

从蝶螈肌细胞的发育谈胚胎细胞的决定与分化*

庄孝德

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

决定和分化是实验胚胎学提出的,在胚胎发育中两个相互关连的过程,同时也是两个基本的概念。实验已经证明,在胚胎的早期发育中,某一组织或器官的原基必须首先获得决定,然后才能向预定的方向发育,也就是分化,形成所应当形成的组织或器官。而且,大家认为,决定之后,分化的方向一般地是不会中途改变的。

虽然关于细胞产生决定和进行分化的机制还知道得不多;但是,因为形态分化的基础是化学分化,是组织专一的结构或功能蛋白质的产生和积累,因此从分子生物学考虑,可以认为分化的基础是蛋白质的翻译;沿这一思路推断,决定的分子基础应是组织专一的mRNA的转录。所以有人认为,mRNA转录的开始及积累意味着细胞逐步获得决定,在这基础上mRNA的翻译,功能蛋白的产生,意味着细胞实现其分化方向,也就是进行分化。这样推论,目前虽然没有太多的实验的证明,似乎顺理成章。本文只是根据我们实验室的工作,对几个与决定和分化有关的概念进行讨论,想用此来说明个人目前对决定和分化的认识。

一、组织分化与细胞分化

过去在实验胚胎学中,判断某个原基是否获得决定,可以自主分化,主要是根据异位移植或外植的实验。把某一原基移到另一胚胎的、与原来不同的部位或离体培养,如果能象在原来位置那样发育,就认为那个原基或组成那个原基的细胞的发育命运已经决定了,因而可进

行自主分化。实际上,用这两种方法得到的结论,都是从组织水平或细胞团水平推断到细胞水平,根据组织水平的决定状态,判断细胞水平的决定状态。其所以如此,主要由于一般地总认为组织是由细胞组成的,组织因细胞发育命运的决 定而决定,因细胞的分化而进行分化。

我们曾用被诱导组织进行少量细胞的培养,把被骨髓诱导的外胚层切成大小不同的小块离体培养。外植块中细胞数量越少,分化越差。整块被诱导的外胚层几乎全部形成肌肉细胞,50细胞以下根本产生不出这样的细胞;细胞是分散的,相互分开的,只能形成形状不规则的细胞,使人更容易想到它们是间质细胞。细胞数目少而分散,单个细胞似乎分化不能正常进行^[1]。我们曾用冰冻蚀刻在能够分化的较大的细胞团中找到间隙连接。分散的细胞之间当然不会形成这种连接结构。当时曾认为在群体中细胞间的接触可能与其进一步分化有关。并且提出,在发育中相同细胞或不同细胞间的相互关系,应是胚胎发育的一个重要方面。

这个实验是用被诱导的外胚层细胞进行的。诱导之后立即分为小块进行培养。虽然可以看出因数量太少不能集聚与细胞分化的关系,但是有两点不能肯定:(1)开始培养时细胞的决定程度不能肯定,说不出这些情况是否因细胞的决定状态还不够稳定而造成的。也有可能,决定还不太稳定的细胞需要在一起进行分化,决定已经稳定的细胞不一定聚在一起就可进行分化。(2)这种发育情况是否因分散而造成的。也有可能,即使已经决定的细胞,处于分散状态也会影响其分化。因此我们采用神经胚背部

* 根据在中国细胞生物学学会第四次学术会议上的发言整理。

的、从移植实验已经知道是已决定为肌细胞的中胚层,专门研究细胞的聚集状态与肌细胞分化的关系。

由于在实验中经常遇到一些仅是从形态上难以判断其属性的细胞,我们采用荧光标记的抗结蛋白(desmin)抗体的免疫反应帮助判断。这是一种肌细胞所特有的中间纤维蛋白。不仅可以用来判断外植的细胞是否沿着已决定的发育方向分化,同时也可了解细胞内蛋白质合成的情况。

选中期神经胚的背部中胚层,移植实验已经证明其发育命运已经决定^[2]。培养在玻片上,全部或绝大部分发育为长梭形的、在远心端有丰富细胞质的、成肌细胞样的细胞。只是在个别外植块中出现少量形状不规则的细胞。用抗结蛋白抗体检测,在长梭形细胞中结蛋白已形成了纤维。

从细胞的形状、结蛋白的分布以及分化的专一性来判断,并且我们还用尾芽早期的肌节进行外植实验作为对比,其发育情况相同,因此可以认为,中期神经胚的肌节原基细胞,在不脱离细胞团的离体培养中,其发育命运是已经决定了。

割取中期神经胚的肌节原基用EDTA使细胞团解离,把已散开的细胞移到正常培养液,但仍使它们处于分散状态,不同时间之后使之聚集,观察分散对细胞分化的影响。同时用解离之后立即聚合的作为对照,说明解离处理对细胞无何影响。处于分散状态6小时,散开的细胞还可团聚起来,培养下去,发育情况和未经处理过的虽有不同但相差不多,结蛋白的分布也差不多。

但是处于分散状态18小时,再聚合起来继续培养,不论细胞形态或结蛋白分布都受到严重影响,绝大多数细胞是间质细胞状或不规则,结蛋白的分布也达不到纤维状^[3]。似乎是,细胞处于分散状态的期间,其分化受到影响,以致不能按已决定的方向进行下去。这使人想到,过去所谓的已决定的肌节原基细胞,是在组织

的范围之内决定的,其中单个细胞的决定还不稳定,要在团聚的状态下,在一定程度上维持它和原有细胞的关系才能沿已决定的方向分化。

所以,不是由于单个已决定的细胞各自进行分化,从而表现为组织的分化,而是在组织的范围之内细胞之间相互影响,使决定和分化进一步稳定下来。决定和分化虽是细胞水平的事件,但是在发育的早期,应是在组织(或原基)范围之内,在细胞相互影响之下,随着初步决定而进行分化,随着分化而决定更加稳定。所以决定不应仅是发生在发育的某个阶段,也不是二者截然划分,决定稳定了才进行分化,很可能在分化的早期,在原基的范围之内,单个细胞的决定状态尚未稳定。

二、细胞间的交通与细胞分化和组织分化

已经知道细胞膜上的间隙连接是细胞间信息交流的主要通道。在肌节的发育中,从早期神经胚开始,间隙连接大量存在,一直持续到尾芽晚期,到成肌细胞融合肌原纤维增多,才逐渐减少^[4]。可见在整体中间隙连接在成肌细胞的分化中起着重要作用。上述实验,肌节原基在中期神经胚解离之后处于分散状态18小时,也就是说,从分期上讲,大约从中期神经胚到尾芽早期,在相当长的、应当有相互影响的阶段,都是分散的处于孤立状态。这样的细胞其内部状态当然与一直处于相互交通的不同,发育受到影响,是可以理解的。

如果从尾芽中期割取肌节,解离之后分散培养18小时,再使之聚合,继续培养,细胞可以较好地分化^[5]。尾芽中期成肌细胞间间隙连接的数量处于高峰之末,细胞已经有了足够的相互影响,分化已进一步稳定,这样的结果是可以理解的。

另一方面,为了解间隙连接的作用而进行的离体实验,也说明通过间隙连接对肌细胞的分化至关重要。离体培养中期神经胚的肌节原基作为对照——不经任何处理成团地培养在玻

片上,在培养过程中细胞虽然不是维持成团而是逐渐铺展在玻片上,排列虽与在整体不同,细胞的分化能达到肌管阶段,具有多个核,而且产生肌原纤维。用冰冻蚀刻复型膜观察,能够找到间隙连接的存在,说明细胞之间仍维持一定的交通^[3]。但是如果在离体培养时用影响间隙连接的药物佛波酯(TPA)处理,细胞的分化就会受到影响,虽然有时可看到少量细胞相连成片,但是停留在较早阶段,形成不了肌管。

因此,从细胞间的信息交流考虑,也可以说,细胞要在组织或细胞团的范围之内,在相互影响之下,逐步地决定、逐步地分化,二者相辅相成;一旦信息交流中断,在组织范围内显示出已经获得一定程度的决定、可以进行分化的细胞,其分化要受到影响。

新近, Gurdon(1988)提出团体效应(Community effect)^[6]来解释团聚的原肠胚外胚层细胞受到植物半球的诱导之后产生出肌肉所特有的蛋白质,而分散的、接受相同处理的细胞则不能表达这样的蛋白质。关于团体效应的作用方式,虽然 Gurdon 提出一些想法,仍是未知的,因而这一术语,并未能更多地说明什么。事实上,这个实验中分散被诱导的细胞的情况,与我们培养少量被诱导细胞的结果有一定程度的相似性。因此我们认为,分散细胞的分化之所以受到影响,主要是由于它们处于分散状态,缺乏相互间的、进一步分化所必需的信息交流。所谓团体效应,应当主要从细胞间的信息交流所产生的、有利于分化的效应来考虑。

三、细胞的转向决定

转向决定(transdetermination)在这里是指已获得决定的细胞或组织在培养过程向着不同于原来决定的方向进行分化。在上述解离实验中,处于分散状态18小时的细胞,其中有些发育成不象是肌肉细胞那样的,但仍有结蛋白抗体反应,似乎分化的方向与原来决定的有所不同。但是明显不同的是肌节原基或肌节在表皮

囊泡中的发育^[7]。

从中期神经胚割取肌节原基,再用同期的表皮包起来,表皮发育成一个囊泡,中胚层细胞处于其中;经过培养后切片观察,表皮囊泡中看不到肌肉细胞,仅含有间质细胞状构造,少数囊泡中还有肾管状结构。用抗结蛋白抗体进行免疫反应也看不到荧光,说明已决定的体节原基细胞在表皮囊中确实发育成了间质细胞。在这样的条件下,细胞未能向已决定的方向发育下去,已经决定要进行的蛋白质合成未能进行。出现这种情况的原因,首先使人猜想,是否与细胞的决定状态有关,是否在中期神经胚时肌节原基虽然已经决定了,但还不够稳定(这可能性是存在的,下面要提到),因而在实验的环境下,未能沿原来的方向进行下去。还不能肯定说细胞发生了转向决定。

取材于更晚发育时期的实验,割取尾芽早期的肌节——这时已是明确的肌节了——再用同时期的表皮包起来,也会出现同样情况。在表皮囊中培养后,切片观察,也很难看到肌肉细胞。应用荧光标记的抗结蛋白抗体检测,在大多数表皮囊中看不到荧光,仅是在少数例子中看到微弱的荧光。但是显示荧光的细胞并不具备肌细胞的形态。甚至再晚些,取自尾芽中期的肌节用同期表皮包起来,在外植块中仍然看不到典型的肌肉细胞,大多数只能说是肌肉细胞样的,但是抗体免疫反应的情况要好些,每个囊泡里都看到不太强的荧光。这给人一种印象,晚到尾芽中期的成肌细胞,在这样的条件下其中相当的部分未能沿已定的肌细胞的方向继续分化下去,而是向着间质细胞的方向发展。虽然如此,已经合成的结蛋白还存留在细胞里,显示一定的荧光。但是荧光的强度还不如同期正常胚胎的,可能由于已经发动的结蛋白合成在表皮囊中未能继续进行下去。

尾芽中期的肌节中,细胞已经是长形的,其长度代表肌节的长度。细胞融合与结蛋白的合成都已开始,它们的决定应是相当稳定的了。但是在表皮囊中表现出的分化似乎还可改变。

是什么原因使这样晚期的细胞发生转化, 显然值得进一步追究。

转向决定一词来自关于昆虫发育的实验研究(参看[8])。果蝇三龄幼虫的成虫盘如果移植到成虫的体腔, 经过若干代在成虫连续移植之后, 再移植到幼虫, 移回的成虫盘随寄主的变态发育为与原来不同的附肢。成虫盘中每个细胞的发育命运应该都已决定了。因而这个从某一发育途径改变到另一发育途径的现象被称为转向决定。但是可以看出, 在果蝇中转向决定是成虫盘转变为形态不同的附肢, 是整个附肢的转向决定, 是表现在器官水平上。但是在细胞水平上的转变并不清楚。

已决定的细胞受到外界影响, 向不同于原来的方向发育, 在两栖类中也有例子。神经胚末期的蛙类胚胎, 切除眼泡后, 间脑组织可以在晶体原基的诱导之下, 产生出相当正常的眼球^[9]。另一方面, 尾芽早期的眼泡碎片, 移植到另一胚胎的眼、耳之间, 可以转变为脑组织^[10]。在这两个例子中间脑和眼泡组织都已决定而且正在实现其发育命运, 受到外界影响尚可转变。可见其决定状态虽在分化过程中但尚不稳定。这和上述的肌节细胞的情况是一致的。而且, 从这两方面都可看出, 不论是肌节细胞或神经细胞的转向决定, 产生的细胞类型都是属于同一胚层之内的。

四、决定、分化与转录、翻译

习惯上认为细胞获得稳定决定之后进行分化, 把二者看作是二个先后相继的过程, 在前者的基础上后者得以进行, 因此用分子生物学解释, 认为决定是与某些基因的转录、mRNA的产生与积累有关; 分化则是与mRNA的翻译有关, 一旦进行蛋白质合成, 分化就继续进行下去。在转录的基础上进行翻译, 这和在做定的基础上分化, 颇为一致。

但是从我们的实验看, 仅是mRNA的转录和积累可能并不意味着决定。因为已知是做定的细胞, 应是已经有了mRNA的积累的, 但

在某些实验条件下不能进行正常分化, 不能进行应有的蛋白质的翻译。例如中期神经胚的细胞经过解离, 或者处于表皮囊泡中, 应表达的蛋白质不能进行翻译。很可能要待细胞中有一定的翻译产物的积累, 决定才能相对地稳定下来。因此, 很可能决定和分化是两个前后相继、相互交错的过程。决定既包括mRNA的转录, 也包括一定量的蛋白质翻译。细胞中有了一定量的蛋白质的积累, 分化方向得以进一步稳定下来, 决定的过程也完成了。

决定和分化既然都是渐进的过程, 在分化尚未稳定的时候, 在实验条件下改变或影响其分化过程, 也是可以理解的。除去上述的事例之外, 我们的电融合实验, 结果虽是初步的, 也说明, 已经决定可以进行分化的细胞, 其发育方向或蛋白质合成是可改变的(高慧, 未发表资料)。

将早期原肠胚的外胚层细胞与中期神经胚的中胚层细胞融合, 前者尚未决定, 离体培养会产生出角蛋白, 后者已有初步决定, 离体培养在细胞团中产生结蛋白。二者融合之后, 培养下去, 可以看到多少有些象肌细胞的样子。用抗角蛋白和抗结蛋白抗体标记荧光染色, 考查在这种情况下是否融合的细胞产生原来各自的蛋白质, 结果只看到抗结蛋白抗体的荧光, 而抗角蛋白抗体没有免疫反应(表1)。融合细胞中没有外胚层细胞原先应该产生的角蛋白。这可以这样解释: 中期神经胚的细胞已初步决定, 融合之后, mRNA继续转录或已有的mRNA进行翻译, 抑制了外胚层细胞中、在融合时尚未转录的mRNA的产生。

表1 不同决定程度的外胚层细胞与肌细胞融合后蛋白质的表达

(用荧光标记抗体检测; 根据高慧, 未发表资料)

外胚层细胞 取自	肌细胞取自	融合后蛋白质的表达	
		角蛋白	结蛋白
早期原肠胚	中期神经胚	-	+
早期神经胚	中期神经胚	+	-
尾芽早期	尾芽早期	+	+

但是换一种组合,早期神经胚的表皮细胞与中期神经胚的中胚层细胞融合——前者已是表皮性质的。和前一种组合不同,融合细胞中检测不到结蛋白的存在,只看到对抗角蛋白抗体的反应(表1)。这可能由于早期神经胚的表皮细胞已有相当稳定的决定,或正处于分化的过程中,抑制了决定不够稳定的中胚层细胞中结蛋白的产生。

如果两个进行融合的细胞都取自更晚的时期,都取自尾芽早期,则在融合的细胞中结蛋白和角蛋白都可检测到(表1)。说明这样晚期的细胞,它们各自的合成结蛋白或角蛋白的机器都已经充分开动了。因此融合之后两种蛋白的产生互不影响。

这些实验与已经熟知的、通过细胞融合激活鸡的红血球细胞核的实验(参看[11])不同,因为鸡的红血球核是已失活的,在这些实验中融合细胞的核都是活化的,但细胞的决定程度不同。所以,用细胞融合的方法了解细胞的决定与分化,可能与一般使用的、细胞外影响的方法有所不同,但是这未尝不是了解细胞的决定与分化的一条途径。从上述的情况可以看出,在决定尚不稳定的时候,不同决定状态的细胞融合,比较稳定的取得主导地位,会影响另一细胞的蛋白质合成,合成它将来要产生的蛋白质。影响可以从两方面考虑:一是影响另一细胞的细胞质,使已存在的mRNA不能进行翻译;此外还可能影响另一细胞的核成分,改变

转录的方向。当然,这仅是根据细胞融合之后蛋白质合成情况做出的一些推想。

所以从蛋白质的合成考虑,决定和分化也不是两个截然分开、先后相继的过程。除去mRNA的转录与积累之外,还要有一定的有关蛋白质的合成,决定才稳定下来。分化的过程也不仅涉及蛋白质的合成,在开始阶段可能还应有mRNA的转录。因此从分子水平上解释,两者也应是相辅相成的。

参 考 文 献

- [1] 蒋婉素, 1986, 实验生物学报, 19 (3): 345-353.
- [2] Yamada, T., 1937, *Wilhelm Roux' Archiv* 137: 151-270.
- [3] 丁小燕, 1989, 中国细胞生物学学会第四次会议论文摘要汇编: 30.
- [4] 王绳琦, 1989, 实验生物学报, 22 (2): 189-203.
- [5] 曾弥白, 1990, 实验生物学报, 23 (1): 105-115.
- [6] Gurdon, G. B., 1988, *Nature*, 336: 772-774.
- [7] 丁小燕, 1989, 中国细胞生物学学会第四次会议论文摘要汇编: 30.
- [8] Hadorn, E., 1968, *Sci. Amer.* 219 (5): 110-123.
- [9] 王希成, 袁春及, 郭樊光, 1964, 南京大学学报(自然科学), 8(2): 324-332.
- [10] 王希成, 金丽华, 1965, 南京大学学报(自然科学), 9(2): 337-359.
- [11] Harris, H., 1970, *Cell Fusion*, Clarendon Press, Oxford.

《细胞生物学名词讨论》专栏

征稿启事

统一中文术语,对细胞生物学的教学、学术交流都是十分必要的。细胞生物学近年来进展迅速,新概念、新术语不断出现,避免译文的混乱就显得更为迫切。为此,本刊自今年起将开辟《细胞生物学名词讨论》专栏,欢迎投稿关于新名词的介绍和试译的稿件。

《细胞生物学杂志》编辑部