

利用果蝇心力衰竭模型筛选果蝇第2号染色体缺失系

张艳阳, 唐 旻, 夏 琼, 李冉林, 邓志伟, 彭向文, 袁葵洲*, 吴秀山*

(湖南师范大学 生命科学学院 心脏发育研究中心, 中国湖南 长沙 410081)

摘要: 果蝇心脏一直以来都是研究心血管发育的极好模型, 许多控制心脏分化和特化的调控基因和信号途径从果蝇到哺乳动物都是保守的. 由于近年心力衰竭的发病率不断升高, 我们最近又建立了果蝇心力衰竭模型用于大规模筛选和鉴定心力衰竭的相关基因. 在这个模型中, 适龄的成体果蝇被整齐排列在导电的载玻片上, 通过电极短暂刺激 30 s, 使果蝇的心跳频率由正常的 3 Hz 增加到 6 Hz, 停止后检测果蝇心率恢复情况, 不能恢复正常心跳频率或出现纤维性震颤的果蝇视为心力衰竭. 该模型可以在短期内大规模筛选到与心力衰竭相关的基因. 利用此心力衰竭模型, 我们筛选了 164 个果蝇 2 号染色体缺失系, 获得 33 个候选缺失系. 这些候选缺失系的心衰率要么与野生型品系相比差异显著, 要么与 *tinman* 或 *panier* 突变系相比差异显著, 提示这些缺失系中可能含有与心力衰竭相关的调控基因.

关键词: 果蝇模型; 心力衰竭; 2 号染色体缺失系; 调控基因

中图分类号: Q344+.14

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2010)03-0195-04

The *Drosophila* Pacing Model for Screening the 2nd Chromosome Deficiency Lines Related to Heart Failure

ZHANG Yan-yang, TANG Min, XIA Qiong, LI Ran-lin, DENG Zhi-wei,
PENG Xiang-wen, YUAN Wu-zhou*, WU Xiu-shan*

(The Center for Heart Development, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: The *Drosophila* heart has been an excellent model of cardiovascular development for over a decade, many of the regulatory genes and signal pathways controlling the specification and differentiation of the cardiac progenitors are conserved from *Drosophila* to vertebrates. Because heart failure are more common in recent years, we have recently developed an external electrical pacing paradigm to use the *Drosophila* heart to understand the molecular mechanisms underlying aging of cardiac tissue and their contribution to heart failure. In this model, *Drosophila* adults are aligned on a specially prepared conductive glass slide and stimulated by a standard square wave stimulator to accelerate their heart rate, which at rest is 3 Hz, to 6 Hz for 30 seconds. When the current pulses are turned off, the flies will either recover to regular heartbeat or fibrillate or undergo arrest. This assay provides to conduct large-scale genetic screens for loci that affect cardiac performance in an age-related manner. Taking advantage of this model, 164 of the 2nd chromosome deficiency lines of *Drosophila* were screened and 33 candidate deficiency lines were obtained, of which the heart failure rate was significant different either from that of wild type or *tinman* or *panier* mutants, indicating these deficiencies contain heart failure gene candidates.

收稿日期: 2009-04-07; 修回日期: 2010-03-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30930054, 30900851); 湖南省普通高校学科带头人培养计划 (湘教通 2008-315)

作者简介: 张艳阳 (1981-), 男, 湖南浏阳人, 硕士研究生, 主要从事果蝇心脏发育研究, E-mail: yanyang.zhang@yahoo.com.cn, 唐旻与张艳阳对本文贡献相同; * 通讯作者: 袁葵洲 (1966-), 女, 湖南衡阳人, 湖南师范大学教授, 博士, 博士生导师, 主要从事果蝇发育遗传学研究, Tel: 0731-88872824, E-mail: yuanwuzhou@yahoo.com.cn; 吴秀山 (1952-), 男, 湖南衡阳人, 湖南师范大学教授, 博士, 博士生导师, 主要从事发育遗传学和分子遗传学研究, Tel: 0731-88872780, E-mail: xiushanwu2003@yahoo.com.cn.

Key words: *Drosophila* model; heart failure; the 2nd chromosome deficiency lines; regulatory genes
(*Life Science Research*, 2010, 14(3): 195~198)

心血管疾病已经成为危害人类健康和生命的头号杀手, 每年因心血管疾病死亡的人数都在不断增加. 研究发现, 各种心血管疾病的发生会导致心脏心律失常与心力衰竭^[1,2]. 同时, 正常老年人群随着年龄增长也会逐步出现心力衰竭现象, 并且发现, 近年来心力衰竭的发生年龄越来越低龄化^[3,4], 因此筛选心力衰竭的基因, 揭示心力衰竭发生的分子机理, 对于预防心脏老龄化和心血管疾病以及已发心脏病的预后都将会有很好的指导意义.

果蝇心脏一直以来都是研究心血管发育的极好模型. 动物的心脏具有显著且保守的胚胎分子发育机制, 这些基因控制成体心脏功能也可能是保守的^[5-7]. 已有的研究证明, 许多执行哺乳动物心脏功能的蛋白质, 它们也存在于果蝇心肌中, 起着相似的作用^[8,9]. 在脊椎动物和无脊椎动物中, 心脏生理和节律的控制的许多方面是保守的. 因此, 果蝇心脏对于我们了解可导致发育缺陷的先天性心脏病及心脏功能异常, 如心肌病和心律失常是非常有用的遗传模型^[10,11].

为了研究心力衰竭与年龄及遗传因素的关系, 我们建立了果蝇心力衰竭模型^[12,13]. 它是将不同果蝇突变品系的成虫头尾置于脉冲电场中刺激 30 s, 然后观察果蝇心脏的跳动加速情况, 以此来确定不同年龄、环境和遗传基因对心力节律恢复的影响. 相对于幼虫期采用的玻璃微电极模型, 心力衰竭模型具有成本低廉、操作简单的优点, 便于大规模、高通量的筛选果蝇突变品系和影响心力衰竭的候选基因^[3,14-16].

利用该模型我们成功开展了果蝇第 2 号染色体缺失系的筛选工作, 以期鉴定出果蝇第 2 号染色体中可能参与心力衰竭的候选基因, 为阐明心力衰竭的分子机制奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

果蝇野生型品系 w^{1118} ; *tinman* 的突变系 $tin^{346}/Tm3$; *pannier* 的突变系 $pnr^{x36}/Tm3$; *kcnq*¹⁸⁶ 突变系 (以上品系为美国伯明翰研究所 Rolf Bodmer 教授惠赠); 2 号染色体缺失系 164 个 (均购自美国伯明顿品系中心).

1.2 方法

1.2.1 果蝇缺失品系杂交后代的获得

果蝇 2 号染色体缺失系的处女蝇分别与 w^{1118} 、 $tin^{346}/Tm3$ 、 $pnr^{x36}/Tm3$ 的雄蝇杂交, 即得到 F₁ 代 Df/w^{1118} (即 $Df/+$)、 Df/Tin^{346} 、 Df/Pnr^{x36} 果蝇, 将 F₁ 代在 25 °C 恒温条件下培养一周龄后分别取各 F₁ 代果蝇做心力衰竭检测分析.

1.2.2 心力衰竭模型的建立

利用电场刺激改变不同突变系和正常果蝇的心率, 再检测其心率恢复的情况来确定研究对象与心力衰竭发生的关系. 首先将成蝇置于麻醉瓶 (内含三酰胺麻醉剂, FlyNapTM) 麻醉 5 min, 将果蝇取出, 整齐排列在两侧有导电胶的载玻片上, 使果蝇翅膀朝上翻转贴于导电胶, 头尾分别与两侧导电胶相连. 用脉冲电激仪 (脉冲电激仪: PHIPPS&BIRD, 美国. 测试参数: 6 Hz、40 V) 循环交流电刺激 30 s 后立即停止, 2 min 内在解剖显微镜下检测果蝇心脏跳动变化与心率的恢复情况.

1.2.3 果蝇缺失系筛选的方法

在停止刺激后, 果蝇心脏表型存在 3 种情况: 1) 心脏与野生型果蝇一样正常而有节律的收缩跳动; 2) 纤维性震颤, 心脏处于一种非正常状态, 常表现为剧烈的收缩、回旋或者缓慢的蠕动等不正常行为; 3) 心脏停止跳动. 实验中表现为情况 1) 时, 属于正常; 表现为情况 2) 或者 3) 时, 则该果蝇心率不能恢复正常, 视为心力衰竭. 每个杂交 F₁ 代检测 100 只, 重复检测 3 次, 并记录发生心力衰竭果蝇的百分率作为心衰率.

1.2.4 统计学分析方法

将缺失系分别与野生型 w^{1118} 、 $tin^{346}/Tm3$ 和 $pnr^{x36}/Tm3$ 杂交, 得到的 F₁ 代 Df/w^{1118} 、 Df/Tin^{346} 、 Df/pnr^{x36} 分别与对照组 w^{1118} 、 $tin^{346}/+$ 、 $pnr^{x36}/+$ 进行差异显著性检验. 如果 Df/w^{1118} 与 w^{1118} 、 Df/Tin^{346} 与 $tin^{346}/+$ 或 Df/pnr^{x36} 与 $pnr^{x36}/+$ 差异显著, 则该缺失系为候选缺失系.

2 结果与讨论

2.1 心力衰竭模型稳定性检验

首先, 我们对果蝇心力衰竭模型的重复性以及稳定性进行了一系列的检测实验. 将 w^{1118} 与

tin³⁴⁶/Tm3 杂交得 F₁ 代 *tin³⁴⁶/+*, *w¹¹¹⁸* 与 *pnr^{xs6}/Tm3* 杂交得 F₁ 代 *pnr^{xs6}/+*, 分别收集 *w¹¹¹⁸*、*tin³⁴⁶/+*、*pnr^{xs6}/+*、*kcnq¹⁸⁶* 基因型的果蝇 100 只于 25 °C 恒温培养至一周龄, 利用心力衰竭模型对它们进行心衰率检测, 重复 3 次(表 1)。检测到的心衰率与 R. Bodmer 等报道结果一致 [3,12,14], 说明本次建立的心力衰竭模型稳定性和重复性都很可靠。*w¹¹¹⁸*、*tin³⁴⁶/+*、*pnr^{xs6}/+*、*kcnq¹⁸⁶* 基因型的果蝇将作为每个缺失系心衰率检测的对照。

表 1 各对照品系心衰率的检测结果
Table 1 Heart failure rate of control lines

Genotype	Heart failure rate/(%)
<i>w¹¹¹⁸</i>	25
<i>tin³⁴⁶/+</i>	42
<i>pnr^{xs6}/+</i>	53
<i>kcnq¹⁸⁶</i>	75

2.2 果蝇 2 号染色体缺失系心力衰竭率的筛选结果

共获得果蝇 2 号染色体缺失系 164 个, 其基因型和缺失区段可在 <http://flybase.org> 网站中查到, 164 个品系覆盖了 2 号染色体 95% 的区段。我们对这些缺失系也分批次扩大培养, 每一杂交 F₁ 代收集 100 只果蝇培养一周龄后进行心力衰竭检测实验, 心衰率的数据如表 2 所示。与 *w¹¹¹⁸*、*tin³⁴⁶/+*、*pnr^{xs6}/+*、*kcnq¹⁸⁶* 对照分析比较并进行统计学分析, 得到候选缺失品系共 33 个, 它们分别是 7834、8000、7836、7539、7835、8900、8930、7798、7864、7503、7852、9223、8044、9181、7886、9158、7853、7496、9185、9060、7489、7507、9353、8944、9271、7803、7518、9176、7493、7782、9061、7912、7543。

表 2 果蝇 2 号染色体缺失系心力衰竭率
Table 2 Heart failure rate of the 2nd chromosome deficiency lines

												/(%)			
Df. No.	Df/+	Df/ <i>tin³⁴⁶</i>	Df/ <i>pnr^{xs6}</i>	Df. No.	Df/+	Df/ <i>tin³⁴⁶</i>	Df/ <i>pnr^{xs6}</i>	Df. No.	Df/+	Df/ <i>tin³⁴⁶</i>	Df/ <i>pnr^{xs6}</i>	Df. No.	Df/+	Df/ <i>tin³⁴⁶</i>	Df/ <i>pnr^{xs6}</i>
7906	31	34.2	41	8930	36	57.1*	37.2	7872	48	56	42	8041	35.3	42	60
7846	41.5	38	37	7805	40	57.6	42	7903	34	46	42	7830	41.2	41.7	49
7796	29	33	36.3	7539	41.9	66.7*	45.7	7502	56	46	60	6963	30.4	41.2	45.8
8040	30.2	35	40	7864	48	68*	34	7853	36	60*	42	9268	34	50	48
7802	35.1	39.5	43	7506	52	60	38	7895	34	30	40	7794	35	36	50
7890	33	36	44.3	9189	40	58	46	7496	46	70*	42	7863	48.1	44.4	56
7916	37.6	45	38.6	7883	38	46	44	9185	42	76*	46	7839	37.5	40	40
7799	36	48	32	7879	50	58	54	9191	36	54	48	7912	36	56	50
7810	36	38	42.3	7503	28	76*	36	9177	30	58	40	7557	34	46	54
7837	40	34	52.7	7548	36	54	60	7489	34	68.2*	56.8	9343	42	48	58
7834	43.6	68.3*	55	7545	48	58	48	7507	21.2	61.1*	39.2	9272	30	46	52
7784	41	53	66	7816	40	44	24	7998	63.2	74.5	75.4	7528	32	38	46
7835	41	46	29*	7852	40	62*	60	8940	39.6	49.1	69.5	9064	40	48	48
8900	48	50	28.8*	7792	42	34	40	9066	67	67.2	67.3	8042	44	52	56
7418	38	43.1	50	9190	26	32	28	9187	25	53.8	64	7826	36	46	56
7815	42	35	39	7750	36	56	48	9353	31.6	70.2*	51.2	7851	42.9	48	49
7896	42.8	43.4	37.5	7511	36	44	38	9222	48.1	48	28.8	7749	46	40	50
7801	44	35	37.2	7898	34	40	38	7803	51	64.2*	22	9186	40	42	50
7844	43	28	73.7	7492	46	52	42	8043	48.1	59.6	45.5	8909	35.2	40	51
7843	32.5	40.1	42.2	7494	30	46	34	7518	31.5	45.1	17.9	9193	31.4	38	48
7819	42	36.7	52	8946	32	34	38	9062	53.5	76.9	33.9	7748	30	42	50
7497	42	45.8	54	7785	32	48	32	8944	33.9	61.1*	46.2	7779	33.3	36	46
8000	46	76*	58	7515	54	62	38	9176	33.3	49.1	22.7	9273	44	40	48
7804	36	42	54	9060	40	60*	40	9271	31.3	64.7*	24	9278	30	42.8	43.4
7913	44	31	44.6	9223	32	58*	40	9684	38.1	41.7	56.8	7870	40	42	52
7885	40.4	40.4	50	7867	40	50	52	7782	42	56.8	66	8931	46	41.8	39.8
7811	48	42.8	42	8044	26	56*	36	8939	30.2	41	51	7551	50	48	49
7838	42	25.5	35.4	8045	40	60	44	7862	28.5	38.4	51	7535	39.3	40	49
7807	34	40	37.2	9181	30	60*	40	7561	30.6	38	47.7	9340	26.7	36	40
7812	37.5	33.3	59.5	7886	24	54*	56	9061	37.5	52.5	60	7787	40	50	52.4
7813	47	40	37.2	9183	46	54	52	7869	29.4	40	51.1	9192	35.7	42.9	46.9
7809	41.6	51	51	9276	52	62	54	9274	38	48	58	7543	33	58.6	46
7774	27.2	39.6	33.3	7793	40	46	40	7776	34	42	54	9344	37.5	43.7	48
8679	38	38	47.5	7877	46	54	42	7855	41.6	39.5	51.2	7558	42.8	47.1	60
7800	40	50	38	7821	50	36	56	7797	34	40	50	8911	33	47	42.8
7836	22.6	54.7*	43.9	7510	36	40	40	8677	48	40	52	7840	42.8	44	57.1
7559	48	53	46	9158	30	50*	36	9297	32	40	46	7860	37.5	45	53
7790	46	46	42	8901	28	40	42	7775	36	47	39	7532	25	37.8	42
7798	38	57.4*	46.1	7524	26	38	40	8945	32	50	52	7873	26	35	47
7822	32	50	44	9266	34	50	40	8915	38	40	54	7780	33.3	43	55
								7419	42	38	54	7814	38	42.6	49
								9342	26.5	41.2	42	7530	28.6	39	44

Notes: *: P<0.01.

3 讨论

我们总共筛选了 164 个果蝇第 2 号染色体缺失系, 得到 33 个候选缺失系. 我们在订购品系过程中, 对于含有相同缺失区段的品系选择缺失区段更小的品系, 以期覆盖第 2 号染色体绝大部分区段. 在品系订购过程中以及后来的培养过程中极个别品系出现死亡情况, 因此这 164 个缺失系虽未能将第 2 号染色体的全部区段所覆盖, 但至少已经覆盖了第 2 号染色体的 95% 的区段.

候选缺失系的缺失片段中, 少则缺失几个基因多则缺失几十个基因, 如何从这些基因中确定某个或某些基因是候选基因是一个有待进一步研究的问题. 我们的目的是从候选缺失系中确定候选基因, 因此在得到候选缺失品系之后, 可利用 www.flybase.org 查找这些缺失品系缺失片段中所覆盖的基因, 根据生物信息学的原理, 大量检索候选基因的表达、生化功能和已有生物功能的信息, 从候选缺失系中确定候选基因. 通常, 胚胎期与心脏发育相关的基因往往在成体也会与心脏功能相关. 另外, 如果其人类同源基因或脊椎动物同源基因被证明与心脏疾病或心脏发育相关, 也被选定为候选基因. 然后订购这些候选基因的 RNA 干扰品系和完全突变品系, 检验它们的心力衰竭率, 再通过心脏生理功能分析系统和成体荧光心脏跟踪系统进一步检测这些候选基因的突变系的心脏表型和功能缺陷, 从而证明它们在心力衰竭和成体心脏中的具体功能与作用机制.

总之, 我们利用心力衰竭果蝇模型筛选了覆盖果蝇第 2 号染色体的 95% 区域的缺失系, 获得了 33 个表现心力衰竭频率高的候选品系, 该工作为进一步鉴定出第 2 号染色体上与心率衰竭发生相关的基因奠定了基础.

参考文献(References):

- [1] 吴秀山. 心脏发育研究[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社. (WU Xiu-shan. Research on Heart Development[M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press), 2004.214-241.
- [2] 蔡振宇, 袁葵洲, 吴秀山. 心肌内皮信号途径在心脏发育中的作用[J]. 生命科学研究(CAI Zhen-yu, YUAN Wu-zhou, WU Xiu-shan. The role of myocardial endothelin signal pathway in heart development[J]. Life Science Research), 2003, 7(2): 6-11.
- [3] OCORR K, REEVES N, WESSELLS R, *et al.* KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in *Drosophila* that mimic the effects of aging[J]. Proc Natl Acad Sci, 2007, 104(10): 3943-3948.
- [4] PATERNOSTRO G, VIGNOLA C, BARTSCH D U, *et al.* Age-associated cardiac dysfunction in *Drosophila melanogaster* [J]. Circ Res, 2001, 88(10): 1053-1058.
- [5] BODMER R. Heart development in *Drosophila* and its relationship to vertebrate systems[J]. Trends in Cardiovascular Medicine, 1995, 5(1): 21-27.
- [6] BODMER R, FRASCH M. Genetic Determination of *Drosophila* Heart Development[M]// HARVEY R P, ROSENTHAL N (Eds). Heart Development. New York: Academic Press, 1999.65-90.
- [7] HARVEY R P. NK-2 homeobox genes and heart development [J]. Dev Biol, 1996, 178(2): 203-216.
- [8] AZPIAZU N, FRASCH M. *Tinman* and *bagpipe*: two homeobox genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*[J]. Genes Dev, 1993, 7(7B): 1325-1340.
- [9] BODMER R, WESSELLS R J, JOHNSON E C, *et al.* Heart Development and Function [M]// GILBERT L I, IATROU K, GILL S (Eds). Comprehensive Molecular Insect Science. California, USA: Academic Press, 2005.199-250.
- [10] CRIPPS R M, OLSON E N. Control of cardiac development by an evolutionarily conserved transcriptional network[J]. Dev Biol, 2002, 246(1): 14-28.
- [11] CHIEN K R, OLSON E N. Converging pathways and principles in heart development and disease: CV@CSH [J]. Cell, 2002, 110(2): 153-162.
- [12] WESSELLS R J, FITZ GERALD E, CYPSEY, *et al.* Insulin regulation of heart function in aging fruit flies[J]. Nat Genet, 2004, 36(12): 1275-1281.
- [13] WESSELLS R J, BODMER R. Screening assays for heart function mutants in *Drosophila*[J]. Biotechniques, 2004, 37(1): 58-60.
- [14] QIAN L, MOHAPATRA B, AKASAKA T, *et al.* Transcription factor *neuromancer/TBX20* is required for cardiac function in *Drosophila* with implications for human heart disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(50): 19833-19838.
- [15] JENTSCH T J. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease[J]. Nat Rev Neurosci, 2000, 1(1): 21-30.
- [16] WEN H, WEIGER T M, FERGUSON T S, *et al.* A *Drosophila* KCNQ channel essential for early embryonic development[J]. J Neurosci, 2005, 25(44): 10147-10156.