

哺乳动物细胞 DNA 修复研究中的 几个重要进展

夏 寿 萱

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

摘要 哺乳动物细胞 DNA 损伤修复的研究近年来已深入到基因水平并取得以下进展: (1) 长期以来人们将 DNA 看成是一个损伤和修复的均一单位, 这种观念现已被基因组内损伤的非随机分布和修复的不均一性所代替。这对于深入细致研究细胞突变、癌变、老化和死亡等过程具有重要理论意义, 对于阐明放射病发病机理和化学药物毒理也有指导作用; (2) 随着分子生物学技术发展, 哺乳动物和人的 DNA 修复基因的分离和克隆已成为可能。现已克隆出十几个修复基因, 推进了理论和实际应用研究, 但由于 DNA 修复系统十分复杂, 还有大量工作要做; (3) 基因转移技术已被有效地用于哺乳动物细胞 DNA 修复的深入研究, 在细胞工程上作出了重要贡献, 改变了受体细胞的遗传特性, 提高了细胞对物理化学损伤的修复能力。对 DNA 修复缺陷症的基因治疗已经提到议事日程。

关键词 DNA 损伤修复, 基因分离和克隆, 基因转移, 基因治疗

哺乳动物细胞 DNA 的损伤与修复的研究作为国际上重大课题之一近几年来已取得快速进展。这是由于这方面的研究不但关系到生命科学的基本理论, 而且在肿瘤、衰老、遗传性疾病、放射病和某些药物中毒等的防治上都有重要的实际意义。本文介绍这个领域的三个重要进展: 1. DNA 损伤和修复的不均一性; 2. 人 DNA 修复基因的克隆; 3. 基因转移技术在 DNA 修复研究中的应用。

DNA 损伤和修复的不均一性

长期以来人们将 DNA 看成是一个均一的单位, 在此基础上发生随机的损伤和修复。近年来随着限制性内切酶、特异性糖苷酶和糖基化酶的发现, 密度梯度离心、高分辨凝胶电泳、基因探针和核苷酸序列分析等技术的运用, 认识到 DNA 的损伤和修复都是不均一的和非随机的, 并且是按照一定的规律在细胞基因组内发生的。

1. DNA 损伤的非随机性

(1) 链断裂的非随机分布 由不同碱基构成的核苷酸对物理的或化学的致伤因子的敏感性不同, 邻位核苷酸对敏感性也有影响。DNA 链上在一定条件下产生的一些不稳定位点如酶敏感位点(ESS)、碱不稳定位点(ALS)和无嘌呤/无嘧啶位点(APS)等对链断裂也有影响, DNA 单链断裂(SSB)和双链断裂(DSB)的比值随着 DNA 分子中辐射能量的沉积量大小而发生变化。这些在一定条件下随着致伤因素的变化决定了链断裂在 DNA 链上的非随机分布。

用 Hae III 限制性内切酶切割 ϕ X 174 DNA 并用高分辨凝胶电泳进行分析, 可以证明 γ 线引起的 SSB 的分布是非随机的。除了 ALS 能引起链断裂外, 碱基本身的种类对 SSB 的位置也有较大影响, 在较低剂量 (<20 Gy) γ 线照射下断裂频率为 $G > A > T \geq C$, 而在较高剂量 (40—80 Gy)

下,断裂频率变为 $T > G > A \geq C$ ^[1]。同样,在 γ 线照射后DSB的分布也不是随机的^[2]。Chalton根据¹²⁵I参入DNA的实验,计算了DNA分子中能量沉积与SSB、DSB比值的关系。在50—100 eV时,SSB:DSB=9:1,随着能量沉积增加,DSB比例上升。在250—300 eV时SSB:DSB=1:2.75,当能量>450 eV时,DSB为SSB的56倍^[3]。

(2) DNA蛋白质交联体(DPC)的组分选择性 细胞受 γ 线照射后,用¹²⁵I-poly(A⁺)RNA为探针,可测得染色质DPC所含转录活性DNA比总体DNA的平均含量高数十倍,而UV所致的DPC中所含活性DNA要相对地少得多。在五种组蛋白中形成DPC的反应性也各不相同,其大小顺序是 $H_3 > H_4 > H_{2A} \gg H_{2B}$,而 H_1 不与DNA交联。用100 Gy γ 线照射HeLa细胞染色质,通过免疫化学方法可以证明DPC中活性高的非组蛋白多于活性低的非组蛋白。因此,在同一细胞的染色质中,基因组不同部位的DPC组分不尽相同,表明DNA和组蛋白,非组蛋白之间都有一定的相互选择^[4]。

(3) 嘧啶二聚体在DNA链上分布不均一 将人基因组DNA中的 α 序列用EcoRI酶切,获得92 bp长的片段,在500 J/m² UV照射后用藤黄微球菌(*M. luteus*)内切酶探测胸腺嘧啶二聚体(TT)位点,同时作DNA序列分析,证明TT发生频率依下列顺序递减:G-T-T-T-C-A > G-T-T-C-A > G-T-T-G,说明TT即使在重复顺序中分布也是不均一的^[5]。

(4) 染色体的脆性部位 一般认为基因组DNA是电离辐射的靶分子,进一步的问题是射线均匀地损伤整个基因组?还是有选择地损伤某些要害部位?已知DNA DSB与染色体畸变有关,那末染色体畸变位点的分布可为靶分子的要害部位提供信息。Radford等^[6]用人周围血淋巴细胞作为模型,将X射线诱发的2278个常染色体断裂点按照巴黎会议制定的人类细胞遗传学标准分带,观察到这些断裂点在染色体内的分布是非随机的,在浅G带中断裂点最多。

人染色体中有四类不稳定部位或不稳定的DNA序列:普通脆性部位(c-fra)、可遗传的脆性部位(h-fra)、原癌基因(c-onc)和肿瘤特异断裂点(tsb)。X线照射后,染色体浅带中c-fra部位和/或c-onc的断裂点比深带和可变带中的相应不稳定序列多得多。h-fra似与断裂无关,tsb只在某些特定细胞中与染色体断裂频率有关。在这方面令人感兴趣的是与淋巴瘤发病有关的原癌基因,如c-abl(9 q 34), bcl-1(11 q 13), C-myc(8 q 24),特别是blym-1(1 q 32)等都对辐射高度敏感^[8]。

2. DNA修复的不均一性

八十年代以来,Hanawalt^[7,8]等用他们设计的在基因组中测定TT分布的方法发现了DNA修复的不均一性,揭示了一些过去未被认识的新现象。

(1) 活性基因中DNA的选择性修复 在基因组中活性基因的损伤往往得到优先修复,例如CHO细胞受20 J/m²UV照射后24小时,二氢叶酸还原酶(DHFR)活性基因中TT清除率可达70%,而此基因的上游30 kb顺序中的TT清除率只有10%,整个基因组的TT清除率为16%^[9]。

(2) 链特异性的DNA修复 活性基因中DNA修复有链特异性,转录链的DNA修复远远高于非转录链,例如上述DHFR活性基因转录链24小时的TT清除率可高达89%,而非转录链的同期清除率要低得多^[8]。

(3) 原癌基因中的DNA修复 在UV照射的小鼠3T3成纤维细胞中有转录活性的c-abl基因和无转录活性的c-mos基因起初含有相似的TT数,但在24小时后,前者清除了85%的TT,而后者只清除了10%—20%^[10,11]。

(4) 化学损伤后的DNA修复 许多化学致癌剂常与染色质DNA交联形成加合物,不同致

癌剂所致损伤的修复频率不同。

3. 生物学意义

基因组 DNA 内的选择性损伤对诱发突变、癌变、加速老化和引起细胞死亡等过程具有重要意义。上述染色体脆性部位的选择性损伤正是点突变、染色体突变和基因组突变的分子基础,也是引起癌基因激活和异常表达的重要原因。在老化过程中 DNA 结构与功能也发生一系列变化,这些选择性变化导致细胞的基因调控失常,老化过程加速,直至启动导致死亡的基因程序。放射病的发病机理和化学中毒毒理也与此有关。

从这里可以清楚地看到针对这些损伤进行选择修复的重要性。它使我们能够:(1)更细致地研究转录、复制和修复三者之间的关系;(2)更好地理解某些细胞或某些区域 DNA 损伤的选择性修复在防止衰老中的重要性;(3)更准确地理解 DNA 修复缺陷症的分子基础;(4)更有利于研究原癌基因的钝化、修复与激活,探讨肿瘤的发生、发展和抑制的机制;(5)更有助于从修复基因与化学药物的选择性结合上去筛选抗癌药物。

人 DNA 修复基因的克隆

DNA 修复系统非常复杂,参与这个过程的酶、蛋白复合物和遗传控制位点很多,进行修复基因的克隆是探讨 DNA 修复机理和进行生物工程研究的重要步骤。虽然在原核生物中已有一些与 DNA 修复有关的基因被克隆,但在哺乳动物细胞中由于基因组庞大,结构复杂,对调控机制了解得很少,DNA 修复基因的分离和克隆十分困难,进展不大,人的 DNA 修复基因的研究更是如此。

近几年来随着基因转移技术的发展和许多哺乳动物细胞修复缺陷株的建立,使人们得以进行人 DNA 修复基因的克隆和特性研究。1983 年加拿大 Rubin 等^[12]用 HeLa 细胞 DNA 转染 UV 敏感的 CHO 细胞突变株,得到抗 UV 的转化细胞,从中分离并克隆出第一个人的 DNA 切除修复基因。紧接着,荷兰 Westerveld 等^[13]也用 DNA 介导的基因转移分离出另一个切除修复基因 ERCC-1。现已克隆出 ERCC-2 至 ERCC-6 多个切除修复基因。此外,另外一些实验室还克隆出能减少 X 射线所致 SSB 的基因 XRCC-1,与复制修复有关的基因 pRR,与控制姊妹染色单体交换(SCE)有关的基因等^[14,15]。在修复 DNA 烷化损伤方面,1989 年日本已克隆出有适应性修复功能的基因(相当于大肠杆菌的 ada 基因)。Tanaka 等^[16]将小鼠胚胎 DNA 转入 XP 20 S(SV)细胞,分离出含与人修复基因同源顺序能纠正人 XP-A 缺陷的基因,但对 XP-C, D, F, G 等均无效。Arrand 等有^[17]从仓鼠中分离出一般 11.5 kb 的 HD-2 基因,能与 XP-D 互补,但不能与 XP-A 互补。在仓鼠和小鼠的 UV 敏感细胞株中有 8 个互补组,其中没有一个与人的 XP 细胞互补组重叠,仓鼠的 1, 2, 3 和 6 互补组能与人类基因 ERCC 1,2,3,6 交叉互补,迄今尚未见到一个 ERCC 基因能与 XP 互补。这些严格的互补性和对不同种类射线有不同的反应,限制着这些已分离的切除修复基因的应用。单单切除修复基因一类即如此复杂,其它类型的修复还有多种,所以在 DNA 修复基因的分离、鉴定、克隆等方面,还有大量工作要做。

用基因转移技术研究 DNA 修复

基因转移法是用物理的、化学的、或生物的手段将外源基因导入受体细胞并使之表达的一种技术。这个技术已被有效地用于 DNA 修复的研究,在上述人类 DNA 修复基因的确认和克隆中此技术已经起了重要作用,在用生物工程方法纠正细胞 DNA 的修复缺陷时,其重要性更不能低

估。目前采用的途径有三条:

1. 将原核细胞的DNA修复基因转入人细胞并使之表达,这方面直接成功的例子不多。但如将原核基因加以改造,前面接上一段真核基因的启动子,必要时融合一段使蛋白质进入细胞核的信号序列,则外源基因较易被受体细胞接受而表达。美国和日本的科学家成功地将改造后的大肠杆菌ada基因导入HeLaMR(Mer⁻)细胞,使O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶(O⁶-MT)基因得到表达,提高了对烷化剂ACNU的抗性^[18,19]。在此基础上日本最近又成功地将改造后的ada基因导入整体小鼠,使实验从细胞水平进入到转基因小鼠(Transgenic mice)的整体水平^[20]。

2. 将克隆出的人修复基因转入人细胞,这条途径较为理想,目前在纠正某些单基因缺失的细胞损伤时多采用此技术途径,这也是下面讨论的基因治疗的基础。

3. 通过DNA介导的基因转移(DNA mediated gene transfer)将含有修复基因的大分子DNA导入受体细胞以恢复其DNA修复功能。在这方面成功和失败的例子都有^[21-23]。我们成功地将人HeLa S3 DNA导入DNA修复缺陷的人着色性干皮病细胞XP-20S(SV40),在较大程度上纠正了受体细胞的基因缺陷,稳定地提高了对UV的抗性。通过限制性酶切,证明切除修复基因在Bgl I或Xho I的酶切片段之间。同时也将人HeLa S3 DNA导入O⁶-MT修复酶缺失的大鼠腹水肝癌JTC-2细胞很大程度地纠正了受体细胞的基因缺陷,提高了对烷化剂ACNU和MNNG的抗性,AIU探针的分子杂交证实人基因确已植入^[24-26]。目前在许多修复基因没有被分离克隆及其调控顺序没有弄清之前,这是一条可行的途径。

基因治疗在国外已被提到议事日程,在目前准备治疗的候选病种中Lesch-Nyhan综合症(编码次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶HGPRT的基因缺失)、重度免疫缺陷症(T细胞编码嘌呤核苷磷酸化酶PNP的基因缺失)和重度联合免疫缺陷症(B、T细胞编码腺苷脱氨酶ADA的基因缺失)都属于单基因缺失的DNA修复缺陷症^[27,28]。在这几种候选病种中目前以对重度联合免疫缺陷症的呼声最高,研究的进展也最快。治疗的技术途径是基因转移。

Kantoff等^[29]将人ADA基因构建于脱毒的重组逆转录病毒载体SAX中,导入猕猴骨髓细胞后输入经10 Gy ⁶⁰Co γ线全身照射过的猕猴体内,在6只猴中有4只可用Southern印迹法和ADA活性测定证明ADA基因已经植入,但酶活性表达不高,起不了治疗作用。最近美、意、荷等国的科学家报告^[30,31]ADA基因转入骨髓细胞后的长时间体外培养和稳定高效表达已取得很大进展,下一步即将开始临床上的正式基因治疗^[32,33]。相信在这些重点项目的带动下,在DNA修复基因的克隆,基因载体的构建,基因转移效率的提高,基因定向整合,基因稳定表达,以及随后的遗传学后果和安全性等方面的研究必将有更快的发展。

参 考 文 献

- [1] A. A. Duplae & R. Teoule, Int. J. Radiat. Biol., 48, 19 (1985).
- [2] K. F. Baverstock, ibid, 47, 369 (1985).
- [3] D. E. Chalton, in "DNA Damage by Auger Emitters" (K. E. Baverstock Ed.), Taylor & Francis, London, 1988, p. 89.
- [4] N. C. Oleinick, in "Mechanisms of DNA Damage and Repair" (M. G. Simic ed.), Plenum Press, NY, 1986, p. 181.
- [5] E. C. Friedberg, DNA Repair, a Laboratory Manual of Research Procedure, V. 2, Plenum Press, NY, 1983, p. 187.
- [6] I. R. Radford, G. S. Hodgson and J. P. Matthews, Int. J. Radiat. Biol., 54, 63 (1988).
- [7] V. A. Bohr & P. C. Hanawalt, Pharmac. Ther., 38, 305 (1988).
- [8] P. C. Hanawalt in "Radiation Biological Effects, Modifiers", Proc. ICBER, Hangzhou 1988 p. 266.
- [9] V. A. Bohr, C. A. Smith, D. S. Okumoto, and P. C. Hanawalt, Cell, 40, 359 (1985).

- [10] V. A. Bohr, D. H. Phillips and P. C. Hanawalt, *Cancer Res.*, 47, 6426 (1987).
- [11] H. D. Madhani, V. A. Bohr and P. C. Hanawalt, *Cell*, 45, 417 (1986).
- [12] J. S. Rubin, A. L. Joyner, A. Bernstein and G. F. Whitmore, *Nature*, 310, 424 (1984).
- [13] A. Westerveld, J. H. J. Hoeijmakers, M. van Duim and D. Bootsma, *Nature*, 310, 424 (1984).
- [14] I. J. Spiro, L. R. Barrows, K. A. Kemody and C. C. Ling, *Radiat. Res.*, 108, 146 (1986).
- [15] 周平坤, 国外医学分子生物学分册, 11(5), 232 (1989).
- [16] K. Tanaka, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86 (14), 5512(1989).
- [17] J. E. Arrand, N. M. Bone and R. T. Johnson, *ibid.*, 86(18), 6997(1989).
- [18] L. Sanson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 5607(1986).
- [19] K. Ishizaki, T. Tsujimura and M. Ikenaga, *Mutat. Res.*, 184, 121(1987).
- [20] S. Matsukuma, Y. Nakatsuru, K. Nakagawa, M. Sekiguchi and T. Ishikawa, *Mutat. Res.*, 218, 197(1989).
- [21] A. R. Lehman, *Mutat. Res.*, 150, 61(1985).
- [22] H. L. Green, *J. Cell Sci, Suppl.* 6, 127 (1987).
- [23] A. Matsumoto & Y. Fujiwara, in "Radiation Research, Proc. 8th ICRR" Edinburg, 1987, p. 110.
- [24] 章杨培, 夏寿萱, 白晓彬, 范国才, *科学通报*, (10), 789(1989).
- [25] 章杨培, 白晓彬, 陈月能, 徐惠英, 范国才, 夏寿萱, *辐射研究与辐射工艺学报*, 7(4), 25(1989).
- [26] 章杨培, 白晓彬, 范国才, 陈月能, 徐惠英, 吴英, 夏寿萱, *生物化学杂志*, 6(1), 23(1990).
- [27] R. C. Willis, D. J. Jolly, A. D. Miller and T. Friedmann, *J. Biol. Chem.*, 259, 7842(1984).
- [28] R. Scott McIvor, *Molec. Cell Biol.*, 7, 838 (1987).
- [29] R. W. Kantoff, A. P. Gillio, J. R. McLachlin and W. F. Anderson, *J. Exp. Med.*, 166, 219(1987).
- [30] B. Lim, J. F. Apperley, S. H. Orkin and D. A. Williams, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 8892 (1989).
- [31] C. Bordignon, S. F. Yu and C. A. Smith, *ibid.*, 86, 6748(1989).
- [32] B. J. Culliton, *Science*, 246 (4931), 751 (1989).
- [33] D. Gershon, *Nature*, 344 (6261), 2 (1990).

(稿件收到日期: 1990年8月16日)

SOME IMPORTANT ADVANCES IN DNA REPAIR STUDY ON THE MAMMALIAN CELLS

Xia Shouxuan

(Institute of Radiation Medicine Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

ABSTRACT In the recent years the study of DNA damage and repair in the mammalian cells has gone deeply at gene level and got the following advances: (1) For a long time DNA has been considered to be an uniform unit in case of damage and repair. Now this concept should be replaced by the non-random distribution of damage and heterogenous repair in the genome. These would allow us to study cellular mutagenesis, carcinogenesis, aging and dying processes in great detail, and would be beneficial to the elucidation of mechanisms of radiation sickness and chemical toxicology. (2) The advent of new techniques in molecular biology has made it possible to isolate and clone the human DNA repair genes. Up to now more than ten human DNA repair genes have been cloned and these works would have an important impact on the theoretical and practical study in this field. Because DNA repair system is very complicate, voluminous work should be done in the future. (3) The technique of gene transfer has been efficiently used in the study of DNA repair in mammalian cells and has made great contribution in the cellular engineering. It could modify the genetic behavior of the gene-accepting cells, and enhance the DNA repair ability to physical and chemical damages. Human gene therapy for DNA deficient diseases is now on the day.

KEYWORDS DNA damage and repair, Gene isolation and cloning, Gene transfer, Gene therapy