

O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶的基因表达调控*

季守平 章扬培

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

DNA 损伤修复是生命科学研究的重要课题。DNA 修复在防止基因突变, 保证遗传信息稳定性的过程中起着极其重要的作用。近 20 年来, 人们通过大量研究发现细胞内 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶(O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase, MGMT) 能专一性很强地修复 DNA 烷化损伤, 防止细胞癌变和死亡; 大量试验还证明细胞内 MGMT 活性的高低是决定肿瘤细胞对亚硝胺类药物产生耐药性的分子基础。详尽了解 MGMT 基因表达调控机理对 DNA 损伤修复的理论研究和克服肿瘤细胞耐药性的实践都具有重要的意义。

一、MGMT 基因结构和蛋白特性

80 年代中后期以来, 国际上众多的实验室相继完成了大肠杆菌(*ada*, *ogt*)、枯草杆菌(*dat*, *adaB*)、酵母(MAT 1)、小鼠、大鼠、兔和人类的 MGMT cDNA 克隆和蛋白质序列分析。人类 MGMT mRNA 长约 950 bp, 编码 207 个氨基酸, 蛋白质大小为 22 KD^[1]。1993 年, Nakatsu 等^[2]克隆到完整的人 MGMT 基因组序列, 发现此基因约 170 kb, 由五个外显子和四个内含子组成, 其中外显子 2—5 为编码区, 外显子 1 的 GC 含量丰富, 是转录的起始区, 在其 3' 端存在一个约 60 bp 的增强子序列, 能强烈影响 MGMT 的转录水平。

人类 MGMT 蛋白位于细胞核。在其近 C 端的 86 个氨基酸中, 酸性氨基酸保守性很强, 尤其是活性中心的-PCHRV-序列, 在不同物种中高度保守, 其中 Cys 是接受烷基的受体, 若被其它氨基酸替换, 突变蛋白将失去接受烷

基的能力。MGMT 与鸟嘌呤第六位氧原子上烷基结合并不可逆转移到其活性中心的 Cys 残基上, 以修复 DNA 的烷基化损伤。MGMT 结合烷基后, 很不稳定, 被细胞内的水解酶迅速降解, 因此把 MGMT 称为‘自杀性酶’。MGMT 作用特异而高效, 不需其他物质的参与。MGMT 被消耗之后, 由 MGMT 基因从头合成。根据细胞内 MGMT 活性的高低可把细胞分为两类: MGMT 活性高, 能够有效修复烷基化损伤, 对烷基化剂不敏感的细胞称为 Mer⁺ 型细胞, 反之 MGMT 活性低, 对烷基化剂敏感的细胞称为 Mer⁻ 型细胞。

二、MGMT 基因的表达调控

在 Mer⁺ 型细胞中, MGMT 基因的表达是一种反馈调节过程。Saget 等^[3]研究大肠杆菌 Ada 蛋白的表达时发现, Ada 的 Cys⁶⁹ 不可逆地接受甲基后, 能和 *ada* 基因的启动子结合, 刺激其表达, 而未甲基化的 Ada 能抑制这种刺激效应; 当去除 Cys⁶⁹ 后, 未甲基化的 Ada 就不能抑制转录。说明 Ada 蛋白的 Cys⁶⁹ 对转录的负调控是必需的。Frtiz 等^[4]用单功能烷基化剂 MNNG 处理两种大鼠肝癌细胞系, 12—72 小时后, 其 MGMT mRNA 的转录水平为未处理细胞的 3—5 倍, 说明某些真核细胞在烷基化剂作用下也能产生适应性反应, 产生 MGMT 蛋白, 修复 DNA 烷基化损伤。

在研究细胞 MGMT 基因限制性片段长度多态性时, 发现 Mer⁻ 型细胞的 MGMT 基因并无明显的缺失、重排和扩增现象, 然而 Northern 分析却检测不到 MGMT mRNA, 提示

* 国家自然科学基金资助项目

Mer⁻表型可能主要是由基因转录水平调控的^[6]。基因表达与mRNA的半衰期有关。MGMT mRNA的半衰期约为10—12小时,而有些Mer⁺细胞MGMT mRNA的转录为中等或低水平,但其mRNA较为稳定,能在较长时间内进行翻译,说明转录后的调控机制也可能在MGMT基因的表达过程中起重要作用^[6]。

MGMT表达水平的改变可能是一个渐进转录抑制的过程。启动子的甲基化水平对转录水平是至关重要的。Costell等^[7]发现,在胶质瘤细胞中,MGMT基因的启动子序列若100%非甲基化,MGMT基因表达量很高;若25%的序列发生甲基化,则细胞内MGMT表达量很低;若50%位点发生甲基化,则MGMT基因完全不表达。在MGMT基因启动子-245—+225 bp的区域内有6个CpGs位点。Qian^[8]等在观察了Mer⁺型和Mer⁻型细胞系各三个,发现在Mer⁺型细胞中这些位点均不发生甲基化,而在Mer⁻型细胞中这些位点至少部分发生甲基化,这就进一步说明MGMT基因表达调控是由DNA甲基化程度决定。5-氮胞苷能降低甲基化水平,用它处理Mer⁻型细胞时,能降低调控序列中SmaI位点的甲基化水平,使其表达水平提高7倍^[9]。有意思的是,基因组中其它序列的甲基化却能提高MGMT的表达水平。

三、MGMT 基因表达调控 与基因突变和细胞癌变

烷化剂能作用于DNA产生O⁶-烷基鸟嘌呤,引起基因突变。烷化剂引起的突变热点为5'GpG 3'中的第二个G。MGMT则能够修复DNA的烷化损伤,防止基因突变和细胞癌变。在分析肿瘤细胞和周围正常细胞时发现,在Mer⁻型细胞中,H-ras基因的第12位密码子GGA的第二个G的G→A转换频率高于Mer⁺型细胞。在MNU诱导的乳腺癌细胞中

H-ras突变全集中于第12个密码子GGA的第二个G,从而激活H-ras。这可能是诱发肿瘤的起因之一^[11]。

MGMT活性下降与肿瘤发生有关。在研究肾细胞的MGMT活性与肾癌发生的关系时发现,近端肾小管细胞内MGMT表达水平很低,对烷化剂敏感,90%的肾细胞肿瘤均发生于此^[10]。Harris等^[12]用表达SV40大T抗原的pSV3 neo载体转染IMR90纤维母细胞,获得5个永生化细胞系,其中三个细胞系的MGMT活性完全缺失,一个细胞系仅残留部分MGMT活性。这说明细胞转化与细胞MGMT基因表达水平下降有关。

MGMT基因本身的点突变和肿瘤发生有关。Imai等分析了患成年人肿瘤12个少年病人(平均16.7岁)生殖细胞系的MGMTcDNA结构,发现在25%病人细胞中,MGMTcDNA的第160位密码子由GGA变成AGA,而22例死于非肿瘤疾病的成年人生殖细胞系中只有10.7%发生这种突变。说明这种突变可能与肿瘤发生有一定的关系。研究还发现这种突变不影响细胞的MGMT活性^[13],其意义有待于进一步探讨。

转基因动物实验结果也表明MGMT基因的表达在修复O⁶-烷基鸟嘌呤损伤,防止基因突变和细胞癌变方面起着重要的作用。Zaidi^[4,15]等把人的MGMT基因转入小鼠胚胎细胞,发现转基因鼠的MGMT活性为对照小鼠的5倍。在用烷化剂注射小鼠后,转基因小鼠结肠隐窝异常病变的发生率明显低于对照鼠,而且对照鼠的正常和异常组织的K-ras的G→A转换率明显高于转基因鼠。用烷化剂MNU处理小鼠,38/50个对照鼠诱发淋巴瘤,而转基因鼠只有9/50发生淋巴瘤。

四、MGMT 基因表达与肿瘤 细胞对亚硝胺药物的耐药性

80年代以来,国内外的一系列研究成果

表明,肿瘤细胞中MGMT活性是决定肿瘤对亚硝脲类烷化剂敏感性的分子基础。MGMT活性高的Mer⁺型肿瘤细胞对亚硝脲类烷化剂有较强耐受性,而MGMT活性低的Mer⁻型肿瘤细胞对亚硝脲类药物敏感。把高效表达MGMT cDNA的真核表达载体导入典型的Mer⁻型肿瘤细胞HeLa MR中,转染细胞对ACNU的耐药性明显提高^[16],说明肿瘤细胞对ACNU的耐药性是由MGMT基因表达引起的。对于Mer⁻肿瘤只要用亚硝脲药物治疗即可取得较好的效果。而对于Mer⁺型肿瘤则必须先用酶活性抑制剂抑制肿瘤细胞MGMT活性,然后再用亚硝脲类药物,可明显提高杀伤肿瘤的效果。章扬培实验组在这方面进行了大量的尝试,在细胞和裸鼠水平及脑胶质瘤I—II期临床化疗实验中都证实了这种化疗新策略的可行性^[17]。

由于这些抑制剂只能暂时地抑制MGMT活性,抑制剂被细胞消耗之后,MGMT活性还会恢复并重新产生对亚硝脲类药物的耐药性,因此,使用酶活性抑制剂的方法有一定的局限性。反义核酸技术可能在较长时期内特异封闭基因表达,从基因表达水平调节MGMT活性,这就为克服Mer⁺型肿瘤细胞对亚硝脲类药物的耐药性提供了新的思路。

Potter^[18]等设计能识别并剪切MGMT mRNA的51 bp长的ribozyme并连接在真核载体上,导入Mer⁺型肿瘤细胞,发现4/16转染细胞的MGMT活性明显降低。Citti等^[19]则合成20 bp针对MGMT mRNA的5'端调控序列的寡聚反义核酸,用它处理Mer⁺型CHO细胞能在一定程度上抑制MGMT活性,并增加细胞对mitozotomid药物的敏感性。最近笔者构建了针对MGMT mRNA全长,5'端和3'端的三种逆转录病毒载体介导的反义RNA并导入Mer⁺型细胞HeLaS 3中,发现针对MGMT mRNA 5'端序列的反义RNA能把MGMT活性抑制到原来的40%,并使肿瘤细胞对ACNU的敏感性提高4.61倍。上述实验说明,反义

核酸技术能够在一定程度上抑制MGMT活性,提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。由于技术条件的限制,目前无法把足量的反义核酸导入每个肿瘤细胞,难以完全抑制肿瘤细胞的MGMT活性。

化疗药物引起的骨髓抑制对人体危害极大,限制化疗药的使用剂量,又会影响肿瘤化疗的效果。Allay^[20]等把表达MGMT cDNA的逆转录病毒载体导入小鼠造血干细胞并进行骨髓移植,小鼠骨髓、脾和胸腺的MGMT活性提高了10—40倍,并在移植后的23周内持续表达,对BCNU的耐药性得到大幅度的提高。说明外源MGMT基因的表达能够保护骨髓细胞、防止亚硝脲类药物引起的骨髓抑制。若基因治疗的技术方法得到进一步的完善,把这些稳定表达MGMT基因的骨髓细胞回输病人体内,将对保护造血细胞、减少化疗引起的毒副作用、提高化疗效果有积极作用。

五、小 结

综上所述,MGMT基因表达调控关系到DNA损伤修复、基因突变、细胞癌变和肿瘤化疗等重要问题。转基因鼠的研究表明,若向胚胎细胞内导入MGMT基因,就能够有效地防止基因突变和细胞癌变,这为实施建立在胚胎细胞基础上的MGMT基因缺陷的治疗提供了理论依据。MGMT基因表达调控研究对解决肿瘤耐药性,提高化疗效果有很重要的意义:一方面用反义核酸抑制MGMT基因的表达,为克服肿瘤细胞的耐药性提供了新的可能性;另一方面利用MGMT基因转移方法或调节甲基化水平的药物提高骨髓细胞内MGMT活性及对亚硝脲药物的耐受性,为保护骨髓细胞、提高化疗效果提供有利的条件

目前,人们对MGMT表达调控的机制还知之甚少,有很多值得研究的问题。如,细胞是如何通过DNA甲基化来调节MGMT基因表达的?如何用人工的方法调节DNA甲基化从而调节MGMT基因的表达?MGMT基因表达

的缺陷可能是肿瘤发生的原因,80%的人类肿瘤的MGMT活性却很高,这可能是肿瘤细胞为适应环境而引起MGMT基因表达水平提高,那么,在肿瘤发生过程中,MGMT基因表达变化机理是什么?对这些调控机制的了解显然为了解肿瘤耐药性形成的分子机制并为克服耐药性提供理论基础。

利用遗传工程技术调节MGMT基因的表达,防止基因突变、细胞癌变或提高化疗效果,是一个很有吸引力的研究方向,但有很多技术问题有待解决:如何以简单而高效的方法把外源基因导入每一个靶细胞?如何提高基因表达载体的表达效率,安全性和表达的稳定性?在人体这么一个复杂的体系内,如何使基因表达能够按预想的方向发展等等?这些困难目前尚难以解决。相信,随着对MGMT表达调控机制研究的不断深入及基因治疗方法的突破,用生物技术方法调节MGMT基因表达、造福人类的愿望最终是能够实现的。

参 考 文 献

- [1] Tano, K., et al., 1990, *Proc. Natl Acad Sci. USA.*, 87: 686—690.
- [2] Nakatsu, Y., et al., 1993, *Mutat Res.*, 293: 119—132.
- [3] Saget, BM. And Walker, GC., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91:9730—9734.
- [4] Fritz, G., et al., 1991, *Mol. Cell. Biol.*, 11: 4660—4668.
- [5] Fornace, AJ Jr., et al., 1990, *Cancer Res.*, 15: 7908—7911.
- [6] Kroes, RA. and Erickson LC., 1995, *Carcinogenesis*, 16: 2255—2257.
- [7] Costall, JF., et al., 1994, *Mol. Cell Biol.*, 14: 6515—6521.
- [8] Qian, X., et al., 1995, *Carcinogenesis*, 16: 1385—1390.
- [9] Peiper RO., et al., 1991, *Cancer commun.*, 3: 241—253.
- [10] Wani, G., et al., 1992, *Carcinogenesis*, 13: 463.
- [11] Ling-ling C., et al., 1992, *Carcinogenesis*, 13: 837.
- [12] Harris, LC., et al., 1996, *Carcinogenesis*, 17: 219—224.
- [13] Imai Y., et al., 1995, *Carcinogenesis*, 16: 2441—2445.
- [14] Zaidi, NH., et al., 1995, *Carcinogenesis*, 16: 451—456.
- [15] Zaidi, NH., et al., 1995, *Carcinogenesis*, 16: 1047—1053.
- [16] Yang, J, et al., 1995, *Carcinogenesis*, 16: 2271—2274.
- [17] 杨军,章扬培,1996,国外医学:遗传学分册,641—44.
- [18] Potter, P M., et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 1731—1534.
- [19] Citti L., et al., 1994, *Anticancer Res.*, 14: 2667—72.
- [20] Allay J A., et al., 1995, *Blood*, 11: 3342—3351.

活性氧诱导细胞凋亡

李 忌 郑荣梁

(兰州大学生物系 730000)

细胞凋亡(apoptosis)又称为程序性细胞死亡(programmed cell death),是细胞主动的衰老和死亡方式,与病理情况下的细胞被动坏死(necrosis)不同,凋亡的细胞周围没有炎症反应,因为细胞凋亡过程中细胞内的细胞器不发生裂解,细胞内容物不外漏,而是通过启动特定的

基因,使原来完整的细胞膜向外皱缩形成凋亡小体(apoptotic body),巨噬细胞或邻近的细胞可吞噬这些凋亡小体进入体循环^[1,2]。细胞凋亡的主要形态学特征是:细胞膜出现囊泡,细胞体积缩小,细胞核固缩,DNA被非随机地降解成小片段^[3,4]。目前认为细胞凋亡是体