

## 间期细胞核中 *abl*和 *bcr*基因的三维空间分布在 *bcr/abl*融合基因形成中的作用

张青<sup>1</sup>,周淑芸<sup>1</sup>,刘晓力<sup>1</sup>,牛超<sup>2</sup>,徐岚<sup>2</sup>,陈赛娟<sup>2</sup>(<sup>1</sup>第一军医大学南方医院血液科,广东广州 510515;<sup>2</sup>上海第二医科大学瑞金医院血液病研究所,上海 200025)

**摘要:**目的 从生物体视学角度分析 *bcr/abl*融合基因的形成机制。方法 应用荧光原位杂交和激光共聚焦扫描显微镜技术,观察  $\gamma$ -射线对 IM9 细胞中的 *bcr*和 *abl*基因在间期核内三维空间分布的影响。结果 *abl*和 *bcr*基因在间期核内有其特定的分布区域,且该分布区域在细胞周期中呈规律性的动态变化。放射性照射会使 *abl*和 *bcr*基因之间的距离缩短。结论 *abl*和 *bcr*基因在间期细胞核内的易接近性是 *bcr/abl*融合基因形成的因素之一。

**关键词:** *bcr*基因; *abl*基因; 三维空间定位; 荧光原位杂交; 激光共聚焦显微镜

中图分类号: Q754 文件标识码: A 文章编号: 1000-2588(2002)03-0197-03

Role of the three-dimensional distribution of *abl* and *bcr* genes in the formation of *bcr/abl* fusion gene in interphase nucleus

ZHANG Qing<sup>1</sup>, ZHOU Shu-yun<sup>1</sup>, LIU Xiao-li<sup>1</sup>, NIU Chao<sup>2</sup>, XU Lan<sup>2</sup>, CHEN Sai-juan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Hematology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China;

<sup>2</sup>Institute of Hematology, Ruijin Hospital, Second Medical University of Shanghai, Shanghai 200025, China

**Abstract** Objective To explore the mechanism of *bcr/abl* fusion gene formation in view of its biological stereology. Methods Assisted by fluorescent in situ hybridization combined with confocal laser scanning microscopy, we observed the effect of  $\gamma$ -ray exposure on three-dimensional distribution of *bcr* and *abl* genes in the interphase nucleus of IM-9 cell line. Results In interphase nuclei of IM-9 cells, *abl* and *bcr* genes retained their own definite distribution patterns that were dynamically and regularly modulated along with the phases of the cell cycle.  $\gamma$ -ray exposure, however, produced shortened distances between the 2 genes. Conclusion The accessibility of *abl* and *bcr* genes to each other in the interphase nucleus is one of the factors for *bcr/abl* fusion gene formation.

**Key words** *bcr* gene; *abl* gene; three-dimensional distribution; fluorescent in situ hybridization; confocal laser scanning microscopy

第 9 号和 22 号染色体长臂的易位导致了 *ph* 染色体的形成,由此产生的 *bcr/abl*融合基因是慢性粒细胞性白血病 (CML) 发病的分子遗传学基础<sup>[1]</sup>。长期追踪调查显示,核爆炸幸存者的 *bcr*和 *abl*基因融合的频率明显增高<sup>[2,3]</sup>。有研究证实,染色质在间期细胞核内占据着特定的空间,即染色体结构域 (chromosomal territory)<sup>[4]</sup>,而存在于染色体之上的基因位点是非随机分布的。为了研究 *bcr*和 *abl*基因融合的生物体视学基础,本实验应用荧光原位杂交 (FISH) 结合激光共聚焦扫描显微镜 (LSCM) 图像分析技术,观察了经  $^{60}\text{Co}$  照射后的 IM-9 淋巴细胞间期核内 *abl*和 *bcr*基因在不同细胞周期的空间分布情况。

### 1 材料和方法

收稿日期: 2001-11-28

基金项目: 国家自然科学基金 (39770831); 广东省自然科学基金 (970833)

作者简介: 张青 (1965-), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 2001 年毕业于第一军医大学, 博士, 主治医师 E-mail: qingzhang@vip.163.com

通讯作者: 刘晓力, 女, 副教授, 电话 020-85141615

### 1.1 试剂及材料

人淋巴细胞株 IM-9 (购自 Japanese Collection of Research Bioresources, JCRB); RPMI 1640 和胎牛血清 (Gibco); 胸苷和诺考达唑 (nocodazole) (Sigma); *bcr*和 *abl*单拷贝序列探针试剂盒以及 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 购自美国 Vysis 公司; RNase、蛋白酶 K、甲酰胺和牛血清白蛋白 (BSA) 均购自西安华美公司; 偶联异硫氰酸荧光素 (FITC) 的鼠抗人 Lamin B 抗体购自美国 Vector 公司, 鼠抗人 Lamin B 抗体 (Santa Cruz)。

### 1.2 细胞培养及同步化<sup>[5]</sup>

将 IM-9 细胞置于 RPMI 1640 培养基, 加入 10% 胎牛血清, 5%  $\text{CO}_2$  37 代培养。采用二次阻断方法, 取对数期生长细胞, 加入 2 mmol/L 胸苷培养 12 h, 换液后在新鲜培养液中继续培养 16 h, 再以等浓度的胸苷培养 12~14 h, 收集的细胞作为 S 期细胞。第一次胸苷阻断后 3~4 h 收集到的细胞为  $\text{G}_2$  期, 加入 40  $\mu\text{g/ml}$  诺考达唑, 4 h 后收集的细胞为  $\text{G}_1$  期。将细胞分为两组, 实验组在同步化前以放射性  $^{60}\text{Co}$  照射 (剂量为 3

Gy),其余处理同对照组。流式细胞仪检测 DNA 含量 (每份样本检测 3 次,取其平均数)后进行细胞周期分析。细胞标本以甲醛:冰乙酸 (3:1, V/V)固定, -20℃ 保存备用。

### 1.3 荧光原位杂交

原位杂交程序参照文献方法 [6]并做以下改良:细胞标本滴片后 PBS 洗 3 次, 100 μg/ml RNase37℃ 温育 1 h, 系列酒精脱水, 经 70% 甲酰胺 / 2×SSC 变性 (75℃、4min), 蛋白酶 K 室温下消化 20min。探针在 75℃ 下变性 5min, 37℃ 杂交 30h, 45℃ 水浴洗片, 以 50% 甲酰胺 / 2×SSC 洗两次, 每次 4min, 再以 0.1% Tween/2×SSC 和 0.1×SSC 各洗 1 次, 每次 4min。

### 1.4 核膜的显色

杂交后的标本以 1% BSA 在 37℃ 下封闭 30min, 加入 2 μg/ml 鼠抗人 LaminB 抗体 50 μl, 4℃ 过夜。再用 PBS 洗 3 次, 加入偶联有 FITC 的羊抗鼠抗体 (37℃、30min), PBS 洗 3 次, DAPI 染色。

### 1.5 激光共聚焦显微镜观察和图像分析

LeicaTCS 共聚焦显微镜 (40 倍油镜下, 激发波长分别为 488nm 和 543nm, 扫描层厚 0.25~0.5nm) 观察。图像处理采用 Photoshop4.0。考虑到细胞核大小的差异性, 检测指标均用相对数来表示: CA=核心与 abl 基因之间的距离与核半径之比; CB=核心与 bcr 基因之间的距离与核半径之比; AB<sub>m</sub>=abl 与 bcr 基因之间的最小距离与核半径之比。每份标本记数 200 个细胞,

### 1.6 统计处理

数据统计分析采用配对 t 检验。

## 2 结果

### 2.1 IM-9 细胞周期的同步化情况

实验组和对对照组 IM-9 细胞经同步化处理后, 分布于 G<sub>1</sub>、S 和 G<sub>2</sub> 期细胞的百分数见表 1。

表 1 IM-9 细胞在细胞周期各阶段中的分布百分数 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )  
Tab.1 The percentage of IM-9 cells in different phases of the cell cycle (% , Mean  $\pm$  SD)

Group	Percentage of the cells		
	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub>
Control	68.5±5.4	57.6±4.3	43.9±6.7
Test	59.8±6.3	50.7±2.8	42.4±3.6

### 2.2 bcr 和 abl 基因在 IM-9 细胞间期核中的空间分布

射线照射后各周期的 CA、CB 和 AB<sub>m</sub> 值均显著减少 (表 2)。

另外还发现, 照射后 abl 和 bcr 基因之间的距离小于 20% 核半径的细胞百分数明显增加 (图 1), 在 FISH 结合共聚焦显微镜对 S 期细胞核的分层扫描图上能

更直观地看到这种变化 (图 2、3)。

表 2 bcr 和 abl 基因在 IM-9 细胞间期核内的相对空间距离 (n=20,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Relative spatial distance of bcr and abl genes in the interphase nucleus of IM-9 cells (n=20, Mean  $\pm$  SD)

Phase of cell cycle	Dose of irradiation (Gy)	AB <sub>m</sub>	CA	CB
G <sub>1</sub>	0	60.4±2.6	49.4±1.9	45.7±2.8
G <sub>1</sub>	3	25.8±1.7	39.7±1.4	39.3±1.9
		P<0.001	P<0.001	P<0.001
S	0	36.4±1.9	40.7±1.6	33.3±1.4
S	3	23.2±1.4	34.4±1.9	31.4±1.1
		P<0.001	P<0.001	P<0.001
G <sub>2</sub>	0	39.3±2.6	51.4±1.1	42.6±2.0
G <sub>2</sub>	3	27.3±0.7	37.4±1.5	40.2±1.7
		P<0.001	P<0.001	P<0.001

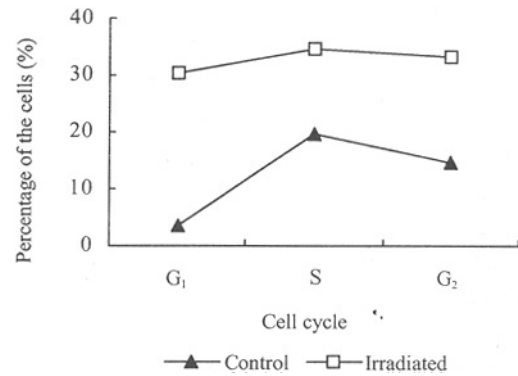


图 1 在各细胞周期中, abl 和 bcr 基因之间最小的空间距离小于核半径 20% 的 IM-9 细胞百分数

Fig.1 The percentage of IM-9 cells whose minimum spatial distance between abl and bcr genes is less than 20% of the nucleus radius in the cells at different phases of cell cycle

## 3 讨论

许多实验证实, 基因之间的融合频率是有差异的 [7], 另外, 基因在核内的空间定位与其功能有着密切的关系 [8-10] (有研究证实在神经母细胞瘤浸润期, MYCN 基因中的 HSR 位点在细胞核内的空间定位上会发生明显的改变 [11])。因此, 我们设想, 除了 DNA 分子的结构特点之外, abl 和 bcr 基因在核内的三维空间定位可能也是决定其融合的因素之一。

Kozubek 等 [12] 曾观察了 bcr 和 abl 基因的二维分布情况, 发现两基因之间最小距离与核半径之比在 G<sub>0</sub>、G<sub>1</sub> 和 S/G<sub>2</sub> 期分别为 24.0、34.5 和 36.0。本实验结果则为 G<sub>1</sub> 期 60.4, S 和 G<sub>2</sub> 期分别为 36.4 和 39.3, 我们认为应用 LCSM 进行基因的三维空间定位的研究将比二维平面研究更准确和可信。

从实验结果看出, bcr 和 abl 基因在 IM9 细胞的间期核中的分布是非随机性的, bcr 基因趋向于分布

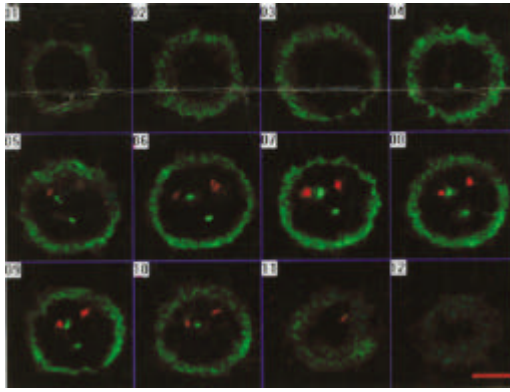


图 2 S 期 IM-9 细胞核内 *bcr*(绿色)和 *abl*(红色)基因的三维空间分布

Fig.2 The three-dimensional distribution of *bcr* green and *abl* red genes in the nucleus of IM-9 cell in S phase. The nuclearmembrane is labeled with anti-Lamine B antibody (green)

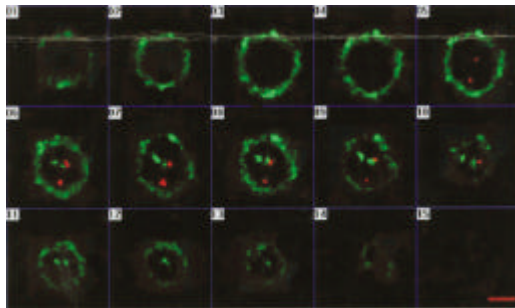


图 3 经辐射后 S 期 IM-9 细胞核内 *bcr*(绿色)和 *abl*(红色)基因的三维空间分布

Fig.3 The three-dimensional distribution of *bcr* green and *abl* red genes in the nucleus of IM-9 cell in S phase after irradiation. The nuclearmembrane is labeled with anti-Lamine B antibody (green)

在近核心处,而 *abl*基因则更靠近核膜,这与 Sun<sup>[13]</sup>的实验结果相一致,即染色质在核内的空间定位与其大小相关。

有人曾用质量随机分布法建立了 *abl*和 *bcr*基因在核内二维分布的数学模型<sup>[12]</sup>,二者距核心的距离与核半径之比的理论预期值约为 0.588,而本实验结果与理论值有很大的区别,支持功能基因在核内的位置及构象变化是非随机性的观点。另外,*bcr*和 *abl*基因在核内的空间分布是一个动态的过程,随细胞周期的变化而改变,Neves<sup>[14]</sup>等在研究人造血干细胞内的 *bcr*和 *abl*基因的空间分布时也观察到了这一现象。这对于基因功能的实现包括转录、复制和 RNA 的加工以及信息的传递可能是必需的。经 <sup>60</sup>Co 照射后,*bcr*和 *abl*基因之间的距离明显缩小,尤其处于 S 期时更为明显。由于 S 期是 DNA 复制期,生物合成极为活跃<sup>[15,16]</sup>,加之 *abl*和 *bcr*之间的距离又最接近,基因的错配有可能就发生在该期。辐射可引起第 9 号和 22 号染色体 DNA 双链的断裂,同时又促使 *bcr*和 *abl*基因相互接近,这可能是引起 *bcr*和 *abl*基因融合的主要因

素之一,即基因在细胞核内的空间定位与基因之间的融合有关。但是这一过程是如何发生的,染色体纤维以及相关的细胞器如微丝、微管以及肌动蛋白等是否也参与了这一过程,这些问题还有待进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] Clarkson BD, Strife A, Wisniewski D, et al. New understanding of the pathogenesis of CML: a prototype of early neoplasia [J]. *Leukemia*, 1997, 11(9): 1404-28.
- [2] Kreth G, Munkel Ch, Langowski J, et al. Chromatin structure and chromosome aberrations: modeling of damage induced by isotropic and localized irradiation [J]. *Mutation Res*, 1998, 404(1-2): 77-88.
- [3] Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part 1: Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987 [J]. *Radiat Res*, 1994, 137(2 suppl): S68-97.
- [4] Zink D, Cremer T, Saffrich R, et al. Structure and dynamic of human interphase chromosome territories *in vivo* [J]. *Hum Genet*, 1998, 102(2): 241-51.
- [5] Patrick M, O'Connor PM, Jackman J. 哺乳类细胞的同步化 [A]. 见: Pagano M 主编, 张世馥译. 细胞周期 - 材料和方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 85-97.
- [6] Croft JA, Bridger JM, Boyle S, et al. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus [J]. *J Cell Biol*, 1999, 145(6): 1119-31.
- [7] Ito T. Induction of *bcr-abl* fusion genes by *in vitro* X-irradiation [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1995, 84(2): 105-12.
- [8] Verschure PJ, van der Kraan I, Manders EM, et al. Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories [J]. *J Cell Biol*, 1999, 147(1): 13-24.
- [9] Misteli T. Protein dynamics: Implications for nuclear architecture and gene expression [J]. *Science*, 2001, 291(5505): 843-7.
- [10] Sadoni N, Langer S, Fauth C, et al. Nuclear organization of mammalian genomes: polar chromosome territories build up functionally distinct higher order components [J]. *J Cell Biol*, 1999, 146(6): 1211-26.
- [11] Solovei I, Kienle D, Little G, et al. Topology of double minutes (dmins) and homogeneously staining regions (HSRs) in nuclei of human neuroblastoma cell lines [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, 29(4): 297-308.
- [12] Kozubek S, Lukasova E, Ryznar L, et al. Distribution of ABL and BCR genes in cell nuclei of normal and irradiated lymphocytes [J]. *Blood*, 1997, 89(12): 4537-45.
- [13] Sun HB, Shen J, Yokota H. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei [J]. *Biophys J*, 2000, 79(1): 184-90.
- [14] Neves H, Ramos C, da Silva GM, et al. The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RAR $\alpha$  genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation [J]. *Blood*, 1999, 93(4): 1197-207.
- [15] de Jong L, Grande MA, Mattern KA, et al. Nuclear domains involved in RNA synthesis, RNA processing, and replication [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 1996, 6(2-3): 215-46.
- [16] Zatschina OV, Schofer C, Weipoltshammer K, et al. The RNA polymerase II transcription factor UBF and DNA are located at the same major sites in both interphase and mitotic pig embryonic kidney (PK) cells [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1996, 73(4): 274-8.