

哺乳类细胞中易错修复诱导信号的初探

苏兆众 罗祖玉

(复旦大学, 上海)

摘要 本研究从两个方面初探哺乳类细胞中易错修复诱导信号的本质: 1. 诱导信号是否产生于DNA损伤因子直接“击中”细胞中某些靶物质? 2. DNA复制的抑制是否诱导信号的必要组成部分? 用转染方法, 把带有紫外线损伤的外源性DNA导入人和大鼠细胞, 能像紫外线直接照射细胞一样诱发易错修复功能, 而且两种诱导处理有着相似的剂量相应关系和动力学过程。再者, 无论导入的DNA在细胞中能否起始复制, 都具诱导功能。所以, 可以认为, 诱导信号来自DNA损伤本身而不是细胞中特定靶物质的损伤; DNA复制的抑制不是诱发易错修复的必要条件。

关键词 易错DNA修复, 病毒探针, 诱导信号

引言

在原核细胞中, 诱发性易错修复功能已从遗传学和分子生物学方面较为深入地阐明, 被称为SOS修复功能^[1,2]。简言之, DNA复制的抑制激活 *recA-lexA* 基因调节系统, 通过加强受损模板上的DNA复制和降低复制真实性, 使受损细菌以及作为探针的噬菌体的存活和突变相随增加。原核细胞的这种修复功能无疑有益于自身的生存和进化。SOS修复的诱导信号也开始从分子生物学角度得以阐明^[2]。

哺乳类细胞中是否存在类似的诱导性易错修复功能已引起日益广泛的关注^[3], 主要是因为体细胞突变与癌变有不解之缘。初步研究表明, 哺乳类细胞中也能诱发类似大肠杆菌中作为SOS反应主要表现的Weigle复活和Weigle致突的增强复活(Enhanced Reactivation, ER)和增强致突(Enhanced Mutagenesis, EM)^[4~7], 即用小剂量DNA损伤剂处理细胞会增强随后感染的探针病毒的存活与突变, 而这种增强的机制也是增加对受损模板的复制^[8]。关于哺乳类细胞中易错修复诱导信号, 目前研究甚少。本文从两个方面研究诱导信号的本质: 1) 诱导信号是否产生于DNA损伤剂直接“击中”细胞中某特定的靶物质? 2) DNA复制的抑制是否诱发易错修复功能的必要条件? 为此, 用转染的方法, 把在体外受紫外线辐照的DNA导入细胞(间接诱导), 以此代替紫外线直接辐照细胞(直接诱导)诱发ER与EM, 因为单链线状DNA病毒细小病毒(parvovirus)对研究诱发性后复制修复功能独具优点^[7], 故被选作病毒探针。实验结果表明, 间接诱导处理能象直接诱导处理同样有效地诱导ER与EM, 且诱导效率与导入细胞的紫外线损伤的量呈剂量响应关系; 间接诱导与直接诱导有相同的动力学过程; 而且无论导入的受损DNA能否在细胞内起DNA复制, 只要带有等量的损伤量, 就具有相似的诱导效率。由此, 易错修复的诱导信号在于DNA损伤本身; DNA复制的抑制不是诱导的必要条件。

材料和方法

1. 细胞培养

人胎儿肾细胞NB-E^[9]和大鼠肝细胞RLSE^[10]单层贴壁培养于塑料培养皿(Nunc)内, 培养液

是含 10% 胎牛血清(Gibco)的 Eagle MEM 完全培养基。非洲绿猴肾脏细胞 CV-IP 的培养液是 DMEM。培养皿放入含 5% CO₂ 和饱和水蒸汽的培养箱。

2. 病毒制备

取自一个病毒空斑的自主性细小病毒 H-1 的温度敏感突变体 H-1 ts 6^[11] 增殖于在转瓶中悬浮生长的 RLSE 细胞内。病毒提纯与制备基本根据 Rhode^[11] 等的 CsCl 密度梯度分离法, 提纯的病毒颗粒悬浮于 TE(Tris 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8.7)缓冲液中保存于 4℃ 备用。猿猴肿瘤病毒 SV₄₀ 增殖于 CV-IP 细胞中。

3. 病毒 DNA 提纯

H-1 t. 6 的双链 RF DNA^[11] 和 SV₄₀ DNA 的提纯基本根据 Hirt 的方法^[12]

4. 紫外线辐照

紫外辐照源是波长为 254 nm 的紫外灯, 其剂量率用 Latarjet 剂量仪(居里实验室)标定。单层细胞受照时先吸除培养液, 照后即重新加入。病毒悬浮液和 DNA 溶液受照时其液体厚度不超过 1 mm。

5. DNA 转染培养细胞

基本根据 Graham 和 Van der Eb 的磷酸钙沉淀法^[13]。简言之, 需转染的 DNA 与作为载体的高分子小牛胸腺 DNA 混合, 浓度为 20 μg/ml, 使之与磷酸钙共同沉淀, 再把悬浮液加到单层细胞(0.5 ml/5 × 10⁵ 细胞/φ 6 cm 皿), 在室温保持 15 分后加入 4.5 ml 完全培养液, 在 37℃ 培养 20 时, 然后换成正常的完全培养液。

6. 探针病毒感染和病毒空斑分析

将 NB-E 或 RL 5E 细胞接入 φ 6 cm 培养皿(NB-E: 2 × 10⁵/皿; RL 5E: 10⁵/皿); 次日用磷酸缓冲生理盐水(PBS, pH 7.2)将细胞淋洗一遍, 接入 H-1 t. 6 在 PBS 中的稀释液(0.4 ml/皿), 在 37℃ 培养一小时, 其间每隔约 10 分钟摇动培养皿, 使细胞有均等的接触病毒的机会。感染后, 吸除接种液, 加复盖培养基(含 10% 胎牛血清、MEM、非必需氨基酸和 0.64% 琼脂的 MEM 完全培养基, 8 ml/皿), 培养 5 ~ 6 天后, 经中性红染色, 即可计数细胞单层上未着色的病毒空斑, 每一空斑表示一个有感染力的病毒颗粒, 以空斑形成单位(PFU)表示病毒滴度。

7. 病毒存活与病毒突变分析

受损病毒与等量的未受损病毒形成的病毒空斑之比表示病毒的存活率。H-1t. 6 在非限制性温度(33℃)能如野生型病毒一样进行复制并形成病毒空斑, 而在限制性温度(39.5℃)下由于 DNA 复制后期功能缺损不能产生子病毒, 但 H-1t. 6 的拟野生型回复突变体能在 39.5℃ 形成病毒空斑。等量的 H-1t. 6 在 39.5℃ 和 33℃ 形成的病毒空斑之比称为病毒突变频率, 病毒在受诱导和未受诱导的细胞里的存活率和突变频率之比分别称为病毒的增强复活(ER)和增强致突(EM); ER 与 EM 用以描写诱发性易错修复功能。

实验结果

1. 带紫外线损伤的外源性 DNA 能诱导 ER 与 EM

提纯的 SV₄₀ 和 H-1t. 6 RF DNA 分别受 2000 JM⁻² 和 500 JM⁻² 的 254 nm 紫外线辐照, 照后即导入 NB-E 或 RL 5E 细胞, 它们如紫外线直接辐照细胞同样有效地诱导 ER 与 EM; 相反, 未照射的等量病毒 DNA 则不具间接诱导功能(表 1)。要注意的是导入 H-1t. 6 DNA 会在 NB-E 或 RL 5E 细胞中产生有感染力的病毒从而形成病毒空斑; 但受如此高剂量(500 JM⁻²)的紫外线辐照

表 1 ER 与 EM 的诱导^(a)

Table I. Induction of ER and EM by Various agents in NBE and RL5 E cells

细 胞 Cells	诱导处理 ^(b) Inducing treatment	病毒存活率 ^(c) ($\times 10^{-4}$) Survival fraction of viruses ($\times 10^{-4}$)	病毒突变频率 ($\times 10^{-5}$) ER Mutation frequency of viruses ($\times 10^{-5}$)	EM
NB-E	对照(模拟转染处理, 但无 DNA) Control (mimic of transfection treatment, without DNA)	1.0 $\pm$ 0.1		
	受紫外线照射的 SV ₄₀ DNA (15 μ g/10 ⁶ 细胞) UV-irradiated SV ₄₀ DNA (15 μ g/10 ⁶ cells)	1.8 $\pm$ 0.2	1.8	2.1
	未受照射的 SV ₄₀ DNA (15 μ g/10 ⁶ 细胞) Unirradiated SV ₄₀ DNA (15 μ g/10 ⁶ cells)	1.1 $\pm$ 0.1	1.1	1.0
	受紫外线照射的 H-1t ₈ 6 RFDNA (10 μ g/10 ⁶ 细胞) UV-irradiated H-1t ₈ 6 RF DNA (10 μ g/10 ⁶ cells)	1.7 $\pm$ 0.1	1.7	2.0
	4.5 JM ⁻² 紫外线 4.5 JM ⁻² UV	1.9 $\pm$ 0.2	1.9	2.3
RL5 E	对照(模拟转染处理, 但无 DNA) Control (mimic of transfection treatment, without DNA)	1.1 $\pm$ 0.2		
	受紫外线照射的 SV ₄₀ DNA (15 μ g/10 ⁶ 细胞) UV-irradiated SV ₄₀ DNA (15 μ g/10 ⁶ cells)	2.0 $\pm$ 0.2	1.9	2.2
	未受照射的 SV ₄₀ DNA (15 μ g/10 ⁶ 细胞) Unirradiated SV ₄₀ DNA (15 μ g/10 ⁶ cells)	1.1 $\pm$ 0.1	1.0	1.1
	受紫外线照射的 H-1t ₈ 6 RF DNA (10 μ g/10 ⁶ 细胞) UV-irradiated H-1t ₈ 6 RF DNA (10 μ g/10 ⁶ cells)	2.1 $\pm$ 0.2	2.0	2.1
	4.5 JM ⁻² 紫外线 4.5 JM ⁻² UV	2.2 $\pm$ 0.2	2.0	2.5

(a) 表中所示数值至少为三个独立实验的平均值(附标准误差), (b) DNA 转染或紫外线直接照射细胞均在探针病毒 H-1t₈6 感染前 15 小时进行(c) H-1t₈6 受 85 JM⁻² 紫外线的辐照^[6]

(a) The data indicated are the averages of at least 3 independent experiments, given with standard deviations.

(2) DNA transfection or UV-irradiation was carried out 15 hrs prior to virus infection.

(3) The UV-dose given to H-1t₈6 was 85 Jm⁻².

后, 即使完整的病毒颗粒的存活率也极低($<10^{-7}$), 所以不会因导入同源的 H-1t₈6 DNA 而干扰 H-1t₈6 的空斑分析结果。

2. 间接诱导的动力学过程和蛋白合成抑制剂的影响

如图 1 所示, 与直接诱导作用一样, 间接诱导作用也先随诱导处理和探针病毒感染间的时间增加而增加, 到 15 小时左右到最大值, 以后又逐步下降, 到 30 小时后消失。

若在整个诱导过程中在培养液中加入蛋白合成抑制剂放线菌酮, 则诱导效应被抑制(表 2)

3. 间接诱导的剂量效应

如图 2 所示, 随着转染受一定剂量紫外线照射的 DNA 量的增加, 或随着照射一定量的 DNA

表 2 放线菌酮(CH)对间接诱导效应的抑制

Table 2. Inhibitory effect of cycloheximide(CH) on ER and EM

细胞 Cells	诱导处理 (a) Inducing treatment	ER		EM	
		- CH	+ CH ^(b)	- CH	+ CH ^(b)
NB-E	受紫外线照射的 SV ₄₀ DNA (15 µg/10 ⁶ 细胞) UV-irradiated SV ₄₀ DNA (15 µg/10 ⁶ cells)	1.8	1.0	2.1	0.9
	4.5 Jm ⁻² 紫外线 4.5 Jm ⁻² UV-irradiation	1.9	1.1	2.3	1.1
RL 5 E	受紫外线照射的 SV ₄₀ DNA (15 µg/10 ⁶ 细胞) UV-irradiated SV ₄₀ DNA (15 µg/10 ⁶ cells)	1.8	1.1	2.2	1.0

(a) 诱导处理在病毒感染前 15 小时进行, 照射 SV₄₀ DNA 的紫外线剂量是 2000 Jm⁻²

(b) 在整个诱导的 15 小时内在培养剂中存在放线菌酮, 浓度为 5 µg/ml(NB-E) 或 7.5 µg/ml(RL 5 E), 该浓度不影响细胞本身的存活。

(a) The cells were induced 15 hrs prior to virus infection. The UV-dose given to SV₄₀ DNA was 2000 Jm⁻².

(2) The concentrations of CH in media during induction were 5 µg/ml for NB-E and 7.5 µg/ml for RL 5 E, respectively, which did not affect the cell survival.

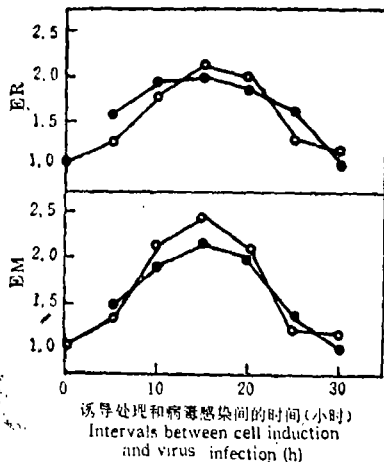


图 1 ER 和 EM 的动力学过程, ○直接照射 RL5 E 细胞的紫外线剂量是 4.5 Jm⁻²; ●被转染的 DNA 是受 2000 Jm⁻² 照射的 SV₄₀ DNA, 剂量为 15 µg/10⁶ 细胞。

Fig 1. Kinetics of ER and EM. The UV-doses given to RL 5 E cells and SV₄₀ DNA were 4.5 Jm⁻²(○) and 2000 Jm⁻², respectively. The amount of SV₄₀ DNA used was 15 µg/10⁶ cells(●)

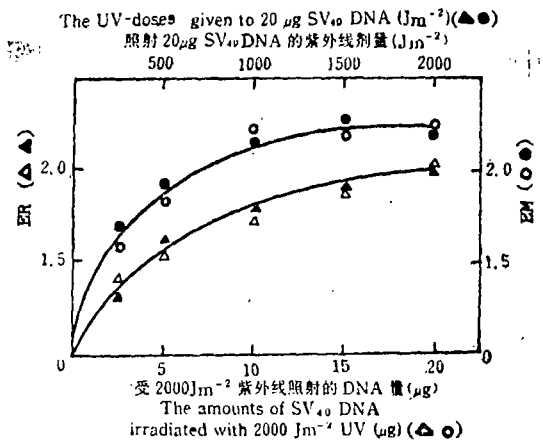


图 2 受紫外线照射的 SV₄₀ DNA 在 RL 5 E 细胞里诱导的 ER (△△) 与 EM (○, ●) 的剂量效应曲线。

DNA 转染与探针病毒感染间的时间为 15 小时。

Fig 2. The dose response curves of ER(△, △) and EM(○, ●) induced by UV-irradiated SV₄₀ DNA in RL 5 E cells.

DNA was transfected 15 hrs prior to virus infection.

的紫外线剂量的增加, ER 和 EM 的值都上升, 直到一饱和值。这与直接诱导的剂量效应相似, 不同之处在于用 DNA 毒剂直接处理细胞, 剂量太大时诱导效率反而下降, 因为此时的细胞毒性过大^[14], 而在间接诱导的情况, 这种影响较小。

4. 受紫外线照射的 SV₄₀ t.A DNA 的诱导作用

野生型 SV₄₀ DNA 和 H-1t.6 DNA 在人和大鼠细胞里都能起始 DNA 复制^[15], 而 SV₄₀ t.A 温

度敏感早期突变体在限制性温度(41℃)由于不能合成复制起始所必需的T抗原,所以不能起始DNA复制^[16],如图3所示,受紫外线照射的SV₄₀t_sA DNA也能有效地诱导ER,而未照射SV₄₀t_sA DNA却无诱导功能。

讨 论

实验结果表明,用转染方法向人或大鼠细胞导入带紫外线损伤的同源(H-1t_s6)或异源(SV₄₀)DNA,能象用紫外线直接照射细胞一样,诱导作为探针的H-1t_s6的ER与EM。由于H-1是一种单链线状DNA病毒,病毒DNA上的阻遏性损伤(如嘧啶二聚体)在病毒DNA复制前不能被细胞固有的DNA修复功能(如切除修复等)除去,所以受损病毒的存活和突变的增加能明确地指示细胞中诱发的易错性后复制修复功能。初步实验结果虽然未能揭示诱导信号的分子本质,但至少可得出下列结论:(1)导入带紫外线损伤的DNA能如直接照射细胞一样诱导ER与EM。两种诱导处

理具有相似的动力学过程,被蛋白合成抑制剂所抑制,而且,若将两种处理同时施加于同一细胞,ER与EM的值并不比单独处理时大(结果未示),说明两种处理诱导的是同一种可饱和过程。那么,诱导信号并不产生于DNA损伤剂直接“击中”细胞中特定的靶。(2)由剂量效应曲线(见图2、3)可见,ER与EM值随着引入细胞的DNA损伤量的增加而增加,且不论这种增加是由于带一定量损伤的DNA量或是一定量DNA上的损伤量的增加,直到一饱和值。再者,4.5 Jm⁻²的紫外线可在每细胞基因组中造成约 5.8×10^5 个含胸腺嘧啶的二聚体;表1中所采用的受紫外线辐照的SV₄₀和H-1t_s6 DNA也能通过转染向每细胞引入相同数量级的二聚体^[17,18]。显见,细胞内存在的DNA损伤的量,不管它们是以何种方式造成的,对于诱导起始有重要意义。(3)原核细胞中强调DNA复制的抑制在诱导起始中的重要作用^[19],真核细胞中情况若何?图3表示,在限制性温度下不能起始复制的受紫外线辐照的SV₄₀t_sA DNA,只要有足够的量,同样能诱导ER;说明DNA复制的抑制并非诱导信号的必要组成部份,虽然此结果并不排除DNA复制的抑制的诱导作用。这与Rommelaere等的实验结果是一致的:当受紫外线照射的细胞被同步于G₀期,仍能诱导易错修复功能^[8]。

所以,哺乳类细胞中的易错修复功能与细菌中的SOS功能虽然不乏相似的表型^[3,4],但亦不完全一致。导入细胞内的DNA损伤如何进一步激活易错修复功能?虽然根据原核细胞中的SOS模式可作出种种假设,例如DNA损伤修复过程中产生的中间形式以及降解产物可能参与诱导信号的形成等,但要阐明诱导信号的本质及其传递过程,尚需从细胞分子生物学角度进一步探索。

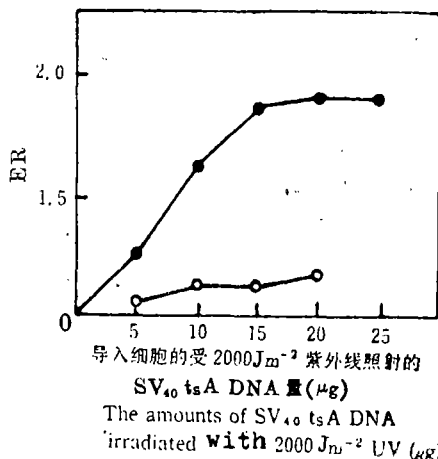


图3 受紫外线照射的SV₄₀t_sA DNA诱导的ER的剂量效应关系,照射的(●)与未照射的(○)SV₄₀t_sA DNA在探针病毒感染前15小时导入RL5E细胞,在整个诱导过程中细胞在41℃下培养。

Fig 3. The dose response curves of ER induced by SV 40 t_sA DNA irradiated (●) or not (○) with UV.

The viral DNA was transfected 15 hrs prior to virus infection. The cells were cultured at 41℃ during induction.

参 考 文 献

- [1] E. M. Witkin, *Bacteriol Res.*, 40, 869 (1976).
[2] J. W. Little, and D. W. Nount, *Cell.*, 29, 11 (1982).
[3] M. Radman, *Photochem. Photobiol.*, 32, 823 (1980).
[4] A. Sarasin, and P. C. Hanawalts, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 75, 346 (1978).
[5] Z. Z. Su, B. Avalose, J-M. Vos, J. J. Cornelis, and Rommelaere, *Mutat. Res.*, 149, 1(1985).
[6] 苏兆众, 罗祖玉, 胡蓓华, *生物化学及生物物理进展*, 67, 47 (1986).
[7] 苏兆众, 罗祖玉, 郭兰萍, *辐射研究与辐射工艺学报*, 4, 54 (1986).
[8] J. Rommelaere, et al., *Photochem. Photobiol.*, 33, 845 (1981).
[9] J. M. Shein, and J. F. Enderc, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 109, 495(1962).
[10] H. Bomford, and I. B. Weinstein, *J. Natl. Cancer Inst.*, 49, 397 (1972).
[11] S. L. Rhode, *J. Virol.*, 17, 659 (1976).
[12] B. Hirt, *J. Mol. Biol.*, 26, 366 (1967).
[13] A. J. van der Ed and F. L. Graham, *Method in Enzymology*, 65, 826 (1980).
[14] Z. Z. Su, J. J. Cornelis, J. Rommelaere, *Carcinogenesis*, 2, 1039 (1981).
[15] W. C. Topp, et al, in "The Molecular Biology of Tumor Viruses" (Tooze et al eds.) 2nd edition, CSH, 205 (1980).
[16] A. Weissbach, *Ann. Rev. Biochem.*, 46, 28 (1977).
[17] P. Tattersall, *J. Virol.*, 10, 586(1972).
[18] S. Uohida, K. Yoshika, S. Watanabe, and A. Furono, *Virology*, 34, 1 (1968).
[19] S. Casaregda, R. D'Ari, and O. Huisman, *Mol. Gen. Gent.*, 185, 440 (1982).

稿件收到日期: 1987年5月15日

THE PRELIMINARY STUDY ON THE INDUCTORY SIGNAL TRIGGERING THE ERROR-PRONE DNA REPAIR FUNCTION IN MAMMALIAN CELLS

Su Zaozhong and Luo Zuyu
(Fudan University, Shanghai)

ABSTRACT The nature of the signal triggering error-prone DNA repair function in mammalian cells was studied from two notions: 1) Does the inducing signal result from the direct hitting the cellular targets by DNA-damaging agents? 2) Is inhibition of DNA replication a prerequisite condition for the triggering effect? Thus, the ultraviolet (UV)-irradiated exogenous DNAs were introduced into human and rat cells by transfection. The results showed that this transfection was able to induce the error-prone repair as efficient as direct UV-irradiation to cells. Moreover, the two inductive treatments expressed similar kinetics and dose-responses. No matter whether the introduced DNAs initiated replication, they exhibited the inductive activity. Therefore, it can be considered that DNA lesions itself, not the direct interaction of DNA-damaging agents with specific cellular targets, serve as a triggering signal for the inductive process. Inhibition of DNA replication is not a prerequisite for the inductive signal.

KEY WORDS Error-prone DNA repair, Viral probe, Inducing signal