

## · 综述与译文 ·

## AT细胞对电离辐射敏感原因的探讨

北京放射医学研究所 郭学青综述 夏寿莹 郑秀龙\*审

**摘 要:** AT细胞具有对电离辐射和拟辐射物质的高敏感性以及DNA合成抑制抗性, 存在复杂的基因异质性。本文从AT细胞的遗传学互补性分析、DNA损伤修复缺陷以及DNA拓扑酶学研究三方面对AT细胞辐射敏感性的分子机理等进行了讨论, 认为DNA双链修复缺陷与重接忠实性下降可能是AT细胞电离辐射敏感性的原因。

毛细血管扩张性共济失调 (Ataxia-telangiectasia, 简称AT) 是一种人类常染色体隐性遗传病, 发病率约为1/40 000 [1]。其主要临床症状为: 进行性小脑性运动失调, 静脉毛细血管扩张,  $\alpha$ -胎盘球蛋白增高, 糖耐量降低, 内分泌异常, 早衰, 多种免疫功能缺陷, 易发淋巴网状细胞癌及其它实体瘤, 如乳腺癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌等。肿瘤的发病率约比正常人高84至167倍 [2]。其典型的细胞学特征是对电离辐射和拟辐射药物高度敏感。虽然AT发病率很低, 但携带AT基因杂合子的人却较为多见, 约占人群的1.4% [1], 这些人的细胞对电离辐射敏感程度介于AT细胞和正常细胞之间, 不表现AT的临床症状, 但易发癌症, 特别是乳腺癌。据Swift报道, 约有15%乳腺癌患者携带AT基因 [1]。由于这部分人对电离辐射敏感, 给肿瘤放疗造成了困难。

鉴于AT的以上特点, 对AT细胞分子生物学的深入研究将对阐明细胞电离辐射敏感性的分子基础, 探讨DNA修复的基因调控和修复忠实性, 进一步探讨免疫缺陷的原因和致突变机理, 都具有重要的理论和实际意义。

本文从AT细胞的遗传学互补分析, DNA损伤修复缺陷以及DNA拓扑酶学研究

三方面对AT细胞电离辐射敏感性的原因进行综述。

## 一、AT细胞遗传学互补分析

遗传学互补分析是研究突变细胞基因异质性的一个有效方法。根据属于不同互补组 (Complementary group) 的AT细胞融合后能够表现出不同辐射敏感性的现象, 可以证明AT的基因异质性。如果进一步利用微细胞介导的染色体转移技术 (micro-cell mediated chromosome transfer), 还可对AT基因进行定位和克隆。

在AT互补分析研究中, 由于其复杂多样的细胞学特性, 人们采用的互补分组标志不同 [3]。1977年, Paterson等首次对AT互补组的分析是依据某些AT成纤维细胞系, 在缺氧条件下受 $\gamma$ 射线照射后, DNA修复能力下降的特性进行的。他将AT细胞系分为“外切缺陷”和“能够外切”两组。Jaspers等以AT细胞对电离辐射所致DNA合成抑制的抗性作为互补分组标志, 将五株AT细胞分为三个互补组, 而Murnace以同样的标志将七株AT细胞分为四个互补组。Thacker等发现利用细胞辐射敏感性做互补分组标志和以辐射所致DNA合成抑制的抗性做标志的互补分析, 会得出不相关联的结

\*上海第二军医大学

果<sup>[4]</sup>。目前对AT互补组分析较为一致的看法是以AT细胞对电离辐射的敏感性做标志,将AT划分为A, C, D, E四个互补组,而B是A的一个变异组(Variant)<sup>[5]</sup>。

诸多AT细胞互补组的存在表明了AT基因的复杂性。在互补组分析中,辐射敏感性与DNA合成抑制抗性缺乏一致的变化,说明了呈显性特性的DNA合成抑制抗性与隐性特性的AT细胞辐射敏感性不是由一种基因所控制的。Lambert等<sup>[6]</sup>在AT-D组研究中,发现一条重组染色体可以互补AT-D组细胞五种性质:(1)电离辐射敏感性;(2)DNA合成抑制抗性;(3)电离辐射后细胞异常动力学;(4)AT细胞S期延长;(5)博来霉素诱导的染色体断裂增多。将此重组染色体转入AT-A组和AT-C组中,未发现任何互补作用,这说明不同互补组的AT基因存在差异。

目前对AT-A组AT基因的定位有了一些明确的看法,认为AT-A组的AT基因位于染色体11q22-23位点<sup>[7]</sup>。由于在这一区域中,不仅含有与免疫功能、神经功能相关的蛋白编码基因,如胸腺细胞膜标记基因(Thy-1),神经细胞粘连分子(N-CAM)基因,CD3-T细胞受体基因(CD3 $\delta$ , CD3 $\gamma$ 和D3 $\epsilon$ ),而且还存在两个染色体断点以及一些与非淋巴性白血病细胞中染色体转位相关的断裂位点。对于染色体11q22-23位点的进一步研究将对阐明AT患者易发神经功能缺陷、免疫缺陷和肿瘤有重要意义。

由于利用基因连锁方法研究AT基因定位既费时又需要大量AT患者家族,而微细胞介导的染色体转移技术为AT基因定位开辟了新的途径。Komatsu等将正常人11号染色体通过微细胞介导的染色体转移技术转入AT-D组细胞中,发现细胞恢复了正常的辐射敏感性,因此认为AT-D组的AT基因也位于11号染色体上。然而目前对AT-D组AT基因的定位仍有不同看法。Lambert等

<sup>[8]</sup>将多条人11号染色体重组体转入AT-D组中,未见对其有任何互补作用。但乐观的是,他们发现了一条可以互补AT-D组细胞五种性质的染色体重组体。对此染色体,目前仅了解到其含有人18号染色体片段,对其成分的鉴定还有待于进一步研究。

总之,对AT基因的定位将有助于对AT复杂表型原因的理解,有助于AT基因的定位和克隆,以及对电离辐射敏感性基础的认识。目前已经发现了一株V79仓鼠细胞突变株irs1,表现出与AT相似的X射线敏感性和DNA合成抑制抗性及高频染色体畸变,而且具有与AT相似的表现型,对此突变株的“类AT基因”的研究将促进对AT基因的了解<sup>[9]</sup>。

## 二、AT细胞的DNA修复缺陷

染色体DNA是电离辐射的靶分子。目前研究发现,一些对电离辐射敏感的突变细胞株存在着对辐射诱导的DNA断裂修复能力的缺陷,主要表现有两种形式:(1)DNA断裂修复能力降低,如仓鼠突变株xrs,大肠杆菌突变株rorA和recN,酵母突变株rad52等;(2)DNA断裂修复忠实性下降,如V79突变株irs1,大肠杆菌突变株rorB等。这些突变细胞对链断裂修复能力的缺陷程度与他们对X射线的敏感性密切相关<sup>[10]</sup>。

在对AT细胞DNA链断裂修复能力的研究中发现,虽然AT细胞能重接辐射诱导的DNA双链断裂,但染色体畸变率增高。因此,人们的兴趣集中到AT细胞DNA双链断裂重接修复的忠实性上。

Cox等首次利用基因转移技术,将带有限制性内切酶切口的质粒转入AT细胞中,发现AT细胞对转化质粒上双链断裂的重接修复正确率下降,AT的正确重接率为4%,而辐射敏感性正常的细胞MRC8C的正确率为75%<sup>[11]</sup>。其后,Cox等又构建了第二代载体pPM17,采用相互联结的双筛选

标记。实验结果支持了最初的结论,而且通过DNA杂交实验发现,大多数转化的质粒载体得到了重接,但在DNA链断裂点周围丢失了部分DNA序列<sup>[12]</sup>。Dehenhan等构造了第三代载体pPMH16(又称pPMH5V16),上面的两个标记基因gpt和neo可以独立地表达。用限制性内切酶KpnI在gpt基因中导入双链切口,再分别转入经SV40转化的AT细胞AT5BIVA和经SV40转化的辐射敏感性正常的细胞MRC5CV中,用G418筛选neo基因转化子,发现至少有 $55 \pm 6\%$  MRC5CV细胞转化子能正确重接质粒中的双链断裂,而AT5BIVA细胞转化子的正确重接率只有 $9 \pm 0.3\%$ <sup>[13]</sup>。

AT细胞对外源性质粒上双链断裂修复忠实性的下降意味着AT细胞对自身DNA损伤的修复可能也存在着同样的缺陷,这种缺陷导致了AT细胞对电离辐射的高度敏感和染色体畸变率的升高。

在AT病人的T细胞中,可以观察到由于基因错误重排引起的染色体易位: $t(x;14)$ ,  $t(7p;14q)$ ,  $t(1q;14q)$ ,  $7(14q;14q)$ ,  $inv(7)$ ,  $inv(11)$ 和 $t(7p;1q)$ 以及端粒二中心体的出现。在B细胞中存在 $t(2;13)(p11;q31)$ 染色体转位。在AT成纤维母细胞中出现端粒二中心体<sup>[14]</sup>。Smith等<sup>[15]</sup>认为,这些染色体畸变体的产生是由于DNA双链断裂的末端重接过程和核酸外切酶降解过程的失调造成的。这一失调过程不仅在辐射引起的DNA损伤修复中造成修复忠实性下降,导致细胞对电离辐射的高敏感性,而且在组织分化中引起基因重排错误,导致染色体转位,从而引起AT的一些临床症状,如神经功能衰退,免疫功能失调及易发肿瘤等。当然,对这一假说的证实还需要对AT细胞的DNA损伤修复机制的进一步研究。

### 三、拓扑酶的研究

目前在鼠淋巴瘤细胞L5178Y中发现,细胞对电离辐射的敏感性与细胞对拓扑酶Ⅱ(Topoisomerase Ⅱ, Topo Ⅱ)抑制剂的敏感性相关。在对X线敏感的仓鼠细胞突变系中,如xrs,可以观察到,由拓扑酶Ⅰ(Topoisomerase Ⅰ, Topo Ⅰ)抑制剂喜树碱(camptothecin, CPT)诱导的染色体畸变增高,并且这些细胞中广泛存在着DNA链断裂修复缺陷<sup>[17]</sup>。因此,研究AT细胞中拓扑酶(Topo)的变化及对Topo抑制剂的敏感性,对研究Topo在DNA损伤修复中的作用有重要意义。

在AT细胞中,Topo Ⅰ活性及由Topo Ⅰ抑制链断裂与正常细胞相比,并无显著变化,但AT细胞对CPT却异常敏感,其敏感性约为正常细胞的3~5倍<sup>[16]</sup>。而Topo Ⅱ的活性在不同组织和不同互补组中的变化大不相同;在AT病人淋巴细胞中,Topo Ⅱ活性比正常细胞约低10倍,但Topo Ⅱ的mRNA和酶蛋白含量不同;在AT成纤维细胞中,Topo Ⅱ含量和活性在整个细胞周期中比正常细胞均有显著提高,并且活性的增高与含量的增高一致;但所有AT细胞都对Topo Ⅱ抑制剂VP16(鬼臼乙叉苷)异常敏感<sup>[17]</sup>。

在拓扑酶作用过程中,会产生一类称为“可断裂复合物”的DNA拓扑酶的中间产物,拓扑酶抑制剂,如CPT,VP16,mAMSA(1'-9-吡啶氨基-甲磺酸-间-茴香胺)等,通过与这些拓扑酶复合物作用产生双链断裂而发挥细胞毒作用。如在噬菌体系统中,Topo Ⅱ抑制剂mAMSA引起的移码突变就涉及了可断裂复合物。可见,如果在细胞中存在依赖于“可断裂复合物”产生DNA双链断裂的途径,辐射损伤引起的DNA双链断裂重接的异常中间体,也就必然与对Topo抑制剂的敏感性有关<sup>[17]</sup>。Smith等认为,电离辐射引起的DNA损伤和拓扑酶抑制剂对细胞DNA的损伤作用在本质上可能

有共同点,某些诱发染色体辐射损伤的途径,也导致了细胞对拓扑酶抑制剂的敏感性<sup>[15]</sup>。因此,对AT细胞DNA拓扑酶学的研究将有助于对AT辐射敏感性原因的理解。

## 四、结 语

AT细胞对电离辐射高敏感性是目前AT细胞研究的热点之一。目前研究认为,AT细胞对电离辐射的高敏感性及AT多种临床症状可能与和Topo II相关的DNA链断裂修复缺陷相关。但有关这方面的证据还不充足,需对AT基因及DNA损伤修复机制等作进一步的研究。

## 参 考 文 献

- 1 Swift M. Am J Hum Genet, 1988; 39 (5): 573-583
- 2 Lenon N et al. Int J Cell Sci, 1989; 56 (5): 667-675
- 3 Chen FC et al. Mutat Res, 1984; 129 (2): 165-172
- 4 Thacker J et al. In: Alan R ed. Mechanism and Consequence of DNA Damage Processing, Liss Inc, 1988; 361-369
- 5 Jaspers NG et al. Cytogenet Cell Genet, 1988; 49: 259-263
- 6 Lambert C et al. In: Ionizing Radiation Damage to DNA; Molecular Aspects, Wiley-Liss Inc, 1990; 281-285
- 7 Richard AG et al. Nature, 1988; 336 (6199): 577-580
- 8 Komatsu K et al. Mutat Res, 1990; 235 (2): 59-63
- 9 Debenham PJ et al. J Cell Sci, 1988; 6 (Suppl): 177-189
- 10 Smith PJ. Int J Radiat Biol, 1990; 58(4): 553-559
- 11 Cox R et al. Br J Cancer, 1984; 49(Suppl 4): 67-72
- 12 Cox R et al. Mol Biol Med, 1986; 3(3): 229-244
- 13 Debenham PJ et al. Radiat Res, Vol 1, 8th IRRS, 1987; 437-442
- 14 Tayler AMR et al. Int J Radiat Biol, 1989; 56(5): 677-684
- 15 Smith PJ et al. Int J Radiat Biol, 1989; 55(2): 217-231
- 16 Davies SM et al. Nucleic Acids Res, 1989; 17: 1337-1351
- 17 Hickson ID et al. Int J Radiat Biol, 1990; 58(4): 561-563

## 荧光原位杂交技术在电离辐射剂量估算中的应用

中国医学科学院放射医学研究所 刘炳辰 王继光综述 肖佩新\*审

**摘 要:** 作为染色体畸变分析的新方法——荧光原位杂交技术,近几年开始在电离辐射研究领域中的应用,并显示了它所独有的特点和可行性。本文就这方面的有关问题,及电离辐射的剂量-效应研究中,生物剂量计的一般性问题进行了概述。

估算受电离辐射照射人员的剂量,对放射防护以及受照者的医学处理具有重要意义。荧光原位杂交技术是一种新的染色体畸变分析的方法,近几年,逐渐被运用到电离辐射的剂量-效应关系的研究。它具有其独特的优点,与其它几种现行的生物剂量计指

标相互补充,有可能建立一套较完善的电离辐射剂量-效应的估算系统。但由于这一技术刚刚开始应用,仍存在一些不足,这些问题将在实践中逐步得到解决。

### 一、生物剂量计的一般方法学进展

\* 河北省放射卫生研究所