

- 8 Curtis SB et al. Radiat Res, 1986; 106 (2): 252-270
- 9 Iliakis G et al. Int J Radiat Biol, 1988; 53(4): 541-584
- 10 Radford IR et al. Int J Radiat Biol, 1986; 49(4): 611-620
- 11 Radford IR et al. Int J Radiat Biol, 1985; 48(1): 45-54
- 12 Radford IR et al. Radiat Res 1990; 124, 334-345
- 13 Bocian EE et al. Int J Radiat Biol, 1982; 42(3): 347-351
- 14 Kempt LM et al. Mutat Res, 1986; 166; 255-263
- 15 Dorroudi F et al. Mutat Res, 1987; 177; 149-160
- 16 Vananker SC et al. Cancer Res, 1984; 44(3): 1091-1097
- 17 Wheeler KT et al. Radiat Res, 1987; 109; 109-117
- 18 Giaccia A et al. Somat Cell Mol Genet, 1985; 11; 485-491
- 19 Resnic MA et al. Nucleic Acid Res, 1979; 6; 3145-3159
- 20 Jeggo A et al. Mutat Res, 1990; 291; 1-16
- 21 Swart SG et al. Radiat Environ Biophys, 1990; 29(2): 93-102
- 22 Fox JC. Mutat Res, 1990; 235; 41-47
- 23 Tabias CA et al. Radiat Res, 1985; 104 (2): S77-S95
- 24 Mifrankenberg-Skhuaper et al. Radiat Res, 1982; 82; 498-514
- 25 Goodhead DT et al. Radiat Res, 1985; 104(2): S58-S67
- 26 Tseng S. Radiat Res, 1990; 122; 333-336
- 27 Ho KY et al. Mutat Res, 1975; 30; 327-334
- 28 Bradley MO et al. Nucleic Acids Res, 1979; 7(3); 793-804
- 29 Kohn KW et al. Biochemistry, 1976; 15 (21); 4629-4637
- 30 Wlodek D et al. Radiat Res, 1990; 124; 326-337
- 31 Olive PL et al. Environ Mol Mutagen, 1988; 11; 487-495
- 32 Olive PL et al. Cancer Res, 1988; 48 (22): 6444-6449
- 33 Stamato TD et al. Radiat Res, 1990; 121(2); 196-205

## 辐射敏感突变细胞与哺乳类DNA损伤修复研究

北京放射医学研究所 周平坤综述 魏康 曹思华\*审

**摘要:** 利用突变细胞研究DNA损伤修复机制, 是DNA损伤修复研究领域的一大进展。本文综述了近年来从部分哺乳动物细胞中诱变获得的辐射敏感突变株, 及其在DNA损伤修复研究、人类DNA修复基因的分子克隆和染色体定位等方面的应用。

在生命科学研究领域中, 许多复杂生化过程的奥秘都是通过通过对单基因突变分析得以揭示。DNA修复是生物体对辐射等损伤反应的生物学过程, 过去, 人们利用大量的原核DNA修复突变株进行遗传学分析、克隆相关修复基因及纯化修复蛋白, 从而对原核DNA修复系统有了较详细的了解。近年来,

研究者们通过诱变或从某些人类遗传病病人细胞培养建株, 获得了大量哺乳类辐射敏感突变株, 并且试图利用这些突变株, 研究哺乳动物细胞辐射敏感性的分子基础、探索DNA修复系统的遗传控制和克隆DNA修复基因, 以在基因水平上了解哺乳类DNA的辐射损伤修复机制。

\*中国科学院生物物理研究所

## 一、辐射敏感突变细胞的获得

辐射敏感细胞的获得,一方面是从一些人类遗传性疾病病人细胞培养建株而来,如电离辐射敏感的AT(共济失调性毛细血管扩张症)细胞、UV敏感的XP(着色性干皮病)细胞等;另一方面是从传代培养的野生型细胞诱变而来。

诱变获得辐射敏感细胞的基本程序,首先是用射线或烷化剂对细胞进行诱变,然后从中筛选出敏感突变细胞克隆,再作生物学鉴定。目前被用作诱变细胞最多的是CHO和V<sub>79</sub>细胞,此类细胞生长好,接种率高,获得突变细胞的频率也高,大部分报道是千分之一。也有报道用V<sub>79</sub>细胞分离突变株的频率高达1/200<sup>[1]</sup>,而且以后作为基因转移的受体细胞时,与其它细胞相比更能有效的接收和嵌入外源基因<sup>[2]</sup>。此外,还有用小鼠细胞(如LY5178)作为诱变细胞的来源。

分离突变细胞的具体方法有:

(1)放射性自杀或5-溴脱氧尿嘧啶(Br-

dUrd)光解反应的富集程序<sup>[3、4]</sup>,主要用于分离UV敏感突变株。其基本原理是,有修复能力的细胞及S期细胞在修复损伤或复制过程中,使之掺入同位素标记的DNA前体物或前体类似物BrdUrd,这些细胞将因射线照射或光解反应而死亡。而修复缺陷的细胞,由于无上述DNA前体物的掺入,而继续存活下来。由于电离辐射诱发细胞DNA切除修复的剂量高达10Gy,而且切除修复量也很低,很显然此方法不宜用来直接克隆电离辐射敏感突变株。

(2)根据对射线高度敏感性的直接筛选法<sup>[5]</sup>。诱变后的细胞,长成一定大小的克隆,用射线处理,继续培养数天后,根据死亡细胞多少、细胞大小和生长异型性这三个指标来初步筛选敏感突变株。

(3)复制接种程序。诱变细胞长成克隆后,用尼龙布、过滤纸、灭菌牙签将每个克隆的一半细胞分别转移到另一个培养体系中,制成一个“复制品”,然后用射线照射“复制品”细胞,培养数天后根据细胞生长

表1a 从CHO细胞诱变获得的辐射敏感突变株

突变株	筛选依据	交叉敏感性	修复缺陷	参考文献
UV20	UV	4NQO, MMC	UDS	7, 10
UV5	UV	4NQO, MMC	UDS	10, 11
UV24	UV	4NQO, MMC	UDS	10, 11
UV41	UV	4NQO, MMC	UDS	10, 11
UV135	UV	4NQO, MMC	UDS	7, 10, 11
UV61	UV	4NQO, MMC	(4-6) 嘧啶光产物	22
UV1	UV	MMC, MMS	复制后修复	12
CHO12RO	UV	X线, MMC	UDS	3
CHO33RO	UV	X线, MMC	UDS	3
Apr-2	UV	BrdUrd	DNA聚合酶 $\alpha$	13
XR-1	$\gamma$ 线	博来霉素	dsb重接修复	6, 14
EM-9	EMS	$\gamma$ 线, UV, EMS, MMS	ssb, dsb重接	15, 16
BLM-2	博来霉素	X线, UV	ssb, dsb重接	17, 18
xrs1-7	X线	UV, EMS, MMS, MNNG*	dsb重接	19, 20
irs1SF	X线	UV, EMS	UDS	21

\*MNNG (1-甲基-1-硝基-3-亚硝胍)

表1b. 从V<sub>79</sub>细胞诱变获得的辐射敏感突变细胞

突变株	筛选依据	交叉敏感性	修复缺陷
UV7	UV		UDS
UV40	UV	MNNG, X线	
V-H1	UV	4NQO	
V-B7	UV	MMC	
V-C4	UV	4NQO, X线	
V-C8	UV	4NQO, MMC, X线	
XR-V15B	X线	4NQO, EMS, MMS	dsb重接
irs-1	X线	UV, MMC, EMS	dsb错误修复
irs-2,3,4	X线	EMS	

情况,从原来的培养体系中挑选出相应的敏感细胞克隆,再作细胞活存分析。Jones采用一种微孔板自动转移系统来转移细胞,大大提高了复制细胞克隆效率<sup>[9]</sup>。比较起来,复制接种程序最适合于分离电离辐射敏感突变细胞,其一个很大的优点是,得到的敏感细胞株没有受到照射处理,从而避免了因此所造成细胞的其它损伤。

表1列出了从CHO、V<sub>79</sub>细胞诱变获得的部分辐射敏感突变细胞。此外还有从小鼠细胞(如LY5178、FM3A)诱变获得的X射线敏感细胞M10<sup>[25]</sup>、SX-9<sup>[8]</sup>、LX830、LX821、LX227<sup>[26]</sup>等。

## 二、辐射敏感突变株的交叉敏感性 及DNA修复缺陷

从表1中可以看出,大部分的突变株除对一种射线(UV或电离辐射)敏感外,还对另一射线或其它化学物质(DNA交联剂、烷化剂等)有不同程度的交叉敏感性。这种现象将有助于我们了解不同损伤因子所致DNA损伤和修复途径相互之间的联系,以其分析突变细胞的生化缺陷。几乎所有的UV敏感突变株都对4NQO(硝基喹啉-1-氧化物)和MMC(丝裂霉素C)交叉敏感,表明这些细胞对DNA交联或DNA分子上加合物形式的损伤的切除修复缺陷。一些电离辐射

敏感细胞同时对博来霉素交叉敏感,说明有可能存在DNA双链断裂的修复缺陷。突变细胞的交叉敏感性,还进一步说明了一种DNA损伤因子能产生多种类型的DNA损伤,及各种损伤修复之间的交叉性(某一缺陷正好发生在修复不同类型损伤所共有的关键步骤上)。当用突变细胞作基因转移受体时,如果突变细胞全部敏感表型被同时纠正,那么就表示只有单个基因缺陷,这种交叉敏感性的解释是修复基因对DNA损伤反应的多效性,即单一基因制约多种表型。如果只有一种或部分敏感表型被纠正,说明突变细胞存在多个基因的缺陷。

DNA作为辐射靶分子的理论早已被接受,因此,人们很自然地将细胞辐射敏感性与DNA损伤修复紧密联系在一起。通过检测一系列的辐射敏感突变细胞的DNA损伤修复,已发现以下几种DNA修复缺陷:

(1)切除修复缺陷。表1大部分UV敏感突变细胞属于这一类。这些突变株具有相类似的表型特征,其DNA程序外合成(UDS)能力低下,如从CHO细胞诱变来的UV敏感互补组1~5细胞(UV20/43-3B, UV5, UV24, UV41, UV135)。另一株UV敏感细胞UV61(定为互补组6),其UDS能力与正常细胞相同,进一步研究表明此细胞切除(5-6)环丁烷嘧啶二聚体的能力正常,而存在嘧啶(6-4)嘧啶光产物的切除缺陷<sup>[22]</sup>。irs1SF是一株电离辐射敏感突变细胞,对UV和烷化剂EMS(乙基甲烷磺酸酯)交叉敏感,其X线诱发UDS只有正常细胞的1/2<sup>[21]</sup>。

(2)复制后修复缺陷。突变细胞UV1除对UV敏感外,同时对交联剂MMC和烷化剂交叉敏感,此细胞存在复制后修复缺陷<sup>[12]</sup>。

(3)DNA链断裂修复缺陷。很多电离辐射敏感细胞表明DNA链断裂重接修复缺陷,这类细胞同时对博来霉素(产生DNA双链断裂)及烷化剂敏感。部分细胞(如EM9、

BLM-2)的DNA单、双链断裂(dsb)修复能力都缺陷,也有的细胞(如LY-S、XR-1、xrs-1)等只存在双链断裂修复缺陷,单链断裂(ssb)修复能力正常,其中XR-1细胞的链断裂修复缺陷和辐射敏感性一样,与细胞周期有关,只发生在G<sub>1</sub>期细胞。根据遗传互补分析,DNA链断裂修复缺陷细胞至少有四个互补组<sup>[18]</sup>。

(4)错误修复。Dehenhan建立一种检测DNA双链断裂错误修复的实验模型<sup>[24]</sup>,将带有标记基因(如neo基因、gpt基因)的质粒DNA,用限制性内切酶切割后,经基因转移技术导入突变细胞中,通过检测标记基因在细胞中的表达情况,来了解细胞对酶切所致质粒DNA双链断裂修复的忠实性。Dehenhan的实验结果表明,电离辐射敏感细胞irs-1的DNA双链断裂修复的忠实度低,说明此细胞为错误修复突变株。

(5)缺陷某种特定的修复酶或蛋白因子。Apr<sup>-</sup>-2是CHO细胞的UV敏感突变株,已发现其DNA多聚酶 $\alpha$ 缺陷<sup>[13]</sup>。

此外,还有部分辐射敏感突变株尚未鉴定出缺陷所在。一方面是受检测条件的限制,另一方面还可能存在尚未明了的生化机制。

### 三、用辐射敏感突变细胞进行人DNA修复基因的染色体定位和分子克隆

借助于细胞杂交融合及基因转移技术,用辐射敏感突变细胞进行人类DNA修复基因的染色体定位和分子克隆,是近年来DNA损伤修复研究中的重大进展。

将辐射敏感突变细胞与DNA修复功能正常的人细胞(通常用外周血淋巴细胞)进行杂交融合,筛选出有辐射抗性的杂交细胞。这些杂交细胞的一个重要特点是,在传代培养过程中,人染色体不断被丢失,随着人染色体的丢失,有的杂交细胞辐射抗性消失,而有的依然保留着抗性,通过对这些杂交细胞的核型分析,就能作出人的修复基因的染

色体定位。表2列出已定位好的人DNA修复基因,其中有三个基因都位于第19号染色体。

表2. 人的部分DNA修复基因染色体定位

受体细胞	基因	染色体定位	参考文献
43-3B	ERCC-1	19q13.2-13.3	27,28
UV-5	ERCC-2	19	29,30
UV-24	ERCC-3	2	31
UV-41	ERCC-4	16	30
UV-125	ERCC-5	13	31
EM-9	XRCC-1	19	32,33
XR-1		5q	34

细胞杂交融合证明啮齿类细胞DNA修复缺陷能被人类基因纠正,从而为用此类细胞来克隆人DNA修复基因提供了理论依据。基本程序是将人的基因组DNA或mRNA、cDNA导入突变细胞,使之在细胞中表达,从中筛选辐射抗性转化克隆,并构建抗性转化细胞的基因文库,从中寻找特定的人DNA修复基因。表2例出了近年来所克隆或正在克隆的人DNA修复基因,其中第一例被克隆的修复基因是ERCC-1,是通过将人基因组DNA导入CHO细胞的UV敏感突变株43-3B中被克隆的。此基因15Kb大小,有10个外显子,转录后的前体RNA通过外显子Ⅲ的交替拼接,被加工成两个mRNA(1.0Kb和1.1Kb),分别编码273和293个氨基酸的蛋白,而只有1.1Kb mRNA的cDNA,才能纠正CHO细胞UV互补组1的切除修复缺陷<sup>[27]</sup>。最近在克隆人DNA修复基因研究中的一个重要进展是,用微细胞融合介导染色体转移,克隆出互补XP细胞DNA修复缺陷的基因,并定位在第9号染色体长臂(9q34.1)<sup>[35,36]</sup>,这一成果无疑将人DNA修复基因研究向前推进了一大步。

### 四、用辐射敏感突变细胞研究DNA修复因子

应用微注射技术将人细胞初提物或已知

原核及酵母细胞的DNA修复因子注入 辐射敏感突变细胞中, 观察其对突变细胞DNA修复过程的影响, 将是研究DNA修复过程的另一条有效途径。Vermeulen等将修复功能正常人细胞的初提物, 注入XP细胞中, 结果使所有互补组XP细胞的DNA切除修复缺陷都得到纠正<sup>[37]</sup>, 从而为纯化DNA修复因子奠定了基础。

## 结 语

辐射敏感突变细胞的分离, 推动了细胞辐射敏感性分子基础以及DNA损伤修复研究的发展, 尤其在人DNA修复基因的定位和分子克隆上更具重要意义。虽然目前已克隆到的人DNA修复基因数目不多, 但随着基因导入技术的不断发展, 利用敏感突变细胞克隆人DNA修复基因的手段仍显示出很大潜力。

## 参 考 文 献

- 1 Zdzienicka MZ et al. *Mutat Res*, 1987; 178 (2): 235-244
- 2 Hoeijmakers HJ et al. *Exp Cell Res*, 1987; 169(1): 111-119
- 3 Stefanini M et al. *Somat Cell Genet*, 1982; 8(5): 635-642
- 4 Schultz RA et al. *Environ Mutagen*, 1981; 3(1): 53-64
- 5 Thompson LH et al. *Somat Cell Genet*, 1980; 6(3): 391-405
- 6 Stamato TD et al. *Somat Cell Genet*, 1983; 9(2): 165-173
- 7 Wood RD et al. *Mutat Res*, 1982; 95(3): 505-514
- 8 Sato K et al. *Jpn J cancer Res*, 1986; 77: 456-461
- 9 Jones NJ et al. *Mutat Res*, 1987; 183(3): 271-286
- 10 Thompson LH et al. *Somat Cell Genet*, 1982; 8(6): 759-773
- 11 Thompson LH et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78(6): 3734-3737
- 12 Stamato TD et al. *Somat Cell Genet*, 1981; 7(3): 307-320
- 13 Chang CC et al. *Somat Cell Genet*, 1981; 7(2): 235-253
- 14 Giaccia AT et al. *Somat Cell Genet*, 1985; 11(5): 458-491
- 15 Thompson LH et al. *Mutat Res*, 1982; 95(3): 427-440
- 16 Ankeren SC et al. *Radiat Res*, 1988; 116(3): 511-528
- 17 Robson CN et al. *Cancer Res*, 1985; 45(11): 5303-5309
- 18 Robson CN et al. *Mutat Res*, 1988; 193(2): 157-165
- 19 Jeggo PA et al. *Mutat Res*, 1983; 112(6): 313-327
- 20 Kemp LM et al. *Mutat Res*, 1984; 132(6): 189-196
- 21 Fuller LF et al. *Mutat Res*, 1988; 193(2): 109-121
- 22 Thompson LH et al. *Mutagenesis*, 1989; 4(2): 140-146
- 23 Zdzienicka MZ et al. *Mutat Res*, 1988; 194(3): 239-249
- 24 Dehenhan PG et al. *Mutat Res*, 1988; 199(1): 1-7
- 25 Shiomi T et al. *Mutat Res*, 1982; 103(1): 61-69
- 26 Sato K et al. *Mutat Res*, 1983; 121(4): 281-285
- 27 Van Duin et al. *Cell*, 1986; 44(6): 913-921
- 28 Brook JD et al. *Cytogenet Cell Genet*, 1985; 40(3): 490-497
- 29 Weber CA et al. *Mol Cell Biol*, 1988; 8(3): 1137-1145
- 30 Siciliano MJ et al. *Am J Hum Genet*, 1987; A42
- 31 Thompson LH et al. *Somat Cell Mol Genet*, 1987; 13(5): 539-547
- 32 Thompson LH et al. *Mol Cell Biol*, 1985; 5(4): 881-884
- 33 Sciliano MJ et al. *Mutat Res*, 1986; 174(4): 303-308
- 34 Giaccia AT et al. *Abstracts of Papers for the 37th Annual Meeting of the Radiation Research Society* 1989; Cn-2 P83
- 35 Ishizakizet al. *Mutat Res*, 1990; 235(3): 209-215
- 36 Tanaka K et al. *Nature*, 1990; 348 (6296): 73-76
- 37 Vermeulen W et al. *Mutat Res*, 1986; 165(8): 199-205