

电离辐射引起的 DNA 链断裂损伤及其修复

苏兆众 罗祖玉

(复 旦 大 学)

摘要 DNA 链断裂是电离辐射的主要生物学效应之一, 单链断裂由一次击中造成, 所以与辐射剂量成线性关系, 双链断裂可以一次击中造成, 也可由两个位置相关的单链断裂迭加而成, 所以与辐射剂量成线性——平方关系。已有各种理化方法能测定活细胞内的单链断裂和双链断裂数。细胞具有修复 DNA 链断裂的能力, 但其机制远不如切除修复机制那么清楚。未修复的链断裂是致死的, 被修复的单链断裂完全恢复 DNA 的正常结构与功能, 被修复的双链断裂的生物学效应如何还不清楚。剂量率对辐射的生物学效应有重要影响。

关键词 单链断裂; 双链断裂; 无错修复; 易错修复; 剂量率效应。

前 言

电离辐射和一些化学致癌剂的主要生物学效应之一是引起细胞内的遗传物质 DNA 分子的链断裂损伤。主要作用机制包括: (1) 辐射粒子直接打断磷酸二酯键; (2) 由辐射和化学致癌物诱导产生的自由基攻击磷酸二酯键; (3) 无碱基位(AP site)与磷酸三酯的形成, 增加磷酸酯键的不稳定性。虽然早已知道链断裂损伤能被修复, 但对其机制的了解远不如切除修复那么清楚, 原因不外乎(1) 电离辐射在造成链断裂的同时还引起其他类型的 DNA 损伤; (2) 链断裂的致死作用强, 活细胞对它们的容忍能力有限, 所以不容易在活细胞里直接测到这类损伤。

单 链 断 裂

1. 单链断裂的形成

由电离辐射造成的单链断裂数 N_{ss} 与剂量 D 的关系由下式决定:

$$N_{ss} = 2 n \mu k D \quad (1)$$

式中, n 是细胞中 DNA 分子上的碱基对数目, μ 是单位剂量中接近核苷酸的电离辐射粒子数, k 是接近核苷酸的粒子中发生能量转移的粒子数。所以 μk 表示与核苷酸发生有效碰撞的粒子数, 它不仅取决于辐射种类, 而且与细胞的状态有关。例如, 在哺乳类细胞内, 单链断裂的发生在富氧情况下要比乏氧条件下高 4 倍; 作为辐射防护剂的半胱氨酸和亚硫酸钠等还原剂则降低单链断裂的发生率, 这是因为由电离辐射粒子能量转移产生的自由基在造成单链断裂中起重要作用, 而氧能固定自由基在快反应中引起的损伤。

2. 单链断裂的测量

(1) 沉降法 最常用的是碱性梯度沉降法^[1], 如果单链断裂把 DNA 分子割成 5×10^3 以下的片段, 那么单链断裂数可被正确地测出, 如果分子量太大, 单链断裂不易测准, 因为大分子往往形成超螺旋, 或与蛋白、磷脂等分子混杂, 而且, 大分子的沉降系数随离心速度而变化。剂量为 1 krad 的 X 射线在细胞正常生理条件下可在每 10^9 的 DNA 上诱导 1-5 个单链断裂, 为了使单链断裂造成的 DNA 片段小于 5×10^3 , 细胞应受 0.2-4 krad 的 X 射线的辐射。通常用半致死剂量照

射细菌(1-15 krad)和低等真核细胞(1-20 krad),但哺乳类细胞的半致死剂量只有100 rad,所以沉降法只能用于测量受到超剂量X射线照射而不能进行复制的哺乳类细胞中的DNA的单链断裂。

(2) 碱性溶胞和荧光光度法 此法可测量受小剂量X射线照射后单个哺乳类细胞中形成的单链断裂^[2]。未照射的细胞中的DNA分子在碱性(pH>12)溶液中较稳定,常温下在一小时内可聚集而不分散;照射后的细胞按剂量增加DNA的分散度逐渐增加,结合荧光染色与显微荧光光度法就可定量计算单个细胞内的单链断裂数,该方法的优点是可比存活细胞与致死细胞里的单链断裂数;而且不必经同步化处理,就能在细胞周期的各个不同阶段测量单链断裂的形成和修复的动力学过程。

(3) 双螺旋解旋法 在碱性条件下,由于游离端的存在,DNA双螺旋会解旋,单链断裂的存在,加速解旋进程。碱性被中和后,单链DNA的量与单链断裂数成正比。此法可测量100 rad左右的X射线在哺乳类细胞中形成的单链断裂^[3]。但链交连损伤的存在会影响测定结果。

(4) 洗脱速率法 碱性溶胞于滤纸片(包括硝酸纤维、醋酸纤维和混合滤膜上),然后在碱性条件下洗脱,DNA洗脱速率随所带的单链断裂的量而增加,此法比双螺旋解旋法更灵敏,可测量几十rad X射线在细胞中造成的单链断裂。

以上为较常用的测量法,此外,还有羟磷灰石柱层析法^[4]。用电镜、电泳等多种方法都可估算超螺旋DNA分子上的单链断裂数。

3. 单链断裂修复

细胞受DNA单链断裂诱发剂处理后继续培养,链的长度增加,这说明细胞具有连接单链断裂的能力。修复的动力学曲线呈指数型:

$$N_{abt} = N_{abo} \exp(-\lambda t) \quad (2)$$

式中 N_{abo} 和 N_{abt} 分别是照后即刻与经 t 时间培养后细胞中的单链断裂数, λ 是修复率常数,各种细胞内单链断裂的半衰期($\frac{\ln 2}{\lambda}$)约为10~40 min。

一般认为,单链断裂修复由一系列高效率酶完成,其过程可能类似切除修复中的内切后修复过程:先是外切酶从断裂处切除一些包括受损与未受损的核苷酸,然后多聚酶以互补链为模板进行修复合成,最后连接酶封闭缺口。也有认为前两过程是同时进行的。用同位素标记法可知每修复一个单链断裂只掺入很少的核苷酸,说明修补长度很小。整个过程是一个无错(error-free)过程,被修复的DNA完全回复到原有的结构和功能。

双链断裂

1. 双链断裂的形成

每Krad的 γ 射线能在人细胞的 1.3×10^{10} 的DNA上生成一个双链断裂,双链断裂形成率与受照射的DNA分子所处的环境有关,干燥的DNA分子中形成的双链断裂与剂量成线性关系,说明断裂由一个电离辐射粒子造成;当DNA分子处于水溶液中,例如在细胞中,双链断裂数与剂量成线性——平方关系,说明除一次击中外,两个独立的单链断裂的重迭可形成一个双链断裂,细胞中由电离辐射诱导的双链断裂数 N_{db} 与剂量 D 的关系可用下式描写:

$$N_{db} = \alpha D + \beta D^2 \quad (3)$$

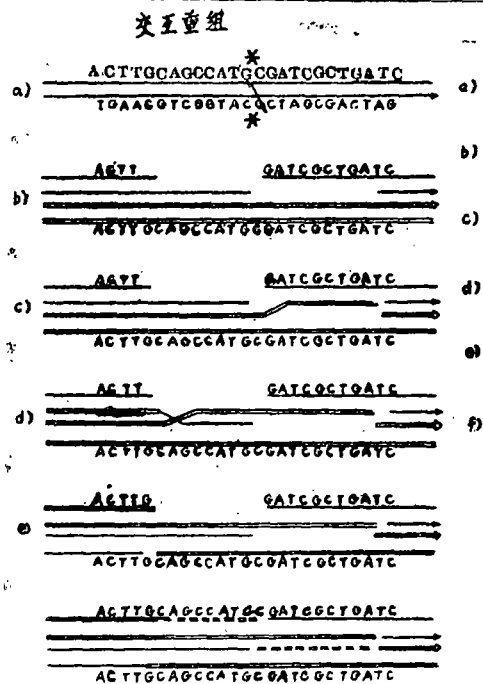


图 1 双链断裂修复模式(I)——交互重组。

当这种重组发生于姐妹染色单体间,对遗传特性无影响;但若发生于同源染色体间,会产生有丝分裂重组;若发生于非同源染色体的重复序列区域间,可导致染色体畸变。a) 双链断裂; b) 外切酶作用与同源染色体会联; c) 形成杂合双链 DNA; d) 解旋,第二个杂合双链 DNA 形成; e) 链互换; f) 多聚酶和连接酶作用。

Fig 1 Repair model of double-stranded breaks (I) — Reciprocal Recombination. When this occurs between sister chromatids there should be no genetic defect. When this occurs between homologous chromosomes it can give rise to mitotic recombination. When this occurs between non-homologous chromosomes at regions of repetitive DNA sequences it can give rise to the formation of chromosomal aberrations a) double-stranded breaks, b) exonuclease action and homologous association, c) heteroduplex formation, d) unwinding and second heteroduplex formation, e) reciprocal exchange of DNA helices, f) polymerase and ligase action



图 2 双链断裂修复模式(II)——互补末端与双链断裂相连。(a), (b) 双链断裂形成; (c) 外切酶作用, 内切酶打开互补末端的回文序列; (d) 重迭; (e) (f) 切除不配对碱基, 多聚酶和连接酶作用。这种修复模式导致染色体突变。

Fig 2. Repair model of double-stranded breaks (II) Telomere-break joining. a) and b) telomere and formation of double-stranded break, c) exonuclease degradation and opening of telomere by endonuclease, d) overlapping, e) and f) excision of unpaired bases, polymerase and ligase action. This repair model gives rise to chromosome mutation.

αD 项表示由单个电离辐射粒子造成的双链断裂, βD^2 表示由吸收两个分立的辐射粒子所造成的两位置上相关的单链断裂重迭成的双链断裂。系数 α 、 β 取决于辐射粒子能量传入 DNA 分子后细胞中发生的许多过程。若用 Ω 表示同时接近组成双链 DNA 的两条单链 DNA 的粒子所占的比例, ΩK 表示每一个第一次单链断裂伴随着第二条链单链断裂的几率, 那么由一次击中造成的双链断裂数为:

$$\alpha D = 2 n \mu K \Omega D \quad (4)$$

n 与 μ 的意义同(1)式, Ω 取决于沿电离辐射粒子轨道上能量传递的空间分布, 即辐射的类型, 也取决于 DNA 分子的几何结构。若 $1 - \Omega$ 是接近第一条链但不接近第二条链的电离粒子的比例, $\Omega(1 - K)$ 是同时接近两条链但不在第二条链上造成单链断裂的粒子比例, 那么 $(1 - \Omega) + \Omega(1 - k) = 1 - \Omega K$ 是仅造成第一个单链断裂的粒子的比例, $2 n \mu K(1 - \Omega K) D$ 可表示剂量 D 造成

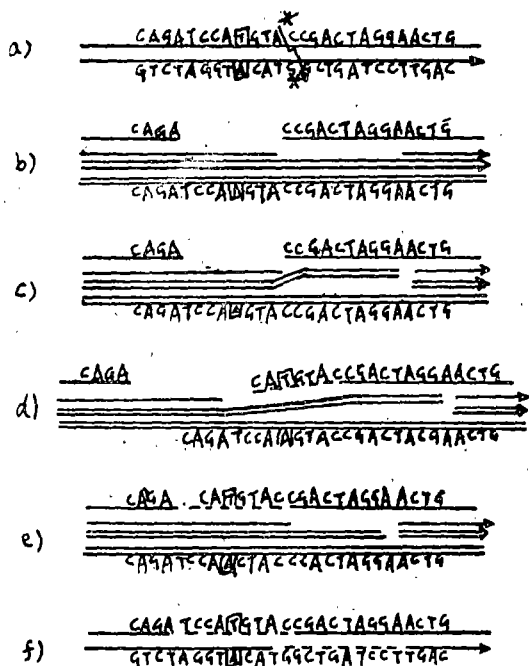


图3 双链断裂修复模式(Ⅲ)——非交互重组, 受损链与完整链完全同源, 双链断裂被无错地修复, a) 双链断裂; b) 外切酶作用和同源染色体联联; c) 内切, 杂合双链形成; d) 多聚酶作用; e) 杂合双链释放, 断裂重迭; f) 多聚酶和连接酶作用。

Fig 3 Repair model of double-stranded breaks (III) — Non-reciprocal recombination with perfect homology a) formation of double-stranded break, c) exonuclease action and association with homologous DNA, c) nicking and heteroduplex formation d) polymerase action, e) heteroduplex release and overlap of break, f) polymerase and ligase action.

的一个单链断裂但不同时在接近的第二条链上造成单链断裂的比例。在此种情况下, 只有另一个辐射粒子在第二条链的离第一个单链断裂几个碱基的距离内造成另一个单链断裂, 才能由两个单链断裂形成一个双链断裂。若 n_1 是两个单链断裂相隔的核苷酸数, μ_1 是单位剂量中接近这些核苷酸的电离辐射粒子数, K_1 是这些电离辐射粒子中发生能量转移的粒子数, 那么 $n_1\mu_1K_1$ 代表单位剂量在第一个单链断裂中伴随着被另一个粒子造成的互补链上单链断裂的比例, 剂量 D 造成的由两个单链断裂重迭而成的双链断裂数为:

$$\beta D^2 = 2n\mu k(1 - QK)n_1\mu_1K_1D^2 \cdot \frac{1}{2} \quad (5)$$

这里用 $D^2/2$ 是因为第二个单链断裂只有在第一个单链断裂存在时才产生的, 所以其出现几率只

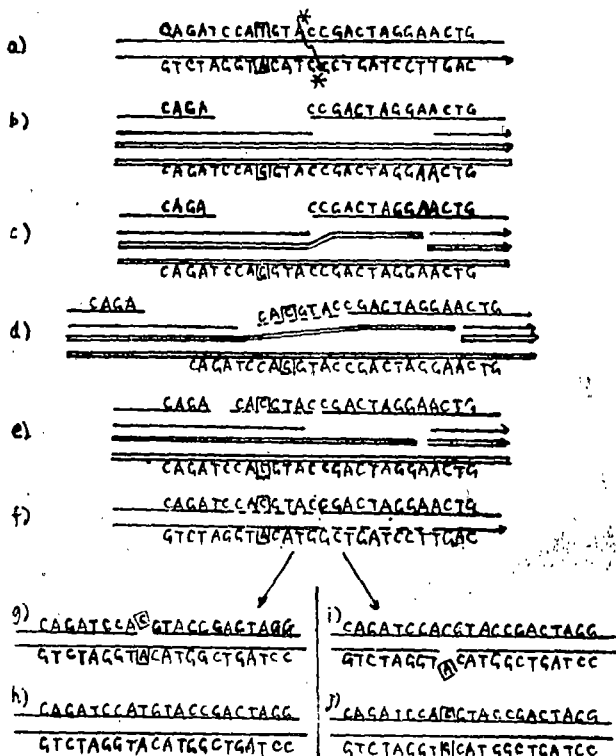


图4 双链断裂修复模式(Ⅳ)——非交互重组, 受损DNA链与完整DNA链间的互补不完善(方框表示形成错配碱基对), 非交互重组和错配修复^[9]的结果, 或完成无错修复, 或导致突变。

a)-f) 同图3, g) 除去子链上的错配碱基; h) 插入正确碱基, 完成无错修复; i) 除去亲链上的错配碱基; j) 插入与子链配对的碱基, 导致点突变。

Fig 4 Repair model of double-stranded break (IV) — Non-reciprocal recombination with non-perfect homology. a) to f) the same as fig 3, g) excision of mismatched bases in newly synthesized strands, h) correct base inserted to give perfect repair, i) excision of mismatched bases in templates, j) insertion of bases which paired with wrong bases in the newly synthesized strands, resulting in point mutation.

与剂量的半数成正比。

高 LET 射线造成双链断裂的几率较高。

2. 双链断裂的测量

双链断裂主要用中性梯度沉降法测定, 但只限于 DNA 分子量小于 10^6 的情况。当 DNA 分子量超过 10^6 , 由于沉降系数随离心速度而变化, 很难测准分子量。X 射线在有氧细胞中的双链断裂形成率是 $0.1-0.2/10^6$ 道尔顿/Krad。所以只有当细胞受到大于 $5-10$ Krad 的 X 射线照射后, 才能用中性梯度沉降法测定双链断裂。

另一种方法是粘度法, 适用于较大的 DNA 分子, 但溶液中最大分子的分子量对此法的影响颇大, 所以很难用它估计平均分子量。

3. 双链断裂的修复

长期以来, 人们认为除了一些对电离辐射抗性很大的细菌(如微球菌 *M. radiodurans*)外, 细胞不具备修复双链断裂的能力。后来证实, 多数细胞都具有修复此类损伤的能力。例如, 用低于 50 Krad 的 X 射线照射离体培养的中华仓鼠卵巢细胞(CHO), 80% 的双链断裂可被修复, 修复所需时间大于单链断裂的, 一般为几小时^[5]。研究哺乳类细胞中的双链断裂修复的主要困难在于: 哺乳类细胞的染色体结构较复杂, 而且它们受到几百拉德的低剂量照射后就停止复制, 造成能测量双链断裂的射线剂量早就杀死哺乳类细胞。

未修复的双链断裂是致死的。然而已修复的双链断裂的效应如何? 现有测量双链断裂的修复的手段都以 DNA 链是否恢复正常长度为依据, 既不知修复后是否恢复原有碱基序列, 也不知被连接的是否原来断裂的链。实验证明, 双链断裂修复是一个酶作用过程, 那么在无完整模板的情况下, 修复往往是易错的(error-prone)。大肠杆菌 *recA* 突变株和不能进行同源染色体配对的酵母 *rad 52* 突变体不能修复双链断裂, 提示 DNA 重组功能为双链断裂修复所必需^[3], 图 1~4 表示双链断裂的几种可能修复模式^[6],

电离辐射的剂量率效应

如上述, 双链断裂的剂量响应关系由 $Ndb = \alpha D + \beta D^2$ 给出, 其中 βD^2 项表示由两个位置上相关的单链断裂形成的双链断裂。两个电离辐射粒可能在作用时间上是分立的。若中间相隔时间过长, 则第一个断裂在第二个断裂形成前已被修复, 则 β 值会下降。若剂量低到在第二个断裂出现前第一个断裂已全部修复, 则 $\beta = 0$ 。所以可将剂量率划分成三个区域, 各个区域内射线的生物学效应不同(图 5)。(1) 急性照射区: 剂量率很高, 在照射时间内不能完成单链修复, 这时 $Ndb = \alpha D + \beta D^2$ 。(2) 慢性照射区: 剂量率很低, 在照射时间内, 第二个单链断裂形成前第一个单链断裂已完全修复。双链断裂完全由电离辐射粒子一次击中造成, 这时 $Ndb = \alpha D$ 。(3) 延时照射区, 剂量率介于急性照射区和慢性照射区之间; 在照射时间内部份单链断裂被修复, 这时, $Ndb = \alpha D + \beta(t) D^2$ 。系数 $\beta(t)$ 随时间 t 而变化, t 愈小, 剂量率愈大, 射线的生物学效应也愈显著。双链断裂比单链断裂具有更强烈的生物学效应。

下列实验更直接地说 明降低射线剂量率使单链断裂得以修复是射线的生物学效应减弱的原因。在中国仓鼠细胞中, 单链断裂修复的动力学曲线是指数型的, 修复率与温度直接有关。单链断裂修复的活化能是 24×4186 J/mol 分子, 以低剂量率射线 (4.8×10^{-2} Gy/min) 在低温 (2°C) 下照射, 细胞的存活曲线可用下式描写:

$$S = K \exp[-(\alpha D + \beta_{\max} D^2)]^{[6]} \quad (6)$$

式中, S 和 D 分别表示细胞的存活率和射线的剂量, α 和 β 的意义同(3)式, $\beta_{\max}$ 是指没有单链断裂修复时的 β 值(见图5)。若用同样的剂量率, 但提高照射时的温度, 则单链断裂修复发生。细胞的存活仍沿用(6)式, 只要把 $\beta_{\max}$ 变成

$$\beta(t) = 2\beta_{\max} \left\{ 1 - \left[1 - \exp\left(-\lambda D / \frac{dD}{dt}\right) \right] \cdot \frac{dD}{dt} / \lambda D \right\} \frac{dD}{dt} / \lambda D^{[8]} \quad (7)$$

式中, λ 是修复亚致死损伤的常数, 随温度而变化, λ 值与单链断裂修复率成正比。亚致死损伤修复的活化能是 $2.67 \times 418.6 \text{ J/mol}$, 与单链断裂修复的活化能很接近。此实验说明单链断裂修复和亚致死损伤修复的一致性, 是影响电离辐射的剂量率效应的主要因素, 在肿瘤的放射治疗过程中必须予以克服。

细胞的 DNA 链断裂修复能力对维持细胞的正常生理功能必不可少。部份运动失调和毛细血管扩张失调综合症 (Ataxia Telangiectasia, AT) 患者^[7] 和早年衰老综合症 (Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome, HGPS) 患者^[8] 修复电离辐射诱发的 DNA 链断裂的能力低下。DNA 链断裂的积累无疑是引起机体衰老的原因之一。

参 考 文 献

- [1] Lett, J. T. (1981) in "DNA Repair, A Laboratory Manual of Research Procedures", eds. E. C. Friedberg & P. C. Hanawalt, M. Dekker Inc. 363—378.
- [2] Rydberg, B. & Johanson, K. J. (1978) in "DNA Repair Mechanisms" P. C. Hanawalt et al eds. Academic Press, New York, 465—468.
- [3] Hutdinson, F. (1978) 同(2) 457—464.
- [4] Ahnstrom, G. & Erixon, K. (1981) 同(1) 403—418.
- [5] Lehman, I. R. (1977) BBA 474 49. Biochem. Biophys. Acte.
- [6] Chadwick, K. H. & Leenout, H. P. (1981). "The Molecular Theory of Radiation Biology" Plenum Press
- [7] Robbins, J. H. (1983) in "Cellular Responses to DNA Damages" Alan. R. Liss Inc. New York I 24. Proc. Natl. Acad. Sa.
- [8] Epstein, J. et al (1973) PNAS USA 70 977—981.
- [9] Baltimore, U. (1981) Cell 26 295—296.

(收到日期 1986 年 8 月 4 日)

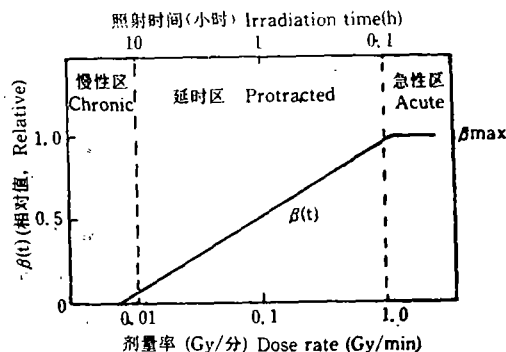


图 5 电离辐射的剂量率效应

Fig 5 Dose rate effect of ionizing radiations.

IONIZING RADIATION-INDUCED DNA STRNAD BREAKS AND THEIR REPAIR

Su Zaozhong Luo Zuyu

(*Department of Biology, Fudan University*)

ABSTRACT DNA strand breaks are the main biological effect of ionizing radiation. Single strand break is induced by a single hit of irradiation and thus has linear dose response curve. Double strand break can be formed not only by a single hit, but also by the overlap of two close single strand breaks located in the complementary strands. The dose response curve of double strand breaks is linear-quadratic. DNA strand breaks can be detected quantitatively by various physicochemical methods. Cells are able to repair both single and double strand breaks. The mechanisms of repair, however, are not so clear as those of other repair models, excision repair, for example. The unrepaired strand breaks are lethal. Single strand repair is error-free. The biological effects of repaired double strand breaks remain unclear thus far. Dose rate has plays important role on the biological effects of ionizing radiations.

KEY WORDS Single strand break, Double strand break, Effect of dose rate, Error-free repair, Error-prone repair.