

DNA 损伤修复研究进展及其对围术期认知功能障碍的影响

戎玉兰, 史成梅, 郭向阳*

(北京大学第三医院 麻醉科, 北京 100191)

摘要: DNA 损伤与修复的动态平衡是保持基因组稳定性的重要因素之一。针对 DNA 双链断裂损伤 (DSB), 主要存在同源重组 (HR) 和非同源末端连接 (NHEJ) 两种修复方式。NHEJ 是中枢神经系统成熟神经元 DSB 的主要修复途径。通过研究 NHEJ 分子机制和围术期认知功能障碍 (POCD), 发现围术期因素会影响 NHEJ 修复通路。NHEJ 有可能成为干预和改善 POCD 的新靶点。

关键词: DNA 损伤修复; 非同源末端连接; 围术期认知功能障碍

中图分类号: R614 文献标志码: A

Research progress of DNA damage repair and its effect on perioperative cognitive dysfunction

RONG Yu-lan, SHI Cheng-mei, GUO Xiang-yang*

(Department of Anesthesiology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China)

Abstract: The dynamic balance between DNA double-strand break (DSB) accumulation and repair is one of the important factors to maintain genomic stability. The homologous recombination (HR) and the non-homologous end joining (NHEJ) are the two major pathways to repair DSB. In mature neurons of the central nervous system, the NHEJ is the main repair pathway of DSB. Recent studies in the molecular mechanism of NHEJ and peri-operative cognitive dysfunction (POCD) revealed several molecular mechanisms underlying the DNA damage repair and its links to POCD, which may provide a new therapeutic target.

Key words: DNA damage repair; non-homologous end joining; perioperative cognitive dysfunction

DNA 损伤在发育-衰老、神经退行性疾病以及肿瘤等病理过程中发挥着重要的作用。近来很多研究发现, 脑细胞 DNA 损伤和修复之间的失衡会造成神经元损伤, 并影响多种神经退行性疾病的发生发展。多种内源和外源性因素会造成 DNA 损伤。不同刺激引起不同的 DNA 损伤类型, 主要有碱基错配、碱基缺失、DNA 单/双链断裂、DNA 交联等, 其中双链断裂 (double-strand break, DSB) 是最有害的一

种损伤^[1]。每个细胞每天大约会经历 10 000 次单链断裂损伤和 10~50 次 DSB。如果 DSB 没有被修复或错误修复的话, 会直接导致细胞死亡。DSB 可通过两种途径进行修复^[2]: 同源重组 (homologous recombination, HR) 和非同源末端连接 (nonhomologous ending joining, NHEJ)。增殖期细胞可以借助姐妹染色体通过 HR 进行精确修复 DSB, 而有丝分裂期后细胞中的 DSB 则主要通过 NHEJ 修复^[3]。有效

的修复对于维持神经元功能至关重要,并且编码 DNA 修复蛋白的基因与神经退行性疾病存在千丝万缕的联系^[4]。

围术期认知功能障碍(perioperative cognitive dysfunction, POCD)是一种常见的手术麻醉并发症,以记忆、注意力、语言理解和社交能力的损伤为特征,可导致患者生活质量下降,延长住院周期、增加病死率,在老年人中的发病率高达 25%~40%^[5],发生机制包括神经炎症反应、病理蛋白沉积、突触功能障碍、线粒体功能障碍、DNA 损伤与修复失衡、持续的脑损伤等,其中,DNA 损伤及修复失衡是极其重要的一种机制。本文将 DNA 损伤修复过程中主要参与蛋白质的功能为重点阐明 NHEJ 修复机制,并简介其在 POCD 中的意义。

1 NHEJ 的基本过程

NHEJ 修复 DSB 的过程包括识别、联会、末端加工和连接。DSB 发生后,Ku 异源二聚体(Ku70/Ku80)最先反应,它快速识别断端并通过环状结构与断端结合,直接或间接招募 NHEJ 所需下游蛋白。同时 Ku70/Ku80 会迅速招募下游 DNA 蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase catalytic subunits, DNA-PKcs)至断端,形成 DNA-Ku-PKcs 三元复合物,稳定断端,并进行联会。接着核酸酶 Artemis 被 DNA-PKcs 募集到 DSB 位点,剪切断端形成适合连接的结构。最后需要 Ligase IV-XRCC4 复合体、XLF 和 PAXX 执行连接功能。

2 NHEJ 的主要参与蛋白

2.1 Ku:快速识别蛋白

Ku 二聚体由 Ku70 和 Ku80 组成,由基因 XRCC6 和 XRCC5 编码,根据来源患者的姓名首字母和蛋白质的大小(70 ku 和 83 ku)命名。首次发现是一种自身免疫抗原,其与 DSB 断端有高度亲和性^[6]。两个蛋白含有相同的核心结构和 N 末端,只有 C 末端结构不同。它们可以组成稳定的环状结构套在 DSB 末端并向内滑动,通过 Ku80 C 末端与 DNA-PKcs 相结合^[7]。Ku70/Ku80 在 DSB 末端的加载是整个 NHEJ 修复过程中至关重要的一步。它不仅像像枢纽一样与下游的修复蛋白合作,还可以与 53BP1 共同作用保护 DSB 末端免受核酸外切酶的加工^[8],

并阻止其他修复方式的启动,比如 HR 等,从而起到选择修复通路的作用。NHEJ 修复通路的大部分核心蛋白都与 Ku 产生相互作用^[9]。

2.2 DNA-PKcs:稳定断端蛋白

DNA-PKcs 分子质量高达 469 ku,具有激酶活性。DNA-PKcs 的 N 末端可以形成一个钳子样结构,为 DNA 提供结合通道。它与断端结合可发生自磷酸化,或被共济失调-毛细血管扩张突变基因(ataxia telangiectasia-mutated gene, ATM 基因)编码的 ATM 蛋白激酶或 Rad-3 相关蛋白(ATM and Rad-3 related, ATR)磷酸化,也可以磷酸化 Artemis 并与其结合,起到促进核酸酶活性的作用,其主要作用就是调节并加速 NHEJ 修复通路^[10]。DNA-PKcs 不仅在 NHEJ 修复通路中发挥着重要的作用,也参与调节 DSB 位点 NHEJ 和 HR 修复通路的选择^[11]。

2.3 Artemis:末端加工蛋白

被识别的 DNA 断端经过加工,才能进行下一步的连接,通常参与的蛋白质具有多种功能。Artemis 具有 5'-3'核酸外切酶活性,在体内、体外可被 ATM、ATR 或 PKcs 等多种蛋白激活,并且在不同的损伤条件下,会发生不同的激活途径。Artemis 与 PKcs 结合后,PKcs 自磷酸化后可激活 Artemis 内切酶活性,切割突出末端以及 V(J)重组过程中形成的发夹结构^[12]。Artemis 不仅是 NHEJ 修复通路的重要核酸酶,它同时也在调节细胞周期以及 DNA 损伤反应中发挥重要的作用^[13]。

2.4 Ligase IV-XRCC4-XLF 复合体:连接蛋白

Ligase IV 只参与 NHEJ 修复通路,需要与 XRCC4 结合才能发挥作用。无论缺乏 Ligase IV 还是 XRCC4 都会出现对辐射敏感并且严重损害 NHEJ 修复通路^[12]。XLF 又称为 Cernunnos,虽然与 XRCC 同源序列有限,但因与 XRCC4 结构相似而得名,二者均以二聚体形式存在。在人类细胞中,只有 XLF 可与 DNA-PKcs 相互作用,并与 DNA 断端结合形成核蛋白丝状结构,起到支架作用,促进末端连接^[14]。XLF 不仅在 NHEJ 中起到重要作用,还可以稳定 DNA 的复制过程^[15]。

3 NHEJ 对 POCD 的作用

保持基因的稳定性是每一个细胞的重要功能,因此每个细胞都具有大量高效的修复蛋白来保证基

因稳定。当 DNA 损伤不能被修复或发生错误修复时,就会导致进行性的或持续的神经损伤,从而影响认知或运动功能^[16-17]。研究提示,如果脑中 DNA 损伤和修复失衡,会造成神经元损伤,学习和记忆受损,并且被证实参与了很多神经退行性疾病的病理生理过程,比如阿尔茨海默病、帕金森病以及肌萎缩性侧索硬化症等。POCD 是一种与年龄相关的神经退行性疾病。课题组研究显示,围术期因素可以通过氧化应激反应,诱导中枢前额叶区 DSB 发生,相关标志物蛋白 γ H2A. X 的表达显著增加,并在细胞核显著聚集^[18]。麻醉暴露还可以抑制中枢海马区的 P53 水平,从而影响 DSB 程度,P53 又可以影响 NHEJ 修复通路中的关键因子,从而调控 NHEJ 修复和细胞存活,另外 NHEJ 与 P53 之间也存在相互作用^[19]。可见围术期因素可以影响 DNA 损伤和 NHEJ 修复之间的动态平衡,从而影响 POCD 的发生。

损伤和修复之间的失衡造成的 DSB 的积累是影响 POCD 的核心。减少 DSB 的发生,促进 NHEJ,则成为干预、治疗 POCD 的新靶点。已经发现通过补充叶酸或 S-腺苷甲硫氨酸可以抑制 DSB 等 DNA 损伤的发生。因此,通过抑制氧化应激反应等途径减少 DSB 的发生,可以降低 POCD 的发生率。对于脆弱脑细胞,NHEJ 相关蛋白表达减少,从而造成 DSB 积累^[20],故如何促进 NHEJ 成为干预 POCD 的难点。

4 NHEJ 近期研究进展

有关 NHEJ 的核心蛋白的研究已经很多,但是每个蛋白的具体工作机制还有很多需要探究,并且也有很多研究对 NHEJ 修复通路的经典过程提出了质疑和挑战。新的研究提示 XRCC-XLF 是 NHEJ 修

复通路的新核心蛋白,Ligase IV 并不是 NHEJ 修复通路的必需蛋白质,XLF-XRCC 复合体可以在 DSB 末端形成袖套结构,并在 DNA 链上滑动,成功高效的修复 DSB,不依赖于 Ligase IV 的存在^[21]。细胞试验提示,与传统的 NHEJ 序贯修复过程相反,在损伤初期,DSB 位点就会形成一个超级 NHEJ 复合体,其中包括 DNA-Ku-PKcs 和连接蛋白,这些蛋白既可以独立发挥作用,也可以相互促进,共同完成修复^[22]。新的 NHEJ 调节复合物 Shieldin (REV7、RINN1、RINN2、RINN3 新型复合体)在 2018 年由多个课题组鉴定发现,它与 CTC1-STN1-TEN1 (CST)复合物相互作用,通过抑制 DNA 末端切除,促进 NHEJ 修复^[23]。这些研究大大丰富了对 NHEJ 的认识。

5 问题与展望

虽然对于 NHEJ 修复通路的核心蛋白和机制已经研究的比较清楚,但其精确的作用方式及相互关系还存在很多空白:1) XRCC 和 XLF 的 C 末端的结构还不是很清楚,在 NHEJ 中如何起到稳定作用? 2) 超级 NHEJ 复合体是否真的存在? 3) POCD 中,NHEJ 修复通路是否受损? 如何从修复角度进行干预,以影响 POCD 的发生和发展?

解决以上问题,需要结合蛋白组学、细胞生物学、有机化学等相关知识,深入研究 NHEJ 修复通路中的相关蛋白的空间结构,以及相互作用的顺序与位点,探究 NHEJ 修复通路分子机制中的空白和疑惑。应用细胞、动物模型研究 P53、 γ H2A. X 等关键因子与 NHEJ 修复通路的相互作用,从而揭示 DSB 和 NHEJ 之间相互影响的分子机制。并开展相关临床研究,探究脆弱脑功能患者的体液中,NHEJ 修复通路相关蛋白的表达水平,以期能以 NHEJ 为核心,找到围术期认知功能障碍的干预新靶点。

参考文献:

- [1] Wang D, Zhou Z, Wu E, *et al.* LRIK interacts with the Ku70-Ku80 heterodimer enhancing the efficiency of NHEJ repair[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27: 3337-3353.
- [2] Cabrini M, Roncador M, Galbiati A, *et al.* DROSHA is recruited to DNA damage sites by the MRN complex to pro-

mote non-homologous end-joining [J]. *J Cell Sci*, 2021, 134: 1-13.

- [3] Kannan A, Bhatia K, Branzei D, *et al.* Combined deficiency of Senataxin and DNA-PKcs causes DNA damage accumulation and neurodegeneration in spinal muscular atrophy

- [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46:8326-8346.
- [4] Wang H, Hegde ML. New mechanisms of DNA repair defects in fused in sarcoma-associated neurodegeneration: stage set for DNA repair-based therapeutics? [J]. *J Exp Neurosci*, 2019, 13: 1-5.
- [5] Austin CA, Gorman T, Stern E, *et al*. Association between postoperative delirium and long-term cognitive function after major nonemergent surgery [J]. *JAMA Surg*, 2019, 154:328-334.
- [6] Nemoz C, Ropars V, Frit P, *et al*. XLF and APLF bind Ku80 at two remote sites to ensure DNA repair by non-homologous end joining [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25: 971-980.
- [7] Inagawa T, Wennink T, Lebbink JH, *et al*. C-terminal extensions of Ku70 and Ku80 differentially influence DNA End binding properties [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 6725-6737.
- [8] Isono M, Niimi A, Dike T, *et al*. BRCA1 directs the repair pathway to homologous recombination by promoting 53BP1 dephosphorylation [J]. *Cell Rep*, 2017, 18:520-532.
- [9] Emerson CH, Lopez CR, Zamora AR, *et al*. Ku DNA end-binding activity promotes repair fidelity and influences end-processing during nonhomologous end-joining in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genetics*, 2018, 209:115-128.
- [10] Chaplin AK, Hardwick SW, Liang S, *et al*. Dimers of DNA-PK create a stage for DNA double-strand break repair [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2021, 28:13-19.
- [11] Burgess JT, Cheong CM, Suraweera A, *et al*. Barrier-to-autointegration-factor (Baf1) modulates DNA double-strand break repair pathway choice via regulation of DNA-dependent kinase (DNA-PK) activity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49:3294-3307.
- [12] Rouhani M. Modeling the interplay between DNA-PK, Artemis, and ATM in non-homologous end-joining repair in G1 phase of the cell cycle [J]. *J Biol Phys*, 2019, 45: 127-146.
- [13] Moscariello M, Wieloch R, Kurosawa A, *et al*. Role for Artemis nuclease in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks by alternative end joining [J]. *DNA Repair*, 2015, 31:29-40.
- [14] Xing M, Oksenyich V. Genetic interaction between DNA repair factors PAXX, XLF, XRCC4 and DNA-PKcs in human cells [J]. *FEBS Open Bio*, 2019, 9:1315-1326.
- [15] Gonzalez-Rodriguez Y, Bunting SF. XLF extends its range from DNA repair to replication [J]. *J Cell Biol*, 2019, 218: 2075-2076.
- [16] Alt FW, Schwer B. DNA double-strand breaks as drivers of neural genomic change, function, and disease [J]. *DNA Repair*, 2018, 71:158-163.
- [17] Khan MM, Xiao J, Patel D, *et al*. DNA damage and neurodegenerative phenotypes in aged Ciz1 null mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2018, 62:180-190.
- [18] Ni C, Li C, Dong Y, *et al*. Anesthetic isoflurane induces DNA damage through oxidative stress and p53 pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54:3591-3605.
- [19] Ho T, Tan BX, Lane D. How the other half lives: What p53 does when it is not being a transcription factor [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21:13-32.
- [20] Shanbhag NM, Evans MD, Mao W, *et al*. Early neuronal accumulation of DNA double strand breaks in Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2019, 7:77-95.
- [21] Brouwer I, Sitters G, Candelli A, *et al*. Sliding sleeves of XRCC4-XLF bridge DNA and connect fragments of broken DNA [J]. *Nature*, 2016, 535:566-569.
- [22] Cottarel J, Frit P, Bombarde O, *et al*. A noncatalytic function of the ligation complex during nonhomologous end joining [J]. *J Cell Biol*, 2013, 200:173-186.
- [23] Mirman Z, Lottersberger F, Takai H, *et al*. 53BP1-RIF1-shieldin counteracts DSB resection through CST- and Pol α -dependent fill-in [J]. *Nature*, 2018, 560:112-116.