

DNA 氧化性损伤与端粒缩短

赵晨阳 郑荣梁¹⁾

(兰州大学生物系, 兰州 730000)

摘要 末端复制问题 (the end replication problem) 不能完全解释端粒在某些细胞分裂过程中迅速缩短的现象. 40% 的高压氧下细胞传代次数降低, 端粒缩短速率增大, 细胞出现衰老特征, 端粒 DNA 上单链断裂积累. 推测端粒缩短的主要原因在于衰老过程中或氧胁迫下端粒 DNA 单链断裂增多, 使端粒末端单链片段在 DNA 复制时丢失. 端粒酶和活性氧对端粒长度的正负调控作用的准确机制还有待于更深入的研究.

关键词 活性氧, DNA 损伤, 端粒, 衰老, 癌变

学科分类号 Q691

大量研究表明, 活性氧参与细胞的许多生理过程. 目前已知, 活性氧引起的 DNA 损伤是细胞衰老和癌变的原发事件. 一方面活性氧通过损伤 DNA 使抑癌基因失活或使原癌基因激活, 引起细胞癌变; 另一方面, 活性氧通过 DNA 损伤使维持细胞基本生理功能的基因失去表达活性, 进而导致细胞衰老. 近期的研究表明, 端粒的稳定性与细胞增殖、分化、衰老、癌变等过程密切相关. 也许对端粒稳定性的影响是活性氧调控上述过程的途径之一. 本文简要总结了这一领域的最新研究成果.

1 端粒与末端复制问题

真核细胞线状染色体两端都有一段特殊的结构称为端粒 (telomere), 它由简单多次重复的富含 T 和 G 碱基的 DNA 序列及端粒结合蛋白 (telomere end-binding protein, TEBP) 组成. TEBP 可特异性地识别并牢固地结合于单链 DNA 3' 端, 行使染色体帽子的功能, 保护 DNA 不被核酸酶消化^[1]. 传统观点认为, 端粒 DNA 丢失的原因是 DNA 复制时, 聚合酶不能复制 DNA 两端的序列, 所以细胞分裂一次, 端粒就缩短一段, 这就是所谓的“末端复制问题 (the end replication problem)”. 当端粒缩短到只剩 5~7 bp 时, 细胞就不能再分裂, 这时细胞在形态和功能上都表现出衰老^[2~4]. 因此, 维持端粒一定长度对细胞保持分裂能力是至关重要的^[5].

2 活性氧损伤端粒 DNA

内源和外源的活性氧都能广泛地引起 DNA 损伤, 端粒 DNA 也不能幸免. 毫无疑问, 尽管末端

复制问题肯定会导致端粒缩短, 然而 RNA 引物是很短的, 在每个细胞复制周期端粒只能缩短 5 个核苷酸左右, 因此单纯的末端复制问题不能完全解释端粒在细胞分裂过程中迅速缩短的现象.

2.1 高压氧引起端粒缩短

von Zglinicki 等^[6]的研究表明 DNA 损伤在端粒缩短中起着重要作用. 人成纤维细胞在正常条件下, 可以传 44~45 代, 每次分裂使端粒缩短 90 bp, 而当细胞在 40% 的高压氧下培养时却只能传几代, 每次分裂使端粒缩短的速率由原来的 90 bp 增大到 500 bp, 同时细胞从形态、脂褐质的沉积、线粒体失水、DNA 的含量和端粒长度等都表现出衰老的特征. 同时发现, 高压氧处理可使细胞停止分裂而呈现衰老样, 其端粒 DNA 上对 S1 核酸酶敏感的位点增多, 即单链断裂积累, 这一现象在正常衰老的细胞中也存在, 但是在氧胁迫的情况下, 更加明显. 因而 von Zglinicki 等推测端粒缩短的主要原因在于衰老过程或氧胁迫下端粒 DNA 遭受氧化性损伤 (即单链断裂的积累), 导致端粒末端单链片段在 DNA 复制时丢失. 目前已知, 高压氧和正常衰老都可导致细胞内活性氧生成的增加, 所以说, 上述端粒 DNA 损伤在高压氧和衰老过程中的积累正是活性氧生成的增加所致.

2.2 缺血培养引起端粒缩短

Sitte 等^[7]缺血培养成纤维细胞, 发现在细胞增殖被抑制期间端粒长度保持不变, 然而端粒 DNA 上对 S1 核酸酶敏感的单链位点增加了四倍.

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (0931) 8912563, E-mail: zhengrl@lzu.edu.cn

收稿日期: 1999-05-10, 修回日期: 1999-10-18

细胞被解除增殖抑制后, 端粒 DNA 上单链位点降低到正常水平, 端粒缩短的速率则比未经增殖抑制处理的对照组增加了约 3 倍, 但在分裂 2 代以后, 端粒缩短速率又降低到正常水平. Sitte 等用端粒特异的 DNA 降解模型来解释这一现象, 即代谢时间依赖的单链 DNA 降解是端粒缩短的主要原因. 该模型最适合氧化性 DNA 损伤引起端粒缩短这一推测. 因为即使在细胞增殖缺血性抑制的情况下, 细胞的基本代谢仍然维持, 因而活性氧仍然产生, 这必然导致 DNA 的氧化性损伤, 包括端粒 DNA 单链位点的积累, 而端粒单链 DNA 的降解则是依赖于更高水平的代谢过程, 所以只有在恢复正常培养水平的代谢条件下, 单链 DNA 才被迅速降解, 端粒因此快速缩短.

2.3 DNA 损伤剂导致端粒缩短

Kondo 等^[8]在 2 株对顺铂敏感性不同的恶性胶质瘤细胞 U87-MG 和 U251-MG 中发现, 敏感株 U87-MG 细胞无端粒酶活性, 而抗性株 U251-MG 细胞端粒酶则表现为强阳性. 当把载有端粒酶反义 cDNA 的质粒导入抗性株后, 转染细胞的端粒酶活性明显下降, 同时对顺铂的敏感性显著增加. 由于端粒酶在端粒 DNA 损伤的修复中必不可少, 所以转染后的抗性株其修复端粒 DNA 损伤的能力大大下降, 导致对顺铂的敏感性大大增加. 而顺铂的细胞毒性正在于它损伤了 DNA, 因此 Kondo 等的研究结果说明: 端粒 DNA 损伤导致的端粒缩短是细胞死亡的主要原因之一.

2.4 活性氧特异性损伤端粒特征性序列

Oikawa 等^[9]用 H_2O_2 加 $Cu(II)$ 系统和两个不同的同时产生 NO 和 O_2^- 的系统作用于端粒特征性 DNA 序列 $(5'-TTAGGG-3')_4$ 和非端粒特征性 DNA 序列 $(5'-TAGTAG-3')_4$ 时, 发现这三个系统均能有效地损伤端粒特征性 DNA 序列, 其损伤率比非端粒序列高 5~6 倍. 在 H_2O_2 加 $Cu(II)$ 作用下, 即使不用哌啶处理仍有寡核苷酸生成, 说明 H_2O_2 加 $Cu(II)$ 不仅引起碱基损伤, 还导致 DNA 骨架的断裂. NO 和 O_2^- 产生系统在不用哌啶处理时无 DNA 断裂, 说明 NO 和 O_2^- 不能引起 DNA 骨架的断裂, 而仅是碱基损伤. 当用同样条件处理单链 DNA 时, 在三个系统中都发现断裂位点的特异性发生变化, 在鸟嘌呤处的断裂明显增多. 在单链 DNA 和双链 DNA 上损伤特异性的不同可能是由于双链 DNA 中多聚鸟嘌呤的电离能较

低的缘故.

Oikawa 等还通过检测 8-OH-dG 的含量来定量说明活性氧对端粒特征性序列的特异性损伤作用. 他们用 H_2O_2 加 $Cu(II)$ 系统作用于端粒特征性 DNA 序列 $(5'-CGC(TTAGGG)CGC-3')_4$ 和非端粒特征性序列 $(5'-CGC(TAGTAG)CGC-3')_4$, 发现这一系统引起的端粒特征性 DNA 上 8-OH-dG 含量比非端粒 DNA 的高 4.5 倍, 且随着 H_2O_2 浓度的增加 8-OH-dG 的生成也随之增加. 由于损伤了的鸟嘌呤 70% 左右会形成 8-OH-dG, 且两个序列只在端粒特征性 DNA 处不同, 所以说 H_2O_2 加 $Cu(II)$ 可造成端粒特征性 DNA 特异性的损伤. 用 NO 和 O_2^- 做同样处理, 在两个 DNA 序列中均无 8-OH-dG 的生成, 目前认为是活性氮在 GGG 序列中产生了 8-N-dG 位点所致.

2.5 外源性抗氧化剂可减缓端粒缩短

Furumoto 等^[10]用高浓度的抗坏血酸处理人血管内皮细胞, 发现在延长细胞寿命、抑制细胞体积增长的同时, 年龄依赖的端粒缩短速度减慢, 其缩短速率为对照组的 52%~62%, 与此同时细胞内的氧化胁迫水平降低为对照组的 53%, 说明清除活性氧可使端粒 DNA 少受损伤, 从而降低缩短速度.

3 端粒 DNA 损伤的修复

Kruk 等^[11]的研究发现: 端粒长度、端粒 DNA 损伤及其修复都与年龄有关. 老年人成纤维细胞的端粒比年轻人的短. 来自早老综合征患者的成纤维细胞端粒最短, 而来自老年性痴呆综合征患者的成纤维细胞的端粒长度则相对较长. 当用 UV 照射诱导端粒 DNA 形成嘧啶二聚体后发现, 这一部分的 DNA 损伤修复能力比活性转录区 (如二氢叶酸还原酶基因 DHFR) 弱, 但比无编码功能的非活性转录区 (如 X 染色体上的 754 区) 强. 老年人成纤维细胞端粒 DNA 修复能力要比年轻人的低, 而老年性痴呆患者细胞端粒 DNA 的修复水平表现正常, 早老患者细胞则略低于正常水平, 这说明端粒 DNA 修复能力随年龄增长而降低, 因而基因组的稳定性随衰老而减弱.

分裂活跃的细胞, 其 DNA 受活性氧攻击的可能性比非分裂的细胞大, 这是由于 DNA 复制时暂时脱离了组蛋白的保护. 肿瘤细胞分裂快, 其端粒 DNA 受活性氧的攻击比正常细胞更多, 这可能是肿瘤细胞端粒格外短的原因.

4 DNA 氧化性损伤与细胞分裂

DNA 的氧化性损伤导致端粒缩短这一推测也为端粒缩短后细胞停止分裂这一现象提供了一种新的解释: DNA 损伤可以作为一个信号激活肿瘤抑制基因 P₅₃, 后者的表达产物可诱导其下游介导者包括 p21 和 GADD45, 进而抑制细胞分裂, 同时激活 DNA 切除修复机制. 而另一些组织细胞由于癌基因 SV40T 抗原、抑癌基因 P₅₃ 和 Rb 的突变均能使细胞逃逸正常细胞的第一死亡期 (M1), 获得额外增殖能力, 此时端粒酶仍为阴性, 端粒继续缩短, 进入第二死亡期 (M2). 在此期间, 绝大多数细胞由于端粒太短染色体极不稳定而死亡, 极少数细胞由于激活了端粒酶而获得了永生性.

活性氧可引起端粒 DNA 损伤, 从而导致端粒缩短. 这一事实为以 DNA 为作用靶的药物研究提供了新的思路和靶标. 活性氧使端粒长度缩短, 而端粒酶对端粒长度却起着正调控作用^[12], 了解和掌握两者之间的动态平衡关系必然能够更有力地控制细胞衰老及癌变, 有效地发掘出一类新型的抗癌药和抗癌措施, 这一领域的研究亟待深入开展.

参 考 文 献

- Price C. Telomeres-capping off the ends. *Nature*, 1999, **397** (6716): 213~ 214
- Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cell and cancer. *Science*, 1994, **266** (5193): 2011~ 2014
- Harley C B, Futcher A B, Greider C W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 1990, **345** (6274): 458~ 460
- Hastie N D, Dempster M, Dunlop M G, *et al.* Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*, 1990, **346** (6287): 866~ 868
- Allsopp R C, Vaziri H, Patterson C, *et al.* Telomere length predicated the replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (21): 10114~ 10118
- von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, *et al.* Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res*, 1995, **220** (1): 186~ 193
- Sitte N, Saretzki G, von Zglinicki T. Accelerated telomere shortening in fibroblasts after extended periods of confluency. *Free Radic Biol Med*, 1998, **24** (6): 885~ 893
- Kondo Y, Kondo S, Tanaka Y, *et al.* Inhibition of telomerase increases the susceptibility of human malignant glioblastoma cells to cisplatin induced apoptosis. *Oncogene*, 1998, **16** (17): 2243~ 2248
- Oikawa S, Kawanishi S. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett*, 1999, **453** (3): 365~ 368
- Furumoto K, Inoue E, Nagao N, *et al.* Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life Sci*, 1998, **63** (11): 935~ 948
- Kruk P A, Rampino N J, Bohr V A. DNA damage and repair in telomere: relation to aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (1): 258~ 262
- Greider C W, Harley C B. Telomeres and telomerase in cell senescence and immortalization. In: Holbrook N J, Martin G R, Lockshin R A, eds. *Cellular Aging and Cell Death*. New York: Wiley-Liss Inc, 1996. 123~ 138

Oxidative DNA Damage and Telomeres Shortening.

ZHAO Cherr-Yang, ZHENG Rong-Liang (*Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China*).

Abstract Telomeres shortening during proliferation of many cell lines can not be explained completely by the mechanism of the end replication problem. Under 40% oxygen partial pressure, cell proliferation is blocked and the rate of telomere shortening is increased. Blocked cells present senescent characteristics and accumulated single-strand breaks in telomeres. It might be speculated that accumulation of single-strand breaks and resultant loss of distal single-stranded fragments during replication could be a major cause of telomere shortening under the condition of senescence or oxidative stress. The precise mechanism of the positive or negative regulation on the telomere length by telomerase and reactive oxygen species still remains unclear.

Key words reactive oxygen species, DNA damage, telomere, senescence, cancer