

14151

16 Tsang Ed W T, Bowler C, Herouart D *et al.* Plant Cell, 1991; 3: 783

17 Feng D F, Doolittle R F. J Mol Evol, 1987; 25: 351

### The Molecular Evolution of Superoxide Dismutase Based on Its Distribution and Structure.

Chen Huaiyang, Liu Wangyi (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031, China*).

**Abstract** Superoxide dismutases (SODs) are metal-containing enzymes that catalyze the dismutation of superoxide radicals to oxygen and hydrogen peroxide. Three classes of SODs, Fe-SOD, Mn-SOD and CuZn-SOD, have been

distinguished according to their bound metals. The Fe-SOD is essentially a prokaryotic enzyme, while the CuZn-SOD is essentially an eukaryotic enzyme. The Mn-SOD is present in both prokaryotes and eukaryotes. The Fe- and Mn-SODs appear to highly similar in the primary structure, three-dimensional structure and other physiochemical properties, but have no resemblance to CuZn-SOD. The Fe- and Mn-SOD can be traced to a common ancestor, whereas CuZn-SOD has evolved independently at a later time.

**Key words** superoxide dismutases, distribution, primary structure, three-dimensional structure, molecular evolution

## 从 DNA 修复机理看细胞癌变的发生机制

黄长晖 傅继梁

(第二军医大学医学分子生物学开放实验室, 上海 200433)

**摘要** DNA 损伤是引起基因突变, 导致细胞恶性转化的重要原因. DNA 损伤的修复过程非常复杂, 是与细胞周期调节、DNA 复制和 DNA 转录等生命活动紧密相连的. 首先 DNA 修复需要细胞周期停滞, 避免 DNA 损伤进入子代细胞. 其次, 参与 DNA 转录的某些基因产物参与 DNA 损伤的识别, 有利于转录链的优先修复. 最后, DNA 修复系统 NER、MMR 参与损伤修复. 上述 DNA 修复过程任何环节的异常, 都将造成 DNA 修复功能减弱, 导致某些功能基因突变, 从而导致细胞的恶性转化.

**关键词** DNA 修复, DNA 复制, 细胞周期, 核酸切除修复, 核酸错配修复, 肿瘤

肿瘤是细胞分化、增殖和死亡机制发生异常的结果. 虽然肿瘤的发生机制目前还不清楚, 但是 DNA 的损伤和基因结构的异常, 以及由此造成的所谓癌基因和抑癌基因表达或功能上的改变, 是细胞恶性转化的必要前提. 造成 DNA 损伤的原因很多, 但并不是所有的损伤都导致突变, 其原因就在于细胞的 DNA 修复系统能够清除和修复 DNA 损伤. 可以想象, 如果 DNA 修复异常, 那么基因组不稳定性增加, 细胞恶性转化的几率也必然增加. 因此, 阐明 DNA 的修复机理, 对于肿瘤的防治

是很有帮助的.

### 1 DNA 修复需要细胞周期停滞

细胞对 DNA 损伤的反应有两种: 一是损伤严重修复无望时, 细胞走向程序性死亡 (apoptosis), 这样损伤也就不致于造成突变. 二是损伤有望修复时, 细胞通过一系列调节机制抑制细胞周期的进程, 抑制 DNA 复制, 阻止细胞分裂, 以避免损伤 DNA 进入子代细胞, 同时 DNA 修复系统修复损伤 DNA, 从而

避免突变产生。目前关于 DNA 损伤信号是如何转换成特定基因的表达或关闭的, 具体的细节尚不清楚。但认为在细胞周期转换和 DNA 复制中起重要作用的某些基因, 在 DNA 修复过程也起重要作用。其功能异常是诱发肿瘤的重要原因。

### 1.1 细胞周期转换的正调控信号

细胞周期素  $D_1$  (cyclin  $D_1$ ) 是  $G_1$  期细胞周期蛋白。在  $G_1$  中期表达至最高峰, 与 CDK4 (cyclin dependent kinase) 结合, 促进细胞进入 S 期, 进入 S 期后 cyclin  $D_1$  从核内消失。目前认为 cyclin  $D_1$  是癌基因 bcl-1, 在多种肿瘤中发现该基因高度表达<sup>[1]</sup>。在该基因的转基因鼠模型中发现 cyclin  $D_1$  高表达引起小鼠乳腺上皮细胞异常增殖, 并导致乳腺腺癌<sup>[2]</sup>。Cyclin  $D_1$  基因的过度表达促使细胞加快从  $G_1$  期进入 S 期, 同时抑制损伤 DNA 的修复。高表达 cyclin  $D_1$  抑制修复是通过与 PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 结合实现的。PCNA 是 DNA 聚合酶  $\delta$  (Pol  $\delta$ ) 和  $\epsilon$  (Pol  $\epsilon$ ) 的辅助蛋白, 是 DNA 复制和修复所必需的。细胞受损伤后 PCNA 在核内重新定位, 表现为不能用非离子去垢剂如 Triton-100 从细胞裂解物中提取出来。Cyclin  $D_1$  与 PCNA 的结合抑制了 PCNA 的这种核内重新定位, 从而抑制了 DNA 修复功能。将 cyclin  $D_1$  表达载体分别与 CDK2、CDK4 和 PCNA 表达载体一起注射入  $G_1$  期成纤维细胞, 发现只有注射有 cyclin  $D_1$  和 PCNA 表达载体的受紫外损伤的成纤维细胞其 DNA 修复率与对照细胞相差无几, 其余共注射 CDK2 和 CDK4 的细胞与只注射 cyclin  $D_1$  表达载体的细胞一样, 其 DNA 修复率只有对照的 1/3 左右。上述结果说明 cyclin  $D_1$  在细胞  $G_1$ /S 期转换检查点 (check-point) 中起重要作用。如果 cyclin  $D_1$  表达异常, 丧失了对细胞  $G_1$ /S 期转换检查点的调节功能, 将导致细胞的恶性转化<sup>[3]</sup>。

### 1.2 细胞周期转换的负调控信号

$P_{53}$  基因是目前公认的功能最为重要, 也是研究最为深入的一个抑癌基因, 大约 50%

的各种癌症发现有该基因的异常。这说明  $P_{53}$  对于维持基因组的稳定性具有重要作用。DNA 受损伤可引起  $P_{53}$  基因表达, 该基因编码的 p53 蛋白是一个转录因子, 它通过诱导其他基因的表达发挥其功能。p53 除了诱发细胞的程序性死亡, 在 DNA 修复过程也发挥重要作用。

**1.2.1 p21 与 DNA 修复:**  $P_{21}$  基因 (CIP1/WAP1/CAP20) 是 p53 诱导表达的<sup>[4]</sup>。p21 蛋白是广谱的 CDK 抑制蛋白, 与 cyclin  $D_1$  竞争结合 CDK4, 从而抑制了 cyclin  $D_1$ /CDK4/PCNA 复合物的催化活性, 使细胞停留在  $G_1$  期; 与 CDK2 结合则阻止细胞进入 M 期<sup>[1]</sup>。这样就有效地防止损伤 DNA 进入子代细胞。p21 除了阻止细胞周期的进程, 还通过与 PCNA 结合直接抑制 DNA 的复制<sup>[5]</sup>。体外实验表明, p21 可抑制 HeLa 细胞粗提物中 T 抗原依赖的 SV40 DNA 复制。p21 与 PCNA 结合影响 DNA 链的延伸, 从而抑制长链 DNA 的合成。

考虑到 PCNA 是 DNA 修复所需的成分, 而 p21 主要是抑制长链 DNA 的合成, 而对短链 DNA 合成的影响较小, 因此认为 p21 并不影响 DNA 的修复, 实验结果证实了这点。在含野生型  $P_{53}$  基因的人肠癌细胞 PKO 细胞株提取物中, 依赖 T 抗原的 SV40 DNA 可以复制, 紫外线损伤的质粒 DNA 也可以得到完全修复。但在反应体系中加入重组 p21 蛋白, 则只抑制 SV40 DNA 的复制, 而不影响质粒 DNA 的修复, 表现为 p21 对 DNA 缺口的填补没有影响, 而对于长链 DNA 的合成抑制效果明显<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 GADD45 与 DNA 修复:** GADD45 (growth arrest and DNA damage inducible) 是 p53 诱导表达的又一种蛋白质。在含野生型  $P_{53}$  的人粒细胞白血病细胞株 ML-1 的提取物中, 发现细胞受辐射后 GADD45 表达量增加。GADD45 高表达影响了细胞周期的进程。在体外培养细胞中瞬时表达 GADD45, 观察到细胞中  $^3H$ -标记胸腺嘧啶的掺入率明显降低, 只有对照的 15% 左右, 表明 GADD45 的高表达阻

止细胞进入 S 期. GADD45 阻止细胞进入 S 期可能是通过与 PCNA 结合实现的. 在细胞提取物中, 发现 GADD45 是以与 PCNA 结合成复合物的形式存在的, 重组的 GADD45 蛋白可以从 cyclin D<sub>1</sub> 和 PCNA 复合物上置换出 PCNA 蛋白, 从而使其失去催化活性, 阻止了细胞周期的进程. 考虑到 PCNA 在 DNA 复制中所起的重要作用, GADD45 与 PCNA 结合必然抑制 DNA 复制, 但是 GADD45 与 PCNA 的结合并不抑制 DNA 修复. 体外和细胞内的实验得到相似的结果证明了这点<sup>[7]</sup>.

## 2 DNA 损伤修复系统修复 DNA 损伤

### 2.1 核苷酸切除修复系统

**2.1.1 NER 基因缺陷与肿瘤:** 核苷酸切除修复系统 (nucleotide excision repair, NER) 是修复环境中理化因素所致损伤的一个重要修复系统. NER 基因的缺陷引起遗传性疾病, 主要有着色性干皮病 (XP)、Bloom 综合征、Cockayne 综合征、Fanconi 贫血和毛细血管扩张性运动失调症 (AT). 这些 NER 缺陷患者易患癌症, 说明 NER 缺陷导致基因突变增加可能是致癌的重要原因. 另外, 前面述及的 cyclin D<sub>1</sub>, 以及 p53 诱导的 p21 和 GADD45 与 PCNA 结合, 影响 NER 修复系统, 而且 p53 可与 ERCC3 直接结合, 可能参与对损伤 DNA 的识别<sup>[8]</sup>.

最近, AT 基因的克隆使人们对 DNA 修复的机理有了进一步的认识. 通过同源性分析发现, AT 基因编码的蛋白质部分序列与磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI-3) 催化亚基的激酶功能区非常相似, 与酵母 TOR1、TOR2 蛋白及其哺乳细胞同源蛋白也有很高同源性 (达 40% ~ 50% 相同). 而且与酵母 rad3 也有较高同源性 (19% 相同, 40% 相似). PI-3 激酶是胞内信号传导途径中一个介导体, 受酪氨酸蛋白激酶活化, 催化磷脂酰肌醇磷酸 (PIP) 或磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP<sub>2</sub>) 生成, 在细胞生长、分化中起重要作用. TOR1 和 TOR2 则在控制细胞 G<sub>1</sub> 期方面发挥功能, 而 rad3 对于 G<sub>2</sub>/M 转换

是必需的, 并参与 DNA 损伤的识别, 阻碍细胞周期进程以利损伤修复. 由此可见 AT 基因的功能可能非常重要. 目前该基因的全序列正在加紧克隆, 相信不久的将来对其功能会有深入的了解<sup>[9]</sup>.

**2.1.2 转录链优先修复:** NER 对不同基因的修复率不同, 表达基因的修复率较不表达基因的修复率高; 同一基因转录链的修复率较不转录链也高出许多; 甚至同一基因不同位点的修复率也不同. Tornaletti 等<sup>[10]</sup>应用连接介导 PCR (ligation mediated PCR, LMPCR) 研究 P<sub>53</sub> 基因外显子不同位点的修复率, 发现 P<sub>53</sub> 基因转录链上不同位点环丁烷嘧啶二聚体 (CPD) 的修复率不同. 这些修复速度降低的位点是皮肤癌中 P<sub>53</sub> 突变热点, 说明 P<sub>53</sub> 基因这些位点受损后 NER 系统修复率降低是导致 P<sub>53</sub> 基因突变的重要原因.

NER 选择性修复的机理有以下两点: 一是染色质结构域的构象变化. 基因的转录涉及到染色质结构域的各级构象变化, 包括染色质结构开放、核小体松弛和双螺旋解开等等. 这些变化可促进修复酶复合物接近 DNA 损伤部位. 基因不同部位的修复率不同, 可能是由于染色质结构差异所致. P<sub>53</sub> 基因突变热点处修复率下降, 可能是由于该处染色质结构较紧密所致. 二是转录复合物是选择性修复的直接信号. NER 修复系统中 ERCC2 和 ERCC3 是转录因子 TF II H 的组成成分. 基因转录时 TATA 盒识别结合蛋白 (TBP) 与其他一些相关因子结合至 TATA 盒, 而后 RNA 聚合酶及一些转录因子包括 TF II H 结合上去开始转录, 聚合酶 II 及转录因子复合物沿转录链滑动延伸 RNA 链, 当碰到 DNA 损伤位点时, TF II H 识别该位点, 并从 RNA 聚合酶复合物上解离下来, 让 NER 修复系统修复损伤位点. 由于 TF II H 本身也参与了 NER 修复系统, 因此转录链的修复较非转录链优先, 保证了转录的准确性<sup>[10, 11]</sup>.

### 2.2 DNA 错配修复系统

有很多证据表明, DNA 错配修复系统

(mismatch repair, MMR) 功能丧失将导致基因组不稳定性增加, 包括 O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (MGMT) 缺陷的细胞株对烷化剂的耐受所致的突变和姐妹染色体交换 (SCE). 基因组不稳定性增加的一个重要表现是微卫星序列不稳定性, 即微卫星序列的长度多发性增加. 在 80% 遗传性非息肉性结肠直肠癌 (HNPCC) 和大约 15% 的散发性大肠癌中, 发现有微卫星不稳定序列存在, 提示癌细胞 MMR 修复系统缺陷, 结果在 HNPCC 患者家族中发现 MutS 同源基因 hMSH2, 以及 MutL 同源基因 hMLH1、hPMS1 和 hPMS2 基因突变. 这些基因突变导致 MMR 系统功能欠缺, 造成基因组不稳定性增加, 诱发细胞恶性转化<sup>[12]</sup>. 除了 HNPCC, 在具有微卫星序列不稳定性的散发性大肠癌患者中也发现 MMR 系统基因突变<sup>[13]</sup>. 目前为止, 还不清楚其他具有微卫星不稳定序列的肿瘤, 如胃癌、胰腺癌、子宫内膜肿瘤和膀胱癌是否具有 MMR 基因异常, 以及 HNPCC 和具有微卫星不稳定序列的散发性大肠癌是否还存在 MMR 系统其他基因的突变.

MMR 缺陷导致细胞恶性转化的原因可能在于引起某些功能基因的突变. Markowitz 等<sup>[14]</sup>在 11 株具有微卫星不稳定序列的大肠癌细胞中发现 9 株其 TGF- $\beta$  II 类受体 mRNA 表达量降低, 细胞表面几乎没有 TGF- $\beta$  II 类受体. 在具有微卫星不稳定序列的原发性大肠癌中也有同样发现, 而 27 例无微卫星不稳定序列的大肠癌细胞株只有 3 株  $\beta$  II mRNA 量减少. TGF- $\beta$  II 类受体转录减少的原因是其基因的突变, 多数是 5' 端 709~718 碱基序列 10 个重复腺嘌呤数量的改变, 导致移码突变. 将正常 TGF- $\beta$  II 类受体 cDNA 导入这些大肠癌细胞株, 可以降低这些细胞在裸鼠身上的致瘤性, 说明 TGF- $\beta$  II 类受体功能丧失在肿瘤形成过程起了重要作用. TGF- $\beta$  抑制多种表皮细胞生长, 对肿瘤生长有抑制作用. TGF- $\beta$  抑制细胞生长的途径可能是通过诱导 P<sub>15</sub> 基因表达实现的. p15 蛋白与 CDK2 和 CDK4 结合, 从而抑

制 CDK2 和 CDK4 与 cyclin D<sub>1</sub> 结合, 使细胞停留在 G<sub>1</sub> 期, 抑制细胞生长<sup>[15]</sup>. 癌细胞中 TGF- $\beta$  受体的突变使 TGF- $\beta$  不能起作用, 可能是致癌的原因.

综上所述, DNA 修复是一个复杂的生命活动, 是与 DNA 复制、转录和细胞周期紧密联系在一起的. 参与这一过程的某些基因的异常, 是导致细胞恶性转化的重要原因. 对 DNA 修复机理的认识将有助于对肿瘤形成机制的深入认识, 还有助于肿瘤的防治<sup>[16]</sup>. a. 危险性评估: 通过在高危人群中检测 P<sub>53</sub>、MMR 等基因突变, 推测肿瘤易感性; b. 致癌、致畸、致突变剂的检测: 目前诱变剂的检测主要在体外进行, 不能完全反应体内的状况. 如果能产生去除 (knockout) 抑癌基因或/和 DNA 修复系统基因的转基因鼠, 将既有助于研究这些基因的正常功能, 也有助于科学评估诱变剂的体内作用. c. 化疗药物的评判和寻求新的治疗策略: DNA 修复系统缺陷使细胞对某些有毒物质产生耐受, 比如 HNPCC 癌细胞对至少一种目前广泛应用的烷化剂产生耐受, 这使得如何评判这些药物的疗效作为问题提了出来. 另外, 随着对肿瘤细胞 DNA 损伤修复异常的认识, 已经初步确立了从细胞信号传导通道入手, 抑制细胞的异常增殖; 以及通过引入正常基因替代肿瘤细胞的缺陷基因的基因治疗策略, 以期达到治疗肿瘤的目的.

## 参 考 文 献

- 1 Hunter T, Pines J. *Cell*, 1994; **79**: 573
- 2 Wang T C, Cardiff R D, Zukerberg L. *Nature*, 1994; **369**: 669
- 3 Pagano M, Theodoras A M, Tam S W *et al.* *Genes and Development*, 1994; **8**: 1627
- 4 El-Deiry W S, Tokino T, Velenescu V E *et al.* *Cell*, 1993; **75**: 817
- 5 Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean F B *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; **91**: 8655
- 6 Li R, Waga S, Hannon G J *et al.* *Nature*, 1994; **371**: 534
- 7 Smith M L, Chen I T, Zhan Q *et al.* *Science*, 1994; **266**: 1376
- 8 Wang X W, Forrester K, Yeh H. *Proc Natl Acad Sci USA*,

- 1994; 91: 2230
- 9 Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S *et al.* Science, 1995; 268: 1749
- 10 Tornaletti S, Pfeifer G P. Science, 1994; 263: 1436
- 11 Chaint C, Moncollin V, Egly J M. BioEssays, 1994; 16 (19): 651
- 12 Karran P, Bignami M. BioEssays, 1994; 16 (11): 833
- 13 Liu B, Nicolaides N C, Markowitz S *et al.* Nature Genetics, 1995; 9: 48
- 14 Markowitz S, Wang J, Myeroff L *et al.* Science, 1995; 268: 1336
- 15 Hannon G J, Beach D. Nature, 1994; 371: 257
- 16 傅继梁. 中华医学遗传学杂志, 1995; 12 (1): 50

**The DNA Repair and Cancer.** Huang Changhui, Fu Jiliang (*Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China*).

**Abstract** DNA damage is the cause of gene

mutation and contributes to cell transformation. The cellular response to DNA damage is complex in its components and regulation. First, DNA repair need cell cycle arrest to avoid mutation accumulating in generated cell. Second, there is strong connection between repair and transcription. Third, nucleotide excision repair and mismatch repair are important pathway of mutation avoidance. If any event mentioned above was altered, mutations would accumulate, and the chance of tumor developing would increase. The relationship between DNA repair, transcription and the cell cycle, and the cell transformation were discussed.

**Key words** DNA repair, DNA replication, cell cycle, nucleotide excision repair, mismatch repair, neoplasm

# 细胞周期蛋白与 CDI 在细胞周期调控中的作用

李宝元<sup>1)</sup> 王代树

(北京市肿瘤防治研究所, 北京 100034)

**摘要** 在细胞周期调控研究中, 对 cyclin-CDK 在细胞周期调控中作用机制的认识已获得突破性进展。近几年来, CDK 抑制因子 (CDIs) 家族成员——p16 和 p21 的分离和研究, 表明细胞周期蛋白 (cyclin) 与 CDI 在调节 CDK 活性方面形成了极为复杂的调控网络, 从而控制细胞的增殖与分化, 并与肿瘤的形成与发展相联系。

**关键词** 细胞周期, 细胞周期蛋白, CDK, CDI

## 1 Cyclin 与细胞周期检查点调控

细胞周期是指细胞通过一系列有序的细胞内事件, 实现细胞生长和增殖的过程。细胞周期调控机制研究是关于细胞如何起动和完成细胞内这些事件, 并保证这些事件按次序正常进行, 从而完成有丝分裂或细胞分化。近年来提出的细胞周期检查点调控机制认为, 在细胞周期中, 其下游事件的起动依赖于上游事件的完

成。在检查点处, 细胞内事件主要集中在 DNA 复制的起始与完成及细胞分裂的起始与完成两个方面。目前认为检查点调控机制是由监视上游事件的传感器、传感器产生的信号以及由细胞周期起动元件构成的信号传导系统实现的<sup>[1]</sup>。它是由家族性蛋白激酶 CDKs 和它们的专一激活分子细胞周期蛋白 (cyclin) 构成。

<sup>1)</sup>大同医学专科学校, 大同 037008.

收稿日期: 1995-10-30, 修回日期: 1996-03-25