

才起作用,BSO对辐敏或化敏剂的增效作用显然也都取决于再氧合是否有效。

辐射防护剂临床应用所面临的问题较大,因其不能保障正常组织的安全,有时又保护了肿瘤,但更重要的是至今尚未找到能在对人体无害水平上起有效作用的化合物。当然,局部用药或外用可能在放疗中找到一个位置。

对于辐敏剂及其增效剂,或辐射防护剂,尚待充分研究的问题有下列十个:

(1)对新的辐敏剂Ro-03-8799,SR-2508和RSU1069的肿瘤反应与正常组织损伤之比值作临床检验。

(2)测定哪些人瘤中含显著量乏氧细胞的方法。

(3)抑制氧耗量的化合物及其对实验肿瘤的效应。

(4)对肿瘤的血流及氧耗作基础生理学研究以探讨能否改善氧合,包括Perfluoro Carbon的研究。

(5)对贫血之放疗患者输血后给辐敏剂或

氧。

(6)在极短之放疗方案(如2周)中试用辐敏剂,包括用安全剂量($10\sim 11\text{g}/\text{m}^2$)之Miso。

(7)对化敏剂进行临床试用,重点为毒性研究;用更直接的实验方法选择药物,即直接筛选化敏药而不是筛选辐敏药;两者对半衰期的要求十分不同。

(8)用动物作SH基清除研究以增强化敏或辐敏作用,对正常组织的毒性给以更多注意。

(9)局部高温与上述任一措施复合,但先在体外进行,逐步过渡到实验动物研究。

(10)作临床试用时,挑选病例的标准应是更高度的选择性而不是广范围;在新药试用中应采用两种水平的照射剂量,一种处在道德上许可的总剂量带的上限,另一种在底部。不这样,大多数临床试用将无法解释,因为只用一种剂量时肿瘤组织及正常组织效应升高是无法区别的。

[徐承熊译 麦智广校]

多聚腺苷二磷酸-核糖对DNA损伤的应答

Berger NA; Radiat Res 101: 4~15,1985(英文)

聚腺苷二磷酸(ADP)-核糖酰基转移酶

多聚(ADP-核糖)是由染色质结合的多聚(ADP-核糖)聚合酶催化,在真核细胞核中合成。多聚(ADP-核糖)聚合酶[又称多聚(ADP-核糖)合成酶或转移酶]是一组ADP-核糖酰基转移酶中的一种,它能在烟酰胺和核糖环间的N-糖基键上裂解烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD),并将ADP-核糖部分转移至各种接受体分子形成共价键。

已经从许多组织如胸腺、肝脏和扁桃体分离纯化出均一的多聚(ADP-核糖)聚合酶。来源于许多组织的这种聚合酶的特征类似于我们

从羚羊胸腺纯化的多聚(ADP-核糖)聚合酶,这些性质包括:酶分子为单条多肽链,分子量为116,000,等电点9.6,最适pH8.6~8.8。 NAD^+ 是该酶合成多聚(ADP-核糖)的唯一底物,且需DNA作为激活剂。反应不需要二价阳离子,能被 $1\text{mmol}\beta$ -羟基苯甲酸汞阻断但不为 1mmolN -乙基马来酰亚胺阻断,酶活性亦可被NAD分子吡啶部分的类似物所抑制。这些类似物包括烟酰胺、苯酰胺、吡啶酰胺,但不被另一些类似物如菸酸、苯甲酸、吡啶羧酸所抑制。烟酰胺类似物也影响其它酶体系的活性,因而它们作为特异的聚(ADP-核糖)聚合酶抑制剂的应用受到限制。多聚(ADP-核

糖)聚合酶能与多聚(ADP-核糖)链联接,每个酶分子最多能同时与15个聚(ADP-核糖)聚合体结合。此外,聚合酶还能将多聚(ADP-核糖)分子连到其他的染色体蛋白质分子上。

多聚(ADP-核糖)聚合酶对DNA损伤的应答

用各种损伤DNA的试剂处理细胞可刺激多聚(ADP-核糖)聚合酶的活性。经UV辐射、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)、N-乙酰氧基乙酰胺基或博来霉素处理的人体淋巴细胞可引起多聚(ADP-核糖)聚合酶活性的增高,而且活性增高的程度与DNA损伤因素的剂量成正比。所有这些损伤因素引起的共同损伤是DNA链的断裂。经核酸内切酶处理细胞直接产生的DNA链断裂,也能导致多聚(ADP-核糖)合成的增加。

用纯化的成分在体外证明多聚(ADP-核糖)的合成与DNA单链断裂有关。SV₄₀极微染色体能轻微地刺激多聚(ADP-核糖)聚合酶,但当SV₄₀极微染色体被DNA酶或限制性内切酶Hae III处理后,它对于多聚(ADP-核糖)合成的刺激能力大为增强。为进一步证明多聚(ADP-核糖)合成是否随DNA链的断裂而出现,我们检测UV辐射对于极微染色体刺激多聚(ADP-核糖)聚合酶能力的影响。50~1000J/m²的紫外辐射对极微染色体激活聚合酶的能力几乎没有影响,但用藤黄微球菌UV核酸内切酶处理UV辐射过的极微染色体使UV损伤部位产生DNA链断裂,便可导致极微染色体的激活多聚(ADP-核糖)聚合酶的能力明显增强。这一体外系统清楚地证明DNA链断裂而不是损伤碱基能刺激多聚(ADP-核糖)的合成。平端DNA链断裂比非配对的连接3'末端的核苷酸链断裂更有效。而后者比连接5'端的未配对的核苷酸断裂更有效。

为弄清在细胞水平多聚(ADP-核糖)聚合酶是对DNA链断裂还是对碱基损伤发生应答,我们选用着色性干皮病(XP)细胞。这种细胞没有在DNA损伤部分形成起始切口的能力。用DNA损伤制剂如MNNG处理XP细胞,导致多

聚(ADP-核糖)合成的增加。说明XP细胞内有多聚(ADP-核糖)聚合酶,并且这些酶能对DNA损伤反应而被激活,但用UV辐射处理XP细胞,导致复制型DNA合成的减少,而多聚(ADP-核糖)的合成不发生改变。当XP细胞在UV辐射后再用藤黄微球菌UV内切酶处理,多聚(ADP-核糖)的合成增加而DNA的合成逐步地恢复到接近UV辐射前的水平。

当XP细胞经UV辐射后再用藤黄微球菌UV内切酶处理,可见多聚(ADP-核糖)合成的增加先于DNA合成的恢复。为确定多聚(ADP-核糖)的合成是不是DNA合成恢复的先决条件,我们研究了抑制剂对UV辐射的XP细胞中的DNA合成和多聚(ADP-核糖)合成的影响。表1的结果表明抑制剂如二脱氧胸腺嘧啶三磷酸、二氧磷基醋酸,aphidicolon亦能抑制DNA合成但不影响多聚(ADP-核糖)的合成。3-氨基苯酰胺和5-甲基烟酰胺是多聚(ADP-核糖)聚合酶的抑制剂,它们抑制多聚(ADP-核糖)的合成,并且部分抑制DNA合成的恢复。多聚(ADP-核糖)合成的抑制剂可以导致DNA合成部分抑制的事实,提示多聚(ADP-核糖)的合成至少部分为DNA损伤后的DNA合成恢复所必需。由于对多聚(ADP-核糖)合成的需要仅仅是部分的,因此提示细胞内还存在一条不依赖于多聚(ADP-核糖)合成的DNA修复途径。可能某些类型的DNA损伤需要多聚(ADP-核糖)合成作为DNA修复合成的前体,而另一些类型的DNA损伤则不需要。也可能某些特殊染色质区域的DNA损伤修复需要多聚(ADP-核糖)合成为先决条件,而其它染色质区域的DNA损伤修复合成则不需要,在这点上,似乎是染色质伸展区域的核蛋白易受最广泛的ADP-核糖化。

这些关于多聚(ADP-核糖)合成与DNA修复合成的关系的研究引出对多聚(ADP-核糖)聚合酶抑制剂对DNA损伤恢复的影响的检测。这些抑制剂对烷化剂诱导的DNA碱基加合物的切割只有极微小的或根本没有影响。虽然抑制剂不影响碱基加合物的去除,却明显地

抑制烷化剂处理细胞中的DNA链断裂的修复。相反，它们只轻微地延迟X线辐射诱导的DNA链断裂的重接速率。

表1 抑制剂对UV内切酶依赖的DNA合成和多聚(ADP-核糖)合成的影响

抑制剂	DNA合成 (对照组的%)	多聚(ADPr)合成 (对照组的%)
对照组	100	100
5 mM 8-氨基苯酰胺	43	5
5 mM 5-甲基烟酰胺	66	32
1 mM 二脱氧胸腺嘧啶	7	101
1 mM 二氧基磷酸酯酸	19	107
1 µg/ml aphidicolon	14	103

注：细胞以50J/m²UV照射，置于含有³HdTTP和¹⁴C NAD的反应混合物中温育。在有和无10单位的UV内切酶存在下测定每一种试剂的影响。

DNA修复中的多聚(ADP-核糖)

多聚(ADP-核糖)促使DNA修复的确切机制目前没有完全弄清。推测聚合物在DNA修复过程中起一种结构或功能的作用。关于可能的结构作用，聚合酶以每个蛋白质分子与15个分支的聚合物的比例结合，迅速地使多聚ADP-核糖化。这样一个多阴离子的迅速合成改变了紧密折叠的染色质结构，从而使DNA修复酶系统易于接近损伤DNA。一旦修复完成，DNA一级结构恢复，就没有断裂的DNA链刺激多聚体的合成，聚合酶也就失去活性。存在的多聚(ADP-核糖)分子将会迅速地被多聚(ADP-核糖)水解酶降解，继而染色质恢复到损伤前的结构。这一假设得到电镜研究结果的支持，在分离的胰腺染色质中，电镜观察到多聚(ADP-核糖)可使紧密卷曲的核小体结构开放和松弛。

多聚(ADP-核糖)聚合酶也可能通过调节几个酶活性而在DNA修复过程中有更直接的功能作用。表2列出部分影响多聚(ADP-核糖)合成或功能上作为这种合成的受体的一些酶和结构蛋白质。如上所述，多聚(ADP-核糖)聚合酶本身可以作为ADP-核糖化的一

个重要受体。这种修饰作用可能被DNA链断裂区域提供直接所需的分子如DNA连接酶。在体外，多聚(ADP-核糖)聚合酶能阻止RNA聚合酶Ⅰ在错误部位开始转录，刺激恰当的启动区域正确转录。这些作用可能是由于多聚(ADP-核糖)聚合酶与DNA链断裂结合从而保护DNA不被RNA聚合酶接触所致。因此，多聚(ADP-核糖)聚合酶在体内可能是通过DNA损伤部位结合从而遮盖DNA断裂区，阻止不恰当的转录的起始而发生作用。

表2 作为受体或被多聚(ADP-核糖)影响的蛋白质

蛋白质	修饰作用
多聚(ADP-核糖)聚合酶	失活
异构酶Ⅰ	失活
DNA连接酶Ⅱ	激活
Ca ⁺⁺ 、Mg ⁺⁺ 核酸内切酶	失活
RNA聚合酶Ⅰ	增加确定性
组蛋白H ₁	交联和改变结合
组蛋白H ₂ A、H ₂ B、H ₃ 、H ₄ 、H ₅	可能改变结合
HMG蛋白质1, 2, 14, 17	可能改变结合
SV ₄₀ T抗原。	不清

用拓扑异构酶Ⅰ在体外研究的结果表明，此酶能作为多聚(ADP-核糖)化作用的一种受体起作用，从而导致酶功能的丧失。这一过程对DNA拓扑学和DNA修复过程显然有重要作用。

DNA连接酶Ⅱ似乎可能被DNA链断裂激活，而且这种激活作用可能被多聚(ADP-核糖)合成抑制剂所阻断。起初的研究提示，DNA连接酶Ⅱ的激活可能涉及酶分子的直接ADP-核糖化。最近的研究表明，多聚ADP-核糖在DNA断裂部位的存在可能对抗组蛋白对DNA连接酶的抑制作用，从而加速连接酶对DNA断链的重接。

一种Ca⁺⁺、Mg⁺⁺核酸内切酶的多聚ADP核糖化能使这种酶失活。这一过程对DNA损伤区域去除之后阻止核酸内切酶活性可能有重要意义。同时，它使正在进行修复的区域免遭核酸酶的切割。

已经表明，组蛋白H₁，所有的核心组蛋白

以及高迁移率蛋白质(HMG)1, 2, 14和17均能作为多聚ADP-核糖化作用的受体, 这些蛋白质的ADP-核糖化能明显地影响染色质结构, 近来还证明类固醇诱导的哺乳动物肿瘤病毒的活化与HMG₁₄和HMG₁₇的ADP-核糖化的减少有关。SV₄₀T抗原似乎也能被ADP-核糖化, 然而还未确定这种修饰作用是否影响它的活性。

多聚(ADP-核糖)聚合酶调节对DNA损伤的自杀性反应

显然ADP-核糖影响与DNA修复有关的许多过程。作为存在于DNA损伤细胞中的危急情况下的总的调节者, 多聚(ADP-核糖)聚合酶可协调上述任何一个或全部功能。当细胞遭到严重的DNA损伤和DNA链断裂时, 所引起的多聚(ADP-核糖)聚合酶的激活本身可能导致一种危急状态。因为多聚(ADP-核糖)聚合酶对于DNA链断裂的反应是剂量依赖性的, 大量的损伤引导足量的酶激活, 进而迅速耗尽底物NAD。附图表明用MNNG处理细胞, 随着MNNG的浓度上升, NAD的水平呈剂量依赖性下降。当MNNG的浓度为1~2 μg/ml时, NAD部分缺乏, 但当MNNG为10~20 μg/ml时, 在不到60分钟内, 细胞内的NAD全部耗尽。这种MNNG诱导的、剂量依赖性的NAD的减少也伴有ATP剂量依赖性减少。用一种多聚(ADP-核糖)聚合酶的抑制剂处理严重DNA损伤的细胞, 可以防止NAD和ATP的耗尽。这一现象提示NAD和ATP的耗尽是继发于多聚(ADP-核糖)聚合酶的激活。

NAD和ATP的剂量依赖性消耗可能导致DNA修复的下降。随着处理细胞的MNNG浓度的增加, 细胞中复制型DNA合成呈进行性减少。在有羟基尿素存在下, DNA修复合成作为MNNG剂量的函数增加, 继续增加MNNG剂量, DNA修复合成减少。这是一个出人意外的现象, 因为根据推测, DNA修复合成应该与DNA损伤程度成正比地增加, 或者是如修复机制可以被某种特定量的损伤饱和, 那么修复

合成应该增加到饱和点, 然后维持在一个恒定水平。尽管DNA进一步损伤, 修复合成达到一个高峰然后减少的事实, 提示由于缺乏某种必需成分导致修复系统活性的下降。用高浓度的MNNG处理细胞能导致能量依赖过程包括DNA、RNA和蛋白质合成的明显下降、由于烟酰胺或苯酰胺能阻止NAD和ATP的消耗, 因而能使这些能量依赖过程部分恢复。烟酰胺和苯酰胺阻止NAD和ATP的消耗, 因而在大量DNA损伤情况下能保护能量依赖功能的事实, 可以解释先前观察到的多聚(ADP-核糖)聚合酶抑制剂刺激大量DNA损伤后的DNA修复合成。显然, 大量的DNA损伤激活多聚(ADP-核糖)聚合酶, 导致NAD和ATP的迅速消耗, 如同时用烟酰胺的类似物去抑制多聚(ADP-核糖)聚合酶, 从而防止NAD和ATP的消耗。NAD和ATP的保存有利于更广泛的DNA修复合成, 说明多聚(ADP-核糖)抑制剂能刺激DNA的修复。

表3 多聚(ADP-核糖)聚合酶抑制剂对大分子合成的影响

处理条件	[³ H]dTTP (dpm/10 ⁶ 细胞/6小时)	[³ H]UMP (dpm/10 ⁶ 细胞/6小时)	[³ H]Leu (dpm/10 ⁶ 细胞/6小时)
对照	140,000	27,400	400,000
20μg/ml MNNG	18,300	3,500	5,100
20μg/ml MNNG + 2mmol 烟酰胺	27,000	13,300	20,900
20μg/ml MNNG + 2mmol 苯酰胺	102,000	18,700	30,000

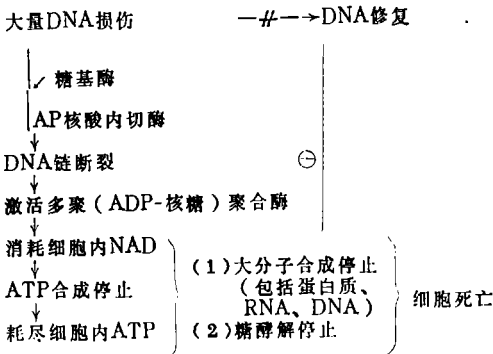


图: 多聚(ADP-核糖)聚合酶对大量DNA损伤的自杀性应答反应模式图解

如上图总结的,大量DNA损伤对多聚(ADP-核糖)聚合酶的激活实际上是一种自杀性反应。由于它能引起NAD和ATP的迅速消耗,从而在DNA损伤修复前导致细胞死亡。这种自杀机理限制着严重受损细胞试图修复以

高度突变频率存活的可能性。DNA损伤对多聚(ADP-核糖)聚合酶的激活可能提供一个安全机制,依赖这个安全机制,将严重损伤细胞去除,从而减少活存细胞具有高度突变表现型的可能。
〔周度金节译 张进 麦智广审校〕

由DNA结合 ^3H 产生的细胞核内吸收剂量的估算

Saito M et al, Health Phys 48(4): 465,1985(英文)

评价 ^3H 掺入哺乳动物(含人)细胞内的遗传和躯体效应的主要方法之一是估计经胎盘或经口掺入到胚胎或幼动物细胞内的 ^3H 所产生的生物学危害程度。无论是细胞增殖活动强的胚胎或幼动物还是断奶之后细胞增殖已显著减慢的年青动物,掺入到器官或组织中的 ^3H 都有很强的滞留,而且由于DNA结合 ^3H ,使 ^3H 的滞留具有器官特异性,因而累积剂量也具有高度的器官特异性。

欲知DNA结合 ^3H 的剂量效应关系,需测定由DNA结合 ^3H 在细胞内沉积所产生的核内吸收剂量。假定 ^3H β 射线的能量全部被细胞核所吸收,吸收剂量则易于计算,而实际上,由于 ^3H β 射线的平均射程(0.8~1.0 μ)短于细胞直径(5~10 μ),使相当一部分能量逸出细胞核,损失在细胞浆中,这种效应叫“边缘效应(edge effect)”。

本研究目的在于估计由于边缘效应使剂量降低的程度、测定吸收剂量和考虑累积剂量的修正因子,如细胞核的形状、容积、DNA含量和DNA的比活性。

材料与方法

让母鼠在孕期摄入含 ^3H -胸腺嘧啶的饮水(188.5kBq/ml),分娩后,新生鼠由未摄入 ^3H -胸腺嘧啶的“无放射性母鼠”喂养,同时在出生后第0、1、2和4周测定各器官内DNA的比活性。

细胞核的形状和容积测定;常规的组织固

定程序会使细胞脱水、核皱缩,难以测定核的准确容积。现采用经温和处理后获得的细胞核悬液,用DNA特异性荧光染料(DAPI)在等渗溶液中进行细胞染色,可获得完好的细胞核,然后在Nikon荧光显微镜下观察并拍摄细胞核照片,假定细胞核为球形,即可从照片上测得细胞的长轴和短轴的长度,将二个轴的平均值作为核的平均直径,从而计算出容积。

细胞核平均DNA含量测定:用荧光计测定各器官的DNA含量,首先要获得纯化的各器官的细胞核悬液,然后用Schneider法测定单细胞核悬液中的DNA总量,用血球计数器在荧光显微镜下计数被DAPI染色的细胞核总数,从而获得各器官细胞核的平均DNA含量。

剂量计算:每次衰变产生的平均吸收剂量用点源公式计算,模拟细胞核的剂量率用蒙特-卡罗法作理论计算并从二点讨论:1.对DNA结合 ^3H ,分析累积剂量对细胞核直径的依赖性;2.对长短轴之比各不相同的细胞核,通过计算理论吸收剂量来估计形状因子对吸收剂量的影响程度。

在给定时间内,每个核内的总衰变数等于核内DNA含量乘DNA比活性的积分,因此,从 t_1 到 t_2 时间内的累积剂量 D_c 可由下式计算:

$$D_c = \int_{t_1}^{t_2} D'(t) dt$$

式中 $D'(t)$ 是 t 时刻的剂量率,如 t 取 t_1 、 t_2 、 t_3 …… t_n ,相应地 $D'(t)$ 为 $D'(t_1)$ 、 $D'(t_2)$ 、 $D'(t_3)$ …… $D'(t_n)$,从而可用下式近似地计