

辟新的思路.

3 体外遗传学展望

体外遗传学的兴起只有几年的时间,但已在分子生物学许多领域显示出强大的生命力,这是因为体外遗传学方法不仅改变了自然界缓慢的进化过程,使人为的进化得以简单地实现,同时也使许多核酸功能区的识别和确定由被动变为主动,为进一步探索基因的调控规律及主动地调节生化反应过程提供了有效的方法.此外,体外遗传学方法也为其构建自然界不存在的催化分子提供了可能性.相信随着人们对体外遗传学的了解,体外遗传学将在体外进化、药物筛选及新结合调控序列的发现等许多方面应用更加广泛.

参 考 文 献

- 1 Szostak J W. Trends Biochem Sci, 1992; 17: 89
- 2 Kinzler K W, Vogelstein B. Nucleic Acids Res, 1989; 17: 3645
- 3 Oliphant A R, Brandl C J, Struhl K. Mol Cell Biol, 1989; 9: 2944
- 4 Kinzler K W, Vogelstein B. Mol Cell Biol, 1990; 10: 634
- 5 Breaker R R, Banerji A, Joyce G F. Biochemistry, 1994; 33: 11980
- 6 Jamieson A C, Kim S-H, Well J A. Biochemistry, 1994; 33: 5689
- 7 Blackwell T K, Weintraub H. Science, 1990; 250: 1104
- 8 Blackwell T K, Kretzner L, Blackwood E M *et al.* Science, 1990; 250: 1149
- 9 Bartel D P, Zapp M L, Green M R *et al.* Cell, 1991; 67: 529
- 10 Chittenden T, Livingston D M, Kaellin W G. Cell, 1991;

65: 1073

- 11 Tuerk C, Macdougall S, Gold L. Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 6988
- 12 Bock L C, Griffin L C, Latham J A *et al.* Nature, 1992; 355: 564
- 13 Tsai D E, Kenan D J, Keene J D. Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 8864
- 14 Ellington A D, Szostak J W. Nature, 1992; 355: 850
- 15 Lorsch J R, Szostak J W. Biochemistry, 1994; 33: 973
- 16 Connell G J, Illangsekare M, Yarus M. Biochemistry, 1993; 32: 5497
- 17 Robertson D L, Joyce G F. Nature, 1990; 344: 467
- 18 Beaudry A A, Joyce G F. Science, 1992; 257: 635
- 19 Bartel D P, Szostak J W. Science, 1993; 261: 1411
- 20 Prudent J R, Uno T, Schultz P G. Science, 1994; 264: 1924

The Methods and Applications of *In Vitro* Genetics. Shi Guoli, Chen Defeng (*Institute for Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China*).

Abstract *In vitro* genetics is a method for isolating and studying functional nucleic acid molecules in test-tubes based on their special phenotypes (e. g. binding properties, catalytic properties). *In vitro* genetic provides an effective, active method for determinating and artificial evolution of nucleic acid function sequences, so it was widely used in investigating the regulation of gene expression and biochemical reaction. The progress of *in vitro* genetic methods and applications in recent years is reviewed.

Key words *in vitro* genetics, *in vitro* selection, nucleic acid sequences, application

参与细胞增殖调控的多功能分子 p21

孟祥兵 叶常青

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 p21是近年来发现的一类调控细胞增殖的小分子,是依赖周期素的CDK抑制因子.这些蛋白

因子可结合 cyclin-CDK 并抑制其激酶活性从而调节细胞周期. p15、p16、p27 均属该类分子, 他们在 G_1 期限制点及 G_1/S 检查点调控中发挥作用. 进一步的研究表明, p21 为 p53 调控, 在 p53 介导的 DNA 损伤诱发的细胞周期阻断中发挥作用. p21 在老化细胞中高表达、细胞分化的同时表达, 表明其在细胞增殖、分化及老化中发挥调节作用.

关键词 p21, 细胞周期调控, 分化, 老化

p21 是 1992 年 Xiong 等^[1]研究周期素 (cyclin) 和依赖周期素的激酶 (CDK) 时发现的一种结合蛋白, 其与多种 cyclin、CDK 及增殖细胞核抗原 (PCNA) 组成四聚体, 该复合物只存在于正常细胞, 而不存在于转化细胞. 次年, 三个研究小组分别从与 CDK2 结合蛋白、野生型 p53 诱导蛋白和老化细胞中抑制 DNA 合成的蛋白 3 个途径, 调出编码 p21 的基因 Cip1、WAF1 和 Sdi1. 这 3 个基因序列相同, 均定位在人染色体 6p21 区. 从此, 人们逐渐了解到 p21 具有抑制 CDK 活性、抑制 DNA 合成、受野生型 p53 调控并发挥其监视基因组完整性的功能. 随着研究的深入, 发现 p21 在细胞增殖、分化和衰老调控中均发挥着重要作用.

1 p21 作为 CDK 抑制因子

p21 基因 Cip1 是通过酵母二次杂交筛选体系调出的与 CDK2 相互作用的基因^[2]. 重组 p21 蛋白在体外优先结合 CDK2、CDK4、CDK5 和 CDK6, 与 CDK3 和 CDK1 也有微弱的结合. 免疫沉淀分析表明 p21 与人二倍体细胞中 cyclin A、D1、E 结合, 这些 cyclin 均与 CDK2 结合. 体外实验表明 p21 抑制 cyclin A-CDK2 磷酸化 H1 组蛋白, p21 也抑制 cyclin A-CDK2、cyclin E-CDK2、cyclin D1-CDK4 磷酸化 Rb 蛋白, 含 cyclin B 的复合物则很少被 p21 抑制. Cks1 是人细胞中与裂殖酵母中结合 CDK 的 Suc1 同源的蛋白, 其可结合 CDK2 但不抑制其激酶活性, p21 对结合有 Cks1 的 cyclin A-CDK2 也有抑制作用, 表明 p21 与 Cks1 可同时结合 CDK2.

p21 在正常细胞中与 PCNA、cyclin、CDK 以四聚体形式存在, 该四聚体中 CDK 具有激

酶活性和无激酶活性两种形式, 这主要取决于复合物中 p21 蛋白的含量^[3]. 在 p53 基因缺失或突变细胞中, CDK 与 cyclin 以二聚体形式存在, CDK 具有激酶活性.

在人二倍体细胞和鼠 NIH3T3 细胞中, 过量表达 p21 可抑制 DNA 合成, 这种抑制作用可被共表达的 SV40 T 抗原拮抗, 表明 p21 在体内可调节细胞周期. p21 通过抑制 cyclin-CDK, 使其不能磷酸化 Rb 蛋白 (成视网膜细胞瘤, retinoblastoma), 低磷酸化 Rb 能与 E2F 形成复合物并阻止其转录活性. E2F 是促进细胞进入 S 期的转录因子, 其调控的许多基因与细胞增殖相关. 与 Rb 形成复合物的 E2F 没有转录调控活力, 只有经 cyclin-CDK 磷酸化 Rb, E2F 与 Rb 解离后, E2F 才可调控基因表达.

p21 的发现使人们了解到, 调控细胞周期进程的元件除 CDK 及正调控的 cyclin 外, 还有负调控因子 CDK 抑制因子. 继 p21 之后, 又一些 CDK 抑制因子在酵母和人细胞中分离出来. 酵母细胞交配因子 α 因子激活细胞抑制因子 far1, 引起细胞 G_1 期阻断. 在哺乳动物细胞中, 至少有 4 种不同的 CDK 抑制因子 p16、p15、p21 和 p27 被鉴定. p16 与 cyclin D1 竞争结合 CDK4, 并发现一些肿瘤细胞系及原发癌中编码 p16 的 MTS1 基因缺失. p15 与 p16 有较高同源性只结合 CDK4 和 CDK6, 在 TGF β (转化生长因子- β , transforming growth factor β) 引起的 G_1 期阻断中发挥作用. p27 是与 p21 同源的蛋白, 在抑制细胞分裂原 TGF β 和接触抑制引起细胞周期 G_1 期阻断中发挥作用. 白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2) 诱导 T 细胞增殖过程中伴有 p27 失活. 这些结果表明, 细胞外信号分子可通过调节

CDK 抑制因子调控细胞周期。

2 p21 基因表达受 p53 调控

El-Deiry 等^[4]用差减杂交法调出 p21 在人细胞中为野生型而非突变型 p53 激活的基因 WAF1. WAF1 启动子区含有 p53 的结合位点, 将含有 p53 结合位点的 WAF1 启动子与报告基因连接, 可构建为受 p53 诱导的报告基因表达质粒. 基于 p21 可抑制 CDK 且为 p53 诱导, 人们提出假设 DNA 受损诱导 p53 表达, p53 又调控 p21 表达, p21 通过抑制 CDK 引起细胞阻断在 G₁ 期, 使受损 DNA 有修复的机会。

Dulic^[5]的实验证实了 p21 参与的细胞对 DNA 损伤作出的细胞周期阻断的反应, γ 辐射使人二倍体成纤维细胞 (NDF) 阻断在 G₁ 期而不进入 S 期, 细胞周期的阻断与 cyclin E-CDK2 失活及 p53 表达相关, p21 被 p53 诱导并抑制 CDK2 活性. Leonardo 等^[6]也证实, 当以 γ 射线照射 NDF 时, DNA 有少量未修复的断裂, 细胞表现为类似老化细胞的 G₁ 期长期阻断, 在此过程中 p53、p21 长期高水平表达, 表明 p53、p21 参与辐射所致细胞 G₁ 期阻断。

参与 p53 介导的辐射诱发细胞 G₁ 期阻断的基因, 除 p21 外, 还有 GADD45 和癌基因 mdm2. GADD45 在电离辐射引起 DNA 损伤时为 p53 诱导, 其在细胞中可与 PCNA 生理性结合, 过表达 GADD45 基因可抑制细胞生长. 尽管其作用机理还有待研究, 但现有结果表明其参与 DNA 损伤修复过程. mdm2 可为 p53 诱导, 其可结合 p53, 抑制其转录激活作用. mdm2 可视为 p53 作用机制中的反馈抑制成员, 其作用是当 DNA 损伤修复后使细胞进入细胞周期^[7]。

虽然 p21 基因启动子上游有 p53 调控位点, 在辐射诱发的 G₁ 期阻断中为 p53 诱导, 但 p21 的表达也有不依赖 p53 的方式, 如肌细胞分化过程中 p21 为肌源性转录因子 D (myogenic D, MyoD) 调控^[8]. 在诱导白血病细胞

向单核及巨噬细胞分化过程中, p21 表达增加但未见 p53 表达增加, 表明此过程 p21 的表达以不依赖 p53 的方式进行^[9]。

p21 可能同 p53 一样是候选的抑癌基因. p21 基因定位在人染色体 6p21, 已发现在非小细胞肺癌、卵巢癌、肾癌和直肠癌中, p53 为野生型但染色体 6p21 区缺失, 表明 p21 可能为抑癌基因^[3]. 但还未发现在癌细胞中有突变型 p21 的存在. 将 p21 表达质粒导入肺腺癌细胞系 H1299、直肠癌细胞系 SW480 及脑瘤细胞系 DEL, 观察到明显的抑制细胞增殖作用。

3 p21 结合 PCNA 抑制 DNA 聚合酶 δ

Waga 等^[10]阐明了 p21 对 DNA 损伤反应的另一面. 当细胞在进入 S 期前 DNA 损伤时, p21 通过抑制 cyclin-CDK 活性使细胞停止进入 DNA 合成期. 当细胞在 S 期发生 DNA 损伤时, 则通过 p21 结合 PCNA 直接抑制 DNA 复制元件。

正常人 NDF 中 p21 以四聚体形式存在, 体外实验表明, 在无 cyclin-CDK 存在条件下, p21 可与 PCNA 直接结合并抑制 DNA 聚合酶 δ 活性. 利用 SV40 真核细胞 DNA 体外复制体系研究表明, p21 可直接抑制依赖 PCNA 的 DNA 复制, 而不需要 cyclin-CDK 的存在. p21 对 DNA 复制的抑制可为过量的 PCNA 抵消, 表明其抑制 DNA 聚合酶主要通过影响其与 PCNA 的结合. p21 抑制 DNA 的合成, 但并不抑制复制起始复合物的形成, 表明 p21 抑制 DNA 复制的延伸阶段而非起始阶段. 故 p21 可抑制损伤 DNA 的复制, 但不影响损伤 DNA 修复过程中小片段 DNA 的合成。

p21 蛋白既可结合 cyclin-CDK 调节细胞周期, 又可结合 PCNA 抑制 DNA 复制, 通过构建 p21 蛋白 N 端及 C 端与谷胱甘肽巯基转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 的融合蛋白, 表明这两种功能分别由位于 p21 N 端和 C 端的结构域完成^[11]. p21 N 端与 GST 的融合蛋白在体外实验中可抑制 cyclin-CDK, p21 C

端与 GST 的融合蛋白则可抑制真核体外复制系统中 SV40 DNA 的复制。

4 p21 与细胞分化、衰老及死亡的关系

p21 参与细胞分化的观点来自最近有关肌细胞分化的研究工作^[8, 12, 13], 对在实验室体外培养的肌细胞观察表明, 肌细胞开始分化的同时 p21 开始表达. 启动 p21 表达的转录因子是 Myo D, 而非 p53. Myo D 是碱性螺旋-环-螺旋蛋白 (basic helix-loop-helix proteins, bHLH) 转录因子家族的一员, 当肌细胞分化时其启动肌细胞特有蛋白如肌球蛋白基因表达, cyclin D1 可抑制 Myo D 对肌细胞中靶基因的活化. 对鼠胚胎发育中 p21 基因表达的分析, 也证实了 p21 在肌细胞开始分化时表达. p21 与分化相关的报道不仅局限在肌细胞, 在软骨、皮肤和肠细胞分化过程中也有相同的报道. 因此人们提出 p21 在细胞分化中发挥关键作用, 其表达不仅抑制了调控细胞周期的 cyclin-CDK, 使细胞停止分裂, 而且可能与细胞分化有直接关系.

p21 与衰老细胞 DNA 复制的阻断直接相关, Noda 等^[14]就是利用筛选衰老的人成纤维细胞中抑制 DNA 合成的组分调出 p21 基因 Sdi1 的. 该基因在老化细胞中的表达量是增殖细胞中的 10~20 倍, p21 RNA 的增加与老化的表型及细胞增殖的丧失密切相关. 当增殖细胞的生长因子去除或接触抑制时, p21 基因的表达明显增加; 再用血清刺激时, p21 RNA 水平在静止细胞中, 起初增加, 随后在进入 S 期前降到较低水平. 与此相比, 老化细胞中 p21 RNA 水平并没有降低, 表明该基因在维持老化细胞表型中, 发挥重要作用. 但 p21 在老化细胞中的表达调控还不清楚.

p21 是否在细胞死亡如辐射引起的 p53 介导的细胞凋亡中发挥作用还存在许多争议. 辐射后某些细胞如成纤维细胞和直肠癌细胞易发生 G₁ 期阻断, 而另一些细胞如造血细胞则易发生凋亡, 这两种命运都有赖于野生 p53 的存在. 辐射后细胞选择哪种命运取决于细胞类型

及其所处的环境. 如鼠造血细胞在生长因子存在下受到 4Gy 的照射, 细胞发生迅速的 G₁ 期阻断; 如果照射时无生长因子的存在, 则细胞迅速发生凋亡. 生长因子在这里起了决定作用, 但这两种命运都有赖于野生型 p53, 完成这两种命运的基因尚不清楚. p53 如何能启动其中一种机制还有待探讨, p21 是否在这两种途径中发挥作用还需研究^[15]. 虽然 Rb 缺失或 myc 过表达引发细胞凋亡过程, 有赖于野生型 p53 的存在; 但并不是所有细胞凋亡都需 p53 存在, 如糖皮质激素及 Ca²⁺ 诱发的细胞凋亡即不需 p53 的存在.

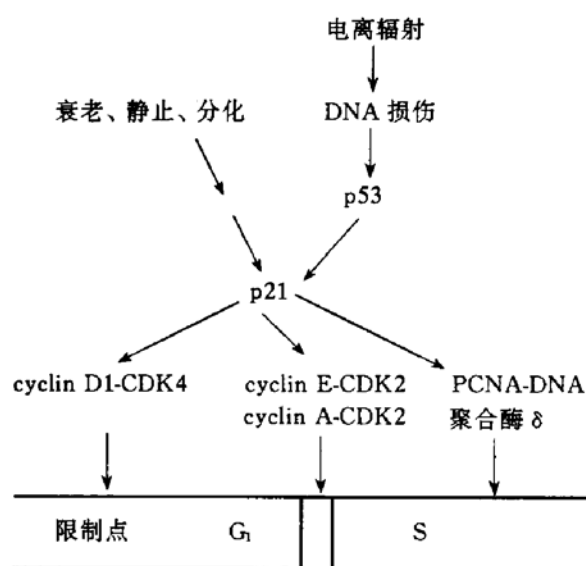


图 1 细胞内 p21 作用方式

p21 蛋白从发现至今仅几年时间, 对其结构和功能的研究表明, 该蛋白在细胞生命活动中发挥着重要的作用. p21 的作用方式见图 1, 当基因组 DNA 损伤时, 监视基因组完整性的 p53 活化, 进而活化 p21 蛋白通过抑制 cyclin E-CDK2 使细胞周期阻断在 G₁ 期; 通过结合 PCNA 及 DNA 聚合酶 δ 直接抑制 DNA 合成. 静止期细胞、老化及分化细胞通过其他不依赖 p53 的方式调控 p21 表达, 进而调节细胞周期及 DNA 复制. 目前对 p21 与衰老、分化相关已确信无疑, 但其是否在老化、分化中发挥关键作用还有待确证. p21 在细胞老化、分化中的调节对细胞发育有重要的意义, 在抑制肿瘤

细胞恶性增殖的研究中有重要的实际意义, 对完成功能的 p21 如何消除也有待探讨. 总之, 对 p21 的深入研究, 将有利于对细胞增殖、分化及衰老的认识.

参 考 文 献

- 1 Xiong Y, Zhang H, Beach D. *Cell*, 1992; **71**: 505
- 2 Harper J W, Adami G R, Wei N *et al.* *Cell*, 1993; **75**: 805
- 3 Zhang H. *Genes & Development*, 1994; **8**: 1750
- 4 El-Deiry W S, Tokino T, Velculescu V E *et al.* *Cell*, 1993; **75**: 817
- 5 Dulic V, Kaufmann W K, Wilson S J *et al.* *Cell*, 1994; **76**: 1013
- 6 Leonardo A D, Linke S P, Clarkin K *et al.* *Gene & Development*, 1994; **8**: 2540
- 7 Kastan M B, Canman C E, Leonard C J. *Cancer and Metastasis Reviews*, 1995; **14**: 3
- 8 Skapek S X, Rhee J, Spicer D B *et al.* *Science*, 1995; **267**: 1022
- 9 Zhang W, Grasso L, McClain C D *et al.* *Cancer Res*, 1995; **55**: 668
- 10 Waga S, Hannon G J, Beach D *et al.*, *Nature*, 1994; **369**: 574
- 11 Chen J, Jackson P K, Kirschner M W *et al.* *Nature*, 1995; **374**: 386
- 12 Haley O, Novitch B G, Spicer D B *et al.* *Science*, 1995; **267**: 1018
- 13 Parker S B, Jackson P K, Kirschner M W. *Science*, 1995; **267**: 1024

- 14 Noda A, Ning Y, Venable S F *et al.* *Experiment Cell Res*, 1994; **211**: 90
- 15 Slichenmyer W J, Nelson W G, Slebos R J *et al.* *Cancer Res*, 1993; **53**: 4164

Multiple Functional p21 Related to Cell Proliferation. Meng Xiangbing, Ye Changqing (*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract p21 is a new discovered cell cycle control element, a CDK inhibitor. p15, p16, p27 are also CDK inhibitors. They can bind with cyclin-CDK complexes and inhibit their kinase activity. These CDK inhibitors play roles in G₁ restriction point and G₁/S checkpoint. Furthermore, p21 gene can be regulated by wild type p53. p21 plays a role in p53 mediated G₁ arrest which is induced by DNA damage. Expression of p21 gene is 10~20 times higher in senescence cells than in proliferating cells. It begins to express when muscle cells start differentiation. These results demonstrate that p21 plays a major role in cell proliferation, differentiation and senescence.

Key words p21, cell cycle control, differentiation, senescence

神经营养素脑内功能及其表达调节*

周安武 郭 君 杜雨苍

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 神经营养素 (neurotrophin, NT) 是与神经生长因子同源的一类神经营养因子, 它们在神经系统的分化和发育过程中起着重要作用, 并具有治疗某些脑疾病的潜在应用价值. 文章较全面地阐述了 NT 在脑内既相互交叉又有各自特性的生理功能, 并系统地介绍了脑内 NT 表达调节方面的研究进展.

关键词 神经营养素, 脑内功能, 表达调节