

心脏的起源和细胞谱系*

朱莹, 朱传炳, 吴秀山

(湖南师范大学 生命科学学院, 中国湖南 长沙 410081)

摘要:心脏是器官发生过程中最早形成的结构之一. 心脏的原基分布图和心脏细胞谱系是心脏起源和形态发生研究的主要方面. 总结了近几年来以鸡和小鼠为模型, 在心脏发生和心脏前体细胞定位方面的研究情况.

关键词:原基分布图谱; 细胞谱系; 形态发生

中图分类号: Q341 文献标识码: A 文章编号: 1007-7847(2001)S0-0025-05

Cardiac Origin and Cell Lineages

ZHU Ying, ZHU Chuan-bing, WU Xiushan

(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: The heart is one of the first structures to form during organogenesis. The cardiac fate maps and cell lineages are the main aspects in the research on the cardiac origin and morphogenesis. The recent study on the early heart morphogenetic movement and the regionalization of heart precursor cells based mainly on models of chicken and mice are reviewed.

Key words: fate map; cell lineage; morphogenesis

(*Life Science Research*, 2001, 5(Suppl): 25~29)

1 前言

心脏和血管的发生是整个胚胎发育过程中的惊人事件. 而心脏原基分布图谱的建立和分析为研究心脏的早期发生提供了有利手段. 原基分布图谱显示的是各种前体细胞群在胚胎上的大致分部, 它首先必须有一个可辨认而且相对稳定的位置标记, 若以鸡胚为模型, 位置标记有原条、后侧边缘区、Koller氏弯及Hensen氏节. 细胞的位置以与这些标记的远近为标准. 心脏前体细胞起源于囊胚的后部(早原条期), 与原条的中段相邻. 将要形成心脏的那部分外胚层细胞在原肠早期穿过原条向内迁入, 并在中原条期继续发育一段时间. 随着中胚层的扩展, 心脏中胚层到达胚胎的前部, 从

而心脏区域大致确定. 鸡和小鼠的上胚层都是胚胎和一些胚外组织的主要来源. 在胚胎发育的关键时期——原肠胚期, 上胚层细胞补充到原条, 经内移作用形成3个新的组织层, 外胚层, 中胚层和内胚层. 除了在形状、大小和细胞数量上的显著差别以外, 鸡和小鼠的胚胎在许多方面都很相似. 对鸡和小鼠原肠胚期基因行为的分析显示, 这两个物种的细胞分化和组织形成的分子控制机制具有高度的保守性. 原肠胚形成后, 随着具有多种发育潜能的前体细胞群形成不同的组织和不同的细胞群在胚胎中的正确定位, 逐渐实现了胚胎发育的组织定位. 本文的第一部分描述了原肠胚时期心脏组织前体的区域性分布和心脏细胞特化过程中的形态发生事件.

* 收稿日期: 2001-09-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(30170479); 湖南省特聘教授基金(25000613)

作者简介: 朱莹(1977-), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生, 从事分子遗传学研究; 吴秀山(1952-), 男, 湖南衡阳人, 湖南师范大学特聘教授, 博士, 通讯作者, 从事分子发育遗传学研究, E-mail: xiushanwu@yahoo.com

脊椎动物的心脏在形成之初是由两层上皮细胞构成的单管结构: 内部的内心膜和外部的心肌层. 原始的管状心脏随后分隔成两室. 心肌的收缩开始于心脏形成的双壁时期, 最初的搏动由右心肌产生并由后向前传至整个心肌层. 除了起搏点, 心脏传导系统此时还未开始发育. 冠状血管细胞、结缔组织细胞和自律神经元在此时期都不存在. 对于鱼这一类的低等脊椎动物, 两室的心脏就是成熟形式, 而对高等脊椎动物来说, 心脏还要经历进一步的形态发生过程. 心房和心室的协同收缩依赖于心脏传导系统的发育和形成. 增厚的心室肌细胞的存活则有赖于冠脉循环系统的形成. 确定它们之间的细胞谱系关系以及在胚胎中的迁移模式, 是了解高等动物在心脏发生过程中心脏各部分的程序化发生和综合控制机制的前提.

2 心脏组织的原基分布图

原肠胚时期, 原条的出现为胚轴的起源提供了形态学标记, 它标志着头尾轴中的尾极. 然而, *EVX 1*, *Fgf 8* 和 *Hex 1* 等基因的定位表达^[1-4]以及外胚层中不同区域细胞命运的差别表明, 胚轴极有可能在原肠胚时期之前就已经形成了.

一些基因的不对称表达说明胚胎组织的分布有左右性. 例如, 小鼠中的 *Nodal* 基因、鸡的 *Nodal* 类似基因 *cNR1*, *HNF 3 β* 以及肌动蛋白受体 *IIA* 沿原条和节仅在原条的前端表达^[5-8], 而鸡胚胎中两种基质蛋白——心脏特异性的植物凝集素联合基质蛋白和纤维相关性基质蛋白在前心中胚层的不对称分布则说明对心脏原基偏侧性的早期决定可能发生于原肠胚时期.

对原肠胚早期胚胎头尾极和左右性特征的出现预示着机体发育的蓝图存在于在形态发生上具有相似性的上胚层和内胚层里. 细胞依据位置特异性模式进行迁移. 根据来自胚胎不同位置的细胞在发育方向上的相互关系, 我们可以绘制整个胚胎的各种组织前体的原基分布图. 虽然克隆分析和原基图谱研究结果显示, 在胚胎的原条期早期(PS 早期), 外胚层细胞的发育方向并不局限于它的谱系发育潜能. 例如: 单一外胚层细胞的后代有可能出现在通常被认为属于不同的胚层^[9]的细胞衍生系中. 细胞移植实验也证明在被移入新位置后, 外胚层细胞的发育方向将和植入点的细胞相同^[10-11]. 但除开细胞潜能的可塑性这一因素的影响, 细胞命运的区域性分布仍可以用原基分

布图来说明. 一系列不同发育时期原基分布图可以说明特定的细胞谱系在发育过程中的形态发生运动以及分化过程中相邻组织之间的相互关系. 而对不同物种的原基分布图的比较研究则能够说明形态发生运动的统一程度.

心脏是在器官发生过程中最早形成的结构之一^[12]. 鸡和小鼠的原基分布图表明中胚层主要来源于外胚层侧面. 一般而言, 侧外胚层能够分别进入两个中胚层区域: 胚外中胚层和胚胎中胚层. 心脏前体细胞和头部中胚层共同定位在胚胎中胚层区域, 位于神经板先祖细胞后. 这些源于外胚层的小鼠心脏前体细胞的后代主要发育成为心肌细胞, 另有一小部分发育成为心内膜和心包膜^[9].

小鼠原肠胚时期的起始阶段(6.5 d), 原条在外胚层最靠近后中线的位置上开始形成. 它靠近胚外中胚层的前体细胞, 并在原肠胚时期持续延伸^[13], 在第 7 d 时(原条期中期)到达心脏中胚层和头部中胚层所在的区域. 鸡的心脏细胞在原条的前中部分进行内移, 这一过程开始于原条期早期, 而在原条期结束时基本完成.

细胞内移后随即形成了中胚层. 随着原条上的细胞继续进入中胚层以及中胚层细胞的增殖, 原肠期开始后 12 h, 小鼠的中胚层就已经覆盖了外胚层后下表面约 2/3 区域, 其中心脏和头部中胚层占据了中胚层的末端部分, 靠近延伸中的原条的前段^[14].

在小鼠中进行的原基定位^[14]和细胞追踪试验^[9]证明, 在 PS 中期到晚期的胚胎侧翼, 将成为心脏细胞的一部分中胚层细胞会沿末端向前端迁移. 小鼠原肠期心脏中胚层的这种移动在鸡的胚胎中也有发现^[15]. 在小鼠的 PS 晚期, 发育中的心脏中胚层在头部神经板下、中胚层前侧出现^[16]. 心脏前体细胞这样的定位与基因的转录部位分布是一致的, *GATA 4* 和 *Flt 1* 基因是心脏内膜上特异表达的, 而 *Nkx 2. 5 (Tinman)* 基因则主要在心肌细胞中表达.

肠内胚层的前体细胞定位在晚期上胚层, 紧接在心脏中胚层和颅中胚层之后. 它们内移穿过原条后加入内胚层, 基本上与心脏中胚层的内移过程同时发生. 新定型内胚层细胞插入到已经存在的内胚层细胞之间, 并被整合到上皮层中. 早期的定型内胚层细胞主要发育为前肠. 心脏中胚层和前肠内胚层在空间上的交叠说明这两个组织在形成之初就建立了一种相邻关系.

分布在原条不同区域里的细胞具有不同的发育方向,虽然这种发育方向依然具有很明显的可塑性.对原条中基因表达的分析表明,转录的区域化与内移细胞在各个器官中胚层之间的分配相一致.在晚期外胚层和刚刚发生内移的中胚层之间进行的相互移植试验证明,细胞内移过程在一定程度上限制了细胞谱系的发育潜能,但是已经发生的内移不会削弱中胚层细胞在原肠胚时期进行形态发生运动的能力^[9].其他对鸟类的研究表明,细胞穿过原条内移之后,胚胎细胞向心肌细胞发展的方向得到了确定.在发生内移时,除了形成脊索的细胞,其他细胞均未定型.前体节中层位于外胚层,前心中胚层的侧面,其中一部分在原条期晚期已位于原条中,并发生内移.这样,前心脏中胚层可以形成体节和侧板中层,而前体节中层和侧板中层也可以形成包括心内层和心肌层在内的心脏.然而在內移结束几小时后,前心肌细胞就已定型,不再与其它的胚胎细胞发生相互作用,而直接分化为心肌细胞^[17].

在对两栖动物和鸡的胚胎的研究中发现,组织间相互的诱导作用可以在原肠胚时期确定心脏前体细胞的发育方向^[18,19].某些来源于内胚层的诱导信号是确定细胞发育方向、维持组织活力和引起心脏发生中胚层终端分化所必需的.一系列对小鼠做的移植实验证明,源于外胚层不同位置的细胞后代都能够用于受体胚胎的心脏发育.心脏细胞终端分化的唯一条件是外胚层细胞的植入位置必须是受体胚胎中心脏前体细胞通常所在的位置.因为只有到达目的地后,移入的细胞才能得到心脏分化所必需的信息——来自内胚层的诱导信号^[20],或者是受体胚胎心脏中层群落中产生的细胞间相互作用.心脏分化的诱导信号来自内胚层前部,而不会出现在中部内胚层,这很可能是由于来自Hensen氏节或其衍生物的抑制作用所致^[21,22].

然而内胚层的诱导作用对于心脏分化的必要性还存在争议.实验结果表明,在内胚层未出现时,就有了早期的心肌分化.而且原肠早期内胚层对于胚胎心脏模式化的过程中也不必要,但却是心肌细胞多种类型的确定所必需的^[18].至少到第6期,肌原纤维蛋白的正确装配和收缩行为的开始都需要前内胚层的支持^[17,20,23].心脏中胚层的特化可能是在内胚层的诱导作用下起始于原肠胚形成的早期^[20].在较晚的时期,前内胚层诱导作

用不再必需,因为肌节的装配和房室心肌的分化都可以在内胚层缺少的情况下正常发生^[23].在鸡胚胎中,前心中胚层夹在都有BMP表达的外胚层和内胚层中间^[24].所以,前内胚层可能也与这种生物的心脏诱导有关.如果在内胚层和中胚层之间存在的诱导作用具有关键性作用,那么在原肠胚形成期心脏中胚层和肠内胚层在空间上的联合就对这一组织间的相互作用的起始和持续起到了重要作用.

3 细胞谱系

在心脏原基确定的时候,心肌细胞和内心膜细胞两种细胞谱系就已经确定.同样,在心肌细胞群中,三类主要的细胞谱系——心房心肌细胞群,心室心肌细胞群和心脏传导系统细胞群——也是由各自的前体细胞分化而来^[25,26].

3.1 内心膜细胞和心肌细胞的起源

在管状心脏形成之初,中胚层心脏细胞生成区首先是一层上皮细胞.然后这一层细胞会产生两个亚细胞群:其中大部分仍然作为上皮层细胞存在,维持N型钙粘着蛋白的表达,后来分化成心肌细胞;而较小的那个亚细胞群则减弱了N型钙粘着蛋白的表达,从初期的上皮层中迁移出来,成为内心膜内胚层的前体细胞.上皮层心肌细胞在心脏开始搏动前开始充分表达肌肉特异性蛋白质^[25],而内心膜细胞则在它脱离中胚层心脏细胞生成区时开始表达上皮细胞标记^[27].反转录病毒细胞系在鸡胚胎中的研究表明,心脏区域单一的细胞只产生由一种类型的细胞构成的克隆,内心膜细胞或心肌细胞^[25].来自中胚层的克隆中,约有95%分布在心肌层,只有约5%分布于内心膜.目前有两种模型来解释这种不平衡的分类过程^[25].第一种模型认为,中胚层心脏细胞具有相同的潜能,而一种作用于局部的机制可以决定在心脏区域中诱导产生的是内心膜细胞还是心肌细胞;第二种模型认为:心脏部位有两种细胞前体:占大多数的的心肌细胞前体和少部分的内心膜细胞前体,上面所提到的不平衡分类过程就可以用这两种细胞系前体数量的不一致来解释.目前有多种证据支持这种模型.

心房和心室肌细胞在原肠胚以前就已分离的假说在对鸡胚胎和斑马鱼胚胎的细胞谱系研究以及在基于克隆技术的原基定位中得到了验证.心房和心室肌细胞前体在囊胚期中期分离,在中胚

层细胞移入生心区时已经形成了。

3.2 冠状血管细胞系的起源

高等脊椎动物胚胎的心脏血管是在心肌层通过心肌细胞的增殖和心室小梁融合而加厚后才形成的。鸡胚在 E6 期开始形成冠状血管, 在 E14 完成冠状血管的连接, 形成封闭的冠脉循环系统。

血管形成有两种方式: 血管发生和维管发生。前者指的是从已形成的血管上长出或分枝而成新血管, 后者则是由局部内皮小囊融合形成新血管。目前对于冠状血管的形成方式还存在争议。

冠状血管的前体、内皮层细胞、血管平滑肌细胞和与前血管相关的组织细胞都在胚胎发生的第 3 d 进入心脏^[28]。每种前体只会产生一种类型的子细胞群, 并形成在一个在冠状血管中有明显界限的细胞群落^[28]。

大多数血管平滑肌细胞都来自神经脊, 但不能肯定神经脊是否也为冠状维管结构提供前体细胞。处在静脉窦外表面右侧、来源于中胚层细胞群的心包膜在 E3 期开始封闭心肌层, 同时管状心脏冠状前体细胞层首次出现。原心外膜的突起与房室接口处的管状心脏的背壁相连, 再形成一个单细胞层, 逐渐覆盖整个心脏。在鸡和鹌鹑的嵌合体的研究中发现, 原心外膜中存在能够分化为冠脉内皮层的内皮层细胞。反转录病毒遗传标记试验显示, 单一的原心外膜的血管生成细胞分化成与血管相关的单一细胞群时, 只包含一种细胞类型——内皮层细胞, 平滑肌细胞或血管外结缔组织细胞^[29]。

目前有一种模型认为冠状血管网通过维管发生机制形成^[30]。第一步, 在外心膜形成时, 独立的内皮层和平滑肌前体从前外心膜移入管状心脏; 第二步, 内皮层细胞分化成为囊状小管囊, 随后内皮层小囊融合成为毛细血管; 第三步, 一旦封闭的血管网建立起来并环化成大动脉, 心脏内平滑肌细胞前体就迁移至确定的内皮层通道处, 形成螺旋形的片断。

3.3 心脏传导系统的起源

高等脊椎动物心脏的节律性收缩由心脏传导系统产生并传递的电刺激来调整。该传导系统由 4 部分构成: 窦房节、房室节、房室束和浦肯野纤维。确定这一系统的细胞成分的起源和谱系关系是了解其分化和形成的控制机制的先决条件。

心脏传导系统的细胞与心肌细胞相比具有自身的特点: 如半径较大、肌原纤维分布较少, 糖原

含量大量增加, 特殊的基因表达产物等。传导细胞中有神经原特异性蛋白, 如神经丝蛋白、脑相关的糖蛋白。神经特异性和肌肉特异性基因的共同表达和神经脊细胞的迁入使传导系统的起源难以确认, 有两种可能性: 肌源性起源和神经脊起源。

虽然心房心室连接处的细胞在发育早期就停止增殖, 但此处的环状结构仍被认为是传导系统形成的起始位点。免疫组织学实验^[31]表明传导系统的分化从近端开始, 然后在 E10 期扩展到浦肯野纤维。除了近端的传导系统^[32], 浦肯野纤维还有不同亲本谱系。确定的图谱说明浦肯野纤维的前体细胞是心肌细胞衍生物而非神经脊细胞衍生物。浦肯野纤维的分化和冠状血管的发育在时空上关系密切^[32], 显示了冠状血管形成的诱导作用可能使收缩性肌肉细胞形成浦肯野纤维。如果这一观点正确, 那么血管网络就成为决定外周传导系统分支模式的关键因素^[26]。

4 展望

分子和细胞生物学方法已揭示了胚胎细胞在诱导定型和末端分化中的可塑性, 然而遗传学方法在确认参与这些过程的基因时也起着重要作用。基于克隆技术的细胞系信息和细胞的定位图确定了胚胎诱导下的心脏谱系的分化和形成的时间和位置。

因为有许多信息只能来自间接的实验证据, 目前仍有一些重要的问题有待解决。如: 内心膜和细胞系在什么时间、什么位置上开始形成? 什么样的胞外因子限制了具有双重潜能的肌源性前体细胞在生心区以空间预定性的模式进行发育? 冠状血管的分支模式是怎样的? 等等。对这些问题的解答会大大加深我们对于脊椎动物心脏发育的理解。

参考文献 (References):

- [1] DUSH M K, MARTIN G R. Analysis of mouse *Evx* genes, *Evx-1* displays graded expression in the primitive streak [J]. *Dev Biol*, 1992, 151: 273-287.
- [2] CROSSLEY P, MARTIN G. The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides that is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo [J]. *Development*, 1995, 121: 439-451.
- [3] HEMESZ E, MACKEM S, MAHON K A. *Rpx*, a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathkes' s pouch of the mouse embryo [J]. *Development*, 1996, 122: 41-52.

- [4] TOMAS P, BEDDING R S P. Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo[J]. *Curr Biol*, 1996, 6: 1487- 1496.
- [5] KING T, BROWN N A. The embryonic one-sided genes[J]. *Curr Biol*, 1995, 5: 1364- 1366.
- [6] LEVIN M, JOHNSON R L, STERN C D, *et al.* A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis[J]. *Cell*, 1995, 82: 803- 814.
- [7] STERN C D, YU R T, KAKIZUKA A, *et al.* Activin and its receptors during gastrulation and the later phases of mesoderm development in the chick embryo[J]. *Dev Biol*, 1995, 172: 192- 205.
- [8] COLLIGNON J, VARLET I, ROBERSON E J. Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning[J]. *Nature*, 1996, 381: 155- 158.
- [9] TAM P P L, BEDDINGTON R S P. Establishment and organization of germ layers in the gastrulating mouse embryo[J]. *Ciba Found Symp*, 1992, 165: 27- 49.
- [10] TAM P P L, ZHOU S X. The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineage is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo[J]. *Dev Biol*, 1996, 178: 124- 328.
- [11] CARCIA-MARTINEZ V, DARNELL K, SOSIC D, *et al.* State of commitment of prospective neural plate and prospective mesoderm in late gastrula/early neurula stages of avian embryos[J]. *Dev Biol*, 1997, 181: 102- 115.
- [12] DERUITER M C, POELMANN R E, *et al.* The development of the myocardium and endocardium in mouse embryos[J]. *Anat Embryol*, 1992, 185: 461- 473.
- [13] TAM P P L, PARAMESWARAN M, KINDER S J, *et al.* The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: The role of ingression and tissue movement during gastrulation[J]. *Development*, 1997, 124: 1631- 1642.
- [14] PARAMESWARAN M, TAM, P P L. Regionalization of cell fate and morphogenetic movement of the mesoderm during mouse gastrulation[J]. *Dev Genet*, 1995, 17: 16- 28.
- [15] PSYCHOYOS D, STERN C D. Fates and migratory routes of primitive streak cells in the chick embryo[J]. *Development*, 1996, 122: 1523- 1534.
- [16] ANTIN P, TAYLOR R G, YATSKIEVYCH T. Precardiac mesoderm is specified during gastrulation in quail[J]. *Dev Dyn*, 1994, 200: 144- 154.
- [17] YUTZEY K E, GANNON M, BADER. Diversification of cardiomyogenic cell lineages in vitro[J]. *Dev Biol*, 1995, 170: 531- 541.
- [18] TONEGAWA A, MORIYA M, NISHIMOTO S, *et al.* Heart formative factors is localized in the anterior endoderm of early Xenopus neurula. *Development*[J]. *Dev Biol*, 1996, 205: 282- 289.
- [19] SUGI Y, LOUGH J. Anterior endoderm is a specific effector of terminal cardiac myocyte differentiation of cells from the embryonic heart forming region[J]. *Dev Dyn*, 1994, 200: 155- 162.
- [20] YUAN S, DARNELL D K, SCHOENWOLF G C. Identification of inducing, respinding, and suppressing regions in an experimental model of notochord formation in avian embryos[J]. *Dev Biol*, 1995a, 172: 567- 584.
- [21] YUAN S, DARNELL D K, SCHOENWOLF G C. Mesodermal patterning during avian gastrulation and neurulation, experimental induction of notochord from nonnotochordal precursor cells[J]. *Dev Genet*, 1995b, 17: 38- 54.
- [22] CANNON M, BADER D. Initiation of cardiac differentiation occurs in the absence of anterior endoderm[J]. *Development*, 1995, 121: 2439- 2450.
- [23] SCHULTHEIS T M, BURCH J B E, LASSAR A B. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis[J]. *Genes Dev*, 1997, 11: 451- 462.
- [24] COHEN-GOULD L, MIKAWA T. The fate diversity of mesodermal cells within the heart field during chicken early embryogenesis[J]. *Dev Biol*, 1996, 177: 265- 273.
- [25] MIKAWA T, FISCHMAN D A. The polyclonal origin of myocyte lineages[J]. *Annu Rev Physiol*, 1996, 58: 509- 521.
- [26] YUTZEY K E, RHEE J T, BADER D. Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHc1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart[J]. *Development*, 1994, 120: 871- 883.
- [27] SUGI Y, MARKWALD R R. Formation and early morphogenesis of endocardial endothelial precursor cells and the role of endoderm[J]. *Dev Biol*, 1996, 175: 66- 83.
- [28] MIKAWA T, GOURDIE R G. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ[J]. *Dev Biol*, 1996, 173: 221- 232.
- [29] MIKAWA T, FISCHMAN D A. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: Discontinuous formation of coronary vessels[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 9504- 9508.
- [30] CHAN-THOMOUS P S, THOMPSON R P, *et al.* Expression of homeobox genes *Msx-1* (*Hox-7*) and *Msx-2* (*Hox-8*) during cardiac development in the chick[J]. *Dev Dyn*, 1993, 197: 203- 216.
- [31] GOURDIE R G, MIMA T, THOMPSON R P, *et al.* Terminal diversification of the myocyte lineage generates Purkinje fibers of the cardiac conduction system[J]. *Development*, 1995, 121: 1423- 1431.
- [32] GOURDIE R G, WEI Y, KIM D, *et al.* Endothelin-induced conversion of heart muscle cells into impulse conducting Purkinje fibers[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 6815- 6818.