

DNA损伤修复在放射生物学中的意义

上海第二军医大学放射医学研究室 郑秀龙 综述

北京放射医学研究所 夏寿莹 审

细胞尤以真核细胞DNA含有大量的信息(每个真核细胞含 10^{10} 核苷酸),DNA长链的表面很大,易受射线及其射解水分子产生的自由基攻击,成为射线敏感的靶分子。DNA结构的高度专一性顺序在维持机体的正常功能及遗传变异上是极其重要的,人们可利用这种具有特定功能顺序基因与质粒DNA重组诱导E.Coli产生干扰素、胰岛素等生物制剂。因此,射线对细胞DNA的损伤都会影响细胞的生理功能及基因遗传的改变。DNA在生物体内的复制、转录和基因调控的重要性已为人们所熟知,近十多年来由于分子生物学的突飞猛进和新技术的应用,认识到从分子水平来研究DNA损伤与修复也是研究生命基础科学中的一个重要课题。正如文献^[1]中指出,它不仅限于放射生物中射线损伤的靶分子范围,还涉及到肿瘤、衰老以及各种遗传性疾病等有关的重要医学基础。因此,开展DNA辐射损伤与修复的研究不仅有理论意义,且有实用价值。因而近年来引起各国科学家的关注,在许多专业会议中均把这一课题列入重点研究项目。

一、辐射引起细胞发生的时相变化

近年来由于射解分析、快速混合技术等方法的突破,对射线引起的物化、生化及生物学在时相上变化的研究进展较快。Chapman等^[2]除用图解法表示射线引起的物化原初变化外,还将射线导致生物体的时相变化分为三个阶段:

(一)在 10^{-8} 秒以内:射线的直、间接作用可使细胞内DNA产生靶分子自由基(T^{\bullet}),而后

随细胞内环境中所含化学成分的差别而产生不同的效应,若有敏化剂(S)或氧化剂存在时,则与之结合成加成物($T^{\bullet} + S \rightarrow T-S^{\bullet}$)或发生电子转移($T^{\bullet} + S \rightarrow T^{+} + S^{-}$),使靶分子氧化固定下来,最后导致细胞潜在性的化学致死损伤,如DNA链断裂等。若有还原剂(P-SH)如谷胱甘肽存在时,则使 T^{\bullet} 还原进行化学修复($T^{\bullet} + P-SH \rightarrow T + P-S^{\bullet}$)。

(二) $1 \sim 10^6$ 秒之间:主要对损伤后的DNA靶分子进行一系列的酶促修复作用,将详述于后。

(三)大于 10^6 秒时:出现动物组织的后效应或延迟效应。

二、DNA损伤修复与细胞活存

(一)DNA损伤

细胞内在环境如温度或pH等的变化会使DNA受损伤,而细胞外环境如UV、X、Y线、中子及 α 、 β 带电粒子的照射使DNA更易遭受严重损伤,并且不象UV那样有选择性的简单损伤。射线除直接破坏DNA外,更多的是通过射解水产生的自由基(OH^{\bullet} 、 $O_2^{\bullet-}$ 、 H^{\bullet})及 e_{aq}^{-} 等引起的DNA损伤,并受细胞内环境中所含化合物不同的影响。现将最近有关DNA损伤机制的研究结果概述如下^[3]:

经X、 γ 射线照射后,DNA中的嘧啶尤以胸腺嘧啶(T)易被氧化破坏而丢失;亦可因糖分子的C3'—C4'键断裂成丙二醛样物质而使碱基脱落,致成无嘌呤或无嘧啶(AP)位点,引起链的不稳定,导致链的断裂;糖的磷酸酯键也易被碱作用发生断裂,称“碱不稳定部位”,

故用碱溶破细胞测得的单链断裂数(SSB)比射线实际损伤值高,有的可达30%。辐射引起细胞DNA的SSB与照射剂量呈线性关系;随剂量的加大,双链断裂(DSB)增加,与剂量的二次方呈线性关系。DSB也可能由两条链的对侧相差3~16bp间的SSB形成,一般产生SSB量比DSB高10~20倍,故照后易检测到的SSB是主要损伤。

Cress等实验表明^[4],细胞经X线25Gy照后,DNA的磷与核蛋白的氮结合成P-N而发生交联,对细胞致死损伤意义不大,是否也属DNA损伤后修复的中间步骤,正在探讨中。

然而经UV照后,则易在DNA同侧链上的两个邻近嘧啶之间以共价键形成环丁酰二聚体的损伤,其损伤程度为T \diamond T:T \diamond C:C \diamond C=10:7:2,也有人计算每产生30个T \diamond T可引起一个SSB。1978年,Wang等^[5]用 γ 线4000Gy照射¹⁴C标记的E.Coli后,也可得到微量¹⁴C标记的T \diamond T,并指出以往 γ 线照射所以测不到二聚体,是由于修复很快的缘故,然迄今未见类似报道。

由于方法的限制,目前研究较多的是二聚体损伤和DNA链的断裂。

(二)细胞DNA损伤后的修复或修补

受了损伤的DNA分子经修复酶系的酶促过程可使DNA结构得到修复或恢复。自1966年McGrath等^[6]首次应用碱性蔗糖密度梯度离心法证明E.Coli受照射引起DNA的SSB损伤能进行重接修复实验后,迅速地在许多生物领域内开展了不少工作,但由于损伤DNA的修复较复杂,并受细胞内外环境许多因素的影响,因而修复研究亦不如UV清楚。在生物体内主要有光修复和切除修复,这两种修复是均将损伤成分清除而进行的修复,对维持机体的正常生理功能和遗传稳定性起重要作用,也是体内主要的修复形式。其次为复制后重组修复和SOS修复,是不将损伤成分清除而进行的修复,修复不甚严格,易发生错误,故属有错误倾向的修复,易发生突变和癌变。有关各修复过程的详细机制已在文献^[1]内详述,恕不赘述。

此外,还有Samson等1977年发现的直接消除修复或适应性反应^[7]。他们将强诱变剂N-甲基N'-硝基-亚硝基胍(MNNG)1 μ g/ml与E.Coli培养2小时后,E.Coli对浓度高达几百倍的MNNG产生极强的抗性,可持续1~2小时。实验证明由于MNNG使DNA中的G甲基化而使G-C间氢键断裂损伤后,细菌适应性反应被诱导,ada基因被启动而合成一种修复酶(转甲基酶),它象受体一样能将G上的甲基转入酶分子中半胱氨酸上形成S-甲基半胱氨酸,而使DNA修复。

关于正确或无错误修复的研究,Grossman等^[8]提出细胞生长速度必须慢于DNA复制速度,后者更慢于修复速度;Pardee^[9]也指出DNA修复速度必须缓慢进行才能保证无错误修复,若DNA未修复好即行分裂,结果使未完好的染色体不均匀地分布入两个子细胞内,核损伤而致细胞变异或死亡。这里需提出的是近年来,在真核特别在原核细胞研究表明,有些无错误修复过程中的酶受基因的调控。例如在E.Coli修复系统中,现已对DNA修复的结构基因如recA和调节基因如lexA进行克隆、扩增及顺序分析。哺乳细胞DNA修复的调控基因也正在利用有修复缺陷型的人细胞株作DNA转染实验进行分离和鉴定基因产物。XP病人的成纤维细胞为解决人类DNA修复的分子机制提供了一个很有用的研究途径。

上述修复中除光修复和直接消除修复外,其它修复过程的全部细节还不清楚,各种修复系统间在体内如何协调和控制,还有待深入探讨,肯定将会发现更多的诱导修复。近年来的事实表明,DNA损伤修复是癌变、老化过程等许多疾病的重要因素,使许多研究室都转向致力于哺乳细胞DNA损伤修复及其遗传效应的研究。

(三)DNA损伤修复与细胞活力间的关系

辐射引起DNA链断裂是一种严重的损伤,干扰了DNA的生物功能,如模板活力减少,表现在对RNA的转录活性下降,有的甚至失去转化活性。关于DNA辐射损伤修复与细胞致

死效应间的关系,至今仍有争议,目前较多的认为辐射引起DNA原初损伤程度与细胞死亡无相应关系^[10],大量材料证明:部分未修复的断裂损伤是细胞的致死效应^[10~13],照后若使用修复抑制剂二酰胺,则未修复断裂增加的同时细胞死亡亦增加^[14];Sakai等^[15]认为不能修复的损伤DNA是细胞死亡的重要因素;我们及其他学者的工作^[16~19]指出,重接修复后DNA不稳定再断裂降解可能是细胞致死的重要原因,这些结果均说明DNA损伤后的修复对改变细胞致死率在放射生物学中是个重要的机制,它对肿瘤放疗和治疗放射损伤均有重要的实用价值。

三、细胞辐射敏感性的机制^[20]

细胞辐射敏感性是放射生物学的重要研究课题之一。近年来人们试图从正常与肿瘤细胞放射敏感因素的差别以提高肿瘤的放疗效果,而放射敏感性的机制较复杂,受射线种类、温度、含氧量及生物膜等多种因素的影响。下面简述与辐射敏感性有关的主要方面。

(一)细胞DNA辐射损伤的敏感性

目前较一致的认为敏感型(S)与抗放型(R)细胞DNA的辐射断裂损伤基本相似^[21~23]。

(二)辐射敏感性与DNA断链的重接能力有关

Korner等证明 L_{5178Y} R型细胞的 D_0 值比S型大2倍,S型DNA修复慢且不完全,孵育至180分钟时,R型DNA断链重接量比S型多2倍以上。Ono等^[22]发现整体受照小鼠的胸腺和肝细胞DNA的SSB数一样,其重接修复的能力胸腺比肝差且慢,胸腺的辐射敏感性亦比肝高。Little等也发现早衰病人成纤维细胞比健康人DNA断链重接慢。上述结果都支持放射敏感性表现在细胞DNA断链的重接能力上,其修复能力比抗性细胞差。但也有持相反意见,Hesslewood用7MeV的电子束照射两种敏感性不同的细胞,观察不出DNA断链重接速度有明显差别,看来辐射敏感性还不能仅限于DNA

断链重接能力的大小那样简单的关系来决定。

(三)辐射敏感性与细胞周期有关

细胞在分裂期最敏感, D_0 值也最小,这是由于染色质浓集成染色体,处于核边缘区域,增加射线的敏感性,而修复酶则不易进入,阻碍细胞的修复。

四、辐射致癌

射线损伤是通过射线的直、间接作用使机体受损,也有不少实验表明射线可以致癌。射线致癌不象辐射损伤发生得迅速,实验研究需时也较长,为何同一物理因素(射线)会产生两种不同的后果?迄今未见报道,但从过去一些研究的迹象推想,若从DNA辐射损伤后的修复方面来探讨也许会得到些线索。Pardee^[9]的工作证明受损细胞DNA在 G_2 期进行修复,待修复后再分裂,故 G_2 期较长,若在修复时加入咖啡因,则 G_2 期缩短甚至消失,使未修复好的DNA进入分裂期,致使有的细胞死亡;有的则突变转化成癌细胞。Grossman等^[8]研究化学致癌指出,正常情况下受损细胞DNA是在调节基因严格控制下进行的,修复速度较慢;异常情况下,阻遏蛋白的抑制作用被解除,就会发生无指令的修复,致损伤细胞DNA形成错误修复,导致细胞突变转化成癌,虽属解释化学致癌的机制,但这些都说明癌变的发生,很大程度上与DNA损伤后错误修复有关。

五、加强细胞DNA辐射损伤与修复基础研究的重要性

近十多年来的国内外研究实践表明,仅从防治急性放射病筛选出有效药物的做法,收效不大,已逐渐转向放射生物学的基础研究;另从放疗经验中亦可以看出,目前肿瘤放疗效果已从物理上掌握了规律,疗效达60%左右,并认为必须从放射生物学基础研究来提高;同时核能工业安全防护问题,即小剂量辐射对机体的影响问题,最近发现射线本底的生物剂量与生物效应不一致的矛盾。如美国高本底地区癌变率低于低本底区;根据1970~1980年调查,

我国广东5万人中,12岁以下儿童畸形发生率,在高与低本底区无差别。由此看来,核工业防护问题,也需要从放射生物学基础研究来解决;另外肿瘤放疗时,肿瘤周围细胞易受损伤坏死而肿瘤有时又复发,可能与肿瘤细胞DNA修复能力较正常高有关。例如受照小鼠白血病L7712细胞DNA修复能力比血淋巴细胞强^[21];又如大鼠小脑神经瘤放疗后,肿瘤细胞DNA修复能力亦大于附近的正常细胞,这就给肿瘤放疗带来困难,这也需从下述放射生物学基础研究来解决:

(一)加强对肿瘤细胞的辐射增敏研究

有人认为WR2721对正常细胞有防护射线损伤而对乏氧瘤细胞则有增敏作用,但还没有得到证实。米索硝唑和灭滴灵是一类辐射敏化剂,对乏氧细胞有辐射增敏作用而对有氧细胞无增敏效应,故有利于肿瘤放疗,该药虽已在临床试用,因毒性太大,有被放弃之趋势。近来人们^[23, 24]试图将辐射增敏剂与防护药合并使用,以减少正常有氧组织受射线损伤而对乏氧瘤细胞则增加辐射杀伤作用,来提高放疗效果,还可降低药物毒性。我们设想,若能从选择载体着手,将敏化剂载入肿瘤部位,将对提高肿瘤放疗效果和降低神经毒性定有所裨益。据此,我们最近也成功地合成了一种能进行肿瘤定位和具有辐射增敏作用的新型肿瘤定位辐射增敏剂^[25],为从事辐射增敏药物的研制工作提出了一条新的途径。也有人主张在寻找辐射预防药时,若获相反效果,后者可能对肿瘤放疗有增敏作用,因此,若在筛选预防药同时,又考虑到辐射增敏剂的性能,也许会提高研究工作的收益。

(二)从抑制修复系统进行探索

1. 肿瘤放疗前或后加热可增加肿瘤疗效^[26]。肿瘤放疗前加热43~44℃ 0.5~1小时,主要增强对DNA的损伤,而照后加热主要对DNA的修复抑制,从而使肿瘤缩小,疗效增加。若能采用加热→照射→再加热处理措施,可能对肿瘤有很强的杀灭作用。

2. 使用修复酶抑制剂可加强对肿瘤的杀

伤作用。

(1)阿的平、尼克酰胺及其类似物3-氨基苯甲酰胺对连接酶有抑制作用,阻碍了DNA片断间的连接而致细胞死亡。

(2)高浓度aphidicolin和ddTTP能抑制聚合酶 β ,从而抑制了损伤DNA的修复而杀灭细胞。

综上所述很多研究事实说明,加强放射生物学基础研究特别是细胞DNA辐射损伤与修复基础研究的必要性,无论对实际应用和基础理论提高以及保证本学科稳定持续发展都是极其重要的。

六、小 结

目前已对辐射引起整体或离体细胞DNA损伤和修复进行了广泛的研究,一般认为除有修复缺陷细胞外,正常细胞均能有效地修复DNA不同类型的损伤,以维持遗传信息的稳定性,研究较多的SSB,在生物体内大部分都能很快地进行重接。

在损伤DNA的修复研究中,至今已发现15种不同的修复酶^[27]。现在不少实验室正在应用不同修复酶的基因与质粒DNA重组、克隆并提取纯酶,为开展DNA修复机制的研究创造条件。DNA修复过程中的基因调控研究,虽在原核细胞中已取得一定的进展,真核细胞的基因调控也有几个研究室试图用XP患者的成纤维细胞进行控制人的DNA修复的分子机制研究,但需解决的问题很多。关于在修复过程中如何保证正确修复,防止基因突变和癌变的发生,以及DNA损伤修复及其与细胞功能表达间的关系等有待深入探讨。上述深入的研究必将为阐明生命现象之间错综复杂的关系以及生命运动与疾病间的内在联系作出重要贡献。

参 考 文 献

1. 郑秀龙:生物化学与生物物理进展 4:19, 1982.
2. Chapman JO et al, Adv in Radiat Biol (Lett

1. JT Ed, NY Academic pr) 9 : 145, 1981.
3. Sonntag CV et al; ibid 9 : 109, 1981.
4. Cress AE et al; Radiat Res 95 : 610, 1983.
5. Wang TV et al; ibid 76 : 540, 1978.
6. McGrath RA et al; Nature 212 : 534, 1966.
7. Paul HF; 科学 3 : 21, 1982.
8. Grossman L; 国际化学致癌机理 讨论会论文摘要 中国上海, 1982.
9. Pardee AB; ibid 中国上海, 1982.
10. Cole A et al; Methanism of cell injury, In "Radiat Biol in Cancer Res" (Meyn RE et al Eds, NY Raven pr) P.33, 1980.
11. Dugle DL et al; Proc Natl Acad Sci USA 73 : 809, 1976.
12. Roots R et al; Radiat Res 78 : 38, 1979.
13. Murry D et al; ibid 100 : 171, 1984.
14. Meyn RE et al; ibid 94 : 14, 1983.
15. Sakai K et al; ibid 98 : 479, 1984.
16. 郑秀龙等; 生物化学与生物物理学报 15 : 17, 1983.
17. 郑秀龙等; 辐射研究与辐射工艺学报 3 : 28, 1985.
18. Ueno AM et al; Radiat Res 79 : 377, 1979.
19. Kanter PE; Int J Radiat Biol 38 : 4, 1980.
20. Szumiel I; Adv in Radiat Biol (Lett JT Ed, NY Academic pr) 9 : 281, 1981.
21. 郑秀龙; 上海生物物理学会(1984 学术会议论文摘要汇编) P.30, 1985.
22. Ono T et al; Int J Radiat Biol 25 : 291, 1974.
23. Koch CJ et al; Radiat Res 87 : 265, 1981.
24. Antoku S et al; J Radiat Res 25 : 305, 1984.
25. 郑秀龙等; 第二军医大学学报 6 : 364, 1985.
26. 孟祥顺等; 辐射研究与辐射工艺学报 2 : 45, 1984.
27. Lindahl T; Ann Rev Biochem 51 : 61, 1982.

放射性液闪废液的处理方法

苏州医学院放射化学教研室 强亦忠综述

核工业部原子能研究所 罗上庚审

一、前言

由于液闪测量技术具有许多突出的优点, 因而在 α 射线、低能 β 和 γ 射线及中子探测中得到了广泛的应用。其中用量最大的是在医学、生物学、有机合成等领域中作为示踪剂的 ^3H 和 ^{14}C 的测量。作为液闪测量重要物质基础的闪烁液, 其组成有多种形式, 但其中量最多的是易燃易爆的低沸点溶剂。因此, 随着液闪测量技术的推广, 液闪废液数量急剧增加, 其处理和处置问题日益突出, 如不及时解决, 将会成为进一步发展液闪测量技术的障碍。

通常都把贮存作为液闪废液的临时处理手段, 这是不很安全的。根据日本消防法等有关规定, 对甲苯、二甲苯一类有机溶剂, 贮量超过20升就需向消防部门申报; 超过100升必须设置单独的贮存场所^[1]。为了防火和防止放射

性污染, 对液闪废液的贮存有很严格的要求^[2], 如建筑物的耐火结构, 防火防爆, 通风设施, 与其它建筑物之间的安全距离等, 这对每个使用液闪的部门来说, 实现起来有困难。因此, 寻求合适的处理方法就成为人们十分关心的问题。

二、液闪废液处理方法

液闪废液的处理方法应满足以下要求: 安全可靠; 不产生新的放射性废物; 不污染内、外环境; 设备简单, 操作方便, 花钱少, 易实现等。现将已研究和采用的处理方法简介如下:

(一) 蒸馏法

这是液闪废液处理常用的方法, 它可单独使用, 也可与固化法、焚烧法联合使用(见图)。由于液闪废液是多组份有机溶液, 在高温下易发生分解和其他化学反应, 因此一般都