

体细胞HPRT基因位点突变在电离辐射 研究中的应用潜势

中国医学科学院放射医学研究所 王玉书 李艳红 综述 王继先审

提 要: 体细胞次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)基因位点是一个对电离辐射变化非常敏感的位点。本文简要介绍了该基因位点的几种检测方法、与电离辐射剂量间的关系、突变的基因位点持续存在的时间以及在电离辐射研究中的发展前景。

一、引 言

早在60年前,第一次发现X线时,Muller就提出:X射线也许诱发单个基因和/或多基因(包括染色体)突变。后来,人们研究证实,除有少数的化学诱变剂诱发单基因突变外,绝大多数突变剂(包括电离辐射)同时诱发单基因和多基因突变。高剂量作用以多基因突变为主,而在低剂量范围内却以单基因突变为主^[1]。然而,在探讨电离辐射所致人体遗传学损伤的机理以及损伤后的远期效应评价中,染色体只能反映本身可见的基因组损伤。因此,有必要探讨电离辐射引起单基因损伤的检测方法的应用潜势。在单基因突变的研究中,HPRT基因位点是一

个经典的基因位点。虽然最近有通过检测红细胞表面GPA位点的缺失进行体细胞突变研究的新报道,但红细胞成熟后丧失DNA物质,无法进一步分析突变细胞的特性^[2]。因此,探讨可确定突变特性及其来源的HPRT基因位点突变在电离辐射效应研究中的应用是非常必要的。

二、HPRT基因的一般生物学特性

人和啮齿类细胞的HPRT基因位于X染色体上,该基因在两性细胞中均呈半合子状态(单倍性),其基因产物为次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶,它由2~4个蛋白亚单位组成。此酶特异性不强,可把嘌呤类似物(如6-TG、8-AG等)掺入到DNA中引

-
- | | |
|--|--|
| 1971, 231:154 | 19. Lloyd DC, et al; In J Radiat Biol 1975, 28:75 |
| 15. United Nations; Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation(United Nations Publication Sales No. E. 88. IX. 7, See Annex G) New York, 1988. | 20. Bender MA, et al; Cytogenetics 1969, 8:241 |
| 16. Evans HJ, et al; Mutat Res 1975, 31:135 | 21. Brewen JG, et al; Radiat Res 1972, 49:647 |
| 17. 周焕庚,等; 人类染色体 科学出版社, 1987, P364 | 22. 白玉书,等; 辐射防护 1984, 4:122 |
| 18. Dufraim RJ, et al; The Medical Basis for Radiation Accident Preparedness, Elsevier, North Holland Inc 1980, P357 | 23. 白玉书,等; 遗传学报 1987, 14:149 |
| | 24. IAEA. Summary Report on the Post-Accident Review Meeting on the Chernobyl Accident Safety Series No. 75-INSAG-1. Vienna, 1986. |
| | 25. Dolphin GW, et al; Health Phys 1973, 25:7 |

起细胞死亡。并且,随着嘌呤类似物浓度的增加,死亡的细胞也随之增加^[3、4]。当H-PRT基因发生突变时,突变细胞对嘌呤类似物不再敏感,表现出抗性;在有嘌呤类似物存在的条件下,突变细胞能够生存而野生型细胞却因摄取嘌呤类似物而死亡。然而,当嘌呤类似物浓度过低时,突变细胞出现的频率变化不稳定。Evans等^[5]用放射自显影方法比较了8-AG和6-TG在不同浓度下,淋巴细胞抗8-AG和6-TG的变异频率。结果表明,随嘌呤化合物浓度增加,淋巴细胞抗8-AG和6-TG的变异频率不断减少,当浓度为 $2 \times 10^{-4} \sim 2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时,其变异频率处于稳定状态,剂量效应曲线呈现“坪值”。Alexander^[6]用T细胞克隆法分析了两个个体在6-TG不同浓度条件下,抗6-TG(TG^r)突变细胞的频率,结果同Evans等^[5]的相似,只是6-TG浓度为 $2 \mu\text{g/ml}$ 时,“坪值”就已出现。因此证明,6-TG只有在一定浓度范围内,抗6-TG淋巴细胞的自然突变频率才是稳定的。

HPRT基因位点的突变频率与性别无关。但在不同的年龄组之间,突变频率却有差异^[7~9]。在同一年龄组中,吸烟者的HPRT基因位点突变频率明显高于不吸烟者^[9]。由此看来,HPRT基因位点对环境变化非常敏感。

三、检测体细胞HPRT基因位点突变的方法

1. 放射自显影法:把³H标记的脱氧胸腺嘧啶核苷掺入到淋巴细胞DNA中,经过短期培养来检测抗嘌呤类似物的突变细胞的方法^[10]。正常成人抗6-TG淋巴细胞的变异频率的数量级为 $10^{-6} \sim 10^{-5}$ 。此法简单、耗资少,并有潜在自动化的可能,但不能确定突变细胞的来源,并有拟表现型出现,使变异频率偏高。后经Albertini对方法进行了改进,去除了拟表现型,但改进的方法在检测人类突变反应中没有得到普遍应用^[11、12]。

最近,Albertini等又将原始的放射自显影方法改进为稀释-放射自显影方法。此方法更简单,无需考虑体外标记中6-TG致死的淋巴细胞数^[7]。

2. 克隆检测法:其中包括T淋巴细胞克隆法和B淋巴细胞克隆法等。该法①可确定发生突变的体细胞^[13、14];②可获得稳定的HPRT⁻的表现型以及结构改变的HPRT基因;③检测结果准确,可用来校准放射自显影方法的检测结果。但是,该法复杂,操作条件和技术要求高,实验耗资较多。

用T淋巴细胞克隆法测定的正常成人抗6-TG T淋巴细胞的突变频率的数量级与放射自显影方法相同。而B淋巴细胞克隆法比T淋巴细胞克隆法灵敏。在健康成人中,抗6-TG B淋巴细胞的突变频率为 $(8.6 \sim 13.1) \times 10^{-6}$,比T淋巴细胞克隆法高2~3倍。但此法用血较多,近100ml外周血才能获得1~2个自然突变的B淋巴细胞集落^[15]。

3. 多核细胞检测法:通过细胞松弛素B的作用,体外短期培养的HPRT⁻的淋巴细胞出现多核的一种方法。此法兼具了以上两种方法的优点:简单、快速、灵敏,检出率是以上两种方法的2~3倍。不足之处是无法分析HPRT⁻的基因成份和结构^[8]。

四、HPRT基因与电离辐射之间的关系

电离辐射引起HPRT基因突变。辐射导致细胞单一死亡的发生率和单一基因突变的发生率之间的定量关系表达方式是:存活细胞减少时,活细胞的突变频率增加。高LET- α 粒子与低LET-X线相比,如果细胞死亡数一定,则前者HPRT基因的突变频率明显高于后者^[16]。

1. HPRT基因的突变频率与电离辐射剂量之间的关系

Evans等^[5]分析了经X线照射剂量在0~2 Gy之间的T淋巴细胞抗8-AG的突变频率。实验结果表明,剂量效应关系方程式为

$y = \alpha + \beta d^n$, 其中, $n = 2$, $\alpha = (6.90 \pm 0.11) \times 10^{-4}$, $\beta = (6.81 \pm 0.20) \times 10^{-4}$, 剂量效应关系接近平方关系。Cox^[17]和 de Ruijter^[18]报告的X线诱发的人成纤维细胞抗6-TG和抗8-AG的突变频率与剂量间的效应关系与其相似: 剂量为0.5Gy时, 突变频率是自发突变水平的2倍; 到2Gy时, 突变频率高达4或6倍。Albertini对27例经放射免疫治疗的病人T淋巴细胞的分析结果也表明: 22例病人中, HPRT基因的突变频率是增加的, 并随剂量的增加而增加。

2. 突变的HPRT基因长期存在

电离辐射引起HPRT基因突变的发生不是由于转录被阻断, 而是真正的突变, 产生的突变是不可逆的。这是电离辐射引起较大的基因损伤所致^[4, 19]。由于这种不可逆性, 使得HPRT基因突变长期存在体内。Hakoda等^[20]用T淋巴细胞克隆法分析了DS₈₀估计值 $D > 0.01$ Gy的30名日本原爆40年后的幸存者和17名 $D < 0.01$ Gy的对照者的HPRT基因突变频率。结果表明: 17名对照者的T淋巴细胞的突变频率为 3.4×10^{-6} , 范围为 $(1.3 \sim 9.3) \times 10^{-6}$, 30名幸存者的突变频率为 5.2×10^{-6} , 范围为 $(0.8 \sim 14.4) \times 10^{-6}$ 。对照组与幸存组经统计学检验分析得 $P < 0.05$, 两组之间有差异。其中的27名幸存者T淋巴细胞突变频率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 $r = 0.30$, $P < 0.05$ 。从结果来看, 在照后40年, 体细胞HPRT基因的突变频率仍能反映受照剂量。Bradley等^[9]在1988年的HPRT基因突变会议上报道了一个病例: 病人受急性照射50Gy, 其HPRT基因突变频率明显增高, 3年后, 其突变频率仍然是高的。

3. HPRT基因突变与染色体畸变的比较

Hakoda等^[20]同时分析了DS₈₀估计值 $D > 0.01$ Gy的原爆40年后27名幸存者外周血淋巴细胞的染色体畸变(包括稳定性畸变

和非稳定性畸变)和T淋巴细胞HPRT基因突变。结果表明, 两者之间存在着线性关系: 随染色体畸变增加, HPRT基因突变频率也增加, 关系式为 $y = 3.7 \pm 0.08X$ (y 为HPRT基因突变频率, X 为染色体畸变率)相关系数 $r = 0.34$, 统计学分析 $P < 0.05$ 。Evans等^[6]也比较了X线诱发的淋巴细胞抗8-AG的突变频率和染色体畸变(包括断片、着丝点环、双着丝点和移位)。结果表明, 随X线剂量增加, 染色体畸变和淋巴细胞抗8-AG的变异频率均增加, 两者的剂量效应动力学非常相似。

然而, 由HPRT基因本身的特点所决定, HPRT基因对电离辐射的灵敏度高于染色体。Norman等^[8]用检测多核细胞的方法, 分析了经⁶⁰Co γ 射线照射剂量在0~0.5Gy之间的健康成人外周血淋巴细胞, 抗6-TG的淋巴细胞可高达80个/1000个幸存淋巴细胞/Gy。Nakamura等^[21]的分析结果也证明了这一点。Muir等^[22]认为, 电离辐射引起的许多损伤在染色体上是见不到的。他用同步装置和G显带方法分析了HPRT基因突变的淋巴细胞克隆的可见核型改变: 在47个自发突变克隆、17个由X线诱发的突变克隆以及33个正常细胞克隆中, 只有一个由X线诱发的克隆中的X染色体 q_{23} 和 q_{24} 之间插有X染色体短臂基因成分。

五、HPRT基因突变检测在电离辐射效应研究中的应用前景

HPRT基因突变可望成为一种生物剂量计。可行的一面是: 检测方法简便、快速、灵敏, 对急性照射以及慢性小剂量长期照射均可分析; 不完善的一面是: 不同发展阶段的淋巴细胞受到电离辐射损伤后, 其HPRT基因突变存在的时间不同。只有发生在未分化淋巴细胞中的突变才能保存下来, 并出现不同的HPRT基因结构改变和重组。如果未分化的干细胞发生突变, 则突变存在的时间

更长,并可在突变细胞中检出相同的HPRT基因结构改变,没有不同的基因重组。但是,这种突变细胞较少;还有,由于细胞本身的动力学所致,部分突变细胞丢失^[20]。由于这些弊端,HPRT基因突变有时不能真正反映受照剂量,使得HPRT基因分析用于群体优于个体。

然而,HPRT基因突变分析在电离辐射研究中的应用仍有其潜势。目前,对HPRT基因的研究已进入分子水平,经特殊电泳分析,即可判断不同诱变剂所致的HPRT基因突变的特异损伤图谱,反过来,也可通过HPRT基因突变图谱,分析所致突变的诱变剂^[23]。再通过PCR(聚合酶连锁反应)技术对部分异常基因片段增殖、放大,从而进一步分析突变发生的机理^[9]。因此,在电离辐射损伤机理和遗传学效应方面,HPRT基因的研究填充了染色体、微核以及GPA的不足之处。

参 考 文 献

1. David MDM, et al; *Mutat Res* 1989, 220:11
2. Nakamura N, et al; *Science* 1987, 236:445
3. Elion GB; *Fedn Proc* 1967, 26:898
4. Nelson TA, et al; *Cancer Res* 1975, 35:2872
5. Evans HJ, et al; *Nature* 1981, 292:601
6. Alexander AM; *Nature* 1983, 302:155
7. Albertini RJ, et al; *Mutat Res* 1988, 204:481
8. Norman A, et al; *Mutat Res* 1988, 208:17
9. Albertini RJ, et al; *Mutat Res* 1989, 216:65
10. Strauss GH and Albertini RJ; *Mutat Res* 1979, 61:353
11. Albertini RJ, et al; *Human somatic cell mutation; in vivo variant lymphocyte frequencies determined by 6-thioguanine resistant lymphocytes*, in: Hook EB and Potter JH (Eds.), *Population and Biological Aspects of Human Mutation*, Academic Press, New York, p. 235
12. Amneus H, et al; *Mutat Res* 1982, 106:163
13. Albertini RJ, et al; *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1982a, 79:6617
14. Albertini RJ, et al; *Nature (London)* 1985, 316:369
15. Hakoda M, et al; *Mutat Res* 1989, 210:29
16. Adams GE, et al; *Br J Cancer* 1987, 15: Suppl (8):11
17. Cox RJ, et al; *Nature* 1978, 276:629
18. de Ruijter YCEM, et al; *Mutat Res* 1980, 69:325
19. Thacker J, et al; *Mutat Res* 1986, 160:267
20. Hakoda M, et al; *Mutat Res* 1988, 201:39
21. Nakamura N, et al; *Mutat Res* 1988, 201:65
22. Muir P, et al; *Mutat Res* 1988, 197:157
23. Jean LM; *Science* 1989, 243:737