

M-FISH 技术分析 ^{60}Co γ 射线急慢性照射诱发小鼠的骨髓染色体畸变

刘青杰¹/陈德清¹

Julie R. korenbery²/陈晓宁²

(1. 中国 CDC 辐射防护与核安全医学所放射生物学研究室, 北京 100088; 2. Cedars-Sinai Medical Center, UCLA, Los Angeles, CA 90048, USA)

Chromosome Aberrations Induced by Acute or Chronic ^{60}Co γ in Mice Bone Marrow Cells Analyzed by Multicolor FISH Method

LIU Qing-jie¹, CHEN De-qing¹, Julie RK², CHEN Xiao-ning²
(1. Department of Radiation Biology, National Institute for Radiation Protection, China CDC, Beijing 100088, China;
2. Molecular Genetics Lab, Cedars-Sinai Medical Center, UCLA, CA 90048, Los Angeles, USA)

【摘要】背景与目的: 探索多色荧光原位杂交 (Multicolor fluorescence *in situ* hybridization, M-FISH) 技术分析急慢性电离辐射照射诱发的小鼠染色体畸变的差异。材料与方法: 建立用小鼠 1、2 和 4 号染色体端粒和着丝粒特异性人工细菌染色体 (Bacterial Artificial Chromosome, BAC) 的 M-FISH 方法, 分析受到急慢性 ^{60}Co γ 射线整体照射 1.5 和 3.0 Gy 的小鼠骨髓染色体畸变, 确定剂量和剂量率因子 (Dose and dose rate effect factor, DDREF)。结果: 急性照射的小鼠骨髓染色体稳定性畸变和非稳定性畸变相同, 慢性照射的小鼠染色体非稳定性畸变显著低于稳定性畸变。以染色体稳定性畸变为指标 DDREF 在 1.5、3.0 Gy 分别为 2.2 ± 0.4 和 3.1 ± 0.6 。结论: M-FISH 方法可用于分析电离辐射诱发的小鼠骨髓染色体畸变, DDREF 低于文献中报道的数值。

【关键词】 ^{60}Co γ 射线; 急慢性照射; 小鼠; 骨髓染色体畸变; 多色荧光原位杂交

中图分类号: R146.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X (2006)03-0224-03

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To investigate the difference of bone marrow chromosome aberrations induced by acute or chronic ionizing radiation with multicolor FISH (M-FISH) method. MATERIAL AND METHODS: The M-FISH method, using the specific Bacterial Artificial Chromosome (BAC) probes on telomeres and centromeres of mouse chromosomes 1, 2 and 4, was established. The bone marrow (BM) chromosome aberration induced by acute or chronic ^{60}Co γ -rays was analyzed with M-FISH. Then the dose and dose rate effect factor (DDREF) was calculated. RESULTS: The stable and unstable chromosome aberrations induced by acute ^{60}Co γ -rays were equal, but the unstable chromosome aberration induced by chronic radiation was lower than the stable chromosome aberration. The DDREF calculated with stable chromosome aberration on 1.5, 3.0 Gy were 2.2 ± 0.4 and 3.1 ± 0.6 , respectively. CONCLUSION: The M-FISH method established in this study could be used in analyzing mice BM chromosome aberration induced by ionizing radiation. The DDREF calculated was lower than that in the literature.

【KEY WORDS】 ^{60}Co γ -rays; acute or chronic irradiation; mouse; bone marrow chromosome aberration; multicolor FISH

荧光原位杂交 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 技术在放射生物学中已经广泛用于回顾性剂量估算及事故剂量重建。对于慢性照射条件下用 FISH 方法进行剂量重建, 目前主要对影响因素进行分析, 如易位染色体的稳定性、剂量和剂量率效应因子 (Dose and dose rate effect factor, DDREF) 等。本室已用人工细菌染色体

(Bacterial Artificial Chromosome, BAC) M-FISH 技术对电离辐射诱发的人外周血淋巴细胞染色体易位进行了探索^[3, 4], 但人淋巴细胞寿命很短, 在体外研究探索急慢性照射的 DDREF 受到限制。我们利用鼠 BAC 资源库, 应用 M-FISH 技术比较急性照射和慢性照射诱发小鼠骨髓染色体畸变的发生情况。

收稿日期: 2005-09-12; 修订日期: 2005-11-18

基金项目: 北京市自然科学基金项目 (No. 7053073)、美国能源部基金项目 (No. DE-FG03-01ER6326(JRK))

作者简介: 刘青杰 (1971-), 男, 河北省无极县人, 副研究员, 博士, 研究方向: 电离辐射生物效应和放射生物剂量学。Tel: 86-10-62389629, E-mail: qjliu@nirp.cn

1 材料与方法

1.1 动物 健康昆明种雄性小白鼠 25 只, 6~8 周龄, 18~22 g, 北京大学医学部动物中心提供。实验前 1 周随机分成 5 组: 对照组、急性照射 1.5 Gy 和 3.0 Gy 组、慢性照射累积剂量 1.5 Gy 和 3.0 Gy 组。

1.2 照射 用中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所国家二级剂量标准实验室提供的 ^{60}Co 治疗机在室温下进行照射, 照射时将小鼠放入特制的有机玻璃鼠盒中。急性照射的 ^{60}Co 治疗机源活度为 1.3×10^{14} Bq, 单次照射, 源至鼠盒中心的垂直距离为 80 cm, 均匀照射野 $15 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$, 剂量率为 0.565 Gy/min, 剂量误差为 $\pm 1\%$ 。慢性照射的 ^{60}Co 治疗机源活度为 2.1×10^{11} Bq, 源至鼠盒中心的垂直距离为 97 cm, 均匀照射野 $24 \text{ cm} \times 24 \text{ cm}$, 每天吸收剂量为 3.54 cGy, 剂量率为 0.197 cGy/min, 剂量误差为 $\pm 1\%$ 。急性照射剂量和慢性照射累积吸收剂量分别为 1.5 和 3.0 Gy。

1.3 小鼠骨髓染色体的制备 急性照射后 20 h 注射秋水仙素(浓度为 $250 \mu\text{g/ml}$), 5 mg/kg 。照后 24 h 后活杀动物, 分离股骨, 用 RPMI1640 培养基从一端冲出骨髓。经过离心、常规低渗、预固定、2~4 次固定, 细胞悬液保存于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中。慢性照射的小鼠在最后一次照射后 2 h 时注射秋水仙素, 照射后 6 h 进行活杀。制备骨髓染色体的方法同急性照射小鼠染色体制备方法。制片按文献[3]的方法进行。

1.4 小鼠 BAC 克隆的确定、DNA 制备、标记、杂交和检测 小鼠 BAC 克隆均来自 mouse rearray (Korenberg and Chen/CSMS collection BAC)。克隆的确定、DNA 制备、标记、杂交和检测基本按照文献[5]的方法进行。本研究中用 1、2 和 4 号染色体的端粒和着丝粒特异性 BAC, 直接标记用荧光素 Fluorescein-11-dUTP 和/或 Fluorolink Cy3-dCTP (Amersham Pharmacia Science, USA)。

1.5 多色荧光原位杂交 (Multicolor FISH, M-FISH) 基本与 1.4 中方法相似, 只是染色体标本需要前处理和探针需要纯化^[3]。

1.6 畸变分析 记录正常细胞、非稳定性畸变(断片、双着丝粒、环)和稳定性畸变(易位)。如果染色体数目为 40, 染色体 1、2 和 4 的端粒和着丝粒信号都存在, 可分辨、位置正确, 该细胞被计为正常细胞; 否则计为异常, 按照常规命名方法确定畸变类型。

1.7 统计学方法 用 Microsoft Excel 7.0 处理数据, 用泊松分布 U 检验分析两组间差异。DDREF 是相同剂量水平的急性照射与慢性照射诱导的染色体易位率的比值。

2 结果

2.1 正常对照小鼠 M-FISH 的杂交结果 应用 1、2 和 4 号染色体的端粒和着丝粒特异性探针, 将 1 号染色体的端粒和着丝粒显示绿色, 2 号染色体的端粒和着丝粒显示红色, 4 号染色体的端粒和着丝粒显示为黄色(红+绿)。其他染色体复染成蓝色, 如图 1A。

2.2 用 M-FISH 法检测到的畸变情况 用本研究中建立的 M-FISH 方法, 可以很容易的分辨染色体易位、双着丝粒、环和断片。图 1B、C 中可见环+断片和易位畸变。

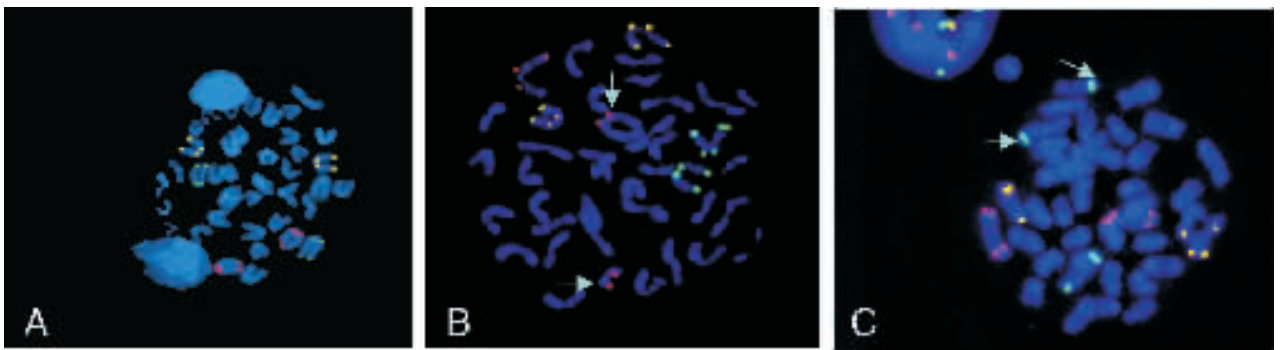


图 1 小鼠染色体 M-FISH 结果

Figure 1 The M-FISH result of mouse. A: Normal mouse; B: Ring + Fragment in chromosome; C: Translocation in chromosome

2.3 急慢性照射小鼠诱发的骨髓染色体畸变

急性照射的各剂量点稳定性畸变和非稳定性畸变数几乎相等; 而慢性照射的小鼠染色体稳定性畸变多, 而非稳定性染色体畸变非常低, 在 1.5 Gy 组小鼠中分析的

980 细胞中未见到非稳定性染色体畸变(表 1)。

2.4 急慢性整体照射小鼠诱发骨髓染色体稳定性畸变的 DDREF 结果发现两个剂量水平的 DDREF 分别为 2.2 ± 0.4 和 3.1 ± 0.6 (表 2)。

表 1 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线急性慢性照射小鼠诱发的骨髓染色体畸变Table 1 The observed bone marrow chromosomal aberration (CA) in mice induced by acute and chronic $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray whole-body irradiation

Dose	No. of mice	Observed cells	Stable CA	Unstable CA
0 Gy	5	1000	0	1
1.5 Gy				
Acute irradiation	5	701	11	12
Chronic irradiation	5	980	7*	0**
3.0 Gy				
Acute irradiation	5	300	31	29
Chronic irradiation	5	667	22**	5**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Significantly different with corresponding acute irradiation group

表 2 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线急性慢性整体照射小鼠诱发的骨髓染色体稳定性畸变的校正因子Table 2 The DDREF of bone marrow translocation in mice induced by acute and chronic $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray whole-body irradiation

Dose	Observed cells	Stable CA	Stable CA Rate	DDREF
1.5 Gy				
Acute irradiation	701	11	0.016 ± 0.005	
Chronic irradiation	980	7	0.007 ± 0.003	2.2 ± 0.4
3.0 Gy				
Acute irradiation	300	31	0.103 ± 0.019	
Chronic irradiation	667	22	0.033 ± 0.018	3.1 ± 0.6

3 讨 论

我们将小鼠染色体特异性的着丝粒和端粒 BAC 探针直接标记成红色、绿色或黄色(红+绿)3种颜色,从而使小鼠的1、2和4号染色体很容易的分辨出,可以检测到易位、双着丝粒、环和断片。这种探针组合可涵盖小鼠全基因组的19.5%,可以检测到全部染色体畸变的33.9%^[6]。

用 FISH 方法进行回顾性剂量重建,基于易位染色体畸变是相对稳定的,终生维持在同一水平,至少变化很小。对于人受到照射后外周血染色体易位是否恒定,需要有人受到照射当时的易位水平,但一般缺乏此种资料,很难进行研究。有研究用 ^{137}Cs γ 射线照射培养中的外周血淋巴细胞,照射后(2~7 d)分析染色体畸变,发现易位也随着时间的延长而下降,但可达到一个可稳定存在的水平,易位水平为最初的53%~74%^[7]。

有关急性慢性校正因子的小鼠研究,目前结果不一,每天照射0.13~1 Gy ^{137}Cs γ 射线,分析小鼠次黄嘌呤磷酸核糖转移酶基因突变细胞发生率,结果 DDREF 为2~10^[8]。也有研究认为在0.006~600 mGy/min 的范围内,DDREF 大于10^[9]。有关人的研究报道,DDREF 有很大的差异。对切尔诺贝利核事故清扫人员的研究认为 DDREF 为2.8^[10];对英国 Sellafield 核设施的工作人员和原子弹爆炸幸存者对比研究结果 DDREF 为5.0~7.0^[11]。Sorensen 等^[12]详细探讨了急性慢性照射诱发小鼠外周血淋巴细胞染色体易位率的影响,急性照射(69.4 cGy/min)与慢性照射(0.5~4 cGy/d)对染色体易位率

诱发的 DDREF 为3~14。本研究中急性照射的剂量率为56.5 cGy/min,慢性照射的剂量率为3.54 cGy/d,与 Sorensen 的研究中间剂量率类似,DDREF 在剂量为1.5 Gy 时为2.2,3.0 Gy 时为3.1,比 Sorensen 的研究结果低。可能与所用的细胞种类不同有关,有研究表明:外周血淋巴细胞和骨髓细胞对照射的反应不同^[13];另外也与细胞的更新速度有关,更新越快,DDREF 值越大。

参考文献

- [3] 刘青杰,陈晓宁,姜恩海,等.多色荧光杂交技术的建立及其在早先受照者剂量重建中的应用[J].中华放射医学与防护杂志,2003,23(2):77-82.
- [4] 刘青杰,陈德清,Julie RK,等.M-FISH 技术检测辐射诱发染色体易位和双着丝粒畸变[J].中华放射医学与防护杂志,2004,24(1):13-15.
- [5] Korenberg JR, Chen XN, Devon KL, et al. Mouse molecular cytogenetic resource: 157 BACs link the chromosomal and genetic maps [J]. *Genome Res*, 1999, 9(5): 514-523.
- [6] Distech CM, Carrano AV, Ashworth LK, et al. Flow sorting of the mouse Cattanach X chromosome, T(X:7)1 Ct, in an active or inactive state [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1981, 29(3): 189-197.
- [7] Hoffmann GR, Sayer AM, Joiner EE, et al. Analysis by FISH of the spectrum of chromosome aberrations induced by X-rays in G₀ human lymphocytes and their fate through mitotic divisions in culture [J]. *Environ Mol Mutagen*, 1999,33(2): 94-110.
- [8] Lorenz R, Leuner K, Deubel W, et al. Normal and reverse dose-rate effect for the induction of mutants in somatic cells by ionizing radiation[J]. *Toxicol Lett*, 1993, 67 (1-3):353-363.
- [9] Bayrakova A, Filev G, Baev I, et al. Reciprocal translocation in germ cells of male mice receiving external gamma-irradiation [J]. *Mutat Res*, 1987, 176(1): 53-58.
- [10] Moore DH, Tucker JD, Jones IM, et al. A study of the effects of exposure on cleanup workers at the Chernobyl nuclear reactor accident using multiple end points [J]. *Radiat Res*, 1997, 148(5): 463-475.
- [11] Tucker JD, Tawn EJ, Holdsworth D, et al. Biological dosimetry of radiation workers at the Sellafield nuclear facility [J]. *Radiat Res*, 1997, 148(3): 216-226.
- [12] Sorensen KJ, Zetterberg LA, Nelson DO, et al. The *in vivo* dose rate effects of chronic gamma radiation in mice: translocation and micronucleus analyses [J]. *Mutat Res*, 2000, 457(1-2): 125-136.
- [13] Tucker JD, Breneman JW, Briner JF, et al. Persistence of radiation-induced translocation in rat peripheral blood determined by chromosome painting [J]. *Environ Mol Mutagen*, 1997, 30(3): 264-272.