

BRCA-1 基因与神经干细胞

杨仁江 高冠群 张卓伯 王 岩 谷莹丽

(哈尔滨医科大学附属第四医院神经内科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 乳腺癌易感基因(Breast cancer susceptibility gene, Brca-1)是肿瘤抑制基因家族中的一员,它是乳腺癌特异性抑癌基因,1994年 Miki 等^[1]采用定位克隆方法首次将 Brca-1 分离出来。Brca-1 能防止细胞过快或失去控制地生长和分化,在调节细胞进程、DNA 损伤修复、细胞生长与凋亡及转录活化和抑制等多种生物学途径都发挥重要作用。Korhonen 等 2003 年报道 Brca-1 基因可促进体外培养的大鼠来源的神经干细胞的增殖。

关键词 Brca-1 基因 神经干细胞 增殖

中图分类号 Q75 Q78 R743 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)04-788-03

BRCA-1 and Neural Stem Cells

YANG Ren-jiang, GAO Guan-qun, ZHANG Zhuo-bo, WANG Yan, GU Ying-li

(The 4th Hospital of Harbin Medical University otolaryngological department, Harbin, Heilongjiang 150001)

ABSTRACT: Breast cancer susceptibility gene (BRCA-1), a member of tumor suppressor gene family, by which breast cancer can be inhibited specifically, was dissociated by Miki et al. through positioning cloning at 1994. It can prevent the over-quick or uncontrolled growth and differentiation. It plays important roles in many fields, Such as regulation of cells process, repareation after DNA damage, growth and apoptosis of cells, activation and inhibition of transcription and so on. In 2003, it was reported by Korhonen et al. that the proliferation of vitro cultured neural stem cells of rat can be promoted by BRCA-1.

Key words: BRCA-1; Neural stem cells; Proliferation

Chinese Library Classification(CLC): Q75 Q78 R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)04-788-03

前言

脑卒中是导致人类死亡的第二大病因和成人致残的主要原因,在世界范围内因卒中所致的死亡 2/3 以上在欠发达国家。在我国脑卒中是第二常见死因,死亡率和发病率比心血管病高 3 倍以上。随预期寿命延长,老龄人口比例越来越高,脑卒中患者将日益增多,其中缺血性卒中占 70%-80%。其高负担、高社会危害性的特点,引起全世界高度重视,投入大量资源对脑卒中防治基础及临床进行研究。阿司匹林的应用、RT-PA 溶栓治疗是缺血性卒中治疗史上两次有里程碑意义治疗进步;神经保护剂应用给缺血性卒中药物治疗带来了希望。虽然前述治疗策略已取得一些效果,但缺血性卒中患者未从中明显获益、高发病率和致残率未明显降低,因此细胞替代治疗成为神经科学家们在不断探索的最有希望的治疗方法。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的发现是神经科学领域的重大突破,对其进行培养、分化、增殖是当前研究热点。NSCs 是脑发育分化的重要源泉,其醒目特征是能够自我更新、并具有多向分化潜能,是修复和代替受损脑组织的有效方法,能重建部分环路和功能,因此 NSCs 成为细胞替代治疗研究的主要细胞来源^[2,3,4]。尽管干细胞研究还处于起步阶段,但其已在医学领域中呈现诱人的光辉前景,采用胚胎神经组织细胞悬液作为神经替代治

疗曾用于治疗帕金森病,移植能部分改善年龄在 60 岁以下患者临床症状,胚胎神经组织移植不可避免面临着伦理学、供体组织缺乏、移植存活率低等问题,从而限制了临床应用。而 NSCs 在一定程度上克服了这些缺点,因而 NSCs 替代治疗应用有巨大光辉前景及应用潜力,为目前难以根治的神经系统疾病带来希望。NSCs 移植治疗缺血性卒中倍受神经科学家关注。目前细胞替代治疗方法主要是:促进内源性 NSCs 增殖、分化,现无成功经验,体外培养 NSCs 进行细胞直接移植治疗,但移植细胞大多分化为神经胶质细胞,分化的少量神经细胞不能与宿主细胞有效整合,虽然治疗取得一定效果,但却投入大量资源。因此,无论是体内还是体外机制,NSCs 发育和分化中基因表达的调控和信号的传导机制等需要迫切探讨。

1 Brca-1 基因

乳腺癌易感基因(Brca-1)是近年发现的对乳腺癌及卵巢癌有特异性抑制作用的抑癌基因。1994 年 Miki 等^[6]采用定位克隆方法首次将 Brca-1 分离出来,其结构复杂,功能多样,能编码具有多重功能的蛋白,其与 DNA 损伤修复、转录活化和抑制、参与染色体稳定,能从多渠道对细胞增殖、生长、凋亡发挥重要作用,监控细胞周期并对其进行调节^[5]。但目前作用机制不明确,可能通过如下机制:Brca-1 是调控 G/M 期关键点的调控因子,在静止期的细胞检测不到该基因转录,在快速增殖细胞中其表达明显增多;现已证实 Brca-1 可对增殖细胞损伤的 DNA 进行修复、保持细胞基因组的完整性,在细胞 DNA 受损时 Brca-1 基因作为一种负性调控因子,参与细胞周期检控点

作者简介 杨仁江(1978-)男,硕士研究生在读,主治医师,主要研究方向:神经系统疾病的神经干细胞治疗。电话:18646357715, E-mail:zzbggq@163.com

(收稿日期 2011-10-06 接受日期 2011-10-30)

的调节^[7]。若损伤的 DNA 无法及时有效修复,将激活死亡蛋白酶(Caspases),特异的酶切许多维持生命活动的重要功能蛋白导致细胞凋亡,同时研究显示剥夺神经营养因子可激活神经元的死亡程序,起先认为其通过神经元代谢而有助于神经元存活,实际上神经生长因子抑制神经元死亡,同时 Brca-1 影响以自分泌、旁分泌因子的分泌,由此认为 Brca-1 对维持神经元正常功能和数量起重要作用;正常情况下 Brca-1 蛋白可与细胞周期素依赖性激酶及细胞周期素 A、D 结合,在不同细胞周期,呈磷酸化和去磷酸化时相变化。在 G1 晚期和 S 期呈现高度磷酸化状态,在 M 期后转为去磷酸化状态。因此,Brca-1 基因可能对细胞周期的正常运转起一定的作用。Brca-1 具有转录活化促进正常细胞的细胞周期进行积极作用,再此过程中对多种分子及通路进行调节。Brca-1 基因可通过作用于 G1/S 期、参与 G2/M 期检控点的调节等多种途径抑制肿瘤细胞过度增殖。并且 Foulkes^[8]Liu^[9]Furuta 等^[10]通过实验证实 Brca-1 在乳腺癌干细胞形成、增殖、分化过程中起重要作用。所以因其广泛功能、重要作用引起肿瘤学家对其进行了广泛、深入研究,同时也引起神经科学家的高度关注。Brca-1 基因最先被发现于内分泌组织中表达,后发现正常状态下神经组织中也有表达,其在神经细胞增殖过程中有较高表达,并受雌激素(estrogen, E2)的调控。用雌激素上调 Brca-1 基因表达,神经干细胞增殖明显增多。

2 神经干细胞

神经干细胞(NSCs)是在研究造血发生和神经发育基础上开始,并于 1989 年首次提出了 NSCs 的概念,McKay 于 1997 将 NSCs 的概念定义为:具有分化为神经元、星形胶质细胞及少突胶质细胞的能力^[11],能自我更新并足以提供大量脑组织细胞的细胞群,并发表在 Science 杂志上。传统的神经组织一成不变的观点被打破。1992 年 Reynolds^[12]和 Weiss 从成年鼠大脑分离出在体外依赖表皮生长因子(epithelial growth factor, EGF)生存的神干细胞,这才有了 NSCs 存在的直接证据。此后人们又从成年地鼠及恒河猴等哺乳动物的海马等处分离出 NSCs。近年来,在人胚胎期 NSCs 的研究中,已先后从大脑皮质、嗅球、室管膜层或者室管膜下层、侧脑室、三脑室、四脑室及脑室附近、纹状体、视网膜、海马的齿状回颗粒细胞下层等脑组织中分离得到 NSCs,间脑、中脑、小脑、脊髓^[13]、隔区也分离出 NSCs,表明其广泛存在于神经系统^[14]。1998 年 Eriksson 首次报道了成年人脑中也存在神经元新生的现象。研究发现集中分布在室管膜下区的 Nestin 阳性细胞即 NSCs,并存在两个聚集区:侧脑室壁的脑室下层和海马齿状回的颗粒下层,在一些非神经发生的部位如脊髓也发现有成体 NSCs 存在。目前对成年动物大脑中 NSCs 研究改变了其神经元数量是稳定不变的认识,且神经再生与其功能有密切关系,强化其功能可以延长神经细胞存活时间、提高增殖水平及增加新生神经元数目,如学习或奔跑对海马神经细胞积极影响,且由 NSCs 产生的新生神经元能和宿主神经细胞进行有效整合,并参与其所在区域正常功能。对其超微结构检查及整合区域进行电生理分析,表明新生神经元具有正常突触结构及相似成熟神经元电生理特征,新生神经

元电生理特征在离体实验同样被证实,现证实成年中脑黑质有新生的多巴胺神经元不断形成,可以向纹状体投射纤维并参与大脑皮层的多突触联系,这些都证明了由成年 NSCs 产生的新生神经元不仅在形态与成熟神经元相同,并且可以有效地整合到神经网络以及进行有效的细胞替代治疗。国内外研究表明,诱导因素能使在体成体 NSCs 发生内源性神经再生。缺血、缺氧可使成年动物脑部 NSCs 自行再生、增殖,且分化的新生神经元能部分地代替和修复受损的神经元,减轻功能缺损。Iwai^[15,16]将这个过程进行了阐述,但激活脑内源性的 NSCs 实现自我修复仍然处在实验研究的初期。此过程受细胞外信号分子和胞内因子的协同调控。多种细胞内因子调控 NSCs 自我更新和分化,对神经元种类和数目的分化有重要影响。现已明确,人 Nestin 基因对神经干细胞起增强作用并也对早期神经干细胞其它基因表达起作用,包括 Notch 基因(在中枢神经系统发育过程中确定神经元数量的重要调控基因)。碱性螺旋-环-螺旋基因(bHLH)其活性的相对减弱及增强均可促发祖细胞向神经元分化。近年来研究发现 Brca-1 参与了 NSCs 更新、增殖和分化。

3 Brca-1 基因调控神经干细胞

神经干细胞发育调控分为内源性、外源性两大类。内源性调控即基因调控,对神经元种类和数目的分化有重要影响,在阐述内源性调控机制的同时可逐渐了解 NSCs 所处微环境(神经干细胞外源性调控机制)。明确 NSCs 内源性调控机制是进行干细胞替代治疗的首要前提。近年来发现,Brca-1 基因在胚胎大鼠神经上皮发育时有高表达。有研究将幼年动物室周带来的祖细胞移植到年老动物体内,正常情况下,这些细胞定居在皮质深层,但实验发现这些细胞与其它细胞想混迁移到皮层表层,更显著的是移植细胞的分化位置与移植时所处细胞周期有关;因而,年幼祖细胞对细胞周期相关的环境信号仍敏感。Rozqallah 等发现 Brca-1 基因对维持大鼠胚胎干细胞增殖起重要作用,大鼠胚胎期神经干细胞增殖旺盛时,Brca-1 基因表达量增加,在胚胎大脑形成时期 Brca-1 表达显著升高;抑制 Brca-1 基因表达,神经干细胞增殖减弱。敲除 Brca-1 基因的胎鼠,出现神经管发育不完全,神经上皮发育过程不连续等。这一现象说明神经发生过程存在早期调控机制,由此推测神经前体细胞和神经细胞的增殖受到 Brca-1 基因调控^[17,18,19]。这可能与 Brca-1 基因及 Brca-1 蛋白的复杂功能有关。Gage 小组研究发现成年神经干细胞 Brca-1 基因表达,出生时几乎不能检测到,出生后表达增加。经过克隆分析表达 Brca-1 的神经干细胞克隆都具有自我更新能力,而且这些初级和次级克隆经过诱导都可以分化为神经元。在进行神经干细胞体外诱导增殖实验时,用雌激素上调 Brca-1 基因表达,神经干细胞的增殖量也随之升高。二者之间表现了正相关关系,这些都证实它可以调控神经干细胞的增殖。Brca-1 基因可能是对神经干细胞分化和增殖状态进行调控的目标基因之一。

4 展望

神经干细胞临床研究虽然还处于起步阶段,但其应用潜力及前景,使越来越多神经科学家去探索神经干细胞迁移、增殖、分化以及与宿主细胞融合的细胞内、外环境调节机制,以早日实现 NSCs 临床应用,实现 NSCs 对机体的自我修复。脑损伤可以促发脑内神经干细胞增殖产生新生的神经元, Brca-1 基因、神经生长类因子可以促进这种新生。并且脑组织的损伤能够刺激新生神经元向损伤区迁移,迁移到损伤区的这些新生细胞有可能存活并分化为成熟细胞甚至整合进入局部的神经网络,从而帮助修复损伤的脑组织。目前由于这种反应尚不足以有效修复缺损的神经元,进一步明确脑损伤对内源性 NSCs 的影响,有助于明确基因、神经生长因子作用机制,将找到其在增殖、迁移和分化过程中作用靶点,才可能人为进行有效干预,促进内源性神经干细胞的激活,从而有效促进受损神经功能恢复,实现神经网络重建,恢复其功能。随着对基因及 NSCs 探索不断深入,将逐渐阐明 Brca-1 基因、Nestin 基因、bHLH 基因等对 NSCs 增殖的影响、信号转导机制及干细胞微环境机制,破解 NSCs 迁移、增殖、分化机制难题,以实现细胞替代治疗的临床应用。

参考文献(References)

- [1] Miki Y, Swensen J, Shattuck Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 [J]. Science, 1994, 266 (5182): 66-71
- [2] Gage FH. Mammalian neural stem cells. Science, 2000, 287 (5457): 1433-1438
- [3] Park KI, Liu S, Flax JD, et al. Transplantation of neural progenitor and stem cells; developmental insights may suggest new therapies for spinal cord and other CNS dysfunction [J]. J Neurotrauma, 1999, 16 (8):657-687
- [4] Svendsen CN, Smith AG. New prospects for human stem-cell therapy in the nervous system. Trends Neurosci, 1999, 22(8):357-364
- [5] Scully, Chen J, Ochs RL, et al. Dynamic changes of BRCA-1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage [J]. Cell, 1997, 90(3): 425-435
- [6] Miki Y, Swensen J, Shattuck Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA 1 [J]. Science, 1994, 266 (5182): 66-71
- [7] Lou Z,chini CC, Minter-Dykhous K, et al. Mediator of DNA damage checkpoint protein1 regulates BRCA-1 Localization and phosphorylation in DNA damage checkpoint control. J Biol Chem, 2003, 278: 13599-13602
- [8] Foulkes WD. BRCA 1 functions as a breast stem cell regulator [J]. J Med Genet, 2004, 41(1): 1-5
- [9] Liu S, Ginestier C, Charafe Jauffret E, et al. BRCA 1 regulates human mammary stem / progenitor cell fate [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(5): 1680-1685
- [10] Furuta S, Jiang X, Gu B, et al. Depletion of BRCA 1 impairs differentiation but enhances proliferation of mammary epithelial cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(26): 9176-9181
- [11] Kornblum HL. Introduction to neural stem cells. Stroke. 2007 ;38 (2Suppl):810-816
- [12] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adults mammalian central nervous system. Science. 1992;255:1707-1710
- [13] Temple S. The development of neural stem cells. Nature, 2001, 414: 112-117
- [14] Deleyrolle LP, Reynolds BA. Identifying and enumerating neural stem cells application to aging and cancer [J]. Prog Brain Res, 2009, 175 :43-51
- [15] Iwai M, Sato K, Omoi N, et al. Three steps of neural stem cells development in gerbil dentate gyrus after transient ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(4): 411-419
- [16] Iwai M, Sato K, Kamada H, et al. Temporal profile of stem cell division, migration, and differentiation from subventricular zone to olfactory bulb after transient forebrain ischemia in gerbils [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(3): 331-341
- [17] Gretchen V. R at brains respond to embryonic stem cells [J]. Science, 2002, 295(5553): 254-255
- [18] Korhonen L, Brannvall K. Tumor suppressor gene BRCA1 is expressed by embryonic and adult neural stem cell and involved in cell proliferation [J]. J Neurosci Res, 2003, 71: 769-776
- [19] Hurn PD, Macrae IM. Estrogen as a neuro protectant in stroke [J]. JCBFM, 2000, 20: 631-652