

O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶研究进展*

章 扬 培

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

韩 文 智

(中国农业科学院品种资源研究所)

提 要

O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶是细胞中一种重要的 DNA 损伤修复酶,它在抵御烷化剂所致的细胞突变和死亡中扮演重要的角色。本文综述近年来关于这个酶的研究进展,内容包括酶及其基因,酶与细胞突变,酶与肿瘤化疗的关系。

关键词 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶, DNA 烷化损伤与修复, ada 基因, 细胞突变, 肿瘤化疗

O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (O⁶-methyl guanine-DNA methyltransferase, 简写 O⁶-MT) 是细胞中一种修复 DNA 损伤的酶,它在抵御烷化剂所致细胞突变和死亡中扮演重要的角色。烷化剂(如 CNU、MNU、MNNG 等)可以攻击细胞 DNA 分子中的许多部位,除了与脱氧核糖形成糖苷键的 N 原子和环外氨基上的 N 原子外,几乎碱基上所有的 N, O 原子都是烷化剂攻击的目标, DNA 双螺旋骨架磷酸酯键上的 O 原子也常常出现烷化损伤,烷化损伤产物多达 12 种。在碱基的各种烷化损伤中,以 O⁶-甲基鸟嘌呤 (O⁶-MeG) 对细胞威胁最大, O⁶-MeG 可以与 T 共价结合,造成 G · C → A · T 碱基配对的转换,进而引起突变和死亡。O⁶-MT 可以把 O⁶-MeG, O⁶-MeT (O⁶-甲基腺嘌呤), O⁶-EtG (O⁶-乙基鸟嘌呤), O⁶-丙基鸟嘌呤和甲基化磷酸酯键上的甲基,乙基等烷化基团转移到酶分子自己身上,酶被消耗, DNA 烷化损伤得到修复。所以也有文献称此酶为 O⁶-烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶 (O⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase)。酶的修复能力随烷化基团链长的增加而下降。对 O⁶-MT 的

研究引起了各国学者的重视,取得了重要的进展。

一、O⁶-MT 及其基因

在大肠杆菌中编码 O⁶-MT 的基因叫作 ada 基因,位于基因图 47' 位置处。1983 Sedgwick 将经 Sau3A 酶切后的 *E. coli* B DNA 与装配型质粒载体 PJB 8 连接,导入 ada 突变株中,从中克隆出 ada 基因^[1]。接着他又与 Teo 一起将重组质粒 PCS 68 用 Hind III 酶切后,经聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离出 ada 基因^[2]。揭开了从分子水平研究 O⁶-MT 的序幕。

1985 英国的 Demple^[3]和日本 Nakabeppu^[4]几乎同时完成了对 ada 基因的序列分析。他们测定出 ada 基因 1126 个核苷酸的排列顺序及其编码的 O⁶-MT 分子 355 个氨基酸的一级结构,发现大肠杆菌 O⁶-MT 的活性部位与大肠杆菌, T₄ 噬菌体, 干酪乳酸杆菌和酵母中胸苷酸合成酶的活性部位具有相似性,都出现-Pro-

* 国家自然科学基金资助项目。

Cys-His³²¹的序列。进一步研究揭示 O⁶-MT 分子中接受甲基的受体就是二个-Pro-Cys-His-肽段中的 Cys 上的 SH 基, Cys³²¹ 位于 O⁶-MT 肽链的 C 端,接受来自 O⁶-MeG 和 O⁴-MeT 上的甲基; Cys⁶⁹ 位于 N 端,接受甲基化磷酸酯键 (MePT) S 异构体的甲基。O⁶-MT 分子量约 39kD,可以裂解为 19kD 和 13kD 两部分。Cys³²¹ 位于 19kD 那部分, Cys⁶⁹ 则在 13kD 当中。用人工合成的 O⁶-MeG, O⁶-EtG, O⁶-IprG (O⁶-异丙基鸟嘌呤)和 O⁴-MeT 等寡核苷酸片段做为实验材料,证明 19kD 中的 O⁶-MT 修复 O⁶-MeG 的速度要比修复 O⁶-EtG, O⁴-MeT 的速度快 100—1000 倍^[5],但不修复 O⁶-IprG,说明 O⁶-MT 裂解后 19kD 那部分的主要功能是修复 O⁶-MeG 损伤。

Tano 运用寡核苷酸介导的点突变技术使 *E. coli* ada 基因产生突变,由此得到两种 ada 突变蛋白。在突变蛋白 I 中, Cys³²¹ 换成了 His³²¹; 突变蛋白 II 的 Cys³²¹ 与 His³²² 互换,成为 -His³²¹-Cys³²²-, 结果两种突变蛋白都丢失了从 O⁶-MeG 上转移甲基的功能,只保留了磷酸酯键-DNA 甲基转移酶的活性^[6]。Takano 做了类似实验,他把 *E. coli* O⁶-MT 中的 Cys³²¹ 换成 Ala³²¹, 突变蛋白只接受甲基磷酸酯键上的甲基,而不再接受 O⁶-MeG 或 O⁴-MeT 上的甲基。如果把 Cys⁶⁹ 换成 Ala⁶⁹, 则突变蛋白接受 O⁶-MeG, O⁴-MeT 上甲基的功能不变,但丢失了接受磷酸酯键上甲基的能力^[7]。这两个实验充分证明 Cys³²¹ 在修复 O⁶-MeG 或 O⁴-MeT, Cys⁶⁹ 在修复甲基化磷酸酯键损伤的各自作用。

Pegg 证明 O⁶-MT 对 DNA 中出现的 O⁶-MeG 有高效修复功能,但对 tRNA 中的 O⁶-MeG 修复能力很低^[8],说明 O⁶-MT 对修复 DNA 烷化损伤的专一性。

已知除了 O⁶-MT 外,有一些 DNA 糖苷酶也参予了 DNA 烷化损伤的修复。在大肠杆菌中编码这些修复酶的基因是排列在一起的,在 ada 基因的下游还有 alkB, alkA 和 aidB, tag 基因。alkA 与 tag 分别编码两种不同的

3-甲基腺嘌呤-DNA 糖苷酶,其中 alkA 的产物 3-甲基腺嘌呤-DNA 糖苷酶 II 可以修复 O²-MeC, O²-MeT 和 3-MeG 损伤。alkB 与 ada 相邻,受同一个操纵子的控制,它编码的 27kD 的蛋白可以抵抗烷化剂对细胞的致死损伤。aidB 基因的产物也可以提高细胞对烷化剂损伤的抗性。细胞受到烷化剂攻击后,内部会产生一种信号,它能诱导 ada 基因的转录与翻译,产生出新的 O⁶-MT,以补充细胞内因消耗掉而显得不足的 O⁶-MT。ada 基因的产物不仅可以调节其本身的表达,而且对邻近的 alkA, alkB 和 tag 基因的表达也有正调节作用^[9]。上边提到的 Takano 的实验^[7]还发现把含 Ala⁶⁹ 突变的 ada 基因导入 ada⁻ 细胞后,即便使用烷化剂诱导,ada 与 alkA 基因也不表达。反之把含 Ala³²¹ 突变的 ada 基因导入 ada⁻ 细胞后,不用烷化剂处理,ada 基因也能表达,说明了 Cys⁶⁹ 对基因表达的调节作用。

Sekiguchi 等从枯草杆菌中克隆出编码 O⁶-MT 的 ada 基因,并由其核苷酸顺序推测出 O⁶-MT 蛋白中 165 个氨基酸的排列顺序,发现大肠杆菌与枯草杆菌的 ada 基因和 O⁶-MT 蛋白在活性部位有着惊人的同源性^[9]。

分离哺乳动物细胞 O⁶-MT 基因的工作遇到不少困难,直到 1990 Tano 等从富含 O⁶-MT 的 HeLaS3 细胞中提取 poly(A)⁺RNA,用逆转录法得到双链 cDNA,然后接上 *EcoRI* 的接头,重组到 PUC9 质粒 DNA 上,构建了人 O⁶-MT 的 cDNA 文库,经导入此酶缺陷的 ada⁻ 大肠杆菌后,再利用质粒回收法,得到了编码修复人 O⁶-烷化鸟嘌呤的蛋白的 cDNA 克隆。进一步的序列测定实验揭示,此 cDNA 编码的酶的分子量约 22kD,酶的活性部位中从第 109 号氨基酸到 169 号氨基酸之间的多肽链中有 60—65% 的顺序与大肠杆菌 O⁶-MT 的第 285 至 345 肽链的排列顺序相似,而且都出现了 -pro-Cys-His-Arg-Val- 的排列^[10]。这使人推测人 O⁶-MT 中的 Cys¹⁴⁵ 与大肠杆菌中的 Cys³²¹ 一样,是 O⁶-烷化鸟嘌呤上烷化基团的受体。

Ishizaki 等把完整的 *E. coli ada* 基因^[11]和去除了编码 N 端 Cys⁶⁹ 而只保留编码 C 端 Cys³²¹ 的不完整的 *ada* 基因^[12], 用基因转移技术分别导入 O⁶-MT 缺陷的人 HeLaMR 细胞, 得到了 5-1 (完整 *ada* 导入) 和 5'dD (不完整 *ada* 导入) 两株转化细胞。5-1 和 5'dD 都比原来的 HeLaMR 增加了对烷化剂 MNNG 的抗性, 提高了细胞存活率和宿主细胞激活能力 (HCR), 降低了 S. C. E. 这充分说明编码含有 Cys³²¹ 的 19kD 那部分 O⁶-MT 的基因在修复人细胞 DNA 烷化损伤中的作用。Brennand 等把完整的和不完整的 *ada* 基因导入 V₇₉ 仓鼠细胞^[13], Kataoka 把突变的 *ada* 基因导入 CHO 细胞^[14], 都得出与 Ishizaki 相似的结论。Matsukuma 等把 *E. coli ada* 基因与中国仓鼠金属硫蛋白 I 基因启动子重组, 用显微注射法注入 C3H/HeN 小鼠受精卵, 在得到的转基因小鼠中出现外源 *ada* 基因表达的产物^[15]。转基因鼠中 O⁶-MT 活性比一般小鼠高出 3 倍。这种转基因鼠为比较哺乳动物和大肠杆菌中的 O⁶-MT 及其基因提供了理想的实验模型。

二、O⁶-MT 与细胞突变

细胞受烷化剂攻击后, DNA 中出现的 O⁶-MeG 常常是造成点突变的重要原因, O⁶-MT 在抵御烷化剂所致细胞突变中扮演着重要的角色。一般来说 O⁶-MT 活性高, 细胞抗突变能力强。

Bignami 等^[16]选用两株同基因的 CHO 细胞, 一株 O⁶-MT 高表达, 另一株 O⁶-MT 缺陷。受到 ENU 处理后, O⁶-MT 高表达和缺陷的二株 CHO 细胞中出现 ouabain (乌本箭苷) 抗性细胞的数目相同(注: 乌本箭苷抗性为钠钾 ATP 酶基因突变株), 但在 O⁶-MT 高表达株中诱发的 SCE 明显低于 O⁶-MT 缺陷株。如果用 MNU 处理, 则在 O⁶-MT 高表达株中出现的 Na-K-ATPase 基因突变的细胞数目大大低于 O⁶-MT 缺陷株中的突变细胞。说明 O⁶-MT 在抵御 MNU 类烷化剂所致鼠细胞突变中起重要作用。Fujio 和章扬培等比较了 O⁶-

MT 缺陷的人 HeLaMR 细胞和向其中导入完整 *ada* 基因的 5-1 转化细胞, 以及向其中导入不完整 *ada* 基因的 5'dD 转化细胞, 发现受 MNNG 处理后, O⁶-MT 缺陷的 HeLaMR 细胞中出现的 Na-K-ATPase 基因突变(ouabain 抗性)和 hprt 基因突变(6-TG 抗性)的细胞数明显高于 5-1 和 5'dD 细胞中基因突变的细胞数, 证明导入的外源 *ada* 基因在人细胞中表达产生的 O⁶-MT 在抵御烷化剂 MNNG 所致人细胞基因突变中也有重要的作用^[17]。Ishida 等从 O⁶-MT 缺陷的 HeLa 细胞中分离出一株对单功能烷化剂 MNNG 呈一定抗性的 MR 10-1 细胞, 但其中 O⁶-MT 仍为缺陷。然后再从 MR 10-1 中克隆出二株对双功能烷化剂 ACNU 也呈抗性的 ACr41 和 ACr42 细胞, 这二株细胞中 O⁶-MT 含量明显提高了。他们发现用 MNNG 处理后, MR10-1 细胞中出现的 Na-K-ATPase 基因突变和 hprt 基因突变的频率很高; 而在 ACr41 和 ACr42 中基因突变频率大大降低。这些细胞的根本差别在于 O⁶-MT 的活性不同。这个实验有力揭示 O⁶-MT 在抵御亚硝胺类烷化剂所致的细胞基因突变中有十分重要的作用^[18]。

三、O⁶-MT 与肿瘤化疗

日本 Ikenaga 发现取自 17 种不同动物的 26 株离体培养细胞株对 ACNU 的敏感性与细胞内 O⁶-MT 活性密切相关^[19]。Tsuji-mura 和章扬培等观察到 40 株日本人肿瘤细胞对 ACNU 的敏感性(D₁₀)与细胞中 O⁶-MT 活性之间有线性关系, 其中 6 株因缺乏 O⁶-MT, 而对 ACNU 非常敏感, 受 ACNU 处理后细胞存活率很低。12 株正常人细胞都表现出高的 O⁶-MT 活性和强的对 ACNU 的抗性^[20]。

有人曾把哺乳动物细胞分成两种类型, 第一种富含 O⁶-MT, 可以激活烷化损伤的腺病毒 (HCR 高), 对烷化剂有一定抗性, 存活率高, SCE 低, 定义为 Mer⁺ (或 Mex⁺); 第二类不含 O⁶-MT 或 O⁶-MT 活性低, HCR 低, SCE 高, 对烷化剂敏感, 称 Mer⁻ (或 Mex⁻)。

美国人和日本人肿瘤细胞中 Mer⁻ 分别占 20%^[21] 和 15%^[20]。章扬培等检测出中国人肿瘤细胞中 Mer⁻ 类约占 10% 左右^[22]。O⁶-MT 活性低与对 ACNU 敏感的相关性提示可能开拓出一条使用 ACNU 类药物对 Mer⁻ 肿瘤进行选择化疗的新途径, 这将提高肿瘤化疗的针对性和预见性, 对化疗有重要的指导意义。

Fujio 等选择三株 Mer⁺ 人肿瘤细胞, 包括宫颈癌 HeLaS3, 胃癌 HGC-27 和 MKN-28; 以及三株 Mer⁻ 细胞, 人宫颈癌 HeLaMR、人卵巢癌 A1336 和人甲状腺癌 Tco-1, 把它们植入裸鼠, 成瘤后腹腔注射 ACNU 治疗。三株 Mer⁻ 肿瘤移植瘤都在裸鼠体内消失, 而三株 Mer⁺ 肿瘤移植瘤愈长愈大^[23]。章扬培等把 HeLaS3(Mer⁺) 和 HeLaMR(Mer⁻) 细胞植入裸鼠体内, 经 25 μg/g ACNU 腹腔注射治疗 4 次, 或 50 μg/g ACNU 治疗 2 次, 可将 HeLaMR 肿瘤治愈, 而且一个月后未见复发。光镜和电镜检查证明 ACNU 对 O⁶-MT 活性低的 HeLaMR 有针对性很强的治疗效果^[24]。最近他们又进一步观察到使用日本 Sankyo 公司的嘧啶亚硝脒 ACNU 和天津新华药厂的双氯乙亚硝脒 BCNU, 对 Mer⁻ 型的 HeLaMR 和中国人宫颈癌 Cc801, 中国人脑恶性胶质瘤 SHG-44 细胞都有理想的治愈效果^[25]。这些结果说明 O⁶-MT 可以作为使用亚硝脒类药物对肿瘤化疗的一项预见性指标。如果检测到肿瘤组织中 O⁶-MT 活性低, 则使用 ACNU 或 BCNU 可以收到理想的治疗效果。关于 O⁶-MT 的测定方法, 中科院生物物理所曹恩华曾做过详细报道^[26]。

近一两年的研究结果证明, 人脑瘤和胃癌中 O⁶-MT 活性一般要比其它组织低得多^[27], 提示选择性化疗可以首先应用于这两类肿瘤。同时证明如果向大鼠体内静脉注射 O⁶-甲基鸟嘌呤 (O⁶-MeG)^[28], 或腹腔注射含 1.5×10^{-4} mmol/L O⁶-MeG 的甲基化 DNA^[29], 或 MNU (甲基亚硝脒)^[30], 都会使动物体内许多脏器中 O⁶-MT 活性在一定时间内显著下降。提示如

果以合适的浓度和时间, 把 ACNU (或 BCNU) 与 O⁶-MeG (或 MNU) 一起使用, 达到先消耗 O⁶-MT 酶活再杀伤肿瘤的目的。用这条途径去治疗那些 O⁶-MT 活性高的 Mer⁺ 肿瘤, 极有可能收到类似治疗 Mer⁻ 肿瘤的效果。这无疑将把肿瘤化疗提高到一个新的水平。

可以预见, 对 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶的深入研究, 会在研究 DNA 损伤与修复、细胞基因突变以及肿瘤化疗等许多方面有着重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Sedgwick B *et al.* *Mol Gen Genet.* 1983; 191: 466
- 2 Teo I *et al.* *EMBO J.* 1984; 3: 2151
- 3 Dimple B *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82: 2688
- 4 Nakabeppu Y *et al.* *J Biol Chem.* 1985; 260: 7281
- 5 Graves R J *et al.* *Carcinogenesis.* 1989; 10(4): 661
- 6 Tano K *et al.* *J Bacteriol.* 1989; 171(3): 1535
- 7 Takano K *et al.* *J Mol Biol.* 1988; 201(2): 261
- 8 Pegg A E *et al.* *Chem Biol Interact.* 1988; 65(3): 275
- 9 Sekiguchi M *et al.* *Gan To Kagaku Ryoho (日文)* 1989; 16: 466
- 10 Tano K *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 686
- 11 Ishizaki K *et al.* *Mutat Res.* 1986; 166: 135
- 12 Ishizaki K *et al.* *Mutat Res.* 1987; 184: 121
- 13 Brennand J *et al.* *Carcinogenesis.* 1986; 7: 2081
- 14 Kataoka H *et al.* *EMBO J.* 1986; 5: 3195
- 15 Matsukuma S *et al.* *Mutat Res.* 1989; 218: 197
- 16 Bignami M *et al.* *Carcinogenesis.* 1989; 10(7): 1329
- 17 Fujio C, Zhang Yangpei *et al.* *J. Radiat Res.* 1988; 29: 77
- 18 Ishida M *et al.* *Carcinogenesis.* 1988; 9(6): 1079
- 19 Ikenaga M *et al.* *Mutat Res.* 1987; 184: 161
- 20 Tsujimura T, Zhang Yang-pei *et al.* *Jpn J Cancer Res (Gann).* 1987; 78: 1207
- 21 Scudiero D A *et al.* *Cancer Res.* 1984; 44: 2467
- 22 贺涛, 章扬培. 中华肿瘤杂志, (付印中)
- 23 Fujio C *et al.* *Carcinogenesis.* 1989; 10(2): 351
- 24 章扬培等. 中国科学, 1990; 10: 1064
- 25 章扬培等. 中国药理学报, (付印中)
- 26 曹恩华等. 生物化学杂志, 1989; 5: 164
- 27 Kyrtopoulos S A *et al.* *Carcinogenesis.* 1990; 11(3): 431
- 28 Dexter E U *et al.* *Cancer Res.* 1989; 49(13): 3520
- 29 Likhachev A *et al.* *Carcinogenesis.* 1988; 9(7): 1139—1142
- 30 Fong L Y *et al.* *Carcinogenesis.* 1990; 11(3): 411—417

[本文于 1990 年 8 月 9 日收到, 9 月 12 日修回]