

文章编号: 1001-098X(2003)05-0225-03

·放射医学·

抗辐射球菌辐射抗性机制的研究

陈剑, 刘芬菊

摘要: 抗辐射球菌是一种对电离辐射和其他 DNA 损伤因子有极强抵抗能力的细菌。对它的研究主要集中在揭示其对 DNA 损伤的抗性机制和如何利用它清除辐射废料。现有研究认为, 该菌的抗性机制主要缘于三个方面: (1)DNA 损伤的高效修复; (2)特殊的生存方式; (3)对氧自由基的有效清除。

关键词: 抗辐射球菌; 辐射抗性; 自由基

中图分类号: R811.5 文献标识码: A

Researches of radioresistance of *Deinococcus radiodurans*

CHEN Jian, LIU Fen-ju

(Radiation Medicine and Public Health School, Suzhou University, Suzhou 215006, China)

Abstract: *Deinococcus radiodurans* is a bacteria which is extremely resistant to radiation and other DNA damage factors. The researches of it focus on finding the mechanism of its resistance and ways to clear radioactive waste by engineering the bacteria. To date, the researches have revealed three respects of the resistance mechanism: (1) The high efficient repair of DNA damage. (2) Specific survival strategy. (3) Ability to clear free radicals effectively.

Key words: *Deinococcus radiodurans*; radioresistance; free radical

自从抗辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 被美国科学家 Anderson AW 等于 1965 年首次在辐射灭菌后变质的肉罐头中分离出以后, 由于其具有极强的抵抗电离辐射及其他 DNA 损伤因子的特性, 世界各地的学者对该菌进行了广泛深入的研究。抗辐射球菌最显著的特点就是对各种理化因素引起的细胞致死和致突变效应有极强的抵抗能力; 它能耐受 5~15kGy 的 γ 射线辐照, 不影响其存活力且不产生突变; 它对紫外线的抗性为大肠杆菌的 20 倍, 并且对 MMC(丝裂霉素)、亚硝酸及 4-硝基喹啉-N-氧化物等都有很强的抗性; 它受 DNA 破坏因子影响后的生存曲线均为肩形存活曲线。

已有的研究表明, 抗辐射球菌有不同于其他微生物的生存本能和极强的 DNA 损伤修复功能, 但是目前对它的辐射抗性机制还是知之甚少。

1 抗辐射球菌 DNA 损伤的修复

抗辐射球菌最主要的 DNA 损伤修复方式有两种: 切除修复和重组修复, 其中切除修复又分为碱基切除修复和核苷酸切除修复。核苷酸切除修复有两种途径: 其一条途径由紫外线核酸内切酶 α 介导, 它能识别很多种类 DNA 损伤, 切除 DNA 损伤及其附近的核苷酸; 而另一途径由紫外线核酸内切酶 β 介导, 对紫外线二聚体光合物具有特异性。紫外线核酸内切酶 α 由 *mtcA* 和 *mtcB* 基因编码, 紫外线核酸内切酶 β 由 *uvsC*、*uvsD* 和 *uvsE* 基因编码。*uvsC*、*uvsD*、*uvsE* 和 *mtcA* 基因中至少有两个同时突变才会导致切除修复的失效。碱基切除在抗辐射球菌中也存在, 有报道表明, 抗辐射球菌提取物中有非嘌呤非嘧啶核酸内切酶 (AP 内切酶)、尿嘧啶-N-糖基化酶、DNA 脱氧核糖磷酸二酯酶和胸

收稿日期: 2003-01-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39900039)

作者简介: ①陈剑(1978-), 男, 苏州大学放射医学与公共卫生学院(苏州, 215006)硕士研究生, 主要从事放射生物学研究。

②刘芬菊(1954-), 女, 苏州大学放射医学与公共卫生学院硕士生导师, 主要从事放射生物学研究。

审校者: 中国医学科学院放射医学研究所 樊飞跃

腺嘧啶乙二醇糖基化酶等酶的活性。关于重组修复,与已发现和克隆的 *polA* 和 *recA* 基因有关。抗辐射球菌的 *polA* 基因能与大肠杆菌 *polA* 基因互补, *polA* 基因缺陷的抗辐射球菌对电离辐射很敏感,但当大肠杆菌的 DNA *polA* 基因在 *polA* 的抗辐射球菌中表达时,就恢复了野生型抗辐射球菌对 DNA 损伤剂的抗性。然而,大肠杆菌中 *recA* 基因在 *recA* 的抗辐射球菌中表达则无法重建该菌的辐射抗性。抗辐射球菌的 *recA* 基因在 *recA* 的大肠杆菌中表达则导致剧烈的细胞毒作用,甚至导致大肠杆菌受体的死亡。最近,克隆和提纯了抗辐射球菌的 RecA 蛋白,并发现在抗辐射球菌中利用 RecA 蛋白修复受损单链 DNA 的过程与大肠杆菌的正好相反,也许能够部分解释这一情况。总之,对于抗辐射球菌中有关 DNA 修复酶的研究表明,这些酶与其他原核生物中的 DNA 修复酶功能相似,所以仅仅了解抗辐射球菌中每个 DNA 修复蛋白的性质是不可能揭示其辐射抵抗机制的。也许在抗辐射球菌中的修复酶的运用方式与其他细菌不同,从而显示出不同于其他细菌的辐射抵抗能力^[1-3]。

2 抗辐射球菌特异的生存方式

2.1 多基因信息

抗辐射球菌是多基因组的细胞,静止期细胞有 4 个染色体组拷贝,活跃分裂的细胞有 4~10 个拷贝。有人发现,双倍体和四倍体的辐射抵抗能力比单倍体更强,大肠杆菌的研究中也发现了类似的结果,但对于染色体拷贝数为 5~10 个的抗辐射球菌的研究并没有证明染色体拷贝数和辐射抗性有相关性。到目前为止,还没有证据表明抗辐射球菌多基因信息这一现象对它的辐射抗性是必需的。

2.2 染色体高效重组

受电离辐射照射后,抗辐射球菌能修复每条染色体上 100 多个染色体 DSB(双链断裂),并且没有死亡或突变,而大肠杆菌在同样的条件下最多只能修复 10~15 个 DSB。Daly MJ 等^[4]研究表明,在受照后,抗辐射球菌中质粒和质粒以及染色体和染色体之间的同源重组是普遍存在的。既然染色体之间的重组是 DNA 修复的主要途径之一,这就需要把上述染色体的多拷贝现象列入考虑之中。

虽然抗辐射球菌染色体组数在 4~10 个拷贝之间,但多染色体组的现象在微生物之间并不少见,而且没有证据证明染色体拷贝数与辐射抗性有关。当一条染色体断裂成 100 多条片段时,抗辐射球菌使用了其他微生物所没有的利用多倍体的方法,才正确地连接这些片段而不导致死亡或突变。

有人对此问题提出了一种假说,认为抗辐射球菌中各条染色体是通过数千个四股连接并列在一起。如果是这样,那么 DSB 的修复就很容易解释了,因为一个 DSB 很可能与旁边完整的双链紧靠在一起,则该双链就可以作为修复 DSB 的模板。不过,目前没有很强的实验证据证实该假说。

2.3 DNA 修复功能的协调性

当细菌受到 DNA 损伤因子的作用时,它就会通过阻止 DNA 聚合酶在模板链上的移动而停止 DNA 复制。许多研究表明,在抗辐射球菌中, DNA 破坏引起的复制暂停具有剂量依赖关系,并且该暂停的时间往往超过修复损伤所需要的时间。这表明,抗辐射球菌中 DNA 复制对细胞内 DNA 破坏是敏感的,细胞有感应 DNA 完整性的机制。换句话说,抗辐射球菌中有一个控制染色体复制的检查点,并且它也控制了细胞分裂。

抗辐射球菌的另一种重要特性就是受照后染色体广泛而迅速的降解,这被看做是 DNA 修复过程之一,而且其降解时间与辐射剂量有关,剂量越大,降解时间就越长,损失的 DNA 越多;而降解的速率与剂量无关,大约每分钟损失 0.1%。降解过程必须由一种受照后诱导产生的非特异性的蛋白质制止,所以受照后抗辐射球菌要求有一个蛋白质合成过程。如果在辐照前将氯霉素或放线菌素 D 加入培养基,会导致染色体因降解过度而大量损失,最终导致细胞大量死亡。由此推测,控制 DNA 复制的信号与 DNA 降解或修复的信号是相互关联的。

在抗辐射球菌受照后早期,在其细胞质及培养液中均发现 DNA 损伤片段,如上节所述,损伤与受照剂量有关,初期的降解产物是寡核苷酸,长约 2 000 个碱基对,随后降解为核苷,快速地从细胞中排出。这也表明了抗辐射球菌一种特殊的生存方式。有两种可能的解释:(A) 排出受破坏的核苷酸,可以防止细胞将破坏的核苷酸作为修复 DNA 的原料,从而降低突变的几率;(B) DNA 修复

功能需要信号来保证协调,核苷酸从细胞内的排出可能正是该信号的一部分^[9]。

3 抗辐射球菌对氧自由基的抵抗

电离辐射通过间接作用能在细胞中产生大量的自由基,而SOD(超氧化物歧化酶)、CAT(过氧化氢酶)、POD(过氧化物酶)等能有效清除自由基,所以生物体内这三种酶的含量和活性高低在相当程度上与生物体的抗辐射能力有关。在抗辐射球菌中也是如此。通过定点突变产生CAT和SOD缺陷型的抗辐射球菌显示,其均比野生型抗辐射球菌对电离辐射敏感。在有DNA修复缺陷的抗辐射球菌中,SOD的活性比野生型的低。这些证据表明,抗辐射球菌的SOD和CAT对它的辐射抗性有一定贡献^[6]。

然而,抗辐射球菌与其他细菌的抗氧化性有一定的区别。在一般情况下,将抗辐射球菌和大肠杆菌同时置于含有玫瑰红(Rose Bengal, RB)的培养基中并置于可见光下时,由于RB是一种光致敏剂,在可见光和氧气存在的条件下会产生单线态氧,并与RB的浓度及可见光照射时间成正比。结果显示,两种菌的生存率均降低,但是抗辐射球菌对这种光动力学处理的敏感性比大肠杆菌更高,大约比大肠杆菌高100倍。一般认为,RB对微生物的作用与微生物的DSB修复能力无关,作用的靶部位在细胞膜,所以该实验说明抗辐射球菌对于单线态氧对细胞膜的破坏的抗性不如大肠杆菌^[7,8]。研究表明,抗辐射球菌CAT水平比大肠杆菌高,并且对H₂O₂的抵抗力更强。在抗辐射球菌培养基中加入亚致死剂量的H₂O₂后,在该培养基上生长的抗辐射球菌对H₂O₂的致死效应有更强的抵抗能力,对电离辐射的抵抗也有所增强。最近的研究表明,抗辐射球菌内的一氧化氮酶与哺乳动物细胞中的同类酶十分相象,而一氧化氮是最近较受重视的自由基的一种,这也许对发现该菌抗自由基功能的机制带来新的启发^[9]。

4 总结

抗辐射球菌具有抗辐射能力的原因是多方面的:(1)高效的DNA修复功能;(2)特殊的生存方式;(3)对氧自由基的有效清除。以前,西方学者对抗辐射球菌的研究绝大多数集中在DNA修复机

制上,最近对抗辐射球菌抗氧化能力的研究有上升的趋势。另外,从利用抗辐射球菌的特性方面人们也进行了大量的研究,由于抗辐射球菌易于被染色体DNA和质粒DNA自然转化,它容易被改造而运用于清除堆积的核废料,包括含有Hg²⁺等金属离子的废料,甲苯、氯苯、3,4-二氯-1-丁烯等有机废料^[10]。相信随着抗辐射球菌耐辐射机制研究的深入,它将在生命科学和环境保护方面具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Kim JI, Cox MM. The RecA proteins of *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli* promote DNA strand exchange via inverse pathways[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(12): 7917-7921.
- [2] Kim JI, Sharma AK, Abbott SN, et al. RecA protein from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: expression, purification, and characterization[J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(6): 1649-1660.
- [3] Earl AM, Rankin SK, Kim KP, et al. Genetic evidence that the *uvrE* gene product of *Deinococcus radiodurans* R1 is a UV damage endonuclease[J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(4): 1003-1009.
- [4] Daly MJ, Minton KW. Interchromosomal recombination in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*[J]. *J Bacteriol*, 1995, 177: 5495-5505.
- [5] Battista JR. Against all the odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*[J]. *Ann Rev Microbiol*, 1997, 51: 203-224.
- [6] Markillie LM, Varnum SM, Hradecky P, et al. Targeted mutagenesis by duplication insertion in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: radiation sensitivities of catalase (*kat A*) and superoxide dismutase (*sod A*) mutants[J]. *J Bacteriol*, 1999, 18(2): 666-669.
- [7] Schafer M, Schmitz C, Facius R, et al. Systematic study of parameters influencing the action of Rose Bengal with visible light on bacterial cells: comparison between the biological effect and singlet-oxygen production[J]. *Photochem Photobiol*, 2000, 71(5): 514-523.
- [8] Schafer M, Schmitz C, Horneck C. High sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to photodynamically-produced singlet oxygen[J]. *Int J Radiat Biol*, 1998, 74(2): 249-253.
- [9] Adak S, Bilwes AM, Panda K, et al. Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(1): 107-112.
- [10] Brim H, McFarlan SC, Fredrickson JK, et al. Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(1): 85-90.