神经管发生中的形态学事件和分子机制

综述

Morphogenetic events and molecular mechanism during neurulation

李泽桂* 综述 蔡文琴 陈活彝** 审校 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室) 重庆, 400038

神经管发生是一个重要的涉及到建立中枢神经系统原基的胚胎学事件,是指从神经板出现到神经管关闭的胚胎发育过程。在此过程中,神经板必须准时准确地关闭形成神经管,神经系统才能得以正常发育,否则将出现神经管关闭缺陷(Neural tube closure defect, NTCD)和随之而来的脊柱裂(Spina bifida)及无脑(Anencephaly)等常见畸形。为此,近一个多世纪以来,胚胎学家和发育神经生物学家坚持不懈地应用了许多不同的动物模型和不同的实验技术,试图探讨从神经板出现到神经管闭合这一涉及多因素调控的过程及机制,以避免和预防 NTCD 的发生。

1 神经管发生的形态学事件

神经管发生经历了四个有序而重叠的阶段,即神经板出现(Formation of the neurula plate)、神经板成形(Shaping of the neurula plate)、神经板卷褶(Bending of the neural plate)和神经褶融合(Fusion of the neural folds)。

1.1 神经板出现(Formation of the neural plate)-形态学事件之一

在小鼠胚胎 8.0 d,人胚约 18 d,由外胚层细胞增厚形成神经板。在此过程中,神经板细胞增高,成为假复层状,开始表达特有的标志分子,如神经细胞粘附分子(Neural cell adhesion molecule, NCAM)等。此时神经板内几乎没有有丝分裂后细胞[1],但其命运已经特化[2]。很长一段时间以来,人们一直认为是脊索释放某种信息诱导了神经板中将发育为未来底板(Floor plate)部分的分化,再由底板发出信息诱导了运动神经元的形成。研究者将鸡胚的一段脊索植入到另外的部位,发现诱导了第二底板的形成。而去除脊索、底板也随之消失[3]。而且发现了脊索诱导底板的物质,称为 Sonichedgehog,这种蛋白质在体外培养能诱导一些细胞出现底板细胞的特征。但是最近 Le Douarin[4]及其同事对此提出质疑,他们发现底板不是由脊索诱导的,而是与脊索一样来自同一前体细胞。在鸡胚发育的很早阶段,如将鹌鹑胚胎的脊索前体细胞移植到鸡胚的相应部位,几天后鸡胚体内同时出现了由鹌鹑细胞形成的脊索和底板。他们认为,如果按过去的观念是脊索诱导了底板的形成,那么底板应由鸡胚的细胞构成。从研究基因突变的资料也支持底板是不依赖于脊索的,发现一种没有脊索的软体鱼(Zebrufish)突变体,其底板仍能发育。另外发现在发育早期,有明显的脊索细胞和底板细胞被检测到。Le Douarin认为,这种情况是由于脊索和底板的前体细胞存在于发育的很早阶段,由它们同时发育为脊索和神经管的底板。

1.2 神经板成形(Shaping of the neural plate)-形态学事件之二

此阶段神经板从头尾方向增长,从内外方向变窄,从顶底方向增厚,但中线上的细胞则呈楔状被锚在脊索上。驱使神经板成形的动力主要来自神经板内细胞行为的变化,称为内力(Intrinsic force)。开始神经板的假复层细胞以梭形为主。在此发育过程中,细胞平均高度增加 30%,平均直径降低 15%[5],认为这种细胞形状的改变至少部分是由微管调节的。这种内力使神经板增厚的同时,其宽度也降低了 1/3[6]。神经板的增长和变窄,还由两个内力驱动:一是神经上皮的重排,重排后沿神经板长轴排列细胞增多。沿横轴排列的细胞减少。神经上皮重排的机制目前还不清楚,但认为与细胞活性和间期核的迁移有关[7];二是由于细胞有丝分裂的纺锤体平面主要是沿神经板长轴方向排列,因而分裂产生的子细胞也沿长轴排列,从而使神经板增长[8]。

1.3 神经板卷褶(bending of the neural plate)-形态学事件之三

此阶段开始于神经板成形过程中,故与之重叠,有两个重要的形态学事件发生于此阶段,第一是结合点(Hinge point HP)的形成,即神经板在正中线和背外侧分别与相邻组织形成一个正中结合点(Median HP, MHP)和两个背外侧结合点(Dorsolateral hinge points, DLHPs)。MHP是神经板沿中线与脊索的结合部,贯穿整个神经板长轴;DLHPs是神经板背外侧与相邻表皮外胚层的结合点,只存在于未来的脑和菱形窦水平。HP的作用是为神经管形成过程中内外力相互作用提供支撑点。其次由于 HP部位的神经上皮以楔状细胞为主,使此处形成纵向的垄沟(Longitudinal furrowing), HP和垄沟的形成也是受来自神经板内细胞行为的内力的驱使。开始时神经板内的细胞为假复层,高度基本一致,其中 75%是梭形细胞,只有 25% 楔状细胞,两种细胞在神经板内随机混合排列。而 HP形成过程中,该部位的细胞高度降低了 1.5倍,在 MHP和 DLHPs分别有 70%和 55%的细胞成为楔状[9]。细胞的楔状改变是由于细胞周期中胞质主要集中于基部而使基部扩大,而微

* 李泽桂,女,46岁,副教授,博士研究生
** 香港中文大学解剖学系

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

丝调节则使顶部收缩所致。但是最近发现 DLHP也存在于 16体节鼠胚胸段水平[10]。如用放线菌素 D(Cytochalasin D)抑制微丝的合成从而干扰 DLHPs的形成,神经褶就不能跨过中线相互融合,提示了 DLHPs参与了神经褶的会聚[11]。第二是神经褶的出现(Formation of the neural folds),此过程是在内、外力作用下,由于 MHP处被固定,神经板背外侧和与之相连的表皮外胚层升高。在逐渐升高过程中,神经板外侧的基膜与各自相连的表皮外胚层内侧的基膜相贴,形成成对的具有双层结构的神经褶。继续升高的神经褶以 MHP部位的凼沟为中轴导致了神经沟(Neural groove)的出现。

1.4 神经褶的融合(Fusion of the neural folds)-形态学事件之四

在外力(Extrinsic force)的作用下,神经褶升高,在向对侧靠拢的过程中,双侧的神经褶与各自相连的表皮外胚层脱离后相互融合形成神经管的顶板(Roof plate)。与此同时,双侧的表皮外胚层也与各自相连的神经褶脱离后相互融合形成胚体背部的皮肤。此时,一些细胞从正在关闭的神经褶或从刚形成的神经管顶板中迁出形成神经嵴,在神经褶向对侧融合的过程中,由于只有 MHP作支点,新形成的神经管呈裂隙状,而在未来脑和菱形窦水平,由于有 MHP和 PLHPs三个支点,使神经管管腔呈宝石状。神经褶的形成和神经沟的关闭主要是外力作用[12],研究发现将神经板侧面的非神经组织与神经板分离后,神经板能够经历正常的成形、凼沟形成,但神经褶不能形成。提示外力来自神经板外部的相邻组织。如果将神经板腹侧的中胚层,内胚层及与之相连的细胞外基质全部去除而只留下表皮外胚层时,发现神经褶的升高和融合仍能发生,提示外力主要来自表皮外胚层。

此外,当神经上皮楔状化被抑制,即消除了内力后,也不影响神经褶的形成和神经沟的关闭,这也提示了外力的作用。研究发现外力也是来自细胞行为的变化,主要表现在以下方面。一是在神经胚形成过程中,表皮外胚层细胞增加宽度和降低高度,由原来的低立方转变为扁平状。这种细胞形状的变化至少提供了部分向中轴线扩展的外力,从而驱使神经褶的升高和会聚;二是外胚层细胞也经历了向内侧和尾侧的排列[13],这种细胞行为除作用于外胚层自身从头尾方向增长外,也在使外胚层在向中轴线扩展中促进神经褶的融合;三是表皮外胚层细胞有丝分裂的纺锤体是沿头尾和内外两个方向排列[8],沿内外侧方向产生的子细胞也为神经褶的融合提供了外部力量。

虽然 MHP和 DLHPs不涉及到神经管的关闭。但它们在来自表皮外胚层的外力和来自神经板内的内力相互作用中,作为支点起到了关键作用。因为神经板通过 HPs被锚在相邻组织上呈稳定状态,从而在外力驱动下完成卷褶和融合,其结果是形成向内卷入的神经管而不致使神经板向外膨出。但是最近出现在不同动物的不同体轴水平和不同的时空阶段,神经管闭合过程中依靠内外力的情况是不同的。有的在关闭中主要依靠外力,有的则主要依靠内力[11]。如 20~29体节小鼠的后神经孔在缺乏相邻组织(缺乏外力)的情况下也能关闭[14]。

过去认为神经管的关闭是从中段开始,以拉链方式(Zipping up fashion)向两端延伸的,近年研究发现神经管关闭的起始部位多达 5个[15]。如颈部/后脑交界处,中脑/前脑交界处,以及前脑最头端等[16]。由于神经管各段受不同基因作用,因而在神经管不同部位由于不正常关闭形成的 NTCD,其病理表现和基因调控都是不同的。

2 影响神经管关闭的分子机制

神经管发生是一个多因素参与的非常复杂的胚胎学事件,其中任何一个环节出现差错,都可能导致 NTCD发生。归结起来这些影响因素主要来自神经管内部和外部两个方面,其中主要是一些调节形态发生的保守同源基因或原癌基因在起作用,尽管目前对它们的确切作用还知之甚少。

2.1 来自神经管内部的影响因素

近年研究表明,许多基因在神经管形成过程中在神经上皮表达,它们可能参与神经诱导(Neural induction)、细胞命运特化及调节细胞行为等。但对这些基因的确切作用及机制还不清楚。一种斑点突变鼠(Murine mutant splotch Sp)是研究 NTCD的成熟模型。最近发现 Sp小鼠的神经管关闭过程中,bcl-2等11种基因都有改变[17],提示 bcl-2参与神经管的形成。发现在不同致畸因子引起的不同 NTCD中,bcl-2的表达是不一样的,在 Valpric acid介导的小鼠 NTCD模型中 Bcl-2的表达增高,提示了 Valpric acid引起 NTCD的机制不是增加细胞凋亡而是改变了神经上皮的增殖速度[18]。两在苯妥英(Phenytoin)介导的小鼠 NTCD模型,bcl-2与 Pax-3都是降低的,而且 bcl-2维甲酸α受体(Retinoic acid receptor alpha)及 Pax-3的降低都是发生在神经管关闭的后期。而 c-jumⅣ型胶原蛋白(col-Ⅳ)及细胞粘附分子 N-Cadherin等则在神经管关闭的早期降低。仅细胞维甲酸结合蛋白-2(Cellular retinol binding pritein-2 RBP-2)是在神经管关闭的中期降低[19]。提示神经管在发育的不同时期是受不同的基因及其产物调控的。

另外,发现在小鼠神经管形成中,Pax-3于 E8.5开始在背侧和尾侧神经上皮表达[20]。研究发现 Pax-3基因功能丧失与 Sp小鼠有关,Sp纯合子(Sp^{-}/Sp^{-})NTCD的发生率为 100%并于 E16死亡。提示 Pax-3的正常表达涉及到神经管的关闭过程[21]。因而 Pax-3也是维持正常胚胎发育和存活的必需的基因。最近在对糖尿病鼠胚研究中发现,在尚未融合的神经褶顶部出现很清晰的凋亡细胞带。而正常情况下,此部位的细胞凋亡只发生在神经褶融合以后,同时发现该部位的 Pax-3 mRNA的转录下调甚至检测不到。据此认为糖尿病鼠胚发生 NTCD的原因是由于糖代谢异常诱导了 Pax-3的下降,而 Pax-3的下降又导致未来神经管顶部的细胞发生异常凋亡所致。目前,Pax-3在神经管中作用的靶基因尚未找到,认为可能是下调的 Pax-3介导了细胞存活基因的失活而使细胞走向凋亡[22]。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 来自神经管外部的影响因素

在神经管形成过程中,来自外部的影响因素主要指来自非神经上皮的一些基因的异常表达,从而影响神经管的关闭过程。如对一种突变卷尾鼠(Curly tail)的研究中发现外力也影响神经管的关闭过程。这种突变鼠由于后神经孔的延迟关闭导致发生 40%~60%的 NTCD胚胎。认为 Curly tail小鼠胚胎发生 NTCD的原因不是来自神经管内部而是来自外部,研究发现由于这种突变小鼠后肠和脊索的细胞增殖缺陷[23],导致胚体腹侧过度弯曲而防碍了后神经孔的关闭而形成 NTCD。进一步研究发现,Curly tail胚胎的细胞增殖缺陷与维甲酸受体β(RARβ)在后肠的表达降低有关[24]。因而这是一种来自神经管外部的影响因素。

另外,在头部表皮外胚层中表达的转录因子 AP-2及在头部间充质中表达的 Cartl基因和 twist基因的降低也会引起颅神经管的 NTCD[25]。虽然这些基因都不在神经上皮表达,但它们可能是通过调节颅侧非神经上皮的细胞行为,从而产生外部力量来影响颅神经管的正常关闭。

目前对神经管发生中的形态学事件已了解得比较清楚,但对影响神经管形成的来自内部和外部的分子机制却了解甚少,在这方面还有许多空白领域值得去研究,特别在神经管颅侧,因为其分化的结构比尾侧复杂,因而调控其演变的基因也比尾侧多,故更易受到内部和外部因素的影响而发生畸形的机会也比尾侧多。因此深入了解神经管形成过程中的影响因素和基因调控机制,将为预防 NTCD的发生带来新的策略。

关键词　神经胚形成;形态学事件;分子机制;神经管关闭缺陷

中图法分类号　R321.4

参考文献

1 Sechrist J, Bronner F M. Birth and differentiate of reticular neurons in the chick hind brain ontogeny of the first neuronal population. Neuron, 1991, 7(6): 947

2 Yamada T, Pfaff S L, Edlund T, *et al*. Control of cell pattern in the neural tube: Motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. Cell, 1993, 73(4): 673

3 Tamab Y, Thomas M J. Diversity and pattern in the developing spinal cord. Science, 1996, 274(2590): 1115

4 Voegel G. Embryo′s organizational chart redrawn? Science, 1998, 280(5371): 1838

5 Schoenwolf G C. Shaping and bending of the avian neuroepithelium: morphometric analyses. Dev Biol, 1985, 109(1): 127

6 Schoenwolf G C, Powers M L. Shaping of the chick neuroepithelium during primary and secondary neurulation: role of cell elongation. Anat Rec, 1987, 218(2): 182

7 Keller R, Shim J, Sater A. The cellular basis of the convergence and extension of the xenopus neural plate. Dev Dyn, 1992, 193(3): 199

8 Sausedo R A, Smith J L, Schoenwolf G C. Role of nonrandomly oriented cell division in shaping and bending of the neural plate. J Comparative Neurology, 1997, 381(4): 473

9 Smith J L, Schoenwolf G C, Quan J, *et al*. Quantitative analyses of neuroepithelial cell shaps during bending of the mouse neural plate. J comp Neurol, 1994, 342(1): 144

10 Shum A S, Copp A J. Regional differences in morphogenesis of the neuroepithelium suggest multiple mechanisms of spinal neurulation in the mouse. Anat Embryol, 1996, 194(1): 65

11 Schoenwolf G C. Microsurgical analysis of avian neurulation: Sepatation of medial and laterial tissue. J Comp Neuol, 1998, 276(4): 498

12 Moury J D, Schoenwolf G C. Coopertive model of epithelial shaping and bending during avian neurulation: autonomous movements of the epidermis, and interactions in the neural plate/epidermis transition zone. Dev Dyn, 1995, 204(3): 323

13 Schoenwof G C, Alvarez I S. Specification of neuroepithelium and surface epithelium in avian transplantation chimeras. Development, 1991, 112(3): 713

14 Van Straaten H W, Hekking J W, Consten C, *et al*. Intrinsic and extrinsic factors in the mechanism of neurulation effect of curvature of the body axis on closure of the posterior neuropore. Development, 1993, 117(3): 1163

15 Van Allen M I, Kalousek D K, Chem G F, *et al*. Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. Am J Med Genet, 1993, 47(5): 723

16 Golden J A, Chernff G F. Intermittent pattern of neural tube closure in two strains of mice. Taratology, 1993, 47(1): 73

17 Bennett G D, An J, Craig J C, *et al*. Neurulation abnormalities secondary to altered gene expression in neural tube defect susceptible splotch embryos. Teratology, 1998, 57(1): 17

18 Wlodarczyk B C, Craig J C, Bennett G D, *et al*. Valproic acid-induced changes in gene expression during neurulation in a mouse model. Teratoloqy, 1996, 54(6): 284

19 Bennett G D, Lau F, Calvin J A, *et al*. Phenytoin-induced teratogenesis: a molecular basis for the observed developmental delay during neurulation. Epilepsis, 1997, 38(4): 415

20 Bang A G, Papalopulu N, Kintuer C, *et al*. Expression of

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Pax-3 is initiated in the early neural plate by posteriorizing signals produced by organizef and by posterior non-axial mesoder. Development, 1997, 124(10): 2075

21 Chalepakis G, Goulding M, Read A, *et al*. Molecular basis of splotch and Waardenburg Pax-3 mutations. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(9): 3681

22 Shelley A P, Moriko I, Mary R L. Neural tube defects in embryos of diabetic mice: Role of the Pax-3 gene and apoptosis. Diabetes, 1997, 46(7): 1189

23 Copp A J, Brook F A, Roberts H J. A cell-type-specific abnormality of cell proliferation in mutant (curly tail) mouse embryos developing spinal tube defects. Development, 1988, 104(2): 285

24 Chen W H, Morris Kay G M, Copp A J. Genesis and prevention of spinal neural tube defect in the curly tail mutant mouse: involvement of retinoic acid and its nuclear receptors. RARβ and RARγ Development, 1995, 131(3): 681

25 Zhang J, Hagopicm-Donaldson S, Serbedzija G, *et al*. Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. Nature, 1996, 381(6579): 238

(收稿: 1999-04-09;修回: 1999-06-02)

(编辑 王 红)

端粒酶的结构、功能与调控*

Function, struction and regulation of telomerase

陈 兵** 综述 刘为纹 房殿春 审校 (第三军医大学附属西南医院消化内科)重庆, 400038

正常细胞经过有限次数的分裂即进入衰老阶段,停止增殖而最终衰亡。但肿瘤细胞似乎成功地摆脱了这种衰老的束缚,表现出无限制加速增殖的永生化能力。这使人们意识到衰老与肿瘤这两大生命科学中的难题之间可能存在着某种联系和转换的必然环节。近年来端粒酶(Telomerase)的发现和"端粒假说(Telomere hypothesis)"的提出,使有关衰老和肿瘤的研究有了长足的进展。包括 Science和 Cell等在内的国际著名期刊,正以逐年增加刊登论著、述评、视点文章的形式,对端粒-端粒酶这一研究方向作出了肯定,认为有可能对衰老、肿瘤等重大生物学问题的解决产生深远的影响[1,2]。

1 末端复制问题与端粒假说

DNA双螺旋的两条链是反向平行的。因此,以这两条链为模板进行 DNA复制时,复制链延伸的方向一条为 3′→5′,另一条是 5′→3′。但生物细胞内催化 DNA复制的所有 DNA聚合酶都只能催化 5′→3′的延伸,这是一个矛盾[3,4]。冈崎片段(Okazaki fragment)的发现使之得以解决。在复制起点 DNA的两条链解开形成复制泡(Replication bubbles), DNA向两侧复制形成复制叉(Replication forks)。以复制叉移动的方向为基准,以 3′→5′模板链的复制在可沿 5′→3′方向连续进行,所形成的 DNA复制链称为前导链(Leading strand)。而以 5′→3′模板链的复制也必须按 5′→3′方向进行,但由于是与复制叉前进的方向相反,因此无法连续进行,而只能分段进行复制形成一系列 DNA片段,即所谓的冈崎片段。这些冈崎片段随后由 DNA连接酶连接成完整的另一条 DNA复制链,又称为滞后链(Lagging strand)。这种前导链的连续复制和滞后链的不连续复制称为 DNA的半不连续复制(Semi-discontinuous replication),是生物界最基本和普遍的 DNA复制方式[3]。然而,这种方式在环状 DNA的复制中表现的似乎完美,但在染色体线形 DNA的复制中却存在着一些问题:① 已知的 DNA复制都需 RNA引物的参与,其势必占据滞后链末端的一段 DNA序列而使之无法复制;② DNA连接酶的作用是连接两条紧邻的冈崎片段,必须是两条紧邻的 DNA片段才能被其催化形成磷酸二酯键,显然在滞后链的末端是不具备这个条件的。这意味着在滞后链末端的的一段 DNA序列最终未被复制,或换句话说每次所复制的子代 DNA都将较其亲本 DNA丢失一段末端 DNA序列。这也就是所谓的末端复制问题(End-replication problem),并随后为一系列实验所证实,所丢失的 DNA序列长约 50~100bp[3,4]。但问题并未到此为止,随之而来并令人长期困惑不解的问题是这种"不精确" DNA复制的动因和意义是什么,其在生物体中的作用和机制是什么?

端粒的研究开始使人们对上述问题有所了解,但真正较好的回答和理解上述问题在于端粒酶的发现及其近期的较为深入的研究。早在 30年代末,诺贝尔奖金获得者 Muller首先发现被 X线打断的果蝇染色体末端极不稳定,因而提出染色体末端结构可能是为了维持染色体的稳定,并根据希腊文组词将其命名为端粒(Telomere)[5,6]。70年代 Olovnikov又提出染色体末端的丢失可能会导致细胞退出增殖假设,但未能提供较为直接的证据[5,6]。1978年 Blackburn等发现四膜虫的端粒是重复串联的 5′-GGGGTT-3′ DNA简单序列[3,6]。1985年和 Gueider等发现一种酶,即端粒酶,可用这种简单序列给端粒 DNA"加

* 中国博士后科学基金资助,中博基[1998]6号,第三军医大学基因诊疗中心科研开发基金资助

** 陈兵,男,38岁,副主任医师,副教授,博士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net