

文章编号:1004 - 616X(2002)02 - 0075 - 05

·论著·

## 应用 FISH 技术对我国早期从事医用 X 线工作者的细胞遗传学评价

孙元明,李 进,王 芹,唐卫生,王知权

(中国医学科学院、中国协和医科大学放射医学研究所效应室,天津 300192)

**【摘要】**目的:对受到长期、低剂量率照射的我国早期从事医用 X 线工作者辐射损伤的远期效应进行细胞遗传学观察和评价。方法:用 4 号和 7 号全染色体探针和荧光原位杂交技术,分析 25 名早期 X 线工作者和 10 名对照者外周血淋巴细胞染色体畸变,并用 Giemsa 染色验证。结果:直观地表现出正常靶染色体和多种畸变。X 线工作者的易位占其染色体总畸变的 84 %;其他各种畸变率分别为插入(Ins)1.9 %、双着丝粒(Dic)4.5 %、无着丝粒断片(Ace)9.7 %;X 线工作者的染色体易位率和总畸变率均明显高于对照组 ( $P < 0.005$ )。结论:早期医用 X 线工作者外周血淋巴细胞的染色体畸变以易位为主。

**【关键词】**荧光原位杂交;X 线工作者;染色体畸变;淋巴细胞

中图分类号:R144.1 文献标识码:A

### CYTOGENETIC EVALUATION OF LONG TERM IRRADIATION EFFECT ON WORKERS EARLY ENGAGED IN X-RAY MEDICINE IN CHINA BY FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION

SUN Yuan-ming, LI Jin, WANG Qin, TANG Wei-sheng, WANG Zhi-quan

(Department of effective, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peiking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

**【Abstract】 Purpose :** To evaluate the cytogenetic effect of irradiation on the workers, early engaged in X-ray medicine in China, who had been exposed to X-ray at low dose rate for a long time (22-44 years). **Method :** The peripheral lymphocyte chromosome aberrations from 25 medical X-ray workers and 10 controls were analyzed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with probes of chromosomes 4 and 7 and verified with Giemsa staining. **Results :** The normal target chromosomes and their aberration were directly exhibited in morphology. The chromosomes translocations of X-ray workers were 84 % of all chromosome aberrations in this group. Ins (insertion), Dic (dicentric) and Ace (acentric fragment) were 1.9 %, 4.5 % and 9.7 %, respectively. The frequencies of chromosome translocation and total aberrations in X-ray workers were higher than that of the control group ( $P < 0.005$ ). **Conclusion :** The peripheral lymphocyte of medical X-ray workers exists chromosomes aberrations, the most part of which are translocations.

**【Key words】** FISH; X-ray worker; chromosome aberration; lymphocyte

低剂量电离辐射对人体的损伤主要表现在体细胞 DNA 靶分子上:引起 DNA 双链的断裂和随后的错误修复;引起中期染色体畸变,导致抑癌基因的缺失和原癌基因的激活性突变。突变的单个细胞失去

收稿日期:2001-09-30;

修订日期:2001-11-27

基金项目:日本体质医学会基金和中国医学科学院中国协和医科大学基金(952060)

作者简介:孙元明(1962-),男,辽宁省鞍山市人,硕士,副研究员,主要从事辐射损伤的细胞生物学研究。

正常增殖控制,形成克隆化生长。因而对职业受照人员染色体损伤的长期观察,有助于人们认识辐射致癌的发生、发展。染色体畸变分析是应用最早,发展最为成熟,已为人们广泛认可的一种方法,但是随着荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 技术在辐射领域的广泛应用,越来越显示出其优越性。直观清晰的图像,灵敏,对分裂相要求不严,对阅片者技术性要求不高,高效快速,特别对稳定性畸变的快速检出而为人们关注。我们用 FISH 技术探讨了我国早期医用 X 线工作者染色体畸变,为人们认识低剂量辐射远后效应提供依据。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 医院中从事医用诊断 X 线工作者 25 名,男性,参加工作时间为 1952~1977 年,1985 年前均没有个人剂量记载,平均放射工作工龄为 32.7 年(22~44 年)。对照人员为医院中同性别,同时期工作,没有接触 X 线的工作人员 10 名,平均工龄为 31.3 年(13~41 年)。

1.2 人外周血淋巴细胞染色体标本制备 按本实验室的常规方法<sup>1</sup> 进行。

1.3 荧光原位杂交 按文献<sup>2</sup> 进行,简述如下。全染色体探针 4 号和 7 号(美国 Oncor 公司产品)在 72 变性 10 min,37 水浴中退火 1.5~2 h。有中期细胞染色体的载玻片在已放入 37 水浴的 2×SSC 中老化 30 min,75%、85%和 100%乙醇中脱水,72 70%甲酰胺(甲酰胺/2×SSC,甲酰胺为美国 Gibco 产品)变性液变性 2 min,-20 的 75%、85%和 100%乙醇快速停止变性。将上述探针加在有样品的载片上,加盖玻片,封口,37 过夜杂交。洗片用 43 50%甲酰胺/2×SSC 15 min,60 0.1×SSC 15 min 和常温下 PN 缓冲液。荧光抗体(美国 Oncor 公司产品)进行连接和放大。复染用抗退色液和碘化吡啶(PD)各 10 μl。

1.4 FISH 结果观察和 Giemsa 复看 在盖玻片范围(22 mm×22 mm)全视野的中期进行观察。去盖玻片,待荧光物质淬灭后,Giemsa 染色。根据坐标查找

异常染色体,确定染色体的畸变类型。

1.5 染色体畸变的识别标准 用 Ni Kon 荧光显微镜在 100×视野中检查中期细胞,用组滤片可同时观察异硫氰基荧光素(FITC)和 PI 荧光。正常中期中有 2 对绿色荧光染色体,根据其大小和着丝粒的位置可区别为 4 号和 7 号染色体。双色(绿色/红色)染色体上有 1 个着丝粒(用 Giemsa 校正)为完全易位、不完全易位或插入,均计为 1 次畸变,双色染色体有 2 个着丝粒者,计为双着丝粒;双色或只带绿色荧光无着丝粒,是无着丝粒断片,如伴有易位或双着丝粒者,只计易位或双着丝粒,无着丝粒断片不单独计数。

1.6 记录 按 PAINT (The Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology) 分类法<sup>3</sup> 记录。在标有各种畸变的英文字母旁有一括号,括号内英文字母用来说明与着丝粒的相对位置染色体的着染情况。字母 A 和 a 代表没有复染部分,有着丝粒用 A,无着丝粒用 a。字母 B 和 b 代表染色体有彩涂部分,有着丝粒用 B 表示,无着丝粒用 b 表示。

1.7 显微摄影 在 Nikon 荧光显微镜下,经坐标找到异常的染色体用 100×的油镜观察,并用 Kodak Ektachrome400EPL 彩色反转胶卷照相记录。

## 2 结果

2.1 形态学分析 FISH 方法能直观地表现医用 X 线工作者 4 号和 7 号染色体。正常有 4 个绿色荧光,根据染色体大小和着丝粒的位置判断出 4 号和 7 号染色体(见图 1A)。4 号和 7 号染色体畸变有完全性相互易位、不完全性相互易位、双着丝粒、无着丝粒断片和插入。图 1B 的中期细胞中有 5 个绿色荧光点,辨认出 7 号染色体与非靶染色体发生完全性互换易位,经 Giemsa 染色得到确认。图 1C 表现 1 个 7 号染色体有着丝粒部分与非靶染色体形成的双着丝粒和该染色体其他部分与非靶染色体形成不完全性易位。图 1D 表现 1 个 4 号染色体有着丝粒部分与非靶染色体形成双着丝粒和该染色体其他部分与非靶染色体形成不完全性易位和无着丝粒断片。

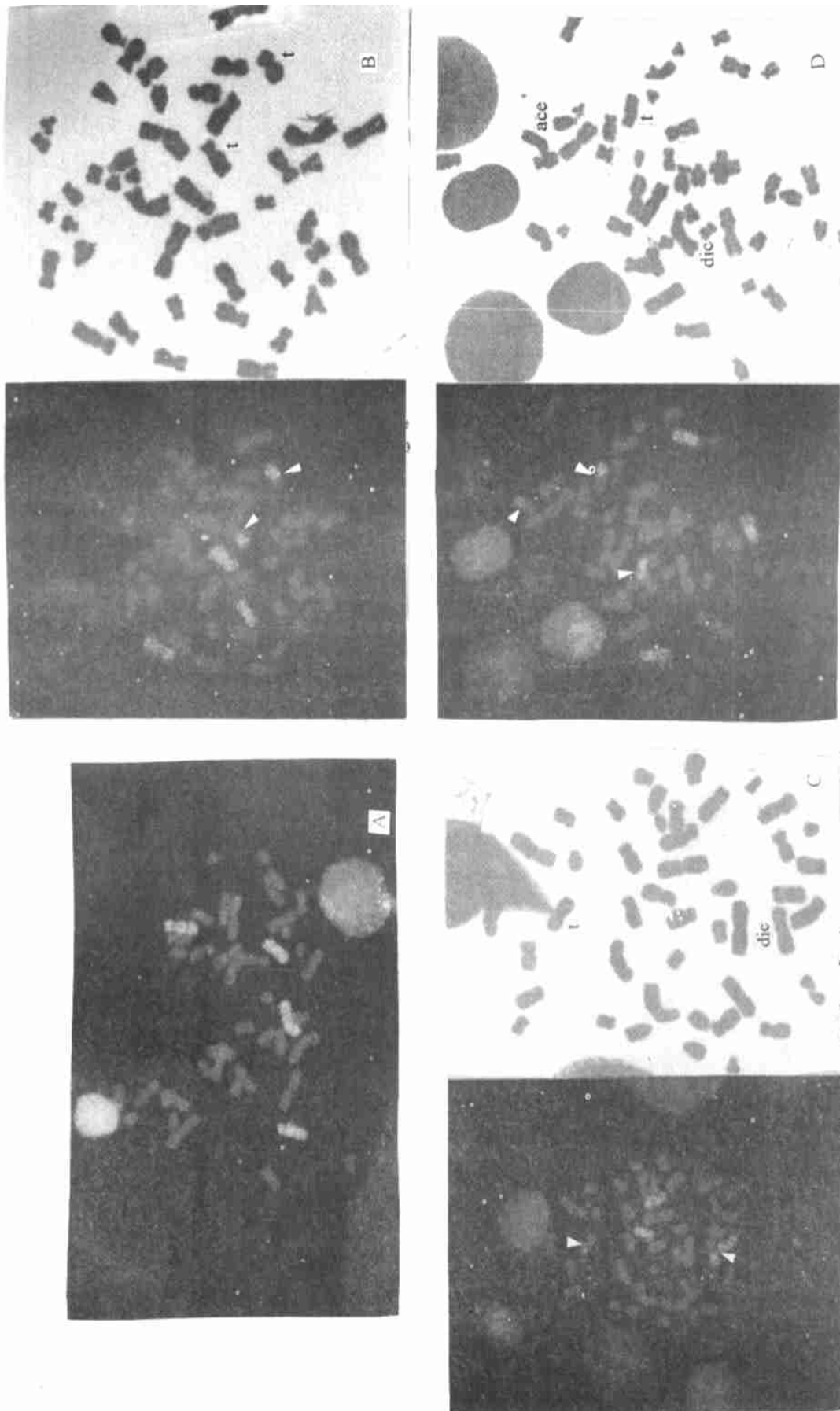


图 1. X线工作者被涂染的正常和畸变的4号和7号染色体

Figure 1. Normal and aberrant chromosomes 4 and 7 painted from X-ray workers (FISH nomenclature)

A: normal chromosomes 4 and 7; B: 7t(Ab)/7t(Ba) (arrow; complete) translocation; C: 7dic (AU) and 7t (Ab) (arrow; incomplete translocation);

D: 4dic (BA), 4t (Ab) (arrow; incomplete translocation and acentric fragment), 1: translocation; acc: acentric fragment; dic: dicen-

tric

2.2 X 线工作者和对照者的染色体结构重排分析

35 名受检人员共分析了 60 028 个中期细胞,其中 25 名 X 线工作者有 39 492 个细胞中期,10 名对照人员有 20 536 个中期。4 号和 7 号靶染色体 FISH 分析: X 线工作者共发现有 129 个易位,占 X 线工作者染色体总畸变的 84%,而其他各种畸变率分别为插入 (Ins) 1.9%、双着丝粒 (Dic) 4.5%、无着丝粒断片 (Ace) 9.7%;对照人员有 26 个易位,占对照人员染色体总畸变的 59%,其他各种畸变率分别为 Ins 2.2%、Dic 9.1%、Ace 29.5% (见表)。X 线工作者外周血淋巴细胞染色体易位以  $F_p/\text{cell}$  表示。根据 Lucas<sup>4</sup> 推荐的公式将  $F_p$  换算为全基因组易位率  $F_G$ ,两者的关系是  $F_G = F_p/2.05fp(1 - fp)$ , $fp$  代表靶染色体在基因组中的份额。4 号和 7 号全染色体的相对长度分别为 6.49 和 5.43,所有染色体的相对长度为 100.14<sup>5</sup>,4 号和 7 号占全染色体的  $fp$  值为 0.12。X 线工作者和对照人员的染色体易位率 ( $F_p/10^3$ )、全基因组易位率 ( $F_G/10^3$ ) 分别为  $3.26 \pm 0.29$ 、 $14.85 \pm 1.31$  和  $1.27 \pm 0.25$ 、 $5.77 \pm 1.13$ ;将 X 线工作者和对照人员的其他染色体畸变率换算为相应的基因组畸变率见图 2,X 线工作者的染色体易位率和总畸变率均明显高于对照组 ( $\chi^2$  检验,  $P < 0.005$ ) (见表 1)

表 1. FISH 分析中国早期医用 X 线工作者和对照组染色体畸变

Table 1. Chromosome aberrations detected by FISH from medical X-ray workers and controls

Subjects	Cells scored	T/10 <sup>3</sup> cells				Aberration types				
		F <sub>p</sub>	F <sub>G</sub>	T <sub>c</sub>	T <sub>i</sub>	Ins	Dic	Ace	total	
X-1	1 223	4.91	22.32	3	3			1	7	
X-2	2 108	2.85	12.95	1	5				6	
X-3	1 410	5.67	25.77	4	4			1	9	
X-4	1 072	7.46	33.91	1	7		1		9	
X-5	960	3.13	14.23		3				3	
X-6	2 931	5.46	24.82	7	9			1	17	
X-7	1 577	1.93	8.77	2	1			1	4	
X-8	554	3.61	16.41	1	1				2	
X-9	1 027	2.92	13.27	1	2				3	
X-10	1 130	0.88	4.00	1					1	
X-11	1 125	2.67	12.14		3				3	
X-12	2 446	2.04	9.27	1	4		1	1	7	
X-13	1 427	9.11	41.41	2	11	2		1	16	
X-14	1 899	3.69	16.77	1	6		3		10	
X-15	1 169	2.57	11.68	1	2				3	
X-16	778	3.86	17.55		3			2	5	
X-17	1 530	4.58	20.82	1	6	1			8	
X-18	2 622	3.81	17.32	3	7		2	1	13	

Subjects	Cells scored	T/10 <sup>3</sup> cells				Aberration types					
		F <sub>p</sub>	F <sub>G</sub>	T <sub>c</sub>	T <sub>i</sub>	Ins	Dic	Ace	total		
X-19	2 936	2.38	10.81	4	3				3	10	
X-20	3 492	1.43	6.50	1	4				2	7	
X-21	1 668	2.99	13.59	4	1					5	
X-22	1 711	1.17	5.32	1	1					2	
X-23	910	2.20	10.00	2					1	3	
X-24	1 026	0	0								
X-25	781	1.28	5.28		1					1	
C-1	1 326	0	0						1	4	5
C-2	850	1.18	5.36		1						1
C-3	4 594	1.09	4.95	2	3			1	4	10	
C-4	1 689	1.78	8.09	1	2				3	6	
C-5	517	1.93	8.77		1	1				2	
C-6	3 695	0.81	3.68	1	2			1		4	
C-7	1 803	3.88	17.64	3	4				1	8	
C-8	1 303	0.77	3.50	1						1	
C-9	2 773	1.08	4.91	2	1				2	5	
C-10	1 986	1.01	4.59	1	1					2	
Total	60 028				53	102	4	10	29	198	

X: X-ray worker; C: control; F<sub>p</sub>: frequency of chromosome translocation; F<sub>G</sub>: frequency of genome; T<sub>c</sub>: complete translocation; T<sub>i</sub>: incomplete translocation; Ins: insertion; Dic: dicentric; Ace: acentric fragment; T: translocation;

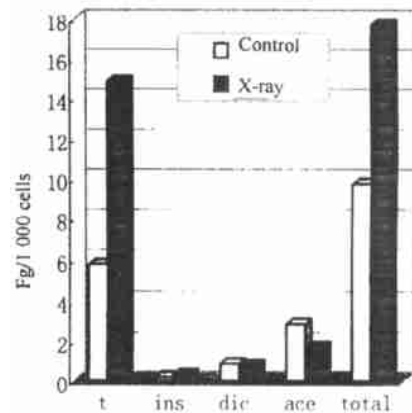


图 2. X 线组与对照组染色体畸变率比较

Figure 2. Comparison of frequencies of chromosome aberrations from X-ray workers and controls

t: translocation; ins: insertion; dic: dicentric; ace: acentric fragment

3 讨论

我们用荧光原位杂交技术直观地展现了 25 名早期医用 X 线工作者和 10 名对照人员的细胞遗传学改变,统计分析说明职业受照人员受到的长期、低剂量率辐射所致的染色体损伤是以易位为主并能在体内长期存在。国内外学者用常规细胞遗传学 G 显带法对早先职业受照人员的研究也证明了这一论点。金瑾珍等<sup>6</sup> 1984 年报道了某核工厂 16 名男性职工长期受到职业性照射。结果表明,稳定性畸变是总畸

变的65%,无论是总畸变率或总畸变细胞率均随累积剂量增加而增加,而稳定性畸变率则明显地随累积剂量增加而增加。王知权等<sup>1</sup>用G显带方法对84例医用诊断工作者和17例对照组血样检测染色体结构重排的结果,看出稳定性畸变是总畸变的67%,而相互易位占稳定性畸变的58%,可以说明残存的畸变中以稳定性畸变为主,其中相互易位占有明显的优势。Slozina N等<sup>7</sup>用常规细胞遗传学方法分析切尔诺贝利核事故现场清扫人员远期细胞学遗传损伤效应,对事故后6~10年的清理人员外周血淋巴细胞染色体畸变和微核进行了分析,结果表明参与清理事故的297名工作人员在6~10年间其染色体断裂率、染色体交换率(双+环)和不正常染色体率明显高于对照组( $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ );22名清扫人员和14名对照人员的微核相比较没有明显的差异。结论是切尔诺贝利核事故现场清扫人员在事故后6~10年淋巴细胞染色体畸变仍保持在较高水平。

用FISH技术对事故受照者的观察也证明了上述细胞遗传学观察。Kreja L等<sup>8</sup>应用Giemsa染色或G显带分析的样本片褪色后,选用1、2、4、5和13号染色体探针作荧光原位杂交分析对前苏联辐射事故患者,切尔诺贝利(1986年)7人,莫斯科(1971年)1人,克桑(1975年)1人,受照后7~25年系统地采集外周血样,冷冻保存,供造血干细胞检查。血样分离出单核细胞,在改良Dulbecco培养基中培养8~14d,使爆发式集落形成单位(BFU-E)和粒细胞巨噬细胞集落形成单位(CFU-GM)和粒细胞巨噬细胞巨核细胞集落形成细胞(GEMM-CFC)形成单一集落。结果表明在事故后的25年,21%集落中检测到稳定性染色体畸变,没有发现非稳定性染色体畸变。19%集落中稳定性染色体畸变呈克隆。2%集落中稳定性染色体畸变不呈克隆。因此可用染色体畸变作为辐射引发的造血干细胞遗传学损伤的标志。Sakamoto-Hojo ET等<sup>9</sup>用FISH技术分析了巴西格埃尼亚事故7.5年后<sup>137</sup>Cs受照者的淋巴细胞染色体易位,并与事故后初始双着丝粒率相比较。12例格埃尼亚事故受照者(受照剂量为0.2~4.6Gy)在1995年(事故后7.5年)取血进行细胞遗传学检查。使用的是1、6、11和3、4、8号染色体两组探针,同时进行常规方法全染色体分析,取12例未受照者的淋

巴细胞培养作对照。结果表明<sup>137</sup>Cs事故7.5年后,多数受照者中淋巴细胞染色体易位率与吸收剂量呈相关关系。从事故初始的双着丝粒与7.5年后的易位之比(D/T)可以看到,在吸收剂量0.8Gy以上时双着丝粒比易位高1.3~4.5倍,但在小于0.5Gy时,平均D/T很低,说明双着丝粒分析对低剂量受照者的局限性。D/T关系也表现出,事故初始的双着丝粒率与后观察到的易位率并不一致,其差异似乎与剂量有关系。

由此可见,辐射受照者多年以后在外周血的淋巴细胞中存在的染色体畸变以易位为主,并且在各系造血干细胞、祖细胞中可以见到。其他类型非稳定性染色体畸变如无着丝粒断片、双着丝粒等不能在体内长期存在,而逐渐衰减。有染色体易位畸变的细胞克隆化生长是细胞发生癌变的前兆,应充分引起关注。

#### 参考文献:

- 1 王知权,刘旭平,李进,等. 用稳定性染色体畸变作为医用诊断X线工作者生物剂量估算的研究J. 辐射研究与辐射工艺学报,1996,14(3):168~170.
- 2 王知权,孙元明,李进,等. 用荧光原位杂交快速检测医用诊断X线工作者染色体结构重排及其剂量估算的探讨J. 中华放射医学与防护杂志,1998,18(4):263~265.
- 3 Tucker JD, Morgan WF, Awa AA, et al. A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome paintingJ. *Cytogenet Cell Genet*, 1995,68:212~221.
- 4 Lucas JN, Awa AA, Straume T, et al. Rapid translocation frequency analysis in human decades after exposure to ionizing radiation J. *Int J Radiat Biol*, 1992, 62(1): 53~63.
- 5 Morton NE. Parameter of the human genomeJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 7474~7476.
- 6 金瑾珍,袁志强,杨捷. 职业受照人员的稳定性染色体畸变观察J. 辐射防护,1984,4(6):425~428.
- 7 Slozina N, Neronova E, Kharchenko N, et al. Increased level of chromosomal aberrations in lymphocytes of chernobyl liquidators 6~10 years after the accident J. *Mutat Res*, 1997, 379: 121~125.
- 8 Kreja L, Greulich KM, Fliedner TM, et al. Stable chromosomal aberrations in haemopoietic stem cells in the blood of radiation accident victimsJ. *Int J Radiat Biol*, 1999, 75(10):1241~1250.
- 9 Sakamoto-Hojo ET, Natarajan AT, Curado MP. Chromosome translocations in lymphocytes from individuals exposed to<sup>137</sup>Cs 7.5 years after the accident in Goiania(Brazil) J. *Radiat Pro Dosim*, 1999, 86(1): 25~32.