

锌指转录因子 *snail* 超家族^①

王 瑛, 朱传炳, 吴秀山

(湖南师范大学 生命科学学院 蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 中国湖南 长沙 410081)

摘要: *snail* 超家族基因作为1种锌指转录因子参与调控胚胎发育和肿瘤发生过程. 不同的家族成员已显示在许多信号的级联放大过程中起作用, 包括左右轴识别、附肢形成、神经分化和细胞命运决定等形成过程.

关键词: *snail* 超家族; 锌指; 转录因子

中图分类号: Q756

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2003)S0-0053-05

The *Snail* Superfamily of Zinc finger Transcription Factors

WANG Ying, ZHU Chuan-bing, WU Xiù-shan

(Key Lab of MOE for Development Biology and Protein Chemistry, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract The *snail* superfamily of zinc-finger transcription factors is involved in the processes of embryonic development and tumour progression. Different family members have been implicated in the signalling cascade that confers left-right identity, as well as in the formation of appendages, neural differentiation, cell division and cell survival.

Key words *snail* superfamily; zinc-finger; transcription factor

(*Life Science Research*, 2003, 7(2): 53~ 57)

snail 超家族作为一类锌指转录因子在形态发生过程中占有核心地位, 从果蝇到哺乳动物的多种生物中, *snail* 超家族的成员对于中胚层的形成是必不可少的. 而且, 在需要大规模细胞运动的其它过程(如神经嵴的形成过程)中, 不同脊椎动物的 *snail* 同源蛋白的作用也是很重要的.

最近, *snail* 超家族在细胞运动方面的研究又取得了新的进展, 包括许多不能适应特殊环境的现象的研究, 比如上皮细胞与间质细胞间转移(EMT)的研究^{1,2}. EMT是一种生物机制, 它能在特殊部位产生的上皮细胞从上皮组织分离并迁

移到其他的位置, 是正常发育过程和恶性上皮肿瘤发生的基础. 除了引发EMT外, *snail* 超家族的成员还参与了包括神经分化、细胞命运决定和左右发育不对称性在内的各种重要的发育过程³.

从进化的角度来看, *snail* 为研究祖系基因和胚胎组织构建提供了一种很好的模型. *snail* 家族与神经嵴的出现密切相关, 而神经嵴对于脊椎动物头部的形成又是必不可少的⁴. 近年来, 对 *snail* 新的家族成员及其功能的鉴定吸引了从胚胎模式研究到肿瘤研究的各个领域的研究者. 本文着重讨论了 *snail* 超家族的分类和结构, 以及不

① 收稿日期: 2003-05-20; 修回日期: 2003-06-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(3017049; 30270644; 3021010392); 国家科技部973前期项目(2002CC000100); 教育部重点课题项目

作者简介: 王 瑛(1981-), 女, 湖南株洲人, 硕士研究生; 吴秀山(1952-), 男, 湖南衡阳人, 湖南师范大学特聘教授, 博士生导师, 通讯作者, 从事分子发育遗传学研究. E-mail: xiushanwu@yahoo.com

同的家族成员具有的功能.

1 *snail* 超家族概况

snail 家族的第一个成员 *snail* 基因是在黑腹果蝇中发现的, 它对于黑腹果蝇中胚层的形成是必不可少的. 此后不久, *snail* 的同源蛋白在包括人类以及其它脊椎动物、原始脊索动物、昆虫、线虫和软体动物的多个物种中被发现.

snail 作为一个超家族, 可分成两个相关联但又独立存在的种类: *snail* 家族和 *scratch* 家族^[5], 对所有 *snail* 超家族成员的锌指区域的序列进行比较, 脊椎动物的 *snail* 基因又被分成两类亚家族: *snail* 和 *slug*^[6]. 序列对比既用来确定 *snail* 和 *scratch* 家族的各自锌指的不同序列, 也可用来确定整个超家族的锌指区域结合的一致性程度^[5].

snail 家族成员编码锌指类的转录因子. 它们具有相似的结构: 由一个含有 4~6 个锌指的高度保守的羧基末端和一个氨基末端组成. 锌指是 C₂H₂ 型^[7], 由两个 β-折叠紧连一个 α-螺旋组成, 其氨基末端与 DNA 大沟接触, 两个保守的 *cys* 和 *his* (C₂H₂) 与 Zn 离子相连, 并与以 6 个碱基 CAGGTG 为核心的结合位点结合. 这一结合位点被看作 E-box 而被识别, 由于 E-box 与螺旋-环-螺旋转录因子 (bHLH) 具有一致的核心结合位点, 所以 *snail* 蛋白可能因为与 bHLH 具有相同的结合序列而相互竞争^[4].

当 *snail* 家族的基因与 E-box 结合时, 它们被视为转录抑制蛋白. 这种抑制蛋白的活化依赖锌指区域和在氨基末端发现的多种不同的模体. 其中一种模体为 SNAG (Snail/Gfi) 结构域, 它最初作为一种抑制子结构域在锌指蛋白 Gfi1 中被发现. SNAG 结构域在所有脊椎动物的 *snail* 基因中都被保存下来, 而且在棘皮动物、头索动物和果蝇 *scratch* 家族中也发现过. SNAG 结构域要么由于其在各种物种中的广泛分布而造成它在果蝇其他的家族成员、尾索动物和线虫中未被找到; 要么已经被独立的分布到不同的物种中. 我们可通过各个物种的完整密码序列的有效分析来区分这两种可能性.

即使没有 SNAG 结构域, 果蝇的 *snail* 也能作为一种转录抑制蛋白而起作用. 它的活性通过与一种共同的抑制蛋白-羧基末端结合蛋白 (CtBP) 相互作用而被激活. 所以, 人们推测, *snail* 抑制蛋

白的功能在进化过程中得以保留, 但其抑制机制可能不尽相同, 有的与 CtBP 协同抑制, 有的是 SNAG 结构域单独作用, 有的则是两者联合作用.

2 *snail* 在中胚层和神经嵴形成中的作用

在果蝇胚胎中, *snail* 最初在即将发育成中胚层的细胞中表达. 在这些细胞中, *snail* 作为一种神经外胚层基因表达的抑制蛋白而存在. 果蝇中胚层的特化是通过 *snail* 抑制蛋白影响部分细胞的分化而完成的, 在这个过程中 *snail* 起核心作用.

除了在中胚层中起作用外, 脊椎动物的 *snail* 家族成员同样也参与了神经嵴的特化. 原始脊索动物没有神经嵴, 在背部神经细胞表达 *snail*, 其位置与脊索动物的神经嵴相同. 所以, 原始脊索动物可能有神经嵴形成的遗传程序, 而且 *snail* 表达的细胞能够表现神经嵴的祖细胞群的特征.

特化后, 中胚层和神经嵴从它们起源和迁移的组织分化出来. 分化过程通过引发 EMT 而调节, 并将上皮细胞转变成能迁移通过细胞外基质的间质细胞.

snail 家族参与 EMT 机制最先是在鸡胚的研究中发现的. *slug* 反义寡聚核苷酸在早期鸡胚的孵化时抑制了神经嵴和中胚层的分化, 但在头部和躯干部的神经嵴的分化中存在不同的机制, 这解释了为什么当 *slug* 表达存在时脊髓的神经嵴分化的抑制现象能够发生. 在鸡的体内, *slug* 沿着胚胎的前后轴参与了嵴的特化, 并在头部的嵴的迁移中起另外一种作用. 由此推测 *snail* 基因在组织 (比如中胚层和神经嵴) 特化上最先起作用, 接着逐渐具有了迁移功能. 除此之外, *slug* 和 *snail* 在其它脊椎动物 (比如斑马鱼和小鼠) 胚胎中的表达模式也与它们在神经嵴发育中作用相协调.

snail 和 *slug* 在引发 EMT 时所起的作用并不因在中胚层和神经嵴中而受限制. 在脊椎动物胚胎的发育过程中, *snail* 和/或 *slug* 所起的作用在其它一些进行 EMT 的细胞中也被观察到. EMT 发生后, *snail* 基因在中胚层的发育后期仍起作用.

3 EMT 和 *snail* 的分子靶点

E-钙粘着蛋白: 哺乳动物中 *snail* 在引发 EMT 的重要性方面通过两条独立的途径被确认. 第一

条是 *snail* 通过直接抑制 E-钙粘着蛋白的表达而使其它一般上皮细胞转变成间质细胞^[8]。更重要的是, *snail* 在原肠胚形成期的基因敲除使动物死亡并在 EMT 机制上表现出一些缺陷^[9]。胚胎的突变体形成了由具有顶端基部极性、微绒毛和粘着连接的柱状细胞组成的中胚层, 这些柱状细胞都具有上皮细胞的特性^[9], 所以不能进行 EMT 机制。众所周知, E-钙粘着蛋白的负调节对于小鼠胚胎原肠胚形成期中胚层细胞的进入是必需的, 而且在 *snail* 突变体中, 这些细胞维持 E-钙粘着蛋白的表达。这样, *snail* 作为 E-钙粘着蛋白基因表达的抑制蛋白得到肯定^[1,2]。

尽管如此, E-钙粘着蛋白在 *snail* 突变体中胚层中的表达水平低于在同一胚胎中的外胚层中的表达水平^[9]。这表明其他的钙粘着蛋白的抑制子可能在原肠胚形成期与 *snail* 同时起作用, 它们的候选因子包括 bHLH 型转录因子和最近发现的在胚胎中胚层表达并用来抑制 E-钙粘着蛋白表达的 SIP1 和 E47。

钙粘着蛋白表达的可靠调节是基于神经嵴细胞的迁移。但是, 即使带有 *snail* 突变体的小鼠死于原肠胚形成期, 也仍不能确定在神经嵴中 *snail* 功能是否丧失。

其它分子靶点: 到目前为止, E-钙粘着蛋白是 *snail* 的唯一直接作用的分子靶点。但是, 通过基因分析和过表达的实验我们又发现了使一系列具有直接或间接调节作用的候选分子靶点的产生。对于 EMT 机制, 除 E-钙粘着蛋白外, 还有 *snail* 转染子对上皮细胞标志的负调节和对间叶细胞的标志的正调节。这些变化对于 E-钙粘着蛋白的丢失不可能只起次要作用, 因为 E-钙粘着蛋白的转染是不能引起上皮细胞逆转的。这表明 *snail* 必然有其它的独立于 E-钙粘着蛋白的分子靶点。

4 EMT 和 *snail* 的诱导信号

不同的信号途径与诱导 *snail* 家族成员的 EMT 机制相连接。

转化生长因子(TGF)- β_1 诱导 EMT 机制和 *snail* 在肝细胞中的表达^[10]。TGF- β_2 作为心脏发育中诱导 EMT 和 *slug* 的信号分子已被证明, 而且这种信号可通过 TGF- β 的其它成员, 即骨骼形态发生蛋白(BMPs) 介导参与 *slug* 正调节作用所诱导的神经嵴的发育。在非洲爪蟾和斑马鱼中, 神经嵴在 BMP 信号途径的上游被诱导。高强度的

BMP 活化产生非神经外胚层, 而低强度的活化产生神经板。有趣的是, BMP 不仅是一种诱导 *slug* 的信号, 同时也是 *slug* 的分子靶点, 这是由于 *slug* 的过量表达可诱导 BMPs 的负调节作用。但是, 单独的 BMP 信号是不足以诱导神经嵴发育的, 对非洲爪蟾、斑马鱼和小鼠的研究表明, 产生所有不同类型的迁移前的细胞运动还需要成纤维细胞生长因子(FGF) 家族的成员参与^[11]。所以, 神经嵴的发育需要 BMP、Wnt 和 FGF 3 种信号共同作用。

FGF 诱导 *slug* 在胚胎外的上皮细胞和小鼠的膀胱癌细胞系 NBT- II 中表达, 而且 FGF 正调节 *snail* 并维持 *slug* 在鸡胚附肢发育中的表达。除此之外, 一种 FGF 受体(FGFR1) 发生突变的小鼠在原肠胚形成期不能进行 EMT 机制, 也不能表达 *snail*, 但在原肠胚进行 E-钙粘着蛋白的异位表达。这表明在原肠胚的结构域维持 *snail* 表达需要 FGFR1 信号, 这种原肠胚的结构域将发育成中胚层并启动 E-钙粘着蛋白的负调节作用^[12]。

最近的研究发现, 从非洲爪蟾中分离出的 *slug* 启动子具备转录因子 Lef 1 的功能性结合位的特性, 它能够在 Wnt 信号被激活后调节基因表达^[13]。相反, Kwoneop 等人在上皮细胞 LEF 过量表达后未观察到 *snail* 或 *slug* 的正调节作用, 也未观察到在人类结肠癌细胞中 *snail* 被 LEF 调节的现象。尽管如此, 通过研究 *snail* 抑制 E-钙粘着蛋白表达的功能, 发现 FGF 和 Wnt 的信号通路建立了一种有趣的关系。标准的 Wnt 信号通路的活化能稳定细胞质中 β -钙粘着蛋白的量, 这使得 β -钙粘着蛋白与 TCF/LEF 转录因子有效结合并协同转移到调节基因表达的细胞核中。相反, 在细胞膜中如果 E-钙粘着蛋白浓度过高, β -钙粘着蛋白将与 E-钙粘着蛋白结合从而形成粘着复合物, 就无法与 TCF/LEF 转录因子有效结合。所以, FGF 信号通过维持 *snail* 的表达而降低 E-钙粘着蛋白的浓度, 从而启动 Wnt 信号。

另一个已被证明诱导 *snail* 的因子是与甲状旁腺激素缩氨酸相关的蛋白质-PTH(rP)。PTH 对于促使体壁内胚层形成的 EMT 机制是必不可少的。

EMT 过程也发生在上皮细胞肿瘤恶性转变时, 而且 *snail* 病理的活化也参与了 this 转变过程。在这些病理现象中, 同样的信号分子看起来似乎都对诱导 *snail* 起作用。事实上, TGF- β 在上

皮细胞中诱导 EMT, 而且它对于癌症的获得性和侵入性表型是必需的. 另外, 在结肠癌细胞中, 一种通过与整联蛋白连接的激酶(ILK)的独立通路可激活 *snail*.

不同的通路最后汇集在 *snail* 处引发 EMT, 在所有过程中 *snail* 处于中心位置, 所以 *snail* 对于引发 EMT 和维持不同信号途径的协调性的表型迁移是必不可少的.

5 *snail* 超家族和细胞存活

一系列的证据证明了 *snail* 超家族在调节细胞死亡和存活问题中的作用. 在线虫神经元的一种特殊的细胞系中, 参与调节细胞凋亡的蛋白质(CES-2)抑制 CES-1(*scratch*)的功能, 这包括调节细胞死亡的激活蛋白 EGL-1 抑制存活基因 CED-9, 以及细胞凋亡蛋白 CED-4 和 CED-3 的活化.

6 细胞分裂和核内再复制

在果蝇的原肠胚形成期, 与腹部沟的形成相联系的细胞形状改变的同时, 伴随有有丝分裂被抑制的现象. 这种抑制被 Tribble 调节, Tribble 是一种阻止 *string* 的丝氨酸或羟丁氨酸激酶, 它含有有丝分裂所必须的 CDC25 磷酸脂酶的同源物. 这种抑制现象依赖于 *snail* 作为有丝分裂抑制剂的功能. 有理由相信, 这些细胞是在细胞分裂过程中被阻滞, 它们正在发生着与细胞形态改变和活跃迁移有关的巨大细胞骨架的重新组织运动.

snail 家族的其它成员(包括小鼠本身的 *snail*)也在以下的过程中与有丝分裂相关. 食用蜗牛和小鼠的 *snail* 参与控制一些组织的多倍体细胞, 包括果蝇的成虫盘、小鼠的三胚层细胞和人类的巨核细胞. 这两个物种的蛋白质抑制核内再复制, 诱导细胞有丝分裂的循环过程. 所以, 在果蝇中依赖这种细胞过程, *snail* 作为一种抑制因子或是作为 *string* 的激活因子而起作用. *Snail* 转录因子作为一种抑制因子已被证明, 这说明调节 *snail* 的活化可能是一种间接调节的结果^[1,2,7]. 但是, 它们作为激活因子的可能性也不能排除.

7 左右发育不对称性

在鸡胚中胚层右边的 *snail* 的表达具有显著的不对称性和短暂性的特性, 于是 Cooke 和他的同事研究发现 *snail* 在左右发育不对称的建立中起作用. 带有 *snail* 的反义寡聚核苷酸的早期鸡

胚的培养导致心脏位置的随机选择. 进一步研究发现, *snail* 位于 TGF- β 超家族成员 *Nodal* 产生的信号的下游和转录因子 *Pitx-2* 的上游——一种负责激活左边特异性分化过程的 bicoid 同源异形框蛋白. 使胚胎左边的 *Nodal* 失活的 BMP 信号的抑制因子导致 *snail* 被抑制, 从而不能再抑制 *Pitx-2*. 同样, *snail* 左右表达的不对称性在小鼠胚胎中也能被观察到. 这种不对称的表达是鸡和小鼠的早期发育阶段相互交换的极少数表达位点中的一个^[14]. 其不对称性的表达和短暂表达的特性, 解释了为什么它在果蝇或其它脊椎动物中无法检测到.

8 协同性和拮抗作用

snail 超家族的不同成员在同一生物过程或在相似的靶体中, 具有协同性和拮抗作用.

对于细胞分化, 鸡的 *slug* 和小鼠的 *snail* 和 *slug* 能维持间叶细胞表型和抑制分化^[1]. 与此类似, 果蝇的 *snail* 和 *escargot* 通过与 bHLH 蛋白竞争而与神经发生过程起相互拮抗作用. 所以, 它们看起来是在果蝇、线虫和小鼠中拮抗 *scratch*, 从而启动神经分化过程.

鸡和人类的 *slug* 与细胞生存相关, 而鸡的 *snail* 与附肢发育的细胞凋亡过程相联系. 对于不同的目的基因, *snail* 在果蝇和哺乳动物的中胚层的形成过程中抑制 E-钙粘连蛋白基因的表达, 相反, *escargot* 在蝇的气管发育过程中活化钙粘连蛋白的表达.

在一些物种中, 不同的家族成员相互协同作用, 例如在前述神经发生和不对称性细胞分裂过程中 3 种 *snail* 基因的协同作用. 而且, *snail* 和 *escargot* 在果蝇的翅膀发育中共同起作用, 脊椎动物的 *snail* 和 *slug* 基因可能在神经嵴的发育过程中相互协作引发 EMT 机制和维持间叶细胞的表型^[1].

值得一提的, 果蝇 *snail* 基因对 *string* 基因的调节备受关注. *snail* 似乎是在不对称的细胞分裂过程中激活 *string*, 但在原肠胚形成时却抑制它.

9 展望

目前, 我们通过研究 *snail* 超家族蛋白参与的发育过程和一些病理状态的各种过程, 获得了很多有价值的信息, 但要全面了解它们的功能和相互之间的关系, 还需不断努力.

由于 *snail* 突变小鼠在原肠胚形成时就已死亡, 所以 *snail* 突变小鼠对研究一系列发育后期过程是非常重要的, 包括神经嵴的形成或中胚层的组织和生物体的分化过程等。调节序列具有一些特性造成在不同物种的不同组织中的家族成员的时空特异性表达。显然, 想要对这种调节序列的特性有一个系统的研究将会是一个艰巨的任务。

从生物化学的角度看, 我们在 *snail* 起转录调节作用的机制方面没有获得什么信息。我们不知道 *snail* 基因能否作为一种激活蛋白而起作用, 没有获得关于诱导和抑制 *snail* 基因表达的其它蛋白的信息, 没有 *snail* 基因调节的靶分子或转录复合物的特性。与 *bHLH* 转录因子竞争结合 E-box 将依赖于相对亲和力, 而这种相对亲和力可能需要不同的共调节子以及与 *bHLH* 蛋白或其他未确定的蛋白的参与。这些蛋白能为特定种类细胞的分化和模式化提供特殊的蛋白复合体。

scratch 作为一类新的家族为在不同的物种中其新功能的研究提供了新的研究方向, 并且在 *snail* 超家族在病理学研究上也具有潜在作用。

参考文献(References):

- [1] CANO A, PEREZ-MORENO M A, NIETO M A, *et al.* The transcription factor *snail* control epithelial-mesenchymal transitions by repressing *E-cadherin* expression[J]. *Nature Cell Biol*, 2000, 2: 76-83.
- [2] BATLLE E, SANCHO E, GARCIA DE HERREROS A, *et al.* The transcription factor *snail* is a repressor of *E-cadherin* gene expression in epithelial tumour cells[J]. *Nature Cell Biol*, 2000, 2: 84-89.
- [3] HEMAVATHY K, ASHRAF S I, IP Y T. *Snail/Slug* family of repressors: slowly going to the fast lane of development and cancer [J]. *Gene*, 2000, 257: 1-12.
- [4] PEREZ-MORENO M A, LOCASCIO A, CANO A, *et al.* A new role for *E12/E47* in the repression of *E-cadherin* expression and epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 27424-27431.
- [5] MANZANARES M, LOCASCIO A, NIETO M A. The increasing complexity of the *Snail* superfamily in metazoan evolution [J]. *Trends Genet*, 2001, 17: 178-181.
- [6] KATAOKA H, MURAYAMA T, KITA T, *et al.* A novel *snail*-related transcription factor *Smuc* regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 626-633.
- [7] KNIGHT R, SHIMELD S. Identification of conserved C₂H₂ zinc-finger gene families in the *Bilateralia*[J]. *Genome Biol*, 2001, 2: 0016.1-0016.8.
- [8] DEL BARRIO M G, NIETO M A. Overexpression of *Snail* family members highlights their ability to promote chick neural crest formation[J]. *Development*, 2002, 129: 1583-1594.
- [9] CARVER E A, JIANG R, LAN Y, *et al.* The mouse *Snail* gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 8184-8188.
- [10] SPAGNOLI F M, CICCHINI C, TRIPODI M, *et al.* Inhibition of MMH (Met murine hepatocyte) cell differentiation by TGF- β is abrogated by pre-treatment with the heritable differentiation effector FGF II [J]. *J Cell Sci*, 2000, 113: 3639-3647.
- [11] CIRUNA B, ROSSANT J. FGF signalling regulates mesoderm cell fates specification and morphogenetic movement at the primitive streak[J]. *Dev Cell*, 2001, 1: 37-49.
- [12] VALLIN J, THURET R, BRODERS F, *et al.* Cloning and characterization of three *Xenopus Slug* promoters reveal direct regulation by *Leff*-catenin signaling [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 30350-30358.
- [13] LINKER C, BRONNER-FRASER M, MAYOR R. Relationship between gene expression domains of *Xsnail*, *Xslug*, and *Xtwist* and cell movement in the prospective neural crest of *Xenopus* [J]. *Dev Biol*, 2000, 224: 215-225.
- [14] ASHRAF S I, IP Y T. The *Snail* protein family regulates expression of *inscutable* and *string*, genes involved in asymmetry and cell division in *Drosophila* [J]. *Development*, 2001, 128: 4757-4767.