

- [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  $\gamma$ -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

即  $(CA)_n / (GT)_n$ , 平均 50kb (30~ 60kb) 就有一个重复序列, 重复单位结构相同, 突变率低。目前已有超过  $10^4$  个 MSDNA 位点被鉴定, 收入基因组数据库 (genomedatabase, GDB) 的 MSDNA 标志之间距离为 0.7 厘摩 (centimorgan, cM), 说明 MSDNA 几乎遍布整个染色体。由于 MSDNA 重复单位小, 串联重复的长度较短, 有利于聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术进行检测, 所以被广泛用作基因作图的遗传标志、遗传病基因的连锁分析等。

MSDNA 作为遗传标志具有以下特征: (1) 出现率高, 分布广泛, 平均每 50 个 kb 就有一个 MSDNA 结构; (2) 人群中高度多态, 有利于检测连锁基因的杂合性缺失; (3) 自身突变率低 ( $< 0.04\%$ ), 是重组

热点, 如有异常, 往往反映其两侧连锁基因的突变; (4) 大部分位于内含子或基因间隔中 (97%); (5) 按照 Mendel 共显性遗传方式遗传; (6) 容易筛选并且顺序化, 可以多个位点同时扫描

## 2 MSDNA 作为遗传标志的发展史

遗传标志的发展大致可以分为第一代限制性酶切片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP); 第二代数量可变的串联重复序列, 主要指小卫星 DNA (variable number of tandem repeat, VNTR) 和微卫星 DNA; 第三代单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)

表 1 微卫星 DNA 和小卫星 DNA 的区别

	微卫星 DNA	小卫星 DNA
存在部位	染色体任何区域	染色体近端粒和着丝粒区
重复单位长度 (核心序列)	1~ 6bp	6~ 70bp
重复次数	10~ 60次	几次~ 几百次
总序列长度	几十~ 几百 bp	0.5~ 30kb
重复单位的变异程度	重复单位变异性低, 可看成结构相同	重复单位组成略有变异, 如单个碱基置换等
存在数组	很多, 整个基因组 50 000~ 100 000个	有限, 有些染色体上尚未发现

MSDNA 广泛存在于人类基因组及其它真核生物基因组中, 因而能从任何一种类型的真核基因组文库中找到它。从符合遗传学标志的高度多态、杂和性高、突变率低等标准来说, MSDNA 比 RFLP 和 VNTR 更为优越, 并且由于 MSDNA 的长度较短, 更适合于 PCR 的扩增, 而 VNTR 作为遗传学标志只是一种过渡, 目前已较少使用。1996 年, Lander 报道了用于第三代遗传连锁图制备的遗传学标志:

SNP, 其策略是用 DNA 芯片 (chips) 分析 SNP。SNP 作为遗传学标志有一定的优越性, 但芯片技术本身尚需完善, 并且由于费用昂贵而限制了其应用。

## 3 MSDNA 的功能

MSDNA 的功能尚未明了, 已发现 MSDNA 能参与遗传物质的结构改变、基因调控及细胞分化等过程, 有自身特异结合蛋白, 是一种非常活跃的碱基序列。目前较公认的是 MSDNA 充当基因重组的热点, 是基因重组和基因变异的来源。这在肿瘤及某些疾病基因调控中发挥重要的作用。已知嘌呤嘧啶核

苷酸交替排列的形式如  $(CA)_n$  是 Z-DNA 形式的基础, 而 Z-DNA 有抑制基因转录的作用。有的 MSDNA 有自身特异性结合蛋白或能直接编码蛋白质, 有的 MSDNA 如  $(CA/GT)_n$  与性别分化、X 染色体的失活有关, 有的则可能参与染色单体的折叠及染色体端粒的形成等。总之, MSDNA 通过改变 DNA 结构或通过特异性蛋白结合而发挥其基因调控作用, 是多态信息量极高的分子标志。不同部位的 MSDNA 对基因表达影响不同, 如在氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 基因 5' 非翻译区插入的 MSDNA 对该基因表达起抑制作用, 而在启动子上游或 CAT 基因下游插入的 MSDNA 则可刺激 CAT 的基因表达<sup>[1]</sup>。

## 4 MSDNA 产生机制

通常认为, DNA 复制过程中的“链滑” (strand slippage) 现象可能是造成 MSDNA 多态性的主要原因<sup>[2]</sup>。

## 5 MSDNA异常及其检测

MSDNA多态性表现于同一MSDNA位点在不同个体之间以及同一个体的正常组织与某些异常组织之间,MSDNA位点的重复单位的数目不同。检测采用PCR为主的方法:选择MSDNA位点;提取基因组DNA;根据所选用的MSDNA标记的旁侧序列合成特异性引物;PCR扩增DNA;扩增的DNA片段在变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离;结果分析。

MSDNA异常主要表现为MSDNA不稳定(microsatellite instability, MSI)和杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)<sup>[3]</sup>。与正常组织相比较,若某一等位基因条带消失或相对密度减少50%以上,记为LOH;若等位基因条带增多或大小有改变记为MSI。

## 6 MSI与MMR

MSI的产生原因可能是DNA复制过程中的“链滑”现象。DNA复制过程中,当复制一个重复单位(repeat unit)后,子链与模板链分离,然后与下一个或几个重复单位重新结合,使一个或几个重复单位形成“环凸”(looped out)区域。正常情况下该结构可被错配修复(mismatch repair, MMR)系统所校正,但校正系统失常时,子链DNA如继续延伸即可引起突变<sup>[4]</sup>。

关于MMR系统,大量研究表明,从细菌、酵母到人体细胞都存在一种能修复DNA碱基错配的安全保障体系,这种保障体系是由一系列特异性修复DNA碱基错配的酶分子组成,被称为DNA错配修复系统。由于MMR系统的存在,可保持遗传物质的完整性和稳定性,避免遗传物质突变的发生,保证DNA复制的高保真度。错配修复反应既可修复DNA复制过程中出现的碱基错配,又可消除由于含简单重复序列的同源序列之间的遗传重组出现的不对配碱基序列,这样可有效地防止DNA复制差错(replication error, RER)的产生。MMR系统的缺陷使DNA复制过程中含简单重复序列的同源顺序发生遗传重组而出现简单重复序列长度的变异,表现为肿瘤细胞中的MSI。目前已发现人类六个错配修复基因,其中三个为细菌MutS同源物:hMSH2, hMSH6和hMSH3;另外三个为细菌MutL同源物:hMLH1, hPMS1和hPMS2<sup>[3]</sup>。

## 7 MSDNA在放射医学中的应用前景

任何物理、化学因子介导的人类细胞的遗传学改变,目前主要是通过一些选择的标志基因来分析的,如hprt、tk、aprt基因,因为这些基因在人类细胞中的自发突变率相当低。但是,其工作量繁重,需要 $10^7$ 个细胞通过分析这些遗传学标志才能获得有意义的的数据。而且,这些标志物可检测的突变类型仅限于功能缺失型突变。

最近,MSDNA序列已作为人类遗传学标志广泛用于研究工作。MSDNA用PCR容易检测,迄今为止超过 $10^4$ 个MSDNA位点已被鉴定。对于分析任何因子的遗传学效应来说,MSDNA可以说是很好的靶子,因为检测遗传学改变无需选择,并且少量细胞通过同时分析多个位点就可以获得有意义的结果。此外,最近关于人类细胞MMR机制的研究揭示:MMR系统缺陷的细胞,在DNA复制过程中,MSDNA序列的错误多数未被纠正,导致MSDNA序列的改变。实际上,MMR系统缺陷的人类细胞中可以观察到微卫星自发改变的频率高达 $10^{-2}$ ,甚至更高<sup>[5]</sup>。在此研究中,Okuda T首先建立了一个方法,可以灵敏检测人类细胞遗传学改变,而无需繁重的工作。因为MSDNA序列广泛分布于整个人体的染色体中,并且比其它单一序列更易改变,因此对于检测自发的和任何因子诱导的遗传学改变都是灵敏并可靠的。近期的研究揭示,MMR系统缺陷的细胞显示了升高的MSI。因为MMR系统不但涉及错配的碱基对的修复,而且在纠正DNA复制过程中发生的重复序列的错误中发挥作用。这表明,MMR系统缺陷的细胞可以通过多个位点的MSDNA改变分析,灵敏地检测到遗传学改变。

射线是一种环境致突变因子,可引起遗传学改变及肿瘤形成,故MSDNA在放射医学中也有较为广泛的应用。

Weinberg<sup>[6]</sup>和Sato<sup>[7]</sup>等成功地将MSDNA标志用于检测原子弹爆炸对幸存者子代DNA水平的潜在遗传学影响。Weinberg对从切尔诺贝利事件发生地区移民到以色列的部分居民子代分子水平改变进行调查,认为将MSDNA标志用于高敏感的分析,是最有前途的技术。

MSDNA常用于辐射诱导的肿瘤研究,主要是辐射诱导的F1小鼠白血病与淋巴瘤中,探讨MSI与它们发生的相关性以及用LOH来寻找抑癌基因。

等。

Rithidech 等<sup>[8]</sup>在研究 MSI与辐射诱导 CBA/Ca 小鼠白血病的相关性时,检测了 55个 MSDNA 位点,在鼠 2号和 4号染色体上找到异常的 MSI,尽管没有直接的证据证明此种 MSI使鼠易于形成白血病,但却表明基因的侧翼序列 D2Mit 140和 D4Mit104易于自发突变并可能被电离辐射损伤

Cleary 等<sup>[9]</sup>也对辐射诱导的小鼠白血病与 MSLOH的相关性进行了进一步的研究。辐射可以引起粒细胞白血病和淋巴细胞白血病,染色体某些位点会出现 LOH,那么在相似的遗传学背景下,这些 LOH是随机出现的还是辐射诱导白血病特异的?是否具有白血病类型特异性?为此选定七条染色体上的 28个 MSDNA位点,结果表明,一些遗传缺失是放射性白血病特有的,但并不具有白血病类型特异性<sup>[9]</sup>。

2号染色体缺失是辐射诱导的急性粒细胞白血病(AML)的特征性改变, Silver等<sup>[10]</sup>对 21个辐射诱导的原发 F<sub>1</sub>小鼠 AML进行 MSDNA分析,将缺失精确定位于 D2Mit126和 D2Mit185仅 1cM 距离之间,此区域与人染色体 11p11-12同源,对于辐射诱导的 AML抑癌基因的鉴定有重要的意义。

Herranz 等<sup>[11]</sup>检测了  $\gamma$ 射线诱导(C57BL/6 $\times$ BALB/cJ) F<sub>1</sub>杂交小鼠胸腺淋巴瘤的一些 MSDNA 位点,发现 D4Mit12位点显示了遗传不稳定性,并具有独立的肿瘤表型

Okumoto 等<sup>[12]</sup>对辐射诱导(BALB/cHeA $\times$ STS) F<sub>1</sub>小鼠淋巴瘤进行多态 MSDNA位点等位基因分析,发现第 24 12 19号染色体经常发生 LOH,在 D4Mit31 D12Mit17和 D19Mit11位点上,LOH 的发生率分别为 27%、57%和 50%,并且这三个区域分别与人染色体 9p和 1p, 12q32.1以及 10q同源。因 MSDNA常与许多重要基因连锁,故认为此三个区域可能存在抑制淋巴瘤形成的抑癌基因。

## 8 结语

MSDNA作为优秀的遗传学标志,广泛地用于基因定位、基因作图、种群研究、个体识别,并成为肿瘤、遗传疾病研究的一条新思路。目前,其检测方法已成熟,并具有实践意义,但尚有一些问题,例如 MSDNA异常产生的确切机制,在研究中如何选择

恰当的位点等,仍有待进一步探讨。

## 参考文献:

- [1] Amirhaeri S, Wohlrab F, Wells RD. Differential effects of simple repeating DNA sequences on gene expression from the SV40 early promoter [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(7): 3313-3319.
- [2] Schlotterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(2): 211-215.
- [3] Arzimanoglou II, Gilbert F, Barber HR. Microsatellite instability in human solid tumors [J]. *Cancer*, 1998, 82(10): 1808-1820.
- [4] Karran P. Microsatellite instability and DNA mismatch repair in human cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 1996, 7(1): 15-24.
- [5] Okuda T, Nishizawa K, Ejima Y, et al. The effects of static magnetic fields and X-rays on instability of microsatellite repetitive sequences [J]. *J Radiat Res*, 1998, 39(4): 279-287.
- [6] Weinberg HS, Nevo E, Korol A, et al. Molecular changes in the offspring of liquidators who emigrated to Israel from the chernobyl disaster area [J]. *Environ Health Perspect*, 1997, 105(suppl 6): 1479-1481.
- [7] Satoh C, Takahashi N, Asakawa J, et al. Genetic analysis of children of atomic bomb survivors [J]. *Environ Health Perspect*, 1996, 104(Suppl 3): 511-519.
- [8] Rithidech KN, Dunn JJ, Gordon CR, et al. Evidence for an uncommon microsatellite instability on mouse chromosomes 2 and 4 and its possible role in radiation leukemogenesis [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 1997, 23(1): 99-109.
- [9] Cleary HJ, Wright E, Plumb M. Specificity of loss of heterozygosity in radiation-induced mouse myeloid and lymphoid leukaemias [J]. *Int J Radiat Biol*, 1999, 75(10): 1223-1230.
- [10] Silver A, Moody J, Dunford R, et al. Molecular mapping of chromosome 2 deletions in murine radiation-induced AML localizes a putative tumor suppressor gene to a 1.0 cM region homologous to human chromosome segment 11p11-12 [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999, 24(2): 95-104.
- [11] Herranz M, Santos J, Perez de Castro I, et al. Instability of the D4Mit12 microsatellite marker in C57BL/6 $\times$ BALB/cJF<sub>1</sub> hybrid mice is independent of the tumor phenotype [J]. *Cytogene Cell Genet*, 1997, 78(3-4): 221-223.
- [12] Okumoto M, Park YG, Song CW, et al. Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 4, 12 and 19 in radiation-induced lymphomas in mice [J]. *Cancer Lett*, 1999, 135(2): 223-228.

# Microsatellite DNA and its application prospect in radiation field

SHI Shuang

(Department of Radiation Medicine, Beijing University, Beijing 100083, China)

**Abstract** Microsatellite DNA is the main part of repeat sequence in eukaryotic genome. Ubiquitous distribution, high polymorphism, low spontaneous mutation and easy for detection, all these characters make it an ideal genetic marker for gene localization, gene mapping, population study, individual identification, etc. Besides, it also closely correlates with some tumors and genetic disorders. In radiation field, microsatellite DNA has also been widely used in detecting ionizing radiation induced mutagenesis, teratogenesis and carcinogenesis.

**Key words** microsatellite DNA; ionizing radiation

文章编号: 1001-098X(2000)05-0234-03

## 造血干细胞“归巢”机制的探讨

姜福全

(第二军医大学放射医学教研室, 上海 200043)

**摘要:** 近年来, 诸如骨髓、外周血、脐血等多种来源的造血干细胞(HSC)移植在临床上日益广泛地开展起来, 同时关于干细胞归巢机制的研究也有所进展。造血干细胞的归巢是一个多步骤过程。经研究发现, 在归巢中涉及了干细胞表面和造血微环境中的一系列分子与细胞因子。本文综述了其中一些研究较多的分子与因子, 并对今后的研究提出了自己的看法。

**关键词:** 造血干细胞; 归巢

中图分类号: R331.2

文献标识码: A

目前常用的移植方法是从外周静脉输注造血干细胞(HSC), HSC随血液循环, 最初出现在包括骨髓、脾、肝、肺、甲状腺等多个器官, 而后特异性地停留在骨髓(鼠类还有脾)中, 这一过程称为“归巢”。目前认为, HSC的“归巢”经历了一系列过程: ① HSC与骨髓微血管内皮结合; ② 结合的HSC通过内皮进入血管外; ③ HSC与骨髓微环境中的基质细胞结合<sup>[1]</sup>。

许多研究者针对HSC“归巢”中要通过内皮细胞屏障这一过程进行了研究。Shirota等将小鼠全身照射100~200cGy剂量, 然后在电子显微镜下研究小鼠骨髓内的变化, 主要发现内皮细胞的浆膜出现分离和脱落, 尤其是在其靠近血管腔的一面; 另外内皮细胞肿胀, 核周空间的扩大也反映了内皮细胞屏障的破坏; 并且发现在低剂量照射的时候这些变化是可逆的, 在1~2周内恢复; 而大剂量照射就使骨

髓与血液屏障受到的破坏不能被修复<sup>[2]</sup>。Hendrikx等将纯化的干细胞用荧光染料PKH-26标记后分别移植给经致死量(1000cGy)照射的小鼠和未照射的小鼠, 结果发现干细胞在未照射小鼠中的“归巢”数目比照射小鼠高2.5倍<sup>[3]</sup>。Stewart等用50~100cGy剂量预处理小鼠后, 再移植 $10 \times 10^6 \sim 40 \times 10^6$ 个骨髓细胞, 可达到40%~100%的嵌合率, 其原因是100cGy的照射仅对干细胞有毒性, 而对骨髓中其他成份无毒性, 因而对宿主和供者干细胞的比较起到了调节作用, 从而证明了低剂量照射对于提高移植效率是有益的<sup>[4]</sup>。

正常成人由骨髓造血, 骨髓中的HSC存在于“龛位”中, 龛位由成纤维细胞、脂肪细胞、巨噬细胞等多种基质细胞构成, 骨髓中的这些基质细胞合成、分泌大量的细胞外基质分子, 包括胶原蛋白I、II、III、IV型, 各种糖蛋白如纤维结合素、层粘连蛋白、血小板凝血酶敏感蛋白等, 各种粘多糖如透明质酸、软骨素衍生物和硫酸乙酰肝素等。这些基质细胞和这些特异的骨髓细胞外基质构成了造血微环境, 这对造血干细胞的生存、增殖起重要作用<sup>[5]</sup>。

首先, 体外实验尤其是骨髓细胞长期体外培养

收稿日期: 2000-04-06

作者简介: 姜福全(1978-), 男, 山东烟台人, 第二军医大学硕士研究生。

基金项目: 国家自然科学基金项目(39770329)

审校者: 第二军医大学放射医学教研室 项莺松