

核基质与瘤基因、抑瘤基因

钟叔平

(汕头大学医学院生物化学教研室, 汕头 515031)

核基质是真核细胞经高盐和 DNase I 处理后的一种残留的核网络结构, 基因组中 DNA 与核基质结合区为 MAR (matrix attach region). 核基质的功能十分复杂, 它与 DNA 复制、RNA 转录和修饰、基因表达调控等密切相关. 核基质与肿瘤的关系也十分密切, 一些与肿瘤发生相关的病毒、瘤基因和抑瘤基因蛋白是核基质蛋白或核基质结合蛋白, 瘤基因和抑瘤基因产物是在核基质结构上发挥作用. SV-40 T 与 p53、HPV E7 与 pRb、pRb 与 c-Myc、p53 与 WAF1/cip1 等的相互作用也是在核基质网络上进行. 本文仅就肿瘤发生的相关问题: 核基质与瘤基因和抑瘤基因的关系, 将近年的研究进展加以综述, 试图唤起人们的关注.

1 瘤基因

研究表明: v-Myc 和 c-Myc 蛋白与核结合有三种类型: a. 低盐和高盐抽提去除 DNA 和 RNA 的细胞残核保留了大部分 (60%~90%) 的 Myc 蛋白; b. 完整的细胞核在低盐缓冲液中经核酸酶消化 DNA 可释放 1% 的 Myc 蛋白; c. 用低盐和去污剂抽提却得不到 10% 的 Myc 蛋白. 显然, 用制备核基质的高盐方法所得的抽提物含有大量的 Myc 蛋白, 这些 Myc 蛋白与单链和双链 DNA 具有亲和性. 经盐和核酸酶抽提的细胞残核用抗 Myc 蛋白抗体的荧光分析显示: Myc 蛋白是与复杂的残留核结构——核基质相结合 (Eisenman RN, 1985). 用分离的 HL-60 核基质与 ^{32}P 末端标记的 c-myc 片段进行结合的实验表明: c-myc 瘤基因的 MAR 可与 HL-60 细胞株的核基质蛋白结合 (Chou RH, 1990). 经不同的方法抽提核

基质后, Myc 蛋白仍与核基质牢固结合. 尽管在细胞周期中 c-Myc 蛋白水平无明显的改变, 但是, 这种核基质结合的 c-Myc 蛋白在 S 期比 G2 期更高; 免疫电镜也证实 c-Myc 的信号在核基质中比在未分步处理的细胞核中更强, c-Myc 蛋白与核基质网络更易结合^[1]. 以上资料说明: c-Myc 瘤蛋白是一种核基质结合蛋白, 它与细胞核基质的结合与其功能密切相关.

2 抑瘤基因

研究得较多的抑瘤基因是 p53、pRb、p21/WAF1 基因, 它们的产物都是细胞核基质结合蛋白, 其共同点是参与细胞周期和细胞生长的调节, 三者协同作用, 有效地控制细胞生长.

2.1 p53

制备 Meth-A (甲基胆蒽转化细胞) 或 SV-40 转化细胞核质、染色质和核基质, 分析 p53 与这三种细胞核亚组分的关系时发现: 在 Meth-A 细胞中, p53 在代谢上变得稳定; 在 SV-40 转化细胞中, p53 与 T 抗原形成复合物后也显稳定, p53 均与 Meth-A 和 SV-40 转化细胞染色质和核基质结合. 进一步分析了 p53 与 DNA 相互作用的结果表明: mt (mutant type) p53 和 wt (wild type) p53 以及重组后的杆状病毒在昆虫细胞中表达的 wt p53 均可与 λ DNA 片段结合. p53 与 λ DNA 相互作用的特征提示: p53 也应与核基质或 MAR-DNA 结合. 根据以上结果, 提出一种模型: p53 通过与 MAR 元件结合并参与程序性的 DNA 复

制和基因表达的调节 (Weibker S N, 1992). 另外, wt p53 和 mt p53 可能对复制区 MAR-DNA 结合产生不同的作用, 它一方面抑制 wt p53 的活性, 另一方面又引起了 mt p53 的活化. mt p53 以类似 wt p53 蛋白的方式与 MAR-DNA 结合, 但是这种 mt p53 缺乏与 SV-40 DNA 的 GGGCGG 相同序列结合的能力 (Bargonetti J, 1991). 因此, p53 突变并不影响 DNA 结合, 而是有选择地干扰了它与个别 DNA 元件的结合. mt p53 与 MAR DNA 的结合具有特异性、高亲和性、和所涉及的 MAR/SAR DNA 与 mt p53 的结合区域. mt p53 的 MAR/SAR (scaffold attach region) 的结合区定位在两部分: 高突变的核心区 and C 端的 60 个氨基酸残基部位, 并带有非特异性 DNA 结合区和寡聚区. mt p53 与 MAR/SAR 元件的相互作用可能干扰了核内的重要事件, 因此产生了多效性的致癌作用^[2]. 这种作用是因为 MAR 元件构成了染色质结构与功能的重要的更高层次的调节元件, 以致改变肿瘤细胞的表现. 或许, mt p53 是一类新的瘤基因的代表, 它通过长距离地改变或干扰染色质结构和功能来发挥作用^[3].

2.2 pRb

Mancini 等^[4]研究表明: 一部分低磷酸化的 pRb 只是在 G1 早期与核基质结合, 肿瘤细胞中的 mt pRb 却不能与核基质结合, 而重组 Rb 的细胞含有大量的核基质结合的 pRb 蛋白; pRb 广泛地分布在整個核基质内, 尤其是浓集在核周和核仁残骸上, 核基质的纤维颗粒上却检测不到 pRb. 他们筛选了潜在的 pRb 结合蛋白的表达文库, 证明有几个克隆是核基质部分的, 特别是核衬层蛋白 Lamin A 和 C 在体外可与 pRb 结合. 因此, 他们提出, pRb 与核基质的相互作用对它调节细胞周期进程的功能来说是重要的. 与 pRb 蛋白羧基末端相互作用的多个细胞蛋白相反, Durfee T 等 (1994) 用双杂交系统筛选, 仅分离到与氨基末端片段相关的一个克隆. 这个基因编码一个新的核蛋白, 其表观分子质量为 84 ku. 与

pRb 相似, 84 ku 核蛋白在检测的组织 and 整个细胞周期中均表达. 实验还证明: 84 ku 蛋白在亚核区域浓集, 并参与 RNA 加工, 与许多参与转录、拼接机制的蛋白相似, p84 是一种核基质的成分. 体内、体外的实验证明: p84 优先和具有功能活性的低磷酸化形式的 pRb 结合.

2.3 p21/WAF1

LEC 大鼠肝损伤与肝脏铜的异常累积有关. 在 LEC 大鼠肝细胞中, p53 和 p21/WAF1 的表达明显增高并显示较低生长活性. 用低铜喂养 LEC 大鼠可明显地降低 p53 和 p21/WAF1 的表达; 在用高铜喂养的大鼠肝细胞核和核基质做免疫印迹分析时发现: p21/WAF1 蛋白在 LEC 大鼠肝的核基质中清楚地检出, 核基质部分可富集 p21/WAF1 约 200 倍. 这表明: 低铜可大大地降低 p21/WAF1 的表达. p21/WAF1 是一种核基质蛋白或核基质相关蛋白^[5]. 不同剂量的铜饲喂的 LEC 大鼠诱导 p53 和 p21/waf1 表达的不同步升高或降低, 提示这两种抑瘤蛋白在核基质结构上协同发生作用 (Sawada N, 1996). 这是目前关于 p21/WAF1 与核基质关系仅有的报道.

综上所述, 我们可以看出, 与肿瘤发生密切相关的瘤基因产物——瘤蛋白是核基质结合蛋白, c-Myc 瘤蛋白是在核基质结构上起作用. 在细胞周期的不同阶段, c-Myc 瘤蛋白与核基质的结合量有所改变. 三种主要的抑瘤蛋白 p53、pRb、p21 也属核基质结合蛋白. 有趣的是, p53 与 SV-40 T 抗原、pRb 与 HPV E7、pRb 与 c-Myc、p53 与 p21/waf1 之间的相互作用也都位于核基质. 核基质在细胞转化和肿瘤发生的 DNA 复制、RNA 转录、基因调控过程中起着—个“操作台”的作用. 它把肿瘤病毒蛋白、瘤蛋白和抑瘤蛋白富集在核基质上, 从而提高了相互间的作用效率.

致谢 感谢湖南医科大学姚开泰教授对本文的指导.

(下转第 67 页, Continued on page 67)

菌肽 CM4 对 K562 癌细胞核染色质 DNA 有明显的断裂作用, 而对正常人白细胞核染色质则没有断裂作用, 说明抗菌肽对靶细胞有较强的选择性, 其抗癌作用也并非只作用于细胞质膜, 而是一个十分复杂的过程. 有关抗菌肽对癌细胞核染色质 DNA 的断裂作用有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Hanawalt P C, Friedberg E C, Fox C F *et al.* DNA repair mechanisms. New York: Academic Press, 1978. 465~ 468
- 2 Ostling O, Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, **123** (1): 291~ 298
- 3 Singh N P, McCoy M T, Tice R R *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exptl Cell Res*, 1988, **175** (1): 184~ 191
- 4 秦椿华, 沈建英, 黄仕和等. DNA 断裂检测方法-单细胞凝胶电泳法. *生物化学与生物物理进展*, 1995, **22** (6): 517~ 520
- 5 罗 琰, 孙志贤, 夏寿萱等. 荧光晕法在细胞染色质结构状态检测中的应用. *实验生物学报*, 1995, **28** (1): 37~ 39
- 6 戴祝英, 张双全. γ -射线及大肠杆菌诱导蓖麻蚕产生抗菌物质的研究. *南京师大学报 (自然科学版)*, 1988, (1): 88~ 93
- 7 屈贤铭, 吴克佐, 邱雪贞等. 经聚肌胞核苷酸诱导家蚕蛹血淋巴中六种抗菌肽的分离纯化. *生物化学和生物物理学报*, 1986, **18** (3): 284~ 292
- 8 Boman H G. Antibacterial peptides: key component deduced in immunity. *Cell*, 1991, **65**: 205~ 207
- 9 张双全, 贾红武, 戴祝英. 家蚕抗菌肽对癌细胞的杀伤作用及其超微结构的观察. *生物化学和生物物理进展*, 1997, **24** (2): 62~ 67
- 10 贾红武, 张双全, 戴祝英. 抗菌肽 CM4 抗 K562 癌细胞的超微结构观察. *动物学研究*, 1997, **18** (2): 258~ 264

Studies on the Action of the CM4-ABP anti K562 Cancer Cells by SCGE. WANG Fang, ZHANG Shuang-quan, DAI Zhu-ying (*Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China*).

Abstract The single cell gel electrophoresis (SCGE), also called comet assay, is a simple, rapid and sensitive biochemical technique for detecting DNA single strand breakage of the mammalian cells. In order to study the anti-cancer mechanism of CM4-component of the anti-bacterial peptides (CM4-ABP), the SCGE was used to observe the chromatin DNA breakage action of the K562 cancer cells comparing with the leucocytes of normal human under treating with CM4-ABP. Using the fluorescent microscopy, it is observed the chromatin DNA cleavage of the K562 cancer cells treated with CM4-ABP forms bright fluorescent head and comet like tail; On the contrary, the normal human leucocytes treated and the K562 cancer cells untreated with CM4-ABP show intact, round nuclei, no comet tails. The analysis of comet assay showed that the average ratio of the K562 nuclei cleavage is 73.62% ($P < 0.001$). The results showed that the CM4-ABP can cause the chromatin DNA of the K562 cells damaged, but it has no normal human leucocytes.

Key words single cell gel electrophoresis, anti-bacterial peptide, K562 cancer cell, chromatin DNA

(上接第 8 页, Continued from page 8)

参 考 文 献

- 1 Waitz W, Loide P. Cell cycle dependent association of c-myc protein with the nuclear matrix. *Oncogene*, 1991, **6** (1): 29~ 35
- 2 Muller B F, Paulsen O, Deppert W. Specific binding of MAR/SAR DNA-elements by mutant p53. *Oncogene*, 1996, **12** (9): 1941~ 1952
- 3 Deppert W. Binding of MAR-DNA elements by mutant p53:

possible implication for its oncogenic functions. *J Cell Biochem*, 1996, **62** (2): 172~ 180

- 4 Mancini M A, Shan B, Nickerson J A *et al.* The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent nuclear matrix-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (1): 418~ 422
- 5 Obata H, Sawada N, Isomura H *et al.* Abnormal accumulation of copper in LEC rat liver induces expression of p53 and nuclear matrix-bound p21 waf1/cip1. *Carcinogenesis*, 1996, **17** (10): 2157~ 2161