

Shh 在指发育过程中的作用及其表达的调节

谭海民 赵鲁杭*

(浙江大学医学院生物化学与遗传学系, 杭州 310058)

摘要 人的肢芽发育过程是一种图式发育过程, Shh 作为极性活化区的一个重要形态发生蛋白质, 在肢芽发育过程中起着关键性作用。大量实验证据表明, Shh 的胆固醇修饰可影响 Shh 的扩散进而调节第二指的发生, Shh 表达后不经扩散直接作用于 3~5 指调节其发生, Shh 不会在第一指发生的位置出现。Shh 和其它蛋白质(包括 Gli 蛋白质家族, FGF 蛋白质家族, Gremlin 骨来蛋白等)相互作用, 共同调节指的发生。该过程中, 蛋白质相互作用可形成 FGF/Shh 正反馈回路和 FGF/Gremlin 负反馈回路。

关键词 Shh; 指(趾); 图式发育

在脊椎动物胚胎发育过程中, 有三个信号中心: 极性活化区(the zone of polarizing activity, ZPA)、无脊外胚层活动区(progress zone, PZ)和顶端外胚层脊(apical ectodermal ridge, AER)。这三个信号中心可产生多种细胞因子, 肢芽的发育就是这一系列细胞因子相互作用的结果。肢芽发育时产生三个方向的主要的轴线: 前后轴, 远近轴, 背腹轴; 前后轴的方向也就是第一指到第五指的方向, 在肢芽还未发育时, 前后轴的极性已经建立, 本文将重点介绍形态发生蛋白 Shh 在前后轴产生极性以调节指的发生方面的作用。

Saunders 等^[1]将鸡的肢芽后部组织 ZPA 的细胞移到另一肢芽前部的 AER, 鸡由原本正常的 2, 3, 4 趾(指)变成了 4, 3, 2, 2, 3, 4 镜像复制现象的趾, 镜像复制现象是一种特殊的多趾现象, 这表明在肢芽后部的 ZPA 提供的某些物质有位置信息的作用, 它可以调节趾的发生。Saunders 将这种具有位置信息的物质称为形态发生素, 并认为形态发生素可以扩散到邻近的组织, 形成一个浓度梯度, 肢芽不同位置的细胞可暴露在不同浓度的形态发生素中, 靠近肢芽后部极性区域细胞暴露在较高浓度的形态发生素中, 靠近肢芽前部的细胞暴露在较低浓度的形态发生素中。因此, 形态发生素的扩散可以沿着前后轴提供位置信息, 它的扩散使鸡 3 个趾位置固定。

1993 年, Riddle 等^[2]在研究过程中发现 Shh 蛋白精确表达在 ZPA 的细胞里, 从肢芽后部到前部 Shh 相对浓度逐步减少, 将 ZPA 表达 Shh 的细胞移到肢芽前部, 可以产生同移植整个 ZPA 一样的镜像复制现象, 产生多指, 表明 Shh 可以影响指的发生, Shh 成为研

究指发育的一个焦点蛋白。

1 Shh 基因及其表达产物 Shh 蛋白

80 年代初, *hh*(hedgehog)基因最早在果蝇属中发现, 果蝇属中, *hh* 基因调节节段和器官芽的图式发育。90 年代早期, 在哺乳类动物中发现 3 个 *hh* 基因, 它们是 Desert hedgehog (*Dhh*), Indian hedgehog (*Ihh*) 和 Sonic hedgehog (*Shh*)。在胚胎发育过程中, 它们都编码分泌蛋白质^[3], *Dhh* 不在肢芽中表达, 它和男性生殖系统发育有关, *Ihh* 决定软骨的发育, *Shh* 是一种与极性活化密切相关的形态发生素, 在肢体前后轴的形成中起着重要作用。此外, *Shh* 作为一个细胞分裂素存在, 在肢芽发育阶段 *Shh* 完全缺失可导致肢芽间充质细胞的显著凋亡^[4]。*Shh* 蛋白是一种相对分子量为 45kDa 的分泌型蛋白质, 在脊索、背神经管底板、大脑、肠和肢芽的 ZPA 表达, 主要参与 SHH-PTCH-GLI 信号通路。这个信号通路中细胞膜跨膜蛋白 *Ptch* 是 *Shh* 的受体, 细胞膜跨膜蛋白 *Smo* 有 7 个跨膜区, *Gli* 为 *Smo* 下游分子, 信号通路的活动规律为: *Shh* 缺乏时, *Ptch* 与 *Smo* 结合, *Smo* 和 *Gli* 的活性被抑制, *Gli* 呈转录抑制模式; *Shh* 存在时, *Ptch* 与 *Shh* 结合, *Smo* 与 *Ptch* 分离并被激活, 激活的 *Smo* 通过降低细胞内 cAMP 的浓度而下调 cAMP 依赖性 PKA, *Gli* 基因从阻扼状态变为激活状态, 进而表达蛋白^[5]。在参与这个信号通路前, *Shh* 先通过蛋白质的

收稿日期: 2009-07-16 接受日期: 2010-05-28

国家自然科学基金(No.30671162)资助项目

* 通讯作者。Tel:0571-88208237, E-mail:zhaoluhang@263.net

自我催化剪切,形成相对分子量为 19kDa 的 N 端结构域(N-Shh_p, p=protein)和相对分子量为 25kDa 的 C 端结构域, N 端结构域与胆固醇共价结合形成复合物,这个复合物可与膜上的受体结合,有利于 N-Shh_p 转运到细胞外, C 端结构域具有分子内胆固醇转移酶活性。

2 Shh 调节指发育的三个认识阶段

动物胚胎发育实验已证实, Shh 作为一种重要的形态发生素在指的正常发育过程中有不可替代的作用, 肢芽前后轴的 Shh 表达异常就会引起指的发育异常, 对于 Shh 是怎样影响指的发育这一问题大致分为以下三个认识阶段。

2.1 Shh 的扩散影响指的发育

Shh 的胆固醇修饰对于 Shh 的扩散及发挥作用有重要的影响^[6], Shh^{+/+} 型小鼠 E9.5(embryonic day, E) 时, Shh 转录物首先在肢芽后部间充质细胞有较低的表达; 随后, Shh 转录物的表达增加并扩散到较远部位, E11.5 时观察到 Shh 转录物的浓度下降。与 Shh 转录物的表达相对应, E9.75~E12 时, Shh 蛋白在肢芽后部相应部位表达。Lewis 等^[7]利用靶基因技术在小鼠的胚胎干细胞的 *shh* 上插入一个终止密码子, 得到的重组基因可以产生一个较短的 Shh 蛋白(N-Shh), N-Shh 翻译在 Shh 多肽的 198 位氨基酸处终止, N-Shh 和野生型小鼠 Shh 蛋白酶解产生的蛋白(N-Shh_p) 不同之处在于缺乏胆固醇的修饰位点而无法进行胆固醇的修饰。具有 N-Shh 基因的小鼠与 +/Shhⁿ(n=null) 杂合子的小鼠杂交可得到同时具有两种突变基因的小鼠(N-Shh/Shhⁿ)。E10.5~E10.75 时, 用原位杂交方法检测到 N-Shh/Shhⁿ 型小鼠胚胎中 N-Shh 转录物在肢芽后部的表达下调。E10.75 时, 用整胚免疫组化方法检测到 N-Shh/Shhⁿ 型小鼠胚胎中 N-Shh 蛋白在肢芽后部只有较低的表达, 表达的范围比 +/Shhⁿ 型小鼠中 Shh 表达的范围要小, E18.5 时, 阿辛蓝-茜素红染色检测到 N-Shh/Shhⁿ 型小鼠第 2 指缺失, +/Shhⁿ 型小鼠指发育正常, 这表明胆固醇的修饰对于 Shh 信号的正常表达和指的正常发育非常重要, N-Shh/Shhⁿ 型小鼠中 N-Shh 蛋白缺乏胆固醇的修饰, 蛋白质的空间表达范围变小。产生这种结果可能是因为 N-Shh_p 可以与胆固醇共价结合, 增强了其脂溶性, 有利于蛋白质结合在细胞膜上跨膜转运到远处, 而 N-Shh 没有胆固醇的修饰缺乏跨膜转运, 表达范围较小。

上述小鼠的突变实验说明蛋白质的胆固醇修饰显著影响着 Shh 的扩散, 支持了 Wolpert 形态发生素

假说^[8], Wolpert 形态发生素假说认为 ZPA 区域的细胞产生形态发生素, 它的扩散建立了一个空间梯度, 这个空间梯度的高浓度在肢芽的后部, 低浓度在肢芽前部, 细胞的发育就是由这一形态发生素的空间浓度梯度决定的。

2.2 Shh 表达时间的长短和 Shh 扩散联合影响指的发育

在小鼠肢芽的发育过程中缺失 Shh 信号, 会导致尺骨及第 2~5 指的消失等严重畸形, 而第 1 指的发育不受影响^[9]。Harfe 等^[10]解释了这一现象, 通过靶基因技术, 将编码绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)和 CRE 重组酶的基因插到 *shh* 基因起始密码子 ATG 位置, 形成 *Shhgfpcr* 基因, 得到的小鼠在表达 Shh 的细胞中也会表达 *gfp* 和 *cre* 基因调节产生的 β-半乳糖苷酶, E10~E12 时, 观察 GFP 和 β-半乳糖苷酶的表达位置即可定位 Shh 表达细胞的位置。通过这种重组小鼠他们发现了 Shh 表达细胞的去处: 肢芽发育早期, 第 4 和第 5 指的原基(先祖细胞)在 Shh 表达细胞构成的区域里, Shh 表达细胞后裔分布在轴后两指(第 4, 5 指)的所有细胞中; 较晚阶段, 只有第 5 指的原基仍表达 Shh, 第 4 指的原基不再表达 Shh, 这两指的细胞暴露在 Shh 中的时间不同。第 3 指只有部分细胞表达 Shh, Shh 表达时间也比第 4 指的要短。Shh 表达细胞后裔并没有分布在整个第 3 指上, 说明第 3 指不完全依赖 Shh 表达细胞后裔, 除了 Shh 表达细胞后裔, 可能还需要扩散的 Shh。E10.5 时, 对比整胚免疫组化检测得到的 Shh 蛋白分布区域和 β-半乳糖苷酶染色检测得到的 Shh 表达细胞后裔区域, 前者比后者大, 也支持了这一点。第二指在 Shh^{+/+} 型突变小鼠中完全消失, 由于它没有 Shh 表达细胞后裔, 因此, 第二指的分化完全依赖 Shh 的扩散。至此, 各指的分化模型可能为: 第 1 指的发育不需要 Shh, 第 2 指的发育依赖扩散的 Shh, 第三指的发育依赖短时间的 Shh 表达和扩散的 Shh, 第 4、5 指的发育依赖不同时间的 Shh 表达。Harfe 等人的实验表明细胞暴露在 Shh 中的累积时间决定了 3~5 指的分化, 这完善了 Wolpert 的空间梯度模型。以前认为 Shh 活动梯度的建立是单纯通过扩散或转运, Harfe 的实验对此提出了质疑, 由于第一指不受 Shh 调节, 因此可能只有第 2 指受扩散的 Shh 调节。

2.3 各指 Shh 阈值影响指的发育

Zhu 等^[11]人的实验发现 Shh 在肢芽发育过程中有两方面的作用, 在肢芽发育的较早阶段可以调节指

的分化;在肢芽发育的较晚阶段可以通过保持细胞的数目继续调节指的生长。小鼠胚胎中注射它莫昔芬(tamoxifen)5~6h后,Shh转录物消失,注射它莫昔芬12h后Shh的功能消失。在小鼠胚胎E9.5~E11时注射它莫昔芬,然后分析指的性状,发现注射时间越早,指的性状改变越大(更多的指消失了)。令人惊奇的是,指的形态发育却是正常的,即使只存在2~3个指,关节的数量都会保持正常,并且发现前后肢指的消失顺序是一样的:第3指首先消失,第5指其次,第2指第三,第4指最后消失。根据“最后产生,最先消失”这一自然界普遍存在的规则,各指的出现顺序或者说各指对Shh的依赖性从小到大的顺序应该是:第4指,第2指,第5指,第3指。目前,Shh在前后轴图式发育中的作用有空间梯度和时间两种模型解释^[12,13],这个消失顺序用目前存在的空间梯度或时间模型都不能解释。Tabin等^[14]认为各指分化发育所需的Shh阈值不同导致了这一现象,即虽然在肢芽发育时Shh表达有空间和时间上的差异,调整着2~5指的发育,但2~5指各指分化发育所需的Shh阈值不一样,Shh阈值并不是从后部(第5指)到前部(第2指)依次变小,而是第3指阈值相对其位置的Shh浓度较高,第4指阈值相对其位置的Shh浓度较低。因此,注射它莫昔芬后,Shh转录物消失,第3指位置Shh浓度最先低于阈值,消失最早。

在小鸡中,只有3趾,相当于小鼠的中间3趾。鸡HH20(hamburger hamilton, HH)期,用环巴明(cyclopamine)使Shh功能丧失,第3、4趾融合,或者第4趾的发育消失;不阻断Shh的功能,只用脱乙酰基酶抑制剂曲古抑菌素A(TSA)抑制趾原基生长所依赖的Shh表达细胞增殖,前部趾的分化最先消失。这可以用Shh信号在趾的发育过程中有双重作用来解释,即Shh控制着趾原基的增殖和分化。当Shh功能丧失时,趾原基的增殖和分化都受到破坏,首先缺失肢芽后部组织;只抑制Shh表达细胞的增殖,Shh对后部组织的独立分化作用仍可继续,前部趾的发育最先消失,这一实验同时说明了Shh在增殖着的细胞中有分化趾的作用^[15]。

2.4 人的轴前多指(PPD)研究情况

人的轴前多指(趾)(Preaxial polydactyly, PPD)是一种常见的先天性肢体畸形遗传病,表现为发生在肢体桡(胫)侧的多余指(趾)。轴前多指(PPD)家系大多为常染色体显性遗传,通过对几个PPD大家系的研究,PPD相关基因的位点被定位在染色体7q36上^[16],其中的LMBR1是目前PPD相关位点研究的焦点基

因,它包含17个外显子,在基因组上跨度约200kb,通常编码一种由490个氨基酸组成的蛋白(LMBR1)。后来的研究表明LMBR1内含子5上的ZPA调控序列(ZPA regulation sequence, ZRS)在调控指发育中的作用尤为关键,Lettice等先后在荷兰、比利时、古巴^[17]共7个PPD家系中发现6个不同的单基因突变位点,全部位于ZRS内长约800bp的保守序列中。ZRS传递肢芽早期发育信号,启动并促使Shh的表达,遗传顺反实验证明,正是Shh的远距离调控元件ZRS的破坏导致了轴前多指的发生^[18]。而在以中国人为代表的黄种人PPD家系中尚未寻找到致病的序列改变,我们的研究也发现在ZRS序列的保守区段内有一G/C单核苷酸多态性位点,但排除了与疾病相关的可能。这提示轴前多指(趾)的成因相当复杂,可能具有遗传异质性。

3 Shh相关蛋白质

指的发育需要Shh的诱导,在这个过程中,Gli3、Hand2(dHand)、Hox和Fgf等蛋白质也参与其中^[19]。

3.1 Gli3

Gli蛋白家族有3个成员:Gli1、Gli2和Gli3,这3者在人和小鼠发育过程中都会出现^[20]。在Gli1^{-/-}/Gli2^{-/-}双突变小鼠中,五指的形态发育良好,说明Gli1和Gli2对于指的形态发育不是必需的,和指的发育关系不大^[21]。而Gli3^{-/-}突变小鼠中有严重的多指现象,说明Gli3在指的发育中起着重要的作用^[22]。当Shh缺失时,Gli3^{-/-}突变小鼠指的性状并不会改变^[23],这和脊髓有很大的不同,Shh^{-/-}/Gli3^{-/-}双突变小鼠脊髓发育不全比Gli3^{-/-}单突变时要严重得多^[24]。除了调节指的发育,Gli3也调节手掌的尺寸,小鼠胚胎E12时,在Gli3^{-/-}突变小鼠中出现增大的手掌^[25]。

完整的Gli3蛋白(Gli-190)是一个转录激活物(Gli3A),通过蛋白酶解加工它可以变成较短的N-末端片段(Gli-83),这是一个转录抑制物(Gli3R)^[26]。Gli3R在指的发育中起着重要作用,野生型小鼠肢芽中,第5指到第2指Shh浓度依次减弱,第1指无Shh;Gli3R浓度从第1指到第4指依次减弱,这样,从第1指到第5指Shh和Gli3R形成两个相反的梯度浓度。在Gli2^{-/-}突变小鼠中,Shh浓度明显减弱,特别是第5指,但Gli3R的浓度不受影响,5指发育正常,说明Gli2可调节Shh的表达。在Gli3^{-/-}突变小鼠中,第1指到第5指无Gli3R,与野生型小鼠相比第5指到第2指的Shh浓度较弱,但第1指的位置出现了Shh,这种突

变小鼠会产生多指,并且各指的形状和第5指相似。*Gli2^{-/-}*和*Gli3^{-/-}*突变小鼠表明Shh梯度浓度并不是影响指发育的决定因素,Shh与Gli3R的相对浓度对指的正常发育才至关重要,它们联合作用控制着指的发育,即肢芽的前部区域由于较高浓度的Gli3R同时缺乏从ZPA区域来的Shh从而发育成第1指;后部区域发育成第5指是因为缺乏Gli3R并且存在高浓度的Shh;居中的2,3,4指分化发育是由于有梯度浓度Shh同时有相反梯度浓度Gli3R^[27]。

3.2 dHand

E7.5时,dHand在胚胎中开始有表达,此后持续表达至E12.5,表达的时间跨度比Shh大(E9.75~E12)。E9.5时,dHand在后肢后部表达,此时无Shh表达;E9.75时,dHand在后肢后部表达量增大,Shh在后肢后部有微弱表达;E10.25时,dHand和Shh两者在后肢后部都有较强表达;E10.75时,dHand在后肢后部表达范围比Shh表达范围大,覆盖了Shh的表达范围;E12时,dHand在后肢后部持续表达,此时无Shh表达。在*dHand^{-/-}*突变小鼠中肢芽无Shh的表达,dHand异位表达在肢芽前部,导致Shh也异位表达在肢芽前部,产生多指现象,这些结果说明dHand是Shh表达的一个上游激活物^[28]。虽然Shh是dHand调控的下游基因,诱导Shh的表达并不需要dHand直接结合在Shh上,dHand是通过蛋白质-蛋白质-DNA结合间接调控Shh的表达^[29]。

3.3 Hox

Hox蛋白对肢芽极性的建立也起着重要作用。在Hox蛋白中,特别是*hoxA*和*hoxD*基因簇表达的蛋白质,在肢芽发育过程中发挥着重要的作用^[30]。*hoxA/hoxD*联合突变小鼠的肢芽性状和Shh缺失时一样,只有第一指发育^[31]。

3.4 Tbx2和Tbx3

Tbx2和Tbx3也调节Shh的表达,Tbx2和Tbx3都可在肢芽后部表达,小鼠中的实验发现缺失Tbx3可导致Shh下调,Tbx3的作用可能是有利于Shh在肢芽后部表达。小鸡中Tbx2的功能和小鼠中Tbx3的作用是类似的,从小鸡中Tbx2的表达推测它可能参与了Shh在小鸡肢芽后部的表达^[32]。

4 Shh及其相关蛋白质形成的回路

Shh及其相关蛋白质相互作用,相互影响,形成了复杂的信息回路,其中,FGF/Shh正反馈回路和FGF/Gremlin负反馈回路两个回路已被许多实验所证

实。

4.1 Fgf/Shh 正反馈回路

研究发现,FGF/Shh正反馈回路是调节肢芽发育的一个重要通路。一旦Shh表达启动后,来自AER的信号如成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)可以通过FGF/Shh正反馈回路维持Shh的表达^[33]。信号从AER到ZPA通过FGF发挥作用,这对Shh的正常表达是必需的;反过来,Shh又可维持FGF的正常表达。在*Shh^{-/-}*突变小鼠中,FGF4和FGF8的表达都减少^[34];而在肢芽前部异位表达的Shh则可使FGF4和FGF8的表达增加。另一方面,FGF4和FGF8双突变的小鼠在肢的形状、大小等各方面的发育都会出现异常,在这种突变小鼠中,检测不到Shh。Gremlin是骨形成蛋白质(bone morphogenetic protein, Bmp)的拮抗剂,它是调节FGF/Shh回路的一个重要组分,在肢芽前部可以阻止FGF下调^[35],在缺少Gremlin表达的肢芽中,Shh表达过早消失,严重影响后部指的分化^[36]。Gremlin的作用可能是通过下调Bmp间接维持FGF4的表达进而维持Shh的表达,这样就形成了一个正反馈系统,调节着指的发育和肢芽的大小^[37]。

Gremlin表达细胞毗邻Shh表达细胞及其后裔组成的ZPA区域,向外不断增殖的Shh表达细胞后裔不表达Gremlin,只分泌Shh诱导临近的间充质细胞表达Gremlin,E11.75时,远离ZPA区域的Shh表达细胞后裔不表达Shh蛋白,这样,在ZPA区Shh表达细胞和Gremlin表达细胞间形成了一个细胞屏障,使Gremlin表达细胞位于Shh信号范围以外。缺乏Shh的诱导后,细胞不再表达Gremlin,FGF4等细胞因子下调,Shh蛋白表达也下降,调节肢芽发育的AER和ZPA两个信号中心终止活动,这两个信号中心终止活动是依赖增殖后的细胞屏障这一物理障碍而不是依赖常见的分子级联反应的终止^[38]。FGF/Shh正反馈回路各信号分子关系如图1A。

4.2 FGF/Gremlin 负反馈回路

Verheijden等^[39]发现,除了FGF/Shh正反馈回路,机体中还存在FGF/Gremlin负反馈回路,从而更好地调节肢芽的发育。在小鼠肢芽中,FGF4的表达首先终止,然后是Shh,最后是Gremlin,FGF4表达的终止使FGF/Shh正反馈回路不再发挥作用。在Shh突变小鼠的肢芽中FGF4的表达量明显减少;在FGF8突变小鼠的肢芽中FGF4表达量增加;而在FGF8/Shh双突变小鼠中,FGF4的表达扩大到整个AER区域,这

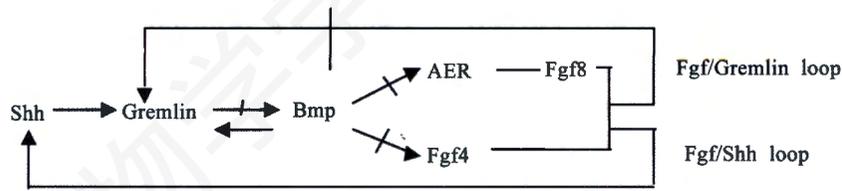


Fig. 1A The positive loop and the inhibitory loop

" \rightarrow "-shaped lines indicate inhibition, whereas arrows indicate activation^[39].

种双突变小鼠 FGF4 表达量比 FGF8 单突变小鼠的 FGF4 表达量大,说明 FGF8 抑制 FGF4 的表达要通过下游的 Shh。FGFr1/r2(FGF receptor, FGFR)双突变小鼠中,在 FGFR 失活细胞中 FGF 信号受到严重影响,肢芽的大小、形状及细胞生长却是正常的,在这种突变小鼠中, Gremlin 异位表达在失活的 FGFR 区域,说明 AER 区的 FGF 信号对于抑制 Gremlin 的表达是必需的。FGF 信号强度改变时, Gremlin 的表达也随之改变: E10 时, FGF 信号较弱, Gremlin 能表达在有 FGF 信号的区域, E10.75 时,随着 FGF 信号增强, FGF 区域的 Gremlin 表达明显减弱,两者的表达边界几乎可重合,表现为明显的抑制关系。可能 FGF 信号强度较小时不抑制 Gremlin 的表达, FGF 信号强度较大时抑制 Gremlin 表达。据此,形成了图 1B 的 FGF/Gremlin 负反馈回路模型。在图 1B 的第一阶段只存

在 FGF/Shh 正反馈促进作用,在第二阶段存在 FGF/Gremlin 负反馈抑制作用。野生型小鼠中,第一阶段为 E9.5~E10.5,在这一阶段 AER 区的 FGF 因浓度太低而不能有效抑制 Gremlin 的表达,却可以通过 Shh 促进 Gremlin 的表达,结果 Gremlin 在临近 AER 的远端间充质表达并有效促进 FGF 的表达。当 FGF 信号增强到能够有效抑制 Gremlin 时过渡到第二阶段,第二阶段相当于小鼠的 E10.5~E12,此时触发了 FGF/Gremlin 负反馈,这种抑制作用使肢芽在 Gremlin 表达细胞和 AER 区间建立了一个 Gremlin 空白区,随着胚胎生长, Gremlin 空白区会不断扩大。第二阶段末,扩大的 Gremlin 空白区超过了 Shh 所能扩散的最大距离,导致 FGF、Shh 和 Gremlin 不能相互维持,调控终止。

最近的研究表明, Etv4/5 作为 FGF 的转录激活因

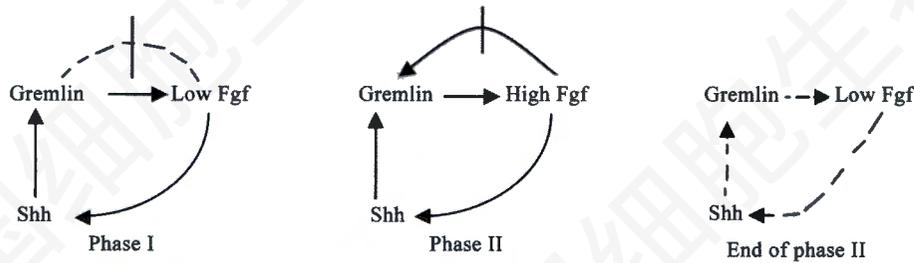


Fig. 1B Model describing a self-promoting and self-terminating mechanism to control limb-bud outgrowth signals

The two loops are first to promote(phase I) and then terminate (phase II) signals. Dashed lines represent diminishing regulation, the dashed line with the vertical through it emphasizes absence of regulation, " \rightarrow "-shaped lines indicate inhibition, arrows indicate activation^[39].

子,敲除 Etv4/5 基因导致 Shh 异位表达在小鼠肢芽前部,使小鼠产生 PPD 的骨生长现象。因此, FGF 在肢芽发育中的作用不仅仅是维持 Shh 在肢芽后部的表达,而且通过抑制 Shh 在肢芽前部的表达来维持骨的正常发育^[40,41]。我们认为,和 Shh 相关的其它蛋白质(Gli, Grem 等)也有类似的作用:在肢芽后部促进 Shh 表达的同时,在肢芽前部可抑制 Shh 的表达,从而保持肢芽的极性发育。这也提示我们,肢芽发育的调控是一个非常复杂的过程,有许多目前被忽视的

基因、蛋白质也许在其中发挥着关键作用。

5 其他

Shh 对指生长的各个方面都起着调节作用。Ahm 等^[27]的实验首先证实,来自 ZPA 的 Shh 在指的发育过程中可调节肢芽后部的间充质细胞发育成骨、肌肉和皮肤。各指都是由相同类型的细胞组成,但可以通过关节的数目和长度进行区分。FGF8 细胞因子表达时间延长可以形成额外的关节,说明 FGF8 在关

节的发育中起着重要的作用^[42], 而 Shh 可调节 FGF8 的表达, 间接说明 Shh 参与了关节的形成。指线 (digital ray, DR) 是指的末端未分节段牙基, 由软骨趾原基、间充质、部分 AER 细胞组成。PFR (Phalanx-Forming Region, PFR) 是指线的远端部分, AER 区域下的远端间充质细胞参与了 PFR 的组成, PFR 区域的细胞和软骨发生有关, 这些细胞最初不稳定, 当和指原基的软骨细胞生长混合到一起时变得稳定, 有利于软骨生长。各指 PFR 细胞的聚集需要的 Bmp 信号浓度不同, 即 Bmp 信号强度不同, 形成不同的软骨, 而 Bmp 是通过 Shh 调节发挥作用的, 间接说明了软骨的发育也和 Shh 有关^[43]。

6 小结与展望

综上所述, Shh 蛋白在指的发育过程中起着重要的调控作用, Shh 表达异常会引起指的异常发育, Shh 及 Gli 等构成的信息网络调节着指发育的各个方面。对 Shh 及其相关蛋白的研究不仅可以进一步了解这个信号网络中各蛋白质之间的关系, 还是对胚胎发育的重要探索, 对于我们深入了解多指现象具有启发性的意义。

参考文献(References)

- Saunders JW, Gasseling MT. Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. In *Epithelial-Mesenchymal Interactions*, Fleischmeyer R and Billingham RE eds (Baltimore USA: Williams and Wilkins) 1968; pp.78-97.
- Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 1993; 75(7): 1401-16.
- Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, *et al.* Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 1993; 75(7): 1417-30.
- Chiang C, Litingtung Y, Harris MP, Simandl BK, Li Y, Beachy PA, *et al.* Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev Biol* 2001; 236(2): 421-35.
- Testaz S, Jarov A, Williams KP, Ling LE, Koteliansky VE, Fournier-Thibault C, *et al.* Sonic hedgehog restricts adhesion and migration of neural crest cells independently of the Patched-Smoothed-Gli signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(22): 12521-6.
- McGlenn E, Tabin CJ. Mechanistic insight into how Shh patterns the vertebrate limb. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16(4): 426-32.
- Lewis PM, Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, St-Jacques B, *et al.* Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* 2001; 105(5): 599-612.
- Tickle C, Summerbell D, Wolpert L. Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature* 1975; 254(5497): 199-202.
- Tickle C. Patterning systems—from one end of the limb to the other. *Dev Cell* 2003; 4(4): 449-58.
- Harfe BD, Scherz PJ, Nissim S, Tian H, McMahon AP, Tabin CJ. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* 2004; 118(4): 517-28.
- Zhu J, Nakamura E, Nguyen MT, Bao X, Akiyama H, Mackem S. Uncoupling Sonic hedgehog control of pattern and expansion of the developing limb bud. *Dev Cell* 2008; 14(4): 624-32.
- Zeller R. It takes time to make a pinky: unexpected insights into how SHH patterns vertebrate digits. *Sci STKE* 2004; 2004(259): pe53.
- Tickle C. Making digit patterns in the vertebrate limb. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(1): 45-53.
- Tabin CJ, McMahon AP. *Developmental biology. Grasping limb patterning. Science* 2008; 321(58- 87): 350-2.
- Towers M, Mahood R, Yin Y, Tickle C. Integration of growth and specification in chick wing digit-patterning. *Nature* 2008; 452(7189): 882-6.
- Heutink P, Zguricas J, Vanoosterhout L, Breedveld GJ, Testers L, Sandkuijl LA, *et al.* The gene for triphalangeal thumb maps to the subtelomeric region of chromosome 7q. *Nat Genet* 1994; 6(3): 287-92.
- Lettice LA, Heaney SJ, Purdie LA, Li L, de Beer P, Oostra BA, *et al.* A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet* 2003; 12(14): 1725-35.
- Maas SA, Fallon JF. Single base pair change in the long-range Sonic hedgehog limb-specific enhancer is a genetic basis for preaxial polydactyly. *Dev Dyn* 2005; 232(2): 345-8.
- te Welscher P, Fernandez-Teran M, Ros MA, Zeller R. Mutual genetic antagonism involving GLI3 and dHAND prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to SHH signaling. *Genes Dev* 2002; 16(4): 421-6.
- Park HL, Bai C, Platt KA, Matise MP, Beeghly A, Hui CC, *et al.* Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* 2000; 127(8): 1593-605.
- Marigo V, Johnson RL, Vortkamp A, Tabin CJ. Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev Biol* 1996; 180(1): 273-83.
- Hui CC, Joyner AL. A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toes(J) mutation contains an intragenic deletion of the Gli3 gene. *Nat Genet* 1993; 3(3): 241-6.
- Litingtung Y, Dahn RD, Li Y, Fallon JF, Chiang C. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* 2002; 418(6901): 979-83.
- Litingtung Y, Chiang C. Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat Neurosci* 2000; 3(10): 979-85.
- May SR, Ashique AM, Karlen M, Wang B, Shen Y, Zerbatis K, *et al.* Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev Biol* 2005; 287(2): 378-89.

- 26 Wang C, Ruther U, Wang B. The Shh-independent activator function of the full-length Gli3 protein and its role in vertebrate limb digit patterning. *Dev Biol* 2007; 305(2): 460-9.
- 27 Ahn S, Joyner AL. Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell* 2004; 118(4): 505-16.
- 28 Charite J, McFadden DG, Olson EN. The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. *Development* 2000; 127(11): 2461-70.
- 29 McFadden DG, McAnally J, Richardson JA, Charite J, Olson EN. Misexpression of dHAND induces ectopic digits in the developing limb bud in the absence of direct DNA binding. *Development* 2002; 129(13): 3077-88.
- 30 Wellik DM, Capecchi MR. Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science* 2003; 301(5631): 363-7.
- 31 Kmita M, Tarchini B, Zakany J, Logan M, Tabin CJ, Duboule D. Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function. *Nature* 2005; 435: 1113-6.
- 32 Naiche LA, Harrelson Z, Kelly RG, Papaioannou VE. T-box genes in vertebrate development. *Annu Rev Genet* 2005; 39: 219-39.
- 33 Martin GR. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev* 1998; 12(11): 1571-86.
- 34 Niswander L, Jeffrey S, Martin GR, Tickle C. A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature* 1994; 371(6498): 609-12.
- 35 Ganan Y, Macias D, Basco RD, Merino R, Hurler JM. Morphological diversity of the avian foot is related with the pattern of *msx* gene expression in the developing autopod. *Dev Biol* 1998; 196(1): 33-41.
- 36 Michos O, Panman L, Vintersten K, Beier K, Zeller R, Zuniga A, *et al.* Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development* 2004; 131(14): 3401-10.
- 37 Scherz PJ, Harfe BD, McMahon AP, Tabin CJ. The limb bud Shh-Fgf feedback loop is terminated by expansion of former ZPA cells. *Science* 2004; 305(5682): 396-9.
- 38 Zuniga A, Michos O, Spitz F, Haramis APG, Panman L, Galli A, *et al.* Mouse limb deformity mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for Gremlin expression. *Genes Dev* 2004; 18(13): 1553-64.
- 39 Verheyden JM, Sun X. An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth. *Nature* 2008; 454(7204): 638-41.
- 40 Mao J, McGlenn E, Huang P, Tabin CJ, McMahon AP. Fgf-dependent Etv4/5 activity is required for posterior restriction of Sonic Hedgehog and promoting outgrowth of the vertebrate limb. *Dev Cell* 2009; 16(4): 600-6.
- 41 Zhang Z, Verheyden JM, Hassell JA, Sun X. FGF-regulated Etv genes are essential for repressing Shh expression in mouse limb buds. *Dev Cell* 2009; 16(4): 607-13.
- 42 Sanz-Ezquerro JJ, Tickle C. Fgf signaling controls the number of phalanges and tip formation in developing digits. *Curr Biol* 2003; 13(20): 1830-6.
- 43 Suzuki T, Hasso SM, Fallon JF. Unique SMAD1/5/8 activity at the phalanx-forming region determines digit identity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(11): 4185-90.

Role of Shh in Digit Development and Regulation of Its Expression

Hai-Min Tan, Lu-Hang Zhao*

(Department of Biochemistry and Genetics, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract The process of human limb bud development is patterning process, Shh protein plays a key role as a morphogen of ZPA during the development of the limb bud. Cholesterol modification of Shh affects its diffusion to regulate digit 2 forming. After Shh expression, it affects digit 3 to digit 5 directly to regulate their forming without diffusion. However, digit 1 doesn't need Shh in its development. Shh and other proteins (contain Gli family, Fgf family, Gremlin and so on) act with each other to form Fgf/Shh positive feedback loop and Fgf/Gremlin negative feedback loop, regulating the digital development.

Key words Shh; digit; patterning

Received: July 16, 2009

Accepted: May 28, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30671162)

*Corresponding author. Tel: 86-571-88208237, E-mail: zhaoluhang@263.net