

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 Amstal 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 夏寿萱**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

乱细胞的正常生理过程,而使细胞向异常的方向发展

细胞内保证遗传稳定性的因素有多种,如细胞周期因子、DNA修复酶、DNA结合蛋白、蛋白激酶、抑癌基因等。可导致遗传不稳定性的因素也有多种,包括物理、化学、生物等因素。遗传不稳定性的表现形式可以是基因扩增、基因突变、等位基因重组及出现重组热点、卫星DNA多态性等,也可以是染色体畸变及异常核型。受照细胞后代的突变高敏感性、细胞转化等。遗传不稳定性是可以传递的,即父代细胞获得的遗传不稳定性,可以在子代表现出来,而且子代表现可能比父代更加突出,即遗传不稳定性的延迟表达。这已在多种实验模型中得到证实。

本文主要侧重于电离辐射诱发的遗传不稳定性,并从以下几方面予以阐述

1 辐射诱发的基因突变及延迟表达

1.1 致死突变及延迟表达

早在50年代,就有实验证实,受照细胞的后代表现出细胞生殖死亡事件(Reproductive death)^[1]。60年代,Sinclair用X射线照射培养的V79细胞,其后代的克隆形成能力下降、克隆变小、细胞倍增时间延长、辐射敏感性增加、染色体总数升高、染色体畸变率升高等。90年代, Little实验室对这种细胞生殖死亡事件进行了一系列研究。他们用X射线照射CHO细胞,其12~34代的细胞后代表现出低的克隆形成能力、巨细胞比例增大、流产性克隆(abortive clones)以及低的贴壁能力等,且有一定的量效关系^[1]。细胞融合实验表明^[2],受照细胞后代与正常未受照细胞杂交,其杂种细胞仍表现出低的克隆形成能力及高比率的巨型细胞,同时,克隆形成能力越低,杂交效率越低。由此说明,这种延迟表达的细胞生殖死亡事件是一种显性表型。这些低克隆形成能力的受照细胞后代核型表现出相似的变化规律,大多呈多倍体或非整倍体,

且染色体数目越多,则巨细胞越多,克隆形成率越低。当然,这并非意味着单位染色体变化在这种延迟致死突变中的作用,而是由于多倍体的形成以及伴随的特异基因的改变所导致的染色体不稳定,造成持续低的克隆形成率。

Chang^[3]的研究提示,DNA双链断裂可能启动了细胞延迟表达的细胞生殖死亡事件。作者用UV(紫外线)内切酶Hinf I及致突剂EMS处理CHO细胞20~40代后,发现UV不能诱发这种表型,而Hinf I和EMS则能诱发,其中Hinf I的作用就是诱发DNA双链断裂。在X射线照射双链断裂修复缺陷型细胞XRS-5后,其后代的克隆形成率并不降低,由此说明,DNA双链断裂及修复过程,在延迟表达的细胞生殖死亡事件中起着重要作用。

1.2 非致死突变及延迟表达

辐射除引起细胞致死突变的延迟表达外,还可引起非致死突变的延迟表达,如HGPRT位点突变。Frank^[4]等人用X射线照射V79细胞108天后,对PUVA(8甲氧基补骨酯素加长波段紫外线)诱发的HGPRT突变呈现高敏感现象,这种高敏感现象从照射后第一天即出现,而单独该剂量的PUVA不能诱发HGPRT的突变。用X射线照射CHO细胞,照射后用HAT培养基筛选未发生突变的细胞,这些细胞的后代均表现出高频率的HGPRT位点的自发突变,且与细胞的克隆形成率呈显著的负相关^[5]。显然,它与致死突变的延迟表达一样,也不属于残留损伤。有趣的是,在HGPRT位点持续高的自发突变克隆中,乌本苷(ouabain)的抗性克隆并不增加,这似乎说明,由于X射线主要引起基因大片段的缺失,而不诱发一些特异碱基的变化,因此也就不会影响与乌本苷结合的 Na^+/K^+ -ATP酶的连锁区域,从而不表现出抗性^[5]。HGPRT突变与细胞克隆形成率之间的关系也意味着在细胞遗传不稳定性延

迟表达过程中,除一些特异的基因变化外,一些细胞生长繁殖所必需的特定基因也存在着一定的缺陷。其中染色体变异如多倍体、持续存在的畸变、末端缺失及重排等可能起着重要作用。

2 辐射诱发的染色体畸变及延迟表达

辐射可引起严重的染色体畸变,且常以环形染色体、双着丝粒为主。这些非稳定性染色体畸变一般不能随细胞分裂而传给其子代。最近的研究不断提示,由于遗传不稳定性的产生及传递,可使受照细胞的后代表现出一些非稳定性畸变。1992年,英国 Kadhim 教授首先在 *Nature* 上报道^[6]了用 α 粒子照射小鼠骨髓干细胞后,其 14 天的单克隆 CFU-A 中仍能观察到双着丝粒、环形染色体等非稳定性畸变,异常核型比例达 50% 以上。与此同时, Sabatier^[7]也报道了用重离子照射人皮肤成纤维细胞,其非克隆细胞后代也表现出染色体不稳定性的传递现象。该二项研究,带动了后来关于遗传不稳定性的深入研究,而且人们开始推测,这种遗传不稳定性传递的过程,是否就意味着细胞已经乘上了通往癌变的直通车。

2.1 染色体不稳定性的体内传递

染色体不稳定性的延迟表达是指子代细胞表现出的非稳定性畸变及父代细胞所没有表达的稳定性畸变。它们可以发生在体内,也可以发生在体外。在用丝裂霉素 C 处理 BALB/C 小鼠后,其骨髓细胞的染色体畸变可持续 17 天以上,并有显著的统计学意义,其畸变类型中,以染色单体畸变为主^[8]。用 α 粒子照射人骨髓干细胞,其非克隆性细胞的染色体畸变也是以染色单体畸变为主,其染色体型畸变则逐渐减少^[9]。这意味着,在细胞进入 S/G₂ 期时,已发生了染色体畸变,而且这种损伤伴随于整个细胞周期的进程中。这种染色单体型畸变是否与以后的不稳定性传递过程中染色体型畸变的表达有关尚不清

楚。在动物骨髓细胞的 SCE(姐妹染色体单体互换)研究中^[10],有统计学意义的 SCE 频率的增加可持续 8 天以上,同时,细胞的平均倍增周期延长。细胞中的 SCE 分布频率显示,在每一间隔时期所分析的 SCE 频率代表了骨髓细胞群体的同质效应,而不存在骨髓干细胞池中受损的细胞停止于 G₁ 期以至对以后的分析产生影响的问题。因此,利用整体动物或非克隆性细胞培养研究遗传不稳定性传递的问题,同样是可行的。

2.2 染色体不稳定性的体外传递

如果利用克隆细胞培养研究染色体不稳定性的传递问题,更能显示这一问题的直观性。Kadhim 等人在研究了 α 粒子诱发的小鼠骨髓干细胞 CFU-A 的染色体不稳定性传递现象后,又进一步研究了 X 射线及 α 粒子诱发人骨髓干细胞 CFU-A 的染色体不稳定性现象^[9],发现在所研究的四个供髓者的培养细胞中,有二个个体的 CFU-A 中出现畸变,畸变分裂相约占 1/7,染色单体畸变与染色体型畸变的比例约为 2:1。由此说明,在不同个体中,辐射诱发的基因不稳定性传递现象存在着异质性,这里遗传易感性或辐射敏感性可能起着重要作用。同时,受照细胞后代所呈现的克隆性及非克隆性的染色体畸变形成过程中,染色体型畸变可能起着重要作用。在细胞获得不稳定性早期所产生的染色单体畸变可能随着细胞分裂而转换成染色体型畸变,这种在染色单体型畸变的背景下持续出现的染色单体型畸变,可被认为是染色体的不稳定性^[9]。

原位杂交技术的应用,提高了微小畸变检出的灵敏度。Marder^[11]用荧光原位杂交技术研究了 X 射线诱发人鼠杂交细胞中人 4 号染色体的重排。通过严格的实验设计,证明这种重排发生在细胞的繁殖过程中,而并非射线的直接作用。在 T 细胞及人皮肤成纤维细胞后代中,也存在着高频率的重排现象^[12,13]。同时,由于这种不稳定性传递的影

响,在细胞受照后的染色体畸变分析中,其畸变频率并非随时间延长而逐渐降低,有可能出现反跳^[9,13,14],对此现象的意义及本质尚不清楚。

微核也可作为染色体不稳定性的一种表现形式而在受照细胞的后代表现出来。在丝裂霉素处理的 BALB/C小鼠外周血中,网织红细胞中微核可持续 14天以上,并有显著的统计学意义^[15]。一般成红细胞完成最后一次分裂迁移至外周血中需要 48小时,所以这种持续出现的微核反应了染色体断裂的持续性表达。

3 辐射诱发细胞凋亡的延迟表达

辐射除引起细胞生殖死亡 (Reproductive death)外,还可引起细胞凋亡的延迟表达。在 X射线及 α 粒子照射的人骨髓干细胞 CFU-A,各个克隆均有细胞凋亡发生,约占 $\pm 5\%$ ^[9]。我们知道,受到致死性照射的细胞要经过几次分裂才能失去分裂能力,而且致死性照射细胞后代的死亡发生是随机的。因此在 CFU-A中均一出现的细胞凋亡,应有别于辐射对于形成 CFU-A的干细胞的直接作用。受照细胞后代出现凋亡现象,这可能意味着这些细胞的 DNA获得了一种不稳定性的损伤,而不再适宜继续分裂下去而走向凋亡。从这个意义上讲,遗传不稳定性的表达形式——细胞凋亡的延迟表达,可能被看作是细胞的一种自稳机制。

4 遗传不稳定性延迟表达的分子机制

遗传不稳定性传递的现象只是近几年才被重视,因此,对其机制的研究还很肤浅,下面就这方面的研究做一概述。

4.1 基因修复的作用

正常细胞中有一套完整的自我 DNA修复系统,遗传不稳定性产生即意味着一定存在着某种 DNA修复缺陷。研究表明,在着色性干皮病变种 (XP-Variant)细胞中存在着一

种错误倾向的复制系统^[16]。在 Raji细胞及中国仓鼠 CHO细胞用低剂量的单功能烷化剂 MNU(N-甲基-N-亚硝基脲)诱导后,获得的对 MNU呈耐受性的细胞克隆中,其细胞提取液缺乏与 G:T错配结合的蛋白,且子代细胞自发突变率升高。由此提示,由于 DNA错配修复缺陷而导致了 DNA复制的忠实性下降^[17]。最近,余应年实验室利用 mRNA差异显示分析研究了 MNNG(N-甲基-N-硝基-N-亚硝基脲)诱发猴肾细胞中遗传不稳定性的变异情况,发现了几个特异表达抑制的基因^[18],同时对 MNNG诱发遗传不稳定 Vero细胞中的错配修复蛋白进行了研究。1993年至 1994年,三个实验室分别在遗传性非息肉性大肠癌 (HNPCC)的病人家族中,克隆了 HNPCC的错配修复基因 hMLH1和 hMSH2。HNPCC的主要特征就是染色体上微小卫星 DNA的不稳定性,呈现高频率的核苷酸缺失或增多。基因突变影响了 DNA复制的忠实性从而增加了染色体断裂的几率,由此直接影响了基因的稳定性,而 DNA修复系统的缺陷又不能对这种不稳定性及时校正。hMLH1和 hMSH2作为错配修复基因在保护基因稳定性方面起着重要作用。

除错配修复系统外, DNA双链断裂修复系统对遗传不稳定性也产生直接影响。X射线诱发的双链断裂修复缺陷细胞 XRS-5的存活细胞中,没有表现出细胞生殖死亡事件^[4],这意味着,双链断裂的修复过程,启动了细胞生殖死亡事件。

4.2 端粒的作用

端粒酶的作用主要是保护染色体的末端,它在染色体断裂及重组中起着重要作用,通过影响 DNA的修复合活性而使可修复的链断裂转变为末端缺失。端粒中的重复序列对辐射诱发的不稳定性异常敏感,常常在这些重复序列中优先发生断裂。端粒的丢失导致了染色体融合频率的增加,由此而介入染色体不稳定性延迟表达的过程中^[13,19]。

4.3 细胞周期与基因不稳定性

正常细胞繁殖受正向与反向两方面的调控因素影响,而决定细胞生长状态的停止或进行。它包括多种因素,如 Cyclin 家族、CDK 激酶、调节蛋白(如 MDM₂)、抑癌蛋白(p53、p21)等。细胞周期的延迟实际上是细胞自身的一种防卫功能。当基因的稳定性受到破坏时,细胞周期进程即表现出延迟现象,而使损伤得到正确、及时地修复。

电离辐射可诱发各个细胞周期的延迟,包括 G₁、S、G₂ 期^[20],实验证实,电离辐射诱发的 G₁ 期延迟过程中有 p53 蛋白的高表达,这种高表达与 DNA 双链断裂有密切关系。p53 高峰出现在细胞受照后的数小时,然后逐渐恢复正常,在 UV 诱发的细胞 G₁ 期延迟中,p53 表达也起着重要作用^[21]。细胞受到照射后,p53 表达升高,G₁ 期延迟,而使受损细胞及时修复,然后进入 S 期。在辐射敏感细胞 AT 纯合子受到照射后,AT 基因对修复基因、G₁/M 控制点(Checkpoint)及 p53 等基因的激活作用丧失,细胞周期不表达延迟现象,而使子代细胞获得高度的遗传不稳定性^[21],但这时通过 p53 而走向凋亡的路径是通的,细胞要么走向凋亡,要么获得遗传不稳定性。但对于 p53 的作用也有相反的报道,即 p53 的缺陷,并未增加细胞的死亡或染色体受损的几率^[22]。

对于 S 期及 G₂ 期延迟的机制目前还不十分清楚,S、G₂ 期延迟的主要作用就是防止受损伤的 DNA 复制以及染色体的凝集和分离。辐射诱发的 S 期延迟主要是通过链延伸和复制起始的抑制造成的,这里 p53 似乎不起作用,G₂ 期的延迟需要细胞周期依赖性激酶的失活以及 Cyclin B 水平升高的抑制。

总之,细胞周期进程受周期因子的调控,如果周期控制点的功能失常,将使基因的不稳定性增加而导致染色体的多种畸变,相反,如果细胞重新获得周期调控功能,又可以恢复基因的完全稳定性^[23]。

5 遗传不稳定性与癌变

在 X 射线及 3-甲基胆蒽诱发的 C3H10T1/2 及 BALB/3T3 转化细胞中,小卫星序列呈现高度的不稳定性,重组频率增加,其中有些异常的丢失,可能与抑癌基因的失活有密切的关系^[24,25]。小卫星重复序列的不稳定性在 HNPCC 中的作用已如前述,它是复制错误表型(Replication Error Phenotype, REP)的主要特征。REP 表型在 HNPCC 中的早期表达预示了一种 DNA 修复的总体缺陷。

细胞原癌基因的功能包括作为生长因子、膜表面受体、膜相关 G 蛋白、核转录因子等而起作用。抑癌基因主要是作为细胞周期调控因子,二者的共同突变将使细胞处于一种增殖失控状态,这种增殖又增加了未修复 DNA 快速复制的可能性。由此而间接导致了遗传不稳定性产生。反过来,遗传不稳定性的逐渐获得,又使细胞一步步走向癌变。

6 结 论

遗传不稳定性产生是细胞癌变的早期事件,遗传不稳定性传递及延迟表达的过程就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,其中涉及到基因修复、基因重组、细胞周期、癌基因、抑癌基因、信号传导等诸多方面。另外,遗传不稳定性还涉及到辐射敏感性、遗传易感性等领域。近几年对于遗传不稳定性传递及延迟表达的重视,也说明人们正在通过这方面的研究去深入探讨癌变的本质,并以此来解释众多的生物现象。

参 考 文 献

- 1 Chang WP et al. Int J Radiat Biol, 1991; 60: 483-496
- 2 Chang WP et al. Carcinogenesis, 1992; 13: 923-928
- 3 Chang WP et al. Radiat Res, 1992; 131: 53-59

- 4 Frank JP et al. *Sciences*, 1982; 216 307-308
- 5 Chang W P et al. *Mutat Res*, 1992; 270 191-199
- 6 Kadhim M A et al. *Nature*, 1992; 355: 738-740
- 7 Sabatier L. *Nature*, 1992; 357 548
- 8 Russo A et al. *Mutat Res*, 1992; 269 119-127
- 9 Kadhim M A et al. *Int J Radiat Biol*, 1995; 67: 287-293
- 10 Russo A et al. *Mutat Res*, 1993; 287 275-282
- 11 Hollmberg K et al. *Mut Res*, 1993; 286 321-330
- 12 Marder BA et al. *Mol Cell Biol*, 1993; 13: 6667-6677
- 13 Martins M B et al. *Mutat Res*, 1993; 279 237
- 14 董连锴等. 癌变、畸变、突变, 1995; 7 270
- 15 Russo A et al. 1993; 8 407-410
- 16 Wang Y C et al. *Mol cell Biol*, 1993; 13 4276
- 17 Branch P et al. *Nature*, 1993; 362 652
- 18 张小山等. 癌变、畸变、突变, 1995; 7 325-328
- 19 Murname JP et al. *EMBO J*, 1994; 13: 4953-4962
- 20 Maity A et al. *Radiother Oncol*, 1994; 31 1-13
- 21 Meyn M S et al. *Int J Radiat Biol*, 1994; 66: S141-149
- 22 Morgan W F. *Cancer Metastasis Rev*, 1995; 14: 49-58
- 23 Yin Y et al. *Cell*, 1992; 70 937: 948
- 24 Houma M et al. *Mutat Res*, 1994; 304 167-179
- 25 Paquette W et al. *Cancer Res*, 1992; 52 5788-5793

(收稿日期: 1996-06-25)

HLA-A基因突变分析技术的研究概况

中国医学科学院放射医学研究所(天津, 300192) 陈振军 王继先综述 刘树铮* 审校
中国协和医科大学

摘要: 简述了 HLA-A 基因突变分析的基本原理及其研究进展。HLA-A 基因不宜作为终生生物剂量计, 对于近期急性受照, 该分析技术的应用价值仍需进一步研究核实。HLA-A 基因突变分子水平的分析, 可为人类基因组不稳定性及辐射致癌关系的研究提供有力的研究手段, 积累有价值的研究依据。

关键词: HLA 体细胞突变 生物剂量计

有关抑癌基因如视网膜母细胞瘤(Rb)^[1]、p53^[2]和 DCC(Deleted in Colorectal Carcinomas)^[3]等基因的发现, 为致癌的体细胞突变学说提供了有力的证据, 使这方面的研究工作不断推向深入。大量的研究已经证明, 电离辐射既可致突又可致癌, 因此如何检测受照人群的体细胞突变正日益受到人们的重视, 成为放射生物学发展很快的一个崭新的研究方向。随着分子生物学技术的引进, 极大地加深加速了辐射诱发体细胞突变本质的研究。HLA-A 基因突变分析便是其中的一个突出的代表, HLA-A 是目前体细胞基因

突变研究最为深入的常染色体基因

1 HLA-A 基因的生物特点

人类白细胞抗原(Human Leucocyte Antigen, HLA)的基因复合体由多个紧密相连的基因组成, 是人类的主要组织相容性复合体, 位于 6 号染色体短臂。其中 HLA-A 位于 6p21.3, 长约 5kb, 具有高度的多态性, 人群中共有二十多个共显性等位基因存在, 其产物为一种重要的细胞表面抗原, 在大多数有核细胞都有表达。

* 白求恩医科大学