

260(1):89.

8. Herbert R, Marcus M, Wolff MS, et al. Detection of adducts of deoxyribonucleic acid in white blood cells of roofers by  $^{32}\text{P}$ -postlabeling. Relationship of adduct levels to measures of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Scand. J. Work. Environ Health*, 1990; 16(2):135.

9. 王良君, 余应年, 陈星若. 建立一种只标记加成后碱基的  $^{32}\text{P}$  后标记检测 DNA 加成物技术. *癌变·畸变·突变* 1993; 5(4):30.

变·畸变 1993; 5(4):30.

10. Phillips DH, Hemminki K, Hewer A, et al. Monitoring occupational exposure to carcinogens: Detection by  $^{32}\text{P}$ -postlabeling of aromatic DNA adducts in white blood cell DNA from foundry workers. *Mutat Res*, 1988; 204(3):531.

11. Randerath K, Li D, Randerath E, et al. Age-related DNA modifications (I-compounds): modulation by physiological and pathological processes. *Mutat Res*, 1990; 238(3):245.

癌变·畸变·突变 1994年第6卷第2期

## 抗着丝点抗体在鉴别微核起源上的应用\*

汪旭 刘素清\*\* 合正基 邱玉洁

云南师范大学生物系 昆明 650092

**摘要** 以抗着丝点抗体间接免疫荧光染色法(CREST染色法)分析了纺锤体毒剂秋水仙素、有丝分裂抑制剂对苯二酚及多功能烷化剂丝裂霉素C诱发小鼠骨髓细胞微核的起源。结果指出,3种受试物均显著诱发小鼠骨髓嗜多染红细胞微核发生。秋水仙素诱发微核中,71%含有着丝点,表现CREST阳性,提示这些微核由完整落后染色体形成。对苯二酚诱发微核中,19%为CREST阳性,与对照无显著差异,说明其遗传毒性主要体现为染色体诱裂效应。丝裂霉素C在所有受试物中微核诱发率居首,但CREST阳性率仅6%,显著低于对照,暗示该化合物具强烈的染色体诱裂效应,且诱裂部位可多集中在着丝粒处,使诱发微核内均无完整的着丝点功能结构,表现CREST阴性,CREST染色法能够为鉴别哺乳动物非整倍体诱发剂提供依据。

**关键词** 抗着丝点抗体;非整倍体诱发剂;落后染色体;无着丝粒片段;微核;骨髓细胞

## ANTI-KINETOCHORE ANTIBODY STAINING TO DISCRIMINATE BETWEEN TWO MICRONUCLEUS ORIGINS

Wang Xu, Liu Suqing, He Zhengji, Qiu Yujie

Department of Biology, Yunnan Normal University, Kunming 650092

**Abstract** Antikinetochore antibody staining (CREST staining) was applied to distinguish micronuclei in vivo induced by spindle poison colchicine (COL), mitotic arrestant

\* 国家自然科学基金及云南省科委基金资助 \*\* 并列第一作者

hydroquinone (HQ) and polyfunctional alkylating agent mitomycin C (MMC). Three chemicals significantly induced micronuclei in polychromatic erythrocytes of mouse bone marrow. About 71% of the micronuclei induced by COL were CREST positive, it indicated that those micronuclei were formed by whole lagging chromosomes. Only 19% micronuclei induced by HQ were CREST positive and no significant difference from the control. HQ was considered, therefore, a clastogen. The frequency of MMC-induced micronuclei reached 5.45% but only 6% of them appeared CREST positive, MMC may extensively damage the kinetochores and induced CREST negative micronuclei, CREST staining will give some supplemental information about aneuploid detecting.

**Key words** antikinetochore antibody; aneuploid; lagging chromosome; acentric fragment; micronucleus; bone marrow cells

鉴于小鼠骨髓细胞微核分析具有快速、准确的特点，其已广泛地应用于化学物质的诱变性检测。微核通常由无着丝粒染色体断片及落后染色体形成，但常规手段显然无法区别这2类微核的来源。近年来，通过微核大小分析<sup>(1,2)</sup>、微核C-分带及微核DNA含量分析<sup>(3,4)</sup>，人们力图区分2类微核的来源，但效果均不尽人意。1980年，Moroi在进行性系统硬化症（progressive systemic sclerosis）患者血清中发现抗着丝点抗体（antikinetochore antibody）<sup>(5)</sup>。因这类患者伴有CREST综合症（钙质沉着、雷诺氏现象、食管运动失调、指趾硬化、毛细血管扩张变异），故利用抗着丝点抗体进行间接免疫荧光染色称CREST染色。应用该手段，许多实验室已能较为成功地在体外实验中分辨由染色体无着丝粒断片和落后染色体形成的微核<sup>(6,7,8)</sup>。Miller等也已在小鼠体内微核分析中，尝试了该手段的可行性<sup>(9,10)</sup>，认为CREST染色法的应用，能够为鉴别非整倍体诱变剂提供进一步证据。

我们以CREST染色法，分析了下列3种化合物在小鼠骨髓红细胞中诱发微核的起源：纺锤体毒剂暨非整倍体诱变剂秋水仙素（Colchicine, COL），有丝分裂抑制剂对苯二酚（Hydroquinone, HQ）及多

功能烷化剂丝裂霉素C（Mitomycin C MMC）。

## 材料和方法

### 1. 实验动物及处理方式

实验用动物为昆明种雄性小白鼠，购自云南大学动物房，10-12周龄，体重25-30g。

每受试组含3只雄性小鼠，对照另设。所有受试物用前以无菌双蒸水配制，腹腔注射动物。受试剂量为70%LD<sub>50</sub>，COL为2mg/kg，HQ及MMC分别为120mg/kg及3mg/kg。处理24h后，断颈处死动物，将股骨骨髓悬浮于5ml生理盐水中，1000rpm离心5min，弃上清液，滴加少许灭活小牛血清，常规涂片，冷风吹干，-20℃甲醇固定20min。每一动物取1张涂片以5%Giemsa（pH 6.8）染色20min，透明封片后计数1000个嗜多染红细胞（Polychromatic erythrocyte, PCE）中微核率。其余涂片立即行CREST染色或-20℃保存。

### 2. CREST染色

间接免疫荧光染色所用抗着丝点抗体（I抗）取自进行性系统硬化病患者外周血血清，II抗为异硫氰酸荧光素（FITC）标记的羊抗人IgG，均由北京师范大学

物系王永潮教授所赠, 特此致谢。

固定后涂片置 0.02 5% SDS 及 0.1% Triton-X100 各 5min, 振动洗涤 2 次, 各 5min; 凉干, 滴加 50 $\mu$ l I 抗 (DPBS 1:40 稀释, 含 0.01%伊文氏蓝) 于细胞分布均匀处, 加 18 $\times$ 18mm 盖片, 置湿盒 37 $^{\circ}$ C 温育 1h; DPBS 振动洗涤 3 次, 各 5min, 稍干后滴加 60 $\mu$ l 1:10 稀释的 II 抗 (含 0.01%伊文氏蓝), 加盖片后置湿盒中 37 $^{\circ}$ C 温育 1h; DPBS 振动洗涤 3 次, 各 3min; 0.1%Hoechst 33258 反染 20min, DPBS 洗 2 次, 每次 3min, 蒸馏水冲洗, 凉干, 以甘油缓冲液 (pH9.8) 封固, 荧光显微镜观察, 每受试组分析 100 个含微核细胞, 确定微核内着丝点的有无。

在 330-380nm 激发紫外光下, 可见

Hoechst 33258 反染的细胞核及微核呈白色; 380-490nm 时, 由 FITC-羊抗人 IgG 间接标记的染色体着丝点与微核内存在的着丝点为黄色荧光颗粒, 在该波长下, 红细胞胞质为暗红色, 白细胞胞质为淡黄色或无色。

### 结果和讨论

图 1(见封三)所示为 CREST 染色后, 380-490nm 波长时观察到的骨髓细胞特性, 淡黄色白细胞内部的黄色荧光斑点为着丝粒(Centromere)所在区域, 红细胞为暗红色。图 2A-B 为红细胞中含着丝点的微核, A 幅显示微核, B 幅显示同一微核的着丝点, C 幅中微核清晰可见, 但在 D 幅中未出现着丝点, 实验结果见表 1。

Tab 1 Micronucleus (MN) analysis in mouse bone marrow erythrocyte by CREST staining

chemical	dose (mg / kg)	treatment interval (h)	animal number	number of MN	CREST		PCE freq. of MN
					positive (%)	negative (%)	
control	0	24	4	23	18	82	2.32
COL	2	24	3	100	71	29	2.25
HQ	120	24	3	100	19	81	5.45
MMC	3	24	3	100	6	94	

溶剂对照组中, PCE 微核率为 2.32%, 荧光分析的 100 个微核中, 71% 含着丝点, 为 CREST 阳性, 充分证实作为纺锤体毒剂的 COL 所诱发的微核多由整条落后染色体形成, 汪旭等的工作发现 COL 无明显的染色体诱裂效应<sup>(11)</sup>, 故对余下 29% 的微核起源尚无满意解释, 估计 COL 对细胞分裂的阻滞作用延长了染色体与细胞质中蛋白酶之间的接触时间<sup>(12)</sup>, 形成通常称为染色体裂隙(gap)的非畸变型变异, 随着有丝分裂阻滞时间的延长, 其中少量裂隙可能发展为断裂, 继而产生 CR-

EST 阴性微核。

HQ 为有效的有丝分裂抑制剂与染色体诱裂剂<sup>(11,13)</sup>, Miller 认为有丝分裂抑制剂一般均具有非整倍体诱发潜能<sup>(13)</sup>, 且 HQ 诱发微核较大, 47% 与 COL 诱发微核有类似核质直径比<sup>(2)</sup>, 因而人们曾一度认为 HQ 具有诱发无着丝粒染色体断片及落后染色体产生的双重作用<sup>(14)</sup>, 但在本实验条件下, HQ 在 PCE 中的微核率高达 2.25%, 却仅有 19% 表现 CREST 阳性, 与对照相差无几, 提示 HQ 无明显的落后染色体诱发作用。回顾以往的染色体结构

畸变分析,曾发现 HQ 能诱发骨髓细胞染色体多重畸变,常集多点断裂、交换于同一细胞<sup>(14)</sup>,由此可能导致粘度增大的染色体断片互融而形成大微核从而表现 CREST 阴性。籍此,有理由排除 HQ 在哺乳动物体细胞中的非整倍体诱发功能,其遗传毒性主要为染色体诱裂效应。

MMC 测试组中, PCE 中诱发微核率居首,达 5.45%,但在 CREST 分析中,仅 6%表现出 CREST 阳性,提示 MMC 诱导产生的微核几乎全来自无着丝粒断片。有趣的是,MMC 组中 CREST 阳性微核的百分数显著低于对照(18%),目前对此尚无满意解释, Vig<sup>(15)</sup>等曾发现哺乳动物染色体上一些无功能的双着丝粒与多着丝粒区域表现 CREST 阻性,提示这些部位的失活着丝点不被抗着丝点抗体所标记。由于 MMC 在小鼠性细胞及体细胞中所诱导的染色体断裂位点多集中于着丝粒区域<sup>(16,17)</sup>,推测断裂片段极少有机会携带着丝点的完整功能结构,从而使绝大多数诱发微核表现 CREST 阴性。

实验结果证明:CREST 染色法能够为判断哺乳动物体细胞非整倍体诱变剂提供较为准确的依据。

#### 参考文献

1. Yamamoto KI, Kikuchi Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by the spindle poison. *Mutat Res*, 1980; 71:127.
2. 汪旭,李雯,周汝敏等.微核直径测试作为非整倍体诱变剂的分析手段.遗传 1993; 15(3):8.
3. Vanderkerken K, Vanparys PH, Verschaeve L, et al. The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis*, 1989; 4(1):6.
4. Verschaeve L, Vanderkerken K, Kirsch VM, et al. C-banding as a simple tool to discriminate between micronuclei induced by clastogens and aneugens. *Stain Technol*, 1988; 63(4):351.
5. Moroi Y, Peebles C, Fritzler J, et al. Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *PNAS*, 1980; 77(3):1627.
6. Degrassi F, Tanzarella C et al. Immunofluorescent staining of kinetochore in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy. *Mutat Res*, 1988; 203:339.
7. Eastmond DA, Tucker JD. Kinetochore localization in micronucleated cytokinesis-blocked Chinese hamster ovary cells: A new and rapid assay for identifying aneuploidy-inducing agents. *Environ Mol Mutagenesis*, 1989; 13:34.
8. Fenech M, Morley AA. Kinetochore detection in micronuclei: an alternative method for measuring chromosome loss. *Mutagenesis*, 1989; 4(2):98.
9. Miller BM, Adler ID. Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocyte induced in vivo. *Mutagenesis*, 1990; 5(4):411.
10. Miller BM, Zitzlesberger HF, Weier HU, et al. Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, 1991; 6(4):297.
11. Wang Xu, Adler ID. Clastogenic effects of known and suspect spindle poisons studied by chromosome analysis in mouse bone marrow cells. *Mutagenesis*, 1990; 5(3):371.
12. Natarajan AT, Obe G. Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. III. *Restriction endonucleases*, 1984; 90(2):120.
13. Miller BM, Adler ID. Suspect spindle poisons; Induction of C-mitotic effects in mouse bone marrow cells. *Mutagenesis*, 1989; 4(3):208.
14. 汪旭, Miller BM, Adler ID 等.三种有丝分裂抑制剂诱发小鼠骨髓细胞非整倍体的比较研究.遗传学报, 1991; 18(4):312.
15. Vig BK. Kinetochores, centromeres, spindles and the induction of aneuploidy. *Mutat Res*, 1988; 201:259.
16. Adler ID, Comparative cytogenetic study after treatment of mouse spermatogonia with mitomycin C. *Mutat Res*, 1974; 23:369.
17. Kliesch U, Danford N, Adler ID. Micronucleus test and bone marrow chromosome analysis. *Mutat Res*, 1981; 80:321.