

应用荧光原位杂交技术探测 苯代谢产物的遗传毒性

邵建华 张罗平

摘要 目的 研究苯代谢产物氢醌和苯三酚以及二者联合作用于体外培养的人淋巴细胞产生多倍体的能力。方法 应用新颖的荧光原位杂交技术,同时使用二个具有特异性结合不同染色体的 DNA 探针。所研究的细胞处于分裂间期。结果 氢醌和苯三酚单独处理后的淋巴细胞,7和 9号染色体的多倍体频数显著增加,且大多数是染色体的三倍体。在低浓度时氢醌对 9号染色体有较明显致多倍体作用,而高浓度时则对 7号染色体有更显著作用。苯三酚对 7和 9号染色体的多倍体诱导作用相似。经氢醌和苯三酚混合处理后的淋巴细胞,其染色体的多倍体显著增加,但未显示协同效应。结论 氢醌和苯三酚的非整倍体诱导性提示它们可能在苯致白血病的发病中起一定的作用。

关键词 氢醌 苯三酚 荧光原位杂交 遗传毒性

Genotoxicity of Benzene Metabolites Detected by Fluorescence in Situ Hybridization in Interphase Human Lymphocytes Shao Jianhua*, Zhang Luoping. Huashan Hospital, Shanghai Medical University. Shanghai 200040

Abstract Objective To investigate the ability of benzene metabolites hydroquinone and benzenetriol and their combination to induce hyperdiploidy in interphase human lymphocytes. **Method** Fluorescence in situ hybridization with two chromosome-specific DNA probes was used. **Results** Treatments with hydroquinone and benzenetriol resulted in significant increases in the frequencies of chromosomes 7 and 9, with the majority being trisomy 7 and trisomy 9. At high concentrations hydroquinone had stronger effect in inducing hyperdiploidy in chromosome 7, whereas at low concentrations chromosome 9 is more sensitive than chromosome 7. Benzenetriol has similar effects in inducing hyperdiploidy in both chromosome 7 and chromosome 9. Simultaneous treatment with equimolar levels of hydroquinone and benzenetriol did not produce synergistic effect in inducing hyperdiploidy of chromosome 7 and chromosome 9. **Conclusion** The ability of hydroquinone and benzenetriol and their combination to induce hyperdiploidy suggests that they may play a role in benzene induced leukemia and other diseases.

Key words Hydroquinone (HQ), Benzenetriol (BT), Genotoxicity, Fluorescence in situ hybridization (FISH)

苯是一种广泛用于工业并普遍存在于环境污染中的化学物,它能引起苯作业工人外周血淋巴细胞染色体结构和数目改变^[1],并能导致人类骨髓毒性甚至白血病^[2]。研究表明导致苯的遗传毒性和致癌性的是有生物活性的苯

代谢产物而非苯本身^[3]。

氢醌(HQ)对培养淋巴细胞致断裂性和非整倍体的产生起着主要作用。尽管苯三酚(BT)在苯的代谢物中显得并不重要,它也能在人淋巴细胞和 HL60 细胞中致微核形成和诱发非整倍体^[4]。动物实验显示同时用 HQ 和苯酚处理后,体内产生的毒性和遗传毒性具有明显的协同效应^[5]。而同时用 HQ 和儿茶酚处理体外培养的淋巴细胞则引起明显的协同作

世界卫生组织奖学金资助

作者单位: 200040 上海医科大学附属华山医院(邵建华),美国加利福尼亚大学柏克莱分校公共卫生学院(张罗平)

用的遗传毒性反应^[6]。这些结果表明苯所致的骨髓毒性和遗传毒性是多个代谢产物的联合效应,而非任何一个单一的代谢物所致。因此,我们决定用荧光原位杂交技术,来探讨 HQ 和 BT 对人外周血培养淋巴细胞的染色体数目畸变的诱导作用及其二者可能存在的协同作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和处理

取健康成人外周血 12ml,置于灭菌肝素抗凝管中。全血稀释于 120ml 含 10% 新生小牛血清, 2mmol/L L-谷氨酰胺, 100 单位/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素及 1% 植物血球凝集素的 1640 完全培养基中,并分装于各培养管中,全血细胞培养液置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中。在培养开始后 24h 时进行细胞处理。处理前即刻用磷酸缓冲盐液配制无菌 HQ 和 BT 溶液至各所需浓度,把不同浓度的化合物加入相应培养管中,每一浓度处理的血培养管有双份同时进行。细胞处理完毕,培养管放回培养箱中。继续培养至 72 小时,收取细胞并置于 0.075M KCl 低渗溶液中半小时,然后用 3:1 的甲醇-冰醋酸固定 3 次,最后制片。片子自然干燥后保存于 -20℃ 氮气环境中直至使用。

1.2 荧光原位杂交

本实验采用二个可结合不同染色体着丝点的探针同时进行杂交。结合 7 号染色体的是鸡尾 α -卫星探针,结合 9 号染色体的是经典-卫星探针。探针均来自美国 Oncor Inc 杂交和检测方法如文献^[7]所述

1.3 读片

采用 Nikon 显微镜,上置荧光照明,并配有 100 倍油镜和能同时通过三部分光谱带的滤光片(激发光分别为 405nm, 490nm, 570nm, 发射光相应为 460nm, 525nm, 605nm),因此可同时观察到荧光素和碱性蕊香红结合的染色体探针及 4,6-联脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色的蓝色细胞核。读片前将所

需片子随机编码,整个读片结束后再解码。每张片子分析左右 2 个区域共 1 000 个分散不重叠的处于细胞分裂间期的细胞核。根据标准将每个细胞核内不同颜色的杂交点的数目同时记录在专门设计的记录纸上。

1.4 统计分析方法

采用 STATA 软件,在 Macintosh II si 机上进行统计学处理

2 结果

采用 7 和 9 号染色体探针的双色荧光原位杂交技术,检测经 HQ 和 BT 单独处理及二者同时处理后的人外周血淋巴细胞 7 和 9 号染色体的非整倍体的结果见表 1 表中所示为每 1 000 个细胞核中 7 和 9 号染色体杂交位点的数目。每个杂交位点代表一条染色体

2.1 HQ 处理浓度为 10, 25, 50, 75 和 100 μ mol/L HQ 的处理使得 7 号染色体的多倍体增多呈剂量-效应关系 ($P < 0.01$),线性回归系数 $r = 0.97$,在 75 和 100 μ mol/L,多倍体的增加极为显著 ($P < 0.01$)。除浓度为 10 μ mol/L ($P = 0.053$) 外,其余各浓度的 HQ 均可引起 9 号染色体多倍体频数明显增加 ($P < 0.05$),以 50 μ mol/L 时增加最为显著 ($P < 0.01$)

2.2 BT 处理浓度为 10, 25 和 50 μ mol/L 各浓度的 BT 均可导致 7 和 9 号染色体的多倍体增加,并具显著性意义 ($P < 0.05$),以 50 μ mol/L 时增加最为显著 ($P < 0.01$)

2.3 用等浓度的 HQ 和 BT 同时处理淋巴细胞,7 号和 9 号染色体的多倍体均显著增加。尽管二者同时处理所产生的多倍体在同等浓度上较单一处理为高,但联合处理并未显示协同效应。

在所产生的多倍体中,包括对照组和处理组,7 和 9 号染色体的三倍体是主要的多倍体成分,占总多倍体数的 76% ~ 96%。

3 讨论

用染色体特异性的重复 DNA 片断为探针进行荧光原位杂交是一近期发展起来的分子

表 1 氢醌和苯三酚对体外淋巴细胞 7号和 9号染色体非整倍体的诱导作用

化合物浓度 ($\mu\text{mol/L}$)		所检测 细胞总数	7号染色体杂交位点数				7号染色体 总多倍数	9号染色体杂交位点数				9号染色体 总多倍数
氢醌	苯三酚		1	2	3	4		1	2	3	4	
0	0	1 000	23	962	12	3	15	54	935	8	3	11
10	0	1 000	25	954	15	6	21	57	922	17	4	21
25	0	1 000	43	937	15	5	20	85	892	20	3	23
50	0	1 000	76	893	29	2	31 [*]	142	829	26	3	29 [*]
75	0	1 000	45	919	35	1	36 [*]	128	850	20	2	22
100	0	1 000	65	896	37	2	39 [*]	147	830	22	1	23
0	10	1 000	16	957	23	4	27	39	938	20	2	22
0	25	1 000	23	949	23	5	28	44	933	20	3	23
0	50	1 000	26	940	29	5	34 [*]	47	923	24	6	30 [*]
10	10	1 000	38	932	27	3	30	63	910	24	3	27 [*]
25	25	1 000	38	930	27	5	32 [*]	118	855	22	5	27 [*]
50	50	1 000	61	902	36	1	37 [*]	131	836	31	2	33 [*]

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

细胞遗传学新技术。同时应用不同的探针能同时检测数个染色体的目标区域。这一技术目前正被广泛用于临床和科研中检测染色体的非整倍体性。荧光原位杂交技术的特点是能快速、大量地获取所检测染色体的非整倍体信息。传统的染色体核型分析要求细胞处于有丝分裂中期，且染色体的形态和分布都要比较好。这样一次培养所得到的符合要求的细胞就较少，一般只有几十个，甚至只有几个，而且需花费大量的人力和时间来分析核型。而荧光原位杂交采用探针，可在细胞间期与特定染色体特异性片段结合，一次培养可观察分析数千个细胞的染色体，从而在短时间内可获得大量有关相应染色体信息，尤其当所取细胞正在治疗处理中不易进入有丝分裂期时。这是传统的核型分析所无法比拟的。

苯作业工人的细胞遗传学研究显示苯所引起的染色体变化主要在 C 组染色体。本实验结果显示 HQ 和 BT 对 7 和 9 号染色体都有显著的致非整倍体作用，与近年来的一些研究结果一致。Eastmond 等发现 HQ 可诱发淋巴细胞 9 号染色体的多倍体^[8]。BT 能在 HL60 细胞中诱导 7 号和 9 号染色体的多倍体^[9]。本次实验结果显示染色体多倍体的诱导作用与 HQ 处理浓度有关。高浓度时 HQ 对 7 号染色体比 9 号染色体的多倍体诱导作用更强，低浓

度时则 9 号染色体对 HQ 更敏感。高浓度的 HQ 并未使 9 号染色体的多倍体进一步增加，重复实验时得到相似结果，可能是因为 HQ 对不同的染色体的作用有一定的上限。而 BT 则对 7 号和 9 号染色体致多倍体的作用相似。比较不同化合物对同一染色体的作用，从本实验所取浓度范围来看，BT 对 7 号染色体的多倍体诱导作用较 HQ 为强，两者对 9 号染色体的作用相似。HQ 和 BT 共同作用于淋巴细胞并未引起协同效应，说明苯所致遗传毒性除 HQ 和 BT 起作用外，更有其他代谢产物的参与^[5,6]。

多倍体的产生机理尚不明了，但它与某一特定染色体在细胞分裂中期成对染色体不分离有关，可能是由于干扰了正常的纺垂体的形成和功能。这样在形成多倍体的同时应该有相应的单倍体出现。本实验中 7 号和 9 号染色体的单倍体的显著增加也支持此点。但是单倍体的增加明显多于多倍体，原因可能主要由于少数杂交位点的重叠，这在较小的细胞核内容易发生，尤其当杂交区域相对较大时。9 号染色体探针所形成的杂交区域比 7 号大，故其单倍体的数目也明显比 7 号染色体多。鉴于此，我们不采用此技术来研究对细胞间期染色体的低倍体形成作用。故本文对本实验中低倍体的产生未作进一步探讨。若研究低倍体的形成可

应用全染色体探针杂交细胞中期分裂相染色体的方法

苯代谢产物引起染色体畸变的现象为苯致白血病的潜在发病机理提供了线索。越来越多的分子和细胞遗传学证据表明,染色体畸变对某些肿瘤的发病起着重要作用^[10]。人们逐渐认识到基因量和平衡的改变,隐匿性突变的表达的重要性。原癌基因、肿瘤抑制基因等的定位表明染色体数目的增减和易位可能在致癌过程中起着相当的作用。苯代谢产物所致染色体多倍体与白血病常见的染色体异常有类同之处。因此,HQ和BT对染色体的非整倍体诱导可能在苯致白血病及其他病变中起着一定的作用。

4 参考文献

- 1 Forni A, et al. Chromosome changes and their evolution in subjects with past exposure to benzene. *Arch Environ Health*, 1971, 23 385
- 2 Yardley-Jones A, et al. The toxicity of benzene and its metabolism and molecular pathology in human risk assessment. *Brit J Ind Med*, 1991, 48 437
- 3 Sammett D, et al. Partial hepatectomy reduced both the metabolism and toxicity of benzene. *J Toxicol Environ Health*, 1979, 5 785
- 4 Zhang L, et al. Benzene metabolite, 1, 2, 4-benzenetriol,

induces micronuclei and oxidative DNA damage in human lymphocytes and HL60 cells. *Environ Mol Mutagen*, 1993, 21 339

- 5 Barale R, et al. Genotoxicity of two metabolites of benzene phenol and hydroquinone show strong synergistic effects in vivo. *Mutation Res*, 1990, 244 15
- 6 Robertson M L, et al. Two benzene metabolites, catechol and hydro quinone, produce a synergistic induction of micronuclei and toxicity in cultured human lymphocytes. *Mutation Res*, 1991, 249 201
- 7 Eastmond DA, Pinkel D Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization with chromosome specific DNA probes. *Mutation Res*, 1990, 234 303
- 8 Eastmond DA, et al. Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence in situ hybridization with DNA probes. *Mutation Res*, 1994, 322 9
- 9 Zhang L, et al. Detection of 1, 2, 4-benzenetriol induced aneuploidy and microtubule disruption by fluorescence in situ hybridization and immunocytochemistry. *Mutation Res*, 1994, 320 315
- 10 Oshimura M, Barrett JC Chemically induced aneuploidy in mammalian cells: mechanisms and biological significance in cancer. *Environ Mutagen*, 1986, 8 129

(收稿: 1997-11-24 修回: 1998-01-24)

参考文献的著录

1 参考文献的著录原则

1.1 只著录最必要、最新的文献。著录的文献要精选,仅限于著录作者亲自阅读过并在论文中直接引用的文献,而且,无特殊需要时不必罗列众所周知的教科书或某些陈旧史料。

1.2 只著录公开发表的文献。公开发表是指在国内外公开发行的报刊或正式出版的图书上发表。在供内部交流的刊物上发表的文章和内部使用的资料,尤其是不宜公开的资料,均不能作为参考文献引用。论文在国内外学术会议上交流,虽然也是一种发表形式,但因这种文献往往交流的范围较小,别人难以获得,也不易查阅利用;所以一般不宜作为参考文献著录,确实需要

者,可作为注释处理。

1.3 采用规范化的著录格式。我国国家标准 GB7714-87《文后参考文献著录规则》中规定采用“顺序编码制”和“著者-出版年制”两种。本刊采用我国科技期刊普遍采用的顺序编码制。

2 参考文献的著录方法

2.1 文内标注格式

采用顺序编码制时,对引用的文献,按它们在论文中出现的先后,用阿拉伯数字连续编码,将序号置于方括号内,并视具体情况把序号作为上角标,或者作为语句的组成部分。

(下转 79页)