

鸡胚原肠胚期原条细胞命运决定于其所处的局部微环境

王晓钰¹ 李 艳¹ 马征来¹ 王丽京² 耿建国² 杨雪松^{1*}

(¹暨南大学再生医学教育部重点实验室, 医学院组织学与胚胎学教研室, 广州 510632;

²广东药学院血管生物学研究所, 广州 510224)

摘要 在果蝇、斑马鱼、鸡等三胚层动物胚胎早期发育的原肠胚期, 原条两侧的上胚层细胞进入原条经历上皮-间充质转化(EMT), 迁移进入囊胚腔, 形成松散的中胚层细胞, 位于原条不同部位的细胞其迁移路线和分化命运不同, 如前部原条细胞贡献于体节和心脏等, 而后部原条细胞则迁移至胚外形成血岛。为了研究细胞的迁移途径及分化命运是否会随着细胞所处不同部位微环境的改变而改变, 利用传统的移植技术, 将宿主鸡胚原条前部的一部分细胞用GFP阳性的相同时期鸡胚原条组织替换, 培养一段时间后, 用荧光体视显微镜追踪GFP阳性细胞的迁移途径。结果发现, 从供体原条后部移植到宿主原条前部的细胞遵循原条前部细胞迁移的路线, 反之亦然; 原位杂交结果显示移植后的GFP阳性细胞分化为所处部位的细胞类型。上述结果表明: 鸡胚原肠胚期原条细胞迁移和分化的命运决定于细胞所处的微环境或者说局部基因表达的时空性。

关键词 原肠胚期; 细胞迁移; 局部微环境; 原条; 移植

胚胎原肠胚形成期, 正确的细胞迁移是三胚层发生的一个最为重要的生命现象。它是细胞在接收到迁移信号或感受到某些物质的浓度梯度后产生的位置的移动。在细胞迁移的过程中, 在复杂信号通路的调控下, 微丝微管不断地在细胞移动的前方组装, 细胞不断向迁移方向伸出伪足, 牵拉胞体移动; 而在细胞移动后方, 微丝微管不断去组装, 如此重复, 使得细胞发生迁移^[1-4]。原肠作用是绝大多数多细胞动物胚胎发育过程中的重要步骤, 其目的是由外胚层产生中胚层和内胚层, 而三胚层是机体各组织器官发育的基础。原肠胚形成是脊椎动物胚胎发育的最早核心步骤, 细胞迁移作为动物胚胎原肠作用的重要过程之一, 在这个过程中, 两侧上胚层细胞向原条迁移、内陷、内卷, 经历上皮-间充质转化形成松散的中胚层, 最终形成三胚层结构^[5-9](图1A)。三胚层的细胞根据所处位置迁移至不同的部位, 同时进行分化、最终形成不同器官^[10-11], 如我们前期工作显示前部原条细胞贡献体节(红色线条表示)或心脏, 后部原条细胞(绿色线条表示)迁移至血岛参与造血和血管发生(图1B)。细胞迁移对于胚胎的原肠形成具有极其重要的意义, 该过程受早期胚胎中空间特异的基因表达的精确控制^[12-16]。事实上, 决定细胞迁

移和分化命运的基因非常复杂, 远未得以完全阐明。本文旨在介绍一种利用电穿孔基因导入技术以及同种组织异体移植技术从宏观角度观察鸡胚原肠胚期中细胞迁移的方法, 并利用该方法观察移植组织中细胞的迁移路线和分化命运是否随着局部微环境的变化而变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 鸡蛋 新鲜海南褐种鸡蛋(华南农业大学正大肉鸡发展中心)。

1.1.2 质粒、酶与抗体 pEGFP-N1质粒(耿建国实验室提供, University of Michigan); VMHC质粒(Andrea Münsterberg实验室提供, University of East Anglia); VE-cadherin质粒(Kees Weijer实验室提供, University of Dundee); Anti-GFP(NOVUS公司); 限制性内切酶(NEB公司); Anti-rabbit Alexa Flour 488(In-

收稿日期: 2011-03-08 接受日期: 2011-04-26

国家重点基础研究发展计划(No.2010CB529702)、国家自然科学基金项目(No.30971493, No.31071054)和中央高校基本科研业务费专项资金(No.21610601)资助项目

*通讯作者。Tel: 020-85228316, E-mail: yang_xuesong@126.com

vtrogen公司); DH5 α 大肠杆菌感受态(TaKaRa公司)。

1.1.3 主要试剂与仪器 高纯度质粒小提中量试剂盒(天根DP107-02); DNA回收纯化试剂盒(北京天根生化科技有限公司); DIG RNA labeling kit (roche); Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche); Milli-Q Integral水纯化系统(Millipore); ECM399 Electroporation System(BTX); SZ61体视显微镜(OLYMPUS); MVX10体视荧光倒置显微镜(OLYMPUS); 数显电热恒温培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); CM1900型冷冻切片机(Leica公司); 恒温恒湿培养箱(科力仪器PYX-150H-B); 明胶(Sigma公司)。

1.2 方法

1.2.1 质粒提取及RNA探针制备 质粒提取按高纯度质粒小提中量试剂盒的说明操作。根据提供的探针信息选择相应的限制性内切酶, 37 °C酶切2 h线性化, DNA回收纯化试剂盒纯化, 选择相应的转录酶依照DIG RNA labeling kit说明合成探针。

1.2.2 鸡胚全胚体外培养 使用改良滤纸鸡胚整体培养法进行鸡胚早期的体外培养^[17], 此方法使用蛋白-琼脂培养基, 操作简单, 鸡胚生长发育状态良好。取第一批鸡胚置于37 °C培养箱进行培养, 相隔3~4个小时, 之后取出第二批鸡胚培养作为宿主。观察鸡胚生长情况, 根据Hamburger和Hamilton^[18]鸡胚分期方式界定鸡胚生长状态。

1.2.3 电穿孔基因导入技术 待第一批鸡胚长至3期, 即利用电穿孔基因导入技术进行电转染。将正极的电极丝置于原条正上方, 用BTX-ECM399电转仪提供方波电流, 电压为10 V, 电击两次(图2A)。转染完毕, 将鸡胚放回37 °C培养箱中继续培养。5~6 h后, 在荧光体视显微镜下观察荧光强弱和位置, 选取荧光位于原条且较强同时生长状态良好的鸡胚作为供体。

1.2.4 移植 在荧光显微镜下观察, 选择原条表达绿色荧光蛋白的胚胎作为供体。取出第二批鸡胚, 选择约HH3⁺期的胚胎作为受体, 进行原条组织的移植(图2B)。在显微镜下, 用已消毒的针切下供体原条组织块, 移植到受体相应位置(供体切出的组织块应与受体待移植位置的空缺大小相当), 为使移植组织块与周围组织紧密接触, 可用玻璃毛细管吸除受体胚胎表面多余的液体, 使移植组织块嵌合到受体胚胎中。将移植后的胚胎放于37 °C培养箱中继续培养。一段时间以后, 在荧光显微镜下观察荧光标记的细胞的运动情况。

1.2.5 全胚原位杂交 将鸡胚用4%多聚甲醛于4 °C固定过夜; 全胚原位杂交步骤参考文献^[19-20]并稍作修改, 加入地高辛标记的RNA探针于65 °C杂交过夜; 碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体1:1 000于4 °C孵育过夜, NBT/BCIP显色。

1.2.6 全胚免疫荧光 胚胎经过原位杂交后, 绿色荧光蛋白的荧光淬灭。使用免疫荧光技术标记表达GFP的细胞: 含有10%灭活羊血清的PBT室温封闭4 h; 一抗: anti-GFP, 1:1 000; 4 °C孵育过夜; 二抗: anti-rabbit Alexa Flour 488, 1:1 000, 室温孵育5 h。

1.2.7 冰冻切片与拍照 用PBS配制含7.5%明胶(Sigma)和15%蔗糖的明胶蔗糖包埋剂, 将全胚在包埋剂中展平、包埋^[21]。使用冰冻切片机以20 μ m厚度切片, 用mowoil(Sigma)封片剂封片, 拍照。

2 结果

2.1 正常情况下原条细胞迁移轨迹

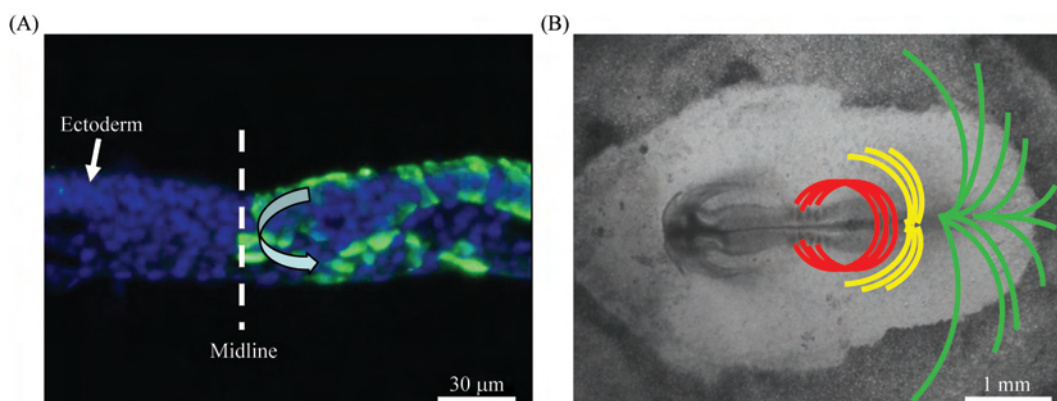
我们将GFP标记的供体原条后部组织移植到受体原条后部, 同理, 将供体原条前部组织移植到受体原条的前部。在这种情况下, 组织在移植前后所处的局部微环境没有变化, 以此作为对照。移植的前部原条细胞先向两侧迁移然后返回中线, 此后参与心管等的形成^[22], 而后部原条细胞向尾部暗区迁移, 稍后形成血岛(图3)。

2.2 原条细胞命运和迁移图式随局部微环境的改变而改变

如图2B所示, 将GFP标记的供体原条后部细胞移植到宿主原条前部, 或将供体原条前部细胞移植到宿主原条后部。经过一段时间的培养, 我们观察到原本位于原条后部的细胞其迁移命运发生改变, 不再遵循原条后部细胞的迁移命运向暗区迁移, 而是遵循原条前部细胞的迁移图式, 向头端迁移并参与左右心管形成, 反之亦然(图4A和图4B)。分别利用VMHC和VE-cadherin原位杂交特异性标记心管的心肌外膜和血岛, 由GFP阳性细胞和原位杂交阳性细胞的共定位证明移植的这些GFP阳性细胞确实迁移到相应的位置参与了心管或血岛的形成。

3 讨论

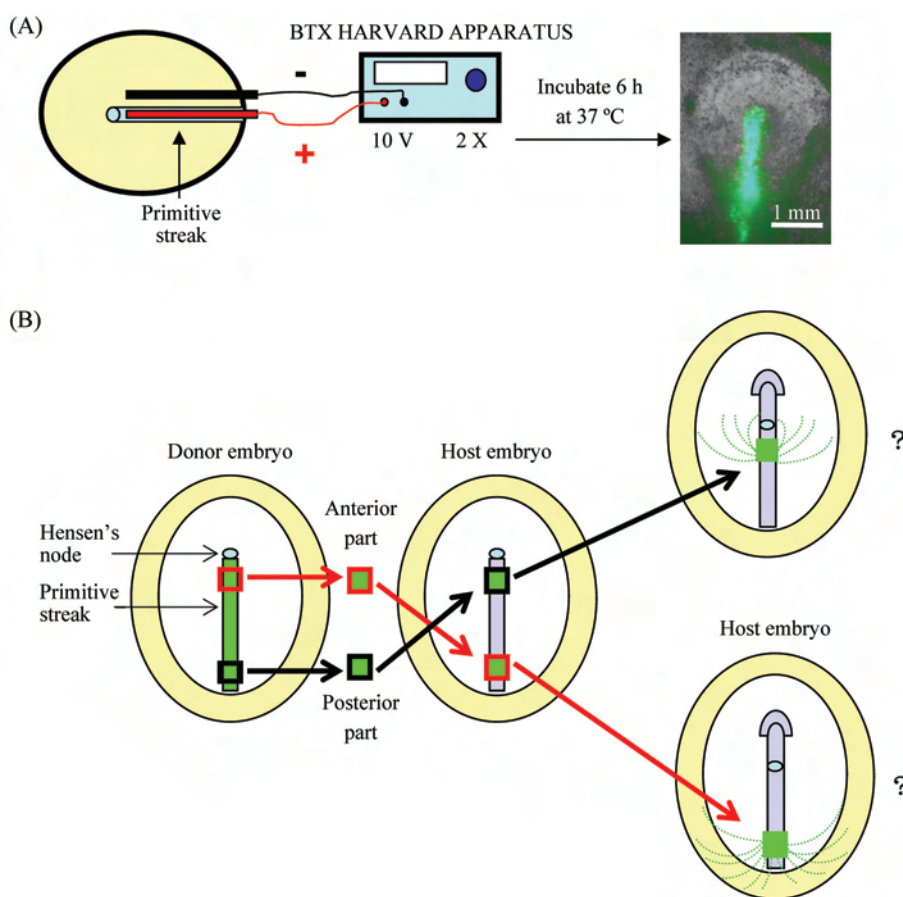
在鸡胚原肠胚形成过程中, 原条两侧上胚层的细胞失去极性和粘着连接、桥粒等细胞连接结构, 重排细胞骨架, 经历上皮-间充质转化(EMT)的过程,



A: 在原肠胚形成过程中, 原条附近的外胚层细胞(GFP标记)经历上皮-间充质转化, 进入囊胚腔, 向两侧以及前端迁移, 最终形成松散的中胚层; B: 前部中胚层的细胞(红色表示)形成体节, 中部的原条细胞(黄色表示)形成侧板中胚层, 而原条后部的细胞(绿色表示)形成胚外结构以及血岛。
A: in gastrulation, the epiblast cells (GFP labeled) near primitive streak go through the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and migrate into the blastocyst cavity laterally and forward, form the loose mesoderm finally; B: the anterior mesoderm cells (red) form somites, the middle streak cells (yellow) lateral plate mesoderm and the posterior streak cells (green) extra-embryonic structures and blood island.

图1 鸡胚原肠胚形成及中胚层迁移示意图

Fig.1 Diagram of chicken gastrulating and movement of mesoderm cells

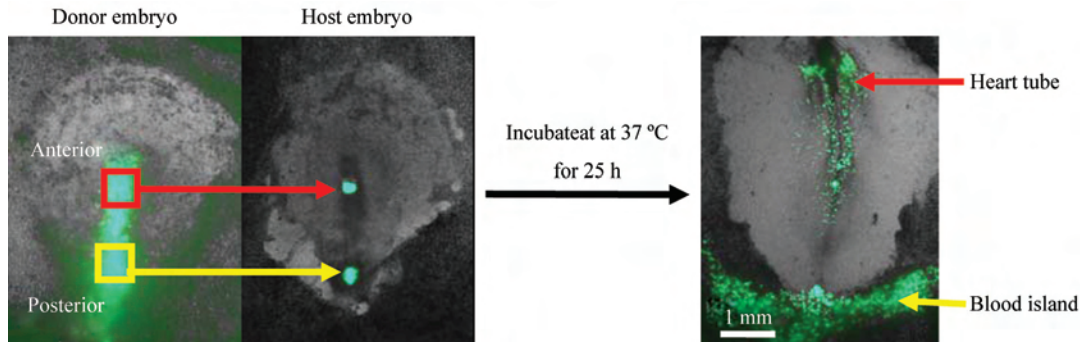


A: 如图所示, 将正极放于原条上方, 电击两次, 电压10 V。继续培养鸡胚6小时, 用荧光体视显微镜观察转染结果; B: 将供体鸡胚原条后部GFP标记的组织移植到相同发育时期的宿主鸡胚原条前部(黑色箭头指示), 而供体鸡胚原条前部GFP阳性组织替换到宿主鸡胚原条后部(红色箭头指示)。拍照并继续培养, 每隔一段时间拍照, 观察移植的细胞迁移路线是否改变。

A: shock the donor embryo twice as shown in the diagram with voltage 10V, then incubate for about 6 hours, observe the fluorescence with stereomicroscope; B: the donor posterior GFP-positive streak cells are transplanted to the same stage host anterior (black) primitive streak position, and the anterior GFP-positive streak cells are grafted to the posterior (red). Then photography was done to check if the migration path of these cells will change.

图2 电穿孔基因导入技术及移植示意图

Fig.2 Diagram of electroporation and graft strategy

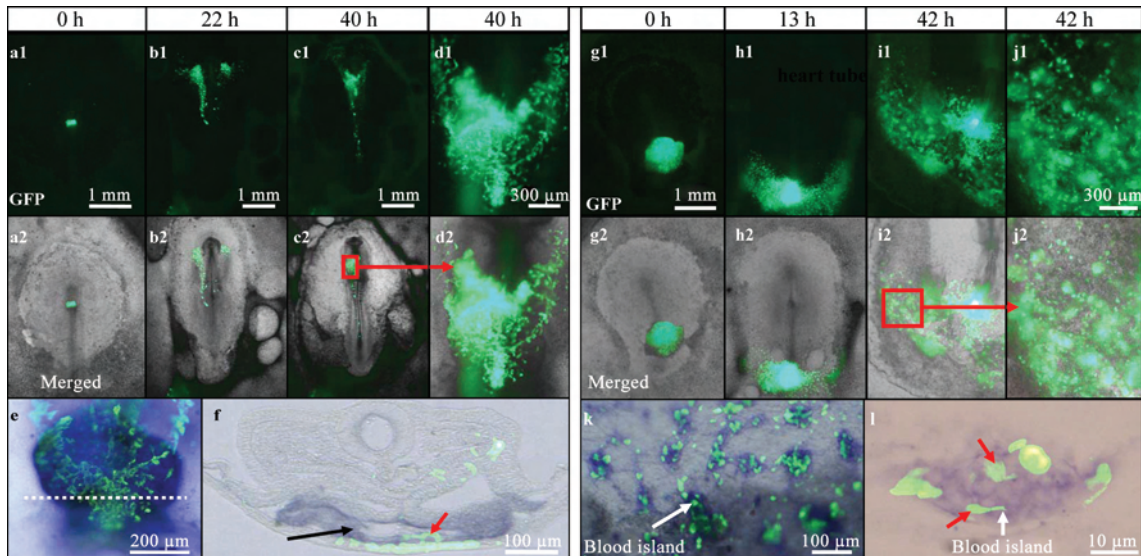


移植的前部原条细胞向侧板中胚层迁移, 随后返回中线, 参与心管的形成, 而后部原条细胞迁移进入暗区, 将来形成血岛。

The transplanted anterior streak cells, which migrate towards the lateral mesoderm and then back to midline, will participate in the formation of heart tube, while the posterior streak cells migrate into opaca and form blood island in the future.

图3 正常环境中原条前部与后部细胞的迁移图式

Fig.3 Cell movement pattern of posterior and anterior streak cells under normal circumstances



a~d: 从供体鸡胚原条后部移植到宿主胚原条前部的细胞的迁移图式: 移植到宿主胚原条前部的细胞遵循原条前部细胞的迁移路线, 其中一些细胞参与到心管的形成中(如图d2中箭头所指); e: 利用全胚原位杂交技术用VMHC特异性标记心管(图中蓝色区域); f: 冰冻切片结果显示, 在e图中虚线所标示的心管位置可以观察到部分GFP阳性的细胞确实参与到了心管的形成中(红色箭头指示); g~j: 从供体鸡胚原条前部移植到宿主胚原条后部的细胞的迁移图式: 移植到宿主胚原条后部的细胞遵循原条后部细胞的迁移路线, 其中一部分细胞参与了血岛的形成(如图j2中箭头所指); i~l: 利用VE-cadherin的原位杂交特异性标记血岛(图中白色箭头所指的蓝色区域)。图l所示是图i中一个血岛的横切面, GFP阳性细胞和表达VE-cadherin的细胞的共定位表明部分GFP阳性细胞确实参与了血岛形成。

a~d: movement pattern of the transplanted posterior primitive streak cells to anterior primitive streak. The transplanted posterior primitive streak cells to anterior part of streak followed the anterior primitive streak cell migration pattern, and some of these cells may participate in the formation of heart tube (arrow indicated d2); e: the heart tube (blue area shown in the figure) is labeled particularly by VMHC making use of the whole mount *in situ* hybridization; f: the frozen section of the heart tube at the position of dotted-line indicated of e represents that part of GFP positive cells definitely participate in the formation of heart tube (red arrows indicated); g~j: movement pattern of the transplanted anterior primitive streak cells to posterior primitive streak: the transplanted anterior primitive streak cells to posterior part of streak followed the posterior primitive streak cell migration pattern, and some of these cells participate in the blood island formation (arrow indicated j2); i~l: the blood island (blue areas indicated with white arrows in i and l) is labeled by VE-cadherin utilizing the whole mount *in situ* hybridization. l is the transversal section for one blood island indicated in i. The colocalization of GFP positive cells and VE-cadherin expressed cells demonstrates that part of GFP positive cells indeed participate in the formation of blood island (red arrows).

图4 移植后原条细胞的迁移图式和分化命运

Fig.4 Movement pattern of the transplanted primitive streak cells

迁移进入囊胚腔, 这些细胞具有低分化的特征和潜在的可塑性^[7,23]。以往关于囊胚发育图的研究证明, 位于不同胚层或相同胚层不同部位的细胞, 其基因表达和分化命运不同^[24-25]。在原肠胚期, 原条不同部位的细胞遵循不同的迁移路线, 在迁移的过程中不断分化, 最终参与不同的器官形成^[26]。

本实验中, 供体鸡胚原条前部表达GFP的细胞移植到宿主鸡胚原条后部, 其迁移路线发生了改变, 不再向头端迁移, 而是向后迁移进入暗区参与血岛形成; 而从供体原条后部移植到宿主原条前部的GFP阳性细胞亦改而遵循原条前部细胞的迁移路线, 并且原位杂交结果表明移植后的组织细胞已经表达移植位点的基因, 说明这些细胞的分化命运具有可塑性, 并且在局部环境的影响下能分化为相应器官的细胞。移植实验的结果证明了鸡胚原肠作用过程中原条细胞的迁移路线和分化命运受局部微环境的影响, 随着微环境的改变, 细胞的迁移路线与分化命运也随之改变。这表明位于相同时期的原条的不同部位的细胞其基因表达模式不同, 并且细胞之间相互影响, 使移植到新环境中的细胞改变其自身的基因表达模式, 从而改变其迁移和分化的命运。

鸡胚所处的发育时期同样影响移植实验的结果。在本实验中, 接受移植的宿主胚胎以HH3⁺期为最佳, 晚于这个时期, 移植到原条前部的细胞仍然向头端迁移, 但不能参与到心管的形成。这表明, 除了基因表达的空间特异性外, 时间特异性也是产生适合细胞分化的微环境的决定性因素。本实验中, 在HH3⁺期进行移植, 交换原条前部和后部组织的位置, 细胞的迁移途径和分化命运也随之改变, 并能参与所处位置的器官形成, 这表明在HH3⁺期, 原条不同部位的细胞其分化命运仍然是可逆的, 那么在鸡胚发育时程上究竟到什么时候, 细胞的分化命运才最终确定仍不明确。

细胞所处的微环境是由其周围细胞基因表达的时空特异性产生的。在原条形成的不同时期上以及原条的不同部位, 细胞基因表达的模式不同, 例如, HH4期, *cNOT1*、*Chordin*、*Shh*等基因的表达仅局限于原条前端^[27], 而*Brachyury*、*Slug*等基因在大部分原条细胞中均有表达, 正是由于这种基因表达的不同造成了原条前部和后部微环境的差异。细胞分化的命运是细胞自身与周围环境相互作用的结果, 某些基因表达的开或关, 导致了在不同时期不同

部位的基因表达产物的浓度不同, 这种浓度梯度的产生, 可能是导致原条不同部位细胞沿不同路线迁移并分化的原因^[28]。

细胞迁移和分化不仅是发育生物学的重要课题, 对于肿瘤等疾病的研究也具有重要意义。恶性肿瘤的一个重要特征是肿瘤细胞能够离开原来的位置发生转移, 这也是一种上皮-间充质转化(EMT)的过程^[29], 因此, 研究胚胎发育中EMT的过程及其机制对于肿瘤发生发展的研究具有重要的意义。

致谢

感谢暨南大学再生医学教育部重点实验室提供开放实验室, 感谢广东药学院血管生物学研究所的合作。

参考文献 (References)

- 1 Weijer CJ. Collective cell migration in development. *J Cell Sci* 2009; 122: 3215-23.
- 2 邢艳丽, 李 静, 耿美玉. 细胞迁移中微丝微管的变化及其信号转导通路研究进展. *现代生物医学进展* 2007; 7(6): 919-22.
- 3 Vicente-Manzanares M, Choi CK, Horwitz AR. Integrins in cell migration-the actin connection. *J Cell Sci* 2009; 122: 199-206.
- 4 Ilin O, Friedl P. Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J Cell Sci* 2009; 122: 3203-8.
- 5 Vasiev B, Balter A, Chaplain M, Glazier JA, Weijer CJ. Modeling gastrulation in the chick embryo: Formation of the primitive streak. *PLoS One* 2010; 5(5): e10571.
- 6 Keller R. Cell migration during gastrulation. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17(5): 533-41.
- 7 Nakaya Y, Sheng G. Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: An embryological view. *Dev Growth Differ* 2008; 50(9): 755-66.
- 8 Wagstaff LJ, Bellett G, Mogensen MM, Münsterberg A. Multicellular rosette formation during cell ingression in the avian primitive streak. *Dev Dynamics* 2008; 237(1): 91-6.
- 9 Iimura T, Yang X, Weijer CJ, Pourquie O. Dual mode of paraxial mesoderm formation during chick gastrulation. *Proc Nat Acad Sci USA* 2007; 104(8): 2744-9.
- 10 Chuai M, Dormann D, Weijer CJ. Imaging cell signalling and movement in development. *Sem Cell Dev Biol* 2009; 20(8): 947-55.
- 11 Psychoyos D, Stern CD. Fates and migratory routes of primitive streak cells in the chick embryo. *Development* 1996; 122: 1523-34.
- 12 Chuai M, Weijer CJ. Regulation of cell migration during chick gastrulation. *Curr Opin Gene Dev* 2009; 19(4): 343-9.
- 13 Yang X, Chrisman H, Weijer CJ. PDGF signalling controls the migration of mesoderm cells during chick gastrulation by regulating N-cadherin expression. *Development* 2008; 135(21): 3521-30.
- 14 Sweetman D, Wagstaff L, Cooper O, Weijer C, Münsterberg A. The migration of paraxial and lateral plate mesoderm cells emerging from the late primitive streak is controlled by different

- Wnt signals. *BMC Dev Biol* 2008; 8(1): 63.
- 15 Chuai M, Weijer CJ. The mechanisms underlying primitive streak formation in the chick embryo. *Curr Topics Dev Biol* 2008; 81: 135-56.
 - 16 Yang X, Dormann D, Münsterberg AEM, Weijer CJ. Cell movement patterns during gastrulation in the chick are controlled by positive and negative chemotaxis mediated by FGF4 and FGF8. *Dev Cell* 2002; 3: 425-37.
 - 17 Chapman SC, Collignon J, Schoenwolf GC, Lumsden A. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev Dynamics* 2001; 220(3): 284-9.
 - 18 Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev Dyn* 1992; 195(4): 231-72.
 - 19 Nieto MA, Patel K, Wilkinson DG. *In situ* hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections. *Meth Cell Biol* 1996; 51: 219-35.
 - 20 Acloque H, Wilkinson DG, Nieto MA. *In situ* hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections. *Meth Cell Biol* 2008; 87: 169-85.
 - 21 马征来, 吴婷, 李艳, 王丽京, 杨雪松. 冰冻切片制作方法的改良. *解剖学研究* 2009; 31(5): 385-7.
 - 22 Münsterberg A, Yue Q. Cardiac progenitor migration and specification the dual function of Wnts. *Cell Adhesion Migration* 2008; 2(2): 74-6.
 - 23 Savagner P. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Annals Oncol* 2010; 21(Supplement 7): 89-92.
 - 24 Kimura W, Yasugi S, Stern CD, Fukuda K. Fate and plasticity of the endoderm in the early chick embryo. *Dev Biol* 2006; 289: 283-95.
 - 25 Chapman SC, Matsumoto K, Cai Q, Schoenwolf GC. Specification of germ layer identity in the chick gastrula. *BMC Dev Biol* 2007; 7: 91.
 - 26 Psychoyos D, Stern CD. Fates and migratory routes of primitive streak cells in the chick embryo. *Development* 1996; 122(5): 1523-34.
 - 27 Lawson A, Colas JF, Schoenwolf GC. Classification scheme for genes expressed during formation and progression of the avian primitive streak. *Anat Rec* 2001; 262(2): 221-6.
 - 28 Furusawa C, Kaneko K. Morphogenesis, plasticity and irreversibility. *Int J Dev Biol* 2006; 50(2/3): 223-32.
 - 29 Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nature* 2002; 2: 442-54.

Local Microenvironment Determines the Primitive Streak Cell Fate in Chick Gastrulation

Wang Xiaoyu¹, Li Yan¹, Ma Zhenglai¹, Wang Lijing², Geng Jianguo², Yang Xuesong^{1*}

⁽¹⁾Key Laboratory for Regenerative Medicine Ministry of Education, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

⁽²⁾Vascular Biological Laboratory, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510224, China)

Abstract In chick gastrulation, the epiblast cells near primitive streak go through the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and migrate into the blastocyst cavity, form the loose mesoderm at last. The cells in different part of primitive streak undergo different trajectory of cell migration. In order to understand whether the pattern of cell migration will be transformed along with the microenvironment alteration, we simply replaced the anterior or posterior primitive streak cells in host embryo using traditional transplantation technology, in which primitive streak tissue was labeled by GFP through electroporation previously in the same stage donor embryo and then we track the migration path of the GFP-positive cells with fluorescence stereomicroscope after incubation for the required time. We found that the transplanted posterior primitive streak cells to anterior part of streak followed the anterior primitive streak cell migration pattern rather than kept its posterior streak cell migration path, and so did vice versa. It suggests that the migration pattern of streak cells in gastrulation depends on the local microenvironment or spatiotemporal gene expression.

Key words gastrulation; cell migration; local microenvironment; primitive streak; graft

Received: March 8, 2011 Accepted: April 26, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30971493, No.31071054), the National Basic Research Program of China (No.2010CB529702), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No.21610601)

*Corresponding author. Tel: 86-20-85228316, E-mail: yang_xuesong@126.com