

细胞恶性增殖的研究中有重要的实际意义, 对完成功能的 p21 如何消除也有待探讨. 总之, 对 p21 的深入研究, 将有利于对细胞增殖、分化及衰老的认识.

参 考 文 献

- 1 Xiong Y, Zhang H, Beach D. *Cell*, 1992; **71**: 505
- 2 Harper J W, Adami G R, Wei N *et al.* *Cell*, 1993; **75**: 805
- 3 Zhang H. *Genes & Development*, 1994; **8**: 1750
- 4 El-Deiry W S, Tokino T, Velculescu V E *et al.* *Cell*, 1993; **75**: 817
- 5 Dulic V, Kaufmann W K, Wilson S J *et al.* *Cell*, 1994; **76**: 1013
- 6 Leonardo A D, Linke S P, Clarkin K *et al.* *Gene & Development*, 1994; **8**: 2540
- 7 Kastan M B, Canman C E, Leonard C J. *Cancer and Metastasis Reviews*, 1995; **14**: 3
- 8 Skapek S X, Rhee J, Spicer D B *et al.* *Science*, 1995; **267**: 1022
- 9 Zhang W, Grasso L, McClain C D *et al.* *Cancer Res*, 1995; **55**: 668
- 10 Waga S, Hannon G J, Beach D *et al.*, *Nature*, 1994; **369**: 574
- 11 Chen J, Jackson P K, Kirschner M W *et al.* *Nature*, 1995; **374**: 386
- 12 Haley O, Novitch B G, Spicer D B *et al.* *Science*, 1995; **267**: 1018
- 13 Parker S B, Jackson P K, Kirschner M W. *Science*, 1995; **267**: 1024

- 14 Noda A, Ning Y, Venable S F *et al.* *Experiment Cell Res*, 1994; **211**: 90
- 15 Slichenmyer W J, Nelson W G, Slebos R J *et al.* *Cancer Res*, 1993; **53**: 4164

Multiple Functional p21 Related to Cell Proliferation. Meng Xiangbing, Ye Changqing (*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract p21 is a new discovered cell cycle control element, a CDK inhibitor. p15, p16, p27 are also CDK inhibitors. They can bind with cyclin-CDK complexes and inhibit their kinase activity. These CDK inhibitors play roles in G₁ restriction point and G₁/S checkpoint. Furthermore, p21 gene can be regulated by wild type p53. p21 plays a role in p53 mediated G₁ arrest which is induced by DNA damage. Expression of p21 gene is 10~20 times higher in senescence cells than in proliferating cells. It begins to express when muscle cells start differentiation. These results demonstrate that p21 plays a major role in cell proliferation, differentiation and senescence.

Key words p21, cell cycle control, differentiation, senescence

神经营养素脑内功能及其表达调节*

周安武 郭 君 杜雨苍

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 神经营养素 (neurotrophin, NT) 是与神经生长因子同源的一类神经营养因子, 它们在神经系统的分化和发育过程中起着重要作用, 并具有治疗某些脑疾病的潜在应用价值. 文章较全面地阐述了 NT 在脑内既相互交叉又有各自特性的生理功能, 并系统地介绍了脑内 NT 表达调节方面的研究进展.

关键词 神经营养素, 脑内功能, 表达调节

脊椎动物神经系统的分化和发育,在一定程度上依赖于一类称为神经营养因子(neurotrophic factor)的蛋白质.这类蛋白质无论是在动物神经系统发育早期,还是在动物成年以后,都在神经元的生存和再生方面起着重要作用.

神经生长因子(NGF)是最早被发现的神经营养因子,在NGF发现40年后,才从猪脑中分离纯化了第二种神经营养因子,称为脑衍生神经营养因子(BDNF),随后又用分子生物学方法克隆到了第三种神经营养因子,简称为NT-3.最近,从非洲爪蟾和哺乳动物组织中又分别克隆到了NT-4和NT-5,但NT-4和NT-5后来被认为是来源于不同种属的同一种神经营养因子,合称为NT-4/5.上述这些神经营养因子组成的家族被命名为神经营养素(neurotrophin, NT).NT家族成员大约有60%的氨基酸残基显示了这个家族的同源特征.近年来,通过深入研究NT在神经系统中所发挥的独特作用,尤其是关于NT在脑内功能及其表达调控方面的研究,提示它具有治疗某些脑疾病的潜在应用价值,并正引起人们广泛的兴趣,成为神经科学最活跃的领域.

1 NT 脑内功能

1.1 NGF 脑内功能

采用RNA印迹法,研究NGF mRNA在新生大鼠和成年大鼠脑内的分布情况,结果显示在海马、新皮层和嗅球内NGF mRNA的含量最高^[1].免疫组织化学方法测定结果表明在成年大鼠脑中NGF蛋白含量最高的是海马,其次是皮层和嗅球^[2],这些脑区都是基底前脑胆碱能神经元投射的靶区.

NGF是基底前脑和隔区胆碱能神经元的主要营养因子.在哺乳动物脑内,基底前脑胆碱能神经元参与动物学习记忆功能^[3],它们的轴突组成海马和新皮层的主要胆碱能传入纤维.胆碱能神经元的特征是产生胆碱乙酰基转移酶(ChAT),该酶参与重要神经递质乙酰胆碱的合成. NGF具有提高基底前脑及其胆

碱能投射区内ChAT的活力,增加乙酰胆碱的合成,在脑发育过程中,海马和皮层内NGF水平同基底前脑内的ChAT活力有着密切的关系^[2].另外,基底前脑胆碱能神经元能以高亲和力同NGF结合,并能表达NGF的低亲和力受体p75和高亲和力受体p140^{rk},而p75与ChAT两者表达水平在脑发育过程中的变化存在平行性,提示NGF在其中起着协调作用.实验表明,给幼鼠或成年大鼠脑室内注射NGF,能显著地提高基底前脑及其胆碱能投射区神经元内ChAT的活力,并使成年大鼠基底前脑的胆碱能神经元体积增大、p75和ChAT mRNA水平上升^[4].除此之外,NGF还对这些神经元内其他基因的表达有诱导作用,如NGF能使淀粉样蛋白前体表达量上升^[5].这种NGF对基底前脑胆碱能神经元的滋养作用在体外实验中也得到了验证^[6].更有说服力的实验证据是,脑室注射NGF抗体后,基底前脑及其投射区神经元内ChAT活力明显下降^[7].

脑内胆碱能神经系统是动物学习记忆神经环路的重要组成部分,基底前脑和隔区胆碱能神经元参与动物的学习记忆功能^[8],如果基底前脑受损,就会影响动物的学习记忆功能,而脑室注射NGF有助于记忆受损动物学习记忆能力的提高,推测NGF可能通过影响脑内胆碱能神经系统参与动物的学习和记忆功能.

1.2 BDNF 脑内功能

在BDNF基因被克隆之后,用RNA印迹和脑组织原位杂交的方法研究了BDNF在脑内的表达情况,结果发现BDNF mRNA在大鼠脑内比在周边组织中要丰富得多^[1].

在大鼠脑内,BDNF主要集中在基底前脑胆碱能神经元投射区,包括海马、杏仁核和新皮层,在海马结构中BDNF最集中的是齿回的门区细胞和颗粒细胞,以及CA2-CA4中的锥体细胞层. BDNF在海马组织中的这种分布规律,正好同隔区胆碱能神经元投射而来的神经末梢在海马中的分布情况相一致,推测BDNF可能直接影响海马胆碱能神经传递^[9].

Alderson 等^[10]发现, BDNF 具有与 NGF 类似的促进隔区胆碱能神经元生存和分化的功能. 小鼠脑内 BDNF mRNA 的含量是 NGF mRNA 含量的 50 倍, 提示 BDNF 可能作用于多种神经元. 实验观察到在用高频电刺激诱发长时程增强效应 (LTP) 的过程中伴随有海马内 BDNF 的表达, 而 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体的拮抗剂既可阻断 LTP 的形成又能阻断 BDNF 的表达, 说明 BDNF 与海马 LTP 的维持有密切关系^[11]. 另外, 在动物某些特定学习行为后其海马 BDNF 的表达量明显高于对照, 提示 BDNF 也可能参与了动物学习记忆这种高级脑活动^[12].

1.3 NT-3 脑内功能

实验表明: NT-3 与 NGF 和 BDNF 在不同脑区内分布情况有较大的差异^[1], 但它们表达量最高的脑区都是海马. NT-3 在海马内的表达只限于在 CA2 锥体细胞和 CA1 中间区域, 以及齿回颗粒细胞中.

关于 NT-3 在脑内的功能还不是十分清楚, 但目前研究已显示, 它不仅具有脑内神经营养因子的特点, 而且在神经元的发育及维持其生存方面起着重要作用. NT-3 在脑内主要有以下两个特征: 第一, NT-3 在海马和小脑等脑区的表达量在动物幼年时比成年后要高得多, 提示 NT-3 作为神经营养因子在神经系统发育过程中起了主要作用. 第二, NT-3 在幼年动物脑内的表达量比 NGF 和 BDNF 要高得多, 主要表现在海马和小脑的颗粒细胞在细胞增殖达到高峰时 NT-3 的表达量特别高, 说明 NT-3 可能作为促细胞分裂因子或诱导神经元分化的因子, 促使颗粒细胞的前体细胞分化成成熟的颗粒细胞^[1].

2 NT 脑内表达调节

2.1 发育调节

脑内 NT 的表达量在动物个体发育过程中是变化着的, 如大鼠出生后第 3 周, 海马和新皮层中 NGF mRNA 的含量达到最高峰, 纹状体内 NGF mRNA 含量在动物出生后也有所上

升, 但随后这些脑区 NGF mRNA 含量逐渐下降^[2]. BDNF 的表达量在脑发育前期较低, 随发育成熟则逐渐增高. NT-3 的情况则完全不同, 在动物出生前脑内 NT-3 的表达量远远高于 NGF 和 BDNF, 但随着脑发育的成熟逐渐降低. 到动物成年后 3 种 NT 大致接近相同水平. 其中有两个特征值得一提: 第一, 在早期胚胎发育过程中 NT 的出现在时间上正好与神经系统的发生相一致; 第二, 在成年动物海马组织中 3 种 NT 的表达量都是最高的^[1].

2.2 神经元活动调节

1989 年, Gall 等^[13]首次发现脑内 NGF 基因表达受神经元生理活动的调节, 如电刺激海马齿回导致的癫痫发作 (seizure) 2~3 h 后可引起海马和皮层中 NGF mRNA 的量增加 25 倍, BDNF mRNA 量也上升了几十倍, 实验还显示 NT 表达量的变化是发生在那些正常生理条件下也表达 NT 的脑区内, 如 BDNF 比 NGF 在脑内的分布更广, 而电生理活动导致的 BDNF 表达量的变化同样也可在较大范围的脑区内观察到. 另外, BDNF 一般比 NGF 较快地受诱导而表达, 尤其是在新皮层这种情况更为明显. NT-3 mRNA 的表达似乎不受神经元生理活动的影响, 或者在某些致痫 (limbic seizure) 条件下反而下降^[14]. 因此, 癫痫发作对脑内 3 种 NT 表达的影响情况具有不同的特点.

有些药物也能通过影响神经元活动改变脑内 NT 的表达情况, 如给动物注射谷氨酸受体激动剂红藻氨酸 (KA), 能诱导脑内 NGF 和 BDNF 的表达, 用 NMDA 受体拮抗剂不能阻断该反应, 而用非 NMDA 类受体拮抗剂却能阻断这种诱导作用, 说明脑内受 KA 诱导的 NT 表达是通过非 NMDA 受体介导的^[15]. 但也有实验表明, 在高频电刺激海马引起 LTP 的同时伴随有 BDNF 表达量的升高, 却是通过 NMDA 受体诱导的^[11]. 另有实验表明, 在幼鼠发育早期, NT 的表达调节不受 KA 的调节, 而是通过 NMDA 受体, 同时受到脑内神经元活动和胆碱能神经递质的影响^[16]. 因此,

不同因素刺激引起的脑内 BDNF 表达可能通过不同的途径, 或者说 NMDA 和非 NMDA 受体都参与了 BDNF 基因的表达调节.

2.3 基因转录调节

用分子生物学方法从分析 NT 的基因结构入手, 为深入了解 NT 在脑内基因表达的调节机制提供了许多有意义的认识.

2.3.1 NGF 基因转录调节: NGF 基因结构中包括 4 个外显子, 编码成熟 NGF 蛋白的序列位于第 4 个外显子近 3' 端. 通过两个独立的启动子和不同的 mRNA 剪接方式, NGF 基因转录后产生 4 种不同大小的 mRNA, 这些 mRNA 编码的蛋白 N 端不同, 却具有相同的含成熟 NGF 部分的 C 端. 在 NGF 基因上游存在几种顺式作用元件, 相对于基因转录起始位点的 -24 至 -28 位的序列是 TTAAA, 可能是所谓的 TATA 盒, 是 RNA 聚合酶复合物的结合位点, 指导转录的起始. 除此之外, NGF 基因上游还存在多个类似 AP-1 的结合位点, 用 DNA 印迹法观察到只有位于第一个内含子的 AP-1 位点结合有转录调控因子 AP-1, 而其他类似的 AP-1 结合位点上无任何调控因子结合^[17]. 外界刺激因素是通过 AP-1 结合到 NGF 基因启动子上的 AP-1 结合位点, 从而启动 NGF 基因转录来达到调节 NGF 基因表达的.

2.3.2 BDNF 基因转录调节: BDNF 结构基因由 4 个近 5' 端的外显子和 1 个近 3' 端的外显子组成, 后者编码成熟的 BDNF 蛋白; BDNF 基因中至少含有 4 个启动子, 通过启动 BDNF 基因的不同启动子可调节其在不同脑区的表达. 在动物发育过程中, 海马组织内 BDNF 结构基因 5 个外显子的表达量有一定的规律性. 外显子 I 和 II 的 mRNA 在动物出生后第 1 天 (P1) 在海马内的表达量很低, 随后慢慢增高, 而外显子 III 和 IV mRNA 的表达量在动物刚出生时就较高, 随后也呈缓慢升高的趋势, 提示尽管控制这 4 个外显子转录的 4 个启动子具有各自的特征 DNA 序列, 但有可能存在共同的调控元件, 参与在动物发育过程中脑

内 BDNF 的转录调节^[18]. 前面曾经提到, KA 诱导的海马 BDNF 基因表达是通过激活谷氨酸受体引起的. 通过分析 KA 刺激后海马组织中 BDNF 各外显子 mRNA 的表达量, 发现 KA 主要是促进外显子 I、II 和 III 的转录, 结合使用谷氨酸受体不同亚型的拮抗剂, 发现 NMDA 受体不对海马齿回中外显子 I 的转录起调节作用, 而 NMDA 或非 NMDA 受体的激活均能促进海马 CA1 区外显子 III 的表达. 因此, KA 诱导的海马内 BDNF 的表达, 是通过不同的信号转导途径来激活 BDNF 基因不同的启动子, 并由此调控脑内 BDNF 基因的表达^[19].

2.3.3 NT-3 基因转录调节: 对于 NT-3 基因的表达调节, 目前还了解不多. 最近有文章报道小鼠 NT-3 的基因结构及其可能的转录调节^[20]. 小鼠 NT-3 基因结构包含基因上游两个较小的外显子 (外显子 IA 和 IB) 以及下游 1 个较大的外显子 (外显子 II), 后者编码成熟的 NT-3 蛋白. 外显子 IA 和 IB 分别和外显子 II 连接产生两种不同长度的转录子, 称为转录子 A 和 B. 另外, 位于基因上游的外显子 IA 和 IB 都含有几个典型的转录因子结合位点, 如 SP-1 和 AP-1 结合位点, 除此之外, 在外显子 IB 上游还存在 1 个 TATA 盒. 通过分析 NT-3 的基因结构和转录产物可以看出, NT-3 基因中有两个启动子都可指导其基因转录. 用这些启动子的 DNA 序列做功能分析发现, 随着所采用的外显子上游 DNA 长度的增加, 这些启动子启动转录的活力下降, 由此推测在 NT-3 启动子上游区域内还存在静息元件 (silencing element) 来调节这些基因的转录效率.

3 NT 潜在的医用前景

随着对 NT 脑内功能研究的不断深入, 人们认识到它们可能具有治疗某些脑疾病的潜在医用价值. 例如, 前脑胆碱能神经元的衰退及伴随的海马和皮层中神经递质乙酰胆碱的缺乏是老年性痴呆症的显著特征, NT 用于治疗这

一病症的可能性在于, 若将隔区胆碱能神经元与投射区海马和皮层的联系切断, 通过脑室注射外源 NGF 能避免这些胆碱能神经元的萎缩和死亡. 另外, 给老龄记忆障碍鼠注射 NGF 同样能提高脑内 ChAT 的水平和增大胆碱能神经元的体积, 并有助于记忆能力的恢复. 除 NGF 外, BDNF、NT-3 和 NT-4/5 也能起到类似的作用. 而且, BDNF、NT-3 和 NT-4/5 对脑内神经元作用的种类更加广泛. 事实上, 在老年性痴呆症中, 脑神经元的病变也不只限于胆碱能神经元, 还有其他神经元也发生了病变, 包括一些以去甲肾上腺素和 5-羟色胺作为递质的神经元, 另外, 新皮层和海马神经元也发生了病变.

当然, 在 NT 真正应用于临床之前还需解决很多问题, 比如安全有效的给药途径, 包括 NT 蛋白在体内的失活问题和血脑屏障等问题. 这方面已有人设想采用依靠载体的给药方法以及开发提高内源 NT 表达水平的试剂等方法, 总之目前有许多研究机构正在积极进行这方面的工作.

参 考 文 献

- Maisonpierre P C, Belluscio L, Friedman B *et al.* Neuron, 1990; 5: 501
- Large T H, Bodary S C, Clegg D O *et al.* Science, 1986; 234: 352
- Richardson P M, Verge Issa V M K, Riopelle R J. J Neurosci, 1986; 6: 2312
- Cavicchioli L, Flanigan T P, Vantini G *et al.* Eur J Neurosci, 1989; 1: 258
- Mobley W C, Neve R L, Prusiner S B *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85: 9811
- Hartikka J, Heftei F. J Neurosci Res, 1988; 21: 352
- Vantini G, Schiavo N, Di Martino A *et al.* Neuron, 1989; 3: 267
- Pallage V, Toniolo G, Will B *et al.* Brain Res, 1986; 386: 197
- Philips H S, Hains J M, Laramée G R *et al.* Science, 1990; 250: 290
- Alderson R F, Alterman A L, Barde Y-A *et al.* Neuron, 1990; 5: 297
- Dragunow M, Beiharz E, Mason B *et al.* Neurosci Lett, 1993; 160: 232
- Falkenberg T, Mohammed A K, Henridson B *et al.* Neurosci Lett, 1992; 138: 153
- Gall C M, Isackson P J. Science, 1989; 245: 758
- Rocamora N, Palacios J M, Mengod G. Mol Brain Res, 1992; 13: 27
- Wetmore C, Olson L, Bean A J. J Neurosci, 1994; 14: 1688
- Berzaghi M P, Cooper J, Castren E *et al.* J Neurosci, 1993; 13: 3818
- Hengerer B, Lindholm D, Heumann R *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 3899
- Timmusk T, Belluardo N, Persson H *et al.* Neuroscience, 1994; 60: 287
- Nakayama M, Gahara Y, Kitamura T *et al.* Mol Brain Res, 1994; 21: 206
- Leingartner A, Lindholm D. Eur J Neurosci, 1994; 6: 1149

Function and Expression Regulation of Neurotrophins in Brain. Zhou Anwu, Guo Jun, Du Yucang (Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031, China).

Abstract A family of neurotrophic factors homologous to nerve growth factor (NGF) is designated by the name of neurotrophins. They play important roles in the differentiation and development of nervous system and might have clinical potential in the treatment of neurodegenerative diseases. The recent advances in reciprocal but distinctive physiological roles of the neurotrophins and their expression regulation in brain are summarized.

Key words neurotrophin, function, expression regulation, brain