

# 基因组学：揭秘人类特有遗传变异对大脑皮层进化与发育的影响

浦懋懋，姚俊，曹新

南京医科大学生物技术系，南京 211166

**摘要：**大脑皮层是人类最高级的神经中枢，控制着人类区别于其他生物的认知能力，其结构与功能的高度复杂性起源于人类特有的遗传变异。应用基因组学技术，大脑皮层发育和进化的分子机制已经被逐步揭示。本文概述了基因组学技术如何运用于研究人类特有的遗传变异对大脑皮层发育与进化的影响，涉及采取基因组学方法研究人类和黑猩猩等其他哺乳类动物大脑皮层的基因表达差异以及重要的非编码调控序列—人类加速进化区 (Human accelerated regions, HARs) 在大脑发育过程中扮演的角色，并讨论了未来人类特有遗传变异在神经生物学领域的研究趋势。

**关键词：**基因组；发育；大脑皮层；分子进化

## Genomics: disclose the influence of human specific genetic variation on the evolution and development of cerebral cortex

Maomao Pu, Jun Yao, Xin Cao

*Department of Biology Technology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China*

**Abstract:** Cerebral cortex, whose complexity of structure and function has derived from human specific genetic variation, is the most advanced nerve center of human, controlling the cognitive ability which distinguishes human from any other creatures. Using genomics technology, molecular mechanisms of cerebral cortex development and evolution have been disclosed. In this review, we summarize how genomics technologies are used in exploring the influence of human specific genetic variation on cerebral cortex development and evolution, including the genomics methods to study the gene expression differences among the cerebral cortex of human beings, chimpanzee and other mammals; as well as the role of the significant non-coding regulatory sequences—human accelerated regions (HARs) in the process of brain development. We also discuss the future research trends on the human specific genetic variation in the field of neurobiology.

**Keywords:** genomics; development; cerebral cortex; molecular evolution

收稿日期: 2016-03-24; 修回日期: 2016-06-23

作者简介: 浦懋懋，本科，专业方向：生物技术。E-mail: 2206824909@qq.com

通讯作者: 曹新，博士，教授，研究方向：分子遗传学。E-mail: caoxin@njmu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.16-102

网络出版时间: 2016/8/5 10:21:00

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160805.1021.002.html>

与大多数哺乳动物类似,人脑最外层的新皮层是覆盖在端脑表面的一种六层式结构。然而有别于其他物种,人类的新皮层高度进化,使人类拥有远胜于其他生物的认知功能,如抽象思维、语言和复杂工具的使用。在解剖结构上,人脑皮层富有脑回和脑沟,使之能够扩展皮层的面积并增强神经元的功能,这与黑猩猩(*Pan troglodytes*)等其他灵长类动物类似。然而,人类大脑的体积至少是黑猩猩的 2~3 倍<sup>[1]</sup>,尤其是前额叶区比其他灵长类动物都发达,表现为神经元的数目较多、形态多样,且神经网络的拓扑结构更加复杂<sup>[2,3]</sup>。此外,甚至在现代人类出现之前,人类始祖的新皮层就有体积逐渐增长的进化趋势。据研究,距今 3000~4000 万前年的两种类人猿(*Platyrrhines* 和 *Catarrhines*)的大脑皮层曾经历过一次显著的增生,相同的改变也发生在 800~1600 万年前直立人(*Homo erectus*)进化为智人(*Homo sapiens*)的过程中,而新皮层增生程度最大的一次变化则发生于距今 300 万年前的人类世系之中<sup>[4]</sup>。在大脑皮层体积不断扩大的同时,其神经元的形态结构也表现出突触密度增多和较大的树突棘<sup>[5]</sup>。近年来,在细胞水平尤其是有关神经前体细胞的一些研究为揭示人类大脑的发育和进化带来崭新的视角。在胚胎小鼠(*Mus musculus Linnaeus*)的大脑发育过程中,投射神经元主要由两类神经前体细胞(Neural precursor cells, NPC)产生<sup>[6]</sup>。一类为顶端放射状神经胶质细胞(Apical radial glia, aRG),它是一种高度两极化的上皮样细胞,位于脑室区(Ventricular zone, VZ),一侧突起整合入脑室表面,另一侧突起向基底部延伸并抵达软脑膜的基底膜层。aRG 细胞具有多向分化与自我更新的潜能,在 VZ 区有丝分裂并分化为各种神经元与神经胶质细胞。另一类为中间神经前体细胞(Intermediate precursor, IP),是一种多极的非上皮样细胞。IP 细胞由 aRG 细胞分化而来,因此,其自我更新以及分化为投射神经元的能力都有局限,主要在脑室下区(Subventricular zone, SVZ)进行有丝分裂<sup>[7]</sup>。相比于小鼠等啮齿类动物,人类大脑皮层的发育则更为复杂,其 SVZ 区可细分为内层 SVZ 区(Inner subventricular zone, ISVZ)和外层 SVZ 区(Outer subventricular zone, OSVZ),各层神经前体细胞的形态结构和基因表达都有差异<sup>[8]</sup>,最引人注

意的是灵长类动物特有的神经前体细胞——外层放射状神经胶质细胞(Outer radial glia, oRG 或称 Basal radial glia, bRG)<sup>[9~11]</sup>。oRG 是一种单级细胞,其胞体位于 SVZ 区,一侧突起延伸至软脑膜的基底膜层,且能够表达与 aRG 细胞相类似的转录因子与细胞骨架标记物。oRG 细胞在 SVZ 区有丝分裂,其自我更新和分化的潜能优于 IP 细胞,能够对称分裂为两个姐妹 oRG 细胞并分化为神经元与星型胶质细胞<sup>[12]</sup>。Johnson 等<sup>[13]</sup>应用单细胞 RNA-seq 发现 oRG 细胞和 aRG 细胞一样都可以表达 LeX(CD15)和 GLAST(SLC1A3),但是却无法表达如 PROM1 等顶端蛋白。而 Thomsen 等<sup>[14]</sup>用类似的方法发现 aRG 细胞表达 *ANXA1*、*CRYAB*,而 oRG 细胞表达 *HOPX*。除上述的神经前体细胞外,还有诸如神经上皮细胞(Neural epithelial cells, NECs)、亚顶端神经前体细胞(Sub apical precursor, SAP)等其他 NPCs 都参与人类大脑皮层的发育过程<sup>[6]</sup>。除了 NPC 的种类和形态的差别,进化也使得 NPCs 的细胞周期发生巨大变化。随着神经发生的进展,小鼠 aRG 细胞的 G<sub>1</sub> 期与 S 期都变长,使总体细胞周期延长<sup>[15,16]</sup>。区别于小鼠,恒河猴(*Macaca mulatta*)的平均 NPC 周期虽然在神经发生的中期之前也随时间增长,但一旦进入神经发生中期,其 VZ 区的 NPCs 的细胞周期反而开始缩短<sup>[17]</sup>。这种神经发生后期 NPCs 的细胞周期缩短的现象甚至在猴的 VZ 区和 SVZ 区的 NPCs 中都有体现<sup>[10]</sup>,且表现为 G<sub>1</sub> 和 S 期都缩短。G<sub>1</sub> 期的时间长短是细胞命运决定的因素之一<sup>[18]</sup>,NPCs 缩短的 G<sub>1</sub> 期可能与灵长类动物大脑皮层的膨大有密切关系,因此寻找缩短灵长类动物 NPCs 的 G<sub>1</sub> 期的决定因素有重要意义。另外,人类等灵长类生物的大脑皮层的发育过程与小鼠也有显著差异,主要表现为神经发生推迟、时程更长,这些因素的最终效应都是使得人类的大脑皮层膨大<sup>[17~19]</sup>。

现代人类大脑皮层所具备的结构和功能的复杂性都非其他物种可比拟,而决定这种差异的分子本质应该归与人类特有遗传变异,这包括结构基因突变导致性状表型的改变和非编码调控序列的变异引发的功能差异。随着新一代测序技术的成熟,人类和黑猩猩等其他灵长类动物的基因组信息被不断揭示,这些结果为人类与灵长类动物分子进化和比较

基因组学的研究奠定了重要的基础。本文基于近年基因组学的研究成果综述了人类特有遗传变异对人类大脑皮层进化和发育的影响。

## 1 人类和黑猩猩等其他哺乳动物大脑皮层的基因差异

作为与人类亲缘关系最密切的物种,黑猩猩和人类共享超过 99% 的基因组序列<sup>[20]</sup>,二者种系分属始于 400~800 万年前<sup>[21]</sup>,因此常常将黑猩猩的基因与人类基因对比,从而发现人类特有遗传变异。事实上,通过全基因组范围内跨种系的比较基因组学研究,已经在不断揭示人类或黑猩猩等其他哺乳动物特有的基因及其与表型(性状)的相关性。可以预期,依据基因组学的研究方法将深入阐明神经系统发育的分子机制,揭示人类高级认知功能的分子调控途径,甚至为人脑记忆、分析和反馈功能的生物学机制的解释提供新的可能性<sup>[22]</sup>。

### 1.1 人类大脑皮层特有遗传变异的基因组学研究策略

#### 1.1.1 进化神经基因组学

传统上,对人类大脑认知功能的研究主要依赖于比较神经解剖学。这种方法的局限性在于无法对生物学过程提供分子水平上的解释<sup>[23,24]</sup>,而近年发展起来的进化神经基因组学可以解决这个问题。进化神经基因组学是利用不同物种的基因组数据,研究生物神经系统的分子进化,并诠释大脑皮层发育相关基因功能的一门学科,其主要研究策略是利用 FASTA、BLAST、Clustal W 等工具对比人类和黑猩猩等进化上具有同源性的灵长类动物的基因组,找出人类特有的基因变异,比如新基因家族或拷贝数增多的基因片段<sup>[20-25]</sup>,继而进一步通过种间基因拷贝数和结构变异的全基因组比较、大脑基因的表达差异研究、候选基因的功能测试以及神经退行性疾病相关致病基因的进化学研究等手段确定候选基因与人脑特有认知能力的联系<sup>[22]</sup>。目前,该方面的研究已经取得很多成果。例如,Cardoso 等<sup>[26]</sup>应用进化神经基因组学的方法绘制出描述社会适应障碍的神经分子机制的概念框架图。Ellis 等<sup>[27]</sup>针对生物对环境感受能力的差异,融合进化基因组学的思想,提

出了解释这种现象的神经进化发育模型。Fortna 等<sup>[28]</sup>也采用基于 cDNA 微阵列的比较基因组杂交技术分析了包括人类在内的 5 种高等灵长类动物的 29619 个基因,发现其中 1005 个基因在一种或几种猿类物种中独有。此外,他们还发现大量与大脑发育相关的基因只在人类中表现出拷贝数的显著扩增。总之,利用进化神经基因组学的方法可以高效率、有针对性地找到与神经发育相关的基因,在未来大脑皮层发育与进化的研究中可能发挥关键作用。

#### 1.1.2 人类认知疾病与大脑进化的趋同研究

研究发现,一些与认知疾病相关的基因往往会发生人类特有的遗传变异,即人类认知疾病与大脑进化的趋同现象。因此,可以在识别与神经发育疾病有关的致病基因后,将其与正常人类或其他灵长类的同源基因比较,从而发现人类特有的基因结构的改变,阐明大脑认知功能的进化历程。例如,PAK3 基因与 X-连锁的智力障碍(X-linked mental retardation, MRX)的分子发病机制有关。作为 p21 活化激酶家族的一员,PAK3 在 Rho 信号转导通路中作为 Rac 和 Cdc42 的下游调控分子,调节这些 Rho 蛋白对微丝蛋白和 p38、JNK 等激酶的作用。研究发现,MRX 患者的 PAK3 蛋白与正常人的 PAK3 相比发生了激酶结构域的截短,导致 Rac/Cdc42 信号转导通路的异常<sup>[29]</sup>。这种突变是人类所特有的,对研究大脑认知功能的进化具有较高的科学价值。目前仍然不清楚为什么相对于其他灵长类生物,人类的 PAK3 更容易发生这种形式的突变。而另外一个 MRX 相关基因 *Oligophrenin1* 的编码产物则作为 GTP 酶激活蛋白(GTPase activating protein, GAP)发挥作用,促进 RhoA、Rac 和 Cdc42 等小 G 蛋白从激活态转变为失活态。类似 PAK3,MRX 患者的 *Oligophrenin1* 也发生人类特有的基因结构的改变,表现为其 C 端编码 Rho GAP 基序的部分外显子缺失<sup>[30]</sup>。此外,在对人类与猿类的全基因组比较分析后,Fortna 等<sup>[28]</sup>发现作为智力障碍疾病潜在诱因的 PAK2、SRGAP2、ARHGEF5 和 ROCK1 等 Rho GTP 酶相关基因也只在人类中表现出基因拷贝数的增加。因此,有效利用人类认知疾病领域的相关基因可以为研究大脑皮层的进化提供借鉴和参考。

### 1.1.3 人类特有遗传变异的功能研究

构建转基因小鼠模型是功能基因组学研究中一项基础技术。现今许多相关的小鼠行为学与认知能力的测试实验已经相对完善,可以根据不同的研究目的进行选用。类似的转基因方法也可以应用于细胞和分子水平,用于探究人类特有的遗传变异引起的生物大分子结构、功能与生物学途径的变化。然而,转基因技术也有局限性。传统的转基因技术是将外源基因随机插入模式生物的染色体,无法确定表型的改变究竟是因为外源基因序列的差别,还是因为插入外源基因的位置或数目不同。针对这个问题,基于位点特异性重组原理的位点特异性整合酶介导的转基因技术(Site-specific integrase-mediated transgenesis)<sup>[31]</sup>已经应运而生,并有取代传统转基因技术愈来愈深入地运用于功能基因组学研究的趋势。这项技术允许外源基因以单拷贝形式插入到特定的染色体位点,成功率高达 40%左右。其主要步骤是:首先通过同源重组的方法将  $\phi$ C31 整合酶的

*attP* 序列插入小鼠受精卵的特定位点,然后再将含有 *attB* 序列、启动子、*GFP* 基因和目的基因的重组质粒与体外转录的  $\phi$ C31 整合酶的 mRNA 混合后注入受精卵,在  $\phi$ C31 整合酶的作用下,质粒与小鼠染色体发生位点特异性重组,从而将目的基因插入小鼠染色体的特定位置。

除了转基因技术之外,染色体免疫共沉淀-基因芯片技术(Chromatin Immunoprecipitation-chip, ChIP-chip)<sup>[32]</sup>、染色体免疫共沉淀-高通量测序技术(Chromatin Immunoprecipitation-seq, ChIP-seq)<sup>[33,34]</sup>、染色质构象捕捉技术<sup>[5,35,36]</sup>、RNA-seq<sup>[37]</sup>技术等也是研究人类大脑皮层特有基因功能的重要技术手段(图 1)。

ChIP-chip 是染色质免疫共沉淀技术与基因芯片技术的联用,其基本原理是先用甲醛裂解细胞并交联 DNA 和蛋白质,再用特异性的抗体沉淀交联复合物,扩增后与基因芯片杂交并检测。目前,ChIP-chip 技术广泛应用于检测 DNA 与蛋白质的相互关系,分

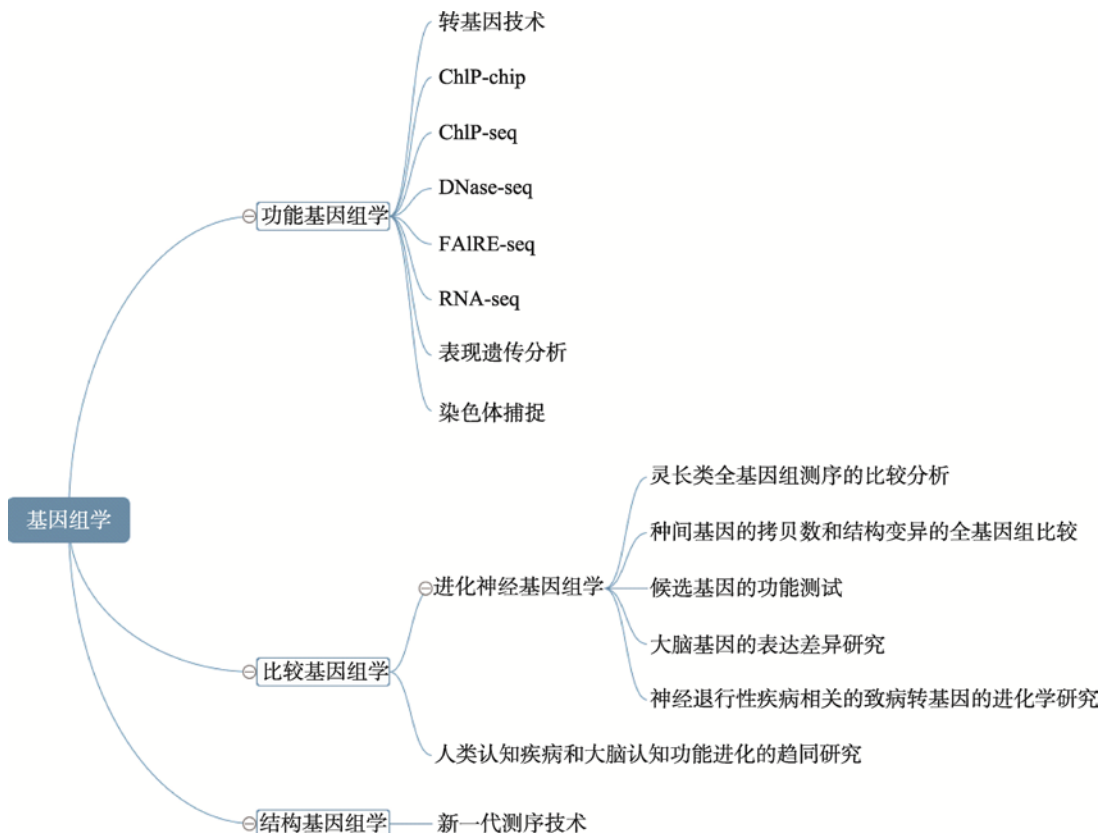


图 1 研究人类大脑皮层特有基因的基因组学策略

Fig. 1 Genomic strategy for the study of human specific genes in cerebral cortex



析转录结合位点(Transcriptional binding site, TFBS)以及组蛋白修饰与 DNA 甲基化的研究中。例如, Yamanaka 等<sup>[38]</sup>就采用 ChIP-chip 技术验证了小鼠脑皮层的转录因子 USF1 与近端启动子区域的 CACGTG E-box 基序结合。

ChIP-seq 是 ChIP 技术与深度测序结合的高通量功能基因组学技术, 用于生成转录因子、结构蛋白、聚合酶以及组蛋白修饰的全基因组图。Perdomo-Sabogal 应用 ChIP-seq 技术找到了转录因子 GABPa 在 5321 个基因中的结合位点, 其中 217 个基因内所含的 GABPa 结合位点是人类所特有的。GABPa 通过调节这些基因的表达调节包括神经系统发育在内的众多生命过程<sup>[39]</sup>。

染色质构象捕捉技术(3C)是甲醛交联相互作用的染色质后, 用特异性的引物进行荧光定量 PCR 准确定量细胞内某对染色质的交联频率, 从而分析 DNA 序列之间的相互作用关系<sup>[40]</sup>。例如, Boyd 等<sup>[41]</sup>利用染色质构象捕捉技术找到了增强子 *HARE5* 的调控基因 *FZD8*。

RNA-seq 是采用深度测序技术对 mRNA 反转录而成的 cDNA 进行高通量测序的技术, 被广泛运用于基因表达水平的检测。例如, Zeisel 等<sup>[42]</sup>应用大规模单细胞 RNA-seq 技术对小鼠躯体感觉皮层与海马体 CA1 区的神经细胞进行分类, 根据表达谱的差异共得到 47 种类型。同时, 他们还确定了各种神经细胞的标记基因。

## 1.2 人类大脑皮层许多基因在表达水平及编码序列上具有区别于其他物种同源基因的特征

### 1.2.1 人类大脑皮层特有的基因表达差异

迄今为止, 以人类、黑猩猩、恒河猴和小鼠为研究对象的比较基因组学研究已经获得诸多成果, 其中也揭示了人类大脑皮层在时间和空间上的基因表达差异<sup>[43-45]</sup>。例如, Pletikos 等<sup>[46]</sup>应用层次聚类、方差分析、主成分分析(Principal component analysis, PCA)、单核苷酸多态性分析(Single nucleotide polymorphism analysis, SNP analysis)和定量即时聚合酶链锁反应(Quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)等方法对一个来自 886 个人类与恒河猴大脑皮层的组织样本(从胚胎期到老年期, 覆

盖左右大脑半球的主要功能区域)的数据集进行了分析, 发现大脑皮层的不同区域以及发育的不同时期都存在基因表达的差异, 有些基因的表达相对于恒河猴是人类所特有的, 如 *CLMP*、*C13ORF38*、*KCNK12*、*WBSCR17*、*GABRG* 和 *TRPC3* 等。此外, 为了揭示进化过程中大脑皮层扩张的分子机制, Fietz 等<sup>[45]</sup>用激光捕捉显微技术结合 RNA 测序技术分析了小鼠与人类胚胎的室管膜层、室管膜下层和皮层板的转录组, 发现各区域在发育过程中都有不同程度的基因表达差异, 并存在种间差异性。Lui 等<sup>[47]</sup>对小鼠和人类新皮层放射状胶质细胞(Radial glia, RG)的转录组进行差异基因的共表达分析, 找出 18 个在人类却不在小鼠 RG 细胞内表达的基因: *ABHD3*、*ASAP3*、*BMP7*、*C5*、*C8orf4*、*FAM107A*、*FOXN4*、*ITGA2*、*LRIG3*、*LRRIC17*、*PAM*、*PDGFD*、*PDLIM3*、*RFTN2*、*SLC2A10*、*SP110*、*STOX1* 和 *ZC3H4V1*。随后, 他们重点研究了生长因子 *PDGFD*, 发现 *PDGFD* 在受孕 14.5 周(GW14.5)的人类新皮层的脑室区全层都表达。相反, 其在小鼠体内的同源基因 *pdgfd* 却无法在胚胎期 15.5(E15.5)的小鼠 RG 细胞内检测到表达。此外, 他们还发现 *PDGFD* 的一种受体 *PDGFR* 同样只在人类而非小鼠的端脑生发区与血管外膜细胞内表现出强表达。*PDGFR* 介导 *PDGFD*-*PDGFR* 信号通路, 促进 RG 细胞的分裂增殖, 并加速新皮层扩增<sup>[48]</sup>。而 *KLK8* 基因(基因产物为一种特异性表达在中枢神经系统的丝氨酸蛋白酶)是人类特有的剪接形式 *KLK8*(type II), 其 N 端第三外显子与其起源蛋白 *KLK8*(type I)相比, 多 45 个氨基酸残基, 这种特殊的表达形式只存在于人类的大脑皮层, 而黑猩猩和小鼠大脑皮层内则并未发现<sup>[49]</sup>。另外, Shi 等<sup>[50]</sup>也发现一个对大脑体积的进化起重要作用的调节基因 *CENPJ*, 该基因只在人类的中枢神经系统中呈现低甲基化, 在大猩猩(*Gorilla*)、旧大陆猴等其他哺乳动物中则因为甲基化程度高而使得表达量降低。有趣的是, 某些研究者认为除了直接参与大脑发育的功能基因的表达差异, 许多转录因子在脑部表现出的人类特有的调控方式也是大脑皮层发育不容忽视的影响因素。例如, Perdomo-Sabogal 等<sup>[39]</sup>应用比较基因组学技术发现转录因子 GABPa 在 *KRAB-ZNF*、*ALDOA*、*HSPA8*、

*TP73* 和 *TMBIM6* 等大脑发育相关基因中都存在人类特有的转录因子结合位点。*GABPa* 基因的表达下调将会引发多种认知功能障碍, 包括自闭症、阿尔兹海默症、帕金森症等。

### 1.2.2 人类大脑皮层特有的基因变异

根据发生突变的碱基数目, 基因变异可以分为两类: 一类是单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNPs); 一类是结构变异(Structure variations, SVs)<sup>[51]</sup>。人类大脑皮层的某些基因发生上述一类或两类特异性的遗传变异, 导致基因功能的改变并影响大脑的发育与进化。

世系进化的过程中常发生基因的碱基突变, 这是人类大脑皮层特有基因变异的重要来源之一。例如, Lai 等<sup>[52]</sup>对一个患有语言障碍的家系进行的功能基因组学研究, 发现一个与语言障碍密切相关的基因 *FOXP2*。*FOXP2* 可以编码一种叉头状转录因子, 与人类语言中枢的发育存在密切联系。而 *FOXP2* 的突变体—(R553H)会引起叉头域的点突变从而导致语言中枢的变异, 并引发语言障碍。随后, Zhang 等<sup>[53]</sup>通过搜索 GenBank 数据库、DNA 测序和基于 Clustal X 的多序列比对等比较基因组学研究发现 *FOXP2* 基因在大多数哺乳动物中高度保守, 但人类 *FOXP2* 与黑猩猩的相比有两个氨基酸的差异, 分别是(T303N)与(N325S)。推测 *FOXP2* 基因的结构与功能差异与人类语言中枢的发育与进化有直接关系<sup>[54]</sup>。此外, Hayakawa 等<sup>[55]</sup>发现一个人类特有基因 *SIGLEC11*, 该基因只在人类而非黑猩猩的小神经胶质细胞中表达, 推测 *SIGLEC11* 是由毗邻的假基因 *hSIGLECP16* 的 5'UTR 区和编码唾液酸识别结构域的序列发生多处人类特有的单核苷酸突变而成, 但仍需进一步实验验证。

除了单核苷酸替换, 结构变异尤其是某些大脑发育基因的部分片段重复也是人类特有的遗传变异, 同时也是人类特有基因产生的重要原因。例如, *SRGAP2* 基因在大脑发育过程中高度表达<sup>[56]</sup>, 其编码的 *SRGAP2* 蛋白包含 N 端参与膜泡运输的 F-BAR 结构域、中央的 Rho GAP 结构域和 C 端含有 SH3 结构域的尾部<sup>[57]</sup>。*SRGAP2* 在皮层处发挥促进神经元树突棘成熟、限制树突棘密度以及调控神经元迁

移等功能<sup>[58]</sup>。进一步研究显示, *SRGAP2* 在尼安德特人(*Homo neanderthalensis*)和智人的基因组中都含有两个假基因拷贝, 分别是 *SRGAP2B* 和 *SRGAP2C*, 而在黑猩猩、猩猩(*Pongo pygmaeus*)和大猩猩的基因组中却没有。Charrier 等<sup>[59]</sup>发现 *SRGAP2B* 和 *SRGAP2C* 来源于 *SRGAP2* 基因座的复制导致的基因片段重复, 都只能表达截短的 F-BAR 结构域。其中, 重复基因 *SRGAP2C* 在人类的大脑皮层处表达, 发挥与 *SRGAP2* 蛋白二聚化并抑制其功能的作用。此外, Florio 等<sup>[60]</sup>的研究结果也显示另一个表达 Rho GAP 的 *ARHGAP11A* 基因部分重复产生的人类特有基因 *ARHGAP11B* 能够促进基底神经前体细胞(Basal radial glia, bRG)的增殖和大脑皮层的膨胀。*ARHGAP11B* 是 *ARHGAP11A* 的截短基因。与 *ARHGAP11A* 相比, *ARHGAP11B* 缺少 C 端 756 个氨基酸残基。*ARHGAP11B* 能够促进顶端神经前体细胞(Apical radial glia, aRG)同时进行对称分裂和不对称分化从而产生更多的 bRGs。

人类的智力优于其他哺乳动物的一个重要原因是大脑皮层体积较大、神经元数目较多。除了上述的 *CENPJ*、*ARHGAP11B* 外, *ASPM*、*Microcephalin* 等其他重要的促进大脑皮层膨大的基因同样只在人类的新皮层中大量表达, 并发生人类特有的基因变异<sup>[50,61-63]</sup>。*ASPM* 基因突变将会导致大脑皮层无法发育到正常水平, 是先天性小头畸形(Recessive primary microcephaly, MCPH)的一个常见分子发病基础。进一步研究人类、黑猩猩、大猩猩、猩猩和恒河猴的 *ASPM* 同源基因, 发现 *ASPM* 基因在进化上趋向保守, 仅发现近 10 个位点存在插入与缺失, 总长达 50 bp。而 *ASPM* 基因的蛋白质编码区同样基本趋于保守, 但其所编码的 *ASPM* 蛋白内部的 IQ 基序的拷贝数(人类含有 47 个 IQ 重复序列, 远多于大部分的哺乳动物)以及 IQ 基序内部氨基酸的替换则有种属特异性, 共同影响大脑体积<sup>[62]</sup>。与 *ASPM* 基因类似, *Microcephalin* 基因突变为假基因后也会引发 MCPH。Evans 等<sup>[63]</sup>测定了猴祖细胞进化至人类细胞世系同源的 *Microcephalin* 基因的 Ka/Ks 值, 大约为 1.05, 显示出 *Microcephalin* 基因在进化的过程中经历了正选择, 表现为促进大脑皮层扩增的能力不断增强。这些结果都共同表明人类体内调节大脑

体积的基因和其他灵长类动物相比存在表达差异, 主要表现为表观遗传调控的变异、基因内部结构的重复或单核苷酸替换, 而总体趋势是使得人类的大脑皮层向体积增大、神经元增多以及突触联系复杂化的方向进化。

以上研究成果显示, 基于基因组学理论和方法的应用对揭示人类特有基因与大脑皮层的发育与进化具有重要意义。

## 2 人类非编码调控序列影响大脑皮层的进化、发育与功能

在全基因组测序技术出现之前, 保守的非编码序列的结构很难获得, 因此大部分的研究都将重点聚焦在编码蛋白质的结构基因上, 主要的研究手段是从人类基因组中筛选出某些在大脑发育进化过程中经历了正选择的基因<sup>[17,64]</sup>。然而相比这些结构基因, 非编码调控序列的碱基对数目是前者的两倍以上, 拥有更大的可能性成为进化上的分子靶点。再加上之前的研究已经表明人类和黑猩猩的蛋白质具有极高的相似性<sup>[65,66]</sup>, 并不支持原先所认为的结构基因的变异是人类和黑猩猩性状差异的主要来源的观点。随着测序技术的突破, 越来越多的研究已经提示人类基因组中非编码调控序列的分子进化同样影响大脑皮层的发育并形成独特的功能特征。

### 2.1 重要的人类非编码调控序列——人类加速进化区域(Human accelerated regions, HARs)

研究表明, 在种系进化过程中非编码调控序列的碱基突变能够引发表型的改变, 间接提示非编码调控序列的变异同样也在人类大脑的进化和发育进程中扮演着关键的角色<sup>[67,68]</sup>。McLean 等<sup>[69]</sup>在全基因组范围内确认了 510 处黑猩猩及其他哺乳动物内保守却在人类基因组内完全缺失的序列, 这些序列几乎全都位于非编码区域, 而且许多位于功能基因附近。其中, 受广泛关注的是人类加速区域的非编码序列。

HARs 是指基因组内某些在脊椎动物进化历程中相对保守, 但在人类与黑猩猩共同的始祖进化成人类的过程中核苷酸替换率迅速增大的 DNA 序列<sup>[70]</sup>。大多数 HARs 都是非编码序列, 只有少数 HARs, 如

*HAR23*、*HAR38* 具有编码蛋白质的功能<sup>[61]</sup>。

Burbano 等<sup>[71]</sup>应用比较基因组学技术分析尼安德特人和丹尼索瓦人(*Denisova hominin*)等古人类的 HARs 区域, 发现相对于结构基因, HARs 区域进化更快, 而且倾向于集中在某些时间段爆发式地进化。它们中有很大部分都是人类特有的功能序列, 这是进化过程中无数次正选择的结果<sup>[72]</sup>。这些进化标记很可能与人类大脑的认知功能存在密切联系, 但此种关系至今仍然存在许多疑问, 因此也成为该领域的研究热点之一。如今, 许多研究者采用新一代测序技术获得各种灵长类动物的基因组图谱, 并应用功能基因组学技术综合计算机建模和遗传分析的方法, 发现许多 HARs 毗邻发育相关基因, 或是位于基因内含子的内部, 并且常作为结构基因的调控成分(如增强子)或 RNA 基因发挥作用<sup>[61,66,73,74]</sup>。根据 Capra 等<sup>[74]</sup>的报告, 2649 个非编码 HARs 已经被确认, 其中有 30 个 HARs 在发育过程中被激活, 大约 10% 具有调节大脑发育的增强子功能。

### 2.2 HARs 影响大脑皮层的发育与进化

大量的研究显示 HARs 可以通过两种途径影响大脑皮层的发育与进化: 一种是表达为非编码 RNA 分子; 另外一种作为增强子发挥功能。

最初对 HARs 的研究始于 *HAR1* 的发现。人类的 *HAR1* 位于 20 号染色体长臂(20q)的左端, 是一对重叠基因 *HAR1F*(一个与 *Reelin* 共表达的 RNA 基因, 影响大脑六层式结构的形成)与 *HAR1R* 的一部分。进化过程中, *HAR1* 总共发生 18 处碱基替换, 且都发生在人类世系中。研究发现, *HAR1* 特异性地在 Cajal-Retzius 神经元内表达长链非编码 RNA, 对大脑皮层正常结构的形成产生重要作用<sup>[75]</sup>。

随后基于对转基因胚胎的分析或表观遗传标记, 越来越多的 HARs 的增强子功能被陆续发现<sup>[66,74]</sup>。其中, Prabhakar 等<sup>[76]</sup>首次证明 HARs 作为增强子调控进化分歧过程中的基因表达, 他们利用转基因小鼠功能测试发现一个人类加速进化区域 *HACNS1*, 也被称为 *HAR2*。在 *HACNS1* 长达 546 bp 的核苷酸序列中共发生 16 处人类特有的核苷酸替换。相比于黑猩猩与恒河猴的同源序列, 人源性 *HACNS1* 具有更加显著的增强子功能, 并主要在四肢部位调节基因的表达。之后, 一些其他的 HARs



也被发现作为增强子发挥作用,其中也包括影响大脑发育的增强子。这些 HARs 常常毗邻一些与大脑发育相关的基因,且具有人类特有的功能特性。例如, Capra 等<sup>[74]</sup>用转基因小鼠胚胎分别测试了 29 对具有增强子活性的人类 HARs 以及黑猩猩体内的同源序列,揭示了其中几对 HARs 在小鼠胚胎的发育脑内具有不同的功能分布与活性差异,发现相比于黑猩猩的同源序列,有些人源性的 HARs 序列能够驱动更广范围的基因表达,譬如,毗邻发育基因 *LYPD1* 和 *NCKAP5* 的 HAR—*2xHAR.164* 以及毗邻发育基因 *HAND1* 的 HAR—*2xHAR.170*。虽然人类和黑猩猩的 *2xHAR.164* 都在端脑背侧、腹侧间脑、中脑、后脑以及间脑和后脑的顶板等结构中具有相似的活性,但只有人类的 *2xHAR.164* 能够在中脑和后脑分界处的脑峡核区域启动基因表达。类似地,同样也只有人类的 *2xHAR.170* 在脑峡核检测到活性。值得关注的是,脑峡核的组织可以表达 WNT 和 FGF 配体调控毗邻组织的发育,如小脑以及黑质与中缝核等含儿茶酚胺的核团。提示 *2xHAR.164* 和 *2xHAR.170* 可能通过增强脑峡核的基因表达从而会影响这些组织的发育。此外,研究还发现人类的 *2xHAR.170* 能够在上丘脑组织内发挥增强子的功能,而上丘脑的发育同样也受 FGF 配体的调控。然而,对另外一些 HARs 而言,反而是黑猩猩的同源序列的功能区域更广泛,如只有黑猩猩的 *2xHAR.238* 能够在背侧大脑皮层尾部的一部分区域发挥功能。*2xHAR.238* 在染色体上毗邻 *GLI2* 基因,但是否调节该基因的表达仍未知。

另外,一些新皮层发育相关基因内部也含有高密度的 HARs。如与自闭症和智障等神经疾病相关的基因 *AUTS2* 内部就包含有 3 个内含子 HARs<sup>[65,77]</sup>,即 *HACNS369*、*HAR31* 和 *HACNS174*。Oksenberget 等<sup>[77]</sup>应用斑马鱼和转基因小鼠分析了 *AUTS2* 内部两个具有增强子活性的 HARs,其中一个是在中脑顶盖部位激活的 *HACNS369*,它对听觉和视觉反应都具有重要影响。至于人类和其他灵长类 *HACNS369* 是否具有活性上的差异仍然需要进一步的实验验证。而 *NPAS3* 则是目前发现的含有最多 HARs 的基因,内部总共有高达 14 个人类特有的 HARs 组分,平均每 100 kb 就有 1.6 个 HARs<sup>[73]</sup>。在脑发育过程中,该基因编码一类高表达的转录因子,若 *NPAS3* 表达异常

有报道则与人类精神分裂症发生有关<sup>[73,78]</sup>; *NPAS3* 缺失的小鼠可以观察到大脑发育的变异,表现为海马体体积减少、胼胝体发育不全、脑室扩大而导致精神分裂症样的行为学缺陷<sup>[78,79]</sup>。Kamm 等<sup>[73]</sup>应用转基因斑马鱼对 *NPAS3* 的 HARs 进一步研究,发现其中 11 个 HARs 能够发挥增强子的功能,并且主要在发育的神经系统中发挥作用。如此高密度的 HARs 可以改变 *NPAS3* 的时空表达,影响大脑发育和进化。例如,不同于黑猩猩的 *HAR202*,人类 *HAR202* 由于丢失了两个转录因子结合位点—*STAT5* 和 *BCL6*,无法在转基因斑马鱼的发育前脑中发挥活性;而用 E12.5 的转基因小鼠胚胎对 *NPAS3* 内的另一个 HAR—*2xHAR142* 进行了类似的分析,却得到相反的结果,即人类的同源序列拥有更强的功能活性<sup>[66]</sup>。这些实验结果都显示出众多基因内部的 HARs 可以作为增强子以多种激活方式影响人类大脑皮层的发育。

### 2.3 首个功能机制被揭示的 HAR——HARE5 增强子

最近 Boyd 等<sup>[41]</sup>发现一个新的 HARs 增强子 *HARE5* 并确定了其靶基因。这项研究首次阐释了一种人类特有的 HAR 的功能与器官形成的联系。研究者们首先利用人类和黑猩猩的全基因组数据筛选出一个对大脑皮层发育有关的增强子 HAR,即 *HARE5*。发现黑猩猩的同源 *HARE5* 与人类 *HARE5* 有 16 个碱基的差异。在功能上,人类的 *HARE5* 驱动大脑发育相关基因表达的能力比黑猩猩的 *HARE5* 更强,而且发挥作用的时间也较早。随后进一步利用染色体构象捕捉技术(3C),获得了 *HARE5* 的靶基因 *FZD8*。*FZD8* 是 Wnt 信号通路中的一种受体,主要表达于发育脑的神经祖细胞的细胞膜上,通过接受胞外信号分子 Wnt,激活下游信号通路的  $\beta$ -catenin 和 Lef/Tcf 等因子,从而发挥调节神经祖细胞的细胞周期与控制大脑体积的作用。相关研究表明,*FZD8* 的表达模式与 *SOX2* 和 *PAX6* 等神经干细胞标志基因存在强的相关性( $r>0.9$ )<sup>[47,80]</sup>。而 *HARE5* 则可以作为增强子直接上调 *FZD8* 受体在神经祖细胞内的表达量。这种调节作用主要集中在大脑皮层的第 3 层和第 5 层。然后,将带有人类 *HARE5* 增强子的 *FZD8* 基因和带有黑猩猩 *HARE5* 增强子的 *FZD8* 基因转入小鼠胚胎内,发现转入人类 *HARE5* 的小鼠胚胎(Hs-HARE5::Fzd8 鼠)的神经祖细胞拥有更短的细胞



周期, 分裂增殖速度加快, 产生更多的神经元, 最终促使大脑皮层体积增大, 而转入黑猩猩 *HARE5* 的小鼠(Pt-*HARE5::Fzd8* 鼠)大脑皮层则相对较小(图 2)。因而推测人类 *HARE5* 增强子加快神经祖细胞的细胞周期的作用主要是通过缩短  $G_1$  期实现的。*HARE5* 作为增强子功能研究的一个成功范例, 为 HARs 序列的进化影响人类大脑皮层的结构与功能的假说提供了有力的佐证。

### 3 未来的研究挑战与趋势

#### 3.1 利用新技术挖掘人类大脑进化与发育相关的分子

未来通过采用新的基因组学技术, 如大规模并行报告分析或基因组编辑技术<sup>[81,82]</sup>, 将有望实现人类特有的变异基因与 HARs 的高通量筛选, 从而获取更多影响大脑皮层进化发育的基因与增强子信息。而如何将这些候选的基因或增强子与具体器官

的性状或表型联系起来仍然是需要深入探索的课题。

虽然转基因动物模型, 如小鼠模型和斑马鱼模型已经为该领域的研究做出了很多的贡献, 但是也存在不可忽视的缺陷。比如小鼠的世代更替与遗传学分析既费时又昂贵, 效率很低。考虑到转基因动物技术的局限性, 诱导多能干细胞技术(Induced pluripotent stem cells, iPSCs)<sup>[83]</sup>以及体外诱导 iPSCs 细胞分化成多种细胞系或组织的技术<sup>[84]</sup>无疑成为研究人类或灵长类细胞发育进程的有前景的替代策略。这种方法在跨越模式动物传代的同时, 又允许转入的遗传物质在相似的遗传背景下表达。结合各种功能基因组学分析技术, 比如 RNA 测序与表观遗传分析, iPSCs 技术将更适合研究人类的进化与发育。例如, Prescott 等<sup>[85]</sup>实现了利用人类和黑猩猩的诱导多能干细胞挖掘 HARs 增强子的差异。有研究者估计为了阐明人类加速进化区的非编码序列对大脑发育的影响, 超过 2000 个 HARs 还有待进行功能

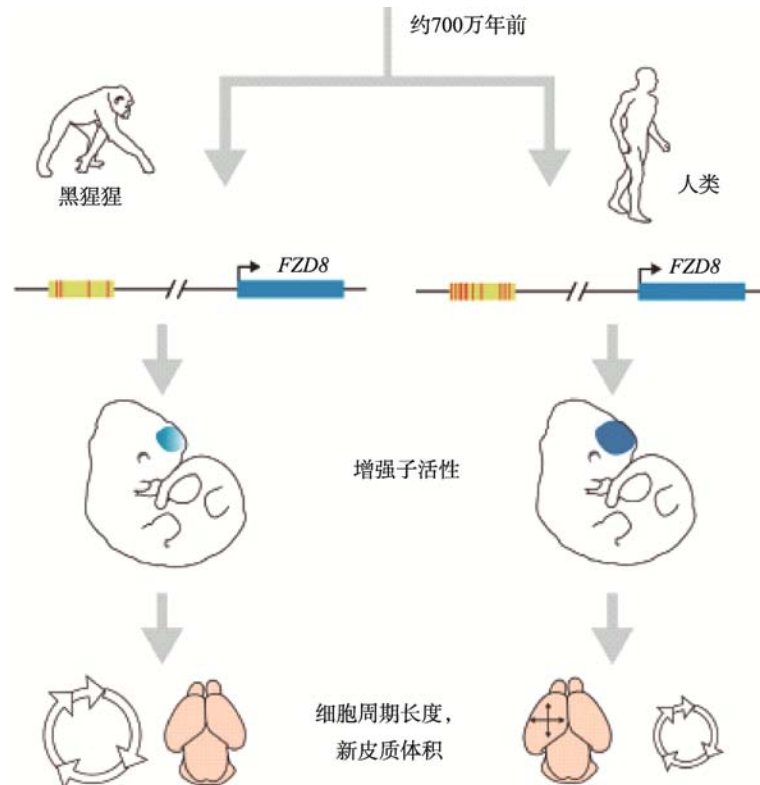


图 2 人类和黑猩猩的 *HARE5* 在不同程度上刺激转基因小鼠新皮质扩增

Fig. 2 Human's and chimpanzee's *HARE5* stimulate the expansion of mouse's cerebral cortex differently

*HARE5* 作为增强子直接上调 *FZD8* 受体在大脑皮质中的表达量, 从而缩短细胞周期, 加快神经祖细胞的分裂增殖, 促进转基因小鼠新皮质的发育生长。人类 *HARE5* 的作用强于黑猩猩 *HARE5*。参考文献<sup>[18]</sup>绘制。

测试。利用 iPSCs 技术有望节省大量的时间和经济成本<sup>[86]</sup>。

另一方面,传统的转基因技术会使外源基因随机地插入基因组。依照这样的方法建立的模型无论是基因拷贝数还是插入位点都会不同,对外源基因的表达具有难以预估的影响。除了上文所提及的位点特异性转基因技术,近年诞生的定点基因敲除技术—CRISPR/Cas9 技术<sup>[87]</sup>可弥补如上缺点,应用 CRISPR/Cas9 技术对灵长类动物干细胞模型的同源序列进行定点突变,可以更好地模拟该序列在人体内发挥作用的模式,具有极大的应用前景。

### 3.2 阐明复杂的分子调控网络

人类大脑的发育是一个复杂的过程,需要许多基因、蛋白质以及小分子物质的参与。它们之间相互作用形成复杂的信号转导途径与分子调控网络,共同决定了大脑的精细结构与功能。因此,仅仅着眼于其中某几个基因或非编码序列对大脑发育的作用,无法从整体水平解释大脑皮层的发育机制与进化历程。随着基因组学及组学技术在该领域的应用,与大脑皮层有关的人类特有遗传变异与非编码序列的结构与功能信息不断积累,为今后探索人类特有的变异基因与 HARs 之间复杂的调控,以及它们如何影响大脑皮层的表型和功能,奠定了重要的基础。进而为进一步阐明人类大脑特有的分子调控网络,揭示调控网络中的遗传变异而引发的诸如自闭症、精神分裂症等认知障碍疾病的分子机制指明了研究方向。目前,多个与大脑发育有关的信号转导通路已经被发现,如 Notch、Shh、Reelin、FGF、Wnt 以及 BMP-SMAD 信号通路<sup>[88]</sup>,然而要具体阐明人类大脑发育调控的分子网络还有很长的路要走。

## 4 结 语

在进入后基因组时代,基因组学已经成为分子生物学乃至整个生命科学领域最具活力和研究前景的一部分。伴随着人类特有遗传变异和 HARs 被不断发现,基因组学的研究成果正在逐步深化和拓展人们对大脑发育与进化的理解。未来,新发展的 iPSCs、CRISPR/Cas9 等技术、各类基因编辑的脑、神经功能缺陷的模式动物,以及结合基于基因组的

生命组学的研究策略,围绕人类特有遗传变异和非编码序列功能的纵深研究,人类大脑特有的皮层发育和分子进化的机制将逐渐被揭示。相伴随的,困扰人类一系列的神经系统的疾病如精神分裂症、帕金森症、抑郁症、阿尔兹海默症等的分子病因将被阐明,从而实现期望的精准诊断与治疗。

### 参考文献(References):

- [1] Herculano-Houzel S. The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(Suppl. 1): 10661–10668. [DOI]
- [2] Geschwind DH, Rakic P. Cortical evolution: judge the brain by its cover. *Neuron*, 2013, 80(3): 633–647. [DOI]
- [3] Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex. *Cell*, 2011, 146(1): 18–36. [DOI]
- [4] Rakic P. Specification of cerebral cortical areas. *Science*, 1988, 241(4862): 170–176. [DOI]
- [5] Dostie J, Richmond TA, Arnaout RA, Selzer RR, Lee WL, Honan TA, Rubio ED, Krumm A, Lamb J, Nusbaum C, Green RD, Dekker J. Chromosome Conformation Capture Carbon Copy (5C): a massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements. *Genome Res*, 2006, 16(10): 1299–1309. [DOI]
- [6] Florio M, Huttner WB. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development*, 2014, 141(11): 2182–2194. [DOI]
- [7] Kowalczyk T, Pontious A, Englund C, Daza RA, Bedogni F, Hodge R, Attardo A, Bell C, Huttner WB, Hevner RF. Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cereb Cortex*, 2009, 19(10): 2439–2450. [DOI]
- [8] Gu J, Chen XP. Length of cell cycle in neural development. *Hereditas (Beijing)*, 2011, 33(11): 1185–1190. 顾娟,陈晓萍.神经发育中的细胞周期时程.遗传, 2011, 33(11): 1185–1190. [DOI]
- [9] Hansen DV, Lui JH, Parker PRL, Kriegstein AR. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*, 2010, 464(7288): 554–561. [DOI]
- [10] Betizeau M, Cortay V, Patti D, Pfister S, Gautier E, Bellemain-Ménard A, Afanassieff M, Huissoud C, Douglas RJ, Kennedy H, Dehay C. Precursor diversity and complexity of lineage relationships in the outer subventricular zone of the primate. *Neuron*, 2013, 80(2): 442–457. [DOI]

- [11] Fietz SA, Kelava I, Vogt J, Wilsch-Bräuninger M, Stenzel D, Fish JL, Corbeil D, Riehn A, Distler W, Nitsch R, Huttner WB. OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat Neurosci*, 2010, 13(6): 690–699. [DOI]
- [12] Reillo I, de Juan Romero C, García-Cabezas MÁ, Borrell V. A role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. *Cereb Cortex*, 2011, 21(7): 1674–1694. [DOI]
- [13] Johnson MB, Wang PP, Atabay KD, Murphy EA, Doan RN, Hecht JL, Walsh CA. Single-cell analysis reveals transcriptional heterogeneity of neural progenitors in human cortex. *Nat Neurosci*, 2015, 18(5): 637–646. [DOI]
- [14] Thomsen ER, Mich JK, Yao ZZ, Hodge RD, Doyle AM, Jang SM, Shehata SI, Nelson AM, Shapovalova NV, Levi BP, Ramanathan S. Fixed single-cell transcriptomic characterization of human radial glial diversity. *Nat Methods*, 2016, 13(1): 87–93. [DOI]
- [15] Calegari F, Haubensak W, Haffner C, Huttner WB. Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J Neurosci*, 2005, 25(28): 6533–6538. [DOI]
- [16] Arai Y, Pulvers JN, Haffner C, Schilling B, Nüsslein I, Calegari F, Huttner WB. Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun*, 2011, 2: 154. [DOI]
- [17] Kornack DR, Rakic P. Changes in cell-cycle kinetics during the development and evolution of primate neocortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(3): 1242–1246. [DOI]
- [18] Calegari F, Huttner WB. An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J Cell Sci*, 2003, 116(24): 4947–4955. [DOI]
- [19] Caviness VS Jr, Takahashi T, Nowakowski RS. Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci*, 1995, 18(9): 379–383. [DOI]
- [20] Cheng Z, Ventura M, She XW, Khaitovich P, Graves T, Osoegawa K, Church D, DeJong P, Wilson RK, Pääbo S, Rocchi M, Eichler EE. A genome-wide comparison of recent chimpanzee and human segmental duplications. *Nature*, 2005, 437(7055): 88–93. [DOI]
- [21] Sherwood CC, Subiaul F, Zawidzki TW. A natural history of the human mind: tracing evolutionary changes in brain and cognition. *J Anat*, 2008, 212(4): 426–454. [DOI]
- [22] Sikela JM. The jewels of our genome: the search for the genomic changes underlying the evolutionarily unique capacities of the human brain. *PLoS Genet*, 2006, 2(5): e80. [DOI]
- [23] Carroll SB. Genetics and the making of Homo sapiens. *Nature*, 2003, 422(6934): 849–857. [DOI]
- [24] Crick F, Koch C. A framework for consciousness. *Nat Neurosci*, 2003, 6(2): 119–126. [DOI]
- [25] Eichler EE. Segmental duplications: what's missing, misassigned, and misassembled-and should we care? *Genome Res*, 2001, 11(5): 653–656. [DOI]
- [26] Cardoso SD, Teles MC, Oliveira RF. Neurogenomic mechanisms of social plasticity. *J Exp Biol*, 2015, 218(1): 140–149. [DOI]
- [27] Ellis BJ, Boyce WT, Belsky J, Bakermans-Kranenburg MJ, van Ijzendoorn MH. Differential susceptibility to the environment: an evolutionary-neurodevelopmental theory. *Dev Psychopathol*, 2011, 23(1): 7–28. [DOI]
- [28] Fortna A, Kim Y, MacLaren E, Marshall K, Hahn G, Meltesen L, Brenton M, Hink R, Burgers S, Hernandez-Boussard T, Karimpour-Fard A, Glueck D, McGavran L, Berry R, Pollack J, Sikela JM. Lineage-specific gene duplication and loss in human and great ape evolution. *PLoS Biol*, 2004, 2(7): e207. [DOI]
- [29] Ramakers GJ. Rho proteins and the cellular mechanisms of mental retardation. *Am J Med Genet*, 2000, 94(5): 367–371. [DOI]
- [30] Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, des Portes V, Vinet MC, Zemni R, Roest Crollius H, Carrié A, Fauchereau F, Cherry M, Briault S, Hamel B, Fryns JP, Beldjord C, Kahn A, Moraine C, Chelly J. Oligophrenin-1 encodes a rho-GAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature*, 1998, 392(6679): 923–926. [DOI]
- [31] Tasic B, Hippenmeyer S, Wang C, Gamboa M, Zong H, Chen-Tsai Y, Luo LQ. Site-specific integrase-mediated transgenesis in mice via pronuclear injection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(19): 7902–7907. [DOI]
- [32] Horak CE, Snyder M. ChIP-chip: a genomic approach for identifying transcription factor binding sites. *Methods Enzymol*, 2002, 350: 469–483. [DOI]
- [33] Furey TS. ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(12): 840–852. [DOI]
- [34] Zentner GE, Henikoff S. High-resolution digital profiling of the epigenome. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(12): 814–827. [DOI]
- [35] Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N. Capturing chromosome conformation. *Science*, 2002, 295(5558): 1306–1311. [DOI]



- [36] Miele A, Dekker J. Mapping *cis*- and *trans*- chromatin interaction networks using chromosome conformation capture (3C). In: Hancock R, ed. *The Nucleus*. Totowa, NJ: Humana Press, 2008: 105–121. [DOI]
- [37] Arner E, Daub CO, Vitting-Seerup K, Andersson R, Lilje B, Drabløs F, Lennartsson A, Rönnerblad M, Hrydziusko O, Vitezic M, Freeman TC, Alhendi AMN, Arner P, Axton R, Baillie JK, Beckhouse A, Bodega B, Briggs J, Brombacher F, Davis M, Detmar M, Ehrlund A, Endoh M, Es-lami A, Fagiolini M, Fairbairn L, Faulkner GJ, Ferrai C, Fisher ME, Forrester L, Goldowitz D, Guler R, Ha T, Hara M, Herlyn M, Ikawa T, Kai C, Kawamoto H, Khachigian LM, Klinken SP, Kojima S, Koseki H, Klein S, Mejhert N, Miyaguchi K, Mizuno Y, Morimoto M, Morris KJ, Mum-mery C, Nakachi Y, Ogishima S, Okada-Hatakeyama M, Okazaki Y, Orlando V, Ovchinnikov D, Passier R, Patrika-kis M, Pombo A, Qin XY, Roy S, Sato H, Savvi S, Saxena A, Schwegmann A, Sugiyama D, Swoboda R, Tanaka H, Tomoiu A, Winteringham LN, Wolvetang E, Yana-gi-Mizuochi C, Yoneda M, Zabierowski S, Zhang P, Ab-ugessaisa I, Bertin N, Diehl AD, Fukuda S, Furuno M, Harshbarger J, Hasegawa A, Hori F, Ishikawa-Kato S, Ishizu Y, Itoh M, Kawashima T, Kojima M, Kondo N, Li-zio M, Meehan TF, Mungall CJ, Murata M, Nishiyo-ri-Sueki H, Sahin S, Nagao-Sato S, Severin J, de Hoon MJ, Kawai J, Kasukawa T, Lassmann T, Suzuki H, Kawaji H, Summers KM, Wells C, Hume DA, Forrest AR, Sandelin A, Carninci P, Hayashizaki Y. Transcribed enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mam-malian cells. *Science*, 2015, 347(6225): 1010–1014. [DOI]
- [38] Yamanaka T, Tosaki A, Kurosawa M, Shimogori T, Hattori N, Nukina N. Genome-wide analyses in neuronal cells re-veal that upstream transcription factors regulate lysosomal gene expression. *FEBS J*, 2016, 283(6): 1077–1087. [DOI]
- [39] Perdomo-Sabogal A, Nowick K, Piccini I, Sudbrak R, Le-hrach H, Yaspo ML, Warnatz HJ, Querfurth R. Human li-neage-specific transcriptional regulation through GA-bin-ding protein transcription factor alpha (GABPa). *Mol Biol Evol*, 2016, 33(5): 1231–1244. [DOI]
- [40] Hagège H, Klous P, Braem C, Splinter E, Dekker J, Ca-thala G, de Laat W, Forné T. Quantitative analysis of chro-mosome conformation capture assays (3C-qPCR). *Nat Protoc*, 2007, 2(7): 1722–1733. [DOI]
- [41] Boyd JL, Skove SL, Rouanet JP, Pilaz LJ, Bepler T, Gordân R, Wray GA, Silver DL. Human-chimpanzee dif-ferences in a FZD8 enhancer alter cell-cycle dynamics in the developing neocortex. *Curr Biol*, 2015, 25(6): 772–779. [DOI]
- [42] Zeisel A, Muñoz-Manchado AB, Codeluppi S, Lönnerberg P, La Manno G, Jureus A, Marques S, Munguba H, He LQ, Betsholtz C, Rolny C, Castelo-Branco G, Hjerling-Leffler J, Linnarsson S. Cell types in the mouse cortex and hip-pocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science*, 2015, 347(6226): 1138–1142. [DOI]
- [43] Konopka G, Friedrich T, Davis-Turak J, Winden K, Old-ham MC, Gao FY, Chen L, Wang GZ, Luo R, Preuss TM, Geschwind DH. Human-specific transcriptional networks in the brain. *Neuron*, 2012, 75(4): 601–617. [DOI]
- [44] Bernard A, Lubbers LS, Tanis KQ, Luo R, Podtelezchnikov AA, Finney EM, McWhorter MME, Serikawa K, Lemon T, Morgan R, Copeland C, Smith K, Cullen V, Davis-Turak J, Lee CK, Sunkin SM, Loboda AP, Levine DM, Stone DJ, Hawrylycz MJ, Roberts CJ, Jones AR, Geschwind DH, Lein ES. Transcriptional architecture of the primate neo-cortex. *Neuron*, 2012, 73(6): 1083–1099. [DOI]
- [45] Fietz SA, Lachmann R, Brandl H, Kircher M, Samusik N, Schröder R, Lakshmanaperumal N, Henry I, Vogt J, Riehn A, Distler W, Nitsch R, Enard W, Pääbo S, Huttner WB. Transcriptomes of germinal zones of human and mouse fetal neocortex suggest a role of extracellular matrix in progenitor self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(29): 11836–11841. [DOI]
- [46] Pletikos M, Sousa AMM, Sedmak G, Meyer KA, Zhu Y, Cheng F, Li MF, Kawasawa YI, Šestan N. Temporal speci-fication and bilaterality of human neocortical topographic gene expression. *Neuron*, 2014, 81(2): 321–332. [DOI]
- [47] Lui JH, Nowakowski TJ, Pollen AA, Javaherian A, Krie-gstein AR, Oldham MC. Radial glia require PDGFR-β signalling in human but not mouse neocortex. *Nature*, 2014, 515(7526): 264–268. [DOI]
- [48] Bergsten E, Uutela M, Li XR, Pietras K, Östman A, Hel-din CH, Alitalo K, Eriksson U. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF β-receptor. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(5): 512–516. [DOI]
- [49] Lu ZX, Huang Q, Su B. Functional characterization of the human-specific (type II) form of kallikrein 8, a gene in-volved in learning and memory. *Cell Res*, 2009, 19(2): 259–267. [DOI]
- [50] Shi L, Lin Q, Su B. Human-specific hypomethylation of *CENPJ*, a key brain size regulator. *Mol Biol Evol*, 2014, 31(3): 594–604. [DOI]
- [51] Wu XM, Xiao HS. miRNAs modulate the drug response of tumor cells. *Sci China Ser C: Life Sci*, 2009, 52(9): 797–801. 武雪梅, 肖华胜. 人类基因组结构变异检测研究进展.

- 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39(03): 237–244. [DOI]
- [52] Lai CSL, Fisher SE, Hurst JA, Vargha-Khadem F, Monaco AP. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature*, 2001, 413(6855): 519–523. [DOI]
- [53] Zhang JZ, Webb DM, Podlaha O. Accelerated protein evolution and origins of human-specific features: Foxp2 as an example. *Genetics*, 2002, 162(4): 1825–1835. [DOI]
- [54] Konopka G, Bomar JM, Winden K, Coppola G, Jonsson ZO, Gao FY, Peng S, Preuss TM, Wohlschlegel JA, Geschwind DH. Human-specific transcriptional regulation of CNS development genes by FOXP2. *Nature*, 2009, 462(7270): 213–217. [DOI]
- [55] Hayakawa T, Angata T, Lewis AL, Mikkelsen TS, Varki NM, Varki A. A human-specific gene in microglia. *Science*, 2005, 309(5741): 1693. [DOI]
- [56] Bacon C, Endris V, Rappold G. Dynamic expression of the Slit-Robo GTPase activating protein genes during development of the murine nervous system. *J Comp Neurol*, 2009, 513(2): 224–236. [DOI]
- [57] Itoh T, Erdmann KS, Roux A, Habermann B, Werner H, De Camilli P. Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev Cell*, 2005, 9(6): 791–804. [DOI]
- [58] Guerrier S, Coutinho-Budd J, Sassa T, Gresset A, Jordan NV, Chen K, Jin WL, Frost A, Polleux F. The F-BAR domain of srGAP2 induces membrane protrusions required for neuronal migration and morphogenesis. *Cell*, 2009, 138(5): 990–1004. [DOI]
- [59] Charrier C, Joshi K, Coutinho-Budd J, Kim JE, Lambert N, de Marchena J, Jin WL, Vanderhaeghen P, Ghosh A, Sassa T, Polleux F. Inhibition of SRGAP2 function by its human-specific paralogs induces neoteny during spine maturation. *Cell*, 2012, 149(4): 923–935. [DOI]
- [60] Florio M, Albert M, Taverna E, Namba T, Brandl H, Lewitus E, Haffner C, Sykes A, Wong FK, Peters J, Guhr E, Klemroth S, Prüfer K, Kelso J, Naumann R, Nüsslein I, Dahl A, Lachmann R, Pääbo S, Huttner WB. Human-specific gene *ARHGAP11B* promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion. *Science*, 2015, 347(6229): 1465–1470. [DOI]
- [61] Amadio JP, Walsh CA. Brain evolution and uniqueness in the human genome. *Cell*, 2006, 126(6): 1033–1035. [DOI]
- [62] Kouprina N, Pavlicek A, Mochida GH, Solomon G, Gersch W, Yoon YH, Collura R, Ruvolo M, Barrett JC, Woods CG, Walsh CA, Jurka J, Larionov V. Accelerated evolution of the ASPM gene controlling brain size begins prior to human brain expansion. *PLoS Biol*, 2004, 2(5): e126. [DOI]
- [63] Evans PD, Anderson JR, Vallender EJ, Choi SS, Lahn BT. Reconstructing the evolutionary history of *microcephalin*, a gene controlling human brain size. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(11): 1139–1145. [DOI]
- [64] Somel M, Liu XL, Khaitovich P. Human brain evolution: transcripts, metabolites and their regulators. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(2): 112–127. [DOI]
- [65] Oksenberg N, Stevison L, Wall JD, Ahituv N. Function and regulation of AUTS2, a gene implicated in autism and human evolution. *PLoS Genet*, 2013, 9(1): e1003221. [DOI]
- [66] Kamm GB, López-Leal R, Lorenzo JR, Franchini LF. A fast-evolving human *NPAS3* enhancer gained reporter expression in the developing forebrain of transgenic mice. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013, 368(1632): 20130019. [DOI]
- [67] Carroll SB. Evolution at two levels: on genes and form. *PLoS Biol*, 2005, 3(7): e245. [DOI]
- [68] Carroll SB. Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution. *Cell*, 2008, 134(1): 25–36. [DOI]
- [69] McLean CY, Reno PL, Pollen AA, Bassan AI, Capellini TD, Guenther C, Indjeian VB, Lim X, Menke DB, Schaar BT, Wenger AM, Bejerano G, Kingsley DM. Human-specific loss of regulatory DNA and the evolution of human-specific traits. *Nature*, 2011, 471(7337): 216–219. [DOI]
- [70] Bird CP, Stranger BE, Liu M, Thomas DJ, Ingle CE, Beazley C, Miller W, Hurles ME, Dermitzakis ET. Fast-evolving noncoding sequences in the human genome. *Genome Biol*, 2007, 8(6): R118. [DOI]
- [71] Burbano HA, Green RE, Maricic T, Lalueza-Fox C, de la Rasilla M, Rosas A, Kelso J, Pollard KS, Lachmann M, Pääbo S. Analysis of human accelerated DNA regions using archaic hominin genomes. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32877. [DOI]
- [72] Hubisz MJ, Pollard KS. Exploring the genesis and functions of Human Accelerated Regions sheds light on their role in human evolution. *Curr Opin Genet Dev*, 2014, 29: 15–21. [DOI]
- [73] Kamm GB, Pisciotto F, Kliger R, Franchini LF. The developmental brain gene *NPAS3* contains the largest number of accelerated regulatory sequences in the human

- genome. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(5): 1088–1102. [DOI]
- [74] Capra JA, Erwin GD, McKinsey G, Rubenstein JLR, Pollard KS. Many human accelerated regions are developmental enhancers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013, 368(1632): 20130025. [DOI]
- [75] Pollard KS, Salama SR, Lambert N, Lambot MA, Coppens S, Pedersen JS, Katzman S, King B, Onodera C, Siepel A, Kern AD, Dehay C, Igel H, Ares M Jr, Vanderhaeghen P, Haussler D. An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. *Nature*, 2006, 443(7108): 167–172. [DOI]
- [76] Prabhakar S, Visel A, Akiyama JA, Shoukry M, Lewis KD, Holt A, Plajzer-Frick I, Morrison H, FitzPatrick DR, Afzal V, Pennacchio LA, Rubin EM, Noonan JP. Human-specific gain of function in a developmental enhancer. *Science*, 2008, 321(5894): 1346–1350. [DOI]
- [77] Oksenberg N, Ahituv N. The role of *AUTS2* in neurodevelopment and human evolution. *Trends Genet*, 2013, 29(10): 600–608. [DOI]
- [78] Erbel-Sieler C, Dudley C, Zhou YD, Wu XL, Estill SJ, Han T, Diaz-Arrastia R, Brunskill EW, Potter SS, McKnight SL. Behavioral and regulatory abnormalities in mice deficient in the NPAS1 and NPAS3 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(37): 13648–13653. [DOI]
- [79] Brunskill EW, Ehrman LA, Williams MT, Klanke J, Hammer D, Schaefer TL, Sah R, Dorn GW II, Potter SS, Vorhees CV. Abnormal neurodevelopment, neurosignaling and behaviour in Npas3-deficient mice. *Eur J Neurosci*, 2005, 22(6): 1265–1276. [DOI]
- [80] Miller JA, Ding SL, Sunkin SM, Smith KA, Ng L, Szafer A, Ebbert A, Riley ZL, Royall JJ, Aiona K, Arnold JM, Bennet C, Bertagnolli D, Brouner K, Butler S, Caldejon S, Carey A, Cuhaciyan C, Dalley RA, Dee N, Dolbeare TA, Facer AC, Feng D, Fliss TP, Gee G, Goldy J, Gourley L, Gregor BW, Gu GY, Howard RE, Jochim JM, Kuan CL, Lau C, Lee CK, Lee F, Lemon TA, Lesnar P, McMurray B, Mastan N, Mosqueda N, Nalwai-Cecchini T, Ngo NK, Nyhus J, Oldre A, Olson E, Parente J, Parker PD, Parry SE, Stevens A, Pletikos M, Reding M, Roll K, Sandman D, Sarreal M, Shapouri S, Shapovalova NV, Shen EH, Sjoquist N, Slaughterbeck CR, Smith M, Sodt AJ, Williams D, Zöllei L, Fischl B, Gerstein MB, Geschwind DH, Glass IA, Hawrylycz MJ, Hevner RF, Huang H, Jones AR, Knowles JA, Levitt P, Phillips JW, Šestan N, Wahnoutka P, Dang C, Bernard A, Hohmann JG, Lein ES. Transcriptional landscape of the prenatal human brain. *Nature*, 2014, 508(7495): 199–206. [DOI]
- [81] Melnikov A, Murugan A, Zhang XL, Tesileanu T, Wang L, Rogov P, Feizi S, Gnirke A, Callan CG Jr, Kinney JB, Kellis M, Lander ES, Mikkelsen TS. Systematic dissection and optimization of inducible enhancers in human cells using a massively parallel reporter assay. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(3): 271–277. [DOI]
- [82] Patwardhan RP, Hiatt JB, Witten DM, Kim MJ, Smith RP, May D, Lee C, Andrie JM, Lee SI, Cooper GM, Ahituv N, Pennacchio LA, Shendure J. Massively parallel functional dissection of mammalian enhancers *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(3): 265–270. [DOI]
- [83] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861–872. [DOI]
- [84] Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 678–684. [DOI]
- [85] Prescott SL, Srinivasan R, Marchetto MC, Grishina I, Narvaiza I, Selleri L, Gage FH, Swigut T, Wysocka J. Enhancer divergence and *cis*-regulatory evolution in the human and chimp neural crest. *Cell*, 2015, 163(1): 68–83. [DOI]
- [86] Franchini LF, Pollard KS. Can a few non-coding mutations make a human brain? *Bioessays*, 2015, 37(10): 1054–1061. [DOI]
- [87] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [DOI]
- [88] Wang S, Xu ZH. Progress in the study of molecular mechanisms of developmental cortex malformations. *Chin J Cell Biol*, 2011, 33(8): 837–846.
- 王硕, 许执恒. 大脑皮层发育畸形及分子遗传机理研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(8): 837–846. [DOI]