

- [10] Rohan R. M., et al., 1990, *Nucleic Acid Res.*, **18**:6089-6095.
- [11] Frank R. P., et al., 1992, *Nucleic Acid Res.*, **20**(6):1259-1261.
- [12] Wilkie T. M., et al., 1986, *Dev Biol.*, **118**:9-18.
- [13] Domon M., et al., 1982, *Cell Tissue Kinet.*, **15**:89-98.
- [14] Dufraim Q. R. J., et al., 1975, *Rad Res.*, **63**:494-500.
- [15] MARC GACNE et al., 1955, *Mol reprod Dev.*, **41**:184-827.
- [16] Lehmann A. R., et al., 1992, *Mut. Res.*, **273**:1-28.
- [17] Harland R. M., et al., 1983, *Nature*, **302**:38-43.
- [18] Puera T. T., et al., 1994, *Theriogenology*, **41**:273.
- [19] Baran V., et al., 1992, *Reprod Nutri Dev.*, **32**:241-248.
- [20] Bravo R., et al., 1986, *Exp Cell Res.*, **163**:287-293.
- [21] Celis J. E., et al., 1985, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **82**:3262-3266.
- [22] Downey K. M., et al., 1990, *Bioassays*, **12**:231-236.
- [23] Saxena J. K., et al., 1990, *Nucleic Acid Res.*, **18**:7425-7431.
- [24] Behboodi E., et al. 1993, *J. Dairy Sci.*, **76**(pp):3392-3399.
- [25] Naish S. J., et al., 1987, *Biol Reprod.*, **36**:253-255.
- [26] Cousens C., et al., 1994, *Mol. Reprod. And Dev.*, **39**:384-391.
- [27] Burdon T., et al., 1992, *Mol Reprod Dev.*, **33**:436-442.
- [28] Whitelaw C. B. A., et al., 1993, *Transgenic Res.*, **2**:29-32.
- [29] Ninomiya T., et al., 1990, *J. Reprod Fertil.*, **41**(suppl):222.
- [30] Cousens C., et al., 1993, *J. Reprod. Fertil.*, **14**:47(abst).

hedgehog 基因家族与果蝇和脊椎动物的发育*

毛炳宇 张红卫

(山东大学生命科学院 济南 250100)

果蝇的 hedgehog (hh) 基因是 1980 年由 Nusslein-Volhard 和 Weieschaus 通过突变筛选发现的, 于 1992 年被克隆。随后, 在不同脊椎动物(包括斑马鱼、爪蟾、鸡、小鼠和人)中均发现了 hh 同源基因, 构成一个基因家族。hh 家族基因编码一类信号分子, 广泛参与了果蝇和脊椎动物的多种发育过程^[1]。本文就 hh 基因家族在果蝇和脊椎动物发育过程中的功能及其作用机制作一简要论述。

一、hedgehog 基因与果蝇的发育

1. hh 基因与果蝇胚胎体节的图式形成

果蝇胚胎体节的形成是由分节基因控制的, 体节极性基因(segment polarity gene)是其中的一组。hh 和 wingless(wg)是体节极性基因中的两个关键基因。这两个基因均编码分泌性

信号分子, 它们的正确表达是胚胎体节正常发育所必需的。在胚胎发育早期, 体节极性基因的表达区域沿胚胎前后轴形成一系列重复的带型, 将胚胎划分为许多重复单位, 即副节(parasegment), 每一副节包含前一体节的后部与后一体节的前部。hh 在每一副节前部的 1-2 列细胞中表达, 分别与前一副节后部 wg 的表达区域相邻, 它们之间的界线恰好确立了各副节的界线。这一区域是调控果蝇胚胎各副节图式形成的信号中心^[2]。

在果蝇胚胎发育的原肠胚和胚带伸展期, hh 和 wg 的表达是相互依赖的: wg 表达的维持需要相邻细胞带中 hh 基因的表达, 反之亦

* 本文由国家自然科学基金支持, 批准号 39670357。

然。如果其中一种信号受到干扰,另一种信号很快也会停止表达。而且,hh的异位表达会引起wg表达区域的扩展^[3]。这表明,这两个基因的表达之间存在一个反馈调节环路。其他体节极性基因大都参与这一调节过程。其中Wg蛋白通过一系列中间步骤维持相邻细胞带中同源异形框基因engrailed(en)的表达,En进而抑制hh的转录抑制因子Ci的表达,使hh的转录得以活化^[2,4]。另一方面,HH蛋白也引发一个复杂的信号传递途径以维持wg的表达^[5]。smo、ptc等基因参与了这一途径(参见下文)。同时,wg基因的表达产物还通过自分泌环路加强其自身的转录^[6]。Wg和HH蛋白的分布范围很小,hh和wg基因表达的相互依赖性也就决定了其表达范围仅限于相邻的很窄的细胞带中。

到胚带伸展完成以后,hh和wg的表达不再相互依赖。hh的转录通过en基因表达的自我调控得以维持,而wg的表达则通过自分泌环路维持^[2]。在这一时期,HH和Wg蛋白参与了幼虫表皮细胞命运的特化。

2. hh与果蝇幼虫表皮细胞的分化

在胚胎发育后期,hh参与了对果蝇幼虫表皮细胞分化的调控。果蝇幼虫背部表皮细胞可分为四个类型,分别称为1°、2°、3°、4°型。hh在1°型细胞中表达,HH蛋白可指导相邻的2°型和较远的3°型细胞的分化。4°型细胞的分化是由wg基因控制的。HH蛋白的作用似乎是浓度依赖性的,较低浓度的HH可以诱导3°型细胞分化而不产生2°型和1°型细胞,而较高浓度的HH则可诱导2°型细胞分化而抑制3°、4°型细胞的分化^[7]。但进一步的研究表明,HH蛋白在胚胎背部表皮中的作用并不是直接的,而是通过抑制其他因子的功能完成的。其中1°、2°型细胞的分化是HH通过抑制ptc基因的功能而产生的,而3°型细胞是通过抑制lines基因的作用产生的。lines对后期wg的表达也具有调节作用^[8]。

3. hh与果蝇成虫盘的图式形成

果蝇成体的附肢等结构都起源于幼虫的成

虫盘。hh在幼虫成虫盘的图式形成中也起着关键作用。以肢成虫盘为例。果蝇的肢成虫盘均形成于胚胎副节界线处,各成虫盘在其形成之初就具有明确的前后区域之分,分别表达不同的标记基因。hh在每一成虫盘的后区表达。hh的失活或异位表达都会引起附肢发育图式的重大改变。在翅成虫盘中,hh基因在前区异位表达时会引起翅前部结构不同程度的镜像倍性增生^[9]。已证实HH蛋白在翅成虫盘中的作用是由另一种分泌性因子Decapentaplegic(DPP)介导的。DPP属于TGF β 家族,是翅的形态发生所必需的。dpp基因的表达区域沿前后区界线形成一道条纹,恰好位于hh表达区域的前部。如果hh基因失活,dpp将停止转录,而hh在翅成虫盘前区的异位表达则可诱导dpp基因的异位活化。而且,dpp单独在前区异位表达也可产生与hh异位表达类似的表型。这些实验表明,HH蛋白是通过DPP起作用的。DPP蛋白可能形成浓度梯度,指导翅成虫盘的图式形成^[10]。腿成虫盘中的情形要复杂一些。不同背腹轴位置的前区细胞可对HH信号作出不同的反应,背侧细胞表达DPP,而腹侧细胞表达Wg,这种表达图式对于腿成虫盘背腹轴的分化具有重要意义^[11]。

此外,HH在果蝇的复眼、脑视觉中心以及卵巢等的发育中都具有重要作用^[12-14]。

二、hedgehog家族基因与脊椎动物的发育

目前在果蝇和其他无脊椎动物中仅发现了一个hh基因,而在脊椎动物中则具有多个hh同源基因,包括Sonic hedgehog(Shh)、Indian hedgehog(Ihh)、Desert hedgehog(Dhh)等,构成一个基因家族^[15]。目前研究最清楚的是Shh基因。

1. Shh与脊椎动物神经管和体节的分化

脊索对于脊椎动物神经管和体节的分化具有重要作用。它可产生一种接触依赖性信号因子诱导神经管腹侧基板的形成。基板形成后,它

本身也具有与脊索类似的诱导能力。脊索和基板可诱导神经管基板两侧背方运动神经元的分化,这种诱导是非接触依赖性的。此外,脊索和基板还可诱导体节腹侧生骨节的分化^[16]。

对 Shh 基因表达图式的研究表明,它很可能介导了脊索的诱导作用。在鼠、鸡和斑马鱼中,Shh 的表达均开始于原肠胚期,分别出现于头突、亨氏节和胚盾处,然后逐渐扩展到整个预定脊索中胚层,随后在神经管腹侧基板中也开始表达^[9]。这一时期恰好是脊索和基板具有诱导能力的时期。进一步的研究很快证实了这一推测。Shh 在胚胎中的异位表达可诱导基板和生骨节标记基因的异位活化^[17,18]。在体外条件下,用编码 Shh 的 DNA 转染 COS 细胞并将其与神经板移植块接触培养,可诱导基板和运动神经元的分化^[17]。其中基板的诱导是接触依赖性的。在 COS 细胞和神经板移植块之间放置滤膜可阻断基板的分化,而运动神经元的分化不受影响^[19]。这也说明运动神经元的分化并不依赖于基板的形成。被转染的 COS 细胞也可诱导前体节期中胚层移植细胞表达生骨节标记基因 Pax1。这是一种远程的诱导作用。COS 细胞和移植块之间可以相隔一定距离而仍具有诱导能力^[20]。上述实验表明,正是由脊索产生的 SHH 信号诱导了基板、运动神经元和生骨节的分化。

2. Shh 与脊椎动物肢的发育

脊椎动物肢芽的后端间充质是一个信号活性中心,称为极化活性区(zone of polarizing activity, ZPA)。如果将鸡胚肢芽的 ZPA 组织移植到受体肢芽的前部边缘,受体肢的发育沿前后轴将出现镜像对称式的倍性增生:正常肢指的排列方式由前到后为 2-3-4,而实验肢中却变为 4-3-2-2-3-4。人们推测极化活性区可能产生某种形态发生原,形成一种浓度梯度而诱导不同部位肢指的发生^[16]。

在鼠、鸡和斑马鱼中,Shh 基因在肢芽的极化活性区均表达。这一发现使人们推测 Shh 可能介导了 ZPA 的极化活性。与此相一致的是,Shh 在肢芽前端的异位表达也可引起肢指

的镜像倍增,与 ZPA 移植相似^[16]。这一过程可能需要一种可被维甲酸(Retinoic acid, RA)诱导的辅助因子的协同作用^[21]。SHH 是否是所要寻找的形态发生源呢?研究表明,与果蝇成虫盘中的情形类似,SHH 在脊椎动物肢芽中的作用也是由次级信号分子介导的。BMP-2(Bone morphogenetic protein 2)蛋白可能参与了这一过程。BMP-2 属于 TGF β 家族,与果蝇的 DPP 蛋白同源。Bmp-2 基因在肢芽的后端间充质中表达,覆盖了 Shh 基因的表达区域,而在表达时间上恰好在 Shh 的表达之后。ZPA 移植或 Shh 的异位表达均可诱导 Bmp-2 的异位表达。这说明 BMP-2 很可能作为一种次级信号分子介导了 SHH 信号的远程效应。这与果蝇肢成虫盘中的情形是多么相似^[9]!但是,BMP-2 单独作用于鸡胚翅芽时,观察不到翅发育图式的改变,其确切功能尚有待于进一步的研究。

除了 ZPA,顶端外胚层嵴(apical ectodermal ridge, AER)在肢的发育中也具有重要作用。它是由肢芽顶端外胚层加厚形成的。切除 AER 将使肢芽停止生长。AER 对极化活性区 Shh 表达的维持具有重要调节作用。切除 AER 后,Shh 的表达将迅速降低。已证实这种调节作用是由 FGF4 介导的。外源 FGF4 可取代 AER 维持 Shh 的表达和肢芽的发育。FGF4 还可诱导中胚层细胞对 SHH 的反应能力。在 AER 缺失的情况下,Shh 的异位表达并不能诱导 Bmp-2 的异位活化,而在施加外源 FGF4 时则可以。同时,Shh 对 AER 中 FGF4 的表达也具有调节作用。正常情况下 FGF4 仅在 AER 后部表达,而当 Shh 在肢芽前端异位表达时,则可诱导 FGF4 在 AER 前部表达^[22,23]。正是由于 SHH 与 FGF4 表达的相互调节、相互依赖,肢芽的生长与图式形成才得以协调进行。此外,肢芽背部外胚层对极化活性区 Shh 的表达也具有调节作用,是由 Wnt 7a 介导的^[24]。

三、HH 家族蛋白的作用机制

1. HH 蛋白的自我剪切

如上所述,HH 蛋白在不同发育过程中可分别参与短程(如在果蝇的体节、成虫盘和脊椎动物基板分化过程中)和远程(如在脊椎动物运动神经元、生骨节分化过程中)的信号传递途径。同一分子是如何产生两种不同效应的呢?这一现象促使人们对 HH 蛋白的生化性质进行了深入研究。

果蝇的 hh 基因编码一种 46kD 的蛋白,其初级产物首先经过信号肽的断裂形成一种 39kD 的产物,随后,这一产物在 257 位的 Gly 和 258 位的 Cys 之间断裂,形成~19kD 的氨基末端产物(HH-N)和~26kD 的羧基末端产物(HH-C)。需要指出的是,HH-N 与 HH-C 断裂是由它自身催化的。脊椎动物的 HH 家族蛋白也要经过类似的加工过程^[25]。HH-N 和 HH-C 具有不同的生化性质,分布也不相同。在培养细胞中表达时,HH-N 保持与细胞紧密结合,在胚胎中的分布也是如此。相反的,HH-C 在培养细胞和胚胎中都是扩散性的^[25,26]。这一发现立刻使人们意识到,HH-N 和 HH-C 可能分别参与短程和远程的信号传递。这样,同一 HH 蛋白就可以同时活化两个不同的信号途径。但随后的研究发现,HH-C 并没有信号活性,而 HH-N 则具有 HH 蛋白的全部信号活力。在果蝇和脊椎动物中都是如此。在果蝇中,HH-N 的过表达会导致胚胎表皮发育图式的改变,而 HH-C 的过表达则没有任何可见效应^[26]。在脊椎动物中,SHH-N 具有诱导基板、运动神经元和生骨节分化的能力,而 SHH-C 则没有任何诱导作用^[27,28]。那么 HH 蛋白的自我加工有什么意义呢?Porter 等发现,尽管缺失全部羧基末端的 HH-N 仍具有全部的信号活力,但这种被“截短”的蛋白在培养细胞中表达时,却不再与细胞相结合,而主要出现于培养上清中^[26]。hh-N 在果蝇胚胎中表达时,即使其表达部位正常,HH-N 的分布也不同于正常的点状分布,而呈扩散性分布,胚胎的发育图式也严重异常^[29]。这表明,HH 蛋白的自我加工过程可能具有调节 HH-N 分布的作用。进一步的研究证实,HH 蛋

白的自我剪切过程是由一个内部硫酯键介导的,胆固醇作为亲脂性的亲核基团参与了这一过程,并共价结合到 HH-N 的羧基末端,从而增加了其亲脂性,影响其共空间分布。HH 蛋白的羧基末端区域实际上起着一种分子内胆固醇转移酶的作用^[29,30]。

那么 HH-N 又是如何同时产生短程和远程效应的呢?目前的研究表明,在脊椎动物神经管和体节分化过程中,SHH-N 可能具有形态发生源的性质。在培养条件下,诱导基板和运动神经元、生骨节分化所需的 SHH-N 浓度是不同的。低浓度的 SHH-N 可诱导运动神经元的分化而抑制基板的产生,高浓度的 SHH-N 则可诱导产生基板而抑制动物神经元的分化^[27]。诱导生骨节分化与诱导运动神经元分化所需的 SHH-N 浓度相当^[28]。这样看来,所谓“接触依赖性”和“远程”效应的区别似乎仅仅是由于不同细胞对 SHH-N 做出反应所需的浓度阈值不同造成的。正是由于 SHH 蛋白的自我加工对 SHH-N 的修饰作用,使得 SHH-N 大部分与脊索细胞相结合,在局部形成足够高的 SHH-N 浓度,从而诱导基板的产生,而扩散出去的低浓度 SHH-N 则可诱导运动神经元和生骨节的分化。

2. HH 信号转导途径

目前对 HH 信号转导途径的认识主要来自对果蝇的研究。遗传学分析表明,在果蝇胚胎体节和成虫盘中,ptc、smo、fu、ci 等基因产物参与了 HH 信号的转导。其中 ptc 基因编码一种膜蛋白。PTC 蛋白可抑制 wg 基因的转录而拮抗 HH 信号的功能,推测它可能是 HH 受体^[31]。有趣的是,ptc 基因本身也是 HH 信号活化的靶基因之一。但 PTC 可能不是 HH 蛋白的唯一受体,因为在 ptc 缺失的胚胎中,HH 仍可增强 wg 的表达。最近,smo 基因已被克隆,其编码产物含有 7 个跨膜区,在结构上类似于 G 蛋白耦联受体^[32]。生化分析表明,在脊椎动物中,PTC 蛋白可直接与 SMO 和 SHH 蛋白结合,而 SMO 蛋白本身不具有结合 SHH 的能力。这

样, PTC 和 SMO 可能共同构成 SHH 的复合受体, 其中 PTC 和 SMO 分别作为 SHH 结合组分和细胞内信号传导组分^[33,34]。果蝇中的情形可能也是类似的。fu 和 ci 基因分别编码 Ser/Thr 蛋白激酶和一种锌指转录因子。最近发现, cAMP 依赖性蛋白激酶 A(PKA)也参与了 HH 信号的转导^[3]。详细的分子机制正在进一步的研究之中。

有证据表明, 脊椎动物中的 HH 信号转导途径可能与果蝇中类似。鸡和小鼠的 ptc 同源基因已被克隆并被证实参与了 SHH 信号的转导^[35]。PKA 也参与了脊椎动物 SHH 信号的转导^[28]。

摘 要

hedgehog(hh)家族基因编码一类分泌性信号分子, 在果蝇的体节和成虫盘、脊椎动物的神经管、体节和肢的图式形成中具有重要作用。HH 蛋白经过自我剪切形成两种产物, HH-N 和 HH-C。其中 HH-N 具有全部的信号活性。HH 蛋白的自我加工过程可对 HH-N 进行修饰而影响其空间分布。

参 考 文 献

- [1] Ingham, P. H., 1995, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 5:492-498.
- [2] Perimon, N., 1994, *Cell*, 76:781-784.
- [3] Perrimon, N., 1995, *Cell*, 80:517-520.
- [4] Dominguez, M. et al., 1996, *Science*, 272:1621-1625.
- [5] Ingham, P. H. & Hidalgo, A., 1993, *Development*, 117:283-291.
- [6] Yoffe, K. B. et al., 1995, *Dev. Biol.*, 170:636-650.
- [7] Heemskerk, J. & DiNardo, S., 1994, *Cell*, 76:449-460.
- [8] Bokor, p. & Di Nardo, S., 1996, *Development*, 122:1083-1092.

- [9] Fietz, M. J. et al., 1994, *Development*, suppl:43-51.
- [10] Nellen, D. et al., 1996, *Cell*, 85:357-368.
- [11] Jiang, J. & Struhl, G., 1996, *Cell*, 86:401-409.
- [12] Heberlein, U. et al., 1995, *Nature*, 373:709-711.
- [13] Huang, Z. & Kunes, S., 1996, *Cell*, 86:411-422.
- [14] Forboes, A. J. et al., 1996, *Development*, 122:1125-1135.
- [15] Smith, J. C., 1994, *Cell*, 76:193-196.
- [16] Placzek, M., 1995, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 5:499-506.
- [17] Roelink, H. et al., 1994, *Cell*, 76:761-775.
- [18] Johnson, R. L. et al., 1994, *Cell*, 79:1165-1173.
- [19] Tanabe, Y. et al., 1995, *Curr. Biol.*, 5:651-658.
- [20] Fan, C-M. & Tessier-Lavigne, M., 1994, *Cell*, 79:1175-1186.
- [21] Ogura, T. et al., 1996, *Development*, 122:537-542.
- [22] Laufer, E. et al., 1994, *Cell*, 79:993-1003.
- [23] Niswander, L. et al., 1994, *Nature*, 371:609-612.
- [24] Yang, Y. Z. & Niswander, L., 1995, *Cell*, 80:939-947.
- [25] Lee, J. J. et al., 1994, *Science*, 266:1528-1537.
- [26] Porter, J. A. et al., 1995, *Nature*, 374:363-366.
- [27] Roelink, H. et al., 1995, *Cell*, 81:445-455.
- [28] Fan, C-M., et al., 1995, *Cell*, 81:457-465.
- [29] Porter, J. A. et al., 1996, *Cell*, 86:21-34.
- [30] Porter, J. A. et al., 1996, *Science*, 274:255-259.
- [31] Ingham, P. H. et al., 1991, *Nature*, 353:184-187.
- [32] Alcedo, J. et al., 1996, *Cell*, 86:221-232.
- [33] Stone, D. M. et al., 1996, *Nature*, 384:129-134.
- [34] Marigo, V. et al., 1996, *Nature*, 384:176-179.
- [35] Marigo, V. et al., 1996, *Development*, 122:1225-1233.