

皮层蛋白和 Arp2/3 蛋白复合物在文昌鱼 原肠期胚胎表达图式的分析*

喻 丹 张培军

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

脊椎动物胚胎发育过程中, 经卵裂和囊胚期积累了一定数量的细胞后, 在原肠期开始出现明显的细胞运动, 囊胚表层的细胞通过一个称为组织者(Spemann and Mongald's organizer)的结构进入胚胎的内部, 经过内陷、内卷、汇聚、延伸等一系列细胞运动, 按照既定的方向迁移到达目的地, 参与构建各个胚层, 这一过程称为形态发生运动。形态发生运动是脊椎动物胚胎发育必不可少的重要步骤, 在这一过程中, 特定的单个细胞或成群细胞的定向迁移, 对于三个胚层(外胚层、中胚层、内胚层), 以及由这些胚层所产生的特定组织器官的发育与分化, 具有决定性影响。

从发育进化角度讲, 作为脊椎动物与无脊椎动物过渡类型, 一个世纪以来, 文昌鱼一直是发育学研究的重要模式生物。其中最重要的发现之一是童第周等做出的关于文昌鱼胚胎调整性的研究(Tung *et al.*, 1958, 1960, 1965), 他们利用卵裂球的分离和配合实验证明了文昌鱼胚胎在发育过程中具有调整能力, 各部分有明显的相互作用。但关于文昌鱼形态发生运动的研究仅限于形态描述(Conklin, 1932; Hirakow *et al.*, 1991), 对于文昌鱼形态发生过程中细胞运动机制依然缺乏深入了解。

细胞前导缘处发生的肌动蛋白纤丝聚合和分枝是细胞运动的主要驱动力(Mogilner, 1996), 体外培养细胞的实验证据表明, 皮层蛋白和 Arp2/3 复合物能够直接调节微丝的聚合和组织, 而在细胞运动中扮演重要的角色。在运动的细胞中, 这两类蛋白集中分布于肌动蛋白动态变化活跃的细胞前导缘处(Weed, 2000)。Svitkina 等(1999)最早提出 Arp2/3 复合物是一种在物种间高度保守的蛋白质复合体, 它是起始肌动蛋白纤丝聚合的肌动蛋白成核化过程的主要调节者(Svitkina *et al.*, 1999); Uruno 等(2001)的研究证明微丝肌动蛋白结合蛋白-皮层蛋白, 对 Arp2/3 复合物也有很高的亲和性, 它通过介导 Arp2/3 复合物与微丝肌动蛋白的结合而进一步活化了 Arp2/3, 在有皮层蛋白存在的条件下, 使 Arp2/3 复合物的成核作用, 以及微丝肌动蛋白聚合作用和分枝的形成效率提高 20~30 倍(Uruno *et al.*, 2001)。目前, 关于细胞运动

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 4564 号。中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放实验室开放课题资助项目, 科学基金资助课题 B56032403。

通信作者: 张培军, 男, 研究员, 博导, E-mail: pjzhang@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2002 年 3 月 15 日

的分子机制已初步达成共识,即皮层蛋白通过结合微丝和 Arp2/3 复合物,激活 Arp2/3 复合物的核化功能,促进细胞前导缘处的微丝发生组装和形成分枝,驱动了细胞运动的发生。

作者利用整装胚胎免疫染色的方法,检测了 Arp2/3 复合物及皮层蛋白在文昌鱼原肠期胚胎的表达图式,证明了皮层蛋白和 Arp2/3 复合物在文昌鱼原肠化运动中的功能,以期进一步研究文昌鱼形态发生运动的分子机制及其进化意义。

结果表明皮层蛋白和 Arp2/3 复合物在文昌鱼原肠期共分布,共同介导了内陷运动的发生,实验还发现皮层蛋白和 Arp2/3 的表达仅限于中内胚层,外胚层始终未见阳性染色,这表明原肠作用中细胞的主动运动仅发生在中内胚层细胞中,皮层蛋白和 Arp2/3 复合物是文昌鱼原肠作用中细胞运动所必须的。

一、实验材料与方法

1. 胚胎材料的获得

本实验采用以青岛文昌鱼 *Branchiostoma belcheri tsingtaoense* (Tchang *et al.*, 1936) 胚胎作为实验材料,于 2001 年 6 月中旬至 7 月中旬文昌鱼产卵季节,从青岛近海采集性成熟的文昌鱼在实验室内培养,在其合适的光照、营养和水温等条件下,文昌鱼在养殖水缸中正常排卵、受精(Tung *et al.*, 1958)。将受精卵置于 24.5℃ 的无菌过滤海水中培养,根据 Hirakow 等(1991)所定的分期(Hirakow *et al.*, 1991),到不同的发育时期取样,将胚胎在固定液(含 4% 多聚甲醛的 0.1mol MOPS pH7.4, 0.5 mol NaCl, 0.15mol EGTA 溶液)中,4℃ 条件下固定 12h。用 PBST 液(20 mmol NaPO₄ buffer, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20)清洗,用镊子剥除卵膜,待整装胚胎免疫染色时使用。

2. 抗体

抗皮层蛋白的单克隆抗体和抗 Arp3 的多克隆抗体(标记 Arp2/3 蛋白复合物)由美国 Holland 实验室 Steven Zhan 教授惠赠,按 1:5 000 的比例稀释使用。用碱性磷酸酶交联的第二抗体(购自华美生物技术有限公司)按 1:2 000 比例稀释,用于识别一抗。

3. 整装胚胎免疫杂交染色

选择固定后并去除卵膜的文昌鱼原肠期胚胎用 PBST 冲洗,在封闭液(1% BSA, 0.1% Triton X-100 的 PBST, pH 7.4)中处理 45min,加入一抗,4℃ 保温孵育过夜后用 PBST 冲洗,随后加入二抗(以 50mmol Tris pH7.5 缓冲)(TBST),室温条件下,置于摇床上以 300rpm 孵育保温 1h。用 TBST 液冲洗后,加入适量 NBT/BCIP 溶液处理约 15min 至产生合适的染色。生色反应用含 5mmol EDTA 的 PBS 溶液进行终止,样品在甘油中透明,封片,用 Zeiss 显微镜观察,记录照相,在 Adobe Photoshop 6.0 中进行图像处理。

二、结果与讨论

文昌鱼卵为均黄卵,进行完全卵裂后,胚胎发育形成一个由单层细胞构成的中空球状囊胚。Hirakow 等(1991)对文昌鱼胚胎原肠化过程的形态观察表明,在受精后发育

4h, 文昌鱼胚胎在植物极区域开始变得较为平坦, 这标志着原肠期的开始, 随后扁平化的区域形成一个较浅的不规则的胚孔状凹陷, 随着发育的进行, 内陷进一步加深, 范围逐渐扩大, 至原肠中期, 胚胎呈杯状, 随后胚胎沿前后轴伸长, 胚孔缩小; 至原肠末期, 囊胚腔消失, 胚胎背侧变为扁平, 整个胚胎呈一侧(背侧)较为扁平的椭圆型结构形状。作者认为, 文昌鱼原肠化过程也是由大量细胞运动构成的, 其整装抗体染色结果表明:

1. 皮层蛋白与 Arp2/3 复合物共分布, 并介导了内陷运动的发生

皮层蛋白与 Arp2/3 复合物都是在进化中结构和功能高度保守的分子, 因此可以利用皮层蛋白和 Arp3 的抗体在文昌鱼胚胎中进行皮层蛋白和 Arp2/3 复合物的免疫检测 (Svitkina., 1999)。由染色的区域上可看出(图 1, 图 2), 在同一时期的胚胎中, 皮层蛋白

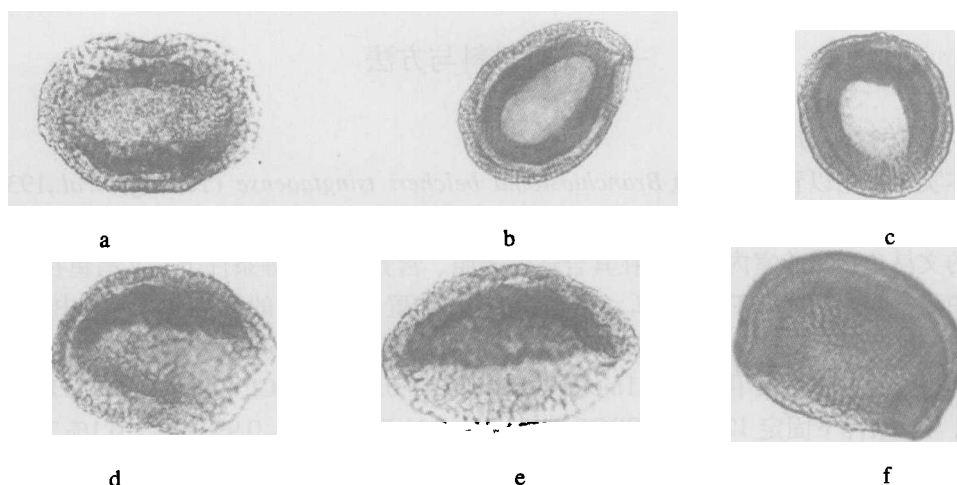


图 1 抗皮层蛋白抗体整装染色的文昌鱼原肠期胚胎

图 a、b、c 为胚胎植物极观, 图 d、e、f 为分别对应于 a、b、c 图中的胚胎侧面观。

图 a、d 为原肠初期, 图 b、e 为中期原肠胚图, 图 c、f 为晚期囊胚的染色结果

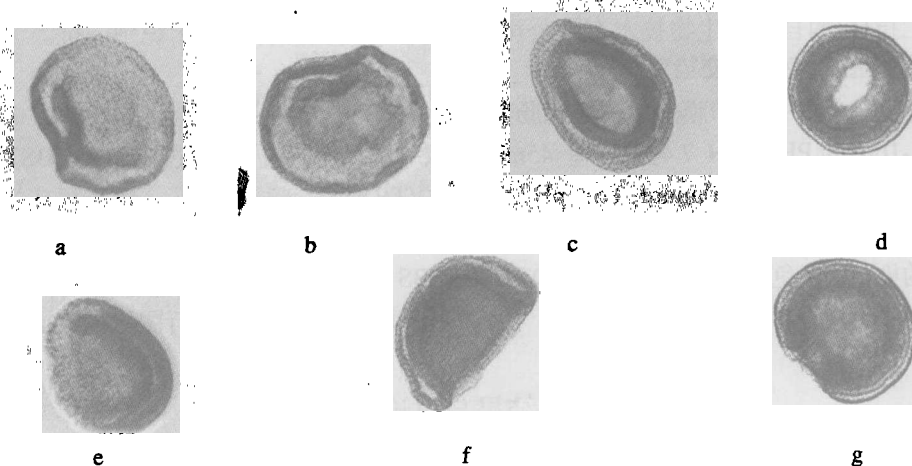


图 2 抗 Arp3 抗体的抗体整装染色的文昌鱼原肠期胚胎

图 a、b、c 为胚胎植物极观, 图 d、e、f 为分别对应于 a、b、c 图中的胚胎侧面观。

图 a、b、e 为原肠初期, 图 c、f 为中期原肠胚, 图 d、g 为晚期囊胚染色结果

与 Arp2/3 复合物染色分布的区域相同,在不同的发育阶段二者染色图式的变化趋势亦相同,这与在活体中的研究结果及体外培养细胞中的实验结果相吻合, Uruno 等(2001)和 Weed 等(2000)在研究 NIH3T3 细胞运动过程中发现,皮层蛋白与 Arp2/3 复合物共分布,皮层蛋白与 Arp2/3 的相互作用不仅是细胞运动前导缘微丝肌动蛋白组装的必要条件而且也是充分条件(Uruno *et al.*, 2001; Weed, 2000)。在文昌鱼原肠胚细胞中,皮层蛋白和 Arp2/3 复合物的分布图式证实其直接介导了这些细胞内陷运动的发生。

2. 皮层蛋白与 Arp2/3 复合物只在发生内陷运动的中内胚层细胞, 外胚层细胞没有表达

作者的研究结果表明,在文昌鱼囊胚期晚期,皮层蛋白与 Arp3 蛋白的染色最初以非对称的形式出现在植物极附近的特定区域(图 3)。首先被染色的这部分细胞位于已经扁平化但尚未出现明显凹陷的植物极外侧,随后在原肠初期,与最先内陷的细胞相对的一系列细胞也被染色,其形状大而圆,相互之间结合较为松散。Hirakow 等人(1991)在用电镜研究同一时期的胚胎时,也观察到了一些独特细胞,他们根据其形态上的特征推测这些细胞可能最早发生内陷。本研究中, Arp2/3 复合物和皮层蛋白在这群细胞上的特异性染色证明了这些细胞的确最早发生了内陷运动。在随后的原肠作用过程中,从胚胎植物极角度观察,染色的区域逐渐向两侧扩展,到原肠中期,整个发生内陷的边缘区域均被染色(图 1b、c, 图 2b、c、d)而位于胚胎最外侧的外胚层细胞始终没有观察到染色的出现,这一结果在侧面观的一组胚胎中(图 1d、e、f, 图 2e、f、g)更为明显。这表明文昌鱼胚胎原肠作用过程中,细胞的主动运动只发生在内陷进入胚胎内部的中内胚层细胞,而外胚层细胞不参与主动运动,由此可初步得出结论,文昌鱼形态发生运动是中内胚层细胞主动运动的过程,胚胎胚层的形成和在原肠期胚胎形状的改变很大程度上是由中内胚层细胞的内陷运动驱动的。

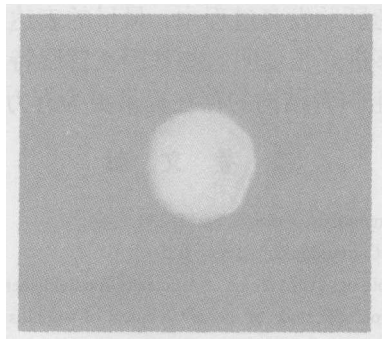


图3 皮层蛋白和 Arp2/3 复合物在原肠期起始时的染色结果

作者在研究中还发现,文昌鱼原肠化过程中,中内胚层与外胚层交界处的皮层蛋白和 Arp2/3 复合物染色一直较弱,作者推测,这部分细胞进行着活跃的有丝分裂,而进行有丝分裂的细胞内部的肌动蛋白往往处于解聚状态,不能形成含丰富的分枝的微丝肌动蛋白,这可能就是这个区域染色较弱的原因。Conklin(1932)在研究文昌鱼胚胎发育过程中也证实了这一点。

3. 关于文昌鱼“组织者”的探讨

组织者的概念是1924年由Spemann等提出的(Spemann, 1938), 尽管这一理论中对于胚胎诱导现象的解释在当时引起了很大争论, 但是, 近半个世纪以来, 越来越多的实验胚胎学证据, 均证实了这一理论, 即组织者的确具有组织体轴形成的能力。现代胚胎学对组织者的定义包括三个方面: ①起始并组织形态发生运动; ②诱导能力; ③自身的分化能力(Gilbert, 2001)。

童第周等(1962)在对文昌鱼胚胎神经诱导现象的研究中, 发现将早期原肠的胚孔唇取相对的两片, 切掉胚孔唇的外层, 只将剩下的内陷部分分别移植到同一时期的两个胚胎的囊胚腔内, 结果有1/4的例子中形成第二个体轴即诱导产生了第二条脊索, 并在脊索的背侧诱导出神经管, 两侧产生肌节。这一移植实验表明文昌鱼的某一侧的胚孔唇具有分化为脊索并诱导产生第二体轴的能力。

在本实验中, 本文作者发现在晚期囊胚至早期原肠期, 富含皮层蛋白和Arp2/3复合物的细胞并不在植物极的中心而是在植物极附近特定的一侧出现, 很可能是内陷运动是由这部分细胞起始的, 而这部分细胞所在的位置, 对应于童第周等的移植实验中同一时期胚胎的胚孔唇的位置。文昌鱼早期原肠胚从形态上很难区分背唇、腹唇或侧唇, 因此胚孔唇的移植实验中随机切割、移植后诱导出现第二体轴的几率应该是1/4。

本研究在囊胚晚期最早出现染色的这些细胞, 标志着最早发生内陷中胚层细胞, 由于它们在移植后能诱导产生第二个体轴, 而且它们是最早发生内陷并引起了原肠运动的发生, 因此可以推测这部分染色细胞可能就是文昌鱼原肠作用过程中类似组织者的结构。

众多在脊椎动物“组织者”表达的基因, 如 *Wnt11*、*Goosecoid*、*Branchery* 等, 在文昌鱼中也发现了这些基因的序列同源物(Schubert *et al.*, 2000; Neidert *et al.*, 2000), 这些“组织者”基因在文昌鱼胚胎发育过程中, 最早的表达区域也是位于原肠胚胚孔唇的一侧, 作者认为, 如果能够进一步证明这些基因在背唇特异表达区域与本实验中的染色区域的关系, 将为文昌鱼组织者结构的存在提供更为有力的证据。

参 考 文 献

- Conklin E G, 1932. The embryology of amphioxus. *J Morph*, 54:65-131
- Curtis A S G, 1982. Cell behaviour. U K: Cambridge Univ Press. 615
- Gilbert S F, 2001. 6th Ed, developmental biology. USA: Sinauer Associates Inc Publishers. 369-377
- Hirakow R, Kajita N, 1991. Electron Microscopic study of the development of amphioxus, *Branchiostoma belcheri tsingtauense*: the gastrula. *J. of Morph*, 207: 37-52
- Mogilner A, 1996. Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys. J*, 71: 3030-3045
- Neidert A H, Panopoulou G, Langeland J.A, 2000. Amphioxus *goosecoid* and the evolution of the head organizer and prechordal plate. *Evol. Dev.*, 6: 303-310
- Schubert M, Holland L Z, Holland N D, 2000. Characterization of an amphioxus *wnt* gene, *AmphiWnt11*, with possible roles in myogenesis and tail outgrowth. *Genesis*, 27:1-5
- Spemann H, 1938. Embryonic development and induction. New Haven: Yale Univ. Press. 472
- Svitkina T M, Borisy G G, 1999. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell. Biol.*, 145: 1009-1026
- Tchang S, Koo K C, 1936. Description of a new variety of *Branchiostoma belcheri* Gray from Kiaochow Bay, Shangtung, China.

- Inst. Zool. Nat. Acad.*, **3**:3~10
- Tung T C, Wu S C, Tung Y F Y, 1958. The development of isolated blastomeres of amphioxus. *Scientia Sinica*, **7**: 57~90
- Tung T C, Wu S C, Tung Y F Y, 1960. The developmental protencies of the blastomereslayers in amphioxus egg at the 32-cell stage. *Scientia Sinica*, **9**:1~8
- Tung T C, Wu S C, Tung Y F Y, 1965. Differentiation of the prospective ectodermal and entodermal cells after transplantation to new surroundings in amphioxus. *Scientia Sinica*, **14**:16~28
- Tung T C, Wu S C, Tung Y F Y, 1962. Experimental studies on the neural induction in amphioxus. *Scientia Sinica*, **11**:6~12
- Urano T, Liu J, Zhang P J *et al.*, 2001. Activation of Arp2/3 complex mediated actin polymerization by cortactin. *Nat. Cell Biol.*, **3**: 259~266
- Weed S A, 2000. Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.*, **151**: 29~40

Analysis of Cortactin and Arp2/3 Complex Expression Pattern in Amphioxus(*Branchiostoma belcheri tsingtaoense*) Gastrulation*

YU Dan ZHANG Peijun

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract

In vitro experiments showed that cell movements are motivated by active actin nucleation and branching at the motile cell's leading edge. Cortactin and Arp2/3 complex play important roles in this process. Here, we report the expression pattern of these proteins in the gastrula of Amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtaoense*) with the method of whole-mount antibody staining; which was indicated that cortactin and Arp2/3 complex were colocalized and mediated the invagination movement during amphioxus gastrulation; and that they appeared in mesendoderm cells but not in ectoderm cells. In addition, a specific stained area near the vegetable pole was detected prior to the initiation of gastrulation.

* Contribution No. 4564 from the Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences