

20kDa 蛋白质对 CytA 蛋白溶细胞作用的影响. 遗传学报, 1999, 26 (1): 81~ 86

Liu Z D, Sun M, Chen Y H. *et al.* Acta Genetica Sinica, 1999, 26 (1): 81~ 86

12 Wu D, Johnson J J, Federici B A. Synergism of mosquitoicidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. Mol Microbiol. 1994, 13 (16): 965~ 972

13 Gazit E, Burshtein N, Ellar D J, *et al.* *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxin associates specifically with its synthetic helices A and C in the membrane bound state: Implication for the assembly of oligomeric transmembrane pores. Biochemistry, 1997, 36 (49): 15546~ 15554

Advances in 3-Dimensional Structure and Function of Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. SHAO Zong-Ze^{1,2)}, LIU Zi-Duo¹⁾, YU Zi-Niu¹⁾ (¹⁾ Department of Microbial Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ²⁾ Life Science College, Shandong Agricultural University, Taian 271018,

China).

Abstract Three-dimensional structure of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* has been revealed to be three distinct domains. It has been found that different Cry toxins share similar structures. Domain I, consisting of a bundle of α -helices in which a hydrophobic helix 5 is surrounded by 6~ 7 amphipathic helices, plays a unique role in pore formation. Domain II, consisting of three antiparallel β -sheets with a loop at each apex, is responsible for receptor binding. Domain III consists of two twisted, antiparallel β -sheets forming a $\alpha\beta$ -sandwich with a "jelly roll" topology, it might prevent the activated toxin from excessive degradation.

Key words *Bacillus thuringiensis*, insecticidal crystal proteins, domain

神经干细胞研究进展

唐炯 赵寿元 李昌本

(复旦大学遗传研究所, 上海 200433)

摘要 神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 是中枢神经系统中保持分裂和分化潜能的细胞, 对它的研究和应用已成为近年来脑科学研究的一个重要领域. 神经干细胞体外培养技术的建立提供了对其进行研究的有力手段. 目前的研究主要集中于神经干细胞在脑中的起源、分布及在中枢神经系统疾病治疗中的应用等方面.

关键词 神经干细胞, 分化, 移植, 帕金森氏综合征

学科分类号 Q343, Q954.52

神经干细胞的研究工作已成为近年来脑科学研究的一个重要领域. 它不仅改变了认为成年动物的神经细胞不能分裂的传统观点, 而且在研究脑的发育和分化以及疾病治疗上均具有重大价值.

早在 20 世纪 60 年代, Altman^[1] 用同位素标记的胸腺嘧啶掺入脑中, 发现在新皮层、海马、嗅球的细胞有同位素掺入, 证明这些区域有能分裂的细胞存在. 但作为干细胞必须具备以下特征: a. 能在动物的整个生命过程中持续分裂或保持分裂能力; b. 能通过分裂产生相同的干细胞来维持自身的存在, 同时也能产生子细胞并进一步分化成各种成熟的细胞^[2,3]. 由于当时的条件无法进行活体追踪, 体外培养也未能建立, 因此传统观点一直占优势^[4].

1 神经干细胞的特点

神经干细胞的分离和鉴定是由于体外培养技术的建立而获得成功的. 研究对象主要是啮齿类动物和人体细胞. 取自胚胎、新生和成年动物的脑组织均能在体外培养出神经干细胞. 获得神经干细胞的方式有三种: a. 用反转录病毒导入原癌基因, 如 *v-myc* 和 SV40 大 T 抗原等, 部分细胞因此获得持续分裂的能力^[2]; b. 用特殊的无血清培养条件结合表皮生长因子 (EGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的作用, 使细胞在体外增殖^[2,3]; c. 通过诱导胚胎干细胞, 使其分化成神经干细

Tel: (021) 65642428, E-mail: syzhao@fudan.edu.cn

收稿日期: 1999-12-19, 修回日期: 2000-04-20

胞^[5,6]。当受到外界因素刺激或撤去生长因子时,细胞即开始分化成各种成熟的神经细胞和胶质细胞^[2,7,8]。

Mckay 等进一步论证了这些细胞在活体中的行为。他们将刚刚分离得到的人神经干细胞和在体外经过传代培养的神经干细胞分别植回大鼠的侧脑中,然后用人特异性的探针和抗体作杂交和免疫组化来追踪移植的细胞。手术后,在灰质和白质的很多部位,包括嗅球、皮层、海马、纹状体、隔膜、头盖、丘脑、脑干等处发现了供体细胞。最初供体细胞团附在脑室壁上,之后逐渐向各个部位迁移并开始分化。用细胞特异性的抗体证明了供体神经干细胞在体内确实分化出了各种成熟的神经细胞和胶质细胞,而且这种分化完全取决于周围微环境的诱导,非常类似于脑早期发育中的情况^[9,10]。

2 研究现状

2.1 神经干细胞在脑中的分布

在胚胎发育过程中,很多部位,包括大脑皮层、纹状体、小脑等均存在一定数量的神经干细胞,这已由体外细胞培养所证实。在成体中,目前对神经干细胞的分布主要有两种意见: a. Frisen 等提出证据认为成体中神经干细胞位于脑室的室管膜。他们使单层的室管膜细胞带上特定的标记,然后追踪它们的迁移和分化。最直接的证据是将单个室管膜细胞取出进行体外培养,细胞能形成神经球,并最终分化成神经细胞、星型胶质细胞和少突胶质细胞。室管膜细胞是处于脑室游离面的一层细胞,长期以来一直被认为是发育成中枢神经系统的神经管的残留部分,但它的起源及与其他细胞的关系仍然不清^[11,12]。 b. van der Kooy 和 Alvarez-Buylla 两个研究组提出另一个部位——室管膜下层,由于这一结构和室管膜紧紧相邻,较难区分。因此他们将这两个结构分离之后分别培养,发现来自室管膜的细胞能形成神经球,但只含有室管膜细胞和胶质细胞,而且不能传代。而来自室管膜下层则具备神经干细胞的特征^[12~14]。这一问题的困难之处在于很难找出时间上的起点,因为一旦神经干细胞由一方向另一方的区域迁移后,就无法确定其起源于何处。

2.2 在治疗神经系统疾病中的应用

中枢神经系统疾病中有很多是因为某种特定的脑细胞发生退行性死亡,导致一些重要的神经递质,蛋白质因子或某些重要结构的匮乏所致。因此

在成功地培养了神经干细胞之后,人们很自然地想到利用它直接进行移植治疗,或利用病毒载体,携带目的基因,导入神经干细胞,将筛选得到的体外高效表达目的基因的克隆进行移植。这种新的细胞治疗方法具有以下优点: a. 神经干细胞在脑中能根据其周围微环境的诱导而分裂,分化成相应的细胞类型,其形态和功能与附近的宿主细胞非常类似。即使是将因转入原癌基因而永生化的神经干细胞植入脑后也未长出肿瘤^[10]。 b. 中枢神经系统具备特殊的结构——血脑屏障,这使得淋巴细胞很难进入,因此不同个体之间,甚至是不同物种之间的神经干细胞移植,都几乎没有排异反应,大大拓宽了神经干细胞的来源。 c. 神经干细胞可以在体外根据不同的需要导入相应的外源基因,成为一种广谱的细胞载体。

目前很多研究组根据神经干细胞的这些特性,从不同角度加以运用,在神经系统疾病的治疗上取得了很大进展。

Snyder 小组针对的是患有黑朦症 (Tay-Sachs disease, TSD) 的转基因小鼠。该小鼠细胞中 β -己糖苷酶的 α 亚基发生突变使神经节苷脂 GM₂ 无法转变成 GM₃, GM₂ 在脑中的积累就导致神经元退化。他们利用双嗜性逆转录病毒将己糖苷酶转入人和小鼠的神经干细胞后,分别与 TSD 小鼠的神经细胞进行共培养。培养时,干细胞和缺陷型细胞用膜隔开,使细胞无法通过。结果神经干细胞分泌产生的己糖苷酶透过膜进入 TSD 小鼠细胞,使细胞中的酶活性升至正常水平,GM₂ 大量下降,各种类型的脑细胞也得到了恢复。在活体实验中,小鼠的神经干细胞被移植入新生小鼠的脑室后迁移至很多部位,并且分化成与该区域发育阶段相应的细胞类型,酶的表达也在体内得到了证实^[10]。

帕金森氏综合症的发病率在神经系统退行性疾病中位居第二,主要是因为多巴胺能神经元的退化、死亡,导致多巴胺的水平下降所致。有两个小组分别采取不同的思路,提出治疗方案。Mallet 小组采用的是表达外源基因的途径。酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 是多巴胺合成过程中的限速酶,因此他们将其作为目的基因导入神经干细胞。同时为了保证其在体内不致于过高表达,将酪氨酸羟化酶基因置于一个四环素的基因负调控系统中。体外和体内实验都证明了这个调控系统的有效性,而且当停用四环素后 TH 的表达又可恢复,使症状得到缓解^[15]。Arenas 等则充分利用了神经

干细胞的潜能, 在体外诱导其分化成具有多巴胺能表型的神经元. 这种诱导需要核受体 Nurr1 的过量表达和来自 I 型星型胶质细胞的因子的共同作用, 获得的细胞中有 80% 具有与内源性多巴胺能神经元相同的表型, 即呈 TH 阳性. 进一步的研究发现, Nurr1 可能在诱导出 TH 阳性表型前调节靶基因, 因而使神经干细胞能对来源于星型胶质细胞的信号作出反应的能力^[16].

多发性硬化症也是一种较为高发的神经系统疾病, 在其啮齿类动物模型中发现产生髓鞘的少突胶质细胞被破坏或失去功能. Snyder 和 Duncan 的实验室分别采用了两种不同的细胞来作为移植的供体细胞. Snyder 的实验方案简单而直接. 他们将神经干细胞直接移植到新生的 shiverer (shi) 小鼠脑中. 该小鼠能产生少突胶质细胞, 但由于缺乏对髓鞘形成至关重要的髓鞘基本蛋白 (myelin basic protein, MBP), 因而产生病变. 移植的细胞在脑中发生了大范围的迁移, 使 MBP 得到了补充. 在分化成的少突胶质细胞中, 平均有 40% 的细胞形成了髓鞘, 其特性非常接近正常状态. 一些接受移植的动物其典型的震颤症状也得到了明显改善^[17].

Duncan 的研究小组采用了和 Arenas 类似的策略, 他们发现 B104 成神经细胞瘤的培养液按一定比例用于培养神经干细胞, 能使神经球转化成少突胶质细胞球. 这些少突胶质祖细胞不仅能自我维持, 而且更类似于新生鼠的少突胶质祖细胞, 因而在移植后具有强大的形成新髓鞘的能力^[18].

另一方面, 人们也想到既然脑中已经存在神经干细胞, 为什么还要进行移植? 现在发现, 脑中的这些干细胞仅是维持分裂的潜能, 由于缺乏足够的正向刺激信号, 在通常情况下很少增殖, 因而在很多损伤条件下无法产生大量的新生细胞去补充. 围绕如何增强活体中神经干细胞的分裂和迁移能力的研究工作也正在开展, 并已取得了一定的成果^[19].

啮齿类动物的海马区一向被认为对记忆至关重要, 在此区域也早已发现有少量新的脑细胞产生. Gould 和 Gage 认为体力和脑力活动能大幅度增加新生细胞数. 同时, Wagner 等报道当把 bFGF 直接在外周循环系统注射后, 它可通过血脑屏障进入脑, 增强细胞的增殖能力, 这种效果与上述体力和脑力活动相类似. 当两者结合运用时, 就能增加成年哺乳动物脑中的新生细胞量^[19].

3 存在的问题与前景

无论是依靠内源还是外源性的神经干细胞, 目

前的策略都带有相对的被动性. 因为不管是生长因子刺激或是移植都无法对其迁移和分化进行控制, 到达预期的区域, 分化成预期的细胞. 因此从基础理论研究和治疗角度出发, 研究神经干细胞如何增殖、迁移和分化应是今后研究的重点. 其中对胚胎干细胞如何转变成神经干细胞又分化成各种成熟的神经细胞的研究, 很可能成为一条将来克服内源性自我修复障碍的途径.

通过结合细胞培养技术和日益发展的基因组研究方法, 比如 DNA 微阵列技术, 有望确认神经干细胞的本质和控制分化的基因. 前者可以使我们弄清成体神经干细胞的确切位置, 从而可以设计药物特异性地激活这些细胞; 而后者中这些基因将成为调控的靶基因, 用以从神经干细胞中产生特定的分化细胞来满足各种需要^[19].

参 考 文 献

- 1 Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 1962, **135** (3509): 1127~ 1128
- 2 Gage F H, Ray J, Fisher L J. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci*, 1995, **18**: 159 ~ 192
- 3 Weiss S, Reynolds B A, Vescovi A L, *et al.* Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain. *TINS*, 1996, **19** (9): 387~ 393
- 4 Alvarez-Buylla A, Lois C. Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells*, 1995, **13** (3): 263~ 272
- 5 Steghaus-Kovac S. Stem Cells as potential nerve therapy. *Science*, 1999, **285** (5428): 650~ 651
- 6 Brustle O, Jones K N, Learish R D, *et al.* Embryonic stem cell derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*, 1999, **285** (5428): 754~ 756
- 7 Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 1992, **255** (5052): 1707~ 1710
- 8 McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science*, 1997, **276** (5309): 66~ 71
- 9 Brustle O, Choudhary K, Karram K, *et al.* Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats. *Nature Biotechnology*, 1998, **16** (11): 1040~ 1044
- 10 Flax J D, Aurora S, Yang C-H, *et al.* Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nature Biotechnology*, 1998, **16** (11): 1033~ 1039
- 11 Johansson C B, Momma S, Clarke D L, *et al.* Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, 1999, **96** (1): 25~ 34
- 12 Temple S. CNS development: The obscure origins of adult stem cells. *Current Biology*, 1999, **9** (11): 397~ 399
- 13 Chiasson B J, Tropepe V, Morshead C M, *et al.* Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci*, 1999, **19** (11):

4462~ 4471

- 14 Doetsch F, Caille I, Lim D A, *et al.* Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 1999, **97** (6): 703~ 716
- 15 Corti O, Sabate O, Horellou P, *et al.* A single adenovirus vector mediates doxycycline-controlled expression of tyrosine hydroxylase in brain grafts of human neural progenitors. *Nature Biotechnology*, 1999, **17** (4): 349~ 354
- 16 Wagner J, Akerud P, Castro D S. Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nature Biotechnology*, 1999, **17** (7): 653~ 659
- 17 Yandava B D, Billingham L L, Snyder E Y. "Global" cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (12): 7029~ 7034
- 18 Zhang S C, Ge B, Duncan I D. Adult brain retains the potential to generate oligodendroglial progenitors with extensive myelination capacity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (7): 4089~ 4094
- 19 Weiss S. Pathways for neural stem cell biology and repair. *Nature*

Biotechnology, 1999, **17** (9): 850~ 851

Advances in Neural Stem Cells. TANG Jiong, ZHAO Shou-Yuan, LI Chang-Ben (*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, China*).

Abstract Neural stem cells (NSCs) maintain the potential of proliferation and differentiation in nerve system. The research and application of NSCs have developed into a frontier of neuroscience in recent years. The establishment of NSCs culture *in vitro* offers an efficient way for study on them. Now the focus is on the origin and location of NSCs in brains and their transplantation for therapy of CNS (central nerve system) diseases.

Key words neural stem cells, differentiation, transplantation, Parkinson's disease

线粒体和细胞内钙自稳平衡

陈良怡¹⁾ 邹寿彬 康华光

(华中理工大学生物物理与生物化学研究所, 武汉 430074)

摘要 线粒体对胞浆钙信号调节作用的研究已经历较长时间. 近年, 随着研究方法和技术的不断改进, 发现在绝大多数生理条件下, 线粒体都能参与胞内钙通信过程. 线粒体可感受其周围钙微区的存在从而摄取钙, 又可以通过钠-钙交换和大分子孔道将钙释放出来, 因此可以调节胞浆钙信号的时空特性, 影响相关的细胞功能. 但是, 由于技术上的局限性, 目前的研究仍然存在模糊不清和自相矛盾之处, 有待于进一步研究.

关键词 线粒体, 钙自稳平衡, 钙微区, 钠-钙交换

学科分类号 Q731

线粒体是细胞内的一种重要器官. 很久以前, 被认为是在细胞中生存的细菌, 通过共生作用在细胞内居住下来. 1978年诺贝尔化学奖授予 Mitchell, 奖励他发现在线粒体上的氧化磷酸化作用. 随后, 线粒体被认为是细胞内的能量发生器, 产生所需要的 ATP. 但是, 实际上线粒体也在其他许多生理过程中都扮演一个重要角色, 例如在神经退行性疾病的发生、体内葡萄糖的代谢作用以及在细胞水平上影响胞内的钙信号、活性氧 (ROS) 的生成和细胞凋亡等. 其中, 人们对线粒体在钙信号方面中的认识经历了一个曲折的过程.

1 线粒体的钙信号研究历史

二三十年前, 人们通过对分离线粒体的研究,

发现它在离体时能够大量累积 Ca^{2+} ^[1], 因此也在钙自稳平衡中起到重要的作用.

20世纪80年代中期, Tsien等^[2]合成了一系列新的测量胞内游离钙浓度的荧光染料, 包括 ind α 1、fur α 2等. 应用这些荧光染料, 发现在生理的刺激条件下, 胞浆游离钙离子浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) 上升幅值最大不超过 1 $\mu\text{mol/L}$. 而测量分离的线粒体的解离常数 K_d 表明, 只有当胞内的钙水平要比它高很多时, 线粒体才能大量摄取钙, 而在正常生理条件下, 线粒体内的钙累积对 $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 的影

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (027) 87543104, E-mail: lychen@163.net

收稿日期: 1999-12-19, 修回日期: 2000-04-14