

- | | |
|--|---|
| 11 何伟辉 等. 中华放射医学与防护杂志, 1985;5(2):109-113 | for Person year computations, command summary. Hiroshima, Japan; RERF, 1989 |
| 12 陶祖范. 国外医学·放射医学核医学分册, 1992;16(1):11-13 | 16 Chaffey JT et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1976;1:399-405 |
| 13 Modam B. 国外医学·放射医学核医学分册, 1992;16(5):208-211 | 17 Choi NC et al. Cancer 1979;43:1636-1642 |
| 14 潘颖东 等. 中华放射医学与防护杂志, 1993;13(1):17-19 | 18 Aydin-F et al. Cancer 1992;69(9):2322-2326 |
| 15 Preston DL Pierce DA. PYTAB:a Program | 19 坂本澄彦 他. 原子力工業, 1990;36(5):3-4 |

微核的自动化检测

北京市肿瘤防治研究所放疗科 蔡勇综述 卫生部工业卫生实验所 白玉书审校

摘要:微核分析已成为继染色体畸变分析之后又一使用最广泛的辐射细胞遗传学方法。微核自动化检测已成为人们关注的焦点和发展趋势,目前主要试图用流式细胞术和图像分析仪来对微核进行自动化检测。

1 前言

微核实验作为一种检测遗传毒物的短期测试法,已在细胞遗传学中得到广泛应用。长期以来,微核检测一直是靠人工完成,这就给检测者增加了很大的劳动强度,而且在微核判断上受主观因素影响很大,因此人们迫切希望微核能自动化检测。如果微核自动化检测获得成功,那么比目前人工检测有如下明显优点:第一,由于大量细胞能被没有疲劳地检测,改善了计数统计;第二,提供了比人为观察更客观和更一致的微核识别标准;第三,能得到核大小、形态、结构、DNA含量等信息,对了解微核生命周期更有帮助;第四,对弱致变剂,因能检测大量细胞,增加了对其评价的准确性;第五,对大样本人群检测,既省时又省力。

2 方法

目前主要试图用流式细胞术和图像分析仪来对微核进行自动化检测,国外不少学者

都在探索把这两种技术用于哺乳动物骨髓PCE微核检测,经过这些年的不断努力,已在这两种方法上取得了初步成果。

2.1 流式细胞术

流式细胞术是根据染色体DNA含量来确定微核大小,微核含有的DNA含量应超过最小染色体,但要小于最大染色体DNA含量的两倍^[1]。由于每个样本分析5000个细胞,使这种方法极大地增加了微核实验的可信性^[2]。Hutter和Stoehr最先实验自动化检测小鼠全部骨髓的微核分析,使用DAPI(染DNA)和SR101(染蛋白质)两种荧光染料相结合来检测微核,但它不能区分PCE和NCE^[3]。Leary和Tomestsko也曾采用过类似的方法^[4]。Hayashi等用小鼠骨髓实验,用流式细胞术得到的结果表明最大的MNEs(有微核红细胞)DNA含量是G₁期核细胞DNA含量的10%,绝大部分骨髓红细胞中微核的DNA含量以前的实验结果也是在这一区域^[2]。比较流式细胞术和人工方法,两者有好的线性关系。Ludwikow等报道流式细

胞术对于估算 CHO 细胞微核频率似乎是个好工具,剂量范围可达 4Gy,剂量再高,则细胞周期紊乱和细胞死亡的出现将影响结果⁽¹⁾。Macgregor 等认为用两种简单的荧光染料 Hoechst33258(染 DNA,蓝色)、Pyronin Y(染 DNA, RNA,桔红色)染骨髓细胞中的 RNA 和微核,更适应于流式细胞术,但它的缺点是不可能确定 PCE 和 NCE 的比率,而这种比率是化合物与细胞毒理有关的一种重要指标。⁽⁵⁾自动化方法与常规阅片方法相比,细胞计数速度提高了 25~100 倍,由于每个样本分析的细胞数目增加,从而也使敏感性增加。在未来,采用这种方法应该可检测弱致变剂和低剂量断裂剂,目前由于研究还在初步阶段,用流式细胞术还不可能达到完全自动化分析微核的目的。

2.2 图像分析仪

由 TV 屏幕摄像机、视频图像转换器和两台图像接收和处理的微机组成⁽⁶⁾。Andrese 等最先采用半自动化进行骨髓玻片微核分析⁽⁷⁾,此后,不少学者都试图发展微核分析的计算机软件,但由于细胞标本不过关和传统的骨髓涂片产生大量人工假象的存在,这些努力都没有成功。直到 1989 年 Romagna 和 Staniforth 经过研究才获得成功,他们的方法特别强调分离技术,用纤维柱把有核细胞从骨髓中清理出来,并使用 Percoll 梯度离心排除人工产生的碎片,丰富外周血的 PCE 部分,解决了 Leitz MIAMED 系统的主要问题:区分 PCE 和 NCE。经这种技术处理,胞浆表现为异质性的蓝色或黄色,微核染成暗色,很容易用图像分析仪识别,对于 PCE 和 NCE 的分类标准,根据它们不同的灰度水平也很容易编进计算机软件,他们用 IBA2000(Kontron/Zeiss)图像分析仪自动化检测的结果同一专家人工分析的结果类似,充分说明了它的可靠性。另外,采用丰富 PCE 部分的微核分析也清楚地表明对小鼠外周血 PCE 也是很敏感的,使用外周血微核分析可以对同一

动物重复性检测,不用同时再设对照组⁽⁸⁾。

Callisen 用图像处理系统研究淋巴细胞中发现,肉眼看到微核的 50%,而他们的结果显示出几乎有 70%的微核被发现,在这些微核中 90%能被很好地识别⁽⁹⁾。Fenech 报道的自动化检测淋巴细胞微核,以核的完整光密度(IOD)和面积变化为基础,与 BrdU 掺入法相结合,根据子细胞核 BrdU 含量减少 50%会引起核的 IOD/面积降低,由此可以检测到仅分裂一次的细胞。然而,这种方法不适用胞浆阻滞法(CB 法),因双核细胞(BNC)不能被检测到,也不能识别胞浆⁽⁹⁾。BNC 中的微核检测更加困难,主要是由于①淋巴细胞是有核细胞,这意味着要分析更加复杂的模式;②要把双核细胞同单核、三核、四核细胞区分开⁽¹⁰⁾。但是,通过肉眼分析得到单/双核细胞的比率,再结合光密度直方图就能得到正确的微核频率,用这种方法得到的结果与肉眼分析结果没有什么差异。由于使用 Feulgen 染色,核与微核 DNA 的 IOD 含量是成一定比例的,最低的 IOD 峰为微核的 DNA 含量,最高的 IOD 峰作为 G₁ 期核的 DNA 含量,用 2Gy 照射淋巴细胞,微核 IOD 的均值是 G₁ 期核的 11.2%±1.0%,并发现有几个微核 DNA 含量大于最大染色体的 DNA 含量,说明某些微核可能含有整条染色体⁽⁹⁾。Tates 和 Van welie 采用 Leytas system 成功地进行了 BNC 检测,它主要通过染色技术的改进,用对核、微核和胞浆具有不连续吸收光谱的两种染色,使自动检测 BNC 和 BNC 中的微核成为可能。结果表明,使用本仪器发现 63% BNC, BNC 中 57%的微核,但同时发现 24% BNC 是假阳性,10%的 BNC 中有假阳性微核,假阳性微核产生的原因主要是因为核内对比度的不均匀⁽¹⁰⁾。此系统还有待于进一步改善。尽管只有 57%的微核被检测出来,但不能不说微核的自动化检测还是向前迈进了一步。

3 结论

为了更好地发现微核和定量计算,还有待于在空间灰度测量的精确性和计算机存储使用及程序运算时间等方面进一步提高。近年来,国外在微核自动化检测软件方面取得了很大进展,国内也已开始着手这方面的工作,理想的微核自动化检测一定会成为现实。

参 考 文 献

- 1 Ludwikow G et al. Act Oncol, 1990; 29: 761
- 2 Hayashi M et al. Mutagenesis, 1992; 7: 251
- 3 Hutter KJ et al. Histochemistry; 75: 352
- 4 Leary JF et al. 17th Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society, Baltimore, MD, 9-13 April, 1986
- 5 Macgregor JT et al. Mutat Res, 1983; 120: 269
- 6 Callisen H et al. Biological Dosimetry, 1984; 171
- 7 Andrese AP et al. 17th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society, Baltimore, MD, 9-13 April, 1986
- 8 Romagna F et al. Mutat Res, 1989; 213: 91
- 9 Fenech M et al. Mutat Res, 1988; 203: 33
- 10 Tates AD et al. Int J Radiat Biol, 1990; 58: 813

放射防护标准的历史变迁

第三军医大学防原医学教研室 郑怀恩综述 程天民 孙福印*审校

摘 要: 1934年, ICRP和NCRP分别提出了第一个放射防护标准。近60年来放射防护标准经过多次修改和完善, 主要剂量限值不断降低, 涉及防护内容日益详细。本文回顾了国际放射防护标准修改变化的历史过程。

随着X射线(1895)和镭(1898)的发现, 早在本世纪初人们对射线的损伤作用就有所认识, 并开始了放射防护工作。在1934年国际上首次提出了剂量防护标准后, 半个多世纪以来, 防护标准几经变迁, 不断得到修改和完善。ICRP在1991年第60号出版物中又建议了最新防护标准。本文对国际放射防护委员会(ICRP)和美国国家放射防护与测量委员会(NCRP)在不同时期提出的防护标准作一综述, 以便更好地学习理解最新防护标准。

1 职业工作人员的外照射防护标准

在1977年引进有效剂量之前, 外照射和

内照射通常是分别进行控制的。本节按发展年代, 分以下阶段对外照射防护标准进行叙述。

1.1 X射线的耐受剂量(1934)

早在1915年X线机投入使用的时候, 就开始了有组织地进行放射防护工作, 但是直到放射剂量单位及其测量标准化之后, 放射防护的剂量限制标准才得以提出。1931年, 伦琴被国际放射单位与测量委员会采用为X射线的空气辐射单位。ICRP和NCRP随后在1934年分别首次提出了关于放射职业工人对X射线耐受剂量的建议:

$$\text{NCRP: } 2.6 \times 10^{-5} \text{Ckg}^{-1} \text{d}^{-1} (0.1 \text{Rd}^{-1})$$

$$\text{ICRP: } 5.2 \times 10^{-5} \text{Ckg}^{-1} \text{d}^{-1} (0.1 \text{Rd}^{-1})$$

* 中国医学科学院放射医学研究所