

主编 房静远

表型遗传修饰

与肿瘤

BIAOXING YICHUAN
XIUSHI
YU
ZHONGLIU

上海科学技术出版社

231

表型遗传修饰与肿瘤

主编 房静远

上海科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

表型遗传修饰与肿瘤 / 房静远主编. — 上海: 上海科学技术出版社, 2003.4
ISBN 7-5323-6839-4

I. 表... II. 房... III. 发育遗传学 IV. Q344

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第009381号

上海科学技术出版社出版发行

(上海瑞金二路 450 号 邮政编码 200020)

常熟市兴达印刷有限公司印刷 新华书店上海发行所经销

2003 年 4 月第 1 版 2003 年 4 月第 1 次印刷

开本 787×1092 1/16 印张 15 字数 276 000

印数 1—2 500 定价: 48.00 元

本书如有缺页、错装或损坏等严重质量问题,
请向本社出版科联系调换

内 容 简 介

在基因表达的调控中,表型遗传修饰(epigenesis,又译为表观遗传修饰、遗传外修饰或后生修饰)占主导地位。染色体由 DNA 和组蛋白包裹而成。表型遗传修饰学说的主要内容是下调转录的 DNA 甲基化,而与之密切相关的增强基因表达的组蛋白乙酰化也常常被一并述及。许多疾病,如某些遗传病、病毒感染和肿瘤受表型遗传改变的影响。各种肿瘤的发生过程中有癌基因的低甲基化和抑癌基因的高甲基化,也同时存在着乙酰化的紊乱。通过干预上述表型遗传修饰的异常,可影响肿瘤的进程。

本书是国内第一部有关表型遗传修饰学说的专著,参阅了近几年国外的研究文献,较系统地阐述了表型遗传修饰的相关概念、肿瘤发生中的表型遗传修饰变化、影响这些改变的诸多因素等。对于进一步丰富表型遗传修饰学说的内容和深入研究其在肿瘤等疾病发生和发展中的影响,具有一定的理论意义和临床指导价值。该书适于遗传学、分子生物学和肿瘤学专业的研究生、实验室工作人员和临床工作者参考应用。

作者介绍

房静远,男,1961年12月出生。1996年获上海第二医科大学博士学位,导师为江绍基院士和萧树东教授。现为上海第二医科大学附属仁济医院消化科主任医师、教授、硕士研究生导师,上海市消化疾病研究所副所长、美国肿瘤学会会员、美国DNA甲基化学会会员等。自1993年起从事DNA甲基化的研究,1998年起留美近3年,在美国国家卫生研究院(NIH)研究甲基化和组蛋白乙酰化的博士后研究。参加过2001年美国DNA甲基化研习班,并在2001年美国基因治疗年会上进行论文交流。几年来,申请或主要参加了有关DNA甲基化的3项国家自然科学基金和1项卫生部科研课题,获得卫生部科技进步三等奖2项,上海市科技进步三等奖2项。在此研究领域,以第一作者在美国、澳大利亚和日本及中华医学英文版发表英文论著6篇和综述2篇,在中华级等杂志发表中文论著20余篇。2002年上海市教委授予“曙光学者”称号。论文曾获首届全国优秀博士毕业论文奖、第三届上海国际消化疾病会议优秀论文一等奖和1997年上海市消化年会优秀论文一等奖等。

作者名单(按编写章节次序):

房静远 陈紫昶 楊 丽
陆 娟 陆 嵘 程中华

序

肿瘤发生原因和诱因复杂,其诊治尤为困难。DNA 甲基化和组蛋白乙酰化与肿瘤的关系是近几年研究热点之一。本书主编房静远博士从事此项工作已 9 年,并在美国 NIH 等地做过博士后研究近 3 年,积累了较丰富的理论知识,并撰写和发表了 30 篇有关该领域研究的中英文论著和综述。他组织了正在进行表型遗传修饰与消化道肿瘤关系研究的 5 位年轻博士和硕士,查阅和翻译了大量的较新的资料,编写这本国内外第一本有关表型遗传学说与肿瘤的专著。内容十分新颖,立题起点高。该书较系统地阐述了表型遗传修饰的相关概念、肿瘤发生发展过程中甲基化和乙酰化的变化,以及目前刚刚起步的分子治疗情况。全书立题新颖、结构布局合理、文字流畅、解释翔实、说理透彻及结论可信。学术水平较高。目前国内尚无表型遗传修饰学说的专著,更缺乏系统阐述其与肿瘤的关系的著作,故此书的顺利出版必将为我国分子肿瘤学和遗传学的发展带来积极作用,并具有较高的理论价值与临床意义。

鉴于编者都具有较好的写作能力和较强的事业心,相信他们奉献给广大读者的我国首部有关表型遗传学说的专著,会增加有关专业人员遗传学、分子生物学和肿瘤学知识,对于进一步丰富该学说的内容和明了肿瘤发生的分子机制,以及将来可能的基因等分子治疗应用于临床,都具有重要的理论意义和一定的实用价值。该书是一部学术水平较高的专业著作,本人有幸先读为快和为之作序,并推荐给广大读者。

萧 树 东

中华消化学会主任委员
卫生部内科消化重点实验室主任
上海市抗癌协会副理事长
上海市消化疾病研究所名誉所长
上海第二医科大学终身教授

前 言

前

言

当今世界,肿瘤的发病率和病死率居高不下,缘于肿瘤的病因、发生机制不甚明了及早期诊断与综合治疗的困难。然癌基因的活化和抑癌基因的失活是其重要因素之一。基因调控的表型遗传学说认为,基因片段尤其是启动子区的甲基化使基因转录受抑;而基因相关的组蛋白乙酰化则上调基因表达。表型遗传修饰的异常,包括癌基因的低甲基化或(和)抑癌基因的高甲基化、基因相关组蛋白的乙酰化异常,存在于癌发生的过程中,并与某些病理情况和预后有关,且对此的分析有助于肿瘤的早期诊断。同时纠正表型遗传修饰的异常有望控制相关基因的表达和影响肿瘤的进程。国外发达国家,尤其是欧美一些著名学者已经在这方面做过有益的尝试。迄今为止,虽然国外有关表型遗传学说和疾病关系的相关论著甚多,但专著尚不足十本。较新的如 1996 年著名的 Cold Spring Harbor Laboratory 出版的 *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*,详述了 DNA 甲基化与植物基因表达及动物发育和遗传病的关系,而很少涉及组蛋白乙酰化问题。而国内尚无类似专著,更无法比较。我国人口众多,肿瘤的死亡率仍占第一位。但有关表型遗传修饰与肿瘤的关系方面的研究甚少,知识也欠缺。作者在国内所做的博士课题(获首届全国优秀博士学位论文奖)和在美国国家卫生研究院(NIH)所做的博士后研究中,均涉及到这些内容。无疑,我们欲编著的该书可以增加肿瘤和分子生物学工作者的相关知识,对于进一步深入研究 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化在肿瘤发病中的作用和对通过干预该变化而控制肿瘤等有一定的理论意义,并且将为未来的临床应用提供理论基础和实验依据。基于此,我们参考近几年国外的研究成果,较系统地阐述了相关概念、实验室进展和临床初步研究。内容包括分子生物学、遗传学和肿瘤学知识。本书将以崭新的面貌,呈现给读者一较系统的表型遗传学说理论及其与肿瘤发生和未来的分子治疗的概

况。全书以实验数据和已被证实的理论为根据,并配以部分示意图。所引用的文献将全部列在每章后,深入浅出地叙述,力争说理有力有理,结论可信和可靠。我们相信,此书能弥补国内这方面研究的不足,将有助于更深入地研究肿瘤发生的分子机制和临床诊断及分子治疗手段等。这也是本书的写作意图。

当然,因为这是国内第一部表型遗传修饰学说的专著,大量的名词翻译存在一定困难,在编写过程中难免有遗漏和错误之处,恳请广大读者提出宝贵意见,以利再版时改正。

房静远

目 录

目

录

第一章 DNA 甲基化的相关概念	1
第一节 DNA 甲基化	2
一、原核生物	2
(一)限制-修饰系统	2
(二)错配-修复系统	3
(三)抗噬菌体感染的免疫应答	4
(四)DNA 复制	4
二、真核生物	4
(一)参与基因的表达调控	4
(二)参与真核生物胚胎发育调节	5
(三)基因组印记	6
(四)X 染色体的失活	7
(五)与细胞分化和增生有关	7
(六)DNA 甲基化与肿瘤	8
第二节 DNA 甲基化酶	9
一、DNMT 的作用机制——维持甲基化和从头甲基化	10
二、DNMT 与细胞增生、分化	13
三、DNMT 与肿瘤	14
四、DNMT 与组蛋白乙酰化	14
第三节 DNA 去甲基化酶	16
第四节 DNA 甲基化结合蛋白	17
一、MeCP2——第一个典型的 DNA 结合蛋白	18
二、DNA 甲基化结合蛋白家族	20
三、MBDs 和甲基化 DNA 的结合	22
四、MBDs 抑制转录	24
第五节 叶酸、维生素 B ₁₂ 与 DNA 甲基化	26
一、叶酸	26

1

(一)叶酸的生化及与核酸代谢的关系·····	26
(二)饮食、叶酸与 DNA 甲基化·····	28
二、维生素 B ₁₂ ·····	28
(一)维生素 B ₁₂ 的生化 and 生物学意义·····	28
(二)维生素 B ₁₂ 与 DNA 甲基化·····	30
第六节 5-氮胞苷和 5-氮脱氧胞苷与 DNA 甲基化·····	33
第七节 DNA 甲基化数据库·····	34
第二章 组蛋白乙酰化的相关概念·····	46
第一节 组蛋白·····	47
第二节 组蛋白乙酰化酶及其相关的转录因子·····	48
一、组蛋白乙酰基转移酶·····	48
二、具有 HAT 活性的转录共激活因子·····	49
(一)GNAT 超家族·····	50
(二)MYST 家族·····	52
(三)p300/CBP·····	54
(四)核受体共激活因子·····	55
(五)TAF _{II} 250·····	55
(六)TF _{II} C·····	57
(七)其他具有 HAT 活性的转录共激活因子·····	57
三、核小体乙酰化复合体·····	57
(一)酵母 HAT 复合体·····	57
(二)人类 HAT 复合体·····	59
四、因子乙酰基转移酶(factor acetyltransferase, FAT)的底物·····	60
(一)非组蛋白染色质蛋白质·····	60
(二)转录激活因子·····	61
(三)核受体共激活因子 ACTR, SRC-1 和 TIF2·····	63
(四)通用转录因子 TF _{II} E 和 TF _{II} F·····	63
(五)自我乙酰化和转录不相关底物·····	64
第三节 组蛋白脱乙酰化酶·····	64
一、HDAC 的发现·····	64
二、HDAC 及 HDAC 复合体·····	65
(一)Sin3-HDAC 复合体·····	65
(二)NuRD 复合体·····	66
(三)c-Ski, Smad, NCoR 和 HDAC·····	67

(四)p53, Ikaros 和 REST	68	
(五)其他 HDAC	69	
三、问题与展望	69	
第四节 HDAC 抑制剂	71	
一、TSA	72	
二、TPX	72	
三、丁酸盐	73	目
四、Apicidin	74	
五、SAHA	74	录
六、MS-27-275	75	
七、Oxamflatin	75	
八、FR901228	76	
九、Depudecin	76	
第三章 表型遗传修饰改变的检测	88	
第一节 DNA 甲基化的分析方法	88	
一、总基因组甲基化的检测	88	
(一) ^3H -SAM 掺入和液闪检测法	88	
(二)高压液相色谱法	89	
二、基因片段的甲基化研究	89	
(一)Southern blotting	89	
(二)甲基化特异性 PCR (MSP)	89	
(三)亚硫酸氢盐修饰和测序 (mapping)	91	
(四)结合亚硫酸氢盐处理和酶解分析 (COBRA)	92	
(五)甲基化的荧光检测 (methylight)	94	
(六)差异甲基化杂交 (DMH)	96	
(七)甲基化敏感的单核苷酸的扩增 (Ms-SnuPE)	100	
(八)酶的区域性甲基化分析 (ERMA)	101	
(九)变性高效液相色谱法 (DHPLC)	105	
第二节 组蛋白乙酰化的研究方法	106	
一、HAT 活性的检测	106	3
(一)HAT 的抽提	106	
(二)标准液相法 (standard liquid assay) 测定 HAT 活性	106	
(三)凝胶法测定 HAT 活性	107	
(四)渗滤结合试验 (filter binding assays) 检测 HAT 活性	107	

二、HDAC 的活性分析·····	108
(一)HDAC 的抽提·····	108
(二)HDAC 活性的体外检测·····	108
三、乙酰化组蛋白的表达——Western blotting·····	111
四、染色质免疫沉淀技术(ChIPs)·····	111
第四章 肿瘤发生中的表型遗传修饰改变·····	116
第一节 总基因组 DNA 甲基化水平降低·····	117
第二节 癌基因及其低甲基化·····	118
一、 <i>ras</i> 癌基因·····	119
(一) <i>ras</i> 基因家族·····	119
(二) <i>Ras</i> 的生物学活性·····	120
(三)与人类肿瘤的关系·····	121
(四)甲基化与肿瘤·····	121
二、 <i>c - myc</i> 癌基因·····	122
(一)癌基因结构·····	122
(二)转录调节作用·····	122
(三)在细胞增殖中的作用·····	123
(四)与细胞凋亡的关系·····	123
(五)与人类肿瘤的关系·····	124
(六)甲基化与肿瘤·····	125
三、 <i>fos</i> 基因·····	126
(一) <i>c - fos</i> 基因的结构·····	126
(二)生物学意义·····	127
(三)与细胞恶性转化的关系·····	127
(四)甲基化与肿瘤·····	128
四、 <i>AFP</i> 基因·····	128
(一)分子生物学特性·····	129
(二)基因的调控·····	129
(三)癌蛋白对 <i>AFP</i> 基因表达的影响·····	130
(四)生物学意义·····	130
(五)临床价值·····	131
(六)甲基化与肿瘤·····	131
五、其他的肿瘤相关基因——环氧化酶基因·····	132
第三节 抑癌基因及其高甲基化·····	132

一、CKIs	133	
(一)影响细胞周期的途径	133	
(二)p16 ^{INK4A}	134	
(三)p14 ^{ARF} 基因	138	
(四)p27 ^{KIP1} 基因	138	
(五)p21 ^{WAF1} 基因	143	
二、p53 基因	145	目
(一)结构与功能	145	
(二)p53 的甲基化与肿瘤的关系	147	
三、错配修复基因	148	录
(一)结构与功能	148	
(二)甲基化紊乱	148	
四、Rb 基因	150	
(一)结构与功能	150	
(二)Rb 基因的高甲基化	151	
(三)Rb 与 DNMT、HDAC 和 E2F 等结合	151	
五、E-钙黏蛋白基因	153	
(一)结构与功能	153	
(二)基因的高甲基化	153	
六、APC 基因	155	
(一)结构与功能	155	
(二)APC 基因的高甲基化	155	
七、CIMP 基因	157	
八、DAPK 基因	158	
九、BRCA1 基因	159	
十、组织金属蛋白酶抑制因子-3	160	
十一、肿瘤高甲基化基因-1	161	
十二、RASSF1 基因	161	
第四节 肿瘤发生中组蛋白乙酰化的异常	163	
一、组蛋白乙酰化对 p21 ^{WAF1} 转录的影响	165	
(一)p53	166	5
(二)p300/CBP	166	
(三)PCAF 和 GCN5	166	
(四)E2A	166	
(五)Sp 结合	167	

(六)信号转导剂和转录激活剂(STAT)	168
二、组蛋白乙酰化对 <i>c-myc</i> 转录调节的影响	168
三、组蛋白乙酰化对角蛋白 18 转录调节的影响	169
第五章 化学物质对表型遗传修饰变化的干预	192
第一节 叶酸与维生素 B ₁₂	192
一、叶酸与维生素 B ₁₂ 的代谢及生理和病理意义	192
二、叶酸和维生素 B ₁₂ 异常与细胞代谢紊乱及 DNA 损伤	193
(一)体外试验	193
(二)体内试验	194
三、叶酸、甲基化与肿瘤	195
四、维持基因稳定性的叶酸和维生素 B ₁₂ 建议摄入量(RDIs)	198
五、环境和基因的因素决定了叶酸和维生素 B ₁₂ 的生物利用度	199
第二节 5-氮胞苷和 5-氮脱氧胞苷	199
一、作用机制	200
二、低甲基化制剂的应用	201
(一)胎儿血红蛋白的诱导	201
(二)实体肿瘤	201
(三)急性白血病	203
(四)骨髓增生异常综合征(MDS)	204
(五)慢性骨髓性白血病	205
第三节 丁酸盐	206
一、体内作用	207
二、体外试验	208
三、丁酸盐作用的机制	208
第六章 干预 DNA 甲基化的基因治疗现状与前景	217
第一节 DNA 甲基化的可逆性	217
第二节 基因治疗的目标靶	218
一、MBD	218
二、DNMT	218
第三节 DNMT ₁ 抑制剂的作用	219

DNA 甲基化的相关概念

表型遗传修饰学说(epigenesis)又译为后成论或遗传外修饰学说。认为个体的发育是在个体器官和各个部分发育过程中逐渐形成的,而不是预先存在于受精卵中。此与错误的先成说相反。表型遗传(渐成)改变(epigenetic changes)是对表型有影响但不改变基因型的变化。本书讨论的重点——表型遗传修饰是基因表达调控的重要形式,因组蛋白乙酰化与其关系密切(图1-1),故两者一并讨论。磷酸胞苷酰(CpG)甲基化是最常见的哺乳细胞表型遗传修饰方式^[1]。

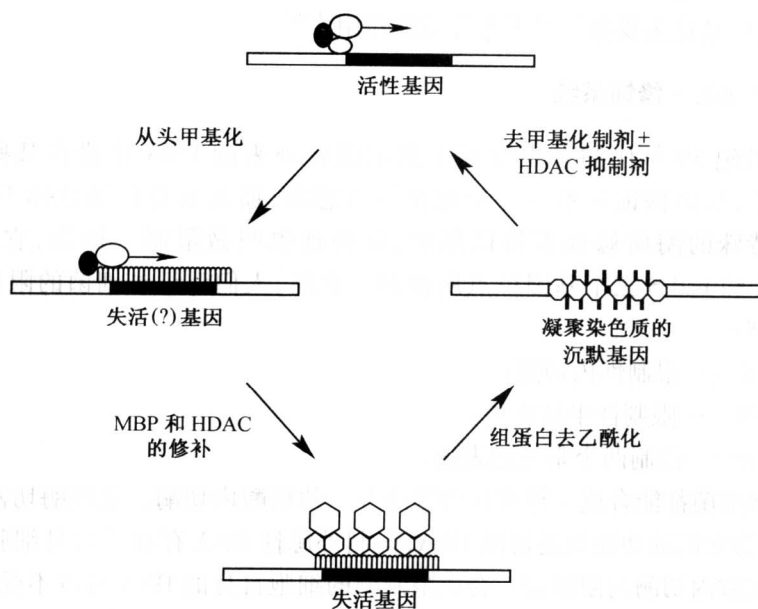


图1-1 甲基化、乙酰化与基因活化

第一节 DNA 甲基化

DNA 甲基化是 DNA 的一种天然修饰方式,广泛存在于细菌、植物和哺乳动物,具有不同的重要生物学意义。DNA 甲基化是由 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)催化的^[2]。根据催化反应的类型可以把 DNA 甲基化转移酶分成三类:第一类能够作用于 - GATC - 序列中的腺嘌呤,称为 dam 甲基化酶,这种甲基化修饰是原核生物中出现频率最高的。第二类能够作用于 - CCGG - 序列中内部的胞嘧啶,称 dcm 甲基化酶,在 *E. coli* k-12 中已经发现 - CCGG - DNA 序列的出现频率与 5 - 甲基胞嘧啶出现的频率成正相关。第三类能将胞嘧啶转化为 C⁵ - 甲基胞嘧啶,这是出现频率最低的甲基化修饰。这三种类型的 DNA 甲基化转移酶在原核生物中都能见到,但是在真核生物中只有第三种类型的甲基化酶。下面我们分别来讲述 DNA 的甲基化在原核生物和真核生物中所起的不同的重要作用。

一、原核生物

如以上所述,原核生物体内存在着三种类型的 DNMT。在原核生物胞嘧啶和腺嘌呤的甲基化主要参与以下几种重要作用^[3~6]。

(一) 限制 - 修饰系统

20 世纪 50 年代初有人发现了细菌能将外来的 DNA 片段在某些专一位点上切断,从而保证其不为外来噬菌体所感染,而其自身的染色体 DNA 由于被一种特殊的酶所修饰而得以保护,这种现象叫做限制 - 修饰,它们由 hsd R、hsd M 和 hsd S 三个基因位点所控制。此后,人们认识到细菌的限制与修饰分子机制:

hsd R——限制性内切酶;

hsd M——限制性甲基化酶;

hsd S——控制两个系统的表达。

- 2 各种细菌都能合成一种或几种顺序专一的核酸内切酶。这些酶切割 DNA 的双链,因为它们的功能就是切割 DNA,限制外源性 DNA 存在于自身细胞内,所以称这种核酸内切酶为限制酶。合成限制酶的细胞自身的 DNA 可以不受这种酶的作用,因为细胞还合成了一种修饰酶,它改变了限制酶识别的 DNA 顺序的结构,使限制酶不能起作用。细胞的限制 - 修饰系统中的修饰作用是由甲基化酶来完成