

烷化剂对哺乳动物生长抑制及 DNA 损伤(gadd)和其它应激反应基因的诱导

胡文蔚 综述 余应年 审校

浙江医科大学病理生理教研室 杭州 310031

摘要 烷化剂可通过对 DNA 的直接攻击及使细胞处于应激状态引起一系列反应,它可诱导许多基因表达的改变,除修复相关基因(已对其进行过专门综述)外,其诱导表达的参与细胞周期调控及转录调控等应激相关基因可参与细胞应激反应,引起细胞对外界损伤剂的耐受,提供细胞对烷化剂的抗性,也参与癌变 突变的发生。本文综述了这些烷化剂诱导基因的表达及作用。

关键词 烷化剂;gadd 基因;应激反应基因

烷化剂是一大类 DNA 损伤剂。它可导致碱基错配, DNA 链内、链间交链,链断裂及复制终止,最终使细胞死亡或突变。烷化剂可以诱导细胞许多基因表达,它所诱导的基因表达可参与细胞应激状态下的多种功能,包括修复、复制、细胞周期调控、细胞信号传导,也可参与遗传不稳定的发生。这是烷化剂除直接 DNA 损伤外对细胞的作用。对它的研究有助于我们了解烷化剂引起细胞恶性转化及细胞应激等的机制。作者已就烷化剂诱导的修复相关基因的表达改变和它们对细胞的作用进行过综述⁽¹⁾,本文将着重讨论烷化剂诱导的细胞周期调控相关基因及其它应激反应基因。

1 参与细胞生长调控的基因

烷化剂诱导一大群对细胞生长呈负性影响的基因表达,主要是 gadd (grow-tharrested and DNA-damage) 基因。gadd 基因最初是在 CHO 细胞 cDNA 文库中分离得到,包括 gadd45、gadd135、gadd34、gadd33 及 gadd7 等⁽²⁾。这些基因在真核细胞中广泛存在,且序列保守。人 gadd45 基因位于染色体 1p31.1 - 31.2,第三内含子中含 700bp 高度保守的 P₅₃ 结合元件, gadd153 基因位于染色体

12q13.1 - 13.2,5' 端启动子区富含 GC 及多转录因子结合位点,含 TAAT 盒,6 个 SP-1 结合部位及 4 个白介素 6 反应元件⁽³⁾。在大多数的细胞中,高水平 DNA 碱基损伤剂(烷化剂、紫外、近紫外辐射及 H₂O₂) 处理后,其 mRNA 及蛋白水平均快速增加,在 CHO 细胞中,MMS 处理 2 小时后 gadd153、gadd45 及 gadd34 表达增加 10 倍以上,而在细胞内丰度较低的 gadd33 及 gadd7 表达量也增加,但小于 5 倍。同时 gadd mRNA 稳定性增高⁽²⁾。其他引起生长抑制的处理(血清减少及前列腺素 A₂) 也可缓慢诱导 gadd 基因的表达,但无 mRNA 稳定性的增高。而一旦去除生长抑制因素,其转录水平亦下降。

gadd 基因的诱导调节机制尚未彻底了解。有实验表明各种 gadd 基因的诱导表达可能是通过共调节完成。在 CHO 及 3T3 细胞中,几种 gadd 转录水平的诱导在不同 DNA 损伤剂及生长抑制处理下都很相似,能被协同诱导⁽⁴⁾。DNA 损伤是诱导 gadd 基因表达的重要信号,某些激酶的作用也参与诱导。在 UV - 修复缺陷突变体中紫外线照射后诱导明显增加;而特定的激酶抑制剂(如 2 - 氨基嘌呤)可以阻断 gadd 基因的诱导⁽⁵⁾,但 gadd45 基因

较特殊,低剂量离子辐射可诱导其表达,这一般只产生极少 DNA 碱基的损伤,不能激活 gadd45 基因启动子,而是通过 P₅₃蛋白介导完成对其的诱导⁽⁶⁾。在 gadd45 序列中第三内含子含强 P₅₃蛋白结合位点,X 线引起的链断裂为激活此 P₅₃依赖的诱导途径中的重要信号。在毛细血管扩张性共济失调症病人中,由于 ATM 基因功能缺失,野生型 P₍₅₃₎不能发挥作用,X 线对 gadd 的诱导作用消失,但 MMS 仍可诱导其表达⁽⁷⁾。尽管烷化剂等 DNA 损伤剂对 gadd45 及 gadd153 的诱导被认为是独立于由离子辐射触发、通过 P₅₃蛋白介导的诱导途径,但当人细胞内转染了 P₅₃突变基因后烷化剂对 gadd45 及 gadd153 的诱导作用减弱,MMS 或紫外辐射引起的 G₁ 期阻滞也显著下降。在 P₅₃缺失的鼠胚成纤维细胞中 MMS 及紫外辐射诱导 gadd45 及 gadd153 的能力下降;对含 gadd45 及 gadd153 启动子的报告基因,其激活能力也大大降低。由于这两者启动子均不能被离子辐射所诱导,也不含 P₅₃结合位点,提示 P₅₃在非离子辐射应激反应对 gadd 基因的诱导也具协同作用⁽⁹⁾。此外,PKC 的途径激活也可参与诱导 gadd45 的表达:在 PKC- 过度表达的 MCF-7 乳房肿瘤细胞,TAP 处理引起凋亡发生前 gadd45 诱导表达,且不依赖 P₅₃的作用⁽⁸⁾。

gadd 基因编码产物具细胞生长抑制作用,其在体内的过度表达,可使细胞内碱基摄取速度减慢,细胞克隆形成能力下降。gadd34 基因与鼠 Myd116 基因同源,gadd45 与 Myd118 基因属于两类基因,但有高度相关性,Myd 基因是一类参与髓性分化的初级反应基因,编码产物是酸性蛋白,Myd116 基因的部分序列与单纯疱疹病毒蛋白序列同源,后者在感染某些细胞后可参与使细胞蛋白合成停止,继而发生凋亡⁽¹⁰⁾。这提示 gadd 基因表达可能与凋亡存在一定关系,而 gadd34 gadd45 及 gadd153 也确实在鼠髓细胞终末分化时可被诱导⁽¹⁰⁾。由于 gadd 可被烷化剂广泛诱导,但烷化剂却并不都诱导凋亡,因此,

gadd 的诱导与凋亡间的关系尚需更直接的证据。gadd153 表达产物是 CCAAT/增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein C/EBP)转录因子家族中 CHOP-10 的同源物,后者在成纤维细胞向脂肪细胞分化时被诱导,CHOP-10 含有 C/EBP 家族所共有的亮氨酸拉链及基本区,所不同的是在 DNA 结合区中的两个残基被转换成脯氨酸,它与 C/EBP 形成杂二聚体不能与 C/EBP 结合位点结合,因此,在特定终末分化细胞中能负调节 C/EBP 样蛋白活性⁽¹¹⁾。

在 gadd45 的研究中发现它的表达能抑制细胞进入 S 期,与 WAF₁ 过度表达引起的生长阻滞水平相似,但较 P₅₃过度表达引起的生长阻滞作用要弱⁽¹²⁾。DNA 损伤后诱导的 gadd45 可能与 DNA 损伤修复有关。它可能与 WAF₁ 竞争结合 PCNA,WAF₁ 具有阻断 Gadd45 与 PCNA 结合活性的作用。在 DNA 损伤后,PCNA 作为修复相关 DNA 聚合酶、的辅助因子,从 DNA 复制部位移至 DNA 损伤部位上。Gadd45 与 PCNA 的结合提示它可能参与 DNA 的修复,在体外切除修复中,Gadd45 的去除使修复效率降低三倍,而在体内反义阻断 gadd45 的诱导及基础表达,则紫外辐射后细胞存活率显著下降^(13,14)。对 gadd45 表达产物功能的进一步研究有助于了解 P₅₃与 gadd45 间的关系及功能。gadd7 基因是在胞内低丰度表达的小片段基因,在仓鼠中分离得到,与其它细胞杂交不能得到同源序列,它缺乏大的开放阅读框,只有 3 个小的开放阅读框,分别编码 38,37 及 43 个氨基酸,与已知蛋白无同源性,体外翻译实验证实它不能翻译产生蛋白产物⁽¹⁵⁾。它在诱导后如何发挥生长抑制功能尚不得而知。

2 其它应激反应基因

在各种遗传毒物对细胞的处理引起的应激反应中具有即刻早期反应,包括对原癌基因 c-fos 及 c-jun 等转录因子的诱导,烷化剂也有此作用。它可诱导 c-jun、c-fos、junB、junD 及

c-myc 的 mRNA 水平升高⁽¹⁶⁾。c-jun 与 c-fos 的编码产物结合成转录因子 AP-1, 由 PKC 途径激活, 可增强许多启动子的转录, 包括鼠胶原、人金属硫因、人免疫缺陷病毒等基因启动子。较大剂量烷化剂处理可快速诱导 c-fos 与 c-jun 表达增高, 并可能与随后的细胞凋亡相关。而小剂量亚细胞毒浓度烷化剂处理人髓细胞后, c-jun 及 c-fos 的 mRNA 水平在 1-6 小时达到高峰后, 48 小时后出现 AP-1 所调节基因表达水平的轻微增高。其中包括胶原酶 mRNA, 波形蛋白及核层蛋白 A 及核层蛋白 C 的 mRNA, 这些基因的编码产物参与细胞分化, 同时细胞表现出诱导分化⁽¹⁷⁾。烷化剂对 c-fos 表达的诱导与致癌剂可增强病毒转化作用有关, 反义 c-fos 能阻断致癌剂增强的病毒转化, 而含 c-fos 表达质粒的鼠胚成纤维细胞可促进此作用⁽¹⁸⁾。烷化剂对 c-fos 与 c-jun 的诱导表达不受蛋白合成抑制剂的抑制, 对 CHO 细胞使用 Cyclohexamide (CHM) 预处理可以使 MMS 对 c-fos 的诱导表达作用增加。烷化剂造成的 DNA 损伤, 如链断裂不参与对转录因子的诱导。修复 DNA 烷化损伤的 O⁶-甲基鸟嘌呤甲基转移酶缺失及正常表达的细胞系中均有这些基因表达水平的增加。MNNG 诱导 fos、jun mRNA 表达所需的剂量为诱导基因突变、姐妹染色体重组所需剂量的 50 倍⁽¹⁶⁾, 它们的诱导可能是通过信号传导途径进行调节的。在“UV”反应中, PKC 对 c-jun 及 c-fos 的转录激活起到重要作用。在烷化剂诱导鼠胚 c-fos, c-jun mRNA 升高的同时, 发现烷化剂处理后 3-6 小时有 PKC 膜相关活性的短暂增加, 至处理后 48 小时, 则胞浆及膜 PKC 活性均显著增加⁽¹⁷⁾。c-jun 主要调节因子是 ATF-2 和 JUN, 它们以预结合的杂二聚体形式可作用在 c-jun 基因调节区的两个 AP-1 样位点上, 可被 DNA 损伤及各种细胞应激激活, 两者对细胞外反应不同, ATF-2 的反式激活作用强于 JUN, 在烷化剂诱导 c-jun 的表达增加中, 主要通过提高 c-Jun N-末端激酶 (JNK), 即应激激活蛋白激酶 (SAPK)

的活性, 使 ATF-2 的 N-末端反式激活功能域中 69 及 71 位苏氨酸磷酸化并激活来完成。阻断 JNK-1 的蛋白活性, 伴随有烷化剂诱导 c-jun 的抑制^(19,20)。此外, 非受体酪氨酸激酶 c-abl 基因产物也可能参与作用, 烷化剂可激活 c-Abl, 而 c-Abl 的缺失就阻断烷化剂激活 JNK, 恢复 c-Abl 则可激活 JNK 及重现一系列后续反应⁽²¹⁾。在对 c-jun 诱导机制的研究中还发现 GSH 也参与烷化剂对 c-jun 的诱导, 细胞内 GSH 的去除, 则阻断烷化剂 MMS 对 c-jun 的诱导; 恢复细胞内正常的 GSH 水平, 则诱导重又出现⁽²²⁾。

这些转录因子如何在诱导表达后选择调节不同基因表达及在烷化剂作用后应激反应中的意义仍值得进一步搞清楚。

烷化剂还可引起其它一些基因的表达增加。它可诱导编码泛醌 (Ubiquitin) 基因表达, MMS 处理 CHO 细胞及未转化人成纤维细胞系可引起编码泛醌的基因家族中长度为 1.7kb (UbB) 及 2.6kb (UbC) 两个转录子的水平增高, 且可为转录抑制剂所阻断, 它的诱导表达情况与其它应激反应 (热休克) 的诱导情况相似⁽²³⁾。泛醌参与介导非溶酶体性蛋白降解, 可去除短寿及异常损伤的蛋白, 作用底物广泛, 包括 p53, Fos/Jun, NFkB/IKB, Mos 等。它还作用于烷化的 O⁶ 甲基鸟嘌呤甲基转移酶 (MGMT), 在烷化剂处理后, 伴随 MGMT 活性下降, 泛醌结合的 MGMT 明显增加, 当泛醌与 MGMT 结合量恢复至正常时, 细胞内 MGMT 蛋白水平降至最低。当在泛醌激活酶 (Ubiquitin-activating enzyme) E1 突变的细胞系中用烷化剂处理, 则 MGMT 大部分不能被降解^(24,25)。泛醌在烷化剂处理后的增多可能也是一种适应性反应, 参与应激状态下的蛋白代谢, 调节参与信号传导及其它细胞重要功能蛋白的半寿期。

烷化剂处理还可引起一些细胞因子 mRNA 水平的增加, 包括 IL-1, 1 及 IL-6, 主要是由于 mRNA 半寿期的延长而非转录速度增加引起。体内实验发现携 MOPC-315 肿瘤的

小鼠经低剂量烷化剂米尔法兰处理后,可诱导 TNF, IFN, IL-12 表达增加,并参与发挥抗肿瘤作用^(26,28)。它们在细胞内可发挥广泛的生物活性及功能。

对热休克蛋白基因的转录激活也是一种常见的应激反应,烷化剂可激活热休克转录因子-1(heat shock transcription factor-1 HSF1),诱导 hsp70 家族基因的表达,可能与烷化剂引起的细胞硫醇-二硫化物(thiol-disulfide)氧化还原状态的改变有关⁽²⁷⁾。

综上所述,烷化剂除直接造成 DNA 碱基损伤,还可引起哺乳动物中一系列基因表达水平的变化,这些基因的表达产物参与细胞的各种功能,包括损伤修复,细胞生长控制,信号传导,代谢及细胞自稳态等各方面,还有一些基因可为烷化剂诱导表达,但尚不知道其确切功能。这些基因的表达可能是细胞对于应激的适应性反应,有利与细胞修复损伤并存活,也可能部分参与细胞在烷化剂作用后产生点突变增加、遗传不稳定的发生和癌变的形成。因此,分离并研究被烷化剂诱导的基因,包括其被诱导表达的机制及其表达的增加在细胞中的作用,有助于我们了解细胞应激状态下基因表达改变,为揭示烷化剂等致癌剂导致肿瘤的发生提供线索。

参与文献

- 1 胡文蔚,余应年. 烷化剂诱导的哺乳动物修复相关基因表达. 国外医学(分子生物学分册),1998;印刷中
- 2 Jackman I, Alamo I Jr, Fornace AJ Jr. Genotoxic stress confers preferential and coordinate messenger RNA stability on the five gadd genes. *Cancer Res*,1994;54(21):5656
- 3 Hollander MC, Alamo I, Jackman J et al. Analysis of the mammalian gadd45 gene and its response to DNA damage. *J Biol Chem*,1993;268(32):24385
- 4 Fornace AJ Jr, Jackman J, Hollander MC et al. Genotoxic-stress-response genes and growth-arrest genes. gadd, MyD, and other genes induced by treatments eliciting growth arrest. *Ann NY Acad Sci*,1992;663:139
- 5 Holbrook NJ, Fornace AJ Jr. Response to adversity: molecular control of gene activation following genotoxic stress. *New Biol*,1991;3(9):825
- 6 Papatheanasiou MA, Kerr NC, Robbins JH et al. Induction by ionizing radiation of the gadd45 gene in cultured human cells: lack of mediation by protein kinase C. *Mol Cell Biol*,1991;11(2):1009
- 7 Zhan Q, Bae I, Kastan MB et al. The p53-dependent gamma-ray response of GADD45. *Cancer Res*,1994;54(10):2755
- 8 de-Vente JE, Kukoly CA, Bryant WO et al. Phorbol esters induce death in MCF-7 breast cancer cells with altered expression of protein kinase C isoforms. Role for p53-independent induction of gadd45 in initiation death. *J Clin Invest*,1995;96(4):1874
- 9 Zhan Q, Fan S, Smith ML et al. Abrogation of p53 function affects gadd gene response to DNA base-damaging agents and starvation. *DNA Cell Biol*,1996;15(10):805
- 10 Smith ML, Fornace AJ Jr. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Muta Res*,1996;340(2-3):109
- 11 Friedman AD. GADD153/CHOP, a DNA damage-inducible protein, reduced CAAEnhancer binding protein activities and increased apoptosis in 32D c13 myeloid cells. *Cancer Res*,1996;56(14):3250
- 12 Chen IT, Smith ML, O'Connor PM et al. Direct interaction of Gadd45 with PCNA and evidence for competitive interaction of Gadd45 and p21 Waf1/Cip1 with PCNA. *Oncogene*,1995;11(10):1931
- 13 Smith ML, Chen IT, Zhan Q et al. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferation cell nuclear antigen. *Science*,1994;266(5189):1376
- 14 Sanchez Y, Elledge SJ. Stopped for repairs. *Bioessays*,1995;17(6):545
- 15 Hollander MC, Alamo I, Fornace AJ Jr. A novel DNA damage-inducible transcript, gadd7, inhibits cell growth, but lacks a protein product. *Nucleic Acid Res*,1996;24(9):1589
- 16 Dosch J, Kaina B. Induction of c-fos, c-jun, junB and junD mRNA and AP-1 By alkylating mutagens in cells deficient and proficient for the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and its relationship to cell death, mutation induction and chromosomal instability. *Oncogene*,1996;13(9):1927
- 17 Ballester A, Perez C, Aller P et al. Differentiation of U-937 promonocytic cells with mitomycin C or cis-diamminedichloroplatinum 11. *Int J Cancer*,1996;65(6):791
- 18 Su ZZ, Yemul S, Stein CA et al. C-fos is a positive regulator of carcinogen enhancement of adenovirus transformation

AL 细胞在基因突变研究中的应用

周红宁 王 琪 高凤鸣

卫生部工业卫生实验所 北京 100088

突变是指生物体遗传物质发生了改变。体细胞突变可能与肿瘤等许多基因性疾病相关,性细胞突变则可影响后代,造成显性死亡或可遗传性改变。许多因素如物理、化学、生物等均可引起基因突变,基因本身也可发生自发性突变。基因突变包括点突变、大片的缺失或插入突变及移码突变。哺乳动物细胞的诱变研究在近几年中有飞速的发展。目前,大多数是进行特定定位点突变研究,即用一定的选择性培养基选择具有特定定位点突变,并表现出一特定表型的细胞株作为研究系统。AL 细胞是一种人地鼠杂交细胞,在突变研究中具

有一定的优势。本文拟对 AL 细胞在基因突变中的应用作一介绍。

1 AL 细胞的起源及培养

AL 细胞是由 Puck 及其同事于 1971 年首先建立的。他们用仙台病毒将中国地鼠卵巢突变株($gl^{-1}A$)细胞和人的皮肤活检成纤维细胞融合,建立了 AL 细胞系(human-hamster hybrid cell line),该细胞含有一套完整的地鼠染色体及人的一条 11 号染色体。在人的 11 号染色体上有多个基因位点,如 Ras 基因(11p15.5)、Wilm's 肿瘤基因(11p13)、甲状旁

. *Oncogene*, 1995;10(10):2037

- 19 Van Dam H, Wilhelm D, Herr I et al. ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J*, 1995;14(8):1789
- 20 Liu Y, Gorospe M, Yang C et al. Role of mitogen-activated protein kinase phosphatase during the cellular response to genotoxic stress. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase activity and AP-1 dependent gene activation. *J Biol Chem*, 1995;270(15):8377
- 21 Kharbanda S, Ren R, Pandey P et al. Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature*, 1995;376(6543):785
- 22 Kuo ML, Meng TC, Lin JK. Involvement of glutathione in induction of c-jun proto-oncogene by methylmethanesulfonate in NIH3T3 cells. *Carcinogenesis*, 1996;17(4):815
- 23 Fornace AJ, Alamo I Jr, Hollander MC et al. Ubiquitin mRNA is a major stress-induced transcript in mammalian cells. *Nucleic Acid Res*, 1989;17(3):1215
- 24 Srivenugopal KS, Yuan XH, Friedman HS et al. Ubiquitination-dependent proteolysis of O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O^6 -benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochemistry*, 1996;35(4):1328
- 25 Isaksson A, Musti AM, Bohmann D. Ubiquitin in signal transduction and cell transformation. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1288(1):F21
- 26 Mallardo M, Gordano V, Dragonetti E et al. DNA damaging agents increase the stability of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 transcripts and the production of the relative proteins. *J Biol Chem*, 1994;269(21):14899
- 27 Mallardo M, Dragonetti E, Baldassarre F et al. An NF-kappaB site in the 5' untranslated leader region of the human immunodeficiency virus type enhances the viral expression in response to NF-kappaB-activating stimuli. *J Biol Chem*, 1996;271(34):20820
- 28 Gorelik L, Mokyr MB. Low-dose-melphalan-induced up-regulation of type-1 cytokine expression in the s.c. tumor nodule of MOPC-315 tumor bearers and the role of interferon gamma in the therapeutic outcome. *Cancer Immunol Immunother*, 1995;41(6):363