

参 考 文 献

- [1] Govindjee et al.: *Bioenergetics of Membranes* (edited by L. Packer et al.) p. 305. 1977.
- [2] Spector, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 957, 1980.
- [3] Cheniae, G. M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 197, 219, 1970.
- [4] Joliot, P. et al.: *Photochem. Photobiol.*, 14, 287, 1971.
- [5] Blankenship, R. E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 357, 252, 1974.
- [6] Cheniae, G. M. et al.: *Plant Physiology*, 47, 568,

- 1971.
- [7] Cheniae, G. M. *Biochim. Biophys. Acta*, 502, 321, 1978.
- [8] Homann, P. H.: *Plant Physiol.*, 42, 997, 1967.
- [9] Lozier, R. et al.: *Photochem. Photobiol.*, 14, 323, 1971.
- [10] Theg, S. M.: *Plant Science Letters*, 16, 319, 1979
- [11] Blankenship, R. E. et al.: *Biochim. Biophys. Acta* 387, 165, 1975.
- [12] Wydrznski, T. J. et al.: *Biochemistry*, 17, 2155, 1978.
- [13] Calvin, M.: *Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy*, 13, 1981.

[本文于1983年9月19日收到]

β 地中海贫血的分子缺陷

方 福 德

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

一、前 言

地中海贫血(简称地贫)是常见的遗传性疾病, 在地中海沿岸国家及我国南方携带地贫基因者比例很高。地贫基因主要有 α 和 β 两类。 β 地贫又包括 β^+ 和 β^0 等主要类型, 前者表现为红细胞中 β 珠蛋白链合成减少(为正常的 5—30%), 后者 β 链完全不能合成, 但二者的 β 珠蛋白基因是完整的(除极少数病例外), 其分子基础涉及到特异性分子缺陷, 从而导致基因表达的异常或失能。现在已知, β 地贫分子缺陷的情况复杂多样, 因而构成了这类疾病高度的异质性。 β 地贫的分子缺陷是研究基因的结构与功能的一个很好体系。

人类具有一整套连锁的 β 类珠蛋白基因簇(位于第 11 号染色体), 其排列顺序见图 1。

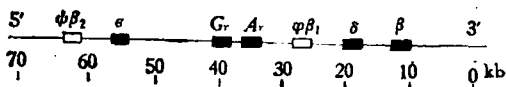


图 1

β 珠蛋白基因的结构、限制性内切酶酶切位点及一级结构序列均已搞清^[1]。从胚胎期开始,

在不同的发育阶段, β 类基因按 5'→3' 顺序依次表达, 出生后 ϵ 、 γ 基因不再表达, δ 基因轻微表达, β 基因成为主要的表达基因。红细胞中这种基因表达的调控机制, 一直吸引着生化和分子生物学家的注意。血红蛋白分子是由两条 β 链和两条 α 链加上血红素组成的。 β 链的减少和完全缺乏将直接影响正常血红蛋白的形成, 进而影响红细胞的形成及功能。因此对这类疾病分子基础的研究, 可为其治疗和预防提供理论依据和方法。

β 地贫的研究大致经过了三个阶段。60 年代, 主要在蛋白质水平上用标记氨基酸掺入法, 研究正常及 β 地贫患者网织红细胞珠蛋白的合成, 结果表明, 后者 β 珠蛋白合成量显著减少或完全缺乏。70 年代, 开始在 mRNA 这一层次上开展研究。到 70 年代末, 对不同种族来源的 120 多个 β^+ 和 β^0 病例作了研究, 发现除了有一类 Ferrara β^0 地贫外, 自正常网织红细胞中分离出来的 mRNA, 能指导合成等量的 α 和 β 链, 而自 β 地贫患者的网织红细胞中分离的 mRNA, 则指导合成 β 链显著减少, 但 α 链合成正常, 说明 β 珠蛋白 mRNA (简称为 β

mRNA)具有两种可能:①合成量与正常相同,但活性降低,②合成量下降。因此必须对 β mRNA 进行定量测定。70年代中期后,科学家们采用人珠蛋白 cDNA 探针与细胞 RNA 分子杂交的方法,直接对 β 地贫 β mRNA 及其前身作动态的定量分析,发现 β^+ 患者的 β mRNA 是存在的,但量明显减少,与 β 珠蛋白合成量的减少基本一致。 β^0 患者则可能出现 β mRNA 完全缺乏、减少、及异常等情况。这就促使人们进一步探讨 β 珠蛋白基因对转录、转录后加工等过程的影响。70年代末80年代初,科学家们开始用 DNA 重组技术、核酸序列测定及克隆化珠蛋白基因功能测定等技术对 β 地贫的分子缺陷作更精细的研究,大大丰富了人们对基因的结构与功能关系的认识。本文拟对与此有关的研究的进展作一概述。

二、 β^+ 地贫的分子缺陷

β^+ 地贫网织红细胞中 β mRNA 量显著减少,提示其转录或转录后加工过程受到阻碍。为此,有人用分子杂交法对 β^+ 骨髓有核红细胞核中 β mRNA 前身及胞浆中 β mRNA 的量进行了检测,观察到核中 β mRNA 前身的产生是正常的,与 α mRNA 前身物的量保持平衡,但胞浆中 β mRNA 的量明显减少,与 α mRNA 的量失去了平衡。说明患者 β 珠蛋白基因的转录过程正常,但 β mRNA 前身物的加工过程或

所形成的 β mRNA 的稳定性可能有问题^[2]。Maquat 等^[3]用 ^3H -核苷对三例 β^+ 纯合子及一例非地贫者的骨髓有核细胞进行脉冲标记12分钟,加入放线菌素D,阻断转录作用继续进行并追踪细胞内标记 RNA 的命运,结果表明,在非地贫细胞中, β mRNA 前身物能被有效地定量加工为成熟的 mRNA,相反, β^+ 患者细胞中 β mRNA 前身物则不能。前身物加工的中间产物出现明显的积累,但二者 α mRNA 前身物均能被正常地加工成 α mRNA。上述结果说明,这些 β^+ 患者红细胞 β 珠蛋白的缺乏是 β mRNA 形成量下降所致。作者推测这可能是 β 基因插入序列中切接信号位点损伤造成的后果。Kantor 等^[4]发现四个不同种族来源的 β^+ 患者骨髓细胞中, β mRNA 前身物的浓度比对照组高2—3倍。进一步用脉冲追踪实验观察到 β^+ 细胞核中, β mRNA 前身物多于 α mRNA 前身物,而胞浆内标记 β mRNA 量却减少。若细胞用 ^3H -核苷脉冲标记后,在除去过量的标记核苷后,在含未标记的核苷培养液中继续培养20小时,原来的 β mRNA 并不发生明显变化,说明地贫 β mRNA 的稳定性与正常者相同,然而 β mRNA 的核浆转移有些延缓。最有意义的是,在一个患者的骨髓细胞核中出现了一种正常细胞核中所没有的 RNA (长度为650bp,转录自 β 基因大内含子及部分结构基因),另一个患者细胞核中则出现了一个额外的1320bp长

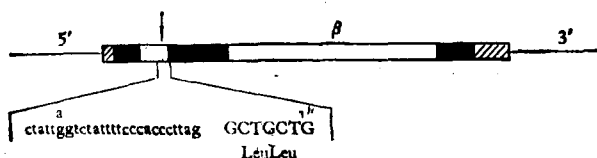


图2 β^+ 地贫基因小内含子中的点突变

箭头表示点突变位点 (g→a)

的 poly(A)-RNA (互补于 β 结构基因及部分大内含子序列),这些额外的 RNA 系 β mRNA 前身物异常切接加工的产物。为了找到直接证据,人们采用基因克隆、序列测定和功能测定等方法进行联合验证,得到了正结果。如 Westaway 等^[5]从一个 β^+ 患者 DNA 中得到一个含

β 基因的片段,经次级克隆后作序列测定,结果发现在1606bp转录区域的小内含子中,在上游区的第21个核苷酸,发生了G→A的取代(图2)。正常序列中 TTAG↓GCT 中的 AG 处是切接信号位点,经突变而成的 TTAG↓TCT 序列,与上面的序列很相似,可形成一个

新的切接信号位点,与正常切接信号位点起竞争作用,使患者细胞 β mRNA 前身物的切接加工发生错误。作者认为另一种可能是,由于这一核苷酸突变,会影响 β mRNA 前身物的二级结构,从而干扰切接过程。本工作从基因结构上提供的证据是有力的,可惜没有从功能上回答这一突变的生物学意义。几乎在同时, Spritz 等^[6]从另外一个 β^+ 纯合子 DNA 中克隆出一个包含 β 珠蛋白基因的 1904 bp 序列,核苷酸序列分析的结果与 Westaway 的结果完全一致。随后作者又将该克隆化基因片段在无细胞转录体系中作功能测定,结果表明转录过程是正常的,这就可以肯定上述的点突变能使 β mRNA 前身物的切接加工发生异常。Busslinger 等^[7]也克隆了 β^+ 地贫及正常人的 β 基因(该 β^+ 的 β 基因小内含子中的点突变同上),然后将克隆化基因转移至 Hela 细胞中,让其表达并检查被转染的 Hela 细胞中的 RNA (S_1 核酸酶酶谱分析法),与正常者相比, β^+ 基因表达出来的 mRNA 有 90% 不是真正的 β mRNA,而是在异常切接点上切接出来的 mRNA,它们能够被翻译,但翻译产物不是正常的 β 珠蛋白,其余 10% mRNA 是正常的 β mRNA,能翻译出正常的 β 珠蛋白。

最近, Poncz 等^[8]报告,一个犹太人 β^+ 患者的克隆化 β 基因序列中, TATA box 中的 CATAAAA 序列突变为 CATACAA (图 3),功能测定表明,这一点突变使 β 基因的转录效率低于正常者。这是迄今为止第一次在地贫患者中发现 TATA box 的点突变。众所周知,真核细胞中 TATA box,对精确的转录起着关键性作用,突变会破坏此过程。除此之外,作者还在 β 基因的 5' 和 3' 旁侧序列中发现核苷酸缺失和插入等改变,但尚未作功能测定,故不能肯定是否属 β^+ 地贫的特异性分子缺陷。

β 珠蛋白基因旁侧序列中含有控制转录的区域,如 5' 侧 CCAAT 区域(-72—-76)等。Orkin 等^[9]报告在该序列邻近处的一 87 位核苷酸发生了 C $\rightarrow$ G 的点突变,可能影响到 β 珠蛋白基因转录的有效起动。此外,还在 β 基因



图 3 β^+ 地贫基因旁侧序列中 TATA box 的点突变

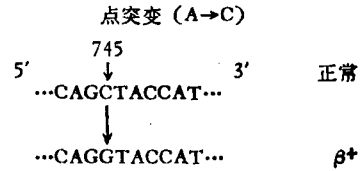


图 4 β^+ 地贫基因大内含子中第 745 位核苷酸的突变

大内含子第 745 位核苷酸发现了分子缺陷,使一个 CAGCT 突变为 CAGGT 序列(图 4),并新出现一个 RsaI 切点。突变后的序列 CAGGT 恰好是一个新的切接信号位点,它干扰了正常的 β mRNA 前身物的切接过程。

三、 β^0 地贫的分子缺陷

上已述及, β^0 地贫患者红细胞中 β 珠蛋白完全不能合成。其分子缺陷从大的方面来划分,可分为转录缺陷、转录后加工异常和翻译缺陷。从细划分,可有以下十种情况:

1. 转录缺陷 Comi 等^[10]用 β cDNA $\cdot$ β RNA 杂交法证明一个意大利 β^0 患者网织红细胞胞浆中无 β mRNA,检查核中 HnRNA 时发现没有 β HnRNA 存在,但 β 基因是存在的,故可肯定其分子缺陷在于丧失了转录能力。

2. β mRNA 前身物加工缺陷 Comi 等^[10]从另一个 β^0 患者细胞核中检出 β HnRNA,但胞浆中无 β mRNA,显然 β mRNA 前身物加工过程完全失效。

3. 翻译缺陷^[11] 意大利北部有一种叫 Ferrara β^0 地贫的,其红细胞内有 β mRNA,但不能翻译出 β 珠蛋白。若将患者细胞的核糖体在无细胞体系中与正常红细胞上清液一起保温,可见到 β 珠蛋白链的合成;若与患者本身的红细胞上清液保温,仍不能合成 β 链,只能合成 γ 珠蛋白链;若用镰形细胞贫血症的红细胞上清液与之保温,则可以合成 β 链,却不能合成镰形细胞 β 链(β^+),这些实验说明无细胞体系中, β 链的合成并不是外源性 β mRNA 污染所造成。

测定 β cDNA· β mRNA 杂交体的融解温度,发现地贫与正常对照之间无甚差异。以上结果清楚地证明, Ferrara β^0 地贫细胞含有结构正常的 β mRNA, 只是缺乏某种翻译所需的因子。整体实验也证明了这一点。这些患者在输血后,其网织红细胞就具有合成 β 链的能力。后来作者又从正常红细胞中分离出促进 β 链合成的因子(叫活化因子),从 Ferrara β^0 红细胞中分离出抑制 β 链合成的抑制因子。这类 β^0 地贫是目前已发现的唯一一种翻译缺陷的类型。

4. 起始密码突变 目前仅有 1 例报告^[12]。患者外周血细胞总 RNA 中含有 β mRNA, 在杂交反应体系中增加 RNA 的浓度,杂交百分率可达正常水平,唯杂交速度相对较低。若用正常 β mRNA 的 5' 及 3' 端非编码序列的 cDNA (分别写为 5' β cDNA 和 3' β cDNA) 作为探针,其杂交百分率均属正常,说明该患者含有完整的 β mRNA。但是,这些 β mRNA 在麦胚及兔网织红细胞溶解物的无细胞体系中无翻译活性。进一步研究表明,若以患者 β mRNA 为模板,以 d(GCACCA) 为引物合成 5' β cDNA,以 d(T₁₀GC) 为引物合成 3' β cDNA,即可发现与 3' β cDNA 相比,5' β cDNA 合成产率只有正常对照的 1.7%。作者认为这是因为引物结合位点 AUG (起始密码)发生突变引起引物与模板结合消失所致。当然,若在 AUG 邻近处发生其他类型的突变也会使 mRNA 的三维空间结构发生改变而引起同样的结果。

5. 3' 非编码区的缺失或额外序列插入

Old 等^[12]用 β cDNA 作探针在 3 例不同种族的 β^0 患者细胞中测得 β mRNA 的存在,但其量比正常者减少。用 5' β cDNA 作探针与 RNA 杂交,结果正常。而用 3' β cDNA 作探针与之杂交,则杂交百分率很低,说明 β mRNA 3' 非编码序列发生了缺失或插入等改变,从而形成异常的 β mRNA 并且不能翻译出正常的 β 链。

6. 无义突变 Temple 等^[13]用分子杂交法,首次在一个中国人 β^0 纯合子的红细胞中发现无功能 β mRNA。这些 β mRNA 与正常 β mRNA 分子大小相同,但不能指导合成 β 链。Chang 等对该病人的 β 基因进行了克隆并测定基因序列,发现无功能 β mRNA 原来是正常 β mRNA 第 17 位密码子 AAG (编码赖氨酸)突变为终止密码 UAG 所致。很显然,这种无义突变将使 β 链在合成过程中提前中止,不能形成正常的 β 链。用类似的方法,另一些作者分别在不同种族的 β^0 地贫中发现了 β mRNA 第 39 位密码子 CAG (编码谷氨酰胺)突变为 UAG^[14-17]。

7. 移码突变 Orkin 等^[15]克隆了一个土耳其人 β^0 地贫的 β 基因。功能测定表明,该基因在体外转录正常,但不能合成 β 链。序列测定发现第 8 位密码子处缺失了两个核苷酸,造成移码突变(图 5),使 3' 端的密码重新组合,以致在新组合的第 21 位密码子变为终止密码。这样,所形成的 β mRNA 也相当于无功能 β mRNA。

1	10
正常 Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser Ala Val Thr	
GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG AAG TCT GCC GTT ACT	
Ala Leu Trp Gly Lys Val Asn Val Asp Glu Val	
GCC CTG TGG GGC AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT	
β^0 GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG...GTC TGC CGT TAC TGC	
Val His Leu Thr Pro Glu Glu Val Cys Arg Tyr Cys	
1	10
CCT GTG GGG CAA GGT GAA CGT GGA TGA	
Pro Val Gly Gln Gly Glu Arg Gly ter	
20	

图 5 β^0 地贫的移码突变

移码突变的地方用箭头表示, ter 为终止密码

8. β 珠蛋白基因大内含子 5' 端切接信号位点的突变 Baird 等^[10]用 β 基因大内含子序列作为探针,对 3 个不同种族的 β^0 DNA 作了酶谱分析,观察到这些 DNA 的 HphI 酶切片段比正常片段长 0.1kb (正常片段为 0.9kb),其他酶切图谱无改变。这一片段的改变是由于大内含子 5' 端切接位点突变而不是 3' 端切接位点突变的结果,因为 3' 端切接位点的突变会使 HphI

片段延长 0.2kb 以上。HphI 的识别位点见图 6。作者进一步用 HinfI 作酶切图谱分析,未发现异常,说明突变的位置在 GGT 三个核苷酸(图 6)。由此可见,这一突变使原来正常的切接信号位点消失。因此,用分子杂交法虽然也能在患者中检出 β mRNA,但实际上它们是异常的 β mRNA,不能翻译出正常的 β 珠蛋白。近来 Treisman 等进一步证明上述 GGT 序列突变为

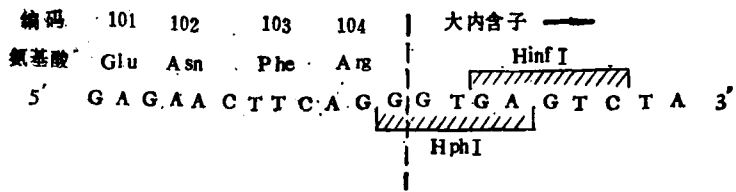


图 6 β 珠蛋白基因中编码序列与大内含子接合处的核苷酸的序列及某些 β^0 地贫在该处的突变位置
纵虚线示大内含子 5' 端切接处。斜线范围为各该内切酶识别序列。
HphI 识别序列中 GGT 为发生突变的位置

GAT, 更确切地证实这类突变的存在。
9. β 珠蛋白基因小内含子 5' 端切接信号位点的突变 Treisman 等从一个 β^0 患者的 β 基因中发现,其小内含子 5' 端切接信号位点发生了突变(图 7)。这种突变的后果与大内含子切接位点的突变是一样严重的。



图 7 一个 β^0 地贫基因小内含子 5' 端切接信号位点的突变 (G→A)

10. β 珠蛋白基因的 3' 末端缺失 在 β^0 地贫中,一般来说 β 基因是完整的,但在少数病例中也可发生结构基因、内含子或非编码区的缺失。基因缺失由酶切图谱分析即可确定。如 Orkin 等^[19]曾在三例 β^0 地贫中发现有异常的酶切图谱。他们分别用 PstI 和 BglII 酶解正常及 β^0 DNA,以 β cDNA 为探针,得到正常图谱为: PstI 4.4kb, BglII 5.1kb; β^0 地贫的图谱为: PstI 4.4kb + 3.8kb, BglII 5.1kb + 4.5kb,说明在每个二倍体细胞中一个 β 等位基因缺失了 0.6kb 片段。为了定位该片段,作者采用 β 基因 3' 端序列为探针,杂交实验的结果是:正常者出现 PstI 4.4kb 片段, β^0 地贫也只出现 PstI

4.4kb 片段,而 PstI 3.8kb 片段消失,故可知其缺失位置在 β 基因 3' 端(包含一部分 3' 端结构基因)。若 PstI 片段用 EcoRI 酶解(该酶切点在 121/122 密码子中),正常者可得到 3.6kb 和 0.8kb 两条杂交带, β^0 地贫的 4.4kb 和 3.8kb 片段用电泳法分离纯化再酶解,结果 4.4kb 片段的酶切图谱与正常者相同,而 3.8kb 片段酶解后没有出现 0.8kb 的杂交带,由此可知缺失部分包括原来 EcoRI 切点的部分(图 8)。与此同时,几乎采用相同的方法,Flavell 等也发现 1 例 β^0 地贫具有 β 基因 3' 端缺失,情况与上相同。

在 β 地贫中,还有的类型其 β 基因全部缺失,如 $\delta\beta^0$ 地贫和遗传性胎儿血红蛋白持续存在血症 (HPFH) 等,限于篇幅不拟详细介绍。

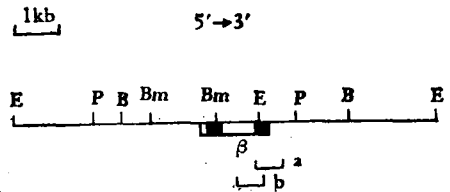


图 8 β^0 地贫基因的 3' 端缺失
E—EcoRI, B—BglII, P—PstI, Bm—BamHI。
 β^0 缺失位置在 a 和 b 范围内

四、结 语

β 地贫的分子缺陷多种多样,不同种族甚至同一种族不同个体,情况都可能有异。因此研究这些分子缺陷有助于在分子水平上阐明 β 地贫异质性的发生机制。当然,在研究 β 地贫的分子缺陷时要注意与多态性酶切位点和多态性核苷酸位点相区别,并应对含有分子缺陷的基因进行功能测定。

β 地贫(除 Ferrara β^0 外)的分子缺陷实质上是基因缺陷,它们造成 β 链合成减少或完全缺乏,而使 α 链相对过剩。值得一提的是 HPFH 患者虽然全部缺失 β 基因,但 γ 珠蛋白基因却持续表达,使 γ 链与过剩的 α 链结合成血红蛋白,补偿了 β 链的缺乏,所以此类地贫并无临床症状。在这一临床现象的启发下,最近一、二年来人们试图通过基因操纵的办法,使 β 地贫的 γ 珠蛋白基因开放表达而达到治疗目的。如所周知,基因序列一旦被甲基化就会处于不表达状态,反之亦然。人们发现 5-氮杂胞嘧啶核苷(5-a3-acytidine)能使 β 地贫患者不表达的 γ 基因去甲基化,从而表达出 γ 珠蛋白,它们能与过剩的 α 链结合并使病情减轻。这一研究成果已在 1982 年底发表,并且被认为是人的基因工程的一个重要进展。

现在虽然已经知道 β 地贫的许多分子缺陷,但随着研究工作的不断深入,必将还会发现

新的分子缺陷,特别是旁侧序列的缺陷与 β 基因的表达调控的关系更有待积累更多的资料,它对于了解基因表达的调控机理无疑是很有意义的。

参 考 文 献

- [1] Lawn, R. M. et al.: *Cell*, **21**, 647, 1980.
- [2] Nieuhuis, A. W. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 3960, 1977.
- [3] Maquat, L. E. et al.: *ibid*, **77**, 4287, 1980.
- [4] Kantor, J. A. et al.: *Cell*, **21**, 149, 1980.
- [5] Westaway, D. and Williamson, R.: *Nucleic Acid Res.*, **9**, 1777, 1981.
- [6] Spritz, R. A. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **78**, 2455, 1981.
- [7] Busslinger, M. et al.: *Cell*, **27**, 289, 1981.
- [8] Poncz, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 5994, 1982.
- [9] Orkin, S. H. et al.: *Nature*, **296**, 627, 1982.
- [10] Comi, P. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **79**, 617, 1977.
- [11] Conconi, F. et al.: *Nature New Biol.*, **238**, 83, 1972.
- [12] Old, J. M. et al.: *Cell*, **14**, 289, 1978.
- [13] Temple, G. F. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **74**, 3047, 1977.
- [14] Trecartin, R. F. et al.: *J. Clin. Invest.*, **68**, 1012, 1981.
- [15] Orkin, S. H. and Goff, S. L.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 9782, 1981.
- [16] Moschonas, N. et al.: *Nucleic Acid Res.*, **9**, 4391, 1981.
- [17] Gorski, J. et al.: *J. Mol. Biol.*, **154**, 537, 1982.
- [18] Baird, M. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 4218, 1981.
- [19] Orkin, S. H. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 2400, 1979.

[本文于1983年7月20日收到]

自由基在抗癌中的作用

莫 筒

(第四军医大学化学教研室,西安)

关于自由基与肿瘤的关系,早期的研究,注意力集中于自由基在致癌方面的作用。近年来,有些研究发现,自由基也有抗癌作用。这方面的资料虽然不多,但值得注意。本文将近几年这方面的研究发展向读者做一介绍。

一、自由基在肿瘤放射治疗中的作用

放射线对机体的作用,通常是通过两种方式:(1)直接作用,即射线直接作用于生物分子的损伤效应;(2)间接作用,即射线作用于体内