

*nov*o purine nucleotide synthesis on human chromosome 4 are closely linked and divergently transcribed. *J Biol Chem*, 1994, **269** (7): 5313~ 5321

- 19 Smith J L, Zaluzec E J, Wery J-P *et al.* Structure of the allosteric regulatory enzyme of purine biosynthesis. *Science*, 1994, **264** (5164): 1427~ 1433

**Cephalosporin Acylases.** LI Yong, WANG Er-duo ( *State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China* ).

**Abstract** Cephalosporin acylases ( CA ) are enzymes that catalyze hydrolysis of the acyl side chain of cephalosporin C ( CPC ) or glutaryl 7- cephalosporanic acid ( GL-7ACA ) to yield 7- aminocephalosporanic acid ( 7-ACA ), the most

important compound in the production of many semisynthetic cephalosporin antibiotics. According to their substrates, cephalosporin acylases can be classified into two classes: CPC acylase and GL-7ACA acylase. CA was divided into five types on the basis of their homologies and mass of molecules, and the structures of their genes; some properties of these enzymes were discussed. Comparison of N-terminal nucleophile hydrolases and CA shows that CA may belong to N-terminal nucleophile hydrolases family. Thus it makes easy to understand further their physiological roles.

**Key words** cephalosporin acylases, 7- aminocephalosporinic acid, N-terminal nucleophile hydrolases

## 癌症治疗的目标

### ——抑制端粒酶的策略\*

郑晓飞 王升启 孙志贤

( 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850 )

**摘要** 端粒酶与癌症密切相关, 抑制端粒酶的活性可以抑制癌细胞的生长. 反义核酸、核酶、细胞分化剂、逆转录酶抑制剂和鸟嘌呤四联体等都可以在不同程度上抑制端粒酶活性. 在癌症治疗中具有很大应用潜力.

**关键词** 端粒酶, 癌症, 抑制剂

**学科分类号** R733

端粒是真核细胞染色体末端的重复 DNA 序列, 其生物学功能是防止染色体 DNA 降解、末端融合、非正常重组和染色体的缺失<sup>[1]</sup>. 端粒由端粒酶合成. 近来的研究表明在 85% ~ 95% 的人肿瘤细胞中可以检测到端粒酶的活性<sup>[2,3]</sup>, 而在正常体细胞中除生殖细胞和造血干细胞等极少数细胞中存在端粒酶活性外, 均检测不到端粒酶活性, 这表明端粒酶

在维持肿瘤细胞的增殖中起着重要作用. 抑制端粒酶的活性有可能抑制肿瘤的生长, 因而端粒酶被认为是潜在的肿瘤治疗靶点. 本文针对端粒酶 RNA 组分的反义核酸抑制剂、核酶、小分子化合物抑制剂以及诱导细胞分化影响端粒酶表达的药物加以介绍.

\* 中国博士后科学基金资助项目 (962004).

收稿日期: 1997-04-01, 修回日期: 1997-07-23

## 1 反义核酸对端粒酶活性的抑制

端粒酶是由蛋白质和 RNA 构成的蛋白复合体, 其 RNA 组分起到合成端粒的模板作用, 与模板区互补的反义寡核苷酸可以抑制端粒酶的活性, 成为端粒酶的抑制剂. Norton 等<sup>[4]</sup>针对端粒酶 RNA 模板区设计合成了不同长度的反义硫代寡核苷酸 (PS) 和肽核酸 (PNA), PS 和 PNA 对细胞抽提物中的端粒酶和细胞内的端粒酶均有不同程度的抑制效果. 抑制效果严格取决于人端粒酶 RNA 组分的模板区. 作者实验室也设计了五条反义核酸, 对端粒酶均有不同程度的抑制作用. DNA 寡核苷酸同样可以抑制端粒酶活性, 但需要较长的寡核苷酸或较高的浓度. PNA 作为寡核苷酸提高了退火温度, 并且抗蛋白酶和核酸酶的降解. 在用量上所需 PNA 浓度更低; 在特异性上, PNA 较 PS 有更好的特异性. 在目前所使用的 DNA 和修饰的反义核酸中, PNA 具有更好的亲和力、特异性结合能力和抗降解能力, 很可能发展成为新型的反义核酸药物, 为癌症的治疗作出贡献.

等<sup>[5]</sup>设计了一种锤头型核酶 (TeloRZ) 抑制端粒酶的活性做为抗癌手段. 制备了 HepG2 细胞中一段包含端粒酶 RNA 组分模板区的 157 个碱基的核酶底物; 用构建的核酶 (TeloRZ) 5'-GUUAGGGUACUGAAGAGUCCGUGAGGACGAAACAAAAAUG-3' 催化 RNA 底物产生 104 和 53 个碱基的产物, 切割的程度依赖于核酶与 RNA 底物的比值, 并与保温时间有关, 37℃保温 12 h, 有 80% 的底物 RNA 被切割. 将核酶 TeloRZ 加入 HepG2 和 Huh-7 细胞提取物中, 均可抑制端粒酶的活性. 端粒酶对维持许多癌细胞的增殖是必需的, 而大多数正常细胞没有端粒酶活性, 降解端粒酶 RNA 组分的核酶有希望成为副作用小的广谱抗癌药物.

## 3 逆转录酶抑制剂对端粒酶活性的抑制

端粒酶是合成真核细胞端粒 DNA 的一种特殊逆转录酶, 逆转录酶抑制剂能否抑制端粒酶的活性呢? Yegorov 等<sup>[6]</sup>实验表明逆转录酶抑制剂 AZT (叠氮胸苷) 和 Carbovir 可以抑制端粒酶的活性. 在 AZT 和 Carbovir 存在下, 鼠胚成纤维细胞可自发地转化形成无端粒酶的细胞克隆, 细胞增殖逐渐减缓, 表现出类似衰老的过程. 但这个过程是可逆的, 去除抑制剂后, 细胞仍能进行有丝分裂. 但鼠成纤维细胞在 Carbovir 中进一步培养也可以获得有高水平端粒酶活性的抗性细胞.

Blackburn 等<sup>[7]</sup>对逆转录酶抑制剂是否干扰永生的 B 细胞系 JY616 和 T 细胞系 Jurkat E6-1 的端粒长度和细胞生长速率进行了研究. 研究发现经过几周的培养 ddG 使细胞的端粒缩短, 随后细胞稳定维持在缩短的状态, 进一步培养 ddG 对细胞的分裂速率和细胞形态无显著影响. AZT 也可以引起部分 JY616 和 Jurkat E6-1 细胞的端粒缩短. 在体外 ddG 和 AZT 均可抑制 JY616 和 Jurkat E6-1 细胞端粒酶活性. 端粒长度的缩短可能是由抑制剂对端粒酶活性的抑制造成的. 因此逆转录酶的抑制剂通过抑制端粒酶这一机制也可能成为治疗癌

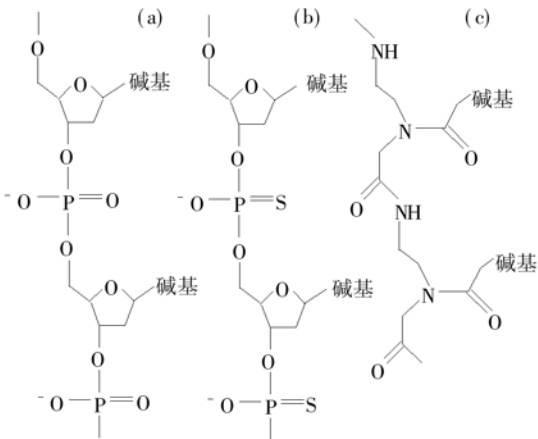


图 1 DNA (a), PS (b) 和 PNA (c) 化学结构

## 2 核酶对端粒酶活性的抑制

核酶是具有特殊核酸内切酶活性的小分子 RNA. 针对端粒酶的 RNA 组分, Kanazawa

症的化疗药物。

#### 4 细胞分化剂对端粒酶活性的影响

人早幼粒白血病 HL60 细胞是高水平表达端粒酶的永生细胞。Xu 等<sup>[8]</sup>用细胞分化剂全反式视黄酸 (ATRA) 和 1 $\alpha$ , 25 二羟维生素 D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) 分别诱导 HL60 细胞分化为 CD11b<sup>+</sup> 成熟的粒细胞和单核细胞。研究发现用分化剂处理 72~120 h 的分化 CD11b<sup>+</sup> 细胞, 端粒酶活性明显受到抑制。相反 VD<sub>3</sub> 处理的 CD11b<sup>-</sup> HL60 细胞和 ATRA 处理的人红白血病细胞 K562 不分化, 仍保持高水平的端粒酶活性。这表明端粒酶活性的抑制与 HL60 细胞分化有关, 白血病细胞同人正常细胞一样有一个通过细胞分化激活的抑制端粒酶活性的机制, 从而导致端粒酶活性的抑制。Savoysky 等<sup>[9]</sup>用 ATRA 和 VD<sub>3</sub> 诱导 HL60 细胞分化发现端粒酶的抑制是分化过程中的早期事件, 不依赖生长抑制过程。这一模型可以用来研究端粒酶活性的调节机制, 同时也表明不仅可以直接抑制端粒酶的活性, 也可以通过细胞调节解除端粒酶的活性, 这为通过端粒酶治疗癌症又增添了一条新思路。

#### 5 鸟嘌呤四联体对端粒酶活性的抑制

端粒 DNA 中广泛分布的富含鸟嘌呤保守序列可以采取非 Watson-Crick 连结, 形成鸟嘌呤四联体。这种四联体结构由在正方形平面排列的四个鸟嘌呤构成, 中间配位结合一个一价金属离子, 其中每个鸟嘌呤都作为碱基对氢键的供体和受体, 连续的 G 四联体的互相堆积可形成折叠结构。除了在两条 DNA 分子间形成 G 四联体外, 还可以在单链 DNA 分子中形成。Zahler 等<sup>[10]</sup>研究了 G 四联体对 *Oxytricha nova* 端粒酶的影响, 发现 G 四联体结构可以抑制端粒酶的活性。端粒酶引物不需要任何折叠, 端粒 DNA 折叠形成 G 四联体结构影响端粒在体外的延伸。在体内可能是端粒酶延伸的反向调节因子。调节途径可能有两个: 一是直接抑制端粒酶结合端粒序列; 一是

改变端粒引物与端粒酶的解离速度。通过向癌细胞中导入富含鸟嘌呤且能形成四联体结构的寡核苷酸不失为一种抑制癌细胞生长的研究方法。

由于端粒酶在细胞内有重要作用及与癌症有着密切的关系, 对端粒酶的研究将愈来愈受到重视。抑制端粒酶活性的研究虽然才刚刚起步, 但由于端粒酶自身的特殊性, 在反义核酸、核酶及小分子抑制剂方面都取得了可喜的进展。随着对端粒酶结构、作用机制、表达调控和端粒酶与癌症关系的深入研究, 通过抑制端粒酶的活性抑制癌细胞的生长会有很大的潜力, 有望成为今后治疗癌症的一种有效广谱的手段。

#### 参 考 文 献

- 1 Blackburn E H. Telomeres. Trends Biol Sci, 1991, 16 (10): 378~381
- 2 Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science, 1994, 266 (5193): 2011~2015
- 3 Shay J W, Wright W E. Telomerase activity in human cancer. Curr Opin Oncol, 1996, 8 (1): 66~71
- 4 Norton J C, Piatyszek M A, Wright W E *et al.* Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids. Nature Biotech, 1996, 14 (5): 615~619
- 5 Kanazawa Y, Ohkawa K, Ueda K *et al.* Hammerhead ribozyme mediated inhibition of telomerase activity in extracts of human hepatocellular carcinoma cells. Biochem Biophys Res Comm, 1996, 225 (2): 570~576
- 6 Yegorov Y, Chernov D N, Akimov S S *et al.* Reverse transcriptase inhibitors suppress telomerase function and induce senescence-like processes in cultured mouse fibroblasts. FEBS Letter, 1996, 389 (1): 115~118
- 7 Strahl C, Blackburn E H. Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. Mol Cell Biol, 1996, 16 (1): 53~65
- 8 Xu D, Gruber A, Peterson C *et al.* Suppression of telomerase activity in HL60 cells after treatment with differentiating agents. Leukemia, 1996, 10 (9): 1354~1357
- 9 Savoysky E, Yoshida K, Ohtomo T *et al.* Down regulation of telomerase activity is an early event in the differentiation of HL60 cells. Biochem Biophys Res Comm, 1996, 226 (2): 329~334
- 10 Zahler A M, Williamson J R, Cech T R *et al.* Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. Nature,

1991, 350 (6320): 718-720

**A Target for Cancer Therapy: Strategies for Telomerase Inhibition.** ZHENG Xiao-fei, WANG Sheng-qi, SUN Zhi-xian (*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

**Abstract** Telomerase activity is associated with

cancer. Telomerase inhibition is a strategy for suppression of tumor growth. The progress in inhibition of telomerase activity by peptide nucleic acids, ribozyme, differentiating agents, reverse transcriptase inhibitors and G-quartet DNA structures are reviewed.

**Key words** telomerase, cancer, inhibitor

## PH 结构域的结构和功能研究进展\*

王吉村 药立波

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032)

**摘要** PH 结构域是一种存在于多种信号转导蛋白和细胞骨架蛋白中的大约由 120 个氨基酸组成的功能性区域. 不同蛋白质中的 PH 结构域在一级结构上的同源性并不很高, 但其空间结构中肽链主链的折叠方式基本相同, 而主要差别存在于其中的三个可变环上, 含有这些环的侧面带有正电荷, 被认为是其配体的结合部位. 目前已知的配体有 G 蛋白  $\beta\gamma$  亚单位 (G $\beta\gamma$ )、蛋白激酶 C (PKC) 和磷脂酰肌醇衍生物 (PIP<sub>2</sub> 或 IP<sub>3</sub>), 所以 PH 结构域可能介导信号蛋白与这些分子间的相互作用, 参与细胞信号转导网络的构成.

**关键词** PH 结构域, 信号转导, 蛋白激酶 C, G 蛋白, 磷脂酰肌醇衍生物

**学科分类号** Q71

PH 结构域是一种存在于多种信号蛋白和细胞骨架相关蛋白中的大约由 120 个氨基酸组成的功能性区域. 由于它们与血小板-白细胞 C 激酶底物 (pleckstrin) 中的一段重复序列具有同源性, 所以称为 pleckstrin homology (PH) 结构域. 这一同源区的频繁出现是 Mayer 等<sup>[1]</sup>和 Haslam 等<sup>[2]</sup>分别于 1993 年在进行计算机基因库资料分析时发现的. 目前已发现的含有 PH 结构域的蛋白质有 90 余种, 主要为一些参与信号传递的分子. PH 结构域在信号转导分子中的广泛分布提示, PH 结构域可能与 SH2 和 SH3 结构域的功能类似, 在细胞信号转导网络中介导信号分子间的相互作用.

不同蛋白质中的 PH 结构域在一级结构上的同源性并不很高, 但是对其空间结构的研究发现, 其肽链主链折叠方式基本相同, 这样就

在结构上证实了 PH 结构域是一真正的功能性单位.

### 1 PH 结构域的结构特点

PH 结构域基本上由两个反向平行的  $\beta$  片层结构和一个长的 C 端  $\alpha$  螺旋构成. 一组  $\beta$  片层结构由  $\beta_1$ 、 $\beta_2$ 、 $\beta_3$  和  $\beta_4$  四条链反向平行组成, 另一组  $\beta$  片层结构由  $\beta_5$ 、 $\beta_6$  和  $\beta_7$  三条链反向平行组成.  $\beta_1/\beta_2$ 、 $\beta_3/\beta_4$  和  $\beta_6/\beta_7$  间各有一个环结构 (图 1). 这两组  $\beta$  片层结构在空间上近似垂直, 曾有人把这一结构形容为“ $\beta$  桶”, 但 Ferguson 等<sup>[3,4]</sup>认为, 这些靠氢键连接起来的结构不可能围成一个桶形, 而是相互包裹形成一个三明治样结构. 将几种蛋白质的

\* 国家自然科学基金资助课题 (39740020).

收稿日期: 1997-04-09, 修回日期: 1997-07-18