

Research development of hematopoietic stem/progenitor cells transplantation for the patients injured by radiation

Zhang Zhan-ying

(Department of epidemiology in Suzhou University, Jiangsu Suzhou 215007, China)

Abstract With the development of nuclear energy and nuclear technology and with using radio nuclide widely, it is an much more important project to provide hematopoietic stem/progenitor cells transplantation timely and efficiently for the patients with acute radiation sickness and for treatment of victims of radiation accidents.

Key words stem/progenitor cells; transplantation; radiation injury; treatment

文章编号: 1001-098X(2000)05-0226-05

电离辐射诱发的基因组不稳定性与辐射致癌

王仲文

(中国辐射防护研究院,山西太原 030006)

摘要: 电离辐射诱发的基因组不稳定性在哺乳动物细胞和体内广泛的存在,使受照的细胞子代增加了遗传变化的频率。在辐射诱发小鼠白血病中,受预照射的 CBA/H 小鼠本身的白血病发生率与对照组相比并不显著,但子代小鼠中受 γ 射线照射后与单独受到 γ 射线照射的小鼠相比,白血病的潜伏期缩短,发病率增高。辐射诱发的基因组不稳定性可能使整基因组处于临界突变状态。随着基因组不稳定性过程使细胞内一些关键的基因(如癌基因活化,抑癌基因失活)突变,癌症发生。因此,基因组不稳定性在癌症的起始过程中作为一个关键的早期事件,可能起着特殊的,也许是独特的作用。

关键词: 辐射; 基因组不稳定性; 微卫星序列; p53

中图分类号: Q345 **文献标识码:** A

1 引言

长期以来一直认为,在哺乳动物细胞中,辐射的重要生物学效应如染色体畸变、突变和细胞死亡是 DNA 损伤的直接结果^[1]。许多研究已显示,这个概念正在发生着变化,辐射可能诱发一个基因组不稳定性过程,它们可传递到细胞复制的子代中,并在细胞复制许多代后继续影响受照射细胞的遗传效应。这样,最终的遗传变化在受照细胞本身并未发生,但照射已使细胞处于一个临界状态,使子代细胞中突变频率增加,并表现出遗传学变化。

这种可传递的基因组不稳定性的类型在受照的细胞子代中是多种形式的,如增加突变频率,滞后性

繁殖的细胞死亡及增加染色体重排的频率。一些形式的表达如滞后性繁殖的细胞死亡在 30 多年前已有描述,但只是在近年来才引起人们的注意^[2]。这主要是基因组的不稳定性可能与辐射致癌相联。如果基因的不稳定性过程发生在体内,对辐射致癌的机制可能有非常重要的意义。长期以来一直假设,辐射致癌的起因是包含了一个关键癌基因或肿瘤抑制基因的突变。在细胞群体中,这个突变的发生是非常低的,大多数癌症的起始是克隆型的。然而,最近的证据表明,这个细胞的子代要完全形成恶性肿瘤必须累积 6 至 8 个分别不同基因的突变。这样就产生了一个问题:如果这些突变的发生是各自的,并且频率很低,那么单个细胞是如何在它的寿命期累积到这些所有的突变?如果照射诱发了一个基因组不稳定性的传递过程,这将引起一个持久的、基因组范围内的突变频率的增加。最近越来越多的资料支持这个观点^[1]。现就电离辐射诱导基因组不稳定性与辐射致癌的最新研究进展简述如下。

收稿日期: 2000-03-07

作者简介: 王仲文(1962-),男,中国辐射防护研究院副研究员,主要从事辐射生物效应的研究。

基金项目: 核工业科学基金资助项目(196Q61008)

审校者: 中国辐射防护研究院 张连珍

2 辐射诱发小鼠白血病中的基因组不稳定性

用 CBA/H 小鼠来研究辐射诱发的白血病是个很好的模型, CBA/H 小鼠白血病的自然发生率是可以忽略不计的, 但当受到单次全身 3Gy X 射线照射时, 白血病的发生率约为 25%, 白血病在照射后 6~24 个月内发生(平均 18 个月), 表明致白血病是一个多阶段过程。多达 80% 的白血病会有 2 号染色体末端或中间缺失^[3]。另一种小鼠模型是诱发胸腺瘤的 C57BL/6 小鼠模型。

从受照射小鼠造血干细胞演化来的子代克隆细胞的细胞遗传学分析结果表明, 电离辐射尤其是高 LET(传能线密度)的 α 粒子照射将引起滞后的染色体畸变, 并为非克隆型的染色体畸变及滞后的基因突变^[4]。这样的滞后染色体畸变在体内可持续存在。

对体外受照射的小鼠造血干细胞研究显示, 高 LET 的 α 粒子照射比低 LET X 射线照射对诱发滞后的非克隆型的染色体畸变方面更为有效^[4], 而 X 射线诱发 CBA/H 小鼠白血病的非克隆型染色单体畸变没有多少改变。

在辐射诱发 CBA/H 小鼠白血病中, 观察到约有 80% 的辐射诱发为 AML(急性髓样白血病)者含有 2 号染色体缺失, 表明这个遗传学缺失对发展成 AML 是必不可少的。这样, 要了解辐射诱发白血病的机制, 必须明确几个关键的问题: (1) 2 号染色体缺失是一个早期事件或是 X 射线照射的直接结果, 包不包括染色体辐射敏感的脆性部位? (2) 2 号染色体缺失是一个后期事件, 在多阶段致白血病发生中作为基因组不稳定性及克隆选择的结果? (3) 2 号染色体缺失在辐射诱发 AML 中是不是特异的?

为了证实骨髓细胞受照后 2 号染色体缺失是否可检测到, 分析了受照后 24h 至几个月的骨髓细胞, 结果表明, 过量的细胞(可达到所有计数细胞的 80%) 带有 2 号染色体缺失。有两个研究表明, 在杂交小鼠个体中 2 号染色体的畸变有显著的改变, 20%~25% 的受照射小鼠细胞带有超敏感的 2 号染色体^[5,6]。但也有研究显示, 在某些小鼠预期可以发展成 AML 的骨髓细胞, 受照后 1~15 个月并不诱发 2 号染色体畸变, 也不存在 2 号染色体畸变克隆^[7]。

辐射诱发小鼠 AML 的细胞遗传学研究表明, 2 号染色体断点是成簇的, 且在 2 号染色体间隙端粒样序列中含有脆性位点。

最近的研究显示, 基因组的不稳定性是可传递的, 且与辐射诱发小鼠淋巴造血系统恶性肿瘤有着密切的关系^[8]。对 CBA/H 雄性小鼠和 DBA2 雄性小鼠(诱发胸腺瘤模型小鼠)分别注射 0 128 256Bq g^{-1} 的 ^{239}Pu , 12 周后分别与 CBA/H 及 C57BL 雌鼠交配, CBA/H 子代小鼠在 12 周时给予 3Gy X 射线全身照射, 观察其发病率, 结果发现, 在父代受照射后, 其子代小鼠约 30% 患淋巴造血系统疾病, 对照组为 20%。在 128 和 256Bq g^{-1} 的 ^{239}Pu 照射组中, 预照射(PPI)后的子代小鼠中, 淋巴造血系统疾病分别增加了 4% 和 64% (见表 1), 淋巴样白血病在 128Bq g^{-1} 的 ^{239}Pu 预照射组中增加了 105%, 而髓样白血病则比对照组低。在 256Bq g^{-1} 的 ^{239}Pu 组中, 淋巴样白血病与髓样白血病的发病率比对照组高。对 DBA2 雄性小鼠与 C57BL 雌性小鼠交配的子代鼠 BDF₁ 注射 50mg/kg⁻¹ 的甲基亚硝基胍, 结果发现, 淋巴瘤的发生率在预照射中要高于对照组。而在预照射组中, 白血病的发生率是胸腺淋巴瘤的 2 倍。在预照射组中, 小鼠患病和潜伏期比对照组短(见表 2)。这个结果表明, 父代预照射后, 可诱发基因组的不稳定性, 使子代在受到二次致癌剂的攻击时更容易诱发淋巴造血系统的恶性肿瘤。

表 1 在父代预照射(PPI)的 CBA/H 小鼠与 PPI 小鼠受 3.3Gy γ 射线照射后淋巴造血系统疾病增加的发生率

	$^{239}PuPPI(Bq\ g^{-1})$	
	128	256
淋巴造血系统疾病	41.2 \pm 2.9	62.4 \pm 2.3
P(PPI 比对照)	< 0.001	< 0.001
髓样白血病	- 30.2 \pm 3.8	15.9 \pm 4.1
P(PPI 比对照)	0.002	0.055
P(256 比 128Bq g^{-1})		0.002
淋巴样白血病	105 \pm 6	98.5 \pm 7.7
P(PPI 比对照)	<< 0.001	<< 0.001

注: 对照组仅给予 3.3Gy γ 射线照射。正常 CBA/H 小鼠自发白血病的频率可以忽略不计。

3 辐射诱发随机重复序列的突变

检测电离辐射对单个遗传位点的突变率, 取决于本底自发突变频率、辐射量及可记录到的受照射细胞子代在统计学上有意义数量的能力。基因组随机重复序列已证明, 在致癌过程或和作为照射结果在估计不同类型的基因组不稳定性过程中, 有很多

可利用的资料。

表 2 用甲基亚硝基脲 (MNU)处理的 BDF₁小鼠中淋巴造血系统疾病

	²³⁹ Pu PPI (Bq·g ⁻¹)		
	0	128	256
注射 MNU 的小鼠数	55	62	41
最短的潜伏期 (d)	89	61	69
恶性肿瘤 50% 发生率 (d)	185	125	161
250d 时恶性肿瘤总发生率	70	93	83
淋巴瘤 (%)	62	35	35
白血病 (%)	38	65	65

小卫星重复序列有高度的种属突变率,父代预照射处理后,能以剂量依赖方式在人或小鼠中增加种系突变频率两倍^[9,10]。用 CBA/H 小鼠给予全身 0.5 或 1Gy γ 射线照射,在照射后 3 6 10 周分别与

CBA/H 雌鼠交配, F₁ 代小鼠用 Ms6-hm 作探针检测小鼠小卫星突变频率,结果在精母细胞期受照的子代小鼠中小卫星位点的突变频率显著升高,且有剂量依赖关系;而在精子细胞期的子代小鼠,小卫星位点的突变频率没有明显的改变。但我们的结果与此不同: 雄性 C3H 小鼠给予 1-3Gy 全身 γ 射线照射后 3 7 10 周与 B57/C 雌性小鼠交配,用 Pc-1 (Ms6-hm) 探针检查 F₁ 代小鼠小卫星位点的突变频率显示在精子细胞期受照的小鼠子代,小卫星位点突变频率增加,而精母细胞期受照的子代小鼠,小卫星位点突变频率增加不明显^[11]。这两组实验得出的突变频率都是子代小鼠中父代基因组小卫星位点的突变频率(见表 3)。在精子细胞期受到照射后的子代小鼠中,来自母体的基因组不稳定的小卫星基因位点的突变频率也增加(见表 4)。

表 3 C3H 雄鼠受照后 F₁ 子鼠 Pc-1 (Ms6-hm) 突变的剂量效应

组别	数量				突变	
	雄	雌	F ₁	总数 (%)	父本	母本
对照	14	22	131	27(10%)	12(9.1%, 4d+ 8i)	15(12%, 7d+ 8i)
精子照射 (Gy)						
3	28	35	182	54(15%)	26(14%, 5d+ 2i)	28(15%, 1d+ 17i)
精子细胞期照射 (Gy)						
1	18	30	81	58(16%)	40(22%, 2d+ 38i)	18(9.9%, 7d+ 11i)
2	12	16	82	33(20%)	23(28%, 6d+ 17i)	10(12%, 6d+ 4i)
3	25	25	104	41(20%)	29(28%, 4d+ 25i)	12(12%, 4d+ 8i)
精原细胞期照射 (Gy)						
2	11	17	133	26(9.7%)	18(14%, 9d+ 9i)	8(6.0%, 2d+ 6i)
3	12	13	95	22(11%)	15(16%, 2d+ 13i)	7(7.3%, 2d+ 5i)

表 4 F₁ 小鼠 C3H/HeN 异位基因 Ms6-hm 位点的突变频率

雄鼠	数量	剂量 (Gy)	阶段	雌鼠	数量	F ₁ 数量	C3 等位突变 (%)
C3H	23	0		C57BL	35	226	19(8.4)
	10	6	精子细胞期		14	63	14(22)
	7	6	精原细胞期		10	69	13(19)
C57BL	27	0		C3H	28	203	20(9.8)
	21	6	精子细胞期		28	117	23(20)
	6	6	精原细胞期		11	61	5(8.2)

在辐射诱发白血病中分析 Ms6-hm 位点的突变频率表明,在白血病小鼠中,27% 含有此基因位点的突变,比自发的突变频率高出 7 倍^[12]。如果 Ms6-hm 位点突变是由电离辐射直接启动的结果,那么

这些体细胞突变频率在辐射诱发的胸腺瘤中是相似的,但实际情况并非如此,在辐射诱发的 AM L 和胸腺淋巴瘤中表现为等位基因组的获得或丢失。在同一小鼠中比较小鼠尾巴和肿瘤组织 DNA, 结果发现

肿瘤组织中很多表现为此位点获得或丢失,而不是体细胞中此位点重复序列长度的轻微变化。获得性突变在AML组织中可达到30%,在淋巴瘤组织中为12.5%。

在切尔诺贝利核电站事故后人群的资料数据也表明,不论是受照射个体或是父母受照后的后代,用微卫星位点探针33.6 33.5及其它8种微卫星位点探针检测其突变频率,其微卫星位点的突变频率都明显地升高^[9]。在>20mSv剂量组中,其微卫星突变频率是对照组的2倍。>20mSv剂量组与<20mSv剂量组比较也有显著的差异。

这些资料都表明,小卫星位点的不稳定性不是电离辐射诱发DNA损伤的直接结果,而是由于辐射诱发了基因组的不稳定性,使一些基因处于临界状态,诱发了小卫星位点的突变或其它基因的突变。

4 p53基因突变在辐射诱发肿瘤中是后期事件

辐射在癌症发展过程中的作用目前了解不多,通常认为辐射致癌效应与遗传效应、突变效应有关,但特异基因的变化与辐射致癌的发展并没有因果关系^[13]。最近的一些资料显示,辐射诱发的不稳定性在辐射致癌的多阶段过程中不是早期事件^[14],这个开始的不稳定性使所有基因处于临界状态,当一些关键的基因突变,如癌基因活化或抑癌基因失活后,导致癌症的发生。

体外细胞实验显示,p53基因突变在辐射诱发小鼠乳腺细胞转化过程中是一个晚期事件^[13]。受1Gy γ 射线照射后,分离BALB/C小鼠乳腺上皮细胞进行体外培养,挑选有转化趋势的细胞克隆(EF42)继续培养,并用免疫组化方法检查其p53基因突变情况,结果表明,在培养11代时p53量的积累在群体中约占10%,当培养到27代时,细胞已有了致瘤性,p53蛋白的阳性细胞数约为100%,用单链构象多态性聚合酶链反应(SSCP-PCR)分析p53的情况,表明p53的突变为点突变,且在照后早期细胞中检查不到,只有当细胞具有致瘤性后才可检测到,这表明不是由电离辐射直接引起的。

动物实验资料也表明^[15],在辐射诱发小鼠胸腺淋巴瘤中,p53基因的突变在致癌过程中是一个后期事件,而在受照射的小鼠中染色体的畸变或易位是高频率发生的,且可能是一个早期事件。

5 小结

电离辐射诱发的基因组不稳定性在哺乳动物细

胞和体内广泛存在,这个不稳定性在细胞内的持久存在,使照射细胞子代增加了遗传变化的频率。基因组的不稳定性表明有多种形式的末端,但它们之间的联系如何目前还不清楚。越来越多的资料表明,受照射细胞子代的突变是基因组不稳定性的结果,而不是由射线本身引起的直接损伤。此外,外源因子作用于宿主在基因组不稳定性的发展中可能起重要的作用。例如:受预照射的CBA/H小鼠本身的白血病发生率与对照组相比并不显著,但子代小鼠中受 γ 射线照射后与单独受到 γ 射线照射的小鼠相比,白血病的潜伏期缩短,发病率增高。

电离辐射诱发的基因组不稳定性在肿瘤的发展过程中可能起着重要的作用,辐射诱发的基因组不稳定性可能使整基因组处于临界突变状态。随着基因组不稳定性过程,使细胞内一些关键的基因(如癌基因活化,抑癌基因失活)突变,癌症发生。因此,基因组不稳定性在癌症的起始过程中作为一个关键的早期事件,可能起着特殊的、也许是独特的作用。

参考文献:

- [1] Little JB. Radiation-induced genomic instability[J]. *Int J Radiat Biol*, 1998, 74: 663-871.
- [2] Hovns-Ringdahl M. Some aspects radiation induced transmissible genomic instability[J]. *Mut Res*, 1998, 404: 27-37.
- [3] Plumb M, Cleary H, Wright E. Genetic instability in radiation-induced leukemia mouse models[J]. *Ent J Biol*, 1998, 74: 711-720.
- [4] Wright EG. Radiation-induced genomic instability in haemopoietic cells implication for radiation pathology[J]. *Radiat Onco Invest*, 1998, 5: 115-118.
- [5] Rithidech K, Bond VP, Cronkite EP, et al. Hypermutability of mouse chromosome 2 during the development of x-ray-induced murine myeloid leukemia[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1995, 92: 1152-1156.
- [6] Ban N, Kai M and Kusama T. Chromosome aberration in bone marrow cells of C3H/He mice at an early stage after whole-body irradiation[J]. *J Radiat Res*, 1997, 38: 219-231.
- [7] Bouffler SD, Meijie EIM, Morris DJ, et al. Chromosome 2 hypersensitivity and clone development in murine radiation acute myeloid leukemia[J]. *Int J Radiat Biol*, 1997, 72: 181-189.
- [8] Lord BI, Woolford LB, Wang L, et al. Induction of lympho-haemopoietic malignancy; impact of pre-conception paternal irradiation[J]. *Int J Radiat Biol*, 1998, 74: 721-728.
- [9] Dubrova YE, Nestorov VN, Krouchinsky NG, et al. Human minisatellite mutation rate after the chernobyl accident[J]. *Nature*, 1996, 380: 683-886.

- [10] Dubrova YE, Plumb M, Brown J, et al. Stage specificity dose response and doubling dose for mouse minisatellite germline mutation induced by acute radiation [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1998, 95: 6251-6255.
- [11] Fan YJ, Wang Z, Sadamoto S, et al. Dose-response of radiation induction of a germline mutation at a hypervariable mouse minisatellite locus [J]. Int J Radiat Biol, 1995, 68: 177-183.
- [12] Fennelly J, Wright E and Plumb M. Mini-add microsatellite mutation in radiation induced acute myeloid leukemia in the CBA/H mouse [J]. Leukemia, 1997, 11: 807-810.
- [13] Uitrich RL and Ponnaiya B. Radiation-induced instability and relation to radiation carcinogenesis [J]. Int J Radiat Biol, 1998, 74: 747-754.
- [14] Selvenayagam CS, Davis CM, Cronforth MN, et al. Latent expression of p53 mutation and radiation-induced mammary cancer [J]. Cancer Res, 1995, 55: 3310-3317.
- [15] Mute M, Chen Y. Analysis of early initiating event(s) in radiation-induced thymic lymphomagenesis [J]. Jpn J Cancer Res, 1998, 87: 247-257.

Ionizing radiation induced genomic instability and its relation to radiation carcinogenesis

WANG Zhong-wen

(China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, China)

Abstract There are widespread testimonies that the genomic instability induced by ionizing irradiation exists in mammal and its vitro cells. Genomic instability can enhance the frequency of genetic changes among the progeny of the original irradiated cells. In the radiation-leukaemogenesis, there is no significant difference between controls and CBA/H mice of PPI (preconception paternal irradiation), but the offsprings of the PPI recipients show a different character (shorter latent period and higher incidence) after an extra γ -radiation. The radiation-induced genomic instability may get the genome on the verge of mutation and lead to carcinogenesis following mutation of some critical genes. The genomic instability, as the early event of initiation of carcinomas, may play a specific or unique role.

Key words ionizing radiation; genomic instability; p53 gene; minisatellite

文章编号: 1001-098X(2000)05-0230-05

微卫星 DNA 及其在放射医学领域中的应用前景

石 爽

(北京大学医学部放射医学教研室, 北京 100083)

摘要: 微卫星 DNA (MSDNA) 是真核生物基因组重复序列中的主要组成部分之一。由于其分布广、多态性高、自身突变率低、易检测等特点, 脱颖而出, 成为优秀的遗传标志, 广泛用于基因定位、基因作图、种群研究、个体识别, 并与肿瘤、某些遗传疾病密切相关。射线作为一种环境致突变因子, 可引起遗传改变及肿瘤形成, 因此, MSDNA 近年来在放射医学领域也有较为广泛的应用。

关键词: 微卫星 DNA; 电离辐射

中图分类号: Q345 文献标识码: A

与原核生物相比, 真核生物基因组要大得多, DNA 序列的组织性也复杂得多。据估计, 真核生物基因组 DNA 总量中大约只有 10% 具有编码功能, 而其余 90% 的序列没有编码功能。在庞大的非编码

区内, 广泛分布着各种形式的重复 DNA 序列。微卫星 DNA (microsatellite DNA, MSDNA) 就是真核生物基因组重复序列中的主要组成部分之一。

1 MSDNA 的概念及特点

MSDNA 是以 1~6 个核苷酸为重复单位, 具有高度多态性的简单串联排列而成的 DNA 序列, 长度为 10~60bp (碱基对), 常见的为双核苷酸重复,

收稿日期: 2000-05-13

作者简介: 石 爽 (1974-), 女, 辽宁省葫芦岛市人, 硕士研究生, 主要从事辐射细胞遗传学的研究。

审校者: 北京大学医学部放射医学基础教研室 龚曼丽、杨新海