

线粒体基因组及其在辐射生物学中的研究进展

刘青杰 封江彬 陆雪

(中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所 北京 100088)

摘要 线粒体 DNA 是人类细胞中唯一核外遗传物质, 缺乏组蛋白的保护和 DNA 修复系统, 对辐射等氧化损伤更敏感。综述了近年来线粒体 DNA 与辐射敏感性、辐射剂量效应关系、辐射致突变以及肿瘤等领域的探索性研究, 并就线粒体 DNA 研究技术在辐射生物学领域的应用前景进行阐述。

关键词 线粒体 DNA, 辐射生物学, 应用

中图分类号 R811.5, Q691.5, Q751

线粒体基因组是人类细胞中唯一存在于核 DNA 以外的遗传物质, 其信息量虽小, 却控制着细胞一些重要的基本功能。人类线粒体 DNA 的全部核苷酸序列已经清楚^[1], 其完整的限制酶谱、限制性片段长度多态性 (RFLP) 资料已经建立。线粒体 DNA 具有进化速率快、群体内变异大、分子结构简单及严格的母系遗传等特点。一般认为 (DNA) 突变与人类的衰老、进化、神经退行性病变、糖尿病和恶性肿瘤等有关^[2, 3, 4]。因此, 线粒体基因组已成为当今学者们的研究热点。许多研究表明, mtDNA 的非编码区是理想的研究区域^[5, 6], 一是因为该区域在正常情况下突变率较高, 可以在对照家系中发现突变; 二是 mtDNA 在进化研究中突变热点 (Hot spot) 很清楚, 使我们可比较进化了的 mtDNA 序列改变和引起有关序列改变因素之间的不同。非编码区有两个高度变化片段: 一是核苷酸 121—340 位 (219bp); 二是 16140—16350 碱基 (210bp)。一般研究先用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增该片段, 然后对 PCR 产物进行测序或 RFLP 分析^[7]。

在辐射生物学领域中, 对线粒体基因组的研究才刚开始。本文就线粒体基因组及其在辐射生物学各领域中的应用研究作简要介绍, 希望引起国内同行的兴趣, 促进线粒体基因组研究技术在辐射生物学相关领域的应用。

1 线粒体基因组的结构与功能特点

哺乳动物的每个细胞中含有 2—100 个线粒体, 每个线粒体有 5—10 DNAmtDNA 分子, mtDNA 只占细胞中 DNA 总量的 10%。人 mtDNA 是独立于细

胞核染色体外的基因组, 为环状双链 DNA 结构, 全长为 16569bp。外环为重链 (H 链), 内环为轻链 (L 链), 两条链均具有自我复制、转录和编码功能。线粒体基因组由保守的编码区和高度多变的非编码区组成。mtDNA 编码 2 个 rRNA 基因、22 个 tRNA 基因和 13 个多肽。mtDNA 各基因排列紧凑, 无内含子, 部分区域出现基因的重叠, 几乎每个碱基都用于基因组建, 因此任何突变都会累及到基因组中的一个重要功能区域。

mtDNA 自身的特点决定了它比核 DNA 对氧化损伤更敏感。(1) mtDNA 是唯一的核外遗传物质并暴露于活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 自由基环境中; (2) mtDNA 与线粒体上的电子传递链紧密相连; (3) mtDNA 呈裸露状态, 缺少组蛋白和非组蛋白对 DNA 进行保护作用^[8]; (4) mtDNA 损伤的修复能力低; (5) 线粒体本身含有类似微粒体细胞色素 P450 氧化酶的催化酶, 故可直接在线粒体原位激活一些化学致癌物质; (6) mtDNA 与富含脂类的线粒体内膜相连, 使得 mtDNA 对脂溶性化学物质及可引起线粒体膜不稳定的因素非常敏感, 并往往成为亲电子物质首选的靶点; (7) mtDNA 的复制酶由核 DNA 编码, 即使 mtDNA 损伤十分严重, 但如果其相关的复制酶编码基因无损伤或损伤很小, 都不会影响损伤的 mtDNA 复制。这引起 mtDNA 损伤在细胞内累积, 使 mtDNA 的突变率比核 DNA 高 10 倍, 而且 mtDNA 易发生点突变和缺失突变^[9]。

由于 mtDNA 位于细胞质中, 而且成熟的精子含有非常少的几乎无线粒体的细胞质, 所以线粒体遗传是母系遗传的, 很容易在家系中追溯来源。线

人事部留学回国人员择优资助项目 (2002 年优秀类)

第一作者: 刘青杰, 男, 1971 年 4 月出生, 2001 年在中国军事医学科学院获理学博士学位, 副研究员, 放射遗传学和辐射生物剂量专业

收稿日期: 初稿 2003-04-14, 修回 2003-06-10

粒体在细胞中的拷贝数很高,可达到每个细胞几千个,可以很简便地分离出完整的闭环 mtDNA,使 mtDNA 的研究成为可能。

2 mtDNA 在辐射生物学中的应用

2.1 辐射致 mtDNA 损伤的作用机理

放射生物学效应是由直接或间接作用于 DNA 或其他结构(如细胞器的膜)而引起的。间接作用主要是指活性氧(ROS)产生的作用,ROS 包括超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($\cdot OH$)和单线态氧。一般认为 ROS 增加引起羟基自由基产物、如 8-羟基-脱氧鸟嘌呤核苷(8-OHdG)在细胞内的大量堆积,进而导致 mtDNA 的突变。mtDNA 突变会引起呼吸链的失衡和 ROS 堆积。ROS 又可促进第 2 次 mtDNA 突变,使线粒体呼吸衰竭与 ROS 堆积进一步恶化,形成脂质过氧化物,从而影响线粒体基因组的生物发生(biogenesis)并导致细胞核 DNA 的损伤。

ROS 造成的损伤约占放射损伤的 2/3,ROS 既可作用于 mtDNA 上的磷酸糖基骨架,也可作用于碱基,前者导致 mtDNA 链的断裂,后者引起碱基的修饰改变。mtDNA 的氧化损伤表现为多种不同的形式,包括体细胞突变(点突变、移位突变、单双链断裂和碱基缺失)和非突变改变。目前已有 20 多种 mtDNA 碱基改变可以被检测。其中,8-OHdG 是研究 mtDNA 氧化损伤非常热点的指标之一。mtDNA 和核 DNA 一样,受到辐射后可发生 DNA 双链断裂和单链断裂。研究表明:辐射诱发的 mtDNA 断裂点或单链断裂增加,和核 DNA 情况一样;但在短时间内被修复的程度不同:在 2h 内,核 DNA 损伤大部分被修复,而在 mtDNA 中只有 25% 的损伤被去除^[10]。

对人肝胚细胞瘤细胞(HepG2)进行 50—400cGy 的照射,发现随着剂量的增加,被照射 HepG2 细胞中产生的 ROS 增加,伴随谷胱甘肽(GSH)水平的降低,在线粒体中更是如此^[11]。如在照射前将 GSH 去除到原来的 50%—60%,辐射可诱导 DNA 的片段化和细胞凋亡。因此推断 GSH 在维持核 DNA 和 mtDNA 的功能完整性方面,起着非常关键的保护作用。

照射引起的 DNA 氧化损伤产物 8-oxoguanine 在照射后短时间内产生,可持续几个小时^[12,13]。

也有报道认为,酪氨酸激酶 lck 功能低下可能是辐射诱导线粒体改变的早期步骤^[14]。

2.2 mtDNA 与辐射敏感性

mtDNA 的缺失和变异所产生的后果,可表现为辐射敏感性的变化。目前,线粒体 DNA 辐射敏感性的研究主要是借助于细胞凋亡、细胞集落形成和微核形成等来判断。

最近研究发现,可利用实验手段得到无线粒体的细胞株。Tang 等用不同剂量的 γ 射线照射人类成纤维细胞缺乏 mtDNA 的细胞株 ρ^0 细胞、携带变异 mtDNA 的细胞株 syn^- 细胞和携带正常 mtDNA 的细胞株 ρ^+ 细胞^[15],用集落形成实验和流式细胞术方法,分析细胞周期的变化,并比较各种细胞之间的凋亡差异。细胞存活曲线的分析表明, ρ^0 细胞对射线不敏感,其细胞凋亡明显少于另两种细胞株,证明 mtDNA 可能是影响细胞辐射敏感性的一个重要因素。缺乏 mtDNA 细胞由于细胞凋亡减少,引起的对辐射的抗性,而凋亡被认为是辐射致死的主要形式之一^[15]。氧应激(Oxygen stress)引起细胞死亡的详细机制,目前还不清楚,但 ROS 增加是细胞凋亡发生中的一个重要因素,并且受到 Bcl-2 基因的调节。

比较线粒体缺乏或正常的人类骨肉瘤细胞株经照射后在微核形成上的差别,发现线粒体缺乏的细胞株微核的发生率显著低于线粒体正常的细胞株^[16,17]。说明 mtDNA 基因型影响辐射后产生的 DNA 损伤,尤其是 mtDNA 对线粒体呼吸链产生 ATP 的功能状态有很重要的作用,此研究支持了 Tang 的研究结果^[15]。

2.3 mtDNA 与辐射的剂量效应关系

许多研究发现在所有老年人和线粒体病病人的各种组织中均可观察到一个 mtDNA 中 4977bp 的缺失($\Delta\text{mtDNA}^{4977}$)。最近的研究用巢式 PCR 发现,辐射可诱导此缺失的特异发生,且该缺失随着年龄的增加而累积^[18],因此认为 $\Delta\text{mtDNA}^{4977}$ 可用于回顾性剂量重建。Prasanna 等应用原位 PCR 方法分析间期淋巴细胞的 $\Delta\text{mtDNA}^{4977}$ 来估算剂量,认为可很准确地估算 0.25—2Gy 范围内的急性照射剂量^[19],对迁延性或慢性照射的剂量估算则需进一步探索。

2.4 辐射致 mtDNA 突变

低水平辐射可造成受照个体本身的突变效应,有研究探索了产前低剂量 X 射线照射对产后代核 DNA 和 mtDNA 的影响。在怀孕第 13 天给孕鼠 0、10、50cGy 的照射,怀孕第 14 天、产后 25 天和 180 天分析子代大脑细胞核 DNA 修复、mtDNA 生物发

生、单链断裂情况以及神经元的丢失。结果表明,宫内受到 50cGy 照射的小鼠出生后 180 天海马锥体细胞丢失增加;而随着照射剂量(10—50cGy)增加,线粒体生物发生减少。可见宫内照射引起的 mtDNA 损伤累积导致了成年小鼠的第二个细胞死亡高峰^[20],证明宫内低水平辐照诱导子代的遗传损伤。也有研究通过分析 mtDNA 来探索切尔诺贝利事故的长期慢性照射对动物的分子遗传危险。结果发现,在受照的动物母代产生的 mtDNA 突变和异质型(heteroplasmy)增多,但无显著性差异。可见长期慢性照射诱发的突变与急性或亚急性照射不同,不引起 mtDNA 碱基替换增多^[21]。

印度 Kerala 邦地区的天然本底辐射水平约为世界平均本底辐射水平的 10 倍, Foster 等对该地区世代居住此地区的 248 个家系(988 个体)的 mtDNA 非编码区进行测序。结果发现,该地区的家系与对照地区的家系相比较, mtDNA 有较高的点突变发生,作者认为高本底辐射加快了进化热点的突变速率^[22]。

2.5 mtDNA 与肿瘤

在实体瘤如乳腺癌、结肠癌、胃癌、肝癌和肾癌中,都有线粒体 DNA 突变的报道。在多种肿瘤患者的肿瘤细胞及体液标本中可检测到 mtDNA 突变,且阳性率较高^[23]。mtDNA 诱发细胞癌变的可能途径包括 mtDNA 突变和表达异常,线粒体基因组不稳定性,以及 mtDNA 与核 DNA 的整合作用。辐射所诱导的肿瘤研究,如前切尔诺贝利核电站事故降尘所致的甲状腺肿瘤细胞中,显示 mtDNA 大片段缺失显著增多^[24]。

mtDNA 在肿瘤药物治疗和放疗中扮演重要角色。新的研究进展显示,多种肿瘤化疗药物的作用途径直指 mtDNA。研究发现,癌症患者的线粒体膜极性增加,从而使亲脂性阳离子化疗药更易在线粒体中浓聚。这样,癌症患者细胞线粒体可能成为亲脂性阳离子化疗药的选择性作用靶。用 Hela 细胞株进行 mtDNA 缺乏细胞株和正常 mtDNA 细胞对肿瘤治疗药物阿霉素的敏感性研究,发现 mtDNA 缺乏的细胞株对治疗药物不敏感,正常 mtDNA 的细胞对药物敏感^[25]。Tang 等对肿瘤细胞的辐射敏感性研究^[15]。结果表明,缺乏线粒体 DNA 的肿瘤细胞株对放射不敏感。因而,线粒体基因组的状态可能影响肿瘤的治疗。

3 总结和展望

在辐射生物学中,线粒体 DNA 的研究不仅涉

及到辐射生物效应的早期事件,还可用于辐射敏感性的研究。尤其是在放疗中的肿瘤细胞的辐射敏感性的研究,线粒体 DNA 的缺失分析有可能被开发为预测放射损伤的敏感指标。线粒体 DNA 4977bp 缺失分析,已证实可用于急性照射后的剂量估算,由于其终生的累积性,有望用于回顾性剂量重建。但其真正的实际应用,尚有一段距离,需要积累大量的研究证据。对于辐射致线粒体 DNA 突变效应、线粒体 DNA 与肿瘤的关系研究,国外才刚起步,有许多问题亟待探索。总之,线粒体 DNA 在辐射生物学领域中的研究处于探索阶段,有许多急需解决的问题,国内学者应对此领域进行深入研究,以期利用线粒体基因组分析来解决辐射生物学领域的许多难题。

参考文献

- 1 Anderson S, Bankier A T, Barrell B G *et al.* Nature, 1981, **290**(5806): 457-465
- 2 Chinnery P F, Samuels D C, Elson J *et al.* Lancet, 2002, **360**(9342): 1323-1325
- 3 Miglore L, Coppede F. Mutat Res, 2002, **512**(2-3): 135-153
- 4 Suzuki S, Oka Y, Kadowaki T *et al.* Diabetes Res Clin Pract, 2003, **59**(3): 207-217
- 5 Harvey M L, Dadour I R, Gaudieri S *et al.* Forensic Sci Int, 2003, **131**(2-3): 134-139
- 6 Mambo E, Gao X, Cohen Y *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100**(4): 1838-1843
- 7 Rajkumar R, Kashyap U K. J Forensic Sci, 2003, **48**(1): 227-237
- 8 Wallace D C, Brown M D, Melov S *et al.* Biofactors, 1998, **7**(3): 187-190
- 9 Habano W, Sugai T, Nakamura S I *et al.* Gastroenterology, 2000, **118**(5): 835-841
- 10 May A, Bohr V A. Biochem Biophys Res Commun, 2000, **269**(2): 433-437
- 11 Morales A, Miranda M, Sanchez Reyes A *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998, **42**(1): 191-203
- 12 Ogawa Y, Kobayashi T, Nishioka A *et al.* Int J Med, 2003, **11**(2): 149-152
- 13 Ogawa Y, Kobayashi T, Nishioka A *et al.* Int J Med, 2003, **11**(1): 27-32
- 14 Belka C, Gruber C, Jendrosseck V *et al.* Oncogene, 2003, **22**(2): 176-185
- 15 Tang J T, Yamazaki H, Inoue T *et al.* Anticancer Res, 1999, **19**(6B): 4959-4964

- 16 Yoshida K, Yamazaki H, Ozeki S *et al.* Radiat Med, 2000, **18**(2): 87-91
- 17 Yoshida K, Yamazaki H, Ozeki S *et al.* Oncol Rep, 2001, **8**(3): 615-619
- 18 Kubota N, Hayashi J I, Inada T *et al.* Radiat Res, 1997, **148**(4): 395-398
- 19 Prasanna G S, Hamel C J, Escalada N D *et al.* Mil Med, 2002, **167**(Suppl. 1): 10-12
- 20 Korr H, Thorsten Rohde H, Benders J *et al.* Int J Radiat Biol, 2001, **77**(5): 567-580
- 21 Wickliffe J K, Chesser R K, Rodgers B E *et al.* Environ Toxicol Chem, 2002, **21**(6): 1249-1254
- 22 Foster L, Foster P, Lutz Bonengel S *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99**(21): 13950-13954
- 23 Han B C, Ha P K, Dhir K *et al.* J Surg Oncol, 2003, **82**(3): 170-173
- 24 Rogounovitch T I, Saenko V A, Shimizu Yoshida *et al.* Cancer Res, 2002, **62**(23): 7031-7041
- 25 Singh K K, Russell J, Sigala B *et al.* Oncogene 1999, **18**(48): 6641-6646

Advances in mitochondrial DNA and its applicative research in radiation biology

LIU Qingjie FENG Jiangbin LU Xue

(National Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety, China CDC, Beijing 100088)

ABSTRACT Mitochondrial DNA (mtDNA) is the only genome outside cell nucleus. It is very sensitive to oxidative damages, such as radiation, because of absence of histone protection and lacking efficient DNA repair mechanism. The paper summarizes research progresses on mtDNA in the field of radiosensitivity, radiation dose-effect relationship, radiation-induced mutation and carcinogenesis in recent years. Prospective application of mtDNA in radiation biology is also outlined.

KEYWORDS Mitochondrial DNA, Radiation biology, Application

CLC R811.5, Q691.5, Q751