

## 早熟染色体凝聚技术简述

军事医学科学院放射医学研究所 高沛永综述 郑斯英\* 王知权\*\*审

早熟染色体凝聚(Premature Chromosome Condensation, PCC)现象发现后,各国学者经过十多年的努力,目前正在形成一项专门的技术,它必将广泛地应用于放射医学等领域中。为促进国内开展这方面的研究,现将PCC技术作一简要的介绍。

### 一、基本原理

真核细胞中的染色体,只有当细胞分裂时才出现,中期时呈现最典型的形态特征。因此,能进行染色体研究的机体组织细胞可分为两类,一是在正常情况下不断增生的细胞,如骨髓、睾丸等;二是经过刺激处理后进行分裂的细胞,如常用PHA激活的外周血淋巴细胞,外科手术切除部分肝的再生细胞等。

1970年,Johnson和Rao首次发现,He-La细胞在紫外线灭活的仙台病毒介导下融合时,处于分裂期的细胞可诱导处于间期的细胞染色质浓缩,呈现细长的染色体形态的PCC现象<sup>[1]</sup>。若是处于G<sub>1</sub>期的间期细胞被诱导,所观察到的PCC为一条细长的染色单体状;若是G<sub>2</sub>期细胞被诱导,则PCC可分辨出二条染色单体,但较中期染色体长。这是一种非典型的有丝分裂,染色体出现时并没有纺锤体的形成。

1983年,Pantelias和Maillie用分子量为1000单位的聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG)代替仙台病毒作促融剂,简化了PCC的实验方法,成功地进行了人、大鼠外周血淋巴细胞,啮齿类脾脏细胞及新生小鼠体细胞的PCC诱导实验<sup>[10]</sup>。为直接

观察研究放射等理化因子对机体中各种处于分裂间期的细胞组织,所产生的诱变致突作用开辟了新的途径。

进行PCC实验的简要操作程序有以下五点:

1. 作为诱导物的分裂细胞的准备:一般常用生长分裂迅速的离体培养细胞株,如HeLa、CHO、V79、CHL等,使用前4~5小时加入秋水仙素,积累分裂细胞并选择性的收集之。

2. 被诱导的待检细胞的分离:1份肝素抗凝的人外周血,加5倍的Hank's液(HBSS)稀释,加入含淋巴细胞分层液的离心管,离心后取淋巴细胞,再用HBSS洗涤,悬浮于常用的培养液中。如果是其他组织,则要用胰酶消化或机械方法分离,制备单细胞悬液。

3. 促融剂的制备:取所需量的PEG,溶于等体积的培养液,pH调至7。

4. 细胞融合:1份分裂细胞加入5~7份间期细胞→离心沉淀→悬浮于2ml的HBSS中并清洗一次→加PEG液0.25ml,作用1分钟→在3分钟内滴加2.5ml的HBSS,并摇动→离心→悬浮于0.5ml含牛血清的培养液中,加入秋水仙素及0.05ml的20mmol/L的MgCl<sub>2</sub>→37℃保温1小时。

5. 按常规法低渗、固定、制片及染色。

计数标准:人的二倍体细胞有46条染色体(2n=46),镜检PCC标本时,细胞中凡染色体数超过46者,均视为额外的染色体断片,以此表示染色体的损伤程度。由于PCC细长,很难识别双着丝粒(dic)畸变,但

\*苏州医学院放射医系 \*\*中国医学科学院放射医学研究所

环(r)可以辨认。

## 二、PCC技术的主要优点

与常规中期染色体畸变分析相比,PCC技术对检测放射等理化因子所致染色体损伤,有以下优点。

1. 快速:得到欲检测的血液等组织细胞样品后,几小时内就能作出实验结果。这在紧急的意外事故情况下是非常有用的,这就可根据染色体放射损伤作出的判断,及时采取相应的措施,而常规法要在2~3天后才能取得结果。

2. 灵敏度高:由于PCC法可直接检查间期细胞,避免了培养过程中发生的间期死亡,及染色体损伤修复使畸变率下降的弊端,所以灵敏度高,可以观察到更多的染色体损伤。已有实验表明,离体人血经2rad X线照射后就可观察到环状畸变。有作者认为,即使在低剂量水平上,只需分析计数100个细胞就足够了<sup>[11]</sup>。

3. 克服了核型分析的困难:有些实验动物在放射医学等领域的多项研究中广泛应用,但由于外周血培养较困难(如啮齿类),或因染色体数目较多(如狗,  $2n=78$ ),难以进行核型分析,限制了常规细胞遗传学技术的应用。PCC技术克服了上述难点,可对实验室常用的各种动物进行细胞遗传学观察,有利于综合使用各学科手段所得资料的比对。

4. 易于标准化:PCC技术所检查的是间期细胞,这就减少了因激活细胞培养物所造成的实验室间误差,因而所得的剂量效应关系易于标准化。

5. 易于分析计数:PCC技术无须分析各种畸变类型,只要计数超过正常二倍体的染色体数目,记为额外断片,比较简单,易于掌握。

## 三、PCC技术的应用

1. 作为生物剂量计将用于辐射防护

生物学指标要成为生物剂量计,必须具备二个条件,一是与受照剂量有严格的定量关系;二是用离体实验建立的剂量效应刻度曲线,应能代表整体受照的情况。大鼠经X线(50、100、200和300rad)照射后,当天的每细胞断片数分别是1.26、2.33、3.64和5.96,与受照剂量呈直线相关<sup>[15]</sup>。整体与离体实验所得到的剂量效应回归方程分别是,  $Y = 0.24 + 0.019D$  及  $Y = 0.19 + 0.022D$ ,两者间无显著性差异<sup>[11]</sup>。在早期Waldren等<sup>[8]</sup>用HeLa细胞的研究中,照射剂量高达1800rad,断片数仍与剂量呈直线关系。由这些初步的实验结果可以看到,PCC完全具备作为生物剂量计的条件。PCC一旦被当作生物剂量计应用,将会改变染色体畸变剂量效应关系研究的全貌,势必引起根本性的变革。

PCC作为生物剂量计存在的主要问题是在照后多长时间进行检查最为适宜,但常规染色体技术应用中也有这个问题,只是PCC随照后时间的延长降低更快,此问题更突出而已。例如用X线照射离体人血的实验中观察到,照后8、48小时的断片产额,比照后即刻分别减少了30%及50%。较为系统的研究说明,断片数的减少在照后1小时内最明显,6小时后会逐渐达到相对稳定的水平。这些实验结果,有利于照后取样时间的统一标准化。

2. 从理论上研究各种类型染色体畸变的形成和恢复

以往的中期染色体畸变分析法,不能及时了解辐射诱发染色体初始断裂与重接的过程,用PCC技术则可做到这一点。Pantelias和Maillia用X线照射人外周血的实验结果表明,照后3小时以内染色体断裂能很快重接,断片和环的形成约在照后6小时内完成<sup>[15]</sup>。他们以每细胞断片数为指标,对不同照射剂量(高达800rad)的效应关系进行了比较研究。照后即刻的剂量效应关系呈直线,说明辐射能量沉积诱发的断片与剂量成

正比。照后1、2及24小时的剂量效应关系也呈直线,也就是说,虽然照后在各个剂量水平上都会有一定比例的断片重接,但这种修复并不影响剂量效应关系的直线性,这些观察与以往的一些观点不同。新近还研究了辐射诱发的细胞遗传学损伤,与间期染色体形态变化的关系<sup>[17]</sup>。

Hittelman和Pollard用X线照射CHO细胞后,为了使染色体损伤得以修复,受照样品进行细胞融合前,在37℃条件下温育1小时,而后用PCC技术和常规法,观察G<sub>2</sub>期的染色体畸变,前者的异常系数明显高于后者。并且他们根据所得实验结果,对经典畸变形成的二个假说,即“互换”假说及“断裂第一”假说,提出了不同的看法。他们认为互换和断裂的修复在动力学上是不同的,反映了这2个过程的机制不同<sup>[2]</sup>。有人比较了DNA修复与染色体修复的关系,发现照后2分钟内就可以观察到明显的DNA修复,较慢的一部分DNA修复发生在照后15~16分钟,而照后45分钟之前检查不出染色体修复<sup>[8]</sup>。

### 3. 化学物质的诱变活性检测

以往观察诱变活性物质对染色体损伤的方法,都要干扰细胞所处的分裂周期,这会影响到损伤的表达及所得结果的最后评价。由于PCC技术所显示的染色体断裂,不妨碍细胞的存活和繁殖,所以Cornforth和Bedford认为,从突变和致癌的观点来看是很重要的<sup>[9]</sup>。阿糖胞苷(ara-C)是一种DNA合成代谢的抑制物,从理论上分析它应是一种断裂剂,文献中也有其诱发染色体断裂的报道。但近来对它本身有无致突作用有不同的看法,Pantelias和Wolff利用PCC技术观察到,ara-C确实能有效地诱发人血淋巴细胞染色体断裂,肯定了它是一种有诱变活性的断裂剂<sup>[16]</sup>。在对博来霉素(Bleomycin)诱发PCC的研究中已得到了一些新的认识。有人提出染色体修复可分快慢两种组份,快修复存在于处理后2小时内,在30分钟内

最明显<sup>[12]</sup>。还有人提出染色单体互换并不象以往认为的那样,只是染色单体断裂修复或重组的简单产物,因为用放线菌酮等抑制染色单体断裂的修复,没有影响染色单体互换的频率<sup>[6]</sup>。

### 4. 白血病的诊断及预后

Hittelman等使用PCC技术对白血病人的研究,已取得了一些有意义的结果。他们观察到急性白血病患者的PPI平均值是正常人的3倍,不同类型白血病的PPI值各不相同。他们推测PPI值可能是骨髓恶性变程度的一种生物学反映<sup>[5]</sup>。因而PPI值高时预后不好,在发病期这可能是进行性病变的征兆,如在缓解期这可能预示有复发的危险<sup>[4]</sup>。化疗病人骨髓再生期的PPI观察特别有意义,因为用经典方法区别是正常再生,还是白血病再生是困难的<sup>[7]</sup>。他们的工作说明,PPI值的观察可用于对病情进行预测,为下一步采取治疗措施提供根据。他们把完全缓解的急性白血病人,以PPI值高低分为2组,PPI值>35者为第一组,<35者为第二组。完全缓解后2~4周第一组病人16名中有14人复发,而在PPI值低的第二组44名病人中,只有19人复发。9~15周的观察也得到了相似的结果,33名病人中PPI值高的10人有9人复发,PPI值低的23人中只有16人复发<sup>[13]</sup>。

从以上简单的介绍中可以看出,PCC这种新技术原理清楚,操作简便迅速,能更加真实地反映放射等理化因子对染色体的损伤,而且在各方面都已得到了一些有意义的初步结果,应当引起我们的重视。

### 参 考 文 献

1. Jonhson RT & Rao PN: Nature (London) 23:717, 1970.
2. Hittelman WN & Rao PN: Mutat Res 23: 251, 1974.
3. Waldren CA & Johnson RT: Proc Natl Acad Sci USA 71:1137, 1974.

4. Hittelman WN & Rao PN: Cancer Res 38:416, 1978.
5. Hittelman WN et al: Blood 54:1001, 1979.
6. Sognier MA et al: Mutat Res 60:61, 1979.
7. Hittelman WN et al: Blood 55:457, 1980.
8. Hittelman WN & Pollard M: Radiat Res 92:497, 1982.
9. Cornforth MN & Bedford JS: Science 222: 1141, 1983.
10. Pantelias GE & Maillie HD: Somatic Cell Genetics 9:533, 1983.
11. Pantelias GE & Maillie HD: Radiat Res 99:140, 1984.
12. Sen P & Hittelman WN: Cancer Res 44: 591, 1984.
13. Hittelman WN et al: Blood 64:1067, 1984.
14. Pantelias GE & Maillie HD: Health Physics 49:425, 1985.
15. Pantelias GE & Maillie HD: Mutat Res 149:67, 1985.
16. Pantelias GE & Wolff S: Mutat Res 151: 65, 1985.
17. Pantelias GE: Radiat Res 105:341, 1986.

## 应用早熟染色体凝聚方法研究电离辐射对细胞的损伤及修复

上海市放射医学研究所 冯嘉林 邵松生综述 郑斯英\* 王知权\*\*审

大量的实验已证明电离辐射诱发的淋巴细胞染色体畸变可作为可靠的生物剂量仪。然而常规细胞遗传学方法,只能分析分裂中期细胞中的染色体,间期的淋巴细胞要进入有丝分裂期,必须在植物血凝素刺激下培养二天才能达到。这种方法受到各种物理或生物因素的影响,例如细胞培养的条件、生长周期、修复和死亡等均可影响畸变量。1970年,Johnson和Rao<sup>[1]</sup>首先发现分裂中期的细胞与另一间期细胞融合,该中期细胞能诱导间期细胞的染色质提前凝聚,这种染色体称为早熟染色体凝聚(简称PCC)。在融合时根据细胞周期的不同,诱发的早熟染色体凝聚的形态各不相同<sup>[2~8]</sup>。该方法的建立,使间期细胞在受到射线或化学诱变剂等损伤后,就可直接观察染色体损伤,为研究染色体的损伤及修复提供了一个有用的工具。它已应用于人类的白血病诊断<sup>[4~7]</sup>,以及测定辐射或化学诱变剂所造成的间期染

色体的致突变作用<sup>[8~9]</sup>。近年来,由于应用化学融合剂Polyethylen Glycol (PEG)<sup>[10~13]</sup>代替了仙台病毒,简化了操作,使这一方法更易推广。本文综述了PCC技术在电离辐射诱发的细胞损伤及修复研究中的应用。

### PCC技术在电离辐射研究中的应用

射线或其它诱变因素对哺乳动物细胞的损伤经常用染色体畸变来表示,但细胞受到见到损伤必须有一时间间隔,PCC技术可大大缩减这一时间,不管细胞处于G<sub>1</sub>还是G<sub>2</sub>期,在细胞受伤后约2小时左右就可分析染色体损伤。

#### (一) G<sub>1</sub>-PCC的研究

1974年,Waldren等用X线和紫外线照射G<sub>1</sub>期的HeLa细胞,发现X线照射引起G<sub>1</sub>-PCC中的断裂数增加,并与剂量有线性关系,剂量可高达1800rad,每100rad剂量平均增加10~15个断片。在G<sub>1</sub>-PCC中所观察到

\*苏州医学院放射医学系 \*\*中国医学科学院放射医学研究所