

- 203, 1985.
12. Hunt VR et al: Int J Radiat Biol 7:277, 1962.
13. Rajewsky B et al: Health Phys 11:161, 1965.
14. Keane AT et al: Health Phys 44 Suppl 1:81, 1983.
15. ICRP Publication No 23, p312, 1975.
16. Schlenker RA et al: Health Phys 42: 671, 1982.
17. NCRP Report, No 45, p93, 1975.
18. Watson AP et al: Nucl Saf 25:815, 1984.
19. Whicker FW et al: "Radioecology: Nuclear Energy and the Environment" Vol 1 CRC Press Inc, Florida, USA, 1982.
20. UNSCEAR Report, Ionizing Radiation: Sources and Biological Effects, Suppl B, 1982.
21. Thorne MC: Phys Med Biol 22:33, 1977.
22. Mays CW et al: Health Phys 48:635, 1985.

辐射所致的DNA碱基损伤和它的修复

——在癌变中的意义及血清学检测方法

中国预防医学科学院病毒学研究所 官宜彬综述

北京放射医学研究所 夏寿莹 审

一、碱基损伤和修复与细胞恶性转化的关系

DNA可被环境因素(包括物理及化学因素)所损伤,正常细胞的修复机能可将其修复。但当环境因素的数量异常增加,或细胞的修复机制有缺陷时,则可能在DNA复制模板上存留着一些致死性、致突性或致癌性损伤,影响了细胞的正常增殖和分化。

受X线照射过的哺乳类细胞,可出现两种类型的DNA损伤,一种是与细胞杀伤相关的损伤;另一种是与突变及致癌性恶性转化相关的损伤。目前认为X线诱导的致死性损伤与致癌性损伤的类型及其修复过程都不相同^[1]。例如:正常细胞经X线照射后都有一个潜在性致死损伤恢复期。在此期中,10T1/2小鼠胚胎成纤维细胞的存活曲线在恢复期最初3小时下降,以后维持在低的水平,而细胞转化率则在恢复期开始时就增加,3~4小时达高峰,然后下降。异常细胞,

如遗传性毛细血管扩张性运动失调患者的细胞,其缺陷是缺乏修复致死性损伤的过程,所以在体外对X线的杀伤作用极为敏感,而对致突变作用的敏感性却很低,说明此两类型的损伤和修复过程是不同的。又如遗传性视网膜胚细胞瘤患者,其缺陷是与修复致突变性和致转化性损伤相关,而与致死性损伤的修复无关,所以对X线杀伤作用的修复与正常人细胞无明显差别,而对致突变作用敏感。这种病人在临床X线治疗后,照射野中常发生肿瘤(间叶来源的)。

近些年来,一些学者根据化学致癌剂和辐射线都是致突剂,以及在最终导致细胞恶性转化的多阶段过程中,DNA损伤是起始事件的理论,建立了人类二倍体成纤维细胞突变率^[2~4]及转化率^[5~6]的定量分析方法,用以研究物理及化学因素诱发肿瘤的机制。学者们大都采用修复机制完整的正常人细胞与修复机制有缺陷的细胞,比较其切除由紫外线(UV)或化学致癌剂所引起的致死性、

致突性、致转化性碱基损伤的能力,以研究DNA损伤及修复在致突及转化过程中的作用^[1,7~10]。其依据是:如果DNA是靶子且碱基损伤是关键的话,则无修复能力,或修复缓慢的细胞将是恶性转化高危险性细胞。切除修复功能有缺陷的遗传性着色性干皮病人细胞对UV异常敏感,要达到相同程度的杀伤、致突和转化率时,正常成纤维细胞需要照射比它高8~10倍的剂量。正常细胞修复损伤需要一定的时间,例如细胞接触致癌因素的时间越靠近S期,突变率就越高,远离S期突变率就低^[8,10],说明正常细胞的致突率与S期前面这段时间的长度呈负相关,这是因为容许进行修复的时间越短,则存留在DNA模板上的损伤就越多之故。遗传性着色性干皮病细胞缺乏修复能力,所以这段时间的长短对突变率无影响。因此,McCormick^[12]认为正常细胞照后出现的突变和转化作用,是由于DNA在含有致突性或转化性损伤碱基的模板上进行半保留合成的结果,而不是由于细胞的切除修复过程错误所致,因正常细胞的切除修复过程本身是无错误的。

其它一些资料也说明碱基损伤和修复与致癌作用的关系。例如,某种鱼类甲状腺经UV照射后产生的胸腺嘧啶二聚体可引起肿瘤,由于修复功能切除了这种二聚体,则肿瘤率明显降低。4-NQO(4-Nitroquinoline-1-Oxide)加合物的切除与小鼠3T3细胞的恶性转化率降低直接相关。

综上所述,研究环境因素对DNA碱基的损伤,追踪其修复过程,对了解细胞恶性转化的机理具有重要意义。

在研究致癌工作中的观察指标,有采用突变率也有用转化率表示,这是由于突变与转化的关系密切,两者具有一些共同点:(1)有表达期;(2)与诱变剂量呈正相关;(3)强致突剂通常也是强致癌原;(4)修复功能有缺陷的细胞,转化及致突两种百分数

都高;(5)取决于细胞周期。因此,McCormick^[12]相信在细胞的恶性转化过程中,可能包括一个以上的突变。

二、损伤碱基的血清学检测方法

建立损伤碱基的检测方法,对研究损伤修复的动态过程及其生物学意义是不可缺少的。化学分析技术存在许多困难,血清学方法不但可以克服这些困难,而且还具有其独特的优点。例如:高度特异性、敏感性;无需分离纯化就可鉴别密切相关的化合物;无需水解即可对低产额物质进行定量;血清学方法不取决于抗原的化学性质,因此可广泛地应用。

Liebeskind等(1974年)和Bases等(1976年)曾根据核苷抗体仅与单链但不与双链DNA起反应的特性,鉴定同步化及X线照射过的细胞群体及其核内单链区的长短。Seaman等(1972年)用放射免疫分析法研究UV损伤的修复。也有人用免疫组织化学染色法作胸腺嘧啶二聚体的细胞内定位^[13]及细胞原位检测^[14]等。还有其它方面的应用。本文以紫外线照射诱生的胸腺嘧啶二聚体及γ线引起的羟甲基脱氧尿嘧啶的血清学检测方法为实例,说明血清学方法在检测辐射损伤碱基的可行性。

(一)用血清学方法测定胸腺嘧啶二聚体

紫外线照射可使细胞发生各种损伤,在大剂量照射下,细胞DNA中两个相邻的嘧啶藉化学键以环丁烷形式结合起来形成二聚体,尤其是胸腺嘧啶更易形成。因此,紫外线照射后,几乎唯一形成胸腺嘧啶二聚体,且产额相当高,这有利于用血清学方法进行测定。二聚体形成的后果就是碱基失活和突变,阻断了DNA的复制,这也是紫外线之所以能杀菌和致突的原因。着色性干皮病患者细胞切除修复损伤碱基的功能有缺陷,患者皮肤对阳光过敏,多数病人在照射区发生癌前的皮肤光化角化症,随后发生不同细胞

来源的肿瘤。曾通过测定DNA上二聚体数量的方法、研究细胞进行光反应修复或切除修复的能力。

已报道的测定方法有：放射免疫分析法^[15,16]，微量酶联免疫吸附法(ELISA)^[17]，亲和素-生物素复合物酶联免疫吸附法(ABC-ELISA)^[18]以及原位免疫学方法(包括放射自显影及免疫荧光法)^[13]。

Leipold等^[17]介绍用微量ELISA法检测胸腺嘧啶二聚体，其原理与放射免疫法的竞争抑制相仿，其不同处是将标准抗原预先固相化于微量反应板孔中，并以酶标第二抗体代替同位素标记的标准抗原，避免了同位素法中存在的麻烦。实验结果表明，UV照射过的ds DNA和ssDNA两者的竞争曲线坡度相似，说明抗体能识别它们的共同抗原决定簇。但未照射的ds DNA和ssDNA，以及照射或未照射的小牛肝RNA都无竞争抑制作用。用 $1 \sim 10^5 \text{ J/m}^2$ 范围内各种剂量UV照射，结果表明其抑制作用与剂量的对数是直线关系。此法可测出的DNA损伤程度相当小，如1 ng的经高剂量照射过的DNA，或8 μg 经 2.5 J/m^2 如此低剂量照射过的DNA损伤量。说明此微量ELISA法在追踪观察组织损伤及修复方面是一种有用的工具。该作者还采用ABC加ELISA来测定^[18]，其敏感性比单独ELISA法高8倍。例如，用 50 J/m^2 的剂量照射，ABC-ELISA法可记录到50%的抑制，而单独ELISA法要达到同一水平的竞争抑制，则需用 400 J/m^2 的剂量进行照射。

Cornelisi曾报道用原位免疫学方法测定胸腺嘧啶二聚体^[13]。将特异性抗体与照射过的细胞核相结合，当抗体用放射性同位素标记者，可用放射自显影法观察，若用荧光素标记者，则用荧光显微镜观察。也可采用免疫酶标法检查细胞核或染色体中的二聚体，它优于荧光法，用普通显微镜即可观察，颜色也不易消退。用荧光素标记第二抗体的

方法，可测出的损伤水平是 10 J/m^2 的剂量。但用荧光法作定量比较困难。用放射自显影法可测出 2 J/m^2 的剂量照射所引起的损伤。假定每一个基因组中有 6×10^9 个碱基对，且每 10 J/m^2 的照射产生0.04%二聚体，则可算出每一基因组中可形成 $10^4 \sim 10^5$ 个二聚体。小寡核苷酸(含二个或三个碱基)中的二聚体，或二个胸腺嘧啶碱基之间所形成的二聚体与抗血清的结合效果较差，甚至一点也不结合。单链DNA中的二聚体似乎比天然DNA中的更易与抗体接触。制备物中的DNA不论是单链的还是天然形式的，都不会影响实验结果。

(二)用血清学方法测定羟甲基脱氧尿苷

Myer等(1965年)已确证5-羟甲基尿嘧啶(5-Hydroxymethyluracil, HMU)是胸腺嘧啶的辐射产物。几年前，Lewis等^[19]曾以5-羟甲基尿嘧啶核苷(5-Hydroxymethyluridine, HMUrd)与牛血清白蛋白共价结合作为免疫原，制备了特异性抗血清，并采用噬菌体中和分析法，建立了胸腺嘧啶核苷的辐射产物——5-羟甲基脱氧尿嘧啶核苷(5-Hydroxymethyldeoxyuridine, HMdUrd)的血清学测定及定量方法，表明此法是高度敏感和特异的。噬菌体中和分析法的原理是：将标准抗原5-HMUrd共价结合于活的、完整的T₂噬菌体外壳蛋白上，当噬菌体上的5-HMU与特异性抗体作用时，抑制了琼脂层上噬菌斑的形成。样品中的抗原可与噬菌体上的相同抗原竞争与抗体的结合，从抑制噬菌斑形成的数量可反映出样品中的抗原量。观察终点是噬菌斑计数，简单易行。此法在存在8 mM胸苷的条件下，可测出 $3 \mu\text{mole}$ 的5-HMUrd。假定HMUrd和HMdUrd与抗体反应的G值都是0.05，则可估算出经 γ 线照射过的胸苷及DNA中所形成的5-HMdUrd数量。假定抗体与DNA上HMU半分子的反应与单核苷酸者相同，则可推算出方法的可测水平是每 3×10^8 道尔顿

DNA中1个核苷酸的量。

氢过氧化甲基尿嘧啶 (Hydroperoxy-methyluracil, HPMU) 是一种很相关的形式,也是由辐射产生。虽然在半抗原抑制分析试验中,它不稳定,而且不能测定它原来的形式,但若是将它转变成成为胸腺嘧啶辐射产物总产率中的一部份,就可进行测定。其法是在高pH时加热,或用亚铁阳离子氧化,使HPMU转变成HMU。照射过的胸苷在pH 9时加热,其产物可增加三倍,G值从0.05增至0.15。加热使不稳定性产物转变成成为能与抗体反应的产物,从而增加了与抗体的反应数值。这说明此种抗体能识别HPMU与HMU。此外,应说明的是5-HM-dUrd单独加热并不增加产额,G值不变,表明照射过的DNA样品,在测定前需要进行的热变性过程,并不会影响羟甲基产物的数量。

(三)其它形式的DNA损伤

致突变剂和致癌剂常诱发的其它类型碱基改变,如烷基取代、直接结合或以活化形式与DNA结合等。为了研究这些损伤碱基的命运,也可以应用识别这些结构的特异性抗体来测定。有些致突变剂对DNA的影响超过一种碱基以上,甚至改变了某特定碱基上的不同原子,在这种情况下不推荐直接用致突变剂处理过的DNA来免疫动物制备抗体,但可用明确已改变的核苷作为免疫原。至今,已制备出识别各种正常核苷的抗体和异常核苷的抗体。例如, Goth (1974年) 已证明用乙基亚硝基脲 (ethylnitrosourea, EN-U) 处理DNA可诱生O⁶-乙基鸟苷 (O⁶-ethylguanosine), 这种损伤的碱基在神经组织中不易修复,并且能形成特异性肿瘤。Hazel等^[20]用此种O⁶-乙基鸟苷制备了具有高度特异性的抗体,与鸟苷 (N⁷-乙基鸟苷或1-甲基鸟苷) 无交叉反应。进行半抗原抑制分析表明,此法有可能用作致癌剂的鉴定。最近, Umbenhauer 等^[21]在放射免疫分

析法中,应用特异性单克隆抗体,测定了食管癌组织中由亚硝胺致癌剂所改变的碱基,当用3mgDNA样品作分析时,可测出的O⁶-乙基脱氧鸟苷 (O⁶-ethyldeoxyguanosine) 加合物浓度为每mgDNA12.5fmol, O⁶-甲基脱氧鸟苷 (O⁶-methyldeoxyguanosine) 加合物为25fmol,后者与亚硝胺致癌作用的启动过程相关。

近些年来,有学者建立了一种超敏感性酶标放射免疫分析法,认为其敏感性比放射免疫分析法高100~1000倍。Hsu等^[22]用此法测定了与DNA共价结合的化学致癌剂,少至3fmol的乙酰基氨基苄-DNA加合物 (AAF-DNA), 10fmol的苯并芘-DNA加合物 [B(α)p-DNA]^[23],用几微克的DNA样品就可以测定出来,可见其敏感性是相当高的。

三、结 语

自从1978年国际分子生物学和细胞生物学DNA修复机制专题讨论会以来,有关DNA损伤及修复的研究工作已涉及多个生物学领域。在肿瘤发生机理的研究工作中更具重要地位和前景。建立及选用特异性强、灵敏性高的DNA损伤检测方法是研究工作中的关键。血清学方法在其它生物学领域中已展示出它的独特优点,也已开始应用于DNA损伤检测。可望在不久的将来在放射生物学领域中将成为普遍使用的常规实验手段。

参 考 文 献

1. Little J B, DNA Repair Mechanisms p701, Philip C, Hanawalt et al (eds), Academic Press, New York, San Francisco, London, 1978.
2. Maher V M, McCormick J J, Biology of Radiation Carcinogenesis, J. M. Yuhas et al (eds), p129, Raven Press, New York, 1976.

3. Maher V M et al: Mutant Res 43: 117, 1977.
4. Maher V M et al: Mutant Res 62: 311, 1979.
5. McCormick J J et al: Proc Am Assoc Cancer Res 21: 122, 1981.
6. Silinskas KC et al: Cancer Res 41: 1620, 1981.
7. Maher VM et al: Proc Natl Acad Sci USA, 79: 2613, 1982.
8. Konze-Thomas B et al: Mutant Res 94: 421, 1982.
9. Kouze-Thomas B et al: Biophys J 28: 315, 1979.
10. Heflich R H et al: Chem Biol Interact, 29: 43, 1980.
11. Yang L L et al: Mutant Res 94: 435, 1982.
12. McCormick J J, Maher V M: Human Carcinogenesis, Harris C C and Autrup H N (eds), p401, Academic Press, New York, London 1983.
13. Cornelis J J et al: Photochem Photobiol, 26: 26; 241, 1977.
14. Cornelis J J, Maurice Errera: DNA Repair, A Laboratory Manual of Research Procedures, Vol. 1, Part A, p31, Friedberg E. C, Hanawalt P. C. (eds), Marcel Dekker, Inc. New York and Basel,
15. Mitchell D L, Clarkson J M: Biochem Biophys Acta 655: 54, 1981.
16. Strickland P T, Boyle J M: J Immunol Methods 41: 115, 1981.
17. Leipold B et al: J Immunol Methods 60: 69, 1983.
18. Leipold B, Remy W: J Immunol Methods 66: 227, 1984.
19. Lewis HL et al: Rad Res 75:305,1978.
20. Hazel L et al: DNA Repair Mechanisms, p35, Philip C. Hanawalt et al (eds), Academic Press, New York, San Francisco, London, 1978.
21. Umbenhauer D et al: Int J Cancer 36: 661, 1985.
22. Hsu I C et al: Carcinogenesis 1:455, 1980.
23. Hsu I C et al: Cancer Res 41: 1091, 1981.

食品放射性核素污染推荐限量专家讨论会介绍

中国医学科学院放射医学研究所 姜会侠

1986年12月1日～5日，联合国粮农组织(FAO)在罗马召开了有关食品放射性核素污染推荐限量的专家讨论会。与会专家11人，FAO顾问2人，秘书组4人，共17人。这次会议是在苏联切尔诺贝利核电站事故之后，不少国家及国际食品贸易受到干扰的情况下，应FAO成员国的请求召开的。与会专家不代表任何政府或组织机构，按照他们自己的专业知识和能力，就下述议题进行了认真讨论，最后形成并通过一份报告初稿。讨论的主要议题是：1.核事故释放

到环境中的放射性对人类的危害；2.切尔诺贝利核事故后，各个国家采取的措施及其对各国、国际食品贸易的影响；3.用于核事故情况下国际贸易食品放射性核素污染的限制量。

会议选举了加拿大的S.W.Gunner为主席，中国的姜会侠为副主席，英国的F.P.W.Winteringham被指定为报告起草者。FAO的食品政策及营养部主任P.Lunven博士首先致开幕词，Lunven博士指出，苏联切尔诺贝利核事故是人类的一大悲