

·遗传与发育·

DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2022.11.0229

斑马鱼 *prkd1* 基因在心脏早期发育过程中的作用研究

李韵璇¹, 陈宇^{2,3}, 吴锦秋¹, 游诗琦¹, 李永青¹, 朱平^{2,3}, 吴秀山^{1,3}, 江志钢^{1*},
王跃群^{1*}

(1. 湖南师范大学心脏发育研究中心 省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室, 中国湖南长沙 410081; 2. 广东省心血管病研究所 广东省人民医院 广东省医学科学院, 中国广东广州 510100; 3. 广东省心脏病发病机制与精准防治重点实验室, 中国广东广州 510100)

摘要: 为了探究蛋白激酶 D (protein kinase D, PKD; 又名 PRKD) 家族典型成员 *prkd1* 基因对早期心脏发育的影响, 选用模式动物斑马鱼为研究对象, 设计了吗啉代反义寡核苷酸敲低实验。表型观察结果显示, *prkd1* 基因敲低会导致斑马鱼心脏发育异常, 出现心包水肿、环化异常、心管线性化等畸形表型; 斑马鱼心率分析数据显示, 与野生型斑马鱼相比, *prkd1* 基因的敲低会导致早期斑马鱼心率降低。利用转录组高通量测序技术对受精后 3 d (3 days post fertilization, 3 dpf) 的斑马鱼对照组和敲低 *prkd1* 组进行测序, 差异基因富集分析表明, *prkd1* 的敲低与心脏相关信号通路如心肌细胞的肾上腺素信号通路等显著相关。进一步通过 qRT-PCR 对高通量测序结果进行验证, 并对早期心脏发育关键因子进行检测, 结果显示, 部分心血管相关基因显著下调, *tbx5a*、*gata4* 等心脏调控关键基因同样显著下调。这些表明 *prkd1* 基因可能通过调控心脏发育相关信号通路以及心脏发育关键基因来影响早期心脏发育, 在早期心脏发育过程中发挥重要作用。

关键词: 心脏发育; *prkd1* 基因; 斑马鱼; 吗啉代反义寡核苷酸(MO)

中图分类号: Q756

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)02-0095-09

Role of the *prkd1* Gene in Early Cardiac Development in Zebrafish

LI Yunxuan¹, CHEN Yu^{2,3}, WU Jinqiu¹, YOU Shiqi¹, LI Yongqing¹, ZHU Ping^{2,3},
WU Xiushan^{1,3}, JIANG Zhigang^{1*}, WANG Yuequn^{1*}

(1. The Center for Heart Development, State Key Laboratory of Freshwater Fish Development Biology, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China; 2. Guangdong Cardiovascular Institute, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510100, Guangdong, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenesis, Targeted Prevention and Treatment of Heart Disease, Guangzhou 510100, Guangdong, China)

Abstract: To investigate the role of the *prkd1* gene, a typical member of the protein kinase D (PRKD) family, in early heart development, zebrafish was used as an animal model in this study. Through *prkd1* knockdown with morpholino antisense oligo (MO), it was found that knockdown of *prkd1* resulted in abnormal cardiac development, such as pericardial edema, cyclization disorder, cardiac tube linearization. Zebrafish heart rate analysis indicated that, compared with the wild type, *prkd1* knockdown zebrafish exhibited early arrhythmia. High-throughput transcriptome sequencing was performed for zebrafish embryos at 3 days post fertilization (dpf) in control and *prkd1* knockdown groups. Differential gene enrichment analysis revealed that *prkd1* knockdown was significantly associated with heart-related signaling pathways, such as the adrenergic signaling

收稿日期: 2022-11-17; 修回日期: 2022-12-06; 网络首发日期: 2022-12-10

基金项目: 广东省人民医院院内博士后进站启动项目(BY012022004); 国家自然科学基金面上项目(31872315); 国家重点研发计划项目(2018YFA0108700, 2017YFA0105602); 国家自然科学基金重点国际(地区)合作与交流项目(81720108004)

作者简介: 李韵璇(1998—), 女, 湖南娄底人, 硕士研究生; 李韵璇和陈宇对本文的贡献相同, 为本文共同第一作者; * 通信作者: 王跃群(1964—), 女, 湖南长沙人, 博士, 教授, 主要从事心脏发育基因调控和心脏疾病发生的分子机制研究, E-mail: yuequnwang@hunnu.edu.cn; 江志钢(1982—), 男, 湖南长沙人, 博士, 高级实验师, 主要从事心脏发育方向的研究, E-mail: 270212729@qq.com。

pathway in cardiomyocytes. Additionally, the results of high-throughput sequencing were confirmed by qRT-PCR, which showed that some genes associated with the cardiovascular system were markedly down-regulated. Meanwhile, identification of the essential factors in early heart development revealed that key cardiac regulatory genes like *tbx5a* and *gata4* were significantly down-regulated. These findings suggest that the *prkd1* gene may affect early cardiac development by regulating cardiac development-related signal pathways and key genes, and play an important role at the early stage of heart development.

Key words: cardiac development; *prkd1*; zebrafish; morpholino antisense oligo (MO)

(*Life Science Research*, 2023, 27(2): 095-103)

先天性心脏病作为人类心脏发育最常见的畸形形式,在世界范围内保持着居高不下的发病率与死亡率^[1]。公认的先天性心脏病包括房室间隔缺损、法洛四联症、主/肺动脉瓣狭窄、血管错位等病症^[2]。研究表明,遗传因素是先天性心脏病发生的主要原因^[3],因此,对控制先天性心脏病发生的基因展开功能研究十分有必要。

斑马鱼作为模式动物,有许多利于其用于心脏疾病研究的特点。胚胎时期,斑马鱼无色透明,心脏特征清晰可见,研究者仅通过普通光学显微镜就可以直接对心脏和血液进行观察^[4]。斑马鱼体型小,可通过被动扩散的方式使氧气到达全身各处组织,从而保证胚胎发育过程中所需的氧气供应,因此在胚胎发育的早期阶段,有严重心脏畸形的个体也能存活数天时间^[4-5]。斑马鱼后代数量多,有利于后续的遗传和统计分析^[6]。此外,有研究表明,斑马鱼基因组序列与人类基因组序列具有高达 70%的同源性^[3]。这些独特的天然优势使得斑马鱼成为心血管研究领域的首选模式生物之一。

prkd1 基因编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 D (protein kinase D, PKD; 又名 PRKD) 家族的成员 PRKD1, 该激酶在细胞增殖分化、血管生成、免疫调节、氧化应激和细胞凋亡等多种生理过程中发挥作用^[7]。前期研究表明, PRKD1 基因与先天性心脏病具有密切联系^[2, 7-10], 但其调控机制尚不明确, 有待深入探究。有研究报道, II 类组蛋白脱乙酰酶(histone deacetylases, HDACs)与心脏肥大的抑制相关, PRKD1 能通过磷酸化心肌细胞中的 HDAC5 刺激核输出, 进而增加心脏肥大相关因子的转录活性; 此外, HDACs 的磷酸化会导致其与肌细胞增强因子 2 (myocyte enhancer factor 2, MEF2) 的分离, 从而影响心脏发育^[11-12]。在针对人类先天性心脏病家族病例的研究中, Massadeh 等^[2]发现了一种基于 PRKD1 的新型常染色体隐性突变,

该基因中的双等位基因截断突变可能导致非综合征型先天性心脏病。心脏特异性 *Prkd1* 缺失的小鼠会下调心脏肥大、纤维化等相关基因的激活; 而且, 在慢性肾上腺素能或血管紧张素 II 处理的情况下, 心脏特异性 *Prkd1* 缺失的小鼠表现出对心脏肥大的抵抗, 这意味着 *Prkd1* 在心肌病与病理性心脏重塑中具有重要作用^[9-10]。*Prkd1* 完全敲除小鼠纯合致死, 其心脏表型尚无法确认^[2]。鉴于斑马鱼胚胎心脏畸形的个体也能存活数天时间的特点, 斑马鱼 *prkd1* 基因的缺失可以用于研究早期心脏发育过程, 而相关研究尚未见报道。因此, 本研究旨在以斑马鱼吗啉代反义寡核苷酸(morpholino antisense oligo, MO)敲低为研究模型, 探究 *prkd1* 对早期心脏发育的影响, 为人类先天性心脏病发病机制的研究提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 斑马鱼品系的养殖

本研究用到的 AB 品系野生型斑马鱼为本实验室自行饲养、繁殖。根据国家斑马鱼中心养殖方案, 本实验室将成鱼饲养在 28.5 °C 循环水系统中, pH 维持在 6.8~7.6。性成熟斑马鱼交配前一晚, 将雌鱼与雄鱼以 2:1 的性别比分别置于杂交缸的隔板两侧, 第二日一早喂食换水后, 给予光照, 将隔板去除, 斑马鱼自然交配产卵。

1.2 MO 设计

本实验选用的是翻译抑制型吗啉代反义寡核苷酸, 由 Gene Tools 公司设计并合成。*prkd1* 基因的 MO 序列和对照 MO 序列分别为: CGGATTAC-CGGAGGTACGCTCAT 和 CCTCTTACCTCAGTTC AATTTAT。

1.3 斑马鱼胚胎显微注射

胚胎受精后, 吸取处于 1 细胞期的胚胎, 均匀分布在注射板上。用无菌水按照 1:1 的比例稀释 *prkd1*-MO 样品原液, 使 *prkd1*-MO 样品浓度

为 0.5 mmol/L, 随后将其添加至注射针中, 并将注射针安装至显微注射仪上。根据 Xu 等^[13]的方案, 将样品注射进胚胎中, 每个胚胎约注射 1 nL。将注射后的胚胎收集到加有 E3 养殖水(60 mL 5 mol/L NaCl, 10 mL 1 mol/L KCl, 20 mL 1 mol/L MgSO₄, 2.94 g CaCl₂·2H₂O, 1 g 亚甲基蓝粉末, 无菌水补充至 1 L)的培养皿中, 放至 28.5 °C 培养箱中培养。对照组(control-MO 组)处理同上。

1.4 死亡率分析

分别于受精后 12 h (12 hours post fertilization, 12 hpf)、24 h、36 h、48 h、72 h 对存活和死亡的 control-MO 组、*prkd1*-MO 组胚胎计数。死亡胚胎数与总胚胎数的比值为死亡率, 利用 GraphPad Prism 6 进行后续分析与制图。

1.5 显微观察

随机收取注射 control-MO 和 *prkd1*-MO 的幼鱼, 在 48 h、72 h 时分别置于显微镜(Carl Zeiss AG 公司, 德国)下观察, 并对典型心脏畸形如心包水肿、心血管线性化等进行拍照记录以及统计分析。

1.6 心率分析

随机收取 48 hpf、72 hpf 时期的 control-MO 组和 *prkd1*-MO 组幼鱼, 依次置于玻片上, 利用显微镜的高速摄像头对单条幼鱼的心脏进行拍照和录像。录像以 16 bit 录制 10 s, 随后将原文件导入 SOHA 心率分析软件进行分析, 以横坐标、纵坐标为轴, 框选出心脏舒张的最大位置与收缩的最小位置, 标记心率峰值, 导出数值, 输入 GraphPad Prism 6 进行后续分析与制图。

1.7 实时荧光定量 PCR

分别随机收集 24 hpf、48 hpf、72 hpf 时期的 control-MO 组与 *prkd1*-MO 组斑马鱼胚胎, 每管 30 颗。使用 TRIzol 法提取总 RNA, 随后使用逆转录酶(Takara 公司, 日本)将其反转录成 cDNA。使用 2× SYBR Green qRT-PCR Master Mix 试剂(Se-llcock 公司, 美国)进行 PCR 实验, 总反应体系为 10 μL, 其中 2× SYBR Green qRT-PCR Master Mix 5 μL, H₂O 2.8 μL, 模板 1 μL, 正反向引物各 0.5 μL, ROX II 0.2 μL。Quant Studio 6 实时荧光定量 PCR 系统(Applied Biosystems 公司, 德国)设置的反应程序为: 95 °C 预变性 120 s; 95 °C 变性 15 s、60 °C 退火 30 s, 循环 40 次; 溶解曲线程序。Control-MO 组与 *prkd1*-MO 组靶基因的相对表达量选用 2^{-ΔΔC_t} 法计算, 并输入 GraphPad Prism 6 进行后续分析与制图。PCR 引物序列见表 1。

1.8 转录组高通量测序及数据分析

随机收取 72 hpf 时期的 control-MO 组和 *prkd1*-MO 组幼鱼, 使用 TRIzol 法提取总 RNA 进行转录组高通量测序。利用 NanoDrop 2000 检测所提 RNA 的浓度和纯度, 采用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 采用 Agilent 2100 测定 RNA 完整值(RNA integrity number, RIN)。文库采用 Illumina Truseq™ RNA Sample Prep Kit 方法构建, 所有样品(每组 3 个重复)送至上海派森诺生物科技股份有限公司进行实验。采用 DESeq 工具对基因进行差异表达分析, 对差异表达分析结果中的显著差异基因集进行统计, 并对每个比较组的上调差异基因和下调差异基因计数。使用 R 语言对所有比较组的差异基因进行双向聚类分析, 根据同一基因在不同样品中的表达水平和同一样品中不同基因的表达模式, 采用欧几里得(Euclidean)法计算距离, 通过层次聚类最长距离法进行聚类。

基因本体论(Gene Ontology, GO; <http://www.geneontology.org>, 2022-11-16)是将全世界所有与基因有关的研究结果进行分类汇总的综合数据库。本研究使用 top GO 进行 GO 富集分析, 利用 GO 术语注释的差异基因计算每个术语的基因列表和基因数目, 通过超几何分布方法计算 *P*-value (显著富集的标准为 *P*-value<0.05), 找出在整个基因组背景下差异基因显著富集的 GO 术语, 从而确定差异基因行使的主要生物学功能。

京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG; <http://www.genome.jp/kegg>, 2022-11-16)是基因组破译方面的公共数据库。本研究通过 KOBAS (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/home.do>)获取 KEGG 通路注释信息, 使用 clusterProfiler 进行 KEGG 富集分析, 利用 KEGG 通路注释的差异基因计算每个通路的基因列表和基因数目, 通过超几何分布方法计算 *P*-value (显著富集的标准为 *P*-value<0.05), 找出在整个基因组背景下差异基因显著富集的 KEGG 通路, 从而确定差异基因行使的主要生物学功能。

2 结果

2.1 *prkd1* 基因敲低影响斑马鱼心脏发育

2.1.1 *prkd1* 敲低导致心脏畸形

分别将 control-MO 和 *prkd1*-MO 注射至 1 细胞期的斑马鱼受精卵中, 培养至 24 hpf, 统计数据显示, 与 control-MO 对照组相比, *prkd1*-MO 处理

表 1 荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Primers used for real-time fluorescence quantitative PCR analysis

Primer		Sequence
actc1a	Sense	5'ACTCCAGTCTTGCGCTACAA3'
	Antisense	5'TACCAACCATCACACCCTGG3'
ryr2	Sense	5'AAGACGATGCTGTCTTGGGG3'
	Antisense	5'CTCTATGGAGCGCTGACTGG3'
caeng8b	Sense	5'CAACGGGTCCTGAGACCAA3'
	Antisense	5'TTCTCACACCCATGCCTGA3'
cacna1da	Sense	5'GCAACACAAACCCAGTTCGAG3'
	Antisense	5'AGCCGTAAAGCATAGTCAAA3'
tpm1	Sense	5'CACTCAGCGTCTCCGGTTTG3'
	Antisense	5'CACATCACCTTCAGCTGTTTCT3'
adrb1	Sense	5'TACAGAGAAGCCAAACAGCA3'
	Antisense	5'TGTTGTAGAACCTTCCCTCAC3'
atf2	Sense	5'CTCTCTGCCTCCGTCCTCA3'
	Antisense	5'GTGCCGGACACGGAACTAT3'
akt3a	Sense	5'AGATCCCAACAAGAGACTGG3'
	Antisense	5'GGTTTGAGCTGTGAACTTTC3'
atp1b2a	Sense	5'CCCTACAACGACACAGTCCA3'
	Antisense	5'TCCCAACTTTGTATTTCTTCGC3'
myl2b	Sense	5'AGAGAAGCTTAAAGGTGCCGAT3'
	Antisense	5'GGTCTTTCTCCTCCCGTGA3'
cacna2d3	Sense	5'CTACGTCGACAGCGCACTTG3'
	Antisense	5'GTCAGGGTGCAACAGGAGAT3'
cacna1fb	Sense	5'CTACTGTCTACAGCGGGG3'
	Antisense	5'GGCTTCTGCTTAAAGGGCTCA3'
cacnb4a	Sense	5'CCTCCATATGATGTGGTTC3'
	Antisense	5'CATATCTGTACCTCGTATCC3'
calml4a	Sense	5'GCTCACAGACAAAGAAGTGGATG3'
	Antisense	5'CCACTGTAGGAAGTGTACCA3'
adcy1a	Sense	5'GTGGAGCCAGGATTTGGTCA3'
	Antisense	5'TCGTAACGCTCGTCTCTGT3'
adcy2a	Sense	5'CCCTGGGATCAGATTCTGGC3'
	Antisense	5'TAACAGACGTTCTGCTGACG3'
bcl2b	Sense	5'GCGCTTCAACGCAGTCATAG3'
	Antisense	5'CCACAAATGCTTCCCAACCG3'
casp8	Sense	5'AGACCAGGAACAAGGAGCGAG3'
	Antisense	5'CTGTAGTAATTGTGCCAGCCG3'
ctsb	Sense	5'GTCAATTTGACAATGTGCC3'
	Antisense	5'CGTTTGTGGAGTGTTCACAG3'
prkg	Sense	5'CACCGATTCATCTGGGGGA3'
	Antisense	5'TAGAGCAGTGAACCCGAGTG3'
si:ch73-55i23.1	Sense	5'ACATGCTGTACCCTGCAAAAGTCT3'
	Antisense	5'ATCCGTACGACCTGAGAAC3'
cox8b	Sense	5'TCCGGCTTCAATCGCTCTTT3'
	Antisense	5'ATGCAATCACTTGTCCCA3'
tbx5a	Sense	5'AAACCACAAGATCACCCAG3'
	Antisense	5'TGCAGCTCCATATCATCAC3'
gata4	Sense	5'CGGGTGGGTTTATCCT3'
	Antisense	5'ATCGCCGACTGACCTT3'
hand2	Sense	5'GGACATTCTGGACAAAAGATGAA3'
	Antisense	5'GCCAACCAGTTCTCCCTTTA3'
nkx2.5	Sense	5'ATGCCATCCGATCCTCTCT3'
	Antisense	5'TCAGATCTTACCCGGTCT3'
β -actin	Sense	5'GACCAGCTAGATCCAGACCC3'
	Antisense	5'GCTCCCCTGAATCCCAAAGC3'

组的斑马鱼胚胎发育迟缓, 死亡率升高(图 1)。随着胚胎发育至 48 hpf, 注射 *prkd1*-MO 的斑马鱼

胚胎可见明显心脏畸形, 出现心包水肿、心血管线性化等缺陷表型(图 2A~D); 发育至 72 hpf 时, 相比

control-MO 对照组, *prkd1*-MO 组斑马鱼胚胎出现环化异常等心脏畸形(图 2E~H)。在显微镜下观察 72 hpf 时期 control-MO 组和 *prkd1*-MO 组斑马鱼不同类型的心脏畸形并计数, 结果显示, 心包水肿、心管线性化、环化异常这三类心脏畸形在 control-MO 组中出现的比例依次为 5.40%、1.51% 和 1.45%, 而其在 *prkd1*-MO 组中出现的比例显著增加, 依次为 88.50%、32.80% 和 42.90% (图 1B)。

2.1.2 *prkd1* 敲低影响斑马鱼心率

为了探究 *prkd1* 的敲低是否会影响斑马鱼的

心率, 我们对 48 hpf、72 hpf 的 control-MO 组与 *prkd1*-MO 组幼鱼进行了心率检测分析(图 3)。经数据统计后发现, 相比 control-MO 组, *prkd1*-MO 组幼鱼表现出异常降低的心率。研究结果证明, *prkd1* 的敲低不仅会导致心脏畸形, 同时也会导致斑马鱼心率降低。

2.2 *prkd1* 敲低对斑马鱼基因表达的调控

2.2.1 *prkd1*-MO 处理后的基因表达差异

为了探究 *prkd1* 影响早期心脏发育的下游靶基因, 对 72 hpf 的 control-MO 组与 *prkd1*-MO 组

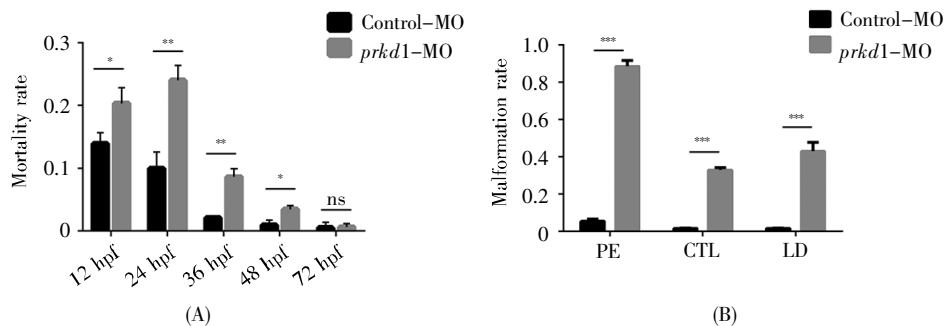


图 1 敲低 *prkd1* 导致的斑马鱼胚胎死亡率及不同类型心脏畸形比例(72 hpf)的统计图

(A) 斑马鱼胚胎死亡率; (B) 不同类型心脏畸形比例。PE: 心包水肿; CTL: 心管线性化; LD: 环化异常。n=3, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001, ns: 无显著变化。

Fig.1 Statistical chart of the mortality and proportion of different types of cardiac malformations (72 hpf) in zebrafish embryos caused by *prkd1* knockdown

(A) The embryonic mortality of zebrafish; (B) The rate of various types of heart malformations. PE: Pericardial edema; CTL: Cardiac tube linearization; LD: Looping disorder. n=3, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001, ns: No significant change.

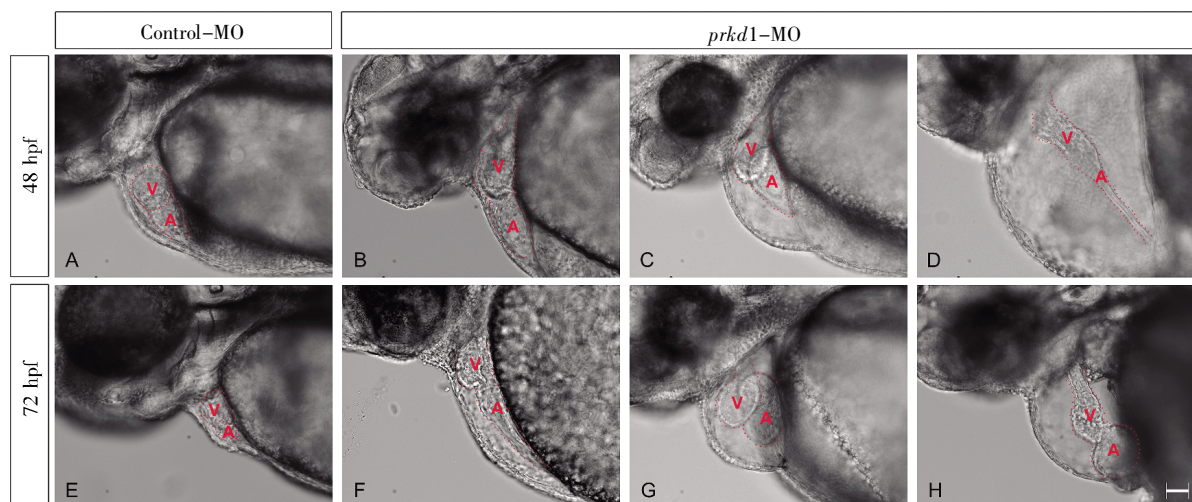


图 2 *prkd1* 敲低导致的斑马鱼胚胎畸形表型

(A) 对照组 48 hpf 时期的心脏表型; (B~D) *prkd1*-MO 处理组 48 hpf 时期的心脏畸形表型, 依次为轻度、中度、重度; (E) 对照组 72 hpf 时期的心脏表型; (F~H) *prkd1*-MO 处理组 72 hpf 时期的心脏畸形表型, 依次为轻度、中度、重度。心脏区域用红色虚线圈出; V: 心室, A: 心房; 标尺=50 μ m。

Fig.2 Abnormal phenotype of zebrafish embryos caused by *prkd1* knockdown

(A) Heart phenotype in control group at 48 hpf; (B~D) Mild, moderate and severe heart malformation phenotypes in *prkd1*-MO group at 48 hpf; (E) Heart phenotype in control group at 72 hpf; (F~H) Mild, moderate and severe heart malformation phenotypes in *prkd1*-MO group at 72 hpf. The area of the heart is circled with a red dotted line. V: Ventricle; A: Atrium. Scale bar = 50 μ m.

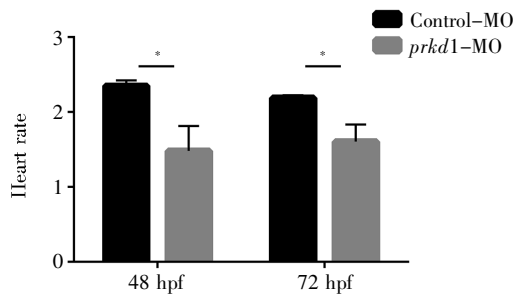


图 3 *prkd1* 敲低的斑马鱼胚胎心率分析统计图
Fig.3 Statistical chart of heart rate of zebrafish embryos caused by *prkd1* knockdown
n=3, *: *P*<0.05.

胚胎进行了转录组测序, 分析了 *prkd1* 敲低后的基因表达差异。样品相关性检测结果表明, 6 个样

品间显示出高度重复性(图 4A)。基因差异表达结果显示, 本次共检测到了 6 246 个发生显著性变化的基因, 其中, 3 913 个基因显著下调, 2 333 个基因显著上调(图 4B)。

2.2.2 差异基因富集分析

为进一步研究 *prkd1* 的生物学功能, 将发生显著性变化的 6 246 个基因进行 GO 富集分析 (top 20), 结果显示门控通道活性富集最为显著(图 5A)。此外, 被显著富集的 GO 类别还包括离子通道活性、离子跨膜转运蛋白活性和电压门控离子通道活性等。

KEGG (top 30)富集分析显示, 与 control-MO 组相比, *prkd1* 的敲低对真核生物的核糖体生物

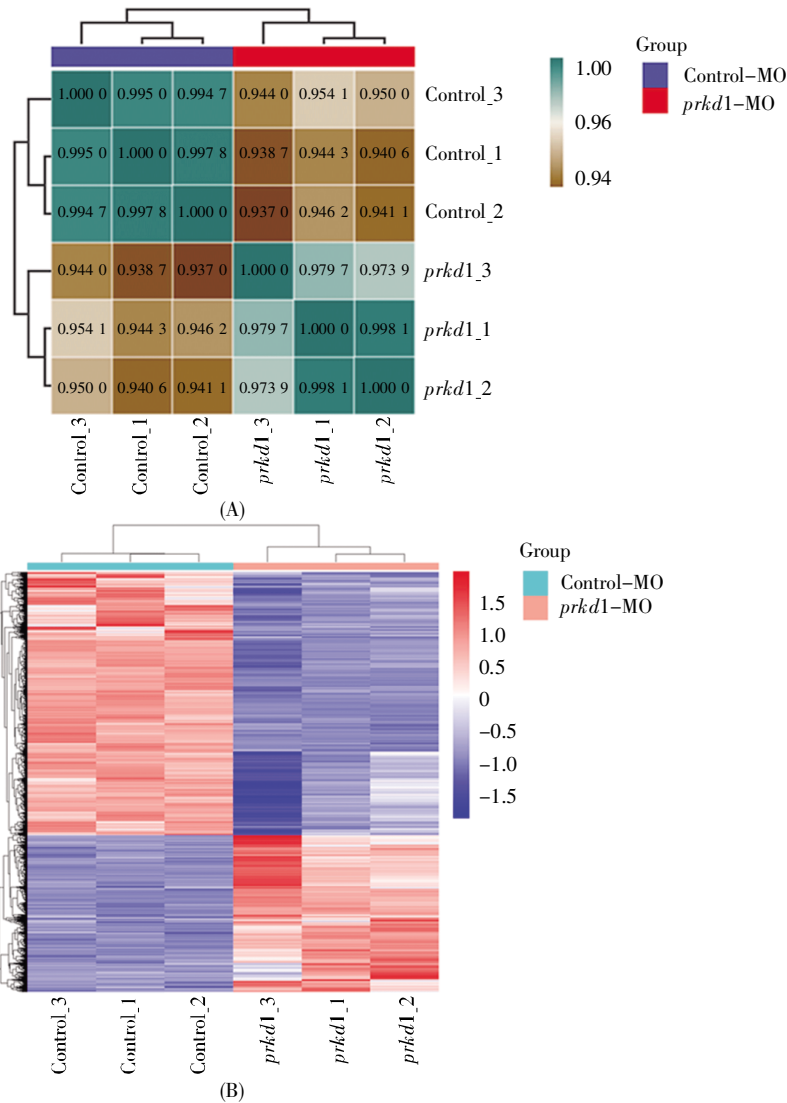


图 4 *prkd1*-MO 处理组与对照组的差异表达基因
 (A) 样品相关性检验; (B) 差异基因聚类分析图。蓝色代表下调, 红色代表上调。

Fig.4 Differentially expressed genes between *prkd1*-MO group and control group
 (A) Sample correlation test; (B) Cluster analysis of differential genes. Blue represents down-regulation and red represents up-regulation.

发生以及 RNA 运输通路的影响最为显著,此外其还影响了心肌细胞的肾上腺素能信号通路、心肌收缩、血管平滑肌收缩、P53 信号通路和钙离子信号通路等(图 5B)。

上述研究结果表明, *prkd1* 可能通过影响心脏细胞相关的信号通路来影响心脏发育。

2.2.3 KEGG 富集结果中相关信号通路的验证

根据 KEGG 富集分析结果,选取心脏相关信号通路如心肌收缩、心肌细胞的肾上腺素能信号通路中有显著变化的基因进行验证。收取 72 hpf

胚胎进行 qRT-PCR 检测,结果显示:与 control-MO 组相比, *prkd1*-MO 组与心肌收缩有关的基因如 *ryr2*、*actc1a* 和 *cacna1fb* 等均发生显著变化,其中, *ryr2* 和 *cacna1fb* 显著下调, *actc1a* 显著上调,这些基因同时也在心肌细胞的肾上腺素能信号通路上;此外, *atp1b2a*、*cacng8b*、*cacna1da*、*cacna2d3*、*tpm1*、*adrb1*、*atf2*、*akt3a*、*myl2b*、*adcyl1a*、*adcyl2a*、*bcl2b* 和 *calml4a* 等心肌细胞的肾上腺素能信号通路相关基因在 *prkd1*-MO 组也显著下调(图 6A)。这些数据均与高通量测序结果相符。

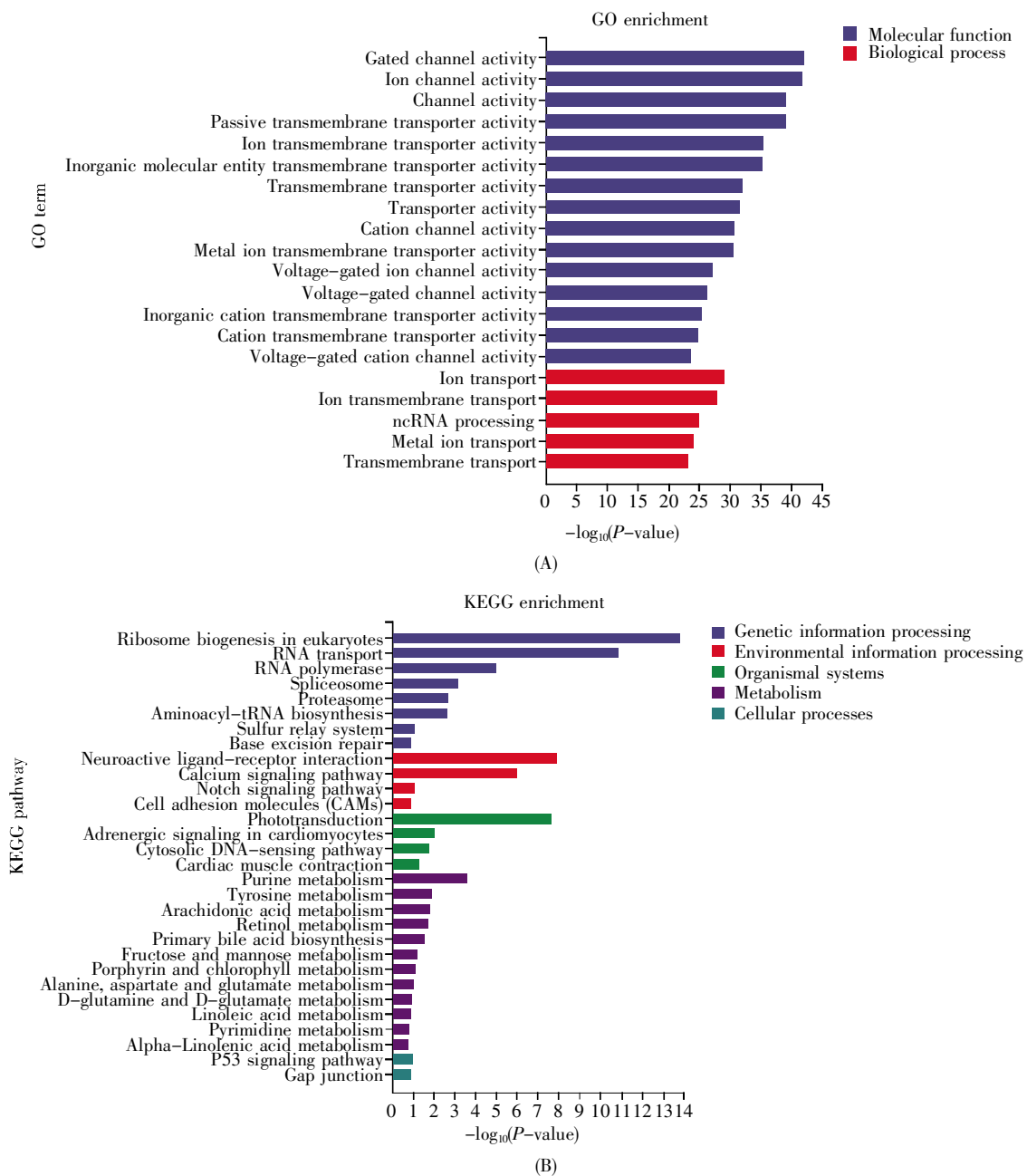


图 5 *prkd1*-MO 处理组与对照组的差异表达基因富集分析
 Fig.5 Enrichment analysis of differentially expressed genes between *prkd1*-MO group and control group

我们还对血管平滑肌收缩以及细胞凋亡信号通路的关键基因进行了检测,结果显示:在 $prkd1$ -MO组中,细胞凋亡相关基因 $casp8$ 显著上调, $ctsbb$ 显著下调(图6B);血管平滑肌收缩相关基因 $prkeg$ 、 $si:ch73-55i23.1$ 和 $cox8b$ 均显著下调(图6C),且它们均与高通量测序结果相符。

以上结果表明, $prkd1$ 可能通过影响心肌收缩和心肌细胞的肾上腺素能信号通路来影响心脏发育, $prkd1$ 敲低后其还可能通过抑制血管平滑肌收缩相关的基因来抑制心脏血液的供给,同时细胞凋亡通路上相关基因的表达也受到影响。

2.2.4 早期心脏发育关键基因 mRNA 的相对表达量变化

由上述结果可知, $prkd1$ 会通过影响心脏相关信号通路来影响心脏发育。为了进一步探究 $prkd1$ 是否在斑马鱼心脏发育的早期发挥作用,收取24 hpf的control-MO组和 $prkd1$ -MO组斑马鱼胚胎,对其进行早期心脏发育关键因子的相

对表达量检测。qRT-PCR数据显示,与control-MO组相比,敲低 $prkd1$ 后斑马鱼早期心脏发育关键因子如 $tbx5a$ 、 $gata4$ 、 $nkx2.5$ 和 $hand2$ 均发生显著下调(图7),这表明 $prkd1$ 的敲低会影响早期心脏发育关键基因的表达。

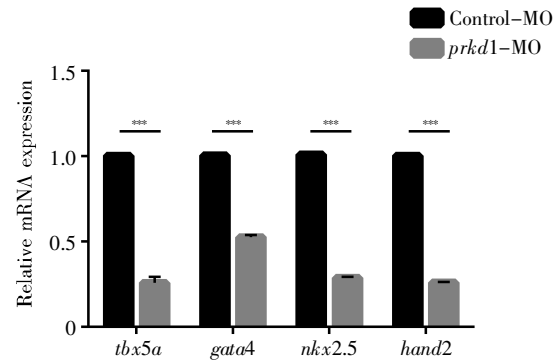


图7 早期心脏发育关键基因 mRNA 的相对表达量变化 (24 hpf)

Fig.7 Relative mRNA expression changes of key genes in early cardiac development (24 hpf)

$n=3$, ***: $P<0.001$.

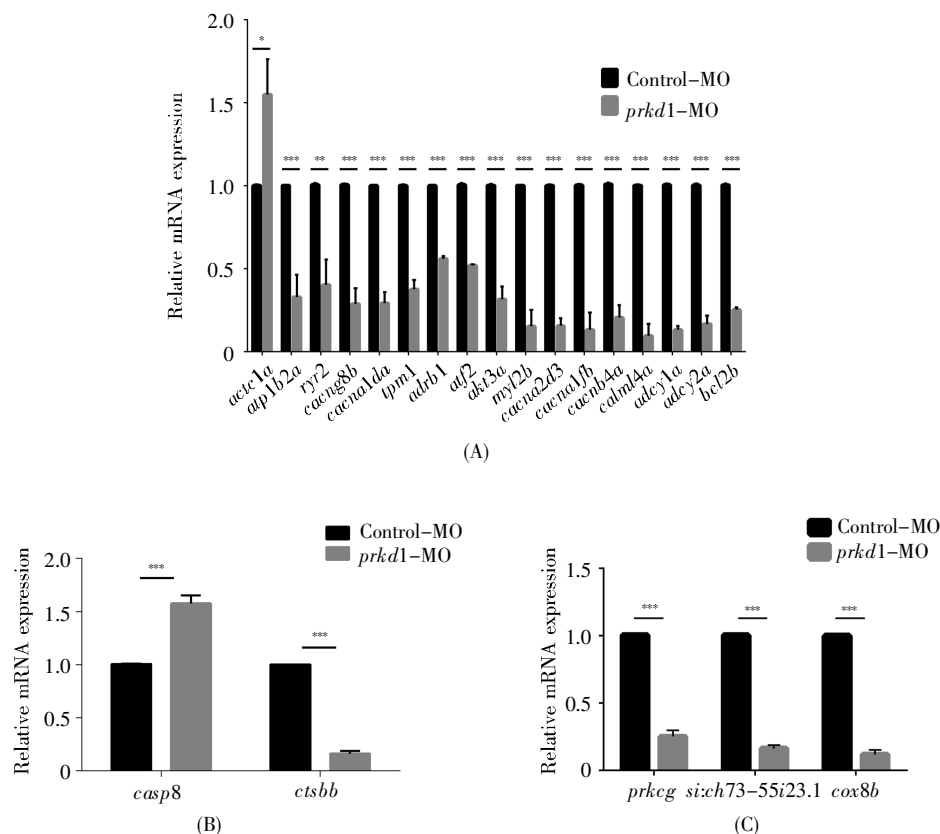


图6 基于KEGG信号通路的基因相对表达量验证(72 hpf)

(A) 心肌细胞的肾上腺素能信号通路相关基因的 mRNA 相对表达量; (B) 细胞凋亡信号通路相关基因的 mRNA 相对表达量; (C) 血管平滑肌收缩信号通路相关基因的 mRNA 相对表达量。 $n=3$, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$ 。

Fig.6 Verification of relative expression of genes based on KEGG signal pathways (72 hpf)

(A) Relative mRNA expression of adrenergic signaling pathway related genes in cardiomyocytes; (B) Relative mRNA expression of apoptosis signaling pathway related genes; (C) Relative mRNA expression of vascular smooth muscle contraction signaling pathway related genes. $n=3$, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$.

3 讨论

PRKD1 最初是蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 家族的非典型成员, 后因其特殊的结构特征如不同的跨膜和 PH 结构域以及氨基末端信号肽, 而被分至一个新的家族——PKD 家族^[11, 14]。已有研究表明, PRKD1 通过磷酸化心肌细胞中 HDAC5 刺激其核输出, 同时减少对肌细胞增强因子 MEF2 类转录因子及其靶基因的负调节作用, 增加心脏肥大相关因子的转录活性, 从而降低心脏特异性 *Prkd1* 缺失的小鼠抵抗外源性心脏肥大的能力^[9-12, 15-16]。2021 年, 研究人员在人类先天性心脏病病例中检测到了 PRKD1 的隐性突变, 患者表现出肺动脉狭窄、动脉干和室间隔缺损的先天性心脏病病征^[2]。PRKD1 会与其他 PKD 家族成员形成二聚体^[17], 且有证据表明 PRKD1 定位于多蛋白复合物^[7], PRKD1 的缺失可能会破坏这些异构体从而导致病理性心脏重塑功能受阻。这一系列研究表明, *prkd1* 与心脏疾病的发生具有密切关系, *prkd1* 的缺失可能通过引起复杂的响应机制来调控心脏发育。

本文使用 MO 敲低斑马鱼 *prkd1*, 发现与对照组相比, *prkd1*-MO 处理组的斑马鱼早期胚胎死亡率升高(图 1A), 且出现心包水肿、心管线性化、环化异常等明显心脏缺陷表型(图 2)。对 72 hpf 时期出现明显心脏缺陷表型的斑马鱼比例进行统计, 结果显示, 与 control-MO 组相比, *prkd1*-MO 组出现心包水肿、心管线性化、环化异常的比例显著增加(图 1B); 48 hpf、72 hpf 时期斑马鱼的心率分析结果显示, *prkd1*-MO 处理组的斑马鱼表现出心率降低等异常(图 3), 这些结果表明 *prkd1* 在早期心脏发育中至关重要。为进一步探究 *prkd1* 影响早期心脏发育的机制, 本研究选用 72 hpf 时期的 control-MO 组和 *prkd1*-MO 组斑马鱼胚胎进行转录组测序, 测序结果显示, 共检测到 6 246 个发生显著性变化的基因, 其中 3 913 个基因显著下调, 2 333 个基因显著上调。差异基因的 GO 和 KEGG 富集分析显示, *prkd1* 基因的敲低会使心脏相关的信号通路, 如心肌细胞的肾上腺素能信号通路、心肌收缩、血管平滑肌收缩、细胞凋亡信号通路、钙离子信号通路等, 受到不同程度的影响(图 4~5)。通过 qRT-PCR 对差异基因进行验证, 验证结果显示, *prkd1* 敲低后心肌细胞的肾上腺素能信号通路、心肌收缩等信号通路的部分相关基

因均发生显著变化(图 6A), 这说明 *prkd1* 可能通过影响心脏相关的信号通路来影响心脏发育; 同时, 血管平滑肌收缩相关的差异基因显著下调(图 6C), 推测 *prkd1* 敲低可能会通过抑制血管平滑肌收缩相关的基因来抑制心脏血液的供给, 从而影响早期心脏发育。此外, 本研究还对两组斑马鱼胚胎早期心脏发育关键因子的相对表达量进行了检测, 发现 *prkd1* 敲低后早期心脏发育关键因子 *tbx5a*、*gata4*、*nkx2.5* 和 *hand2* 均发生显著下调(图 7), 这表明 *prkd1* 的敲低会影响早期心脏发育关键基因的表达, 并且可能会通过调控这些关键因子的表达来影响心脏发育。

综上所述, 本文以斑马鱼为模型, 就 *prkd1* 基因的敲低对早期心脏发育的影响进行了初步探究。然而, MO 敲低技术存在不可遗传的局限性, 且 *prkd1* 影响早期心脏发育的分子机制仍有待进一步探究, 因此, 后续将在斑马鱼体内敲除 *prkd1* 基因, 从而对 *prkd1* 基因在早期心脏发育中的重要作用展开深入探究。

参考文献(References):

- [1] THOMAS H, DIAMOND J, VIECO A, *et al.* Global Atlas of Cardiovascular Disease 2000—2016: the path to prevention and control[J]. *Global Heart*, 2018, 13(3): 143-163.
- [2] MASSADEH S, ALBELADI M, ALBESHER N, *et al.* Novel autosomal recessive splice-altering variant in PRKD1 is associated with congenital heart disease[J]. *Genes*, 2021, 12(5): 612.
- [3] PAONE C, DIOFANO F, PARK D D, *et al.* Genetics of cardiovascular disease: fishing for causality[J]. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2018, 5: 60.
- [4] DAHME T, KATUS H A, ROTTBAUER W. Fishing for the genetic basis of cardiovascular disease[J]. *Disease Models & Mechanisms*, 2009, 2(1/2): 18-22.
- [5] GUT P, REISCHAUER S, STAINIER D Y R, *et al.* Little fish, big data: zebrafish as a model for cardiovascular and metabolic disease[J]. *Physiological Reviews*, 2017, 97(3): 889-938.
- [6] BROWN D R, SAMSA L A, QIAN L, *et al.* Advances in the study of heart development and disease using zebrafish[J]. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 2016, 3(2): 13.
- [7] ALTER S, ZIMMER A D, PARK M, *et al.* Telangiectasia-ectodermal dysplasia-brachydactyly-cardiac anomaly syndrome is caused by *de novo* mutations in protein kinase D1[J]. *Journal of Medical Genetics*, 2021, 58(6): 415-421.
- [8] ALGHAITH F A, ARTS H H, PLOURDE F J, *et al.* Increased intracranial pressure in a patient with congenital heart defect and ectodermal dysplasia (CHDED): extension of phenotype and review of literature[J]. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2023, 191(2): 554-558.
- [9] FIELITZ J, KIM M S, SHELTON J M, *et al.* Requirement of protein kinase D1 for pathological cardiac remodeling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2008, 105(8): 3059-3063.

- [29] 林小峰, 陈兴燕. 贵州苗族黔东南方言区青年群体的语言使用态度调查分析[J]. 黔南民族师范学院学报(LIN Xiaofeng, CHEN Xingyan. The language attitude and the identity self-consciousness of Hmong youth today[J]. Journal of Qiannan Normal University for Nationalities), 2017, 37(6): 20–22, 31.
- [30] EXCOFFIER L, SLATKIN M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population[J]. Molecular Biology and Evolution, 1995, 12(5): 921–927.
- [31] 李沈明, 陈富超, 陈纯静, 等. 贵州侗族人群 *MICB* 等位基因多态性研究[J]. 激光生物学报(LI Shenming, CHEN Fuchao, CHEN Chunjing, et al. Study on the allele polymorphism of *MICB* in Dong nationality of Guizhou[J]. Acta Laser Biology Sinica), 2017, 26(2): 162–167.
- [32] MEI B, DU K, HUO Z, et al. Discrepant effects of *Chlamydia trachomatis* infection on *MICA* expression of HeLa and U373 cells[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2010, 10(6): 740–745.
- [33] MEI B, LUO Q Z, DU K, et al. Association of *MICA* gene polymorphisms with *Chlamydia trachomatis* infection and related tubal pathology in infertile women[J]. Human Reproduction, 2009, 24(12): 3090–3095.
- [34] GONG Z, LUO Q Z, LIN L, et al. Association of *MICA* gene polymorphisms with liver fibrosis in schistosomiasis patients in the Dongting Lake region[J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2012, 45(3): 222–229.
- [35] HUGHES E H, COLLINS R W M, KONDEATIS E, et al. Associations of major histocompatibility complex class I chain-related molecule polymorphisms with Behcet's disease in Caucasian patients[J]. Tissue Antigens, 2005, 66(3): 195–199.
- [36] GUPTA M, NIKITINA-ZAKE L, ZARGHAMI M, et al. Association between the transmembrane region polymorphism of MHC class I chain related gene-A and type 1 diabetes mellitus in Sweden[J]. Human Immunology, 2003, 64(5): 553–561.
- [37] JIANG X, ZOU Y, HUO Z, et al. Association of major histocompatibility complex class I chain-related gene A microsatellite polymorphism and hepatocellular carcinoma in South China Han population[J]. Tissue Antigens, 2011, 78(2): 143–147.
- [38] MARTINEZ-CHAMORRO A, MORENO A, GÓMEZ-GARCÍA M, et al. *MICA**A4 protects against ulcerative colitis, whereas *MICA**A5.1 is associated with abscess formation and age of onset[J]. Clinical and Experimental Immunology, 2016, 184(3): 323–331.
- [39] LEE Y H, BAE S C, KIM J H, et al. Meta-analysis of the association between functional *MICA*-TM polymorphisms and systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis[J]. Zeitschrift für Rheumatologie, 2015, 74(2): 146–152.
- [40] FERNANDEZ-MORERA J L, RODRIGUEZ-RODERO S, TUNON A, et al. Genetic influence of the nonclassical major histocompatibility complex class I molecule *MICB* in multiple sclerosis susceptibility[J]. Tissue Antigens, 2008, 72(1): 54–59.
- [41] RODRIGUEZ-RODERO S, RODRIGO L, FDEZ-MORERA J L, et al. MHC class I chain-related gene B promoter polymorphisms and celiac disease[J]. Human Immunology, 2006, 67(3): 208–214.
- [42] LI Y, XIA B, LÜ M, et al. *MICB*0106 gene polymorphism is associated with ulcerative colitis in central China[J]. International Journal of Colorectal Disease, 2010, 25(2): 153–159.
- [43] JUMNAINSONG A, JEANANAIKON P, KHAHMAHPAHTHE S, et al. Associations of *MICB* with cervical cancer in north-eastern Thais: identification of major histocompatibility complex class I chain-related gene B motifs influencing natural killer cell activation[J]. Clinical and Experimental Immunology, 2008, 153(2): 205–213.
- [44] IVANOVA M, AL HADRA B, YORDANOV S, et al. Associations of high-resolution-typing-defined *MICA* and *MICB* polymorphisms, and the levels of soluble *MICA* and *MICB* with oral squamous cell carcinoma in Bulgarian patients[J]. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2021, 50(8): 758–765.
- [45] MORELLI M, GALLUZZO M, MADONNA S, et al. *HLA-Cw6* and other *HLA-C* alleles, as well as *MICB-DT*, *DDX58* and *TYK2* genetic variants associate with optimal response to anti-IL-17A treatment in patients with psoriasis[J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2021, 21(2): 259–270.
- [46] MALAVIA T A, CHAPARALA S, WOOD J, et al. Generating testable hypotheses for schizophrenia and rheumatoid arthritis pathogenesis by integrating epidemiological, genomic, and protein interaction data[J]. NPJ Schizophrenia, 2017, 3: 11.

(上接第 103 页)

- [10] AVKIRAN M, ROWLAND A J, CUELLO F, et al. Protein kinase D in the cardiovascular system: emerging roles in health and disease[J]. Circulation Research, 2008, 102(2): 157–163.
- [11] JAGGI M, DU C, ZHANG W G, et al. Protein kinase D1: a protein of emerging translational interest[J]. Frontiers in Bioscience, 2007, 12: 3757–3767.
- [12] VEGA R B, HARRISON B C, MEADOWS E, et al. Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5[J]. Molecular and Cellular Biology, 2004, 24(19): 8374–8385.
- [13] XU Q, STEMPLE D, JOUBIN K. Microinjection and cell transplantation in zebrafish embryos[J]. Methods in Molecular Biology, 2008, 461: 513–520.
- [14] JOHANNES F J, PRESTLE J, EIS S, et al. PKCu is a novel, atypical member of the protein kinase C family[J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(8): 6140–6148.
- [15] SHAHEEN R, AL HASHEM A, ALGHAMDI M H, et al. Positional mapping of *PRKD1*, *NRP1* and *PRDM1* as novel candidate disease genes in truncus arteriosus[J]. Journal of Medical Genetics, 2015, 52(5): 322–329.
- [16] MISKA E A, KARLSSON C, LANGLEY E, et al. HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor[J]. The EMBO Journal, 1999, 18(18): 5099–5107.
- [17] AICART-RAMOS C, HE S D Q, LAND M, et al. A novel conserved domain mediates dimerization of protein kinase D (PKD) isoforms: dimerization is essential for PKD-dependent regulation of secretion and innate immunity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(45): 23516–23531.