

# 电离辐射诱发的基因组不稳定性

中国辐射防护研究院(太原,030006) 王仲文综述 陈如松审核

基因组不稳定性的特征是在哺乳动物基因组中增加了获得改变的频率。低水平电离辐射对人的最主要的危险是诱发癌症<sup>[1]</sup>。癌细胞典型的表现为基因组非整倍体和染色体重排。基因组 DNA 是公认的辐射作用最基本的靶分子,辐射的生物效应是通过辐射对细胞 DNA 损伤来表现的。电离辐射诱发的 DNA 损伤可引起基因突变、基因扩增、染色体重组、细胞转化和细胞死亡<sup>[2]</sup>。虽然很多这些变化可能是由辐射直接诱发的,但越来越多的证据显示,电离辐射可引起延迟性基因组的不稳定性。即辐射照射“记忆”传递对子代细胞可能会引起类似的增加,在癌变过程中起作用的几种基因组的某一形式可能有所表达<sup>[3]</sup>。

## 1 延迟性致死突变的发生

对电离辐射细胞毒性的早期研究显示,在照射后再次死亡的发生可多至 5~6 代细胞。受照后个体克隆的形成,在克隆大小及增长速率方面显示出相当大的异质性。这种称之为“小克隆形成”的效应在中国仓鼠细胞和人的细胞系中已被观察到。单个小克隆细胞经胰酶消化后再培养,显示它们的次克隆能力要比分离的较大克隆的克隆形成能力效率低,而且需要较长的倍增时间,并且在增长介质中细胞碎片增加。在克隆大小,增长速率及次克隆效率中观察到的异质性被认为是由于固有的非致死性损伤与观察到的较高频率的染色体畸变相关。这种遗传损伤的准确特性还不清楚,因为高频率的诱发可能是由于点突变,而不能用大片段遗传缺失来解释,在表型中并没有检测到这种严重的遗传改变,它被假设为非致死性的损伤表达,导致受照细胞的子代对适宜的再生环境的适应性降低。

在研究了受照的细胞群体在照后几周中克隆的形成能力后,发现照后表面上正常的克隆经分离增长后与对照组相比,克隆效率持续降低,此现象称之为致死突变的延迟表达。这在小鼠、仓鼠及人的 HeLa 杂交细胞中都已观察到。这种剂量依存效应被证明对受照细胞克隆形成能力的抑制阶段可多达 30 代细胞。照射后立即接种与照射后 5~6 代接种相比较,后者克隆形成能力降低,这与假设一致,即存活细胞子代集落很难增殖。这些结果表明,辐射照射诱发了基因组持久的不稳定性,导致致死突变的延迟表达。这些实验中,克隆形成能力的下降可能与以下因素有关:①细胞发育不良及异质克隆数目增加;②从分裂期到 S 期过渡时间的延长;③细胞碎片的增多减弱了培养基的接触<sup>[3]</sup>。

体细胞杂交实验确认延迟性突变在 CHO 细胞中是显性表型<sup>[4]</sup>,在受照的子代克隆形成不良的细胞与未照射的 CHO 细胞之间进行杂交,保留了小克隆表型,具有低的再培养效率的杂交克隆显现出不稳定性表型的其它方面的效应,包括非整倍体的形成。它反映了群体中辐射诱发的遗传的不稳定性。在受照后存活的克隆细胞及克隆子代的亚克隆中,延迟性致死突变的发生显示它们的效应是非克隆化的<sup>[5]</sup>,在大于 1Gy 剂量时它们的发生是独立的,每次细胞倍增约 15% 发生率。照射的存活克隆有很多凋亡小体存在,且发现有 c-myc 基因的高效表达<sup>[5]</sup>。

电离辐射照射可引起胚胎死亡,出生后早期死亡和发育异常。现在比较有争议的是在受照亲本的子代中有增加癌症危险度的可能。小鼠实验中,雄性小鼠受 2GyX 射线照射后 3 周与正常雌性小鼠交配,其产子数量显

著降低<sup>[6]</sup>。雄性小鼠注射<sup>239</sup>Pu 3个月后与正常雌性小鼠交配,其子代小鼠造血系统多能干细胞数量和造血基质细胞的早期克隆发生显著的降低,但最终分化的造血细胞未见区别。这种引起造血系统不断处于受压状态来维持正常细胞的产量可能增加了对致白血病诱变剂的敏感性<sup>[7]</sup>。在受照射的造血干细胞克隆子代中细胞凋亡显著的增加。

## 2 延迟性染色体畸变

染色体畸变研究也显示,电离辐射照射能引起基因组的不稳定性。在受 $\alpha$ 粒子照射后的小鼠造血干细胞中观察了非克隆的自发染色体畸变的升高<sup>[8]</sup>,在单个克隆内多达50%。可记录的中期相细胞表现出各种染色体异常,表明诱发了大量的不稳定性。非克隆型畸变在人淋巴细胞和成纤维细胞受到重粒子电离辐射后也观察到这种现象<sup>[9]</sup>。为了检测这种延迟性染色体畸变在体内是否也会发生,用受照射后的雄性小鼠骨髓细胞移植到切除了骨髓的雄性小鼠受体中<sup>[10]</sup>,直到移植后的一年还观察到了持续的染色体不稳定性。在这些实验中观察到的染色体畸变为断裂和丢失,这些畸变类型的延迟表现表明,重粒子电离辐射照射诱发的不稳定性表型可传递到受照后的子代细胞。

人淋巴细胞和仓鼠 CHO 细胞的杂交细胞在受到 X 射线照射后,采用荧光原位杂交 (FISH) 方法用带有人 4 号染色体的特异序列 DNA 作为探针,分析染色体的不稳定性。检查来自单个克隆的细胞,在受到 5-10 Gy X 射线照射后存活细胞克隆中的中期相细胞,发现受 5 Gy 照射后和 10 Gy 照射后的细胞克隆中分别有 29% 和 62% 的延迟性染色体畸变,单个克隆内非克隆畸变的多种表现呈剂量效应关系。延迟性染色体不稳定性与假 2 倍体和 4 倍体克隆中次级克隆的效率降低相关,且可通过一系列的过程被传递。异常的中期细胞包括双着丝粒和断裂。

在辐射诱发的延迟性染色体畸变中,姐妹染色体交换频率并不升高,观察到的染色体重组表明是通过染色体融合机制,导致了延迟性染色体畸变和细胞死亡。这种延迟性的染色体畸变与特殊的 DNA 序列有关,且在不同的个体和不同种系的小鼠细胞中畸变的频率也不相同,它与受照细胞的遗传特性密切相关<sup>[10]</sup>。

## 3 辐射诱发基因组不稳定性分子水平上的证据

分子遗传学分析也提供证据,辐射照射诱发不稳定性可导致自发突变频率的升高。X 射线可明显诱发受照后的 CHO 细胞中 HPRT 位点自发突变频率持续性升高<sup>[11]</sup>。在小鼠造血细胞中受 $\alpha$ 粒子、X 射线或中子照射后干细胞子代的 HPRT 突变,分别经 14 次和 > 20 次细胞分裂后,与未照射组相比显著升高<sup>[12]</sup>,解释这种突变延迟表达的一种可能的机制是损伤的持久性,突变损伤在初始受照后直到几代才“固定”下来,与化学诱变及电离辐射照射有关的碱基损伤,在复制过程中可能回避过去,从而导致在子代细胞中突变的发生。

体内研究中,在父代受射线照射后的子代小鼠中导致新的小卫星多态性频率极度升高。我们<sup>[4,13]</sup>选择新的多态性等位基因 Ms6hm 位点作为探针 (GGCA 重复序列),父代小鼠经 1、2、3 Gy 分别照射后,检测来自精子细胞受照期的子代小鼠,其 Ms6hm 位点突变频率分别为 22% 和 28%,而在精子和精原细胞期受同样照射后其突变频率要低的多,精子期受 3 Gy 照射后子代小鼠的突变频率为 14%,精原细胞期 2 Gy 和 3 Gy 照射后子代小鼠的突变频率分别为 14% 和 16%,此现象不能用突变位点附近的电离作用来解释,它提示重复序列长度变化在 DNA 合成期间可能通过某些聚合酶的滑动而发生。

在人的肾乳头离体培养细胞受到 0.5-

5Gy照射后经 7~10次分裂的细胞中,发现有 *c-myc*、*BCL-2*和 *p53*基因的表达<sup>[14]</sup>。在 0.5Gy照射后,形成一些失去接触抑制的多细胞克隆,用 SSCP(单链构型多态性)-PCR法检查这些细胞的 *p53*基因,发现都含有不同的 *p53*基因突变。在辐射诱发的 *Helax* 人皮肤纤维杂交细胞恶性转化研究中,用 *p75/150*细胞表面蛋白〔已确定为肠碱性磷酸酶(IAP)]的再表达,作为恶性转化指标,经 Western Blue(WB)染色可以早期发现恶性转化细胞<sup>[15]</sup>。杂交细胞经辐射诱发后,最早的转化细胞出现在照射后的第 9天。这些结果表明,辐射诱发细胞的恶性转化,是在外因控制下导致肿瘤抑制基因功能丧失,遗传损伤延迟性表达的结果。

#### 4 基因组不稳定性的机制

延迟性细胞遗传异常、特异基因位点突变、基因重组及细胞凋亡,可能反映了辐射诱发基因组不稳定性的不同结果<sup>[16]</sup>。辐射诱发延迟性致死突变的发生代表了细胞凋亡的监督机制,在细胞进程中它的失活使细胞趋于恶性化,从而涉及到受照细胞群体基因组不稳定性<sup>[5]</sup>。受照细胞子代中持续性基因组不稳定性的诱发,可能部分地有助于解释小鼠 C3H10T1/2细胞中得到的观察;在那里不稳定性引起的恶性转化在照射后的很多代后出现。而 *Helax* 人皮肤纤维杂交细胞受照射后提示,恶性转化是在外因控制下遗传损伤延迟性不稳定性表达的结果,从而导致肿瘤抑制基因丢失和恶性转化。

带有多种同向重复或反向重复的 DNA 序列,可能明显的趋向于辐射诱发的基因组的不稳定性。小鼠精子细胞期受照后诱发的子代 *Msohm* 位点突变频率升高显示,在此位点上 DNA 损伤不是直接种系突变的结果,而是辐射诱发了基因组的不稳定性,是在 DNA 复制修复过程中发生的<sup>[6,13]</sup>。在很多情况下,遗传因素可以加速致癌过程。这些遗传

上的缺陷,增加了对电离辐射的敏感性,构成辐射诱发基因组不稳定性表达的基础。已知导致基因组不稳定性有三种类型的遗传缺陷。即修复过程缺陷、DNA 复制和染色体分离过程缺陷及细胞周期调控缺陷<sup>[3]</sup>。

AT(毛细血管扩张共济失调)综合症是最明显的增加辐射敏感性的人类疾患,已鉴定出 4个互补的基因 AT(A~D),但还不清楚哪个在 DNA 修复过程受到影响。受电离辐射的 AT 细胞存在两个特点,即致死损伤修复缺陷和异常的辐射抑制 DNA 的合成<sup>[1]</sup>,使其基因组的不稳定性增加。人的非息肉性结肠癌(HNPCC)中已克隆出两个基因 *hms2*和 *hms1*,他们为 DNA 错配修复基因<sup>[17]</sup>,这两个基因的缺陷可引起小卫星 DNA 序列高度的不稳定性。虽然还没有证据显示它们与辐射相关,但这些基因在辐射诱发基因组不稳定性的表达中可能起到控制作用。

*p53*基因在细胞周期调控中起着重要的作用。野生型 *p53*功能的丧失,会消除辐射诱发的 *G<sub>1</sub>*抑制,或使损伤的细胞过早的进入 *S*期,或是通过对靶细胞损伤,使趋于凋亡的失控。可使其成为辐射诱发基因组不稳定性的易患个体。此外细胞能通过活化衰老状态(即不可逆细胞阻滞相),免受染色体不稳定性状态这样的诱导。电离辐射可使细胞衰老抑制机制逃逸。衰老抑制的逃逸可能代表一个重要的机制,成为染色体不稳定性原因之一,因而引起细胞癌变。

电离辐射照射诱发的细胞周期抑制,不仅保护细胞防止辐射诱发引起的基因突变,而且也可阻止基因扩增<sup>[1]</sup>。基因扩增在癌症的进程中起着重要的作用。有证据表明 *c-myc*基因的扩增可增加基因组的不稳定性<sup>[18]</sup>。

总之,辐射诱发致癌过程,是随着初始辐射照射后,多次遗传改变的结果<sup>[19]</sup>。典型的研究已显示,特定位点的突变是相对少的事

件,而对于低剂量的照射来说,因照射直接原因产生的所有相应的改变的可能性是很小的。辐射改变细胞的演变过程可能受许多因素的影响,如果照射本身诱发了持久的基因组的不稳定性,则受照细胞的演变可能比预计的自发突变以更快的频率出现,因而提供了这些细胞变为恶性的增长机会。由于同样的原因,持续性的基因组的不稳定性可能导致受照射细胞生存能力的持续降低,因为在同一群体中致死突变也以较快的频率产生(即细胞凋亡)。因此,基因组不稳定性过程可能被看作是一个动态平衡,在那里,细胞演化频率增加,既可导致细胞死亡的增加,也增加了细胞获得突变的机会,从而导致细胞恶性转化的增长优势。

#### 参 考 文 献

- 1 Lohman PHM et al. *Int J Radiat Biol*, 1995; 68 331-340
- 2 Mardes BA et al. *Mol Cell Biol*, 1993; 13 6667-6677

- 3 Kronerberg A. *Int J Radiat Biol*, 1994; 66 603-609
- 4 Chang WP et al. *Carcinogenesis*, 1992; 13 923-928
- 5 Mothersill C et al. *Int J Radiat Biol*, 1995; 68 347
- 6 Sadamoto S et al. *Int J Radiat Biol*, 1994; 65 549-557
- 7 Macdonald D et al. *Int J Radiat Biol*, 1995; 68 347
- 8 Kadhim M A et al. *Nature*, 1992; 355 738-740
- 9 Sabatien L et al. *Nature*, 1992; 357 548
- 10 Watson G et al. *Int J Radiat Biol* 1995; 68 347
- 11 Chang WP et al. *Mutat Res*, 192; 270 191-199
- 12 D'Reilly SS et al. *Int J Radiat Biol*, 1994; 66 77-83
- 13 Fan Y J et al. *Int J Radiat Biol*, 1995; 68 177-183
- 14 Colucci S et al. *Int J Radiat Biol*, 1995; 68 347
- 15 Mendonc MC et al. *Radiat Res*, 1993; 134 209-216
- 16 Wright EG. *Int J Radiat Biol*, 1995; 68 346
- 17 Fishel R et al. *Cell*, 1993; 75 1027-1038
- 18 Niwa O et al. *Cancer Res*, 1995; 55 5670-5676
- 19 Cox R. *Int J Radiat Biol*, 1994; 65 50-60

(收稿日期: 1996-07-20)

## 电离辐射与 AT 的遗传学研究

第二军医大学放射医学研究室(上海, 200433) 李 雨综述 罗成基\* 郑秀龙审校

摘 要: AT 的辐射敏感性与其遗传学特征有内在联系。随着对 AT 分子水平研究的不断发展,人们对该病的辐射遗传特征有了进一步的认识。

关键词: AT 电离辐射 遗传

共济失调性毛细血管扩张症 (Ataxia Telangiectasia, AT) 是一个累及多组织器官的遗传性疾病,主要表现为共济失调、毛细血管扩张、免疫功能缺陷、肿瘤发生增加,对电离辐射敏感是其重要的特征之一。

### 1 AT 患者(纯合子)的辐射反应

对电离辐射敏感是 AT 的所谓“经典”

(classical) 症状之一,由于某种基因突变或遗传背景变化,存在一些辐射敏感性介导于典型 AT 和正常人之间的 AT 病例。其原因除了可能与突变有关外,还有一种设想认为是某种调节分子(转录因子)变化使致辐射敏感的靶基因不能表达,从而降低 AT 的辐射敏感性<sup>[1]</sup>。

NB 综合症 (Nijmegen-Breakage Syn-

\* 第三军医大学防原教研室(重庆, 630038)