

5-甲基胞嘧啶在发育和分化中的作用*

卫林祥

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

自从在小牛胸腺 DNA 中最早发现 5-甲基胞嘧啶(^mC)以来,所有研究过的动物和植物 DNA 中都发现有这种稀有碱基。 ^mC 并非随机地分布在 DNA 上,90%以上的 ^mC 出现在 CpG 二核苷酸处。DNA 的甲基化是在 DNA 复制以后由甲基化酶将 S-腺苷甲硫氨酸的甲基转移到胞嘧啶的 5 位上去而形成。脊椎动物 DNA 的甲基化模式具有遗传连续性^[1]。细菌和噬菌体 DNA 中,甲基化通常发生在腺嘌呤处,即 N⁶-甲基腺嘌呤(^mA)。然而在双鞭藻 DNA 里,确含有 5-羟甲基尿嘧啶(^mU)。shapiro^[2]收集了各种生物的 DNA 的碱基组成和甲基化碱基的含量,从这些资料可以看出, DNA 的甲基化普遍存在于各种生物中。

DNA 合成后发生的胞嘧啶和腺嘌呤的甲基化在细胞分化和基因表达的调节控制中所起的作用,是目前许多生物学家正在研究的课题之一。愈来愈多的证据表明:越是活跃的基因其甲基化程度越低;反之,不活跃的基因甲基化程度高。本文将着重叙述 ^mC 在发育和分化中的作用。

一、基本分析技术

分析 DNA 中 ^mC 含量和分布位置的方法大致有以下几种:(1)层析法(纸层析或薄板层析);(2)气相色谱法;(3)质谱分析法;(4)气相色谱-质谱联合分析法;(5)高压液相色谱分析法,这是近年来广泛采用的高灵敏度分析法;以及(6)用抗 ^mC 抗体在染色体上进行 ^mC 分布的定位研究。以上方法大多只能进行定量和简单的定位分析。

近来许多作者发现,来自不同种细菌的一

些酶能识别 DNA 中某一个相同碱基顺序,这些酶称做异源同功酶(isoschizomer)。这是一类具有顺序专一性的内切酶。Hpa II 和 Msp I 是一一对 DNA 甲基化研究最有用的异源同功酶。Hpa II 能专一地切割 DNA 中 CCGG 片段,但不能切割甲基化的 ^mC CGG 片段。然而 Msp I 酶对 CCGG 和 ^mC CGG 片段都能切。Bird 和 southern^[3]称这类酶为 CpG 限制性内切酶,简称 CpG 酶。现已发现好几种 CpG 酶。 ^mC 分布在 DNA 上的确切位置可用 CpG 酶测定。DNA 样品经 CpG 酶作用后,采用 Southern 墨迹法,以标记的 RNA 或克隆 DNA 作探针,即可显示出 DNA 上甲基化的位置以及甲基化的程度。这种以 CpG 酶作为 ^mC 探针的测定方法,是近几年发展起来的一种非常专一而灵敏的分析 DNA 甲基化方法。下面提到的许多结果大多是用这一方法和高压液相色谱法得到的。

二、 ^mC 含量及其种属和组织特异性

Vanyushin 等人先后于 1970、1973^[4]和 1979 年对一系列动、植物细胞 DNA 中 ^mC 含量用层析法进行测定。结果发现所有研究过的动物 DNA 里 ^mC 含量在 0.65—2.61mole% 之间,而且具有一定的种属特异性。例如不同种海胆精子 DNA 样品, ^mC 含量各不相同。Strongylocentrotus intermedius 精子 DNA 中, ^mC 含量(0.6mole%)比 Echinus esculentus 精子 DNA 少三倍。此外,种属关系越接近的物

*在本文写作过程中,承蒙庄孝德、曾弥白教授热情鼓励和指导,特此致谢。

种, ^{14}C 含量越接近; 关系越远的物种, 含量相差越大。例如大鼠、兔子和小鼠 DNA 里 ^{14}C 含量很相似。大致在 0.88—1.1mole% 之间, 这是啮齿目动物的特点。

Vanyushin 等人还发现 ^{14}C 含量具有组织特异性。例如功能上最活跃的组织(脑和肝脏)中, DNA 甲基化程度高。在被寄生植物菟丝子属感染的苜蓿总 DNA 里, ^{14}C 的分布也有组织特异性; 来自这种植物顶端部分的 DNA 甲基化程度低(4.2mole%), 来自吸器和吸器后面区域的 DNA 甲基化程度高(5.4mole%)。最近许多人采用 CpG 酶法分析 DNA 中 ^{14}C 含量, 也发现 ^{14}C 的分布具有组织特异性。兔子 β -珠蛋白基因在大多数体细胞组织中约 50% 被甲基化, 然而在精子 DNA 中则 100% 被甲基化, 在脑组织 DNA 里约 80% 被甲基化^[5]。鸡的不同组织的 DNA 里, 编码卵白蛋白基因的甲基化程度也有组织特异性^[6]。鸡和人珠蛋白基因甲基化程度在各种不同组织中各不相同^[7,8]。后面在谈到 DNA 甲基化与基因表达之间关系时还将详细讨论这一点。

然而有关 ^{14}C 分布的组织特异性问题, 意见并非一致。Razin 和 Cedar^[9] 用质谱分析 ^{14}C 含量, 发现鸡的各种不同组织的 DNA 里 ^{14}C 含量几乎相等(表 1)。因此在解释这些结果时, 需要特别小心。

表 1 鸡不同组织 DNA 里 ^{14}C 含量

组织来源	红血球	肾脏	脾脏	脑	输卵管	肝脏
^{14}C 含量(mole%)	2.8	2.5	2.8	2.5	2.4	2.7

引自 Razin 和 Cedar^[9](1977 年)。

Vanyushin 等人采用纸层析或薄板层析法测定各种组织的 ^{14}C 含量, 方法不够灵敏, 误差较大。CpG 酶法作用专一, 质谱分析灵敏可靠。在分析各种组织的 ^{14}C 含量及组织特异性时最好用几种方法同时分析, 互为补充, 避免由于分析方法不同而造成的差异。

三、胚胎发育过程中甲基化的变化

研究胚胎发育过程中 DNA 的甲基化, 海胆卵是个好材料。有关海胆胚胎发育过程中甲基化发生的时间有某些争论, 说法不一。

有些作者认为原肠期之后才发生 DNA 的甲基化。若将卵裂晚期(受精后 4 小时)、囊胚期(7 小时)、原肠期(16 小时)和长腕幼虫期的海胆(*Lytechinus variegatus*) 胚胎, 用 ^{14}C -甲基甲硫氨酸标记 15 分钟后, 分别提取各核酸成分并测定其甲基化的程度。结果发现原肠期之前没有一种核酸成分发生甲基化, 原肠期(即受精 14—15 小时)后开始在 tRNA 和 DNA 中测出 ^{14}C 。rRNA 的甲基化则要等到长腕幼虫期才能在它们的细胞核中发现^[10]。作者当时对卵裂和囊胚期不发生 DNA 甲基化这一事实无法作出适当的解释。近来日益增多的证据表明越是活跃的基因, DNA 的甲基化程度越低。原肠期之前 DNA 正处在合成的旺盛时期; 许多基因处在活跃状态, 这可能是卵裂和囊胚期未发现 DNA 甲基化的原因之一。

Adam^[11] 用 ^3H -甲硫氨酸标记海胆(*Paracentrotus lividus*) 的受精卵, 然后观察不同发育时期 DNA 上甲基化的变化。结果发现长腕幼虫期 DNA 的甲基化程度比桑椹期 DNA 高两倍。受精七十小时后, DNA 的甲基化至少增加三倍。作者认为在发育过程中当某些基因完成一定作用之后, DNA 的甲基化可能参与基因的关闭过程。

然而另一些作者认为, 胚胎发育的各个时期都有 DNA 的甲基化。用正在发育的海胆(*Paracentrotus lividus* 和 *Sphaerechinus granulatus*) 胚胎进行的研究表明, 海胆 *P. lividus* 的 16 细胞或原肠胚时期, 掺入到 DNA 的标记甲硫氨酸在开始几十分钟内呈直线增加, 约 1 小时后趋向平衡。海胆 *S. granulatus* 的未受精卵不能从培养介质中摄取标记甲硫氨酸。然而受精后的卵对甲硫氨酸的透性立即发生突然变化, 甲硫氨酸的掺入从卵裂期、囊胚期到

表2 海胆 (*Lytechinus Variegatus*) DNA 中碱基比例和 ¹⁴C 含量

受精后小时数 (相应发育时期)	碱基比例 (mole%)					测定 次数
	¹⁴ C	Cyt	Gua	Ade	Thy	
4 小时(64-128细胞)	0.90	18.2	15.2	31.9	33.8	1
5 小时	0.97±0.13	16.8±0.5	17.2±0.2	32.7±0.1	32.7±0.8	3
6 小时	0.87±0.07	17.1±0.6	16.8±0.5	32.6±0.2	32.8±0.3	4
7 小时(孵化囊胚期)	0.80±0.1	18.3±3.3	15.5±0.5	31.5±0.1	34.1±2.7	2
8 小时	0.80±0.0	16.8±0.1	17.0±0.1	32.7±0.5	32.9±0.4	2
13½ 小时(早原肠胚期)	0.89±0.0	16.6±0.1	17.1±0.1	32.5±0.1	33.0±0.2	2
37½ 小时(长腕幼虫期)	0.81±0.01	16.9±0.1	15.4±1.0	32.7±0.0	34.2±0.9	2
精子细胞	0.85±0.05	18.7±1.7	16.5±0.5	31.9±0.9	32.1±0.2	2

引自 Pollock 等^[14](1978)。

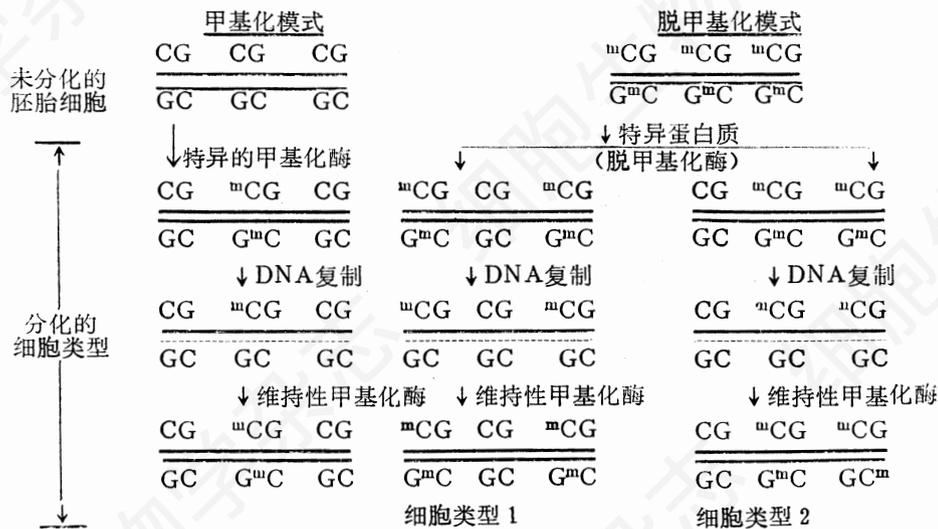


图1 影响胚胎分化的甲基化和脱甲基化模式[参照 Singer 等人^[15](1979), 并作适当修改]。

原肠期逐步增加^[12]。作者就此认为这种海胆 DNA 的甲基化贯穿于胚胎发育的各个时期。他们还发现海胆 *P. lividus* 的各个发育时期也都有 DNA 的甲基化。

Baur 等^[13]将海胆 *P. miliaris* 胚胎培养在过滤过的海水中, 并用同位素标记。收集 32 细胞、囊胚、原肠胚和长腕幼虫期的胚胎。然后分别从这些胚胎中纯化 DNA, 经水解后用高压液相色谱法测定 ¹⁴C 含量, 发现所有上述

各发育时期基本相似。这与 DNA 的甲基化在细胞分化中起某种作用的假说不相符合。

Pollock、Swihart 和 Taylor^[14] 等也采用高压液相色谱法对海胆早期发育过程中 DNA 的甲基化作了系统测定。海胆卵受精 4—37½ 小时胚胎 DNA 中的 ¹⁴C 含量如表 2。从表 2 可看出各不同发育时期 ¹⁴C 含量明显地保持恒定, 变化范围在 0.80—0.97mole% 之间。

近来我们用抗¹⁴C间接免疫过氧化物酶法鉴定东方蝾螈胚胎不同发育时期染色体上¹⁴C的分布,结果发现抗¹⁴C抗体在胚胎染色体上的分布与在成体细胞(肠上皮)不一样。在原肠期之前的胚胎染色体上,抗¹⁴C抗体呈均匀的浅着色,没有看到体细胞染色体在着丝点和端粒部分显现的抗¹⁴C抗体深着色现象。这可能是由于在东方蝾螈原肠期之前,胚胎细胞的DNA正处在DNA合成的旺盛时期,大都基因都很活跃,因而DNA的甲基化程度低。

Singer等人^[15]根据近年来取得的一些结果提出了影响胚胎分化的甲基化和脱甲基化模式(图1),试图解释DNA的甲基化在基因活力的表达和胚胎分化中的作用。甲基化模式假定发育早期未分化胚胎细胞中,甲基化程度很低,然后到一定发育阶段有一种特异的甲基化酶使DNA甲基化,在已经分化的细胞中则由维持性甲基化酶(maintenance methylase)使甲基化模式保持遗传连续性。脱甲基化模式假定未分化胚胎细胞的DNA处在充分甲基化状态,在发育过程中,一种具有顺序专一性的特异蛋白质使DNA脱甲基化,从而产生具有组织特异性的甲基化模式。尽管作者倾向于脱甲基化模式,但他们也承认目前只集中到一个模式上来似乎还为时太早。每种模式都只能解释一部分实验结果。

四、肿瘤分化过程中甲基化的变化

一些科学工作者正在探索核酸的甲基化与细胞恶性变之间的关系,不过这种研究还刚开始,结果还不太一致。

Silber等^[16]和Federov等^[17]发现白血病的淋巴细胞DNA中¹⁴C含量有所增加。然而患淋巴细胞白血病牛的淋巴细胞DNA中,甲基化降低约20%^[18]。Cox和Irving^[19]在研究乙硫氨酸致癌过程中,也发现肝癌细胞核DNA的甲基化程度降低。最近Lapeyse和Becker^[20]对大鼠再生肝和化学致肝癌过程中,细胞核DNA的¹⁴C含量进行了系统测量。

70%肝脏切除之后4、10、21、32小时到两星期内,DNA的甲基化相当稳定,保持在3.60—3.76mole%之间。但切除21小时后,¹⁴C含量降为3.23mole%,即约比开始时低12.5%。在用二乙基亚硝基胺(DEN)或乙酰氨基芴(AAF)诱发的肝癌和移植性肝癌试验中,均发现¹⁴C含量降低。DEN和AAF致癌过程中分别使¹⁴C含量降低20%(2.88±0.19mole%)和45%(1.98±0.21mole%)。

最近Hanski和Stehlik^[21]对由化学物质、病毒以及辐射引起细胞癌变过程中不同核酸成分的甲基化进行了测定,发现这种甲基化与癌变过程有关,并可作为鉴别肿瘤的一个指标。

表3显示二株正在分化的畸胎瘤细胞DNA的甲基化情况^[15]。PSAI株细胞在分化过程中¹⁴C含量并没有显著变化,然而在分化13天的LT株细胞中,甲基化有所增加。

表3 正在分化的畸胎瘤细胞里¹⁴C含量

培养细胞分化时间 (天数)	¹⁴ C含量(mole%)	
	LT(XX) 细胞株	PSAI(XO) 细胞株
0	2.73±0.26	3.61±0.10
4	2.56±0.32	3.78±0.36
7	2.91±0.33	3.46±0.44
13	3.32±0.26	3.56±0.26

引自Singer等^[15](1979)。

五、甲基化与系统进化

Rae和Steele^[22]发现,果蝇等四种昆虫的总DNA,用Hpa II和Msp I酶消化后其酶解图谱彼此不能区分。这表明这四种昆虫的DNA中标志甲基化的Hpa II切点非常少,处在低水平甲基化状态。然而小鼠DNA中,70%以上的Hpa II切点处在高度甲基化状态^[23]。海胆*Echinus esculentus*的DNA,约有1/3是处在高度甲基化状态,而剩下的2/3 DNA没被甲基化,因此这种DNA

处在甲基化与非甲基化相间隔的部分甲基化状态。Bird 和 Taggart^[24]对一系列动物总 DNA 的甲基化进行了系统研究,所有研究过的昆虫和蟹类的 DNA 都与果蝇相同,均属低水平甲基化,然而所有其它无脊椎动物(包括腔肠动物、软体动物和八种棘皮动物)以及脊索动物门的被囊类则都像海胆 DNA 那样,属部分甲基化。所研究过的十三种脊椎动物 DNA(七种哺乳类、两种鸟类、一种爬行类、两种两栖类和一种鱼类等)全都像小鼠和爪蟾一样,显示高度甲基化。作者根据这些结果将所有研究过的动物 DNA 分成三类:(1)没明显甲基化的昆虫型 DNA、(2)甲基化和非甲基化区域相间隔的棘皮动物型 DNA 以及高度甲基化的脊椎动物型 DNA。他们还对各种动物核糖体 DNA(rDNA)的甲基化也进行了系统研究,基本情况与总 DNA 的甲基化情况相似。他们认为进化关系近的有机体通常显示相似的甲基化类型,并将研究过的各种动物所处的分类位置与它们的甲基化类型用图 2 联系起来。虽然图上并没有告诉我们哪一种甲基化类型是祖先,然而有理由相信棘皮动物型甲基化早于昆虫型和脊椎动物型,因为棘皮动物型甲基化广泛分布在彼此相距很远的动物门之间。

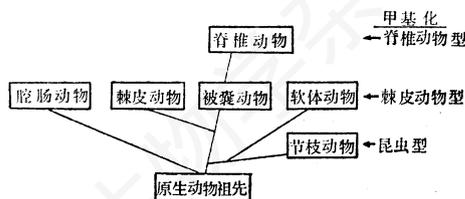


图 2 系统发生和甲基化类型相互关系(引自 Bird 和 Taggart^[24])

六、DNA 甲基化与基因表达的关系

近来有越来越多的证据表明, DNA 的甲基化参与基因的表达和分化过程^[1]。许多证据表明,越是活跃的基因甲基化程度就越低;不活跃的基因则 DNA 的甲基化程度高^[25]。

一些珠蛋白合成的诱导物,例如乙硫氨酸、

二甲亚砷和丁酸盐,能在 Friend 细胞 DNA 中引起低水平甲基化^[26]。

鸡红血球和网织红血球里,由于 β -珠蛋白基因区域正在转录或刚完成转录,因此靠近这一基因末端的特殊甲基化位置处(Hpa II, CCGG)完全没被甲基化。然而在输卵管、脑和胚胎红血球细胞中,由于这一基因不在转录,因此有部分甲基化。这也是 DNA 的甲基化具有组织特异性的一个例证^[7]。

用 CpG 酶法研究鸡不同组织 DNA 里卵清蛋白(ovalbumin)、伴清蛋白(conalbumin)、卵类粘蛋白(ovomucoid)基因和 β -珠蛋白基因的表达与甲基化之间的关系,发现正在生蛋母鸡的输卵管里,构成卵白蛋白的上述三种基因的甲基化程度低,而且对 DNase I 敏感。其他组织里这些基因的甲基化程度高,因为它们没有在表达^[6]。对人珠蛋白基因以及兔子珠蛋白基因进行的分析得到相似的结论,其中有些甲基化位点的甲基化程度会发生变化,活跃基因的甲基化程度总是偏低^[8]。长期以来腺病毒 DNA 被认为基本上是没有甲基化的,近来也发现不在表达的病毒 DNA 则发生甲基化^[27]。同样,不产生疱疹病毒的该病毒转化的细胞株 1670,含有许多高度甲基化的游离基因拷贝,而那些正在活跃地产生疱疹病毒的细胞株则具有未甲基化的病毒 DNA^[28]。

我们用抗 ³H 间接免疫过氧化物酶法结合放射自显术,在草履虫唾腺多线染色体上进行的试验也表明类似情况,即草履虫多线染色体的 DNA 涨泡、RNA 涨泡、带和带间上的 DNA 的甲基化与其 RNA 转录活性之间具有相反关系, DNA 转录活性高则甲基化程度低(Wei 等^[29])。

用 5-氮胞苷(5-azacytidine)进行的试验更直接证明甲基化参与基因表达和分化过程^[30]。5-氮胞苷是胞嘧啶的一种类似物,由于胞嘧啶 5-位的碳原子被氮原子取代,因此 5-氮胞苷不能接受甲基。作者用 5-氮胞苷处理小鼠 $10T\frac{1}{2}$ 细胞株 24 小时后除去 5-氮胞苷,然后

继续培养10—12天, 结果发现5-氮胞苷能诱发小鼠10T $\frac{1}{2}$ 细胞株产生肌管(myotube), 同时抑制新合成DNA链的甲基化。

Mohands等^[31]从一种缺失次黄嘌呤——鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT⁻)的小鼠-人体细胞杂交细胞株里, 分离到具有正常结构然而不活跃的人类X-染色体。当用5-氮胞苷处理这类杂交细胞株以后, HPRT⁺细胞株里的HPRT活力比没处理的细胞株高1000多倍。现已分离出14种独立的HPRT⁺克隆, 并用人类X-染色体上某些特征性基因的表达作为分析指标。等电点聚焦结果表明, 在这些克隆里所表达的HPRT是属于人的。14种克隆里有一种表达人葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 另一种表达人磷酸甘油酸激酶。由于用5-氮胞苷处理后会起DNA甲基化程度降低, 因此人类X-染色体失活的机制也许是由于DNA的甲基化。

参 考 文 献

- [1] Wigler, M. H., 1981a. *Cell*, 24: 285-286.
- [2] Shapiro, H. S., 1976. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Nucleic acids*, Vol II, p. 241-283, Fasman, C. V. ed.
- [3] Bird, A. P. and Southern, E. M., 1978. *J. Mol. Biol.*, 118: 27-47.
- [4] Vanyushin, B. F., Mazin, A. L., Vasilyev, V. K., and Belozersky, A. N., 1973. *B.B.A.*, 299: 397-403.
- [5] Waalwijk, C. and Flavell, R. A., 1978. *Nucleic acids Res.*, 5: 4631-4641.
- [6] Mandel, J. L. and Chambon, P., 1979. *Nucleic acids Res.*, 7: 2081-2103.
- [7] McGhee, J. D. and Ginder, G. D., 1979. *Nature*, 280: 419-420.
- [8] Van der ploeg, L. H. T. and Flevell, R. A., 1980. *Cell*, 19: 947-958.
- [9] Razin, A. and Cedar, H., 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 2725-2728.
- [10] Comb, D. G., 1965. *J. Mol. Biol.*, 11: 851-855.
- [11] Adams, R. L. P., 1973. *Nature New Biol.*, 244: 27-29.
- [12] Grippo, P., Iaccarino, M., Parisi, E., and Scarano, E., 1968. *J. Mol. Biol.*, 36: 195-208.
- [13] Baur, R., Wohler, H., and Kroger, H., 1979. *Hoppe-Serler's Z. Physiol. Chem.* 360: 1263-1269.
- [14] Pollock, J. M., Swihart, J. M. and Taylor, J. H., 1978. *Nucleic acids Res.*, 5: 4855-4863.
- [15] Singer, J., Roberts-Ems, J., Luthardt F. W. and Riggs, A. D., 1979. *Nucleic acids Res.*, 7: 2369-2385.
- [16] Silber, R., Berman, E., Goldstein, B., Stein, H., Farnharn, G., and Bertino, I. R., 1966. *Biochim. Biophys. Acta*, 123: 638-640.
- [17] Federov, N. A., Kuzmichev, V. A., Krilskii, G. A., and Vinogradova, Y. E., 1977. *Biokhimiya*, 42: 791-793.
- [18] Burtseva, N. N., Azizov, Y. M., Itkin, B. Z., and Vanyushin, B. F., 1977. *Biokhimiya*, 42: 1331-1335.
- [19] Cox, R., and Irving, C. C., 1977. *Cancer Res.* 37: 222-225.
- [20] Lapeyse, J. N. and Becker, F. F., 1979. *B. B. R. C.*, 87: 698-705.
- [21] Hanski, C., and Stehlik, G., 1980. *Wien. Klim. Wochenschr.* 92: 134-140.
- [22] Rae, P. M. M., and Steele, R. E., 1979. *Nucleic acids Res* 6: 2987-2995.
- [23] Singer, J., Roberts-Ems, J., and Riggs, A. D. 1979. *Science* 203: 1019-1020.
- [24] Bird, A. P., Taggart, M. H. and Smith, B. A., 1979. *Cell*, 17: 889-901.
- [25] Wilgler, M. H., 1981. *Cell*, 24: 33-40.
- [26] Christman, J. K., Price, P., Pedrinan, L., and George, A., 1977. *Eur. J. Biochem.* 81: 53-61.
- [27] Sutter, D., and Doerfler, 1980. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77: 253-256.
- [28] Desrosiers, R. C., Mulder, C. and Fleckenstein, B., 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 3839-3843.
- [29] Wei, L. H. (卫林祥), Erlanger, B. F., Eastman, E. M., Miller, O. J., and Goodman, R., 1981. *Exp. Cell Res.*, 135: 411-415.
- [30] Jones, P. A. and Taylor, S. M., 1980. *Cell*, 20: 85-93.
- [31] Mohands, T., Sparkes, R. S. and Shapiro, L. J., 1981. *Science*, 211: 393-396.