

## 。综述与编译。

# 细胞遗传学技术在辐射事故生物剂量估算的研究进展

北京放射医学研究所(北京,100850) 金瑾珍综述

**摘要:**对现有几种生物剂量测定方法如:染色体畸变、微核、早熟染色体凝集及新近开展的荧光原位杂交、HPRT/GPA等在辐射事故剂量估算中的应用情况作了介绍。迄今,染色体畸变仍是各种生物剂量测定方法中研究最多、较为可靠的一种。分子细胞遗传学方法,主要是FISH的建立和应用,对解决慢性长期照射和早先照射的剂量估算将是一种具有实用前景的方法。

**关键词:**生物剂量学 染色体畸变

作为一个理想的生物剂量计除了能在事故后早期提供辐照剂量外,它还应当根据生物学上有意义的变化而预测对受照者远期健康的影响。迄今,已经得到应用或正在研究中的生物剂量计已有多种,其中多数属于细胞遗传学范畴,本文重点综述染色体畸变、微核、早熟染色体凝集作为生物剂量测定方法的研究进展。

## 1 染色体畸变

染色体畸变作为一种生物剂量测定方法已有30多年历史。1962年Bender用照射离体人血方法,首先肯定人体细胞染色体畸变量和受照剂量之间呈正比关系。随后又有大量的研究工作表明,离体照射哺乳动物血细胞诱发的畸变量与活体照射所得结果近似,由此提出利用染色体畸变分析可以作为生物剂量计估算事故情况下人员所受的辐射剂量。1966年在美国Hanford“Recuplex”事故中,Bender和Gooch首次应用外周血淋巴细胞染色体分析方法,对3名受中子、 $\gamma$ 射线混合照射者进行了生物剂量的估算。现今,染色体畸变分析作为生物剂量计已在辐射事故中得到广泛的应用,并且已被公认为是一种比较成熟的技术。IAEA已将其收入技术报告丛书之中,对染色体标本的培养、制片以及畸变分析在国际上得到统一和规范化。

近几年来国外相继发生的几起事故,如1986年切尔诺贝利核电站事故<sup>[1]</sup>、1987年巴西Goiania铯源事故<sup>[2]</sup>以及1989年San Sal-

vador 钴源事故<sup>[3]</sup>都有染色体畸变分析作为生物剂量测定方法的详细报道。我国自1971年以来,已先后报道了Co-60 $\gamma$ 射线、180kV X射线、14MeV快中子、人工中子源Cf-252 Am-Be中子源、不同比例混合的裂变中子 $\gamma$ 射线以及核爆炸瞬时辐射照射离体人血的畸变量和照射剂量关系的刻度曲线,并已在几起辐射事故中得到实际应用。1986年至今国内先后发生的几起事故中,受到高中、低剂量照射人员共22例,由于都是意外照射,无一人佩带个人剂量仪,对他们的剂量估算,除用物理方法外,同时在受照后取血培养,分析外周血淋巴细胞染色体畸变估算剂量。大部分受照者是在照后2天内取血,采用微量全血法,分析M<sub>1</sub>细胞的双着丝粒和环畸变(以下简称双+环)参照实验室用标准培养条件以及分析畸变方法建立的Co-60 $\gamma$ 射线双+环畸变量和照射剂量的刻度曲线,进行辐射剂量的估算。证实用染色体畸变估算的剂量与物理方法测定的剂量比较接近,与放射损伤的临床诊断也是一致的<sup>[4-6]</sup>。通过对事故病例的实际应用,对染色体畸变作为生物剂量测定方法的一些具体要求有以下方面:

### (1)取血时间

染色体畸变用于生物剂量估算,都是采用分析非稳定性畸变(Cu),其中又以双+环较为准确,但Cu会随照后时间而逐渐减少,因此作为生物剂量估算必须在畸变率尚未明显下降前取血培养才能给出可靠的结果。究竟在受照后多长时间内取血才“有效”,文献

上没有可供参考数据,一般均笼统建议取血时间应越早越好;也有报道用双+环畸变下降一半的时间来表示。根据国内的一些报道,发现照后 1~2个月内,双+环频率变化不大,3个月后明显下降,据此提议染色体畸变作为生物剂量测定方法,最好在事故后 48小时内取血,最迟不宜超过 6~8周<sup>[5]</sup>。

## (2) 分析细胞数

当用染色体畸变分析结果估算剂量时,剂量的可信程度取决于从标本中观察到的畸变数以及所分析的细胞数。由于辐射诱发的畸变是随机的,分析大量的细胞时,双畸变在细胞中的分布应符合泊松分布,当高剂量急性全身照射时,由于畸变率高,一般分析近百个中期细胞就能达到统计学要求,而在低剂量照射时,由于畸变率低,需要分析大量细胞才能达到要求。英国 NRPB(国家辐射防护局)实验室规定,通常情况下,每份标本分析 500个细胞,当剂量高时分析 200个细胞,对于低剂量照射,甚至要求分析细胞数为 1000以上。根据国内几起事故的实际应用,在高剂量急性全身照射时,一般分析 100~200个细胞就能满足统计学要求,当低剂量照射情况下,估算剂量在 1Gy 以下时,至少分析 500个细胞<sup>[3]</sup>。

## (3) 剂量非均匀性与畸变分布

染色体畸变分析用于事故生物剂量估算主要用在剂量分布较均匀的急性照射,在这种情况下,用所得的畸变频率可以给出全身等效剂量,但在很不均匀或局部照射条件下,这种剂量表达方式就有很大的局限性。在 60年代就发现,在低 LET 射线均匀照射条件下,外周血淋巴细胞的双畸变在细胞间呈泊松分布。后来 Edwards 对此问题作专题研究,发现在局部照射或不均匀照射情况下,畸变分布偏离泊松统计,呈过分散的分布,偏离的程度反映了不均匀照射的程度。因此,在 1969年 Dolphin 提出研究畸变在细胞间的分布与泊松分布的偏离情况可以获得剂量均匀性的信息。根据对国内几起事故受照者的畸变分析,常见到在同一个细胞内含有多个双+环畸变,经泊松分布检验,证实偏离泊松

分布,表明有少部分淋巴细胞曾受到过较高剂量的照射。如 1986年的开封钴源事故中,有一男性受照者,全身剂量估算 2.6Gy,头部和左手局部受照剂量为 10Gy左右,右手剂量在 20Gy 以上。在分析畸变时,见到有多畸变的细胞,其中一个细胞内竟有 7个双+环,经泊松分布检验,证实偏离泊松分布<sup>[4]</sup>。又如 1996年元月发生在吉林的一起 Ir-192源事故,有一青年全身剂量估算 3Gy,而左上肢及右大腿局部受照剂量高达数十 Gy 以上,在所分析的 200个中期细胞中,出现有多畸变细胞,其中在同一个细胞内含有双+环数多达 4~6个,最多的一个细胞竟有 9个双+环,经泊松分布统计,  $u$  值 19.84,证实偏离泊松分布,为 1例高度不均匀照射。

## 2 稳定性畸变在远后效应研究中的应用

当人员受到一定剂量的电离辐射后,不仅在照后早期可以在外周血淋巴细胞和骨髓细胞中见到有畸变,而且在照后若干年甚至数十年仍残存有畸变。因此染色体畸变分析作为一项重要观察指标在远后效应研究中得到广泛的应用。根据对日本原爆幸存者以及 Y-12核事故受照者的随访观察,发现辐射诱发的稳定性畸变 ( $C_s$ ) 可以长期存在,畸变率与原先所受剂量高低仍呈正比关系,其中主要是相互易位(以下简称易位)与剂量关系密切<sup>[8]</sup>。关于  $C_u$  和  $C_s$  随照射后时间的推移而变化的规律,文献上报道不多。日本原爆幸存者是在照后 20年首次分析  $C_s$ , Y-12核事故受照者是在照后 16年开始分析  $C_s$ 。根据对国内两例中度放射病人的连年随访结果,表明照后 2年  $C_u$  高于  $C_s$ ,照后 4年,  $C_u$  和  $C_s$  比例接近,而照后 5年,主要是  $C_s$ ,其中易位占多数。上海“6.25”钴源事故 5名受照者,于 1994年(即照后 4年)开始对他们进行每年一次的随访,考虑到距照射已有 4年,所以用常规染色核型分析方法进行畸变观察,发现畸变率与原先所受剂量大小呈正比关系,畸变类型主要是  $C_s$ ,其中以易位占多数,其次是倒位及缺失。1995年用 G 显带方法作随访观察,发现畸变率与剂量关系密切,和常规法

相比较, Cs 检出率有所提高,原因是有些复杂易位、插入、臂内倒位,只有用显带方法才能察觉。1996年用染色体核型图像自动分析系统作随访观察,加大分析细胞数,除进一步证实易位畸变与剂量密切相关外,还发现两种易位的克隆细胞(1例剂量 5.2Gy) 显带方法的另一优点可以较为准确地对染色体的各个断裂点加以定位,因此可以用来研究辐射诱发染色体的断裂点分布。根据对“6.25”钴源事故受照者的断裂点分布测定,结果是非随机的,其中有几条染色体上的断裂点数目明显高于预期值<sup>[9]</sup>。虽然目前对染色体上见到的断裂点多发部位,但真正的生物学意义还不太了解,对这些 Cs 长期存在受照者体内的远期危害也无法预测,但对这些受照者的追踪观察则是十分必要的。

### 3 染色体彩涂 (Chromosome painting)

作为生物剂量,通常记录双畸变,因为它易于识别,可以在镜下直接计数,而且正常人双畸变率很低,约万分之三。但双畸变属于 Cu,随细胞分裂而畸变逐渐消失。因此对长期慢性照射或早先照射者的剂量估算实用意义不大。而 Cs 如易位,可以通过细胞周期,在照后若干年甚至几十年保持恒定,特别适合于慢性照射或早先照射者的剂量估算。以往对 Cs 的分析,主要用显带方法,这种方法如用人工进行十分费时费力,也无法分析大量细胞。1986年 Pinkel 首创荧光原位杂交技术(以下简称 FISH)<sup>[10]</sup>,能有选择地对特定的染色体进行着色,从而能迅速有效地检测与这些染色体相联系的任何结构畸变。目前 FISH 技术已成功应用于易位的检测,同时也能方便地测出双畸变。FISH 技术用于生物剂量测定是当前辐射细胞遗传学发展中的一门前沿技术,由于双和易位畸变的发生频率与照射剂量之间有良好的量效关系,因此可以用着丝粒探针使细胞中的染色体着丝粒区着色,在荧光显微镜下快速进行计数,在事故情况下,作为早期剂量诊断方法,要比用常规的镜下计数方法更简便、快速。用作易位畸变的计数,是用全染色体探针,可以是一条

或数条全染色体探针,常用的有人染色体 1 2 4号,其中以 4号用的较多,因其荧光较强且较均匀。用 FISH 方法可以大大提高易位的检出率,与常规显带技术相比较,节省了人力物力,由于不需要分散良好的中期细胞供分析用,所以可以增加分析细胞数,能测出细微的结构改变。这方面的研究以美国 LLNL (Lawrence Livermore National Laboratory) 和日本 RERF(放射线影响研究所)两家实验室的工作最为深入,他们用 FISH 方法对广岛原爆幸存者的易位畸变进行测定,并和显带方法所得的易位率相比较,发现两者的结果接近。他们又用此方法得出人血离体照射的易位频率与剂量的关系曲线,并用它估算原爆幸存者的剂量,发现两者符合很好<sup>[11]</sup>。最近 Salassidis 等<sup>[12]</sup>、Natarajan 等<sup>[13]</sup>用 FISH 方法对切尔诺贝利核电站事故受照人员、巴西 Goiânia 铯源事故受照者进行易位畸变的测定,发现易位率在照后波动不大,可以反映染色体最初损伤。Lucas 等和 Tucker 等用 FISH 方法对人易位的自发率以及个体辐射敏感性差异的问题进行了深入研究,他们认为用此法可以作为低剂量慢性照射的剂量重建<sup>[14,15]</sup>。此技术在国内尚处于起步阶段,用于生物剂量测定还有不少问题有待深入研究解决。

### 4 微核

染色体畸变用于生物剂量测定虽有许多优点,但由于畸变分析费时、技术要求高,很难满足大群体受照人员剂量估算的要求,因此人们不断探索更为简便的方法,其中微核是目前被认为在一定情况下可考虑采用的另一种生物剂量测定方法。

1976年 Countryman 首次建立辐射诱发人淋巴细胞微核率与照射剂量的量效关系曲线,以后在一些实验室陆续建立了<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线、X射线、中子辐射的量效关系曲线。过去由于对微核的形成机制的了解,微核受细胞分裂动力学的影响以及分析方法的不统一,彼此间结果差异较大。1985年 Fenech 首先报道用胞浆分裂阻滞剂——Cyt-B法,在细

胞有丝分裂前加 Cyt-B于全血中,分析双核淋巴细胞中的微核率,大大提高微核测定方法的准确度。国内外一些实验室相继对微核的自发频率、吸烟、年龄以及环境中诱变因子对微核率的影响进行了深入研究<sup>[16]</sup>。应用微核测定方法作为生物剂量估算的剂量范围一般认为在 0.25~5Gy 比较合适。国外几家著名的细胞遗传学实验室对染色体畸变与微核方法估算事故剂量进行了比较研究,对两种方法的长处及不足之处提出了各自的看法,综衡利弊,微核测试估算事故剂量不如染色体畸变分析准确,对评价远后效应意义不大,但它方法比较简单,容易掌握,更适于大群体的剂量估算。

### 5 早熟染色体凝集 (Premature Chromosome Condensation, PCC)

PCC技术是 1970年由 Johnson等建立的,后来相继有研究报道,发现 PCC技术可以成为又一种生物剂量测定方法。PCC是将细胞融合与染色体分析相结合的一种技术。国内外一些实验室用<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线、X射线照射 G<sub>0</sub>期人血淋巴细胞,用 PCC技术建立量效关系曲线,并初步应用于事故剂量的估算。国内冯嘉林等<sup>[17]</sup>用<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线照射人外周血,剂量范围从 0~1Gy 和 0~7Gy,观察 G<sub>1</sub>-PCC的断片率并和常规染色体方法进行比较,在低剂量照射,PCC方法的断片率要高于染色体畸变。并用所得的剂量-效应曲线,对 1例全身照射的肿瘤患者作生物剂量估算,与实际受照剂量较为符合。当然这一方法要作为一种成熟的生物剂量测定方法实际应用,还有大量工作要做。欧共体在其一份关于受照人员的治疗与生物剂量测定的研究报告中,在承认需对 PCC技术作进一步的基础研究的同时,又建议应开展培训以推广此技术<sup>[18]</sup>。

以上所列举的都是细胞遗传学方法,除此之外,还有属于体细胞突变方面的几种方法也正在研究中,其中 HPRT(次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶)方法和 GPA(血型糖蛋白 A)方法已在日本广岛原爆幸存者的

远后效应研究中加以应用,发现 HPRT突变细胞频率和 GPA频率均随剂量增加而有增高<sup>[14-21]</sup>。美国 LLNL对一名 50年代开始接受职业性照射的放射工作人员,本人不同意剂量档案的记载,认为实际剂量至少是记载的 5倍,LLNL用 FISH和 GPA两种方法进行了分析,虽两种方法结果的符合程度不能令人满意,但基本上排除了本人主观估计。此外,LLNL与荷兰 Leiden大学用 GPA方法对巴西 Goiânia辐射事故受照者进行剂量估算,发现照后一年用此法测定的 5例剂量与照后立即用双畸变测定的剂量是接近的<sup>[22]</sup>。国内王惠琛等对“6.25”事故受<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线照射的 5例,在事故后 4年随访时发现事故病人外周血淋巴细胞 HPRT突变细胞频率比正常人高,且与照射剂量呈正相关,而且 $\gamma$ 射线引起突变细胞 HPRT基因结构变化,主要表现为基因大片段缺失,基因缺失总数与受照剂量之间密切相关<sup>[23]</sup>。上述这些体细胞基因突变测定方法作为生物剂量诊断手段还只是初步的,是否具有实际应用价值,还需要深入研究。

### 参考文献

- 1 Sevankaev AV et al. Radiat Protect Dosim, 1995; 58(2): 85
- 2 Ramalho AT et al. Radiat Protect Dosim, 1988; 25(2): 97
- 3 Littlefield LG et al. Radiat Protect Dosim, 1991; 35(2): 115
- 4 金瑾珍等. 辐射防护, 1992; 12(4): 266
- 5 金瑾珍等. 中华放射医学与防护杂志, 1993; 13(1): 8
- 6 金瑾珍等. 上海“6.25”钴源辐射事故病人诊断与救治文集, 北京: 科学出版社, 1994: 26
- 7 Ramalho AT et al. Health Phys, 1991; 60(1): 67
- 8 Awa AA. J Radiat Res, 1991; (Suppl) 265
- 9 金瑾珍等. 上海“6.25”钴源辐射事故病人后效应研究文集, 上海: 第二军医大学印刷厂, 1994: 34
- 10 Pinkle D et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1986; 83: 2934
- 11 Awa AA et al. J Radiat Res 1992; 33(Suppl): 206
- 12 Salassidis K et al. Int J Radiat Biol, 1995; 68(3): 257

- 13 Natarajan AT et al. *Mutat Res*, 1991; 247: 103
- 14 Lucas JN et al. *Health Phys*, 1995; 68(6): 761
- 15 Tucker JD et al. *Int J Radiat Biol*, 1995; 67(1): 19
- 16 白玉书等. *中华放射医学与防护杂志*, 1993; 13(4): 243
- 17 冯嘉林等. *辐射研究与辐射工艺学报*, 1990; 8(2): 107
- 18 Lloyd DC et al. Treatment and biological dosimetry of exposed persons, Post-Chernobyl Action. Report EUR 12558 XI-XXV, 1991: 49
- 19 Hakoda M et al. *Mutat Res*, 1988; 201: 39
- 20 Kyoizumi S et al. *Cancer Res*, 1989; 49: 581
- 21 Akiyama M et al. *Health Phys*, 1995; 68(5): 643
- 22 Straume T et al. *Health Phys*, 1992; 62(2): 122
- 23 王惠琛等. 上海“6.25”钴源辐射事故病人后效应研究文集, 上海: 第二军医大学印刷厂, 1994: 42

(收稿日期: 1996-06-03)

## 回顾性剂量学方法

中国医学科学院、中国协和医科大学放射医学研究所(天津, 300192) 张良 安综述

**摘要:**在辐射流行病学调查研究中,为了对调查结果进行有效评价,并得出科学的结论,必须具有可靠及较完整的剂量学资料,为此产生了一种新的方法,即回顾性剂量学方法。本文重点介绍回顾性剂量学方法中的辐射剂量重建方法、辐射剂量重建中的几种直接测量方法、辐射剂量重建中的不确定度分析及与辐射流行病学相关的一些问题。

**关键词:**辐射流行病学 回顾性剂量学 辐射剂量重建

### 1 回顾性剂量学方法的提出及其内含

在辐射流行病学调查研究中,为了对调查结果进行有效评价,并得出科学的结论,必须具有可靠及较完整的剂量学资料。但面临这些情况确是大多数无完整的剂量学资料,因而要靠回顾的方法来重建辐射流行病学研究中的剂量学模式,用这样的模式来逼近真实情况,从而获得较为可靠和完整的剂量学资料。回顾性剂量学方法是 90年代初期开始受到人们重视的一种新的剂量学方法,它的关键是进行辐射剂量重建,因而也把这种方法称之为辐射剂量重建方法。

辐射剂量重建研究的主要目的是估算代表性的剂量和特定人员的剂量,或者二者兼有之。代表性的剂量是指在一个特定范围内的人员所接受到的平均剂量,而不是生活在这个范围的每个人员的真实剂量。一般这种剂量可以通过历史记录、文献资料来推导和

重建,文献资料是指通过饮食、生活习惯,在典型年龄范围内人员的生活环境、生活条件、工作条件、工作量及职业辐射史等研究得到的。代表性剂量表明了剂量的幅度和一般情况下,特定受辐照的方式及污染情况在其中的重要性。这种剂量可以用来确定计划中的辐射流行病学研究中的统计效能(statistical power)。特定人员的个人剂量估算的结果对辐射流行病学研究统计分析也有十分重要的意义,特别是个例(case control)调查的结果。

判断一个辐射剂量重建项目的设计是否合理,很难有一个统一的标准,它依赖于公众或研究者打算通过这样的研究项目回答辐射健康效应的问题。某些项目研究结果表明,从统计上讲,可探测到的效应虽然对公众的健康影响并不大,但它确具有较大的科学意义,它可通过对过去受照结果的监测和处理,来防止将来可能的受照。