

- [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. Enderinol.*, 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

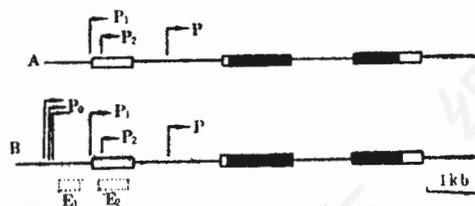


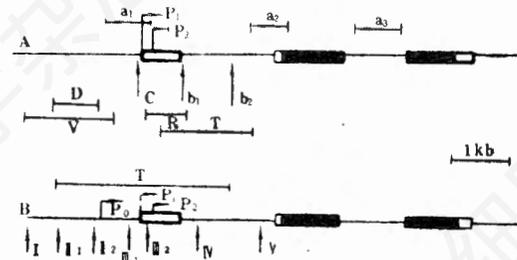
图 1 小鼠(A)和人(B)*c-myc* 基因结构

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

c-myc 基因外显子 I 的翻译产物, 证明有此蛋白质的存在^[5]。

(2) 小鼠和人的 c-myc 基因启动子 P₁ 5' 端上游区也可转录。Bentley 和 Groudine^[6] 在人细胞中, 分离到 2.5 和 3.2 kb 两种新的 c-myc mRNA, 这两种 RNA 是通过不同剪接方式产生的, 它们的起始位点在 P₁ 上游 0.6 kb 处(P₀), PolyA 位点与通常的 c-myc mRNA 相同。P₀ 不同于 P₁ 和 P₂, 它没有 TATA box 结构。RNA 可以从这个区域的不同部位的核苷酸起始转录。从 c-myc mRNA 的 cDNA 序列揭示, 2.5 kb mRNA 有两个 ORF, 编码一个由 114 个氨基酸组成的肽和一个 c-myc 蛋白; 而 3.2 kb mRNA 有三个 ORF, 从 5' 端依次为有 114 个氨基酸的肽, 188 个氨基酸的肽和 c-myc 蛋白。其中, 188 个氨基酸的肽与上述 Gazin 等人分离的多肽相一致。由于 3.2 kb mRNA 的起始点在 P₁ 上游, 并且前端还有一个编码 114 氨基酸肽的序列, 所以此 188 个氨基酸肽很可能是由一个尚未分离到的 RNA 翻译合成^[3]。2.5 和 3.2 kb mRNA 与 114 个氨基酸的肽和 188 个氨基酸的肽之间确切关系, 尚不清楚。除了上述的启动子 P₀、P₁ 和 P₂ 外, 在内含子 I 内还有一个潜在的启动子 P (图一)。在通常情况下, 转录并不能以 P 位点开始。但在某些 c-myc 基因 5' 端非编码区发生转位的 Burkitt 淋巴瘤细胞中, P 启动子被激活。在 5' 端截断的 c-myc 基因上游, 接上含有 SV 40 的一个 21 个碱基对重复序列和复制起始区域, 也可使 P 转录起始位点激活^[7]。在 c-myc Poly A 位点下游也检测到转录信号。

(3) c-myc 基因的反义链 (Antisense Strand) 也可转录。在人类细胞中, c-myc 基因的反义转录, 存在于 P₁ 上游区。在小鼠细胞中情况比较复杂, 几乎整个 c-myc 位点都有反义转录存在^[8]。这些转录可能是由几个不同的转录单位组成, 以 P₁ 上游、第一个内含子、第二个内含子转录最强(图二)。分析反义



图二 小鼠(A)和人(B)c-myc 基因转录调控示意图

图中框结构为 c-myc 基因外显子部分, 实心框为编码 c-myc 蛋白部分。P₀、P₁、P₂ 为各启动子位点和方向。a₁、a₂、a₃ 为反义转录最强的三个部位。c 为转录起始抑制位置。b₁ 和 b₂ 为转录延伸阻断位置。D 为 dehaner 区域。V 为原病毒插入区域。R 为正调控区域。T 为 c-myc 基因转位高发区域。I、II₁、II₂、III₁、III₂、IV、V 为 DNAase I 超敏感位置。

RNA 转录的结果, 大多是通过细胞核体外转录系统检测转录起始位点和延伸(Nuclear Run-on Transcriptional Elongation)而获得的, 目前尚未分离到体内独立存在的反义 RNA。人们推测这些内源反义 RNA 的转录, 很可能对 c-myc 基因转录及转录后加工起调节作用。但目前尚无实验证据。至今发现的内源 c-myc 反义 RNA 的表达都是组成型的, 不随 c-myc mRNA 表达的影响^[9]。然而, 大量的外源 c-myc 反义 RNA 片段, 则能起到抑制内源 c-myc 基因表达的功效。

二、c-myc 基因的转录调控

(1) DNAase I 超敏感点的确定和顺、反式作用因子的分离, 是目前真核基因转录调控研究的主要方法。在 c-myc 基因中, 已经分析确定了一些取决于转录状态的 DNAase I 超敏感点^[10](图二)。结果分析表明, c-myc 基因很可能由多种不同的调节因子共同协调作用, 以调节其表达水平。

Remmer 等人^[11]利用含有 c-myc 基因片段的 pSV2 CAT 质粒来研究此片段的顺式作用因子时发现, 在小鼠 c-myc 基因 P₁ 上游 400—1200 bp 处, 存在着一个顺式负调控区, 具有抑制增强子(enhancer)的效应, 而被称之为

dehancer。Yang 等人则发现,鼠 *c-myc* 基因的外显子 I 内,有一个正调节区,它只对其顺方向的 3' 端附近启动子起激活作用(图二)。

Chung 和 Lipp 两个研究小组,分别将指示基因 *c-myc*-CAT(由 *c-myc* 基因启动子驱动的氯霉素乙酰转移酶基因)和来源于可能起调控作用的区域片段共转染体细胞,通过指示基因表达水平的变化,确定此区域片段功能作用。他们发现 *c-myc* 启动子 P_1 上游区域、启动子 P_1 和 P_2 区域、外显子 I 区域和内含子 I 区域可能与反式作用因子相互作用,共同对 *c-myc* 基因的表达起正、负调节作用。Chung、Lipp、Remmer 和 Yang 三个研究小组的实验结果不完全一致,有待于进一步的实验分析。

(2) *c-myc* 基因的转录,也可以通过转录起始的抑制和转录延伸的阻断的负调控机制调节。至少在两个小鼠浆细胞瘤系,一个 Burkitt's 淋巴瘤系和一个用病毒 *v-myc* 基因转化的小鼠早期髓样粒细胞系中^[12],其 *c-myc* 基因转录起始的抑制是归因于等位排斥。转录延伸的阻断,主要发生在外显子 I 内,以及其与内含子 I 的交界处。有些细胞在内含子 I 处也发生阻断(图二)。这种不连续转录的发生,是由 RNA 和蛋白质共同决定的。在体外转录前,把细胞培养在含有二氨基吡啶的培养液中,或用 RNAaseA 处理细胞核,可以使转录通过外显子 I,说明 RNA 的二级结构参与了 RNA 转录延伸的控制。蛋白质合成的抑制能部分地减轻阻断,表明此过程中有短期活性蛋白质的参与^[13]。此外,转录延伸阻断位点处的 DNA 序列也至关重要。许多肿瘤细胞 *c-myc* 基因在此处发生了突变,伴随着转录延伸阻断现象的消失或部分减轻。

(3) 许多实验说明, DNA 甲基化对基因转录有重大影响。DNA 转录非常活跃的区域,通常甲基化程度较低。在 *c-myc* 基因中,存在 4 个极易甲基化的 CCGG 位点。位于外显子 I、内含子 I 和外显子 II 内的三个 CCGG

位点,在所有检测过的细胞中,都没有甲基化。而位于外显子 III 内的 CCGG 位点只有在许多肿瘤细胞内没有甲基化,在正常细胞内则处于甲基化状态^[14]。外显子 III 编码着 *c-myc* 蛋白中与 DNA 结合的结构域(domain)。许多肿瘤细胞通过此部位的 DNA 去甲基化,而使 *c-myc* 基因转录发生改变。

三、*c-myc* 基因在转录后水平的调控

c-myc 基因还可以通过控制其 RNA 和蛋白质的稳定性来调节表达。通常情况下 *c-myc* mRNA 相当不稳定,半衰期一般在 15~30 分钟之内。但在细胞受到生长刺激或分化时,其稳定性常发生明显改变。进一步分析 RNA 结构与其稳定性关系,发现在 Burkitt's 淋巴瘤和小鼠浆细胞瘤中,存在着各种 *c-myc* 基因的转位、剪接异常、甚至外显子扩增。其结果产生 5' 端异常的 *c-myc* mRNA,导致这些 RNA 的稳定性明显提高。Shaw 和 Kamen^[15] 最近在人类粒细胞单核细胞集落形成刺激因子(GM-CSF)mRNA 的 3' 端,发现存在着 51 个 AU 丰富的核苷酸区域,将它转移到兔 β 血红蛋白的 mRNA 上,会使其变得不稳定。非常相似的结构,也出现在包括 *c-myc* mRNA 在内的多种不稳定 RNA 中。他们认为, *c-myc* 基因 5' 端结构的改变,可能是通过 mRNA 二级或三级结构的改变,而部分克服了 3' 端的不稳定性。

四、*c-myc* 基因在蛋白质水平上的调控

c-myc 蛋白是一种富含脯氨酸的磷酸化蛋白,存在于细胞核内。从 DNA 序列分析,推断 *c-myc* 蛋白的分子量应为 49 KD。但在 SDS-PAGE 中分离到的却是 62—64 或 64—66 KD 的蛋白质双体。将外源 *c-myc* 基因导入细菌内,合成的蛋白质也是双体^[16]。而且此蛋白质在丝、苏氨酸残基,而不是在酪氨酸残基上发生磷酸化^[17],分离的 *c-myc* 蛋白在体外能与 DNA 结合。早期研究提示,在体内, *c-myc*

蛋白紧密地吸附在与DNA、RNA合成密切相关的核基质上(Nuclear Matrix)。但近年研究发现,在低温温浴的条件下,用中浓度的盐溶液即可使c-myc蛋白分离下来^[18]。Studinski等人用亲和层析分离抗人c-myc蛋白的抗体,将此抗体和抗人c-myc蛋白的单克隆抗体作用于分离的多种细胞核,发现它们能特异性地抑制DNA的合成,而对RNA转录无明显影响。所以,c-myc蛋白可能直接参与了DNA的复制^[19]。另外还有文献报道,c-myc蛋白还存在于核内小分子RNA蛋白质复合体内(SnRNPs)。推测其可能参与RNA前体的成熟过程,但尚无实验证据。

Reger等人^[20]利用计算机辅助分析的方法来研究c-myc蛋白不稳定的原因时发现,在包括c-myc蛋白在内的10个不稳定蛋白质中,都存在着一个PGST区域,即富含脯、谷、丝、苏氨酸残基的区域。此区域的两侧,有一串正电荷氨基酸残基。而在大多数稳定蛋白质中则缺少或少见。这可能就是此类蛋白质不稳定的重要原因之一。

五、c-myc 基因表达对细胞增殖的调控

由于c-myc基因表达异常与肿瘤发生的密切相关性;用外源c-myc基因转染的小鼠受精卵细胞(transgenic)长成成体后,多种组织极易产生肿瘤;c-myc蛋白产物直接参与DNA合成的发现,使人们很容易推想到它与正常细胞增殖的关系。c-myc基因的表达,在静止期细胞内是很低的,经过有丝分裂原或生长因子的刺激能迅速、大量地增加。例如,在BALB/3 T3成纤维细胞中,血小板来源的生长因子(PDGF)或成纤维细胞生长因子(FGF)能够刺激c-myc基因在几小时内表达增加10~20倍。尽管表皮生长因子(EGF)和胰岛素样生长因子(Insulin-Like Growth Factor)在其它一些细胞中也有类似效果,但在BALB/3 T3细胞中却不能使c-myc基因表达升高^[21]。当体细胞组织进入增殖期时,如肝

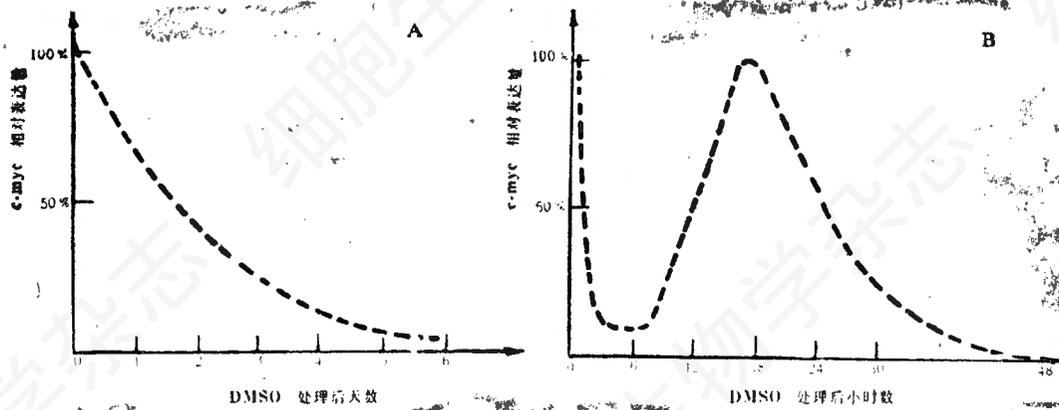
损伤后部分再生时,c-myc基因表达也有明显的提高。在胚胎发育过程中,c-myc基因的表达与细胞增殖也密切相关。如在妊娠30天的人胎盘滋养层细胞中,c-myc基因表达特别高。c-myc基因表达的丰度与滋养层细胞增殖之间有明显的相关性^[22]。转染激活的外源c-myc基因,可使有些细胞降低对PDGF的生长依赖性;有些细胞在低血清条件下生长;有些细胞失去原来对白细胞介素-2或白细胞介素-3(IL-2或IL-3)的依赖性。另外发现,c-myc基因表达的诱导与磷酸肌醇代谢和蛋白激酶C紧密相关^[23]。这些结果提示,从生长因子刺激到细胞最终进入S期,尤其是细胞从G₀期进入到G₁期的过程中,c-myc基因参与了此过程并可能起重要作用。当细胞已进入到增殖期后,c-myc RNA和蛋白质水平,在细胞周期的各个时期,基本上是稳定的,它的表达水平与细胞增殖的速率呈正相关。最近,Heikkila等人^[24]发现有丝分裂原刺激下的T细胞,用人工合成的寡聚核苷酸链作为c-myc基因的反义RNA片段,抑制内源c-myc基因的表达,可以抑制T细胞从G₁期→S期的过渡,而对其从G₀期→G₁期的转变没有明显影响。c-myc基因虽然在有丝分裂原刺激下立即高表达,但其产物可能只有在细胞进入到G₁期后,并向S期过渡时才发挥作用。

六、c-myc 基因表达对细胞分化的调控

人类前髓细胞HL-60和小鼠红白血病细胞是二种研究细胞体外分化的好材料。这些肿瘤细胞在二甲亚砜等一系列化学诱导剂处理下,能够发生终末分化。用化学诱导剂处理一段时间后,这些细胞能按照预定的分化途径自发地进行终末分化,而不需要诱导剂的长久存在。诱导剂处理的过程被认为是这些肿瘤细胞分化决定(Differentiation Determination)的过程。在HL-60细胞中,诱导剂处理的分化决定与c-myc基因表达的下降呈平行关系^[25]。在小鼠红白血病细胞中,诱导剂的处理使

c-myc 表达经历了一个双峰下降过程^[26], 即 c-myc 基因表达在诱导剂处理后迅速下降, 然后再上升, 以后又逐渐下降(图三)。第一次下降过程与细胞分化决定相平行, 而第二次下降过程则伴随着分化表型的出现。这种 c-myc

基因表达的下降与细胞分化决定之间的确切关系, 现在并不十分清楚。一种可能是 c-myc 基因表达的下降, 将使小鼠红白血病细胞在 G₁ 期滞留^[27], 从而使分化基因得到表达。但有许多实验否定这种假设。



图三 肿瘤细胞诱导分化时 c-myc 基因表达变化

A. HL-60 细胞 B. 小鼠红白血病细胞

Lachman 发现^[26]用次黄嘌呤诱导小鼠红白血病细胞, 其细胞内 c-myc mRNA 表达发生了快速的双峰下降, 细胞最终发生了终末分化, 但细胞并没有在 G₁ 期滞留。其次, 组蛋白 H₃ mRNA 虽然在 G₁ 期和 G₂ 期小鼠红白血病细胞中大量下降, 但在二甲亚砜处理后 24 小时内, 小鼠红白血病细胞内 H₃ mRNA 含量并没有发生改变, 而此时细胞却早已分化决定了。由此可以推断, c-myc 基因表达的下降, 并没有使小鼠红白血病细胞细胞周期时间发生明显的改变。在 HL-60 细胞体外诱导终末分化时, 也发现 c-myc 基因表达下降与细胞分化相平行, 而与增殖不呈相关性^[28]。Dmitrovsky^[29]等人最近用实验证明 c-myc 基因的表达直接参与了细胞分化的调节控制。他们将外源 c-myc 基因转染入小鼠红白血病细胞, 就可以使表达外源 c-myc 的小鼠红白血病细胞的体外终末分化的诱导不能发生。

总之, 有关 c-myc 基因表达调控, 以及其对细胞生长、分化作用机理研究, 已经取得了很大的进展, 但仍有许多问题有待进一步研

究。c-myc 基因表达产物的复杂性, 表达调控的多因素及多层次作用, 很可能意味着其功能对细胞生长和分化, 对其它基因表达调控的重要性。值得我们注意的是, 正是由于 c-myc 基因表达调控的复杂性, 导致 c-myc 基因表达在一个层次的变化, 可能并不改变最终 c-myc 基因产物的功能特性。如 c-myc 基因的扩增, 有时并不伴随着 c-myc 基因表达水平的升高, c-myc mRNA 表达的增加, 也并不意味着 c-myc 蛋白活性的同步提高。另外必须注意的是, 细胞的生长和分化是一个极其复杂的生命活动, 它必然涉及到许多基因的相互作用, 由一组或几组基因共同协调调控, 才能得以完成。还有 c-myc 基因与其基因家族 (Gene Family) 中其它成员的关系也是应该引起重视的一个问题。不管怎样, 随着对 c-myc 基因及其它癌基因、生长因子及其受体研究的深入, 将为我们了解真核基因表达调控机理, 正常细胞增殖、分化和肿瘤细胞发生的分子基础, 提供一条有效的途径。

摘 要

本文简要地叙述了近年来,原癌基因 *c-myc* 基因表达调控机理及 *c-myc* 基因产物功能研究概况。*c-myc* 基因转录有多个转录起始点,产生多种不同大小的 mRNA。其反义链也能在体内转录。转录的调控受多种正、负调控因子控制。*c-myc* 基因表达还可以在转录后加工、翻译水平上得到调控。其基因产物则可以通过蛋白质的稳定性及磷酸化等得以调节。*c-myc* 基因产物不仅与 DNA 复制及细胞增殖有关,在某些细胞株中,如 HL-60 和 MEL 细胞,它的表达与细胞分化密切相关。

参 考 文 献

- [1] Battey. J. et al, 1983, *Cell*, 34: 779—787.
 [2] Rabbitts. T. H. 1985, *Trends Genet.* 1: 327—331.
 [3] Piechaczyk. M et al, 1987, *Trends Genet.* 3: 47—51.
 [4] Marcu. K. B 1987, *Bioassays*, 6: 28—32.
 [5] Gazin. C et al, 1986, *EMBO J*, 5: 2241—2250.
 [6] Bentley. D. L. and Groudine. M 1986, *Nature*, 321: 702—706.
 [7] Nishikura. K 1987, *J. Mol. Biol.* 193: 497—505.
 [8] Nepveu. A and Marcu. K. B 1986, *EMBO J*, 5: 2859—2865.
 [9] Nepveu. A et al, 1987, *Gene and Development* 1: 933—945.
 [10] Eick. D and Bornkamm. G 1986, *Nucleic*

Acids Res. 14: 8331—8346.

- [11] Remmers. E. F et al, 1986, *EMBO J*, 5: 895—904.
 [12] Fahrländer. P. D et al, 1985, *EMBO J*, 4: 3195—3202.
 [13] Mechti. N et al, 1986, *Nucleic Acids Res.* 14: 9653—9666.
 [14] Marc. S. C. Cheah. et al, 1984, *J. Natl. Cancer. Insti.* 73: 1057—1060.
 [15] Shaw. C and Kamen. R, *Cell*, in Press.
 [16] Watt. R. A et al, 1985, *Mol. Cell Biol.* 5: 448—456.
 [17] Cole. M. D. et al, 1986, *Annu. Rev. Genet.* 20: 365—384.
 [18] Evan. G. I and Hancock. D. C 1985, *Cell*, 43: 253—261.
 [19] Standinski. G. P et al, 1986, *Science*, 234: 467—470.
 [20] Regers. S et al, 1986, *Science*, 234: 364—368.
 [21] Kelly. K et al, 1983, *Cell*, 35: 603—610.
 [22] Pfeifev-Ohlsson. S et al, 1984, *Cell*, 38: 585—589.
 [23] Coughlin. S. R et al, 1985, *Cell*, 43: 243—251.
 [24] Heikkila. R et al, 1987, *Nature*, 328: 445—449.
 [25] Wastin. E et al, 1982, *Proc. Natl Acad Sci. USA* 79: 2490—2494.
 [26] Lachman. H. M and Skoultchi. A. I. 1984, *Nature*, 310: 592—594.
 [27] Friedman. E. A and Schildkrant C. I. 1977, *Proc. Natl Acad Sci. USA* 75: 3813—3817.
 [28] Filous. J and Buick. R. N 1985, *Cancer Res.* 45: 822—830.
 [29] Dmitrovsky. E et al, 1986, *Nature*, 322: 748—750.

核仁抗原的研究进展

雷思晋 王永潮

(北京师范大学生物系)

真核细胞核糖体的生物发生主要是在核仁中进行的。其生成过程极为复杂,除有大约 70 余种蛋白作为其组成成份外,还有大量蛋白

质从 rDNA 转录的最初阶段就参与了 rRNA 的合成、修饰、组装、转运等过程。有人估计,在核仁中大约有 200 种蛋白质成份;而在细胞