



异种 DNA 对受照小鼠体细胞染色体的保护效应

陶毓顺 王天宇 周素华 杨丽君

(南京医学院七〇九 研究组)

核酸代谢是机体内对射线较敏感的一个重要环节。在急性放射病时,体内一些重要生命物质代谢,尤其是核酸代谢遭到破坏,并导致其他一系列物质代谢的紊乱,从而影响整个细胞代谢过程,造成组织和脏器的功能障碍,成为急性放射损伤重要发病机理之一。因此,机体在受急性外照射时,若能阻断和抑制其代谢紊乱进一步发展,或能修复体内核酸大分子的辐射损伤,并加速核酸的合成代谢等,就成为有效治疗急性放射损伤的一个重要措施。

过去,关于脱氧核糖核酸(DNA)及其水解产物对急性放射损伤的防治作用,已有不少报道^[1,2]。DNA对辐射损伤的修复效果不仅见于动物实验,而且从体外细胞培养和用细胞遗传学方法观察也获得类似结果^[2,3]。实验证明,它对射线所致细胞死亡和分裂抑制,DNA合成障碍以及染色体畸变等的辐射损伤都有不同程度的保护作用。

因此,我们期望在以往动物实验治疗基础上,用细胞遗传学方法(即染色体分析方法),以期从整体和体外细胞培养^[4]的染色体畸变率分析,即从细胞水平作出判断,并联系以往报道的动物实验资料进行比较分析,借以研究其抗辐射效应的可能机制。

材料与 方法

DNA 的来源与制备

DNA取自鸭的有核红细胞,按照 Kay 方法^[5],并作适当的改进,进行提取。即除用 Duponol(十二磺基硫酸钠)脱蛋白外,另外用 3.5:1 氯仿-戊醇再脱蛋白一次,提高去蛋白效果,然后用无水酒精使之析出,溶于生理盐水缓冲液中,贮存在 4℃ 冰箱备用。该制剂浓度用 Dische 的二苯胺发色方法^[6]定量

测定,并用酚试剂方法测定该溶液蛋白含量低于 1%。另用 Orcinol 方法^[7]测得 RNA 占 DNA 总含量的 3.4%。

动 物

南京生物制品研究所引入的昆明种系杂交繁殖鼠,体重为 20±2 克,分组时雌雄各半。

照射条件与剂量

用⁶⁰钴 γ-线作水平式全身照射,剂量率为 50.6 伦/分。各剂量组分别照射 100、300、500、700 伦(经换算相当于 96、288、480、672 拉德)。

DNA 用量和用法

为了寻求和选择相当于 50—100 拉德射线剂量致畸作用的 DNA 用量^[4],分别给小鼠腹腔注射 105、210、315、420 微克 DNA,观察和比较了属于染色体型畸变中的双着丝粒体、末端缺失和总畸变细胞数等项,由此选定 300 微克 DNA 作为本实验研究中的 DNA 用量。预防组和治疗组分别于照前或照后 24 小时,从小鼠腹腔注射 0.2 毫升含 300 微克量的 DNA 溶液,对照组注入相应量的消毒生理盐水。

染色体片制备

受照小鼠 3 天后在腹腔注入秋水仙素,间隔 5 小时,断椎处死剥离和取出股骨,用生理盐水冲出生成骨髓细胞悬液。经低渗膨胀后,用甲醇-冰醋酸溶液重复固定。离心后,留沉淀 0.2—0.3 毫升,用气干法制成染色体片,最后 Giemsa 染色。

小鼠染色体畸变的观察和计数

用低倍镜择其形态完整,分散较好的染色体细胞,然后转入高倍油镜下逐个观察和计数细胞染色体数,分析和记录染色体型和染色单体型畸变。由于小鼠体细胞均属端着丝粒染色体,为了统一镜下识别标准,我们参照世界卫生组织建议标准及按照染色体畸变形成机理,拟定了双着丝粒染色体和末端缺失等分析标准。在观察中所见到染色体畸变均由两人以上过目核定,最后对实验数据进行统计处理,算出各统计项目的百分率±泊松标准误。

结 果

本实验所选择 DNA 用量为 300 微克, 其致畸作用在染色体型畸变指标上为 0.75%, 相当于 50—100 拉德射线的剂量效应^[4]。现将小鼠经⁶⁰钴 γ -线各个剂量照射, 骨髓细胞染色体的 DNA 防治效应的染色体畸变观察结果列表 1 和表 2。

一、总畸变细胞数

实验结果表明: 各抗放组(包括预防和治疗组)总畸变细胞数均低于相应的对照组, 其中, 尤以 300—500 伦照射组 DNA 的抗辐射

效应较为显著, 另外, 以染色体型畸变细胞变化较为稳定, 并有一定规律性, 和总畸变细胞数的变化相一致。染色单体型畸变细胞各抗放组亦均低于相应对照组。

二、染色体型畸变分析

染色体型畸变包括: 双着丝粒体, 着丝粒环、微小体、末端缺失和易位等。从七个组(因 700 伦对照组仅观察到 34 个可分析的骨髓染色体细胞, 此组除外)的实验研究观察, 各抗放组均明显低于对照组, 且预防组的抗辐射效应优于治疗组。实验结果还表明, 它和总畸变细胞数的变化基本一致, 并以 300—500 伦

表 1 DNA 对小鼠⁶⁰Co γ -线辐照的预防效应分析——骨髓细胞染色体畸变指标观察
(百分率±泊松标准误)

照射剂量(伦)	组别	观察细胞数	染 色 体 型					染色单体型		畸 变 细 胞 分 析		
			双着丝粒体	双着丝粒体+着丝粒环	微小体	末端缺失	易位	间隙	断裂	总畸变细胞	染色体型畸变细胞	染色单体型畸变细胞
100	对照	392	—	—	—	3 0.76±0.44	2 0.51±0.36	6 0.62	1 0.26±0.26	6 0.62	5 1.28±0.57	1 0.26±0.26
	预防	373	—	—	—	—	1 0.27±0.27	5 1.34±0.60	—	1 0.27±0.27	1 0.27±0.27	—
300	对照	372	2 0.54±0.38	2 0.54±0.38	—	4 1.08±0.54	5 1.34±0.60	5 0.60	7 1.88±0.71	17 4.57±1.11	10 2.69±0.85	7 1.88±0.71
	预防	351	—	—	—	1 0.28±0.28	5 1.42±0.64	2 0.40	6 1.71±0.70	12 3.42±0.99	6 1.71±0.70	6 1.71±0.70
500	对照	352	6 1.70±0.70	6 1.70±0.70	1 0.28±0.28	5 1.42±0.64	9 2.56±0.85	3 0.49	11 3.12±0.94	27 7.67±1.48	18 5.11±1.20	9 2.56±0.85
	预防	310	—	—	—	—	10 3.22±1.02	6 1.94±0.79	5 1.61±0.72	15 4.84±1.25	10 3.22±1.02	5 1.61±0.72
700	对照	*34	—	—	—	—	2 5.88±4.16	1 2.94±2.94	4 11.76±5.88	6 17.65±7.20	2 5.88±4.16	4 11.76±5.88
	预防	117	2 1.71±1.21	2 1.71±1.21	—	2 1.71±1.21	2 1.71±1.21	4 1.71	4 1.71	8 6.84±2.42	5 4.27±1.91	3 2.56±1.48

* 此组未观察到 100 个可供分析的骨髓染色体细胞。

表 2 DNA 对小鼠 $^{60}\text{Co}\gamma$ -线辐照的治疗效应分析——骨髓细胞染色体畸变指标观察
(百分率±泊松标准误)

照射剂量 (伦)	组别	观察细胞数	染 色 体 型						畸 变 细 胞 分 析			
			双着丝粒体	双着丝粒体+着丝粒环	微小体	末端缺失	易位	间隙	断裂	总畸变细胞	染色体型畸变细胞	染色单体型畸变细胞
100	对照	358	2 0.56±0.40	2 0.56±0.40	—	3 0.84±0.48	2 0.56±0.40	4 1.11±0.56	3 0.84±0.48	9 2.51±0.84	7 1.96±0.74	2 0.56±0.40
	治疗	400	—	—	—	2 0.50±0.35	4 1.00±0.50	2 0.50±0.35	—	6 1.50±0.61	6 1.50±0.61	—
300	对照	400	7 1.75±0.66	7 1.75±0.66	1 0.25±0.25	4 1.00±0.50	7 1.75±0.66	3 0.75±0.43	8 2.00±0.71	27 6.75±1.30	19 4.75±1.09	8 2.00±0.71
	治疗	400	1 0.25±0.25	1 0.25±0.25	—	1 0.25±0.25	7 1.75±0.66	1 0.25±0.25	3 0.75±0.43	11 2.75±0.83	9 2.25±0.75	2 0.50±0.35
500	对照	311	2 0.64±0.46	*3 0.96±0.56	3 0.96±0.56	6 1.93±0.79	5 1.61±0.72	5 1.61±0.72	11 3.54±1.07	26 8.36±1.64	16 5.14±1.29	10 3.22±1.02
	治疗	178	—	—	1 0.56±0.56	3 1.69±0.97	1 0.56±0.56	1 0.56±0.56	2 1.12±0.79	5 2.81±1.26	5 2.81±1.26	—
700	对照	163	5 3.07±1.37	5 3.07±1.37	—	7 4.29±1.62	6 3.68±1.50	3 1.84±1.06	7 4.29±1.62	21 12.88±2.81	14 8.58±2.30	7 4.29±1.62
	治疗	141	—	*1 0.71±0.71	1 0.71±0.71	2 1.42±1.00	5 3.55±1.59	1 0.71±0.71	4 2.84±1.42	12 9.22±2.56	8 5.67±2.00	4 2.84±1.42

* 此两组, 每组各查见一个着丝粒环。

剂量范围效果较理想。

三、双着丝粒体加着丝粒环畸变分析

此类畸变除 700 伦预防组出现 1.71±1.21% 变化, 其他各预防组均未见到双着丝粒体 (以及双着丝粒体加着丝粒环) 的出现。而 300 和 500 伦对照组, 该类畸变率分别为: 0.54±0.38%; 1.70±0.70%。

在治疗组的各对照组中, 双着丝粒体加着丝粒环的百分率±泊松标准误分别为 0.56±0.40%; 1.75±0.66%; 0.96±0.56%; 3.07±1.37%。而 100, 500 伦治疗组中未查见此类变化; 即使在 300, 700 伦治疗组变化仅为 0.25

±0.25%; 0.71±0.71%。结果还表明, 300 和 500 伦剂量组预防和治疗效应均较好, 而且前者优于后者。

四、末端缺失的变化

末端缺失单项变化基本上和其他变化相吻合, 表明 DNA 的预防效应较治疗组为好, 而且无论预防和治疗效应均明显地好于对照组。

讨 论

由射线引致的核酸代谢变化是辐射细胞学的关键因素之一。因此, 许多学者企图用 DNA 及其水解产物来逆转射线的损伤效应。首先,

Panjevac 等用同种肝脾 DNA 来处理大鼠均取得一定疗效^[8]。当然, DNA 对辐射损伤的修复效果, 不仅见于动物存活, 还可见于体内外细胞染色体畸变率降低的保护效应。苏联学者(1977)报道, 对经 840 伦射线照射大鼠给予 5 毫克小牛胸腺 DNA, 骨髓有核细胞染色体畸变率可明显地降低^[9]。Smets 等(1967)证实天然 DNA 能使体外培养牛肝细胞由 X 线所致染色体畸变率明显下降^[10], 表明 DNA 及其核苷酸在减少(或减轻)辐射损伤方面是行之有效的。

我们实验结果也证实异种 DNA 有预防和治疗急性辐射损伤的作用, 以往在动物实验中已获得初步证实, 因为 DNA 制剂能使造血组织活化, 又有利于造血组织的修复; 另外, 它还可以加速照射动物淋巴组织的再生。急性照射动物在应用 DNA 制剂后, 外源性脾结节生成单位(CFU-S)数较对照组明显增多^[11], 表明 DNA 对造血干细胞辐射损伤具有良好的保护效应, 这对急性受照动物的恢复是一关键性因素, 尤其对造血型急性放射病的恢复更为有利。

同样, 从细胞遗传学分析方面也取得了相应结果。由于 DNA 的预防和治疗效应, 使小鼠骨髓有核细胞因射线引起的总畸变细胞数和染色体畸变率都明显低于对照组, 照射剂量以 300—500 伦范围内, 其效果较理想。另外从染色体畸变分析, 双着丝粒体加着丝粒环以及末端缺失等变化, 都表明 DNA 预防效应优于治疗效应, 说明了异源 DNA 主要是保护细胞减轻(及至免遭)辐射损伤。因为预先注入 DNA, 使之有足够时间在体内水解成核酸片段, 为在照后的细胞修复过程中提供较多的外源性物质和原料, 并且容易为骨髓细胞吸收和利用。国外有些学者也作了类似的阐述^[12], 认为照前预先注入 DNA, 在骨髓细胞中染色体畸变率显著地降低, 而照后 10 分钟给予 DNA, 则效果较差, 说明预防性应用 DNA 具有较好的防止照射后染色体畸变的作用。此外, 还报

道由于预先注入的 DNA 牵制了被射线激活的核酸酶, 因此使核酸酶对体细胞 DNA 的水解作用及破坏作用减弱, 从而保护了细胞染色体。

在我们的实验研究中, 300—500 伦剂量范围 DNA 的抗放效果较理想。因为射线剂量的大小会涉及到损伤程度和特点, 直接关系到损伤的恢复情况, 因此只有在一定照射剂量范围才能确切地反映其效果。

总之, 异种 DNA 对受照小鼠体细胞染色体有一定保护效应, 已为国内外学者所证实。考虑到细胞染色体畸变分析较可靠地反映了放射损伤程度, 因此选用细胞遗传学指标配合动物存活率平行观察, 操作既简单又较可靠, 还可以把动物的整体研究和细胞水平的研究结合起来, 就一些机制性的问题进行初步探讨。

参 考 文 献

- [1] Rico, A. G. and Lorgue, G., 1970, *NSA* 24: 3163 № 32064.
- [2] Tsuchiya, T., 1971, *Peaceful uses of Atomic Energy*. 13. 423—434.
- [3] Djordjević, O., Kostić, L., Kanazir, D. 1962, *Nature* 195: 614—615.
- [4] 王天宇、杨丽君, 1981, *江苏医药*, 7: 46—47.
- [5] Kay, E. R. M., Simmons, N.S. Dounce, A.L. 1952, *J Amer Chem Soc*. 74: 1724.
- [6] Dische, Z., 1955, *The Nucleic Acid*, Vol I p. 287.
- [7] Dische, Z. and Schmartz, K. 1955, *ibid*, Vol I p. 301.
- [8] Panjevac, B., Ristic, G., 1958, *Bull Inst Nucl Sci*. 8: 159—160.
- [9] Николаевская, Н. Т., 1977, *Радиобиология Том 17 Вы 3*: 426—427.
- [10] Smets, L.A., et al., 1967, *Int J Rad Biol* 13: 269—273.
- [11] Juráškova, V. and DrInášil, V., 1966, *ibid*. 11: 531—537.
- [12] Николаевская, Н. Т., Мукси Нова, К. Н. 1974, *Радиобиология. Том 14 Вы 5*: 695.

* 文中承蒙魏宝清副教授帮助查阅有关资料, 特此致谢。