到,如果同一对染色体的不同基因座位上同时有两个或者两个以上的致死基因存在,而这些座位又不发生重组的话(例如倒位的引入),这些致死基因就可以永远以杂合状态保存起来,而不会发生分离。这就是平衡致死系。果蝇的许多与发育相关的基因都是通过平衡致死系保存并进一步用于功能研究的。而其它生物的致死基因就很难采取这种方式被保存和被研究。

3. UAS - Gal4 二元转基因果蝇系统和 RNAi 等新技术的建立为果蝇基因调控途径的研究提供了捷径

UAS - Gal4 系统是由 Brand 和 Perrimon 1993 年才在果蝇中建立起来的一套新的转基因系统。在 UAS - Gal4 系统中, Gal4 是来自于酵母的一个转录激活因子。在果蝇中并不存在靶基因,但是它却可以在果蝇体内的任何细胞或组织中表达。Gal4 的表达必须由已知表达图型的基因的启动子启动,或者由基因组中的增强子激活。当有增强子存在时, Gal4 基因就会在该增强子所激活的特定组织中表达。Gal4 基因的表达产物 Gal4 蛋白可以激活其它基因的表达,但这个基因必须位于 Gal4 蛋白结合位点的下游。UAS 是 Gal4 蛋白的结合位点, UAS 下游基因都可以被 Gal4 蛋白激活而转录。在实际操作中,通常同时建立两个品系,一个是特定增强子(启动子)——Gal4 品系,能在特定增强子的表达区域表达 Gal4 蛋白;另一个是 UAS——目的基因品系。需要目的基因表达时,把两个品系杂交,在杂交一代的个体中就会同时含有增强子——Gal4 及 UAS——目的基因,于是,凡是能够表达 Gal4 蛋白的组织就可表达目的基因,使目的基因实现了定点表达。因此, UAS - Gal4 系统在研究基因的过量表达及异位表达时具有无比的优越性,现在已被广泛应用于鉴定果蝇基因的功能及研究基因的表达调控。

RNAi 即 RNA 干扰是一种新的基因敲除技术, 1998 年首先在线虫中建立。它通过人为地引入与内

源靶基因具有同源序列的双链 RNA(有义 RNA 和反义 RNA),从而诱导内源靶基因的 mRNA 降解,达到阻止基因表达的目的。因此, RNAi 并非真正意义上的“基因敲除”,而只是使基因沉默不表达。但与其它基因敲除技术相比, RNAi 技术操作相对简便、结果出来得快捷,尤其对那些不容易获得突变体的基因或生物体来说, RNAi 技术无疑提供了一种快速有效的研究基因功能的新方法。而且由于双链 RNA 引入生物体内的剂量和时间可以人为地控制,故 RNAi 技术还可以用于研究某个特定基因在特定发育阶段的功能。继线虫之后,研究者迅速在果蝇中建立了成熟的利用 RNAi 技术研究基因功能的技术平台,已成功地应用于基因表达调控途径的研究^[10]。

可以认为,遗传学与发育生物学研究中的许多新技术都是首先在果蝇中建立然后再在其它生物中得到应用的,而绝大多数细胞信号传导途径也是首先在果蝇中被发现而后再在其它生物体中被证实的。

二、果蝇与人类心脏早期发育的进化保守性

果蝇的心脏位于背中线的表层下,是一个简单的管状结构,覆盖了绝大部分胚胎和幼虫的体长。果蝇心脏主要由两种细胞类型组成,即位于心管内壁的具有收缩能力的心肌细胞和位于心管外侧周围的无收缩能力的副心肌细胞。而人体心脏是由心房和心室 4 个腔室、隔膜、动脉和静脉血管、心传导系统等组成的复杂的器官。虽然从表面上看,果蝇的心管无法与人体复杂的心脏相比,但从人体心脏发育和形成的过程来看,果蝇与人类心脏的早期发育却具有进化保守性。

人体胚胎同其他脊椎动物一样,是从原肠胚时期开始心脏的发生过程的。原肠胚形成时,中胚层的祖细胞形成一个双侧对称的生心区,进一步形成平行的管状原基即心脏前体细胞,然后心脏前体细胞迁移至中线,在神经嵴下融合,形成一个跳动的心管。心管由心内膜、心内膜下组织、心肌膜和心外膜构成。这个管状结构与果蝇的心管非常类似,只不过随着人体胚胎的进一步发育,心管会向右进行环化,并出现一系列的细胞分化和心脏组织的改建过程,以至于心脏房、室被隔开,肺动脉、主动脉也被分开,并逐渐形成瓣膜、小梁、传导系统和冠状循环,最后形成功能协调的复杂心脏器官。

因此,虽然人体成体心脏是复杂的腔室结构,但心脏形成的早期却也是一个心管结构,与果蝇心管类似;所以,至少从早期心脏发育过程来看,两者是相似的^[4,12]。

三、果蝇模型与人类心脏发育基因及其基因调控的相似性

自第一个心脏发育基因 *tinman* 在果蝇中被鉴定以来,在模式生物果蝇中相继鉴定了包括 *wingless*、*even-skipped*、*Zfh-1* 等在内的约 40 余个心脏发育的基因,并且通过研究 *wingless* 基因的功能,已经初步阐明了果蝇心脏早期发育的基因调控机理。首先,母源基因 *Dorsal* 蛋白的作用诱发了合子基因 *twist* 的表达,而 *twist* 基因是控制果蝇中胚层形成的关键基因。一方面,*twist* 诱发中胚层产生并形成,另一方面,*twist* 又激活了同源框基因 *tinman* 的表达。*tinman* 基因首先在果蝇中胚层表达,而后受到外胚层基因 *dpp* 的影响,局限于背部中胚层表达。最后,在 *wingless* 基因的作用下,*tinman* 仅局限于在果蝇心脏前体细胞及心管中表达。*tinman* 基因的表达图式充分表明 *tinman* 在果蝇心脏的早期发育中具有重要调控作用,与 *wingless* 一样,是控制果蝇心脏形成和早期发育的关键基因^[1,2,3]。

Christiane Nüsslein-Volhard Eric 和 Wieschaus 在进行果蝇体节发育基因的筛选和鉴定研究时,发现从果蝇到人类的同源基因往往具有相同或相近的功能,这一研究成果使他们荣获了 1995 年的诺贝尔生理学医学奖。

根据这一基因同源同功的原理,1995 年首先克隆了小鼠的 *tinman* 同源基因 *NKx2.5*,并证明该 *NKx2.5* 家族的基因对小鼠心脏的形成确实是必需的。1998 年在《SCIENCE》杂志上,再一次证实人类的 *tinman* 同源基因 *NKx2.5* 是控制人体房间隔缺损的疾病基因,它一定也与人体心脏发育和分化密切相关^[5]。更令人惊奇的是,与果蝇中 *tinman* 基因的表达受到外胚层信号 *dpp* 的调控一致,脊椎动物 *NKx2.5* 的表达也受到临近内胚层的信号 *BMP2/4* 的影响和调控。而 *BMP2/4* 正是果蝇 *dpp* 的同源家族基因。

2002 年,《NATURE》杂志又证实,果蝇心脏发育基因 *wingless* 的脊椎动物同源基因 *WNT11* 也被鉴定出来,并被证明是非洲爪蟾的心脏发育基因^[6]。

以上的研究结果充分表明,果蝇与包括人类在内的脊椎动物的心脏发育具有极其相似的基因控制机理和基因调控途径。

四、利用果蝇模型研究人体心脏发育的基因调控的基本思路

1. 高通量筛选和鉴定控制果蝇心脏发育的候选基因

要想利用果蝇模型筛选人体心脏发育的候选

基因,首先必须尽可能全面地鉴定控制果蝇心脏发育的所有候选基因。为此,我们研究组从 1995 年开始,利用 P 因子诱变和化学诱变的方法建立了约 3 000 个隐性致死基因平衡系,并通过特异的抗体筛选,又初步鉴定了 72 个新的与果蝇心脏发育相关的基因^[8,9]。

2. 利用果蝇模型筛选和鉴定人类心脏早期发育的候选基因

利用同源基因具有相同功能的原理,以及 *genebank* 中新建立的 5 万余条人类 EST 的数据资料,我们大规模地筛选和克隆了 67 个人类心脏发育的候选基因,其中 36 个是人类新基因。初步的表达研究表明,这些基因有的在心脏表达,有的只在心脏和肌肉组织中表达,有的在这两种组织以外的其它组织中也表达,说明这些基因直接或间接与人体心脏发育相关。阐明这些基因与心脏发育的关系,确定它们在心脏祖细胞分化与特化过程的功能与信息调控网络,将使我国在人类心脏发育的基因调控领域的研究走在国际研究的前沿^[11,12]。

3. 利用果蝇模型进行基因功能与调控途径的研究

将表达正常的人类基因同源结构域引入相应果蝇同源基因已失活的果蝇体内,可构建成“基因心脏功能检测体系”。在这一体系中,由于果蝇基因已被失活,其胚胎不能形成或仅少量形成心脏前体细胞。如果引入的人类基因具有调控心脏发育的功能,该基因能使胚胎形成部分心脏前体细胞或使心脏前体细胞增多。比较无人类基因和引入人类基因的两种胚胎心脏前体细胞的形成,便能检测出人类基因是否具有调控心脏发育的功能。

如果同时引入两个或两个以上的人类同源基因的结构域,进行过表达或异位表达分析,就可进一步阐明基因表达的调控途径。

需要指出,利用果蝇模型研究人体心脏发育基因调控仍有局限性。利用模式生物果蝇研究人类心脏发育的基因调控的最大优点是,可以在短期内大规模地筛选和鉴定控制人体心脏发育的基因,并且便于开展基因表达的调控途径的研究。但是,果蝇毕竟是较低等一些的动物,与人类进化关系较远;因此,果蝇模型只能用作前期研究,而基因心脏功能的确认最后还必须依赖与人类亲缘关系较近的小鼠模型的验证。小鼠的基因与人类基因同源性高,而且基因敲除技术完善,因而适用于人类基因的功能验证。而且,人类心脏后期的发育过程与果蝇很不相同,却与小鼠一致,因此,只有将果蝇模型与小鼠模型结合起来使用,才能取得事半功倍成果。

参考文献

[1] Bodmer R. The gene *tinman* is required for specification of

从 SARS 研究的得失谈医学科研人员的职业素质

缪晓辉

(第二军医大学长征医院,教授、博士生导师 上海 200003)

【摘要】 2003 年 SARS 在我国大面积流行的同时,也暴露出不少问题,很值得我们反思并汲取深刻的教训。本文通过 SARS 流行期间我国某些医学科研人员的种种表现,分析我国科研体制存在的问题及科研人员应具备的职业素质。

【关键词】 SARS 研究 科研人员 职业素质 [中图分类号] G3 B82

2003 年中国人因为 SARS 而付出了一定的代价,同时也从 SARS,以及全国上下抗击 SARS 的过程中汲取了不少经验和教训。作为一名曾经参与 SARS 防治的医院管理者和一线医务人员,在此就 SARS 流行期间我国科研人员的表现,尤其是对其中折射出的科研人员职业素质的问题谈点看法。

一、对科研材料的认知: 采集标本引出的血液标本归属权问题

北京的研究人员不远数千里来到 SARS 最先流行的地区——广东,希望采集到 SARS 患者的血清标本用于实验研究。遗憾的是,尽管他们想尽一切办法、进入多家医院、找过许多部门,也动用了熟人的关系,最终还是空手而归。科研人员十分沮丧。后来,其中一位科学家在接受记者采访并被要求评述此事时,提出了 SARS 血液标本归属权的问题。记得某报最终给出的结论是:血液标本的所有权既不属于某个科室,也不属于医疗机构,应该属于国家,亦是人类的共同财富,可以共享。

在我国现有的法律条文里,的确没有明确或直接提及过患者血液标本归属权的问题。过去谁也没有想到血液标本的归属会成为一个问题而被提出,但是一旦成为科学家和公众关心的焦点时就必然

产生许多“说法”:收治患者的科室认为有权处置血液标本;医疗机构则认为血液标本理所当然归属于医院;某些行政部门则认为,医院应该毫无保留地把患者的标本提供给科学家和研究者作研究之用,以造福于更多人,因此标本是“国有的”。笔者想从 3 个层面剖析这个问题。首先从生物学的角度看,一个完整的人是多个器官、系统的有机整合体,血液是人体的一种正常体液,它可以被抽取,但总体上不可以与人体分割,所以血液无论在人体内还是在体外都属于个人,并具有个体的独有标志(基因组)。自愿献血另当别论,比如姜素椿教授患 SARS 之后接受恢复期患者的血清治疗,其血清来源是恢复者本人自愿捐献的。其次,患者就医,与院方建立了一种契约关系。患者要得到医院提供的服务,就有义务提供各种标本,以配合医生对疾病的诊治,但不等于毫无条件地任医院随意处置个人的组织器官,比如手术切除某一个病态器官,医院必须得到患者的知情同意;医院在提供服务的同时应该得到相应的经济报酬,但决不是以获取临床标本为目的。西方国家在器官移植的问题上,对供体的要求十分严格,要获得死亡者的脏器必须征得死者生前的意愿,或监护人的许可。说到底,这是一个尊重人权的问题。由此看来,患者的血液标本既不属于医

the heart and visceral muscles of drosophila. Development, 1993,118:719 - 729

[2] Wu X, Golden K, Bodmer R. Heart development in Drosophila requires the polarity gene wingless. Developmental Biology,1995,169:619 - 628

[3] Wu X, Park M, Golden K, Axelrod J D, Bodmer R. The wingless signaling pathway is directly involved in Drosophila heart development. Development Biology, 1996, 177:104 - 116

[4] Bodmer R, Golden K, Lockwood W B, Ocorr K A, Park M, Su M - T, Venkatesh T V. Heart development in Drosophila. In “Advances in Developmental Biology” (Wassarman P, ed.) 1997,5:201 - 236. JAI Press, Greenwich, CT

[5] Schott J J, Benson D W, Seidman J M, et al. Congenital heart disease caused by mutations in transcription factor NKX2 - 5, Science, 1998,281(5373):108 - 111

[6] Pandur P, Lasche M, Eisenberg L M, Kuhl M. Wnt - 11 activ

ation of a non - canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis, Nature. 2002,418(6898):636 - 41

[7] Wu X. Studies on molecular mechanism of human early cardiogenesis using the Drosophila as a model system, Developmental Biology, 2002,11(1 - 2):74 - 86

[8] 李敏,袁葵洲,吴秀山. P 转位子诱发果蝇心脏发育基因的突变. 湖南师范大学学报,1997,(4):66 - 69

[9] 李东玲,戴琪,袁葵洲,吴秀山,李敏. 影响果蝇心脏发育的基因突变. 遗传学报,2001,28(5):424 - 432

[10] 袁葵洲, Bodmer R, 朱传炳, 李永青, 王跃群, 吴秀山. 利用 RNAi 技术研究果蝇心脏基因的功能. 遗传学报, 2002,29(1):34 - 38

[11] Luo K, Wang Y, Zhu C, Li Y, Wang Y, Jiao W, Liu M, Wu X. Expression of a Novel Kruppel - like Zinc Finger Gene, ZNF382, in Human Heart, Biochim Biophys Res Comm, 2002,299:606 - 612

[12] 吴秀山. 心脏发育研究. 长沙:湖南科技出版社,2003 (责任编辑 苏青)