

溶解的部分膜蛋白,其分子结构内含有穿膜的疏水部分,而包涵体内重组蛋白一般亲水性较强,因此复性后可利用疏水作用色谱将二者分离。非蛋白类杂质通常是一些酸类物质(如核酸、磷脂、脂多糖),可利用阴离子交换色谱去除。利用表达产物与杂质等电点的差异也可将两类物质分离,多数的人重组蛋白,如干扰素等的 pI 大于 7.0,而大肠杆菌膜蛋白的 pI 值一般小于 7.0,因而可在 pH 7.0—8.0 之间用阴离子交换色谱来纯化。

同样,许多大肠杆菌宿主蛋白质在 pH 小于 5 时溶解性较差,而产物对酸稳定,可以有选择地利用酸沉淀的方法去除部分杂质。

在复性过程中往往形成部分产物的衍生物,如共价或非共价聚合体、错配的二硫键衍生物,以及化学修饰物等。通常聚合体的溶解性较差,可用沉淀的方法去除;也有部分聚合体呈可溶状态或形成病毒颗粒大小的絮状沉淀,可用色谱方法去除。

白细胞介素-2 复性过程中易形成二硫键错配,这些错配的异构体亲水性较白介素-2 大,可通过反相或疏水色谱进行分离;而复性不完全的还原型白介素-2 的疏水性较天然白介素-2 大,也可用同样的方法分离^[18]。干扰素在复性过程中往往含有少量巯基衍生物,以磺基丙氨酸或与谷胱甘肽形成的二硫键方式存在,可通过反相或酸沉淀的方法去除^[19]。

应该注意,某些提取包涵体的方法可能对以后的色谱过程产生影响,如用 SDS 萃取包

涵体蛋白,由于 SDS 与蛋白呈共价结合从而改变了蛋白的带电状态及分子的疏水性能,它明显改变了蛋白分子在离子交换、疏水、反相色谱上的保留行为,对此必须采取相应的措施,从纯化策略上加以调整。

由于原核表达系统的众多优点,所以至今人们还在大量应用,但原核基因工程的发展依赖于对包涵体以及蛋白质变性复性等问题的阐明^[20-22]。

参 考 文 献

- 1 Schoner RG *et al.* *Bio/Technology*, 1985; **3**: 351
- 2 Hartley DL *et al.* *Biochem Soc Trans*, 1988; **16**: 101
- 3 Schein CH *et al.* *Bio/Technology*, 1989; **7**: 1141
- 4 Builder SE *et al.* *United States Patent* no. 4620948, 1986
- 5 Fish N M *et al.* *Biochem Soc Trans*, 1988; **16**: 102
- 6 Maston FAO *et al.* *Bio/Technology*, 1984; **2**: 800
- 7 Sarmientos P S *et al.* *Cell*, 1988; **52**: 1337
- 8 Poulsen C *et al.* *Eur J Biochem*, 1989; **185**: 433
- 9 Kung H F. *United States Patent* no. 4476049, 1986
- 10 Burton S J. *Eur J Biochem*, 1989; **179**: 379
- 11 Battig F A *et al.* In: Battig F A *et al.* eds, *6th Inter Symp on HPLC of proteins and peptides*, New York: Academic Press, 1986: 801
- 12 Doonan S *et al.* *Biochem Soc Trans*, 1990; **18**: 231
- 13 Olsen K C. *United States Patent* no. 4518526, 1985
- 14 Holtzman T F *et al.* *Biochemistry*, 1986; **25**: 6907
- 15 Wingfield P *et al.* *Eur J Biochem*, 1988; **173**: 65
- 16 Schrimsher J L *et al.* *Biochem J*, 1987; **247**: 195
- 17 Viitanen PV *et al.* *Biochemistry*, 1990; **29**: 5665
- 18 Tsuji T *et al.* *Biochemistry*, 1987; **26**: 3129
- 19 Honda S. *J Biotechnol*, 1987; **5**: 39
- 20 Chang B Y *et al.* *J Bacteriol*, 1990; **172**: 3257
- 21 Lee T C *et al.* *J Biol Chem*, 1990; **265**: 7472
- 22 Tomasselli A G *et al.* *Biochemistry*, 1990; **29**: 264

抗 癌 基 因:Rb

党 进 军

(军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

提 要

介绍有关视网膜母细胞瘤(Retinoblastoma,简称 Rb)基因研究的最新进展。已经证明 Rb 基因异常与某些肿瘤发生密切相关。其编码产物具有抑制细胞增殖

和细胞转化作用,可能是一个具有 DNA 结合活性的细胞生长负调控因子。Rb 基因作为抗癌基因在肿瘤分子生物学研究中已引起人们的普遍重视。

关键词 视网膜母细胞瘤易感性基因,抗癌基因,基因异常

抗癌基因 (antioncogene) 是近年发现的一类存在于细胞内具有维持细胞正常生长和抑制细胞转化作用的基因^[1,2]。根据它在肿瘤细胞内特异染色体位点上等位基因的丢失及其对细胞转化的抑制能力进行识别和命名,目前已鉴定出 10 多个与某些肿瘤发生密切相关的特异染色体位点的丢失^[3]。其中定位于人染色体 13 q¹⁴ 上的视网膜母细胞瘤易感性基因位点的丢失,正是特异等位基因丢失涉及肿瘤发生的一个典型范例^[4]。由于这些特异等位基因的丢失导致肿瘤发生,因此抗癌基因也称退行性癌基因 (recessive oncogenes) 或肿瘤抑制基因 (tumor suppressor genes)。

最近几年的大量研究结果表明,Rb 基因作为一个抗癌基因具有明显的细胞转化抑制作用,它可能是一个具有 DNA 结合活性的细胞生长负调控因子。Rb 基因在肿瘤细胞中的丢失或失活是视网膜母细胞瘤等肿瘤发生中的重要事件^[5]。

1 Rb 基因结构

最早报道的 Rb 克隆 (H3-8) 是来自正常人染色体 13 上的一个基因片段,该片段后来定位在 Rb 基因的 1 个内含子上。在此克隆的基础上,Friend^[6]、Lee^[7]、和 Fung^[8] 等人的实验室利用染色体行走技术均分离出 Rb 基因 cDNA 克隆。正常人 Rb 基因含有 27 个外显子,分布在染色体 13 长臂上约 200kb 的基因组

DNA 之中(图 1),这些外显子的长度范围从 31bp 到 1889bp 之间不等。Rb 基因中最大的内含子大于 60kb,最小的只有 80bp。在所有已检测的正常组织中,Rb 基因的表达产物均为一个 4.7kb 的 mRNA 分子^[9]。

Rb 基因详细结构研究表明^[10]: 位于其 5' 端从 +13 到 +83 之间 70bp 的核苷酸序列对于 Rb 基因的转录是非常重要的。该 70bp 含有启动子活性,它的去除几乎可以完全导致 CAT 基因表达活性的丧失。该启动子区有常见的富含 G + C 启动子区的类似结构,但不含有典型的 TATA 盒。在 Rb 基因 5' 端 7.3kb 的上游区序列中,未检测出增强子的存在。利用 S1 核酸酶保护实验可以观察到 Rb 基因含有三个转录起始位点 (+1、+44 和 +51),其中只有 +1 位点含有常见的 mRNA 转录起始位点特异 DNA 序列。

Rb 基因的编码产物是一个由 928 个氨基酸组成的磷蛋白,定位于细胞核内^[11]。由于 Rb 蛋白在细胞内以不同形式的磷酸化状态存在,故其分子量在 105—115kD 不等。Rb 蛋白的磷酸化主要发生在丝氨酸和苏氨酸残基上^[12]。根据 cDNA 序列分析推导 Rb 蛋白结构表明,该蛋白分子内含有一个“锌指”结构,分别由四个不连续的外显子 (17, 18, 20 和 21) 所编码。此外,外显子 20 还编码着一个 DNA 结合蛋白所特有的“亮氨酸拉链”结构^[10],Wang 等人已证明 Rb 蛋白的 c-端含有 DNA 结合活

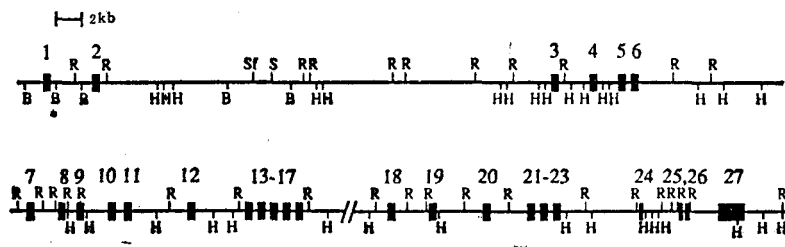


图 1 人 Rb 基因结构^[10]

性^[13]。

2 Rb 蛋白的功能

Rb 蛋白是一个具有 DNA 结合活性的细胞生长调节因子,现有实验结果表明 Rb 蛋白在细胞内具有抑制细胞增殖和控制细胞分化等功能,起着维持细胞正常生长的作用。

Mihara 等人^[14]观察到 Rb 蛋白的磷酸化具有细胞周期依赖性,并与其参与细胞周期调控有关。作者发现 Rb 蛋白在 G_0 和 G_1 期以去磷酸化形式存在,而在 G_1/S 期之间和 S 期则以多位点的磷酸化形式存在。其中去磷酸化的 Rb 蛋白具有抑制细胞增殖能力。当细胞开始 DNA 合成时, Rb 蛋白自身一个或多个重要位点因发生磷酸化而失活。因此人们认为由磷酸化引起的 Rb 蛋白抑制细胞增殖能力的丧失,可能是细胞跨过 G_1/S 期之间界线的重要事件。

正常 Rb 蛋白能够与某些 DNA 肿瘤病毒的转化蛋白(如 SV40T 抗原、腺病毒 E1A 蛋白和人乳头状瘤病毒 E7 蛋白)结合并形成复合物^[15]。研究发现 SV40T 抗原只能与去磷酸化形式的 Rb 蛋白结合,而不能与磷酸化形式的 Rb 蛋白形成复合物, Rb 蛋白与 T 抗原之间复合物的形成部分地受细胞周期和 T 抗原本身四级结构的调节。在 G_1 期以完全去磷酸化形式存在的 Rb 蛋白与 T 抗原形成的复合物在进入 S 期时,由于蛋白本身发生磷酸化而与 T 抗原生解离。当细胞重新开始进入 G_1 期时,发生去磷酸化的 Rb 蛋白重新与 T 抗原结合形成复合物(图 2)^[16]。这些结果表明 Rb 蛋白的细胞周期性磷酸化和去磷酸化与其结合并释放 T 抗原密切相关。这种复合物的形成还表明病毒癌蛋白可能是通过与 Rb 蛋白结合来影响 Rb 蛋白对细胞增殖的抑制能力,间接地改变细胞生长并发挥病毒的细胞转化作用。

Coppola 等人^[17]最近报道在用 DMSO 等诱导剂诱导小鼠红白血病细胞分化过程中,发现 Rb 基因表达增强与细胞分化程度有关。经诱导分化的细胞在其分化后期 Rb mRNA 水

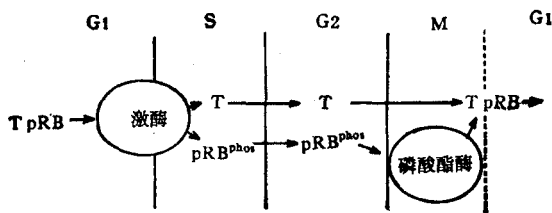


图 2 Rb 蛋白细胞周期性磷酸化/去磷酸化与 SV40T 抗原的结合和释放^[16]

平明显增加,在某些其它类型的细胞中也观察到类似的结果,表明 Rb 蛋白可能涉及某些细胞的分化过程。

尽管认为 Rb 蛋白是一个细胞生长的负调控因子,但其抑制细胞增殖的分子机制还不清楚。最近,Robbins 等人^[18]报道 Rb 蛋白在成纤维细胞中对 c-fos 基因表达有负调节作用,并在 c-fos 基因启动子区鉴定出一个与此调节作用相关的顺式作用子 (cis-acting element),称为 Rb 控制子 (retinoblastoma control element)。Moses 等人^[19]还认为 Rb 蛋白可能作为一个中介调节因子直接或间接地参与 TGF- β 对 c-myc 基因表达的抑制以及对细胞生长的负调控。

3 Rb 基因异常与肿瘤发生

肿瘤的发生和发展可能是一个涉及许多不同基因相互作用的复杂过程。大多数肿瘤发生涉及的基因异常可分为二类:细胞原癌基因激活和抗癌基因失活^[20],其中抗癌基因的失活在肿瘤研究中有着更重要的意义。现有研究已证明在视网膜母细胞瘤等一些肿瘤中常常可以检测出 Rb 基因的丢失或突变等基因异常。

视网膜母细胞瘤是一种儿童期眼部恶性肿瘤,有遗传型和非遗传型两种形式。1971 年,Knudson^[21]根据对视网膜母细胞瘤的遗传易感性研究和临床数据分析,提出了视网膜母细胞瘤发生需经过基因两次突变的“两次击中”假说。随后人们利用细胞遗传学方法将 Rb 基因定位于染色体 13q14,与一个多态性标志酶(酯酶 D)的编码基因紧密连锁,并发现 Rb 基因位点在视网膜母细胞瘤中常常发生丢失或突变^[22]。

DNA 限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析也证实了 Rb 基因表型的杂合子丢失^[31]。

随着 Rb cDNA 的分子克隆和 PCR 技术的应用,人们能够进一步深入研究各种肿瘤中 Rb 基因的杂合子丢失或突变失活等基因异常,探讨它们在肿瘤发生中的作用机制。除视网膜母细胞瘤外,在肺癌、乳腺癌和膀胱癌等常见肿瘤中也常常可以检测到 Rb 基因异常^[24]。Yokota 等人^[25]通过 RFLP 分析观察到在人小细胞肺癌中 Rb 基因的杂合子丢失几乎达 100%。Horowitz 等人^[26]最近也报道 Rb 基因在某些肿瘤细胞中的频发失活。

目前已检测出的 Rb 基因异常主要有杂合子丢失,单个碱基或小片段缺失,点突变和因点突变造成个别外显子缺失等。Rb 基因异常反映在基因表达或蛋白翻译水平上,经常可以观察到 mRNA 缺失,表达水平降低、分子大小改变和 Rb 蛋白异常等。在 mRNA 或蛋白水平上检测可以提高对 Rb 基因异常检出的灵敏度和准确性。通过分子水平的分析,进一步证实并扩展了有关 Rb 基因的遗传学研究。研究结果证明 Rb 基因位点上两个等位基因的失活是某些肿瘤发生的重要原因。由于 Rb 基因失活造成其不能合成具有生物学活性的 Rb 蛋白,失去对细胞增殖的抑制作用,从而导致细胞转化和肿瘤发生。

Rb 蛋白在细胞内起着抑制细胞转化作用的直接证据是将正常 Rb 基因引入不能产生正常 Rb 蛋白的肿瘤细胞中的基因转移实验^[27],这种置换突变 Rb 基因的实验在视网膜母细胞瘤、成骨肉瘤和前列腺癌细胞中均已观察到明显的抑制细胞转化作用。重新获得野生型 Rb 基因的肿瘤细胞其表型发生改变,并且不能在软琼脂上形成集落和在裸鼠身上产生肿瘤。这些结果进一步证明 Rb 基因的丢失或突变失活

是导致某些肿瘤发生的重要步骤。

综上所述,Rb 基因异常与某些肿瘤的发生密切相关。虽然有关 Rb 基因的生物学功能仍有待于深入研究,但已证明 Rb 基因在细胞生长过程中可能起着重要的调节作用。以 Rb 基因为代表的抗癌基因为肿瘤分子生物学研究开拓了一个新的领域,随着抗癌基因研究的不断深入,必将为阐明肿瘤发生的分子机理提供新的科学依据。

参 考 文 献

- 1 Friend S H et al. *The New England Journal of Medicine*, 1988; 318: 618
- 2 Levine A J. *BioEssays*, 1990; 12: 69
- 3 Geiser A G, Stanbridge E J. *Oncogenesis*, 1989; 1: 261
- 4 Hensel C H et al. *Cancer Research*, 1990; 50: 3067
- 5 Lee E H et al. *Science*, 1988; 241: 218
- 6 Friend S H et al. *Nature*, 1986; 323: 643
- 7 Lee W H et al. *Science*, 1987; 235: 1394
- 8 Fung Y K T et al. *Science*, 1987; 236: 1657
- 9 Bookstein R et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 2210
- 10 Hong F D et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 5502
- 11 Chen P L et al. *Cell*, 1989; 58: 1193
- 12 Shew J Y et al. *Oncogene Res*, 1989; 1: 205
- 13 Wang N P et al. *Cell Growth & Differentiation*, 1990; 1: 233
- 14 Mihara K et al. *Science*, 1989; 246: 1300
- 15 Furukawa Y et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 2770
- 16 Ludlow J W et al. *Cell*, 1990; 60: 387
- 17 Coppola J A et al. *Oncogene*, 1990; 5: 1731
- 18 Robbins P D et al. *Nature*, 1990; 346: 668
- 19 Moses H L et al. *Cell*, 1990; 63: 245
- 20 Hu Q et al. *EMBO J*, 1990; 9: 1147
- 21 Knudson A G. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971; 68: 820
- 22 Cavenee W K et al. *Nature*, 1984; 309: 170
- 23 Horowitz J M et al. *Science*, 1989; 243: 937
- 24 Mori N et al. *Oncogene*, 1990; 5: 1713
- 25 Yokota J et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 9252
- 26 Horowitz J M et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 2775
- 27 Bookstein R et al. *Science*, 1990; 247: 712