

决定、分化与细胞间相互作用

曹 弥 白

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

细胞的“决定”和“分化”是胚胎发育早期的重要事件，它们是两个既有密切联系而又不应该混淆的过程。“决定”指的是胚胎细胞发育命运逐渐被局限到某一方面的过程，也就是获得向某一方面发育的能力，但是还未显示出应有的形态或明显的生化变化的过程。“分化”是逐渐显示这些变化的过程是某一基因在一定时间和一定部位的表达，例如红细胞产生出其特有的血红蛋白，或是眼睛的晶体细胞产生出其特有的晶体蛋白。

不论是在“决定”还是在“分化”的过程中，胚胎细胞都是处在细胞群体之中，受到相邻细胞的影响。相邻细胞，对一个器官原基来说，可以是原基之内、性质相同的、彼此靠近的细胞，也可以是原基之外的、与原基相邻的、性质不同的细胞。相邻细胞之间发生影响的因素可以通过不同途径传送到有关细胞，这也就是说，细胞间的通讯方式是多种多样的。可以通过扩散，一种细胞分泌讯号物质到细胞外，如生长因子等，使具有相应受体的靶细胞起反应；也可以通过相邻细胞之间的某种结构。间隙连接(gap junction)就是两个相邻细胞质膜的特化结构。相邻细胞通过它的通道产生直接讯息交通。至于是一些什么物质在起作用，现在还不知道。根据间隙连接通道的孔径，估计是一些小分子物质。

根据我们自己的实验结果，结合文献中的资料，我们形成了一种看法，在“分化”过程中细胞间的相互作用与“决定”过程中的有所不同。现在分别叙述如下：

一、决定过程中细胞间相互作用

神经系统的决定 在原肠形成过程中，中

胚层内陷，进入内部，把外胚层衬垫起来，同时对它产生诱导作用，使外胚层向神经组织的方向发育。到神经胚期，受到诱导的外胚层在背方形成形状独特、轮廓清晰的神经板，组成神经板的细胞也都变成了长柱形。离体培养这时期的神经板或者它的小块，可以发育出神经组织，说明这时期神经板细胞的发育命运已经决定，诱导作用已经完成。

用染料偶合(dye coupling)的方法检测神经诱导前后间隙连接介导的细胞间通讯的情况，可以看到，细胞间的通讯在诱导前后(也就是在获得决定之前和以后)发生了变化。获得决定之后细胞间通讯明显加强，同时间隙连接的出现频率增高，它们的面积也明显加大^[1]，这就表明，连接通讯的加强和间隙连接的增加都发生在决定之后；在神经系统的决定中通过间隙连接的通讯方式不是主要的。

肌细胞的决定 已经知道，在发育的较早时期，桑椹期，植物半球的细胞产生一种物质，作用于动物半球的外胚层细胞，使得在两个半球相接触的部位产生出中胚层^[2]。关于起作用的物质，在生长因子方面最近有不少工作，但是尚难下定论。关于起作用的方式，还一无所知，很可能不是通过间隙连接，因为这时期这种结构还很少见。

在原肠形成期间，中胚层向内部移动，本身分离为当中的脊索以及两侧的预定肌节(也就是肌细胞的前身)。到原肠结束时，虽然细胞的移动基本停止，预定肌节也已经到达应该到达的位置，但是它们的决定还是不稳定的，实验证明，要到神经胚中期以后肌细胞的决定才稳定下来^[3]。

考察肌细胞发育的各个时期的间隙连接，结果看到，从决定到分化的过程中，肌细胞的

间隙连接有一个出现、增多和消减的过程。间隙连接数量最多、面积最大的期间恰好是肌细胞的决定已经趋向稳定、分化逐渐完善的阶段^[4]。从外胚层受到植物极的影响产生中胚层，到肌细胞获得稳定的决定，通过间隙连接的通讯方式看来也不是主要的。

脊索的决定 前面已经提到，脊索到原肠末期才和两侧的肌节分离。作为最早出现的中轴器官之一，脊索对邻近组织的影响在过去得到了足够的重视^[5-7]。但是，几乎所有过去的工作都涉及它对周围组织结构的影响，使人形成预定脊索细胞经过内陷就已经决定了的概念。这是因为过去这方面的工作几乎全是采用蝶螈为材料，而在蝶螈，预定脊索细胞经过内陷到能够与预定肌节明确分辨，可以清楚地从胚胎背部中央分离割取的时候脊索已经决定，因此无法了解它的决定是否受周围组织的影响或者受哪些组织的影响。

但是，我们在爪蟾胚胎，用体外培养检测不同时期预定脊索的决定状态，结果与蝶螈不同(表1)^[8]。在原肠末期，当预定脊索刚刚从两侧预定肌节分离的时候，离体培养的预定脊索主要分化为肌细胞，显示出明显的横纹，并且对抗结蛋白抗体呈阳性反应。这说明，在刚刚能辨别脊索和肌节时，预定脊索还没有完成决定过程。在这以后，从神经板期分离的脊索原基，除了主要分化为肌细胞外，在有些实验则完全分化为脊索。从更晚的期间(神经褶期)分离培养的预定脊索，所有的外植块都分化为脊索，这时脊索才完成了它的决定过程，即使在和正常环境完全不同的条件下，它也分化为脊索。这一实验结果明确地证实，爪蟾脊索的决定，从原肠末期到神经胚中期，是一个逐渐完成的过程。

既然用爪蟾胚胎进行的实验指出，脊索的决定是一个渐进的过程，这就可能研究在决定过程中邻近组织对它的影响。在原肠末期，脊索的两侧是肌节，背方为神经上皮，腹面是肠腔上皮。为了了解左邻右舍对脊索决定的影

表1 爪蟾脊索细胞的决定

分期	外植块数	分化		
		肌肉细胞	脊索细胞	
		铺展	中央有少数脊索细胞	
原肠晚期 中卵黄栓 S 12	8	4	4	
小卵黄栓 S 12 ^{1/2}	12	4	8	
神经胚期 神经板初现 S 13	6	3	3	
神经板 S 13 ^{1/2}	8	1	3	4
S 14	4		2	2
神经褶中期 S 15	4		2	2
S 16	6			6

响，我们进行了体外共培养的实验^[9]。把躯干部预定脊索和等长的两侧肌节一起培养，后者的存在使外植块产生分化良好的脊索，但是一侧的肌节和脊索一起培养，大多数外植块中脊索不能形成；似乎要使预定脊索的决定稳定下来，向预定的方向分化。需要一定量的肌节的存在。神经上皮对预定脊索的发育似乎没有促进的影响，躯干部预定脊索和一段等长的神经上皮共同培养，在神经上皮的包裹中，脊索的发育不能正常进行。在有些例子里预定脊索仍向肌细胞分化，在另一些虽然出现脊索，但是分化达不到正常程度，显然是受到阻抑。

这方面的工作证实了脊索的决定和其它胚胎结构一样，都离不开周围组织的作用。此外，它也补充了我们多年前^[10]关于中胚层结构决定和分化的系统实验分析。当时受到蝶螈材料的局限，只着重于脊索对它周围的中胚层和其它胚层结构的影响，而忽略了邻近组织对脊索决定和分化的影响。

二、分化过程中间隙连接的作用

我们在前面把间隙连接的出现频率增多、面积加大和细胞分化联系起来,认为通过间隙连接的细胞间通讯在分化过程中起重要作用。这从以下的实验得到了支持:

注射抗体的实验 我们进行了注射抗间隙连接蛋白抗体的实验,注射是在8-细胞期进行的,注入动物半球的2个背部裂球。被注射胚胎发育到早期原肠胚时,割取背部外胚层,因为抗体是注射到动物半球4个裂球中的2个背部裂球,割取的外胚层只包括被注射裂球的后裔,也就是背部外胚层。用中胚层诱导物质处理割取的外胚层。结果发现,抗体注射后仍有脊索和肌细胞的形成,也就是诱导作用不受影响,但是诱导形成的脊索和肌细胞的分化受到不同程度的阻抑^[11]。

佛波酯(TPA)处理的实验 由于从注射抗体的8-细胞期到肌细胞分化要经历相当长的时间,抗体起作用的时间很难确定,因此又选用TPA,企图能够精确地控制作用的时间。它的原始作用部位是质膜,对间隙连接的影响已从各个方面得到了证实。用适量的TPA处理,可以看到,使成肌细胞分化为肌细胞的过程受

到了明显的阻抑,而且间隙连接的出现频率在处理组低于对照组,说明TPA对肌细胞分化的阻抑很可能是间隙连接减少的结果。如果在培养的不同时间给以TPA处理,只要TPA的处理包括培养的第二天,肌细胞的分化就受到阻抑。和正常发育对照,第二天正相当于间隙连接出现频率最高、面积最大的时期。这一结果更精确地从时间上证实了细胞通讯在细胞分化中的重要性^[12]。

间隙连接与脊索的分化 脊索在分化过程中经历细胞形状变化和重新排列等一系列既复杂又有序的变化^[13]。它逐渐由疏松相连的细胞构成的条状结构(原肠末期)转变为尾芽期的由“一串铜钱”组成的棒状构造。为了了解这一阶段中间隙连接的变化以及细胞间通讯的情况,我们从蝶螈胚胎不同发育时期割取正在进行分化的脊索,用冷冻蚀刻技术,在透射电镜下观察间隙连接,并对各个时期进行定量比较(表2)^[14]。看到间隙连接在原肠晚期最早出现,在蝶螈这是完成决定、开始分化的时期。间隙连接的面积与侧膜总面积的比值逐渐加大,在神经胚中期达到最高值,而且在神经胚阶段一直保持高水平。神经胚期以后,间隙连接明显递减,到幼虫期仅存在极少量。神经胚

表2 蝶螈脊索细胞不同时期间隙连接的出现频率

分 期	侧膜面积 (μm^2)	间隙连接数	间隙连接总面积 (μm^2)	间隙连接总面积与侧膜面积的比例 (%)
原肠晚期	2041	27	1.10	0.054
神经胚期				
N-1	2001	30	3.35	0.167
N-2	4382	93	6.41	0.146
N-3	2219	52	4.02	0.181
N-4	1571	31	1.67	0.106
N-5	2543	40	4.24	0.167
尾芽期				
Tb-1	1199	16	0.45	0.038
Tb-2	2268	29	0.24	0.011
幼虫期				
T-1	1790	15	0.06	0.003
T-2	2163	6	0.03	0.001

期是间隙连接最多,也正是脊索细胞活动最旺盛、分化继续进行的时期。很可能间隙连接对脊索细胞的活动起了协调的作用,并使细胞分化顺利进行。

染料偶合的实验结果指出,细胞转运率的高低和间隙连接的多寡是密切相关的^[16]。这就结合功能说明,间隙连接在细胞分化过程中起着重要作用。

爪蟾脊索细胞的分化过程和蝶螈相似,根据我们目前掌握的资料,各个时期间隙连接增减的情况,也和蝶螈中观察到的相一致(未发表资料)。

总结以上关于“决定”和“分化”所进行的实验观察,我们认为,这两个过程中细胞相互作用不同,不但相互作用的性质不同,方式也不一样。

在决定过程中,主要的影响途径是相邻细胞对原基本身的影响,也就是不同种细胞之间的。拿脊索中胚层来说,它是在动物半球的细胞受到植物半球细胞的影响下产生的。这些细胞经过内陷,到原肠末期虽然形成介于神经板和内胚层之间的、可以加以区分的脊索和两侧的预定肌节,但是它们还没有完全决定。对于它们的进一步的决定,相邻细胞的影响是不能缺少的。对脊索的决定,两侧肌节(对脊索来说是原基之外的)的影响是不可缺少的;对肌节的决定,脊索(也是原基之外的)的影响可能也是不可缺的。

不同种细胞之间以什么方式产生影响,从现有的资料看还很难肯定,很可能是多途径的。拿脊索来说它与相邻细胞之间频繁出现的有被内吞胞可能是物质传送的一种方式。一些囊胞状结构也可能在物质传送中起作用。间隙连接在脊索和相邻细胞之间偶有出现,频率很低,通过它们介导的、不同种细胞之间的相互影响,很可能不是主要的。

在分化过程中,不论是肌肉还是脊索,在原基范围内的、同种细胞之间的作用是至关重要的。如果把正在进行分化的肌节原基剥离

下来,进行解离处理,使所有的细胞都处于游离分散的状态,经过一定时间再使分散的细胞聚合,观察细胞的进一步分化,就可以看到,游离分散的时间过长,肌细胞就不再能进行正常分化。这说明,对正在进行分化的细胞,细胞群体之内的、相同细胞间的影响是维持分化进行所不可缺少的。

另一方面,在肌节和脊索分化过程中,间隙连接出现的高峰正处在分化旺盛的阶段^[4,14],这从正面说明了间隙连接与细胞分化的相关性。而且,用TPA处理一定时间,间隙连接受到影响,肌细胞的分化就不能正常进行^[12],更直接地说明间隙连接介导的原基之内的、同种细胞之间的通讯,对细胞分化起主要作用。

结合在组织和细胞水平的决定的概念^[10],我们认为可以这样考虑:

实验胚胎学用移植或外植检测胚胎某一部分的决定状态,如果移植或外植的部分仍然象在原来部位那样发育,就认为它在移植或外植时已经决定了,否则就是尚未决定或尚未完全决定。所以,在一个正在发育的胚胎中,决定指的是器官原基的决定;一部分细胞在其相邻组织的影响下,决定了发育命运,形成某一器官的原基,向一定方向发育。这和我们提出的,决定过程中主要的影响来自原基之外的相邻细胞是相符合的。在相邻细胞的影响下,原基是作为原基获得决定的,因此,获得决定的原基也只能作为原基在移植或外植的情况下进一步发育。这是因为,作为原基虽然获得了决定,但是组成原基的细胞未必都已获得决定,未必都能独立地进行分化。原基范围内的细胞,各自获得进一步分化的能力是和间隙连接在同种细胞之间的大量出现分不开的。间隙连接在原基分化中数量的和面积的变化说明这一点。间隙连接介导的细胞间通讯,使单个细胞的决定变得更稳定,同时使细胞的分化顺利地进行下去。所以我们认为,与原基的决定不同,原基范围内的细胞分化主要依赖于同种细胞间的相互影响。

参 考 文 献

- [1] Zeng Mi-bai & Jiang Wan-su, 1990, *Cell Research*, 1: 67—75.
- [2] Nieuwkoop, P. D., 1969, *Roux Arch.*, 162: 341—373.
- [3] Yamada, T., 1940, *Okajimas Fol Anat. Jap.*, 19: 131—197.
- [4] 王绳琦, 1989, 实验生物学报, 22: 189—203.
- [5] Nieuwkoop, P. D. & Nigtevecht, G. V., 1954, *JBEM*, 2: 175—193.
- [6] van Straaten, H. W. M. et al., 1989, *Development*, 107: 793—804.
- [7] Malacinski, C. M. & Youn, B. W., 1982, *Differentiation*, 21: 13—21.
- [8] Zeng Mi-bai, 1993, *Acta Biol. Expt. Sin.*, 26: 361—375.
- [9] 曾弥白, 1994, 实验生物学报, 27: 331—340.
- [10] Chuang Hsiao-Hui & Tseng Mi-pai, 1957, *Scientia Sinica*, 6: 669—709.
- [11] Zeng Mi-bai & Chen Yanhua, 1988, *Scientia Sinica*, 31: 1315—1319.
- [12] 曾弥白, 1990, 实验生物学报, 23: 105—115.
- [13] Keller, R. et al., 1989, *J. Exp. Zool.*, 251: 134—154.
- [14] Zeng Mi-bai & Zhou Mai-yun, 1993, *Roux's Arch Dev Biol*, 201: 12—17.
- [15] Zeng Mi-bai & Wang Ying, 1993, *Cell Research* 1: 67—75.
- [16] 庄孝德, 1990, 细胞生物学杂志, 12: 1—5.

反义战略——分子细胞生物学研究的新手段

林建庆 徐永华

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

反义战略(Antisense Strategy)或称反义技术(Antisense Technology)是继重组DNA技术后分子生物学领域的又一重大进展。它从反向生物学(Reverse Biology)的角度来研究结构基因的功能、基因表达的调控等等,从而为阐明分子细胞生物学的某些根本问题提供了又一重要手段。在实践中,反义战略已给人类病毒性疾痼和恶性肿瘤的基因治疗、动植物品种的改良等诸多领域带来了曙光,从而吸引了越来越多的临床医学和基础研究科学家的兴趣。

一、反义战略与反向遗传分析

传统的反向遗传战略有^[1-3];异位表达目的基因、过度表达目标基因、同源重组灭活目的基因(也称基因打靶)等,其中以同源重组最为精确有效。然而同源重组在二倍体哺乳动物细胞中灭活基因的效率较低。高等真核生物由于相对长的细胞传代时间和高度复杂的基因结

构使基因功能的分析显得更为复杂、困难,而反义战略为研究基因的功能提供了捷径^[4-6]。

反义战略应用反义分子(反义DNA或RNA,包括具催化功能的RNA即ribozyme)干预目标基因表达,使mRNA前体剪接和翻译受阻,达到封闭或阻断特异基因表达的目的。近几年来国内外关于反义分子的应用有很多报道,这种基因操作手段简捷、构思精巧,有效而且可靠,它不需改变基因结构就能分析简单或复杂生物体内基因的功能,从而可以避免应用对基因进行条件性突变进行研究等比较复杂的常规方式;其高度特异性表现为靶基因邻近基因的正常表达不受影响,如反义分子可以通过选择性地抑制单一启动子控制的多基因区内某一基因的表达而不影响这一多基因区内其他基因的表达,甚至某一特定结构基因内不同区域(如N-端或C-端)可被选择性封闭,从而可以判断该序列片段在完整基因中的作用。