

荧光原位杂交研究辐射诱发染色体畸变

张泽云 金瑾珍 综述

北京放射医学研究所 北京 100850

电离辐射对真核细胞的一个重要生物学后果是诱发染色体畸变。有证据表明染色体畸变是导致细胞死亡的主要原因⁽¹⁾,因而辐射诱发染色体畸变形成的机理研究一直是辐射效应研究的重点。电离辐射主要引起四类

DNA 损伤,即单链断裂、双链断裂、各种碱基损伤和DNA-蛋白质交联。染色体畸变主要由双链断裂形成,碱基损伤也可形成染色体畸变⁽²⁾。然而染色体畸变的形成机理十分复杂,迄今还有许多基本问题需要研究。近年来

- ity. *Cytogenet Cell Genet*, 1986; 41: 202
- 12 Lee TC, Wang W, Wu S, Huang RY, et al Differential effects of pre- and posttreatment of sodium arsenite on the genotoxicity of methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells *Cancer Res*, 1986; 46: 1854
 - 13 Lee TC, Lee KC, Tzeng YJ, et al Sodium arsenite potentiates the clastogenicity and mutagenicity of DNA crosslinking agents *Environ Mutagen*, 1986; 8: 119
 - 14 Leonard A. Recent advances in arsenic mutagenesis and carcinogenesis *Toxicol Environ Chem*, 1984; 7: 241
 - 15 沈善美, 吴国用 亚硒酸钠对亚砷酸钠所致的小鼠精子畸形的影响 *延边医学院学报*, 1989; 12: 18
 - 16 Jacobson Kram D, Montalbano D. The reproductive effects assessment group's report on the mutagenicity of inorganic arsenic *Environ Mutagen*, 1985; 7: 787
 - 17 Morton WE, Dunnette DA. Health effects of environmental arsenic: in: *Arsenic in the Environment, Part II: Human Health and Ecosystem Effects* (ed Nriagu JO), John Wiley & Sons, Inc., 1994: 17-34
 - 18 Hutchinson J. On some examples of arsenic-keratosis of the skin and of arsenic-cancer *Trans pathol Soc, London*, 1888; 39: 352
 - 19 Huepper WC. Occupational and environmental cancers of the respiratory system, Springer-Verlag, 1966: 30-52
 - 20 Huepper WC. Chemical Carcinogenesis and Cancer Charles C. Thomas Pub., 1984: 3384-3398
 - 21 Ott MG, Holder BB, Gordon HL. Respiratory cancer and occupational exposure to arsenical *Arch Environ Health*, 1974; 29: 250
 - 22 Sundeman FW Jr. Metal carcinogenesis: in: *Advances in Modern Toxicology* (eds Goyer RA and Mehlman MA), Washington, Hemisphere Pub. Co., 1977: 1: 257-295
 - 23 Chen CJ, Lin LJ. Human carcinogenicity and teratogenicity induced by chronic exposure to inorganic arsenic: in: *Arsenic in the Environment, Part II: Human Health and Ecosystem Effects* (ed Nriagu JO), John Wiley & Sons, Inc., 1994: 109-131
 - 24 Higgins I, Welsh K, Uhl W, et al Influence of arsenic exposure and smoking on lung cancer among smelter workers: A pilot study. *Am J Ind Med*, 1981; 2: 33
 - 25 Brown CC, Chu KC. Implications of the multistage theory of carcinogenesis applied to occupational arsenic exposure *J Natl Cancer Inst*, 1983; 70: 455
 - 26 Pershagen G. The carcinogenicity of arsenic *Environ Health Perspect*, 1981; 40: 93
 - 27 Ivankovic S, Eisenbrand G, Preussman R. Lung carcinoma induction in SD-rats after a single intracheal instillation of an arsenic-containing pesticide mixture formerly used in vineyards *Int J Cancer*, 1979; 24: 786
 - 28 云南锡业公司劳动保护研究所, 华北辐射防护研究所. 大鼠气管注入含砷粉尘诱发肺癌的实验观察 *中华肿瘤杂志*, 1982; 4: 14
 - 29 Ishinishi N, Yamamoto A. Discrepancy between epidemiological evidence and animal experimental results *J UOEH*, 1983; 5(Suppl): 109
 - 30 Di Paolo JA, Casto BC. Quantitative studies of in vitro morphological transformation of Syrian hamster cells by inorganic metal salts *Cancer Res*, 1979; 39: 1008
 - 31 Casto BC, Meyers J, Di Paolo JA. Enhancement of viral transformation for evaluation of the carcinogenic and mutagenic potential of inorganic metal salts *Cancer Res*, 1979; 39: 193
 - 32 Landolph JR. Molecular and cellular mechanisms of transformation of C3H/10T1/2 Cl8 and diploid human fibroblasts by unique carcinogenic, nonmutagenic metal compounds: A review. *Biol Trace Elem Res*, 1989; 21: 459

发展的染色体荧光原位杂交 (Fluorescence in situ hybridization, FISH) 技术, 应用染色体特异的探针选择性地显示特定的染色体, 可以精确地检测染色体断裂和互换畸变⁽³⁾。FISH 技术与其它细胞遗传学和分子遗传学技术相结合, 为研究染色体畸变的形成和修复以及辐射生物剂量的估计提供了强有力的工具。本文就近年来应用 FISH 技术研究辐射诱发染色体畸变的进展作一综述。

1. 辐射诱发染色体畸变的形成

由于受多种因素的影响, 如 DNA 的复制、DNA 的损伤修复、细胞受照时所处的时相、畸变染色体在细胞中的传递和受损细胞的间期死亡等, 辐射诱发的 DNA 双链断裂, 间期细胞的染色体断裂和互换畸变以及中期分裂细胞的断裂和互换畸变在数量上依次减少。分析中期细胞只能研究修复后的染色体畸变, 早熟染色体凝集 (PCC) 技术只能研究断裂畸变。应用染色体特异探针的 FISH 技术与 PCC 相结合, 不仅可分析细胞周期中任何时相的断裂和互换畸变, 而且使畸变分析限定在特定的染色体上而简化了分析过程。Kovacs 等⁽⁴⁾应用此技术研究 137Cs 诱发人成纤维细胞染色体畸变的结果显示, 照射后立即检测, 染色体畸变绝大部分是断裂, 照后 24 小时, 85% 的断裂愈合 (至少在光镜水平), 其余的断裂一半错接形成互换畸变, 一半仍然保持断裂状态, 至第一次中期分裂时, 染色体畸变进一步减少, 尤其是断裂畸变显著减少。

染色体畸变形成的机理主要有断裂重接假说和互换假说, 根据互换假说, 一个互换畸变的形成只能发生在两条染色体间, 而根据断裂重接假说推知, 互换畸变由染色体断裂端间随机重接形成, 可涉及三条或三条以上的染色体。Lucas⁽⁵⁾等应用三色荧光标记的探针检测辐射诱发的染色体畸变形成的模式, 结果发现由三条染色体的六个断裂端间交错重接形成的互换畸变, 表明互换畸变的形成

与断裂重接假说相符合。

2. 畸变断裂点在染色体上和染色体间的分布

畸变断裂点在染色体上和染色体间的分布不仅涉及畸变染色体的形成机制, 而且是 FISH 技术检测染色体畸变所必须回答的问题, 因为 FISH 技术检测的是特定染色体的畸变率, 只有辐射诱发的染色体畸变断裂点在染色体上和染色体间的分布是随机的, 才能根据特定染色体占整个细胞 DNA 的份额将它换算成整个细胞的染色体畸变率。通过对正常人群的自发染色体畸变和肿瘤病人放射治疗诱发的染色体畸变的研究表明染色体畸变断裂点的分布是非随机的, 但这些研究主要通过显带方法来判断断裂点, 由于方法局限, 研究结果的精确性受到限制。

Pandita⁽⁶⁾等用 PCC 和 FISH 相结合的方法研究染色体的大小与辐射诱发的染色体畸变的关系, 结果表明一定剂量下染色体单位长度上的断裂与染色体的 DNA 含量呈线性增加, 并且剂量越大增幅越大, 说明断裂点在染色体间的分布是非随机的, 大染色体比小染色体对辐射诱发染色体断裂更敏感。Tucker⁽⁷⁾等详细研究了体内和体外照射诱发人 1、2、4 号染色体的断裂点分布, 结果表明断裂点在这些染色体上的分布都是非随机的, 染色体臂的末端比中部断裂和重排少, 作者认为是由非随机的断裂和修复造成的。Knehr⁽⁸⁾等的实验也表明断裂互换位点在染色体上的分布是非随机的。有证据表明, 染色质的结构和翻译活性影响 DNA 的断裂和修复, 常染色质比异染色质产生更多的原初损伤和具备更强的修复能力⁽⁹⁾, 染色体的末端 DNA 序列比其它序列具有更高的辐射敏感性⁽¹⁰⁾。染色质在细胞核中所处的状态和位置也影响其辐射敏感性和畸变形成^(11, 12)。

但是, Kovacs 等⁽⁴⁾的研究结果正好相反, 他们应用 PCC 和 FISH 技术相结合研究了 1、4、8、13 号染色体在照射后 0、24 小时及第一次分裂和多次分裂后的染色体畸变, 结

果显示这些染色体无论是原初的损伤还是修复后的畸变,断裂互换位点的分布都是随机的,每号染色体的畸变率与染色体DNA的含量成正比。Matsuoka⁽¹³⁾等的结果也显示染色体畸变在染色体间是随机分布的。上述结果不一致的原因还不清楚,可能染色体的畸变位点包含随机和非随机两种成分,并且与所研究的材料有关。

3 易位和双着丝粒染色体的比例

易位染色体和双着丝粒染色体分别是稳定性染色体畸变和非稳定性染色体畸变的主要类型。根据染色体断裂点随机重接理论,一般认为照后第一次中期分裂细胞中产生易位染色体和双着丝粒染色体的机率应该是相等的⁽¹⁴⁾。过去用常规染色和显带方法分析,易位染色体特别是微小易位不如双着丝粒染色体容易检出,结果是双着丝粒染色体多于易位染色体。应用FISH技术检测,多数学者的结果是易位染色体数明显多于双着丝粒染色体^(8, 12, 13, 15, 16, 17)。而Nakano⁽¹⁸⁾用FISH结合常规染色, Straume⁽¹⁹⁾用染色体特异探针和着丝粒探针双荧光检测都发现易位染色体和双着丝粒染色体数相等,并且认为单独应用FISH检测畸变,容易把双着丝粒染色体误认为是易位。但Bauchinger⁽¹⁷⁾应用特定染色体探针和着丝粒探针检测的结果还是易位染色体多于双着丝粒染色体,作者认为将双着丝粒染色体误读为易位染色体不足以解释它们间的差异,并且排除了是由于计数了非稳定细胞(含非稳定染色体畸变)中的易位染色体造成的解释。Tucker⁽¹²⁾和Matsuoka⁽¹³⁾的实验结果排除了这种差异是由于计数细胞中混有二次或多次分裂细胞的缘故。Knehr⁽⁸⁾研究了12条人染色体的易位和双着丝粒畸变的观察值和预期值,发现1、4、6、7、8和X染色体的易位数比预期值高,并且各号染色体的易位都高于双着丝粒染色体,但不同染色体的差值不同。Robert⁽²⁰⁾的研究发现X染色体很少发生易位畸变,Natarajan⁽²¹⁾的实验

提示形成易位和双着丝粒的损伤修复机制可能不同。现在还不清楚是易位染色体确实多于双着丝粒染色体,还是其它因素影响了易位和双着丝粒的检测,如易位染色体的识别标准,着丝粒的精确检测,特定染色体探针的选择,计数细胞的分裂次数等。对这个问题的深入研究有助于染色体畸变形成机制的揭示。

4 染色体复杂畸变的检测

染色体复杂畸变指在2条或多于2条染色体间发生3个或3个以上断裂点的重排形成的畸变。应用常规染色或显带方法,只能检出二条染色体间的简单易位和部分复杂的畸变。而应用FISH技术检测染色体畸变的结果表明辐射诱发的染色体结构畸变类型非常复杂。根据染色体随机断裂重接的假说和实验结果可知这种多位点损伤的畸变随剂量而增加,在低剂量时($< \sim 2\text{Gy}$),染色体复杂畸变可忽略,但在高剂量时,它严重影响检测结果^(12, 22), Simpson⁽²³⁾等的实验结果显示4Gy和6Gy X射线诱发的染色体畸变中,复杂染色体畸变分别占所检测畸变的35%和54%。Savage⁽²⁴⁾等从随机断裂重接理论上分析了FISH检测的染色体复杂畸变,结果显示实际畸变类型非常多,同样的畸变用不同的染色体探针检测,常表现为不同的畸变类型,而许多不同的畸变类型又可显示相同的杂交信号,许多看上去是简单畸变的信号,实际上是复杂的畸变。多种荧光标记的探针同时与辐照细胞杂交可以提高对复杂畸变的检出效率,但是增加了镜检的难度。由于辐射诱发大量的复杂畸变,Tucker⁽²⁵⁾等制定了一套应用于FISH的畸变染色体分类系统,即PANT系统,使得它能描述FISH检测的所有畸变类型。

5 FISH检测染色体畸变的剂量效应关系

虽然不同学者应用FISH检测的互换畸变存在较大的差异,并且易位高于双着丝粒

染色体,但 FISH 与 G 显带方法对易位染色体和双着丝粒染色体检出效率基本一致^{12,13},畸变和照射剂量呈线性平方关系,在 2Gy 以下,符合情况较好,剂量下限约为 0.1 - 0.2Gy^(4,22)。在高剂量范围,由于辐射诱发大量的复杂畸变,染色体畸变的剂量效应关系不复存在。Tucker⁽²⁶⁾等应用 PA NT 系统记录畸变,结果表明剂量效应关系也能很好的反应。但 Finnon 等认为 PA NT 系统记录的畸变不服从泊松分布,因而不适合用来进行剂量估计⁽²⁷⁾。虽然应用 FISH 检测的畸变估计剂量还有待进一步的研究,但由于 FISH 技术能灵敏检测稳定性染色体畸变,利用 FISH 检测早先受照者和低剂量慢性受照者的易位染色体畸变用以估计其受照剂量具有广阔的前景。

FISH 技术由于能灵敏检测染色体断裂和交换畸变,已成为辐射细胞遗传学研究的强有力工具,并积累了大量的实验数据。在染色体畸变形成机制研究领域, FISH 技术的应用加深了对辐射诱发染色体畸变形成过程中 DNA 的断裂,修复,畸变的形成,畸变的分类,畸变位点的分布,畸变随细胞分裂的变化等一系列规律的认识。在生物剂量估计方面,应用 FISH 检测易位染色体估计早期照射受害者的生物剂量已取得一定进展,并在实际应用中得到初步验证。

参考文献

- Joshi GP, Nelson WJ, Revell SH, et al X- ray- induced chromosome damage in live mammalian cells, and improved measurements of its effects of their colony- forming ability. *Int J Radiat Biol*, 1982; 41: 161.
- Natarajan AT. Chromosomal aberrations from radiation- induced DNA lesions. In: Shama T, et al trends in chromosome research. Narosa Publishing House, 1990: 119- 124.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high- sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 2934.
- Kovacs M S, Evans JW, Johnstone M, et al Radiation- induced damage, repair and exchange formation in different chromosomes of human fibroblasts determined by fluorescence in situ hybridization. *Radiat Res*, 1994; 137: 34.
- Lucas JN, Sachs RK. Using three- color chromosome painting to test chromosome aberration models. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90: 1484.
- Pandita TK, Gregoire V, Dhingra K. Effect of chromosome size on aberration levels caused by gamma radiation as detected by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 1994; 67: 94.
- Tucker JD, Senft JR. A analysis of naturally occurring and radiation- induced breakpoint locations in human chromosomes 1, 2 and 4. *Radiat Res*, 1994; 140: 31.
- Knehr S, Zitzelsberger H, Brasehmann H, et al A analysis for DNA- proportional distribution of radiation- induced chromosome aberrations in various triple combinations of human chromosomes using fluorescence in situ hybridization. *Int J radiat Biol*, 1994; 65: 683.
- Slijepcevic P, Natarajan AT. Distribution of X- ray- induced G2 chromatid damage among Chinese hamster chromosomes: influence of chromatin conformation. *Mutat Res*, 1994; 323: 113.
- Alvarez L, Evans JW, Wilks R, et al Chromosomal radiosensitivity at intrachromosomal telomeric sites. *Genes, Chromosome & Cancer*, 1993; 8: 8.
- Mullenders LHF, Venema J, van Hoffen A. Heterogeneity of DNA repair in relation to chromatin structure. In: Obe G, et al eds. Chromosomal aberrations. Springer-Verlag, 1990: 13- 21.
- Tucker JD, Ramsey MJ, Lee DA, et al Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human peripheral lymphocytes following acute exposure to ionizing radiation in vitro. *Int J Radiat Biol*, 1993; 64: 27.
- Matsuoka A, Tucker JD, Hayashi M, et al Chromosome painting analysis of X- ray- induced aberrations in human lymphocytes in vitro. *Mutagenesis*, 1994; 9: 151.
- Savage JRK, Papworth DG. Frequency and distribution of asymmetrical versus symmetrical chromosome aberrations. *Mutat Res*, 1982; 95: 7.
- Schmid E, Zitzelsberger H, Brasehmann H, et al Radiation- induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization with a triple combination of composite whole chromosome- specific DNA probes. *Int J Radiat Biol*, 1992; 62: 673.
- Natarajan AT, Vyas R, Darroudi F, et al Frequencies of X- ray induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by in situ

荧光原位杂交(FISH)在毒理遗传学中的应用

汪旭 梁子卿 合正基 刘素清 综述

云南师范大学生命科学系 昆明 650092

原位杂交(In Situ Hybridization, ISH), 是一种在保持组织、细胞或染色体原有形态结构的基础上, 对其内部特殊核苷酸顺序进行检测及定位的分子生物学手段。ISH 构成了分子遗传学与经典细胞遗传学之间的桥梁, 其原理是将已标记或经特殊修饰的核酸探针与已固定的组织、细胞或染色体中 DNA、RNA 杂交, 继而通过分析标记探针在被检对象中的显示状况而达到对特殊目标顺序进行检测、定位的目的。用放射性同位素标记探针和放射自显影曾一度作为唯一、高度

敏感的 ISH 手段。早在 1969 年, 以放射性同位素进行 ISH 的方法业已建立⁽¹⁾; 1981 年, 用该手段第一次在细胞染色体上进行了单基因定位⁽²⁾。近年来, 利用化学修饰合成核苷酸(如 dig-UTP, dUTP 及 ddUTP 等), 并将这些核苷酸掺入可与被检目标顺序杂交的 RNA、DNA 或寡核苷酸片段中, 杂交后, 通过荧光法、酶沉淀法或发色团检测来鉴定目标顺序是否存在及其位置。荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization, FISH) 是目前最常用的 ISH 手段之一, 其具有操

- hybridization using chromosome - specific DNA libraries *Int J Radiat Biol*, 1992; 61: 199.
17. Bauchinger M, Schmid E, Ziteelsberger H, et al Radiation-induced chromosome aberrations analysed by two-colour fluorescence in situ hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe *Int J Radiat Biol*, 1993; 64: 179.
 18. Nakano M, Nakashima E, Pawel DJ, et al Frequency of reciprocal translocations and dicentrics induced in human blood lymphocytes by X-irradiation as determined by fluorescence in situ hybridization *Int J Radiat Biol*, 1993; 64: 565.
 19. Straume T, Lucas JN. A comparison of the yields of translocations and dicentrics measured using fluorescence in situ hybridization. *Int J Radiat Biol*, 1993; 64: 185.
 20. Jordan R, Schwartz JL. Noninvolvement of the X chromosome in radiation-induced chromosome translocations in the human lymphoblastoid cell line TK6 *Radiat Res*, 1994; 137: 290.
 21. Natarajan AT, Balajee AS, Boei JWA, et al Recent developments in the chromosomal damage *Int J Radiat Biol*, 1994; 66: 615.
 22. Lucas JN, Awa A, Straume T, et al Rapid translocation frequency analysis in man decades after exposure to ionizing radiation *Int J Radiat Biol*, 1992; 62: 53.
 23. Simpson PJ, Savage JRK. Identification of X-ray induced complex chromosome exchanges using fluorescence in situ hybridization: a comparison at two doses *Int J Radiat Biol*, 1994; 66: 629.
 24. Savage JRK, Simpson P. FISH "painting" patterns resulting from complex exchanges *Mutat Res*, 1994; 312: 51.
 25. Tucker JD, Morgan WF, Awa AA, et al A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting *Cytogenet Cell Genet*, 1995; 6: 211.
 26. Tucker JD, Lee DA, Moore II DH. Validation of chromosome painting: II. A detailed analysis of aberrations following high doses of ionizing radiation in vitro. *Int J Radiat Biol*, 1995; 67: 19.
 27. Finnon P, Lloyd DC, Edwards AA. Fluorescence in situ hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry. *Int J Radiat Biol*, 1995; 68: 429.