

七、间歇表达公式的评述

计算分次、间歇照射剂量的公式，除本文外还有另外三种，着眼点各有异同。Cohen (1971) 提出一个半经验计算射线效应模型，模型以各种组织细胞群体动力变化为理论基础，它是一个复杂模型，需要烦琐的计算。模型不是纯经验公式，而是以细胞活存曲线为根据是它的优点。

临床治疗常用的公式是 Ellis 标称标准 NSD 治疗过程中有间歇时，Ellis 等提出的部分耐受剂量 PT 的概念和表达公式，

$$PT = \frac{N}{NTOT} \cdot NSD$$

N 为间歇前的照射次数， $NTOT$ 为全疗程无间歇的照射次数。所谓部分耐受剂量即由于中断治疗，其剂量达到标称标准剂量的分额。因此必须首先获得 NSD 值，才能计算出 PT 值。

Ellis 给出一个疗程中有间歇 G 天的中断时间，则间歇前部分耐受剂量为 PT_1 ，继间歇后的部分耐受剂量为 PT_2 ，两者有以下的关系。

$$PT_2 = PT_1 \cdot \left[\frac{T+G}{T} \right]^{-0.11}$$

T 为从开始治疗日起达到 PT 耐受剂量的时间。部分耐受剂量公式经 Kirk 数学处理后应为

$$\begin{aligned} PT_2 &= PT_1 \cdot \left[\frac{T+G}{T} \right]^{-\left(\frac{0.11}{0.65}\right)} \\ &= PT_1 \cdot \left[\frac{T+G}{T} \right]^{-0.169} \end{aligned}$$

才符合 NSD 的表达式。

另外一个经验方法 (Liversage, 1971) 是间歇时间不足 20 天，每间歇一天加 30 拉德，间歇时间超过 20 天，每间歇一天加 20 拉德。如前所述，间歇时间在疗程中的位置很重要，简单地每休息一天加 20 或 30 拉德是不合理的。但临床经验证明这种办法还是可用的。

(徐海超综述 杨世魁，吴加金，史元明，朱壬葆 审)

参 考 资 料

1. Cohen L: Radiology 101: 419 ~ 427, 1971.
2. Ellis F: Current Topics in Radiation Research, Vol. 4, Ch. VII, PP. 357 ~ 397, 1968. (Ebert M 等编)
3. Kirk J: Clinical Radiology 22: 145 ~ 155, 1971.
4. Kirk J: Clinical Radiology 23: 93 ~ 105, 1972.
5. Kirk J: Clinical Radiology 24: 1 ~ 11, 1973.
6. Kirk J: Clinical Radiology 26: 77 ~ 88, 1975a.
7. Kirk J: Clinical Radiology 26: 159 ~ 176, 1975b.
8. Liversage WE: Br J Radiol 44: 91 ~ 100, 1971.
9. Paterson R: The treatment of Malignant Disease by Radiotherapy, 2nd edition, 1963.

放 射 自 显 影 技 术

核乳胶的研制成功及标记化合物的问世，为放射自显影术在生物学研究中的应用创造了必要的条件。近廿多年来发展迅速，

越来越多地被科研工作者应用，不仅在生物学、细胞学、血液学、药理学、细胞培养、肿瘤学〔3〕，而且在放射生物学也越来越多

地应用。由于此技术能较准确地反应出机体组织细胞和器官的机能代谢状态,因而很好地把组织细胞和器官的生理机能、生化代谢、增生繁殖和细胞结构,形态学改变非常紧密地结合在一起,并精确地给以定位,回答了哪些器官掺入核素最多,是实质还是间质,在胞浆内还是在胞核内,在亚细胞水平上哪些染色体掺入,在分子水平上超微结构观察在大分子DNA链上掺入的情况。

本文仅从放射自显影的基本知识、基本理论、近年来的进展和技术方法的改进方面进行概括的叙述。

放射自显影术就是用比一般照像用感光乳胶含卤化银成分更多,对来自放射性核素的辐射更加敏感的原子核乳胶,作为探测器,对 α -及 β -粒子的径迹进行记录及定位的一种方法。

一、基本条件

进行放射自显影工作两个最基本的条件

表 1 : 核 乳 胶 与 一 般 乳 胶 的 比 较

乳 胶 种 类	厚 度 (微米)	卤 化 物 (%)	颗 粒 大 小 (微米)	颗 粒 数 / 1000 微米 ³
一般照像底片	10~20	10~15	1~4	6
X - 线 胶 片	10~30	10~20	1~4	6
核 乳 胶	50~1000	45	0.2	10000
剥膜核乳胶	5	45	0.2	10000

对能量低的 β -粒子(^3H , ^{14}C , ^{35}S 等)则用薄膜乳胶,因其最大的穿透力<3微米,一般为1微米,而 α -粒子(如 ^{210}Po , ^{232}Th , ^{239}Pu 等)由于其能量大、径迹长,故核乳胶要厚达50~100微米,而 α -粒子(如 ^{210}Po , ^{232}Th , ^{239}Pu 等)由于其能量大、径迹长,故核乳胶要厚达50~100微米。

近些年来在核乳胶的制备过程中为了提

是核素和核乳胶。

1. 核素:基本上是原子放射 α -及 β -粒子的核素。放射 α -粒子的有 ^{239}Pu 、 ^{232}Th 、 ^{227}Ac 、 ^{235}U 、 ^{210}Po 等,它们的能量较大,4~8百万电子伏,射程15~40微米。

在生物学研究中更广泛应用的是放射 β -粒子的核素,如 ^{32}P 、 ^{59}Fe 、 ^{35}S 、 ^{14}C 和 ^3H 等。它们的能量与呈均一性的 α -粒子不同,而是由小到大,如 ^3H ,它的初发能量为0~18千电子伏。在生物学研究中对放射低能量 β -粒子的核素最感兴趣,如 ^3H 、 ^{14}C 及 ^{35}S ,因它们的能量低,射程短,电离能力强,从而可以获得较好的分辨力。

2. 核乳胶:核乳胶与一般照像底片及X-线胶片乳胶比较,含卤化银多,浓度高,以便提高测定精确性,同时卤化银颗粒小,以提高分辨力(表1)。

高其灵敏度,保证高质量,减少潜影消退等,国内外均采取了一系列有效措施,如乳化过程保持 KBr 和 AgNO_3 两溶液的滴比值大于1.14。此外,还要加一定量的 KI 及 CdBr 以增加 I 及 Cd 离子,使 AgBr 颗粒大小一致,提高核乳胶测定放射性核素的精确性。同时在成熟过程,降低搅拌速度,加入增感剂,如三乙醇胺等以提高核乳胶的敏感性^[9]或

先后加入适量浓氨水及枸橼酸,最后形成核乳胶时加入铬矾、甘油、酒精等致敏剂均能提高核乳胶的敏感性^[10]。在减少潜影衰退及去雾点等方面也都取得较好成绩。我国核乳胶产品质量,某些类型已赶上了世界上先进国家^[11]。目前已生产有核-2、核-3,用于测 α -粒子,有核-4、核-5用于测 β -粒子,测慢性中子的有核-2载硼、核-2载锂等核乳胶。除核-5外,一般均能在4°C左右冰箱内储存半年,仍可使用^[12]。国外产品一般储存2~3个月左右。

目前,国内外常用的核乳胶有两种:液体核乳胶及核乳胶片。用液体核乳胶时,则先要取一定量核乳胶凝胶块,在加温到40°C的水浴锅中熔化,加入一定量的蒸馏水稀释,将涂片或切片浸入液体核乳胶中片刻或将液体核乳胶滴加在玻片上,用小毛刷或玻棒在标本上面将核乳胶摊平铺张。核乳胶片,这是熔化好的核乳胶已涂在一块预先涂有一层明胶膜的玻璃板上,用时用保险刀片或手术刀片划开一定适宜大小的方形或长方形小块,用刀片掀起一角,再用小镊子取下,面(核乳胶层)朝下放到搪瓷盆水面上,片刻,核乳胶膜展开平坦,将切片标本侧向上浸入水中,捞取核乳胶膜,使密切完全覆盖标本上。

Gomberg氏提出用溶液方法代替核乳胶膜方法(所谓湿操作法)。曝光完全是在含有一定量的AgNO₃酸性水溶液中进行^[13]

二、放射自显影术的应用范围

1. 宏观标本:广泛应用于骨、冰冻切片、动物尸体正中剖面(冰冻下锯开)等观察核素的分布。于核乳胶片(可用X线胶片代替)与标本之间加一层极薄的塑料膜,防止化学反应,增加雾点。用内衬有海绵橡皮或泡沫塑料的胶合板将核乳胶片压在标本上,使核乳胶片与标本密切接触。此方法简单、易于操作。最常用的核素是放射 α -粒子

的或放射高能量 β -粒子的(¹⁴C, ³⁵S等)。

2. 显微放射自显影:此乃应用最广泛的一种。根据操作过程的不同分为:

(一) 浸蘸法(Mounting Method),切片浸入熔化的液体核乳胶中片刻,取出,拭去玻片背面的核乳胶,垂直放于吸水纸上,阴干。此法操作简便、快速,核乳胶与标本接触密切、牢固。特别是在有大量标本(切片或涂片)需进行显微放射自显影时,就更显示其费时短的优越性。此法广泛用于组织切片、血及骨髓涂片。缺点是核乳胶膜不够均匀一致,银颗粒显影不均匀,不易重复前次结果。

(二) 复盖法(Coating Method),用上述液体核乳胶,用吸管滴在玻片上3~4滴,再用玻棒或小刷摊开铺平。较上法费时稍多,但节省核乳胶。操作时避免用力,防止玻棒与玻璃表面或边缘磨擦,产生机械性雾点。此法同样具有核乳胶厚薄不均的问题。可用简单的核乳胶扩散器(Spreader)获得较好的结果^[14]

(三) 剥膜法(Stripping film Method):具体方法如前所述。此法优点是核乳胶膜厚度均匀一致,可重复获得前一次的结果。特别是进行少数标本的显微放射自显影时,简便易行,避免水浴锅加温及核乳胶的熔化配制过程。缺点是与标本的贴敷不如液体乳胶的密切牢固。特别是在组织切片的边缘及大血管腔处易留有间隙,容易导致产生机械性雾点或在显影、定影、染色过程中核乳胶膜易移位或脱落。尤其是切片较厚时更容易产生此种不良结果^[14]。

最常用的是 β -粒子放射性核素。

显微放射自显影能准确地将组织或细胞内核素定位及相对定量。在细胞水平及亚细胞水平上把细胞的生理、生化代谢与细胞结构改变紧密地结合起来。

3. 电镜(超微结构)放射自显影:电镜放射自显影的操作过程要求细致、严格。

在格栅 (grid) 上先要镀一层炭末, 将所要观察的超薄切片放上后, 则复盖上经过处理的核乳胶。即将核乳胶用蒸馏水稀释 (约 1:4), 加热至 40℃, 混匀, 再加清洁剂 (detergent), 降低表面张力, 以获得薄的核乳胶膜, 用铜丝环浸蘸核乳胶, 缓慢提出铜丝环, 空干约 2 分钟左右, 在其进行凝胶化的过程将其复盖在格栅上^[2]。通过电镜放射自显影可进行超微结构和分子水平 (如 DNA 分子的标记) 的研究。

4. 其他: 放射自显影可用于体外的组织细胞培养。根据要求、目的, 可将所培养的组织细胞按上述显微自显影或电镜自显影进行处理。

三、影响放射自显影结果的几个主要因素

对实验室常规性的显微放射自显影及电镜放射自显影的详细操作步骤, 如曝光、显影、定影、染色及误差分析等本文不想作全面的叙述, 仅就下面几个影响显微放射自显影的主要因素重点地谈一下, 其他方面的问题可参考有关文章^[3,14,15,16]。

1. 核乳胶的选择: 根据观察所用的手段, 如电镜、光学显微镜或宏观大标本以及所用核素放射粒子的性质、能量来选择适宜的核乳胶型号是很重要的。电镜, 则要求核乳胶 AgBr 颗粒小、浓度高, 以达到高敏感性及其良好分辨力。如 Ilford I-4 型核乳胶就较适用, 其 AgBr 颗粒直径为 0.1 微米左右。但不适于光学显微镜观察用, 因为这种高敏感性及其高分辨力的核乳胶在一般光学显微镜观察下, 一个蜕变能引起几个银颗粒。用于光学显微镜观察的, AgBr 颗粒直径为 0.2 微米或更大些较合适。而用宏观观察高能 α -粒子的核乳胶, 则 AgBr 颗粒要大, 甚至 X 线胶片或一般照像用乳胶底片均可使用。国内核-2、核-3 适用于放射 α -粒子核素。核-4、核-5 适用于放射 β -粒子的核

素。

2. 温度: 核乳胶需要储存于 4℃ 冰箱内, 温度高时增加本底雾点, 缩短使用期限。在曝光过程中, 温度对核乳胶敏感性有明显影响的是在 -20~24℃ 之间。在此阶段内, 温度稍有波动都对银颗粒的形成有着明显的影响^[17,18]。温度再高, 如达 27℃, 则潜影反而衰退。为保证在长时间 (半个月或几个月) 曝光过程免受环境温度波动的影响而一般多选用在 4℃ 冰箱内进行曝光。

3. 湿度: 在曝光过程中要保持核乳胶干燥。标本在暗盒中曝光时, 盒内要加干燥剂, 同时在附上核乳胶膜后待阴干才能放入暗盒内曝光。否则, 湿度大, 引起潜影衰退。如果在 100% 的相对湿度下曝光, 则无银颗粒形成。在 4℃ 条件下伴有干燥剂曝光时, 持续一年以上, 核乳胶敏感性无改变, 未见潜影衰退现象。有些作者为了防止由于在干燥环境中曝光时间长而致核乳胶发生干裂, 甚至脱落, 在暗盒中放入过饱和的氯化锌 ($ZnCl_2$) 溶液 (相对湿度 10%) 对核乳胶的敏感性及其潜影等未见任何不良影响^[18]。甚至 Jofte 氏在暗盒中放入饱和 KNO_3 溶液及固体 KNO_3 , 保持相对湿度为 47%^[19]。这没有被多数学者所接受。Leblond 氏实验, 在 40% 的湿度下, 曾使银颗粒减少 90%。

4. 曝光环境中的气体: 潜影衰退的主要原因是在潮湿的环境下曝光, 使还原的银颗粒又被氧化, 在显影后导致黑色银颗粒减少, 如上所述。此外, 与环境中的氧气分压有关, 在曝光时暗盒中充填氮气或二氧化碳气体, 以减少氧分压, 这样可以提高细胞标记的银颗粒数 30~81%^[20]。

5. 曝光时间: 由于核素在组织细胞内掺入量对于使核乳胶感光来说是很少的, 能量也低。为了弥补此点, 延长曝光时间, 累积辐射引起的还原银颗粒, 在显影时使之足以显示黑色银颗粒。一般说来, 曝光时间越

长,还原的银离子越多、越充分。Boren氏等用一定量的 ^3H -聚(正丁基)甲基丙烯酸酯(^3H -PBM)溶于甲苯,在液闪谱仪中测其放射活性后,将其涂于玻璃片上测定,结果显示还原的银颗粒数与曝光时间长短呈线性关系[17]。

从细胞学放射自显影要求着眼,曝光一定时间达到目的后就不宜拖时间。例如艾氏腹水瘤标记 ^3H -胸腺嘧啶核苷涂片曝光时间

以30天为标准来比较,在曝光10天时标记的细胞已达到100%,只是每个标记细胞的银颗粒数少,仅为30天的35.3%。在25天时达到90.7%。在曝光30天之内,每天产生的银颗粒数平均比30天的多(>1),而30天以后,虽然标记细胞的平均银颗粒数有所增加,但每天产生的银颗粒数(产生率)降低了(<1) [20] (表2)。

表2: 曝光时间对 ^3H -TdR标记的艾氏腹水瘤放射自显影效率的影响

曝光时间(天)	标记细胞数(%)	平均颗粒数/标记细胞	颗粒产生数/天
3	72.6	16.2	1.21
6	74.7	31.0	1.21
10	100.00	35.3	1.09
14	"	48.2	1.07
20	"	68.3	1.07
25	"	90.7	1.11
30*	"	100.0	1.00
35	"	105.9	0.92
40	"	110.2	0.85

*标准过程,人为定值为100及1.00

根据实际情况来定曝光的时间。但是并不是越长越好。因为曝光时间延长将增加潜影衰退及本底增高(雾点)的发生机率。

6.核素的用量问题,根据实验的目的及要求考虑用量问题。一般 ^3H -胸腺嘧啶核苷的用量为1~2微居里/克体重。达到一定用量之后,再增加用量则不会再增加标记细胞的数量,而表现为明显增加标记细胞平均银颗粒数。用量增加不仅浪费核素,且有放射效应的干扰。用量在1~20微居里/克体重,大多数组织脏器吸收、储留核素的量与

用量呈半对数关系。用量越大,各组织掺入、吸收的核素越多[21]。用 ^3H -胸腺嘧啶核苷标记藏氏腹水瘤小鼠,用量为30微居里/只作为标准用量(标记细胞定为100%,平均相对银颗粒数/标记细胞定为100。实际标记的瘤细胞平均银颗粒数为30个左右/细胞)。一般说来,每个标记细胞平均银颗粒数30个左右较为适宜。如果用量降到5微居里/只,则不仅标记细胞素减少(为标准用量组的78%,更重要的是每个标记细胞的平均银颗粒数明显减少,平均15个颗粒/细胞。

这容易导致人为地将标记细胞数降低,特别是在观察细胞增殖世代时,由于每一子代的标记颗粒数呈半数递减后更易造成假阴性结果(误认为为本底雾点)〔20〕。

7. 雾点问题:由于核乳胶存放日期过久、长时间在常温下运输、受宇宙射线影响、储存器化学物质的作用、机械性摩擦、液体核乳胶反复加热、曝光时温度较高、湿度较大以及显影液温度较高等均能增加核乳胶本底水平,雾点增多。应避免上述因素对核乳胶的影响。一旦雾点增多,清除的方法是:在曝光时于暗盒内放入3%新配制的 H_2O_2 浸蘸了的吸水纸上,玻片放在玻片架上(使玻片与纸不直接接触),用 H_2O_2 蒸气薰3~5小时,再彻底清除残留的 H_2O_2 后进行曝光,这样可消除雾点95%,而对核乳胶的敏感性 & 标记的银颗粒数不受影响〔18〕。

此外也可用其他方法消除雾点,如显影剂中加上抗雾剂-苯并三唑(Benzotriazole)〔19〕或在37℃、相对湿度100%条件下曝光一小时〔22〕。

8. 组织切片或涂片的固定、染色和封存等问题:甲醛固定液易引起潜影衰退,故组织块或涂片用甲醇或冰醋酸酒精(1:3体积)溶液或Carnoy氏固定液较好。组织切片原则上要薄一些,如厚1~2微米。特别是对于富有脂肪组织和/或血管组织的脏器,切片要薄,脱脂要彻底,如经纯酒精、二甲苯各处理两三次。用 3H -胸腺嘧啶核苷作标记物时标本与核乳胶之间可不用明胶膜,如要用,胶膜要薄,以减少对 β -粒子的吸收,削弱其能量。明胶膜厚1微米就阻挡了大部分低能的 β -粒子。染色以色浅,黄色、红色较好,易与黑色银颗粒区别。故常用Feulgen氏染色。此外,要注意染液的酸硷度。酸性的,则氧化银颗粒,而使还原银颗粒减少,而硷性的则对明胶膜有溶解、破坏作用。特别是剥膜核乳胶,其表面(由于敷贴核乳胶膜时将明胶底膜翻到玻片的表面

上来)明胶层容易被溶解、脱掉,导致核乳胶膜移位或银颗粒丢失。为避免此问题的发生,切片或涂片固定后先染色,涂一层薄防水膜,如软尼龙、硝化纤维素或聚氯乙烯膜,然后再进行显影、定影,可避免在显影、定影过程中引起严重脱色〔16〕。在染色时还要避免金属盐沉淀在切片或涂片上。为了便于光学显微镜观察及长期保存标本,则要用树胶、盖玻片封固玻片。也可用快速、简便的丙烯酸塑料气溶胶喷膜于核乳胶表面代替盖玻片〔23〕。

小 结

1. 本文对放射自显影术中的重要环节进行了文献复习。如对所应用的核素的种类、核乳胶的种类、性质,放射自显影术的应用范围进行了较系统地扼要地叙述。

2. 文中着重叙述了影响放射自显影术结果的几个重要因素,提出了如何避免发生,以及一旦发生了克服的方法。

参 考 文 献

1. Chapter 1. The uses of autoradiography, in Rogers A W: Techniques of autoradiography, p.1, London, 1967.
2. Hulaer D F and Rajewsky M F: Methods in Cell histology, vol. 3, p.293, New York and London, 1968.
3. 张家兴:放射自显影在医学研究中的应用。国外军事医学资料(第二分册)3: 47, 1973,
4. Lisco H: Exp Cell Res 8: 162, 1959.
5. Rubini J R等: J Clin Inv. 39: 909, 1960.
6. Heiniger H J等: Blood, 37: 340, 1971.

7. Feinendegen L E等 : Cell Tissue Kinet 6 : 573, 1973.
8. Faires R A 和 parks B H : Radio-isotope Laboratory Techniques, p.259, 3rd. Lodon, 1973.
9. 何泽慧等 : 物理学报, 15(3):131, 1959.
10. Barkas W H : Nuclear Research Emulsion, vol.1. p.467, New York, and London, 1963.
11. 何泽慧等 : 科学通报, 第二期, 第43页, 1957.
12. 陆祖荫等 : 物理学报, 15(3):139, 1957.
13. Gomberg H J : Nucleonics, 9(4) : 28, 1951.
14. IAEA : Laboratory Training Manual on the Use of Isotopes and Radiation in Animal Research, p.169, 2nd. Ed. Vienna, 1969.
15. 赵凤章和李章 : 吉林医科大学通讯, 第二期, 第246页, 1973.
16. Rogers A W : Techniques of Autoradiography, p.207, London, 1967.
17. Boren H G等 : J. Histochem. and Cytochem. 23 : 901, 1975.
18. Care L G等 : J. Cell Biol. 15 : 173, 1962.
19. Jofte, DL : Lab. Inv. 8 : 131, 1959.
20. Baserga R and Nemeroff K : Stain Tech. 27 : 21, 1962.
21. Samuels L D and Kisileki W E : Rad. Res. 18 : 620, 1963.
22. Rogers, A.W : Techniques of Autoradiography, p.83, London, 1967.
23. Ranson J p : stain tech. 28 : 279, 1973.

【北京753信箱 一室 高凤鸣综述 欧阳兆明
汤瀚审阅】

放射生物学结构代谢学说的基本原理

放射生物学, 从其创立之初, 就是一门独立科学。它除了对所观察到的事实予以确认并定量地记述研究的现象外, 还要力图阐明照射机体与照射细胞发生变化过程的性质, 以及照射后经过一定时间所引起的放射生物效应的本质。随着我们对以细胞生命活动为基础的有关细胞结构与代谢过程的普通生物学概念的发展, 并由于大分子结构、亚细胞结构与在其中进行的分解和合成反应的研究仪器、研究方法的改进, 以致能实现对照射细胞内发生的各种变化及其进一步发展成终末放射生物效应的研究, 并加以深入开展。

近十年来, 由于分子生物学、放射生物化学和放射生物物理学的成就, 对照射细胞

发生变化的结构代谢观点的认识业已获得牢固基础。应用现代的化学、物理学和细胞学的方法, 来研究照射细胞的实验结构、细胞大分子(首先是独特的DNA分子)、染色质和生物膜的超分子结构、亚细胞器的功能、细胞的代谢过程和动力学变化的影响, 所取得的实际资料, 与约在30年前创立的靶学说的粗略概念, 发生了许多矛盾。这样, 使研究人员对于实际结构真正变化过程所了解的那些新的正式的假设与概念来认识靶学说。作为细胞内确实存在的执行一定功能的具体结构——靶子, 是一种可以设想的粗略概念。过去, 曾以抽象的敏感区域、效应区域这类概念来代替靶子, 而敏感区域、效应区域与细胞结构并没有什么关系。对于