

ADPRT 及其对 DNA 损伤修复的影响

北京放射医学研究所 贺涛 综述 夏寿莹 麦智广*审。

提 要: ADP-核糖基转移酶 (ADPRT) 存在于真核细胞核内, 在细胞DNA损伤后ADPRT活性明显上升, 已经发现ADPRT催化的P(ADPR)反应与DNA链断裂重接、DNA拓扑异构酶活性、染色质稳定性、染色体畸变与姐妹染色单体互换、突变等过程有关。ADPRT 抑制剂有望作为肿瘤治疗的增敏剂而发挥作用。

一、前 言

ADP-核糖基转移酶是六十年代发现的广泛存在于真核细胞核的核内酶。ADPRT催化NAD(辅酶I)中尼克酰胺与核糖间连键的断裂并将ADP-核糖部分与受体蛋白共价结合, 且能不断重复此反应, 形成寡(oligo-)多聚ADP-核糖(polyADPR)。ADP-核糖基化反应参与调节DNA合成、转录和细胞分化等重要的生理过程。越来越多的证据表明, ADP-核糖基化反应与DNA损伤修复有关, ADPRT活性在DNA损伤修复中具有重要的作用。

二、ADPRT酶学特点

从许多组织如肝、胸腺^[1]已经得到提纯的ADPRT(EC2.4.2.30), 同时发现此酶是DNA依赖的。各组织获得的ADPRT性质类似, 分子量约175 000道尔顿, 等电点为9.6, 最适pH8.6~8.8。Jongstra-Bilen^[2]发现在不同种属间ADPRT性质近似, 这种进化上的保守性表明了此酶功能的重要。ADPRT在哺乳类细胞核内的典型分布约为10~20个核小体间一个酶分子, 数量上与DNA拓扑异构酶I和一些组蛋白分子类似。染色体被微球菌核酸酶消化时, ADPRT活性只存在于单个核小体长度以上的碎片中, 表明ADPRT主要位于核小体间的连接区^[3]。在DNA复制区域此酶活性最高, 活性染色质区域亦发现ADPRT活性, 此酶对DNA的结合似乎具有一定的特异性, 但尚需

进一步证实。1987年, Suzuki^[4]获得了人类ADPRT cDNA的分子克隆, 为进一步研究此酶的特性与功能提供了条件。

ADPRT以NAD为底物, 催化形成寡或多聚ADP-核糖。细胞内许多酶和蛋白都可作为P(ADPR)的受体, P(ADPR)与受体蛋白内的谷、精氨酸连接, 完成修饰作用, 受体蛋白经修饰后, 其原有功能多被抑制。P(ADPR)在细胞内代谢很快, 半衰期小于1分钟。三种酶参与P(ADPR)的水解^[5]: (1)糖基水解酶, 断裂核糖间的连接键; (2)磷酸二酯酶, 水解磷酸键; (3)ADPR水解酶, 分解ADPR单体。

三、ADPRT与DNA损伤修复的关系

ADPRT在DNA修复过程中具有相当重要的作用, 但其确切机制尚不明了。研究ADPRT在DNA损伤修复中的作用, 通常以ADPRT抑制剂为手段。以下通过几个方面讨论ADPRT与DNA损伤修复的关系。

1. NAD含量变化

当细胞受到损伤因子如 γ 线、X线, 烷化剂等处理时, 外源性(^3H)-NAD在细胞酸不溶组分的掺入明显增加, 即ADPRT活性迅速上升, 而内源NAD含量下降。1~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MNNG(1-甲基-1-亚硝基-3-硝基胍)能使L1210细胞内NAD减少, 10~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MNNG可使细胞内NAD在1h内全部丧失。DMS(硫酸二甲酯)可使L1210细胞内源DNA在5h内下降60%, 但当2mmol/L A-

DPRT特异性抑制剂3-氨基苯甲酰胺(3-AB)存在时,细胞内NAD含量基本不发生变化,且细胞损伤后NAD含量的变化程度与损伤因子呈明显的剂量依存关系^[6]。

2. DNA修复缺陷细胞

为了研究ADPRT与DNA链断裂或碱基损伤之间的关系,Berger等^[7]采用DNA切除修复缺陷的人着色性干皮症(XP)细胞为研究对象。当用烷化剂处理XP细胞时,可以检测到P(ADPR)合成上升,表明ADPRT可由此类DNA损伤激活;用UV照射XP细胞后,发现DNA复制合成降低,但P(ADPR)合成没有变化,若UV照射细胞后,再用*M. luteus*紫外内切酶(*micrococcus luteus* UV endonuclease)消化,可见ADPRT活性上升,且DNA合成恢复到UV照前水平。这表明紫外线损伤后,切除修复过程中产生的DNA链断裂是P(ADPR)合成的必要条件,P(ADPR)合成对DNA合成的恢复可能有一定作用。

3. DNA链断裂重接

DNA链断裂的产生是DNA损伤的直接或间接结果, γ 线、X线和一些化学物质如博来霉素可以造成直接的DNA链断裂;烷化剂处理、UV照射后酶切可造成间接DNA链断裂。实验结果表明^[8],P(ADPR)合成抑制剂对损伤因子造成的DNA链断裂重接修复有抑制作用。至于P(ADPR)在DNA链断裂重接修复中哪一步骤发挥作用,看法上还存在一些分歧。

早期的研究认为^[9],这种抑制作用是由于P(ADPR)合成抑制造成了连接过程的延迟,以至使DNA链断裂不能得到修复。近来的实验结果对上述假说提出了怀疑。Yoshisada^[10]发现5mmol/L 3-AB与MMS (methyl methane sulfonate) 处理后的10 T1/2细胞保温,可以增加DNA单链断裂,但对单链断裂重接速度没有延迟作用。Clee-
ver等^[11]建立了一种直接检测DNA损伤后

链断裂重接速度的新方法,将致伤因子处理后的细胞生长于含aphidicolin (DNA聚合酶 α 抑制剂)和³H-TdR的培养液,积累³H标记的不完全修复片断,然后更换为含3-AB或无3-AB的培养液,分离DNA,以外切酶Ⅲ检测不完全修复片断,以掺入DNA的残存放射性来表示链断裂重接速度。结果表明,4 mmol/L MMS处理后的人类淋巴细胞用此法检测连接速度时,若分析分离的DNA,发现3-AB的存在反而加快连接速度;若分析染色体时,则3-AB存在与否无差别。

4. DNA拓扑异构酶

DNA拓扑异构酶控制DNA的超螺旋程度,与染色体结构修饰及DNA复制、转录、重组有关。Jenny^[12]发现,从牛胸腺制备的高度纯化的ADPRT有部分拓扑异构酶I的活性,纯化的ADPRT可对拓扑异构酶I进行P(ADPR)化修饰,从而抑制其活性。研究表明,纯化的拓扑异构酶I受三种修饰作用的影响:(1)丝氨酸磷酸化增加酶活性;(2)酪氨酸磷酸化降低酶活性;(3)P(ADPR)化降低酶活性。

Johnstone等^[13]研究了在细胞受到 γ 辐射损伤情况下,P(ADPR)合成与拓扑异构酶I活性之间的关系。人淋巴细胞受到8.4~25Gy γ 线照射后,拓扑异构酶I活性大约上升3倍,ADPRT特异性抑制剂3-AB的存在并不抑制辐射所致的拓扑异构酶I的活性上升。作者对此现象的解释为:正常情况下拓扑异构酶I是受ADPRT修饰的,即其酶活性较低,而当受到辐射损伤时,拓扑异构酶I受到的修饰较少,活性上升,有利于染色体结构变化以启动修复。

5. 染色质稳定性

Loestcher^[14]发现,增加细胞NAD浓度70%后,染色质结合的P(ADPR)增加5倍,因此认为P(ADPR)可能作为信号改变染色质的代谢状态,从而修饰其功能。分离的染色质经P(ADPR)化后在电镜图像可见

结构变化。Thraves等^[15]认为P(ADPR)与组蛋白交联后促使DNA高级结构解体,从而使DNA聚合酶和切除修复有关的酶易于接近,修复过程结束后,P(ADPR)由糖基水解酶水解,DNA重建其高级结构。

Ortega^[16]根据他的实验结果对上述P(ADPR)与染色质结构损伤间的关系提出异议,H₂O₂或DMS处理后染色质发生重排,这时染色质DNA对微球菌核酸酶敏感,这种敏感性随时间推延而下降,表明染色质DNA通过修复逐渐回复天然状态。3-AB对损伤后染色质重排与核酸酶敏感性的上升无抑制作用。

6. 染色体畸变与姐妹染色单体互换(SCE)

染色体畸变与SCE形成是检测DNA损伤的灵敏指标。ADPRT抑制剂本身不造成染色体畸变。Darroud^[17]研究CHO野生型与X线敏感株xrs5.6细胞过程中发现,3-AB只促进细胞G₁、G₂期染色体畸变。其它以人淋巴细胞为材料的实验也表明^[18],3-AB对G₀期细胞受X线照射后形成的染色体畸变没有影响。上述结果表明,ADPRT只在细胞周期的特定阶段参与辐射损伤的染色体修复。

与染色体畸变不同,ADPRT抑制剂以剂量依存方式增加姐妹染色单体互换频率,抑制剂越强,诱导的SCE越多。Morgan等^[19]发现,1mmol/L 3-AB可显著增加CHO细胞的SCE频率,在照后立刻加入BUdR(5-溴脱氧尿嘧啶核苷);3-AB与3Gy X线所致的SCE可叠加。而ADPRT抑制剂与烷化剂共同处理细胞获得的SCE超过二者单独处理的叠加值^[20],且此效应与蛋白酶或DNA拓扑异构酶无关。

7. 细胞活存与潜在致死性损伤修复(PLDR)

特异的ADPRT抑制剂可以增强多种损伤因子对细胞的杀伤作用,且对烷化剂的增强程度要大于电离辐射^[21]。CHO细胞和人

类成骨肉瘤细胞受γ线照射后,3-AB不改变其亚致死性损伤修复(SLDR),但对PLDR近乎全部抑制^[22]。而非分裂细胞经烷化剂MNNG处理后的PLDR不受ADPRT抑制剂的影响^[23]。

8. 突变与癌变

ADPRT抑制剂本身没有致突变作用。Guo等^[24]研究了P(ADPR)合成与细胞突变频率之间的关系,结果表明,在Na⁺/K⁺ATPase(Ouabain抗性)、HGPRT(6-TG抗性)位点,3-AB对UV和X线诱导的CHO突变频率没有影响;但当用MMS处理CHO细胞后,3-AB使6-TG抗性突变株增加,对Ouabain抗性突变株数目没有影响,表明3-AB对点突变频率没有影响。另有报道^[25]发现ADPRT抑制剂能够在一定程度上降低辐射所致的G₂期阻滞。

最近,Tseng^[26]将EJ-ras基因构建在胆固醇诱导的鼠肿瘤病毒启动子/增强子控制之下,然后转入Rat-1成纤维细胞,体外诱导EJ-ras mRNA提高15~20倍,将此细胞注入Fischer344大鼠,产生致死的纤维肉瘤,ADPRT抑制剂苯(并)吡喃酮抑制此细胞在琼脂中的生长与体内的致癌性。

四、ADPRT抑制剂

ADPRT抑制剂已被广泛应用于研究ADPRT的生物学功能,部分抑制剂对损伤因子处理后的生物效应见表。

Hiromi^[27]通过荷瘤小鼠实验表明,3-AB和Benzamide具有促进博来霉素治疗EAT肿瘤的作用。另有报道将ADPRT抑制剂与其它增敏方法^[28]或增敏剂^[29]一起使用,获得了较好的增敏效果。可以预期,随着P(ADPR)合成在DNA损伤修复及其它生理过程中作用的阐明,ADPRT抑制剂作为一类新的放、化疗增敏剂将会对肿瘤治疗发挥作用。

五、结语

关于ADPRT在DNA损伤修复中的作

表 ADPRT抑制剂作用效果

DNA损伤因子	抑制剂	细胞系	检测指标	效果
H ₂ O ₂	3-AB	CHO	DSB重接, 存活	+
γ线	3-AB, 3-甲氧基苯甲酰胺	CHO	存活, PLDR	+
X线	3-AB	成纤维细胞	存活	+
X线	3-AB	L-1210	DSB重接	+
中子	3-AAB*	L5178Y	DSB重接, 存活	+
UV	3-AB	成纤维细胞	存活	-
γ线	3-AB	成纤维细胞	存活	-
X线	3-AAB	L5178Y	存活	+
DMS	3-AB	成纤维细胞	存活, DSB重接	+
MNU	5-甲尼克酰胺	L1210	存活	+
MMS	3-AB	CHO	DSB重接	+
博来霉素	3-甲氧基苯甲酰胺	CHO	存活	+
UV	3-AB	CHO	DSB重接	+
MNNG	3-甲氧基苯甲酰胺	C3H/10T1/2	存活	+
EMS	3-AB	BALB/3T3 A31-1	存活	+
X线 + 热疗	3-AB	CH	存活	+

注: DSB; DNA Strand breaks; 因篇幅所限, 参考文献略。

* 3-乙酰氨基苯酰胺

用机制还不十分清楚, 现有以下三种假说:

(1) 以DNA连接酶Ⅰ为中心, 认为DNA修复过程中连接为限速步骤, P(ADPR)合成刺激此酶活性, 从而促进DNA损伤修复[9]。

(2) P(ADPR)合成影响染色质稳定性, 从而使各种修复酶可以接近染色质DNA, 启动修复[15]。

(3) P(ADPR)抑制修复酶进行的修复过程, 同时P(ADPR)合成消耗细胞内NAD与ATP, 造成细胞自杀性死亡。ADPRT抑制剂抑制P(ADPR)合成, 使损伤因子激活的核酸酶能够进攻染色质DNA, 造成更多的DNA损伤, 此假说认为损伤细胞内P(ADPR)合成使全部酶活性降低[11]。

上述三种假说的提出是基于各个作者实验的侧重不同, 但都不能圆满地解释ADPRT在DNA损伤修复中的作用, 要彻底阐明这一问题, 尚需进行更加深入的研究。

参 考 文 献

1. Carter SG and Berger NA, Biochemistry 1982, 21: 1813
2. Jongstra-Bilen, et al, Biochem Biophys Res Commun 1980, 97: 1517
3. Thraves P, et al, Prog Mutat Res 1982, 4: 147
4. Suzuki H, Biochem Biophys Res Commun 1987, 146: 403
5. Oka J, et al, Biol Chem 1984, 259: 986
6. Shall S, ADP-ribosylation Reaction, Biology and Medicine Academic Press, N.Y. 1982, P477
7. Berger NA, et al, Biochemistry 1981, 20: 3610
8. Cautoin O, Biochim Biophys Acta 1986, 867: 135
9. Shall S, Adv Radiat Biol 1984, 11: 1
10. Yoshisada F, Cancer Res 1987, 47: 1118
11. Cleaver JE, et al, Mutat Res 1986, 173: 287

(下转第151页)

- 66 : 226
3. Mori KJ, et al, Radiat Res 1981, 22 : 312
 4. Prusser JS, et al, Int J Radiat Biol 1976, 30 : 359
 5. 刘伟宏: 博士研究生学位论文 白求恩医科大学 1988, 9月, p61
 6. Anderson RE, et al, J Immunol 1977, 118 : 1191
 7. Schwartz JL, et al, Environ Mutagen 1980, 2 : 473
 8. 茅子均, 等: 中华放射医学与防护杂志 1982, 2(5) : 33
 9. 苏燎原, 等: 辐射研究与辐射工艺学报 1987, 5(2) : 23
 10. Birkland SA, et al, Transplantation 1980, 29 : 23
 11. 杨文礼, 等: 核防护 1980, 5 : 21
 12. Szczylik C, et al, Int J Radiat Biol 1981, 39 : 253
 13. Gupta S, et al, Cell Immunol 1977, 34 : 10
 14. Anderson RE, et al, Adv Immunol 1976, 24 : 215
 15. Merluzzi VJ, et al, Cell Immunol 1984, 84 : 74
 16. Engers HD, et al, Scand J Immunol 1979, 10 : 509
 17. Bendel V, et al, Strahlentherapie 1981, 157 : 774
 18. Swartz RP, et al, Proc Soc Exp Biol Med 1981, 167 : 20
 19. Manori I, et al, J Natl Cancer Inst 1985, 74 : 1215
 20. 赵丽苹, 等: 中华放射医学与防护杂志 1988, 8 : 27
 21. 张远强, 等: 中华放射医学与防护杂志 1988, 8 : 125
 22. 宁国伯, 等: 上海免疫学杂志 1986, 6 : 22
 23. Herberman RE, et al, Adv Cancer Res 1978, 27 : 305
 24. Brovall C, et al, J Immunol 1981, 126 : 2236
 25. 范晓慧, 等: 白求恩医科大学学报 1989, 15 : 551

(上接第155页)

12. Jenny JB, Eur J Biochem 1983, 136 : 391
13. Johnstone A, et al, Biosci Rep 1985, 5 : 907
14. Loetscher P, Proc Natl Acad Sci USA 1987, 84 : 1286
15. Thraves PJ, et al, Cancer Res 1985, 45 : 386
16. Ortega JM, Braz J Med Biol Res 1985, 18 : 455
17. Darroud F, Mutat Res 1987, 177 : 133
18. wiencke JK, Biochem Biophys Res Commun 1987, 143 : 372
19. Morgan WF, et al, Radiat Res 1983, 93 : 567
20. Schwattz JL, et al, Carcinogenesis 1985, 6 : 699
21. Lunec J, et al, Br J Cancer 1984, 49 (Suppl-VI) : 19
22. Hue J and Laval F, Int J Radiat Biol 1985, 47 : 655
23. Jacobson EL, et al, Carcinogenesis 1985, 6 : 711
24. Guo XC and Cleaver JE, Mutagenesis, 1986, 1 : 237
25. Rowley R and Martin JH, Radiat Res 1988, 113 : 58
26. Tseng AJ, Proc Natl Acad Sci USA 1987, 84 : 1107
27. Hiromi S, J Antibiotics 1983, 36 : 296
28. Miyakoshi J, et al, Radiat Res 1985, 102 : 359
29. Leith JT, Radiat Res 1988, 114 : 186