

多肽生长因子与中胚层诱导

寿伟年

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

近几年来,许多发育生物学家采用分子生物学手段对利用实验胚胎学方法所揭示的胚胎早期发育的重要现象进行了分析研究,其中关于中胚层诱导的分子及细胞生物学机制的研究获得了极有意义的进展。研究中胚层诱导虽然主要以两栖类动物胚胎为主,但实际上中胚层诱导现象存在于所有脊椎动物的早期胚胎中,甚至文昌鱼也不例外^[1]。并且中胚层诱导被认为是脊椎动物胚胎发育过程中出现最早的诱导反应,其意义不仅在于由此产生了中胚层以及分化出中胚层范围内的多种类型细胞,而且还对以后各种发育事件起着相当重要的作用。

从研究的历史来看,中胚层诱导可有两种不同的含义:一是早期从探讨组织者作用的物质基础出发,进行过大量的中胚层诱导实验,即从原肠胚外胚层诱导出属于中胚层的构造;二是在60年代末发现囊胚的预定外胚层在内胚层的诱导下可产生出组织者或中胚层。二者产生作用的时间不同,但是否具有相同的物质基础,目前尚难回答。本文将着重介绍对后一方面研究的最新成果,并对今后的发展趋势作一定的展望。

一、中胚层诱导现象

“诱导”的概念来源于Spemann早期研究眼晶状体产生机制的工作。随着“组织者”(Organizer)的发现,这一概念迅速得到了发展,并提出了“诱导链”的概念,借此来解释早期发育的各种现象^[2]。与此同时,人们也提出了许多有待解决的问题。其中一个问题是“组织者”是怎样形成的?或者说中胚层作为一个胚层是怎样产生的?当时人们认为中胚层是“生来俱有”的,组织者在受精卵时期就以灰色新月区

为标志定位在边缘区域(Marginal Zone)。然而,Nieuwkoop等人的工作对此作出了新的解释。

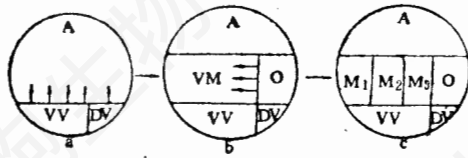
1. Nieuwkoop的中胚层诱导理论

中胚层诱导现象是通过实验胚胎学方法发现的。60年代末,Nokamura^[3]、Nieuwkoop^[4]等进行了一系列的分离、重组实验,Nieuwkoop^[5]提出了中胚层诱导理论来解释中胚层的形成机制。其理论的核心内容是,(1)囊胚期,在动、植物半球交界处存在一种从植物半球卵黄团发出的,向动物极方向的诱导作用。(2)这种诱导作用在背部较强,腹方及侧方较弱。(3)背方的诱导作用产生中轴中胚层(axial mesoderm),侧方的诱导作用产生侧板中胚层(lateral plate mesoderm),腹方的诱导作用产生出血岛等构造。(4)诱导作用的最强时期为囊胚期^[6]。

2. 中胚层诱导的三种信号的模型(three signal model)

Slack等人在爪蟾早期胚胎上重复了Nieuwkoop等人的实验^[7],并以Nieuwkoop的诱导理论为基础,提出了一个三种信号的模型来解释中胚层的诱导过程(图1)。他们认为第一种信号在背方,方向是由植物半球背侧(DV)向动物半球,其诱导的主要产物将发育成脊索,并且有人将其称为“组织者”。第二种信号在侧方和腹方,方向仍由植物半球向动物半球,主要诱导出向侧部和腹部中胚层方向分化的细胞成分,假若没有第三种信号的作用,这部分细胞将分化为间质细胞、血细胞等等,但不能产生肌肉细胞。第三种信号来自于新形成

本文在整个书写的过程中,得到庄孝德教授和曾弥白教授的悉心指导,在此表示感谢。

图1 Slack三信号模型^[8]

A: 动物极 DV: 植物半球背侧 VV: 植物半球腹侧 O: 组织者 VM: 腹部中胚层 M: 中胚层 箭头表示诱导信号的方向, 详细说明见正文。

的组织者, 其方向是由背方向腹方, 起所谓“背部化”(dorsalization)作用, 其特点是背部化强度向腹方减弱, 使侧方产生向肌肉细胞分化的细胞成分^[8]。Slack的一信号模型是总结一些实验结果提出的假说, 是否正确需有进一步的实验来证明。

中胚层诱导现象已被许多实验所证实, 但对其物质基础和作用机制的研究由于受到手段上的限制, 较难深入。然而, 采用分子生物学手段, 结合实验胚胎学技术, 似乎为这一领域的研究打开了局面。

二、中胚层诱导因子(mesoderm inducing factors, MIFs)与多肽生长因子(peptide growth factors, PGFs)

自Spemann“组织者”的概念提出以来, 许多发育生物学家都在致力于寻找起诱导作用的因子, 并发现了许多能诱导预定外胚层产生中胚层构造的异源动物组织^[9], 称之为异源诱导物(Heterogenous inducers)。Sax'en等还发现Hela细胞的培养液也能诱导产生中胚层组织^[10], 可惜这一发现未能引起重视。以异源诱导者的工作为基础, 曾也进行过诱导物质的生化提取工作。尽管Tiedemann等从鸡胚中得到“植物极化因子”等等^[11], 然而这部分工作却始终未能得到满意的结果。70年代Tiedemann曾力图利用提取“植物极化因子”的方法和密度梯度超离心法从爪蟾早期胚胎中分离诱导因子^[12], 但结果不理想。看来以当时对中胚层诱导因子的认识为背景, 从早期胚胎或成体组织中提取诱导因子是非常困难的, 需要寻找新的途径。然而近几年来, 从众多的已纯化的蛋

白中发现了一些能起诱导作用的因子, 利用它们进一步分析诱导作用的可能的分子机制似乎是可行的。

多肽生长因子近10年来受到许多生物学家的重视, 许多工作表明它不仅对肿瘤的发生意义重大, 而且对细胞的正常生长、分化起着调控作用。目前相当多的工作指出它们在中胚层诱导中起着重要的作用。

1. FGF (fibroblast growth factor)与中胚层诱导

在已发现的众多的PGFs中, Slack等首先证明了牛的FGF能够从外胚层诱导出中胚层构造, 其诱导活性能被肝素所抑制^[13]。既然异源的FGF具有诱导功能, 那么在爪蟾的正常胚胎中是否存在其自身的, 具有诱导功能的类似于FGF的分子呢? Kimelman和Kirschner^[14]在爪蟾卵母细胞cDNA库中发现了包含有非常近似于牛bFGF (basic FGF)顺序的cDNA。它能同卵母细胞、成熟卵及早期胚胎的1.5 kb RNA杂交。而且还探明这种RNA虽然大量地存在于卵母细胞中, 但在受精卵中却减少了95%, 在中期囊胚转变时期(MBT^[15], middle blastula transition)出现第二次表达高峰。

进一步的工作还发现了分子量分别为2.3 kb、4.5 kb的另外两种RNA, 前者自卵母细胞到原肠中期持续表达, 后者只存在于卵母细胞中, 在神经胚期重新表达^[16]。这三种不同分子量的RNA均能同爪蟾bFGF cDNA探针杂交。其中4.5 kb mRNA包含着爪蟾bFGF全顺序。序列分析的结果表明它所编码的蛋白全顺序同人bFGF有89%的同源性。当将此cDNA构建到T₇表达性载体上, 在大肠杆菌中表达, 可合成出具有与中bFGF相同中胚层诱导活性的蛋白。令人吃惊的是在卵母细胞及早期胚胎中大量存在的1.5 kb mRNA的转录方向同4.5 kb mRNA转录方向相反^[17], 即前者是反义mRNA (antisense mRNA)。Kimelman和Kirschner认为1.5 kb反义mRNA的

存在起调节 bFGF mRNA 稳定性的作用, 从而调控 bFGF 蛋白的合成。

Slack^[18]等将囊胚期胚胎的可溶性提取物通过肝素亲和层析柱, 发现高盐洗脱成分中有一个能用抗 bFGF 抗体阻断其中胚层诱导活性的组分。进一步用高压液相亲和层析和蛋白杂交技术, 证明此组分确能同抗 bFGF 抗体结合。Kimelman 等^[19]亦进行了类似的实验, 其结果说明在卵母细胞和早期胚胎中贮存着大量的 FGF。他们从蛋白杂交的结果推算出每个卵约贮存有 100 pg 的 FGF, 即 200 ng/ml。因为 20—50 ng/ml bFGF 就能诱导预定外胚层产生中胚层构造, 因此, 他们认为卵中所贮存的 bFGF 足以产生中胚层诱导反应。综上所述, 可以认为在爪蟾早期胚胎中存在着具有中胚层诱导功能的 FGF 分子。

原癌基因(proto-oncogene)产物是一类控制胞内信号传递, 控制细胞生长、分化的重要分子。癌基因 Int-2 和 K-FGF 同 FGF 约有 40—60% 的同源性。它们的功能目前仍不明朗, 仅知道 Int-2 在哺乳动物(小鼠) 7.5—9.5 天的胚胎中主要分布在原条区域^[19], K-FGF 的表达高低与胚癌细胞(EC)诱导分化有关, 即诱导分化后胚癌细胞的 K-FGF 表达量明显降低^[20]。Paterno^[21]将 Int-2 和 k-FGF 蛋白分别去培养爪蟾囊胚预定外胚层, 发现它们虽然中胚层诱导的能力有所不同, 但均能诱导外胚层产生中胚层构造。这一结果提示了这两种癌基因产物可能与哺乳动物胚胎的中胚层形成有关。

Gillespie 和 Slack 等^[22]还分析了爪蟾早期胚胎 FGF 受体的分布及亲合性, 发现囊胚期不仅受体密度最大, 受体的亲合性也最高。更为有趣的发现是边缘区的受体密度高于动物极和植物极, 背方略高于腹方。这种受体的分布特性似乎同中胚层的诱导特性相吻合。这从另一方面进一步说明了 FGF 参与了胚胎中胚层的诱导。但是关于 FGF 分子在爪蟾胚胎中的空间分布, 这个非常重要的问题, 至今仍没有

任何资料。

2. TGF β (transforming growth factor) 与中胚层诱导

另一类多肽生长因子, TGF β , 已发现可能同中胚层诱导有关。Rosa 等发现 TGF β -2 具有较强的中胚层诱导活性^[23], 但 TGF β -1 却没有此活性, 但 TGF β -1 是否同中胚层诱导有关, 目前仍无更多的资料。

Smith^[24]发现, 培养过 XTC 细胞(一株来源于爪蟾的细胞株)的培养液, 能诱导预定外胚层产生中胚层构造。将此培养液浓缩, 部份纯化后, 用不同专一性的抗体进行阻断实验, 发现抗 TGF β -2 的抗体能完全终止其中胚层诱导活性, 而对 TGF β -1 专一的抗体却不能有效地阻断其诱导功能^[25]。上述结果说明在培养过 XTC 细胞的培养液中起中胚层诱导作用的成分可能是 TGF β -2 或其类似分子。虽然 XTC-MIFs 是爪蟾细胞来源的, 但在未能证明早期胚胎中所具备的 MIFs 等同于 XTC-MIFs 之前, 还不能认为 XTC-MIFs 为爪蟾胚胎自身的 MIFs。

此外, 有一类定位于植物半球的母体 mRNA, 称之为 Vg-1^[26], 被认为其蛋白产物同 TGF β 相关, 可能参与了中胚层诱导。Week 和 Melton^[27]对从卵母细胞 cDNA 库中筛选到的 Vg-1 cDNA 进行了序列分析, 发现 Vg-1 编码一个分子量约为 41.8×10^3 道尔顿的蛋白, 其羧端 120 个氨基酸同 TGF β -1 有 38% 同源性, 且其中所含的六个半胱氨酸的位置完全一致。因此他们将 Vg-1 归入 TGF β 大家族中。有趣的是 Vg-1 同 TGF β 大家族中的另一成员果蝇 dpp 基因有 48% 的同源顺序, 后者被认为与果蝇的形态建成(pattern formation) 有关。

Vg-1 之所以受到重视与它的空间分布有关。原位杂交的结果表明(图 2)^[27-28], 随着卵母细胞的发育过程, Vg-1 从核周围移向植物极, 并定位于植物极皮层, 形成薄薄的一层。受精前后, Vg-1 mRNA 从皮层释放出来,

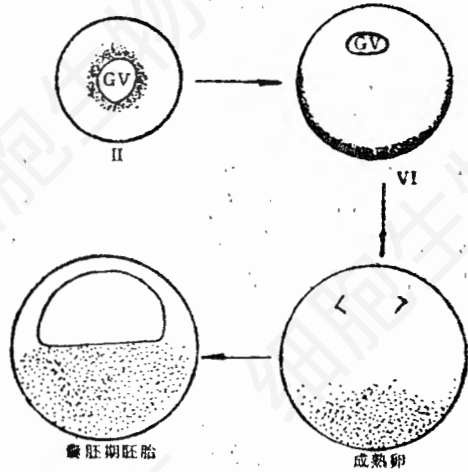


图2 Vg-1 mRNA原位杂交结果^[27,28]

GV: 胚泡, II、VI: 卵母细胞发育第II、第VI期。此图表示Vg-1 mRNA自合成后的迁移情况。详细说明见正文。

向动物极方向扩散。当胚胎处于囊胚期时,整个植物半球的裂球均包含有Vg-1基因的转录产物。更进一步,Tannahill和Melton^[29](1989)将Vg-1基因构建到T₇表达性载体上,并得到了其融合蛋白。他们利用它制备了抗Vg-1蛋白的多克隆和单克隆抗体,采用蛋白杂交(Western blot)技术,证明Vg-1蛋白定位于囊胚期胚胎的植物半球,原肠期所含Vg-1蛋白量最高。Dale等也获得了类似的结果^[30]。从上述的结果来看,Vg-1的空间分布同人们推想的中胚层诱导因子可能的空间分布相吻合,加之Vg-1同TGF β 有38%的同源性,因此许多人认为Vg-1可能是爪蟾自身的MIFs之一。但实际上至今仍未有直接的证据说明Vg-1编码的蛋白具有中胚层诱导活性。仅凭其与其它蛋白的同源性及其空间定位是不能断定其确切功能的。事实上,由于Tannahill和Melton是采用将动、植物半球分离,分别去测定Vg-1蛋白的含量的方法来确定Vg-1蛋白的空间分布,因此并不能精确地回答Vg-1蛋白的定位。

确定Vg-1的功能目前看来遇到了困难,采用常规的方法在短时期内难以解决这个问

题。Shuttleworth和Colman^[31]所建立的利用反义寡聚核苷酸(antisense oligonucleotides)消除爪蟾卵内特异mRNA的技术,可能为解决这个问题提供了手段。他们证明了注入卵内的反义寡聚核苷酸能与特异的mRNA形成可被内源RNase H识别的DNA-RNA双聚体,从而消除特异的mRNA。利用这个方法,还可以去探明对早期发育起不同作用的不同的分子,进而分析这些分子在起作用时的分子机制。同样,向早期胚胎注射专一性抗体也是一个值得采用的方法。

三、展 望

发现多肽生长因子FGF和TGF β -2具有明显的中胚层诱导活性,特别是一系列的实验表明,在爪蟾早期胚胎中可能存在具有中胚层诱导功能的类似于FGF和TGF β 的分子,为进一步研究中胚层诱导的分子生物学机制开辟了途径。如果这类分子确实在正常发育中起作用,那么以下讨论的两个方面,在进一步开展工作,应引起人们的重视。

1. 中胚层诱导是否是多因子的协同作用

在人们发现FGF和TGF β -2具有中胚层诱导活性时,就发现它们各自所诱导产生的中胚层类型有明显的差异。FGF主要诱导产生肌肉、间质细胞等^[13],TGF β -2则主要诱导产生脊索^[29]。由此看来,不同的诱导因子的诱导特性可能是不同的。因此中胚层诱导很可能是一个多因子的协同作用。Kimelman和Kirschner所发现的FGT β -1可增强FGF的诱导活性,似乎亦暗示了这一点。特别是在早期胚胎中可能还存在另一类不同于FGF和TGF β -2的分子,即它本身并没有诱导活性,但起着某种重要的辅助作用。值得注意的是在爪蟾早期胚胎中确实存在许多未知功能的mRNA。例如,Mercola发现血小板衍生生长因子(PDGF)的mRNA大量存在于爪蟾卵母细胞和早期胚胎中^[32]。但是用PDGF蛋白去处理预定外胚层,并未发现有任何作用。因此PDGF在爪

蟾早期胚胎中的功能没有被确定。而这一类分子存在于卵母细胞和早期胚胎表明对于早期发育起着极为重要的作用。采用前已述及的反义寡聚核苷酸技术^[31], 可能会有利于新的诱导因子的发现。

2. 中胚层诱导与细胞内信号传递途径的关系

在其他系统中已发现: FGF 作为一种成纤维细胞分裂原(fibroblast mitogen)是通过膜上受体及胞内信号传递途径(intracellular signal transduction pathway)起作用的^[33]。Giellespie 和 Slack 已证明在爪蟾早期胚胎的细胞膜上存在有 FGF 受体^[22], 因此人们自然会联想到, FGF 诱导中胚层的作用是否也是通过受体/信号传递模式实现的。对于其他诱导因子, 人们也会提出相类似的问题。

胞外信号转化为胞内信号是通过细胞膜受体和细胞内一系列的生化活动实现的。第二信使除人们所熟悉的 cAMP 外, 还有目前正处于研究热点的三磷酸肌醇(InsP₃)和二酰甘油(DG)。受体结合相应配体后, 可通过三磷酸肌醇代谢途径^[34], 激活胞内信号传递途径(图 3)。此外, 许多受体与配体结合之后, 受体可自身磷酸化, 或者受体直接激活酪氨酸蛋白激酶和丝氨酸蛋白激酶, 从而使胞外信号转换成胞内信号, 最终, 信号传至核内基因转录调控系统^[35, 36], 由此影响到细胞的生长和分化。

中胚层诱导因子可能是通过胞内信号传递途径起作用的证据, 来自两方面。第一个证据是许多年前, 人们就发现 Li⁺ 是一种极强的内一中胚层诱导因子^[5]。而这个现象一直使人迷惑: 为什么这种无机离子具有这么强的诱导作用? 最近发现 Li⁺ 可抑制由 InsP 向 Ins 的转变过程(图 3)。当将 Li⁺ 注射入 32-细胞期动物半球腹侧的一个细胞后, 产生双头胚胎, 但若把 InsP 的前体 Myo-Ins 与 Li⁺ 同时注射到同一个细胞, 胚胎正常发育^[37]。这一结果说明 Li⁺ 的诱导作用同磷酸肌醇代谢有关, 而后者与胞内信号传递系统相联系。

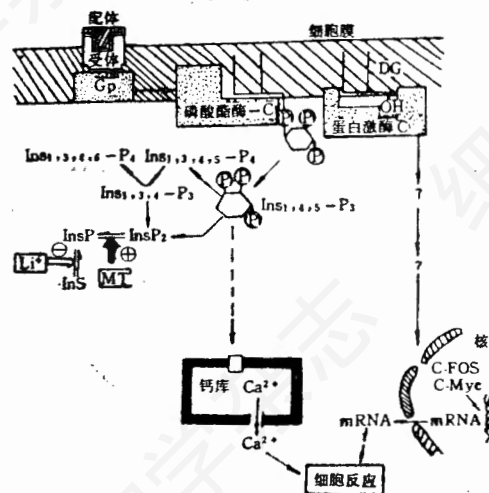


图 3 三磷酸肌醇(InsP₃)代谢与胞内信号传递

Ins, 肌醇 GP, GTP 结合蛋白 DG, 二酰甘油受体结合配体后通过 GP_i 激活磷酸酶 C₁ 产生 InsP₃ 和 DG InsP₃ 使胞内 Ca²⁺ 库释放 Ca²⁺。DG 激活蛋白激酶 C₁ 后, 可使一系列信号传递蛋白磷酸化, 将信号传递至核内癌基因产物, 如 c-fos, c-myc 等, 最终信号传至基因转录的调控系统。从而影响细胞的生长和分化。

第二个证据来自于 Whitman 和 Melton 的工作^[38], 他们向爪蟾受精卵中微量注射病毒致癌基因 MT(middle T)的 mRNA, 胚胎发育至囊胚期后, 将预定外胚层分离培养于无机盐溶液中, 预定外胚层产生出中胚层构造, 如脊索, 肌肉等。已知 MT 在致癌过程中是通过激活胞内信号传递途径起作用的, 如激活细胞酪氨酸激酶(tyrosine kinase)PP 60^{src}、PP 62^{src} 和磷酸肌醇激酶(InsPkinase)。注射入 MT mRNA 后, 在囊胚期分别检测酪氨酸激酶和磷酸肌醇激酶的活性, 发现它们均有明显的提高。有趣的是 Li⁺ 的作用位点与 MT 的作用位点之一在同一条途径上(图 3), 产生的结果相近似, 即 Ins 的产生受阻。他们的实验表明, 激活胞内信号传递途径同 MT 诱导中胚层有关。在胚胎自身的诱导过程中, 是否存在类似的激活胞内信号传递途径的过程? 看来提出这个问题是合理的。

然而几年前, Davids 和 Tiedemann 等^[39]

用蛋白激酶C的激活剂佛波酯(Phorbol ester),如TPA、PMA等,处理预定外胚层,试图分析胞内信号传递途径在诱导过程中所起的作用,未能得到令人满意的结果。因此,由此也产生了以下的一系列问题,仅仅激活一条途径是否就足以诱导出中胚层?不同的诱导信号所激活的途径有什么异同?它们之间又是怎样协同起作用的?

以上讨论的仅是关于中胚层诱导可能的分子生物学机制。实际上中胚层的形成是一个极为复杂的过程,对它的了解仅限于细胞内的分子生物学机制是远远不够的。细胞之间的相互通讯、调控也是不容忽视的重要因素^[40]。只有较为全面地对各方面的工作进行综合,才能认识胚胎中胚层的形成机制。

参 考 文 献

- [1] Nieuwkoop, P. D. et al., 1985, "The Epigenetic Nature of Chordate Development". Cambridge press.
- [2] Holtfreter, J. et al., "Analysis of Development" ed. by Willier, B. H. et al. 230-296. W. B. Saunder Company press.
- [3] Nakamura, O. et al., 1967, *Embryologia*, 9: 223-237.
- [4] Nieuwkoop, P. D. 1969, *Wilhelm Roux' Arch. EntwMech. Org.*, 162: 341-373.
- [5] Nieuwkoop, P. O., 1973, *Advances in Morphogenesis*, 10: 1-39.
- [6] Asashima, M., 1975 *Wilhelm Roux' Arch*, 177: 301-308.
- [7] Dale, L. et al., 1987, *Development*, 100: 279-295.
- [8] Slack, J. M. W. et al., 1980, *JEEM.*, 56: 283-299.
- [9] Chuang, H. H., 1938, *Biol. Zhetrabl.*, 58: 472-480.
- [10] Saxén, L., 1958, *JEEM.*, 6: 616-633.
- [11] Tiedemann, H., 1978, "Organizer", 91-117. ed. by Nakamura, O. et al. Elsevier/North-Holland Biomedical press.
- [12] Janeczek, J. et al., 1984, *Roux' Arch. Dev. Biol.*, 193: 1-12.
- [13] Slack, J. M. W. et al., 1987, *Nature*, 326: 197-200.
- [14] Kimelman, D. et al., 1987, *Cell*, 51: 369-377.
- [15] Newport, J. et al., 1982, *Cell*, 30: 675-686.
- [16] Kimelman, D. et al., 1988, *Science*, 242: 1053-1056.
- [17] Kimelman, D. et al., 1989, *Cell*, 59: 687-696.
- [18] Slack, J. M. W. et al., 1989, *Development*, 105: 147-153.
- [19] Delli-Bovi, P. et al., 1988, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2933-2941.
- [20] Moore, R. et al., 1986, *EMBO J.*, 5: 191-924.
- [21] Paterno, G. D. et al., 1989, *Development*, 106, 79-83.
- [22] Gillespie, L. L. et al., 1989, *Development*, 106: 203-208.
- [23] Rosa, F. et al., 1988, *Science*, 329: 783-785.
- [24] Smith, J. C. et al., 1987, *Development*, 99: 3-14.
- [25] Smith, J. C. et al., 1988, *Development*, 103: 591-600.
- [26] Rebagliati, M. R. et al., 1985, *Cell*, 48: 599-605.
- [27] Weeks, D. L. et al., 1987, *Cell*, 51: 861-867.
- [28] Yisraeli, J. K. 1988, *Nature*, 336: 592-595.
- [29] Tannahill, D. et al., 1989, *Development*: 106, 775-785.
- [30] Dale, L. et al., 1989, *EMBO J.*, 8: 1057-1065.
- [31] Shuttleworth, J. et al., 1988, *EMBO J.*, 7: 427-434.
- [32] Mercola, M. et al., 1988, *Science*, 241: 1223-1225.
- [33] Pasquale, E. M. et al., 1988, *J. Cell Physiol.*, 137. 146-158.
- [34] Whitman, M. et al., 1988, *Biochim. Biophys Acta.*, 948, 327-340.
- [35] "Nuclear Oncogene" ed. by Alt, F. W. et al., 1987, Cold Spring Harbor Lab press.
- [36] Hunter, A. et al., 1985, *Annu. Rev. Biochem.*, 54: 897-920.
- [37] Altman, J., 1988, *Science*, 331: 119-120
- [38] Whitman, M. et al., 1989 *Science*, 244, 803-806.
- [39] Davids, M. et al., 1987, *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 196: 137-140.
- [40] 庄孝德, 1990, 细胞生物学杂志, 12: 1-5.