

- 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¹⁾ 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^[1]。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。

¹⁾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

Cyclin 被视为细胞成熟促进因子 (MPF) 的调节亚基, 而 CDK 作为 MPF 的催化亚基, 通过 MPF 的磷酸化作用. a. 使组蛋白 H₁ 磷酸化, 导致染色体凝聚. b. 使微管蛋白磷酸化, 导致细胞骨架的重新组合. c. 使核纤层蛋白 (lamins) 磷酸化, 而使核膜解体或再现. d. 使一些抑癌基因 P₅₃、原癌基因 c-myc 磷酸化, 从而控制细胞周期进程^[2,3].

1.1 D 型 cyclin 与 G₁ 期检查点调控

在 G₁ 后期存在一个检查点, 在酵母菌中被称为 start checkpoint, 在哺乳类细胞中则被认为是一个限制点. 在这一点处细胞开始下一轮 DNA 复制, 细胞内所有正、负调控信号都集中在这一点上. 与这一检查点联系最密切的是 D 型 cyclin 及其结合分子 CDK4 和 CDK6. Cyclin D 可与 CDK4 或 CDK6 结合并激活 CDK4 或 CDK6, 而使一些核蛋白磷酸化, 从而启动细胞 DNA 复制.

有实验表明 cyclin D 直接影响肿瘤抑制蛋白 pRb 的磷酸化状态. 在正常细胞中, pRb 作为一种转录调控因子在 G₁ 期是低磷酸化的, 进入 S 期开始磷酸化, 直到 M 后期仍保持磷酸化状态. 而磷酸化能解除低磷酸化 pRb 对细胞 G₁ 期的阻滞作用^[4]. 对 pRb 抑癌机制的研究表明, 其作用与一类转录因子 DRTF₁/E2F 有关. 这些具转录激活作用的活性蛋白可以激活一系列促进细胞进入 S 期并顺利进行 DNA 复制所必需的蛋白表达. 如胸腺嘧啶核苷激酶、DNA 聚合酶 α 、p34cdc2 和 B-myc 等, 从而促使细胞分裂增殖. 而 pRb 与 DRTF₁/E2F 结合使之处于非活性状态. 在细胞周期中 pRb 可被 CDK4 磷酸化而与 DRTF₁/E2F 解离, 其抑制作用也被解除.

D 型 cyclin 可通过其 N 端 LxCxE 基序与 pRb 结合并已证实 cyclin D₁-CDK4 复合体磷酸化大部分细胞内晚 G₁ 期 pRb 被磷酸化的位点. 当细胞 cyclin D₁ 经启动子诱导而高表达时, pRb 磷酸化要比正常时间提早, 通过 G₁ 期进程也加快. 相反, 当抗 cyclin D₁ 抗体在 G₁ 期开始不久显微注射进细胞, 则多数细胞

被阻滞在前 S 期阶段^[5]. 这一实验充分说明 D 型 cyclin 在 G₁/S 转换中的作用.

D 型 cyclin 有三种类型: cyclin D₁、cyclin D₂ 和 cyclin D₃. 当从巨噬细胞中撤去集落刺激因子 CSF₁ 时, cyclin D 水平迅速下降, mRNA 也发生变化. 通过观察人 T 淋巴细胞在有丝分裂原 mitogen 作用下诱导 G₀/G₁ 转化并进入 S 期时三种 cyclin D 的表达变化发现: G₀ 期 T 细胞 cyclin D₂ 表达水平低, D₃ 不表达, 而用 mitogen 刺激后, D₂ mRNA 在 G₁ 期被诱导, 随后为 D₃, 而 D₁ 在实验中未检测到. 另有实验表明, 当用有丝分裂原处理 G₁ 细胞, D 型 cyclin 的搭档分子 CDK4 mRNA 被诱导表达, 而用 TGF- β 处理人角质化细胞, 则 CDK4 mRNA 血清诱导生成被抑制. 这使人们想到 cyclin D-CDK4 复合体是作为一些生长因子的传感器或作用靶位而调节细胞进程. 其合成失调将使得细胞周期进程不依赖于生长因子作用, 而诱使细胞癌变^[6]. 但现在还不清楚三种 cyclin D 是在细胞周期中起不同作用, 还是在不同细胞中起相同作用.

1.2 其他检查点调控机制

除 G₁ 期检查点外, 另三个检查点被认为是: a. G₁/S 检查点, 其调控元件为 E 型 cyclin 和 A 型 cyclin. 在细胞周期进程中, 随着 cyclin D 启动核 DNA 复制而 cyclin E 逐渐积累并激活 CDK2 使 DNA 复制延续. 当细胞进入 S 期后, cyclin A 替代了 cyclin E 而与 CDK2 结合, 进一步促进 DNA 合成. b. G₂/M 检查点, 其调节蛋白为 B 型 cyclin. 当细胞进入 G₂ 期时, D、E 和 A 型 cyclin 降解而 cyclin B 增高, 并与被磷酸化的 p34cdc2 结合. 在正常细胞中, cyclin B-CDK2 复合体在 S 和 G₂ 期是以非活化形式积累, 其通过 wee₁/mik₁ 相关蛋白激酶对 CDC2 在 Tyr15 和 Thr14 处磷酸化而保持失活状态, 而在 G₂ 期最后阶段, cdc 25c 磷酸酶被激活而对 CDC2 (Y15, T14) 处去磷酸化, 从而激活 CDC2. 正常细胞当 DNA 由于辐射或烷化剂作用而损伤时, 存在一种机制阻止 CDC2 (T14, Y15) 处去磷酸化, 而细

胞被阻滞在 G_2 期^[7]. 在非洲蟾蜍卵中未复制 DNA 激活一种 wee_1/mik_1 激酶, 从而阻止细胞进入 M 期, 但在哺乳类细胞中还不不知这一机制的作用元件. c.M 期检查点, 这一检查点调控与一些遍在蛋白 (ubiquitin) 依赖性蛋白分解事件相关, 其中包括 B 型 cyclin 及与姊妹染色体连接的一些蛋白的降解. Cyclin B 的降解伴随 p34cdc2 被磷酸化而失去活性, 细胞完成有丝分裂又回到 G_1 期^[8]. 在肿瘤细胞中常看到纺锤体呈三个或多极状态, 表明肿瘤细胞中这一检查点调控机制的缺失. Cyclin 与 CDK 在细胞周期中的相互作用见图 1.

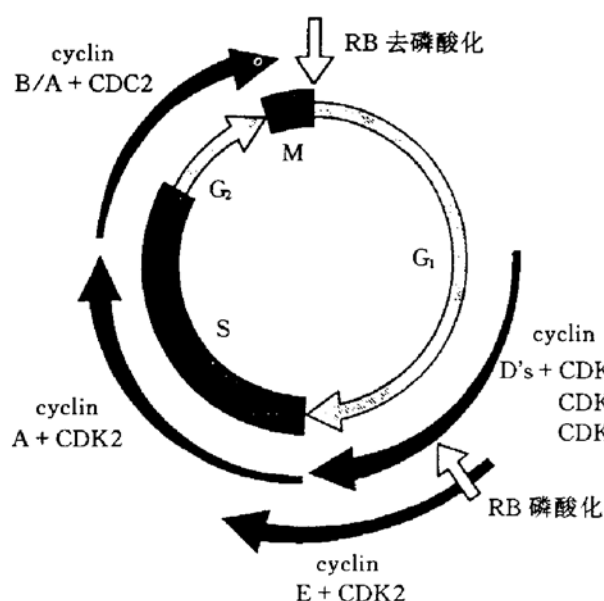


图 1 细胞周期过程中 cyclins 与激酶的作用

2 CDI 的结构及其功能

在哺乳类细胞检查点调控的另一面就是最近发现的 CDIs. Cyclin 对 CDK 是正调作用, 而 CDI 则与 cyclin 作用相拮抗, 对 CDK 起负调作用. 二者平衡变化从而控制细胞的周期进程. 众所周知, 真核细胞分裂必须通过 G_1/S 转换开始 DNA 复制, 通过 G_2/M 转换开始有丝分裂. 这种控制细胞分裂的机制很可能是通过 CDK 调节诸种重要底物的磷酸化, 从而打开 G_1/S 和 G_2/M 转换的开关^[9]. 到目前为止, 已有五种 CDK (CDK2~6) 被鉴定参与 G_1/S 转换的调控. 它们直接受控于 D 型

cyclin, 有几方面的证据表明, cyclin D_1 与一些原癌基因 PRAD₁、bcl-1 是相同的, 这种物质过度表达时, 细胞会向癌变发展. 而一系列 CDI 的分离, 都是针对 D 型 cyclin 及 G_1/S 转换调控方面的. 一方面细胞正常生长需不同类型 cyclin 的正常消长, 另一方面又需要 CDI 参与监控 cyclin, 从而调节 CDK 活性. 三者保持平衡是保证细胞正常生长的必要条件.

2.1 p16 的结构与功能

Cyclin-CDK 复合体酶活性受一系列 CDIs 的调控. 最近分离的 p16ink4 则专一抑制 cyclin D-CDK4 活性. P₁₆ 基因位于人染色体 9P21 处, 对 C₅ 粘粒与基因库序列的比较分析表明: C₅ 粘粒的两个区域与早先确定的编码 p16 蛋白基因序列相一致. 这两个区域分别被命名为 MTS₁ 和 MTS₂. C₅ 基因组序列与 P₁₆ mRNA 序列的详细比较揭示 MTS₁ 包含 307 bp 与 P₁₆ 序列一致, 其中包含全部 P₁₆ 编码序列和两个内含子. 这两个内含子将 P₁₆ 编码序列分为三个区域: 一个 5' 端 126 bp 编码外显子 I 区, 一个中间段 307 bp 编码外显子 II 区, 另一个 3' 端 11 bp 编码外显子 III 区. 而 MTS₂ 含有一段 DNA 序列与 P₁₆ 序列编码 5' 端外显子 II 区到内含子 II 的 256 bp 有 93% 相同^[10].

人 P16ink4 基因编码蛋白在 N 端含有一个与 B 型 cyclin 相同的 cyclin box 结构, 被定义为 P 盒. 另外具有四个 ankyrin 重复序列^[11]. p16 最初被定义为 CDK4 结合蛋白, 存在于 SV40 T 抗原转化细胞中是个专一抑制 CDK4 的蛋白分子. p16 通过与 cyclin D 竞争性结合 CDK4 而明显抑制 CDK4 活性, 并以同样方式抑制 CDK6. 最近一项实验指出: p16ink4 抑制由于 cyclin D_1 过表达诱导的 E2F 转录因子对 DHFR 基因启动子和腺病毒 E₂ 启动子激活作用, 而这一抑制作用可由 CDK4 过表达而解除. 同时显示 E2F 的两个结合位点结合有 pRb. 而在 Rb 基因缺失细胞系中, cyclin D_1 过表达则不能激发依赖于 E2F 的转录活性. 表明 pRb 与启动子活性有关^[12]. 体外研究证实: p16 能抑制 CDK4 活性, 使之不能

解除 pRb 对转录因子的抑制, 从而阻止细胞从 G₁ 期进入 S 期. 由此可见在 p16、CDK4、cyclin D 与 pRb 之间形成一个反馈调节环路调节着细胞 G₁/S 进程, 四者任何之一发生变化都会造成细胞增殖异常 (图 2).

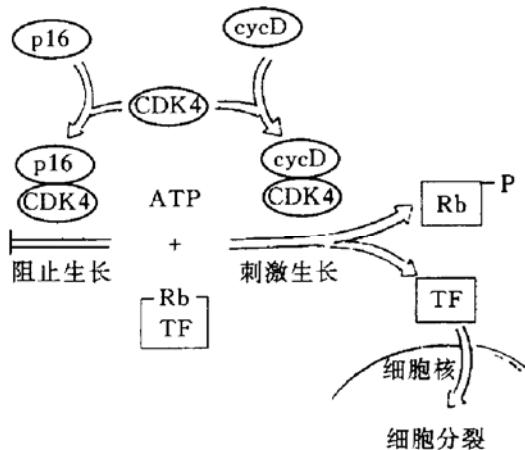


图 2 细胞增殖周期刺激与阻滞示意图

人 P₁₆ 基因与一个编码和 p16 蛋白相似蛋白的基因相毗连, 这一基因被称为 MTS₂, 其蛋白被称为 p15^{ink4B}, p15 与 p16 在最先 50 个氨基酸有 44% 相一致, 在随后 81 个氨基酸中有 97% 一致, 并和 p16 一样有四个 ankyrin 基序, 结合并抑制 CDK4 和 CDK6. 但又不同于 p16, 在用 TGF- β 处理 HaCaT 角质化细胞时, p15 mRNA 和蛋白质比 p16 高出 30 倍, 表明 p15 受 TGF- β 激发而阻滞细胞于 G₁ 期. P₁₆ 与 P₁₅ 基因 (MTS₁, MTS₂) 前后排列于人染色体上, 在肿瘤细胞系中 MTS 位点存在大量的重排、缺失和突变, 家族性易感黑色素瘤, 其中一种类型基因 (MLM) 也定位于染色体 9P21, 由此推测 MLM 很可能就是 P₁₆ 基因. 现已证实 p16 是一个有效的肿瘤抑制因子. 另外还存在一些与 p16 和 p15 相关的蛋白, 包括 p15.5 和 p18 等, 表明 G₁ 期这一类 CDIs 的存在^[13].

2.2 p21 与细胞周期抑制

已有很多证据表明另一类 CDK 抑制因子在细胞周期调控中的作用, 这就是 p21. p21 也被称为 SDI₁、WAF₁、CIP₁、CAP₂₀、PIC₁,

作为 CDIs 广泛存在于各种类型细胞中, 对所有 cyclin-CDK 复合体均有不同程度抑制. 其中包括 cyclin D-CDK4、cyclin E-CDK2、cyclin A-CDK2, 但对 cyclin D-CDK4 抑制较强, 而在抑制 cyclin A-CDK2 情况下, 明显需要几个 p21 分子的结合^[14]. 通过对这些蛋白的序列分析证明它们是同一种基因 P₂₁ 编码蛋白, 长为 164 个氨基酸, 分子质量为 21 ku. 最近一项实验表明 p21 CIP₁ 可有效地抑制由 cyclin A-CDK2、cyclin E-CDK2、cyclin D₁-CDK4、cyclin D₂-CDK4 复合体介导的 pRb 磷酸化, 从而抑制细胞 G₁/S 的转换. 而且当其与 SV40 T 抗原共转染人成纤维细胞, 在细胞周期进程上表现为相互拮抗作用^[15].

在正常细胞中 p21 是以 cyclin-CDK-PCNA-p21 四聚体形式存在, 而在转化细胞中则缺少这种联系. 实验指出 p21 不同区域对应于不同的靶位, p21 蛋白 N 端结合并抑制 cyclin-CDK, 而 C 端则结合并抑制增殖细胞核抗原 (PCNA), 很显然 p21 通过调控 CDKs 活性而控制细胞周期进程, 而 PCNA 则在 DNA 复制与修复中发挥功能作用^[16]. PCNA 是 DNA 聚合酶 δ 的功能亚基, p21 抑制 PCNA, 直接阻止 DNA 复制. 但 p21 却不能抑制 PCNA 在 DNA 修复中的作用. 由于 p21 这种不同作用, 使细胞在 DNA 损伤后, 细胞被阻滞在 G₁ 期并停止 DNA 复制, 而修复却能继续进行^[17].

P₂₁ 基因启动子具有 p53 结合位点, 野生型 p53 激活 P₂₁ 启动子, 而突变型 p53 则无此功能. 许多实验表明, 当 G₁ 期细胞 DNA 受损伤后, p53 被激活并启动 P₂₁ 基因表达 p21 蛋白, 导致 cyclin D-CDK4、cyclin E-CDK2 的活性抑制, 从而阻止细胞进入 S 期. 相反在缺少功能性 p53 细胞中, DNA 损伤后无法诱导 P₂₁ 表达, 而使损伤 DNA 进行复制, 引起细胞染色体畸变和基因突变等事件增多^[18]. 人乳头瘤病毒 (HPV) E₆ 癌蛋白, 其可以灭活 p53, 并诱导与 p21 相关的 cyclin-CDK 表达, 从而诱发人二倍体成纤维细胞发生癌变. 充分

说明三者之间在肿瘤形成中的相关性。

p21 蛋白在 p53 缺失细胞中也可受其他转录因子的调节。在一项小鼠实验中, p21 表达与多种细胞终末分化相关, 包括骨骼肌细胞、表皮细胞等。在这些细胞中, p21 表达是由具 bHLH 基序的转录因子家族成员 MyoD 诱导产生的。处于增殖状态的成肌细胞, MyoD 表达可诱使细胞进入 G₀ 期并分化, 而 cyclin D₁ 的强制表达可抑制 MyoD 的反式激活作用, 并伴有 MyoD 的磷酸化而使细胞保持增殖状态而不是分化。但当将 p21 和 p16 转入这些细胞后, 即使在高浓度血清培养下也能促进成肌细胞特异性基因表达, 表明 p21 和 p16 为许多类型细胞终末分化的启动和维持所必需^[19]。

p21 与另一种哺乳类细胞 CDI-p27kip1 在 N 端有 42% 相同。与 p21 一样, p27 在体外抑制许多型 cyclin-CDK 复合体, 包括 cyclin D-CDK4、cyclin E-CDK2。p27 过表达能阻滞细胞通过 G₁ 期。实验表明由 cAMP 诱导的鼠巨噬细胞 G₁ 期阻滞明显是通过增加 p27 表达, 从而抑制由 TGF- β 介导的 pRb 磷酸化而实现的。

3 展 望

对细胞这些周期检查点调控元件在细胞周期调控中的作用机理进行深入研究, 将有助于我们对肿瘤细胞增殖调控的认识, 同时也将为我们确定抗癌药物, 改善抗癌药物的治疗效果提供重要的理论依据。从细胞周期来看, 癌变是一种细胞不能撤离细胞周期而异常增殖的过程。现行的抗癌药物大多具有细胞周期特异性, 因而采取有效措施将癌细胞阻滞在某一期, 然后进行药物处理, 将会大大提高治疗效果。在基因治疗方面, 由于 p16 分子质量小而在很多方面优于 p53。因此人们已在设计用 p16 来对肿瘤病人进行基因治疗。同时, 在肿瘤细胞中, CDI、CDK 与 cyclin 的调控存在许多变化, CDI 与肿瘤发生的关系也有待进一步确立, 其与诱使肿瘤细胞分化的关系也需进一步深入。从而提高我们对肿瘤的本质认识, 有目的地促进细胞分化, 控制癌细胞增殖和肿瘤

的发生。

参 考 文 献

- 1 Hartwell L H. *Science*, 1989; **246**: 629
- 2 Lew D J. *Trends Cell Biol*, 1992; **2**: 77
- 3 Gautier J. *Cell*, 1990; **10**: 487
- 4 Jiang W, Kahn S M, Tomita N *et al.* *Cancer Res*, 1992; **52**: 2980
- 5 Baldin V, Lukas J, Marcote M J *et al.* *Genes Dev*, 1993; **7**: 812
- 6 Matsushime H, Ewen M E, Strom D K *et al.* *Cell*, 1992; **71**: 323
- 7 Devoto S H, Mudry J M, Pines J *et al.* *Cell*, 1992; **68**: 167
- 8 Hunt T. *Nature*, 1991; **349**: 100
- 9 Sherr C J. *Cell*, 1993; **73**: 1059
- 10 Alexander K. *Mol Cell Biol*, 1994; **14**: 7195
- 11 Manuel S. *Nature*, 1993; **366**: 704
- 12 Almut S. *Oncogene*, 1994; **9**: 3475
- 13 Hannon G J, Beach D. *Nature*, 1994; **371**: 257
- 14 Zhang H, Hannon G J, Beach D. *Genes Dev*, 1994; **8**: 1750
- 15 WadeHarper J. *Cell*, 1993; **75**: 805
- 16 Junjie C. *Nature*, 1995; **374**: 386
- 17 Rong L. *Nature*, 1994; **371**: 534
- 18 El-Deiry W S. *Cancer Res*, 1994; **54**: 1169
- 19 Orna H. *Science*, 1995; **267**: 1018

Cyclin, CDK Inhibitor and Cell Cycle Regulation. Li Baoyuan¹⁾, Wang Daishu (*Beijing Institute of Cancer Research, Beijing 100034, China*; ¹⁾ *The Medical School of Datong, Datong 037008, China*).

Abstract In the research of cell cycle regulation, the knowledge of the functions of cyclin-CDKs in the cell cycle regulation has been made a significant progress. Recently, the isolation and studies of the family of CDK inhibitor proteins, p16 and p21, imply that cyclins and CDIs form a very complicated cascaded regulation network in the regulation of the activity of CDKs, through which they impose control upon the proliferation and differentiation of cell, are related to the formation and development of cancer.

Key words cell cycle, cyclin, CDK, CDI