

- Pathol, 1992; 1 (2): 98
- 5 Bagasra O, Hauptman S, Lischner H *et al.* N Engl J Med, 1992; 326: 1385
- 6 Patterson B, Till M, Otto P *et al.* Science Wash, 1993; 260: 976
- 7 Long A, Komminoth P, Lee E *et al.* Histochemistry, 1993; 99: 151
- 8 Nuovo G, Lidonnici K, MacConnell P *et al.* Am J Surg Pathol, 1993; 17: 683
- 9 Nuovo G, MacConnell P, Forde A *et al.* Am J Pathol, 1991; 139: 847
- 10 Pestaner J, Bibbo M, Bobroski L *et al.* Acta Cytol, 1994; 38: 676
- 11 Heniford B, Shum-Siu A, Leonberger M *et al.* Nucleic Acids Research, 1993; 21: 3159
- 12 Troyer D, Goad D, Xie H. Cytogenet Cell Genet, 1994; 67: 199
- 13 Zhang X, Jiang H, Li L *et al.* Science in China (Series C), 1996; 39 (1): 45
- 14 Zhang X, Jiang H, Ma Q *et al.* J Wuhan Univ (Natural Science, English Edition), 1996; 1 (1): 119
- 15 Komminoth P, Aidan A, Long A *et al.* Diagn Mol Pathol, 1992; 1: 85

- 16 Tsongalis G, McPhail A, Lodge-Rigal R *et al.* Clin Chem, 1994; 40 (3): 381
- 17 Sallstrom J, Zehbe I, Aleml-M *et al.* Anticancer Res, 1993; 13: 1153
- 18 Embleton M, Gorochov G, Jones P *et al.* Nucleic Acids Research, 1992; 20: 3831
- 19 Correspondence: Questioning in situ PCR. Am J Pathol, 1994; 145 (3): 741

The Method and Applications of *in situ* PCR.
Ma Qi, Zhang Xiyuan, Xu Yaodian (School of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China).

Abstract *In situ* PCR is a novel technique in the field of molecular biology. It combined advantages of both PCR and *in situ* hybridization (ISH). Its origin, development and methodology are introduced. Its application and prospect are also described briefly.

Key words *in situ* PCR, *in situ* hybridization, PCR

真核生物 DNA 复制起始调控

奚亚丽 童坦君¹⁾

(北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 复制起始调控是真核生物复制调控机制的重要环节, 也是细胞生长调控的核心问题。对 SV40 病毒和酵母体系的研究为阐明真核生物的复制起始机制及其与细胞周期的关系提供了线索。目前, 与 DNA 复制起始有关的多种蛋白质因子 (如核蛋白 P₁, DNA 单链结合蛋白, DNA 聚合酶 α , 增殖细胞核抗原等) 的作用机理逐渐明朗, 周期依赖的调控特点得到了证实。文章着重介绍了 DNA 复制起始在细胞周期中的两个调控点及各种周期蛋白在该点的作用。文中还涉及复制起始异常与肿瘤发生的关系。

关键词 复制起始, SV40 细胞周期蛋白, 染色质状态

遗传物质的稳定性是细胞正常生长、分化的前提。真核生物经过长期进化, 建立起一套完善的 DNA 复制调控系统。这个调控系统保证了遗传结构的稳定性。它在 DNA 复制的起始、延长、终止各个阶段, 以及复制与细胞周

期的协调方面皆发挥重要作用。这一系统如受干扰, 便会出现染色质断裂, 丢失及重复复制等现象。

¹⁾通讯联系人。

收稿日期: 1995-11-10, 修回日期: 1996-04-08

复制起始调控在复制调控中占重要地位. 高等真核生物的复制起始是多位点的. 这种多位点起始对于真核生物十分必要. 原核生物 *E. coli* 等简单复制体系 DNA 含量约为 4×10^6 bp, 它的复制叉移动速度为 1700 bp/s. 在如此高的复制速度下, *E. coli* 虽然只有一个复制起始点却可在 20 min 内完成全部复制; 而高等真核生物内复制叉的移动速度很慢, 人体细胞仅为 100~150 bp/s, 面对庞大的染色体 DNA, 细胞通过增加复制起始的数目来提高 DNA 合成的速度. 哺乳动物细胞中约含 6×10^4 个复制单位. 其次, 复制起始点的利用度与种属、发育阶段、组织特异性有密切关系. 果蝇胚胎细胞 DNA 复制的完成需 4 min, 而成虫后的果蝇细胞需 400 min. 两种细胞中复制叉移动速度相同, 可能在胚胎细胞的复制起始点均被利用, 而随后的发育阶段只启用部分起始点. 再者, 复制起始点具有时、空特异性. 复制起始点在 S 期内的激活有先后之分, 与转录密切相关. 常染色质复制先于异染色质, 高转录活性区域先于低转录活性区域. 复制起始点在每一细胞周期只被激活一次. 这表明高等真核生物的 DNA 复制起始调控十分复杂, 需要深入研究.

目前, DNA 复制起始调控的研究热点集中在以下两方面: 即复制起始的分子机制, 复制起始与细胞周期的关系.

1 DNA 复制起始的分子机制

DNA 复制起始至少需以下三个步骤: a. 起始蛋白识别一个或一个以上的顺式作用元件. b. DNA 双链局部解旋. c. 选择适宜位点进行引物合成及开始聚合反应. 高等生物的复制起始机制不明, 但通过对 SV40 及酵母体系复制起始机制的分析和高等生物中已找到的复制因子的对应物, 为此提供了一定线索.

SV40 为研究真核生物 DNA 复制提供了十分有用的研究模型, 该模型体系除 T 抗原为病毒蛋白外, 其余均为细胞成分. SV40 的复制起始需要三种蛋白质: T 抗原, 单链 DNA

结合蛋白 (RP-A) 和 DNA 聚合酶 α -引物酶复合物 (pol α -primase). 其起始分几个步骤完成:

1.1 T 抗原与起始核心序列特异结合

这种结合需要 ATP 的存在, 它使起始序列中的早回文区局部解链及 A/T 区解链. 在 RP-A 存在及 ATP 水解条件下, T 抗原具有解旋酶活性使 DNA 出现更大范围解链. 起始效率与 DNA 构象变化成正相关^[1].

1.2 Pol α -primase 复合物的亚单位

Pol α -primase 复合物含四个亚单位: p180、p86、p58、p48. 其中 p180 具 DNA 聚合酶活性, p48 具引物酶活性. p86 的羧基端与 p180 相作用, 氨基端与 T 抗原相互作用, 而 p180 又通过 p58 与引物酶 p48 紧密相连. 复合物通过 T 抗原与起始区相连后由引物酶 p48 合成引物, 随后 p48 解离, 再由 p180 与引物末端结合起始 DNA 合成^[2]. T 抗原与 Pol α -primase 复合物的相互作用使复制蛋白优先定位于复制起始区开始引物合成 (图 1).

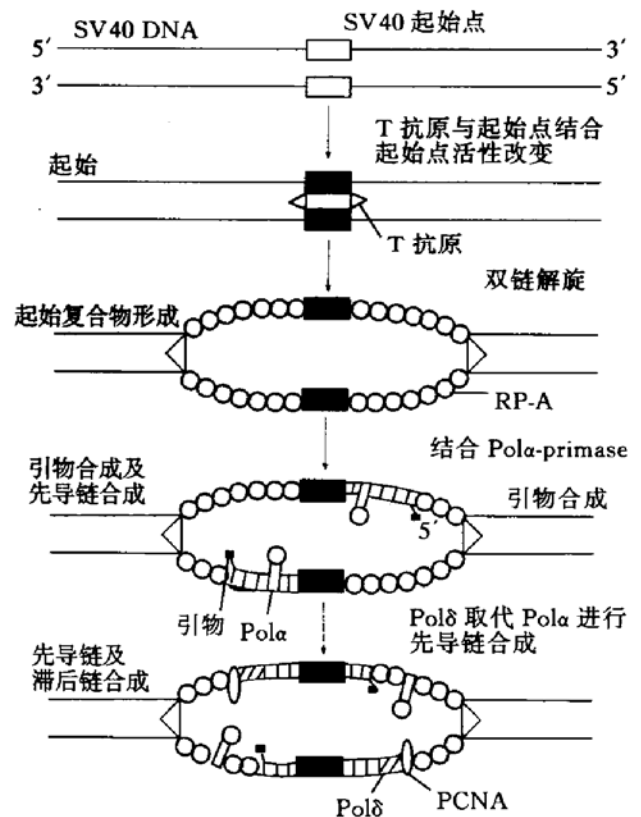


图 1 SV40 DNA 复制起始

□: SV40 复制起始点; ■: 引物; ■: 改变活性后的复制起始点; ○: Pol α ; <◇>: T 抗原; ▨: Pol δ ; ○: 复制蛋白 A (RP-A); ○: 增殖细胞核抗原.

RP-A 和 Pol α -primase 具有高度保守性。前者以周期依赖的方式接受磷酸化调节, 修饰后的 RP-A 一方面促进 DNA 聚合酶作用, 使解链与合成偶联, 另一方面起到“登记”(register)作用, 磷酸化的 RP-A 与 DNA 结合能力下降, 使起始效率降低, 从而避免 DNA 的重复复制^[3]。

酵母体系中, 复制起始点为自主复制序列(ARS)。ARS 包含核心(A区)和侧翼(B区)。A区主要由 11 bp 的 ARS 共有序列(ACS)——5' (A/T) TTTA (T/C) (A/G) TTT (A/T) 3' 组成, 为复制起始所必需。B区由 2~3 个部分重复的亚区(B1, B2 等)组成, 位于 A 区 3' 端, 不具遗传保守性。酵母体系中的起始识别复合物(ORC)已被分离。它以 ATP 依赖的方式特异识别 ACS 区和 B1 区并与之结合。这种结合使 B1 区产生扭转张力^[4]。类似 T 抗原结合时产生的张力, 这可能有利于 ARS1 形成开链复合物。酵母中微小染色体维持基因(minichromosome maintenance, MCM)产物 MCM 蛋白似具有解旋酶活性。MCM3、MCM2 及 CDC46/MCM5 等蛋白质有 75% 的同源区, 该区域内有类似于解旋酶和转录因子的 ATP 结合序列, 表明 MCM/CDC46 蛋白可能负责起始过程中的 DNA 解链。MCM2、MCM3 突变株的 ARS 活性下降, 暗示 MCM 对起始序列具有活化作用^[5]。在酵母的复制起始过程中还有转录因子(ABF-1 等)的参与, 转录因子可以促进复制起始复合物的活性, 这可能与产生 RNA 引物和改变染色体构象有关^[6]。

根据 SV40 及芽殖酵母体系的 DNA 复制起始的共同点可以建立起一个简单的模型: 起始蛋白特异结合到 DNA 复制起始点。这种结合造成染色质变构并产生张力, 在张力作用下, DNA 局部变性或弯曲以利于其他因子的进一步作用。在 RP-A 及解旋酶作用下, DNA 局部在较大范围内解链, 在各种聚合酶作用下开始先导链和滞后链的合成。

由于高等真核生物基因组的复杂性和蛋白

因子分离的困难, DNA 复制起始机制目前还缺乏直接证据。但已明确以下几点:

a. 已获得 MCM 的哺乳动物类似物核蛋白 P₁。P₁ 是 Pol α 的辅助蛋白, 在哺乳动物中高度保守。在细胞系内 P₁ 以超磷酸化和低磷酸化两种形式存在。低磷酸化形式与特定的核结构结合, 当 DNA 复制完成后, P₁ 通过细胞周期依赖的磷酸化转变为超磷酸化形式从而与核结构解离。常染色质区 P₁ 先消失, 然后在异染色质区消失, 这与 DNA 复制的时序相吻合^[7]。据推测, P₁ 与 RP-A 共同起复制的“登记”作用, 避免重复复制的发生。它可能还参与复制起始的其他环节, 发挥类似于 T 抗原或 MCM 的作用, 把起始识别、解链与 DNA 复制偶联起来。

b. RP-A 及 Pol α 等具有高度保守性, 已证明在高等真核生物中亦具类似作用。

c. 周期蛋白及其有关激酶在复制起始中的作用已得到一定阐明。

2 DNA 复制起始与细胞周期调控

DNA 复制起始在细胞周期中存在两个调控点。首先, M/G₁ 过渡时建立复制前染色质状态, 该步骤是复制起始所需的准备阶段。其次, G₁/S 过渡时参与复制起始的蛋白质因子接受周期依赖的调节, 直接引发 DNA 合成。

2.1 复制前染色质状态的建立

“染色质状态”这一概念是分析真核生物 DNA 复制的理论基础。最早由 Johnson 等^[8]在 1972 年提出。当 S 期细胞与 G₁、G₂ 期细胞融合后, 只有 G₁ 期细胞可以复制 DNA, 而 G₂ 期细胞不能起始复制。因而 G₁ 期细胞核为复制前状态, G₂ 期核为复制后状态。最近在芽殖酵母体系中用 DNA 酶 I 对基因组进行足迹分析, 表明染色体 DNA 确实存在这两种状态^[9]。状态转换分别发生在 M/G₁ 过渡(复制后→复制前)和 S 期(复制前→复制后)。复制后状态是由起始识别复合物 ORC, 转录因子 ABF-1 和自主复制序列 ARS 结合形成。此状态下, ORC、ABF-1 与复制起始点的相互作

用尚不足以起始 DNA 复制. 基因组足迹分析表明, 复制前状态基因组的蛋白质保护区明显大于复制后状态. 这意味着起始复合物接受某种调节或与其他因子结合, 使其与 DNA 的结合状态有所改变.

目前认为, 微小染色体维持基因家族 (MCM family) 与复制状态的建立有关^[10]. 在酵母体系中, M-S 期核内的 MCM5/CDC46 作用于复制起始点, 与 ORC、ARS 相互作用. 哺乳类细胞中, 在整个间期 MCM 基因产物都存在于核内, 但它的 G_1 期磷酸化水平与 G_2 期明显不同. MCM 突变株 ARS 活性降低, 复制难以起始.

另一与建立复制前状态有关的因子是 CDC6^[11]. CDC6 的表达在 M/ G_1 期达到高峰, 它在细胞周期的早期与 ORC 相互作用, 提高起始点活性. 酵母 CDC⁻ 温度敏感型突变株在限制性温度下出现质粒丢失, 说明其质粒复制存在缺陷, 这种缺陷可由增加复制起始点 (ARS 元件) 补救.

除反式因子的参与, 复制起始点周围染色质三级结构对于复制起始或复制起始抑制也发挥重要作用^[12].

真核生物中, 周期蛋白及其依赖的激酶 (CDK) 对复制前状态的建立也有调节作用^[13]. CDKs 可防止重复复制, 协调复制和细胞周期. a. 防止复制蛋白在 G_2 期与复制起始点结合. Adachi 等用非洲爪蟾卵细胞提取物证明 CDKs 可抑制复制前染色质状态的建立. b. CDK 活性增高使细胞进入 S 期. S 期 CDK 高浓度将抑制蛋白因子在起始点的继续组装. 这样, 当在 M/ G_1 期组装于起始点的起始复合物经复制被破坏后, 细胞在 S、 G_2 期不能重新组装起始复合物. 因而从 M 期到 G_1 期限制点这段时期内, 由于原有周期蛋白降解, 新的周期蛋白还未合成, CDKs 活性较低有利于复制前状态的建立和维持. 此外, CDKs 还在 S 期与 M 期偶联过程中发挥作用^[14].

2.2 DNA 复制起始的引发

酵母体系 DNA 复制起始有赖于细胞通过

周期限制点 (START, 又称起始点). 在生长因子等刺激下, G_1 期周期蛋白 1、2 和 3 活跃表达, 它们的积累使细胞得以通过起始点. 起始点与 S 期间有两点联系: a. B 型周期蛋白 5 和 6 依赖起始点的表达. 它们可与周期蛋白依赖的激酶 CDC28, CDK 抑制因子 P40 形成复合物. b. 该复合物被依赖起始点的 P40 降解激活. CDC28 可使 RP-A、CDC7 等磷酸化. CDC7 活化后在晚 G_1 期磷酸化调节 ORC、MCM 或其他蛋白质, 激活 DNA 复制^[5].

高等真核生物 DNA 复制起始的引发更为复杂. 哺乳动物细胞内不止一种 CDC (CDK) 和周期蛋白参与这一过程^[15]. 由图 2 可见哺

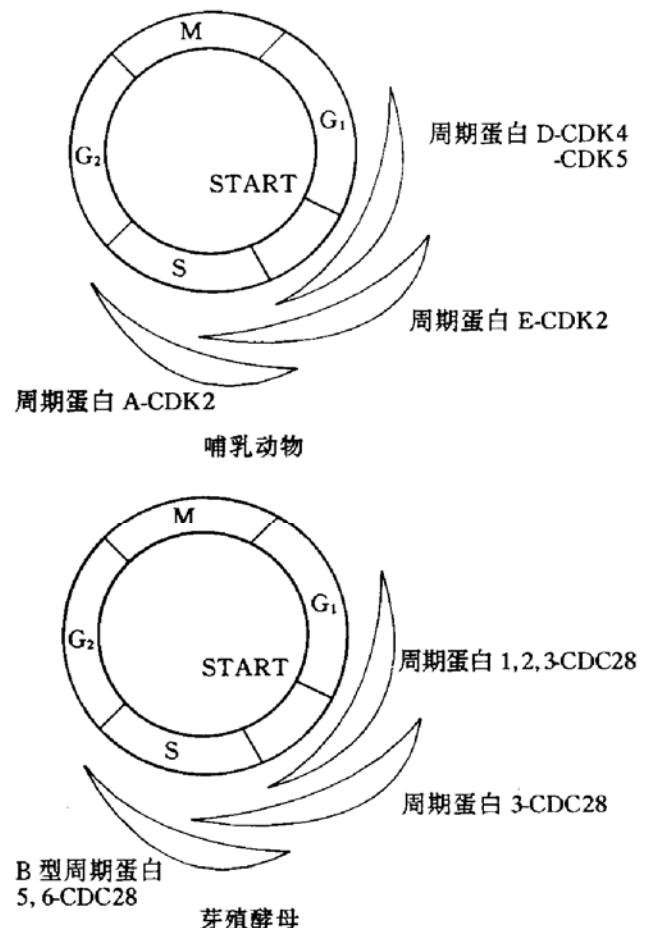


图 2 哺乳动物和芽殖酵母中周期蛋白-CDK 复合物比较

乳类细胞周期蛋白-CDK 复合物复制起始活化作用与酵母细胞的异同. 实验表明人周期蛋白 D、E 和 A (cyclin D, E, A) 可以完成 cyclin⁻, CDC28⁻ 芽殖酵母突变株细胞 DNA

复制起始功能, 这表明与复制起始有关的周期蛋白-CDK 复合物的关键底物在进化上十分保守, 这些底物包括转录因子和 DNA 复制起始因子等。

周期蛋白与复制调控的关系很密切。

G_0 期哺乳类细胞受生长因子刺激后, 周期蛋白 D 出现早于周期蛋白 E。周期蛋白 D 和它的 mRNA 不稳定。去除生长因子后, 周期蛋白 D 水平迅速下降。周期蛋白 D 可与 CDK4、CDK5、CDK2 结合, 在细胞周期内发挥双向调节作用: a. 刺激 G_1 期进行。b. 确保 DNA 不提前复制。周期蛋白 D 可结合并使 CDK2, 增殖细胞核抗原 (PCNA) 保持非活性形式, 其降解可活化这些蛋白质^[16]。

周期蛋白 E 的水平在 G_1/S 过渡期最高。周期蛋白 E 可以结合并磷酸化修饰 CDK2, 作用于复制起始因子, 诱导细胞进入 S 期。人周期蛋白 E-CDK2 可使视网膜母细胞瘤敏感蛋白 (retinoblastoma susceptibility protein, P_{105} -Rb) 磷酸化。 P_{105} -Rb 的磷酸化被认为是 G_1 向 S 过渡的关键步骤。

周期蛋白 A 的合成开始于 G_1/S 过渡期并迅速进入胞核。对同步化细胞以胸腺嘧啶类似物脉冲标记其复制起始区域, 结果表明, 周期蛋白 A-CDK2 与 RP-A、 $Pol\alpha$ 、PCNA 也定位于该区域, 因而 DNA 复制和细胞周期调节之间可能存在直接联系。微量注射周期蛋白 A 的反义 cDNA 或亲和纯化抗体可抑制 G_1 期细胞进入 S 期。周期蛋白 A-CDK2 可磷酸化调节核蛋白 P_1 , RP-A, 组蛋白, $Pol\alpha$ 等多种参与 DNA 复制起始的因子^[17]。

在早期肝细胞癌中, 肝炎病毒可与周期蛋白 A 基因整合^[18]; 此外, 腺病毒 E_1A 蛋白与 p60/周期蛋白 A 结合后可与 P_{105} -Rb 蛋白结合, 使之保持失活状态^[19]; G_1 期周期蛋白突变可能有致癌作用; 周期蛋白 D_1 基因被认为是一种癌基因^[20]。在很多肿瘤细胞系均有 D_1 基因的扩增及表达, 但 D_1 蛋白质水平却很低。

对真核特别是哺乳类的周期调控的研究虽然尚待深入, 但从已知材料看, 它在医学、生

物学中的重要性是无可怀疑的。

参 考 文 献

- 1 Borowiec J A, Hurwitz J. EMBO J, 1988; 7: 3149
- 2 Foinai M, Marini F, Gamba D. Mol Cell Biol, 1994; 14: 923
- 3 Fotadar R, Roberts J M. EMBO J, 1992; 11: 2177
- 4 Diffley J D X, Cooker J H. Nature, 1992; 357: 923
- 5 Toyn J H, Toone W M, Morgan B A *et al.* TIBS, 1995; 20: 70
- 6 Chen Y, Hennessy K M, Botstein D *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 10459
- 7 Kimura H, Nozaki N, Sugimoto K. EMBO J, 1994; 13: 4311
- 8 Johnson R T, Rao P N. Nature, 1970; 226: 717
- 9 Diffley J D X, Cooker J H, Dowell S J *et al.* Cell, 1994; 78: 303
- 10 Wang T A, Li J J. Currien Opi Cell Biol, 1995; 81: 825
- 11 Li J J, Herskowitz I. Science, 1993; 262: 1870
- 12 张晓伟, 童坦君. 国外医学分子生物学分册, 1995; 17: 251
- 13 Su T, Follette P J, O'Farrell P H. Cell, 1995; 81: 825
- 14 Enoch T, Nurse P. Cell, 1991; 65: 921
- 15 Lodish H. Molecular Cell Biology, 3rd. New York: Scientific American Books, Inc, 1995: 365~402
- 16 Matsuoka S, Yamaguchi M, Matsukage A. J Biol Chem, 1994; 269: 11030
- 17 Wolffe A P. Regulation of chromatin structure and function, 1st. Austin: R. G. Landes Company, 1994: 62~67
- 18 Decaprio J A, Ludlow J W, Lynch D *et al.* Cell, 1988; 58: 1085
- 19 Nasmyth K A. Cell, 1990; 63: 1117
- 20 Cardoso M G, Leonhardt H, Nadal G B. Cell, 1993; 74: 979

Regulation of DNA Replication Initiation in Eukaryotes. Dou Yali, Tong Tanjun (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract One of the most important mechanisms to regulate DNA replication in eukaryotic cells is to regulate the initiation of the replication. Investigations into SV40 (simian 40) and *Saccharomyces cerevisiae* systems provide

instructive suggestions to the mechanisms of replication initiation in eukaryotic systems and maneuvers with which the initiation are concerted with cell cycle. Many functions of protein factors involved in initiation of replication in eukaryotic cells are being clarified. And the cycle-dependent regulatory pattern is gaining experimental supports. Two regulation points in

cell cycle for DNA replication initiation and the roles played by cyclins are mainly introduced. The relationship between carcinogenesis and the disturbance of replication-cycle is also discussed at appropriate point, which hints at the significance of initiation regulation.

Key words replication initiation, SV40, cyclin, chromatin state

流式细胞术在细胞凋亡检测中的应用

张群洲 周克元 凌光鑫

(广东医学院医用生化研究所, 湛江 524023)

摘要 凋亡是细胞受一些生理或病理信号刺激时所发生的一种程序性死亡过程。近年来, 有关肿瘤细胞凋亡的研究已成为一个新的研究热点。围绕凋亡细胞出现的典型的形态变化及生化改变, 建立了一些检测分析凋亡细胞的方法。文章着重概述了流式细胞术 (FCM) 在细胞凋亡研究中的应用, 尤其是 NT 法、TdT 法及 SBIP 法等新方法的价值。

关键词 细胞凋亡, 流式细胞术, 末端脱氧核苷酰转移酶法, 缺口平移法

多细胞生物的细胞死亡有两种不同的方式: 凋亡 (apoptosis) 和坏死 (necrosis)。细胞凋亡不同于坏死, 是细胞在受一定生理或病理信号刺激后主动参与并遵循一定程序的细胞自杀机制。近年来的研究发现, 细胞这种主动死亡过程是受基因调控的, 其中与细胞凋亡关系密切的基因主要有 bcl-2 基因, P₅₃ 基因, c-myc 基因^[1]。既然细胞凋亡是由基因控制的一种程序性细胞死亡过程, 它与细胞坏死在形态及生化改变方面都存在显著差别。主要表现在: a. 在凋亡的早期阶段有染色质浓缩及片段化现象, 同时伴有明显的细胞体积减小, 内质网松弛及细胞器聚集等。b. 尔后, 凋亡细胞内形成由完整胞浆膜包绕的致密小体, 即所谓的凋亡小体, 该结构中含有一些细胞器及片段化的染色质。c. 胞浆膜结构依然完整, 与活细胞一样, 台盼蓝试验拒染。这些典型的形态改变是由一系列特殊的生化事件所致。其中

生化改变的核心是细胞内源性内切酶被激活, 引起寡核小体片段的形成^[2]。另外在多数凋亡细胞的早期生化事件中还包括细胞内 Ca²⁺、Na⁺、K⁺、H⁺ 浓度及线粒体跨膜电位的变化等^[3,4]。

针对凋亡细胞特殊的形态及生化改变特点已建立了许多检测分析凋亡细胞的方法^[5]。这些方法包括: a. 利用各种显微镜技术如光学显微镜、电子显微镜、相差显微镜、共焦显微镜等以观察凋亡细胞的典型形态变化^[6,7]。b. 检测凋亡细胞中 DNA 断裂或 DNA 片段的方法如琼脂糖凝胶电泳^[6]; 同位素标记法测定 DNA 次级片段^[8,9]; 碱洗脱法测定 DNA 单链断裂等^[8]。c. 测定凋亡发生中起重要作用的内源性内切酶活性的方法^[10]。d. 测定凋亡细胞的多聚 ADP 核糖化酶活性的方法^[6,11]。近年来随着流式细胞术 (flow cytometry,