

特约综述



我们利用活体胚胎细胞电穿孔技术、移植技术、Real Time-lapse等细胞生物学技术结合基因沉默、原位杂交、免疫组化、Western blot、RT-PCR等生化及分子生物学技术研究鸡胚早期发育过程中细胞迁移的基因调控。目前,我们的研究重点主要包括以下胚胎发育过程中的细胞迁移:胚胎原肠胚形成期三胚层形成、胚胎血岛及早期心血管形成、神经系统发生中神经嵴细胞形成。

<http://jd.jnu.edu.cn/yxsx/detail.asp?id=24021>

鸡胚早期发育过程中细胞迁移的基因调控

王 广 李 艳 杨雪松*

(暨南大学医学院组织与胚胎教研室,再生医学教育部重点实验室,广州 510632)

摘要 鸡胚是发育生物学的经典动物模型,通过基因导入技术调节胚胎发育的基因功能,研究鸡胚早期发育过程中的细胞迁移,有助于更好地诠释相关先天性疾病的发生发展过程。在早期胚胎发育的过程中,原肠胚期三胚层的形成、心血管的发生及神经嵴的发育都伴随着显著的细胞迁移过程。该文将结合近年来国内外对该过程的研究进展,介绍这三个不同时期细胞的迁移及相关基因调控。

关键词 细胞迁移; 基因调控; 原条; 心血管; 神经嵴

由于鸡胚胎早期与人胚胎相似,且取材方便、利于进行显微操作处理,因此长期以来被用作发育生物学经典的动物模型。虽然禽类在基因定位突变或转基因研究方面存在劣势,但是近十五年来,一些新的基因导入技术能够有效地调节胚胎发育早期基因功能,使基因的下游转录失活或者过表达,这些技术连同鸡胚基因组序列分析使得鸡胚发育的研究也进入到基因组领域,为探讨发育过程中基因功能学的研究提供了重要工具。

瞬时转染方法能高效地使基因失活或过表达。对于长期的分析来讲,逆转录病毒介导的基因转染方法具有独特的优势;而对于短期的实验来说,电穿孔和腺病毒介导的基因转染方法能够提供瞬时表达(细胞中转基因只能持续较短时间)。近来,为了延长转基因的表达时间,可以通过To12转座子整合基因组来实现。这些现在已经是常规的用来过表达或异位表达感兴趣的基因,从而进行功能获得分析的方法。

除此之外,通过使用显性抑制结合物作为竞争性抑制剂、吗啉代反义引物阻碍翻译或剪接、构建siRNA或shRNA等方法也可以用来研究基因失活实验。

电穿孔(electroporation)是鸡胚研究中最流行的瞬时转染方法,通过施加给胚胎组织一个电场,短暂电场的作用使细胞膜产生可逆性小孔,然后核酸或者其他类似物就可以运输到细胞质中。电穿孔的方法需要通过控制电压、脉冲类型及持续时间来实现,低电压下连续的矩形脉冲使DNA聚合物或者其他小的带电粒子进入细胞质,能够通过这种方法成功转染的DNA大小界限还不清楚。我们通常将3~4 Kb大小的克隆片段同GFP或者RFP表达载体来标记成功转染的细胞。通过以上方法,结合早期鸡胚胎扁平状、半透明、在荧光显微镜下的可视性等特点,

国家重点基础研究发展计划(No.2010CB529702)和自然科学基金(No.30971493, No.31071054)资助项目

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

可以更好地研究胚胎早期发育过程中的细胞迁移, 本文就我们实验室感兴趣的鸡胚早期发育过程中原条(primitive streak)形成期的细胞迁移、心脏形成过程中的细胞迁移及神经嵴细胞的迁移作一综述。

1 原条形成期的细胞迁移

1.1 原条形成中的上胚层细胞运动

原肠胚期是各种生物发育最初的重要阶段, 其特征是胚层前体细胞迁移到胚胎三个胚层的特定位置。因为鸡胚胎易于体外培养并能应用于组织移植实验等, 这对研究细胞命运与迁移成像很有帮助^[1]。我们用鸡胚作为模型结合在体时间流逝显微镜摄像技术(Real Time-lapse)和基因表达分析技术研究原肠胚期细胞迁移的基因调控。鸡胚胎中心为明区(area pellucida), 是胚胎发育的主体; 外围为暗区(area opaca), 为发育的胚外组织, 这些细胞与蛋黄有联系。而中心区域的细胞(pellucida区域)发育成上皮单细胞层^[2], opaca区域与边缘区的信号诱导opaca与pellucida区域界面的中胚层, 结果中胚层迁移模式为镰刀的形状, 即脱离原条后首先向两侧移行, 然后返回中线^[3]。胚胎发育早期原条形成过程中, 细胞迁移入胚胎中线, 相互堆积形成一条加厚的细胞线, 显微镜下可见并被称为原条。我们的前期工作表明: 上胚层细胞以高度协作的方式大范围地以细胞流的形式运动。原条向前延伸时, 在两侧形成漩涡状迁移模式^[4-6](图1A)。外胚层细胞具有上皮组织特性, 由广泛的顶部连接复合物连接。尚未解决的问题如细胞流动的驱动机制是什么? 细胞是通过基底膜的降解来被动地移动^[7-8], 还是通过基底膜或其他细胞的牵拉主动地运动? 一旦它们受到其他细胞的牵拉, 它们相对那些牵拉细胞开始运动并改变它们的临近细胞形态^[6,9]; 如果它们受到基底膜的牵拉, 它们会朝着一个方向移动且不改变其临近细胞的形态^[10]。若这两种情况都有, 那细胞必定存在内在极化的过程, 这种极化需要与外在信号协调, 与鞭毛虫细胞的发生过程相似。为了在胚胎发育过程中更好地观察单个细胞的行为, 实时观察单细胞的高效摄影技术是必需的^[11], 由DSL开发的新型显微镜, 能够以更高分辨率对更大结构的组织进行长时间观察^[12-13]。这种显微镜成功地应用于追踪斑马鱼胚胎早期发育过程中核的运动^[14], 可以期待其在观察GFP标记的鸡胚中、外胚层细胞运动的协调中发挥巨大作用。

1.2 原肠胚期中胚层细胞迁移

原条为胚胎发育过程中的第一个有形结构, 它的细胞组成成分处于不断变化中的, 具体说是上胚层细胞持续进入原条, 同时细胞离开原条成为中胚层细胞, 部分首先迁出的深层细胞成为内胚层组成成分^[15]。在原条形成过程中, 原条中细胞间的*E-cadherin*表达降低, 并且基底膜崩溃, 产生间质细胞状中胚层细胞(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。EMT过程是中内胚层细胞迁入的关键, 用特异的分子标记细胞后, 高倍镜下分析细胞行为以及相互之间的连接是解决中胚层细胞迁移起始的关键^[16]。在鸡胚胎及其它胚胎中, 高分辨率图像获得的主要问题是光分散。早期鸡胚胎有50 μm厚, 而且细胞含有大量蛋黄泡状结构, 所以胚胎不透明, 这导致光线分散, 图像质量降低^[17-18]。该技术也很难应用到活体细胞中, 目前, 我们的细胞迁移资料主要来源于低倍摄影。我们发现在原条不同部位产生的中胚层细胞呈现截然不同的迁移模式, 这极大地丰富了以前的细胞命运模式(fate mapping)研究^[19-20]。胚胎原肠胚期当原条和亨氏节(Hensen's node)后退时, 亨氏节细胞残留在中线形成脊索(notochord), 而位于亨氏节后面的原条中胚层细胞离开原条后首先移向两侧。当亨氏节后退后, 这些细胞再和神经上皮一同迁移回中线形成体节等中胚层结构。起源于原条中部的中胚层细胞则向两侧移行得更远些, 然后形成中间和外侧中胚层; 而起源于原条后部的中胚层细胞移行至胚胎外部, 产生血液系统原生细胞。

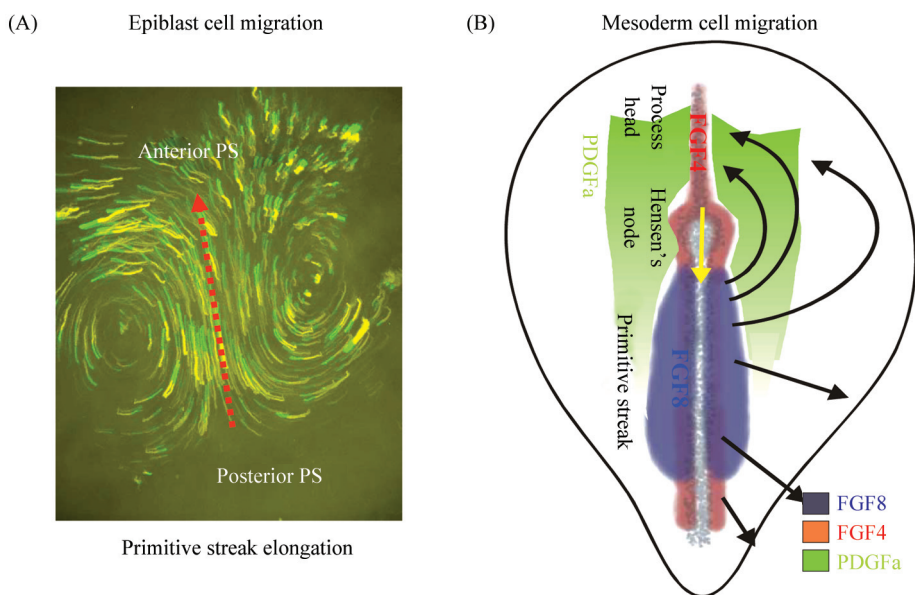
我们通常结合Real Time-lapse和基因转染的原条组织块移植来研究细胞迁移模式: 供体来自特异的GFP标记的胚胎, 受体则是来源于未标记的相同时期的胚胎^[21-22]。向原条两侧迁移后迁回中线的中胚层细胞迁移轨迹具有共同的特征, 这些细胞是朝着迁移方向高度极化的, 表明其能感知趋化因子的梯度并决定其运动方向。分析表明, 中内胚层细胞对局部的*FGF*、*WNT*梯度做出回应以决定移动方向, 如*FGF*、*WNT*信号通路会抑制或干扰移动方向, 这些实验数据提示细胞趋化性在决定细胞移动中的重要性^[21,23-24]。为进一步研究特定类型细胞的运动, 有必要用特异的信号通路分子标记物在体标记这些细胞。由于基因敲除技术不适于鸡胚, 因此需要寻找其他方法。可以考虑的方法有荧光抗体作用于细胞表面复合物, 如粘附分子、受体等, 这种技术被成功

地应用在标记胞外基质复合物中。在研究鸡胚、非洲爪蟾胚胎胞外基质分子过程中发现: 迁移中的细胞会影响细胞外基质的形成, 同时细胞外基质的改变也会对细胞的迁移造成影响^[8,25-27]。

我们实验室以鸡胚胎为模型研究多细胞生物原肠胚期调节细胞迁移的化学趋化性及其细胞内信号传导的相关途径, 即研究原肠胚期细胞迁移是受何种信号调控, 及调控信号的信息是如何传导至细胞内纤维骨架系统(actin-myosin cytoskeleton)产生细胞迁移的动力。我们发现, *FGF*信号影响在原条不同部位产生的中胚层细胞迁移, 我们完成了*FGF4*和*FGF8*基因在早期鸡胚胎的表达模式(图1B), 又利用*in vivo*显微移植实验表明*FGF4*和*FGF8*分别是生物活性吸引分子(chemo-attractant)和排斥分子(chemo-repellant)。以此为依据, 我们提出假设: 原条前半部的中胚层细胞离开原条是由于*FGF8*的排斥, 而当原条和亨氏节退后时, 这些细胞由于表达在脊索的*FGF4*的化学趋化(chemotaxis)吸引返回中线形成中胚层结构。此外, 我们发现*PDGF*也参与

*FGF*诱导的细胞迁移, 它们共同的靶基因可能为*N-cadherin*, 在缺失*N-cadherin*的情况下, 来自原条前部的中胚层细胞迁移发生障碍, 提示*PDGF*信号在诱导细胞迁移中的关键作用。接下来, 我们又通过一系列基因表达和在体化学趋化性实验显示, 在鸡胚原肠胚期源于原条后部的中胚层细胞是造血细胞和血管内皮细胞的共同前体细胞, 它们在血管发生中的迁移也是受到*VEGF*信号系统的调节从而离开原条形成血岛的。

实现胚胎细胞迁移调节需要将外界的信号传导至细胞骨架(cytoskeleton)的细胞内信号传导系统, 我们发现在原肠胚期中胚层细胞迁移过程中, *PIP3* (phosphatidylinositide (3,4,5)-trisphosphate, *PIP3*)调节细胞内骨架蛋白重新排列而影响细胞迁移的首要步骤——细胞极化, 抑制*PIP3*蛋白激酶活性或者通过过表达(over expression)各种*PIP3*磷酸酶基因来降低细胞内*PIP3*水平, 导致运动中的中胚层细胞在离开原条后丧失细胞运动的方向性(random migration)。实验也显示, *PTEN* (phosphatase and tensin homolog)



A: 鸡胚原肠胚期上胚层细胞迁移模式。HH1-4期鸡胚原肠胚期, 当原条向前延伸时, 上胚层细胞在原条两侧形成旋涡状迁移模式; B: 鸡胚原肠胚期中胚层细胞迁移模式。产生于前部和中部原条中胚层细胞离开原条后, 先向两侧移行, 而后回归中线, 迁移中的中胚层细胞可能受到*FGF*和*PDGF*信号调控。

A: epiblast cell migration pattern of chick gastrula embryo. A pair of lateral vortex-like cell migration pattern appeared when primitive streak elongated toward rostral part at the HH1-4 chick embryo; B: mesoderm cell migration pattern during chick gastrulation. The mesoderm cells derived from anterior and middle primitive streak firstly migrated laterally before moved toward to midline. The migrating cells might be regulated by *FGF* and *PDGF* signaling.

图1 鸡胚原肠胚期上胚层和中胚层细胞迁移模式

Fig.1 The cell migration pattern for epiblast and mesoderm during chick embryonic gastrulation

作为一个肿瘤抑制基因和PIP3磷酸酶在控制细胞迁移方面有其独立于磷脂的独特功能。*PTEN*的一个基本功能是控制EMT, 即依靠tyrosine磷酸酶活性和通过它的C末端的PDZ结合位点正确地结合于细胞间的依附连接点。上述信号基因的功能学研究将使我们更完整地理解胚胎发育中原胚肠形成期细胞迁移的调节机制, 从而有效地防止早期流产或先天性疾病发生。

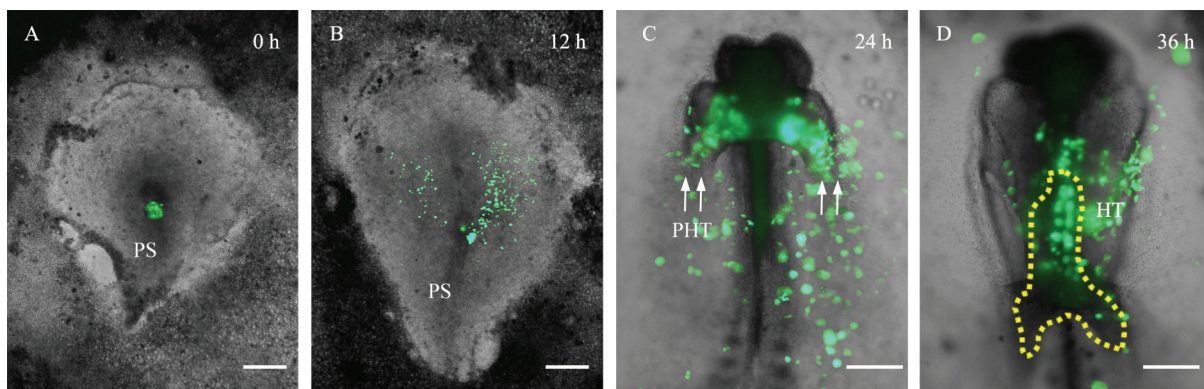
2 心脏发生过程中的细胞迁移

心脏是最早开始发育的器官, 其发生分为不同的阶段。在鸡胚中, 早期起源于原肠胚时期的中胚层, 在HH4期的原条开始出现第一生心区的细胞(图2A), 在HH5-HH6期时被认为是处于头部进程的两边脏壁中胚层对称的斑区细胞^[28-29], 被称为心脏新月体。心脏新月体发育成线性心管包括后来的左心室和房室管(AVC)^[30]。心肌前体细胞在鸡胚和鼠胚原条的前部区域, 这个时期他们还保留心脏命运的可塑性。随后这些细胞离开原条(图2B)迁移到位于头褶以下的前侧方向, 形成中线两侧的两组细胞(图2C)。这个时期心肌的特异性标记物开始表达。然后细胞开始扩展穿过中线形成一个新月体形状, 心脏新月体就是后来在中线融合形成的早期心管(图2D)。早期心管是一个心内膜管, 包含心肌细胞。心管经过右侧环化, 后部区域向前移动, 心脏通过环化进程和心肌的扩展被定型, 形成可辨别的心腔。

第一生心区是由位于前侧板的中胚层细胞簇生成的^[31], 这些细胞后来形成心管, 心管经过右侧环化时, 来自于脏壁中胚层的第二生心区的细胞参与到心管发育中, 第二生心区的细胞最终参与心脏流出通道、右心室、心房和流入通道区域的形成^[30]。随后, 通过集中在心管外部的细胞分化和增殖形成心房和心室的膈^[32]。重要的是, 部分心管(包括流出通道, OFT)内部弯曲, AVC和流入通道通过抑制T-box因子的活性, 不参与膈膜的发育^[33-35]。体内的标记实验说明部分第二生心区细胞在心管环化过程中参与房室管、心房和圆锥动脉干的形成。

第二生心区形成于HH10期时直心管中线前部的脏壁中胚层细胞, 这些细胞被细胞标记实验和鹌鹑到鸡的移植实验所确定^[36-38]。在早期心脏环化时期, 第二生心区前体位于咽头的脏壁中胚层。第二生心区前体细胞首先添加到心肌膜, 然后参与发育平滑肌到动脉极的心肌细胞^[39-40]。*FGF*和*BMP*细胞因子家族成员是再次诱导来自第一生心区心肌细胞的重要信号。*FGF-2,4*和*BMP4*在第二生心区及附近不表达。HH14期*FGF8*表达在侧咽部的外胚层和内胚层。*BMP-2*在脏壁中胚层流出通道心肌膜的尾部表达很强。第二生心区前体细胞增殖、迁移和分化失败会导致流出通道缩短和心脏环化异常^[41-42], 如: 法乐四联症和右室双出口(DORV)^[39,42]。

在正常的发育时期, 神经嵴细胞是位于咽弓尾部与主动脉弓的内皮细胞, 由于内胚层和腹侧咽的



移植GFP标记的组织块于正常HH4鸡胚受体第一生心区。A~D为第一生心区细胞分别在0, 12, 24, 36 h的迁移轨迹的荧光合成图示。PS: 原条; PHT: 原始心管; HT: 心管。标尺: A, B=500 μm; C, D=200 μm。

Transplanted GFP labeled tissue into the primary heart field (PHF) of an equivalently host staged embryo (HH4). A-D are the merge images of fluorescence and bright for PHF cells migration track in incubation 0, 12, 24 and 36 h, respectively. PS: primary streak; PHT: primary heart tube; HT: heart tube. Scale bar: A, B=500 μm; C, D=200 μm.

图2 心脏形成的前体细胞迁移轨迹

Fig.2 Precursor cell migration trajectory of heart tube formation

外胚层相互作用^[43], 超过48 h后神经嵴细胞迁移到流出通道^[44]。心脏神经嵴细胞是来自于第二生心区心肌膜到动脉极的正常补充。心脏神经嵴细胞迁移进入第3、4和6咽弓, 从那里一个细胞亚群迁移进入心脏流出通道, 参与流出进入肺和主动脉血管沟。除了直接参与心脏的发育之外, 嵴细胞还有一个间接的作用即调节咽头*FGF*信号^[45]。*FGF8*信号在正常心脏的咽弓发育过程中起重要作用^[45-47]。在心脏神经嵴细胞去除的胚胎中, 第二生心区不能添加心肌细胞到流出通道而且管道的延伸不足^[48]。神经嵴去除之后会导致流出通道变短, 心脏成环改变。

第二生心区和心脏神经嵴细胞关系密切, 有研究结果表明: 第二生心区提供心肌和血管平滑肌到心脏的动脉极。而且, 主动脉干和肺动脉干的平滑肌有两种来源: 远侧来自心脏神经嵴细胞; 近侧来自第二生心区。这意味着在动脉极处存在两种细胞连接: 第一是心肌和第二生心区来源的血管平滑肌, 第二是第二生心区来源的血管平滑肌和心脏神经嵴来源的血管平滑肌。

心脏细胞的纯系克隆分析显示: 从心肌膜的形成时间来看, 心脏是一个极化和分化的组织。这个组织中, 细胞定向生长在房室形成中是重要的^[49]。虽然在心管形成中发挥重要作用的关键因子已经被确定, 包括*GATA4*、*NKX2.5*、*dHAND*、*TBX5*和*RALDH2*, 但细胞极性的分子效应和细胞形状改变的机制仍然不清楚。

3 神经嵴细胞的迁移

据Hall^[50]的综述: 1868年, Wilhelm His发现在由神经沟愈合为神经管的过程中, 神经沟边缘与表面外胚层相延续的一部分神经外胚层细胞游离出来, 形成左右两条与神经管平行的细胞索, 位于表面外胚层的下方, 神经管的背外侧, 称之为神经嵴(neural crest), 到20世纪60年代, Weston和Johnston对鸡胚颅神经嵴(cranial neural crest)和躯干神经嵴(trunk neural crest)的研究打开了探索神经嵴细胞迁移的领域^[50]。由于迁移的神经嵴细胞将会分布到机体的各个部位, 从最早发生的器官——心脏, 到神经系统、腺体、骨骼、牙齿、眼睛等, 鉴于此, 有些学者甚至提出将神经嵴细胞定义为第四胚层的建议。神经嵴细胞迁移异常会引发许多疾病, 包括Waardenburg综合征^[51]和DiGeorge综合征^[52]等。

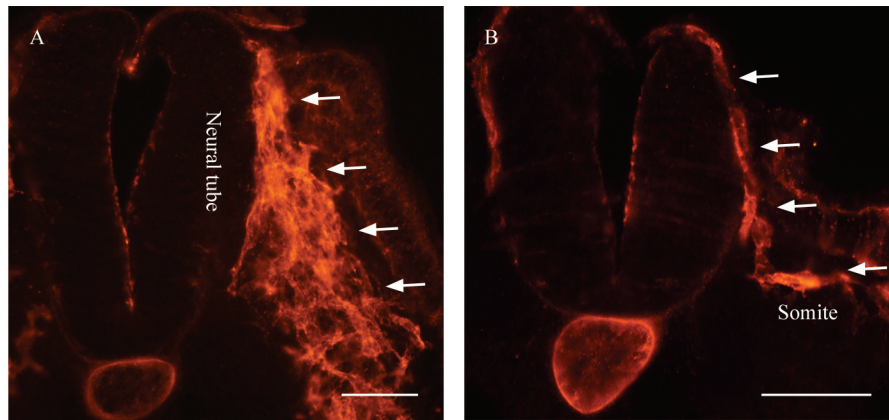
根据神经嵴在时间轴上形成的不同位置, 我们可以将其分为四个区域: 颅神经嵴、躯干神经嵴、迷走神经和骶骨神经嵴以及心脏神经嵴。神经嵴细胞的迁移大体有背侧和腹侧两条路线^[53], 我们可以用*NCAM (HNK-1)*抗体来标记正在迁移的神经嵴细胞。由于上文已经介绍了心脏神经嵴的迁移, 这部分我们主要介绍研究最多的颅神经嵴和躯干神经嵴细胞的迁移。

3.1 颅神经嵴细胞的迁移

颅神经嵴细胞的主要迁移路线是背外侧迁移^[54](在外胚层和底层中胚层之间迁移, 图3A)。利用鹌鹑一鸡的嵌合体实验发现颅神经嵴细胞能够发育为黑色素细胞、神经元、神经胶质细胞及真皮、软骨和骨骼的嵌合体等^[55]。通过这个实验也发现, 在HH10期很少一部分迁移的神经嵴细胞源于前脑, 大部分是源于间脑和中脑, 这些细胞腹侧的向视柄和前脑环绕迁移。HH12期在中脑外胚层旁侧迁移出来的细胞能够迁移至第一鳃弓(first branchial arch, BA1), 随后发育为部分下颌骨。最后, 来自后脑和末脑(将会进一步发育为7段菱脑节)的神经嵴细胞旁侧和腹侧迁移形成三个细胞群侵入鳃弓。通过鹌鹑神经管移植到鸡胚上的实验及*Dil*标记实验可以发现每一个菱脑节(rhombomere)来源的脑神经嵴的具体迁移分化^[56-57]: 来自中脑后部、r1-r2及少部分r3的脑神经嵴细胞形成BA1, 来自r4及部分r3和r5的脑神经嵴细胞形成BA2, 来自r6、r7及少量r5的脑神经嵴细胞形成BA3^[58-59]。

控制神经嵴细胞迁出并准确地迁移至鳃弓的信号通路是研究热点之一, 有一些信号系统的作用已被大家证实, 如: *BMP4*与源于r3和r5的神经嵴细胞的迁移有密切联系^[60-61], *BMP4*只表达在r3和r5水平, 将*BMP4*加入培养基中培养菱脑节的时候, 只有能够表达*BMP4*拮抗基因*noggin*的r4能够有神经嵴细胞迁出, 推测来源于r3和r5的神经嵴细胞可能参与到了*BMP4*介导的细胞凋亡中。当把r4神经嵴细胞移植到r3或r5的时候, 它们不再进行旁侧迁移, 说明神经嵴细胞的迁移更多地依赖于微环境而不是细胞自身的作用^[62]。除此之外, *Nrp1*、*Nrp2*及其配体*SEMA3A*、*SEMA3F*^[63-64]、*Eph/ephrin*信号通路^[65]和近几年发现的趋化因子*Sdf1*及受体*Cxcr4*和*Cxcr7*^[66]都与脑神经嵴细胞的迁移密切相关。

3.2 躯干神经嵴细胞的迁移



A: 颅神经嵴细胞的主要迁移路线是背外侧途径; B: 在HH13期, 躯干神经嵴细胞开始沿神经管和体节之间的腹侧途径迁移。绿色箭头: 迁移的神经嵴细胞。标尺=50 μm 。

A: neural crest cells at the cranial level migrate mainly in the dorsolateral pathway; B: neural crest cells at the trunk level migrate ventrally between the somites and neural tube at HH13 chick embryo. Green arrows: indication of migrating neural crest cells. Scale bar=50 μm .

图3 HNK-1标记神经嵴细胞的迁移

Fig.3 Migration of neural crest cells marked by HNK-1

在HH13期, 躯干神经嵴细胞开始沿神经管和体节之间的腹侧途径迁移(图3B), 在胚胎发育的胸腔水平, 神经嵴细胞在神经管的背侧表面出现并且沿背侧及外侧迁出, 而在第V和第VI体节间的神经嵴细胞沿肌间节腹侧迅速迁出并到达背主动脉^[67-69], 这些细胞最终有可能分化为躯干交感神经节^[68,70]。第VII体节水平的神经嵴细胞侵入体节生皮节和生肌节之间^[67], 以生肌节的基板作为基础^[71], 沿着内侧到外侧的轨迹迁移^[72]。当神经嵴细胞迁移穿过体节, 它们开始融合并形成周围神经系统的神经节, 一些靠近背侧神经管的细胞群形成背根神经节, 另一些停留在背主动脉的腹侧迁移的神经嵴细胞形成早期的交感神经链^[73]。随着胚胎的发育, 这些背侧迁移的神经嵴细胞会形成第二交感神经链, 到了18~24体节水平, 腹侧迁移和背侧迁移的细胞在靠近肾的位置融合在一起并发育为肾上腺髓质, 其他腹侧迁移的神经嵴细胞迁移形成腹根运动纤维并分化为胶质细胞^[74-75]。总之, 神经嵴细胞的腹侧迁移需要两个条件: 控制穿过体节迁移途径的分子机制和沿腹侧途径迁移的不同谱系细胞的准确定位及分化。

神经嵴细胞在HH19期开始才沿着背侧途径迁移并最终分化为定位于皮肤的黑素细胞^[76-77]。同颅神经嵴细胞不同的是, 一些实验证实这部分神经嵴细胞在离开神经管进入背侧迁移之前就已经决定了向黑素细胞分化^[78-81]。黑素细胞的实验支持神经嵴

细胞早期就具有了独特的细胞性质, 并按照特殊的路线进行迁移分化。因而, 对于神经嵴细胞的发育模式有两种猜想: 第一种是假定神经嵴细胞是一种多功能的细胞前体, 能够在胚胎发育的过程中迁移并且根据不同的微环境来分化; 另一种观点认为神经嵴细胞早期就具有了独特的细胞性质并按照特殊的路线迁移分化, 当然现阶段还没有足够的证据证明哪一种观点是正确的。

4 小结与展望

总之, 在胚胎发育的过程中, 细胞迁移是一个非常非常重要的过程, 从最初的原条形成时的中胚层细胞迁移, 到最早形成的器官——心脏的发育, 再到后来能够迁移至机体不同组织的神经嵴细胞, 都伴随着细胞迁移的过程。对于调控细胞迁移机制的探讨才刚刚开始, 随着活体胚胎细胞电穿孔技术、移植技术、Real Time-lapse等细胞生物学技术及基因沉默、原位杂交、Western blot、RT-PCR等分子生物学技术的日益成熟, 结合鸡胚早期发育的特点, 有助于我们更好地诠释各个阶段细胞迁移的发生规律, 同时对相关的先天性疾病的临床诊断和治疗也有重要意义。

参考文献 (References)

- 1 Rupp PA, Rongish BJ, Czirok A, Little CD. Culturing of avian

- embryos for time-lapse imaging. *Biotechniques* 2003; 34(2): 274-8.
- 2 Stern CD. Gastrulation: From cells to embryo. New York Cold Spring Harbor Laboratory 2004.
- 3 Skromne I, Stern CD. Interactions between Wnt and Vg1 signaling pathways initiate primitive streak formation in the chick embryo. *Development* 2001; 128(15): 2915-27.
- 4 Chuai M, Zeng W, Yang X, Boychenko V, Glazier JA, Weijer CJ. Cell movement during chick primitive streak formation. *Dev Biol* 2006; 296(1): 137-49.
- 5 Cui C, Yang X, Chuai M, Glazier JA, Weijer CJ. Analysis of tissue flow patterns during primitive streak formation in the chick embryo. *Dev Biol* 2005; 284(1): 37-47.
- 6 Voiculescu O, Bertocchini F, Wolpert L, Keller RE, Stern CD. The amniote primitive streak is defined by epithelial cell intercalation before gastrulation. *Nature* 2007; 449(7165): 1049-52.
- 7 Chuai M, Weijer CJ. Who moves whom during primitive streak formation in the chick embryo. *Hfsp J* 2009; 3(2): 71-6.
- 8 Zamir EA, Rongish BJ, Little CD. The ECM moves during primitive streak formation—computation of ECM versus cellular motion. *PLoS Biol* 2008; 6(10): e247.
- 9 Keller R. Cell migration during gastrulation. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17(5): 533-41.
- 10 Chuai M, Weijer CJ. The mechanisms underlying primitive streak formation in the chick embryo. *Curr Top Dev Biol* 2008; 81: 135-56.
- 11 Czirok A, Rupp PA, Rongish BJ, Little CD. Multi-field 3D scanning light microscopy of early embryogenesis. *J Microsc* 2002; 206(Pt 3): 209-17.
- 12 Verweer PJ, Swoger J, Pampaloni F, Greger K, Marcello M, Stelzer EH. High-resolution three-dimensional imaging of large specimens with light sheet-based microscopy. *Nat Methods* 2007; 4(4): 311-3.
- 13 Keller PJ, Stelzer EH. Quantitative *in vivo* imaging of entire embryos with digital scanned laser light sheet fluorescence microscopy. *Curr Opin Neurobiol* 2008; 18(6): 624-32.
- 14 Keller PJ, Schmidt AD, Wittbrodt J, Stelzer EH. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *Science* 2008; 322(5904): 1065-9.
- 15 Psychoyos D, Stern CD. Fates and migratory routes of primitive streak cells in the chick embryo. *Development* 1996; 122(5): 1523-34.
- 16 Nakaya Y, Sukowati EW, Wu Y, Sheng G. RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation. *Nat Cell Biol* 2008; 10(7): 765-75.
- 17 Kam Z, Hanser B, Gustafsson MG, Agard DA, Sedat JW. Computational adaptive optics for live three-dimensional biological imaging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(7): 3790-5.
- 18 Hom EF, Marchis F, Lee TK, Haase S, Agard DA, Sedat JW. AIDA: An adaptive image deconvolution algorithm with application to multi-frame and three-dimensional data. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 2007; 24(6): 1580-600.
- 19 Stern CD, Hatada Y, Selleck MA, Storey KG. Relationships between mesoderm induction and the embryonic axes in chick and frog embryos. *Dev Suppl* 1992: 151-6.
- 20 Psychoyos D, Stern CD. Restoration of the organizer after radical ablation of Hensen's node and the anterior primitive streak in the chick embryo. *Development* 1996; 122(10): 3263-73.
- 21 Yang X, Dormann D, Munsterberg AE, 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(3): 425-37.
- 22 McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico SG, Gilhooley HJ, Kingsman AJ, *et al.* Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep* 2004; 5(7): 728-33.
- 23 Yue Q, Wagstaff L, Yang X, Weijer C, Munsterberg A. Wnt3a-mediated chemorepulsion controls movement patterns of cardiac progenitors and requires RhoA function. *Development* 2008; 135(6): 1029-37.
- 24 Sweetman D, Wagstaff L, Cooper O, Weijer C, Munsterberg 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: 63.
- 25 Czirok A, Rongish BJ, Little CD. Extracellular matrix dynamics during vertebrate axis formation. *Dev Biol* 2004; 268(1): 111-22.
- 26 Rozario T, Dzamba B, Weber GF, Davidson LA, DeSimone DW. The physical state of fibronectin matrix differentially regulates morphogenetic movements *in vivo*. *Dev Biol* 2009; 327(2): 386-98.
- 27 Davidson LA, Marsden M, Keller R, Desimone DW. Integrin alpha5beta1 and fibronectin regulate polarized cell protrusions required for *Xenopus* convergence and extension. *Curr Biol* 2006; 16(9): 833-44.
- 28 ME. R. The heart-forming areas of the early chick blastoderm. *Physiol Zool* 1943; 16: 22-42.
- 29 Selleck MA, Stern CD. Fate mapping and cell lineage analysis of Hensen's node in the chick embryo. *Development* 1991; 112(2): 615-26.
- 30 Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 2005; 6(11): 826-35.
- 31 Harvey RP. Patterning the vertebrate heart. *Nat Rev Genet* 2002; 3(7): 544-56.
- 32 Christoffels VM, Keijsers AG, Houweling AC, Clout DE, Moorman AF. Patterning the embryonic heart: Identification of five mouse Iroquois homeobox genes in the developing heart. *Dev Biol* 2000; 224(2): 263-74.
- 33 Harrelson Z, Kelly RG, Goldin SN, Gibson-Brown JJ, Bollag RJ, Silver LM, *et al.* Tbx2 is essential for patterning the atrioventricular canal and for morphogenesis of the outflow tract during heart development. *Development* 2004; 131(20): 5041-52.
- 34 Singh MK, Christoffels VM, Dias JM, Trowe MO, Petry M, Schuster-Gossler K, *et al.* Tbx20 is essential for cardiac cham-

- ber differentiation and repression of Tbx2. *Development* 2005; 132(12): 2697-707.
- 35 Bakker ML, Boukens BJ, Mommersteeg MT, Brons JF, Wakker V, Moorman AF, *et al.* Transcription factor Tbx3 is required for the specification of the atrioventricular conduction system. *Circ Res* 2008; 102(11): 1340-9.
- 36 Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R, Norris RA, Kern MJ, Eisenberg CA, *et al.* The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol* 2001; 238(1): 97-109.
- 37 Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, Stadt HA, Hutson MR, Platt DH, *et al.* Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development* 2001; 128(16): 3179-88.
- 38 Kelly RG, Buckingham ME. The anterior heart-forming field: Voyage to the arterial pole of the heart. *Trends Genet* 2002; 18(4): 210-6.
- 39 Waldo KL, Hutson MR, Stadt HA, Zdanowicz M, Zdanowicz J, Kirby ML. Cardiac neural crest is necessary for normal addition of the myocardium to the arterial pole from the secondary heart field. *Dev Biol* 2005; 281(1): 66-77.
- 40 Abu-Issa R, Kirby ML. Heart field: From mesoderm to heart tube. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 45-68.
- 41 Creemers EE, Sutherland LB, McAnally J, Richardson JA, Olson EN. Myocardin is a direct transcriptional target of Mef2, Tead and Foxo proteins during cardiovascular development. *Development* 2006; 133(21): 4245-56.
- 42 Hutson MR, Kirby ML. Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18(1): 101-10.
- 43 Waldo KL, Kumiski D, Kirby ML. Cardiac neural crest is essential for the persistence rather than the formation of an arch artery. *Dev Dyn* 1996; 205(3): 281-92.
- 44 Waldo K, Miyagawa-Tomita S, Kumiski D, Kirby ML. Cardiac neural crest cells provide new insight into septation of the cardiac outflow tract: Aortic sac to ventricular septal closure. *Dev Biol* 1998; 196(2): 129-44.
- 45 Farrell MJ, Burch JL, Wallis K, Rowley L, Kumiski D, Stadt H, *et al.* FGF-8 in the ventral pharynx alters development of myocardial calcium transients after neural crest ablation. *J Clin Invest* 2001; 107(12): 1509-17.
- 46 Abu-Issa R, Smyth G, Smoak I, Yamamura K, Meyers EN. Fgf8 is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse. *Development* 2002; 129(19): 4613-25.
- 47 Hutson MR, Kirby ML. Neural crest and cardiovascular development: A 20-year perspective. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003; 69(1): 2-13.
- 48 Yelbuz TM, Waldo KL, Kumiski DH, Stadt HA, Wolfe RR, Leatherbury L, *et al.* Shortened outflow tract leads to altered cardiac looping after neural crest ablation. *Circulation* 2002; 106(4): 504-10.
- 49 Meilhac SM, Esner M, Kelly RG, Nicolas JF, Buckingham ME. The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Dev Cell* 2004; 6(5): 685-98.
- 50 Hall BK. The neural crest and neural crest cells: Discovery and significance for theories of embryonic organization. *J Biosci* 2008; 33(5): 781-93.
- 51 Ghosh SK, Bandyopadhyay D, Ghosh A, Biswas SK, Mandal RK. Waardenburg syndrome: A report of three cases. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2010; 76(5): 550-2.
- 52 Kinoshita H, Kokudo T, Ide T, Kondo Y, Mori T, Homma Y, *et al.* A patient with DiGeorge syndrome with spina bifida and sacral myelomeningocele, who developed both hypocalcemia-induced seizure and epilepsy. *Seizure* 2010; 19(5): 303-5.
- 53 Erickson CA, Reedy MV. Neural crest development: The interplay between morphogenesis and cell differentiation. *Curr Top Dev Biol* 1998; 40: 177-209.
- 54 Tosney KW. The segregation and early migration of cranial neural crest cells in the avian embryo. *Dev Biol* 1982; 89(1): 13-24.
- 55 Couly GF, Coltey PM, Le Douarin NM. The triple origin of skull in higher vertebrates: A study in quail-chick chimeras. *Development* 1993; 117(2): 409-29.
- 56 Kulesa PM, Fraser SE. Neural crest cell dynamics revealed by time-lapse video microscopy of whole embryo chick explant cultures. *Dev Biol* 1998; 204(2): 327-44.
- 57 Birgbauer E, Sechrist J, Bronner-Fraser M, Fraser S. Rhombomeric origin and rostrocaudal reassignment of neural crest cells revealed by intravital microscopy. *Development* 1995; 121(4): 935-45.
- 58 Kulesa P, Ellies DL, Trainor PA. Comparative analysis of neural crest cell death, migration, and function during vertebrate embryogenesis. *Dev Dyn* 2004; 229(1): 14-29.
- 59 Noden DM, Trainor PA. Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *J Anat* 2005; 207(5): 575-601.
- 60 Lumsden A, Clarke JD, Keynes R, Fraser S. Early phenotypic choices by neuronal precursors, revealed by clonal analysis of the chick embryo hindbrain. *Development* 1994; 120(6): 1581-9.
- 61 Smith A, Graham A. Restricting Bmp-4 mediated apoptosis in hindbrain neural crest. *Dev Dyn* 2001; 220(3): 276-83.
- 62 Farlie PG, Kerr R, Thomas P, Symes T, Minichiello J, Hearn CJ, *et al.* A paraxial exclusion zone creates patterned cranial neural crest cell outgrowth adjacent to rhombomeres 3 and 5. *Dev Biol* 1999; 213(1): 70-84.
- 63 Schwarz Q, Vieira JM, Howard B, Eickholt BJ, Ruhrberg C. Neuropilin 1 and 2 control cranial gangliogenesis and axon guidance through neural crest cells. *Development* 2008; 135(9): 1605-13.
- 64 Gammill LS, Gonzalez C, Bronner-Fraser M. Neuropilin 2/semaphorin 3F signaling is essential for cranial neural crest migration and trigeminal ganglion condensation. *Dev Neurobiol* 2007; 67(1): 47-56.
- 65 Mellott DO, Burke RD. Divergent roles for Eph and ephrin in avian cranial neural crest. *BMC Dev Biol* 2008; 8: 56.

- 66 Olesnick Killian EC, Birkholz DA, Artinger KB. A role for chemokine signaling in neural crest cell migration and craniofacial development. *Dev Biol* 2009; 333(1): 161-72.
- 67 Loring JF, Erickson CA. Neural crest cell migratory pathways in the trunk of the chick embryo. *Dev Biol* 1987; 121(1): 220-36.
- 68 Schwarz Q, Maden CH, Vieira JM, Ruhrberg C. Neuropilin 1 signaling guides neural crest cells to coordinate pathway choice with cell specification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(15): 6164-9.
- 69 Spence SG, Poole TJ. Developing blood vessels and associated extracellular matrix as substrates for neural crest migration in Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Int J Dev Biol* 1994; 38(1): 85-98.
- 70 Kulesa PM, Lefcort F, Kasemeier-Kulesa JC. The migration of autonomic precursor cells in the embryo. *Auton Neurosci* 2009; 151(1): 3-9.
- 71 Oakley RA, Lasky CJ, Erickson CA, Tosney KW. Glycoconjugates mark a transient barrier to neural crest migration in the chicken embryo. *Development* 1994; 120(1): 103-14.
- 72 Rickmann M, Fawcett JW, Keynes RJ. The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite. *J Embryol Exp Morphol* 1985; 90: 437-55.
- 73 Kasemeier-Kulesa JC, Kulesa PM, Lefcort F. Imaging neural crest cell dynamics during formation of dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Development* 2005; 132(2): 235-45.
- 74 Vogel KS, Weston JA. The sympathoadrenal lineage in avian embryos. II. Effects of glucocorticoids on cultured neural crest cells. *Dev Biol* 1990; 139(1): 13-23.
- 75 Vogel KS, Weston JA. The sympathoadrenal lineage in avian embryos. I. Adrenal chromaffin cells lose neuronal traits during embryogenesis. *Dev Biol* 1990; 139(1): 1-12.
- 76 Serbedzija GN, Bronner-Fraser M, Fraser SE. A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration. *Development* 1989; 106(4): 809-16.
- 77 Erickson CA, Duong TD, Tosney KW. Descriptive and experimental analysis of the dispersion of neural crest cells along the dorsolateral path and their entry into ectoderm in the chick embryo. *Dev Biol* 1992; 151(1): 251-72.
- 78 Richardson MK, Sieber-Blum M. Pluripotent neural crest cells in the developing skin of the quail embryo. *Dev Biol* 1993; 157(2): 348-58.
- 79 Reedy MV, Faraco CD, Erickson CA. The delayed entry of thoracic neural crest cells into the dorsolateral path is a consequence of the late emigration of melanogenic neural crest cells from the neural tube. *Dev Biol* 1998; 200(2): 234-46.
- 80 Wakamatsu Y, Mochii M, Vogel KS, Weston JA. Avian neural crest-derived neurogenic precursors undergo apoptosis on the lateral migration pathway. *Development* 1998; 125(21): 4205-13.
- 81 Thomas AJ, Erickson CA. FOXD3 regulates the lineage switch between neural crest-derived glial cells and pigment cells by repressing MITF through a non-canonical mechanism. *Development* 2009; 136(11): 1849-58.

Gene Regulation of Cell Migration During the Development of Early Chick Embryo

Wang Guang, Li Yan, Yang Xuesong*

(Department of Histology and Embryology, Medical College, Key Laboratory for Regenerative Medicine of the Ministry of Education, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract We employ the chick embryo, a classically embryological model for studying developmental events, to investigate cell migration modulated by early expressing genes in embryogenesis by transgenesis during the development of early chick embryo. This research eventually leads to understanding the fundamental questions in developmental biology and to describing the development of some correlative congenital diseases as well. Cell migration dramatically occurs during the three germ layers formation at gastrula, generation of straight heart tube and delamination of neural crest after neural tube closure. In this review, we will discuss the current research progresses of the cell migration regulated by relevant genes in the three portions mentioned above at cellular and molecular levels.

Key words cell migration; gene regulation; primitive streak; heart tube; neural crest

This work was supported by the National Basic Research Program of China (No.2010CB529702) and the National Natural Science Foundation of China (No.30971493, No.31071054)

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