

端粒与辐射敏感性

郭月凤

(中国辐射防护研究院 太原 030006)

摘要 本工作回顾了端粒的基本特征并特别强调端粒与有机体辐射敏感性的关系及其在放射生物学中的潜在重要性。研究结果显示,端粒长度的改变、端粒序列所在位点的变异能够影响辐射敏感性。缩短和功能紊乱的端粒参与脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid, DNA)断裂并干预DNA的正确修复。端粒损失导致的染色体不稳定性在与肿瘤细胞进程相关的染色体重排中起着重要作用。端粒功能是细胞和整体辐射敏感性的决定因素之一。

关键词 端粒, 辐射敏感性

中图分类号 Q691.5

端粒为线性染色体末端,在基因组完整性的保持中起主要作用,其正确的功能对于正常细胞的存活和发育是至关重要的。端粒结构和功能的改变可能直接影响细胞和生物体的辐射敏感性。因此,它们在辐射生物学中具有潜在的重要性。

1 端粒结构及其保持与消蚀

端粒是作为真核细胞染色体的天然末端被发现的。绝大多数真核细胞分享一个相似的端粒重复脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid, DNA)序列,脊椎动物的端粒重复序列是(TTAGGG) n [(thymine \times 2-adenine-guanine \times 3) n , 重复单位(胸腺嘧啶 \times 2-腺嘌呤-鸟嘌呤 \times 3)]。染色体末端重复单位的数量具有种间差异。人类端粒的全长约为5—10kb(kilobase, 千碱基),而小鼠约为50kb。在同一细胞内的个体染色体之间,其端粒长度也有变异。例如,小鼠染色体的p臂(染色体短臂)倾向于携带比q臂(染色体长臂)更短的端粒,而人染色体17p上的端粒最短^[1,2]。

端粒的终端是一条突出的3'单链,这条3'单链形成环状,并与位于内双链区内的富G链配对^[3]。已证明这些结构的形成和稳定是通过促甲状腺素释放因子1(Thyrotropin releasing factor, TRF1)和TRF2蛋白的作用得以促进和保持的^[4]。

端粒的作用是保护和稳定染色体末端。在酵母中发现DNA双链断裂导致端粒蛋白从端粒到损伤位点的重新分布^[5]。端粒可能作为一个“储水库”为修复蛋白和其它蛋白服务。某些修复蛋白在端粒

功能的保持中起活化作用^[6]。

端粒酶依赖性途径是端粒保持途径之一。端粒酶能够以自身核糖核酸(Ribonucleic acid, RNA)为模板、以端粒3'末端为引物,合成端粒DNA序列并维持其长度。而在端粒酶阴性的永生化人细胞中,端粒则通过非端粒酶依赖的选择性延长(Alternative lengthening of telomeres, ALT)途径得以保持和生长。

正常体细胞的端粒会随着细胞分裂而缩短。当端粒持续缩短到一定程度时,呈现端粒功能丧失和细胞生长显著抑制的临界状态,而经历临界的细胞恢复生长的可能性极小^[7]。

2 端粒序列位点变异与辐射敏感性

端粒不仅位于染色体末端,也存在于染色体间隙位点。在间隙位点端粒则可能破坏染色体的稳定,间隙端粒序列与自发的和辐射诱发的染色体重排的位点相互关联。

中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary K1, CHO K1)细胞株的一个标志性染色体,包含放大的来自中国仓鼠染色体10的间隙端粒序列,并且在CHO K1的两个亚克隆的核型演化过程中,形成了两个更具标志性的染色体,它们均包含放大的来自中国仓鼠染色体10的间隙端粒序列^[8]。本文认为包含间隙端粒序列的CHO K1细胞的染色体不稳定性起源于中国仓鼠染色体10。

Mondello等^[9]分析了四种人间隙端粒序列的长度。其中位于21q22、2q31和7q36的三种间隙端

第一作者:郭月凤,女,1962年12月出生,1983年毕业于北京大学生物系,放射医学专业,研究员

收稿日期:初稿 2005-12-02,修回 2006-02-20

粒序列含有 53—84bp (base pair, 碱基对) 的伸展的短端粒, 另一种间隙端粒序列源于染色体 6p 的亚端粒域, 含有一束由几百个碱基对组成的精密但变性的端粒序列。在 21q22 位点发现了两个常见的等位基因, 而在 2q31、7q36 和 6p 位点, 等位基因的数量分别是 8、6 和 4。在三个包含短间隙端粒序列的位点上, 由于六核苷的倍数不同, 其等位基因也彼此不同。在胃癌细胞中这三个位点也是不稳定的, 其特征是微卫星不稳定性。在 6p 间隙端粒序列位点, 四个等位基因的长度为 500—700bp。本文认为伸展的精密间隙端粒序列具有高度不稳定性。

Busson 等^[10]发现三位血癌患者的细胞中存在易位的端粒序列。涉及 1q12、2q、16p 和 19q 的跃迁式易位, 分别在两位患者的染色体 t (translocation, 易位) (1; 16)、t (1; 19) 和 t (1, 17) 中用荧光原位杂交 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 方法检出了端粒序列。第三位患者约一半的中期相 der (derive, 衍生) (2) t (1; 2) 中存在间隙端粒序列。这些易位的间隙端粒序列也存在不稳定性。

Desmaze 等^[11]用多种细胞遗传方法分析了三种人细胞株, 这几种细胞的间隙位点上具有包含完整端粒序列的质粒。其中两种细胞中, 包含完整质粒的染色体存在不稳定性, 分别涉及断裂/融合/桥循环和质粒 DNA 扩大。Kilburn 等^[12]为了确定一个限定的间隙端粒序列对染色体不稳定性以及 DNA 代谢的作用, 在中国仓鼠卵母细胞的腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (Adenine phosphoribosyltransferase, APRT) 基因的第二内区, 从两个方向插入 800bp 的功能性端粒重复序列, 其中从一个方向插入的端粒重复序列不干预 APRT 基因的表达, 而从另一方向插入的端粒重复序列则轻度降低信使核糖核酸 mRNA (messenger, RNA) 水平。该端粒序列不诱发染色体断裂、不改变同源重组事件的发生率和分布。但两个方向的间隙端粒重复序列却将基因重排增加了约 30 倍。这表明在哺乳动物染色体内部嵌入端粒重复序列能够导致染色体的不稳定性。在分子水平上, 间隙区域的端粒序列产生局部动摇基因组的作用。

对小鼠和中国仓鼠的研究表明, 裂隙端粒区域可能是辐射损伤 (或来自其它试剂的损伤) 导致染色体畸变的优先作用位点^[13-15]。对间隙端粒样 DNA 序列的 FISH 分析表明, 受到 X 射线照射或丝裂霉素 C 处理的中国仓鼠细胞中, 约 40% 的互换涉及重排位点的端粒样序列区域。这提示间隙端粒样 DNA 序列至少在使用 DNA 损伤剂的情况下具有普遍的重组能力, 这种能力与 DNA 损伤的起始机制并不

相关^[16]。

3 端粒长度改变及功能紊乱与辐射敏感性

端粒长度及功能的改变能够影响细胞和生物体的辐射敏感性。McIlrath 等^[17]用定量荧光原位杂交 (Quantity-fluorescence *in situ* hybridization, Q-FISH) 方法测量了对辐射敏感的 L5178Y-S 鼠淋巴瘤细胞和亲代 L5178Y 辐射抗性细胞的端粒长度。结果显示, L5178Y-S 辐射敏感细胞的端粒长度为 7kb, 是 L5178Y 辐射抗性细胞端粒长度 (48kb) 的 7 倍, 并且 L5178Y-S 细胞的某些染色体无端粒信号, 说明其端粒序列可能完全丢失或者其长度在 Q-FISH 检测下限 200bp 以下。24 例乳腺癌患者和 5 例正常志愿者的淋巴细胞中染色体辐射敏感性与端粒长度亦呈负相关。本文认为端粒长度可能成为染色体辐射敏感性的一种标志物。

Goytisolo 等^[18]研究了端粒长度和哺乳动物机体对电离辐射敏感性的相关性。他们给予 wt (wide type 野生型) 和 mTR^{-/-} (鼠端粒酶 RNA 缺乏, mouse telomerase RNA ^{-/-}) 小鼠 ¹³⁷Cs 照射, 每周 1 次, 剂量率 1.14Gy/min, 剂量 1.75Gy, 共照射 6 次。采用流式-荧光原位杂交 Flow-FISH (flow-FISH,) 方法对骨髓细胞端粒长度的分析显示 G5 mTR^{-/-} 小鼠的端粒 [(2.236±0.420) units (荧光强度单位)] 比野生型小鼠端粒 (3.351±0.548) units 缩短了 40% (*t* 检验 $p=9.08 \times 10^{-5}$)。受照的 G5 mTR^{-/-} 小鼠中, 濒死小鼠的端粒荧光强度 (1.636±0.119) units 低于存活小鼠 (2.088±0.233) units (*t* 检验 $p=0.00173$), 显示前者辐射敏感性高于后者。而存活的受照 G5 mTR^{-/-} 小鼠端粒荧光强度与未受照的 G5 mTR^{-/-} 小鼠无显著差异 (*t* 检验 $p=0.349$), 提示在存活的受照 G5 mTR^{-/-} 小鼠中, 端粒的消蚀不明显。对小鼠的不同器官进行组织病理学分析显示, G5 mTR^{-/-} 小鼠对累积剂量的 γ 射线照射超敏感, 60% 受照的 G5 mTR^{-/-} 小鼠在照射结束后死亡并呈现病理变化, 如肾小管严重坏死、胃腔形成胞囊、腔壁细胞恶化、绒毛萎缩加重、骨髓细胞数量显著减少。存活的 G5 mTR^{-/-} 小鼠未见病理变化。受照的野生型和 G2 mTR^{-/-} 小鼠在 2 个月内均未死亡, 也未发现组织或器官的病理改变。受 1.75Gy 和 4Gy 照射的 G5 mTR^{-/-} 小鼠脾细胞凋亡率分别为 37%±17% 和 64%±9%, 显著高于 wt 小鼠 (26%±8% 和 36%±6%, $p<0.01$)。60% 的 G5 mTR^{-/-} 小鼠显示辐射诱发的 DNA 损伤, 受照 G5 mTR^{-/-} 小鼠双着丝粒、删除、罗伯逊氏融合、端粒联合+罗伯逊氏融合的发生率均比未受照的 G5 mTR^{-/-} 小鼠显著增加,

而 wt、G2 mTR^{-/-}小鼠中均未检出辐射诱发的这些染色体畸变。G5 mTR^{-/-}小鼠的电离辐射敏感表型说明缩短的端粒可导致机体对电离辐射的超敏感性。mTR^{-/-}小鼠端粒随代数增加而缩短, G5 mTR^{-/-}小鼠端粒长度小于 G2 mTR^{-/-}小鼠, 因此前者辐射敏感性高于后者。

Cabuy 等^[19]采用 Southern blot(Southern 印迹), Flow-FISH 和 Q-FISH 方法分析了来自共济失调性毛细血管扩张 (Ataxia telangiectasia, A-T)、Fanconi's 贫血、对电离辐射有高度敏感性等疾病患者和正常个体的 11 种成纤维细胞株的端粒长度。与正常个体相比, 来自上述患者的大多数细胞株端粒缩短的速率加快, 并且在处于分裂后期的细胞内伴随着染色单体桥(提示端粒覆盖功能的早期丧失)、在处于分裂中期的细胞内伴随着低水平的染色体畸变。辐射敏感小鼠的胚胎干细胞亦显示相似的端粒缩短加快和中度端粒功能紊乱。患有 LiFrameni 综合症、Fanconi's 贫血和 A-T 的个体与他们的非感染双亲相比, 平均端粒长度变短^[20]。A-T 细胞相对于正常细胞的端粒长度永久性地减小^[21]。A-T 患者呈现神经衰退、免疫缺陷、以高频率端粒联合/融合为特征的染色体不稳定性以及对电离辐射的超敏感性。这些结果提示电离辐射敏感性的机制与导致端粒缩短与功能紊乱的机制是相互关联的。

缩短的端粒参与 DNA 断裂, 干预 DNA 的正确修复^[22]。在端粒酶被摧毁的小鼠模型中, 具有短端粒的染色体与辐射诱发的断裂融合, 干预了断裂末端的重新聚集。这种类型的融合是造成在这些小鼠模型中所观察到的电离辐射照射后染色体不稳定性原因。严重结合性免疫缺陷 (Severe combine immunodeficiency, Scid) 是由 DNA 蛋白激酶 (DNA-protein kinase, DNA-PK) 的催化亚单位突变造成的一种免疫缺陷。Bailey^[23]及其同事利用细胞遗传技术分析了接受 γ 射线照射的 wt、scid 小鼠细胞的染色体畸变, 该技术能够检测到一个端粒与一个双链断裂 (Double strand break, DSB) 末端的融合。在具有 scid 的两株细胞中均观察到了端粒-DSB 融合, 而在 wt 细胞中则未观察到。在接受 25—340cGy 照射的 scid 细胞中, 可见的互换型染色体畸变有一半涉及端粒-DSB 融合。本文认为, 无防护的端粒“冒充”DSB 末端并与之融合, 打开了一条错误修复路径, 减小了 DSB 修复的综合精确度。这些事件在 scid 细胞中高频发生表明功能紊乱的端粒参与 DSB 的错误修复, 并且对与 DNA-PK 相关的辐射敏感性做出了主要贡献。

端粒功能的损失与基因不稳定性和细胞的生存

能力以及恢复潜力相联系。Wong 等^[24]用 mTR^{-/-}小鼠, 评估了端粒酶和端粒功能对细胞和机体辐射反应的作用。虽然端粒酶活性缺乏对电离辐射反应没有可辨别的影响, 但子代 mTR^{-/-}小鼠在端粒功能障碍的突发事件中显露出与加速死亡相关的辐射敏感综合症。在细胞水平上, 胃肠腔干细胞和初级胸腺细胞凋亡率增加, 小鼠胚胎纤维原细胞存活率剂量依赖性减少。端粒功能障碍细胞的辐射敏感性与延迟的 DNA 断裂修复、持久的染色体断裂和以复合染色体畸变及大块碎片为特征的细胞遗传表型相联系。这一结果显示端粒功能障碍削弱了 DNA 修复并增强了对电离辐射的敏感性。

研究证实功能紊乱的端粒至少在部分人类癌症的恶性转化进程中起到了关键作用。端粒结构损失对端粒稳定性及其功能有深刻的影响。为确定端粒损失与染色体不稳定性之间的关系, Anthony 等^[25]用一种基因内区编码的核酸内切酶 1 (An intron encoded endonuclease, I-Sce) 诱发小鼠胚胎干细胞端粒附近的 DNA 双链断裂造成断裂染色体模型。该模型内, 断裂的染色体不能恢复端粒并经历涉及非同源末端结合的姊妹染色单体融合, 之后是由断裂-融合-桥循环导致的染色体不稳定性, 涉及姊妹染色单体及与其它染色体的重排, 这一过程造成了通过添加一个端粒到 DNA 断裂端而最终变得稳定的高度重排的染色体。这说明端粒损失导致的染色体不稳定性在与肿瘤细胞进程相关的染色体重排中起着重要作用。在上皮组织中, 临界端粒缩短能够导致端粒去覆盖并可能发生在最早可识别的恶性转化阶段^[26]。Wu 等^[27]测量了 92 例头颈癌、135 例膀胱癌、54 例肺癌和 32 例肾细胞癌患者淋巴细胞的端粒长度并用彗星法分析其基因不稳定性。结果显示, 头颈癌患者的端粒 (6.5 kb) 比正常对照者的端粒 (7.4 kb) 显著缩短 ($p < 0.001$)。在肺癌、肾细胞癌和膀胱癌中也观察到相似的情况。受试者癌症风险随其端粒长度的减小而增加。这提示端粒长度变异和功能紊乱是一种潜在的癌症易患因素。

综上所述, 端粒功能是细胞和整体辐射敏感性的决定因素之一^[28]。端粒功能紊乱能够增加机体的辐射敏感性并可能增加辐射致癌的危险。

参考文献

- 1 Zijlmans J M, Martens U M, Poon S S, *et al.* Proc Natl Acad Sci, USA. 1997, **94**(4): 7422-7428
- 2 Martens U M, Zijlmans J M, Poon S S, *et al.* Nat Gen, 1998, **18**(1): 76-80
- 3 Griffith J D, Comeau L, Rosenfield S, *et al.* Cell, 1999,

- 97(4): 503-514
- 4 Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, *et al.* Mol Cell Biol, 2000, **20**(5): 1659-1668
 - 5 Martin S G, Laroche T, Suka N, *et al.* Cell, 1999, **97**(5): 621-633
 - 6 Goytisolo F A, Samper E, Edmonson S, *et al.* Mol Cell Biol, 2001, **21**(11): 3642-3651
 - 7 Feng J, Walter D F, Sy-Shi W, *et al.* Sci, 1995, **269**(5228): 1236-1241
 - 8 Slijepcevic P, Xiao Y, Natarajan A T, *et al.* Cytogenet Cell Genet, 1997, **76**(1-2): 58-60
 - 9 Mondello C, Pirzio L, Azzalin C M, *et al.* Genomics, 2000, **68**(2): 111-117
 - 10 Busson L C M, Brizard F, Smadja N V, *et al.* Leukemia, 2000, **14**(9): 1630-1633
 - 11 Desmaze C, Alberti C, Martins L, *et al.* Cytogenet Cell Genet, 1999, **86**(3-4): 288-295
 - 12 Kilburn A E, Shea M J, Sargent R G, *et al.* Mol Cell Biol, 2001, **21**(1): 126-135
 - 13 Alvarez L, Ezans J W, Wilks R, *et al.* Genes Chromosomes and Cancer, 1993, **8**(1): 8-14
 - 14 Slijepcevic P, Xiao Y, Dominguez I, *et al.* Chromosoma, 1996, **104**(8): 596-604
 - 15 Day J P, Limoli C L, Morgan W F. Carcinogenesis, 1998, **19**(2): 259-265
 - 16 Fernandez J L, Gosalvez J, Goyanes V. Chromosome Res, 1995, **3**(5): 281-284
 - 17 McIlrath J, Bouffler S D, Samper E, *et al.* Cancer Res, 2001, **61**(3): 912-915
 - 18 Goytisolo F A, Samper E, Martin-Caballero J, *et al.* J Exper Med, 2000, **192**(11): 1625-1636
 - 19 Cabuy E, Newton C, Joksic G, *et al.* Radiat Res, 2005, **164**(1): 53-62
 - 20 Kruk P A, Bohr V A. Radiat Oncol Invest, 1999, **7**(1): 13-21
 - 21 Sprung C N, Bryan T M, Reddel R R, *et al.* Mutat Res, 1997, **379**(2): 177-184
 - 22 Latre L, Tusell L, Martin M, *et al.* Exp Cell Res, 2003, **287**(2): 282-288
 - 23 Bailey S M, Cornforth M N, Ullrich R L, *et al.* DNA Repair, 2004, **3**(4): 349-357
 - 24 Wong K K, Chang S, Weiler S R, *et al.* Nat Genet, 2000, **26**(1): 85-88
 - 25 Anthony W I Lo, Carl N S, Bijan F, *et al.* Mol Cell Biol, 2002, **22**(13): 4836-4850
 - 26 Meeker A K, De Marzo A M. Curr Opin Oncol, 2004, **16**(1): 32-38
 - 27 Wu X, Amos CI, Zhu H, *et al.* J Natl Cancer Inst, 2003, **95**(16): 1211-1218
 - 28 Bouffler S D, Blasco M A, Cox R, *et al.* Int J Radiat Biol, 2001, **77**(10): 995-1005

A review on correlation between telomeres and radiosensitivity

GUO Yuefeng

(China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006)

ABSTRACT The paper gives a review on features of telomeres with particular emphasis on a correlation between telomeres and organism sensitivity to ionizing radiations and their potential importance in radiation biology. Recent findings show that radiosensitivity can be impacted by changes in telomere length or telomere-being locations. Shortened and dysfunctional telomeres join to DNA breaks interfering with their correct repair. Chromosome instability resulting from telomere loss plays a significant role in chromosomal rearrangements associated with tumor progression. Telomere function is one of the factors that determine radiosensitivity of cells and whole organism.

KEYWORDS Telomeres, Radiosensitivity

CLC Q691.5