

# 荧光原位杂交应用于介入放射人员受照剂量的研究

刘双梅, 丁爱萍, 牟志春, 李子祥, 李新兰

中图分类号: R144.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2007)04-0392-02

【摘要】 目的 了解介入放射人员细胞遗传学的改变及放射剂量重建。方法 应用荧光原位杂交技术测定介入的工作人员, 不接触射线的医务工作者的对照组的染色体畸变进行分析。对介入人员进行剂量比较。结果 从事介入治疗的射线组染色体易位率、总畸变率显著高于对照组, 二者差异显著; 染色体易位率随介入工龄增加而增加。结论 应用 FISH方法检测染色体易位畸变来对长期小剂量受照人员进行剂量重建是可行的。

【关键词】 荧光原位杂交; 介入放射人员; 染色体畸变

Study on the Application Fluorescence in Situ Hybridization to the Exposed Dose of Radiation Workers LIU Shuang-mei, DING Ai-ping, MOU Zhi-chun, et al. Qingdao university affiliated Qingdao municipal hospital, Qingdao 266011 China

【Abstract】 Objective To study the chromosomal aberrations about exposed dose of radiation workers. Methods To investigate the chromosomal aberrations in the exposed dose of radiation workers by applying fluorescence in situ hybridization dose of radiation and those in the control group and the reconstructive dosimetry. Results Chromosomal aberrations rate in exposed dose of radiation workers is higher than that in the control group, and chromosomal aberrations rate gets higher along with the working time prolonged. Conclusion FISH are effective ways to analyse the chromosomal aberrations and to estimate the dose of the ionizing workers.

【Key words】 Fluorescence in Situ Hybridization; Exposed to Ionizing Workers; Chromosomal Aberrations

从事介入放射治疗工作的人员辐射损伤越来越受到关注, 临床上采用佩戴的个人剂量计进行受照剂量的测定, 由于剂量计放置部位的影响, 测定出的剂量难以准确, 促使我们寻找更准确的方法。当机体受到一定剂量的电离辐射作用后, 外周血淋巴细胞和骨髓淋巴细胞中早期即可见到染色体畸变。稳定性染色体畸变如易位、插入等在照后若干年, 仍可在受照者体内基本保持恒定, 因此国内外一些从事辐射远后效应研究机构多采用分析稳定性染色体畸变为主要指标, 通过对受照者的随访观察, 作为远期健康影响的评估指标。易位的检出通常采用 G-显带技术, 由于其费时费力, 技术要求高, 很难推广。本课题应用 FISH技术进行染色体畸变及剂量重建研究, 以观察远后效应, 对推动了回顾性剂量学新技术的发展具有重要意义。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 研究对象为从事 X射线介入治疗人员 30名, 均为男性, 接触射线的工龄范围为 5~24 放射工龄平均为 15 年; 对照组 30名, 为同工作条件、同年龄段、同性别的不接触射线的医务工作者。

1.2 方法 荧光原位杂交所用试剂为 1<sup>#</sup>、4<sup>#</sup>全染色体探针和检验试剂盒为英国 Cambi 公司的产品。为了获得一个稳定的 FISH 方法实验条件, 我们根据生产厂家介绍的操作方法和试验步骤及借鉴国内相关试验的成功经验, 总结出了适合本实验室的 FISH 实验方法: 人外周血淋巴细胞培养及染色体中期相制备、探针变性、标本处理、杂交、洗片、信号检测及放大、复染、染色体畸变识别及记录、Giemsa 染色复核等步骤。正常中期中有两对绿色全荧光染色体。根据大小可区别 1<sup>#</sup>、4<sup>#</sup>染色体。双色(黄绿色/红色)染色体上有一个着丝粒为易位。两个双色染色体上有一个着丝粒(用 Giemsa 校正)为完全易位, 只见到一个双色染色体, 伴或不伴无着丝粒断片, 断片为全荧光或双色为不完全易位。完全易位、不完全易位和插入均记为一个畸变。双色染色体上有两个着丝点者为双着丝粒。双色或只带黄绿色荧光, 且不含着丝粒的染色体断片为无着丝粒断片。若一个易位或双着丝粒只伴有一个无着丝粒断片, 则该无着丝粒

断片不单独记数。

1.3 统计学分析 应用 FISH 方法分析染色体易位不同组别间的比较采用《医学统计学》<sup>[1]</sup> 中普哇松分布检验或卡方检验, 生物剂量与物理剂量的比较采用配对 t 检验方法。剂量估算的公式为 Straume 等<sup>[2]</sup> 提供的:  $H = [(Y - k) / \alpha] / Q$  公式。

## 2 结果

2.1 FISH 方法分析放射人员和对照组染色体畸变的结果 FISH 分析结果显示, 放射组发现易位 105 个, 对照组检出易位 54 个, 两组人员的染色体易位占总畸变的 82%, 其中放射组的易位检出占总畸变的 85%、对照组的易位检出占总畸变的 78%, 说明易位在畸变中占主要份额。放射组染色体易位率、总畸变率显著高于对照组, 经普哇松分布分析, 两组总畸变率与染色体易位率均有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。表 1 列出了 FISH 分析两组受检人员的染色体畸变结果。

表 1 放射组与对照组染色体畸变比较

组别	例数	受检细胞	染色体畸变					T/10 <sup>3</sup> cells		
			T	Ins	Dic	Ace	Total	FP±SE	FG±SE	
放射	30	30 361	105	2	7	10	124	3.46±0.58	13.55±1.37	
对照	30	30 281	42	1	5	6	54	1.39±0.35	5.45±0.52	

注: T—易位, Ins—插入, Dic—双着丝粒, Ace—无着丝粒断片, Total—总畸变; SE—标准误, FP—染色体易位率, FG—基因组易位率。

2.2 不完全易位与完全易位的比较 放射组和对照组中完全易位均多于不完全易位, 但两组构成差异无显著性, 经  $\chi^2$  分析,  $P > 0.05$  ( $\chi^2 = 0.01$ )。

2.3 易位的类型比较 按染色体易位的着丝点部位分成, 着丝点位于不带荧光部分与着丝点位于带荧光部分两种, 可见两组着丝点位于不带荧光部分, 均明显多于着丝点位于带荧光部分。但构成差异无显著性, 经  $\chi^2$  分析,  $P > 0.05$  ( $\chi^2 = 0.03$ )。

2.4 1<sup>#</sup>和 4<sup>#</sup>染色体易位的比较 使用 1<sup>#</sup>和 4<sup>#</sup>全染色体探针, 对两组人员进行的分析中, 所观察到的 1<sup>#</sup>和 4<sup>#</sup>染色体易位数接近, 且构成差异无显著性, 经  $\chi^2$  分析,  $P > 0.05$  ( $\chi^2 = 0.01$ )。

2.5 不同放射工龄组染色体易位结果(表 2) 染色体易位率和总畸变率有随着放射工龄的增加而明显增高的趋势。

2.6 放射人员的受照剂量重建及验证 对 30 名放射人员进

行了生物剂量估算, 不同工龄组的估算结果见表 3 表 3可见, 随着工龄的增加, 估算的累计剂量也随之增加。

表 2 不同放射工龄组染色体畸变比较

组别	例数	受检 细胞	染色体畸变						T/10 <sup>3</sup> cells		
			T	ns	Dic	Ace	Toal		FP±SE	FG±SE	
~ 5	5	5 160	12	0	1	2	16		2 32±0 50	9. 09±1 45	
~ 10	11	11 078	35	1	3	1	40		3 16±0 57	12. 39±1 61	
~ 15	8	8 020	31	1	2	4	38		3 86±0 47	15. 13±1 53	
> 15	6	6 103	27	0	1	3	30		4 42±0 52	17. 33±1 65	

注: T—易位, ns—插入, Dic—双着丝粒, Ace—无着丝粒断片, Toal—总畸变; SE—标准误, FP—染色体易位率, FG—基因组易位率。

表 3 不同介入工龄组剂量估算

组别 (a)	例数	估算剂量 (Gy)
~ 5	5	0 32±0 05
~ 10	11	0 39±0 05
~ 15	8	0 71±0 04
> 15	6	0 79±0 05

为了验证 FISH方法应用于小剂量受照者剂量估计的准确性, 对 5名佩戴剂量计人员的实测物理剂量与其生物剂量进行比较, 佩戴剂量计人员的实测物理剂量为 (0 35±0 04) Gy 估算剂量为 (0 33±0 04) Gy 经配对 检验, 差异无显著性。此例数少需进一步检验。

3 讨论

3 1 进行回顾性剂量估计的检测指标 必须能在机体内长期保持其相对稳定, 许多实验结果表明, 稳定性染色体畸变尤其易位, 在照后若干年甚至数十年仍存留在受照者体内, 其频率基本保持恒定。本研究结果与某些实验室的结果是一致的, 金瑾珍<sup>[3]</sup>等报道了用常规细胞遗传学方法对其染色体进行分析, 观察结果为稳定性畸变占总畸变的 65%, 并且稳定性畸变随累积剂量增加而增加。王知权<sup>[4]</sup>等用 G—显带方法分析了 84 例医用诊断工作者和 17 例对照组人员的染色体畸变情况, 结果表明稳定性畸变占总畸变的 67%, 其中相互易位占稳定性畸变的 58%, 表明稳定性染色体畸变能在体内保持相对恒定。现已阐明用 FISH对早先受照者进行剂量重建的机制与常规淋巴细胞染色体稳定性畸变分析是相同的, 并优于其他方法。

3 2 1#、4染色体易位情况 用 FISH技术检测辐射诱发的染色体易位率进而估算其剂量, 首先应将发生在靶染色体上的易位率通过公式换算成全基因组的畸变率。之所以能进行这种换算是根据下述假设: 假设辐射引起的染色体断裂点在基因组中是随机分布, 任何一对染色体没有优先发生互换的特殊性。这样任何一条染色体发生易位的几率就和其 DNA含量成正比。本研究的结果支持这一假设。尽管 1号染色体 DNA物理长度是 4号染色体的 1. 3倍, 所观察到的易位数却无明显差异, 说明 4号染色体较 1号染色体容易发生染色体互换畸变, 这与国外一些研究结果相一致。

3 3 染色体易位率比较 放射人员的染色体易位率随放射工龄的增加而增加, 这说明放射人员的受照剂量在累积。许多研究者的实验表明早先受照者的染色体易位率反映的是最初染色体损伤的情况, 染色体易位的累积也反映了剂量的累积。FISH技术检测的染色体易位率能在体内保持相对恒定, 这进一步证明稳定性染色体畸变分析适用于早先受照者的回顾性研究。近年来, 国外部分学者的研究结果不同于这一观点, Lindholm<sup>[5]</sup>等对 20名核工厂职业受照者用传统 G—显带和 FISH方法分析其染色体易位率, 发现累积剂量与易位率呈正相关, 而个体间的易位率与个人的累积剂量无明显线性关系, 作者考虑这可能与易位率个体间差异有关, 本底易位率可受多种因素的影响, 比如年龄、吸烟等。

3 4 剂量估算或重建 国外有关这方面的研究已积累了一些资料。尽管不同实验室用不同的组合探针及不同种类的射线,

但总的结论是受照人员的受照剂量与染色体畸变量呈线性平方关系:  $Y=C+\alpha D+\beta D^2$ , 其中 C为自发畸变率,  $\alpha$  和  $\beta$  各为一次和二次击中畸变系数。对长期慢性小剂量受照者进行剂量估算时, 平方项系数对易位畸变贡献很小, 线性系数是主要贡献者。Lloyd<sup>[6]</sup>认为在慢性小剂量照射时, 系数可认为是零。因此在对小剂量慢性受照者进行估算剂量时, 线性项系数  $\alpha$  是主要的贡献者。为了减少各种因素和个体间的差异影响 FISH检出的染色体畸变的误差, 在低剂量时就要计数足够多的细胞来确定  $\alpha$  系数<sup>[8]</sup>。在对 X射线小剂量慢性长期受照人员估算剂量使用 公式<sup>[2]</sup>:

$$H = [(Y - k) / \alpha] Q$$

式中: Y为每个受照者的易位率, k为对照组的易位率, Q为辐射品质系数。

FISH分析的染色体易位仅能覆盖部分基因组, 仅能测定与探针组有关的染色体易位, 需将 FISH测出的染色体畸变率换算成全基因组畸变率。Lucas<sup>[9]</sup>等从辐射诱发的辐射断裂点在整个基因组中随机分布, 且染色体之间发生交换的概率是相同的设想, 提出 FISH检测的染色体易位率经下式转换为全基因组易位率:  $F_G = F_p/2.05 \times (1 - f_p)$ 。根据  $FG = F_p/2.05 \times (1 - f_p)$  公式和 Moron测定的每个染色体的相对长度, 可将分析的易位率换算成全基因组易位率。应用  $H = [(Y - k) / \alpha] Q$  公式和 Rao BS<sup>[8]</sup>等测定的  $\alpha$  系数 ( $\alpha = 0.027$ ), 便可推算出每一个放射人员从开始接触射线到目前积累的剂量。

3 5 FISH技术特点 由于图像清晰和分析快速的优点, 以及对分裂项要求不那么严, 对分析者技能要求不那么高的特点, 从而解决了剂量估计需要分析大量细胞的难题。和常规法相比, 对易位畸变的判断速度快, 准确性也高, 近年来在剂量重建研究中得到应用与重视。对 FISH技术的实用价值也逐渐积累了不少资料。不足之处是试验所需的探针和试剂及设备成本尚高, 目前国内尚无法普及和推广。

参考文献:

[ 1 ] 上海第一医学院卫生统计学教研组编. 医学统计方法 [ M ]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979

[ 2 ] STRAUEN E, LUCAS J N, TUKER J D, et al. Biodosimetry for radiation worker using multiple assays [ J ]. Health Physics 1992 62(2): 122

[ 3 ] 金瑾珍, 刘秀林, 张泽云, 等. 上海 6 25 雇员事故受照者照后 4—6 年细胞遗传学随访观察 [ J ]. 中华放射医学与防护杂志, 1998 18: 21

[ 4 ] WANG Z Q, SUN Y M, LI J, et al. A retrospective dosimetry in medical diagnostic X—ray workers in China by FISH [ J ]. Radiat Prot Dosim 1998 77(1—2): 87

[ 5 ] Lindholm C, Salmuss S, Tekkel M, et al. Stable and unstable chromosomal aberrations among finnish nuclear power plant workers [ J ]. Radiat Prot Dosim 2001 93: 143—150

[ 6 ] LLOYD D C. The dose—response relationship obtained at constant irradiation times for the induction of chromosome aberration in human lymphocytes by<sup>60</sup>Co gamma ray [ J ]. Radiat Env Biophys 1984 23: 179

[ 7 ] LLOYD D C. Chromosome aberrations in human lymphocytes: Effect of radiation quality dose and dose rate in Ishijara T M S Eds. Radiation induced chromosome damage in human [ M ]. New York: Alan R. Liss Inc 2001: 23

[ 8 ] Rao B S, Naraj A T. Retrospective biological dosimetry of absorbed radiation [ J ]. Radiat Prot Dosim 2001 95: 17—23

[ 9 ] LUCAS J N, TENJIN T, STRAUEN T, et al. Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence in situ hybridization [ J ]. Int J Radiat Biol, 1989 56: 201