

[文章编号] 1000-4718(2008)06-1240-04

· 综 述 ·

Shh 基因在胚胎发育过程中的调控作用*

周昱男, 胡波[△]

(华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科, 湖北 武汉 430022)

Function of Shh gene in the development of embryos

ZHOU Yu-nan, HU Bo

(Department of Neurology, The Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China. E-mail:hubo@mail.hust.edu.cn)

[A Review] Mammals have three genes with homology to the hh gene. These comprise Sonic hedgehog (*Shh*), Indian hedgehog (*Ihh*), and Desert hedgehog (*Dhh*). Shh has been shown to play a crucial role in embryogenesis and the development of ectoderm. Shh has the great relationship with the forming all the system. Shh - Patched - Smoothened signal pathway will lead the embryogenesis in the normal way. Otherwise, the abnormal embryogenesis, malformation, and tumor will be happened.

[关键词] 基因, Shh; 转录因子 Gli; 胎儿发育

[KEY WORDS] Genes, Shh; Transcription factor Gli; Fetal development

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

在胚胎发育过程中, *hh* (hedgehog) 基因参与编码和调控长、短信号途径。Echelard 等^[1] 研究发现: 在果蝇和其它一些无脊椎动物体内只有一种 *hh* 基因; 在脊椎动物体内则有同源 *hh* 基因; 而在哺乳动物体内则有 3 种 *hh* 基因, 它们分别是 *Shh*、*Ihh* 和 *Dhh*。对于人类来说, *Shh* 定位在 7 号染色体长臂远端(7q36), 且与 D-V 轴(背腹轴)神经管的形成、前肠、消化道、头面部以及上下肢芽等的发育有密切关系。目前认为, 在胚胎发育过程中, *Shh* 中对外胚层发育的影响举足轻重。

1 Shh - Patched - Smoothened 通路

Shh - Patched - Smoothened 信号途径是 1 条重要转导通路, 与 *Wingless*/*Frizzled* 系统密切相关, 参与肿瘤细胞分化的调控过程^[2]。已知涉及该途径的至少有 4 种信号分子: ①分泌蛋白 *Shh*, 是 *Hedgehog* 家族(*hedgehog family*) 成员, 在神经系统、皮肤、肢体以及其它组织的形成中起关键作用; ②细胞膜跨膜蛋白 *Patched* (*Ptch*) 是 *Shh* 的受体, 具有 12 个跨膜区; ③细胞膜跨膜蛋白 *Smoothened* (*Smo*) 具有 7 个跨膜区; ④锌指家族转录因子 *Gli* 为 *Smo* 下游分子,

可调节 *Shh* 目标基因的活动。该信号途径的活动规律为: 当缺乏 *Shh* 时, *Patched* 与 *Smo* 结合, *Smo* 和 *Gli* 活性被抑制, 呈转录抑制模式; 当 *Shh* 存在时, *Patched* 与 *Shh* 结合, 使 *Smo* 游离并被激活, 激活的 *Smo* 通过降低细胞内 cAMP 浓度而下调 cAMP 依赖性蛋白激酶 A, *Gli* 和 *HRK4* 基因也从阻扼状态变成松弛状态, 成为转录激活因子, 与 DNA 结合, 诱导目标基因的转录, *PTCH* 也是该途径的目标基因, 所以 *PTCH* 和 *Gli* 的水平可反应该信号途径的活性^[3]。人们已在脊椎动物内鉴定出了 *Shh*、*PTCH*、*Smo* 的同源蛋白, 并发现 *Shh* - *Gli* 信号转导途径在胚胎神经嵴干细胞的增生、存活等过程中起重要作用: 抑制 *Shh* 信号, 可导致神经嵴干细胞死亡^[4]; 此外, *Shh* 还可促进肠神经嵴干细胞和交感神经细胞增生, 却抑制其分化^[2,5]。

固醇类复合物是 *Shh* 转录所必需的, *Shh* 合成后并没有生物学活性, 只有在切除 C 末端的一部分氨基酸后, 剩下的 N 末端片段才有活性。在这个过程中就是 N 末端片段加上胆固醇的时候, 使其脂溶性增加, 同时也抑制了 N 末端片段在细胞间的扩散^[6]。

[收稿日期] 2007-01-18

[修回日期] 2007-09-07

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30600189)

[△]通讯作者 E-mail:hubo@mail.hust.edu.cn

2 Shh 与神经系统发育的关系

2.1 Shh 参与神经系统发育过程 神经系统是从胚胎期第 3 周初开始发育,起源于外胚层,由神经管和神经嵴分化而成,其中神经管发育为中枢神经系统,神经嵴分化为周围神经系统的神经节、神经胶质细胞以及肾上腺髓质的嗜铬细胞、黑色素细胞等。另外,神经嵴头部的部分细胞还可转化成间充质细胞,并由此分化为头颈部的部分骨、肌肉及结缔组织^[7]。神经板的分化分为 A-P 轴(前后轴)和 D-V 轴(背腹轴)2 部分,由不同的信号途径来调控的。不同区域的神经上皮细胞分化形成不同的神经元,中缝和相关神经元在靠背部顶板处分化,运动神经元和腹部的中间神经元在腹侧靠近底板处分化。Shh 主要参与调节腹侧细胞的分化,与背腹侧神经板的形成密切相关^[8]。

同源基因是在脊椎动物体内发现的一组基因,具有高度保守的序列和次序,这些基因的蛋白质产物与 DNA 结合,并形成调节基因转录的转录因子,在胚胎早期发育对细胞的分化方向和空间分布起重要调控作用。Shh 可以通过活化 Gli 锌指转录调控因子,抑制 *pax3*、*pax7*、*Msx2* 这几种同源基因的表达。靠近脊索的细胞由脊索所分泌的 Shh 诱导分化形成底板细胞,随后底板细胞合成的 Shh 又诱导靠近背侧的细胞分化形成运动神经元,此时如果阻断 Shh 的作用,这部分神经元就会分化形成中间神经元。诱导运动神经元和中间神经元所需的 Shh 浓度要比诱导底板细胞的浓度低 2-3 倍,因此,Shh 的浓度也是影响神经板细胞分化方向的重要因素^[7]。

研究发现 Shh 诱导的 Patched 表达沿 D-V 轴由背部向腹部呈递增的趋势,因此推测 Shh 是从底板细胞产生后从腹侧向背部扩散,形成一个浓度梯度分布,处于不同 Shh 浓度的神经元就向不同的方向分化^[6]。在胚胎脊索,Shh 诱导同源结构域的转录因子的表达,将促进原始颗粒细胞向神经底板、中枢神经元和少突神经胶质细胞分化^[9]。

2.2 与 Shh 信号相关的疾病 小神经胶质前体细胞(GCPs)是大脑中最丰富的神经元,GCPs 是最常见的转化成小儿脑瘤及神经母细胞瘤的一类细胞。GCPs 的调节是依赖 Shh 分子信号途径的。但是,Shh 是如何调控 GCPs 的分子机制并不太清楚。Oliver 等^[9]利用 DNA microarrays 的方法来辨别 Shh 的靶点,发现 Shh 可激活转录、诱导 DNA 复制,促使细胞进入分裂周期。在这些基因中,被 Shh 明显诱导调控的是 *cyclin D1* 和 *N-myc*。如果上调 GCPs 的 *N-myc*,将诱导 *Cyclin D1*、*E2F1* 和 *E2F2* 的表达增加;如果下调 *N-myc* 则显著抑制 Shh 所诱导的增殖过程。Knoepfler 等^[10]发现 Shh 不仅在体外调控 *N-*

myc 在小脑颗粒前体细胞(CGNP)中的表达,而且在转基因的胚胎中发现:Shh 的表达上调可诱导 *N-myc* 在背部脊髓中异位表达上调。这两个现象表明了 *N-myc* 作用于 Shh 的下游。此外,*cyclin D1* 和 *N-myc* 在神经母细胞瘤中都有过度表达,也提示 *cyclin D1* 和 *N-myc* 与神经母细胞瘤的发生密切相关,可能参与 Shh 诱导肿瘤发生的过程。

人 Patched 同源基因的突变与遗传性基底细胞癌综合征相关,此综合征为常染色体显性遗传性疾病,以多发性基底细胞癌和各类皮肤癌症及发育异常为特征,其相关基因定位于 9q22.3。在家族性和散发性基底细胞癌中,染色体即有该区的杂合性丢失。由于 Patched 与 Smo 结合,Smo 和 Gli 活性被抑制,呈转录抑制模式,若 Patched 功能丢失将导致游离的 Smo 蛋白过度激活,导致基底层细胞的过度分裂增生;此外,Smoothened 发生突变也可阻断它与 Patched 间的相互作用,诱导癌变发生;而在一些人类肿瘤中发现 *Gli-1* 基因的扩增也会产生相似的后果^[11]。例如:Patchd-1 的突变,导致 Gorlin's 综合征,临床上出现皮肤癌、骨骼异常和神经母细胞瘤高发病率。

固醇类复合物(胆固醇或特殊的 oxysterols)是 Shh 信号途径所必须的。缺少胆固醇将影响 Shh 信号途径,从而影响发育,如:7-脱氢胆固醇还原酶缺乏,影响 Shh-N 区域胆固醇转运激活过程,导致 Smith-Lemli-Opitz 综合症发生(临床上表现为:前脑无裂、小头、生长发育迟缓、面部畸形、并指等)^[12];用 7-脱氢胆固醇还原酶抑制剂 AY-9944 阻断 Shh 对神经管发生的作用,将发生前脑无裂畸形^[13]。此外,如果 Shh-N 出现错义突变(G31R, D88V, Q100H, N115K, W117G, W117R, E188Q),胚胎发育过程将出错,如 E188Q 和 Q100H 的错义突变将导致前脑无裂畸形^[14]。在胚胎脊索,*Sonic Hedgehog*-基因突变,将导致常染色体显性遗传病—前脑无裂畸形(holoprosencephaly),临床上表现为:侧脑室不完全分离,无眼或独眼畸形,中线面发育不良或面裂,单上颌骨中央门牙,两器官间距离过近等畸形^[15]。

在 20% 散发的神经母细胞瘤病例上有 Patched 或 SuFu 的突变,还有一部分则伴有 Smo 的突变^[16]。在小脑的发育过程中,Purkinje 细胞分泌 Shh,其与 Patched 连接,产生脱抑制状态,促进突触发生和轴突的成熟,使晚期颗粒细胞分化成熟。使小脑颗粒细胞向神经母细胞瘤细胞转化^[17]。Cordero 等^[18]通过在人和鼠身上构建 Patchd-1 缺陷或在鼠的脑内过度表达 Shh,都将诱发神经母细胞瘤发生。

3 Shh 与前肠、消化道各方面发育的关系

Shh 也是人类纵轴与横轴胃肠发育中的重要信

号途径。在早期发育过程中,缺失 Shh 将导致肠转变成胃。Shh 表达在胃底腺异位的 Meckel's 憩室瘤中,在 Barrett 食管形成过程中,Shh 促使鳞状上皮细胞变为胃底腺细胞^[19]。目前的研究表明,在许多胃底腺细胞和少部分的小肠和结肠隐窝中 Shh mRNA 的高表达。

Shh - 敲除小鼠会出现许多器官畸形:Shh 基因断裂的小鼠会出现远肢缺失、独眼、脊柱和肋骨的缺失;而 Shh 基因敲除鼠则会出现:(1)前肠缺陷:食管闭锁/狭窄,气管 - 食管瘘,单叶肺裂片和肺发育不全;(2)胃肠缺陷:胃蠕动不良,平滑肌减少,肠化生,环状胰腺,十二指肠狭窄,闭锁肛门^[20]。

在小鼠的胚胎发育过程中,胰腺内胚层不表达 Shh 或 Ihh,这揭示了缺少 Shh 表达在中胚层的分化和发育中是允许的^[21]。转基因小鼠的胰腺内胚层 Shh 的异位表达所产生的异形胰腺,还是可以分泌胰岛素,但是存在显著的组织结构溶解。因此,Shh 信号途径在早期的胰腺分泌和后续调控胰岛素分泌上有非常重要的作用。

4 Shh 与肢芽发育的关系

Shh 对四肢的发育和对骨骼系统的正确排列非常重要。Shh 在肢芽的内缘表达,该区被定义为极性活化带(the zone of polarizing activity, ZPA)。在对多指(趾)畸形老鼠的研究表明,异位表达在前肢区,从而造成 Shh 不对称的表达的缺失,并发现该区染色体异常位点 Ssq(sasquatch),干扰了 Shh 在长信号途径中的表达,从而造成多指(趾)畸形^[22]。

在脊椎动物体内发现依赖 PKA 的 Gli3,通过 Shh 的长信号途径作用而产生一个有效的抑制物。这种 Gli3 产生的阻扼作用在对人类生殖综合症和 talpid - 2 突变鸡的畸形肢体的研究中都有发现^[23]。

在人胚胎期,Shh 的异位表达在肢芽发育过程中将导致并趾(指)的发生。如果 Gli3 发生突变,临床上可出现:(1)Grieg 综合症:颅面的异常合并手指的轴后性多指或脚趾的并指;(2)Pallister - Hall 综合症:下丘脑错构母细胞瘤,垂体功能减退和肛门闭锁,颅面的异常,轴后性多指症;(3)常染色体显性轴后性多趾(指)畸形 A/B 型和轴前性多趾 IV 型^[24]。

5 Shh 信号与颅颌面部与口腔发育的关系

Sarkar 等研究者通过逆转录病毒基因组构建和原位杂交等方法,发现哺乳动物牙齿形成的早期,Shh 和 Wnt 在外胚层牙齿形成的正确定位和牙形形成中有关键作用。鼠类 Wnt - 7b 基因发生异位表达会引起牙齿发育异常,而外源性 Shh 可纠正该错误,可见,Shh 和 Wnt - 7b 在口腔发育过程中的相互作

用,使正常的牙蕾形成^[25]。

Dwight 等研究者发现家族成员携带相同的 Shh 突变基因,却有着不同的面部畸形特征。从独眼到精确的正中线不对称。于是他们对禽类动物胚胎进行短暂的 Shh 信号分子干预,结果导致颅面畸形发生,如:两器官间距离过近,面中部发育不良,面裂,过度嵴细胞非程序性死亡^[26]。

6 Shh 与其他系统发育的关系

Shh 与皮肤正常分化有关。在皮肤发育的过程中,Shh 过度表达的转基因小鼠,表现出家族性基底细胞癌综合症的许多特征,这表明 Shh 可以诱导正常的皮肤上皮细胞向癌细胞转化^[27]。

Shh 参与早期的心血管系统的建立。在正常胚胎发育形成循环之前,Shh 仅在左侧表达并诱导了节状形成素,这种形成素在心血管建立从右向左的循环的过程中起着非常重要的作用。Smo 和 Shh/Ihh 复合突变小鼠不能形成从右向左的循环,并有独眼等其他畸形^[28]。

Shh 还与胚胎毛囊发育有关。Gli - 1 和 Gli - 2 的激活是依赖 Shh 的。Shh 激活 Gli - 1,使 Gli - 1 的 mRNA 增加,引起毛发生长周期加快、毛发增多^[29]。此外,Shh 在人类胚胎的前列腺和女性泌尿生殖道发育中也有作用^[30]。

7 展望

综上所述,Shh 信号途径不仅在正常胚胎的外胚层发育中起着重要调控作用,且与肿瘤的发生密切相关。对 Shh 信号调控机制的研究不仅是对胚胎发育的重要探索,也可帮助我们进一步了解发育与肿瘤的相关性,这将为相关疾病,尤其是神经系统发育异常和神经肿瘤的治疗提供理论依据,更好地了解这条信号途径的调节过程有望引导我们找到相关疾病靶向治疗的新靶点,从而发展这些难治性疾病的治疗新手段。

[参 考 文 献]

- [1] Echelard Y, Epstein DJ, St - Jacques B, et al. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity[J]. Cell, 1993, 75(7): 1417 - 1430.
- [2] Williams Z, Tse V, Hou L, et al. Silverberg. Sonic hedgehog promotes proliferation and tyrosine hydroxylase induction of postnatal sympathetic cells *in vitro*[J]. Neuroreport, 2000, 11(15): 3315 - 3319.
- [3] Testaz S, Jarov A, Williams KP, et al. Sonic hedgehog restricts adhesion and migration of neural crest cells independently of the Patched - Smoothed - Gli signaling pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(22):

- 12521 – 12526.
- [4] Jeong J, Mao J, Tenzen T, et al. Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordial[J]. *Genes*, 2004, 18(8) : 937 – 951.
- [5] Fu M, Lui VC, Sham MV, et al. Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut[J]. *Cell Biol*, 2004, 166(5) : 673 – 684.
- [6] Heussler HS, Suri M. Sonic hedgehog[J]. *Mol Pathol*, 2003, 56(3) : 129 – 131.
- [7] Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, et al. HEDGEHOG – GLII signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self – renewal and tumorigenicity [J]. *Curr Biol*, 2007, 17(2) : 165 – 172.
- [8] Campbell K. Dorsal – ventral patterning in the mammalian telencephalon[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2003, 13(1) : 50 – 56.
- [9] Oliver TG, Grasdeder LL, Carroll AL, et al. Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: A critical role for N – myc in proliferation of neuronal precursors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(12) : 7331 – 7336.
- [10] Knoepfler PS, Cheng PF, Elsenman RN. N – myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(20) : 2699 – 2712.
- [11] Testaz S, Jarov A, Williams KP, et al. Sonic hedgehog restricts adhesion and migration of neural crest cells independently of the Patched – Smoothed – Gli signaling pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(22) : 12521 – 12526.
- [12] Yu H, Patel SB. Recent insights into the Smith – Lemli – Opitz syndrome [J]. *Clin Genet*, 2005, 68(5) : 383 – 391.
- [13] Corcoran RB, Scott MP. Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(22) : 8408 – 8413.
- [14] Maity T, Fuse N, Beachy PA. Molecular mechanisms of Sonic hedgehog mutant effects in holoprosencephaly [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(47) : 17026 – 17031.
- [15] Ahlqren SC, Thakur V, Bronner – Fraser M. Sonic hedgehog rescues cranial neural crest from cell death induced by ethanol exposure [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(16) : 10476 – 10481.
- [16] Pomeroy SL. Neural development and the ontogeny of central nervous system tumors [J]. *Neuron Glia Biol*, 2004, 1(2) : 127 – 133.
- [17] Wang J, Pham – Mitchell N, Schindler C, et al. Dysregulated Sonic hedgehog signaling and medulloblastoma consequent to IFN – α – stimulated STAT2 – independent production of IFN – γ in the brain [J]. *Clin Invest*, 2003, 112(4) : 535 – 543.
- [18] Cordero D, Marcucio R, Hu D, et al. Temporal perturbations in sonic hedgehog signaling elicit the spectrum of holoprosencephaly phenotypes [J]. *Clin Invest*, 2004, 114(4) : 485 – 494.
- [19] van den Brink GR, Hardwick JC, Nielsen C, et al. Sonic hedgehog expression correlates with fundic gland differentiation in the adult gastrointestinal tract [J]. *Gut*, 2002, 51(5) : 628 – 633.
- [20] Ramalho – Santos M, Melton DA, McMahon AP. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development [J]. *Development*, 2000, 127(12) : 2763 – 2772.
- [21] Morton JP, Mongeau ME, Klimstra DS, et al. Sonic hedgehog acts at multiple stages during pancreatic tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(12) : 5103 – 5108.
- [22] Hill RE, Heaney SJ, Lettice LA. Sonic hedgehog: restricted expression and limb dysmorphologies [J]. *Anat*, 2003, 202(1) : 13 – 20.
- [23] Wang B, Fallon JF, Beachy PA. Hedgehog – regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb [J]. *Cell*, 2002, 100(4) : 423 – 434.
- [24] Radhakrishna U, Bornholdt D, Scott HS, et al. The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type – IV and postaxial polydactyly type – A/B; no phenotype prediction from the position of GLI3 mutations [J]. *Am J Hum Genet*, 1999, 65(3) : 645 – 655.
- [25] Sarkar L, Cobourne M, Naylor S, et al. Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(9) : 4520 – 4524.
- [26] Cordero D, Marcucio R, Hu D, et al. Temporal perturbations in sonic hedgehog signaling elicit the spectrum of holoprosencephaly phenotypes [J]. *Clin Invest*, 2004, 114(4) : 485 – 494.
- [27] Oro AE, Higgins KM, Hu Z, et al. Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog [J]. *Science*, 1997, 276(5313) : 817 – 821.
- [28] Olson EN, Srivastava D. Molecular pathways controlling heart development [J]. *Science*, 1996, 272(2) : 671 – 676.
- [29] Mill P, Mo R, Fu H, et al. Sonic hedgehog – dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development [J]. *Genes Dev*, 2003, 17(2) : 282 – 294.
- [30] Barnett DH, Huang HY, Wu XR, et al. The human prostate expresses sonic hedgehog during fetal development [J]. *J Urol*, 2002, 168(5) : 2206 – 2210.