

高 LET 和吸烟导致损伤的相互作用已经阐明,但对非吸烟者的危险度估算仍是非常困难的。一个好的例子就是将体外研究的资料直接用于流行病学的危险度估算,Hei 和 Piaio 报

道了用 C3H10T1/2 细胞以致癌性为终点的初步工作,观察受 0.5Gy 的  $\alpha$  粒子照射又经历不同浓度香烟冷凝液处理的培养细胞,确实看到其损伤之间有相加作用。

[Int J Radiat Biol 1992,61(1):3~13(英文) 秦 岚 译 刘 及 校]

## DNA 组构状态影响细胞辐射敏感性 和初始 DNA 链断裂的测定

Olive PL

**摘 要:**评价了中性滤膜洗脱、类核分析、碱解旋等几种测定哺乳类细胞中“初始”DNA 损伤的方法,并着重讨论了 DNA 包装因素而不是 DNA 分子本身的断裂因素对细胞辐射敏感性以及对这些测定方法的影响。

### 一、引 言

培养的哺乳类细胞对电离辐射的致死效应呈现不同敏感性。一般认为,这类固有的辐射敏感性差异是由于 DNA 修复能力的差异所致。

DNA 修复酶在修复辐射诱发的 DNA 损伤过程中起着重要作用。那么为什么常常只根据对初始 DNA 损伤测定来预测辐射生物细胞的最终存活呢?答案可能包括两种观察事实:(1)对 DNA 链断裂的测定不仅受 DNA 完整性影响,而且受测定时 DNA 构象以及 DNA 与其它细胞组分相互作用的影响;(2)DNA 损伤修复不仅需要修复酶,而且需要损伤部位与这些酶的充分接近,继而恢复细胞核内的正常物理组构状态。二者都强调 DNA“包装”对辐射敏感性的重要影响。

### 二、细胞核基质与 DNA 损伤

用某些测定 DNA 链断裂方法可检测 DNA 损伤受染色质高级结构的影响。至于“超结构”的哪一方面起决定作用,尚无事实根据,因为有关核小体水平以上染色质组构状态仍处于猜测之中。有证据表明,细胞核基质参与许多包括 DNA 修复在内的关键性细胞功能。已反复

讨论过这一问题,现在有希望解决,但细胞核基质也可能是制备过程中的人为假象。

问题是,基质是一个动态性细胞结构,其组成及超微结构在细胞生长周期中不断变化,而且在很大程度上依赖于制备方法。为使基质最佳复原,对不同细胞类型,其制备方法通常也需要作相应调整。其原因尚不明了,但有可能涉及蛋白质的交联。研究结果表明,一个辐射敏感 CHD 突变细胞系中,核膜内的超微结构有明显不同。这种探索结构蛋白而非修复酶变化的常规研究方法为解释某些细胞类型辐射敏感表型提供了线索。然而,初始损伤的性质也可能受 DNA 包装的影响。正如得出的结论那样,辐射敏感性的差异并非由于初始损伤数量的差异所致。至于滤膜洗脱和类核方法测定的是 DNA 损伤的真正差异,或不仅仅是不同细胞对同一损伤的不同真正差异,或不仅仅是不同细胞对同一损伤的不同反应方式,这一问题至今尚未完全解决。当然,DNA 组构状态可影响初始损伤的积累,而且染色质的高度变化(即蛋白质的移去)可严重影响 DNA 损伤的量及损伤的性质。然而,如果 DNA 包装方式既影响测定初始损伤,又影响细胞对其修复能力,这一假说可以

解释为什么用中性滤膜洗脱和类核沉降法测得的DNA初始损伤会与细胞辐射敏感性有关。

### 三、中性洗脱法对DNA包装很敏感

中性滤膜洗脱法除了可测定DNA双链断裂外,似乎还能测定与细胞修复有关的某些细胞特性。用该方法测得,不同细胞类型的受照DNA从滤膜洗脱的能力与其辐射敏感性有关, DNA损伤修复缺陷细胞则例外。

中性滤膜洗脱法可测得受照单层和类球体中DNA损伤的差异,这种差异与其辐射敏感性相关。辐射抗性细胞的洗脱率低,可能是由于某些残基结构阻碍DNA“胶”在滤膜上的伸展。这种假说来源于对从滤膜上洗脱的DNA片段大小分析,以及对一些可修饰DNA组装的试剂影响洗脱率的研究。在这些实验中发现,从滤膜上洗脱的DNA片段的大小(约460kb)不受细胞类型、辐射剂量或洗脱时间的影响。基于有更多这样的片段从辐射敏感细胞中洗脱,提出这样一个模型:在辐射敏感细胞中,裂解后DNA更易伸展,因而在洗脱过程中有更多DNA被剪切下来;而在抗性细胞中,由于DNA不易伸展,较少DNA被洗脱,从而表现为较少的DNA片段被剪切。

DNA包装影响洗脱的另一观察现实是,洗脱S期细胞DNA要比其它时期慢。与此类似,用中性蔗糖梯度沉降法、脉冲凝胶电泳法和单细胞凝胶电泳法测定双链断裂也受复制过程中DNA的影响。从受照的S期(尤其是早S期)单细胞中可移去的DNA量,与G<sub>1</sub>,G<sub>2</sub>期相比要少2/3~3/4,这很可能是由于复制子簇的形成所致。

如果辐射抗性细胞的DNA超级结构中某些成分可抗裂解,那么为什么不同辐射敏感性细胞用中性沉降或中性凝胶电泳测得的DNA初始损伤的量相似呢?这可能是由于中性滤膜洗脱过程中的某些抗裂解结构,在其它测定条件下是不稳定的。最重要的条件之一就是裂解时间,对中性洗脱而言,DNA“胶”的伸展率是

DNA双链断裂测定的因素之一。有趣的是,除非长时间裂解,否则蔗糖梯度沉降分析将受快速沉降物存在干扰。该快速沉降物含有与其它细胞组分结合的总DNA组分。用大肠杆菌所做的有关工作显示,在类似的复合体中,DNA的量可预示细胞的敏感性。作者得出的结论是,细胞对电离辐射致死的敏感性在很大程度上由细胞DNA“包装”介导。

### 四、类核分析揭示DNA包装的差异

类核沉降和核晕圈法对由DNA单、双链断裂引起的超螺旋结构的改变很敏感。这些方法用高盐和去垢剂溶液裂解细胞,由此产生的类核用DNA插入性荧光染料染色,类核性质的变化用低速蔗糖梯度沉降、荧光显微镜或流式细胞仪测定。类核“体积”用存在的链断裂数、插入性染料的浓度以及与基质附着位点的数量和性质有关的因素来确定。

类核沉降率或流式细胞仪测得的光散射,在辐射较敏感的单层细胞中要比类球体细胞中高。显然,裂解时间、去垢剂浓度对类核的稳定性有很大影响。然而,在我们先前所说的“最佳”条件(不仅是类核分析,而且也是中性滤膜洗脱,蔗糖梯度沉降)下,可能忽视了细胞系之间有意义的差异。用类核方法测定不同细胞系之间辐射敏感性的差异为染色质结构与辐射敏感性之间有密切关系这一假说提供了直接证据。

### 五、碱解旋受细胞/细胞核结构的影响

用碱裂解和DNA变性来测定单链断裂的方法,通常无法区分不同细胞系或不同细胞周期间辐射敏感性的差异。用碱性蔗糖梯度沉降、碱性洗脱和碱性DNA沉降方法获得的单层/类球体数据说明了这一点。这些方法对测定单链断裂有着广泛的敏感性,它们是基于不同的物理原理来测定DNA损伤的。然而所有结果均显示,在受照的单层细胞和类球体中存在有等量的单链断裂。

Ahnstrom等的碱解旋法则不同,当细胞在

0.03mol/l NaOH, 1mol/l NaCl 中裂解时, DNA 在类球体中的解旋程度要比在单层中低, 而且用这一方法得出的结果与类球体抗性增高相一致。再者, 一旦类球体恢复单层生长, 接触效应的出现与丧失率正好与 DNA 解旋动力学平行。然而, 最近的研究表明, 解旋测定并不一定反映辐射敏感性本身, 而是对生长中细胞表现出的形态敏感。进而提示细胞和/或细胞骨架的差异影响单层/类球体中 DNA 解旋动力学。

有趣的是, 细胞和细胞核骨架特性也可能影响中性洗脱的测定结果, 因为与完整细胞的 DNA 相比, 核 DNA 的洗脱要快得多, 而且呈线性动力学特征。细胞骨架中较稳定的成分中等纤维, 同时见于细胞核和细胞质中。中等纤维与 DNA 的紧密联接可导致其间的优先交联。分析细胞核 DNA 损伤可避免不溶性细胞蛋白与 DNA 的粘附或缠结等潜在问题, 但不得不以难以令人接受的大量本底断裂为代价。因此, 大多数链断裂测定都是将完整细胞置于滤膜、琼脂糖包被, 或置于梯度顶层。某一方法的裂解条件能否成功地除去干扰链断裂测定的蛋白, 就决定了该方法对细胞类型间结构差异是否敏感。

## 六、结构差异的可能特点

从 DNA 包装差异的特点中, 可得出什么结论呢? 不管辐射敏感性如何, 经碱 ( $\text{pH} \geq 12.3$ ) 处理或经有蛋白酶 K 和去垢剂存在下的长时间裂解后, 细胞系一般呈现大致等量的 DNA 断裂。然而不用蛋白变性剂而用高浓度盐洗脱蛋白的测定方法(即基于类核的方法)可测出差异常来。紧密附着于 DNA 的蛋白不能用去垢剂、尿素、高浓度盐除去。在中性洗脱中, 裂解后仍有 1%~3% 的与 DNA 结合的蛋白留在滤膜上。尽管这一量在单层与类球体之间或在不同细胞周期间不会有很大差异, 但残留物中可能含有阻碍洗脱率或阻止类核伸展的 DNA 结合蛋白。

初期观察显示, 裂解后滤膜上的残留物包括种种细胞骨架及基质蛋白。虽没有明确证据,

但这些蛋白可能阻碍 DNA 洗脱或对核稳定有重要作用。然而, 在除去组蛋白或非组蛋白后, DNA 的某些超级结构仍可能在一段时间内保持下来。Cook (1988) 基于几乎所有蛋白被抽提除去后, 包埋在琼脂糖珠中的染色体形态仍保持不变这一观察提出: 染色体结构可由抗强去垢剂的力(比如被超螺旋结构所稳定的双螺旋间的氢键)来保持。因此, 即使在造成细胞系之间 DNA 超级结构差异的蛋白不存在的情况下, 这种差异也可能被保存下来。

## 七、细胞核基质与 DNA 修复

以上讨论了 DNA 结构在损伤初始测定中的决定性作用, 但也应考虑 DNA 包装在修复中的必要作用。最近, Penman 令人信服地介绍了一直在探索着的占基因组 95% 的部分功能, 基因组的这部分不编码蛋白, 可能含有与执行机体“设计”有关的信息。

现已普遍认为, 细胞形态在复制、基因表达和分化中起重要作用。DNA 在细胞中的组构状态影响其对种种 DNA 损伤剂的敏感性。正如 Penman 所说: “细胞作为胶状袋最适合着重生生化研究, 但只是一种假象。”为摆脱这一假象, 不仅需要进一步了解细胞和细胞骨架的组成, 而且需要知道这些成份是如何一起工作的。

1973年, Cook 提出一种新假设, DNA 高级结构控制着包括分化在内的重要细胞过程。其它实验室已接受了这一观点。这可能是由于已积累了大量有关细胞核蛋白基质影响转录和复制方面的数据资料。如果细胞核骨架指导 DNA 修复酶, 而且损伤 DNA 的准确而快速的定位为正确修复所必需, 那么这一结构在组构状态上的差异将影响细胞对 DNA 损伤剂的反应。Lipetz 等指出, 不能再认为 DNA 修复过程与染色质结构无关, 因为 DNA 超螺旋力实际上可使 DNA 链变形, 使得修复性核酸内切酶更易识别 DNA 损伤。损伤与修复酶的可接近程度的差异, 以及伴随分化过程的染色结构上的变化都能影响辐照后的修复率。与非转录序列相

比,活跃转录中的染色质易受更严重损伤,而修复也最快,靠近核基质处的损伤优先修复。

有关基质对修复的重要作用,也许就体现在修复后 DNA 与基质的结合方式上。Cook 等认为,电离辐射的致死效应可能是由于 DNA 修复过程中错误结构的引入。现已发现核基质上的特异性 DNA 附着位点,其中大部分位点含有一个一致顺序,这种一致顺序可结合一种基质酶,即拓扑异构酶 I。拓扑异构酶 I 除了作为核基质成分外,还参与 DNA 变构,为 DNA 复制所必需,也可能为修复所必需。有趣的是,这种酶活性在类球体中比在单层中低。现在应当明白,对双链断裂的修复,不仅需要断裂末端的正确重接,而且需要整个 DNA/蛋白质结构的复原。

## 八、结 论

已有许多证据表明,细胞核中 DNA 组构状态在 DNA 损伤和修复中起着重要作用,而且 DNA 包装上的差异可影响对初始 DNA 单、双链断裂的准确定量。用诸如中性洗脱、类核等方法测定初始 DNA 损伤,再结合 DNA 修复能力测定,可作为细胞固有辐射敏感性的指示。现在仍不清楚活细胞中 DNA 包装如何影响 DNA 修复。结构上的差异可改变损伤的性质、修复酶的功能和定位,还可影响修复系统的诱导或改变 DNA 高级结构的复原。首先需要解决的问题是,确定什么细胞结构影响对 DNA 链断裂的测定。这一信息将有助于进一步了解 DNA 组构状态如何影响 DNA 修复。

(Int J Radiat Biol 1992, 62(4), 389-396(英文) 李士生  
节译 穆传杰校)

## 大鼠重组干细胞因子对小鼠的辐射防护作用

Zsebo KM et al

**摘 要:**受致死剂量的小鼠用重组大鼠干细胞因子(rSCF)处理,可刺激受致死性照射小鼠的造血明显恢复。照射前后注射 rSCF 产生最佳防护效应提示,rSCF 不仅保护造血细胞免遭早期辐射损伤,而且也刺激照后造血恢复,说明重组大鼠干细胞因子处理对小鼠具有辐射防护作用。

干细胞因子(SCF)是小鼠 Sl 位点的产物,同时也是小鼠白斑位点编码的 c-kit 酪氨酸催化酶受体的配体。SCF 的生物学性质证明;SCF 作用于非常幼稚的干细胞群,有与 IL-1 相同的抗放作用。本研究表明 rSCF 可刺激受致死性照射小鼠的造血明显恢复,从而使小鼠存活。

实验使用 10~12 周雌性(C57B1/6J × DBA2)F<sub>1</sub>小鼠,从饲养实验室取回后,适应饲养 5 天再用。小鼠受到不同剂量的铯源照射,分次照射强度相等,时间间隔 4 小时。在不同的时间间隔内,经尾静脉或腹腔给小鼠 rSCF(100μg/kg)或 0.1% 胎牛血清溶液。

rSCF:用含有适量质粒的大肠杆菌制备,提纯后的 rSCF 与聚乙二醇(PEG)偶合。用

PEG 修饰的牛血清白蛋白作为对照,以测定抗放活性。纯 rSCF 浓度为 0.92mg/ml,其中内毒素含量 < 0.5ng/ml(用 Limulus 变形细胞测定)。

骨髓分析:用含 2% 胎牛血清的 HEPES 缓冲液冲洗股骨干收集骨髓细胞,在细胞计数板上计算结晶紫染色后的有核骨髓细胞数。按 Bradley 法测定高增殖潜能克隆形成细胞(HPP-CFC)和粒/巨细胞克隆形成细胞。培养物培养 14 天后,在解剖显微镜下检测克隆形成。HPP-CFC 的计数标准:克隆直径 > 0.5mm,至少含 5 万个细胞/克隆。EMT-6 条件培养基是刺激 HPP-CFC 因子的来源。将多个重组因子作一组合亦可获得同样结果。GM-CFC 计数的标