

别调节细胞周期和凋亡反应^[11,12]。有实验证实, DNA-PK 选择凋亡而不是细胞周期阻滞, ATM 则选择细胞周期而不是凋亡^[13]。

此外, RB 通路对决定 DNA 损伤的生物反应也起重要作用。例如, RB 的灭活导致 DNA 损伤后的 G₁ 期阻滞的丧失以及诱导凋亡的发生, 这可解释为与转录因子 E2F 的释放有关。E2F 的过表达阻止了 p53 介导的凋亡。这样, DNA 损伤反应通过 p53 信号调节 RB 和 E2F, 在决定细胞周期阻滞和凋亡之间的平衡中起主要作用^[14]。

3 结束语

多项研究表明, 很多重要的与细胞周期以及细胞凋亡相关的基因都被 p53 调控。因此, 使人们在分子水平上加深了对生命现象的了解。p53 表达在正常细胞经历的是可逆的细胞周期延长, 而肿瘤细胞则经历不可逆的凋亡, 故促使 p53 高表达对抑癌、防癌、治癌有很大帮助。如何将分子机制和调控系统等方面的发现转化为有益于维护人类健康和疾病的治疗, 将有待于我们继续深入研究。

参考文献:

- [1] Burns TF, El-deiry WS. The p53 pathway and apoptosis[J]. *J Cell Physiol*, 1999, 22(6): 264-269.
- [2] Gottlieb E, Oren M. P53 facilitates pRb cleavage in IL-3-deprived cells: novel pro-apoptotic activity of p53 [J].

EMBO, 1998, 17(13): 3587-3596.

- [3] 傅海青. p53 基因状态与辐射诱导的 G₁ 期阻滞[J]. 国外医学·放射医学核医学分册, 1997, 21(3): 133-137.
- [4] Pellegata NS, Antoniono RJ, Redpath JL, et al. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: A reevaluation[J]. *Cell Biol*, 1996, 93: 15209-15214.
- [5] Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network [J]. *Nature*, 2000, 408: 307-310.
- [6] 施勤. p53 基因状态与电离辐射效应[J]. 国外医学·放射医学核医学分册, 1998, 22(4): 181-184.
- [7] Taylor WR, Rstark G. Regulation of the G₂/M transition by p53[J]. *Oncogene*, 2001, 20: 1803-1815.
- [8] Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, et al. Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G₂ phase[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(30): 22627-22630.
- [9] 苑宾. 辐射诱导细胞凋亡的基因调控[J]. 国外医学·放射医学核医学分册, 1998, 22(6): 269-272.
- [10] Kevin M, Ryan, Vousden KH. Characterization of structural p53 mutants which show selective defects in apoptosis but not cell-cycle arrest[J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 3692-3698.
- [11] 李雨民, 张宇光. 细胞凋亡的研究进展: 回顾 1998[J]. 国外医学·放射医学核医学分册[J], 1998, 22(6): 264-269.
- [12] Woo RA, Mclure KG, Lees-Miller SP, et al. DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage[J]. *Nature*, 1998, 394: 700-704.
- [13] Wang S, Guo M, Ouyang H, et al. The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase selectively regulates p53-dependent apoptosis but not cell-cycle arrest[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(4): 1584-1588.
- [14] Agarwal ML, Taylor WR, Chemov MV, et al. The p53 network [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(1): 1-4.

文章编号: 1001-098X(2002)02-0083-04

微核着丝粒的荧光原位杂交技术在辐射研究中的应用

田素青

摘要: 微核分析因其在遗传毒理学和辐射生物剂量学中的广泛应用而受到人们关注。近年来, 随着分子遗传学及荧光原位杂交(FISH)技术的发展, 人们对微核有了进一步的认识。FISH 技术能用于解释微核的形成机理、功能及微核的超微结构, 并可用于辐射损伤的遗传学评价。

关键词: 微核; 荧光原位杂交技术; 辐射损伤

中图分类号: Q345⁺.2 **文献标识码:** A

The applications of the centromere micronucleus using FISH in radiation research

TIAN Su-qing

(Institute of Radiation Medicine Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

Abstract: The micronucleus assay is widely used both in genetic toxicology and in the radiation biomonitoring of human population. With the development of molecular genetics and fluorescence in situ hybridization (FISH), more have been known about micronucleus. FISH can be used to interpret the formation mechanism, the function and the ultrastructure of the micronucleus, as well as the genetic evaluation of radiation damage.

Key words: micronucleus; fluorescence in situ hybridization technology; radiation damage

微核是由细胞分裂后期滞后的染色体断片、一条或多条染色体组成的小体，用其作为评价药物、放射线及细胞毒性物质对人或动物及体外细胞损伤已有较长历史。现将最近国外研究细胞微核的形成机理、特性及在辐射领域的应用作一概述。

1 微核形成的原因

(1)化学毒性物质损伤及电离辐射所致的微核：纺锤丝毒性类药物如秋水仙碱、HO-221(一种抗肿瘤药)等直接抑制动物纺锤丝的形成，阻止细胞分裂中期纺锤丝将染色体拉至细胞的两端。Ando N 等人^[1]应用 HO-221 破坏纺锤丝，结果在染色体分析时诱导出多倍体和亚二倍体细胞，还可见较大的微核；体内外细胞放射线照射也是导致遗传物质损伤诱发微核形成的一个重要因素^[2,3]。

(2)细胞组成成分缺乏所致微核：Titenko-holland N 等人^[4]对 9 位健康志愿者进行了叶酸限量试验：从基础用量的 195mg/d，减到 56mg/d，维持 5 周，然后慢慢补充叶酸，结果减量后外周血的双核淋巴细胞和淋巴细胞内的微核率均增高，且着丝点阳性和阴性的微核都增加；当叶酸补充后，两类细胞微核率明显下降，带有着丝粒的微核变化更为显著。

2 微核着丝粒荧光原位杂交(FISH)技术在辐射研究中的应用

收稿日期：2001-12-20

作者简介：田素青(1977-)，男，山东鱼台人，中国医学科学院中国协和医科大学放射医学研究所(天津，300192)硕士研究生，主要研究方向：分子流行病学。

审校者：中国医学科学院 中国协和医科大学放射医学研究所 王继先

微核分析的主要优点是计数相对容易，可以记录较大数量的细胞，与经典中期染色体分析相比，在统计学显著性上更令人信服。由于微核的来源不同，常规微核分析缺少特异性，近几年引入了 FISH 技术进行微核分析。应用 FISH 技术，微核的来源很容易被区分：无着丝粒断片的微核将不会被荧光物质标记，因为它们不含着丝粒；而含全染色体的微核将被明显标记。FISH 技术与其他细胞遗传学和分子生物学相结合，为微核着丝粒的研究提供了强有力的工具。

2.1 人类着丝粒结构与功能研究

微核着丝粒分析所用的是人全着丝粒探针，即着丝粒 α 卫星 DNA 探针。人类着丝粒包含两个重要成分：①着丝粒 DNA (centromere DNA, CEN-DNA)，主要由大量高度串联的重复序列组成，目前已鉴定的着丝粒 DNA 及 DNA 家族主要有 α 卫星 DNA、 β 卫星 DNA 等 8 种；②着丝粒蛋白质 (centromere protein, CENP)，一部分位于着丝粒 DNA 两侧，称为着丝点(kinetochore)，控制染色体的移动，并参与细胞周期的监控；另一部分与 CEN-DNA 结合，共同行使同源染色体的配对、姊妹染色单体的连接及复制与分离等功能。 α 卫星 DNA 是 hcDNA 中一种由 171bp 的重复单位组成的高度重复 DNA 片段，是目前发现的唯一一个存在于所有人类染色体着丝粒区域的卫星 DNA 家族成员。大量的 α 卫星 DNA 测序研究发现，各染色体间单体序列具有很强的相似性，因此，有人推测所有人类的 α 卫星 DNA 起源于 2 种或 3 种基本的“祖先单体”，这些祖先单体又衍生和扩增出 12 种不同的单体类型。

2.2 微核的超微结构

辐射诱发微核形成的机制还不十分清楚,现在研究的热点是微核能否反映畸变的染色体、微核内DNA的特性以及来源^[6]。应用FISH技术,可以探测到辐射诱发的微核所含的DNA来自损伤的染色体。DNA辐射损伤可导致微核的形成,这些微核与主核相似,但体积小,DNA含量少。Walker IA等人^[7]发现,辐射诱发的微核也含有纤层蛋白A、C,并被波形蛋白包裹,而纤层蛋白和波形蛋白都是主核的结构成分。假定微核内所含染色体的DNA是随机的,染色体DNA与微核结合的概率仅与染色体的大小有关,用2、7、11和16号染色体探针与辐射诱发微核内的DNA序列进行杂交,微核内来自较小染色体(11和16号染色体)的DNA含量与预期的没有差别,而来自较大染色体(2和7号染色体)的DNA含量显著高于预期值,表明染色体有被微核包裹的基因组DNA丢失,但不同染色体对辐射敏感性是不同的。电离辐射致染色体损伤与修复可能是非随机性的,微核的形成可能反映这种差异。

2.3 同时探察有丝分裂延迟、染色体断裂以及染色体丢失和不分离

应用FISH技术,可以区分诱变剂和非整倍基因毒剂诱发的微核,配合使用端粒探针更能提高精确性;用FISH技术,还可区分由染色体不分离或染色体丢失引起的非整倍体。Kirsch-Volder M等人^[8]分析了辐射诱发染色体不分离相对于染色体丢失的能力。应用全着丝粒探针,可以在细胞松弛素 β 阻断的双核细胞内确定染色体的丢失;在分裂间期的双核细胞内,使用染色体着丝粒特异性探针,可估计染色体的不分离。

2.4 辐射诱发微核的剂量效应关系

实验研究已证明,活体和离体照射的外周血淋巴细胞染色体畸变效应是一致的,故可以用照射离体人血所建立的剂量效应曲线来估算活体受照者的生物剂量。由于自发微核率有较高的个体差异,用于低剂量估算时,微核分析的不确定性较大,而急性辐射诱发的微核(85%~100%)来源于无着丝粒染色体的断片,即染色体断裂的结果,这样就可以通过仅记录无着丝粒微核数日来提高低剂量微核分析的特异性,并可以应用到辐射事故中进行剂量重建。应用FISH技术来区分自发的微核和辐射诱发的微核,大大提高了微核分析的灵敏度。

Vral A等^[9]研究发现:自发微核中有很高的比

率(73%)带有一个着丝粒,这些有着丝粒的微核包含全染色体或染色单体,用⁶⁰Co γ 射线低剂量(1~2Gy)照射,辐射所诱发的微核主要是无着丝粒的微核;数据表明,在低剂量照射时,由于仅记录不带着丝粒的微核而使微核分析的敏感性增加。FISH技术,减少了微核率的个体差异,提高了微核分析的灵敏度,记录2000个双核细胞,可以观察的最小剂量的95%可信区间是[0.1~0.3Gy],目前,仅有微核着丝粒分析才有如此高的敏感性^[10]。

2.5 微核指标在慢性小剂量照射研究中的意义

微核测定法在辐射领域内除可用于回顾性生物剂量估算外,还可用作辐射流行病学的调查指标。人急性照射后,可以诱发各种形式的细胞遗传学的损伤,包括微核率和染色体畸变的增加。慢性小剂量照射诱发微核的机制比较复杂^[11]。剂量率与微核内包含无着丝粒断片的概率有关。急性大剂量照射,无着丝粒片段很少单个进入微核,而是有多个无着丝粒断片进入同一微核的倾向。先前研究发现小剂量电离辐射可以诱发非整倍体,最近发现,NIH373成纤维细胞照射后,仅有17%的微核含有一个着丝粒和约4个端粒的杂交信号,这就表明它们来源于全染色体。

慢性小剂量照射可以引起微核率增加,这一点已被普遍认可。目前对慢性小剂量照射诱发的微核增加是以无着丝粒微核为主还是以有着丝粒微核为主存在争议。Thierens H等^[12]用FISH方法对核电站工人进行微核分析结果是:对照组的总微核数随着年龄增加(0.24/年),几乎完全归因于有着丝粒的微核的增加(0.23/年);暴露组总微核率增加,主要是无着丝粒微核的增加,而有着丝粒的微核数基本稳定。但是,Thierens H等^[13]通过对医院放射线工作者的微核分析得出截然相反的结果:暴露组与年龄相匹配的非暴露组比较,放射线工作者的有着丝粒微核数显著增加($P < 0.05$),而无着丝粒微核无显著性效应。Kryscio A等人^[14]用FISH微核法分析评价铀矿工人的遗传学远期效应,结果是:带着丝粒微核的所占微核总数的比率随剂量而下降,也就是来源于无着丝粒染色体断片的微核是增加的;健康对照组着丝粒微核比率最高(平均74.6%),其次是健康的铀矿工人(平均62%),最低是患癌症的铀矿工人(平均55.8%)。Thierens H等人^[12]和Kryscio A等人^[14]认为,小剂量电离辐射主要

是诱裂作用,导致染色体不稳定和畸变增加。这在 Namibian 铀矿工人^[13]和 Chernobyl 清扫工人^[16]同样可以观察到。Thierens H 等人^[13]又提出了新的观点:与急性电离辐射主要引起诱裂作用相反,长期慢性小剂量照射主要是非整倍基因效应(aneugenic effect),导致有着丝粒微核增加。通过用分裂间期的 FISH 技术对甲状腺癌病人进行研究发现:放射性碘治疗甲状腺癌,除了有诱裂效应外,还有一个非整倍基因效应,而且年轻的和年老的病人无着丝粒微核率同样增加,但有着丝粒的微核数在年老病人中比年轻病人高 2~3 倍^[17]。这一结果支持 Thierens H 等人^[13]的观点。对于小剂量慢性照射诱发微核的机制,还存在着争论,需要进一步研究探讨。

3 结语

FISH 技术提供了微核研究的一个新思路,其技术已较为成熟。微核作为估算剂量的生物学指标,有待进一步研究的问题包括局部或高度不均匀照射的剂量估算以及微核荧光信号的自动化分析等。

参考文献:

- [1] Ando N, Nakajima T, Masuda H, et al. Antimicrotubule effects of the novel antitumor benzoylphenylurea derivation HO-221 [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1995, 37(1-2): 63-69.
- [2] Watanabe N, Yokoyama K, Kinuya S, et al. Radiotoxicity after strontium-89 therapy for bone metastases using the micronucleus assay[J]. *J Nucl Med*, 1998, 39(12): 2077-2079.
- [3] Catena C, Parasacchi P, Conti D, et al. Peripheral blood lymphocyte decrease and micronucleus yields during radiotherapy[J]. *Int J Radiat Biol*, 1997, 72(5): 575-585.
- [4] Titenko-Holland N, Jacob RA, Shang N, et al. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate[J]. *Mutat Res*, 1998, 417(2-3): 101-114.
- [5] Romanova LY, Deriagin GV, Mashkova TD, et al. Evidence for selection in evolution of alpha satellite DNA: the central role of CENP-B/p1 alpha binding region[J]. *J Mol Biol*, 1996, 261(3): 334-340.
- [6] Wutke K, Muller WU and Streffer C. Combination of the cytokinesis blocked micronucleus assay with the whole chromosome painting technique for the detection of specific chromosomes within micronuclei [C]. *Proceedings of the 10th International Congress of Radiation Research*, Wurzburg, Germany, 1996. P26-P30.
- [7] Walker IA, Boreham DR, Unrau P, et al. Chromosome content and ultrastructure of radiation induced micronuclei [J]. *Mutagenesis*, 1996, 11(5): 419-424.
- [8] Kirsch-Volder M, Tallon I, Tanzarella C, et al. Mitotic non-disjunction as a mechanism for in vitro aneuploidy induction by X-rays in primary human cells[J]. *Mutagenesis*, 1996, 11(4): 307-313.
- [9] Vral A, Thierens H. In vitro micronucleus-centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes [J]. *Int J Radiat Biol*, 1997, 71(1): 61-68.
- [10] Thierens H, Vral A, Kirsch-volde M, et al. Inter-laboratory comparison of cytogenetic endpoints for the biomonitoring of radiological workers[J]. *Int J Radiat Biol*, 1999, 75(1): 23-34.
- [11] Chang WP, Tsai MS, Hwang JS, et al. Follow-up in the micronucleus frequencies and subsets in human population with chronic low dose gamma irradiation exposure[J]. *Mutat Res*, 1999, 428(1-2): 99-105.
- [12] Thierens H, Vral A, Barbe M, et al. A cytogenetic study of nuclear power plant workers using the micronucleus centromere assay [J]. *Mutat Res*, 1999, 445(1): 105-111.
- [13] Thierens H, Vral A, Morhertier R, et al. Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay[J]. *Mutagenesis*, 2000, 15(3): 245-249.
- [14] Kryscio A, Ulrich WU, Wojcik A, et al. A cytogenetic analysis of the long-term effect of uranium mining on peripheral lymphocytes using the micronucleus centromere assay[J]. *Int J Radiat Biol*, 2001, 77(11): 1087-1093.
- [15] Zaire R, Notter M, Riedel W, et al. Unexpected rates of chromosomal instabilities and alteration of hormone levels in Namibian uranium miners [J]. *Radiat Res*, 1997, 147(5): 579-584.
- [16] Lazutka JR, Lekevicius R, Dedonyte V, et al. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in Lithuanian population: effects of occupational and environmental exposures [J]. *Mutat Res*, 1999, 445(2): 225-239.
- [17] Ramirez MJ, Surrallés J, Galofre P, et al. Radioactive iodine induces clastogenic and age-dependent aneugenic effects in lymphocytes of thyroid cancer patients as related by interphase FISH [J]. *Mutagenesis*, 1997, 12(6): 449-455.