

体细胞 HPRT 基因位点在电离辐射及其它致突物质研究中的应用

白求恩医科大学放射医学研究所(长春,130021) 卜桂兰 王彬综述 金玉珂审校

摘要:体细胞次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)基因位点是电离辐射研究中的一个经典位点。本文综述了该基因位点目前在辐射研究中的应用、检测方法新进展、突变频率与辐射剂量、(环境)化学诱变剂、肿瘤患者之间的关系。

关键词:基因位点 电离辐射 突变

目前,在研究电离辐射致人体遗传学损伤的机理与损伤后的远期效应评价中,虽然染色体畸变和微核已作为辐射作用后可靠的生物剂量计,被广泛地应用着^[1],但由于一些非稳定性畸变随细胞的分裂增殖而丢失,常常使检测结果产生一定误差,从而影响辐射效应评价的准确性。而且,染色体只能反映本身可见的损伤^[2],检测方法繁杂,为此,近年来建立了外周血抗 6-TG 突变体测试方法来检测 HPRT 基因位点突变频率,该方法简单、快速、灵敏度高,已广泛应用于电离辐射工作者、接触过各种化学环境诱变剂的人群及肿瘤患者^[3]的致突性定量研究和离体分子遗传学研究。

1 HPRT 基因的一般生物学特性

次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)为哺乳动物体细胞的正常组分,其控制基因定位于 X 染色体长臂末端。该酶由 2~4 个蛋白亚单位组成,其特异性不强,可把嘌呤类似物(6-TG, 8-AG)等掺入到 DNA 中去,引起细胞死亡。当细胞突变引起该基因结构或功能改变时,影响其表达,表现为 HPRT 缺陷型。离体培养时可抵抗 TG 的细胞毒作用而存活,故测定人外周血淋巴细胞中的抗 6-TG 细胞,可反映外周血淋巴细胞突变率。目前常用来检测 HPRT 基因位点突变的细胞还有 CHO V 79 等。

HPRT 基因位点的突变频率与性别无

关,但与年龄呈正相关。平井裕子等^[4]对 79 名受照剂量在 0.005Gy 以下的原爆幸存者和 26 名健康成人的体细胞突变率(Mf 值)进行了测定,结果表明, Mf 值与年龄呈正相关, $Y = 0.13 + 0.14X$, $r = 0.338$, $P < 0.001$ 。

2 检测体细胞 HPRT 基因位点突变的方法学进展

2.1 放射自显影法

该方法是由 Straness 等^[5]于 1979 年首创,是把 ³H 标记的脱氧胸腺嘧啶核苷掺入到淋巴细胞 DNA 中,经短期培养来检测抗嘌呤类似物突变细胞的方法。此法简单、耗资少,但由于拟表型的存在,使突变频率偏高,后经 Albertini^[6]和 Amneus^[7]等方法进行了改良,但未得到普遍应用。

2.2 克隆检测法

包括 T 淋巴细胞克隆和 B 淋巴细胞克隆法等。该法是使在嘌呤类似物或嘧啶类似物中存活下来的突变细胞形成克隆,通过计数克隆数而确定突变细胞的多少。T 淋巴克隆法是目前最常用的检测突变体方法,但没有 B 淋巴细胞克隆法灵敏。该方法培养时间长,排除了拟表型的影响,可进一步研究抗 6-TG 细胞基因突变类型、HPRT 活性水平,可获得稳定的 HPRT 表现型及结构改变的 HPRT 基因,且检测结果准确可靠。

2.3 多核细胞检测法

通过细胞松弛素 B 的作用,使体外短期

培养的 HPRT 的淋巴细胞出现多核,来检测 HPRT 基因位点突变频率的一种方法。此法简单、快速、灵敏,兼具了以上两种方法的优点,检出率是上述两种方法的 2~3 倍。史纪兰等利用多核细胞检测法分析了经 X 线照射剂量在 5~100cGy 之间 T 淋巴细胞抗 6-TG 的突变率,结果表明,HPRT 基因位点突变率随照射剂量增加而增加,与染色体畸变亦存在线性关系。

2.4 PCR 技术

PCR 技术是由 Kary Mullis 等建立的一种体外核酸扩增方法^[8],又有“无细胞克隆”之称。它是基于碱基互补原则以待扩增时 DNA 片段为模板,在其两端加上与之互补的两段寡核苷酸引物,通过模板 DNA 在高温下变性;引物与其互补序列结合;在 DNA 聚合酶作用下,引物延长合成互补链,这样的三步反应为一周期。每一周期的产物又可作为新的模板,进行新的合成反应。目前利用 PCR 技术来检测基因突变的方法有以下几种:直接测序法(DS),单链构象多态性分析(SSCP),变性梯度凝胶电泳(DGGE),化学错配裂解法(CMC),限制性长度多态分析(RFLP),等位基因特异性寡核苷酸(ASO)。其中,直接测序法其敏感性最高,达 95%,可检测各种大小(250~1700bp)的片段,是未来主要的测序方法^[9,10]。

3 HPRT 基因与电离辐射、化学诱变剂、肿瘤之间的关系

3.1 HPRT 基因突变频率与电离辐射剂量之间的关系

目前,许多研究表明,电离辐射能够引起 HPRT 基因突变,且其突变频率的增加与辐射剂量之间有一定的依赖关系。史纪兰等利用多核细胞检测法,分析了经 X 线照射剂量在 5~100cGy 之间的 T 淋巴细胞抗 6-TG 的突变频率。实验结果表明,HPRT 基因突变频率随照射剂量增加而增加。5cGy 时突

频率(1.18)为对照(0.81)的 1.5 倍,100cGy 时达 2.7 倍。低剂量范围内剂量-效应关系方程式适宜配曲线回归, $Y = a_1 + b_1 D$,即 $Y = 1.0246 + 0.01043D$,其结果与 Grosovsky 的实验结果相似,均呈线性增加。相关系数(r)为 0.9727, $P < 0.01$ 。同时也证明 HPRT 基因突变频率与染色体畸变亦存在线性关系,相关系数 $r = 0.9399$,进一步证实 HPRT 基因突变频率用于低 LET 射线、低剂量生物剂量估算的可行性。

平井裕子等人对 Albertini 和 Morley 建立的 T 淋巴细胞克隆法进行了改良,检测 127 名原爆幸存者(对照 59 名,0.5Gy 以上幸存者 68 名)的 Mf 值(体细胞突变频率),结果表明, Mf 值随剂量增加而增加。此后,又对 0.005Gy 以下的对照人群 83 名,0.005Gy 以上幸存者 171 名,共计 254 人进行检测,结果表明,79 名对照者的 Mf 值为 $9.5 \pm 6.87 \times 10^{-6}$,163 名幸存者的 Mf 值为 $12.74 \pm 9.9 \times 10^{-6}$ 。进行统计学检验分析(Wilcoxon 秩和检验,危险度 0.1% 以下),原爆组的 Mf 值明显升高,差异显著,但研究与剂量关系的结果却显示了 $r = 0.142$, $P = 0.028$ 的较弱的正相关关系。从上述结果来看,在照后 45 年,体细胞 HPRT 基因突变频率仍能被检出并反映受照剂量。同时也证实由射线产生的 HPRT 基因突变细胞随时间推移而减少的报道结果^[8]。为此,平井裕子等人正对接受放疗的子宫癌患者的 Mf 值与治疗后经过年限的关系进行分析研究由射线诱发体细胞突变随时间变化的关系。

3.2 HPRT 基因突变频率与化学环境诱变剂之间的关系

众所周知,许多化学诱变剂比电离辐射等其它因素更易诱发显微镜下看不见的基因损伤。尤其是 HPRT 基因对化学诱变非常敏感。为此,检测 HPRT 基因突变频率为环境诱变剂对人群致突性的定量研究提供了有利的条件和手段。

廖明阳等对已知直接诱变剂 MNNG和间接诱变剂 DMN诱发 CHO/HPRT基因位点的致突变性进行了研究,结果表明: MNNG浓度在 0.1 0.2 0.3 μg/ml,诱发突变分别为 15.4 52.5 106.2/10⁶细胞,对照为 2.0/10⁶,说明 MNNG对 CHO/HPRT基因位点有明显的致突变作用,并有良好的剂量-效应关系。在加入 SP活化系统条件下,间接诱变剂 DMN浓度在 50 100 150 μg/ml时,诱发突变频率分别为 16.3 32.7 29.2/10⁶细胞,对照为 3.8/10⁶细胞,也说明 DMN对 CHO/HPRT有明显致突作用。

郭建辉等在 HPRT缺陷株的诱变和分离实验中用 MNNG作为化学诱变剂处理中国仓鼠细胞(CHO-K1) HPRT基因突变频率高达 1.3 × 10⁻⁵,证明上述结果。

张桥等研究了五种镍化合物对 V79细胞 HPRT位点突变实验结果表明,五种镍化合物均有诱导 HPRT位点突变的能力,至少有一个以上剂量的突变率超过空白对照组 2倍以上。诱导能力依次为 Ni₂O₃ NiSO₄ NiCl₂,这与大鼠气管上皮细胞体外诱导恶转的能力强弱是一致的。提示镍化合物可能是一类通过突变机制作用的致癌物。

3.3 HPRT位点突变与肿瘤的关系

近年来,在癌发生机理的研究中,许多专家和学者的大量实验都证实,种种癌基因和抑癌基因突变是癌发生的主要原因。而电离辐射又是基因突变的主要诱因之一,所以秋山实利^[12]和箱田雅之^[13]等人通过定量检测体细胞基因突变率来推测其致癌危险度的大小。但就 HPRT基因位点突变率与肿瘤的关系尚有待于进一步研究。

Tompa^[3]等人的研究也表明,肺癌患者的外周血淋巴细胞突变频率增加,且与辐射

剂量之间有一定的依赖关系。

目前研究较多的基因位点尚有红细胞 GPA和淋巴细胞 TCR位点。秋山实利就 GPA和 TCR位点突变与癌的关系做了详尽的报道^[12]。

4 小结

目前,许多实验^[4]均证实 HPRT基因位点频率用于低 LET射线,低剂量生物剂量估算的可行性。其检测方法简便、快速、灵敏,可以揭示染色体和微核所不能揭示的规律。但也有其不完善的一面,HPRT基因突变有随时间延长而减少的趋势,同时其自发突变率高,这些原因使 HPRT基因突变不能真正反映受照剂量,使 HPRT基因分析群体优于个体,这同时也是将来需进一步研究改善的问题。总之,HPRT基因位点突变频率测定将以它客观、准确、灵敏等优点,被应用在辐射损伤机理和遗传效应及定量检测突变物质及肿瘤研究方面。

参考文献

- 1 Mendelsohn ML et al. Health Phys, 1990; 59: 23
- 2 Muir P et al. Mutat Res, 1988; 197
- 3 Tompa A et al. Mutat Res, 1989; 210: 345
- 4 平井裕子. 长崎医学会杂志, 1992; 64: 414
- 5 Strabss GH et al. Mutat Res, 1988; 197
- 6 Albertini RJ. Mutat Res, 1985; 150: 411
- 7 Amneus H et al. Mutat Res, 1986; 173: 61
- 8 Erlich HA. Basic methodology. PCR technology principles and applications for DNA amplification. New York: Stockton Press, 1989; 1
- 9 关谷刚男. 最新医学, 46(增刊): 847
- 10 山田裕一. 代谢, 1990; 15(2): 142
- 11 Messing K et al. Health Phys, 1989; 57: 537
- 12 秋山实利. 长崎医学杂志, 1992; 67: 421
- 13 箱田雅之. Mebio, 1990; 8(6): 93

(收稿日期: 1996-08-28)