

- USA., 98:10910-10917.
- [28] Yoshimura S, Takagi Y, et al., 2001, *Proc Natl Sci USA.*, 98:5874-5879.
- [29] Carro E, Nunez A, et al., 2000, *J Neurosci.*, 20:2926-2933.
- [30] Li XC, Jarvis ED, et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 97:8584-8589.
- [31] McEwen BS, 2000, *Brain Res.*, 886:172-189.
- [32] Chen B, Dowlatshahi D, et al., 2001, *Biol Psychiatry*, 50:260-265.
- [33] Russo-Neustadt A, Ha T, et al., 2001, *Behav Brain Res.*, 120:87-95.
- [34] Gritti A, Vescovi AL, 2002, *J of Physiology*, 96:81-90.
- [35] Tada H, Takahashi J, et al., 2000, *Exp Neurol.*, 165:66-76.
- [36] Bjornson CRR, Rietze RL, et al., 1999, *Science*, 283:534-537.
- [37] Galli R, Borello U, et al., 2000, *Nat Neurosci.*, 3:986-991.
- [38] Clarke DL, Johansson CB, et al., 2000, *Science*, 288:1660-1663.
- [39] Bjorklund A, Lindvall O, et al., 2000, *Nature*, 405:892-895.
- [40] Magavi SS, Leavitt BR, et al., 2000, *Nature*, 405:905-955.
- [41] Noctor SC, Flint AC, et al., 2001, *Nature*, 409:714-720.
- [42] Armstrong RE, Barker RA, 2001, *Lancet*, 358:1174-1176.
- [43] Fallon J, Reid S, et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 97:14686-14691.

第 VI 类中间丝蛋白—Nestin

李雪玲

(内蒙古大学生命科学学院 呼和浩特 010021)

摘要 Nestin 最早发现于神经上皮干细胞,在肌肉和牙齿组织中也有表达。Nestin 在中枢神经系统(central nervous system, CNS)中特异表达于神经前体细胞,其 mRNA 的减少与神经发育中干细胞的减少相平行,而且在神经系统病变和损伤的组织中有 Nestin 表达,表明 Nestin 可以作为研究神经系统发育的一个手段,对神经系统疾病的诊断也有一定的参考价值。

中间丝(intermediate filaments)与微管和微丝一起构成细胞骨架的主要成分。在氨基酸序列分析的基础上,将中间丝分为五类:Ⅰ.酸性角蛋白、Ⅱ.碱性角蛋白、Ⅲ.肌纤维蛋白、胶质纤维酸性蛋白、未梢蛋白和波形蛋白、Ⅳ.中间丝三联体(包括神经丝,神经丝是广泛存在于动物成熟神经元中的一种中间丝蛋白)、Ⅴ.核纤蛋白^[1]。

这里我们描述的是一个主要在神经干细胞表达的中间丝蛋白,最初发现它特异表达于神经上皮干细胞中,被称为巢蛋白。Nestin 基因预测的氨基酸序列分析表明它不同于上述五类中间丝蛋白,归为第 VI 类中间丝蛋白^[2]。这种蛋白在几乎所有的中枢神经系统(CNS)干细胞中都有表达,目前已被作为鉴定 CNS 干细胞的一个标记物^[3],以区别于分化的神经细胞。以后的研究发现, Nestin 还在肌肉等其他组织中表达。

一、Nestin 基因及其表达调控

1990 年 Lendahl 等分离并鉴定了大鼠 Nestin

基因^[2],发现 Nestin 基因的转录物不包含 PolyA 在内是 5945bp,在 +127 和 +160 存在两个潜在的起始密码子。根据 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳迁移率确定的分子量为 240 000^[4],Nestin 基因在转录区域的 912、1038 和 1111 位置有三个内含子,内含子数目少于其他中间丝基因(有 7-8 个内含子),而且内含子的位置与其他中间丝基因也不相同。1992 年 Dahlstrand 等分离了人类的 Nestin 基因,经检测人和大鼠的 Nestin 基因在羧基端重复区域和内含子的位置保守性较高,而且三个内含子中的两个是与神经丝共享的,表明在从其他中间丝分离出来之后 Nestin 和神经丝可能来自同一祖先,并是神经丝分支中最早分离出的一员^[5]。2001 年小鼠 Nestin cDNA 被分离和鉴定,整个序列长 5983bp,编码 1821 个氨基酸,其多肽序列与大鼠、仓鼠和人类 Nestin 的同源性分别为 84%、73% 和 62%,并且都是单拷贝基因^[6]。

Zimmerman等(1994)进行的转基因小鼠的研究表明,在 Nestin 基因的第一个和第二个内含子中分别存在着细胞类型特异的调节因子,指导报告基因在发育的肌细胞和神经前体细胞中表达。在第二个内含子中包含一个 CNS 干细胞特异的增强子,表明在 CNS 干细胞中可能存在一个单独的转录机制调节 Nestin 的表达,因为这个增强子在 PNS 的活性很低^[7]。Yaworsky 和 Kappen 进一步的研究证明在小鼠 Nestin 基因的第二个内含子中其实有两个 CNS 前体细胞特异的增强子,其中一个在 CNS 发育的整个过程中都有活性,而另一个只有在中脑背部有特异活性,所以没有被前人发现^[8]。大鼠和人 Nestin 第二个内含子的克隆和序列分析显示,在此内含子的 3' 端的局部区域有很高的序列相似性。用人类 Nestin 第二个内含子 3' 端最保守的一段 714bp 和全部 1852bp 序列与 LacZ 基因构成的融合基因产生的转基因小鼠,表达模式非常相似,表明在该 714bp 序列中含有重要的控制因子^[9]。另有研究者发现大鼠 Nestin 基因第二内含子中的增强子的一个 257bp 序列就足以指导 Nestin 在胚胎神经上皮中的表达,其中包含两个 III 型 POU(Brn-1, Brn-2, Brn-4 和-1),其中的一个对 CNS 表达是必需的^[10]。1999 年,Lothian 等报道,人类 Nestin 基因的第二内含子中的一个 374bp 区域就可以指导 Nestin 在神经前体细胞的表达,而其中一个 120bp 的序列是必需的,它包含 TRs, RXR, RAR 和 COUP-TF 结合区域^[11]。

Nestin 的表达还受甲状腺转录因子(TTF-1)的调控,TTF-1 是 NKX-1 家族的一员,在甲状腺、肺和前脑腹部的组织发生中起重要作用,稳定表达 TTF-1 的成纤维细胞克隆在培养过程中获得神经上皮细胞回归的表型,而且内源 Nestin 基因上调。Nestin 是 TTF-1 在 CNS 中一个直接的特异靶基因^[12]。

二、Nestin 的蛋白结构及其分布

Nestin 与其他中间丝蛋白一样,包含一个 307 个氨基酸的保守核心结构,其中有一个七个氨基酸特征序列(abckefg)构成的 α 螺旋,残基 a 和 d 经常是疏水的。这个特征序列被认为促进丝形成时卷曲螺旋的相互作用,七个氨基酸特征序列由保守性不强的间隔序列分开^[1]。Nestin 蛋白的预测氨基酸序列的核心区域与所有其他五种中间丝蛋白有 16% - 29% 的一致性,这个相似性水平与其他不同

种类中间丝相比的结果相近,而同一种中间丝的核心区域的一致性可达 50%。这意味着 Nestin 蛋白不属于任何已确定的中间丝种类,而代表一个新的种类。在这个杆状的保守区域的外面,Nestin 蛋白与其他中间丝蛋白的相似性很小。它的 N 末端只有 11 个氨基酸残基,比其他中间丝蛋白短;C 末端很松散与神经丝很相像,电荷密度高,带有谷氨酸密集区域,有一个 11 个氨基酸的特征序列 S/P-L-E-E/K-E-X-Q-E-S/L-L-R(划线的是高度保守的氨基酸),在 512 - 1050 氨基酸残基之间有 35 个这样的重复。

Nestin 蛋白在细胞内的分布与微管(微管蛋白)和微丝(肌动蛋白)不同。微管在细胞里平均分布,没有在细胞核周围的聚集,而 Nestin 蛋白呈现一种波形的分布模式,在核周围聚集。微丝形成直而平行的纤维,Nestin 蛋白形成轻微弯曲的纤维。同一细胞的 Nestin 蛋白和波形蛋白的染色证明,两者在细胞里的总体网络组织非常相似,纤维以放射状形式从核周围发散出去。但波形蛋白在细胞周边区域的染色较强,其他区域两者的强度也有区别。秋水仙素和细胞松弛素 B 处理证明,Nestin 蛋白不是微管和微丝的结合蛋白,它对秋水仙素的反应与神经丝相似^[13,14]。

三、在 CNS 成熟过程中中间丝的表达以及 Nestin 的功能

与其他细胞骨架成分不同,中间丝有组织特异性,不同的中间丝蛋白在不同类型细胞中表达,在细胞内形成网络,并在主要的分化步骤中出现由一种中间丝蛋白向另一种的转变。神经系统的发育过程,经历了细胞分裂、分化、迁移和成熟的发育过程,在这个过程中,中间丝网络的成分也发生着变化,各种类型中间丝的表达有一个严格的时序。在小鼠的胚胎发育过程中,早期上皮细胞表达的中间丝是角蛋白;神经胚形成时,神经板皮层细胞开始表达 Nestin;神经细胞的迁移基本完成后,Nestin 的表达量下降,波形蛋白开始表达,此时细胞内的中间丝网络是由两者共同组成的;随着进一步分化,Nestin 停止表达, α -internexin 开始表达,并与波形蛋白共同组装成中间丝网络;接着波形蛋白的表达量下降。出生前 5 天左右,神经细胞前体刚刚完成终末分裂(terminal mitosis),中等分子量神经丝蛋白(NF-M)和低分子量神经丝蛋白(NF-L)出现,这时细胞内的

纤维网络由 NF-L、NF-M、波形蛋白和 α -internexin 共同组成;随后 NF-M 和 NF-L 逐渐停止表达, α -internexin 表达量下降,但并不消失,一直到成年都维持一个低水平的表达,由 NF-L 和 NF-M 组装成神经丝,互相平行排列,神经丝间的横桥比成熟神经元轴突中的少;高分子量神经丝蛋白(NF-H)一般在出生后才开始表达。NF-H 的出现标志着神经元的成熟^[15]。

中间丝的功能是形成和维持特定的组织细胞形态^[16]。早期阶段的 CNS 发育是细胞迁移和集中的形态发生过程,包括神经板折叠、神经管腔和软膜的迅速分离以及祖细胞的核摆动和高度延伸的放射状胶质的形成(以支持神经元的迁移)^[17]。神经上皮干细胞的 Nestin 可能就是参加这些过程。其中,一个较好的例子就是放射状胶质细胞^[18],放射状胶质细胞是脑内最先出现的胶质细胞,它能产生灰、白质中的星形胶质细胞,在某些脑区,也能产生少突胶质细胞。它在控制脑中细胞数量、细胞类型和空间组成上起关键作用。在放射状胶质细胞可以检测到 Nestin 的表达,而在星形胶质细胞和少突胶质中只能检测到波形蛋白和胶质纤维酸性蛋白的等中间丝蛋白,这表明 Nestin 对放射状胶质细胞的形态的形成和维持以及功能的完成有特殊的作用。

四、Nestin 在其他组织表达的情况

1991 年 Valtz 等建立了一种大鼠小脑细胞系 ST15A,这种细胞不仅表达 Nestin,并能分化为神经元、胶质细胞和肌细胞^[19],提示 Nestin 有可能在肌肉细胞中也有表达。后来的研究证明 Nestin 是肌肉发育过程中中间丝复合物的一个组分,表达于成肌细胞,在成体动物的肌肉中显著下调^[20]。1995 年 Terling 等报道在牙齿发育的所有阶段都有 Nestin 的表达,但其表达模式与 Nestin 在神经和肌肉发育过程中的模式完全不同,Nestin 可作为成牙质细胞的一个特殊标记^[21]。2001 年,Zulewski 等发现在大鼠和人类的胰岛中包含一种迄今为止还未鉴定的细胞也表达 Nestin^[22]。

五、Nestin 应用前景展望

1. Nestin 在研究神经系统发生和分离神经干细胞中的应用

神经系统的发生过程一直是发育生物学研究的热点之一,Nestin 的发现为研究者提供了一个新的研究思路,即通过跟踪 Nestin 的表达来分析神经系

统的发生过程。由于 Nestin 是神经干细胞特异表达的一个中间丝蛋白,所以 Nestin 可以作为神经干细胞的一个标记基因用于分离神经干细胞。

现在许多研究者用 Nestin 启动子和增强子指导报告基因 LacZ 或绿色荧光蛋白(GFP)基因在转基因动物中表达,来研究基因表达、神经发生和分离神经干细胞。2000 年 Yamaguchi 等用 Nestin 基因的调控序列和绿色荧光蛋白(GFP)基因构成的融合基因产生转基因小鼠,研究神经系统的体内发生的全过程,进一步跟踪其迁移和分化^[23],之后,有人用同样方法结合流式细胞分离仪,将神经元前体和神经元进行分离^[24],还有人用此法确定了中脑神经前体细胞的分布,证明此细胞可以迁移到 Parkinson's 大鼠模型的病变部位并分化为多巴胺能神经元^[25]。

2. Nestin 在神经系统疾病诊断中的潜在应用前景

Nestin 在神经前体细胞中特异表达的特性,提示在神经系统发生病变或损伤引起再生时可能存在 Nestin 表达。现在已有大量研究结果证实了这一结论。人类中枢神经系统肿瘤和黑素瘤中有 Nestin 的表达,恶化的神经胶质瘤中 Nestin 表达量更高^[26]。皮质发育不良患者在特定皮层区域表现胶质细胞和神经元的 Nestin 阳性^[27]。另外,脑或脊髓损伤后,围绕室管膜层出现 Nestin 阳性细胞;而且 Nestin 阳性星形胶质细胞会出现在脑梗死周围的环绕区域^[28,29]。

所有这些研究表明,Nestin 的异常表达预示着神经系统发生了异常变化,医务工作者可以将 Nestin 的荧光组化鉴定作为神经系统疾病的一个辅助诊断手段,通过检测 Nestin 的表达情况,确定病变发生的部位。

参 考 文 献

- [1] Steinert PM, and Roop DR, 1988, *Annu. Rev. Biochem.*, **57**:593 - 625.
- [2] Lendahl U, Zimmerman LB and McKay R, 1990, *Cell*, **60**:585 - 595.
- [3] McKay R, 1997, *Science*, **276**:66 - 71.
- [4] Hockfield S and McKay R, 1985, *J. Neurosci.*, **5**:3310 - 3328.
- [5] Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, et al., 1992, *J. Cell Sci.*, **103**:589 - 597.
- [6] Yang J, Cheng L, Yan Y, et al., 2001, *Biochim Biophys Acta.*, **1520**:251 - 254.
- [7] Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, et al., 1994, *Neu-*

- ron, 12:11-24.
- [8] Yaworsky PJ and Kappen C, 1999, *Dev Biol.*, 205:309-321.
- [9] Lothian C and Lendahl U, 1997, *Eur J Neurosci*, 9:452-462.
- [10] Lothian C, Drakash N, Lendahl U, et al., 1999, *Exp Cell Res.*, 248:509-519.
- [11] Josephson R, Muller T, Pickel J, et al., 1998, *Development*, 125:3087-3100.
- [12] Lonigro R, Donnini D, Zappia E, et al., 2001, *J Biol Chem.*, 276:47807-47813.
- [13] Hynes RO, and Destree ST, 1978, *Cell*, 13:151-163.
- [14] Monteiro M J, and Cleveland DW, 1989, *J. Cell Biol.*, 108:579-593.
- [15] 佟向军、陈建国、翟中和, 1998, 细胞生物学杂志, 20:63-68.
- [16] Lazarides E, 1980, *Nature*, 282:249-256.
- [17] Rakic P, 1972, *J. Comp. Neurol.*, 145:61-84.
- [18] Schmechel DE and Rakic P, 1979, *Anat. Embryol.*, 156:115-152.
- [19] Valtz NL, Hayes TE, Norregard T, et al., 1991, *New Biol.*, 3:364-371.
- [20] Sejersen T and Lenahl U, 1993, *J Cell Sci*, 106:1291-1300.
- [21] Terling C, Rass A, Mitsiadis TA, 1995, *In J Dev Biol*, 39:947-956.
- [22] Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, et al., 2001, *Diabetes*, 50:521-533.
- [23] Yamaguchi M, Saito H, Suzuki M, et al., 2000, *J Neurosci Res.*, 61:421-429.
- [24] Sawamoto K, Yamamoto A, Kawaguchi M, et al., 2001, *J Neurosci Res.*, 65:220-227.
- [25] Sawamoto K, Nakao N, Kakishita K, et al., 2001, *J Neurosci*, 21:3895-3903.
- [26] Dahlstrand J, Collins V P, Lendahl U, et al., 1992, *Cancer Res.*, 52:5334-5341.
- [27] Duggal N, Iskander S and Hammond RR., 2001, *J Neurosurg* 95:459-465.
- [28] Namiki J and Tator CH, 1999, *J Neuropathol Exp Neurol.*, 58:489-498.
- [29] Duggal N, Schmidt-Kastner R, Hakim AM, et al., 1997, *Brain Res.*, 768:1-9.

端粒(酶)的结构功能及其与衰老和癌症的关系

梁铮铮 胡 剑

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室 北京 100094)

摘 要 端粒是真核生物线性染色体末端由重复 DNA 序列和蛋白质结合形成的复合结构。在哺乳动物中,其特殊的环形结构与多种结合蛋白形成了端粒功能的基础。端粒酶具有逆转录酶特性和维持端粒长度的功能,其活性与恶性肿瘤的发生密切相关。衰老是大多数真核细胞分裂到一定次数后必然走上的道路,端粒的缩短是其中重要的调控因素,并在早衰症患者中表现出异常。癌细胞的恶性转化过程中,端粒酶的激活是一重要步骤,此过程可受到多水平多途径的调节。癌症和衰老相互联系,端粒酶可能在两者交错的网络中体现了这一联系。

端粒(telomere)是存在于真核生物线性染色体末端,由富含 GC 的正向高度重复序列通过与多种蛋白质的特异结合,形成的核酸-蛋白复合结构。它的存在及其特殊构像的维持,是从纤毛虫、发育期的酵母到哺乳动物,保护线性染色体末端、顺利完成 DNA 末端复制的共同解决方案^[1]。端粒功能的缺失会造成严重的遗传不稳定性,影响染色体的完整性和传代的连续性,并能导致细胞生活力和更新能力的丧失。端粒酶(telomerase)是对抗正常复制过程中端粒的缩短,维持真核生物染色体长度的关键酶,在肿瘤细胞中表达得尤为强烈。针对这两个特殊角色的研究正在不断深入,它们在衰老、癌变等重

要而复杂的生理过程中所起作用的研究,也在不断地取得进展。这不仅引出了细胞学上一系列诱人的研究课题,同时也为肿瘤的诊断和治疗带来了新的希望。

一、端粒的历史与现在

1. 末端复制问题

线性 DNA 分子的复制过程中,滞后链的复制是在 5' 端的 RNA 引物引导下,以冈崎片断的形式合成的。当复制到 DNA 分子的最末端, RNA 引物