

用 HPRT 基因突变及 CBMN 研究 AT 细胞高辐射敏感性

罗加林 曹建平 朱巍 刘芬菊 王明明 周献锋 朱财英 郑斯英

(苏州大学放射医学与公共卫生学院放射生物学教研室 苏州 215007)

摘要 研究了毛细血管扩张性共济失调症 (Ataxia-telangiectasia, AT) 患者皮肤的成纤维细胞系 AT5BIVA (AT 细胞) 的高辐射敏感性。以源于正常人皮肤的成纤维细胞系 GM0639 (GM 细胞) 为对照, 利用次黄嘌呤磷酸核糖转移酶基因 (Hypoxanthine phospho-ribosyl transferase, hprt) 位点突变分析技术及胞质分裂阻滞微核法 (Cytokinesis-Block micronucleus method, CBMN), 在 AT 细胞和 GM 细胞经 ^{60}Co γ 射线 0、1、2、3、4Gy 照射后, 观察比较 AT 细胞和 GM 细胞之间 hprt 基因位点突变频率 (hprtMF)、微核率 (MNF) 及微核细胞率 (MNCF) 的差异, 并分别进行曲线拟合。在各剂量点, AT 细胞 hprt 基因突变频率、微核率及微核细胞率均明显高于 GM 细胞, 其差别具有显著性统计意义 ($p < 0.01$); AT 和 GM 细胞 hprt 基因突变频率、微核率及微核细胞率均与照射剂量呈正相关, 可拟合成剂量效应直线方程 $y = a + bx$ 。结果表明, 毛细血管扩张性共济失调症患者 AT 细胞辐射敏感性显著高于 GM 细胞, 具有高辐射敏感性。

关键词 毛细血管扩张性共济失调症, 高辐射敏感性, 次黄嘌呤磷酸核糖转移酶基因, 胞质分裂阻滞微核法
中图分类号 X591, R114

毛细血管扩张性共济失调症 (Ataxia-telangiectasia, A-T) 是一种常染色体隐性遗传性疾病, 具有进行性小脑退化、高辐射敏感性、免疫缺陷、基因组不稳定性、早熟和肿瘤高发率等多种特殊临床表现。AT 突变 (AT mutation) 基因编码蛋白参与细胞周期调控、DNA 损伤信号传导及修复、染色体稳定性维持等过程, 当细胞遭受电离辐射后会启动 AT 突变激酶介导的信号传导途径以识别并修复损伤的 DNA。而在 AT 患者成纤维细胞, ATM 基因突变所致的 ATM 激酶活性丧失导致了 AT 细胞无法修复诸如辐射等损伤因子所造成的 DNA 损伤, 表现出了高辐射敏感性、染色体不稳定性等特征^[1,2]。本工作采用了 hprt 基因位点突变分析技术及胞质分裂阻滞微核法研究 AT 细胞的高辐射敏感性。hprt 基因定位于 X 染色体长臂末端, 是一个对电离辐射非常敏感的位点, 可简便、快速检测电离辐射引起遗传物质的基因位点损伤^[3,4], 胞质分裂阻滞微核法 (Cytokinesis-Block micronucleus method) 是 Fenech 等^[5]于 1985 年提出, 该法可简便衡量染色体损伤。

1 实验材料和方法

1.1 试剂及仪器

DMEM 培养基 (美国 Invitrogen 公司); 小牛血清 (上海华美生物工程公司), 细胞松弛素 B (Cyt-B) (美国 Sigma 公司); 6-巯基鸟嘌呤 (6-TG) (美国 Sigma 公司); 二甲基亚砜 (上海硫酸厂), 显微镜 (Olympus)。

1.2 细胞系和培养

人成纤维细胞系 AT5BIVA 和 GM0639 (德国 GSF 国家环境与健康研究中心放射生物实验室惠赠) 细胞分别接种于 DMEM 培养基 (含 15% 小牛血清和青、链霉素各 100U/mL), 在 37°C、5%CO₂ 培养箱中培养。

1.3 电离辐射

在室温条件下用 ^{60}Co γ 射线照射处于对数生长期的 AT 和 GM 细胞, 照射剂量分别为 0、1、2、3、4Gy (剂量率 1.0Gy/min), 照射后继续培养。

国家自然科学基金 (30170288); 江苏省 2004 年度研究生创新计划项目 (Xm04-67); 苏州大学医学发展基金重点项目 (EE126032)
第一作者: 罗加林, 男, 1978 年 11 月出生, 苏州大学在读硕士, 从事辐射遗传学研究
通讯联系人: 曹建平
收稿日期: 初稿 2004-06-15, 修回 2004-08-16

1.4 hpert 基因突变检测

取照射后第4代细胞,每一剂量点2瓶,其中一瓶加6-TG,使其终浓度为 1×10^{-5} mol/mL,当培养至60h,每瓶加入Cyt-B使其终浓度为4 μ g/mL,继续培养至84h,用0.25%胰蛋白酶收获细胞,1500r/min离心8min,弃上层培养基,加入3mL 37 $^{\circ}$ C预温的0.15mol/L KCl低渗处理,新鲜固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定处理、常规滴片、5% Giemsa染色、显微镜检。6-TG培养液中1000个细胞中双核或多核细胞数(包括相压、相切和分离的双核或多核细胞)除以不含6-TG培养液中1000个细胞中双核或多核细胞数,所得结果为hpert基因突变频率(%)^[6]。

1.5 微核检测

处于对数生长期的AT和GM细胞经 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后,立即更换培养液并加入细胞松弛素B(终浓度为4 μ g/mL),继续培养24h,用0.25%胰蛋白酶收获细胞,1500r/min离心8min,弃上层培养基,加入3mL 37 $^{\circ}$ C预温的0.15mol/L KCl低渗处理,新鲜固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定处理、常规滴片、Giemsa染色后制备完整细胞微核片。观察计数:

(1)双核细胞:胞体较大,胞核为2个,此系经过了第一次分裂所致。染色质较细致、疏松,核仁多清晰可见,胞浆丰富。(2)微核鉴别标准:微核必须位于双核细胞胞浆中,与主核完全分开,如有重叠或相切,必须看到各自完整的核膜;微核呈圆形或椭圆形,直径小于主核的 $1/3-1/5$;无折光性;着色与主核相同或略浅。(3)分析细胞:高倍镜下(400 $\times$)计数3000个双核细胞中的微核数和含有微核的细胞数,并以微核率和微核细胞率(%)表示^[7,8]。

1.6 统计方法

使用SPSS 11.0统计软件分析数据, hpert基因突变率、微核率、微核细胞率与剂量间的关系采用直线回归与相关性检验,两两对比用 t 或 u 检验。

2 结果

2.1 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后, AT和GM细胞hpert基因突变频率比较

表1为 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后,AT和GM细胞hpert基因突变频率随剂量的变化情况。在受到0、1、2、3、4Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后,在同一剂量点,AT细胞hpert基因突变率明显高于GM细胞,差别有高度

显著性统计意义($p<0.01$)并且AT和GM细胞hpert基因突变频率均随受照剂量增加而升高,差别也有高度显著性统计意义($p<0.01$),其趋势见图1。相关分析表明,两种细胞hpert基因突变率均与照射剂量成正相关,其直线回归方程分别拟合如下:

AT细胞hpert基因突变率(%) : $y_{\text{AT}} = 0.3792 + 0.1513x$ $r = 0.992$ $R^2 = 0.984$ ($p<0.01$)。

GM细胞hpert基因突变率(%) :
 $y_{\text{GM}} = 0.1908 + 0.1088x$ $r = 0.998$ $R^2 = 0.998$ ($p<0.01$)。

式中, x 代表照射剂量(Gy), y 代表hpert基因突变率(%)。从以上方程可看出AT细胞hpert基因突变率直线回归方程斜率与GM细胞差别明显,其差别有统计学意义($p<0.05$),说明AT细胞hpert基因突变率随剂量增加的趋势快于GM细胞。

Table 1 hpertMF of AT and GM cells after $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray irradiation ($\bar{x} \pm s$)

Dose/Gy	hpertMF/ %	
	AT	GM
0	0.348 $\pm$ 0.015	0.195 $\pm$ 0.019 ⁽²⁾
1	0.559 $\pm$ 0.031 ⁽¹⁾	0.288 $\pm$ 0.017 ⁽¹⁾⁽²⁾
2	0.715 $\pm$ 0.045 ⁽¹⁾	0.417 $\pm$ 0.023 ⁽¹⁾⁽²⁾
3	0.876 $\pm$ 0.054 ⁽¹⁾	0.518 $\pm$ 0.039 ⁽¹⁾⁽²⁾
4	0.901 $\pm$ 0.077 ⁽¹⁾	0.624 $\pm$ 0.053 ⁽¹⁾⁽²⁾

$n=6$, the 1、2、3 and 4Gy groups are compared with the control (0Gy) respectively in AT and GM, ⁽¹⁾ $p<0.01$, AT is compared with GM at the same dose points, ⁽²⁾ $p<0.01$

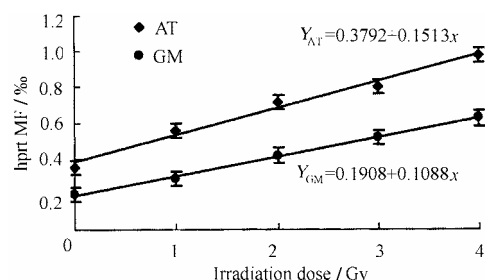


Fig.1 Relationship of hpert MF in AT and GM cells with irradiation dose

2.2 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后, AT和GM细胞微核分布情况

$^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后,两种细胞的微核分布情况见表2。在受到0、1、2、3、4Gy剂量的 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后,AT和GM细胞中出现的微核细胞类型和各微核细胞类型中的微核数不同;AT细胞可出现含单核、二核、三核、四核、五核的微核细胞,而GM细胞只出现单核、二核、三核的核细胞。

Table 2 Micronucleus distribution of AT and GM cells after ⁶⁰Co γ-ray irradiation

Dose/Gy	AT					GM				
	Uni-MN	Bi-MN	Tris-MN	Tetra-MN	Five-MN	Uni-MN	Bi-MN	Tris-MN	Tetra-MN	Five-MN
0	51	2	0	0	0	39	0	0	0	0
1	146	16	7	0	0	80	4	3	0	0
2	220	38	12	0	0	133	6	4	0	0
3	465	225	70	15	0	144	13	7	0	0
4	520	231	111	50	4	181	25	18	0	0

MN: Micronuclei, Observed cells:3000

2.3 ⁶⁰Co γ 射线照射后，AT 和 GM 细胞的微核率和微核细胞率的比较

⁶⁰Co γ 射线照射后，两种细胞的微核率和微核细胞率的比较见表 3。由表 3 可见，在 1、2、3、4Gy 剂量照射后，AT 细胞微核率和微核细胞率均显著高于 GM 细胞 ($p<0.01$)；且 AT 和 GM 细胞微核率和微核细胞率均随剂量增加而升高，其关系见图 2 和图 3。相关分析表明，两种细胞微核率和微核细胞率均与照射剂量成正相关，其直线回归方程分别拟合如下：

AT 细胞微核率： $y_{AT} = -42.8 + 131.7x$ $r = 0.952$
 $R^2 = 0.906$ ($p < 0.05$)。

GM 细胞微核率： $y_{GM} = 12.2 + 19.7x$ $r = 0.994$
 $R^2 = 0.988$ ($p < 0.01$)。

AT 细胞微核细胞率： $y_{AT} = -9.3 + 77.1x$ $r = 0.959$
 $R^2 = 0.920$ ($p < 0.05$)。

GM 细胞微核细胞率： $y_{GM} = 1.4 + 15.0x$ $r = 0.994$
 $R^2 = 0.988$ ($p < 0.01$)。

式中， y 为微核率或微核细胞率 (‰)， x 为受照剂量 (Gy)。从以上方程看出 AT 细胞微核率和微核细胞率直线回归方程斜率明显大于 GM 细胞，其差别具有统计意义 ($p < 0.05$)，表明 AT 细胞微核率

和微核细胞率随剂量增加的趋势快于 GM 细胞。

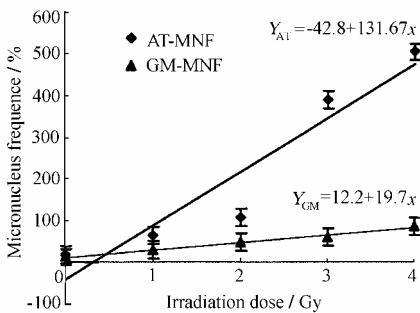


Fig.2 Relationship of MNF in AT and GM cells with irradiation dose

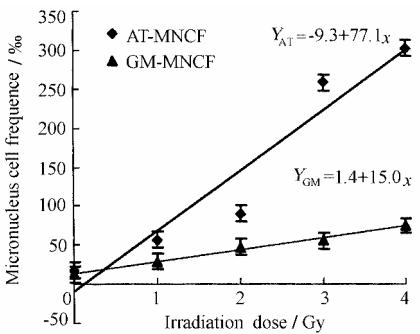


Fig.3 Relationship of MNCF in AT and GM cells with irradiation dose

Table 3 MNF and MNCF of AT and GM cells after ⁶⁰Co γ-ray irradiation

Dose/Gy	MNF/ ‰		MNCF/ ‰	
	AT	GM	AT	GM
0	18.33±2.45	13.00±2.07	17.67±2.41	13.00±2.07
1	66.33±4.54 ⁽¹⁾	32.33±3.23 ⁽¹⁾⁽²⁾	56.33±4.21 ⁽¹⁾	29.00±3.06 ⁽¹⁾⁽²⁾
2	110.67±5.73 ⁽¹⁾	52.33±4.07 ⁽¹⁾⁽²⁾	90.00±5.22 ⁽¹⁾	47.67±3.89 ⁽¹⁾⁽²⁾
3	395.00±8.93 ⁽¹⁾	65.67±4.52 ⁽¹⁾⁽²⁾	258.33±7.99 ⁽¹⁾	55.33±4.17 ⁽¹⁾⁽²⁾
4	512.33±9.13 ⁽¹⁾	95.00±5.35 ⁽¹⁾⁽²⁾	302.33±8.39 ⁽¹⁾	74.67±4.80 ⁽¹⁾⁽²⁾

The 1、2、3 and 4Gy groups are compared with the control (0Gy) respectively in AT and GM,⁽¹⁾ $p < 0.01$, AT is compared with GM at the same dose points, ⁽²⁾ $p < 0.01$, Observed cells: 3000

3 讨论

AT 病是由于 ATM 基因的突变引起的,ATM 基因编码了一种与 PI-3K (磷酸酰肌醇 3-激酶) 的催化功能域有高度同源性的蛋白激酶,该激酶通过磷酸化不同细胞周期的不同靶蛋白来调控细胞周期检控点,并且在 DNA 损伤信号传导及修复、细胞凋亡、染色体稳定性方面具有重要作用。基因组不稳定性是 A-T 细胞主要病理学表型,这一表型主要反应在高辐射敏感性,以及体内外染色体自发畸变率、辐射诱发染色体畸变率和辐射引起遗传物质的基因位点损伤的异常增加^[9]。通过检测 AT 细胞和 GM 细胞经 ^{60}Co γ 射线 0、1、2、3、4Gy 照射后两者次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (HPRT) 基因突变率的差异,发现在同一剂量点 AT 细胞 hppt 基因突变率明显高于 GM 细胞,差别有显著性统计意义 ($p<0.01$);并且 AT 和 GM 细胞 hppt 基因突变率均随受照剂量增加而升高,相关分析表明,两种细胞 hppt 基因突变率均与照射剂量成正相关,根据文献[10]提供的 hppt 基因突变频率与受照剂量成线性关系,我们将其拟合成直线回归方程 $y=a+bx$ 模式,从方程斜率的差别 ($p<0.05$) 可看出随着剂量增加,AT 细胞 hppt 突变率增加趋势快于 GM 细胞,并且 hppt 基因突变频率可用于衡量个体辐射敏感性^[8]。从这点上可看出,AT 细胞辐射敏感性高于 GM 细胞。与此同时,我们通过胞质分裂阻滞微核法检测 AT 和 GM 细胞受射线照射后染色体的损伤情况,发现 AT 和 GM 细胞经 ^{60}Co γ 射线 0、1、2、3、4Gy 照射后,AT 细胞可出现多种类型微核细胞,包括单核、二核、三核、四核、五核,而 GM 细胞只出现单核、二核、三核。在相应的剂量点,AT 各类型微核细胞中的微核数均高于 GM 细胞。AT 细胞微核率和微核细胞率明显高于 GM 细胞 ($p<0.01$),并且 AT 和 GM 细胞微核率和微核细胞率随着剂量增加而升高。对此资料我们根据 WHO 提供的 4 种数学模式 ($y=a+bx$, $y=a+bx+cx^2$, $y=kx^n$, $y=a+cx^2$) 并参照文献[8]有关统计方法进行曲线拟合,同时检验回归系数和拟合度,选择 $y=a+bx$ 模式为最佳回归方程。从所拟合的直线回归方程可看出,AT 细胞微核率和微核细胞率直线回归方程斜率明显大于 GM 细胞,其差别具有统计意义 ($p<0.05$)。说明,AT 细胞的上升趋势明显快于 GM 细胞。微核是由于染色体畸变形成的,能反映个体的辐射敏感性^[8],故这些研究结果都说明了在同一剂量点下 AT 细胞染色体损伤程度比 GM 细胞重,AT 细胞辐射敏感性显著高于 GM 细胞。

一般情况下,真核细胞受电离辐射后,会产生诸如细胞周期阻滞、DNA 损伤修复增强和细胞凋亡等效应,而 AT 细胞对电离辐射的反应则不同。AT 细胞在 G1 期受电离辐射后, p53 蛋白累积过程明显延迟, p53 的一些下游基因 (如 WAF1、gadd45、mdm2 和 p21 等) 也降低表达水平或延迟出现^[11]; AT 细胞受电离辐射后,未出现 S 期进程变缓,以降低 DNA 合成,减少受损 DNA 的复制;而且受照后 p34cdc2 酪氨酸残基的磷酸化减少,而细胞周期素 B/cdc2 蛋白激酶被活化使细胞失去 G2/M 关卡,细胞不能较久地停滞于有丝分裂之前导致细胞损伤得不到修复。AT 细胞中 ATM 蛋白异常表达阻止了电离辐射诱发的 p53 磷酸化,从而使 p53 调节作用减弱或延迟,使受损伤 DNA 的合成受抑,阻碍 DNA 的修复过程,最终遗传物质的基因位点损伤异常增加^[11,12],这就解释了 AT 细胞受电离辐射后微核率、微核细胞率及 hppt 基因突变率远高于正常 GM 细胞。

致谢 本实验在苏州大学放射医学与公共卫生学院核医学与生物技术省级重点实验室完成。

参考文献

- 1 Lavin M F, Shiloh Y. *Annu Rev Genet*, 1997, **15**(1): 177-202
- 2 Meyn M S. *Cancer Res*, 1995, **55**(24): 5991-6001
- 3 王海燕, 张连珍. 辐射防护, 1999, **11**(19): 466-469
WANG Haiyan, ZHANG Lianzhen. *Radiat Prot*, 1999, **11**(19): 466-469
- 4 Norman A, Mitchell J C, I warmoto K S. *Mutat Res*, 1988, **208**(5): 17-19
- 5 Fenech M, Morley A A. *Mutation Research*, 1985, **147**(1-2): 29-36
- 6 杨素霞, 樊飞跃, 李煜, 等. 中国放射卫生, 1997, **16**(2): 116-117
YANG Shuxia, FAN Feiyue, LI Yi, *et al.* *China Radiat Health*, 1997, **16**(2): 116-117
- 7 Gutierrez-Enriquez S, Hall J. *Mutat Res*. 2003, **535**(1): 1-13
- 8 王继先, 金瑾珍, 白玉书, 等著. 放射生物剂量学. 北京: 原子能出版社. 1997, 6.65-75, 216-235
WANG Juxian, JIN Cuizhen, BAI Yushu, *et al.* *Radiobiological dose*. Beijing: Atomic Energy Press. 1997, 6.65-75, 216-235
- 9 Khanna K K, Lavin M F, Jackson S P, *et al.* *Cell Death Differ*. 2001, **8**(11): 1052-1065
- 10 史继兰, 商希梅, 李志荣, 等. 中国辐射卫生, 1993, **2**(4): 181-182

- SHI Julan, SHANG Ximei, LI Zhirong, *et al.* China Radiat Health, 1993, **2**(4): 181-182
- 11 Khanna K K, Keating K E, Kozlov S, *et al.* Nat Genet, 1998, **20**(4): 398-400
- 12 Enoch T, Norbury C. Trends Biochem Sci. 1995, **20**(10): 426-430

Study on high radiosensitivity of AT cells by HPRT gene mutation and cytokinesis-block micronucleus method

LUO Jialin CAO Jianping ZHU Wei LIU Fenju WANG Mingming ZHOU Xianfeng
ZHU Caiying ZHENG Siying

(School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215007)

ABSTRACT The high radiosensitivity of fibroblast cells (AT5BIVA cells) from the skin of the Ataxia-telangiectasia (A-T) patients were studied. Using Hypoxanthine phospho-ribosyl transferase gene mutation analysis and Cytokinesis-Block micronucleus method, the hprt mutation frequency(hprtMF), the micronucleus frequencies (MNF) and micronucleus cell frequencies (MNCF) of AT and GM cells irradiated with 0, 1, 2, 3 and 4Gy of ^{60}Co γ -rays were observed. The difference of hprtMF, MNF and MNCF between AT and GM cells were analyzed, and dose-response curves of hprtMF, MNF and MNCF in AT and GM cells were also established. After exposure to 0, 1, 2, 3 and 4Gy of ^{60}Co γ -rays, hprtMF, MNF and MNCF were significantly higher in AT cells than those in GM cells ($p<0.01$). In the two cell types, hprtMF MNF and MNCF had a positive correlation with dose, and their linear regression equations were $y=a+bx$. These results show that the radiosensitivity of AT cells is significantly higher than that of GM cells and AT cells are extremely sensitive to radiation.

KEYWORDS Ataxia-telangiectasia, High radiosensitivity, Hypoxanthine phospho-ribosyl transferase, Cytokinesis-Block micronucleus method

CLC X591, R114