

貳、緒論

1.先天性心臟病

正常人的心臟位於胸腔的左側，由心臟中膈分成左、右心房及左、右心室。左心房接受來自肺部的鮮血(充氧血)，經由左心室及主動脈，送到全身，提供體內各細胞所需的養分、及氧氣。由上、下腔靜脈流回來的靜脈血(低氧血)經右心房、右心室及肺動脈到肺部行氣體交換，此過程交換新鮮的氧氣，再回到左心房，如此週而復始。心臟接受靜脈血回來，並將動脈血打出去，是人體血液循環的幫浦。由於心臟的構造甚為複雜，在發育的過程中，只要稍有差錯，極有可能產生心臟的缺失，一般稱為先天性心臟病，換句話說，就是與生俱來的心臟構造異常。即胎兒心臟形成受阻，發育不正常所造成的。根據現有的資料顯示，在世界各地先天性心臟病的罹病率皆非常相近，大多為千分之 6.25 至千分之 10.45。在死產兒的報告，先天性心臟病的罹病率約為 3.2 至 3.4%(Chiu I.S., 1988)。根據 1976 年就新莊地區國民中小學學童 10,321 人及隨機抽樣台北市民 9,425 人作調查，發現每約 1,000 名學童患有先天性心臟病者 2.4 人；每 1,000 名住民中有 2.5 人，無男女差別(Lue H.C., 1976)。呂,孟,沈等台大醫院等十個醫院小兒心臟醫師於 1986 至 1989 年就台北市國小，國中及高中學生做全面的心臟篩檢，所獲罹病率為千分之 3.9 至 5.1(Lue H.C., 1986)。歸

究先天性心臟病其原因可能是綜合環境和遺傳的因素造成的，環境方面有放射線照射、病毒感染、藥物服用、荷爾蒙及母親的糖尿病、高齡產婦等；遺傳方面如基因或染色體的異常，無論如何先天性心臟病的發生跟基因調控發生了缺失脫不了關係。但由於實驗材料的關係，要研究人的心臟發育的調控不甚方便，目前的資料也顯示，人、老鼠、蛙、果蠅在許多控制發育的基因調控上有著相當的保守性，如 Hox gene 控制前後體節的分化，在許多動物上是有相當的保守性，以其他物種來研究發育基因的調控已被廣泛使用其中果蠅被用來當動物模式已近百年，由於果蠅易於繁殖、生活週期短、突變株眾多、可使用遺傳方法多，再加上果蠅的基因體計畫的完成，多顯現出果蠅在當模式動物的好處，用來研究心臟發育的基因調控亦是個相當便利的模式動物，而心臟發育的調控基因已被證實具有基因的保守性(Park et al., 1998)，在型態發生上果蠅與脊椎動物的心臟也有許多類似之處 (Cripps and Olson, 2002)。

2. 果蠅的心臟發育過程：

果蠅為無脊椎動物，屬於開放性循環系統，其心臟或稱背血管位於背中線被表皮所包覆著，其位置由胸節(T₂)到腹節(A₇)，主要功能為提供營養、循環、過濾 hemolymph，和脊椎動物不同的是運送氧氣的功能，昆蟲是由氣管系負責。果蠅心臟由中胚層(mesoderm)衍生而

來，中胚層的產生為一個關鍵的基因 *twist* 調控，在中胚層進一步分化的過程中，*twist* 會呈現模組化的條紋區域 (strip)，每一節有所謂的高度表現的 *twist* 區及低度表現的 *twist* 區，高度表現的 *twist* 區將來會分化為 somatic mesoderm (body wall muscle fate 及 heart)，低度表現的 *twist* 區域分化為 gut muscle and fat body fate，不過在晚期中胚層的分化除 *twist* 外尚需許多基因的參與(Furlong et al., 2001)，在發育時期 Stage 12 embryo 由 somatic mesoderm 分裂出兩列中胚層細胞 (左右各兩列) 這些細胞即為 primordium of the dorsal vessel。Stage 13 embryo 的 primordium of the dorsal vessel 往背部移動到外胚層 (ectoderm) 之下，這二列細胞分化出不同的型態，靠背部的一列細胞(cardioblasts)長的較為立方且排列整齊靠後端細胞衍生為瓣膜 (cardiovascular valve)及 Ostium，外側一列細胞(pericardial cells)較為圓形且稍為不規則排列而靠前端 (anterior) 部分衍生為 primodium of the lymph gland，在 dorsal closure(Stage 17)這兩列 (左右各二) 細胞相互接觸融合成為 dorsal vessel 即為果蠅的心臟，在脊椎動物心臟發育的前期基本上與果蠅心臟有類似的過程，心臟均是由中胚層的兩側形成並於中線部分癒合成管狀，除了果蠅心臟的形成靠背側、脊椎動物心臟形成靠腹側，不過到後期脊椎動物通常還會有進一步的捲曲、形成腔室，在心臟收縮的功能上，果蠅與脊椎動物的心臟包括單核的心肌

細胞，這些心肌細胞有著連接在 intercalate discs 的 myofilament，無論是在功能上、型態上、器官形成的過程中，果蠅都是很好的動物模式研究心臟發生。(Andree et al., 1998; Cripps and Olson, 2002)

3. tinman 參與果蠅心臟發育形成：

Tinman gene 為 homeobox gene 可轉譯為一個 homeodomain transcription factor，homeobox genes 往往在發育上扮演重要的角色，這群基因所產生的蛋白質皆包含一個約 60 個氨基酸的序列，其二級結構構成一個 helix-turn-helix loop 的 DNA binding domain，編碼此 domain 的 DNA 序列稱為 homeobox，含 homeobox 的基因常是控制動物體節的分化，不同的物種間從果蠅到脊椎動物都可以找到這一群具保守性的 homeobox genes，在基因的表現上也有著相似的類型(Lewis Wolper, 2002)。在基因的表現層次上，tinman 最早出現在果蠅胚胎發育 stage 4，stage 5 廣泛的分佈於中胚層(mesoderm)，stage 9 漸漸局部表現於背側中胚層(dorsal mesoderm)，此處細胞將來發育成為心臟、midgut musculature 及背側肌肉。若失去 tinman gene 的功能則會造成沒有背血管先驅細胞 (dorsal vessel precursor) 產生，midgut musculature 缺失，甚至背側肌肉也無法形成，但鄰近的 somatic mesoderm 及 fat body 卻不受其影響，也就是說本來要變成背側中胚層的部分，卻變成了腹側的細胞及側邊的肌肉壁或是經歷了細胞死亡

的階段(Yin and Frasch, 1998), *tinman* 突變株於胚胎發育的末期死去，此可能為胚胎缺乏心臟發育以致於喪失循環功用的緣故，這顯示 *tinman* 的功能對於果蠅的背側中胚層 (dorsal mesoderm) 組織如：心臟，發育必須的，但 *tinman* 不像果蠅眼睛發育的關鍵基因 *eveless*，ectopic expression 會到處表現眼睛，單獨 ectopic expression of *tinman* 卻不會產生心臟，由此可見 *tinman* 的表現在心臟發育是必須的，但心臟發育的過程並不是只有 *tinman* 單獨作用，需要有其他基因的參與協同作用，由於 *tinman* 的突變株往往於胚胎時即死去，故有關 *tinman* 是否有生理上的功能則是未知的(Knirr and Frasch, 2001; Lockwood and Bodmer, 2002; Patterson et al., 1998; Yin and Frasch, 1998)。

Tinman 基因於各類動物上均有著極高的保守性，在脊椎動物中，可以找到一群同源基因 *NKX2.5* group，此基因突變亦會造成心臟發育上的缺失，在 *tinman* 突變的果蠅中，visceral mesoderm 的缺失可被 *NKX2.5* 所補償(Park et al., 1998)，相反的在野生型果蠅中若大量表現 *NKX2.5* 卻會抑制心臟的發育，這顯示 *NKX2.5* 與 *Tinman* 競爭相同的作用位，但 *NKX2.5* 卻不能補償 *tinman* 突變株的心臟的發育，在其他脊椎動物如：*Xenopus* 使用 *tinman* 相似基因 *XNkx2.3*、*XNkx2.5* dominant negative inhibitor 的方式也抑制了 *Xenopus* 的心臟發育(Sparrow et al.,

2000), *Tinman* 對心臟發育的作用是需要其他因子共同協助, 以上雖然顯示出 *Tinman* 與 *NKX2.5* 在基因調控心臟發生中在演化上已有著分歧, 但基本上果蠅及脊椎動物在心臟發生的調控上有著相當的保守性(Holland et al., 2003)。

***Tinman* 於胚胎發育的表現情形 (Fig.1) :**

Tinman 最早出現於 stage 4 時期, 其出現於 cellular blastoderm , stage 5 時期, mesoderm 在胚胎的腹面特化產生, 此時 *tinman* 表現於整個中胚層部分, 在 stage 8 時期, 中胚層沿著外胚層整個 invaginate、spread 在背部的位, 在 stage 9 時期 *tinman* 的表現受到 *dpp* single 的限制於背部中胚層(dorsal mesoderm)的部分, 此時腹側部分的 *tinman* 表現已經消失, 在 stage 11 時期, 腹部中胚層先驅 (visceral mesoderm precursors) 移至胚胎的內層, *Tinman*-expression heart precursors 較靠近上表皮部分。在 stage 12 時期, 發生 dorsal closure , 不同的心臟先驅細胞開始聯合在一起形成 管狀的直列背血管, 此時的 *tinman* 開始侷限在每一節六個心肌細胞及圍心細胞的各只表現四個。在 stage 17 時期, 特化成功的背血管位於被中線下。(Cripps and Olson, 2002)。

***Tinman* 參與著許多調控路徑控制果蠅胚胎中胚層的分化:**

I. 在 Stage 5 時期 *tinman* 首先被偵測到於中胚層表現, 此時 *tinman*

的 180 bp enhancer 包括 E-box 序列，此序列直接受到 basic helix-loop-helix protein *Twist* 接合、活化，*Twist* 為促使中胚層發育的關鍵基因，藉由 *Twist* 的活化，*Tinman* 開始表現於中胚層，並開始促成中胚層進一步的分化為 dorsal mesoderm、visceral mesoderm(Lee et al., 1997; Yin et al., 1997)。

II. stage 8 時期，*tinman* transcription 局限於 dorsal mesoderm，而 dorsal mesoderm 將來會發育為 cardiac、visceral muscle，此時的 *tinman* 受到 *Decapentaplegic (dpp)* (屬 bone morphogenetic protein family BMP) 的間接活化，*Dpp* 為一分泌性蛋白，從 dorsal ectoderm 分泌的 *Dpp*，其功能可能是讓心臟特化表現在中胚層的背側位置，此時 *tinman* 的表現亦會受到 *tinman* 自身的調控，*tinman* 的表現亦受到 *dpp* 的維持，且在 visceral mesoderm 的一些細胞，*tinman* 活化了 *bagpipe* 促使了 visceral mesoderm fate(Lockwood and Bodmer, 2002; Yin and Frasch, 1998)。

III. 一個分泌性的蛋白質 *Wingless(Wg)*(與脊椎動物的 *Wnts* 類似)，從 ectoderm 產生，缺乏 *Wg* 功能就沒有 dorsal vessel 產生，在中胚層裡，*Wg* 的功能是促成背血管的特化，表現在外胚層的 *Wg* 卻與心臟形成的決定有關，*Wg* 與之前提及的 *Dpp* 可能透過相同的方式促成果蠅背血管的產生，在 stage 9~11 時，兩者分泌性蛋白

Dpp、*wg* 依序的表現，兩者表現在外胚層其表現的重疊區域其下的中胚層為 *Tinman* 表現的所在，其共同促進 *Tinman* 於中胚層的表現，間接使心臟先驅特化，若異位表現 *Tinman* 於 *Wg*、*Dpp* 表現的外胚層也促使外胚層異位表現心臟的細胞命運，暗示此兩個分泌蛋白經由 *tinman* 讓心臟表現在中胚層的位置及特化(Azpiazu and Frasch, 1993; Bodmer, 1993; Lockwood and Bodmer, 2002)。

IV. *heartless(htl)* FGF receptor gene 與 *U-shape(ush)* 有著 genetic interaction，共同控制著 mesodermal migration，若無法進行 mesodermal migration，無法使中胚層細胞收到外胚層的訊號 *Dpp*，於是造成 dorsal mesoderm 無法產生，*Tinman* 也無法直接受到 *Dpp* 的活化，此外 *ush* 亦扮演另一個角色，其調控著 *Pannier(pnr)* 表現，而 *Pnr* 亦受到 *Tinman* 的直接調控，與 *Tinman* 共同促進心臟細胞的特化有關(Beiman et al., 1996; Carmena et al., 1998; Michelson et al., 1998a; Michelson et al., 1998b)。

V. sloppy-paired locus 的兩個 gene：*slp-1, slp-2* 受到 transcriptional regulator *Pangolin*(此基因受到 *Wg* 活化)在中胚層直接活化，在中胚層中 *Slp* 藉著 *Tinman* 及 *Dpp* 間接去 down-regulation *Bagpipe*，*Bagpipe* 為促使 visceral mesoderm 產生的決定因子，dorsal mesoderm *Bagpipe* 的被抑制，促使此處的細胞命運不形成

visceral mesoderm 而是朝向背血管的形成的命運，在外胚層，*Slp* 維持著 *Wg* 的表現，間接促使心臟的形成，但其無法取代 *Wg* 在心臟發育的作用(Lee and Frasch, 2000; Riechmann et al., 1997; Yin and Frasch, 1998)。

Tinman 本身可接合於一 consensus sequence 5'-TYAAGTG-3'，且同時兼具活化及抑制轉錄表現的功能，就目前而言四個 *Tinman* 的目標基因已被鑑定出來：*tinman* 本身、*GATA* factor gene *pannier*、*dMef2* 和構造基因 *β 3-tubulin*，總歸來說以上基因均有兩個 *Tinman* 的結合位，且需要同時被兩個 *Tinman* 協同接合這些 enhancer 才有作用(Chen and Schwartz, 1995)。*Tinman* 的目標基因的功能均跟心臟的發育具有高度相關，如：*Tinman* 活化 *pnr*，*Pnr* 協同 *Tinman* 活化 *Mef2* 促使心臟的分化；或是 *β 3-tubulin* 受 *Tinman* 活化表現於成熟的心臟，這些基因除了受 *tinman* 的直接調控外，它們亦協同 *tinman* 去活化下游基因的表現，*tinman* 本身亦受自身的調控，由上面的敘述顯示 *tinman* 參與著多個調控心臟發育的路徑，若能鑑定出 *tinman* 的下游基因，及協同作用的基因並能對於心臟發育的基因調控有著較為深入的了解(Gajewski et al., 1999; Gajewski et al., 1998; Gajewski et al., 2001)。

4.許多基因參與果蠅背血管細胞的特化 (Fig.2, Fig.3)

果蠅背血管的分佈從果蠅體節的胸節(T₂)到腹節(A₇)，就外型及

功能來分果蠅背血管可分為兩個部分：aorta 屬於果蠅背血管前端部分占大部分背血管範圍 (T₂~A₄) 最後面三節為真正有收縮功能的部分或稱為 Heart (A₅~A₈) 兩者的之間由 cardiovascular valve 所分開，而 heart 體節間有 ostia 使果蠅體液向內流，血管的細胞可分為兩個類群，myocardial cells、pericardial cells，其中 T₂~T₃ 兩節 12 個 myocardial 皆表現 *tinman*，而其後的 A₁~A₈ 每一節有 6 個 myocardial cells，而 *tinman* 表現於前四個細胞，*tinman* 亦表現於一層的 pericardial cells，以其他的基因的當 maker 來看，如：*odd* 表現在每一體節的 pericardial cells 部分，每一體節的一側有四顆 pericardial cells 表現 *odd* (Ward and Coulter, 2000; Ward and Skeath, 2000)，*eve* 只表現於某些 pericardial cells，每一體節的一側有兩顆 pericardial cells 表現 *eve*，*eve* 的 enhancer 上有多個 Tinman、Smad、Pan 的 binding site，暗示著他的活性受這些基因的促進 (Knirr and Frasch, 2001)，*lb* 表現在某些 myocardial cells (每一體節的一側表現兩顆)、pericardial cells (每一體節的一側表現兩顆)，*eve*、*lb* 有著互相拮抗，所以不會同時表現，*zfh-1* 表現於 pericardial cells (每一體節的一側表現五顆)，其對於 even-skipped (*eve*)-expressing subset of pericardial cells (EPCs) 的表現是必需的，但卻不影響 *eve* 的先驅細胞 founders of a dorsal body wall muscle (DA1) 的產生 (Su et al., 1999)，*svp* 表現於 myocardial cells (每一體節的一

側表現兩顆)、pericardial cells(每一體節的一側表現兩顆)，似乎跟 *tinman*、*lb* 也互相拮抗，*svp* 由 dorsal ectoderm 產生的 hedgehog signal 所活化(Ponzielli et al., 2002)，與控制細胞分裂的基因 *spdo*、*numb* 有關，此外含 *svp* 的 myocardial cells 亦受到 *pointedP2* 的抑制(Alvarez et al., 2003)，這在在的顯示這些基因在 myocardial cells、pericardial cells 間的排列存在某種關係，這些基因的似乎有著交互作用造成這些細胞按照一定的形式排列、生長著，myocardial cells 及 pericardial cells 間不同心臟細胞的命運的決定牽涉到不對稱的細胞分裂 (asymmetric division) 此過程為 *numb/Notch* 的訊息傳導路徑控制(Gajewski et al., 2000; Han and Bodmer, 2003)。此外，依照功能及分子標誌來看整個背血管的型態發生，似乎可以看出一致性，即前端的 aorta 及後端的 heart 的部分功能構造上有所差異，其表現的分子標誌亦有所不同，目前也有資料顯示負責控制體節分化的 Hox gene 亦參與著控制背血管的型態分化，如：*abdominal-A* 會促進 heart cell fate 產生，異位表現 *abdominal-A* 於 aorta 位置也會造成異位 heart cell fate 產生，而一同表現 *abdominal-A* 及 *sevenup* 則決定了 ostia 的位置(TyAnna L. Lovato, 2002)，果蠅的心臟的細胞形式隨著表現基因的不同有不同的命運，各細胞形式以不同的排列方式及位置則決定果蠅心臟的構造，也賦予心臟收縮的功能(Gajewski et al., 2000; Han et al., 2002; Ponzielli et al.,

2002; Su et al., 1999; Ward and Skeath, 2000)。

5. *Him* 的研究背景

從 Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) 有計畫性的對於果蠅基因體中 non-redundant 的 EST 所製成的 RNA 探針對果蠅胚胎發育的各個時期做 RNA in situ hybridization (Fig.4) ,其染色的結果可以在 BDGP 的網頁查詢每一個 EST probe 所染色的結果。

從 BDGP 所建構的網頁，查循到一 EST (CG15064) 其已被命名為：*Him*，從 in situ 的資料可以顯示 *Him* 從果蠅發育時期 stage 9 開始表現，其位置包含大部分的中胚層，到了 stage 13 基因似乎侷限於果蠅心臟部分，大抵上的表現位置與促使果蠅心臟分化的 *tinman* 基因一致，不過表現時期略晚一點，就現有的 in situ data 顯示 *Him* 可能於果蠅心臟發育扮演特定功能。

Him gene 的發現始於 Rebeiz 於在 2002 年使用電腦資料庫搜尋特定轉錄因子的 cis-regulatory modules 的方法，搜尋 *Notch*-regulated transcription factor *Suppressor of Hairless* [*Su(H)*] 的特定調控基因，他找到的一群基因中，有一基因名為 *Her* 在其 5' 的上游區域，有很密集的 *Su(H)* binding site，但將 *Her* 5' 包含 promoter 的上游區域做 enhancer assay，卻沒有 enhancer 的表現，發現此 *Su(H)* binding site，可能不是 *Her* 調控片段，於是往上游區域找發現一相鄰基因 CG15064，於是做

此基因包含 3' 的 promoter 及上游部分的 enhancer assay 發現確有活性存在，於是推斷此處調控著 CG15064，而非 *Her*，由於此基因尚未命名，於是命名為 *Him*(Rebeiz et al., 2002)。

6. 研究問題

詳細分析 *Him* 基因的 5' 上游部分，除了確如 Rebeiz 所述有著密集的 *Su(H)* binding site 及七個可能為 mesodermal bHLH activator *Twist* binding site 外，目前已知 *Twist* 為調控中胚層分化的關鍵基因，故 *Him* 基因可能在中胚層的表現受到 *Twist* 的調控，除此之外還發現許多與心臟相關的轉路因子的調控序列，比較 Rebeiz 的資料及 BDGP 所公布的 *Him* 基因的 in situ hybridization 資料來推斷 *Him* 在果蠅胚胎發育時期的 stage 9 開始表現在中胚層，此時中胚層的發育可能受到 *Twist* 基因所調控，而在 enhancer 的預測也找到 *Him* 基因的上游有著許多 *Twist* 的調控區域，而隨著時間的推演，*Him* 基因的表現到晚期侷限在果蠅心臟部位，此時的 *Him* 基因有可能受到心臟發育的相關調控基因所控制，而 *Him* 基因可以說是個全新的基因，相關的功能尚未被確認，其表現的位置又可能與果蠅心臟的發育相關，所以證實 *Him* 基因是否在心臟發育扮演某種特定角色，也是亟欲需要解決的問題，建立相關的 *Him* 基因的突變株或 lose-of-function 果蠅株就成為研究 *Him* 基因必經的途徑之一，從基因組序列的比對來看 *Him* 基因

在可能被 *Su(H)* 及 *Twist* 所調控，*Twist* 又是中胚層發育所需的基因，果蠅的心臟又源自於背側中胚層(dorsal mesoderm) *Him* 是否被 *Twist* 所控制調控其在果蠅中胚層的發育，也是有待證實的地方，而且 *Him* 基因在果蠅胚胎發育晚期又專一性的表現於果蠅心臟，其中就可能受到許多果蠅心臟發育相關的調控因子所控制，就序列的比對來看其中可能有著控制果蠅心臟發育的基因 *Tinman* 及 *Pannier* 有可能參與其中，故 *Him* 基因於果蠅心臟專一表現是否真的被此兩種基因所調控也是有待證實的問題。