

个不变的氨基酸残基(脯氨酸P和丝氨酸S)。这些同源顺序可能与它们的蛋白前体进入叶绿体、加工以及定位有关。同源区Ⅲ的GRV可能与转运肽的切除有关。

研究核编码的叶绿体蛋白质基因结构和表达调节,对了解核质关系、核基因对细胞器功能的调控等具有重要的意义。

### 摘 要

高等植物叶绿体的一些重要蛋白质基因位于细胞核的基因组内。这些基因的细微结构已研究得较为清楚,并对不同植物的编码叶绿体蛋白质的核基因进行了比较研究。

### 参 考 文 献

- [1] Dean, C., et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82: 4964—4968.
- [2] Coruzzi, G. R., et al., 1983, *J. Biol. Chem.*, 258: 1399—1402.
- [3] Broglie, R., et al., 1983, *Biotechnology* 1, 55—61.
- [4] Berry-lowe, S. L. et al., 1982, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 483—498.
- [5] Wimpee, C., et al., 1983, In *Plant Molecular Biology*, R. B. Goldberg (ed.) pp. 391—401.
- [6] Fluhr, R., et al., 1986, *The EMBO J.* 5: 2063—2071.
- [7] Polans, N. O., et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82: 5083—5087.
- [8] Tumer, N. -E., et al., 1986, *Nucl. Acids Res.*, 14: 3325—3342.
- [9] Mazur, B. J., & Chui, C. F., 1985, *Nucl. Acids Res.*, 13: 2373—2386.
- [10] Coruzzi, G. R., et al., 1984, *The EMBO J.*, 3: 1671—1679.
- [11] Stiekema, W. J. et al., 1983, *Nucl. Acids Res.*, 11: 8051—8061.
- [12] Dean C., et al., 1985, *The EMBO J.*, 4: 3055—3061.
- [13] Fluhr R. & Chua N. -H., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83: 2358—2362.
- [14] Fluhr R., 1986, *Science* 232: 1106—1112.
- [15] Kozak M., 1984, *Nature*, 308: 241—246.
- [16] Broglie R., et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78: 7304—7308.
- [17] Kohorn B. D., et al., 1986, *J. Cell Biol.*, 102: 972—981.
- [18] Dunsmuir P., 1985, *Nucl. Acids Res.*, 13: 2503—2518.
- [19] Timko M. P. et al., 1985, In *Molecular Biology of the Photosynthesis Apparatus*, Steinbeck K. E. et al., (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 381—396 N. Y.
- [20] Karlin-Neumann G. A. et al., 1985, *J. Mol. Appl. Genet.*, 3: 45—61.
- [21] Leutwiler L. S. et al., 1986, *Nucl. Acids Res.*, 14: 4051.
- [22] Lamppa G. K., et al., 1985, *Mol. Cell Biol.*, 5: 1370—1378.
- [23] Lamppa, G. K. et al., 1985, *Nature*, 316:750—752.
- [24] Nagy, F. et al., 1986, *EMBO J.*, 5: 1119—1124.
- [25] Smeekens S., et al., 1986, *Nucl. Acids Res.*, 13: 3179—3184.
- [26] Smeekens S., et al., 1985, *Nature*, 317: 456—458.
- [27] Dobers, M. S. et al., 1987, *Plant Mol. Biol.*, 8: 77—85.

## DNA 烷化损伤及修复的分子基础

章 扬 培

(军事医学科学院放射医学研究所)

韩 文 智

(中国农科院品种资源研究所)

DNA 是生命活动中最重要的遗传物质,也是环境中物理和化学因素攻击的主要靶分

子。DNA 损伤与修复的研究一直是生命科学的前沿课题。近年来,不少学者从分子水平上

对 DNA 烷化损伤与修复过程进行了深入的探讨,取得了较大的进展,有的学者还在此基础上提出了 DNA 烷化损伤修复与肿瘤选择性化疗的设想。本文综述这一领域的研究概况。

一、DNA 烷化损伤与修复

DNA 的主要损伤形式可以划为两大类:

①碱基损伤,包括形成嘧啶二聚体、碱基共价结合物、碱基烷化、碱基脱落等;② DNA 链断裂与交联。其中 DNA 烷化损伤,主要是 DNA 中碱基的甲基化或乙基化,这是由于烷化剂与 DNA 共价结合的结果,它可以造成细胞突变或死亡。有些烷化剂必需经过生物体内的混合功能氧化酶(MFO)的激活才会对细胞产生毒性,如亚硝酸等。但也有些烷化剂可以直接攻击细胞 DNA 而起作用,如亚硝基脲、氮芥等<sup>[1]</sup>。烷化剂可以攻击 DNA 分子中的许多部位,除掉与脱氧核糖形成糖苷键的 N 原子和

环外氨基上的 N 原子外, DNA 分子中所有的 N 和 O 原子都是烷化剂攻击的目标<sup>[2]</sup>(图 1)。各种烷基化产物的比例是不同的,其中以 N<sup>7</sup>-甲基鸟嘌呤和 N<sup>7</sup>-乙基鸟嘌呤的产率最高(表 1)<sup>[3]</sup>。

表 1 烷化剂引起的 DNA 碱基损伤<sup>[3]</sup>

	二甲基亚硝基脲 N-甲基-N-亚硝基脲 基脲1,2-二甲基- -联氨	甲基甲 烷磺酸 盐	二乙基亚 硝基脲 -乙基-N- 亚硝基脲
1-烷化腺嘌呤	0.7	1.2	0.3
3-烷化腺嘌呤	8	11	4
7-烷化腺嘌呤	1.5	1.9	0.4
3-烷化鸟嘌呤	0.8	0.7	0.6
7-烷化鸟嘌呤	68	83	12
O <sup>6</sup> -烷化鸟嘌呤	7.5	0.3	8
3-烷化胞嘧啶	0.5	...	0.2
O <sup>2</sup> -烷化胞嘧啶	0.1	...	3
3-烷化胸腺嘧啶	0.3	...	0.8
O <sup>2</sup> -烷化胸腺嘧啶	0.1	...	7
O <sup>4</sup> -烷化胸腺嘧啶	0.1-0.7	...	1-4
烷化磷酸酯	12	1	53

表中数字为占烷化产物的百分数。

各种烷化产物中以 N<sup>3</sup>-甲基腺嘌呤(N<sup>3</sup>-MeT)和 O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤(O<sup>6</sup>-MeG)对细胞的威胁最大,前者会阻碍 DNA 聚合酶的功能<sup>[4]</sup>,后者会造成碱基错误配对, O<sup>6</sup>-MeG 不再与 C 配对,而与 T 配对。研究结果证明 O<sup>6</sup>-MeG 是引起细胞突变和致死的非常重要的原因<sup>[5]</sup>。

细胞中有多种修复 DNA 烷化损伤的途径,①被引入到 DNA 碱基上的烷基化基团直接被去烷基酶(Dealkylase)除掉,②烷基化的碱基被糖基酶(Glycosylase)切除,然后由插

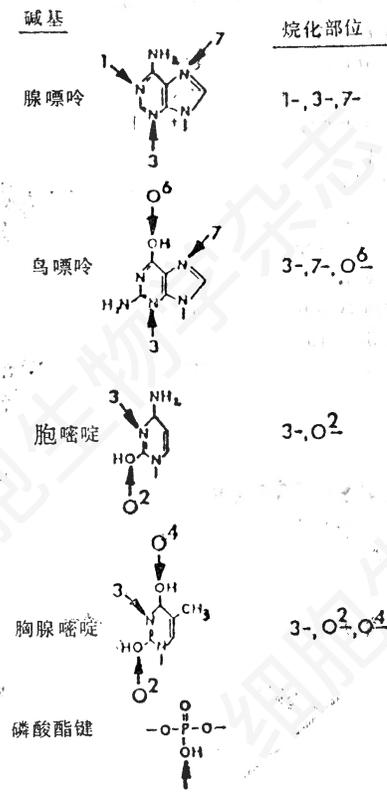


图 1 DNA 分子中烷化损伤部位

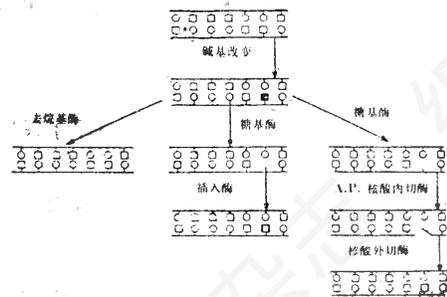


图 2 DNA 中碱基损伤修复的几种途径

入酶(Insertase)填补新的碱基; ③糖基酶将受损伤的碱基切除, 然后由 A. P. 核酸内切酶(A. P. Endonuclease)在相应部位切开缺口, 由核酸外切酶(Exonuclease)把这个单核苷酸切除, 最后经 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶共同作用, 修补缺口(图 2)。

$O^6$ -MeG 的修复过程为第一种途径, 细胞内的  $O^6$ -甲基鸟嘌呤 DNA-甲基转移酶( $O^6$ -Methylguanine-DNA-methyltransferase, 简写  $O^6$ -MT)可以把  $O^6$ -MeG 上的甲基转移到酶分子自己身上, 使鸟嘌呤的分子损伤修复。在大肠杆菌中的研究表明  $O^6$ -MT 是个复合体分子, 分子量 39 kD (千道尔顿), 可以进一步裂解成 19 kD 和 13 kD 两部分<sup>[6]</sup>。 $O^6$ -MT 是一种自杀性的酶, 酶分子中有两个甲基的受体, 它们分别是第 321 位半胱氨酸和第 69 位半胱氨酸上的-SH 基。前者特异性地接受  $O^6$ -MeG 上的甲基, 后者接受烷化的磷酸二酯键上的甲基<sup>[7]</sup>, 它们分别位于  $O^6$ -MT 分子中 19 kD 和 13 kD 亚基上。酶分子接受甲基后, 自己就失去了活性(图 3)。

世界上已经有几个实验室成功地克隆出大肠杆菌的  $O^6$ -MT 基因——ada, 并完成了 ada 的序列分析工作<sup>[7]</sup>。ada 基因的产物不仅可以修复  $O^6$ -MeG、 $O^4$ -MeT( $O^4$ -甲基胸腺嘧啶)和甲基化的磷酸二酯键, 而且可以调节附近的 tag、alkA、alkB 基因。其中 alkA 基因的产物 31 kD 的 DNA 糖苷酶对  $N^3$ -MeA ( $N^3$ -甲基腺嘌呤)、 $N^3$ -MeG ( $N^3$ -甲基鸟嘌呤)、 $O^2$ -MeC ( $O^2$ -甲基胞嘧啶)和  $O^2$ -MeT ( $O^2$ -甲基胸腺嘧啶)的修复起着重要的作用。

在哺乳动物细胞(包括人)中也观察到有  $O^6$ -MT, 与大肠杆菌不同的是它的分子量小, 只有 20 到 25 kD, 只能有效地修复  $O^6$ -MeG, 而对  $O^4$ -MeT 和烷化化的磷酸二酯键损伤的修复效率极低。推测哺乳动物细胞的  $O^6$ -MT 可能仅相当于大肠杆菌  $O^6$ -MT 分子中 19 kD 的那一部分<sup>[8,9]</sup>。至今尚没有人分离出哺乳动物细胞的  $O^6$ -MT 基因。

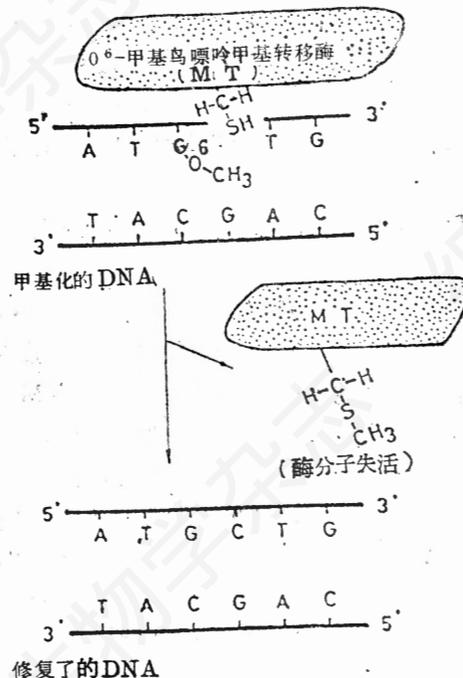


图 3  $O^6$ -MT 作用机制示意图<sup>[2]</sup>

## 二、Mer<sup>+</sup>和 Mer<sup>-</sup>细胞

Day 等把人的肿瘤细胞划分为两种类型:

①Mer<sup>+</sup>(MNNG damage repair plus), 这类细胞可以激活 MNNG (N-methyl-N'-Nitro-N-nitrosoguanidine)处理过的腺病毒-5; ②Mer<sup>-</sup>, 不能激活 MNNG 处理过的腺病毒-5。SKlar 和 Strauss 把能修复 DNA 中  $O^6$ -MeG 损伤的细胞定义为 MeX<sup>+</sup>, 缺乏对  $O^6$ -MeG 修复能力的细胞为 MeX<sup>-</sup><sup>[10]</sup>。Mer<sup>-</sup>(或 MeX<sup>-</sup>)细胞中没有或仅有少量的  $O^6$ -MT<sup>[11]</sup>。与 Mer<sup>+</sup>(MeX<sup>+</sup>)细胞相比, Mer<sup>-</sup>类细胞容易受到烷化剂 MNNG 和 CNU(Chloroethylnitrosourea)的攻击, 表现为低的细胞存活率和高姐妹染色单体交换(S. C. E)率<sup>[12,13]</sup>。

世界上已经有 4 个实验室成功地把大肠杆菌的 ada 基因植入到 Mer<sup>-</sup>类的哺乳动物细胞, 转化后的细胞明显地增强了对烷化剂的抵抗能力<sup>[14-17]</sup>。Ishizaki、章扬培等把人 HeLas 3 (Mer<sup>+</sup>)细胞 DNA 植入到 Mer<sup>-</sup>型的大鼠腹水肝癌 JTC-2 细胞中, 转化后的细胞提高了对烷化剂损伤的抗性<sup>[18]</sup>, 首次实现了哺乳动物

细胞之间烷化损伤修复基因的转移。这些研究结果进一步揭示： $O^6$ -MT在修复烷化损伤中的重要作用。细胞中有 $O^6$ -MT( $Mer^+$ )则对烷化剂有抗性，没有 $O^6$ -MT( $Mer^-$ )则对烷化剂敏感。

Scudiero等对已建株的93种美国人的肿瘤细胞做了生化分析，发现其中有19株属于 $Mer^-$ 类型，约占20%左右<sup>[13]</sup>。这19种 $Mer^-$ 肿瘤细胞分布多在脑瘤、神经胶质瘤和恶性黑色素瘤。Day的实验证明脑组织中 $O^6$ -MT含量低，大多为 $Mer^-$ 类型，比例高达35%以上<sup>[19]</sup>。Tsujiura和章扬培等对40株日本人肿瘤细胞做了分析，结果表明在日本人肿瘤细胞株中 $Mer^-$ 占15%左右，多集中于恶性黑色素瘤和肺癌细胞<sup>[20]</sup>。如果他们的研究材料包括脑瘤细胞的话，则 $Mer^-$ 比例会更高。

人正常组织的细胞均含 $O^6$ -MT，属 $Mer^+$ 类。Day曾分析了20多种取自人正常组织的细胞，检测结果都为 $Mer^+$ 。Tsujiura、章扬培等分析了10株正常日本人组织的细胞，结果也都属于 $Mer^+$ 类<sup>[20]</sup>。Gerson等从70多名实验对象中取出正常组织的细胞，发现它们都有很高的 $O^6$ -MT含量<sup>[21]</sup>。Myrnes等对24例夹杂正常组织细胞的肿瘤做了分析，指出肿瘤细胞中 $O^6$ -MT含量要比周围的正常细胞低2到7倍<sup>[22]</sup>。如果用 $Sv_{40}$ 病毒或EB病毒去转染 $Mer^+$ 细胞，它们会以很高的频率转变成 $Mer^-$ 型<sup>[10]</sup>。这些研究结果说明：① $Mer^-$ 细胞可能仅见于肿瘤细胞；② $Mer^-$ 的出现可能是细胞在癌变过程中的产物；③特别引起人们兴趣的是，有些烷化剂对 $Mer^-$ 肿瘤细胞有很强的杀伤作用，正常组织则可以修复这些烷化剂造成的损伤，这就为肿瘤的选择性化疗提供了理论基础。

### 三、双官能烷化剂 ACNU[1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride]

ACNU在生物体内可以分解出非常活泼的氯乙基偶氮离子(Chloroethyl-diazonium

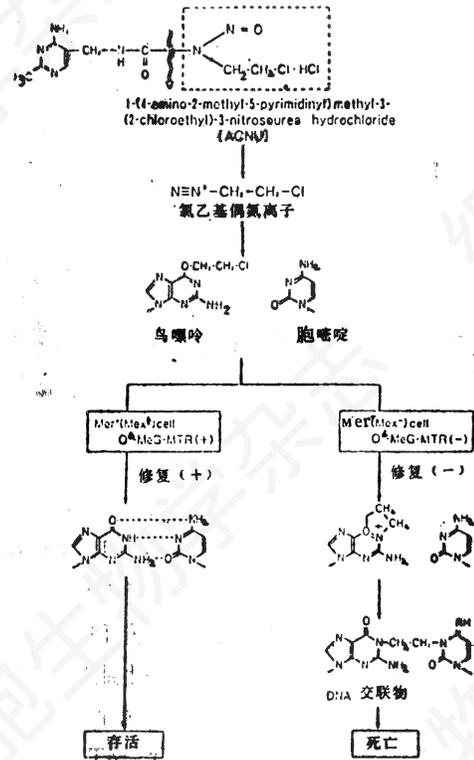


图4 ACNU引起细胞DNA交联的作用机制

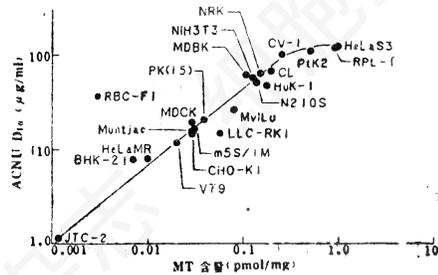


图5 动物细胞中 $O^6$ -MT含量与对ACNU敏感性的关系<sup>[23]</sup>

ion)，它可以与细胞DNA结合，形成 $O^6$ -氯乙基鸟嘌呤。与 $O^6$ -MeG一样， $O^6$ -氯乙基鸟嘌呤上的氯乙基可以被 $O^6$ -MT除去，使损伤得到修复，细胞继续生长活存。如果细胞本身没有 $O^6$ -MT，即属于 $Mer^-$ 细胞，则 $O^6$ -氯乙基鸟嘌呤会与互补链上的胞嘧啶之间形成DNA交联物，导致细胞死亡(图4)。ACNU作用机制阐明之后，它就被认为是肿瘤选择性化疗的理想药物，它可以针对性很强地把 $Mer^-$

类肿瘤杀死，而对正常组织(Mer<sup>+</sup>)危害甚小。

池永满生教授分析了17种不同动物的26株体外培养的细胞，发现细胞中O<sup>6</sup>-MT含量与对ACNU的敏感性密切相关<sup>[23]</sup>。O<sup>6</sup>-MT含量高的细胞对ACNU的D<sub>10</sub>值亦高，即细胞对ACNU有一定的抗性；O<sup>6</sup>-MT含量低的细胞，对ACNU的D<sub>10</sub>值亦低，其中以大鼠腹水肝癌JTC-2、叙利亚仓鼠BHK-21、中国仓鼠卵巢CHO-K<sub>1</sub>、中国仓鼠肺成纤维细胞V79、小鼠胚胎上皮细胞m5s/1M、狗肾细胞MDCK、印度鹿上皮细胞muntjac的O<sup>6</sup>-MT含量低，对ACNU敏感，划入Mer<sup>-</sup>类(图5)。

Tsujimura、章扬培比较了40株日本人肿瘤细胞O<sup>6</sup>-MT含量与对ACNU敏感性之间的关系<sup>[20]</sup>，发现细胞O<sup>6</sup>-MT含量低，则对ACNU的D<sub>10</sub>值亦低；O<sup>6</sup>-MT含量高的细胞，对ACNU的D<sub>10</sub>值亦高。其中有6株划为Mer<sup>-</sup>类。它们是Lu65(大细胞肺癌)、PC-6(小细胞肺癌)、PL-14和SEKI(恶性黑色素瘤)、Tco-1(甲状腺癌)、Huo-3N<sub>1</sub>(骨癌)。这6种Mer<sup>-</sup>肿瘤细胞都很容易被ACNU杀死(图6)。

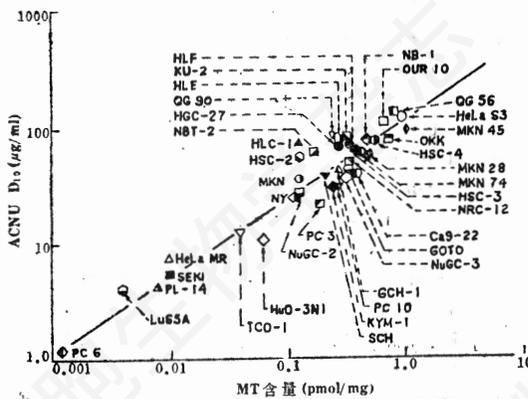


图6 人肿瘤细胞中O<sup>6</sup>-MT含量与对ACNU敏感性的关系<sup>[20]</sup>

他们的实验还发现10株人正常组织细胞，包括皮肤成纤维细胞、口腔成纤维细胞、胎肝细胞和胎肾细胞，O<sup>6</sup>-MT含量都高，对ACNU有抗性。这提示ACNU针对性很强，是治疗Mer<sup>-</sup>肿瘤的理想药物。

在人们发现ACNU与细胞O<sup>6</sup>-MT之间的相关性之前，ACNU曾作为放疗、热疗和化疗的辅助药物用于临床实验。结果证明ACNU是一种有效的增敏剂。在治疗脑瘤、神经胶质瘤、恶性黑色素瘤和白血病方面有很好的疗效。实验还证明在同类烷化剂中，ACNU的毒副作用最低，它在脑脊液中排出量的时间仅18分钟。猎犬可以耐受1mg/kg的药量。人正常组织对ACNU的耐受性会更高。1984年经联邦德国卫生部批准已投放市场。日本三共(Sankyo)公司也开始批量生产。人们预测，ACNU将在肿瘤化疗上有广阔的应用前景。

#### 四、ACNU 治疗 Mer<sup>-</sup> 肿瘤的裸鼠异体移植实验

Watatani等把人的Mer<sup>-</sup>(HeLaMR)和Mer<sup>+</sup>(HeLas3)肿瘤细胞同时植入到同只裸鼠臀部两侧，然后用250µg的MNNG注射治疗。22天后Mer<sup>-</sup>肿瘤消失、治愈。而Mer<sup>+</sup>肿瘤细胞继续生长扩大(图7)<sup>[24]</sup>。

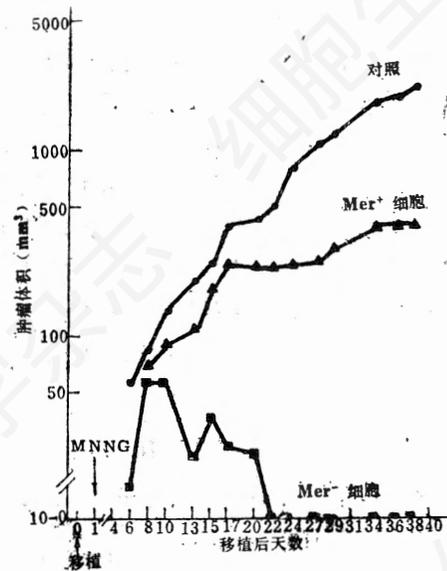


图7 MNNG 治疗移植到裸鼠上的Mer<sup>+</sup>及Mer<sup>-</sup>肿瘤细胞<sup>[24]</sup>

Fujio等把人的Mer<sup>-</sup>肿瘤细胞(HeLaMR、A-1336卵巢癌细胞)和Mer<sup>+</sup>肿瘤细胞(HeLas3

MKN-28胃癌细胞)分别植入同只裸鼠髂部两侧,1周后按50 mg/kg注射ACNU,每周注射1次,疗程3周。18天后Mer<sup>-</sup>肿瘤消失,而对照组Mer<sup>+</sup>肿瘤的体积增大了10倍<sup>[25]</sup>。

裸鼠异体移植实验进一步说明,以DNA烷化损伤修复理论为基础而提出的肿瘤选择性化疗的设想是可行的。它有希望成为治疗肿瘤的新途径。只要我们诊断出患者肿瘤部位是否含有O<sup>6</sup>-MT酶,即判断是Mer<sup>-</sup>还是Mer<sup>+</sup>肿瘤,就可以使用ACNU一类烷化剂有预见性和针对性地进行治疗。这样可以大大提高化疗工作的水平,避免盲目性,为相当数量的肿瘤患者解除痛苦,带来福音。

### 摘 要

烷化剂可以造成细胞DNA分子的烷化损伤。其中鸟嘌呤第6位氧原子的甲基化(O<sup>6</sup>-MeG)会造成碱基错误配对,引起细胞致突致死。O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤DNA-甲基转移酶(O<sup>6</sup>-MT)可以修复O<sup>6</sup>-MeG损伤。原核细胞中编码O<sup>6</sup>-MT的烷化损伤修复基因ada已经克隆成功。哺乳动物细胞的烷化损伤修复基因的克隆工作正在研究中。根据O<sup>6</sup>-MT含量可以把人肿瘤细胞分为两类,Mer<sup>+</sup>和Mer<sup>-</sup>。Mer<sup>-</sup>不含O<sup>6</sup>-MT,约占1/5左右。细胞学及裸鼠实验证明使用双功能烷化剂ACNU可以特异性地杀死Mer<sup>-</sup>类肿瘤。提示以DNA烷化损伤修复研究为基础,可以开拓出一条肿瘤选择性化疗的新途径。

### 参 考 文 献

- [1] Karran, P. et al. 1985, *Cancer Surveys*, 4(3): 583—599.
- [2] 辻村亨、池永满生. 1986, 放射線生物研究, 21(1): 49—62.
- [3] Pegg, A. E. 1984, *Cancer Investigation*, 2: 221—231.
- [4] McCarthy, T. V. 1984, *EMBO Journal*, 3: 545—550.
- [5] Yarosh, D. B. et al. 1983, *Carcinogenesis*, 4: 199—205.
- [6] Teo, I. et al. 1984, *EMBO Journal*, 3: 2151—2157.
- [7] Demple, B. et al. 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 2688—2692.
- [8] Harris, A. L. 1983, *Cancer. Res*, 43: 3247—3252.
- [9] Yarosh, D. B. et al. 1984, *Mutat. Res*, 131: 27—36.
- [10] Sklar, R. and Strauss, B. 1981, *Nature*, 289: 417—420.
- [11] Yarosh, D. B. 1985, *Mutat. Res*, 145: 1—16.
- [12] Watatani, M. et al. 1985, *Carcinogenesis*, 6: 549—553.
- [13] Scudiero, D. A. et al. 1984, *Cancer. Res*, 44: 2467—2474.
- [14] Ishizaki, K. et al. 1986, *Mutat. Res.*, 166: 135—141.
- [15] Brennan, J. et al. 1986, *Carcinogenesis*, 7: 185—188.
- [16] Yarosh, D. B. et al. 1986, *Carcinogenesis*, 7: 1603—1606.
- [17] Kataoka, H. et al. 1986, *EMBO, Journal*, 5(12): 3195—3200.
- [18] Ishizaki, K. and Zhang, Y. P. 1987, *J. Radiat. Res*, 28: 93.
- [19] Day, R. S. et al. 1983, *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.*, 24: 335—337.
- [20] Tsujimura, T. and Zhang, Y. P. 1987, *Japan. J. Cancer. Res.*, 78: 1207—1215.
- [21] Gerson, S. L. et al. 1986, *Carcinogenesis*, 7: 745—749.
- [22] Myrnes, B. et al. 1983, *Carcinogenesis*, 4: 1565—1568.
- [23] Ikenaga, M. et al. 1987, *Mutat. Res.*, 194: 161—169.
- [24] Watatani, M. et al. 1985, *Carcinogenesis*, 6: 549—553.
- [25] Fujio, C. et al. 1986, The 6th International Symposium on Biotechnology and Radiobiology. pp. 120. Kyoto. Japan.