

## 细胞周期的检查点调控机制

吕吉宁 左嘉客

(中科院上海细胞生物学研究所 200031)

细胞周期是指细胞通过一系列有序的细胞内事件,实现细胞生长和分裂增殖的过程。细胞周期调控机制的研究主要包括两方面内容,一方面研究细胞是怎样启动和完成细胞内的重要事件,进而完成细胞分裂;另一方面研究细胞怎样保证这些事件按次序正常地运行,以保证细胞能正常增殖与生存。细胞周期的检查点(cell cycle checkpoints)调控机制就是这种保证细胞周期事件按次序、正常发生的调控机制,它实际上是一种涉及细胞内信号及内信号转导的调控机制。本文就细胞内存在的检查点调控机制,以及该机制与细胞的正常生存,癌变等生物现象的关系作一初步的综合性介绍。

## 细胞周期中的检查点调控机制

两栖类、软体动物等的卵母细胞和早期胚胎,哺乳类动物的躯体细胞以及低等真核细胞酵母都是细胞周期调控机制研究中最常用的材料。在这些材料中都发现同类的细胞周期调控元件分子,如 CDKs(Cyclin-Dependent Kinases)、细胞周期蛋白(cyclins)等,它们的活化、失活机制和生物学效应也基本一致。但是诸如两栖类等受母系 mRNAs 调控的早期胚胎细胞,其保证细胞周期事件按正常程序发生的机制却是不同于酵母的。两栖类卵受精后进行多次迅速的分裂,这些细胞分裂依赖于 MPF(maturation promoting factor)的周期性活化,可是在细胞周期各事件的进程中,其下游事件的发生并不依赖于上游事件的完成,细胞周期内的事件是按时序发生的,因而称之为时序性调控。但是在酵母和许多躯体细胞的细胞周期中,虽然 MPF 扮演重要的角色,细胞内各事

件的次序性发生基于一种依赖关系,下游事件的启动依赖于上游事件的完成<sup>[1]</sup>。譬如,已知的依赖关系有:有丝分裂相的启动依赖于 DNA 复制和修复的完成;有丝分裂后期的启动依赖于有丝分裂中期的完成;中心粒的复制依赖于 DNA 合成;复制子启动依赖于其他复制子的存在;DNA 重新合成的启动依赖于有丝分裂相的完成;有丝分裂相的启动依赖于细胞生长程度<sup>[2]</sup>。在酵母和躯体细胞中,这种依赖关系被认为是细胞分裂过程中保证染色体正常复制和分配忠实性(fidelity)的一个关键因素。

既然存在这样一种依赖关系,那么其基础是什么呢?由于细胞周期中许多重要事件的发生都涉及大分子的组装,因而人们就曾猜想其是否类似于噬菌体颗粒的装配,因为噬菌体颗粒的组装是完全依赖于内在分子本身的调控,其每一步都利用前一步的产物作为底物,并为下一步创造底物。这种调控机制被称作为底物-产物次序依赖性途径。值得注意的是在包装入噬菌体头部的过程中, $\lambda$ 噬菌体 DNA 成熟的机制却是依赖于另一种形式的调控机制。在存在原头(prohead)之前,多联体 DNA 不能被末端酶(terminase)所切断。如果末端酶是在与原头结合之后被活化的,那么它就遵循了底物-产物原则。但事实上,在原头还没有装配完成时,有一种转录抑制因子阻断末端酶对多联体 DNA 的酶切。通过去除这种抑制因子,可以消除末端酶酶切多联体 DNA 对原头存在的依赖<sup>[2]</sup>。

Hartwell 等人<sup>[2]</sup>最先研究细胞周期中的这种依赖性关系,他们认为如果这种依赖性是属于底物-产物次序调控机制的话,那么在 DNA

复制没有完成之前,是无法通过基因突变、化学药物和改变其他条件的方法来启动有丝分裂,也就是说不能通过上述方法来解除有丝分裂相启动对DNA复制完成的依赖。如果这种依赖性类似于上述噬菌体装配过程中的后一种调控机制的话,则能通过上述方法来解除这种依赖关系。通过基因突变等方法, Hartwell等人找到了解除这种依赖关系的突变株,证实这种依赖属于后一种调控机制,他们称之为检查点调控机制。目前认为检查点调控机制是由监测上游事件的感受器、感受器产生的信号以及由细胞周期引擎组成的反应元件等构成的信号转导系统实现的,其功能是保证细胞周期在上游事件正确完成的前提下才启动下游事件。

### RAD 9 基因

RAD 9(Radiation Arrest Defective)基因是Hartwell等人用常规遗传学方法在芽生酵母中确定的检查点基因,当染色体未完成复制或损伤时,它具有阻止细胞分裂,使之停滞于G 2相的作用。他们首先筛选DNA复制功能有缺陷的温度敏感突变株,如在一定温度中(限制温度),cdc 17(DNA聚合酶I)、cdc 2(DNA聚合酶III)、cdc 9(DNA连接酶)等有缺陷的突变株,这些突变株在限定温度中不能进行有丝分裂。然后再对上述突变株进行X-辐射,筛选其中不能被阻断进入有丝分裂相的细胞株。由此发现,如果通过辐射使RAD 9基因完全缺失,即能使该突变株在限制温度中(尽管DNA不能完成复制)进行有丝分裂,原有的对DNA复制完成的依赖关系被解除。譬如,在限制温度下DNA连接酶(cdc 9)有缺陷的芽生酵母突变株,虽然其合成的DNA量已足够,但是在DNA中出现许多未连接的单链片段,因而细胞分裂被阻断于染色体分离之前。倘若是RAD 9和cdc 9双重缺陷的突变株,则就能进行有丝分裂,并把不完整的DNA分配到子细胞中。

RAD 9基因既不是DNA复制也不是有丝

分裂所必需的基因,但是在DNA复制受抑或出现对DNA起损伤作用的外源因素时,RAD 9却是维持细胞生存所必需的。单独RAD 9缺失的突变株的生长特征与野生型细胞相比没有明显区别,只是其染色体自发丢失机率比野生型细胞高21倍,这说明RAD 9基因产物具有维持细胞分裂过程中染色体完整性(integrity)的功能。对于大多数细胞而言,DNA连接酶(cdc 9)的暂时失活并不是致命的,cdc 9突变株在限制温度中短时间培养都能生存。如果cdc 9突变株的RAD 9也缺失,那么这种双重突变株在限制温度中尽管能不断分裂,但细胞却死得更快。因而可以这样认为,如果在DNA合成被阻断的情况下,把进入有丝分裂相对DNA复制完成的正常依赖性解除,对细胞而言将是致命的。重要的是,这种生理功能是目前已发现的大多数检查点调控基因所共有的,对于细胞而言,在上游事件没有正确完成的情况下启动下游事件的发生将是致命的<sup>[2]</sup>。

RAD 9基因已由Schiestl等人克隆<sup>[3]</sup>。Brown<sup>[4]</sup>等人证实,除RAD 9外,在芽生酵母中还有五个基因与DNA损伤和DNA复制受阻后、细胞被阻断于G 2相的机制有关。其中RAD 9、RAD 17、RAD 24和MEC 3(Mitosis Entry Checkpoint)等的基因产物对DNA损伤作出反应,而MEC 1和MEC 2的基因产物却对DNA复制阻断和DNA的损伤都能作出反应,使细胞无能进入M相<sup>[4]</sup>。另外在裂殖酵母中,通过X-辐射和羟基脲抑制DNA合成等方法,都筛选到具有对DNA损伤和DNA复制阻断进行检测的基因。其中Hus 12(Hydroxy Urea Sensitive)和Hus 16只检查DNA复制阻断,RAD 21,RAD 27(chk 1)只检查DNA损伤,而Hus 14,Hus 17,Hus 22,RAD 1,RAD 3,RAD 17和RAD 26等既能检查DNA损伤也能检查DNA复制的阻断。另一些检查点基因Hus 2,Hus 3,Hus 4,Hus 5等的具体作用尚未分析清楚。裂殖酵母中的这些检查点基因与芽生酵母中发现的检查点基因

之间的关系也还不清楚<sup>[5]</sup>。

RAD 9 和上述提及的与其类似的这些检查点基因产物的特征之一是其既不是 DNA 复制也不是有丝分裂所必需的,那么这些基因在检查点信号转导途径中扮演什么样的角色呢?目前认为它们主要起转导信号的作用。Elledge<sup>[6]</sup>最近做了两类筛选,其中 DUN(DNA Damage Uninducible) 突变株在 DNA 损伤后不能转录 RNR 3 (RiboNucleotide Reductase inducible subunit), 另外有几种 DUN 基因编码转录所需的元件, DUN 1 编码一种为其他 DNA 损伤诱导基因转录所需的激酶, DUN 2 编码的产物就是 POL 2(聚合酶 II)。POL 2 是哺乳类中 DNA 聚合酶  $\epsilon$  的同类物, 是 DNA 损伤的修复酶, 因而存在由修复酶自身感受 DNA 损伤的可能性。另一类是 SAD(S phase Arrest Defective) 突变株, 这些突变株在羟基脲处理后都不能阻断有丝分裂, 而且对 DNA 损伤也都能作出反应。还有几种这类突变株只有在 RAD 9<sup>-</sup> 的背景下才能作出上述反应。其中 SAD 1 的基因产物是多功能性的, 其编码的蛋白激酶是在 DNA 损伤导致 G 1 相阻断和诱导 RNR 3 表达时所必需的<sup>[6]</sup>。根据有的基因只针对 DNA 损伤或者 DNA 合成阻断, 而另一些基因对两者都作出检查等现象的存在, 表明细胞内可能存在不同的检查点信号转导途径。

### RCC 1 基因

RCC 1(Regulator of Chromosome Condensation) 突变株是从源自仓鼠 BHK 21/13 细胞株的温度敏感细胞株(tsBN 2 细胞)中分离到的。将处于细胞周期不同时期相的 tsBN 2 细胞分别转移到限制温度中后, 表现出的缺陷特征不同。当 G 1 相细胞被转移到限制温度中, 这些细胞就被阻断于 G 1 相, 而处在 S 相细胞被转移到限制温度中后即发生早熟染色体浓集(PCC, Premature Chromosome Condensation), 并能进行有丝分裂。通过大分子合成的

定量分析表明, tsBN 2 细胞转移到限制温度中以后, DNA 合成迅速被抑制, 转录与翻译活动也逐渐被抑制。但是 tsBN 2 细胞对新合成的 DNA 的延长和连接功能不受影响。已知 tsBN 2 细胞的 RCC 1 缺陷是由于单点突变(S 256 F)引起的, 突变的 RCC 1 蛋白在限制温度中极不稳定。对哺乳类 RCC 1 蛋白的进一步分析表明, 它是核内 DNA 结合蛋白, 在有丝分裂相时与 DNA 解离<sup>[4,7]</sup>。

在培养的细胞中, RCC 1 是一种含量丰富蛋白, 与其相关的主要分子是 Ran(Ras related nuclear protein), 两者形成复合物, 是染色质内核小体的结构组份。Ran 是 GTP 结合蛋白, 分子量 26 KD, 序列分析表明其就是已克隆的人类 TC 4 蛋白的同类分子, 在培养的细胞中含量也非常丰富, 为 RCC 1 的 25 倍。在缺乏  $Mg^{++}$  和鸟苷酸时 Ran 和 RCC 1 紧密结合, 而在  $Mg^{++}$  和鸟苷酸存在时两者解离。RCC 1/Ran 以这种复合物的形式与染色质结合, 但不是直接与 DNA 结合, 而是与染色质内其它蛋白质元件结合。Ran 和 Ras 一样, 有非常低的 GTPase 活性, 因而推测可能存在一种参与活化 RCC 1/Ran 系统的 GAP (GTPase Activating Protein)<sup>[7]</sup>。

通过研究裂殖酵母中克隆到的 pim 1/Spi 1 基因之间的关系, 进一步证实了组织培养细胞中 RCC 1/Ran 之间可能存在的关系。pim 1 (Premature Induced Mitosis) 基因是从一种有丝分裂对 DNA 复制依赖有缺陷的裂殖酵母中分离到的, 它与 RCC 1 不一样, 在细胞周期的任何时期 pim 1 缺陷的细胞都诱发 PCC, 并进入有丝分裂相。此外 pim 1 突变株能通过 spi (Supressor of Pim 1) 的过量表达而抑制。spi 1 编码一种与人类 TC 4 类似的小分子量 G 蛋白, 因而认为 pim 1 和 spi 1 与 RCC 1/Ran 一样, 是以复合物形式起作用的<sup>[7]</sup>。

由于 RCC 1 一类的检查点基因是目前克隆的检查点基因中既影响进入有丝分裂相又影响 DNA 复制的基因, 因而 RCC 1 基因被认为

是检查点调控机制中参与检查DNA复制或DNA损伤,进而产生信号的元件。在裂殖酵母中还发现cut 5(Cell Untimely Torn), cdc 18<sup>[8]</sup>和rum 1(Replication Uncoupled from Mitosis)基因<sup>[9]</sup>,它们是一些与RCC 1和pim 1类似的检查点基因,其基因产物既与DNA复制有关,也与DNA复制阻断或DNA损伤时阻断细胞进入M相有关。当然RCC1/Ran与pim 1/spi 1、cut 5、cdc 18、rum 1的基因产物的功能也有不同之处:首先不同物种的RCC 1突变株都有RNA和DNA的合成缺陷;第二,RCC 1在G 1相失活时,细胞就被阻断于G 1相;第三,RCC 1在S相失活时,则使细胞加速进入M相,而不仅仅是解除阻断;第四,rum 1的主要特征是在其过量表达时,细胞进行反复的DNA复制,却不出现有丝分裂<sup>[7,10]</sup>。

### 影响p 34<sup>cdc 2</sup>激酶活性的 激酶和磷酸酯酶

p 34<sup>cdc 2</sup>激酶活性是细胞能否进入有丝分裂的决定因素。事实上,检查点基因产物在DNA复制受阻断和DNA损伤而阻止细胞进入M相时,可能就是通过控制p 34<sup>cdc 2</sup>激酶活性来实现的。已知p 34<sup>cdc 2</sup>激酶活性至少部分地受其Y 15残基的磷酸化状态所影响。Wee 1(Wee;原意为“小”,由于该基因突变导致小细胞分裂而命名)和Mik 1(Mitosis Inhibitory Kinase)两种激酶专一地磷酸化p 34<sup>cdc 2</sup>·Y 15,使p 34<sup>cdc 2</sup>激酶失活;cdc 25、pyp 3(Protein tyrosine (Y) Phosphatases)和p 65三种磷酸酯酶却专一地使Y 15去磷酸化,由此活化p 34<sup>cdc 2</sup>激酶。在裂殖酵母中,cdc 25的过量表达,cdc 2显性活化等位基因cdc 2-3w的表达、p 34<sup>cdc 2</sup>·Y 15 F突变、Wee 1和mik 1激酶的失活等都能加速细胞进入M相,并消除因DNA复制阻断而阻止细胞进入M相的现象<sup>[10,4]</sup>。

最近从无冠构巢曲霉菌(*Aspergillus nid-*

*ulans*)中发现一条进入有丝分裂相所必须的调控途径,该途径的活化不依赖于p 34<sup>cdc 2</sup>激酶。BimE(Blocked In Mitosis)温度敏感型突变能在DNA复制阻断的情况下进入M相,而且在限制温度中可以自细胞周期的任何时相进入M相。但是在NimA(New Inducer of Mitosis)突变株中,即使组蛋白H 1激酶活性已达到细胞进行正常分裂所需的水平,但是细胞仍被阻断于G 2相。已知NimA编码一种蛋白激酶,其活化不依赖于p 34<sup>cdc 2</sup>激酶的活化。此外BimE突变与NimA突变相关,NimA和BimE双重突变株仍能在DNA复制阻断的情况下进入M相。这些现象说明BimE可能是一种抑制细胞进入M相的因子,而NimA的活化能够克服这种抑制。因而当DNA复制完成时NimA活化,进而抑制BimE,并启动有丝分裂。又NimA激酶活性是M相一些结构事件发生所必需的<sup>[10,4]</sup>。

上述提及的检查点基因产物的主要特征是:它们都较为直接地参与p 34<sup>cdc 2</sup>激酶活性的调控,甚至在p 34<sup>cdc 2</sup>活化的情况下实现细胞周期的G 2相阻断。上述特征表明这些检查点基因的产物在检查点信号转导系统中可能位于下游,起效应元件的功效。

### 真核细胞中的其它检查点基因

检查点调控机制研究过程中积累的结果是相当丰富和复杂的,其中有些重要的检查点基因很难归类到上述任一种尚属不成熟的分类系统中。在这里则着重介绍两类与离开M相有关的检查点基因。Murray等用高剂量的对微管有毒性的苯并咪唑(benzimidazole),完全破坏M相的纺锤体,这时细胞被阻断于M相中期,且维持高的组蛋白H 1激酶活性。利用这个体系分离到两株突变体bub 1和bub 2(Budding Uninhibited by Benzimidazole)。这两个突变株在无药物存在时正常生长和分裂,但在有药物的情况下,由于不成熟地离开M相而迅速死亡<sup>[10]</sup>。

Murray 等用适量的另一种微管毒性药物苯菌灵(benzomethyl or benomyl),使纺锤体推迟形成,这样由于M相的延长而导致整个细胞周期延长。用这个体系,他们筛选到一种在这种情况下能按正常速度分裂的MAD(Mitosis Arrest Deficient)细胞株。MAD突变株对苯菌灵是高敏感的,在野生型细胞能生长的苯菌灵浓度下,MAD细胞迅速死亡。MAD细胞在维持组蛋白H1激酶活性方面与bub细胞一样有缺陷。另一个有趣的现象是MAD细胞对苯菌灵的高敏感性可以通过加入适量的羟基脲来抑制,低剂量的羟基脲能延长但不能阻断S期。由于纺锤体的形成起始于S期,由羟基脲所致的DNA复制的延长可以补偿苯菌灵导致的纺锤体形成的延缓<sup>[4,10]</sup>。

上述的现象表明有两种不同的检查点基因产物检查纺锤体形成的阻断或者延缓。根据这些现象,以及在HeLa细胞中发现的细胞周期蛋白B1与有丝分裂元件的关系,并在裂殖酵母中发现细胞周期蛋白B和cdc2产物位于纺锤体极体的现象,均提示可能存在微管功能与MPF活性相关的活动模式。

## 细胞周期检查点调控 机制与细胞癌变

肿瘤细胞的典型特征之一就是具有非整倍的基因组或染色体通过重排的基因组。流行病学和分子生物学研究结果也表明细胞的癌变需要一些突变基因的积累,其中以细胞增殖阻遏基因的失活突变最为重要,这种突变一般都是通过有丝分裂过程中染色体重组或丢失而致野生型基因失活或丢失的情况下发生的。检查DNA损伤和复制完整性的检查点基因和检查纺锤体错误装配的基因缺失,都会导致染色体自发丢失的机率增加30倍。因此检查点调控机制具有保证细胞在分裂增殖时DNA的完整性和精确性的功能<sup>[4,9]</sup>。

在哺乳类细胞,用中等剂量X-辐射导致

的DNA损伤,可以通过G1→S相检查点或G2→M相检查点来阻断细胞周期的异常运行。此外,处于S相的哺乳类细胞接受中等剂量的X-辐射后,能迅速抑制新复制子的形成,将细胞阻滞于S相,以赢得充分的时间来修复损伤的DNA。运动失调性毛细血管扩张症,简称AT(Ataxia Telangiectasia)是一种因检查DNA损伤的基因突变而致的遗传病。自AT患者取得的细胞株,在X-辐射后能继续进行DNA复制,因而该细胞迅速死亡。未癌变的AT成纤维细胞接受X-辐射后也不能使细胞阻断于G2相<sup>[4,9]</sup>。

p53蛋白在人类肿瘤发生过程中扮演重要角色,它是通过促进一种CDK抑制因子p21的表达来阻断细胞由G1向S相的过渡,不能起DNA复制<sup>[11]</sup>。目前知道p53是G1→S相检查点调控途径中的一个元件,中等强度的紫外线和X-辐射可以增加正常细胞p53的表达而阻断细胞于G1相。但是缺乏p53或p53突变的肿瘤细胞株,接受X-辐射后,无能阻断于G1相,而且导致某些基因的扩增。Li-Fraumeni综合症是一种易发生癌变的遗传病,它就是与p53点突变有关。从Li-Fraumeni病人中取来的成纤维细胞显示正常的生长特征,但是在培养传代过程中,出现相当高的自发性染色体异常化倾向,最终导致癌变,成为永生细胞。这些现象都表明p53作为检查点调控机制中的一个成员的重要作用。另外,在其他一些肿瘤中发现的突变,也导致一些检查点基因的失活,而不涉及直接调节细胞增殖的基因<sup>[4,9]</sup>。最近Utah研究小组发现在肿瘤发生中更为多见的是p16的突变,且证实p16能直接与CDK4结合,阻遏具癌基因作用的周期蛋白D1与CDK4结合。所以p16已被列入可能参与G1向S相过渡的检查点调控的重要候选元件的名单中<sup>[12]</sup>。

## 小 结

由于细胞周期检查点调控机制具有特别重

要的生物学功能,一开始就受到人们的普遍重视。目前的研究现状是,用遗传学等方法,在不同物种、不同种类的细胞中筛选到为数不少的检查点调控基因,分析了其功能。但是,对于检查点的具体调控途径,包括对上游事件是否完成的检查,信号的产生和转导,和由此产生的具体效应过程等等却还没有完整的认识。另一方面细胞周期的检查点调控机制是细胞周期内各事件能正确“偶联”的关键。因此综合利用各事件现有研究的成果,将有助于推动检查点调控机制的研究。我们相信,细胞周期检查点调控与发育、癌变、衰老和编程死亡的关系,必将成为人们关注的焦点。

### 参 考 文 献

[1] Murray, A. W., et al., 1989, *Science*,

246: 614—621.

[2] Hartwell, L. H., et al., 1989, *Science*, 246: 629—634.

[3] Schiestl, R. H., et al., 1989, *Mol. Cell Biol.*, 9: 1882—1896.

[4] Nishimoto, T., et al., 1992, *Current Opinion in Cell Biology*, 4: 174—179.

[5] Shedrick, K. S., et al., 1993, *BioEssays*, 15: 775—782.

[6] Downes, C. S., et al., 1994, *BioEssays*, 16: 75—79.

[7] Dasso, M., et al., 1993, *Trends in Biochem. Science*, 18: 96—101.

[8] Joachim, J. L., et al., 1993, *Cell*, 74: 223—226.

[9] Hartwell, L. H., et al., 1992, *Cell*, 71: 543—546.

[10] Murray, A. W., et al., 1992, *Nature*, 359: 599—604.

[11] Marx, J., 1993, *Science*, 262: 1644—1645.

[12] Marx, J., 1994, *Science*, 264: 344—345.

## 人体 $\beta$ -类珠蛋白基因时空表达与调控

严志江 钱若兰

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

人体 $\beta$ -类珠蛋白基因簇可以说是真核生物基因组中最具有代表性的一个基因家族,它的表达具有严格红系组织特异性和发育时期专一性,是用以研究真核基因表达与调控以及基因表达与细胞分化关系的理想体系。目前,国内外对人体 $\beta$ -类珠蛋白基因时空表达与调控分子机制的研究,引起了极大的关注。本文就几个方面作一简要概述。

### 一、人体 $\beta$ -类珠蛋白基因簇 结构组成及其表达特征

人体珠蛋白基因有两个家族,即 $\alpha$ -类珠蛋白基因( $\alpha$ -like globin genes)家族和 $\beta$ -类珠

蛋白基因( $\beta$ -like globin genes)家族,它们分别位于16号染色体短臂和11号染色体短臂上,各自排列成簇。在胚胎发育进程中, $\alpha$ -类和 $\beta$ -类珠蛋白基因的表达在任何发育阶段始终维持平衡,平衡失调就会导致各种地中海贫血症或异常血红蛋白病。

人体 $\beta$ -类珠蛋白基因簇主要由五个功能性结构基因和一个假基因组成。它们以5'- $\epsilon$ - $\alpha\gamma$ - $\psi\beta$ - $\delta$ - $\beta$ -3'的顺序排列,全长约60 Kb。其中, $\epsilon$ 为胚胎型结构基因, $\alpha\gamma$ 、 $\psi\beta$ 为胎儿型结构基因, $\delta$ 和 $\beta$ 为成年型结构基因, $\psi\beta$ 为假基因(见图1)。珠蛋白基因簇全序列已全部测定。典型的珠蛋白基因内含有三个外显子和两个内含子(IVS-1和IVS-2)。同类珠蛋白