

细胞共育 5天,通过<sup>3</sup>H标记靶细胞检测 CTL 活性。结果显示,用 B7 CD48 Ag104A免疫的小鼠抵抗野生型肿瘤的攻击,而 CD48 Ag104A免疫的小鼠无保护免疫性, B7 CD48 Ag104A具有 CTL杀伤活性,对 NK敏感的 YAC-1细胞系有杀伤作用,尽管杀伤水平较低。另一组实验,用照射的 Ag104A细胞在体外不断刺激正常脾细胞,一种代表 CTL系, YLI和克隆 c18,对野生型 Ag104A具有高的杀伤活性,但没有溶解其它靶细胞的能力,包括同基因的肿瘤系 Ag104B UV4102Pro和 UV6132APro等。从而说明,用 B7 CD48 Ag104A免疫小鼠能够产生对 Ag104特异的 CD8、MHC I 限制的 CTL。

将照射(30Gy)和未照射的 B7-K1735肿瘤片段植入皮下,33天后再用 V-K1735肿瘤片段植入皮下,发现辐射消除了 B7-K1735诱导其后攻击的保护能力<sup>[23]</sup>。用受照射(100Gy, 12.8Gy/min)的 32Dp210/clone26或 32Dp210/B7-1/clone2细胞株(10<sup>6</sup>细胞/只)通过静脉注射免疫 C3H/HeJ小鼠,以2周为间隔,末次免疫后2周用10<sup>6</sup>个32Dp210/clone26细胞再通过静脉注射攻击,未显示出对后来攻击的保护性反应。小鼠被以更大量细胞,即10<sup>7</sup>个照射的32DcB-32Dp210/clone26或32Dp210/B7-1/clone2细胞株皮下注射,末次免疫后2周再攻击仍无保护性免疫。这可能是照射的细胞通过缩短细胞在体内寿命,损伤抗原呈递减少抗原产生,改变宿主状态或其他机制,而消除 B7

表达细胞免疫的潜能<sup>[22]</sup>。

Chen等研究证实,应用同一细胞量,照射的肿瘤片段比新鲜切除的肿瘤片段作用要小。因此,指出照射的细胞不能作为有用的免疫治疗剂。在体内,照射过的肿瘤片段可以很快死亡,并被排出,不能诱导长期的有力的免疫应答。然而,辐射可以改变个别肿瘤的抗原性,以致相关抗原丢失<sup>[7]</sup>。

#### 参考文献

- 1 Li YW et al. J Exp Med, 1996; 183: 639
- 2 Bashian GG et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997; 17: 235
- 3 Tacke M. J Immunol, 1995; 154: 5121
- 4 Bluestone JA et al. J Immunol, 1997; 185: 1989
- 5 Chen LP. Chin J Cancer Biother, 1996; 3: 86
- 6 Melero I et al. Life Sci, 1997; 60: 2035
- 7 Chen LP et al. Cell, 1992; 71: 1093
- 8 Qin L et al. J Exp Med, 1994; 179: 341
- 9 Harding FA et al. J Exp Med, 1993; 177: 1791
- 10 Marti WR et al. Cell Immunol, 1997; 179: 146
- 11 Chen LP et al. Leukemia, 1997; 11: 567
- 12 Pericle F et al. J Leukoc Biol, 1997; 61: 201
- 13 Tatsumi T et al. Hepatology, 1997; 25: 1108
- 14 Hunter CA et al. J Immunol, 1997; 158: 2285
- 15 Komata T et al. Immunother, 1997; 20: 256
- 16 June CH et al. Immunol Today, 1994; 15: 321
- 17 Li YW et al. J Immunol, 1994; 153: 421
- 18 Chen LP et al. Cancer Res, 1994; 54: 5420
- 19 Chen LP et al. J Exp Med, 1994; 179: 523
- 20 Townsend SE et al. Science, 1993; 259: 368
- 21 Hayakama M et al. Int J Cancer, 1997; 71: 1091
- 22 Ursula A et al. Blood, 1995; 85: 2507
- 23 Sarch E et al. Cancer Res, 1994; 54: 6477

(收稿日期: 1998-08-15)

## 端粒与染色体不稳定性

上海医科大学放射医学研究所(上海, 200032) 朱涵能综述 程文英审校

**摘要:**端粒(telomere)存在于染色体两端,由端粒 DNA 和端粒蛋白质组成,端粒部分富含鸟嘌呤,是高度保守的串联重复排列的核苷酸序列。端粒不仅与端粒酶、肿瘤和细胞衰老过程密切相关,而且在染色体不稳定性过程研究中占重要地位。

关键词: 端粒 染色体不稳定性

端粒在细胞正常生理功能运转过程中起重要作用,涉及到染色体末端复制、端粒酶作用机理、肿瘤及衰老等多方面问题,端粒的缺失将造成多种病理状况,直接影响到细胞的生存,随着人们对端粒酶研究的日益重视,端粒与染色体不稳定性的关系及机理的探索已引起普遍关注。这为进一步研究肿瘤发生、衰老及细胞毒性作用机理提供理论基础。

## 1 端粒的结构和功能

端粒 (telomere)是真核细胞染色体末端的 DNA 序列,其主要功能是保持染色体的稳定,早在 30 年代,爱丁堡大学 Muller 就注意到染色体在其末端带有一种具有稳定性作用的特殊成份, Muller 从西腊文的“末端” (telos)和“部分” (meros)创造了端粒 (telomere)这个学术术语。另一遗传学家 McClintock 观察到,如果没有端粒,染色体之间就会相互粘连,结构发生变化,并可能以其它方式表现出错误的行为,如融合、重排和易位,形成双着丝粒染色体等,而这些错误能够严重地威胁染色体的生存和复制,可致使容纳染色体的细胞死亡和错误复制<sup>[1]</sup>。

端粒由端粒 DNA 和端粒蛋白质组成,其端粒 DNA 是富含鸟嘌呤 (G)的高度保守的重复核苷酸序列,不同物种的端粒 DNA 序列并不一致。1978 年, Blackburn 首次发现一种具有纤毛的单细胞池塘生物四膜虫的端粒中含有一种极短的多次重复的简单核苷酸序列 (TTGGG)<sub>n</sub>,之后的文献报道了人和小鼠的端粒以 TTAGGG 重复序列为特征。不同有机体之间端粒中重复亚单位数目不同,甚至在同一有机体的不同细胞之间也不同,人和其它哺乳类动物的端粒 DNA 序列由 5' → 3' 方向的 (TTAGGG)<sub>n</sub> 反复串联组成,在人类 10~ 15kb,为非结构基因,不具备编码蛋白质的功能。由于染色体端粒部分富含鸟

嘌呤,端粒部分往往在链内和链间形成非 Watson-Crick 的 G-C 碱基配对,并且形成鸟嘌呤四联体,中间配位结合一个一价的金属离子。端粒 DNA 的 3' 端较 5' 端伸出 12~ 16bp,向内弯曲呈帽状,保护染色体,防止其断裂、重组或降解,尤其是一些外切酶、连接酶、DNA 损伤检查点等因素的作用,还参与染色体在核内的定位及基因表达的调整<sup>[2]</sup>。

端粒被认为是细胞有丝分裂的“生物钟”,由于存在着“末端复制问题”,端粒的长度,随着细胞的每一次分裂而进行性缩短。在初期阶段,正常细胞保持有较长的端粒,但随细胞分裂数的增加而缩短。从细胞培养实验中观察到,细胞每分裂一次,丢失 50~ 200 个端粒核苷酸序列,至死亡前约丢失 4000 个核苷酸,新生儿的细胞在体外培养中可分裂 70~ 90 次,而 70 岁老人的细胞则只能分裂 20~ 30 次<sup>[3]</sup>。当端粒缩短到某一关键长度时,受 RB p53 基因调控,细胞分裂停止,部分细胞发生凋亡,细胞进入第一个危机期 (M1),此时当抑癌基因发生突变,癌基因活化或 SV40 HPV 转染,可使少量细胞脱离 M1 期继续分裂,端粒 DNA 的进一步丢失,使细胞进入第二危机期 (M2),少数细胞激活端粒酶活性,形成永生化细胞或癌细胞,其余则死亡<sup>[4]</sup>。此时的癌细胞及端粒酶阳性永生生化细胞的端粒均较短,相反,端粒酶阴性永生生化细胞和端粒酶阴性的正常细胞如精子及卵细胞却有非常长的端粒,这说明除了端粒酶活化因素外,细胞还可利用重组等其它机理来维持端粒长度<sup>[5~ 7]</sup>。

## 2 影响端粒形成和延长的因素

Est1 蛋白推测为酵母端粒酶的组成成份之一,能够特异性地与酵母 RNA TLC1 共同沉淀,由此形成的免疫沉淀物有类似端粒酶的活性,当 Est1 基因发生突变时,可影响

端粒长度的变化,其功能在于 Est1基因的丢失导致端粒酶 RNA模板的丢失,而 Est1可作为端粒末端结合蛋白,成为端粒酶作用的识别位点与酵母鸟嘌呤丰富的端粒寡核苷酸区结合,从而调控端粒重复序列的合成<sup>[8]</sup>。

影响端粒合成的因素有多种,其中端粒酶是重要的因素之一,根据端粒酶端粒假说,在复制前,端粒酶首先要在3'末端添加4~6个核苷酸的单链,才能保证子链和母链保持同一长度,此过程需要螺旋酶或核酸酶的存在,否则,端粒酶对染色体的钝头寡核苷酸的延长无活性<sup>[9]</sup>,其它如端粒结合蛋白、多聚酶、DNA复制因子等都能通过激活端粒酶来影响端粒的延长。但也有人认为端粒长度与端粒酶活性并不一致,端粒长度由细胞分裂次数和端粒酶活性之间的平衡来决定<sup>[10]</sup>。

有实验表明,虽然端粒酶在大多数肿瘤细胞及永生化细胞内呈阳性,然而其活性的强弱与肿瘤的临床病理特征之间无显著相关性<sup>[11]</sup>。Rogalla在检测了端粒长度与乳腺癌病人的年龄、肿瘤大小、淋巴结情况和类固醇受体情况等因素相关性后发现,端粒长度与肿瘤致癌过程的不同阶段无关<sup>[12]</sup>。

CDC13蛋白为端粒DNA连接蛋白,具有双重功能,一方面所在端粒部位起到延长和保护作用,另一方面又可主动或被动地调节端粒酶在染色体末端的作用,从而控制端粒的长度<sup>[13]</sup>。

人端粒蛋白TRF含有一个Myb类的DNA连接重复序列,和一个氨基末端酶活性功能区,免疫荧光标记反应表明TRF可特异性地与端粒DNA存在于人分裂间期和中期的细胞染色体末端形成特殊的核蛋白复合物,实验发现,染色体末端结合保护性端粒蛋白,如TRF的失活,可提高由端粒磨损所形成的不良结果的危险性<sup>[14]</sup>。

人端粒重复序列结合因子TRF1在端粒酶阳性肿瘤中的过度表达,可导致端粒的逐渐缩短,作为端粒延长的抑制因子,以负反馈

机理稳定端粒的长度,控制其变化<sup>[15]</sup>。

### 3 端粒与染色体不稳定性

染色体不稳定性的延迟是指子代细胞表现出的非稳定性畸变及父代细胞所没有的稳定性畸变,由于染色体不稳定性传递,受外界因素影响的细胞后代可出现多种畸变,体内和体外均可出现。

染色体端粒中的重复序列对外界影响因素诱生的不稳定性异常敏感,常常在这些重复序列中优先发生断裂,端粒的丢失导致染色体不稳定性频率的增加,由此介入染色体不稳定性延迟表达的过程中<sup>[16]</sup>。

虽然端粒所具有的是无转录活性,且非编码DNA序列,然而端粒所处的位置表明其对染色体稳定性具有重要的调节作用<sup>[17]</sup>。一定长度的端粒是保持染色体稳定性的必需,当细胞处于传代早期时,端粒较长,染色体稳定性较好。Filatov对体外成纤维细胞实验表明,细胞在培养前期具有正常的染色体组型,当端粒长度随着细胞的多次分裂、衰老而逐渐缩短,此时染色体畸变率上升,端粒连接、易位和双着丝粒形成显著性增加,认为端粒磨损、G<sub>2</sub>周期检查点功能失活以及染色体数目和结构的变化是造成染色体不稳定性的综合因素<sup>[18]</sup>。有人通过放射线照射体外培养细胞证实了染色体不稳定性与端粒缩短密切相关<sup>[19]</sup>。

大量文献表明,染色体稳定性的丧失是体外细胞的转导、永生化和肿瘤恶变的重要标志,双着丝粒、易位和端粒连接等染色体畸变随着衰老和肿瘤发生、发展而频率上升,值得注意的是,肿瘤细胞和衰老细胞都具有较短的端粒。由于短端粒所引起的多种畸变是造成染色体不稳定性的重要原因之一<sup>[20]</sup>。

Bauffer实验发现,染色体上的易碎点与端粒重复序列相关,染色体上的放射敏感点存在于端粒部位,由于外界影响因素的作用使端粒物理性缩短,同样可造成多种畸变,使染

染色体稳定性减弱<sup>[21]</sup>。

染色体端粒丢失后的修复是重新建立稳定性的重要途径,主要有以下几个方面:(1)利用端粒酶活性来合成端粒,有文献报道,100%的肺癌细胞存在端粒酶,同时含有大量的环状染色体和双着丝粒体,端粒酶活性可维持细胞生存<sup>[22]</sup>; (2)通过与周期染色体重组,从而获得缺失的 DNA 部分和端粒; (3)端粒缺失染色体在细胞第一次分裂前,或若干次分裂后丢失,产生非整倍体细胞<sup>[23]</sup>。

#### 4 展望

端粒作为染色体重要组成部分,是维持染色体稳定性的重要环节。端粒与衰老、肿瘤和染色体畸变关系方面仍存在许多值得研究的地方,如端粒的长度检测可确定生理年龄及判定肿瘤细胞,而端粒和端粒酶的相互作用机理仍需进一步阐明;端粒是否可作为电离辐射损伤的计量指标;辐射敏感性与端粒的相关性研究等。围绕着端粒与染色体不稳定性研究的进一步研究将有助于上述问题的解决。

#### 参 考 文 献

1 Blackburn EH et al. *Sci Am*, 1996; 74(37): 92-99

- 2 Nurgent CI et al. *Science*, 1996; 274(5285): 249
- 3 Blackburn EH et al. *Nature*, 1991; 350: 569-516
- 4 Vaziri H. *Am J Hum Genet*, 1993; 52: 661
- 5 Sharma W et al. *Anticancer Res*, 1996; 16: 511-516
- 6 Bryan TM et al. *EMBO J*, 1995; 14: 4240-4248
- 7 Biessmann H et al. *Chromosoma*, 1997; 106: 63-69
- 8 Steiner BR et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93(7): 2817
- 9 Lingner J et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93(20): 10712
- 10 Kim NW et al. *Science*, 1990; 266: 2011-2014
- 11 Ohta K et al. *Kobe J Med Sci*, 1996; 42(37): 70
- 12 Rogalla et al. *Cancer Lett*, 1996; 106(2): 155
- 13 Collins K et al. *Genes Dev*, 1998; 12: 721-733
- 14 Chong L et al. *Science*, 1995; 270: 1663-1667
- 15 Steensel BV et al. *Nature*, 1997; 385: 740-743
- 16 Musio A et al. *Cytogenet Cell Genet*, 1996; 75: 159-163
- 17 Kruk PA et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92: 258-262
- 18 Filatov L et al. *Oncogene*, 1998; 16: 1825-1838
- 19 Sabatier L et al. *Int J Radiat Biol*, 1994; 66(5): 611-613
- 20 Mondello C R et al. *Exp Cell Res*, 1997; 236: 385-396
- 21 Bouffler S et al. *Genes Chromosomes Cancer*, 1993; 6: 98-106
- 22 Bryan TM, *Exp Cell Res*, 1998; 239: 370-378
- 23 Zakiam V A. *Trends Cell Biol*, 1996; 6: 29

(收稿日期: 1998-09-04)

## 基因表达系列分析及其应用

北京放射医学研究所(北京, 100850) 葛世丽综述 吴德昌审校

**摘 要:** 基因表达系列分析(SAGE)使同时、定量分析诸多转录本成为可能,从而可进行有机体正常、发育、疾病状态基因表达的定量比较。本文就该方法的原理、步骤及应用加以综述。

**关键词:** 基因表达系列分析 基因表达谱 cDNA 标签

随着人类基因组计划的即将完成,科学家已经获得有关人类、线虫、微生物和植物基因组 DNA 序列的大量数据<sup>[1-2]</sup>。因此,应用先进的技术进行基因表达及功能的研究,及

时有序地获取 mRNA 水平、蛋白质水平的表达信息,已成为新的挑战<sup>[4-8]</sup>。以肿瘤相关基因为例,有癌基因、抑癌基因、DNA 修复基因、与肿瘤细胞的侵袭及转移相关的基因、II