

究了在孕期的不同阶段将<sup>239</sup>Pu引入小鼠体内后对造血的影响。结果显示,在怀孕的早期阶段给予低剂量的<sup>239</sup>Pu时,对干细胞具有直接作用;而在较晚时期给予时,<sup>239</sup>Pu的作用是降低了骨髓微环境的造血能力。至于在宫内的不同发育阶段,多种潜在的造血细胞对α粒子损伤的敏感性问题也需要加以进一步的研究。

### 参 考 文 献

- 1 朱寿彭等. 放射毒理学. 第二版, 北京: 原子能出版社, 1992: 301-302
- 2 Stather JW et al. Comparative studies on the transfer of radionuclides to the fetus in the rat-

- implications for human dosimetry. In: Gerber GB, Metivier H eds. Age-related factors in radionuclide metabolism and dosimetry, Netherlands: Martinus Nijhoff, 1987: 371-380
- 3 Morgan A et al. Int J Radiat Biol, 1991; 59(6): 1395-1413
- 4 Sikov MR et al. Health Phys, 1968; 14(3): 205-208
- 5 Wiss JF et al. Health Phys, 1978; 35(6): 773-777
- 6 Hui TE et al. Health Phys, 1993; 64(suppl 1): S74
- 7 Morgan A et al. Health Phys, 1992; 63(5): 552-559
- 8 阎效珊. 国外医学·放射医学核医学分册, 1990; 14(3): 114-116

## DNA 损伤检测技术的新进展

西安医科大学 李 润综述 王德全 曹恩华\* 审校

摘 要: 在 DNA 损伤检测中, 染色体畸变经历着筛选与改进, 用激光扫描共焦显像探测类核的改变及核粒的出现对探讨 DNA 损伤具有重要作用。以 dsb(双链断裂)及突变检测方法为主要内容的 DNA 分子水平损伤的研究方法层出不穷。从单个细胞的全基因放大获得了精子或卵子分型及多点核酸图谱; 凝胶电泳及滤膜洗脱技术不断改进, 使 dsb 及突变检测灵敏度及可靠性不断提高。HPLC(高效液相色谱法)及 GC/MS 技术的应用, 大大提高了单个碱基突变的检测灵敏度。

近年来, DNA 损伤的检测技术不断发展, 原有的技术在沿用中接受筛选与改进, 新的技术不断出现。

### 1 染色体畸变的沿用与改进

染色体畸变是最经典的观察指标, DNA 损伤后, 染色体可出现各种异常表现, 故是至今仍被沿用的主要观察指标。但是, 对具体的某种畸变形态能否作为损伤指标, 尚在不断筛选之中。例如, 有人以染色体畸变为观察指标, 检测了某些德国居民外周淋巴细胞的染

色体变化。在原苏联切尔诺贝利核事故后, 这些人是德国境内接受辐射剂量最大的居民(>42kBq/m<sup>2</sup>), 曾接受体内放射性铯的含量测定。在 1989~1990 年间, 他们的染色体畸变不断上升。但上述测定结果不能对双核和环状染色体的暂时下降做出解释<sup>(1)</sup>。

早熟染色体凝聚已作为 G<sub>1</sub> 期人淋巴细胞接受电离辐射时染色体损伤的指标, 但随辐射后的时间推移, 这种损伤逐渐修复, 而低温保存可暂时冻结修复过程, 待以后的剂量分析<sup>(2)</sup>。

\* 中国科学院生物物理研究所

在评价一位工作人员的受照剂量时,有人比较了四种方法的检测结果,在GPA(血型糖蛋白A位点)突变,染色体易位、微核和双着丝点四种指标中,GPA突变和染色体易位明显升高,提示这两种指标较为敏感<sup>(3)</sup>。

有人将BrdU(5-溴脱氧尿嘧啶核苷)掺入中国田鼠细胞DNA,经过两个细胞周期后,以电子打孔方法将四种限制性内切酶导入细胞,这四种酶分别为能识别富含胸腺嘧啶序列的酶EcoRI(识别GAA/TTG),Sea I(识别AGT/ACT),Dra I(识别TTT/AAA)和不识别序列中胸腺嘧啶的酶Hae III(识别GG/CC),观察酶所引起的染色体畸变和断裂。结果表明:BrdU掺入后,染色体对识别富含胸腺嘧啶序列的酶所引起的DNA断裂呈现对抗作用<sup>(4)</sup>。

类核的激光扫描共焦显微检测。据报道,用X射线照射细胞后,以原位碱变性方法溶解细胞,将产生的类核捕捉于琼脂糖膜中,经溴化乙锭染色,应用共焦激光扫描荧光显微镜测量由DNA损伤引起的松弛度,球状类核体积及相对DNA含量,并分析了经过类核赤道平面的共焦截面,结果平均类核体积的增加是细胞接受X射线剂量的线性函数,提示在非周期培养中,不考虑细胞循环年龄时细胞中的DNA解聚和解链特性的多相性,则相对DNA含量对类核体积的二元点阵图可直接用于估计细胞在某一分裂相的修复能力,从而实现了细胞分裂位相与DNA断裂的同时测定。在测定单个的人瘤细胞时,可应用激光扫描共焦显微<sup>(5)</sup>。这是DNA损伤宏观检查技术的重要进展。

核粒与程序性细胞死亡。胸腺细胞在接受 $\gamma$ 辐射后,会出现程序性细胞死亡,其早期指标为核粒的出现。核粒是构成染色质的基本单位,由四种不同类型的八个组蛋白分子和大约140个碱基对组成的DNA螺旋围绕其中而组成,每200个碱基对中出现一个核粒,在核粒之间起连结作用的是第五种组蛋

白H<sub>1</sub>。大鼠胸腺细胞在体外正常培养1~5h,程序性细胞死亡保持在15%左右,随着 $\gamma$ 辐照剂量的增加,这种死亡可达90%。当受照后立即向培养液中加入环己胺或放线菌素D时,可控制核粒的出现。若将受照细胞培养在含Ca<sup>+2</sup>螯合剂EGTA的培养液中,可大大降低核粒(DNA碎片)的出现率。而BAPTA-AM,一种高度特异的细胞内Ca<sup>+2</sup>螯合剂,则可以完全制止核粒的出现,即使未受照细胞本底水平的核粒也不再出现,提示Ca<sup>+2</sup>是引起核粒出现的第二信使,而且说明在外表不同的各种因素引起的程序性细胞死亡过程中,存在着共同的调节途径和机制<sup>(6)</sup>。有人发现,示踪量的<sup>32</sup>P即可引起广泛的程序性细胞死亡,故类似的放射性同位素实验结果均可能是无效的。从而提示在一种细胞株或细胞系统被用于放射性同位素实验之前,应先进行程序性细胞死亡的对照研究,否则,将不可避免地引起对结果的不正确解释<sup>(7)</sup>。以上关于核粒及Ca<sup>+2</sup>的信使作用的研究,对探讨DNA损伤具有重要意义。

## 2 DNA分子水平的研究方法层出不穷

### ——dsb及突变检测

在DNA分子的序列检测方面,样品的数量已达到几乎不受限制的程度。有人应用15个碱基的随机低聚体混合物,通过反复的引物扩增,从一个单倍体的细胞可以得到大部分的DNA序列,并实现了体外放大和检查其中的12个基因限位。据估计,基因组中任一序列被放大30个拷贝以上的几率不少于0.78(95%可信限)。这种对单一细胞的全基因组或其他极少量DNA样品的放大技术,对获得精子或卵子的分型及多点核酸图谱具有重要意义,对基因病的诊断,法医学及古代DNA样品分析也都具有重要意义<sup>(8)</sup>。

脉冲凝胶电泳技术已成为dsb研究的常规技术之一,但电泳技术仍在不断改进之中。有人采用脉冲电场凝胶电泳——不对称电场

反相凝胶电泳(AFIGE)研究 DNA 双链断裂的修复过程。选用 CHO 细胞及其修复低能的子代突变株细胞 xrs-5, 峰值培养法, 造成 dsb 的 X 射线剂量为 15~50Gy。结果 xrs-5 的 dsb 半修复时间大于 CHO 的半修复时间, 但两种细胞的 dsb 半修复时间均随剂量而增加。经 37℃ 240min 培养仍未重接的 dsb 比率, 在两种细胞中均随剂量下降而下降。虽然 xrs-5 的比率大于 CHO, 说明其修复能力及对剂量的依赖性不同, 但却表现了相同的变化趋势。作者认为 xrs-5 对射线敏感性的增加是由于基因发生了改变, 故 DNA 水平的结果必须与细胞水平的结果联系起来考虑。但按每 Gy 和每 u 产生的 dsb 比较, 用 AFIGE 测量, 结果却未见差异<sup>[9]</sup>。

有人应用脉冲电场凝胶电泳(PFGE)研究了人膀胱癌细胞株在有氧、无氧、加入 misonidazole 条件下的 dsb, 结果呈双相剂量反应曲线, 即出现明显的随剂量增加而 dsb 减少的现象。当细胞存活率为 0.1 时, 氧增比(OER)为 2.0; 当 PFGE 收率 80% 时, 按 DNA 损伤统计的 OER 为 3.0。当 misonidazole 浓度为 15mmol/L 时, 它的剂量改变系数(DMF)对细胞存活为 1.9, 对 DNA 损伤为 2.4。虽然组内差异过大, 无法比较细胞存活与 DNA 电泳结果, 但却显示了简单的相关。按分子量计算的 dsb 为: 有氧 2.7(±0.3), 无氧 0.7(±0.1), 无氧加 misonidazole 2.6(±0.5) × 10<sup>-9</sup> dsb/(bp · Gy), 其相应的 OER 为 3.9, DME 为 3.7<sup>[10]</sup>。

恒温变性凝胶电泳(CDGE)可分离某一熔点范围的突变片段, 似乎在突变探测中是一种有用的工具。由于次黄嘌呤转磷酸核糖基酶(HPRT)基因广泛用于在体内的突变研究, 故以之作为靶限位, 建立了用聚合酶链反应(PCR)和 CDGE 分析人类 HPRT cDNA 的方法。即以 HPRT cDNA 为模板, 经 PCR 得到 716bp 的 cDNA 片段, 其中包括 HPRT 全部九个主要序列(exon)。对全部

cDNA 片段进行 CDGE 时, 只能得到 exon8 和 exon9 的最后部分。但是, 从 exon3 的起始部开始消化, 并应用两组内部引物, 使每对引物之一带有一个富含 GC 的钳部, 则包括 exon3 至 exon6 的大部分区段可以得到放大, 从而识别出在这部分区段内的带有点突变的片段。用本法可以快速筛选出人类 HPRT cDNA 序列中大约三分之二区段内的点突变。在验证实验中, 从已知样品中的 13 个突变里识别出 12 个突变, 包括一个单碱基丢失, 一个双碱基丢失, 11 个单碱基替换<sup>[11]</sup>。

除电泳技术外, 还常用滤膜洗脱法检查 DNA 单链的断裂。有人以 4Gy γ 射线照射静止态及植物血凝素(PHA)刺激的人外周淋巴细胞(PBL), 再经碱性滤膜洗脱技术测定 DNA 的单链断裂(ssb)消除过程。结果表明: PHA 刺激的 PBL, 其 DNA 的 ssb 消失比率高于静止态 PBL; 在切除修复抑制剂 1-β-D-arabinofuranosylcytosine (araC) 存在下, 二种 PBL 的 ssb 均出现堆积, 说明在碱性条件下保持稳定的碱基损伤以切除方式进行修复的过程受到了抑制。以上是辐照后 5min 的测定结果, 经过 1h 的修复培养, araC 存在下的 ssb 在两种 PBL 未见差异<sup>[12]</sup>。

有人以滤膜洗脱法(pH7.2)观察了在 X 射线照射前后温度变化(25℃~45℃)对 dsb 修复的影响。在照射前升温处理(45℃, 15min), 明显增加 dsb 半修复时间和核内 DNA 在照射后 180min 时的剩余 dsb 数量, 而照射后升温处理(41℃~45℃)则可加速 dsb 修复, 并对 180min 后的剩余 dsb 无影响, 提示照射前后的升温影响不同, 其机制也不同, 而 dsb 修复率及照射后核内 DNA 中 dsb 的残存率均不能正确反映高温下的放射敏感性。结果证实, 本方法测定 dsb 无遗漏, 高剂量辐照后进行细胞毒和 DNA 修复比较是可行的<sup>[13]</sup>。

### 3 HPLC 及 GC/MS 检测碱基改变

应用一种含 5-氟脱氧胞苷的寡脱氧核

昔作为自杀性替代物捕获了相应的酶及双氢胞嘧啶的中间产物,凝胶阻滞实验证明形成了含 5-氟脱氧胞苷的双螺旋 DNA 和相应酶的共价化合物。由于人 DNA 中 CG 位常见 C 变为 T 的突变,用 HPLC 寻找在甲基转移反应中可能水解产生的胸腺嘧啶。资料表明:人转甲基酶在复制甲基化模式时,保留基因信息的能力与哺乳类 DNA 聚合酶复制 DNA 序列时保留基因信息的能力相当,故人 DNA 中 CG 位 C 变为 T 的高出现频率并不一定依赖于酶的甲基化模式保持正常<sup>[14]</sup>。

细胞 DNA 损伤来自电离辐射的直接或间接作用。间接作用为羟自由基(OH·)、水化电子(e<sup>-</sup>aq)和 H 原子等自由基的作用,它们与 DNA 碱基反应,与分子双键发生加成作用,而 OH 还可以从胸腺嘧啶的甲基上吸引一个氢原子,或者从糖基的 C-H 键上吸引一个氢原子。修饰后的碱基可保留在 DNA 链上,但某些糖产物及完整碱基则可能脱落。研究 DNA 损伤的其他技术包括免疫化学后标记等,但由于 GC/MS 技术的杰出性能,它已成为研究电离辐射和其它能产生自由基系统所引起 DNA 损伤的最佳选择<sup>[15]</sup>。

#### 参 考 文 献

1 Brasselmann H et al. *Mutat Res*, 1992; 283: 221-

- 225  
 2 Maillie DH et al. *Health Phys*, 1992; 63(3): 349-351  
 3 Straume J et al. *Health Phys*, 1992; 62(2): 122-130  
 4 Cortes F and Ortiz T. *Int J Radiat Biol*, 1992; 61(3): 323-328  
 5 Smith PJ. *Int J Radiat Biol*, 1992; 61(4): 553-560  
 6 Story MD et al. *Int J Radiat Biol*, 1992; 61(2): 243-251  
 7 Forster TH et al. *Int J Radiat Biol*, 1992; 61(3): 365-367  
 8 Lin Zang et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89: 5847-5851  
 9 Iliakis G et al. *Int J Radiat Biol*, 1992; 61(3): 315-321  
 10 Whitaker SJ et al. *Int J Radiat Biol*, 1992; 61(1): 29-41  
 11 Smith-Sorensen B et al. *Mutat Res*, 1992; 269: 41-53  
 12 Boerrigter METI et al. *Int J Radiat Biol*, 1992; 61(1): 95-101  
 13 Wartens RL et al. *Int J Radiat Biol*, 1992; 61(1): 43-48  
 14 Smith SS et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89: 4744-4748  
 15 Dizdaroglu M. *Int J Radiat Biol*, 1992; 61(2): 175-183

## 染色体畸变分析用于非均匀与局部照射剂量估计的研究进展

北京放射医学研究所 韩保光综述 陈 迪 金瑾珍审校

**摘 要:**针对 IAEA TRS-260 报告推荐的不纯泊松分布方法与 Qdr 方法的适用性,用染色体畸变分析方法进行了离体模拟实验研究,但在活体情况下的适用性尚需进一步验证。

自 1962 年 Bender 和 Gooch<sup>[1]</sup>首次提出将染色体畸变分析方法用于事故生物剂量估计以来,迄今已有 30 年的历史。现在,该方法已成为公认的可靠的生物剂量估计方法,并在许多辐射事故受照人员的医学处理中得到了应用<sup>[2-6]</sup>。但该方法目前主要用于剂量分布较均匀的急性照射,在这种条件下,用染色

体畸变分析方法可以给出全身等效剂量<sup>[7]</sup>。在很不均匀或局部照射的条件下,这种剂量表达方式就有很大的局限性。为此,IAEA TRS-260 报告<sup>[8]</sup>介绍了两种方法来估计受局部照射事故病人的受照份额及剂量,即由 Dolphin<sup>[7]</sup>首先提出根据畸变分布对泊松分布的偏离程度进行估计的方法,该方法后来