

- 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)<sup>[1]</sup>、p53<sup>[2]</sup>和 DCC(Deleted in Colorectal Carcinomas)<sup>[3]</sup>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 基因的生物学特点

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

## 2 HLA-A基因突变分析的基本原理及特点

目前常用的 HLA-A基因突变分析法有两种:一为补体依赖的细胞毒性(Complement-dependent Cell Cytotoxicity, CDC)筛选法,也称为克隆形成法;另一种为流式细胞法(Flow Cytometry, FCM)。CDC法为澳大利亚 Flinders 医学中心的 Morley 研究组建立<sup>[4,5]</sup>。对澳洲人群 HLA-A<sub>2</sub>或 A<sub>3</sub>杂合个体进行分析。A<sub>2</sub> A<sub>3</sub>在澳洲人群中占主导地位,其人群频率各为 50%。该法利用 CDC 选择性地杀死正常细胞,只有 A<sub>2</sub>或 A<sub>3</sub>位点发生突变,造成 HLA-A<sub>2</sub>或 A<sub>3</sub>抗原在细胞表面的表达缺如,这类突变细胞(VC)才能逃避这种选择毒性而得以生长并形成克隆。根据最初接种的细胞总数即可得知其突变频率(MF)。具体而言,首先在人群中筛选 A<sub>2</sub>或 A<sub>3</sub>杂合个体,分离外周淋巴细胞(LC),加入单克隆抗体 BB7.2(抗 HLA-A<sub>2</sub>)或 GPA3(抗 HLA-A<sub>3</sub>),之后再加入含有补体的兔血清。一定时间后,经有限稀释接种于 96孔板进行培养,显示细胞增生的记为 VC 克隆。经对照组克隆效率的校对即可初步得出 HLA-A<sub>2</sub>或 A<sub>3</sub>基因的 MF。最后将 VC 克隆进一步扩增,达到一定的细胞数后再用标准的 NIH(淋巴细胞毒试验)血清法对 HLA 进行抗原分型,以确证 VC 克隆为细胞 HLA-A<sub>2</sub><sup>-</sup>或 A<sub>3</sub><sup>-</sup>细胞。利用剩余的细胞制备 DNA 可对 HLA-A<sub>2</sub>或 A<sub>3</sub>基因突变的本质进行分子水平的研究。

HLA-A 基因突变分析的 FCM 为日本 RERF(放射线影响研究所)的 Akiyama 研究组建立<sup>[6]</sup>,可检测人群中 HLA-A<sub>2</sub>或 A<sub>24</sub>杂合个体(约占日本人群的 60%),其 FCM 检测原理与 GPA(血型糖蛋白 A)<sup>[7]</sup>、TCR(T 细胞受体)<sup>[8]</sup>基因突变分析相同。FCM 利用藻红蛋白(PE)标记的抗 HLA-A<sub>2</sub>或 A<sub>24</sub>单克隆抗体(分别为 BB7.2 和 HU49)和异硫氰基

荧光素(FITC)标记的抗 CD3 抗体,在流式细胞仪上设两个窗口分别收集计数 CD3<sup>+</sup>/A<sub>2</sub><sup>+</sup>或 A<sub>24</sub><sup>+</sup>正常细胞和 CD3<sup>+</sup>/HLA-A<sub>2</sub>或 A<sub>24</sub>突变细胞,后者细胞数除以两者细胞数之和即得 HLA-A<sub>2</sub>或 A<sub>24</sub>基因 MF。如所用的流式细胞仪具备分选系统,可将 VC 分选出来,在特殊的培养条件下进行克隆扩增,制备 DNA 以对 VC 克隆进行突变本质的研究。

仅就检测 HLA-A MF 而言,FCM 明显优于 CDC 法。① FCM 用血量少(~ 1ml),而 CDC 法用血量多(> 10ml);② FCM 操作快速,几个小时就能完成。该法还可省去以血清法筛选人群中 HLA-A<sub>2</sub>或 A<sub>24</sub>杂合个体而直接用 FCM 筛选,这是由于 HLA-A<sub>2</sub>或 A<sub>24</sub>杂合个体的流式分布图明显不同,很易区别。已经证明用 FCM 的筛选结果和标准 NIH 血清法完全吻合。而 CDC 法则很繁琐,费时费力,仅克隆形成就需 16~ 20 天;③ FCM 可靠性好,重复性高。FCM 的重建实验(Reconstruction Experiment),即人为地在 HLA-A<sub>2</sub><sup>+</sup>或 A<sub>24</sub><sup>+</sup>细胞中掺入一定比率的 HLA-A<sub>2</sub><sup>-</sup>或 A<sub>24</sub><sup>-</sup>细胞,上机检验 FCM 的重复性和可靠性。结果表明,测得的 HLA-A<sub>2</sub><sup>-</sup>或 A<sub>24</sub><sup>-</sup>细胞比率与实际掺入率非常吻合,从一开始就保证了其方法学的重复性和可靠性。而在 CDC 法中经常有一些正常细胞可逃过筛选的细胞毒性并增殖为克隆,所以需对获得的细胞克隆进行再次的血清学分型以确证这些细胞是真正的 VC(HLA-A<sub>2</sub><sup>-</sup>或 A<sub>24</sub><sup>-</sup>细胞)。由于其操作繁琐,步骤较多,就不可避免地造成 CDC 法失误增多,影响了其重复性和可靠性。④ FCM 灵敏度高。FCM 检出的 MF ( $1.5 \times 10^{-4}$ , 受检人平均年龄 34 岁)比 CDC 法的 ( $2.6 \times 10^{-5}$ , 受检人平均年龄 35 岁)高约 5 倍。其机制尚不明,部分原因可能是 FCM 能检出那些没有克隆增生能力的 VC,而 CDC 法却漏检了这部分 VC。

如研究重点侧重于 HLA-A 基因的突变本质,这两种方法则各有利弊,因最后都要归

结于 VC 的克隆重扩增

### 3 研究概况

目前有关基因突变的研究主要集中在以下几方面:

#### 3.1 年龄效应

正常人群中,HLA-A 基因 MF 的年龄效应很明显。Grist 等<sup>[9]</sup>采用 CDC 法对 73 人不同年龄进行了研究,结果显示 HLA-A<sub>2</sub> 或 A<sub>3</sub>MF 的升高均与年龄显著相关 ( $r = 0.69, P < 0.0001$ ) 其中新生儿约为  $0.7 \times 10^{-5}$ , 老年人 (> 60 岁) 为  $6.53 \times 10^{-5}$ 。FCM 的研究<sup>[6]</sup> 结果表明,随着受检者年龄的增高 HLA-A<sub>2</sub> 或 A<sub>24</sub>MF 明显升高:  $MF_{A_2} = 0.012 + 0.043A$ ;  $MF_{A_{24}} = -0.11 + 0.026A$  (A 为岁数) 这可能是由于随着年龄的升高,个体接触环境有害因素的经历增多,体内的 DNA 损伤不断累加,而其本身 DNA 损伤的综合修复能力又不断减弱。综合起来导致体细胞基因组的不稳定性增加,造成 HLA-A 基因 MF 的升高。鉴于此,在研究评价与其诱发因素的关系时,上述的年龄效应应纳入总体考虑之中。

#### 3.2 作为生物剂量计

Kushiro 等<sup>[6]</sup>用 FCM 研究了 168 例原癌幸存者,物理学估算的受照剂量 (DS86) 为 0Gy 或大于 1Gy,这样的选择可使存在的辐射生物效应能清楚地显现出来。结果表明,与对照组相比,照射造成的 HLA-A 基因 MF 未见明显的升高 ( $P \approx 0.8$ )。即使将年龄因素考虑在内,其辐射效应仍然没有统计学差异。这与 Akiyama 等<sup>[10,11]</sup>及 Nakamura 等<sup>[12]</sup>的研究结果类似。有关 HLA-AVC 在体内被清除的确切机制尚不清楚,可能是由于这些 VC 在体内环境选择中处于不利地位,然后经 40 多年漫长时间的不断淘汰,其 HLA-A 基因 MF 已恢复到正常水平。Kushiro 等<sup>[6]</sup>对离体照射的研究表明,人外周 LC 经 1~2Gy 的 X 射线 (220kVp, 8mA) 照射,体外培

养 11 天以保证 HLA-A 基因足够的时间将其产物 (A 抗原) 表达至细胞表面后,其 HLA-A 基因显著升高,并有明显的剂量效应关系。Janatipour 等<sup>[4]</sup>利用 CDC 法对经 1~4GyX 射线照射的人外周 LC 进行研究。结果表明,其 HLA-A 基因 MF 的剂量效应关系为正线性关系。对类放射药物丝裂霉素 (0.025~0.125g/m) 的研究<sup>[4]</sup>也显示了明显的剂量效应关系。

以上研究表明,HLA-A 基因突变分析不宜用做终生生物剂量计。如能知其 VC 在体内的半衰期,或许能被用于评估近期急性受照情况,但仍需更多的研究验证其应用价值。

#### 3.3 HLA-A 基因突变本质与辐射致癌

癌的体细胞突变学说的提出加速了人们对辐射诱发的体细胞突变本质的研究,如对 HPRT (次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶)、GPA、TCR 等多个体细胞基因的研究。由于 HLA 的重要地位,人们对其基因结构的研究也更为详尽,迄今为止 HLA 是目前体细胞突变本质研究最为深入的常染色体基因。

##### 3.3.1 HLA-A 基因突变本质

对 HLA-A 基因及 6 号染色体上的几个多态性位点进行 Southern Blot (SB) 分析<sup>[4,6,13-14]</sup>,确定其基因倍性剂量和杂合性的丢失情况,再配合镜下染色体形态的观察;或直接用 PCR (聚合酶链反应)<sup>[15]</sup>,都可对 HLA-A 基因突变进行定性和分类。结果表明,涉及该位点的自发 VC 约 2/3 为突变 (SB 分析未见任何变异) 引起,约 1/3 为体细胞有丝分裂过程中的错误重组引起,此外还有少量的基因缺失、基因转换,未见涉及整条 6 号染色体不分离的现象。离体照射引起的 VC 绝大部分 (21/28) 克隆源自缺失,少部分为突变 (4/28) 和重组 (3/28),这一结果与 Janatipour 等<sup>[4]</sup>的结果相似。

##### 3.3.2 评估个体基因组的不稳定性,为辐射

### 致癌机制的研究提供参考

在迄今为止研究的体细胞基因中,老年人或老化细胞的基因组不稳定性都明显升高,其基因 MF 也随之而升高。引起癌基因过度表达或抑癌基因结构性缺失或功能性失活的突变机会就多。HLA-A 也许可以作为评估个体基因组的不稳定性的指标之一。

Kusunoki 等<sup>[16]</sup>对 1 例 Bloom's 综合征(高危癌患)患者进行研究,结果显示:其 HLA-A 基因 MF 比正常人高十倍以上。对其 13 个 VC 克隆的 DNA 及染色体分析表明,HLA-A 基因突变性质皆为体细胞重组。说明高危癌患个体的自发有丝分裂错误重组率升高,显示了其基因组的高度不稳定性。这与 GPA<sup>[17,18]</sup>及 TCR<sup>[16]</sup>的研究结果非常吻合。

### 3.3.3 突变细胞的克隆增生为其今后可能发生的癌变提供了必要的前提

极强的增生能力是癌细胞最显著的必要特征之一,分裂能力的维持、获得或增强是细胞癌变所必须的,同时细胞分裂涉及到大量的 DNA 复制、结构重排及重组后基因在子细胞的再分配,因此细胞分裂本身就是突产生和表达的过程之一。如终极分化的细胞只有经脱分化并再次获得分裂能力后才能发生癌变。Kushiro 等<sup>[6]</sup>对辐射诱发的 HLA-A VC 克隆的 TCR 基因重排情况进行了研究。结果表明,一些 VC 重排的 TCR 基因完全相同,其 DNA 的缺失类型也完全相同,说明这些 VC 源自同一祖先 VC,即某些 VC 在体内有克隆增生现象。这与 Grist 等<sup>[9]</sup>的研究结果相似。Morley 等<sup>[13]</sup>甚至进一步估算出约 3.4% 的 VC 是体内克隆增生的结果。

### 3.3.4 正常细胞中由辐射诱发的基因突变与癌细胞中常见的突变很相似

Turner 等<sup>[19]</sup>对 HLA-A VC 克隆的 DNA 研究表明,HLA-A 基因的突变经常伴随其等位基因及其临近一些基因的倍增(纯化)或减半(单倍化),这与很多癌变过程中起着重要作用的基因突变本质上相同。

HLA-A 基因突变本身也许与癌变毫无关系,但这作为间接证据强烈提示辐射也可以诱发肿瘤相关基因发生类似的突变。这就要求我们今后应努力开发那些与癌变密切相关基因的突变分析技术,以获取体细胞基因突变与癌变发生相关的更为直接的证据。

## 4 结 语

HLA-A 基因突变分析不宜作为终生生物剂量计,但却显示了其在对近期受照情况评估中一定的应用潜势,作为体细胞基因突变检测技术经过方法学的改进,例如采用 FCM,使其变得简便快速,通过对突变性质的定性与分类,为探讨辐射诱发的体细胞基因突变、人类基因组不稳定性及致癌机制提供了强有力的研究手段。

## 参 考 文 献

- 1 Klein G. Science, 1987; 238: 1539-1545
- 2 Sager R. Science, 1989; 246: 1406-1412
- 3 Fearon ER et al. Science, 1990; 247: 49-56
- 4 Janatipour M et al. Mutat Res, 1988; 198: 221-226
- 5 McCarron MA et al. Mutat Res, 1989; 225: 189-193
- 6 Kushiro J et al. Mutat Res, 1992; 272: 17-29
- 7 Langlois RG et al. Science, 1987; 236: 445-448
- 8 Kyoizumi S et al. Mutat Res, 1992; 256: 173-180
- 9 Grist SA et al. Mutat Res, 1992; 266: 189-196
- 10 Akiyama M et al. J Radiat Res, 1991; Suppl: 278-282
- 11 Dewey WC et al. Radiation Research: A twentieth-century perspective. Volume II: Congress Proceedings. Academic Press, Inc. Harcourt brace jovanovich, Publishers. 1992: 117
- 12 Nakamura N et al. Prog Clin Biol Res, 1991; 372: 341-358
- 13 Morley AA et al. Cancer Res, 1990; 50: 4584-4587
- 14 Morley AA. Mutat Res, 1991; 250: 345-349
- 15 Joseph G et al. Environ Mol Mutagenesis, 1993; 22: 152-156
- 16 Kusunoki Y et al. J Cancer Res, 1994; 85:

- 610-618  
 17 Langois RG et al. Proc Acad Sci USA, 1989; 86: 670-674  
 18 Kyoizumi S et al. Mutat Res, 1989; 241: 215-222  
 19 Turner D R et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85: 3189-3192  
 (收稿日期: 1996-06-21)

## 重离子辐射的细胞突变效应

北京放射医学研究所 (北京, 100850) 袁 雄综述 叶常青审校

**摘 要:** 重离子治癌作为一种新的疗法应用越来越广泛,同时,随着宇航事业的发展,有关重离子辐射的生物效应研究日益增多。本文对重离子辐射所致细胞的突变效应与其各种物理参数如粒子注量、突变截面的关系及重离子辐射致突变的相对生物效应和特点等作了扼要介绍。

**关键词:** 重离子辐射 突变 LET

随着人类向外层空间的拓展,高 LET (传能线密度)粒子的生物效应正受到越来越多的重视。在空间,重离子在整个带电粒子场中约占 1%,但由于其 LET 高,能量沉积密集,局部剂量也大。对重离子辐射的生物效应,人们关心的是遗传变异、癌的发生等远后效应。突变在其中起着重要作用<sup>[1]</sup>。

### 1 突变的参数

#### 1.1 突变与粒子注量

现有的大量实验结果均认为,重离子辐射导致的突变与粒子注量成线性正相关关系。Kronenberg<sup>[2]</sup>等用 LET 值为 95~97keV  $\mu\text{m}$  的氩离子 (Ar) 和 LET 值为 61keV  $\mu\text{m}$  的硅离子分别照射人的成淋巴细胞 TK6,观察 tk 位点和 hprt 位点的突变情况,发现两位点突变率随粒子注量增大而上升。以 hprt 突变率与粒子剂量作图时,硅离子每单位剂量的诱变率要高于氩离子,而与粒子注量作图时,两种离子的诱变率相差无几。而 tk 位点突变率无论与粒子剂量或注量作图,硅离子的诱变率均高于氩离子。这反映引起每一位点突变的机制不同。

Kranert 等<sup>[3]</sup>用原子序数 ( $Z$ )  $\leq Z \leq 92$ , 300keV  $\mu\text{m} \leq \text{LET} \leq 18\ 000\text{keV} \mu\text{m}$  的多种

离子照射 V 79 中国仓鼠纤维细胞,检测 hprt 位点突变,发现每种离子的诱变率均与粒子注量成线性正相关关系。Stoll 等<sup>[4]</sup>用镍、金、铅等离子的实验也获得了一致的结果,但效率与原子序数成反比,铀和铅的效应极低。

#### 1.2 突变截面

突变截面是指单位注量引起突变的概率,以  $\sigma_m$  表示,其量纲为面积,通常取  $\mu\text{m}^2$ 。重离子辐射造成的突变截面可以分两种情况<sup>[3]</sup>。对 He、Be、B 等较轻离子,每种离子的  $\sigma_m$  与 LET 的关系可以用一条曲线表示, $\sigma_m$  随 LET 一直上升到 200keV  $\mu\text{m}$  左右,当 LET 继续增大时, $\sigma_m$  下降,形成特有的  $\sigma$  钩。但每种离子下降斜率不同,有各自的曲线,这与离子能量、有效电荷有关。Stoll 等<sup>[5]</sup>用氟离子和氖离子 (LET 18~754keV  $\mu\text{m}$ ) 照射 V 79 细胞,检测 hprt 位点突变后认为, $\sigma_m$  随 LET 上升至 200keV  $\mu\text{m}$  (He) 或 300keV /  $\mu\text{m}$  (O) 左右时,两种离子形成各自的下降曲线,峰谷值之间相差可大于一个数量级。Tsuboi 等<sup>[6]</sup>用铁、氩、镧等三种离子照射人纤维细胞 (LET 150~920keV  $\mu\text{m}$ ) 的结果认为, $\sigma_m$  最大值在 LET 为 200keV  $\mu\text{m}$  左右,而 Stoll 等<sup>[4]</sup>用镍、金、铅三种离子的结果却发现,这三种离子导致的  $\sigma_m$  随 LET 的变化