

# 中胚层诱导中反应系统的分子生物学研究

寿 伟 年

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

中胚层诱导机制的研究大体上应该包括两方面的内容：“诱导”本身的机制，即植物半球细胞是通过怎样的方式诱导动物半球细胞的；目前在这个领域中，主要是对诱导因子的研究。另外是对反应系统的研究，即动物半球细胞受到诱导后，所发生的一系列的变化，还包括对反应能力(competence)的研究等等。第一个方面的内容已在另文中作了较为详细的论述<sup>[1]</sup>，本文只着重讨论近几年来对反应系统的研究成果。

为了从基因本水平上搞清诱导之后细胞所发生的变化，人们首先必须寻找一系列分子标志(Molecular marker)，这个标志不仅能告诉我们“诱导”是否发生，而且它能反映出被诱导细胞的分化特性或分化状况。所以，可以说近几年的研究进展主要是在基因水平上发现了许多标志。这里我们将主要讨论五个目前看来非常重要的分子标志，心肌肌动蛋白(cardiac muscle actin), XMyoD, Xtwi, Mix. 1 和 Xhox 3。

## 一、爪蟾心肌肌动蛋白基因

心肌肌动蛋白基因是最早用来研究诱导与某一特殊基因表达关系的基因。许多研究者用它的表达特性来分析诱导的机理。

心肌肌动蛋白在爪蟾胚胎主要分布在肌肉中；但在成体，主要分布于心肌中。心肌肌动蛋白基因最早是在原肠胚开始表达，大约距中胚层诱导起始9小时之后。因此，它曾经被认为是肌肉细胞分化的最早标志<sup>[2]</sup>。另外，与它同时开始表达的还有另一类肌动蛋白基因，即细胞骨架肌动蛋白(cytoskeletal actin)，后者

因为无组织特异性，所以不能作为中胚层细胞的标志。虽然两者的 mRNA 均能与同样的探针结合，但可以通过核酸酶保护法(Nuclease protection assay)将两者区别开来。所以，国外许多实验室用心肌肌动蛋白 mRNA 作为中胚层诱导的标志，并以它的表达强弱来衡量诱导的强弱。

Gurdon 等首先分析了心肌肌动蛋白基因的结构<sup>[3]</sup>。总的来说，基因可分为 5'端的启动子区域和 3'端的编号区域。为了探寻基因结构中的哪些区域与诱导有关，Gurdon 等建立了基因短暂表达系统(transient gene expression system)。

他们将克隆到的基因片段，构建到质粒上，然后将它注射到受精卵中。在随后的细胞分裂过程中，一些注入的 DNA 参入到细胞核中。如果注入的基因是心肌肌动蛋白基因，那么它也将与内源的心肌肌动蛋白基因在同一时间和同一位置表达。如果将囊胚分成三部分，即动物极帽(animal cap)，边缘区域和植物半球细胞，分别测试心肌肌动蛋白基因的表达状况，当发育至相当原肠胚时，边缘区域开始同时表达内源和外源的心肌肌动蛋白基因。如果将动物极帽和植物半球细胞组合培养，几小时后，内源和外源的肌动蛋白基因也同时开始表达。利用这个特点，如果注入的基因仅仅是肌动蛋白基因的某一部分，并非完整的基因，那么就可以根据外源基因的表达状况来判断基因的哪些区域对诱导信号起反应。

他们将心肌肌动蛋白基因的启动子接上报导基因(report gene)(哺乳动物血红蛋白基因或细菌 CAT 基因)，即用报导基因取代心肌

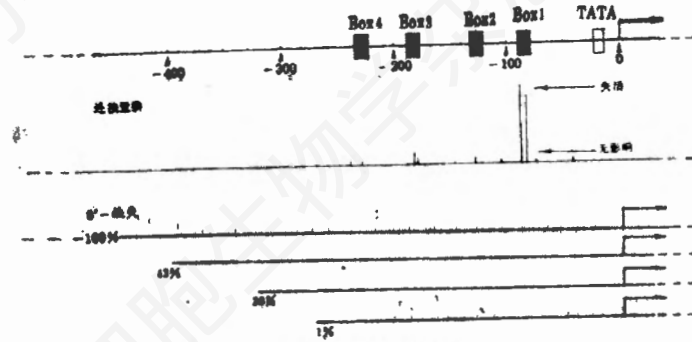


图 1 心肌肌动蛋白基因启动子<sup>[3]</sup>

详见正文

肌动蛋白基因的编码区域, 注入到爪蟾的受精卵中。依照上述的诱导实验, 检测哺乳动物血红蛋白基因或 CAT 基因的表达状况, 发现它们均能很好地与内源心肌肌动蛋白基因同时表达。这个结果说明心肌肌动蛋白基因的编码区不存在对诱导起反应的区域<sup>[4-5]</sup>。

用一系列的连接置换(Linker substitution)和缺失(deletion)改变 5'端启动子的结构, 按照上述的分析手段, 终于发现在启动子中的 4 个含有 CArG 顺序(CC[A 或 T]<sub>n</sub>GG)的区域中(分别定为 Box 1, Box 2, Box 3 和 Box 4), Box 1 是一个非常关键的区域。如果将 Box 1 CArG 的顺序置换掉, 整个基因对诱导的反应几乎消失, 但另外 3 个 Box 中的 CArG 却没有如此明显的作用(图 1)。缺失实验的结果还说明, 在约 3 Kb 长的 5'端中, 对诱导起反应的区间主要在一 400—0。

另一个重大发现是 CArG 结构与 DNA 结合蛋白有关<sup>[3,6]</sup>。将爪蟾胚胎细胞的核蛋白分离出来, 用胶阻抑法(Gel retardation assay)(将标记的 DNA 片段与核蛋白作用, 然后根据电泳图谱判断此 DNA 片段是否能与核蛋白结合), 证明了心肌肌动蛋白基因的 5'端能同胚胎的核蛋白结合。进一步用 foot printing 方法, 找出了与核蛋白结合的部位为 Box/CArG 顺序。由此看来, 与对诱导的反应活性相关的基因成分主要分布在此基因的 5'端启动子区域中, 其中 CArG 结构起着非常重要的作用。

但目前还不清楚与 CArG 结合的核蛋白

的性质; 特别是诱导之后, 核蛋白是怎样被激活或由另一基因合成出来, 然后又通过怎样的机制去调控心肌肌动蛋白基的活性, 但上述研究结果至少给了我们一个从诱导到激活—特殊基因(组织特异的)整个过程的大致的框架。这为进一步了解其中的机制打下了一个很好的研究基础。

## 二、与肌肉细胞分化有关的调节基因

### XMyoD (Xenopus MyoD)

MyoD 是从小鼠成肌细胞(Myoblast) cDNA 库中发现的一类基因, 它可以将许多培养细胞, 如成纤维细胞转化成为肌肉细胞, 激活一系列肌肉细胞特异基因<sup>[7-10]</sup>。与 MyoD 有类似作用的基因还有 Myogenin, Myf-5 和 MRF 4/Myf-6 等, 它们均在骨骼肌中表达。它们往往被称为成肌调控因子(Myogenic regulating factors, MIFs)。从其蛋白结构来看, 它们都非常接近 DNA 结合蛋白的螺旋-环-螺旋家族(helix-loop-helix family)成员。因为这些成肌调控因子能与肌肉特异蛋白基因的启动子结合<sup>[9-10]</sup>, 所以它们又被称作骨骼肌特异转录因子。

爪蟾 Myo 的转录可被中胚层诱导激活。在正常胚胎中, XMyo mRNA 在心肌肌动蛋白基因表达前 2 小时(早期原肠胚), 富集于预定肌肉细胞内。所以, 有人认为这种 mRNA 直接与激活肌肉特异基因有关<sup>[11-13]</sup>。

为证明这一点, Hopwood 和 Gurdon 将大

量, XMyoD mRNA 注射到爪蟾受精卵中, 结果导致了許多肌肉特异基因的激活, 如心肌肌动蛋白基因等, 特别是动物极帽的细胞(外胚层细胞)也表达出了大量的肌肉特异的基因产物<sup>[14]</sup>。所以, 他们认为 XMyoD 自身, 也许还包括一些辅助因子, 就足以激活许多(但可能不是全部)肌肉特异基因。

值得注意的是注射了 XMyoD mRNA 的动物半球细胞, 虽然能产生许多肌肉特异蛋白, 但它并不能分化为肌肉细胞。因此, 肌肉细胞的分化仅仅依靠 XMyoD 还不够, 可能还需要在分子和细胞水平上得到其他因素的共同作用。例如最近又发现癌基因 *v-ski* 可诱导鹌鹑胚胎的肌肉分化<sup>[15]</sup>, 说明肌肉分化还存在不同于 MyoD 的调控因子在其中起作用。所以目前只能说被诱导细胞所产生的 XMyoD 对于细胞向肌肉方向分化是非常重要的, 但它并不能决定细胞的最终分化方向。

### 三、与非肌中胚层(non-muscle mesoderm) 分化有关的基因, Xtwi

在以前的工作中, 人们只注意肌肉细胞的分化, 而忽略了非肌中胚层(肌肉之外的中胚层成分)的早期发育, 原因可能是一直未能在早期胚胎中找到一个适当的分子标志。

最近从爪蟾胚胎中克隆到一个与非肌中胚层细胞有关的基因, 称为 Xtwi<sup>[16]</sup>。它可能与果蝇 *twist* 基因同源, 后者在果蝇的中胚层发育中起着很重要的作用, 并也属于 DNA 结合蛋白的螺旋-环-螺旋家族。

Xtwi mRNA 分布在许多中胚层细胞中, 体外的中胚层诱导实验说明诱导可以激活它的表达。原位杂交给出了一个非常有趣的结果, Xtwi mRNA 和 XMyoD mRNA 在中胚层中的分布是互补的, 即含有 Xtwi mRNA 的细胞不含 XMyoD mRNA, 反之亦然。预定肌肉细胞中含有大量的 XMyoD mRNA 但不存在 Xtwi mRNA。令人吃惊的是 Xtwi 基因在侧板中胚层(腹方中胚层)和脊索(背方中胚层)

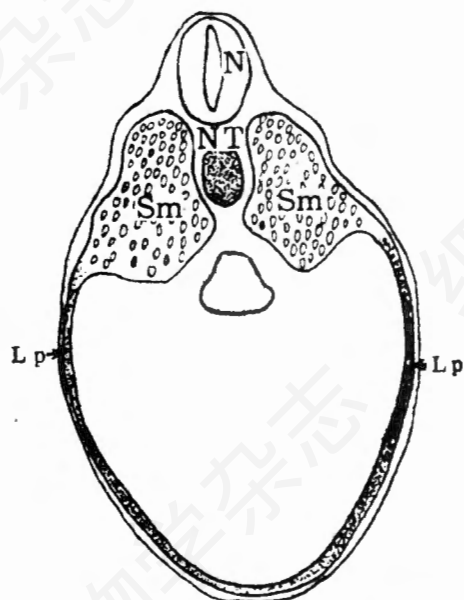


图 2 XMyoD 与 Xtwi 原位杂交图  
NT: 脊索 LP: 侧板中胚层 Sm: 肌节 N: 神经管 ■Xtwi 杂交部位, ▨XMyoD 杂交部位。详细说明见正文。

中同时表达(图 2)。由此看来, Xtwi 可能是一个中胚层细胞选择向非肌肉细胞分化的重要基因。

但应注意到, Xtwi 的表达时期(早期神经胚)晚于 XMyoD。在此之前, 在正常胚胎中已可划分出哪些细胞将可能发育成肌肉, 哪些将不可能。所以 Xtwi 看来还不是非肌中胚层细胞的最早标志。另一方面关于 Xtwi 的表达, 果蝇的情况值得参考。在果蝇胚胎中, *twist* 基因的表达受到“*dorsal*”基因的调控。有证据表明 *dorsal* 蛋白可能起直接激活 *twist* 基因的作用<sup>[17]</sup>。所以, 有必要去寻找 *dorsal* 蛋白在爪蟾中的存在, 以便进而分析 *dorsal* 相关基因产物在爪蟾胚胎中的分布, 以及对中胚层诱导的反应, 也许两者之间存在一定的联系。

### 四、Mix. 1 基因

Rosa(1989)从爪蟾原肠胚 cDNA 库中, 用来源于经 XTC-MIFs<sup>[18]</sup>诱导的外胚层细胞的 cDNA 探针, 筛选到一非常特殊的基因。从它的核酸序列来看属于 homeo-蛋白(homeo-

oprotein)。在体外诱导实验中,在培养的动物极帽中加入 XTC-MIFs 仅仅 10 分钟,它就开  
始表达。因此,它的表达是目前所知反应系统  
对中胚层诱导作出的最快反应。它被命名为  
Mix.1(mesoderm inducible homeobox)<sup>[19]</sup>。其  
表达的另一特点是不需要蛋白质的合成,即在  
培养液中加入蛋白合成抑制剂,它仍能表达;  
也不需要细胞间的相互作用,即单个外胚层细  
胞受诱导后,也能表达 Mix.1。这两点与前面  
提到的心肌肌动蛋白等完全不同,后者若在培  
养液中加入蛋白合成抑制剂就完全不能表达,  
而且单个外胚层细胞即使受到中胚层诱导,后  
者也不能表达。所以, Mix.1 基因的表达可能  
是在基因水平上对诱导的最直接的反应,即反  
应系统受到诱导作用后,通过胞内一系列的信  
号传递,直接开启 Mix.1 基因。它不同于心  
肌肌动蛋白基因的表达,后者可能是间接的,  
即反应系统受到诱导后,先激活其它一些基  
因,而这些基因的蛋白产物进而开启心肌肌  
动蛋白基因,所以心肌肌动蛋白基因的表达受  
到蛋白合成抑制剂的影响。

在正常胚胎中, Mix.1 的表达起始于囊胚  
终止于原肠胚。从这一点来看,它的表达与中  
胚层诱导紧密相关,但它在囊胚及原肠胚中,  
除在预定中胚层或中胚层细胞有一定分布外,  
大量地分布在内胚层细胞内。目前还很难解释  
这个现象,但 Rosa 等认为这个现象也许说明  
内胚层的早期发育所需要的信号,可能与中胚  
层早期发育所需要的信号非常相似。虽然人们  
目前对 Mix.1 的了解还较少,还没有直接去  
分析它的基因结构同诱导的关系,但显然这是  
一类非常值得注意的基因。

### 五、与确定中轴中胚层头-尾轴有关 的基因, Xhox 3

Homeobox 基因已被证明是广泛存在的。  
爪蟾 homeobox 基因 Xhox 3 是中胚层诱导过程  
中最早被激活的基因之一。在正常胚胎中,它  
在囊胚中期已开始表达。其 mRNA 最大的特

点是在原肠胚和早期神经胚的中轴中胚层中,  
以梯度分布,即胚胎的头部含量较低,尾部含  
量较高<sup>[20]</sup>。在 UV 照射处理的胚胎中(无头胚  
胎), Xhox 3 的表达量增加了 5 倍;而用 Li<sup>+</sup>  
处理的胚胎(无尾胚胎), Xhox 3 的表达量降  
低了 5 倍。如果将大量的 Xhox 3 mRNA 注射  
至受精卵中,会导致产生出有头部缺陷的胚  
胎。所以,从这些实验结果来看, Xhox 3 基  
因的表达活性与沿头-尾轴分布的中轴中胚层  
细胞的特性有关<sup>[21-22]</sup>。

这里需要说明的是,注射 Xhox 3 mRNA  
胚胎的原肠运动并没有受到影响,即中胚层细  
胞的迁移是正常进行的,所以 Xhox 3 mRNA  
的含量增高所导致的胚胎头部发育受阻并不  
是通过影响胚胎原肠运动,而是细胞的进一步  
分化发生了变化。另一个值得注意的问题是,  
注射 Xhox 3 mRNA 并没产生 homeotic 表型,  
即头部结构并未转化为尾部结构。这说明  
Xhox 3 的低表达水平是头部发育所必需的,  
但高表达并不一定产生尾部。也就是,高表达  
不是尾部发育的唯一条件,可能还存在其它一  
些因子与之有关。例如最近发现 Xhox 36<sup>[24]</sup>  
和 Xhox 1<sup>[25]</sup>基因可能与中轴中胚层的区域  
分化有关。

另一个非常重要的发现是,用不同特性的  
中胚层诱导因子诱导外胚层时,可导致 Xhox 3  
不同水平的表达。对 XTC-MIFs(属于 TGF $\beta$   
家族)的诱导, Xhox 3 的表达水平较低;但对  
FGF 的诱导, Xhox 3 的表达水平要高于前者  
5—10 倍。因此,推测 XTC-MIFs 主要诱导产  
生头部中胚层,而 FGF 主要诱导产生尾部中  
胚层。以下的实验支持这个猜想。

如果分别地将经过 XTC-MIFs 和 FGF 诱  
导的动物极帽置入早期原肠胚的囊胚腔的腹  
方,前者在腹方主要诱导出由头部结构构成的  
次级胚胎;而后者所诱导的次级胚胎主要由尾  
部结构构成。这个活体实验不仅证实了以上的  
推断,同时也反映出了 Xhox 3 基因在中轴中  
胚层的形成中所处的重要位置<sup>[22-23]</sup>。

以上讨论了关于5个分子标志及其可能功能的研究进展。从它们表达的时期及在胚胎中的分布来看,它们在较早或较晚的时期对于爪蟾的中胚层的形成起着非常关键的作用。毫无疑问,在今后几年中,利用越来越完善的技术,人们会发现更多的分子标志。虽然目前只是在分别地对它们进行研究,还没有将它们联系起来,综合地分析诱导后细胞反应的机理,也就是距全面搞清,被诱导细胞是怎样一步步改变其分化方向,是怎样产生各自相异的中胚层细胞,还相差甚远。但至少目前在基因水平上已发现了一系列与此相关的基因,这为最终解决这些问题打开了一个很好的局面。

### 参 考 文 献

- [1] 寿伟年, 1990, 细胞生物学杂志, 12: 110—115.
- [2] Mohun, T. J. et al., 1984, *Nature*, 311: 716—721.
- [3] Gurdon, J. B. 1989, *TIG*, 5: 51—56.
- [4] Wilson, C. et al., 1986, *Cell*, 47: 589—599.
- [5] Mohun, T. J. et al., 1986, *EMBO J.*, 5: 3185—3193.
- [6] Mohun, T. J. et al. 1989, *EMBO J.*, 8: 1153—1161.
- [7] Davis, R. L. et al., 1987, *Cell*, 51: 987—1000.
- [8] Weintraub, H. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 5434—5438.
- [9] Murre, C. et al., 1989, *Cell*, 56: 777—783.
- [10] Lassar, A. B. et al., 1989, *Cell*, 58: 823—831.
- [11] Hopwood, N. D. et al., 1989, *EMBO J.*, 8: 3409—3417.
- [12] Harvey, R. P. 1990, *Deve.* 108: 669—580.
- [13] Scales, J. B. et al., 1990, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 1516—1524.
- [14] Hopwood, N. D. & Gurdon, J. B. 1990, *Nature*, 347: 197—200.
- [15] Colmenares, C. et al., 1989, *Cell*, 59: 293—303.
- [16] Hopwood, N. D. et al., 1989, *Cell*, 59: 893—903.
- [17] Thisse, B. et al., 1987, *Genes Dev.* 1: 709—715.
- [18] Smith, J. C. et al. 1987, *Deve.*, 99: 3—14.
- [19] Rosa, F. M. 1989, *Cell*, 57: 965—974.
- [20] Ruiz i Altaba, A. & Melton, D. A. 1989, *Devl.*, 106: 173—183.
- [21] Ruiz i Altaba, A. & Melton, D. A. 1989, *Cell*, 57: 317—326.
- [22] Ruiz i Altaba, A. & Melton, D. A. 1989, *Nature*, 341: 33—38.
- [23] Ruiz i Altaba, A. & Melton, D. A. 1990, *TIG.*, 6: 57—64.
- [24] Condie, B. G. et al., 1987 *Devl.*, 101: 93—105.
- [25] Cho, K. W. et al., 1988, *EMBO J.*, 7: 2139—2149.

### 智能型基因扩增 PCR 装置在京研制成功

以聚合酶链式反应(PCR)为基础的离体基因扩增技术对基因工程的研究和应用产生革命性影响。提供自动化的 PCR 专用仪器则是推广 PCR 技术的关键。

为解决国产 PCR 装置的更新换代并替代大量进口,中科院发育生物学所最近完成了以智能化仪表控制系统为核心的干式基因扩增 PCR 装置,经多种对照引物和模板 DNA 的 PCR 实验,获完全成功,即将通过技术鉴定并批量生产。该仪器的研制成功为分子生物学、生物工程、医学和法医学鉴定及考古、环卫等研究和应用部门掌握和应用 PCR 技术提供了高性能价格比的新装备。

该 PCR 装置采用人机对话操作方式,利用单片机小型专家系统,以丰富的智能化软件取代了常规仪器的大部分硬件功能,使整机结构大大简化,操作方便,工作可靠,性能精良。其别具特色的实时动态运行状态显示、自动整定最佳 PID 参数、传感器偏差补偿、九组九步任意曲线串接编程、确保曲线平台和伺服起动、多种可预设上电方式、掉电保护及报警等硬件软化功能充分显示了智能化仪表技术的优越性。为已有的国内外 PCR 装置所不及。

注:本研制项目得到中科院计划局装备处的支持。

(中国科学院发育生物学所高级工程师 曹明丹)

一九九二年十月