

DNA 损伤监测及修复相关酶与细胞衰老

罗 瑛* 隋建丽 铁 轶
(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 衰老是细胞的重要生命现象之一, 衰老假说之一认为细胞中残留 DNA 损伤的积累可加速细胞的衰老. 因此, 细胞内 DNA 损伤监测及修复系统的正常运行与细胞衰老调控密切相关, DNA 损伤监测及修复相关酶如 PARP、DNA-PK、ATM、p53 等在细胞衰老中的调控作用日益受到广泛关注. 研究这些蛋白质分子间的相互作用及其在细胞衰老过程中的调控功能, 有利于揭示 DNA 损伤应激、损伤修复调控与细胞衰老之间的内在联系, 为抗衰老研究及从衰老角度治疗肿瘤提供新的思路.

关键词 细胞衰老, DNA 损伤监测, DNA 损伤修复, tankyrase

学科分类号 Q523

衰老, 同生长一样, 是细胞的重要生命现象之一. 研究细胞衰老现象的发生及调节机理, 是人类认识自我研究的重要组成部分, 也为衰老相关疾病的防治提供理论基础.

在细胞的生长过程中, 细胞基因组不可避免地受到各种外源或内源 DNA 损伤因素的作用, 不断有自发的 DNA 损伤产生, 同时被细胞识别并予以修复, 以维持细胞正常功能. 细胞衰老的假说之一认为细胞中 DNA 损伤监测及修复相关机制退化, 导致细胞中残留 DNA 突变的积累, 进而加速细胞的衰老. 因此, 在衰老研究中, DNA 损伤监测及修复相关酶的作用日益受到广泛关注.

聚腺苷二磷酸核糖基聚合酶 (poly (ADP-ribose) polymerase, PARP) 是较早认识到的 DNA 损伤感应及监测分子, 它广泛存在于有核细胞中, 是一类重要的蛋白质翻译后修饰酶. PARP 分子由一条多肽链组成, 分子质量为 116 ku, 在结构上可分为三个区域: N 端为两个锌指组成的 DNA 结合区, 可特异地识别并结合 DNA 的单链或双链断裂; 中部为核定位信号序列和酶蛋白自身修饰区, 含有亮氨酸拉链结构, 与酶蛋白分子相互作用有关; C 端为催化活性区, 含有底物 NAD⁺ 的结合位点, 具有催化生成 ADP-核糖聚合链, 修饰受体蛋白的活性. 研究表明, PARP 是 DNA 损伤所致细胞早期应激反应的重要分子. 当细胞 DNA 出现损伤时, 它通过 N 端的锌指识别、结合 DNA 损伤, 激活 C 端的聚 ADP 核糖基化活性, 修饰受体蛋白, 从而通过蛋白质的糖基化修饰, 感受与传递 DNA 损伤信息, 在细胞损伤修复或凋亡中皆显示了重要的调控作用. 另外, PARP 还可维持细胞染色体结

构的紧密性, 增加细胞对损伤的抗性^[1]. 因此, PARP 被认为是继 p53 之后的又一细胞安全分子^[2].

近来研究表明, PARP 与细胞衰老的调控密切相关. Salminen 等^[3]应用 WI38 细胞传代衰老模型的研究发现, 衰老的 WI38 细胞中 PARP 活性显著降低, 可能因此导致细胞损伤识别及修复功能下调, 从而导致衰老细胞中 DNA 损伤积累. 有意义的是, Burkle 等^[4]对人、猩猩、大象、猪、大鼠等 13 种具有不同寿限 (life span) 动物的研究也表明, 它们的单个核细胞 (MNC) 中 PARP 活性显著不同, PARP 活性与动物寿命成极显著的正相关关系 ($P < 0.001$), 即寿命越长的动物, 其单个核细胞中 PARP 活性就越高. Muir 等^[5]对长寿人群 (如百岁老人) 及普通寿命的人群进行了比较研究, 发现长寿人群外周血淋巴细胞中 PARP 活性显著高于普通人群, 表明 PARP 活性确实与寿命正相关. 这与我们观察到的现象是一致的, 我们发现^[6], 恶性程度较高的白血病细胞中 PARP 活性远高于正常人外周血淋巴细胞的 PARP 活性, 而我们知道, 恶性细胞增殖能力很强, 较之正常细胞是难于进入衰老的. 这些研究表明, PARP 活性在调控细胞衰老方面有重要作用.

极为有意义的是, 1998 年 11 月, 《Science》杂志报道了一个新酶: Smith 等^[7]以端粒结合蛋白 TRF1 为诱饵, 筛选酵母双杂交库, 发现一个具有 PARP 活性的酶. 此酶可与端粒结合蛋白 TRF1 结合, 且具有锚蛋白 (ankyrin) 的 motif, 因而被命

* 通讯联系人.

Tel: 010-66932292, E-mail: zhoupk@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2000-01-06, 接受日期: 2000-03-20

名为 tankyrase (TRF1-interacting, ankyrin-related ADP-ribose polymerase). 研究表明, tankyrase 蛋白分子质量约 142 ku, 其 N 端为富含组氨酸、脯氨酸及丝氨酸的 HPS 区, 中段为 24 个拷贝的锚蛋白 motif 及 SAM 区, 而 C 端则是 PARP 催化活性区, 即聚 ADP 核糖基化活性区. 因此, 除了具有 PARP 的催化活性, tankyrase 并不具有 PARP 蛋白 N 端的 DNA 结合区和自修饰区, 由此推测 tankyrase 具有与 PARP 不同的活性调控方式.

免疫荧光定位发现, tankyrase 与端粒结合蛋白 TRF1 共同定位于中期染色体的末端, 表明 tankyrase 与 TRF1 的作用可能与端粒调控有关. 研究已经表明^[8], TRF1 可形成二聚体, 特异结合端粒 DNA 的 TTAGGG 双链重复序列, 从而抑制端粒酶的活性, 对端粒的长度起负调控作用. 而 tankyrase 与 TRF1 分子结合后, 通过其 PARP 活性对 TRF1 进行聚 ADP 核糖基化修饰, 阻断 TRF1 与端粒 DNA 的结合, 从而解除 TRF1 对端粒酶的抑制. 因此, tankyrase 酶活性的调节及其与 TRF1 的相互作用可能是细胞内调控端粒长度的一种重要方式, 而端粒缩短是细胞衰老的一个重要指征^[9], 由此推测 tankyrase 及其 PARP 活性与细胞衰老的调控之间有着密切的联系. 最新的研究进一步发现^[10], tankyrase 在细胞核内的定位与 TRF1 的调控密切相关, 并随细胞周期时相而变化. 因此, 研究 tankyrase 与 TRF1 的相互作用及其在细胞衰老中的调控功能, 可能在端粒、PARP 活性与衰老之间建立起新的联系.

DNA 依赖的蛋白激酶 (DNA-dependent protein kinase, DNA-PK) 是另一类重要的 DNA 链断裂损伤感应分子, 它是定位于细胞骨架微丝系统的一种钙调蛋白. DNA-PK 全酶由多个亚基组成, 其中催化亚基 (DNA-PKcs) 的分子质量为 460 ku, DNA 结合亚基是由 Ku70、Ku80 (分子质量分别为 70 ku、80 ku) 组成的异源二聚体. 有意义的是, DNA-PKcs 分子 C 端约 500 氨基酸序列与磷脂酰肌醇激酶 (PI3-kinase, PI3K) 家族分子的催化活性区密切相关, 因此将 DNA-PK 归为磷脂酰肌醇激酶家族的蛋白. 当 DNA 双链断裂发生时, DNA-PK 结合到双链断裂处, 其活性被激活, 通过蛋白质相互作用或磷酸化作用, 吸引修复相关蛋白到 DNA 损伤处, 并引发 DNA 损伤信号传递反应, 另外还可通过抑制转录活动促进修复. DNA-PK 与 PARP 在功能上非常相近, 二者均能

识别、结合 DNA 链断裂, 并通过酶活性的激活引发损伤信号传递的级联反应, 但 PARP 对 DNA 单、双链断裂均能识别、感应, 而 DNA-PK 主要识别双链断裂. 另外, PARP 与 DNA-PK 在细胞凋亡发生之前均被凋亡酶 caspase 3 降解, 提示它们在协调细胞损伤修复与凋亡中的重要作用.

研究表明^[3], 传代衰老细胞中 Ku70、Ku80 蛋白水平均有显著降低, 由此导致细胞中 DNA-PK 活性降低. 另一方面, SV40 诱导细胞永生化后, 可少量提高细胞中 Ku70 蛋白含量, 从而使细胞中 DNA-PK 活性增高. 另外, Ku70 缺陷小鼠生长缓慢, 体型仅有正常对照小鼠一半的大小. 同时, 它们的成纤维细胞表现出早老 (premature senescence) 症状, 如非分裂细胞增多等. 这些研究表明, DNA-PK 与 PARP 均在细胞衰老调控中占有一席之地.

磷脂酰肌醇激酶家族中与 DNA 损伤监控有关的另一个分子是 AT 细胞突变蛋白 (ATM). 在对电离辐射及癌症高度敏感的毛细血管扩张共济失调症病人细胞 (AT 细胞) 中, ATM 发生突变, ATM 基因的突变是导致 AT 细胞异常的主要原因. ATM 基因大约 150 kb, 有 66 个外显子, 可发生断裂、缺失、插入和点突变等多种使 ATM 表达产物失活的突变. 由 cDNA 推测及免疫印迹分析, 表明该蛋白质由 3 056 个氨基酸组成, 分子质量为 350 ku, 在 1 217~ 1 238 密码子为“亮氨酸拉链”结构, 该区真核表达产物具有负显性 (dominant negative) 抑制作用, 可抑制正常细胞中 ATM 的功能. 在密码子 2 855~ 12 875 为磷脂酰肌醇激酶家族同源序列, 单独表达该结构域可恢复 AT 细胞多种缺陷. 对 ATM 基因序列同源性分析表明, 其 C 端含有参与细胞双信使信号转导的磷脂酰肌醇激酶结构域.

研究表明 ATM 与原癌基因 c-Abl 间可直接相互作用, 而 c-Abl 与 p53 间可相互作用, 为 ATM 与 p53 间功能联系提供了新线索. c-Abl 还与辐射诱发 SAPK/JNK 激酶途径的活化有直接关系. 由此可见, ATM 通过对多种信号传递途径的调控启动细胞对 DNA 损伤的细胞学反应, ATM 是细胞 DNA 损伤监视网络中处于重要位置的调控分子.

我们已经知道, 早老是 AT 病的症状之一, AT 病人的成纤维细胞在体外培养中也表现出早老症状. 近期研究表明^[11], AT 细胞的端粒快速缩短, 这种端粒丢失与细胞衰老密切相关, 并导致细胞中 p53 与 DNA 结合活性增加. 进一步的研究认为,

ATM 基因调控端粒的缩短, 端粒缩短信号作为一个 DNA 损伤信号激活 p53 基因等, 由此导致细胞衰老. 以端粒长度的缩短这一特殊的 DNA 损伤事件为研究指征, 研究 DNA 损伤修复相关酶如 PARP、DNA-PK、ATM 等蛋白质分子间的相互作用及其在细胞衰老过程中的调控功能, 有利于揭示 DNA 损伤应激、损伤修复调控与细胞衰老之间的内在联系.

综上所述, 细胞内 DNA 损伤监测及修复系统的正常运行与细胞衰老调控密切相关, 同时也通过调控细胞的凋亡与细胞恶性的控制密切相连. 正常的 DNA 损伤监测及修复网络可调控严重损伤的细胞进入凋亡, 调控自然衰变的细胞进入衰老, 而任意一条通路的异常都将导致细胞进入癌变. 我们已经看到, 肿瘤细胞与尚未进入衰老的细胞 (或长寿人群的细胞) 具有某些共同特征, 如具有较高的 PARP、DNA-PK 及端粒酶的活性, 表明这些酶活性的增加使细胞逃避了衰老调控机制, 成为“长寿”细胞. 因此, 在抗衰老药物的研究中可供借鉴. 但是, 细胞的长寿并不意味着生物个体的长寿, 肿瘤细胞的出现往往大大缩短了生物个体的寿命, 因而在研究生物个体抗衰老药物的同时, 如何防止肿瘤的发生应引起研究者的关注. 另一方面, 认识细胞衰老的调控机制, 诱导细胞进入衰老应成为肿瘤治疗的可行之策.

参 考 文 献

1 罗 瑛, 孙志贤, 吴祖泽. 聚 (ADP-核糖) 聚合酶在 DNA 损

伤修复与细胞凋亡中的作用. 生物化学与生物物理进展, 1996, **23** (4): 308~ 312

- Luo Y, Sun Z X, Wu Z Z. Prog Biochem Biophys, 1996, **23** (4): 308~ 312
- 2 Jeggo P A. DNA repair: PARP-another guardian angel? Curr Biol, 1998, **8** (2): R49~ R51
- 3 Salminen A, Helenius M, Lahtinen T, *et al.* Down-regulation of Ku autoantigen, DNA-dependent protein kinase, and poly (ADP-ribose) polymerase during cellular senescence. Biochem Biophys Res Commun, 1997, **238** (3): 712~ 716
- 4 Burkle A, Muller M, Wolf I, *et al.* Poly (ADP-ribose) polymerase activity in intact or permeabilized leukocytes from mammalian species of different longevity. Mol Cell Biochem, 1994, **138** (1~ 2): 85~ 90
- 5 Muirns M L, Muller M, Schachter F, *et al.* Increased poly (ADP-ribose) polymerase activity in lymphoblastoid cell lines from centenarians. J Mol Med, 1998, **76** (5): 346~ 354
- 6 罗 瑛, 陈飞华, 周平坤, 等. 白血病细胞与正常外周血淋巴细胞的 PARP 活性及本底 DNA 链断裂的比较研究. 实验血液学杂志, 1998, **6** (1): 53~ 58
- Luo Y, Chen F H, Zhou P K, *et al.* Chinese J Exp Hematol, 1998, **6** (1): 53~ 58
- 7 Smith S, Giriati L, Schmitt A, *et al.* Tankyrase, a poly (ADP-ribose) polymerase at human telomeres. Science, 1998, **282** (5393): 1484~ 1487
- 8 Bianchi A, Smith S, Chong L, *et al.* TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. EMBO, 1997, **16** (7): 1785~ 1794
- 9 Butler M G, Tilburt J, Devries A, *et al.* Comparison of chromosome telomere integrity in multiple tissues from subjects at different ages. Cancer Genet Cytogenet, 1998, **105** (2): 138~ 144
- 10 Smith S, de Lange T. Cell cycle dependent localization of the telomeric PARP, tankyrase, to nuclear pore complexes and centrosomes. J Cell Sci, 1999, **112** (Pt 21): 3649~ 3656
- 11 Vaziri H, West M D, Allsopp R C, *et al.* ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly (ADP-ribose) polymerase. EMBO, 1997, **16** (19): 6018~ 6033

Cell Senescence and the Enzyme System for Surveillance and Repair of DNA Damage

LUO Ying, SUI Jiar-Li, TIE Yi

(Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract Senescence is one of the most important phenomena in cells' life. It is hold by one of hypothesis for cell senescence that residue DNA damages of a cell will accelerate its senescence. The normal function of surveillance and repair system for DNA damage is highly related with the senescence regulation of a cell. As a result, research of senescence regulation role of enzymes related for surveillance and repair of DNA damage, such as PARP, DNA-PK, ATM, p53, etc., will discover the inner relation between stress response of cell to DNA damage, regulation of DNA damage repair and cell senescence. That may be helpful for research of anti-aging and treatment of tumor by regulation of senescence of tumor cells.

Key words cell senescence, surveillance system for DNA damage, DNA damage repair, tankyrase

* Corresponding author. Tel: 86-10-66932292, E-mail: zhoupk@nic.bmi.ac.cn

Received: January 6, 2000 Accepted: March 20, 2000