

- rsad, 1973, *Exp. Cell Res.*, 77:167-174.
- [4] Tepfer, D. A. and Fosket, D. E., 1978, *Developmental Biology*, 62:486-497.
- [5] Fosket, D. E. and D. A. Tepfer, 1978, *In Vitro*, 14:63-75.
- [6] Shininger, T. L., 1975, *Dev. Biol.*, 45:137-150.
- [7] Shininger, T. L., 1978, *In Vitro*, 14:31-50.
- [8] Steward, F. C., Hapes, M. O. and Meers, K., 1958, *Am. J. Bot.*, 45:705-708.
- [9] Reinert, J., 1959, *Planta*, 53:318-333.
- [10] Halperin, W., 1966, *Am. J. Bot.*, 53:443-453.
- [11] Fujimura, F., and Komamine, A., 1975, *Plant Sci. Lett.*, 5:359-364.
- [12] Matsumoto, H., Gregor, D. & Reinert, J., 1975, *Phytochem.*, 14:41-47.
- [13] Gregor, D., Reinert, J. & Matsumoto, H., 1974, *Plant Cell Physiol.*, 15:875-881.
- [14] Verma, D. C. & Dougall, D. K., 1978, *In Vitro*, 14:183-191.
- [15] A. Komamine, T., Morigaki and Tatsuhiro Fujimura, 1978, Metabolism in synchronous growth and differentiation in plant tissue and cell cultures. in "Frontiers of Plant Tissue Culture 1978" Ed. by Trevor, A. Thorpe. University of Calgary, p. 159-168.

不均一核核糖核酸及其在肿瘤细胞中的研究*

孙 谨

(辽宁省肿瘤研究所)

HnRNA 即不均一核核糖核酸,系真核生物的核 RNA 成分之一,因分子量不均一而得名。它约占核 RNA 的 30% 左右,碱基比例与 DNA 相似。它是真核细胞基因的一级转录体,是遗传信息由核向胞质,由核酸向蛋白质传递中的主要中间体,它一部分加工成 mRNA,因此是 mRNA 的前体,大部分(70—90%)于核内降解。

结构特征

HnRNA 的平均长度(13000 个核苷酸)约为 mRNA 的 5—10 倍。新转录的 HnRNA 在链增长完成前,便在 5' 端加上一段与其后加工过程无关的甲基化帽结构, m^7GpppN_mN'' , 其抗酶解能力增强。

10—40% HnRNA 在核内转录后立即在分子 3' 端进行多聚腺苷化并完成于加工之前。Poly(A) 顺序部分运送到胞质,部分在核内降解。Poly(A) 顺序对 HnRNA 加工成 mRNA 并输送至胞质有决定作用。HnRNA 加成 Poly(A) 后即形成利于加工的结构。腺病毒 HnRNA 加成 Poly(A) 后即开始加工,未加成

Poly(A) 的则迅速降解。但非造血组织珠蛋白 HnRNA 的加工似乎与多聚腺苷化无关。

HnRNA 转录自基因组的重复和非重复顺序。哺乳类及海胆 HnRNA 分子中约 10—30% 是来自重复顺序。用部分碱水解和 Poly(dT) 纤维素亲和层析确定,与 3' 端 Poly(A) 相连接的主要是单一顺序,5' 端主要是重复顺序。大鼠腹水细胞 HnRNA 的 80% 是重复和单一顺序交替排列,其中 28% 由长 200 个核苷酸的重复顺序与长 1200 个核苷酸的非重复顺序交替间插,另 43% 交替间插的重复与非重复顺序各长 200 及 9800 个核苷酸。Hela 细胞 HnRNA 3' 端有一段非重复顺序与 Poly(A) 片段邻近,其长度与细胞 mRNA 的平均长度相似。海胆胚胎 HnRNA 由 300 与 800 个核苷酸的重复与非重复顺序交替组成。基因无性繁殖技术揭示,编码 mRNA 顺序的结构基因被非密码插入顺序所隔开。小鼠 β -珠蛋白 mRNA 前体中的结

* 本文系作者在中国科学院上海细胞生物学研究所基因三组进修时撰写,承蒙导师张玉砚教授指导修改,谨致谢意。

构基因转录顺序则被两段插入顺序隔成三个区段。HnRNA 顺序复杂性一般比相应 mRNA 的要高。HeLa 细胞 HnRNA (4.1×10^8) 及海胆 HnRNA (1.7×10^8) 比相应 mRNA (4.95×10^7 及 1.7×10^7) 高 10 倍。L 细胞 HnRNA 复杂性比 mRNA 高 4 倍。

转录自 DNA 回文区的发夹结构 (即双链 RNA, dsRNA) 在哺乳类 HnRNA 中约占 1—3%, 可能是加工产生 mRNA 的区域, 有易被加工酶识别的位点。

HnRNA 链与积聚在链上的蛋白质结合成电镜下可见的约 200 埃的 HnRNP 颗粒。HnRNA 在形成 HnRNP 颗粒时就可开始加工, 但有的颗粒则连结到核膜上成为颗粒网留于核内, 不被加工且很稳定。HnRNP 中的蛋白质能随基因活化时染色质非组蛋白增加而起变化, 推测两者间有某种联系。

制备方法简介

研究 HnRNA 在基因调控中的作用时要求首先制备获得完整的、不被 DNA 污染的 HnRNA。

总 HnRNA 可以从总核 RNA 制得。以大鼠肝和腹水细胞为例, 用蔗糖—氯化钙法或枸橼酸法先分离核, 再将核悬于 $0.14M$ NaCl ($1\%SDS$) 中, 在 $4^\circ C$ 用等容积 pH6 的水饱和酚提取。将水相和酚相间的界面蛋白质再依次严格地在 $4^\circ C$ 、 $40^\circ C$ 、 $55^\circ C$ 、 $65^\circ C$ 及 $85^\circ C$ 分别用 $0.14M$ NaCl 与 pH6 的水饱和酚的 1:1 混合液提取, $85^\circ C$ 时得 HnRNA。不同组织的提取条件有所不同^[1]。用此法制备, HnRNA 易降解。冷酚法提取大鼠腹水细胞^[2]、HeLa 细胞^[3]、海胆胚^[4]及小鼠 L 细胞^[5]HnRNA 时, 将核悬于 $2\%SDS$ —($7-8M$) 尿素— $0.35M$ NaCl— $1mMEDTA$ — $0.01M$ Tris—HCl (pH8) 中, 用 1:1 的酚—氯仿在室温振荡两次, 水层加 pH6 的醋酸钠至最终浓度为 2%, 再以 2 容积乙醇沉淀 HnRNA, $-18^\circ C$ 冷冻 4 小时后高速离心分离。

产品中污染的 DNA 一般均用电泳纯无

RNase 的 DNaseI 酶在 $37^\circ C$ 水解除去。HnRNA 与 rRNA 前体的分离可采用蔗糖线性梯度离心法或甲基化白蛋白硅藻土吸附柱层析法。在含二甲亚砜变性剂的蔗糖梯度上离心或用 Poly(U) 琼脂糖柱层析, 所得 HnRNA 纯度更高, 不降解, G+C 比例低。

还可从 HnRNP 制备总 HnRNA。真核细胞核用生理离子强度微碱性的缓冲液处理, 再借超声法等破核膜即可获得 HnRNP, 但得率均低。超声法所得一般均为 30SHnRNP, 加核酸酶抑制剂则 S 值可达 300S 左右^[6]。大鼠肝细胞核是在 $10mM$ Tris—HCl (pH7)— $0.15M$ NaCl— $1.5mM$ MgCl₂ 缓冲液中利用超声波破核膜, 然后两次蔗糖梯度离心即可分出 HnRNP 区带, 在 $0.5\%SDS$ 中用酚从 HnRNP 中提取 HnRNA^[7]。Pogo 鉴于酚易使 RNA 积聚发生构型改变, 改用 SDL 破核膜, 再在蔗糖梯度上分级分离, SnRNA 在梯度顶部, 18S 及 28SrRNA 在梯度中部, 底部主要为 HnRNA^[8]。

Long 等^[9]从 Friend 红白血病细胞中提取 HnRNA 时, 将细胞悬于 $10mM$ Tris—HCl (pH7.5)— $1.5mM$ MgCl₂— $300mM$ 蔗糖中冻融破膜, 然后在含 $0.5\%SDL$ 的 $100mM$ Tris—HCl (pH8.2)— $20mM$ EDTA 中用酚提取, HnRNA 的产率可达 70—90%。细胞核若先在含 PIPES 后在含苯甲磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl-fluoride) 的蔗糖—Tris (pH7.7) 中处理, 并与 DNase 于 $10^\circ C$ 温育 1—2 小时, 即能使核内 DNA 完全水解, 可提得无 DNA 污染的 HnRNA。

此外, 采用 Edmonds 等方法用 Oligo(dT) 纤维素进行亲和层析, 借有无 NaCl 的 Tris 缓冲液梯度洗脱, 可从总核 RNA 中分出带 Poly(A) 的部分即 Poly(A⁺)HnRNA。

HnRNA 在正常细胞基因调控中可能的作用

(1) 活化或抑制基因表达 Frenster^[10] 提出 HnRNA 对 DNA 双螺旋体有两个相反的作用

用:①作为多聚阴离子体,通过无选择地络合能从 DNA 双螺旋体上移去染色质中的组蛋白,使 DNA 双螺旋解链,活化基因。HnRNA 还能降解成中度重复顺序的去阻遏物 RNAs,在特定基因位点与 DNA 反密码链杂交,既稳定了解链作用,又使 DNA 密码链游离成不对称转录的模板。②HnRNA 断裂成信使与非信使片段时, DNA 双螺旋的反密码链上的去阻遏物 RNAs 即与后者形成双链体而被除去,基因则被关闭(抑制)。

(2) Sherrer 指出^[11], HnRNA 加工成 mRNA 时系通过高度专一机制除去一些 RNA 顺序,胞质 mRNA 顺序是分几步从含多顺反子的 HnRNA 中选择加工而来,所以从核向胞质的信息流量是有选择性和受限制的。

(3) Dickson 指出^[12], HnRNA 与 DNA 相比,更易与蛋白质(酶)缔合。机体通过酶与 HnRNA 结合使之迅速降解。HnRNA 因能迅速转变,又有强编码能力,还能高度专一地与 DNA 及蛋白质反应,故能充当基因调控分子。HnRNA 中保留在核内的顺序还可在基因组的适当位点借氢键固定下来,成为转录新 HnRNA 的引物。Davidson 等^[13]曾提出一重要设想, HnRNA 中互补重复顺序转录体间在核内生成的二联体本身不能加工成 mRNA,在与整合调控转录体(即 SnRNA)结合成二联体后才能加工。

HnRNA 在细胞癌变过程中的变化

有两种观点:

(1) 认为 DNA 的转录模板活性以及转录后的加工和运转在细胞癌变时有改变。Shapot 等^[14]指出,大鼠及小鼠在用放线菌素 D 抑制 rRNA 合成时作体内标记,结果正常肝中 HnRNA 比活迅速下降,而肝癌细胞中仅微有降低,表明肝癌细胞中代谢稳定的 HnRNA 比例较正常肝细胞低得多。Torell 等^[15]证实,有些肝癌细胞不能加工某些大 HnRNA 分子,只能保留未加工的 HnRNA 分子。他们还指出,白血病细胞与淋巴细胞相比,含有较大量的

带 Poly(A) 的核 RNA。Garratt 等^[16]用核酸分子竞争杂交法证明,新生大鼠肝和肝癌 5123C 细胞中的核 RNA 的共同特征就是都缺少成年鼠肝核 RNA 中所存在的某些碱基顺序。Ono 等^[17]用同样方法也证明正常肝与肝癌 AH-130 细胞的核 RNA 顺序之间有一定差异。Grady 等^[18]用单一顺序 DNA 探针与过量 RNA 饱和杂交,发现正常小鼠及多瘤病毒转化的 AL/N 细胞的核 RNA 和 Polysomal RNA 在顺序复杂性上有很大差别。张玉砚等^[19]用核酸分子杂交技术观察到二乙基亚硝胺诱发的大鼠肝癌细胞中,能与正常大鼠肝细胞核 DNA 重复顺序互补的细胞核 RNA 比正常大鼠肝细胞核 RNA 少,而能与正常大鼠肝细胞核 DNA 单一顺序互补的细胞核 RNA 比正常大鼠肝细胞核 RNA 有所增加。此外还观察到^[20]与 rRNA 基因扩增或基因调控变化有关的大鼠肝癌核 RNA 中 rRNA 碱基顺序比正常大鼠肝核 RNA 中 rRNA 碱基顺序增加。观察结果似能间接说明,大鼠肝细胞癌变中核 RNA 顺序的缺失可能发生在 HnRNA 分子上。Capetaneki 等^[21]利用 cDNA·RNA 杂动力学分析揭示,根据 Poly(A⁺)nRNA 复杂性的测定,Novikoff 肝癌细胞单倍体基因组获得表达的比率(4%)比正常肝的(5%)要低。正常肝与 Novikoff 肝癌两种类型细胞中所共有的某些顺序在分布频率上也有差别。Novikoff 肝癌 Poly(A⁺)nRNA 与转录自正常肝 Poly(A⁺)nRNA 的 cDNA 之间的异源杂交表明,某些正常肝的顺序在 Novikoff 肝癌细胞中确有丢失。

分子杂交技术已证实,真核细胞分化时发生 RNA 转录及加工模式的改变,因而可以推测细胞从正常到肿瘤表型的转变时也伴随基因表达的改变,上述 HnRNA 及核 RNA 顺序的变化可能是这种改变的反映。

(2) 认为转录模板活性没有改变而是转录后核 RNA 向胞质内的传递有了改变或 RNA 在胞质内的稳定性有了改变。Moyzis

等^[22]利用 Melli 等的过量 DNA·RNA 杂交法及 Grady 等所用方法证明正常的和苯并芘转化的中国仓鼠胚胎培养细胞间的 Poly(A⁺)nRNA 和 Poly(A⁺)mRNA 在顺序的量和复杂性上均无显著差异。我们^[23]用 Melli 等的方法也只看到大鼠正常肝及肝癌细胞的 Poly(A⁺)nRNA 顺序间有很小差异。这些结果似表明化学致癌剂引起细胞癌变出现表型变化时只伴随基因表达模式的很少改变。Moyzis 等^[22]还指出, 转录自重复顺序的标记 Poly(A⁺)nRNA 部分仅 11.5% 而 Poly(A⁺)mRNA 部分却达 22%, 大概 Poly(A⁺)nRNA 加工成 Poly(A⁺)mRNA 时有某些重复顺序发生选择性丢失或此两种 RNA 群体间可能存在部分非同源性。此种丢失或非同源性在正常的和转化的中国仓鼠胚胎培养细胞间又有相同程度的表现, 表明细胞癌变时重复和单拷贝转录体相对量的变化并未引起 RNA 顺序总量的改变。Jacobs 等^[24]用大鼠肝总的和按丰度分级分离的 Polysomal RNA-cDNA 探针与大鼠正常肝和 HTC 肝癌细胞的 Poly(A⁺)nRNA 进行同源和异源杂交, 发现正常肝 nRNA 中含有的高丰度的信使顺序在 HTC 肝癌细胞 RNA 及其 nRNA 中有缺失, 可能是转录后选择性加工的专一性有了改变。Jacobs 等并未发现 HTC 肝癌细胞中有新顺序的表达。Reiners 等^[25]也提出, Novikoff 肝癌细胞中复杂性低丰度高的肝 RNA 群体的缺失直接与转录后调控机制有关。信使顺序的核稳态水平是核内各种事件综合影响的结果。核和胞质间发生的信使顺序丰度分布频率的调控对决定细胞表型有重要作用。Wilkes 等^[26]也认为, 大鼠再生肝 Poly(A⁺)nRNA 中含有正常肝的全部顺序, 而正常肝 Poly(A⁺)nRNA 中却缺少再生肝的某些顺序, 既可解释为肝再生时比正常肝有更多的基因获得转录, 也可解释为大鼠肝再生时顺序的多聚腺苷化作用可能有了改变, 某些在正常肝中未多聚腺苷化的核 RNA 顺序在肝再生时被多聚腺苷化了。Balmain 等^[27]研究 Pre-

mRNA 顺序在 Friend 细胞 Poly(A⁺)nRNA 中的分布频率时也确认, 多聚腺苷化作用不仅是 RNA 顺序运转的一个信号, 而且在向胞质传递的定量选择中起一定作用。Wilkes 及 Balmain 等的观点对于癌变细胞核 RNA 顺序的变化也是适用的。

以上两种观点至今尚处于争论之中。

参 考 文 献

- [1] M. E. Bramwell., 1976, in "Subnuclear Components Preparations and Fractionation", ed. by G. D. Birnie, pp. 267.
- [2] D. S. Holmes., 1973, *J. Bonner, Biochemistry*, 12, 2330.
- [3] N. V. Fedoroff, T. R. Wall., 1976, in "Icv-UsLa Symposia on Molecular and Cellular Biology, Molecular Mechanism in the Control of Gene Expression", Vol. 5, pp. 379.
- [4] K. C. Kleene, T. Humphreys., 1977, *Cell*, 12, 142.
- [5] R. P. Perry, E. Bard, B. D. Hames, D. E. Kelley., 1975, in "Federation of European Biochemical Societies, 9th Meeting", Vol. 33, pp. 18-63.
- [6] A. Alonso, H. Winter, L. Krieg, in "International Cell Biology, 1980-1981", papers presented at the 2nd international Congress on Cell Biology, Berlin ed. by E. H. Schweiger, pp. 50.
- [7] V. M. Kish, T. Pederson., 1978, in "Methods in Cell Biology", Vol. 27, pp. 387.
- [8] A. C. Pogo., 1981, in "The Cell Nucleus" ed. by H. Busch, Vol. 3, Part A, pp. 331-364.
- [9] B. H. Long, C. Y. Huang, A. O. Pogo., 1980, *Cell*, 18, 1079.
- [10] J. H. Frenster., 1976, *Cancer Res.*, 36, 3394.
- [11] K. Scherer, L. Marcaud., 1968, *J. Cell Physiol.*, 72, Suppl. 1, 181.
- [12] E. Dickson, H. D. Robertson, 1976, *Cancer Res.*, 36, 3387.
- [13] E. H. Davidson, R. J. Britten., 1979, *Science*, 204, 1052.
- [14] V. S. Shapot., 1980, *Biochemical Aspects of Tumor Growth*, translated by D. A. Myshino, 1st edition, pp. 266.
- [15] N. M. Emannel., 1982, *Kinetics of Ex-*

perimental Tumor Processes, Pergamon Press.

- [16] C. T. Garratt, F. Gonzaler, M. Caine, D. Wiener., 1977, *Proc. Nat. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 18, 61.
- [17] T. Ono, M. Kawamura, M. Hyodo, K. Wakabayashi., 1971, *Gann*, 62, 31-40.
- [18] L. J. Grady, W.P. Campbell., 1975, *Nature* (London), *New Biology*, 254, 356.
- [19] 张玉砚, 徐永华, 徐亚男, 彭素芬, 1982, 实验生物学报, 15(2), 137.
- [20] 徐亚男, 张玉生, 张玉砚, 1980, 实验生物学报, 13(4), 371.
- [21] Y. G. Capetanaki, A. Alomso., 1980,

Nucleic Acids Res., 8(14), 3193.

- [22] R. K. Moyzis, D. L. Grady, D. W. L. Li, S. E. Mirris, P. O. P. Ts'o., 1980, *Biochemistry*, 19, 821.
- [23] 孙 谨、张玉砚, 最近工作, 待发表。
- [24] H. Jacobs, G. D. Birnie., 1980, *Nucleic Acids Res.*, 8(14), 3087.
- [25] J. I. Reiners, H. Busch, 1980, *Biochemistry*, 19, 833.
- [26] P. R. Wilkes, G. D. Birnie., 1981, *Nucleic Acids Res.*, 9(8), 2021.
- [27] A. Balmain, A. J. Minty, G. D. Birnie., 1980, *Nucleic Acids Res.*, 8(7), 1643.

上接第 22 页

- [4] Brutlag, D. et al., 1977, *Cell*, 10:509-519.
- [5] Hofstetter, H. et al., 1976, *Biochim. Biophys. Acta.*, 454:587-591.
- [6] Goff, S. P. and P. Berg, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1763-1767.
- [7] Yoneda, M. and F. J. Bollum, 1965, *J. Biol. Chem.*, 240:3385-3391.
- [8] Setlow, P., 1974, *Methods in Enzymology*, 29. Part E:4.
- [9] 细胞生物学研究所, 三室, 上海市生物化学学会, 1978 年年会论文摘要: 96.
- [10] Birnboim, H. C. and J. Doly., 1979, *Nucleic Acids Res.*, 7:1513-1523.
- [11] Colman, A. et al., 1978, *Eur. J. Biochem.*, 91:303-310.
- [12] Layne, E., 1957, *Methods in Enzymo-*

logy, 3:451-454.

- [13] Chang, L. M. S. and F. J. Bollum, 1971, *J. Biol. Chem.*, 246:909-916.
- [14] Johnson, D. and A. R. Morgan, 1976, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 72:840-849.
- [15] Okamura, S. et al, 1978, *J. Biol. Chem.*, 253:3765-3757.
- [16] Bickle, T. A. et al., 1977, *Nucleic Acids Res.*, 4:2561-2572.
- [17] Baksi, K. et al., 1978, *Biochemistry*, 17: 4136-4139.
- [18] Lindell, T. D. et al., 1979, *Biochim. Biophys. Acta.* 562:231-239.
- [19] Deibel, M. R. and M.S. Coleman., 1979, *J. Biol. Chem.*, 254:8634-8640.