

辐射所致DNA损伤与修复的免疫学检测方法

北京放射医学研究所 吕 星 综述 夏寿莹 孟祥顺*审

提 要: 免疫学方法经诸多研究者努力, 现已发展成为检测辐射所致 DNA 损伤与修复的主要方法之一, 并在实际应用中显示出特异性强、敏感性高、样品用量低等显著优点。本文结合基本原理与应用实例介绍了这一方面的研究概况。

一、引言

DNA是生物细胞中易受辐射损伤的敏感分子, 或称靶分子。 γ 射线、X射线、紫外线等辐射因子对DNA结构造成的任何改变, 都可能导致细胞的突变, 癌变, 以至死亡。因此, 长期以来, DNA损伤与修复的检测一直是放射生物学及肿瘤病因学研究的重要课题。由于各种辐射因子所致DNA分子损伤的结构变化及其修复过程异常复杂, 对于隐蔽较深或含量极低的损伤, 许多理化检测方法, 如密度梯度离心、膜过滤、高压液相层析、琼脂糖电泳、内切酶解等, 常受敏感性所限而不能达到满意的检出效果。近年来, 以特异性强、敏感性高为显著优点的免疫学方法日益受到广泛重视与采用, 渐已成为检测DNA损伤与修复的主要方法之一^[1~3]。本文将结合应用实例就此方面的研究概况作一扼要综述。

二、基本原理

1. 免疫抗原的制备: 为在实验动物体内诱导出结合核酸与碱基的特异抗体, 早期研究总结了两条核酸抗原的制备原则^[4]。一是无论DNA片断或单核苷酸都必须与载体蛋白连接后进行免疫, “抗原”中的核酸成分实质上是半抗原; 二是若采用天然来源的DNA, 则必须经变性处理为单链形式。天然DNA的变性处理通常采用高碱溶解和加热

法, 而载体蛋白及其连接方法则有多种。由于带正电荷的甲基化牛血清白蛋白(MBSA)可降低DNA分子的电负性而增强其免疫原性, 因而是应用最早也是最多的抗原载体。其他如鸡 γ -球蛋白, 以及某些海洋软体动物的血蓝蛋白等也都具有良好的免疫效果。Muller和Rajewsky曾详尽介绍了核苷酸或核苷与载体蛋白连接的各种方法^[5]。因上述原则亦都适用于制备辐射所致DNA损伤的各种抗原, 故本文在讨论中, 仅对其中的核酸结构变化加以说明。

如何依据损伤DNA的结构改变制备出相应的抗原, 是获得特异性抗体的关键。对于损伤类型单一、结构改变明确的碱基, 通常采用的方法是以作用专一的致伤因子对抗原进行预处理, 使其产生一定的损伤变化。例如, 紫外线照射可特效地使DNA产生胸腺嘧啶二聚体(thymidine dimer, TD)。因此, 可用紫外线照射后的DNA进行免疫, 以获得识别TD的抗血清或单克隆抗体^[6~10]; 胸腺嘧啶乙二醇(thymidine glycol, TG)是DNA受电离辐射后的碱基氧化产物, 四氧化锇(OsO_4)可专一地氧化胸腺嘧啶形成TG, 故经其处理的DNA可诱导出结合TG的特异抗体^[11~13]。预处理的抗原可以是天然来源的DNA、寡聚核苷酸片断或单核苷酸。此外, 也有某些特定结构的损伤碱基是采用化学方法直接合成的, 如5-羟甲基脱氧尿嘧啶(5-HMUdR)^[14]、8-羟基腺嘌呤(8-

hydroxyadenine)^[15]等。

对于随机发生的损伤,例如链断裂,如仅从结构改变的特点出发,则不可能制备出相应的抗原与抗体,但可从其他角度寻找检测途径。Ahnstrom的早期研究表明:哺乳动物细胞中的双链DNA在碱性条件下解旋为单链形式的变化量,除与作用时间相关外,可因辐射产生的链断裂损伤而明显增加^[16]。根据这一原理, van der Schans等人^[17]用特异识别单链DNA的单克隆抗体(免疫抗原是以苯并芘处理的小牛胸腺DNA),对多种培养细胞及照射后小鼠体内白细胞和骨髓细胞的DNA链断裂损伤与修复进行了检测。实验表明,尽管抗体并不识别链断裂的部位,但抗体与单链DNA结合量的增减变化,可以反映出细胞DNA受辐射损伤及修复时单链结构的消长过程,从而间接地证实链断裂的存在与消失。

2. 抗体特异性的影响因素:抗体的特异性直接影响到样品检测的敏感性与精确性。而不同类型的免疫抗原,适当的处理条件以及抗体的筛选方法(主要指单克隆抗体)

等,又是影响抗体特异性的重要因素。例如,天然来源的DNA经较大剂量的紫外线照射后,与TD形成的同时也会产生空间构象的改变,由此获得的抗血清则难以区别这两种并存的结构改变^[6, 7],即使是单克隆抗体也只是对含有TD的核苷酸片断有亲和性^[8]。显然,这种存在着双重特异性的抗体将会增加TD检测的非特异干扰。Klocker等人采用化学合成的TD单体进行免疫获得了特异性均一的抗血清^[9]。以后, Roza等人用脱氧四核苷酸(dGTTG)制备的单克隆抗体,也显示出识别TD的高度特异性^[10]。TG抗体也有类似情况,由天然DNA诱发的抗血清,会因含有对其他氧化碱基产生非特异结合的抗体成分而混淆TG检出的准确性^[12],而采用结构单一的poly-dT制备单克隆抗体,则可避免这种不足。据Leadon报道,经筛选而获得的均质单抗,不仅能结合游离TG,并可在损伤DNA链的正常碱基间隔中识别出TG^[13]。

3. 检测方法:放射免疫(RIA)、酶联免疫吸附(ELISA)、免疫荧光(IF)、免疫

表1 不同类型的DNA损伤及其免疫学检测方法

损伤类型	抗体类型	检测方法	敏感性
TD	多克隆	RIA	3.0~2.5J/m ² 或15 μ gTD ^[6,9]
	多克隆	ISB	0.5J/m ² ^[8]
	多克隆	ELISA	1J/m ² 或0.6TD/10 ⁸ 道尔顿DNA ^[7]
	单克隆	ELISA, IF	1.5J/m ² 或20fmol TD ^[10]
TG	多克隆	RIA	4fmol TG ^[11]
	多克隆	ELISA	10fmol TG ^[12]
	单克隆	ELISA	2fmol或2.5Gy ^[13]
链断裂	单克隆	ELISA	1Gy ^[17]
DNA-蛋白质交联	单克隆	ISB	2kJ/m ² ^[30]
Pyr(6-4)pyo	多克隆	RIA	2.5J/m ² ^[22]
	单克隆	ASPA*, ELISA	20J/m ² ^[21]
5-HMudR	多克隆	PNA*	4 \cdot 10 ⁻¹⁴ mol或10Gy ^[16]
补骨脂素加合物	单克隆	IF	9fmol/ μ gDNA ^[20]
特定基因片段	单克隆	ITA*	10J/m ² ^[8, 21]

*ASPA: 硫酸铵沉淀实验, NPA: 噬菌体中和实验, ITA: 抗体滴定实验

印迹(ISB)等经典免疫学方法均可用于DNA损伤与修复的检测。近年发展的免疫电泳,以及与免疫荧光相结合的负像显影技术用于DNA损伤的定位分析或单一细胞的检测,也已见诸报道^[18, 19]。

照射剂量和被检物浓度是评价检测方法敏感性的两项指标。可检测到引起DNA损伤的照射剂量越小、被检物浓度越低,说明检测方法越敏感。表1列举了不同类型的DNA损伤及其免疫学检测方法。

修复过程的检测通常与损伤对照进行。以细胞或组织受照后立即检出的损伤值为基数,抗体与损伤DNA结合量在一定时间内的逐渐减少或消失可以反映修复过程。但可检测到的修复过程所需要的照射剂量一般要高于以同样方法检测到的最小损伤剂量。例如,用ELISA法可检测到1Gy γ 射线在培养细胞中引起的DNA链断裂损伤,而检测修复过程所需要的照射剂量则为5Gy^[17]。

与蛋白质抗原检测有所不同的是,在涉及竞争原理的实验中,如RIA和竞争性ELISA等,对于采用单核苷酸或寡聚核苷酸片段制备的抗体,一般不用免疫抗原作竞争抗原,以避免因抗体对免疫抗原的亲合性高于待测样品而使检测结果产生误差。

三、应用举例

发现DNA损伤与修复的不均一性是近年研究取得的一项重要进展^[20]。已有一些实验表明,不同理化因子对DNA分子造成的不同类型的损伤,或发生在细胞基因组不同部位的相同类型的损伤,都可能在修复速率上表现出一定程度的差异。然而,如何验证和比较细胞DNA不同基因间或特定序列内的损伤及修复过程,却是检测方法所面临的新课题。为此,Leadon等用免疫学方法进行了有益的探索^[21, 22]。他们将受紫外线照射或苯并芘处理后的非洲绿猴细胞(含pSV2-gpt外源基因),在含有溴尿嘧啶(bromo-

uracil, BrUra)的培养基中进行一定时间的培养,以使BrUra掺入到细胞DNA的修补片块(repair patches)中,再将细胞溶解,尔后用抗BrUra的单克隆抗体进行沉淀,抗体沉淀下的DNA片断经电泳分离及探针杂交,即可分析出细胞DNA不同基因及特定序列的损伤修复过程。他们的实验结果表明,在外源基因整合部位形成的胸腺嘧啶二聚体或苯并芘加合物,其修复速率明显高于细胞基因组的平均水平,而在重复序列的 α -DNA区段,修复速率则与平均水平相当。

嘧啶(6-4)吡啶酮[pyrimidine (6-4) pyrimidone, pyr(6-4)pyo]是DNA受紫外线照射后形成的另一种损伤产物。由于pyr(6-4)pyo的形成量较低(与嘧啶二聚体之比过去测定为1:10),因而一直认为它对细胞突变致癌的影响不如嘧啶二聚体显得重要。近年来, Mitchell等人应用免疫学方法对pyr(6-4)pyo的紫外作用光谱及其修复过程进行了系统研究^[22],纠正了一些以往因检测方法灵敏度低而产生的不正确认识。例如,在269~303nm紫外波长范围,pyr(6-4)pyo与嘧啶二聚体的形成量基本相当;波长超过313nm以后,pyr(6-4)pyo的形成量才明显降低,与嘧啶二聚体之比大约在1:3~1:5^[23]。修复研究的结果表明,pyr(6-4)pyo的修复是细胞内发生较早、进行较快的一种修复,并会对嘧啶二聚体或其他损伤类型的修复过程产生影响^[24]。着色性干皮病(XP)患者的皮肤细胞由于缺乏嘧啶二聚体修复酶,受日光紫外线照射后容易癌变。Mitchell的实验证实,XP细胞也不能对pyr(6-4)pyo进行有效的修复^[25]。这些结果都说明pyr(6-4)pyo同样是一种易致癌变的重要损伤。

补骨脂素是一种核酸代谢抑制剂。临床上可用补骨脂素辅以长波紫外线(UVA)照射来治疗表皮增生性疾病,如牛皮癣、T淋巴瘤细胞型白血病的皮肤浸润期等^[26],但经过

治疗的患者皮肤癌的发病率却有显著提高。因此,补骨脂素的致癌机理日益受到重视与研究。体外实验表明,在UVA的作用下,补骨脂素可与嘧啶碱基形成各种类型的光化产物,并使DNA产生链间交联^[27]。杨晓燕等用抗甲氧基补骨脂素的单克隆抗体,结合免疫荧光法,在经补骨脂素和UVA处理的人细胞中,以及接受补骨脂素治疗的患者皮肤中,均证实有补骨脂素的光化产物,从而为补骨脂素导致DNA损伤及细胞癌变找到了直接证据^[28]。

在抗损伤DNA抗体的应用研究方面,特别值得一提的是,1988年,Schultz等人用化学合成的顺式胸腺嘧啶二聚体制备单克隆抗体,其中有几株抗体在结合TD的同时,尚显示出催化TD水解的酶活性^[29]。这项实验的成功引起了广泛关注,其意义已远不止于TD的检测。可以想象,对于研究生物体内TD修复酶的催化机制,以及旨在消除DNA损伤的各种治疗方法,本身具有酶活性的抗体既是一个难得的模型,也是一个极好的“药物”。

四、小结与展望

免疫学方法为DNA损伤与修复的检测开辟了新途径,尤其对隐蔽深、含量低的损伤类型,免疫学方法更显示出独到的优点。但应该指出,目前免疫学方法用于DNA损伤与修复的检测仍有一定的局限性。这首先在于必须明确损伤DNA的结构改变,才能制备出相应的抗原与抗体。由于一种抗体只针对一种损伤,对于结构尚未明确或当几种损伤类型并存时,免疫学方法还不能进行有效的检测。其次是,在体外物理或化学条件下制备的抗原与细胞内的DNA损伤是否完全一致,将直接影响抗体的特异性和检测结果的准确性,而这却是很难掌握和不易进行比较的。因此,为慎重起见,除在检测方法的设计上需采取不同于蛋白质抗原检测的相

应措施(如“检测方法”中所述)外,对实验结果中可能存在的偏差,亦应充分估计。此外,在DNA损伤的修复过程中,除切除等修复形式外,还包括了损伤结构的化学修饰,如果这种修饰导致了损伤结构的抗原性改变,那么抗体事实上是检测不到的。随着DNA损伤结构的不断阐明及其修复机制研究的日益深入,可以乐观地相信,免疫学检测方法将会有进一步的发展与应用。

参考文献

1. Gasparro FD and Santella RM, *Photochem Photobiol* 1988, 48:321
2. Leadon SA, In "DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures" (Friedberg EC, Hanawalt PC, eds) Vol. 3, New York, Marcel Dekker, 1988, P.311
3. Phillips DL, In "Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I" (Cooper CS, Grover PL, eds), Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 1990, P.515
4. 王亚辉: 分子免疫学 科学出版社 1982, P.90
5. Muller R and Rajewsky MF, *J Cancer Res Clin Oncol* 1981, 102:99
6. Mitchell D and Clarkson JM, *Biochim Biophys Acta* 1981, 655:54
7. Wani AA, et al, *Photochem Photobiol* 1984, 40:465
8. Wani AA, et al, *Photochem Photobiol* 1987, 46:477
9. Klocker H, et al, *Eur J Biochem* 1984, 142:313
10. Roza L, et al, *Photochem Photobiol* 1988, 48:627
11. West GJ, et al, *Radiat Res* 1982, 90:595
12. Rajagopalan R, et al, *Radiat Res* 1984, 97:499
13. Leadon SA and Hanawalt PC, *Mutat Res* 1983, 112:191
14. Lewis HL, et al, *Radiat Res* 1978, 75:305

(下接第56页)

9. Hagemann RF, et al, Radiat Res 1971, 46:533
10. Potten CS, et al, Int J Radiat Biol 1988, 54:1041
11. Potten CS, et al, Int J Radiat Biol 1975, 27:413
12. Kinsella TJ, et al, Surg Gynecol Obstet 1980, 151:273
13. Huczkowski J, et al, Int J Radiat Biol 1984, 46:293
14. Rao KR, et al, Radiat Environ Biophys 1983, 21:247
15. Dethlefsen LA, et al, Radiat Res 1984, 100:157
16. Milligan AJ, et al, Br J Radiol 1985, 58:741
17. Dewit L, et al, Radiat Res 1987, 111:445
18. Maisin J, et al, Radiat Res 1977, 71:338
19. Becciolini A, et al, Acta Radiat Oncol 1986, 25:51
20. Dewit L, et al, Radiat Res 1987, 110:372
21. Hauer-Jenson M, et al, Acta Radiat Oncol 1986, 25:203
22. James DC, et al, Cancer 1985, 55:2105
23. Hauer-Jenson M, et al, Int J Radiat Oncol Biol Phys 1988, 14:1205
24. Hauer-Jenson M, et al, Acta Radiat Oncol 1983, 22:299
25. Trott KR, et al, Int J Radiat Oncol Biol Phys 1984, 10:907
26. Galland RB, et al, Br J Surg 1987, 74:742
27. Fischer L, et al, Acta Chir Scand 1989, 155:47
28. Berthrong M, et al, World J Surg 1986, 10:155
29. O'Brien PH, et al, Am Surg 1987, 53:501
30. James DC, et al, World J Surg 1986, 10:171
31. Bourne RG, et al, Int J Radiat Oncol Biol Phys 1983, 9:1445
32. Kline JC, et al, Radiology 1972, 105:413
33. 李鼎九等: 肿瘤热疗 湖南科学技术出版社, 长沙 1987, P.185

(上接第52页)

15. West GJ, et al, Int J Radiat Biol 1982, 42:481
16. Ahnström G and Erizon K, Int J Radiat Biol 1973, 23:285
17. van der Schans GP, et al, Int J Radiat Biol 1989, 55:747
18. Paules RS, et al, Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85:2176
19. Liu PK and Hsu GS, Somat Cell Mol Genet 1990, 16:49
20. Bohr VA, et al, Cell 1985, 40:359
21. Leadon SA, Nucleic Acids Res 1986, 14:8979
22. Mitchell DL and Nairn RS, Photochem Photobiol 1989, 49:805
23. Mitchell DL and Rosenstein BS, Photochem Photobiol 1987, 45:781
24. Nairn RS, et al, Mutat Res 1989, 217:193
25. Mitchell DL, et al, Nucleic Acids Res 1990, 18:963
26. Edelson RL, et al, Clin Res 1983, 31:469
27. Hansen JB, et al, Biochemistry 1983, 22:4878
28. Xiao Yan Yang, et al, Cancer Res 1987, 47:2451
29. Schultz PG, Science 1988, 240:426
30. Miller III CA and Costa M, Mutat Res 1990, 234:97
31. Mori T, et al, Mutat Res 1988, 194:263