

分子生物学与辐射研究

魏 康

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

摘要 本文综述了近年来运用分子生物学的理论和技术研究放射生物学的主要进展: 在 DNA 损伤研究方面用序列分析及限制性酶切技术对 DNA 链断裂及碱基损伤在分子内的定位获得了新的信息, 基因探针有可能成为研究哺乳动物细胞 DNA 结构损伤的敏感的新方法; 染色体畸变及细胞突变的分子机理已有所阐明; 哺乳动物 DNA 修复基因的研究正在兴起阶段, 已克隆出人的 DNA 修复基因, 在哺乳动物细胞上进行外源基因转移的成就为辐射损伤的防治开辟了新的前景。

关键词 分子生物学, 重组 DNA 技术, 基因转移, DNA 损伤修复

八十年代是分子生物学蓬勃发展的年代。它渗透到医学、生物学研究的各个领域。同样也给辐射研究带来新观点、新技术和新方法, 使某些研究突破原有的传统方法进入了新阶段, 并给未来展示出新的前景。分子放射生物学涉及的问题很广泛, 本文主要围绕与 DNA 研究有关的进展作一综述。

关于 DNA 损伤的研究

DNA 损伤与修复是放射生物学研究的一个重要基本问题。电离辐射可以造成 DNA 大分子单链断裂、双链断裂、交联和碱基损伤。但这些损伤究竟发生在大分子结构的哪些部位, 过去缺乏直接的资料。近年来运用序列分析、限制性酶切等多种手段对损伤的结构定位进行了较深入的研究。

DNA 链断裂发生的部位究竟是否随机分布, 过去从发生机理来考虑, 一般认为是随机的。Henner 等^[1]用高分辨的序列胶直接观察了 $^{60}\text{Co}\gamma$ 线所引起的 DNA 链断裂, 他证实质粒 pMC 1 在照射后各个碱基部位上发生断裂的机率几乎是相等的。然而 Duplax 等^[2]用相似的方法研究了 ϕX 174 DNA 的 Hae III 酶切片段, 却发现在 γ 线照射后链断裂(包括碱不稳定性断裂在内)的分布不是均等的。在较低剂量下($<20\text{ Gy}$)碱基位置上发生断裂的顺序为 $\text{G} > \text{A} > \text{T} \geq \text{C}$, 而在较高剂量($40-80\text{ Gy}$)下嘧啶处的断裂频率增加, 顺序变为 $\text{T} > \text{G} > \text{A} \geq \text{C}$ 。这种现象如何解释尚不清楚。而 Baverstock^[3]用电镜分析的方法也支持质粒 DNA 分子中非随机分布的双链断裂的存在。因此链断裂与碱基顺序的关系尚待进一步阐明。对于哺乳动物细胞 DNA, 因其分子量过大, 通常切取其片段来进行分析。如 Bases^[4]用猴 CV-1 细胞 DNA 的 α 顺序(172 bp)作材料, 采取 5' 端 ^{32}P 标记、变性胶电泳的方法, 分析了 X 线照射后链断裂的结构特点。显示出 2-巯基乙醇在溶液中能充分防护链断裂的发生。还观察到 DNA 分子在细胞内所受到的损伤程度仅为溶液中损伤的 1/20。该实验室还发展了一种研究细胞修复 DNA 损伤的新方法, 即将 X 线照射后的 DNA 用电激法导入细胞, 然后追踪细胞内该片段的变化。用序列分析法还揭示了电离辐射所致 DNA 碱基损伤的特

本文于 1986 年 12 月在全国第三届辐射研究学术讨论会上报告。

点,发现 DNA 上形成的胸腺嘧啶乙二醇及尿素残基是造成 DNA 复制阻断的主要位置^[6]。

对于研究结构损伤,限制性酶切图谱分析也是一项极为有用的手段。Cleaver^[6]首先报告了受紫外线照射的 SV 40 及 pBR 322 DNA 对 HindⅢ、EcoRI 等多种酶的切割受阻。在这几种酶的识别顺序中都存在易形成嘧啶二聚体的结构,说明是由于二聚体的形成造成了这种酶切受抑。用 UV 特异的核酸内切酶处理,发现酶切的阻断发生在二聚体对侧的位置上。因此,根据以上原理就可以从限制性酶切图谱的改变推测结构的损伤。运用类似的方法已成功地检测了不同波长紫外线所造成的 DNA 损伤及其差异^[7],推断了在近紫外线作用下 8-MOP 与 DNA 作用部位的碱基特异性^[8]。

对于哺乳动物细胞的大分子 DNA,上述方法的直接应用都还有一定困难。采用多种基因探针与限制性酶切相结合的方法将有可能揭露基因组不同位置上 DNA 损伤和修复的特点。1986 年美国 Los Alamos 实验室已有了初步的报道^[9]:用克隆的 DNA 重复序列作探针,发现人皮肤纤维母细胞在 X 线照射不到 1 Gy 剂量下, DNA 受 EcoRI 消化的能力降到 50% 左右,印迹法显示出新的区带图形。这是低剂量 X 线照射细胞引起人基因组 DNA 限制性酶切功能发生变化的第一篇报告。值得引起重视。

在充分运用新技术的基础上,可以预期几年后对于辐射损伤哺乳动物细胞的本质将会有进一步的了解。这对于理解辐射的致突,致死效应以及控制和改善细胞损伤的修复无疑会起到推动作用。

关于辐射细胞遗传学的研究

辐射引起染色体畸变的研究开展得极为广泛。畸变形成和 DNA 损伤的关系也有不少探讨。最近运用限制性内切酶获得了一些很有意义的结果^[10-12]。Natarajan 等用中国仓鼠细胞,增加其通透性,使限制性内切酶透入,然后继续培养达到第一次有丝分裂,观察染色体畸变。发现切割产物为平末端的酶如 PvuII, EcoRV, AluI 都可引起与 X 线照射下相似的畸变,其中 PvuII 可使畸变增加 10 倍。产物为粘性末端的酶,切口间隔为 2 个核苷酸的,也可生成畸变,但若切口相距 4 个核苷酸,如 BamHI 或 EcoRI,则不引起畸变。X 线照射的细胞再用单链特异的酶(Neurospora endonuclease)处理,也使畸变率增加。这些都说明了 DNA 双链断裂是构成畸变的主要原因。

辐射致突的问题历来受到放射生物学家的重视。但在研究中有一定的困难,一是发生频率低,二是突变类型与自发突变没有什么差别。离体细胞突变株的培养及分子水平的分析使这方面的研究有了新的进展。

利用 6-巯基嘌呤作选择性培养可以筛选出对 6-TG 抗性的突变细胞。X 线照射 1.5 Gy 就能从人的淋巴母细胞中分离出 6-TG 抗性的突变细胞。其中 57% 都有 DNA 缺失或重排^[13]。4 Gy 照射可使人淋巴细胞突变率提高 32 倍(突变率约为 10^{-4}),突变率随剂量的增加而增加^[14,15]。

运用 DNA 重组技术已获得了不少关于基因突变的分子改变的结果^[16]。已观察到电离辐射可引起多种形式的基因损伤,局限性的变化包括基因内缺失和点突变,广泛围的变化如大片段的缺失、重排、重组及基因间的其它事件等。用放射性标记的基因探针和细胞 DNA 的限制性酶切片段杂交的方法观察到 X 线照射引起人纤维母细胞突变生成的 6-TG 抗性细胞中 HGPRT 基因缺失或部分缺失^[17]。 γ 线照射所引起的 CHO 细胞 APRT⁻ 突变,在 APRT 位置上有基因重组,或有小的缺失,或有单个碱基对的替代^[18]。Lee^[19]用 X 线照射黑腹果蝇,31 个突变体中有 28 个的印迹

分析都有异常所见。

利用紫外线诱变,对突变机理分析做了相当深入的工作。Sarasin^[20,21]等观察到无嘌呤嘧啶位置是高度致突的。大部分突变是由于单个碱基对替代,往往发生在嘧啶损伤的原位。又分析了温度敏感突变细胞的回复突变,很有意思的是发现原有的碱基对替代并未消失,而是形成了第2个突变点——另一个碱基对替代。

这些基础研究对于我们了解突变规律以及进而控制突变有着重要的启示。

关于 DNA 修复基因的研究

伴随着分子遗传学对人类基因定位、克隆研究的进展,不少放射生物学实验室竞相开展人和哺乳动物 DNA 修复基因的研究。研究中所采用的主要方法是 DNA 介导的基因转移。采用的细胞主要有人的着色性干皮病(XP)细胞,毛细血管扩张性共济失调症(AT)细胞,以及 CHO 细胞突变株,以后者的成功率较高。

1983 年以来多个实验室用人或哺乳动物细胞 DNA 向 CHO 细胞的紫外线敏感株进行基因转移获得成功^[22,23]。转化细胞株具有明显的抗 UV 能力,并用印迹法证实其 DNA 中确有人 DNA Alu 顺序的存在。1984 年 Westerveld^[24]克隆出了哺乳动物的第一个 DNA 修复基因, ERCCI。1985 年 Rubin^[25]也分离出了一段人的 DNA 修复基因,经过染色体杂交证实它定位在第 19 号染色体上。Thompson^[26]利用 CHO 的另一突变株 EM 9,它对 EMS 高度敏感,姊妹染色单体交换(SCE)频率高出野生型 12 倍,通过基因转移找到了一个 3.8 kb 的片段,这是一个人的控制 SCE 的基因。最近还有学者报告用 EM 9 的转变细胞发现了人的抗 X 线损伤的修复基因^[27]。可以预计,新的基因将会不断地克隆出来。

用人的缺陷株细胞寻找特定修复基因的工作,虽有不少实验室在努力,但成功的例子不多。1982 年 Takano^[28]曾报告用人的正常细胞基因组 DNA 向 XP-A 细胞进行基因转移,获得成功,但以后在其它实验室未能重复出来。最近英国报道用 SV 转化的 AT 细胞作受体,从 40 万克隆中筛选出一个抗 γ 辐射的细胞克隆,这是用非病毒的 DNA 在人二倍体细胞中转移成功的第一个报告^[29]。现正进行 AT 基因的克隆^[30]。

除了分离和克隆人的 DNA 修复基因外,还正在研究外源性的原核基因在哺乳动物细胞中的表达。已成功的有抗 UV 的来自质粒的 muc 基因^[31],抗 ACNU 及 MNNG 的 Ecoli ada 基因^[32]等。这对如何提高哺乳动物细胞的抗辐射损伤能力有重要的启示。

用骨髓细胞进行基因转移的进展令人鼓舞。Cline 在 1980 年提出了在整体动物上进行基因转移的第一个报告^[33],他将抗氨甲蝶呤(MTX)细胞的 DNA 导入小鼠骨髓细胞,输给受照射小鼠,用 MTX 抑制未转化的骨髓细胞,结果抗 MTX 的骨髓细胞在受体小鼠内活跃生长,直观察到 150 天,未见异常。此后 Joyner^[34]及 Williams^[35]等相继用反向病毒构建载体(MLV-NEO, MSV DHFR-NEO)大大提高了小鼠骨髓细胞的转化效率。Williams 等将带有外源基因标志的骨髓细胞进行第二代受体鼠的骨髓输注,用分子杂交印迹法证实了受体中外源基因的存在,说明外源基因向造血干细胞的导入获得成功。这是向基因治疗迈出了重要的一大步。

当然基因治疗用于临床还有许多难关有待攻克。但是这些成就无疑为遗传疾病、癌症的防治开辟了新的途径,对辐射损伤的防治也会有巨大的推动。

用分子生物学的原理和技术进行辐射研究,还正处在起始的阶段。在这学科交叉的边缘领域里,分子生物学家和放射生物学家通力合作,定将会有更多的新发现,将辐射研究推向新的阶段。

参 考 文 献

- [1] W. D. Henner, S. M. Grunberg and W. A. Haseltine, *J. Biol. Chem.*, 257, 11750 (1982).
- [2] A. M. Duplaa and R. Téoule, *Int. J. Radiat. Biol.*, 48(1), 19 (1985).
- [3] K. F. Baverstock, *Int. J. Radiat. Biol.*, 47(4), 369 (1985).
- [4] R. Bases, J. Maio and F. Mendez, *Radiat. Res.*, 105(2), 259 (1986).
- [5] H. Ide, Abstracts of papers for 34th annual meeting of the Radiation Research Society, Las Vegas, 25 (1986).
- [6] J. E. Cleaver, *J. Mol. Biol.*, 170, 305 (1983).
- [7] K. Wei, S. Tomita and K. Suzuki, *J. Radiat. Res.*, 27, 247 (1986).
- [8] 魏 康, 铃木坚之, *生物化学杂志*, 2(1), 83 (1986).
- [9] S. V. Atchley, J. M. Bingham, R. K. Moyzis and G. F. Strniste, Abstracts of papers for 34th annual meeting of the Radiation Research Society, Las Vegas, 55 (1986).
- [10] A. T. Natarajan, *Int. J. Radiat. Biol.*, 43(3), 449 (1985).
- [11] P. E. Brynt, *Int. J. Radiat. Biol.*, 48(3), 449 (1985).
- [12] P. E. Brynt, *Int. J. Radiat. Biol.*, 46(5), 639 (1984).
- [13] H. L. Liber and J. B. Little, Abstracts of papers for 34th annual meeting of the Radiation Research Society, Las Vegas, 104(1986).
- [14] B. J. S. Sanderson, J. L. Dempsey and A. A. Morley, *Mutat. Res.*, 140, 223 (1984).
- [15] Vijiyalaxmi, *Int. J. Radiat. Biol.*, 48(3), 450(1985).
- [16] A. R. Lehmann, *Mutat. Res.*, 150, 61 (1985).
- [17] D. J. Chen, 同 5, 104 (1986).
- [18] A. J. Grosovsky, E. A. Drobetsky, J. G. deBoer and B. W. Glickman, 同 5, 104 (1986).
- [19] W. R. Lee, 同 5, 104 (1986).
- [20] F. Bourre and A. Sarasin, *Nature*, 305, 68 (1983).
- [21] A. Sarasin, F. Bourre, A. Benoit, L. Daya-Grosjean and A. Gentil, *Int. J. Radiat. Biol.*, 47(5), 479 (1985).
- [22] J. S. Rubin, A. L. Joyner, A. Bernstein and G. F. Whitmore, *Nature*, 306, 206(1983).
- [23] M. A. MacInnes, *Mol. Cell Biol.*, 4(6), 1152(1984).
- [24] A. Westerveld, *Nature*, 310, 425 (1984).
- [25] J. S. Rubin, V. R. Prideaux, H. F. Willard, A. M. Dulhanty, G. F. whitmore and A. Bernstein, *Mol. Cell Biol.*, 5(2), 398 (1985).
- [26] L. H. Thompson, K. W. Brookman, J. L. Minkler, J. C. Fuscoe, K. A. Henning and A. V. Carrano, *Mol. Cell Biol.*, 5(4), 881(1985).
- [27] I. J. Spiro, L. R. Barrows, K. Konnelly and C. C. Ling, 同 5, p 55 (1986).
- [28] T. Takano, M. Noda and T. Tamura, *Nature*, 296, 269 (1982).
- [29] P. G. Debenham, M. B. T. Webb, W. K. Masson and R. Cox, *Int. J. Radiat. Biol.*, 45(5), 525 (1984).
- [30] M. H. L. Green, J. Lowe, C. F. Arlett, A. R. Lehmann, M. R. James, J. Burke and S. A. Harcourt, *Int. J. Radiat. Biol.*, 48(3), 458(1985).
- [31] L. Marcucci, F. Gigliani, P. A. Battaglia, R. Bosi, E. Sporeno and R. Elli, *Mol. Cell Biol.*, 6(2), 586(1986).
- [32] K. Ishizaki, T. Tsujimura, C. Fujio, Y. Zhang, H. Yawata, Y. Nakabeppu, M. Sekiguchi and M. Ikenaga, *Mutat. Res.*, 184, 121 (1987).
- [33] M. J. Cline, H. Stang, K. Mercola, L. Morse, R. Ruprecht, J. Browne and W. Salser, *Nature*, 284, 422(1980).
- [34] A. Joyner, G. Keller, R. A. Phillips and A. Bernstein, *Nature*, 305, 556(1983).
- [35] D. A. Williams, I. R. Lemischka, D. G. Nathan and R. C. Mulligan, *Nature*, 310, 476(1984).

(稿件收到日期: 1987年4月1日)

(下转第11页)

THE EFFECT OF VINYL CONTENT ON THE ENHANCEMENT OF THE RADIATION INDUCED CROSSLINKING IN SILOXANE COPOLYMER

Luo Yunxia, Li Ping, Pan Hongbin and Yu Min

(Changchun Institute of Applied Chemistry Academia Sinica, Changchun)

ABSTRACT The radiation-induced crosslinking of siloxane copolymers with various contents of vinyl group has been studied. It was found that the existence of vinyl groups in the copolymer macromolecules could reduce the gelation dose and hence increases the G value of crosslinking.

The variation of the content of vinyl groups in sol fraction of irradiated samples with dose was followed by NMR. It has been shown that they remain unchanged with radiation dose. Such a result indicates that the vinyl group is very sensitive to radiation-induced crosslinking. The effect of vinyl group on the enhancement of crosslinking could be well understood.

When a semi-crystalline copolymer at -78°C was irradiated such an effect was much pronounced. It results from concentrating of vinyl group in the amorphous region so that greater probability exists in reaction with radical before they decay with a process without crosslinking formation.

The vinyl group in siloxane copolymer could also influence the deviation from the linear relationship given by Charlesby and Pinner. The effect of vinyl content on the relationship between crosslinking density and radiation dose is expected to be in a similar situations.

KEY WORDS Polysiloxane, Radiation effect, Crosslinking

(Continued from page 4)

THE PROGRESS OF MOLECULAR BIOLOGY IN RADIATION RESEARCH

Wei Kang

(Institute of Radiation Medicine, Beijing)

ABSTRACT The paper reviews the recent progress in application of molecular biology techniques in the study of radiation biology. The three sections are as follows: (1) the study of DNA damage on molecular level, (2) the molecular mechanism of radiation cell genetics, including chromosome aberration and cell mutation, (3) the study on DNA repair gene with DNA mediated gene transfer techniques.

KEY WORDS Molecular biology, Recombinant DNA technique, Gene transfer, DNA damage and repair