

# 双着丝粒染色体自动分析生物剂量估算影响因素研究

冯骏超<sup>1</sup>, 张琳<sup>2</sup>, 戴宏<sup>1</sup>, 刘玉龙<sup>1</sup>, 卞华慧<sup>1</sup>, 陈炜博<sup>1</sup>, 王优优<sup>1</sup>, 马娅<sup>2</sup>, 刘伟<sup>2</sup>

1. 苏州大学附属第二医院, 江苏 苏州 215004; 2. 山东省医学科学院放射医学研究所

**摘要:** **目的** 研究不同实验条件对双着丝粒染色体自动生物剂量估算结果的影响。**方法** 不同方法制备染色体标本, 遗传工作站自动分析双着丝粒畸变后, 用本实验室拟合的“双着丝粒染色体自动分析剂量-效应曲线”进行生物剂量估算。**结果** 受照血液 20℃ 室温放置 50 h、滴片细胞悬液浓度、中期分裂相分散度、染色深浅、重复扫描、遗传工作站扫描灵敏度设置、玻片细胞采集部位均不影响自动生物剂量估算结果( $P>0.05$ )。**结论** 双着丝粒染色体自动分析对实验中的一般性影响因素不敏感, 有利于该方法在不同实验室间的推广。

**关键词:** 双着丝粒染色体; 自动分析; 生物剂量估算; 影响因素

中图分类号: Q691 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2018)04-0289-05

## Study on the influence factors of automatic analysis of dicentric chromosomes for biodosimetry

FENG Junchao<sup>1</sup>, ZHANG Lin<sup>2</sup>, DAI Hong<sup>1</sup>, LIU Yulong<sup>1</sup>, BIAN Huahui<sup>1</sup>, CHEN Weibo<sup>1</sup>, WANG Youyou<sup>1</sup>, MA Ya<sup>2</sup>, LIU Wei<sup>2</sup>

1. The Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004 China;

2. Institute of Radiation Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences

**Abstract:** **Objective** To study the influences of different experimental conditions on the results of automatic analysis of dicentric chromosomes for biodosimetry. **Methods** The dose effect curve of “automatic analysis of dicentric chromosomes” fitted by our laboratory to estimate the dose of samples prepared in different conditions after the genetic workstation automatically analyzed the dicentric chromosomes. **Results** The results of biodosimetry are not affected by the conditions of 50 hours at 20℃ of blood placement before inoculation, different cell suspensions concentration, different degree of dispersion in the metaphases, Wright-Giemsa staining depth, repeated scanning times, sensitivity parameter of genetic workstation and distribution positions of the metaphases on the slide ( $P>0.05$  and have no significant difference). **Conclusion** Automatic analysis of dicentric chromosomes is not sensitive to the general influence factors in the experiments, and is conducive to the promotion among different laboratories.

**Key words:** Dicentric Chromosome; Automatic Analysis; Biodosimetry; Influence Factors

随着近年来核能的广泛应用以及核与辐射事故数量的日益增加, 人们对生物剂量估算的需求愈加迫切。核与辐射事件发生后, 必须及时根据受照剂量确定相应的医学应急处置, 从而保证人员的生命安全。双着丝粒(dic)染色体分析是生物剂量估算的金标准<sup>[1]</sup>, 但该方法非常耗时, 并不适用于大规模核事故情况下的生物剂量估算。遗传工作站具有 dic 自动分析功能, 但有假阳性和假阴性, 无直接使用价值。我室通过舍弃假阴性, 人工剔除假阳性, 建立了国内第一条“双着丝粒染色体自动分析剂量效应曲线”<sup>[2]</sup>, 可将遗传工作站原先无直接使用价值的双着丝粒自动分析功能有效利用, 大幅度减少人工分析时间, 每例生物剂量估算

标本人工分析时间从原来的数小时缩短为数分钟。该方法填补了我国大规模核事故情况下早期、快速、高通量生物剂量估算的技术空白。为了使该方法利于在不同实验室间的推广, 本文对不同实验条件下的影响因素进行了研究, 该项研究国内鲜见报道。

### 1 材料和方法

**1.1 标本采集与照射** 将多名健康志愿者肝素锂抗凝外周血在 37℃ 水浴下进行<sup>60</sup>Co 离体照射(二级标准剂量学实验室), 照射剂量率为 0.39 Gy/min, 照射后在 37℃ 水浴中修复 2 h, 照射剂量 2、3 Gy。

**1.2 标本培养与制备** 采用 0 h 加秋水仙素法进行

基金项目: 江苏省卫生计生委 2014-2015 年度预防医学科研项目(Y2015024), 山东省自然科学基金(ZR2016YL017)

作者简介: 冯骏超(1990-), 男, 江苏苏州人, 技师, 从事辐射生物剂量估算工作。

通讯作者: 戴宏, E-mail: dfkc180@163.com

细胞培养<sup>[3]</sup>。淋巴细胞培养液(青岛莱佛生物工程研究所)含 RPMI 1640、胎牛血清、PHA、双抗。秋水仙碱浓度为 0.04  $\mu\text{g/ml}$ 。每瓶 5 ml 淋巴细胞培养液加 0.5 ml 肝素锂抗凝血,37℃ 恒温箱培养 50 h<sup>[4]</sup>。使用 CP-II-64(上海乐辰生物科技有限公司)自动细胞收获仪制备细胞悬液,CP-AS-40 自动制片机(上海乐辰生物科技有限公司)制片,CP-G-24 自动制染片机(上海乐辰生物科技有限公司)Giemsa 染色。

1.3 自动双着丝粒染色体分析 使用 Metafer 4 (V.3.11.6)染色体扫描分析系统(德国 MetaSystems 公司)进行自动中期分裂相寻找及高倍图像采集。对采集的高倍数字图像,使用 DCScore 软件(德国 MetaSystems 公司)进行双着丝粒染色体自动分析并人工确认,记录人工确认的双着丝粒染色体数及软件给出的分析细胞数。

1.4 剂量估算及统计分析 使用 CABAS 2.0 软件及本室拟合的“双着丝粒染色体自动分析剂量效应曲线” $Y = 0.018\ 06D^2 + 0.012\ 79D + 0.000\ 489\ 1$ (其中, $Y$ 为软件自动分析并人工确认的每细胞“dic”数; $D$ 为吸收剂量,Gy。估算剂量范围 0.5~5 Gy,吸收剂量率 0.39 Gy/min。)进行生物剂量估算<sup>[2,5]</sup>。使用 SPSS 软件进行  $\chi^2$  检验,检测不同实验方法对剂量估算结果的影响。

1.5 受照血液放置不同时间接种培养对剂量估算结果的影响 将 3 Gy 组受照外周血分别在 20℃ 室温放置 0、50 h 后进行接种培养、制片、双着丝粒染色体自动分析(人工确认),并使用“双着丝粒染色体自动分析剂量效应曲线”估算剂量。

1.6 细胞悬液浓度对估算剂量的影响 取 2 Gy 组混合细胞悬液稀释 9 倍后作为低浓度组,未稀释悬液为高浓度组进行滴片,每张玻片滴 40  $\mu\text{l}$  细胞悬液,两组玻片的细胞密度不同,每张玻片分析相同细胞数,分别进行双着丝粒染色体自动分析(人工确认),并使用“双着丝粒染色体自动分析剂量效应曲线”估算剂量。

1.7 中期分裂相分散度对估算剂量的影响 取 2 Gy 组混合细胞悬液,调整全自动滴片仪的参数使同一份细胞悬液获得不同分散度的中期分裂相标本,一组为过分散(扫描细胞中染色体条数小于 46 条的细胞数 > 20%),另一组为欠分散(扫描细胞中染色体存在重叠的细胞数 > 20%),分别进行双着丝粒染色体自动分析(人工确认),并使用“双着丝粒染色体自动分析剂量效应曲线”估算剂量。

1.8 染色深浅对估算剂量的影响 取 2 Gy 组混合细胞悬液,相同条件滴片,一组 Giemsa 染色 80 s,另一组染色 240 s,分别进行双着丝粒染色体自动分析(人工

确认),并使用“双着丝粒染色体自动分析剂量效应曲线”估算剂量。

1.9 扫描次数对剂量估算的影响 取 2 Gy 组混合细胞悬液,相同条件滴片,每张玻片使用遗传工作站相同参数扫描 5 次(每次用擦镜纸除去镜油),分别进行双着丝粒染色体自动分析(人工确认),并使用“双着丝粒染色体自动分析剂量效应曲线”估算剂量。

1.10 扫描灵敏度对估算剂量的影响 取 2 Gy 组混合细胞悬液,相同条件滴片 5 张,每张玻片遗传工作站全玻片扫描 2 次。第一次遗传工作站灵敏度参数设置为 6,第二次遗传工作站灵敏度参数设置为 12。分别进行双着丝粒染色体自动分析(人工确认),并使用“双着丝粒染色体自动分析剂量效应曲线”估算剂量。

1.11 载玻片不同部位采集的中期分裂相对估算剂量的影响 取 2 Gy 组混合细胞悬液,相同条件滴 5 张玻片,遗传工作站全玻片自动扫描拍摄中期分裂图像,将每张玻片的细胞图像,按拍摄顺序分为头、中、尾三部分,分别进行双着丝粒染色体自动分析(人工确认),并使用“双着丝粒染色体自动分析剂量效应曲线”估算剂量。

## 2 结果

2.1 受照血液放置不同时间接种培养对剂量估算结果的影响 0 h 组平均估算剂量为 2.95 Gy,偏差 -1.7%,50 h 组平均估算剂量为 2.60 Gy,偏差 -13.3%。对 0 h、50 h 两组估算剂量值进行卡方检验  $\chi^2 = 0.038, P = 0.999\ 82, P > 0.05$ ,两组间估算剂量值的差异无统计学意义。受照血液 20℃ 室温放置 0~50 h 不会对剂量估算产生影响。见表 1。

2.2 细胞悬液浓度对估算剂量的影响 对高浓度、低浓度两组估算剂量值进行卡方检验  $\chi^2 = 0.021, P = 0.999\ 95, P > 0.05$ ,两组间估算剂量值的差异无统计学意义。滴片时细胞悬液浓度(玻片细胞密度)差异不会对剂量估算产生影响。见表 2。

2.3 中期分裂相分散度对估算剂量的影响 对过分散和欠分散两组估算剂量值进行卡方检验  $\chi^2 = 0.031, P = 0.999\ 88, P > 0.05$ ,两组估算剂量值的差异无统计学意义。这是由于遗传工作站在进行双着丝粒染色体自动分析时具有自动剔除染色体条数明显过少和染色体形态欠佳的细胞的功能,因此中期分裂相分散度不会对剂量估算产生影响。见表 3。

2.4 染色深浅对估算剂量的影响 对染色 80 秒和 240 秒两组估算剂量值进行卡方检验  $\chi^2 = 0.028, P = 0.986\ 1, P > 0.05$ ,两组估算剂量值的差异无统计学意义。染色深浅不会对剂量估算产生影响。见表 4。

表 1 血液放置时间对自动剂量估算结果的影响

照射剂量(Gy)	标本号	放置时间(h)	分析细胞数(个)	自动 dic 数(个)	估算剂量(Gy)	偏差(%)
3	1	0	802	132	2.68	-10.7
3	2	0	1 170	249	3.09	3.0
3	3	0	1 234	233	2.89	-3.7
3	4	0	735	134	2.84	-5.3
3	5	0	771	171	3.16	5.3
	合计		4 712	919	2.95	-1.7
3	6	50	442	66	2.54	-15.3
3	7	50	1 144	171	2.54	-15.3
3	8	50	757	113	2.54	-15.3
3	9	50	1 674	286	2.74	-8.7
3	10	50	1 641	244	2.53	-14.3
	合计		5 658	880	2.60	-13.3

表 2 细胞悬液浓度对自动估算剂量值的影响

照射剂量(Gy)	玻片号	细胞悬液浓度	分析细胞数(个)	自动 dic 数(个)	估算剂量(Gy)	偏差(%)
2	1	高	200	19	1.93	-3.5
2	2	高	200	18	1.90	-5
2	3	高	200	20	2.02	1.0
2	4	高	200	20	2.02	1.0
2	5	高	200	21	2.08	4.0
	合计		1 000	98	2.00	0
2	6	低	200	19	1.96	-2.0
2	7	低	200	22	2.13	6.5
2	8	低	200	20	2.02	1.0
2	9	低	200	19	1.93	-3.5
2	10	低	200	19	1.93	-3.5
	合计		1 000	99	2.01	0.5

表 3 滴片分散度对自动估算剂量值的影响

照射剂量(Gy)	玻片号	分散度	分析细胞数(个)	自动 dic 数(个)	估算剂量(Gy)	偏差(%)
2	1	过分散	357	33	1.93	-3.5
2	2	过分散	221	23	2.07	3.5
2	3	过分散	274	26	1.96	-2.0
2	4	过分散	372	31	1.82	-9.0
2	5	过分散	250	22	1.88	-6.0
	合计		1 474	135	1.92	-4.0
2	6	欠分散	533	44	1.81	-9.5
2	7	欠分散	774	53	1.62	-19.0
2	8	欠分散	544	43	1.76	-12.0
2	9	欠分散	497	34	1.62	-19.0
2	10	欠分散	472	42	1.89	-5.5
	合计		2 820	216	1.73	-13.5

2.5 扫描次数对剂量估算的影响 对各组间估算剂量值进行卡方检验  $\chi^2 = 0.075, P = 0.999\ 99, P > 0.05$ , 各组估算剂量值的差异无统计学意义。同一张玻片可以根据需要多次重复扫描不会对剂量估算产生影响。见表 5。

2.6 扫描灵敏度对估算剂量的影响 对灵敏度分别为 6 和 12 的两组间估算剂量值进行卡方检验  $\chi^2 = 0.018, P = 0.999\ 96, P > 0.05$ , 两组估算剂量值的差

异无统计学意义。遗传工作站不同灵敏度参数设置不会对剂量估算产生影响。见表 6。

2.7 载玻片不同部位采集的中期分裂相对估算剂量的影响 对头、中、尾采集图像剂量估算值进行卡方检验  $\chi^2 = 0.088, P = 0.999\ 99, P > 0.05$ , 各组估算剂量值的差异无统计学意义。玻片不同区域采集拍摄的染色体中期图像不会对剂量估算产生影响。见表 7。

表 4 染色深浅对估算剂量的影响

照射剂量(Gy)	标本号	染色时间(秒)	分析细胞数(个)	自动 dic 数(个)	估算剂量(Gy)	偏差(%)
2	1	80	216	17	1.76	-12.0
2	2	80	188	15	1.77	-12.0
2	3	80	187	19	2.04	2.0
	合计		591	51	1.85	-7.5
2	4	240	258	21	1.79	-10.5
2	5	240	296	29	2.00	0
2	6	240	266	22	1.81	-6.0
	合计		820	72	1.87	-6.5

表 5 扫描次数对剂量估算的影响

照射剂量(Gy)	玻片号	估算剂量值(Gy)				
		第一次	第二次	第三次	第四次	第五次
2	1	1.80	1.72	1.97	1.92	2.05
2	2	2.31	2.13	2.24	2.18	2.21
2	3	2.12	2.22	2.24	2.24	2.21
2	4	2.30	2.17	2.16	2.19	2.05
2	5	2.01	1.96	2.08	2.17	2.13
2	6	2.24	2.13	2.18	2.18	2.02

表 6 扫描灵敏度设置对估算剂量值的影响

照射剂量(Gy)	玻片号	灵敏度	低倍细胞数(个)	分析细胞数(个)	自动 dic 数(个)	估算剂量(Gy)	偏差(%)
2	1	6	2 389	1 577	172	2.12	6
2	2	6	2 081	1 689	201	2.23	11.5
2	3	6	1 898	1 536	157	2.05	2.5
2	4	6	1 582	1 353	104	1.73	-13.5
2	5	6	1 035	875	59	1.60	-20
	合计		8 985	7 030	693	2.01	0.5
2	1	12	2 426	1 795	148	1.81	-9.5
2	2	12	3 685	2 606	251	1.98	-1
2	3	12	3 753	2 864	254	1.88	-6
2	4	12	2 738	2 299	164	1.66	-17
2	5	12	2 327	1 923	135	1.64	-18
	合计		14 929	11 487	952	1.81	-9.5

表 7 采集玻片不同部位中期分裂相对估算剂量的影响

照射剂量(Gy)	玻片号	分析玻片区域	分析细胞数(个)	自动 dic 数(个)	估算剂量(Gy)	偏差(%)
2	1	头部	400	33	1.81	-9.5
2	2	头部	600	74	2.28	14.0
2	3	头部	500	58	2.20	10.0
2	4	头部	400	38	1.96	-2.0
2	5	头部	300	31	2.06	3.0
	合计		2 200	234	2.10	5.0
2	1	中部	400	43	2.11	5.5
2	2	中部	600	63	2.08	4.0
2	3	中部	500	47	1.95	-2.5
2	4	中部	400	37	1.93	-3.5
2	5	中部	300	24	1.77	-11.5
	合计		2 200	214	1.99	-0.5
2	1	尾部	353	29	1.80	-10.0
2	2	尾部	489	60	2.27	13.5
2	3	尾部	536	51	1.96	-2.0
2	4	尾部	553	40	1.67	-16.5
2	5	尾部	297	22	1.70	-15
	合计		2 228	202	1.91	-4.5

### 3 讨论

戴宏、Gruel、Vaurijoux 等报道的自动 dic 分析法可以快速准确地进行生物剂量估算<sup>[2,6-7]</sup>, Romm H 等报道六个实验室联合实验成功的建立了半自动的双着丝粒分析的新方法,该方法可作为大规模辐射事故剂量估算的高通量筛选工具<sup>[8]</sup>。双着丝粒染色体自动分析生物剂量估算方法可能是目前较为接近理想的生物剂量计,值得推广。为了使该方法得到更好的应用,开展实验影响因素研究十分必要。

本研究结果表明,受照血液采集后室温(20℃)放置 50 h,不会影响自动生物剂量估算的结果,因此允许事故发生后采集的血液标本 48 h 内送达实验室。

中期分裂相的过分散以及欠分散均可能影响 dic 的检出率,但我们的实验结果显示不同分散度的标本自动剂量估算结果没有显著性差异,原因可能是遗传工作站对中期分裂相的形态优劣具有自动判别能力,形态不符合要求的中期分裂相不会被列为分析对象。只要检测标本中有一定数量的符合要求的中期分裂相,就不会对剂量估算结果产生大的影响。

滴片时的细胞悬液浓度可影响染色体的分散以及遗传工作站每个视野的细胞数。我们的研究未发现细胞悬液浓度(细胞密度)对自动剂量估算结果带来影响,因此滴片时可以加大细胞悬液浓度,使每张玻片上分布较多的中期细胞,从而减少滴片工作量。我们的经验表明加大细胞悬液浓度后每例标本只需制备 1 张玻片,就可满足分析需要。

样本玻片染色过深可能影响检测结果,但我们的实验结果显示没有影响,可能是遗传工作站具有自动调节采集图像灰度及亮度的功能,可以将不同染色深浅的标本自动调节为最合适的深浅度,因此不会对剂量估算结果产生影响。

遗传工作站可以自动扫描搜索中期分裂相,提高软件灵敏度设置可以提高中期分裂相的检出率,但无效图像数也会增加。在中期分裂相较少的情况下提高灵敏度设置可减少漏检,增加的无效图像会在软件 dic 自动分析时自动过滤,不会对 dic 畸变率产生大的影响。

本实验显示,采集玻片不同区域的染色体中期图像,以及同一张玻片除去镜油后多次扫描,均不会影响图像采集及 dic 自动分析,不会对自动剂量估算值产生影响。因此可以对同一张玻片进行分区、多次扫

描,根据需要逐步增加细胞数,达到缩短检测时间的目的。

本文通过对可能影响自动生物剂量估算结果的 7 种因素进行研究,发现受照血液采集后室温放置 50h、滴片细胞悬液浓度、中期分裂相分散度、染色深浅、重复扫描、扫描灵敏度设置、玻片细胞采集部位均不影响自动生物剂量估算结果,各组间  $P > 0.05$ , 差异无统计学意义。实验细节的一般性改变,不会对自动生物剂量估算结果带来影响,有利于该方法的推广普及。当然,实验过程中过于极端化的操作,还是可能对剂量估算结果带来影响,实验过程的标准化有利于保持检测结果的稳定和准确。

我们建立的染色体双着丝粒自动分析生物剂量估算方法经过对多种条件及因素的研究,明确了它们的影响情况,也证明了双着丝粒染色体自动分析生物剂量估算具有较好的重复性和很高的分析速度,适用于大规模辐射事故下快速高通量的生物剂量估算,可能具有较好的推广应用价值。

### 参考文献

- [1] Philippe Voisin. Standards in biological dosimetry: A requirement to perform an appropriate dose assessment [J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015, 793:115–22.
- [2] 戴宏,刘玉龙,冯骏超,等. 双着丝粒染色体自动分析生物剂量估算研究[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2017, 37(3):182–186.
- [3] Chen DQ, Zhang CY. A simple and convenient method for gaining pure populations of lymphocytes at the first mitotic division in vitro [J]. *Mutation Research*, 1992, 282:227–229.
- [4] 中华人民共和国卫生部. GB/T 28236–2011 染色体畸变估算生物剂量方法[S]. 北京:中国标准出版社, 2011.
- [5] Deperas J, Szluinska M, Deperas–Kaminska M, et al. CABAS: a freely available PC program for fitting calibration curves in chromosome aberration dosimetry [J]. *Radiat Prot Dosimetry*, 2007, 124(2):115–123.
- [6] Gruel G, Grégoire E, Lecas S, et al. Biological dosimetry by automated dicentric scoring in a simulated emergency [J]. *Radiat Res*, 2013, 179(5):557–569.
- [7] Vaurijoux A, Gruel G, Pouzoulet F, et al. Strategy for population triage based on dicentric analysis [J]. *Radiat Res*, 2009, 171(5):541–548.
- [8] Romm H, Ainsbury E, Barnard S, et al. Validation of semi-automatic scoring of dicentric chromosomes after simulation of three different irradiation scenarios [J]. *Health Phys*, 2014, 106(6):764–771.