

抗癌基因——p53 和 Rb 基因甲基化的研究进展

杨和平 周爱儒 汤 健

(北京医科大学心肺内分泌研究室, 北京 100083)

摘要 介绍 p53 和 Rb 基因甲基化研究的最新进展. CpG 序列是 DNA 甲基化和基因突变的频发位点. p53 和 Rb 基因的 CpG 序列易发生甲基化. 其高度甲基化可能与基因功能失活有关, 从而丧失抑制细胞增殖的功能, 可能为肿瘤等发生的重要原因之一.

关键词 抗癌基因, 视网膜母细胞瘤易感基因, p53, DNA 甲基化

p53 基因含有 11 个外显子和 10 个内含子; 其突变的频发部位为外显子 5 到 8, 被称为突变热点, 约相当于编码子 132 到 281 的区域; 突变的形式有双等位基因的突变和单等位基因位点的突变或丢失; 在不同的肿瘤甚至同一种肿瘤中 p53 基因的改变呈多种形式, 这些突变常常是错义突变 (mis-sense)^[1-3]. 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^[4]. 但上述 p53 和 Rb 基因异常亦不能对所有与其相关的肿瘤发生给予满意的解释, 如一些视网膜母细胞瘤的 Rb 序列并没有改变. 由于一些肿瘤等发生伴有 p53 和 Rb 基因的高度甲基化 (hypermethylation), 因此推测 p53 和 Rb 基因甲基化可能为肿瘤等发生的重要原因之一.

1 p53 基因甲基化

1.1 p53 基因甲基化序列专一性

在真核生物中, 5-甲基胞嘧啶主要出现在 5'-CpG-3' 序列^[5]. 人类 1% 以上的碱基是 5-甲基胞嘧啶. 5-甲基胞嘧啶的脱氨作用产生胸腺嘧啶, 它不易被识别并校正; 特定部位 5-甲基胞嘧啶的脱氨作用, 将在 DNA 分子中导致一种可遗传的变化 (GC 向 AT 的跃进), 而这必将影响到分化作用. 据估计 30%—40% 的点突变发生在 CpG 二核苷酸序列^[6], 约 90% 的点突变由 C 变为 T, 或者由 G 变为 A. CpG 序列是

p53 基因突变频发部位, 约 40% 的点突变发生在 CpG 序列^[7], CpG 甲基化能增加其突变的发生, 因为 5-甲基胞嘧啶可通过脱氨作用变为 T.

1.2 p53 基因甲基化的检测方法

前述 p53 基因甲基化易发生的部位是 CpG 序列, 而能切割 5'-CpG-3' 部位的限制性核酸内切酶有 Hpa II (5'-C↓CGG-3'), Msp I (5'-C↓CGG-3'), Hha I (5'-GCG↓C-3'), Xho I (5'-C↓TCGAG-3'), Ava I (5'-C↓PyCGPuG-3'), Sal I (5'-G↓TCGAC-3') 和 Sma I (5'-CCC↓GGG-3'). 如果 CpG 序列中的 C 被甲基化, 则这些酶中的大部分便不能识别同样的部位. 因此, 这些酶可被用来检查甲基化作用. 其中在 p53 DNA 甲基化研究使用最广泛的内切酶是 Hpa II 和 Msp I^[8], 这两种酶识别顺序和切割位点都是 $\begin{smallmatrix} \text{CCGG} \\ \text{GGCC} \end{smallmatrix}$, 但如第二位胞嘧啶发生甲基化后, Hpa II 就不能水解, 而不影响 Msp I 水解, 通过比较两者的酶切带型即可直接了解第二位胞嘧啶是否发生甲基化.

1.3 p53 基因甲基化与肿瘤发生

有研究报道在直肠和脑肿瘤中发现 p53 基因的密码子 175CGC 变为 CAC, 编码蛋白由 Arg 变为 His; 非编码链的 5-甲基胞嘧啶变为

T. Nigro^[7]等用基因定位方法显示:在脑瘤、乳腺癌和直肠癌中, p53 基因的密码子 273 含 CpG 序列, 常见的改变是 CGT 变为 CAT, 导致 Arg 变为 His. 其次为 CGT 变为 TAT, 导致 Arg 变为 Cys. 而密码子 273 中 CpG 和侧翼的密码子 267, 282 和 283 则是 p53 基因发生甲基化的序列^[8].

肺癌组织 p53 基因突变频发位点也是 CpG 二核苷酸序列. 发现小细胞肺癌中最常见的核苷酸改变是 G : C 为 T : A 取代, 其次为 A : T 变为 G : C^[9]; 在非小细胞肺癌中 p53 突变由 G : C 为 T : A 的频率高达 59.3%. 由于 p53 基因的甲基化易发生的序列为 CpG, CpG 发生甲基化后可增加胞嘧啶残基突变的可能性. 因此, 5-甲基胞嘧啶可能起内源性诱变剂 (mutagen) 和致癌因子 (carcinogen) 的作用, 它为进一步探讨 5-甲基胞嘧啶如何引起 p53 基因突变而导致肿瘤发生提出了新的课题.

1.4 p53 基因的甲基化与动脉粥样硬化

William 等^[8]用甲基化不敏感的内切酶 Msp I 和甲基化敏感的内切酶 Hpa I 消化白细胞 DNA, 检查 LDL 受体基因和 p53 基因的甲基化状态. Msp I 消化的 DNA 出现小分子量的 DNA 片段, Hpa I 消化的 DNA 出现一条高分子量的带型 (约 13.5kb), 这表明 CpG 序列出现了明显的甲基化. Lubbert 等用 Msp I 和 Hpa I 消化白细胞 DNA, 以 p53 cDNA 作探针, 结果显示 5 个酶切位点出现甲基化. William 等^[8]用序列分析方法发现: 在 LDL 受体基因中, 构成密码子 407 和 408 的 CpG 序列以及密码子 409 和 410 序列都有 DNA 甲基化. Leiterdorf 等发现家族性高胆固醇血症的家系中有一例出现密码子 407 和 408 的 CpG 序列由 G 变为 T, 氨基酸由 Val 变为 Met. 我们对家兔动脉粥样硬化斑块组织的 DNA 用 Hpa I 和 Msp I 酶切, 以 p53 cDNA 作探针, 注意到用 Hpa I 酶切的斑块组织中部分 CCGG 序列酶切位点消失, 这说明在斑块组织的 p53 基因中, 部分 CCGG 序列中的第二位胞嘧啶 C 发生了甲基化 (待发表).

前述 p53 基因中含有甲基化的 CpG 二核苷酸序列, 并为一些肿瘤的突变热点^[9]; 动脉粥样硬化发生中也有 p53 基因甲基化; 肿瘤与动脉粥样硬化的病理变化都出现细胞增殖, 而 p53 基因在调节细胞增殖方面起重要作用^[10]. 因此 p53 基因的甲基化不仅在肿瘤, 而且在动脉粥样硬化发病机理研究中具有重要的意义.

2 Rb 基因的甲基化

2.1 Rb 基因 5' 端结构特点

人们发现 5-甲基胞嘧啶在基因水平的分布是不随机分布的, 在基因的 5' 端和 3' 端丰富. 对 Rb 基因结构分析表明: 位于其 5' 端从 +13 到 +83 之间 bp 的核苷酸序列对 Rb 基因的转录是非常重要的. 该 70 bp 含有启动子活性, 它的去除几乎完全导致 Rb 基因表达活性的丧失; 该启动子区有常见的富含 G+C 启动子的类似结构, 与 "CG 岛" (CG island) 相一致^[11,12].

2.2 DNA 甲基化模式的保持和复制与 Rb 基因的失活

甲基的来源主要由蛋氨酸循环中 S-腺苷蛋氨酸提供. 一般认为在真核生物中有两种甲基化酶催化胞嘧啶甲基化, 即启动甲基化酶和维持甲基化酶. 启动甲基化酶的作用是催化未甲基化 CG 使之甲基化成为 C^mG. 维持甲基化酶对半甲基化的 DNA 有较高的亲和力, 使处于半甲基化的 DNA 与甲基胞嘧啶相对称的胞嘧啶甲基化. 此酶催化特性极强, 使新生的半甲基化的 DNA 甲基化, 从而在 DNA 复制及细胞分裂后, 甲基化模式不致于丢失. 就 Rb 基因而言, Rb 基因被引入甲基的过程可使单等位基因或双等位基因过度甲基化^[12]. 由于甲基基团被引入 DNA 分子而改变 DNA 大分子的构象, 又由于甲基引入 DNA 双螺旋分子主要沟道中暴露在外的位置, 从而影响了蛋白质与 DNA 结合, 因此这可能是 Rb 基因失活的原因之一.

2.3 Rb 基因 5' 端甲基化与肿瘤发生

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。大多数肿瘤的发生涉及的基因异常可分为两类：细胞原癌基因激活和抗癌基因的失活。其中抗癌基因在肿瘤研究中有着极重要的意义^[6,13]。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。新近发现 Rb 基因的甲基化为视网膜母细胞瘤等肿瘤形式的机制解释开辟了新的途径^[6,12,14,15]。Sakai 等^[12]用 Msp I 和 Hpa I 消化视网膜母细胞瘤的 DNA, 发现 5 例视网膜母细胞瘤中的 4 例(纯合子)出现 5' 端 Rb 基因高度甲基化。另外一例(杂合子)也与 5' 端甲基化有关, 一条等位基因 5' 端出现高度甲基化, 另外一条等位基因为低甲基化。对 5 例进行序列分析均未发现 DNA 序列的异常。de Burtros 等^[16]认为抗癌基因启动子高度甲基化可作为肿瘤形成机制之一。因此 Rb 基因 5' 端甲基化可能与肿瘤形成有关, 并需要加强研究 Rb 基因甲基化对 mRNA 和 Rb 蛋白影响的研究, 以利进一步阐明 Rb 基因甲基化是否影响 Rb 基因失活, 进而影响 mRNA 转录和蛋白质合成, 失去对细胞增殖的调控, 导致细胞转化和肿瘤发生。

参 考 文 献

- 1 Kern S E, Kinzler K W, Bruskin A *et al.* Science, 1991; 252 (5013): 1708
- 2 Iggo R, Gatter K, Bartek J *et al.* Lancet, 1990; 335 (8691): 675
- 3 Imazeki F, Omata M, Nose H *et al.* Gastroenterology, 1992; 103: 892
- 4 党进军. 生物化学与生物物理进展, 1992; 19 (2): 92
- 5 Ehrlich M, Gama-Sosa M A, Huang L H *et al.* Nucleic Acids Research, 1982; 10: 2709
- 6 Jones P A, Rideout W M, Shen J C *et al.* Bioassays, 1992; 14 (1): 33
- 7 Nigro J M, Baker S J, Preisinger A C *et al.* Nature, 1989; 342 (7): 705
- 8 William M, Rideout I I I, Gerhard A *et al.* Science, 1990; 249: 1288
- 9 Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B *et al.* Science, 1991; 253 (5015): 49
- 10 Milner J. Curr Opin Cell Biol, 1991; 3 (2): 282
- 11 McGee T L, Yandell D W, Dryja T P *et al.* Gene, 1989; 80: 119
- 12 Sakai T, Toguchida J, Ohtani N. Am J Hum Genet, 1991; 48: 880
- 13 Gallie B L, Dunn J M, Hamel P A *et al.* Eye, 1992; 6: 226
- 14 Greger V, Kerst S, Messmen E *et al.* J Med Genet, 1988; 25: 217
- 15 Greger V, Passarge E, Hopping W *et al.* Hum Genet, 1989; 83: 115
- 16 de Burtros A, Nelkin B D, Silverman A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85: 5693

胼胝体在初级视觉信息加工中的作用*

刁云程

(中国科学院生物物理研究所视觉信息加工开放实验室, 北京 100101)

摘要 在综述初级视区胼胝体功能研究的基础上, 提出了视网膜双侧投射带的中枢拓扑联系模型, 它不仅符合一系列生理学和形态学实验的结果, 而且解释了胼胝体存在的必要性: 它传送的信号补偿了由于存在视网膜双侧投射带而在每侧皮层上所造成的信息损失。

关键词 视皮层, 胼胝体, 视网膜双侧投射

哺乳动物大脑两侧皮层之间有大量纤维相互联系着。这些纤维如同电缆一样汇集成带状, 深埋于大脑皮层的下面, 称作胼胝体。美国著

名神经学家 Sperry 及其它学者的研究表明, 它

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1993-03-12, 修回日期: 1993-08-16

(China). 1994; 21 (1): 27

As a family of multifunctional cell-proliferation regulating factor, TGF- β has great potential in clinical application. Both naturally secreted and recombinantly expressed TGF- β are existed in the inactive form of latent complex. Activation of latent TGF- β complex is an important pathway of modulating the biological function of TGF- β . This review concerns on the molecular structure of both natural and recombinant latent TGF- β complexes, and their possible activation mechanisms under physiological conditions.

Key words transforming growth factor- β , latent complex, activation mechanism

Lipid Containing Protein. Pan Huazhen. (*Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 31

Proteins anchored in membrane by fatty acids or glycosylphosphatidylinositol have been found in a wide variety of cells. Recent evidence shows that the function of these proteins widely related with immunology and signal transduction. This review summarizes the progress in the past few years concerning the structure, biosynthesis and functions of these proteins.

Key words lipid containing protein, palmitic acid, myristic acid, glycosylphosphatidylinositol, structure, biosynthesis, function

Progress in the Studies on Gene Mutations of Factor VIII. Geng Jieping, Qi Zhengwu, Chen Zhu. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 36
Human factor VIII is an important cofactor in the intrinsic blood coagulation. Hemophilia A

is the most common severe inherited bleeding disease due to the deficiency or abnormality of factor VIII. Factor VIII gene has been successfully cloned and expressed in eukaryotic cells that promotes the studies on the gene mutations of factor VIII widely and thoroughly. This article introduces the recent progress about this field, and new techniques used in researches. The study on gene abnormalities of factor VIII can be regarded as an excellent example both in depth and width for researches of the congenital diseases.

Key words coagulation factor VIII, hemophilia A, gene mutations

Gene Expression Specifically in Mammary Glands of Transgenic Animals. Chen Ruihuan. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 42

Heterogeneous genes express specifically in mammary glands of transgenic animals is established recently in gene engineering. The milk protein genes and their fusion fashions with heterogenous genes, the necessary elements and the possible factors which effect the expression of the recombinant genes in transgenic animals are introduced.

Key words milk protein genes, transgenic animals, mammary-gland-specific gene expression

Progression in p53 and Rb Gene Methylation. Yang Heping, Zhou Airu, Tang Jian. (*Department of Cardiopulmonary Endocrine, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 48
Progress in p53 and retinoblastoma (Rb) gene methylation is introduced. CpG dinucleotides are the hot spots of DNA methylation and mu-

tation. CpG dinucleotides of p53 and Rb gene are easily methylated. Hypermethylation of the tumor-suppressor genes, with consequent gene inactivation and the loss of the suppression of the cellular proliferation, has been postulated as one of the potential mechanism for oncogenesis.

Key words tumor-suppressor gene, retinoblastoma, p53, methylation of DNA

Roles of Corpus Callosum in Early Visual Information Processing. Diao Yuncheng. (*Laboratory of Visual Information Processing, Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (1): 50

Results of a series of studies by this research group on the functional roles of the callosal connections in primary visual cortices were reviewed. Based on these, a topographical projection model of the vertical retinal bilaterally projecting strip was proposed, which not only agrees well with experimental results but also explains the necessity of the corpus callosum: signals conveyed by these fibers compensate information loss in the cortex due to the existence of retinal bilaterally projecting strip.

Key words visual cortex, corpus callosum, retinal bilateral projection

Recent Progress and Prospect in the Studies of Cell Biophysics. Zhang Jinzhu. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (1): 55

Recent studies of cell biophysics have been introduced about cell ultrastructure effects of physical factors on living cells, cellular motilities, ion channels and cellular signalling. Some progress in methodology for studying living

cells are also reviewed. It has been emphasized that the main purpose of cell biophysics is to understand the nature of the living cell in order to explain why and how the cell is alive. Accordingly, some questions and problems on principles and methodology have been discussed in this article as well.

Key words cell, biophysics, progress, prospect

The Protecting Effect of Mg^{2+} on the Changes of Cardiac Mitochondrial F_1F_0 Induced by Adriamycin. Lin Zhihuan, Li Shengguang, Cao Maosun, Chen Yunjun, Feng Chaoyang, Deng Junpeng. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (1): 61
Adriamycin (ADM) is a widely used anticancer drug, but the chronic cardiotoxicity severely limits the use of it in the treatment of neoplastic disease. The experimental results obtained from F_1F_0 -ATPase activity assay, ^{31}P -NMR spectra measurement, fluorescent probe NBD-PE detection, packing and fluidity of membrane lipids and intrinsic fluorescence measurements can be summarized as follows: ADM induces the phase transition of mitochondrial membrane lipids at first, as a consequence affecting on the lipid packing and fluidity of the lipid molecules and then influencing the conformation of the F_1F_0 -ATPase and finally resulting in the decreasing of the enzymatic activity. And Mg^{2+} can protect all the effects induced by ADM thus reducing the harmful effect of ADM.

Key words cardiac mitochondrial F_1F_0 -ATPase complex, Mg^{2+} , Adriamycin, non-bilayer-lipid, conformation

Vacuum Ultraviolet Circular Dichroism Studies