

对15214名参加核试验者的辐射效应进行了调查,除以前Caldwell曾报道过核爆后即作烟云取样者的白血病发生率有增加外,其他一般参加者未发现有此现象。到目前为止,对所观察到的死亡率和死因分析研究表明,参加者的死亡率比预期值还低,而死因分析也未发现与对照组有明显差别。

(三) 职业受照群体的调查

Placek研究了住房中(特别是冬天)氡对大量人群的辐射危险估计指出,捷克与美国矿工肺癌的研究结果比较一致,用这两个结果可计算出每单位剂量诱发肺癌的危险为2.0~4.0肺癌/10000人/1WLM。1968~75年的新矿工组在10年内的肺癌发生率与预期值差不多,这主要是由于氡子体照射减低20~30倍,累积剂量照射下降了20~47倍,每人每年暴露

量低于1WLM。

Hofmann和Katz对照射的粒子束流与致癌关系提出了一些令人注意的看法,他们强调在辐射诱癌的剂量效应模型时的辐射物理学原则,提出两个阶段模式对肿瘤诱发概率可作出估计。即始发阶段的概率是恶性转化的概率,而促癌阶段的概率则取决于生物因素的变化,如对骨肉瘤的促进则取决于骨质重建的速度等。

由于肿瘤病因学,发生和发展都有相当大的复杂性,大部分工作还是描述性的,定量关系的研究还不多。因而就目前大会所提出的资料,要从辐射诱癌病因学(分子、细胞和整体水平),剂量-效应关系(特别是低剂量低LET照射)及如何改变其发展(癌前阻断)等方面得到明确的规律性和肯定的结论还为时过早,还需广大的辐射研究工作者共同的努力。

辐 射 生 物 学 研 究 进 展

第七届国际辐射研究大会中国代表团成员 罗祖玉

细胞内DNA损伤与修复

1. DNA单链断裂(SSB)、双链断裂(DSB)动力学与重接

单链断裂动力学(以仓鼠细胞CHO为材料),不同时间的大鼠肝细胞SSB重接时间有区别, G_0 5hr, G_1 50', S 37'。

以Kohn氏法测定了增敏剂 Misonidazole(以下简称Miso)在低氧($<20\text{ppm O}_2$)条件下对CHO细胞DNA损伤与修复的影响。

人的成纤维细胞DSB修复大于V79细胞。在较高剂量时, V79细胞有一个持续4小时的快的初始修复以及慢得多的一个修复。与Setlow氏的“短型”及“长型”修复相一致。

以DSB修复作为 α 粒子RBE的决定因素,发现:(1)无DSB修复, RBE低(1.6),与剂量无关;(2)当DSB修复发生时, RBE

与剂量有关;(3)随DSB修复的逐渐增加,某存活水平的RBE值逐渐增大(直至7)。

高温使X射线导致的 L_{1210} 细胞的DSB修复下降。在白血病细胞中观测了DNA链断裂慢修复的动力学。

染色质结构可以影响酶切(微球菌核酸酶 micrococcal nuclease DNase I) DNA, 因而涉及SSB的重接。

人们观察了 ^{137}Cs γ 射线30Gy处理CHO细胞,其SSB的氧增比(OER)为4.3,而修复速率与程度在氮、氧中是一样的。

2. 病毒DNA作为生化探针

以双链DNA病毒SV40病毒为例,采用下列步骤,即以SV40受照射后感染细胞,分离核,再提取病毒DNA,琼脂糖胶电泳,原位杂交(Southern blot)技术,以 ^{32}P 标记的具切口的SV40DNA与之作DNA杂交,从自

显影上可见三条带,即SSB,DSB及完整的DNA。由此可判断细胞内SSB,DSB的修复状况。

3. DNA修复基因的定位

以人细胞与小鼠细胞杂交,从杂交细胞对DNA的紫外线损伤进行基因定位,即探讨DNA修复系统的遗传结构。如以XP细胞(着色性干皮症细胞)作为模式系统,与小鼠细胞的杂交体可以探讨辐射诱导的肿瘤发生、人的切除修复的遗传结构。

以溴脱氧尿嘧啶(BUdR)光解测定修复能力,已知DNA修复的一个(或几个)基因位于染色体3上,而染色体14与切除修复能力有关。

4. 内切酶Endo A, Endo B及其它酶

一种人的淋巴母细胞无嘌呤内切酶可以内切受UV或X射线照射过的DNA即无嘌呤DNA(AP-DNA)。

Endo A:切AP位的3'端,留下3'端的AT残基,是DNA多聚酶的不良引物。Endo B:切AP位的5'端,留下3'-OH核苷末端,是多聚酶的正常引物。

此外,有人比较了分化与未分化培养的人神经母细胞(neuroblastoma cells)的 α -及 β -多聚酶。

5. 对紫外线的敏感性与非预定DNA合成(UDS)

不同种类的细胞在UDS上有高低,但D₀仍在同一范围。所以UDS可能反映了其它因素如细胞形态学及内源的TdR库的品系差别。

有人以人成纤维细胞、XP细胞作材料,探讨DNA二聚体切除修复的途径。也有报道UV作用后,rec A基因产物的动力学过程。

6. ^{125}I -T₃受体的研究

^{125}I -Triiodothyronine [^{125}I -三碘甲状腺原氨酸(T₃)]与一专门的核内受体(一种非组蛋白的蛋白质)结合,后者又与DNA结合,与RNA转录调节有关。T₃受体因细胞而异。因 ^{125}I -T₃极接近DNA,使DSB或更重要的损伤不能恢复。作者认为 ^{125}I -T₃可用于具

大量核受体的肿瘤的选择性治疗。同时,有必要重新估价放射性碘的防护标准,明确主要受害器官是什么。

对DNA及膜的效应

目前对于射线作用的靶是DNA还是膜颇为关注。

1. 用基因转移技术研究DNA修复系统

为了探讨人的DNA修复基因,设计了如下实验:以CHO细胞的修复缺陷型作为DNA受体,先将有修复能力的HeLa细胞的基因组DNA合入质粒PSV₂-GPT(即SV40基因组加Ecogpt,它可以利用黄嘌呤,对霉酚酸有抗性)。将它们转入CHO修复缺陷型细胞,然后在含丝裂霉素及霉酚酸的培养基中选择。

以 ^{32}P -PSV₂-GPT为探针,用原位杂交技术证明细菌的基因存在于转化细胞的基因组中。以高度重复的人DNA("Alu")顺序作探针可以显示转化细胞中人的DNA顺序。

用PSV DNA [SV40/PBR322]研究正常细胞株及毛细血管扩张性共济失调症(Ataxia Telangiectasia,以下简称AT)细胞株的DNA修复及重组功能,发现AT细胞的修复功能不正常,但重组是正常的。

2. (ADP-核糖)同聚物聚合酶

它是依存DNA的一种细胞核内的酶。使辅酶I(NAD⁺)的ADP-核糖部分掺入ADP-核糖的同聚物中,可以调节连接酶,从而与DNA断裂重接的修复有关。苯酰胺及3-氨基苯酰胺(一种辅致突剂?)均可抑制它。

3. 生物膜

亚德里亚霉素处理仅影响亚致死损伤而与修复无关。以抗亚德里亚霉素的V₇₉细胞株为对象,其细胞膜上有180,000 daltons的糖蛋白,编码基因位于一对微小染色体上。

^{60}Co 照射人红细胞血影,可使膜流动性下降,即膜的脆性增加。加入与膜有关的药物如氯丙嗪,普鲁卡因, lidocaine等可以改变流动性。无疑,关于细胞内辐射敏感靶的研究对于肿瘤辐射生物学是颇为重要的。

脂肪的辐射敏感性,脂肪的过氧化作用很重要,其抗氧化性与防护相关联。为此提出了脂质体膜式系统。辐照改变了膜的脂肪微环境,从而“激活”了与膜相结合的碱性磷酸酶(ALP)。也有酸性磷酸酶(ACP)的脂质体膜式。

很低剂量(0.001Gy)即可使小鼠肝线粒体的柠檬酸脱水酶活性和细胞表面的相变温度改变, ^{125}I -IUdR掺入DNA受抑制。

在E.coli中,观察了膜、存活与DNA的关系。对与膜的麦角固醇结合的两性霉素B以及小鼠小脑的丙种氨基丁酸受体也有个别报道。

4. 检测损伤DNA的单克隆抗体的制备

用含有胸腺嘧啶乙二醇(thymine glycol——辐射作用于DNA的主要产物)的DNA制备单克隆抗体,以检测DNA的损伤产物。

此外,还注意到谷胱甘肽(GSH)在辐射敏感性及氧增比中的作用,DNA单链断裂重接与细胞的GSH有关等。

致突与染色体改变

1. 以克隆基因技术探讨辐射致突

前已提到质粒PSV₂-gyl,它由XGPRT(E.coli),SV40及PBR322组成,XGPRT可以利用黄嘌呤,但是HGPRT不行。方法是:以磷酸钙使PSV₂-gyl沉淀,复盖HGP-RT⁻的V76细胞,以SV40或其它讯号刺激它,使XGPRT的性状表达。在含黄嘌呤抑制剂氮丝氨酸的培养基中选择,两种XGPRT⁺的V79细胞亚系被分离出来。在氮丝氨酸存在时,可以利用黄嘌呤及次黄嘌呤生长,无细胞抽提液可以高速度地将 ^{14}C 黄嘌呤转为黄嘌呤单磷酸盐。

从细胞中分离DNA,ECORI酶切,以 ^{32}P -PSV-gyl DNA作原位杂交,上述两个细胞亚系DNA均有二个一致的带,说明载体已整合入DNA。

XGPRT也可利用6TG。选择XGPRT⁻细胞,它抗6TG。亚系XGPRT₁⁺的6TG^R突变体

的诱导频率与X线剂量成线性,因化学诱变剂的处理而大增,它的自发突变频率与诱导突变频率均高于HGPRT⁻的母系V79-4。XGPRT₁⁺的6TG^R突变体DNA的两条带丢失,个别的发生DNA重排。

转移的XGPRT基因也比“原有的”基因突变频率大,这是转移DNA的一个特性。

在啤酒酵母菌中已经克隆了一些DNA修复基因,包括光复活修复基因,切除修复基因,有错误倾向的修复基因及与交联修复有关的基因。

2. 以病毒作为遗传学探针

SV40病毒用来探讨哺乳动物细胞的紫外致突变与遗传重组。经对SV40回复子DNA作序列分析:2024位碱基的变化,使病毒蛋白质VP₁中野生型的脯氨酸突变为温度敏感型的丝氨酸;156位碱基的变化,使温度敏感型的丙氨酸转为回复子的缬氨酸。

报道了腺病毒受UV照射后在AT成纤维细胞中的增强复活(ER)及增强致突(EM);疱疹病毒在5-氮胞苷处理的CV1细胞中的ER及EM等。

3. XP细胞的致突变

以XP及正常人成纤维细胞S期在UV照射后比较致突率及致死率的关系。以 ^{232}Pu 处理人成纤维细胞,观察致突率与DNA修复的相关性。以人的成纤维细胞DNA转染XPA型细胞的手段探讨致突与DNA修复。

4. 流式细胞计的应用

以流式显微荧光计(FMF)研究染色体损伤;裂缝扫描流式细胞计(SSFCM)使含双着丝粒的染色体计数大大提高了工效。

此外,有 $^3\text{H}_2\text{O}$ 处理后骨髓的姐妹染色体交换,微粒(MN)与存活率关系(CHO细胞)的研究。

细胞的致死、亚致死与潜在性致死损伤

1. 小剂量率照射与辐射抗性的增加

0.003~0.03Gy/hr X线照射L5178Y-R,

L5178Y-S, 观察辐射敏感性与突变频率。L5178Y-S的敏感性下降。照射后20~30天内, L5178Y-R的 TG^R 突变体呈线性增加, 而L5178Y-S的 TG^R 突变体则急剧增加, 且 TG^R 突变频率与辐射抗性的增加有着不同的动力学过程。所以在受照射群体中辐射抗性与 TG^R 细胞是由两个独立的突变事件产生。

2. 潜在性致死损伤修复 (PLDR)

在XP及AT细胞中无PLDR, 所以PLDR相当于DNA修复, 因加入新生霉素, 使PLDR受抑制, 它发生在DNA双链断裂之后, 可能涉及核小体的装配, 以平均失活剂量作为人细胞敏感性比较, PLDR使曲线的肩区重现, 分次剂量恢复是以DNA双链断裂的PLDR为依据的。

3. AT超敏感性的原因

AT细胞对X线是高度敏感的, 其原因是DNA合成受抑? 还是DNA修复缺陷? 仍在探讨之中。

4. DNA损伤与亚致死损伤修复 (SLDR)

DNA的残余损伤与SLDR有关, 重水可以抑制SLDR并涉及SLDR机制的染色质 (ADP-核糖) 的多聚化。

5. 夜蛾细胞株TN368的利用

在28℃下培育, 其抗性大, 非预定的DNA合成极高。对辐照后存活率变化与DNA损伤修复作平行研究, 是一个极理想的材料。(注: 一般哺乳动物细胞存活率研究时, 采用剂量在10Gy以下, 而DNA修复的研究往往需用30Gy或更大的照射剂量。)

敏化作用与防护作用

1. 氧增比与-SH含量

加DTT使-SH含量增加, OER上升, 加NEM使-SH含量减少, OER下降。

人成纤维细胞GSH缺陷型株系GM3877, 其GSH为正常细胞株的5%, OER降为1.5, 另一株系GM3878, GSH为正常株的15%, OER与正常的相同 (等于3)。

2. cAMP与辐射敏感性

cAMP激活蛋白激酶使组蛋白及非组蛋白的蛋白质磷酸化, 从而改变了组蛋白与DNA的相互作用及核小体的结构。

在X线、UV、或丝裂霉素C (MMC) 处理前或/后加入双丁酰cAMP (DBcAMP) 于CHO细胞培养基中, 因为cAMP使染色质结构松弛, 所以, MMC处理前加入DBcAMP使存活率下降, 而在MMC处理后加入DBcAMP, 则使存活率增加。MMC使DNA链发生交联, 但是X线与UV不一样。

3. 剂量改变因素 (DRF)

在细胞活存率10%时的DRF, β 羟-5羟色胺加AET的DRF为1.70, 5-羟色胺的DRF为1.16。

4. 顺铂化合物的作用

有抗肿瘤活性, 也是辐射增敏剂。CHO细胞以 2.5×10^{-3} mM的Cis-pt处理1.5小时及再受 ^{137}Cs γ 线照射, 在低氧状态下有辐射增敏作用。

5. Miso的作用

Miso可以抑制中国仓鼠细胞PLDR。

此外, 也有报道2-脱氧-D-葡萄糖对HeLa细胞及白细胞微核产生的作用。

细胞、细胞接触的修复

1. 多细胞球状体的利用

直径为850 μm 。先以吖啶橙染色, 采用流式细胞计, 进行计算机分析。由此可以探讨细胞微环境与细胞增殖关系。

将人上皮样癌细胞KBE在多细胞球状体中生长, 可以研究各种抗癌手段 (X线, 化疗及高温) 的相互作用。pH低时, 作为单细胞的KBE对37℃下照射更敏感, 多细胞球状体置于低PH溶液中使微环境大大改变, 从而细胞敏感性增加。

2. (ADP-核糖) 同聚物合成抑制的后果

DNA单链断裂增加 (ADP-核糖) 同聚物的合成, 后者粘附于染色体蛋白质上, 使染色质更易受修复酶的作用。(ADP-核糖) 同

聚物激活DNA连接酶,可能参与修复过程的最后步骤。DNA单链断裂增加(ADP-核糖)同聚物的合成,抑制它则可增加哺乳动物细胞的辐射反应。以烟酰胺(NA)处理中国仓鼠细胞,存活率明显下降,但对于未照射细胞并无影响。照后加入NA敏化作用大,间隔照射时可减慢亚致死损伤修复。

3. 非蛋白的-SH (NPSH) 与辐射反应

NPSH特别是谷胱甘肽(GSH),在细胞内的含量与辐射反应的关系颇受人注意。二乙基马来酸(DEM)等降低细胞的GSH。当DEM加入时照射,对-SH含量降低的细胞出现有氧增敏。DEM对-SH含量下降的影响小,但它本身是一种辐射增敏剂,可以改变低氧细胞的辐射反应。所以,应特别注意,NPSH下降并不是唯一的(或主要的)DEM增敏的机制。

结 束 语

由上可见,细胞对DNA分子损伤修复的研究已开始深入到修复基因的定位及其克隆。基因工程技术,单克隆抗体、细胞杂交,多细胞球状体以及流式细胞光度计等技术的应用也在逐步推广。

可以预计,DNA修复的工作向修复基因的定位、克隆、产物表达的方向深入将可揭示辐射生物学、肿瘤发生、肿瘤以及若干遗传病的治疗、老年学、细胞分化、生命起源等共同关联的理论基础。

同时,膜在辐射损伤作用中的地位也受到了重视,但仅仅是一个开端。把膜结构与功能方面的新概念,新技术引入辐射生物学的工作无疑是一个生长点。

肿 瘤 放 射 生 物 学

第七届国际辐射研究大会中国代表团成员 罗祖玉

一、对肿瘤、细胞活存、生长延迟的效应

1. 低氧细胞的探测

Gray 实验室建立了一种快速,正确的测定肿瘤内低氧细胞比例的方法。已知硝基咪唑类(nitroimidazoles)及其它含氮化合物只在低氧细胞内氮还原及结合。硝基吡啶(NA)可以区分含氧细胞及低氧细胞(图1)。其实2

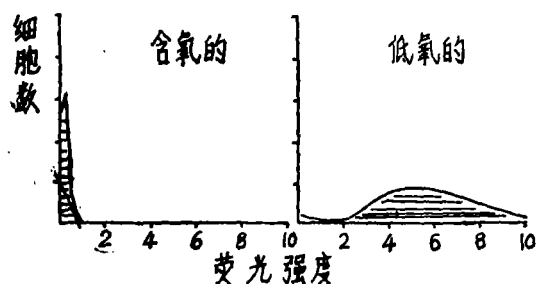


图1 V79细胞以10 μ M NA 培育3小时的荧光图谱

μ M NA处理二小时已可区分,但都必须在通氧情况下,由此可算出两类细胞的比例。利用流式细胞计区分细胞极为方便、迅速。

2. 球状体的应用

利用V79细胞的球状体造成中心坏死区并围以抗辐射的低氧细胞。以无毒荧光染料Hoechst 33342染色,根据荧光强度,可以用FACS检测到不同深度部位的低氧细胞。染色与计数前在有氧或乏氧状况下照射球状体,比较乏氧或通氧的V79球状体的同一深度细胞的辐射敏感性,OER稳定在 2.7 ± 0.2 。这些资料支持了一种假说:V79球状体的慢性低氧细胞对辐射的反应,虽则是在乏氧状态,仍可因其它因素而敏化

以辐照加Miso处理EMT6多细胞球状体评价其再氧化。照前给 ^3H -Miso,照后给 ^{14}C -