

- for the rapid measurement of gross alpha and gross beta activities in sea water. *Appl Radiat Isot*, 2009, 67(5): 978-981.
- [20] Beyermann M, Bünger T, Schmidt K, et al. Occurrence of natural radioactivity in public water supplies in Germany:  $^{238}\text{U}$ ,  $^{234}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{228}\text{Ra}$ ,  $^{222}\text{Rn}$ ,  $^{210}\text{Pb}$ ,  $^{210}\text{Po}$  and gross  $\alpha$  activity concentrations. *Radiat Prot Dosimetry*, 2010, 141(1): 72-81.
- [21] Bonotto DM, Bueno TO, Tessari BW, et al. The natural radioactivity in water by gross alpha and beta measurements. *Radiat Meas*, 2009, 44(1): 92-101.
- [22] Forte M, Bertolo A, D'Alberti F. Standardized methods for measuring radionuclides in drinking water. *J Radioanal Nucl Chem*, 2006, 269(2): 397-401.
- [23] International Organization for Standardization. ISO 11704 Water quality: measurement of gross alpha and beta activity concentration in non-saline water—liquid scintillation counting method. Geneva: International Organization for Standardization, 2010.

(收稿日期: 2012-03-02)

## 多色荧光原位杂交显带技术在高、低传能线密度辐射损伤中的应用

马铁军 王毅 安源 王东平 秦雪琴 范青萍 张娟

**【摘要】** 淋巴细胞染色体畸变率与电离辐射密切相关,并且已经广泛应用于辐射损伤的生物剂量评估。多色荧光原位杂交显带技术(mBAND)是染色体畸变检测的重要新兴技术,并且逐步应用于不同传能线密度(LET)射线所引起的染色体畸变检测。该文对 mBAND 技术在 X、 $\gamma$  射线所属的低 LET 射线和太空射线及高能重离子流所属的高 LET 射线中的应用,二者引起不同染色体畸变类型以及产生的不同辐射生物剂量效能作综合阐述。

**【关键词】** 染色体畸变;辐射损伤;传能线密度;荧光原位杂交显带,多色

**Multicolour-banding fluorescence in situ hybridisation analysis of radiation damage induced by high- and low-linear energy transfer rays** MA Tie-jun, WANG Yi, AN Yuan, WANG Dong-ping, QING Xue-qin, FAN Qing-ping, ZHANG Juan. Department of Protection, the 537th Hospital of People's Liberation Army, Baoji 721006, China

Corresponding author: MA Tie-jun, Email: matiejun19860926@yahoo.com.cn

**【Abstract】** Lymphocyte chromosome aberrations rate is closely related with ionizing radiation, and it has been widely used in biological dose evaluating. Multicolour-banding fluorescence in situ hybridisation(mBAND) is a newly-emerging technology in chromosome aberrations checking. It has been used in chromosome aberrations checking of different linear energy transfer(LET) rays. This article briefly reviewed mBAND using in different chromosome aberrations checking and different radiation biological evaluation by both low LET(such as X and  $\gamma$  rays) and high LET(such as space lines and energetic heavy ions).

**【Key words】** Chromosome aberrations; Radiation injuries; Linear energy transfer; Fluorescence in situ hybridization, multicolour-banding

射线类型主要分为高传能线密度(linear energy transfer, LET)和低 LET。高 LET 主要包括太空射线和高能重离子流,低 LET 主要包括 X、 $\gamma$  射线。由于高、低 LET 导致辐射损伤机制的不同,所产生的

染色体畸变类型也存在差异。多色荧光原位杂交(multicolor fluorescence in situ hybridization, M-FISH)是辐射损伤中染色体畸变检测的前沿技术,与传统染色体显带技术和单色荧光原位杂交相比有明显的优越性。M-FISH 的显色方法也称多色荧光原位杂交显带(multicolor-banding fluorescence in situ hybridisation, M-banding FISH),简称 mBAND。mBAND 技

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2012.03.012

作者单位: 721006 宝鸡,解放军第五三七医院防护科

通信作者: 马铁军(Email: matiejun19860926@yahoo.com.cn)

术应用于高、低 LET 辐射损伤染色体畸变的检测也已成为研究的热点<sup>[1]</sup>。

## 1 高、低 LET 辐射损伤导致染色体畸变的主要类型

高、低 LET 射线所导致的不同辐射损伤机制一直是放射生物学中的研究重点。相关实验室研究资料以及生物信息学研究显示,不同 LET 射线所导致的细胞电离程度有很大差别<sup>[2-3]</sup>。一般认为,电离辐射损伤 DNA 有两个途径:一是射线直接作用于 DNA 分子,通过电离激发使其受到损伤,称为射线的直接作用;二是射线与 DNA 周围其他原子或分子特别是水分子作用,产生具有很高活性的自由基进而损伤 DNA,称为射线的间接作用。其中,低 LET 辐射损伤的间接作用占主导地位,而高 LET 辐射损伤的直接作用占主导作用。高 LET 射线能导致更多的 DNA 双链断裂(double strand breaks, DSB),并且引起相对复杂和较难修复的 DNA 损伤<sup>[4-5]</sup>。目前,关于 DNA 辐射损伤机制的研究虽然有了广泛进展,但很少有研究发现引起 DNA 双链断裂与非双链断裂的机制。DSB 是染色体畸变的一种常见类型,也是电离辐射诱导的生物学效应中最严重的原发性损伤<sup>[6]</sup>。未修复的 DSB 引起遗传信息的丢失而导致细胞增殖死亡,修复不正确的 DSB 则导致易位、倒位等染色体重排,进而引起细胞遗传性改变或死亡。DSB 被认为是辐射诱导的重要损伤,而增殖细胞的死亡和辐射诱导 DSB 的相对生物学效应(relative biological effectiveness, RBE)依赖于电离密度。也就是说,高 LET 射线的 RBE 值相对较高。但是,也有研究结果显示,辐射诱导 DSB 的 RBE 与细胞效应之间没有对应关系,高 LET 辐射诱导的哺乳动物细胞 DSB 的初始水平等于或者低于低 LET 辐射诱导的 DSB<sup>[7]</sup>。因此,高、低 LET 射线引起的不同辐射损伤效应有待进一步研究论证。

## 2 高、低 LET 辐射损伤染色体畸变的检测手段

到目前为止,在高、低 LET 辐射损伤致使染色体畸变的检测中,传统染色体显带技术主要有 G、R、Q 等显带技术。由于传统显带技术显示的结果只是黑白条带,因此不能同时应用两种不同的显带技术检测染色体可能发生的多种类型的序

列改变。另外,传统显带技术分辨率较低,对检测染色体内部的碱基重排有很大的局限性。荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)是一种应用非放射性荧光物质,依靠核酸探针杂交原理在细胞核中或染色体上显示 DNA 序列位置的方法。相比传统的显带技术, FISH 在很大程度上提高了检测的特异度和分辨率。目前,在放射领域的 FISH 研究中,探针大多选用大染色体的全染色体特异性探针,用单一荧光染色不可避免地造成被标记的各种染色体之间发生的易位不会被识别,以及发生在染色体末端小的易位很容易被遗漏<sup>[8]</sup>。因此,在 FISH 基础上发展起来的 mBAND 技术能够使用多种不同颜色的荧光标记不同的探针,对染色体不同类型的序列改变进行检测。mBAND 技术可以很容易地辨认出双着丝粒和易位畸变,避免了传统显带方法容易将双着丝粒畸变误计为易位,而且大大提高了末端微小易位的检出率,同时也解决了单色荧光导致易位不能识别的问题<sup>[9-10]</sup>。

## 3 mBAND 技术在高、低 LET 辐射损伤染色体畸变检测中的应用

### 3.1 mBAND 技术在染色体内重组检测中的应用

染色体同源重组包括染色体内重组和染色体间重组,因连锁和交换产生的重组称为染色体内重组(intrachromosomal recombination);因染色体自由组合而产生的重组称为染色体间重组(interchromosomal recombination)。染色体间重组一般产生单个或多个整条染色体增加或缺如,常规方法也易于检出。而染色体内重组是由于连锁和交换而产生的,一般畸变比较隐秘,不易检测。因此,应用 mBAND 技术研究染色体内重组具有较突出的优势。关于高、低 LET 射线导致的染色体内重组是否存在特异性,目前的研究仍然没有一致的结论。一方面,一些研究者认为高 LET 射线能够导致较高、较复杂的染色体内重组,它是高 LET 辐射损伤的重要指标<sup>[11]</sup>。Tawn 等<sup>[12]</sup>应用 mBAND 技术分别将外周淋巴细胞暴露在高 LET 射线的  $\alpha$  粒子流和低 LET 的  $\gamma$  射线下,结果证实,高 LET 射线能够产生比低 LET 射线更多、更复杂的染色体倒置、交换等染色体内重组现象。Hada 等<sup>[13]</sup>同样应用 mBAND 技术研究气管上皮细胞,分别暴露在高能铁离子和  $\gamma$  射线,结果显示,暴露在高能铁离子下能够产生更

高频率的染色体内重组倒置。另一方面,一些研究者却持相反意见,认为高 LET 射线不会产生高频率的染色体内重组。宇航员长期作业于太空环境下,接受太空中小剂量质子和重离子的高 LET 辐射,Horstmann 等<sup>[14]</sup>应用 mBAND 技术对宇航员外周血淋巴细胞染色体畸变进行研究,结果显示没有明显的染色体内重组产生。另外,Johannes 等<sup>[15]</sup>在体外将淋巴细胞分别暴露在 X 射线、中子流和铁离子流下,结果也显示,在高、低 LET 射线下,染色体内部以及染色体之间的交换现象没有明显差异。甲状腺癌是辐射诱导的重要肿瘤之一,其发生概率与染色体内重组密切相关。Pignatelli 等<sup>[16]</sup>将甲状腺细胞分别暴露在高速重离子和 X 射线下,研究发现染色体内重排同样没有明显不同,甲状腺癌发生的概率也没有明显差异。这些观点都证实了高、低 LET 射线对染色体内重组影响没有明显差别。大量生物模型研究显示,密集频繁的电离辐射下,染色体内重组会增加<sup>[17]</sup>。在小剂量暴露下,其发生概率很低,以致于几乎无统计学意义。mBAND 技术广泛应用于高、低 LET 辐射损伤研究,其本身也存在一个问题,就是它的分辨序列的长度 $\geq 10$  Mbp,因此当染色体基因组序列发生改变的长度小于 10 Mbp 时,mBAND 就无法检测出来了。这也可能是高、低 LET 射线是否导致不同染色体内重组尚无定论的原因之一。

### 3.2 mBAND 技术在复杂染色体畸变类型检测中的应用

高、低 LET 辐射导致的染色体畸变的复杂程度存在差异。高 LET 辐射介导的染色体畸变中一个重要的表现是产生相对复杂的染色体重排现象。低 LET 辐射所致的染色体内部交换发生的频率很低,远远低于染色体之间的交叉互换,但在高 LET 辐射下,染色体内部和染色体之间交叉互换的发生频率都明显增高。体内、体外的大量研究显示,高 LET 辐射下除主要发生染色体内倒置外,同时伴随其他复杂类型的染色体畸变。相比之下,低 LET 辐射下主要发生染色体内倒置,而基本不伴有其他类型的畸变发生<sup>[12-13]</sup>。Lee 等<sup>[18]</sup>应用 mBAND 技术对比研究了碳离子束与 X 射线对染色体畸变的影响,结果均支持在高 LET 辐射下,会发生复杂的染色体畸变。虽然高 LET 辐射导致复杂类型的染色体畸变,但这些畸变类型相对来讲很不稳定。因此,

在复杂染色体畸变中,仍没有发现特异的畸变类型能够作为高 LET 辐射下的生物效应的标记。

### 3.3 mBAND 技术在染色体断点分布检测中的应用

近年来,关于辐射暴露下染色体断点畸变的研究已经成为热点领域。但是,对比高、低 LET 辐射暴露下染色体断点分布的研究报道很少。以往有学者应用 G 显带方法对比研究辐射损伤中断点分布情况,显示染色体断点畸变在富含基因区域存在簇集发生现象。mBAND 在检测染色体断点分布中也具有一定的优势,并逐步应用于染色体断点畸变研究。Horstmann 等<sup>[19]</sup>将人外周血淋巴细胞暴露在高能铁离子束下,应用 mBAND 技术研究分析 5 号染色体的断点情况,发现断点畸变的发生频率明显高于预期结果,断点呈非均匀分布。但是研究中并没有对比观测低 LET 辐射的断点分布情况。在高、低 LET 辐射损伤中,存在不同的染色体断点分布情况。近期相关研究显示,在人上皮细胞 3 号染色体发生的断点分布中,高 LET 射线导致的断点碎片发生频率明显高于低 LET 射线<sup>[20]</sup>。Hada 等<sup>[21]</sup>的研究也证实了这一观点,并进一步揭示高 LET 射线导致更多的断点碎片产生,其主要由染色体间重组产生。相反,高、低 LET 射线导致的染色体内部碱基重排产生的断点分布无明显差异。Hada 等还发现高、低剂量低 LET 射线暴露下,均存在断点畸变的多发区域,而在次级中子流和铁离子流暴露的高 LET 射线下,却不存在这些多发区域,研究显示,断点畸变存在的簇集现象主要发生在 3 个染色体区域,即 6、12、22 号染色体。在辐射损伤中,起初产生的 DNA 双链断裂在各个染色体上是随机产生的,但是在 6、12、22 号染色体上这些断裂的碎片可能在某些信号介导下,彼此之间发生结合,最终导致这 3 个染色体发生断点畸变的簇集现象。而其他染色体发生 DNA 双链断裂后,可能在正常状态下更容易地完成自身修复。然而,这些猜想都有待进一步的探索研究。

## 4 总结

辐射损伤对细胞遗传学影响的相关研究已经有很多年。mBAND 技术应用于高、低 LET 辐射损伤的染色体畸变检测,大大提高了各种复杂畸变类型的检测水平。而目前,高、低 LET 辐射损伤却没有特异的染色体畸变标志,这个领域的研究也正在

深入。未来的研究重点将集中于高、低 LET 辐射下各种染色体畸变类型的定量分析,以便寻找特异的损伤标志,同时为不同性质、不同类型辐射损伤的定性、定量分析提供依据。另外,关于电离辐射导致细胞染色体重组的具体机制仍不十分明确。mBAND 技术提高了各种复杂染色体畸变类型的检测水平,有利于其机制的研究。但是还必须明确,mBAND 技术仍存在一定的局限性。例如,它检测的目标基因序列只能 $\geq 10$  Mbp,对 $<10$  Mbp 基因序列发生的染色体重组,包括小的缺失、插入和倒置等,mBAND 技术将无法实现检测。近年来,比较基因组杂交技术(comparative genomic hybridization, CGH)能够对 20~80 Mbp 长度的断裂基因序列进行分析<sup>[2]</sup>。这为利用 CGH 联合 mBAND 技术对复杂染色体畸变进行综合、系统的分析提供了依据。

### 参 考 文 献

- [1] Chudoba I, Hickmann G, Friedrich T, et al. mBAND: a high resolution multicolor banding technique for the detection of complex intrachromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res*, 2004, 104 (1-4): 390-393.
- [2] Nikjoo H, Uehara S, Wilson WE, et al. Track structure in radiation biology: theory and applications. *Int J Radiat Biol*, 1998, 73 (4): 355-364.
- [3] Cucinotta FA, Nikjoo H, Goodhead DT. Model for radial dependence of frequency distributions for energy imparted in nanometer volumes from HZE particles. *Radiat Res*, 2000, 153(4): 459-468.
- [4] Lobrich M, Cooper PK, Rydberg B. Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation. *Int J Radiat Biol*, 1996, 70(5): 493-503.
- [5] Hada M, Georgakilas AG. Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. *J Radiat Res*, 2008, 49(3): 203-210.
- [6] Foray N, Arlett CF, Malaise EP. Radiation-induced DNA double-strand breaks and the radiosensitivity of human cells: a closer look. *Biochimie*, 1997, 79(9-10): 567-575.
- [7] Pinto M, Prise KM, Michael BD, et al. Quantification of radiation induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts by PFGE: testing the applicability of random breakage models. *Int J Radiat Biol*, 2002, 78(5): 375-388.
- [8] Johnson KL, Nath J, Pluth JM, et al. The distribution of chromosome damage, non-reciprocal translocations and clonal aberrations in lymphocytes from Chernobyl clear-up workers. *Mutat Res*, 1999, 439(1): 72-85.
- [9] Chudoba I, Plesch A, Lörch T, et al. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 1999, 84(3-4): 156-160.
- [10] Johannes C, Chudoba I, Obe G. Analysis of X-ray-induced aberrations in human chromosome 5 using high-resolution multicolor banding FISH(mBAND). *Chromosome Res*, 1999, 7(8): 625-633.
- [11] Hande MP, Azizova TV, Geard CR, et al. Past exposure to densely ionizing radiation leaves a unique permanent signature in the genome. *Am J Hum Genet*, 2003, 72(5): 1162-1170.
- [12] Tawn EJ, Whitehouse CA, Holdsworth D, et al. mBAND analysis of chromosome aberrations in lymphocytes exposed in vitro to alpha-particles and gamma-rays. *Int J Radiat Biol*, 2008, 84(6): 447-453.
- [13] Hada M, Cucinotta FA, Gonda SR, et al. mBAND analysis of chromosomal aberrations in human epithelial cells exposed to low- and high-LET radiation. *Radiat Res*, 2007, 168 (1): 98-105.
- [14] Horstmann M, Durante M, Johannes C, et al. Space radiation does not induce a significant increase of intrachromosomal exchanges in astronauts' lymphocytes. *Radiat Environ Biophys*, 2005, 44 (3): 219-224.
- [15] Johannes C, Horstmann M, Durante M, et al. Chromosome intra-changes and interchanges detected by multicolor banding in lymphocytes: searching for clastogen signatures in human genome. *Radiat Res*, 2004, 161 (5): 540-548.
- [16] Pignalosa D, Ritter S, Durante M. Inversion in chromosome 10 of human thyroid cells induced by accelerated heavy ions. *Radiat Res*, 2010, 174 (1): 14-19.
- [17] Ponomarev AL, Cucinotta FA. Chromatin loops are responsible for higher counts of small DNA fragments induced by high-LET radiation, while chromosomal domains do not affect the fragment sizes. *Int J Radiat Biol*, 2006, 82 (4): 293-305.
- [18] Lee R, Sommer S, Hartel C, et al. Intra- and inter-chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to radiation in vivo and in vitro detected by mBAND. *GSI Scientific Report* 2008, 2009: 373.
- [19] Horstmann M, Durante M, Obe G. Distribution of breakpoints and fragment sizes in human chromosome 5 after heavy-ion bombardment. *Int J Radiat Biol*, 2004, 80(6): 437-443.
- [20] Hada M, Gersey B, Saganti PB, et al. mBAND analysis of chromosome aberrations in human epithelial cells induced by gamma-rays and secondary neutrons of low dose rate. *Mutat Res*, 2010, 701(1): 67-74.
- [21] Hada M, Zhang Y, Feiveson A, et al. Association of inter and intra-chromosomal exchanges with the distribution of low- and high-LET radiation-induced breaks in chromosomes. *Radiat Res*, 2011, 176 (1): 25-37.
- [22] Gijsbers AC, Schoumans J, Ruivenkamp CA. Interpretation of array comparative genome hybridization data: a major challenge. *Cytogenet Genome Res*, 2011, 135(3-4): 222-227.

(收稿日期: 2012-02-05)