

应。另一种新的设想是放疗后巧妙使用降压药(如胍苯吡嗪),可改变体内的血液分布,有效地降低肿瘤的血流,如同时并用热疗,则这种组合将是一种正确的方法。

日本松平宽通教授通过动物试验,完成了培养哺乳动物细胞和鱼、小鼠胚胎胎儿突变及发育异常的研究。发现:1.在低剂量和低剂量率照射下,氚的β射线效应比γ射线高;2.γ射线在长期低剂量率照射下,除修复能力外,细胞生长和突变效应有所降低;3.辐射致癌效应受剂量和剂量率、受照时的激素状态、饮食和年龄等多种因素的影响。小鼠的胎儿和仔鼠被认为是判定肿瘤发生和寿命缩短的理想方法。

与会期间,日本体质研究会负责人还先

后同以中国医学科学院放射医学研究所及卫生部工业卫生实验所为负责单位的两大课题协作组,分别签订了双边合作协议。

中日核医学学术会议也于11月3日~5日举行。10多位日方代表和30多位中方代表出席了会议,会上报告了20余篇核医学领域新进展的研究论文。与会的中日核医学工作者还参观了中国医学科学院阜外医院核医学科和北京师范大学化学系。西门子公司还举办了一次正电子发射断层(PET)设备的讲座。

这次中日医学交流的空前盛会,达到了预期目的,必将促进两国医学界的相互了解和学术水平的提高,以进一步加强双边科技合作。

电离辐射和核酸内切酶诱发DNA双链断裂作为致癌致畸致突和细胞死亡的临界损伤

Obe G et al

摘要: 本文综述了低传能线密度(LET)电离辐射、胰脱氧核糖核酸酶(DNase I)和限制性内切酶(RE)引起DNA双链断裂(DSB)末端基团化学结构的改变。这些均为细胞毒因子,与细胞周期无关,可使体外哺乳动物细胞产生染色体畸变,也可引起基因突变和细胞癌变。核酸内切酶引起的染色体畸变可作为低密度电离辐射引起染色体畸变的模型。

一、高能量辐射DNA水溶液产生DSB

低LET X射线、γ射线或电子电离辐射主要是通过羟自由基(OH·)水解DNA,在水溶液中产生的单、双链断裂。主要有以下几类末端基团:

1. 磷酸酯键断裂的SSB,而无糖或碱基的改变。
2. 有完整糖和碱基,没有磷酸基团的SSB。
3. 带有变化的糖和/或碱基末端联或不联磷酸基团的SSB。

4. 丢失整个核苷酸的SSB,

在DSB中可认为由所述各SSB组成的。以往研究认为,DNA断裂末端糖基的变化在有氧和无氧时均能产生,但却形成不同的末端基团,这表明引起DNA链断裂的机制是不同的。由于氧的作用,随生成中间产物DNA过氧基的消失而形成链断裂。碱基过氧基作用由糖基的抽氢作用决定SSB形成快慢的因素。无氧时,无DNA过氧基的生成,此时碱基经糖基的抽氢作用,是影响SSB形成快慢的重要因素。

在产生3'-OH和5'-磷酸末端的情况

下,由于核苷酸的丢失不能简单地连接,到目前为止,测量末端基团G值总量(G值表示吸收每焦耳能量使分子形成或分解的显微尔数)是DNA链断裂后产生的末端基团G值的一半,说明我们对DNA断裂的末端基团认识是有限的。在有氧时,Henner等人(1983年)发现末端基团 $-CH_2COOH$ 有较高的产额,说明在氧的作用下,糖被分解成小的片段。

γ 射线照射DNA水溶液所产生的改变与在细胞中相似。这些改变碱基均出现在链断裂端。有氧时,碱基衍生物的形式是很复杂的,并包括不稳定的氢过氧化物,后者在有重金属存在时,可自身分解,产生高反应性的OH和氧基,可进一步引起DNA的损伤。

电离辐射对DNA链断裂的直接效应时,经用 10^{-9} 秒激光脉冲激发研究可观察到碱基阳离子生成中间产物,惊奇的是推测由嘧啶嘌呤阳离子引起的DNA断裂与OH自由基作用的结果相类似。电离辐射作用后,DNA中各类糖基的分布是未知的,OH自由基是随机分布于游离糖中,由于DNA空间位阻,OH基易从C-4'位上游离出。

Jericevic(1982年)的工作证实,经电离作用的磷酸基团很可能引起DNA链的断裂。

总之,电离辐射引起的DNA链断裂总是带有受损的糖基和碱基末端,有许多是整个核苷酸发生丢失。

二、DNase I 产生DSB的结构

DNase I是分子量为34000的单体蛋白,与DNA的小沟(minor groove)结合产生的SSB有5'-磷酸和3'-OH末端,对其混合晶体结构分析表明,酶结合在DNA小沟可引起双螺旋扭曲。在染色质内,DNase I可切割10余个核苷酸而产生SSB,它分布于DNA双链的二侧而形成不同长度碱基的DSB。DNase I只能作用没有蛋白覆盖的

DNA。

三、I型限制性核酸内切酶产生DSB的结构

I型限制性核酸内切酶通过打开磷酸酯键切割双链DNA,DSB可根据两个SSB之间的碱基对重叠的长度进行分类。

活性RE酶含有两个相同蛋白质亚基(二聚体),作用于识别序列上的磷酸二酯键使双链DNA水解。

RE的活性受保温时的温度、离子强度及pH的影响。RE切割识别序列的程度同样也受到识别顺序间部位等的影响,RE能识别4~8个核苷酸的碱基序列并进行切割。RE作用生成的DSB有5'-磷酸和3'-OH末端。RE与DNA识别序列专一结合后,就可非专一性的结合到DNA序列上,当两条DNA链切开时,两个磷酸酯键可被一个个切下,然后RE从DNA上解离下来。用碱基类似物代替噬菌体DNA中的胞嘧啶或胸腺嘧啶,可使RE切割活性降低或消失。

四、DSB, 细胞致命性染色体畸变

电离辐射、DNase I和RE都能使体外培养的哺乳动物细胞致死。AluI可使酿酒酵母死亡。上述材料显示DSB是引起细胞死亡的主要损伤。

中国仓鼠卵巢细胞(CHO)和人末梢血淋巴细胞,经X射线、争光霉素等因素作用,使染色质中产生SSB,再用特异性的单链核酸内切酶处理,染色体的畸变明显上升,证实核酸内切酶作用可使SSB形成DSB,DSB进一步引起染色体畸变。用中性蔗糖沉降技术,对受照后的CHO细胞DNA经核酸内切酶作用,可见到SSB转变为DSB。这些都证明核酸内切酶(DNase I和RE)作用染色体DNA生成的DSB,能引起染色体畸变。

五、核酸内切酶引起的染色体畸变

DNase I的染色体断裂活性首先由Callann和McGegor (1963年)报道的。Nuzzo和Zazak-Kaye (1987年)也证实DNase I可引起培养的哺乳动物细胞发生畸变,在G₁期表现出的多着丝粒点的染色体与DNase I使用量有相应的线性关系。S期DNase I可引起染色单体类型畸变,如染色单体互换。DNase I只有在高浓度时才引起畸变。DNase I失活的解释是其与细胞内肌动蛋白结合,或者只有少量的酶分子进入核内所致。

Ⅱ型限制性核酸内切酶引起染色体畸变出现在G₁期,染色单体型畸变发生在G₂期,在S期二种类型畸变均能出现。多着丝粒点和染色单体互换的畸变率与加入细胞内的酶量呈线性关系。

六、电离辐射和RE引起染色体畸变的比较

一些作者从RE活性和X射线剂量上,对引起的DNA断裂进行了比较,这些定量的比较也只能是粗略的估计。存在的主要问题是不知道有多少酶分子进入细胞核内,在细胞核内酶的活性能维持多久。下面对这些问题进行了讨论。

RE对细胞的处理

用RE处理细胞的方法有许多,在用AluI处理CHO细胞实验中,除电穿孔术外,用叠氮化钠或/和2-脱氧葡萄糖或低温都能使ATP合成受到抑制,表明酶分子进入细胞对能量是有依赖性的,可能是经吞饮方式进入胞内的。用氯喹、甲胺和巴西金叶树甙(monensin)等促溶酶剂处理CHO细胞后,再经AluI处理,引起的畸变明显降低而证实其作用机制。但也有不同的报道。

RE引起染色单体形成的DSB

有关这方面的实验,RE均用电穿孔法

导入CHO细胞内进行的。用Pvu II (200单位/ml)导入细胞内,Costa和Bryant(1990年)发现DSB数量呈上升趋势,24小时达到坪台状态,使用非变性滤膜洗脱法(pH9.6)检测Pvu II、BamHI及EcoRI等引起的DSB,证实其中Pvu II能有效地引起DSB,其用量在50~100单位/ml范围内与其诱导的DSB量呈线性关系,而BamHI和EcoRI无活性。用AraA不能抑制由Pvu II引起的DSB的修复。Costa和Bryant(1991年)认为DSB平头末端的修复是连接作用,而不是聚合作用,BamHI和EcoRI无活性,则认为DSB生成和连接修复之间存在一种竞争作用而引起的,这两种酶产生的粘性末端DSB修复要比其形成更有效。相反,Pvu II引起的DSB则属平头末端DSB。

已证实经电穿孔法使RE进入细胞内,其活性在核内可保持一段时间。可能是RE进入核内一段时间后,胞浆内仍有一定量的RE分子,也可能是RE识别不止一个核苷酸序列进行切割。RE处理G₁期细胞12小时或更长时间内,DSB的积累可产生染色体和染色单体畸变。

Obe(1985年)的微量法实验证实,细胞用RE处理时间越长,畸变生成就越多。这证明DSB的生成要有一定的时间,可能是用RE处理时,细胞要不断地接受酶。

染色单体结构对RE引起染色体畸变的影响

RE和DNase I与无蛋白的DNA作用时才能切割。RE能取代染色体蛋白与DNA结合,已被Morgan(1991年)证实。CHO细胞在分裂中期经AluI和Sau3AI处理,不产生典型的染色体畸变,但在下一分裂中期,却出现大量的染色体畸变,表明即使在分裂中期染色质也是被蛋白质折叠和包装着的,RE也能接触到DNA。毫无疑问,细胞在分裂期经RE作用,G₁期产生的畸变是酶活性作用的结果。上述实验中出现的高畸变,可

能是核分裂中期没有核膜使更多的RE与染色体作用。

染色单体结构对畸变率的影响是用AluI处理CHO细胞进行研究的。实验时所用的热休克处理可阻止AluI接近DNA,这种作用可使核酸内非组蛋白累积。相反,在有高渗无机盐溶液内,AluI可使CHO细胞和人末梢血淋巴细胞出现更多的染色体畸变。这是因为高渗盐溶液使染色质蛋白与DNA结合变得松散,使更多的识别序列暴露出来,而有利于RE的作用。

RE的识别序列与染色体的畸变率

RE与染色单体内的相互作用是非常复杂的,从计算染色体DNA的识别位点频率与RE引起染色体畸变间的相关性不能预测的,然经对比分析表明,他们之间的相关性是存在的。DNA内的碱基替换后,改变了识别位点,也会影响RE切割活性。

粘性末端与平头末端DSB

BamHI和EcoRI均能使DNA生成有四个碱基的粘性末端,这两种RE处理细胞只能引起轻微的染色体畸变。Winiger和Preston(1988年)用能分别产生平头末端和粘性末端的RE进行对比分析,分析时考虑了它们切割位点频率,结果表明这两类RE均能产生相同程度的染色体畸变或者切割成平头末端更有效。

用DNA解旋法,脉冲场凝胶电泳法测定RE经电穿孔法导入CHO细胞内引起的DSB,这些实验也证实了上述的两类RE均能产生相同程度的DSB。

核酸内切酶类引起的染色体畸变在性质上可作为电离辐射引起染色体畸变的模型。DSB在诱导染色体畸变中,本文对各类DSB的化学结构进行了讨论,可以认为DSB引起的染色体是经不同细胞机制发挥作用的。

七、基因突变

电离辐射可以引起hprt基因、tk基因发生突变。hprt基因突变大部分是遗传改变,如缺失。Na⁺/K⁺ATP酶的基因突变则不是辐射所致的。Singh和Bryant(1991年)经用电穿孔法将Pvu II导入CHOK1细胞内,引起tk基因的突变与RE的剂量(5~30单位/ml)有依赖性。EcoRI却呈现出较低的活性。在tk基因中,Pvu II有4个位点,EcoRI有6个位点,作者认为RE的识别顺序是均一的,实验结果支持了Pvu II所致DSB平头末端比EcoRI所致粘性末端更有效地引起tk基因的突变。其它试验表明,AluI能引起V79细胞的hprt基因突变,但不能引起Na⁺/K⁺ATP酶基因突变。这些资料表明,离体哺乳类细胞出现的hprt基因和tk基因突变与其DSB损伤密切相关。Na⁺/K⁺ATP酶基因则不同,其基因突变是碱基对改变。

八、离体细胞的癌变

电离辐射引起离体培养的哺乳动物细胞发生癌变已为人们所知,DNaseI经脂质体对叙利亚仓鼠胚胎细胞处理后,将形态上改变了的细胞接种到新生仓鼠体内可引起肿瘤,表明DSB是引起癌变的临界损伤。

九、小 结

电离辐射、DNaseI和RE均可引起细胞死亡,染色体畸变、hprt基因和tk基因突变以及细胞癌变。毫无疑问,DSB是引起这些变化的起因,但还不清楚的是DSB如何引起不同的生物终点以及是否各类DSB都是相同的,这些均值得讨论。