

有共同点,某些诱发染色体辐射损伤的途径,也导致了细胞对拓扑酶抑制剂的敏感性^[15]。因此,对AT细胞DNA拓扑酶学的研究将有助于对AT辐射敏感性原因的理解。

四、结 语

AT细胞对电离辐射高敏感性是目前AT细胞研究的热点之一。目前研究认为,AT细胞对电离辐射的高敏感性及AT多种临床症状可能与和Topo II相关的DNA链断裂修复缺陷相关。但有关这方面的证据还不充足,需对AT基因及DNA损伤修复机制等作进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Swift M. Am J Hum Genet, 1988; 39 (5): 573-583
- 2 Lenon N et al. Int J Cell Sci, 1989; 56 (5): 667-675
- 3 Chen FC et al. Mutat Res, 1984; 129 (2): 165-172
- 4 Thacker J et al. In: Alan R ed. Mechanism and Consequence of DNA Damage Processing, Liss Inc, 1988; 361-369
- 5 Jaspers NG et al. Cytogenet Cell Genet, 1988; 49: 259-263
- 6 Lambert C et al. In: Ionizing Radiation Damage to DNA, Molecular Aspects, Wiley-Liss Inc, 1990; 281-285
- 7 Richard AG et al. Nature, 1988; 336 (6199): 577-580
- 8 Komatsu K et al. Mutat Res, 1990; 235 (2): 59-63
- 9 Debenham PJ et al. J Cell Sci, 1988; 6 (Suppl): 177-189
- 10 Smith PJ. Int J Radiat Biol, 1990; 58(4): 553-559
- 11 Cox R et al. Br J Cancer, 1984; 49(Suppl 4): 67-72
- 12 Cox R et al. Mol Biol Med, 1986; 3(3): 229-244
- 13 Debenham PJ et al. Radiat Res, Vol 1, 8th IRRS, 1987; 437-442
- 14 Taylor AMR et al. Int J Radiat Biol, 1989; 56(5): 677-684
- 15 Smith PJ et al. Int J Radiat Biol, 1989; 55(2): 217-231
- 16 Daviies SM et al. Nucleic Acids Res, 1989; 17: 1337-1351
- 17 Hickson ID et al. Int J Radiat Biol, 1990; 58(4): 561-563

荧光原位杂交技术在电离辐射剂量估算中的应用

中国医学科学院放射医学研究所 刘炳辰 王继光综述 肖佩新*审

摘 要: 作为染色体畸变分析的新方法——荧光原位杂交技术,近几年开始在电离辐射研究领域中的应用,并显示了它所独有的特点和可行性。本文就这方面的有关问题,及电离辐射的剂量-效应研究中,生物剂量计的一般性问题进行了概述。

估算受电离辐射照射人员的剂量,对放射防护以及受照者的医学处理具有重要意义。荧光原位杂交技术是一种新的染色体畸变分析的方法,近几年,逐渐被运用到电离辐射的剂量-效应关系的研究。它具有其独特的优点,与其它几种现行的生物剂量计指

标相互补充,有可能建立一套较完善的电离辐射剂量-效应的估算系统。但由于这一技术刚刚开始应用,仍存在一些不足,这些问题将在实践中逐步得到解决。

一、生物剂量计的一般方法学进展

* 河北省放射卫生研究所

自六十年代初,染色体畸变分析被用来估算受照人群的受照剂量以来,生物剂量计的方法学已有了很大进展,方法的标准化问题也渐被重视,使得生物剂量计的估算更接近于照射的实际剂量水平。近几十年来发展起来的生物剂量计的方法,主要有以下几种:

1. 染色体畸变分析:这是应用最早的一种方法,也是发展较为成熟的一种方法。染色体对于电离辐射是相当敏感的,它可以很好地反映电离辐射的剂量-效应关系,方法简单易行,且可以进行体外培养外周血淋巴细胞的染色体畸变分析,利用该剂量-效应的标准曲线,估算受照人员的受照剂量。因此,在物理测量难以达到要求的情况下,更显示出它特有的优点。许多事故的现场测量均证实了它的可靠性。

染色体畸变分析估算受照剂量,适用于原爆幸存者、事故受照者、接受放疗的患者、职业性受照者及高本底地区居民的受照者等。但也有人指出,它不适用于混合照射、分次照射、长期小剂量照射和内照射等〔1〕。因此,对于其应用范围方面的问题,还需积累更多的资料。

2. CB微核法:在体外培养的人及动物细胞中,加入一定浓度的细胞松弛素B,以阻止其细胞质的分裂,然后在双核细胞中计数微核,这就是细胞质分裂阻滞微核技术,即CB微核法。CB法的优点是获得结果的时间短,对实验条件及实验人员的技术要求较低。由于微核较易识别,为自动化分析提供了有利条件。当出现大量受照人员时,CB法可及早估算受照剂量。但由于年龄及多种因素的干扰,各种射线对活细胞效应的差异,CB法作为生物剂量计,还必须对不同品质射线进行深入的研究〔2〕。

3. HPRT基因位点突变分析:该基因位于xq27染色体上,是一个对电离辐射非常敏感且可长期存在的突变基因座。电离辐

射诱发HPRT基因座突变后,用6-氨基鸟嘌呤或8-氮鸟嘌呤筛选得到抗性克隆,由此计算出突变频率,进一步反向估算受照剂量。有的实验表明,该基因座突变率与染色体畸变具有良好的线性关系,随染色体畸变的增加,HPRT基因突变频率也增加〔3〕。

该方法适用于急性照射及慢性小剂量长期照射的剂量分析,具有简便、快速、灵敏的特点。应注意的是不同发育阶段的淋巴细胞受损伤后,其HPRT基因突变存在的时间也不同,只有未分化的淋巴细胞的突变才能保存下来,而未分化的干细胞发生突变的存在时间则更长。

4. GPA基因位点突变分析法:GPA(血型糖蛋白A)是一种人类红细胞表面上的血型糖蛋白,由此构成人类MN血型的物质基础,其基因定位于4q28-q31。有的学者利用该系统对广岛原爆幸存者的GPA基因座突变频率进行了研究〔4〕,发现其剂量-效应关系基本上符合线性模型。由此也证明了该基因座突变可以在体内长期存在,与染色体畸变比较,二者之间也可相互引证。因此,可以认为,GPA基因座突变是一个较真实的反映机体受辐射损伤程度的指标,有望成为一种新的生物剂量计。

该方法的主要优点是灵敏、快速、采样方便、稳定性好,但它只能分析MN血型的受照者中有稳定表型变化的变异体,且需要价格昂贵的流式细胞仪,目前尚难以普及。

二、染色体畸变分析的方法学进展

目前为止,基本可分为以下三种。

1. 常规分析法:该方法只能分析染色体数目异常及非对称性染色体缺失、双着丝粒体、环状染色体等结构畸变。

2. G显带分析法:可用于分析染色体的结构畸变,如易位、倒位、缺失、染色体重排等,准确率很高,但对实验人员的操作技术及阅片水平要求较高。

3. 染色体原位杂交技术：随着分子生物学技术的发展，染色体的原位杂交技术已被运用到辐射诱发染色体畸变分析及剂量的估算方面。这一技术可以直接定位单拷贝基因及存在20个转录单位以上的RNA，具有许多优点，主要是：（1）方法直接并易于进行统计学分析，所需染色体标本较少；（2）易于测量细胞内含量较低的核酸分子的碱基排列顺序。在用互补的DNA探针杂交及杂交条件相同时，可对该顺序进行定量分析；（3）可直接查出基因在区、带以至亚带的定位，也可显示染色体重排发生的位置；（4）目前尚不能通过核型分析的细微染色体重排，但可通过分析有关探针杂交后的杂交点分布而确定；（5）虽然操作技术较为复杂，但易于辨认。

三、原位杂交技术的原理、方法和优缺点

只要两个核酸分子的碱基序列互补，就可在适宜的条件下形成稳定的杂交分子。核酸的原位杂交技术就是利用带有标记的已知碱基序列的核酸作为探针，与标本上细胞染色体的同源顺序进行杂交，从而对染色体上待测的核酸进行定位和相对定量分析。

原位杂交最早采用的是放射性同位素¹²⁵I标记的自显影法。由于此法存在某些缺点，如方法的稳定性差；自显影时间较长；以及显影后的信号和染色体标本往往不能相吻合，加之射线散射致使信号颗粒不一定显示在杂交位点上，从而影响观察的准确性。近年来，人们采用了非同位素标记的方法，如荧光原位杂交法。其原理就是通过第一抗体将荧光素连接到生物素上，再通过第二抗体将荧光信号放大，在荧光显微镜下观察杂交的区带。

荧光原位杂交技术目前已较成熟，主要步骤包括：（1）用重组DNA技术克隆的目的基因或片段，通过缺口翻译或随机引物法，进行核苷酸片段的生物素标记；（2）

染色体标本的制备：用受照人员或体外照射的淋巴细胞常规制备染色体标本，要求染色体必须分散良好，无胞质覆盖，而且有足够的分裂相。标本一般在制备一个月内使用，时间太长则影响杂交效果；（3）杂交前标本须分别用RNA酶和蛋白酶处理，以分别消除染色体标本上的内源RNA和荧光标记中的非特异结合蛋白；（4）用一定浓度的酸、碱或甲酰胺使染色体标本的DNA变性；（5）加热使DNA探针变性，根据探针分子的大小，拷贝数多少等，用适量的探针与杂交液混合，加到标本上，进行杂交；（6）将抗生物素蛋白-荧光素加至标本上，进行荧光标记；（7）为使荧光信号扩大，用缓冲液洗去抗生物素蛋白-荧光素，加生物素-抗生物素蛋白抗体；（8）缓冲液洗去生物素-抗生物素蛋白抗体，再加抗生物素蛋白-荧光素；（9）加入防止荧光褪色的试剂，镜下观察。

荧光原位杂交技术，除具有一般原位杂交方法的优点外，还有其特殊的优点：（1）避免实验人员接触放射性同位素；（2）杂交后可直接分析结果，不需长时间的自显影过程，因此在受照人员的剂量估算方面更有其优越性；（3）易于进行自动化分析。但它仍存在着难以避免的缺陷，即过高的生物素化探针浓度，会导致非特异性的结合。对染色体畸变分析还受到以下方面限制，对某些畸变如倒位、缺失等不甚敏感；由于探针的特异性，只有某些与探针相对应的染色体畸变才能被观察到；以及此法的操作技术要求高，且需高纯度的试剂。

四、荧光原位杂交技术在电离

辐射研究中的应用

荧光原位杂交技术，用于电离辐射所致染色体畸变的研究，只是近几年发展起来的一种新的方法。但目前有关这方面的研究还不多，为了探索新的生物剂量计，对此我们

仅作一动向性分析和回顾。

Pinkel等人首先将荧光原位杂交技术引入电离辐射诱发的染色体畸变分析。他们利用4号染色体的基因组文库做探针,证实了 ^{60}Co 射线诱发的4号染色体易位^[5]。随后,该实验室进一步利用自己克隆的1q12,1p36作探针,对于 ^{60}Co 及 ^{137}Cs 射线的剂量-效应关系进行了研究^[6]。分别用 ^{137}Cs 照射外周血淋巴细胞,吸收剂量分别为0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2Gy, 剂量率为4.05Gy/min; ^{60}Co 照射外周血淋巴细胞的吸收剂量为0, 0.09, 0.18, 2.0, 3.1, 4.1Gy, 剂量率为0.9Gy/min。常规制备染色体标本,进行原位杂交分析。在畸变计数时,只计数以下两种类型的畸变:其一为断裂点在1p及另外的染色体某部位,易位后产生两个染色体,一个是带有1q12的偏中央着丝粒的1号染色体,另一个是带有1p36末端的另外染色体;其二为断裂点在1p及另外染色体的某部位,易位后形成一个带有1号染色体着丝粒和另外染色体着丝粒的双着丝粒体,及一个带有1p36末端的染色体断片。其它易位由于出现的频率很低,故不予计数。对于分裂相不足四个荧光点的不予计数,有时9号染色体着丝粒类似荧光点,需注意区别。实验结果证实,该方法分析到的染色体畸变率与剂量之

间有较好的剂量-效应的线性关系。与其它结果对比发现,在同一剂量下的染色体易位频率,较Dutrillaux^[7]用G带分析计数的总易位频率高。作者认为一是1p的易位频率可高于总体的平均易位频率;二是G显带分析的敏感性略差,某些易位被遗漏。对同一实验组的染色体畸变,分别用原位杂交和G显带技术进行分析,也证实了后者的结论。对于染色体双着丝粒畸变分析表明,原位杂交分析的某剂量诱发的畸变率亦高于常规染色体分析的同一剂量诱发的畸变率。但是作者未对此作出解释,而我们认为是因灵敏度不同所造成的差异。

Meyne^[8]等人用人工合成的 α -卫星DNA的寡核苷酸作探针,分析X线诱发的双着丝粒及无着丝粒畸变,证实这是一种较好的分析方法,是可行的。

Straume^[9]利用原位杂交技术对广岛原爆幸存者的染色体双着丝粒畸变率进行了研究,并与GPA分析相比较,二者对剂量的估算结果有较好的一致性,且GPA突变频率与双着丝粒频率亦呈直线正相关。

到目前为止,用于辐射诱发染色体畸变分析的探针仅有如下几种(附表)。尽管选用的探针数量有限,但我们认为探针的选择应遵循一个原则:即选用那些经过G带分析

表 用于电离辐射诱发染色体畸变分析的DNA探针

探针	染色体定位	检测对象和目的	参考文献
4号, 21号染色体 基因组文库	4, 21	γ 射线诱发的人外周血淋巴 细胞染色体畸变	5
1q12, 1p36	1	γ 射线照射人外周血淋巴 细胞的剂量效应曲线	6
α -卫星DNA的 寡核苷酸探针	染色体着丝粒	X射线诱发的人外周血淋巴 细胞染色体畸变分析	8
Cocktail A	1, 2, 4	广岛原爆幸存者的剂量 估算	9
Cocktail B	1, 3, 4		
Cocktail A	1, 3 X	X线诱发的人外周血淋巴	10
Cocktail B	2, 4, 8	细胞染色体畸变分析	

证实, 在电离辐射中最易发生畸变的系列探针。这样, 一方面避免了探针选择的盲目性, 另一方面减少了漏检的染色体畸变数目。另外还要考虑到获得探针的可能性。

五、小 结

荧光原位杂交技术用于辐射的剂量-效应研究, 从现有的资料可以看出, 具有较好的剂量-效应关系, 且对于某些染色体畸变分析的准确性高于常规的分析方法, 与染色体畸变的G带分析, GPA分析等方法, 有较好的一致性。总之, 荧光原位杂交技术有望成为较理想的生物剂量计, 若再与其它分析方法配合, 对评价受照剂量将会有更高的准确性和可靠性。

参 考 文 献

- 1 白玉书. 国外医学放射医学核医学分册, 1990; 14(2):97-101
- 2 蕾开先. 国外医学遗传学分册, 1990; 13(5):230-234
- 3 Hakoda M et al. Mutat Res, 1988; 201(1):39-49
- 4 Langlais RG et al. Science, 1987; 236(4800):445-448
- 5 Pinkel D et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85(23):9138-9142
- 6 Lucas JN et al. Int J Radiat Biol, 1989; 56(1):35-44
- 7 Dutrillaux B et al. Mutat Res, 1985; 152(1):197-203
- 8 Meyne J et al. Mutat Res, 1989; 226(1):75-79
- 9 Stranme T et al. Health Phys, 1991; 60(1):71-76
- 10 Natarajan AT et al. Int J Radiat Biol, 1992; 61(2):199-203

电离辐射诱发哺乳动物生殖细胞染色体畸变

卫生部工业卫生实验所 王 冰综述
河北省放射卫生研究所 肖佩新审

摘 要: 由于核能的广泛应用, 辐射诱发生殖细胞染色体畸变的效应已成为 辐射 遗传学研究的重要课题。各种不同的电离辐射均可诱发生殖细胞内作为遗传基因载体的染 色体畸变。两性生殖细胞的畸变可分为结构畸变和数量畸变两大类, 且具有很多常见类型。

生殖细胞染色体畸变是辐射遗传学中非常敏感的指标。由于发生了染色体畸变的生殖细胞有可能通过生殖过程传给子代, 而引起不育、半不育、胚胎早期死亡或遗传缺陷, 特别是某些基因突变能稳定地从一代传给下一代, 以至辐射对本代生殖细胞的遗传效应会在以后的许多世代中得到表现, 从而在一定程度上增加了人群的遗传负荷, 所以这种危害对子孙后代更大。电离辐射诱发的生殖细胞染色体畸变既可用作为估价辐射剂量有用的生物指标, 又是估价辐射远后效应的重要指标。当考虑电离辐射的遗传效应

时, 必须考虑到它对群体的遗传负荷的影响, 从潜在的遗传危险考虑, 探讨生殖细胞染色体畸变具有重要意义。

一、染色体数量畸变

(一)染色体丢失

单体型在人类和小鼠均可导致胚胎死亡。唯一例外是XO畸变, 可能存活, 很少引起不良后果, 同时用适当标志在表型上是可检出的。

1. 雄性生殖细胞

Russell等(1974, 1976年)用X射线