

致突 致畸 致癌的分子生物学基础

复旦大学生物系 罗祖玉 苏兆众综述

军事医学科学院 夏寿莹审校

导 言

多年前,人们已经知道噬菌体是探讨原核生物的DNA修复、致突及有关过程的理想遗传学探针。在真核细胞领域里, Lytle等^[1~3]首次用紫外线照射过的疱疹病毒(HSV)监察人成纤维细胞的DNA修复。至今,用于探讨哺乳动物细胞DNA修复调节与致突过程的病毒有猿猴病毒40(SV₄₀)^[4,9,10]、腺病毒(Adv)^[2]、HSV^[5]及微小病毒(PV)^[6,8,24],它们都在细胞核内增殖,是DNA病毒。

很多种物理化学因素可以阻断E.coli的DNA复制,从而诱导出一系列适应性功能,诸如前噬菌体诱导、诱导性噬菌体复活,致突及细菌丝状化等等。近十年来,人们观察到改变哺乳动物细胞正常DNA结构或代谢途径的各种物理化学因素可以诱导哺乳动物细胞内的原病毒,提高细胞转化能力,有效地增加在细胞核内复制的受损病毒的存活(Enhanced Reactivation, ER)以及提高存活病毒子代的突变频率(Enhanced Mutagenesis, EM)。

虽则哺乳动物细胞的DNA结构及复制形式比原核细胞的复杂,但两者的DNA复制仍可以比较^[9~11]。可以推测,在哺乳动物细胞中存在一种诱导性的、具有错误倾向的(error-prone)DNA修复过程,它与E.coli的SOS修复相似。这一过程可以作为ER与EM的分子机制,也可以作为辐射或致癌剂致突、致畸、致细胞转化(或致癌)的基础。

原核生物与真核生物的增变活性

很多化合物对细菌及培养细胞是致突剂,而对动物则是致癌剂。如硝基呋喃衍生物是DNA合成的抑制剂,它可以诱导E.coli的错误修复过程,并可以增加细胞内受UV照射过的病毒的存活率^[12~14]。

当用病毒探针研究原核及真核细胞中DNA修复与致突时,发现有很多可以类比的现象。然而,有一点是不同的:正常细菌使受损噬菌体子代致突增加甚微。除自发突变以外,用UV照射噬菌体本身不能得到附加的突变体。只有在处理宿主细菌使其发生SOS修复的条件下,致突才明显地增加。反之,用哺乳动物细胞当宿主,仅双链DNA病毒本身受照射就足以增加病毒致突。其可能原因是:在哺乳动物细胞中存在一种使病毒UV致突的,固有的致突能力,或是将受UV照射过的病毒引入细胞就足以间接地诱导一种错误修复系统,或是两者并存。

为了明确触发哺乳动物细胞错误修复过程的性质,在探针病毒感染以前用另一种病毒感染完整的细胞,结果表明它与UV或化学物质处理是等效的^[8]。不仅仅以UV处理过的病毒超数感染细胞可以触发增变活性(Mutator activity),而且以UV处理过的SV₄₀DNA、变性小牛胸腺DNA转染(transfection)也可以触发增变活性。

至少有两种相互独立的途径在正常病毒与受UV损伤的病毒复活中起作用。因此,比较完整病毒和受损伤病毒的致突是有意义的。

Witkin^[16]首先提出非靶型突变 (untargeted mutagenesis) 描述模板上半保留复制合成时发生在DNA完整部位的突变, 而靶型突变 (targeted mutagenesis) 描述在受损伤DNA部位的突变。完整病毒的突变主要是非靶型突变, 而受损伤病毒的突变可能是靶型突变或非靶型突变。

遗传探针

噬菌体被成功地用于研究细菌中基因表达的控制。有关DNA修复的许多过程, 诸如: 溶原诱导, 宿主细胞复活, UV复活以及UV致突等均已明确。那么, 在哺乳动物细胞中有相似的机能吗? 它们是如何调节的? 人们利用哺乳动物细胞病毒系统作为遗传探针, 为揭开上述问题提供了极大的方便。

大部分在细胞核内生长的病毒, 其DNA代谢途径与细胞DNA代谢途径基本上相同, 因而在细胞DNA中所进行的过程可以在病毒DNA上得到反映。例如, 以受损伤的DNA病毒感染细胞, 病毒的存活数表征宿主细胞修复DNA损伤的能力; 如在病毒感染以前以各种物理化学因素处理细胞, 则病毒存活及突变显示所诱导出来的修复途径的特征。重要的是, 因为错误修复过程同时作用于细胞DNA与病毒DNA, 因而测试病毒基因的突变频率可以知道哺乳动物细胞的错误修复。

以病毒作为探针具有许多优点。除病毒基因组简单, 贮存稳定, 增殖周期短, 各种突变体易于选择等优点外, 它最大的潜在优点是可以将病毒所受到处理后的损伤效应与细胞受处理后所诱导的潜在效应区分开来。因此, 受损伤病毒的基因组可以靠细胞酶学机制来修复与复制, 或是完整病毒模板可以接受因DNA损伤物质所引起的细胞增变活性的作用。运用此技术可以探测活体内非靶型突变, 并可估量直接与间接作用在诱导致突总量中的比重。

SV₄₀早已广泛地用作遗传探针^[4,10]。其DNA核苷酸顺序及蛋白质合成均已搞清。其感染周期包括一系列早期机能、病

毒DNA合成及晚期机能。因为它的裂解周期需要宿主细胞的机构, 而且只有一种病毒蛋白质 (为始发DNA复制的T抗原), 证明了它自身是一个监测DNA修复途径的极好的探针。其它哺乳动物细胞病毒如HSV、腺病毒及微小病毒H-1等也被用来监测哺乳动物细胞的致突及有关的受损DNA修复的过程。H-1病毒DNA结构是: 线状单链DNA, 分子量 1.6×10^6 , 3'及5'端均有回纹结构的序列, 90~150个核苷酸, 可以摺回和自我退火^[17]。

Rhode^[18]筛选了几种H-1温度敏感型突变体, Cornelis等^[8]采用了H-1t_{5.6}。它在非许可温度下 (39.5℃), 由于缺乏后期功能而不能形成感染的病毒颗粒。

由于固有的细胞增变活性, t₅突变体回复到野生型的突变频率为 $10^{-8} \sim 10^{-6}$ 。回复突变的分子事件常常限制于某一特有的途径。在SV₄₀t₅中已证实回复子多数由碱基取代所致。

由于在细胞核内复制, 其DNA合成完全取决于宿主细胞的酶系。DNA多聚酶 α 的一种专一抑制剂aphidicolin几乎完全抑制病毒DNA复制, 利用它具有回复突变的特征, H-1t₅显示出它自身可以作为监察细胞致突活性的理想探针。特别是单链DNA结构适合于测试细胞内所诱导的错误修复过程。如亲代DNA带有损伤, 病毒单链复制子转化为双链复制形式 (RF) 可能反映“旁路”过程。此外, 微小病毒是一种溶源性病毒, 其感染力 (infectivity) 易于用单层细胞中形成空斑的能力测定。

值得提出的是, 毕竟病毒DNA是外源性的, 细胞DNA和病毒DNA之间存在着某些差别。例如, 病毒探针的基因组结构比宿主细胞的基因组简单得多, 而病毒DNA复制的速率较细胞DNA复制的速率快。然而, 虽则用病毒探得的细胞致突并不等价于它真正的数值, 但是利用病毒探针的优点却越来越多地吸引人们去应用它们。

增加致突

早已知道UV照射E.coli可以诱导细菌及

其噬菌体突变^[11,18]。254nmUV照射在DNA上形成T-T为主的二聚体,从而使结构变形,碱基对不能形成,阻断了正常DNA的复制。嘧啶二聚体可以通过光致复活而修复,它们是最初的致死及致突损伤。此外,在DNA中其它未知损伤也可以改变正常DNA的构型及其复制,所以也是致突的。

虽则只有少数例子直接证明致突与DNA损伤有因果关系,或至少它与DNA修复密切相关,因为两个过程均作为DNA受损的结果。在原核生物中,UV所诱导的致突被认为主要是受UV损伤的DNA的不正确修复的结果。Radman^[20~21]称它为SOS修复。

在哺乳动物细胞内有诱导性的错误修复过程吗?哺乳动物细胞的UV致突变是否也由于对DNA损伤起反应而诱导出来的一种错误修复过程?突变和DNA修复的关系怎样?因为它与体细胞致突及动物致癌紧密相关,人们对上述问题正在进行广泛的研究。

当采用哺乳动物细胞/病毒系统后,证明哺乳动物细胞有一种可诱导的修复机制。UV照射宿主细胞使双链DNA病毒复活及突变频率增加。用H-1t₆为遗传探针,在表象上也见到由于人细胞及鼠细胞受UV照射而诱导出一个错误修复的过程或增变活性。从研究它的动力学过程,对蛋白质合成的抑制以及DNA修复的关系可以进一步了解这一过程的机理。

业已报道^[8]H-1t₆在人肾细胞(NB-E)或大鼠肝细胞(RL5E)受UV处理后的EM现象,以4.5JM⁻²的UV剂量最佳。如照射后立即加7.5~10μg/ml的放线菌酮,则EM值回至1左右。而且受UV损伤病毒在受照射细胞中出现ER(其值为1.4~1.5)的条件、动力学过程以及对放线菌酮的敏感性也与EM现象相平行,说明这一过程的诱导性,暂时性。

在野生型E.coli及UVrA品系,UV所诱导的,分子量为4,000的recA蛋白质与错误修复系统密切相关。此种蛋白质90%在胞浆,10%在膜中。因而,新蛋白质合成可能对于

E.coli的SOS修复机能的诱导与哺乳动物细胞增变活性的诱导都是必要的^[24]。

EM和ER有协调现象。在细菌系统中,早已报道噬菌体的EM与ER相关。Summer^[28]等证明在UV照射过的猴肾细胞中UV处理的SV₄₀存活增加与病毒突变速率增高一致。Cornelis等^[4]证明猴肾细胞/SV₄₀系统,增变机能的时间过程与UV处理的SV₄₀的ER看来类同,错误修复过程可能诱导细胞增变活性。

比较哺乳动物细胞的诱导反应与细菌的SOS表达,可以假定,以DNA损伤因子触发的一种诱导性错误修复存在于细胞中。

致突触发讯号的性质

增变活性的触发讯号的性质是什么?有两点值得考虑:在哺乳动物细胞/病毒系统中,UV处理病毒的突变频率在完整细胞中高于完整病毒的突变频率,即UV照射病毒本身就是以增加病毒致突^[28]。在原核细胞中没有这一现象。这种EM是由于细胞固有的错误机制作用于受损病毒的DNA上或是UV处理病毒的引入可以使细胞诱导出一种增变活性。其二,细菌的SOS机制的“间接诱导”早已报道,那么细胞的增变活性可否因类同的“间接诱导”过程所触发?为此,实验用“触发”病毒即UV重度照射的病毒代替UV去处理细胞,过一段时间,再以作为探针的“靶”病毒H-1t₆感染。结果发现:EM为2,最适表达时间为“触发”病毒感染后14~18小时,是暂时的诱导,它依赖于新蛋白质的合成^[8]。如果改用UV-DNA或UV处理细胞,只要其二聚体的数量相近,均得到同样的结果。所以,UV造成的DNA损伤本身是一个讯号。

在哺乳动物细胞,一般概念是:DNA损伤——DNA合成受抑制——细胞拯救机构受触发——细胞的潜在性致死危险被克服。从UV照射细胞,UV处理过的病毒(H-1, MVM, SV₄₀)引入的二聚体数目相近,它们诱导出的增变活性相同,说明DNA损伤本身是形成细胞增变活性的诱导因子。

既然DNA复制抑制是诱导讯号,那么,在受损伤的模板上预定的DNA复制是否是诱导哺乳动物细胞错误修活性活的先决条件,Rommelaere^[6]等观察到照射加上进一步培育处于G₀期的细胞导致UVER活性的暂时性表达,提出诱导讯号可以在受损模板上缺少半保留复制的条件下发生。以UV-SV₄₀t₅A早期突变体代替UV-SV₄₀野生型,后者在非许可温度下可以始动流产的DNA复制,但前者因为T抗原编码的早期基因不能表达而不能开始DNA复制。UV-SV₄₀t₅A仍与野生型一样,EM值接近。致突的剂量依存关系也相似。只要有足够的DNA损伤引入,不论“触发”病毒是否开始复制,其诱导效率相同^{〔25〕}。

用化学诱变剂2-nitronaphthofuran衍生物R7000及R7160处理细胞,和UV一样,也可以诱生哺乳动物细胞的增变活性。在哺乳动物细胞中致突作用显示了微小病毒的ER及EM的双重诱导,说明了对化学物质造成的DNA损伤的反应中也存在一个诱导的错误修复途径。

直接致突与间接致突的比重

前面已经谈到,以损伤DNA的物理因素或化学物质或是UV处理过的外源性DNA处理细胞,其增变活性可能作用于完整的病毒引起间接的非靶型致突。这些诱导物质都是间接诱变剂。如果UV诱导直接突变与间接突变,怎样评价这两种形式在总致突作用中的相对贡献?

如在E.coli中,预料哺乳动物细胞的UV致突主要由于受UV损伤的DNA的复制或修复,即致突与DNA合成有关。人们采用UV处理的双链DNA病毒探讨哺乳动物细胞的VU致突,由于所用测试系统各异,所得结果不一。在猴细胞中UV-SV₄₀子代及在人细胞中腺病毒子代突变频率均按所给予病毒的UV剂量的平方增加。Lytle等报告HSV生长在着色性干皮病XP变异细胞中的前向突变呈剂量平方反应,

但HSV在正常的或经典的XP人成纤维细胞中突变与剂量成线性关系^{〔6〕}。这可能是修复系统的模式不同。双链DNA病毒的UV致突可以由于细胞固有的受损DNA复制的错误过程,或是受损病毒本身诱导出一种增变活性。

受UV照射过的H-1t₅6在受照射的或对照的人细胞中,其回复突变频率随着给予病毒的UV剂量的增加呈线性的、恒定的、适量的增加,因而提示UV可以引起哺乳动物细胞中病毒的致突有间接的也有直接的。

人们对于双链DNA病毒(例如HSV, SV₄₀, 腺病毒)的UV致突已有广泛的研究,其UV致突的剂量效应曲线是二次或部分二次的,机制是两次光子击中产生两种光产物,可能在对侧链形成致突前的构造。这两个独立的UV损伤与DNA复制或修复合成一起产生一个致突条件。

微小病毒致突的线性剂量效应曲线表明它直接由致突前UV损伤引起,一次击中引起这样一种损伤。二聚体形成单链DNA病毒的有效致死击中。在病毒基因组中一个二聚体就足以使它失活。UV怎样引起单链DNA病毒的直接突变?可能作这样的解释:①哺乳动物细胞可以改变二聚体的致死性;②哺乳动物细胞可能有固有的错误修活性,它们可以使DNA复制自发地通过二聚体,虽则频率不高;③二聚体以外的损伤是致突的,但对于UV处理的病毒不是致死的。在受照细胞中生长的UV处理的病毒的回复频率大于在完整细胞中生长的、且其效应曲线斜率略大于后者,说明诱生的细胞增变活性更倾向于作用在UV-DNA损伤部位,此部位修复时增加了更多的错误。但可以说,两者斜率的差别并不大。靶型致突与非靶型致突的相加特点提示这两条致突途径是相互独立的。

当病毒未受照射时,在UV处理的细胞中病毒突变频率与正常细胞中的突变频率比值表征UV处理细胞所增加的致突。致突至少包括三部分:①自发回复频率;②靶型突变,即在UV照射病毒所致的突变;③非靶型突变,即

细胞内诱导的增变活性所产生的病毒突变。如何评价②③在病毒UV致突总量的比重?显然,低UV剂量给予病毒时,大部分病毒突变可以是诱导的细胞增变活性而不是病毒DNA中致突前UV损伤所造成。例如,以 5JM^{-2} UV照射细胞就可以大大地增加回复突变,但是对于病毒基因组的直接突变却几乎察觉不到。当给予病毒的UV剂量增加时,靶型突变就越来越重要,因为非靶突变的部分几乎不变或略增加^(26~27)。

平时,人们从人为的高剂量数据外推来评价致突或致癌剂的毒性,上述分析则提出低剂量对人类会有更多的致突危险。

小 结

人或鼠类的培养细胞在某些损害DNA的理化因素处理后对于所感染的微小病毒有增变活性。该增变活性表达的研究提示有一个诱导的过程。虽则尚不能证实这种增变活性是由一个诱导的DNA错误修复过程所引起,但是提示了两者优先相关。

以UV或化学物质处理细胞,或以重度剂量的UV照过的病毒甚至UV-DNA转染细胞,所得的结果几乎相同,因而提出DNA损伤本身可以作为触发剂,而不是靶基因直接受射线击中。利用损伤DNA链作为模板的DNA合成看来并不是始发EM诱导的唯一的先决条件。

这种诱导的增变活性可以作用在DNA的完整部位及受损部位,而略为倾向于后者。在完整细胞及UV处理过的细胞中生长的UV照过的病毒的剂量效应曲线几乎平行提示固有的及诱导的增变活性都是基本的,但不是完全互相独立的。

UV辐照可以作为单链DNA病毒的直接及间接的诱变剂。线性的剂量效应关系提示一次击中足以形成一个致突事件。较低的UV剂量引起更多的间接诱导,换言之,此条件下,突变大部分由于诱导增变活性产生,而不是由于致突前损伤。随着病毒所受UV剂量的增加,直接致突越益突出,也可能掩盖间接作用。

如果这种诱导的增变活性是对于DNA损伤剂的一系列反应之一,它们受一般遗传途径所调节与控制,因此可以看作类似于细菌的“SOS”机能。如果它们作用于细胞基因组和病毒基因组,则将有利于进一步探索DNA错误修复,体细胞突变及肿瘤发生的内在联系。

微小病毒是探索细胞增变活性及有关DNA修复过程的有用探针。除一般探针病毒的优点外,最显著的是它可以避开宿主细胞固有的、无错误的(error-free)DNA修复系统,因而,对于致死及致突特别敏感。加之,它的核苷酸顺序已搞清,DNA的3'末端本身可以作为DNA引物,对于探索细胞遗传学及生化过程,无疑是一种极好的探针。

综上所述,在原核生物中,对诱导讯号生化性质的研究,外切酶正确阅读活性的抑制可以产生一种新的活性从而使DNA复制通过二聚物,这可能是一种致突事件,以及UV处理病毒存活看来与致突有关联。在真核生物中,人们也在注视几方面的问题:①诱导讯号的生化性质是什么?②使DNA复制得以通过二聚物的诱导多聚酶活力的性质是什么?③是否这种诱导途径是带有错误倾向的?它可以增加致突吗?它使肿瘤发生的机率增加或降低?细胞恶性转化是由于DNA损伤的存在或是error-prone式地通过DNA损伤点的结果?人们认为SOS功能在真核生物中的最重要的表达是致突诱导作用。目前知道致突与致癌有一个很好的关联,诱导性DNA修复过程的揭露将有助于人们更好地了解哺乳动物细胞的转化作用及致肿瘤的诱导作用。

参 考 文 献

1. Bockstahler LE et al, Biochem & Biophys Res Commun 41:184, 1970.
2. Bockstahler LE et al, Photochem Photobiol 25:477, 1973.
3. Bockstahler LE et al, J Virol 8:601, 1971.
4. Corneliers JJ et al, Mutation Res 82:1, 1981b.

5. Lytle CD, J Natl Cancer Inst Monogr 50: 145, 1978.
6. Rommelaere J et al, photochem photobiol 33:845, 1981.
7. Luo Zu Yu et al, Int J Radiat Biol 41: 119 1982.
8. Cornelis JJ et al, Proc Natl Acad sci USA 78:4480, 1981.
9. Devoret R, Biochimie 60:1135, 1978.
10. Sarasin A, Biochimie 60:1141, 1978.
11. Blanco M et al, Mutat Res 17:293, 1973.
12. Lytle CD et al, Nature 272:60, 1978.
13. Sarasin A et al, Proc Natl Acad Sci USA 75:346, 1978.
14. Su ZZ et al, Carcinogenesis 2:1039, 1981.
15. Witkin EM, Bacteriol Rev 40:869, 1976.
16. Sarasin A et al, Mutation Res 70:71, 1980.
17. Rhode SL, In Ward DC et al (eds) Replication of mammalian parvovirus, Cold Spring Harbor laboratory, New York, p. 279, 1978.
18. Rhode SL, J Virology 17:659, 1976.
19. Defais M et al, Mol Gen Genet 148:125, 1976.
20. Radman M, In "molecular and Environmental Aspects of Mutagenesis" (Edited by Prakash L et al) P. 128, Springfield, IL, 1974.
21. Radman M et al, In "Origins of Human Cancer" (Edited by Hiatt H et al) p. 903, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1977.
22. Lytle CD et al, Photochem Photobiol 29: 959, 1979.
23. Lytle CD et al, Mutat Res 70:139, 1980.
24. 罗祖玉, 中华放射医学与防护杂志, 63, 1981.
25. Cornelis JJ et al, Biochimie 64:677, 1982.
26. Rommelaere J et al, In Castellani A (ed) The use of human cells for the assessment of risk from physical and chemical agents, Plenum Press, New York (in press).
27. Cornelis JJ et al, The EMBO Journal 1:693, 1982.
28. Das Gupta UB et al, PNAS 75:2378, 1978.

乏氧细胞辐射增敏剂的辐射生物学研究概况

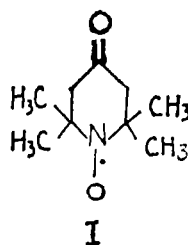
第二军医大学 刘楠综述 郑秀龙* 胡璧**审

一般认为肿瘤内约有10~20%的细胞处于乏氧状态,乏氧细胞的辐射敏感性只有有氧细胞的三分之一左右,因此有碍于放疗疗效的提高。如何增加肿瘤内乏氧细胞的辐射敏感性是多年来放射治疗学家和放射生物学家所共同关注的问题。自六十年代以来,相继发现了许多能够选择性地使乏氧细胞辐射增敏的药物,统称为乏氧细胞辐射增敏剂。

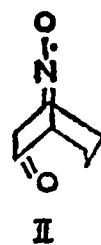
一、辐射增敏剂

最早,人们发现一些具有稳定游离基的氮

氧化物能使缺氧的细菌辐射敏感性增加^(1,2),不久在哺乳动物细胞也证实了这种增敏效应⁽³⁾。这类药物主要有三丙酮胺-氮氧化物(T-



TAN



NPPN