

丙烯酰胺非整倍体诱发效应的荧光原位杂交 和 CREST 染色的研究*

胡斌** 曹佳 程天氏
(第三军医大学预防医学系 重庆 630038)

丙烯酰胺 (Acrylamide, AA) 是一种具有广泛用途的重要工业化合物,也是实验室进行凝胶电泳的常用材料,因而是人类重要的职业接触化合物。近年来的大量研究表明,AA 不仅具有较强的致突变作用,而且还是潜在的致癌剂^[1-4]。另外,有实验表明 AA 具有诱导非整倍体作用,但尚需进一步证实^[5-6]。本研究采用小鼠着丝粒次要卫星 DNA 探针荧光原位杂交 (Fluorescence in situ hybridization, FISH) 和抗着丝粒抗体技术 [Antikinetochores antibodies, (CREST syndrome serum), CREST 染色], 研究了 AA 诱导小鼠 NIH 3 T 3 成纤维细胞微核 (Micronuclei, MN) 的着丝粒组成比例, 以了解其 MN 是主要来源于染色体断片还是滞后的整条染色体。以及 AA 诱导小鼠骨髓细胞染色体畸变的情况, 进而判定 AA 的非整倍体诱发效应。

材料和方法

1. 受试化合物

AA 购自 Sigma 公司。另外,非整倍体毒剂秋水仙素 (Colchicine, COL) 作为阳性对照用于此次实验。

2. NIH 3 T 3 细胞微核实验

小鼠成纤维细胞 NIH 3 T 3 培养按 Miller 方法进行^[7]。细胞加受试物后继续培养 22 h, 然后收获细胞。0.56% KCl 低渗, 甲醇-20℃固定, 20 min 后滴片。

3. MN 的 FISH 和 CREST 染色

生物素标记的小鼠着丝粒次要卫星 DNA 探针 (Murine minor satellite DNA probe) 由德国 GSF Grawe 博士赠送, FISH 方案按 Schriever-Schwemmer 所述方法进行^[8]。FISH 后 MN 着丝粒 DNA 杂

交信号使用 Cy 3 链霉抗生物素蛋白检测 (红色荧光)。CREST 血清由德国 GSF Nusse 博士赠送, CREST 染色亦按 Schriever-Schwemmer 所述方法进行^[8]。MN 内着丝粒信号使用山羊抗人 Cy3 抗体检测 (红色荧光)。上述两种染色方法均使用 Hoechst 33258 (10 μg/ml) 配染细胞核及 MN (蓝色荧光)。荧光显微镜下观察细胞 MN 和 MN 内着丝粒荧光信号, 并分别记录之。

4. 小鼠染色体中期相畸变分析

每个剂量组随机分入昆明种小鼠 2 只 (第三军医大学动物中心提供), 雌雄各 1, 体重 23±2 g。AA 采用腹腔注射 1 次给药。小鼠在给药后 24 h 处死, 处死前 2 小时腹腔注射 4 mg/kg COL 以积累染色体中期相。常规制片, 使用着丝粒次要卫星 DNA 探针对小鼠染色体进行 FISH, 方法同前。仍使用 hoechst 33258 配染染色体, 荧光显微镜观察。为排除由于染体制备所引起的人为染色体丢失, 按照目前国际上新的建议^[9], 2n≤39 的细胞不计数, 仅记录 2n=41-43 情况者。

结 果

1. FISH 显示的 AA 诱导 NIH 3 T 3 细胞 MN 的着丝粒组成情况

从表 1 可以看出, 典型非整倍体毒剂 COL 诱导的 MN 约 76.7% 为着丝粒 DNA 信号阳性, 显示了很强的非整倍体毒性。而 AA 在 100-400 μg/ml 范围内, 诱导 MN 的 52.7-71.6% 为 FISH 信号阳性, 在这些阳性 MN 中又平均约有 32.9% (45/137) 的 MN 含有 2 条

* 国家自然科学基金和总后回国启动基金资助项目

** 广州师范学院生物系硕士研究生

表1 AA诱导NIH3T3细胞MN的FISH染色结果

化合物	剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	计数 细胞数	计数 MN数	MN的FISH ⁺ 信号数					MN (%)	FISH ⁺ (%)
				1	2	3	4	>4		
COL	0.1	2000	167	75	25	12	7	9	83.5	76.7
AA	100	2000	55	15	8	3	2	1	27.5	52.7
	200	2000	69	12	16	8	5	4	34.5	65.2
	400	2000	88	20	21	10	4	8	44.0	71.6

表2 AA诱导NIH3T3细胞MN的CREST染色结果

化合物	剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	计数 细胞数	计数 MN数	MN的CREST ⁺ 信号数					MN (%)	CREST ⁺ (%)
				1	2	3	4	>4		
COL	0.1	1800	60	22	8	1	2	1	33.3	56.7
AA	100	2015	43	15	6	5			21.3	60.5
	200	2085	85	22	13	11	9	3	40.8	68.2
	400	2062	94	25	20	10	4	1	45.6	63.8

以上的染色体(着丝粒DNA信号>2)。这些结果显示AA诱导的MN主要来源于染色体异常分离后滞后的整条染色体。

2. CREST染色显示的AA诱导NIH3T3细胞MN的着丝粒组成情况

从表2可见,两种化合物CREST染色结果同FISH结果基本相同,AA在CREST染色中也显示出很强的非整倍体诱发效应。

3. FISH对AA诱导的小鼠骨髓细胞染色体畸变的分析

为了进一步了解AA对染色体的损伤和非整倍体诱发效应,本研究同样使用次要卫星DNA探针对AA诱导的小鼠骨髓细胞染色体进行FISH,结果见表3,从中可以看出,AA对小鼠骨髓细胞既有一定的染色体损伤作用,又有诱导非整倍体形成作用,并且在本实验中非整倍体诱发效应更明显一些。

表3 AA诱导小鼠骨髓细胞染色体畸变FISH结果

化合物	剂量 (mg/kg)	中期相 数目	结构畸变			细胞 畸变率 (%)	非整倍体(%) $2n=41-43$
			双着 丝粒	无着丝 粒断片	着丝粒 断片		
AA	30	100		1	1	2	5
	60	100		2	1	3	6
	120	100	3	4	3	10	11
control	0	100		1		1	1

讨 论

有关AA的遗传毒性,过去一直认为主要以染色体断裂和生殖毒性为主^[1],但最近Adler等的研究发现^[5-9],AA能通过诱导有丝分裂抑制效应(即有丝分裂阻滞、分裂后期像消失等)而诱发非整倍体形成,作用类似COL。由

于近年来越来越多的研究发现非整倍体形成与肿瘤发生关系密切,因而这对解释AA能诱导啮齿类动物肿瘤形成具有一定的意义。

分析细胞非整倍体的传统方法是在染色体中期相中直接计数染色体数目,但这一方法有时显得费时费力。而微核试验(Micronucleus-test, MNT)作为一种检测染色体损伤和丢失

的简单、灵敏试验,目前已得到广泛的应用。但常规的MNT无法区分其MN是来源于染色体断片还是丢失的整条染色体,因而也无法区分诱发MN的化合物是染色体断裂剂还是非整倍体毒剂。近年来,国外通过使用着丝粒DNA特异性探针检查MN内着丝粒存在情况,以了解其MN是主要来源于染色体断片还是丢失的整条染色体,进而判定待检化合物的非整倍体诱发效应,已有的研究均表明这是一种灵敏客观的方法。目前使用的小鼠着丝粒DNA探针,主要有主要卫星DNA探针(约234 bp)和次要卫星DNA探针(约120 bp)两种,两者均为小鼠着丝粒处高度重复的DNA序列^[10]。因此,使用这两种着丝粒DNA探针对MN进行FISH后,当MN来源于染色体臂断裂后形成的无着丝粒断片时,其MN应无着丝粒DNA杂交信号。而当MN来源于丢失的整条染色体时,其MN应呈现着丝粒DNA杂交信号。当然,如果断裂发生在着丝粒处,所形成的带着丝粒断片也会出现DNA杂交信号阳性,这会给染色体断片和丢失染色体的判断带来部分混淆。但由于着丝粒断片在染色体畸变中并不是一种常见的畸变类型,加之本方法是计算一定数量的MN着丝粒组成比例,因此FISH后所得的MN着丝粒组成比例仍是主要反映了染色体断片和丢失染色体的组成比例。另外,为了尽可能地避免FISH后着丝粒断片造成MN来源的误判,国外有学者研究比较了主要卫星和次要卫星DNA探针对MN进行FISH的结果^[8],认为由于主要卫星DNA探针片段要大一些,一些在靠近着丝粒处断裂的断片组成的MN,有可能带有部分主要卫星DNA片段,易形成DNA杂交信号假阳性。故次要卫星DNA探针更适合于着丝粒检测。因此,本研究使用次要卫星DNA探测针来对AA诱导的NIH 3T3细胞MN进行FISH。结果表明,典型非整倍体毒剂COL(0.1 µg/ml)所诱发的MN中约76.7%的MN为DNA杂交信号阳性,提示其MN约7成含有着丝粒,主要由丢失的整条

染色体组成,显示了很强的非整倍体毒性。而AA在100—400 µg/ml剂量范围内,诱导的MN有52.7%—71.6%含有着丝粒DNA杂交信号,其FISH阳性率与AA诱导剂量间还有剂量反应关系存在,同时其FISH阳性MN中又平均约有32.9%的MN可能含有多条染色体(着丝粒信号>2),提示AA诱导形成的MN有约50%—70%来源于丢失的整条染色体。这证明AA的确具有非整倍体诱发效应。

CREST染色是近年来发展的另一项非整倍体检测技术,它是通过使用抗着丝粒自动抗体(来源于具有CREST症的硬皮病人血清)来检测MN内着丝粒存在情况^[10]。本研究中对AA诱导MN的CREST染色结果,与着丝粒次要卫星DNA探针的FISH结果基本相同,其MN阳性比例也在60.5%—68.2%之间,表明CREST染色也是检测着丝粒存在的一个良好的方法。另外,由于CREST血清是与着丝粒蛋白结合,故一些能对着丝粒蛋白的结构和功能产生损害作用的化合物有可能出现假阴性。而本实验中CREST和FISH结果基本相同,说明AA对着丝粒蛋白并无直接损伤作用,或者说AA诱导非整倍体形成并不以着丝粒蛋白为靶目标。Adler等使用AA对V79细胞的研究表明^[6],AA可能是通过对纺锤体功能产生干扰,进而出现细胞有丝分裂障碍(有丝分裂阻滞、分裂后期像消失)来诱导非整倍体形成,这可能是AA在染色体畸变试验和生殖毒性试验中多为阳性结果,而在DNA损伤和基因突变试验中多为阴性结果的重要原因。

为了进一步提供AA诱导染色体结构畸变和非整倍体的详细情况,本研究使用次要卫星DNA探针对AA诱导小鼠染色体中期相进行了FISH,结果表明AA既能诱导染色体断片、双着丝粒染色体等结构畸变,又能诱导非整倍体形成,而以非整倍体诱发效应更为明显,这与本研究微核实验中AA诱导MN具有较高的着丝粒组成比例相一致。但AA诱导非整倍体形成的具体作用机制,还有待进一步阐明。

摘 要

本文以小鼠着丝粒次要卫星DNA探针FISH和抗着丝粒CREST染色,研究了可疑的非整倍体毒剂丙烯酰胺(AA)诱导的小鼠NIH3T3细胞微核(MN)的着丝粒组成情况和小鼠骨髓染色体畸变(CA)情况。结果发现AA在100—400 μ g/ml诱导的MN约52.7%—71.6%为FISH阳性,60.5%—68.2%的MN为CREST阳性,两种结果均显示AA具有较强的非整倍体诱发效应。小鼠骨髓CA的FISH表明,AA既能诱导染色体结构畸变,又能诱导非整倍体形成,而以非整倍体诱发效应更为明显。

关键词: 非整倍体 DNA 荧光原位杂交 抗着丝粒抗体 微核 染色体畸变

参 考 文 献

- [1] Dearfield KL, Douglas GR, Ehling UH, et al., 1995, *Mutat Res.*, 330 (1): 71—99.
- [2] Tsuda H, Shimizu DS, Taketomi MK, et al., 1993, *Mutagenesis*, 8(1): 23—29
- [3] Bull RJ, Robinson M, Laurine RD, et al., 1984, *Cancer Research*, 44: 107—111.
- [4] Cao J, Beisker W, Nusse M, et al., 1993, *Mutagenesis*, 8(6): 533—541.
- [5] Adler ID Zhou RM, Sshmid E. 1993, *Mutat Res.*, 301: 249—254.
- [6] Adler ID, Gassner P, Schriever-schwemmer G, et al., 1993, *Chromosome Segregation and aneuploidy*, p 297—308.
- [7] Miller BM, Werner T, Weier HU, et al., 1992, *Radiat Res.*, 131: 177—185.
- [8] Schriever-schwemmer G, Adler ID. 1994, *Mutagenesis* 9(4): 333—340.
- [9] 孟全新, 1994, 国外医学卫生学分册, 4: 206—210.
- [10] 曹佳, 1994, 癌变、畸变、突变, 6 (3): 43—48.

THE STUDY ON THE ANEUPLOIDY OF ACRYLAMIDE WITH FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION AND CREST STAINING

HU Bin* CAO Jia Cheng Tian Ming

(Preventive Medicine Department, Third Military Medical University, Chongqing 630038.

* Biochemistry Department, Guangzhou normal College, Guangzhou 510400)

ABSTRACT

The fluorescent in situ hybridization (FISH) with murine minor satellite DNA probe and antikinetochores antibodies (CREST staining) techniques were applied to study the kinetochores compositions of micronuclei (MN) in mouse NIH 3 T 3 fibroblast cell lines and chromosome analysis in mouse bone marrow induced by suspect aneugen acrylamide. The results showed the labelling frequencies of MN with the FISH and CREST were identical (52.7%—71.6% and 60.5%—68.2% respectively). Both of FISH and CREST results indicated that AA has stronger aneuploidy toxicity. FISH for chromosome analysis in mouse bone marrow showed that AA not only induced chromosomal structural aberrations but also induced aneuploidy, and the last effect is more effective.

Key words: Aneuploidy FISH Antikinetochores antibodies Micronuclei Chromosome aberration