

Int J Med Sci | 斑马鱼模型首次证实TIE2基因突变可导致多种畸形

2018年2月12日，《Int J Med Sci.》杂志在线发表了上海交通大学附属第九人民医院-口腔颌面-头颈肿瘤科王延安课题组的合作成果“Transgenic Expression of A Venous Malformation Related Mutation, TIE2-R849W, Significantly Induces Multiple Malformations of Zebrafish”，首次在斑马鱼体内实验证实：人类TIE2基因突变（TIE2-R849W突变体）会导致斑马鱼尾部静脉融合、颌面骨骼缺陷、眼睛发育缺陷等多个表型。本研究中斑马鱼模型的构建和表型分析、信号通路分析等实验是在上海南方模式生物斑马鱼平台完成。

2018年2月12日，《Int J Med Sci.》杂志在线发表了上海交通大学附属第九人民医院-口腔颌面-头颈肿瘤科王延安课题组的合作成果“Transgenic Expression of A Venous Malformation Related Mutation, TIE2-R849W, Significantly Induces Multiple Malformations of Zebrafish”，首次在斑马鱼体内实验证实：人类TIE2基因突变（TIE2-R849W突变体）会导致斑马鱼尾部静脉融合、颌面骨骼缺陷、眼睛发育缺陷等多个表型。

研究背景

- 静脉畸形（Venous malformation, VM）是一种血管形态发生缺陷。在遗传性静脉畸形——多发性皮肤粘膜静脉畸形（VMCM）中发现，TIE2基因第2545位碱基C>T导致在胞质内结构的第849位氨基酸R>W突变，是最为常见且独特的突变，被认为是致病的关键。
- TIE2或TEK（内皮特异性受体酪氨酸激酶（RTK））是调节血管生成和心血管发育的重要组成部分，因此TIE2和VM之间的关系备受关注。虽然早前的体外研究发现TIE2-R849W导致突变TIE2的组成型配体非依赖性超磷酸化，从而激活下游信号通路并增强相应的细胞功能，但TIE2-R849W在体内是否直接导致临床的遗传性静脉畸形表型，至今尚无相关动物模型来证明。
- 由于Tie2敲除纯合子小鼠胚胎致死、血管网畸形导致内皮细胞显著减少、以及心脏缺陷，因此转基因小鼠模型的可行性仍值得考量。为更直接快速地研究TIE2点突变在体内的机制，斑马鱼模型提供了一个稳妥简洁的体内研究系统。

斑马鱼模型可以：

- 快速过表达人类同源基因（突变体或者野生型）
- 早期胚胎通体透明，便于靶器官观察

- 体外发育迅速

- 便于大规模遗传学操作

因此，在斑马鱼中建立TIE2-R849W过表达模型可快速观察潜在表型。

研究结果

构建人TIE2-R849W突变质粒，将TIE2-R849W突变mRNA通过显微注射操作，注射到单细胞期fli1a:EGFP血管绿色荧光转基因斑马鱼胚胎中，建立人突变TIE2-R849W过表达斑马鱼模型（图1A-B）。结果发现，表达了突变的TIE2后，斑马鱼尾部静脉丛（caudal vein plexus, CVP）不能正常形成蜂窝状结构，具有明显缺陷（图1C-D）。定量结果显示，表达突变TIE2-R849W的斑马鱼CVP面积与环数减少了约50%（图1E-F）。说明TIE2-R849W突变对早期血管生成具有直接作用。

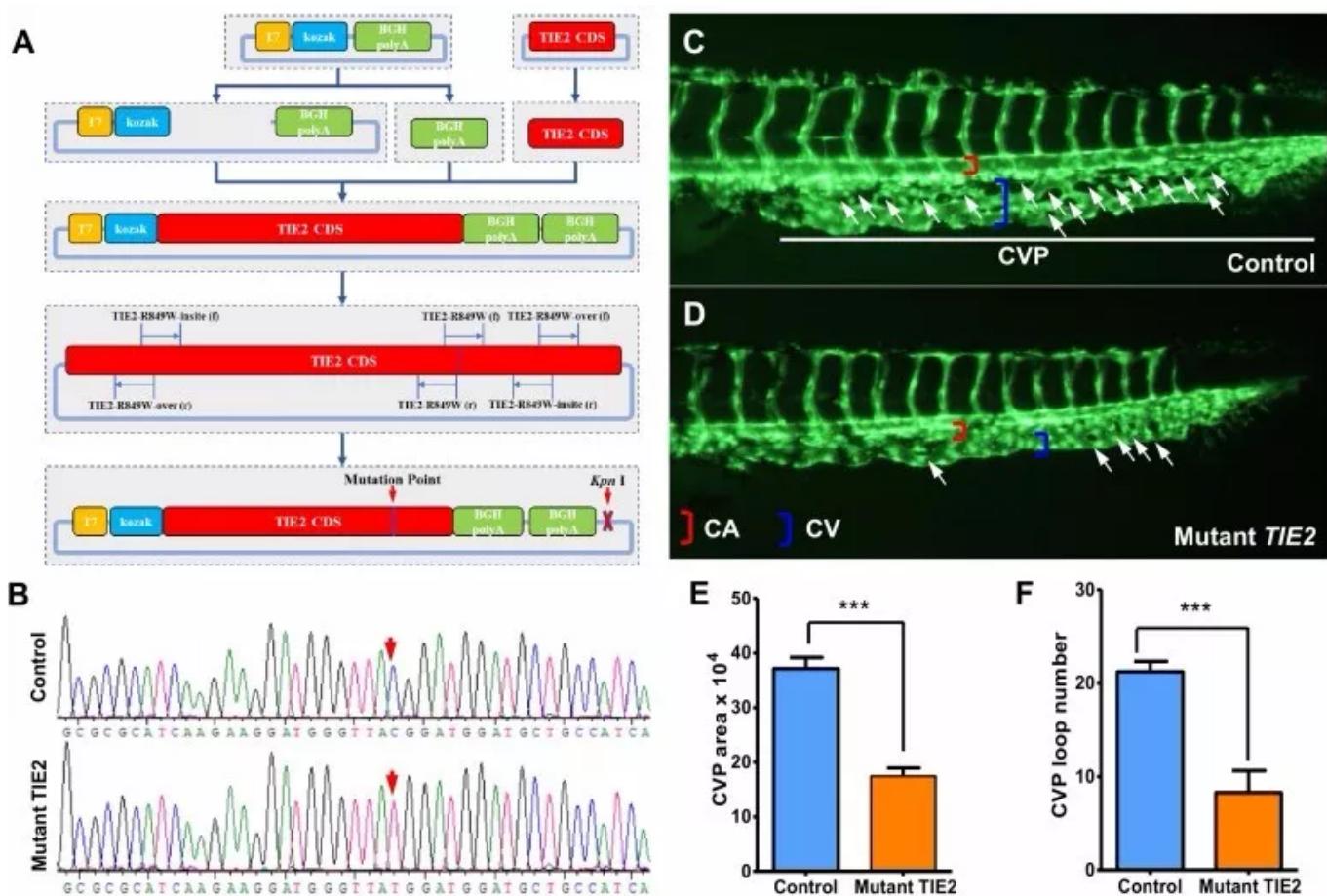


图1. 人源TIE2-R849W过表达斑马鱼模型建立与CVP缺陷表型。

随着斑马鱼发育，TIE2-R849W的表达还引发了严重的眼部缺陷。从背侧和腹侧看，明显存在单侧或双侧无眼鱼（图2A）。与对照组相比，在受精后52小时（hpf），TIE2-R849W组有58.5%（42/73）发生不同的眼部缺陷（图2A-B）。由于TIE2-R849W导致的严重畸形（眼部及下文所示的其它畸形），TIE2-R849W过

表达斑马鱼死亡率非常高、且生长困难，因此无法用成年斑马鱼来进行常规的组织切片观察。故而在7dpf收集斑马鱼幼鱼，进行组织学分析，发现与对照组相比，TIE2-R849W表达导致斑马鱼眼睛明显缩小（图2C）、晶状体损伤（用绿色星号表示），异常网状层（用黄色星号表示）和仍然可辨认的分离层结构。

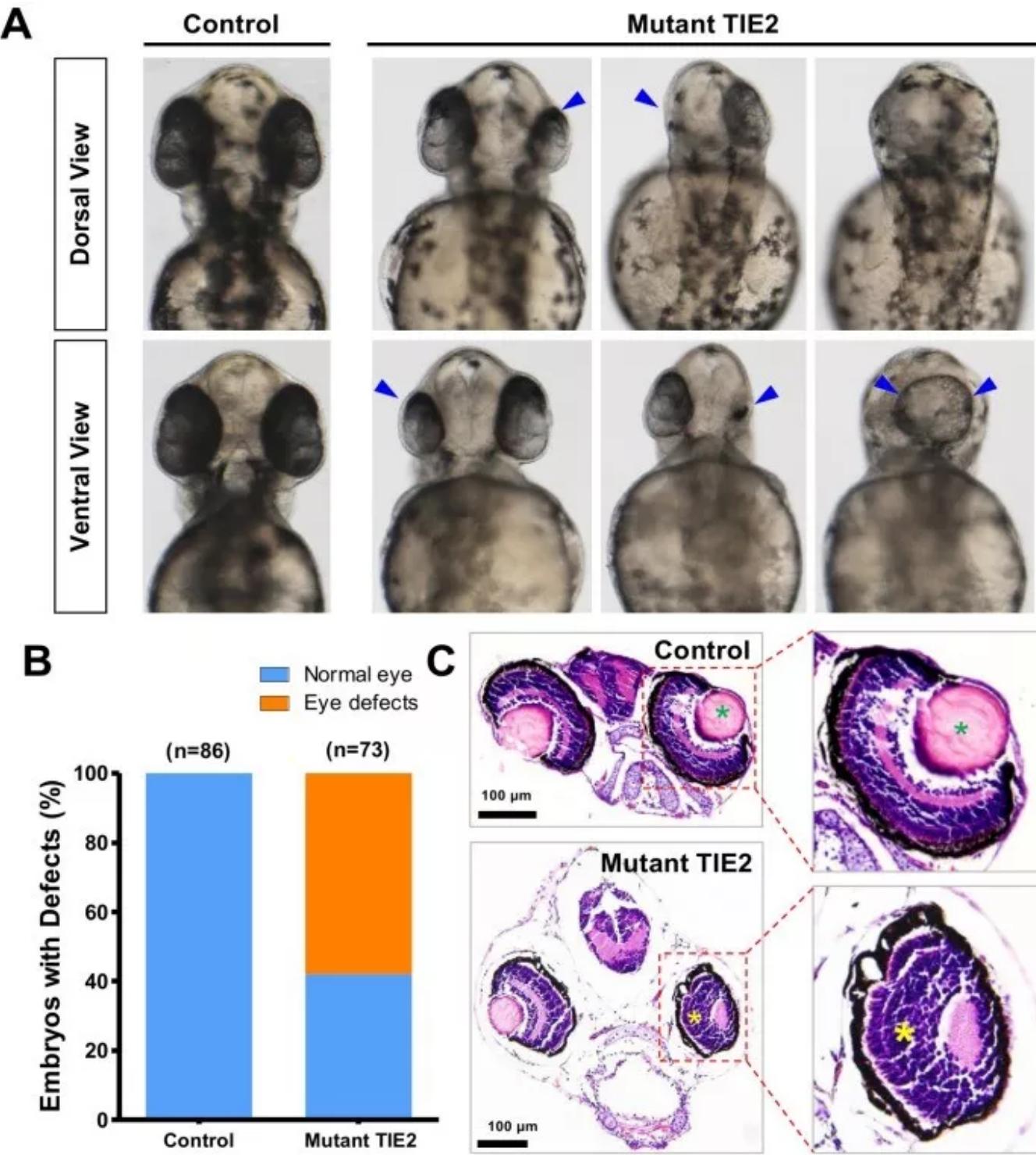


图2. 人TIE2-R849W突变体引起斑马鱼明显的眼部缺陷。

除了眼部缺陷之外，TIE2-R849W突变组（n = 55）7dpf时，还观察到显著的前脑和下颌畸形，而对照组的胚胎全部可正常发育（图3A-D）。从剖面图比较（图3C-D），尽管前脑和下颌骨结构明显异常，不过鼓室

发育正常。此外，从形态学分析来看，TIE2-R849W突变体导致下颌向下前部发展、下颌宽度减小、整体形态异常和轻度双颌偏斜（图3E-F）。柱状图（图3G）显示与对照组相比，突变体组中25.4%的胚胎（14/55）表现出明显的发育性颌缺陷。对7dpf 斑马鱼头部的组织学研究发现，TIE2-R849W组斑马鱼下颌软骨异常延伸、脑内异位增生和神经胶质细胞的异常定位（图3H-I）。根据前人的研究，下颌和前脑缺陷表型暗示了TIE2和WNT信号通路之间可能存在重要联系。

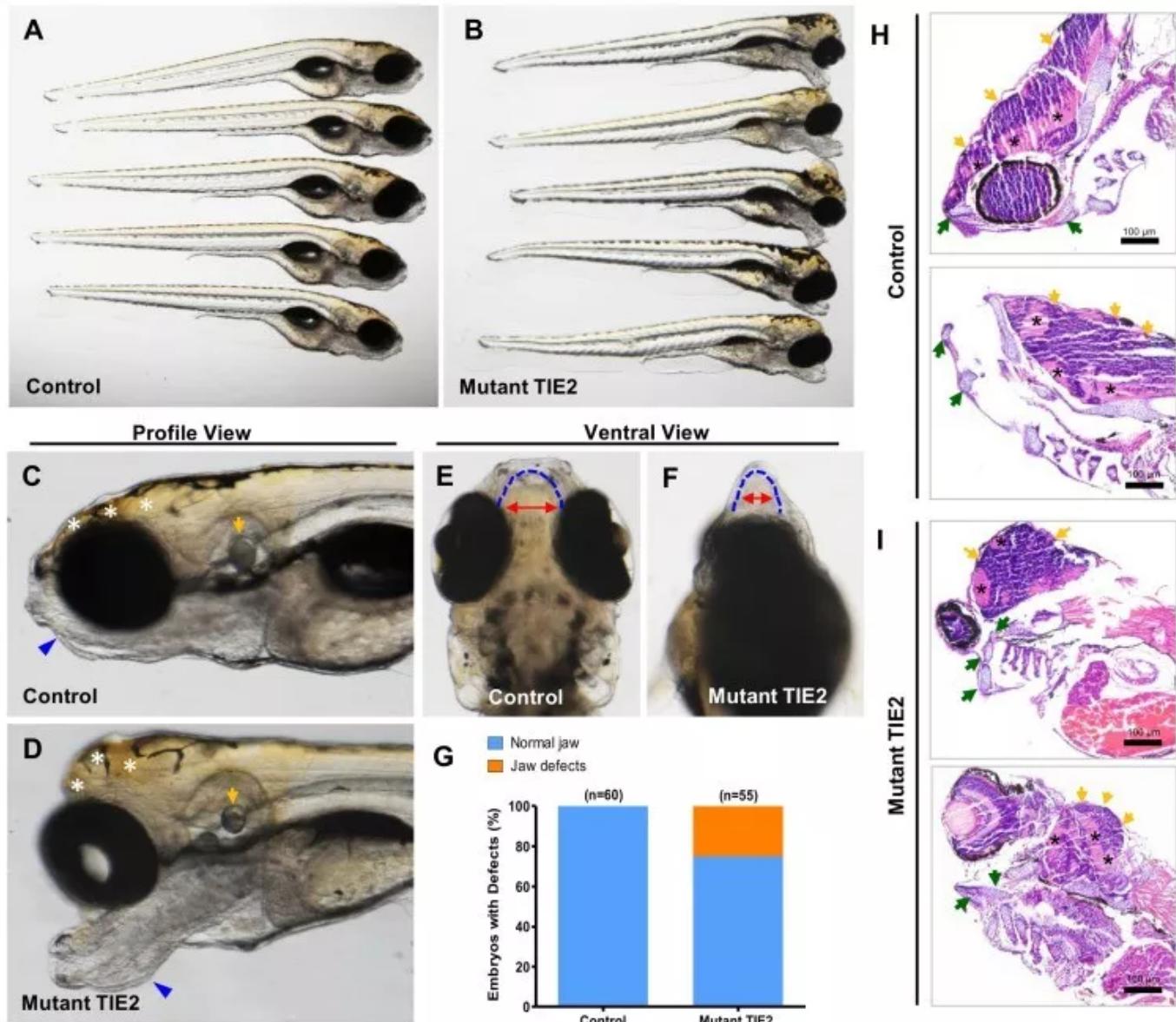


图3. TIE2-R849W突变导致前脑畸形和斑马鱼下颌异常发育延长。

对TIE2-R849W突变体过表达斑马鱼模型进行信号通路研究。结果发现，与之前的体外实验结果相一致，TIE2-R849W突变体过表达导致pik3r2和foxo1b表达上调（图4A）；与CVP相关的转录因子egfl7有明显上调，而cd146，nr2f1a和s1pr1的表达与对照组相比没有显著差异（图4B）。说明egfl7在TIE2-R849W突变导致的静脉畸形中可能发挥重要作用。

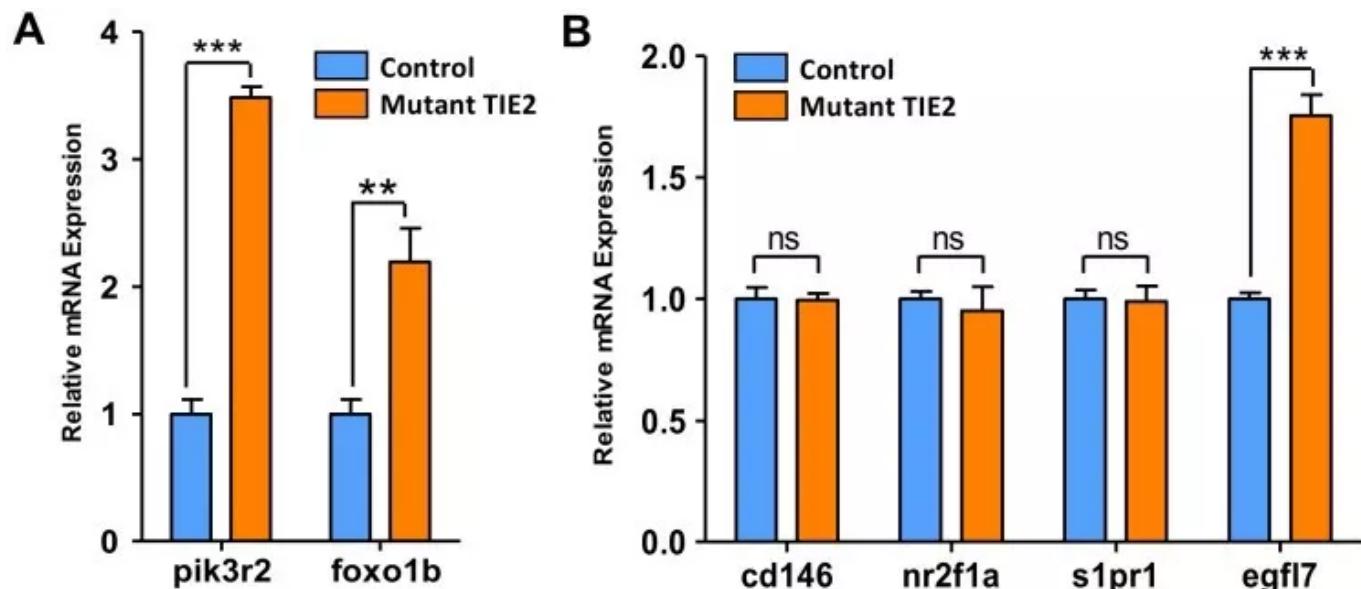


图4. 通过qRT-PCR检测pik3r2, foxo1b和CVP相关基因在突变组与对照组中的表达水平。

分析与前脑畸形相关的wnt途径相关基因的表达水平（图5A）发现，包括wnt8a、gsk-3 β 、dkk1b、 β -catenin在内的几乎所有被测基因都有显著上调。由这些结果，总结出图5B所示信号通路示意图。Wnt信号通路下游 β -catenin的高表达可能是各种畸形产生的基础。这意味着TIE2-R849W突变体对WNT信号的调节不仅通过磷酸化的PI3K30，而且上调WNT。对早前的一项研究中分别表达野生型TIE2和多种VM致病突变体TIE2的HUVEC细胞基因芯片表达谱（GSE46684）进行分析（图5C），在突变体-1组中，pik3、egfl7、foxo1、wnt9a、lrp5和dkk1均有较高水平的表达。然而，与对照组相比，突变体-2和突变体-3则没有显著差异。

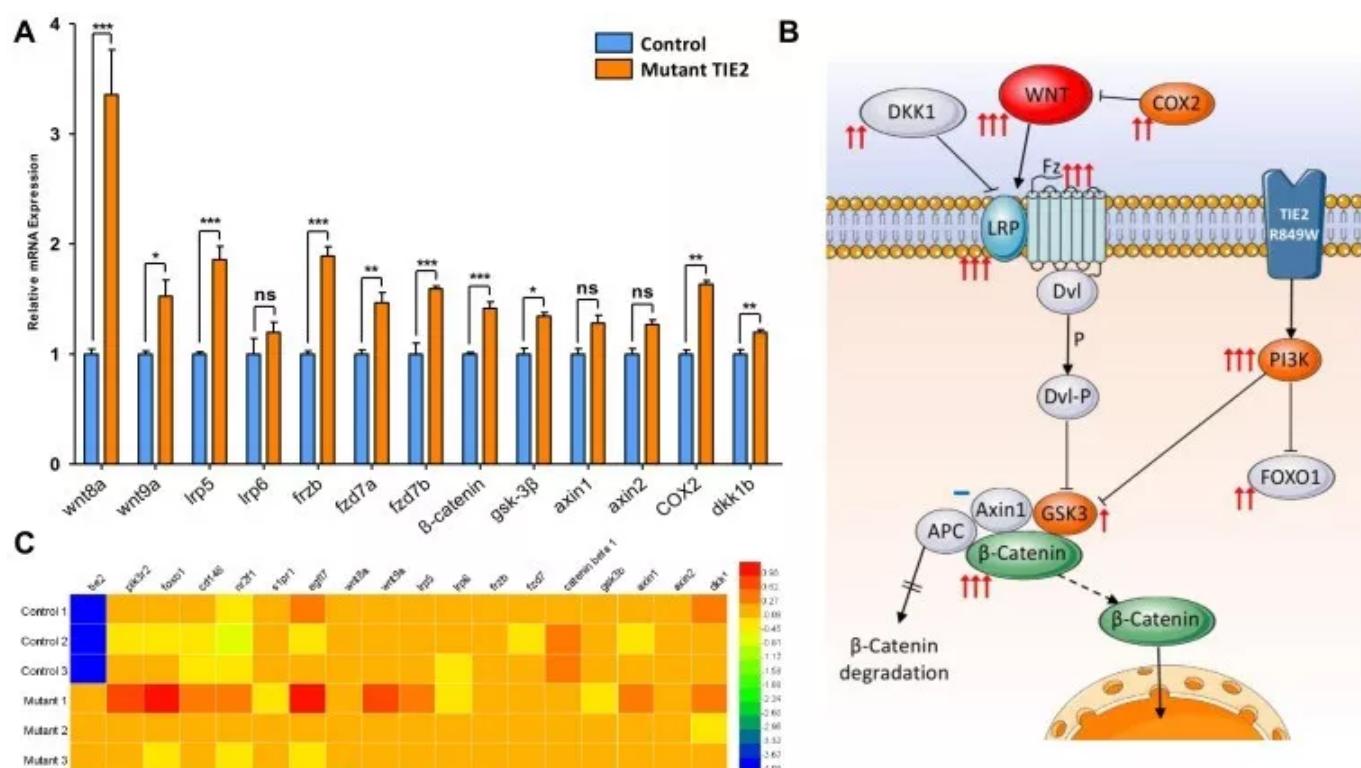


图5. 通过qRT-PCR和芯片分析wnt相关基因的表达水平。

此项研究首次在斑马鱼体内实验证实：人类TIE2基因突变（TIE2-R849W突变体）会导致斑马鱼尾部静脉丛异常融合，还导致斑马鱼眼部、前脑、下颌发生严重畸形。结合对相关信号通路的分析结果，体内外实验都指出EGFL7和WNT信号通路在TIE2-R849W相关的调控途径中发挥重要作用。然而，要阐明具体作用机制，仍需进一步深入研究。

[**全文下载**](#)