

射线引起 DNA 双链断裂的统计分布

魏志勇^{1)†} 臧黎慧²⁾ 李明²⁾ 范我²⁾ 许玉杰²⁾

¹⁾ 南京航空航天大学材料科学与技术学院医学物理系, 南京 210016)

²⁾ 苏州大学放射医学与公共卫生学院, 苏州 215007)

(2004 年 6 月 14 日收到, 2004 年 12 月 29 日收到修改稿)

辐射过程引起的生物细胞的 DNA 双链断裂是一种很重要的细胞损伤过程. 射线在细胞中能量沉积比较大时, DNA 双链断裂的碎片分布会偏离随机断裂模型给出的结果, 为此发展了新的模型分析方法-统计碎裂模型. 根据统计物理学的原理和方法, 放射性射线照射细胞后, 将射线的能量传递给细胞中的 DNA 分子, 当沉积的能量比较大时, 体系会经过一个弛豫过程, DNA 碎片大小 l 按照统计规律分布. 体系熵值取极大的分布是最可几的分布, 从而得到了辐射导致 DNA 双链断裂后碎裂片段随其大小 l 的分布函数 $\exp(-\alpha l + \beta l^2)$, 它对应于两种成分, 一种成分随碎裂片段的大小 l 的增大而迅速减小, 这对应于分布函数中的 $\exp(-\beta l^2)$ 项, 对于质量比较小的碎裂片段, 这种成分为主要贡献; 另外一种成分随碎裂片段的大小 l 的增大而缓慢减小, 这对应于分布函数中的 $\exp(-\alpha l)$ 项, 对于质量比较大的碎裂片段, 这种成分为主要贡献. 根据实验所测的碎裂片段分布, 通过数值解法解积分方程, 将热力学参数 α, β 解出, 与实验结果进行比较, 实验的结果支持了 DNA 双链断裂后碎裂片段分布的统计碎裂模型.

关键词: 熵, 统计碎裂模型, DNA 双链断裂

PACC: 8700, 8710, 1240E, 6550

利用物理学方法和手段来研究生物问题已经得到了广泛的重视, 目前这方面研究工作正在迅速发展. 这方面的研究工作不仅仅局限于利用基于物理学原理的实验手段来观测生物现象, 测量一些生物过程中的参量和指标, 而是将许多比较复杂的物理学原理, 如量子力学原理等, 用于生物医学研究工作中, 实现了在较深的层次上物理学和生物学、物理学和医学的交叉和融合^[1,2].

放射性射线(经常碰到的有 α, β, γ, x 射线, 及各种重带电离子等)射入细胞中后会对各种细胞组织产生损伤, 此外对应于某种细胞器, 损伤过程又表现出多种损伤机制. DNA 是细胞中对辐射敏感的器官, 放射性射线对细胞的 DNA 的作用会引起一系列复杂的损伤过程, 其中主要的损伤过程有: DNA 单链断裂(single-strand break, SSB), DNA 双链断裂(double-strand break, DSB), 局域多位点损伤(locally multiply damaged sites, LMDS, regionally multiply damaged sites, RMDS)^[3,4]等. 除此之外还会出现由于辐射引起 DNA 碱基的化学性质发生了改变的基变

化(base alteration), 基缺失(base deletion), 核苷丢失(碱基, G 或 A, 从 DNA 中释放出来的脱嘌呤作用(depurination), 脱氧核糖的化学性质发生了改变的糖变化(sugar alteration)等复杂过程^[5].

辐射引起的 DNA 双链断裂是很重要的细胞损伤过程^[6-8], 这是一个仍然在探索之中了解不很清楚的课题, 也是目前具有广泛兴趣研究较多的问题^[9]. 过去人们对剂量不太高时 γ 射线、轻带电粒子引起的 DNA 双链断裂研究比较多, 发展了许多 DNA 模型来分析研究 DNA 断裂过程^[10], 其中比较重要的模型有, 随机断裂模型^[11], 集团损伤模型(clustered-breakage formalism)^[12]等. 随着研究工作的深入, 后来的许多研究表明实验测量得到的 DNA 双链断裂的碎片分布和随机断裂模型的预言有偏差, 尤其是重离子照射引起的断裂过程. 重带电离子射入生物细胞后, 在细胞体内的介质中沿其径迹产生稠密电离, 电离密度越大, DNA 双链断裂越多, 损伤也越严重, 并且断裂后双链越难修复^[13]. 随线性能量转移(linear energy transfer, LET)的增大, DSB 断裂

[†]通讯作者. E-mail: weizhiyong@yahoo.com cc wzy_msc@nuaa.edu.cn

后链重新连结的动力学过程变得缓慢.此外,随线性能量转移的增大,DSB后DNA双链出现错误联接的几率增大^[14],并且辐射后经长时间培养后保留下来的断裂数目也较多.此外,实验发现随LET增大,与相对生物效应(RBE)相比,高级生物效应随辐射种类不同而出现很大差别.射线会引起DNA链的直接断裂,这是初始的断裂过程,此外,射线会在细胞内产生大量的自由基,这些自由基的运动将进一步引起DNA的损伤,也可能导致DNA双链的断裂,另外,生物体系有一个很独特的性质,生物体系具有修复功能,经过一定的时间后会使得损伤得到一定程度的修复.DNA双链断裂应当包含初始的断裂过程和随后的自由基作用过程以及缓慢的生物修复过程等一系列过程的贡献,初始损伤DSB是研究断裂产额分布中的关键问题^[15].

多年来关于DNA的DSB研究一直侧重于总的断裂产额,并且认为DSB的总的断裂产额和粒子的种类几乎无关,而且关于断裂片段的分布报道的实验结果不是很多.但是,随着脉冲场电泳仪PFGE(pulsed-field gel electrophoresis)的出现和广泛使用^[16],辐射引起的DNA断裂过程得到了详细的实验测量研究.在一般的电泳仪中,DNA断裂片段在迁移中很容易卷曲,因而分离不好,脉冲场电泳仪通过施加一个交变电场,有规律地变换迁移方向,使不同质量的DNA断裂片段能很好地分离.目前,利用脉冲场电泳仪PFGE已经能够对5k—6Mbp范围内的断裂片段的分布提供很好的测量结果.断裂片段分布中碎片的大小可以用断裂片段的质量来表示,断裂片段的质量的单位可以是原子质量单位,更多的情况是以碱基对(bp)为单位,用碱基对的数目来表示断裂片段的大小.由于断裂片段的质量及DNA链的初始质量都很大,它所含的碱基对的数目也越多,此外,碱基对彼此间距离为0.34nm,每一螺旋含10个碱基对,故螺距为3.4nm,DNA中碱基对的空间几何大小基本上不变,这样,DNA断裂片段大小的质量表示和其长度表示是一致的.因此,在实际中常常用DNA的长度来表示其质量大小,断裂片段的质量的大小由其所含的碱基对的数目的多少来表示,其单位以碱基对bp来表示.后面我们讨论的断裂片段的大小 l ,即反映了断裂片段的质量的大小也反映了断裂片段的长度的大小.

关于双链断裂后DNA断裂片段的分布,已往的研究工作都利用随机断裂模型来分析,在此基础上

还发展起来许多有用的分析研究方法.随机断裂模型强调了在初始长度为 n 的DNA链经过 r 次随机断裂后碎片的长度(或质量)分布,通常用长度小于某一阈值 k 的DNA断裂片段产额所占DNA断裂片段总产额的份额来研究DNA双链断裂过程.如典型的FAR(Fraction of the activity released approach)方法.由于脉冲场电泳仪分辨能力或其他因素的限制,实验上只能测量一定质量区间的断裂片段的产额(通常在10k—6Mbp的范围内),因此,这种分析方法很适合实验结果分析研究.具有质量 n 的初始DNA链经过 r 次断裂后产生质量低于 k 的DNA碎片的总产额为^[17,18]

$$F_{<k} = 1 - \exp\left(-\frac{rk}{n}\right) \left[1 + \frac{rk}{n} \left(1 - \frac{k}{n}\right)\right]. \quad (1)$$

通过设定一个比较大的断裂片段质量,可以取 $k = 10\text{Mbp}$, n 是DNA链的大小, n 一般在Gbp的范围,数量级为 10^9bp .随机断裂从追踪单个辐射事件出发,对多个事件的效果求和.这可以从一个侧面反映了放射性射线引起的DNA双链断裂过程.随机断裂模型并不是严格成立的,高LET的辐照实验和随机断裂模型的计算结果有较大差异,尤其是在LET比较大的时候,此时,由于带电离子在生物介质中的阻止本领(stopping power $-\frac{dE}{dx}$)很大,单位长度径迹上的能量沉积很大,沿径迹产生的电离激发很多,高密度的电离激发导致对细胞组织的损伤很严重.近几年来的定量的仔细研究表明,随LET的增大,和随机断裂模型相比,实验测量结果发现,断裂片段中质量数比较大的产额减小,而断裂片段中质量数比较小的产额增多,断裂片段的质量分布偏离了随机断裂模型的结果.发展新的模型成为研究DNA双链断裂模型的一个重要的努力方向.

放射性射线进入到细胞中后,首先通过电离激发过程损失能量,产生大量的电子-离子对,阻止本领越大,产生的电子-离子对的密度越高,其中有些电子的能量足够大可以进一步引起电离激发,这便是二次电子引起的电离激发,总的电离激发有直接引起的电离激发和二次电子引起的电离激发构成,电离激发直接导致了DNA链的断裂.对于重带电离子引起的损伤过程,LET比较大,双链断裂过程涉及到一系列复杂的过程,它实际上是一个自由度很大的复杂体系,除了以往所用动力学方法外还需要用统计方法来研究.

辐射引起DNA断裂过程可以从另外一个角度

出发来研究,不从单个或者少量事件来追踪辐射过程,而是利用热力学和统计物理的基本原理,从大量事件的统计系综出发研究体系的统计性质.

从统计物理的角度看,生物体系是一个开放的热力学体系,它含有大量规则排列的原子,化学键的结合又形成多种组态,因此是一个自由度充分的体系.受到照射时,带电粒子将辐射能量传递给生物细胞.根据带电粒子在各种介质中阻止本领的特性可以理论计算阻止本领.如重带电离子 ^{12}C 在水中的阻止本领如图 1 所示,带电离子在生物介质中的阻止本领和水中的阻止本领很相似.由参数化的阻止本领计算方法可以知道,在生物体内阻止本领可以达到 GeV/cm 以上,带电离子在生物介质中的阻止本领和入射带电离子的电荷态有关,入射带电离子的电荷态越高,阻止本领越大,阻止本领也和入射离子的能量有关,阻止本领越大,LET 也越大.我们可以估算一下,如果初始的电离径迹半径为纳米($1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$)尺度,则微剂量可达 10^6Gy 以上,这是一个很大的剂量.在局部空间区域内沉积了很多的能量.这种有很多自由度,并且能量沉积很多时,体系的大量自由度会被激发,因此是很适合用统计方法描述的体系.

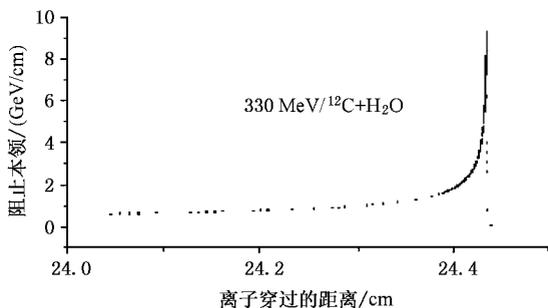


图 1 $330\text{MeV}/^{12}\text{C}$ 在水中的阻止本领

射线射入细胞后,带电粒子会在细胞内引起大量的电离和激发(不带电的中子和 γ 射线等则会通过和物质的相互作用产生带电的粒子,产生的带电粒子再引起电离激发),高能电子又会进一步引起电离激发,在进一步的电离激发过程中高能电子的能量逐渐降低,最后形成一种热平衡分布.这是一个能量弛豫的过程,经过一个弛豫的过程后,入射粒子的动能在各自由度中分配.电离产生自由运动的电子和正离子,电子和正离子会在细胞内运动和迁移,由于电子的质量小且结构简单,电子的迁移要比正离子大得多.电子离开原来的位置成为自由电子就会

导致化学键的断裂,如果电子处于连接 DNA 链的化学键处,则会使键断裂.电子在运动中也会被捕获而将键连接起来.电子脱离原来的位置及自由的电子被俘获这样一些过程不停地进行,直到达到一个动态平衡.这种动态平衡对应于一定的 DNA 双链断裂分布,沉积的能量多时,有较多的电子离开原位而形成较短的片段,相反,如果沉积的能量少时,有较少的电子离开原位,这样一来形成的片段较长.

DNA 双链断裂后会形成许多不同长度的碎裂片段,定义 DNA 双链断裂后形成的片段的长度为 l ,其长度大小以碱基对(bp)为单位.经过一段时间的弛豫过程后,体系过渡到平衡态.熵是热力学体系中的一个重要的统计参量,通过研究体系的熵及其变化,可以对体系的性质和其演化行为^[19]给出分析和判断.根据热力学原理,对于这样一个热力学体系,体系的熵 $S = -\text{tr} \rho_l \ln \rho_l$, ρ_l 是长度为 l 的碎裂片段出现的几率,这里 tr 表示求迹, ρ_l 满足归一化条件,此外,体系的总能量及碎裂片段的总长度都是守恒量.在这些条件下,要求体系熵取极大值^[20],即求 $-\text{tr} \rho_l \ln \rho_l + \alpha \text{tr} \rho + \beta \text{tr} E \rho + \gamma \text{tr} l \rho$ 的极值,于是得

$$\rho_l = \frac{\exp(-\beta E_l + \gamma l)}{F_1}, \quad (2)$$

其中 $F_1 = \sum \exp(-\beta E_l + \gamma l)$, 对于生物体细胞,为了使问题简化,可以不考虑 DNA 分子的几何形状而认为 DNA 的总长度是一定的,在一定的照射剂量下, DNA 碎裂片段的平均大小也是一定的.因此碎片的分布受约束条件

$$\sum_l \rho_l l = H \quad (3)$$

的限制.此外,生物大分子中碱基对之间的相互作用比较复杂,目前认为碱基对之间的相互作用具有范得瓦尔斯(van der Waals)力的形式,或者 Morse potential,在这种相互作用下,体系应该具有饱和性,这样一来,在有限能量体系下,不同 l 量子状态的能量可以近似展开为 $E \approx E_0 + E_1 l + E_2 l^2$,在此条件下,可将分布函数和约束条件表示如下:

$$\rho = \frac{\exp(\alpha l + \beta l^2)}{F_1}, \quad (4)$$

$$F_2 = \sum_{l=1}^h l \exp(\alpha l + \beta l^2), \quad (5)$$

$$F_2 F_{ar} = \sum_{l=1}^h l \exp(\alpha l + \beta l^2), \quad (6)$$

其中 F_{ar} 为长度小于 L (碱基对数目为单位)的所有片段的产额所占总产额的份额, F_2 反映了碎裂片段的平均大小.利用脉冲电泳仪可以测得很宽范围内

的片段分布,从而得到 F_w . 约束条件(5)和(6)是关于超越函数的积分方程,只能数值解联立解方程组,可以将参数 α 和 β 定下来. 在实际实验过程中,由于实验手段的限制,实验上只能测量一定质量区间的断裂片段总产额, F_w 比较小的数据给出的 α 和 β 参数误差比较大.

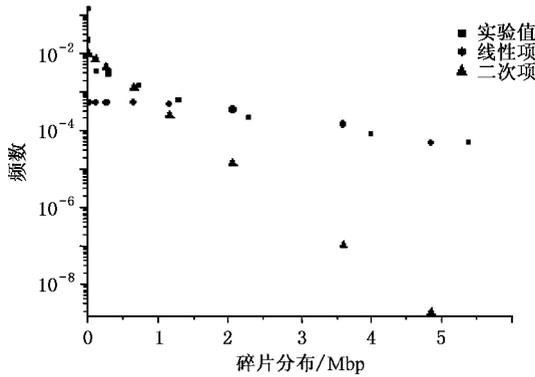


图2 α 粒子照射后的碎片分布

图2所示的实心方块(■)为人体成纤维细胞经过100Gy的 α 粒子(^{239}Pu)照射后,其DNA双链断裂形成许多断裂片段,断裂片段出现的频数随断裂片段大小 l 变化的实验结果(实验在低温下进行)^[15], (●)和(▼)均为统计模型计算的结果,其中(●)为分布函数中和断裂片段长度 l 有线性关系的贡献而(▼)则是分布函数中和断裂片段长度 l 有二次函数关系的贡献. 对于x射线引起的辐射损伤,DNA双链断裂断裂片段断有相似的结果.

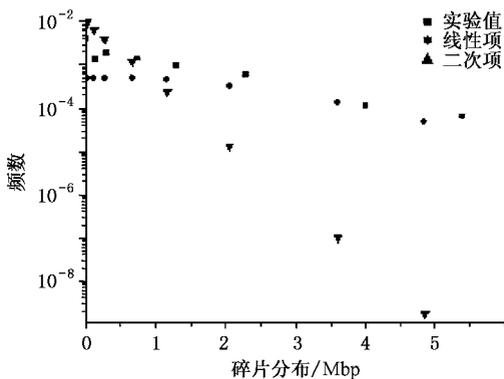


图3 x射线照射下的碎片分布

图3所示的实心方块(■)为人体成纤维细胞经过115Gy的x射线照射后,其DNA双链断裂形成的断裂片段出现的频数随断裂片段大小 l 变化的实验结果(实验在低温下进行)^[15], (●)和(▼)均为统计

模型计算的结果,其中(●)为分布函数中和断裂片段长度 l 有线性关系的贡献而(▼)则是分布函数中和断裂片段长度 l 有二次函数关系的贡献.

根据实验所测的,经过射线照射后,在实验观测的区间内,断裂片段出现的频数随断裂片段大小变化的实验结果可以看出,断裂片段大小的分布有两种成分,一种随断裂片段 l 的增大而迅速减小,这对应于分布函数中的 $\exp(-\beta l^2)$ 项,对于质量比较小的断裂片段,这种成分为主要贡献,另外一种随断裂片段 l 的增大而缓慢减小,这就是 $\exp(-\alpha l)$ 项的贡献,对于质量比较大的断裂片段,这种成分为主要贡献.

放射性射线引起的DNA双链断裂,是一个包含多种过程的复杂过程.放射性射线进入到生物介质后,首先发生一个快速的物理损伤过程,这一过程在纳秒(10^{-9}s)以下,其次是一个持续时间比较长的化学过程,在这个过程中会产生大量的自由基^[21],这一过程可达秒数量级,最后是一个缓慢修复的生物过程,这一过程可达数天或更长.本工作中的统计断裂模型主要是研究快速的物理损伤过程,它所描述的分布对应于初始的碎片分布.

射线的种类不同时,LET会有很大的区别^[22],产生的损伤及最后导致的DNA断裂片段的分布也会不同.从能量沉积的物理机制看,LET主要反映了单位路程上的能量沉积的大小,因此低LET的大照射剂量和高LET的照射都会在DNA分子上产生同样的损伤和初始碎片分布,高LET射线在一次作用中沉积较多的能量,而低LET的高剂量则是利用多次作用来沉积较多的能量,由于生物细胞具有很强的修复功能,由于作用时间不同,高LET下修复效果会弱一些而低LET高剂量的情况修复效果会强一些,这样一来由于修复的作用使得高剂量和高LET照射的结果会有所不同.从物理机制上看,在沉积能量一定的条件下,在高剂量和高LET照射下初始碎片分布应该很相近的.本工作中的统计断裂模型是针对于初始碎片的分布,因此这种模型方法原则上讲既适应于低LET的高剂量照射也可用于高LET照射的情况.

目前,放射性射线引起的DNA双链断裂的碎片分布,无论是实验测量还是理论模型分析都还在进展之中,还需要进一步的研究.实验测量的碎片分布在不同的质量区间有很大的区别^[17, 23-25],对不同的细胞也表现出较大的区别.射线的LET不同时,在细胞中引起的损伤的密集程度会有很大的不同,对

重带电离子,其 LET 比较大,沿其径迹产生的电离激发密集,产生的损伤很稠密,此时 DNA 碎裂片段有变短的趋势.小质量的片段相对增多.本研究工作的分析是在 Mbp 区间的片段分布,它具有指数衰减的特点.而在较小的质量区间,碎裂片段的分布不再有指数衰减的特点而是具有突起的峰,分析这种具有峰的碎片分布,不能不考虑 DNA 分子的几何形状,此时约束条件会发生变化,从而导致热力学参数 α β 发生变化,甚至于热力学参数 α β 可能改变符号.但这时利用约束条件求解热力学参数将更加困难.

放射性射线引起 DNA 双链断裂过程包含一个快速的物理损伤过程,这个快过程可以用统计模型分析.在短暂的物理过程中放射性射线将射线的动

能沉积在很小的空间区域内,沿离子径迹产生了大量的电子离子对,高能电子会进一步引起电离激发,使电子的能量降低,最后电子能量达到热平衡的能量.在此过程中引起细胞组织的损伤,对 DNA 则引起链断裂,双链断裂后的片段的分布可以用统计物理方法来描述,线性能量转移越大,产生的损伤越多,沉积的能量越多,统计特性越明显.选取修复比较弱的生物细胞系,另外在低温条件下进行实验,这样可以有效地观测快速的物理损伤过程,初步的理论分析和实验结果的支持了 DNA 双链断裂后碎裂片段的统计碎裂模型.

本研究工作得到苏州大学,南京航空航天大学资助支持.

- [1] Zhao M W , Xia Y Y , Ma Y Ch , Liu X D and Ying M J 2002 *Acta Phys. Sin.* **51** 2440 (in Chinese) 赵明文、夏曰源、马玉臣、刘向东、英敏菊 2002 物理学报 **51** 2440]
- [2] Song J , Chen L , Liu D Sh and Xie S J 2004 *Acta Phys. Sin.* **53** 2792 (in Chinese) 宋 骏、陈 雷、刘德胜、解士杰 2004 物理学报 **53** 2792]
- [3] Iliakis G 1991 *Bioessays* **13** 641
- [4] Heilmann J , Rink H , Taucher-Scholz G *et al* 1993 *Radiation Research* **135** 46
- [5] Edwards A A 2002 *Int. J. Radiat. Biol.* **78** 551
- [6] Belli M *et al* 2000 *Int. J. Radiat. Biol.* **76**(8) 1095
- [7] Belli M *et al* 2002 *Int. J. Radiat. Biol.* **78**(6) 475
- [8] Ward J F 1994 *Int. J. Radiat. Biol.* **66** 427
- [9] Wu H , Durante M and Lucas L N 2001 *Int. J. Radiat. Biol.* **77** 781
- [10] Cook V E and Mortimer R K 1991 *Radiation Research* **125** 102
- [11] Bl Cher D 1990 *Int. J. Radiat. Biol.* **57** 7
- [12] Rainer K S , David J B , Philip J H and Lynn H 1998 *Int. J. Radiat. Biol.* **74** 185
- [13] Ward J F 1995 *Radiation Research* **142** 362
- [14] Kühne M , Rothkman K and brich M L 2000 *Int. J. Radiat. Biol.* **76** 891
- [15] Pinto M ,Prise K M and Michael B D 2002 *Int. J. Radiat. Biol.* **78** 375
- [16] Georgakilas A G , Haveles K S , Sideris E G and Konsta A A 1998 *IEEE , Dielect El. In.* **5** 26
- [17] Foray N , Arlett C F and Malaise E P 1999 *Int. J. Radiat. Biol.* **75** 1589
- [18] Blöcher D 1990 *Int. J. Radiat. Biol.* **57** 7
- [19] Wei Z Y , Duan L M , Wu H Y *et al* 2001 *Acta Phys. Sin.* **50** 469 (in Chinese) 魏志勇、段利敏、吴和宇等 2001 物理学报 **50** 469]
- [20] Zybaplev D H 1977 *Non-Equilibrium Statistics* (Moscow :Scientific Press) (in Russian)
- [21] Milligan J R , Aguilera J A , Paglinawan R A , Nguyen K J and Ward J F 2002 *Int. J. Radiat. Biol.* **78** 733
- [22] Michalik V and Frankenberg D 1996 *Radiat Environ Biophys.* **35** 163
- [23] Newman H C , Prise K M , Folkard M and Michael B D 1997 *Int. J. Radiat. Biol.* **71** 347
- [24] Stenerlöw B , Höglund E , Carlsson J and Blomquist E 2000 *Int. J. Radiat. Biol.* **76** 549
- [25] Sikpi M O and Wang Y 2000 *Int. J. Radiat. Biol.* **76** 177

Fragmentation in DNA double-strand breaks

Wei Zhi-Yong^{1,2)†} Zang Li-Hui²⁾ Li Ming²⁾ Fan Wo²⁾ Xu Yu-Jie²⁾

¹⁾ College of Material Science & Engineering, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China)

²⁾ School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215007, China)

(Received 14 June 2004 ; revised manuscript received 29 December 2004)

Abstract

DNA double strand breaks are important lesions induced by irradiations. Random breakage model or quantification supported by this concept is suitable to analyze DNA double strand break data induced by low LET radiation, but deviation from random breakage model is more evident in high LET radiation data analysis. In this work we develop a new method, statistical fragmentation model, to analyze the fragmentation process of DNA double strand breaks. After charged particles enter the biological cell, they produce ionizations along their tracks, and transfer their energies to the cells and break the cellular DNA strands into fragments. The probable distribution of the fragments is obtained under the condition in which the entropy is maximum. Under the approximation $E \approx E_0 + E_1 l + E_2 l^2$, the distribution functions are obtained as $\exp(\alpha l + \beta l^2)$. There are two components, the one proportional to $\exp(\beta l^2)$, mainly contributes to the low mass fragment yields, the other component, proportional to $\exp(\alpha l)$, decreases slowly as the mass of the fragments increases. Numerical solution of the constraint equations provides parameters α and β . Experimental data, especially when the energy deposition is higher, support the statistical fragmentation model.

Keywords : entropy, statistical fragmentation model, DNA double strand break

PACC : 8700, 8710, 1240E, 6550

[†] Corresponding author. E-mail : weizhiyong@yahoo.com cc wzy_msc@nuaa.edu.cn