

胰岛素增强子结合蛋白1在小鼠胚胎心的时空分布

蔡玉瑾 景雅* 宋励 杨艳萍 崔慧林 李爱红 郭蕊

(山西医科大学组织学与胚胎学教研室 太原 030001)

[摘要] 目的 观察转录因子胰岛素增强子结合蛋白1 (ISL1) 在小鼠胚胎心的表达与心、第二生心区及前肠内胚层的发育。方法 胚龄8~13d小鼠胚胎心共18个,连续石蜡切片,用抗心肌肌球蛋白重链(MHC)、抗ISL1、抗增殖细胞核抗原(PCNA)和抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体进行免疫组织化学染色、免疫荧光染色和Western blotting检测。结果 胚龄9d, ISL1阳性心前体细胞进入流出道远端。胚龄10d, ISL1阳性细胞延伸入流出道近端及静脉窦心肌。胚龄11~12d, 心内ISL1表达量逐渐增多并达高峰。动脉端ISL1阳性细胞分布于流出道远端壁、心包内主肺动脉壁及主肺动脉隔。静脉端ISL1阳性细胞主要限于窦房结和静脉瓣。动脉端前肠内胚层细胞索增至最长,周围前生心区ISL1阳性细胞密度也达高峰,并且明显多于后生心区。胚龄13d, 心内及第二生心区ISL1阳性细胞显著减少,内胚层细胞索趋于消失。结论 ISL1阳性细胞在小鼠胚胎心的表达主要集中在胚龄9~13d,其表达模式与第二生心区及前肠内胚层的发育密切相关。

[关键词] 胰岛素增强子结合蛋白1; 心; 胚胎; 免疫组织化学; 免疫印迹法; 小鼠

[中图分类号] Q132 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-4356.2016.06.016

Expression patterns of islet-1 in developing mouse embryonic hearts

CAI Yu-jin, JING Ya*, SONG Li, YANG Yan-ping, CUI Hui-lin, LI Ai-hong, GUO Rui

(Department of Histology and Embryology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression patterns of islet-1 (ISL1) in developing mouse embryonic hearts and the morphogenesis of the heart, the second heart field and foregut endoderm. **Methods** Serial sections of eighteen mouse embryonic hearts from embryonic day (ED) 8 to ED 13 were stained immunofluorescently or immunohistochemically with antibodies against myosin heavy chain (MHC), ISL1, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and α -smooth muscle actin (α -SMA). Expression of ISL1 was measured with Western blotting in mouse embryonic hearts from ED11 to ED14. **Results** At ED9, ISL1-expressing cardiac progenitors was detected at the distal wall of the outflow tract (OFT). At ED 10, ISL1 positive cells extended into the proximal wall of OFT from the distal and distributed in the myocardium of venous sinus. From ED11 to ED12, ISL1 expression reached the highest level in embryonic hearts. ISL1 positive cells were mainly distributed at the sinus node and the venous valves on venous pole of the heart but were detected at the distal wall of OFT, the developing intrapericardial aorta, pulmonary trunk and aortic-pulmonary septum on the arterial pole of the heart. At the same time, the length of solid corn stretching out from foregut endoderm reached the longest and was surrounded by ISL1-expressing progenitors of anterior component of the second heart field (aSHF). The density of ISL1 positive cells in aSHF was significantly higher than that of posterior component of the SHF. At ED13, ISL1-expressing progenitors were dramatically reduced both in the heart and the SHF, while the solid endoderm cord was gradually eliminated. **Conclusion** ISL1 positive progenitor cells are mainly detected from ED9 to ED13 in mouse embryonic hearts. The extent of ISL1 positive cells distribution in mouse embryonic hearts is accompanied by the morphogenesis of the SHF and foregut endoderm.

[Key words] Islet-1; Heart; Embryo; Immunohistochemistry; Western blotting; Mouse

[收稿日期] 2016-06-13 **[修回日期]** 2016-06-27

[基金项目] 国家自然科学基金(30771141, 31200899); 山西省优势学科资助项目(2011-2014); 山西医科大学博士启动基金(B03201201)

[作者简介] 蔡玉瑾(1975—),女(汉族),辽宁省海城市人,博士,讲师。

* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

E-mail: jingya66@hotmail.com Tel: (0351) 4135204

人类先天性心脏病的发生率占活产婴儿的 1.2%^[1]。正常心发育依赖两群心前体细胞系协同完成,分别称第一生心区和第二生心区(second heart field, SHF)。第一生心区形成的原始心管发育为左心室和心房,SHF 不断向其两端添加心前体细胞发育为右心室、流出道和部分心房^[2,3]。SHF 发育不良可致多种心缺陷^[4]。胰岛素增强子结合蛋白 1(islet-1, ISL1)可促进 SHF 前体细胞增殖和迁移,被广泛用于标记 SHF 前体细胞^[2,5]。ISL1 基因敲除或突变,胚胎早期死亡,心组织缺失^[2]。观察 ISL1 在心内的表达模式有助于理解 SHF 参与心正常发育的机制。有关 ISL1 表达的研究,主要集中在心发育初期对敲基因或转基因小鼠 mRNA 水平的观察,而其表达不能完全重现蛋白的表达^[2,6],因此尚缺乏在正常小鼠心发育早中期对心内 ISL1 表达模式的系统观察。心的正常发育需要前肠内胚层的诱导^[7]。阻断内胚层特定的信号通路引起多种心畸形^[4,8]。已有大量研究揭示其部分分子机制,也观察了神经胚前期生心板与内胚层的时空关系,而在胚胎发育早中期对 ISL1 阳性细胞在心内分布的特点与心发育、SHF 发育及内胚层形态发育间的时空关系仍缺乏系统描述。本实验应用免疫组织化学染色、免疫荧光染色及 Western blotting 方法,观察 ISL1 阳性心前体细胞在胚龄 8~13d 小鼠心的表达特点,并观察其表达模式与同期内胚层与 SHF 发育间的联系,为进一步研究先天性心脏病的发生机制及应用干细胞修复心肌损伤提供形态学依据。

材料和方法

1. 标本制作

健康 BALB/c 雌性小鼠,2~3 月龄,体质量 18~23g,于晚 19:00 与同种雄鼠合笼[山西医科大学动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(晋)2009-0001,动物合格证号:晋医动字 07-0102]。次晨发现阴栓者为妊娠 0.5d。收集胚胎,胚龄(embryonic, E)8~E13 各 3 只。石蜡包埋,连续切片,厚 7 μ m。进行免疫组织化学染色,每间隔 10 片取 1 片用于 HE 染色。另取胚龄 E10~E13 胚胎各 2 只,制作石蜡切片,用于免疫荧光染色。

Western blotting 取材:体视显微镜下,在冰 PBS 中分离 E11~E14 胎鼠,取整心组织,-80℃冻存。

2. 免疫组织化学染色

切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,3%过氧化氢 30min 阻断内源性过氧化物酶,TENG-T 40min 封闭非特异性背景染色^[9]。用小鼠抗心肌肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC, 1:1000)单克隆抗体、小鼠抗 ISL1 单克隆抗体(1:100)、小鼠抗 α -平

滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA, 1:1000)单克隆抗体和小鼠抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA, 1:1000)单克隆抗体分别对连续切片进行孵育,室温过夜。兔抗小鼠 IgG 室温 2h、羊抗兔 IgG 室温 2h 和兔过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物室温 1.5h 分别孵育^[9]。DAB 显色。

3. 免疫荧光双染

石蜡切片常规处理至水,TENG-T 封闭非特异染色。配制:兔抗 ISL1 多克隆抗体(1:100, AB Tech 公司)与小鼠抗 PCNA 单克隆抗体(1:100, 2F2, Santa Cruz 公司)混合一抗或兔抗 ISL1 多克隆抗体与小鼠抗 α -SMA 单克隆抗体(1:400, 1A4, 武汉博士德生物工程有限公司)混合一抗孵育,室温过夜。混合二抗孵育 2h,4',6'-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)复染,漂洗,封片^[9]。摄片(Leica 荧光显微镜),处理图片(Confocal Assistant 软件, Version 4.02)。

4. 免疫印迹法(Western blotting)

取冷冻组织,使用 RIPA 裂解液(Solarbio 公司)抽提细胞总蛋白。Bradford 法测蛋白浓度,上样量 75 μ g,10% SDS-PAGE 电泳,半干法转至 PVDF 膜(Millipore 公司),5%脱脂奶粉封闭 1h,小鼠抗 β -微管蛋白(β -tubulin)单克隆抗体(北京康为世纪生物科技有限公司, CWA209, 1:2500)及小鼠抗 ISL1 单克隆抗体(Developmental Studies Hybridoma Bank, 39.4D5, 1:1000)分别孵育过夜,山羊抗小鼠 IgG(HRP 标记,北京中杉金桥生物技术有限公司, 1:5000),室温 1h,增强型化学发光剂(北京康为世纪生物科技有限公司)显色,X 线暗盒胶片成像。

5. 统计学分析

实验均重复 3 次,测量显影条带灰度值(Image J 1.44P 软件),每 1 条带均重复测量 3 次,目的蛋白的相对表达水平用目的蛋白条带与内参条带灰度值比表示。测量数据采用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行单因素方差分析(One-way ANOVA, SPSS16.0 统计学软件), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。采用 GraphPad Prism 5.01 软件生成柱状图。

结 果

1. 免疫组织化学结果

E8~E8.5,原始心管除尾端外其余部分已融合,心管表达心肌特异性标志蛋白 MHC(图 1A),心管与心包腔背侧壁间心背系膜完整。内胚层头中段已卷褶形成位于心管背侧的原始消化管前肠部分。ISL1 阳性细胞在前肠腹侧壁、两侧间充质和心包腔背侧壁脏壁中胚层均有较强表达,并延伸入心背系膜(图 1B)。内胚层尾段尚未封闭,紧邻心管尾端的

生心板。

胚龄 9d,单一心管形成、增长,动脉端(头端)攀状伸长形成流出道(图 2A、2B),心管中段心背系膜消失(图 2C),心管静脉端(尾端)形成心房和静脉窦(图 2D、2E)。脏壁中胚层 ISL1 阳性细胞,经与流出道返折处(图 2A、2B,箭头)延伸入流出道远端壁(图 2A、2B,▲),开始表达 MHC。静脉端,ISL1 在前肠腹侧壁、脏壁中胚层及心背系膜表达较弱,尚未进入静脉窦心肌(图 2D、2E)。前肠腹侧壁内胚层与脏壁中胚层邻近,之间缺少间充质细胞(图 1、2)。

胚龄 10d,心管长度明显增加,四腔心初步形成,内部尚未分隔(图 3A~3E)。脏壁中胚层 ISL1 阳性细胞已开始向早期心肌细胞分化,表达 α -SMA(图 3C,箭头),并经流出道远端(图 3C,箭头)迁入流出道近端及右心室壁,与 MHC 表达共存(图 3A~3C,▲)。咽腹侧壁增厚为复层上皮的内胚层与腹侧脏壁中胚层紧邻,均为 ISL1 阳性染色(图 3C),两者间开始出现较多的 ISL1 阳性间充质细胞位于动脉囊背侧(图 3B)。静脉端,前肠向腹侧凹陷形成喉气管沟(图 3D、3E),紧邻增厚的 ISL1 阳性表达的脏壁中胚层,ISL1 阳性细胞经心背系膜返折入静脉窦壁(图 3E),近心背系膜处静脉窦壁 MHC 表达阴性(图 3D,箭头)。

胚龄 11~12d 早期(图 4~5B),ISL1 阳性细胞自脏壁中胚层继续延伸入进一步伸长的流出道远端壁,与 MHC 共同表达于流出道壁(图 4A、4B、5A、5B,▲)。喉气管沟向前肠头端扩展,前肠腹侧壁内胚层向动脉囊方向伸出 ISL1 阳性实心细胞索(图 4C,▲),细胞索周围大量 ISL1 阳性间充质细胞聚集形成特征性锥体形结构,其尖端形成动脉囊隔雏形(图 4B、5B,箭头)。SHF 及内胚层 ISL1 阳性细胞增殖活性较强(图 4D,箭头),流出道壁内 ISL1 阳性细胞增殖活性较低(图 4D,▲)。静脉端,前肠已分隔为背腹两部分,背侧为食管,腹侧发育为气管及肺芽(图 4E),气管腹侧至肺芽外侧 ISL1 阳性间充质细胞增多,但明显少于动脉端咽腹侧间充质中的 ISL1 阳性细胞,与静脉端间充质延续的脏壁中胚层 ISL1 阳性细胞经心背系膜延伸入心房,少数位于心房背侧壁(图 4F,箭头),大多聚集在窦房结和静脉瓣,与 MHC 共表达(图 4E、4F)。心室及大部分心房心肌未见 ISL1 阳性细胞。

胚龄 12d 晚期,动脉囊已分隔为心包内升主动脉、肺动脉干,流出道远端正在分隔(图 5C、5D)。前肠腹侧锥体结构内 ISL1 阳性细胞密度达高峰,与脏壁中胚层 ISL1 阳性细胞一同延伸入 MHC 阴性的升主动脉、肺动脉干壁和主肺动脉隔,并继续向主肺动脉根部的近端流出道壁延续,继续表达 MHC,持

续向心肌细胞分化(图 5C、5D)。内胚层细胞索较胚龄 11d 显著增长(图 5D、5E,▲)。静脉端,静脉瓣及窦房结心肌中 ISL1 阳性细胞增多(图 5F、5G)。

胚龄 13d,心包内升主动脉和肺动脉干分隔基本完成,前肠头端已分隔(图 6A、6B)。气管腹侧内胚层细胞索消失,周围间充质 ISL1 阳性细胞急剧减少,锥体形结构消失,少量 ISL1 阳性细胞流从气管腹侧间充质及脏壁中胚层继续延伸入主肺动脉隔和主肺动脉壁(图 6C),分化为 α -SMA 阳性平滑肌细胞(图 6B),延伸入流出道远端的少量 ISL1 阳性细胞与 MHC 阳性心肌细胞共存(图 6A、6C)。静脉端,气管、肺芽周围及脏壁中胚层 ISL1 阳性细胞基本消失,窦房结及静脉瓣 MHC 阳性心肌细胞中仍有 ISL1 明显表达(图 6D、6E),但其增殖活性低(图 6F)。

2. Western blotting 检测 ISL1 蛋白表达

胚龄 11~12d,ISL1 在小鼠胚胎心的表达量持续增多并达高峰,胚龄 13d 后,ISL1 表达显著减少($P < 0.01$,图 7)。

讨 论

1. 心内 ISL1 的表达与心发育

第 1 生心区,即原始生心板卷褶形成原始心管主要发育为成体心的左心室和大部分心房,而流出道、右心室、部分心房则由 SHF 前体细胞不断向原始心管两端添加心肌前体细胞形成。SHF 主要包括心包腔背侧壁脏壁中胚层上皮、前肠腹侧(咽前)间充质^[2,3,10],连续分布于原始心管背侧,将心管头端(动脉端)背侧的 SHF 称前第二生心区(anterior component of the second heart field, aSHF),心管尾端(静脉端)背侧的 SHF 称后第二生心区(posterior component of the second heart field, pSHF)^[3]。有报道认为,心流出道的 ISL1 阳性细胞除来自 SHF 也可来自神经嵴^[11]。但也有研究显示,流出道心肌中神经嵴来源的细胞不表达 ISL1^[5,9]。我们前期研究观察到,神经嵴细胞出现在胚龄 11d 前,散在于间充质、心包腔背侧壁及主肺动脉隔,极少数细胞同时表达 ISL1^[9,12],因此本实验所见胚龄 11d 前心内 ISL1 阳性细胞可认为主要来自 SHF。

利用细胞追踪等技术发现,左心室有少量 SHF 来源的细胞^[2]。本实验观察到胚龄 9d 前心背系膜完整,可能脏壁中胚层 ISL1 阳性细胞经心背系膜较早迁入心管位于左心室,因数量少,镜下未见心管内 ISL1 阳性染色。对转基因小鼠进行细胞谱系分析,大多数 ISL1 阳性心前体细胞迁入心的时间至胚龄 9d,心内始终未见 ISL1 mRNA 表达^[2]。而我们观察到自胚龄 9~13d,心内持续可见 ISL1 阳性细胞,并

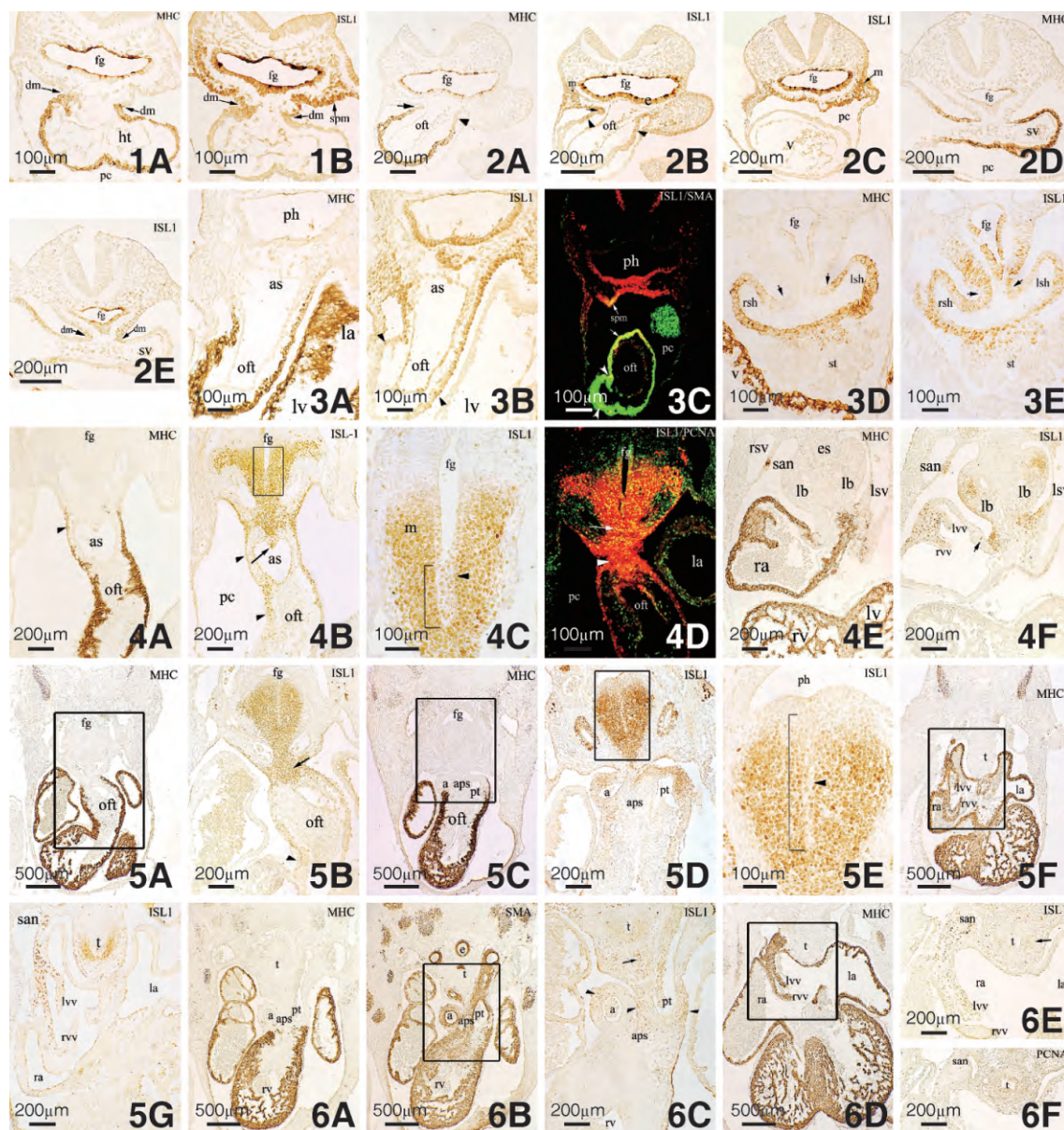


图1 胚龄8.5d 心横切面 A 示 MHC; B 示 ISL1; 免疫组织化学染色 标尺示 100 μ m

图2 胚龄9d 心横切面 A、D 示 MHC; B~C、E 示 ISL1; 免疫组织化学染色 标尺示 200 μ m

图3 胚龄10d 心横切面 A、D 示 MHC; B、E 示 ISL1, 免疫组织化学染色; C 示免疫荧光染色, ISL1(红)和 SMA(绿)叠加后(黄); 标尺示 100 μ m

图4 胚龄11d 心横切面 A、E 示 MHC; B、C、F 示 ISL1 免疫组织化学染色; C 为 B 图中方框放大; D 示免疫荧光染色, ISL1(红)和 PCNA(绿)叠加后(黄); A、B、E、F 标尺示 200 μ m; C、D 标尺示 100 μ m

图5 胚龄12d 心横切面 免疫组织化学染色; A、C、F 示 MHC; B、D、E、G 示 ISL1; B、D、E、G 分别是前图中方框放大; A、C、F 标尺示 500 μ m; B、D、G 标尺示 200 μ m; E 标尺示 100 μ m

图6 胚龄13d 心横切面 免疫组织化学染色; A、B、D 示 MHC; C、E 示 ISL1; F 示 PCNA; C、E、F 分别为 B、D 图中方框放大; A、B、D 标尺示 500 μ m; C、E、F 标尺示 200 μ m

fg, 前肠; dm, 心背系膜; ht, 心管; pc, 心包腔; spm, 脏壁中胚层; oft, 流出道; e, 内胚层; m, 间充质; v, 心室; sv, 静脉窦; ph, 咽; as, 动脉囊; rsh, 静脉窦右角; lsh, 静脉窦左角; st, 原始横膈; lv, 左心室; rv, 右心室; ra, 右心房; es, 食管; lb, 肺芽; san, 窦房结; lsv, 左上腔静脉; rsv, 右上腔静脉; lvv, 左静脉瓣; rvv, 右静脉瓣; a, 升主动脉; pt, 肺动脉干; aps, 主肺动脉隔; t, 气管; la, 左心房

Fig. 1 Transversal sections of mouse embryonic hearts at ED8.5 A, B showed MHC and ISL1 immunohistochemical staining Bar = 100 μ m

Fig. 2 Transversal sections of mouse embryonic hearts at ED9 A, D showed MHC and B, C, E showed ISL1 immunohistochemical staining Bar = 200 μ m

Fig. 3 Transversal sections of mouse embryonic hearts at ED10 A, D showed MHC and B, E showed ISL1 immunohistochemical staining; C were stained immunofluorescently, merged(yellow) of ISL1(red) and SMA(green); Bar = 100 μ m

Fig. 4 Transversal sections of mouse embryonic hearts at ED11 A, E showed MHC and B, C, F showed ISL1 immunohistochemical staining; C corresponding to selected box in B; D were stained immunofluorescently, merged(yellow) of ISL1(red) and PCNA(green); A, B, E, F, Bar = 200 μ m; C, D, Bar = 100 μ m

Fig. 5 Transversal sections of mouse embryonic hearts at ED12 A, C, F showed MHC and B, D, E, G showed ISL1 immunohistochemical staining; B, D, E, G corresponding to selected box in A, C, D, F, respectively; A, C, F, Bar = 500 μ m; B, D, G, Bar = 200 μ m; E, Bar = 100 μ m

Fig. 6 Transversal sections of mouse embryonic hearts at ED13 A, B, D showed MHC, C, E showed ISL1 and F showed PCNA immunohistochemical staining; C, E, F corresponding to selected box in B, D respectively; A, B, D, Bar = 500 μ m; C, E, F, Bar = 200 μ m

fg, Foregut; dm, Dorsal mesocardium; ht, Heart tube; pc, Pericardial cavity; spm, Splanchnic mesoderm; oft, Outflow tract; e, Endoderm; m, Mesenchyme; v, Ventricle; sv, Sinus venous; ph, Pharynx; as, Artery sac; rsh, Right horn of sinus venosus; lsh, Left horn of sinus venosus; st, Septum transversum; lv, Left ventricle; rv, Right ventricle; ra, Right atrium; es, Esophagus; lb, Lung bud; san, Sinoatrial node; lsv, Left superior vena cava; rsv, Right superior vena cava; lvv, Left vein valve; rvv, Right vein valve; a, Ascending aorta; pt, Pulmonary trunk; aps, Aortapulmonary septum; t, Trachea; la, Left atrium

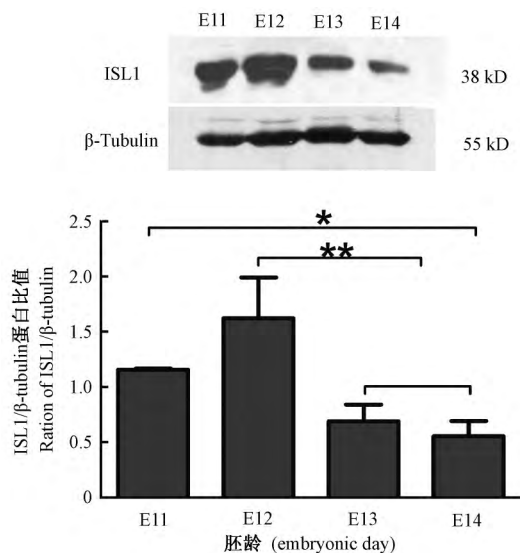


图7 不同胚龄小鼠胚胎心组织中 ISL1 蛋白的表达与其他胚龄组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig. 7 Expression of ISL1 in mouse embryonic hearts on different embryonic day Compared with other group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

且胚龄 9 ~ 10d, ISL1 阳性细胞已广泛分布于流出道、右心室、心房尾端及静脉窦, 因此早期敲除 ISL1 基因, 这些结构缺失, 胚胎在 9.5d 发育停滞并死亡^[2]。ISL1 阳性 SHF 前体细胞分化为心肌细胞后, 不再表达 ISL1^[2, 5]。而我们观察到, 胚龄 9 ~ 13d, 心管心肌中均可见 ISL1 与 MHC 表达共存, 提示持续有 SHF 前体细胞添加至心管两端, 与已分化的 ISL1 阳性细胞并存。免疫组织化学染色与 Western blotting 检测均显示, 胚龄 10d 始, 心内 ISL1 阳性细胞明显增多, 自胚龄 11 ~ 12d, 心内 ISL1 表达量逐渐达高峰, 胚龄 13d 后, 心内 ISL1 表达量急剧下降。胚龄 10 ~ 12d 正是流出道伸长及分隔的关键时间窗, ISL1 表达升高提示 SHF 向流出道添加足量的前体细胞, 以保障流出道正常的伸长及流出道嵴的形成。胚龄 13d, 流出道分隔基本完成, 心内 ISL1 表达降低, 提示 SHF 向心内迁移量减少, 因此, 心内 ISL1 的表达量与心结构的发育密切相关。ISL1 阳性细胞在不同时空发育阶段可分化为不同类型的细胞, 是多潜能细胞^[5, 13]。对鸡胚及小鼠的研究中观

察到, 在流出道发育晚期, 升主动脉和肺动脉干壁远端的平滑肌由迁移至流出道壁的 SHF 细胞发育而来^[5]。我们观察到, 胚龄 12 ~ 13d 始, ISL1 阳性细胞分布于 MHC 阴性而 α -SMA 阳性的心包腔内的主肺动脉壁及主肺动脉隔, 提示 ISL1 阳性细胞开始向平滑肌方向分化^[5]; 进入流出道远端壁的 ISL1 阳性细胞减少, 提示流出道进入低速伸长阶段。静脉端, 胚龄 10d, ISL1 阳性细胞遍布静脉窦, 之后主要局限于窦房结和静脉瓣心肌, 且增殖活性低, 提示部分静脉端及中枢传导系统心肌来自 pSHF 前体细胞, ISL1 在整个发育过程中对起搏细胞的生存、增殖及功能起关键作用^[14]。

2. 心内 ISL1 的表达与第二生心区发育

SHF 发育受多种转录因子调控, 转录因子 ISL1 不仅用于标记 SHF, 还可促进 SHF 细胞增殖及存活, 是其发育的重要节点蛋白^[2, 10]。我们观察到 SHF 内 ISL1 阳性细胞处在活跃的增殖状态, 可能有助于 SHF 不断发育并维持在前体细胞状态; 而 ISL1 阳性细胞进入心管后增殖活性降低, 可能启动了向心肌细胞的分化, 逐渐失去增殖能力, 进一步提示正常心发育依赖 SHF 细胞的添加。敲除 BMPs、Tbx1 和 FGF8 转录因子或阻断 Shh 信号通路引起 SHF 增生不良和法洛四联症、动脉干永存、肺动脉及心房分隔畸形^[8, 10, 15], 可能信号分子影响了 SHF 发育及 ISL1 阳性细胞向心管两端的迁移。

我们还观察到, 胚龄 10d, 静脉端脏壁中胚层上皮增厚, 呈 ISL1 强阳性表达, 进入静脉窦壁的 ISL1 阳性细胞分布最密集。胚龄 13d, 气管腹侧及肺芽外侧 pSHF 中 ISL1 阳性细胞较胚龄 11 ~ 12d 显著减少, 心房心肌内 ISL1 阳性细胞明显减少且分布更加局限, 提示静脉端 ISL1 阳性细胞密度与 pSHF 发育相关。应用 β -半乳糖苷酶染色对胚龄 9.25d 小鼠心定量分析表明, ISL1 阳性细胞在流出道、右心室分布最多, 其次是心房, 左心室最少^[2]。细胞示踪及回顾性克隆分析显示, pSHF 前体细胞除进入心静脉端, 还可通过心包腔背侧壁向心管头端移动, 进入流出道近端及远端壁分化为动脉端心肌细胞^[16, 17]。因此我们认为, 心内 ISL1 阳性细胞主要来自 aSHF。

这与 pSHF 出现较 aSHF 晚、ISL1 阳性细胞不及 aSHF 密集的这种 SHF 发育不对称相关。胚龄 11 ~ 12d, aSHF 中 ISL1 阳性细胞密度逐渐达高峰, 同时心内 ISL1 表达也达高峰; 胚龄 13d, 主肺动脉分隔基本完成, aSHF 与心内 ISL1 阳性细胞数量骤减, 仍可见少量 ISL1 阳性细胞流自 aSHF 延续入主肺动脉壁及主肺动脉隔, 以上结果提示, SHF 的发育与迁移入心的 ISL1 阳性细胞数量成正相关, 与流出道的分隔密切相关。

3. 心 ISL1 的表达与前肠内胚层发育

大量来自两栖类、禽类和小鼠的体内外实验表明, 在原肠胚期, 前肠内胚层在诱导紧密毗邻的第一生心区心肌细胞分化、心管形成及正常搏动形成等方面起重要作用^[7]。前肠内胚层通过分泌的多种转录因子促进自身生长和 SHF 前体细胞的增殖及迁移, 参与心正常发育^[4, 8]。敲除前肠内胚层 ISL1、骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP)、Tbx1 等转录因子或 Shh 信号通路成员, 引起 SHF 细胞凋亡增加、流出道长度缩短、分隔异常、室间隔缺损及心房发育畸形^[2, 4, 18, 19]。我们观察到, 胚龄 8 ~ 9d, 前肠内胚层腹侧壁邻近位于脏壁中胚层的 SHF, 提示内胚层分泌的可溶性因子可近距离作用 SHF, 促进前体细胞向心管迁移。胚龄 10 ~ 12d, 前肠内胚层与脏壁中胚层间距离逐渐增大, 间充质细胞逐渐增多, 内胚层伸出细胞索, 缩短了与脏壁中胚层的距离, 可能也增加了可溶性因子的分泌量。且随内胚层细胞索的伸长, 围绕细胞索分布的 aSHF 细胞密度增加, 心内 ISL1 表达量增加。胚龄 13d 后, 内胚层细胞索退化消失, aSHF 细胞密度明显降低, 心内 ISL1 表达量骤减, 提示内胚层细胞索可诱导 SHF 前体细胞增殖并向心内迁移。因此我们认为, 心内 ISL1 阳性细胞的数量与内胚层及毗邻的第二生心区发育耦联, 其时间窗覆盖主肺动脉分隔的关键期。

同时我们注意到, 胚龄 10d, 静脉端, ISL1 阳性的前肠腹侧壁首先形成喉气管沟, 与之邻近的脏壁中胚层增厚为腹侧, 并且呈 ISL1 阳性表达, 此时静脉窦壁 ISL1 阳性细胞密度最大, 这种近距离可能促进了内胚层对脏壁中胚层 SHF 细胞生长及迁移的诱导, ISL1 同时促进内胚层及 SHF 的增殖、发育。随前肠分隔, 气管及肺芽内胚层与脏壁中胚层间出现大量间充质细胞, 距离增大, 但始终未见内胚层细胞索形成, 可能是 pSHF 中 ISL1 阳性细胞不及动脉端密集、ISL1 阳性细胞在心静脉端分布也较局限的原因, 提示心管两端内 ISL1 阳性细胞数量分布不均等可能与内胚层发育不均一有关, 同时也提示, pSHF 中 ISL1 阳性细胞经动脉端迁入心可能是受到

来自动脉端内胚层细胞索更强的诱导作用所致。

参 考 文 献

- [1] Hoffman JJ, Kaplan S, Libersohn RR. Prevalence of congenital heart disease[J]. *Am Heart J*, 2004, 147(3): 425-439.
- [2] Cai CL, Liang X, Shi Y, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart[J]. *Dev Cell*, 2003, 5(6): 877-889.
- [3] Zaffran S, Kelly RG. New developments in the second heart field[J]. *Differentiation*, 2012, 84(1): 17-24.
- [4] Goddeeris MM, Schwartz R, Klingensmith J, et al. Independent requirements for Hedgehog signaling by both the anterior heart field and neural crest cells for outflow tract development[J]. *Development*, 2007, 134(8): 1593-1604.
- [5] Sun Y, Liang X, Najafi N, et al. Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells[J]. *Dev Biol*, 2007, 304(1): 286-296.
- [6] Zhuang S, Zhang Q, Zhuang T, et al. Expression of Isl1 during mouse development[J]. *Gene Expr Patterns*, 2013, 13(8): 407-412.
- [7] Lough J, Sugi Y. Endoderm and heart development[J]. *Dev Dyn*, 2000, 217(4): 327-342.
- [8] Hoffmann AD, Peterson MA, Friedland-Little JM, et al. Sonic hedgehog is required in pulmonary endoderm for atrial septation[J]. *Development*, 2009, 136(10): 1761-1770.
- [9] Wu ShSh, Jing Y, Yang YP, et al. Association of neural crest cells and ISL-1 positive cells with the development of the outflow tract of the mouse embryonic heart. [J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2011, 42(5): 684-689. (in Chinese)
武姗姗, 景雅, 杨艳萍, 等. 神经嵴细胞和胰岛因子 1 阳性细胞与小鼠胚胎心流出道发育的关系[J]. *解剖学报*, 2011, 42(5): 684-689.
- [10] Dyer LA, Kirby ML. The role of secondary heart field in cardiac development[J]. *Dev Biol*, 2009, 336(2): 137-144.
- [11] Engleka KA, Manderfield LJ, Brust RD, et al. Islet1 derivatives in the heart are of both neural crest and second heart field origin[J]. *Circ Res*, 2012, 110(7): 922-926.
- [12] Yang YP, Wu ShSh, Jing Y, et al. Distribution and function of cellular retinoic acid binding protein 1 positive neural crest cells of mouse embryo[J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2013, 44(04): 519-524. (in Chinese)
杨艳萍, 武珊珊, 景雅, 等. 小鼠胚胎细胞视黄酸结合蛋白 1 阳性神经嵴细胞的时空分布与功能[J]. *解剖学报*, 2013, 44(04): 519-524.
- [13] Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, et al. Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages[J]. *Nature*, 2009, 460(7251): 113-117.
- [14] Liang X, Zhang Q, Cattaneo P, et al. Transcription factor ISL1 is essential for pacemaker development and function[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(8): 3256-3268.
- [15] Hooper JE, Scott MP. Communicating with hedgehogs[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(4): 306-317.
- [16] van den Berg G, Abu-Issa R, de Boer BA, et al. A caudal proliferating growth center contributes to both poles of the forming heart tube[J]. *Circ Res*, 2009, 104(2): 179-188.
- [17] Domínguez JN, Meilhac SM, Bland YS, et al. Asymmetric fate of the posterior part of the second heart field results in unexpected left/right contributions to both poles of the heart[J]. *Circ Res*, 2012, 111(10): 1323-1335.
- [18] Dyer LA, Kirby ML. Sonic hedgehog maintains proliferation in secondary heart field progenitors and is required for normal arterial pole formation[J]. *Dev Biol*, 2009, 330(2): 305-317.
- [19] Rochais F, Mesbah K, Kelly RG. Signaling pathways controlling second heart field development[J]. *Circ Res*, 2009, 104(8): 933-942.

(编辑 张立克)