

电离辐射对淋巴细胞 DNA 修复合成的影响

魏 康 刘学英 周平坤 孙文种

(北京放射医学研究所, 北京)

摘要 本文用液体闪烁测量法和放射自显影法,测定小鼠及人淋巴细胞在紫外线诱发下的DNA 周期外合成(UDS),发现小鼠经 γ 射线照射后3—4 d,其淋巴结和血液的淋巴细胞在UV照射后的UDS明显下降,抑制程度随 γ 照射剂量增加而加重,二者呈线性依赖关系。两例中度放射病人的外周血淋巴细胞的UDS水平也低于正常。研究结果说明 γ 射线对细胞修复功能的影响值得重视,UDS测定也可作为辐射敏感指标使用。

关键词 DNA 周期外合成, 辐射损伤, 淋巴细胞, DNA 修复

哺乳动物细胞在受物理或化学因素损伤后,发生一系列对DNA损伤进行切除与修复的过程,其中对损伤切除后的修补表现为一种与细胞周期无关的DNA修复合成,也称作DNA期外合成(unscheduled DNA synthesis,UDS)。对于各类细胞在各种损伤因子作用后的UDS已开展了广泛的研究^[1],而且有的还用UDS水平反过来评估外源因子对DNA的损伤作用。但是一些损伤因子除了可以诱发UDS以外,是否影响细胞原有的修复能力的问题探讨得不多。电离辐射对细胞DNA的损伤作用是众所周知的,且可以诱发UDS,但是它又对细胞的生化代谢有着广泛的影响,有可能也影响细胞的修复合成水平。本文以紫外线(UV)作为诱发细胞UDS的手段,探讨电离辐射对此过程的影响,以求更全面地了解辐射的损伤作用。

材 料 与 方 法

实验动物为LACA小鼠,日龄60—80 d。全身照射采用 ^{60}Co γ 源,剂量率1.45 Gy/min。

1. 细胞分离

在预定实验时间将小鼠断头活杀,迅速取出肠系膜淋巴结,在冰浴下剪碎,加入少量RPMI 1640培养液,经尼龙网过滤,离心、洗涤,制成细胞悬液。血淋巴细胞则以眼眶取血,肝素抗凝,经淋巴细胞分离液(上海试剂二厂)密度梯度离心而分离取得。

2. 紫外线照射及 ^3H -TdR掺入

紫外线光源采用30 W灭菌灯,用UVR-254紫外线强度计(上海顾村电光仪器厂)监测辐照度。分离所得淋巴细胞先加到含10 mmol/L羟基脲的1640培养液中室温放置30 min,以抑制95%以上的半保留复制。然后取1 ml细胞悬液(含细胞 2×10^6 — 6×10^6)加入到直径为2 cm的玻璃杯中,进行紫外线照射,剂量为20 J/m²,照射前即刻加入 ^3H -TdR 14.8×10^4 Bq,同时另取1份样品作为对照,除不进行UV照射外其它处理全同。照射后样品在37℃水浴中保留3 h。

本课题为国际原子能机构资助课题

3. UDS 测定法

(1) 液体闪烁测量法 保温后的细胞样品抽滤在玻璃纤维滤纸(红光 49 号)上, 依次用生理盐水、5 %三氯醋酸及酒精充分洗涤抽干后烤干。用 LKB 液体闪烁仪测定样品的放射性强度(cpm)。结果以(照射样品 cpm-对照样品 cpm)/细胞数表示。

(2) 放射自显影法^[2] 保温后的细胞用 1640 培养液、0.075 mol/L KCl 及固定液(冰醋酸: 甲醇 = 1:3 混合)依次洗涤、离心各 2 次, 用冷扩法制片。脱脂后涂 4 号核乳胶(原子能研究院产品)。置暗盒中于 4℃冰箱中曝光二周。显影、定影后用姬姆萨液染色。油镜下逐个计数细胞核中的银颗粒数, 每份样品计数 200—500 个细胞, 同时计数片子上无细胞处相当于一个细胞核面积内的平均颗粒数, 作为本底。细胞平均颗粒数减本底后表示细胞的 UDS, 含有 UDS 颗粒细胞占总细胞数的百分率称作标记率。计数过程中遇有曝光成深黑色的 S 期细胞忽略不计。

结 果

1. 辐射对小鼠淋巴结细胞 UDS 水平的影响

预试实验发现小鼠经 ⁶⁰Co γ 射线 1 Gy(剂量率为 431 × 10⁻⁴C/kg·min)照射后 3—4 d, 其淋巴结细胞经 UV 诱导的 UDS 水平较低, 因此以下实验均选择此时间进行。

小鼠经不同剂量 γ 射线全身照射后于照后 4 d 活杀, 取淋巴结细胞, 经 20 J/m² 紫外线照射后用液体闪烁法测定 UDS, 结果见表 1。从表 1 可以看出细胞的 UDS 在 0.5 Gy 照射后已有下降趋势, 1 Gy 以上剂量照射后与正常对照组差异显著, 到 6 Gy 时 UDS 已测不到。按表 1 的数据分析剂量与抑制效应的关系, 以 y 代表 UDS(正常值的%)、x 代表剂量(Gy)、则 $y = 81.4 - 14.3x$, $r = -0.94$, 说明抑制效应与剂量间存在线性依赖关系。

Tab 1. UV induced UDS in mouse lymph node cells on 4 th day after γ-wholebody irradiation (Mean ± S. E)

Dose (Gy)	Number	cpm/4 × 10 ⁶ cells	Normal value(%)
0	8	2345 ± 235	100
0.5	8	1686 ± 210	71.9
1.0	8	1140 ± 149*	48.6
2.0	5	1220 ± 299*	52.0
4.0	5	547 ± 141*	23.3
6.0	4	0	0

p < 0.05

用放射自显影法所得的结果, 也表示在一定剂量下 γ 射线照射对小鼠肠淋巴结细胞的 UV 诱导 UDS 的抑制效应。表 2 的数据表明小鼠在 1.0 和 2.0 Gy 照射后 3 d, 淋巴结细胞在 UV 诱导后的细胞核内平均银颗粒数明显减少, 细胞标记率也同时降低, 这表明照射后细胞群体中 UDS 水平的下降, 一方面是由于单个细胞中 DNA 期外合成量减少, 另一方面也由于具有 UDS 能力的细胞数量的减少。此外, 从表 2 看到 0.5 Gy 照射组的 UDS 比对照组要高, 与液闪测量法结果不一致, 这可能由于 0.5 Gy 组和其它组不是同批实验而受到曝光条件等因素影响, 再加上放射自显影法所观察的是几百个细胞, 尚难以准确地反映出 0.5 Gy 这样小剂量照射所产生的群体效应, 但对于 1.0 Gy 以上剂量照射结果是可以肯定的。

2. 小鼠血淋巴细胞 UDS 的改变

为了便于 UDS 测定应用于人体, 对小鼠血液淋巴细胞的 UDS 变化与 γ 射线照射剂量的关系

Tab 2. UV-UDS in mouse lymph node cells on 3rd day after γ -irradiation by autoradiography method (Mean $\pm$ S.E.)

Dose(Gy)	Number	Labelled cells(%)	Average grain count/nucleus
0	10	76.7 $\pm$ 7.3	13.3 $\pm$ 1.3
0.5	7	86.7 $\pm$ 3.3	15.1 $\pm$ 2.2
1.0	5	51.8 $\pm$ 6.0	6.2 $\pm$ 0.7
2.0	4	10.2 $\pm$ 3.7	5.0 $\pm$ 1.6

进行了研究。由于小鼠血量少,每份样品由3只小鼠的血液合并而成,细胞数在 1×10^6 左右。表3显示的结果与淋巴结细胞的结果相似,自0.5 Gy起,随着剂量的增加,UDS水平呈逐步下降趋势,到4.0 Gy时已几乎测不出。从各剂量点的UDS平均值看,其抑制程度也与剂量有关,只是由于标准误差较大,在2.0 Gy组才与正常对照组达到统计学显著差异的程度。

Tab 3. UV induced UDS in mouse blood lymphocytes on 3rd day after γ -wholebody irradiation (Mean $\pm$ S.E.)

Dose(Gy)	cpm/ 1×10^6 cells	Normal value(%)
0	641 $\pm$ 140	100
0.5	561 $\pm$ 154	87.5
1.0	341 $\pm$ 66	53.2
2.0	137 $\pm$ 54*	21.4
4.0	15 $\pm$ 16**	2.4

(Number = 4, * $p<0.05$, ** $p<0.01$)

与此同时还观察了小剂量多次照射对UDS的影响。小鼠每日以 ^{60}Co γ 射线照射0.05 Gy,待累积剂量达0.5 Gy及1.0 Gy时活杀,测定 1×10^6 血淋巴细胞的UDS,分别为 578 ± 50 cpm($n=5$)及 681 ± 54 cpm($n=4$),与平行对照 725 ± 75 cpm($n=12$)相比,无明显差异,尤其是没有看到有刺激升高的趋势。

3. 两例事故病人的观察

C与W均为钴源事故而受到一次全身照射的中度急性放射病患者。在事故后不同时间,用放射自显影法测定了外周血淋巴细胞UV诱发的UDS,并与3名健康人进行平行对比。在事故后2、5和26 d其细胞平均银颗粒数均明显低于健康对照,而到恢复期——事故后78 d时均已接近正常。这是本文首次观察到人受急性放射损伤后UDS水平明显下降,且持续时间颇长(见表4)。

Tab 4. UV induced UDS in blood lymphocytes of 2 radiation accident patients

Case	Dose(Gy)	Day after accident	Labelled cell(%)	Average grain count per nucleus
C	2.6	2	64	8.3
		5	61	8.2
		26	54	5.7
		78	47	17.0
W	3.5	2	67	7.8
		5	58	6.4
		26	38	2.1
		78	35	10.9
Health	Control		60	14.7

讨 论

UV 诱发 UDS 作为反映细胞对 DNA 损伤进行切除修复的一个重要指标引起广泛的重视, 例如关于动物种属的寿命长短、个体或细胞的老化程度、细胞的辐射敏感性以及某些疾病等对 UV-UDS 的影响都开展了研究^[3,4], 而电离辐射对此过程的影响虽有少数报道^[5,6], 但研究得尚不充分。本文通过小鼠实验研究及两例事故病人的观察, 说明了在 γ 射线全身照射后的一段时间内细胞对 UV 造成的 DNA 损伤的切除修复能力确有明显下降。这种下降并非只是由于细胞死亡引起, 因为在较低的、非致死剂量下也能发生, 而且用放射自显影法也证实了单个细胞内的 UDS 水平下降。因此在辐射研究中不仅要注意辐射对 DNA 分子的损伤, 而且要注意其对修复能力的抑制作用, 这对考虑改善细胞修复的途径是极为重要的。切除修复是一个复杂的酶学过程, 射线对此过程的抑制可能与参与修复的某些酶的活力下降或生成减少有关, 值得进一步探讨。

还有一些资料报道小剂量照射对 UDS 有刺激作用^[7,8], 但在本实验中未能观察到, 可能与各自采用的照射条件、实验方法等因素不同有关。究竟在多少剂量、什么条件下能发生明显的刺激作用有待深入分析确定。

从本文的研究结果还看出 UDS 的抑制程度与所受 γ 射线照射剂量间存在线性依赖关系, 小鼠在 1—2 Gy 照射后 UDS 抑制达 50% 左右, 4 Gy 以上则降到很低的程度。两例中度急性放射病患者在受照射后 2—5 d 也都有明显下降, 因此值得今后对受照人员进行此项测定, 一方面可以了解其细胞切除修复水平, 同时积累受照剂量与 UDS 水平间的量效关系, 进一步考查此项测定作为生物敏感指标的评价。

参 考 文 献

- 1 周平坤. 国外医学军事医学分册, 1989, 28:9
- 2 Cleaver J E, Thomas G H, Friedberg E C, Hanawalt P C. Manual of DNA repair, A laboratory manual of research procedures, Part B, 1981:277.
- 3 Ishikawa T. Cancer Res., 1986, 46(3):1344
- 4 Koval T M, et al.. Mutat. Res., 1978, 49:431
- 5 Hollatz R, Tempet K. Radiat. Environ., 1978, 15(1):77
- 6 Горт Л, и др.. Радиобиология, 1980, 20(4):508
- 7 Altman H, Tuschl H. International Symposium on Late Biological Effects of Ionizing Radiation, IAEA, Vienna, 1987:224.
- 8 国体健等. 中华放射医学与防护杂志, 1986, 6(2):88

(稿件收到日期: 1990 年 9 月 18 日)

GAMMA RADIATION EFFECT ON DNA REPAIR SYNTHESIS IN LYMPHOCYTES

Wei Kang Liu Xueying Zhou Pingkun Sun Wenzhong

(*Institute of Radiation Medicine, Beijing*)

ABSTRACT Unscheduled DNA synthesis in mouse and man lymphocytes was measured by liquid scintillation method and cell autoradiography after an ultraviolet exposure of 20 J/m^2 . The level of UDS was distinctly lowered in mouse lymph node and blood lymphocytes on the 3rd—4th day after γ -wholebody irradiation. The relationship between inhibitory effect and γ -radiation dose was linear. The average grain count per nucleus in blood lymphocytes of two patients, accidentally exposed to ^{60}Co , was also reduced. The results demonstrate that the inhibition of DNA excision repair ability must be taken into account of radiation injury effect on cells. The estimation of UV induced UDS might be used as a radiosensitive biological indicator.

KEYWORDS Unscheduled DNA synthesis, Radiation injury, Lymphocyte, DNA repair

This work was supported by the International Atomic Energy Agency