

放射线工作者的生物学监测新技术

Mendelsohn ML

摘 要: 本文简要综述了①有关4个基因(hprt、hla-a、血型糖蛋白A和β球蛋白)的体细胞基因突变监测技术及其在放射线工作者生物剂量学研究中的应用;②利用DNA原位杂交的一项染色体分析新技术。这两类技术的发展为放射线工作者生物剂量学开辟了崭新的研究途径。

近年来,人类体细胞突变和染色体畸变(CA)的监测技术获得了长足进展,为放射线工作者的生物剂量学研究提供了许多重要的新途径。使用不同的监测技术可以①对短期或终生受照者进行独立的全身累积剂量的估算;②甄别由于对损伤的先天敏感性差异而造成危险度固有升高或降低的个体;③证明或排除辐射与疾患发生的相关性;甚至④预测受照个体未来的健康状况。

迄今,多以记数CA和微核(MN)进行生物剂量学的细胞遗传学研究。有关体细胞基因突变和CA检测技术的新进展,不仅拓宽了辐射生物效应的研究范围,同时也提高了结果的灵敏度及其检测效率。本文着重讨论了有关的几项最新进展,并预示未来的发展将偏向躯体效应。

体细胞基因突变监测技术

近十年来,有四个基因:hprt、hla-a、血型糖蛋白A和β球蛋白基因可用于人类体细胞突变的研究,它们分别存在于外周LC(淋巴细胞)、RBC中。许多其它基因也有一定的应用潜势,涉及的细胞类型也很多。但检查新基因、新细胞类型时,都需有可靠的检测手段,即突变细胞中受损DNA或功能易于检测且能明确指示出突变的来源。可是目前成功的例子却很少。

次黄嘌呤转磷酸核糖基酶(HPRT)

体细胞突变研究中常用的基因首推hprt。此项技术的基础在于缺乏HPRT的细胞具有6-巯基鸟嘌呤(6-TG)抗性。HPRT

是一种嘌呤合成酶,其编码基因位于X染色体。hprt技术有两种方法:第一种方法较为简便,采用放射自显影检测6-TG存在时仍能结合³H标记TdR的LC频率;第二种方法是分离在6-TG环境中生长的克隆细胞。

人类LC的hprt突变频率与剂量有一定的相关。在离体培养条件下,100kVp X射线照射时,基本上没有阈值,且与0.6Gy的倍增剂量呈线性关系;原爆幸存者在照后43年仍有显著的剂量效应关系。

hprt技术也有一些限制和不足,对于X染色体,由大片段缺失造成的hprt突变计数偏低,因为缺失很可能波及到临近的对细胞生存非常重要的杂合基因,使得hprt缺陷的细胞在体内处于选择劣势。随着时间的推移,hprt突变频率就会降低。这也部分解释了原爆幸存者的剂量效应关系不明显的现象。最后,由于在男性(女性也有可能)中不能检测到涉及有丝分裂重组的突变,因此该位点法也就漏检了这类在致癌过程中非常重要的突变。

hprt统计结果中另一个问题是检测到的突变有时(甚至经常)源自一个克隆,因此这种方法所得的结果可能偏高。是否所有的体细胞突变监测技术都有这种情况,或是LC对环境刺激反应具有特定的克隆倾向,目前尚不清楚。

总之,人体细胞突变监测技术中hprt最为完善,特别是检测半年内的受照情况时,这一方法备受推崇,但对长时间复杂职业性受照情况却不能很好地予以监测。

人类白细胞抗原A (HLA-A)

hla-a位于6号染色体,其检测方法出现较晚,目前只有一个实验室采用这项技术。本法也以外周LC为实验材料,分为直接放射自显影法和克隆法。突变细胞的检出通过两个常见的等位基因编码的HLA-A₂、HLA-A₃的抗体进行,它们在人群中各约占50%。对100kVp X射线的效应关系基本上没有阈值,与1 Gy的倍增剂量成线性关系。用Southern印迹法研究有关突变基因结构的损伤,结果发现很多辐射诱发的突变为DNA损失或有丝分裂重组。另外hla-a技术许多环境检测领域和流行病学研究中也有一定的应用潜势,但目前仍需进一步的验证。

血型糖蛋白A (GPA)

这一方法采用荧光标记的单克隆抗体、和红细胞流式细胞测定方法,检测两种来自同源等位形式GPA基因产物的丢失。GPA分布于红细胞膜上,含量丰富,其编码基因位于4号染色体。GPA分子除作为M、N血型抗原外,似乎并无其它功能。失去一个或两个基因拷贝,似乎没有选择或生理劣势。由于所需的流式细胞术要求非常精细,目前只有两个实验室进行这方面的研究。另外,本法只适用于检测M/N杂合子个体,他们约占人群的50%。其中正常红细胞具有M、N两种荧光,变异细胞分为两类:①一种荧光正常,另一种缺如(杂合子);②一种荧光增加1倍,另一种缺如(纯合子)。由于细胞无核,因此有关DNA损伤的信息尚缺。

关于辐射效应,从63名原爆幸存者照后42年的研究结果来看,虽然所得数据较为离散,但效应关系却非常显著,基本上符合线性模型。切尔诺贝利核事故中消防人员照后6个月的检查亦得到类似的结果。而对于经局部高度集中放疗(约40Gy)的60例Hodgkins病和前列腺癌患者的研究结果表明,GPA突变频率并不增加。在乳腺癌患者,

当用诱变剂辅助化疗时,GPA突变频率增加,但停止治疗4个月后,却恢复至正常水平,恢复时间相当于红细胞的寿命。

总之,放疗、化疗时GPA效应差异很大,这也许反映了幸存干细胞的突变情况。如辅助化疗时,化学药物很可能仅使分裂旺盛的定型细胞发生突变却不影响干细胞。辐射效应虽无这样的选择性,但在放疗时,局部受照的干细胞很可能因为受照剂量太大而不能存活。就现有的资料来看,经可耐受的任何剂量的全身照射、一次或多次小剂量的局部照射时,都可诱发造血干细胞突变而使GPA发生改变,突变频率与受照骨髓的面积以及受照剂量的大小有关。

β球蛋白

本法可检测含有大量突变血红蛋白的红细胞。最初仅用于检查镰形血红蛋白,荧光抗体结合后在显微镜下即可鉴别这类细胞。随着扫描显微镜的应用,已能进行自动分析。由于突变是因单个碱基改变所致,故而突变频率很低,仅约 3×10^{-8} 。有报道表明,大剂量事故全身受照者的突变细胞增加了100倍。目前,本法只有一个实验室使用且技术要求较高。因此尽管其应用潜势很大,但仍需验证。

突变监测方法小结

在四种体细胞突变监测技术中,最适合研究放射线工作者的为GPA法。目前hla-a和β球蛋白法尚不成熟;而hprt法则适用于受照后的短期研究。对于受到累积剂量照射的核工作者,只可选择GPA法。但GPA法亦有一定的限制,目前尚无证据表明GPA与长期慢性小剂量照射有剂量效应关系,对其灵敏度所知不多。

细胞遗传学研究方法

在人类辐射研究中,CA为一传统、可靠的生物剂量计。X、γ射线与CA的剂量效应关系符合二次线性模型,而高LET的辐

射剂量效应为线性关系,其斜率反映了射线的RBE。对于照后短期研究,非稳定性CA(Cu)最为合适,其主要形式为双着丝粒染色体(dic)。理论上易位与dic频率相同,但易位的检测困难,并且不同实验室的结果差别很大。因有丝分裂过程中染色体的不均等分配,含有Cu如dic的LC数月后会自行消亡,而含有易位的LC却能保持恒定。因此,对于长期受照者最好采用有效可靠的技术检测其易位频率。以CA为检测指标的困难是劳动强度大,而在流行病学调研中,选择的方法应快速有效。

微核(MN)的检测要容易得多。但过去,由于不能区分分裂细胞(不稳定,为风险细胞)和不分裂细胞,MN技术的应用曾受到限制。最近,采用细胞松弛素B(CB)阻断胞质分裂,可将分裂细胞表现为双核细胞,从而易于检测风险细胞中的MN频率,但该项技术也有其局限性,只能检测Cu,用于照后短期的研究。

染色体彩染技术(Chromosome Painting)

最近,Livermore实验室建立的这项新技术似可弥补传统CA分析的不足。彩染技术即为荧光原位杂交技术(FISHT),通过特异性DNA探针使选定的染色体着色。其基本过程为:对所用探针进行化学修饰,使生物素标记的U替代T,将常规制片得到的染色体标本热变性;加入DNA探针使之与其同源序列杂交;冷却后冲洗,再与荧光素标记的抗生物素蛋白结合即出现特征性荧光;加入碘化丙啶与所有剩余的DNA结合,进行背景染色体荧光染色。这样结合了探针的染色体或核的区域就会呈现绿色而其他部分呈现红色。目前,FISHT已成功地用于分裂相或间期核中非整倍体的检查、特定DNA序列定位、染色体在间期核中的位置确定、人类精子的性染色体组成检测以及结构性CA,特别是相互易位等许多研究中。

FISHT涉及两类探针,一为高度重复序列DNA探针,可对2/3人类染色体进行研究。如在研究易位时所用的一对1号染色体探针,其中1个识别1p36处端粒附近的重复序列,另1个识别1q21处的重复序列,发生在1p的断裂所造成的易位(或其他CA),将使这一对探针结合位点分开到不同的染色体上,因此非常易于识别、计数。Lucas等(1989年)采用这一方法研究了离体LC经 ^{60}Co 或 ^{137}Cs 照射后易位和dic的频率,发现这两类CA的剂量效应关系与二次线性模型非常吻合。标本分析也很快速,平均每分钟分析两个分裂相。这一方法的不足在于分析覆盖的染色体不够多,而其它染色体目前尚缺成对合适的重复序列探针。

第二类探针包括整条或部分染色体特异克隆序列组成的探针集合,这些探针可从Lawrence Livermore和Los Alamos国家实验室基因文库项目组制备的人类特定染色体重组DNA文库中获得。因每条染色体不仅包含许许多多单一的特异DNA序列,同时也含有与其它染色体相同的重复序列。因此在进行FISHT特殊染色时,必须抑制这些重复序列,抑制过程可通过加入适量的基因组DNA予以完成。基因组中重复序列含量丰富,可竞争性地抑制那些标记重复序列的结合,结果可清晰、有选择地彩染靶染色体。

如果彩染的染色体和未彩染的染色体间发生互换,则交换的染色体在断裂点一端呈现绿色而另一端呈现红色,这样畸变的染色体就非常易于识别。

有关FISHT方法学的研究清楚地表明:
①易位的检出率提高了两个数量级;
②以易位作为细胞学终点,很容易估算照后几十年的生物剂量。

结 语

随着方法学的发展,大规模群体流行病

学以及其它剂量效应关系的研究,人体细胞基因突变监测技术的应用不断得以加强。可以设想基因突变将成为有效的生物剂量计,并有可能做为一项很好的预测迟发效应的指标和一类相应的生物学终点。

FISHT 的应用是常规染色体分析技术



086 Z-100对放射治疗引起白细胞减少的临床治疗效果——用多设施双盲法与肌苷的比较研究〔日〕/橋本省三…//日本医放会誌。—1990, 50(8)。—977~992

Z-100是人型结核杆菌青山B株的菌体提取物,其主要成分是阿拉伯甘露聚糖等多糖类。本文报道了Z-100对胸腹部恶性肿瘤患者放疗所致白细胞减少的治疗效果,并与肌苷组多设施双盲法试验进行了比较。

对象为进行放疗的胸腹部恶性肿瘤患者,16~80岁,治疗前白细胞总数在 $4\,000\sim 8\,000/\text{mm}^3$ 。但肝肾、骨髓功能严重障碍者等及其他主治医师认为不合适的患者除外。照射野 100cm^2 ($10\times 10\text{cm}$)以上,总剂量40Gy以上。分30 μg 组(简称Z-30组),使用Z-100 30 μg 针剂和安慰剂片剂;20 μg 组(简称Z-20组),使用Z-100 20 μg 针剂和安慰剂片剂。对照组为肌苷组(简称IN组),使用Z-100生理盐水注射剂和30 μg 肌苷片剂。针剂一次一安瓿(含20或30 μg 结核菌提取物),每周二次,皮下注射。片剂一次两片,一天三次,饭后服。针剂从放疗后三天内开始注射,片剂则从放疗开始当天服用,两者均给予至放疗结束。疗程超过八周者,给药时间到八周为止。治疗期间禁用影响药效评价的药物。疗效评价项目和方法有:1.由主治医生对白细胞减少的疗效、总安全性和有用性作出评价;2.由评定委员会按白细胞减少率和白细胞维持在 $3\,000/\text{mm}^3$ 的情况作出评价。在累积剂量达40Gy时或照射终了时,照前白细胞总数不足 $6\,000/\text{mm}^3$ 的病例,如白细胞减少率在35%以内者为有效,超过35%时为无效;照前白细胞总数高于 $6\,000/\text{mm}^3$ 的病例,如白细胞减少率 $<45\%$ 有效, $>45\%$ 时无效。照后如白细胞

的进一步发展,其分析成本较低、易于统计且很敏感。此项技术的应用将大大加强生物剂量学的分析能力,并有可能为辐射防护中许多现有棘手问题的解决提供足够的帮助。

〔Health Phys 1990, 59(1): 23~28 (英文)
陈振军节译 穆传杰校〕

总数维持在 $3\,000/\text{mm}^3$ 以上时有效,低于 $3\,000/\text{mm}^3$ 时无效。

总病例数为171例,用作分析的病例分别是:治疗效果134例,总安全性161例,有用性142例。结果Z-30组、Z-20组和IN组的有效率分别为67.4%、79.1%和48.9%,Z-20组明显优于IN组,Z-30组有优于IN组的趋势。

按白细胞减少率评价时,当累积剂量达40Gy时的有效率,三组间无显著性差异,但在放疗结束时,Z-20组明显优于IN组。用白细胞总数维持在 $3\,000/\text{mm}^3$ 来评价时,三组间的有效率无显著性差异。Z-30组、Z-20组和IN组副作用出现率分别为14.3%、3.9%和5.6%,以Z-30组出现率最高,但三组间无显著性差异。

作者指出,Z-100对放射治疗时的白细胞减少具有比肌苷优越的治疗效果,是一种十分安全的药物,将其推广应用到放射学科领域是有意义的。最佳用药量为一次20 μg ,每周两次,皮下给予。

〔杨秀梅摘 张景源校〕

087 Z-100对放射治疗引起白细胞减少的临床治疗效果——用多设施双盲法与L-半胱氨酸的比较

〔日〕/橋本省三…//日本医放会誌。—1990, 50(8)。—993~1006

作者曾在另一篇文章中报道了Z-100对放疗所致白细胞减少的临床效果,并与肌苷进行了比较。本文报道了Z-100与半胱氨酸进行比较的结果。

观察对象与方法同与肌苷进行比较一文。Z-100针剂(或其安慰剂),简称Z组,照射前一日或照射当日给予,每次一安瓿(20 μg),每周二次,皮下注射。对照药为L-半胱氨酸片剂80mg(或其安慰剂),简称L组,照射前一日或照射当日给予,每次二片,每日三次,饭后服。两组给药总时间为八周。

总病例数220例,用作疗效分析的资料完整的病