

电离辐射对淋巴细胞核酸代谢的影响

——兼谈作为辐射损伤观察指标的意义

蒋 英 华

(西南沱江医院)

人们对淋巴细胞功能重要性的认识,正处在一个快速深化的阶段。由于在电离辐射作用下,淋巴细胞具有高度的敏感性及相对的可恢复性,因而在辐射影响下淋巴细胞的物质代谢和功能的改变,日益为放射生物学和放射医学工作者所关注。在电离辐射作用下,淋巴细胞的核酸代谢及表面膜功能的改变与各种放射损伤的早期观察(诊断)指标有直接联系。放射损伤的诊断指标问题,是目前放射医学中亟待解决而未获满意解决的问题。有鉴于此,本文先介绍淋巴细胞在未经电离辐射时核酸代谢及其功能的最近研究进展;然后介绍淋巴细胞在电离辐射作用下核酸代谢的变化;最后提出对其作为辐射损伤的观察指标的意见。借以作为引玉之砖。

一、淋巴细胞核酸代谢概况

出现在周围血、淋巴组织和造血器官中,在形态学上有其基本相同特征的小淋巴细胞,是一种统称,指的是一类细胞。它们分别执行着不同的免疫功能。基本上可分为两种:即T细胞和B细胞。除了对外界刺激反应的差异外,它们的核酸代谢过程基本一致。淋巴细胞不是终末细胞。其作为恒定的体细胞更新而分裂的周期,按细胞种类而异,长者超过100天,短者仅数天。淋巴细胞在抗原或非特异性分裂原的刺激下,能进入细胞周期进行分裂。此时它就显示出一些特殊的核酸代谢规律。处于分裂间期的淋巴细胞,习惯上称之为静止淋巴细胞。

1. 静止淋巴细胞的核酸代谢特点

静止淋巴细胞因处于细胞分裂周期的间期(G_0 期)。除非是因DNA分子的损伤而修复外,一般说来,此时不进行DNA的复制,但间期淋巴细胞仍有一定程度的RNA合成。正常淋巴细胞已证实不重新合成嘌呤环。总的说来,静止淋巴细胞的核酸代谢反映在DNA和RNA方面的概况可大致归纳如下。

(1) DNA 小淋巴细胞的染色体组成是二倍体。每个细胞DNA含量约8.0微微克。 ^3H -胸腺嘧啶核苷(^3H -Tdr)和 ^{32}P 掺入试验中得知,静止淋巴细胞不进行DNA的合成。在静止淋巴细胞中提出的DNA聚合酶的活力极微。其它一些参与合成DNA及其前体的有关酶的活性亦均处于低下状态。约仅为一般体细胞的1/6左右。

(2) RNA 每个小淋巴细胞的RNA含量约为2.5微微克, RNA/DNA值为0.32,小于一般哺乳类细胞。其RNA在胞核与胞浆内的分布几乎相等,此皆与静止小淋巴细胞的胞浆和核糖体缺乏有关。淋巴细胞各类RNA在超微结构上的定位见表1。

2. 增殖过程中淋巴细胞核酸代谢的特点

研究辐射对淋巴细胞核酸代谢的改变,所用的照射方法不外活体的(全身或局部)和体外两种。为观察辐射效应的需要,有时有必要将淋巴细胞从周围血或组织中分离后在体外经不同时间的培养和处理,然后对核酸和酶的变化加以检定。在体外培养过程中加入非特异性促

表 1 淋巴细胞的各类 RNA 在超微结构上的定位

RNA 的定位及名称		代 号	沉降常数
胞核	不均一核 RNA	Hn-RNA	20-100S
核仁	核糖体前体 RNA	r-Pre-RNA	45S, 32S
胞 浆	1. 信使 RNA	m-RNA	按信息量各异
	2. 核糖体 RNA	r-RNA	
	a. 大亚单位核糖体 RNA	r-RNA	28S + 7S
	b. 小亚单位核糖体 RNA	r-RNA	18S
	3. 转移 RNA	t-RNA	4S
线粒体	线粒体 RNA	mit-RNA	—

分裂原(各种植物促分裂原如 PHA、Con-A、PWM 等)¹⁾或对致敏淋巴细胞加入特异性抗原。均可促使原来处于静止状态的淋巴细胞进入分裂周期,即所谓淋巴母细胞的转化过程。置受照淋巴细胞于活跃的核酸代谢的分裂周期中加以观察,就可使在静止期细胞不易显示的异常代谢过程得以暴露,成为常用的研究淋巴细胞辐射效应的手段。为便于讨论,兹将淋巴细胞在增殖周期的核酸代谢特点作以下简要说明:

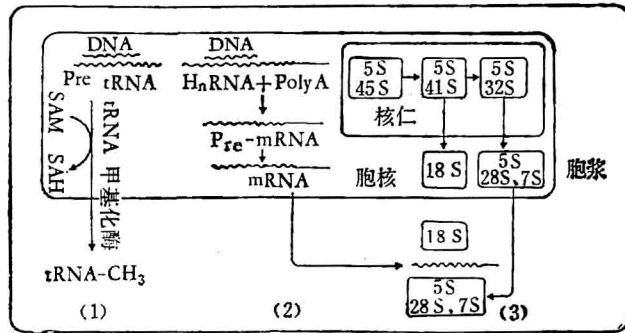


图 1 淋巴细胞的 RNA 成熟过程

(1) 表示在胞核 DNA 中转录出 t-RNA 前体,后者在 t-RNA 甲基化酶的作用下甲基化后进入胞浆

(2) 表示在胞核 DNA 中转录出 Hn-RNA,后者在核内合入一段多聚-A 后形成 Pre-mRNA,继而 Pre-mRNA 降解成带有一段多聚-A 的成熟 mRNA,进入胞浆

(3) 表明核仁 RNA 在形成 r-RNA 的成熟过程,其形成的大小亚单位的核糖体,在来自(2)中的成熟 m-RNA 上逐步串联成多聚核糖体

(1) 关于 DNA 方面 淋巴细胞的表面膜上存在着各种对于外界刺激物作出反应的受体,其中包括对植物促分裂原和抗原作出细胞分裂反应的受体。当这些刺激物一旦与细胞膜

上的受体结合时,激活了邻近的腺苷酸环化酶,酶促环腺苷一磷(cAMP)的合成。后者作为一种第二信使继而激活了蛋白激酶,组蛋白是一种包果在 DNA 分子外的碱性蛋白,起着基因复制的阻遏剂的作用。在组蛋白激酶的作用下,组蛋白磷酸化,解除了对 DNA 复制的阻遏,于是 DNA 的复制起始过程得以实现,这就是目前对淋巴细胞在分裂原的作用下导致 DNA 合成和使细胞进入 S 期的可能解释。

(2) 关于 RNA 方面 静止淋巴细胞虽然也有一定程度的 RNA 合成,成熟和转运过程,但各类 RNA 活跃地经历这一进程,则在细胞受刺激后进入细胞周期并为 M 期作准备的各个有关时相之中。因此,了解 RNA 在细胞内成熟过程对辐射损伤的研究甚关重要。目前对淋巴细胞的 RNA 成熟过程的研究颇有进展^[1-3],限于篇幅,这里仅用简图(图 1)表示其大致过程,作为叙述以下有关内容的参考。

静止和转化淋巴细胞核酸代谢的其它特点将在以后的叙述中一起讨论。

二、在电离辐射作用下 淋巴细胞的核酸代谢

静止或转化淋巴细胞在电离辐射作用下,核酸代谢及其有关分子的规律和相互制约的顺序均遭到不同程度的扰乱和破坏。这是我们从核酸代谢的观点上探讨其作为辐射损伤指标的分子生物学基础。

1. 辐射对单核苷酸和环核苷酸代谢的影响

(1) 对 ATP 分解代谢的影响 以前曾经认为辐射可以抑制淋巴细胞合成 ATP (腺苷三磷酸)。而由辐射造成的细胞核内氧化磷酸化的障碍,则与导致细胞的间期死亡有关。这种看法后来得到纠正。因为实验证明在 X 射线体外照射大鼠胸腺细胞

1) PHA: 植物血球凝集素; Con-A: 刀豆球蛋白-A
PWM: 商陆促分裂原

后,并不影响其 ATP 的合成。照射引起的 ATP 水平下降的同时亦无相应的 ADP 或 AMP 增高的现象。此外,有人报道在照射后的淋巴细胞的培养液中有相当量的 260 毫微米光谱吸收,这些均说明射线造成细胞核内 ATP 水平下降乃是由于腺嘌呤核苷的直接分解所致。Araki 等人^[4]在体外以 X 射线照射大鼠胸腺细胞后的细胞培养液中,发现次黄嘌呤核苷的释放量在 0.5—32 千拉德范围内有剂量依存关系。这些都支持射线所造成的细胞 ATP 下降是由于核苷酸直接分解的说法。

(2) 对腺苷酸环化酶活性的影响 有人^[5]给大鼠以 800 伦的 X 射线照射后从脾脏及胸腺淋巴细胞制备腺苷酸环化酶。该作者利用酶制剂对 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 转变为 $[\text{P}^{32}]$ -环腺苷一磷酸的酶促反应能力,以测定细胞的腺苷酸环化酶的活性。实验表明,经射线照射后的淋巴细胞,其腺苷酸环化酶的水平一般并不低于或仅稍低于对照细胞的基础水平。但这些细胞对在经肾上腺素刺激后所引起的腺苷酸环化酶活性增高的反应能力却大为减弱。这一点提示射线可能损伤淋巴细胞表面膜的肾上腺素受体。

2. 辐射对 DNA 代谢的影响

(1) 对淋巴细胞 DNA 分子的断裂效应 不久前 Ono 和 Okada^[6]用在碱性蔗糖梯度顶部溶解细胞,在超离心场中得出 DNA 分子的沉降系数($S^{0'}$ zow)以推算断裂效应的方法,观察了小鼠胸腺淋巴细胞在 γ 射线照射后的 DNA 单链断裂效应和连接能力。他们发现体外照射的每个细胞的 DNA 分子断裂数为 $0.8 \pm 0.3/10^{12}$ 道尔顿/拉德,体内照射为 $0.6 \pm 0.2/10^{12}$ 道尔顿/拉德。但在体内照射情况下所受剂量越高,所需连接的时间越长。这可能意味着胸腺细胞内连接酶的数量是有限的。所以当断裂数量增多时,需要酶行使其功能的时间亦相应增加。实验中发现当延长受照细胞的培养时间,在梯度的顶部可出现另一小峰。根据它的出现与 DNA 酸溶部分的增加和核溶相联系的特点,说明它的形成可能是 DNA 仍在进一步降解的一种反映。Hashimoto 等人^[7]对在 γ 射线照射后的

人周围血淋巴细胞,经 PHA 刺激和非刺激情况下的单链 DNA 断裂效应作了观察。他们发现转化细胞的敏感性较静止细胞为高(分别为 $1.8 \pm 0.2/10^{12}$ 和 $1.2 \pm 0.1/10^{12}$ 道尔顿/拉德)。但转化细胞的单链 DNA 断裂的连接速度要比静止淋巴细胞快 10 倍左右。其详细机理正在研究之中。

(2) DNA 链的修复和非预定合成 静止淋巴细胞并不进行 DNA 的合成已如前述,但细胞经射线照射之后, DNA 发生断裂,对这部分损伤进行修复而发生的 DNA 合成,不受细胞周期及其时相的限制。所谓“非预定合成”也就是为修复辐射损伤而发生的 DNA 合成,并不是在细胞分裂周期的 S 期按基因复制的预定需要而进行的。Barliner 等人^[8]曾对人周围血淋巴细胞在辐射作用下 DNA 的非预定合成的动力学作了观察。发现非预定合成可以分为两个阶段,第一阶段完成于照射后的 1 小时之内,表现为同位素标记前体掺入的快过程。第二阶段的慢修复过程至少持续至照射后 7 小时。氧效应在非预定合成过程中表现显著。缺氧可减少 1/2 的快修复过程。将照射后 2 小时的人周围血淋巴细胞给以 ^3H -Tdr 掺入后制成电镜自显影标本观察,发现非预定合成的 DNA 部位在细胞核内的分布并不是随机的。约 70% 的银粒集中在细胞核的核膜邻近部位,与占核 DNA 量大部的异染色质的分布无关。这种影响持续在照射后培养的 0.5—4 小时。它的这些改变并不因细胞是否经 PHA 刺激而受影响。作者认为这种现象可能与核膜接近的 DNA 分子的特点有关。因为不论是单链的还是双链的断裂,都只有其中一小部分能为修复酶所达到的断裂部位才可以重接。可能核膜邻近的 DNA 分子结构上的特点就表现为:一旦这些 DNA 为射线所打断,修复过程就集中在这些部位发生。目前还不能证实修复过程与这一区域 DNA 分子的高度重复顺序的关系。

(3) DNA 与组蛋白的结合能力和模板活性 Umansky 等人^[9]对受 γ 射线照射的大鼠胸腺细胞的 DNA 在聚丙烯酰胺凝胶柱中对组蛋

白各组份的结合能力进行了观察,发现其对组蛋白的 F_1 、 F_{2a} 、 F_{2b} 、 F_3 等组份的结合能力均有不同程度的下降。其中尤以对 F_{2a} 的结合能力下降最为显著。照射后细胞的 DNA 与组蛋白及各组份所形成的复合物溶解度,高于与对照动物的自然(双链)DNA 所形成的复合物。组蛋白对这些受照动物细胞的 DNA 在依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶反应中的模板活性抑制作用,亦比对照细胞的 DNA 有所减弱。作者认为所有上述现象可能与照射改变了染色质内组蛋白与 DNA 分子间的关系有关。并非由于对组蛋白本身的直接分解所致。

(4) 对 DNA 合成的抑制 辐射对淋巴细胞 DNA 合成的抑制影响,较一般哺乳类体细胞更为敏感。在 PHA 刺激下受照淋巴细胞对 ^{32}P 或 ^3H 、 ^{14}C 标记的 Tdr 掺入,一般均表现为明显的降低。但在某些较低的照射剂量情况下,也见有标记的 DNA 前体掺入稍为增加的报告。有人用大鼠淋巴细胞在以 100 拉德的 X 射线照射后,标本经 Feulgen 染色,在细胞光度计下测量其细胞核的 DNA 含量。发现在照射后 1—6 小时,大部分细胞核的 DNA 含量都在二倍体量以下。但也见有一些核形增大, DNA 含量高于二倍体的细胞,显示出 DNA 合成活跃的现象。根据形态学上的判断,鉴定出这些核形增大的细胞,就是在照射之后最终(3—6 小时)将发生核溶的细胞。从以上实验结果分析,似乎提示着照射后表现出淋巴细胞 DNA 合成抑制的后面,还重叠着与核酸代谢有关的分子事件异常的可能。

Myers 等人^[10]对大鼠胸腺细胞经不同剂量的 X 射线照射后,在各培养时间中观察了这些细胞的 ^3H -Tdr 掺入的动力学。发现在 X 射线照射后 1—2.5 小时,剂量在 1 千拉德以下, DNA 前体的掺入百分数与剂量间存在着一定依存关系。其中尤其以照射后的 4—4.5 观察组的剂量依存关系最为明显(见图 2)。最近苏州医学院卫生系^[11]对 γ 射线照射下人周围血的淋巴细胞 DNA 的 ^3H -Tdr 掺入情况,在 10—400 伦的剂量范围内给出了对数方程,实验表明以 ^3H -Tdr

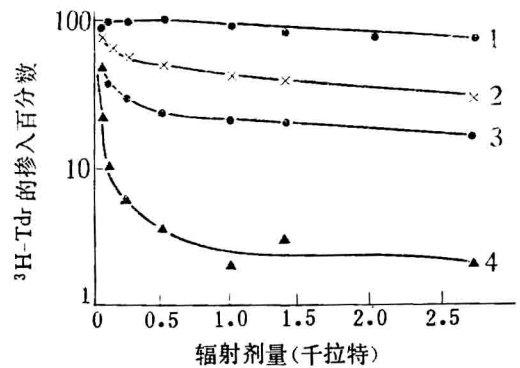


图 2 大鼠胸腺淋巴细胞在不同照射剂量下 ^3H -Tdr 掺入的动力学

曲线 1, 2, 3, 4 分别为细胞经照射后培养 0—20 分钟, 1.0—1.5 小时, 1.5—2.5 小时, 4—4.5 小时后的观察结果

的掺入作为观察射线的剂量效应的手段,其依存关系和敏感性还是相当明显的。

3. 辐射对 RNA 代谢的影响

早年的一些研究已经注意到在亚致死剂量的照射下,动物胸腺淋巴细胞的蛋白质合成和多聚核糖体形成率下降等现象,嗣后,又见到受照动物的胸腺细胞 RNA 聚合酶活性下降及 RNA 合成能力降低。但辐射对淋巴细胞 RNA 代谢过程影响的详细情况,则只是在近年来逐渐认识到各类 RNA 在淋巴细胞内的成熟过程的基础上才开展起来的。

(1) 对 RNA 的降解和成熟过程的影响

Geraci 等人^[12]给大鼠胸腺淋巴细胞在体外以 ^{14}C -尿嘧啶核苷脉冲标记 30 分钟,然后分别在间隔 0.5, 2.5, 4.5, 8.5 小时之后,再给予 1 千伦 X 射线照射。细胞经照射后在 2 小时的培养过程中观察 ^{14}C -尿嘧啶核苷在 RNA 上脱落的程度,并与非照射的对照细胞相比较。发现标记物脱下的程度与脉冲标记至细胞接受照射的间隔时间有关。例如相应于上述的间隔时间,标记物脱下的百分数分别为 31, 22, 11 和 5。说明愈是新合成的 RNA 其成熟过程对辐射愈是敏感。Bergstrand 等人认为标记物快速掺入的核 RNA 部分,即通常称为快速标记 RNA 部分,有相当高的代谢活性,由此推断,辐射对核 RNA 成熟过程的影响,可能与影响核内的 Hn-

RNA 和核仁中 45S RNA 等的成熟过程有关。

(2) 对转录过程的影响 给大鼠以 400 拉德的 X 射线全身照射后,分离胸腺淋巴细胞。分别在体外经 PHA 刺激和不受刺激情况下分离其不均一核 RNA,并使之与腹水肝癌细胞的 DNA 进行分子杂交试验^[12]。发现受照动物细胞的 Hn-RNA 形成杂交分子的能力均低于对照细胞。根据重接动力学 (Cot 曲线) 实验得知,受照细胞的 Hn-RNA 杂交能力下降的 RNA 分子部位,最显著地表现在 Cot 值为 10^2 — 10^4 的慢重接区,也即是在核酸分子的单一顺序或低重复顺序的部位。因此在全身照射的情况下出现的转录过程的抑制也可能集中地表现在这些分子部位转录过程的障碍。

三、淋巴细胞核酸代谢研究作为辐射损伤观察指标的诤议

由于近几年才系统地研究了辐射对淋巴细胞核酸代谢的影响,这里仅对它的诊断意义提些浅见,至于把它作为生物计量仪的意义则有待更多资料的积累。

1. 指标本身的特点

(1) 敏感性 淋巴细胞是机体对辐射损伤敏感的靶细胞,而核酸及其酶系则是细胞中对电离辐射敏感的靶分子。从这样的双重意义来看,本类指标有可能成为辐射损伤的较高敏感度的观察指标。可是目前意在寻求小剂量效应的本类指标的研究所见尚少,也尚未见到有将本类指标与其他生物学指标作系统的比较的工作。但参考如 Scaife 的 DNA 分子粘度与剂量关系的观察,以及 Myers, Geraci 和最近苏医卫生系等一些工作,从辐射对核酸前体掺入到分子杂交能力的影响中还都能显示出在较低剂量范围内,本类指标的相对敏感程度。相信今后对本类指标的敏感性问题,将会有更为确切的评价。

(2) 剂量依存关系 即使不从严格的生物剂量计来要求,作为一个可靠的诊断指标仍需要在一个较宽的剂量范围和观察期限内,有明

显地指标改变与剂量增减的依存关系,以利于在诊断上对损伤程度作定量估计,对治疗效果或恢复过程作动态比较。从目前的资料看,本类指标虽然也能表现出一定程度的剂量依存关系,但由于实验所用的剂量往往较高,是否能符合上面所提的基本要求尚难作定论。此外有些体外效应与对全身情况相比,当然还存在一定差距。

(3) 特异性 严格说来迄今所用的辐射损伤的生物学观察指标、均非特异。但就淋巴细胞而言,它对电离辐射有较高的生物效应,目前研究淋巴细胞本身所具有的特殊功能和代谢规律的工作也在日益深入,对我们从核酸代谢方面来探索和提高指标的特异性很有帮助。例如对淋巴细胞在特异性抗原和非特异性分裂原作用下 DNA 和 RNA 的代谢规律,免疫信使 RNA 的形成、淋巴细胞表面膜受体的特点与环核苷酸的关系以及核膜对染色质核酸代谢的影响等进行深入研究,有可能提高本类指标的特异性。

(4) 可行性 选择诊断指标的另一重要条件是检查方法应尽可能做到简单易行,便于推广。人的淋巴细胞在周围血中取材,只要取血量少,就可根据检查要求作一定次数的重复取样而不致影响受检者的健康。淋巴细胞尚有易于在体外培养以至建株的特点,有利于在生长增殖过程中加以各种处理,以观察核酸代谢等各种变化。

(5) 方法和条件 本类指标所用的方法中,虽然要求对核酸和酶进行提取和分离等手续,但也并不比一般生物化学操作复杂多少。至于对设备的要求,除电泳和超离心术需要在较为中心的实验场所进行之外,其它如紫外光谱分析,同位素的标记、剂量,各种层析、电泳以及淋巴细胞体外培养等技术,都能为一般临床实验室经努力而达到。

2. 展望

目前对淋巴细胞核酸代谢的辐射效应的研究十分活跃。由于本类指标具有上述特点以及有利于观察辐射对携带、传递和表现生命遗传

信息的影响,故值得进一步探索。再则对淋巴细胞功能的深入研究,使我们对一些人类重要疾病的认识和处理不断深入。研究淋巴细胞的辐射效应,将有助于阐明其功能和作用机理,从而带来了放射医学本身的进展。例如最近有人^[15]在研究 γ 射线照射后的组蛋白对大鼠胸腺细胞DNA造成的断裂效应时,发现受照组蛋白对DNA造成的断裂部位是非随机的,根据在蔗糖梯度上出现的恒定的 6×10^7 道尔顿峰,以及当组蛋白受照剂量增加时,引起其所处理的DNA出现 6×10^7 道尔顿分子量断片的相应增加,而又不产生其它分子量组份的特点,有力地支持了胸腺细胞的DNA分子是由一些较小的分子片段借含巯基的蛋白联结的设想,经照射后的组蛋白产生羟基过氧化氢组蛋白,起巯基结合剂的作用,造成DNA大分子特异性的断裂。辐射对核酸代谢影响的观察除了在理论上丰富并推动分子生物学的进展外,也与放射医学中除诊断技术外的其他方面相关联。例如最近有人^[16]发现缺乏维生素E的小鼠淋巴肉瘤细胞,在X射线的照射下引起的DNA合成抑制效应比对照细胞更为显著。此结果不仅加强了近年来对在核膜邻近部位与核膜形成复合物的DNA有特异的辐射敏感性的看法,还表明维生素E有保护细胞膜的不饱和脂肪酸的抗自由基氧化作用的能力,为放射损伤的防治提供了有力的依据。从目前所用的各类生物学指标缺乏特异性的现实情况看来,当前要以某一单项指标全面反映机体的辐射受损程度可能是困难

的。但如把本类指标与血液学、细胞遗传学、体液生化、免疫学等指标相互参照,从中找出规律,就可以使之在放射损伤的诊断、治疗和病情观察中发挥更大的作用。

主要参考文献

- [1] Cooper, H. L. et al.: *J. Biol. Chem.*, **24b**, 5059, 1971.
- [2] Rubin, A. D. et al.: "Erythrocyte, Thrombocytes, Leukocytes" 2nd. Int. Symposium. Vienna, 424, 1972.
- [3] Mansson, P. E. et al.: *Scand. J. Haematol.*, **14**, 42, 1975.
- [4] Araki, K. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **17**, 375, 1970.
- [5] Kemp, R. G. et al.: *J. Immunology*, **114**, 660, 1975.
- [6] Ono, T. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **25**, 291, 1974.
- [7] Hashimoto, Y., et al.: *Blood*, **45**, 503, 1975.
- [8] Barliner, J. et al.: *Radiat. Res.*, **63**, 544, 1975.
- [9] Umansky, S. R. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **25**, 31, 1974.
- [10] Myers, D. K. et al.: *Can. J. Biochem.*, **44**, 839, 1966.
- [11] 苏州医学院卫生系第三教研组:《生物化学与生物物理进展》1977年,第3期,第10页。
- [12] Getaei, J. P. et al.: *Radiat. Res.*, **58**, 74, 1974.
- [13] Hanson, K. P. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **30**, 129, 1976.
- [14] Scaife, J. F.: *The cell nucleus-metabolism and Radiosensitivity*, Taylor and Francis, London, 1966.
- [15] Ueno, A. M. et al.: *Radiat. Res.*, **69**, 541, 1977.
- [16] Konings, A. W. T. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **31**, 397, 1977.

[本文于1978年1月26日收到]

(上接第40页)
刺激是很敏感的。

综上所述,昆虫、鱼类、鸟类和哺乳动物都具有一定的、特化的振动感受器。关于它们的形态特征、感受振动的频率范围、阈振幅以及换能机制等,已经进行了一些研究,特别是那些关

于接受来自空气、水域和地面轻微振动的功能的工作,更是引人注目。这些问题的深入研究,对于阐明动物对地震起反应或许可能提供一些有意义的论证。

[本文于1977年4月11日收到]