

10 Lehmann AR. <i>Cancer Res.</i> 1995;55:968-970	19 Williams GT, Smith CA. <i>Cell</i> , 1993;74: 777
11 Jeggo PA et al. <i>Int J Radiat Biol.</i> 1994;66(5): 573-577	20 Stewart BW. <i>J Natl Cancer Inst</i> , 1994;86(17): 1286-1296
12 陆长德. <i>生命科学</i> , 1995;7(2):1-10	21 Allan DJ. <i>Int J Radiat Biol</i> , 1992;62(2):145
13 Coleman CN. <i>Radiother Oncol</i> , 1993;28:1-15	22 Levine EL et al. <i>Radiother Oncol</i> , 1995;37:1-9
14 Szumiel I. <i>Int J Radiat Biol</i> , 1994;66(4):329	23 Meyn RE et al. <i>Int J Radiat Biol</i> , 1994;66(6): 655-659
15 Marx J. <i>Science</i> , 1994;266:1321-1322	24 Collins MKL et al. <i>BioEssays</i> , 1994;16(2): 133-138
16 Kastan MB et al. <i>Cancer Metastasis Rev</i> , 1995; 14:3-15	25 Datta R et al. <i>Proc Natl Acad Sci</i> , 1992;89: 10149-10152
17 Nagasawa H et al. <i>Int J Radiat Biol.</i> 1994;66 (4):373-379	
18 Yanagihara K et al. <i>Int J Radiat Biol.</i> 1995;67 (6):677-685	

(收稿日期:1996-01-22)

蛋白质-DNA 相互作用与辐射诱导的基因转录

白求恩医科大学卫生部放射生物实验室(长春,130021) 陈沙力综述 刘树铮审校

摘要:综述了电离辐射诱导基因及其表达产物的研究现状,阐明了蛋白质-DNA 结合作用及转录水平调控的研究进展,讨论了辐射诱导基因转录的信息传递通路及其意义。

关键词:电离辐射 基因转录 蛋白质-DNA 相互作用

基因转录调控的关键因素是转录、翻译和应答的成分及其特殊结构。真核生物的转录起始是由顺式作用元件(cis-acting element)与反式作用蛋白因子(trans-acting protein factors)间的复杂作用所调控。在顺式调控区域中,启动子靠近转录起始位点且常由邻近的元件(如 TATA box)和较远的元件(如 CCAAT box)所构成。启动子和增强子常由几个分离而重复的元件组成,其排列、组合方式不同,转录激活模式也不尽相同,其中每个元件都可以由一个或更多的反式作用因子特异地识别。只有当几个有关的 DNA 特异序列都被调控因素占据后, RNA 转录才能进行。因此,蛋白质-DNA 相互作用在基因转录激活过程中起着重要调节作用。

1 辐射诱导的基因表达及其产物

电离辐射诱导多种细胞一系列基因的表达或使另一些基因表达下调和关闭^[1,2]。截至

1992 年已报道的电离辐射诱导激活的基因至少有 20 多种^[2],主要包括 c-fos、c-jun、jun-B 及 EGR₁、NF-κB、TNF-α、IL-1、FGF、PKC、gadd45、α 干扰素、胶原酶等基因。这些研究始于对原核细胞的观察,后来扩展到真核细胞,主要是体外培养的中国仓鼠细胞、多种胚胎细胞和某些肿瘤细胞株。研究中多数使用较高剂量,诱导的基因产物主要涉及 DNA 修复、细胞周期进程、细胞信息传递和细胞凋亡等。

进一步的研究又发现辐射诱导激活 fos-B、jun-D、jun/fos、c-myc、EGR₂、EGR₃、EGR₄、IL-2、PCNA、p53、PDGF、FGF、Ptk-3、RNA 聚合酶 β、金属硫蛋白、酪氨酸激酶和 DT 黄递酶等基因^[3-5]。Boothman 等^[6]用差示杂交技术在 X 射线照射的正常人细胞和肿瘤细胞中分离出一系列 cDNA 克隆,其中有 t-PA(组织型血纤维蛋白溶酶原活化因子)、ST-1(基质溶素-1)、MMP(基质金属蛋白酶)

和 TK(胸苷激酶)等的 cDNA。他们认为,诱导的某些基因产物可能参与细胞的酶促反应。

已知低剂量辐射可诱导 SHE 细胞的 c-fos 等原癌基因和 PKC(蛋白激酶 C)基因的表达,并使 α -微管蛋白、 β -和 γ -肌动蛋白及鸟氨酸脱羧酶等的转录水平增高^[7,8]。75mGy X 射线全身照射小鼠胸腺和脾脏细胞中 c-fos 和 c-jun 的 mRNA 转录水平增高^[9],推测 AP-1 的水平可能上调。75mGy X 射线全身照射 4 小时,经二维电泳发现脾细胞表达一些新蛋白质,其中有的蛋白质具有生物活性^[10]。低剂量辐射诱导的这些早期基因产物的功能尚不清楚,可能在后期转录中参与诱导细胞因子、转录因子、转录调节因子或转录调节抑制因子。

2 蛋白质-DNA 相互作用及转录调节

真核基因转录的启动始于转录前起始复合物的形成,即转录因子间和转录因子与调节蛋白因子间复合物(反式作用蛋白因子)的形成与解聚,反式作用蛋白因子与顺式作用元件相互作用,即蛋白质-DNA 相互作用启动转录。

Sherman 等^[11]用 Northern blot 方法证实,5~50Gy X 射线照射 HL-60 细胞后 c-jun、c-fos 和 jun-B RNA 表达增强,50Gy X 射线照射后 3 小时 HL-60 细胞的 c-jun mRNA 表达增强 9.6 倍。为了确定这种表达可能的调控机制,作者用正常 HL-60 细胞所具有的肌动蛋白基因转录作为阳性对照,用不能检出的 β -球蛋白基因转录作为阴性对照。结果显示,照射细胞 c-jun 基因转录增强 7.2 倍,而无肌动蛋白基因转录效应,说明辐射诱导 c-jun 基因表达至少部分是通过转录机制。为了研究 c-jun mRNA 表达是否存在转录后机制,用蛋白合成抑制剂 CHM(放线菌酮)作对比参照,结果表明,CHM 本身可轻微诱导表达,而辐射与 CHM 同时作用可明

显增强表达,比单纯辐射作用增强 3.6 倍。提示 CHM 通过转录后或翻译后机制增强辐射细胞的 c-jun mRNA 表达。HL-60 细胞接受照射后 3 小时,用 RNA 合成抑制剂(放线菌素 D)抑制进一步的转录,结果表明,c-jun mRNA 的半衰期为 58 分钟,在转录抑制的情况下,CHM 使半衰期延长到 94 分钟,进一步说明辐射诱导 c-jun mRNA 增强表达至少部分是通过转录后或翻译后机制,包括抑制 c-jun mRNA 转录的蛋白质合成。mRNA 合成的启动是基因表达调控关键的控制点,依赖于某些转录因子识别特异性 DNA 控制序列,而转录因子多以二聚体形式结合 DNA,如 Jun 和 Fos 蛋白形成异源性二聚体复合物识别基因 AP-1 控制序列,引起转录。

Sahijdak 等^[12]用已知的能与特异转录因子结合的控制序列探针检测经 4.5Gy γ 射线照射的 UI-Mel 细胞,发现蛋白提取物中 CREB、NF- κ B 和 SP1 的 DNA 结合活性的增高,而 AP-1、AP-2、AP-3、GRE 和 Oct-1 则无改变,说明高剂量 γ 射线选择性地激活了某些转录因子,通过与启动子控制序列位点结合,诱导特异性基因转录。电离辐射作用后,一些转录因子的结合活性发生特异性变化,由于某些转录因子,如 SP1、CREB 和 NF- κ B 的激活不受 CHM 或放线菌素 D 的抑制,因此这些变化不依赖于新蛋白的合成或 mRNA 的转录。照射后并不是所有转录因子的靶基因都要被激活,而是某些基因被激活,如许多 SP1 靶基因(胸苷激酶、t-PA 和 DT 黄递酶)能被激活,而 NF- κ B 反应基因产物在 UI-Mel 细胞中很少检出。因此,许多有关调节蛋白质(转录因子和蛋白调节因子)可能以某种特异的方式相互作用,并在特定条件下诱导转录。

Prasad 等^[4]用 0.25~2Gy γ 射线照射 EB 病毒转染的 244 B 细胞能诱导激活 NF- κ B 的表达,其中以 0.5Gy 照射组最为明显。NF- κ B 激活靶基因转录有两种方式:①在细

胞浆 PKC 使正常 NF- κ B/I κ B 抑制复合物中的抑制因子 I κ B 磷酸化,降低了 I κ B 与 NF- κ B 的亲合力,NF- κ B 从抑制复合物中游离出来,然后转入细胞核,诱导特定的基因转录^[13];②电离辐射作用所产生的活性氧破坏 NF- κ B/I κ B 复合物,使 NF- κ B 游离并进入细胞核激活转录^[14]。

Yamamoto 等^[15]认为,CREB 单体和二聚体组成两种形式的 DNA 蛋白复合物,其转录活性的变化随两种复合物的比值而改变,二聚体复合物的形成和激活是通过 PKC 介导的磷酸化过程^[16]。在电离辐射作用后两种复合物均增加,但二聚体复合物结合活性明显增高^[15],CREB 靶基因的转录随之增强。

在电离辐射后,包含 SP1 在内的多聚蛋白复合物增加^[12]。虽然其与 DNA 结合的确切机制尚不清楚,但推测结合的增加可能是由于和 Rb(视网膜细胞瘤)基因产物相关的一种蛋白有关^[17]。SP1 和 Rb 基因产物形成紧密的蛋白质-蛋白质结合,然后与 RCE(或 SP1)DNA 控制序列结合,激活转录。因辐射后 SP1 单聚体复合物几乎没有变化,推测同 NF- κ B 基因的激活一样,以预存的无活性的蛋白形式存在的 SP1 本身不能被激活,而包含 SP1 的多聚蛋白复合物结合活性增高。该复合物可能调节 SP1、RCE 位点的基因表达。

Boothman 等^[5]研究了 X 射线诱导的转录因子与细胞核提取物中 t-PA 基因启动子的结合,发现 4.5Gy X 射线照射 UI-Mel 细胞后,4 小时内此种转录因子的 DNA 结合活性增高。并初步确定了转录因子结合的控制序列部位,命名为 XRE 区(即 X 射线反应元件区),不同于任何已知的转录因子控制序列。

电离辐射是否可激活“特异的”DNA 结合蛋白尚无定论。Teale 等^[18]比较了正常人和 AT(毛细血管扩张性共济失调症)病人经 EB 病毒转染的淋巴瘤细胞系体外照射后诱

导 DNA 结合蛋白,其结合序列为 3'-CAGT-CAATCCCACCTAG-5',用 Klenow 聚合酶对寡核苷酸标记³³P-dCTP。剂量效应研究表明,正常细胞(C3ABR)在 2.5Gy 以上 γ 射线照射后核提取物的结合呈剂量依赖性增加,在 0.5 和 1Gy 照射未见结合;而 AT 细胞(AT1ABR)则在未照射对照中即有结合,照射后无明显变化。同时用 UV 照射与 γ 射线进行对比,发现 24J 的 UV 射线在 C3ABR 细胞只能引起微弱的反应。故认为上述 DNA 结合蛋白是电离辐射诱导的特异因子。在未照射的正常 C3ABR 中仅胞浆内存在此 DNA 结合蛋白;照射后迅速向核内转移,胞浆内不复存在;照射后 7 小时从核内消失,其在核内的短暂出现,提示对辐射的早期反应可能起重要作用。TPA(佛波酯)可使 C3ABR 细胞的核内出现很高的结合活性,推测 PKC 参与此反应。此反应不需新蛋白合成,而是将预存于细胞浆内的结合因子经翻译后修饰转移到核内,发挥转录因子的作用。

3 电离辐射诱导基因转录的信息传递通路

PKC 是丝裂原和 DNA 损伤等多种刺激因素诱导激活基因表达的细胞信息传递通路中的重要媒介之一。Woloschak 等^[19]证实低剂量 X 射线和 γ 射线照射细胞 1 小时内诱导 PKC mRNA 表达增强,提示电离辐射可能通过 PKC 传导通路调节基因表达。为了进一步确定 PKC 是否参与辐射激活的即刻早期基因表达过程,Hallahan 等^[20]观察了 X 射线照射细胞后 jun、EGR₁ 和 fos 不同类型的即刻早期基因的 mRNA 表达,同时用 PKA(蛋白激酶 A)选择性抑制剂(HA1004)、PKC 抑制剂(H₇)和长时间 TPA 预处理作对比参照,结果发现,辐射后 EGR₁ 和 jun mRNA 迅速、短暂增强表达(0.5~3 小时),H₇ 或长时间 TPA 预处理使表达下调,而 HA1004 不影响表达。高剂量辐射诱导的 NF- κ B 经 PKC 通路激活转录已得到证实。酪氨酸磷酸化也

是辐射激活 PKC 的重要步骤。以上结果证实,电离辐射通过 PKC 依赖性信息传递通路调节 EGR₁ 和 jun 的表达,而不依赖 PKA 传导通路。

已有实验证明^[9],低剂量全身照射可引起胸腺和脾淋巴细胞信息传递的变化,表现在三个环节:一是接受第一信使的受体 TCR/CD3 表达上调;二是第二信使活动升高,致使 PKC 激活和 $[Ca^{2+}]_i$ (细胞内钙离子) 动员增强;三是第三信使 c-jun 和 c-fos 转录水平增高。这些变化表明,低剂量辐射可促进淋巴细胞内信息传递过程,使淋巴细胞分泌 IL-2 (白细胞介素-2) 和 γ -IFN (γ -干扰素) 增多以及 IL-2R (白细胞介素-2 受体) 表达上调,最终引起淋巴细胞功能激活和克隆扩增,成为免疫增强效应的基础。

Mohan 等^[21]用低剂量 γ 射线照射人体淋巴母细胞 244B 细胞系,发现 NF- κ B 的 DNA 结合活性明显增高,可被抗氧化剂乙酰半胱氨酸所抑制,证实这种反应是被活性氧中间物 (ROIs) 所激活。Datta 等^[22]证实,辐射启动的基因转录信息传递通路可被各种自由基清除剂所抑制。Hallahan^[20]提出 TNF (肿瘤坏死因子) 的早期基因表达是由细胞器的氧化所启动,经代谢过程形成第二信使,进一步激活 PKC 或其它激酶,导致一系列磷酸化过程,转录因子磷酸化导致早期基因如 c-jun、c-fos 和 Egr-1 的转录。一些不需经蛋白合成和编码转录因子的基因,通过预存蛋白质的翻译后修饰诱导后期基因表达。

辐射诱导基因转录是十分复杂的过程,可能有许多信息传递通路参与。不同剂量范围的辐射可能诱导不同的基因系列表达,通过不同的信息传递通路和转录因子,产生不同的效应。细胞类型的反应特点对上述效应产生明显的影响,这就更增加了这一领域研究工作的复杂性。

4 展望

高剂量电离辐射诱导激活许多细胞基因

表达,表达产物可能参与细胞变异、癌变、损伤修复、细胞周期进程和细胞死亡等。低剂量电离辐射有所不同,所诱导激活的基因及产物可能参与适应性反应、免疫增强、肿瘤抑制和神经内分泌调节等过程。虽然确切的发生机制还不清楚,但进一步的深入研究无疑有助于了解辐射激活基因,诱导新蛋白质的本质和功能。特别是低剂量辐射如何影响基因表达的研究尚少,对某些基因是否具有特异诱导或特异诱导抑制是一个值得研究的问题。

电离辐射可能选择性地激活某些转录因子,特异地结合到启动子控制序列位点上引起基因转录。不同类型细胞的辐射激活转录因子及其在基因表达调控中的作用特点,值得进一步研究。

参考文献

- 1 Boothman DA et al. X-ray-induced proteins and genes in human cells. In: Wallace S eds, New York: Wiley-Liss, 1990;309
- 2 Albert J et al. Annu Rev Genet, 1992; 26:507
- 3 Hallahan DE et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1991;88:2156-2160
- 4 Prasad AV et al. Radiat Res, 1994; 138:367
- 5 Shirou S et al. Radiat Res, 1995;143:1-7
- 6 Boothman DA et al. Radiat Res, 1994;138: S68-71
- 7 Woloshak GE et al. Cancer Res, 1990;50:339-344
- 8 Woloshak GE et al. Radiat Res, 1994;138:S56
- 9 Liu SZ et al. Int J Occp Med Toxicol, 1994;3: 107-117
- 10 Liu SZ et al. Proc ISBELLES. Chang Chun, China, 1993:71
- 11 Sherman ML et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1990;87:5663-5666
- 12 Sahijdak WM et al. Radiat Res, 1994;138:S47-51
- 13 Ghosh S et al. Nature(London); 1992;34:678-682
- 14 Schreck R et al. EMBO J, 1991;10:2247-2258
- 15 Yamamoto KK et al. Nature, 1988;334:494-498
- 16 Montimong MR et al. Proc Natl Acad Sci USA,

1986;83:6682-6686
 17 Kim SJ et al. Mol Cell Biol, 1992;12:2455
 18 Teale B et al. Radiat Res, 1994;138:S52-55
 19 Woloschak GE et al. Cancer Res, 1990;50:3963-3967
 20 Hallaham DE et al. Radiat Res, 1994;140:143
 21 Mohan N et al. Radiat Res, 1994; 140:97-104
 22 Datta R et al. Biochemistry, 1992;31:8300

(收稿日期:1995-06-19)

DNA 聚合酶 β 在分子放射生物学中的作用

第二军医大学放射医学研究室(上海,200433) 蔡建明 罗成基*综述 郑秀龙审校

摘要:介绍了 DNA 聚合酶 β 三个方面的研究进展:①DNA 聚合酶 β 参与 DNA 修复合成的功能区域以及重要活性氨基酸;②DNA 聚合酶 β 活性调控机制;③DNA 聚合酶 β 在放射生物学中的作用和意义。

关键词:DNA 聚合酶 β 放射生物学

一般认为,DNA 聚合酶 β (DNA pol β , 本文简称 pol β) 在体内的主要功能是参与 DNA 损伤修复^[1-2],已有的实验结果提示,该酶在哺乳动物细胞 DNA 辐射损伤修复中起着重要作用,是参与 DNA 修复合成过程的主要 DNA 聚合酶。其生物学功能的发挥,与酶本身的生物学性质,尤其是与酶活性及其调控水平有关,若外界因素改变了酶的活性等会影响其 DNA 修复功能^[3]。阐明 DNA pol β 分子结构中各组分在 DNA 聚合反应中的作用以及对酶活性的贡献,弄清细胞内该酶活性调控机制,对深入认识该酶 DNA 损伤修复等生物学功能无疑是十分重要的。国外近年来在这方面做了不少研究。此外,该酶与肿瘤的发生以及放疗耐受性等的联系也开始引起人们的关注^[4-6]。本文对上述问题作一概述。

1 DNA 修复合成功能区域以及重要活性氨基酸

经过多年研究,人们发现各种真核细胞 pol β 分子量大小稍有差异,约为 30~40kD,与其它真核细胞 DNA 聚合酶相比,人们对

哺乳动物细胞 pol β 有更多的了解。Wilson^[7] 等利用克隆出的人和大鼠 pol β 的 cDNA,已经推断出人和大鼠 pol β 的分子量为 39kD,整个酶分子由 335 个氨基酸组成,并已测出了全部氨基酸序列(图略)。

各种脊椎动物 pol β 的一级结构是高度保守的^[7],表现在两个方面:一是不同种类动物之间,pol β 的胰酶肽段二维图谱有很大的相似性,抗一种动物 pol β 的抗体对多种脊椎动物细胞 pol β 有交叉反应;二是 pol β 与其它 DNA 合成酶之间有一定保守性。例如,Earl^[8] 等报道,哺乳动物 pol β 序列中的某些区域内可见四个氨基酸残基顺序与其它 DNA 合成酶的保守序列是相同的,pol β 与脱氧核糖核苷转移酶的末端结构也有相似性^[9],若将整条 pol β 肽链与后者的 C 末端部分相比较,发现有 24% 的氨基酸残基是相同的。

Kumar^[10,11] 等报道,从 pol β 的催化活性来分析,可以将整个酶分子分成两个功能区域,一个位于肽链的 N 端,分子量为 8kD(约 70~80 个氨基酸),它赋予酶蛋白与 DNA 模板结合的功能;另一个位于肽链的 C 端,分子量为 31kD,行使催化功能,在适宜条件下,

* 第三军医大学防原医学教研室