

脊椎动物肢芽发育图式形成的分子机理

邱 嵘

(解放军兰州医学高等专科学校 730020)

洪水根

(厦门大学细胞生物学研究室 361005)

动物的附肢都是在个体发育的特定阶段,由肢原基——肢芽(limb bud)发育而来的。脊椎动物的肢芽是从胚胎的预定肢区(prospectivve limb area)向两侧伸出的突起,由肢芽中胚层和肢芽外胚层组成。

发育生物学家早就发现,肢芽是一个自我组织体系(self-organizing system),当将一个胚胎的肢芽移植至另一胚胎的适宜位置时,植入的肢芽会发育成为形态完全正常的异位附肢(ectopic limb)。肢芽发育图式的形成是肢芽中胚层与肢芽外胚层之间相互诱导作用的结果。最近十几年来,随着现代生物技术的发展及其在发育生物学研究中的应用,人们对肢芽图式形成过程中诱导作用的机理在分子水平上有了突破性的认识。现在,发育生物学家已初步揭示出了脊椎动物肢芽图式形成的分子机理,本文就此作一综述。

一、肢芽的图式形成与肢轴的决定

由于脊椎动物的附肢结构具有高度不对称性,肢芽的图式形成包括三个肢轴(limb axe)的决定,即近侧远侧轴、前后轴(anterior-posterior axe)和背腹轴(dorsalventral axe)的决定。

1. 近侧远侧端轴的决定

肢芽的近侧远侧轴指从肩(腰)带到指(趾)端的轴。在附肢发生过程中,随着肢芽的发育,肢芽近端中胚层的间充质细胞不断分化,肢芽远端中胚层的间充质细胞则持续增殖,从而形成肢芽发育的近远端轴。肢芽的近远端轴决定

于肢芽远端外胚层的一个特殊的区域,人们把这一肢芽外胚层区域称作顶端外胚层嵴或顶端表皮嵴(AER)。^[1]

2. 前后轴的决定

肢芽的前后轴指从拇指(趾)至小指(趾)侧的肢轴。大量证据表明,后部肢芽中胚层有一区域对肢芽的前后轴的形成起着决定性作用,该肢芽中胚层区域被称为极化活性带(zone of polarizing activity, ZPA)^[2,3]。然而,肢芽中胚层 ZPA 活性的维持依赖于肢芽 AER 的存在。因此,目前普遍认为 ZPA 主要决定着肢芽的前后轴,但这种决定作用依赖于 ZPA 与 AER 的相互作用^[4]。

3. 背腹轴的决定

肢芽的背腹轴指垂直于附肢背面和腹面的肢轴。尽管目前发育生物学家还未确定决定该轴的肢芽区域,但已有许多证据表明,肢芽顶端的外胚层主要决定着肢芽的背腹轴^[5-8]。

二、肢芽发育图式形成的分子基础

不少实验结果表明,以下分子在脊椎动物的肢芽发育图式形成中起着重要作用。

1. Shh 蛋白

Shh 蛋白是发育调控基因 Shh(sonic hedgehog)的表达产物,它是一种分泌蛋白信号分子。在脊椎动物的个体发育中,Shh 蛋白对体节、脊索、神经板、眼和附肢的形成均起着重要作用^[9]。在脊椎动物的肢芽中,Shh 蛋白在 ZPA 区表达;植入肢芽前缘的外源 Shh 蛋白会使该肢芽发育成的附肢与在同样部位植入另

— ZPA 时肢芽所发育成的附肢结构一致,呈镜像重复(mirror-image duplication)的异常肢骨模式^[9-11]。因此,目前普遍认为,Shh 蛋白是 ZPA 决定前后轴的主要诱导因子。

2. 生长因子

生长因子是由细胞自分泌或旁分泌的多功能的多肽分子,在动物的个体发育中起着举足轻重的作用。生长因子包括以下家族:PDGF 家族、EGF 家族、FGF 家族、IGF 家族和 TGF β 家族等。现已发现,TGF 家族成员和 TGF β 家族成员参与了脊椎动物肢芽发育图式的形成^[8,10-18]。

大量证据说明,FGF 家族成员是 AER 决定近远端轴和维持 ZPA 活性的主要诱导分子^[10-18]。例如,在发育的鸡翅中,FGF 能替代 AER 来决定近远端轴和维持 ZPA 活性。FGF 家族的成员在肢芽图式形成中的作用还不只限于此,向处于第 13 至第 17 期发育阶段的鸡胚肺部植入 FGF 源时,会诱导鸡胚在植入部位产生形态完全正常的额外附肢^[15]。因此,FGF 家族成员在肢芽图式形成中的作用还有待进一步研究。

TGF β 家族的成员在脊椎动物肢芽图式形成过程的作用也不容忽视。Bmp-2 在鸡的肢芽图式形成过程中表达,有实验表明它可能是 Shh 蛋白的调控下游靶之一^[9,10]。最近,Parr, B. A. 等(1995)利用胚胎干细胞基因打靶(gene targeting)技术,研究了 TGF β 家族的成员 Wnt-7 a 在小鼠肢芽图式形成过程中的作用,结果显示,Wnt-7 a 不仅是外胚层决定肢芽背腹轴的主要诱导分子,而且还影响肢芽前后轴的发育图式^[8]。因此,TGF β 家族成员也是决定肢芽发育图式的关键分子。

3. 同源异形域蛋白

同源异形域蛋白(homeodomain protein)是指含有同源异形域(homeodomain,由大约 180 个半保守的核苷酸序列组成的同源异形框。homeobox,所编码的氨基酸序列所构成的结构域。)的蛋白质。至今所发现的同源异

形域蛋白质都是转录因子,对发育基因的时空表达起着举足轻重的作用。实验证明,肢芽发育图式的形成过程也有同源异形域蛋白表达与作用^[10,16-20]。例如,Laufer 等(1994)发现,Hox d-g 与 Hoxd-10 在鸡胚发育的第 16 期于预定翅区表达,Hoxd-11 至 Hoxd-13 则在第 18 期之后,伴随 Shh 蛋白的表达而依次开始表达,从而推测 Hoxd-9 与 Hoxd-10 可能是 Shh 基因表达的上游调控因子,而 Hoxd-11 至 Hoxd-13 则可能是 Shh 蛋白调控的下游靶^[10]。Charites 等用转基因技术改变 Hoxb-8 在小鼠前肢芽的表达域(domains of Hoxb-8 expression)时,Shh 蛋白的表达域也随之改变,由该肢芽发育成的附肢结构异常^[20]。因此,同源异形域蛋白在肢芽的图式形成中,至少可以通过影响 ZPA 来起作用。

4. 视黄酸类似物

视黄酸类似物(Retinoid)指维生素 A 的类似物或代谢物,如视黄醛、视黄酸等。视黄酸类似物是动物发育不可缺少的形态发生因子(morphogen)。80 年代初,就有人发现,植入肢芽前缘的视黄酸源能诱导该肢芽发育成类似植入额外 ZPA 所诱导的镜像重复的异常附肢^[21-23]。Riddle 等(1993)发现,植入肢芽前缘的视黄酸源诱导 Shh 蛋白的异位表达^[13]。由此可见,视黄酸类似物可以通过影响 ZPA 而参与肢芽的发育图式形成。

三、肢芽发育图式形成的分子模型

综上所述,对脊椎动物肢芽发育图式形成的机理可初步提出如下分子模型(如图所示):

1. 脊椎动物肢芽发育图式的形成表现在 3 个肢轴:近侧远侧轴、前后轴、背腹轴的决定,它们分别主要由肢芽外胚层的 AER、肢芽中胚层的 ZPA 和肢芽外胚层决定;

2. FGF 家族成员、Shh 蛋白和 TGF β 家族成员(如 Wnt-7 a)分别是 AER、ZPA 和外

胚层决定三个肢轴的关键诱导分子;

3. AER 与 ZPA 之间存在一个正反馈环路,使这两个区域内 FGF 与 Shh 的表达相互激活; TGF β 家族成员(如 Wnt-7a)通过一定途径影响 ZPA 中 Shh 的表达,因而通过 FGF、Shh 和 TGF β 家族成员(如 Wnt-7a)形成一个协调的信号因子调控网络,从而使 3 个肢轴的图式形成协调地进行;

4. 不同时间在肢芽表达的不同同源异形域蛋白从 Shh 蛋白的上游或下游以直接或间接的方式进入肢芽图式形成发育基因表达的调控网络;

5. 视黄酸类似物作为一种形态发生因子,直接或间接地调控 Shh 蛋白与 FGF 的表达,影响肢芽的发育图式。

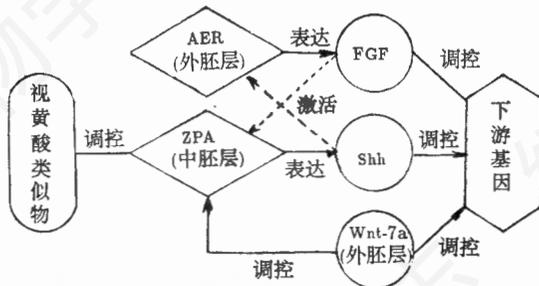


图 脊椎动物肢芽图式形成的分子模型

四、存在的问题及其展望

尽管现在人们对脊椎动物肢芽发育图式形成的分子机理已有了一定的认识,但上述模型只是个雏形,有许多问题有待更深入的研究来阐明。例如,上述模型中提出的各种信号分子调控的具体分子途径是什么?各种动物在生理条件下具体起作用的是何种 FGF 和 TGF β 家族的成员?在生理条件下不同的同源异形域蛋白在上述模型中的具体位置在哪?其直接靶基因是谁?对上述斯芬蒂斯之谜虽然人们还未找到答案,但已对某些问题的解答找到了一些线索。例如,人们发现 Shh 蛋白在果蝇的同源蛋白 Hh 的信号传递途径与依赖于 cAMP 的蛋白激酶 A (cAMP dependent protein kinase

A, PKA) 有关^[24,25]。从而将 Hh 蛋白的信号传递与细胞的重要第二信使 cAMP 联系起来,无疑,它将对 Shh 信号传递途径的揭示提供了可能的突破点。又如,近年来人们从分子水平上对视黄酸类似物受体作了全面深入的研究^[26],这为肢芽图式形成过程中视黄酸类似物作用机理的探明创造了条件。因此,随着研究的深入,关于脊椎动物肢芽发育的分子机理的这个雏形终将会被更完善的模型所取代。

摘要

本文简要介绍了有关脊椎动物肢芽发育图式形成分子机理研究的一些进展,提出了一个分子模型。肢芽发育图式的形成是肢芽外胚层与肢芽中胚层相互诱导的结果。肢芽外胚层 AER 表达的 FGF、肢芽中胚层表达的 Shh 蛋白、肢芽外胚层表达的 TGF β 家族成员(如 Wnt-7a)是分别决定肢芽的近远端轴、前后轴和背腹轴的关键分子。视黄酸类似物和同源异形蛋白直接或间接地调节 Shh 蛋白和 FGF 的表达,影响肢芽的图式形成。这些重要的调控分子通过一定途径相互调节,形成一个协调的基因表达调控网络,从而使肢芽的图式形成过程中 3 个肢轴的形成协调进行。

参考文献

- [1] Summerbell, D. et al., 1973, *Nature*, 224: 492-496.
- [2] Souders, J. W., 1972, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 193: 29-42.
- [3] Souders, J. J. and Reuss, C., 1994, *Dev. Biol.*, 38: 41-50.
- [4] Tabin, C., 1995, *Cell*, 80: 671-674.
- [5] MacCabe, J. A. et al., 1974, *Dev. Biol.*, 39: 69-82.
- [6] Stark, R. J. and Searls, R. L., 1974, *Dev. Biol.*, 38: 51-63.
- [7] Gedespan, J. S. and MacCabe, J. A., 1987, *Dev. Biol.*, 124: 398-408.
- [8] Parr, A. B. and McMahon, A. P., 1995, *Nature*, 374: 350-353.
- [9] Nobert, P., 1995, *Cell*, 80: 517-520.

- [10] Laufer, E. et al., 1994, *Cell*, 80: 739—746.
- [11] Niswander, L. et al., 1994, *Nature*, 371: 609—612.
- [12] Fallon, J. F. et al., 1994, *Science*, 264: 104—107.
- [13] Riddle, R. D. et al., 1993, *Cell*, 75: 1401—1416.
- [14] Vogel, A. and Tickle, C., 1994, *Development*, 119: 199—206.
- [15] Wilkinson, D. G. et al., 1989, *Development*, 105: 131—136.
- [16] Cohn, M. J. et al., 1995, *Cell*, 80: 739—746.
- [17] Vogel, A. et al., 1995, *Dev Bid.*, 171: 507—520.
- [18] Francis, P. H. et al., 1994, *Development*, 120: 209—218.
- [19] McGinnis, W. and Krumlauf, R., 1992, *Development*, 114: 755—768.
- [20] Charite, J. et al., 1995, *Cell*, 78: 589—601.
- [21] Summebell, D., 1983, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 78: 269—289.
- [22] Tickle, C. et al., 1982, *Nature*, 296: 564—565.
- [23] Wanek, N. et al., 1991, *Nature*, 350: 81—83.
- [24] Blair, S. S., 1995, *Nature*, 373: 656—657.
- [25] Lepage, T. et al., 1995, *Nature*, 373: 711—715.
- [26] Giguere, V. et al., 1987, *Nature*, 330: 624.

γ-微管蛋白的研究进展

梁 爱 华

(山西大学生命科学系 太原 030006)

微管是构成细胞骨架的主要成分。而组成微管的主要结构成分是由α-、β-微管蛋白构成的异二聚体。各类生物的α-微管蛋白和β-微管蛋白在氨基酸序列上有很高的同源性,均大于62%。α-与β-微管蛋白之间氨基酸的同源性一般在30%—40%之间。长期以来α-、β-微管蛋白被认为是微管蛋白大家族中的两大主要成员,近几年的研究表明这一结论是不确切的,至少是不完善的。人们在微管蛋白家族中又发现了第三个成员——γ-微管蛋白^[1]。尽管人们对γ-微管蛋白的了解和认识远不如象对α-、β-微管蛋白那么多,但从许多实验结果来看,同α-、β-微管蛋白一样,γ-微管蛋白也存在于所有的真核生物中。它不是构成微管的主要结构成分,但却是微管执行其功能所必不可少的。它位于细胞内微管组织中心(microtubule organizing centers, MTOCs),可能对微管的形成及微管极性的确定起重要作用。

本文介绍γ-微管蛋白的发现、基因的克隆、该蛋白在细胞中的定位及其功能方面的研究进展。

一、γ-微管蛋白的发现

1989年, Oakley^[1]首次从一种线状真

菌——构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中发现了γ-微管蛋白。该实验小组在1985年从这种真菌中分离到了对热敏感的β-微管蛋白的突变体(mutation)-benA33的回复体(revertants)。他们推测benA33蛋白阻止细胞在高温下进行有丝分裂和生长主要是抑制了微管的解聚所造成的^[2]。在2604个benA33的回复体中,有许多是α-、β-微管蛋白的突变体,还有两种突变体mipA, mipB^[3]的基因是以前没有研究过的。基于mipA、mipB突变体可以使benA33突变体的功能得以恢复这一事实, Oakley等推测mipA、mipB与微管的功能有关。当他们用基因组步移法(chromosome walking)将mipA基因克隆并测序后, Oakley意外的发现这一基因的产物既不是α-微管蛋白,也不是β-微管蛋白,但它与其它生物的α-微管蛋白及β-微管蛋白的同源性分别为28.9%—31.7%和33.3%—35.2%。而各类生物中的α-与β-微管蛋白之间的同源性为30%—40%。显然这一蛋白与α-及β-微管蛋白同属一个大家族。Oakley将其命名为γ-微管蛋白^[1]。

二、γ-微管蛋白是保守的蛋白质

γ-微管蛋白的发现向人们提出了许多问