

讲 座

用细小病毒作为探针研究细胞对 DNA 损伤的反应

本文根据比利时布鲁塞尔自由大学生物物理及放射生物学实验室主任 J. Rommelaere 教授于 1987 年 5 月来华讲学部分报告, 由复旦大学生物物理教研组苏兆众、张青青整理。

一、绪 言

在原核和真核细胞中, 病毒探针广泛用于研究宿主细胞功能^[1]。我们对细胞 DNA 复制、表达和调控的了解, 常始于对噬菌体和病毒的研究。病毒是分析细胞对 DNA 损伤反应的极好工具^[2,3]。真核细胞中细胞核 DNA 包含许多复制子, 它们的启动是相互独立的, 这给研究复制过程带来困难, 而病毒基因组仅含一个复制子, 不少病毒包括本文所述的细小病毒的基因组结构和核苷酸序列已经搞清。细胞对 DNA 损伤的反应包括 DNA 复制、修复、突变和病毒增殖。虽然所述的实验仅限于细小病毒探针, 但对单链或双链 DNA 噬菌体在大肠杆菌及双链 DNA 病毒在哺乳类细胞中的实验也作了介绍。

二、受损细小病毒在未处理细胞中的存活和突变

1. 病毒存活

虽然紫外线 (UV) 诱导的嘧啶二聚体是潜在的致死性 DNA 损伤, 但受 UV 照射的细胞却表现对 UV 的一定的抗性, 因为细胞具有修复这类损伤的能力, 而且, 哺乳类细胞能容忍部分未修复的二聚体的存在。核内复制的单链 DNA 细小病毒是分析这一容忍过程的最佳探针, 因为它在形成 DNA 双链复制形式 (RF) 前不能进行切除或重组修复。细小病毒单链 DNA 通过 3' 末端迴文序列的延伸合成互补链, 形成

RF 分子, 此过程提供了分析主导链 DNA 合成的探针。

受 UV 辐照的小鼠细小病毒 (MVM) 在小鼠成纤维细胞里的存活, 在半对数坐标上与剂量成线性关系^[4]; γ 射线或热酸性处理造成的 MVM、大鼠细小病毒 (RV) 和仓鼠细小病毒 (H-1) 损伤表现出典型的对病毒感染力的单击失活效应; 单链 DNA 噬菌体 (如 ϕ x174) 在 *E. coli* 中也表现相似的行为^[5]。因为 UV 损伤不可逆地阻断细小病毒 DNA 合成, 抑制了互补链的延伸。在弱酸性 (pH 5.0) 条件下加热 (60°C) H-1 或 MVM 可在其基因组上造成无碱基位点 (Ap)。Ap 损伤抑制 RF DNA 合成, 对细小病毒是一种致死性损伤。与此相反, 双链 DNA 病毒 SV₄₀ 虽然基因组大小与细小病毒的相仿, 但对二聚体和 Ap 位损伤却呈抗性, 二者的差别可能部份源于细胞的切除修复功能。

细胞表现出能容忍 DNA 上的二聚体损伤并能对带有二聚体损伤的 DNA 分子进行复制。但为什么不能对带有损伤的细小病毒 DNA 分子进行复制, 这个问题现在还不清楚。下文将会介绍, 特殊的处理能使细胞获得对带有非码损伤 (non-coding lesions) 的细小病毒 DNA 进行复制的能力。

2. 病毒突变

迄今对细小病毒突变的研究限于 H-1 ts6, 这种温度敏感型突变株在限制性温度 (39.5°C) 能复制 DNA, 但不产生有感染力的后代, H-1

ts6 能产生带有野生表型的回复突变体,它在 39.5℃ 也能形成病毒空斑。受 UV 辐照或化学致突变剂乙基亚硝基脲 (ENU) 处理的 H-1 ts6 的子病毒的回复突变率高于未处理的病毒,且突变频率的增加与剂量呈线性关系。由 ENU 处理引起的突变可归因于一些烷化碱基的错配性质;而由 UV 损伤引起的突变可能是由于错码损伤的复制或二聚体的低水平的自发旁路 (bypass) 的复制。

三、由 DNA 毒剂诱导的细胞条件反应

细胞条件反应指细胞环境变化调节细胞表型变化;如细菌对各种环境压力的反应,包括启动特殊调节控制网等。DNA 毒剂如何影响哺乳类细胞的存活和突变,已引起广泛的关注^[3,4]。由于缺乏这类哺乳类细胞的突变体,上述机制不易阐明;而且,要把 DNA 毒剂的损伤效应与潜在的诱导效应相分离是很困难的。但病毒探针克服了这些困难,因为可把毒剂的损伤作用和潜在的诱导作用分别施加于病毒和细胞。以下是由细小病毒探针阐明的三种条件反应。

1. 受损病毒的增强复活

(1) 病毒增强复活现象 (ER) 宿主细胞在受损病毒感染前先受辐照或化学致突变物处理,则受损病毒的存活提高,这一现象称为受损病毒的增强复活 (ER)。ER 首先见于核内复制的双链 DNA 病毒如单纯疱疹病毒 (HSV),腺病毒和 SV₄₀^[3]。ER 的表现是延时且短暂的

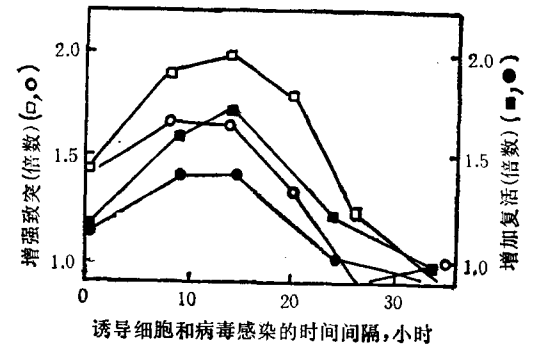


图 1 在 H-1 ts6/NB-E 系统中由 DNA 毒剂诱导的增强致突 (EM) 和增加复活 (ER) 的动力学过程

■, □ 2-硝基-7-甲氧基-萘(2,1, b)呋喃 (R7000)
●, ○ 2-硝基-7-溴-萘(2,1, b)呋喃 (R7160)

(图 1)。由 UV 照射和 2-硝基萘呋喃衍生物引起的 ER 的动力学过程相同^[6,7,9]。当细胞处理和病毒感染的时间间隔为 12—15 小时, ER 值最大;间隔超过 30 小时, ER 现象消失。ER 与处理细胞的 DNA 毒剂呈剂量响应关系(图 2): ER 值先随剂量的增加而增加,达到峰值,然后下降^[6,7,9]。剂量较高时 ER 下降是由于细胞正常代谢功能受损,即细胞存活下降。然而二者间不表现简单的关系,当用两种 2-硝基萘呋喃衍生物进行比较时,发现一种 (R7000) 在亚致死损伤剂量时就能最佳地诱导 ER,而另一种 (R7160) 只有在高剂量时才有效 (图 2)。因此,在相同浓度时, DNA 毒剂的诱导潜力不同。

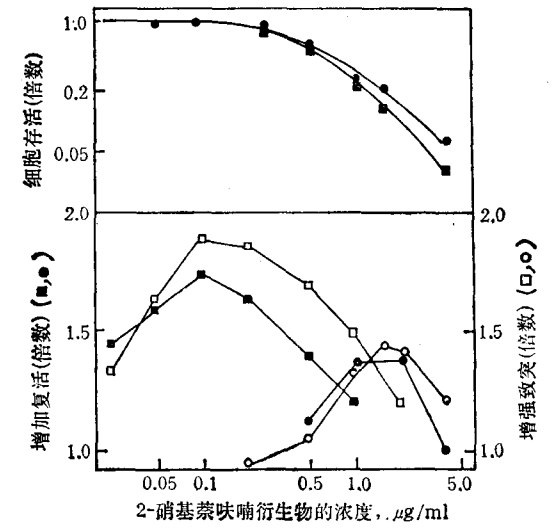


图 2 在 H-1 ts6/NB-E 系统中由 DNA 毒剂诱导的增加复活 (ER) 与增强致突 (EM) 的剂量响应曲线

■, □ R7000; ●, ○ R7160

若在细胞处理与病毒感染间在培养剂中加入蛋白合成抑制剂放线菌酮, ER 反应被强烈抑制^[9]。ER 的动力学过程及对蛋白合成的需求表明它是细胞内非结构性的诱导现象。

(2) 增强复活的机制 对细小病毒 ER 的分子机制所知甚少。细小病毒的 ER 可作为促进在受损模板上 DNA 合成的一种表现形式。对上述可能性可作如下探究: 确定受 UV 辐照的或去碱基的 MVM 的 ER 是否与病毒 DNA

复制的某些障碍作用的克服有关。某些阻遏性 DNA 损伤(如二聚体和 Ap 位损伤)能强烈抑制整个细小病毒 DNA 合成^[6,7]。在预先受 UV 照射的小鼠成纤维细胞中,这种抑制作用减弱^[6,7]。所以, DNA 复制受抑状态的恢复程度可用来解释这些细胞中观察到的 ER 程度^[10]。

ER 现象可被蛋白合成抑制剂放线菌酮所抑制,对这个现象的可能解释是,UV 辐照能在细胞中诱导出某种功能,克服受损病毒 DNA 上互补链延伸时所遇到的障碍。

2. 完整病毒的增强复制 (EC)

用低剂量 UV 预处理宿主细胞,也增强其复制未经处理的病毒的能力^[6],比未处理细胞产生更多的病毒,这一现象称为完整病毒的增强复制 (EC),并与 ER 有平行的动力学过程和剂量响应关系^[6],也能被蛋白合成抑制剂所抑制。这可能是 UV 辐射克服了正常细胞中限制细小病毒增殖的障碍;也可能是部分未经处理的病毒颗粒带有自发的 DNA 损伤,这些损伤在正常情况下是致死的如 Ap 位点,但在诱导的条件下可被容忍,即 EC 也许包含直接容忍自发致死损伤的 ER 组分。

用 HSV 和 SV₄₀ 作为探针,可发现在受 UV 照射的细胞层上形成的病毒空斑比未照细胞层上的大,这称为大空斑效应 (LPE),H-1 和 MVM 也表现 LEP。LEP 也被放线菌酮抑制。LEP 也是细胞对 DNA 损伤的条件反应,它并不起因于预处理促进病毒颗粒释放进而再感染周围细胞,而是增加病毒复制的次数,所以它是 EC 的一种表现形式。

3. 细小病毒的增强致突 (EM)

(1) 未受损病毒 用 UV, X-射线或化学致突剂预先处理宿主细胞,能增强未处理病毒的致突性,这一条件反应称为病毒的增强致突 (EM)。它与 ER 的表现相平行: 二者的诱导过程都是短暂和延时的^[6,12](图 1),且可被放线菌酮所抑制^[12]; 它们的剂量响应曲线都呈钟型^[7,9,12](图 2)。EM 和 ER 的平行表现说明两种反应是重迭的。EM 的分子机制尚不明瞭。在人 NB-E 细胞中,当每个细胞中存活病毒颗

粒数超过 1 时, EM 值降低,这可能是因为每个细胞内可容纳的病毒数有限,病毒 DNA 复制次数随进入细胞的病毒数增加而减少^[7]。

(2) 受损病毒 如二、2. 小节中所述,UV 对 H-1 是致突的。用 UV 预照射细胞也增强受 UV 损伤的 H-1 的突变^[9]。但是,后者产生的突变只略多于完整病毒在预照射 UV 的细胞中增殖所产生的突变,尤其当照射病毒的 UV 剂量不大时。换言之,带有或不带有 UV 损伤的细小病毒基因组对细胞中诱导的致突功能来说差异不大。H-1ts6/NB-E 系统的这一性质与 ϕ x174/*E. coli* 系统所得结果不同。在细菌中, SOS 致突能力对 ϕ x174 DNA 上的 UV 损伤的作用更强烈^[13]。

在感染未处理的细胞前,用乙基亚硝基脲 (ENU) 处理细小病毒 H-1ts6,可观察到有剂量响应的病毒失活和突变。对每一致死击来说,ENU 的致突力 12 倍于 254 nm UV。ENU 预处理细胞不能有效地增加随后感染的病毒的突变^[14],因而,由 ENU 造成的碱基损伤是直接致突的,而不是诱导产物致突修复的底物。将受 ENU 处理的 H-1ts6 置于弱酸性 (pH 5.0) 条件下,某些烷化碱基 (主要是 7N-乙基鸟嘌呤) 会从病毒 DNA 上脱落形成 Ap 位损伤^[15]; 用热和弱酸性条件处理 MVM 也得到一致的结果; Ap 位损伤对于在正常宿主细胞中增殖的病毒是致死的而非致突的,而在经诱导的细胞中,病毒 Ap 位损伤却增加了病毒的突变^[14]。因而, Ap 位损伤成了哺乳类细胞中的诱导性修复功能的靶损伤,这类似于 ϕ x174/*E. coli* 系统中所得到的结果^[13]。

4. 哺乳类细胞中的诱导反应与细菌的 SOS 反应的相似性

在原核系统中,受损噬菌体在经诱导细胞中的存活率和突变率较高,这种现象称为 Weigle 复活和 Weigle 突变^[3,14]。未经处理的单链 DNA 噬菌体在经诱导的细菌中的突变率也较高^[15]。所有这些反应都受 SOS 调节系统控制^[14,15]。

SOS 诱导作用的分子机制已探明:用 DNA

损伤剂或 DNA 合成抑制剂处理,产生信号,使阻遏物 (LexA 蛋白)失活,导致一系列基因特别是被称为 din (可被 DNA 损伤诱导的) 基因的增强表达。部分 din 基因的功能已被确定,如受损双链 DNA 噬菌体的 Weigle 复活主要归因于增强的切除修复,即增强 *uvrA*、*B*、*C* 基因的表达。但此反应似乎还应包含未被探明的机制,有人曾将其归结为增强的后复制修复功能,这一机制也可用来解释单链 DNA 噬菌体的 Weigle 复活,它对噬菌体的 Weigle 突变也极为重要。尽管至今仍不能从分子水平证明细菌中 SOS 反应和哺乳类细胞中的诱导反应的机制是相似的,但在表型上二者具有惊人的相似之处,我们可对两个系统加以比较。

(1) 诱导表型的多样性 在细菌中,诱导处理能增强细菌和噬菌体复活,增强致突,增强受损模板的复制;在哺乳类细胞和细小病毒系统中也存在相对应的表现 (见前述)。另一个共同表现是整合在宿主基因组内的病毒的诱发^[10]。在 *SV₄₀* 转化的人或仓鼠细胞中诱导细小病毒 EM 的某些处理如外源性受 UV 辐照的 DNA 的转染,不能将 *SV₄₀* 从这些培养细胞中诱发出来^[16],在细菌中也存在类似现象。

(2) 诱导作用的特征 EM 和 ER 的激活作用是延时和短暂的,并要求蛋白的重新合成^[4,9,12];噬菌体/*E. coli* 中的 Weigle 复活和 Weigle 突变也表现相似的特征。

(3) 间接诱导作用 SOS 调节系统的一个显著特征是不必直接用诱导剂处理细胞,此系统的某些功能可被导入的受损外源性 DNA 间接诱导,这暗示:细菌自身 DNA 的损伤对诱导反应并不是必要的,而 DNA 损伤本身或损伤修复过程的中间体也可构成触发 SOS 功能的信号。将受 UV 辐照的单链、双链 DNA 病毒或细胞 DNA 导入未经照射的细胞,可间接地诱导 EM 和 ER^[12,16],而未受照射的外源性 DNA 不能在未经照射的细胞中诱发 EM 和 ER。间接诱导与直接用 UV 照射细胞能诱导相同水平的 EM。引入受体细胞的 DNA 损伤总数决定 EM 表达的程度,而与作为损伤载体的 DNA 分

子数无关。令人感兴趣的是,间接诱导的 EM 随照射外源 DNA 的 UV 剂量的增加而增大,直至饱和水平;而直接处理细胞所诱导的 EM 在达到一峰值后,随剂量的增加而减小 (图 2)。这种不同的剂量响应关系是由于大剂量的 DNA 毒剂直接处理细胞使参与 EM 与 ER 反应的基因“失活”。用受 UV 照射的 *SV₄₀* 诱导鼠细胞 EM 的动力学过程与直接诱导的动力学过程相似^[12]。总之,这些特征说明,损伤参与了激活由 UV 诱导的细胞的条件反应;EM 的诱导并不要求损伤剂直接击中细胞中特殊的靶;DNA 损伤产生信号,并因而产生一定条件下的表型。

四、受致癌物诱导的细胞帮助提高非自主性细小病毒的复制能力

非自主性细小病毒 (主要指腺相关病毒, AAV) 的复制需协同感染的帮助病毒 (腺病毒、HSV 或牛痘病毒) 的功能。近来发现^[18],用各种化学致癌剂处理 *SV₄₀* 转化的中国仓鼠或人细胞,可使同时接种的 AAV-5 产生有限的复制而无需帮助病毒的“帮助”。而且,这种有限的复制与整合的 *SV₄₀* DNA 序列的扩增作用的削弱相吻合。用化学 DNA 毒剂处理或只用 AAV-5 感染都不严重影响细胞的存活 (图 3),因而,

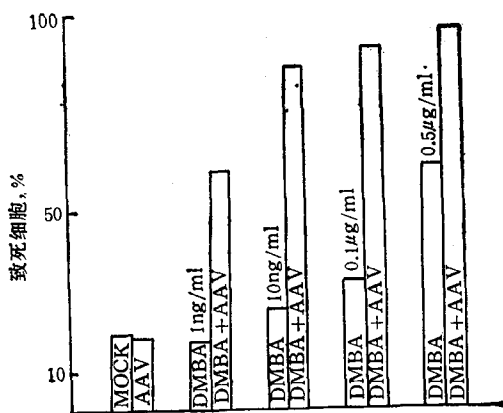


图 3 几种物质对被 *SV₄₀* 转化的仓鼠细胞的杀伤作用
AAV 腺相关病毒 DMBA 二甲基苯蒽

DNA 毒剂处理可产生一个新的细胞内环境,使 AAV-5 在没有帮助病毒存在的情况下也能进行一定程度的复制。虽然在未经处理的细胞中

SV₄₀无帮助病毒的活性,但在诱导细胞中情况可能不一样,可以设想SV₄₀的某些早期基因产物提供了部分帮助病毒功能,此功能在正常细胞里不足以支持AAV-5 DNA复制,但却能与被诱导细胞中的某些活性协同作用。致癌剂处理的SV₄₀转化细胞中一定限度的AAV-5 DNA复制与SV₄₀扩增作用的抑制相吻合,并导致细胞死亡,这些效应的机制目前仍不详,虽然DNA扩增受抑制可简单解释为SV₄₀和AAV-5竞争对其复制必需的共同因子,但也可能是AAV-5直接地、特异地干扰SV₄₀基因的扩增作用。许多恶变细胞含有扩增了的基因,它们在染色体内或游离于染色体,AAV也许能抑制这样的肿瘤细胞。

由化学致癌剂诱导的细胞帮助提高AAV-5 DNA复制能力至今只限于被SV₄₀转化的细胞。在多种致癌剂处理的细胞中,AAV-5能不依赖帮助病毒而进行复制,这一点与经辐照或化学致癌剂处理后非许可性(即不能支持细小病毒DNA复制)或半许可性细胞对各种其它病毒致敏是一致的。例如,丝裂霉素C或5-碘-2'-脱氧鸟嘌呤能在SV₄₀转化的细胞中诱导SV₄₀ DNA的扩增,使其复制能力提高10—100倍。在人细胞/腺病毒及人淋巴细胞/Epstein-Barr病毒系统中获得了更有力的证据^[20]。

五、结论和展望

细小病毒可用以鉴别直接突变和间接突变。直接突变可能是结构性复制功能对错配性质碱基的复制造成的;而间接突变是由细胞条件反应的激活产生的,同时,具有这种活性的致突剂可用细小病毒鉴别。至今,用细小病毒研究致突只限于H-1 ts6/NB-E和H-1 ts6/大鼠细胞系统。由原核系统的研究结果可知,噬菌体对不同致突剂的敏感性不同,因而有必要用其它病毒探针进行突变试验。ER和EM在表型上分别类似Weigle复活和Weigle突变,但仍不知它们的分子机制是否相同,在这方面需要研究各种条件反应的相互作用和调控的分子机制。有关细小病毒ER是否代表了对受损模

板的增强复制仍有争议。寻找某些带有修复缺损的人细胞突变体对于阐明受诱导的哺乳类细胞中的DNA复制和突变机制具有重要意义。已发现各种亚型的着色性干皮病(Xp)和Bloom综合症患者的细胞表现不正常的自发突变和受DNA毒剂处理后的异常DNA复制。

一个颇有希望的研究涉及到对腺相关病毒的复制有帮助作用的致癌剂的诱导效应。一些实验室正在研究被诱导的细胞帮助AAV、DNA复制的能力是否是短暂的,是否需要蛋白质的重新合成,是否受到与ER、EM和EC相同的调节系统的控制。另一相关的问题是,致癌剂处理能否有效地增强自主性细小病毒DNA复制。

参 考 文 献

- [1] Kolata, G. B.: *Science*, 1977, 196, 417.
- [2] Bernstein, C.: *Microbiol. Rev.*, 1981, 45, 72.
- [3] Defrais, M. et al.: *Adv. Radiol. Biol.*, 1983, 10, 1.
- [4] Rommelaere, J. and Ward, D. C.: *Nucl. Acid Res.*, 1982, 10, 2577.
- [5] Yatagai, F. et al.: *Mutat. Res.*, 1981, 91, 3.
- [6] Rommelaere, J. et al.: *Photochem. Photobiol.*, 1981, 33, 845.
- [7] Cornelis, J. J. et al.: *EMBO J.*, 1982, 1, 693.
- [8] Bates, R. C. et al.: *J. Virol.*, 1984, 49, 319.
- [9] Su, Z. Z. et al.: *Carcinogenesis*, 1981, 2, 1093.
- [10] Lubbe, J. M. et al.: *Mutat. Res.*, 1985, 151, 1.
- [11] Su, Z. Z. et al.: *Mutat. Res.*, 1985, 149, 1.
- [12] Cornelis, J. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 4480.
- [13] Loeb, L. A.: *Cell*, 1985, 40, 483.
- [14] Walker, G. C.: *Microbiol. Rev.*, 1984, 48, 60.
- [15] Little, J. W. and Mount, D. W.: *Cell*, 1982, 29, 11.
- [16] Dinsart, C. et al.: *Mutat. Res.*, 1985, 151, 9.
- [17] Bridges, B. A. and Harnden, D. G. (eds.): *Ataxia Telangiectasia A Cellular and Molecular Link between Cancer, Neuropathology and Immune Deficiency*, Wiley, Chichester, 1982.
- [18] Schlehofer, J. R. et al.: *Virology*, 1986, 152, 110.
- [19] Yalkinoglu, A. O. et al.: *Transient inhibition of cellular DNA replication in a SV40 transformed chinese hamster cell line by aphidicolin, hydroxyurea or methotrexate, respectively, induces helper-virus independent AAV-5 DNA replication*, EMBO workshop on Parvoviruses, Grangeneuve, Switzerland, September, 1985, abstr. n°SVII/5" p. 48.
- [20] Lin, J. C. et al.: *Carcinogenesis*, 1983, 4, 185.

[本文于1987年7月8日收到]