

神经营养因子

董新文

(中国科学院上海生理研究所 上海 200031)

神经营养因子(neurotrophic factor)是多肽。这些因子在发育神经系统中支持神经元生长、分化和存活;在成年神经系统中维持神经元的作用^[1,2]。最近的资料还支持一种新的观点,即有些神经营养因子可能与改善脑发育中神经元之间的联系有关^[3]。在神经营养因子中,一些因子主要作用于神经元;而另一些因子既作用于神经元,也作用于非神经元。

神经营养因子中的一个最重要的家族是神经营养素(neurotrophin)。在这个家族中,最早发现的是神经生长因子(nerve growth factor, NGF)。它是该家族中最具有特征的成员。在NGF发现之后的近半个世纪里,有关NGF的研究一直主导和推动着神经营养因子这一新兴领域的研究。NGF对神经元的营养作用具有专一性,有许多神经元对NGF没有反应。另外,由靶细胞介导的营养作用并不只局限于NGF所支配的神经元,这些现象提示,有可能存在与NGF相似功能的其他神经营养因子。这一设想导致后来其他神经营养素的发现,它们包括脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF),神经营养素-3(neurotrophin-3, NT-3),神经营养素-4/5(neurotrophin-4/5, NT-4/5);NT-4最初发现于爪蟾和毒蛇组织中,而NT-5发现于哺乳动物老鼠和人,它们之间的相似性大于该家族其他成员间的相似性,约有66%的同一性,表明这两种神经营养因子很可能是同一营养因子种属的变异体。后来,又发现了这个家族中的新成员——神经营养素-6(neurotrophin-6, NT-6)。

上述营养分子通过结合和激活基因家族的特异细胞表面受体而行使其效应。被激活的受体触发一个级联(cascade)的细胞内事件,最终诱导基因表达和改变神经元的形态和功

能。本文着重提及神经营养素及其受体表达和作用的研究近况。

一、NGF和神经营养因子假说 (the neurotrophic factor hypothesis)

NGF发现于早期对发育神经中枢(即神经节和神经元核团)与其靶支配之间相互作用的研究。到本世纪40年代末期,已知靶大小的改变对相应神经中枢的大小有明显的影响。因此,去除一个肢体可导致发育神经中枢的发育不良(hypoplasia)。而植入一个额外肢体则引起增生(hyperplasia)^[4]。Hamvurger和Lsevi-montalcini发现,在神经发育期间,细胞发生正常死亡;肢芽摘除后,神经发育不良与正常供给被摘除肢芽的神经中枢内溃变细胞的增加有关。很明显,在正常发育期间,一些神经元死于其突起进入靶的时候。这些重要的发现使研究者认定,在神经元的发育过程中靶起关键作用。而且,靶通过调节中枢神经元细胞的死亡决定相应神经中枢的大小。为解释这些发现,Ham-burger和Levi-Montalcini曾提出“神经轴突及其长入的基质之间存在代谢物交换”^[4]。这种“代谢物交换”的性质最终通过将小鼠肉瘤(sarcoma)碎片移植入鸡胚体壁可生成一个很大的和相对均质的靶的实验得到证明。Levi-Montalcini和Hamburger还发现,背根感觉神经节(dorsal root sensory ganglia, DRGs)和交感神经节增大而在生长的动运神经元中不增加。他们还注意到,明显的神经节增生包括远离肿瘤(tumor)的神经节和某些内脏不正常的神经支配^[5,6]。根据这些发现,Levi-Montalcini和Hamburger他们提出,新成形细胞(neoplastic cell)释放一种可溶的,也可扩散的因子作用于感觉和交感神经元。这一拟议因子被命名为神

经生长因子。继后的离体实验证明,将 DRGs 或交感神经节移植于小鼠肉瘤邻近,可长出一个神经纤维晕^[7]。离体生物测定对 NGF 最终纯化是有利的。近年来,高纯化的 NGF 使之在许多研究中有可能检测其结构和作用以及鉴定它们的受体。近半个世纪过去了,Levi-Montalcini 和 Hamburger 的发现得到了大量实验的证实;也扩大和延伸了我们关于 NGF 对一些特定神经元的存活,分化和生长等作用的了解。

基于 NGF 的发现和有关研究而提出的神经营养因子假说认为:“……一旦一个发育神经元的突起长入其靶,它就与其他同类发育神经元竞争靶为它们提供的一种供应有限的神经营养因子”。成功的竞争者存活,不成功者死亡。根据这一假说,神经营养因子应是可扩散的,并作用于位于支配神经元突起上的特异细胞表面受体;而且,神经营养因子所具有浓度低于维持所有支配神经元生存之所需。作为这一假说的逻辑延伸应包括:1)靶为每个支配的神经元群体产生一种或一个数目有限的神经营养因子。2)相应地,对于每个神经元群体均有一种特异的神经营养因子,这就产生一种可能,即数以千计的这样的因子作用于神经系统中原本数千个不同神经元群体。3)神经元只是对一种神经营养因子产生应答的细胞。4)神经元分化的

程度,像其存活一样,也被神经营养因子的有限浓度所调节。

神经营养因子假说对于神经营养因子的重要性及其非凡的生物学意义作出了正确的论断;但随着研究的不断深入和发展,神经营养因子的复杂性和多样性远出于假说所作出的评估。

二、神经营养因子表达和作用的复杂性和多样性

随着一些新的神经营养因子的发现,有关这些因子作用的概念大为扩充。从神经营养因子假说出发,一个有意义的发展是,有的神经营养因子像作用于神经元一样,也作用于非神经元;甚至有的神经营养素的作用也只是相对地局限于有关神经元。这一发展是神经营养因子假说未估计到的。最近,关于神经营养素的表达和作用的研究表明,除靶源性因子获得外,神经营养素的自分泌(autoocrine)和非靶源性的旁分泌(paracrine)方式的存在是很重要的(图 1)。已经证明,BDNF 参与成年 DRGs 中自分泌环(autoocrine loop)^[8]。另外,BDNF 和 NT-3 可能在海马起自分泌或旁分泌的作用。这些海马神经元的 BDNF 和 NT-3 像它们各自的受体 TrkB 和 TrKC 一样产生 mRNAs^[9,10]。事实

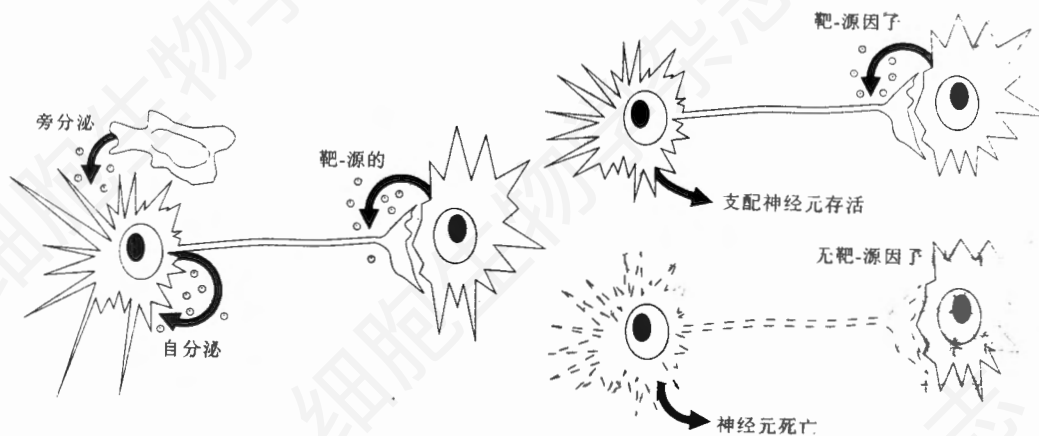


图 1 神经营养素具有靶源性的、自分泌的和旁分泌的方式^[12]

右上边一个支配神经元的存活依赖于靶源性的神经营养因子。

上,一些海马神经元既含有 BDNF,也含有 TrKBmRNA。在培养的海马锥体细胞和齿回颗粒细胞中,外源性 BDNF 可诱发 c-fos 表达,说明 BDNF 作用于这些神经元。另一个复杂性表现在海马神经元产生的 BDNF 可能作用于基底前脑胆碱能支配神经元。这些神经元含 TrKBmRNA;BDNF 可增加这些细胞中胆碱乙酰转位酶(ChAT)的活性。有趣的是,有个别神经元产生的神经营养素既参与局部的也介入靶源性的营养关系。很显然,关于神经营养素在体内所表现的复杂性还有待进一步研究。

神经营养因子假说的另一个发展是,一定的神经元群体能对许多不同的神经营养因子反应。例如,运动神经元至少对 13 种不同的神经因子有反应^[11,12]。但究竟有多少种具有增强神经元存活的生理作用,尚不清楚。如不是单个因子起作用,那就可能是这些因子不单独地发挥作用以调控神经元的存活;若是各个因子增强存活,则有可能是好几个因子一起作用的水平决定运动神经元是否死活。一个有趣的相互关系揭示,单个神经元群体对许多神经营养因子起反应;而单个因子能对许多不同神经元群体起作用。例如,NGF 作用于外周神经系统中的 DGR 感觉神经元和交感神经元以及至少 9 个不同的中枢细胞群体^[13]。这样看来,在许多情况下,神经元的存活和分化可能涉及好几个神经营养因子的共同合作。数以千计的神经营养因子被用来直接作用于一个同等数目的神经元群体的估计可能是不正确的;而一个相对有限数目的因子的精确结合可能对调节神经元的发育的存活是重要的。

通过神经营养因子激活的受体的多样性也是明显的。例如,神经营养素有两种受体。每个神经营养素与 p75^{NTR}(低亲和营养受体)和 TrK 基因家族中的一员(或数员)结合。p75^{NTR}是单一的跨膜糖蛋白,具有通过 TrK 受体调节神经营养信号的作用。TrK 家族的成员是 TrKA, TrKB 和 TrKC。每个成员是酪氨酸激酶(tyrosine kinase)和一种适合神经营养

素配体的受体(即 NGF 结合 TrKA, BDNF 和 NT-4/5 结合 TrKB, NT-3 结合 TrKC)。有些神经营养素还可能出现串通现象,如 NT-3 既能被 TrKA 也能被 TrKB 受体激活。受体多样性还进一步表现为 TrKB 和 TrKC 同工型的存在,缺乏酪氨酸激酶域或在影响信号的细胞内域中含有插入物。最近的研究证明,神经营养因子的作用不只是局限于发育的有丝分裂后的神经元。这些因子也确实能作用于分裂后的成年神经细胞以及已稳定的建立了突触接触的成熟神经元^[14]。例如,NT-3 促进分裂的交感神经细胞以及年青的交感神经元存活。随后,成熟的交感神经元转而以 NGF 为其存活的依赖。这一变化与神经营养素受体的表达从 TrKC 转换到 TrKA 有关。由此看来 某些神经元群体的发育需要多种神经营养因子的相继作用。关于 NGF 在成熟神经元中的作用,有研究表明,在老鼠脚趾局部注入 NGF 抗体可使骶部的 DRG 神经元的轴突直径减小,神经细丝的水平降低和细胞核偏位的细胞数目增加。

最后,在一系列有关神经损伤和神经疾病的动物模型的研究中,已经证明,神经营养素可保护神经元使其不发生功能异常或死亡。更令人兴奋的是,有资料提示,神经营养素可能像保护正常神经元一样保护着疾病中的神经元不发生溃变。虽然这些研究进展未能为神经营养因子假说所预料,但在逻辑上却是跟随假说而发展的。

神经营养因子假说强调这些因子在促进发育神经元存活的作用。除这一重要功能之外,最新资料指出,神经营养素在发育皮层中具有调节突触增强(reinforcement)的功能^[15,16]。视皮层的发育可明显地通过外源性神经营养素或通过隔绝它们的试剂而发生显著的变化^[17-19]。这些新资料,令人乐观地预测,神经营养素可能涉及突触联系的结构和功能的改善。这也是神经营养因子假说未能预言到的功能。

三、NGF 在中枢神经系统中的作用

上述讨论已涉及神经营养关系的复杂性。

一种神经营养因子及其受体的简单表达的证明尚不能说明这种关系的存在。虽然神经营养素和它们的受体在 CNS 中广泛表达,但事实上在 CNS 的神经元中有关神经营养素信号的生理意义的资料尚不多。这些因子明确的生理学功能应包括:1)基因表达的明确定位;2)基因表达的特异性调节;3)在离体和在体中某种神经营养因子对特定神经群体效应的证明;4)用抗体阻断一种神经营养素效应的检查;5)神经营养素或其受体破裂基因结果的评估。在 CNS 的研究中,NGF 的资料最多。NGF 的功能主要通过 TrKA 调节,NGF 作用于前脑和脑干的一些神经元^[13]。而最引人注意的焦点是基底前脑的胆碱能神经元(the basal forebrain cholinergic neurons, BFCNs)和尾-壳核胆碱能神经元(caudate-putamen cholinergic neurons, CPCNs)。

1. NGF 和基底前脑胆碱能神经元

这些胆碱能投射神经元发出触突支配海马和新皮层(图 2),在学习、记忆和注意中起重要作用。多方面的证据建议,NGF 是 BFCNs 发育的一种靶源性神经营养因子。NGF 产生于海马和新皮层,外源性 NGF 增进 BFCNs 的神经化学分化,引起一些发育调节基因的表达^[20]。在发育期间,海马和新皮层中内源性 NGF 水平和基底前脑特异的胆碱神经递质合成酶(ChAT)的活性之间有密切的短暂的一致性。最近的研究证明,TrKA 在这些细胞中表达,并且在发育期间,TrKA 基因调节的模式与 ChAT 的模式很相似。有三方面的新证据支持 NGF 调节 BFCNs 分化作用的观点:第一,在发育的基底前脑中注入 NGF 可引起 TrKA 激活。第二,外源性 NGF 可引起 TrKA 和 ChATmRNA 两者的水平提高和 BFCNs 的大小增加。第三,给予特异的抗 NGF 抗体可减少两者基因的表达和抑制 BFCN 细胞大小正常发育的增加。这些发现指出,NGF 是作为发育 BFCNs 的一种神经营养因子,NGF 和 TrKA 基因破裂(disruption)提供的结果与这些发现是一致的。在 NGF 基因破裂的情况下,BFCNs 虽仍存在,

但比较小;ChAT 免疫染色变得很淡^[21]。在 TrKA 基因破裂后,BFCNs 也存在,但海马和皮层中乙酰胆碱脂酶(acetylcholinesterase, AChE)染色明显减低^[22],这些结果提供的强有力的证据说明,内源性 NGF 对 BFCNs 的发育起主要作用;它们增进基因表达和促进细胞分化。

2. NGF 和尾-壳核胆碱能神经元

NGF 也作用于发育的尾-壳核胆碱能神经元(CPCNs)。这些神经元在运动的控制中起重要作用。与 BFCNs 投射神经元不同的是,CPCNs 是中间神经元。它们的触突分支完全局限在尾-壳核之内。因此,尾-壳核不仅含胆碱能神经元;尾-壳核的本身就是这些神经元的靶。较早期的研究已表明,NGF 产生于发育的尾-壳核之中,它们是内源性的,NGF 增强这些细胞的神经化学分化。有兴趣的是,与 BFCNs 的发现有所不同,内源性 NGF 的水平与 CPCNs 分化的关系不大。而是与 NGF 结合高亲和力受体的总量有关^[23]。最近的研究发展了这一分析,结果表明:1)TrKA 表达定位于发育的 CPCNs;2)TrKAmRNA 和蛋白存在于整个生后发育期;3)TrKA 在生后发育期间能被 NGF 激活;4)TrKA 和 ChAT 基因表达彼此密切相关;在生后发育期间出现 CPCNs 神经元的大小增加。这些发现建议,TrKA 和 ChAT 基因的表达和神经元的大小有可能被同一因子或同一一些因子所调节。已知 NGF 增加 ChAT 和 TrKAmRNA,并增加成年动物中这些神经元的大小^[24]。但 NGF 是否在发育的 CPCNs 中产生类似的变化,有实验发现,外源性 NGF 上调 ChAT 的表达;也引起尾-壳核中 TrKA 阳性细胞增大(hypertrophy)和 TrKAmRNA 的水平适度地增加。但像所指出的那样,发育尾-壳核中 NGF 水平与分化不为相关。因此,检查外源性 NGF 的意义尚不说明问题。为强调指出,是否内源性 NGF 调节 CPCN 分化,Yuen 等检查了一些复制 NGF 基因被破坏动物 CPCN 中神经元的大小,结果没有发现什么不同。而在相同的动物中 BFCNs 的大小有明显的不同。鉴于

TrKA 和 ChAT 基因的紧密联系,他们进一步问,是否 TrKA 对 CPCN 分化是至关重要的。在 TrKA 基因破裂的动物中,很明显,CPCNs 是比较小的。这一结果指出,TrKA 表达对正常 CPCN 发育是关键的。由于 NGF 是通过 TrKA 的作用以增强 CPCN 发育的最可靠的神经营养素,因此,NGF 对于 CPCN 同样是重要的。但资料指出,CPCN 的分化是决定于 TrKA 受体的水平而不是 NGF 的水平(图 2)。

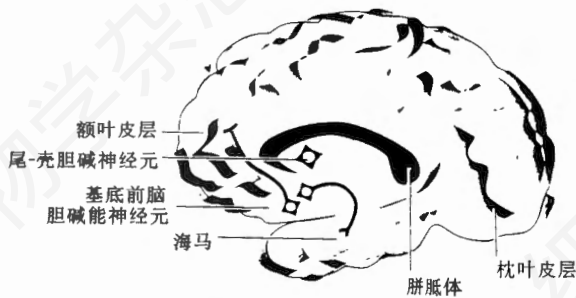


图 2 基底前脑和尾-壳核胆碱能神经元示意图^[12]

基底前脑胆碱能神经元是投射神经元,它们发出轴突支配海马和新皮层。这些细胞起学习、记忆和注意的作用;而尾-壳核的胆碱能神经元是中间神经元,它们与运动的控制有关。

四、神经元的分化—多水平调控

BFCNs 和 CPCNs 的有关研究指出,神经营养素及其受体的作用能够在两个或更多水平进行调节(图 3)。一种情况是,以 BFCNs 为例,是因子的水平主宰下游(downstream)的事件。分化的调节是通过神经营养素的有效性和浓度控制的。神经营养因子假说的逻辑延伸正强调神营养的靶的效应性。第二种情况是受体表达的水平调节继后事件。有意义的是,除神营养素之外,其他一种(或一些)因子调节受体的表达。这一(或一些)其他因子的鉴定尚待发现。但也有可能另外的靶源性神经因子是可能反应的。推测 TrKA 可能不是这个因子的一种受体,而有可能是神营养因子串通(crosstalk)的一个例子。在其间,这样一种因子

配备一种神经元以对另一个因子反应。在 CPCNs 情况中,NGF 必定存在,以激活受体,但它们的绝对水平不是重要的。神经元细胞的分化以神经营养因子受体水平调节的方式很明显的是与原先神营养因子假说相违的。值得一提的是,BFCNs 是投射神经元,而 CPCNs 是中间神经元。也许不同水平的调节对具有不同生理功能的神经元是合适的。

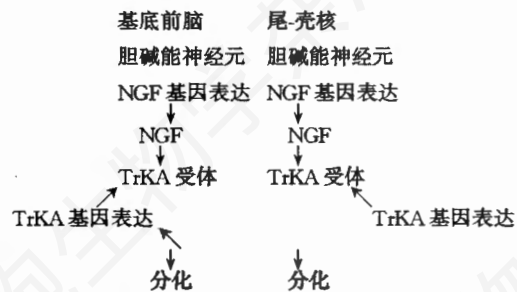


图 3 基底前脑和尾-壳核胆碱能神经元不同水平的调节^[12]

粗黑箭代表每个通路主要的调节步骤

结 论

NGF 的发现和神营养因子假说的确切阐述对于发现神营养因子及其作用特征是极为重要的。随着研究的不断发展,得知神营养关系存在着明显的多样性和复杂性。进一步扩大有关知识将为神经系统发育和维持的了解以及神经疾病的治疗提供更重要的真知灼见。

参 考 文 献

- [1] Longo FM et al., 1993, In: Neurotrophic Factors, Fallon J and Loughlin S, Academic Press, 209.
- [2] Bothwell M, 1995, *Annu. Rev. Neurosci.*, 18: 223 - 232.
- [3] Thoenen H, 1995, *Science* 270: 593 - 599.
- [4] Hamburger V. and Levi-Montalcini, R, 1949, *J. Exp. Zool.*, 111: 457 - 466.
- [5] Levi-Montalcini R. and V. Hamburger, 1951, *J. Exp. Zool.*, 116: 321 - 332.
- [6] Levi-Montalcini R, 1987, *Science*, 237: 1154 - 1162.
- [7] Levi-Montalcini R and V Hamburger, 1953, *J. Exp. Zool.*, 123: 233 - 242.
- [8] Acheson A, et al., 1995 *Nature*, 374: 450 - 456.
- [9] Phillips HS, et al., 1995, *Science*, 250: 290 - 298.

- [10] Barbacid M, 1994, *J. Neurobiol.*, **25**:1386-1394.
- [11] Yuen EC, and WC Mobley, 1995 *Mol Med Today*, **1**:278-287.
- [12] Yuen EC, et al., 1996, *Neural Notes*, **1**,3-7.
- [13] Holtzman DM, et al., 1995 *J. Neurosci.*, **15**:1567-1576.
- [14] Diccico-Bloom. E, et al., 1993 *Neuron*, **11**:1101-1110.
- [15] Verdi JM, and D. J. Anderson, 1994, *Neuron*, **13**:1359-1365.
- [16] Cabelli RJ, et al., 1995, *Science*, **267**:1662-1668.
- [17] Domenici L, et al., 1994 *Neuroreport*, **5**:2041-2052.
- [18] Berardi N, et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **91**:684-694.
- [19] McMahon SB, et al., 1995, *Nature Med*, **1**:774-783.
- [20] Li Y, et al., 1995, *J. Neurosci.*, **15**:2888-2897.
- [21] Crowley C, et al., 1994, *Cell*, **76**:1001-1010.
- [22] Smeyne RJ, et al., 1994, *Nature*, **368**:246-252.
- [23] Mobley MC, et al., 1989, *Neuron*, **3**:655-665.
- [23] Holtzman DM, et al., 1995, *J. Neurosci.*, **15**:1567-1576.

小麦遗传转化技术研究进展

安海龙 卫志明

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

植物基因工程研究兴起于本世纪八十年代中期。自其诞生至今,如何将这项技术应用于小麦、水稻、玉米等农作物的遗传改良研究始终是人们努力的重要目标之一。要实现这一目标,首先需要建立一套高效、可靠、重复性好的基因转化系统。而在植物基因转化系统研究方面,禾谷类相对于其他双、单子叶植物而言,具有起步晚、困难大的特点,而小麦相对于其他禾谷类如水稻、玉米等,又进一步表现出其滞后性和困难性。通常产生转基因植物的方法有两类,一类是借助于原生质体的直接转化法如PEG法、电激法、脂质体法等,另一类是农杆菌介导的植物细胞、组织、器官直至完整植株的基因转化法。在原生质体转化方面,由于用于游离原生质体的小麦胚性悬浮系的建立及由原生质体再生植株的艰难性,直到1988年才由小麦原生质体再生植株成功^[1],进而在1993年获得了小麦转基因植株^[2,3]。迄今这方面的研究也仅有零星的几篇,而已建立的转化系统又普遍存在实验周期长、转化频率低和重复性差的缺点,限制了其进一步的应用。农杆菌方面Woolston等早在1988年即利用农感染的方法证明了小麦细胞的可转化性^[4],然而由于小麦不是农杆菌的天然宿主,同时也由于当时人们

对转化条件的认识尚不足,虽然其后甚至也获得了一些抗性愈伤组织,但是直到1997年才利用农杆菌转化法获得了小麦转基因植株^[5]。目前这方面的报道已有两篇,虽然尚缺少相应的重复实验,转化频率也不高,但以水稻方面的工作为借鉴,继续深入研究无疑是极有价值的。虽然上述两类方法是产生转基因植物的较常用的方法,但是世界首例转基因小麦却是利用基因枪介导的方法产生的。其后一系列的研究又进一步发展和完善了基因枪转化法,使其真正成为目前产生转基因小麦的最成熟、最可靠的转化方法。本文将就这些情况作一综述。

一、基因枪法

1992年Vasil等^[6]用杜邦PDS 1000/He型基因枪轰击5-7月龄具分化能力的C型小麦胚性愈伤组织,采用梯度筛选的方法获得了抗除草剂Basta的再生植株, Southern杂交和PAT酶活性分析证实了bar基因在该小麦基因组中的整合、表达及稳定遗传。这是世界上首例转基因小麦的报道。之后借助于基因枪导入系统,先后有多家实验室也获得了转基因小麦,并进一步在转化系统的改进和完善方面作出了贡献^[7-14]。下面将从受体材料的选择,轰击条