

多聚(ADP-核糖)在哺乳类细胞辐射反应中的作用

Ehud Ben-Hur; Int J Radiat Biol 46 (6): 659~671, 1984 (英文)

一、引言

ADP-核糖基转移酶(ADPRT)是高等真核细胞的染色质结合酶,它能催化烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺,即辅酶I),使之转变为多聚(ADP-核糖)。在此反应中,当ADP-核糖残基通过2''-1'核糖基——核糖配糖键相互连结时,NAD⁺的烟酰胺部分被释放出来。(ADP-核糖)多聚物在形成的最初阶段需要使多聚体与染色质蛋白(主要是组蛋白H1和ADPRT本身)作共价连接。ADP-核糖基化作用可能参与细胞分化和DNA修复。多聚(ADP-核糖)与化学致癌早期阶段也可能有关。

多聚(ADP-核糖)的合成与DNA修复有关这一结论是基于多方面观察结果得出的。一些能引起DNA断裂的因子可刺激ADPRT的活性,并使细胞内NAD⁺含量下降及多聚(ADP-核糖)增高。核内的ADPRT可被DNA单链断裂(SSB)和双链断裂(DSB)所激活。ADPRT活性能被烟酰胺及其类似物如苯酰胺衍生物可逆性地抑制。将这类抑制剂加入DNA损伤细胞可阻断NAD⁺的下降及抑制SSB的重接,从而使DNA损伤因子的细胞毒作用增强。在饮食中去除烟酰胺使NAD⁺水平下降可抑制烷化剂引起的SSB的重接。

多聚(ADP-核糖)参与DNA修复的有些证据来自对先天性DNA修复缺陷病人细胞的研究。例如,着色性干皮病(XP)细胞由于切除修复的起始阶段缺陷,对紫外线(u.v.)高度敏感,这种细胞在u.v.照射后不伴有ADPRT活性升高。在XP细胞中加入藤黄细球菌(*m. luteus*)中分离出的u.v.核酸内切酶,u.v.照射后ADPRT活性就增高3~4倍。此结果表明u.v.照射细胞在切除修复期中产生的SSB可使ADPRT激活。

ADPRT抑制剂可使电离辐射引起的大量DNA链断裂的重接减慢,但它对细胞杀伤的增强作用不明显或很微弱。作者初期的研究表明,人体淋巴细胞在γ线照射后的恢复有多聚(ADP-核糖)参与。在本文中,作者将他们对多聚(ADP-核糖)在哺乳类细胞电离辐射损伤修复中的作用的系统研究结果与他人工作一起进行评述。

二、多聚(ADP-核糖)在受照射细胞中的代谢

人们早已知道,X线照射后哺乳类细胞内NAD⁺池明显下降。对数生长期细胞的NAD⁺水平高于高坪期细胞,这种下降更为显著。最近才阐明NAD⁺的下降是由于照后即刻爆发了多聚(ADP-核糖)的合成。X线引起的DNA链断裂对ADPRT活性有刺激作用,这种作用是剂量依赖性的,大约在200Gy时达到饱和。在此剂量照射后,NAD⁺的利用率约20pmol/分/10⁵细胞,这种速率足以使细胞内NAD⁺总量在5分钟内全部耗尽,并产生相当细胞DNA量10%的多聚(ADP-核糖)。由于多聚物很快为糖水解酶降解,故实际上不会达到如此大量。照射后ADPRT活性升高的衰退也很快,其半寿命约3分钟。这一速率与SSB重接的快速时相的速率相似。X线引起的ADPRT活性升高的衰变依赖于NAD⁺,说明多聚(ADP-核糖)为DNA断链重接所必需。

ADPRT的抑制剂如3-氨基苯酰胺(3-ABA)可使重接过程和ADPRT活性衰变的速率均减慢。

高渗处理和D₂O可通过抑制潜在致死损伤(PLD)修复而增强辐射反应,也对ADPRT活性衰变的速率起抑制作用。这两种处理均加重X线照射细胞中NAD⁺的耗竭。D₂O并不抑制ADPRT活性,但使SSB重接减慢。D₂O的这种作用和对DSB重接可能类似的影响可解释它对ADPRT活性衰变速率的抑制作用(从而使NAD⁺耗竭加重)。值得注意的是DSB在体外刺激ADPRT活性的效率要比SSB高10倍左右。高渗处理似乎是使NAD⁺易于从细胞漏出,从而降低了多聚(ADP-核糖)合成时得到NAD⁺的可能性。

三、ADPRT抑制剂对辐射引起的细胞毒作用的影响

最初,ADPRT抑制剂被认为只能轻微地增强辐射的杀细胞作用,或根本无增强作用。在作者用人淋巴细胞作研究期间,发现烟酰胺在一狭窄浓度范围内(1mM左右)对辐射起保护作用。当淋巴细胞照后即

刻用丝裂原(各种植物凝集素)刺激分裂时,加入烟酰胺可使淋巴细胞静止并起保护作用。这种效应并非因1mM烟酰胺对ADPRT活性有轻度抑制作用,因为用强效ADPRT抑制剂3-ABA未见有保护。与此相反,3-ABA使人淋巴细胞的辐射反应增强。这一结果可作如下解释:静止淋巴细胞的 NAD^+ 水平比增殖细胞低许多倍,加入外源性烟酰胺可提高 NAD^+ 水平。可以认为,淋巴细胞中 NAD^+ 水平较低限制了多聚(ADP-核糖)的生物合成,成为DNA辐射损伤修复的速率限制因素。在培养中加烟酰胺可使细胞内 NAD^+ 池增大,较多的多聚(ADP-核糖)可在照后产生,从而使修复加强和抗性提高。如果多聚(ADP-核糖)的合成是修复率的限制因素,那么它的抑制剂3-ABA应能增强辐射反应,这与观察到的情况正好相符。

在ADPRT抑制剂未能增强哺乳类细胞对电离辐射反应的研究中,培养物在受照射至集落形成期间常处于低浓度抑制剂作用之下。如果是多聚(ADP-核糖)合成对链断裂的重接具有重要意义,那么只须在照后第1~2小时抑制其合成,即应对细胞的生存起不利影响。此外,对数生长期细胞从介质中摄取显著量的抑制剂约需10分钟,高坪期细胞则约需1小时。这种摄取速度还依赖于抑制剂的浓度。基于这些理由,作者决定对ADPRT抑制剂在辐射杀细胞作用中的地位作再研究,即用较高浓度的抑制剂处理较短的时间。他们发现,中国地鼠成纤维细胞在照后用5mM以上浓度的3-ABA和其它抑制剂处理1~2小时可显著增强辐射反应。在20~50mM以内,作用的强度依赖于抑制剂的浓度和作用时机(直至照后2~3小时)。化合物增强辐射反应的效率与其作为ADPRT抑制剂的能力成正比。

尽管3-ABA的主要作用是使生存曲线的肩区变小,但亚致死损伤(SLD)修复并未受抑。在条件照射与二次梯度剂量之间的2小时内用3-ABA处理,不能阻抑分次照射生存曲线的肩区重现。这与高渗处理后所得结果相似。但二次照射后高渗处理不能进一步增强反应,而再次加入3-ABA则仍有效。作者对此的解释是首次照射后的高渗处理已使细胞内 NAD^+ 严重下降,其回复通常很慢,故2小时后再次照射及高渗处理不能产生协同作用。在另一方面,如果多聚(ADP-核糖)的合成仍然对修复起重要作用,再次照射后ADPRT抑制剂的作用就不会消失。

另一种已在哺乳类细胞确定的修复过程是PLD修复。这种修复一般见于高坪期细胞,细胞在照后延缓接种时生存率可提高。已知高坪期中国地鼠细胞的P-

LD修复被烟酰胺抑制。与对数期细胞相比,这种抑制的总效应较小,这可能是因为高坪期细胞摄取抑制剂较慢,ADPRT在高坪期细胞辐射损伤修复中所处地位较不重要;或者辐射反应的增强在S晚期最明显而高坪期细胞S期比例较小所致。Brown等(1984)也曾报道ADPRT抑制剂对PLD修复的影响,结果与上述类似。

高坪期细胞用低剂量率辐照时,烟酰胺也有辐射增效作用。此时照射时间延长所致的保护效应(Sparing effect)是SLD和PLD修复两者的结果。烟酰胺处理之低剂量率照射细胞的生存曲线介于慢性与急性照射之间,这与PLD修复被抑制但SLD修复不受影响的观点一致。对数期人成纤维细胞在低剂量率照射后用8mM 3-ABA处理,也可见到细胞杀伤提高。

对辐射抵抗和敏感的各种小鼠淋巴瘤细胞株也作了广泛研究。用2mM苯酰胺(BA)处理X线照射之小鼠淋巴瘤细胞,可使敏感株L5178Y-S敏化,但对抵抗株L5178-Y无作用。如假设L5178Y-S细胞多聚(ADP-核糖)的合成有缺陷,这些结果就能解释。事实上这些细胞的 NAD^+ 水平很低($0.2\sim 0.3nM/10^6$ 细胞),辐射引起的ADPRT活性增强比抵抗株小,不过其他作者用另外的抵抗株(L5178Y-R)时未见此种情况。多聚(ADP-核糖)合成在敏感株已成为修复率的限制因素,任何进一步的抑制都将使辐射反应增强。在抵抗株这种合成或许不是修复率的限制因素,故部分地抑制并不使细胞辐射敏化。这种解释如正确,则L5178Y-R细胞之辐射反应应能被高浓度ADPRT抑制剂增强,而低浓度烟酰胺则可能对L5178Y-S细胞起辐射保护作用。

ADPRT抑制剂在体内增强辐射效应预计取决于它们的有效浓度。按照前述观点,在那些多聚(ADP-核糖)是修复率限制因素的肿瘤,低水平抑制剂将能增强肿瘤反应而不影响正常组织,从而提高癌症放疗的疗效指数。博莱霉素杀死哺乳类细胞的方式与电离辐射相似,使DNA产生SSB,其实验数据也支持这一观点。3-ABA和BA对博莱霉素的抗小鼠艾氏腹水癌有增效作用。Jonsson等(1984)最近报道,给小鼠 $0.2g/kg$ (2mM)烟酰胺可使C3H小鼠移植性乳腺腺癌的辐射反应明显增强。如乳腺腺癌的ADPRT有缺陷,这些结果就与作者的工作假设一致。这是很可能的,因2mM烟酰胺使正常细胞起明显辐射敏化作用显然太低。由于此类抑制剂无毒性,将其用作癌治疗中有用的辐射敏化剂的可能性应予以探索。

解释ADPRT抑制剂的作用机制必须特别小心,因不能排除其它的作用。如3-ABA和BA对嘌呤的从头开

始合成有阻断作用,对葡萄糖代谢和DNA合成也有影响。烟酰胺及其衍生物能抑制哺乳类细胞转运RNA甲基化酶的活性。更加特异的ADPRT抑制剂显然有利于消除这种可作两种解释的情况。3-乙酰胺苯酰胺(3-acetamido-benzamide)可能是一种这样的抑制剂,它已被证明能提高一些人和啮齿类细胞系的电离辐射杀伤作用。因各种抑制剂相互竞争,故其作用有所侧重,采取高浓度短期作用或能增强抑制程度和降低副作用。在此种条件下(如用50mM烟酰胺作用2小时)确实对中国地鼠细胞的细胞周期进程只产生极小的影响。

四、ADPRT抑制剂对DNA修复的影响

一般认为,烷化剂引起的SSB重接可被ADPRT抑制剂阻抑。对于辐射所致的SSB重接则意见较分歧。Zwelling等(1982)和Johanson等报道,ADPRT抑制剂使SSB重接速度减慢,James和Lehmann(1982)则认为它虽影响SSB重接,但对DSB修复无影响。这可能与所用方法有关,较敏感的方法如碱洗脱能测出变化,而较不敏感的方法如碱性蔗糖梯度沉降法则不能。Johanson等的结果特别有意思,他们发现抑制剂对L5178Y-S细胞的影响较明显,对L5178Y-R细胞则不太明显。前者的辐射反应为2mM-BA所增强,后者未见增强(三)。采用高浓度BA时,Johanson发现两种细胞系的SSB重接均被有效地抑制。值得注意的是辐射敏感细胞系DNA辐射损伤的修复可能不完全,因而保持了较高的染色体畸变率。另一与3-ABA有关的重要情况是3-ABA只抑制SSB重接,而对DNA紧密性(compactness)无影响。DNA紧密性用核状体沉降测定,是X线损伤修复之第二阶段,可为新生霉素抑制。Durkacz等(1981)的研究结果可作支持性证据来解释。DNA在核状体中的紧缩似乎不依赖于SSB重接,而是取决于DNA的局部异构酶(topoisomerase)或其它同功能物质。

多聚(ADP-核糖)最可能是DNA切除修复连接阶段所需之物质。它与u.v.引起的嘧啶二聚体的切除无关。那些认为它与DNA修复合成有关的报道或系人为因素所致,这已在第一节中讨论过。说明多聚(ADP-核糖)参与连接阶段之证据有两点;首先,前已提及

SSB重接为ADPRT抑制剂所阻断;其次,有报道表明多聚(ADP-核糖)可激活DNA连接酶。其机制被认为系ADPRT对DNA链断裂反应产生的多聚(ADP-核糖基化)抵消了组蛋白对DNA连接酶的抑制作用,从而为重接过程创造了条件。此过程由DNA链末端通过与ADPRT相结合的多聚(ADP-核糖)和DNA连接酶结合而完成的。因此,通过使连接酶定位于链断裂处的方法可提高连接作用。此外,带正电荷的组蛋白的局部中和作用和DNA-组蛋白相互作用的减弱也起作用。在此,应注意的是组蛋白H1的多聚(ADP-核糖基化)可使染色质结构松弛。这种变化使修复酶较易进入松弛区域,而使DNA损伤的切除修复得以进行。

与DNA代谢有关的酶活性能直接被多聚(ADP-核糖基化)所影响。例如,DNA局部异构酶的此种改变可使其活性明显下降。这一现象的生物学意义尚不清楚。作者假设,核状体沉降作用结果说明DNA局部异构酶可能参与DNA辐射损伤修复之最后阶段。如此酶之活性在修复开始阶段干扰了这一过程的效率,则多聚(ADP-核糖基化)可作为一种有用的调节机制。

最后,鉴于高坪期细胞NAD⁺水平较低和X线照射后消耗较少,应重视不能增殖的已分化神经母细胞瘤细胞X线引起的SSB不能重接的事实。静止人体细胞的SSB重接也比指数生长细胞慢得多。对这种现象与多聚(ADP-核糖)代谢降低之间的关系应进行仔细地研究。

五、结论

大量证据表明,多聚(ADP-核糖)参与DNA损伤切除修复,最可能是促进了修复的连接阶段。此作用在烷化剂损伤的修复过程中最明显。在对电离辐射后情况进行综述的基础上提出下列工作假说:多聚(ADP-核糖)的合成对哺乳类细胞通常不是修复率的限制因素。只有在ADPRT活性几乎全部被抑制时,辐射反应才增强。在多聚(ADP-核糖)代谢有缺陷的细胞,其合成可能成为修复率的限制因素,任何进一步的ADPRT抑制都能导致辐射敏感性增高。这种代谢缺陷可能是由于NAD⁺水平异常低下和(或)ADPRT的不足。

[徐承熊节译 麦智广校]