

紫外线对哺乳类细小病毒 H-1 的致突效应的分析

苏 兆 众

(复旦大学生物系生物物理组, 上海)

提 要

用哺乳类细小病毒 H-1 为探针研究紫外线的致死和致突效应, 可发现随照射剂量的增加, 病毒存活率按对数规律下降, 病毒的突变频率线性增加, 低剂量紫外线诱导回复突变体的几率较大。用小剂量紫外线诱导宿主细胞, 病毒的存活率和突变频率相应提高, 同时使紫外线诱导突变体的几率显著提高。

用病毒探针研究环境致癌因素对细胞的各种生物学效应已充分显示其优越性^[1]。尤其是核内复制的细小病毒 H-1^[2], 由于其简单的基因组(由 5176 个核苷酸组成的单链线状 DNA 分子)只载有几个病毒外壳蛋白的结构基因, 病毒 DNA 复制及其损伤修复几乎全依靠宿主细胞的酶系, 所以受 DNA 毒物损伤的病毒 DNA 在细胞内的复制与修复基本反映受损的细胞 DNA 的复制与修复。再者, 由于 H-1 的特有基因组结构及其复制方式, 即首先延伸 3' 端自我引物以病毒 DNA 为模板复制互补链, 使单链的病毒 DNA 变成双链的复制形式(RF), 再以互补链为模板复制子病毒 DNA。病毒 DNA 上的损伤在变成 RF DNA 前不能被宿主的修复(如切除修复)功能除去, 这使 H-1 成为研究真核细胞内受损模板上 DNA 复制的理想探针。并且, 已筛选了多种 H-1 的突变株, 以供研究环境致癌因素的致突效应。

本文用细小病毒 H-1 为探针研究紫外线的致死与致突效应, 发现在人细胞内, 病毒的存活率按对数规律随照射病毒的紫外线剂量的增加而下降。H-1 的一种温度敏感突变体 H-1 ts6 的回复突变频率随紫外线剂量增加而线性地增加。若在病毒感染前先用小剂量紫外线诱导细胞, 则病毒的存活率与突变频率相应提高,

说明真核细胞中存在类似细菌中的 SOS 修复机制。对病毒存活与突变的剂量响应曲线分析表明, 用较低剂量紫外线照射病毒获得突变体的几率较大。

一、材料和方法

1. 培养细胞 新生儿肾脏细胞株 NB-E^[3] 贴壁生长于塑料培养皿(Nunc)内。培养液是含 5% 小牛血清和“三抗”(青霉素 100u/ml, 链霉素 100μg/ml, 卡那霉素 50u/ml) 的 Eagle (MEM, Gibco)。大鼠肝细胞株 RL5E^[4] 悬浮生长于转瓶内。培养液是含 5% 小牛血清和“三抗”的 Joklik-MEM。培养皿与转瓶都置入含 5% CO₂ 和饱和水蒸汽的培养箱内。

2. 病毒 细小病毒 H-1 的温度敏感突变体 H-1 ts6 增殖于 33℃ 转瓶内生长的 RL5E 细胞内。病毒提纯基本根据 Rhode^[5] 的方法。

3. 紫外线照射 用居里研究所的 Lartajet 剂量仪标定输出波长为 254nm 的紫外灯的剂量率。受照病毒悬浮液的厚度不超过 1mm。细胞受照前先吸除培养液, 照后即加入培养液继续培养。

4. 病毒感染和病毒空斑分析 见参考文献 [6]。病毒空斑数表示病毒滴度。受照病毒的空斑数与同滴度的未照病毒的空斑数之比表示

受照病毒的存活率。

5. 病毒突变分析 H-1 的温度敏感突变体 H-1 ts6 在限制性温度 (39.5℃) 下由于病毒复制的后期功能缺损,即不能自 RF DNA 上复制成熟的子 DNA 链,所以不能形成病毒空斑。在非限制性温度 (33℃) 下,能像野生型病毒一样形成病毒空斑。H-1 ts6 的回复突变体在 39.5℃ 也能形成空斑。病毒突变频率等于相同滴度的病毒在 39.5℃ 和在 33℃ 形成的空斑数之比。H-1 ts6 的自发回复突变频率小于 10^{-5} 。

二、结果和讨论

1. 受紫外线照射的 H-1 ts6 的存活曲线

如图 1 所示, H-1 ts6 的存活率按对数规律随照射病毒的紫外线的剂量增加而下降 (图 1, 曲线 a)。可以认为紫外光子与病毒颗粒间的相互作用符合 Poisson 分布规律。所以可用:

$$S = \exp(-m) = \exp(-D/10) \quad (1)$$

来描述病毒的存活率。式中, m 是每病毒颗粒平均所受致死击中数, D 是紫外线剂量。可见 10 JM^{-2} 的紫外线形成一个致死击中。这与 H-1 结构非常相似的细小病毒 MVM 受紫外

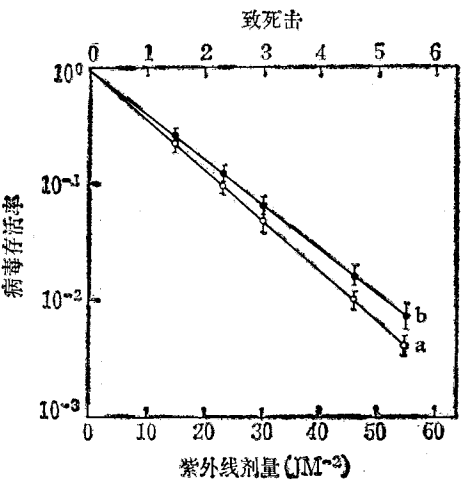


图 1 受紫外线照射的 H-1 ts6 存活曲线

—○— 在未受诱导的 NB-E 细胞里; —●— 在受诱导的 NB-E 细胞里 (病毒感染前 14 小时受 4.5 JM^{-2} 的紫外线照射); 结果取自三个相互独立的实验, 数值经线性回归处理, 垂直短线表示标准误。

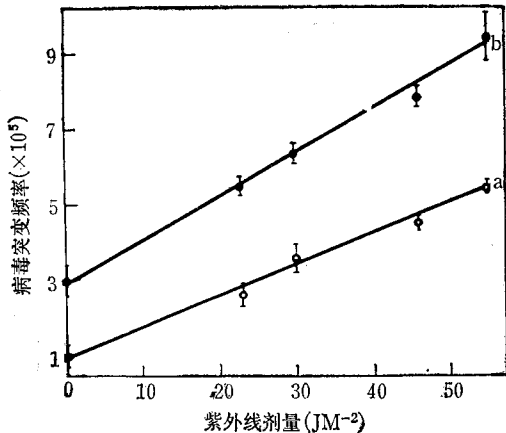


图 2 受照射病毒 H-1 ts6 的突变—剂量响应曲线

图注同图 1

线照射后的存活曲线是一致的^[6]。紫外线引起的 DNA 损伤的 90% 左右是环丁烷型嘧啶二聚体, 线性的无肩的存活曲线表明细胞不能修复单链 DNA 上的二聚体损伤。

2. 受照病毒的突变—剂量响应曲线

如图 2 所示, H-1 ts6 的回复突变频率随照射病毒的紫外线剂量线性地增加 (图 2, 曲线 a), 其突变—剂量响应曲线可用下式:

$$Mf = 6.5 \times 10^{-7} D \quad (\text{不计自发突变频率}) \quad (2)$$

表示; 式中 Mf 和 D 分别表示病毒突变频率和紫外线剂量。(2) 式表明每 1.54×10^6 个致死击中中有一个致突变击中。

已知 DNA 模板上的嘧啶二聚体是一种复制阻遏性损伤, 对单链 DNA 病毒是致死的^[6]。病毒的突变频率随紫外线剂量线性地增加, 可能是因为除了环丁烷型嘧啶二聚体外, 紫外线还造成其他类型的 DNA 损伤, 如 TC(6-4) 连接体^[7]。已证明这类损伤在原核细胞中对 DNA 复制的阻遏性较小, 但具有较大的致突潜力。虽然它只占紫外线诱导的 DNA 损伤的总量的 10% 以下, 但很可能对病毒突变起主要作用, 因为回复突变通常是由 DNA 复制过程中的碱基取代等点突变引起的^[8]。

3. 紫外线照射细胞对病毒存活与突变的影响

在病毒 感染前 12—18 小时, 用小剂量

(4.5 JM^{-2}) 紫外线幅照细胞, 则病毒的存活率与突变频率都有相应的增加(图 1, 2; 曲线 b)。病毒的存活率与突变频率可分别用下式表示:

$$S' = \exp(-D/11) \quad (3)$$

$$Mf' = 9.8 \times 10^{-7}D + 1.0 \times 10^{-5}, \quad (4)$$

形成一个致死击中的紫外线剂量由 10 JM^{-2} 提高到 11 JM^{-2} , 每 1.0×10^6 个致死击中中有一个致突变中。这一现象类似原核细胞中的 Weigle 增强复活与 Weigle 增强致突^[9], 说明真核细胞中也可能存在类似 SOS 的修复机制。

在受紫外线照射和未受紫外线照射的人细胞中, 受紫外线照射的一定量的 H-1 ts6 中的回复突变体出现几率 (即相同滴度的病毒受不同剂量紫外线照射后感染受诱导和未受诱导的细胞, 回复突变体的产率) 不同因为紫外线诱导细胞可使完整 (即未受照射) 的病毒的复制增强 1.6 倍, 所以一定量的受照病毒在未受诱导和受诱导的细胞里产生的存活子病毒量分别为

$$Y = \exp(-D/10) \quad (5)$$

和

$$Y' = 1.6 \exp(-D/11) \quad (6)$$

那么一定量的病毒在两种细胞里形成回复突变体的几率分别是

$$P = Mf \cdot Y = 6.5 \times 10^{-7}D \cdot \exp(-D/10) \quad (7)$$

和

$$P' = Mf' \cdot Y' = (9.8 \times 10^{-7}D + 1.0 \times 10^{-5})$$

$$\cdot 1.6 \exp(-D/11) \quad (8)$$

(图 3, 曲线 a 和 b)。

分别对 (7)、(8) 两式求导, 可知在未受照射细胞里受 10 JM^{-2} 紫外线照射的病毒出现回复突变体的几率最大, 而在受照射的细胞里, 受 0.9 JM^{-2} 紫外线照射的病毒出现回复突变体的几率最大。将图 3 所示的 P 和 P' 分别对剂量 D 积分, 可得

$$I = \int_0^{\infty} P(D)dD = 6.5 \times 10^{-5} \quad (9)$$

$$I' = \int_0^{\infty} P'(D)dD = 3.6 \times 10^{-4}. \quad (10)$$

对受紫外线照射的 H-1 ts6 在未受诱导和受诱导的细胞里的存活和突变曲线的分析可得出如下结论: 病毒受较低剂量幅照时形成回复突变体的几率较高; 病毒的突变频率虽然随照射剂量而增加, 但高剂量射线对病毒的致死作用更显著, 使病毒 DNA 上具有致突潜力的损伤得不到表现。紫外线诱导细胞提高了获得回复突变体的几率 (约 5.5 倍), 同时使获得最大回复突变体几率的紫外线剂量降低。

本实验结果提示: 不能低估低剂量的环境 DNA 毒剂的致突危险性, 特别是考虑到存在体细胞突变导致癌变的可能性。低剂量紫外线或其他 DNA 毒剂 (如烷化剂; 结果另发表) 诱导细胞, 更增加了致突变中在致死击中中的比例。

参 考 文 献

- [1] Defais, M. J. et al.: *Adv. Radiat. Biol.*, 10 1, 1983.
- [2] Rhode, S. L. & Paradiso, P. R.: *J. Virology*, 45, 173, 1983.
- [3] Shein, J. M. & Enders, J. F.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 109 495, 1962.
- [4] Bornford, R. & Weinstein, I. B.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 49, 376, 1972.
- [5] Rhode, S. L.: *J. Virology*, 11, 856, 1973.
- [6] 苏兆众等: 《生物化学与生物物理进展》, (1), 47, 1986.
- [7] Haseltine, W. A.: *Cell*, 33, 13—17, 1983.
- [8] Drake, J. W. & Baltz, R. H.: *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 11, 1976.
- [9] Witkin, E. M.: *Bacterial Res.*, 40, 869, 1976.

[本文于 1986 年 8 月 12 日收到]

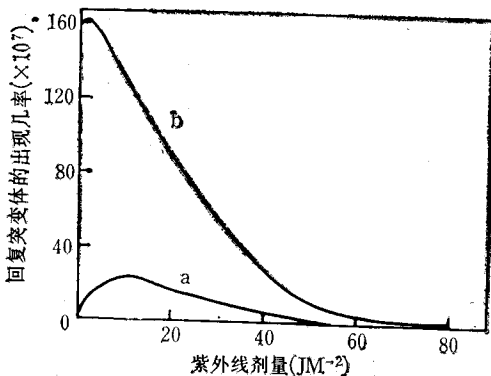


图 3 受紫外线照射的一定量病毒中出现回复突变体的几率, a: 宿主细胞 NB-E 未受紫外线诱导; b: 宿主细胞 NB-E 受紫外线诱导。