

O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 的修复研究

曹恩华 王菊君

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

提 要

O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 是某些烷化剂直接或通过酶转化后与 DNA 反应生成的一种有致死、致突及致癌作用的产物。细胞内的 O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶能有效地去除这种损伤, 即甲基基团从 DNA 鸟嘌呤第六位氧原子上特异地转移到受体蛋白的半胱氨酸的残基上, 反应产物是 S-甲基半胱氨酸。受体蛋白就是酶本身。O⁶-甲基鸟嘌呤的修复过程所完成的是一种无错的修复, 它可能与减少肿瘤的发生有关。

在活细胞中有一系列原有的或损伤因素诱导产生的酶、能有效地去除 DNA 的损伤。这种修复作用是生物在长期进化过程中获得的一种保护作用。研究表明, 细胞 DNA 的修复水平不同与人类对肿瘤敏感性高低有关^[1]。

某些烷化剂直接或通过酶转化使 DNA 烷基化。其中 O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA (O⁶-mGua DNA) 是一种致死、致突和致癌的损伤, 引起了很多科学家的兴趣。直到 1980 年 Olsson 和 Lindahl^[2] 才发现在大肠杆菌中有一种能直接去除鸟嘌呤 O⁶ 位置上甲基的蛋白质, 即 O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶 (O⁶-MTase)。1982 年 Waldstein 和 Cao^[3,4] 首先证实了人的淋巴细胞中存在类似的酶, 但其诱导能力与细菌不同。在 DNA 修复研究中, 至今只有为数很少的一些损伤的生物效应被鉴别清楚, O⁶-mGua 是其中之一。本文仅就哺乳动物细胞的 O⁶-mGua DNA 修复及其在癌变中的作用作一简述。

一、修复模型及分子机制

1. 烷基化产物的修复模型

在生理条件下, 一个 DNA 分子上至少有

12 个位置可供烷基化。各种烷基化产物的比例是不同的, 以 N⁷-甲基鸟嘌呤产率最高。在甲基化的产物中, 目前研究较多的有 N⁷-甲基鸟嘌呤、N³-甲基腺嘌呤及 O⁶-甲基鸟嘌呤。多数研究者的兴趣在后者。由于鸟嘌呤第六位氧原子被甲基化后, 首先影响碱基对间氢键的形成, 引起碱基的错误配对, 形成 G-T 对, 导致突变频率增加^[5]。因此 O⁶-mGua 在甲基化损伤的生物效应的研究中占有比较重要的位置。

图 1 表示烷基化损伤的 DNA 各种修复途径^[6]。途径 a 是最简单的、即烷基化基团从 DNA 分子上被去除但不影响 DNA 的骨架, 这是修复 O⁶-mGua 的主要途径。在这种修复系统中没有伴随非常规 DNA (unscheduled DNA) 的合成及链断裂。途径 b 和 c 与糖基酶 (glycosylase) 作用有关。它切除多聚核苷上被

文中缩写及代号:

O⁶-mGua, O⁶-甲基鸟嘌呤; O⁶-mdGuo, O⁶-甲基鸟嘌呤脱氧核苷; O⁶-mGua DNA, O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA; O⁶-MTase, O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶; N⁷-mGua, N⁷-甲基鸟嘌呤; N³-mAde, N³-甲基腺嘌呤; MNNG, N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍; DMN, 二甲基亚硝胺; NMU, 甲基亚硝基胍; MMS, 甲磺酸甲酯。

改变的嘌呤,达到修复 DNA 损伤的目的。途径 b 中新的嘌呤被直接插入到多核苷酸中,这一方式用 ^3H 胸腺嘧啶渗入看不到非常规 DNA 的合成和链断裂,只有烷基被标记在去嘌呤的位置链的骨架上,才能测到这种断裂。途径 c 与去嘌呤的内切酶有关,在糖基酶作用后产生一个链断裂,紧接着在酶的作用下被修复。因此这一类修复将提高非常规 DNA 的合成和出现 DNA 单链断裂,随着它们的消失,修复就近完成。

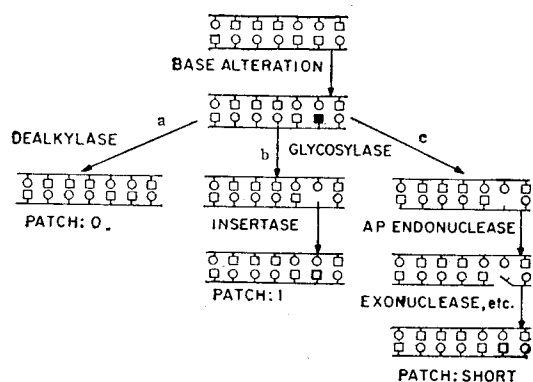


图 1 DNA 中碱基损伤修复的各种途径

□,表示嘌呤, ○,表示嘧啶, ■,被改变的碱基,假定碱基的改变是烷基化损伤。a,通过去烷基酶(Dealkylase)的作用直接去除嘌呤上的烷基,补片(Patch): O。b,在糖基酶(Glycosylase)作用下切除烷基化的嘌呤,再经插入酶(Insertase)的作用插入新的嘌呤,补片(Patch): 一个嘌呤。c,在糖基酶作用下切除烷基化的嘌呤,再在核酸内切酶(A. P. Endonuclease)和外切酶等酶(Exonuclease etc.)作用下,割断损伤部位,连接新的片段,完成修复补片(Patch): 短的单链。

2. O⁶-mGua 修复的分子机制

O⁶-mGua 的修复是由 O⁶-MTase 的作用完成的,即甲基基团从 DNA 鸟嘌呤第六位氧原子上特异地转移到 O⁶-MTase,即受体蛋白的半胱氨酸的残基上,反应的产物是 S-甲基半胱氨酸^[2,3]。其特点是随着甲基的转移, O⁶-MTase 自杀,因此该酶具有转移和作为受体的双重功能。在大鼠肝中每个 O⁶-MTase 有两个受体位置反应是快速的,并可用化学计量。如人的细胞或细胞提取物在 37℃,最多只需 10 分钟即能完成甲基的转移^[7]。

二、O⁶-MTase

1. 底物的影响

O⁶-MTase 的活性与底物的结构密切相关。它不仅能去除鸟嘌呤 O⁶ 位置上的甲基,也能除去乙基或取代乙基,如氯乙基或羟乙基,但反应速率均远远低于甲基基团。大肠杆菌的 O⁶-MTase 除能修复鸟嘌呤的甲基外,对处于 DNA 深沟中的 O⁶-甲基胸腺嘧啶、O⁴-甲基胸腺嘧啶及甲基磷酸三脂上的甲基也有修活性。O⁶-MTase 对双链 DNA 比变性 DNA、单链 DNA 有较好的活性^[7],它也能去除 tRNA 中鸟嘌呤上的甲基^[8]。人类细胞的 O⁶-MTase 对交联 DNA 无修复能力^[9]。DNA 碱基上 O⁶-mGua 的密度能影响甲基转移速度,当 DNA 中 O⁶-mGua 减少 250 倍,完成修复的时间将增加 15 倍。有人认为修复分为两个阶段,开始时由于 O⁶-mGua 密度高,修复速度较快,随着 O⁶-mGua 浓度变小,修复变慢,于是进入第二阶段。

2. 分子量和稳定性

纯化的大肠杆菌 O⁶-MTase 分子量是 18000。克隆 ada 基因的大肠杆菌所得到的 O⁶-MTase,分子量是 37000 的多肽。前者是后者在胞溶时快速裂解而成的,37-kd 是天然形式,而 18-kd 是人工纯化的产物^[10]。部分纯化的大鼠 O⁶-MTase 分子量在 18.5—20-kd 之间。小鼠粗提物为 22-kd。人的细胞株和组织为 21—24-kd^[17],目前还没有发现哺乳动物细胞的 O⁶-MTase 裂解现象。哺乳动物细胞的 O⁶-MTase 的热稳定性与细菌不同,纯化的大肠杆菌的甲基转移酶对热有抗性,在 95℃,半衰期是 45 分钟,而人淋巴细胞的 O⁶-MTase 在 45℃ 就很快失活^[9];也有人报道在 95℃,10 分钟仍保留 54% 的活性^[7]。细菌的 O⁶-MTase 在 5℃ 或 5℃ 以下仍有活性,但哺乳动物的酶在相同温度下很易失活^[7]。

3. O⁶-MTase 的体外测定及含量

测定细胞提取物或部分纯化的提取物中的酶活性,一般用外源性的 O⁶-mGua DNA 为底物。Waldstein 和 Cao 等人发展的方法^[6,11],细

胞用量一般在 2×10^6 个即可进行。测定原理如下：将超声制备的细胞或组织提取物与 ^3H -mGua DNA 在 37°C 保温 1 小时，然后可用下列方法测定。(1) 用高压液相色谱测定底物 DNA 分子上 $\text{O}^6\text{-mGua}$ 的丢失情况、计算酶活性。(2) 由于反应后 ^3H 甲基转移到受体蛋白上，用蛋白酶水解蛋白、测定反应液中酸溶部分的放射活性。(3) 反应的混合物用酸水解 DNA、测定酸不溶部分的放射活性。三种方法得到相同的结果，以第三种最经济方便，由于是直接测定少量转移到蛋白上放射活性，避免了第二种方法中因长时间的水解，一些组织或细胞中含有的核酸酶的作用，使测定结果偏高。

用不同方法测定的一些细胞和组织内 $\text{O}^6\text{-MTase}$ 的水平见表 1^[12,13]。经诱导的大肠杆菌每小时可产生约 6000 个分子的 $\text{O}^6\text{-MTase}$ ，而人的肿瘤细胞是 750—4500 个分子。

表 1 每个细胞中 $\text{O}^6\text{-甲基鸟嘌呤 DNA}$
甲基转移酶分子数目

来 源	每个细胞中 酶分子数
<i>E. coli</i> B/r and adaption-deficient strains	13—60
<i>E. coli</i> B/r(adapted)	3000
<i>E. coli</i> BS21 (adaption-constitutive)	6700
Rat hepatocytes (uninduced)	60000
Rat hepatocytes (induced)	400000
Rat liver non-parenchymal cells	5000—12000
Rat kidney	12000
Rat kidney (induced)	31000
Rat brain	1500
Hamster liver	28000
Human liver	600000—900000
Human lymphocytic leukocytes	91000—220000
Human lymphocytes	14000—140000
Human fibroblasts	110000—130000
Hela CLL2	95000—119000
Hela CLL2 (induced)	320000
Hela S3	114000
A549	120000
HT29	175000
WI-38	107000
V79 hamster fibroblasts	94000
Hela M. R.	9

三、哺乳动物细胞 $\text{O}^6\text{-mGua DNA}$ 修复特点

1. 适应性响应 (adaptive response)

一些生物系统暴露于低水平的烷化剂后，对高剂量烷化剂的作用缺乏敏感性，称为适应性响应。如用低剂量的 DMN 处理大鼠，增加其肝中 DNA 分子上 $\text{O}^6\text{-mGua}$ 的丢失，增强了肝提取物去除外源性 DNA 的 $\text{O}^6\text{-mGua}$ 的能力。在肝细胞中，用 DMN 诱导后受体蛋白增加 3 倍左右，而诱导后的大肠杆菌 $\text{O}^6\text{-MTase}$ 可增加 1000 倍。Hela 细胞用低水平的 MNNG 处理后，受体蛋白量增加仅是原来的三倍^[14]。可见细菌和哺乳动物细胞在诱导能力方面有明显的差别。适应性响应必须有新的蛋白合成，因此上述反应可以用环己亚胺抑制。上述的适应性响应是快速的、无错的修复，诱导的信号有可能来自 $\text{O}^6\text{-mGua}$ 残基本身。但反应机制至今还不清楚。

2. Mer^+ , Mer^- 细胞

一些人类肿瘤细胞对用 MNNG 处理的腺病毒 5 (MNNG-Ad5) 缺乏激活能力，不能从 $\text{O}^6\text{-mGua DNA}$ 分子上去除甲基基团。这类细胞株称为 Mer^- 细胞，反之为 Mer^+ 细胞。如果是淋巴细胞，对 MNNG 不敏感者为 Mex^+ ，敏感者为 Mex^- 。Yarosh^[15] 等人测定了 16 种 Mer^- 细胞株，它们或没有 $\text{O}^6\text{-MTase}$ 活性或活性很低，而所测定的 15 种 Mer^+ 细胞均有很高的 $\text{O}^6\text{-MTase}$ 活性。然而这两种的细胞对 $\text{N}^7\text{-mGua}$, $\text{N}^3\text{-mAde}$ 均有修复能力。在已鉴定的 Mer^- 细胞中，其中有一些来自病人的肿瘤。

实验表明 Mer^- 细胞并非都没有 $\text{O}^6\text{-MTase}$ 活性。Setlow 等人^[6,16] 认为烷化剂对人类细胞产生的细胞毒性大小取决于内部剂量、细胞本身固有的修复活性和对单一烷化剂刺激后适应性反应能力，即受体蛋白的再合成能力。所测定的 6 种不同来源的 Hela 细胞株可分为三类：第一类，Hela CLL 229(ATCC)，Hela CLL2 (ATCC) 和 Hela CLL (BNL)，它们有较高

的固有的修复活性和较强的适应性响应,细胞存活率高。第二类, Hela S₃(ATCC) 和 Hela S₃(BNL), 为较敏感的细胞株, 虽有高的固有修复能力但无适应性响应, 细胞存活率也较低。第三类 Hela M. R. 细胞对 MNNG 最敏感, 没有修复 O⁶-mGua 的能力, 细胞存活率最低。由此可见 MNNG 对细胞毒性的大小与细胞对 O⁶-mGua 的修复能力密切相关。

3. 修复的饱和性

每个细胞内的受体蛋白与烷基化 DNA 反应仅仅作用一次, 因此快速的修复能力将被细胞内有限的受体数量所限制。当受体蛋白用尽后, 饱和性即产生。去除甲基的速率将反映受体蛋白的再生和合成情况。Setlow^[46] 指出, 在正常人类的细胞中, 每个细胞中有受体位置 10⁴—10⁵ 个, 而每个细胞内生成的 O⁶-mdGuo 分子数约 130 个, 表明这种修复系统在一般正常环境的长期慢性低剂量作用下是不会被饱和的。

4. 细胞分裂的影响

可以从以下两个例子得到说明。当脑细胞在 NMU 存在下, 其 DNA 被甲基化时, 肿瘤仅仅产生于胶质细胞, 该细胞是可以分化的, 而神经细胞是不能分裂的。但 O⁶-mGua (以及其它甲基化的碱基) 的量在两种细胞中是类似的。第二个例子是单一剂量的 DMN 或 NMU 在成年大鼠中不能诱导产生肿瘤, 而能诱发新生大鼠或具有部分肝肿瘤的再生肝的大鼠产生肿瘤。上述两种情况, DNA 合成速率和细胞分裂速度都快。这表明 DNA 分子中有甲基化碱基存在时, 分裂了的细胞更易导致肿瘤产生, 基因的表达在分裂时才是有害的^[17]。

5. 颠复性修复 (Subversive repair)

Hela 细胞在含有 0.2mM O⁶-mGua 培养基中, 培养 4 小时, O⁶-MTase 活性减少 70—80%^[18]。Karran^[3] 对 Mer⁺ 人的淋巴细胞的研究指出, 由于在核糖核酸转移反应时, O⁶-mGua 被错误地渗入到 tRNA 分子上, 细胞的 O⁶-MTase 由于竞争性地修复 tRNA 分子上的 O⁶-mGua 甲基而被消耗, 因此丧失了修复 O⁶-mGua

DNA 的能力。这个现象称为颠复性修复。其生物学意义还不清楚。

四、生物学意义

1. O⁶-mGua 与癌变

有关癌变的分子机制目前有多种假说, 但一般认为癌的发生与 DNA 的改变有关。在含有 O⁶-mGua, N³-mAde 及 N⁷-mGua 的培养基中生长的 CHO 细胞, 唯有 O⁶-mGua 使细胞突变增加。用 NMU, DMN, MMS 处理的大鼠, 前两种可诱发肾肿瘤, 而 MMS 在相同的实验条件下则不能导致任何肿瘤, 后者主要产物是 N⁷-mGua。这说明 N⁷-mGua 不是 DNA 重要的损伤。在产生肿瘤的大鼠脑组织中, O⁶-mGua DNA 的修复能力较低或不能修复, 而正常组织具有很快的修复能力。目前还没有方法证明甲基磷酸三脂能诱导突变。体外的 DNA 复制研究证明在核糖或去氧核糖核苷酸多聚体中, 由于 O⁶-mGua 或 O⁶-mdGuo 的渗入, 在 RNA 多聚酶的作用过程中, 引起 U (和 A) 的错误渗入, 而 N⁷-mGua 没有这个现象。不难看出 O⁶-mGua 与细胞突变和引发肿瘤有较密切的关系。

2. 甲基化与基因表达

在大肠杆菌中, O⁶-MTase 受 ada 基因控制, 用 MNNG 处理后 ada 基因产物 20 分钟后达最高水平, 诱导 ada 基因表达增加的信号也可能是 O⁶-MTase 的甲基化产物。已知 ada 基因产物能诱导 alk 基因的表达, aidB 基因(其功能还不清楚)也在 ada 基因的控制之下。因此研究 ada 基因的转录也许是了解基因调控的关键。在哺乳动物细胞中, O⁶-MTase 的调节机制还知道得很少。用单一剂量 NMU 诱导的大鼠乳腺肿瘤, H-ras-1 肿瘤基因由于 G-C 向 A-T 转化而被激活, 推测它与突变和肿瘤转移有关^[19]。

3. O⁶-mGua DNA 修复的意义

O⁶-mGua DNA 的修复过程是一种无错修复, 它可能与减少肿瘤发生有关。人类细胞修复 O⁶-mGua DNA 损伤的能力有很大的不同。

正常人群的淋巴细胞的受体活性相差 7 倍^[3]。抽烟者的肺巨噬细胞的受体蛋白活性很低, 是否与肺癌发病率有关, 尚待进一步阐明^[20]。人们已经知道太阳光诱导的皮肤癌, 着色性干皮病患者的发病率是正常人的 10^4 倍, 这是由于他们对产生的胸腺嘧啶二聚体缺乏修复能力。人肝具有很高的 O^6 -MTase 活性, 这对于修复大量的烷基化损伤有重要意义。

最近 Kim^[21] 等人报告正常人的皮肤成纤维细胞用高浓度小牛血清处理后, 细胞内 O^6 -MTase 在 DNA 复制前酶活性增加, 因此在 DNA 复制时, 一些损伤已被除去, 而布卢氏综合症患者的细胞没有观察到 O^6 -MTase 增加。利用人类细胞的 O^6 -MTase 作用规律, 调节修复能力, 允许在正常细胞中发挥活性, 在肿瘤细胞中得到抑制, 达到预防和治疗肿瘤的目的。另一方面、设计一种既能产生 O^6 -烷基化鸟嘌呤又能提高 DNA 交联的药物, 有可能建立一种选择性化疗手段。

五、结 束 语

肿瘤的产生是一系列事件的结果, 用单一的理论来解释是不可能的。一些实验表明某些肿瘤的诱发与细胞内 O^6 -mGua 的含量之间缺乏相关性, 因此其它位置的烷基化产物的生物学作用不容忽视^[22]。本文重点介绍了 O^6 -mGua DNA 及其修复机制, 以及与细胞突变、癌变的关系。这些方面的研究虽然取得了重要进展, 但很多重要问题如诱导信号的本质、DNA 甲基化的基因表达、是否可以利用修复的调节作用减少致突、致癌的可能性等至今还不清楚, 这方面的研究无疑是有重要科学意义的。今后需要做更多的工作, 积累更多的资料。

参 考 文 献

- [1] Setlow, R. B.: *Natl. Inst. Monogr.*, **60**, 249—255, 1982.
- [2] Olsson, M. and Lindahl, T.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 10569—10571, 1980.
- [3] Waldstein, E. A., Cao, E. H., et al.: *Mutat. Res.*, **95**, 405—416, 1982.
- [4] Waldstein, E. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4786—4790, 1982.
- [5] Eadie, J. S. et al.: *Nature*, **308**, 201—203, 1984.
- [6] Setlow, R. B. et al.: *N-Nitroso Compounds: Occurrence, Biological effects and Relevance to Human Cancer* (eds. O'Neill, I. K.), et al. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1984.
- [7] Harris, A. L., et al.: *Cancer Res.*, **43**, 3247—3252, 1983.
- [8] Karran, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5285—5289, 1985.
- [9] Brent, T. P.: *Cancer Res.*, **44**, 1887—1892, 1984.
- [10] Teo, I., Sedgwick, B. et al.: *EMBO J.*, **3**, 2151—2157 1984.
- [11] Waldstein, E. A. et al.: *Anal. Biochem.*, **126**, 268—272, 1982.
- [12] Pegg, A. E.: *Biochemical Basis of Chemical Carcinogenesis* (eds. Greim, H. et al.), Raven press. New York, 1984.
- [13] Waldstein, E. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5117—5121, 1982.
- [14] Waldstein, E. A. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **10**, 4595—4604, 1982.
- [15] Yarosh, D. B. et al.: *Carcinogenesis*, **4**, 199—205, 1983.
- [16] Setlow, R. B.: *Assessment of risk from low-level exposure to radiation and chemicals*, Vol. **33**, Plenum press, New York, 213, 1985.
- [17] Pegg, A. E.: *Cancer Investigation*, **2**(3), 223—231, 1984.
- [18] Dolan, M. E. et al.: *Cancer Res.*, **45**, 6413—6417, 1985.
- [19] Sukumar, S. et al.: *Nature (London)*, **306**, 658—662, 1983.
- [20] Cao, E. H. et al.: *Hematopoietic Cellular Proliferation*, Vol. **459**, 269, 1985.
- [21] Kim, S., et al.: *Mutation Res.*, **173**, 141—145, 1986.
- [22] Singer, B.: *Cancer Investigation*, **2**(3), 233—238, 1984.

【本文于 1986 年 8 月 30 日收到】