

核细胞分化的能力, CFU-S 是促进造血恢复的主要成分。CFU-S 和骨髓有核细胞的变化代表机体造血组织恢复的能力^[3]。从本实验中可以看出, 银耳多糖注射剂可以保护受照小鼠的造血功能。

以银耳多糖和孢子为主要成分的银耳孢糖胶囊具有抗辐射、升高白细胞等作用。通过本实验可以说明银耳孢糖胶囊中具有抗辐射作用的成分是银耳多糖, 且银耳多糖注射剂保护受照小鼠造血功能的效果强于银耳孢糖胶囊。

辐射损伤是肿瘤治疗和意外核事故的主要损伤类型之一, 如何有效的防治是急需解决的问题, 中药在这方面具有一定的优势, 已发现许多植物多糖对造血功能的辐射损伤有一定的治疗作用, 如地黄多糖^[4]、梁金菇多糖^[5]等。

多糖类药物发挥药效作用有一个最合适的剂量范围, 从本实验观察到银耳多糖在 6~12mg/kg 剂

量时, 药效作用较好。

小鼠受照射后数日内造血功能损伤较大, 在第 9 日时, 造血功能开始恢复, 因此本研究观察了第 9 日时的各项指标^[6]。

参 考 文 献

- 1 郑仕中. 银耳的化学成分和药理研究进展. 中国药理学杂志, 1993, 28(5): 164-267.
- 2 中华人民共和国卫生部药政局. 新药临床前研究指导原则汇编, 1993.
- 3 杨福军, 王汝勤, 赵云庭, 等. E838 对造血组织的放射防护作用. 中国肿瘤临床, 1998, 25(11): 832-833.
- 4 黄霞, 刘杰, 刘惠霞, 等. 熟地黄多糖对血虚模型小鼠的影响. 中国中药杂志, 2004, 29(12): 1168-1173.
- 5 席亚明, 席亚荣, 孙延庆, 等. 梁金菇多糖对辐射损伤小鼠造血功能的影响. 中华放射医学与防护杂志, 2002, 22(4): 291-293.
- 6 周永, 虞漫天, 杨镇洲. 三羟异黄酮对照射小鼠造血系统损伤的防护作用. 中华放射医学与防护杂志, 2002, 25(1): 21-24.

(收稿日期: 2005-12-28)

·放射生物学·

多聚(ADP-核糖)聚合酶与电离辐射

杜翔 龚守良

【摘要】 多聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)是广泛存在于细胞内的一种具有蛋白修饰和核苷酸聚合作用的聚合酶, 参与细胞 DNA 损伤后的修复过程。已经证实, PARP 具有多种生理、生化功能, 并与细胞的死亡相关, 电离辐射等各种细胞损伤因素都可以影响 PARP 活性。

【关键词】 细胞凋亡; 电离损伤; 多聚(ADP-核糖)聚合酶

【中图分类号】 Q555, Q691.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2006)02-0116-04

Poly (ADP-ribose) polymerase and ionizing radiation

DU Xiang, GONG Shou-liang

(Ministry of Health, Radiobiology Research Unit, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China)

【Abstract】 Poly ADP-ribose polymerase (PARP) is a kind of polymerase which widely exists in cells, has the function of protein modification and nucleotide polymerization, and participates in the repair processes after DNA has been damaged. It has been proved that PARP has lots of physiological and biochemistry functions and correlates with cell death. Many kinds of damage factors such as radiation may influence the activity of PARP.

【Key words】 Apoptosis; Radiation injuries; Poly (ADP-ribose) polymerase

多聚(ADP-核糖)聚合酶[poly (ADP-ribose) polymerase, PARP]是广泛存在于细胞内的一种具有蛋

白修饰和核苷酸聚合作用的聚合酶。环境因素、氧化剂或者自由基等各种有害因子所造成的 DNA 断裂损伤均可以影响 PARP 的活性, 引起包括自身在内的相应蛋白核苷多聚基化, 从而影响相关蛋白的活性, 进一步影响由于损伤修复而引起细胞内一系

作者单位: 130021 长春, 吉林大学公共卫生学院卫生部放射生物学重点实验室

通讯作者: 龚守良(E-mail: gongsl@163.com)

列的生化改变。

1 PARP 的结构特性

PARP 分子分为 3 个功能区域: N 末端的 DNA 结合域、C 末端的催化域和中间自我修饰域。N 端的 DNA 结合域具有核定位信号(nuclear localization signal, NLS)和 2 个锌指(zinc finger)结构, 其作用为非序列依赖型地识别 DNA 单链或者双链断裂。C 端的催化域则具有氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide, NAD⁺)结合位点, 能够结合 NAD⁺, 以其为底物, 裂解成为 ADP-核糖和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD), 并催化 ADP-核糖聚合到其他核蛋白(如组蛋白)上, 使其形成大分子同源聚合物, 发生多聚 ADP-核糖基化。多聚 ADP-核糖基化的蛋白质活性受到抑制, 与染色体分离, 并使染色体变得松散, 从而促进 DNA 修复酶对受到损伤的染色体进行修复。PARP 在发生自身多聚基化后则与结合的损伤 DNA 链解离, 并被其他酶水解。中间自我修饰域则含有自身核糖基化的区域, 在发生断裂后能够自身活化, 大大地增强活性^[1]。

2 PARP 的生物学功能

2.1 PARP 与 DNA 损伤修复

大量资料表明, 细胞内的 DNA 损伤可以使 PARP 的活性增强。应用 PARP 抑制剂或 PARP 缺陷细胞, 则表现出细胞对各种损伤的敏感性增加。

关于 PARP 的损伤修复机制, 大致认为基于如下过程: 首先, PARP 识别并连接 DNA 断裂的缺口, 这种结合不但可以阻止染色体的重组, 同时也可自身激活, 大大提高 PARP 自身的活性。同时, 进行催化功能, 使自身和相关核蛋白多聚 ADP-核糖基化。接着, DNA 断裂的信息被传递, 导致修复过程被启动。修复完成后, PARP 被水解, 并从 DNA 链上脱落。

2.2 与其他损伤修复因子组成损伤修复网络

2.2.1 PARP 与 X 射线修复交叉互补-1(X-ray repair cross complementing 1, XRCC1)基因

XRCC1 基因也是动物细胞内与 DNA 损伤修复相关的基因, 其主要作用在于 DNA 的单链断裂修复, 主要作用途径为碱基切除修复(base excision repair, BER)途径。很早就发现, XRCC1 通过与 PARP、

DNA 修复酶 III 和 DNA 多聚酶 β 相互作用来影响 DNA 的损伤修复。一般认为, PARP 可以通过锌指结构和中央区连接到 XRCC1 的中央区域(301~402), 此区域包含 1 个乳腺癌易感基因 C 端(breast cancer susceptibility gene C terminus, BRCT)区域(BRCT1 的 C 端)。显然, 这种相互作用在细胞的损伤修复过程中发挥重要作用。体内 Cos-7 和 Hela 细胞中 XRCC1 的过度表达可明显降低 PARP 的作用, 加强 PARP 对细胞的潜在保护作用。此外, 也有人认为 PARP 具有在 DNA 单链损伤修复后吸引结合 XRCC1 并形成支架的作用, 也证明 DNA 氧化损伤后 XRCC1 复合体的形成和作用必须依赖 PARP 的存在^[2], 暗示细胞内 DNA 单链损伤修复是 XRCC1 和 PARP 共同作用的结果。Okano 等^[3]也提到, 应用 PARP 的抑制剂 3-氨基苯甲酰胺(3-aminobenzamide, 3-AB)后, 细胞对紫外线的抗性降低, 而在 XRCC1 表达缺陷的中国仓鼠卵巢细胞系 EM9 中, 紫外线损伤内切酶(UV damage endonuclease, UVDE)表达也很大程度上使细胞对紫外线的敏感性增加, 即 PARP 和 XRCC1 缺陷均使细胞对紫外线的敏感性升高; 然而, 增加 3-AB 却不能继续增加 EM9 细胞对紫外线的敏感性, 从而证明 PARP 和 XRCC1 以相同的途径进行 DNA 单链断裂的修复。值得一提的是, XRCC1 可与 DNA 修复酶 III 结合形成稳定的复合物, 而 PARP 又可通过其锌指结构与 DNA 修复酶 N 端结合^[4], 从而使 PARP、XRCC1 和 DNA 修复酶 III 形成一个复杂的单链断裂修复网络。

2.2.2 PARP 与 p53

核磷酸化蛋白 p53 已被认为是细胞生长过程中的主要负调控因子, 能相应地抑制细胞的恶性生长和肿瘤的发生, 具有“分子警察”功能。为研究 PARP 缺失细胞中野生型 p53 的表达和调节功能, 有人分别研究了 PARP 和野生型 p53 基因剔除的小鼠细胞, 发现前者 p53 蛋白表达均以另路剪接 p53(alternative splice p53, As p53)的形式存在, 而正常剪接 p53 蛋白则无法存在于 PARP 剔除的细胞内^[5]。有人在研究过氧化氢诱导人气管上皮细胞 Fas 表达上调的报道中指出, PARP 抑制剂能够完全抑制过氧化氢诱导的 Fas 易位和 p53 蛋白活性, 从而证明 PARP-p53 通路在过氧化氢诱导 Fas 表达上调中发生作用^[6], 进一步揭示了 PARP 和 p53 在调

节细胞功能上的密切联系。有研究指出, 缺乏 PARP 使野生型 p53 蛋白丧失稳定性, 其原因为核输出(nuclear export)的过度活化; 而在正常细胞, 由于连接了包含 PARP 的核输出信号(nuclear export signal, NES)p53 蛋白的 C 端, 从而屏蔽了 NES, 并在一定程度上阻止了核输出, 维持了 p53 蛋白的稳定性^[7], 从而证实了 PARP 对 p53 的作用。已知 p53 调控细胞生长与细胞的凋亡相关, 有人认为 PARP 和 p53 各自独立作用于细胞的 DNA 双链修复过程^[8]。

2.3 PARP 维持染色体的完整性

De Blasio 等^[9]发现, 应用 PARP 抑制剂 3-AB 可使人骨肉瘤细胞 MG-63 限制生长并进入分化。其机制为, 在此种细胞中, 异常的基因可通过磷酸化导致成视网膜细胞(retinoblastoma, RB)蛋白的灭活, 从而使细胞无限制地增长; 然而, 通过使用 3-AB 抑制 PARP 的活性可有效抑制多聚 ADP-核糖基化, 导致 RB 蛋白的活性形式和 pRB-E2F 复合体(RB 蛋白和转录因子 E2F 复合体)的增加, 抑制细胞过度增长。

对来源于 PARP^{-/-}小鼠成纤维细胞和脾细胞, 均显示较高的姐妹染色单体交换, 从遗传毒性效应来看也表现出较高的微核率。这些结果提示, PARP 具有抗同源重组的功能^[10]。此外, 也有人发现 PARP 和端粒的长度相关。端粒是位于染色体一端的双链结构, 其功能为保持染色体的稳定性, 防止染色体融合的发生。有人应用荧光原位杂交和流式细胞术研究发现, PARP 缺陷的细胞端粒变短, 染色体稳定性降低, 包括染色体融合、断裂等^[11]。

3 PARP 与细胞死亡

3.1 PARP 与细胞凋亡

尽管在以往的研究中发现细胞凋亡的发生和调节有多种途径, 但 caspases 是与其凋亡最为密切的一组蛋白, 其中以 caspase-3 最为重要, 多条凋亡途径最终汇聚并通过 caspase-3 来实现凋亡的发生。PARP 具有促进细胞 DNA 损伤修复的作用, 凋亡中的细胞需要克服 PARP 的修复作用及其造成的 NAD⁺和 ADP 耗竭, 即抑制 PARP 的活性, 才能使细胞凋亡。实际上, 促凋亡因子 caspase-3 恰好具备这种抑制 PARP 的作用。一般认为, caspase-3 能够切割 PARP, 使之裂解成相对分子质量为 89×10³和

24×10³的片段^[12]。这种作用能够抑制 PARP 对 DNA 的修复作用, 达到促进细胞凋亡的目的; 而且, 由于 PARP 裂解的 24×10³片段能够结合在 DNA 断裂点, 从而达到阻止修复酶修复的作用; 同时, caspase-3 的切割作用还减少了 PARP 过度活化而引起 ADP 和 NAD⁺的耗竭, 从而保证了细胞凋亡的顺利进行。实验证实, 通过使用 PARP 锌指的特异性抗体虽然不能抑制 PARP 的催化活性, 却能够有效抑制 caspase 对 PARP 的裂解作用, 从而达到抑制细胞凋亡、延长其存活期的作用^[13], 这也进一步证明了 caspase 对 PARP 的抑制作用。不过, 有人认为, PARP 的裂解是由 caspase-7 而不是 caspase-3 作用的^[14]。因此, 对于 caspase 和 PARP 的关系还有待进一步研究。

3.2 PARP 与细胞坏死

已证实, NAD⁺和 ADP 的大量消耗是 PARP 过度活化所致, 是细胞坏死的主要机制。细胞凋亡是一个耗能的过程, 需要细胞内有一定的 ADP。研究表明, 细胞损伤后 PARP 过度激活, NAD⁺的大量损失和重新生成 NAD⁺, 可能导致 ADP 的大量耗竭, 引起细胞坏死, ADP 决定了细胞死亡方式, 即相对高量的 ADP 允许细胞沿凋亡方式发展, 而低量 ADP 或耗竭则使细胞向坏死方式发展。Los 等^[15]通过研究 L929 细胞的不同死亡方式进一步证明, L929 纤维肉瘤细胞在肿瘤坏死因子作用下能诱导其坏死, 而 CD95 则诱导其凋亡, 但其不同方式发生的生化作用机制则仍然未知, CD95 作用 L929 细胞后 1h 发现 caspase-3 的活性亚基和 PARP 的裂解物, 从而证明 CD95 能够激活 caspase-3 的活性, 导致 PARP 的大量裂解, 最终避免了 ADP 的大量消耗而使细胞向凋亡发展; 相反, 肿瘤坏死因子作用于 L929 细胞, 大大延迟 caspase 的激活; 同时, PARP 裂解物 89×10³片段在诱导细胞死亡后 8h 才被观察到。这些结果证明, PARP 和 caspase 在细胞死亡方式上起决定的作用。另外, 最新的报道证实, 线粒体通透性转变(mitochondrial permeability transition, MPT)也与 NAD⁺耗竭一样, 成为连接 PARP 激活和损伤、诱导细胞死亡这一过程中的必经阶段^[15]。

4 PARP 与辐射敏感性

PARP 和蛋白激酶等 DNA 损伤修复酶与 DNA

损伤后修复相关,所以与细胞辐射抗性也存在一定的关系。分别应用 NU7026(一种 PARP 抑制剂)和 AG14361(一种蛋白激酶抑制剂)后,细胞均表现为:①辐射敏感性增加:电离辐射所致的细胞毒性作用,应用抑制剂比不应用的增强,以 90%细胞杀伤增强因子(potential factor at 90% cell killing, PF₉₀)作为衡量指标, NU7026 用于蛋白激酶正常细胞和 AG14361 用于 PARP^{+/+}细胞造成辐射细胞毒性作用,而联合应用则造成更大的辐射毒性作用,说明两者分别作用于不同的途径;②潜在致死性损伤修复(potential lethal damage repair, PLDR)的减少:对于 V3YAC 细胞,分别应用 NU7026 和 AG14361 能够有效抑制 PLDR,其效果小于联合应用,NU7026 甚至能够完全抑制 PLDR;③此外,NU7026 和 AG14361 还能够减少细胞对 DNA 双链断裂的修复,照射后 60 min,两者均具有抑制双链断裂修复的作用,在联合应用后甚至可减少 90%双链断裂的修复^[16]。

在 PARP 和蛋白激酶的对比研究中发现,NU7026 和 AG14361 均能产生抑制 DNA 损伤修复和增加辐射敏感性的效应,且联合应用效应大于单独一种,这一结果均证明 2 种抑制剂通过作用于不同途径而影响其损伤修复。

另外,关于 PARP 与低剂量辐射的相互关系,Chalmers 等^[17]报道,应用 PARP 化学抑制剂可以显著提高 V79 和 CHO 等细胞对于低剂量辐射的敏感性;有的细胞则无此作用,PARP-1 剔除的细胞就无效应。因此,关于 PARP 和细胞辐射敏感性方面尚需深入探讨。

参 考 文 献

- 1 Alvarez-Gonzalez R, Pacheco-Rodriguez G, Mendoza-Alvarez H. Enzymology of ADP-ribose polymer synthesis. *Mol Cell Biochem*, 1994, 138 (1-2): 33-37.
- 2 El-Khamisy SF, Masutani M, Suzuki H, et al. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(19): 5526-5533.
- 3 Okano S, Kanno SI, Nakajima S, et al. Cellular responses and repair of single-strand breaks introduced by UV damage endonuclease in mammalian cell. *J Biol Chem*, 2000, 275(42): 32635-32641.
- 4 Leppard J, Dong Z, Marckey ZB, et al. Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly (ADP-ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol*, 2003, 23 (16): 5919-5927.
- 5 Wesierska-Gadek J, Wang ZQ, Schmid G, et al. Reduced stability of regularly spliced but not alternatively spliced p53 protein in PARP-deficient mouse fibroblasts. *Cancer Res*, 1999, 59(1): 28-34.
- 6 Fujita T, Maruyama M, Araya J, et al. Hydrogen peroxide induces upregulation of Fas in human airway epithelial cells via the activation of PARP-p53 pathway. *Am J Repair Cell Mol Biol*, 2002, 27(5): 542-552.
- 7 Wesierska-Gadek J, Wojciechowski J, Schmid G. Central and carboxy-terminal regions of human p53 protein are essential for interaction and complex formation with PARP-1. *J Cell Biochem*, 2003, 89(2): 220-232.
- 8 Süss S, Scholz CJ, Bürkle A, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1) and p53 independently function in regulating double-strand break repair in primate cells. *Nucl Acid Res*, 2004, 32(2): 669-680.
- 9 De Blasio A, Messinab C, Santullib A, et al. Differentiative pathway activated by 3-aminobenzamide, an inhibitor of PARP in human osteosarcoma MG-63 cells. *FEBS Letter*, 2005, 579 (3): 615-620.
- 10 Wang ZQ, Stingl L, Morrison C, et al. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev*, 1997, 11(18): 2347-2358.
- 11 d'Adda di Fagagna F, Hande MP, Tong WM, et al. Functions of poly (ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability. *Nat Genet*, 1999, 23(1): 76-80.
- 12 Decker P, Isenberg D, Muller S. Inhibition of caspase-3-mediated poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) apoptotic cleavage by human PARP autoantibodies and effect on cells undergoing apoptosis. *J Biol Chem*, 2000, 275(12): 9043-9046.
- 13 Los M, Mozoluk M, Ferriari D, et al. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(3): 978-988.
- 14 Germain M, Affar EB, D'Amours D, et al. Cleavage of automodified poly (ADP-ribose) polymerase during apoptosis: Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem*, 1999, 274(40): 28379-28384.
- 15 Alano CC, Ying W, Swanson RA. Poly (ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD⁺ depletion and mitochondrial permeability transition. *J Cell Biochem*, 2004, 279(18): 18895-18902.
- 16 Veuger SJ, Curtin NJ, Richardson CJ. Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly (ADP-Ribose) polymerase-1. *Cancer Res*, 2003, 63(10): 6008-6015.
- 17 Chalmers A, Johnston P, Woodcock M. PARP-1, PARP-2, and the cellular response to low doses of ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 58(2): 410-419.

(收稿日期: 2005-07-11)