

辐射分子生物学展望

Hagen U

提 要: 辐射分子生物学的发展在于寻找未决的问题及其分析方法。考虑到细胞辐射效应的终点, 研究受照细胞的DNA损伤类型及其修复机理自然成为必要的课题。目前, 正致力于甄别、克隆参与控制DNA损伤修复的基因并分析其核苷酸序列、研究基因调节。有关DNA修复基因产物即酶和蛋白质, 亦应进一步研究导致核苷酸序列改变、点突变的酶学反应。DNA聚合酶的误导误配及错误调控也许是可能的机理。

引 言

辐射分子生物学的任务是分析、研究辐射诱发的细胞死亡、染色体畸变、突变和恶性转化等细胞学效应的分子机理。近来, 研究基因功能、基因调节的分子技术的改进, 为辐射生物效应的深入研究开辟了新途径。作者在本文中阐述和讨论了辐射分子生物学未来发展的几个问题。

受照细胞的DNA损伤

细胞出现死亡、发生突变和转化都可归结于染色质的结构损伤。关于离体受照DNA的研究多数叙述了碱基损伤和DNA链断裂的不同类型, 而关于体内受照细胞DNA损伤(直接辐射效应, 即DNA内吸收的辐射能量对损伤程度的作用)的研究却很少。另外, 照射剂量与双链断裂(dsb)间存在的线性正相关表明: 体内DNA受照后发生了群簇DNA损伤而导致dsb。S1-核酸酶敏感部位(区域性损伤多发部位, S1部位)的形成成为另一类型的DNA损伤, 仍需进一步研究其结构和可修复性。

另一方面, 我们对离体和部分体内照射诱发的DNA单链断裂(ssb)部位的结构构型了解较多, 而对体内诱发dsb的结构却一无所知, 但这些分析对了解dsb重组修复过程中的酶学反应却非常重要。

关于受照细胞中DNA碱基损伤的研究

亦是如此。尽管事实上人们预期碱基损伤是随机的, 化学和免疫学分析最先指出了胸腺嘧啶残基的损伤。胸腺嘧啶乙二醇与ssb的形成频率相等, 而对体内其它碱基的了解却少得多。或许DNA的能量吸收随机分布, 但在其中可能发生了能量传递而导致优先胸腺嘧啶损伤(preferential thymine damage)。

受照细胞DNA损伤的程度和类型取决于染色质的结构特点, 曾观察到解聚染色质的辐射效应增高。另外, 损伤的修复率即修复酶对DNA损伤的可及性亦受染色质结构的影响。Xue等(1988年)研究V₇₉CHO-细胞在不同条件(谷光甘肽缺乏、缺氧)下其DNA-蛋白质交联(DNA-protein crosslinking)程度时, 提出了研究辐射诱发染色质损伤的新课题; 另外交联形成机理亦仅是推测性的; 再者, 很有必要采用新的技术方法分析染色质损伤, 以更好地了解辐射诱发染色体畸变的过程。

切除修复

切除修复无错误过程是研究受照细胞内反应的最好课题之一, 业已发现越来越多的酶、蛋白质和基因参与这类修复过程。在研究DNA链断裂、碱基损伤的不同机理时, 有两种途径可供选择: 1. 以特定类型损伤的特点及其修复动力学分析为基础, 分别分离参与修复过程的酶和蛋白质; 2. 从找出有意义

的修复步骤中的突变子缺陷开始,再克隆其各自基因,分析其序列及产物。采用这一程序可以获得有关修复分子机理的信息。

关于修复酶的研究仍有两个问题悬而未决:1.不同的修复酶如何识别其特异的待修复DNA损伤。Kuhnlein等证实,无嘌呤-无嘧啶DNA核酸内切酶(apurinic-apyrimidinic DNA endonuclease; AP核酸内切酶)对于AP部位具有高亲合性,但在着色性干皮病患者的某些成纤维细胞系中,对AP部位的亲合力降至正常的1/10,AP核酸内切酶本身的活性也降低了。这提示修复酶与其底物的亲合力受控于一些未知因子,这些因子将成为未来的研究课题。为深入了解DNA损伤的酶学反应,应对修复酶进行晶体衍射分析,研究其结构特征;2.关于DNA链断裂修复的最初几步酶反应仍不甚明瞭。已知E.coli中的DNA聚合酶I不能切除ssb 3'端的受损核苷酸,因而在修复复制起动前仍需一核酸外切酶对辐射诱发的ssb 3'端进行活化。Inoue等在研究正常成纤维细胞的粗提物时发现,其中3'-5'核酸外切酶活性很高,可使完整的3'/OH末端基因作为DNA聚合酶后续作用的引物。而在扩张性毛细血管共济失调患者细胞中,这种酶活性丧失,使ssb修复进程受阻。总之,要阐明DNA链断裂修复过程中关键的起始步骤,仍需作进一步研究。

在克隆及分析不同生物中控制切除修复的基因和寻找其同源序列方面已进行了大量的研究。例如,在细菌、酵母、果蝇、啮齿动物和人类细胞中,业已发现其DNA损伤处的酶催化切入。另外,在这些基因中,推测的氨基酸序列的同源性已被确证,提示了其DNA序列在进化上的保守性,这些不同的修复酶间的关系仍需作进一步的分析。

可通过将克隆的修复基因转移至另一具有相应突变的生物个体进行这类研究。如Weber等发现,将人类XRCC1(X射线修

复交叉互补)基因转染辐射敏感型CHO细胞,可恢复其 γ 射线抗性、DNA链断裂重接率和SCE(姐妹染色单体互换)频率至野生型水平。

另外有研究表明,CHO细胞中活化的DHFR基因比其下游的非编码区具有更有效的可修复性;UV敏感型CHO细胞修复效率低得多,基因与其下游区之间却无此差异。用控制DNA插入T₄噬菌体的den-V基因转染UV敏感型细胞株,发现两个区域都可被有效地修复。但只有用人ERCC1-基因对敏感型CHO细胞进行转染后,才会出现在野生型细胞中观察到的基因编码区的优先修复。这提示,活化的转录基因的优先修复不仅是因为其染色质的解聚状态使修复酶易于识别,而是由于另外一些因子对这些酶的控制所致,这一现象亦需做进一步的研究。

重组修复

Resnick等的研究表明,dsb的修复需DNA重组。同时,已经克隆出酵母中许多控制这一过程的基因,其序列亦已测出。Ray等的结果显示dsb可激发三母链重组(triparental recombination);Murnane和Young(1990年)指出,由于DNA重排而衍生的染色质不稳定区可加剧DNA重组。用正常的和毛细血管扩张性共济失调患者的细胞系提取物的研究显示,其dsb的修复率相同,但后者的修复准确性确大大低于前者。所有这些,都有力地提示,很有必要采用新的技术手段(如研究体外质粒中dsb的修复)对体内染色质结构中的酶学变化进行详细的研究。

突变形成的机理

辐射损伤修复的第三种途径称为“诱变修复”(mutagenesis repair),这一修复过程不仅增加了受照细胞的存活比率,亦会增加细胞群体的突变几率。在特定的突变个体

中,某些控制基因发生突变,使诱变修复进程受阻或被抑制,同时亦使受照个体的存活率和突变率降低。

解释突变形成分子机理的一个重要假说认为:辐射诱发的DNA损伤可以增强某些基因的表达,这些基因包括修复基因和其它控制突变形成(易错修复的诱导)基因。这一机理在研究*E.coli*的SOS修复时首次得以描述,并得到实验研究的有力支持,发现其它肠道细菌亦有类似过程。在哺乳动物细胞中,发现有许多“可诱发DNA损伤的基因”(“DNA-damage-inducible genes”),这些基因也许与诱变修复有关,但需作进一步的研究。

虽然越来越多的基因得以报道,但对于突变形成的关键步骤,即DNA聚合酶对已发生改变的核苷酸链复制过程的了解却很少。如在*E.coli*中,DNA聚合酶活性很可能受诱导SOS状态的修饰,聚合了额外的受损碱基,在新链中发生核苷酸错接。同时,由于损伤处DNA复制准确性降低,可能会使突变发生在新链中DNA损伤的相应部位(靶子突变)或其它部位(非靶子突变),在这方面仍需进一步研究参与突变形成的基因产物的功能。

解释“突变DNA”(“mutated DNA”)形成的另一模型由Siede和Eckardt-Schupp(1986年)在研究酵母突变时提出。他们认为,突变是由于“误导误配修复”(“mismatch mismatch repair”)造成的。业已分离

到参与此过程的基因(可被DNA损伤诱导),如REV2基因,相信不久还会有新的进展。最近关于体外特定系统中甲基导引的DNA误配校正(methyl-directed DNA mismatch correction)的研究也为诱变修复分子机理的研究开辟了新的途径。

通过比较野生型基因和突变子中已发生改变的核苷酸序列,分析辐射诱发的DNA损伤类型与突变的相关性,可获得更多的有关突变机理的知识。已经建立了许多系统来确立这样的“突变谱”(“mutation spectra”)。如最先详细研究的X射线诱发的哺乳动物细胞的A^{prt}-突变子。应指出,在辐射诱发的16个突变子中,其类型有缺失、移码、转换和颠换;而自发突变则多为G:C=A:T转换。在这方面,今后仍有许多研究工作要做。

为比较光产物(photoproducts)频度分布与同一部位的突变频率,观察了UV诱导的光产物在启动碱基置换突变中的作用,结果表明在大多数情况下,含胞嘧啶的二聚体具有突变倾向。但突变热点却与光产物的高频率分布并不相关,这暗示突变位置亦取决于其它因素,如DNA三级结构。要证实这些及其他一些实验,有必要作进一步的研究,以了解原发的DNA损伤通过酶修复反应而导致核苷酸序列改变或突变的机理。

[Radiat Environ Biophys 1990;29(4):315~322
(英文) 陈振军节译 穆传杰校]