

· 综述与译文 ·

生物组织辐射损伤分子机制研究的趋势*

第二军医大学放射医学研究室 郑秀龙综述 麦智广审

摘 要: 详细介绍目前国内外对重要生物靶分子辐射损伤的原初变化, 后续效应及其修饰作用机制的研究概况, 提出今后研究趋势和可能取得的重大进展。

辐射等环境因素对生物组织的损伤及其控制方法, 是当今受到各国普遍关注的探讨生命科学前沿之一, 其分子机制是辐射生物学的基础, 系“人类前沿科学计划”所强调的重大研究领域^[1]。对于放射性核素和核能利用、放射损伤防治、肿瘤放疗、辐射育种、菌种辐射诱变及生物高分子材料研制等将有重要的指导意义。根据现代生物学的观点, 机体内各种生理功能, 均与构成生物体的DNA大分子的结构顺序有关。因此, 只有从细胞分子水平上阐明机体内各种功能受辐射损伤而引起的生物效应, 才能揭示其本质和规律性。它的研究将会加速生命科学向微观、动态和定量化的发展过程, 有助于解决DNA大分子辐射损伤的原初变化、后续效应及其修饰作用的机制。

一、国内外研究概况

(一) 辐射生物物理与化学

1. 辐射原初效应的研究

近二十年来, 辐射生物物理研究发展极其迅速。由于技术条件的改善, 特别是采用多种新颖时间分辨计测技术, 可从不同频域, 如电离辐射、电子、重离子(n, p, α)及紫外光波到微波; 和不同时间域, 如用脉冲辐射分解及激光光解, 现可测至脉冲宽为 10^{-9} 秒至 10^{-8} 秒级来研究辐射后生物大分子

产生的各种瞬态活性中间产物的细微结构和动态变化过程。Chapman等曾根据辐射引起的原初效应时间变化, 大致将它分为三个阶段^[2]: 1. 激发与电离的辐射物理阶段(10^{-15} 秒~ 10^{-12} 秒级); 2. 水辐射分解所产生的氧自由基及水合电子的辐射化学阶段(10^{-12} 秒~ 10^{-8} 秒级); 3. 超过 10^{-8} 秒级的DNA等靶分子自由基氧化还原作用和有害自由基清除的辐射生化阶段。当然这三个阶段不是截然分开的, 如水射解产生的羟自由基(OH·)能很快氧化破坏DNA靶分子, 在修饰剂(防护剂和敏化剂)存在下, 损伤的DNA分子可得到修复或进一步破坏, 其后续继发效应将会导致细胞的损伤和恢复。

目前已能应用 10^{-9} 秒级脉冲射解和 10^{-11} 秒级激光光解、ESR(电子自旋共振)及快速混合技术等研究各种瞬态中间产物的细微结构变化与动力学过程, 这就使研究生物靶分子的辐射损伤机制提早达几个数量级, 解决了辐射的原初损伤机制和修正了一些旧的观点。以往认为辐射与化学致癌机理不同, 1983年采用快速混合技术和脉冲射解技术, 发现均能使机体产生自由基损伤DNA分子而致癌, 有力地推进了生命科学前沿的研究^[3]。80年代以来, 美国国家标准局(NBS)、阿贡实验室及西德马克斯-普朗克实验室等均在用脉冲射解和激光光解技术, 研究辐射

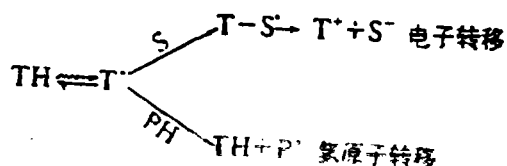
* 部分内容由上海辐射联合实验室林念芸、张加山及金一尊教授提供

诱发DNA主要组分嘧啶碱基的自由基加成产生的二聚体交联、DNA碱基与核蛋白中某些氨基酸间的交联,及某些化学毒物产生多种加成物的损伤取得了重要进展〔4〕。研究还阐明了自由基的氧化还原机制及辐射诱发DNA主要组分产生的各种瞬态中间产物的结构和演变过程,并积累了不少实验资料。

生物组织约含70%水,因此,一般认为水辐射分解产生的氧化性自由基($\dot{\text{O}}\text{H}$, $\dot{\text{O}}_2$)是辐射诱发DNA大分子损伤的间接原因,其中 $\dot{\text{O}}\text{H}$ 是水辐射分解产生的主要活性自由基。1989年在美国第37届辐射研究年会上,NBS又报道了 $\dot{\text{O}}\text{H}$ 诱发产生的DNA-蛋白质交联物超过12种,并指出这种交联是DNA嘧啶碱基与蛋白质氨基酸(如酪氨酸)的加合物。还发现致癌毒物也可产生多种加合物,其损伤机制亦与 $\dot{\text{O}}\text{H}$ 有关。这种被人称为“DNA损伤的化学指纹”,生化家Dleinnick将它评为是在辐射与化学致癌机制中一项新的突破〔5〕。

2. 辐射诱发生物大分子损伤修饰机理的研究

DNA辐射物理与化学的一个重要课题是在研究DNA及其组分的辐射损伤机理的基础上,研究在辐射修饰剂存在下,辐射防护和敏化的变化,从而为探讨细胞和整体水平的化学防护和敏化作用提供分子的理论依据。在辐射防护和敏化效应这一范畴中,自Charlesby(1964年)等提出的氢原子转移修复和Adams(1969年)提出的电子转移敏化机制以来,形成了如下的机理:



辐射的直接和间接作用可使细胞DNA(TH)产生靶分子自由基($\text{T} \cdot$),而后随

环境中所含化学成分的差别而发生不同的效应。若有敏化剂(S)存在时,则与之形成加合物($\text{T-S} \cdot$),继而发生电子转移,使靶分子氧化(T^+),最后导致细胞潜在性的化学致死损伤,如DNA链的断裂、交联及碱损伤等;若有还原剂(PH)如谷胱甘肽存在时,则经氢原子转移而使 $\text{T} \cdot$ 还原修复。该机理虽比较简单,需进一步完善,但对指导修饰剂的设计与筛选仍起到了推动作用。

国内分子辐射生物学的研究起步较晚,近十几年来,从DNA、蛋白质分子及细胞等各层次的研究工作正在逐步开展。上海原子核研究所自1980年开始,一直从事DNA辐射生物物理与化学的研究,系统研究了生物重要靶分子DNA的早期辐射损伤机制及其与修饰剂作用的修饰作用机制等基础理论,曾证实了辐射诱发胸腺嘧啶二聚体的交联产物〔6〕,并提出了“三转移”机理〔7,8〕。现能从 10^{-9} 秒级研究辐射诱发DNA碱基自由基等瞬态产物及其演变过程。

(二)辐射生物化学

近年来的研究表明,DNA的辐射损伤为非随机的,其损伤与基因活性有关。因而只研究DNA大分子的辐射损伤,不能区别特殊部位或基因的损伤修复,给DNA结构与功能间关系的研究带来困难。自1982年Chiu等〔9〕将基因工程的DNA重组分子杂交技术用于DNA损伤修复后,使此项研究取得长足进展,现已能从DNA大分子的辐射损伤深入到DNA分子中某一个或几个特定功能基因的损伤及其与功能间关系的研究。

1. DNA辐射损伤中,以研究单链断裂(ssb)损伤的较多,DNA双链断裂(dsb)也可能是由于两条链对侧相差3~16bp间的ssb形成的。对DNA断裂末端也作了不少工作。DNA断裂位点的分布很复杂,受照射剂量、剂量率及检测方法等许多因素的影响,至今未获一致结果。一般, γ 射线大剂量照射(40~80Gy)加碱处理后,断裂处的碱基

次序为 $T > G > A \geq C$ ；低于20Gy照射，则为 $G > A > T \geq C$ 。若不加碱处理，则断裂处无碱基差异^[10]。

2. DNA辐射单、双链断裂损伤的生物学效应问题，一直是放射生物学家多年探索未解决的课题。近几年的研究认为dsb是使细胞失活的主要因素，因而趋向研究dsb的损伤效应。1938年，美国Laurence实验室用重离子⁵⁶Fe照射小鼠胚胎细胞，分析细胞存活率和转化作用与DNA dsb间的关系时，经实验计算，DNA断裂间隔隔20 Å或5bp以内可引起细胞死亡，若相隔30 Å或20bp则可引起细胞的转化作用^[11]。

3. 低LET的X、γ射线与高LET的重粒子（中子、氦离子）辐射引起DNA损伤的差异，特别是重离子辐射生物效应的研究引人注目。随着航天事业的发展，宇航员长期在高空飞行时受到射线（尤以重粒子）的辐射损伤危害较大^[12]，据报道，所诱发的DNA损伤与低LET照射不同，不易修复，易引起突变，故利用卫星携带麦种飞行是诱变选种试验的好环境。

值得指出的是1988年1月，自然杂志在日本东京主办的“分子生物学研究进展”讨论会上，英国Branner提出DNA大分子中约有98%的基因组不能编码蛋白质和表达功能（其中可能有不少基因组的功能未被发掘）^[13]。这说明以往研究总DNA分子损伤修复时，可能观察的大多是非编码基因组和少量编码基因总的变化结果，因此各实验室研究结果有时不一致。如深入到功能基因组的研究，则可避免此问题。

（三）DNA辐射损伤后修复机制的研究

DNA辐射损伤后的修复重点在于研究修复机制中修复酶的作用，迄今已发现15种不同的修复酶^[14]，其中较重要的如Polβ和Topo I和II。1990年，美国曾对后者进行了专题讨论，对阐明急性放射损伤和修饰剂的放射防护及肿瘤放疗均有指导作用。

1. DNA亚分子辐射损伤与修复的研究

80年代初，Chiu等采用无转录活性卫星DNA、有转录活性的poly(A) mRNA及有活性基因的非洲爪蟾核糖体DNA(rDNA)三种探针，经分子杂交试验探测受30Gyγ射线照射小鼠L929细胞DNA损伤时，发现有活性基因的损伤比休止基因严重得多^[9]。其后，Bohr等用相同方法只观察到受UV照射CHO细胞内转录活性强的编码二氢叶酸还原酶(dhfr)基因组比DNA全基因组及其上游和下游区修复切除嘧啶二聚体的效率高4倍左右，而未见到它们之间在二聚体损伤量有何差别^[15]。两种射线损伤似无相同的规律，值得深入探讨。

2. DNA修复与基因治疗

在DNA修复研究中，正采用修复酶的基因与质粒DNA重组、克隆和提纯修复酶为开展DNA修复机制的研究创造条件；也有从基因治疗着手，用转基因法使有该酶缺陷细胞得到修补，恢复正常修复功能。这是从另一侧面研究基因损伤与修复的机制，尤为研究修复缺陷型遗传疾病的热点。着色性干皮病(XP)和毛细血管扩张共济失调(AT)患者，由于分别缺乏修复UV和X射线辐射引起的DNA基因损伤，迄今尚无法进行治疗。人们试图通过转基因法，探明受体细胞的修复功能或修复缺陷型细胞，使之恢复正常达到治疗目的。在这方面均有成功与失败的例子^[16-18]。

目前，国内不少单位开展了细胞DNA辐射损伤与修复机制的研究。上海第二军医大学自80年代始，系统研究了细胞DNA辐射损伤及其在增敏剂存在下，辐射与激光增敏的作用机制和受损DNA修复与修复酶的相关性，指出DNA的辐射增敏与激光增敏损伤机制不同，以及某些酶(DNA聚合酶β)的抑制剂（如CM）也是抑制细胞潜在性致死损伤修复的作用机制^[19-21]。军事医学科学

院已采用转基因法,对UV损伤修复有缺陷的XP细胞作基因修补治疗研究,获得初步成功^[22]。

二、研究趋势

1. 辐射与相关领域的研究

进一步提高辐射研究时间分辨技术,现由 10^{-9} 秒级向 10^{-12} 秒级乃至 10^{-15} 秒级发展,并从不同频域(UV~微波)及重离子研究生物靶分子在短脉冲辐射作用下瞬间产物的演变及动态变化,以探讨辐射损伤的原初过程,并促进自由基生物学和化学动态学的发展。

2. 生物靶分子的早期损伤与快速修饰的微观动态研究。研究靶分子与修饰剂的辐射活性中间产物,包括正、负离子,激发态和自由基的种类,结构及其动态演变过程。

3. 探索辐射诱发DNA靶分子或功能基因损伤机制的演变动态过程,包括中间瞬态活性产物的检测及最终稳态产物(诸如DNA与DNA或与蛋白质交联产物)的分离与鉴定,以及采用DNA重组技术基因探针直接探测DNA基因损伤,以阐明DNA或基因损伤的化学指纹和生物大分子相互作用的自由基过程及长程电子转移过程。

4. 探明稳态辐解产物的生物学特性及其对细胞致突、致畸、致死作用的影响,以评价其在后续效应中的意义和危害性。

5. 研究在后续效应中DNA尤以功能基因辐射损伤修复与修饰作用的分子机制及其与基因表达或细胞存活间的相关性,为修饰剂合成设计提供理论依据。

三、小 结

综合上述以辐射生物物理与化学为基础探索原初损伤机制,继而研究生物靶分子与细胞生物学后续效应的演变过程及其与修饰剂的作用机制,从不同层次和不同侧面进行综合研究,可望在分子辐射生物学取得突破性进展,总结提出有重大理论与实际意义的新概念、新理论。

参 考 文 献

- 1 日本通商产业省工业技术院,人类前沿科学计划,1986;12.中国生物物理学会译,1987
- 2 Chapman JD et al. *Adv Radiat Biol*, 1981; 9:143-198
- 3 Didaroglu M et al. *Cancer Res*, 1989; 49(13):3 463-3 467
- 4 Willson KL. *Br J Cancer*, 1987; Suppl VIII:55-58
- 5 Raloff J. *Science News*, 1989; No13:135
- 6 赵蓉等.辐射研究与辐射工艺学报, 1990; 8(1):48-52
- 7 Lin Nian-Yun et al. *Radiat Phys Chem*, 1986; 28(2): 211-217
- 8 Lin Nian-Yun et al. *Res Chem Intermediat*, 1990; 14(2):209-212
- 9 Chiu Song-Mao et al. *Biochim Biophys Acta*, 1982; 699(1):15-21
- 10 Tracker J. *Int J Radiat Biol*, 1986; 50(1): 1-30
- 11 Yang Tracy CH et al. *Adv Space Res*, 1989; 9(10):131-140
- 12 Chatterjee A. *Nucl Instr Methods Phys Res*, 1989; A280(3):439
- 13 Newark P. *Nature*, 1988; 331(6151): 401-402
- 14 Lindahi T. *Ann Rev Biochem*, 1982; 51: 61-87
- 15 Bohr VA et al. *Cell*, 1985; 40(2):359
- 16 Lettman AR. *Mutat Res*, 1985; 150(1, 2):61-67
- 17 Green Michael HL. *J Cell Sci*, 1987; Suppl 6:127-137
- 18 Matsumoto A et al. Human DNA transfection confers a partial UV resistance on xeroderma pigmentosum cells. In: Fielden EM et al. eds. *Radiation Research, proceedings 8th ICRR*, Edinburg 1987, London: Taylor and Francis, 1987; 110
- 19 郑秀龙等. DNA损伤修复的研究及其应用,中国科协学会工作部编,全国生命科学前沿学术研讨会论文集,上海,1988,北京:中国科协,1988; 175-176
- 20 蒋逸凤等.辐射研究与辐射工艺学报, 1990; 8(3):148-154
- 21 杨立锡等.辐射研究与辐射工艺学报, 1991; 9(4):204-209
- 22 章杨培等.科学通报, 1989; 34(10): 789-792