

## DNA链断裂损伤修复及其修复酶\*

第二军医大学放射医学研究室 孟祥顺 郑秀龙

**提 要:** 电离辐射能导致DNA链断裂。本文阐述了DNA链断裂的修复及其在维持细胞的生物学功能和活存中的意义,介绍了与其有关的修复酶在DNA损伤修复中的作用。

DNA是电离辐射敏感的靶分子。被损伤的DNA分子的修复对维持细胞的生物学功能及活存有着重要的意义,在急性放射病的治疗、遗传病的诊治、肿瘤放射治疗、环境保护及抗衰老等许多领域有重要的应用前景。

细胞DNA损伤修复功能的正式发现和对其进行详细研究是六十年代后期的事情。在射线对DNA造成的多种损伤类型中,研究得比较详细、发展比较快的是链断裂损伤及重接修复。

链断裂损伤主要有单链断裂(下简称ssb)和双链断裂(dsb),同时也涉及硷基、脱氧核糖的损伤。断链重接修复处理的对象一般有两类,一类为ssb和dsb,对其进行重接;另一类是对损伤的或配对错误的硷基进行光复活修复、切除修复和复制后重组修复。

### 一、DNA单链断裂及其重接修复

水射解形成的自由基(主要是 $\cdot\text{OH}$ )直接或间接作用于DNA靶分子,使脱氧核糖的 $\text{C}_3'-\text{C}_4'$ ,  $\text{C}_4'-\text{C}_5'$ 之间键被打断,或使脱氧核糖与磷酸间的 $3'-\text{OH}$ 和 $5'$ -磷酸基或 $3'$ -磷酸基和 $5'-\text{OH}$ 之间键被打断后,均可形成ssb。实验证明,DNA分子每吸收50eV的能量就可以产生一个ssb。

大约有10~15%的ssb形成 $3'-\text{OH}$ 末端,20~40%形成 $5'$ -磷酸基末端<sup>[1]</sup>,还

有一些未能识别的非羟基、非磷酸基的末端<sup>[2]</sup>。Duplaa用顺序凝胶电泳的方法研究了 $\psi\times 174$ DNA的HaeIII酶切片断(118和234bp)受 $\gamma$ 线照射后的碱不稳定损伤。发现在低剂量照射时碱基断裂的顺序为 $\text{G} > \text{A} > \text{T} \geq \text{C}$ ,而剂量较高时(40~80Gy)断裂顺序变为 $\text{T} > \text{G} > \text{A} \geq \text{C}$ <sup>[3]</sup>。

ssb形成的相邻羟基和磷酸基末端,可通过DNA连接酶直接将缺口“封闭”。Mitzel-landbeck<sup>[4]</sup>证实大约有30%的ssb是 $5'$ -磷酸基末端及相邻的 $3'-\text{OH}$ 末端,这种断裂直接被连接酶修复。被损伤的部位如果有硷基改变,可被特异的酶如DNA糖苷酶等识别、切除(以下将详述)。

在超致死剂量下照射后,哺乳动物细胞可修复ssb。辐射敏感和耐辐射的细胞株对ssb修复的速度和程度基本相同。ssb与细胞的致死性间无明显的关系,但如果断裂发生在某些“致命位点”且未能正确修复,则可引起细胞的死亡。

### 二、DNA双链断裂及其重接修复

DNA双股链的每条单链如果在相对或相邻近(13~16bp)的部位发生ssb,则形成一个dsb。已有不少实验证实,dsb也是由于自由基的攻击或酶促作用而形成<sup>[5]</sup>,大约有50%的dsb带有 $3'-\text{OH}$ 末端。

#### 1. dsb与染色体畸变

未修复的dsb与染色体畸变及细胞死亡间的关系一直有争论,目前比较一致的观点认为,dsb修复缺陷突变株细胞比野生型细胞染色体畸变率高、对射线更敏感,因此推测dsb是致死性的。

Natarajan<sup>[6]</sup>的研究结果表明,细胞受X线照射后加入特异的核酸内切酶,发现染色体畸变率和dsb频率均相应增加。作者认为,这些损伤可能是由ssb转变而来的。Bryant<sup>[7]</sup>用PvuIII(切割双链DNA后形成“平”末端)或BamHI(形成“粘”性末端)两种核酸内切酶处理V<sub>79</sub>仓鼠细胞,发现,用前者处理后可出现各种类型的染色体畸变,且畸变率增加,同时观察到有近似的浓度依赖关系;与此相反,用后者处理后则未见畸变率增加的现象。另有作者也证明,在某些特定条件下,用形成“粘性”末端的某些核酸内切酶处理后,也可以形成dsb及染色体畸变率增加。从这些结果可以认为,染色体畸变可来自dsb,表明dsb、染色体畸变及细胞死亡间有明显的相关性。

## 2. dsb与细胞活存

1984年, Kamp<sup>[8]</sup>分离到6株对X线敏感的CHO突变株细胞,其均为dsb修复缺陷型。他们用中性滤膜洗脱法研究时发现,野生型细胞95Gy照射后2小时,最大修复水平可以达到72%,而4小时后突变株Xrs-5仅有17%的dsb被修复。当突变株逆转为正常细胞后,其修复dsb的能力及对射线的敏感性也得到恢复。Radford<sup>[9]</sup>用相同剂量的X线照射细胞后,检测DNA dsb及细胞活存,发现起始断裂数与细胞致死性损伤有直接关系。作者还观察了在有放射增敏剂Miso(10mmol/L)和防护剂半胱胺(30mmol/L)存在的条件下以及不同的细胞系(各细胞系Do与Dq值均不同)都存在这种直接相关性。但对DNA ssb、硷基损伤和DNA-蛋白质交联等不存在这种相关。也有的作者提出,一个dsb如未能修复就是一

个致死事件。

## 3. 影响dsb修复的因素

### (1) 照射剂量

dsb修复一般有快修复和慢修复两个时相过程,Bradley<sup>[10]</sup>用中性滤膜洗脱法研究了L1210细胞受照后dsb的修复特点。观察到快和慢两个过程,其半修复时间( $t_{1/2}$ )分别为5分钟和90分钟。不过他认为50~100Gy剂量dsb修复的时间进程是相似的。但Woods的结果指出,照射剂量影响 $t_{1/2}$ ,当剂量为50GyX线照射人成纤维细胞时, $t_{1/2}$ 为10分钟;而当剂量为100Gy时, $t_{1/2}$ 延长到39分钟。作者认为这种慢修复过程相当于dsb的重接修复。我室的研究结果表明,大鼠淋巴细胞受照10和30Gy后,其修复过程不完全相同。30Gy照后30分钟约有76%的dsb被修复,而10Gy照后15分钟已有78%的dsb重接,30分钟后可恢复到照前水平<sup>[11]</sup>。

### (2) 射线的LET

Ritter和Roots等均报道,同X线相比,随射线LET增加,照射20Gy后断链重接的速率减慢,保温后12~14小时,约有25%的损伤不能被修复。Ahnstrom<sup>[12]</sup>用LH-V79细胞证实,高LET射线比低LET射线产生的dsb要少,但未重接的断链比例要增加。这一结果后来也被其它作者进一步证实。

### (3) 动物年龄与细胞老化

Sargent<sup>[13]</sup>报道,增殖的大鼠上皮细胞DNA dsb修复能力与大鼠的年龄有关。大鼠细胞受照12Gy后28、100、200、400天,细胞dsb的 $t_{1/2}$ 分别为20、27、69和107分钟。而年龄对dsb形成的水平无明显影响。Suzuki<sup>[14]</sup>将HeLaS<sub>3</sub>细胞照射8GyX线,照后1~2小时dsb可完全重接修复。如用老化的人二倍体成纤维细胞实验时发现,与修复功能正常的非老化细胞相比,2小时后只有80%的断链被重接。细胞老化后修复功能减弱的原因是目前正在研究的感兴趣课题。

### (4) 细胞周期

不同增殖周期的细胞对辐射的敏感性不同,其dsb修复的能力也不同。Giaccia<sup>[15]</sup>分离到两株CHO突变株细胞,其在G<sub>1</sub>和早S期对γ线是敏感的,而在迟S期的辐射敏感性与野生型细胞相似。突变株细胞可以修复γ线引起的ssb,但在辐射敏感的G<sub>1</sub>和早S期,其dsb修复能力是缺陷的,耐辐射的迟S期突变株和野生型细胞dsb修复能力是相同的。作者认为,在正常细胞内可能有两种途径来修复dsb损伤,一种途径是在迟S期起作用,另一种途径是在整个细胞周期或是在G<sub>1</sub>和早S期起作用。Stamoto也分离到对γ线敏感的dsb修复有周期依赖性的CHO突变株细胞,证实了这些结果。

影响dsb重接的因素还很多,如氧效应、细胞内GSH水平等,不再赘述。

#### 4. dsb重接修复后的再断裂

许多作者观察到,dsb重接修复后会再发生再断裂。Kanter<sup>[16]</sup>用两株白血病细胞株观察了24小时内的慢修复过程,发现两株对射线敏感的细胞经10Gy X线照后保温4小时,又出现新的DNA降解。Bryant也观察到EAT细胞经50Gy照射后7小时,断链数目又有明显增加。我们用大鼠淋巴细胞实验,30Gy γ线照后保温2小时,可使dsb重接修复。8~12小时后,又出现新的再断裂现象。进一步的研究表明,这种再断裂与DNase活力升高有直接的关系<sup>[17]</sup>。这种再断裂与dsb正确或错误修复有何关系尚不清楚,其可能是细胞死亡的重要标志之一。

#### 5. 正常与恶性细胞dsb修复能力

肿瘤细胞与其相对应的正常细胞相比,其dsb修复能力明显增加,这可能是肿瘤细胞易增殖的原因之一。我室对鼠淋巴细胞和鼠急性淋巴细胞白血病细胞(L7712)两种细胞分别用40Gy γ线照射,观察到照后两种细胞的DNA dsb百分数无明显差别,但其修复能力却明显不同。L7712细胞照后30分钟即可修复到照前水平,而淋巴细胞保温2小时

后的修复水平只有照前的78%<sup>[18]</sup>。也有作者观察到鼠脑瘤细胞受X线照射后其dsb修复能力较瘤旁正常小脑神经元要明显增加。弄清这种修复能力的差别及进一步阐明其原因,将有助于进一步探明细胞恶变的本质。

#### 6. dsb修复抑制与肿瘤治疗

dsb修复是一个酶促反应过程。修复过程中大约有70%的ssb和100%的dsb修复需要DNA聚合酶参与、需要核苷酸插入以将断裂处“封口”;而大约30%的ssb修复可直接由连接酶单独完成。近几年来在DNA修复抑制及其应用于肿瘤治疗方面有了很大进展。但从目前的研究来看,应用抑制剂来抑制DNA损伤修复,大多是在紫外光引起的损伤中效果较好,而在电离辐射引起的损伤中不那么有效。

Collins<sup>[19]</sup>研究了修复酶抑制剂对dsb修复的影响,发现 $10^{-5}$ mol的novobiocin(细菌内DNA解旋酶抑制剂)可使15Gy照射的HeLa细胞DNA dsb修复速率减慢,保温45分钟后才观察到修复现象。不少作者报告聚ADP核糖转移酶的特异抑制剂3-aminobenzamide可使dsb重接速度减慢。

过热温度可以使修复酶失活,因而可抑制dsb重接修复。我们的研究表明<sup>[20]</sup>,L7712细胞照前于44℃加热30分钟,可完全抑制受30Gy γ线照射后细胞的修复功能。在42℃加热时已可观察到修复速率和修复程度明显受抑制。

许多放射增敏剂在乏氧条件下可以增加照后细胞DNA的ssb和dsb,可以抑制dsb的重接修复过程,在肿瘤的放射治疗中有重要的应用价值。我室合成的放射增敏剂甲硝唑氨基酸钙(CMCA)在乏氧条件下可增加DNA的链断裂损伤并抑制其重接的慢修复过程<sup>[21]</sup>。其它放射增敏剂如RSU-1069等均观察到类似的结果。不少研究者已将DNA链断裂损伤及其修复的抑制作为判断放射增敏剂效价的一个观察指标。

### 三、与DNA损伤修复有关的修复酶

#### 1. DNA聚合酶

DNA聚合酶是DNA链断裂损伤后重接的重要修复酶。

目前认为DNA聚合酶主要有 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 四种类型,其共同特点是在DNA模板-引物及金属激活剂(如 $Mg^{++}$ )存在时,使底物三磷酸脱氧核苷(dNTP)逐个加到具有3'-OH末端的多核苷酸链上,使其沿5'→3'方向延长。真核细胞DNA聚合酶与原核细菌中的功能主要区别在于除 $\delta$ 酶外,前者不具有外切核酸酶活性。

几种聚合酶中,究竟哪一种参与了DNA损伤后的修复合成,长期以来是有争议的。较多的证据支持是 $\beta$ 酶,其主要证据有:(1) $\beta$ 酶活性无明显的细胞周期变化,与DNA复制合成的速度无关;(2)其在种属进化过程中具有明显的保守性;(3)神经元细胞内 $\beta$ 酶活力占聚合酶总活力的99.2%以上,而该细胞损伤后DNA修复合成明显增加;(4)利用 $\alpha$ 或/和 $\beta$ 酶特异抑制剂(如Aphidicolin, NEM, ara CTP,  $d_2$ TTP等)实验证明, $\beta$ 酶参与修复合成。

Goffin在进行 $\phi \times 174$ RFDNA(含无嘌呤位点)的损伤修复实验中,用 $\beta$ 酶代替T<sub>4</sub>DNA连接酶,证明切除无嘌呤位点后, $\beta$ 酶参与修复合成,使切除后的缺口“填满”。我们将H<sub>22</sub>肝癌细胞核照射40Gy  $\gamma$ 线,在修复保温时加入 $\alpha$ 酶的特异抑制剂NEM后,修复合成不受影响,而加入 $\alpha$ 酶抑制剂和 $\beta$ 酶抑制剂NEM及 $d_2$ TTP后,修复合成则被明显抑制,证明了主要是 $\beta$ 酶参与了修复合成<sup>[22]</sup>。

许多因素可以影响 $\beta$ 酶参与照后DNA的修复合成。(1)细胞种类: Seki<sup>[23]</sup>的研究证明, Aphidicolin 对大多数人类细胞的DNA修复合成有一定的抑制作用;与 $d_2$ TTP合用能更有效地抑制这类细胞的修复合成。但对鼠类细胞, Aphidicolin 对修复合成无

影响,认为 $\alpha$ 酶在此类细胞中不起作用。这种因细胞不同而导致的不同结论可能是不同细胞内的 $\alpha$ 酶对Aphidicolin的敏感性不同。

(2)细胞周期: Aphidicolin 对静止期细胞的DNA修复合成有抑制作用,而对分裂细胞的影响较小。这可能是由于两种细胞内“核苷酸前体库”(dCTP)大小不同所致,分裂细胞内dCTP含量高,竞争性降低或抑制了Aphidicolin对 $\alpha$ 酶的抑制作用。(3)损伤剂的类型及其剂量:不同的损伤剂可造成不同类型的DNA损伤,损伤后造成缺口的大小决定哪种酶参与DNA的修复合成。

#### 2. DNA糖苷酶

DNA糖苷酶是一种催化DNA中切割硷基-糖苷键、专一作用于被修饰或被损伤的核苷酸硷基的酶。分子量相对较小(1.8~3.1万之间)。一般认为此类酶起作用不需要辅助因子如二价金属阳离子等。最适底物为双链DNA,对单链DNA几乎没有或很少有活性,对单核苷酸也不起作用。这类酶的每一种均有较窄的底物特异性,因此不同的硷基损伤需要不同的糖苷酶来清除。目前已分离到数种糖苷酶缺陷细胞株,对研究此类酶的作用提供了直接证据。现就几种主要糖苷酶简述如下。

##### (1)尿嘧啶DNA糖苷酶

1974年Lindahl<sup>[24]</sup>首次报导在E.Coli中发现此酶,可特异地切除被修饰或改变的尿嘧啶硷基与DNA脱氧核糖之间的N-糖苷键。该酶分子量约为2.5~3万。在人类细胞中分离得到的该酶的K<sub>m</sub>值(约为1 $\mu$ mol)比细菌中该酶的K<sub>m</sub>值高20倍。该酶活性主要在细胞核中发现,线粒体内也有该酶活性,二者是否有区别尚不明确。该酶活性可被游离的尿嘧啶所抑制,其K<sub>i</sub>值为 $2 \times 10^{-4}$ mol,属非竞争性抑制。尿嘧啶同系物(包括1~6位被修饰后的衍生物)对酶活性无抑制作用。

##### (2)次黄嘌呤-DNA糖苷酶

DNA电离辐射后可发生腺嘌呤的脱氮

基作用。中性pH条件下, DNA中的腺嘌呤通过水解作用可转变为次黄嘌呤, 该酶可特异地切除脱氨基后的腺嘌呤残基。但对脱氨基的其它类似次黄嘌呤衍生物如黄嘌呤或烷基化的嘌呤碱基等无作用。从人类细胞中提取的该酶分子量为3.1万,  $K_m$  值为  $7.4 \times 10^{-5} \text{ mol}$ 。游离的次黄嘌呤对该酶活性抑制作用不明显。

### (3) 其它类型的DNA糖苷酶

用烷基化试剂处理DNA后, 重要的碱基损伤是生成3-甲基腺嘌呤, 对细胞这是一种潜在性致死损伤。3-甲基腺嘌呤-DNA糖苷酶可将这种损伤切除。大肠杆菌中已鉴定出为I型和II型酶编码的基因。

电离辐射可使DNA中嘧啶碱基开环或形成碎片, 生成尿素或N-取代的尿素衍生物, 失去编码特性, 尿素-DNA糖苷酶可将这种损伤切除。

电离辐射后还有一种常见的碱基损伤即嘧啶环“被饱和”, 形成胸腺嘧啶乙二醇残基, 细胞内以此为底物的胸腺嘧啶乙二醇-DNA糖苷酶将其切除。

另有报道哺乳动物细胞内也发现有切除嘧啶二聚体的嘧啶二聚体-DNA糖苷酶。

### 3. Ap内切核酸酶

细胞受照后DNA碱基丢失或上述糖苷酶将损伤碱基切除后, 均在DNA骨架上形成无嘌呤或无嘧啶位点, 统称为Ap位点。Ap位点的修复主要由Ap内切核酸酶完成。

在E. Coli中, 该酶分为二类, 一类是在Ap位点的3'端切割DNA, 另一类在5'端切割, 形成3'-OH和5'-磷酸基残端。哺乳动物细胞中的酶大多属后一种类型<sup>[25]</sup>。从HeLa细胞中分离的该酶分子量为3.2~4.1万, 是一种单体蛋白, 激活时需 $\text{Mg}^{++}$ 参加。

该酶绝大部分活性位于染色质的非组蛋白内。胞核、线粒体、胞膜及胞液中均含有该酶活性, 但线粒体中的酶起主要生物学作用, 而其它部位的酶可能是线粒体内酶的前体。

Gossard<sup>[26]</sup>阐明了该酶详细的工作步骤: ①Ap内切核酸酶水解脱嘌呤(或脱嘧啶)部位5'端的磷酸二酯键; ②切口处分别留下3'-OH和5'-磷酸基残端; ③该酶具有外切核酸酶活性, 沿3'→5'方向切下几个核苷酸, 形成缺口; ④DNA聚合酶以对侧链为模板, 从3'-OH端开始合成新的链, ⑤最后连接酶“封口”。

最近的研究表明, Ap位点还有另一种修复途径, 即不用切割DNA而由嘌呤插入酶(purine insertase)直接将正确配对的嘌呤碱基插入到DNA骨架, 使损伤得到修复<sup>[27]</sup>。目前已发现有二种嘌呤插入酶, 一种利用游离的碱基作为底物, 另一种利用三磷酸脱氧核苷。细胞内前一种酶无明显的嘌呤浓度依赖性。后一种酶的底物含高能磷酸键, 反应是在两个脱氧核糖之间转移腺嘌呤。人类细胞内起作用的多为第一种酶。酶活性表达需要一种DNA结合蛋白(分子量为12万), 需要游离的嘌呤碱基作为“供嘌呤体”。目前尚不清楚这种插入反应的能量从何而来, 有人假设是在被修复的DNA片段周围, 由于碱基堆积的相互作用增加, 可以提供反应能量。另一种假说认为该酶是以活化形式存在, 如以酶-腺嘌呤核苷酸复合物的形式。

还涉及许多其它修复酶, 不再赘述。

最后应特别指出, 近几年来由于重组DNA技术的发展, 也广泛地应用于DNA损伤与修复的研究。上述的一些实验结果就是用此技术获得的。如使用特定顺序的DNA分子可以用来检测辐射形成损伤的性质、部位和频率及辐射引起天然基因损伤变化等; 用重组DNA技术可以研究酶-DNA的相互作用, 用来评价特殊的损伤类型及部位对细胞活存产生的影响, 也可以用来阐明基因相互作用中所形成的损伤。某些基因转移技术可以用来证实哺乳动物细胞内所存在的特殊修复功能, 也可以用来克隆人类细胞的修复基因或对修复基因进行人们公认的鉴别。

基因表达调控的研究可以从本质上阐明修复基因的启动及基因水平对修复功能的控制。可以肯定,随着DNA损伤修复机理的进一步阐明,损伤与修复的定向控制将在放射分子生物学、肿瘤放射治疗学等许多学科有广泛的应用前景。

### 参 考 文 献

1. El-Metainy, et al; Radiat Res 1973, 55: 324
2. Henner WD, et al; J Biol Chem 1982, 257: 11750
3. Duplaa AM, et al; Int J Radiat Biol 1985, 48: 19
4. Mitzel-landbeck, et al; Biochim Biophys Acta 1976, 432: 145
5. Tilby MJ, et al; Radiat Res 1984, 98: 284
6. Natarajan AT, et; Mutat Res 1978, 52: 137
7. Bryant PE, et al; Int J Radiat Biol 1984, 46: 57
8. Kamp LM, et al; Mutat Res 1984, 132: 189
9. Radford IR, et al; Int J Radiat Biol 1985, 48: 45
10. Bradley MO, et al; Nucleic Acids Res 1979, 7: 793
11. 郑秀龙, 等: 辐射研究与辐射工艺学报 1985, 3(1): 28
12. Ahnstrom G, et al; Int J Radiat Biol 1974, 26: 493
13. Sargent EV, et al; Radiat Res 1985, 102: 176
14. Suzuki F, et al; Expl Cell Res 1980, 127: 299
15. Giaccia A, et al; Somatic Cell Molec Genet 1985, 11(5): 485
16. Kanter PM, et al; Int J Radiat Biol 1980, 38: 483
17. 赵芳, 等: 生物化学与生物物理学报(印刷中) 1989.
18. 郑秀龙: 生物物理学报 1987, 3: 311
19. Collins A, et al; Nucleic Acids Res 1979, 7: 1311
20. 孟祥顺, 等: 辐射研究与辐射工艺学报 1984, 2(4): 45
21. 杨立锡, 等: 生物化学与生物物理学报 1988, 20: 212
22. 蒋逸风, 等: 辐射研究与辐射工艺学报(印刷中) 1989.
23. Seki S, et al; Biochim Biophys Acta 1980, 606: 246
24. Lindahl, et al; Proc Natn Acad Sci USA 1974, 71: 3649
25. Kane CM, et al; J Biol Chem 1981, 256: 3405
26. Gossard F, et al; Eur J Biochem 1978, 82: 321
27. Deutsch WA, et al; J Biol Chem 1979, 254: 2099

(上接第267页)

本法的自动诊断程序已广泛应用于二维图像的诊断。

### 参 考 文 献

1. Holman BL, et al; J Nucl Med 1981, 22: 849
2. Maublant J, et al; Eur J Nucl Med 1981, 6: 289
3. Garcia EV, et al; J Nucl Med 1985, 26: 17
4. 成田充启, 他: 映像情报(M) 1987, 19: 943
5. 玉木良良, 他: 核医学 1983, 20: 1299
6. 伊藤綱朗, 他: 核医学 1986, 23: 43
7. 松田宏史: 映像情报(M) 1988, 20: 387
8. 岛田智好, 他: 核医学 1987, 24: 853
9. 久保田昌宏, 他: 核医学 1987, 24: 1577
10. 今井嘉門, 他: 核医学 1987, 24: 865
11. 堀合恭弘, 他: 核医学 1988, 25: 293