

- 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)

细胞的表型为 HPRT⁻。人类 HPRT 基因序列长 44kb (小鼠是 34kb), 带有 9 个外显子和 8 个内含子。该基因产物为 HPRT, 该酶由 2 ~ 4 个蛋白亚单位组成, 是一种细胞膜酶, 存在于人体所有组织内, 脑组织含量最多, 参与细胞内嘌呤核苷酸的补救合成^[2,3]。

HPRT 特异性不强, 在细胞 DNA 合成时可将嘌呤类似物 (如 6-TG) 掺入到 DNA 中, 阻断半保留复制造成细胞死亡。细胞 HPRT 基因突变后, 不能编码生成正常 HPRT, 嘌呤类似物就不能掺入到 DNA 中, 不影响其复制。因此, 在选择性培养基中, 突变的细胞能存活, 非突变型细胞则死亡。

2 HPRT 基因突变检测方法

2.1 放射自显影法及克隆检测法

这两种检测方法目前在国内外得到广泛应用, 其方法及各自的优缺点已有大量报道^[2,4,5], 这里不再重述。

2.2 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (5-Brdurd) 法

在淋巴细胞培养物中加 5-Brdurd, 细胞增殖时掺入 DNA 中, 然后用荧光加吉姆萨染色 (FPG) 法来检测突变细胞。该方法简单、迅速、化费少, 有潜在自动化趋势, 适用于任何遗传实验室。缺点是无法证实突变表型、基因型或克隆关系^[6]。

2.3 多核细胞检测法

体外短期培养的突变细胞在细胞松弛素 B 的作用下出现双核或多核。本法比自显影法及克隆检测法简单、快速、灵敏、检出率高, 不足之处是无法分析 HPRT 的基因成份和结构^[7]。

2.4 分子生物学技术

利用分子生物学技术检测 HPRT 基因突变的方法主要有 Southern 印迹、PCR (聚合酶链式反应) 技术、荧光原位杂交等。Southern 印迹常用于检测 HPRT 基因的缺失和重排。首先常规法提取 DNA, 然后用限制性内切酶 Pst I 消化, 电泳并将 DNA 片段

转移到尼龙膜上, 再用 HPRT 基因 cDNA 探针进行杂交^[8]。PCR 技术是一种体外核酸扩增方法, 可以和其它技术联合应用, 主要有 DNA 直接测序法、单链构象多态分析法、限制性片段长度多态分析法等, 可用于检测 HPRT 基因的点突变、移码突变及小片段缺失等。

3 影响 HPRT 基因突变频率的因素

3.1 年龄

大量研究表明, HPRT 基因突变频率或变异频率 (VF) 随着年龄的增加而增加, 新生儿 MF (~ 0.8×10^{-6}) 约低于成年人 (~ 6×10^{-6}) 的 10 倍, 而儿童的 MF 约 3×10^{-6} 。成年人 MF 每年约增加 1% ~ 5%。Branda 等^[9]对年龄在 19~ 80 岁的 232 名个体 (77 名男性, 115 名女性) 应用 T 淋巴细胞克隆技术测定 HPRT 基因突变频率, 对测定结果进行统计分析, 年龄和 MF 之间的关系可以用以下方程表示 $\ln MF = 1.46 + 0.018 \times \text{年龄}$ ($P < 0.001$), 因此突变频率每年大约增加 2%。King 等也得出相类似的结论。为何突变频率随年龄增加而增加, 还有待进一步探讨。

3.2 淋巴细胞克隆效率

克隆效率 (CE) 的增加与 MF 的降低相关, 这已被许多学者所证实。Branda 等^[9]对 232 名个体研究表明 CE 与 MF 之间可用方程 $\ln MF = 2.91 - 1.32CE$ 表示 ($P < 0.001$), 这一结果与 Tates 1991 年报道的 CE 增加 2 倍, MF 减少 37% 以及 Cole 等 1991 年报道的 CE 增加 2 倍, MF 减少 40% 相近。

3.3 吸烟史

有许多报道揭示吸烟者 HPRT 基因 MF 升高。Henderson 等最初揭示吸烟者 MF 增加, 但并无显著意义。随后 Bridges 等发现由于吸烟而使 MF 增加了 1.5 倍, 有较大的显著性^[10]。目前的结论是吸烟与非吸烟者的 MF 有显著性差异。有趣的是吸烟和年龄的

影响也许是相关的。Cole等研究发现非吸烟者 MF 每年增加 0.8%, 而吸烟者却增加 2.8%。另外, Ammenheuser 等报道母亲在妊娠期吸烟也会影响新生儿的 HPRT 基因 VF^[11]。

3.4 饮食成分

饮食对人 HPRT 基因 MF 的影响相对来说还未引起足够的重视。Branda 等对 107 名妇女 (49 名患乳腺癌, 52 名有乳房良性肿块, 6 名健康) 的研究表明, 血清缺乏叶酸同 MF 升高相关。以后又对 70 名妇女 (有乳房肿块) 的营养调查表和 HPRT 基因 MF 在考虑到年龄、克隆效率及总的热量摄入情况下进行多元分析, 发现铁和维生素 A 量与 \ln MF 呈显著性正相关 ($P=0.03$), 而总的脂肪量与 \ln MF 呈负相关 ($P=0.004$)^[11, 12]。

4 在放射生物学中的应用

4.1 生物剂量计

4.1.1 原爆幸存者

原爆幸存者接受的是一次性的全身性照射, 可根据 DS86 估算剂量。Hakoda 等^[13]用 T 淋巴细胞克隆法分析 DS86 估算值 $D > 0.01\text{Gy}$ 的 30 名原爆幸存者和 17 名 $D < 0.01\text{Gy}$ 对照者的 HPRT 基因 MF, 结果 17 名对照者的 MF 为 3.4×10^{-6} , 30 名幸存者的 MF 为 5.2×10^{-6} , 两组间有差异 ($P < 0.05$)。其中 27 名幸存者 MF 与受照剂量之间的关系式为 $Y = 3.7 + 7.5 \times 10^{-3} X$ (相关系数 $r = 0.8, P < 0.05$)。Hirai 等克隆检测了 254 名原爆幸存者的外周血 HPRT 位点的 MF, 并分析其中 244 名的剂量效应及吸烟的影响。结果, 与对照组相比, MF 增加 10% / Gy, 而吸烟者增加 34% / Gy^[14]。

4.1.2 放疗癌症患者

Ammenheuser 等观察 12 名癌症病人的放射治疗效应, 当考虑到吸烟影响时, 癌症病人治疗前 HPRT 基因 VF 同非癌症患者的 VF 无显著性差异。治疗后 2 周 VF 升高 (8

名病人平均为 8.1×10^{-6}), 尽管这并不显著, 治疗后 3~4 周达高峰 (平均为 20.5×10^{-6} 和 15.5×10^{-6} , 每次检测 4 人), 最后一次治疗后间隔 6~32 周, VF 几乎下降到治疗前水平^[15]。Messing 等对 12 名乳腺癌病人在接受总剂量达 6Gy (每天 2Gy) 照射后进行检测, 发现 HPRT 基因 MF 无显著性增加, 而 1 个月后累积剂量达 50Gy 时, 将这组病人作为一个整体, 发现每个可克隆细胞 MF 显著增加 (28.2×10^{-6})。估计通过放疗, 血细胞接受 4Gy 的剂量, 因而诱导的 MF 是 6.9×10^{-6} 每个位点每 Gy^[16]。

4.1.3 放射免疫治疗病人

Niklas 等研究了 13 名治疗前癌症病人和 12 名¹³¹I 放射免疫治疗后不同时间的癌症病人。结果发现, 13 名治疗前病人平均 HPRT 基因 MF 为 11.5×10^{-6} , 与对照组 MF 12.8×10^{-6} (考虑到年龄影响的校正值) 十分相近。而 12 名治疗后病人, 平均 MF 为 27.8×10^{-6} 与治疗前病人相比显著性增加 ($P < 0.007$)。并且 MF 与总剂量间有剂量-效应关系^[17]。

4.1.4 事故性受照者

Ostrosky-Wegman 等对在墨西哥事故中 3 名怀疑受到⁶⁰Co γ 射线的人员 2 年后进行放射自显影分析, 其中两人的 HPRT 基因 VF 约 120×10^{-6} (其中一人染色体畸变资料分析表明其受照剂量在 0.5~1.3Gy), 剩下一人受照剂量可能最小, VF 为 18.8×10^{-6} , 在正常范围内^[18]。另外, 切尔诺贝利核电站事故中两人在受照后 24 天检测, VF 增加, 其中一位非常高 ($VF 86.4 \times 10^{-6}$), 一年后重新检测这两人, 同时还检测了该事故中的另两人, 结果 VF 都在正常范围内。

4.1.5 职业性受照者

史纪兰等对 30 例 X 线诊断工作者的体细胞 HPRT 基因 MF 利用多核细胞法进行测定, 平均为 $(1.1480 \pm 0.0844) \times 10^{-6}$, 与 30 例健康献血员的 HPRT 基因 MF (1.0518

$\pm 0.069) \times 10^{-3}$ 相比有非常显著性差异 ($t=4.81, P < 0.01$)。根据文献报道, 剂量效应直线回归方程 $Y=1.0246+0.0104X$, 求得累积剂量除以放射工龄得年平均剂量当量为 5.73mSv/年 。结果表明, 与以往建立的 X 线诱发 HPRT 基因 MF 刻度曲线推算的累积剂量和年剂量当量值基本相符。

4.2 评价癌患风险势

4.2.1 DNA 修复缺陷病人

两种与染色体断裂增加有关的综合征, 一是 Fanconi 氏贫血 (FA), 特征是染色体断裂自发性或诱导性增加, 另一是毛细血管扩张共济失调 (AT), 患者对辐射敏感。Vigalaxmi 等^[19]应用克隆法分析 5 名 FA 病人, 平均 MF 约为 10×10^{-6} , 显著高于 5 名年龄相当的儿童 (约 $4 \times 10^{-6}, P < 0.05$) 而 5 名 FA 杂合子个体的 MF 同正常人无显著差异。Cole 等^[2]对患有 AT 的 11 名儿童和 2 名年青人的研究表明, 与年龄相当的对照组相比, AT 病人 MF 明显升高 ($P < 0.001$), 12 名杂合子父母和 6 名 AT 病人的同胞兄妹 MF 都在正常范围。Cole 等^[20]还研究 10 名着色性干皮病 (XP) 病人, 其中 6 名儿童, 4 名成人。结果 MF 显著性升高 ($P < 0.001$)。XP 病人循环淋巴细胞 HPRT 基因突变增加是由于细胞通过皮肤毛细血管时紫外线诱导的, 这些病人红细胞血型糖蛋白 A (GPA) 基因突变频率正常证实了这个假说。

4.2.2 原爆幸存者及放疗癌症患者

流行病学调查表明, 原爆幸存者癌患风险比正常人高几倍到几十倍, 放疗癌症患者其继发性癌患风险也显著增加。这两类人群的 HPRT MF 都显著升高, 因而可对这两类人群 HPRT MF 过高个体进行长期追踪调查, 将有利于解决其癌患风险的评价。

5 展望

目前对 HPRT 的研究已进入分子水平,

人们可以利用各种分子生物学技术对各种因素所致的 HPRT 突变基因进行突变类型检测, 绘制突变图谱, 分析突变发生机制。这个领域的研究将使人们更好地理解一些关键基因的突变是怎样对正常及异常个体活细胞分化起作用的。此外, 由于各种诱变剂所致 HPRT 基因突变图谱有其特异性, 也可通过基因突变图谱, 反过来分析所致突变的诱变剂。随着 HPRT 基因突变分析技术的不断完善, 对放射生物学的应用将更加广泛。

参考文献

- 1 Branda RF Albertini RJ. *Mutat Res*, 1995; 346 121
- 2 Cole J Skopek TR. *Mutat Res*, 1994; 304 33
- 3 Glickman BW et al. *Mutat Res*, 1994; 304 23
- 4 Albertini RJ et al. *Mutat Res*, 1988; 204 481
- 5 Cole J et al. *Mutat Res*, 1988; 204 493
- 6 Ostrosky-Wegman P et al. *Mutat Res*, 1987; 191 211
- 7 norman A et al. *Mutat Res*, 1988; 208 17
- 8 Steingrimsdottir H et al. *Mutat Res*, 1993; 294 29
- 9 Branda RF et al. *Mutat Res*, 1993; 285 267
- 10 Bridges BA et al. *Leukemia*, 1989; 3 846
- 11 Ammenheuser MM et al. *Mutat Res*, 1994; 304 285
- 12 Branda RF et al. *Environ Mol Mutagen*, 1992; 19 274
- 13 Hakoda M et al. *Mutat Res*, 1988; 201 39
- 14 Hirai Y et al. *Mutat Res*, 1995; 329 183
- 15 Ammenheuser MM et al. *Environ Mol Mutagen*, 1991; 18 126
- 16 Messing K Bradley W EC. *Mutat Res*, 1985; 152 107
- 17 Nicklas JA et al. *Mutat Res*, 1991; 250 383
- 18 Ostrosky-Wegman P et al. *Mutat Res*, 1990; 232 49
- 19 Vijayalaxmi et al. *Human Genet*, 1985; 70 264
- 20 Cole et al. *Mutat Res*, 1992; 273 171

(收稿日期: 1996-10-18)