

·综述与译文·

电离辐射诱发DNA链断裂及其修复动力学

中国医学科学院放射医学研究所 穆传杰综述
中国科学院生物物理研究所 曹恩华审

摘 要: 电离辐射诱发DNA损伤及其修复过程的研究对揭示电离辐射生物效应的分子机理有重要意义。本文根据近年来文献报道,论述了辐射诱发哺乳动物细胞DNA链断裂的依据、与致死效应和染色体畸变的关系、修复模式及测定方法的新进展。

电离辐射诱发DNA损伤主要有单链断裂(ssb)、双链断裂(dsb)、交叉连接及碱基损伤等。近年来,有关电离辐射诱发DNA链断裂及其修复机理的研究异常活跃,不仅因为DNA链断裂是电离辐射诱发的重要损伤之一,而且是揭示电离辐射生物效应分子机理的重要途径。

DNA链断裂,尤其是双链断裂,使DNA模板功能丧失,从而导致细胞死亡、突变及转化等严重生物学后果。修复是在DNA损伤后,细胞内发生的包括切除、聚合及连接等一系列生物学过程。准确的修复可使受损DNA复原,错误修复过程的积累,同样产生严重的生物学后果。因此,损伤和修复是同一细胞内相互竞争的不同生物学过程,共同决定细胞对电离辐射的敏感性。不同细胞,同一细胞的不同细胞周期,对电离辐射敏感性不同,取决于DNA损伤程度和类型、DNA损伤的分布,以及修复能力和修复的准确性。无论损伤还是修复,又都与辐射品质、剂量和剂量率、作用时间等有密切关系。

哺乳动物细胞修复缺欠突变体的建立,DNA断链的测定和分子生物学技术的进步,为研究DNA损伤及其修复机理提供了可靠的手段,取得了新的进展。本文根据文献资料,就有关DNA链断裂物理化学过程,导致的生物学后果及修复动力学等问题进行

粗浅的讨论。

一、DNA链断裂及其细胞周期依赖性

1. 直接效应和间接效应

在活细胞中,电离辐射诱发的DNA链断裂,包括dsb和ssb,通常被认为是由直接效应和间接效应引起的。间接效应是电离辐射径迹通过介质产生的自由基与DNA分子相互作用引起的,直接效应则是光子或带电粒子的能量直接沉积于DNA分子上所引起的。

在直接效应中,能量直接沉积在糖和磷酸骨架上,通过共振失能($<100\text{eV}$)或碰撞电子失能($>100\text{eV}$)产生直接解离,或去质子作用,每一电离反应可产生一个ssb,如果互补链上发生断裂与其相距很近(在10个碱基对以内),就会发生dsb。因此,电离事件的后果可能是无断裂、一个或多个ssb、一个或多个dsb。低LET时,沉积于DNA分子上的总能量很小,电离以及继之产生的断裂机率小,由直接效应产生的断裂占总断裂的比例,相当于35%的致死效应。而高LET时,由直接效应引起的致死效应可达80%^[1,2]。

高LET时,任何时间通过DNA,都有足够的能量沉积,并产生断裂。dsb是由两个独立的ssb所致,因此,两次断裂的机率是一次断裂机率的平方。根据LET及作用

的有效截面等可以推算出dsb和ssb的产额。Holley^[8]根据直接作用模型计算dsb和ssb的产额为 $Y = 0.06\delta / LET$, δ 为有效截面, 其含义是N个激发粒子径迹均匀分布在面积为A上, 能使分子量为M的DNA分子产生N个dsb或ssb ($\delta = N_{\text{dsb或ssb}} / MN \cdot A$)。对dsb和ssb, 其 δ 值是不同的。

溶液中DNA分子表面有水化层, 因此, 直接效应的化学过程(去质子化作用)与间接效应的机理可能是一样的^[4]。基于类似的原理, 对荷电粒子间接效应诱发断裂进行了较为详细的研究^[5]。

2. 细胞周期依赖性

实验表明, 电离辐射诱发的链断裂具有明显的细胞周期依赖性。处于不同周期的细胞对电离辐射的敏感性不同, 因此, dsb及致死效应剂量反应曲线的形状及斜率因周期而异。不同的实验之间其结果可能有差异, 但一般认为, 增殖细胞较静止细胞敏感, S期细胞比G₁期细胞敏感。用不同的哺乳动物细胞进行的研究都证明了这一规律。

X线照射处于不同周期的CHO细胞, 中性洗脱技术测定dsb, 发现有丝分裂期及G₁/S期比G₁期敏感, S期最敏感^[6]。X线照射M期、S期及非同步细胞(V₇₉)后, dsb明显增高。照射后, 细胞DNA损伤在G₁/S处被固定, 由于不可修复而提高其敏感性。应用DNA合成抑制剂及修复抑制剂处理照射后的细胞, 同样可以提高细胞敏感性。X线照射CHO细胞后, 用APC(aphidicolin)处理, 使其停滞在G₁/S期, dsb剂量反应曲线斜率就被提高。

细胞周期依赖性与不同细胞周期的染色质结构有关, DNA化学性质的改变, 对电离辐射的反应不同。另外, 不同周期的细胞修复能力和修复准确性不同, 也可能是主要原因之一。M期产生致死效应所需dsb数是S期的两倍, 认为是由于该期修复很少发生错误。

二、DNA链断裂的生物学后果

1. dsb与致死效应

许多证据表明, 电离辐射诱发dsb是致死的主要原因, 依据是①辐射致死效应剂量反应曲线与dsb剂量反应曲线较一致; ②潜在致死效应修复的时相变化与dsb修复相似; ③缺乏dsb修复能力的突变体同样缺乏修复致死效应。直接测定dsb与细胞致死的相关研究也都证明了这一点。

Curtis^[8]提出的LPL(致死与潜在致死)模型认为, 电离辐射引起的致死性损伤经历物理的(沿径迹的电离作用)、化学的(自由基产生)及生物的三个领域的连续过程。前二个过程在10⁻¹¹秒内完成, 并引起DNA预损伤, 如果两个损伤是非常靠近的, 可产生致死性损伤, 如果是分离的, 产生的是潜在致死性损伤(PLD), PLD未经固定则可修复, 若经固定导致死亡。PLD修复有两种时相过程, 一是快过程(β -PLD), 半修复期为10秒钟; 另一是慢过程(α -PLD), 半修复期为1小时^[9]。这种现象在dsb修复过程中也可见到。

X线照射人和鼠的正常和转化的纤维母细胞, dsb产额在各细胞间有差别, 反映了细胞敏感性不同, 但dsb和致死效应间直线相关在各类细胞间无明显差别^[10]。小鼠L细胞系经X线照射后, dsb产额与致死效应间也呈直线相关^[11]。X线照射后, 比较AT(共济失调性毛细血管扩张症)细胞与人正常纤维母细胞(IMR-90)间的反应, 发现两种细胞的致死效应均与dsb呈直线相关, 但敏感性不同, AT细胞的dsb为IMR-90的2倍, 因AT细胞缺乏修复能力^[12]。

2. dsb与染色体畸变

众所周知, 电离辐射是一种很强的染色体畸变(CA)诱变剂。电离辐射诱发的CA与dsb有密切关系。CA不仅取决于dsb及其修复, 而且与染色质结构的变化有关。染色

质高度凝集时照射,畸变率增高,而染色质松散时照射,畸变率减少。

目前认为,染色体畸变是残留的未修复的dsb,或dsb错误修复所致。因此,照射dsb修复缺欠突变体细胞,如xrs及Ly/S后,染色体畸变率明显高于其野生型^[13,14]。可见修复在CA形成过程中起重要作用。用限制性内切酶或拓扑异构酶Ⅱ(topoisomeraseⅡ)的抑制剂处理xrs-5细胞时,畸变率明显增高,是由于抑制了dsb重接过程所致。当电离辐射诱发钝性末端dsb时,由于缺乏氢键的稳定作用,使重接能力丧失,染色体畸变率增高;粘性末端dsb易于重接,畸变率减少。

由于CA与SCE(姐妹染色单体互换)的形成机理不同, γ 射线很少诱发SCE。然而,用xrs-6突变株的研究表明, γ 射线照射xrs-6后,SCE增高,尚不清楚是由于dsb直接引起的,还是其它修复过程引起^[15]。微核的增加是由于残留的未修复的dsb所致。

三、dsb修复动力学

1. 两种dsb重接机理的证据

尽管目前还不清楚DNA损伤和修复与细胞死亡间的确切关系,但已有充分证据证明,哺乳动物细胞内有重接dsb和ssb的能力,且重接的速度和范围与PLD的恢复速度和范围密切相关^[16,17]。不同细胞周期,其重接能力不同, G_1 及早S期缺乏重接能力,S期重接能力正常。

γ 射线照射XR-1突变细胞株,晚S期对电离辐射抗性增强,并伴有dsb重接能力增高,认为CHO细胞具有两种重接dsb的机制,一是依赖于XR-1,在整个细胞周期起作用,另一是不依赖XR-1,在晚S期发挥作用^[18]。Resnic^[19]用蔗糖梯度离心技术测定dsb,也发现有两个时相的重接过程。Jeggo^[20]用xrs同步细胞研究表明,和XR-1

相似,晚S/ G_2 期抗性增强,CHO-K也有此表型。依据这些实验结果,人们认为,哺乳动物细胞内有两种完全不同的重接机制,一是依赖于XR-1和xrs基因产物,在整个细胞周期内起作用,无广泛的同源性要求,可能是一种相对无错误的修复;第二种机制不依赖于XR-1和xrs基因产物,只在晚S/ G_2 期起作用,也可能是一种重组过程,同时复制同源染色体。

用小鼠乳腺癌增殖细胞群和静止细胞群研究发现,ssb的修复也有双时相反应。两种增殖细胞群66P和67P,快修复过程的半修复期分别为3.6和4.3分钟,慢修复过程的半修复期分别为52和47分钟。两种静止细胞群,66Q和67Q快修复的半修复期分别为10.8和9.7分钟,慢修复的半修复期分别为123和150分钟。Q细胞半修复期长,是由于Q细胞对DNA修复复合物敏感性低,Q细胞染色质比P细胞更紧密^[21]。当用X线和中子照射V₇₉₋₄及X线敏感细胞株irs-1时,X线使irs-1 dsb随剂量增加而轻度增加。照射剂量为40Gy时,irs-1的dsb比V₇₉₋₄高1.5倍。中子照射时情况相似,两种细胞系的dsb重接模型相似,但中子诱发的dsb,在irs-1细胞具有更有效的重接。这些材料表明,irs-1可能是修复错误突变株^[22]。

2. 修复动力学模型

如前述,照射诱发的细胞死亡和CA与DNA的dsb有密切关系,分析dsb随剂量和时间的变化,对评价辐射效应有重要作用。学者们根据众多的实验材料,提出不尽相同的修复动力学模型,包括直线平方理论,LPL、修复与错误修复(RMR)及修复饱和理论等。

RMR模型认为^[23],DNA损伤的修复含有直线自身修复和平方错误修复过程,修复和错误修复共同决定细胞是正常存活,还是活着的突变体。与LPL模型相似,都考虑了电离辐射和细胞的双重作用。DNA损伤

的修复在很大程度上取决于修复酶的活力和数量, 辐射可灭活也可激活修复酶, 与照射剂量有关, dsb的修复率随剂量下降, 未修复的dsb与剂量平方相关^[24]。在低剂量情况下, 修复率较高, 因修复酶浓度高于基质, 随着能量耗尽, 或修复酶灭活, 修复可能达到“饱和”状态, 剂量再高, 则修复率随剂量而降低^[25]。

Tseng^[26]基于同样的假设, 即电离辐射诱发的DNA双螺旋上dsb要是可修复的, 要是不可修复的, 可修复的dsb可恢复到正常状态。并指出, 除了剂量的影响, dsb的数量变化为时间的函数, 假设由非损伤部位变迁到不可修复的损伤部位是瞬间的而不是逐渐的, 提出dsb修复动力学模式为:

$$N_d(t) = N_0 - N_r(t) = (K_1D + K_2D) \\ + [N_0 - K_1D - K_2D^2] \times \\ \{1 - \exp[-(K_3D + K_4)t]\}$$

$N_d(t)$ 为t时间dsb数, N_0 为照射后当时的dsb数, $N_r(t)$ 为t时间修复数, D 为剂量, K_1 、 K_2 …为常数, 根据具体实验材料而定。

四、DNA断链的测定

准确地测定DNA的dsb和ssb, 为研究辐射诱发DNA断裂及其修复动力学提供可靠保证。为此, 已建立多种测定DNA断链的方法, 这些方法包括蔗糖梯度离心沉淀技术、中性和碱性滤膜洗脱技术及交变电场反向凝胶电泳(AFIGE)技术等。虽然其方法的原理各不相同, 但均能有效地检出DNA断链, 在一定范围内, 与剂量相关。

第一个dsb重接缺欠突变体是用蔗糖梯度离心法由*S. Cerevisiae*酵母菌分离出来的^[27], 该法相对的不敏感。目前普遍应用的是中性滤膜洗脱法(测dsb)^[28]和碱性滤膜洗脱法(测ssb)^[29]。由于电离辐射诱发的ssb比dsb高20倍, 所以洗脱技术在生理

剂量情况下就可以检出ssb, 而中性洗脱法测定dsb的最低剂量为3Gy。而且, pH9.6时, 很可能过高估算dsb, 因为此时另一些碱性易溶损伤能转变为dsb。最近, Wloddek^[30]对中性洗脱技术测定dsb的物理学基础进行了详细的研究。

Olive^[31,32]建立了一种新的快速断链沉淀分析技术, 放射性标记的细胞经变性剂溶解后, 低速(3500rpm)离心, 使断片留在上清液中, 结合解旋技术测定dsb和ssb。该方法快速简便, 与中性洗脱法比较, 有异曲同工之效。

AFIGE技术^[33]只是对dsb特异的敏感方法, 灵敏度比中性洗脱法高, 从2.5Gy~40Gy显示直线剂量反应关系。因为在电泳时采用了分子量标志, 可直接分析dsb分子量大小的分布情况。

本文所述及的DNA损伤和修复动力学模型, 是依据直接测得的DNA链断裂数和相应的生物表型时相性变化而建立的, 未涉及其分子机理。近几年来, 由于分子生物学技术的进步, 已可以在基因水平上观察到基因组内DNA序列优先修复的证据。随着研究的不断深入, 辐射损伤和修复的分子机理的研究将会有新的突破, 对进一步阐明辐射诱变和诱癌作用有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Roots R et al. Radiat Res, 1975, 64(2): 306-320
- 2 Roots R et al. Int J Radiat Biol, 1985, 47(2): 157-166
- 3 Holley WR et al. Radiat Res, 1990, 121(2): 161-168
- 4 Dischulte-Frohlinde et al. Int Radiat Biol, 1985, 48(3): 397-408
- 5 Chatterjee A. Adv Space Res, 1986, 6: 97-105
- 6 Iliakis G et al. Int J Radiat Biol, 1988, 53(3): 395-403
- 7 Rodford IR et al. Int J Radiat Biol, 1986, 49(5): 909-914

- 8 Curtis SB et al. Radiat Res, 1986; 106 (2): 252-270
- 9 Iliakis G et al. Int J Radiat Biol, 1988; 53(4): 541-584
- 10 Radford IR et al. Int J Radiat Biol, 1986; 49(4): 611-620
- 11 Radford IR et al. Int J Radiat Biol, 1985; 48(1): 45-54
- 12 Radford IR et al. Radiat Res 1990; 124, 334-345
- 13 Bocian EE et al. Int J Radiat Biol, 1982; 42(3): 347-351
- 14 Kempt LM et al. Mutat Res, 1986; 166; 255-263
- 15 Dorroudi F et al. Mutat Res, 1987; 177; 149-160
- 16 Vananker SC et al. Cancer Res, 1984; 44(3): 1091-1097
- 17 Wheeler KT et al. Radiat Res, 1987; 109; 109-117
- 18 Giaccia A et al. Somat Cell Mol Genet, 1985; 11; 485-491
- 19 Resnic MA et al. Nucleic Acid Res, 1979; 6; 3145-3159
- 20 Jeggo A et al. Mutat Res, 1990; 291; 1-16
- 21 Swart SG et al. Radiat Environ Biophys, 1990; 29(2): 93-102
- 22 Fox JC. Mutat Res, 1990; 235; 41-47
- 23 Tabias CA et al. Radiat Res, 1985; 104 (2): S77-S95
- 24 Miffrankerberg-Skhuaper et al. Radiat Res, 1982; 82; 498-514
- 25 Goodhead DT et al. Radiat Res, 1985; 104(2): S58-S67
- 26 Tseng S. Radiat Res, 1990; 122; 333-336
- 27 Ho KY et al. Mutat Res, 1975; 30; 327-334
- 28 Bradley MO et al. Nucleic Acids Res, 1979; 7(3); 793-804
- 29 Kohn KW et al. Biochemistry, 1976; 15 (21); 4629-4637
- 30 Wlodek D et al. Radiat Res, 1990; 124; 326-337
- 31 Olive PL et al. Environ Mol Mutagen, 1988; 11; 487-495
- 32 Olive PL et al. Cancer Res, 1988; 48 (22): 6444-6449
- 33 Stamato TD et al. Radiat Res, 1990; 121(2); 196-205

辐射敏感突变细胞与哺乳类DNA损伤修复研究

北京放射医学研究所 周平坤综述 魏康 曹思华*审

摘 要: 利用突变细胞研究DNA损伤修复机制, 是DNA损伤修复研究领域的一大进展。本文综述了近年来从部分哺乳动物细胞中诱变获得的辐射敏感突变株, 及其在DNA损伤修复研究、人类DNA修复基因的分子克隆和染色体定位等方面的应用。

在生命科学研究领域中, 许多复杂生化过程的奥秘都是通过通过对单基因突变分析得以揭示。DNA修复是生物体对辐射等损伤反应的生物学过程, 过去, 人们利用大量的原核DNA修复突变株进行遗传学分析、克隆相关修复基因及纯化修复蛋白, 从而对原核DNA修复系统有了较详细的了解。近年来,

研究者们通过诱变或从某些人类遗传病病人细胞培养建株, 获得了大量哺乳类辐射敏感突变株, 并且试图利用这些突变株, 研究哺乳动物细胞辐射敏感性的分子基础、探索DNA修复系统的遗传控制和克隆DNA修复基因, 以在基因水平上了解哺乳类DNA的辐射损伤修复机制。

*中国科学院生物物理研究所