

多胺在 DNA 生物合成中的作用

缪金明 潘瑞彭

(上海第二医科大学仁济医院)

提 要

多胺存在于每个细胞之中,由细胞自身合成,并受控于细胞内外的许多因素。近十年来发现多胺在 DNA 生物合成中具有重要的调控作用,引起了人们的关注。本文主要评述多胺对 DNA 生物合成过程的影响,以及多胺对 DNA 聚合酶、DNA 促旋酶、拓扑异构酶、DNA 连接酶和胸腺嘧啶核苷激酶的作用机制。

多胺 (Polyamine) 是指腐胺 (Putrescine, Pu, 1, 4-丁二胺)、精脒 (Spermidine, Spd, 亚精胺, 1, 4, 7-庚三胺) 和精胺 (Spermine, Spm, 精素, 1, 3, 7, 10-癸四胺) 等物质。近年来对多胺生物学功能的研究发展较快,尤其是在与细胞增殖、分化和分裂过程密切相关的 DNA、RNA 和蛋白质的生物代谢等过程中的调控作用倍受人们青睐。细胞内游离多胺带有高密度的阳性电荷,可以与带负电荷基团的物质如核酸、磷脂等相互作用,调节其生物学活性。特别是 DNA, 负电荷密度高,除与等量组蛋白结合外,尚可与多胺结合形成复合物,改变其构象及功能状态,同时对 DNA 生物合成有关的酶的活性亦具有调控作用,本文就这方面作一综述。

调 节 效 应

一、多胺对 DNA 链延伸的影响

七十年代初, Morris 发现一种多胺营养缺陷型的大肠杆菌突变体,其细胞内的 DNA 浓度为正常生长的大肠杆菌的两倍^[1], 由于在胸腺嘧啶限制的 DNA 复制及在 rep 位点突变的菌体中亦伴有 DNA 浓度的增加,因此推测多胺缺乏时 DNA 浓度的增加是由于复制叉移动速率减慢所致, 5 年后的实验结果证实了这

种假设^[2]。应用多胺合成抑制剂如二氟甲基鸟氨酸 (α -Difluoromethylornithine, DFMO) 或腐胺拮抗剂丙二胺处理实验细胞 (如中国仓鼠卵巢细胞、致分裂原激活的淋巴细胞), 可不影响进入 S 期的细胞数量, 但 S 期延长, 加入腐胺便可逆转这种抑制效应^[2,3]。S 期的延长提示 DNA 链的延伸受到影响。由于 DNA 复制率和细胞生长速率是通过改变复制叉起始频度而非移动速率来进行调节的, 故多胺缺乏时复制叉移动速率的减慢提示多胺可能作为一种辅助因子直接参与 DNA 的合成反应。

二、多胺对 DNA 生物合成起始的影响

在一些分离的真核细胞 DNA 合成体系中, 多胺缺乏时只有已开始的复制子的延伸, 而很少有新的复制子的起始^[4]。多胺合成抑制剂丙脒脒 (MGBG) 除可以减慢 DNA 链延伸外, 尚可减少活性复制子的数目^[5], 由于 DNA 合成起始的抑制, 正常细胞在 G₁ 早期积聚, 转化型 (Transformed) 细胞在 S 期亦见有积聚^[6], 其阻滞在 S 期的细胞, 成熟前凝缩染色体 (Prematurely condensed chromosomes) 的 DNA 活性复制位点显著减少, 亦未出现典型的新合成的 DNA 碎片的迹象^[6]。这些提示了多胺对 DNA 链合成起始的控制作用。

调节机制

一、多胺对 DNA 聚合酶的影响

哺乳动物病毒逆转录 DNA 聚合酶在细胞内合成双股前病毒 DNA 时,有一种细胞因子参与,并在细胞周期的不同阶段内,其浓度可出现明显的波动,因此认为刺激 DNA 合成的物质可能是有机阳离子多胺^[7]。用泥鳅 α -DNA 聚合酶、牛胸腺 α -、 β -DNA 聚合酶研究发现,多胺可显著增加酶活性,其刺激效应依次为腐胺、精脒、精胺^[8],而高浓度多胺则又强烈抑制该酶促反应。多胺对 DNA 聚合酶的激活效应可受到模板的特性、二价阳离子及盐浓度的影响^[8,9]。精脒、精胺可使 Rauscher 白血病病毒 (RLV) DNA 聚合酶活性增加 10 倍以上,对大肠杆菌 I、II、III 型聚合酶及鸟类 C 型、哺乳类 B 型、D 型逆转录酶均有刺激作用,而腐胺、尸胺则无这种效应^[10,11]。

对多胺刺激 DNA 生物合成的动力学研究发现,其机制至少有以下几种:

1. DNA 聚合酶与 DNA 结合形成复合物后,多胺再与酶-DNA 复合物相互作用,激活 DNA 聚合酶。在多胺缺乏时, DNA 聚合酶可紧密地与双股 DNA 结合,然而这种结合并不能复制 DNA,低浓度的精胺 (0.1 mmol/L) 可显著减低酶与双股 DNA 的亲合力,0.5 mmol/L 精胺时酶与双股 DNA 的亲合力几近消失,但并不影响与激活的单股 DNA 的亲合力,结果“非复制性结合”减少,“复制性结合”增加,反应速度亦增大。当多胺浓度进一步增高时,反应速度又趋于降低,这可能是 DNA 聚合酶与单股 DNA 模板的亲合力进一步降低所致^[8,9,11]。

2. 精胺直接与激活的 DNA 模板相互作用。精胺和精脒与 DNA 具有很强的亲合力,即使用电泳的方法亦难以分离,当精胺与 DNA 模板预温育后,透析去除游离精胺,再加入 DNA 聚合酶,这时 DNA 合成就明显增加,而未与精胺温育者则无 DNA 合成。这是由于精胺与 DNA 模板结合后,选择性地限制了“死端”(Dead-end) 酶-DNA 复合物的形成,或

者使“非复制性结合”转变为具有起动合成的活性位点,促进了 DNA 的合成^[8,9]。

3. 多胺使 DNA 聚合酶-DNA 复合物去稳定。多胺可明显减低 DNA 聚合酶的静态亲和力 (Static affinity) 与动力学亲和力 (Kinetic affinity) 的比率,提示在 DNA 链合成终止时,多胺可促使 DNA 聚合酶从 DNA 模板上解离下来。此外多胺尚可减低 DNA 合成对 DNA 合成终止物 3'-NH₂-dTTP 和减慢 DNA 链延伸之物质 ara CTP 的敏感性。这些均利于增加聚合酶的催化效率^[8]。

4. 多胺刺激 DNA 聚合酶蛋白的合成。多胺耗竭后, DNA 合成明显受抑,补充多胺可部分恢复 S 期的 DNA 合成,若要完全恢复,则必须在 DNA 合成开始前至少 10 小时补充多胺^[12],实验还发现,多胺耗竭可使 DNA 合成前的细胞内总蛋白合成及核糖体形成明显减少^[13],提示 DNA 生物合成所需的蛋白质因子合成受到抑制。因而推测在 S 期补充多胺,由于 DNA 聚合酶蛋白量的不足,只能部分恢复 DNA 合成。在 DNA 合成起始之前补充多胺才能纠正 DNA 合成所需蛋白质因子的不足^[12,14]。

二、多胺对 DNA 促旋酶的影响

1. 原核细胞

多胺营养缺陷型大肠杆菌突变体,其生长速率减慢了约一半^[1,2],这是 DNA 复制叉移动速率减慢 50% 所致^[2]。复制叉移动减慢被认为与 DNA 促旋酶 (DNA gyrase) 和解旋酶 (Unwinding protein) 受抑有关^[15]。DNA 促旋酶是通过切断 DNA 双股中的一股,使 DNA 双螺旋体旋转,以减少复制叉前面所遇到的扭转张力,同时亦可使超螺旋 DNA 结构变为闭环状 DNA 结构,利于 DNA 复制。依赖于 ATP 的 DNA 促旋酶对精脒有强烈的依赖性^[16],当精脒浓度减低时,该酶活性便受到抑制。新生霉素 (Novobiocin) 是一种 DNA 促旋酶抑制剂,处理大肠杆菌时,可得到非常类似于多胺耗竭后所出现的结果。

2. 真核细胞

在哺乳细胞中, DNA 拓扑异构酶 II (Topoisomerase II, TOPO II) 介导正常的 DNA 合成与 DNA 重组等功能, 可以与 DNA 结合成复合物, 剪切 DNA 的单股或双股, 在功能上与 DNA 促旋酶很相似。TOPO II 的催化活性亦需要 ATP, 并可被 Mg^{2+} 所加强。一般认为在 DNA 凝缩或松解时, TOPO II 介导单股剪切, 让其另一股从切口通过 (Strand-passing), 而这种作用似乎直接受控于多阳离子物质^[15], 因此相对高的多胺浓度如精胺可以使 DNA 凝缩, 并为 TOPO II 执行连接与 DNA 股间链锁功能创造条件, 而在多胺浓度较低时, TOPO II 所介导的解除 DNA 股间链锁功能则更为便利^[15]。其机制与 DNA 构象变化和 TOPO II 酶活性改变有关。

一些 DNA 嵌入剂可使 TOPO II 以共价键的形式结合于 DNA 上, 加强了 TOPO II 对 DNA 链的断裂^[17], 多胺耗竭后可增加 DNA 嵌入剂的细胞毒性。这是由于多胺耗竭后 DNA 构象发生变化、或是 TOPO II 与 DNA 亲和力增加、或结合位点增多所致。

三、多胺对胸腺嘧啶核苷激酶的影响

3H -TdR 参入试验证明多胺合成抑制剂可减少 3H -TdR 参入 DNA, 同时细胞内 dTTP 水平减低, 提示多胺水平的降低可影响胸腺嘧啶核苷激酶的活性。实验证明, 多胺合成抑制剂处理淋巴细胞抽提物后, 该酶活性明显降低^[12,13,18]。由于该酶是 dTTP 合成的限速酶, 其活性降低便会影响 dTTP 水平及 DNA 合成, 同时该酶亦参与 TdR 向细胞内的转运。该酶的抑制程度依赖于多胺合成抑制剂的浓度和处理的时间过程。此外还发现, 多胺耗竭后对胸腺嘧啶核苷酸合成酶亦有抑制作用。而外源性腐胺可防止上述两酶活性的降低及 dTTP 水平的降低, 从而逆转 DNA 合成的抑制。

然而有些研究则认为, 多胺合成抑制剂对 3H -TdR 参入 DNA 的抑制是由于多胺缺乏直接引起的 DNA 合成率减低所致, 而非细胞内 dTTP 水平变化所致^[18], 因为在 Amethopterin 阻滞 dTMP 合成的条件下, DNA 合成依赖

于外源性的 TdR, 多胺耗竭后亦同样可以减少 3H -TdR 的参入^[18]。丙脒脲在体外对胸腺嘧啶核苷激酶的活性亦无明显的直接影响, 证实了上述观点。

四、多胺对 DNA 连接酶的影响

用嗜热性 HB 8 DNA 连接酶 (Ligase) 研究发现, 各种多胺及其类似物对 DNA 连接酶作用于 DNA 平齐末端具有激活作用^[19], 使之形成线性的 DNA 产物, 其刺激效应随多胺碳链的延长而减低。在低于 0.4 mmol/L 的多胺时不能激活 DNA 粘性末端的连接, 但高于 0.4 mmol/L 时则又产生抑制效应。精胺和精胺亦有激活 T4 DNA 连接酶的作用^[20]。这些提示多胺对 DNA 连接酶的调控作用。

DNA 生物合成的调控是当今分子生物学领域的热门课题。人们自从发现多胺具有调节 DNA 合成的作用以来, 已从多角度探索了多胺的调控机制, 虽然有一些尚待进一步完善, 但初步结果已显示了多胺具有人为调控 DNA 生物合成的开发潜力。

参 考 文 献

- [1] Morris, D. R. et al.: *J. Bacteriol.*, 1973, **113**, 271.
- [2] Geiger, L. E. et al.: *Nature*, 1978, **272**, 730.
- [3] Sunkara, P. S. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, **74**, 1125.
- [4] Hallick, L. M. et al.: *Biochemistry*, 1974, **13**, 3152.
- [5] Krokan, H. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 1977, **72**, 501.
- [6] Sunkara, P. S. et al.: *J. Cell Physiol.*, 1979, **98**, 451.
- [7] Grillo, M. A.: *Int. J. Biochem.*, 1985, **17**(9), 943.
- [8] Mikhailov, V. S. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, **783**, 6.
- [9] Yoshida, S. et al.: *J. Biochem.*, 1976, **79**, 895.
- [10] Marcus, S. L. et al.: *Cancer Res.*, 1985, **45**, 112.
- [11] Osland, A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, **520**, 317.
- [12] Gallo, C. J. et al.: *Biochem. J.*, 1986, **238**, 37.
- [13] Holttä, E. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 1985, **152**, 229.
- [14] Assaraf, Y. G. et al.: *Biochem. J.*, 1987, **242**, 221.
- [15] Gellert, M.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1981, **50**, 879.
- [16] Gellert, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, **72**, 3872.
- [17] Dorr, R. T. et al.: *Cancer Res.*, 1986, **46**, 3891.
- [18] Seyfried, C. E. et al.: *Cancer Res.*, 1979, **39**, 486.
- [19] Takahashi, M. et al.: *J. Biochem.*, 1986, **100**, 123.
- [20] Poso, H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, **117**, 217.

[本文于1988年5月3日收到]