

DNA 损伤和修复研究进展

中国科学院生物物理研究所 薛良球

随着分子生物学的深入发展及新技术的应用, DNA损伤与修复的研究近年来取得很大进展。在9th ICRR会议上, 关于这方面的文章约有近百篇, 目前的研究趋势较集中于DNA双链断裂(dsb)和染色体畸变及细胞存活间的关系。通过比较具高辐射敏感性的突变株和正常细胞的异同以及各种环境因素对dsb的影响, 来探索辐射损伤的修复机制。通过对调控DNA修复基因的研究, 从而揭示DNA修复的分子特性。本文就以下几个方面的研究作一介绍。

一、DNA双链断裂与细胞致死之间的关系

DNA双链断裂的研究, 目前在辐射领域中处于十分重要的地位。在第九届国际辐射研究大会上, 有一个专题辩论会, 辩论主题是“DNA双链断裂是唯一能导致受到电离辐射照射的哺乳动物细胞致死的损伤”。赞成和反对双方各由两位专家组成, 辩论十分热烈。多数人认为DNA双链断裂可能与细胞致死有极密切的关系, 但不能说它是导致细胞致死的唯一因素。

中国留美学者陈春章等人用细胞存活曲线和DNA双链断裂两种方法测定潜在致死损伤修复(PLDR)时发现, 这两种方法得到的修复图形很相似。由此推测, DNA双链断裂的修复能力可能是决定细胞致死的主要因素。美国的Iliakis G等人比较细胞受到相同剂量(10Gy)照射后, DNA双链断裂重接和染色质断裂重接的关系时发现, DNA双链断裂的重接呈双相动力学, 其快相的 $t_{1/2} = 9 \pm 2 \text{min}$, 慢相的 $t_{1/2} = 60 \sim 80 \text{min}$, 而染色质断裂重接的 $t_{1/2} = 70 \pm 10 \text{min}$ 。因此,

修复较慢的DNA双链断裂可能导致在细胞分裂中期观察到的染色质断裂。然而下列实验证明快相的修复也和染色质断裂有关。当受照射细胞保温在高渗溶液(0.5mol/L NaCl)中来抑制具快修复能力的DNA双链断裂的重接时, 这些快相dsb会产生染色体断裂。

Schwartz J等人从另一角度, 即用不同的DNA合成和DNA双链断裂重接的抑制剂作研究。例如用Arabinofuranosylede-nine(ara A)研究时发现, 照射前30分钟把ara A加进对辐射不敏感的细胞, 会大大增加细胞的死亡率。由此证明, 细胞致死与DNA双链断裂之间的密切关系。

除了用辐射诱发DNA双链断裂外, 近来很多学者还利用不同的限制性酶来产生dsb, 从而研究dsb的产生与修复和染色体损伤间的直接关系。

二、对辐射具高敏感性细胞的DNA损伤修复研究

对辐射敏感的突变株在辐射生物的机制研究中是十分有用的。这些突变株大部分局限在灵长类细胞中。近年来, 英国的Steel GG等人从人的膀胱肿瘤细胞株MGH-U1中分离出对辐射敏感的突变株S40b。比较突变型和野生型细胞对辐射诱发的DNA双链断裂和它的修复时发现, 两种细胞在照射后即刻存在的损伤和重连接速度方面没有差别。然而, 限制性酶切质粒修复(Repair of a restriction enzyme cut plasmid)的可靠性从MGH-U1细胞的84%降至突变细胞的59%。因此, 修复缺陷可能是导致S40b细胞对辐射敏感的主要原因。

Evans HH等人也发现,对辐射敏感的细胞,诸如小鼠L细胞株SL3-147,小鼠L5178Y-S以及对X或 γ 射线诱发的突变有高敏感性的人成淋巴细胞株TK6,它们对辐射的敏感性是由于不能有效地连接DNA双链断裂。对TK6和L5178Y-S细胞,照射后一小时测量到的dsb重接只有15~33%,而人的皮肤成纤维细胞株GM3440、人的前髓白血病细胞HL60和对辐射不敏感的小鼠L5178Y-R细胞,其DNA双链断裂重接率分别为58%、66%和69%。

以上研究表明,DNA修复缺陷可能是细胞具有高辐射敏感性的原因,日本Sakai K等认为是别的因素导致这种敏感性。如当用DNA解链技术(Unwinding technique)测定对X射线特别敏感的人白血病细胞MOLT-4和小鼠L5178Y细胞的损伤修复时发现,两种细胞呈现相同的照射后即刻产生的DNA断裂和快修复动力学特性。因此,最初的DNA断裂或DNA重接不能解释MOLT-4细胞的高敏感性。然而,MOLT-4细胞在照后4~8小时保温过程中,出现很多新的DNA断裂,而且这些二次产生的DNA断裂时间对应于由染料排斥试验(Dye exclusion test)测出的细胞致死。由此推测,可能是二次断裂导致了MOLT-4细胞对辐射的高敏感性。Iliakis G等比较中国仓鼠V₇₉细胞和它的三种对辐射敏感的突变株irs-1、irs-2、irs-3时发现,虽然这些细胞对辐射的敏感性相差很大,但每Gy照射后产生的单位长度DNA上的dsb在这几种细胞间没有差别,而且修复动力学也很相似。然而,他们发现irs-1细胞受照射后,G₂期延迟要比V₇₉细胞长,而当irs-1和irs-3细胞受到较高剂量(4~6 Gy)照射时,G₂期延迟反而有所减少。因此,照射后细胞周期变化可能是irs细胞具有高辐射敏感性的原因。

导致细胞对辐射具不同敏感性的因素很多,DNA损伤和修复的不同可能是很重要

的因素,但DNA损伤修复与敏感性之间的关系,似乎随细胞种类不同而有很大差别。是否存在一种共同的影响辐射敏感性的因素,尚待进一步研究。

三、影响DNA损伤和修复的因素

1. 氧效应

在有氧和缺氧条件下,照射产生的DNA损伤是不同的。Whitaker SJ等用人膀胱癌细胞株RT-112作研究时发现,有氧和缺氧时照射产生的DNA双链断裂数分别为 4.4×10^{-9} 和 1.2×10^{-9} dsb/bp·Gy,其OER(氧增比)为3.7。而且在这两种不同条件下,照射产生的损伤有质的差别,即有氧时照射产生的DNA双链断裂的片段比缺氧时小。

Frankenberg-Schwager M等也研究了在原核细胞中辐射诱发的DNA双链断裂和重接的OER。酵母细胞在有氧时受到300MeV电子照射产生的dsb是缺氧时的2.9倍。有氧时DNA双链断裂的重接呈双相动力学,而缺氧时,由于细胞在照射后的保温过程中会产生第二次dsb而变得很复杂。第二次产生dsb被推测为是一种修饰那些与DNA双链断裂不同的另一些损伤的过程。因此,在损伤修复过程中,观察到细胞在缺氧下照射,有较多的没有重接的DNA双链断裂,这导致了在dsb重接过程中OER减少,而且这种减少以与剂量相关的方式进行。

2. DNA染料Hoechst 33342

Bisbenzimidazole fluorochrome Hoechst 33342(HO)广泛用于放射生物研究中的DNA染色。美国Keng PC等报道,HO明显增加CHO细胞的抗辐射引起的致死效应。他们在研究HO对辐射诱发的DNA链断裂和它的修复时发现,HO的辐射防护性质与辐射产生的初始单链和双链断裂无关。HO处理也不影响DNA单链断裂重接的速率,却大大增加DNA双链断裂的重接率。dsb修复的快相和慢相T_{1/2},用HO处理的

细胞为6min和69.6min,而对照组分别为16min和98.6min。因此,HO和DNA之间的相互作用促进了双链断裂的修复过程,从而增加细胞的抗辐射损伤能力。

3. 染色质结构和其它

很多证据表明,DNA损伤和修复可能受染色质结构的影响。DNA Topoisomerase (拓扑酶) I是核中控制、修饰和保持DNA结构的酶。Kuehl BL等用Topo I有缺陷的两种细胞和正常细胞来研究它们对辐射的响应时发现,三种细胞在 γ 射线照射后产生的存活曲线形状、相同剂量引起的链断裂和损伤修复能力方面均无差别。因此,Topo I缺陷和相应的染色质结构均变化,似乎并没有改变辐射诱发的损伤和修复。

Arundel-Suto CM等用多腺苷二磷酸核糖聚合酶的抑制剂PD128763研究辐射引起DNA双链断裂时发现,PD128763明显抑制中国仓鼠V₇₉细胞对X射线诱发的双链断裂的修复,特别影响重接的最初阶段。这一研究对探索辐射敏感的机制很有意义。

McNally NJ等人研究由H₂O₂和辐射产生的单链断裂之间的相互作用,发现细胞在10⁻⁴mol/L H₂O₂在4℃处理20分钟会产生与8Gy X射线相近的DNA单链断裂,但没有dsb和细胞致死产生。当细胞用H₂O₂处理后立即照射时,存活曲线的肩减少,但对斜率影响不大,而且DNA双链断裂数也没有比仅由辐射本身引起的多。因此,由H₂O₂产生的单链断裂不能与由X射线产生的损伤合在一起而增加dsb的产生。此外,H₂O₂损伤可能使负责X射线存活曲线肩的修复系统部分饱和。

四、DNA-蛋白质交联

哺乳动物细胞中的DNA是紧密地与蛋白质结合在一起的,辐射除引起DNA链断裂外,还引起DNA-蛋白质交联(DPC)。德国Schuessler H等用小牛胸腺DNA和血

清蛋白研究这两种损伤间的关系时发现,与DNA紧密结合的蛋白质的百分数决定交联和链断裂两者中哪种损伤占优势,而且蛋白质与DNA的比例决定辐射引起哪种损伤。当与DNA结合的蛋白质浓度最高时,DPC达到最大值而链断裂可忽略;当蛋白质浓度很低时,只有链断裂而没有交联产生;但当蛋白质-DNA重量比太高(>10:1)时,由于蛋白质降解反而使交联减少。

DNA和蛋白质交联研究的另一个方面是利用那些在修复过程中有缺陷的细胞以及代谢抑制剂和照射后的不同处理来研究它的消失或修复。虽然DPC的消失并不依赖于新的蛋白质合成,但Chiu SM实验证明它被以下因素所抑制:(1)多腺苷二磷酸核糖聚合酶的抑制剂3-氨基苯甲酰胺(3-AB);(2)由L-buthionine sulfeximine引起的谷胱甘肽的减少;(3)过热处理(在46℃保温5min);(4)高渗介质;(5)细胞在分裂中期照射。DPC的修复在对辐射敏感的CHO突变株xrs-6和XR-1中是正常的,而这些细胞对DNA双链断裂修复有缺陷。对UV敏感的突变株UV-5、UV-20和UV-H细胞在核苷酸切除修复的缺刻阶段(incision step)有缺陷,但DPC的修复与正常细胞无差别。因此,DPC修复不需要双链断裂和切除修复所需的途径,它以完全不同的独特方式进行。

五、DNA损伤修复研究中新技术的应用

目前用于DNA双链断裂测量的主要方法是交变场凝胶电泳(PFGE)、中性洗脱技术和中性蔗糖梯度离心法。Iliakis G等人同时使用这三种方法来比较DNA双链断裂的重接时发现,三种方法得到的结果很相似。PFGE是分子生物学领域中近年来发展起来的新技术,其方法简便,能在较短的时间内得到结果。因此,现在比较多的人用PFGE进行DNA双链断裂的研究。当用PFGE方法

时,发现若减少暂存在样品准备过程中所用的EDTA的浓度低于 10^{-6} mol/L以下,可使纯DNA(naked DNA)双链断裂的探测下限达到0.05Gy。因此,随着测量技术的不断改进,PFGE方法将更灵敏可靠,从而得到广泛的推广和使用。

Oliver PL等人将凝胶微电泳与DNA荧光染色和图像分析相结合,用来测定受电离辐射照射后哺乳动物个体细胞中产生的DNA单链或双链断裂。在测dsb时,先将细胞埋入涂在显微镜载玻片上的琼脂中,然后在50℃的0.5%SDS(十二烷基磺酸钠)、30mmol/L EDTA溶液中溶解4小时再电泳。个体细胞或“彗星”(Comets)用荧光染色,然后在显微镜下观察。分析结果时,先使彗星图像数字化,再从荧光强度和荧光分布两个方面分析。用此法测定的呈不同辐射敏感性细胞的剂量响应曲线很相似,但修复速率不同。

Nevaldine B等发展了一种新的体系,

即用一种特殊的小鼠EMT-6细胞来研究DNA双链断裂的修复。这种细胞对氨甲蝶呤有高度抗性,而且在它特异的二微染色体(double-minute)上包含多拷贝的DHFR基因。用此体系的优点是,没有断裂的二微染色体在PFGE电泳时,不能进入琼脂,而含有dsb的二微体将迁移成条带。用此方法能准确测定迁移条带的DNA与停留在电泳原点的DNA量的比,而此比值与DNA双链断裂的数目成比例。

综上所述,目前辐射研究者从各种不同的角度研究DNA损伤与修复。然而值得令人注意的倾向是,人们的出发点虽不同,但研究焦点比较集中于DNA双链断裂。在9th ICRR会议上发表的有关DNA损伤修复的文章中,有一半以上是关于DNA双链断裂的,这一事实充分反映了这种趋势。可以预言,关于DNA双链断裂的研究,在未来几年中仍将占有相当重要的位置,并有可能取得较大的突破。

关于辐射流行病学调查资料

卫生部工业卫生实验所 陶祖范

第九届国际辐射研究大会上关于辐射流行病学调查资料较少,但仅有的少数资料也几乎涉及到了各种类型的受照人群。除日本原爆受照幸存者外,还有核设施周围人群、医学诊断或治疗受照病人和放射线医学工作人员、铀矿工人及其它受氡及其子体照射人群、受不同水平天然辐射照射人群、事故受照人群等。这些资料多以大字报形式报告,现将有关情况摘要介绍如下。

一、日本原爆幸存者中非癌死亡率 及其后代死亡率

Y. Shimizu等报告了日本原爆幸存者中

1950~1985年非癌死亡资料的分析结果,指出受照剂量大于2~3Gy群组,似乎有超额非癌死亡,但相对危险度比癌死亡小得多;非癌死亡有统计学意义增加是在1965年以后,原爆时年龄小于40岁者更为敏感;实际观察资料比较符合纯平方或线性阈[阈值为1.4(0.6~2.8)Gy]模型,而不是简单的线性或线性平方模型。根据不同原因死亡分析结果,观察到在高剂量(>2Gy)时,循环系统、呼吸系统及消化系统疾病的超额死亡有统计学意义。但报告者指出,需要进一步追踪观察,才能得出确定的结论。还指出,原爆幸存者中非癌疾病的发生率正在逆