

- Res Commun, 1994, **200** (1): 290~ 297
- 10 Bergelson S, Pinkus R, Daniel V. Intracellular glutathione levels regulate Fos/ Jun induction and activation of glutathione S-transferase gene expression. *Cancer Res*, 1994, **54**: 36~ 40
 - 11 Nguyen T, Rushmore T H, Pickett C B. Transcriptional regulation of a rat liver glutathione S-transferase Ya subunit gene. *J Biol Chem*, 1994, **269** (18): 13656~ 13662
 - 12 Osada S, Takano K, Nishihara T *et al.* CCAAT/enhancer-binding proteins α and β interact with the silencer element in the promoter of glutathione S-transferase P gene during hepatocarcinogenesis. *J Biol Chem*, 1996, **270** (52): 31288~ 31293
 - 13 Moffat G J, McLaren A W, Roland Wolf C. Sp1-mediated transcriptional activation of the human Pi class glutathione S-transferase promoter. *J Biol Chem*, 1996, **271** (2): 1054~ 1060
 - 14 Hales B F, Huang C. Regulation of the Yp subunit of glutathione S-transferase P in rat embryos and yolk sacs during organogenesis. *Biochem Pharmacol*, 1994, **47** (11): 2029 ~ 2037
 - 15 Christensen M J, Nelson B L, Wray C D. Regulation of glutathione S-transferase gene expression and activity by dietary selenium. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **202** (1): 271~ 277
 - 16 Khan M F, Srivastava S K, Singhal S S *et al.* Iron-induced lipid peroxidation in rat liver is accompanied by preferential induction of glutathione S-transferase 8-8 isozyme. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995, **131** (1): 63~ 72
 - 17 Fukuda A, Osawa T, Oda H *et al.* Oxidative stress response in iron-induced renal carcinogenesis: acute nephrotoxicity mediates the enhanced expression of glutathione S-transferase Yp isozyme. *Arch Biochem Biophys*, 1996, **329** (1): 39~ 46
 - 18 Pinkus R, Weiner L M, Daniel V. Role of quinone mediated generation of hydroxyl radicals in the induction of glutathione S-transferase gene expression. *Biochemistry*, 1995, **34** (1):

81~ 88

- 19 Stalker M J, Kocal T E, Quinn Bette Anne *et al.* Reduced expression of glutathione S-transferase Yb2 during progression of chemically induced hepatocellular carcinomas in fischer 344 rats. *Hepatology*, 1994, **20** (1 Pt1): 149~ 158
- 20 Matthey D L, Nixon N, Aldersea J E *et al.* Alpha, mu and Pi class glutathione S-transferases in human synovium and cultured synovial fibroblasts: effects of interleukin 1 α , hydrogen peroxide and inhibition of eicosanoid synthesis. *Free Rad Res Commun*, 1993, **19** (3): 159~ 171

Regulation of Glutathione S-Transferase Gene Expression. PANG Zhanjun, CHEN Yuan, ZHOU Mei (*Laboratory of Free Radical Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China*).

Abstract The proteins expressed by the glutathione S-transferase (GST) supergene family which catalyze the conjugation of endogenous or exogenous electrophiles with glutathione (GSH) are a family of detoxicating proteins, the gene expression of which is regulated by many sorts of compounds through different mechanisms. A brief review for the gene structure and regulation mechanisms associated with the expression of GSTs, and the action of oxidative stress in the regulation of GST gene expression was made.

Key words glutathione S-transferase (GST), gene expression, regulation, oxidative stress, reactive oxygen species

检测脱氨基速率的超灵敏方法及应用

陈 洪

(Department of Chemistry, Duke University, Durham, NC 27708, USA)

李雨民¹⁾

(中国医学科学院
放射医学研究所, 天津 300192)

摘要 脱氨基被认为是引起细胞突变的主要因素, 如果这些脱氨基的产物不被修复, 将引起转换 (transition) 突变. 为了理解DNA结构和其化学活性的关系, 介绍一种新的灵敏的遗传学方法, 它应

¹⁾ 通讯联系人. 收稿日期: 1996-07-15, 修回日期: 1996-11-15

用在 DNA 特定点的脱氨基速率的测定. 这种方法基于 M13mp2 噬菌体内的 lacZ α 基因中的 CCC 脯氨酸密码子的反转突变, 即每个脱氨基事件表现为在白色菌斑背景中的一个蓝色菌斑, 其灵敏度可达 10^5 M13mp2 DNA 分子中检验出一个脱氨基事件. 此外, 该法可以计算脱氨基动力学速率常数和反应活化能.

关键词 胞嘧啶, 脱氨基, DNA 突变

C $\rightarrow$ T 突变是最普遍的发生于动物组织中的碱基取代形式, 是引起人类疾病和癌症的原因之一^[1, 2]. 在 p53 抑癌基因中, 67% 的突变为 CG $\rightarrow$ TA 的转换突变^[3, 4]. C $\rightarrow$ T 突变最可能由两个原因引起: a. 鸟嘌呤 (G) 的损害和随后的错码, 即 DNA 聚合酶在被损害的 G 的互补链放进一个 T 而不是 C. b. 5-甲基胞嘧啶脱氨基给出胸腺嘧啶, 或胞嘧啶脱氨基给出尿嘧啶, 最终得到 CG $\rightarrow$ TA 突变. 紫外线 (UV) 和烷基化试剂可以引起高比例的 C $\rightarrow$ T 突变^[5, 6], 而 UV 又可以引起相邻双突变^[6, 7] (例如: CC $\rightarrow$ TT). 这些突变同样也可以借助化学诱导的胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶脱氨基而发生^[8~11]. 本文介绍一种敏感的遗传学方法, 可以使我们理解脱氨基突变的根源和动力学^[8~10, 12~16], 也可以精确地测量在稀溶液中发生的极慢反应的动力学 (例如脱氨基). 这个方法已经成功地应用于自发脱氨基动力学, 嵌插剂对脱氨基的影响, 化学诱导脱氨基动力学和化学诱导的相邻双突变等方面^[13~16].

1 原理及在自发脱氨基中的应用

胞嘧啶自发脱氨基是细胞中发生的内源性的突变过程^[1~3, 17]. 据估计在人类基因中 (10^9 碱基对) 每 14 分钟将有一个碱基自发脱氨基^[17]. 这个值仅仅是一种估计, 因为在生理条件下, 自发或水解脱氨基很慢, 而以前的分析方法^[17~20] 又缺乏足够的灵敏性来检验如此少量的脱氨基产物, 进而也就很难知道细胞中的体液、离子、自由基、烷基化试剂对 DNA 脱氨基的影响.

以前, 生理条件下的脱氨基动力学参数都是借助外推实验结果得到的, 即使用核苷酸或变性 DNA 在高温, 酸碱 pH 和高浓度化合物

(如亚硫酸钠) 情况下的试验结果外推到生理条件. 而本文介绍的方法可以让我们在生理条件下直接测定 DNA 中某个特定位置的胞嘧啶的活性及其脱氨基动力学^[12].

该法的基本原理是: M13mp2 噬菌体中克隆入一段 LacZ α 基因, 该基因含有一个突变的脯氨酸密码子 (即 $^{141}\text{GCC} \rightarrow ^{141}\text{CCC}$), 因此这种 DNA 简称为 C141 DNA. 这种 DNA 在转染 *E. coli* 宿主细胞后产生无色斑 (plaques). 当此密码子中前两个 C 被脱氨基后 (C $\rightarrow$ T) 则给出深蓝色菌斑. 因此每一个蓝色菌斑均代表一个脱氨基事件, 我们称它为反转突变 (即由突变型变成野生型). 将处理过的 DNA 转染 *E. coli ung*⁻ 细胞, 因这种细胞缺乏尿嘧啶糖基化酶, 所以不能除去脱氨基产物, 因此这种突变被保留下来, 并形成蓝色菌斑. 当 DNA 被转入 *E. coli ung*⁺ 细胞时, 因其含有尿嘧啶糖基化酶, 可以切除尿嘧啶并产生一种线性的没有生物活性单链 DNA, 形成无色菌斑. 蓝色菌斑在提纯后进行 DNA 序列分析, 以确证突变类型 (C $\rightarrow$ T, C $\rightarrow$ G, 或 CC $\rightarrow$ TT 等等). 处理 DNA 的反应条件可以人为地控制, 以使反应物浓度大大超过 DNA 浓度, 从而脱氨基可以认为是假一级反应, 并应用以下公式计算在该条件下的速率常数:

$$k = -\ln(1 - F')/t$$

其中 t 为反应时间, F' 为修正的突变速率. 它可以由某实验条件下的反转突变速率 (F) 减去本底反转突变速率 (F_0) 而得到. 所有的反转突变速率可以用某样品在转染后得到的蓝斑数除以总菌斑数而得到. 如果在不同温度下进行实验, 可以得到不同速率常数, 利用 Arrhenius 方程 $k = A e^{-E_a/RT}$, 可以得到脱氨基反应活化能 E_a , 因此该法是定量的.

该法十分灵敏, 它可以检验出在 10^5 DNA 分子中某一特定的脱氨基事件. 使用该法还可以检验烷化, 质子化, DNA 构象变化, DNA 与抗肿瘤剂以及小分子的反应等对胞嘧啶氨基的影响.

2 DNA 二级结构的影响

DNA 二级结构为双螺旋结构. 生理条件下, 单链和双链 M13mp2 C141 DNA 中的胞嘧啶自发脱氨基速率已经用该法直接测定^[12]. 单链 DNA 在 37℃, pH 7.4 脱氨基的半衰期为 200 a, 而双链 DNA 为 30 000 a, 它们相应的速率为 $1.0 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ (单链) 和 $7 \times 10^{-13} \text{ s}^{-1}$ (双链). 使用 Arrhenius 关系求出单链 DNA 脱氨基的活化能为 117 kJ/mol, 它与用化学法求出的活化能 121 kJ/mol 十分相似. 由以上数据看出扰动 DNA 双螺旋结构可使脱氨基速率增加, 这具有明显的生物学意义.

3 错配可以增加脱氨基速率

以构建含有 C: C 或 C: T 错配的缺口杂双链质粒的方法, 可确定位于这种反常配对中的胞嘧啶的横向交联突变的程度^[13]. 环状的 (+) 和线状的 (-) M13mp2 杂交, 然后这种错误配对的混合双链被转导入 ung^- 和 ung^+ 细胞. 实验结果显示在 C: C 或 C: T 中的胞嘧啶的脱氨基速率比正常 DNA 增加了 20~100 倍^[13]. 即错配中的胞嘧啶速率接近于单链 DNA 的胞嘧啶脱氨基速率. 在 37℃ 和 pH 7.4 条件下, T: C 或 C: C 错配具有 20% 到 100% 的单链特征. 这些研究显示了双链结构和碱基对在保持 DNA 遗传信息完整性上的重要性.

4 离子化是脱氨基的决定性因素

脱氨基突变可以借助胞嘧啶离子化的催化作用来实现, 我们知道离子化的碱基对可能有重要的动力学功能, 即增加修饰碱基以及它的横向交联的化学活性^[8~10]. 质子化的胞嘧啶在 37℃ 脱氨基大大加快, 其半衰期只是 17.5 d. 而在双链 DNA 中, 自发的非质子化

的核苷要慢 5×10^5 . 这些结果指出: 脱氨基很大程度上取决于胞嘧啶的质子化程度和 DNA 的二级结构. 因此, 能使 DNA 中胞嘧啶直接质子化的试剂都可以极大地增加脱氨基速率. 在细胞中可能有一些未知的因素或过程催化胞嘧啶离子化, 并最终引起癌和其他疾病.

5 溴乙锭防止 DNA 脱氨基

嵌插剂是一些大分子的芳香化合物, 它们可以插在两个碱基之间. 溴乙锭 (EB) 作为一种嵌插剂使 DNA 更稳定 (溶解温度上升 6℃ 左右), 然而 EB 阻止双链 DNA 脱氨基这一假设还必须加以检验. 双链 DNA 在不同温度和存在或不存在 EB 的情况下培养一段时间, 脱氨基事件可用该方法检验. 实验证明在 EB 存在的情况下, 脱氨基曲线往高温方向移动了 6℃. 因此在双链 DNA 中胞嘧啶脱氨基直接与双螺旋的稳定性有关, 并通过解链成单链 DNA 而实现, 这是因为在碱基对中的胞嘧啶的 N3 孤对电子参与了 G—C 氢键, 从而减少了 N3 被质子化的可能性. 而 N3 的质子化被认为是胞嘧啶脱氨基的第一步^[17].

6 棘霉素诱导双链 DNA 脱氨基

棘霉素 (echinomycin) 作为一种双嵌插剂可以连接 CpG, 它可以使双链 DNA 脱氨基速率提高 3 倍 (37℃ 和 pH 6.0)^[14]. Echinomycin 使脱氨基发生在 CpG 连接点的最近和最远的两侧^[14]. 另外, 在温度低于 20℃ 时, 该化合物使部分 DNA 形成有利于胞嘧啶质子化的 Hoogsteen 构象, 因此可以加速脱氨基反应^[8]. 把这种处理过的 DNA 转导入 ung^+ 细胞, 突变频率几可忽略, 指出尿嘧啶是 C→T 转换的中间产物^[14], 因此, echinomycin 导致的 DNA 结构变化可以增强胞嘧啶的活性.

7 亚硫酸氢钠引导的相邻双突变

亚硫酸氢钠在酸性 pH 下是一种突变剂^[20], 但是它引导的 DNA 突变的反应动力学常数从来没有在生理条件下测量过. 在高浓度

(1 mol/L) 和低 pH (< 5), 亚硫酸氢钠被用于 DNA 点突变的脱氨基试剂, 被认为对人体是无害的, 它广泛地用于药品、食物、酒类的防腐剂^[20]. 在 *E. coli* 中它引起的 GC → AT 仅略高于背景值, 然而在另外一些细菌、植物和动物组织中, 包括复制错误, 染色体反常, 转化以及其突变效应都被观察到, 这种方法也用于生理条件下亚硫酸氢钠脱氨基的研究^[20].

单链 DNA 用 10 mmol/L 亚硫酸氢钠脱氨基 (pH 7.4, 37℃) 处理, 然后转导入 *ung*⁻ 细胞, 突变频率随时间呈线性增长. 54 个突变样品测序结果全部为 C → T 突变. 当转导入 *ung*⁺ 细胞, 突变频率大幅度降低, 说明尿嘧啶为主要的突变反应中间物^[15]. 测量得出一级速率常数为 $3.4 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ (37℃, 10 mmol/L HSO_3^-), 高出背景值 3 倍, 且呈显出剂量依赖关系^[15].

双链 DNA 用亚硫酸氢钠处理, 其脱氨基速率比背景值高一个数量级. 序列分析的结果表示: 脱氨基导致了大量的相邻双突变. 而这种双突变的频率取决于 DNA 与亚硫酸氢钠处理时间的长短和亚硫酸氢钠的浓度, 浓度越高, 时间越长相邻双突变的比率越高.

相邻 CC → TT 双突变的频率如此之高, 不能用独立的脱氨基事件解释, 其化学机理虽然目前还不十分清楚, 但化学试剂能够引起相邻 CC → TT 双突变是无疑的. 相邻 CC → TT 双突变机理的研究有助于理解化学致癌的机理.

8 结 论

这种敏感的遗传学测脱氨基速率的方法具有十分广阔的应用前景, 该法可以把很多致病因素分离研究, 并可以把实验结果定量化, 因此可以定量地比较各种因素的致突变能力.

参 考 文 献

1 Halliday J A, Glickman B W. Mechanism of spontaneous mutation in DNA repair-proficient *Escherichia coli*. Mutation Research, 1991, **250**: 55~ 71
2 Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of

DNA. Nature, 1993, **362**: 709~ 715
3 Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B *et al.* p53 Mutations in human cancer. Science, 1991, **253**: 49~ 53
4 Coles C, Condie A, Chetty V *et al.* p53 Mutation in breast cancer. Cancer Research, 1992, **52**: 5291~ 5298
5 Drobetsky E A, Grosovsky A J, Glickman B W. The specificity of UV-induced mutations at an endogenous locus in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, **84**: 9103 ~ 9107
6 Horsfall M J, Zeilmaker M J, Mohn G R *et al.* Mutational specificities of environmental carcinogens in the *lacI* gene of *Escherichia coli*. II: A host-mediate approach to N-nitrosor N, N-dimethylamine and endogenous mutagenesis *in vivo*. Molecular Carcinogenesis, 1989, **2**: 107~ 115
7 Brash D E, Rudolph J A, Simon J A *et al.* A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, **88**: 10124 ~ 10128
8 Sowers L C, Shaw B R, Veigl M L *et al.* DNA base modification: Ionized base pairs and mutagenesis. Mutation Research, 1987, **177**: 201~ 218
9 Peng W, Shaw B R. Accelerated deamination of cytosine residues in UV-induced cyclobutane pyrimidine dimer leads to CC → TT Transitions. Biochemistry, 1996, **35**: 10172 ~ 10181
10 Williams L W, Shaw B R. Protonated base pairs explain the ambiguous pairing properties of Z06-methylguanine. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, **88**: 1779~ 1783
11 Tessman I, Kennedy M A. The two-step model of UV mutagenesis reassessed: deamination of cytosine in cyclobutane dimer as the likely source of the mutations associated with photoreactivation. Molecular General Genetics, 1991, **227**: 144~ 148
12 Frederico L A, Kunkel T A, Shaw B R. A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. Biochemistry, 1990, **29**: 2532~ 2537
13 Frederico Zuraw L, Kunkel T A, Shaw B R. Cytosine deamination in mismatched base pairs. Biochemistry, 1993, **32**: 6523~ 6530
14 Moyer R A, Stewart U, Briley J D *et al.* Echinomycin, a bis-intercalating agent, induces C → T mutations *via* cytosine deamination. Mutation Research, 1993, **288**: 291 ~ 300
15 Chen H, Shaw B R. Kinetics of bisulfite-induced cytosine deamination in single-stranded DNA. Biochemistry, 1993, **32**: 3535~ 3539
16 Chen H, Shaw B R. Bisulfite-induced tandem double CC → TT mutations in double-stranded DNA. 2. kinetics of cytosine deamination. Biochemistry, 1994, **33**: 4121~ 4129
17 Seeberg L, Kleppe K. Chromosome damage and repair. New York: Plenum Press, 1981, **40**: 3~ 18
18 Lindahl T, Nyberg B. Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. Biochemistry, 1974, **13**:

3405~ 3410

19 Lindahl T. DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision repair. *Pro Nuc Acid Res*, 1979, **22**: 139~ 192

20 Lawrence C W. Molecular mechanisms and their implications for environment protections. New York: Plenum Press, 1983. 34~ 60

A Sensitive Assay for the Detection of Cytosine Deamination Rate and Its Application. CHEN Hong (*Department of Chemistry, Duke University, Durham, NC 27708, USA*); LI Yumin (*Institute of Radiation Medicine, Chinese Acadmy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China*).

Abstract Deamination of bases is regarded as the major factor for mutation in DNA and it will induce transition mutation if the products of

deamination have not been repaired. Now a new sensitive genetic assay to determine quantitatively deamination of bases in DNA special site has been introduced to understand the relationship between DNA structure and its chemical activities. The assay is based on reversion of a mutant of CCC proline coding sequence which is located in Lac Z α gene of bacteriophage M13mp2 from a colorless to blue plaque phenotype. This approach is highly sensitive; deamination of a single cytosine residue in 10^5 M13mp2 DNA molecules can be detected. Besides, the kinetic rate constant of the reaction and the activation energy of deamination can be calculated.

Key words cytosine, deamination, DNA mutation

EB 病毒 BNLF-1 基因的分子生物学研究进展*

马先勇 曹 亚 姚开泰
(湖南医科大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 位于 EB 病毒基因组 U₅-TR 区内的 BNLF-1 基因, 其转译产物为潜伏膜蛋白 (latent membrane protein1, LMP-1), 由于 LMP-1 可以导致细胞转化并在 EB 病毒致癌过程中具有重要作用, 因而成为近年来 EB 病毒分子生物学及相关肿瘤如人鼻咽癌、伯基特淋巴瘤、何杰金氏病等疾病因发病学研究的热点, 并取得了一批有重要意义的成果, 文章从 BNLF-1 的基因结构及表达调控, LMP 蛋白的结构及生化功能, LMP-1 的生物学功能和 LMP-1 研究进行评述.

关键词 EB 病毒, BNLF-1 基因, 表达调控, 结构, 功能

EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 属人类疱疹病毒类, 它是一种广泛存在于人体的 DNA 致癌病毒. 1946 年 Epstein 和 Barr 首次从非洲儿童伯基特淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma, BL) 组织建立了一株可传代的类淋巴母细胞, 他们发现这一细胞株中有疱疹病毒颗粒 (后证明为 EB 病毒). 随后, 人们利用血清学、流行病学、分子生物学等方法证明:

EB 病毒能够导致免疫缺陷型患者的单核细胞及淋巴细胞增生性疾病^[1]. 同时, EB 病毒与人 BL、鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC)、何杰金氏病 (Hodgkins disease) 具有密切的联系. 在 EBV 的病毒粒子中其 DNA 以线性双链的构型存在, 基因组大小为 172 kb,

* 国家八·五攻关项目 (859140304).
收稿日期: 1996-08-09, 修回日期: 1996-12-09