

综述与编译

辐射诱发突变热点研究进展*

武汉大学生物化学与生物物理学系(武汉,430072) 夏璐 丘冠英综述 夏寿莹** 审校

摘要: 传统放射生物学认为辐射诱发突变是一个随机过程,不存在突变热点,但近年一些报道发现 UV 和 γ 射线诱变存在突变热点。本文简要介绍这一领域的研究概况和若干进展。

关键词: 突变热点 紫外线 γ 射线 离子注入

80年代以来,随着分子生物学及相应技术的突飞猛进,分子放射生物学得到迅速发展,从而为辐射致突变机制的研究向分子水平深化创造了良好条件。在分子放射生物学领域近十年研究的一大重要进展是:长期以来形成的电离辐射对 DNA 损伤和修复的随机性观念已逐渐被损伤的非随机分布和修复的不均一性所代替;与此相联系的另一个很有意义的问题是关于突变热点(mutational hotspot)。所谓“热点”,是指同一基因内部突变频率特别高的位点,不仅在诱发突变中有突变热点,而且在自发突变中也存在突变热点。这一现象最初由 Beuzer 在分析 T4 噬菌体基因突变体时发现。通过分子遗传学的研究,现已得到不少实验的支持,例如抑癌基因 p53 突变至少存在 3 个热点(分别位于 175-248 和 273 位密码子上),而且不同组织的肿瘤,其 p53 突变类型和热点分布也不同^[1,2]。放射生物学的一个传统观念认为,辐射诱变是一个随机过程,不存在突变热点,但近年一些研究表明,UV(紫外线)和 γ 射线引起各种形式的突变不是完全随机的,至少在一定条件下具有位点特异性和突变热点

1 紫外线诱发突变热点

UV 对大肠杆菌是一种很有效的诱变因

素。Takimoto 指出^[3]: UV 诱发突变主要是由于 SOS(应急修复)反应的表达,这要求一系列基因,如 *rec A*, *lex A* 和 *umu CD* 的表达。基于无义突变的形成及回复突变,已对基因的有限位点进行了遗传分析,并对一些基因(如 *lac* 启动子, *Cl lacI* 和四环素基因)任意类型的突变直接测序,表明大多数 UV 致突的主要前突变 DNA 损伤(pre-mutational DNA lesions)是一种光产物,即嘧啶(6-4)嘧啶酮〔Pyr(6-4)Pyo〕而非环丁嘧啶二聚体,虽然二者都被公认为 UV 所致 DNA 损伤的主要产物^[4]。因此有必要进一步研究突变基因核苷酸序列变化,以了解突变热点,前突变损伤和 UV 诱变的一般特征。Takimoto 发现检测的 *crp* 基因突变大都在 Pyr-Pyr 序列上发生碱基转换,而颠换的频率很低。在其实验的 9 个转换突变中,6 个为 GC \rightarrow AT,这种转换也是 *lacI* 基因 UV 诱变的主要形式,而且这 6 个突变均发生在 5'-T(C)-C-3' 序列的 3'C,提示 UV 诱发碱基转换的主要前突变 DNA 损伤是 Pyr(6-4)Pyo。Brash^[5] 曾测定 *E. coli lacI* 基因 380bp 区(其中包含 UV 诱发的无义突变热点)内环丁嘧啶二聚体和 Pyr(6-4)Pyo 的分布,发现 Pyr(6-4)Pyo 光产物主要发生在 TC 和 CC 序列,结果显示确实存在多个碱基损伤热点(base damage

* 国家自然科学基金资助项目

** 北京放射医学研究所

hotspots),而且碱基损伤发生率与突变发生率之间存在线性关系。McCready最近进一步指出: Pyr(6-4)Pyo对已研究的有机体都是一种具有显著致突变和细胞毒作用的损伤,这种损伤占UV光产物的10%~30%^[6]。Hagen^[7]观察了紫外线照射产生的光产物在引发碱基置换突变中的作用,并比较了光产物频率分布与同一位点的突变频率后指出:在大多数情况下,含胞嘧啶的二聚体具有突变倾向,但突变热点却与光产物的高频率分布不相关,这提示突变位点还取决于其它因素,如DNA三级结构等。要证实还需进一步研究原发DNA损伤通过酶促修复反应导致核苷酸序列改变或突变的机制。以M13lacZ杂种噬菌体单链DNA为材料,LeClerc^[8]研究了单链DNA噬菌体的突变规律,发现114bp靶序列突变主要为单核苷酸置换和缺失,其中74%的单核苷酸置换发生在相邻嘧啶位点上,以T→C, G→T的转换为主,缺失突变则主要发生在重复嘧啶序列,串联和双碱基置换较少发生。在M13mp2嘧啶二聚体位点上发生转换的频率高出其它类型4倍,而且最明显的是在lac启动子热点上,T→C和G→T转换比发生颠换分别高出8倍和10倍,而在非邻近嘧啶位点处,颠换多于转换,这就说明各种突变有其各自不同的起因。有关碱基转换可得到以下一些结论:

(1)转换与Pyr-Pyr序列高度相关,在Pur-Pur-Pyr序列中Pyr发生突变的频率很低;(2)碱基转换优先发生在Pyr-Pyr序列的3'端;(3)T: A→C: G和C: G→T: A转换的频率相当,但在琥珀或赭石密码子突变中则未见T: A→C: G的转换;(4)-C-T*序列中T发生突变频率很低,同样琥珀或赭石密码子除外^[9]。

杂种噬菌体M13lacZ突变谱中一个重要的发现是单核苷酸缺失较多,占分析的17%,这可能是因为lacZ结构基因移码较碱基替代更可能引起β半乳糖苷酶失活,这种

情况下邻近碱基,如重复嘧啶特异启动缺失突变,所以不存在读码框架移位的恢复。Wood等^[9,10]实验证明未被照射的λ噬菌体生长在UV照射过的E.coli细胞内主要发生的是移码突变,而琥珀密码子、赭石密码子和乳白密码子的突变谱包含5个热点,其中30%以上来自UV诱发的无义突变。Miller^[11]曾经报道移码突变发生在2个或2个以上AT碱基对重复序列的位置。Wood还指出不同类型突变的数目决定于基因产物,例如UV诱发的c1基因上很多碱基转换取决于氨基末端对氨基酸变化的敏感性,对241~714碱基对编码的氨基酸敏感的基因产物更易发生移码突变。

p53基因诱突无疑是一个诱人的模型,近年用UV和电离辐射诱发p53突变的研究已有陆续报道,例如Amatal等^[12]用UVB(280~320nm)诱发的皮肤癌中,p53基因主要在密码子248处发生G→A和G→T颠换。最近,Ishizaki等还用UV诱导穿梭质粒pYZ289携带的靶基因突变,研究p53缺失细胞的遗传不稳定性,发现其突变分子谱在该细胞和p53正常细胞并无明显差异,但在前者,颠换发生率多于后者^[13]。

2 电离辐射诱发突变热点

Hoebbe等报道^[14,15]Co⁶⁰射线在有氧水溶液条件下照射双链(ds)DNA产生的突变既有类型上的特异性,又有序列的特异性。将144bp的靶序列分别克隆到dsM13mp10噬菌体DNA和pUC18质粒lacZ基因上,发现其突变类型不同,但其突变热点却是一致,而且80%的碱基置换集中于二个位点(热点),表明突变的形成是序列依赖的^[16]。在dsM13DNA中144bp的突变类型主要是C/G→G/C颠换(占67%),而在pUC18DNA中则主要为C/G→A/T颠换(占68%),但两种情况的突变热点都在同一处(-160),由于pUC18和dsM13DNA同为环状超螺旋

DNA分子,且144bp插入片段的突变热点一致,因此认为 γ 辐射产生的损伤类型也应该一致,要解释两者的差异只能认为是由于DNA复制过程中的差异所致。Hoebee等认为8-羟基鸟嘌呤在dsM13DNA C/G \rightarrow G/C的颠换中起重要作用。顺式8-羟基鸟嘌呤能与烯醇-亚氨基鸟嘌呤配对,而质粒DNA的复制则不是这种类型的配对,因为C/G \rightarrow A/T是pUC18DNA中的主要突变形式,一种可能的解释是质粒复制子把8-羟基鸟嘌呤识别为非密码子损伤,腺嘌呤是这些位点的配对碱基,并导致产生C/G \rightarrow A/T颠换^[15,16]。我们对⁶⁰Co γ 射线照射质粒pGEM-3ZF(-)DNA所得突变体*lacZ*基因的序列测定也表明点突变主要是碱基置换(76%),并以C/G \rightarrow A/T颠换为最多(50%)。Ayaki等^[17]将M13mp10单链噬菌体DNA进行⁶⁰Co γ 照射,在测序的15个突变体(*lacZ*)中有14个发生碱基置换,一个为碱基插入,没有发生碱基缺失,胞嘧啶的突变频率高于其它碱基,且主要为C \rightarrow T转换,其可能原因是由胞嘧啶辐射分解衍生物或(和)脱嘌呤-脱嘧啶所致脱氧腺苷酸(dAMP)错误掺入的结果;突变在3个位点(-32,-37和-57)最为频繁,-57位点在UV诱发M13mp2突变中也是一个热点。他们还指出dAMP最易与受损伤的核苷酸配对,说明AP位点的形成对电离辐射诱变也有重要作用,其它类型的碱基置换也反映在AP位点存在优先错配。关于X射线诱导*E. coli crp*基因突变的序列测定亦有报道^[18],结果表明,突变DNA序列(*crp*基因的编码区627bp)具有高度特异性,在测序的92个突变体中,74个(80%)为单碱基置换,11个单碱基缺失,7个插入,主要突变类型为G/C-A/T转换(56/92,60%),其中3/4(42/56)集中于一个热点(-706位),但缺失和插入均不在热点上。有趣的是,该热点的周边序列5'-TGTTTC/3'-ACAAG,与前述M13mp10和pUC18DNA的144bp靶序列

中的突变热点十分相似^[15]。此外,p53基因突变和突变热点分析已在氢诱发的肺癌患者和切尔诺贝利核事故污染区的儿童甲状腺肿瘤患者中得到了证实^[18,19]。

值得注意的是,应用低能离子注入技术诱发突变的序列分析已在我国首先报道^[20]。杨剑波等用能量为30keV的N⁺离子束照射M13mp18DNA(RF1)后,发现被测序的7个突变体*lacZ*基因有5个都在1个以上的位点检测到碱基变异,有的甚至多达5~6个碱基变异。其中碱基替换占95%,缺失只占5%,未发现碱基插入或重复。

人们知道,电离辐射有别于UV和化学剂的诱变特点之一,是较易引起缺失,特别是大缺失。Retel等指出^[16],缺失是除单碱基置换外最重要的突变类型。但已有报道大都是小缺失。例如,Kimura等^[22]对X射线诱发人*hprt*基因cDNA突变的序列分析显示,在测序的38个突变序列中,缺失突变占各类型突变的比例高达47%(18/38),其中缺失1~2bp和缺失3~4bp的序列各7个,缺失9bp和38bp者各仅2个,没有发现更大缺失。同时,这些小缺失主要分布于那些短的同向重复(direct repeats)序列,提示这种序列对缺失突变可能很敏感,另一些文献给出的缺失突变比例虽然没有Kimura的那样大,但以小缺失甚至单碱基缺失为主却是相似的^[16,18]。其原因之一可能与实验系统和靶基因序列特点有关,另一个原因可能是所用技术难以检测大的缺失^[18,22]。

应当指出,UV诱发碱基变异的非随机分布和位点特异性及热点看来比较肯定,而电离辐射的这类研究迄今仅在少数几个靶基因上进行,所得实验结果差异较多,甚至互相矛盾,看法也不一致^[23,24]。因此一些研究者认为,突变热点和碱基变异特异性受着许多内外因素的影响,如照射条件(有氧与缺氧、稀水溶液与否)、剂量、DNA的单双链性、DNA修复系统和DNA复制模式、靶基因序

列特点与功能等等^[16,18]。关于碱基变异的随机性在一些系统中也有报道^[18,23,26],但是 Takimoto等认为这可能不是普遍现象,虽然不同实验系统之间突变谱有很大变化,但存在突变热点的事实说明,至少在一定条件下,突变不是随机发生的^[18]。Hagen^[7]认为或许DNA的能量吸收是随机分布,但在其中发生了能量传递,从而导致某种碱基优先损伤。关于辐射诱变热点,Retel认为可以有多种解释,但最可能的解释是,对DNA损伤的修复存在优先的和序列依赖的抑制^[17]。

3 结 语

辐射突变热点和基因水平突变谱研究已引起学者们的兴趣,正如 Thacker在第十届国际辐射研究会议(1995)上所指出^[25,26]:突变分子谱的研究已成为当前研究热点之一。通过更广泛地测定突变基因的序列变化,分析DNA损伤类型与突变发生的相关性,可获得更多有关突变机制的知识。

参 考 文 献

- 1 Stratton MR. *Oncogene*, 1990; 5: 1297
- 2 Beck JS et al. *Hum Genet*, 1993; 91: 25-30
- 3 Takimoto K. *J Radiat Res*, 1986; 27: 310-314

- 4 Alapetite C et al. *Int J Radiat Biol*, 1996; 69: 359-369
- 5 Brash DE et al. *Nature*, 1982; 298: 189-192
- 6 McCready S. *Mutat Res*, 1996; 364: 25-32
- 7 Hagen U. *Radiat Environ Biophys*, 1990; 29: 315-322
- 8 LeClerc JE et al. *J Mol Biol*, 1984; 180: 217-237
- 9 Wood RD et al. *J Mol Biol*, 1984; 173: 293-305
- 10 Wood RD et al. *J Mol Biol*, 1984; 173: 273-291
- 11 Miller JH. *J Mol Biol*, 1985; 182: 45-68
- 12 Amstutz P et al. *Mol Carcinogen*, 1994; 4: 181-188
- 13 Ishizaki K et al. *Mutat Res*, 1996; 364: 43-49
- 14 Hoebee B. et al. *Nucleic Acids Res*, 1988; 16: 8147-8156
- 15 Hoebee B. et al. *Mutagenesis*, 1991; 6: 455
- 16 Retel J et al. *Mutat Res*, 1993; 299: 165-182
- 17 Ayaki H et al. *Nucleic Acids Res*, 1986; 14: 5013-5018
- 18 Takimoto K. et al. *Mutat Res*, 1991; 254: 199-206
- 19 Taylor JA. et al. *Lancet*, 1994; 343: 86-87
- 20 Hillebrandt S et al. *Int J Radiat Biol*, 1996; 69: 39-45
- 21 杨剑波等. *中国科学(B辑)*, 1995; 25: 1273-1278
- 22 Kimura H et al. *Radiat Res*, 1993; 134: 202-208
- 23 Tindall KR et al. *Genetics*, 1988; 118: 551-560
- 24 Hutchinson F. *Mutat Res*, 1992; 281: 261-266
- 25 Mckey M et al. *Mutat Res*, 1996; 363: 137-146
- 26 Thacker J et al. *Radiat Res* 1895-1995, *Cong Proc 10th ICRR*, 1995; 515-520

(收稿日期: 1996-07-20)

辐射诱发的遗传不稳定性传递及分子机制*

中国医学科学院
中国协和医科大学放射医学研究所(天津, 300192) 刘炳辰综述 夏寿莹**审校

摘 要: 综述了近年来遗传不稳定性传递的研究进展,遗传不稳定的表现形式多种多样,从染色体水平到基因水平。而且细胞的这种不稳定性可以由父代传递给其子代,并在子代表现出来,即遗传不稳定性延迟表达。遗传不稳定性传递及延迟表达的过程是细胞渐进性癌变的过程。遗传不稳定性代表了恶性细胞的总体特征。

关键词: 遗传不稳定性 延迟表达

遗传的稳定性保证了细胞行为的正常及 细胞群体遗传的连续性,该平衡的破坏,将扰

* 国家自然科学基金资助项目(编号: 39470182)

** 北京放射医学研究所