

# GPA基因位点突变分析在辐射生物学中的应用潜势

中国医学科学院放射医学研究所 李艳红综述 王知权 肖佩新\*审

**提 要:** 利用单克隆抗体和流式细胞仪检测血型糖蛋白A (glycophorin A) 基因位点突变的新方法, 为人类体细胞突变的定量分析提供了一个快速、灵敏、可靠的实验体系。对接受过综合化疗或放疗的肿瘤病患者和对40多年前广岛原爆幸存者的研究表明: GPA基因位点突变频率的增高与线性剂量反应相一致。从而提示, GPA基因位点突变分析系统有可能作为对慢性小剂量照射累积的生物剂量计。

## 一、引 言

随着科学技术的进步, 核能和核技术在工业、农业、医学中的应用日益广泛, 受到附加低剂量辐射的人群则越来越多, 如何有效地评价慢性辐射的累积生物效应已显得日臻重要。由于通常采用的回顾性调查和物理模拟方法在估算慢性辐射剂量中的局限性, 人们一直在寻找一个较灵敏的生物剂量计。目前, 有可能作为辐射生物剂量计的是: 染色体稳定性畸变的检测<sup>[1, 2]</sup>和特殊基因位点突变分析<sup>[3, 4]</sup>; 尤其是最近综合利用单克隆抗体标记和流式细胞仪检测而建立起来的血型糖蛋白A位点(GPA)突变分析方法, 突出地在这一方面显示了其应用潜势。

## 二、GPA突变分析系统

### 1. GPA的一般生物学特性

GPA是人类红细胞表面上一种最主要的, 也是结构了解得最清楚的血型糖蛋白, 在每个人红细胞上大约有 $5 \times 10^5$ 个拷贝<sup>[5, 6]</sup>。GPA分子由一个共显性表达的多态等位基因编码, 此基因定位在人类第4号染色体上的4q<sup>28</sup>-q<sup>31</sup>区<sup>[7]</sup>。除少数几个不常见的变异体外<sup>[8]</sup>, GPA分子主要以GPA(M)和GPA(N)两种等位形式存在, 二者的

差别仅在于整个多肽链中N端的第1和第5位上氨基酸不同, 前者在第1和第5位上分别为丝氨酸和甘氨酸, 而后者则分别为亮氨酸和谷氨酸<sup>[9, 10]</sup>。GPA的这两种主要形式决定着MN血型系统。人类中, 大约有50%的人在此位点是杂合的<sup>[11]</sup>。

### 2. 检测GPA突变的1W1和2W2系统

由Langlois和Bigbee等<sup>[7]</sup>最近建立起来的GPA突变分析方法, 包括1W1和2W2两个检测系统; 突出的特点之一是GPA单克隆抗体的使用。有关GPA单克隆抗体的研究已有过许多报道<sup>[12~17]</sup>。表1列出了1W1和2W2两系统所选用的单克隆抗体及检出的变异体。其中1W1检测系统选用一种对GPA(M)特异的MoAb-6A7和另一种能均等地与GPA(M)和GPA(N)结合的MoAb-10F7; 2W2系统中选用了2种分别对GPA(M)和GPA(N)特异的单克隆抗体MoAb-NN3和MoAb-9A3。由于所选用的抗体具有不同的特异性, 因此不同表型的红细胞经固定后将会与相应的荧光抗体结合而具有不同的标记特征, 被标记的红细胞从流式细胞仪喷嘴口喷出时与激光束相遇便释放出特征性荧光和散射光讯号, 根据细胞与激光相遇所产生的光讯号的不同, 流式细胞仪即可将少数变异体从正常MN细胞中分选开来<sup>[12]</sup>。

\*: 河北省放射卫生研究所

依据以上原理, 使用1W1和2W2系统可检出NO、NN、MO和MM四种变异体。

表. 1W1和2W2两系统所选用抗体及检出的变异体

系 统	抗 体	抗体特异性	荧光标记	荧光讯号	检出的变异体及荧光讯号的强度			
1W1	6A7	对GPA (M)	B-AVTR	红	NO	失去>90%	NN	失去>90%
	10F7	对GPA (MN)	FITC	绿		正常的1/2 ( $\pm 30\%$ )		正常 ( $\pm 30\%$ )
2W2	NN3	对GPA (N)	B-AVTR	红	MO	失去>90%	MM	失去>90%
	9A3	对GPA (M)	FITC	绿		正常 ( $\pm 30\%$ )		正常的2倍 ( $\pm 30\%$ )

选择GPA位点作为检测体细胞突变的指标, 有其独到的优点: ①GPA基因位于常染色体上, 是共显性表达的, 因此每个等位基因的表达缺失都能够独立地进行检测, 并使我们能够分辨那些将会同时对两个等位基因产生影响的非GPA位点突变(蛋白质转运或转运前修饰等)和一些非遗传性影响[7]。②发生在GPA位点上的突变在选择上可能是中性突变(neutral mutation), 因为, 这个蛋白质似乎没有必不可少的功能, 那些被确认在红细胞膜上完全缺乏GPA的个体, 其红细胞的寿命和功能并不受到明显的影响[7]。由于选择上的中性, 所测得的突变频率可以较真实地反映过去所发生的突变。③GPA基因的表达在正常个体以及同一个体的不同细胞中非常稳定, 其间的差别小于10%[7]。此外, 由于正常MN血型红细胞上GPA(M)和GPA(N)几乎均等地各占50%, 因而可以很方便地使用正常NN、M-M和MN血型人的红细胞作为检测变异体的参照标准。

### 三、GPA突变分析系统在医学和放射生物学研究中的应用

Langlois等[7]应用GPA突变分析系统, 对二组肿瘤病患者进行了研究, 一组是在未接受任何治疗之前进行检测, 另一组则在接受了至少9周(平均20周)的综合化疗

或放疗之后进行。研究结果表明: 未接受治疗的患者其GPA位点的突变频率与正常者无甚差异, 但接受治疗后, 患者GPA位点的突变频率增高2~4倍, 并且差异显著, 作Mann-whitney测试 $P < 0.001$ 。以上结果也与从次黄嘌呤转磷酸核糖基酶分析系统所得的结果相吻合[3、4]。另外, 在治疗过程中或治疗后立即取样以及在治疗完成后12~16周取样都观察到患者血液中红细胞变异体发生的频率出现增高; 在治疗过程中因接受致突性化学药物和放射线作用而增加的GPA位点突变频率能够长期保存。事实上, 许多报道表明: 接受过综合化疗或放疗的肿瘤病患者, 发生继发性癌症的危险度增高[18、19], 其中最明显的是白血病的发生。据Curtis等[20]大规模的研究表明: 因治疗因素诱发白血病的危险度增高2~5倍, 这个数值与GPA位点突变频率的增高相一致。可见, GPA突变频率的增高与患癌症危险度的增高也有相关性。

最近, 日本的Nakamura和Akiyama等[21]利用GPA位点突变分析系统, 对广岛原爆幸存者作了分析。实验对象分为两组: 受照组43人, 根据T65DR\*受照剂量为14~884cGy (1cGy = 1rad); 对照组为20人, 受照剂量小于1cGy。研究表明: 对照组中NO、MO、MM变异体的频率都较低, 平均变化范围为 $(7 \sim 15) \times 10^{-6}$ , 此值与以前

\*指广岛和长崎原子弹受害幸存者1965年估算的暂定照射剂量。

在正常人中测得的GPA突变频率 $VF = (9 \sim 21) \times 10^{-6}$ 相符;在受照组中,NO、MO、MM变异体的频率从正常水平到 $1312 \times 10^{-6}$ ,变化幅度很宽。用每个受照者的T65-DR剂量估算值来确定辐射剂量与所观察到的GPA突变频率(VF)之间的关系,按照Brown和Mood所提出的中值检验表明,随着剂量的增加,VF的中值也增加。大多数供血者的VF与线性剂量反应相一致,并符合 $V_s = a + bD$ 的模式方程。Nakamura等还进一步将供试对象分为14~62, 69~174, 180~359和367~884cGy四个不同的剂量组,依据各组的平均VF和剂量区间分析,线性回归给出的适宜参数是 $a = 15 \times 10^{-6}$ ,  $b = 0.22 \times 10^{-6}/cGy$ , 相关系数 $r = 0.99$ , 分组的资料与线性回归高度吻合。利用动物模拟实验, Nakamura等还研究了急性照射对于干细胞池大小的影响,并圆满地解释了少数大剂量受照者的VF明显偏离线性回归是由于大剂量急性辐射使干细胞池中存活细胞数目剧减而引起的统计波动所致。

#### 四、GPA突变分析系统的应用前景

尽管广岛原子弹爆炸距今已40余年,但在原爆幸存者中仍然观察到GPA位点突变频率的增高与线性剂量反应相一致。这进一步证明了辐射引起红细胞样前体细胞GPA位点的突变,并通过遗传机制而长期保存。另外,在肿瘤病患者和广岛原爆幸存者中所观察到的GPA位点突变频率的增高与表示机体遗传损伤效应和健康危险度增加的其它指标(如染色体畸变等)的结果也是相互印证的。有理由认为,GPA位点突变是一个能较真实地反映机体遭受辐射损伤程度的指标,而且这一分析系统将有希望作为一种新的生物剂量计。

作为一个辐射生物剂量计,GPA突变分析系统具有许多优点:

1. 灵敏。对1W1和2W2检测系统中选用

的几种单克隆抗体的Scatchard分析表明,抗体与红细胞表面GPA抗原的结合常数几乎达 $10^9 M^{-1}$ ,而且结合量呈线性关系<sup>[5,6]</sup>。单克隆抗体的高度特异性、亲和性以及抗原决定基位置各异的单克隆抗体的结合使用,使GPA突变分析系统的检测范围相当宽,不仅能检出单个碱基变换,小的嵌入或缺失,甚至能检出大片段或整个基因的丢失等。如1W1检测系统中MoAb-3A7的抗原决定基在GPA分子的N末端,而MoAb-10F7的抗原决定基位于GPA分子的中部,可以肯定,在1W1系统中所检出的NO变异体缺失了GPA分子的大部分,甚至是全部<sup>[7]</sup>。

2. 快速。应用MoAb和流式细胞仪分析GPA位点突变是一种十分快速的方法。根据Jensen<sup>[22]</sup>的估计,M位点的自发突变频率为 $8 \times 10^{-6}$ ,对每一个体检测 $10^6$ 个红细胞即足以用于定量分析,而流式细胞仪每秒钟一般能分析1000~2000个细胞,因此每分析一个样品只需要约15~30分钟。

3. 采样方便。利用外周血作为检测样品,既方便又易获得,很适宜做群体分析。

4. 稳定性好,重复性高。这是GPA突变分析系统的另一个优点。

当然,GPA突变分析系统也有其局限性,因为GPA是在红细胞样前体细胞上表达的,一个突变损伤必须在早期前体细胞上被固定,最后变异体还必须能够增殖和分化,这就使这一分析系统只能检测有稳定表型变化的变异体,并且只实用于MN血型者。另外,在确定各供血者的受照史和健康危险度时,其有效性还有赖于在数目有限的干细胞池中极少数突变被记载的精确性(即受统计波动的影响)。但尽管有以上限制,GPA突变分析系统仍不失为一种有希望的生物剂量计。Nakamura等<sup>[21]</sup>认为,此方法尤其实用于检测由慢性低剂量照射所引起的突变。因为此类辐射对正常干细胞池大小的干扰程

(下转封三)

几乎不成问题。

【朱锡霖摘 林汉校】

060  $^{99m}\text{Tc}$ -高锝酸盐(裂变 $^{99}\text{Mo}$ 发生器产品)制剂中放射性核杂质对不同年龄组的辐射剂量〔英〕/Nagaratnam A...//Eur Nucl Med.—1988, 14(7/8).—331~6

放射性药物中的放射性核杂质不能提供任何诊断信息,却可增加对病人的辐射剂量。本文列出了来自 $\text{No}\beta\text{ke}$ 和Elsasser与来自ICRP工作组报告草案关于 $^{99m}\text{Tc}$ -高锝酸盐对不同年龄组(1、5、10、15岁及成人)的剂量表 and 不同核杂质对不同年龄组的作用表。这些核杂质又是根据欧洲药典上规定的 $^{99}\text{Mo}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{103}\text{Ru}$ 、 $^{89}\text{Sr}$ 和 $^{90}\text{Sr}$ 的最大允许量进行选择,此外在最大规定水平上还选择了 $^{110m}\text{Ag}$

作为 $\beta$ - $\gamma$ 发射体、 $^{239}\text{Pu}$ 作为 $\alpha$ 发射体。

由于ICRP工作组针对人进行研究,而 $\text{No}\beta\text{ke}$ 大部分研究对象是动物,故前者更可靠。

结果表明,最大允许量条件下的放射性核杂质的总作用相当于 $^{99m}\text{Tc}$ -高锝酸盐剂量的30%左右,这个值随着年龄的增大略微增加。

此外,特殊器官如肝脏、肾脏可接受 $^{99m}\text{Tc}$ 剂量的3~4倍和1~3倍,骨表面剂量从1岁的25%增加到成人的200%,肾上腺60%,肺、大肠和胰腺40%左右,甲状腺与胸腺各30%、睾丸25%~40%、卵巢和红骨髓各25%。 $^{131}\text{I}$ 主要集中在甲状腺,其它器官主要为 $^{110m}\text{Ag}$ 、 $^{99}\text{Mo}$ 和 $^{239}\text{Pu}$ 。

文章最后指出,应该考虑将杂质的有效当量剂量限制在 $^{99m}\text{Tc}$ -高锝酸盐本身的10%。

【胡可可摘 夏振民校】

(上接第116页)

度低,因而统计波动的影响不大。

GPA位点突变分析系统除了有希望作为慢性照射的生物剂量计应用于评价医用X线工作者、放射性厂矿的工人、核医学及放射诊断病人的健康危险度外,还可以广泛用于检出和分析发生在GPA位点上的各种不同的变异,对探讨突变机理有一定的意义。此外,其工作原理还可推广应用于检测发生了化学或酶学改变的变异细胞。

### 参 考 文 献

- 1). 阿波章夫(日): 中华放射医学与防护杂志 1987, 7(5): 315—319
- 2). Littlefield LG, et al; Applitions and Limitation of Cytogenetic Evaluations As an Index of Recent or Previous Radiation Exposures. From Radiation Emergency Assistant Center Oak Ridge
- 3). Albertini RJ, et al; Nature 1985, 316: 369-371
- 4). Janatipour M, et al; Mutat Res 1988, 198: 221-226
- 5). Langlois RG, et al; J Immun 1985, 134: 4009-4019
- 6). Mole RH, Br J Radiol 1975, 48: 157-169

- 7). Langlois RG, et al; Hum Genet 1986, 74: 353-362
- 8). Blumenfeld OO, et al; Biochem Genet 1983, 21: 333
- 9). Blumenfeld OO, Acdamy AM, Proc Natl Acad Sci USA 1978, 75: 2727
- 10). Furthmayr H, Nature 1978, 271: 419
- 11). Race RR, Sanger R; Blood Groups in Man. 6th eds. Lackwell Oxford. 1975, PP92-138
- 12). Bigbee WL et al; J Immun 1984, 133: 3149-3155
- 13). Anstee DJ, and Edwards PAM, Eur J Immun 1982, 12: 228-232
- 14). Barsoum AL, et al; Hybridoma 1982, 1: 198
- 15). Fraser RH, et al; J Immunogenet 1982, 9: 295
- 16). Ochiai Y, et al; J Immun 1983, 131: 864-868
- 17). Bigbee WL, et al; Molecular Immun 1983, 20: 1353-1363
- 18). Collman CA Jr; Cancer Treat Res 1982, 5: 61-108
- 19). Schmahl D, et al; Cancer Treat Rev 1982, 9: 167-194

20). Curtis RE, et al, J Natl Cancer Inst

1984, 72 : 513-544

21). Nakamura Nori, et al, Science 1987,

236 : 445-448

22). Kyoizumi Seishi, et al, 1986, RERF RP

14-85

## 启 事

本刊自1977年7月创刊至今年第四期将满50期, 历时整整12年。在这12年里, 承蒙广大读者的大力支持, 得以使本刊顺利完成了编辑出版工作。在此, 谨向广大读者表示衷心的感谢, 并致以崇高的敬意!

为了纪念50期的编辑出版, 现决定将今年的第四、五期合刊作为纪念专辑。出版日期: 9月10日, 定价: 1.60元。

特此敬告。

本刊编辑部

## 国外医学

GUO WAI YI XUE

放射医学  
核医学分册

(双月刊)

一九八九年 第十三卷 第三期

一九八九年五月出版

编 辑: 《国外医学放射医学核医学分册》

编 辑 部

出 版: 中 国 医 学 科 学 院

放 射 医 学 研 究 所

印 刷: 天 津 新 华 印 刷 二 厂

总发行处: 天 津 市 邮 局

订 阅 处: 全 国 各 地 邮 局

期刊代号 6—102

统一刊号 CN 12—1083

每册定价 0.80元