

心脏的左右不对称发育*

李大力, 王跃群, 吴秀山

(湖南师范大学 生命科学学院, 中国湖南 长沙 410081)

摘要:心脏是脊椎动物发育过程中最早形成的器官之一, 心血管向右环化打破了左右对称的格局, 是左右分化的第一个重要标志. 不对称的心管环化和心脏腔室的形态发生是一个相当复杂的过程, 人们对其分子机制, 特别是心脏定位和不对称发育机理的了解还相当有限. 为了探讨心脏的左右不对称发育, 重点从形态学和分子水平对近期的研究作了简要的概述.

关键词:环化; 左右不对称; 基因

中图分类号: Q344.14 文献标识码: A 文章编号: 1007-7847(2001)S0-0059-04

Left-right Asymmetry During Heart Development

LI Da-li, WANG Yue-qun, WU Xi-shan

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

Abstract: Though the outside of vertebrate looks like symmetric, at last their inner organs are obviously asymmetric. Patterning of all tissues and organs in the vertebrate embryo occurs along the dorsoventral(DV), anteroposterior(AP) and left-right(LR) body axes. Comparing the formation of DV and AP axes, little is known about the patterning events that established the vertebrate LR axis. Heart is the first functional embryonic organ. Rightward looping is an asymmetric event and is a remarkable landmark of L-R patterning. The asymmetric looping and chamber formation are complex processes which were started to study at molecular level in recent years and some novel genes were detected.

Key words: looping; left-right asymmetry; genes

(Life Science Research, 2001, 5(Suppl): 59~62)

对称是动物形态发育过程中的一个基本特征, 但对称是相对的. 脊椎动物虽然表面看似两侧对称, 但内部器官最终都表现出左右不对称. 所有脊椎动物胚胎的组织、器官都是以前后、背腹及左右三条体轴为依托而发生. 相对于前后、背腹轴而言, 人们对左右轴形成机制的了解还很有限^[1]. 脊椎动物所有的内脏器官发育到最后都是左右不对称的, 或是在体腔中的位置, 或是左右两边的形态差异. 在一定范围内内脏排列不对称是恒定的, 进

化上是保守的. 其发育机制一般分为3类. 第一类: 内脏器官本身由不对称的器官原基发生, 如肺; 第二类: 两个对称的器官原基其中任意一个退化, 如不对称静脉的发生; 第三类: 非成对器官起源于外观上对称的器官原基, 通过发育形成位置上和解剖上的不对称. 例如脊椎动物的心脏, 起源于双侧中胚层的心脏前体细胞. 心脏前体细胞在两侧形成线性心管, 然后迁移到腹侧融合, 并向右环化, 定位到胚胎左侧, 逐渐形成多腔室的心脏.

* 收稿日期: 2001-09-28

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

作者简介: 李大力(1978-), 男, 湖南长沙人, 硕士研究生, 从事分子发育遗传学研究; 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.

心脏的不对称,就其本质而言应包括其定位的不对称(即定位在左侧还是右侧)和自身的不对称(左右心室心房的不对称)。

1 心脏定位的左右不对称

通过对鸡和非洲爪蟾的连体双胞胎分析证实,两侧对称的轴(即背中线)特化之前胚胎是没有左右区别的。由此可以推测胚胎中某些细胞通过前后、背腹轴信息衍生出左右轴^[2,3]。如果我们能够找到前后、背腹轴最早在哪里出现就能发现上述推测在什么时间和部位发生。在非洲爪蟾第一细胞周期中,短暂的微管排列能够指导胞质循环,而且是必需的。如果阻断微管排列,胞质循环就会消失^[4]。由于微管是根据前后、背腹的向量关系组装的,有人认为^[5]一种蛋白(F因子)可能与微管结合而确定左右轴。Spemann(♂)组织者位于非洲爪蟾胚胎前后、背腹轴交叉点上的一群细胞,与鸟类的(Hensen(♂) node)是类似结构。在理论上来说组织者能够用“F”因子来计算左右极性。羊膜动物中,背腹轴的确定是根据胚盘的外胚层—脏壁中胚层的极性确定。当胚盘的径向对称被打破,原条就在这一时间形成。这样拥有两条轴向信息的原条、组织者和亨氏节在理论上来说就应具有建立左右不对称的能力。Kumud和Majumder等人就此提出了轴转换模型理论^[6]:前后、背腹轴已确定的情况下,通过细胞外基质、传感器跨膜蛋白、极化细胞骨架蛋白组织中心等部件的交互作用在细胞内形成左右极性分化。虽然亨氏节对左右不对称的确立是至关重要的,但有研究表明在左右分化过程中它实际上是一个中转站而不是最初来源。*Shh*第5期时就在亨氏节的左侧表达,具有典型的左右不对称性。如果在第4期将亨氏节部分摘除或原位旋转180°, *Shh*仍在相对于胚胎正常位置表达,这些结果表明亨氏节是从周围的组织接受左右信息。此外,早在鸡胚的第3~4期就能探测到原条附近有不对称的基因表达^[3,7,8]。由此看来,左右轴的确定应早于亨氏节的形成。

左右轴具体怎样形成的,我们可以通过一系列相关基因来了解。有许多人认为 *nodal* 是左右轴形成的关键基因。因为它在哪边表达哪边就是机体的左侧,不表达的一侧就是右侧,如果在两边都表达,则左右分化是随机的。但 *nodal* 表达时期太早而不能真正指导各个器官的正确排列。这使得人们去寻找一个能真正指导内脏器官定位的关

键基因。1998年,世界上4个实验室同时找到 *pitx2*。 *Pitx2* 只在胚胎左侧表达,并完全由 *nodal* 控制。非洲爪蟾的一个 *nodal* 相关基因 *Xnr-1* 仅在胚胎左侧表达,很可能在受精后就决定了。 *TGF-β* 家族成员之一的 *Vg1* 在整个植物极都有表达,以 *Vg1* 前体蛋白形式存在,但只在胚胎的左边转化成激活形式。如果在囊胚期胚胎左侧注入激活型 *Vg1* 蛋白对胚胎没有什么影响。如果在右侧注入就会使 *Xnr-1* 在侧板中胚层随机表达,使心脏和肠的定位随机^[9]。如果使 *Vg1* 在16细胞期胚胎右侧的特定细胞中表达,会使肠和心脏逆位 (*situs inversus*),而且使 *Xnr-1* 在侧板中胚层右侧表达,没有其他 *TGF-β* 家族成员能如此^[10]。 *Xnr-1* 是通过什么途径指导心脏和肠的形成还没完全弄清楚,但被 *Xnr-1* 激活的关键基因是 *Pitx2*, 它主要在胚胎左侧表达。如果将 *Pitx2* 蛋白注射到胚胎右侧,会使心脏定位和肠的螺旋随机。 *Pitx2* 不仅在早期胚胎左侧表达,还伴随着心脏和肠有较长时期的表达,控制它们各自定位,因此有人称它是“心脏的心脏”。在小鼠中, *lftly-1* 是左右分化的重要基因,位于 *nodal* 和 *Pitx2* 上游,其表达产物使 *lftly-2* 和 *nodal* 仅在小鼠胚胎左侧表达^[11]。小鼠 *lftly-1* 基因缄默突变体中 *lftly-2* 和 *nodal* 在两侧都有表达,而且 *Pitx2* 随后也会在两侧表达^[12,13]。类似的情况在鸡胚中出现, *nodal* 调节 *Pitx2* 的表达。将含有 *nodal* 和 *Pitx2* 的小珠异位放置,将会使心脏的转体、肠的定位及心脏环化颠倒^[12]。 *Pitx2* 的表达还需 *Nlx-2* 的维持^[14]。 *Shh* 是 *hedgehog* 家族成员之一,最初在鸡胚双侧对称表达。由于 *activinβB* 和 *Activin* 受体 *Ila* 在右侧不对称的表达,使 *Shh* 在右侧表达受到抑制。运用阻断单克隆抗体技术发现 *Shh* 是将一侧性信息转换为器官原基发生的关键中介。如果将浸泡了抗体的小珠在第5期嵌入亨氏节左侧,胚胎侧板中胚层没有 *nodal* 和 *pitx2* 的表达,说明 *Shh* 在 *nodal* 上游。 *Patched (PTC)* 基因编码一种膜蛋白,这种蛋白在 *Shh* 信号通路中起作用。但是在 *PTC* 与 *nodal* 之间应该有一个转换因子,至今没有确定,称之为“X”因子。Chang等人在小鼠中发现了 *Smad5* 基因^[15],它是 *TGF* 家族信号级联的下游成分。 *Smad5* 突变体心脏环化和胚胎转体会出现缺陷,而且 *lftly-1* 的表达非常弱,甚至检测不到,而 *nodal*、*lftly-2* 和 *Pitx2* 在两侧表达,表明 *Smad5* 应在它们的上游。在鸡胚的心脏原基和

右边的侧板中胚层中发现一个转录因子基因—*cSnR*^[16]。*Pitx2* 和 *nodal* 在左侧侧板中胚层表达时, *cSnR* 产生作用。阻断 *cSnR* 活性会使心脏环化和胚胎转体随机。而且似乎 *cSnR* 和 *nodal* 不会同侧表达。通过 *nodal* 能够抑制 *cSnR*, 说明 *cSnR* 在 *nodal* 下游, 受其抑制。在左右轴形成的相关基因中, *Pitx2* 对心脏的形成和定位起至关重要的作用^[17]。

2 心脏自身的不对称

心脏环化是脊椎动物心脏发育过程中关键的形态发育事件。线性心管通过一系列复杂的过程向右环化, 为即将形成的多腔室的器官提供条件。心脏的环化由左右轴信息控制, 同时启动不对称器官形态发育。向右环化为心脏的形态奠定了基础, 至少在高等脊椎动物中是这样^[18]。细胞外基质改变细胞的形状, 甚至可以改变细胞增殖^[19, 20], 环化需要在细胞外基质的帮助下完成。在鸡胚的成心区左侧观察到较高的 *flectin* 水平, 这是早期细胞外基质左右不对称的实验证明^[20]。在心脏前体细胞迁移过程中改变细胞外基质或是细胞结合基质的能力会最终影响环化的方向^[19, 21]。左右成心区转位实验表明心脏原基在融合之前其环化方向在某种程度上来说就已确定了^[22]。但是定向信息是否释放到细胞外基质中, 如果是的话又是怎样释放的, 这个问题有待进一步研究。

心脏发育基因已鉴定了不少, 前面的综述已详细阐明, 以下我们就主要回顾一下心脏自身不对称发育相关基因。

Hand 基因 *ehand* (又称 *Hand1*) 和 *dHand* (又称 *Hand2*) 是基本的螺旋-环-螺旋(*HLH*) 大家族转录因子, 都在心脏及其它组织中表达, 是环化早期重要的基因。在小鼠胚胎中, *Hand2* 在侧中胚层中表达(中胚层包含所有心脏和内脏器官原基^[23])。心管形成后, *Hand2* 在心肌层和心内层表达, 同时还在预定心脏中胚层表达。其在心肌层、前心区和环化后的心脏中逐渐呈梯度表达, 在右心室和流出管的转录水平最高^[23, 24]。在环化前期特异扰乱 *Hand2* 会使心脏产生严重畸变, 虽然环化能够进行, 但右心室不能形成, 主动脉弓也受其严重影响, 导致动脉弓膨大^[24]。这些结果都表明 *Hand2* 对右心室、流出管和动脉弓特化、存在以及增殖都是必需的。还有人认为 *Hand2* 的梯度表达

帮助原始心管分化。小鼠中 *Hand1* 至少早在心管时期就在心脏中表达^[23, 25], 并发现 *Hand1* 的转录高度限制在沿心管前后、背腹轴区域。在环化早期, *Hand1* 仅在心脏尾部腹侧及动脉球表达。环化完成后, 它又在左心室的外弯表达, 随后又在右心室外弯表达。而心管腹表面将会形成外弯, 因此 *Hand1* 的表达与心室节段的工作心肌的特化和扩张密切相关。虽然在敲除了 *Nkx2.5* 的胚胎中不能正常启动环化, *Hand1* 也不能正常表达, 但 *Bibcn* 和 *Harvey*^[23] 认为与 *Nkx2.5* 相联系的左右信息确定了 *Hand1* 在左侧的转录而对环化产生决定性作用。*Hand1* 还控制 *Hand2* 的表达, 在没有 *Hand1* 的情况下不会出现心管向右环化及心室的形成^[26, 27]。

Mf2c 编码一个含 *MADS* 框的转录因子, 是小鼠 4 个 *Mf2* 相关基因中的一员。发育过程中 *Mf2* 因子在整个心脏的所有类型肌肉中表达, 甚至在血管内皮细胞和脑组织中都有表达。许多肌肉发育基因包含 *Mf2* 因子的结合位点。骨骼肌中, *Mf2* 是 *HLH* 肌肉发生决定因子的协作因子^[28]。据推测它们可能与心脏的 *HLH* 因子(*HAND*) 产生协同作用。*Mf2c* 在心脏发育早期开始表达。敲除了 *Mf2c* 的纯合体胚胎在心脏环化是其产生严重畸变。与 *Hand2* 基因类似, 右心室不能形成^[29]。在 *Mf2* 突变体中, *Hand2* 起初正常表达, 但接着被下调, 通过 *Hand1* 扩大表达判断, 剩下的心室组织出现了“左”边的特征, 说明 *Hand2* 位于 *Mf2c* 的下游。*Mf2c* 还激活其下游的一个心脏特异性的解旋酶基因—*CHAMP*^[30]。

ANF 基因编码心房促尿钠排泄因子。它的表达在早期的线性心管中没有发现。在胚龄 8.25 d 小鼠胚胎中开始表达, 特别是从线性心管到环化早期这段时间在心脏腹侧表达。鸡的预定命运图显示线性心管的腹侧将会形成环化后的外弯(outer curvature)。从胚龄 9~9.5 d 起, *ANF* 在左心室外弯强烈表达而在右心室外弯表达要弱得多。与此同时, 心耳原基中也有表达, 内弯中没有表达。这个发育时期的心管其心房肌也定位于外弯。在胚龄 9~11 d 之间 *ANF* 正调节区扩张, 后面的心房区域到了心室区前, *ANF* 在右心室的表达接着减少, 并在心耳和左心室小梁中被限制。由此看来, *ANF* 仅在早期心管、心房和心室外弯表达, 而在其他组织表达, 可能与左右心房、心室的分化有关。

心脏发育相关基因的分离和鉴定已成为研究遗传性心血管疾病的重要途径, 为先心病的基因治疗提供病理依据。

参考文献(References):

- [1] RAMSDELL A F, YOST H J. Molecular mechanisms of vertebrate left- right development [J]. Trends in Genetics. 1998, 14(11): 459 - 465.
- [2] NASCONE N, MERCOLA M. Organizer induction determines left - right asymmetry in *Xenopus* [J]. Dev Biol, 1997, 189: 68- 78.
- [3] LEVIN M, PAGAN S, ROBERTS D J, *et al.* Left- right patterning signals and the independent regulation of different aspects of situs in the chick embryo [J]. Dev Biol, 1997, 189: 57- 67.
- [4] YOST H J. The genetics of midline and cardiac laterality defects [J]. Curr Opin Cardiol, 1998, 3(3): 185- 189.
- [5] BROWN NA, WOLPERT L. The development of handedness in left- right asymmetry [J]. Development, 1990, 109: 1- 9.
- [6] RICHARD P. H, NADIA R. Heart Development [M]. San Diego: Academic Press, 1998. 398- 400.
- [7] 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.
- [8] LEVIN M. The roles of activin and follistatin in signaling in chick gastrulation [J]. Int J Dev Biol, 1998, 42: 553- 559.
- [9] HYATT B A, LOHR J L, YOST H J. Initiation of vertebrate left- right axis formation by maternal *Vg1* [J]. Nature, 1996, 384 (6604): 62- 65.
- [10] HYATT B A, YOST H J. The left- right coordinator: the role of *Vg1* in organizing left- right axis formation [J]. Cell, 1998, 93 (1): 37- 46.
- [11] HAMADA H, MENO C, SAJIHO Y, *et al.* Role of asymmetric signals in left- right patterning in the mouse [J]. Am J Med Genet, 2001, 101(4): 324- 327.
- [12] YOSHIOKA H, MENO C, KOSHIBA K, *et al.* *Pitx2*, a bicoid - type homeobox gene, is involved in a lefty- signaling pathway in determination of left- right asymmetry [J]. Cell, 1998, 94(3): 299- 305.
- [13] MENO C, SHIMONO A, SAJIHO Y, *et al.* *Lefty- 1* is required for left- right determination as a regulator of *lefty- 2* and *nodal* [J]. Cell, 1998, 94(3): 287- 297.
- [14] SHIRATORI H, SAKUMA R, WATANABE M, *et al.* Two - step regulation of left- right asymmetric expression of *Pitx2*: initiation by nodal signaling and maintenance by *Nkx2* [J]. Mol Cell, 2001, 7(1): 137- 149.
- [15] CHANG H, ZWIJSEN A, VOGEL H, *et al.* *Smad5* is essential for left- right asymmetry in mice [J]. Dev Biol, 2000, 219(1): 71 - 78.
- [16] ISAAC A, SARGENT M G, COOKE J. Control of vertebrate left - right asymmetry by a snail- related zinc finger gene [J]. Science, 1997, 28, 275(5304): 1301- 1304.
- [17] CAMPIONE M, ROS M A, ICARDO J M, *et al.* *Pitx2* expression defines a left cardiac lineage of cells: evidence for atrial and ventricular molecular isomerism in the *iv/iv* mice [J]. Dev Biol, 2001, 231(1): 252- 264.
- [18] HARVEY R P. Cardiac looping—an uneasy deal with laterality [J]. Semin Cell Dev Biol, 1998, 9(1): 101- 108.
- [19] LINASK K K, LASH J W. A role for fibronectin in the migration of avian precardiac cells. I. Dose dependent effects of fibronectin antibody [J]. Dev Biol, 1988, 129: 315- 323.
- [20] TSUDA T, PHILIP N, ZILE M H, LINASK K K. Left-right asymmetric localization of fibronectin in the extracellular matrix during heart looping [J]. Dev Biol, 1996, 173: 39- 50.
- [21] YOST H J. Regulation of vertebrate left- right asymmetries by extracellular matrix [J]. Nature, 1992, 357: 158- 161.
- [22] HOYLE C, BROWN NA, WOLPERT L. Development of left- right handedness in the chick heart [J]. Development, 1992, 115: 1071- 1078.
- [23] BIBEN C, HARVEY R P. Homeodomain factor *Nkx2- 5* controls left [right] asymmetric expression of bHLH *dHand* during murine heart development [J]. Genes, 1997, 11: 1357- 1369.
- [24] SRIVASTAVA D, THOMAS T, LIN Q, *et al.* Regulation of cardiac esodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, *dHAND*. [J] Nature Genet, 1997, 16: 154- 160.
- [25] THOMAS T, YAMAGISHI H, OVERBEEK P A, *et al.* The bHLH factors, *dHAND* and *eHAND*, specify pulmonary and systemic cardiac ventricles independent of left-right sidedness [J]. Dev Biol, 1998, 196: 228- 236.
- [26] FIRULLI A B, MCFADDEN D C, LIN Q, *et al.* Heart and extra - embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor *Hand1* [J]. Nature Genet, 1998, 18: 266 - 270.
- [27] RILEY P, ANSON - CARTWRIGHT L, CROSS J C. The *Hand1* bHLH transcription factor is essential for placental and cardiac morphogenesis. [J]. Nature Genet, 1998, 18: 271- 275.
- [28] MOLKENTIN J D, BL B, JF M, *et al.* Cooperative activation of muscle gene expression by *Mef2* and myogenic bHLH proteins [J]. Cell, 1995, 83: 1125- 1136.
- [29] LIN Q, SCHWARZ J, BUCANA C, *et al.* Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor *MEF2C* [J]. Science, 1997, 276: 1404- 1407.
- [30] LIU ZP, NAKAGAWA O, NAKAGAWA M, *et al.* *CHAMP*, a novel cardiac- specific helicase regulated by *MEF2C* [J]. Dev Biol, 2001, 15, 234(2): 497- 509.