

- Cancer Treatment Reports*, 63: 461—471.
- [21] Kenneth, C. R. et al., 1980, *J. Clin. Invest.*, 66: 389—395.
- [22] Prümmer, O. et al., 1985, *Exp. Hemat.*, 13: 891—898.
- [23] Trobaugh, E. E. et al., 1964, *J. Clin. Invest.*, 43: 1306—1311.
- [24] Abrams, R. A. et al., 1980, *Blood*, 56: 516—520.
- [25] Kenneth, B. et al., 1971, *Science*, 171: 293.
- [26] Neuwirt, 1984, In *Recent Advances in Haematology, Immunology and Blood Transfusion*. ed. by Hollan, S. R., pp. 127—132.
- [27] Epstein R. B. et al., 1966, *Blood*, 28: 692—707.
- [28] Fliedner, T. M. et al., 1975, In *Leucocyte: Separation, Collection and Transfusion*. ed. by Goldman, J. M., pp. 271—275. Academic Press, London.
- [29] Vos, O. et al., 1981, *Blut*, 43: 33—40.
- [30] 马恩普等, 1986, *中华放射医学与防护杂志*, 6: 145—149.

## 植物激素与基因表达

刘 愚

(中国科学院上海植物生理研究所)

30年代植物激素研究发展很快, 领先于动物激素的研究。但是最近20多年来人们对动物激素及其作用机理了解的进展都超过了植物激素。60年代发现“快速反应”, 使得许多研究者致力探讨生长素控制植物细胞扩大的直接作用, 削弱了对基因表达调节的研究方向。结果整个70年代植物激素作用机理的研究处于徘徊状态。随着分子生物学的崛起, 在动物激素分子生物学研究成果的冲击下, 70年代末、80年代初终于意识到基因表达同样是植物激素作用的重要位点。几年来事实证明运用分子生物学理论和技术同样有力地推动了植物激素的研究, 在调节基因表达方面取得了很大的进展。

### 一、GA(赤霉素)控制的 $\alpha$ -淀粉酶合成

1. GA诱导 $\alpha$ -淀粉酶mRNA的形成  
GA控制的 $\alpha$ -淀粉酶合成是激素对基因表达作用的研究中最早和最多的一个系统。麦粒吸水膨胀, 胚中合成GA扩散到胚乳四周的糊粉

层。糊粉层细胞在GA作用下合成 $\alpha$ -淀粉酶(及其它水解酶类), 分泌到胚乳使淀粉等水解, 供给种子萌发所需的能量和物质。当去掉胚时, 无胚种子失去GA来源, 糊粉层细胞便不会产生 $\alpha$ -淀粉酶, 不能水解胚乳的淀粉。如果外源加入GA, 糊粉层细胞中酶重新合成和分泌。Varner和Jacobsen两个实验室的经典工作证明<sup>[1,2]</sup>, GA促进 $\alpha$ -淀粉酶生成与可翻译的mRNA水平变化一致。GA诱导的 $\alpha$ -淀粉酶生成的时间曲线在无胚种子和分离的糊粉层细胞体外试验中是一样的。Muthukrishan等<sup>[3]</sup>(1983)从大麦分离得到的 $\alpha$ -淀粉酶mRNA制备cDNA克隆作为探针与糊粉层RNA杂交证明: 加入GA 1小时后糊粉层细胞中淀粉酶mRNA开始积累, 持续几小时后很快下降。说明糊粉层细胞中没有贮藏的 $\alpha$ -淀粉酶mRNA, 它是在GA诱导下重新合成的。

2. 同功酶  $\alpha$ -淀粉酶具有许多同功酶, 根据它们在凝胶电泳中的表现、对pH的稳定性、免疫性以及Ca<sup>++</sup>的需要等至少可分为两大类群<sup>[4]</sup>。运用各种同功酶cDNA克隆探针检出

GA 对每类同功酶 mRNA 诱导生成的时间曲线和剂量反应都不相同。看来尽管 GA 在转录水平上控制  $\alpha$ -淀粉酶合成, 但对各种同功酶作用的细节还不一样, 可能是独立的, 而同一类中是同步控制的。

**3. ABA(脱落酸)的拮抗作用** 大麦种子中 ABA 抑制 GA 诱导的  $\alpha$ -淀粉酶生成已有许多报道, Jacobson 和 Beach (1985)<sup>[5]</sup>用 GA 处理大麦糊粉层细胞原生质体, 诱导  $\alpha$ -淀粉酶形成和积累, 在 GA 同时加入 ABA 取消了 GA 的作用。各种处理后分离出的细胞核体外基因表达(核取出试验, nuclear run-off)中也看到 GA 抑制总 RNA 和 rRNA 转录, 促进  $\alpha$ -淀粉酶和 PHV<sub>14</sub> mRNA 的转录; 加入 ABA 就抵消了 GA 的作用, 说明 ABA 与 GA 的拮抗作用发生在转录水平上。最近 Nolan 等<sup>[6]</sup>报道在 GA 诱导  $\alpha$ -淀粉酶基因转录不同时间加入 ABA, 作用不一样, 对各类同功酶的作用也不一样, 除了在转录水平上拮抗 GA 作用外, 还降低 mRNA 的稳定性。

**4. Ca<sup>++</sup>的作用** 早期试验表明 Ca<sup>++</sup> 能促进 GA 诱导的  $\alpha$ -淀粉酶等水解酶形成和分泌, 特别是生成高 pI 同功酶所必需。Deikman 和 Jones(1986)<sup>[9]</sup>用高低 pI 两类同功酶 mRNA 核苷酸顺序的 cDNA 克隆研究大麦糊粉层中 GA 和 Ca<sup>++</sup>对  $\alpha$ -淀粉酶 mRNA 积累的影响, 看到 Ca<sup>++</sup> 在转录水平上对两类酶都没有作用。可能它对高 pI 同功酶生成的影响是在更后的步骤(翻译后或分泌)中起作用<sup>[9]</sup>。

**5. 蛋白质因子及其它因素的作用** CH (环己酰亚胺)是常用的蛋白质合成抑制剂, 抑制 mRNA 翻译成蛋白质, 不致影响 mRNA 的生成。但是在无胚大麦糊粉层系统中不同时间加入 CH 以及干扰蛋白质合成的氨基酸同系物 S-2-氨基-L-半胱氨酸时, 发现它们能抑制 GA 诱导的淀粉酶 mRNA 形成。GA 处理时加入 CH 愈晚其抑制作用愈小。当 CH 与 GA 同时加入时, 完全抑制 mRNA 生成, 说明 GA 诱导淀粉酶 mRNA 合成时还有其它为诱导淀

粉酶 mRNA 生成所必需的蛋白质形成, 所以加入 CH 抑制蛋白质合成也就抑制了淀粉酶 mRNA 生成<sup>[9]</sup>。丁酸盐也能在转录水平上抑制 mRNA 生成。

GA 控制  $\alpha$ -淀粉酶作用总结如下图:

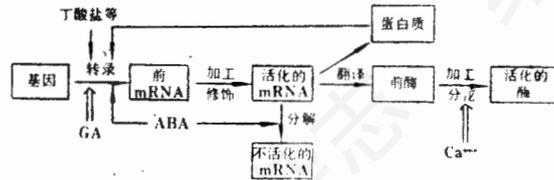


图 1 GA 控制  $\alpha$ -淀粉酶生成可能的机制  
(根据 Parthier<sup>[10]</sup>修改)

## 二、生长素对基因表达的快速调节

**1. 植物对生长素的反应** 一般分为快反应和慢反应两类: 细胞扩大(伸长)就是一种快反应, 滞后期 10—25 分钟; 另一类慢反应, 如细胞分裂、分化、形态建成, 滞后期几小时到几天。细胞伸长反应的快速性常常用来研究激素作用的初始机制。对生长素作用机理的解释有两种假说, 60 年代初 Key 等人就提出过“基因表达活化”假说, 认为生长素调节着指导生长过程所必需的蛋白质合成的 mRNA 形成。当时曾被广泛接受, 而且得到许多实验支持。但是, 限于当时分析技术无法检出 10 到 25 分钟内 mRNA 和新形成的特殊蛋白质的变化, 更无法证实它们就是促进生长的原因。因此 70 年代人们的注意力转向“酸生长”假说: 由于生长素刺激结合在膜上依赖 ATP 的质子泵, 分泌质子作用于细胞壁, 降低纤维分子间氢键结合度, 或增加壁酶活性, 使纤维松弛引起伸长生长。但是一直没有实验能证实生长素对 H<sup>+</sup> 泵的直接作用, 相反生长素诱导的 H<sup>+</sup> 分泌能被蛋白质合成抑制剂所抑制, 表明生长素可能通过某些新蛋白质合成而间接刺激 H<sup>+</sup> 分泌。Vanderhoef 和 Dute(1981)<sup>[11]</sup>结合两种假说提出生长素诱导生长包括两个时相, 第一时相中

反应快速而短暂，是生长素诱导  $H^+$  分泌的作用。第二个时相是与初始反应区别的对基因表达的作用，有较长的滞后期，表现为持久和稳定的生长反应。这个“酸化-基因表达”学说，还是基于生长素不可能在短时间内作用于基因表达的认识。

**2. 生长素快速诱导 mRNA 合成** 由于分子生物学技术的进展，放射免疫以及 PAGE 等配合可以非常灵敏地检出体外翻译系统中新生成的微量的蛋白质，从而鉴定 mRNA 的变化以及 DNA 分离、重组、克隆和杂交等技术应用，直接检出新生成的 mRNA，有可能重新审视生长素诱导  $H^+$  分泌和 mRNA 合成之间的关系。

Theologis 实验室用豌豆上胚轴切段为材料在有或没有 IAA 的溶液中保温，不同时间后取样，分离提取 Poly(A)<sup>+</sup>mRNA，进行体外翻译。用双向 SDS-PAGE 分析 <sup>35</sup>S-蛋氨酸标记的翻译产物。他们发现生长素处理 6 小时后，新出现 6 个体外翻译产物(蛋白质)，有 6 个新的 mRNA 形成<sup>[12]</sup>。\*1 和 \*2 在处理 2 小时后增加，他们称为迟的 IAA 调节的 mRNA (Late IAA-regulated mRNAs)，\*6 在 30 分钟后增加，而 \*3，\*4 和 \*5 在 20 分钟内就增加了，它们是早的 IAA 调节的 mRNA (Early IAA-regulated mRNAs)。cDNA 杂交选择实验表明 IAA 处理 10 分钟后 pIAA 4/5 mRNA 增加就能被检出，pIAA 6 在 20 分钟后才开始累积。没有 IAA 的对照 2 小时内表达水平一直很低，非 IAA 诱导的 pWII mRNA 处理和对照间没有差异(图 2)<sup>[13]</sup>。

Guilfoyle 实验室以菜豆下胚轴切段为材料用 50 μ 2,4-D 处理，得到上述类似的结果。生长素处理后 15 分钟，就检出分子量 25 kd 的体外翻译产物，30 分钟后有 8 种，45 分钟后有 9 种，60 分钟后 10 种体外翻译产物增加<sup>[14]</sup>。他们还在玉米胚芽鞘中发现 IAA 处理后至少有四种 mRNA 诱导生成，其中两种在处理 10 分钟便能检出<sup>[15]</sup>。

所以，豌豆上胚轴中 IAA 诱导 mRNA 增

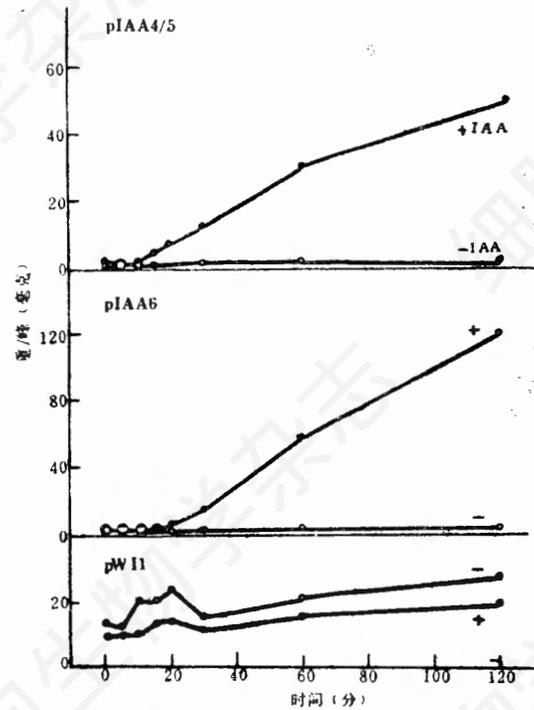


图 2 IAA 诱导 mRNA 生成的时间动态<sup>[13]</sup>

加在处理 10—15 分钟内出现，早于细胞伸长开始(滞后期 21—23 分钟)。菜豆下胚轴系统中生长素诱导的 mRNA 滞后期与 Vanderhoef 和 Stahl (1975) 测定的细胞扩大滞后期 (11.8 分) 相近。最近核取出实验表明，mRNA 生成的滞后期只有 5 分钟，15—30 分便达到最大表达<sup>[16]</sup>。这些反应之快，可与哺乳动物及昆虫激素快速诱导 mRNA 相比拟，这是近年来植物激素研究中引人注目的进展之一。

**3. 专一性** 生长素调节的基因表达十分专一，在菜豆胚芽核取出实验中，具有生长素活性的 IAA，2,4-D，NAA，245-T 等诱导 IAA 专一的 mRNA，而没有活性的结构类似物色氨酸、吲哚乙醛、环己烷乙酸等没有或有很弱的诱导作用<sup>[17]</sup>。其它激素如细胞分裂素、GA、ABA、乙烯等都没有作用<sup>[12,16,17]</sup>。

**4. 蛋白质合成抑制剂的作用** Theologis 等发现蛋白质合成抑制剂 CH，emetine (吐根碱) 和 anisomycin (茴香霉素) 在豌豆上胚轴中

能模拟 IAA 的作用,诱导 pIAA 4/5 和 pIAA 6 mRNA。表明 IAA 诱导的基因表达还受一个快速周转的蛋白质控制(抑制),当 CH 等抑制蛋白质合成就促进(模拟)mRNA 的生成<sup>[18]</sup>。但在菜豆组织中蛋白质合成抑制剂却抑制 pGH<sub>1,2,4</sub> mRNA 形成,对 pGH<sub>3</sub> 没有影响<sup>[17]</sup>。

**5. H<sup>+</sup> 不能诱导 mRNA 形成** 由于生长素能促进 H<sup>+</sup> 分泌而且常被认为是其原初作用,那么 H<sup>+</sup> 能否诱导 mRNA 形成呢? Cerulenin 是一种脂肪酸生物合成抑制剂,钒酸盐是细胞膜上 H<sup>+</sup>-ATP 酶的抑制剂,甘露醇能阻碍 H<sup>+</sup> 分泌和细胞扩大,它们都能抑制生长素诱导的 H<sup>+</sup> 分泌,却不能抑制生长素诱导的 mRNA 累积<sup>[15,19]</sup>。壳梭霉素(Fusicoccin)刺激 H<sup>+</sup> 分泌,不促进 mRNA 形成,CH 抑制 H<sup>+</sup> 分泌却促进 mRNA 形成。这些事实否定了生长素诱导 H<sup>+</sup> 分泌和 pH 改变在生长素快速诱导 mRNA 形成中起作用。

**6. mRNA 形成, H<sup>+</sup> 分泌和细胞扩大之间的关系** Theologis(1986)<sup>[18]</sup> 总结了近年来的研究成果重新审查“酸生长”理论。从时间进程看,豌豆组织使用生长素后 10 分钟内诱导 mRNA 增加,比诱导 H<sup>+</sup> 分泌早 5 至 10 分钟,比细胞扩大早 11 至 14 分钟。据此他提出新的假说:

IAA → 诱导 mRNA → H<sup>+</sup> 分泌 → 细胞伸长  
尽管诱导 mRNA 所编码的蛋白质如何控制 H<sup>+</sup> 分泌还不清楚,这个假说还有待证实,但它一改以往观念,说明生长素原初作用就包括对基因表达的调节。

### 三、乙烯对成熟基因的调节

**1. 乙烯与果实成熟** 无论是跃变或非跃变型果实乙烯作为成熟激素对成熟有关的代谢活动都有相似的促进作用:刺激呼吸上升,叶绿素分解,水解酶类,半乳糖醛酸酶(PG),纤维素酶等活性增加。跃变型果实成熟时乙烯大量增加;外源乙烯诱发或加强成熟作用;乙烯生成抑制剂(氨基乙酸 AOA, 氨基乙基甘氨酸

酸 AVG)抑制乙烯生成推迟成熟;从果实中除去乙烯抑制成熟;乙烯作用的拮抗物(CO<sub>2</sub>, Ag<sup>+</sup>, 降冰片二烯 NDE)也抑制成熟。这些事实说明乙烯调节控制成熟的作用<sup>[20,21]</sup>。而且,我们在番茄成熟过程的任何阶段加入 NDE,抑制 PG 出现或增加,说明不仅发动成熟需要乙烯,整个成熟过程一直依赖乙烯的作用<sup>[21]</sup>。

**2. 成熟基因及其表达** Grierson 及其同事们<sup>[22]</sup> 番茄体外翻译实验发现,绿色未熟果实中存在的某些 mRNA (至少有六种),随果实成熟而减少和消失,同时出现许多新的 mRNA。从成熟果实中提取的 Poly(A)<sup>+</sup>RNA 反转录获得 cDNA,引入细菌质粒 pAT 153 中 pst 1 位点,再用以转化 *E. coli* C 600,建立 146 个克隆的基因文库,并利用分子杂交进行分类,鉴定了与成熟有关的克隆<sup>[23]</sup>。5 个 mRNA (PTOM 5, 6, 13, 36 和 39)仅仅在成熟的果实中表达,不存在于叶片、根和未熟的果实中,它们在成熟时增加几百倍。其中 PTOM 5, 6 编码 PG。PTOM 75 和 137 在成熟和未熟果实、叶片、根中都能表达,果实成熟时增加几倍。

鳄梨成熟过程中纤维素酶增加与番茄的 PG 相似为果实软化的主要酶,用纤维素酶的 cDNA 为探针检出成熟时纤维素酶 mRNA 至少增加 50 倍<sup>[24]</sup>。

**3. 乙烯对基因表达的作用** 乙烯处理未熟的番茄果实后某些 mRNA 消失了,另一些 mRNA 重新合成增加。体外翻译和 cDNA 杂交实验证明乙烯处理后出现的 mRNA<sub>3</sub> 与 PTOM 5, 6, 13 同源,前两者编码 PG,后者可能与乙烯自我催化有关<sup>[25]</sup>。最近 Lincoln 等(1987)<sup>[26]</sup> 用 10 ppm 乙烯处理绿熟的番茄果实 0.5 小时后开始取样,样品与成熟度 MG 4 果实的 mRNA 建立的 cDNA 克隆进行分子杂交,发现 E<sub>4</sub>, E<sub>5</sub>, E<sub>17</sub>, 和 J 49 mRNA 在 30 分钟内开始增加,2 小时后都显著地超过了对照(图 3)。其中 E<sub>17</sub> cDNA 与蛋白酶抑制因子 I 基因 DNA 顺序有 67% 同源,所以可能与组织伤害

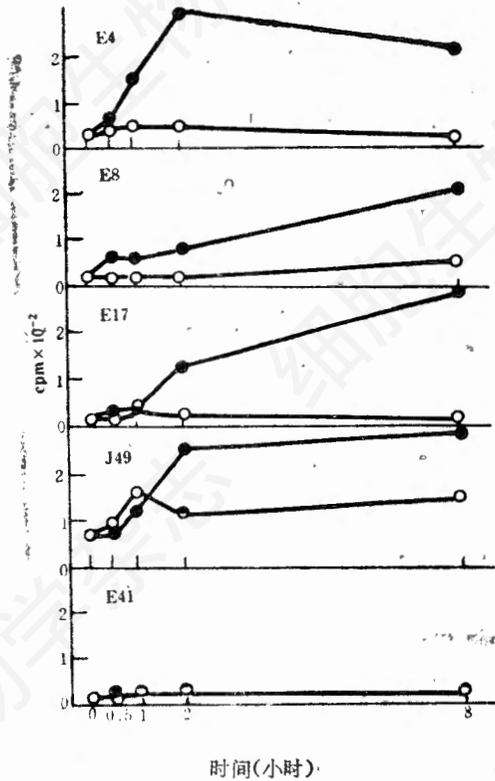


图3 乙烯处理诱导 mRNA 生成<sup>[26]</sup>

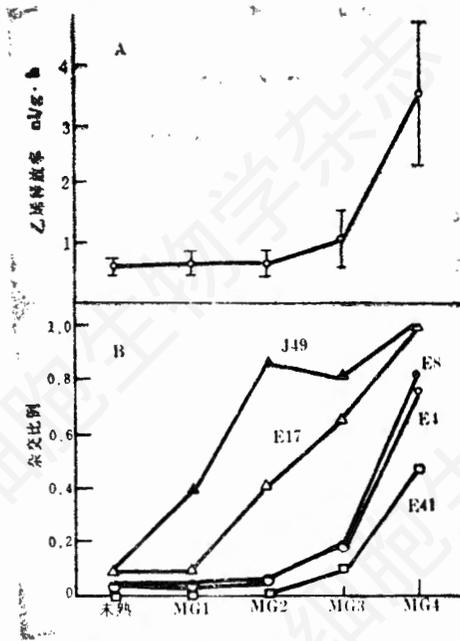


图4 番茄果实发育过程中乙烯生成速率(A)与 mRNA 积累<sup>[26]</sup>

有关, E<sub>41</sub>可能代表 PG 的 mRNA, 8 小时内

不增加。考虑到乙烯扩散进入组织所需的时间, 达到 50% 浓度至少 15 分钟, 所以乙烯诱导基因表达与生长素快速诱导作用速度差不多(参见第二节), 也能快速调节基因表达。同时, 不同基因反应的时间差异很大, PG 诱导需要 8 小时以上(图 3)。这些基因的表达还依赖于果实发育阶段(图 4)。E<sub>4,8,41</sub> 在 MG3 开始表达, 显然是由于乙烯浓度增加所诱导, 而 J<sub>49</sub> 和 E<sub>17</sub> 在 MG1 就开始表达, 在乙烯大量生成之前。加入乙烯作用拮抗剂 NBD 时, 所有基因表达都被抑制, 说明 J<sub>49</sub> 和 E<sub>17</sub> 是由于组织对乙烯敏感性增加而对基础乙烯反应, 也是受乙烯诱导而表达。

#### 四、结束语

其它许多系统中都已证明植物激素参与基因表达的调节, 如细胞分裂素对 RuBP 羧化酶基因、硝酸还原酶基因, ABA 对胚胎发生和种子发育中专一基因表达的调节<sup>[10,27]</sup>。大量的研究结果支持早已提出的论点: 诱导 RNA 和蛋白质合成, 调节专一基因表达也是植物激素的基本作用。特别是最近生长素、乙烯的研究表明植物激素对基因表达调节的快速性, 足以解释“快反应”。

尽管已经取得了许多重要进展, 激素对基因表达的研究还有大量问题等待回答:

1. 植物激素如何启动转录过程, 其分子机制如何? 包括对启动子、调节顺序的作用, RNA 聚合酶和 DNA 异构酶的活化, mRNA 修饰和加工及其稳定性的影响。

2. 如何确定和解释同一细胞中不同激素在基因表达同一步骤中的加合作用和拮抗作用? 以及同一激素在同一类细胞中一定时间诱导活化某些基因而抑制另一些?

3. 激素作用下表达的产物(蛋白质)与生理反应之间的关系必须确立。

#### 摘 要

本文综述了植物激素调节基因表达研究中

的一些最新进展,着重阐明 GA、ABA 等对  $\alpha$ -淀粉酶基因表达,生长素刺激细胞生长以及乙烯对成熟基因表达的调节。生长素和乙烯诱导专一基因表达的快速性可以解释“快反应”,表明植物激素初始作用可能包括对基因表达的调节。

### 参 考 文 献

- [1] Higgins T. J. V. et al., 1976, *Nature* 260 : 166.
- [2] Ho D. T. H, Varner J. E. 1974, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 : 4783.
- [3] Muthukrishan S, et al. 1983, *Pl. Mol. Biol.* 2 : 249.
- [4] Huang J. K, et al., 1984, *J. Mol. Appl. Gen.* 2(6) : 579.
- [5] Jacobson J. V. Beach L. R, 1985, *Nature* 316 : 275.
- [6] Nolan R. C. et al., 1987, *Pl. Mol. Biol.* 8 : 13.
- [7] Deikman J, Jones R. L, 1985, *Pl. Physiol.* 78 : 192.
- [8] Deikman J, Jones R. L, 1986, *Pl. Physiol.* 80 : 672.
- [9] Muthukrishan S, 1983, *J. Biol. Chem* 258 : 2730
- [10] Parthier B, 1985, in "Plant Growth Substances" ed by Bopp M. 169.
- [11] Vanderhoef L. N, Dute R. R, 1981, *Pl. Physiol.* 67 : 176.
- [12] Theologis A, Ray P. M, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 418
- [13] Theologis A, et al., 1985, *J. Mol. Biol.* 183 : 53
- [14] Zurfluh L. L, Guilfoyle T. J, 1982, *Planta* 156 : 525.
- [15] Zurfluh L. L, Guilfoyle T. J, 1982, *Pl. Physiol.* 69 : 332.
- [16] Hagen G, et al., 1984, *Planta*, 162 : 147.
- [17] Hagen G, Guilfoyle T. J, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5 : 1197.
- [18] Theologis A, 1986, *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 37 : 407.
- [19] Sze H, 1985, *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 36 : 175.
- [20] McGlasson W. B, 1985, *Hortsci.* 20 : 51.
- [21] 刘愚, 1986, 大自然探索, 5 : 127.
- [22] Grierson D, 1986, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 134 : 399.
- [23] Slater A, et al., 1985, *Pl. Mol. Biol.* 5 : 137.
- [24] Tucker M. L, et al., 1985, in "Ethylene and Plant Development" ed by Roberts J. A, Tucker G. A, 163.
- [25] Smith C. J. S, et al., 1986, *Planta* 168 : 94.
- [26] Lincoln J. E, et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 2793.
- [27] 张德颐, 1986, 大自然探索, 5 : 1215

## 癌细胞抗药性的分子基础

沈 鼎 武

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

肿瘤化疗过程中的最大障碍之一,乃癌细胞产生抗药性。近年来,关于癌细胞抗药机理的研究已取得了重大进展,一系列具有抗药性

的细胞突变株、系已在体外建成<sup>[1-5]</sup>,从而促进了对癌细胞抗药机理进行广泛而深入的研究。由于近代分子生物学及基因工程的快速进