

2009, 681(1): 13-23.

[22] 刘强, 姜恩海, 李进, 等. SCGE 作为辐射生物剂量计的可行性研究. 国外医学放射医学核医学分册, 2005, 29(3): 126-129.

[23] Blakely WF, Salter CA, Prasanna PG. Early-response biological dosimetry—recommended countermeasure enhancements for mass-casualty radiological incidents and terrorism. Health Phys, 2005,

89(5): 494-504.

[24] 刘强, 姜恩海, 李进, 等. 单细胞凝胶电泳技术检测 DNA 损伤与修复在辐射生物剂量学中的应用. 中华劳动卫生与职业病杂志, 2006, 24(12): 734-738.

(收稿日期: 2012-05-20)

《荧光原位杂交分析染色体易位估算辐射生物剂量技术方法》解读

刘青杰 陆雪 陈德清 赵骅

【摘要】 国家职业卫生标准——《荧光原位杂交分析染色体易位估算辐射生物剂量技术方法》是在收集整理、全面阅读了与该标准有关的国内外文献资料 and 我国现行有效的放射性疾病诊断标准, 将资料汇总分析后经实验室反复验证的基础上制定的。此标准主要用于早先事故受照人员的生物剂量估算, 为临床放射损伤的诊断提供科学依据。为了使放射性疾病临床工作者更好地理解、贯彻执行该标准, 该文对标准的相关内容进行了解读。

【关键词】 原位杂交, 荧光; 易位, 遗传; 辐射剂量; 职业卫生标准

Explanation of Method of Dose Estimation Using Chromosome Translocation with Fluorescence in Situ Hybridization LIU Qing-jie, LU Xue, CHEN De-qing, ZHAO Hua. Key Laboratory of Radiological Protection and Nuclear Emergency, Chinese Center for Disease Control and Prevention, National Institute for Radiological Protection, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100088, China

Corresponding author: LIU Qing-jie, Email: qjliu@nirp.cn

【Abstract】 National occupational health standard—*Method of Dose Estimation Using Chromosome Translocation with Fluorescence in Situ Hybridization* has been developed, which based on comprehensive collection, reading and analysis of relevant literature both abroad and domestic and the existing diagnostic criteria for radiation diseases of the China, and the repeated experimental verification. This standard is mainly applied for dose estimation for individuals who previously exposed to irradiation by accident, and provide the scientific diagnosis of radiation sickness. To better understand and implement it, the contents of this standard were interpreted in this article.

【Key words】 In situ hybridization, fluorescence; Translocation, genetic; Radiation dosage; Occupational health criteria

1 目的和背景

随着核能与核技术的应用, 放射工作人员和公众受到照射的潜在危险性也在逐年增高。在

放射性实践和工作中, 事故性受照的情况时有发生, 可以用常规染色体分析非稳定性染色体畸变(双着丝粒+着丝粒环)来估算剂量, 国家对此已制定了有关标准^[1]。但更多的早先事故受照人员的剂量重建、慢性受照人员的剂量估算就受到很多的限制, 无法用非稳定性染色体畸变进行估算。2001年颁布的卫生行业标准《用稳定性染色体畸变估算职业受照者剂量的方法》中采用G显带技术进行剂量估算^[2]。但由于该技术分析的主观性比较强,

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2012.04.013

基金项目: 卫生部标准研究课题(2009-09-01)

作者单位: 100088 北京, 中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所, 辐射防护与核应急中国疾病预防控制中心重点实验室

通信作者: 刘青杰 (Email: qjliu@nirp.cn)

需要分析者具有非常丰富的分析经验,且显带标本的质量与分析结果的可靠性存在很大关系,因此限制了该标准在全国的推广应用。

经过20多年的发展,分子细胞遗传学中的主要技术——荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术已逐步完善^[3-4],在分析稳定性染色体畸变方面比G显带技术有着显著的优势,具体表现为结果直观,分析者不需要非常丰富的分析经验,稍加培训就可以准确判定结果。国际原子能机构405号报告中推荐将1、2和4号染色体的全染色体探针的FISH技术用于回顾性剂量重建,该方法可用于早先受照人员和慢性受照人员的剂量估算^[9]。国际上从20世纪90年代已开始探索用FISH技术进行回顾性剂量重建^[3-4],我国科技人员几乎同时开始探索此领域,目前已有多家研究单位对此进行了探索,中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所实验室建立了两种FISH方法,建立了相应的剂量-效应曲线,并对早先事故受照者和慢性受照者的剂量估算进行了尝试,取得非常好的结果^[9-10],同时还对此方法进行了全面和深入的研究,取得了一些新的进展,例如对照后时间和估算剂量准确性等影响因素的研究。

为了更好地规范用FISH技术进行生物剂量估算的方法,使FISH技术在全国得以推广,有必要编制《荧光原位杂交分析染色体易位估算辐射生物剂量技术方法》。制定本标准将有助于完善放射性损伤判定体系,规范对早先受照人员和慢性受照人员的生物剂量估算,以便更有效地为放射性疾病的临床诊治提供科学的依据。

2 基础和依据

国际上从20世纪90年代已开始探索将FISH技术用于回顾性剂量重建。欧盟国家建立了生物剂量参比实验室网络,已经开始对用FISH技术进行回顾性剂量重建进行了参比,获得了一定的经验^[7],但仍未搜索到具体的标准。《荧光原位杂交分析染色体易位估算辐射生物剂量技术方法》的制订主要依据《中华人民共和国职业病防治法》^[11]、《国家职业卫生标准管理办法》^[12]、《电离辐射防护与辐射源安全基本标准》^[13]、《染色体畸变估算生物剂量方法》^[14]和《用稳定性染色体畸变估算职业受照者剂量的方法》^[15]等标准,结合国际原子能机构的405号报

告,综合国内外有关用FISH技术对电离辐射所致外周血淋巴细胞染色体易位畸变进行剂量估算的研究资料,并对FISH技术分析染色体易位的试验方法进行实验室验证、完善,同时还结合了我国实际情况,广泛征求意见,最后确定标准的实验方法和分析记录规范,形成了《荧光原位杂交分析染色体易位估算辐射生物剂量技术方法》征求意见稿。经过国内同行专家和卫生部放射性疾病诊断标准专业委员会专家的多次审修,形成了国家职业卫生标准《荧光原位杂交分析染色体易位估算辐射生物剂量技术方法》送审稿,于2011年7月获得标准委员会通过。

3 内容解读

《荧光原位杂交分析染色体易位估算辐射生物剂量技术方法》编制了采用FISH分析染色体易位对受电离辐射照射人员生物剂量进行估算的方法,主要包括标本制备、荧光分析、易位判定标准和剂量估算,附录中还包括主要仪器设备、试剂、操作规范和结果记录等。本标准属于推荐性标准。

3.1 适用范围

本标准规定了用FISH技术分析外周血淋巴细胞染色体易位对电离辐射外照射人员的生物剂量进行估算的技术规范,所用FISH方法和国际原子能机构405号报告中推荐的方法一致,为单色荧光素直接标记探针的染色体涂染(chromosome painting)方法^[9],本标准不适用于生物素、地高辛等间接标记探针的FISH方法。另外,本标准适用于发生在10年内、受照剂量在0.2~5 Gy、急性全身均匀或近似均匀照射的事故受照人员的回顾性剂量估算,也可用于受过量外照射人员的生物剂量估算;而不适用于慢性职业受照人员、非均匀照射、内照射、剂量大于5 Gy或事故发生时间大于10年的急性受照人员的剂量估算。对于慢性职业性受照人员的生物剂量回顾性估算,采用本标准虽然不能提供准确的剂量水平,但是能为临床的诊治提供一些科学依据。

3.2 FISH标本制备

国家标准《染色体畸变估算生物剂量方法》中采用的是在细胞培养开始时加入微量秋水仙碱的方法,培养48 h后收获以获得较多的处于第一次有丝分裂中期分裂象的细胞,可用于电离辐射诱发的非稳定性染色体畸变(双着丝粒+着丝粒环)的分析^[14]。对早先事故受照人员的染色体易位畸变分

析,同样需要分析成百上千个处于第一次有丝分裂中期的细胞,因此,本标准中采用在培养开始时加入秋水仙碱,可以确保得到的第一次有丝分裂中期的细胞核型达到99%以上。

用于FISH的染色体标本的制片过程和常规非稳定性染色体畸变分析标本的要求不同,FISH标本的理想中期分裂象应该是:染色体分散良好、无或很少有染色体臂的交叉。这使得染色体变性非常容易实现,探针容易达到相应的染色体位置,实现理想的杂交效果。本标准推荐选择湿热的环境,让染色体慢速、均匀散开,使得到的中期分裂象能够达到上述标准,更适于FISH和易位染色体畸变的判定^[9]。本标准还规定了检定染色体标本质量的标准(在相差显微镜下,中期分裂象的染色体应是中等灰色、轮廓清楚、分散良好、很少或没有肉眼可见的细胞质),使国内使用单位有据可查,容易达到标本质量检定的标准化。

染色体标本在杂交前用RNA酶和/或胰蛋白酶进行预处理,可以去除染色体上影响探针与染色体DNA片段进行杂交的RNA、蛋白质,不仅使杂交效率大大提高,而且降低了背景信号,容易得到理想的结果^[9]。杂交前进行的预杂交步骤,即在80℃的混合溶液(70%甲酰胺、2倍柠檬酸盐缓冲溶液、50 mmol/L平衡盐溶液)中作用3 min,可以使染色体标本上的DNA链更易打开,为杂交提供更为合适的环境。

3.3 染色体易位畸变分析标准

目前,国际上用FISH分析染色体易位畸变有3种判定方法^[16-17]:第一是传统畸变技术标准(Conventional Nomenclature),第二是PAINT畸变判定命名系统(Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology),第三种是S&S命名系统(Nomenclature of the Number of Chromosomes, Arms and Breaks)。本标准采用传统的畸变分析方法,主要是借鉴世界卫生组织对易位畸变的定义^[18],考虑到相互易位和非相互易位的情况,使易位畸变的分析更为国内基层工作人员理解和接受。本标准在附录B中给出了染色体易位畸变的示例,利于标准使用者进行直观的参考,能尽快掌握畸变的判定方法。同时,考虑到国内相关单位的荧光显微镜及配套系统参差不齐的现状,本标准建议使用同一荧光素标记的1、2和4号染色体探针,这样容

易实现标准化,使用和推广的可行性提高。

本标准在附录C中还对FISH方法分析染色体易位畸变在分析记录表和监测报告单中的应用进行了详细介绍,利于本标准使用者在剂量估算实践中借鉴。

3.4 剂量-效应曲线的建立

剂量-效应曲线的建立最重要的因素是正常供血者的选择,因此,本标准对供血者年龄、性别、健康状态、射线和化学毒物接触史、病毒感染史等进行了详细的描述。对于建立剂量-效应曲线的照射剂量点数、剂量范围、剂量率和剂量准确度等进行了详细规定,以便于在实际中的应用。

剂量-效应曲线是描述电离辐射诱导的全基因组染色体易位率与受照剂量之间的剂量效应关系。易位畸变分析后获得检测到的涉及1、2和4号3对染色体的染色体易位率,根据检测到的染色体易位率和荧光标记的染色体DNA占整个基因组DNA的比例,利用公式就可以换算出全基因组的易位率。有些实验室建议采用某一染色体探针来进行分析,本标准中不建议采用,原因是探针组合不同,染色体易位畸变分析的效率有所不同,需要慎重选择;选择不同的探针组合,还需要在生物剂量估算实践中进行验证。

3.5 剂量估算

标准剂量-效应曲线是用急性照射诱导的离体血染色体易位畸变建立的,早先事故受照的方式一般也是急性照射,因此,标准剂量-效应曲线用于早先事故受照者的回顾性剂量估算是可行的。目前,国际放射生物学界中对于辐射诱导的染色体易位是否稳定存在仍有一些分歧,但是大多数研究表明:由于易位畸变率在10年内降低不明显,因此,事故受照后10年内,早先受照者的剂量估算是准确的^[19]。但对事故受照超过10年以上的早先受照者的剂量估算是 inaccurate的,如何提高估算的准确率,目前尚无结论。因此,本标准适用于10年内的早先事故照射。

本标准中提供了如何从检测到的染色体易位数开始,对检测到的染色体易位率及其95%可信区间、全基因组易位率及其可信区间、估算剂量等进行推算的详细步骤,并在附录E中详细列举了男性早先受照人员的剂量估算的全过程,利于使用者很快掌握统计学处理的过程,获得可靠的结果。

4 小结

本文通过对国家职业卫生标准《荧光原位杂交分析染色体易位估算辐射生物剂量技术方法》的目的和背景、基础和依据、标准的相关内容(适用范围、FISH标本制备、染色体易位畸变分析标准、剂量-效应曲线的建立、剂量估算)等方面进行解读,为临床上早先事故受照人员的疾病诊断提供了较为准确、可靠的生物剂量资料,解决了一些放射性疾病诊断中的实际问题,有助于提高放射性疾病诊治工作的质量。

参 考 文 献

- [1] 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. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [2] 中华人民共和国卫生部. WS/T 204-2001 用稳定性染色体畸变估算职业受照者剂量的方法. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [3] Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(9): 2934-2938.
- [4] Fan YS. 分子细胞遗传学——技术与应用. 刘青杰, 译. 北京: 科学出版社, 2007: 3-7.
- [5] International Atomic Energy Agency. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual technical report series No. 405. Vienna: IAEA, 2001: 109-115.
- [6] Lucas JN, Awa A, Straume T, et al. Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*, 1992, 62(1): 53-63.
- [7] Bauchinger M, Braselmann H, Savage JR, et al. Collaborative exercise on the use of FISH chromosome painting for retrospective biodosimetry of Mayak nuclear-industrial personnel. *Int J Radiat Biol*, 2001, 77(3): 259-267.
- [8] Camparoto ML, Ramalho AT, Natarajan AT, et al. Translocation analysis by the FISH-painting method for retrospective dose reconstruction in individuals exposed to ionizing radiation 10 years after exposure. *Mutat Res*, 2003, 530(1-2): 1-7.
- [9] 刘青杰, 陈晓宁, 姜恩海, 等. 多色荧光原位杂交技术的建立及其在早先受照者剂量重建中的应用. *中华放射医学与防护杂志*, 2003, 23(2): 77-82.
- [10] 陆雪, 吕玉民, 封江彬, 等. 用染色体涂染方法对早先辐射受照人员进行回顾性照射剂量估算. *癌变·畸变·突变*, 2008, 20(2): 135-138.
- [11] 中华人民共和国职业病防治法. 2001-10-27.
- [12] 中华人民共和国卫生部. 国家职业卫生标准管理办法. 2002-03-28.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB 18871-2002 电离辐射防护与辐射源安全基本标准. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [14] Chen DQ, Zhang CY. A simple and convenient method for gaining pure populations of lymphocytes at the first mitotic division in vitro. *Mutat Res*, 1992, 282(3): 227-229.
- [15] Korenberg JR, Chen XN. Human cDNA mapping using a high-resolution R-banding technique and fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 1995, 69(3-4): 196-200.
- [16] Tucker JD, Morgan WF, Awa AA, et al. A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet*, 1995, 68(3-4): 211-221.
- [17] Savage JR, Simpson P. On the scoring of FISH-"painted" chromosome-type exchange aberrations. *Mutat Res*, 1994, 307(1): 345-353.
- [18] Buckton KE, Evans HJ. Methods for the analysis of human chromosome aberrations. Geneva: WHO, 1973: 3-15.
- [19] Lloyd DC, Moquet JE, Oram S, et al. Accidental intake of tritiated water: a cytogenetic follow-up case on translocation stability and dose reconstruction. *Int J Radiat Biol*, 1998, 73(5): 543-547.

(收稿日期: 2012-06-08)

· 消息 ·

第八届杭州国际分子影像研讨会会议通知

第八届杭州国际分子影像研讨会定于2012年9月14日至15日在浙江杭州召开。本次会议由浙江大学、浙江大学医学院附属第二医院主办的分子影像领域综合性、前瞻性的国际研讨会。会议主题为: 脑科学与神经分子影像。会议邀请了诸多来自美国、欧洲、日本、韩国、中国、中国台湾等国家和地区的世界顶级专家, 组成强大的专家阵容, 就脑科学与神经分子影像进行多角度对话和探索, 届时将为国内临床医学、医学影像、化学和药学、医疗仪器与信息等领域广大与会同行带来一场国际最前沿、最高水平的科研盛宴, 进一步推动我国分子影像的研究发展, 加强国内外分子影像学术交流, 建立一个国内外分子影像领域最新科研成果交流的高效平台。本次会议授予国家 I 类继续教育学分 10 分。

会议专用网址: <http://www.molecularimaging.ac.cn>, 联系人(组委会秘书长): 王菁(电话: 0571-87767158, 传真: 0571-87767188, Email: zjupetcenter@gmail.com)。