

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00449

斑马鱼管腔器官空腔形态发生及分子机制

肖春, 胡火珍, 莫显明

四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室医学干细胞生物学中心, 四川大学生命科学院, 成都 610041

摘要: 后生动物复杂的体内结构和器官结构多以网络状的管道系统出现。中空的管腔作为这个系统的重要结构单元承担了运输物质、区分器官不同部位功能、分隔机体和外环境等诸多重要的生理功能。管腔的发育障碍将致使相关器官形态发生畸形、功能紊乱。管腔型器官形态发生易被直接观察以及各种相关突变鱼和荧光转基因鱼的出现, 使得斑马鱼(*Danio rerio*)成为管道器官研究的优秀模式动物。斑马鱼血管、神经管、小肠、胰腺外分泌腺、前肾管等几种重要的器官的形态发生都伴随着典型的腔道发育过程, 是研究管腔形成的重要器官模型。管腔形成由胞外信号诱导、细胞极生化、胞内物质定向运输、腔内液体形成和胞内细胞骨架重构等相关管腔细胞内外发生的结构功能变化过程所构成, 而这些结构与功能的变化过程是通过精确而复杂的分子调控网络来实现, 最终形成管道器官。文章对斑马鱼 4 种典型管腔型器官的空腔形态发生过程进行了综述, 并总结了此过程中的分子机制, 为今后的相关研究提供了参考。

关键词: 管腔; 管腔器官; 极性; 细胞骨架

Lumen morphogenesis and molecular mechanisms in tubular organs during zebrafish embryonic development

XIAO Chun, HU Huo-Zhen, MO Xian-Ming

College of Life Sciences and Center for Medical Stem Cell Biology, State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: A network tubular system is an important structure in the body and organ of metazoa. The lumen of tube is fundamental units in the structure, which serve to transport material, divide the organ into different functional compartments and separate the organ from the environment. The defects of lumen formation will lead to abnormalities of the organ morphogenesis and disorder of the function. Zebrafish (*Danio rerio*) is an important model for development research. Meanwhile easy observation of tubular organ, the relevant mutants, and transgene lineages make zebrafish to become an excellent model to study the formation of lumen in the tubular organs, including the blood vessels, neural tube, gut, exocrine pancreas, and pronephric duct, which undergo the typical morphogenesis of lumen that is involved in the organs' development. The process of lumen formation is mainly consisted of induction of extracellular signals, polarization of epithelial cell, directional transportation in the polar cells, the aggregation and transportation of fluid in the lumen, and the reconstruction of cytoskeleton in polar cells and controlled by the precise and complicated molecular networks during

收稿日期: 2012-12-24; 修回日期: 2013-02-01

基金项目: 内胚层组织器官发育胰腺定向分化(编号: 2009CB941202)

作者简介: 肖春, 博士研究生, 研究方向: 发育生物学。E-mail: ztxbc@yahoo.com.cn

通讯作者: 莫显明, 教授, 研究方向: 发育生物学。E-mail: xmingmo@yahoo.com

网络出版时间: 2013-2-27 9:19:40

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130227.0919.002.html>

embryonic development. This review will summarize our current knowledge on lumen morphogenesis in four kinds of typical tubular organs during zebrafish embryonic development and the related molecular mechanisms as well as to supply helpful reference to the future studies.

Keywords: lumen; tubular organs; polarity; cytoskeleton

为应对复杂变化的外界环境,生物在不断进化过程中演变出复杂的体内结构。这个复杂结构的起始即是体腔的出现,并在进化过程中不断多样化和复杂化。在后生动物中,他们的体内或组织器官中大多都存在由管道构成的网络系统。这套系统在生物体内行使着控制和运输气体、养分、激素和代谢产物,分割器官不同部位的功能,分隔机体内部与外环境等功能。这些管道形成的障碍将致使相关器官形态发生畸形、功能紊乱,导致如脑积水、肛门闭锁、高血压等疾病。管道系统构成的基本单位都是由单个或多个细胞围成的中空结构。最简单的结构是某些毛细血管所具有的在单个细胞内中空形成的管腔结构;在腺体中存在由多个细胞围成的中空的腺泡,他们多与整个器官中的其他管道系统相连,成为这个管网的终端;最为复杂也是最常见的管道器官是遍布整个机体的血管系统。围成中空结构也即腔的细胞主要是上皮细胞,在血管中是内皮细胞。这些细胞都具有极性,靠近腔的一面被定义为顶侧(Apical surface),远离腔的一面为基底侧(Basal surface),与细胞外基质接触。在细胞间及侧面建立有各种重要的胞间连接。对这个腔的起始形成和变化的探索是研究管道结构的基础。斑马鱼(*Danio rerio*)作为现在常用的模式生物,具有发育周期短、胚胎透明易观察等优点,如神经管,特别是脑室可直接通过简单的光学显微镜观察。随着一些管道发育障碍的突变鱼和在各管道特异地发荧光的转基因鱼品系的出现也使得斑马鱼成为研究管腔形成的便利模式动物。本文对斑马鱼几种重要的管道器官,特别是腔体的形成过程进行综述并概述管腔形成的一些共同的过程和分子机制

1 斑马鱼典型管腔器官的形态发生

1.1 血管腔的形态发生

在斑马鱼胚胎发育的过程中,成血管细胞(An-

gioblasts)作为血管内皮细胞(Endothelial cells)的前体细胞,起源于受精后 12 hpf(Hours post-fertilization, hpf)的侧板中胚层(Ventrolateral mesoderm)。通过在 14 hpf 和 16 hpf 的两轮细胞迁移,到达中线脊索和底索之间^[1]。在 17.5 hpf(即 17 体节期),第 7~9 体节处首先出现扁平的由成血管细胞构成的实心细胞团。此时的细胞间无胞间连接建立,胞外基质中的纤连蛋白(Fibronectin)分布在这些细胞间^[1]。

脊椎动物的血管形成过程可分成两个不同的阶段^[2]。第一个阶段是成血管细胞聚集形成初级血管(Vasculogenesis)^[3],第二个阶段是在已有血管的基础上出芽形成新的血管(Angiogenesis)^[4]。在斑马鱼血管发生的第一个阶段形成的主要血管是背主动脉(Dorsal aorta, DA)和后主静脉(Posterior cardinal vein, PCV)^[5]。在 19 hpf(20 体节期)时,成 DA 的细胞团中出现 ZO1(Zonula Occludens protein 1)和 Claudin5 信号^[6],显示胞间连接开始建立,新的胞间连接的建立将诱导细胞间建立新的极性。CD34 家族和 Podocalyxin 在新形成的顶侧膜聚集,这些蛋白的定位都依赖于 VE-cadherin 的存在。在 21 hpf 时,DA 细胞间的顶侧极性处出现新生的管腔,随后管腔空间的逐渐扩大依赖于定位于顶膜的 VEGF-A 的功能,这种成腔的方式被称为细胞束中空化(Cord hollowing)(表 1)。在成腔的过程中,内皮细胞将由立方形逐渐变为绕腔的长条形,此时 F-actin 的定位于成腔细胞的顶侧,这种特殊的定位模式将影响腔体扩大过程中细胞形态的变化^[7]。Moesin 与 CD34-sialomucins 参与诱导 F-actin 在此过程中的特殊定位。

PCV 的成腔方式与 DA 不同,它是成静脉血管细胞(Venous angioblasts)包裹邻近的血细胞融合而成^[8]。在 28 hpf~30 hpf,DA 和 PCV 的管腔已完全打开^[9]。

在第二个阶段形成次级血管腔的方式至少有 3 种:出芽化(Budding),细胞束中空化和细胞中空化

表 1 斑马鱼典型管腔型器官的成腔模式

成腔方式	成腔特点	器官类型
细胞束中空化	腔出现在细胞间, 腔内细胞无凋亡	神经管、前肾管、小肠、胰外导管、背主动、体节间血管
细胞间空蚀化	腔出现在细胞间, 腔内细胞以凋亡的方式形成空腔	神经管
细胞中空化	腔出现在细胞内	体节间血管
出芽化	腔出现在细胞间, 腔紧随前端细胞出现	脑部血管网

(Cell hollowing)(表 1)。出芽化指的是当一个新的血管通过在主血管上出芽的方式形成时, 紧随出芽最前端细胞(Tip cells)的血管内皮细胞一直保持着特定的顶侧-基底侧的极性。新的血管腔在出芽形成血管的过程中随着端细胞的迁移不断在其后端形成。这种形式在分支管状网络的形成中常见, 如果蝇(*Drosophila*)的气管系统和哺乳动物的多种多分支管状系统^[10]。在 小鼠(*Mus musculus*)的视网膜中, 血管的管腔就紧挨前端细胞。对斑马鱼脑部血管系统的形成的实时观察结果显示也符合这种模式^[11]。

对斑马鱼体节间血管(Intersegmental blood vessels, ISV)管腔的研究发现, 在新出芽的位置后端并没有紧跟着出现管腔。当体节间动脉(Segmental arteries, SA)、背侧纵向吻合管(Dorsal longitudinal anastomotic vessel, DLAV)和体节间静脉(Segmental vein, SV)已形成特定的连接后, 才出现明显的血管管腔。通过对循环血液的荧光染料标记的观察, 体节间血管的管腔首先出现在它们出芽的起始位置, 位于 DA 的近端并逐渐向远端延伸^[12], 表明它们的成腔方式不是出芽化的方式。从而认为, ISV 管腔的形成采用的是细胞中空化的方式, 这种方式很早就 在哺乳动物毛细血管的成腔中被描述过^[13]。它的形态发生过程首先是在胞内形成空泡, 这些空泡在胞内融合成一个完整的空腔, 并与相邻细胞的空腔联通构成管道。因为腔体存在于单个细胞内, 这种管道被称为无缝的管道。近来在对出芽的新生血管和已有空腔的体节间细胞的胞间连接的观察发现在构成血管的细胞束间存在由多细胞构成的管道, 这些管道位于细胞间, 属于胞外管道^[14]。这种多细胞结构的管道通常是通过细胞束中空化的方式形成的。在这种模式中, 起始的实心细胞束通过重排在细胞间中心的位置形成连续的顶侧界面, 一些不连续的胞间空泡通过胞吐的液流产生, 整个联通的管道将在细胞形态的变化中不断形成。3 种成管腔的模式

在血管形成的过程中并不是独立存在的, 出芽化和细胞束中空化的方式经常共存, 这取决于细胞极 性化所延伸到的区域是否到达前端细胞。在同一根血 管中也发现在某一区域是通过细胞中空化形成胞内 管腔, 而在另一区域则是胞间管腔(表 1)。

1.2 神经管腔的形态发生

斑马鱼的神经管来自神经外胚层。首先由腹侧的脊索原基诱导其背侧的细胞分化成为柱状上皮形的神经干细胞, 排列成板状, 称为神经板(Neural plate)。随着发育的进程, 神经板侧缘增厚, 中间不断下陷形成神经脊(Neural keel), 并演化为沿前后轴方向的实心细胞团构成的神经柱(Neural rod)。起始的神经柱中的细胞并没有极 性化, 细胞不断地向中 线聚拢, 中线处的细胞以中线到神经柱外侧的方向 分裂, 子代细胞各自进入中线的两侧并拉长和极 性化^[15], 这个是斑马鱼神经管形成的特有方式。观察 17 hpf 的胚胎神经管横切面发现, 此时的管腔虽未 形成, 但在中线两侧的细胞已在中线两侧形成镜像 的对称排列模式^[16]。他们边缘包裹的是假复层柱状 上皮。此后管腔在神经柱的中线靠近腹侧处形成并 逐渐扩大成熟。22 hpf 可检测到在包裹管腔的神经 上皮细胞中 Actin 的极性分布和细胞粘着连接。神经 上皮细胞的极性和胞间连接信号不仅是维持细胞 形态的重要因素, 也是决定细胞分裂方向的重要条 件, Pard6γb 参与过程的此调控^[17]。错误的神经上皮 细胞分裂方向将导致管腔无法打开^[18]。18 hpf 至 22 hpf 之间是斑马鱼的前部神经管腔及脑室腔从打开 到初步形成的时期, 成腔的方式是细胞束中空化(表 1)。在这个过程中, 在管腔打开和扩张的区域都伴随 着较高的细胞增殖, 抑制细胞的增殖将导致管腔的 狭窄^[19]。而在此过程中细胞的凋亡并没有发挥重要 的作用。神经上皮会在特定的地方弯曲使得联通的 前部神经管形成前中后脑室。整个过程发生在心跳

起始前 24 hpf。这说明在这一阶段神经管腔的打开和扩张不受血液循环建立的影响^[20]。对 *silent heart* 突变鱼的神经管腔观察确认了这个推论。*silent heart* 突变体胚胎没有心跳不能建立血液循环^[21]，在 24 hpf 胚胎正常的血液循环建立前的脑室腔与野生型没有明显区别，但在 24 hpf 后其神经管的扩张受到了影响，这说明后一阶段神经管的扩张有赖于正常的血液循环。脑室腔形成的另一个重要因素是脑脊髓液(Cerebrospinal fluid, CSF)的分泌，它依赖于 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的活性。CSF 不断在新生的空腔累积形成液压，促使腔体的扩张。在神经管中还存在能够运动的纤毛，它们将驱动 CSF 在管腔中流动，从而为后生的腔体扩张提供动力。这两个因素的缺失都会导致神经管腔不能扩张到正常的水平。

1.3 肠腔的形态发生

斑马鱼的小肠起源于原肠胚期 Sox32 阳性的内胚层前体细胞。在胚胎发育过程中，这群细胞通过聚合延伸运动向中线聚集。内胚层前体细胞在体节生成期被内卷入下部胚层，在紧挨着的卵黄上形成一个扁平的不连续的细胞层。在 26 hpf，这群细胞在胚胎中线处已经形成一个连续实心的带状双层结构，靠近前端部分将发育成未来的嘴，后端将发育成肛门^[22]。

在 26 hpf，原肠管还没有形成空腔。从 26 hpf 到 52 hpf 是小肠形态形成的快速阶段。斑马鱼没有胃^[23]，成体的替代器官是小肠泡，胚胎期食管直接与小肠相连。消化道空腔的形成首先开始于食管和靠近嘴侧的小肠，并通过小肠逐渐向肛门延伸。在小肠泡的原基处，起初是在由方形内胚层细胞构成的双层结构中出现一些独立的小孔，后来这些小孔融合形成一个大的腔体，与哺乳动物小肠腔形成相反^[24]，在此过程中细胞凋亡并不是必需的，这是细胞束中空化的方式(表 1)。42 hpf 时已有明显的空腔形成，这个过程需要 aPKC(Atypical protein kinase C)诱导的细胞极化^[25]。形成腔体的细胞是以单层结构存在，彼此间建立起由 Claudin15 介导的胞间紧密连接^[26]。食道的空腔形成起始于嘴部，并向小肠延伸，在 72 hpf 与小肠联通。在空腔形成的过程中，极性的细胞顶侧的生成是非常重要的，腔体形成的位置总是发生在以 Cytokeratin 阳性为细胞顶侧标记的

位置。在 74 hpf 到 76 hpf，整个消化道已经形成一个中空管道，嘴已经张开，但肛门仍然是封闭的。随着小肠空腔的形成和不断扩大，小肠上皮细胞也在以持续的极理化来维持小肠形态的发生。小肠上皮细胞逐渐由原来的立方形转变为长柱形，在面向空腔的细胞顶层仍然有较强的 Cytokeratin 阳性信号，细胞的侧膜可以检测到 E-cadherin，细胞核则定位在靠近基底部，在基底部的周围开始出现薄层的间质组织。在 98 hpf，肛门打开，小肠完全成为了一个开口的、由单层极化的上皮细胞围成的管道。

1.4 胰腺外分泌腺导管和腺泡的形态发生

成体斑马鱼的胰腺结构和哺乳动物相似，由内分泌腺和富含导管的外分泌腺构成。他们起源于原肠胚期 Sox32 阳性的内胚层前体细胞。胰腺由在时空上不同出现的两个原基发育而成^[27]。第一个原基靠前以后发育成内分泌腺。第二个原基出现在 40 hpf，位于小肠泡原基的腹侧右边(背侧观)，新生肝的后面和正在形成的胰岛前面，这个原基将发育为外分泌腺、胰管和一小部分邻近胰管的内分泌腺。在 50~52 hpf，Cytokeratin 阳性的胰外导管形成^[28]，以后将以细胞束中空化的方式形成空腔(表 1)。在 60 hpf，腺泡还是实心的细胞团，细胞间已建立 Cadherin 阳性的胞间连接，此时 Cytokeratin 阳性的胰内管前体细胞被包裹在外分泌腺的原基中，此时这些细胞还没有与腺泡和胰外管形成联系，只是独立散在的分布。到 72 hpf 时，外分泌腺已延伸到胸鳍的尾部。在此时的外分泌腺组织中，从胰腺的头部到尾部都可以检测到 Cytokeratin 阳性的不连续的胰内管，这些初级的胰内管沿着胰腺的前后轴分布。头部的胰内管已经开始有和腺泡细胞相连接的趋势，腺泡在 Cadherin 信号诱导下，以细胞束中空化的方式形成空腔。在 96 hpf，第一次级胰管出现，此时的腺泡细胞已发育成典型的柱状形态。到 120 hpf，腺泡细胞已完全极化，此时已出现了从独立的腺泡生长出的第二次级胰管。胰内主管现在已基本联通，原本独立的腺泡通过次级胰管和主管相连并最终与胰外管形成一个联通的网络。

1.5 前肾管的形态发生

在受精后 2~3 d 的斑马鱼胚胎中已形成典型的前肾结构以完成渗透调节的功能。它由肾小球，前

肾小管和前肾管构成。肾小球由左右对称的两个肾单位在前段融合而成,它在发育至 48 hpf 具有调节渗透的功能。一对前肾管形成于 24 hpf, 它们分别位于体轴两侧,前端起始于肾小球处,后端延伸到尾侧与泄殖口融合^[29]。连接肾小球与前肾管的前肾小管在 30 hpf~40 hpf 形成。

发育成熟的前肾管是通过 Cadherin17 介导,通过胞间连接构筑的上皮管道^[30],成腔的方式为细胞束中空化(表 1)。构成前肾管的细胞是由侧板中胚层和轴旁中胚层之间的一条中胚层(Intermediate mesoderm)细胞通过间质向上皮转化(Mesenchymal-epithelial transition, MET)而来的^[31]。管道的形成由前段开始逐渐向尾侧演进,整个过程伴随着上皮细胞的极化化和细胞间连接的建立。极性化的上皮细胞在顶层具有可摆动的纤毛,产生在前肾管中流动的液流^[32]。在基底和侧面膜上有离子转运蛋白以完成前肾管具有的部分渗透调节作用。

2 管腔形成的过程和分子机制

2.1 胞外基质信号和细胞间信号的诱导

上皮性的腔道通常是一个器官的组成部分,它本身也受到细胞外基质和周围细胞所包围。上皮性腔道内成熟的上皮细胞具有非常明确的特征,包括细胞间的接触、细胞的极性、相邻细胞间的连接和基底膜等。在胚胎发育过程中,不同器官中上皮性腔道的起始形成、形成过程和形成后细胞的排列结构都有明显的区别。然而,不管腔道器官管腔结构怎样变化,它们都具有一个基本的结构,即由高度极化的上皮细胞层围成一个管腔,细胞的顶侧面向管腔,而基底部与基底膜相接触,细胞的侧面互相连接。因此,在胚胎发育过程中,上皮性腔道器官的发生与构筑的核心就是上皮细胞聚集并极化形成管腔的过程。胚胎发育过程中,有多种方式形成上皮性腔道,包括极化上皮的包裹(Wrapping)围成管腔,非极化上皮前体细胞可通过出芽化,细胞中空化,细胞束中空化和细胞间空蚀化(Cavitation)等方式形成管腔。但是,不管形成管腔的方式怎样,都有一个基本的过程,即上皮细胞的极化。因此,上皮细胞的极化是理解上皮性腔道形成与构筑过程的一个基本点。

细胞极性的形成过程被认为是一种间质上皮化(MET)过程,始于空间信息对细胞的诱导。对于上皮细胞来说,空间信息即为细胞的粘附信息,包括细胞与基质的粘附信息和细胞与相邻细胞的粘附信息两个方面。在上皮细胞表面上感受空间信息的位置依赖于细胞表面的粘连带受体蛋白。这些受体蛋白感受到细胞的空间信息后,通过诱导特异信号通路的活化,引起细胞内受体蛋白周围的细胞骨架聚合和重构,继而诱导细胞内其他部位的细胞骨架的重构和细胞内蛋白与细胞器的重新分布,形成细胞极性。没有细胞外基质时单个上皮细胞很少表现出极性特征,当细胞与细胞外基质或与其他细胞接触后,可诱导细胞的极性形成。上皮细胞间的粘连主要由 Cadherin 介导^[33], Cadherin 能够起始细胞极性的形成。上皮细胞与细胞外基质相互作用是由粘连带受体蛋白 Integrin 介导的^[34]。细胞外基质与细胞接触后,可诱导细胞表面的粘连带受体蛋白活化,继而改变细胞的结构,形成细胞极性。Cadherin 和 Integrin 介导的细胞粘附导致细胞内粘着处的细胞骨架和信号分子聚集,继而引起细胞局部和整个细胞内细胞骨架的重构、细胞分泌器的重新分布特别是细胞骨架中的微管的重构与重新分布等改变,形成极性细胞。

2.2 细胞新极性的建立

实心的细胞团在胞外基质信号和胞间连接信号的诱导下在共同的位置形成顶端的极性位点。这个未来的空腔原始位置被命名为顶侧膜起始位点(Apical membrane initiation site, AMIS)^[35]。在果蝇的气管研究中发现, Cadherin 介导的粘着连接是 AMIS 形成的前提条件^[10]。在斑马鱼神经管腔形成初始 N-cadherin 起着类似的作用^[36],并在神经管管腔形成的初始检测到 AMIS 结构^[16]。此后极性蛋白 Crumbs3a 和足糖萼蛋白等在 Rab8/11 阳性的囊泡中聚集^[37]。Rab 启动的 GTPase 的级联反应可通过激活动力蛋白 Myosin5 促使囊泡向膜表运输^[38], SNARE 蛋白促使囊泡与细胞膜融合,从而创立新的细胞极性位点^[39]。极性复合物 Pard3-aPKC 与胞吐亚体 Sec8 也都出现在 AMIS 的位置^[35],并广泛定位于细胞间紧密连接。Cdc42 在细胞的 AMIS 被 Rab8/11 激活^[40],此时由 Cdc42-Pard3-aPKC 构成的顶端极性复合物协同与在顶侧聚集的膜联蛋白 2(Annexin2)结合的

磷脂酰肌醇二磷酸盐(PIP₂)调控后续向 AMIS 的胞内运输^[41]。

AMIS 将由点逐渐扩大成为一个斑块, 这需要 Pard3 和 aPKC 激酶活性^[42]。在此过程中, aPKC 调控 Pard3 的磷酸化, 使得 Pard3 脱离 Pals1 并同时脱离 aPKC^[43], aPKC 将与 Pard6 形成复合物定位于细胞顶端^[44], Cdc42 协同 Pard6 募集 Crumbs 到顶膜形成 Crumbs-Pals1-PatJ 复合物^[45], 并同时限制 Pard3 位于顶膜两侧, Crumbs 蛋白将抑制细胞连接相关蛋白在顶侧的定位, 驱使新的细胞连接出现在侧面。

此时 AMIS 的进一步扩大需要细胞的增殖, 但为了在确定的位置形成单一的腔体, 调控围腔细胞的有丝分裂方向是必要的。在这个过程中仍然需要 Cdc42 和 Pard3 的协同作用^[46,47], 被募集到顶侧的 aPKC 磷酸化控制有丝分裂方向的 LGN-NuMA 复合物^[48], 抑制其在顶侧的定位, 从而阻止了沿顶侧-基底方向的分裂模式, 保证细胞分裂后仍为单层的围腔形式。

在上述过程中, 不仅胞内的蛋白在定位上发生特异的变化, 构成细胞膜的脂类成分也发生相应的变化, 在顶侧聚集的主要是与膜联蛋白 2 结合的磷脂酰肌醇二磷酸盐(PIP₂), 而在即将形成的侧面和底部则是 PIP₃^[49], 这样的模式依赖于定位于顶侧的磷酸酶 PTEN。它将顶侧的 PIP₃ 转化为 PIP₂, 而 PTEN 的定位则受到了 Par 复合物的调控^[50]。

2.3 新的空腔的形成

新的空腔是如何在 AMIS 处最终打开的呢? 在 AMIS 处主要聚集的跨膜蛋白如 Crumbs、Mucin1 和 Podocalyxin 等的胞外段都被广泛的糖基化, 由此在胞外形成了较高的负电荷区域^[51], 这起到了抗粘附的作用^[52]。不仅如此, 他们的胞内段在空腔打开的过程也发挥着重要作用。Crumbs 的胞内段募集 Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) 家族成员和极性蛋白 Pard6 和 aPKC^[53]。Podocalyxin 则在亚顶层的区域募集 F-actin-ERM-RhoA-myosin-II, 这些复合物为空腔的打开提供动力^[54]。

另一种空腔化的方式是细胞间空蚀化^[54], 围腔的细胞接受胞外和相邻细胞的信号开始极化, 而中央的细胞则因为外围环境的变化而凋亡, 于是形成中空腔体。细胞凋亡因子 Bim 和 Bmf 在这个过

程中发挥重要作用^[55]。

2.4 空腔的扩张与细胞极性的维持

新形成的空腔必须通过扩大到一定大小来完成它的功能。细胞极性的维持在整个过程中都起到重要的作用。同时空腔内开始不断积累液体产生液压。空腔内液体的产生主要是腔内和胞内的离子浓度差造成的。离子浓度的差异主要依赖于不断向顶侧运输离子和将它们排出到胞外。用于排出离子的蛋白 Na⁺-K⁺-ATPase 在这个过程中发挥重要的作用。在斑马鱼小肠中 Tcf2 转录因子的缺失可抑制 Na⁺-K⁺-ATPase 的表达, 导致小肠形成多腔体^[26]。囊性纤维化跨膜传导调节蛋白(Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)调控氯离子的运输, 在空腔积液的形成中也起到重要的作用, 通过药物作用提高 CFTR 活性将导致斑马鱼小肠腔的异常增大^[56]。围腔的细胞彼此间建立起紧密连接, 确保在空腔内积累的液体不会遗漏。在斑马鱼的神经上皮中缺失 Claudin5a, 可导致胞间紧密连接的受损, 通透性增加, 脑室腔内的积液遗漏, 从而影响脑室腔形态的正常形成^[57]。空腔不仅形成积液, 还有细胞分泌到空腔的基质, 主要是一些纤维状的壳多糖。在空腔扩大的过程中他们也是必要的^[58]。这些分泌物大多都要依赖内质网-高尔基体的运输体系, 包被复合物 (Coat protein complex, COP) 调控从内质网到高尔基体的顺式运输, 抑制其成员 Sec13 的表达将导致斑马鱼小肠上皮结构的紊乱^[59]。

细胞骨架在空腔形成的过程中发挥着综合的作用, 它们不仅在胞内构建物质运输通道, 为物质运输提供动力, 也是维持细胞正常形态的重要条件。前面已提到过, Actin 是在极性细胞中定位于顶侧的微丝蛋白, 它参与亚顶侧基质的构造, 为这个网络运作提供支持和其中蛋白的运动动力。

微管是一种广泛存在于真核细胞中的重要细胞骨架成分, 在细胞分裂、迁移和形态、细胞极性形成过程中起重要的作用。它主要是通过影响染色体移动、胞内物质的定向运输和细胞器的定位来实现其功能^[60]。微管是由 α -tubulin 和 β -tubulin 两种微管蛋白形成的异源二聚体聚合而成的空心管状物质, 并具有极性。 γ -tubulin 定位于微管生长且较为稳定的负端, 是重要的微管成核物质。在大多数增殖和

迁移的细胞中,中心体是微管成核物质锚定的主要位置。微管的负端锚定在中心体上,正端通过微管蛋白聚合而向细胞的边缘生长延伸,形成由一个中心发散出来的放射结构。但是在很多分化的细胞中,例如肌细胞^[61]、上皮细胞和神经细胞等,都存在微管负端并不锚定在中心体上而形成的非中心体微管,这样的微管所形成的网络结构也通常是束状,为细胞状态维持的关键结构^[62]。

微管的再组装与再分布是维持细胞极性的关键因素。微管极性分布的消失,可导致细胞极性的消失,即为上皮间质化。在细胞粘着后引发微管的再组装与再分布,在细胞的顶端形成致密随机排列的短微管;在细胞的其他部位为长微管,其正端位于细胞基底部,并与细胞侧膜平行分布。管腔的形成和扩大过程伴随着管腔上皮细胞内微管的再生、重构与再分布;而这种再生与重构的微管主要是非中心体微管^[63]。随着管腔的形成和扩大, γ -tubulin 及 γ -tubulin 结合的复合物离开中心体,到达极性细胞顶侧分布,此时新生的微管都会向这个新生的微管成核中心聚集,而成熟的微管会形成从细胞顶层到基层的平行排列分布。在这个过程中,蛋白 Spastin 对解离从中心体生成的新生微管发挥关键作用,而蛋白 Pih1 发挥着将解离下来的微管锚定到细胞顶层的作用。抑制这个过程中相关蛋白的表达将影响管腔的发育形成^[64]。在血管生成的研究中有类似发现,通过 RNAi 抑制微管锚定蛋白 Ninein 在血管内皮细胞的表达将会影响血管的形成^[65]。体外实验的研究也证明上皮细胞可以通过 EMK1 途径调控非中心体微管的组织,从而影响上皮细胞形成管腔结构^[66]。

研究显示,非中心体微管负端还可以锚定在定位于上皮细胞顶层的中间丝上,化学性缺氧可以导致微管负端从中间丝上脱离,对大鼠的肾脏进行缺血-再灌注同样可以达到这个目的。再灌注 3 d 后,大鼠肾近端小管上皮细胞内的非中心体微管组织中心脱离细胞骨架而弥散于胞浆,与此同时 Na^+ - K^+ -ATPase 也重新分布,预示着非中心体微管的紊乱会导致细胞极性的错乱和相关生理功能的丧失^[67]。在已极性的上皮细胞中,这些微管是重要的胞内蛋白的运输轨道。微管的极性和微管构成的特殊网络使得上皮细胞内沿微管的运输蛋白也有了特殊的方

向和定位,最终导致相关蛋白的特异分布,是形成、维持上皮细胞形态和实现极性上皮细胞功能的重要因素。

目前研究显示空腔形成的主要步骤包括:胞外和胞间信号诱导、细胞极理化、新空腔的形成和成熟。细胞的极理化贯穿于整个事件的始末,是空腔形成的关键;细胞骨架的重构和维持是空腔形成的基础条件。细胞骨架中非中心体微管的生成和重排是目前研究的热点,新的研究成果的不断出现使得我们对这个领域的了解不断加深。

3 结 语

生物体器官腔道的发育障碍不仅会导致器官形态的发育异常,更会带来相应功能的故障,造成胚胎在发育中致死,如脑室腔发育障碍形成的无脑畸形、脑裂、脑积水等。而在新生儿先天缺陷中常见的肛门闭锁、胆道狭窄或闭锁、由输尿管狭窄或闭锁引起的肾囊肿也都是这些器官中相应管道的发育障碍造成的。由血管狭窄引起的高血压在成年人群中也是普遍存在且危害很大的疾病。对管腔形成的研究将为我们理解相应疾病的发病机制提供理论基础,为我们寻找治疗疾病的方法提供线索。斑马鱼作为良好的研究管腔形成的模式动物将在这个过程中发挥重要的作用。

参考文献(References):

- [1] Eriksson J, Löfberg J. Development of the hypochord and dorsal aorta in the zebrafish embryo (*Danio rerio*). *J Morphol*, 2000, 244(3): 167–176. DOI
- [2] 王旭,熊敬维. 血管内皮细胞发育及分子机制. 遗传, 2012, 34(9): 1114–1122. DOI
- [3] Coffin JD, Poole TJ. Embryonic vascular development: immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordia in quail embryos. *Development*, 1988, 102(4): 735–748. DOI
- [4] Risau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J*, 1995, 9(10): 926–933. DOI
- [5] Isogai S, Horiguchi M, Weinstein BM. The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development. *Dev Biol*, 2001, 230(2): 278–301. DOI
- [6] Jin S W, Beis D, Mitchell T, Chen JN, Stainier DYR. Cellular and molecular analyses of vascular tube and

- lumen formation in zebrafish. *Development*, 2005, 132(23): 5199–5209. [DOI](#)
- [7] Strilić B, Kuceraš T, Eglinger J, Hughes MR, McNagny KM, Tsukita S, Dejana E, Ferrara N, Lammert E. The molecular basis of vascular lumen formation in the developing mouse aorta. *Dev Cell*, 2009, 17(4): 505–515. [DOI](#)
- [8] Herbert SP, Huisken J, Kim TN, Feldman ME, Houseman BT, Wang RA, Shokat KM, Stainier DY. Arterial-venous segregation by selective cell sprouting: an alternative mode of blood vessel formation. *Science*, 2009, 326(5950): 294–298. [DOI](#)
- [9] Roman BL, Pham VN, Lawson ND, Kulik M, Childs S, Lekven AC, Garrity M, Moon RT, Fishman MC, Lechleider RJ, Weinstein BM. Disruption of *acvr1l* increases endothelial cell number in zebrafish cranial vessels. *Development*, 2002, 129(12): 3009–3019. [DOI](#)
- [10] Baer MM, Chanut-Delalande H, Affolter M. Cellular and molecular mechanisms underlying the formation of biological tubes. *Curr Top Dev Biol*, 2009, 89: 137–162. [DOI](#)
- [11] Huisken J, Stainier DYR. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development*, 2009, 136(12): 1963–1975. [DOI](#)
- [12] Kamei M, Saunders WB, Bayless KJ, Dye L, Davis GE, Weinstein BM. Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature*, 2006, 442(7101): 453–456. [DOI](#)
- [13] Bär T, Guldner FH, Wolff JR. "Seamless" endothelial cells of blood capillaries. *Cell Tissue Res*, 1984, 235(1): 99–106. [DOI](#)
- [14] Blum Y, Belting HG, Ellertsdottir E, Herwig L, Lüders F, Affolter M. Complex cell rearrangements during intersegmental vessel sprouting and vessel fusion in the zebrafish embryo. *Dev Biol*, 2008, 316(2): 312–322. [DOI](#)
- [15] Ciruna B, Jenny A, Lee D, Mlodzik M, Schier AF. Planar cell polarity signalling couples cell division and morphogenesis during neurulation. *Nature*, 2006, 439(7073): 220–224. [DOI](#)
- [16] Tawk M, Araya C, Lyons DA, Reugels AM, Girdler GC, Bayley PR, Hyde DR, Tada M, Clarke JD. A mirror-symmetric cell division that orchestrates neuroepithelial morphogenesis. *Nature*, 2007, 446(7137): 797–800. [DOI](#)
- [17] Munson C, Huisken J, Bit-Avragim N, Kuo T, Dong PD, Ober EA, Verkade H, Abdelilah-Seyfried S, Stainier DYR. Regulation of neurocoel morphogenesis by *Pard6* yb. *Dev Biol*, 2008, 324(1): 41–54. [DOI](#)
- [18] Geldmacher-Voss B, Reugels A M, Pauls S, Campos-Ortega JA. A 90° rotation of the mitotic spindle changes the orientation of mitoses of zebrafish neuroepithelial cells. *Development*, 2003, 130(16): 3767–3780. [DOI](#)
- [19] Elsen GE, Choi LY, Millen KJ, Grinblat Y, Prince VE. *Zic1* and *Zic4* regulate zebrafish roof plate specification and hindbrain ventricle morphogenesis. *Dev Biol*, 2008, 314(2): 376–392. [DOI](#)
- [20] Lowery LA, Sive H. Initial formation of zebrafish brain ventricles occurs independently of circulation and requires the *nanog* and *snakehead/atp1a1a.1* gene products. *Development*, 2005, 132(9): 2057–2067. [DOI](#)
- [21] Sehnert AJ, Huq A, Weinstein BM, Walker C, Fishman M, Stainier DYR. Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nat Genet*, 2002, 31(1): 106–110. [DOI](#)
- [22] Ng ANY, de Jong-Curtain TA, Mawdsley DJ, White SJ, Shin J, Appel B, Dong PDS, Stainier DY, Heath JK. Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Dev Biol*, 2005, 286(1): 114–135. [DOI](#)
- [23] Rombout JH, Lamers CH, Helfrich MH, Dekker A, Taverne-Thiele JJ. Uptake and transport of intact macromolecules in the intestinal epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the possible immunological implications. *Cell Tissue Res*, 1985, 239(3): 519–530. [DOI](#)
- [24] Abud HE, Watson N, Heath JK. Growth of intestinal epithelium in organ culture is dependent on EGF signalling. *Exp Cell Res*, 2005, 303(2): 252–262. [DOI](#)
- [25] Horne-Badovinac S, Lin D, Waldron S, Schwarz M, Mbamalu G, Pawson T, Jan YN, Stainier DYR, Abdelilah-Seyfried S. Positional cloning of *heart* and *soul* reveals multiple roles for PKC λ in zebrafish organogenesis. *Curr Biol*, 2001, 11(19): 1492–1502. [DOI](#)
- [26] Bagnat M, Cheung ID, Mostov KE, Stainier DYR. Genetic control of single lumen formation in the zebrafish gut. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(8): 954–960. [DOI](#)
- [27] Field HA, Dong PD, Beis D, Stainier DY. Formation of the digestive system in zebrafish. II. Pancreas morphogenesis. *Dev Biol*, 2003, 261(1): 197–208. [DOI](#)
- [28] Yee NS, Lorent K, Pack M. Exocrine pancreas development in zebrafish. *Dev Biol*, 2005, 284(1): 84–101. [DOI](#)
- [29] Drummond IA, Majumdar A, Hentschel H, Elger M, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Stemple DL, Zwartkruis F, Rangini Z, Driever W, Fishman MC. Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development*, 1998, 125(23): 4655–4667. [DOI](#)
- [30] Horsfield J, Ramachandran A, Reuter K, LaVallie E, Collins-Racie L, Crosier K, Crosier P. Cadherin-17 is required to maintain pronephric duct integrity during zebrafish

- development. *Mech Dev*, 2002, 115(1–2): 15–26. [DOI](#)
- [31] Serluca FC, Fishman MC. Pre-pattern in the pronephric kidney field of zebrafish. *Development*, 2001, 128(12): 2233–2241. [DOI](#)
- [32] Kramer-Zucker AG, Olale F, Haycraft CJ, Yoder BK, Schier AF, Drummond IA. Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development*, 2005, 132(8): 1907–1921. [DOI](#)
- [33] Lele Z, Folchert A, Concha M, Rauch GJ, Geisler R, Rosa F, Wilson SW, Hammerschmidt M, Bally-Cuif L. Parachute/n-cadherin is required for morphogenesis and maintained integrity of the zebrafish neural tube. *Development*, 2002, 129(14): 3281–3294. [DOI](#)
- [34] Chiu CH, Chou CW, Takada S, Liu YW. Development and fibronectin signaling requirements of the zebrafish interrenal vessel. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43040. [DOI](#)
- [35] Bryant DM, Datta A, Rodríguez-Fraticelli AE, Peränen J, Martín-Belmonte F, Mostov KE. A molecular network for *de novo* generation of the apical surface and lumen. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(11): 1035–1045. [DOI](#)
- [36] Hong E, Brewster R. *N-cadherin* is required for the polarized cell behaviors that drive neurulation in the zebrafish. *Development*, 2006, 133(19): 3895–3905. [DOI](#)
- [37] Nelson WJ. Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature*, 2003, 422(6933): 766–774. [DOI](#)
- [38] Wakabayashi Y, Dutt P, Lippincott-Schwartz J, Arias IM. Rab11a and myosin Vb are required for bile canaliculi formation in WIF-B9 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(42): 15087–15092. [DOI](#)
- [39] Sharma N, Low SH, Misra S, Pallavi B, Weimbs T. Apical targeting of syntaxin 3 is essential for epithelial cell polarity. *J Cell Biol*, 2006, 173(6): 937–948. [DOI](#)
- [40] Iruela-Arispe ML, Davis GE. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Dev Cell*, 2009, 16(2): 222–231. [DOI](#)
- [41] Martín-Belmonte F, Gassama A, Datta A, Yu W, Rescher U, Gerke V, Mostov K. PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell*, 2007, 128(2): 383–397. [DOI](#)
- [42] Ferrari A, Veligodskiy A, Berge U, Lucas MS, Kroschewski R. ROCK-mediated contractility, tight junctions and channels contribute to the conversion of a preapical patch into apical surface during isochoric lumen initiation. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 21): 3649–3663. [DOI](#)
- [43] Krahn MP, Buckers J, Kastrup L, Wodarz A. Formation of a Bazooka-Stardust complex is essential for plasma membrane polarity in epithelia. *J Cell Biol*, 2010, 190(5): 751–760. [DOI](#)
- [44] Morais-de-Sa E, Mirouse V, St Johnston D. aPKC phosphorylation of Bazooka defines the apical/lateral border in *Drosophila* epithelial cells. *Cell*, 2010, 141(3): 509–523. [DOI](#)
- [45] Walther RF, Pichaud F. Crumbs/DaPKC-dependent apical exclusion of Bazooka promotes photoreceptor polarity remodeling. *Curr Biol*, 2010, 20(12): 1065–1074. [DOI](#)
- [46] Rodríguez-Fraticelli AE, Vergara-Jauregui S, Eastburn DJ, Datta A, Alonso MA, Mostov K, Martín-Belmonte F. The Cdc42 GEF Intersectin 2 controls mitotic spindle orientation to form the lumen during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol*, 2010, 189(4): 725–738. [DOI](#)
- [47] Hao Y, Du QS, Chen XY, Zheng Z, Balsbaugh JL, Maitra S, Shabanowitz J, Hunt DF, Macara I G. Par3 controls epithelial spindle orientation by aPKC-mediated phosphorylation of apical Pins. *Curr Biol*, 2010, 20(20): 1809–1818. [DOI](#)
- [48] Zheng Z, Zhu HB, Wan QW, Liu J, Xiao ZN, Siderovski DP, Du QS. LGN regulates mitotic spindle orientation during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol*, 2010, 189(2): 275–288. [DOI](#)
- [49] Martín-Belmonte F, Mostov K. Phosphoinositides control epithelial development. *Cell Cycle*, 2007, 6(16): 1957–1961. [DOI](#)
- [50] Feng W, Wu H, Chan LN, Zhang MJ. Par-3-mediated junctional localization of the lipid phosphatase PTEN is required for cell polarity establishment. *J Biol Chem*, 2008, 283(34): 23440–23449. [DOI](#)
- [51] Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 22): 3683–3692. [DOI](#)
- [52] Takeda T, Go WY, Orlando RA, Farquhar MG. Expression of podocalyxin inhibits cell-cell adhesion and modifies junctional properties in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(9): 3219–3232. [DOI](#)
- [53] Bulgakova NA, Knust E. The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 15): 2587–2596. [DOI](#)
- [54] Debnath J, Brugge JS. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(9): 675–688. [DOI](#)
- [55] Reginato MJ, Mills KR, Becker EB, Lynch DK, Bonni A, Muthuswamy SK, Brugge JS. Bim regulation of lumen formation in cultured mammary epithelial acini is targeted by oncogenes. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(11): 4591–4601. [DOI](#)
- [56] Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem*, 2008, 77: 701–726. [DOI](#)

- [57] Zhang JJ, Piontek J, Wolburg H, Piehl C, Liss M, Otten C, Christ A, Willnow TE, Blasig IE, Abdelilah-Seyfried S. Establishment of a neuroepithelial barrier by Claudin5a is essential for zebrafish brain ventricular lumen expansion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(4): 1425–1430. [DOI](#)
- [58] Swanson LE, Beitel GJ. Tubulogenesis: an inside job. *Curr Biol*, 2006, 16(2): R51–53. [DOI](#)
- [59] Townley AK, Schmidt K, Hodgson L, Stephens DJ. Epithelial organization and cyst lumen expansion require efficient Sec13-Sec31-driven secretion. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 3): 673–684. [DOI](#)
- [60] Siegrist SE, Doe CQ. Microtubule-induced cortical cell polarity. *Genes Dev*, 2007, 21(5): 483–496. [DOI](#)
- [61] Tassin AM, Maro B, Bornens M. Fate of microtubule-organizing centers during myogenesis in vitro. *J Cell Biol*, 1985, 100(1): 35–46. [DOI](#)
- [62] Meads T, Schroer TA. Polarity and nucleation of microtubules in polarized epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1995, 32(4): 273–288. [DOI](#)
- [63] Bartolini F, Gundersen GG. Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 20): 4155–4163. [DOI](#)
- [64] Brodu V, Baffet AD, Le Droguen PM, Casanova J, Guichet A. A developmentally regulated two-step process generates a noncentrosomal microtubule network in *Drosophila* tracheal cells. *Dev Cell*, 2010, 18(5): 790–801. [DOI](#)
- [65] Matsumoto T, Schiller P, Dieterich LC, Bahram F, Iribe Y, Hellman U, Wikner C, Chan G, Claesson-Welsh L, Dimberg A. Ninein is expressed in the cytoplasm of angiogenic tip-cells and regulates tubular morphogenesis of endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(12): 2123–2130. [DOI](#)
- [66] Cohen D, Brennwald PJ, Rodriguez-Boulant E, Müssch A. Mammalian PAR-1 determines epithelial lumen polarity by organizing the microtubule cytoskeleton. *J Cell Biol*, 2004, 164(5): 717–727. [DOI](#)
- [67] Salas PJI. Insoluble γ -tubulin-containing structures are anchored to the apical network of intermediate filaments in polarized CACO-2 epithelial cells. *J Cell Biol*, 1999, 146(3): 645–658. [DOI](#)

•综合信息•

2013 年 35 卷第 4 期《遗传》封面说明

随着基因组研究的飞速发展,对基因的功能及其表达调控机制的研究得到更多的关注。利用模式动物从个体发育水平、细胞分子水平研究基因表达调控成为一个非常重要的研究领域。斑马鱼体外受精、发育,并且胚胎透明,近年来成为研究早期基因表达调控的有力模型。整胚原位杂交技术是利用反义 RNA 探针检测体内 mRNA 表达的一项技术,在利用模式动物研究基因时空表达及调控方面有着重要的应用。如何使用该技术得到特异、高敏感度的表达结果,对每一个使用该技术的实验室来说都很重要。本实验室参经常规的实验方法,并在此基础上加以改进,使之更加灵敏,结果更加特异。详见本期第 522~528 页张春霞,刘峰“斑马鱼高分辨率整胚原位杂交实验方法与流程”一文。以斑马鱼为例,介绍了整胚原位杂交技术的发展历史,并重点介绍了本实验室所用的整胚原位杂交实验流程,包括 RNA 探针的制备及原位杂交的具体步骤,同时还分析了实验结果不理想的原因及其解决方法。封面图片展示的是利用该方法得到的不同时期、不同基因的特异性表达结果。

(张春霞,刘峰)