

多胺与细胞生长及分化的关系

李润生 左嘉客

(中国科学院上海细胞生物研究所)

腐胺(Putrescine)、亚精胺(Spermidine)和精胺(Spermine)是一类广泛存在于生物体中的多胺化合物。对其生物学的研究已有三百多年的历史。早在1674年,列文虎克就用他发明的原始显微镜首次在人的精液中观察到精胺盐晶体。后人又在细菌中分离出腐胺。但有关两者的分子结构及性质直到本世纪初才被阐明。亚精胺是在人工合成精胺时被发现的,并被进一步证实其自然存在。随着生物合成多胺的一些酶的发现,多胺的各方面研究进入了迅速发展状态。近二十年来,大量的工作表明多胺确实是许多生命活动过程中的重要调节分子,对细胞生长、分化、肿瘤形成以及激素对靶细胞的调控过程中都具有很大影响。多胺作用的广泛性促使多胺的研究成为现代分子生物学中相当活跃的领域。

一、多胺的新陈代谢及其调节

在哺乳类细胞,亚精胺和精胺的含量大约都在毫摩尔水平;腐胺的含量一般很少。它们主要分布于细胞质中,而细胞核内以精胺为主^[1]。

各种有机体合成多胺的途径不完全相同^[2]。在动物细胞和真菌细胞中,多胺的前身物是L-鸟氨酸和S-腺苷甲硫氨酸(S-Adenosylmethionine, SAM)。前者经鸟氨酸脱羧酶(Ornithine Decarboxylase, ODC)作用后形成腐胺;后者在SAM脱羧酶的催化下形成脱羧SAM。然后,在亚精胺合成酶的作用下,腐胺与来源于脱羧SAM分子中的丙基胺基团结合形成亚精胺(图1)。按同样的方式,在精胺合成酶的催化下,亚精胺结合源自脱羧SAM的丙基胺基团后生成精胺^[2]。伴随每一个亚精

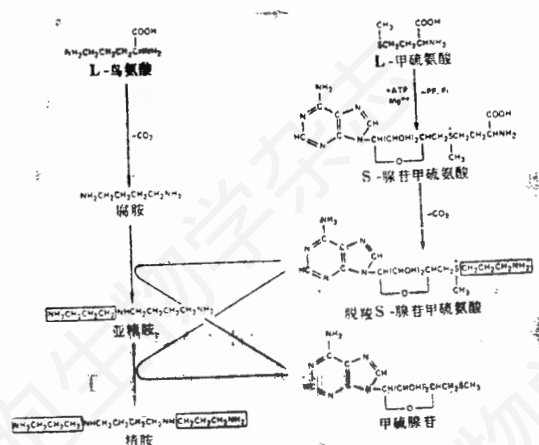


图1 动物和真菌细胞合成多胺的途径^[2]

胺或精胺分子的合成,也形成了另一产物甲硫腺苷(Methylthioadenosine, MTA)。

在细胞内,多胺分子还能被降解。该过程是由精胺/亚精胺-N'-乙酰基转移酶(SAT)和多胺氧化酶共同作用完成的^[3]。SAT催化精胺(或亚精胺)转化成N'-乙酰化精胺(或N'-乙酰化亚精胺),再经多胺氧化酶催化后形成了亚精胺(或腐胺)。在动物细胞中已证实,细胞内的多胺一直处于合成与降解的互相转化过程之中。该过程也称为鸟氨酸循环^[2]。

当哺乳动物细胞处于静息或未受刺激的状态时,作为多胺合成过程中第一限速步骤酶的ODC含量很低。当靶细胞接受外界刺激或调节后进入生长、分化或改变生理状态时,ODC活性显著增加,甚至可提高数百倍。Russell认为,ODC活性的增加是一个依赖cAMP水平上升、转录水平的调节以及ODC蛋白合成的过程^[4]。ODC一直处于合成与水解的平衡之中,其半衰期很短,仅二十分

钟^[2]。这一特征决定了蛋白质合成可能是 ODC 活性增加的主要方式。该推论实际上已得到了广泛的证实^[4]。此外,在哺乳动物细胞中还广泛存在 ODC 的拮抗酶(Antizyme)。它与 ODC 非共价结合后,不仅使 ODC 的活性消失,而且增加了 ODC 对蛋白水解酶的敏感性^[2]。在细胞周期中,ODC 的拮抗酶含量与 ODC 活性的变化成反比关系,说明拮抗酶很可能参与了 ODC 活性的生理性调节过程^[2]。在一些培养细胞匀浆后高速离心的沉淀物如微粒体中,还发现了一些能改变 ODC 活性的成份^[5],其意义尚待进一步研究。

值得注意的是,除了 ODC 参与多胺合成的调节,参与鸟氨酸循环的另外两种酶——SAM 脱羧酶和 SAT,它们的活性在细胞受刺激时也发生变化^[2-3]。其中 SAM 脱羧酶是生物合成亚精胺和精胺的限速酶, SAT 是多胺降解的限速酶。细胞内多胺的含量不仅与其合成和降解的速度有关,而且还取决于细胞对多胺的摄取和分泌^[6]。因此,仅仅 ODC 活性增加往往不能提高亚精胺或精胺的水平^[7]。目前对上述调节胞内多胺水平的因素还很少进行过综合的研究。

二、多胺与细胞生长

在动物胚胎发育或组织迅速生长的过程中,细胞内多胺的水平迅速增加。其中以腐胺含量的变化最大,如在表皮生长因子诱导的小鼠上皮、雌二酮刺激的鸡子宫和再生的鼠肝^[8],以及非洲爪蟾早期胚胎发育^[9]、培养细胞等等中广泛得到证实。

多胺合成增加是细胞生长所必需,还是生长过程中多元反应的非必需的副产品?为了研究这类问题,人们广泛地使用了 ODC 的不可逆抑制剂 α -二氟甲基鸟氨酸(DFMO)和 SAM 脱羧酶的竞争性抑制剂甲基乙二醛双脒脲(MGBG)进行干扰实验。大量实验表明(除少数例外),细胞生长能被 DFMO 或 MGBG 抑制。

研究细胞生长与多胺的关系,主要是从细

胞周期进程对多胺的需要的角度进行分析的。当静息状态的细胞(G_0 期)受到刺激包括营养物的更新,致癌病毒 DNA 的感染,激素、生长因子的使用等等之后进入了 G_1 期,同时细胞内 ODC 活性出现峰值。但在连续分裂的细胞中没有出现早 G_1 期 ODC 活性峰值^[10],说明 ODC 活性上升可能是 G_0 - G_1 期转变的标志。当细胞处在合成 DNA 的前夕,即在晚 G_1 -早 S 期时,再次出现 ODC 活性的峰值。腐胺水平与 ODC 活性保持着平行关系;SAM 脱羧酶受腐胺激活后也增加,亚精胺的含量因此提高;精胺水平的变化与否则因实验材料而异^[7,9]。受 DFMO 处理的细胞,其 DNA 合成受到抑制。一般来说,DFMO 能降低各种细胞内大部分 ODC 活性,致使腐胺水平下降到难以测出的程度;亚精胺也因此下降 90% 以上;精胺的水平则稍有增加。以上说明多胺,尤其是腐胺、亚精胺与 DNA 合成有关^[2]。外源腐胺能加速培养的成纤维细胞 DNA 合成,以缩短细胞周期^[10];另外两种多胺也有类似的作用^[8]。亚精胺能明显激活依赖 DNA 的 DNA 多聚酶 B^[9]。不过最近的报道表明,多胺饥饿效应更直接地影响蛋白质合成,降低多聚核糖体中核糖体的数量^[11]。在迅速生长的细胞中,亚精胺的积累与 RNA 的含量增加呈平行关系^[2]。在核糖体中亚精胺的含量相当高。而且仅发现亚精胺参与了蛋白质合成起始因子 4 D(eIF 4 D)的转译后修饰^[3]。

大量的工作集中于探讨多胺与 G_0 - G_1 期转变或晚 G_1 -早 S 期 DNA 合成启动之间的关系及其作用机理,而有关 DNA 复制之后的事件对多胺依赖性的报道却很少。在 G_2 期的 CHO 细胞中,ODC 活性出现峰值;在仓鼠肾细胞中却没有观察到该变化^[2]。经 MGBG 处理的细胞,其精胺和亚精胺的含量降低,伴随着双核化细胞数量的增加。外源多胺还能解除细胞松弛素 B 对 3 T3 成纤维细胞胞质分裂的抑制作用。以上说明多胺参与了细胞分裂过程^[10]。

上述的多胺与细胞生长的关系都说明了多胺对细胞周期进程具有正调控作用。最近发现在孕酮诱导的两栖类卵母细胞成熟过程,即G₂-M期转变过程中,卵内精胺水平下降;外源精胺能抑制该相变过程。从而首次提供了精胺对细胞周期进程具有负调控作用的证据(李润生等,待发表)。

DFMO对大部分细胞的生长具有抑制作用^[3],但DFMO都不能直接降低内源精胺的含量。在精胺再合成被阻断之后,胞内仍有足量的剩余精胺以供一至数次细胞周期活动的需要^[13]。唯有当剩余的精胺被消耗至一定水平时,DFMO对细胞生长的抑制作用才能增加,甚至还可产生细胞毒性作用^[13]。届时,即使胞内存在足量的亚精胺的结构类似物(不能转化成精胺),亦不能取代精胺维持细胞生长的功能^[14],暗示这两种多胺具有不同的生理功能。Pegg最近提出:细胞内亚精胺可以取代精胺维持细胞生长^[3]。该观点显然与上述实验结果^[14]不符。Pegg的证据之一是某些细胞能在精胺含量下降甚至缺乏,但亚精胺增加的条件下生长^[3]。这却可以理解成低水平的精胺不同于低水平的腐胺或亚精胺,它不是细胞生长的限速因素。假如生理情况下亚精胺可以取代精胺维持细胞生长,那么细胞为什么又要合成精胺呢?对此可有两种解释:(1)精胺还具备着维持细胞生长以外的功能;(2)精胺作为一种多胺的贮存形式^[3],在正常生理条件下高度区域化^[3]。实际上,约50%的精胺和亚精胺都与细胞的膜系统结合,且都在细胞应答反应中发生显著变化^[15];此外,处在对数生长期的细胞,其核中多胺以精胺为主^[1],很可能参与了细胞分裂时染色体凝集^[12],由此推测上述的第二种解释不可能成立。

研究肿瘤细胞生长与多胺系统之间的关系也许可进一步促进对多胺功能的认识。与正常的肝细胞相比,小鼠L1210细胞中腐胺和亚精胺的含量明显增加,而精胺的水平却没有提高,甚至稍有下降^[4]。在肝肿瘤细胞生长过

程中,仅腐胺的含量与各种肝肿瘤细胞株的生长速度成正比;绝大多数细胞株中亚精胺的含量都高于正常肝细胞的亚精胺含量;而精胺的水平则在肿瘤及正常的肝细胞中没有明显差别。源自神经系统的肿瘤,其移植块边缘区域细胞中的腐胺和亚精胺的含量比中心区域的高,各个区域肿瘤细胞的数量与其腐胺及亚精胺的含量成正比。值得注意的是,各区域细胞中精胺的含量保持稳定^[16]。在肿瘤衰退过程中,也只有腐胺和亚精胺的水平逐渐减少^[10]。这种平行关系常用来鉴定抗癌药物的疗效。由此可知,和正常细胞一样,肿瘤细胞的生长也依赖于腐胺和亚精胺。不过,两者的功能可能并不相同。在MGBG处理的细胞中,即使腐胺的含量比对照组高,其DNA合成仍然因亚精胺的水平降低而停止^[9]。此外,从上述结果还可总结出:肿瘤细胞并不需要比正常细胞更多的精胺以供应其更快生长的需要,说明在是否对细胞生长实行正调控的问题上,精胺和另外两种多胺之间存在质的区别。在肝的再生过程中,肝细胞中多胺的增加正是依赖多胺的快速生长的典型例子。实际上,也只有腐胺和亚精胺的水平迅速增加;而精胺的水平却下降^[16]。

鉴于十年来,主要借用多胺合成的抑制剂及多胺的类似物来研究细胞生长与多胺的关系,致使对某些实验结果的理解变得复杂了。首先是源于各种抑制剂的副作用:例如DFMO尚影响其它酶的活性,又如MGBG还能损伤线粒体,干扰多胺的运输^[17]。其次是源自各种抑制剂的超生理作用:各种抑制剂可使细胞内多胺的水平过分降低,其程度远远突破了细胞周期中多胺水平变化的下限,甚至可能降到不能满足细胞基础代谢水平的要求,从而忽视了对多胺是否具有负调控细胞生长过程作用的研究。

三、多胺与细胞分化

对多胺与细胞分化关系的研究,起步较晚,进展缓慢。研究结果可大致归纳成以下三

类: (1) DFMO 抑制某些细胞分裂, 同时诱导其分化^[18]; (2) 细胞分化过程中 ODC 活性增加, 多胺水平上升, 而 DFMO 却抑制这类细胞的分化过程^[19]; (3) DFMO 降低多胺的含量从而诱导细胞分化, 细胞分化的程度与细胞内多胺的水平成反比关系^[20], 说明了多胺对细胞分化可能有负调控作用。在表型方面, DFMO 诱导的分化和正常诱导分化因子的作用并不完全相同。

四、多胺与细胞应答反应

在细胞外信号刺激细胞生长, 改变细胞功能状态以及诱导细胞分化, 癌变等过程中, 都涉及到靶细胞的应答反应。在程序化的应答反应中, 多胺系统变化与其它应答反应的联系究竟如何, 这是令人十分感兴趣的问题。从巴豆油中提取的佛波酯 TPA (12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) 促肿瘤形成可作为一种供这方面研究的实验模型。

TPA 本身并不致癌, 但是却能促进经过低于致癌剂量的致癌剂处理过的小鼠上皮形成肿瘤块。已经证实, TPA 在细胞内的受体是蛋白激酶 C(PKC)。TPA 能仿效 PKC 的生理性激活剂二酰甘油(Diacylglycerol, DAG)的作用, 而 DAG 和三磷酸肌醇(Inositol triphosphate, IP₃)一样, 都是质膜肌醇脂质水解的产物, 在细胞的应答反应中, 它们都是重要的第二信使^[21]。在促肿瘤形成过程中, TPA 诱导小鼠上皮发生一系列变化, 包括 ODC 活性大量增加, 且各种 TPA 促肿瘤生成的能力与其增加 ODC 活性的程度成正比^[22]。DFMO 能抑制 TPA 的促肿瘤生成作用。其它一些抑制 TPA 作用的药物虽然不能影响 ODC 活性的增加, 但确实能降低上皮组织中亚精胺的水平^[23]。

那么, TPA 激活 PKC 后又如何进一步提高 ODC 活性呢? 实验表明环氧酶(Cyclooxygenase)或脂氧酶(Lipoxygenase)的抑制剂, 如消炎痛(Indomethacin)也能抑制 TPA 的促肿瘤形成作用以及 TPA 诱导的 ODC 活性的变

化, 但是并不影响 TPA 处理后细胞内蛋白质合成^[23]。实际上和正常细胞相比, 肿瘤细胞 ODC 活性对外界刺激更加敏感, 表明 ODC 活性的调节机理发生了变化。环氧酶和脂氧酶分别参与了花生四烯酸(Arachidonic acid)合成前列腺素和白三烯(Leukotrienes)的过程。外源前列腺素能拮抗消炎痛对 TPA 的抑制作用。很明显, TPA 在促肿瘤形成过程中提高 ODC 活性是通过前列腺素的合成实现的。某些实验还发现, 前列腺素本身也能诱导 ODC 活性的增加^[24]。白三烯也具有类似于前列腺素的作用。

很久以来, 前列腺素与白三烯都被看作是激素, 调节细胞之间的相互作用。近来一些实验结果却清楚地表明它们是细胞内的调节物, 均参与了靶细胞的应答反应过程。在 PDGF(血小板衍生的生长因子)诱导的 3T3 细胞分裂的过程中, 前列腺素合成增加, 并通过提高胞内 cAMP 的水平将外界的刺激传递给后继

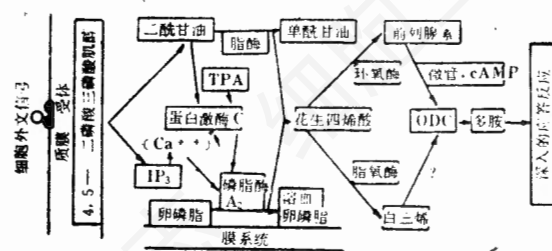


图 2 逐级调控多胺系统的应答反应^[19]

的应答反应。细胞内前列腺素或白三烯如何增加 ODC 活性的机制尚需进一步研究。该过程似乎依赖于微管系统^[12]。而有关 TPA 促进前列腺素或白三烯合成的机理却比较清楚。目前认为它们合成的共同前身物花生四烯酸有两个来源: (1) 二酰甘油的水解——花生四烯酸残基以游离酸的形式释放出来; (2) PKC 间接激活磷脂酶 A₂, 致使膜系统中卵磷脂的花生四烯酸与甘油之间的酯键解开^[26]。这两条途径都受到 TPA 的促进性影响。

综合上述, 多胺系统在 TPA 促肿瘤形成过程中, 受到第二信使 PKC、前列腺素或白

三烯、甚至cAMP等因子的逐级调控。这些调节分子有条不紊地实现其功能,正是细胞作出程序性的应答反应的分子基础。在TPA诱导的HL-60细胞的分化过程中,多胺系统也受到上述调节分子的逐级调控^[19],因此,这种程序调控模式(图2)具有普遍性。对此深入研究必将能更加全面地、深刻地理解生命的本质。

遗憾的是,至今对多胺的生理功能的认识尚有限。多胺在体外研究所显示的广泛作用大部分属于多胺的非特异性离子效应^[10]。不过,在生理pH的条件下,多胺分子带有多个阳电荷,这无疑是它们生理功能的部分基础。由于细胞内近一半的多胺与膜系统结合,所以,多胺与膜酸性磷脂、膜蛋白的结合具有重要的生理意义。在红细胞膜,多胺能提高膜的稳定性;与膜结合的多胺,很可能参与了维持线粒体的ATP酶活性。肾上腺素刺激小鼠肾皮质细胞的胞饮,加强膜的运输过程,这些膜活动都是细胞内多胺与膜结合的结果^[27]。

在粘菌和哺乳动物细胞中分别分离到了一种以酸性蛋白为优先底物的蛋白激酶^[28]。多胺通过直接激活该酶或(和)改变底物构象从而增加催化位点的方式增加该酶催化的蛋白磷酸化反应,而对其它蛋白激酶的活性却有明显的抑制作用。这种激酶被认为是多胺的生理性靶分子,从而调节一些重要功能蛋白的活性,这类蛋白包括糖元合成酶, eIF₂ 以及染色体高迁移(High Motivity Group)蛋白。如果在细胞内确证多胺可以通过蛋白激酶改变功能蛋白的活性的话,那么,多胺无疑是细胞内信使,调节着第二信使之后的、包括转录和转译在内的应答反应。

多胺在细胞内另一个靶子是DNA。它们在维持基因构象、Z型与B型DNA间的互换以及基因表达都可能具有重要的调节作用^[2]。

摘 要

多胺是一类重要的生物活性物质,其代谢受到周密的调节。多胺参与了细胞生长、分化

等许多生命过程。尽管其生理功能尚待进一步研究,但在靶细胞的应答反应中,多胺似乎是细胞内信使。

参 考 文 献

- [1] Mach, M. et al., 1982 *Biochem. Biophys. Res. Common.*, 104: 1327—1334.
- [2] Tabor, C. W. and H. Tabor, 1984, *Annu. Rev. Biochem.*, 53: 749—790.
- [3] Pegg, A. E., 1986, *Biochem. J.*, 234: 249—262.
- [4] Russell, D. H., 1973, Polyamines and Their Accumulation in Tumor Cells. In: *Polyamines in Normal and Neoplastic Growth*, edited by D. H. Russell, pp. 15—30. Raven Press, New York.
- [5] Zure-Tti, M. F. et al., 1985, *Cell. Biochem. Function*, 3: 139—145.
- [6] Feige, F. F. and E. M. Chambaz, 1985, *Biochem. Biophys. Acta*, 864: 93—100.
- [7] Thyberg, J. and B. B. Fredholm, 1987, *Exp. Cell Res.*, 170: 160—169.
- [8] Raina, A. et al., 1966, *Biochem. Biophys. Acta*, 123: 197—201.
- [9] Rupniak, H. T. and D. Paul, 1978, *J. Cell Physiol.*, 94: 161—170.
- [10] Heby, O., 1981, *Differentiation*, 19: 1—20.
- [11] Rudkin, B. B. et al., 1984, *Biochem. J.*, 217: 731—741.
- [12] Heby, O. and G. Anderson, 1980, Polyamines and the Cell Cycle. In: *Polyamines in Biomedical Research*, edited by J. M. Gaugas, pp. 17—34. A Wiley-Interscience Publication, New York.
- [13] Mamont, P. S. et al., 1984, *Eur. J. Biochem.*, 142: 457—463.
- [14] Casero, R. A. et al., 1984, *J. Cell Physiol.*, 121: 476—482.
- [15] Schindler, J. et al., 1985, *J. Cell Physiol.*, 122: 1—6.
- [16] Jänne, J. et al., 1978, *Biochem. Biophys. Acta*, 473: 241—273.
- [17] Pegg, A. E. and P. P. Mcoann, 1982, *Am. J. Physiol.*, 243: C 212—C 221.
- [18] Ewton, D. E. et al., 1984, *J. Cell Physiol.*, 120: 263—270.
- [19] Kufe, D. W. et al., 1984, *Cancer Res.*, 44: 4281—4282.
- [20] Canellekis, Z. E. et al., 1984, *Cancer Res.*, 44: 3841—3845.

- [21] 李润生和左嘉客, 1986, 细胞生物学杂志, 8: 108—112.
- [22] Slaga, J. J. and K. G. Nelson, 1983, Multistage Skin Tumor Promotion in Mouse Skin: Critical Protein Changes During Tumor Promotion. In: Gene and Protein in Oncogenesis, edited by I. B. Weinstein and H. J. Vogel, pp. 125—142. Academic Press, New York.
- [23] Verma, A. K., 1980, *Cancer Res.*, 40: 308—315.
- [24] Verma, A. K., 1977, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 79: 1160—1166.
- [25] Rozengurt, E., 1983, *Cell*, 34: 265—272.
- [26] Touqui, L. et al., 1985, *Nature*, 321: 177—180.
- [27] Koenig, H. et al., 1983, *Nature*, 305: 630—634.
- [28] Cochet, C. and M. C. Chambaz, 1983, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 30: 247—266.

c-myc 基因表达调控及其功能研究进展

夏顺汉 张玉砚

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

原癌基因 *c-myc* 是鸟类成髓细胞瘤病毒转化基因的细胞同源顺序。DNA 序列分析表明, *c-myc* 基因由三个外显子, 两个内含子组成, 其中后两个外显子顺序, 具有高度的保守性, 编码着一种由 439 个氨基酸组成的蛋白质^[1]。有实验说明, *c-myc* 基因表达调控的异常, 常与肿瘤的发生有关。例如在许多种肿瘤细胞中, *c-myc* 基因发生了基因扩增、逆转录病毒基因组的插入、基因转位等^[2]; 另外, *c-myc* 基因的激活可以诱导出肿瘤细胞所具有的某些特性^[3]。细胞内 *c-myc* 基因的表达, 常可受到某些生长因子刺激的诱导, 它的产物定位于核内, 并能与其产物定位于胞膜的一类癌基因(如 *ras* 基因)协调转化培养细胞, 因而被认为是细胞分裂信号在细胞内的中介物^[4]。正是由于这些原因, 最近几年人们对 *c-myc* 基因的表达调节及其功能进行了大量的研究。本文简要地概述一下近年来这方面的进展。

一、*c-myc* 基因和转录起始

(1) 通常的 *c-myc* 基因转录本由三个外显子组成(图一), 其中只有后二个与 *v-myc* (MC 29 病毒转化基因)相对应, 编码着 *c-myc*

蛋白。*c-myc* 基因从 P_1 和 P_2 二个启动子分别起始转录, 产生 2.2 和 2.4 kb mRNA, 分别携带一个由约 400 和 550 个核苷酸组成的非编码部分。在各种不同动物中, *c-myc* 基因的第二和第三外显子具有高度的保守性, 而第一个外显子则有较大的差异。鸟类 *c-myc* 基因外显子 I 很短。在小鼠和人的 *c-myc* 基因的外显子 I 间, 只有 70% 的同源性。鸡和鼠的 *c-myc* 基因外显子 I 没有编码能力, 而人的外显子 I 则有一个开放阅读框(Open Reading Frame, ORF), 从其 DNA 序列推译出一个由 188 个氨基酸组成的多肽。Gazin 等人用人工合成的短肽为抗原制备抗体, 检测人类细胞抽提液中

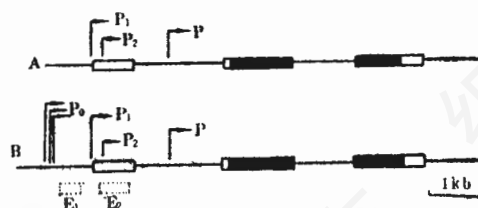


图 1 小鼠(A)和人(B)*c-myc* 基因结构

图中框结构为 *c-myc* 基因外显子部分。实线框结构为编码 *c-myc* 蛋白部分。虚线框 E_1 和 E_2 分别代表编码 114 个氨基酸和 188 个氨基酸部分。 P_0 、 P_1 、 P_2 、 P 为各个启动子起始位点和方向。