

- 1983;585-604
- 7 Bender MA et al. *Mutat Res*,1988;196,103-159
- 8 Littlefield LG et al. *Medical management of radiation accidents*,Florida:CRC Press,1990;109-129
- 9 IAEA. *Summary report on the post-accident review meeting on the Chernobyl accident safety series*,No. 75-INSAG-1. Vienna,1986
- 10 金瑾珍等. *中华放射医学与防护杂志*,1993;13(1):8-10
- 11 白玉书等. *辐射防护*,1993;13(2):103-106
- 12 Ramalho AT et al. *Radiat Prot Dosim*,1988;25(2):97-100
- 13 Littlefield LG et al. *Radiat Prot Dosim*,1991;35(2):115-123
- 14 金瑾珍等. 上海“6. 25”⁶⁰Co 源辐射事故病人诊断与救治文集,北京:科学技术出版社,1994;26-32
- 15 白玉书等. *中国辐射卫生*,1993;2(2):77-78
- 16 Countryman PL et al. *Mutat Res*,1976;41:321-332
- 17 Brewen JG et al. *Radiat Res*,1972;49,647-656
- 18 Ramalho AT et al. *Health Phys*,1991;60(1),67-70
- 19 Sreedevi B et al. *Radiat Prot Dosim*,1993;50(1):45-49
- 20 Campos IMA et al. *Radiat Prot Dosim*,1990;30(1):33-36
- 21 Llyod DC et al. *Mutat Res*,1987;179-208
- 22 韩保光等. *辐射防护*,1993;3(6),401-413
- 23 Fenech M et al. *Mutat Res*,1986;161:193-198
- 24 K öksal G et al. *Radiat Prot Dosim*,1989;29(3):209-212
- 25 Gantenberg HW et al. *Radiat Res*,1991;128:276-281
- 26 蒋本荣等. *中华放射医学与防护杂志*,1994;14(3):169-172
- 27 白玉书等. *中华放射医学与防护杂志*,1993;13(4):243-245
- 28 Balasem AN et al. *Radiat Prot Dosim*,1993;46(4):295-297

荧光原位杂交技术与辐射生物剂量计

中国医学科学院放射医学研究所 王知权综述

摘要: 一种快速检测染色体畸变、特别是相互易位和微小互换的新方法——荧光原位杂交(FISH)技术,近年来在放射医学研究领域异常活跃。本文对其发展过程、探针来源、分类、特性、操作程序、影响因素以及在放射医学领域中剂量-效应关系研究、早先受照人群的剂量估算等方面都作了较为详细的描述。

1969年,Pardue和Gall^[1]首先建立了原位杂交方法。该法源于这样一个事实,即在适当条件下,单股DNA和RNA序列可能与其互补序列进行复制,这个过程就叫做杂交。他们以同位素氟标记的探针开始了对两栖类卵母细胞的研究。1977年,Rudkin和Staller^[2]是第一个用5S核糖体探针作果蝇多线染色体定位的荧光原位杂交(FISH)方法的先驱。1986年,Pinkel等^[3]首先将FISH交技术引入辐射领域,开创了辐射生物剂量计的新篇章。近年来,FISH技术在各个领域应用的报

道,正如雨后春笋,显示出广阔的应用前景。

1 概 况

FISH是用来检测已固定在玻片上的特有核酸序列的一种高度敏感方法。其原理是,用已知标记的碱基序列的核酸作探针,按照互补原则与靶细胞上的同源序列进行特异性结合,然后通过第一抗体将荧光物质连接到生物素上,再加入一层用生物素标记的第二抗体将信号放大,最后通过荧光显微镜对中期染色体和间期核观察并定位。目前该技术

的敏感性可检测到小于 1kb.

1.1 DNA 来源

①分离含有人类染色体的体细胞杂交系。该杂交系中往往杂合有人的染色体,在培养过程中会随机丢失,此时用流式细胞仪来分离特定的染色体。

②来自已纯化的人类染色体文库。

③将显微切割(microdissection)片段进行聚合酶链反应(PCR)后所得的产物。

1.2 探针分类

①具有高度重复序列,其靶区集中在染色体着丝粒附近异染区的 α -卫星探针,可检测细胞中的着丝粒区。

②具有广泛分布序列,其靶区集中在一个或多个整条染色体或染色体片段的 Painting 探针。

③具有特殊基因组位点的,其靶区为缺失和易位等。

1.3 FISH 特点

①与放射性同位素杂交比,减少了操作人员与同位素接触的机会,没有放射性废物的排出,大大缩短了操作过程,在灵敏性、特异性和安全性等方面都优于放射性探针。

②既可从中期染色体和间期核中观察 DNA 含量,也可在悬液中显示间期核内 DNA 三维结构。

③多色 FISH 可在同一中期相或间期核上显示多种颜色,从而可检测多种 DNA 序列。

④应用不同的探针可分别显示其相应基因组,某一条染色体,甚至某一片段,以便于定位。

⑤与染色体 G-显带比,操作简便、分裂相不要求那么严,分析速度快(2~6 个/min,而 G-带 4 个中期/h)、客观。

⑥特别适用于易位、微小缺失、插入等染色体畸变的分析。

⑦记录易于自动化。

⑧不足之处是对倒位不灵敏。

1.4 操作程序

尽管各公司介绍的操作程序有所不同,但大致如下:

①制备带有中期相或间期核的标本。

②用 RNA 酶或蛋白酶 K 处理,以去除表层蛋白。

③靶细胞和探针变性(70℃水浴)。

④杂交使探针上 DNA 与靶细胞上的互补序列特异性结合。

⑤反复冲洗靶分子,以除去未杂交的和非特异性杂交部分。

⑥用免疫细胞化学法将荧光物质插入,进行标记。

⑦信号扩增放大。

⑧复染。

⑨荧光镜检。

1.5 影响杂交效果的因素

①最好在新鲜标本(当天~三天内)制成片后勿用火或放干燥箱烤片,否则会减弱荧光信号。

②探针长度以 200~400bp 为最佳。探针太长,背景脏;太短,特异性差。

③片子不清洁,细胞碎片多,洗涤条件不合适等易形成高本底。

④探针浓度要合适,以 1 μ l 左右为好。太低,杂交时间需增长,使杂交率降低;反之,浓度过高则非特异性结合增加。

⑤信号强弱决定于探针用量、纯度、杂交温度是否合适、洗涤程度是否彻底等。

2 在放射医学研究中的应用

2.1 离体研究

Lucas 等^[4]应用 1q12 和 1p36 两个探针做了两组实验,一是用 0.66MeV ¹³⁷Cs γ 射线,剂量率为 4.05Gy/min 条件下,离体照射人血样品,剂量为 0,0.8,1.6,2.4 和 3.2Gy,对易位率来说,其方程为 $f(D_t) = 0.0025 + 0.0034D + 0.0057D^2$;对双着丝粒率: $f(D_{dic}) = 0.0005 + 0.0012D + 0.0042D^2$. 另一实验

是用 140.6TBq, 1.25MeV⁶⁰Co γ 射线, 剂量率为 0.9Gy/min, 剂量依次为 0, 0.09, 0.18, 2.0, 3.1 和 4.1Gy, 其方程对易位率和双着丝粒率分别为: $f(D_1) = 0.0010 + 0.0064D + 0.0048D^2$ 和 $f(D_{dic}) = 0.0001 + 0.0008D + 0.0033D^2$. 结果表明: 畸变率均随剂量增高而增加, 符合线性平方模式。

Bauchinger 等^[5]应用 1, 4 和 12 全染色体和全着丝粒探针, 再用 0.662MeV¹³⁷Cs γ 射线照射离体人血标本, 观察到的易位和双着丝粒率也是随照射剂量的增加而升高, 符合线性平方模式。同时, 还发现易位率比双着丝粒率大 1.3~1.8 倍。

最近, Matsuoka 等^[6]分别以 1, 3, 4 及 1 和 4 组合全染色体探针用 220kV X 线机照射人离体血样品, 同样也发现易位, 在 48 和 72h 收获时, 畸变率均随剂量增加而升高; 对双着丝粒来说, 在 48h 收获时, 随剂量增加而升高, 而在 72h 收获时, 则随剂量增高而降低。

2.2 事故照射

Lucas 等^[7]应用 1, 3 和 4 号全染色体组合探针, 对南斯拉夫 4 名 Y-12 核事故受照者的易位率测定, 与用常规法测定的结果非常一致。

Straume 等^[8]报道了发生在巴西 Goiania 的一次¹³⁷Cs 事故, 约 100 人受到不同剂量照射, 最大为 7Gy. 其中 5 人分别用 1, 3 和 4 号以及 1, 2 和 4 号两组组合探针对易位率进行了测定, 进而估算了剂量, 结果与用红细胞膜血型糖蛋白 A (GPA) 和事故后立即用双着丝粒或双着丝粒+环状染色体所估算的剂量比较接近。

2.3 原爆幸存者

Nakano 等应用 1, 2 和 4 号全染色体及全着丝粒探针检测了 36 例原爆幸存者。根据 DS86, 骨髓剂量为 0~4Gy, 同时采用 FISH 和 G-显带测定其易位频率, 除个别外, 其它绝大多数用两种方法都得到一致的结果, 且

剂量-效应模式也相似。两种方法之间的线性回归斜率为 0.84, 其回归系数为: $r = 0.951$.

Lucas 等^[7]应用 1, 2 和 4 号全染色体探针和 G-显带同时检测了 20 例原爆幸存者, 发现随着剂量的增加, 其易位率也随之升高, 且两种方法测定的结果也非常一致。

2.4 职业性受照人员

Straume 等^[9]报道, 在某核工厂工作的一名长期慢性小剂量受照者, 是一位 59 岁白人, 1953 年开始参加工作, 连续工作 36 年, 物理剂量记载为 0.56Sv, 早年 (1953~1965 年间) 剂量计性能远不如现在, 他个人认为过低地估算了他的剂量。此人既不吸烟, 也没有接受过医疗或其它非职业性照射。为此, 用 GPA 突变基因位点、染色体易位、微核和双着丝粒畸变四项生物指标来估算其生物剂量。结果表明, 微核和双着丝粒畸变在受照者与对照样品间无统计学意义, 而 GPA 位点和染色体易位在两组间却有非常显著的差异。测定易位方法, 同时采用了 FISH 和 G-显带技术, 易位率在两组间分别为 0.017/细胞和 0.0026/细胞。为此该作者根据 GPA 位点和染色体易位两个指标, 同时考虑了一些不确定因素, 推算出该职业受照人员长期低水平照射的剂量当量范围为 0.4~2.0Sv 之间。

荧光原位杂交技术在放射医学领域不仅显示其明显的剂量-效应关系, 同时对早先受照人群又可用来估算过去受照剂量; 它不仅可作为染色体 G-显带分析易位的验证, 同时还是一种更有效的发展。深信它若与 GPA, HPRT 等位点相结合, 必将显示出是一种快速的、准确的、客观的、很有前途的辐射生物剂量计。

参 考 文 献

- 1 Pardue ML and Gall JG. Proc Natl Acad Sci USA, 1969; 64: 600

- | | |
|--|--|
| 2 Rudkin GT and Stollar BD. Nature, 1977; 265; 472 | (2); 179 |
| 3 Pinkel D et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1986; 83: 2934 | 6 Matsuoka A et al. Mutagenesis, 1994; 9(2); 151 |
| 4 Lucas JN et al. Int J Radiat Biol, 1989; 56(1); 35 | 7 Lucas JN et al. Int J Radiat Biol, 1992; 62(1); 53 |
| 5 Bauchinger M et al. Int J Radiat Biol, 1993; 64 | 8 Straume T et al. Health Phys, 1991; 60(1); 71 |
| | 9 Straume T et al. Health Phys, 1992; 62(2); 122 |

毛发细胞计数作为生物剂量计的可能性

中国医学科学院放射医学研究所 刘旭平 王知权综述

摘要:对毛囊死细胞裂解断片、毛发宽度、毛发髓质细胞计数(HMCC)、毛发皮质细胞计数(HCCC)四个指标作为辐射生物剂量计的原理、优缺点进行了讨论,并详细指出HMCC和HCCC作为有价值的生物剂量计的应用前景。

电离辐射可引起机体的很多反应,准确估算受照者的吸收剂量,对于推算辐射致癌危险度,放射损伤诊断等至关重要。估算剂量时,除物理估算系统外,近年来人们发展了很多生物检测方法。如稳定性染色体畸变(Cs)^[1-3],细胞膜上血型糖蛋白A(GPA)^[4-5],次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖基酶位点(HPRT)^[6]和淋巴细胞微核法(MN, CBMN)等^[7]。这些指标作为生物剂量计已得到证实和应用。本文利用毛囊和毛发的辐射敏感性,对作为生物剂量计的可能性进行讨论。

1 原理

大多数哺乳动物包括人的身体表面覆盖大量的毛囊,并产生毛发。毛囊的生长呈周期性,从毛发生长到脱落为一个周期,包括生长期、衰退期、终末期。处在生长期的毛囊,其胚基质区的细胞迅速增殖,进一步分化成内根鞘细胞、髓质细胞、皮质细胞、毛小皮。这些细胞逐渐角质化形成毛发。在毛囊生发角质化的区域,髓质和皮质的细胞核逐渐退化。

胚基质中快速增殖的细胞对辐射非常敏感,并且胚基质的损伤能预期反应在毛发中。

辐射对毛囊的影响包括细胞的固缩和裂解。死细胞的出现和细胞周期的紊乱进而导致形成毛发的细胞减少,毛发变细,甚至出现异常毛发。如剂量足够大,则会导致毛发脱落^[8]。Potten等^[9]证明了胚基质中细胞快速增生区与形成毛发区之间,毛发的髓质细胞数和皮质细胞数均是剂量-效应关系敏感的终点,它们随着剂量的增加而减少。

毛囊及其毛发的这些变化能检测到的剂量依赖关系范围为0~5Gy^[9],每种方法都有其特征的短暂关系,且毛囊和毛发又易得到,它们不仅能测定剂量,而且是唯一能够鉴别体表剂量分布的生物系统^[10]。为此,Potten等提出了毛囊及毛发作为有价值的生物剂量计的可能性。

2 剂量效应关系

小鼠毛囊的生长周期短,容易控制。选择7~8周龄的小鼠^[9-10],此时其背部毛囊处在终末期,易拔。经拔去小鼠背部毛发,10天后照射动物,经处理制成所需标本,分析毛囊死细胞的断片数、毛发宽度、毛发髓质细胞数和毛发皮质细胞数。