

展分子遗传学诊断研究,对推动我国相关学科的发展乃至提高整个民族的遗传质量都会有积极作用

参 考 文 献

- 1 Chessa L et al. *Am J Hum Genet*, 1992; 42: 741
- 2 Curry CJR et al. *Am J Hum Genet*, 1989; 45: 270
- 3 Kemp CJ et al. *Cell*, 1993; 74: 813
- 4 Harnder DJ et al. *Int J Radiat Biol*, 1994; 66 (6): S13
- 5 Swift M et al. *New Eng J Med*, 1991; 325: 1831
- 6 Brensow AL et al. *Gen Chro Can*, 1990; 2: 339
- 7 Taylor AM R et al. *Int J Radiat Biol*, 1994; 105: 65
- 8 Swift M et al. *J Natl Can Inst*, 1995; 87(18): 1350
- 9 Woods CG et al. *Hum Genet*, 1990; 84: 555
- 10 Taylor AM R et al. *J Med Genet*, 1987; 24: 669
- 11 Lambert W C et al. *Mutat Res*, 1992; 273: 179
- 12 Elkind M M et al. *Cancer*, 1985; 56: 2351
- 13 Meyn M S et al. *Int J Radiat Biol*, 1994; 66: 141
- 14 Folelano S R et al. *Cancer*, 1980; 45: 1675
- 15 Stephen M M et al. *Cancer Res*, 1995; 55: 5991
- 16 Hardwell L H. *Genet*, 1991; 129: 975
- 17 Green M H et al. *J Cell Sci*, 1987; 6: 127
- 18 Little J B et al. *Int J Radiat Biol*, 1983; 43: 157
- 19 Savitsky K et al. *Science*, 1995; 268: 1749
- 20 Murnane J P et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982; 79: 1960
- 21 Glad S et al. *Hum Mol Genet*, 1996; 5: 433
- 22 Abraham R T. *Curr Opin Immu*, 1996; 8: 412
- 23 Kappeller R et al. *BioEssays*, 1994; 16(8): 565
- 24 Anderson C W. *Crit Rev Euka Gene Exp*, 1992; 2(4): 283
- 25 Jargensen T J et al. *Int J Radiat Biol*, 1996; 69 (5): 527
- 26 Carter S L et al. *Cancer Res*, 1994; 54: 627

(收稿日期: 1997-04-21)

p53基因状态与辐射诱导的 G₁期阻滞

白求恩医科大学 卫生部放射生物实验室(长春, 130021) 傅海青综述 鞠桂芝审校

摘 要: G₁期阻滞是细胞对 DNA 损伤作出的一种保护性反应,它与 p53基因状态密切相关。本文对 G₁期阻滞的发生机制、生物学意义及 p53突变对辐射诱导 G₁期阻滞的影响进行综述。

关键词: 电离辐射 p53基因状态 G₁期阻滞

早在 1968年 Little就曾报道 X射线能引起细胞周期 G₁期阻滞,但对其分子基础的研究在此后的二十多年里进展不大。直到 1991年 Kastan等^[1]发现 γ射线诱导的 G₁期阻滞伴有 p53蛋白的核内堆积,并且发现了 p53基因状态(野生型和突变型)与辐射诱导的 G₁期阻滞密切相关^[2]。提示 p53蛋白在辐射诱导的 G₁期阻滞中起重要作用。从此,辐射诱导的 G₁期阻滞成为放射生物学和细胞生物学研究的热点。近年来随着分子生物学技术的发展,各种新基因的不断发现,辐射诱导的 G₁期阻滞的分子机制研究有了一定

进展

1 p53基因及其表达产物的结构和功能

p53基因定位于 17号染色体短臂 1区 3带上,全长约 20kb,由 11个外显子和 10个内含子组成。p53基因转录的 mRNA长度为 2.5kb,编码产物为 394个氨基酸残基组成的核磷蛋白。p53蛋白的一级结构可分成三个区域,即 N端酸性区、中间疏水区、C端碱性区。其中 N端酸性区的 20~42位氨基酸与转录因子有相似之处,可抑制或激活某些靶基因的转录。筛选了大量人基因组 DNA

克隆,证实了 p53蛋白的基因组共有序列都有双拷贝的 10bp 的对称结构,即 5'-PuPuPuCCA/T(A/T)GPyPyPy-3',中间被随机的 0~13bp 隔开,不影响 p53蛋白的结合力^[3]。p53蛋白结合位点的对称结构——四个 5'-(A/T)GPyPyPy-3'相对取向,提示 p53蛋白以四聚体形式结合于 p53蛋白的结合位点,现已证实,p53蛋白以四聚体的形式结合靶 DNA,323~355位氨基酸与四聚体的形成有关 p53蛋白作用的靶基因可能包括有关调节基因组稳定性的、细胞对 DNA 损伤起反应的和细胞周期进展的基因^[1,2,4]。

2 G₁期阻滞的分子机制

尽管 DNA 损伤所致的 G₁期阻滞已被发现多年,但对其调控的分子机制知之甚少。Kastan 等^[1]1991 年发现肿瘤抑制基因 p53 蛋白产物的短暂升高与 γ 射线照射后人细胞 DNA 复制合成的短暂下降密切相关。并发现,含野生型 p53 基因 (wt p53) 的细胞在 γ 射线照射后出现短暂的 G₁和 G₂期阻滞,而含突变型 p53 基因 (mt p53) 的细胞只有 G₂期阻滞。因此认为 wt p53 蛋白在 G₁期阻滞中起重要作用。Kuerbitz 等^[5]的研究进一步证实了这一观点。他们将 wt p53 基因转染到缺乏内源性 p53 基因的变性细胞中,可使细胞部分恢复 γ 辐射诱导的 G₁期阻滞;而在有内源性 p53 的肿瘤细胞中,由于转染 mt p53 基因过度表达,可取消该细胞 γ 辐射后出现的 G₁期阻滞。近几年有更多的实验证实,p53 蛋白是 DNA 损伤诱导 G₁期阻滞的重要生物调节分子^[6,7]。那么 p53 蛋白是如何实现其调控 G₁期阻滞的功能呢?

作为转录因子的 p53 蛋白,在接受到 DNA 损伤信号后被激活,通过与其下游效应基因的靶序列结合从而激活这些基因的转录^[8,9]。p53 蛋白激活的这些效应基因的蛋白产物似乎在细胞 DNA 损伤应答反应的 G₁期阻滞中起重要作用。目前研究较多的 p53

下游基因包括 MDM2 GADD45 CIP1/WAF1 MDM2 最初是作为结合 p53 蛋白的癌基因产物被发现的^[10]。p53 蛋白通过结合于 MDM2 第一内含子区的 p53 蛋白共有序列而调节 MDM2 的转录 Mdm2 反过来通过蛋白与蛋白之间的相互作用结合 p53 蛋白的氨基末端来阻止 p53 蛋白的转录激活功能,形成一个“负反馈环”。因此认为 Mdm2 的正常功能是限制 G₁期阻滞的时间,使 DNA 损伤修复后的细胞进入细胞周期^[11]。GADD45 首先是在 CHO 细胞中作为紫外线诱导的一些转录物之一被发现的。现已证实, DNA 损伤剂和其它刺激均可在多种细胞中诱导其表达,γ 射线就是其一,并且 γ 射线诱导的 GADD45 表达严格依赖 wt p53 蛋白^[2,12]。现已发现 GADD45 的第三内含子区有 p53 蛋白的共有序列 Gadd45 可与增殖细胞核抗原 (PCNA),一种 DNA 复制和核苷酸切除修复必需的蛋白结合,从而抑制 DNA 的合成,阻止细胞进入 S 期^[13]。最新报道认为,Gadd45 可与 p21 相互作用来调控细胞周期^[14]。两个不同小组通过不同途径同时发现了一段相同的基因,分别命名为 WAF1^[15]和 CIP1^[16],现在习惯上称之为 CIP1/WAF1 基因 CIP1/WAF1 位于染色体 6P21.2,其启动子区含有 p53 蛋白的共有序列 CIP1/WAF1 的蛋白产物为 p21 在正常细胞中 p21 与 PCNA cyclin 和 CDK (周期素依赖激酶)以四聚体形式存在,该四聚体中 CDK 具有激酶活性和无激酶活性两种形式,这主要取决于复合体中 p21 的含量。p21 含量增加与 CDK 结合而抑制其活性,从而阻止 DNA 合成和细胞分裂导致 G₁期阻滞^[17]。

现已有许多实验结果表明,电离辐射作用后存在 G₁期阻滞的细胞同时伴有 p53 蛋白的累积和 MDM2 GADD45 及 CIP1/WAF1 mRNA 含量的增加^[7,18,19]。Bae 等^[19]报道,辐射诱导 WMN 细胞系的 CIP1/WAF1 GADD45 和 MDM2 mRNA 表达高

峰出现在照后 4h,照后 8h恢复本底水平,推测可能是由于 Mdm2结合到 p53蛋白氨基末端的转录激活区,从而抑制了 p53介导的转录所致。在 p53介导的 G₁期阻滞中, GADD45 MDM2和 CIP1/WAF1 mRNA表达增高固然重要,但其蛋白产物的稳定性也不容忽视。O'Connor等^[20]在研究一组 Burkitt's淋巴瘤和淋巴母细胞时发现,有些淋巴瘤细胞(如 EW36)尽管存在 wt p53,但无γ射线诱导的 G₁期阻滞,同时伴有 p53蛋白累积减少,提示 EW36细胞系可能在 DNA损伤后稳定 p53蛋白机制存在缺陷。Bae等^[19]报道在照射后存在明显 G₁期阻滞的 WMN细胞系中,p21蛋白在整个 G₁期阻滞中保持高水平,在照射后无 G₁期阻滞的 EW36细胞系中,p21水平随着 CIP1/WAF1 mRNA水平的下降而很快消失。因此作者认为 p21蛋白的稳定性是γ射线诱导 G₁期阻滞的决定因素。

并非所有由 p53蛋白介导的 G₁期阻滞同时存在 GADD45和 CIP1/WAF1两条通路。Namba等^[21]证明具有 wt p53人甲状腺细胞系在受到足以使其它有 wt p53细胞系诱导 GADD45表达的 10Gy照射后,未发现 GADD45的诱导,只存在 p53-CIP1/WAF1通路诱导的 G₁期阻滞。Bae^[22]亦报道,20Gy高剂量照射后,大多数 wt p53黑色素瘤系仅表达 CIP1/WAF1而不表达 GADD45。尽管缺乏 GADD45的表达,但却存在明显的 p53蛋白水平的增高和 G₁期阻滞。提示辐射诱导的 G₁期阻滞在黑色素瘤系中可能只通过 p53-CIP1/WAF1通路,而无需 GADD45的诱导。时程研究表明,照射后无 GADD45诱导的 wt p53黑色素瘤系,CIP1/WAF1基因转录明显延长,提示在缺乏 GADD45诱导的细胞系中存在某种补偿机制。

总之,辐射诱导 G₁期阻滞的初步研究表明,哺乳动物细胞中的 wt p53及其蛋白产物在 G₁→S过渡中起关键作用。电离辐射作为

DNA损伤分子可诱导 p53基因激活,其蛋白产物作为转录因子调控下游基因(GADD45 CIP1/WAF1 MDM2)转录,并表达蛋白产物(Gadd45 p21 Mdm2)。因此 p53蛋白可通过 GADD45和 CIP1/WAF1通路阻止细胞从 G₁进入 S期,导致 G₁阻滞。MDM2则通过负反馈限制 G₁阻滞。另外少数细胞系 p53蛋白不通过 GADD45而仅有 CIP1/WAF1通路诱导的 G₁期阻滞。机制则有待进一步研究。

3 G₁期阻滞的生物学意义

目前关于 G₁期阻滞的生物学意义尚有争议。多数学者认为 G₁期阻滞是机体对外界刺激的一种保护性反应。因为在绝大多数生物体的整个生命过程中,DNA损伤是一个永远存在的刺激,无论是真核生物还是原核生物都能对基因毒性刺激做出保护性反应,从而保证了基因组的遗传稳定性。G₁期阻滞可能是这种保护反应中的一个环节,可提供充足的时间来促使受损伤的 DNA进入 DNA合成和复制的 S期前得以修复,损伤严重者可可通过凋亡等方式除掉 DNA异常的细胞,从而降低了基因组的不稳定性,减少了肿瘤的发生^[1,2,25]。Weinert等^[23]在酵母中发现,在开始一个重要的生命过程(如 DNA复制和有丝分裂)前的细胞周期延迟,可能提供时间使 DNA损伤修复。无足够时间进行修复,DNA复制将产生染色体断裂和/或重排,最终导致基因扩增、延迟的突变、基因组的不稳定性甚至细胞死亡。但至今,在哺乳动物细胞中尚无实验证据证明,电离辐射作用后的 G₁期阻滞提供时间使 DNA损伤修复。Gupta等^[24]采用源于人胶质瘤的 U87-Lux. 8(wt p53,有辐射诱导的 G₁期阻滞)和 U87-175. 4(显性失活突变,无辐射诱导的 G₁期阻滞)细胞系观察了 G₁期阻滞对 X射线照射后首次有丝分裂细胞染色体重排类型和频率的影响。结果发现,用常规的细胞遗传学方法分

析,两种细胞系在 1~6Gy 范围内无论是畸变率还是畸变类型均无显著差异。用荧光染色原位杂交法发现,1~4Gy 两个细胞系间染色体重排无明显区别,6Gy 时 U87-175.4 细胞系相互易位增加。因此,作者不支持辐射所致的 G₁ 期阻滞可提供时间使受损伤的 DNA 得以修复。作者也不否认可能存在着未被检出的损伤修复差别。值得注意的是 U87-175.4 细胞系在 6Gy 时染色体互相易位增加,而带有易位的细胞较带有双着丝粒细胞更易存活,导致后代基因组的不稳定性增加。另外在 1~4Gy 范围内,两种细胞系的染色体畸变类型和畸变率相似,但无 G₁ 期阻滞的 U87-175.4 细胞系存活率明显增加,这与多数学者的报道是一致的,即无 G₁ 期阻滞的细胞辐射敏感性下降,凋亡减少,存活率增加^[20,25,26]。有趣的是无 G₁ 期阻滞的细胞系, DNA 突变不减少甚至增加,而细胞存活率却明显增加,由此可以设想无 G₁ 期阻滞的细胞系带有更多的损伤 DNA,从而导致该细胞系基因组的不稳定性,增加了癌变的危险度。从另一角度证实了 DNA 损伤诱导的 G₁ 期阻滞是一种保护性反应。这种设想是否成立,其机制如何有待于进一步的实验研究。

4 p53 突变对辐射诱导的 G₁ 期阻滞的影响

从辐射诱导的 G₁ 期阻滞的机制可以看到, p53 是辐射诱导 G₁ 期阻滞的关键环节,那么 p53 突变对 G₁ 期阻滞产生什么影响呢?

Fan 等^[25]报道,存在 wt p53 的细胞系,在照射后出现明显的 G₁ 期阻滞,并且在整个 G₁ 期阻滞期间伴有 p53 蛋白和 p21 蛋白的持续增高,且有诱导凋亡的倾向,使受伤严重的细胞死亡,细胞存活下降。在 mt p53 细胞系中无上述反应。为进一步证实仅 p53 功能丢失,而无其它遗传学异常可否使 γ 射线照射后的 G₁ 期阻滞消失? Livingstone 等^[27]通过同源重组方式破坏鼠胚纤维母细胞上的 0 或 2 条内源性 p53 等位基因,然后观察 γ

射线照后该细胞 G₁ 期阻滞变化。结果正如所料,具有两个 wt p53 等位基因的细胞在接受 2Gy 或 4Gy γ 射线照射后,从 G₁ 期继续进入 S 期的细胞数显著下降;只有一条 wt p53 等位基因的细胞亦出现 S 期细胞百分数下降,但不如有两个 wt p53 等位基因细胞明显;两条 wt p53 等位基因都被破坏者,失去了辐射后的 G₁ 期阻滞。这一结果证实,仅 wt p53 功能的丧失就足以取消辐射诱导的 G₁ 期阻滞。Bae 等^[19]亦发现在淋巴瘤细胞系中,具有两个 wt p53 等位基因 (p53^{+/+}) 的细胞系在照后 4h,由 p53 蛋白转录调控的 GADD45 和 CIP1/WAF1 mRNA 水平明显升高,分别升高 3.9 和 21 倍,同时伴有显著 G₁ 期阻滞;而那些纯合 p53 突变 (p53^{-/-}) 细胞系中,未见到照射后 GADD45 和 CIP1/WAF1 的升高和 G₁ 期阻滞。杂合型 p53 突变 (p53^{+/-}) 细胞系的表现介于二者之间。提示, p53 突变将导致辐射诱导的 G₁ 期阻滞的丧失,不利于 DNA 损伤的修复和基因组的稳定性。

5 结语

p53 蛋白在辐射诱导的 G₁ 期阻滞中起重要作用, p53 蛋白通过调节其下游效应基因的转录而实现其调节辐射所致的 G₁ 期阻滞功能。 p53 基因的突变将导致辐射诱导的 G₁ 期阻滞功能的丧失,不利于 DNA 损伤的修复和损伤修复细胞的去除,导致基因组的不稳定,成为辐射致癌的原因之一。

参考文献

- 1 Kastan MB et al. *Cancer Res.* 1991; 51: 6304-6311
- 2 Kastan MB et al. *Cell.* 1992; 71: 587-597
- 3 El-Deiry W S et al. *Nature Genet.* 1992; 1: 45-49
- 4 Prives C et al. *Genes Dev.* 1993; 7: 529-534
- 5 Kuerbitz S J et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89: 7491-7495
- 6 Gadbois D M et al. *Radiat Res.* 1996; 164: 414-424

- 7 Zhan Q et al. *Cancer Res.* 1994; 54: 2755-2760
- 8 Kern SE et al. *Science*, 1992; 256: 827-830
- 9 Funk WD et al. *Mol Cell Biol*, 1992; 12: 2866-2871
- 10 Momand J et al. *Cell* 1992; 69: 1237-1245
- 11 Chen CY et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91: 2684-2688
- 12 Canman CE et al. *Cancer Res*, 1994; 54: 5054-5058
- 13 Smith ML et al. *Science*, 1994; 266: 1376-1380
- 14 Kearsley JM et al. *Oncogene*, 1995; 11: 1675-1683
- 15 El-Deiry WS et al. *Cell*, 1993; 75: 817-825
- 16 Harper JW et al. *Cell*, 1993; 75: 805-816
- 17 Dulic V et al. *Cell*, 1994; 76: 1013-1023
- 18 Bae I et al. *Exp Cell Res*, 1995; 217: 541-545
- 19 Bae I et al. *Cancer Res*, 1995; 55: 2387-2393
- 20 O'Connor P et al. *Cancer Res*, 1993; 53: 4776-4780
- 21 Namba H et al. *Cancer Res*, 1995; 55: 2075-2080
- 22 Bae I et al. *Cancer Res*, 1996; 56: 840-847
- 23 Weinert TA. *Radiat Res*, 1992; 132: 141-143
- 24 Gupta N et al. *Radiat Res*, 1996; 145: 289-298
- 25 Fan S et al. *Cancer Res*, 1994; 54: 5824-5830
- 26 Siles E et al. *Br J Cancer*, 1996; 73: 581-588
- 27 Livingstone LR et al. *Cell*, 1992; 70: 923-935

(收稿日期: 1997-05-08)

HPRT基因突变分析技术及其在放射生物学中的应用

苏州医学院放射医学系(苏州, 215007) 徐永忠综述 赵经涌 郑斯英 夏寿莹* 审校

摘要: 较系统地综述了 HPRT 基因突变分析的基本原理、方法、影响因素及其在放射生物学中的应用及存在的问题。研究表明, HPRT 基因突变分析可望成为一种生物剂量计。通过检测个体 HPRT 基因突变频率, 对急性照射及慢性低剂量长期照射的生物剂量估算, 评价癌患风险等方面均有实用价值。

关键词: HPRT 基因 生物剂量计 癌患风险

随着核能、核科学技术的广泛应用, 人们越来越关注来自电离辐射的可能危害。而这些危害所引起的临床症状常要在多年后才能出现, 因此, 需要建立和发展基因损伤的生物标记来监测人们接受电离辐射情况并分析疾病。在分析和定量体细胞基因突变增高的方法中, 应用最广泛的是 TG^r (6-thioguanine resistance) 分析, 用于检测次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HPRT) 基因位点的突变。这个位点作为生物标记有几个优点: ① 细胞对 HPRT 活性不是必需, 因此可发生的突变类型是无限制的, 并且 HPRT 基因突变的细胞表型容易识别; ② 基因位于 X 染色体上, 在

纯合子正常个体比常染色体隐性基因具有更高的突变频率 (MF); ③ 人类细胞的 HPRT 基因结构与基因序列已清楚, 可用探针进行分析^[1]。本文就 HPRT 基因位点突变在放射生物学中的应用作一综述。

1 HPRT 基因的一般生物学特征

人和啮齿类细胞的 HPRT 基因位于 X 染色体上。在雄性, HPRT 基因呈半合子状态, 而在雌性, 由于在一条 X 染色体上失活而呈效应性半合子状态。X 染色体上的失活发生在雌性发育的早期, 随后, 雌雄两性细胞中只有一个活性的 HPRT 基因, 它的失活使

* 北京放射医学研究所(北京, 100850)