

脊椎动物发育的多功能调节因子—BMPs

管孝鞠 王治乔 王爱平 廖明阳

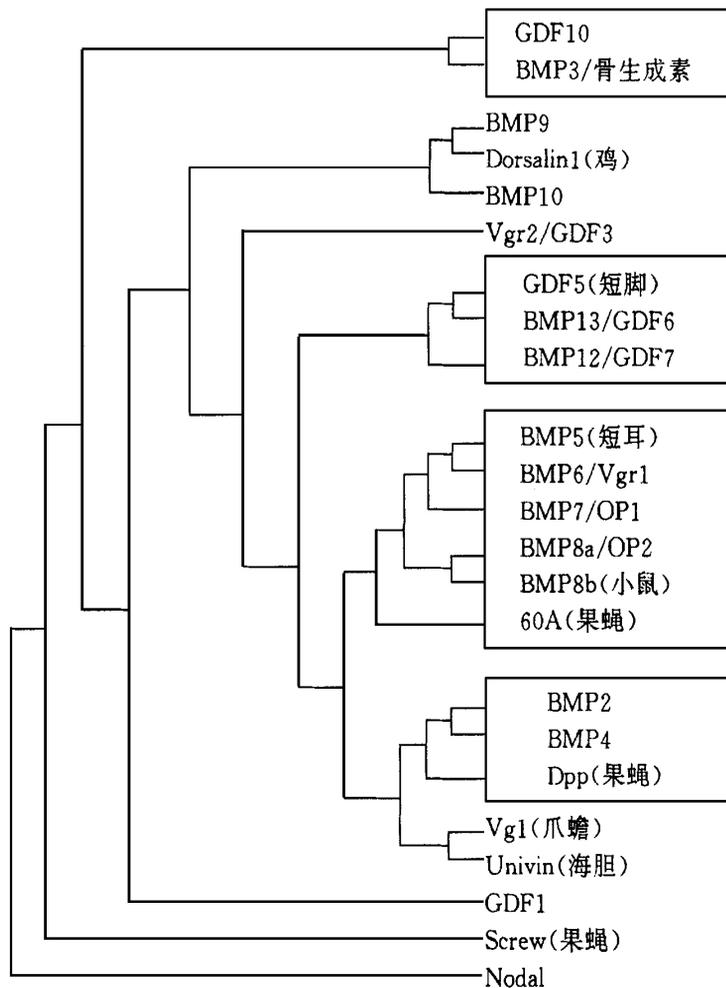
军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850

胚胎发育和组织再生的一个热门话题是为数不多的几个信号分子保守家族介导的细胞间通讯,其中,骨形态形成性蛋白质 (bone morphogenetic proteins), 是这些多功能家族中规模最大的成员之一,迄今为止,包括从海胆到哺乳动物的机体内已发现 20 余种。BMP 最初是对从去矿质的牛骨制品中纯化所得的三种蛋白质的命名(即 BMP1、BMP2 和 BMP3), 这些蛋白植入实验动物体内可引起异位软骨和软骨内骨的形成。研究认为, BMP1 是属于虾红素家族的一种蛋白酶, 而 BMP2 和 BMP3 与人转化生长因子

(TGF) 有关。BMP 的命名其实不够恰当, 因为大量遗传学和实验研究表明 BMPs 参与多种生物学过程的调节, 包括细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化、细胞转归的决定 (cell fate determination) 和形态形成等, 脊椎动物的 BMPs 几乎与所有细胞器官 (如神经系统、体节、肺、肾、皮肤、性腺等) 的发育和胚胎形成有关。

1 概述

BMPs 家族成员及相互关系示意图如下:



和 TGF 超家族的其他成员一样, BMP 也先合成前体, 然后经加工和蛋白裂解作用产生 C 末端成熟的蛋白二聚体; 不同之处在于, 其他成员成熟区通常有 9 个保守的半胱氨酸序列, 而 BMP 只有 7 个。

目前对 BMP 蛋白的细胞外组装、加工和分泌了解得不多, 虽然已得到一些多克隆和单克隆抗体⁽¹⁾, 但尚未获得特异、高亲和力和抗体。已有研究表明, 前体二聚体化和蛋白裂解先于分泌, 分泌蛋白的氨基末端序列与蛋白裂解后在第一个半胱氨酸前形成的二元 RXXR 位点出现的羧基末端一致。脊椎动物蛋白中与 Tolloid 关系最密切的是 BMP1, 它编码一种蛋白酶, 对前胶原 C 末端具有裂解作用, 从而使胶原组装为纤维; BMP1 还可裂解其它细胞外蛋白, 可能与 BMPs 结合, 发生多价整合。但是, 对 BMP 前区是否具有特异细胞外功能尚不清楚, 此区可能影响二聚体形成和加工的速率和效率。此外, BMP2 前区与分泌功能有关的 Vg1 的成熟区融合后可提高成熟配体的产量⁽²⁾。

已在体外得到 BMPs 的杂二聚体, 并发现 BMP2, BMP7, BMP4 - BMP7 杂二聚体比同型二聚体活性更强⁽³⁾。对苯丙酸诺龙和抑制素 (inhibin) 的拮抗作用提示, 杂二聚体可能是同型二聚体在受体结合水平上的竞争性拮抗剂。

BMPs 是否为脊椎动物胚胎形成的形态原? 形态原的定义为: 一种呈梯度分布的分子以浓度依赖方式改变靶细胞发育的命运。果蝇试验中大量证据表明, Dpp 是胚层阶段胚胎背 - 腹范型 (dorsal - ventral patterning) 形成的形态原⁽⁴⁾。爪蟾外胚层细胞对不同浓度苯丙酸诺龙的反应不同, 表明苯丙酸诺龙是中胚层形成的形态原。但是苯丙酸诺龙或 TGF 家族成员在体内的作用是否如此尚不肯定。

2 BMPs 与胚胎发育

2.1 BMPs 与胚层形成

小鼠的遗传学研究表明, BMP 家族至少有两个成员是原肠胚形成所必需的, 它们是 Nodal 和 BMP4。Nodal 是结节和中轴中胚层形成所必需⁽⁵⁾。基因最初在胚胎外胚层低水平表达, 渐渐集中在原条内; 结节形成后, 基因表达呈 U 形分布在结节附近腹侧细胞内, 不对称分布于侧板中胚层。脊椎动物的 Nodal 参与前 - 后轴、中轴中胚层的产生, 此外, 其相关基因在脊椎动物胚胎内的不对称表达可能与左 - 右轴的建立有关⁽⁶⁾。

BMP4 是作用最强的腹侧因子 (ventralizing factor), Bmp4 转录本几乎在早期原肠胚的各个部位都有分布 (除背唇外)⁽⁷⁾。加入外源蛋白或 RNA, BMP4 活性上调; 注射反义 Bmp4 RNA, BMP4 活性下调, Bmp4 在原肠胚形成前胚胎卵柱阶段低水平表达, 随后在原条后部、羊膜、胚外中胚层、前、后肠中胚层、心脏等部位高水平表达。Bmp4 同种突变体显型存活到原肠胚形成之后, 说明 BMP4 是胚外中胚层 (包括卵黄囊血岛) 和后端中胚层 (包括后肠附近) 增殖和/或分化所必需。

Bmp2 功能缺失突变 (loss - of - function mutations) 模型已建立, 9.5 天左右同种突变体羊膜、心脏发育缺陷, Bmp2 基因在这两种组织内表达水平较高。最新研究还表明, BMP 家族的新成员反背侧形态形成蛋白 (Anti - dorsalizing morphogenetic protein, Admp), 具有腹侧活性, 可能在背唇也有表达⁽⁸⁾; Admp 可能通过局部作用, 限制背侧因子 (dorsalizing factors) 的作用, 但是其作用机制以及是否与 BMPs 其它成员形成杂二聚体, 目前还不太清楚。

2.2 BMPs 与体节形成

神经管两侧成对体节可产生一系列分化的衍生物, 腹侧区逐渐形成生骨节, 是脊椎的前形; 而背侧区产生生皮肤节, 可进一步形成真皮和肌肉; 中侧体节的形成中, 内侧肌节形成中轴肌, 外侧肌节产生体壁和四肢的肌肉。最新研究表明, 胚胎神经管和体节之间植入有 Bmp4 表达的细胞可模拟外侧信号的作用⁽⁹⁾, BMP4 在背侧外胚层和神经管内表达却具有体节外侧因子的功能可解释为背 - 腹侧和中侧形成的时间不同。

2.3 BMPs 与肢体形成

肢芽形成是四个信号组织交互作用完成的: (1) 控制背 - 腹侧形成的背侧和腹侧外胚层; (2) 尖端外胚层嵴 (AER), 背侧外胚层的特殊区域, 可维持肢芽背侧的突出生长和 FGF4、FGF8 的高表达; (3) the progress zone, 邻近 AER 的间质区, 该区域内细胞不断增殖, 保持非分化状态, 表达高水平的 Msx1 和 Wnt5a; (4) 后端间质的极化活性区 (the zone of polarizing activity in the posteriormesenchyme), 可产生 Shh, 调节肢芽前 - 后端极性。

Bmp2, Bmp4 和 Bmp7 在小鼠肢芽 AER 内均有表达, 肢芽间质内这三个基因表达方式明显不同, Bmp4RNA 在前端、后端间质内及 AER 下面的 the progress zone 高水平表达, 随后在发育的关节和腹侧

足垫表达;Bmp2 首先在后端间质内表达,在指(趾)原基附近可见高水平转录本,之后,在关节和足垫处;Bmp7RNA 开始分布于整个肢芽的间质内,然后在指(趾)原基附近和指(趾)间高水平表达,也往往是程序性细胞死亡(凋亡)发生率较高的区域⁽¹⁾。

关于早期鸡翅和后肢形成有类似的报道。鸡翅芽试验胚胎学研究表明异位 ZPA 移植或前端间质内的 Shh,可诱导邻近细胞内 Bmp 的表达,此反应需要 AER 产生的 FGF 的参与。BMP2 可作为第二信使分子,在诱导间质细胞内 Hoxd11 - Hoxd13 表达中发挥作用⁽¹¹⁾。最近研究表明,Bmp2 在前端间质内的异位表达可诱导 AER 内的 fgf4 转录本和间质内 Hox13 转录本的产生。

2.4 BMPs 与骨骼发育

一些编码 BMP 的基因首次发现是由于其诱导异位软骨内骨的活性,不同部位骨的正常发育需要 BMP 家族不同成员的参与,但是,对其在正常或异位骨发育中作用的细胞成分机制却知之甚少,提出了不少机制假说,其中之一是:BMPs 作用于多功能干细胞,促进其进入软骨形成或骨发生途径而不是生肌或生脂通路⁽¹²⁾;此外,BMPs 可促进细胞转为软骨素原和成骨细胞谱系,促进程序性细胞死亡的发生或转化为其它细胞谱系。

成软骨细胞和成骨细胞系或原代培养的研究表明,BMPs 可刺激分化表型标志物的表达,如碱性磷酸酶、骨钙的合成、甲状旁腺素的 cAMP 反应、胶原合成、软骨小结的形成等。

2.5 BMPs 与神经系统的形成

BMPs 参与中枢和外周神经系统形成的多个环节,包括原始神经诱导、神经管背 - 腹侧的形成、脑的区域化、眼的发育、细胞凋亡以及外周神经系统的谱系决定。

有研究表明,鸡胚神经管背 - 腹侧形成过程中,Bmp4 和 Bmp7 在神经板边缘非神经外胚层内表达;神经板逐渐闭合为神经管时,表皮内这两种基因(除了前脑内的 Bmp7 外)均下降,Bmp4 在背侧神经褶和神经管闭合时的中线内高水平表达⁽¹³⁾,随后 Bmp2 而不是 Bmp4 首先在神经褶内表达。神经管闭合后,Bmp4 在背侧中线前表达,Bmp6 沿整个神经轴表达。

BMPs 在体内可能抑制神经管底板腹侧信号的延伸。许多试验表明,脊索和底板产生的 Shh 是一长距离腹侧信号,可能通过 ptc 依赖的途径;鸡胚脊髓移植培养的体外试验结果提示,BMP4 和 shh/脊

索对神经管形成具有协同拮抗作用。

除了对神经管背 - 腹侧形成的影响外,编码 BMP 的基因可能还参与神经的发育,一些编码 BMP 的基因在小鼠胚胎前脑和中脑的局部区域内表达,包括 Bmp4、Bmp5、Bmp6 和 Bmp7。但是,表达的区域还没有准确定位,除了 Bmp7(Bmp7 缺失的胚胎眼发育有严重缺陷⁽¹⁴⁾)外,其余在神经发生中的作用尚未明确。

2.6 BMPs 与器官形成

研究表明,BMPs 为许多器官(包括肾、肺、心、牙齿、肠和皮肤)发育所必需,尤其介导间(充)质细胞和上皮细胞之间的相互诱导作用,还可控制细胞增殖与凋亡,在某些存在分枝或复杂形态形成的器官内 BMPs 可表达为较小的细胞群,作为器官形成的中心。

2.6.1 BMPs 与牙的发育

研究表明,BMPs 参与牙发育的不同阶段,包括细胞增殖、细胞凋亡、上皮 - 间质相互作用和分化过程。牙形成过程中,表达 shh、Bmp2、Bmp4、Bmp7 和 FGF4 的细胞集中分布在外胚层上皮的中心区域(又称为釉质结),增殖速率明显低于周围的上皮细胞。釉质结是牙机化的中心,局部控制细胞增殖,在牙从帽状向钟形形态转变过程发挥重要作用。BMPs 在釉质结中的具体作用及与其它信号分子的关系尚未明了,BMP2 可能抑制上皮增殖;而 BMP4 可调节细胞凋亡的发生,阻断釉质结的信号作用,在早期上皮 - 间质相互作用启动牙发育中起作用。幼牙体外给予 BMP2 或 BMP4 可模拟来自受侵基板上皮 BMP4 信号,可诱导密集间质下 Bmp4 和同型基因盒(homeobox genes) Msx1、Msx2 的表达。在钟形期,Shh、Bmp2 和 Bmp4⁽¹⁵⁾ 在成牙质细胞和成釉细胞层内表达,提示它们可能参与这些特化细胞的增殖和/或分化。

2.6.2 BMPs 与肠的发育

早期鸡和小鼠胚胎内,Shh 在前肠和后肠内胚层,Bmp4 在外胚层周围高水平表达⁽¹⁶⁾,之后的发育中,shh 和 Ihh、Bmp4 局部表达。鸡胚试验表明,Shh 在后肠前部内胚层异位表达,可诱导周围内脏中胚层(splanchnic mesoderm)产生 Bmp4 转录本;异位 Shh 也可诱导邻近中胚层 Hoxd3 的表达。

2.6.3 BMPs 与肾的发育

许多 BMPs 在胚胎的肾和泌尿系统内表达(Bmp3、Bmp4、Bmp5、Bmp6、Bmp7 和 gdnf)⁽¹⁷⁾,遗传

学试验表明 Bmp5 在输尿管发育, Bmp7 在肾发育中起作用。后肾的发育是输尿管芽长入后肾间质形成的两个组织间相互作用导致输尿管芽的分枝和远侧间质细胞密集形成上皮结构。Bmp7 首先在后肾管内表达, 之后在输尿管浓缩聚集, 在上皮小管、肾小球足突细胞内表达。Bmp7 缺失突变小鼠出生后不久由于肾衰而死亡, 表明 BMP7 是它们继续增殖、分化和生存所必需, 但此死亡的确切机制并不清楚。

2.6.4 BMPs 与肺的发育

肺由前肠内胚层的芽发育而来。在胚胎肺内可检测到 Bmp4、Bmp5、Bmp7 转录本。有趣的是, Bmp4RNA 局限在远侧芽和邻近间质的尖端⁽¹⁸⁾。在转基因胚胎肺芽远侧上皮的 Bmp4 若全部异位表达, 则分支形成严重破坏, 导致胀大的囊泡形成, 内胚层增殖受抑, 而间质生长加快, 结果表明, 肺炎尖端局部 Bmp4 的表达可抑制内胚层增殖, 使外侧分枝突出生长, 这与 BMPs 在牙芽釉质结中的作用相似。

2.6.5 BMPs 与其它器官、组织的发育

BMPs 在许多器官和组织中表达, 除上面提到的以外, 还有皮肤、毛发和生殖细胞。Bmp4 在转基因小鼠的毛的外层根鞘 (outer root sheath) 过度表达可导致毛鞘 (hair sheath) 增殖抑制和脱发⁽¹⁹⁾, 阻断化学致癌剂所致乳头状瘤的产生。BMP 和 Shh 在毛发内表达的关系还不清楚, 生长分化因子 9 (Growth and Differentiation Factor 9, Gdf9) 在卵巢的卵母细胞内特异性表达, Bmp8a、Bmp8b 在睾丸的精细胞内表达, 其中 Bmp8b 基因失活可导致精子产生缺陷和雄性不育。

3 结语与展望

BMP 超家族成员是许多器官和组织发育所必需, 其异常变化可能导致胚胎的畸形, 所以弄清它们的功能有重要意义。在不久的将来, 编码有关配体、受体和用可能的结合蛋白的基因的功能缺失突变模型可望在小鼠内建立, 从它们各自的表现型将能够得到更多的信息, 特别是通过诱导产生化学突变体或采用现有的剔除 (knock-in) 技术取代某一基因⁽²⁰⁾, 可揭示不同因子之间的相互作用及用某一 BMP 取代另一 BMP 的作用。此外, 亦可利用其配体和显性负受体 (dominant-negative receptors) 在转基因小鼠一定组织内的表达进行研究。有关 BMPs 还有许多问题, 如 TGF、Wnt、FGF 等细胞因子和 Hh 超家族成员之间的相互作用及其是对各个细胞的生存与死亡

的影响, 特别是这些信号分子在胚胎发生与发育中各自的作用, 值得进一步研究。

参考文献

- 1 Masuhara K, Nakase T, Susuki S, et al. Use of monoclonal antibody to detect bone morphogenetic protein-4 (Bmp-4). *Bone*, 1995;16:91
- 2 Thomsen GH and Melton DA. Processed Vg1 protein is an asial mesoderm inducer in *Xenopus*. *Cell*, 1995;74:433
- 3 Hazama M, Ao no A, Ueno N, et al. Efficient expression of a heterodimer of bone morphogenetic protein subunits using a baculovirus expression system. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995;209:859
- 4 Ferguson EL and Anderson KV. *decapentaplegic* acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell*, 1992;71:451
- 5 Conlon FL, Lyons KM, Takaesu N, et al. A primary requirement for *nodal* in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development*, 1994;120:1919
- 6 Levin M, Johnson RL, Stern CD, et al. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell*, 1992;71:451
- 7 Schmidt JE, Suzuki A, Ueno N, et al. Localized Bmp-4 mediates dorsal/ventral patterning in early *Xenopus* embryo. *Dev Biol*, 1995;169:37
- 8 Moss Jr M, Wang S and Krinks M. Anti-dorsalizing morphogenetic protein is a novel Tgf⁻ homolog expressed in the Spemann organizer. *Development*, 1995;121:4293
- 9 Pourquie O, Fan CM, Coltey M, et al. Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: A role for Bmp-4. *Cell*, 1996;84:461
- 10 Mori C, Nakamura N, Kimura S, et al. Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. *Anat Rec*, 1995;242:103
- 11 Francis PH, Richardson MK, Barickell PM, et al. Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing limb bud. *Development*, 1993, (Suppl):115
- 12 Gimble JM, Morgan C, Kelly K, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem*, 1995;58?:393
- 13 Liem JKF, Tremml G, Roelink H, et al. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by Bmp-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell*, 1995;82:969
- 14 Dudley AT, Lyons KM and Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev*, 1995;9:2795
- 15 Vainio S, Karavanova I, Jowett A, et al. Identification of Bmp-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell*, 1993;75:45
- 16 Roberts DJ, Johnson RL, Burke AC, et al. Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and

蚕豆根尖微核试验的应用与发展

臧宇 综述 薛开先 审校

江苏省肿瘤防治研究所 南京 210009

蚕豆根尖微核试验在 1986 年已被中国环保局列为一种水环境生物测试的规范方法。它作为一种环境致突变性的检测手段,在我国不少地区的环保部门和医疗卫生系统中都有广泛的应用。近十多年来仅国内关于蚕豆根尖微核试验的论文就已达百余篇。本文在前人工作积累的基础上,对蚕豆根尖微核技术的理论、方法学和应用方面做一个阶段性的综述,希望有助于有关学者和工作人员全面了解本方法以及今后的改进和普及。

1 研究背景

蚕豆 (*Vicia faba*) 是一种很好的细胞遗传学研究材料。蚕豆的染色体组型为六对相当大的染色体,而且根尖含有较多的分裂相细胞,非常适合显微观察。早在 1959 年,放射生物学家已经用蚕豆的根尖细胞来进行 X 射线的遗传损伤研究。到了 70 年代,蚕豆根尖染色体畸变技术已发展得相当成熟,作为一种检测化学品遗传学毒性的方法为人们所知,并广泛采用。而蚕豆根尖的微核试验是 1982 年由 Degraasi 和 Rizzoni 正式介绍的⁽¹⁾,他们指出微核试验与染色体畸变试验同样具有准确、快速、有明显的剂量-效应关系等特点,操作更简便,也更适于大批量样品的检测。美国国家环保局也肯定了蚕豆根尖细胞学试验在环境致突变性检测中的作用,对许多环境致癌物都作了标准化的试验,建立了庞大的数据库,并建议在全世界范围内推广⁽²⁾。

蚕豆根尖细胞微核实验的测试终点是微核出现的频率。微核是常用的遗传毒理学指标之一,指示染色体或纺锤体的损伤。由于这种损伤会因细胞受到的外界诱变因子的作用而加剧,而微核产生的数量又可与诱变因子剂量的强弱呈正比,因此可以用微核出现的频率来评价环境诱变因子对生物遗传物质的程度⁽³⁾。蚕豆根尖微核试验的应用价值几乎立即引起了中国学者的注意,1983 年陈光荣等利用此方法检测了农药和诱变剂对遗传物质的损伤,1985 年发表了国内首篇用蚕豆根尖微核试验直接检测淡水湖泊水质污染的论文⁽⁴⁾。在此之后,关于蚕豆根尖微核测试方法学的探讨及各方面的应用研究迅速在我国发展起来。

2 研究进展

2.1 方法学研究

在 1986 年中国环保局制定的“环境监测技术规范”中,蚕豆根尖微核试验的材料与方法已经得到了规范化⁽⁵⁾,保证了在我国各地区推广的可行性和试验结果的可比性。

这里值得一提的是染毒剂量设计、微核识别和水样的前处理这几个关键步骤。首先,染毒剂量要根据预试验的结果来定,预试验的目的不仅在于保证染毒的最高剂量不会使根尖产生致死效应,也在于确定剂量-效应关系最敏感的受试物浓度范围。有试验证明,不同诱变机理的诱变剂在蚕豆根尖微核试验中诱

regionalization of the chick hidgut, *Development*, 1995;121:3163
17 Bitgood MJ and McMahon AP. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol*, 1995;172:126
18 Bellusci S, Henderson R, Winnier G, et al. Evidence from normal expression and targeted misexpression that bone morphogenetic protein-4(Bmp-4) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis.

Development, 1996;122:1693 - 1702
19 Blessing M, Nanney LB, King LE, et al. Transgenic mice as a model to study the role of Tgf- β -related molecules in hair follicles. *Genes Dev*, 1993;7:204
20 Hanks M, Wurst W, Anson-Cartwright L, et al. Rescue of the *Er1* mutant phenotype by replacement of *Er1* with *Er2*. *Science*, 1995;269:679 (1998 - 11 - 28 收稿;1999 - 03 - 19 修回)