

·论著·

电离辐射诱导小鼠骨电子顺磁共振信号检测的影响因素

任越 张慧芳 胡波 王靖洁 王宏利 原雅艺 张睿凤 李幼忱

【摘要】 目的 研究影响小鼠骨辐射诱导电子顺磁共振(EPR)信号检测的因素。**方法** 将小鼠股骨去除软组织 and 骨髓,干燥,制成股骨段,经 ^{60}Co γ 射线照射,照射剂量率为5 Gy/min,照射剂量为10 Gy和50 Gy。检测不同干燥程度、检测方向、微波功率和叠加次数等条件下骨EPR的信号强度。**结果** 降低骨样品含水量、设置合适的微波功率、增加叠加次数均可以增加样品信号强度,且不同检测方向下同一份样品的信号强度有一定差异。**结论** 适当的样品预处理和检测参数设定可以提高骨EPR检测的灵敏度,样品多方向检测并取平均值可减弱骨样品不均一产生的影响。

【关键词】 电离辐射;骨;电子顺磁共振;小鼠

Influencing factors of detection on ionizing radiation-induced electron paramagnetic resonance signal in bones Ren Yue, Zhang Hui Fang, Hu Bo, Wang Jingjie, Wang Hongli, Yuan Yayi, Zhang Ruifeng, Li Youchen. Department of Radiological Medicine and Environmental Medicine, China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, China

Corresponding author: Li Youchen, Email: liyc69@163.com

【Abstract】 Objective To study the influencing factors of detection on ionizing radiation-induced electron paramagnetic resonance(EPR) signal in mice bone. **Methods** Soft tissue and bone marrow samples of mice femur were collected, and femur sections were dried. The femur sections were irradiated at 10 and 50 Gy by ^{60}Co sources with irradiation dose rate of 5 Gy/min. Bone EPR signal intensity was detected under different degrees of drying, detection direction, and microwave power, as well as various scan times. **Results** The water content of the bone sample was reduced, and microwave power was set to an appropriate value. Results showed that increasing scan times increased the signal intensity. Additionally, different detection directions of the same sample resulted in differences in signal intensity. **Conclusion** Appropriate sample preparation and detection parameters can improve bone EPR detection sensitivity. Multidirectional detection of samples and averaging of the results may reduce the effects of inhomogeneity on bone samples.

【Key words】 Ionizing radiation; Bone; Electron paramagnetic resonance; Mice

电离辐射会诱导生物骨组织中产生 $\text{CO}_2\cdot$ 自由基,这些自由基沉积在骨组织羟基磷灰石的晶体结构中而变得稳定,且该自由基浓度会随着照射剂量的增加而增加。应用电子顺磁共振(electron paramagnetic resonance, EPR)技术可以检测到该自由基产生的顺磁信号,并可以利用该顺磁信号的强度来进行剂量估算^[1]。通常将骨中由辐射诱导产生的自

由基的EPR信号称为辐射诱导信号(radiation induced signal, RIS)。因而通过检测骨中RIS的强度,就可以分析得到骨的受照剂量。国内外有较多利用骨EPR技术进行辐射剂量估算的相关研究^[2-5],但是对信号检测方法缺乏详细的介绍,当照射剂量较低时,RIS强度很弱不易检测,因而需要对影响检测的因素进行分析,以提高在较低剂量时骨EPR检测的灵敏度。

本研究旨在探讨影响骨EPR信号检测的因素,提高检测灵敏度,并确定适于小鼠骨EPR检测的最佳方法,为骨EPR信号的研究提供方法学参考。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.05.004

基金项目:中国辐射防护研究院青年基金项目(YQ130202)

作者单位:030006 太原,中国辐射防护研究院放射医学与环境医学研究所

通信作者:李幼忱(Email: liyc69@163.com)

1 材料与方法

1.1 实验材料

昆明种小鼠购自军事医学科学院; EMX A-200 型电子顺磁共振谱仪购自德国 Bruker 公司; g 标准样品购自德国 Bruker 公司; 万分之一天平购自德国 sartorius 公司; 超声清洗机购自宁波新芝公司。

1.2 实验方法

1.2.1 骨样品制备

取成年健康昆明种小鼠股骨, 剥离软组织, 剪去两端松质骨, 冲去骨髓, 超声清洗 90 min 后纯水冲洗 3 次, 60℃鼓风干燥箱中干燥。在干燥器中冷却至室温, 制成长度 5~8 mm 的皮质股骨段。

1.2.2 EPR 信号检测

检测仪器为 Bruker EMX A-200 型电子顺磁共振谱仪, 检测参数: 中心磁场=3510 G; 扫描宽度=150 G; 调制幅度=2 G; 时间常数=164.32 ms; 转换时间=180 ms。每次检测时, 在谐振腔中固定一个顺磁信号强度恒定的 g 标准样品, 深度 9.0, 作为内参与样品一起检测, 用以消除不同份样品的调谐差异带来的定量测量误差。

1.2.3 样品照射

使用中国辐射防护研究院辐照中心的 ^{60}Co 放射源进行照射, 放射源活度为 9.9×10^{14} Bq, 吸收剂量率为 5 Gy/min, 照射剂量分别为 10 Gy 和 50 Gy。

1.2.4 RIS 信号峰的确定

分别取未照射对照组和 50 Gy 照射组骨样品各 3 份, 每份 80 mg 进行 EPR 检测。调节中心磁场参数和扫场宽度, 使信号峰位置位于图谱中央。调整对照组和照射组的图谱, 使其 g 标峰重叠, 分析对比对照组与 50 Gy 照射组 EPR 图谱的区别。

1.2.5 样品方向对检测结果影响的测定

取 50 Gy 照射组骨样品 3 份, 每份 80 mg 进行检测。每份样品以初始装样方向为 0°, 依次顺时针旋转样品管 120°共 2 次, 分别进行 3 个角度 (0°、120°、240°) 的 EPR 检测。

1.2.6 样品干燥程度对检测结果影响测定

取对照组骨样品 80 mg, 同一份样品依次在常温自然干燥 18 h, 60℃鼓风干燥 2、7、12 h 后进行称重和 EPR 检测。每次检测均进行了 3 个角度 (0°、120°、240°) 的检测, 取 3 次测量的平均值。

1.2.7 微波功率对检测结果影响的测定

取 50 Gy 照射组骨样品 80 mg, 样品放入谐振腔后固定不动, 将微波功率逐步从 10 mW 增大至 80 mW 进行 EPR 检测, 每个功率测量 3 次。

1.2.8 叠加次数对检测结果影响的测定

取对照组、10 Gy 照射组和 50 Gy 照射组骨样品各 80 mg, 每份样品装入谐振腔后固定不动, 分别叠加 20 次和 50 次进行检测。

1.2.9 数据处理

采用 Origin 8 软件进行数据分析和制图。以信号吸收峰峰尖和峰谷的高度作为样品信号强度, 由照射组样品信号强度减去对照组样品信号强度得到增加值。使用 Excel 计算均值和标准差, 将标准差除以均值得出相对标准偏差值。

2 结果

2.1 RIS 信号峰的确定

调整对照组和 50 Gy 照射组 EPR 波谱图, 使两图的 g 标峰重叠 (图 1)。由图 1 可见, 对照组骨的 EPR 波谱呈单峰 (经计算该信号峰 $g=2.0040$), 为股骨 EPR 本底信号 (background signal, BKS)。50 Gy 照射组小鼠股骨的 EPR 波谱呈现双峰, 除了本底峰外, 还出现一个信号峰 (经计算 $g=2.0025$), 该信号峰即小鼠股骨的 RIS 峰。图中箭头指出均为相应信号峰的峰尖, 计算信号峰 g 值则需要结合峰尖和峰谷的磁场值计算得出。

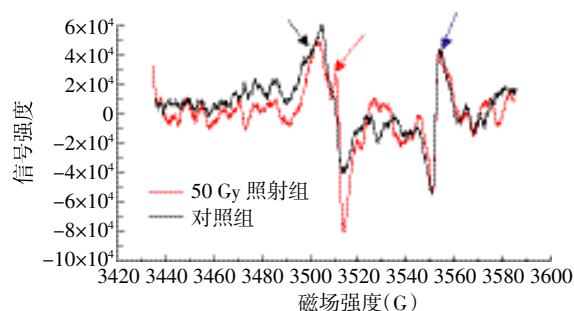


图 1 对照组与 50 Gy 组小鼠股骨电子顺磁共振波谱图 图中, 蓝色箭头所指为 g 标峰峰尖, 黑色箭头所指为 BKS 信号峰峰尖, 红色箭头所指为 RIS 信号峰峰尖。BKS 表示本底信号; RIS 表示辐射诱导信号

Fig.1 Electron paramagnetic resonance spectro gram of control check and 50 Gy-irradiated group

2.2 样品方向对检测结果的影响

同一份股骨样品在不同的检测方向下其 EPR 波谱信号强度也不同 (表 1), 相对标准偏差值在

7.3%至15%之间,即装样方向对检测结果会产生影响。因而检测时,每份样品检测3个方向并取平均值,可以尽量降低装样方向引起的偏差。

表1 不同检测角度电子顺磁共振检测结果的差异

Table 1 Differences of electron paramagnetic resonance results in different angles

样品序号	装样角度			均值	相对标准偏差(%)
	0°	120°	240°		
1	10 593	9187	9625	9802	7.3
2	9430	9815	11 664	10 303	11.6
3	11 112	10 188	8229	9843	15

2.3 样品干燥程度对检测结果的影响

表2给出不同干燥程度下一份骨样品信号和g标样信号的强度。可见,同一份样品自然干燥18 h时质量较大,股骨本底信号强度和g标样信号强度均较低。伴随干燥时间增加,水份减少,样品质量逐渐下降,信号强度逐渐增强。60℃鼓风干燥7 h后,样品质量下降了6.2 g,样品信号强度增加了6072, g标样信号强度增加了6465。之后继续延长干燥时间,样品质量趋于恒定,样品和g标的信号强度也都趋于稳定。

表2 不同干燥条件下骨样品信号强度与g标样信号强度

Table 2 Signal intensity of bone and g-standard in different dry-conditions

干燥条件	质量(mg)	股骨本底信号强度	g标样强度
自然干燥 18 h	80.7	3492±986	5546±190
60℃干燥 2 h	75.8	6648±1419	10 316±917
60℃干燥 7 h	74.5	9564±2135	12 011±1380
60℃干燥 12 h	75.0	7869±1529	11 413±553

2.4 微波功率对检测结果的影响

图2所示为在不同微波功率下,同一份样品RIS强度的变化。随着微波功率的增加,骨的RIS强度逐渐增加,当微波功率为50 mW时,小鼠股骨RIS达到最大值;当功率大于50 mW, RIS强度随微波功率的增加而逐渐下降。

2.5 叠加次数对检测结果的影响

叠加20次时,10 Gy和50 Gy照射组样品信号强度与对照组比分别增加了10 149和29 419;叠加50次后,10 Gy和50 Gy照射组样品信号强度与对照组比分别增加了31 012和67 309(表3)。可见,增加叠加次数可以提高检测信号强度。

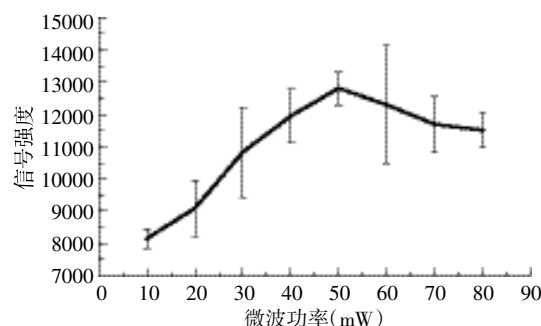


图2 不同微波功率下50Gy照射组小鼠骨辐射诱导信号强度

Fig.2 Radiation induced signal intensity of 50 Gy-irradiated group in different microwave power

表3 20次和50次叠加样品信号强度

Table 3 Signal intensity of 20 scans and 50 scans

照射剂量(Gy)	20次叠加		50次叠加	
	信号强度	与0 Gy比增加值	信号强度	与0 Gy比增加值
0	18 570	—	39 425	—
10	28 022	9452	70 437	31 012
50	47 989	29 419	106 734	67 309

3 讨论

目前,牙釉质EPR技术已经较为广泛地应用于辐射事故的剂量重建中,其探测范围在50 mGy~100 Gy之间具有良好的线性关系^[6]。骨与牙釉质具有相同的化学成份,仅在组成比例上有所不同,利用骨组织也可以进行辐射剂量学研究。

本研究检测得到小鼠股骨皮质本底信号g=2.0040,辐射诱导信号g=2.0025,与刘青杰等^[7]报道的结果基本一致。本底信号与RIS部分重叠,导致当照射剂量较小时,RIS会被本底信号掩盖而难以区分。

为提高检测的灵敏度,主要从骨样品和仪器检测参数两个方面入手。因为水对微波具有较强的吸收作用,所以在骨样品制备方面,主要考虑了样品含水量对信号强度的影响。本实验发现,样品含水量的轻微改变会对检测结果产生很大的影响,骨本身是含水量较少的生物组织,当样品60℃干燥7 h时,样品质量仅下降了7.7%,而EPR信号强度却增加了116.6%。此外,样品含水多时,不仅会降低样品信号强度,而且还会对g标样的强度产生干扰,不利于对信号强度进行定量检测,所以进行EPR检测的骨样品一定要进行干燥,这与刘青杰等^[7]、赵永富等^[8]的实验结果是一致的。检测不同

干燥程度下样品信号强度发现, 60℃鼓风干燥 7 h 以上, 样品含水量趋于恒定, 样品信号强度和 g 标信号强度也趋于稳定, 此时骨样品 EPR 信号受水的影响较小。

每一种顺磁信号都对应 1 个特征的饱和功率, 因而通常情况下, 对 EPR 信号的检测应使微波功率略小于目标信号的饱和功率^[9], 从而获得最大的目标信号强度, 并减弱其他杂质信号的干扰。所以在选择仪器检测参数时, 首先分析微波功率对信号强度的影响, 以确定骨 RIS 的饱和功率。检测不同功率水平下 50 Gy 照射组样品的信号强度发现, 在 50 mW 微波功率下, 样品 RIS 达到峰值, 得出骨 RIS 饱和功率为 50 mW, 因而骨 EPR 检测采取 30~50 mW 的微波功率较为适宜。

在确定好微波功率后, 对干燥好的照射组样品进行检测发现, 样品 RIS 强度仍然很低。为了降低噪音, 提高信噪比, 增加叠加次数是最简便易行的方法。将对照组和照射组样品分别叠加 20 次和 50 次检测发现, 多次叠加后照射组信号强度比对照组明显增加。因而通过增加叠加次数, 信号强度得到了提高, 但是增加叠加次数的同时扫描时间也会延长, 本实验叠加 20 次检测一份样品耗时约 210 min, 叠加 50 次耗时约 500 min, 因而扫描次数也不宜过大。

同时, 由于骨段装样时样品均一性较差, 因而不同的检测方向下样品信号强度相对标准偏差为 7.3%~15%。将股骨研磨呈粉末状可能会使样品均一性得到改善, 但是 Ciesielski 等^[10]提出机械研磨会导致骨中本底信号增加 2~4 倍。本研究采用骨段样品多方向测量的方法, 以减弱样品均一性对检测结果的影响。

综上所述, 适当的样品预处理和检测参数设定可以提高骨 EPR 检测的灵敏度。但是, 应用本研究所建立的检测方法, 在较低剂量时得到的小鼠骨

RIS 强度仍然较弱, Wieser 等^[11]提出利用二亚乙基三胺处理去除骨中的有机成分, 可以进一步提高检测的灵敏度, 因而骨 EPR 检测的灵敏度仍有望进一步提高。

参 考 文 献

- [1] Romanyukha AA, Regulla DF. Aspects of retrospective ESR dosimetry (invited paper)[J]. Appl Radiat isot, 1996, 47(11-12): 1293-1297.
- [2] Shengli N, Pascal D, Hajo Z. Approaches to attribution of detrimental health effects to occupational ionizing radiation exposure and their application in compensation programmes for cancer[M]. Geneva: ILO, 2010: 66-67.
- [3] Caracelli I, Terrile MC, Mascarenhas S. Electron spin resonance dosimetric properties of bone[J]. Health Phys, 1986, 50(2): 259-263.
- [4] 吴可, 孙存普, 汤立达, 等. ^{60}Co γ 射线照后骨组织 ESR 信号特性及与照射剂量的关系[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1993, 15(4): 229-231.
- [5] 陈英, 周平坤, 吴可, 等. 放射损伤生物剂量估算技术的研究现状[J]. 辐射防护, 2008, 6: 385-391.
- [6] 范亚光. 牙釉质 ESR 回顾性剂量技术与剂量重建[J]. 国外医学·放射医学核医学分册, 2002, 26(2): 90-92.
- [7] 刘青杰, 杨英杰, 陈金娣, 等. ^{60}Co γ 射线急性慢性照射对小鼠骨、牙和毛发 ESR 信号的影响[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2003, 21(3): 198-201.
- [8] 赵永富, 哈益明, 刘婷, 等. 电子自旋共振波谱法检测含骨类食品的初步研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2007, 25(5): 279-282.
- [9] 赵保路. 电子自旋共振技术在生物和医学中的应用[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2009: 13-14.
- [10] Ciesielski B, Krefft K, Penkowski M, et al. Effects of water treatment and sample granularity on radiation sensitivity and stability of EPR signals in X-ray irradiated bone samples[J]. Radiat Prot Dosimetry, 2014, 159(1-4): 141-148.
- [11] Wieser A, Haskell E, Kenner G, et al. EPR dosimetry of bone gains accuracy by isolation of calcified tissue[J]. Appl Radiat Isot, 1994, 45(4): 525-526.

(收稿日期: 2015-03-16)