



脊椎动物神经嵴细胞发育相关非编码 RNA 研究进展

方熹雅, 刘 洁, 张春兰, 赖振宇, 李世鹏, 吴 菲, 周子惠, 雷初朝, 党瑞华*

(西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:神经嵴是脊椎动物胚胎发育中的一种过渡性结构, 神经嵴细胞经诱导后可迁移、分化成机体多种类型的细胞以形成重要组织的一部分。研究显示, 部分非编码 RNA 对神经嵴细胞发育具有一定调控作用。非编码 RNA 是一种不参与编码蛋白质, 对转录后水平的基因表达有调控作用的 RNA。神经嵴细胞的正常发育影响着机体重要组织的发育, 相关研究对于色素异常、肠道神经节细胞发育异常等遗传性疾病的治疗具有重要意义。本文综述了近几年与神经嵴细胞发育相关的非编码 RNA 研究进展。

关键词:神经嵴细胞; 发育; 非编码 RNA

中图分类号:Q956; Q344

文献标识码:A

文章编号:1001-9111(2019)03-0055-04

1 非编码 RNA 研究背景

1.1 miRNA

miRNA (microRNAs), 又称为微小 RNA, 是长度为 18 ~ 25 个核苷酸的内源性非编码单链 RNA, miRNA 不参与编码蛋白质, 主要调控转录后水平的基因表达。miRNA 广泛分布在真核生物体内的不同的细胞系中, 相同 miRNA 家族中的各 miRNA 在不同的物种中进化的保守性是一致的; 同时, 不同物种中 miRNA 对不同生物过程生物的调节也是不同的。microRNA 通过使自身 5' 端非编码区域的一段序列以碱基互补配对的方式与在靶向蛋白基因 3' 端非翻译区 (UTR) 之前的靶向蛋白编码基因相结合, 从而影响转录出的 mRNA 的稳定性, 即对其进行裂解, 或干扰蛋白质的翻译过程。越来越多的研究表明, miRNA 控制着许多的生命过程, 在调控正常生命活动和疾病方面有着不容忽视的影响, 至少超过 1/2 以上的功能基因都可以被相关的 miRNA 在转录后水平进行一定的调控, 包括各种不同的信号通路^[1]。

1.2 其他 ncRNA

除了 miRNA 家族之外, 非编码 RNA 还包括 rRNA、tRNA、snRNA、siRNA 等。它们功能繁多, 积

极参与生物体基因表达和关闭, 蛋白质合成, 细胞增殖等各项生命活动。例如 gRNA 在 mRNA 转录中起到指导作用; tmRNA 既可以起到与 mRNA 相似的模板作用, 又可起到与 tRNA 相似的转运作用; snRNA 在 mRNA 前体剪接体中的担任重要的组成成分; snRNA 参与 rRNA 的修饰; siRNA 可对特定 mRNA 的降解进行指导等^[2-3]。

1.3 神经嵴细胞研究背景

神经嵴是脊椎动物胚胎发育过程中在神经板弯曲形成神经管时部分边缘细胞形成的胚胎发育中的一种过渡性结构。神经嵴细胞经诱导后可迁移, 并可分化成软骨细胞、骨细胞、神经元细胞、黑色素细胞、和平滑肌细胞等^[2]。神经嵴细胞的分化是一个由多个信号通路控制的复杂过程, 包括 Wnt、Fgf 和 Bmp 通路^[3]。Bmp 信号在决定神经嵴分化方向中起着核心作用^[4-5]。在软骨形成过程中, I 型受体 Bmpr1a 和 Bmpr1b 或受体激活的 Smads 1, 5 和 8 会导致软骨细胞增殖、分化和存活受到损害, 造成严重的软骨发育异常^[6]。因此神经嵴细胞的发育对神经系统, 肌肉系统以及心脏、颅面等组织有重要作用, 所以近年来对于神经嵴细胞的研究越来越多。研究表明, 神经嵴细胞发育异常会导致多种疾病。以 PAX3 和 SOX10 为中心的基因互作引起的神经

收稿日期: 2019-03-03 修回日期: 2019-03-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81770514); 杨凌示范区科技计划项目 (2018NY-33); 国家肉牛牦牛产业技术体系项目 (CARS-37)

作者简介: 方熹雅 (1998—), 女, 山东东营人, 本科生, 主要从事动物科学研究。E-mail: fxiya5819@163.com

* 通讯作者: 党瑞华 (1976—), 男, 陕西勉县人, 副教授, 博士生导师, 主要从事家畜分子遗传研究。E-mail: dangruihua@nwsuaf.edu.cn

嵴细胞功能异常会导致综合征型耳聋^[7]。先天性巨结肠(HSCR)也是由于在胚胎时期神经嵴细胞向肠管的定向迁移发生障碍而引起的^[8]。此外,家族性神经母细胞瘤,DiGeorge 综合征等疾病均与神经嵴细胞发育异常有关。除此之外一些非编码 RNA 也对其发育有作用^[9]。神经嵴细胞的发育对多种组织器官等都有影响,因此相关研究对于神经嵴细胞发育障碍相关疾病的治疗有重要的意义。

2 非编码 RNA 对神经嵴细胞发育的调控作用

2.2 miRNA 对神经嵴细胞发育的调控

目前研究较为广泛和深入的是 miRNA 在软骨细胞神经嵴谱系分化中的作用。在颅神经嵴细胞的发育中,Oct4, Sox2 等叶酸受体 α 一方面通过与启动子区域结合来上调颅神经嵴细胞中的多能性标志物,另一方面自身调节 miR-138 和 miR-let-7, MiR-138 靶向 Oct4, miR-let-7 靶向 Trim71,来调节颅神经嵴细胞的增殖,以使颅神经嵴细胞在分化前保持其多能性表型和增殖潜能^[10]。而 miR-873 被 Koufaris 等人使用生物信息分析方法证明参与 Hedgehog 信号传导的调控, Hedgehog 信号通路是颅面形态形成和分化的重要途径。其可能靶标为 ZIC2,然而仍需要在动物模型中进行进一步研究来确认 miR-873 的调节作用^[11]。

在斑马鱼模型上的实验发现,斑马鱼中存在 2 个 mir92a, mir92a-1 和 mir92a-2 虽然序列相同,但分别由 mir17-92 簇和 mir106a-92 簇编码。miR-92a 的失活增加了咽部区域的 Nog3 水平,咽部软骨形成祖细胞的细胞增殖,分化和存活显著减少,导致咽部软骨的损失^[12]。Ning 等通过双荧光原位杂交以及向斑马鱼胚胎中注入 92a-MO 的方法研究发现, mir92a 可以通过靶向 noggin3 解除 BMP 信号并诱导软骨细胞凋亡影响颅面部发育^[12]。Wang 等应用了 3'UTR 荧光素酶报告基因以及位点突变的方法,对 mir17-92 对于唇腭裂的影响进行研究。结果表明,小鼠体内 miR-17-92 簇的缺失会导致颅面畸形^[13]。此外,研究表明 mir-17-92 簇直接抑制了在颅面发育过程中具有重要的功能的 T-box 因子。并且进一步证明, miR-17-92 是由 BMP 信号和转录因子 AP-2 α 直接激活的。miR-27 则靶向粘着对软骨的形成有负调节作用的整合素介导的细胞外基质粘附的关键调节因子斑激酶 Ptk2aa^[14]。Kara 等人对 miR-27 的敲除实验证明 miR-27 可下调咽弓中的 Ptk2aa,促进软骨细胞分化。miR-27 的缺失可导致软骨原细胞的增殖和分化受损。王冬玥等人则使用斑马鱼模型在显微镜下

注射 mir-1 反义核苷酸(MO)抑制 mir-1,观察下颌骨的生长情况并利用整体 TUNEL 染色技术和 pH3 免疫荧光技术发现 mir-1 对于神经嵴细胞的发育具有正向调控作用^[9]。魏安瑶等人通过在斑马鱼胚胎中注射与其 miRNA-23a 序列完全互补的 MO 以抑制斑马鱼胚胎内源性 miRNA-23a 的活性,并通过阿尔新蓝染色法以及原位杂交法观察低表达的 miRNA-23a 对斑马鱼颅面部软骨发育的影响时发现低表达的 miRNA-23a 会导致斑马鱼胚胎的咽区软骨缺失,为了进一步确认 miRNA-23a 在神经嵴细胞向斑马鱼咽部迁移过程中的作用,采用激光共聚焦显微镜拍摄并对结果进行分析发现 miRNA-23a 抑制神经嵴细胞从后脑向咽部迁移并导致其不能分化成为软骨细胞,从而导致了斑马鱼胚胎的咽区软骨缺失^[15]。

在对神经嵴衍生细胞谱系的研究中,王艳华等人采用流动分选法分离人毛囊神经嵴干细胞定向诱导,在诱导过程中分为对照组,加入 mir-21 激动剂组,加入 mir-21 抑制剂组,无活性的 microRNA 类似物组, qRT-PCR 检测 mir-21 表达水平。结果表明, mir-21 的表达水平在毛囊神经嵴干细胞分化过程中逐渐升高。转染对 mir-21 有激活作用的 agomir-21 后,干细胞分化为 schwann 细胞的能力增强,转染 mir-21 抑制剂 antagomir-21 后干细胞分化的能力减弱。证明 mir-21 可以促进神经嵴干细胞向 schwann 细胞分化^[16]。

神经嵴衍生的交感肾上腺细胞谱系产生交感神经元和肾上腺髓质的内分泌嗜铬细胞,两种细胞表达了大量重叠的基因。miR-124 在发育的交感神经元中是可检测的,但在嗜铬细胞前体中不存在。Stella 等人证明了 miR-124 在转染到培养的嗜铬细胞中时促进神经突伸长,表明 miR-124 可以促进在非神经元交感肾上腺细胞中建立神经元形态^[17]。进一步研究发现用神经营养素神经生长因子治疗 PC12 细胞会导致 miR-124 表达上调,而抑制 miR-124 会降低 PC12 细胞中神经生长因子诱导的神经突的生长。表明 miR-124 有助于在发育中的交感肾上腺细胞中建立特定的神经元特征^[17]。

在对神经嵴细胞凋亡过程的研究中,Chen 等人将神经嵴细胞暴露在不同浓度的乙醇中,发现体外和体内乙醇处理均可显著降低胚胎细胞或组织中 miR-125b 的表达,暴露于 50 mM 乙醇导致 Bak1 蛋白和 PUMA 蛋白表达显著增加,表明 miR-125b 的直接靶点 Bak1 和 PUMA 参与了乙醇诱导的神经嵴细胞凋亡^[18]。同时用乙醇处理 miR-125b 模拟物转染的神经嵴细胞,发现 miR-125b 模拟物过表达 miR-125b 可抑制乙醇诱导的 Bak1 蛋白表达增

加。miR-125b 水平的上调也降低了暴露于乙醇的神经嵴细胞中 PUMA 蛋白的表达。此外,用 miR-125b 模拟物处理大大降低了神经嵴细胞中乙醇诱导的 caspase-3 活化。表明 miR-125b 参与乙醇诱导的细胞凋亡,并且 miR-125b 的过表达可以阻止乙醇诱导的神经嵴细胞细胞凋亡^[18]。

神经嵴细胞在原肠胚形成期间在外胚层中被诱导,在神经系统发育过程中外胚层形成的神经板分化成神经管以及神经嵴^[19],发育后期,神经管构成整个中枢神经系统,神经嵴细胞则可以继续分化形成外周神经系统的细胞^[20]。Xi 等利用胚胎干细胞神经分化

系统的研究表明在神经系统发育初始阶段 Pou3f1-miR-29b-Dnmt3a 轴非常活跃,即 mir-29b 可以通过 DNA 甲基转移酶 3a (Dnmt3a) 以及转录因子 Pou3f1 调节胚胎干细胞分化成神经管并抑制其向神经嵴细胞方向的分化^[21]。Nicole 等人使用源自非洲爪蟾胚胎的外胚层移植体的文库进行测序,同时对外胚层和囊胚阶段组织进行测序,发现 miR-301a,miR-338 和 miR-427 以及 5 种 miR-427 在不同组织中差异表达的亚型或异构体在所有 4 种组织类型中高度表达^[22]。表明这些 miRNA 对于维持神经嵴细胞的干细胞样表型具有一定作用(表 1)。

表 1 近 5 年已证明与神经嵴细胞发育有关的 miRNA 及其靶点

谱系	miRNA	靶点	引用文献
软骨细胞谱系	miR-138	Oct4	Mohanty 等 ^[10]
	miR-let-7	Trim71	Mohanty 等 ^[10]
	miR-873	Zic2	Koufaris 等 ^[11]
	miR-27	Ptk2aa	Kara 等 ^[14]
	miR-92a	Nog3	Ning 等 ^[12]
	miR-17-92	Fgf10,Shox2,Tbx3,Osr1	Wang 等 ^[13]
	miR-23a	—	魏安瑶等 ^[15]
神经元谱系	miR-138	Ccnd1,Sox2,Jun	Yun 等 ^[28]
	mir-138-1	Sox10,Egr2	Lin 等 ^[29]
	mir-21	SOX2	王艳华等 ^[16]
	miR-124	SOX9	Shtukmaster 等 ^[17]
凋亡	miR-125b	Bak1,PUMA	Chen 等 ^[18]
诱导分化	mir-29b	Dnmt3a,Pou3f1	Xi 等 ^[21]

2.3 其他 ncRNA 对神经嵴细胞增殖分化的调控

近几年来,更为广泛的研究显示除 miRNA 外 lncRNA Pnky,BDNF-As 等非编码 RNA 对神经嵴细胞的增殖分化也具有一定的调控作用。Liu 等人采用 RT-PCR 技术分析了 HA117 在不同结肠段的表达情况,利用荧光原位杂交技术(FISH)检测 HA117 在肠壁的分布,发现一种长链非编码 RNA (LncRNA) 的视网膜相关转录本 HA117 参与了 HSCR 的发生,并在其中起到了抗分化作用^[24]。Ramos 等发现了神经特异性长链非编码 RNA-Pnky。Pnky 主要与剪切调节因子 PTBT1 相互作用,相关敲低实验表明,Pnky 可以促进神经嵴细胞的分化,降低增殖^[25]。另外,Modarresi 等研究发现,脑源性神经营养因子基因(BDNF)的非编码反义 RNA 转录物(BDNF-As)可以通过改变 BDNF 位点上的染色质结构来抑制 RNA 转录,从而降低内源性 BDNF 蛋白的水平,对神经嵴细胞的生长、成熟以及分化等起到了一定的作用^[26]。Walter 等人发现人环状 RNA 与小脑退化相关蛋白 1 转录本(CDR1as)反义,CDR1as 在神经元组织中极易与 miR-7 结合,吸附并抑制 miRNA-7 的正常功能,从而影响神经

嵴细胞发育^[27]。

3 小结与展望

本文介绍了与神经嵴细胞发育、分化、凋亡有关的非编码 RNA 近年来的研究进展,并以 miRNA 以及其他非编码 RNA 在神经嵴细胞诱导,软骨细胞神经嵴谱系分化,神经嵴衍生细胞谱系分化,神经嵴细胞凋亡等几个过程中的作用为落脚点,收集整理了近 5 年经试验证实与神经嵴细胞发育具有相关性的 miRNA 和其他非编码 RNA 及其靶基因,但是仍有部分 miRNA 还未发现或证实其靶点。此外还有许多已被证实对体内其他细胞组织发育具有调节作用的 miRNA,其对神经嵴细胞发育的作用仍然有待探索和研究。神经嵴细胞的发育是一个受多种信号通路调控的复杂过程,发育异常则会导致综合征型耳聋,神经母细胞瘤,DiGeorge 综合征等疾病。因此相关研究对于神经系统,肌肉系统以及心脏、颅面等组织的发育异常疾病的治疗具有重要意义。

参考文献:

[1] 董健,陈妍珂,程继文,等. miRNA-338 与肿瘤相关研究新进展[J]. 现代肿瘤医学,2014,22(4):929-932.
[2] 王君芳,王佳琦,毕庆伟,等. 神经嵴细胞发育分子调控网络的

- 生物信息学分析[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(24): 3621-3627.
- [3] Nie X, Luukko K, Kettunen P. BMP signaling in craniofacial development[J]. *Int. J. Dev. Biol.*, 2006, 50: 511-521.
- [4] Knecht A K, Bronner - Fraser M. Induction of the neural crest; a multigene process[J]. *Nat. Rev. Genet.*, 2002, 3: 453-461.
- [5] Tribulo C, Aybar M J, Nguyen V H, et al. Regulation of *Msx* genes by a *Bmp* gradient is essential for neural crest specification[J]. *Development*, 2003, 130(26): 6441-6452.
- [6] Retting K N, Song B, Yoon B S, et al. *BMP* canonical *Smad* signaling through *Smad1* and *Smad5* is required for endochondral bone formation[J]. *Development*, 2009, 136: 1093-1104.
- [7] 刘亚兰, 张华, 冯永. 神经嵟发育异常导致综合征型耳聋的机制[J]. 遗传, 2014, 36(11): 1131-1144.
- [8] 王智勇, 王国斌, 王继亮, 等. *EdnrB* 基因 *cpg* 岛甲基化在先天性巨结肠发病机制中作用的初步探讨[J]. 中华小儿外科杂志, 2009, 30(12): 849-853.
- [9] 王冬玥, 翁亚娟, 倪洁丽, 等. *Mir-1* 通过调控神经嵟细胞增殖和凋亡影响颌骨发育[J]. 口腔生物医学, 2016, 7(4): 169-172.
- [10] Mohanty V, Shah A, Allender E, et al. Folate receptor alpha up-regulates *Oct4*, *Sox2* and *Klf4* and Downregulates *miR-138* and *miR-let-7* in cranial neural crest cells[J]. *Stem. Cells*, 2016, 34: 2721-2732.
- [11] Koufaris C, Papagregoriou G, Kousoulidou L, et al. Haploinsufficiency of the *miR-873/miR-876* microRNA cluster is associated with craniofacial abnormalities [J]. *Gene*, 2015, 561: 95-100.
- [12] Ning G, Liu X, Dai M, et al. MicroRNA - 92a Upholds *Bmp* signaling by Targeting *noggin3* during Pharyngeal Cartilage Formation[J]. *Developmental Cell*, 2013, 24(3): 283-295.
- [13] Wang J, Bai Y, Li H, et al. MicroRNA - 17 - 92, a direct *Ap-2 α* transcriptional target, modulates *T-box* factor activity in Orofacial Clefing[J]. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003785.
- [14] Kara N, Wei C, Commanday A, et al. *miR-27* regulates chondrogenesis by suppressing focal adhesion kinase during pharyngeal arch development[J]. *Dev. Biol.*, 2017, 429: 321-334.
- [15] 魏安瑶, 赵鹏辉, 夏景兰, 等. microRNA - 23a 调控斑马鱼神经嵟细胞迁移和分化[J]. 发育医学电子杂志, 2017, 5(1): 7-13.
- [16] 王艳华, 刘浩, 辛红, 等. *miR-21* 促进毛囊神经嵟干细胞分化为许旺细胞[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(50): 8156-8161.
- [17] Shtukmaster S, Narasimhan P, Faitwri T E, et al. *MiR-124* is differentially expressed in derivatives of the sympathoadrenal cell lineage and promotes neurite elongation in chromaffin cells[J]. *Cell & Tissue Research*, 2016, 365(2): 225-232.
- [18] Chen X, Liu J, Feng W K, et al. *MiR-125b* protects against ethanol - induced apoptosis in neural crest cells and mouse embryos by targeting *Bak1* and *PUMA*[J]. *Exp. Neurol.*, 2015, 271: 104-111.
- [19] Bronner - Fraser M, Fraser S E. Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells[J]. *Nature*, 1988, 335: 161-164.
- [20] Bhatt S, Diaz R, Trainor P A. Signals and switches in Mammalian neural crest cell differentiation[J]. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2013, 5: a008326.
- [21] Xi J, Wu Y, Li G, et al. *Mir-29b* mediates the neural tube versus neural crest fate decision during embryonic stem cell neural differentiation[J]. *Stem. Cell. Reports*, 2017, 9(2): 571.
- [22] Ward N J, Green D, Higgins J, et al. microRNAs associated with early neural crest development in *Xenopus laevis*[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 59.
- [23] 秦云霞, 田娥, 刘志昕, 等. 非编码 rna 及其研究进展[J]. 生物技术通报, 2004(5): 9-12.
- [24] Liu H, Luo Y, Li S, et al. Expression profiles of *HA117* and its neighboring gene *DPF3* in different colon segments of Hirschsprung's disease [J]. *International Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 2014, 7(7): 3966.
- [25] Modarresi F, Faghihi M A, Lopez - Toledano M A, et al. Inhibition of natural antisense transcripts in vivo results in gene - specific transcriptional upregulation [J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(5): 453-459.
- [26] Ramos A D, Andersen R E, Liu S J, et al. The Long noncoding RNA *Pnky* regulates neuronal differentiation of embryonic and postnatal neural stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(4): 439-447.
- [27] Lukiw W J. Circular RNA (circRNA) in Alzheimer's disease (AD)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2013, 4.
- [28] Yun B, Anderegg A, Menichella D, et al. MicroRNA - deficient Schwann cells display congenital Hypomyelination[J]. *J. Neurosci.*, 2010, 30: 7722-7728.
- [29] Lin H P, Oksuz I, Svaren J, et al. *Egr2* - dependent microRNA - 138 is dispensable for peripheral nerve myelination [J]. *Sci. Rep.*, 2018, 8: 1-11.

Research Progress on Non - coding RNAs Related to Neural Crest Cell Development in Vertebrate

FANG Xi - ya, LIU Jie, ZHANG Chun - lan, LAI Zhen - yu, LI Shi - peng, WU Fei, ZHOU Zi - hui, LEI Chu - zhao, DANG Rui - hua *

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Neural crest is a kind of transitional structure in embryonic development of vertebrate. Neural crest cells may migrate and differentiate into various types of cells after induction to form various important tissues and organs. Studies have shown that some non - coding RNAs have a certain regulatory effect on the development of neural crest cells. Non - coding RNA is a kind of RNA that does not participate in the encoding of proteins and regulates the expression of genes at the post - transcriptional level. The normal development of neural crest cells affects the form of important tissues of the body, and related research is of great significance for the treatment of genetic diseases such as abnormal development of pigment and intestinal ganglion cells. This article reviewed the progress of non - coding RNA studies related to neural crest cell development in recent years.

Key words: neural crest cell; development; non - coding RNA