

# 荧光原位杂交技术分析大剂量照射后 Calyculin A 诱导的早熟凝集染色体

马娅 丁卜同 卢峰 李洁清 侯殿俊 贾喜明 乔建维 李卫国

**【摘要】** 目的 探索用荧光原位杂交(FISH)技术分析大剂量照射后 Calyculin A (CA) 诱导的早熟凝集染色体的可行性。方法 采用 X 射线照射离体外周血, 吸收剂量为 0、1、5、10、15 和 20 Gy。RPMI 1640 培养基培养, CA 诱导染色体早熟凝集, 1、4 号全染色体探针荧光原位杂交, 荧光显微镜下观察, 计数畸变阳性细胞数及两条染色体断片数, 拟合剂量效应曲线。结果 以阳性细胞作为观察对象, 剂量范围在 0 ~ 15 Gy 时, 阳性细胞数和照射剂量呈现良好的剂量-效应关系,  $Y = 0.008 + 0.065D + 1.858 \times 10^{-5} D^2$  ( $R^2 = 0.994$ )。以断片数作为观察对象, 剂量范围在 0 ~ 20 Gy 时, 同样呈现良好的剂量-效应关系:  $Y = -0.032 + 0.216D - 0.01D^2$  ( $R^2 = 1.0$ )。结论 用 FISH 分析 CA 诱导的早熟凝集染色体, 可用于估算大剂量照射后的生物剂量。

**【关键词】** 荧光原位杂交; 早熟凝集染色体; 大剂量照射

**Analysis of Calyculin-A-induced prematurely condensed chromosome after high-dose irradiation by using fluorescence in situ hybridization (FISH)** Ma Ya, Ding Butong, Lu Feng, Li Jieqing, Hou Dianjun, Jia Ximing, Qiao Jianwei, Li Weiguo. Institute of Radiation Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China

**【Abstract】 Objective** To explore the feasibility of using fluorescence in situ hybridization (FISH) technology to detect the Calyculin A (CA)-induced prematurely condensed chromosome (PCC) after high-dose irradiation of X-rays. **Methods** Human peripheral blood was irradiated by X-rays at 0, 1, 5, 10, 15 and 20 Gy. Whole blood was cultured with RPMI 1640 medium, thereafter the CA was used to induce premature chromosome condensation. The No. 1 and No. 4 whole chromosome probe was used in the FISH, and the chromosomes were observed under the fluorescence microscope. The aberration positive cell quantity and the quantity of fragments of two chromosomes were counted, and dose-effect curve fitted was performed. **Results** The ratio of chromosomal aberration positive cells had a good dose response (0 - 15 Gy) with an equation  $Y = 0.008 + 0.065D + 1.858 \times 10^{-5} D^2$  ( $R^2 = 0.994$ ). The PCC fragments also had a good dose response within 0 - 20 Gy with an equation  $Y = -0.032 + 0.216D - 0.01D^2$  ( $R^2 = 1.0$ ).

**Conclusions** Analysis of Calyculin-A-induced PCC by using FISH technique could be used to estimate the biological dose after high-dose irradiation.

**【Key words】** Fluorescence in situ hybridization; Prematurely condensed chromosome; High-dose radiation

用双着丝粒染色体和着丝粒环作为生物剂量估算的金标准, 估算急性均匀照射情况下的生物剂量非常准确, 但在照射剂量超过 5 Gy 的大剂量照射事故时, 由于受照人员外周血淋巴细胞急剧减少、细胞周期阻滞、细胞凋亡和间期细胞死亡、取样时间等因素很难获得足够的中期分裂相, 用双着丝粒等染色体畸变进行分析有很大局限性。陈英等<sup>[1]</sup>

通过延长培养时间到 72 h 建立了特大剂量照射后的剂量-效应曲线, 但是染色体畸变可能会随着培养时间的延长而丢失, 从而影响剂量估算的准确性。近年来大剂量受照后, 早熟凝集染色体 (PCC) 成为生物剂量估算的一种重要方法, 目前国内外对电离辐射诱导 PCC 的研究中, 观察指标主要有 PCC 环和 PCC 断片, 但是由于 PCC 染色体在 G<sub>1</sub> 期以单体形态存在, 计数 PCC 断片需要花费大量的时间精力; 此外, PCC 环的形态各异, 有实心环、肾形环、空心环等, 计数 PCC 环同样比较繁琐。荧光原位杂交技术 (FISH) 可以在荧光显微镜下直观地看到标记染

染色体的畸变情况,本实验拟用 Calyculin A (CA) 联合秋水仙素诱导大剂量照射后的早熟凝集染色体,收获制片以后用荧光原位杂交 (FISH) 技术分析早熟凝集染色体 (PCC), 建立剂量-效应曲线,为大剂量受照后生物剂量的估算提供一种新的方法。

## 材料与方 法

1. 主要试剂: RPMI 1640 培养基 (美国 GIBCO 公司), 优质新生牛血清 (中美合资民海生物工程有限公司), Calyculin A (CA, 美国 Sigma 公司), 秋水仙素 (英国 Cambia 公司), hepes (北京 Solarbio 公司), 植物血凝素 (PHA, 广州市达辉生物技术有限公司), 1 号、4 号全染色体探针 (德国 MetaSystems 公司)。

2. 血样采集与照射: 血样采自 3 名健康男性自愿献血者 (献血者知情同意), 年龄 28 ~ 32 岁, 平均年龄 (28.5 ± 1.5) 岁, 无烟酒嗜好, 近期内未进行过任何医学诊断或治疗, 也未接触过有毒有害化学物质, 每人采集肘静脉血 10 ml, 平均分装在 0.5 ml 的无菌 EP 管内, 肝素抗凝, 将抗凝血样放置于固体水的插孔中, 在照射样本下面放置 5 cm 厚的固体水, 用直线加速器 X 射线照射, X 射线的能量为 6 MV, 吸收剂量率为 400 cGy/min, 源靶距为 100 cm, 照射野为 10 cm × 10 cm, 吸收剂量为 0、1、5、10、15 和 20 Gy, 照后血样立即置 37℃ 培养箱中静置 1.5 h 以后培养。

3. 细胞培养和收集 PCC: 将静置后的血样混匀, 加入含有 20% 新生牛血清的 5 ml RPMI 1640 培养基中 (含 0.2 mg/ml PHA、20 mmol/L hepes, 培养基预先在 37℃ 培养箱中预热 1 ~ 2 h) 充分摇匀, 放于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温二氧化碳培养箱内培养 52 h, 培养 24 h 后加入秋水仙素, 终浓度为 0.03 μg/ml, 继续培养至收获前 2 h 加入 CA, 终浓度为 40 nmol/L, 每个剂量点培养细胞 2 ~ 3 瓶。培养后收获细胞, 常规低渗、固定、制备细胞悬液。

4. 荧光原位杂交实验: 细胞悬液混匀滴片, 避光取 1、4 号探针各 5 μl, 充分混匀后加到玻片上, 封片, 75℃ 变性 2 min, 37℃ 水浴过夜, 72℃ pH 7.1 的 0.4 × SSC 洗片 2 min, 室温 pH 7.06 的 2 × SSC, 0.05% Tween-20 洗片 30 s, 70% 的乙醇脱水、晾干, 加 15 μl DAPI 复染, 10 min 以后荧光显微镜下观察。

5. 镜检: 日本 Olympus BX 60 荧光显微镜镜下

观察。选用 1、4 号组合全染色体探针。1 号全染色体探针由异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记, 绿色荧光, 4 号全染色体探针由罗丹明 (RHOD) 标记, 红色荧光, PCC 中各个细胞周期的染色体形态不一, G<sub>1</sub> 期的染色体为单线状, S 期为粉末状, G<sub>2</sub>/M 期染色体为双线状。单线状染色体正常分裂相含 4 条红色 (4 号) 和 4 条绿色 (1 号) 染色体, 双线状染色体正常分裂相含 2 条红色和 2 条绿色染色体, 荧光显微镜下观察 S 期细胞无法分辨是否有畸变, 因此, 仅计数 G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>/M 期阳性细胞和断片数。G<sub>1</sub> 期细胞橙色或绿色荧光信号多于 4 个记为阳性细胞, 多余的荧光信号记为断片, G<sub>2</sub>/M 期细胞橙色或绿色荧光信号多于 2 个记为阳性细胞, 多余的荧光信号记为断片, 计算阳性细胞率和染色体断片率, 阳性细胞率 (%) = 阳性细胞数/观察细胞数 × 100%, 断片率为每个细胞所含有的断片数。

## 结 果

1. 染色体畸变阳性细胞数: X 射线照射后, CA 联合秋水仙素培养收获, 1 和 4 号全染色体探针杂交, 荧光显微镜下观察, G<sub>2</sub>/M 期细胞的染色体呈双线状存在, 2 个红色信号, 4 个绿色信号, 表示 4 号染色体无畸变, 1 号染色体有畸变, 记为阳性细胞 (图 1A); G<sub>1</sub> 期细胞, 染色体呈单线状存在, 着丝粒不能分辨。红色和绿色信号均为 5 个, 表示 1 和 4 号染色体均有畸变, 记为阳性细胞 (图 1B)。X 射线照射后, 随着照射剂量的增加, 1 和 4 号染色体畸变的阳性细胞数和阳性细胞率也随之增加, 当照射剂量达到 15 Gy 时, 畸变的阳性细胞率为 98%, 阳性细胞已经达到饱和, 照射剂量大于 15 Gy 时就不能准确反映畸变情况, 因此, 剂量范围在 0 ~ 15 Gy 时, 阳性细

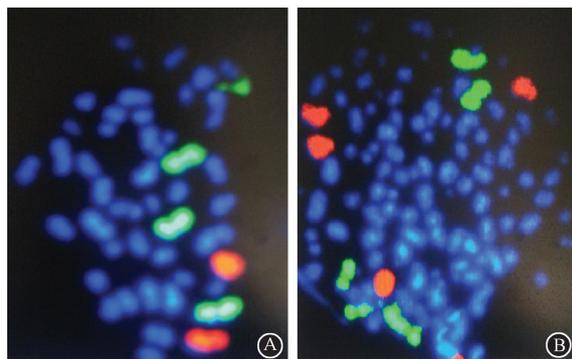


图 1 1、4 号荧光标记的全染色体探针与早熟凝集染色体荧光原位杂交 × 100 A. G<sub>2</sub>/M 期阳性细胞, 1 号染色体有一个断片; B. G<sub>1</sub> 期阳性细胞, 1、4 号染色体各有一个断片

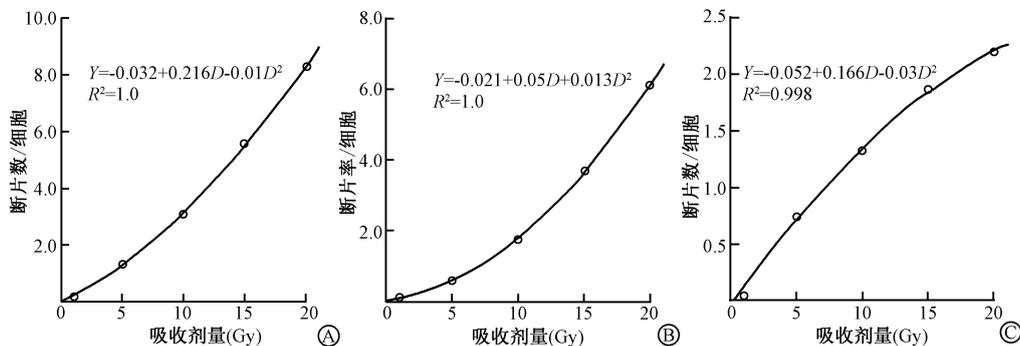


图2 X射线照射后荧光显微镜下观察到的染色体断片与照射剂量拟合的剂量-效应曲线 A. 1、4号染色体总断片拟合曲线; B. 4号染色体断片拟合曲线; C. 1号染色体断片拟合曲线

表1 不同剂量X射线照射后1、4号染色体断片数和断片率

| 吸收剂量(Gy) | 分析细胞数 | 断片总数 | 总断片率(/细胞) | 4号断片数 | 1号断片数 |
|----------|-------|------|-----------|-------|-------|
| 0        | 100   | 0    | 0         | 0     | 0     |
| 1        | 100   | 16   | 0.16      | 12    | 4     |
| 5        | 100   | 132  | 1.32      | 58    | 74    |
| 10       | 100   | 307  | 3.07      | 175   | 132   |
| 15       | 100   | 556  | 5.56      | 370   | 186   |
| 20       | 79    | 656  | 8.30      | 482   | 174   |

胞和照射剂量呈现良好的剂量-效应关系,  $Y = 0.008 + 0.065D + 1.858 \times 10^{-5}D^2$  ( $R^2 = 0.994$ )。

2. 染色体断片数:在荧光显微镜下计数荧光信号的个数,正常的G<sub>2</sub>/M期细胞的标记染色体的荧光信号为两个,G<sub>1</sub>期细胞的标记染色体荧光信号为4个,超过的信号数记为断片数。把染色体断片数作为观察对象,由表1可以看出,随着照射剂量的增加,断片数呈增加趋势,分别计数两条染色体的断片数及总断片数,拟合剂量-效应曲线,见图2,可以看出,3项观察指标拟合的剂量-效应曲线均符合二次多项式模式,剂量-效应关系良好。从表1可以看出,染色体含量高于4号的1号染色体断片数反而比4号染色体要少,对于这一结果尚需进一步研究。

## 讨 论

PCC技术是近年来不断完善发展的一项技术<sup>[2-4]</sup>,化学诱导剂CA和OA的出现能够使外周血淋巴细胞在G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>/M期发生PCC,即便是在大剂量照射的情况下仍然能够获得足够分析的早熟凝集染色体。因此,可以用于大剂量照射后的染色体畸变分析,弥补常规染色体培养方法在大剂量照射后因为外周血淋巴细胞急剧减少、细胞周期阻滞、细胞死亡等原因所造成的不能获得足够分析的中期分裂相的不足。CA和OA相比较,其诱导活性是OA的20倍<sup>[5]</sup>。目前,国内外对电离辐射诱导PCC

的研究中,观察指标主要有PCC环和PCC断片。Balakrishnan等<sup>[6]</sup>用OA诱导PCC,在培养48h后获得PCC,并建立剂量-效应曲线,在0~24.5Gy剂量范围内,PCC环和PCC断片与照射剂量均呈线性关系。Puig等<sup>[7]</sup>用CA+秋水仙素诱导PCC,在20Gy范围内照射9个剂量点,PCC环和PCC断片与照射剂量呈线性关系。Romero等<sup>[8]</sup>用PCC环估算大剂量局部照射。Lamadrid等<sup>[9]</sup>用PCC环估算了中子照射后的生物剂量。但显微镜下观察PCC实心环和肾形环不易与染色体断片区分,因此,分析时存在一定的困难,另外,因为化学诱导剂诱导的PCC大部分都呈单体形式存在,因此,在计数PCC断片数的时候也存在一定的难度。全染色体涂染FISH技术能直接、清楚地显示被观察染色体是否存在异常,对于畸变能够快速清楚地识别。本研究把FISH和PCC技术结合,观察大剂量照射后染色体畸变情况,既利用了早熟染色体凝集技术能够诱导足够多的染色体的优点,又克服了普通显微镜下分析困难的不足。本实验选择了在整组染色体中DNA含量较高的1号和4号染色体作为观察对象,以畸变细胞数、断片数作为观察指标,一组染色体中如果观察到多余的荧光信号则视为畸变细胞,在0~15Gy剂量范围内,畸变细胞数和剂量呈良好的剂量-效应关系,但是在剂量达到15Gy的时候,畸变细胞数已经接近100%,所以,用

阳性细胞作为观察指标的时候,不适用于照射剂量大于 15 Gy。而用 1、4 号染色体断片数作为观察指标的时候则不存在这个问题,本研究分别分析了 1、4 号染色体断片总数和 1、4 号染色体断片数与照射剂量之间的关系,1 号断片数、4 号断片数及断片总数与照射剂量均呈现良好的剂量-效应关系,拟合剂量-效应曲线均符合二次多项式模式,相关系数接近 1。男性 1 号染色体整条染色体的基因组含量百分比为 8.28%<sup>[10]</sup>,比 4 号染色体的 6.39% 要高,有研究表明辐射诱发的染色体断裂在染色体上的分布是随机的,即每条染色体上发生的染色体断裂的概率与该染色体的 DNA 含量或物理长度成正比,而本研究发现染色体含量高于 4 号的 1 号染色体断片数反而比 4 号染色体要少,这一问题尚需进一步观察研究。总之,认为 FISH 技术和 PCC 相结合,能够直观、快速、准确地观察大剂量照射后染色体畸变情况,为大剂量照射后的剂量估算提供一种新的估算手段。

### 参 考 文 献

[ 1 ] 陈英,骆亿生,曹珍山,等. 特大剂量  $\gamma$  射线照射的染色体畸变剂量效应曲线 [ J ]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2006, 24 ( 4 ): 241-244.

[ 2 ] Miura T, Blakely WF. Optimization of calyculin A-induced premature chromosome condensation assay for chromosome aberration studies [ J ]. Cytometry A, 2011, 79 ( 12 ): 1016-1022.

[ 3 ] Lamadrid Boada AI, Romero Aguilera I, Terzoudi GI, et al. Rapid assessment of high-dose radiation exposures through scoring of cell-fusion-induced premature chromosome condensation and ring chromosomes [ J ]. Mutat Res, 2013, 757 ( 1 ): 45-51.

[ 4 ] Gotoh E, Tanno Y. Simple biodosimetry method for cases of high-dose radiation exposure using the ratio of the longest/shortest length of Giemsa-stained drug-induced prematurely condensed chromosomes ( PCC ) [ J ]. Int J Radiat Biol, 2005, 81 ( 5 ): 379-385.

[ 5 ] Kanda R, Eguchi-Kasai K, Hayata I. Phosphatase inhibitors and premature chromosome condensation in human peripheral lymphocytes at different cell-cycle phases [ J ]. Somat Cell Mol Genet, 1999, 25 ( 1 ): 1-8.

[ 6 ] Balakrishnan S, Shirsath K, Bhat N, et al. Biodosimetry for high dose accidental exposures by drug induced premature chromosome condensation ( PCC ) assay [ J ]. Mutat Res, 2010, 699 ( 1-2 ): 11-16.

[ 7 ] Puig R, Barrios L, Pujol M, et al. Suitability of scoring PCC rings and fragments for dose assessment after high-dose exposures to ionizing radiation [ J ]. Mutat Res, 2013, 757 ( 1 ): 1-7.

[ 8 ] Romero I, García O, Lamadrid AI, et al. Assessment of simulated high-dose partial-body irradiation by PCC-R assay [ J ]. Radiat Res, 2013, 54 ( 5 ): 863-871.

[ 9 ] Lamadrid AI, González JE, García O, et al. Prematurely condensed chromosome rings after neutron irradiation of human lymphocytes [ J ]. Radiat Res, 2011, 52 ( 4 ): 531-535.

[ 10 ] 白玉书, 陈德清. 人类辐射细胞遗传学 [ M ]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 161-162.

(收稿日期: 2014-01-20)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 本刊对论文中化学元素与核素符号书写的要求

根据国家标准 GB 3100 ~ 3102-1993《量和单位》,本刊对论文中化学元素与核素符号的书写规定如下:

1. 化学元素符号应当用罗马(正)体排印,首字母大写,在符号后不加圆点。
2. 核素的核子数(质量数)标注在元素符号的左上角。例如:<sup>14</sup>N, <sup>60</sup>Co, 不写成<sup>14</sup>氮或 N<sup>14</sup>, <sup>60</sup>钴或 Co<sup>60</sup>。
3. 分子中核素的原子数标注在核素符号的右下角。例如:<sup>14</sup>N<sub>2</sub>。
4. 质子数(原子序数)标注在元素符号的左下角。例如:<sub>82</sub>Pb, <sub>26</sub>Fe。
5. 离子价和表明阴、阳离子的符号“+”或“-”标注于元素符号的右上角,离子价数写在符号前。例如:正 2 价的镁离子,应写成 Mg<sup>2+</sup>, 不宜写成 Mg<sup>++</sup>。
6. 激发态标注在元素符号的右上角。例如:<sup>99m</sup>Tc<sup>m</sup>, 不写成<sup>99m</sup>锝、Tc<sup>99m</sup>或<sup>99m</sup>Tc。

(本刊编辑部)