

其后 1Gy X 射线照射的存活率。关于细胞遗传学适应性反应机制的报道多集中于 DNA 损伤修复。Ikushima 用“彗星”技术检测了 DNA 双链断裂率及双链断裂的修复率,证实 5cGy 制约剂量明显增加 V59 细胞对其后 1.5Gy 攻击剂量照射后双链断裂的修复率。Wojewodzka 用单个细胞凝胶电泳法 (SCGE) 证实,人淋巴细胞在受制约剂量照射后,明显加快攻击剂量所致 DNA 损伤的修复率。Joiner 报道,0.5cGy 以下剂量诱导的适应性反应在辐射敏感性高的细胞不明显,在 AT 细胞则不诱导适应性反应。证明适应性反应与 DNA 损伤修复及细胞周期效应有关。并鉴别出与调节以上过程有关的蛋白及基因,其中 34kD 蛋白在 DNA 复制及修复中起作用,70kD 蛋白在 DNA 修复及细胞周期调控中起作用。并证实,从 L132 细胞分离出的 3 个 cDNA 克隆经 0.5Gy 以下剂量照射后表

达下调。

#### 4 免疫效应

工作讨论会上交流的有关辐射免疫效应的文章共 6 篇。Fliedner 综述了一个新的生物数学模型,以设计辐射免疫效应研究的新方案。Akiyama 报告了原子弹爆炸幸存者免疫功能晚期效应,主要是 T 细胞亚群及其功能剂量依赖性的降低,和 B 细胞及其功能的增高。鞠桂芝报告了动物实验研究的辐射免疫效应,实验结果表明,0.5Gy 以上剂量对不同免疫学参数的剂量依赖性抑制;0.1Gy 以下剂量对某些免疫学参数的刺激作用以及 0.075Gy 全身照射对移植肿瘤及肿瘤扩散的抑制作用。Fritz 报告了慢性照射所致犬淋巴瘤反应的变化。Doria 报告了重组 IL-11 与重组 IL-3 诱导小鼠辐射免疫损伤的修复。

(收稿日期:1995-11-17)

## DNA 分子水平的放射效应研究

第二军医大学放射医学核医学研究所(上海,200433) 郑秀龙

**摘要:**重点介绍癌基因与全基因组 DNA 辐射损伤的比较,有氧和乏氧下、剂量率、LET、加热等因素对 DNA 修复作用的机制及 p53 基因研究等的最新研究进展。许多研究结果进一步论证了 DNA 辐射损伤类型的多样性,其损伤类型受环境因素影响。随后的修复则视其损伤在 DNA 中的位置,可能是决定细胞命运的关键。

**关键词:**DNA 损伤 DNA 修复 p53 基因

第十届国际辐射研究大会涉及 DNA 损伤修复的占总论文数 20% 以上,其会议内容反映了当前染色体、DNA 及某些基因辐射损伤修复的最新研究进展和从分子遗传学及基因工程等邻近学科移植研究与手段的新成就。

### 1 DNA 辐射损伤与修复的变化

近年来不少学者认为受照细胞 DNA 双

链断裂 (dsb) 对决定细胞存活、突变及死亡有重要影响,为此进行了大量的研究。

#### 1.1 癌基因与全基因组 DNA 辐射损伤比较

以人结肠癌 Colo HSR 细胞株(含放大 20 倍 c-myc 癌基因)和乳腺癌 MCF-3 细胞株(含单拷贝 c-myc 癌基因)及其全基因组 DNA 于 4℃ 经 X 射线照射 30~4 000Gy 后,

分离 DNA 以限制内切酶切少数缺口,经脉冲凝胶电泳(PFGE)分离,再用人 c-myc 探针作分子杂交测 dsb,结果在 myc 区特定位置产生 dsb,而全基因组随机产生 dsb,两者产生 dsb 频率均随照射剂量而增加,与剂量呈线性关系,dsb 大小分别为  $5\sim 8\times 10^{-9}$  和  $7\times 10^{-9}$  dsb/(bp·Gy),两者无差别。

### 1.2 有氧和乏氧条件下 DNA 辐射损伤修复

哺乳细胞在空气中照射可产生的 dsb 和 DNA 蛋白质交联(DPC)尤其容易发生在活性基因与核蛋白区。乏氧下照射时,使 DPC 增加并改变了 DNA 碱基与氨基酸交联图。若除去细胞内 GSH(谷胱甘肽)或用  $\text{Cu}^{2+}$  处理过的细胞照射后,可使 DPC 增加更明显,表明核蛋白对 DNA 断裂损伤有保护作用而对 DPC 无保护作用。DPC 修复呈双相型,照后第一相修复时间为 30~60 分钟,修复时不需 RNA 或蛋白质合成。许多对 X 射线、紫外线敏感的细胞对 DPC 也有修复能力。另用 V79 细胞于 277K 在空气或乏氧下经  $\alpha$  ( $^{238}\text{Pu}$ )照射后,分别用恒电场电泳和滤膜法检测 dsb 和 DPC。结果,在乏氧下照射产生的 DPC 大于空气下。而 dsb 则相反,受照细胞在 310K 保温修复 3 小时后,残余 DPC %量与 dsb 相似,显示乏氧下照射诱生的 DPC 损伤大于有氧照射,细胞修复 DPC 能力也较强,但其损伤与细胞功能间的关系有待研究。

### 1.3 剂量率对 DNA 辐射损伤修复的改变

有人用 10 株原代人成纤维细胞分别经高剂量率(HDR)和低剂量率(LDR)照射相同剂量后,用克隆和 PFGE 法分别测细胞存活率和 dsb。HDR 照射细胞存活率较 LDR 低 3.2 倍,而测得的 dsb 差别较小,证明 dsb 与细胞存活无关;然而 HDR 照射保温 4 小时后,残留 dsb 比 LDR 高 3.2 倍,显示与细胞存活有关。另外,HDR 与 LDR 照后残留 dsb 损伤曲线斜率比值为 1.2,表明 LDR 照射诱生 DNA 损伤与酶修复在相同时间内比 HDR

大。若以放射敏感性不同的一对 CHO 细胞株(CHOK-1 与 CHOxrs 5-11)经 HDR 和 LDR(9.6 和 0.24Gy/min) $\gamma$  射线照射,产生的 dsb 两者无差别;但修复后,LDR 照射的 xrs 5-11 细胞的残留 dsb 大于 K-1 细胞,表明放射抗性的 K-1 细胞对 LDR 照射产生的 dsb 修复能力强于放射敏感性的 xrs 5-11 细胞。但这种能力在 HDR 照射时则被抑制。由此推想,用 LDR 照射可区别细胞放射敏感性与存活率间的关系,p53 基因在 HDR 照射时,对两株细胞亦无表达差别。正常与共济失调毛细血管扩张症(AT)成纤维细胞于 4℃ 分别以 HDR 和 LDR(1 和 0.01Gy/min)照射 5~50Gy,PFGE 检测 dsb,37℃ 保温 6 小时,30Gy 组的重接率一样;然而保温 24 小时,AT 细胞残留 dsb 比正常细胞高,表明 AT 细胞缺乏修复功能。两株细胞若在 37℃ 以 LDR 照射 5~50Gy,在 10Gy 以下时,dsb 呈线性剂量效应,10~40Gy 达坪期,各剂量组内 AT 细胞产生 dsb 均高于正常细胞,发现在 37℃ 用 LDR 照射 40Gy 与在 4℃ 以 HDR 照射 40Gy 诱生 dsb 产额相同,设想用 LDR 于 37℃ 照射可测定细胞放射敏感性。但也有持不同意见的,有人用正常成纤维细胞经 HDR 和 LDR(4 和 0.04Gy/min) $\gamma$  射线照射 5~180Gy,用恒电场电泳测定 dsb,结果表明修复动力学与照射剂量率无关。在快修复相  $f_1=60\%\sim 70\%$ , $\tau_1=8\sim 11$  分钟;慢修复相  $f_2=20\%\sim 30\%$ , $\tau_2=100\sim 165$  分钟。残留 dsb 5%~6%,24 小时后仍测到残留的 dsb,且与照射剂量呈线性关系。经计算高、低剂量率照射细胞后残留 dsb 分别为  $2.4\pm 0.1$  和  $0.66\pm 0.08$  dsb/(细胞·Gy)。残留 dsb 与死亡细胞比值随剂量率而不同,HDR 为 LDR 的 3 倍,表明残留 dsb 与细胞存活率间无相应关系。

### 1.4 局部照射对血细胞 DNA 损伤修复的作用

德国环境健康研究所报告 6 只犬的试

验,犬下半身用铅屏蔽,上半身以 X 射线局部照射 11Gy,照射后 1 小时抽血,用“彗星”电泳法测单个核细胞 DNA ssb(单链断裂)和碱不稳定损伤。照后一天由照射区肩胛骨和屏蔽区髌骨抽取骨髓(BM)检查,实验持续 1.5 年,照后 1 小时血细胞 DNA 损伤最强,产生 ssb 频率极高,其后很快修复,ssb 下降,三天后只测出少量 ssb。有意思的是照后一天,测得屏蔽区 BM 细胞 ssb 高于照射区,表明照射与屏蔽区 BM 细胞交换很快。1 年后仍测到 BM 细胞 DNA 损伤,证明 BM 内损伤细胞活存较长,血细胞也测到长期 DNA 损伤,Kreja 等认为可用以作为检测评估受照者危害性的指标。

### 1.5 其它

#### 1.5.1 LET 的影响

以低能量质子(10.31keV/ $\mu\text{m}$ )和  $\gamma$  射线照射 V79 细胞产生的 dsb 无 LET 影响,只是保温 2 小时后,质子照射残留 dsb 比  $\gamma$  射线高,证明高 LET 照射所引起的 DNA 损伤难以修复。

#### 1.5.2 加热的影响

加热合并 X 射线照射与单纯 X 射线照射所产生的 dsb 量相似,但修复动力学不同,两者均呈双相修复。后者有 2/3 的 dsb 进行修复, $t_{1/2}$  为 4~10 分钟;1/3 dsb 行慢修复, $t_{1/2}$  为 100~200 分钟。而加热合并照射则快修复速度减慢和修复时间延长,慢修复 dsb 量增加,这不是由于快修复转变成慢修复,而是因其它类型损伤如碱基损伤仍可在慢修复相进行。另一实验也得到类似的结果。

## 2 DNA 辐射损伤修复与染色体

DNA 辐射损伤修复及其与染色体高级结构间的关系越来越受到人们的重视。美国 Warters 等认为 DNA 与组蛋白构成的染色体结构可减少放射引起 DNA 损伤。他们从游离核分出的松弛染色质照后引起 DNA dsb、ssb、碱基损伤及 DPC 等损伤比未

分离的浓集型染色质损伤高 10 倍;在细胞内连接复制或转录 DNA 松弛结构的染色质照后可增加 DNA 损伤 3~6 倍。DNA 修复亦受核染色质结构与组分的影响。细胞中有转录活性的 DNA 修复较快,染色质内非组蛋白量增加,修复就慢些。但 Pantelias 等则认为染色体结构改变与否并不影响 dsb 修复程度,只是松弛染色质可增加错误修复而致细胞畸变或死亡。有人以放射敏感性不同的 CHO 和 xrs-5 细胞株经  $\gamma$  射线照射后,用滤膜法测得 dsb 量及其后保温快修复速度无明显差别,但后者的慢修复明显下降,显示 xrs-5 细胞对染色质的高级结构环状区所产生 2~3Mbp 的多种 dsb 损伤修复能力差。也有实验证明,CHOK-1 与 xrs-5 细胞株染色体的放射敏感性与其 DNA 结合核蛋白的分子量不同有关,前者为 32.2kD,后者为 31.8kD。照后,后者产生 dsb 和染色体断裂增加量均比前者高,大多认为哺乳细胞放射产生 dsb 频率随细胞株而不同,但均与照射剂量呈线性关系。修复呈双相:快修复  $t_{1/2} = 10 \sim 15$  分钟;慢修复  $t_{1/2} = 40 \sim 240$  分钟,用电子显微镜可看到染色体断裂同时发生 dsb。其重接可能反映 dsb 慢修复过程,但并非与 dsb 重接率一致,其机制待阐明。

## 3 DNA 修复作用的机制

众所周知,受照细胞能修复 DNA 损伤,如何进行修复也是当前各国探索的重要课题。美国 Resnicr 等通过 DNA dsb 转入酵母(AC)构建酵母人工染色体(YAC)用以了解人 DNA 修复稳定性和 dsb 如何引起遗传变异。他们在实验中发现,根据受照人细胞 DNA dsb 所在位置与酵母 DNA 重组后的转变过程而定,可活存或发生缺失甚至细胞死亡。他们又从分离人染色体片段,按上述方法,经转化关联 DNA 重组(TAR)克隆法进行探索 dsb 修复机制。现已能从小鼠/人单染色体杂交细胞株通过 dsb 介导的人 DNA 与

含 AL 或 LINE 重复顺序载体重组克隆研究 DNA 修复机制。用此系统已分离的特殊序列,证明着丝粒 DNA 与染色体传递有关,可能是 DNA 损伤的靶。Löbrich 等用核素标记单拷贝 DNA/探针与 NotI 酶内切片段分子杂交法发现,人成纤维细胞经 80 和 100Gy X 射线照射后的 21 号染色体 DNA 损伤率为  $5.7 \times 10^{-3}$  断裂/(Mbp. Gy),与其他作者用不同方法检测受损全基因组 DNA 结果吻合。然而两种剂量照射后即使保温达 24 小时,前者还有 25%~30% 为错误重接使分子量升高;后者只有 2%~5% 重接不正确,相差 20%,这可能与全基因组不均一,使 dsb 重接范围和真实性有关。此杂交法可用于检查 dsb 修复缺陷细胞株的放射敏感性以了解 dsb 修复途径。但英国 Foirmcin 则认为,用上述酶切法难以控制,主张用无细胞 DNA 直接了解 dsb 的连接过程。他将质粒 DNA 经限制内切酶切成不同末端,再加部分纯化哺乳细胞重接同源或非同源末端的酶,产物经序列分析,发现能重接同源末端者真实性高。而非同源末端连接产物差异很大,对 dsb 重接机制提供了有意义的结果。美国 Lendon 等利用人遗传缺陷病细胞,研究发现 CS(科克因综合征)患者缺少  $\gamma$  射线损伤后转录偶联修复基因,因而致修复活性基因转录链与非转录链或全基因组损伤修复速度相似,显示其对  $\gamma$  射线高度敏感是由于缺乏转录偶联修复基

因。XP-G(着色性干皮病-G)病人症状与 CS 患者相似,也对 X 射线敏感,偶联修复的能力低。

#### 4 p53 基因的研究

p53 基因对细胞生长、增殖具有负调节功能,并反映 DNA 结构损伤及放射敏感性。损伤突变后,不仅丧失抑癌作用且有癌基因的性质,成为当前研究的热点。在本届会议上有人报告 12 例因  $\alpha$  核素引起骨肉瘤患者细胞用 RTPCR 检查有 10 人缺乏 p53 基因,且用 cDNA 分子杂交测知 p53 基因内失去 30 或更多的碱基;而自发骨肉瘤细胞内未找到 p53 突变,认为放射可引起骨肉瘤。经查明 90% 人骨肉瘤是因 p53 基因突变所致。照射易使含密码 273 处突变基因(mp53)的 A43、L33A、3T3MG 及 LVCA420 等细胞诱导过表达产生 p53 蛋白,促进癌变及肿瘤生长;也可通过射线激活 c-fos 癌基因产生 c-Fos 蛋白增加,抑制 p53 表达功能,使细胞癌变或凋亡。突变后的 p53 基因则对射线敏感,喉癌细胞因失去 p53 等位基因,对射线很敏感。p53 突变小鼠照射 2Gy 引起胚鼠畸形比野生型小鼠大 4 倍,抗放小鼠因有 p53 调节功能无胚鼠死亡,而杂交(+/-)小鼠显示中等敏感性,畸形也比野生型高,提示 p53 突变致畸似难逆转。

(收稿日期:1995-11-15)

## 临床放射生物学研究进展

中国医学科学院肿瘤研究所(北京,100021) 沈 瑜

**摘 要:**简单介绍第十届国际辐射研究大会(10th ICRR)有关临床放射生物部分的最近进展。

**关键词:**临床放射生物 肿瘤放射治疗 热疗 光动力学

第十届 ICRR 和 8 年前的第八届 ICRR 比较,放射生物学研究工作比重明显增加,辐