

外遗传调节与神经干细胞分化

赵明涛 安志兴* 刘凤军 张 涌*

(西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

摘要 神经发生与神经干细胞的分化调控机制是当今神经发育生物学的重要研究热点, 在阐明干细胞的可塑性机制和临床治疗神经退行性疾病等方面具有广阔的应用前景。最近研究表明, 外遗传调节在神经干细胞的生长及分化方面表现出重要作用。这些外遗传调节包括组蛋白的乙酰化/去乙酰化, DNA 甲基化以及非编码 RNAs 对细胞命运决定的影响。

关键词 组蛋白乙酰化/去乙酰化; DNA 甲基化; miRNA; 神经干细胞

多细胞生物个体的细胞在遗传物质上具有同质性, 而在结构和功能上由于基因的特异性表达呈现异质性, 该异质性是在个体发育过程中基因的差异表达造成的, 可以通过细胞分裂而稳定遗传下来, 这类稳定的改变称为“外遗传改变(epigenetic alteration)”。外遗传调节(epigenetic regulation)指通过子代分化细胞基因表达的特异性和可遗传性促进细胞特化, 其机制主要包括 DNA 的甲基化, 组蛋白的修饰(包括甲基化、乙酰化、磷酸化和泛素化)以及具有调节作用的非编码 RNAs 等^[1]。哺乳动物的神经干细胞具有自我更新的能力, 能通过不对称分裂产生中枢神经系统三类主要的细胞类型: 神经元、星型胶质细胞以及少突胶质细胞, 并能在体外形成“神经球(neurosphere)”或作单层培养^[2], 为研究干细胞分化的外遗传机制提供了很好的模型系统。本文主要对神经干细胞分化的外遗传调控机制的研究进展予以综述。

1 组蛋白乙酰化/去乙酰化对神经干细胞命运的影响

组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase, HAT)介导组蛋白 Lys 残基的乙酰化, 减弱了带正电荷的组蛋白 Lys 尾巴与带负电荷的 DNA 骨架磷酸基团的作用, 使核小体结构松弛, 易于转录激活物的接近, 从而活化基因。相反, 组蛋白去乙酰酶(histone deacetylase, HDAC)催化组蛋白 Lys 残基的去乙酰化, 组蛋白压缩包装与 DNA 形成紧密的核小体结构, 阻止转录因子接近而抑制转录, 导致基因沉默。

1.1 REST/NRSF 介导的 HDACs 转录抑制复合物

HDACs 将细胞染色质水平调控和神经元特异性基因表达联系起来(图 1)。它能与特异性沉默因子组成转录抑制复合物, 已经鉴定的复合物有 mSin3A/B (包括 HDAC1 和 HDAC2) 和核受体共阻抑蛋白(nuclear receptor co-repressor, N-CoR)(包括 HDAC3)^[3,4]。在非神经元细胞中, HDACs 转录抑制复合物与神经元特异性基因启动子结合, 抑制这些基因的表达, 从而维持细胞处于特定的分化状态。这些特异性基因启动子的共同特征是具有一段长约 21~23 bp 的保守 DNA 应答元件, 称为阻抑元件 1/神经元限制性沉默子元件(repressor element-1, RE-1/neuron-restrictive silencer element, NRSE)。RE1/NRSE 的下游基因编码诸如离子通道、突触小泡蛋白以及神经递质受体等神经元特有的蛋白质^[5]。RE1/NRSE 通过与阻抑元件 1 沉默转录因子/神经元

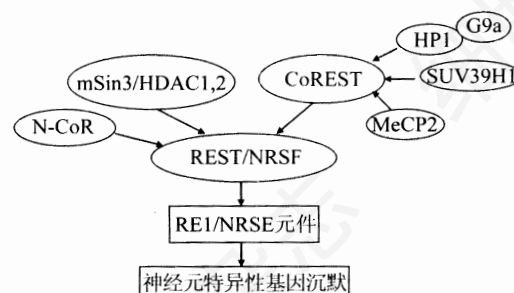


图 1 HDACs 转录抑制复合物作用模式图^[3,4,6-9]

收稿日期: 2005-12-05 接受日期: 2006-04-04

* 通讯作者。Tel: 029-87080092, E-mail: anxbull@yahoo.com.cn

限制性沉默因子(RE-1 silencing transcriptional factor, REST/ neuron-restrictive silencer factor, NRSF)特异性结合, 导致至少 30 个神经元特异性基因在非神经元细胞中的转录抑制^[5, 6]。

REST/NRSF是神经元特异性基因表达的主要调控因子, 分子量大约为 116 kDa, 有 8 个锌指结构域和 2 个阻抑蛋白结合结构域, 其 N 末端阻抑结构域与 HDACs 转录抑制复合物结合, C 末端阻抑结构域与 REST 共阻抑蛋白 (co-repressor of the REST, CoREST) 结合, 通过 SWI3, ADA2, N-CoR 及 TF III B(SANT)结构域为特异性转录抑制物的装配提供平台^[6-8]。CoREST 特异性结合于 REST/NRSF, 作为分子灯塔进一步募集甲基化 CpG 结合蛋白 2 (methyl-CpG binding protein, MeCP2)、组蛋白 Lys 甲基转移酶(suppressor of variegation 39H1, SUV39H1)和异染色质蛋白 1(heterochromatin protein1, HP1), 横跨特定的染色体间隔, 扩展和维持甲基化 CpG 依赖性的基因沉默状态, 其中包含了染色体上一些非 REST/NRSF 结合位点, 产生协同抑制效应, 具有细胞类型和启动子甲基化的特异性^[8]。在非神经元细胞中, REST/NRSF 还可募集组蛋白甲基化酶 G9a, 通过结合 HP1 阻抑 RE1/NRSE 基因表达^[9]。这表明 REST/NRSF 与染色质修饰相关蛋白协同作用, 调控神经元基因的表达。

在基因组中大约有 1 047 个潜在的 REST/NRSF 结合位点。REST/NRSF 调控的靶基因约有 90% 为神经元特异性基因, 这些靶基因大致分为两类: 一类靶基因为 REST/NRSF 介导的 HDAC 依赖性的, 可通过使用 HDAC 的抑制剂制毛癣素 A(trichostatin A, TSA)来活化; 另一类为 REST/NRSF 介导的 HDAC 和 DNA 甲基化依赖性的, 需要 TSA 和 DNA 甲基化抑制剂 5-氮胞嘧啶(5-azacytosine)同时作用来激活。

1.2 HDACs 转录抑制复合物与神经干细胞的分化

组蛋白的乙酰化能促进神经干细胞向神经元分化。一种 HDAC 抑制剂丙戊酸(valproic acid, VPA)能使成体大鼠海马神经前体细胞增殖能力减弱并分化为神经元, 并且在有利于胶质细胞分化的条件下, VPA 能抑制其向星型胶质细胞和少突胶质细胞的分化。进一步分析发现, VPA 能使 HDACs 失活, 不能形成 HDACs 转录抑制复合物, 从而阻止 REST/NRSF 与靶基因的结合, 导致神经元特异性基因表达^[10]。同样, 用 TSA 处理大鼠少突胶质细胞前体

细胞, 则会抑制其胞体在形态学上的分支以及成熟少突胶质细胞标志分子的表达^[11]。提示组蛋白的乙酰化 / 去乙酰化调节神经干细胞的分化: 组蛋白的去乙酰化抑制神经元基因表达, 而 HDACs 为胶质细胞的系谱分化所必须的。

最近研究发现, HDACs 转录抑制复合物通过介导神经元基因染色质的可塑性, 在多能干细胞向神经干细胞以及前体细胞向成熟神经元的转变中起着重要的调节作用^[12]。在从胚胎干细胞转变为前体细胞时, REST/NRSF 降解到足以维持神经元染色质处于非活性状态的水平; 当从前体细胞分化为神经元时, REST/NRSF 及 CoREST 从 RE1 位点解离, 导致神经元基因表达。

2 DNA 甲基化与神经系统发育

DNA 的甲基化是维持基因表达稳定状态的重要因素, 在基因组印记和 X 染色体失活过程中起重要作用。DNA 的甲基化多发生在 CpG 位点的胞嘧啶核苷酸上, 通过胞嘧啶的甲基化介导基因沉默。DNA 的甲基化主要通过两种机制调控基因表达: (1) CpG 位点的甲基化阻止转录因子与靶基因的结合, 导致转录抑制; (2) 甲基化 CpG 结合蛋白(methyl-CpG binding proteins, MBDs)与 CpG 位点结合, 进一步募集 HDACs 形成转录抑制复合物, 导致染色质处于转录抑制状态^[1, 13]。

2.1 MBDs 参与神经系统发育

MBDs 家族包括: MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 和 MeCP2。X 染色体 MeCP2 突变导致严重的神经紊乱性疾病 Rett 综合征^[14], 有关 MeCP2 突变的数据库信息量也很快增加起来^[15]。MeCP2 在神经元中含量丰富, 小鼠妊娠中期大量的 MeCP2 结合于 S100 β (一种可溶性钙离子结合蛋白, 是未成熟的星型胶质细胞标志分子)启动子, 导致 S100 β 基因在一定发育阶段内沉默, 但其甲基化程度随着发育逐渐降低, 致使 S100 β 基因活化, 这表明组织特异性启动子的甲基化在大脑发育过程中对神经上皮细胞/神经干细胞命运决定的调节起重要作用^[16]。重新甲基化的 DNA 甲基化转移酶 3a、3b 以及维持甲基化的 DNA 甲基化转移酶 1(DNA methyltransferase1, Dnmt1)均在神经元中表达, 对神经元的功能十分必要。Dnmt1 在小鼠胚胎发生时以及出生后的中枢神经系统中表达丰富, 如果在胚胎发育第 9~12 天或有丝分裂后的神经元中剔除 Dnmt1 基因, 突变的大脑前

体细胞就会产生甲基化不足的子代细胞, 携带 95% 该细胞的突变小鼠在出生不久后即死亡^[17]。

MBD1 与其他的 MBDs 仅在 CpG 结合结构域上存在同源性。MBD1 集中于着丝粒区域 DNA 高度甲基化的异染色质位点, 特异地结合于甲基化的启动子, 通过其反式阻抑结构域实现转录抑制^[18], 在成体动物的神经发生中有重要作用^[19]。MBD1^{-/-} 突变小鼠表现神经发生作用减弱、空间学习识别能力下降以及海马齿状回的长时程增强(long-term potentiation, LTP)效应减弱。MBD1^{-/-} 神经干细胞比野生型产生较少的神经元, 同时染色体的非整倍性程度增加以及 IAP(intracisternal A particle)表达上调。

2.2 DNA 甲基化调节神经干细胞对胞外信号的反应

DNA 的甲基化状态对于调节神经干细胞对胞外信号的反应性具有重要影响^[20]。当小鼠 E(embryonic day)11.5 和 E14.5 的神经上皮细胞用白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)处理后, 激活了细胞的信号转导及转录活化蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3), 通过 JAK/STAT 途径将信号传递到细胞核内。E14.5 神经上皮细胞中活化的 STAT3 与胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)启动子序列结合, 激活 GFAP 基因表达, 神经上皮细胞分化为星型胶质细胞; 而在 E11.5 神经上皮细胞中, GFAP 启动子甲基化的胞嘧啶阻止 STAT3 与其识别元件结合, 导致 E11.5 神经上皮细胞不能分化为星型胶质细胞^[21]。

3 非编码 RNAs 在神经干细胞分化中的调节作用

非编码 RNAs 在哺乳动物的 X 染色体失活、基因组印记、植物的转录后基因沉默以及线虫发育的时序调控方面发挥着重要作用^[22,23]。而且最近研究发现, 微小 RNA(miRNA)以及一些双链 RNA(double-strand RNA, dsRNA)参与了神经系统发育分化的复合调控网络。

3.1 miRNA 参与神经系统的发育分化

哺乳动物中成熟的 miRNA 长约 20~22 bp, 是由原初转录物(pri-miRNA)经过 RNase III 家族的核酸酶加工而来。miRNA 的一条链参与形成 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)或 miRNA 核糖体核蛋白复合物(miRNA ribonucleoprotein complex, miRNP), 指导 miRNA 与靶序列

结合, 使靶 mRNAs 裂解或抑制其翻译, 即 RNA 干扰^[24~26], 在转录后水平调节基因表达。

miRNA 通过双负反馈途径主动调控自身基因表达, 在调节细胞分化和维持特定细胞状态中具有重要作用。两个 miRNAs 分子和它们的转录因子靶位点相互作用, 形成双负反馈环, 使终末分化的神经元细胞状态保持稳定性和不可逆性^[27]。斑马鱼用母体-合子(maternal-zygotic dicer, Mzdicer)突变体来破坏 Dicer RNase III 和 dsRNA 的结合结构域, 从而阻止 miRNA 的形成。MZdicer 突变体呈现正常的体轴行成并能分化为多种细胞类型, 但大脑形态发生表现异常^[26]。小鼠大脑中 miRNA 的表达有一短暂的波动, 并发现一些调节大脑发育时序性的 miRNA, 它们与线虫中 *lin-4* 和 *let-7* miRNA 的作用类似^[28]。此外, 已在多种生物神经元类型的细胞中发现 miRNA, 说明 miRNA 为大脑形态发生所必须, 并有可能参与动物神经系统发育和分化的调节^[29]。

3.2 dsRNA 介导的 RE1/NRSE 基因活化

通常认为大多数非编码 RNAs 主要介导基因沉默, 然而最近发现某些非编码 RNAs 能激活基因的表达。Kuwabara 等^[30]研究表明包含 NRSE 序列的非编码 RNA 构成长约 20 bp 的 dsRNA, 即 NRSE dsRNA, 它在神经发生的早期阶段激活 RE1/NRSE 基因的表达。NRSE dsRNA 通过调节 RE1/NRSE DNA 和 REST/NRSF 的相互作用使神经元基因从抑制状态变为活化状态, 诱导多能神经干细胞向终末神经元分化, 起到内源诱导物的作用。NRSE dsRNA 的基因激活效应明显不同于细胞内 miRNA/siRNA (short interfering RNA)介导的基因沉默, 揭示了非编码 RNAs 在基因表达调控中的新功能。这类新发现的小的具有调节作用的 dsRNA 被称作 smRNAs (small modulatory RNAs), 进一步说明了非编码 RNAs 在调节神经干细胞的分化以及神经发生中所起的重要作用^[31]。

4 展望

研究神经干细胞的外遗传调节机制, 可从以下方面入手:

(1)从 HDACs 参与的 REST/NRSF 复合物介导的基因沉默出发, 找出在中枢神经系统发育中调节神经元基因表达的转录抑制物和激活物, 从整体上理解神经发生过程中神经元基因染色质修饰的动态变化过程;

(2)鉴于在人类胚胎干细胞中主要转录调节回路的发现^[32],可以对 REST/NRSF 的靶基因进行基因组定位分析(genome-scale location analysis),有望阐明神经干细胞的转录调节回路;

(3) miRNA 途径调控着干细胞的分裂增殖^[33],可利用微阵技术找出调控中枢神经系统发育时序性的关键 miRNA,完善神经干细胞发育分化的复合网络。

神经干细胞生长和分化的外遗传调节研究可以帮助人们澄清干细胞的可塑性是实验操作的结果还是在体内环境中的真正特性,促进干细胞的临床应用。利用 NRSE dsRNA 介导的 NRSE/RE 基因活化途径,可以设计 dsRNAs 药物,诱导内源的成体神经干细胞分化为神经元,从而为治疗阿尔茨海默病等中枢神经系统退行性疾病提供一条新的途径。在细胞移植治疗中,为了防止移植的神经干细胞分化为胶质细胞,通过 DNA 的甲基化途径可以很好解决这个问题。虽然在研究神经干细胞的生长和分化机制方面尚存在诸多谜团,但随着基因表达调控机制研究的逐步深入,将促进神经干细胞的临床应用,更好地为人类造福。

参考文献 (References)

- [1] Jaenisch R *et al. Nat Genet*, 2003, **33** (Suppl): 245
- [2] Gage FH. *Science*, 2000, **287**: 1433
- [3] Hassig CA *et al. Cell*, 1997, **89**: 341
- [4] Guenther MG *et al. Genes Dev*, 2000, **14**: 1048
- [5] Schoenherr CJ *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 9881
- [6] You A *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 1454
- [7] Hakimi MA *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 7420
- [8] Lunyak VV *et al. Science*, 2002, **298**: 1747
- [9] Roopra A *et al. Mol Cell*, 2004, **14**: 727
- [10] Heish J *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 16659
- [11] Marin-Husstege M *et al. J Neurosci*, 2002, **22**: 10333
- [12] Ballas N *et al. Cell*, 2005, **121**: 645
- [13] Bird A. *Genes Dev*, 2002, **16**: 6
- [14] Amir RE *et al. Nat Genet*, 1999, **23**: 185
- [15] Van den Veyver IB *et al. Curr Opin Genet Dev*, 2000, **10**: 275
- [16] Namihira M *et al. FEBS Lett*, 2004, **572**: 184
- [17] Fan G *et al. J Neurosci*, 2001, **21**: 788
- [18] Ohki I *et al. Cell*, 2001, **105**: 487
- [19] Zhao X *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 6777
- [20] Fukuda S *et al. Anat Sci Int*. 2005, **80**: 12
- [21] Takizawa T *et al. Dev Cell*, 2001, **1**: 749
- [22] Grewal SI *et al. Science*, 2003, **301**: 798
- [23] Mello CC *et al. Nature*, 2004, **431**: 338
- [24] Bartel DP. *Cell*, 2004, **116**: 281
- [25] Melster G *et al. Nature*, 2004, **431**: 343
- [26] Giraldez AJ *et al. Science*, 2005, **308**: 833
- [27] Johnston RJ *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 12449
- [28] Miska EA *et al. Genome Biol*, 2004, **5**: R68
- [29] Pasquinelli AE *et al. Curr Opin Genet Dev*, 2005, **15**: 200
- [30] Kuwabara T *et al. Cell*, 2004, **116**: 779
- [31] Kuwabara T *et al. Nucleic Acids Symp Ser*. 2005, **49**: 87
- [32] Boyer LA *et al. Cell*, 2005, **122**: 947
- [33] Hatfield SD H *et al. Nature*, 2005, **435**: 974

Epigenetic Regulation of Neural Stem Cell Fate

Ming-Tao Zhao, Zhi-Xing An*, Feng-Jun Liu, Yong Zhang*

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract Currently it is the focus of neural developmental biology to unravel the regulation of neurogenesis and differentiation mechanisms of neural stem cells, which have broad prospect in understanding the principle of the plasticity of stem cells and clinical therapy for neurodegenerative diseases. Recent studies have showed that epigenetic regulation plays an important role in the control of neural stem cell growth and differentiation. These epigenetic controls include the effects of histone acetylation/deacetylation, DNA methylation and noncoding RNAs on cell fate specification.

Key words histone acetylation/deacetylation; DNA methylation; miRNA; neural stem cell

Received: December 5, 2005 Accepted: April 4, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-21-87080092, E-mail: anxbull@yahoo.com.cn