

染色体端粒研究的进展

汪国顺 潘惟钧 程中和

(北京大学生物学系 100871)

端粒(Telomere)构成真核生物染色体的天然末端。早在本世纪40年代,人们就发现其对于染色体的稳定有着十分重要的作用: X射线辐射能引起染色体突变,但在染色体末端区域却很少有缺失与倒位等现象发生,当染色体发生断裂时,其断端不同于天然末端,具有粘性,能在断端处发生融合,形成多着丝点的环状或串状等畸形染色体^[1]。

几十年来,端粒被看成是染色体的重要结构之一,然而人们对它的结构却一无所知,随着分子生物学的发展和对DNA复制机制研究的深入,端粒问题又再一次从分子水平上提出来。DNA复制的起始是由RNA聚合酶在起始因子的作用下与DNA母链结合,合成一段RNA引物,提供一个3'端羟基,这样DNA聚合酶才能够接着这条引物对母链进行延伸复制。当链复制延伸反应启动后,5'端的RNA引物便被降解掉,在新链的5'端就留下了一段空缺而无法填补,因为任何DNA聚合酶都不能从线性DNA的5'端部起始合成一段DNA链,而只能从已有链的3'-OH端使链延伸。这样随着细胞的分裂,DNA每复制一次,母链5'端与RNA引物结合的那一段DNA无法拷贝到子链中去,势必造成DNA链愈来愈短,遗传信息不断丢失。这就是由Watson首先提出的DNA末端复制难题^[2]。

当然,自然界中各种生物都有各自巧妙的方法回避和解决了这一难题。原核生物如细菌将自己的DNA永久性环化,这种首尾相连的形式使新链的3'-OH端继续向前延伸,而补上RNA引物被消除后所留下的空缺。 λ 噬菌体

DNA虽是一个线性分子,它的两个5'端都有一个12 b. p. 长的单股互补突出,一旦它感染细胞后,就能借助互补突出暂时环化,达到完全复制的目的。许多动物病毒DNA也为线线,它们以核酸多联体方式复制或末端过剩等机制克服了DNA复制的5'端缺失^[3]。

真核生物的染色体DNA都是线性分子,它们又是通过什么方法来达到完全复制的呢?这个问题一直到70年代末,由于端粒的分子结构的发现,才被真正搞清楚。

一、端粒的DNA序列与结构

尽管端粒的概念是在研究高等生物时提出的,但真正弄清它的分子结构却是在单细胞的原生生物中完成的。1978年Blackburn等^[4]对四膜虫的rDNA进行研究,首次发现四膜虫rDNA分子末端是一连串的六核苷酸重复,序列为 $\left[\begin{array}{l} 3' \text{CCCCAA} 5' \\ 5' \text{GGGGTT} 3' \end{array} \right]_n$ 。这种重复一般可达几十次,总长度为370—520 b. p. 并发现四膜虫不同株之间以及不同种之间的rDNA末端结构完全一样,而且这种重复序列总有着某些特性。① GT链的5'→3'方向总是指向染色体的末端,而CA链的5'→3'则相反指向染色体中心。② 当用限制性内切酶把rDNA分子切成几段,电泳时发现末端片段长短不一,形成一个参差不齐的条带,表明这一六核苷酸重复的重复次数不完全均一。③ 提纯的天然rDNA的

陈阅增先生与丁明孝老师对本文提出过修改意见,谨表感谢。

端粒序列 $(\frac{G_4T_2}{C_4A_2})_n$ 区域可以直接用 E. Coli 的 DNA 聚合酶 I 做缺口平移标记而掺入 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ dNTP, 表明该链区内有缺口(NiCk)因而有游离的 3' 端羟基存在, 可以直接作为聚合酶合成

的引物。④ rDNA 分子的最末端不能进行末端标记, 因而推断 rDNA 的分子末端不是游离的, 而是一个回折结构。

根据以上的研究结果, 他们画出了四膜虫的 rDNA 分子末端结构模式(图 1)。

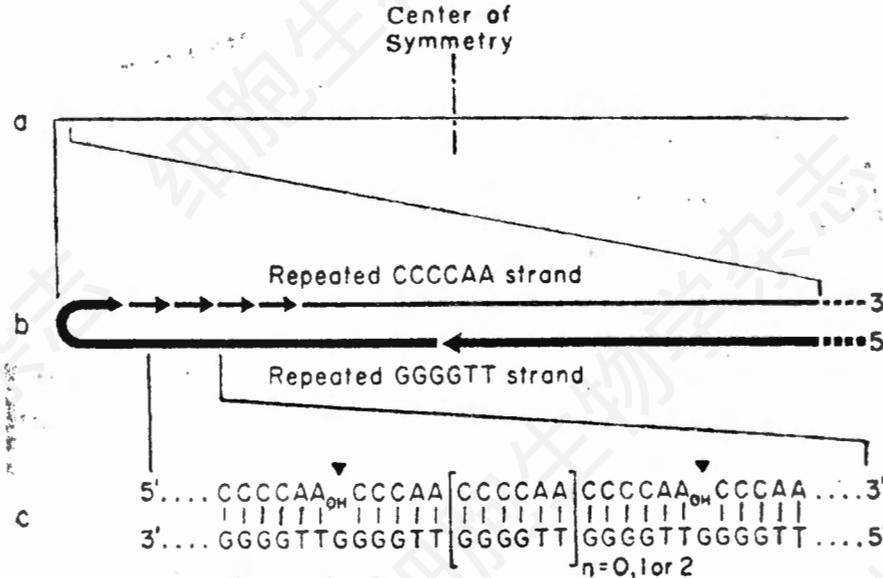


图 1 四膜虫大核 rDNA 的末端结构^[4]

- (a) 迴文对称的 rDNA。
 (b) 末端几百个碱基对, 显示 G_4T_2 链形成的末端回折; G_4T_2 链(大粗线)和 C_4A_2 链(小粗线)内的特异性缺刻, 如箭头所示, 箭头方向表示 5'→3', 最靠内的缺刻远离其分子顶端 100 b.p.。
 (c) C_4A_2 链中两个相邻缺刻区域的 DNA 序列。

进一步的研究表明, 四膜虫内不仅 rDNA 而且其他大核 DNA 分子都拥有同样的末端结构。

四膜虫端粒 DNA 结构的发现导致了其它物种染色体端粒结构的相继发现。表 1 所列是不同物种的端粒序列的重复单位^[5]。

由表中可以看出, 端粒 DNA 序列广泛存在于真核生物的染色体末端, 而且它们基本上都有着与四膜虫端粒序列相同的特点, 例如总有一条链富含 G, 其 5'→3' 方向总是指向染色体末端, 且比反向链长出若干个核苷酸而造成一种末端突出等。

Henderson 等^[6] 用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、吸热变性分析, 以及 ^1H 和 ^{31}P 的核磁共振光谱分析了端粒的顶端结构, 证实其顶端

由于 DNA 链的回折而形成了一个发夹形结构, 且这一特殊结构是由于 G-G 配对所造成的, 为氢键所稳定。G-G 配对是不遵循 Watson-Crick 的 G-C 配对规律的。富含 G 链的这些特性对于端粒 DNA 的复制有着重要的意义。

在细胞中, 端粒 DNA 总是和非组蛋白成份的蛋白质结合, 形成一个复合体, 构成染色体或染色质的天然末端。这种 DNA 和蛋白质的复合体常常表现为典型的异染色质或构成染色体的末端结节^[7]。

1986 年 Gottschling & Zakian 在尖毛虫 *Oxytricha* 中发现了与端粒 DNA 结合的特异性蛋白质, 其分子量为 55 KD, 26 KD。它们与端粒 DNA 结合, 这种结合能抗高盐抽提和

表 1 不同物种的端粒重复

端粒重复单位*	生物体	属类
AGGGTT	人 <i>Homo sapiens</i>	哺乳
	绒泡菌 <i>Physarum</i>	粘真菌
	双泡菌 <i>Didymium</i>	粘真菌
	脉泡菌 <i>Neurospora</i>	线真菌
	锥虫 <i>Trypanosoma</i>	动基体原虫
	短膜虫 <i>Crithidia</i>	动基体原虫
GGGGTT	四膜虫 <i>Tetrahymena</i>	纤毛原虫
	瞬膜虫 <i>Glaucoma</i>	纤毛原虫
GGGGTTTT	尖毛虫 <i>Oxytricha</i>	纤毛原虫
	棘尾虫 <i>Stylonychia</i>	纤毛原虫
	游仆虫 <i>Euplotes</i>	纤毛原虫
GGG(G/T)TT	草履虫 <i>Paramecium</i>	纤毛原虫
AGGGTT(T/C)	疟原虫 <i>Plasmodium</i>	球原虫
AGGGTTT	拟蓝芥菜 <i>Arabidopsis</i>	高等植物 (双子叶)
AGGGTTTT	衣藻 <i>Chlamydomonas</i>	藻类
G ₍₁₋₃₎ T	裂生酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	酵母
	酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	酵母
G ₍₁₋₃₎ A	网柱霉菌 <i>Dictyostelium</i>	细胞粘霉菌

* 各端粒序列均只列出富含G的那条链,而且其5'-3'方向均朝向染色体的天然末端。

核酸酶的处理,但对蛋白质变性剂敏感,因此推测这种结合是紧密的非共价结合^[8]。

Raguraman & Cech(1989)发现尖毛虫 *Oxytricha* 的端粒蛋白能与端粒 DNA 在体外组装成复合体,并推测出了端粒 DNA 与端粒蛋白的结合模式^[9]。

二、端粒酶的发现及端粒 DNA 的合成

为什么端粒的存在可以使染色体 DNA 完全复制而不会有末端遗传信息的丢失?端粒 DNA 本身又是怎样复制的呢?

原生动物学的研究表明:纤毛原虫(如四膜虫、游仆虫)都有两个细胞核,大核为营养核,基因活跃地转录,负责着个体的表型特

征;小核是生殖核,其基因不表达,负担着种质遗传,在有性生殖(接合)的过程中,大核是由小核发育而成。发育时,小核的单拷贝 rRNA 基因被剪切下来成为染色体的游离基因,经过扩增和多倍化,最后的 rDNA 分子多达 1 万个。分析这些 rDNA 分子,其末端都具有端粒序列,即为(GGGGTT)_n的六核苷酸重复片段,而从小核 rRNA 基因两侧则找不到相应的重复片段的模板。很显然,这些末端重复并非小核遗传的,而是在大核发育过程中添加到染色体两端的^[10]。

1984 年 Shampay^[11] 等为了研究酵母染色体的端粒结构,构建了一个线性 DNA 质粒,这个线性质粒的一端带有酵母的端粒重复(G₁-₃T),另一端带有四膜虫的端粒重复(G₄T₂)。当这个质粒转化酵母后,发现经过扩增,原有的四膜虫端粒序列仍都保留着,但在其后面(最末端)又加上了酵母的端粒重复。因而推测端粒的复制是一种无模板复制,并猜想有一种具有末端转移酶活性的物质负责着将端粒 DNA 片段加到染色体上。以此为契机,Blackburn 实验室^[12]利用四膜虫的无细胞抽提物在体外进行了端粒“加尾”实验。用合成的四膜虫末端重复(G₄T₂)₄做为引物,并加入同位素标记的 dGTP 和 dTTP,发现四膜虫的抽提物能使引物向前延伸上百个核苷酸,而且是以每 6 个核苷酸为单位延长。如果加入的是酵母端粒序列,则“尾巴”上加上的仍是四膜虫的端粒重复。若用 PBR³²² 片段做引物,不能使链延长。用四膜虫端粒 DNA 的另一条链(CCCCA-A)₄做引物,也不能加尾。当把反应基质加热至 90℃或用蛋白酶处理后,即失去活性。因而得出了许多重要的结论:① 端粒的加尾方向是按富含 G 链的 5' 端到 3' 端,每次是以 TTGGGG 为一个单位重复加上的。② 它是无模板重新合成 de novo synthesis ③ 能特异性识别拟被加尾的末端序列。④ 是一种蛋白质的酶所催化的反应。并把这种酶称为端粒转移酶,现简称端粒酶(Telomerase)。

Greider and Blackburn^[18]对四膜虫的端粒酶蛋白进行了分离纯化。该酶的分子量在200—500 KD之间。如此大的分子量,以及对RNA酶的极为敏感性,说明了端粒酶是一种RNP结构。

1989年Greider等又对端粒酶中的RNA成份进行了克隆和序列分析,发现端粒酶RNA是一个159碱基的小RNA,其中46,47和48位的核苷酸被修饰过,而这一位置恰恰有CAACCCCAA的序列结构。用反义RNA封闭该区域,能抑制端粒酶的活性,从而提出了端粒酶RNA的CAACCCCAA序列是该酶的一个活性位点,并为合成TTGGGG的端粒重复提供模板^[14]。

1990年Blackburn实验室的余国良(Yu)等对四膜虫端粒酶RNA的基因的核心序列^{5'}CAACCCCAA^{3'}进行了点突变,后将其插入质粒转化四膜虫,果然发现受体细胞后代的染色体两末端出现相应突变的端粒序列,从而以

实验遗传学方法在基因水平上证实了端粒酶RNA的核心序列是拷贝端粒DNA的模板^[15]。

最近从游仆虫的端粒酶中发现了相似的核心RNA片段CAAAACCCCAAAA以做为游仆虫的端粒重复GGGGTTTT的合成模板^[5]。

端粒酶是如何合成端粒DNA的呢?人们根据端粒DNA以及端粒酶的特性提出端粒延长的“爬行”模型(图2)。

从图2中可以看出,端粒合成必须有三个步骤:①端粒酶对已有的末端的识别和结合。②根据内设的RNA模板添加互补的核苷酸并聚合。③移位使端粒重复得以连续拷贝。

端粒酶能够“自主”地对端粒DNA的G-富含链进行加尾延长,而G-富含链又能通过G-G配对使其终端形成回折,这样DNA复制时,新链5'端缺失就可以得到补齐(图3)。这就是其该生物解决DNA末端复制难题的方法。

三、端粒的其他特性与功能

(一) 端粒与非组蛋白结合

端粒DNA总是和非组蛋白紧密结合。四膜虫大核DNA的 $(G_4T_2)_n$ 重复片段不能被小球菌核酸酶所消化,这种受保护的片段长度可达300—400 b. p.,并且是作为一个整体受到保护的。所以端粒DNA并不形成核小体结构^[16,17]。游仆虫和尖毛虫的端粒结合蛋白已经被找到^[8,9]。这种核酸与蛋白质的结合关系可以从许多种生物的染色体制片中看到,用蛋白质银染的方法对粗线期的人卵细胞染色体进行染色,发现端粒部位出现浓染,而其它部位出现不完全染色或不染色^[18]。爪蟾灯刷染色体中也能见到顶端有球形结节的结构^[19]。这些端粒蛋白质就象两顶帽子盖在线性DNA两端,使其末端具有惰性,保持着遗传系统的稳定,并有可能参与染色体的空间组织。

(二) 染色体的端粒可以相互“并合”

无论是同源染色体还是异源染色体,它们



图2 由于发生链内G₄/G₄配对形成局部双链并使链移位,似尺蠖虫爬行,故称为“*Inchworm Model*”。

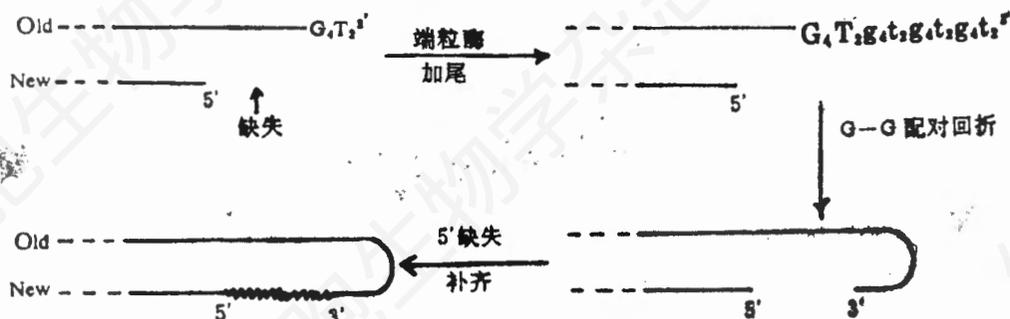


图3 线性DNA复制时5'端缺失补齐机制

的端粒常常会发生暂时的并合。第一次减数分裂前期，端粒聚集在一起，并处于核膜周围，这样染色体就呈现出一种“花束”状排列(bouquet orientation)^[20]。双翅目染色体的双线期，异源染色体相互配对(异位配对)时，端粒的并合参与了这一过程的发生^[21,22]。人卵细胞的粗线期染色体(联会复合体形成的早期)，染色体的配对首先发生于染色体末端的端粒位置^[18]。爪蟾的灯刷染色体末端也出现相互融合现象^[19]。洋葱根尖细胞间期染色体的端粒似乎是以成对的方式相联合^[23]。

体外的端粒DNA也有相互粘附的现象。Lipps发现提纯的尖毛虫大核DNA相互并合成大的多聚体，并认为是由于端粒DNA间相互并合所造成的^[24]。Oka又对这一现象进行了研究，他们发现这种粘附现象明显不同于互补单链间的配对^[25]。

这种端粒与端粒间的相互作用意义还不十分清楚，人们认为它一定影响着染色体的行为，如基因重组以及基因表达。这一方面还需要进一步的研究。

(三) 端粒的长度与序列变化及其引起的细胞效应

端粒的长度与序列变化常常伴随着一些有趣的生物学现象发生。余国良等(Yu)^[15]用显微注射的方法将天然的以及人工突变的端粒酶RNA基因导入四膜虫。结果发现：注射天然野生型基因的四膜虫与未注射的对照组没有差异。而注入突变基因的四膜虫变得形态异

常巨大、形状不规则并且老化。大多数后代都死掉。检查其端粒DNA，发现已掺入突变序列，且长度要么比平均长得多，要么短得多，表现为端粒长度调节机制紊乱或端粒延长系统缺陷。

酵母estI株是一种不能有效进行线性染色体复制的突变株，它的端粒长度随着细胞分裂而缩短，同时它的活力、集落形成能力也不断下降而最终出现老化^[26]。

Harley等用人的端粒重复片段(TTAGGG)为探针对胎儿的细胞株、新生儿细胞株以及青年和老年的细胞株的端粒长度进行了研究，发现随着年龄的增长，人的成纤维细胞的端粒序列长度不断下降^[27]。

端粒DNA和着丝粒DNA一样是一种结构DNA，以上的研究成果表明：端粒结构不仅仅是为染色体的完全复制所必需，而且端粒的变化可以引起细胞形态乃至生命状态的变化，因此可以推测：端粒在参与细胞功能的同时，还参与着细胞结构的构建。

(四) 端粒与核膜的关系

本世纪初，许多细胞学家就发现动、植物细胞中期、间期染色体有不随机分布性。他们常常看到端粒位于核膜附近，总是位于与着丝粒相对的位置，并把这一现象称为“Rabl定向”^[28]。

Fussell用³H-T对洋葱根尖细胞进行脉冲标记，发现无论是G₁期、S期、G₂期还是早前期，其染色体的走向都和分裂末期的染色体

一样,着丝粒异染质聚集于核的一边,而端粒则位于着丝粒的对侧,成散在状分布,端粒和着丝粒均与核膜逼近,并认为可能正是这种与核膜的紧密结合关系,维持着细胞染色体的空间定向,使得染色体所携带的信息能有秩序而又有效地复制表达^[23]。

Mathod用光镜摄像系统对果蝇唾腺的多线染色体进行断层分析,计算机重建了唾腺染色体的三维空间模型,也发现染色体的顶端常位于核膜下^[29]。

(五) 端粒与细胞核骨架的关系

Shoeman等在体外进行了中间纤维蛋白 Vimentin 和 Lamins 与不同寡核苷酸序列之间的吸附实验。发现端粒序列与中间纤维蛋白有很高的亲和性,并把这种亲和部位确定到 N 端的螺旋区^[30]。

Olins等从游仆虫中分离出端粒蛋白,分子量为 55 kD,用特异性的中间纤维单克隆抗体进行免疫印迹,发现 55 kD 和 68 kD 条带处有阳性反应。因而他推断端粒蛋白与中间纤维以及 Lamin 有关,可能它们共同组成大核的核骨架系统^[31]。

我们实验室用 HeLa 细胞为材料,用选择性抽提方法,分离出核骨架,并从而得到与核骨架紧密结合的 DNA,然后用人的端粒序列为探针与之杂交,结果表明端粒富积在核骨架上。因此,从一方面证明了染色体端粒与核骨架的结合关系^[32]。

总之,端粒的研究已经从研究其 DNA 序列及其与染色体复制关系发展到对其多方面生物学功能的研究。目前人们尤为感兴趣的是它与核骨架(包括核纤层)以及染色体空间定位的关系;端粒酶做为反转录酶的一种特殊类型(酶自身含有其作用底物模板)所具有的生物学特性等。

摘 要

端粒为真核生物染色体的天然末端。它对染色体的稳定以及染色体的完全复制有着十分

重要的作用。许多种生物的端粒 DNA 分子结构及其复制机制已被阐明,不少资料显示端粒在细胞中有着特殊的行为,并推测端粒可能参与了染色体的空间组织等核功能。

参 考 文 献

- [1] Muller, H. J., 1938, *Collect. Net.*, 13: 181—198.
- [2] Watson, J. D., 1972, *Nature New Biol.*, 239: 197—201.
- [3] 潘惟钧, 1986, *遗传*, 8: 1—4.
- [4] Blackburn, E. H., 1986, In *The Molecular Biology of Ciliated Protozoa*, ed. by Joseph G. Gall, pp. 155—178, Academic Press, Inc.
- [5] Blackburn, E. H., 1984, *J. biol. chem.*, 265 (11): 5919—5921.
- [6] Henderson, E. et al., 1987, *Cell*, 51: 899—908.
- [7] Blackburn, E. H., 1984, *Ann. Rev. Biochem.*, 53: 159—164.
- [8] Gottschling, D. E. and V. A. Zakian, 1986, *Cell*, 47: 195—205.
- [9] Raghuraman, M. K. and T. R. Cech, 1989, *Cell*, 59: 719—728.
- [10] King, B. O. and M. -C. Yao, 1982, *Cell*, 24: 313—320.
- [11] Shampay, J. et al., 1984, *Nature*, 310: 154—157.
- [12] Greider, C. W. and E. H. Blackburn, 1985, *Cell*, 43: 405—413.
- [13] Greider, C. W. and E. H. Blackburn, 1987, *Cell*, 51: 887—898.
- [14] Greider, C. W. and E. H. Blackburn, 1989, *Nature*, 337: 331—337.
- [15] Yu. G. -L. et al., 1990, *Nature*, 344: 126—132.
- [16] Blackburn, E. H. and S. S. Chou, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78: 2263—2267.
- [17] Budarf, M. L. and E. H. Blackburn, 1986, *J. Biol. Chem.*, 261: 362—369.
- [18] Hastie, N. D. and R. C. Allshire, 1989, *Trend in Genetics*, 5: 326—331.
- [19] Callan, H. G. et al., 1987, *Chromosoma (Berl.)*, 95: 236—250.
- [20] Lima-de-Fana, A., 1983, In *Molecular Evolution and Orgnization of the Chromosome*, pp. 1186. Amsterdam, Neths., Elsevier.
- [21] Hinton, T., 1945, *Biol. Bull.*, 89: 144—

- 165.
- [22] Rubin, G. M., 1978, *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, 42: 1041—1046.
- [23] Fussell, C. A., 1975, *Chromosoma (Berl)*, 50: 201—210.
- [24] Lipps, H. J., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 4104—4107.
- [25] Oka, Y. and C. A. Thomas, 1987, *Nuc. Ac. Res.*, 15: 8877—8898.
- [26] Lundblad, V. and J. W. Szostak, 1989, *Cell*, 57: 633—643.
- [27] Harley, C. B. et al., 1989, *Nature*, 345: 458—460.
- [28] Wison, E. B., 1924, In *The Cell in Development and Heredity*, 3th edition, pp. 251—276, The Macmillan Co., New York.
- [29] Mathod, D. et al., 1984, *Nature*, 308: 414—421.
- [30] Shoeman, R. L. et al., 1988, *J. Biol. Chem.*, 263: 18744—18749.
- [31] Olins, A. L. et al., 1989, *J. Cell Biol.*, 109 (4): 317 a.
- [32] 汪国顺等, 1992, *实验生物学报*, 25: 185—189.

人嗜中性白细胞活化蛋白-1/白细胞介素-8的研究进展

金冬雁, 侯云德

(中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室 北京, 100052)

细胞因子(cytokine)是由人体及动物体的各种细胞所产生的一类负责调节免疫反应强度与时相的低分子量(<80 kD)糖蛋白, 通常以自分泌或旁分泌的方式在一定的时间与空间内通过与受体结合而发挥极其强有力(一般在皮摩尔水平即有效)的作用。各种细胞因子既相互联系又相互拮抗, 构成细胞因子网络(cytokine network)^[1]。人嗜中性白细胞活化蛋白-1/白细胞介素-8(neutrophil activating protein-1/interleukin-8, NAP-1/IL-8)是近年来阐明的一种新的细胞因子, 有关该因子的研究进展, 可从一个侧面反映目前有关细胞因子的研究方法、内容及特点。

一、NAP-1/IL-8的研究历史

传统的细胞免疫学根据嗜中性白细胞随环境中化学物质的浓度梯度进行定向移动的生物现象描述了嗜中性白细胞趋化因子的活性, 同样也描述了嗜中性白细胞活化因子及淋巴细胞活化因子的活性。在1987年间, 若干个不同的研究小组先后独立地阐明了嗜中性白细胞活化因子的一级结构。但由于各小组的研究出发点及沿袭用名不同, 因此造成同一种细胞因

子采用多种命名的情况。在文献中出现过的该因子曾用名包括: 单核细胞源性的嗜中性白细胞活化因子(monocyte-derived neutrophil activating factor, MDNAF)^[2]、单核细胞源性的嗜中性白细胞趋化因子(monocyte-derived neutrophil chemotactic factor, MDNCF)、嗜中性白细胞活化因子(NAF)^[3]、嗜中性白细胞活化蛋白-1(neutrophil-activating protein-1)、粒细胞趋化肽(granulocyte chemotactic peptide, GCP)^[4]、淋巴细胞源性的嗜中性白细胞活化肽(lymphocyte-derived neutrophil activating peptide, LYNAF)^[5]、T淋巴细胞趋化因子(T-lymphocyte chemotactic factor)^[6]等等。这些命名反映了该因子的多种活性、多种产生细胞及多种效应细胞, 但也造成一定的混乱与不便。有鉴于此, 1988年12月在伦敦召开的新嗜中性白细胞活化肽国际会议曾建议将该因子统一命名为白细胞介素-8^[7]。但由于发现该因子代表着结构及功能相似的一个蛋白质超家族, 因此白细胞介素-8的命名也受到质疑。随后提出了一个暂定名: 嗜中性白细胞活化蛋白-1/白细胞介素-8(NAP-1/IL-8), 目前被多数文献所接受。