

粒子辐射所致 DNA 损伤与修复效能及哺乳动物细胞敏感性

Lett JT

摘要: 目前认为 DNA 水化壳与细胞核内容积水不同,是 DNA 不可缺少的组成部分。新观点主张放弃经典的“直接”和“间接”作用理论,认为 DNA 水化作用促进或参与能量和电荷传递,它才是辐射对细胞作用的精确理论。

引言

以往 LET_∞(单位径迹长度失去的能量)用于描述电离密度,但同样的 LET 可由不同径迹结构的重离子产生,因而是 inaccurate 的。随着对 DNA 水化水功能及 DNA 和脱氧核蛋白中电荷及能量沉积在辐射反应中作用的进一步了解, DNA 放化研究重点已改变,其结果使“间接作用”一词将被放弃,而用“可清除”损伤代替。有足够的理由认为,细胞核内能量沉积的靶子是水化脱氧核蛋白及某些结合水(水化 DNA 周围有 3 个水分子厚度的水),后来发现,致死性损伤累及基因组 DNA。

辐射诱发细胞致死性 DNA 改变是 DSB 或某类型 DSB,因为,对稀疏电离辐射具有抗性的细胞能有效修复其它类型 DNA 损伤。不同 DSB 的形成及其命运是本文讨论的主要课题。

用电离射簇来解释 DSB 是由稀疏射线引起水化 DNA 中发生的不连续事件更合适。目前,很少用局部多种损伤这一概念,因它是一种假设的、未经证实的化学机制。也不应不加区别地应用电离射簇理论,有时它受低 G 值的影响。由稀疏电离辐射引起的需要极少能量的少数事件,也可能产生 DSB。因此,水化水中沉积的能量,如直接传递到已知 DNA 双螺旋多聚核苷酸结构上,就能仔细计算出能量值。无水化水就勿需计算。也可能有来自细胞内蛋白的能量传递,问题是要弄清什么是最终的能量沉积,而不是最初的能量吸收的靶子。

用标准的酶动力学可描述细胞存活曲线的

形状,但需了解由能量吸收到最终生物效应间各事件发生的顺序,靶子说已不适用,因为它忽略了修复及调控方式。用修复停止后呈现的 DNA 变化来测定存活曲线,该模型由剩余的没有修复和/或不完全或错误修复损伤所决定,是修复的效力和速度的反映。亚致死损伤概念不能精确地解释放射生物学现象,与饱和修复相抵触。修复饱和对酶动力学而言,是指反应速度的饱和,在此情况下,修复未停止,而是以最大速度运行。

直接和间接作用现状;需氧条件

虽然 30 年前就已测定了 DNA 水化作用曲线及水化水对稀疏电离辐射引起 DSB 的影响,迄今才承认脱氧核蛋白水化作用对细胞辐射敏感性的意义。这些知识有助于研究受照水化 DNA 的早期化学事件,在放射生物学中有重要影响。有些化合物能清除细胞核容积水中自由基,起辐射防护作用。研究水化 DNA 和脱氧核蛋白时,根据推定的自由基清除效应,计算了细胞核内自由基扩散而袭击细胞 DNA 的范围由 5nm 降到 1nm,“间接作用”对细胞致死的贡献变小。据此,最近计算时,将 DNA 内 SSB 与最大“清除能力”一起考虑。

Word 见解不同,指出自由基清除剂(DMSO)的浓度高于 1.0mol,其防护能力不增加,DMSO 不能清除与 DNA 反应的结合水中的 -OH 及其前体 H₂O⁺,此例中,“直接效应”是不能被 DMSO 清除的损伤,因此,溶液中 DNA 的差别介于“可清除”和“不可清除”的损伤之间。电离辐射诱发溶液或细胞 DNA 损伤时,不

能消除结合水中能量沉积引起的损伤,因此,机理上的不同也在于“可清除”和“不可清除”损伤之间。将来自模型研究的资料用于计算“不可清除”损伤的产额,在 1mol DMSO 存在下,Milligen 测定了受照染色质 SSB 产额为 G21.9,由 DNA 分子内直接沉积的能量算出,此值相当于每个细胞有 700 个 SSB,即每 Gy 在一个细胞中产生 1000 个断裂,其中 35% SSB 未能清除。上述计算,可清除损伤要求在直径为 2nm 圆柱周围水厚度小于 3 个水分子,自由基扩散小于 1nm。矛盾之处在于,1000 断裂/细胞·Gy⁻¹时,断裂效率为 38eV/断裂,此值在不同细胞周期及分化状态都是一样的,在自由基被 DMSO 最大清除条件下,染色质 G 值与未有清除剂存在时的细胞相同,因此细胞内“间接效应”实际为零,认为此观点不够正确,必须考虑到受照 DMSO 本身形成自由基的影响。选择 1mol 为最大清除浓度也有些武断。 γ 射线照射质粒(ρ BR322)DNA 水溶液时,在任何甘油浓度下都能发生 DSB 诱发率的饱和,但对 SSB 无影响。DSB 是由被分割成许多 10BP 大小(3~4nm)DNA 双螺旋双链断裂所形成,由不连续事件引起的 DSB,似乎是由受累 DNA 双螺旋电离射簇引起的不可清除损伤所致,确定其 DSB 的化学类型,需观察水化在 DNA 放化中的作用。DMSO 和甘油对细胞基因组 DNA 的主要影响是由于限制了水化壳内及其外缘的结合水分子数目,薄层水可影响电子传导,多价金属离子催化 DNA 损伤,而巯基化合物等起保护作用,这些功能都受 DMSO 和甘油的影响,因为它们可能与核蛋白相互作用。应指出, DNA 水化水牢固地结合在双螺旋沟槽中的磷酸基上。对某些类型的 DNA 损伤,水和受损 DNA 的反应可能与 OH 基和未受损 DNA 的反应相区别,因此,主张放弃“间接作用”一词,考虑到 DSB 的一个链断裂是由“直接作用”引起的,而另一个则由“间接作用”引起,因而也不主张用“可清除”或“不可清除”这样的概念,除非它们准确无误。

受照 DNA 的早期事件

迄今,研究 DNA 中电荷和能量传递大部分是用稀疏电离辐射,认为产生电子失去中心(G⁺)及电子俘获中心(C⁻, T⁻)的电荷迁移,在低温和常温下能被水化 DNA 中水化水提高,水化水影响电荷分离,远离能量沉积初始部位损伤的定位,导致产生化学产物。对致密电离辐射,电子穴,如甲氧甲基硝基咪唑乙醇,在受照 DNA 中通过清除自由电子干扰基因重新组合,因此,电离射簇能导致损伤部位基因数目明显增加。由于 LET 增加,使氧和其他辐射增敏剂生物效应降低,在损伤集中的局部,电子俘获引起基因增加不明显,相反,如果 C⁻(T⁻)导致 DNA 断裂,在微微秒的时间内,未经重新组合的电子的清除只可导致少量 DNA 损伤的形成。当用 γ 射线照射 DNA 冻存液时,电子俘获还能减少 C⁻(T⁻)SSB 和 DSB 产额。

现在已有可能评价重离子引起的 DNA 中的早期事件。受 100k 重离子照射 DNA 的电子自旋谐振谱单线能谱,根据线的宽度可分为几种不同的形式,这些形式也见于 300k 照射后所得到稳定性基因的结构中,这种效应是在离粒子径迹结构最近处(2.5nm)产生的基因的非均匀分布的双极相互作用引起的。常温下,用扩散反射脉冲辐解法分析水化 DNA,发现具有完整水化壳(1gH₂O : 1gDNA)的 DNA 的吸收谱与附加水不同,如在 3gH₂O : 1gDNA 时,吸收谱就与用脉冲辐照 DNA 的水稀释溶液相似。最近用电子自旋反应研究的结论也附合在旧观念中由“直接作用”向“间接作用”转换的解释,但重复却很困难。

相对湿度为 76% 时,水化水是 DNA 靶子的组成部分,而放化是研究冰冻及 95% 相对湿度的水化 DNA,因此,77k 照射时,基因产额随水含量而增加是由于 76% 湿度前出现坪的饱和曲线的靶子体积(DNA + 水化水)增加所致。这项结果与以前用干的或冰冻 DNA 的研究结果相似,差别在于两者剂量产额曲线的斜率不同,指出湿度 76% 时, DNA 中含等量水化水。

照射水化水引起碱基释放是原发水化层中头 12~15 个水分子(每个核苷酸)直接电离($H_2O^{\cdot+}, e^-$)的电荷传递所致。Lett 也发现,攻击在外层结合更松弛的水分子中生成的 OH 基,也发生碱基释放。辐照冰冻液也可观察巯基对 DNA 损伤的影响,用 100k 照射 DNA 含胱胺的 D_2O 溶液时,两者产生的碱基离子相同,当后者对 100k 退火时,电子由胱胺转移到 $G^{\cdot+}$ 上,也能从 $C^{\cdot-}$ 转移到胸腺嘧啶生成 $T^{\cdot-}$,这个结果支持了电子沿 DNA 传递可能发生巯基和空穴迁移的说法。这些发现对解释氧对细胞辐射敏感性的影响是很重要的。业已证明,氧和巯基对 DNA 基因的竞争是放射生物学氧效应的化学基础。

氧效应与 LET

虽然,氧对细胞辐射敏感性的影响在 RSE 峰值出现前的 LET 区域内大部已消失,但很少了解其余 LET 范围内水化 DNA(染色质)真实的早期化学变化,由于氧效应降低,细胞 RBE 关键性改变似乎与 DSB 和染色质断裂诱发频率增加及其修复效率降低有关。人们相信,细胞内氧效应参与化学致敏和 DNA 修复,例如, DNA 过氧基和巯基反应,低 LET 下 SSB 诱发效率受重金属离子影响等。

细胞 DNA 的双链断裂

强调研究辐射诱发 DSB 主要是为弄清受照细胞的命运,一般认为,DSB 不完全修复是细胞致死、突变及癌变的根源。在较高剂量下,用现有技术已揭示 X 线诱发 DSB 细胞周期期间的差异。依据 DNA 放化知识,类似细胞周期反应见于较高 LET,但需要慎重研究损伤的发生及 DSB 的非泊松分布等问题。用超致死剂量照射同步哺乳动物细胞、低等微生物、质粒和 DNA 纤维后,分析了 LET 对诱发 DSB 反应的特性,对稀疏电离辐射,即使微小差别也能准确测出。在有氧条件下,正常抗性细胞 DSB/LET 反应模式与细胞致死效应的 LET 反应曲线的

形状相似。

用可信的分子技术研究 LET 时发现,细胞 DSB 与剂量呈线性关系,LET 增加必然引起 DSB 化学的质和量的变化,与电子计算机模拟相似,完全证明了 DSB 的有效修复随 LET 增加而降低,尤其是低等真核细胞。在有氧条件下,暴露了 MeV 电子而不是 3-5MeV 的 α 粒子时, DNA 损伤伴有第二次 DSB 产生。特别急需更多有关对放射生物学有意义的剂量条件下用哺乳动物细胞进行研究的资料,来解释细胞致死 DSB,LET 和氧效应间的基本关系。

染色质损伤,染色体畸变,LET 和细胞存活

在所观察的 LET 范围内,早熟染色体凝集(PCC)断裂是剂量直线函数,除重离子所致严重损伤外,损伤难以定量。PCC 断裂似乎只诱发部分 DSB,而且 RBE/LET 反应很小,LET 对染色质断裂的影响与 DSB 相似。对正常辐射抗性细胞而言,某些染色体畸变是细胞死亡的原因,虽然断裂也可由错误修复引起,但还是把损伤分为不可或不完全修复及错误修复(交换)两类。再者,从有价值但有限的证据反映,LET 效应与 DSB 和 PCC 断裂有关,尤其是断裂/交换比的变化表明了修复发生的困难程度。因为交换似乎是其它准确修复(重组)功能发生错误的副产品,故企图找到 LET 对 DSB、染色质断裂及其它细胞修复功能如染色体畸变和辐射敏感性等生物学终点相互关系的影响,现在还还为时过早。然而,也有不同看法认为,了解 LET 反应基本性质已在掌握之中,最终答案将符合包括酶(反应)动力学在内的细胞辐射敏感性的理论。

酶动力学和细胞辐射敏感性

根据酶反应动力学建立起来的细胞存活理论,细胞存活曲线的形状由修复后的 DNA 和染色质变化所决定,这些变化包括未被修复或未被完全修复或错误修复的致死性损伤,如果能量、沉积所致染色质(DNA)损伤与剂量成直

线相关,在无修复情况下(理论上),存活曲线呈简单的指数性质,当“修复”和“固定”反应发生竞争时,修复功能遵循第一阶动力学,也是简单的指数性质,但其斜率反映的是染色质(DNA)损伤的诱发率和其后修复功能的调节作用。

当辐射剂量增加,反应机理由第一阶向零阶变化,即辐射损伤的数量增加时,许多类型细胞存活曲线的斜率,在低剂量时为直线,而高剂量时则有肩部分割;当有两个连续发生的反应或有两个同时发生的反应,或几个反应组合的更复杂的情况下,存活曲线斜率减少,反映现正经历第一阶反应,降低了存活曲线的斜率,勿需测定所给剂量诱发的染色质初始损伤。

当以不同速度常数,一是第一阶、另一是零阶,同时发生的两个过程对稀疏电离辐射诱发同一损伤(DSB或染色质断裂)之间相互竞争时,除非中途停止,修复将继续进行到完成。因此,许多曲线的斜率都是假设在照后不同时间点上反应终止基础上建立的,而未考虑不完全修复和细胞周期的影响。当LET增加,基线(零时间)的斜率首先是增加,然后随LET对诱发DSB和/或染色质断裂的影响而降低。另外,由于修复作用所致斜率降低可能随LET直降到零,影响基线变化的这些效应相叠加代表LET全部效应。当修复减少到零时,存活曲线为一简单指数函数,其斜率是辐射损伤诱发率的直接度量。

如果LET对零阶反应是原发的,实际曲线的肩部在其它修复功能失效前就消失。然而,这样的细胞至少有两套修复机理参与修复,因为染色质断裂可能被静止期(G_1 , G_0)细胞修复,反之,如染色体交换可能涉及到以后细胞周期的其它(错误)修复过程,提高LET的结果,可能使无效修复的致死产物取代不适当修复的致死产物。

细胞灭活饱和截面

Zimmer认为,靶学说只在两种特殊的条件下才能描述存活曲线,一是缺乏修复辐射损

伤的细胞机制;二是虽有修复机制,但未能活化或在特殊条件下对某些类型损伤不起作用,后者已被确认,辐射高敏感的修复缺陷突变体L5178YS/S,失去对LET为 $475\text{keV}/\mu\text{m}^{98}\text{Nb}$ 所致损伤的恢复能力。在这种特殊情况下,细胞灭活的饱和截面稍大于其几何截面,这种差别归因于径迹宽度、射束断裂及DNA损伤的非泊松分布等。 G_1 期S/S细胞的X射线敏感性受照后温度的影响,低温效应表明修复能力的增加,所获能灭活截面较 37°C 时小,恰好接近于截面的饱和状态。

如果修复发生在第一阶,则预示灭活截面减少,从正常辐射抗性具有修复能力的人肾细胞所得到的截面较小,使这一解释更加令人信服,也表明对这些细胞来说,达到修复饱和状态的速度比S/S细胞更慢。对具有修复能力的细胞,反应细胞几何截面的饱和截面只有在高LET($>10^3\text{MeV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$)才能达到。而某些人类肿瘤细胞系间放射敏感性的差别只有LET达 $4000\text{keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ 时才能显现出来。

用细胞致死反应动力学的概念解释LET对饱和截面的影响,为放射物理学家长期关心的问题提供了可信的解释,这些物理学家企图只根据能量沉积模型和初始细胞损伤来解决哺乳动物细胞饱和截面,当用Zimmer第二原则时,后一方法才是正确的。

结 论

用重离子分析研究有希望最终解决细胞辐射敏感性的机理问题,特别要加强DNA的放射化学研究,起特殊作用的DNA(脱氧核蛋白)水化壳必然成为辐射对细胞作用的化学和物理学理论中的一部分。用能量沉积模型解释细胞辐射敏感性不太恰当,而抽象的科学概念更会适得其反。为细胞敏感性提供科学解释的现代方法,很快就会取代用于放射治疗的纯数学计算的方法,正如Yase提出的线性平方模型——LQ模型对整理临床和实验资料是很有用的理论,其中并无什么奥秘, $E = -\ln S$ 是剂量

D 的函数,当 $D=0$ 时, $E=0$, $2D+\beta D^2$ 表达式给出的是泰勒级数中 $D=0$ 时的 ED 扩展式的头两项, LQ (线性平方) 模型有用, 是指对与通常临床放疗应用的分次剂量相似剂量时, E 的

近似值不比泰勒级数头两项高。

[Radiat Environ Biophys 1992;31:257~277

(英文) 穆传杰节译 杨凤桐校

文 摘

063 受 X 射线照射 7Gy 成龄和幼鼠造血系统的残留损伤 [英] / Grandeo T... // Int J Radiat Biol. - 1993, 63 (1). - 59~67

成龄鼠和幼鼠经 X 射线全身照射后, 其造血和基质细胞所形成的残留损伤是不同的, 本实验对成龄和幼鼠造血干细胞的缺陷, 成熟粒细胞功能和基质细胞的作用进行了研究。

方法: F_1 鼠 7Gy 一次全身照射, 剂量率分别为 1.05Gy/min 和 0.87Gy/min。用 B γ um 法分离淋巴细胞, 股骨和脾内细胞用 IMDM (Giboco) 培养液制成悬液。CFU-S 按 Till 法测定, CFU-GM 和 BFU-E 的测定与 Teiero 相同。评价造血微环境的长期骨髓培养 (LTBMC) 用 Dexter 和 Greenberger 方法, 其上清部分刺激细胞生长活性用 CFU-GM 评定。

结果: 成龄鼠受照后 1 个月、1 年和 2 年, 生存率为 95%, 90% 和 50%; 幼鼠照后一个月为 90% 并维持一年, 2 年为 80%, 受照幼鼠体重明显减少。受照成龄鼠第一年血细胞比容和白细胞为对照组的 80%, 以后持续下降, 幼鼠变化不明显。照后第一年内, 成龄鼠每根股骨有核细胞数为对照组的 90%, CFU-GM, BFU-E 出现衰减。CFU-S 为对照组的 30%, 照后 20 个月, CFU-GM, BFU-E 恢复到对照组的 60%。幼鼠股骨有核细胞为对照组的 80%, CFU-S, BFU-E 一年内达到对照组的正常值。受照后一个月, 成龄鼠脾细胞为对照组的 70%, 造血干细胞为正常的 30%。幼鼠脾内细胞为对照组的 60%, 一年后每 10^6 脾细胞中的 CFU-GM, BFU-E 和 CFU-S 与对照组类似。成熟细胞的 O_2^- 可反映干细胞恢复, 受照后成龄和幼鼠

的 O_2^- 生成明显升高。受照鼠一年后, LTBMC 表明成龄鼠增殖池基质有 $(5.1 \pm 0.1) \times 10^4$ 贴壁细胞, 幼鼠为 $(7.6 \pm 0.5) \times 10^4$, 14 个月非照射鼠为 $(8.3 \pm 0.9) \times 10^4$ 。从 LTBMC 收集的粒细胞, 观察到受照成龄和幼鼠的 O_2^- 均高出对照组的 2~3 倍, 从受照鼠 LTBMC 收集的上清液具有明显的 GM-CSF 活性。这表明经 7Gy 照射的成年鼠, 其股骨和脾细胞生成的 CFU-S, CFU-GM 和 BFU-E 持续性衰减。而受照幼鼠却持续性恢复, 一年后接近正常。受照成龄鼠一年后, 其 LTBMC 表明造血基质低于受照的幼鼠。受照幼鼠和成龄鼠的外周血和 LTBMC 中收集的粒细胞, 均能生成较高水平的 O_2^- , 在 LTBMC 上清液中, 有很强的激活 CFU-GM 生成作用。

(孙元明摘 蒋铁男校)

064 局部或全身应用 16,16dm 前列腺素 E_2 (PGE $_2$) 或 WR-2721 (WR-1065) 对受局部照射小鼠脱毛的防护作用 [英] / Geng L... // Int J Radiat Biol. - 1992, 61(4). - 533~537

方法: 麻醉下拔去 B6D $_2$ F $_1$ 雄性小鼠右肋腹部及其周围的毛, 导致毛生长初期, 每组 6 只动物用 ^{137}Cs γ 射线局部照射 (剂量率 1.3Gy/min, 剂量范围 20~50Gy)。从毛生长初期的 10~15 天, 每天照射 4.0Gy 或 4.5Gy (5 天组); 从 5~15 天, 每天 2.5, 3.5, 4.5, 5.5Gy (10 天组); 从 3~18 天, 每天 2.0Gy (15 天组)。照射前 1h, 每只小鼠分别皮下注射 10 μ g PGE $_2$ 或 U-62840 (PGE $_2$ 的类似物) 或 8mg WR-2721; 照射前 15min, 分别局部应用 10 μ g PGE $_2$ 或 0.3mg WR-1065。PGE $_2$ 和 U-62840 用 2% 乙醇和磷酸盐缓冲液作溶剂, WR-2721 和 WR-1065 则用林格氏液。照后 3 周活杀小鼠并取