

文章编号: 1001-098X(2005)03-0132-05

X 射线修复交叉互补基因功能的研究进展

王芹

摘要 对 X 射线修复交叉互补(XRCC)基因功能的研究极大地促进了对哺乳动物 DNA 损伤修复过程和遗传不稳定性致癌机制的理解。通过观察 XRCC 基因突变体的表型, 可以对其功能进行鉴定。目前已鉴定的这一基因家族的多数成员均参与几种重要的 DNA 修复途径, 包括碱基切除修复、同源重组修复和非同源末端重接。XRCC 基因的鉴定及其在 DNA 损伤修复和维持遗传稳定性过程中发挥重要的作用。

关键词 X 射线修复交叉互补基因; 碱基切除修复; 同源重组修复; 非同源末端重接

中图分类号 Q345+.7 文献标识码 A

The recent advance in identification and functions of X ray repair cross complementing genes

WANG Qin

(Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

Abstract The researches on functions of X ray repair cross complementing(XRCC) genes had promoted the understanding of DNA damage repair processes and the mechanism of cancer induced by genetic instability. The functions of XRCC genes could be identified by studying their mutant phenotypes. Most members of the XRCC genes family participated in several DNA repair pathways, including base excision repair, homologous recombination repair and non-homologous end joining. The identification of XRCC genes and their functions took important parts in DNA damage repairs and genetic stability processes.

Key words X ray repair cross complementing genes; base excision repair; homologous recombination repair; non-homologous end joining

X 射线修复交叉互补(X ray repair cross complementing, XRCC)基因最初因其具有对哺乳动物细胞电离辐射损伤的防护作用而被发现。在对哺乳动物突变细胞的研究中发现, 有些细胞系因其修复缺陷而表现出对电离辐射的敏感性增高。通过细胞融合和对 X 射线的互补试验, 目前已鉴定出 11 种不同的遗传族群。每一遗传族群可能有几种不同的细胞系, 同一遗传族群各细胞系的功能相同或相似, 利用这些细胞系最终克隆到参与修复 DNA 损伤的新基因(见表 1), 因此这些基因被命名为 XRCC。但值得注意的是, 这样的命名并不简单地等同于其生物学功能, 因为电离辐射诱发 DNA 损伤的类型是多种多样的, 这些基因参与修复 DNA 损伤的途径也是不同的。另外, 在 XRCC 基因家族中, 并非每一成员都对校正 X 射线诱发 DNA 损伤高度有

效。XRCC 基因家族各成员在 DNA 损伤修复和维持遗传稳定性方面发挥了重要的作用。

1 XRCC 基因参与碱基切除修复 (base excision repair, BER)

XRCC1 基因最早是从 EM9 突变细胞系克隆得到的, EM9 同其他的 XRCC1 基因功能缺失的仓鼠细胞系如 EM7、EM-C11 和 EM-C12 一样, 对烷化剂的敏感性比其亲本细胞系高 10 倍, 而对 X 射线则表现轻度敏感(<2 倍), 对其他多种 DNA 损伤剂均表现 2 倍的敏感性。这些细胞系受到损伤后表现为 DNA 单链断裂的积累、染色体畸变率的升高, 以及非正常的自发和突变诱发的姊妹染色单体互换率增加。对 XRCC1 基因缺陷细胞系辐射诱发 DNA 单链断裂的修复研究表明, 其快速修复期的损伤修复速率仅是亲本细胞系的 1/3~1/2, 与慢速修复期修复速率相当。但是, 经过一定时间恢复后, 不论

表1 XRCC 基因缺陷细胞系的性质及相关修复基因

修复途径	基因	缺陷细胞系	缺陷细胞表型	基因剔除小鼠表型	人类相关疾病
BER	XRCC1	EM7、EM9、EM-C11、EM-C12	对烷化剂高度敏感, 对其他多种 DNA 损伤剂中度敏感	胚胎致死	n.k.
HRR	XRCC2	irs1	对 DNA 交联剂高度敏感, 对其他多种 DNA 损伤剂中度敏感, 自发和可诱导的染色体不稳定性	胚胎致死	n.k.
	XRCC3	irs1SF		n.k.	n.k.
	RAD51L2	CL-V4B, irs3		n.k.	n.k.
	XRCC11 BRCA2, FANCD1)	V-C8		胚胎致死	Fanconi's贫血症
	XRCC9(FANCG)	UV40, NM3		存活, 性腺功能和生育功能减退	Fanconi's贫血症
NHEJ	XRCC4	XR-1, M10	对电离辐射和类辐射作用物质高度敏感, 诱发染色体不稳定性, 双链断裂修复受损, V(D)J 重组缺陷	胚胎致死	n.k.
	XRCC5(Ku80)	xrs, XR-VB		存活, 生长迟缓	n.k.
	XRCC6(G22P1)			存活, 生长迟缓	n.k.
	XRCC7(PRKDC)	V3, scid, irs20, SX9, XR-C1, XR-C2		存活, 生长正常	n.k.
	LIG4	SX10		胚胎致死	LIG4 综合征
其他	XRCC8	irs2, V-C4, V-E5, V-G8, CM1, CM3, CM6	对电离辐射及类辐射作用物质敏感, 辐射抗性 DNA 合成	n.k.	共济失调毛细血管扩张症

注: BER 为碱基切除修复; HRR 为同源重组修复; NHEJ 为非同源末端重接; n.k.为未知

是通过剂量分级分离还是测定照射后细胞周期阻滞细胞数, 均与其亲本细胞系水平相当。

哺乳动物的 XRCC1 蛋白序列高度保守, 并具有与 BER 相关蛋白的作用区, 如 DNA 连接酶 III、DNA 聚合酶 β、无嘌呤或无嘧啶 (apurinic or apyrimidinic, AP) 核酸酶以及多腺苷二磷酸核糖聚合酶-1 和聚合酶-2^[1]。除此之外, XRCC1 蛋白还与人多核苷酸激酶相互作用, 在 DNA 损伤位点可激活其磷酸酶和磷酸激酶的活性, 在断链连接过程中发挥作用。尽管 XRCC1 蛋白的 N-端区域可直接与 DNA 单链断裂和缺口结合, 但至今尚未发现 XRCC1 蛋白表现有酶活性, 由此推测 XRCC1 蛋白可能在其中只是起到支架的作用, 以此来协同 BER 所需的蛋白在碱基损伤位点发生作用^[2]。

2 XRCC 基因参与同源重组修复 (homologous recombination repair, HRR)

细胞系 irs1 和 irs1SF 被分别用来鉴定 XRCC2 和 XRCC3 基因。这些细胞系对多种 DNA 损伤剂呈现敏感的表现, 尤为特殊的是对 DNA 交联剂高度敏感, 例如丝裂霉素 C。这些细胞系具有自发的遗传不稳定性, 表现为染色体畸变率升高, XRCC2 基因组 DNA 和 cDNA 能够完全校正 irs1 细胞系对丝裂霉

素 C 的高敏感性。从人睾丸组织 cDNA 文库克隆到的 XRCC3 基因 cDNA 在 irs1SF 细胞系中具有与 XRCC2 基因相似的互补作用。

哺乳动物的 XRCC2、XRCC3 基因编码类似于酵母中 RAD51 样蛋白, 序列相似性分析显示, XRCC2 和 XRCC3 与 RAD51 或其他 RAD51 样蛋白的相似程度较低, 分别为 45% 和 25%。但是从不同种类哺乳动物克隆到的这些基因, 其编码产物高度保守, 提示这些基因均具有重要功能。早期对 irs1 和 irs1SF 细胞系的研究均检测不到双链断裂修复的缺陷, 进一步的研究发现这两种细胞系均属于位点特异的双链断裂同源重组修复缺陷。相似地发现还表明, XRCC2 和 XRCC3 基因是染色体正确分离所必需的, 因此这两个基因的缺失将导致有丝分裂过程中中心体的破裂。

参与 HRR 的其他人 RAD51 样基因包括 RAD51L1、RAD51L2 和 RAD51L3。最近, 这些基因的缺陷细胞系已被鉴定出来, 仓鼠细胞系 CL-V4B 和 irs3 均表现为 RAD51L2 基因缺失。与 irs1 和 irs1SF 细胞系相似, 这些细胞也具有对多种 DNA 损伤剂敏感的表现。有趣的是, CL-V4B 细胞系表现为不平衡染色单体粘连比例升高^[3], 是 irs3 细胞系所不具有的表现型。这可能与两种细胞系

RAD51L2 基因缺失位点不同有关, CL-V4B 细胞 RAD51L2 基因 cDNA 为外显子 5 缺失, irs3 细胞为外显子 6 缺失。Western blot 分析在两种细胞内均检测不到 RAD51L2 蛋白的表达, 而 RAD51L2 蛋白是两种重要复合物 RAD51L2-XRCC3 异二聚体和 RAD51L1-RAD51L2-RAD51L3-XRCC2 异四聚体的组成部分。

RAD51 样蛋白在依赖于 RAD51 蛋白的 HRR 中发挥了重要作用, 但其确切的作用机制尚不清楚。有丝分裂细胞通过 HRR 对损伤 DNA 进行修复过程中, 两个 DNA 双链体以四股 DNA 在连结点交换配对形成霍利迪连结体 (Holliday junctions, HJ), 最终 HJ 结构的解除是完成重组修复的关键一步, 但至今真核生物中负责 DNA 内切酶(解离酶)这一功能的蛋白还未被明确鉴定。近期 Liu Y 等^[4]对几种辐射敏感细胞系纯化组份的蛋白进行了分析, 同时测定了解离酶的活性, 结果显示 XR-CC3 蛋白和 RAD51L2 蛋白为 HJ 结构解离所必需。纯化的人细胞组份中含有 RAD51L2 蛋白则具有解离酶的活性, 缺失 RAD51L2 蛋白则大部分解离酶的活性被丢失, HJ 结构也不能解离; 相反, 重组表达的 RAD51L2 蛋白则使酶活性恢复, 同时可使几种含有 RAD51L2 蛋白的 RAD51 样蛋白复合物出现。缺失 XRCC3 基因的细胞系 irs1SF 或缺失 RAD51L2 基因的细胞系 irs3 均显示解离酶的活性显著降低, 而 XR-CC2 基因缺失的细胞系 irs1 则具有野生型解离酶活性。当然, XRCC3 蛋白和 RAD51L2 蛋白是真的扮了解离酶的角色, 还是在 HJ 结构解离过程中发挥了协同作用, 还需要进一步的确认。

3 XRCC 基因参与非同源末端重接 (non-homologous end joining, NHEJ)

啮齿类 XRCC5 基因和 XRCC7 基因缺陷细胞系在揭示 NHEJ 修复双链断裂机制过程中发挥了重要作用。xrs-5、xrs-6 和 XR-V5B 均为 XRCC5 基因缺陷细胞系, 利用这些细胞系成功鉴定出了末端重接途径的第一个组份—XRCC5, 该蛋白起初也称 Ku80 蛋白或 Ku86。转染人 XRCC5 基因可以使这些缺陷细胞系几乎恢复到野生型细胞表型。经鉴定这些细胞均表达缩短了的 XRCC5 蛋白, 同时细胞内未发现 XRCC6(也称 Ku70)蛋白表达, 这或许可解释这些 XRCC5 基因缺陷细胞之间表型差异不显

著。XRCC6 基因缺陷细胞系不具有对 DNA 损伤剂敏感的表现, 但 XRCC6 基因剔除小鼠具有该表型, 如同其他对应的 XRCC5 基因缺陷细胞系一样, 对 γ 辐射高度敏感, 而且细胞失去了 V(D)J 重组过程中对信号端和编码端有效重接的能力。

现在知道 XRCC6 蛋白和 XRCC5 蛋白是依赖于 DNA 的蛋白激酶 (DNA-dependent protein kinase, DNA-PK) 的组份之一, 通过另外几种细胞系证实, XRCC7 基因的产物即为依赖于 DNA 的蛋白激酶催化亚单位 (catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase, DNA-PKcs)。从辐射敏感合并重度免疫缺陷 (severe combined immunodeficient, SCID) 小鼠衍生而来的细胞系显示了 V(D)J 重组缺陷和双链断裂修复缺陷, 另外几种缺陷细胞也发现了相似表型。这些细胞的 XRCC7 基因存在突变, 使得编码的 DNA-PKcs 功能受损^[5]。

XRCC4 基因由 XR-1 仓鼠细胞系克隆得到, 所表达的 XRCC4 蛋白是一种核磷酸蛋白, 直接与 DNA 连接酶作用, 在双链断裂位点可以使连接酶活性增加数倍。XRCC4 基因突变分析表明, 该蛋白中心区与 DNA 连接酶 IV 作用, 对修复功能是至关重要的, 但尚不清楚该蛋白的 N-端和 C-端区域的功能。XRCC4-DNA 连接酶 IV 复合物在 NHEJ 中被 DNA-PK 募集, 参与双链断裂修复。对辐射敏感 SX-10 细胞系从小鼠乳腺癌细胞衍生而来, 最近发现该细胞系缺失 DNA 连接酶 IV (lig4) 基因^[6], 其对双链断裂的重接效率显著低于亲本细胞系。

破坏 XRCC4 或 lig4 中任一基因的功能将导致小鼠胚胎致死, 并伴随神经细胞过度凋亡。XRCC4 或 lig4 基因缺陷的胚胎细胞其增殖受到抑制, 同时具有对辐射敏感、染色体不稳定性和 V(D)J 重组受损等表型。但令人奇怪的是, 一例对辐射敏感的血病患者虽然被鉴定为 lig4 突变, 但该患者并不表现免疫缺陷, 患者体内细胞只显示 DNA 连接酶 IV 轻度降低, 但存在相对保守的序列 R278H 突变, 该突变显著影响连接酶-腺苷酸复合物的形成^[7]。最近又发现了数例 lig4 基因突变的患者, 尽管其表型不尽相同, 但均不显示严重的免疫缺陷^[8]。这些患者细胞表型均为 DNA 连接酶部分缺失, 表明残余的连接酶活性已足够完成 V(D)J 重组过程中产生的少量双链断裂重接, 但对于电离辐射引发的大量和严重的 DNA 断裂则难以完全修复。

XRCC4、XRCC5、XRCC6和XRCC7基因突变以及基因分析结果显示, NHEJ在成纤维细胞G₁期是主要的修复途径, DNA-PK在双链断裂的识别和结合过程中发挥中心作用。XRCC5蛋白与XR-CC6蛋白形成异二聚体, 能与多种类型的DNA断端(包括钝端、5′或3′突出端)和发夹结构结合, Tuteja R等^[9]预测在修复过程中其可能发挥断裂DNA感受器或保护器的作用。该异二聚体蛋白在DNA-PKcs与损伤DNA结合的导向过程中起调节作用, 同时负责将DNA连接酶IV-XRCC4复合物装配到DNA末端以及激活最后的连接步骤。近期的研究显示, DNA-PKcs的自身磷酸化是该蛋白定位于DNA损伤位点和双链断裂重接所必需的^[10]。参与NHEJ的另一种蛋白是Artemis, 该蛋白具有3′和5′核酸酶的活性, 与DNA-PK一起作用可以切除DNA3′和5′突出端。

4 XRCC基因与基因组稳定性和中心体完整性

人们发现, 在不同的研究中, NHEJ对染色体畸变形成的防护作用存在互相矛盾的结果: 早期用XRCC5基因缺陷仓鼠细胞系和近期对XRCC6基因剔除鸡DT40细胞系的研究均未发现自发突变率的升高, 然而, 对来自XRCC6基因和XRCC5基因剔除小鼠的胚胎成纤维细胞和真皮成纤维细胞进行详细的染色体研究显示了自发突变率的升高^[11]。对这种不一致现象可能的解释是: 不同的细胞类型对未修复的或修复缓慢的DNA损伤具有不同的应答反应, 例如来自XRCC5基因缺陷小鼠的前B细胞表现的是过度的细胞死亡, 而不是畸变的形成。

HRR缺陷细胞中染色体不稳定性研究显示, 封闭鸡DT40细胞内RAD51基因表达将导致具有大量染色体断裂的G₂/M期细胞积累。而且近期对XRCC2基因剔除小鼠的胚胎成纤维细胞和真皮成纤维细胞的研究显示, 染色体交换频率和非整倍体比例很高^[12]。另外, XRCC2^{-/-}剔除的胚胎成纤维细胞显示染色体畸变和中心体破裂, 表明杂合子部分失活。在XRCC2基因和XRCC3基因缺陷细胞中, 染色体的不正确分离和非整倍体的出现被认为与中心体缺损有关。乳腺癌易感基因BRCA1和BRCA2(XRCC11)丢失将导致染色体不稳定性增加, 同时伴有中心体缺损和非整倍体出现^[13]。因此, HRR缺陷的细胞系除了染色体重排频率增加, 另一个独特的表型是在有丝分裂过程中结构-功能关系的丧

失, 这将导致非整倍体的出现。这一表型不存在于NHEJ缺陷细胞中, 可能具有更深远的后续效应, 因为非整倍体的出现与癌症的发生相关。由此可见, NHEJ和HRR途径可能对遗传不稳定性都具有防护作用, 尽管多数NHEJ缺陷细胞并没显示出自发的遗传不稳定性, 但在HRR缺陷细胞系中存在这种高水平自发的和可被诱发的遗传不稳定性。

综上所述, XRCC基因的发现对揭示DNA损伤修复机制, 尤其是NHEJ和HRR两种双链断裂修复机制发挥了重要作用, 同时也引申出一些更深层次问题, 例如, DNA损伤各修复系统之间(尤其是双链断裂修复的两种主要途径NHEJ和HRR)是如何协调的, 当NHEJ和HRR途径同时缺陷后还有哪种途径承担DNA双链断裂损伤修复等等。

近期对XRCC基因功能的深入研究显示, 其中部分基因与人类疾病相关并有助于揭示某些疾病的病因。对XRCC基因中某些成员的多态性研究有望与人类某些癌症联系起来^[14]。所有这些对损伤敏感的细胞系或个体, 将为不断发现新的修复基因和修复途径发挥重要作用, 同时可加深对人类易患疾病尤其是癌症相关知识的了解。

参 考 文 献

- 1 Schreiber V, Ame JC, Dolle P, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(25): 23028-23036.
- 2 Thompson LH, West MG. XRCC1 keeps DNA from getting stranded [J]. *Mutat Res*, 2000, 459(1): 1-18.
- 3 Godthelp BC, Wiegant WW, van Duijn-Goedhart A, et al. Mammalian Rad51C contributes to DNA cross-link resistance, sister chromatid cohesion and genomic stability[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(10): 2172-2182.
- 4 Liu Y, Masson JY, Shah R, et al. RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells[J]. *Science*, 2004, 303(5655): 243-246.
- 5 Woods T, Wang W, Convery E, et al. A single amino acid substitution in DNA-PKcs explains the novel phenotype of the CHO mutant, XR-C2[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(23): 5120-5128.
- 6 Sado K, Ayusawa D, Enomoto A, et al. Identification of a mutated DNA ligase IV gene in the X-ray-hypersensitive mutant SX10 of mouse FM3A cells[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(13): 9742-9748.
- 7 Riballo E, Critchlow SE, Teo SH, et al. Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient[J]. *Curr Biol*, 1999, 9(13): 699-702.
- 8 O'Driscoll M, Cerosaletti KM, Girard PM, et al. DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency[J]. *Mol Cell*, 2001, 8(6): 1175-1185.
- 9 Tuteja R, Tuteja N. Ku autoantigen: a multifunctional DNA-binding protein[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2000, 35(1): 1-33.

- 10 Chan DW, Chen BP, Prithivirajasingh S, et al. Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(18): 2333-2338.
- 11 Ferguson DO, Sekiguchi JM, Chang S, et al. The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6630-6633.
- 12 Deans B, Griffin CS, O'Regan P, et al. Homologous recombination deficiency leads to profound genetic instability in cells derived from Xrcc2-knockout mice[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(23): 8181-8187.
- 13 Venkitaraman AR. Chromosome stability, DNA recombination and the BRCA2 tumour suppressor[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13(3): 338-343.
- 14 Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002, 11(12): 1513-1530.

(收稿日期: 2005-03-30)

文章编号: 1001-098X(2005)03-0136-04

动态成像技术及其在精确放疗中的应用

杨克桢 孙卫国 林意群

摘要 放射治疗的发展与现代医学影像技术密不可分, CT成像的空间分辨力和时间分辨力的提高使得动态CT日益成为临床应用的有效手段。在放疗模拟定位的应用中, 采用呼吸门控技术得到呼吸周期中不同相位的三维图像, 可掌握肿瘤目标随呼吸的运动变化规律, 从而建立精确的数学模型, 对改进治疗计划具有重要意义。此外, 在直线加速器上嵌入两正交的X射线成像系统, 以实时跟踪肿瘤目标的位置, 也是四维放疗研究的一个方向。

关键词 动态成像; CT; 放疗; 模拟定位

中图分类号 R814.42 文献标识码 A

Dynamic imaging technique and its application in precise simulation of radiotherapy

YANG Ke-cheng, SUN Wei-guo, LIN Yi-qun

(Department of Medical Instrument, Biomedical Engineering Faculty, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract The development of radiotherapy is closely linked with modern medical imaging technique. 4-dimensional CT increasingly becomes an effective measure due to the improvement of temporal and space resolution of CT imaging. In the simulation of radiotherapy, 3-dimension images in different phases can be collected with respiration-gating technique. Therefore, a precise mathematical model is set up after the rule of tumor motion along with respiration is found out, which is significant for the improvement of treatment planning. Moreover, two orthogonal X-ray imaging systems mounted on the gantry of a medical linear accelerator for tracking the real position of tumor is also an interesting aspect in 4-dimensional radiotherapy study.

Key Words 4-dimensional imaging; computed tomography; radiotherapy; simulation

1 引言

放射治疗模拟定位的局限性主要体现在两个方面: 一是模拟定位和治疗实施分时进行, 无法克服时效性问题; 二是体位固定技术无法从根本上消除呼吸和心跳等生理运动的影响, 而肿瘤目标在治疗实施过程中并非静止不动, 可能导致脱靶, 降低疗

效, 尤其在胸腹部的应用中更为严重。解决这些问题的根本方法是不仅要提高成像系统的时间分辨力等性能, 关键要在诊断、定位和治疗的全过程实现实时、动态成像, 最终实现对射束的实时控制, 这就是所谓的四维放疗(4-dimensional radiotherapy)技术的基本思想。近年来, 计算机断层成像(computed tomography, CT)装置的快速发展为研究肿瘤的运动模型提供了硬件条件, 可望改变传统的三维模拟定位, 实现动态定位。

作者单位: 510515 广州, 南方医科大学生物医学工程系医学仪器教研室