

最近 Cross 等人^[13]发展了一种新的方法, 他们将 MeCP2 改造成只保留与 mCpG 结合的位点 (MBD), 用 MBD 制成的层析柱可以吸附一定甲基化程度的 CpG 双核苷酸. 利用这种层析柱并结合使用甲基化酶, 他们从人总 DNA 中 (已用 MseI 切成约占 760 bp 的片段) 得到了 CpG 岛库, 由于 MseI 的作用位点一般不位于 CpG 岛内, 因此所得到的 CpG 岛大部分将是完整的. 当然这种方法仍需进行改进 (如改用别的酶, 从而既能不破坏 CpG 岛又能将总 DNA 切成约 1 kb 大小). 可以相信 CpG 岛库的建立将有助于人类基因组的研究工作.

参 考 文 献

- 1 Bird A P, Taggart M, Frommer M *et al.* Cell, 1985; **40**: 91
- 2 Bird A. Trends Genet, 1987; **3**: 342
- 3 Larsen F, Gundersen G, Lopez R *et al.* Genomic, 1992; **13**: 1095
- 4 Bird A P. Nature, 1986; **321**: 209
- 5 Li E, Bestor T H, Jaenisch R. Cell, 1992; **69**: 915
- 6 Sapienza C, Peterson A C, Rossaut J *et al.* Nature, 1987; **328**: 251
- 7 Feinberg A P. Nature Genet, 1994; **4**: 110
- 8 Lin C, Lieber M R. EMBO J, 1992; **11**: 315
- 9 Boyes J, Bird A. Cell, 1991; **64**: 1123
- 10 Lewis J D, Meehan R R, Henzel W J *et al.* Cell, 1992; **68**: 905
- 11 Bird A. Cell, 1992; **70**: 5
- 12 Patel K, Cox R, Shipley J *et al.* Nucl Acids Res, 1991; **19**: 4371
- 13 Cross S H, Charlton J A, Nan X *et al.* Nature Genet, 1994; **6**: 236

CpG Methylation and Gene Regulation. Kang Yibin, Wu Xiaohui, Wei Yong, Chai Jianhua (*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, China*).

Abstract The methylation and demethylation of cytosine in CpG dinucleotide plays an important role in regulation of mammalian gene expression. There are two kinds of promoters in mammalian genome: CpG-island promoters and CpG-deficient promoters. Two protein factors influence gene expression by interacting with methylated CpGs. CpG islands also have useful applications in genome analysis.

Key words methylation, gene expression, CpG island, genome analysis

载脂蛋白 A- I 基因表达调控的研究进展

尹银亮 王克勤 陈保生

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

摘要 载脂蛋白 (apolipoprotein, apo) A- I 是一种重要的血浆蛋白, 其基因表达具有明显的组织特异性、种属特异性和发育阶段特异性. Apo A- I 基因 5' 调控区的肝细胞特异性增强子等顺式作用元件同 ARP-1、HNF-4、RXR α 等反式作用因子相作用, 调控该基因的特异性表达.

关键词 apo A- I 基因, 基因表达, 调控

Apo A- I 是血浆高密度脂蛋白的主要载脂蛋白, 对机体脂质运输和代谢起着重要作用. 目前, 人、猴、狒狒、猪、大鼠、兔和鸡等动物的 apo A- I 基因已先后被克隆, 各种动物的

apo A- I 基因主要在肝脏和小肠中表达, 呈现出明显的组织特异性. 另一方面, 不同种属的

哺乳动物肝、小肠中的表达水平有很大差异,鸟类除主要在肝和小肠中表达外,在其它多种组织中也有较高水平的表达,这又表现出明显的种属特异性.此外,apo A-I 基因在发育过程中还表现出明显的发育阶段特异性,同一器官在不同的发育阶段中表达水平也不相同.

Apo A-I 基因的表达调控主要在转录水平上进行,是通过其顺式作用元件与相应的反式作用因子的相互作用来实现的.

1 顺式作用元件

人 apo A-I 基因缺乏典型的“TATA” Box,在转录起始位点上游的-32~-26 bp 处有一个AT丰富区:5'-ATAAATA-3',在-108~-103 bp 处有一个类似“CAAT” Box 的序列:5'-ACATTGCC-3',在-220~-215 bp 及-440~-435 bp 处有两个反向重复的“GC” Box 样序列,这些序列可能为 apo A-I 基因转录调控的基础性元件^[1].

在 apo A-I 基因的5'上游调控区中,存在着一个重要的肝细胞特异性增强子.Y. S. Chao 等^[2]发现鼠 apo A-I 基因的-464~-148 bp 为该基因在 Hep G-2 细胞中表达所必需,起着增强子样作用. S. K. Karathanasis 等^[3]发现人 apo A-I 基因的-256~-41 bp 的 DNA 序列足以使 CAT 基因在 Hep G-2 细胞中最大量表达,要在 Caco-2 细胞中表达,则需-2052~-192 bp 片段,他们认为在-256~-41 bp 序列中有一个肝细胞特异性增强子. A. Walsh 等^[4]以人 apo A-I 基因进行转基因小鼠实验发现,-256 bp 以内的 DNA 序列足以使人 apo A-I 基因在小鼠肝中最大量表达. S. K. Karathanasis 等^[5]对该肝细胞特异性增强子作了详细研究,发现其增强子活性区域在-222~-110 bp 之间,其间有3个与肝细胞(Hep G-2)核提取物中蛋白质因子特异性结合的位点,即 A 位点:-214~-192 bp: 5'-TGAACCCTTGACCCCT-3'; B 位点:-169~-146 bp, 5'-TGCCCACTCTATTTGCCCA-GCCCC-3'; C 位点:-134~-119 bp, 5'-

TGATCCTTGAACCTCTT-3'. A 和 C 位点中的序列有较大的同源性,二者与核提取物中蛋白质因子的结合存在着一定的竞争性,推测它们可能与相同或相似的蛋白质因子相结合.突变分析证实,单独一个位点被结合时不能促进基因转录,任意两个位点被结合而另一个位点不被结合时只能较弱地促进基因转录,必须三个位点同时被结合,才能以最大活性促进基因转录.缺乏-222~-110 bp 的序列的 apo A-I 基因,在小肠来源的 Caco-2 细胞中仍能转录出高水平的 mRNA,表明-222~-110 bp 序列为严格的肝细胞特异性增强子, apo A-I 基因在小肠中的表达是由另一条转录激活途径所控制. S. K. Karathanasis 等又发现鸡 apo A-I 基因的-60 bp 的 DNA 序列即足以使 CAT 基因在 Hep G-2、Caco-2、HeLa、NIH 3T3 等细胞中最大量表达,鸡与人 apo A-I 基因的-222~-110 bp 的 DNA 序列之间有近 50% 的同源性,但鸡的该序列不具有增强子活性^[6].比较人、猕猴、兔、大鼠和鸡 apo A-I 基因的这一区域的 DNA 序列可见,哺乳动物的 A、B 和 C 三个位点都很保守,鸡则缺失整个 A 位点和 B 位点的一半,且在 B 位点的另一半和 C 位点间有一段长 17 bp 的插入序列,即加入了 1.7 个 DNA 双螺旋.这种 DNA 序列的变化,可能改变了 DNA 分子在该处的空间构象,妨碍了相应转录因子的结合,导致鸡的这一区域不具有增强子活性.在鸡的-20~-10 bp 处有一个 SP1 结合位点: 5'-GGGGCGGCGG-3',而哺乳动物的相应区域中不存在这一位点.由于 SP1 是一种广泛存在的转录因子,所以推测 SP1 与这一 SP1 结合位点相互作用后,可以在基础水平上使 apo A-I 基因在鸡的多种组织中表达.

Apo A-I 基因与 apo C-III、apo A-IV 基因相连成簇,共同位于第 11 号染色体长臂上, apo C-III 基因居中,转录方向与 apo A-I 和 apo A-IV 基因相反.位于 apo A-I 和 apo C-III 基因共同 3' 区中的 DNA 序列及位于 apo C-III 和 apo A-IV 基因共同的 5' 区中的 DNA 序列,

可能也参与对 apo A-I 基因的转录调控. A. walsh 等^[7]通过转基因小鼠实验发现, 要使人 apo A-I 基因在转基因小鼠小肠中表达, 必须有位于人 apo C-III 基因 5' 上游的 -0.2~1.4 kb 的 DNA 片段, 将此片段以不同的方向连接于人 apo A-I 基因 5' 上游, 都能使人 apo A-I 基因在转基因小鼠小肠中高水平表达. 其它实验也表明, 这一 DNA 片段也为 apo C-III、apo A-IV 基因在小肠中表达所必需, 所以认为这一片段中存在着 apo A-I、apo C-III 和 apo A-IV 基因共同的小肠组织特异性增强子. A. Haase 等^[8]发现, 位于 apo A-I 和 apo C-III 基因共同的 3' 区中的 DNA 序列, 能与“寂静子”(silencer) 性的核蛋白因子结合, 参与抑制 apo A-I 基因在肝、小肠以外组织中的表达.

2 反式作用因子

已发现多种核蛋白因子能与 apo A-I 基因调控区域中的 DNA 序列相结合, 其中研究较多的有 ARP-1 (apolipoprotein AI regulatory protein 1, 载脂蛋白 A-I 调控蛋白 1)、HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4, 肝细胞核因子 4)、RXR α (retinoic acid receptor RXR α , 维甲酸受体 RXR α) 和 hT₃R α 1 (human T₃ receptor- α 1, 人 T₃ 受体 α 1).

ARP-1 是一种能特异性地结合于 apo A-I 基因肝细胞特异性增强子中 A 位点上的负调控性蛋白因子. S. K. Karathanasis 等^[9]以含 A 位点 DNA 序列的寡核苷酸为探针, 从肝细胞的 cDNA 文库中克隆出了能表达 ARP-1 的阳性克隆, 并从所测定的 cDNA 序列推导出 ARP-1 的全部氨基酸序列. ARP-1 由 414 个氨基酸组成, 其 C 端的 145~414 区域与 Ear-2、Ear-3 和 Seven-up 的同源性分别为 95%、67% 和 84.4%, 其 79~144 区域富含 Cys, 与 Ear-2、Ear-3 和 Seven-up 的同源性分别为 89.4%、98.5% 和 92.4%, N 端则同源性很小, 由此认为 ARP-1 是甾族激素受体超家族的一个成员, 其 337~414 区域可能为二聚化的结构域. 在各

种组织中都有 ARP-1 mRNA 转录, 以 Cos-1 细胞表达的 ARP-1 也能专一地结合于 apo A-I 基因的 A 位点. DNase 保护实验发现, 鼠肝细胞核抽提物的蛋白因子能同时结合 apo A-I 基因的 A、B 和 C 位点, 不表达 apo A-I 的鼠脾、肾、脑组织和 HeLa 细胞核抽提物只能同 A 位点相结合, 所以认为, ARP-1 是一种广泛存在于各种组织细胞中的负调控性转录因子, 在控制 apo A-I 基因的组织特异性表达中起着关键作用.

HNF-4 也是一种参与 apo A-I 基因表达调控的重要蛋白因子, 也是甾族激素受体超家族成员, 它只存在于肝、小肠和肾组织中, 本身即是一种受着转录调控的具有组织特异性的转录调控因子^[10]. J. Chan 等^[11]以共转化实验发现, HNF-4 能使 CAT 基因表达活性提高 2.5~6 倍, 而 ARP-1 则使之降低至 1/2~1/5, 二者都能结合于 apo A-I 基因的 C 位点. 在 C 位点中进行定点突变, 可以阻止 HNF-4 和 ARP-1 的结合, 消除它们的促进或抑制作用. HNF-4 也能同 A 位点结合, 但优先于与 C 位点结合, 而 ARP-1 则优先于与 A 位点结合. HNF-4 的 cDNA 已被克隆, 推导出 HNF-4 共有 455 个氨基酸, 分子量约为 54 000, 其 50~160 氨基酸序列与甾族激素受体其它成员的锌指结构区有着 40%~63% 的同源性, 存在着两个潜在的锌指结构, 可能是与 DNA 相结合的区域. HNF-4 以二聚体形式与 DNA 结合^[10].

J. N. Rottman 等^[12]发现, apo A-I 基因中的 A 位点也是一个高度选择性的维甲酸反应性元件 (retinoic acid-responsive element), 已发现的几种维甲酸受体 RAR α 、RAR β 和 RXR α 都能与 A 位点结合, 而以 RXR α 亲和力最强. 以 Hep G-2 细胞进行瞬时转化实验发现, A 位点对于维甲酸在 RXR α 介导下对 apo A-I 基因表达的激活作用是必不可少和足够的, 通过共转化表达出的 ARP-1 可消除由 RXR α 介导的转录激活作用. RXR α 和 ARP-1 同 A 位点的亲和性相似, 而二者构成的异源二聚体对 A 位点的亲和性要比 ARP-1 或 RXR α

单独的强 10 倍. 无论有无维甲酸存在, RXR α 单独对 apo A- I 基因转录的影响很小, 无维甲酸存在时, ARP-1 或 ARP-1 与 RXR α 共同作用能大大抑制 apo A- I 基因的转录; 在有维甲酸存在时, 由 ARP-1 和 RXR α 共同产生的抑制作用 (而不是由 ARP-1 单独引起的) 几乎可完全被解除. 这表明, ARP-1 对 apo A- I 基因的转录抑制作用, 使得 apo A- I 基因对 RXR α 和维甲酸的反应性变得敏感, 这种反应性是由细胞内 ARP-1 和 RXR α 浓度的比率所调节. RXR α 既能与 ARP-1 相互作用而抑制 apo A- I 基因的转录, 又能在维甲酸的参与下解除 ARP-1 对 apo A- I 基因的转录抑制^[13].

J. S. Romney 等^[14]发现, 甲状腺素受体 hT₃R α 1 也参与 apo A- I 基因的转录调控, T₃ 通过其受体 hT₃R α 1 的介导来调节 apo A- I 基因转录, hT₃R α 1 与 A 位点结合能促进转录, 而与其它位点结合又能表现出转录抑制作用. 此外, 其它因子如 Ear-3/COUP-TF 等也参与对 apo A- I 基因的表达调控.

3 Apo A- I 基因的转录调控模式

Apo A- I 基因的转录调控机理还不完全清楚, 但从已有的实验结果可以初步总结出其基本模式 (见图 1). 对于大多数哺乳动物来说,

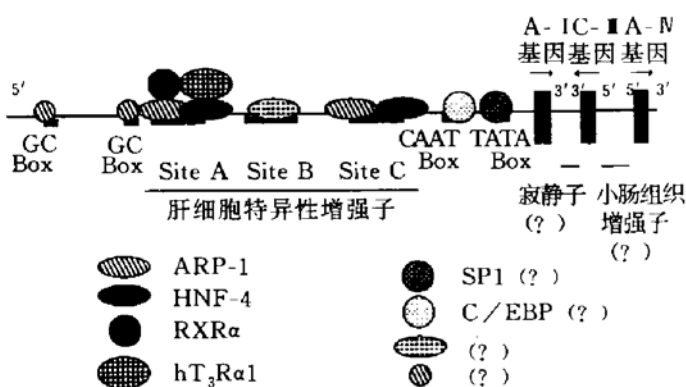


图 1 apo A- I 基因表达调控模式

apo A- I 基因肝细胞特异性增强子中的 A 位点, 是一个广泛性的负调控元件, 它与广泛存在于各种组织细胞中的负调控性蛋白因子 ARP-1 相结合, 抑制 apo A- I 基因在肝和小肠

以外组织中表达. 此外, apo A- I 基因和 apo C-III 基因共有的 3' 区域中的 DNA 序列, 也可能通过与相应转录因子作用而产生“寂静子”效应, 参与抑制 apo A- I 基因在肝和小肠以外组织中表达. 在肝细胞中, 通过 HNF-4 及其它尚未十分明了的正调控性蛋白因子与肝细胞特异性增强子的相互作用, 拮抗和消除了 ARP-1 的转录抑制作用, 使 apo A- I 基因特异性地在肝细胞中表达. 在小肠中则可能是通过另一些转录因子与位于 apo A- I 基因更上游的正调控序列或位于 apo C-III 基因 5' 上游的小肠特异性增强子的相互作用而激活 apo A- I 基因的转录. 甾族激素、膳食中摄入的胆固醇、甲状腺素和维甲酸分别通过其受体 HNF-4、Ear-3、hT₃R α 1 和 RXR α 等介导来调控 apo A- I 基因的转录. 不同发育阶段中体内激素水平的变化、甲基化作用和 HNF-4 等转录因子本身所受到的与发育阶段相关的转录调控, 共同导致了 apo A- I 基因表达的发育阶段特异性. R. Shemer 等^[15,16]发现, apo A- I 基因的表达活性同其甲基化状态密切相关, 精子和不表达 apo A- I 的成年组织中, apo A- I 基因呈高度甲基化, 卵细胞和早期胚胎 (从 8~16 细胞期到原肠期) 中 apo A- I 基因都保持去甲基化, 在原肠期后器官形成过程中, apo A- I 基因又逐步甲基化. 在成体的肝、小肠组织中, apo A- I 基因呈去甲基化状态. 在转基因鼠中, 人 apo A- I 基因只在肝中表达, 肝组织中人 apo A- I 基因呈非甲基化, 而其它组织包括小肠中的人 apo A- I 基因均呈甲基化. 对于鸡来说, 其 apo A- I 基因肝细胞特异性增强子中缺失了 A 位点, B 位点和 C 位点间又有插入序列, 使该增强子失其活性, 不能增强鸡 apo A- I 基因在肝中的表达和抑制该基因在肝、小肠以外组织中的表达, 另外在转录起始位点附近正调控序列 SP1 结合位点的存在, 使鸡 apo A- I 基因在体内多种组织中都能以较高水平表达, 从而与哺乳动物的 apo A- I 基因表达形成显著区别. Apo A- I 基因表达调控的许多细节尚未弄清, 但从目前迅速发展的研究趋势来看, 这

一问题不久将得以彻底阐明。

参 考 文 献

- 1 Higuchi K, Law S W, Hoeg J M *et al.* J Biol Chem, 1988; **263**: 18530
- 2 Chao Y S, Ding X, Dai P *et al.* Nucleic Acids Res, 1988; **16**: 7061
- 3 Sastry K N, Seedorf U, Karathanasis S K. Mol Cell Biol, 1988; **8**: 605
- 4 Walsh A, Ito Y, Breslow J L. J Biol Chem, 1989; **264**: 6488
- 5 Widom R L, Ladas J A A, Kouidou S *et al.* Mol Cell Biol, 1991; **11**: 677
- 6 Lamon-Fava S, Sastry R, Ferrari S *et al.* J Lipid Res, 1992; **33**: 831
- 7 Walsh A, Azrolan N, Wang K *et al.* J Lipid Res, 1993; **34**: 617
- 8 Haase A, Stoffel W. Biol Chem Hoppe Seyler, 1990; **371**: 375
- 9 Ladas J A A, Karathanasis S K. Science, 1991; **251**: 561
- 10 Sladek F M, Zhong W, Lai E *et al.* Genes Dev, 1990; **4**: 2353
- 11 Chan J, Nakabayashi H, Wong N C W. Nucleic Acids Res, 1993; **21**: 1205
- 12 Rottman J N, Widom R L, Nadal-Ginard B *et al.* Mol Cell Biol, 1991; **11**: 3814
- 13 Widom R L, Rhee M, Karathanasis S K. Mol Cell Biol, 1992; **12**: 3380
- 14 Romney J S, Chan J, Carr F E *et al.* Mol Endocrin,

1992; **6**: 943

- 15 Shemer R, Walsh A, Eisenberg S *et al.* J Biol Chem, 1990; **265**: 1010
- 16 Shemer R, Kafri T, O'Connell A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991; **88**: 11300

The Advancements of the Research on Apolipoprotein A- I Gene Expression Regulation. Yin Yinliang, Wang Keqin, Chen Baosheng (*Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100005, China*).

Abstract The apolipoprotein A- I is an important plasma protein which plays an essential role in transportation and metabolism of lipid, and its gene expression shows evident tissue-specificity, species-specificity and developmental stage-specificity. By the cooperation of the *cis*-acting elements, eg. the liver-specific-enhancer at the 5' upstream region and the positive or negative transcriptional factors such as ARP-1, HNF-4, RXR α , the apo A- I gene is regulated to express specifically.

Key words apolipoprotein A- I gene, gene expression, regulation

PFP 的研究进展

李 霖* 张洪渊

(四川大学生物系, 成都 610064)

摘要 焦磷酸: 果糖-6-磷酸 1-磷酸转移酶 (PFP) 可催化果糖-6-磷酸与果糖-1, 6-二磷酸间的可逆转变. 该酶广泛存在于各种高等植物及一些微生物体内. 文章综述了 90 年代以来有关 PFP 的一些研究进展. 包括: PFP 的种类与亚基构成、活性中心、底物特异性、酶活性的调节及功能等.

关键词 焦磷酸: 果糖-6-磷酸 1-磷酸转移酶 (PFP), 果糖-6-磷酸, 果糖-1, 6-二磷酸, 糖酵解, 糖异生