

细胞周期检控点

蔡秋凤 江瑞胜 欧阳高亮* 鲍仕登

(厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要 细胞周期是高度有组织的时序调控过程, 受到 DNA 损伤检控点、DNA 复制检控点和纺锤体检控点等细胞周期检控点的精确调控。细胞周期检控点的作用主要是调节细胞周期的时序转换, 以确保 DNA 复制、染色体分离等细胞重要生命活动的高度精确性, 并对 DNA 损伤、DNA 复制受阻、纺锤体组装和染色体分离异常等细胞损伤及时做出反应, 以防止突变和遗传不稳定的发生。细胞周期检控点的功能缺陷, 将导致细胞基因组的不稳定, 与细胞癌变密切相关。因此细胞周期检控点对于维持细胞遗传信息的稳定性和完整性以及防止细胞癌变和遗传疾病的发生起着至关重要的作用。

关键词 细胞周期检控点; DNA 损伤检控点; DNA 复制检控点; 纺锤体检控点; 遗传不稳定性

细胞周期检控点是细胞内调节细胞周期时序转换有序进行的重要调控机制, 主要包括 DNA 损伤检控点(DNA damage checkpoint)、DNA 复制检控点(DNA replication checkpoint)和纺锤体检控点(spindle checkpoint)等细胞周期检控点^[1-3]。细胞周期检控点的作用主要是调节细胞周期的时序转换, 以确保 DNA 复制、染色体分离等细胞重要生命活动的高度精确性, 并对 DNA 损伤、DNA 复制受阻、纺锤体装配和染色体分离异常等细胞损伤及时做出反应, 阻滞细胞周期的运行, 诱导相关基因表达, 使细胞有充分的时间对损伤进行修复, 以防止突变和遗传不稳定的发生。如细胞损伤过大而无法修复, 检控系统则启动相应的细胞凋亡机制将损伤细胞加以清除, 以确保细胞基因组的完整性和遗传的稳定性。

细胞周期检控点是一复杂的信号转导网络系统, 这些检控系统主要由一系列相关的检控蛋白相互作用所组成, 这些检控蛋白构成检控系统的感受器、转导器和效应器, 从而对细胞周期进行检控并产生相应的生物学效应。近年来, 有关细胞周期检控点调控的分子机制研究已成为当今生命科学的重要前沿领域。本文主要介绍 DNA 损伤检控点、DNA 复制检控点和纺锤体检控点的基本特性及其主要分子机制和生物学功能, 并对该领域的一些研究进展进行综述和展望。

1 DNA 损伤检控点

生物体的生存依赖于细胞将遗传信息正确地传递给子代细胞。遗传信息的这种忠实传递不仅要求 DNA 复制的高度正确和染色体的准确分布, 还要求细胞具有在自发性或诱发性 DNA 损伤时存活下去的能力, 并将可遗传突变最小化。在细胞的生命活动过程中, DNA 损伤是细胞生命活动过程中相对普遍的生物学事件, 许多细胞代谢产物和环境因素都可能影响细胞基因组的完整性, 而且基因组在复制过程中也会产生一些 DNA 损伤。DNA 损伤可导致基因突变、细胞癌变、细胞死亡乃至生物体死亡。为确保遗传信息的高度准确, 细胞逐渐进化出一系列监控染色体结构并协调 DNA 损伤修复和细胞周期演进的机制, 这就是 DNA 损伤检控点^[4-6]。最初认为的 DNA 损伤检控点的功能只是在 DNA 损伤时阻滞细胞周期进程, 使细胞有充分的时间进行修复。但最近的研究表明, DNA 损伤检控点的作用不仅在于调控细胞周期阻滞, 更重要的是参与调控 DNA 损伤修复通路的活化或诱导损伤严重的细胞凋亡, 而且 DNA 损伤检控点在维持端粒的稳定性中也起重要作用。

收稿日期: 2005-02-06 接受日期: 2005-05-30

国家自然科学基金(No.30170463、No.30370307、No.30400239)

和福建省青年科技人才创新专项重点项目(No.2003J017)资助

* 通讯作者。Tel: 0592-2186091, Fax: 0592-2188101, E-mail:

oygldz@yahoo.com.cn

1.1 DNA 损伤应答

DNA 损伤应答通路是一条信号转导通路, 更准确地讲是一个信号转导网络。简要地讲, DNA 损伤检控点应用 ATM、ATR、Rad17-RFC 复合物、9-1-1 复合物(Rad9、Rad1、Hus1)等作为感受器, 检测 DNA 的结构异常并启动检控点信号, 活化 Brca1、Claspin、53BP1、MDC1 等介导分子(mediator), 并通过 Chk1、Chk2 等转导分子进一步将信号转导给相应的效应器, 如 Cdc25A、Cdc25C、p53、p21 等, 效应器则引发这个通路的生物学效应, 如 G₁ 期检控、S 期检控和 G₂ 期检控, 引起细胞周期阻滞, 损伤严重的则直接诱导细胞凋亡^[4~7]。

1.2 DNA 损伤修复

DNA 损伤修复通路是一复杂的信号网络, 包括直接修复、碱基切除修复、核苷切除修复、双链断裂修复和复制叉修复等^[4]。每一条 DNA 损伤修复通路可针对特定的 DNA 损伤, 而且大多数 DNA 修复是组成型修复, 但许多 DNA 损伤修复通路与 DNA 损伤应答通路相关联。真核生物 DNA 损伤时, 首先进行识别, 再对损伤进行评估并做出恰当的反应(如 DNA 损伤修复或诱导细胞死亡)。但这些步骤的激活并不是简单的线性关系, 因为损伤识别可引发多个同步信号, 这些信号均可诱发 DNA 损伤修复和细胞凋亡。

1.3 DNA 损伤检控点对端粒稳定性的调控

端粒是位于真核细胞染色体末端由重复 DNA 序列和蛋白质组成的复合物, 给染色体末端提供一个保护“帽”, 防止核酸外切酶和连接酶的攻击, 并防止染色体末端的端端融合、重组、降解, 以保证细胞在有丝分裂时染色体的正确分离, 引导减数分裂时的同源染色体配对和分离^[8,9]。端粒结合蛋白中包括一些 DNA 修复蛋白, 这些 DNA 修复蛋白将染色体末端看作双链断裂(DSB), 这可能是细胞维持端粒稳定的巧妙机制。

研究表明, DNA 损伤检控系统的 ATM 检控蛋白通过对 c-Abl 等下游效应分子的磷酸化来调节 hTERT 的活性, 从而在端粒长度的维持中发挥重要作用, ATM 功能缺失可导致哺乳动物细胞端粒维持功能的缺陷^[10~13]。另外也有研究显示, 在裂殖酵母等生物中, 检控蛋白 Rad1、Rad3、Rad17、Rad26 以及 Rad9、Chk1、Chk2、Hus1 等均与端粒长度的变化关系密切^[14~17]。检控系统下游蛋白如 Rad50、p53 等也与端粒的代谢有关^[18,19]。我

们的初步研究发现, 用 RNAi 技术使 Rad17 水平降低可导致端粒迅速变短。由此可见, DNA 损伤检控点在维持端粒稳定性中起重要作用, 表明端粒的稳定性调节也是 DNA 损伤检控点的重要功能之一。

2 DNA 复制检控点

细胞在分裂之前必须将 DNA 忠实地复制并传递给两个子代细胞, 许多胞内和胞外因素都可干扰 DNA 的正常复制。如果细胞在 DNA 还没有完全复制的时候就提前进入有丝分裂期, 就必然会破坏子代细胞的基因组完整性, 导致一些致命性的后果。在正常的 DNA 复制过程中, 细胞有多种分子机制可保证 DNA 复制的高保真性, 以克服这些胞内外因素导致的细胞遗传不稳定性, DNA 复制检控点是其中关键的一种。DNA 复制检控点能够监测 DNA 复制情况, 当 DNA 复制受阻或者细胞内还存在没有完全复制的染色体时, DNA 复制检控点能够及时活化, 引发一系列下游生物学事件如复制速率的减慢、复制叉的稳定和细胞周期运行的阻滞, 为细胞修正错误提供足够的时间, 以保证细胞遗传的稳定性^[20~22]。

与 DNA 损伤检控点类似, DNA 复制检控点大致也是由 ATR 等检控蛋白组成感受器、转导器和效应器。研究发现, ATR 不仅会对 UV 等诱导产生的 DNA 损伤产生应答, 引发 DNA 损伤检控点的活化, 还在羟基脲(hydroxyurea, HU)等 DNA 复制阻断剂诱导活化的 DNA 复制检控点中起着重要的作用^[23~25]。爪蟾中的研究显示, 在 DNA 复制的时候, ATR 与染色质相结合, 并且在用 DNA 聚合酶 α 抑制剂阿非迪霉素(aphidicolin)活化 DNA 复制检控点时, 这种结合会得到加强^[26]。此外, RNA 引物是 DNA 复制和复制检控点所需的, 如果抑制 RNA 引物的功能, 就能够阻止 ATR 与染色质的结合^[27]。在哺乳动物细胞中也发现, 当细胞用阿非迪霉素处理之后, ATR 可结合到受阻的复制叉上^[28]。这些都说明, 当 DNA 复制受阻的时候, ATR 能够通过某种机制结合到染色质, 激活复制检控点功能。不过目前的研究显示, ATM 只对 DNA 损伤产生应答, 对 DNA 复制阻断剂诱导产生的 DNA 复制抑制并不产生任何应答。

Rad17 和 9-1-1 复合物虽然不是 ATR 检测异常的 DNA 结构所需的, 但是与 DNA 损伤检控点相似, 它们也是复制检控系统中 ATR 活化下游因子所需的。Hus1^{-/-} 小鼠表现出高度的染色体异常和高度的

UV、HU 敏感性。剔除 *Hus1* 基因对于小鼠胚胎来说是致命的, 其结果与 *ATR* 缺陷是一样的^[29]。在鸡 B 淋巴细胞系 DT40 中, *Rad17*^{-/-} 和 *Rad9*^{-/-} 细胞无法对受阻的 DNA 复制产生应答^[30], 表明 *Rad17* 和 9-1-1 复合物在 DNA 复制检控点中起重要作用。但 *Rad17* 和 9-1-1 复合物在复制检控点中的具体作用模式还不是很清楚, 不过有研究发现, HU 处理之后, PCNA 与 *Rad17*-RFC 和 *Rad9* 之间都会发生相互作用^[31], 表明 DNA 复制抑制剂能够诱导 *Rad17*-RFC 复合物结合到 DNA 复制受阻的位点, 并协助 9-1-1 复合物结合染色体, 使得 9-1-1 复合物能够与 PCNA 相互作用。PCNA 则可能介导了从 DNA 复制机制与 DNA 复制检控点之间的信号转导。不过具体的机制和作用方式还需要更进一步的探讨。

ATR 在 DNA 复制检控点中的下游信号转导因子也是 *Chk1*, *Chk1* 的 4 个 SQ 位点能够被 *ATR* 直接磷酸化, 并且这些位点的磷酸化对 DNA 复制检控点活化之后的细胞周期阻滞非常重要。*Chk1* 可将阻滞信号转导给 *Cdc25*, *Chk1* 可磷酸化 *Cdc25* 的 3 个位点: Ser99、Ser192、Ser359, 这些位点的磷酸化一方面会导致 *Cdc25* 与 14-3-3 蛋白结合并发生核输出, 同时还会使 *Cdc25* 的活性下降, 阻止 *Cdc25* 活化 *Cdc2*, *Cdc2* 的 Tyr14 和 Tyr15 位点就无法发生去磷酸化活化, 从而引发细胞周期阻滞^[32-34]。

DNA 不仅需要得到精确复制, 并且在一个细胞周期内只能复制一次。因此, 细胞内必定存在一套严谨的检控机制, 控制 DNA 的起始复制。近年来的实验结果表明, 检控点通路在阻止 DNA 再次复制中也起重要作用^[35]。用 ATM/ATR 或 *Chk1* 的抑制剂处理 *Cdt1* 过表达的细胞, 可促进细胞的再次复制。在人类肿瘤细胞中, 去除检控蛋白 *Rad17* 可导致 DNA 的再次复制。有趣的是, 在 p53 缺陷型的细胞中, 过表达 *Cdt1* 和 *Cdc6* 可导致 DNA 的再次复制, 而在 p53 野生型细胞中则无此现象。

3 纺锤体检控点

有丝分裂过程中, 染色体的准确分离需经过一系列过程, 这些过程大致为: DNA 复制结束后, Cohesins 等蛋白质可将染色体的两条姐妹染色单体结合在一起; 在有丝分裂的前中期, 姐妹染色单体通过动粒附着到细胞两极中心体发出的纺锤体微管上; 在中期, 与纺锤体微管结合的染色体排列到赤道板; 当细胞进入后期, Cohesins 发生降解, 姐

妹染色单体彼此分离, 并在微管的牵引下分别向细胞两极移动, 从而将两套完整的基因组拷贝平均分配给两个子代细胞^[36]。如果这些过程出现错误, 细胞在不恰当的时候进入有丝分裂后期, 子代细胞中将出现染色体缺失, 其后果将是致命的。因此, 这些过程也受到细胞周期检控点的严密监控。为了确保遗传物质的平均分配, 在细胞进入后期之前, 细胞内所有染色体上的动粒都必须与微管发生相互作用并处于两极连接的状态。纺锤体组装检控点能够检测染色体与微管之间的相互作用, 当细胞内出现纺锤体损伤或者未连接到纺锤体的染色体时, 纺锤体组装检控点能够迅速活化并延迟细胞周期的进行, 阻止姐妹染色单体的分离。在所有的染色体都连接到纺锤体之前, 细胞会一直被阻滞在中期^[37,38]。

动粒是染色体与微管间相互作用的位点, 同时也是纺锤体组装检控点信号产生的重要位点, 受到纺锤体组装检控点的严密监控。目前发现几乎所有的脊椎动物纺锤体组装检控点蛋白如 Mad、Bub (除了 Bub2)、Mps 蛋白都位于动粒上。在哺乳动物细胞中, 用激光融化未连接到纺锤体的染色体的动粒, 能够破坏这些动粒引发检控点阻滞细胞周期的能力, 导致细胞提前进入后期。

目前一般认为细胞调节纺锤体的正确装配和姐妹染色单体的正确分离的大致方式为: 在细胞分裂的前中期, 没有与纺锤体发生连接的动粒会产生一个等待信号, 促使 *Cdc20* 与 Mad2、Mad3、Bub3 形成一复合物, 阻止 APC 降解 Securin, 从而阻止 Separase 的活化和 Cohesins 的降解^[39]。细胞分裂中期, 染色体的动粒连接到纺锤体上, 并且通过来自细胞两极的适当的张力而处于细胞正中央。纺锤体组装检控点可检控染色体动粒与微管之间的连接和张力。当这种连接和张力出现意外, 导致纺锤体功能缺陷时, 纺锤体组装检控点就会活化, 引发细胞周期阻滞。其中 BubR1 与动粒蛋白 CENP-E 之间的相互作用被认为是引发纺锤体组装检控点应答的一个早期事件, 能够监控动粒的连接与张力情况。

除纺锤体组装检控点外, 纺锤体检控点还包括纺锤体定位检控点, 即纺锤体的定位也受到检控点的监控。在芽殖酵母中, 两套染色体精确分配到亲代和子代中要求纺锤体正确定位于分裂轴上, 这一过程失败将导致两套染色体都停留在亲代细胞中。纺锤体定位检控点可阻滞细胞周期进程, 直到纺锤体得到正确定位。

表 1 部分人类癌症与检控点基因缺陷的关系^[40,41]

疾病	易患癌症类型	基因
Ataxia-Telangiectasia (A-T)	白血病、淋巴瘤	ATM
Nijmegen breakage 综合征 (NBS)	白血病、淋巴瘤	NBS1
A-T-like disorder (ATLD)	白血病、淋巴瘤	Mre11
Fanconi's anaemia (FA)	急性髓性白血病	FancD2, Brca2
家族性乳腺癌、卵巢癌	乳腺癌、卵巢癌等	Brca1, Brca2
Li-Fraumeni 综合征	白血病、脑瘤、肉瘤、肾上腺瘤等	p53, Chk2

当细胞内引发纺锤体检控点活化的因素得到了排除，细胞将重新启动细胞周期运行机制，进入细胞周期分裂后期。目前一般认为该时期细胞有两种重新启动细胞周期的方式，一种为检控蛋白从动粒向纺锤体的两极移动，这样从物理上将 APC 与其抑制因子分离；另一种为 Mad2 等检控蛋白发生降解，这样 APC 就会恢复活性。但具体的作用方式还有待深入研究。

4 细胞周期检控点功能缺陷与细胞癌变的关系

大量研究表明，基因组不稳定是人类肿瘤发生发展的主要因素。由于检控点通路在维持细胞遗传的稳定性中起重要作用，因此，这些信号转导通路的缺陷可能会提高肿瘤的发生率^[40-44]。目前已经发现，细胞周期检控系统功能缺陷可导致细胞基因组的不稳定，许多与 DNA 复制、损伤修复以及纺锤体组装和染色体分离有关的基因的功能缺陷可引发细胞癌变，如 ATM/ATR 的功能缺陷与 A-T 有关，Brca1 与乳腺癌密切相关(表 1)。尽管如此，很多细胞周期检控点功能缺陷的细胞并不会变成恶性肿瘤细胞，这可能是因为这些细胞内出现损伤、功能障碍之后仍会发生细胞周期阻滞以及细胞凋亡。

5 展望

近年来有关细胞周期检控点调控的研究进展非常快，对有关细胞周期检控点的认识也进一步深入并全面，这将有助于人们从根本上认识细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡和细胞衰老等细胞重大生命活动的本质。但随着研究的逐步深入，人们也逐步发现细胞周期检控点是一个非常复杂的信号调控网络，目前揭示的只是冰山之一角，仍有许多重大问题有待深入研究，如细胞在发现 DNA 损伤、复制受阻、染色体分离异常等细胞损伤时可激活相应的激酶，介导一系列生物学效应，但当细胞将有关损

伤修复后，细胞又是如何将这些激酶去磷酸化？如何重新启动细胞周期进程？细胞周期检控点如何参与维持染色体端粒长度的稳定性？细胞周期检控点在细胞进化过程中较为保守，但在认识这些共性的同时，如何深化认识不同生物的细胞周期检控点的特性也值得进一步深入研究。而且，减数分裂作为一种特殊的有丝分裂方式，在遗传与进化中具有重要作用。但目前对减数分裂过程中细胞周期检控点的作用研究较少，尤其是有关哺乳动物生殖细胞减数分裂研究很少，因此有关不同生物减数分裂过程中的细胞周期检控点机制也是今后该领域的重点之一。另外，如何应用有关细胞周期检控点的认识，针对细胞周期检控点的某一或某些成分为靶点，开发新的癌症治疗方法也是今后特别值得注意的地方。

参考文献(References)

[1] Zhou BB *et al. Nature*, 2000, **408**: 433
[2] Abraham RT. *Genes Dev*, 2001, **15**: 2177
[3] Elledge SJ. *Science*, 1996, **274**: 1664
[4] Sancar A *et al. Annu Rev Biochem*, 2004, **73**: 39
[5] Li L *et al. J Cell Biochem*, 2005, **94**: 298
[6] 江瑞胜等. *细胞生物学杂志*, 2004, **26**: 209
[7] 刘 敏等. *细胞生物学杂志*, 2003, **25**: 210
[8] Lydall D. *J Cell Sci*, 2003, **116**: 4057
[9] Karlseder J. *Cancer Lett*, 2003, **194**: 189
[10] Pandita TK. *Oncogene*, 2002, **21**: 611
[11] d'Adda di Fagagna F *et al. Nature*, 2003, **426**: 194
[12] Lei M *et al. Nature*, 2003, **426**: 198
[13] Naka K *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 2030
[14] Oh H *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 5378
[15] Nakamura TM *et al. Genetics*, 2002, **161**: 1437
[16] Enomoto S *et al. Mol Biol Cell*, 2002, **13**: 2626
[17] Dahlen M *et al. Mol Biol Cell*, 1998, **9**: 611
[18] Trujillo KM *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 48957
[19] Artandi SE. *Trends Mol Med*, 2002, **8**: 44
[20] Boddy MN *et al. Front Biosci*, 1999, **4**: D841
[21] Toueille M *et al. Chromosoma*, 2004, **113**: 113
[22] Shechter D *et al. Nat Cell Biol*, 2004, **6**: 648
[23] Sibon OC *et al. Curr Biol*, 1999, **9**: 302
[24] Brown EJ *et al. Genes Dev*, 2000, **14**: 397
[25] de Klein A *et al. Curr Biol*, 2000, **10**: 479
[26] Hekmat-Nejad M *et al. Curr Biol*, 2000, **10**: 1565

- [27] Michael WM *et al. Science*, 2000, **289**: 2133
[28] Shechter D *et al. DNA Repair (Amst)*, 2004, **3**: 901
[29] Weiss RS *et al. Genes Dev*, 2000, **14**: 1886
[30] Kobayashi M *et al. Genes Cells*, 2004, **9**: 291
[31] Dahm K *et al. Oncogene*, 2002, **21**: 7710
[32] Zeng Y *et al. Nature*, 1998, **395**: 507
[33] Rhind N *et al. Mol Cell Biol*, 1998, **18**: 3782
[34] Zeng Y *et al. Mol Cell Biol*, 1999, **19**: 7410
[35] Machida YJ *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 6253
[36] Michaelis C *et al. Cell*, 1997, **91**: 35
[37] Musacchio A *et al. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, **3**: 731
[38] Lew DJ *et al. Annu Rev Genet*, 2003, **37**: 251
[39] Yu H. *Curr Opin Cell Biol*, 2002, **14**: 706
[40] Kastan MB *et al. Nature*, 2004, **432**: 316
[41] Grady WM. *Cancer Metastasis Rev*, 2004, **23**: 11
[42] Laiho M *et al. Ann Med*, 2003, **35**: 391
[43] Nojima H. *Methods Mol Biol*, 2004, **280**: 3
[44] Brown EJ *et al. Genes Dev*, 2003, **17**: 615

Cell Cycle Checkpoints

Qiu-Feng Cai, Rui-Sheng Jiang, Gao-Liang Ouyang*, Shi-Deng Bao

(The Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Cell cycle is a collection of highly ordered processes which are regulated by DNA damage checkpoint, DNA replication checkpoint and spindle checkpoint. Cell cycle checkpoints control the order and timing of cell cycle transitions and ensure that critical events such as DNA replication and chromosome segregation are completed with high fidelity. In addition, cell cycle checkpoints respond to DNA damage, DNA replication blocks, abnormal spindle assembly and improper chromosome segregation by inducing transcription of genes that facilitate repair to avoid mutations and genetic instability. Cell cycle checkpoints loss will result in genomic instability and cell carcinogenesis. Therefore, cell cycle checkpoints play a vital role in maintaining genomic stability and avoiding cell carcinogenesis and many genetic diseases.

Key words cell cycle checkpoint; DNA damage checkpoint; DNA replication checkpoint; spindle checkpoint; genomic instability

Received: February 6, 2005 Accepted: May 30, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30170463, No.30370307, No.30400239) and Innovation Project Foundation of Fujian Province for Young Scientists (No.2003J017)

*Corresponding author. Tel: 86-592-2186091, Fax: 86-592-2188101, E-mail: oyglz@yahoo.com.cn