

辐射致突变的分子机理研究概况

季守平 综述 章杨培 审校

北京放射医学研究所 北京 100850

电离辐射是最早发现也是最常见的致突剂,但人们对辐射致突分子机理的了解远不如化学诱变剂那么清楚。近年来,人们在电离辐射致突的研究系统和分子机理等方面都取得了长足的进步。

辐射致突已从中国仓鼠细胞系的离体研究发展到人和哺乳动物的多种细胞系,现已对人体内淋巴细胞和红细胞进行研究;并采用 Southern 印迹技术研究限制性片段长度多态性 (RFLP) 的改变,检出大片段缺失;应用 PCR 扩增和 DNA 测序技术检出 DNA 的点突变。现介绍几个基因位点的研究概况。

1. hprt 基因

hprt 基因为非必需基因,定位于 X 染色体。人和仓鼠的 hprt 基因组长度分别为 44 和 34Kb,都有 9 个外显子。用 6-TG 可筛选突变细胞。Southern 印迹能检出 500bp 以上的缺失。

分析此基因自发突变的细胞,发现 80%—90% 没有 RFLP 的改变,说明自发突变的主要形式是点突变。自发突变有以下几个特点: 1. 胎儿和成人的点突变位置及小片段缺失的断裂点位置都不同,说明两者突变的机理可能不同⁽¹⁾。2. 点突变中, G·C→A·T 的转换频率较高。部分点突变正好发生在剪切位点上,造成 hprt 基因的 mRNA 缺失整个外显子(一个或二个)或某个外显子的一部分⁽²⁾。3. 在人淋巴细胞中,59%的断裂点都位于 3' 端,估计断裂点的分布是非随机的。

辐射主要引起 hprt 基因的大片段损伤,点突变形式是次要的(表 1)。辐射引起的此基因突变有以下特点: 1. 不同的射线,其诱

变能力有所不同。Belli⁽³⁾等用 LET 相同的 α 粒子和质子分别照射 V79 细胞,发现质子的诱变作用比 α 粒子强。2. 同种射线,其剂量不同则突变形式也不同。Morgan⁽⁴⁾等用不同剂量的 γ 线照射 CHO 细胞,发现其缺失的比例不同。如,以 4Gy 的剂量照射时,70% 突变细胞的 hprt 基因完全缺失,而照射剂量为 2Gy 时,只有 43% 的基因完全缺失。3. 辐射诱发的基因内缺失的断裂点的分布可能是非随机的。Morgan 等分析了 15 个 CHO 突变细胞的基因内缺失,发现 12 个缺失的断裂点都分布在基因的 3' 端(外显子 4 和外显子 9)。4. 辐射引起的点突变分布可能是非随机的。Thacker⁽⁵⁾等发现,在 V79 细胞中,有 $\frac{1}{3}$ 的点突变都发生外显子 4 和外显子 5。

2. aprt 基因

aprt 基因为非必需基因,位于常染色体。仓鼠在 3p,人在 6q²⁴,基因组长度为 2.5Kb,有 5 个外显子。一般选择此基因的半合子或杂合子细胞进行辐射诱变分析。用 8-氮腺嘌呤筛选突变细胞。Southern 印迹能检出 25bp 以上的缺失。

80-90% 的 aprt 基因的自发突变都无 RFLP 改变。自发突变可能是非随机的。点突变的形式主要是 G·C→A·T 转换。利用 PCR 技术,de Jong 等发现,在 CHO 细胞中 90% 的突变都为碱基替换,其中 66% 都是 G·C→A·T 转换(无 A·T→G·C 的转换)。值得注意的是,23% 的 G·C→A·T 突变都发生在 UV 诱变的热点密码子 241 位置上。Phear 等的研究也证实 G·C→A·T 是自发突变的主要类型。据估计,高频的 G·C→A·T 突变可能是

由于 CpG 二核苷酸上的 C 很容易甲基化变为 5-mC, 而 5-mC 很容易自发地脱氨基变成 T, 在得不到修复的情况下, 很容易发生转换突变。aprt 基因的自发缺失一般发生在 5' 端, 3' 端以外部分没有发现缺失。通过顺序测定发现, aprt 的缺失末端非随机地分布在外显子 5 的 100bp 区域内, 可能是通过 2-7bp 的短的直接重复顺序进行非同源重组而造成缺失的。

电离辐射诱发的 aprt 基因突变能力较强 (见表 1), 其突变有以下特点: 1. 与 hpert 基因不同, 辐射诱变的 aprt 基因的 75—86% 无 RFLP 改变, 主要为点突变。2. 辐射诱变的碱基替换与自发突变有相似之处, 说明二者突变机理可能相似。3. 辐射诱发的小片段缺失频率与自发突变相同, 可能都是由剪切和错配引起的。但自发突变的小片段缺失主要发生在外显子 5, 辐射诱变主要集中在外显子 3, 说明二者突变的机理可能有所不同。4. 其移码突变的频率高于自发突变, 而且移码发生的位点也和自发突变不同。5. 与自发突变相比, 辐射诱变往往容易引起多位点的碱基替换, 这和电离辐射的多位点作用的结论是一致的。

3. TK 基因

TK 基因为非必需基因。定位人的 17q²³, 基因组全长 12.9Kb, 有 7 个外显子, 13 个 Alu 家族重复序列; 鼠定位于 ch11。一般以此基因的半合子或杂合子细胞作为致突材料。用 BUrd 或三氟胸腺嘧啶筛选突变细胞。突变细胞分为正常生长突变细胞 (NG) 和缓慢生长突变细胞 (SG) 两类。Southern 实验能检出 200bp 以上的缺失。

自发突变的人淋巴细胞系中, NG 细胞仅 20% 无 RFLP 改变, 而且缺失 SacI 带的频率很高。而在 SG 细胞, 只有 3% 的无 RFLP 改变, SacI 带的缺失频率高达 90%。这主要由等位基因的缺失引起的。在 33% 的 NG 缺

失和 51% 的 SG 缺失中, TK 基因旁边的 c-erb-A₁ 基因也随之缺失, 等位基因的缺失可能是由细胞的基因重组引起的⁽⁶⁾。

Applegate⁽⁷⁾ 等用 γ 线处理 L5178Y 鼠淋巴细胞 (TK 基因的杂合子), 发 TK 基因在广泛区域内发生等位缺失, 并伴随着 TK 的等位基因的复制。说明体细胞重组 (包括有丝分裂重组和基因转换) 机制可能与某些基因缺失有关。用 X 线、中子和氩离子照射实验也发现大部分基因都发生等位缺失, 而且其相邻的 c-erb-A₁ 大多随之丢失。

4. DFHR 基因

DHFR 基因为必需基因。定位于人的 ch5, 全长 30Kb, 6 个外显子。定位于中国仓鼠细胞的 ch2, 全长 25Kb, 也有 6 个外显子。在此基因的 5' 端在 DNaseI 敏感位点, 此位点的 CpG 均不甲基化, 其他 22Kb 都甲基化。用半合子或杂合子作为辐射诱变细胞,³H-UdR 筛选突变细胞。Southern 印迹能检出 100bp 以上的缺失。

在自发突变的细胞中, 其碱基替换都发生在外显子 5 的断裂位点上, 说明这些断裂位点可能是自发突变的热点。Urlaub 等分析了 11 个由 6Gy 的 γ 线诱变的细胞, 发现此基因都有 RFLP 的改变。8 个缺失长度为 35-200Kb (其中 2 个缺失在细胞学水平就可观察到染色体区带的缺失), 另 3 个突变的断裂点都位于 3' 端, 相当于转录的起始位点, 说明此基因的辐射诱变的非随机性。

5. HLA 基因群

位于人的 ch6p, 由 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C 三类基因组成, 总长度为 600Kb。通过特异的抗血清和单克隆抗体能检出此基因的缺失、移码和染色体重排。其中 HLA-A 有 7 个外显子, 长 5Kb, 最为常用。HLA-A 主要有 HLA-A₂ 和 HLA-A₃ 形式。

Morley 等⁽⁸⁾ 发现; 在 127 个自发突变的

细胞中, 61.4%无 RFLP 改变, 8.7%为缺失, 29.9%为有丝分裂重组, 没有发现基因转换和有丝分裂不分离现象。Janatipoar 等发现, 当 HLA-A 缺失时, HLA-B 也常常发生等位缺失。

HLA-A 对 X 线敏感, 基因突变频率最高。X 线诱变细胞中, HLA-A 的缺失高达 70%, 而且其中 14%的突变细胞的 HLA-B 也一起丢失。 γ 线诱发突变的人淋巴细胞中, HLA-A 的缺失还往往伴随着旁边的乙二醛酶 I 基因的缺失, 而且有的缺失在细胞水平就可以观察到。

6. 其它基因

在人和 CHO 杂交细胞系中, 含有人的 chl1, 编码细胞表面抗原 α_1 、 α_2 和 α_3 的基因及乳酸脱氢酶 A 基因。1-4Gy 的 γ 线照射能明显增加 α_2 位点和四个位点都缺失的频率, 说明辐射主要引起大片段损伤。

$\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ 基因为必需基因。只有当编码 α 亚基的顺序发生点突变时, 才能产生对乌本苷的抗性。缺失突变对细胞是致死的。电离辐射不能增加此基因的突变频率。

β -球蛋白基因主要突变形式是点突变, 用抗血红蛋白抗体检测。辐射诱变频率较低(比 hprt 位点低 1-2 个数量级), γ 线照射剂量与突变频率线性相关。有报道高剂量的辐射能将突变频率提高 100 倍。

GPA 位点位于 Ch4, 有 M 和 N 两型抗原。原爆幸存者在受照 42 年之后, 其突变频率与剂量之间基本上符合线性关系。

7. 辐射致突的特点

从上述各基因位点的研究结果来看, 辐射致突有以下特点: 1. 辐射主要引起基因的大片段缺失, 除 aprt 基因位点外、点突变形式较次要。2. 辐射致突能力与基因大小无关, 其中 HLA-A 基因最强, HBB 基因最弱;

必需基因的突变率低, 辐射不增加 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ 基因的突变频率。3. 辐射致突存在着年龄效应, 不同的年龄其致突的量效关系不同。4. 辐射的种类、剂量和 LET 等不同, 则其致突特性不同。5. 辐射致突可能是有规律的。在点突变, 可能存在突变的热点; 在缺失突变, 断裂位点有部分随机地分布在基因的一定区域内; 在细胞水平, 也发现辐射诱发的染色体断裂点有部分集中地分布在一定的区带内。6. 辐射诱变和自发突变的机理可能有一定的相似性, 因为内源突变剂和辐射有某些共同产物(如自由基), 其修复酶可能一样, 而且突变都是由 DNA 的修复和复制错误引起的。但目前主要研究它们点突变的相似性。值得注意的是, 研究者发现以 Alu 和 LINE-1 为代表的重复顺序集中地分布在染色体一定区带内, 与缺失有一定的平行关系。这可能是自发突变和辐射诱变的共同热点。两种突变的相似机理有待进一步研究。

8. 小结与展望

对辐射致突的分子机理的深入了解还是近十年的事。目前, 已发展成多种细胞的多个基因位点的研究体系, 而且还认识到辐射致突的某些规律。然而, 目前的研究体系只能测定预定的目标基因, 远不能反映辐射造成的种类繁多的基因突变; 对辐射与损伤的对应关系了解不多; 对 DNA 修复与突变形成之间关系的了解也很有限。总之, 人们对辐射致突的分子机理的认识还很肤浅, 待研究的问题很多。相信随着人们对基因结构与功能关系的更深入了解, 对 DNA 损伤修复的分子测定方法的改进, 对 DNA 修复机理的深入研究, 可望在辐射致突分子机理的研究上取得突破, 这还需物理学家、遗传学家和分子生物学家的共同努力。

表 1 各基因位点的辐射致突与自发突变的特性

基因和细胞系	RFLP 异常的百分率 (%)		突变频率	
	自发突变	辐射诱变	自发突变 (10^{-6})	辐射诱变 ($10^{-6}/\text{Gy}$)
HPRT:				
中国仓鼠细胞	14-18	69-89	10-30	13.5-3
CHO 细胞			1-10	13
人淋巴样细胞系 (TK6)	36-57	52-84	1.3-1.9	8
人 T 淋巴细胞	9-57	14-75	3.0-6.5	12-23 (离体) 2-60 (体内)
人二倍体纤维母细胞			9.0	30
L5178Y 小鼠淋巴细胞			0.5-3.5	10-20
APRT:	3-17	16-24	1.8	4.3
CHO 细胞				
TK:				
L5178 小鼠淋巴细胞			9.0	12
人淋巴样细胞系 (TK6)	80-97	60-78	1.5-5	6
DFHR:				
CHO 细胞		100	0.13	
中国仓鼠细胞				1.6
HLA-A:				
人 T 淋巴细胞	36-50	78	30.8 (A2) 4.7 (A3)	60 (A2)
GPA:				
人红细胞血型蛋白 (N)			10.9-11	63
(M)			10	32
(MN)			10	
(NN)			17	
(MM)				14
HBB				
人红细胞血红蛋白 HbS			0.038	0.07-1.5

参考文献

- Albertini RJ et al. Hprt mutations in vivo in human T lymphocytes: frequencies spectra and clonality. In: Mutation and the environment. Part C. Mendelsohn ML, Albertini RJ. Eds. New York: Wiley-Liss 15-24.
- Rossi AM, et al. Mutation affecting RNA splicing in man are detected more frequently in somatic than in germ cells. *Mutat Res* 1990; 244: 353.
- Belli M, et al. Direct comparison of biological effectiveness of proton and alpha-particles of some LET. II. Mutations induction at the HPRT locus in V79 cells. *Int J Radiat Biol* 1992; 61: 625.
- Morgan TL, et al. Molecular characterization of X-ray-induced mutations, a hprt locus in plateau-phase chinese hamster ovary cell. *Mutat Res* 1990; 232: 171.
- Thacker JW, et al. Localization of deletion breakpoint in radiation-induced mutant of the hprt gene in hamster cells. *Mutat Res* 1990; 232: 163.
- Yandell DW, et al. Molecular genetic analysis of recessive mutations at heterozygous autosomal locus in human cells. *Mutat Res* 1990; 229: 89.
- Applegate ML, et al. Molecular dissection of mutations at heterozygous thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. *PNAS USA* 1990; 87: 51.
- Morley AA, et al. The molecular nature of in vivo mutation in human cells at the autosomal HLA-A locus. *Cancer Res* 1990; 50: 4584.
- Sankaranarayanan K. Ionizing radiation and genetic risks. III. Nature of spontaneous and radiation-induced mutation in mammalian in vitro system and mechanisms of induction of mutations by radiation. *Mutat Res* 1991; 258: 75.