

FISH方法在辐射事故评介中的应用

王明明¹ 陈英² 段志凯³ 郑斯英¹ 张淑贤³ 徐洪兰³

¹(苏州大学放射医学与公共卫生学院 苏州 215007)

²(北京放射医学研究所 北京 100850)

³(中国辐射防护研究院 太原 030006)

摘要 为研究辐射远后危害效应,探讨荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization, FISH)方法用于剂量重建的可行性。同时,用FISH、常规染色体畸变、G显带、细胞松弛素B(Cytochalasin B, CB)微核和次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase, HPRT)基因位点突变分析方法对3名事故受照射者(F、S、Y)进行了照射后7年半的生物学终点检测,并对宫内受照射者S的生长发育指标进行了测量。FISH方法检测易位的结果显示,在观察足够数量细胞时用易位率估算的生物剂量与照射后模拟的物理剂量非常吻合,证明该方法可用于剂量回顾和剂量重建。从FISH、常规染色体畸变及G显带分析结果发现,受照射7年半后受检者体内仍有明显的染色体畸变,且与受照射剂量呈现良好的剂量依赖性。实验结果还表明,宫内受照射者S出生后的生长发育状况基本正常。

关键词 荧光原位杂交,常规染色体畸变,事故受照射者,剂量估算

中图分类号 R811.5

随着核能和辐射防护事业的发展,人们对各种辐射危害极为重视,先后发展了多种辐射损伤检测技术,用来估算事故受照射者的剂量或辐射远后危害效应。但是,这些技术都有一定局限性,如常规染色体畸变所检测的双着丝粒体和着丝粒环会随时间推移而递减,故不适宜于照射后远期剂量重建和慢性小剂量照射的剂量估算。近十几年发展起来的荧光原位杂交技术(FISH)是用特异探针检测固定在玻片上染色体所含特有核苷酸序列的一种高度敏感方法^[1],它不仅能快速检测急性照射后的染色体畸变,而且还适于稳定性染色体畸变的检测,可满足剂量重建和辐射远后危害效应评估的要求。为此,用FISH及常规染色体畸变分析、G显带等方法对忻州事故受照射者7年半后的细胞遗传学改变进行了随访观察。

1 材料和方法

1.1 样品采集

1992年11月19日山西发生了一起⁶⁰Co源所致的意外事故^[2]。事故中,捡源者及其父兄因诊断不明相继在两—三周内死亡,其岳父Y及其妊娠4

个半月的妻子F同时受到不同程度照射。照射后40d,卫生部工业卫生实验所白玉书等^[3],用染色体畸变分析诊断F受照射剂量为2.30Gy,患急性中度骨髓型放射病;Y的受照射剂量为0.63Gy,为过量受照射。两者经北京医科大学人民医院治疗恢复健康,F于1993年3月24日顺利分娩一女婴S,出生时婴儿身高、体重、头围和胸围均比正常值低3%。事故7年半后,对3名受照射者进行血样采集并检测S的生长发育指标。

1.2 宫内受照射者的生长发育指标检测

分别用普通皮尺及家用体重计测量宫内受照射者S的身高、头围、胸围和体重值。

1.3 细胞遗传学观察

1.3.1 标本制备 抽取3名受检者外周血,进行血常规分析。同时,以抗凝血0.3mL/瓶加入到含20%的小牛血清(杭州四季青生物工程研究所)及适量植物血凝素(PHA)(上海市医学化验所)的5mL RPMI 1640培养液(美国Gibco)中,培养开始时加入终浓度为0.015 μ g/mL的秋水仙碱(上海卫辉化学试剂厂),37 $^{\circ}$ C培养52h,离心收集淋巴细胞,分

国防科工委基金(Y5573262)资助

第一作者:王明明,男,1966年9月出生,2001年在中国辐射防护研究院获硕士学位,放射医学专业,助理研究员,现攻读苏州大学放射医学博士

收稿日期:初稿 2003-09-03,修回 2003-10-23

别进行 FISH、常规染色体、G 显带、微核、HPRT 基因位点突变检测的标本制备。微核、HPRT 按本实验室建立的方法进行^[4]。FISH 具体操作按产品说明书进行。染色体常规及 G 显带方法见文献[5]。

1.3.2 畸变分析 染色体常规分析根据人类染色体数目、着丝点位置及各条染色体固有长度为标准来判别畸变与否，G 显带根据人类染色体数目及各条染色体固有带型为标准来判别是否发生畸变。FISH 方法制备的标本用 Nikon 公司 EX600 荧光显微镜分别在绿、蓝色激发光下观察。在蓝色激发光下正常细胞中可见 1、2、4 号染色体共 6 条，显示为黄绿色，其它染色体均被染成红色。如发现显示探针信号且具着丝粒的染色体超过 6 条则为数目畸变，若六条中发现一条染色体显示两种不同颜色且只有一个着丝粒则为染色体易位，若该双色染色体有两个着丝粒则为双着丝粒体，将上述畸变用数码相机记录并输入计算机保存。每个畸变均经两名以上观察者确认。

1.3.3 结果统计 记录染色体常规及 G 显带法分析所得的各种畸变。对 FISH 法将 1、2、4 号全染色体与其它染色体发生易位或其它各种畸变的情况记录下来，用 Lucas 等^[6]提出的全基因组畸变转换公式： $F_G = F_p / 2.05 f_p (1 - f_p)$ (F_G 、 F_p 和 f_p 分别为全基因组畸变率、FISH 检测的染色体畸变率和所选全染色体探针在全基因组中所占份额) 计算全基因组畸变率。

1.4 剂量估算

选用中国辐射防护研究院，建立的双着丝粒体 + 着丝粒环畸变的剂量，估算公式 $Y = (0.99 \pm 0.36) D + (2.82 \pm 0.38) D^2$ 进行剂量估算。

2 结果

2.1 宫内受照射者出生后生长发育状况

宫内受照射者身体发育指标的测量结果见表 1^[7]。

Table 1 The comparison of growth and development index between normal child and the irradiated subject in uterus

Duration	Height / cm		Weight / kg		Circumference of head / cm		Circumference of breast / cm	
	NR	DV	NR	DV	NR	DV	NV	DV
Birth	46.4—52.4	44.0	2.5—3.7	2.0	33.6	30.0	32.2	28.0
2m	51.5—61.6	53.0	3.8—6.3	4.2	37.8	34.5	37.3	39.0
4m	56.9—65.2	60.0	4.7—7.6	5.5	39.6	39.0	39.0	42.0
14m	68.0—79.2	78.0	7.4—11.0	9.5	44.9	42.3	44.3	47.0
3.8y	88.3—105.1	96.0	11.1—17.5	13.0	47.9	45.0	50.6	50.0
7.2y	106.2—128.7	123.0	15.5—25.1	19.0	49.3	47.0	55.5	54.5

Note: NR, DV and NV stand respectively for normal range, determination value and normal value. The determination value from birth to 3.8y were obtained in an earlier study, and the normal value from Reference [7].

由表 1 可知，出生时 S 身长、体重、头围和胸围均低于正常值，2 个月以后各项指标均在正常范围内，至 7.2 岁时，除头围始终略低于正常均值外，其余各项指标均处在正常范围内。

2.2 血常规检测

3 名事故受照射者外周血常规分析结果见表 2。

Table 2 The conventional analysis of peripheral blood of the victims

Victim	Hb(g/L)	RBC($10^{12}/L$)	Pts ($10^9/L$)	WBC($10^9/L$)	S / %	L / %
F	130	4.1	150	6.1	85	15
S	120	4.1	120	7.6	75	25
Y ⁽¹⁾	140	5.87	—	3.0	53	47

⁽¹⁾Not to be detected in time, Hb, RBC, Pts, WBC, S and L stand respectively for the hemoglobin contents, numbers of the white blood cells, red blood cells and platelets, the neutrophile granulocyte and the lymphocyte ratios.

由表 2 可知，除 F 的中性粒细胞比例略高外，Y 和 S 的各种血液常规分析指标均处于正常值范围内。Y 除白细胞总数偏低外其余各项指标也在正常值范围内。

2.3 细胞遗传学及 HPRT 基因位点突变检测

2.3.1 常规染色体畸变分析 3 名受照射者外周血淋巴细胞常规染色体畸变分析结果见表 3。

Table 3 The results of conventional chromosome aberration analysis

Victim	Cell number	Dic	r	Ace	t	Del	Rac / %	Tra / %
F	700	32	5	15	12	2	7.14	9.43
S	700	10	1	3	2		2.00	2.28
Y	700	7	1	5	4		2.00	2.28
Control	1000	3	1	3				0.34

Dic, r, ace, t, Del, Rac, Tra and Control stand respectively for dicentric, ring chromosome, acentric fragment, translocation, deletion, the ratio of aberrant cells, total ratio of aberration and normal control value in our laboratory.

由表 4 可见，3 名事故受照射者的染色体畸变率均以 F 为最高，S 和 Y 次之显示出损伤程度与受照射剂量之间的相关性。

2.3.2 微核和 HPRT 分析 3 名受照射者外周血淋巴细胞微核及 HPRT 分析结果见表 4。

Table 4 The analysis results of chromosome aberration, micronuclei and HPRT

Victim	Rra / %	Rm(mr) (%)	rHPRT / ‰
F	9.43	11.3 (9.0)	0.6155
S	2.28	8.0 (7.6)	0.5048
Y	2.28	13.0 (12.3)	0.2409
Control	0.34	4.0	0.1628

Rra, rm(mr), rHPR and Control stand respectively for the ratio of chromosome aberration, the ratio of micronuclei (micronuclei cell), the ratio of HPRT gene locus mutation and normal control value in our laboratory.

由表 4 可见，HPRT 基因位点突变率以 F 为最高，S 和 Y 次之，显示出损伤程度与受照剂量之间的相关性。微核结果均在正常值范围内，无明显的

剂量效应关系。

2.3.3 G 显带分析 3 名受照射者的 G 显带组型分析结果见表 5。

Table 5 The results of G-banding karyotyping in the victims

Victim	Cell number	t	dic	ace	r	Super-diploid	Tra / %	Ttr / %
F	30	5		3		1(60)	26.67	16.67
S	27						0	0
Y	31	6	2	1			29.03	19.35

Tra, and Ttr stand for total ratio of chromosome aberration and total translocation ratio, respectively.

由表 5 可知，每例受检者 G 显带分析 30 或 31 个细胞核型的结果，S 未发现畸变，F 与 Y 间无显著差异。

2.3.4 FISH 检测 3 名受照射者的 FISH 检测结果见表 6。

Table 6 The results of chromosome translocation detected by FISH method

Victim	Cell number	t(1, 2, 4 ⁽¹⁾)	Fp / %	F _G / %
F	582	14(1, 2, 11)	2.40	6.74
S	813	1(0, 0, 1)	0.12	0.34
Y	1017	8(3, 4, 1)	0.78	2.20

⁽¹⁾ 1, 2, 4 mean whole chromosome probe number. $F_G = Fp/2.05fp$ (1-fp), fp=22.44%^[8]

Table 7 Estimated doses of three victims

Victim	Cell number	"Dic+r" ratio	dose at 40d		Dose at 7.5y	
			"Dic+r"	Physical	FISH	"Dic+r"
F	700	37(5.29)	2.30(2.07-2.50) ²	2.00 ³	1.38	1.21 ¹
S	700	11(1.57)	—	—	0.21	0.45 ¹
Y	700	7(1.00)	0.63(0.43-0.80) ²	0.73 ³	0.73	0.06 ¹

1, Dose estimated by "Dic+r" At 7.5 year after the accident. 2 and 3, Estimated dose and dose detected by physics method at 40 day after the accident, from Reference [3]. —, Not detected

由表 7 可见, 在事故发生 7 年半后, 通过常规染色体畸变发现, 所测得的双着丝粒体和着丝粒环 (简称双 + 环) 来估算的剂量值低于事故当时, 所测物理剂量。

3 讨论

王家锦等^[2]曾报道该事故受照射者 F 受照射后 4 个月时检测到染色体畸变率为 36%, 而所生的婴儿未见染色体畸变, 但其姐妹染色单体互换率高于其母 F 及正常对照。本实验结果表明, 事故后 7 年半经过自我修复和调适, 各种血细胞的增殖能力均已恢复正常 (见表 2)。而外周血淋巴细胞常规染色体畸变分析、G 显带、微核、HPRT 基因位点突变分析及 FISH 检测结果表明, 经过 7 年半辐射诱发的染色体损伤、基因突变仍未得到完全修复。

微核分析结果表明, 随着时间的推移, 微核所反映的染色体断片随着细胞分裂次数的增多而逐步丢失, 已经失去了作为生物剂量计来估算剂量的意义。HPRT 分析结果表明, 尽管已历经 7 年半, HPRT 基因位点突变频率仍与受照射剂量间存在一定相关性。但由于个体及年龄差异, 用于个体剂量重建和剂量回顾人仍有一定局限性。

已有资料表明^[9], ¹³⁷Cs γ 射线源事故受照射剂量 1Gy 以上者, 照射后 100d 大部分人的双 + 环畸变已降至最初频率的 50% 左右, 15 个月后降到 20%, Little^[10]根据萨尔瓦多 ⁶⁰Co γ 射线事故受照射

由表 6 可知, 由 FISH 检测到的易位和基因组易位率均为 F 最高, Y 次之, S 最低。

2.4 生物剂量估算

3 名受照射者的“双+环”生物剂量估算结果见表 7。

者的远期观察, 认为“双 + 环”畸变在照射后 143d 下降 50%; 比较白玉书等^[3]和本实验结果可知, 历经 7 年半, 受照射 2.3Gy 的 F 的“双 + 环”畸变下降至初始值的 11.83%, 受照射 0.63Gy 的 Y 的“双 + 环”畸变降为原值的 20%。根据“双 + 环”估算得到的剂量值分别为 F=1.21, Y=0.06, 此结果小于照射后 40d 的估算值。这说明随着时间的推移, 尤其在照射后远期“双 + 环”畸变的数值下降较多, 用来进行剂量回顾误差较大。但在事故发生远期, 可根据“双 + 环”随时间递减的模式方程, 测算出一个修正系数, 将“双 + 环”生物剂量值乘以该修正系数即可估算出事故发生当时的准确剂量值, 而“双 + 环”随时间递减的模式方程尚有待于通过大量研究来建立。至于 7 年半后 Y 的剂量估算值特别低, 可能因 Y 在事故发生时所受剂量较小, 需计数较多细胞才能准确估算剂量, 但其为老年人, 其淋巴细胞转化增殖能力弱, 无法计数 1000 以上细胞而降低了剂量估算的准确性所致。

从以上的结果可知, 用“双 + 环”这类非稳定性染色体畸变作剂量重建存在一定误差, 而稳定性染色体畸变如易位、倒位和缺失等, 则相对稳定; 且实验证实易位率随剂量增长的规律符合线性平方模式 $Y = c + aD + \beta D^2$ ^[11], 可用于剂量回顾和剂量重建。常规染色法通过测量染色体长度和着丝粒位置来检测易位, 只能检出明显的非对称性易位。我们通过常规染色体组型分析测得 3 名事故受照射者的

易位率分别为 $F = 1.71\%$ 、 $S = 0.29\%$ 、 $Y = 0.57\%$ 。G 显带方法虽能准确检测易位,但技术要求高,工作量大且费时费力。Pinkel 等^[12]于 1986 年将 FISH 方法引入辐射剂量学领域,使得易位的检测变得快捷方便。我们将用 FISH 对 3 名事故受照射者的检测结果与同时用 G 显带法所测结果作了比较,发现两种方法所得结果不完全一致。用 FISH 法观察细胞最多(1017)的 Y 的易位率为 0.78%,换算成全基因组易位率为 2.20%。根据国内外多数的研究得出的辐射诱发双着丝粒和易位两种畸变率基本一致的结论^[10],加之本实验室尚未建立自己的易位剂量效应曲线,所以套用本室建立的由“双+环”畸变率估算剂量的公式 $Y = (0.99 \pm 0.36)D + (2.82 \pm 0.38)D^2$ 求得 Y 的生物剂量为 0.73Gy,正巧与事故发生后用物理方法模拟测得的剂量非常吻合(见表 7),也与事故发生后 40d 时白玉书等^[3]用双+环估算的剂量比较接近;而 F 由于观察细胞数较少,根据同样步骤求得的生物剂量为 1.38Gy,与先前模拟测得的剂量数值间差异较大,这也说明“双+环”剂量效应方程式不一定完全适合易位的剂量效应关系,简单套用“双+环”剂量效应曲线方程估算剂量可能存在一定误差。同时我们已用 Lucas^[13]以 1、2、4 号全染色体探针进行 FISH 实验所建立的易位率剂量效应曲线方程来对本实验结果进行估算,所得剂量明显偏低。这提示,以 FISH 方法检测的易位估算生物剂量必须计数足够数量的细胞。另外,用 FISH 和 G 显带方法检测易位结果的不一致也与 G 显带组型分析细胞数较少有关。

综上所述,由于“双+环”畸变随时间推延而递减,必须经过修正,否则不能直接用于剂量回顾和剂量重建。微核反映的染色体断片随时间推移而很快丢失,不适于用于剂量回顾和剂量重建。HPRT 基因位点突变检测用于群体危害评价有一定意义,目前尚不能用于个体剂量回顾和剂量重建。FISH 方法因能快速、灵敏、准确地检测稳定性染色体畸变而可用于剂量回顾和重建,但该方法要求必须观察足够数量的细胞才能精确测出事故受照射者的易位率,从而准确估算其受照射剂量。

致谢 本实验得到卫生部工业卫生实验所陈德清教授和王春燕、张伟等老师的大力支持,在此表示衷心的感谢。

参考文献

- 1 王继先,金瑾珍编著.放射生物剂量学,北京:原子能出版社,1997.97-108
WANG Jixian, JIN Cuizhen. Radiation Biodosimetry, Beijing: Atomic Energy Press, 1997. 97-108
- 2 王家锦,穆莹,王山米等.中华放射医学与防护杂志,1995,15(2):80-82
WANG Jiajin, MU Ying, WANG Shanmi *et al.* Chin J Radiol Med Prot, 1995, 15(2): 80-82
- 3 白玉书,黄一龙,关树荣.中华放射医学与防护杂志,1995,15(2):85-87
BAI Yushu, HUANG Yilong, GUAN Shurong. Chin J Radiol Med Prot, 1995, 15(2): 85-87
- 4 段志凯,徐洪兰,陈英等.职业医学,1999,26(2):4-6
DUAN Zhikai, XU Honglan, CHEN Yi *et al.* Occup Med, 1999, 26(2): 4-6
- 5 刘权章主编.人类染色体方法学,北京:人民卫生出版社,1992.238-239
LIU Quanzhang. The Methodology of Human Chromosome, Beijing: People Hygiene Press, 1992. 238-239
- 6 Lucas J N. Int J Radiat Biol, 1992, 62(1): 53-63
- 7 中国医科大学和上海第一医学院主编.儿科学.人民卫生出版,1979.528-529
China Medical University and Shanghai First Medical College. Paediatrics, People Hygiene Press, 1979. 528-529
- 8 Morton N E. Proc Natl Acad Sci, USA1991, (88): 7474-7476
- 9 金瑾珍,刘秀林.中华放射医学与防护杂志,1993,13(1):9-10
JIN Cuizhen, LIU Xiulin. Chin J Radiol Med Prot, 1993, 13(1): 9-10
- 10 Little Field L G Prog Clin Biol Res, 1991, 372: 387-397
- 11 王晓琳.国外医学:放射医学核医学分册,1999,23(1):30-37
WANG Xiaolin. Foreign Medicine: Radiological Medicine and Nuclear Medicine, 1999, 23(1): 30-37
- 12 Pinkel D. Quant Biol, 1986, 51(Pt 1): 151-157
- 13 Lucas J N. Health Physics, 1995, 68(6): 761-762

Application of FISH method in evaluation of a radiation accident

WANG Mingming¹ CHEN Ying² DUAN Zhikai³ ZHENG Siying¹
ZHANG Shuxian³ XU Honglan³

¹ (Radiation Medicine and Public Health School, Soochow University, Suzhou 215007)

² (Beijing Institute for Radiation Medicine, Beijing 100850)

³ (China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006)

ABSTRACT To study effects of long term radiation hazard and explore the possibility of the application of chromosome aberration and FISH method to dose retrospection and reconstruction, FISH method was used to detect biological destination of three accidental victims at 7.5 years after Xinzhou accident. In the meantime, conventional chromosomal aberration, G-banding, CB micronuclei and HPRT gene locus mutation assays were performed. In addition, the growth and development of Victim S, who suffered the radiation accident as a fetus, were examined. And comparison of dose estimations between chromosome aberration and FISH method of the victims was conducted. The results demonstrated that the biological dose estimated by translocation frequency is very close to the imitated dose by the physical way after the accident if enough cells are observed. It is suggested that FISH may be applied to dose retrospection and reconstruction. Obvious chromosomal aberrations still existed in the examined victims at 7.5 years after the accident and displayed good dose correlative dependence. The results also showed that the growth and development of S were basically normal after birth.

KEYWORDS Fluorescence in situ hybridization (FISH), Conventional chromosome aberration, Accidental victims, Dose estimation

CLC R811.5