

细胞增殖的调节和癌基因的作用

陈汉源

(第一军医大学生物教研室)

细胞的生长和分化是个体发育的基本环节。细胞周期概念在辐射生物学和肿瘤生物学中地位重要,控制细胞增殖对辐射疾病和肿瘤的治疗具有应用前景。

一、细胞周期的调节

在细胞分裂中,原有的细胞成分和结构都要经过复制加倍和重新分配,子代细胞开始新的生命过程。如果缺乏营养、生活空间或生长因子(GF),细胞就从 G_1 期中后阶段回到相对静止状态(G_0),并可长期如此^[1]。至于静止细胞进入增殖周期需经两个转变 $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$ (图1A),所需时间的长短变化较大(3T3细胞各需6h)。其余时期 $G_2 \rightarrow S \rightarrow M$ 均按正确时序进行,很少受外界因素影响。细胞增殖的调节包括^[2,3]:(1)激活 $G_0 \rightarrow G_1$ 。当 G_0 细胞受到外界效应因子(competent factor)刺激后,进入C状态。接着受到进展因子(progression factor)的作用,细胞合成所需蛋白后,通过V点,才能进入 G_1 期。上述两类因子单独均无效果,只有依次作用才能奏效。(2)促进 $G_1 \rightarrow S$ ^[4]。 G_1 细胞合成必需的蛋白和酶类,为DNA合成做好准备,才能通过R点(限制点约在S前2h^[2,3]),进入S期。但是,此等细胞如果缺乏生长调节素C(SmC, IGF-1)的刺激,还可阻遏于W点^[4](约位于 G_1 和S交界处^[4])(图1B)。当供应SmC或超生理浓度的胰岛素后,细胞立即合成DNA。凡是未能超越R和W点的细胞都可回到 G_0 期。然而,各种细胞增殖所需的GF常不相同,这取决细胞表面的受体和效应物的差别。例如, G_0 期成纤维细胞的效应因子有血小板生长因子(PDGF)、成纤维

细胞生长因子(FGF)、磷酸钙、放线菌酮和局部创伤等^[1],进展因子有表皮生长因子(EGF)、SmC和胰岛素等^[5](图2)。B细胞的增殖需要抗原和脂多糖的刺激,T细胞需受外源凝集素和白细胞介素-2(IL-2)的诱发才能增殖。至于指数生长细胞虽已受到上次细胞周期中GF的刺激($M \rightarrow G_1$),但仍需SmC或IGF的促进,才能进入S期。

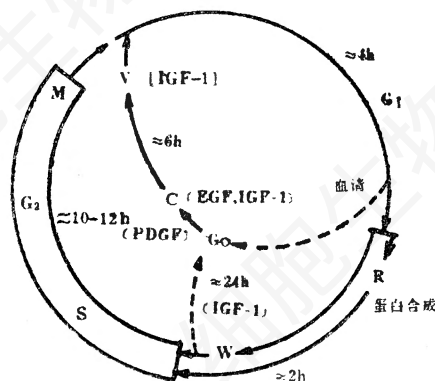
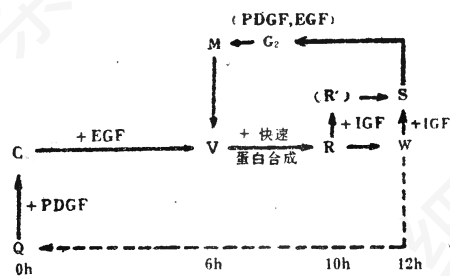


图1(A) 3T3细胞周期的控制点

外环代表指数生长细胞周期所需GF和时间,如果缺乏GF,则细胞从 G_1 中后阶段在R和W点之前回到 G_0 期。



(B) 3T3细胞周期的控制点

到达R点的细胞接受IGF后,进入激活状态 R' ,2h后,开始DNA合成。如果缺乏IGF,细胞可超越R点,到达W点,在供应IGF后,细胞立即进入S期,否则回到Q静止状态。

总之, 细胞的 $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$ 转变过程必需进行下列生化事件^[2]: (1) 外界供应 GF。(2) 表面受体(GFR)与 GF 结合。(3) 生长信号经过第二信号系统或 G 蛋白转导, 前者包括二酰基甘油(1,2-DG)和三磷酸肌醇^[5] (IP₃)。(4) 激活核内调节基因。(5) 转录相应 mRNA。(6) 合成新的调节蛋白。(7) 或复制酶^[3]。细胞周期的循序进行取决于各种调节蛋白按时空次序有规则地出现于细胞中。

二、负反馈控制

动物体能精确地控制细胞的增殖, 使细胞的数目紧密符合机体的需要。经过生长和分化的成熟细胞反过来抑制细胞增殖, 称为负反馈^[6]。亦可通过负反馈信号间接地提供细胞增殖的刺激物。造血组织是分析细胞增殖控制的模式, 在干细胞和分化细胞之间存在着刺激物和抑制物的反馈回路(图 3)。在粒细胞生成中, 早期祖细胞需受粒细胞集落刺激因子(CSF)的促进才能增殖, 而乳酸铁蛋白和成熟粒细胞提取物(GCE)则能抑制增殖。祖代红细胞的增殖需要突发促进活性(Burst promoting activity BPA)和促红细胞生成素(EPO)的先后刺激, 而受到成熟红细胞提取物(RCE)的抑制。BPA 来自 T 细胞, EPO 则由肾产生的 EPO 与血浆因子(PF)结合而成。通过成熟红细胞释放氧给肾, 使肾产生适合需要的 EPO 水平, 达到负反馈控制^[6]。G₀ 期淋巴细胞增殖的刺激物有外源凝集素、抗原和 IL-2, 其抑制物为肠系膜淋巴结提取物(LNE)。

在机体内 GF (图 2)、抑制因子和分化因子互相保持动态平衡。转化生长因子 β (TGF β) 主要来源于血小板, 其受体分布于所有细胞的表面。TGF β 对支气管上皮、角质细胞和肝细胞的增殖为强烈抑制物^[7,8], 但对来源于这些细胞的肿瘤无影响。而且, TGF β 能够阻遏促分裂作用, 包括 PDGF 对鼠胚成纤维细胞、FGF 对血管内皮和 IL-2 对 T 细胞的刺激。TGF β 也能抑制脂肪生成、肌生成和血生成。

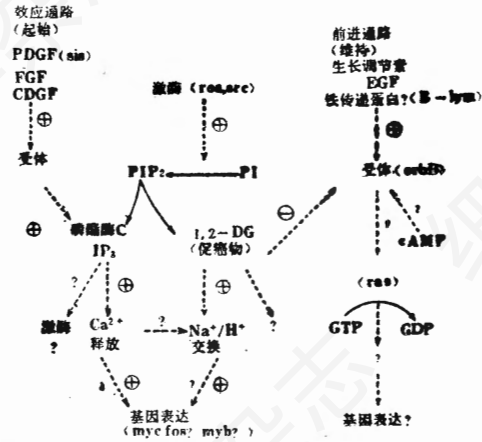


图 2 GF 和癌基因产物对细胞增殖的调节模式

实线表示化学反应, 虚线表示调节作用
 ⊕ 为正反应 ⊖ 为负反应
 PIP₂ 磷脂肌醇二磷酸 cAMP 环化腺苷酸
 PI 磷脂酰肌醇 CDGF 软骨生长因子
 sis, ros, src, Blym, erb B, ras, myc, fos, myb 为癌基因
 其他缩写见文中说明

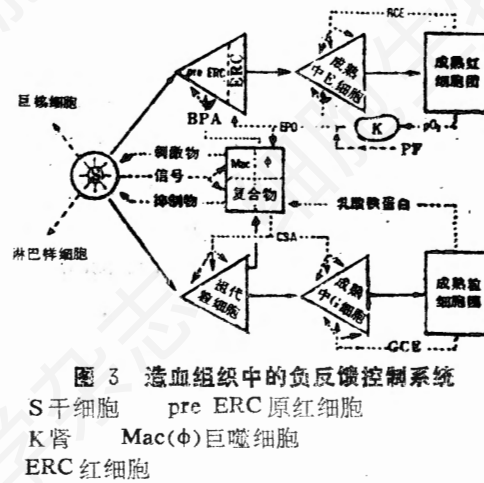


图 3 造血组织中的负反馈控制系统

S 干细胞 pre ERC 原红细胞
 K 肾 Mac(φ) 巨噬细胞
 ERC 红细胞

另一方面, TGF β 却能刺激软骨生成, 诱导体外培养的上皮化生成鳞形细胞, 并促进间质细胞和上皮提高纤维结合素、胶原和其他粘着蛋白的合成。在组织分化中心常出现高水平的 TGF β , 包括骨化软骨管、骨细胞、胸腺小体、骨髓和胚肝造血干细胞等^[8]。而且, TGF β 能够导致组织纤维化和血管生成^[7], 这与创伤愈合相关。此外, 在化学结构和生物特性上类似于 TGF β 的因子还有^[8]: (1) 苗勒管抑制物

(MIS)存在于哺乳动物雄性胚胎的精巢中，这能促使苗勒管退化，但 TGFβ 无此效用。(2)抑制素(inhibitin)存在于卵巢和精巢液中，能抑制脑下垂体分泌促滤泡激素(FSF)。(3)激活素(activin)又称 FSH 释放蛋白，来源同上，能够刺激脑下垂体产生 FSH。

三、影响细胞增殖的因素

影响细胞增殖的因素很多^[9]，我们必须将细胞增殖所需的原料、结构和条件，与确能触发细胞增殖的内在联系加以区别。如果缺乏镁离子就不能激活有关细胞增殖的酶类；由于缺少某些氨基酸就难以建成细胞结构和合成蛋白的机器，两者都会阻碍细胞增殖的进行，但是并不直接控制细胞增殖。其他因素包括细胞和核的大小、糖脂物质、氨基酸库、核苷酸库、化学分子和金属离子等都可影响细胞增殖，但非主要缘由^[9]，只有基因及其产物才是控制细胞增殖的决定因素。由于这些基因有规则地依次表达，才能促使静止细胞进入增殖周期。

早已证明细胞从 G₀→S 必需有 RNA 多聚酶 II 的转录本^[10]。在温度突变型(ts AF 8 和 ts 13)细胞株中，此酶基因突变，以致酶的功能有缺陷。当将细胞移置于不许可温度中(39.5—40.6℃)，就阻遏于 G₁ 中期，即使给以适当的 GF 刺激，也不能进入 S 期(图 4)。实验显示 S 期细胞质可能补偿 G₁ 突变株细胞的遗传缺陷，而 G₀ 细胞质无效。对 ts AF 8 的 G₀ 细胞显微注射 RNA 多聚酶 II mRNA 后，培养于不许可温度中，并给以适当的 GF，则有 45% 细胞进入 S 期。而对照组细胞只有 10% 如此^[11]。而且，对正在生长的细胞注射 α-鹅膏蕈碱，后者能专一地抑制 RNA 多聚酶 II 活性，能使细胞阻遏于 G₁ 期^[10]。可见 RNA 多聚酶 II 转录本为细胞增殖不可缺少的。

在增殖细胞中，与 DNA 复制不能分割的为组蛋白和 DNA 复制酶的合成。核心组蛋白和 H1 各有 10—20 基因复本^[1]，各种组蛋白基因的转录本比例恒定，因受同一机制调

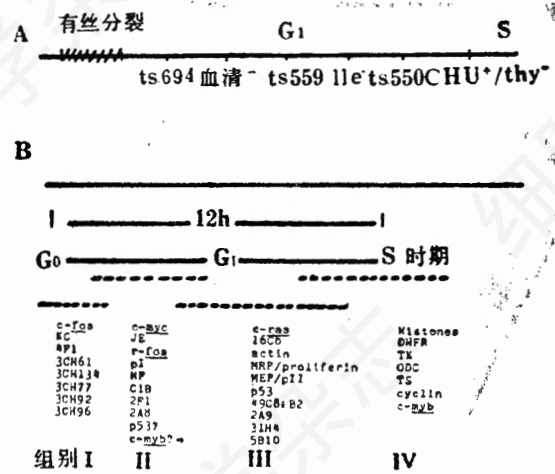


图 4 (A) 细胞阻遏于 G₁ 期
ts 694, ts 559, ts 550C 为温度敏感突变株细胞
Ile⁻ 缺乏亮氨酸 HU⁺ 加羟基豚
thy⁻ 缺胸腺核苷
(B) 静止细胞受血清刺激后的基因表达时间
这是应用各种 cDNA 来识别 mRNA 的

节^[12]。DNA 复制酶是由裸露 DNA 和 10 多种有关 DNA 合成的酶构成的复合体。在机体内这些酶之间的相互作用是 DNA 合成所必需的，因为一种酶的抑制也会阻遏另一种酶的活性^[2]。其他对细胞增殖紧密相关的还有胸腺激酶、鸟氨酸脱羧酶和钙调蛋白等。

四、依赖细胞周期的基因

某些基因的表达呈现时间程序，只在细胞周期一定时相内，瞬间出现基因活性，细胞质内相应的 mRNA 水平起落分明，称为依赖细胞周期(CCD)基因^[1,10,13]。此等基因的高度表达由于加快转录速度、缩短加工过程或提高 mRNA 稳定性。组蛋白基因和 DNA 复制酶基因是 S 期专一的。G₀ 期专一基因的产物可能与抑制因子相关，阻遏增殖。G₁ 期专一基因可能编码刺激因子，促进增殖。后者在静止细胞中表达水平很低或无，当细胞受 GF 的作用进入增殖周期后表达增高。鉴于细胞增殖的调节主要在 G₁ 期，这类基因的表达可能是触发

增殖的关键。找寻 G_1 期专一基因的方法包括^[2]: (1) 从 G_1 细胞分离 mRNA, 并逆转录成 cDNA 文库, 在其印迹平板上探明能与 G_1 期 cDNA 探针杂交, 而不与 G_0 期探针杂交的 cDNA 克隆。(2) 分离 G_1 细胞所合成的蛋白, 并进行双相电泳分析。

估计细胞内的 CCD 基因约有 50—300 种, 占有所有基因的 0.5—3%, 目前已知的近 50 来种^[10]。CCD 基因实际包括三类^[14]: (1) 调节基因的产物确能控制细胞增殖, 并调节其他有关增殖的基因表达。(2) 基因受前类基因的控制, 其产物可能为细胞功能的效应物。(3) 基因产物虽出现于 G_1 期, 但与细胞增殖很少或无关系。如促分裂剂引起细胞内糖代谢酶系活性的提高。

目前检验控制细胞增殖基因的方法有^[10,14,15]: (1) 将基因 DNA 转染或显微注射到静止细胞中, 继续培养后, 检查细胞能否进入 S 期。这可与效应因子或进展因子单独处理相结合。也可显微注射基因产物进行类似试验。(2) 对上述细胞同时注射该基因产物功能所专一的化学抑制剂或单克隆抗体, 继续培养后, 检查能否阻遏细胞增殖。

五、癌基因对细胞增殖的调节

除某些原癌基因能够编码 GF, GFR 和转导物, 影响细胞增殖外^[16,17], 另有 c-fos^[18], c-myc^[19], c-ras^[20] 和 p 53^[21] 的原癌基因都是 CCD 基因, 均于 $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$ 转变时期依次瞬间表达活性(图 4)。其中 c-ras 蛋白分布于质膜内侧, 其余癌蛋白(oncoprotein)均位于核内基质中, 能与 DNA 结合, 半衰期 20—30 min。当静止的成纤维细胞受到效应因子(PDGF 和 FGF)促进后 15—30 min, c-fos mRNA 增高 20 倍^[14], 2 h 后下降。在同样刺激后 2—3 h, c-myc mRNA 提高 20—40 倍^[17], 4 h 后降低, c-myc 蛋白积累在 $G_0 \rightarrow G_1$ 转变阶段。p 53 mRNA 出现于刺激后 30 min 的细胞内, 约于 10 h 后达到最高, 增加 10—20 倍^[21]。但

在增殖细胞的整个周期内, 此等癌基因表达水平较低, 只比静止细胞稍高几倍, 而在转化细胞中, 这些癌基因往往过度表达。经过植物凝血素诱发的人血单核细胞, 进入 G_1 中后期后, c-ras^N 的表达增高 10—15 倍^[14]。

显微注射克隆化 v-ras 基因或蛋白 p 21 能诱发静止细胞的 DNA 合成^[22]。将较大剂量的大鼠正常 c-ras^H 蛋白或较小剂量的致癌性 c-ras^H 蛋白注射到静止的成纤维细胞中, 均能进入 S 期, 同时注射 ras 蛋白的单克隆抗体能抑制之^[1,23]。这种单抗也能阻遏血清、PDGF 或 EGF 对细胞的激活作用^[14], 并能暂时逆转由 ras 基因转化细胞的表型特征。但是注射带启动子的 v-myc 基因或其癌蛋白不能引起静止细胞合成 DNA, 只有继续培养于不含血小板的血清中(ppp), 细胞亦能进入 S 期^[24]。而且, 同时注射 c-myc 基因及其癌蛋白抗体后, ppp 仍能促进细胞的 DNA 合成^[24]。导入有启动子的 p 53 基因或 cDNA 到静止细胞中, 需经 ppp 的作用, 才能进入 S 期^[14]。注射 p 53 抗体能阻遏血清对成纤维细胞的刺激作用。但是同时注射 p 53 及其单抗不能抑制周期性细胞的 $M \rightarrow G_1 \rightarrow S$ 转变^[1]。因此, c-fos 蛋白和 c-myc 蛋白有效应因子功能, 而 c-ras 蛋白和 p 53 为进展因子。

六、CCD 癌基因对细胞癌变的作用

原癌基因经过突变、重排、缺失或倍增后, 成为致癌性细胞癌基因(c-onc), 呈现构成性(constitutive)过度表达, 产生大量结构改变的癌蛋白, 致使细胞增殖失控, 转化成为肿瘤^[25]。癌基因的不正常表达是细胞癌变的必需因素, 但非足够条件。细胞癌基因对细胞的作用包括^[17]: (1) 永生性。正常二倍体细胞体外只能生存有限代数 and 时期, 最终衰老死亡, 但肿瘤细胞能无限增殖。(2) 形态转化。转化细胞的形态结构、生理功能和生长行为均发生改变。(3) 致癌性。将转化细胞植入裸鼠体内生长成为瘤块, 正常细胞则否。但是各种

癌基因对细胞的作用效果并不一致。

细胞转化需要两种或更多细胞癌基因的协同作用^[20]，这两种癌蛋白分别位于核内和细胞质内。例如，c-myc和c-ras共同能使未建株的大鼠胚胎细胞转化，各自单独则否^[27]。c-ras促使细胞形态转化，但只能生存有限时期。c-myc诱发细胞永生，但无形态转化，亦不致瘤。大鼠软骨细胞只能体外生存30代，p53基因使之永生，并使永生细胞(Rat-1)致瘤。有转录活性的p53基因和c-ras基因协同作用促使大鼠原代成纤维细胞转化^[1]。但是，在适当环境下，c-ras的高水平表达可使细胞永生^[1]。v-fos蛋白既可使细胞永生，又能使之转化致瘤^[28]。连接启动子的c-myc转染非瘤性细胞，促使致瘤，并能引起神经视网膜的胶质和神经祖细胞转化^[29]。可见两种细胞癌基因协作的致瘤效果要比单个的较大^[7]。

将带启动子的c-myc在体外注射到小鼠受精卵的雄性原核中，再移植到假孕母鼠子宫内，这些转基因(transgenic)小鼠出生后长到10—15月龄时，约有40%个体患瘤^[30]。在启动子控制下的人野生型c-ras^H基因能转化人肝上皮细胞，但此细胞植入组织适应性大鼠的肝门静脉中，日后并未形成肿瘤。如以T24突变型c-ras^H进行同样试验，则能出现肝细胞瘤^[30]。

总之，细胞周期的调节是细胞生物学研究的重要领域之一，发现有些原癌基因的表达活性依赖细胞周期是近来的重大进展，从而加深对细胞癌变原理的理解。

摘 要

细胞周期受到正负两类因子的调节，GF刺激静止细胞开始增殖，已分化的成熟细胞能抑制增殖。虽然影响细胞增殖的因素很多，只有基因及其产物才是决定因素，其中包括在细胞周期一定时相瞬间表达活性的CCD基因。原癌基因除能编码GF、GFR和转导物外，另有c-fos、c-myc、c-ras和p53为CCD基因。

原癌基因经过突变、重排和倍增后，导致细胞增殖失控，引起癌变。

参 考 文 献

- [1] Denhardt DT, et al., 1986, *Biochem Biophys Acta*, 865: 83—125.
- [2] Pardee AB, et al., 1986, *J Cell Sci Suppl.*, 4: 174—180.
- [3] Pardee AB, 1987, *Cancer Res.*, 47: 1488—1491.
- [4] Campisi T, et al., 1984, *Mol Cell Biol.*, 4: 1807—1814.
- [5] Macara IG, 1985, *Am J Physiol.*, 248: C3—C11.
- [6] Lord BI, 1986, *Int J Radiat Biol.*, 49: 279—296.
- [7] Sporn MB, et al., 1986, *Science.*, 233: 532—534.
- [8] Massague J, 1987, *Cell.*, 49: 437—438.
- [9] Baserga R, 1984, in "Recombinant DNA and cell proliferation" ed. by Stein GS, et al., 337—351.
- [10] Baserga R, 1986, *Int J Radiat Biol.*, 49: 219—226.
- [11] Rassini M, et al., 1980, *J Cell Physiol.*, 103: 97—103.
- [12] Schümperi D, 1986, *Cell.*, 45: 471—472.
- [13] Andreeff M, 1986, *Seminars Hematol.*, 23: 300—314.
- [14] Kaczmarek L, 1986, *Lab Invest.*, 54: 365—376.
- [15] Soprano KJ, in "Recombinant DNA and cell proliferation" ed. by Stein GS, et al., 1—24.
- [16] 陈汉源, 1988, 第一军医大学学报, 8: 71—76.
- [17] Marshall CJ, 1986, *J Cell Sci Suppl.*, 4: 417—430.
- [18] Müller R, 1986, *Biochem Biophys Acta.*, 823: 207—225.
- [19] Alitalo K, et al., 1987, *Biochem Biophys Acta.*, 907: 1—32.
- [20] Czerniak B, et al., 1987, *Am J Pathol.*, 126: 411—416.
- [21] Oren M, 1985, *Biochem Biophys Acta.*, 823: 67—78.
- [22] Hyland JK, et al., 1985, *Virology.*, 41: 333—336.
- [23] Mulcahy LS, et al., 1985, *Nature.*, 313: 241—243.

- [24] Kaczmarek L, et al., 1985, *Science*, 228: 1313—1315.
- [25] 陈汉源, 1986, 第一军医大学学报, 6: 88—94.
- [26] Nishimura S, et al., 1987, *Biochem J.*, 243: 313—327.
- [27] Land H, et al., 1983, *Nature* 304: 596—602.
- [28] Jenuwein T, et al., 1985, *Cell* 41: 629—637.
- [29] Casalbore P, et al., 1987, *Nature*, 326: 188—190.
- [30] Lebovity RM, 1986, *Lab Invest.*, 55: 249—251.

植物染色体 G 带研究概况*

卫俊智 朱凤绥

(中国农业科学院作物育种栽培研究所)

早在本世纪 20 年代后期, Heitz 就注意到植物染色体物质上的线性分化, 并区分为常染色质和异染色质。1940 年, Darlington 和 La cour 曾对重楼属(*Paris*)和延龄草属(*Trillium*)植物染色体的线性分化进行过详尽的描述^[1]。但是, 这些并未引起人们足够的重视。直到 1968 年之后, Caspersson 等人^[2]的工作才真正揭开染色体显带技术的序幕, 他们用一种叫芥子喹啉啶(Quinacrine mustard)的荧光染料处理蚕豆、延龄草属等植物和中国仓鼠的染色体, 得到亮暗相间的荧光带纹, 之后又在人类染色体上显带成功, 并称之为 Q 带^[3]。随后, 不同的研究者又先后发展了 C 带、G 带、R 带、N 带、高分辨带等多种显带技术。20 年来, 显带技术不断发展并得以广泛应用, 推动了细胞遗传学的研究进展, 对植物有关学科的研究也有一定的促进作用。然而令人不解的是, 植物染色体一直只能显示带纹较简单的 C 带、N 带和荧光带等, 在动物和人类染色体上能很好显带的 G 带和高分辨带技术, 应用于植物却多年进展缓慢, 并一度被认为植物染色体是不可能显示 G 带的, 一个时期研究几乎陷于停顿, 近几年来才又取得了新的发展。

一、对植物 G 带的认识

按照巴黎会议^[4]的命名, G 带是指预先经

过或不经碱处理的染色体标本, 在某种盐溶液中温育, 然后 Giemsa 染色而显示的带纹。后来发现用尿素、去污剂或蛋白酶等处理后, Giemsa 染色也可以显示 G 带^[5]。

G 带技术是动物染色剂显带中带纹最丰富、应用最普遍, 也是最有价值的一种显带技术, 它的建立为动物染色体的研究提供了很大方便。并且在中国仓鼠^[7]和人类^[8]的染色体中证明, G 带带纹同减数分裂粗线期染色体上的染色粒有密切的对应关系, 这就更加肯定了 G 带技术的利用价值。此后一个时期, 许多实验室试图把这一技术引入植物中, 然而无论使用何种 G 带程序, 植物染色体都不显示 G 带, 最多只能产生代表组成型异染色质的 C 带。

不少人曾断定, 植物染色体不可能显示 G 带, 并给予了不同的解释。Bhattacharya^[9]认为这是由于植物染色体标本制备原因所致; Greilhuber^[10]认为植物染色体不显 G 带, 可以用植物染色体中不同的组装方式或植物界中缺乏显 G 带的染色质来解释; Nagl^[11]根据分子生物学的观点, 认为是由于在植物中含有较高比例的中度重复 DNA 的缘故。这些解释都不能令人满意。1977 年, Greilhuber^[6]通过分析资料指出, 植物染色体具有比动物染色体高得多

* 农业部农 02-01-02 重点科研项目。