

费用大。

### 参考文献

- 1 Wang ZQ et al. Radiat Prot Dosim, 1998; 77(1-2): 87
- 2 Salassidis K et al. Int J Radiat Biol, 1995; 68(3): 257

- 3 Snigiryova G et al. Int J Radiat Biol, 1997 71(2): 119
- 4 Bauchinger M et al. Int J Radiat Biol, 1998; 73(6): 605
- 5 Lloyd DC et al. Int J Radiat Biol, 1998 73(5): 543

(收稿日期: 1998-07-20)

## DNA损伤修复与细胞凋亡

中国医学科学院放射医学研究所(天津, 300192) 李雨民综述 杨凤桐审校  
中国协和医科大学

**摘要:** 细胞 DNA 的损伤修复是影响细胞存活和死亡的主要原因, 细胞缺乏修复能力, 其辐射敏感性就会增加。近年来, DNA 损伤修复的机制已被逐步阐明。本文介绍 DNA 损伤修复和细胞凋亡发生的机制及其与细胞周期、细胞增殖关系的研究进展。

**关键词:** DNA 损伤修复 细胞周期 细胞增殖 细胞凋亡

### 1 引言

细胞和组织的 DNA 损伤修复是影响细胞存活和死亡的主要原因。各种细胞组织修复能力虽然不同, 但就一个物种而言, 其机制却是相同的<sup>[1,2]</sup>。DNA 复制时会产生自发性错误, 其几率是相当高的; 同时, 有害环境对人体的伤害使 DNA 发生损伤, 其损伤形式包括: 碱基丢失或修饰、化学键断裂和 DNA 链折断。如果人的 DNA 复制出了问题, 细胞就不可能正常工作, 突变产生积累, 或者可能使我们处于诸如肿瘤等疾病高发的危险, 或者我们就不会从亲代那里得到遗传, 从而物种的延续和生存就会出现麻烦。但是, DNA 的复制又不能非常精确, 否则就不能使物种进化, 以适应环境的变化。细胞内的多重 DNA 修复系统就是这两项工作的监控系统。DNA 修复系统只允许人类基因组在复制几十亿个碱基对时产生 3 个碱基的错误, 任何一个高效的复制系统也不可能如此精确<sup>[3]</sup>。

不同物种之间的 DNA 修复系统存在着高度的相似性, 但是也具有重要的差异, 这样才能解释为什么对一个物种是致癌的化学物

质, 对另一个物种的作用也许更大, 也许几乎没什么作用, 例如阿司匹林可引起兔的先天缺陷, 但对人却是无害的<sup>[4]</sup>。

### 2 细胞 DNA 损伤修复的分子机制

辐射所致 DNA 的损伤修复至少有两个修复途径: 重组和切除<sup>[5]</sup>。

双链断裂 (DSBs) 是辐射所致细胞死亡的最重要的 DNA 损伤形式, 它的修复是通过重组修复进行的。重组修复可分为两种形式: 同源重组和非同源末端结合重组, 前者是低等真核细胞如酵母和细菌的修复形式, 而后者则是脊椎动物应付 DNA 损伤的主要手段<sup>[5]</sup>, 这是在研究免疫球蛋白基因 V(D)J 重组中发现的<sup>[6]</sup>。已经证实, 一些哺乳动物辐射敏感细胞系不能进行 DSBs 修复的原因是由于 DNA 依赖的蛋白激酶 (DNA-PK) 成分 Ku 的缺失, 同时也缺乏 V(D)J 重组机制。DNA-PK 是一种由双链 DNA 激活的丝/苏氨酸激酶, 能使很多蛋白底物包括一些转录因子如 Sp1 抑癌基因 p53 蛋白、RNA 聚合酶 II 磷酸化。该酶至少由两个蛋白质组成: 含有催化亚基的 p350 和与双链 DNA 作

用的 Ku 自身抗原,后者是一个分子量为 70/80ku(kD)的二聚体,可被自身免疫性疾病如硬皮病-多肌炎患者血清抗体识别<sup>[7]</sup>。由辐射和化学药物所形成的 DSBs 的酶学修复机制是: 70/80 ku 的二聚体结合 DSBs 的断端,然后由于催化亚单位的作用,使得必需蛋白质磷酸化,将断端重接起来<sup>[8]</sup>。结构性热休克蛋白结合元件能够抑制诱导热休克蛋白 HSP70 生成的热休克转录因子, Ku 自身抗原与这个元件具有同源性,这说明 DNA 修复和应激反应是有关系的<sup>[9]</sup>。来自有严重联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)鼠的细胞,由于其 DNA-PK 发生突变而缺乏 DSBs 修复能力,在 X 射线和博莱霉素处理之后,细胞凋亡发生率明显增高<sup>[10]</sup>。

体内氧化代谢过程中产生了大量的对身体有害的自由基,它们与电离辐射、辐射疗法一样,使细胞产生诸如 DNA 单链断裂(SSBs)、碱基丢失以及对嘌呤与嘧啶的一些修饰,这些损伤多为潜在性致死损伤,可能与细胞存活、染色体畸变、突变、基因组不稳定性以及细胞凋亡有关,一般与辐射引起的细胞死亡率无关,这是因为碱基切除修复迅速而准确。

DNA 损伤切除修复系统包括:

(1)错配修复:负责切除 DNA 复制时发生的错误配对碱基,并充填正确碱基。人类细胞具有修复连续 5 个以上碱基的能力,而大肠杆菌却只有修复 3 个的能力。

(2)碱基切除修复:针对单个碱基受自由基的作用所产生的损伤,切除并修复。

(3)核酸切除修复:对于环境刺激如紫外线或化学物质产生的 DNA 损伤,这样的损伤往往是相当大的,由此种修复系统识别并修复。一种遗传性疾病——着色性干皮病的患者就是缺乏此种修复系统。

(4)转录偶联修复:这也是一种核酸切除修复系统,转录基因即将进行蛋白质的翻译,

它的损伤修复要比非转录基因损伤修复迅速<sup>[3]</sup>。DNA 切除修复系统是一系列酶,例如,嘌呤嘧啶内切酶、修复聚合酶和连接酶参与各种 DNA 损伤的切除修复;而嘌呤嘧啶修饰是由 DNA 糖基化酶识别后再切除的<sup>[11]</sup>。

### 3 DNA 损伤修复与细胞周期

真核细胞的细胞周期由细胞生长、DNA 复制和细胞分裂三个部分组成,可将细胞周期分为 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub> 和 M 四期,其进程由 10 余种周期素(cyclins A、B、C、D、E、F、H 等)和数种周期素依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)两大基因家族的集合、装配并激活来调控,从而形成各个关卡,控制细胞进入细胞周期各期,保证细胞周期严格而有序地进行。周期素和 CDKs 的活性有一部分是通过其本身与其抑制蛋白(CDIs)的相互作用来调控的。在 CDIs 中 p21(WAF1, CIP1, CAP20, SDI1)对所有的 CDKs 都具有抑制作用。DNA 损伤后,细胞转导出一个使 p53 蛋白蓄积和激活的信号,转录诱导 p21 和 GADD45(growth arrest and DNA damage inducible)的表达。DNA 损伤的关卡在 G<sub>1</sub>/S 和 G<sub>2</sub>/M 期的交界处,抑制细胞周期的进程,以利于有充分的修复时间。p53 蛋白上调包括 p21 在内 CDKs 抑制物(CDIs)家族,从而使 G<sub>1</sub> 和 S 期 CDKs 受到抑制<sup>[11]</sup>; p53 和 DNA 损伤本身也诱导 GADD45 使细胞周期发生阻滞<sup>[12]</sup>。

p21 和 GADD45 都可和一个 DNA 合成所需的称为增殖细胞核抗原(PCNA)的蛋白结合,激活各个细胞周期的关卡并抑制被损伤 DNA 的合成。分析野生型和 DNA-PK 缺失 SCID 鼠的早期成纤维细胞对辐照后的反应,发现两者之间无甚区别, p53 及其诱导的 p21、GADD45 和 GADD135 水平变化以及细胞周期的 G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 期阻滞均可正常发生,说明 p53 引起的细胞周期阻滞并无 DNA-PK 的参与<sup>[13]</sup>(前已述及,后者是前者

的激活物)

共济失调性毛细血管扩张(AT)是一种遗传性多系统疾病,由于Atm基因突变导致进行性神经退化性变化、免疫缺陷、肿瘤发生及辐射敏感。Atm基因蛋白是一核磷酸蛋白,与磷酸肌醇3(PI3)激酶C端相似,具有信号传递功能,上调p53。它同时还是细胞周期关卡机制中的成员,表现为在电离辐射引起的DNA损伤后,它可以引起细胞生长的阻滞,清除那些具有DNA过度损伤的神经<sup>[14]</sup>。

NF- $\kappa$ B的激活与细胞DNA损伤和生长抑制有关。NF- $\kappa$ B是一个异二聚体蛋白,由Rel家族的分子量50ku和65ku(RelA)两个亚单位组成,其中后者刺激各种基因转录。RelA的转录激活区和复合激活因子p300的N端作用后,p300C端再结合周期素E-CDK2复合物,从而调节NF- $\kappa$ B依赖的基因激活,在DNA和细胞损伤时,调节细胞生长的阻滞。刺激NF- $\kappa$ B依赖的基因表达,也增加了在p21存在情况下的p300的表达。p300是腺病毒E1A蛋白N末端区的结合蛋白,它的磷酸化与细胞周期有关,在体内它与TATA结合蛋白复合物作用(已证明在体外它是CDK蛋白的底物),在细胞分化时,诱导不依赖p53的p21表达<sup>[15]</sup>。

Ras可启动不依赖p53细胞凋亡反应,即Ras转化的细胞即使不表达抑癌基因p53产物,也对细胞凋亡敏感,NF- $\kappa$ B的激活可抑制这种凋亡反应。而且,Ras介导的转化灶形成也要有NF- $\kappa$ B参加,NF- $\kappa$ B的激活能抵抗细胞凋亡的发生<sup>[16]</sup>。

#### 4 细胞增殖和细胞死亡

细胞周期中的细胞死亡和细胞增殖看起来是两个对立过程,实际上两者有着不可分割的联系。早期在癌基因研究中出现很多令人不解的结果,如很多含有激活癌基因的细胞却出现大量细胞死亡。自从细胞凋亡现象

被深入研究以后,这些癌基因蛋白的奇怪致死性才得以重新认识。具有致凋亡性质的c-Myc和腺病毒蛋白E1A都是细胞增殖的诱导物,就是细胞凋亡研究中的一个很好的例子。后来发现,癌蛋白使细胞对于凋亡更加敏感,也就是说,使细胞增殖失去控制的损伤往往会导致细胞凋亡。这说明,细胞凋亡是细胞进行增殖的整个机制中的一个正常结果,即细胞凋亡和细胞增殖是偶联的。

Myc蛋白在增殖的细胞中表达,静止的细胞无Myc蛋白,它的异位表达,可使细胞在无外部的促细胞分裂原的情况下进入细胞周期;但是,在很多情况下Myc也促进细胞凋亡。Myc的这种既促进分裂增殖又促进细胞凋亡的性质并不是各自独立的,它们都与其N端转录激活区有关(此区与DNA结合)。到目前为止,Myc促细胞凋亡的分子机制仍不十分清楚<sup>[17]</sup>,但有证据表明,Myc通过转录调节其靶基因,使细胞消除G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>阻滞,进入细胞周期,如前述的GADD45的表达就会受到Myc的抑制<sup>[18]</sup>。

E1A是腺病毒编码的癌蛋白,主要功能是促细胞增殖。近来发现,E1A和Myc一样,具有促细胞凋亡的功能,这两种功能也都与它的N末端区有关,此区可结合包括成视网膜细胞瘤蛋白(Rb)和p300在内的很多蛋白<sup>[15,19]</sup>。由于这些蛋白的作用或相互作用,E1A才能诱发细胞增殖或细胞死亡。E1A作用于p53的转录活性区,并抑制它的转录活性,消除它的正常生物功能<sup>[20]</sup>。

癌基因蛋白Myc和E1A的表达失去控制就会驱动细胞增殖,而使细胞增殖生长抑制回路失活也会有癌的发生。Rb基因抑制细胞从G<sub>1</sub>期过渡到S期所需基因的激活,通过cyclin D-CDK4和CDK抑制蛋白p16INK的作用使Rb蛋白磷酸化,从而消除Rb蛋白的抑制作用,使细胞进入周期。Rb基因调节回路的损伤,无一例外会出现癌的发生<sup>[21]</sup>。Rb的关键作用是结合转录因子E2F

蛋白并抑制其活性,而后者调节细胞从 G<sub>1</sub> 期进入细胞周期时多个基因的表达。E2F的异位表达将使细胞在没有促分裂原的刺激下诱导细胞进入 S 期,但如此进入 S 期的细胞在 p53 的作用下常伴随细胞凋亡的发生<sup>[22]</sup>。

E2F 的突变,使 Rb 不能与其相互作用,也会消除 Rb 蛋白的抑制作用,使细胞进入 S 期。

## 5 p53 的关键作用

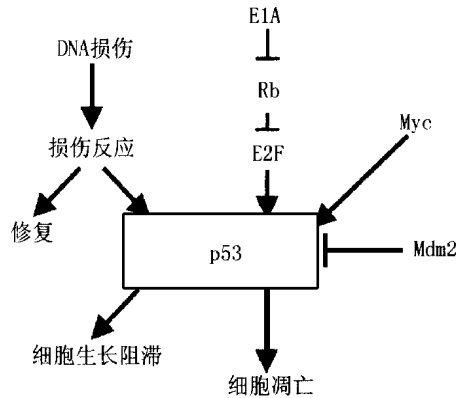
p53 是 Atm 蛋白和 DNA-PK 的重要靶作用物,通常状态下由于和 Mdm-2 蛋白相互作用而保持在较低水平, Mdm-2 蛋白也是 DNA-PK 的重要靶作用物。DNA 损伤后,由于 DNA-PK 的作用,使 p53 或 Mdm-2 磷酸化,并阻止两蛋白的相互作用,使 p53 激活,水平升高,上调 p21 及其他 CDIs,抑制 CDKs,发生细胞周期阻滞,以便进行 DNA 修复或细胞凋亡<sup>[17]</sup>。DNA 损伤反应有一个相当的范围,是一个主动过程,但是所有的主动反应都可被突变逆转。前已述及,细胞内存在一个相当精细的机制感知 DNA 损伤,其反应为修复、细胞周期阻滞和细胞凋亡。

只有癌基因蛋白的作用才引起细胞增殖和细胞凋亡的双向结果,这是由于正常细胞受到低水平、偶发的 DNA 损伤后迅速得到修复,而癌基因蛋白启动了 p53 的细胞凋亡程序,使细胞对于凋亡更加敏感,即使少量、偶发的 DNA 损伤也能够使细胞凋亡。其他各种引发细胞凋亡的因素除 DNA 损伤以外,当然还包括去除营养物、干扰素、蛋白合成抑制物、低氧、TNF 和 Fas/CD95/Apo1 等,它们一般并不引起细胞增殖反应。环境因素如 X 射线、紫外线可造成 DNA 损伤,同时也使细胞受体 Fas 在无配体情况下激活<sup>[23]</sup>;而 DNA 损伤通过 p53 回路,对 Fas/CD95 和 CD95L 也具有诱导作用<sup>[24]</sup>。

实际上,非 p53 依赖的细胞周期阻滞和细胞凋亡也是存在的,如癌基因 ras 可启动不依赖 p53 的细胞凋亡反应,并通过 NF- $\kappa$ B

的激活受到抑制<sup>[16]</sup>。突变可能产生在 DNA 损伤以后的各个阶段,包括修复、p53 本身、细胞周期和生长阻滞以及细胞凋亡反应回路。每一形式的突变在不同形态的细胞中产生的结果也是不同的。

有关回路总结如下图:



## 参考文献

- 1 Stone HB et al. Radiat Res, 1998; 150: 134
- 2 Coleman CN et al. Radiat Res, 1998; 150: 125
- 3 Culotta E et al. Science, 1994; 266: 1926
- 4 Koshland Jr DE. Science, 1994; 266: 1925
- 5 Thomapson LH. Mutat Res, 1996; 363: 77
- 6 Lewis SM. Adv Immunol, 1994; 56: 27
- 7 Lees-Miller SP. Cell Biol, 1996; 74: 503
- 8 Jeggo PA. Mutat Res, 1997; 384: 1
- 9 Yang SH et al. Mol Cell Biol, 1996; 16: 3799
- 10 Meng H et al. Int J Radiat Biol, 1998; 73: 503
- 11 Bae I et al. Cancer Res, 1995; 55: 2387
- 12 Zhan Q et al. Mol Cell Biol, 1998; 18: 2768
- 13 Rathmell WK et al. Cancer Res, 1997; 57: 68
- 14 Herzog KH et al. Science, 1998; 280: 1089
- 15 Perkins ND. Science, 1997; 275: 523
- 16 Mayo MW et al. Science, 1997; 278: 1812
- 17 Evan C et al. Science, 1998; 281: 1317
- 18 Marhin WW et al. Oncogene, 1997; 14: 2825
- 19 Flint J et al. Ann Rev Genet, 1997; 31: 177
- 20 Steegenga WT et al. Mol Cell Biol, 1996; 16: 2101
- 21 Sherr CJ. Science, 1996; 274: 1672
- 22 Canman CE et al. Oncogene, 1998; 26: 957
- 23 Aragane Y et al. J Cell Biol, 1998; 140: 171
- 24 Reap E et al. Proc Natl Acad Sci, 1997; 94: 5750

(收稿日期: 1999-04-27)