

的RK和RP系列化合物,其中RK-28在1 m mol/L浓度时对HelaS₃细胞的ER=1.56 (MISO为1.40),对V-79细胞的ER=1.84 (MISO为1.7),RP026在1m mol/L时对EMT-6细胞的ER=1.40。我国学者介绍的

CMD、764-1、764-3、含吡啶和吡咯环的双环化合物等也引起代表们广泛的兴趣。此外,在辐射增敏研究方法学上也有新的进展,如Gray实验室介绍的荧光熄灭测定方法,对分子水平的研究有很大促进。

DNA辐射损伤和修复基因研究的一些进展

第八届国际辐射研究大会中国代表 曾思华

在第八届国际辐射研究大会上,与DNA辐射研究直接有关的报告和论文有200余篇。这些论文反映近几年该研究领域的新成就和今后发展的新动向。值得注意的是,DNA序列分析、基因克隆和DNA重组技术等分子生物学研究方法已广泛应用于辐射研究。与四年前相比,由于这些新技术的引进,对真核细胞DNA原初辐射损伤的阐明和修复基因的研究已取得了一些进展,并突破传统的研究方式进入新的阶段。下面仅就笔者所了解的一些情况从两方面作一简单的介绍。

一、DNA分子的损伤及其修复

DNA分子损伤及其修复是分子放射生物学的重要研究课题之一,研究十分活跃。大会的报告有Elkind的放射生物学中靶理论、非线性关系、修复与错误修复;Schulte-Frohlinde的DNA链断裂和生物学效应;Ward的细胞死亡的辐射化学机制和Lett的细胞修复、DNA修复和细胞存活。有关DNA修复的各种途径如切除修复、复制后修复和SOS修复等内容在大会上都有所报道。这里仅就分子生物学技术在辐射研究中的应用和取得的某些进展作一介绍,以期对我们的工作有所启发。这些技术包括DNA序列分析,DNA限制性内切酶图谱,酶探针,单克隆

抗体技术和计算机模型的应用。

DNA是公认的射线作用的靶分子。多年来的研究表明,无论是射线的直接作用或间接作用,都能使DNA大分子的结构发生改变,造成DNA分子的单链、双链断裂及碱基损伤。就辐射敏感性而言,嘧啶碱基一般比嘌呤碱基敏感。对于链断裂的位置,一般认为是随机的。法国Gremoble核研究中心的Duplax等人介绍,用高分辨率的序列凝胶电泳观察到链断裂的分布是不随机的。他们用 γ 线照射³²P标志的 $\phi \times 174$ 单链DNA,照后进一步用六氢吡啶处理,所得到的片段进行电泳分析表明,链断裂的位置分布是不随机的。当用低剂量的 γ 线照射,碱不稳定损伤优先发生在鸟嘌呤碱基,在高剂量时则发生在胸腺嘧啶,双链DNA也得到类似的结果。James等用四氧化钨定量氧化得到胸腺嘧啶乙二醇,电泳分析表明,损伤位置在5'末端,并建立了DNA胸苷乙二醇计算机模型。

染色质中DNA的分子量高达 $10^{10} \sim 10^{11}$ 道尔顿,含有 $10^7 \sim 10^8$ 碱基对。对于这样大的分子,目前的技术水平还不能对整个分子进行序列分析,一些实验室用内切酶切取其中一片段进行研究。有人曾对从猴于CV-1细胞所得到的172bp的片段进行辐射研究,

这次大会上未见类似报告¹。但 Temple 大学的 Patricia 等人从 T₄ 感染的大肠杆菌或 M. Luteus 纯化得到的一种内切酶 V，与人的 DNA 作用获得 92bp 的片段。经序列电泳分析发现，紫外光照射后生成一种新的光产物，可能是一种嘌呤的二聚体，产生这种光产物的最佳波长为 265~300nm。进一步观察，发现切除这种光产物的酶不同于切除嘧啶二聚体的糖苷酶。

限制性内切酶图谱分析也是一个极为有用的手段。序列分析已证明，大肠杆菌 *endonuclease* 所切位点在胞嘧啶。而 Brenie 等人从人的淋巴细胞纯化得到的 UV 内切酶，在 DNA 分子中识别和切割的位点是非嘧啶二聚体，通过酶切图谱的分析发现产生了新的胞嘧啶光产物，它不能被上述的 UV 内切酶识别，产生这种光产物的最佳照射波长为 270~295nm。

Mori 等人用单克隆抗体技术直接测定 UV 的损伤。所使用的抗体不能结合 313nm UV 光照的 DNA，却能结合 254nm 光照的 DNA，根据这一特点，测定 6~4' 嘧啶产物。

有关 DNA 结构的研究在这次大会上也有所反映。Trumbore 等人用紫外差光谱分析含有不同金属离子的小牛胸腺 DNA 溶液，照射低剂量的 γ 线，其 UV 差光谱类似于嘌呤的变化，反映 DNA 分子从 B 型向 Z 型构象变化。金属离子作用大小是 $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+} \gg \text{Mg}^{2+} \gg \text{Na}^+$ 。加州大学伯克利分校和劳伦斯实验室的科学家装配了三维模型，第一次证实了紫外线辐射可引起活细胞中 DNA 结构损伤，并证明在单独受紫外线辐射或同时接触补骨脂素之后，DNA 双股螺旋链的分子构象发生变化。新的三维模型表明，紫外线照射和补骨脂素引起的双股螺旋链的结构改变可显示出修复酶的识别部分。

一般来说，在哺乳动物细胞中， γ 线引起的 DNA 双链断裂 (DSB) 约是 DNA 单链

断裂 (SSB) 的 $1/15 \sim 1/20$ 。Ward 等人的研究指出，DSB 的致死效应与 DSB 的产率和性质有关。其根据 (1) 辐射诱导的 DSB 产率越高，V79 细胞的死亡率越大，(2) 核酸酶诱导的 DSB 对细胞的致死无效，并且链断裂的存在不影响细胞的辐射敏感性。日本的 Sakai 将辐射诱导的 DNA 的链断裂分为三类：(1) 快修复 (FRBs, $T_{1/2} = 3 \sim 5 \text{ min}$)，(2) 慢修复 (SRBs, $T_{1/2} = 60 \sim 70 \text{ min}$)，(3) 不修复的断裂 (NRBs)，后者在诱导细胞死亡中起主要作用。

英国 MRC 放射生物学实验室 Debenham 等人利用 DNA 转化和 DNA 重组技术探测 DNA 双链断裂修复，发现在 AT 细胞中 DNA 错误修复频率增加，对作用于拓扑酶 II 的试剂的敏感性增强。美国 Los Alamos 国家实验室的研究人员认为，在正常人纤维细胞中，X 线诱导的染色体断裂的重接，服从一级动力学， $T_{1/2} = 1.7 \text{ h}$ 。染色体的断裂是潜在性致死损伤和亚致死损伤，前者不能重接。

以上的研究对于了解各种损伤的生物学意义、细胞死亡机理也是十分重要的。

二、基因突变和修复基因的研究

基因突变的研究也是本次大会比较引人注目领域之一。值得注意的是，细胞癌变与基因突变有关，辐射可诱导基因突变。从会议的报告来看，各实验室高度重视辐射致突问题，开展了大量的致突分子机理研究。基因是在染色体上只有一定位置的遗传单位，系由一段特定序列的脱氧核糖核酸所组成，担负着将亲代的性状传给子代的任务，一段以表达某种蛋白质全部氨基酸组成的 DNA 核苷酸序列即称为一个基因，一个基因有时在化学结构上发生变化或基因与基因间的排列上可能有所改变叫做基因突变。目前的研究侧重对突变分子的分析、辐射引起的基因损伤及基因突变机理等方面。主要采

用已克隆化的哺乳动物基因如hprt, aprt以及整合到哺乳动物细胞中的细菌基因如gpt。

电离辐射是一种有效的致癌因素, 它可以在不同的部位产生不同种类的肿瘤, 在转化过程中, 突变是一个重要的阶段。Diamond等人使用RF/J和C57B¹/₆小鼠, γ 线和NMU诱导肿瘤的发生率均是100%, 经寡核苷酸配对分析, 发现被活化的Kras基因与原初克隆的基因有相似的突变作用。诱导T-细胞产生淋巴瘤, γ 线是46%, NMU是70%。还有报告认为Ha-ras基因是突变的直接靶, ras的活化可能是皮肤肿瘤形成的最初阶段。Sarasin介绍了用微小病毒SV40快速分析猴子细胞突变的新方法。

加拿大Glickman改进了一种CHO细胞aprt基因序列分析方法, 结果表明, 11个辐射诱导的突变株中, 有3个G:C向A:T转化, 并发现只有5个突变株有小的缺失(1~3bp), 电离辐射诱导的碱基取代和移码突变的频率分别是 2.7×10^{-8} 和 1.4×10^{-9} /Gy。Grossovsky等人研究辐射诱导的中国仓鼠细胞aprt的突变性质, 指出84%为点突变。Lindhahl等人发现来自不同的Bloom氏综合征的病人, 5个细胞株都缺乏连接酶I(在复制中起主要作用的连接酶), 其原因是由于DNA连接酶I结构基因发生突变。

美国Illinois大学生物系一研究组通过原核细胞和真核细胞的试验表明, 他们用紫外光诱导的主要光产物可能比(5~6)环己烷二聚体更有突变作用, 并成功地引进了光解酶基因(phr)到CHO UV-5细胞中。Los Alamos实验室Chen等人将人类辐射基因的克隆用于DSb的重接研究。高分子量DNA用Sau 3A内切酶降解产生平均分子量20~40kb, 并连接到psv2-gpt DNA转移到CHO xrs-6突变细胞, 突变频率是人正常细胞的500~1000倍。

上述研究有助于对基因损伤的了解及如何控制基因突变提供新的认识。

DNA修复基因的研究是DNA辐射研究中比较引人注意的一个专题。恶性病变和遗传病致病的分子基础最根本原因是基因突变, 最理想的只能在基因水平进行修复, 随着分子遗传学基因定位和生物工程技术进展, 一些放射生物学实验室先后开展了人和哺乳动物DNA修复基因、基因产物以及利用克隆新技术提取纯修复酶的工作。对于真核基因的调控研究, 目前正处在蓬勃兴起的阶段。目前所采用的主要方法是DNA介导的基因转移, 转入的DNA既可以是克隆基因也可以是克隆的基因组, DNA转入的细胞主要有着色性干皮病(XP)细胞, 毛细血管扩张共济失调症(AT)细胞, Bloom氏综合征细胞以及CHO突变株, 以后者成功率较高。其方法即把纯化的外源DNA引入受体细胞, 并使外源DNA所包含的基因在细胞内表达。这些工作包括克隆新的基因和寻找特定的修复基因, 原核基因在哺乳动物细胞内的表达以及利用骨髓转移基因。

1984年, Westorveld首先克隆出了第一个哺乳动物的与UV切除修复有关的修复基因ERCC-I。这次大会上, 该实验室的Bootsma继续报道了他们最近的研究结果, 通过DNA序列分析观察到哺乳动物、酵母、大肠杆菌的ERCC-I的修复基因具有同源性。小鼠和人的ERCC-I基因有85%氨基酸相似, 就象在突变分析中指出的在DNA修复功能方面, ERCC-IN端部分不是很重要的。

Las Alamos实验室Strniste等人克隆了人类DNA切除修复基因, 转入的细胞是CHOUV135。DNA用Sau 3A限制性内切酶降解, 再联结PSV2 gpt, 然后用CaPO₄-DNA介导转移。分别用Southern blots和Northern blots分析人DNA和信使RNA, 研究修复基因的功能和规律。

用人的缺陷性细胞株寻找选择性修复基因的工作, 不少实验室在努力进行, 但成功

的例子不多。斯坦福大学的Charles等人发展了一个与DNA修复功能有关的特殊序列的分析方法,观察到人的细胞能迅速地从DHFR基因上去除二聚体,这种选择性修复在XP的细胞中没有观察到。他们正在研究这些细胞中不同活性状态的人类基因的选择性修复。

DNA修复是一种简单的酶切除过程和DNA小的损伤片段的再合成,已证明不如预先想象的那样复杂。美国加州大学Cleaver等人已证实至少有9个基因突变能导致失去切除UV损伤的修复能力,并在临床XP病人中被识别出来,其中一些基因在多数数的Cockayne综合征、毛细血管扩张共济失调征和Fanconi氏病人中被识别出来,

而仓鼠突变株的研究指出,至少有6个基因与UV损伤修复有关。其中一个染色体19,并已被克隆到人的细胞,但没有表达出来。

活性氧具有细胞毒性,去除氧毒的基因分为三类:(1)消除活性氧如SodA, SodB, KatE, KatF和KadG;(2)与DNA修复有关的基因有polA, recA, recB及xth;(3)由氧和H₂O₂诱导的基因,其性质没有确定。紫外辐射诱导的DSB和SSB的复制后修复与recA有关。

显然,这类研究的深入,将为DNA修复,遗传病和肿瘤的防治,以及未来的基因治疗提供新思路、新技术和新方法。

辐射化学研究的概况

第八届国际辐射研究大会中国代表 陈小毛 林念芸

第八届国际辐射研究大会涉及面很广泛,其辐射化学部分几乎复盖了辐射化学研究的每一个领域。下面按辐射生物化学、辐射化学基础研究、辐射化学的工业应用及其它、辐射化学的新趋势等四个部分,扼要介绍其内容。

一、辐射生物化学

辐射生物化学一直是辐射化学中的一个活跃分支,第八届ICRR会议也明显地反映了这点。在此主要介绍辐射诱发DNA损伤, DNA和核苷化学变化机理,以及氧、硫醇基在蛋白质和肽的辐射效应中的作用等方面的研究工作。

Chatterjee A等(美国)用计算机模拟方法从理论上研究了·OH自由基对DNA分子的初级结构和二级结构的损伤机理,发现二级结构(组蛋白)受·OH自由基的损伤较线性DNA有保护效应。Baverstock KF和Will S(英国)报道了细胞中DNA辐

射断链主要由直接效应引起的实验事实,从而对辐射诱发细胞中DNA断链究竟是由于水辐解产物的间接作用于DNA,还是由于DNA直接辐解而引起的提供了实验依据。Paul CR等(美国)研究了DNA模式化合物的辐射化学。Holley WR等(美国)用Monte-Carlo方法与简单电子径迹模型协同,从理论上研究了荷电粒子直接作用诱发的DNA断链。林念芸等(中国)用计算机辅助ESR方法和分子轨道计算方法,研究了芥子酸和芥子碱分别与DNA形成的混合物中辐射引起的长程电子转移的定量结果及其保护效应。

Rahn RO(美国)研究碘代胞嘧啶和碘代腺嘧啶经紫外线照射后的自由基反应,以更多地了解卤代嘧啶的辐射敏化机制。Decarroz C等(法国)对直接作用产生的阳离子和羟基间接机制引起的2'-脱氧胞苷辐解产物进行了比较。Hildenbrand K和Frohlinde DS(西德)用ESR法比较了几