

# 哺乳动物细胞 DNA 损伤修复的研究——病毒探针的利用

苏兆众 罗祖玉 郭兰萍

(复旦大学)

**摘要** 用病毒探针研究 DNA 修复具有显著的优越性。由于病毒 DNA 结构及复制方式远比真核细胞的简单,病毒探针法可使真核细胞 DNA 修复的研究大为简化。双链 DNA 病毒的宿主细胞回复和多重感染回复被用来研究细胞的结构性修复功能。单链 DNA 病毒如细小病毒被用来探测诱导性修复过程。真核细胞内可能存在一个类似于原核细胞中的 SOS 功能的诱导性易错修复功能,诱导信号是 DNA 损伤本身。一些 DNA 损伤,如无碱基位损伤可充作此修复功能的底物。

**关键词** 细小病毒,病毒探针,SOS 修复,宿主回复功能,多重感染回复功能,DNA 后复制修复功能,诱导性易错修复功能。

## 前 言

从 50 年代初期 Weigle 发现用射线照射宿主细菌能使随后感染的受损噬菌体的存活与突变增加<sup>[1]</sup>到 70 年代中期 Radman 和 Witkin 提出原核生物存在 SOS 修复的假设<sup>[1,2]</sup>,噬菌体被成功地用作遗传和生化探针来研究原核生物的基因表达与调控、DNA 损伤修复机制。同理,动物病毒可用来探测真核细胞 DNA 损伤修复机制。核内复制病毒的 DNA 复制大多或几乎完全取决于细胞的 DNA 代谢功能,如果用带有 DNA 损伤的病毒感染细胞,那么病毒的存活率就可以表征细胞对病毒 DNA 损伤的修复功能;而如果用小剂量的 DNA 损伤处理细胞,它对病毒的存活与突变的作用则反映细胞内诱导的 DNA 损伤修复功能及其性质。

## 病毒探针的特点及其实验技术简介

### 1. 种类

常被用作探针的病毒有单纯疱疹病毒(Herpes Simplex Virus, HSV)、腺病毒(Adenovirus),猴猴肿瘤病毒(SV<sub>40</sub>)、细小病毒(Parvovirus, PV)等,它们都是核内复制的病毒。前两种病毒的 DNA 分子量较大,且编码自身复制所需的酶,因而给检测和分析某些细胞修复功能带来困难。SV<sub>40</sub> 是用于研究修复的较为理想的探针。但是,它的双链 DNA 结构限制了它的某些功能。例如某些 DNA 毒剂所产生的具有突变潜力的损伤在遇到 DNA 复制之前已被切除功能所修复,因而使它在探测由后复制修复功能引起的突变时的灵敏度较低。而含单链线状 DNA 的 PV 在这方面独具优点。

自主性 PV 如 MVM, H-1, KRV 等的 DNA 结构简单,整个复制过程几乎完全依靠宿主的酶系。单链 DNA 上的损伤不能被切除修复或重组修复功能所克服。这样,带有 DNA 损伤的病毒

的存活都是由于细胞的后复制功能对损伤的修复作用,而且病毒 DNA 的复制速率高于细胞 DNA 的复制速率,细胞的后复制修复功能在病毒模板上得以放大。

## 2. 实验技术

(1) 病毒空斑试验;(2) 病毒结构蛋白(抗原)的检测;(3) 对细胞核内形成的包涵体的观察;(4) 转化细胞频率;(5) 分离宿主细胞内病毒 DNA, 直接研究病毒基因带有的损伤在宿主细胞内的结局<sup>[4]</sup>。

## 3. 病毒探针的优点

(1) 由于病毒 DNA 结构远比真核细胞的简单,其复制方式已基本搞清,而且容易从宿主 DNA 中分离。如果把真核细胞的修复功能反映到病毒 DNA 上,就可以使细胞修复机制的研究大为简化。

(2) 病毒的生活周期短,增殖速度大,突变体易被筛选到,有利于从遗传学角度研究宿主修复功能的性质。

(3) 只有用病毒探针这一实验技术才能把细胞的结构性复制功能所产生的直接突变作用与由诱导性易错修复功能引起的间接突变作用相分离。

(4) 通过对子病毒突变体的 DNA 核苷酸序列分析,可以区分有靶突变与无靶突变。

目前,病毒探针主要被用来研究哺乳动物细胞的宿主复活功能,多重感染修复和诱发性后复制修复功能。

## 模板损伤对其 DNA 复制的抑制作用

用 PV 作探针,可发现辐射所造成的 DNA 损伤与剂量成线性关系。受紫外线(UV)照射的细小病毒存活百分数的对数与 UV 剂量即 UV 所造成的 DNA 损伤成负线性关系<sup>[5,6]</sup>。DNA 模板上形成一个嘧啶二聚体即可使该病毒失活。定量分析细小病毒 DNA 上的无碱基位损伤与病毒失活的关系也可证明此种损伤对单链 DNA 病毒是致死的,这可能是无碱基位损伤抑制了 DNA 复制<sup>[7]</sup>。

用 SV<sub>40</sub> 的温度敏感型突变体为探针, Sarasin 等发现 DNA 复制受阻于所遇到的第一个二聚体,因为在受照后一小时内,新合成的子链的平均长度约等于模板上两个相邻二聚体之间的平均距离<sup>[8]</sup>。

## 宿主回复功能(Host Cell Reactivation, HCR)

所谓宿主回复功能,即细胞对受损病毒有修复功能。在正常情况下,细胞能修复 80—98% 的双链 DNA 病毒上的 UV 损伤<sup>[9]</sup>。

Lytle 等首先用 HSV 作探针研究不同细胞的 HCR<sup>[10]</sup>,发现在各种细胞中受损病毒的存活曲线都由两条不同斜率的直线组成。在病毒所受剂量较小时,曲线斜率较大,这部分称为敏感部分;在病毒接受较大剂量时,曲线变得平缓,这部分称为迟钝部分。敏感部份的 HCR 有以下特点①与非半保留 DNA 复制平行;②是无错的回复过程;③不受细胞周期的影响。以上特征暗示切除修复作出的主要贡献<sup>[19~21]</sup>。迟钝部份的 HCR 取决于细胞的 S 期,并且可被咖啡因所抑制,说明此阶段 HCR 与后复制修复有关。

HCR 被成功地用来研究遗传病患者的细胞 DNA 修复缺损机制。已知 XP 细胞有 8 个互补亚

群及一些变种亚群。以 UV 处理过的 SV<sub>40</sub> 在各亚群的纯合子 XP 细胞里的存活均不同程度地低于在正常细胞里的存活,而杂合子 XP 细胞的 HCR 功能几乎与正常细胞一样。Rainbow 等<sup>[12]</sup>以腺病毒为探针用检测病毒结构蛋白抗原的技术观察几种遗传病患者的细胞 DNA 损伤修复情况。他们发现 XP 细胞对受 UV 照射过的病毒修复能力较差,而 Faconi 贫血症(FA)患者的细胞对受  $\gamma$  射线照射过的病毒修复能力较差。Ataxia Telangiectasia(AT,毛细血管扩张性共济失调)患者的细胞对 DNA 受电离辐射处理后的病毒 DNA 链断裂不能有效地连接,所以 HCP 也较弱。

## 多重感染回复功能

当细胞分别受多个或单个辐照过的病毒感染后,前者对损伤病毒的回复能力较大。病毒存活率的提高可能是由于细胞 DNA 的重组功能,带有致死损伤的病毒 DNA 重组后产生有感染力的病毒。已经发现,病毒 DNA 中遗传标记的重组频率与多重感染复活率相一致<sup>[13]</sup>。在受 UV 照射的 HSV/细胞系统中,当病毒与细胞之比为 2 时,其病毒存活率比病毒与细胞之比为 0.2 时的高 5 倍左右<sup>[14]</sup>。

由多重感染回复功能所引起的受损病毒存活率增加,即受损病毒 DNA 的重组频率增加,与未被修复的 DNA 损伤数量成正比。受相同剂量 UV 照射过的病毒在切除修复缺陷型 XP 细胞 A 亚群中的重组频率高于在正常细胞中的重组频率,而在切除修复功能正常的 XP 细胞变种亚群与 AT 细胞中的重组频率接近于正常细胞中的重组频率<sup>[15]</sup>。

哺乳动物细胞对病毒的多重感染回复功能比细菌对噬菌体的多重感染回复功能更显著,因为在正常情况下病毒群体中一些没有空斑形成能力的病毒颗粒在受辐射损伤后也参与 DNA 重组,而通常说的病毒数与细胞数之比只是指有形成空斑能力的病毒颗粒数与细胞数之比。病毒群体中不能形成空斑的颗粒远比能形成空斑的颗粒多。

## 后复制修复功能

利用病毒探针可研究哺乳动物细胞中的链断裂连接等后复制修复功能,如在模板损伤处对侧子链上所留下的缺口的填补<sup>[16]</sup>、重组在后复制修复中的作用等<sup>[17]</sup>。近来, Hanawalt 等<sup>[18]</sup>用 SV<sub>40</sub> 作为探针来研究哺乳动物细胞的后复制修复过程,病毒受 UV 照射后一个小时内, SV<sub>40</sub> 复制中间体的子链长度略等于亲链上两个相邻二聚体之间的距离;三小时后子链长度超过此值。在子链中,二聚体以一定几率出现。这说明哺乳动物细胞的后复制修复过程包括对二聚体的复制与链交换。

### 1. 哺乳动物细胞中可能存在诱导性后复制修复功能

Bockstahler 和 Lytle 发现如用小剂量的 UV 或 X 射线照射培养细胞,那么随后感染的受 UV 照射的 HSV 的存活率可提高 2-3 倍<sup>[19,20]</sup>。此现象称为增强复活(Enhanced Reactivation, ER)。许多实验证明,在各种病毒/哺乳动物细胞系统中,各种 DNA 损伤剂处理后均可观察到这一现象<sup>[21]</sup>。

一些作者认为这可能是由于小剂量的射线或化学物质引起的 DNA 损伤在细胞中诱发了一种后复制修复功能,它使病毒 DNA 复制克服二聚体等阻遏性损伤,从而导致病毒存活率的提高<sup>[23,31]</sup>。例如 Rommelaere 等用细小病毒 MVM 作探针对 ER 现象进行了体外生化分析。发现在被诱导的细胞里,受 UV 照射的 MVM 的 DNA 由单链变为双链的复制形式的机率比在未受诱

导的细胞里高,说明这种诱导作用使细胞内的 DNA 复制易克服 UV 所造成的阻遏性损伤<sup>[4]</sup>。

诱导作用加强了在受损模板上的 DNA 复制,这与分剂量辐射效应是一致的。

## 2. 诱导性后复制修复的性质

诱导性后复制修复是无错的还是易错的?Summer 等<sup>[22]</sup>首先发现在 HSV/猿猴细胞系统中,在受损伤病毒表现出增强复活的同时,存活病毒的突变频率也增加,即出现增强突变(Enhanced Mutagenesis, EM)。在 SV<sub>40</sub>/人细胞系统<sup>[23]</sup>和 PV/人(或大鼠)细胞系统<sup>[24]</sup>中,ER 与 EM 是平行表现的。这十分类似于原核细胞中的 Weigle 增强复活与增强突变<sup>[1,3]</sup>。一些作者<sup>[23,26]</sup>认为在哺乳动物细胞中也可能存在着类似于 SOS 修复功能的诱导性易错修复功能。由于加入重新合成蛋白质的抑制剂可以阻断诱导过程,所以可以推断诱导过程产生了新的蛋白质,这些新的蛋白质可能是 DNA 合成酶复合体的组成部分。它(们)降低复制对模板的要求,使之能直接地错误地通过一些阻遏性损伤。

## 3. 诱导性后复制修复功能与间接突变

一般认为有直接突变与间接突变两条途径<sup>[27]</sup>。直接突变指在 DNA 复制过程中所产生并固定下来的遗传信息的改变。

在未被诱导的人细胞中,随着辐射剂量的增加,受 UV 照射的 PV 的突变频率呈线性增加,这是直接突变作用<sup>[6]</sup>。用 HSV 作探针也能观察到直接突变作用<sup>[27]</sup>。

在原核细胞中已证实 DNA 复制受阻后能诱发 SOS 功能,它能增强细菌自身与噬菌体的突变。这种由诱导性易错修复功能引起的突变称为间接突变<sup>[8]</sup>。哺乳动物细胞中也存在着这种间接突变作用。

用病毒探针可以把直接突变与间接突变明确地区分开来。完整的 PV 在被诱导的细胞中突变频率增加<sup>[24]</sup>。这种间接突变作用是通过细胞中诱导性易错修复功能作用于完整的病毒 DNA 模板来实现的。用 SV<sub>40</sub> 和 HSV 也能探测到同样的突变功能<sup>[14,23]</sup>。

## 4. 诱导信号的本质

对原核细胞 SOS 修复功能的诱导信号本质已有一定的研究。DNA 双链中的单链缺口结合于 recA 基因的产物并使之获得蛋白酶功能,后者分解 lexA 基因产物,从而使一系列 din 基因不再受阻遏而得以表达或加强表达<sup>[28]</sup>。

对哺乳动物细胞中易错修复功能的诱导信号的研究较少。有的作者<sup>[30,31]</sup>认为:由于 DNA 复制受抑制,细胞发出自救信号,通过一系列基因功能的表达调节了生理功能,使 DNA 复制能克服阻遏性损伤。

在细小病毒 H-1/人细胞系统中,在用病毒感染前十余小时先用 UV 或化学致癌剂处理细胞,那么病毒的存活率与突变频率均增加。如果用带有损伤的外源性 DNA 代替 UV 或化学致癌剂处理细胞,则 H-1 的存活率与突变频率也能增加,而且诱导的动力学过程也与前类处理相同。只要所引入的 DNA 损伤数与 UV 直接照射在细胞 DNA 上造成的损伤数处于相同的数量级,则无论损伤的载体是什么,都能诱导出同样水平的 ER 与 EM。如果用胸腺 DNA、SV<sub>40</sub> 早期温度突变体 DNA (在 41℃ 以下不能复制)处理细胞,只要带有足够数量的损伤,ER 与 EM 就能被诱导出来。以上说明了原始诱导信号是 DNA 损伤本身、也就是诱导并不需要细胞中特定的靶受击中,复制受损 DNA 也不是诱导的必须条件。DNA 损伤究竟通过怎样的途径诱导易错修复功能的尚待探讨<sup>[32]</sup>。

## 5. 诱导性易错修复功能的底物

怎样的 DNA 损伤是诱导性易错修复功能的底物?现用 H-1 为探针来说明。将受各种剂量的

UV 照射的 H-1 分别感染正常细胞和受 UV 处理的细胞,在两类细胞中病毒的突变频率均随照射病毒剂量的增加而线性地增加,所得到的两条突变-剂量曲线几乎平行。在病毒受照射的任何一个剂量点,在受诱导的细胞中的病毒突变频率均比正常细胞中的高-常量<sup>[6]</sup>。这说明诱导性易错修复功能在完整病毒模板上所产生的突变频率与在受 UV 损伤的病毒模板上基本一样,可以认为 UV 诱导的 DNA 损伤并非此修复功能的底物。

如用烷化剂或低 PH 的缓冲液在病毒 DNA 链上诱生无碱基位损伤,则病毒的存活率随无碱基位损伤的增加而线性地下降。在 H-1 DNA 上的一个无碱基位损伤就可以构成一个致死击,而在受 UV 处理过的细胞中,在病毒存活率提高的同时突变频率也增加,且两者在数量上相符合。这说明无碱基位损伤是诱导性易错修复功能的底物之一<sup>[7,25]</sup>。

## 结 束 语

在真核细胞中,病毒探针技术的应用历史虽然还不长,但却已显示出自己特有的优越性。宿主回复功能、多重感染回复功能以及诱导性易错后复制修复功能的发现都是用病毒作探针来研究真核细胞 DNA 损伤修复功能所取得的成果。但是人们必须考虑到病毒 DNA 的结构比真核细胞的 DNA 结构简单得多,而且对于细胞来说它必竟是一种外源性 DNA,在病毒 DNA 上所表现的损伤修复功能可能只是反映了宿主细胞 DNA 损伤修复功能的一个部分。虽然如此,病毒探针技术将在研究真核细胞的 DNA 代谢特别是 DNA 损伤修复中得到更加广泛的应用。

## 参 考 文 献

- [1] J. J. Weigle, Proc. Natl. Acad. Sci., 39, 628-636(1953).
- [2] M. Radman, in L. Prokash ed. "Molecular and Environmental Aspects of Mutagenesis", Springfield, Illinois, 128-142(1974).
- [3] E. M. Witkin, Bacter. Res. 60, 869-907(1976).
- [4] J. Rommelaere, & D. C. Ward, Nucleic Acid Res., 10, 2577-2596(1982).
- [5] J. Rommelaere, J-M. Vos, J. J. Cornelis, & D. C. Ward, Photochem. Photobiol., 33, 845-854 (1981).
- [6] J. J. Cornelis, Z. Z. Su, & J. Rommelaere, EMBO Journal 1, 693-699(1982).
- [7] J-M. Vos, B. Avalosse, Z. Z. Su, & J. Rommelaere, in "Proteins involved in DNA replication", Hubsch & Spadari ed. (1983)
- [8] A. R. Sarasin, & P. C. Hanawalt, in "DNA Repair Mechanisms", P. C. Hanawalt et al ed. Academic Press 547-550(1978).
- [9] W. R. Proctor, J. S. Cook, & R. W. Tennent, Virology, 49, 368-378(1972).
- [10] C. D. Lytle, Int. J. Radiat. Biol., 19, 329-337(1970).
- [11] R. S. Cay, in "Cellular Senescence and Somatic Cell Genetics: DNA Repair Processes", Symposia Specialists, Miami, p. 119(1977).
- [12] A. J. Rainbow, in "DNA Repair Mechanisms", P. C. Hanawalt et al ed. Academic Press pp 541-545(1978).
- [13] J. D. Hall, J. D. Featherstone, & R. E. Almy, Virology, 105, 490-500(1980).
- [14] C. D. Lytle, J. G. Goddard, & H. L. Chen, Mutat. Res., 70, 139-149(1980).
- [15] U. B. Dasgupta, & W. C. Summer, Molec. Gen. Genet., 178, 617-628(1980).
- [16] R. B. Painter, Cancer Res., 38, 4445-4449(1978).
- [17] A. J. Linkhacher, Cancer Res., 43, 3610-3618(1983).
- [18] J. M. Clark, & P. C. Hanawalt, Mutat. Res., 132, 1-14(1984).
- [19] L. E. Bockstahler, & C. D. Lytle, Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 184-189(1970).

- [20] L. E. Bockstahler, & C. D. Lytle, *Mutat. Res.*, 35, 189-198(1976).  
[21] M. Radman, *Photochem. Photobiol.*, 32, 823-830(1980).  
[22] U. B. Dasgupta, & W. C. Summer, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 2379-2383(1978).  
[23] J. J. Cornelis, J. H. Lupker, *Mutat. Res.*, 82, 1-10(1981).  
[24] Z. Z. Su, J. J. Cornelis, & J. Rommelaere, *Carcinogenesis* 2, 1039-1043(1981).  
[25] Z. Z. Su, B. Avalosse, J-M. Vos, J. J. Cornelis, & J. Rommelaere, *Mutat. Res.*, 149, 1-8 (1985).  
[26] A. Sarasin, F. Bourre, & A. Benoit, *Biochimie* 64, 815-824(1982).  
[27] C. D. Lytle, et al., *Mutat. Res.*, 94, 405-412(1982).  
[28] D. Grunberger, & I. B. Weinstein, *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, 23, 151-194(1979).  
[29] J. Roberts, et al., *Biochimie* 64, 805-807(1982).  
[30] C. D. Lytle, & J. G. Goddard, *Photochem. Photobiol.*, 29, 959-962(1979).  
[31] A. Sarasin, & P. C. Hanawalt, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 346-350(1978).  
[32] J. J. Cornelis, Z. Z. Su, C. Dinsart, & J. Rommelaere, *Biochimie* 64, 677-680(1982).

(1985年3月10收到)

## STUDY ON THE REPAIR OF DNA DAMAGES IN MAMMALIAN CELLS—APPLICATION OF VIRAL PROBES

Su Zhaozhong    Luo Zuyu    Guo Lanping

(Laboratory of Biophysics, Fudan University)

**ABSTRACT** The use of Viral probes to study DNA repair processes in mammalian cells has demonstrated its prodigious advantages. Expressing cellular repair functions in viral DNA greatly simplifies the strategy of investigation. The cellular constitutive repair activities have been probed as host cell reactivation and recombinational multiplicity infection reactivation by double-stranded DNA viruses such as Herpes Simplex Virus, adenovirus and SV 40. Single-stranded parvoviruses have been employed successfully to probe inducible cellular repair or recovery processes. It has been shown that an error-prone recovery activity resembling "SOS" response in *E. coli* may be induced in mammalian cells by a series of DNA-damaging agents. The inducing signal resides in DNA damage itself. Some DNA damages such as apurinic or apyrimidinic site may serve as the proper substrate of the induced repair function.

**KEY WORDS** Parvovirus; Viral Probe; SOS repair; Host cell reactivation; Multiplicity infection reactivation; Post-replicative DNA repair; Inducible error-prone repair.