

电离辐射损伤和修复的研究进展

Arrand JE et al

摘要:讨论了DNA修复与肿瘤的研究领域,经典的放射生物学和生物物理方面的问题,以及用分子生物学和哺乳细胞遗传学方法研究DNA链断裂累积和电离辐射后的修复机制,并强调了它们在肿瘤放疗及测定个体暴露于电离辐射后的致癌危险度中的应用。

一、电离辐射诱发的损伤类型及其修复过程

已经明确,DNA双链断裂是电离辐射诱发的主要损伤,仅仅有少部分损伤有延续效应,这主要取决于损伤是如何发生的。DNA双螺旋的有序排列形成了严密的靶空间,并且在DNA上有广谱的能量沉积,不断增加的LET导致高能沉积和复杂、严重的损伤。

在DNA修复研究中,进一步认识由于损伤严重程度的增加而对于细胞修复能力提出异议,是很重要的。目前应用的分析DNA损伤(如DNA双链断裂)的方法尚无法区别不同类型的损伤,尽管它们可以检出相当于化学或辐射诱发的20倍致死剂量所引起的损伤。在哺乳细胞中,不同LET形成的双链断裂变化很小,但在链重接方面则有质的区别。类似的结果在酵母研究中也发现,即在有氧条件下,诱发的链断裂较低氧条件下慢,由此提示,氧可能在能量沉积和增加损伤程度方面起作用。

由于新的链断裂不断发生,使链重接动力学更加复杂。关于电离辐射诱发损伤的酶学方面知之甚少,利用气相层析及质谱分析大肠杆菌甲酰胺嘧啶DNA糖基酶所产生的修复产物后证实,这种酶具有修复DNA损伤中自由基的作用,从而抵消了活性氧的有害作用。

二、用于检测辐射诱发DNA损伤的新方法

准确检查生物学相关剂量水平的电离辐射损伤是一个由来已久的问题。利用中性洗脱法检测的剂量-反应关系,不是线性相关,且没有采用分子量标准,因此在肿瘤放疗效果及肿瘤发生可能性预测过程中,很难清楚研究DNA

的损伤和修复。

交变场凝胶电泳(PFGE)逐步应用于检测DNA双链断裂,尽管有一些未受样品的干扰。在该系统中,辐射增敏剂—溴脱氧尿苷整合到DNA中,引起DNA不规则迁移。最近利用反相脉冲交变电泳对这一系统进行了改进。在48小时内,从一个凝胶上可以分辨出200kb~6Mb的DNA片断,从而对1~100Gy的X射线照射后双链断裂特性及50Gy照射后修复特性进行研究。对于具有双微染色体的细胞,脉冲电泳及Southern blot杂交合并应用,也可以研究30Gy照射后的修复情况,其检测损伤的下限为2.5Gy,且剂量-反应关系较好。同一照射剂量下,对裸DNA的损伤是细胞内DNA损伤的80倍,由此也证实了细胞内环境对辐射诱发DNA双链断裂的影响。还研究了用于检查单一细胞内单链或双链断裂的微电泳“彗星”分析法去分析细胞的辐射敏感性。该技术提示DNA包装(如S期)过程中的差别可以影响DNA的迁移率。

整个染色体的荧光原位杂交技术用于分析电离辐射后染色体断裂重接作用的方法已被改进并自动化,可以很容易区别单个染色体内的断裂和交换。与早熟染色体凝聚相结合,可以快速而准确地检查临床受照剂量范围(0~5Gy)内DNA和染色体的损伤,同时可以预测人类肿瘤的辐射敏感性。利用敏感的免疫化学方法检测单链断裂,可以预测合并应用化疗和全身放疗后的治疗效果。与改良的碱洗脱方法结合起来,可检出经过治疗后白血病病人的单链断裂和碱基损伤,利用相似的免疫化学方法可提

高血细胞中双链的断裂率。

三、利用细胞提取物分析 DNA 修复

利用哺乳细胞的温和裂解物催化限制性内切酶诱发的双链断裂,可以有效地区别正常和辐射敏感细胞。但目前用于电离辐射诱发的链断裂分析尚未成功,只在一个仓鼠突变体中检测到一种缺陷,人细胞系中尚未成功。需要更多的生理条件才能分析链重接过程中起作用的蛋白质。具有产生转录、复制功能和修复复合物的提取物,经过改进后,可以在体外用于分析具有转录活性基因的优先修复情况。

该系统最终将用于修复蛋白的提纯及基因克隆,但这将是一个长期的工作。类似的方法如利用合成的含误配碱基的寡核苷酸分析修复酶(如 DNPase 和 DNAase IV)的相关作用,这些酶存在于大肠杆菌和哺乳动物细胞的复合物中,DNPase 主要是切除类似于辐射诱发的 G/U 错配,DNAase IV 起辅助作用。在修复过程及合成底物中加入 DNA 多聚酶抑制剂,证实了 DNA 多聚酶 β 在人细胞及细菌中均具有填充碱基切除空位的作用。

四、检测培养细胞中 DNA 损伤

对于电离辐射和限制性内切酶产生的双链断裂及修复的结果等问题的讨论,与这样的假设是一致的,即在有氧条件下的最初质的损伤而非量的损伤依赖于 LET。该模型中双链断裂产生及修复的竞争及限制性内切酶系统,使问题复杂化。那些残余的未修复的损伤将影响细胞的存活。

在高于临床剂量情况下,已应用所述修复测定来预测 AT 杂合子突变或肿瘤辐射敏感性。应用延迟接种技术已能从未知标本中检出 AT 杂合子。具有 AT 杂合子的妇女易患乳腺癌,人群中约 2% 个体有 AT 基因缺陷,10% 的乳腺癌病人可能是 AT 杂合子携带者,因此,对这部分人群避免在胸透和治疗时接受过量的 X 射线是很重要的。利用延迟接种技术可以分辨

出乳腺癌患者中 50% 的修复缺陷个体,其中仅有 10% 的可能是 AT 杂合子携带者。这种方法还可检出其它的那些在纯合状态下是致死性的、在杂合状态下易使个体发展为乳腺癌的基因缺陷。尚无单一的一种方法即可正确检出 AT 携带者或预测肿瘤的辐射敏感性,只有在 AT 基因及 X 射线修复基因被克隆后才能准确地预测。

五、修复及修复的诱导、错误修复、辐射致癌

损伤诱发的 DNA 修复已从细菌和酵母研究中积累了大量的资料。越来越多的证据表明,哺乳细胞中有诱导修复系统。本次会议上,提出了用不同形状的存活曲线测验诱导修复理论。来源于存活曲线形状的诱导修复证据支持体内肿瘤研究的结果,同时也提出了一个电离辐射诱导的特异的 DNA 修复途径,即 6-氧甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶对烷基取代损伤的修复。

将限制性的 DNA 分子暴露于细胞提取物或人细胞暴露于 X 射线后,DNA 重复序列之间产生的缺失及 hprt 突变体的分离,在体内和体外都证实了修复或错误修复的现象。覆盖很长基因组的非同源重组机制也存在于其它的人基因中,如男性生殖细胞暴露于电离辐射后造成的序列缺失,使精子发生过程中逐渐丧失了修复能力。

六、修复突变体、基因、综合征

随着对损伤测定方法的改进,无疑有助于对 DNA 修复机理的理解,但只有在克隆了修复蛋白的基因并对其特性进行研究后,才能彻底解决这一问题。已克隆了几个紫外线损伤修复的基因。在校正仓鼠突变体的基础上克隆了一个人 X 线损伤修复基因(XRCC)。在遗传性疾病及肿瘤组织中没有发现这些基因的缺陷。第二个参入电离辐射损伤修复的人基因,无嘌呤核酸内切酶基因已被克隆。人体中辐射损伤的修复基础研究需要更多的突变体和互补基

因。

几个互补性的啮齿类动物 X 射线敏感突变体已经获得,但它们的基本缺陷尚不清楚,也没有克隆到互补基因。染色体转移技术的应用,已将与仓鼠 xrs 突变体互补的人基因定位于 2 号染色体长臂,且正在进行基因克隆的工作。通过研究交叉敏感性及细胞提取物对确定的 DNA 损伤的校正,明确了 irs 组突变体的特性,最近分离了更多的 V79 X 射线敏感突变体。目前正在克隆人类的突变校正基因及小鼠 X 射线敏感的 scid 突变的研究工作。

当前,大量的工作仍是集中在 AT 缺陷的研究方面。该基因的分离克隆,对于认识辐射损伤移除和修复的机制及其在体内的调节作用,通过遗传控制而减少 AT 基因池,以及迅速、准确地从那些乳腺癌及其肿瘤易患个体中筛选杂合子携带者等,都具有重要意义。位置克隆技术已将 AT 基因定位于 11q22-23 的 4 分摩范围内。目前正移用多种方法如考斯质粒,酵母人工染色体、辐射杂交图谱、体细胞遗传及微小卫星序列标记技术等,对该范围内的基因进行研究。所有的克隆基因将通过转染入 AT 细胞内,检查其校正 AT 辐射敏感缺陷的能力。转染技术曾用来筛选原始的校正基因,但最近证实这种方法是不成功的,在我们的实验中只是部分成功。另有实验通过 AT 细胞与大量受照后的仓鼠细胞系融合而校正了 AT 缺陷,但由于缺少仓鼠 Alu 重复序列,因此,限制了仓鼠校正序列的克隆,但该问题目前已经得到解决。

对于正常个体内成纤维细胞及 T 淋巴细胞广泛的筛选,促进了对无明显遗传基础的辐射敏感缺陷的认识,这将有助于我们理解辐射敏感性的基础及由此造成的人体内肿瘤发生情况。

七、放疗过程中与肿瘤及正常组织的 辐射效应相关的修复

对 DNA 链重接与 DNA 修复的准确性及细胞存活之间关系的研究使我们认识到,电离辐射诱发的损伤修复并非是决定人肿瘤中辐射抗性的中心环节。在质粒重接分析中,应用人肿瘤细胞提取物并不能区分肿瘤的辐射敏感性和辐射抗性,如神经纤维瘤、卵巢瘤、胶质瘤等。

可诱导的 DNA 修复可能是肿瘤及正常组织对放疗的一种反应。临床观察到,当每次照射剂量较低时,辐射效应也逐渐降低。然而在很低剂量时,在体内的正常组织及体外的仓鼠细胞中又观察到辐射敏感性的增加。这可能是由于 DNA 修复的诱导而并非细胞周期或辐射抗性的亚细胞群体的效应,而且这种效应可能对临床放疗及暴露于环境中低剂量危险度评价方面产生影响。

考虑到肿瘤组织中掺杂有正常组织而影响修复效应,因此,分次间隔照射已用于临床研究且在设计放疗方案时予以考虑。如果能在体外预测到肿瘤及正常组织的辐射敏感性,将会有更大的临床意义。目前已有实验室成功地培养了电离辐射暴露后的肿瘤及正常组织用于生长特性分析。但这些方法周期较长,且由于细胞过度生长而影响细胞亚群的辐射效应。因此,正在努力寻找一种更快速的方法,以便能在放疗开始前或开始后的几天内鉴别出个体的辐射敏感性。

八、结 论

由于方法学的进展,使我们对辐射损伤有了一个定性和定量的了解,并进一步认识了损伤的移除或“固定”使细胞存活不致受损或导致细胞死亡、突变、转化等一系列过程。克隆 DNA 修复基因和揭示控制它的表达的复杂机制促进了肿瘤治疗的进展及鉴别出那些具有发展为辐射相关的肿瘤的危险个体。

Int J Radiat Biol 1992;61(6):712-720(英文)

刘炳辰节译 穆传杰校