

细胞遗传剂量学： 在辐射应急准备与响应中的应用



出版日期：2011 年 9 月



IAEA

国际原子能机构

国际原子能机构安全标准和相关出版物

国际原子能机构安全标准

根据《国际原子能机构规约》第三条的规定，国际原子能机构受权制定或采取旨在保护健康及尽量减少对生命与财产之危险的安全标准，并规定适用这些标准。

国际原子能机构借以制定标准的出版物以国际原子能机构《安全标准丛书》的形式印发。该丛书涵盖核安全、辐射安全、运输安全和废物安全。该丛书出版物的分类是**安全基本法则、安全要求和安全导则**。

有关国际原子能机构安全标准计划的资料可访问以下国际原子能机构因特网网站：

<http://www-ns.iaea.org/standards/>

该网站提供已出版安全标准和安全标准草案的英文文本。以阿拉伯文、中文、法文、俄文和西班牙文印发的安全标准文本；国际原子能机构安全术语以及正在制订中的安全标准状况报告也在该网站提供使用。欲求进一步的信息，请与国际原子能机构联系（Vienna International Centre, PO Box 100, 1400 Vienna, Austria）。

敬请国际原子能机构安全标准的所有用户将使用这些安全标准的经验（例如作为国家监管、安全评审和培训班课程的依据）通知国际原子能机构，以确保这些安全标准继续满足用户需求。资料可以通过国际原子能机构因特网网站提供或按上述地址邮寄或通过电子邮件发至 Official.Mail@iaea.org。

相关出版物

国际原子能机构规定适用这些标准，并按照《国际原子能机构规约》第三条和第八条 C 款之规定，提供和促进有关和平核活动的信息交流并为此目的充任成员国的居间人。

核活动的安全报告以《安全报告》的形式印发，《安全报告》提供能够用以支持安全标准的实例和详细方法。

国际原子能机构其他安全相关出版物以《放射防护评价报告》、国际核安全组的《核安全组报告》、《技术报告》和《技术文件》的形式印发。国际原子能机构还印发放射性事故报告、培训手册和实用手册以及其他特别安全相关出版物。

安保相关出版物以国际原子能机构《核安保丛书》的形式印发。

国际原子能机构《核能丛书》由旨在鼓励和援助和平利用核能的研究、发展和实际应用的报告组成。相关资料载于各项导则、技术和进步状况报告以及和平利用核能的最佳实践。该丛书是对原子能机构安全标准所作的补充，并提供核电、核燃料循环、放射性废物管理和退役领域的详细导则、经验、良好实践和实例。

细胞遗传剂量学： 在辐射应急准备与响应中的应用

下列国家是国际原子能机构的成员国：

阿富汗	格鲁吉亚	尼日利亚
阿尔巴尼亚	德国	挪威
阿尔及利亚	加纳	阿曼
安哥拉	希腊	巴基斯坦
安提瓜和巴布达	危地马拉	帕劳
阿根廷	圭亚那	巴拿马
亚美尼亚	海地	巴布亚新几内亚
澳大利亚	教廷	巴拉圭
奥地利	洪都拉斯	秘鲁
阿塞拜疆	匈牙利	菲律宾
巴哈马	冰岛	波兰
巴林	印度	葡萄牙
孟加拉国	印度尼西亚	卡塔尔
巴巴多斯	伊朗伊斯兰共和国	摩尔多瓦共和国
白俄罗斯	伊拉克	罗马尼亚
比利时	爱尔兰	俄罗斯联邦
伯利兹	以色列	卢旺达
贝宁	意大利	圣马力诺
多民族玻利维亚国	牙买加	沙特阿拉伯
波斯尼亚和黑塞哥维那	日本	塞内加尔
博茨瓦纳	约旦	塞尔维亚
巴西	哈萨克斯坦	塞舌尔
文莱达鲁萨兰国	肯尼亚	塞拉利昂
保加利亚	大韩民国	新加坡
布基纳法索	科威特	斯洛伐克
布隆迪	吉尔吉斯斯坦	斯洛文尼亚
柬埔寨	老挝人民共和国	南非
喀麦隆	拉脱维亚	西班牙
加拿大	黎巴嫩	斯里兰卡
中非共和国	莱索托	苏丹
乍得	利比里亚	斯威士兰
智利	利比亚	瑞典
中国	列支敦士登	瑞士
哥伦比亚	立陶宛	阿拉伯叙利亚共和国
刚果	卢森堡	塔吉克斯坦
哥斯达黎加	马达加斯加	泰国
科特迪瓦	马拉维	前南斯拉夫马其顿共和国
克罗地亚	马来西亚	多哥
古巴	马里	特立尼达和多巴哥
塞浦路斯	马耳他	突尼斯
捷克共和国	马绍尔群岛	土耳其
刚果民主共和国	毛里塔尼亚	乌干达
丹麦	毛里求斯	乌克兰
吉布提	墨西哥	阿拉伯联合酋长国
多米尼克	摩纳哥	大不列颠及北爱尔兰联合王国
多米尼加共和国	蒙古	坦桑尼亚联合共和国
厄瓜多尔	黑山	美利坚合众国
埃及	摩洛哥	乌拉圭
萨尔瓦多	莫桑比克	乌兹别克斯坦
厄立特里亚	缅甸	瓦努阿图
爱沙尼亚	纳米比亚	委内瑞拉玻利瓦尔共和国
埃塞俄比亚	尼泊尔	越南
斐济	荷兰	也门
芬兰	新西兰	赞比亚
法国	尼加拉瓜	津巴布韦
加蓬	尼日尔	

《国际原子能机构规约》于 1956 年 10 月 23 日经在纽约联合国总部举行的国际原子能机构规约大会核准，1957 年 7 月 29 日生效。国际原子能机构总部设在维也纳，其主要目标是“加速和扩大原子能对全世界和平、健康及繁荣的贡献”。

细胞遗传剂量学： 在辐射应急准备与响应中的应用



国际原子能机构
维也纳 • 2011 年

版 权 说 明

国际原子能机构的所有科学和技术出版物均受 1952 年（伯尔尼）通过并于 1972 年（巴黎）修订的《世界版权公约》之条款的保护。自那时以来，世界知识产权组织（日内瓦）已将版权的范围扩大到包括电子形式和虚拟形式的知识产权。必须获得许可而且通常需要签订版税协议方能使用国际原子能机构印刷形式或电子形式出版物中所载全部或部分内容。欢迎有关非商业性翻印和翻译的建议并将在个案基础上予以考虑。垂询应按以下地址发至国际原子能机构出版科：

Marketing and Sales Unit

Publishing Section

International Atomic Energy Agency

Vienna International Centre

PO Box 100

1400 Vienna, Austria

传真：+43 1 2600 29302

电话：+43 1 2600 22417

电子信箱：sales.publications@iaea.org

<http://www.iaea.org/books>

© 国际原子能机构 • 2015 年

国际原子能机构印制

2015 年 10 月 • 奥地利

**细胞遗传剂量学：
在辐射应急准备与响应中的应用**

2015 年 • 维也纳国际原子能机构
国际原子能机构 — 《应急准备和响应丛书》

前 言

细胞遗传剂量学作为一种重要的剂量检测手段，填补了剂量测量技术的空白，特别是在难以解释数据的情况下，当有理由相信没有配带个人剂量计但受到了辐射照射的时候，当诉讼放射损伤赔偿而又没有明确的剂量学证据支持的时候，或当个人受到工作终身照射的时候。

从 1978 年起，国际原子能机构保持了对生物剂量学技术的长期参与。设立了一系列的协调研究项目，开设地区和国家培训班，赞助个人培训奖学金，为成员国家实验室提供设备，建立生物剂量学检测能力等。

由此，为成员国提供了关于最佳研究重点的建议，为生物剂量学的未来实践提供了最适用技术的建议。

协调研究项目于 1986 年出版了第一本手册，题为《生物剂量学：用于剂量评价的染色体畸变分析》（第 260 号技术报告丛书），2001 年出版了修订后的第二版，即第 405 号技术报告丛书。

本出版物是该报告的第三版，做了大范围修订，反映了过去十年里细胞遗传生物剂量检测技术的可观进展。

国际原子能机构向本出版物的所有作者和审稿人表示感谢。特别感谢 D. Lloyd 博士所做的重大贡献。

本出版物由泛美卫生组织和世界卫生组织共同倡议编写。

负责本出版物的国际原子能机构官员是核安全和安保司的 E. Buglova。

本出版物由中国军事医学科学院放射与辐射医学研究所王治东、陈英翻译完成；参加部分工作的还有沈丽萍、乔玉磊、刘海翔、荣曙、王琪。中国辐射防护研究院科技信息培训中心郝建中对本出版物进行了审校；中国辐射防护研究院放射医学与环境医学研究所李幼忱、郭月凤、李建国、邢利红、刘红艳在本出版物审校过程中提供了相关专业意见。国际原子能机构谨对他们的工作表示感谢。

编者按

使用某些国家或领土的特定名称并不意味着国际原子能机构作为出版者对这类国家或领土、其当局和机构或其边界划定的法律地位作出任何判断。

提及具体公司或产品的名称（不论表明注册与否）并不意味着国际原子能机构有意侵犯所有权，也不应被解释为国际原子能机构的认可或推介。

目 录

1. 导言	1
1.1. 背景	1
1.2. 目标	3
1.3. 范围和发展历史	3
1.4. 结构	4
2. 剂量概念在生物剂量学中的应用	5
3. 染色体损伤的生物物理学背景	7
4. 人类淋巴细胞	13
5. 染色体结构	17
5.1. 染色质组装	17
5.2. 人类染色体核型和 DNA 含量	18
5.3. 细胞周期	20
6. 辐射诱发的染色体改变	23
6.1. 辐射诱发的 DNA 损伤	23
6.2. 染色体型畸变	25
6.3. 染色单体型畸变	29
6.4. 早熟染色体凝聚	32
6.5. 微核	33
7. 血样采集	37
7.1. 时间	37
7.2. 抗凝剂	38
7.3. 容器	38
7.4. 运输	38
8. 离体剂量-效应曲线的制备	41
8.1. 总体因素	41
8.2. 物理因素	41
8.3. 统计因素	43
9. 双着丝粒分析	47
9.1. 培养	47
9.2. 固定过程	50
9.3. 染色	52
9.4. 样片分析	54

9.5. 数据记录	55
9.6. 数据和样片的保存	56
9.7. 剂量估算	56
10. 易位分析	75
10.1. 细胞培养与固定	77
10.2. 染色体涂染	77
10.3. 计数标准	79
10.4. 数据处理	80
10.5. 易位的对照水平	83
10.6. 易位的持久性	85
10.7. 刻度曲线	87
10.8. FISH 用于回顾性生物剂量估算的举例	88
11. 早熟染色体凝聚 (PCC) 分析	95
11.1. 有丝分裂融合法诱导 PCC	95
11.2. 化学法诱导 PCC	99
11.3. 用 PCC 环法调查辐射事故	102
12. 胞质分裂阻断微核检测	105
12.1. 背景	105
12.2. CBMN 检测的淋巴细胞培养	106
12.3. CBMN 检测的计数标准	106
12.4. CBMN 检测的数据处理	108
12.5. CBMN 检测在生物剂量估算中的应用	112
13. 染色体分析的自动化	117
13.1. 样品处理自动化	117
13.2. 图像自动分析	118
13.3. 实验室信息管理系统 (LIMS)	122
14. 大规模伤亡事件	125
14.1. 潜在辐射照射事件	125
14.2. 历史经验	126
14.3. 生物剂量学的作用	127
14.4. 应对大规模伤亡的现有策略	128
15. 质量管理和 ISO 标准	131
15.1. 质量保证和质量控制体系的基本理论	131
15.2. ISO 19238 号文件结构	132
15.3. 在人群分类诊断中的应用	133

16. 实验室工作人员安全.....	137
16.1. 感染.....	137
16.2. 光照.....	137
16.3. 化学药品.....	138
参考文献.....	141
附件 I：双着丝粒检测.....	167
附件 II：FISH 法易位检测.....	171
附件 III：早熟染色体凝聚（PCC）.....	175
附件 IV：胞质分裂阻断微核检测.....	181
附件 V：有丝分裂指数的确定标准.....	187
附件 VI：统计分析.....	189
附件 VII：实验室间质量保证比对演练实例.....	197
附件参考文献.....	201
缩写词表.....	203
定义.....	207
起草和审订人员名单.....	221
向反馈意见致谢.....	223

1. 导 言

1.1. 背景

生物剂量学检测建立在双着丝粒染色体固定染色分析之上，从上世纪 60 年代中期进入使用。几十年来，这门技术已经取得了显著的进步，双着丝粒分析已经成为许多成员国家辐射防护计划中的一项常规内容[1]。经过对数千例真实或疑似过量照射事件的应用实践，不仅证明了这种方法的应用价值，同时也明确了它的局限性。用染色体损伤作为生物标志物的生物剂量检测特别重要，是因为它不同于物理测量方法，考虑到了个体间的辐射敏感性差异。

应该强调的是，染色体畸变被作为一种剂量计加以应用，当对核或放射应急¹进行调查，需要搜集和考虑信息时，染色体畸变往往提供非常重要的依据[2]。诊断信息源还可以来自其他辐射生物标志物以及患者表现出来的临床症状和体征，也可以来自物理测量，如个人剂量计、热释光剂量计和光激发光剂量计，或者对人的固体物质（如牙釉质、指甲、提取的骨）及受照人员随身携带的物品（如手表和眼镜等）进行电子自旋共振测量。通过询问病人和目击者而得到的基本情况，如接近放射源的时间和距离位置等，也有助于剂量估算。所有这些信息源可以与生物剂量检测相结合，可以对案例做出更确切的评估。

多年来，外周血淋巴细胞双着丝粒检测一直是生物剂量检测中唯一可以利用的方法，并且至今仍然是最常用的技术。虽然双着丝粒和其他类型的畸变也可以在别的细胞中观察到，如皮肤成纤维细胞和口腔上皮细胞等，不过这超出了本出版物的范围，本出版物仅限于外周血淋巴细胞的检测。还有一些也可以在淋巴细胞中检测的生物学终点，如微核、相互易位和早熟凝聚染色体等（图 1 和表 1）也在本出版物中作了介绍。

¹ 本文中的“辐射应急”意义同“核或放射应急”。

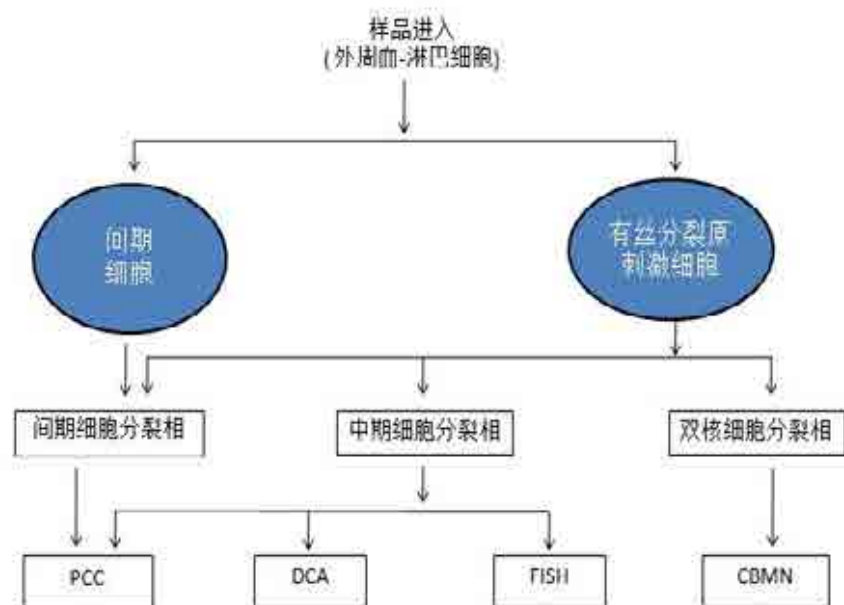


图 1. 用于各种细胞遗传学染色体畸变分析的外周血淋巴细胞样品获取示意图，即早熟染色体凝聚（PCC）、中期细胞分裂相双着丝粒（和环）染色体畸变检测（DCA）、中期细胞分裂相荧光原位杂交（FISH）法易位检测，胞质分裂阻断微核检测（CBMN）。

表 1. 用于剂量估算的细胞遗传学畸变检测方法的比较^a

	细胞遗传学畸变检测			
	早熟染色体凝聚 (PCC)	双着丝粒 (和环) (DCA)	荧光原位杂交 (FISH)	胞质分裂阻断微核检测 (CBMN)
为生物剂量估算计数的 典型畸变	额外的染色体断片； 双着丝粒和环 ^b 易位 ^b	双着丝粒 ^b （和环）	双着丝粒 ^b （和环） 易位 ^b	微核 核质桥
典型辐射情景应用	急性 近期照射	急性 迁延性近期照射	急性 迁延性 早先照射	急性 迁延性近期照射
光子当量（Gy）， 用于全身剂量评价的 急性剂量范围	0.2~20	0.1~5	0.25~4	0.3~4
适用于局部照射	适用	适用	不适用	不适用
适用于分类剂量估算	适用	适用	不适用	可以
检测标准化状况	不适用	ISO 标准 [3, 4]	不适用	ISO 标准 — 待发行和[5]

^a 此表在 TMT 手册[6]基础上进行了修改。

^b 用着丝粒或全染色体特异性 DNA 杂交探针检测的特异性染色体畸变。

其他检测方法，如 DNA 断裂分子终点、细胞或血清、血浆中基因调节的变化，和蛋白生物标志物的存在的检测等不在本出版物范围内。这是一个快速兴起的技术领域，多种检测技术尚处于发展和验证的不同阶段。目前可以利用的生物剂量检测范围导致了用多参数方法对过量受照人员进行调查[7]，一个实验室在不得不应对一起涉及大量伤亡的事件时，拥有多种可用的检测方法是特别有用的。

在辐射应急事件的调查中，对不同原因的受照人员进行剂量估算是十分重要的。对大剂量照射的病例（>1 Gy 的急性照射），剂量信息有助于治疗方案的制定，同时提醒医生在接下来的几周和几个月内可能出现确定性健康效应（组织损伤）。

对低于需要救治水平的照射，剂量学信息对于医生向受照人员提示关于发生随机效应（如癌症）的风险非常重要。对受到极低剂量照射的人来说，如果发现染色体损伤程度没有明显升高，则往往会使人放心。特别是在对事件的细节了解甚少，又得不到物理剂量测量或计算的情况下。因之，生物剂量检测可能成为确定剂量的唯一手段，尽管尚有一些定量问题受不均匀照射、放射性核素的摄入和采血延迟等因素影响，这一点在本出版物中将要讨论。

在辐射应急或恐怖袭击后的早期，可能许多人已经受到照射，生物剂量检测对此也有宝贵的作用。在这种情况下，需要用生物学指标和临床指标对伤员进行分类诊断，这样能够初步快速地识别出疑似受到威胁生命剂量的伤员，并提供分类诊断剂量。

1.2. 目标

本出版物的主要目的是向用户提供技术信息，以便以标准方式选择和实施适当的细胞遗传学技术，以保证在电离辐射照射后进行可对比的剂量估算。本出版物介绍生物剂量学目前应用的四种细胞遗传学方法（图 1 和表 1）。将这些技术方便地应用于主要地理区域是适当的，但是鉴于现有的国际合作和网络功能，要让所有这些技术应用于每一个国家生物剂量学实验室是不必要的。

1.3. 范围和发展历史

本丛书的第一本手册[1]专门阐述双着丝粒检测。该书的及时出版为生物剂量学领域提供了有价值的、经常引用的标志性参考工具。本出版物是为两个层次的读者编写的。首先，作为一本实验室手册，在技术层次上提供方便的和全面的信息来源。其次，是对本学科的技术背景提出简要的总结，或用于放射生物学教学，或用于保健物理师、律师、政策制定者等可能需要对生物剂量学有某些专业认识的人员。

十五年后出版了本手册的修订版[8]，其中包括荧光原位杂交（FISH）染色体涂染、早熟染色体凝聚（PCC）和胞质分裂阻断微核（CBMN）检测技术。

现在又过了十年，产生了本文件。原版本中关于中期细胞分裂相双着丝粒（和

环) 染色体畸变分析 (DCA) 的大部分内容仍然有效, 保留了下来, 但作了适当修改。鉴于新的研究和实际应用的经验, FISH、PCC 和 CBMN 检测技术已经有了相当的改进。不可避免的是, 在这三个版本经历的二十五年里, 细胞遗传生物剂量学有了显著的发展, 技术上变得更加复杂。然而, 本次修订作了这样的安排: 要使刚刚进入该领域且仅有最低限度设备的实验室不至于感到本出版物望而生畏。从有关双着丝粒和微核检测这两个最重要的应当建立的核心技术的相关章节中仍然能够提取到资料。本出版物通过建立基本的剂量-效应曲线, 解释过量照射病例的调查数据, 从而对在实践中如何应用这些技术提出了明确的建议。

本次修订反映出近些年来新的重大进展, 就是针对大规模辐射伤亡事件如何安排实施分类诊断。考虑了一个生物剂量实验室如何应用分类诊断方式应对突发事件, 如何使用计算机辅助显微镜加快分析速度, 以及如何与其他实验室进行网络联系。与此同时, 为了应急响应中的合作, 已经提出了关于质量保证、质量控制和参与实验室比对活动的国际导则。这些内容在本出版物中一并讨论

在生物剂量估算中, 应用多种细胞遗传学手段是必要的, 因为没有一项单一的指标足以应对所潜在的照射情景, 包括早期急性照射、局部照射、回顾性或早先照射 (例如照后多年的生物样品), 同时也包括大规模辐射伤亡事件中涉及伤员分类诊断的细胞遗传学方法。

1.4. 结构

本出版物的编排是: 第 1 章导言, 第 2 章考虑由染色体损伤确定的“剂量”意义是什么, 如何与物理方法导出的剂量值联系起来, 如何与国际放射防护委员会定义的当量剂量概念联系起来。第 3 章介绍诱发染色体损伤的生物物理学和微剂量学背景。接下来的第 4 章简要介绍人类淋巴细胞, 其中的 T 细胞用于生物剂量估算。第 5 章介绍染色体结构。第 6 章讨论与电离辐射相互作用后诱发的 DNA 损伤类型, 以及照射后在淋巴细胞中观察到的染色体改变的种类与分类。第 7 章介绍对血液采样的要求。第 8 章介绍建立剂量-效应曲线的物理学、生物学和统计学要求。第 9、10、11 和 12 等四章分别介绍用双着丝粒、荧光原位杂交易位、早熟凝聚染色体和微核等四种细胞遗传学终点进行生物剂量估算的技术。第 13 章介绍近年来在染色体检测自动分析技术上取得的巨大进展。第 14 章考虑另一个最新发展, 即染色体生物剂量学界如何最有效地响应大规模辐射伤亡事件。第 15 章介绍质量保证的导则和程序。最后一章即第 16 章讨论从事细胞遗传学分析的实验室工作人员的安全问题。提供了迄今最为全面的参考文献清单, 之后给出七个附件, 前四个附件介绍 DCA、FISH 法易位、PCC 和 CBMN 检测的可重复操作程序。附件 V 介绍有丝分裂指数的测试标准。附件 VI 提供生物剂量数据分析及其基础研究中常用的多种统计检验指南。最后, 附件 VII 给出了关于双着丝粒计数和剂量估算的实验室之间质量保障演练实例。本出版物的末尾提供了一份缩略语表, 一份重要技术术语表, 及一份参与本出版物第三修订版的起草和同行审议人员的名单。

2. 剂量概念在生物剂量学中的应用

本章提供有关剂量学术语、吸收剂量的物理意义、不同类型电离辐射事故照射剂量的生物学（细胞遗传学）评价的解释等方面的简单信息。

淋巴细胞染色体畸变用于估算过量受照人员的吸收剂量。淋巴细胞中计数的畸变可以参照参考剂量-效应刻度曲线解释为吸收剂量。这种曲线是用适当辐射品质的剂量离体照射血液后制备而成。授与样品的剂量应该可以通过物理仪器（如电离室）溯源到初级或次级标准。

测量光子和中子的物理装置通常用空气比释动能进行刻度，因此，在考虑授与组织（或血样）的剂量时需要用到修正因子。对于光子，这些修正因子是根据质能吸收系数比导出的，其值可从标准表[5]中获取。对于中子，仪器可用组织等效材料制成，用以表示组织剂量。或者按照中子注量进行初级或次级剂量学实验室刻度，注量可以转换为组织剂量。

既然被计数的生物学终点是染色体畸变，那么严格地讲，染色体畸变反映细胞核的剂量。对于光子和中子来说，软组织的剂量与细胞核的剂量非常近似。这是因为与光子和中子所产生的次级粒子的射程相比，淋巴细胞核的直径很小，大约 $6\ \mu\text{m}$ 。因此适用 Bragg-Gray 空腔理论[10]。

不过也有少数例外。例如氚化水照射， β 粒子的穿行距离仅介于 $0\sim 7\ \mu\text{m}$ 之间。因此，细胞核的绝大部分剂量归因于细胞核内所含的氚的发射。在这种情况下，淋巴细胞核的剂量构成了刻度依据，并且依赖于细胞核内水含量，相对于血液中含水量而言[11]。另一个例子是 $100\ \text{keV}$ 以下的低能中子照射，其反冲质子的射程小于 $2\ \mu\text{m}$ 。在这种情况下，淋巴细胞核的剂量可能与其中的氢含量相关。然而，在一起事故中受到主要是这个能量范围的中子照射，几乎不大可能。

用检测到的畸变数，如双着丝粒数，查阅刻度曲线得到的剂量值表示淋巴细胞的平均吸收剂量，这近似于全身的平均剂量，因为淋巴细胞不仅遍布于全身，而且是可移动的。通过本出版物后面描述的几种方法，有时也可以为非均匀照射或局部照射情况改进全身剂量估算值。

大多数进入体内的放射性核素也会导致非均匀照射，但是这里关心的剂量并不是淋巴细胞的剂量，而是放射性沉积的特定器官和组织的剂量。因此，染色体分析的有效性往往受到一定程度的限制，因为摄入放射性碘后会诱发淋巴细胞染色体畸变，但这并不能解释为甲状腺剂量。例外是那些体内广泛分布的核素如氚化水或放射性铯，经验表明淋巴细胞染色体畸变分析能够提供有意义的剂量估算值。

对于照射后十年或更久的回顾性生物剂量测定，是用 FISH 方法检测易位，估算的剂量代表的是活性骨髓平均剂量。这是因为最初受到照射的是被计数淋巴细胞的干细胞前体，在较短的时间内，在长寿命淋巴细胞和受照骨髓干细胞后代的混合物中可观察到易位。

引出一项生物剂量调查的原因往往源自个人剂量计记录的常规测量结果。个人剂量计经刻度后用来测量特定深度的个人剂量当量。这个运行实用量提供了实践中遇到的大部分照射野中有效剂量或剂量当量的合理估算值。有效剂量和剂量当量用于放射防护。它们不适用于确定高吸收剂量的效应。

因此，建议从事生物剂量检测的实验室应该以吸收剂量（Gy）来刻度它们的程序，适当规定足够的细节以表征辐射类型和辐射品质[12~15]。

3. 染色体损伤的生物物理学背景

本章提供的信息旨在帮助理解 and 解释后面各章中出现的方法学原理。更多的信息可以查阅参考文献[16, 17]。

当电离辐射通过物质时，排斥原子中的电子，留下带正电荷的离子。沿带电粒子径迹上的初始事件分布、电离和激发，因辐射类型的不同而不同。这些初始事件的平均间隔随粒子（中子或 α 粒子）电荷和质量的增加而减少。下面将要讨论到，必须用单位径迹长度沉积的能量来定义一个特定的辐射，因为这种特性会改变特殊辐射类型诱发各种生物效应的有效性。

一个用来描述不同类型辐射能量沉积的有用的比较术语是传能线密度（LET）。对于宽范围 LET 辐射，如中子，可以导出一个平均 LET。这是根据授与的能量（或剂量）或根据穿过的径迹长度，对每一个 LET 区间进行权重而获得的。分别称为剂量平均 LET 和径迹平均 LET。径迹平均 LET 似乎是描述染色体损伤相对生物效能（RBE）变化的最好的量[18]。250 kV 的 X 射线的径迹平均 LET 大约是 2 KeV/ μm ，而重带电粒子的径迹平均 LET 值是 100~2000 KeV/ μm 或更大。值得注意的是，相同或不同类型的辐射在每微米径迹上沉积的能量是显然不同的，可以明显改变不同类型辐射的生物效应。

不同 LET 辐射电离分布的一个后果是细胞之间染色体畸变率的分布。对于低 LET 辐射或弱电离辐射，任何剂量的电离在细胞之间都是随机分布的，特别是由于大量径迹的存在。DNA 损伤在细胞之间也是随机分布的，并且假设任何损伤转化为畸变的概率是相等的，那么畸变在细胞间的分布也是随机的。这种情况已经被证实：在 X 或 γ 射线照射后，诱发的染色体畸变符合泊松分布。对于高 LET 或密电离辐射，电离径迹在细胞间的分布是非随机的，能量沉积在更多的“离散包”中。径迹数比同等剂量的低 LET 辐射的少得多。与低 LET 辐射做同样的假设，结果是高 LET 辐射诱发的畸变在细胞间是非随机分布的。在任何观察到的平均畸变率下，多畸变和零畸变的细胞比由泊松分布预期的多。这个特点在生物剂量学中是有用的，将在第 9.7.4.3 节中讨论，该节专门讨论非均匀照射或局部照射。

对诱发某一特定生物终点的不同类型的辐射效应，通常用术语“相对生物效能”（RBE）来表示。RBE 定义为参考辐射（通常为中等电压 X 射线）的剂量与被研究的产生相同生物效应的特定辐射的剂量之比。即

$$RBE = \frac{\text{产生 } Z \text{ 效应的 } 200 \sim 250 \text{ kVp 电压 X 射线的剂量}}{\text{产生 } Z \text{ 效应的辐射剂量}} \quad (1)$$

值得注意的是，X 射线的效应比 γ 射线的高 2~3 倍，因此应当始终定义参考照射 [19]。

图 2 示出高 LET 辐射和低 LET 辐射诱发的典型形状的线性性和线性平方型的双着丝粒剂量-效应曲线。

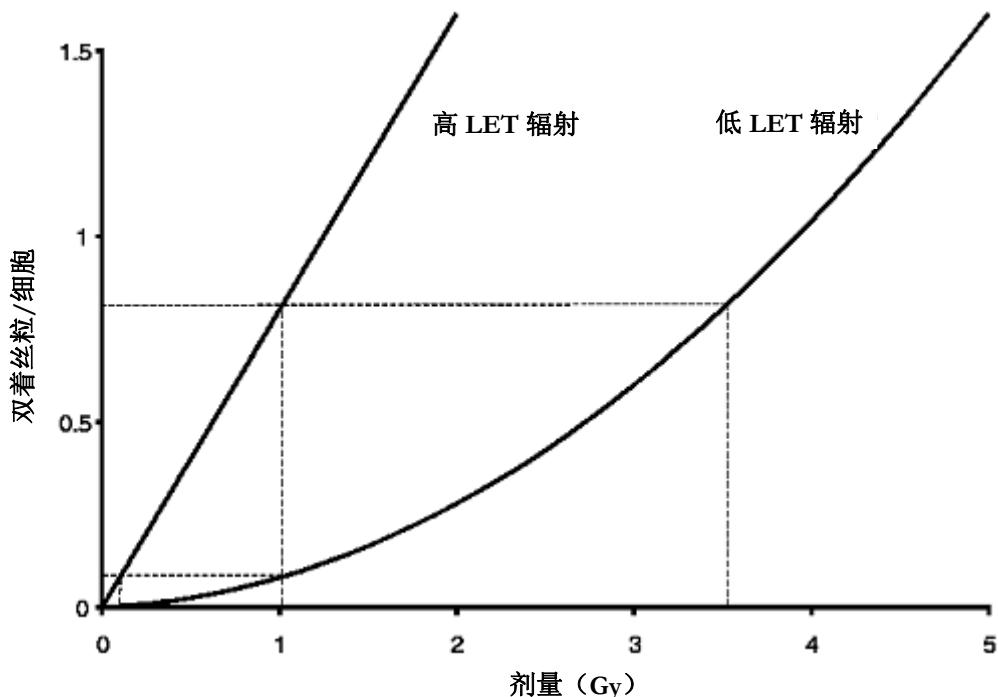


图 2. 典型的线性和线性平方型剂量-效应曲线，表明 *RBE* 如何随畸变率变化[8]。

对这些图形产生的原因将在本节后面讨论。高双着丝粒产额由高剂量照射所引起，图中用上部水平虚线在 1.0 和 3.5 Gy 处横截两条曲线，表示高双着丝粒产额的 *RBE*，*RBE* 值是这两个剂量的比，即 $3.5/1.0 = 3.5$ 。用下部水平虚线在 1.0 和 3.5 Gy 处横截两条曲线，得到较高的 *RBE*： $1.0/0.1=10$ 。最大 *RBE* 描述低剂量下的情况，通常称为 *RBE_m*，是两条曲线的产额方程式中线性系数的比。

对于许多生物学终点（包括突变，细胞死亡和染色体畸变）来说，已经证明，*RBE* 随 LET 而变化，以至得到驼峰形响应曲线（图 3）。

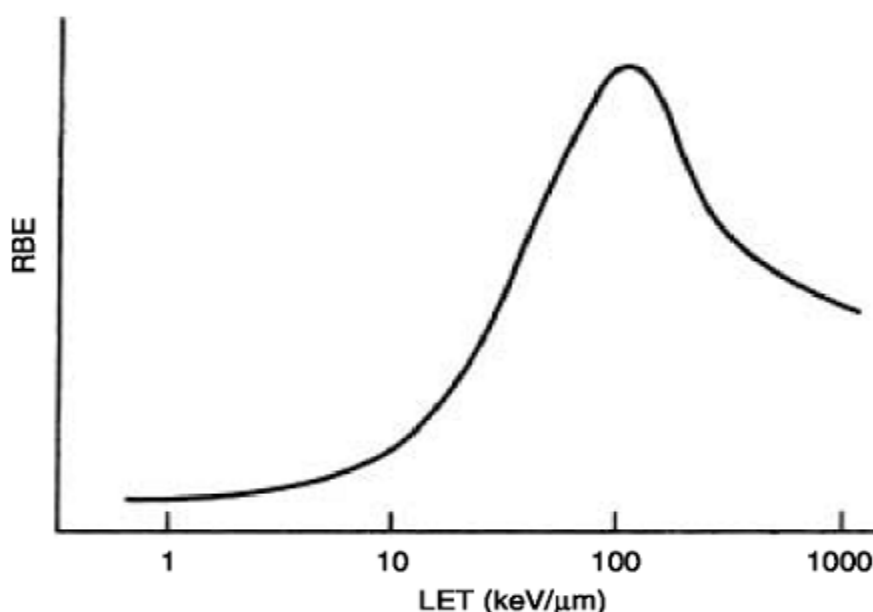


图 3. RBE 与 LET 的一般关系[8]。

这条曲线显示，RBE 在到达大约 100 keV 的最佳值之前是增加的，然后随 LET 值的增加而下降，这里，用这条曲线来解释染色体畸变的诱发是最好的。为说明问题，以双着丝粒畸变为例，部分原因是它明显涉及两条染色体之间的相互作用（或互换），同时也因为它是生物剂量学中最常用的畸变类型。

要产生双着丝粒畸变，必须使两条未复制的正常染色体受到 DNA 损伤，进而使受损的染色体能够互换。这种互换可以由辐射直接诱发的 DNA 双链断裂的错误修复所引起，也可以由碱基损伤切除修复过程中的错误修复而引起。由此可知，两条染色体的损伤一定要彼此靠近，在所谓“重接距离”内，才能产生错误修复。这个定义区可以视为靶。两个损伤位点，包括每一条未复制染色体的 DNA 双螺旋结构，必须在这个靶内。这个靶或相互作用区域很小，一般认为直径小于 1.0 μm 。X 射线的 LET 较低，单位径迹长度内的电离频度也很低，因而在靶内在单一径迹上发生两次电离事件的概率也很低。至少需要两次电离才能产生涉及双着丝粒的两条染色体损伤。由两条独立的径迹电离产生两个损伤的概率要高得多。一个径迹产生双着丝粒的频率与剂量的线性函数成正比，而两条径迹诱发双着丝粒的频率与剂量的平方成正比。在低于 0.5 Gy 的剂量下，两条径迹穿过一个靶的概率极低，所以双着丝粒几乎都是由一个径迹产生，而且频率也很低。随着剂量的增加，两条径迹诱发双着丝粒的贡献也将增加。因此，低 LET 诱发双着丝粒的剂量-效应曲线（图 2）由一个和两个径迹的事件结合组成，前者主要出现在低剂量，后者更多的出现在高剂量。剂量-效应曲线一般拟合为方程（2）

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \quad (2)$$

式中，

Y 是双着丝粒畸变率，

D 是剂量，

C 是对照（本底畸变率），

α 是线性系数，

β 是剂量的平方系数。

α/β 的比称为交叉剂量，等于对形成双着丝粒具有同等贡献的线性部分和平方部分的剂量。

当辐射的 LET 值增加到最大时，由同一径迹内的两次电离引起靶内的两个损伤的概率增大，这将产生两种结果。LET 约为 20 keV/ μm 时，剂量-效应曲线为线性（图 2）。由于一个径迹产生两个损伤的可能性增加，诱发双着丝粒的高 LET 辐射的效能或 RBE 也随 LET 的增加而增加。一个径迹产生两个必要损伤的概率，远远超过在另一个径迹已经产生损伤的附近由第二个径迹的产生一个损伤的随机过程，特别是在低剂量，低迹密度的情况下。RBE 的最大值出现在当 LET 值使得后述情形发生时：电离以不“浪费”能量的最佳间隔，在双着丝粒的形成所涉及的两个 DNA 双螺旋链中的每条链中造成损伤，即沉积在靶内的电离多于所需要的。然而，当 LET 超过这个最佳值时，沉积在靶内的能量将多于需要的能量，在这种情况下，RBE 将随 LET 的增加而下降，如图 3 所示的 RBE 与 LET 关系图。

综上所述，低 LET 辐射、高能质子和快中子的剂量-效应曲线（图 2）是非线性的，更符合线性平方模型；高 LET 辐射（裂变中子和 α 粒子）的剂量-效应曲线呈线性或接近线性；在 LET 小于大约 100 keV/ μm 时，RBE 值随 LET 增加而增加，在 LET 大于 100 keV/ μm 时，RBE 值随着 LET 的增加而减小（图 3）。剂量率对细胞遗传学改变有何影响？关于这个问题，最容易的是了解双着丝粒的形成过程，尽管其原理也适用于微核和易位。已知形成双着丝粒的 DNA 损伤是可以修复的，修复的时间从几分钟到数小时，取决于损伤的特性。如果诱发一个双着丝粒所需的两条染色体损伤是由不同的径迹产生，并降低剂量率，那么第一个径迹产生的损伤有可能在第二个径迹穿过靶形成第二个损伤之前修复。虽然这两个损伤都在靶内，但它们不能相互作用形成一个双着丝粒体。两个损伤相互作用的概率随着剂量率的降低而降低，剂量率越低，单位时间内电离径迹的频率就越低，这样，第一个损伤在第二个损伤形成前的修复时间就越长。因此，在低 LET 辐射情况下，剂量率越低，每单位剂量诱发双着丝粒的频率就越低。在剂量率非常低的情况下，两条径迹畸变的概率基本为零，在这种情况下双着丝粒的剂量-效应曲线为线性，斜率等于急性照射线性平方曲线的线性部分。对于分次照射或分割照射，同样的论点也成立。如果受到两次或多次照射，则第一次照射产生的损伤可以与第二次或随后的照射产生的损伤相互作用，只要第一次照射和随后照射

之间的时间间隔不超过第一次或之前照射的损伤修复所需的时间。因此，如果分次照射的时间间隔足以允许分次照射之间的损伤修复，那么，总剂量（分次剂量的和）所产生双着丝粒率将少于单次照射总剂量产生的双着丝粒率。

高 LET 辐射的情况有所不同，因为高 LET 辐射诱发双着丝粒的两个损伤来自同一个径迹。这样，降低剂量率不会改变双着丝粒，因为在较长时间的受照过程中，损伤的修复已不是一个影响因素。同样的观点也适用于分次受照；由于产生双着丝粒的两个损伤同时来自一个径迹，所以在两次照射之间的损伤修复对双着丝粒的形成并没有太多的影响。

本章讨论的是生物剂量检测实践中要考虑的问题。剂量-效应曲线的形状受辐射品质（LET）的影响。因此，进行剂量估算时，拟用的标准曲线应该是这样的曲线：其相关辐射品质应该与应急事件涉及的特定类型辐射的品质相同或相似。这个要求很重要，因为即使为了辐射防护的目的，权重因子是相同的（ $W_R = 1$ ），但是不同低 LET 辐射诱发染色体损伤的 RBE 具有明显的不同[19]。对于低 LET 辐射，随着剂量率降低，每单位剂量产生双着丝粒率也降低，导致在剂量率很低的情况下，剂量-效应曲线呈线性，与急性照射的剂量-效应曲线的线性部分相同。一条线性曲线可以由 X 或 γ 射线急性照射的标准曲线产生，经过受照时间和淋巴细胞寿命的适当修正，也可以作为慢性照射的标准曲线。关于高 LET 辐射，由于剂量率的变化不影响双着丝粒率，所以为急性照射得到的曲线也可以用于慢性照射或分次照射，当然也要考虑到受照的时间和外周血淋巴细胞的寿命。

4. 人类淋巴细胞

人类外周血淋巴细胞是主要处于细胞周期的 DNA 合成前期（即 G_0 期）的一个细胞群。仅有 0.2% 或更少的外周血淋巴细胞处于自动合成细胞周期，而这些细胞可能来自大淋巴样的细胞池，他们代表受刺激的淋巴细胞或未成熟的浆细胞。在这组细胞中偶然可能会引起在外周血中偶尔看到的罕见有丝分裂。

Nowell [20] 首先提出，外周血“人类白细胞”在离体受到植物血球凝集素（PHA）即一种来自豆子的植物蛋白的刺激后，可以进行有丝分裂。Carstairs [21] 证实“小淋巴细胞”是 PHA 诱导后启动有丝分裂的靶细胞。

观察血液涂片可见，外周血小淋巴细胞具有大密度的核和周围较少的细胞浆（图 4 和图 5）。其直径约为 $6\ \mu\text{m}$ ，体积估计大约 $110\ \mu\text{m}^3$ 。

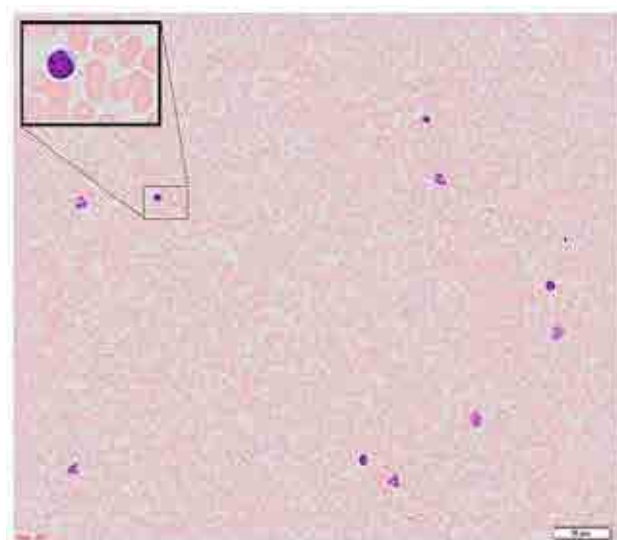


图4. 放大显示的典型血涂片：一个小淋巴细胞和一些红细胞。

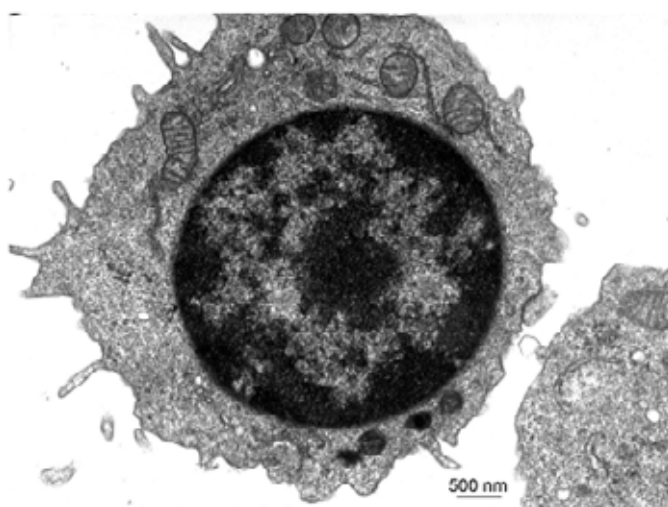


图5. 电子显微镜下看到的小淋巴细胞。

淋巴细胞可以分为两大部分，即 T 细胞和 B 细胞。这两种细胞起源于卵黄囊中没有免疫力的干细胞，最后驻留在骨髓中。这些未分化的干细胞迁移到胸腺和其他主要的淋巴器官中，在那里增殖，经历体细胞的突变，形成一个循环的长寿命淋巴细胞池。以细胞表面标志物为基础，T 细胞和 B 细胞组成幼稚和记忆细胞的混合体，这些细胞具有不同的寿命，在免疫过程中发挥不同的作用[22]。T 细胞，大多数为 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 亚型，在离体受到植物血球凝集素（PHA）刺激后而被用于生物剂量检测。

外周血中淋巴细胞的浓度随着年龄、种族、病原体和环境因素（如吸烟，肥胖，饮酒等）的不同而变化。比如，某些种族群（如东非）的淋巴细胞基线值低于人群总体参考水平。观察发现，淋巴细胞数呈现出随年龄增加而减少的趋势。尤为明显的是，在儿童时期淋巴细胞持续下降，在 15 岁下降至 $2 \times 10^9/L$ 。对于成人，也观察到了下降的趋势，只是下降较慢，在 75 岁或以上时，淋巴细胞数低于 $2 \times 10^9/L$ [23]。

外周血中淋巴细胞浓度的正常范围是 $(1.5 \sim 4.0) \times 10^9/L$ [24]。然而，在机体的大部分受到几 Gy 的大剂量照射时，早期的确定性反应之一是外周血淋巴细胞数快速下降。在辐射伤亡的早期采集血液进行生物剂量估算时应注意这些因素[25]。

一个健康年轻成人的淋巴细胞总数估计大约为 500×10^9 个，只有约 2% (10×10^9) 是在外周血中，其他一般存在于其全身他组织中，特别是集中于胸腺、淋巴结、扁桃体、肠淋巴组织、脾脏和骨髓中。淋巴细胞的寿命不同，寿命的定义可以指细胞死亡也可以指细胞分裂。根据 CD45 抗原不同种型的表达， $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 亚型的 T 细胞可以进一步分成不同的亚群。刚出生时，90%以上的 T 细胞表达为 CD45RA 种型，称为未被激活的或幼稚的细胞。到了成年，下降到大约 50%，因为细胞向被抗原激活或记忆细胞的 CD45RO 亚群转化。

按照 PHA 刺激的 RA 型 T 细胞和 RO 型 T 细胞，研究了放射治疗诱发的染色体改变[26]。从非稳定性损伤的持续时间可以看出，幼稚型 RA 细胞平均每 3.5 年分裂一次，而记忆型 RO 细胞分裂更频繁，平均每 22 周分裂一次。记忆细胞也可以恢复为幼稚表型，但这种情况只有在记忆类型平均约 3.5 年后才会发生。

为了解释体内诱发的人类染色体畸变，很重要的一点是，大部分外周血淋巴细胞位于“重新分布池”。也就是说，淋巴细胞能够离开外周血，通过脾脏、淋巴结和其他组织重新进入循环系统。重新分布池中的一个特定淋巴细胞再次进入外周血的平均时间大约为 30 分钟。据估计，人体约 80%即 400×10^9 个淋巴细胞处于重新分布池，全部再循环的时间约 12 小时。这就意味着，在体内任何地方生成染色体畸变的淋巴细胞最终都将出现在外周血中。因此，对于人淋巴细胞检测系统，不仅可以检测外周血淋巴细胞自身诱发的染色体畸变，也可以检测全身不同器官分布的淋巴细胞的染色体畸变[27]。

大部分外周血淋巴细胞处于细胞周期的“静止期”（ G_0 期），为 DNA 含量约 5.6 pg 的二倍体。这些细胞可以在 PHA 诱导下进行离体有丝分裂。PHA 是刺激所有 T 细胞的极为全面的有丝分裂原。在 PHA 作用下，淋巴细胞转化为分裂细胞，胞核与整个

细胞的体积随之增大。外周血淋巴细胞在刺激后 48 小时的体积大约为 $500\ \mu\text{m}^3$ ，而刺激前的体积只有约 $110\ \mu\text{m}^3$ 。细胞质体积也由刺激前的约 $50\ \mu\text{m}^3$ 增大到刺激后的 $350\ \mu\text{m}^3$ 。细胞核体积则由约 $50\ \mu\text{m}^3$ 增加到 $170\ \mu\text{m}^3$ 。

用 PHA 刺激后淋巴细胞的细胞周期进程有很大差异，取决于培养条件，使用的不同培养基，如 Ham's F-10, (Roswell Park Memorial Institute, RPMI-1640), TC-199 或极限必须培养基 (MEM)。例如，在 Ham's F-10 培养基中，在培养约 26 小时后开始 DNA 合成，再经过 10 小时开始第一次有丝分裂。用 H^3 标记的胸腺嘧啶处理，测量到两个 DNA 合成峰，一个在第 34 小时，第二个在第 40 小时，有丝分裂活性有两个峰值，一个在第 44 小时，另一个在大约第 49 小时，这可能代表两个亚细胞群，表明在使用 Ham's F-10 和 PHA 的一个培养体系中存在不同的刺激方式[28]。然而，在 TC-199 培养基中生长的淋巴细胞中，用氘标记间期细胞和有丝分裂指数，表现为不规则的模式，由此很难得出有关细胞亚群的任何结论。

5. 染色体结构

5.1. 染色质组装

尽管非组蛋白与核小体组装之间的关系尚不十分清楚，但是在一个核小体结构中 DNA 与组蛋白的关系已经得到很详细的证实。另外，也清楚 DNA 位于核小体组蛋白核心的外部。研究表明，在一个中期细胞的染色体上存在由非组蛋白或非组蛋白骨架形成的轴心结构[29, 30]。这种轴心结构是否参与染色体畸变的形成还不清楚。光显微镜下观察，在有丝分裂不同阶段的染色体上可以见到代表轴心结构的银色染色区域。虽然文献记载间期细胞中存在着有组织的核蛋白基质排列，但中期细胞染色体中骨架结构的存在可能只是一个假说。图 6 给出一个中期细胞染色体结构的模型。

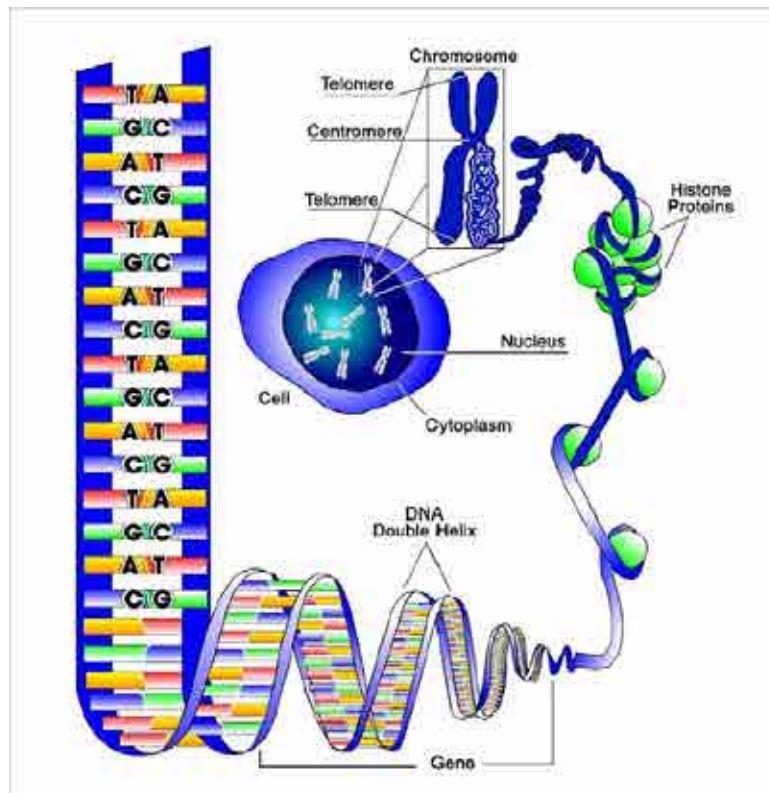
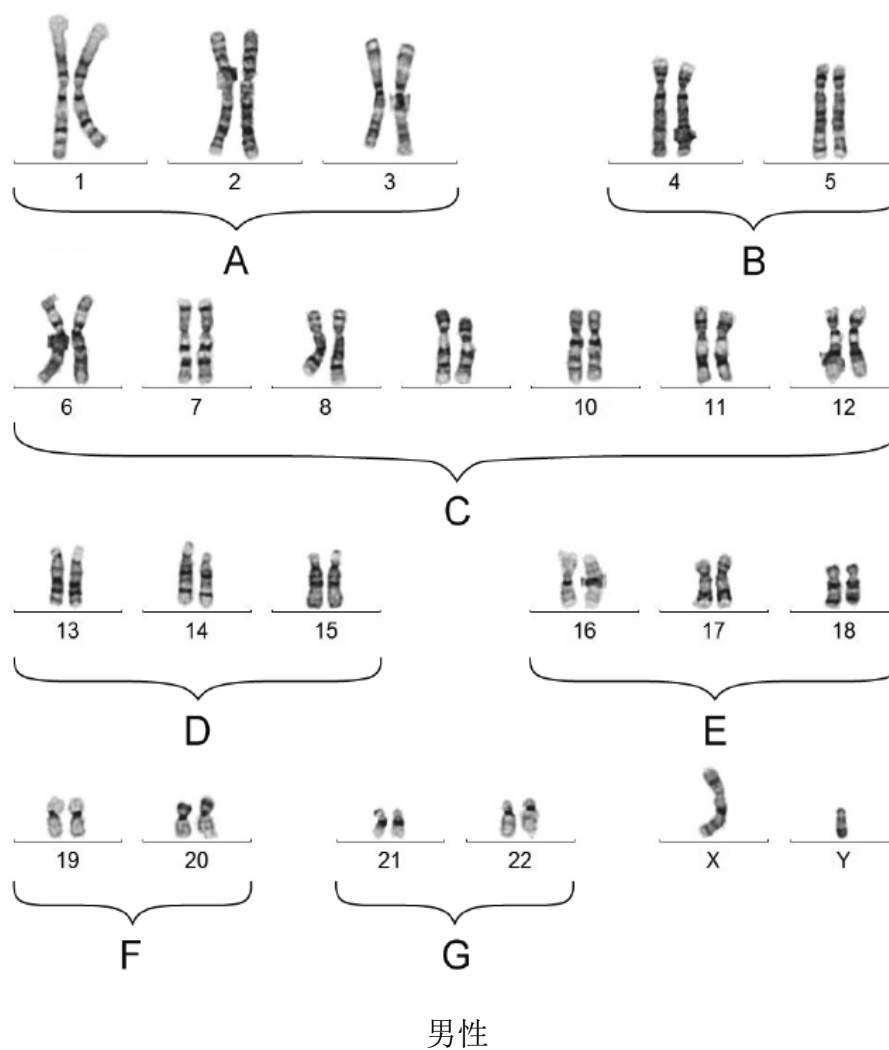


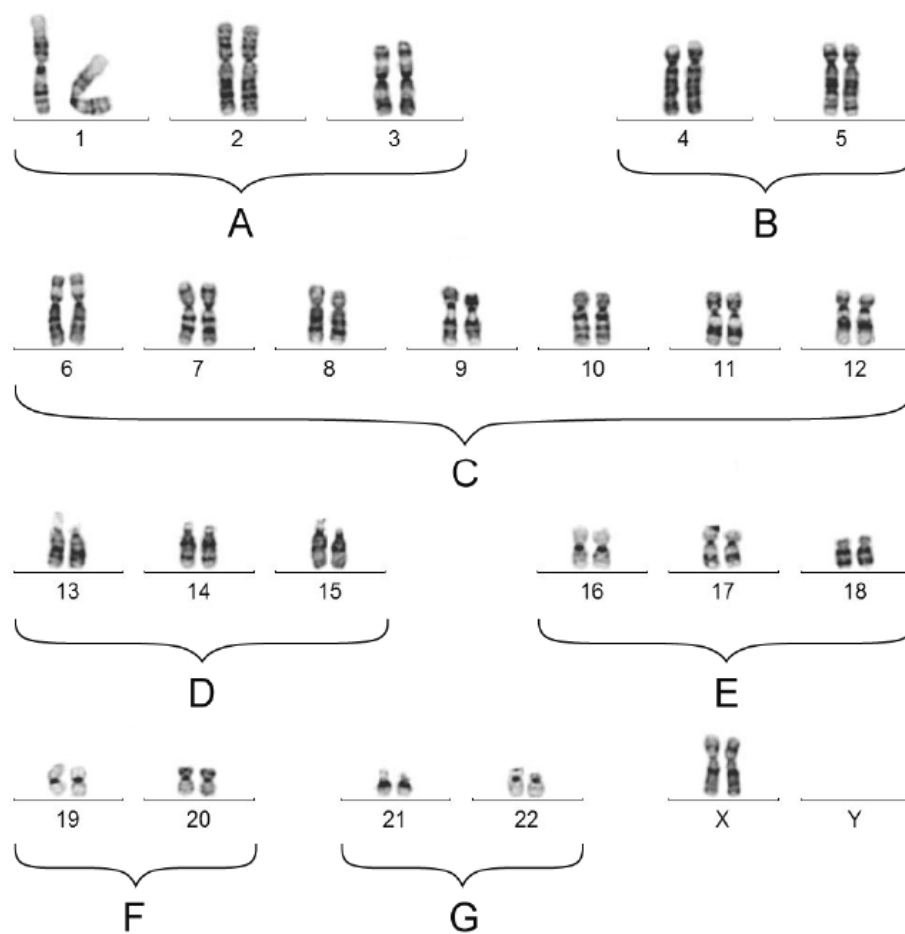
图 6. 导致高度凝聚中期细胞染色体的许多不同顺序的染色质组装示意图（由美国 REAC/TS 提供）。

图中文字从上到下，从左至右：Chromosome 染色体，Telomere 端粒，Centromere 着丝粒，Telomere 端粒，Histone Proteins 组蛋白，Nucleus 核，Cytoplasm 细胞质，DNA Double Helix DNA 双链，Gene 基因

5.2. 人类染色体核型和 DNA 含量

人类染色体核型（图 7）是人类特征染色体配伍，由 23 对不同大小的线形染色体所组成，在每一个二倍体细胞总共有 46 条染色体。人类染色体正常分为七组，即从 A 组到 G 组，再加上一对性染色体 X 和 Y[31]。染色体组分为：A 组：1~3 号，B 组：4 号和 5 号，C 组：6~12 号，D 组：13~15 号，E 组：16~18 号，F 组：19 和 20 号，G 组：21 和 22 号。





女性

图 7. 正常男性 (46, XY) 和正常女性 (46, XX) 的染色体分带核型图 (由美国 Mayo Clinic 提供)。

人类染色体两性相对 DNA 含量见表 2 和表 3。数据来自 Morton, 1991 年[32]。

表 2. 人类男性基因组中每对常染色体和每个性染色体所占 DNA 含量的百分比

染色体号	短臂	长臂	双臂	染色体号	短臂	长臂	双臂
1	4.03	4.25	8.28	13	0.50	3.09	3.59
2	3.12	4.92	8.04	14	0.50	2.97	3.43
3	3.12	3.62	6.74	15	0.54	2.80	3.34
4	1.76	4.63	6.39	16	1.23	1.86	3.09
5	1.64	4.47	6.11	17	0.88	2.02	2.90
6	2.05	3.72	5.77	18	0.63	2.05	2.68
7	2.05	3.34	5.39	19	0.94	1.17	2.11
8	1.57	3.31	4.88	20	0.98	1.29	2.27
9	1.61	2.96	4.57	21	0.35	1.23	1.58
10	1.38	3.15	4.53	22	0.41	1.35	1.76
11	1.83	2.71	4.54	X	0.97	1.61	2.58
12	1.23	3.27	4.50	Y	0.20	0.73	0.93
合计							100

表 3. 人类女性基因组中每对染色体所占 DNA 含量的百分比

染色体号	短臂	长臂	双臂	染色体号	短臂	长臂	双臂
1	3.97	4.18	8.15	13	0.49	3.04	3.53
2	3.07	4.83	7.90	14	0.50	2.88	3.38
3	3.07	3.56	6.63	15	0.53	2.76	3.29
4	1.74	4.55	6.29	16	1.21	1.83	3.04
5	1.61	4.40	6.01	17	0.87	1.98	2.85
6	2.02	3.66	5.68	18	0.62	2.01	2.63
7	2.01	3.29	5.30	19	0.93	1.15	2.08
8	1.55	3.25	4.80	20	0.96	1.27	2.23
9	1.58	2.91	4.49	21	0.34	1.21	1.55
10	1.36	3.10	4.46	22	0.40	1.34	1.74
11	1.80	2.66	4.46	X	1.92	3.16	5.08
12	1.21	3.22	4.43	合计			100

5.3. 细胞周期

物理或化学因素致染色体间期细胞断裂作用的重要信息，可以通过随后的细胞分裂染色体检测点来获取，对于体细胞这个检测点就是有丝分裂期。细胞周期包括多个阶段，这些阶段可以从其外观和功能上进行区分（图 8）。

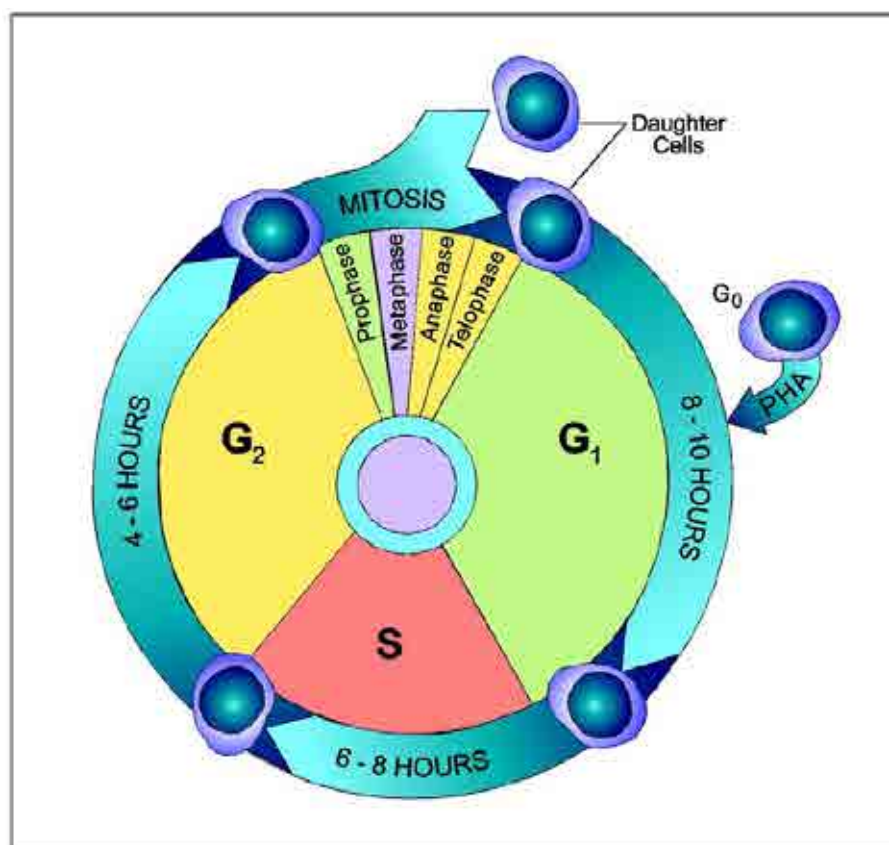


图 8. 细胞周期（由美国 REAC/TS 提供）。

图中文字从上到下，从左至右：Daughter Cells 子代细胞，MITOSIS 有丝分裂期，Prophase 前期，Metaphase 中期，Anaphase 后期，Telophase 末期，4-6 HOURS 4~6 小时，6-8 HOURS 6~8 小时 8-10 HOURS 8~10 小时

有丝分裂期分为前期、中期、后期和末期。在细胞间期，染色体物质（即 DNA 和相关蛋白）进行复制。这个时期称为“S”（合成）期，在此之前是 G_1 期（合成前期），S 期之后是 G_2 期（合成后期），它们均属于细胞间期。在未进入细胞周期的细胞中，如外周血淋巴细胞，细胞仍在 G_0 期。

对于周期细胞，间期是细胞周期中代谢最活跃的阶段，细胞核内的大部分能耗反应均发生在这个阶段。细胞周期中每个阶段的持续时间会随细胞类型和生长条件的不同而不同。通过使用放射性标记的 DNA 前体，如 3H 标记的胸腺嘧啶，能够确定各个阶段的时间长度。在淋巴细胞中，受刺激后的第一个细胞周期几乎是同步的，这些细胞特别便于放射生物学研究。当然，培养中的哺乳动物细胞周期是不同步的，但可以用一些技术使其同步。细胞周期的不同阶段对化学行为或辐射的敏感性也各不相同，产生的染色体畸变类型因细胞受到处理时所处的阶段不同而不同[33]。因此，在这种研究中采用一个同步化的细胞群进行研究很重要，至少要对处理时处于不同阶段的细胞比例有一个估计。

细胞周期的进程在不同的检查点受到控制，以最忠实地保证 DNA 的完整性和染色体向子代细胞的适当分离。主要的检查点分别作用在 G_1 期末、DNA 复制之前， G_2 期末、有丝分裂之前，及分裂中后期过渡时、染色体分离和细胞分裂之前。在这些检查点上，如果发现 DNA 损伤、不完全复制、或纺锤体结构异常，细胞周期进程就会被阻断。

6. 辐射诱发的染色体改变

首先报道 X 射线能够诱发染色体畸变的证据来自 Müller 对果蝇的遗传学研究[34]。这一发现被 Painter 和 Müller[35]的细胞学研究所证实。后来 Sax[36]在 X 射线诱发染色体畸变起源的基础上发展了他的“先断“假说，后来 Revell[37]提出选择性互换假说。Sax 提出，从本质上，在分离的染色体完全断裂发生后，损伤部位成为接触点，断裂末端位移最终结合形成互换[36]。另一方面，Revell 推测，损伤位点并没有完全分开，而是形成非稳定部位，可以与其他相似的位点相互作用而形成配对互换[37]。Chadwick 和 Leenhouts[38]后来又提出第三种可能，即损伤与未损伤的相互作用，按照 Revell 的说法，是一个损伤位点可能与未受伤的染色体相互作用，形成交换。

6.1. 辐射诱发的 DNA 损伤

电离辐射的特点是在时间和空间上产生离散的能量沉积事件（如，点状、团块状、径迹状），由于主要是水的辐解产生的活性组份，直接和间接地损伤了 DNA[39]。径迹结构的生物物理学研究表明，低 LET 辐射可在单一电子径迹上产生局部电离簇，高 LET 辐射则在邻近的空间范围内产生更多的电离[17]（图 9A）。电离辐射可以引起广泛的 DNA 损伤，包括碱基损伤（BD）、单链断裂（SSB）、无碱基位点（AS）、DNA-蛋白交联（DPC）以及双链断裂（DSB）等（图 9B）。

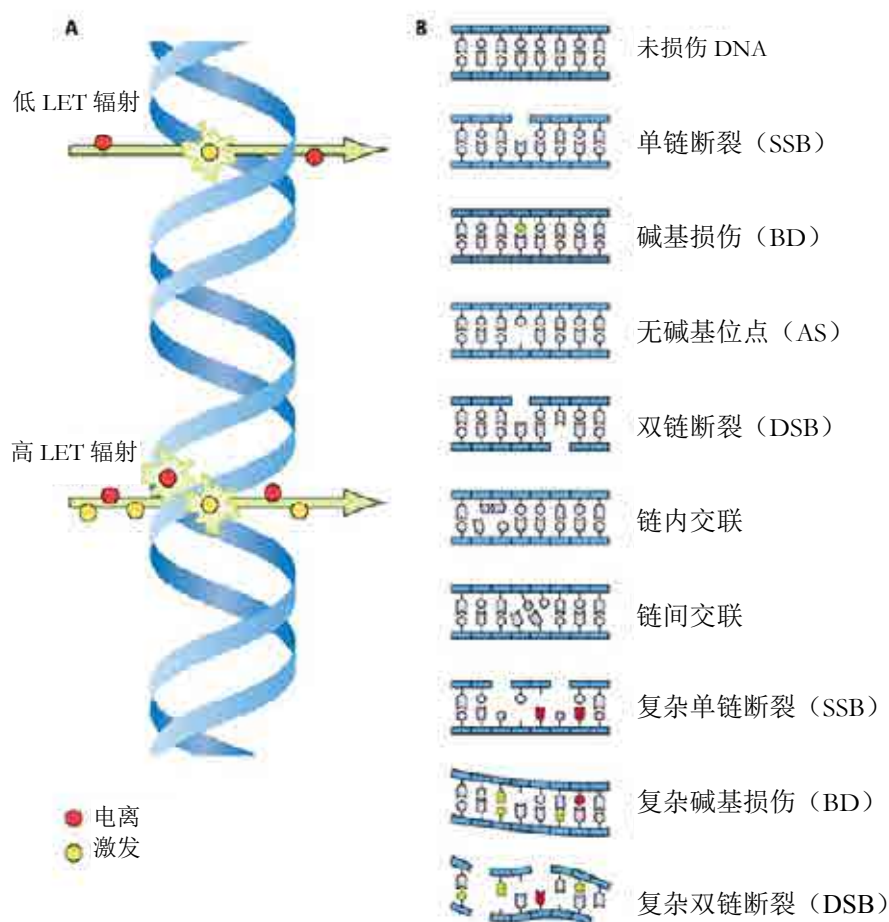


图 9. 低 LET 辐射和高 LET 辐射的电离方式 (A) 以及辐射诱发的 DNA 损伤 (B) [40, 41]。

水的辐解形成一个离子对 ($\text{H}_2\text{O}^+ + \text{e}^-$) 所需的能量约为 20 eV，而电离辐射在事件中沉积的能量范围可达到数百 eV，平均为 60 eV。由于这个能量足以产生大约三个离子对，从而形成的离子基团将在邻近的固定区域内产生作用。对于所有类型的辐射导致的 DNA 损伤可以是单个的 DNA 损伤，包括 SSB，AS 和 BD，以及多重损伤位点 (MDS) 或者集簇性 DNA 损伤[42]。DNA 中产生的多重损伤位点可能包含一个或多个 DSB、几个 SSB 和 BD。复杂的集簇性 DNA 损伤很难修复或者根本不可修复，因此会导致致死性染色体畸变的发生[43]。

细胞自身具有对 DNA 损伤作出反应的复杂信号传导通路、细胞周期检测点和修复途径。BD、AS 和 SSB 可通过不同的过程进行修复，如碱基切除修复 (BER)，核酸切除修复 (NER) 和单链断裂修复 (SSBR) [44, 45]。DPC 经过 NER 或者同源重组 (HRR) 进行修复[46]。DSB 是关键性的损伤，它的错误修复或者未修复可能形成像双着丝粒或易位这样的染色体畸变[47]。HRR 和 DNA 非同源末端连接 (NHEJ) 是两个主要的 DSB 修复机制[48, 49]。这两种机制在细胞周期的不同阶段发挥作用。而 NHEJ 实质上在整个细胞周期都参与 DSB 修复，而 HRR 则只有在 G_1 期和更多地是在随后细胞进入 G_2 期的过程中发挥作用[50]。Sasaki [51]发表的一篇全面综述，阐述了染色体畸变形成的生物物理学和分子过程。

6.2. 染色体型畸变

有人提出了染色体畸变的分类体系[52, 53]。

受有丝分裂原刺激的外周血淋巴细胞群，通常不进入细胞周期，而停留在细胞周期的 G_0 期。辐射诱发的染色体畸变最终是染色体型畸变，即畸变涉及染色体的两条染色单体。众所周知，电离辐射是 S 期非依赖性断裂剂，与此不同，紫外线和化学剂是 S 期依赖性诱变剂。所以，细胞在 G_0/G_1 和 G_2/S 期分别受到电离辐射照射后，诱发染色体型和染色单体型畸变。然而，紫外线和化学剂在整个细胞周期的所有阶段主要诱发染色单体型畸变。如果在受到电离辐射照射的 G_0/G_1 期细胞中观察到染色单体型畸变，那么可以推测要么这些畸变不是辐射诱发的，要么就是细胞已经通过了第二个离体细胞周期。

染色单体型畸变之所以不作为生物剂量学的指标，是因为他们不是由 G_0 期的淋巴细胞照射诱发的。尽管如此，染色单体型畸变仍作为染色体损伤率总本底的一部分而存在，而且可能过量存在，如果因疑似受照而接受调查的人员也有暴露于化学断裂剂的历史的话。因此，要求显微镜计数者对染色单体型畸变有充分了解，不得与染色体型畸变混淆。另外，随着对迟发染色体非稳定性和旁效应研究兴趣的增长，对染色单体型畸变又有了新的兴趣。因之，本节讨论染色体型畸变，染色单体型畸变在第 6.4 节介绍。

6.2.1. 非稳定性畸变

双着丝粒

双着丝粒（图 10）是用于生物剂量估算的主要畸变类型。

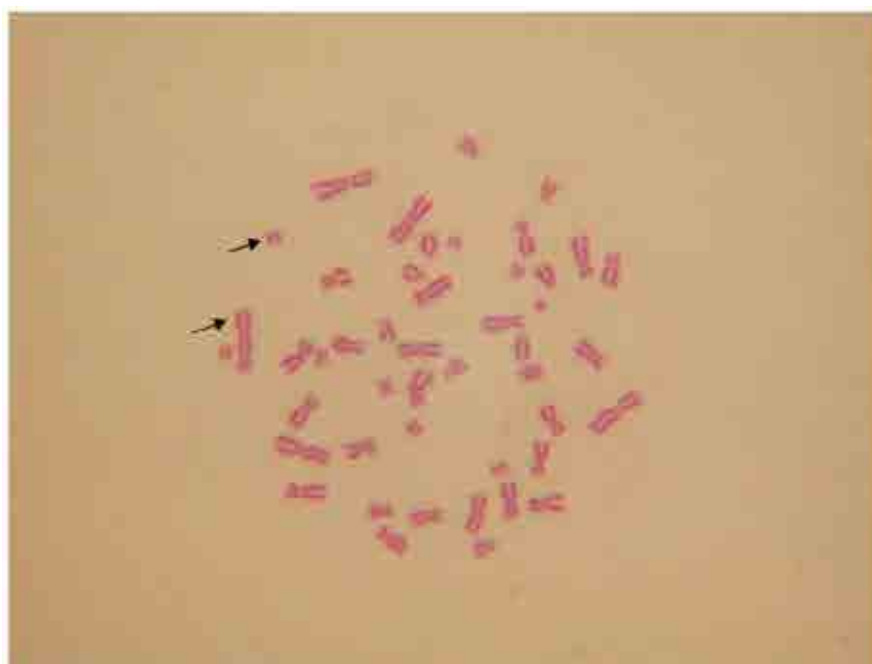


图 10. 一个双着丝粒染色体伴有无着丝粒断片（吉姆萨染色）。

双着丝粒畸变是两条断裂染色体的着丝粒之间的互换，就完整形态而言，伴有一条无着丝粒断片，由这些染色体的无着丝粒组成。特别是在大剂量照射后，还会形成多着丝粒构型。三着丝粒体伴随两对断片，四着丝粒体伴随三对断片，以此类推。双着丝粒检测技术将在第九章详细介绍。

着丝粒环

人类淋巴细胞中，着丝粒环比双着丝粒罕见得多。一些研究者把它们与双着丝粒结合起来进行剂量估算，而另一些研究者则选择忽略不计。染色体环是一条染色体的两条臂断裂后重新相互连接互换所形成，同时也伴随一对无着丝粒断片（图 11）。

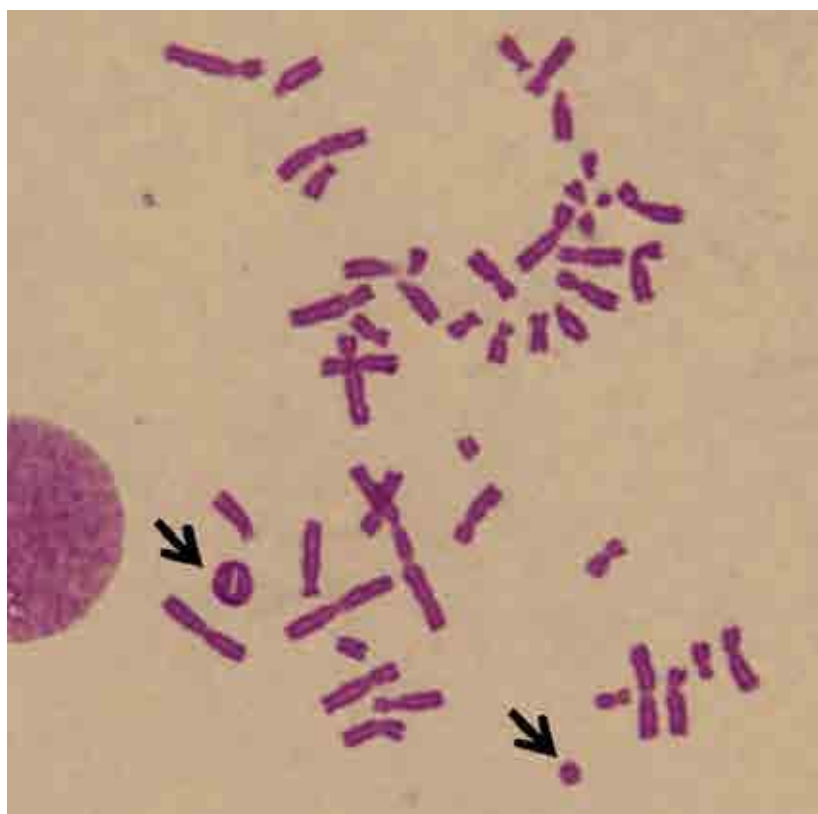


图 11. 有两个着丝粒环（箭头所示）、1 个双着丝粒和无着丝粒断片的中期细胞分裂相（吉姆萨染色）。

无着丝粒断片

无着丝粒畸变可独立于上述互换而形成，通常称作额外的无着丝粒。它们可以是大小不同的染色体末端缺失或中间缺失，但也并不都能确定其生成来源，因此往往伴随其他畸变存在。无着丝粒环通常在圆点中间可以看到清楚的空隙，来源于中间缺失，而微小体是两个小点，大多数源于末端缺失[54, 55]。

流氓细胞

流氓细胞定义为从培养的外周血淋巴细胞中制备的中期分裂细胞，在没有明显原

因的情况下显示出极严重的染色体损伤。如图 12 所示，细胞中出现大量的染色体断裂和重排，很难找到 1 个或 2 个以上的正常单着丝粒染色体。

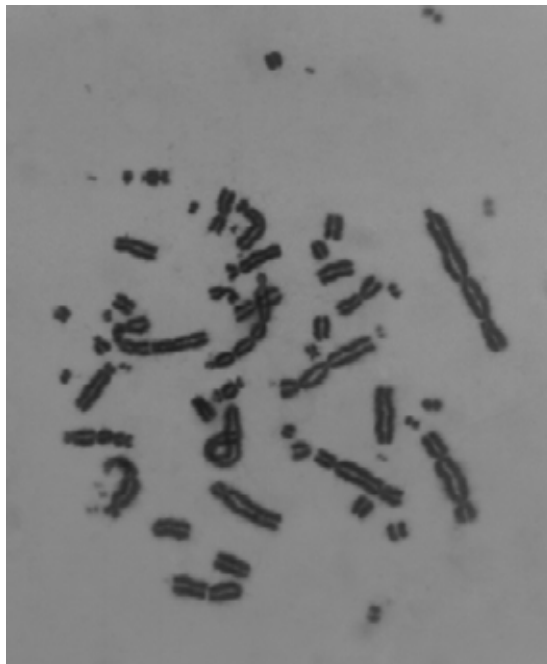


图 12. 在 500 个正常细胞中发现一个流氓细胞，来自一个健康的、不吸烟、没有辐射照射职业或医疗史且生活在低氡地区的对照人员。中期细胞中可见多个多着丝粒染色体和无着丝粒断片，并且包含大量的双微小体。

相比之下，流氓细胞含有大量的多着丝粒染色体、无着丝粒断片和双微小体。双微小体是包含几百万碱基 DNA 的染色质小体，可定义为 DNA 序列放大后的细胞遗传学等同物[56]。

在全世界所有的种族和族群中都观察到了这种独特的细胞。例如，1968 年，从生活在委内瑞拉热带雨林中的雅诺马米部落的印第安人血液样本中首次观察到流氓细胞[57]。后来在包括英国、日本、乌克兰、立陶宛和俄罗斯联邦在内的许多国家的居民中都报道发现了这种细胞。术语“流氓”细胞是 Awa 和 Neel [58]命名的，他们介绍了广岛原子弹爆炸受照和未受照对照人群后代中的这种细胞。与原爆幸存者的研究相类似，针对生活在切尔诺贝利附近的受照和未受照人群的细胞遗传学研究证实，流氓细胞与受照与否并无关联，因为在没有受照的对照组中也发现了这种细胞[59, 60]。

虽然，已经肯定流氓细胞在世界范围的广泛人群中都存在，但临床意义尚不清楚。有些研究进行了系列取样，发现流氓细胞在不相关的群体的某些个体中是短暂出现的，断断续续地、同时爆发地出现。值得注意的是，临床的细胞遗传学文献并没有关于流氓细胞的报道，这可能是由于三天较长时间的培养使细胞分裂了 2 或 3 次，这段时间内流氓细胞有可能已经丢失。另外，临床细胞遗传学家仅需分析相对较少的前期细胞（如 15~20 个）就可以诊断患者核型的正常与否。相反，辐射细胞遗传学家则常规分析一个人的几百个甚至一千个或更多的第一次分裂的中期细胞，这就大大增加了发生率很低的流氓细胞的检出概率。总之，尽管一些证据提示，病毒（如 JC 人类多

瘤病毒）在它们的表达中可能起一定作用，但是，人类淋巴细胞中的流氓细胞的病因学和临床意义仍然是个谜[61]。

鉴于流氓细胞的存在，因此建议，出于多数生物剂量学检测的目的，具有流氓细胞形态的分离的中期细胞应当排除在剂量估算之外。但有一种例外是，在另有证据表明存在高 LET 辐射照射的情况下，理想地讲，会出现具有连续损伤谱的多重损伤细胞。

6.2.2. 稳定性畸变

相互易位

相互易位是两条独立的染色体末端部分的互换。不同类型的易位起初是用 G-显带技术和核型分析来识别的，但这种技术对于常规生物剂量检测来说过于费力。用固定吉姆萨染色方法观察易位并不那么可靠。如今，使用 FISH 方法能够使易位用于剂量估算（第 10 章）。采用 FISH 法，易位可以显现为双色单着丝粒染色体（图 13）。

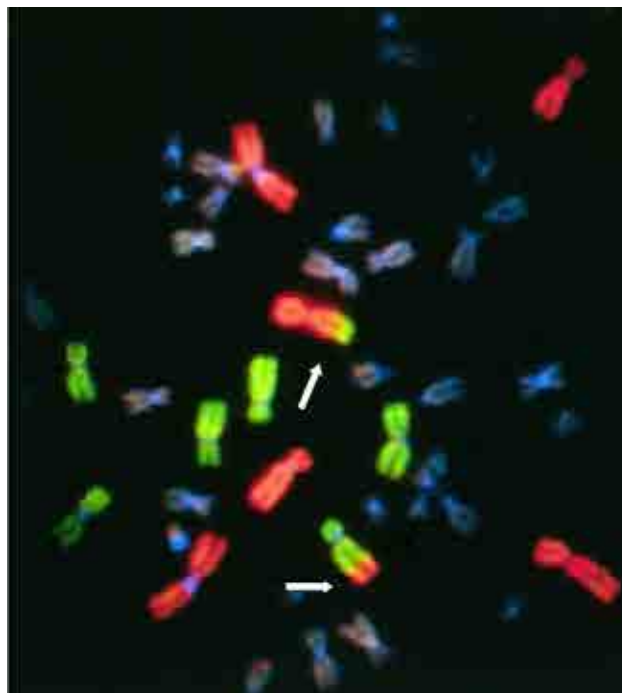


图 13. 用 FISH 染色体“涂染”法检测一个中期细胞的易位图示。1、2、4 号染色体被染成红色，3、5、6 号染成绿色。两条双色染色体（2 号和 5 号）代表一个相互易位，其长臂末端发生了互换。（由 Ramsey 和 Tucker 提供，LLNI，美国）

非相互易位

当只能看到一条双色的染色体时，非相互易位通常叫做末端、不完全或单向易位。然而，通过全染色体探针、着丝粒和端粒探针的联合应用，许多被认为是末端或者不完全的易位实际上是相互易位。这种情况极大可能是因为遗失的配对信号低于目视分辨率，因此建议将这种模式叫做单向交换或易位。目前的观点认为，真正的末端

易位确实存在，但占总体的比例很小，比如，4 Gy 照射下约占 5%[62]。

中间易位（插入）

这是一条双色染色体，显示一条染色体的一片无着丝粒插入到另一条染色体的一个臂内。见图 14。

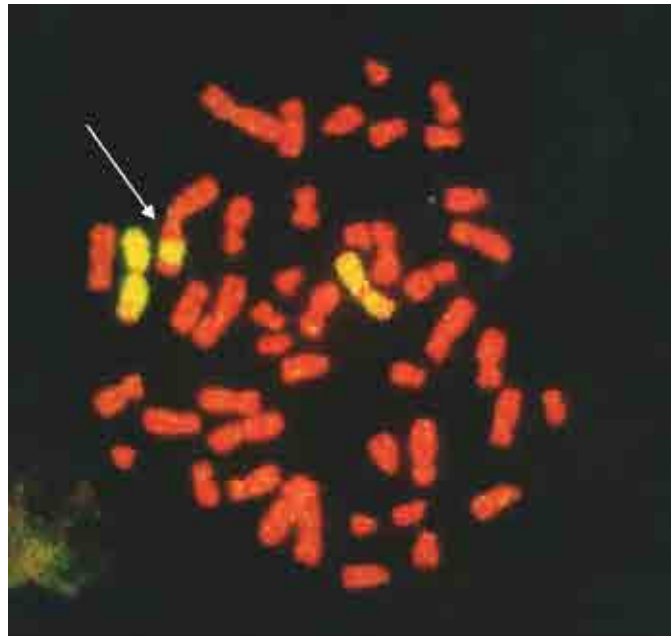


图 14. 包含一个插入畸变的人类中期分裂相。第 1 对染色体染为黄色，其他所有染色体被碘化丙啶（PI）染成红色。

稳定性和非稳定性细胞

FISH 回顾性生物剂量检测已经成为可能，因为稳定性畸变，如相互易位，可以成功地通过有丝分裂进入子代细胞。然而为了获得成功，全基因组必须是稳定的。如果在同一个细胞中存在一个无关的和非稳定的结构，如双着丝粒或额外的无着丝粒，那么易位仍然不能达到分裂。这不仅需要考虑个别畸变类型的稳定性，同时也要考虑整个细胞的稳定性。这个概念是许多年前由 Buckton 等人 1967 年提出的[63]，他们用 Cs 和 Cu 分别代表稳定性和非稳定性细胞。随着 FISH 回顾性生物剂量检测技术的发展，这个概念再一次成为主流概念，证实了相互（双向）易位似乎比不完全（单向）易位更加稳定[64, 65]。

6.3. 染色单体型畸变

染色单体型畸变的分类与染色体型畸变的相同；大多数情况下，参与染色单体型畸变的明显部位是在一条染色单体上，而不像染色体型畸变是在整条染色体上。

末端缺失和中间缺失

末端缺失是损伤的染色单体断片末端发生明显的位移损伤（图 15）。

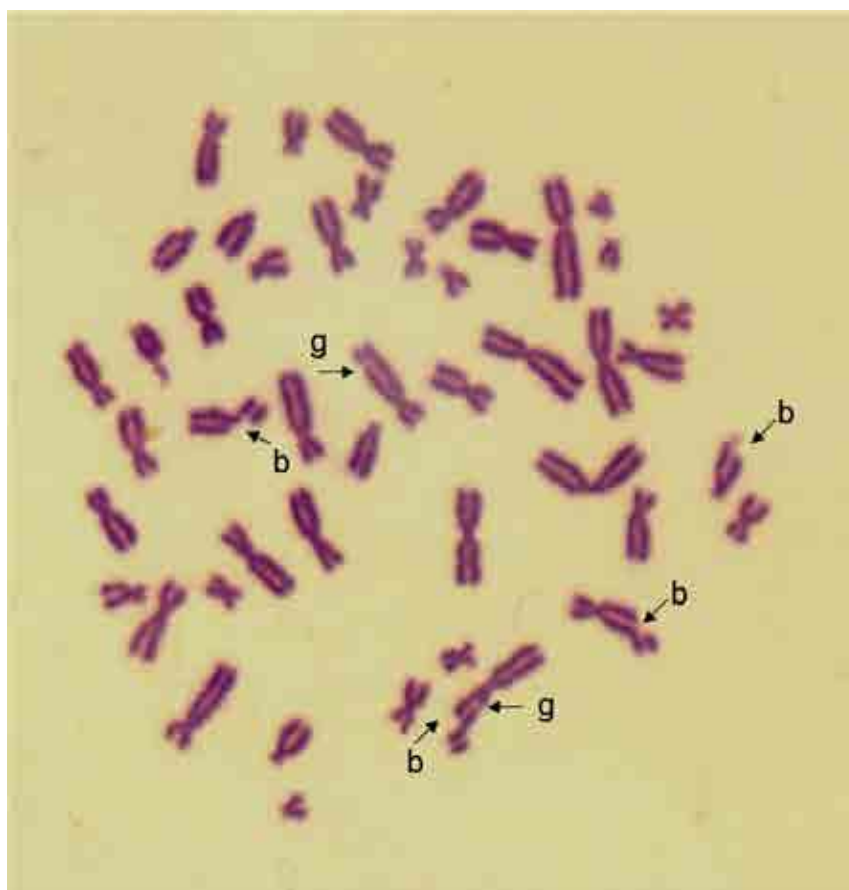


图 15. 伴有染色单体断裂 (b) 和间隙 (g) 的中期分裂相。

如果没有位移，那么在着丝粒区和无着丝粒区之间的不着色区的宽度，必须大于染色单体的宽度，才可考虑为末端缺失。这个定义用来区别末端缺失（染色单体断裂）和无着色损伤（间隙）。

染色单体型中间缺失不像对应的染色体型缺失那样容易观察到，部分原因是由于小的缺失碎片常常与发生缺失的染色体分离，因而观察不到。

无着色损伤

图 15 中的无着色损伤（或间隙）是染色体的不着色区或者着色非常浅的区，出现于一条染色单体（单的）或者两条姊妹染色单体中，在相同的位点（双的）出现。如果不着色区的宽度没有超过染色单体的宽度，则该事件记录为一个无着色损伤。很显然，这只是一个工作定义。一般还是建议记录无着色损伤，但应该与染色单体缺失分开。其发生率不应该包含在每个细胞畸变的总数内，因为它们的意义以及与其他“真正”畸变类型的关系还不清楚。

等位缺失

等位缺失的出现是染色单体型畸变的一个例外，因为其涉及两条染色单体，在两条染色单体的相同位置上有明显的断裂。然而，在适当的材料中可以发现，等位缺失与其它单体型畸变的情况一样，是在细胞周期的 S 期和 G₂ 期由辐射诱发的。

有几种可能的类型，这与姊妹联合体发生的性质有关。假如出现一个姊妹联合体，则可以区分染色单体型畸变和染色体型末端缺失。不过，在哺乳动物细胞内，姊妹联合体事件非常少见，大部分等位缺失并非是非联合体相临或末端类型的。无着丝粒断片往往与缺失的染色体着丝粒部分无关。分析常规指出，因为 G_0 期淋巴细胞中辐射诱发的畸变属于染色体型的，所以所有的成对无着丝粒断片应当分类为染色体型末端缺失。由于等位缺失率在任何情况下，在淋巴细胞内出现的频率较低，所以这个常规是不合理的。

非对称互换

非对称互换（臂间互换和非对称单体互换）就是染色体型双着丝粒畸变中的染色单体型畸。

对称互换

对称互换（对称性单体互换），见图 16，是染色体型相互易位中的单体型畸变。



图 16. 伴有单体型对称互换的中期分裂相（吉姆萨染色）。

在染色单体型对称互换中，体细胞配对两条染色体之间保持相互配对的相互联系，因此缺少任何染色体分带技术也能够容易地观察到。

非对称互换和对称互换

非对称臂间互换和对称臂间互换各有两种形式，但分析中期细胞时，每一种形式中只有一种可以识别。体细胞配对可以观察到对称互换。

四射体

四射体（三臂构型）可以描述为一条等位缺失的染色体与另一条染色单体缺失的染色体之间的互换。

这个分类模式显然不够详尽，因为还有许多类型的复杂畸变可能产生，这里所介绍的只是最常见的。更完整的分类可参见 Savage 的报道[52]。

6.4. 早熟染色体凝聚

当周期细胞进入有丝分裂期时，染色质凝聚为熟悉形状的染色体。有些技术也可以使未进入有丝分裂期的染色质发生凝聚，这种技术称为早熟染色体凝聚（PCC）。用仙台病毒或者聚乙二醇（PEG）作为融合剂，将间期细胞融合到有丝分裂期的中国仓鼠卵巢（CHO）中或 Hela 细胞中，这样可以诱发早熟凝聚[66]。然而，采用仙台病毒进行融合，要求细胞膜特别容易接受病毒颗粒，而且已经报道，使用仙台病毒并不能对 G₀ 期的淋巴细胞获得满意的融合。为了生物剂量学目的，采用 PEG 诱导 PCC 的方法克服了这一困难[67]。

已经研发了化学诱导 PCC 的方法，使用 DNA 磷酸化抑制剂，如岗田酸（okadaic acid）或花萼海绵诱癌素 A（calyculin A）等。这些方法多数都要求细胞在培养液中循环[68, 69]。

PCC 技术是一种非常有用的研究工具，用于探测照射后即刻过程及染色体断裂重接，或错误修复形成畸变（如双着丝粒和易位）的动力学，这一技术将在第 11 章详细介绍[70~72]。这些研究表明，在分裂中期最终看到的双着丝粒体、完全和不完全易位、以及无着丝粒断片，都形成于 G₀ 期的不同时间，与照射剂量有关。人类淋巴细胞受到低剂量的 X 射线照射（1~2 Gy），双着丝粒和易位迅速形成。然而，在 4~6 Gy 的高剂量照射后，染色体互换的频率与染色体断裂重接（修复）成正比增加。

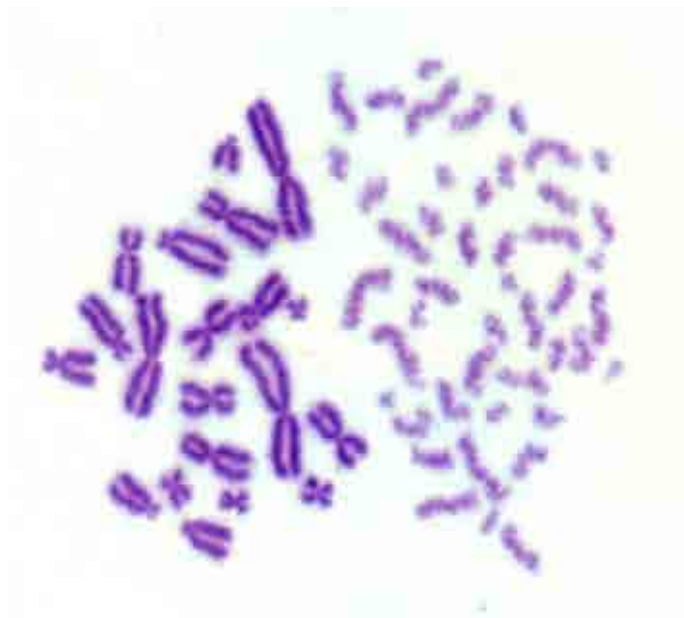


图 17. PEG 诱导的未受照人类淋巴细胞与有丝分裂期的 CHO 细胞融合后诱发的早熟染色体凝聚。可见 46 条明显的单条 PCC 染色单体。

6.4.1. PCC技术

PCC 技术可分为以下几种：

融合 PCC 检测是 1974 年文献首次报道的[73, 74]。在此检测中，通常用 CHO 细胞使淋巴细胞与有丝分裂细胞融合，以便诱导人类染色体早熟凝聚[67]。通过这种方法可以计数人类染色体的条数，因此也可以计数辐射诱发的超出本底频率的染色体断片的数目。这种方法也可以用于估算非均匀照射[75]。这种方法的主要优点是取血后不久就可以观察到损伤结果。

间期染色体快速检测（RICA）使用 FISH 探针可以观察到辐射诱发损伤的形态。采用人工方法对染色体 DNA 进行凝聚，是为了识别染色体结构域，并检测两个不同结构域之间的互换[76~78]。

双着丝粒-PCC 检测可以观察到传统 M 期以外的其他细胞周期（主要是 G₂ 期）的双着丝粒，因此可以看到传统双着丝粒检测中看不到的细胞[79]。当照射后淋巴细胞计数下降，并且当难以获得典型的有丝分裂细胞时，这种方法非常有用。使用融合-PCC 技术可以缩短从采样到剂量估算之间的时间[79]，而使用化学技术诱导 PCC 的方法，大部分实验室标本要培养 48 小时，因此没有缩短时间。

PCC 环检测用以观察在细胞周期的不同时期辐射诱发的环状结构（图 18）。

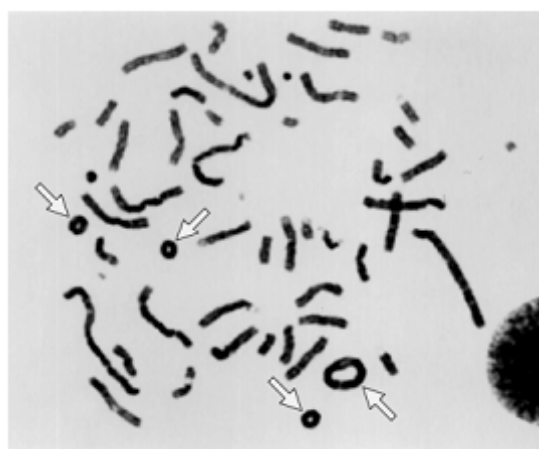


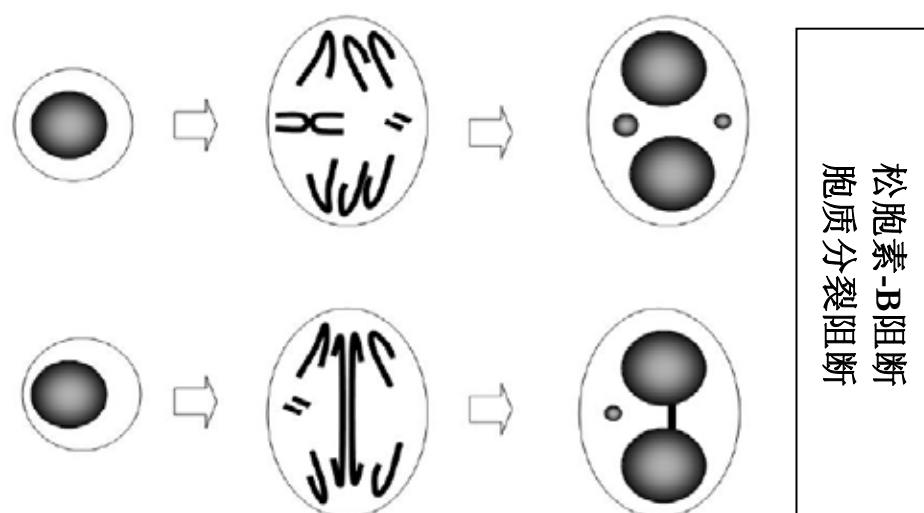
图 18. 东海村事故患者 A 淋巴细胞中的 PCC 环（箭头所指）（第 11.4 节）。

这种方法的主要优点是，它所测量的剂量比用经典的双着丝粒检测得到的剂量要高得多，因为只有在低 LET 辐射剂量大于 20 Gy 时，环的数目才达到饱和[70, 80, 81]。

6.5. 微核

微核（MN）由细胞分裂后期未进入子代细胞核的滞后染色体断片或整条染色体所形成（图 19A, B）。因此看上去是完全分离的小球体，其形态和染色性质与细胞核相同，存在于子代细胞的胞质内[82]。

微核形成

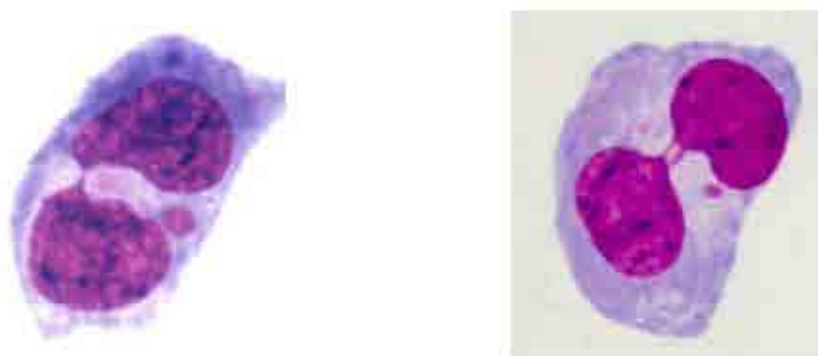


核质桥形成

A



B



C

图 19. (A) 胞质分裂阻断微核检测中微核及核质桥起源机理示意图。(B) 双核细胞中没有和伴有 1 或 2 个微核。(C) 双核细胞伴有 1 和 2 个核质桥，每个核质桥的细胞都伴有一个微核。

上世纪 80 年代中期引入了一项重大技术创新。在培养体系中加入松胞素 B (Cyt-B)，阻断被培养淋巴细胞中的胞质分裂，而不抑制胞核分裂。胞质分裂阻断[83, 84]产生双核 (BN) 细胞，而并不允许两个子体细胞分离。因此用这种方法，可以区分正在增殖的细胞（在第一次有丝分裂后）和非增殖的细胞，可以明确地计数双核细胞中的微核数目。这种改进的方法可以对胞浆完整的双核细胞中的微核进行定性和定量分析（图 19B）。

用着丝粒探针可以进一步改进双核细胞中微核的测量，可以区别是来源于无着丝粒断片的微核，还是来源于整条染色体的微核[85, 86]。

目前微核计数自动化的发展，为这项检测技术在大规模辐射伤亡检测和常规生物监测中的应用提供了新的前景[87]（第 13.3.3 节）。

胞质分裂阻断微核检测目前已经演变成为一种细胞学检测，可以评价一系列的染色体损伤，包括断裂、非对称染色体重排、染色体丢失和不分离，以及坏死、凋亡和生长抑制等[86]。这种方法也可以特别用于核质桥 (NPB) 检测，（图 19A, C）。核质桥是双着丝粒体的一个代替标志物，是由端粒末端融合，或者 DNA 双链断裂错误修复[86]而形成的。在胞质分裂阻断细胞检测中测量到的核质桥也适用于电离辐射照射的生物剂量检测[88]。在核质桥和双着丝粒以及着丝粒环之间观察到了密切的关联和相似的剂量-效应曲线[89]。

微核分析以及细胞学检测的详细内容见第 12 章。

7. 血 样 采 集

7.1. 时间

全身辐射照射后，应在几个小时内抽取静脉血样，以 10 mL 为宜。不过，在局部照射和不均匀照射情况下，循环的和血管外细胞池的淋巴细胞直到 24 小时左右才能达到平衡[90]。这可能会导致血样中受照细胞的比例不具有代表性，因此建议采样至少延迟到第二天。应当努力保证快速获得血样，因为即使照射后四周患者的血液参数仍在正常限值内，但畸变产额已开始下降，引起辐射剂量估算的较大不确定性[91]。

在严重过量照射情况下，白细胞计数可能会严重下降，血样采集的“时间窗口”可能只有几小时或者几天，之后淋巴细胞数量会降至不能满足细胞遗传学分析的要求。如果医学处理包括全血输学和成份输血，那么在治疗开始前采集患者的血样非常重要。出于科学考虑，实验室应尽量按频繁的时间间隔采集血样。这样做在伦理上是可以接受的，因为采血本身是为了监测白细胞分类计数的变化。

细胞培养并不总是能够快速进行，比如，如果采样发生在交通不便的偏远地区。血样可以保存在冷藏状态，但淋巴细胞活性很快降低是一个大问题[92]。克服这一困难的方法是，血样采集后马上用 PHA 刺激并保持在低温状态下（低于 20℃），以保证淋巴细胞不转化和不进入细胞周期，直到 37℃ 使细胞升温为止。由 M. S. Sasaki（个人交流）设计的以下方法可以使细胞在培养前至少保存两个星期。

- (1) 提前准备好 10 mL 无菌试管，内含 5 mL Leibovitz's L-15 培养基，20%胎牛血清和 4%脱水 PHA。（在长时间运输过程中，Leibovitz's L-15 培养基是必须的，因为它的氨基酸含量比其他普通培养基高 10 倍，pH 值长时间保持稳定）。
- (2) 用常规肝素抗凝管采集血样。
- (3) 取 5 mL 肝素抗凝血，加入含 L-15 培养基的试管内，混匀。
- (4) 保持试管低温（<20℃）；在这种条件下保存血样或者快递到实验室，不会明显降低细胞活力。
- (5) 然后将细胞用常规培养基清洗，按照后述第 9.1 节介绍的步骤处理，以便进行常规培养。

如果用 Leibovitz 培养基处理，应该用相同条件下制备的剂量-效应曲线来验证。

7.2. 抗凝剂

虽然可以使用肝素钠或者肝素铵作为抗凝剂，但不含防腐剂的肝素锂是淋巴细胞培养的最常用抗凝剂。其他常见的抗凝剂，如乙二胺四乙酸（EDTA），常常导致细胞

生长不良，因此不要使用。如果接收血样用了不当的抗凝剂，最好要求用新鲜血样。然而，这并不总是可能的，在这种情况下可以通过清洗来“挽救”样本。步骤是取 4 mL 血液，加 6 mL 平衡盐溶液（Hank's 或者 Earle's）或者培养基，600 g 离心 3~5 分钟。去除上清，再加入 10 mL 新鲜的洗涤液，冲散细胞球，再次离心。在最后一次去除上清后，洗过的细胞可以用含 10%胎牛血清的培养液恢复到开始的体积。用后面第 9.1 节的方法培养细胞，将洗过的样本同正常血样一样进行处理。

7.3. 容器

含适量肝素锂的一次性玻璃或塑料试管可从多家生产商购得。可使用老式的拧盖试管或者真空管。这些试管必须是无菌的，很多厂家常规提供的试管是无菌的，但需要确认。应当避免使用含有玻璃珠、或塑料珠或凝胶的试管。如果用干燥的肝素抗凝，必须保证取血后颠倒几次试管与血液适当混匀。细胞遗传学实验室最好能够提供自己储存的血样试管，顺便给医生提供一套详细的说明和地址书写正确的货包，以便样本的返回。

7.4. 运输

运输过程中，血样的理想温度应保持在 18~24℃。如果可能遇到温度超出此范围的情况，可以准备冷冻剂或室温包裹和温度记录仪。在任何情况下，运输过程中要避免冷冻。

样品的运输应遵守有关感染物品运输的国家或国际适用条例，如现行的 WHO 感染品运输条例导则[93]。这个文件也向承运人解释了如何对感染品或潜在感染品，如诊断用血样，进行分类、记录、标记、标签和包装。

可以使用标准的玻璃或塑料肝素锂试管。应将试管置放于坚硬、不易破碎且防水的第二容器内。容器也应含有缓冲材料和充分吸收的材料，以便能够吸收全部内容物，但不能含有冷却袋。第二容器应放置在外包装内，如一个坚硬的纸盒，并贴上适当的标签。为了诊断目的，在运送不知是否含有病原体的血样时，包裹上应标记“UN 3373. 生物物品，B 类”的字样。标签应该包括这句话，同时用一张白色的菱形标签，在上面书写黑色字母‘UN 3373’。另外，包裹要标记与本次运输有关的寄件人的姓名、地址和电话号码；收件人的姓名、地址和电话号码；及负责人的电话号码[93]。

如果需要冷藏或者室温包裹，这些东西应该放在第二容器的外面，外包装则用隔热材料，如扩大的聚苯乙烯盒子。符合规定的包装盒可以从市场上买到。

对于国际运输，发货人需要获得任何必要的进出口许可，并在发货前通知接收实验室，以便根据需要办理进口许可。使用国际快递公司提供的‘门对门’快递服务较为方便，他可以代理所有的海关手续等。

2~3 天的运输时间是可以允许的；然而，血样需要特殊的投递服务，以避免长期延误，如节假日前后。

在空运期间，血样在过安检时不应受到 X 射线照射。可能的话，可以在货包中放置一张 X 光胶片或者标准热释光剂量计（TLD）或光激发光（OSL）剂量监测计。“避免 X 射线”的标签应该贴在货包上。这些条件也要写在随行的文件上。

8. 离体剂量-效应曲线的制备

8.1. 总体因素

尽管取得了技术上的改进，不同工作人员采用了更为类似的数据分析统计软件，但是各实验室之间的刻度曲线仍然存在差异。使用其他实验室拟合的刻度曲线解释剂量，可能会引入额外的不确定性，因此建议，任何进行生物剂量检测的实验室都应该建立自己的剂量-效应数据[94]。

多数事故过量照射都由 γ 辐射源引起，但也有相当数量的事故涉及 X 射线。这两种低 LET 辐射的刻度曲线是不同的，尤其是在低剂量时。因此，对于开展生物剂量检测项目的实验室来说，首先应当为这两种辐射建立剂量-效应曲线。幸好涉及中子照射的事件是罕见的，但是也应当考虑到一个实验室被要求响应临界事故的可能性。如果这样，就需要建立裂变中子谱的刻度曲线。

淋巴细胞离体照射应该尽可能与活体条件接近，这样可以获得相同的剂量-效应关系[95]。应当使用采集在肝素锂抗凝管中的新鲜血样，在 37°C 条件下全血照射。照射后在 37°C 静置 2 小时，然后用标准方法培养，与进行双着丝粒、易位和微核分析的疑似过量受照患者的血样培养方法相同。

8.2. 物理因素

剂量-效应曲线的制备必须有可靠准确的物理剂量测量来支持，有几点需要注意。血样放置的位置要容易推算剂量，并且要尽量离放射源远些，这样才可以认为是均匀照射。例如，假设样品的厚度为 1 cm，那么需要离照射源至少 1 m，才能使样品前后的剂量差异小于 2%。为了带电粒子的平衡，血样周围必须有足够的材料。对于 ^{60}Co γ 射线，有 4 mm 单位密度的材料就够了；对于 250 kVp X 射线，仅仅需要 1 mm 的材料。对于中子，一般 1 mm 的材料也够了。

应将周围材料减到最小，以避免射线散射的复杂性。选用材料的原子结构应尽量与血样的相同，因为贴近血样容器壁的血液所受的剂量会由管壁内相互作用产生的电子所引起。非常不匹配的原子成分将导致细胞受到不均匀照射。对于 X 和 γ 射线，电子密度是不匹配的主要因素，而对于中子，原子组成则是重要因素，因为中子与靶原子核产生相互作用。

照射条件应该通过物理测量来校准，最常见是用电离室，但也可以选用其它方法。如图 20 所示的丙氨酸测量。



图 20. 放置 15 mL 试管和 10 mL 真空采血管、用 γ 辐射源进行照射的装置。照射盒设计有机玻璃壁厚为 6 mm，以确保带电粒子平衡。照射盒在两端还配有接口，允许循环水浴（未显示）的水流动，以使照射过程样品保持在 37°C。在用于监测剂量的试管和真空管内分别放置水或丙氨酸小瓶[97]（由美国 AFRRI 提供）。

在物理剂量计的探测器周围，应该围有与血样周围材料等效的材料。可能的话，物理剂量计的大小应该与血样的大小相同，这样才能代替血样达到剂量监测的目的。物理剂量计通常用以 Gy 为单位的空气比释动能来校准，并能追溯到国家标准。软组织中 Gy 的转换因子是质能吸收系数比。对于 250 kVp 的 X 射线，该值是将空气比释动能值乘以 1.09；对于 ^{60}Co γ 射线则乘以 1.10。因此，转换因子是能量相关的，随能量降低而降低。对于软组织和血液，转换因子之间也存在一个差异，但是对于低 LET 辐射它可以小到忽略不计。对于中子，可能接近 5%。尽管刻度因子包括电离室墙壁的任何吸收，但由于血液自吸收往往有必要对剂量率进行校正。

确定剂量常用的方法是将测量的空气比释动能转换为组织或血液中的吸收剂量，然后需要对距离（反平方定律）、血液界面上材料的吸收和不匹配进行转换。仪器的大小和几何形状在这些因素中起折中作用，因为血样越小，吸收校正就越小，不匹配校正就越大。无论怎样，应选择几何形状和材料，尽量减少必要的校正。

为了制备适用于急性事故照射的离体刻度曲线，需要选择合适的剂量率，使所有剂量所用的照射时间少于 15 分钟。如果不同剂量间照射时间的差异较小，那么畸变率的 β 或剂量平方系数受到的影响将不超过 4%。另外，一些研究者选择制备非急性刻度曲线，以便更好地理解，对于解释迁延照射事故时的畸变率，应如何修正 β 系数。更为重要的是制备刻度曲线必须在 37°C 下进行。如果在室温下进行，则照射期间将很少或不发生修复，导致剂量-效应曲线将与急性照射的曲线一样。需要指出的是，迁延照射刻度的关键因素是照射时间而不是剂量率。因此，每个数据点都应来自相同时间受照的血样。这可以通过调整与源的距离来实现，这个过程需要更多的物理校正测量。另一个比较容易的方法是，用一个固定的剂量率也就是一个照射位置，每个剂量照射不同时间，得到的数据可能不太适合线性平方剂量效应方程[96]。

考虑到一定程度的人体散射，有些实验室在刻度曲线时喜欢将血样放在一个体模里（图 20，21）。



图 21. 位于 ^{60}Co γ 射线源前面的、加热到 37°C 的水浴装置。为了实现电子平衡，血样放在一个有机玻璃架里。

然而，需要给予更多考虑的是上述剂量校正因子，以及电离室是否可以放在血样旁边。通常用水作模拟，水温保持在 37°C 。如果电离室放置在与血样相同的几何位置，这就要考虑由散射引起的剂量。使用温水时需要施加明显的温度和压力校正，当然，电离室还不能被弄湿。体模内中子刻度是一个特别困难的问题。体模最好不是水而是组织等效材料。这样产生的辐射谱才类似于体内的、可能会对淋巴细胞明显增加剂量的低 LET 成分。详细描述总吸收剂量的成分谱是件非常困难的事情。

8.3. 统计因素

第三章中已经讨论到，非常有力的证据表明，染色体畸变或微核产额（Y）与剂量（D）之间的关系用线性平方方程表示：

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \quad (3)$$

对于高 LET 辐射， α 项变大，最终 β 项在生物学上的相关性关变小，在统计学上被“隐藏”，剂量效应关系用线性方程来近似：

$$Y = C + \alpha D \quad (4)$$

曲线拟合的目的是为了确定系数 C、 α 和 β 的值，这些值能够很好地拟合数据点。对于双着丝粒来说，X 或 γ 射线照射产生的损伤分布可以非常好地用泊松分布来表示 [98]。相反，中子和其他高 LET 辐射产生的分布则是过离散型的，其方差（ σ^2 ）大于平均值（y）。方差与均值的比（ σ^2/y ）是否是一个剂量函数，目前还是一个讨论的问题。对于微核，在所有剂量下，甚至光子辐照下，数据都趋向于过离散分布。

由于拟合曲线的方法是基于统计学的泊松分布，因此对于建立刻度曲线的每个剂量点，都应检验双着丝粒细胞的分布是否符合泊松分布。如今，使用最广泛的检验方法是 u 检验 [99、100]。u 检验统计量是离散指数（ σ^2/y ）的一个归一化单位，对于泊松

分布它的值是 1。如果 u 值高于 1.96，表示过度离散（采用两侧显著性水平， $\alpha = 0.025$ ）。

$$u = \left(\sigma^2 / y - 1 \right) \sqrt{\frac{N - 1}{2 \left(1 - 1/X \right)}} \tag{5}$$

其中

N 代表分析细胞数；

X 为检出的双着丝粒数（或双加环数）。

u 值小于 -1.96 表示欠离散分布。生物学上欠离散分布不太可能发生，因此 u 值低于 -1.96 可能意味着数据抽样有问题。

合适的曲线拟合需要足够的自由度以减少误差。理想情况下，在 0.25~5.0 Gy 范围内应该有 10 或 10 个以上剂量点。对于低 LET 辐照，没有必要高出 5 Gy 的数据，的确，如果高出这一剂量，有证据表明畸变数会饱和，这将导致 β 系数的失真[101]。对于高 LET 辐射，建议最大剂量为 2.0 Gy。

鉴于大部分辐射事故涉及的剂量在 1.0 Gy 以下，曲线的低端对剂量估算非常重要。因此，需要尽力减少与 α 系数相关的统计不确定性。建议在 0.25~1.0 Gy 范围内刻度曲线的剂量点不少于四个。如果实验室能够获得低于 0.25 Gy 的剂量数据，当然是非常好的。在较高的剂量组中，每个剂量点分析细胞数应该以检出 100 个双着丝粒为准。然而在较低剂量点这一要求很难达到，相反每个剂量点应当计数几千个细胞；建议细胞数目在 3000~5000 个之间。任何情况下，在低剂量范围内分析细胞的实际数目取决于剂量点的数，关键是减小曲线拟合的误差。表 4 给出建立低 LET γ 辐射和高 LET α 辐射剂量效应-曲线的实例数据。

表 4. 从 γ 射线和 ^4He 粒子照射血样获得的细胞遗传学结果

γ 射线 (^{60}Co)											
剂量 (Gy)	N	X	双着丝粒细胞分布						σ^2/y	u	
			0	1	2	3	4	5			6
0.000	5000	8	4992	8						1.00	-0.07
0.100	5002	14	4988	14						1.00	-0.13
0.250	2008	22	1987	20	1					1.08	2.61
0.500	2002	55	1947	55						0.97	-0.86
0.750	1832	100	1736	92	4					1.03	0.79
1.000	1168	109	1064	99	5					1.00	-0.02
1.500	562	100	1736	92	4					1.06	1.08
2.000	332	103	251	63	17	2				1.14	1.82
3.000	193	108	104	72	15	2				0.83	-1.64
4.000	103	103	35	41	21	4	2			0.88	-0.84
5.000	59	107	11	19	11	9	6	3		1.15	0.81
平均										1.0	

20 MeV ^4He 粒子

剂量 (Gy)	N	X	双着丝粒细胞分布							σ^2/y	U
			0	1	2	3	4	5	6		
0.000	2000	3	1997	3						1.00	-0.04
0.051	900	19	881	19						0.98	-0.44
0.104	1029	27	1004	23	2					1.12	2.84
0.511	1136	199	960	154	21	1				1.07	1.60
1.010	304	108	217	69	15	3				1.09	1.15
1.536	142	96	75	40	25	2				0.98	-0.20
2.050	137	120	63	44	16	12	2			1.20	1.65
2.526	144	148	66	34	25	14	3	2		1.40	3.40
3.029	98	108	47	16	17	14	0		1	1.56	3.93
平均										1.19	

对于每一个被分析的剂量，分别列出计数细胞的总数（N）、观察到的双着丝粒总数（X）、双着丝粒分布、离散指数（ σ^2/y ）和 u 检验（u）。u 值高于 1.96 表示过离散分布。

为确定最佳拟合系数，建议使用最大似然法[104、105]。使用这种方法，通过假设泊松分布，并采用反复重新权重最小二乘法，使观察值最大化，以获得每个系数的最佳拟合值。对于过离散（非泊松）分布，像高 LET 辐射，必须要考虑对过离散进行权重。如果 σ^2/y 随剂量显示具有统计学显著性趋势，就应该利用这种趋势。否则，每个数据点的泊松加权值应该除以 σ^2/y 的平均值。

随后要对曲线拟合的优度和 α 、 β 系数的意义进行检验，比如分别使用卡方（ χ^2 ）检验和适当的 F 检验（如 F 检验、z 检验或 t 检验）。这些检验方法详见附件 VI。如果证明拟合不足（例如 χ^2 值比自由度（df）还大）， $(\chi^2/df)^{1/2}$ 会导致标准误增加。许多计算机软件计算的标准误（SE）是由平方和求得的，而不是方差的泊松估算，这就可能造成不真实的低估泊松误差。正因如此，当用这种方法计算 SE 且 df 大于 χ^2 时，通过 $(df/x^2)^{1/2}$ 来增加 SE 是一种良好的实践。

表 5 示出用表 4 数据值拟合的系数和按泊松假设计算的 SE。

表 5 用表 4 中的双着丝粒数据拟合的结果

γ 射线 (^{60}Co)				
C \pm SE	α (Gy^{-1}) \pm SE	β (Gy^{-2}) \pm SE	χ^2	df
0.001280 \pm 0.00047	0.02103 \pm 0.00516	0.06307 \pm 0.00401	6.61	8
	F=4.08, p<0.03	F=15.73, p<0.01	P=0.058	
20 MeV ^4He 粒子				
C \pm SE	A (Gy^{-1}) \pm SE	β (Gy^{-2}) \pm SE	χ^2	df
0.00143 \pm 0.00093	0.32790 \pm 0.02875	0.02932 \pm 0.01636	7.40	6
	F=11.41, p<0.03	F=15.73, p<0.01	P=0.39	
0.00193 \pm 0.00097	0.37290 \pm 0.01787		10.91	7
	F=20.87, p ¹ <0.01		P=0.14	

¹ $F_{.05 [7, 7]} = 3.77$

表 5 中 χ^2 检验的 p 值表示拟合的数据点与观察的实际数据相比无显著差异，证明拟合度好。另外，线性和平方系数的显著性也用 F 检验，即每个系数和标准误之间的比来确认；对于每个系数， F 值高于 3.44（临界值 $F_{.05[8, 8]}$ ）， z 值高于 1.96（正常分布临界值；两值在统计表中可查到）。 F 检验，详见附件 VI，是两卡方分布之比， $F_{.05[8, 8]}$ 是 $\alpha = 0.05$ 的临界值，分子和分母的自由度均为 8。对于 ^4He 粒子，通过 σ^2/y 的平均值 1.19 来减少权重。线性平方系数 β 无显著意义（临界值 $F_{.05[6, 6]} = 4.28$ ； z 检验 $p = 0.12$ ），因此得到了一个线性拟合。

在拟合剂量-效应数据时，关于如何处理畸变的本底值，观点不一。一般有三种方法：在曲线拟合过程中包含一个 0 Gy 剂量点；忽略 0 Gy 剂量点；或者在每次拟合过程中，用一个标准本底值代表 0 Gy 剂量点。如果用 0 Gy 剂量点检测到的畸变数作为曲线拟合的一个数据点（正像上面给出的曲线拟合中所用的），那么本底值就是一个可变参数。然而，由于在未照射细胞中畸变数通常是很低的，经常是观察不到的，所以 0 剂量点测定的畸变数为 0。如前所述，低剂量时各数据点的统计结果一般都比较低。这样，包含 0 剂量在内的曲线拟合过程中有时会出现本底值（ C ）和线性系数（ α ）为负数，这显然没有生物学依据。一些学者通过忽略 0 剂量点和使曲线通过原点来解决这一问题。然而，关于仅仅受到本底辐射照射人员的调查已经发表了充分的数据，表明畸变的阳性本底水平很低。因此，一些人采用选择可替代方法，用小的阳性本底值作为一个数据点，将大比例的不确定度归因于它。理想的实验室应该有自己的本底数据，尽管这需要分析数千个细胞。一致认为，双着丝粒的本底水平是 1000 个细胞中大约 0.5~1.0 个[106]，而对于易位[107]和微核[108]来说，对照值较高。

有一些软件可用于曲线拟合，如 Peterson [109]开发的泊松迭代加权最小二乘法计算程序（PIRLS），可用于加法、乘法、幂次和非线性模型；或一般线性交互模型（GLIM，www.nag.co.uk/stats/GDDGE-soft.asp）；或用 R 基础工具²。这需要与本出版物附件 VI-3 中专门为曲线拟合所编程序相结合。此外，辐射细胞遗传学界近来开发了多种专用的曲线拟合计算机程序[110]。CABAS[111]使用最大似然法将刻度数据拟合成线性平方模型。“剂量估算”[112]是一个类似的工具，可以拟合线性平方和线性方程。当情况并非近期急性和全身照射时，除了曲线拟合外，CABAS 和“剂量估算”两种软件，具有帮助处理辐射事故病例中的数据的工具，以便导出剂量估算值。包括了后面第 9.7 节中介绍的计算范围。

不论是采用这些软件或是其他软件，都应给出使用方法的足够信息，并且提供与拟合系数相关的方差与协方差的详细资料，因为这些都是计算剂量估算的不确定性所需要的（第 9.7.3 节）。

² R 是一个免费的统计学计算软件，可从网址 <http://www.r-project.org/> 下载。

9. 双着丝粒分析

下文讨论细胞培养、固定和染片，是针对双着丝粒分析编写的，但其中多数内容也与本出版物中的其他分析方法有关。本章充分讨论双着丝粒的样品制备方法，而有关其它分析方法的部分仅讨论与双着丝粒分析不同的过程。

主要不同点如下：

- (a) 对于双着丝粒分析，细胞培养需要 2 天，而对于微核和/或核质桥分析（胞质分裂阻断微核检测，(CBMN Cyt)），培养时间则需延长至 3 天。
- (b) 早熟染色体凝聚的有丝分裂原融合法无需细胞培养，而化学诱导法一般需要细胞培养。
- (c) 双着丝粒和其它针对中期细胞的分析均需要用秋水仙素阻止有丝分裂，而 CBMN Cyt 分析不需要。
- (d) CBMN Cyt 微核分析需要用松胞素 B 进行胞质阻断。

9.1. 培养

收到的血样要做几个平行培养。

9.1.1. 培养基的选择

有几种定名的培养基可以使用。全部可从市场购得，并已证实适合淋巴细胞培养。用于检测染色体脆性位点的、不含叶酸的培养基不适用于淋巴细胞培养。与 MEM 或 TC-199 培养基相比，某些培养基（F-10 和 RPMI-1640）促进更加快速的生长 [113]。虽然离体第二次分裂的中期细胞（M2）数可以通过荧光加吉姆萨（FPG）染色来确定，但是较好的办法是用常规培养法，一般培养 48 h 时，M2 期细胞数最少。

培养基中应添加 L-谷氨酰胺、肝素和抗生素。通常使用青霉素和链霉素（详见附件 I）。根据厂家的不同，许多培养基已含有这些抗生素。不过，如果购买浓缩或粉状的培养基，将培养基稀释到工作浓度时需要添加抗生素。一些实验室喜欢使用不含抗生素的培养基，在这种情况下，必须是无菌操作，包括使用无菌的采血管。

9.1.2. 血清的选择

应当使用胎牛血清或人 AB 血清。血清批次间可能有明显的差异，新到货的血清要测定其支持细胞生长的能力。应放在 $56 \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中加热灭活 0.5~1 小时，这样有助于减小批次差异。淋巴细胞也可以在不含血清的培养基中生长，这种培养基可以在市场上买到。

9.1.3. 溴脱氧尿嘧啶

为了进行 FPG 染色，培养基中应加入溴脱氧尿嘧啶（BrdU）[114]。DNA 复制过程中优先利用这种胸腺嘧啶类似物。当 BrdU 不对称性掺入两条染色单体时，FPG 染色会在中期细胞染色体中产生一种“花斑”效应，出现在第二次或后来的替代后分裂中（图 22）。

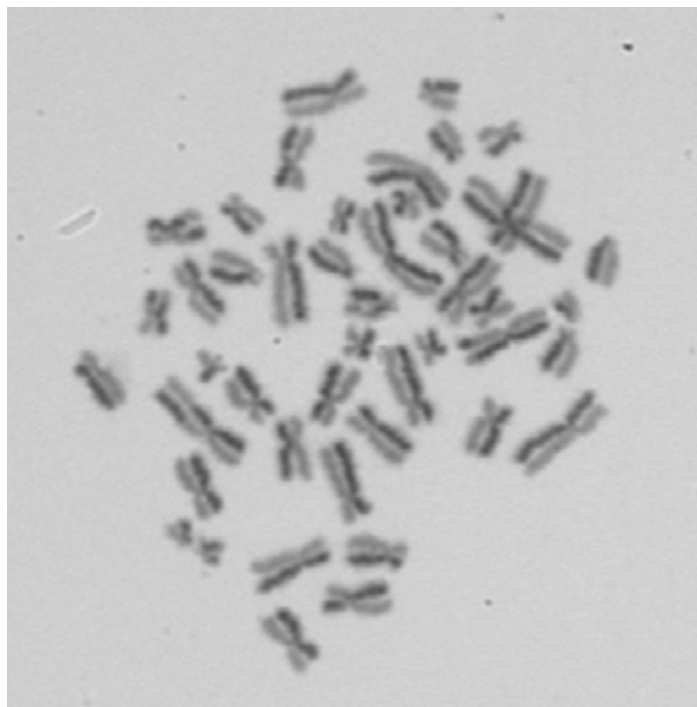


图 22. 用 FPG 法染色的二次分裂中期细胞，显示姊妹染色单体的不同着色；即“花斑”效应。

没有一个普遍确定的 BrdU 浓度可供使用。最佳浓度因各种因素而变化，如培养基中胸腺嘧啶浓度等因素。实验室应该通过实验为自己确定一个满意的浓度水平。通常情况下，在培养基中添加 BrdU 的终浓度不超过 $50\ \mu\text{M}$ ($15.4\ \mu\text{g/mL}$)。高于这个水平可能会引起过度的有丝分裂延迟[115]。新鲜血样 (< 24 小时) 终浓度为 $15\ \mu\text{M}$ 往往令人满意。如果血样运送延迟已超过 24 小时，为了保证 PGF 染色，BrdU 浓度不得不增加到 $40\ \mu\text{M}$ [116]。应当注意 BrdU 对光敏感，因此要在避光条件下制备（例如黄色的安全光），然后在黑暗中培养。可以用铝箔纸包裹培养瓶。

当采用 BrdU 法时，为了获得第一次分裂期的较多分析细胞，应该确定一个最佳培养时间。遗憾的是，这个时间并不好预测。差别不仅是因为个体差异，也因为辐射对细胞周期时相的影响不同。严重受损的细胞对于有丝分裂刺激可能会产生明显的停滞反应。实际上，实验室培养一次的时间多为 48 h。另一种方法为接种多瓶培养物同时培养，在不同培养时间重复收获，然后挑选包含第一次有丝分裂最多的细胞。然而，这种方法既费时又昂贵，在实践上是不可行的，尤其是在许多病例需要快速估算的情况下。因此提出一种稍微改进的培养方法。在中期培养中可以加入松胞素 B（Cyt

B)，正常情况下它是用于微核制备的（第 12 章），这样可以区分不同分裂阶段的细胞，只选择分析第一次有丝分裂的细胞。在培养 24 h 时加入 Cyt B，终浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 。Hayata 等[117]首先使用这种技术来识别第一细胞周期的细胞，依据的是染色体数目，而不是 BrdU 对姊妹染色单体的分染。Cyt-B 技术并没有广泛应用于双着丝粒分析，但已经成功应用于一些实验室间的剂量估算比对演习中[118、119]。

9.1.4. 有丝分裂原

有几种市售的有丝分裂原，多为植物血凝素。大多数情况下，并未精确定义有丝分裂原刺激哪种淋巴细胞群。建议使用植物血球凝集素（PHA），它是应用最广泛的有丝分裂原。一些厂家销售两种类型的 PHA，有时称为 M 型和 P 型。对于常规的全血培养，没有必要使用更贵的高纯度 PHA（P 型）；不过一些实验室考虑将其用于培养分离的淋巴细胞。

还有其它一些有丝分裂原可以利用，如刀豆蛋白 A 或美洲商陆有丝分裂原，主要刺激特定的淋巴细胞亚群。这些有丝分裂原已经应用于一些实验体系和非人类细胞。都不像 PHA 那样作用广泛，也不适用于生物剂量检测。

9.1.5. 培养方法

可以采用高压灭菌玻璃容器或无菌一次性塑料容器进行培养。通常使用 10 mL 圆底一次性管。应当放置在 37°C 和 5% CO_2 的培养箱中，管壁 45° 度角倾斜，并松动管帽。也可以在没有 CO_2 培养箱的条件下培养，但要拧紧管帽。

细胞应在 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 的条件下培养。培养箱的温度稳定性十分重要，最好用一个温度计和一个图表记录监测。温度过低，将会导致培养 48 小时后的中期细胞数目太少。如果温度偏高（38°C 或以上），细胞周期的循环进程会加速，导致 48 小时后出现过高的第二分裂中期细胞数目[120]。在忙碌的实验室，公用的培养箱可能会被频繁的开关，这会产生一种风险，即风机辅助的培养箱温度将在一段时间内降到最佳温度以下。另一种方法是在恒温水浴箱中进行培养。与通过空气传热相比，水浴传热更快，保证在 48 小时培养过程中提供更好的热稳定性。如果使用水浴，那么 5 mL 培养物上方至少要留 10 mL 的传热空间，并使空气中充满 5% 过滤的 CO_2 。然后封紧管盖。水浴箱应该加盖，使含有 BrdU 的培养物保持黑暗。

培养方法是根据 Moorhead 等[121]和 Hungerford [122]最初发表的技术方法改进的。简单地说，就是一种可以对全血或分离的淋巴细胞进行培养的方法。该方法的优缺点与提供的血量、培养用的时间以及结果中可计数细胞的数目（较高的分裂指数）等有关。确定分裂指数的标准见附件 V。

9.1.5.1. 全血培养

这种方法所需血量较少（1~2 mL），必要时可以刺破手指采集血液。还有一个优点是培养迅速而又简单。但是每张玻片上可计数的中期染色体数目一般要比用别的方法

计数到的少。步骤是将 0.3 mL 全血和 0.1 mL 的 PHA 工作液加入到含 4 mL 培养液和 1 mL 血清的培养管内，然后进行培养。

9.1.5.2. 分离淋巴细胞培养

这种方法是将浓集的淋巴细胞接种到培养基中。在血量大于 3 mL 的情况下适用。有两种制备浓集接种物的方法：

- (a) 首先，将 0.15 mL PHA 加入到 2 mL 血液中，然后轻轻混匀。血液将凝集在管壁上。然后，加入 2 mL 血清，轻轻混合后，50 g 离心 1 min。用注射器将大约 3 mL 的上清抽出，其中包括血清、血浆和白膜，留在后面的大部分是凝集的红细胞。用针头将白膜刺破，吸出上清。使用大孔的针头可以减小对细胞的压力。3 mL 液体足够制备两份培养物，等分加入两个培养管中，每个含有 4 mL 培养液。
- (b) 第二，采用无菌的淋巴细胞分离管（Ficoll Hypaque column）从全血中分离淋巴细胞。市场上可以买到这种淋巴细胞分离备用管。将分离管离心后，吸出淋巴细胞富集层。用磷酸盐缓冲液清洗，然后接种到培养基中。可以用血细胞计数板，通过少量未染色细胞的计数来计算活细胞浓度，从而调整培养液中最佳的细胞浓度。不同实验室间接种细胞的浓度可能不同，各实验室应该独立建立自己的值，但可能在 $0.5\sim 2\times 10^6/\text{mL}$ 范围内。Hayata 等和 McFee 等已发表了该方法的详细步骤[123、124]，认为该方法特别适合制备含有大量分裂细胞的干净片子。一些实验室发现，采用分离淋巴细胞培养，更适合进行 FISH 分析以及制备用于中期细胞寻找自动扫描的标本（第 10 章和 13.3.1 节）。对于用正常光学显微镜计数常规吉姆萨染色的标本，就没必要这么复杂，用上述(a)方法或全血培养法就足够了。

9.1.6. 有丝分裂阻断

秋水仙素或其合成类似物秋水仙碱（Colcemid）可用做细胞分裂阻断剂，大部分研究者喜欢用后者。通常用生理盐水配成浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的秋碱储存液。如果是无菌配制并储存于 4℃ 的话，可以保存 6 个月。每 5 mL 培养液中加入 25~50 μL 工作液（终浓度 0.05~0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），可以提供足够数量的中期细胞，从而避免浓度过高引起的细胞毒性问题。通常在结束培养前 2~3 小时加入秋碱。少数研究者[125]喜欢在培养中间加入秋碱，比如在培养 24 小时后或在培养开始时就加入[123]。这样可以防止细胞生长超过 M1 期，也是避免分析 M2 期细胞的另一种方法。应该注意的是，培养早期加入秋碱可能会造成染色体浓缩过度，除非将培养液中的秋碱终浓度大幅降至约 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [123]。早期加入秋碱可以使培养时间超过 48 小时，以便顾及到细胞周期时间较长的个体，例如老人。

9.2. 固定过程

淋巴细胞常规培养时间为 48 小时，精确时间在各实验室之间是不同的，变化在

46~52 小时之间。实验室应该具有正常获得较多 M1 期细胞的最适宜培养时间及常规操作流程。也可以在常规培养时间只收获一部分平行培养物，剩余的部分再继续培养。这样就允许一些来自不同供体的细胞有充足的时间到达分裂中期，同时，也为高剂量引起有丝分裂延迟提供了计数滞后细胞的机会。

一旦结束培养就不再需要无菌操作，除特殊情况外，剩下的步骤可在室温下进行。但仍需要遵守安全操作规则，因为血样中可能含有人类病原体。首先将培养物离心后去除上清，然后加入 5 mL 0.075 M 的氯化钾低渗液。如果采用吸取方法去除上清，则离心速度为 200 g，离心 10 min。如果采用倾倒方法去除上清，则需要一个更坚实的细胞团（600 g，离心 3 min），不过这可能会导致更多的细胞破碎。加入低渗液的试管应该在 37℃ 放置大约 15 min，如果使用分离的淋巴细胞培养，放置 3~5 min 就够了。可以向低渗液中加入约 1 mL 的固定液，固定 5~10 min，这样可以使离心时细胞破损减少。然后再次离心，移去低渗液，加入 5~10 mL 新鲜配制的固定液（甲醇：冰醋酸为 3:1）。应该以恒定的速率缓慢地加入固定液，用漩涡混合器混匀细胞。重复固定 3 次。如有需要，细胞可长期保存在固定液中，置于 -20℃ 冰箱中冻存更为理想。细胞固定后可以立即或隔天制备样片，固定后的细胞悬液可在 4℃ 短时间保存。

除去最后的固定液，留下足量的液体（约 0.25 mL）用于细胞悬液滴片。而最终的液体量取决于细胞浓度，必要时可以用固定液进行稀释。玻片必须洁净无油。虽然一些厂商告诉他们提供的玻片是足够干净的，但是许多实验室还是愿意再次处理以确保洁净，并将其保存于脱油的液体中。液体可以是 1:1 的甲醇：丙酮混合物、或 1:1 的乙醇：乙醚混合物、或是含 1% HCl 的甲醇溶液。必要时，可将玻片晾干后用洁净纸擦亮。要注意质量高的纸巾为使其变软添加了羊毛脂，并不适合擦拭玻片。冰凉潮湿的玻片有利于染色体的分散。将玻片存于冰箱中，使用前将其取出，滴片前吹几下使冻霜融化。或者可以将玻片浸泡在盛有蒸馏水和冰块的烧杯中几秒钟。如果在冰水上加一些甲醇但不要搅动，可以增加玻片的湿度。在滴片前，应该摇晃一下玻片表面的液体。经验表明，染色体的分散程度受到实验室的周围温度和相对湿度的明显影响。在可控环境的小橱柜内滴片，可以排除由于这些因素导致的质量变化。这种专为细胞遗传学实验室设计的柜子已有市售。

用移液管反复吹打剩余的固定液，使细胞充分混匀，然后滴 2~3 滴细胞悬液到玻片上。同一培养瓶的细胞悬液至少应制备两张玻片，许多人愿意制备多达 10 张的玻片。在把所有细胞滴完之前，最好先滴一滴细胞悬液测试一下。这样可以判断细胞的浓度，如果有必要的话，可以将剩余的细胞悬液进一步浓缩或用固定液进行稀释。如果检测标本的细胞形态不好，如染色体分散不好或有过量的碎片，可以用固定液再次洗涤，或者暂不滴片，将细胞置于冰箱过夜，然后沉降，第二天再滴片。玻片应空气干燥，也可以置于加热板上微微加热，加速干燥，还可以在风扇吹动下进行风干，或者将它们在酒精灯上文火烤干（避免点燃固定液）。

9.3. 染色

这里推荐采用荧光加吉姆萨染色法 (FPG)，因为可以使分析限制在离体第一次分裂的中期染色体 (M1) [126]。尽管这一方法有一定弊端，但可以通过常规吉姆萨染色及 FPG 加以克服。许多工作者已经注意到，不仅在平行的片子之间，而且在同一张片子的不同位置之间，FPG 质量有相当大的差别。如果样片制好后放置几天（可至五天），则 FPG 染色技术是最成功的。其余的样片在使用前可以放在一个盒子里，保存在 -20℃。如果用新制的片子，或是 2~3 周的旧片子，染色的质量会比较差。如果将 FPG 染色的样片放置几周后再计数，片子的质量可能会变差。存在着因为中期细胞的图像不清楚而不能准确识别所有畸变的风险。不过，一般情况下，标本的质量足以确定 M1 期细胞的相对比例，因为 M1 期细胞并不被差别染色，而 M2 期细胞显示花斑效应。作为染色是否有效的阳性对照，在一批标本中也应该含有几张培养时间更长（72 h）、已知含有 M2 期细胞的标本。

因此，建议在制备每份培养物的多张片子中至少有一张以上的平行片用 FPG 染色。如果染得好，这些样片可以用于计数 M1 期细胞的畸变。如果不好，可以用来检测 M1/M2 的比，用经吉姆萨染法染色过的同一培养中的平行样片进行畸变分析，只要通过 FPG 评估的 M2 期细胞少于 5%。假如 M2 期细胞较多，则需要校正畸变率，否则会产生一些额外的偏差。其中需要某种相关的假设，比如，M2 期细胞中有部分伴有无着丝粒断片的双着丝粒。前面已经强调过，较好的办法就是采用一种 M2 期细胞最少的培养方法，当然，尽管这样也不能预测所有个体，因为每个人的淋巴细胞刺激和增殖能力表现各不相同[127]。

采用不同的培养方法，像用 Cty-B、秋水酰胺或提前加入秋碱培养等，可以提供比 FPG 更简单快速的方法[117~119、125]。这些方法对于需要快速估算剂量的分类情景是特别有用的。

9.3.1. 预处理

染色前用 RNase A 对玻片进行预处理，可以除去残留细胞浆中的可染色杂质 [128]。这是一个可选步骤，可以为固定染色、姊妹单体分染或分带制片提供更为清晰的染色体图像。此外，也有助于自动图像分析系统识别样片。

方法如下：将保存在 Tris EDTA 缓冲液中的浓度为 10 mg/mL 的 RNase A 液在 70℃ 加热 10 min，然后慢慢冷却。分装后可以在 -20℃ 储存几年。用蒸馏水冲洗玻片，然后放置在浓度为 0.5 mg/mL 的 RNase A 溶液中（原液：蒸馏水 = 1:20），在 37℃ 孵育 10 min。这一步既可以在一个预热的染色缸中完成，或者更经济些，也可以用少量稀释的保存液滴在玻片上然后封上盖玻片。用蒸馏水冲洗玻片，置于 3:1 的甲醇：冰醋酸中固定 2 min，干燥后按下述方法进行染色。RNase A 去杂质过程也可以用于旧的标本片脱色后或微核标本的制备。对于这些应用，可以根据情况对浓度和作用时间进行调整[128]。

9.3.2. 荧光加吉姆萨（FPG）染色

此方法是在 Perry 和 Wolff [114]报道的基础上改进的。将约 10 滴 Hoechst 33258 染液（0.5 $\mu\text{g/mL}$, pH = 6.8 的磷酸缓冲液）滴在玻片上，盖上盖玻片，确保没有气泡。这时如果愿意，可以根据 Latt 的方法[129]用荧光显微镜快速检测 M1/M2 的比，样片会出现分染后的花斑效应，但很快就会消退。此外，也可以将样片用 20 W 的紫外灯照射 0.5 h ($>310\text{ nm}$)，或者 30 W 的荧光灯照射 1.5 h。然后，小心去除盖玻片，用 pH = 6.8 的磷酸缓冲液洗净玻片。这一步，有些人是把玻片浸入 60°C 的 2 \times SSC 液（0.3 M 氯化钠和 0.03 M 柠檬酸钠）大约 20~30 min。

经验表明，假如浸入 2 \times SSC 会导致不希望的染色单体肿胀，使显微镜下分析更加困难，那么这一步可以省略。然而，使用 2 \times SSC 可以除去一些细胞碎片，从而使制备的标本更干净。之后，用蒸馏水冲洗，接着用吉姆萨染色（浓度为 5~10%，pH = 6.8 的磷酸缓冲液，Gurr R66）3~5 min。用缓冲液冲洗，然后蒸馏水冲洗后晾干。这时标本片可以直接在显微镜下观察或清洁后封上盖玻片。

9.3.3. 常规吉姆萨染色

将样片浸于 pH = 6.8 的磷酸缓冲液稀释的 2% 吉姆萨染液（改进的 Gurr R66）中浸染 5 min 后，在缓冲液中漂洗，然后用蒸馏水稍微冲洗后晾干，最后用盖玻片封片。图 10 和图 11 为吉姆萨染色后的中期分裂细胞。

虽然可以通过改变染色方法，有意突出着丝粒染色，但是对经验丰富的计数者来说，通常是不必要的[130]。观察着丝粒的方法可以采用着丝粒探针的 FISH 分析（图 27）或用 C-显带法吉姆萨染色（图 23）来实现。



图 23. 显示着丝粒的 C-显带吉姆萨染色的中期细胞。

C-显带操作过程：

- (1) 室温下将波片置于 0.2 N HCl 中 30 min。
- (2) 蒸馏水漂洗三次。
- (3) 将波片置于 5% Ba(OH)₂ 中，在 60℃ 放置 1 min。
- (4) 0.2 N HCl 漂洗 2 min。
- (5) 蒸馏水漂洗 2 min。
- (6) 置于 2×SSC 液中，在 60℃ 放置 45 min。
- (7) 蒸馏水漂洗。
- (8) 空气干燥后，用 pH = 6.8 的磷酸缓冲液配制的 2% 吉姆萨染液染色 10 min。
- (9) 如果染色不够，可以重新用吉姆萨再染 5~10 min。

9.4. 样片分析

9.4.1. 常规显微镜分析

为防止计数时的主观偏差，应对染色体标本进行编号，而且有条不紊地进行全片观察。先在低倍镜（约 100~200 倍）下观察。在这个水平上虽然不可能计数细胞中的染色体是否够数，也不可能发现畸变，但是观察者可以辨别大约 40 条以上的染色体分裂相以及满足在高倍镜下分析要求的形态。重要的是，开始观察的放大倍数要尽量低，以防止有意选择含有畸变的细胞造成的偏差。发现一个满足分析要求的中期细胞后，应切换到高倍镜下（1000~2000 倍），尽可能先不要考虑是否存在畸变，而是要根据图像的形态和染色体扭曲和重叠的数量来快速判断染色体是否满足计数要求。对于 FPG 染色的标本，如果细胞显示出花斑，则表明不是 M1 期细胞，应放弃分析。

确定了要分析的细胞后，应当计数染色体的数目和存在的畸变。建议只记录含有 46 条染色体的完整中期细胞。如果细胞里包含非稳定性畸变，那么应该考虑这个细胞的平衡。例如，一个分裂相中含有一个双着丝粒，还应该伴有一个无着丝粒断片，但仍计数为 46 条。相反，一个着丝粒环也会伴随一个断片，但是被分析细胞的染色体总数要计为 47。每一个多余的无着丝粒断片，即不与双着丝粒或着丝粒环伴随的断片，将导致染色体计数超出 46 条。记录畸变时，与双着丝粒或环伴随的断片不应包括多余的无着丝粒。当高剂量辐射时，一个细胞里可能存在不止一个畸变，染色体计数仍然需要平衡。三着丝粒畸变相当于两个双着丝粒，应该伴随两个断片，以此类推，四着丝粒则应伴随三个断片，等等。尽管剂量估算只需要双着丝粒或双+环的数据，但是细胞中所有的畸变都应当记录下来。包括无畸变在内的所有完整细胞在显微镜 x 和 y 轴上的坐标都应该记录下来，以便可能进一步参考。

9.4.2. 计算机辅助显微镜分析

许多实验室已经引进自动模式识别系统来寻找中期细胞，还有一些商业化的自动系统也可使用。这些设备还包括帮助畸变染色体定位的数字化图像半自动分析。然而，没有任何系统是全自动化的，所有具体步骤都离不开操作人员的判断和决定。这些设备的使用应该同上面列出的推荐标准保持一致，即选择计数待分析的中期细胞不应该带有容易歪曲畸变率的主观偏差，而且只分析染色体数目完整的分裂相。染色体自动寻找细胞和自动计数系统将在第 13 章中详细讨论。

9.5. 数据记录

好的实验室需要对样品、玻片和相关的文字记录建立独立的识别码或标签体系。无论是实验研究还是超剂量调查，样本的接收与处理过程都应记录在日常实验记录本上。数据储存和处理的电子学系统也是需要的（第 13.4 节）。然而，许多研究人员仍然喜欢将显微镜观察结果写到记录纸上，而且大多数实验室都改进了自己习惯的数据记录方式。电脑系统可以有多种方式存储并显示数据，以更好的适应实验需要。重要的是，可以对每个细胞所做的观察等原始数据进行存取，以便后来进行各种编辑和资料汇总。

表 6 示出了一个畸变记录数据表的简单格式。

表 6. 畸变记录数据表的格式

样片编号：
计数者：
显微镜编号：
分析日期：

细胞 编号	坐标		染色体数目	双着丝粒	着丝粒环	额外的 无着丝粒	备注
	x	y					
1	100.1	1.2	46				
2	103.4	1.5	47	1		1	
3	105.4	1.2	49	2	1	2	
4	112.4	1.6	46				
5	112.7	1.8	48			2	
6	120.1	1.2	46	1			
7	122.7	1.5	47		1		
8	124.1	1.4	45				单体互换
9	126.8	1.7	46	2*			* = 1 个三着 丝粒

根据这个记录表中的信息，任何细胞都可以在将来需要复查时重新被找到。采用常规吉姆萨染色分析非稳定性畸变记录的数据，对生物剂量估算是最重要的，尽管没有单独列出微小体、断片和无着丝粒环。这是因为有时并不好准确地区分这些畸变。假如愿意的话，可以分别用 M、F 和 AR 来分别代替表中“额外的无着丝粒”。备注栏可用来记录其它畸变，如：数目畸变、稳定性畸变损伤或单体畸变。任何其它的需要数据，如带有损伤的细胞百分比，或者细胞中的畸变分布等都可以很容易地从表中获取。

9.6. 数据和样片的保存

显然，研究资料必须存档保存，以供将来参考。值得强调的是，事故病例的有关材料可能会在很久以后需要重新查阅。对于一个患有恶性肿瘤的患者，也许在数十年后会提出赔偿要求。

大多数实验室愿意或有义务储存显微镜标本，这样就会带来一些问题。常规吉姆萨染色的片子有褪色的可能，而 FPG 染色往往在几个月后就褪色了，这类片子的保存更困难。这里建议将染过的片子放在一个盒子里，置于室温干燥处保存。褪色后的片子可以小心将盖玻片浸泡后取出，再用常规吉姆萨重新染色，但是 FPG 不能复染。储存在-20℃的未染色的同批片子在数年后仍然可以进行常规吉姆萨染色。

将来自过量照射调查的剩余固定细胞储存起来也是一种良好的实践。为了便于储存，可以将其浓集到小的（2 mL）安瓿管里，-20℃保存。数年后如有需要，可以将这些储存细胞再制片，用 FPG 法或 FISH 法进行常规染色。

9.7. 剂量估算

9.7.1. 曲线的选择

使工作人员通常受到照射的辐射源有 γ 射线、X 射线，偶尔还有慢化中子。一般认为，X 射线和 γ 射线的剂量-效应曲线的畸变数是有区别的，特别是在低剂量时（ <0.5 Gy）。因此，最好是有一个合适能量的 X 射线（如 200~250 kVp）及 ^{60}Co 或 ^{137}Cs 对应的刻度曲线。相对于 ^{137}Cs ，总体上看，绝大多数科研实验室更容易制备 ^{60}Co γ 源的刻度曲线。中子的慢化能谱与裂变能谱相似。已有的证据表明，裂变中子谱的剂量-效应曲线是线性的，并且随中子能量的变化不大。因此，用一个裂变谱产生的刻度曲线就足够了。

在工业放射探伤中常用 ^{192}Ir ，其 γ 射线能量平均为 400 keV。几乎没有实验室用 ^{192}Ir 拟合刻度曲线，它应该位于 X 射线和 ^{60}Co 或 ^{137}Cs γ 射线的曲线之间。而且通常认为接近后者，因此建议用 γ 射线的曲线进行剂量估算。

9.7.2. 待分析细胞数

为了产生一个剂量估算值，使其统计不确定性足够的小，通常需要计数大量的细

胞。决定分析多少细胞，要根据事件的重要性、可付出的劳动以及标本的质量综合权衡。例如在几 Gy 或更高剂量照射后，受照者的淋巴细胞数可能会急剧下降，反映在样片上则是可分析的中期细胞数目减少。但是，由于每个细胞的畸变数目很高，分析几十个细胞就可以达到合理的剂量估算要求。在大规模伤亡事件后，以双着丝粒检测作为快速评价的分类诊断方法时，考虑剂量不确定性与计数细胞数的关系是重要的。这一内容将在后面详细讨论（第 14 章）。

在低剂量照射下，可用的细胞数并不是限制因素，可以分析 500 个细胞来进行剂量估算。在常规显微镜下分析 500 个细胞可能需要一个人工作 2~3 天，尽管在紧急情况下可以几个人同时分析平行样本。对于双着丝粒检出率较低或为零的情况，一般计数 500 个细胞得到的置信限就足够了。是否需要扩大分析 500~1000 个细胞或者更多，要根据是否有严重过量照射的证据、或者一名持续从事放射性工作的人员是否处于危险环境来决定。显然，不可能推荐一个单一的细胞数目适用于所有情况。然而，为了合理准确地估算剂量，作为一般规则，建议计数 500 个细胞或 100 个双着丝粒。

表 7 示出了用这种方法对 1.0 Gy 以下的几个剂量估算值计算的限值。

表 7. 增加分析细胞数对急性 γ 射线照射的 4 个剂量估算值的 95%置信区间上下限的影响

（根据图 24 所示曲线）

剂量估算值 mGy	置信限	分析细胞数	
		500	1000
100	上限	320	245
	下限	<0	16
250	上限	448	380
	下限	111	141
500	上限	677	627
	下限	333	383
1000	上限	1178	1127
	下限	830	881

在第 9.7.3 节中将对剂量估算值置信限的简单计算方法进行讨论。

9.7.3. 剂量估算的不确定性

尽管根据双着丝粒的计数估算受照剂量并不困难，但是有很多途径可以造成计数的不确定性。为了表达不确定性，引入置信区间来表示，并且计算 95%置信限是一种标准实践。95%置信限定义为至少在 95%的情况下包括真实剂量的区间。因为不确定性来自两个方面，造成计算置信限的困难，一是从过量受照人员样本中检测到畸变数的泊松分布特性，二是由近似正态分布的刻度曲线产生的不确定性。Savage 等[131]、

Merkle [105]和最近的 Szluisńska 等[132]在文献中已就这一问题进行了讨论。Merkle 提出了一种最简单的解决方法，同时考虑了畸变数的泊松误差与刻度曲线的误差。

图 24 说明了 Merkle 的方法，包含下列步骤：

- (1) 假设为泊松分布，根据观察到的畸变数计算与 95%置信上下限相对应的畸变数 (Y_U 和 Y_L)。
- (2) 计算 Y_L 与上部曲线相交处的剂量，即为置信下限 (D_L)。
- (3) 计算 Y_U 与下部曲线相交处的剂量，即为置信上限 (D_U)。

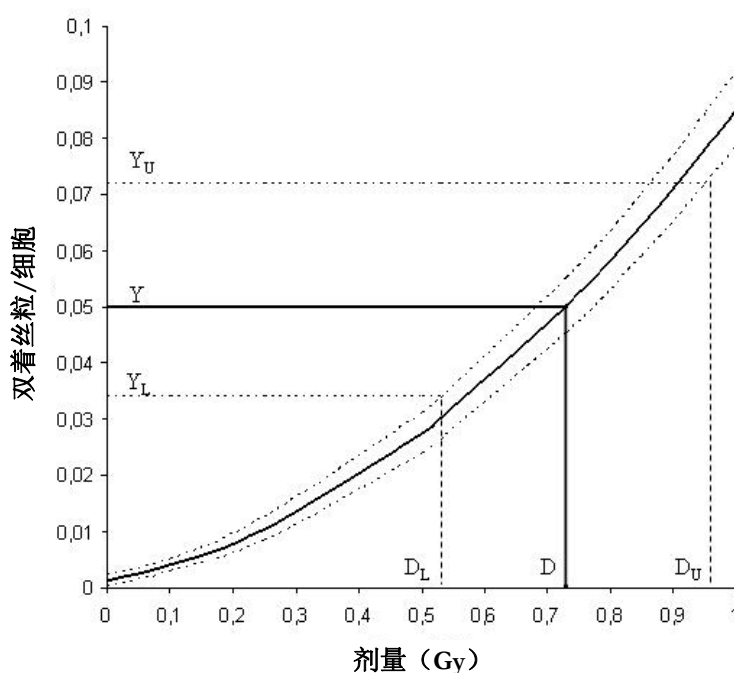


图 24. 用以估算不确定性的剂量-效应刻度曲线，置信限 95%。

举例：分析 500 个细胞，其中 25 个细胞分别含有 1 个双着丝粒。由此得出畸变率 (Y) 为 0.05 个双着丝粒/细胞，离散系数和 u 检验分别为 0.95 和 -0.78。使用图 24 所示的 ^{60}Co 剂量-效应曲线进行剂量估算，常数、方差和协方差列下：

$$C = 1.28\text{E-}3$$

$$A = 2.10\text{E-}2$$

$$\beta = 6.31\text{E-}2$$

$$\text{var } C = 2.22\text{E-}07$$

$$\text{var } \alpha = 2.66\text{E-}05$$

$$\text{var } \beta = 1.61\text{E-}05$$

$$\text{covar } (C, \alpha) = -9.95\text{E-}07$$

$$\text{covar}(C, \beta) = 4.38\text{E-}07$$

$$\text{covar}(\alpha, \beta) = -1.512\text{E-}07$$

- (1) 因为剂量-效应曲线是线性平方模型 ($Y = C + \alpha D + \beta D^2$)，通过解方程得到剂量估算值为 0.73 Gy:

$$D = \frac{-\alpha + \sqrt{\alpha^2 + 4\beta(Y - C)}}{2\beta} \quad (6)$$

- (2) 从泊松变量期望的置信限标准统计表中得出 Y_L 和 Y_U [133]。表 8 显示双着丝粒数从 0 到 103 各自对应的 95%置信区间的上下限。本例观察到 25 个双着丝粒， Y_L 为 $16.768/500 = 0.034$ ， Y_U 为 $36.03/500 = 0.072$ 。

表 8. 双着丝粒检测数 (X) 的泊松分布的 95%置信上下限 (来自文献[133])

X	下限	上限	X	下限	上限	X	下限	上限	X	下限	上限
0	0	3.285	26	16.77	37.67	52	38.165	66.76	78	61.9	96.06
1	0.051	5.232	27	17.63	38.165	53	39.76	68.1	79	62.81	97.545
2	0.355	6.686	28	19.05	39.76	54	40.94	69.62	80	62.81	99.17
3	0.818	8.102	29	19.05	40.94	55	40.94	71.09	81	63.49	99.17
4	1.366	9.598	30	20.335	41.75	56	41.75	71.28	82	64.95	100.32
5	1.97	11.177	31	21.36	43.45	57	43.045	72.66	83	66.76	101.71
6	2.613	12.817	32	21.36	44.26	58	44.26	74.22	84	66.76	103.315
7	3.285	13.765	33	22.945	45.28	59	44.26	75.49	85	66.76	104.4
8	3.285	14.921	34	23.76	47.025	60	45.28	75.785	86	68.1	104.58
9	4.46	16.768	35	23.76	47.69	61	47.025	77.16	87	69.62	105.905
10	5.323	17.633	36	25.4	48.74	62	47.69	78.73	88	71.02	107.32
11	5.323	19.05	37	26.31	50.42	63	47.69	79.98	89	71.09	109.11
12	6.686	20.335	38	26.31	51.29	64	48.74	80.25	90	71.28	109.61
13	6.686	21.364	39	27.735	52.15	65	50.42	81.61	91	72.66	110.11
14	8.102	22.945	40	28.97	53.72	66	51.29	83.14	92	74.22	111.44
15	8.102	23.762	41	28.97	54.99	67	51.29	84.57	93	75.49	112.87
16	9.598	25.4	42	30.02	55.51	68	52.15	84.67	94	75.49	114.84
17	9.598	26.306	43	31.675	56.99	69	53.72	86.01	95	75.785	114.84
18	11.177	27.735	44	31.765	58.72	70	54.99	87.48	96	77.16	115.605
19	11.177	28.966	45	32.28	58.84	71	54.99	89.23	97	78.73	116.93
20	12.817	30.017	46	34.05	60.24	72	55.51	89.23	98	79.98	118.35
21	12.817	31.675	47	34.665	61.9	73	56.99	90.37	99	79.98	120.36
22	13.765	32.277	48	34.665	62.81	74	58.72	91.78	100	80.25	120.36
23	14.921	34.048	49	36.03	63.49	75	58.72	93.48	101	81.61	121.06
24	14.921	34.665	50	37.67	64.95	76	58.84	94.23	102	83.14	122.57
25	16.768	36.03	51	37.67	66.76	77	60.24	94.705	103	84.57	123.77

(3) 95%置信上下限用以下方程计算：

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \pm R \sqrt{\text{var}C + \text{var}\alpha D^2 + \text{var}\beta D^4 + 2\text{covar}(C, \alpha)D + 2\text{covar}(C, \beta)D^2 + 2\text{covar}(\alpha, \beta)D^3} \quad (7)$$

式中：

R^2 为置信回归系数，也是卡方分布的 95%置信限， $\chi^2(\text{df}, 95\%)$ ，自由度（df）为 2 或 3。

对于一个线性平方模型（df = 3）， R^2 等于 7.81，而对于一个线性模型， R^2 为 5.99。在方程（7）中， R^2 为 2.79，对线性模型， R^2 为 2.45。由于同时要考虑双着丝粒检出率和刻度曲线的 95%置信限，一些作者建议用回归曲线的 83%置信限来代替 95%，以减少高估不确定性的可能[134、135]。在这种情况下，线性平方模型的 R^2 为 5.02，线性模型为 3.54。

(4) 可以用迭代法计算 Y_L 与上部置信曲线相截点的值，即剂量估算值的 95%置信下限（ D_L ）。可以使用 Excel 程序里的“solver”工具。用同样的方式，可以得到 Y_U 与下部置信曲线相截点的值（ D_U ）。在本例中， D_L 和 D_U 分别为 0.51 和 0.97 Gy。

如果得不到协方差，可以利用方程（8）近似估计置信限。当协方差对不确定性的贡献较小时，可以使用方程（8）。

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \pm R \sqrt{\text{var}C + \text{var}\alpha D^2 + \text{var}\beta D^4} \quad (8)$$

对于在计数大量细胞基础上建立的刻度曲线来说，与受检者畸变率的方差相比，曲线的方差很小，可以忽略不计。在图 25 中，通过 Y_L 和 Y_U 与实线的交点可以直接从刻度曲线得到 D_L 和 D_U 的近似估计值。

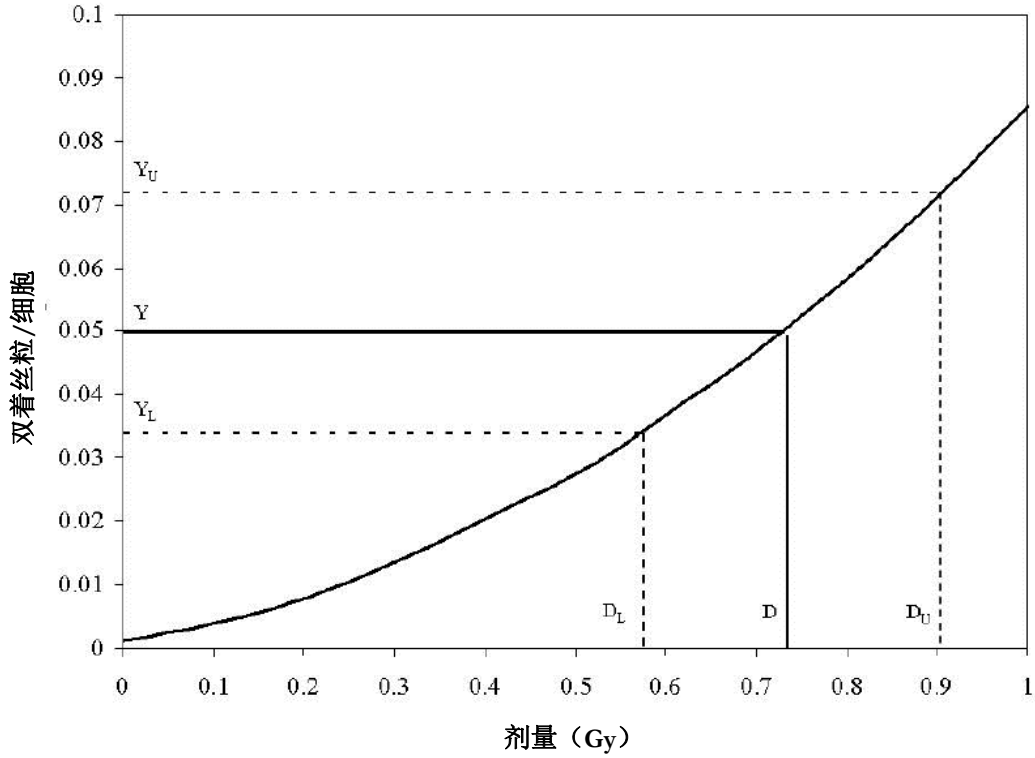


图 25. 用于估算不确定性的剂量-效应曲线，（忽略曲线误差）。

本例中，0.73 Gy 的曲线相关误差为 0.002；这个值是将 0.73 Gy 代入方程（7）中的 D 得到的。这个值比双着丝粒观察值的标准误 $SE(25)^{1/2}/500$ （等于 0.01）还要小。用此方法得出的 D_L 和 D_U 分别为 0.57 和 0.91 Gy。

如果 u 检验统计量大于 1.96，应考虑离散分布，分别将 Y_U 和 Y_L 乘以下面的因数加以校正，其中 CL 是标准统计表中给出的泊松分布的置信限， X 是观察到的双着丝粒数， σ^2/y 为观察到的离散指数：

$$Factor = \left(\frac{CL}{X}\right)^{\sqrt{\sigma^2/y}} \quad (9)$$

用上面的例子，如果含有一个双着丝粒的细胞不是 25 个中，而是 19 个细胞中含一个双着丝粒、三个细胞中含两个双着丝粒，那么 σ^2/y 为 1.19， u 值为 3.19。这种情况下， Y_U 和 Y_L 分别为：

$$Y_U = \frac{36.03}{500} \times \left(\frac{36.03}{25}\right)^{\sqrt{1.19}} = 0.1074 \quad (10)$$

$$Y_L = \frac{16.77}{500} \times \left(\frac{16.77}{25}\right)^{\sqrt{1.19}} = 0.0217 \quad (11)$$

对应的 D_L 和 D_U 分别为 0.39 和 1.19 Gy。

9.7.4. 更复杂照射情景下的剂量估算扩展

前一节适用的是，相对低 LET 辐射大规模急性事故过量照射全身均匀分布、并可以快速得到血样的情况。按照适当的离体急性照射剂量-效应曲线评估的每细胞双着丝粒率，可以给出可靠的全身平均吸收剂量估算值。然而，实践中这种理想的情况很少发生，比较常见的是迁延照射或分次照射。更常见的是，事故照射多为非均匀照射，可能只涉及身体的一部分。在采血进行染色体分析前，也可能会有较长时间的拖延。这些因素将导致被采集淋巴细胞的不均匀分布，得到的双着丝粒数目与标准的离体剂量-效应曲线相比，会产生不实际的剂量估算值。不均匀照射的双着丝粒数目不符合泊松分布，一般是过离散的。对于局部照射，因为那些照射野之外组织中的淋巴细胞不受到损伤，不均匀性更为明显。在极端不均匀局部照射情况下，细胞受到损伤的数目比预期要少，但一个细胞可以包含多个畸变。即使在皮肤辐射剂量均匀分布的情况下，剂量随组织深度的单调减少，也会导致淋巴细胞受照剂量的不同。这种效应对于弱贯穿辐射尤为明显，而对于更强的贯穿辐射，如 250 kVp 的 X 射线或 ^{60}Co 、 ^{192}Ir 和 ^{137}Cs γ 源，效应则小到足以使双着丝粒数近似服从泊松分布。

高 LET 辐射事故照射，如中子辐射，也会由于剂量在细胞水平的沉积方式而导致过离散分布，由于剂量沉积在细胞水平（第 3 章）。

含有非稳定性畸变的细胞会从外周血中消失，而被新生的不含双着丝粒的细胞所取代，所以延迟采血时间会影响畸变数。

本节讨论不均匀照射、延迟采血和迁延照射对染色体畸变率的影响，以及如何根据检测数据进行有效的剂量估算。也考虑如何报告由于统计局限性而与低剂量难以区分的极低剂量应急事件。

下面针对每一种应急照射情况举例说明。

9.7.4.1. 临界事故

在一起临界事故中，机体同时受到中子和 γ 射线照射。如果中子对 γ 射线的剂量比是已知的，而且这种信息是可以通过物理测量得到的，那么利用迭代法可以对中子和 γ 射线分别进行剂量估算。迭代步骤如下：

- (1) 假设所有畸变都是由中子造成的，则根据检测的双着丝粒数用中子曲线估算剂量；
- (2) 用估算的中子剂量和提供的中子对 γ 射线的比来估算 γ 射线的剂量；
- (3) 用 γ 射线的剂量来估算由 γ 射线产生的双着丝粒数；
- (4) 从检测到的双着丝粒数中减去计算得到的 γ 射线所致双着丝粒数，得到一个新的由中子产生的双着丝粒数值；

(5) 重复步骤 1~4，直到获得与双着丝粒数相同的估算值。

在不能用物理方法估算中子对 γ 射线比的情况下，不能采用上述方法。一个办法是借鉴日本东海村事故伤员中使用的 Gy-Eq 法来表示剂量。然而，Brame 和 Groer [136]介绍了一种 Bayesian 方法，这种方法可以在不知中子对 γ 射线比的情况下估算临界事故的剂量。当模拟一个事故时，用 Bayesian 法可以给出与传统迭代法非常相似的结果。

9.7.4.2. 低剂量过量照射案例

通常认为，双着丝粒对低 LET 辐射的剂量探测下限大约是 0.1~0.2 Gy。低剂量的灵敏性受到双着丝粒的本底水平（对于普通人群大约是 0.5~1/1000 细胞）以及能够实际计数的中期细胞分裂相数目的限制。因此，低剂量照射的剂量估算存在较大的统计学不确定性。如前所述，这些统计不确定性主要来源于染色体畸变数的泊松误差，只有小部分是来自剂量-效应曲线系数的标准误，曲线中的 α 系数在低剂量下是最重要的。在实际应用中，后者可以忽略不计，除非刻度数据在低剂量范围是稀疏的。

尽管在考虑照射的健康后果时，100~200 mGy 并不重要，但是与国际放射防护委员会（ICRP）建议的 20 mSv 年职业剂量限值相比，在法律上是一种高剂量。试图解决疑似低剂量过量照射，往往对于遗传学是有压力的，使得方法超出了它本身的能力。

在报告结果时，经验表明外行人士对不确定性的概念了解极少。有许多方法可以帮助解释结果。首先，虽然在统计学上并不十分准确，但可以解释为剂量大于 95% 置信上限的机会只有 2.5%。此外，置信下限可定义为检测的“探测限”：以表 9 数据为例，只有当 1000 细胞中有 4 个或更多双着丝粒时，才表示在统计学上剂量大于 0 Gy，即置信下限大于 0 Gy。

表 9. 每 1000 个细胞中双着丝粒的不同低检出率所对应的 95%剂量置信限以及表示 0 剂量或 0.25 Gy 剂量似然性的概率比。

（用 $Y = 0.0010 + 0.0164D + 0.0492D^2$ 计算的剂量）

观察值 (双着丝粒)	剂量 (Gy)			概率比 p(0 Gy):p(0.25 Gy)
	置信下限	均值	置信上限	
0	—	0	0.12	1306:1
1	0	0	0.18	160:1
2	0	0.05	0.23	20:1
3	0	0.09	0.26	2:1
4	0.01	0.13	0.3	1:3
5	0.03	0.16	0.33	1:28
6	0.06	0.19	0.36	1:229
7	0.09	0.22	0.38	1:1868

另外，如果只考虑两种可能情形：0 剂量或者疑似（如佩章剂量计）剂量，那么可以用每个剂量的相对概率来计算两个剂量的概率比。这种机会源于下面的泊松分布。如果剂量为 0，那么根据剂量-效应曲线推算，预计双着丝粒本底水平为 1 个/1000 细胞。对于 0.25 Gy 剂量，预计双着丝粒为 8.2 个/1000 细胞。根据泊松分布，当预计双着丝粒为 1 个和 8.2 个时，预期观测不到双着丝粒的相对机会为 $e^{-1}/e^{-8.2}$ ，即 0.36788/0.00027，大约等于 1300。表 9 最上一行列出了剂量平均值、剂量置信区间上下限、及 0 Gy 对佩章剂量计剂量的概率比，下面几行是 1000 个细胞中看到的不同数目双着丝粒的相关值。

实验室在报告分析结果时，可以根据具体情况采用上述一种或两种方法出据检测报告。

9.7.4.3. 局部照射

局部受照的细胞遗传学分析显示，患者的计数中期细胞中的双着丝粒是非泊松分布。因此首先要计算方差和均值的比（ σ^2/y ），然后用 u 检验来确定是否该比值明显偏离总体（第 8.3 节）。如果数据与泊松分布一致，建议报告全身剂量估算平均值。如果数据不符合泊松分布，可以通过下面介绍的两种方法估算局部受照剂量，而不是简单地采用全身平均剂量。对于局部照射的剂量估算也可以根据过量照射事件的资料而定。一般推荐 u 检验法来估算数据的泊松分布，但是许多人认为这种方法并不十分有力，特别是在计数中期细胞分裂相数目较少的情况下。因此，许多实验室在日常实践中，选用下面两种方法之一对全身照射和局部照射的剂量估算值进行比较。如果全身照射和局部照射剂量估算值显著不同，那么实验室就应该考虑这种情况可能是局部照射。在不确定全身照射和局部照射剂量估算结果是否有显著性差异的情况下（第 9.7.3 节），只有当数据明显是非泊松分布的时候，才建议采用这里介绍的两种方法。

方法 1

该方法是由 Dolphin [138] 首先提出的，命名为“不纯泊松法”。考虑的是所有计数细胞中双着丝粒的过离散分布。所观察的双着丝粒分布代表 (a) 机体受照部分和 (b) 其余未受照部分的泊松分布总和。含畸变的细胞显然是在机体的受照部分。而未损伤细胞则包含两个亚群：一部位来自未受照部分，另一部分来自受照部分的未损伤细胞（代表泊松分布公式的项用第一项 e^{-Y} 表示）。方程 12 描述细胞中损伤的分布。

$$\frac{Y_F}{1 - e^{-Y}} = \frac{X}{N - n_0} \quad (12)$$

式中：

Y_F 为受照部分双着丝粒数的平均值，

e^{-Y} 代表受照部分未损伤的细胞数，

X 为观察到的双着丝粒数，

N 为细胞总数，

n_0 为不含双着丝粒的细胞数。

可以用迭代法求解方程 (12) 找出畸变数的最大似然估计值，然后通过方程 (13) 用 Y_F 计算受照计数细胞的比份数 (f):

$$Y_F f = \frac{X}{N} \quad (13)$$

然后用 Y_F 和适当的刻度曲线计算受照部分的剂量。在校正间期死亡和有丝分裂延迟影响后，受照部分的大小可以由 f 导出。这些因素可能会使 48 小时培养后到达分裂中期的受照细胞、甚至受照后未发生畸变的细胞，比未受照细胞要少。假如到达中期的受照细胞部分为 p ，机体局部受照的部分为 F ，

$$F = \frac{f/p}{1 - f + f/p} \quad (14)$$

通过方程 (15) 可以估算出 p 值

$$P = \exp(-D/D_0) \quad (15)$$

式中：

D 为估算的剂量，

实验证明 D_0 值在 2.7~3.5 之间[139、140]。

但是，这种方法也有一些局限性：

- (1) 该方法假设受照部分的照射是均匀的。
- (2) 简单地假设淋巴细胞均匀分布于全身，由此得出受照的淋巴细胞只与机体的受照部分有关。
- (3) 这需要一个相当高的局部剂量，以便能够观察到大量的含有两个或更多双着丝粒的细胞。这对于最好地计算受照而未损伤细胞的估算是必要的。
- (4) 该方法假定受照和取血之间的时间间隔很短，所以不会因为新生成的未损伤细胞进入血液循环，而使双着丝粒数目明显稀释。如果已经稀释，那么由该方法导出的受照比例就会被低估[141]。

方法 2

该方法由 Sasaki 和 Miyata[142]提出，并命名为 Qdr 法。考虑的是仅仅来自含有非稳定性畸变的细胞的双着丝粒和环，并且假设这些细胞是在事故时产生的。因此，该

方法就避开了由机体未受照部分的未受损伤的细胞、或照射后从干细胞池补充的未受损伤细胞造成的细胞稀释问题。该方法也不需要含有两个或两个以上畸变的严重损伤细胞的存在。 Qdr 是损伤细胞 (N_U) 中双着丝粒和环的预期产额, 由此得出:

$$Qdr = \frac{X}{N_U} = \frac{Y_1}{1 - e^{Y_1 - Y_2}} \quad (16)$$

式中:

X 为双着丝粒和环的数目,

Y_1 和 Y_2 分别为双着丝粒+环和额外无着丝粒断片的数目。

由于 Y_1 和 Y_2 为已知的剂量函数, 可以从离体剂量-效应曲线推出, 而 Qdr 是一个单独的剂量函数, 因此可对机体的受照部分进行剂量估算。

这种方法也有一些局限性:

- (1) 同方法 1 一样, 也是假设受照部分的照射是均匀的, 而按照 Sasaki 和 Miyata[142] 的报道, 这种方法没有提供受照部位大小的信息。不过, 采用与方法 1 相同的步骤, 通过将剂量转换为畸变数, 然后用方程 (13) 和 (14) 可以推导出这一数据。
- (2) 假定额外的无着丝粒畸变也服从泊松分布, 但并没有得到离体实验数据的证实。如果认为这一限制是重要的, 则可以只计数那些含有双着丝粒和环的受损细胞中的双+环的数目, 可以避免这一问题。方程 (16) 就简化为:

$$Qdr = \frac{X}{N_U} = \frac{Y_1}{1 - e^{-Y_1}} \quad (17)$$

这个方程等同于方程 (12)。这一简化形式得出的剂量估算值与上述方法 1 得出的相同。

- (3) 该方法假设含有非稳定畸变的所有细胞是照射时出现的, 还假设没有包括由于细胞中染色单体损伤引起的染色体畸变细胞。

9.7.4.4. 延迟采血

文献记载表明, 在一次照射后, 含有畸变的一些淋巴细胞可以在外周血循环中持续存在多年。但是已经证明, 照射后延迟几周以上采血, 样品的畸变数会减少。在受到足以引起白细胞数降低的早期确定性效应的大剂量照射后, 这种情况尤其明显。对于低于确定性效应阈值的较低剂量照射, 过量照射迟发效应的可能性较大。因此, 为了获得更真实的剂量估算值, 需要做一些调整。遗憾的是, 几乎没有能够导出一个可信的校正系数的数据。的确, 由于存在明显的个体差异, 如感染等因素影响, 畸变数目的减少不可能简单的仅以一个时间函数来表达。尽管如此, 已有研究提出染色体畸

变的指数消减半衰期大约为三年[106]。作为大体上的近似，这可能适用于取样时间延长的事件，如五年或五年以上。然而，当处理简单的事例照射时，很少会延误这么长时间。一般间隔时间是几天到几个星期。如果在对个人剂量计进行常规处理时发现受照，且照射发生在这个阶段的早期，可能会有几周的延迟。最可能遇到的采样时间延迟长达一年，超过这个时间段，大约三年的指数衰减半衰期就不适合了。

Buckton 等[63、143、144]发表的数据可能是最为全面的。他们 30 多年来对一组经 X 线分次照射治疗强直性脊柱炎的病人反复采集血样。经研究发现，染色体畸变数目有一个较长的初始平台期，大约持续 20 周，随后伴随一个迅速下降期，持续四年以上。他们还计算出在前四年里，双着丝粒数每年以大约 43% 的速率下降，之后大约为每年 14%。考虑到有限数据的显著变化，不可能给出确切的指导，特别是对超过几周的延迟。因此，未经修正的双着丝粒数目可能会低估受照剂量，而低估的程度通常取决于每一个体特有的不可量化的因素。

在讨论机体局部照射时（第 9.7.4.3 节）已经指出，Qdr 法只考虑损伤细胞中的双着丝粒和环的数目。因此，采用这种方法延迟采血，也能规避进入血循环的未损伤细胞造成染色体畸变随时间稀释的问题，只要可以观察到足够数量的含非稳定性畸变的细胞。这种方法对于太长时间的延迟显然不适合。然而，在这种情况下可以考虑稳定性畸变细胞的持续存在。多年来，唯一可能的方法是通过核型许多块状染色和后来的分带制片。用这些方法对强直性脊柱炎的研究表明，在 30 多年的随访过程中，这些细胞或多或少地保持在恒定水平。Awa [145]也报道了在原子弹爆炸幸存者中稳定畸变率和 DS86 剂量估算之间的良好相关性。含有非稳定性畸变的分裂细胞在有丝分裂过程中因不分离而被选择性的排除掉。稳定性畸变随着时间而增加，这是因为稳定性和非稳定性畸变的细胞以相同的速率消失，但稳定性畸变细胞的丢失被来自干细胞池的正常分裂所抵消。对于回顾性生物剂量，费力的显带核型分析技术已经被 FISH 方法所取代，后者作为一种最好的方法，用来筛查大量细胞中存在的罕见的、随机的、非组成成分的稳定性易位畸变。这一内容将在第 10 章中介绍。

9.7.4.5. 迁延照射与分次照射

迁延照射或分次照射与相同剂量的急性照射相比，产生的染色体畸变数也可能较少。对于高 LET 辐射，剂量-效应关系接近线性，不会产生剂量率效应或分次照射效应。但对于低 LET 辐射，剂量迁延的效应会减小方程（2）中的剂量平方系数 β 。这一项代表的畸变数可能来源于两条径迹，在迁延照射过程中或在间断性急性照射期间，有时间通过修复机制来改变。许多研究都表明，畸变率的减少服从平均约两小时的单一指数函数规律。在这个时间内转化为染色体畸变的多数损伤已经修复，或在照后 5~6 个小时内不再能相互作用。

Lea 和 Catcheside[146]提出一个称作 G 函数的时间相关因子，用来修正剂量平方系数，因此而顾及到剂量迁延效应。由此线性平方方程（2）被修改为方程（18）：

$$Y = C + \alpha D + \beta G(x) D^2 \quad (18)$$

式中

$$G(x) = \frac{2}{x} [x - 1 + e^{-x}] \quad (19)$$

$$x = t/t_0 \quad (20)$$

式中

t 为照射持续的时间，

t_0 为平均间隔时间，已经证明约为 2 h [96、147]。

因此，在连续照射情况下，有必要知道照射持续的时间长度，并简单地假设照射期间剂量率大致是恒定的。这一过程只有在涉及的总剂量足够大，且照射时间持续数小时到数日的情况下才值得尝试。显然，对于低 LET 小剂量照射 (<0.3 Gy)，哪怕是急性的，多数畸变是通过单电离经迹产生的，所以畸变数无论怎样都近似为 $Y = \alpha D$ 。当长时间照射时， $G(x)$ 实际上减少到 0。因此，即使是涉及到高剂量照射 (> 1.0 Gy)，畸变数仍是 $Y = \alpha D$ 。对于短暂的间歇性照射，如果间歇期超过 6 小时，可以认为是多次独立的急性照射，而每次诱发的畸变数量是叠加的。对于较短的间歇时间，方程 (18) 中的 $G(x)$ 可以被 $\exp(-t_i/t_0)$ 替换，其中 t_i 为分次照射之间的时间。Lloyd 等[96]和 Bauchinger 等[147]已经给出了支持 G 函数假说的实验证据。

9.7.4.6. 放射性核素内污染

放射性核素进入体内构成一种特殊类型的迁延性照射，具有更多的复杂性，通常是极不均匀的照射。这是因为核素在体内的沉积位置和滞留时间取决于多种因素。包括进入身体的途径、物理化学形态、辐射品质、核素可能被结合的代谢途径以及机体的生理状态等。

在放射性核素内污染患者的淋巴细胞中，可以观察到高出本底水平的染色体畸变。但是由于多种因素干扰，不大可能利用畸变数推导出全身或特定器官的、合理的辐射剂量估算值。利用离体淋巴细胞受到特定核素照射的剂量-效应曲线可以获得相应的畸变产额，用以对患者体内循环淋巴细胞的剂量进行估算。一个例子是 DuFrain 等[148]报告的一例受到 ^{241}Am 严重污染男子的事例。然而，对于淋巴细胞的剂量，特别是在 α 核素照射情况下，可能会使体内其它细胞和组织的剂量严重失真。

因此一般来说，对于体内摄入的放射性核素，细胞遗传学研究的价值是有限的，放射性核素在体内分布非常均匀的情况例外。铯同位素和氟化水就是两个这样的例子。铯趋向于聚集在肌肉中，在体内是相对普遍分布的，而且具有二次清除作用，清除 10% 的半排期为 2 天，清除 90% 的半排期为 100 天。 ^{137}Cs 是格鲁吉亚事故[149、150]中释放到环境中的核素，也是切尔诺贝利事故[151]中环境污染的主要核素之一。氟以氟化水或气体的形式进入体内并被结合到身体的水分中，由此产生大致均匀的照

射。它的生物半排期大约为 10 天，同铯一样，实际上相当于慢性照射，剂量-效应关系为线性。在没有针对氚的离体剂量-效应曲线情况下，用 200~300 kVp 的 X 射线曲线也可以。Prosser 等[152]证明，在低剂量或低剂量率下，氚对 250 kVp X 射线的 RBE 值为 1.13。

9.7.5. 剂量估算实例

9.7.5.1. 全身急性照射

Brewen 等[91]和 Preston 等[153]报道了一起 ^{60}Co 源照射事故，受照者身体正面受到完全均匀的大剂量照射。因为男子转身并离开放射源，所以背部也受到较低剂量的照射。总的照射时间不到 1 分钟。事故后 6 小时到 3 年内多次采集血样。在事故后 6 小时到 32 天时间里，分 7 次采血，每次分析 300 个中期细胞，染色体畸变率基本保持恒定。汇总 7 次检测数据，在 2100 个细胞中观察到 478 个双着丝粒和着丝粒环。他们用以下离体 γ 射线的剂量-效应曲线方程进行剂量估算，其中剂量 D 用伦琴 (R) 表示：

$$Y = 3.93 \times 10^{-4} D + 8.16 \times 10^{-6} D^2 \quad (21)$$

全身平均受照剂量估算为 144 R (1 R = 0.0095 Gy)。这与受照者随身佩戴的热释光剂量计和用一个体模进行事故剂量重建获得的物理剂量 127 R 非常吻合。一般血液学改变也指示受照剂量大约为 150 R。

9.7.5.2. 临界事故

以一次临界事故为例，分析 100 个细胞，观察到 120 个双着丝粒，即每个细胞含 1.2 个双着丝粒。物理测量提供吸收剂量中的中子与 γ 比为 2:3。使用 0.7 MeV 的裂变中子谱和 ^{60}Co γ 射线的刻度曲线进行细胞遗传学剂量估算。曲线方程如下：

$$\text{中子: } Y = 0.0005 + 8.32 \times 10^{-1} D \quad (22)$$

$$\gamma \text{ 射线: } Y = 0.0005 + 1.64 \times 10^{-2} D + 4.92 \times 10^{-2} D^2 \quad (23)$$

按照第 9.7.4.1 节所列的步骤进行剂量估算：

- (1) 每个细胞含 1.2 个双着丝粒相当于 1.44 Gy 的中子照射；
- (2) $1.44 \times 3/2 = 2.16$ Gy 的 γ 射线照射；
- (3) 2.16 Gy 的 γ 射线照射相当于每个细胞含 0.226 个双着丝粒；
- (4) $1.20 - 0.266 = 0.934$ ，即中子所产生的双着丝粒数；
- (5) 每个细胞含 0.934 个双着丝粒相当于受到 1.12 Gy 的中子照射；

重复步骤 2, $1.12 \times 3/2 = 1.683$ Gy 的 γ 射线照射, 等等, 经过几次迭代, 最终得到中子剂量为 1.21 Gy, γ 射线剂量为 1.82 Gy。表 10 列出了完整的剂量估算过程。

有人报道了对这种方法的离体验证, 在比对临界事故剂量估算的国际演练中, 对实际的中子剂量和 γ 射线剂量获得了非常好的估算结果[137、154]。

表 10. γ 和中子混合照射剂量估算步骤

步骤 1 和 5 中子剂量 (Gy)	步骤 2 γ 射线剂量 (Gy)	步骤 3 γ 射线畸变率 (每个细胞的双着丝粒数)	步骤 4 中子畸变率 (每个细胞的双着丝粒数)
1.44	2.16	0.266	0.934
1.12	1.68	0.167	1.032
1.24	1.86	0.201	0.999
1.20	1.80	0.189	1.011
1.21	1.82	0.194	1.006

9.7.5.3. 低剂量过量照射

一名操作 ^{192}Ir 放射源进行无损伤检测的放射师, 送回了每月的热释光剂量计, 记录的贯穿辐照剂量为 250 mSv。与其一起工作的同事的热释光剂量计均没有剂量记录, 也没有证据显示任何系统故障或关于过量记录的任何其他解释。对其进行细胞遗传学分析, 共计数 1000 个中期细胞均未发现损伤。最佳估算剂量为 0, 但是, 用曲线 $Y = 0.0010 + 0.164D + 0.0492D^2$ 估算, 0 Gy 的 95%置信上限为 0.12 Gy。调查人员不能确定该男子是否的确受到照射, 所以在这种情况下, 证明了用一种不同方式给出结果是有用的。用第 9.7.4.2 节描述的概率比方法, 0 Gy 的概率比大约为 1300: 1。

9.7.5.4. 急性非均匀照射

一名非辐射工作人员捡到一枚 250 GBq (6.7 Ci) 的 ^{192}Ir 放射源, 放在口袋里, 发生了非均匀照射, 导致大剂量局部照射, 引起皮肤烧伤[155]。之后迅速采集血样, 分析 1000 个淋巴细胞的分裂相; 其中 99 个细胞含有下列非稳定性畸变: 86 个双着丝粒, 2 个着丝粒环和 60 个额外的无着丝粒。双着丝粒分布如表 11 所示。

表 11. 急性非均匀照射后的双着丝粒分布

	每细胞中的双着丝粒					
	0	1	2	3	4	5
细胞数	932	56	9	1	1	1

研究实验室的离体剂量-效应曲线为：

$$Y_{\text{双着丝粒}} = 1.57 \times 10^{-2} D + 5.00 \times 10^{-2} D^2 \quad (24)$$

$$Y_{\text{无着丝粒}} = 2.30 \times 10^{-2} D + 3.90 \times 10^{-2} D^2 \quad (25)$$

使用不纯泊松法（第 9.7.4.3 节，方法 1），将此例中的数据代入方程（12），可以得出受照细胞中双着丝粒数 Y_F 的最大似然估计值。通过迭代， $Y_F = 0.489$ ，即每个受照细胞含 0.489 个双着丝粒，在剂量效应曲线中对应的剂量为 2.97 Gy。

求解方程（13）可以得出受照份额大小 f ，此例中 $f = 0.176$ 。由于该值代表了那些受照后存活下来的细胞群，因此需要用方程（14）进行校正，以便排除间期死亡和分裂延迟等因素，重新选择未受照的细胞。一些实验证据表明[147]，这个选择是剂量的指数函数，这里 $D_0 = 2.70$ Gy。在此例中，剂量估算值约为 3.0 Gy，意味着仅有大约 0.33 份额的受照细胞存活下来（方程 14 中的 p 值），可用于分析。用方程 14 计算得到初始受照份额 F 等于 0.393。因此，最终结果是，机体受照份额约为 40%，平均剂量约为 3.0 Gy。

在 Q_{dr} 法中（第 9.7.4.3 节），应该指出的是，该研究实验室通常不使用双加环数，而只使用双着丝粒数 Q_d 来进行剂量估算。由于相对于双着丝粒和额外的无着丝粒而言，环的畸变极少观察到的，所以这一改变影响甚微。因此，将值代入方程（16），忽略着丝粒环，得到：

$$Q_d = \frac{86}{99} = \frac{1.57 \times 10^{-2} D + 5.00 \times 10^{-2} D^2}{1 - e^{-3.87 \times 10^{-2} D - 8.90 \times 10^{-2} D^2}} \quad (26)$$

方程中的 D 可以用迭代法求出，得到剂量估算值为 3.19 Gy。这与由不纯泊松法得出的 2.97 Gy 的剂量估算值非常一致。

9.7.5.5. 延迟采血

下面给出延迟采血情况下的两个剂量估算实例。

调整双着丝粒数

Stephan 等[156]报道了一起事故，有 2 个男人受到 ^{60}Co γ 源 5 分钟均匀照射。他们佩戴胶片剂量计，记录指示剂量为 470 和 170 mSv，与物理方法估算的剂量非常一致。遗憾的是，受较高剂量照射的人血样采集延迟 215 天，另外一名同事延迟 103 天。每人分析 1500 个中期细胞分裂相，观察到的双着丝粒数几乎相同，分别为每 100 个细胞 0.47 个和 0.46 个双着丝粒。在剂量-效应曲线上相应的剂量为 0.13 Gy：

$$Y = 3.00 \times 10^{-4} D + 5.00 \times 10^{-6} D^2 \quad (27)$$

考虑到采样延迟，作者分别选择乘以 3 和 2，对两人的双着丝粒数进行调整。这是根据第 9.7.5.1 节中 Brewen 等[91]和 Preston 等[153]介绍的全身事故照射数据确定的。

调整后用双着丝粒数求出的估算剂量分别为 0.31 Gy 和 0.22 Gy。这样，尽管受照较严重人的生物剂量更接近于物理估算值，但仍然有一些偏差。如果作者选择用强直性脊柱炎研究的延迟数据[143]，则最多乘以 1.4 倍的校正，这样第一个人的生物剂量和物理剂量估算值之间的偏差会更大。考虑到脊柱炎的效应可以维持至 20 周，延迟 103 天将不需要校正。

使用 Qdr 法

Ishihara 等[157]报道了一起严重事故，一枚 ^{192}Ir 工业探伤源被带回家中，致使六人受到照射。受照最严重的两人受到局部照射，皮肤烧伤明显。在畸变数据中得到进一步反映，用 Qdr 法估算的剂量分别为 1.95 Gy 和 1.50 Gy，均明显高于由每细胞所含双加环数估算的全身剂量 1.52 Gy 和 0.54 Gy。在受照后头两个月，每细胞的双加环数略有变化，到六个月时趋于稳定。与此不同，当停止进一步研究停后，Qdr 值从受照开始分别到 400 天和 200 天里，一直保持相对恒定。

9.7.5.6. 迁延性照射和分次照射

1998 年 12 月在伊斯坦布尔发生一起严重事故，在一家废旧金属回收站，一枚使用过的放射治疗用 ^{60}Co 源被打开[158]。几乎在一天内 10 人受到照射，受照时间在 2~7 小时内[159]。这里以其中一名受照者为例。该人受照时间为 7 小时，四个实验室汇总的双着丝粒畸变率为 668 个细胞中有 157 个双着丝粒，即每个细胞中有 $157/688 = 0.228 \pm 0.18$ 个双着丝粒。根据急性照射剂量-效应曲线

$$Y = 0.001 + 0.003D + 0.060D^2 \quad (28)$$

急性剂量估算值 ($\pm \text{SE}$) = 1.7 ± 0.1 Gy。忽略剂量-效应曲线的任何误差，不确定性被稍微简化。应用 G 函数，即

$$x = \frac{t}{t_0} = \frac{7}{2} = 3.5 \quad (29)$$

所以 $G(x) = 0.413$ ，剂量-效应曲线变为

$$Y = 0.001 + 0.003D + 0.025D^2 \quad (30)$$

现在，从这一双着丝粒率得出受照 7 小时的剂量为 2.5 ± 0.1 Gy。

9.7.5.7. 放射性核素内污染

Lloyd 等报道了一例工厂工人意外吸入约 35 GBq (~ 1 Ci) 氟化水滴的事故[160]。通过强迫利尿，加速排除她体内的氟。根据测量尿液中排除氟的浓度和速率获得软组织的待积剂量。在事故后不同时间采集血样，检测双着丝粒畸变数。采用 40~50 天的数据进行生物剂量估算，因为那时机体已经接受了所有的待积剂量。将双着丝粒数代入到一个离体线性剂量-效应刻度曲线 $5.37 \times 10^{-2}D$ 中，得到淋巴细胞的平均估算剂量为 0.58 Gy。该值需要再乘以一个 0.66 的校正因子，这是考虑了全身、软组织和淋巴细

胞中的不同水含量而得出的。剂量-效应曲线是根据淋巴细胞的畸变率刻度的，而氟化水产生的剂量主要是对机体的软组织。校正后的估算生物剂量为 0.38 Gy，其 95%置信限为 0.48 和 0.28 Gy，更接近尿液测量中所得的 $0.47 \text{ Gy} \pm 20\%$ 的实际值。将尿液中的氟浓度转换为软组织的剂量也考虑到软组织中的水含量[160]。

10. 易位分析

双着丝粒检测和胞质分裂阻断微核（CBMN）检测的一个公认缺点是，损伤是非稳定性的，因而会以细胞更新的速率从外周血淋巴细胞池中消失（第 4 章）。长期以来一直认为，需要分析更持久类型的损伤，如稳定性染色体易位，以解决早先照射或长期照射的生物剂量估算问题。通过核型分析虽然可以检测易位，但是这种方法太费力，以致不能在生物剂量估算中常规使用。FISH [16]的引进开启了用替代手段检测易位的希望之门。

该技术采用特异性的 DNA 序列作为基因组特定部分的探针，然后通过不同的荧光染料突出显示或“涂染”不同颜色的区域。在荧光显微镜下分析彩色区域的重排，即可识别易位（图 26 和 27）。

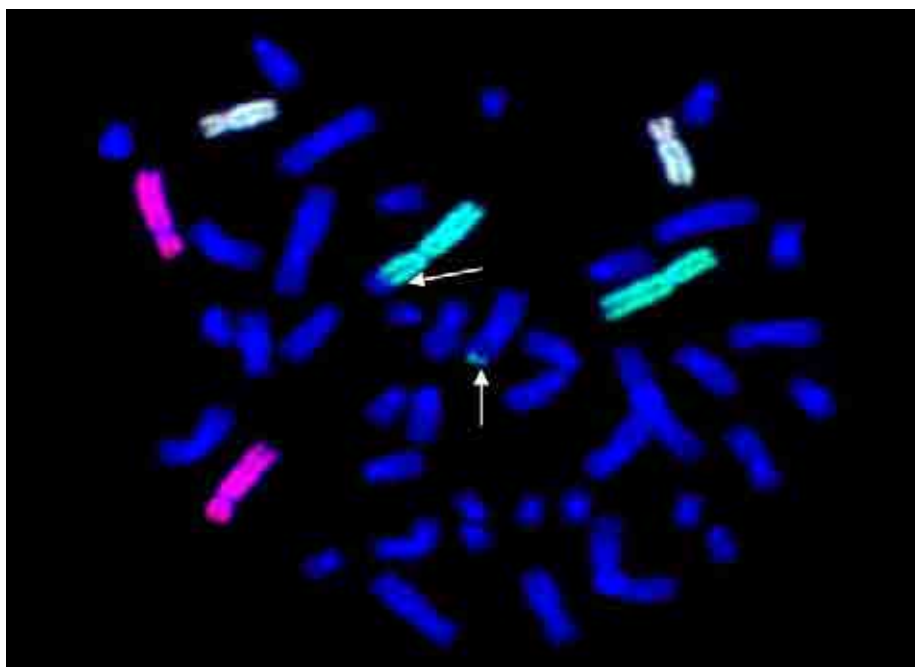


图 26. 不同颜色涂染的人类中期分裂细胞，其中 2 号染色体（FITC，绿色），4 号染色体（德克萨斯红），8 号染色体（FITC + 德克萨斯红，黄色），其余染色体用 DAPI 复染。可见 2 号染色体有一个明显的简单易位或双向易位[t(Ba), t(Ab)]。

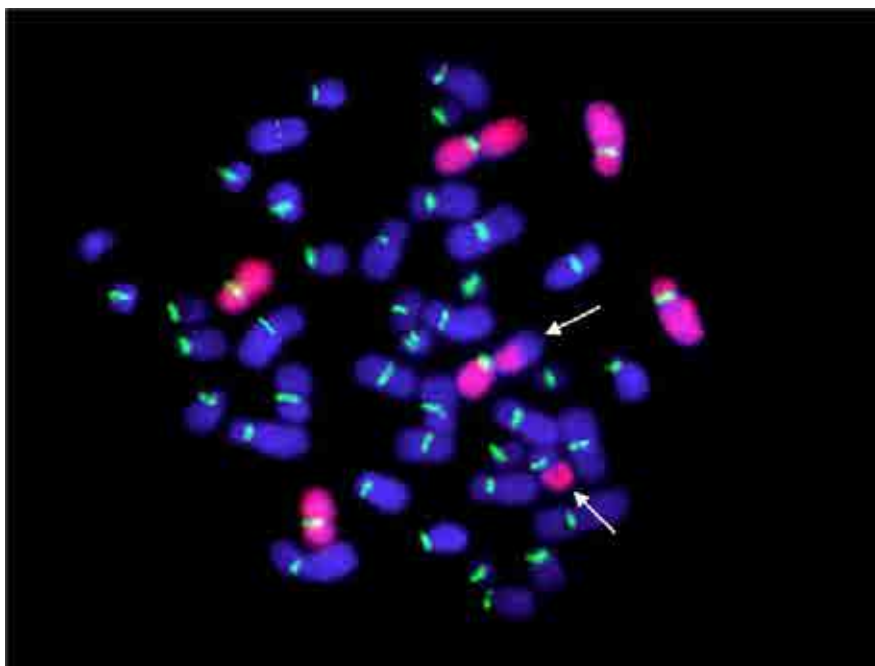


图 27. 单色涂染的人类中期分裂细胞，1、4 和 11 号染色体用 Cy3（红色）标记，着丝粒用标记有 FITC（绿色）的泛着丝粒探针突出显示，其余染色体用 DAPI 复染。1 号染色体可见一个明显的简单易位或双向易位[t(Ba), t(Ab)]。

FISH 在医学和基础细胞遗传学领域有着广泛的应用。然而，本出版物仅涉及其在生物剂量学领域的应用。目前有多种类型的探针可以使用，因此可以选择性地对整条人类染色体或其指定部分进行染色。以不同比例对特定部位进行荧光染色，可以同时用各种颜色突出显示不同区域。使用多种颜色如多色荧光原位杂交（mFISH）的一个缺点是，用人眼分辨色彩的深浅差异可能过于敏感。因此，需要用电子系统来捕捉图像，以可用的假色来显示图像（图 28 和 29）。

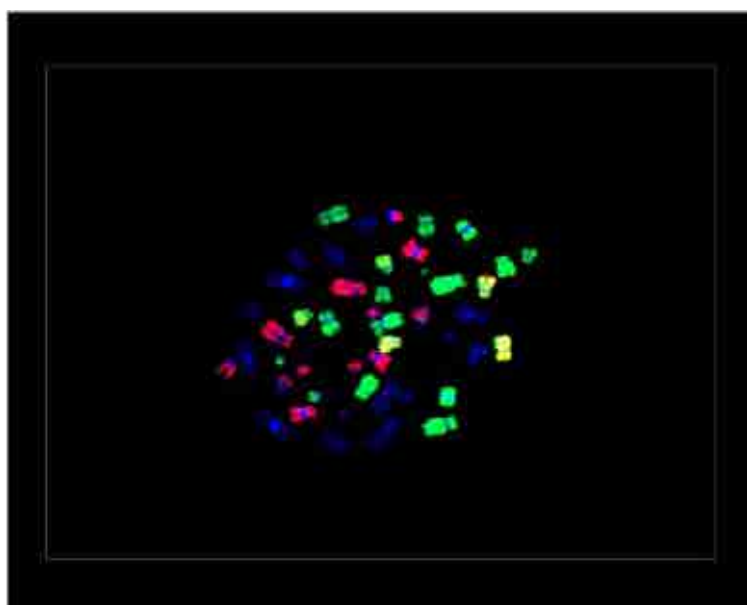


图 28. 用 mFISH 染色的中期分裂细胞。A：用相机拍摄的 RGB 颜色。

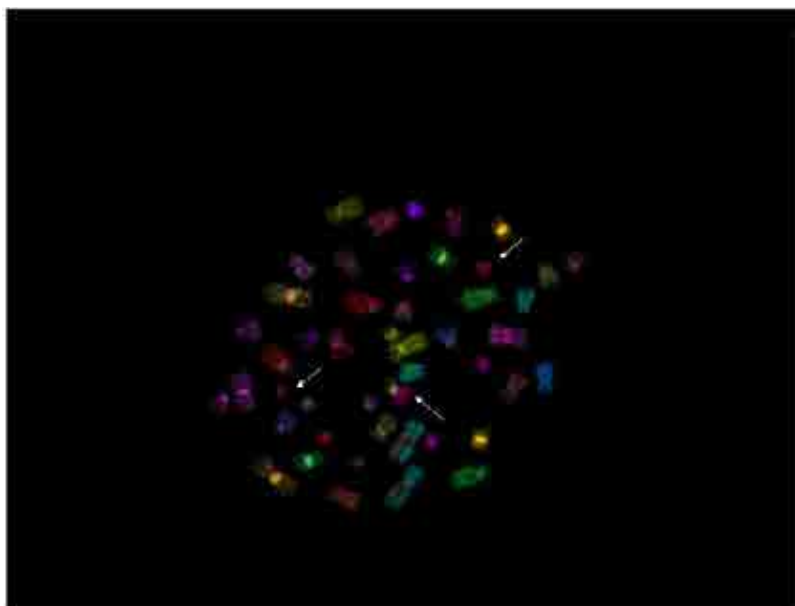


图 29. 用 mFISH 染色的中期分裂细胞，B：同一中期细胞，但每对染色体都有假色。

10.1. 细胞培养与固定

血样采集、淋巴细胞培养和收获固定细胞的步骤与双着丝粒分析（第 9.1 和 9.2 节）的步骤类似。尽管通过有丝分裂，易位是稳定的，但是对 M1 期细胞进行分析仍然是一种良好的实践。因为含非稳定性畸变的细胞在有丝分裂时会丢失，可能会使平均易位率失真，因此分析 M1 期细胞尤为重要。而且可能有这样的情况：从同一血样中既要获得稳定性易位率，也要获得非稳定性双着丝粒率。对于 FISH 分析，最好是保存冷冻的固定细胞悬液。滴在显微镜片上的细胞可以保存。应该保存在 -20°C ，即便如此，有时还是会出现退化。固定的细胞悬液更便于运送到其他实验室。

对于生物剂量估算，一般仅对部分基因组（如三对染色体）染色。这就要求对中期细胞的计数应多于双着丝粒的计数。因此，制备样片时使每一片上有大量可计数的优质中期细胞，是有帮助的，是可以降低成本的。

10.2. 染色体涂染

现在各种探针和荧光结合物已经商业化，使用多色荧光原位杂交（mFISH）法[162]可以对所有的染色体进行明显着色。这样，不仅可以进行完整的核型分析，也可以计数染色体间的所有易位。所有染色体的着丝粒和端粒也能被分别突显出来。

染色体内交换，如臂间倒位，可以用不同颜色选择性地涂染一条染色体的长短臂得以鉴别[163]，臂内重组可以通过一条染色体呈现出多彩带纹的 mBAND 进行检测[164、165]。相对于染色体间的变化而言，染色体内的变化频率增加已经被作为高 LET 辐射效应的一个“指纹”标记[166]，因此这些方法对研究不同辐射品质的效应具有特殊的作用。

就大多数回顾性生物剂量检测技术的应用而言，只检测染色体间的易位就可以满足需要，mFISH 能够理想地提供每个中期细胞的最大信息。这种方法也可以扩展为用不同颜色突出单条染色体的臂（pq-mFISH）[167]，但这是一种昂贵费时的方法，更需要精细的图像捕捉和熟练的操作系统。因此，实践已经进化为用相同的或不同的颜色涂染有限的染色体对，同时复染其余的染色体。建议同时使用泛着丝粒探针[168]和全染色体涂染，更准确地区分双着丝粒和易位（图 30）。

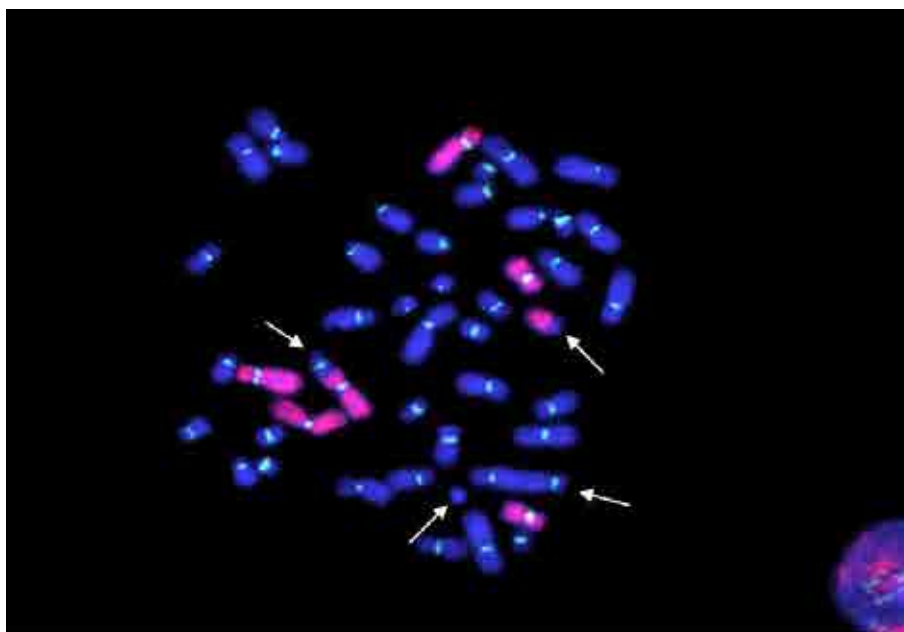


图 30 用单色涂染的人类中期细胞：1、4 和 11 号染色体用 Cy3（红色）标记，着丝粒用标记有 FITC（绿色）的泛着丝粒探针突出染色，其余染色体用 DAPI 复染。1 号染色体可见明显的双着丝粒[dic(BA), ace(ab)]。复染的染色体上也有一个双着丝粒加一个无着丝粒断片。

一般来说，涂染三对较大的染色体（即 1 到 12 号，图 7）代表了大约 20%的基因组（表 2 和 3），在使用单色探针时大约可检出全部易位的 33%。每种配伍染色的组合染色体所占全基因组的百分比，是根据染色体的自然长度来估算的[169]。全基因组的易位率可以根据 Lucas 等人[170]推荐的标准公式来估算，这个公式应用的是简单的配对互换的假设。这里建议，选择探针配伍时不要包含 7 或 14 号染色体，因为在体内免疫发育过程中，这两条染色体容易出现易位和其他畸变，这可能会混淆辐射效应的定量分析[171、172]。

对于回顾性生物剂量检测来说，用三条配伍染色体的单色 FISH 检测就足够了。三条染色体的多彩染色可以增加检出率（如果 1、4 和 12 号染色体着色，检出率可以从 31%增加到 34%），并且可以更好地发现因为近期受到大剂量照射而导致的复杂易位。下面第 10.5 节中给出对应全基因组的换算公式，可以用于单色和多重染色。

10.3. 计数标准

10.3.1. 可计数细胞的选择

尽管什么样的中期细胞可以计数并无确切共识，但是如果细胞看上去完整，所有着丝粒形态可见并存在于被涂染的染色体中，荧光标记的亮度足以检测出不同颜色标记的染色体之间的交换，则考虑分散良好的中期分裂相适合于计数[107]。

通常情况下，不必考虑复染的染色体数目完整性，但如果明显丢失了一些染色体，比如少于 40 条，多数研究人员就会舍弃这个中期分裂细胞。

一些研究人员认为，对所有出现的着色物质都应该计数，虽然在一定程度上这涉及到染色体与其他物质的鉴别，因为目前 FISH 技术的分辨率限值大约是 11~15 Mbp[173]。实际上，一些对称性易位看上去像不完全交换，而端粒探针的研究已经证明，大部分表面看上去不完全的易位其实都是完全的[62]。对那些明显缺乏大部分染色物质或标记着丝粒的细胞应不予计数。

对于回顾性剂量检测，已经证明在稳定细胞中，即在无着丝粒、着丝粒环或无着丝粒的细胞中，易位率是长期恒定的[64、174]。因此，建议记录每一个易位是出现在稳定性细胞中，还是非稳定性细胞中。

10.3.2. 命名和数据记录

为了描述用涂染法检测的染色体畸变，建立了两套独立的特殊命名体系，对问题的叙述依据的也是常规细胞遗传学计数的传统术语[173、175~178]。引进这两种命名系统，是因为对部分基因组进行分析时，由 FISH 揭示的许多图形似乎比预期的复杂，传统术语不足以表达。

- (i) 建立了一个以缩写字母“PAINT”为首的系统，用来完整地描述中期细胞中每一个异常染色体[175]。该系统对每一条染色体都进行单独描述，不牵涉细胞中的其他异常交叉。一种颜色由一个字母代表，复染按字母顺序排列开始。大写字母代表具有一个着丝粒的染色体部分。这样，单色涂染时，t(Ab)指一条含有双色的染色体，其中包括一条复染染色体的着丝粒片段和一条标记染色体的无着丝粒片段。相反，t(Ba)表示着丝粒是在标记染色体的部分。多重染色可以在命名体系中包含更多的字母。读者可以参考 Tucker 等[175]的文章，该文对该体系中的所有缩写给予了完整叙述。文章还建议，把颜色连接作为辐射诱发损伤的一个指标，在回顾性剂量估算上并没有实际应用。
- (ii) Savage 和 Simpson (S&S) [176, 177]提出一个数字和字母的命名体系，用来从整体上描述每一种互换。数字指包含标记物的染色体数目，按字母顺序排列是反映希望这个图形有多常见。这个所谓的 S&S 体系只用于单色标记的模式。不过，也可以用于双重或三种颜色的染色模式，但不管有几种颜色模式，每一种标记颜色的染色体不得不开分计数[131]。这个命名体系在机理研究上有重要作用，特别是对于复杂重排的理解。

可以采用一种更传统的命名方式，它将“易位”命名为相互易位、末端易位或中间易位[179]。相互易位也称作完全易位或双向易位，末端易位则称作不完全或单向易位。中间易位包括倒位和插入。完全易位和不完全易位，或相互易位和末端易位，均涉及到机理概念，从生物剂量学目的考虑，最好称作双向易位或单向易位，这纯粹是考虑视觉形象而不涉及机理含义。事实上，机理研究已经表明，单向易位并不能提供不完全互换的可靠剂量估算值[180]。插入是许多复杂重排类型的一种，正式定义为两个以上的染色体发生三个以上的断裂而形成[177]。

上面介绍的命名不是相互排斥而是互补的，这些命名之间的比较已经用于常见的数据系统[175]。

当今使用最广泛的数据记录方法是，用 PAINT 命名法把每个异常中期细胞作为一个独立单元来叙述[175]，但考虑到畸变形成的基本机理，叙述的方法略有改进[178]。使用 PAINT 体系的同时，注意到中期细胞染色体之间的联系，因此也结合了传统的命名法的一些方面。染色体畸变分为简单畸变和复杂畸变，后者是指在两个或两个以上染色体上产生三个或三个以上的断裂，出现可观察到的畸变。当所有的断裂部分重接时称为完全畸变，而当一个或更多的断裂部分不能重接时则是不完全畸变。

例如，当看到 t(Ba)伴有 t(Ab)时，这是一个简单的完全易位或双向易位，当在一个细胞中单独看到其中一种模式，则是一个简单的不完全易位或单向易位，有时还会伴有一个染色的无着丝粒体，t(Ba)+ace(b)。复杂易位记录同上，可以是插入，例如 ins(Aba)，也可以是更复杂的重排，如一个 t(Ba)伴 ace(ab)，或 dic(BA)伴一个 t(Ab)。

值得注意的是，发生在涂染探针的一套具体的染色体之间的互换畸变，如一个 t(Ba)+t(Ab)，被认为是“明显的”简单畸变，因为它们可能来自未被发现的复杂畸变，而这些只能用 mFISH 才能检测到[182、182]。

10.4. 数据处理

Lucas 等人[170]推出了全基因组的计算公式，后来 Lucas 和 Deng 对这些公式做了进一步的概括[183]。

基因组的易位率，通常用计算基因组中被染色部分的公式来计算[32]：

$$F_G = \frac{F_P}{2.05 f_p (1 - f_p)} \quad (31)$$

式中：

F_G 表示全基因组畸变率，

F_P 表示 FISH 技术检测到的易位率，

f_p 表示基因组中杂交的份额[170]，需要考虑检测对象的性别。

下面在第 10.5.1 节中将给予更详细的说明。

当对使用不同组合的全染色体探针研究结果，进行数据整合或实验室间比对时，推荐用全基因组公式进行数据转换。这种假设有时称作 Lucas 公式，就是一条特殊涂染的染色体发生畸变的概率与该染色体的 DNA 含量成正比。这个问题已经得到深入研究[184~186]并且已被实际接受，因为这个假设可以给出合理的近似。然而一致认为，运用 Lucas 公式（DNA 含量）时，在简单的互换畸变中大的染色体可能会比小的染色体高估[[187、188]。因此，用 Lucas 公式（DNA 含量）^{2/3}比直接用（DNA 含量）更为准确。一些学者对此有争议，认为这种比例可能涉及靠近染色体区域的染色质的互换[186、188]。Morton[32]给出了人类染色体相对 DNA 含量的最佳数据，表 2 和表 3 显示的数值是从他的表 4 第 2 列数据中计算出来的。

10.4.1. 单色涂染

f 是基因组中被涂染的份额（绿色）； $1-f$ 是基因组中被复染的其余部分（蓝色）。

注：为了简单起见，这里将上述公式（31）中的 f_p 简写为 f 。

有	f^2	绿—绿互换
	$(1-f)^2$	蓝—蓝互换
	$2f(1-f)$	蓝—绿互换
	总和 1.00	

不过，这个总和也包含同一条染色体上的互换，例如倒位。用相同的 DNA 比例假说来计算，染色体之间互换的总数是 0.974（见 Lucas 等人[170]的计算结果）。因此，所有易位即蓝-绿色易位的份额由公式（32）给出：

$$\frac{F_P}{F_G} = \frac{2f(1-f)}{0.974} = 2.05f(1-f) \quad (32)$$

式中：

F_P 和 F_G 分别指通过 FISH 检测到的易位率和全基因组的易位率。

同样的公式也适用于蓝—绿色双着丝粒。

举例

假设 1、2 和 4 号染色体被染色，从表 2 中得到它们的 DNA 含量（男性）分别是 0.0828，0.0804 和 0.0639。

因此， $f = 0.2271$ ，所以 $F_P/F_G = 0.360$ 。

这种组合检测双色易位的有效率是 36%，因此，要获得全基因组的易位率，观察到的易位率要除以 0.36。

10.4.2. 双色涂染

假设染成红色的份额为 f_1 ，染成绿色的份额是 f_2 ，则复染成蓝色的份额是 $(1 - f_1 - f_2) = f_3$ 是。

将有	f_1^2	红—红互换
	f_2^2	绿—绿互换
	f_3^2	蓝—蓝互换
	$2f_1f_2$	红—绿互换
	$2f_1f_3$	红—蓝互换
	$2f_2f_3$	绿—蓝互换

同样，总的染色体间的互换是 0.974，因此所有双色易位的份额由下式得出：

$$\frac{2(f_1f_2 + f_1f_3 + f_2f_3)}{0.974} - 2.05[f_1(1 - f_1) + f_2(1 - f_2) + f_3(1 - f_3)] \quad (33)$$

举例

假设 1、2 和 4 对染色体染成红色，3、5 和 6 对染色体染成绿色，其余的复染为蓝色。从表 2 中得到份额 $f_1 = 0.227$ ， $f_2 = 0.186$

$$F_P/F_G = 2.05(0.175 + 0.151 - 0.042) = 2.05(0.284) = 0.582 \quad (34)$$

这种组合检测易位的有效率是 58%。但要注意的是，在两个不同颜色涂染的染色体之间发生双向互换时，仍然只能作为一个单一事件计数。

10.4.3. 两种以上颜色涂染

可以将计算扩展到多色 FISH 涂染。对于多种颜色，方程变为

$$\frac{F_P}{F_G} = 2.05 \left[\sum_i f_i(1 - f_i) - \sum_{i < j} f_i f_j \right] \quad (35)$$

本节中介绍的所有计算可以作为第 8.3 节中提到的剂量估算软件的一部分。

10.5. 易位的对照水平

易位的对照水平比双着丝粒的要高，在某种程度上是因为前者是一种持久型畸变。因此，如果要进行回顾性生物剂量估算，必须考虑易位的本底水平，尤其是在低剂量照射的情况下。

当然，从事故受照者或被调查人群组获得照射前的对照血样是不现实的，因此只得采用基于普通调查数据获得的假设值。理想情况下，实验室应该建立自己的对照数据库，但这是一内容广泛的工作，必然会涉及多种复杂因素，特别是要有一个大跨度的年龄组。Sigurdson 等[107]发表的综合性 meta 分析提供了最好的国际数据库，分别按年龄、性别、种族和吸烟习惯等进行了划分。该数据库包括了一项早期研究的数据，其中包括了一些欧洲实验室的成果[189]。

两项研究清楚表明，年龄是决定本底易位率的主要因素，60 岁以上的本底易位率大幅上升（图 31）。

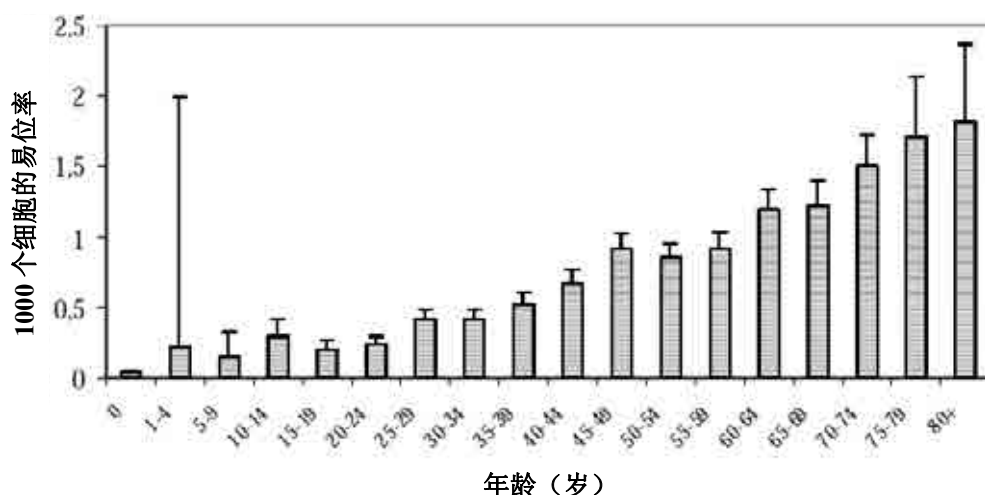


图 31. 不同年龄段的染色体易位数[107]

值得指出的是，应当考虑本底水平，并从个体淋巴细胞中观察到的易位数中减去他或她的年龄段预期的易位率。除了确认的实验室影响外，Sigurdson 等人[107]的研究表明，在四个主要地理区域间存在明显的差异。另一方面，没有观察到种族和性别因素的影响。由此看来，在研究易位率的影响因素时，必须只比较同一实验室的数据。

在关于性别对易位率影响的为数不多的报道中[107、189、190]，只有 Whitehouse 等人的报道[189]表明，在 20~29 岁年龄组中，男性的易位率高于女性，在 30~39 岁年龄组中存在显著差异 ($P < 0.05$)。其他的年龄组中，女性的易位率要比男性高，但差异并不显著。其他关于性别影响的研究，甚至按年龄组的研究，均未发现有任何差异的证据[107、190、191]。

尽管研究一致认为易位率随年龄而增加，但是该文献综述的结果表明，这种趋势并不像其他一些因素那么明显（表 12）。

表 12 对产生易位和双着丝粒有影响的因素汇总

影响因素	重要研究和相关参考文献	其他参考文献
酒精	Badr 和 Hussain[192]	
	Burim 等[193]	
烟草	Ramsey 等[191]	Tawn 和 Cartmel[195]
	Bothwell 等[194]	Van Diemen 等[196]
	Sigurdson 等[107]	Pressl 等[190]
		Tucker 等[197]
		Whitehouse 等[189]
		Maeng 等[198]
		Beskid 等[199]
		Pluth 等[200]
农药	Steenland 等（使用者）[201]	Tucker[197]
苯	Smith 等（>31 ppm）[203]	Kim 等[202]
		Smith 等（<31 ppm）[203]
		Zhang 等[204]
工业污染	Beskid 等[199]	Beskid 等[205]
	Sram 等[206]	
重金属	Maeng 等（铬，吸烟者）[198]	Dulout 等（砷）[208]
	Doherty 等（铬）[207]	Maeng 等（铬，不吸烟者）[198]

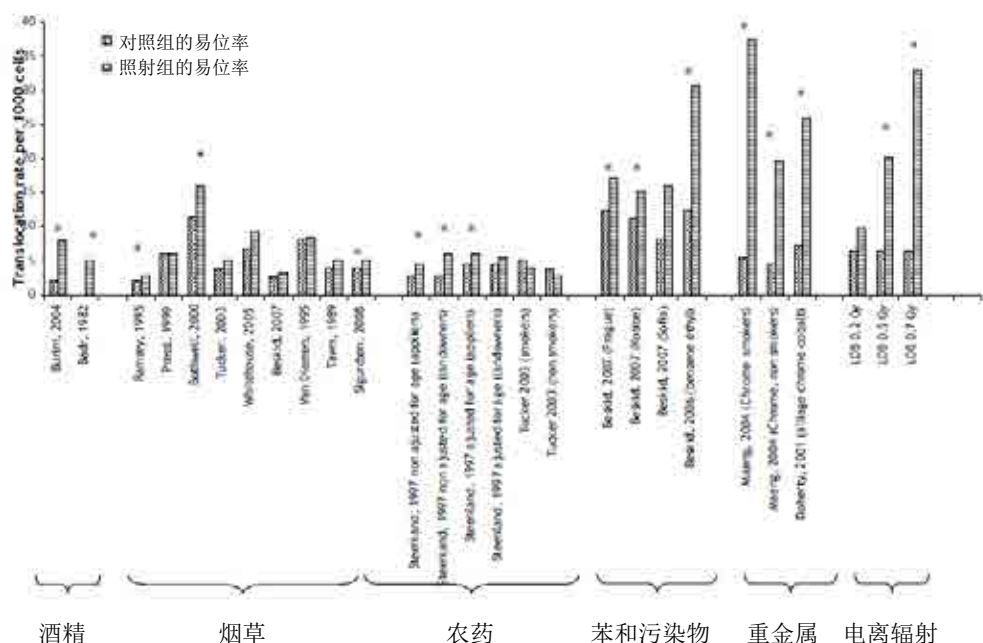
在该文献所考虑的研究中，两项关于酒精的研究认为，只有酒精会产生过量易位。而对吸烟（11 项中的 8 项）和农药（2 项中的 1 项）的研究并未发现这种趋势。苯的情况比较特殊，因为染色体分析是针对与照射特别相关的疾病进行的。这意味着在有些研究[202~204]中只记录两条染色体（8 和 12 号或 14 和 18 号）之间的互换。当只研究 t(8, 21)和 t(14, 18)的易位率时，三篇报道均认为有明显影响。然而，当检查这些染色体与其他所有染色体之间的易位时，三篇报道均未发现有意义的结果。

选择性使用和滥用的物质，如香烟、药物和酒精，只有长期大量使用时才会影响易位水平。但是，当这些物质与其他类型的物质（金属和致突性化学物）联合使用时，往往会诱发易位率显著增加[192]。一些研究报道了有关滥用物质的协同作用，提示吸烟会增加职业照射产生的易位率。这是指人暴露于电离辐射[194]、农药[197]和铬[198]的情况。大多数研究表明，单独吸烟对易位率的影响并不明显，但是吸烟的协同作用非常明显。另一方面，酗酒的协同作用更难显现，因为酗酒者极少只有这一种嗜好，或至少没有其他嗜好的人数太少，难以与对照组进行比较。关于酗酒对易位率影响的研究是会有启示的。

工作场所使用的有毒物质（农药、苯和金属）对易位数的影响往往与剂量和暴露时间成正比。已经表明，暴露于这些产品的混合物要比暴露于单一的化学元素更有

害。最终，个人的防护效果（手套、面具、连体衣或外套），由于暴露于这些类型的致突物的人群的易位率的减少而得到证明。

图 32 示出了影响易位率的各种因素，包括因素的类型、照射方式和相关研究。



LDB: 生物剂量实验室由已知辐射剂量 (钴源照射, 剂量率为 0.5 Gy/min) 得到的易位率。

* 照射组与对照组之间存在显著性差异的研究

图 32. 不同因素引起的易位率和离体照射产生的易位率之间的比较。

图中示出每项研究中对照人群和暴露人群每 1000 个细胞的易位率。另外，图中还示出了血样离体照射 0.2、0.5 和 0.7 Gy 后的易位率，用以进行易位率比较。然而，需要指出的是，照射是在很短的时间内完成的，属于急性照射，而暴露于酒精、烟草、农药或苯则是慢性的。当个体在其一生或某一特定阶段暴露于遗传毒物（生活方式或职业暴露）时，这种暴露被定义为是慢性的。

从图 32 也可以看出, 人群暴露于酒精、烟草和农药后的易位率, 比暴露于苯特别是铬产生的易位率低得多。而且, 对照组的数值与暴露于酒精、烟草和农药组的数值比较相似。与受到 0.5 Gy 电离辐射照射组相比, 暴露于酒精、烟草和农药人群的易位率是低的。因此可以认为, 如果在人群中观察到高的易位率, 可以归因于辐射照射。另一方面, 在对大量暴露于铬和苯的人群进行电离辐射照射的回顾性研究中, 不可能从环境因素引起的易位率中区分出放射性所致的易位率。不过, 接触苯或铬并不常见, 可以通过调查问卷加以鉴别, 内容包括过去和现在的职业活动。

10.6. 易位的持久性

双着丝粒法的最大缺点是，受照人员的畸变率会随着照射后的时间而减少。外周

循环淋巴细胞池中的双着丝粒会随着细胞死亡而消除，随着血细胞的更新而稀释。在有丝分裂过程中，不稳定的双着丝粒畸变不能通过反复的细胞分裂传递到子细胞中。相反，易位在有丝分裂过程中一般是稳定的，假如细胞整体是稳定的（Cs），在干细胞中诱发的易位就能够顺利地通过成熟的循环淋巴细胞。照射后早期，易位诱发的频率与双着丝粒的相似，但是易位的辐照后稳定性使其更适合于回顾性生物剂量估算。

易位率的持久性长期以来一直都讨论的问题。在巴西戈亚尼亚事故后几年，发现易位率低于刚照射后观测到的双着丝粒率[209、210]。但是，这两项研究都没有给出最初的易位数。在马亚克（南乌拉尔）核工业人员的回顾性研究中，估算的剂量大部分都低于由明显易见的简单易位拟合的刻度曲线所预测的剂量[211]。对其他事故受照人员的随访研究表明，随着时间的推移，易位率保持相对恒定。在切尔诺贝利事故发生后 5~8 年，事故受照者的易位率没有发现实质性变化[212]。在爱沙尼亚事故全身受照人员中，除了一例受到全身迁延照射、而且是非均匀照射的人员外，其他人的易位率在两年之内非常稳定[213]。然而，事故发生 4 年后，在只含有简单重排的细胞中，所有易位率平均下降到初始值的 65%，而双向易位比总的易位稍微更持久一些[214]。易位率随时间的减少可归因于局部照射，并且在这种照射情况下，符合双着丝粒和易位的一致分布观点[215，216]。由此可知，在局部照射后较长时间，全身剂量估算值将随剂量的增加而减少[215]。

在其他有管人类事故照射的案例中，报道了当剂量增加时易位率随受照后时间更明显减少的情况；照射剂量在 1~3 Gy 以下的易位率不随时间而减少，但较高剂量的易位率则随时间而减少[217、218]。在接受放疗的癌症患者身上，明确可见易位数随照射后时间而减少，这一现象在照射前易位率较高的患者身上更为明显[219~222]。对于放疗患者的这些观察，一种可能的解释是，照射对干细胞达到致死剂量，来自机体受照部位以外的正常细胞在这个区域再生。综上所述，这些结果表明，在高剂量照射时，随着照后时间的推移初始易位数可能并不总是恒定不变的。

完整性和复杂性可能是易位随照后时间消失的影响因素。大多数复杂的畸变是不会传递下去的，结果是携带这些畸变的细胞将随照后时间的推移而消失[213、215、223~226]。

在同一个细胞中，易位和非稳定性畸变的共存是影响易位持久性的另一个因素。因此，对于回顾性剂量估算，已经提出了考虑用稳定性细胞而不用全部细胞的方法。在爱沙尼亚事故受害者的随访研究中，当考虑所有细胞时，2 年后初始易位率大约减少到 70%[214]。而对同一组人群进一步研究，只选择那些不含非稳定性畸变的细胞，重新分析损伤细胞的数字图像，结果是 7 年后与最初 2 年的易位率基本相似。然而，这种研究受到了限制，因为必须依赖于因涂染的染色体中含有损伤而被保留的细胞图像。因为没有数字化处理，有关染色物质起初被认为是“正常”的那些细胞有可能并不正确。尽管如此，这种研究在理论上存在可能性，因为经过很长一段时间后，剩下的只有稳定性细胞，所以建议只考虑稳定性细胞的易位率比考虑所有细胞的易位率更

为合适。这个问题最终只有通过很好的随访研究来解决，在事故后立即对受照者实施 FISH 和非稳定性畸变分析。

10.7. 刻度曲线

为了用 FISH 方法检测的易位，进行剂量估算，每个实验室都需要建立自己的曲线。曲线拟合的数学过程与之前描述的双着丝粒计算过程相同（第 8.3 节）。制备曲线使用的 FISH 组合探针应该与病例研究通常使用的探针相一致。这样做可以避免需要对基因组进行同等转换，由此可能带来一些额外的不确定性。

对于低 LET 辐射，当易位刻度曲线是在考虑到稳定性细胞或者所有细胞建立的时，如果只考虑明显的简单易位，那么拟合的系数没有差别[227、228]。但是在显微镜分析过程中，建议对整个染色体细胞中发现的所有畸变记数，而不仅仅是计数那些影响标记染色体的畸变[64]。这样做可以有机会确切知道，只考虑稳定性细胞是否给出更实际的估算剂量。

FISH 剂量估算一般是对于高剂量但又是迁延性照射、或早先受过长期低剂量照射而没有表现出临床症状的那些病例。相反，对于采用线性平方曲线估算的急性照射剂量，剂量-效应曲线的 α 线性项至关重要。第 8.3 节中给出的 F 检验能够用来确定线性系数的可靠性。几乎很少有已经公开的刻度曲线，在低剂量范围能够计数足够多的细胞，从而获得较小置信区间的十分可靠的线性系数[64]。为了建立一个线性的剂量关系，需要在 1 Gy 以下设立一些剂量点，而每个剂量点都需要分析大量细胞，这意味着相当大的工作量。暂时可以用许多合理的假设来解决这个问题。假设双着丝粒和易位形成的比例大约是 1:1[229、230]，因此可以预测类似的剂量-效应系数。已经发表的双着丝粒数据表明，线性刻度曲线的系数是每 Gy 高能 γ 射线照射，在每 1000 个等位基因组细胞中大约有 15~20 个易位[51]。进一步研究表明，剂量-效应曲线的线性项主要是受辐射品质的传能线密度影响，而曲线的 β 系数的曲率是由剂量率决定的（见第 9.7.4.5 节中关于 G 函数的校正）。有证据表明，在体温条件下由离体慢性照射得到的线性系数与已报道的急性剂量效应曲线的线性项没有差别[233]。因此，除非 FISH 检测易位的可靠线性系数是通过离体低剂量-效应刻度实验获得的，否则，使用由急性双着丝粒刻度曲线的相同辐射品质获得的线性项应该是合理的。

当照射后很长一段时间才进行剂量重建时，剂量估算是建立在这种假设之上的：离体照射的淋巴细胞和体内照射的造血干细胞显示出相似的易位率。并不能确定干细胞放射敏感性和成熟淋巴细胞的放射敏感性是否相同，或是否会对细胞分裂有影响，引起含非稳定性畸变的细胞消失。回顾性剂量估算假设这些都不是主要的混淆因素，而且最近的文献也提示这没有实际的重要性[64]。

总之，根据稳定性细胞的易位进行剂量重建是一种已经确定的方法[174]，但也存在局限性。在刻度曲线的线性项起主导作用的迁延性照射和低剂量照射后，这似乎是一种好方法。作为一个临时措施，可以根据双着丝粒的剂量-效应曲线来推测线性项。

在高剂量特别是急性照射后，限制只分析稳定性细胞的结果可能会低估受照剂量，因为含有易位的不稳定性细胞数将与复杂畸变数一起增加。此外还有剂量上限，达到刻度上限时从不稳定性损伤中存活的细胞会变得越来越少。

10.8. FISH 用于回顾性生物剂量估算的举例

这些研究试图探讨 FISH 易位分析在下列人群回顾性剂量估算中的可行性：(1) 早先没有做过生物和物理剂量估算的人群；(2) 物理剂量估算值已知的人群；(3) 照射后立即采用常规双着丝粒分析得到生物剂量估算值的人群。为了明确易位的稳定性，第三组人群的数据是便于同易位率比较的最可靠数据。

选择四个调查组，包括 (1) 核电厂工作人员；(2) 生活在核污染区的人群；(3) 切尔诺贝利事故清洁工人；(4) 事故受照人员中的人员或人员组。

10.8.1. 对早先没有个人剂量的人群组进行回顾性生物剂量估算

为了进行回顾性辐射剂量估算，对切尔诺贝利事故中受严重照射的 15 人进行了染色体畸变率检测，这些人都因后期的放射皮肤综合征接受治疗。

这些研究开始于 1991 年，随访持续到 1994 年[212、233、234]。1991 年，或采用 Qdr 法对染色体双着丝粒和环畸变率进行检测，或通过 FISH 组合全基因组特异性 DNA 文库和泛着丝粒 DNA 探针对稳定性易位率进行分析，测定了生物剂量当量估算值。用这两种方法，15 人中有 12 人的个人剂量估算值在 1.1 和 5.8 Gy 之间，有相当的可比性，而另外 3 人则未显示出畸变率升高[234]。从 1991 年 9 月到 1994 年 7 月的三年期间，对同样的受检者进行了染色体易位率的随访研究，12 例中有 11 例相当稳定。这说明在不同的采样时间可以进行剂量估算的比较[212]。

从这些研究还不能直接做出易位稳定性的结论，这是因为没有照射后立即得到的参考数据（如生物和物理剂量）。然而，随访研究表明，在照后 5 年时间里，在不同剂量水平上，易位保持恒定。

10.8.2. 对已有物理剂量估算值的人群或职业照射组进行回顾性生物剂量估算

一些主要用来估算吸收剂量的研究，已经用来研究日本广岛和长崎原子弹爆炸幸存者或切尔诺贝利事故清洁工人的淋巴细胞染色体畸变率分析。在原子弹爆炸幸存者中记载的易位率，似乎都接近于从个人 DS86（1986 年剂量体系）剂量估算值导出的预期值，DS86 是用离体剂量-效应曲线比较得出的估算剂量[145]。因此，这些研究都支持易位的长期持续存在的观点。然而，与此相反，对 1959 年美国橡树岭 Y-12 事故中受到照射的 4 名工作人员的研究发现明显不同，一些年后他们的易位率明显低于预期值[170]。

1994 年进行了一项试验研究，大约有 60 名从爱沙尼亚招募的、在 1986 到 1987 年间曾经参加切尔诺贝利事故清理的工作人员，他们登记的剂量从 0 到 300 mSv 不等，

对这些人进行双着丝粒和易位分析，以确定是否可以验证他们的记录剂量[235]。在另一组研究中，对 52 名清洁工作人员进行 FISH 涂染法研究[236]。对于受到更高剂量照射的人员，双着丝粒估算已不再有效，而易位可以用来验证早先的剂量。对于绝大多数较低剂量的受照者而言，发现用 FISH 作为个人剂量计是不切实际的。不过，在区别不同剂量的受照组上 FISH 具有一定价值[235]，这一点得到对爱沙尼亚清洁工作人员研究的支持[92、237]。

另一组数据是关于 75 名马亚克工作人员，这些人的物理剂量是可知的，他们接受的主要照射是在 1948 到 1963 年之间[238]。累积外照射剂量在 0.02~9.91 Sv 之间，钷负荷在 0.26~18.5 kBq 之间。在迁延照射后的 35~40 年，采用 1、4 和 12 号全染色体探针结合泛着丝粒探针检测了易位率。结果表明，这些工作人员的易位率比相应对照组的要高。但是，易位数的范围总体上比根据个人剂量记录和刻度曲线预期的要低[235、238]。

对 73 名来自 Techa 河流域的受照居民进行 FISH 涂染中期细胞检测。调查组包含两个亚组，分别生活在工厂下游 7~60 km 和 78~148 km 处。研究发现这两组人群的平均易位率显著高于对照组[239]。

1991~1994 年间曾经对谢拉费尔德（Sellafield）核设施的放射工作人员进行生物剂量学研究，他们的终生累积全身剂量分布在 173~1180 mSv 之间，除了三人以外其他所有人的剂量均大于 500 mSv。将这些工作人员按照剂量范围排列成队列组，可见平均易位率随着剂量的增加而显著增加。与此不同的是，终生累积剂量与双着丝粒畸变率之间并没有相关性[240]。

在广岛原子弹爆炸幸存者中，对 40 名生活在爆心附近（大约 2 km）并且爆炸时年龄至少 10 岁的幸存者进行检测，发现电子自旋共振的剂量和淋巴细胞易位率的细胞遗传学剂量之间存在良好的相关性[241]。广岛原子弹爆炸幸存者的研究证明了稳定性易位的持久性。但是，从上面提到的其他一些研究也能得出结论，部分易位好像随着照后时间的推移而减少。

10.8.3. 对事故后不久用常规双着丝粒分析获得生物剂量估算值的人员进行回顾性剂量估算

氙水事故

前面所述的氟化水过量照射事故（第 9.7.5.7 节）也用 FISH 方法进行了回顾性检查[242]。最初双着丝粒给出的平均剂量为 0.38 Gy，与在尿检测到的氟剂量 0.47 Gy 比较接近。因为氟与机体水分相混合，导致全身软组织或多或少的不均匀照射，所以这些值是机体软组织的平均剂量。后来的血样分析显示，双着丝粒数的预期减少与氟 3.3 年的半消失期相吻合。

事故后第 6 年和 11 年，通过单向和双向易位的结合尝试进行 FISH 剂量估算。首先，一个实验室通过 1、2 和 4 号染色体单色涂染进行分析，第二项检测由另一个实验室承担，涂染 2、3 和 5 号染色体。剂量估算参考其中一个实验室用氚离体照射建立的刻度曲线，剂量-效应曲线呈线性关系，源于全基因组校正的总易位数 $Y = C + (5.26 \pm 0.49) \times 10^{-2}D$ 。从所有 FISH 计数合并的数据得到剂量估算值为 0.48 Gy。

戈亚尼亚事故

在戈亚尼亚事故（巴西，1987 年）中，一个乏 ^{137}Cs 放射治疗源被砸开，大量人员受到照射[149、150]。这些人员为随访研究提供了一个良好的队列。在发现事故后立即对 129 名相关者进行检测，分析淋巴细胞双着丝粒和着丝粒环的畸变率。其中 29 名受照者的估算剂量在 0.3 到 5.9 Gy 之间[243]。虽然局部皮肤损伤提示大多数人受到不均匀照射，但是除了 6 人以外，所有病例的染色体畸变均呈泊松分布。对其中一些受照者进行多年随访，检查双着丝粒畸变率（受照后立即开始）以及用 FISH 检测易位（受照后 5 年开始），进行回顾性剂量重建[209]。

可以将 FISH 检测获得的易位率数据（用不同的探针组合，覆盖大约 80%的基因组）直接与相同人员的早期双着丝粒畸变率基准水平进行比较[209]。在受到较高剂量（>1 Gy）照射后多年（从 1992 年起），观察的易位率比 1987 年最初确定的双着丝粒率要低 2~3 倍。对于估算受照剂量<0.9 Gy 的人，易位率和早期双着丝粒畸变率之间仅有很小的差别。计数更多的细胞可以提高这些剂量估算值的准确性。但是，有易位的淋巴细胞的持久性、与染色体大小不成比例的易位水平、以及个体差异等，这些因素都会降低这些估算值的精确性。随访研究发现，单向和双向易位并未减少[209]，这与切尔诺贝利的研究相似。Straume 等[244]也在事故后 1 年对戈亚尼亚事故的二名受照者用 FISH 方法进行了评价。当将数据与事故后立即获得的双着丝粒频率相比时，发现易位频率要低。

德国与爱沙尼亚事故

与之不同，另一项研究[245]是在事故发生后 11 年，用 2、4 和 8 号染色体和泛着丝粒探针对 3 名受照工人进行 FISH 分析。结果发现，稳定性易位率与事故发生后不久用常规 FPG 染色获得的双着丝粒平均畸变率没有显著差别。大约 75%的易位为双向型易位。在 1994 年爱沙尼亚辐射事故后，从照后 1 个月直到随后的 2、6、10、12、17、22 和 24 个月对 5 名剂量估算值在 1~3 Gy 的人员进行了染色体分析[213、246]。随访研究发现，双向易位在全部 5 名受照者中均保持相对稳定，而其中 1 人的单向易位出现明显下降。照射后 12 个月，所有受检者的双着丝粒率均降至初始程度的 50%左右[246]。事故后长达 7 年的进一步随访研究表明，对稳定性细胞中易位的计数似乎说明所有细胞中观察到的易位均不再下降。在随访的前几年里，稳定性细胞的易位数与时间无关[174]。

伊斯坦布尔事故

在第 9.7.5.6 节中介绍了一起事故，有几人受到与废金属混合在一起未屏蔽的 ^{60}Co

源照射。事故过去 1 个月后，主管部门才认识到发生了辐射照射事件。患者的血细胞计数非常低。对 5 名受照最严重的人员进行了双着丝粒分析，表明剂量在 2.2~3.1 Gy 之间。考虑到这些人的照射迁延时间超过了若干小时，剂量估算时对剂量-效应曲线进行了 G 函数调整。在第 9.7.4.4 节中提到，当照射剂量大到引起确定性效应（如血细胞计数降低）时，双着丝粒数超过几周时间后会稍微下降。

也进行了 FISH 剂量估算，所血样与双着丝粒分析用的同血样相同。这项检测在三个实验室进行[158]，汇集各实验室的单向和双向易位综合数得出剂量估算结果。FISH 剂量估算也经过 G 函数调整，结果比双着丝粒估算值高 20~30%。

FISH 通常被考虑用作回顾性剂量计，适用于照射后数年采血或发生长期照射的情况，如放射性核素引起的环境污染。然而，这种情况已经很好地说明，在较低剂量照射下通常认为双着丝粒分析就足够的时间段内，在受到高剂量照射、采血当延迟的情况下，FISH 也是有用的。

格鲁吉亚事故

11 名年轻边防士兵在里鲁（Lilo）军事训练中心意外受到活度不超过 150 GBq 的 1 个或几个 ¹³⁷Cs 源的照射，这些源是用于训练和仪器标定用途的。受照射时间从 1996 年中期至 1997 年 4 月，接近 1 年[247]。

四个受照最严重的人在法国住院接受治疗，1997 年 11 月在那里进行了细胞遗传学检测[248]（表 13）。

表 13. 非稳定性染色体畸变数目和每细胞畸变率（括号内）^a

患者	分析 细胞	双着丝粒	环	无着丝粒	U 检验	双着丝粒剂量	FISH 剂量
						Gy[95%置信限]	Gy[95%置信限]
1	500	14(0.03)	0(0.000)	11(0.022)	-0.43	0.4[0.2~0.6]	0.7[0.4~1.0]
2	500	19(0.04)	1(0.002)	15(0.030)	-0.59	0.5[0.4~0.7]	0.4[0.1~0.7]
3	502	55(0.11)	4(0.008)	24(0.048)	4.68	1.1[0.9~1.3]	0.8[0.6~1.1]
4	518	80(0.15)	4(0.008)	25(0.048)	3.61	1.3[1.1~1.5]	1.7[1.4~1.9]

^a: $u > 1.96$, u 检验表明显著过离散分布；或 $u < 1.96$, 欠离散分布。剂量估算值由双着丝粒和双向易位得出。

用一个 ⁶⁰Co 离体急性照射（0.5 Gy/min⁻¹）诱发双着丝粒和环的刻度曲线来估算剂量。对于 1 号和 2 号患者，物理剂量重建提示严重局部照射，但从每细胞的双着丝粒分布却没有得到证实（ $u < 1.96$ ，表 13）。因此，假设按急性均匀照射估算的剂量远远低于 3 号和 4 号患者，后二者的畸变分布是过离散的（ $u > 1.96$ ），提示其为局部照射。这与物理剂量重建的照射情况是一致的。

所有 4 名患者在到达法国之前可能淋巴细胞均已下降，因此，用非稳定性畸变进行剂量估算（第 9.7.7.4 节）可能低估全身平均剂量。所以同时也进行 FISH 易位检

测，对所有细胞而不仅限于稳定性细胞进行分析。用三对染色体（2、4 和 12 号）涂染探针和一个泛着丝粒探针一起杂交。对于 2 号患者，用双着丝粒数和易位数估算的剂量基本一致（表 13）。对于 1 号和 4 号患者，用 FISH 估算的剂量比用双着丝粒估算的要高，但差别无统计学意义。而对于 3 号患者，用双着丝粒估算的剂量较高。这些差别或许可以解释为不均匀照射和分次照射，造成人与人之间的明显差异，从而改变了不稳定细胞中易位的分布，结果导致双着丝粒相对于易位的消失。

尽管未能获得每个患者每次检测的全部样本，但还是进行了进一步的细胞遗传学随访观察（图 33 和 34）。

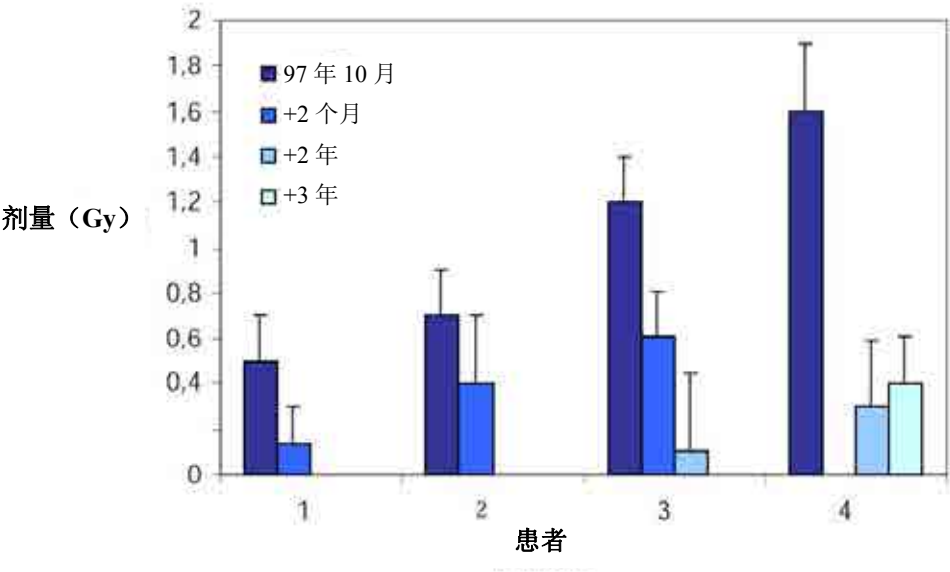


图 33. 由双着丝粒估算的剂量随照后时间的变化。

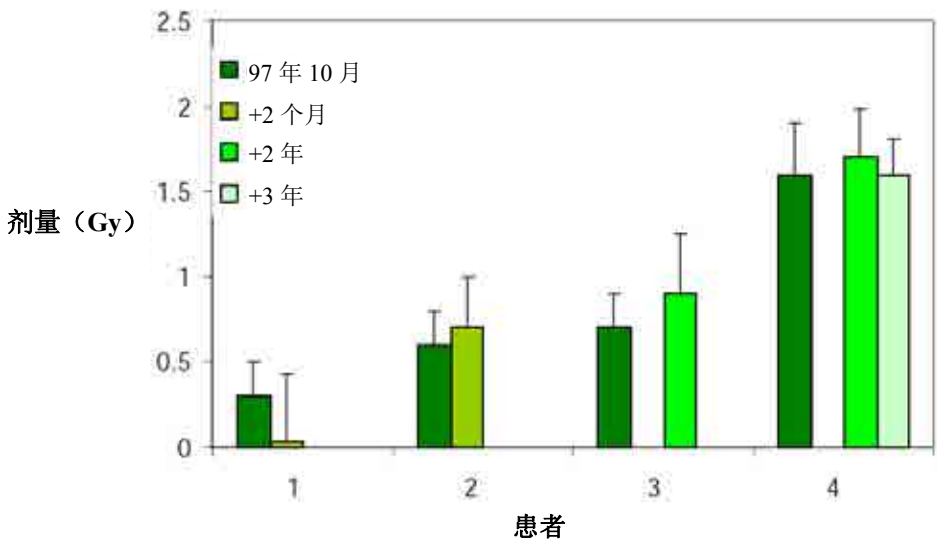


图 34. 由双向易位估算的剂量随照后时间推移的变化。

正如所料，随着时间的推移，在整个观察期内所有患者的双着丝粒数均下降。相比之下，4 名患者中有 3 名的双向型易位率并未降低。1 号患者在第一次采血后两个月的易位率减少，考虑是不确定性原因，并无统计学意义。后来的易位数据总体稳定，可能反映了伴随淋巴细胞减少和非稳定性畸变的迅速消失，淋巴细胞快速的更新。后期的 FISH 数据可能表示骨髓干细胞接受的剂量。

11. 早熟染色体凝聚（PCC）分析

通常情况下，生物剂量估算是通过分析经离体 PHA 刺激转化后第一次有丝分裂产生的双着丝粒或易位来完成的。这些分析方法存在某些公认的问题，即所谓在两天的培养过程中，辐射诱发的有丝分裂延迟和细胞死亡，特别是在高剂量照射后更为明显，可能会导致对辐射照射剂量的明显低估[250]。本章将介绍诱导染色体早熟凝聚的技术，即在第一次有丝分裂前的一定时间诱导染色体早熟，以减少或取消培养时间来减少有丝分裂延迟或细胞死亡的发生机会。

11.1. 有丝分裂融合法诱导 PCC

利用聚乙二醇（PEG）作为融合剂，将人淋巴细胞与中国仓鼠卵巢（CHO）分裂细胞进行融合诱导 PCC，可以不需要任何分裂原刺激和培养，在照射后立即进行染色体畸变检测[66]。应用这种 PCC 技术与传统的方法如 C 显带、伴有或不伴有泛着丝粒探针的染色体特异性 DNA 文库的 FISH 相结合，可以检测染色体断裂、双着丝粒、环及易位等畸变。这种检测方法已被提议作为分析染色体畸变率（如断片、双着丝粒和易位）的生物剂量工具[67、72、75、250]。这种方法可用于确定低剂量照射，也可以检测低 LET 辐射和高 LET 辐射引起的危及生命的急性大剂量照射，而且还可以精确地区分全身和局部照射[75]。因为用这种 PCC 检测，正常细胞的数目更准确地反映了未受照射的淋巴细胞比例，甚至对低至 5% 的剩余细胞都能检测出来。同样，PCC 方法也适用于确定局部照射的小范围烧伤。

11.1.1. 细胞培养和细胞融合条件

11.1.1.1. 利用 CHO 有丝分裂细胞

在进行 PCC 分析前，需要准备中国仓鼠卵巢（CHO）有丝分裂细胞。CHO 细胞培养通常是用保存的细胞系建立的。这些过程简单，非常容易操作，而且细胞周期较短，大约为 12 小时。将 CHO 细胞置于含有完全培养基（由 F-10 培养基，15% 新生牛血清及抗生素组成）的 750 mL 组织培养瓶或圆形瓶中进行培养。当细胞密度达到 50% 时，加入终浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的秋水仙素作用 4~6 h，经震荡分离，收获有丝分裂细胞。每只培养瓶中的分裂细胞每天可以分离几次；因此，每次分离后，必须将新鲜的含有秋水仙素的培养液补充替换到含有剩余细胞的培养瓶中。可以提前将有丝分裂细胞大量制备好，使用前在 -80°C 至 -110°C 冻存储用。

11.1.1.2. 分离淋巴细胞

如前面第 9.1.5.2 节的介绍，一般采用 Ficoll Hypaque 液分离淋巴细胞。这种方法的优点是，如果分离的淋巴细胞足够多，一部分细胞可以立即用于实验，剩余部分在 -80°C 至 -120°C 冻存，将来一旦发现需要可以使用。

11.1.1.3. 融合剂

常用分子量为 1450 的聚乙二醇 (PEG)，理想的融合浓度为 40%~50% w/v (用无血清的 F-10 培养基和 PBS 或者无血清含 HEPES 的 RPMI-1640 培养液配制)。

11.1.1.4. 细胞融合及染色体凝聚过程

为了诱导早熟凝聚染色体，需要在 PEG 存在的条件下，使淋巴细胞与含有丝分裂促进因子的 CHO 细胞以 5:1 的比例融合。融合过程仅需 4 min (PEG 单独作用 1 min，然后逐渐加入 F-10 培养基进行清洗)。随后，在含秋水仙素的完全培养液中在 37°C 培养 1 h [67、72、251]。

11.1.1.5. 固定过程

原则上，固定过程与中期细胞的固定方法类似 (第 9.2 节)，但固定的最佳时间和浓度略有差异。淋巴细胞需用 0.075 M 的 KCl 低渗液处理，并在 37°C 预热的水浴中静置 3~4 min。然后离心，用醋酸：甲醇 (1:3) 混合液固定细胞。

玻片制备同之前介绍的其它标准方法相似 (第 9.2 节)。

11.1.1.6. 染色过程

染色方法的选择取决于要观察的生物学终点，具体如下：

(1) 标准的染色体断裂分析

以分析辐射诱发的染色体断裂为目的，可采用常规吉姆萨 (Gurr 改良的 R66) 或第 9.3.2 节 (图 35) 介绍的 FPG 法对玻片进行染色 [67、252]。FPG 法用于 PCC 是针对两套融合的染色体完全混合在一起的细胞。对这里介绍的淋巴细胞而言可能没有必要，因为两套染色体基本保持在两组，这里能够清楚地辨别出单条人类染色体，如图 35 所示。FPG 染色还有一个缺点是染色体发生肿胀，由于小的相邻肿胀的染色体相互接触看上去像是一个结构，这会妨碍准确的计数 PCC 断片。



图 35. 有丝分裂融合法产生的带有一些断片（箭头指示）的人 G_0 期细胞 PCC。

(2) C 显带法双着丝粒分析

除了染色体断裂之外，也能观察双着丝粒。为此，要用氢氧化钡和盐溶液对玻片进行预处理（第 9.3.3 节），然后用吉姆萨染色，突出显示所有染色体的着丝粒区域，以便可以容易地区别双着丝粒和单着丝粒染色体（图 36）[70、79]。

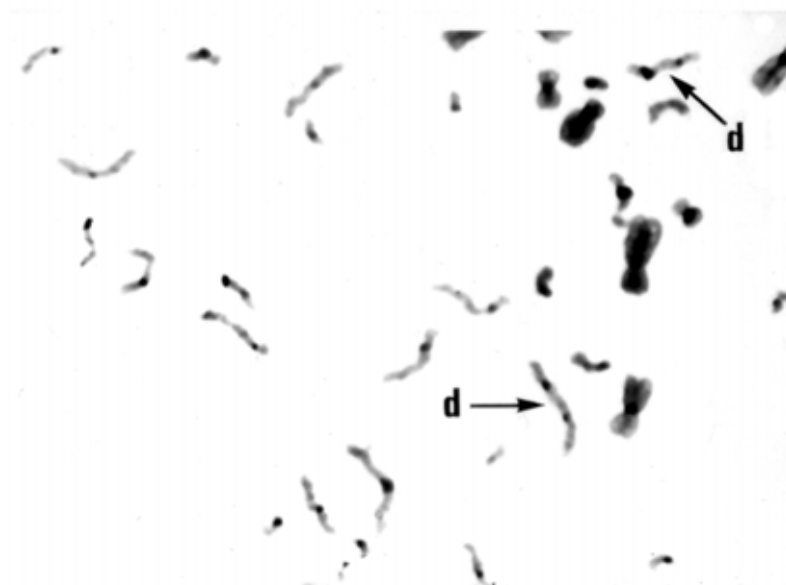


图 36. C-显带法 PCC 显示两个双着丝粒体 (d)。

(3) 染色体涂染法易位和双着丝粒分析

用 FISH 技术制备 PCC 标本也可以检测辐射诱发的易位及双着丝粒，FISH 可单独使用染色体涂染探针，也可以结合泛着丝粒探针（图 37）。后者可以更准确地区分易位和双着丝粒[72]。

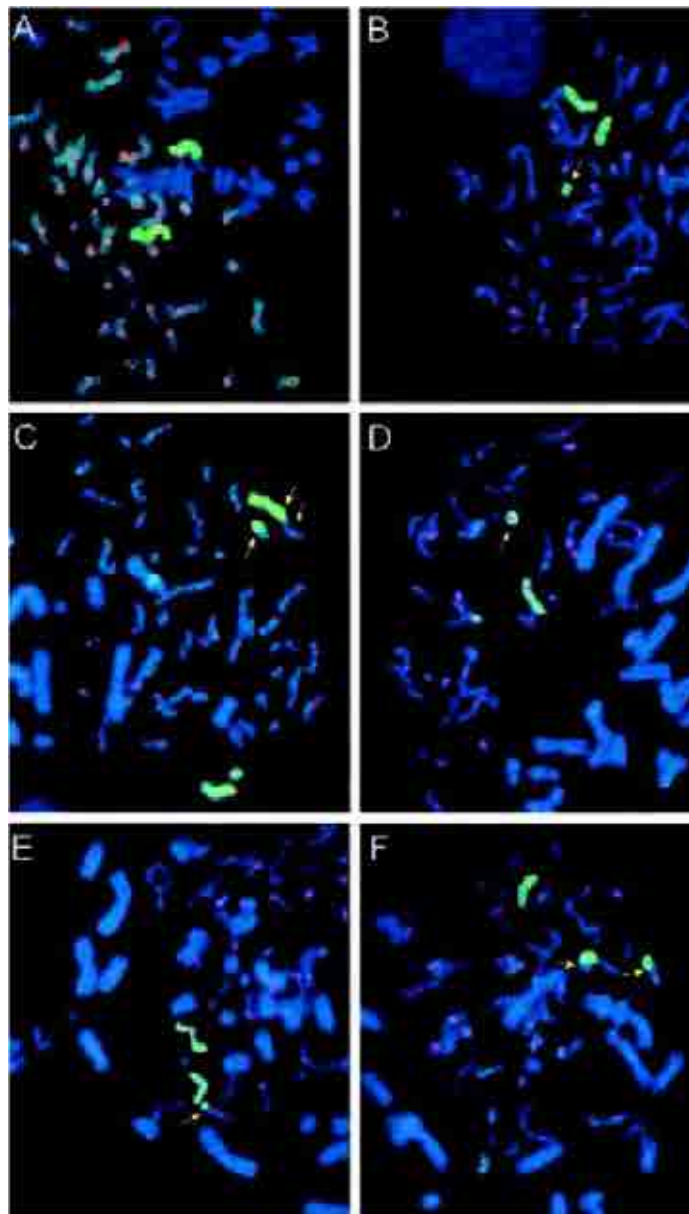


图 37. 双色 FISH 法 PCC，8 号染色体涂染探针和全基因组泛着丝粒探针相结合。
(A) 未照射的对照组正常 PCC；(B) 照射细胞，箭头指示 PCC 中的断片，ace (b)；
(C) 双着丝粒，dic(BA)，双色断片，ace(ba)；(D) 环，r(B)；(E) 和 (F) 末端易位，t(BA)和 t(AB)[8]。

11.1.2. 分析

样片的分析标准与第 9.4 节中介绍的方法相似（如玻片编号、扫描参数等）。PCC 分裂相可以用手工定位，也可以通过中期细胞自动寻找系统定位，后者更常用一些（第 13.3 节）[75]。建议使用能对 PCC 细胞图像或影像中的每条染色体进行标记的记录系统来帮助计数分析。显微镜的附件（清晰照像机）可以将 PCC 分裂相成倍放大后进行观察，同时将图像记录下来。有些中期细胞寻找系统配备了专门的应用软件，能对数字图像进行注解。需要记录玻片上的 PCC 细胞在显微镜载物台上的坐标，而且 PCC 分裂相的选择方法不应当引入偏差，以免使畸变数失真。

PCC 分析涉及对染色体条数的计数，是作为单个染色单体计数，这在吉姆萨染色后人的间期 PCC 细胞中很容易与 CHO 分裂细胞的染色体相区别。应用 FPG 染色时，人类染色体呈深染，而 CHO 细胞在含有 BrdU 的培养基中生长超过两个细胞周期，染色后呈“花斑”效应，且着色非常浅（图 22）。FISH 分析时，用 cot-1 仓鼠 DNA 可以覆盖 CHO 染色体的所有信号，这样正好使人类 PCC 单独显示出来（图 37）。

11.1.3. 计数标准

根据 PCC 的形态很容易确定处理此时淋巴细胞所处的细胞周期位置。 G_1 期为单个染色单体、S 期的染色体呈粉末状、 G_2 期为两条染色单体。用吉姆萨染色标本进行生物剂量估算时，只需记录含有单个染色单体的细胞，即处于 G_0/G_1 期的人淋巴细胞，每条染色单体代表一条人类染色体（图 35）。

因此，在未照射的淋巴细胞中染色体计数为 46 条。用计数照射样本中的染色体数减去未照射样本中的染色体数，即可估算出辐射诱发的染色体畸变率。在疑似局部照射时，可选择另一种分析方法：Qpcc 法，即已经介绍过的分析含 PCC 断片的损伤细胞中多余 PCC 断片数的方法[75]。这种方法在原理上等同于 Sasaki 和 Miyata 介绍的 Qdr 法[142]（第 9.7.4.3 节）。通过采用 C 显带或泛着丝粒探针和染色体特异性 DNA 文库的 FISH 技术，可以像第 9.4 和 10.4 节介绍的一样，分别计数、记录和分析样片上的双着丝粒和易位（图 37）。

11.2. 化学法诱导 PCC

11.2.1. 间期细胞快速染色体分析（RICA）

这种分析方法不需要延长培养时间。用 Ficoll Hypaque 法从血液中分离淋巴细胞（第 9.1.5.2 节），然后将淋巴细胞接种到含磷酸酶抑制剂（如：冈田酸、花萼海绵诱癌素 A、三磷酸腺苷、p34^{cdc2}/细胞周期性蛋白激酶 B）的培养基中，在 37℃ 孵育 3 小时。Prasanna 等[76]对该方法有完整的介绍。固定及制片（KCl 低渗；3:1 的甲醇：冰醋酸固定；在洁净玻片上滴片）应遵循中期细胞正常操作步骤。

然后，经原位杂交和染色体涂染后即可用荧光显微镜对辐射诱发的染色体损伤进行分析（图 38）。

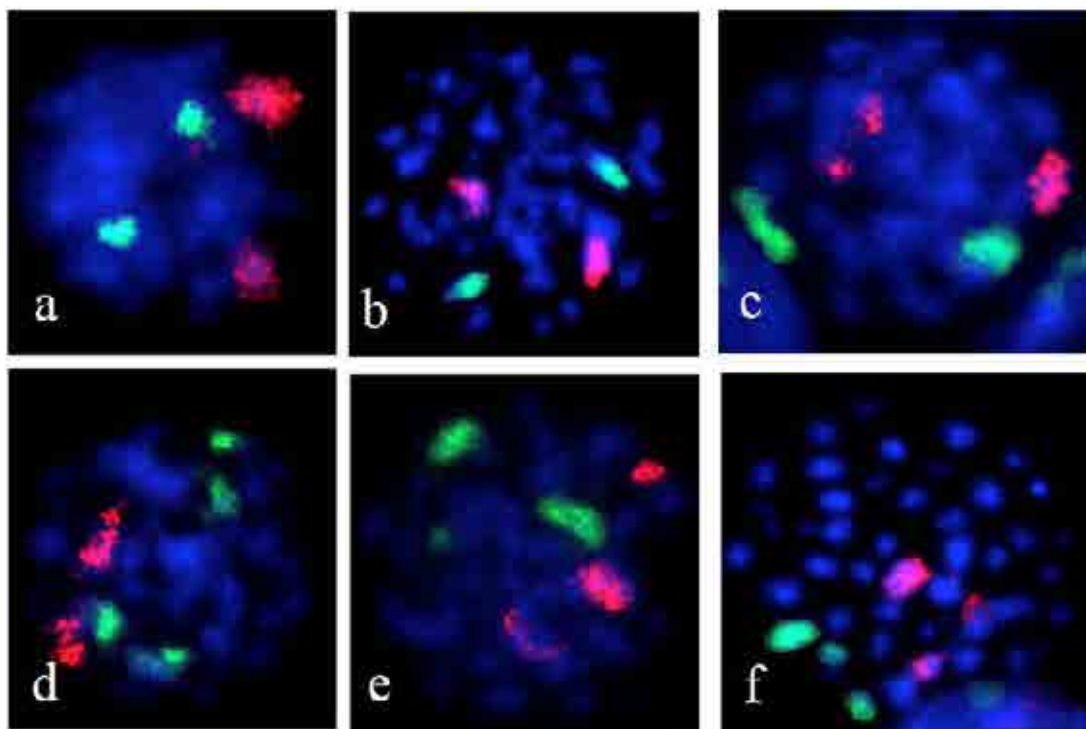


图 38. RICA 法显微照相显示 ^{60}Co 照射后 FISH 涂染的人类间期淋巴细胞 1 号（红色）和 2 号（绿色）染色体[78]。正常细胞含有两个红点和两个绿点（a 和 b）；畸变的 1 号染色体出现 2 个以上的红点（c）；畸变的 2 号染色体出现 2 个以上的绿点（d）；带有两个以上红点和绿点的细胞（e 和 f）（由 Pathak 和 Prasanna 提供，AFRRI，美国）。

正常细胞每条染色体呈现两个荧光点，而带有结构畸变（断裂或互换）的细胞涉及与涂染探针相应的特异染色体，可显示两个以上的荧光点。对于生物剂量估算，用一个大号染色体探针就足够了[76]，而一种以上的染色体探针更能提高检出敏感性[78]。

11.2.2. PCC环分析

在化学法诱导 PCC 的生物剂量估算中，吉姆萨染色后对染色体环进行计数是其中一种简单有效的方法。这种方法仍然需要淋巴细胞培养，Kanda 等[68]推荐 48 小时的培养方法。因此这种方法并不节省时间，但特别适用于常规双着丝粒检测的剂量效应已经显示饱和迹象的大剂量照射。这种方法已经被刻度，并被用于 20 Gy 当量以下的 X 射线照射。在这样的剂量下，诱发的双着丝粒和断片太多，很难准确计数。但是淋巴细胞中诱发环的频率要低得多，一般约为双着丝粒的~10%，这使得环的计数成为极高剂量照射后的一个可能的终点。

11.2.2.1. 细胞培养、化学处理和制片

该方法详细实验步骤见附件 III。

化学试剂的制备

应当制备 DNA 磷酸化抑制剂，如冈田酸或花萼海绵诱癌素 A。这些化学物具有致

癌作用，操作时应当注意适当的安全防护。尽管 PCC 诱导机制可能相似，均具有剂量依赖性并导致染色体形成，但 calyculin A 诱导 PCC 的效率较冈田酸高 20 倍。用二甲基亚砜（DMSO）将上述试剂溶解后，用培养液稀释并以储存液形式（5~10 μM ）在 -20°C 保存。

培养

化学法诱导淋巴细胞中的 PCC 一般需要细胞进入周期循环。因此，实验步骤是用 PHA 刺激细胞并培养 48 h，方法与第 9.1 节中介绍的中期细胞培养方法类似。虽然 PCC 可以用全血培养来诱导，但分离淋巴细胞能够得到更多细胞的更清洁的片子（第 9.1.5.2 节）。这样，尤其在非常大的剂量照射时，强烈推荐采用分离淋巴细胞的方法。

PCC 诱导标准方案是：细胞培养至最后 1 h 时，向培养液中加入冈田酸（500 nM）或花萼海绵诱癌素 A（20~50 nM），这样将会产生 M1 期所有阶段细胞的 PCC 混合物。不过，化学诱导的效率还有赖于培养条件和药物质量。每个实验室的药物最佳浓度和作用时间取决于 PCC 细胞的发生率及染色体的形态质量。作用不充分可导致可供分析的细胞不足；而作用过度则会使染色体形态模糊和过度短缩。固定、制片和吉姆萨染色过程与中期细胞制备方法相同。

11.2.2.2. 计数标准

经大剂量照射后的淋巴细胞培养 48 h，大部分可分析细胞处于 G_2 后期与 M 期之间。若为低剂量照射，则还可能有分裂后期细胞污染。与 M 期分裂细胞环状染色体的形态（图 11）相比， G_2 后期及分裂后期细胞的 PCC 环较细（图 39A），很容易被识别。因此，最好选择这些细胞来计数 PCC 环。对处于 G_2 后期和分裂后期的细胞，可以分别通过附带的或分离的姊妹染色单体来区分（图 39B）。

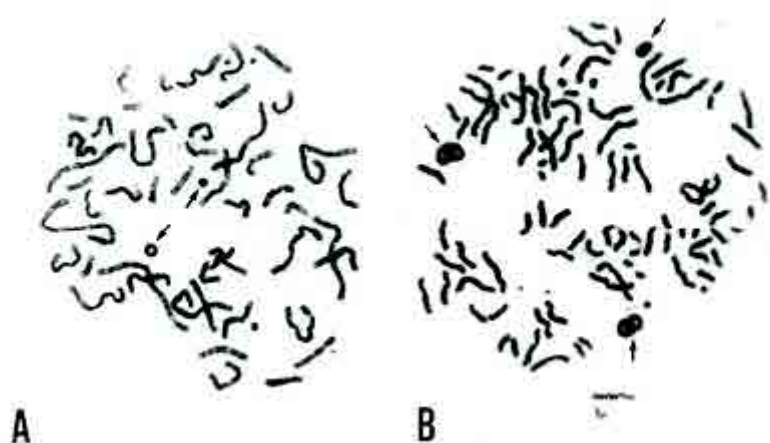


图 39. 受照淋巴细胞在细胞周期不同阶段由冈田酸诱导的 PCC 示例。(A) G_2 /M-PCC 细胞，(B) M/A-PCC 细胞，显示分离的姊妹染色单体。箭头指示环状染色体[68]。

在 G₂ 后期和分裂后期细胞之间 PCC 环率没有明显差别，可以将数据合并。

一个环状染色体记为一个 PCC 环。只用吉姆萨染色的 PCC 细胞无法看清着丝粒，所以 PCC 环没有“着丝粒”或“无着丝粒”之分。

正像双着丝粒一样（第 9.7.4.3 节），与泊松分布相比，PCC 环的细胞间分布情况的分析，提供了一些关于低 LET 辐射照射均匀性和事故所涉辐射品质的信息。有些情况下，如在延迟发现的事故中，照射与采血之间有一定的时间间隔，这时可能要通过计算半寿期来校正结果，以获得原始 PCC 环率的准确估算。目前还没有明确的数据来支持这一观点。而根据日本东海村事故一名幸存者的细胞遗传学随访研究的报道，PCC 环的半寿期大约为 8.7 个月[253]。

11.3. 用 PCC 环法调查辐射事故

在 200 kV X 射线刻度的 PCC 环技术公布不久[68]，采用冈田酸诱导 PCC 环技术检测一起严重辐射事故的机会出现了。1999 年在日本东海村临界事故中，用该方法对三名受到严重照射的病例进行了生物剂量估算[254]。

事故后 9 h，三个样本中每 100 个细胞的 PCC 环检出率分别为 150、77 和 24，估算剂量分别为 >20 Gy、7.4 Gy（95%置信区间为 6.5~8.2 Gy）和 2.3 Gy（1.8~2.8 Gy）。需要注意的是，这次事故是 γ 和中子混合辐射野照射，而以 Sv 为单位测量的剂量当量（第 2 章）不适用于这种高剂量照射，因为它依据的是低剂量随机效应的危险度判断。RBE 加权器官剂量作为器官吸收剂量和 RBE 的乘积，专门用来表征高剂量照射，用以评价确定性健康效应的危害[15]。200 kV X 射线的 RBE 为 1。RBE 加权剂量的单位是 J/kg，在文献[15]中称为戈瑞当量（Gy-Eq）[15]。对于受照剂量最大的人员，剂量近似 > 20 Gy-Eq，因为已发表的离体刻度曲线[68]证明，在 200 kV X 射线照射全身 RBE 加权剂量达到 20 Gy-Eq（或 RBE 为 1，全身吸收剂量为 20 Gy）时，线性平方模型的剂量-效应曲线已趋向平稳（饱和）。

采用常规计数中期细胞的双着丝粒和环（dic + rc）也可以对血样进行平行分析。由于受到如此大剂量的照射，会导致外周血淋巴细胞计数迅速减少，因此用一种培养方法尽可能多的获得中期细胞[123]。这种方法就是用 Ficoll Hypaque 分离管浓集淋巴细胞，与第 9.1.5.2 节介绍的方法相似。结果是，对于最严重的受照者，在 78 个细胞中每个中期细胞都受到损伤，双着丝粒为 715 个，着丝粒与无着丝粒环为 188 个。其他两名受照者的畸变情况分别是：一人在 175 个细胞中双着丝粒 479 个，环 55 个；另一人在 300 个细胞中双+环 191 个。表 14[255]概括了用细胞遗传学方法和钠活化物理测量法得到的剂量估算结果。

表 14. 用不同指标估算的剂量比较

患者	用以下指标估算的 RBE 加权全身剂量 (Gy-Eq) ^a			
	PCC-环	Dic	Dic+R/Rc	²⁴ Na ^b
A	>20	22.6	24.5	17~24
B	7.4 (6.5~8.2)	8.3	8.3	8.7~13
C	2.3 (1.8~2.8)	-	3.0 (2.8~3.2)	2.5~3.6

^a 对于 X 射线（患者 A 和 B）和 γ 射线（患者 C）RBE 为 1。

^b 来自 Ishigure 等[255]，中子 RBE 估计值为 1.5~2.0。

12. 胞质分裂阻断微核检测

12.1. 背景

电离辐射诱发形成染色体无着丝粒断片，同时也造成少量的整条染色体错误分离。不能与纺锤体发生作用的无着丝粒断片和整条染色体在细胞分裂后期滞留在后，因而不能进入子细胞的主核内。滞后的染色体断片或整条染色体则形成一个单独的小核，因此叫做微核。

外周血淋巴细胞微核检测是基于淋巴细胞经短期培养后出现微核的现象，首先是由 Countryman 和 Heddle 报道的[82]。但是，最初应用这种方法时，由于没有尝试去确定计数的细胞在离体培养过程中是否实际上完成了核分裂，因此使分析结果不可信，因为细胞中损伤的染色体只有在细胞分裂时才会形成微核。基于胞质分裂阻断剂松胞素 B 的使用，后来发展出一种更可靠的方法。1985 年，Fenech 和 Morley [83、84]证明，使用松胞素 B 后，已经完成一次核分裂的细胞会在胞内累积，表现为双核（BN）细胞。然后可以特异和有效地计数这些双核细胞中的微核，而排除未分裂的单核细胞，因为未分裂的单核细胞在离体培养时不会出现微核（图 19）。这样，用微核检测获得的结果在分裂细胞率上不受个体间和实验室间差异的影响，表明在观察微核率方面具有非常重要的作用[84、256、258]。胞质分裂阻断微核检测（CBMN）法因此成为测量培养淋巴细胞微核的标准方法。

血样中收集的淋巴细胞是自身在体内发生细胞分裂的结果，因此可以推测，其中一些细胞已经含有微核。由于这个原因，已经表明计数常规血涂片上单核淋巴细胞的微核，对慢性受照人群的遗传损伤监测非常有用[259~263]。而且，在 CBMN 检测中，单核细胞中的微核计数也可以作为一个有意义的附加参数[262、263]。

上世纪 90 年代又发展了 CBMN-着丝粒检测法，应用 FISH 和泛着丝粒探针来观察微核中的着丝粒。这种方法可以区分是由无着丝粒断片形成的微核，还是由整条染色体形成的微核[69、85、263~267]。应用这种方法，可以大大提高 CBMN 检测在低剂量范围的敏感性[85、266、267]（第 12.4.2 节）。

最近，又一种更加全面的 CBMN 检测法，称为胞质分裂阻断微核细胞（CBMN Cyt）检测法得到了发展和验证。这种方法除了分析双核与单核细胞中的微核外，还对核质桥（NPB，图 19C）和双核细胞中的核芽进行检测，二者分别为双着丝粒染色体[89]和基因扩增[86]的生物标志物。而且在 CBMN Cyt 检测中，可以计数单核细胞、双核细胞、多核细胞以及坏死和凋亡细胞的比例，测量细胞增殖及死亡情况，这也可以为生物剂量估算提供信息[88、268]。

此外，计数红细胞中的微核也可以作为染色体损伤的一项指标，注意这种方法的检测上限是 1 Gy，由于红细胞生成受到抑制，照射后越早采血越好。近来，采用流式细胞术通过限制转移受体阳性的网织红细胞（Tf-Ret；CD71）[269]的微核计数来检测小

鼠体内幼稚红细胞微核的方法已经用于人类。对放射性碘治疗甲状腺癌患者的网织红细胞检测评价提示，这种方法可用于监测疑似事故照射的个体[270、271]。

12.2. CBMN 检测的淋巴细胞培养

淋巴细胞培养方法与第 9.1 节中介绍的中期细胞培养方法类似，主要存在以下几点区别：(i) 培养至 24 或 44 小时加入 Cyt-B（用于辐射生物剂量估算最好选择 24 h，这样可以确保收获的细胞为 M1 期）；(ii) 不用溴脱氧尿嘧啶和秋水仙素；(iii) 培养时间延长至 72 h，低渗处理、固定和离心均要轻柔，以保持胞浆完好，便于识别双核细胞。可以经吉姆萨常规染色后用光学显微镜观察，也可以用荧光染料（如吖啶橙）标记后用荧光显微镜观察。标本还可以进一步用 FISH 加泛着丝粒探针标记着丝粒。具体步骤见附件 IV。

12.3. CBMN 检测的计数标准

CBMN Cyt 检测中所有指标的详细计数标准已有文献报道[86]。本节仅提供双核细胞中微核和核质桥的计数标准，因为这是用于电离辐射生物剂量估算的最有效指标。

12.3.1. 计数微核率的双核细胞选择标准

计数微核率的胞质分裂阻断细胞应该具有以下特点（图 19）：

- (a) 细胞具有双核。
- (b) 双核细胞中的两个核应有完整的核膜，位于同一胞浆内。
- (c) 双核细胞中的两个核应该大小形态及染色深浅相近。
- (d) 双核细胞中的两个核可以分离，也可以通过一条或多条纤细的核质桥相连接，核质桥的宽度不超过核直径的 1/4。
- (e) 双核细胞中的两个主核可以相互接触，但理论上不能相互重叠。对于两个核重叠的双核细胞，只有每个核边界都清晰可辨时才能计数。
- (f) 双核细胞的胞浆边界（细胞膜）必须完整，与邻近细胞的胞膜清晰可辨。

12.3.2. 微核的计数标准

微核形态上与主核相同，但较主核小（图 19）。微核具有以下特点：

- (a) 人类淋巴细胞中的微核直径通常为主核平均直径的 1/16~1/3，相当于一个双核细胞主核面积的 1/256~1/9。
- (b) 微核不具有折光性，因此容易与染色颗粒这样的杂质相区别。
- (c) 微核与主核不连接。

- (d) 微核可以与主核接触但二者不重叠，同时微核的界限与主核界限有明显的区分。
- (e) 微核与主核染色深浅相同，但偶尔可能染色更深。

表 15 为记录微核的表格示例。

表 15. 单分血样平行培养（1 和 2 号）微核结果记录表

样本号:
 计数者:
 日期:

片号	双核细胞中的微核分布							双核细胞 总数	微核 总数
	0	1	2	3	4	5	> 5		
1								500	
2								500	
1+2								1000	
备注									

12.3.3. 核质桥的计数标准

核质桥（NPB）是双核细胞中连接细胞核的含 DNA 的连续结构。核质桥来源于双着丝粒染色体（由 DNA 断裂错误修复或端粒末端融合形成），在细胞分裂后期，着丝粒被拉向两极而形成（图 19A 和 C）。核质桥具有以下特点：

- (a) 核质桥的宽度可能有较大差异，但通常不会超过细胞核直径的 1/4。
- (b) 核质桥的染色性质与主核相同。
- (c) 偶尔一个双核细胞中可以观察到两个以上的核质桥。
- (d) 含有核质桥的双核细胞可能同时含一个或多个微核。
- (e) 也有可能含有一个或多个核质桥的双核细胞不含微核。

表 16 示出了核质桥数据记录表格的简单结构。

表 16. 单份血样平行培养（1 和 2 号）核质桥计数结果记录表

样本号：
计数者：
日期：

片号	双核细胞中的核质桥分布							双核细胞 总数	核质桥 总数
	0	1	2	3	4	5	> 5		
1								500	
2								500	
1+2								1000	
备注									

在与细胞核相互接触的双核细胞中，计数核质桥的难度更大一些，因此，有必要明确说明：是否对所有双核细胞中的核质桥进行计数，而不考虑是否有细胞核的接触；或是否对核明显分离的双核细胞中的核质桥和与核有接触的双核细胞中的核质桥分别计数。尚没有足够的证据来推荐只计数核没有相互接触的双核细胞中的核质桥。

12.4. CBMN 检测的数据处理

12.4.1. 剂量-效应关系

制备离体辐射剂量-效应刻度曲线的步骤已在第 8 章作了介绍。很多研究表明，辐射诱发的微核数与辐射剂量和辐射品质密切相关[87、272~275]。但是，由于实验室间采用的实验方法、计数标准等不同，得到的微核剂量-效应关系有一定的差异，正像本出版物中介绍的其它检测方法一样，任何打算进行生物剂量估算的实验室都应制备自己的离体剂量-效应刻度曲线。理想的要求，在 5 Gy 范围内至少应有 8 个剂量点。按第 8 章介绍的方法，用线性（高 LET）和线性平方（低 LET）模型进行曲线拟合。图 40 示出了低 LET 辐射（⁶⁰Co γ 射线，剂量率 0.5 Gy/min）微核剂量-效应曲线的典型例子。

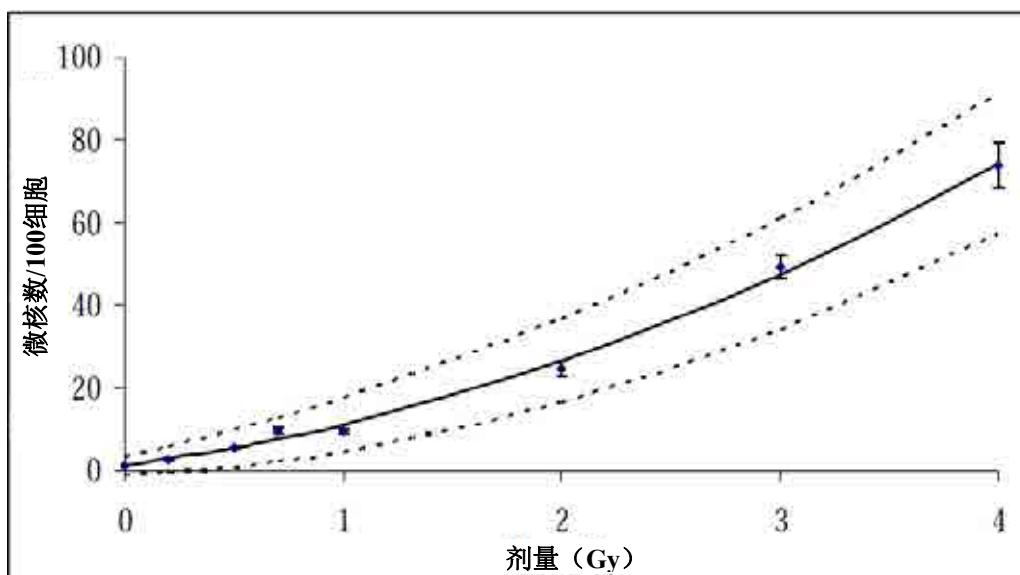


图 40. ^{60}Co γ 射线照射后微核的典型剂量-效应线性平方模型。实线为 47 名志愿者的合并数据；虚线为 95% 置信区间的上下限。

12.4.2. 本底水平

文献报道，微核率的本底差别很大；每 1000 个双核细胞中的微核数分布在 0~40 之间[257~286]。除了饮食因素和暴露于大范围的环境断裂剂和致突剂因素以外，影响微核率本底的两个最重要因素是年龄和性别。

大规模的生物监测研究显示，微核自发率随着年龄的增加而增加是普遍存在的现象。在一项针对核电厂和医院工作人员的调查中，男性对照人群的微核率分别为 0.35 微核/1000 双核细胞/年和 0.44 微核/1000 双核细胞/年[278~280]。这些数据与 Fenech [108]对影响微核本底值因素的大规模调查的结果基本一致：0.31 微核/1000/年。女性对照人群的微核率增加更明显，为 0.58 微核/1000/年[279]，也与 Fenech[108]的结果一致：0.52 微核/1000/年。应用泛着丝粒 FISH 探针（图 41）对有着丝粒的微核进行分析，表明由年龄因素引起的本底微核率增加可全部归因于着丝粒阳性的微核，反映出随着年龄的增加，染色体的丢失增加[266、279、280]。

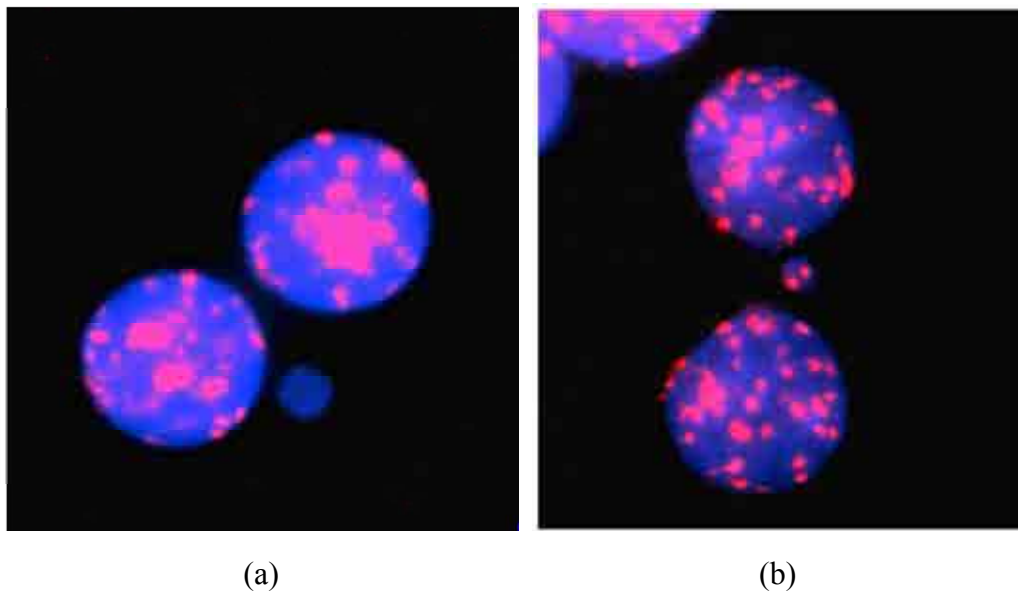


图 41. 显示无着丝粒微核 (a) 和有着丝粒微核 (b) 的双核细胞。着丝粒用泛着丝粒探针 (橘红色光谱) 染色, 细胞核及微核用 DAPI 复染。

X 染色体几乎是这种自发性染色体丢失的主要原因[281、282]。这也解释自发性微核率确实存在性别差异: 对平均年龄 41.4~41.8 岁的人群调查研究结果显示, 平均自发性微核率为每 1000 个双核细胞中男性 16.4 个微核, 女性 23.5 个; 相反, 无着丝粒的微核数男性为 6.7 个, 女性为 7.7 个, 两性之间无显著性差异[279]。

因为受照前个体的微核本底水平并不清楚, 微核的本底差异明显限制了用它来作为低剂量照射的生物剂量计。经过估计, 建议对 X 射线活体照射 CBMN 检测的下限在 0.2~0.3 Gy 以上[87、266、283]。

已经证明, 大部分辐射诱发的微核主要来自无着丝粒断片, 而自发的微核主要含有整个染色体[85、264~267], 应用 CBMN-着丝粒分析大大增加了 CBMN 在低剂量范围的检出灵敏性[85、266]。两项研究[85、266]均发现, 使用泛着丝粒探针, 大部分自发性微核为着丝粒阳性 (MNCM⁺) (分别为 73%和 71%), 而大部分辐射诱发的微核为着丝粒阴性 (MNCM⁻)。MNCM⁺ 数随剂量的增加非常小, (分别为 3.7 和 5.3 MNCM⁺/1000 双核细胞/Gy)。通过人工计数 2000 个双核细胞, 在 95%置信限内, MNCM⁻ 的检出限为 0.1 Gy[266、267]。

12.4.3. 核分裂指数 (NDI)

当计数胞质分裂阻断 (CB) 法制备的淋巴细胞样片时, 会看到含有 1、2、3……个主核的细胞。根据这些细胞的相对频率, 可以确定淋巴细胞在有丝分裂原刺激后所处的细胞周期进程。

这种频率称为核分裂指数[284]。核分裂指数本身并不能直接作为生物剂量计来应用。然而, 它常被用作了解培养物的细胞周期动力学的有用研究工具。核分裂指数能

够表示诱变剂（如辐射）引起的干扰。数据直接从 CBMN 检测中得到，不需要进行任何附加的实验室努力，因此本出版物对该方法予以介绍。

12.4.3.1. 计数单核、双核与多核细胞的标准

各类细胞特点如下：

- 单核、双核及多核细胞具有完整的细胞浆和正常的细胞核形态，分别含有 1 个、2 个或多个细胞核。
- 这些细胞可能含有或不含有 1 个或多个微核或核芽（NBUD）。在双核或多核细胞中，可能含有或不含 1 个或多个核质桥。

在计数的活细胞中不应该包括坏死细胞和凋亡细胞。

极少情况下，假如细胞周期时间比正常情况短得多，或胞质分裂阻断时间过长时，可能会看到具有不止 4 个核的多核细胞。

12.4.3.2. 计算核分裂指数

确定含 1、2、3 或 4 个核的细胞率需要计数 500 个细胞，用公式（36）计算核分裂指数：

$$NDI = \frac{M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4}{N} \quad (36)$$

式中：

$M_1 \sim M_4$ 代表含相应数目细胞核的细胞数量， N 为计数细胞的总数。

已报道的核分裂指数计算方法[284]并未考虑它的不确定性。实际上，似乎还没有报道能够计算核分裂指数不确定性的方法。因此，这里对这一方法加以介绍。由于比较复杂，在附件 IV-4 中有一个完整的运用举例。

因为 $M_1 \sim M_4$ 的值是相互关联的，核分裂指数的不确定性不能用标准误分析来计算。而必须考虑协方差分析，它能够检测各变量之间的相关度。可以假设核分裂指数的 $M_1 \sim M_4$ 值符合多项式分布，这意味着一个细胞中核的数目可能有一个固定数（3 或者更多）——即 1、2、3 或 4。 $M_1 \sim M_4$ 中每一个变量的方差（var）和协方差（covar）可用方程（37）到（39）进行计算：

$$var (M_i) = np_i (1-p_i) \quad (37)$$

$$covar (M_i, M_j) = -np_i p_j \quad (38)$$

i 和 j 分别等于 1、2、3 或 4。

式中：

M_1' 、 M_2' 、 M_3' 和 M_4' 分别代表 $1 \times M_1$ 、 $2 \times M_2$ 、 $3 \times M_3$ 和 $4 \times M_4$ 的值； n 为细胞总数与相应的微核数乘积之和（即 NDI 公式中的分子）； p_i 和 p_j 为 M_i' 和 M_j' 的概率，等于 M_i' 和 M_j' 除以 n 。

利用协方差的定义，可发现核分裂指数的方差取决于用方程（37）和（38）计算的方差和协方差：

$$\text{var}(NDI) = \sum_{i=1}^4 M_i'^2 \text{var}(M_i) + 2 \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^4 M_i' M_j' \text{cov}(M_i' M_j') \quad (39)$$

这个计算比较复杂，通过一个常用的统计学软件或者第 8.3 节提到的“剂量估算”程序很容易进行。

12.5. CBMN 检测在生物剂量估算中的应用

12.5.1. 病例研究

为了证明 CBMN 在生物剂量中的应用，对以下病例的外周血淋巴细胞微核数进行测量：(1) 接受分次局部机体放疗的不同组癌症患者，如前列腺癌、宫颈癌、何杰金氏病[285~288]，(2) 接受放射性碘治疗的甲状腺癌患者[289~291]。

这些研究表明，用微核估算的剂量与根据放疗方案+累积剂量-体积柱状图计算的平均全身剂量非常一致[285~287、292]。

对甲状腺癌患者的 meta 分析表明[289]，放疗后的微核率比放疗前增加了 3 倍以上，说明 CBMN 检测对发现体内放射源引起的全身平均低剂量照射造成循环淋巴细胞的遗传损伤具有足够的敏感性。

12.5.1.1. 放射性碘病例研究

对一名甲状腺完全切除术后接受 ^{131}I 摘除性放射治疗的 34 岁男性甲状腺癌患者进行 CBMN 测试，研究淋巴细胞的辐射反应[291]。幸运的是，在甲状腺癌确诊前几个月，患者为一项不同剂量 X 射线离体照射（198 mGy/min）诱发微核的研究捐献过血样。未照射的培养细胞本底微核率（处理前的基础值）平均为 6.0‰；而在剂量为 50、100、150、200 和 250 mGy X 线照射后平均微核率分别为 18.5‰、29.0‰、41.0‰、61.0‰和 75.5‰。数据满足线性无阈剂量-效应方程（ $Y=3.714+2.783D$ ； $r=0.99$ ），如图 42 所示。

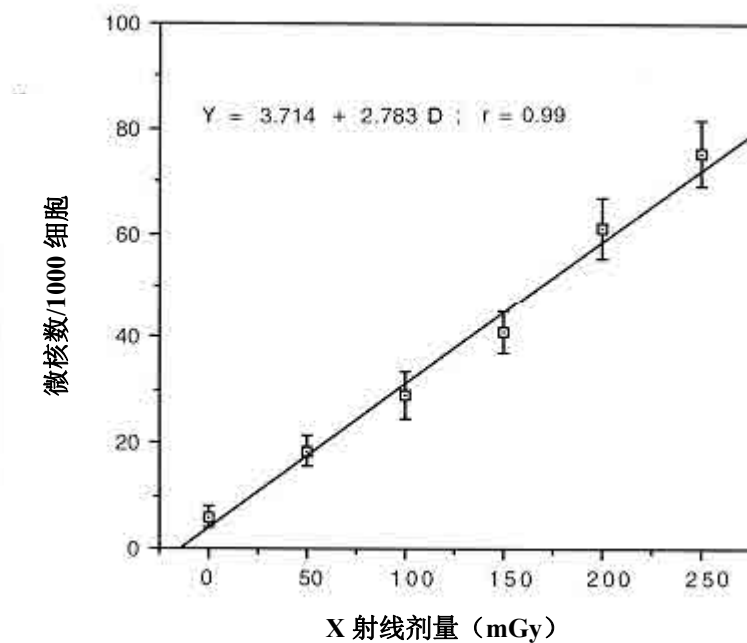


图 42. 诊断前及 ^{131}I 治疗后，患者淋巴细胞微核 X 射线低剂量离体照射的剂量-效应关系（由 Livingston 提供，REAC/TS，美国）。

首次用 48 mCi (1.78 GBq) ^{131}I 体内治疗后 11 天采血，随后每月间隔采血一次，直到每季度采血一次，直至 5 年。第一次治疗后标本微核率为 35.5‰，比治疗前的基础值增加了 6 倍，提示外周血的剂量大约为 110 mGy。首次 ^{131}I 治疗后 26 个月第二次治疗，剂量为 390 mCi (14.46 GBq)，导致微核率进一步增加。微核计数随时间波动很大，在 5 年后的随访中，微核率较放疗前的基础值高出 10 倍（图 43）。

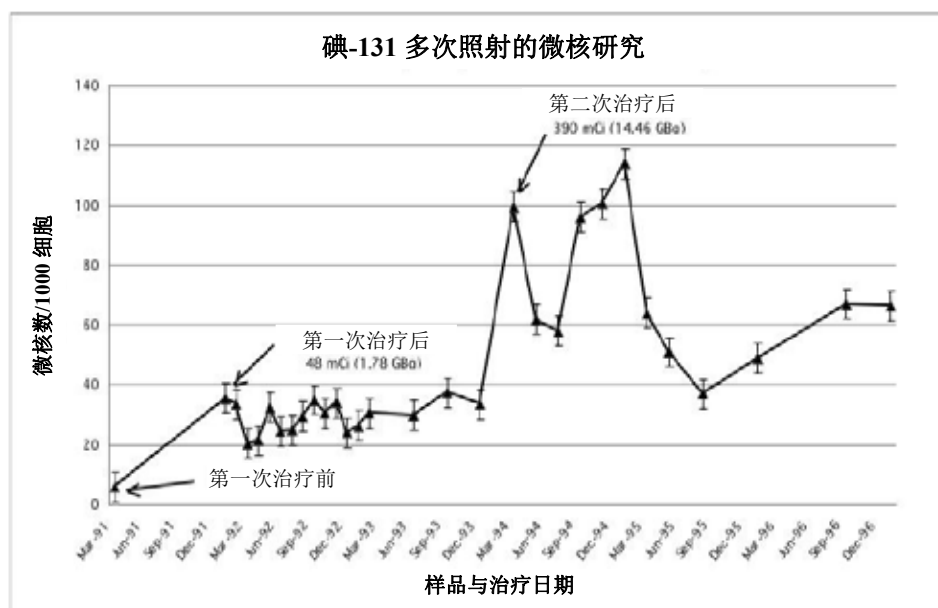


图 43. 患者 ^{131}I 治疗前、治疗中及治疗后的 5 年微核随访结果（由 Livingston 提供，REAC/TS，美国）。

第二次治疗后 15 年以上的时间，患者处于无癌且健康的状态。这项研究结果支持 CBMN 检测是一项快速、灵敏和定量的辐射照射生物学指标的结论。但是，这种研究不能确定靶组织的局部剂量，这里指任何残留甲状腺细胞+甲状腺癌转移。

12.5.2. 生物监测研究

作为一项活体生物监测指标，经若干患者研究验证后，CBMN 及 CBMN-着丝粒分析已被大规模应用于职业受照放射工作者的生物监测，如核电厂和医院工作人员的生物监测[266、278~280、293~295]。这些生物监测研究表明，微核的高低取决于采血之前多年接受的累积剂量。在 Thierens 等[280]的研究中，对年龄因素进行校正后（第 12.4.2 节），个体微核率的线性回归分析显示，微核增加率为 0.0175 微核/1000/mSv，Pearson 相关系数为 0.10。此外，Thierens 等[295]还在另一项研究中用 CBMN-着丝粒法对放射工作人员进行了分析，得到微核随剂量的增加率几乎与前一结果相同，为 0.025/1000/mGy，并且证明这种剂量依赖性完全归因于电离辐射断裂作用产生的 MN^{CM}。Vaglenov 等[296]的研究也发现在一个职业照射人群中微核的剂量依赖性。他们报道微核增加率为 0.03/1000/mGy。大量生物监测研究表明，微核检测能够证实在群体水平上职业性照射累积剂量超过 50 mGy 引起的遗传损伤。

12.5.3. 事故研究

12.5.3.1. 切尔诺贝利事故

CBMN 检测已成功用于评估切尔诺贝利核电厂附近的居民由于摄入长寿命放射性核素造成的迁延性照射。1986 年核事故时居住在切尔诺贝利 100~200 km 范围内的 80 位居民，在 1989~1991 年间接受了双核淋巴细胞微核率检测[297]。该研究对受检者进行了 ¹³⁴Cs 和 ¹³⁷Cs 全身计数，以便了解微核率与全身剂量的关系。从 80 名受检者的数据多项回归分析得出：(a) 微核率与放射性铯的活度水平显著相关（ $p = 0.004$ ）；(b) 估算的体内吸收剂量（在 0.6~9.2 mGy 之间）与微核率呈明显正相关（ $R = 0.71$ ）。

12.5.3.2. 伊斯坦布尔事故

当事故涉及到的受照者较少，而且获得结果的速度并非至关重要时，大部分实验室选择用双着丝粒法进行剂量估算。因此，几乎没有关于微核计数作为事故后快速生物剂量计的报道。但有一个例子，就是第 9.7.5.6 和 10.9.3 节中介绍的伊斯坦布尔事故[158, 159]。10 名清除废金属的工人受到未屏蔽的早先用于放射治疗的 ⁶⁰Co 源照射。受照后大约一个月对淋巴细胞血样进行了 CBMN 检测以及双着丝粒和 FISH 易位分析。将两个实验室的数据合并，其中 8 名受照者用微核进行剂量估算，结果为 0.7~2.7 Gy，与双着丝粒估算的剂量非常一致。第 10.9.3 节提到，用 FISH 估算的剂量比用双着丝粒畸变率估算的剂量要高 20~30%，这可能是由于受照后患者的血细胞数量严重减

少所致。在这种情况下同样低估剂量的倾向也存在于微核分析中，因为这也是一种损伤类型，不会在体内长期存在，尤其是高剂量照射后。

12.5.3.3. 塞米巴拉金斯克核试验场

塞米巴拉金斯克（Semipalatinsk）核试验场区在 40 年（1949~1989）的连续核武器试验期间，已经被放射性落下灰严重污染，生活在场区附近的人们既受到内照射也受到外照射。对受不同程度污染的几个村庄和一个对照村庄的居民进行了双着丝粒与微核分析。结果发现，污染区居民的双着丝粒及微核均比对照组要高，这种高的发生率看来主要是由体内摄入放射性核素所引起[298]。

12.5.3.4. 一起 50 kV 接触式 X 射线放疗装置辐射事故

2003 年，采用 CBMN 法对一名维修时意外受到 50 kV 接触式 X 射线放疗装置照射的医院工作人员进行了回顾性剂量估算[299]。得到的估算剂量为 0.73 Gy，95%置信限为 0.54~0.96 Gy。用双着丝粒计数得到的估算剂量为 0.62 Gy（0.45~0.90 Gy），与 CBMN 检测剂量非常一致。这名工作人员的背部皮肤损伤显示，其过量照射为躯体局部照射。根据过离散分布的双着丝粒数据推断，患者躯体 49%的部分受到照射。由于微核始终存在过离散分布，不可能用微核数据进行这类分析，即使在全身照射情况下。一年后对该患者进行第二次采血，结果显示微核率随着照后时间的推移而减少，半消失期为 342 天，与双着丝粒 377 天的半消失期非常接近。这一结果与在放疗患者中观察到的治疗后 1 年微核率随着照后时间减少至 60%一致[292]。

12.5.3.5. 大规模辐射事故

在大规模辐射事故情况下，可能会有数百人受到照射，这时最重要的是将需要早期救治的严重受照者（ ≥ 1 Gy）与较轻的受照者区分开来。为此目的，需要一种快速的生物剂量检测手段。在最近一项研究中[87]，用自动微核计数对人群快速分类诊断的有效性已经在一个多中心装置中得到确认。详细资料见第 13.3.3 节。

13. 染色体分析的自动化

为了有效地响应大规模伤亡事件，必须实现细胞遗传学剂量估算方法自动化，增加检测通量，因为这些方法既费时又费力。而且，自动化也可以改进质量控制和质量保证。此外，由于操作涉及血液处理，是有职业性生物危害的，所以自动化也增强了实验室人员的安全。细胞遗传学实验室自动化包括：(i) 样品制备自动化，(ii) 分析自动化，(iii) 用于样品跟踪和数据处理的实验室信息管理系统[300]。

13.1. 样品处理自动化

细胞遗传学实验室样品自动处理过程可能由下列任何或全部设备组成：(i) 血液处理机器人，(ii) 生物安全罩，(iii) 培养箱，(iv) 中期细胞收获装置，(v) 中期细胞分散装置，(vi) 染片机。

13.1.1. 血液处理机器人

为了高通量处理血样并从外周全血中分离淋巴细胞，定制自动化液体处理机器人，可以消除细胞遗传学剂量估算样本处理过程中的重要的限速瓶颈[300]。市售液体自动处理器能够分配、稀释和抽取血样，尤其是血库的应用[301]，可以针对所需目的专门定制和使用。该系统是精确的，准确的，不会引起交叉污染[302]。定制的机器人血液处理工作站可以配备一个定制的大工作台、一个保持样品链式监管的条形读码器、一只处理液体和运输采血管的机械手臂、离心管和一个移液管吸头清洗站。机器人也可以结合细胞活力分析仪，用于培养时调整淋巴细胞的密度；也可以结合高速自动离心机，用于淋巴细胞培养的密度梯度分离。不过，所有设备必须封闭在一个二级生物安全工程环境中，确保样品无菌和实验人员的职业安全。这套系统必须提供一个有效的监管链[301]。

13.1.2. 中期细胞收获装置

为了持续可靠地获得高质量的中期细胞分裂相，可以用定制的市售中期细胞收获机收获血液培养物的分裂细胞。这些设备可以消除劳动密集型过程，可以完成中期细胞收获所涉及的重复性工作，如细胞悬液的离心、上清液的吸取及安全丢弃、细胞的低渗液处理以及甲醇：冰乙酸的固定等。这些步骤是在受控的环境条件下一步完成的，不需要使用者的合作，从而提高了操作过程的质量和过程的可重复性[300]。

13.1.3. 中期细胞分散装置

分散到玻片上的中期细胞受温度和湿度的影响[303]。自动装置对细胞分散的过程提供最佳的温度和湿度环境条件，检测通量大于人工滴片的数目。该分散装置可以与一个微处理器配套，以精确地平衡和控制温度、湿度及干燥时间。这些控制器及其与功能相适应的形状，可使不同的使用者都能获得一致的结果，无论是对人体细胞还是动物细胞。内置的密封导管提供细胞的连续分散，并且有助于防止细胞重叠。

13.1.4. 玻片自动染色

该装置提供一种用吉姆萨法快速一致涂染玻片的方法，只需最少的人工参与。现行的自动染片机可以智能灵活地排列 1~520 张玻片，在无人看管的情况下以相同的或不同的步骤进行染色和冲洗。样品的优先安排性能允许特定的一批样品在没有使用者参与的情况下先于其它样品排队和处理。内置的备用电池在停电的情况下可以提供长达 40 分钟的运行时间，以确保正在进行的染色过程可以继续。

13.2. 图像自动分析

虽然许多生物剂量学实验室尚未使用自动分析功能对显微镜拍摄的图像进行常规分析，但随着系统的改进这种可能性会增加。对于本出版物中介绍的所有四种检测方法，目前已经尝试实现自动计数。

13.2.1. 中期细胞寻找和图像捕获

虽然用以细胞遗传学损伤计数的、具有无人可靠性的、自动分析系统还在开发阶段，但是用以计算机辅助人工分析的高通量中期细胞寻找装置和卫星计数站可以显著提高技术人员的分析效率。中期细胞寻找装置帮助对玻片上的中期细胞分裂相进行定位、聚焦和放大拍照，为分析做好准备[304、305]。

以中期细胞寻找装置为基础的传统的图像分析系统包括一个计算机、一个高分辨率数码相机、一个高质量显微镜、一个自动聚焦平台和一个自动进片装置。计算机装载有中期细胞自动寻找软件和染色体畸变分析的交互式自动计数和标注软件。这种中期细胞寻找装置每次运行可以扫描多达 150 张玻片上的中期细胞分裂相[300]。当扫描时，结果（图像和备选的分相定位）被储存于中央处理器，用于后续的染色体分析在多个辅助计数系统的自动重定位。另外，由中期细胞寻找装置捕获的中期细胞分裂相的虚拟高分辨率图像可以进行数字加密，并通过一个虚拟私人网络进行转移，实现下游远程分析和评估。这种“远程计数”需要建立统一的计数标准，以保证结果的可比性。

13.2.2. 双着丝粒检测自动化

显微镜下分析双着丝粒染色体是一个耗时过程，在生物剂量实验室，受过良好训练和经验丰富的计数者通常每天只能分析几百个细胞。在低剂量照射情况下，必须分析大量的细胞，因此改善方法的首要环节是双着丝粒计数自动化，以节省时间，特别是对于低剂量照射的评估。

上世纪 80 年代开始进行自动计数系统的一些尝试[306~308]。同时，一些商业化的系统开始应用，相应的中期细胞寻找和核型分析软件模块现在已在许多细胞遗传学实验室建立起来。这种计算机辅助显微镜分析大大地促进了这项工作。首先，在低倍放大下扫描玻片，发现的中期细胞及其坐标被储存在一个虚拟的操作系统中。这一过程形成一个中期细胞图库。当这些细胞被重新定位和进行人工分析时，个人的电子记录表作为文件很容易保存，打印和存档。在辐射事故的快速应急响应中，观察到的畸变

细胞也可以立即用手动拍照、数字记录和归档。总之，使用中期细胞寻找装置，计数时间可以缩短一半[304]。

很早就认识到，中期细胞自动寻找、图像捕获和其他过程应伴随电子图像分析以实现包括双着丝粒计数在内的染色体自动分析。完成双着丝粒自动分析有以下几步：首先，通过中期细胞寻找装置扫描玻片。第二步，对发现的中期细胞自动捕获，获取高分辨率的数字化图像。第三步，图像分割，以鉴别染色体和可能的双着丝粒。在上世纪 90 年代，只储存疑似双着丝粒的图像和坐标。如今，随着数字化图像的发展，这一过程变得更加快速有效。此外，随着硬盘技术的进步，现在可以将一张玻片上的所有细胞以高分辨率模式加以储存。

双着丝粒计数软件的使用经验表明，开发能够将一个完整细胞分割为 46 条染色体的分级多步计算程序是相当困难的[308、309]。一般情况下，由于染色体重叠或聚集在一起，造成某些染色体不能被发现，结果使某些双着丝粒被遗漏（假阴性）。也有某些比 X 染色体小的双着丝粒可能会被系统性地忽略，这种情况可能低于 8%。虽然自动发现的疑似双着丝粒还需经过受过培训的计数人员来确认，但是这个过程要比人工分析快得多，容易得多。疑似的双着丝粒被标记显示在屏幕上（图 44a），可以快速进行判断。大部分假阳性（杂质、染色体重叠，见图 44b）易于排除。

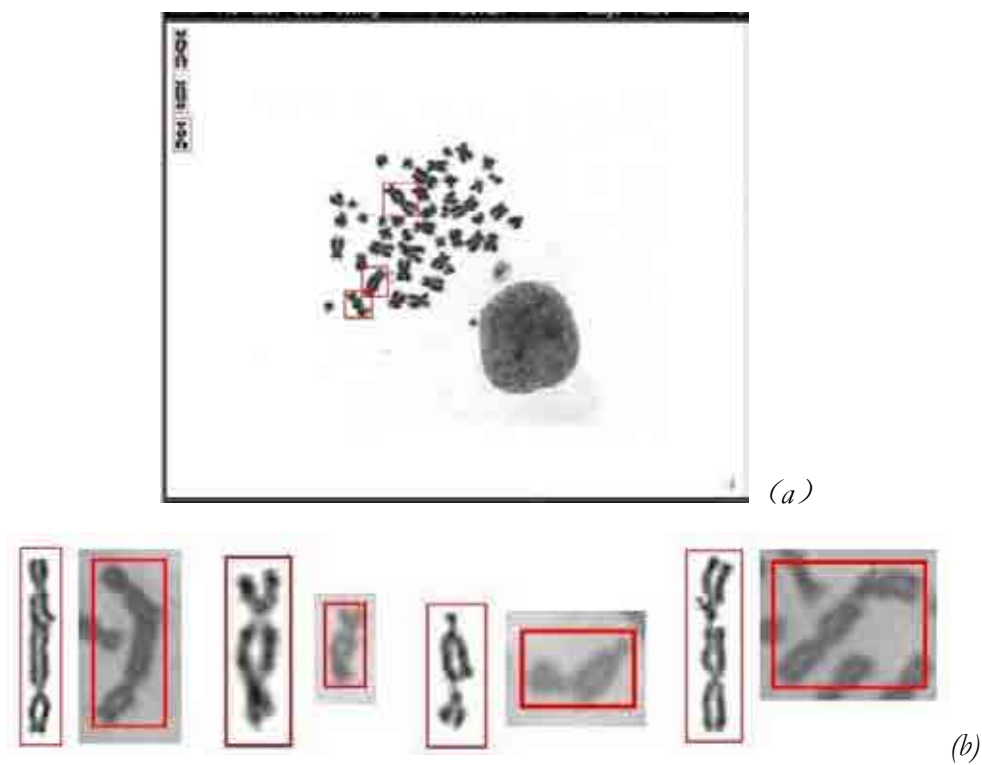


图 44. (a) 识别自动发现的疑似双着丝粒，使诊断更加容易和快速。(b) 假阳性的疑似双着丝粒（如染色体重叠、染色单体绞腿、或染色体未分割）很容易辨认并被排除。

由于分析细胞的不完整（人工标准只计数有 46 个着丝粒的完整细胞）和结果的不确定性，双着丝粒自动分析尚未被作为常规建立的方法。此外，还需要决定是否发现

的双着丝粒率与发现的染色体数目相关，或者是否可以计数为每细胞的双着丝粒数，要记住在每个细胞中的染色体数目并不是恒定的。这就提出关于使用双着丝粒过离散指数（第 9.7.4.3 节）的问题，以及这种方法检测局部照射的可能性问题。另一个感兴趣的方面可能是制片质量的影响。好的中期细胞分裂相可以增加检测染色体的数目，这需要更多的研究并通过双着丝粒分类的软件培训来优化。

双着丝粒自动检测给出非常好的重复结果。比较人工和半自动计数建立的剂量-效应曲线，证明两种方法有很好的相关性。文献报道，双着丝粒的自动检出效率大约为 50~70%[310、311]。

双着丝粒自动计数能够改善双着丝粒法作为辅助工具，在大规模辐射应急时对大量血样进行筛查。一个工作站可以有数个下属卫星站来补充，卫星站同时检测细胞和双着丝粒，以增强检测系统的能力和效率。对于分类诊断，双着丝粒自动计数可以显著减少分析时间，结果与人工计数有很好的 consistency[300、310、311]。

13.2.3. 微核自动计数

20 世纪 90 年代开发了几种用于 CBMN 检测的自动图像分析计算程序[312、313]。但是这些系统都具有一定局限性，如在双核细胞分类上误差较高。最近，已经开发了新的和更好的 CBMN 自动图像分析系统。Metasystems 公司（显微镜图像分析系统制造商）将微核软件模块整合到中期细胞寻找系统中，实现了商业化，该软件通过双核细胞的形态学标准，即出现两个邻近的形态相似的 DAPI 染色的细胞核来实现自动鉴别。第二步，围绕在双核细胞的两个核周围的一个圆形区域自动计数微核[314、315]（图 45，可见带有微核的双核细胞图库）。计数者不必进一步鉴定发现的微核数目。需要特别指出的是，与 CBMN 检测的肉眼计数标准不同，Metasystems 软件不用胞浆边界鉴定双核细胞，而是简单假设只要两个核紧靠（满足软件模式识别分类的特定参数），就足以准确判别为双核细胞；如果需要，可以用 Eastmond 和 Tucker（1989）[284]推荐的相差显微镜，通过看到胞浆边界来核实双核细胞检出的准确性。

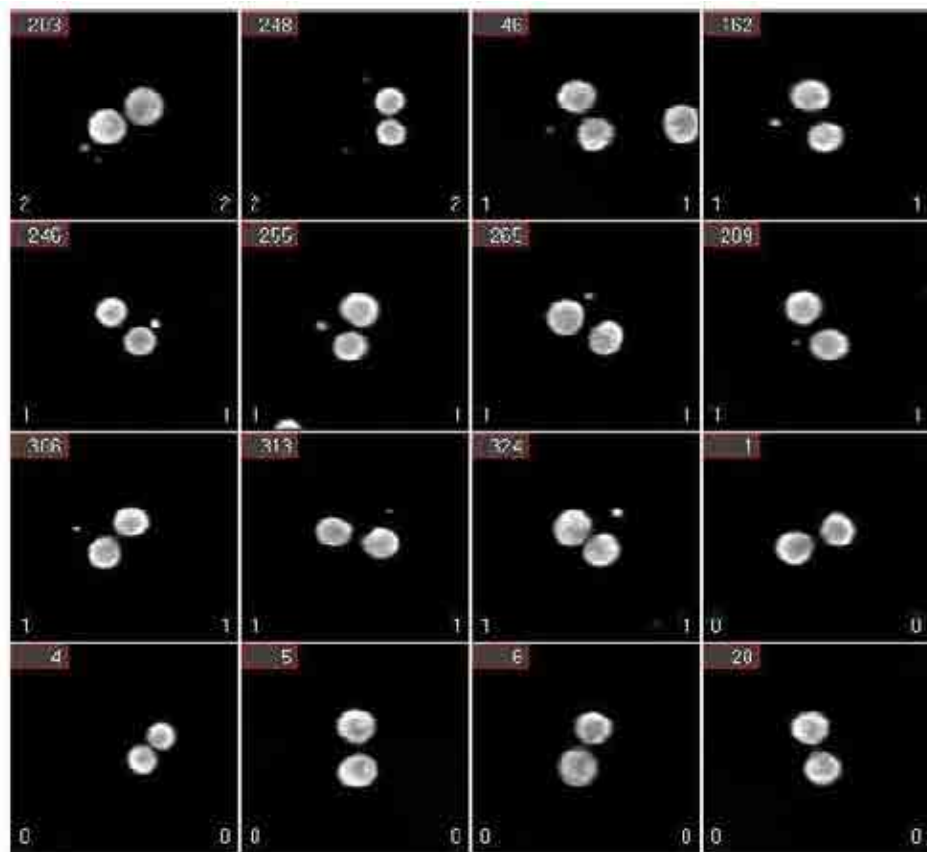


图 45. 自动系统拍摄的含和不含微核的双核细胞图库。

Decordier 等[316]开发了一个用于活体照射诱变剂的生物监测系统，使用一个图像采集站和两个微核分析工作站。该系统首先识别吉姆萨染色细胞的胞浆，然后检测细胞中核的数目，以此识别双核细胞，第三步计数微核。

Willems 等[87]进行的一项研究表明，在大规模辐射应急情况下，十分重要的是迅速将受照严重 (≥ 1 Gy)、需要尽早医学随访和治疗的人员从受照较轻的人员中区分出来，微核自动计数对人群分类诊断具有一定的适用性和优势。

该项研究表明，微核完全自动计数与人工计数具有高度相关性 ($r^2=0.917$)，不需要进行肉眼确认[87]。根据 10 个人的微核数，据通过微核自动计数获得的剂量-效应参考曲线显示，1 Gy 剂量的不确定性达 0.2 Gy。0 Gy 和 1 Gy 剂量的 95%置信区间并不重叠。在 2~3 Gy 较高剂量时也得到准确的剂量估算值。因此，微核计数系统可以区分 1、2 或 3 Gy 的照射。在该项研究中还估计，二名计数人员 12 小时轮班可以至少完成 60 份血样（120 张样片）。

总之，通过使用更多的自动操作设备可以大大提高血样的分析数目。这里，一个由经过培训的实验室组成的网络，配备类似的设备和微核分类软件，使用标准化的固定的操作程序，就能够给出可比的结果。通过这种手段，可以提高微核自动计数的工作效力，以便快速应对大规模辐射应急事件。

13.2.4. 早熟染色体凝聚检测

该方法与采用吉姆萨染色制片的自动寻找中期细胞的双着丝粒分析方法基本一致[75]。然后由操作者对图像进行肉眼计数。分析速度比完全用人工分析大约快3倍。

13.2.5. 基于易位的 FISH 分析

用 FISH 染色法对 3~4 对染色体进行染色已经取得了很大的成功[75]。开发了由一个 PC 机和一个冷 CCD 相机组成的系统。该系统基于两步方法：首先寻找荧光复染的中期细胞，随后检测全染色体涂染标记的染色体中的易位。与吉姆萨染片中疑似双着丝粒的报道一样[317]，在荧光染色的淋巴细胞标本上，从疑似易位的列表中，已经测量了类似的假阳性和假阴性率（大约 10%左右）。与普通光学显微镜筛选每张样片需要几分钟相比，荧光筛选时间需要更长：每张样片需要 25 分钟的自动聚焦，总时长要 1 小时。因此，为了增加分析速度，CCD 相机正在使用更大的集成电路块。为了检测染色体涂染，一个基于灰度值直方图结合一些形态学操作的相对简单的阈值，就可以发现标记了全染色体探针的染色体或染色体成分[318]。这一系统对于计数易位的适用性，在一个 X 射线探测导致 4 号染色体易位的研究中得到验证。自动分析和人工分析比较发现，自动分析的效率接近人工分析的 90%。

增加用一种颜色杂交的染色体数目，可以提高方法的灵敏性。不过，当涂染更多的染色体时，最终接触和/或重叠的染色体的分离过程十分重要[319]。Piper 等[320]报道了配有市售硬件和标准 Unix 工作站的荧光中期细胞寻找装置的结构。选用 1 号、2 号和 4 号三对染色体的组合探针，与人工分析进行了比较。结果表明，分析所需的时间量减少了 1/3。此外，中期细胞寻找比肉眼扫描可以发现更多的可计数细胞。计算机辅助分析还有另一个明显的好处：中期细胞的数字化图像有时可以帮助进行染色体重组分析，因为很容易再次对细胞进行复查和进一步分析。运用二元决策树进一步改善系统，用于对观察到的中期细胞进行分类，提高扫描的准确度[321]。计算机中数字化彩色图像查找的另一个优点是，可以从电子学上强化图像，以便能够比肉眼更好地识别非常小的染色体易位片段。

目前正在考虑，扩展到将染色体和着丝粒特异 DNA 库相结合，分析多色 FISH 标本，同时自动分析易位和双着丝粒。

13.3. 实验室信息管理系统（LIMS）

一个定制的市售 LIMS，对于应对由样本制备和分析数增加所带来的挑战，是一个不可缺少的工具。另外，LIMS 可以帮助保存总的实验室记录，包括人员培训、仪器校准和化学品清单等。通过 LIMS 进行电子数据管理，还可以提供一些便利，包括连接、搜寻和检索资料，并在辐射事故后迅速报告结果等。下面简要介绍几个可用的模块：

- **样品识别** — 指定专一的样品条形码识别器
- **样品运输** — 结构模板，用以输入运输期间和到达时的样品条件（例如温度记录仪的数据）。

- **实验设置** — 对任何给定样品指定的适当流程和细胞遗传学实验（例如全血培养或淋巴细胞分离；双着丝粒或 CBMN 检测）。
- **样品次序安排** — 根据事件的紧急程度和特定实验室人员的记录情况，决定样品分析的优先次序。
- **安全性** — 需要通过密码进行用户身份验证，用户可能在亚系统中被赋予不同的权限。
- **审核** — 跟踪记录和修改。
- **归档** — 保持数据库的有效运行，帮助维持纪录的完整性，确保科研数据的安全储存。
- **报告** — 产生格式化的个人案例报告，可以转达主治医生。
- **设备整合** — 可以直接从组成模块中自动收集和校对数据，减少抄写错误的风险。这有助于改善数据的准确性和一致性，对于应对大规模伤亡事件非常重要。

图 46 是一个可扩展高通量自动化细胞遗传学实验室的示意图[301、302]。

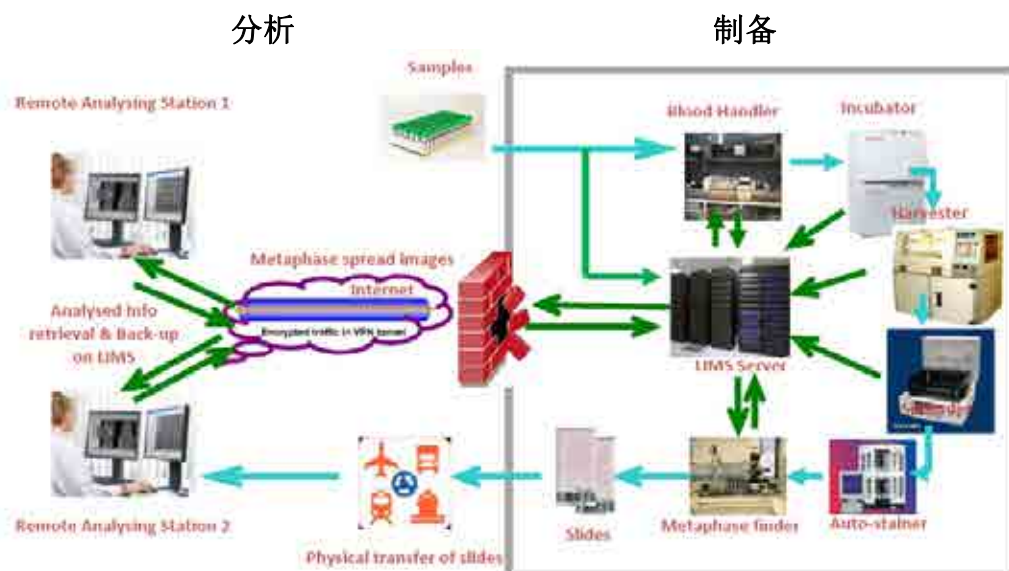


图 46. 是一个高通量细胞遗传实验室和具有信息管理系统（LIMS）网络的自动化处理系统示意图。在中心实验室制备的样片可以人工运送到计数站/实验室，或将拍摄的图像通过电子通讯安全传送到接受的实验室进行分析（由 Ramakuma 和 Prasanna 提供，AFRRI，美国）。

图例从左到右，从上到下

方框左侧：分析，远程分析站 1，样品，通过 LIMS 进行分析信息的提取与备份，中期细胞分裂相图像，互联网，虚拟专用网络加密电信量，远程分析站 2，样片的物理传输

方框右侧（内外）：样品制备，血样处理装置，培养装置，收获装置，LIMS 服务器，样片，中期细胞寻找装置，自动染色装置

14. 大规模伤亡事件

大规模伤亡事件是指损伤人数超过当地响应能力的事件[322、323]。当这类事件涉及到辐射时，其结果可能是一个大的群体受到照射，受照剂量可以从本底水平到足以引起临床后果的范围。这时需要快速估计这些人员的受照水平，以决定是否需要医学干预[4、322、324~326]。

涉及辐射的事件可能是由事故或蓄意行为所导致，二者一旦发生，都可能对公众造成伤亡。如通常的物理损伤等干扰因素也可能存在，在进行剂量估算和其他行动之前，要优先处理威胁生命的损伤[327]。

计划和准备对于有效应对大规模伤亡事件至是关重要的。在辐射应急情况下，一般公认的原则包括：a) 建立和培训地方和国家级应急队伍，配备必要的设备和物资，b) 了解并应用估算辐射损伤和剂量的适当可行的诊断方法，c) 访问回溯参考实验室，包括剂量估算的细胞遗传学生物剂量专业实验室[322、328、329]。生物剂量学“操作理念”的一个重要部分是优先筛选快速细胞遗传学分类-剂量估算的样品，这需要在医学应急人员和参考细胞遗传学生物剂量实验室之间保持动态沟通。

14.1. 潜在辐射照射事件

14.1.1. 蓄意事件

已经确定了很多可能发生的蓄意辐射事件的情景，这里分为三大类[322、324、326]。

- (a) 放射照射装置（RED）是指散布在环境中但不会造成污染威胁的密封源。靠近这类源的人可能会受到明显的局部照射，但估计受大剂量照射的人数较少。
- (b) 放射性散布装置（RDD）是用爆炸或机械装置散布放射性物质，造成放射污染。受到影响的区域相对较小，照射可能同时产生体内污染和体外污染，但辐射影响预期没有医学意义。
- (c) 简易核装置（IND）含有能够产生核爆炸的核材料。能够产生大范围的辐射和热烧伤，由大剂量照射引起大量伤亡。该类事件将会造成灾难性后果。

14.1.2. 意外事件

辐射照射可能包括但不限于下列几种情况[326]：

- (a) 在失去冷却剂的情况下，辐照过的燃料元件破损，导致反应堆应急。这类事故可能导致反应堆工作人员以及邻近的普通公民受到大剂量照射，污染会引起附近地区的公民受到低剂量照射（如切尔诺贝利事故）。

- (b) 当足够量的特殊核材料意外发生裂变，可能会导致临界事故。将导致周围人员受到高水平照射（如东海村事故）。
- (c) “孤儿源”丢失或被盗的应急事件可导致严重照射情景，其严重程度取决于放射源的活度、照射持续时间以及源的分布。这类事故会导致全身或局部大剂量照射，同样也会引起体内污染和体外污染（如戈亚尼亚事故）。

14.2. 历史经验

在最近的过去，已经有数起涉及多人伤亡的意外事故，事故发生后用细胞遗传学方法估算了生物剂量（表 17）。

表 17. 细胞遗传学生物剂量估算法在多人伤亡辐射事中的应用实例

事故时间	事故地点	涉及人数	细胞遗传学检测病例数				参考文献
			Dic	PCC	FISH	CBMN	
		>100 000	436				[342、343、344]
1986	切尔诺贝利，乌克兰		1755		97		[235、236、347]
						140 ^a	[259、260、297]
1986~1987	利洛，格鲁吉亚	11	11		4		[247]
1995	伊斯坦布尔，土耳其	21	21	10	5	10	[349]
1997	戈亚尼亚，巴西	250	129				[158]
1998	Matkhoji，格鲁吉亚	多人	85				[350]
		43	43				[333]
1999	东海村，日本			3			[351]
							[253]
							[254]
2000	曼谷，泰国	多人	28	28			[352]
2005	康塞普西翁，智利	233	45		1		[353]
2006	达喀尔，塞内加尔	63	33				[354]

^a 回顾性

事故可以具有不同特点，如短时间内突然发生的确认许多伤亡人员的事件（如切尔诺贝利事故），或者延迟发现受照人员的缓慢发展情况（如戈亚尼亚事故）。一起事故也可能只有少数几个人真正受照，甚至几乎没有体检证据支持，但是由于巨大的公众压力而将生物剂量估算扩展到周围的社会群体（例如东海村事故）。在这次事故中，国立放射线综合医学研究所（NIRS）的细胞遗传学生物剂量实验室通过对 265 位相关

人员在事故期间所在位置的调查，保证他们没有受到明显的剂量[330]。通过染色体畸变分析，还对一个铀处理厂曾通过测量 ^{24}Na 全身计数而被确认受到轻微照射的一个 43 人队列进行了剂量评价。

从历史上看，用双着丝粒分析进行细胞遗传学生物剂量估算，结合常规白细胞计数，在多人伤亡事故照射事件后可作为一种基本的剂量估算方法（表 17）。其他的细胞遗传学方法（FISH, PCC 和 CBMN）已经被用来进一步证实剂量估算，不过这些检测往往在事故发生后数月或数年才进行。

14.3. 生物剂量学的作用

14.3.1. 辐射照射评价方法

在大规模伤亡辐射事件发生后，医生主要关心的是保护生命，评估医学症状和体征，以便提供早期治疗决策。经国际专家共识评估，一些辐射照射评价是适用于早期急性辐射事件的[6、25、322、325~327、329]。在大规模伤亡辐射应急时，应该根据受辐射情景及可用的资源，实施适当的辐射评价方法。

14.3.2. 生物剂量学的操作理念

IAEA 为大规模伤亡辐射事件第一响应者的“操作概念”提供了通用导则[322、323、331]。然而，在没有专家小组进入的情况下，在大规模伤亡辐射应急中实施多参数生物剂量评价方法会造成明显混乱[322、333]。图 47 说明 REAC/TS 和 AFRRI 的处置策略和应用多参数生物剂量估算方法的操作理念[329]。

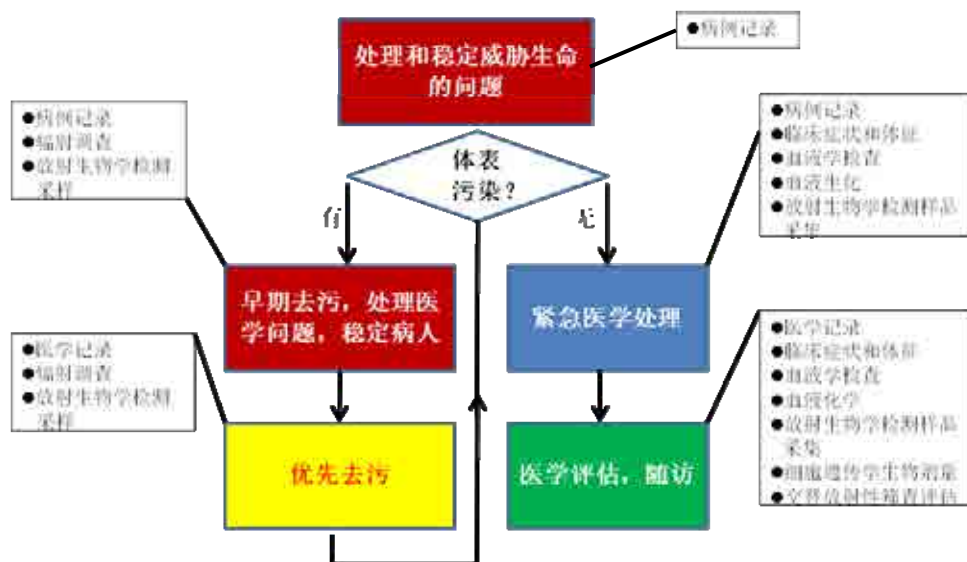


图 47. 引起创伤或疾病的辐射应急管理中的生物剂量学操作概念。示意图给出对于“放射患者处置”流程中 REAC/TS 和 AFRRI 个体化行动方案的生物剂量学作用[329]。

当前的剂量评价方法和新兴技术，提供了进行辐射损伤和剂量评价的可能。需要通过研发活动建立分类诊断的理念，推动生物剂量学操作理念在大规模伤亡事件中的应用[329]。早期筛选辐射检测必须是快速的（每分钟或更短时间内完成一次检测），必须使用手持式装置，更理想的是进行自行测试。第二级和第三级的辐射检测可能需要更专业的方法和较长的时间（>1 天），但有更高的辐射明确性。

一旦确认为可能受照，建议对患者进行生物剂量检测，证实其是否受照并确定剂量水平。在辐射应急的早期响应阶段，细胞遗传学分类的最初目的是，为每个指定患者进行快速剂量估算，为早期临床评价提供支持。尽管这些初期的剂量估算可能不十分准确，但目的是将患者迅速分为 4 个剂量范围（1~2 Gy，2~4 Gy，4~6 Gy 和 >6 Gy），为医疗机构及时提供可以利用的信息，以便对患者进行处置[4]。在这一阶段，也可以排除由于呕吐等症状造成的假阳性病例。同时也可以找出局部照射病例。

一旦经过需要快速分类剂量检测的初始紧急期后，就可以对那些被确定为受到显著剂量的患者做进一步分析，以提供更为准确的剂量估算。

在应急情况过去之后，在对受照人员更为准确剂量估算完成后，将继续对那些受到极低剂量或未受照射但仍需再次确认的人群做进一步随访。此外，还需要应用 FISH 等其它技术进行流行病学随访研究。

14.3.3. 与医疗机构的交流

医疗机构和生物剂量实验室之间的交流是必不可少的。对医疗信息的保密应当给予应有的注意[3、4]。来自医疗机构的任何信息都是非常有用的，有助于生物剂量学家选择样品。同样重要的是，生物剂量实验室要将信息及时反馈回医疗机构，这将有助于他们对患者的治疗方案做出决定。这种保持不断交流的要求，突出地反映了在应急事件响应期间进行样本跟踪的重要性。必须要有一个独特的、建立完好的、文字记录的样品编码系统（如第 13.4 节介绍的 LIMS），这样可以采集、处理、分析和报告等各环节对样品进行跟踪，并反馈给医疗机构。细胞遗传学实验室用盲法对血样进行检测，而医学专家则按姓名进行相关工作。实验室需要确定人员，负责从 LIMS 或类似文件中提取信息，与医疗专业人员交流。这些人必须对样品解码，以便能够与医生进行交流，因此可能不参与样品计数。

14.4. 应对大规模伤亡的现有策略

14.4.1. 分类诊断计数

快速分类诊断计数适用于生物剂量学所用的几种细胞遗传学检测方法。已经确定，双着丝粒分析只需计数 50 个细胞（或 30 个双着丝粒体），足以获得为医疗机构提供有用剂量估算的准确结果。该计数方法将提供 1 Gy 以内的剂量估算[332、333]。与计数 500 或 1000 个细胞的全部双着丝粒相比，这种分类方法将检测数目提高达 20 倍。为了进一步提高分析速度，Flegal 等介绍了一种快速扫描法，只要细胞看上去是完

整的，即对其中的染色体畸变进行计数，而不需要保证是 46 条染色体。这一计数方法将显微镜分析时间减少到原来的 1/6 [334]。

对于大规模伤亡事件，PCC 尤其适用于大剂量照射。已经证明，PCC-环法适用于 6 Gy 以上剂量的分类诊断剂量检测，可检测 300 个 PCC 细胞或 50 个环[335]。但是该方法在低剂量范围有一定的局限性。

分类诊断计数也可用于 CBMN 检测。对于标准的生物剂量检测，建议计数 1000 个双核细胞。不过，最近已经证实，计数 200 个双核细胞就可以识别 1 Gy 以上的剂量 [335]。计数 200 个双核细胞大约需要 15 分钟的时间，明显比分类诊断双着丝粒计数要快，而且还略快于快速扫描法。该法的另一个优点是，计数所需的专业知识和培训要比双着丝粒分析所需要的少得多，所以在大规模伤亡情况下可以快速培训出计数人员。

14.4.2. 自动化

在第 13 章中已经详细讨论了自动化。显然，自动化可以提高检出通量，释放人力资源去完成大规模伤亡事件中的其他任务。自动化过程包括血样处理、中期细胞收获、中期细胞寻找和双着丝粒或微核计数等。

14.4.3. 网络

许多国家已经建立了参考专业细胞遗传学生物剂量实验室。最近，其中一些实验室已经建立了国家和地区的网络，以增强它们的检测能力[118、337、338]。其他实验室已经综合了各自国家的资源和能力，旨在形成一个地区网络[339]。在生物剂量学领域提供国际合作的联合国机构（IAEA，WHO）也已经建立了细胞遗传学实验室网络 [340、341]（表 18）。极少数国家拥有一个以上的细胞遗传学实验室，能够承担生物剂量学的主要功能。不过在其他研究院所，特别是在医院的临床遗传学部门，可能具有许多细胞遗传学专业技能。国家网络（例如法国，韩国，日本，加拿大）已经实施了包括培训在内的安排，通过这种安排，在专业的参考生物剂量学实验室领导下，这专业技能可以被迅速调动起来。无论是国家网络还是国际网络，都需要后勤基础设施、数据管理和通信的协调。这些网络也为演练和比对研究提供了极好的平台，确保了各实验室和细胞遗传学生物剂量检测网络的适当运行。通过细胞遗传学网络，可以提高在大规模伤亡辐射事件中应用细胞遗传学分析，进行分类诊断剂量评价和参考剂量评价的能力。

表 18. 现有的生物剂量学网络汇总

地点	名称	领导者	参加者 (数量或名称)	² 在用的分析方法
国际的	响应和援助网络 (RANET)	IAEA	不断变化 ⁴	DCA, FISH, PCC, CBMN
世界范围	生物剂量网络	WHO	63	DCA, FISH, PCC, CBMN
欧洲	三国组成	根据事件发生地确定	³ 英国、法国、德国	DCA, FISH, PCC, CBMN
拉丁美洲国家的	拉丁美洲生物剂量学网络	¹ 阿根廷 — 核监管局和古巴 — 放射防护与卫生中心	阿根廷(2)、巴西、智利、古巴、墨西哥、秘鲁、乌拉圭	² DCA, FISH, CBMN
加拿大	细胞遗传学应急网络	加拿大卫生部	4 个参考实验室 18 个卫星实验室	DCA, FISH, CBMN
法国	生物剂量学网络	辐射防护和核安全研究所 (IRSN)	二个来自 CEA 的实验室, 一个来自 MNHN 的实验室	DCA, FISH, PCC
日本	染色体网络	国立放射线综合医学研究所 (NIRS)	7	DCA, PCC, FISH
韩国	韩国放射生物剂量学网络	韩国放射与医学研究所	6	DCA, FISH, PCC, CBMN

1. 在参与国之间每两年轮换一次领导者

2. DCA 是为共同合作而应用的技术, FISH、PCC、CBMN 至少在某些网络合作伙伴中建立

3. 共同领导

4. 广泛的援助和响应网络的一部分

15. 质量管理和 ISO 标准

15.1. 质量保证和质量控制体系的基本理论

本出版物已经证实，对于生物剂量估算没有统一采用的细胞遗传学检测步骤。实验室采用的方法大体上相似，但从细节上考虑，会有方法上的差别，可能会影响到分析结果。所以，希望每一个服务实验室都能制定质量大纲，确保检测步骤的可靠性、准确性和重复性。

为了在较长时期内确保生物剂量学实验室的产品质量，实验室的生产过程必须牢固地建立在科学原则、方法验证和结果检验之上。一套完整的质量大纲可以为实验室产品的质量提供保障策略，无论是检测还是服务。此外，这些能力还需要与其他已经认证的、或有适当资质的、细胞遗传生物剂量学实验室的能力进行定期比对、包括实验过程的持续稳定性、以及对于最终产品定其评估，以确认是否符合预期标准。

根据内部质量保证大纲，在标准文件的指导下操作，定期同行评估和质量记录程序可保证正式的能力评估之间的稳定操作。

内部质量保障大纲必须对项目评估、适当的操作环境、人员资质、操作手册、仪器仪表、刻度校准、数据简化、记录系统和数据报告等做出规定。对于能力评估之间的细胞遗传学过程进行控制，可以再次保障最终产品有可靠的质量。采用全面的质量管理方法将会保证操作过程的不断改善。

能力测试可定期评估与其他认证的、或有适当资质的、细胞遗传学生物剂量学实验室之间的检测一致性，（详见附件 VII），并对实验室及其能力进行测试，以证实这些实验室是否有能力提供高质量产品和服务，即剂量估算。一个基本要素是在规定的准确度范围内成功完成测试。此外，这种检测过程能过用于验证实验室的服务或产品的质量。具体到生物剂量领域，可以采用下面两种方法对检测能力进行测试：1) 在照射剂量、剂量率和辐射品质已知的情况下对样品进行离体照射，再将样品送到服务实验室进行分析；2) 样品送到其它认证的或有适当资质的实验室进行分析，并在多个实验室之间进行比对。在这两种情况下，要进行样品分析，将本实验室得到的数据与服务实验室得到的数据进行比对。之后，报告会给出实验室之间结果差异的百分比。直接测试是针对实验室检测能力进行的测试。另一方面，当实验室检测自己的产品，同时将一份相同样品送至测试实验室进行确认性和明确的回溯性测量时，两个实验室的分析过程和检测能力均得到了测试。

将所有这些质量保证措施相结合，可以保证实验室检测和服务的质量和完整性。在这些措施中，必须着重强调有力的内部质量保障大纲，积极的、深入现场的专家评估，严格遵守操作文件标准，和实验室“盲测”评估。这些方面的结合可以确保分析

过程控制在规定的精确目标内。虽然最终产品的定期评估是必不可少的（如 1~3 年之间），但是如果能够将分析过程保持在可控范围内，则评估频度可以减到最小。

承担生物剂量学服务的实验室的质量保证计划应包括以下内容：

- 样品确认和制备
- 程序或方法的有效性确认
- 检测
- 数据简化
- 文件编制

质量保证计划应当包括系统的行动，以便可以充分相信检测和程序可以得到满意的实施。

国际标准化组织（ISO）是制定与编写这样一套共同规则的合适环境。ISO 制定标准所依据的一般原则是自愿的、一致同意的和涵盖全行业的。此外，每一个标准草案都要接受专家工作组的同行审议，然后由参与国通过派往 ISO 的国家代表予以审议。标准出版后可以直接使用，也可以照搬为国家标准实施。生物剂量学标准化工作组的创建是于 1998 年提出的，后于 1999 年被 ISO 接受，下设于第 85 委员会（核能委员会）第 2 分委员会（辐射防护分会）。工作组成员包括来自 11 个国家的 13 名专家和 1 名 IAEA 代表。2004 年发布的 ISO 19238 号文件为服务实验室用细胞遗传学进行生物剂量测定提供了标准文件[3]。

15.2. ISO 19238 号文件结构[3]

在现行的版本中，该文件分为 11 章及 4 个信息附件。

该文件的主要特点如下：

- (a) 有关下述内容的个人信息保密性：
 - (i) 有关患者或过量照射情况的保密资料从代表患者的医生（或患者本人）到实验室之间的传递。
 - (ii) 血液样品的匿名性及结果和报告的保密性。
 - (iii) 实验室内部的保密协议。
- (b) 实验室工作人员在处理可能感染的血样时诱发的潜在风险。虽然这个问题并不是生物剂量学所特有的，但是必须强调微生物、化学及光学的最低安全要求。

- (c) 在服务实验室内至少建立一条合适的刻度曲线，这是进行剂量估算的必备条件。特别是，建立这条曲线所用的方法必须与该实验室进行全部剂量估算所用的方法相同。报告必须包括刻度曲线拟合的条件，例如，源的特性、源的物理刻度、剂量范围和最小探测限。
- (d) 尽管服务实验室并不控制某些条件，比如所取血样的质量及运送，但是服务实验室在收到样品后必须对样品和剂量估算值进行充分处理，最后，还要对有资质的专家审核和签署的报告进行充分处理。
- (e) 通常情况下，实验室的报告应该再现委托人提供的所有相关信息，因为它可以影响结果的解释。必须列出所有观察到的畸变，并根据辐射诱发染色体畸变形成的机理进行解释。
- (f) 服务实验室的质量保证计划应该包括内部程序，确保操作的长期准确性和稳定性、定期的同行评估、及与外部参考程序的交叉刻度。强调包括下列多种要素：样品的识别和制备、程序或方法的验证、测量与仪表、数据解释、记录保存和文件制备。

15.3. 在人群分类诊断中的应用

在第 14 章中已经讨论过，事故和蓄意行为导致大规模伤亡的核与辐射应急的可能性是随时存在的。这种事件发生后，要根据人员过量照射的前驱症状和体征以及他们参与应急活动的信息，对受照人员进行临床评估和分类。在辐射应急的早期响应阶段，为了对人员伤亡的早期临床分类进行补充，还需要进行细胞遗传学分类诊断，即利用染色体损伤快速近似地估算个体所受的辐射剂量。

然而随着时间推移，临床医生需要更准确的剂量估算，无论是在诱发晚期随机效应风险的低剂量区，还是在预测严重组织反应的高剂量区。细胞遗传学的二次检查应该实现更为精确的定量的剂量估算，并查找不均匀照射的任何证据。

然而，事件可能会超出事故当地生物剂量学实验室的资源，需要网络内其他实验室的参与（第 14.5.3 节）。一些生物剂量学实验室已经独立成功完成了在大规模伤亡应急或演练中的快速剂量估算。他们的方法主要基于双着丝粒分析，包括前期准备、试剂储存、简化的样品处理、自动分析、计数标准以及与其他专业实验室的网络合作。根据 ISO 19238 号文件的原则[3]，为了满足快速响应和剂量估算的需求，在某种程度上偏离精确操作方法是可行的。

基于这种经验，2008 年出版的新标准 ISO 21243 规定了“用于核与辐射应急中大规模伤亡评价的细胞遗传分类诊断实验室的操作准则：一般原则及在双着丝粒分析中的应用”[4]。

该标准是按照生物剂量学分类诊断操作步骤编写的。其中，检测的标准通常取决于结果的应用：适当的医学管理、辐射防护管理、记录保存、及医学和法律要求。例

如，应当分析选定的病例，以便更准确地估算大剂量局部照射；其次，应当采用 ISO 19238 标准对低于确定性效应阈值的受照人员进行剂量估算。

ISO 21243 标准的内容概括如下：

(1) 事件发生前，每个实验室负责：

- (a) 保持所需试剂及其他实验消耗品的储备，或者能够立即从地方、州（省）或国家储备中或供应商处获得。
- (b) 保持与地方、州、联邦医疗机构的既定通讯联系。
- (c) 明确并记录每个对应急生物剂量响应质量有影响的实验室人员的责任、作用及相互之间的关系。
- (d) 了解处理标本的最大能力（时间与数量）。
- (e) 维护实验室内部的质量控制和质量保证大纲。
- (f) 适当参加相关的教育、培训和演练活动。
- (g) 参加实验室间的定期比对研究。

(2) 事件过程中：

- (a) 当待检病例数超过实验室自身检测能力时，负责剂量估算的参考实验室请求网络实验室协作。
- (b) 一旦作出启动实验室网络的决定，参考实验室就成为网络之间联系的核心。参考实验室向合作伙伴通报事件情况，一同确定合作内容。
- (c) 按照医生要求，进行细胞遗传学检查和剂量估算。受检病例的选择应由细胞遗传学剂量估算专家、现场管理人员和医生讨论后决定。
- (d) 参考实验室和网络实验室讨论生物剂量测定的分工细节。
- (e) 采集血样之前，每个受检者或治疗医师必须提交知情同意书。整个过程中要注意保护个人隐私。
- (f) 参考实验室组织血样采集，并将血样分配给合作实验室，或者指定其他合适的机构接管。
- (g) 计数结果（有时为剂量估算结果）需要由一个以上的实验室核对，根据核对后的结果对每个人进行剂量估算。

- (h) 合作实验室应将原始数据送往参考实验室，其中包括染色体畸变分数数据。并将本实验室的、根据最适宜于给定射类型辐的刻度曲线得到的、剂量估算值送往参考实验室，对于迁延照射和不均匀照射做适当调整。
- (i) 参考实验室接受来自网络合作实验室的结果，担当与医生交流和联络的中心点。
- (j) 经过与医疗人员审核后，可挑选出一些病例，增加细胞计数，以改善剂量估算值的统计不确定度，更好地区分不均匀过量照射。进一步的检查应该按照 ISO 19238 标准所述操作规则进行。

根据这些不同的配置，下面流程图（图 48）描绘了参考实验室、网络和医疗机构之间的相互关系。

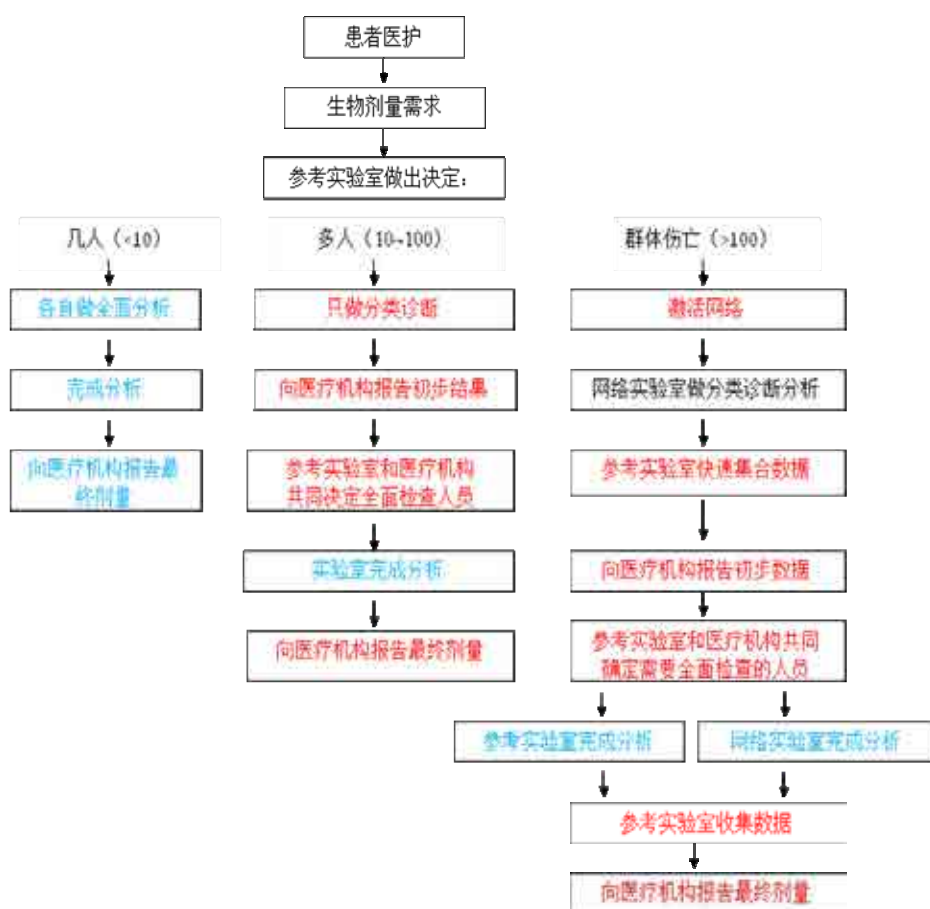


图 48. 参考生物剂量学实验室、网络和医疗机构之间的相互关系流程图。分别表示少数人员剂量估算过程（ISO 19238 标准，蓝色[3]）和大量人员剂量评价过程（ISO 21243 标准，红色[4]）。（经 AFNOR 代表 ISO 许可，本图复制于 ISO 21243: 2008 标准，版权归 ISO 所有）。

16. 实验室工作人员安全

“实验室生物安全”是一个用来描述为了防止意外暴露于病原体、毒物或其事故释放而实施的包封原则、技术和实践的术语。近期发生的全球事件，已经凸显保护实验室及室内物质不受故意损害，避免危害人、牲畜、农业和环境的必要性。因此，有必要引进实验室生物安保措施，加强生物安全。

“实验室生物安保”描述的是对实验室内有价值的生物物质实施防护、控制和责任追究，防止未经许可获得，丢失，盗窃，滥用，转移或故意释放这些物质[355]。

关于细胞遗传学实验室，《世界卫生组织实验室生物安全手册》及其附属文件《生物危险管理：实验室生物安保导则》中提出了实验室生物安全和生物安保，比如，实验室设计和设施、设备（如生物安全柜）、安全工作实践、职业卫生和医疗监督、消毒和灭菌、废物处置、化学品暴露、防火、及电气、辐射和设备安全等。这些信息完全适用于，而且特别有益于细胞遗传学实验室的运行[355, 356]。

除了指导文件外，工作人员还应该遵守国家和组织机构关于实验室安全可靠工作实践的法律和规定。

下面是一些需要强调的与细胞遗传学实验室安全相关的特别措施。

16.1. 感染

处理人类血样时，始终应该应用和采用一般的预防措施，所有的样品都应该认为是有可能感染的。样品应在使用维护得当、经过认证的生物安全柜中打开和操作。

应该限制使用注射器针头等尖锐物，减少被刺伤的危险。污染的尖锐物应放置在防刺穿的带盖容器内，作为废物处理。在样品处理后，应该用适当的消毒剂处理洒出的液滴，对操作面和设备进行去污。所有的生物废弃物和使用过的一次性塑料制品都应该在废物处理前进行消毒处理，比如，高压灭菌。如果要将感染性废物从实验室送去去污和处置，必须按照适用的国家或国际法规，用密封和防漏的容器进行运输[356]。

如果一种特定的疫苗或类毒素在当地获准使用，那么在对可能的照射进行适当的风险评估和个人临床健康评价后，可以提供[356]。

16.2. 光照

对于某些操作环节，必须用到紫外线灯。

生物安全柜中不需要使用紫外线灯。如果要用，必须经常清洁，去除灰尘和污垢，保证灯的杀菌效果。在使用紫外线灯的地方，如果室内有人，则应该关闭紫外线灯，防止眼睛和皮肤受到意外照射[356]。

在 FPG 染色过程中使用紫外灯照射玻片时，屏蔽措施和工作程序应当到位，避免对实验室工作人员眼睛和皮肤的直接照射。

荧光显微镜正常使用期间，在设计上是自身安全的。

16.3. 化学药品

在本出版物包括的操作程序中，常规使用一些精制化学品和药物。关于有害化学品和化学安全性的更多信息，可见 WHO《实验室生物安全手册》第 VI 部分[356，第 VI 部分]，其中列出了化学品的详细清单，详述了它们的危害和使用注意事项。

细胞培养和染色过程中使用的化学品和药物，绝大多数用量很小并经过稀释，一般不存在健康危害。但是，这些化学药物质是以浓缩贮存液存在和储存的。关心的主要试剂及其国际认可风险值（R 值）列于表 19。

实验室中的化学品保存量应该限制在每日必需用量。大量的贮存液应该放在专门设计的房间或建筑物中。

化学品不能按照字母顺序存放！[356]

表 19. 生物剂量学实验室主要相关试剂及其国际认可风险值

试剂	风险值（R 值 ^a ）
醋酸	10; 25
吖啶橙	36; 37; 38
氢氧化钡	20; 22; 34
氨苄青霉素	42; 43
溴脱氧尿嘧啶（BrdU）	20; 21; 22; 46; 61
花萼海绵诱癌素 A	23; 24; 25; 38
秋水仙胺	25; 63
松胞素 B	26; 27; 28; 63
DAPI	36; 37; 38
二甲基亚砷（DMSO）	36; 37; 38
福尔马林	23; 24; 25; 34; 40; 43
甲酰胺	37; 38; 47; 61
吉姆萨染液	20; 21; 22; 40; 41
肝素	36; 37; 38
Hoechst 染液	23; 24; 25; 36; 37; 38
盐酸	34; 37
泛影葡胺	42; 43
甲醇	11; 23; 24; 25; 39
冈田酸	23; 24; 25; 38
胃蛋白酶	36; 37; 38; 42

试剂	风险值 (R 值 ^a)
植物血凝素 (PHA)	20; 21; 22; 38
RNA 酶 A	20; 21; 22; 38
氢氧化钠	35
硫酸链霉素	20; 21; 22; 61
二甲苯	10; 20; 21; 38

^a R10: 易燃

R11: 高度易燃

R20: 吸入有害

R21: 皮肤接触有害

R22: 吞食有害

R23: 吸入毒性

R24: 皮肤接触毒性

R25: 吞食毒性

R26: 吸入极毒

R27: 皮肤接触极毒

R28: 吞食极毒

R34: 引起烧伤

R35: 引起严重烧伤

R36: 刺激眼睛

R37: 刺激呼吸系统

R38: 刺激皮肤

R39: 非常严重的不可逆损伤的危险

R40: 可能引起不可逆效应的危险

R41: 严重眼损伤的风险

R42: 吸入可能引起过敏反应

R43: 皮肤接触可能引起过敏反应

R46: 可能引起遗传基因损伤

R61: 可能引起胎儿伤害

R63: 对胎儿可能造成危害的风险

参 考 文 献

- [1] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment, Technical Reports Series No. 260, IAEA, Vienna (1986).
- [2] TURAI, I., The IAEA's co-ordinated research project on biodosimetry, 1998– 2000, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **52** (2000) 1113–1116.
- [3] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, Radiation Protection-Performance Criteria for Service Laboratories Performing Biological Dosimetry by Cytogenetics, ISO 19238, ISO, Geneva (2004).
- [4] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, Radiation Protection-Performance Criteria for Laboratories Performing Cytogenetic Triage for Assessment of Mass Casualties in Radiological or Nuclear Emergencies-General Principles and Application to Dicentric Assay, ISO 21243, ISO, Geneva (2008).
- [5] FENECH, M., et al., HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutat. Res.* **534** (2003) 65–75.
- [6] ROJAS-PALMA, C., et al. (Eds) TMT Handbook, Triage, Monitoring and Treatment of People Exposed to Ionizing Radiation Following a Malevolent Act, Lobo Media AS, Norway (2009).
- [7] BERTHO, J.M., et al., New biological indicators to evaluate and monitor radiation-induced damage: an accident case report, *Radiat. Res.* **169** (2008). 543–550
- [8] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. A Manual, Technical Reports Series No. 405, IAEA, Vienna (2001).
- [9] HUBBLE, J.H., Photon mass attenuation and energy — Absorption coefficients from 1 keV to 20 MeV, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **33** (1982) 1269–1290.
- [10] GRAY, L.H., An ionization method for the absolute measurement of gamma- ray energy, *Proc. Soc. Lond.*, **A156** (1936) 578–596.
- [11] DENG, W., MORRISON, D.P., GALE, K.L., LUCAS, J.N., Biological dosimetry of beta-ray exposure from tritium using chromosome translocations in human lymphocytes analyzed by fluorescence in situ hybridization, *Radiat. Res.* **150** (1998) 400–405.
- [12] INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS, Quantities and Units in Radiation Protection Dosimetry, ICRU Rep. **51** (1993).
- [13] STRAUME, T., High-energy gamma rays in Hiroshima and Nagasaki: Implications for risk and WR, *Health Phys.* **69** (1995) 954–956.

- [14] SCHMID, E., BAUCHINGER, M., LET dependence of dicentric yields in human lymphocytes induced by low doses of sparsely ionizing radiations and its implication for risk assessments, *Health Phys.* **74** (1998) 719–721.
- [15] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, WORLD HEALTH ORGANIZATION, Generic procedures for medical response during a nuclear or radiological emergency, EPR-MEDICAL, IAEA, Vienna (2005).
- [16] LEA, D.E., *Actions of Radiation on Living Cells*, 2nd edn, Cambridge University Press, Cambridge, UK (1956).
- [17] GOODHEAD, D.T., The initial physical damage produced by ionizing radiations, *Int. J. Radiat. Biol.* **56** (1989) 623–634.
- [18] EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., PURROTT, R.J., “Dicentric chromosome aberration yield in human lymphocytes and radiation quality. A resume including recent results using alpha particles”, *Microdosimetry (Proc. 7th Symp. Harwood Academic, Oxford, 1980)*, Vol. 2 (BOOZ, J., EBERT, H.G., HARTFIEL, H.D., Eds), Harwood Academic Publishers, Brussels and Luxembourg (1981) 1263–1273.
- [19] INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION, The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection, (Publication 103) *Ann. ICRP Vol. 37*, (2007).
- [20] NOWELL, P.C., Phytohemagglutinin — An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes, *Cancer Res.* **20** (1960) 462–466.
- [21] CARSTAIRS, K., The human small lymphocyte — its possible pluripotential quality, *Lancet* (1962) 829–832.
- [22] WUESTERMANN, P.R., CRONKITE, E.P., Physiological and pathophysiological aspects of the immune system contributing to a biomathematical model of lymphocytes, *Stem Cells* **13** Suppl. 1 (1995) S268– S275.
- [23] CHENG, C. K-W., CHAN, J., CEMBROWSKI, G.S., VAN ASSENDELFT, O.W., Complete blood count reference interval diagrams derived from NHANES III: Stratification by age, sex, and race, *Lab. Haematol.* **10** (2004) 42–53.
- [24] DAINIAK, N., WASELENKO, J.K., ARMITAGE, J.O., MacVITTEE, T.J., FARESE, A.M., The hematologist and radiation casualties, *Hematology*, **2003** (2003) 473–496.
- [25] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Diagnosis and Treatment of Radiation Injuries*, Safety Report Series No. 2, IAEA, Vienna (1998).
- [26] McLEAN, A.R., MICHIE, C.A., In vivo estimates of division and death rates of human T lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92** (1995) 3707–3711.
- [27] BOGEN, K.T., Reassessment of human peripheral T-lymphocyte life span deduced from cytogenetic and cytotoxic effects of radiation, *Int. J. Radiat. Biol.* **64** (1993) 195–204.

- [28] OBE, G., BEEK, B., DUDIN, G., The human leukocyte test system: V. DNA synthesis and mitoses in PHA-stimulated 3-day cultures, *Humangenetik* **28** (1975) 295–302.
- [29] PAULSON, J.R., LAEMMLI, U.K., The structure of histone-depleted metaphase chromosomes, *Cell* **12** (1977) 817–828.
- [30] CREMER, C., et al., Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations, *Mutat. Res.* **366** (1996) 97–116.
- [31] SCHAFFER, L.G., TOMMERUP, N. (Eds), Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN, Karger, Basel (2005).
- [32] MORTON, N.E., Parameters of the human genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88** (1991) 7474–7476.
- [33] CARRANO, A.V., Induction of chromosomal aberrations in human lymphocytes by X rays and fission neutrons: Dependence on cell cycle stage, *Radiat. Res.* **63** (1975) 403–421.
- [34] MÜLLER, H.J., Artificial transmutation of the gene, *Science* **66** (1927) 84–87.
- [35] PAINTER, T.S., MÜLLER, H.J., Parallel cytology and genetics of induced translocations and deletions in *Drosophila*, *J. Hered.* **20** (1929) 287–298.
- [36] SAX, K., Types and frequencies of chromosomal aberrations induced by X- rays, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **9** (1941) 93–103.
- [37] REVELL, S.H., “A new hypothesis for chromatid exchanges”, *Radiobiology* (Proc. Symp. Liège, 1954), Butterworths, London (1955) 243–253.
- [38] CHADWICK, K.H., LEENHOUTS, H.P., The rejoining of DNA double- strand breaks and a model for the formation of chromosomal rearrangements, *Int. J. Radiat. Biol.* **33** (1978) 517–529.
- [39] MOZUMDER, A., MAGEE J.L., Model of tracks of ionizing radiations for radical reaction mechanisms, *Radiat Res.* **28** (1966) 203–14.
- [40] GEORGAKILAS, A.G., Processing of DNA damage clusters in human cells: current status of knowledge, *Mol. Biosyst.*, **4** (2008) 30–35.
- [41] JAEA R&D REVIEW, Dependency of yield of DNA damage refractory to enzymatic repair on ionization and excitation density of radiation – Exploring the induction mechanism of clustered DNA damage, (2007), http://jolifukyu.tokai-sc.jaea.go.jp/fukyu/mirai-en/2007/6_5.html
- [42] WARD, J.F., DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities, mechanisms of formation and repairability, *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **35** (1988) 95–135.
- [43] RYDBERG, B., Radiation-induced DNA damage and chromatin structure, *Acta Oncol.* **40** (2001) 682–685.

- [44] FORTINI, P., DOGLIOTTI, E., Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short and long-patch repair subpathways, *DNA Repair* **6** (2007) 398–409.
- [45] CALDECOTT, K.W., Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin, *DNA Repair* **6** (2007) 443–453.
- [46] IDE, H., et al., Repair of DNA-protein crosslink damage: Coordinated actions of nucleotide excision repair and homologous recombination, *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)* **52** (2008) 57–58.
- [47] JEGGO, P.A., LÖBRICH, M., Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability, *DNA Repair* **5** (2006) 1192–1198.
- [48] WYMAN, C., KANAAR, R., Homologous recombination: down to the wire, *Curr. Biol.* **14** (2004) R629–R631;
- [49] HEFFERIN, M.L., TOMKINSON, A.E., Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining, *DNA Repair* **4** (2005) 639–648.
- [50] ROTHKAMM, K., KRÜGER, I., THOMPSON, L.H., LÖBRICH, M., Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle, *Mol. Cell. Biol.* **23** (2003) 5706–5715.
- [51] SASAKI, M.S., Advances in the biophysical and molecular bases of radiation cytogenetics, *Int. J. Radiat. Biol.* **85** (2009) 26–47.
- [52] SAVAGE, J.R.K., Annotation: Classification and relationships of induced chromosomal structural changes, *J. Med. Genet.* **13** (1976) 103–122.
- [53] EVANS, H.J., Chromosome aberrations induced by ionizing radiations, *Int. Rev. Cytol.* **13** (1962) 221–321.
- [54] MESTRES, M., et al., Analysis of alpha-particle induced chromosome aberrations in human lymphocytes, using pan-centromeric and pan-telomeric probes, *Int. J. Radiat. Biol.* **80** (2004) 737–744.
- [55] BENKHALED, L., et al., Analysis of gamma-rays induced chromosome aberrations: a fingerprint evaluation with a combination of pan-centromeric and pan-telomeric probes, *Int. J. Radiat. Biol.* **82** (2006) 869–875.
- [56] GEBHART, E., Double minutes, cytogenetic equivalents of gene amplification in human neoplasia: a review, *Clinical and Translational Oncology* **7** (2005) 477–485.
- [57] BLOOM, A.D., NEEL, J.V., CHOI, K.W., IDA, S., CHAGNON, N., Chromosome aberrations among the Yanomama Indians, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66** (1970) 920–927.
- [58] AWA, A.A., NEEL, J.V., Cytogenetic “rogue” cells: what is their frequency, origin and evolutionary significance? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (1986) 1021–1025.
- [59] SEVAN’KAEV, A.V., et al., Rogue cells observed in children exposed to radiation from the Chernobyl accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **63** (1993) 361–367.

- [60] NEEL, J.V., AWA, A.A., KODAMA, Y., NAKANO, M., MABUCHI K., Rogue lymphocytes among Ukrainians not exposed to radioactive fall-out from the Chernobyl accident: the possible role of this phenomenon in oncogenesis, teratogenesis and mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1992) 6973– 6977.
- [61] NEEL, J.V., et al., Hypothesis: “rogue cell”-type chromosomal damage in lymphocytes is associated with infection with the JC human polyoma virus and has implications for oncopenesis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93** (1996) 2690–2695.
- [62] FOMINA, J., DARROUDI, F., BOEI, J. J., NATARAJAN, A.T., Discrimination between complete and incomplete chromosome exchanges in X-irradiated human lymphocytes using FISH with pan-centromeric and chromosome specific DNA probes in combination with telomeric PNA probe, *Int. J. Radiat. Biol.* **76** (2000) 807–813.
- [63] BUCKTON, K.E., SMITH, P.G., COURT BROWN, W.M., “The estimation of lymphocyte lifespan from studies on males treated with X-rays for ankylosing spondylitis”, *Human Radiation Cytogenetics (Proc. Conf. Edinburgh, 1966)* (EVANS, H.J., COURT BROWN, W.M., McLEAN, A.S., Eds), North-Holland, Amsterdam (1967) 106–114.
- [64] EDWARDS, A.A., et al., Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry applications, *Radiat. Prot. Dosim.* **113** (2005) 396–402.
- [65] DURAN, M., BARQUINERO, J.F., CABALLIN, M.R., RIBAS, M., BARRIOS, L., Persistence of radiation-induced chromosome aberrations in a long-term cell culture, *Radiat. Res.* **171** (2009) 425–437.
- [66] PANTELIAS, G.E., MAILLIE, H.D., A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol, *Somat. Cell. Genet.* **9** (1983) 533–547.
- [67] PANTELIAS, G.E., MAILLIE, H.D., The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry, *Radiat. Res.* **99** (1984) 140–150.
- [68] KANDA, R., HAYATA, I., LLOYD, D.C., Easy biodosimetry for high-dose radiation exposure using drug-induced, prematurely condensed chromosomes, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 441–446.
- [69] DURANTE, M., FURUSAWA, Y., GOTOH, E., A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosome analysis in biodosimetry, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 457–462.
- [70] VYAS, R.C., DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., Radiation-induced chromosomal breakage and rejoining in interphase-metaphase chromosomes of human lymphocytes, *Mutat. Res.* **249** (1991) 29–35.
- [71] PANTELIAS, G.E., MAILLIE, H.D., Direct analysis of radiation induced chromosome fragments and rings in unstimulated human peripheral blood

- lymphocytes by means of the premature chromosome condensation technique, *Mutat. Res.* **149** (1985) 67–72.
- [72] DARROUDI, F., FOMINA, J., MEIJERS, M., NATARAJAN, A.T., Kinetics of formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes, using PCC and FISH, *Mutat. Res.* **404** (1998) 55–65.
 - [73] WALDREN, C.A., JOHNSON, R.T., Analysis of interphase chromosome damage by means of premature chromosome condensation after X and UV irradiation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71** (1974) 1137–1141.
 - [74] GOTOH, E., DURANTE, M., Chromosome condensation outside of mitosis: mechanisms and new tools, *J. Cell Physiol.* **209** (2006) 297–304.
 - [75] BLAKELY, W.F., PRASANNA, P.G.S., KOLANKO, C.J., PYLE, M.D., MOSBROOK, D.M., LOATS, A.S., RIPPEON, T.L., LOATS, H., Application of the premature chromosome condensation assay in simulated partial-body radiation exposures: evaluation of the use of an automated metaphase-finder, *Stem Cells Suppl.* **1** (1995) S223–S230.
 - [76] PRASANNA, P.G.S., ESCALADA, N.D., BLAKELY, W.F., Induction of premature chromosome condensation by a phosphatase inhibitor and a protein kinase in unstimulated human peripheral blood lymphocytes: a simple and rapid technique to study chromosome aberrations using specific whole-chromosome DNA hybridization probes for biological dosimetry, *Mutat. Res.* **466** (2000) 131–141.
 - [77] PRASANNA, P.G.S., BLAKELY, W.F., “Premature chromosome condensation in human resting peripheral blood lymphocytes for chromosome aberration analysis using specific whole-chromosome DNA hybridization probes”, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 291 *Methods in Molecular Biology* (KEOHAVONG, P., GRANT, S.G., Eds), Humana Press, Totowa, NJ (2004) 49–57.
 - [78] PATHAK, R., RAMAKUMAR, A., SUBRAMANIAN, U., and PRASANNA, P.G.S., Differential radio-sensitivities of human chromosomes 1 and 2 in interphase- and metaphase–spreads after ^{60}Co γ -irradiation in one human donor, *BMC Med. Phys.* **9** (2009) 1–8.
 - [79] PANTELIS, G.E., ILIAKIS, G.E., SAMBANI, C.D., POLITIS, G., Biological dosimetry of absorbed radiation by C-banding of interphase chromosomes in peripheral blood lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* **63** (1993) 349–354.
 - [80] LAMADRID, A.I., GARCIA, O., DELBOS, M., VOISIN, P., ROY L., PCC- ring induction in human lymphocytes exposed to gamma and neutron irradiation, *J. Radiat. Res.* **48** (2007) 1–6.
 - [81] GOTOH, E., TANNNO, Y., TAKAKURA, K., Simple biodosimetry method for use in cases of high-dose radiation exposure that scores the chromosome number of Giemsa-stained drug-induced prematurely condensed chromosomes (PCC), *Int. J. Radiat. Biol.* **81** (2005) 33–40.

- [82] COUNTRYMAN, P.I., HEDDLE, J.A., The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes, *Mutat. Res.* **41** (1976) 321–331.
- [83] FENECH, J., MORLEY, A.A., Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.* **147** (1985) 29–36.
- [84] FENECH, J., MORLEY, A.A., Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of *in vivo* ageing and low-dose X-irradiation, *Mutat. Res.* **161** (1986) 193–198.
- [85] VRAL, A., THIERENS, H., DE RIDDER, L., *In vitro* micronucleus- centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 61–68.
- [86] FENECH, M., Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 1084–1104.
- [87] WILLEMS, P., et al., Automated micronucleus (MN) scoring for population triage in case of large scale radiation events, *Int. J. Radiat. Biol.* **86** (2010) 2– 11.
- [88] FENECH, M., The cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry, *Hlth Phys.* **98** (2009) 234–243.
- [89] THOMAS, P., UMEKAGI, K., FENECH, M., Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutagenesis.* **18** (2003) 187–94.
- [90] TAMURA, H., SUGIYAMA, Y., SUGAHARA, T., Changes in the number of circulating lymphocytes with chromosomal aberrations following a single exposure of the pelvis to γ -irradiation in cancer patients, *Radiat. Res.* **59** (1974) 653–657.
- [91] BREWEN, L.G., PRESTON, R.J., LITTLEFIELD, L.G., Radiation-induced human chromosome aberration yields following an accidental whole-body exposure to ^{60}Co γ -rays, *Radiat. Res.* **49** (1972) 647–656.
- [92] GRANATH, F., et al., Retrospective dose estimates in Estonian Chernobyl clean-up workers by means of FISH, *Mutat. Res.* **369** (1996) 7–12.
- [93] WORLD HEALTH ORGANISATION, Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances, 009-2010 WHO/HSE/EPR/2008.10, WHO, Geneva (2008).
- [94] WILKINS, R.C., et al., Interlaboratory comparison of the dicentric chromosome assay for radiation biodosimetry in mass casualty events, *Radiat. Res.* **169** (2008) 551–560.
- [95] FABRY, L., LEMAIRE, M., Dose response relationships for radiation induced chromosome aberrations in human lymphocytes *in vivo* and *in vitro*, *Strahlentherapie* **162** (1986) 63–67.
- [96] LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., PROSSER, J.S., CORP, M.J., The dose response relationship obtained at constant irradiation times for the induction of

- chromosome aberrations in human lymphocytes by cobalt-60 gamma rays, *Radiat. Environ. Biophys.* **23** (1984) 179–189.
- [97] MYSKA, J.C., et al., Arrays for Use at the Cobalt Irradiation Facility, TR97-2, Armed Forces Radiobiology Research Institute (1997), <http://www.usuhs.mil/afri/outreach/reports/pdf/TR97-2.pdf>
- [98] EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., PURROT, R.J., Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution, *Radiat. Environ. Biophys.* **16** (1979) 89–100.
- [99] RAO, C.R., CHAKRAVARTI, I.M., Some small sample tests of significance for a Poisson distribution, *Biometrics* **12** (1956) 264–282.
- [100] SAVAGE, J.R.K., Sites of radiation induced chromosome exchanges, *Curr. Top. Radiat. Res.* **6** (1970) 129–194.
- [101] LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., “Chromosome aberrations in human lymphocytes: effect of radiation quality, dose and dose rate”, *Radiation- Induced Chromosome Damage in Man* (ISHIHARA, T., SASAKI, M.S., Eds), Alan R. Liss, New York (1983) 23–49.
- [102] BARQUINERO, J.F., et al., Establishment and validation of a dose-effect curve for gamma-rays by cytogenetic analysis, *Mutat. Res.* **326** (1995) 65–69.
- [103] DI GIORGIO, M., et al., Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by heavy charged particles in track segment mode, *Radiat. Prot. Dosim.* **108** (2004) 47–53.
- [104] PAPWORTH, D.G., Curve fitting by maximum likelihood, *Radiat. Bot.* **15** (1975) 127–140.
- [105] MERKLE, W., Statistical methods in regression and calibration analysis of chromosome aberration data, *Radiat. Environ. Biophys.* **21** (1983) 217–233.
- [106] LLOYD, D.C., PURROTT, R.J., REEDER, E.J., The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people, *Mutat. Res.* **72** (1980) 523–532.
- [107] SIGURDSON, A.J., et al., International study of factors affecting human chromosome translocations, *Mutat. Res.* **652** (2008) 112–121.
- [108] FENECH, M., The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutat. Res.* **285** (1993) 35–44.
- [109] PETERSON, L.E., PIRLS, Poisson iteratively reweighted least squares computer program for additive, multiplicative, power, and non-linear models, *J. Stat. Soft.* **2** (1997) 1–28.
- [110] AINSBURY, E.A., BARQUINERO J.F., Biodosimetric tools for a fast triage of people accidentally exposed to ionising radiation: statistical and computational aspects, *Ann. Ist Super Sanita*, **45** (2009) 307–12.

- [111] DEPERAS, J., et al., CABAS: a freely available PC program for fitting calibration curves in chromosome aberration dosimetry, *Radiat. Prot. Dosim.* **124** (2007) 115–123.
- [112] AINSBURY, E.A., LLOYD, D.C., Dose estimation software for radiation biodosimetry, *Hlth Phys.* **98** (2010) 290–295.
- [113] PURROTT, R.J., VULPIS, N., LLOYD, D.C., Chromosome dosimetry: The influence of culture media on the proliferation of irradiated and unirradiated human lymphocytes, *Radiat. Prot. Dosim.* **1** (1981) 203–208.
- [114] PERRY, P., WOLFF, S., New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature* **251** (1974) 156–158.
- [115] LAMBERT, B., HANSSON, K., LINDSTEN, J., STEN, M., WERELIUS, B., Bromodeoxyuridine-induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes, *Hereditas* **93** (1976) 163–174.
- [116] PROSSER, J.S., MOQUET, J.E., The effect of blood storage on differential chromosome staining of human lymphocytes, *Experientia* **39** (1983) 778–780.
- [117] HAYATA, I., KAJIMA, J., OKABE, N., Distribution of metaphases in the 1st cell-cycle for automated-system in radiation-dosimetry, *Radiat. Phys. Chem.* **39** (1992) 517–520.
- [118] WILKINSON, D.T., et al., Canadian biodosimetry capacity for response to radiation emergencies, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 1128–1132.
- [119] STRICKLIN, D., et al., An initial limited biodosimetry inter-comparison exercise: FOI and DRDC Ottawa, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 1133–1137.
- [120] PURROTT, R.J., VULPIS, N., LLOYD, D.C., The influence of incubation temperature on the rate of human lymphocyte proliferation *in vitro*, *Experientia* **37** (1981) 407–408.
- [121] MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMANN, W.J., BATTIPS, D.M., HUNGERFORD, D.A., Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood, *Exp. Cell Res.* **20** (1960) 613–616.
- [122] HUNGERFORD, D.A., Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl, *Stain Technol.* **40** (1965) 333–338.
- [123] HAYATA, I., et al., Robot system for preparing lymphocyte chromosomes, *J. Radiat. Res.* **33** Suppl. (1992) S231–S241.
- [124] McFEE, A.F., SAYER, A.M., SALOMAA, S.I., LINDHOLM, C., LITTLEFIELD, L.G., Methods for improving the yield and quality of metaphase preparations for FISH probing of human lymphocyte chromosomes, *Environ. Molecul. Mutagen.* **29** (1997) 98–104.
- [125] SASAKI, M.S., “Radiation damage and its repair in the formation of chromosome aberrations in human lymphocytes”, *Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man*

- (EVANS, H.J., LLOYD, D.C., Eds), Edinburgh University Press, Edinburgh 62–76 (1978).
- [126] SCOTT, D., LYONS, C.Y., Homogeneous sensitivity of human peripheral blood lymphocytes to radiation-induced chromosome damage, *Nature* **279** (1979) 756–758.
 - [127] KOLIN-GERRESHEIM, J., BAUCHINGER, M., Dependence of the frequency of harlequin-stained cells on BrdU concentration in human lymphocyte cultures, *Mutat. Res.* **91** (1981) 251–254.
 - [128] HAYATA, I., Removal of stainable cytoplasmic substances from cytogenetic slide preparations, *Biotechn. Histochem.* **68** (1993) 150–152.
 - [129] LATT, S.A., Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **70** (1973) 3395–3399.
 - [130] FERNANDES, T.S., LLOYD, D., AMARAL, A., A comparison of different cytological stains for biological dosimetry, *Int. J. Radiat. Biol.* **84** (2008) 703–711.
 - [131] SAVAGE, J.R.K., PAPWORTH, D.G., Constructing a 2B calibration curve for retrospective dose reconstruction, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 69–76.
 - [132] SZŁUŃSKA, M., EDWARDS, A., LLOYD, D., Presenting statistical uncertainty on cytogenetic dose estimates, *Radiat. Prot. Dosim.* **123** (2007) 443–449.
 - [133] CROW, E.L., GARDNER, R.S., Confidence intervals for the expectation of a Poisson variable, *Biometrika* **46** (1959) 441–453.
 - [134] SCHENKER, N., GENTLEMAN, J.F., On judging the significance of differences by examining the overlap between confidence intervals, *Am. Stat.* **55** (2001) 182–182.
 - [135] AUSTIN, P.C., HUX, J.E., A brief note on overlapping confidence intervals, *J. Vas. Surg.* (2002) 194–195.
 - [136] BRAME, R.S., GROER, P.G., Bayesian methods for chromosome dosimetry following a criticality accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **104** (2003) 61–63.
 - [137] VOISIN P., et al., Criticality accident dosimetry by chromosomal analysis, *Radiat. Prot. Dosim.* **110** (2004) 443–447.
 - [138] DOLPHIN, G.W., “Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods”, *Handling of Radiation Accidents (Proc. Int. Symp. Vienna, 1969)*, IAEA, Vienna (1969) 215–224
 - [139] LLOYD, D.C., PURROTT, R.J., DOLPHIN, G.W., Chromosome aberration dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation, *Phys. Med. Biol.* **18** (1973) 421–431.
 - [140] BARQUINERO, J.F., et al., Biological dosimetry in simulated in vitro partial irradiations, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 435–440.

- [141] VOISIN, P., et al., Mathematical methods in biological dosimetry: the 1996 Iranian accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **76** (2000) 1545–1554.
- [142] SASAKI, M.S., MIYATA, H., Biological dosimetry in atom bomb survivors, *Nature* **220** (1968) 1189–1193.
- [143] BUCKTON, K.E., HAMILTON, G.E., PATON, L., LANGLANDS, A.O., “Chromosome aberrations in irradiated ankylosing spondylitis patients”, *Mutagen-Induced Chromosome Damage in Man*, Edinburgh University Press, Edinburgh (1978) 142–150.
- [144] BUCKTON, K.E., Chromosome aberrations in patients treated with X- irradiation for ankylosing spondylitis, *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man*, Alan R. Liss, New York (1983) 491–511.
- [145] AWA, A., Analysis of chromosome aberrations in atom bomb survivors for dose assessment: studies at the Radiation Effects Research Foundation from 1968–1993, *Stem Cells* **15** Suppl. 2 (1997) S163–S173.
- [146] LEA, D.E., CATCHESIDE, D.G., The mechanism of the induction by radiation of chromosome aberrations in *Tradescantia*, *J. Genet.* **44** (1942) 216– 245.
- [147] BAUCHINGER, M., SCHMID, E., DRESP, J., Calculation of the dose-rate dependence of the dicentric yield after ⁶⁰Co-irradiation of human lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* **35** (1979) 229–233.
- [148] DUFRAIN, R.J., LITTLEFIELD, L.G., JOINER, E.E., FROME, E.L., “*In vitro* human cytogenetic dose-response systems”, *The Medical Basis for Radiation Accident Preparedness*, Elsevier North-Holland, Amsterdam (1980) 358–374.
- [149] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, *The Radiological Accident in Goiânia*, IAEA, Vienna (1988).
- [150] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, *Dosimetric and Medical Aspects of the Radiological Accident in Goiânia in 1987*, IAEA-TECDOC- 1009, IAEA, Vienna (1998).
- [151] EUROPEAN COMMISSION, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, WORLD HEALTH ORGANIZATION, *One Decade after Chernobyl — Summing up the Consequences of the Accident* (Proc. Int. Conf. Vienna, 1996), IAEA, Vienna (1996).
- [152] PROSSER, J.S., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., STATHER, J.W., The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by exposure to tritiated water in vitro, *Radiat. Prot. Dosim.* **4** (1983) 21–26.
- [153] PRESTON, R.J., BREWEN, J.G., GENGOZIAN, N., Persistence of radiation-induced chromosome aberrations in marmoset and man, *Radiat. Res.* **60** (1974) 516–524.
- [154] VOISIN, P., LLOYD, D., EDWARDS, A., Chromosome aberrations scoring for biological dosimetry in a criticality accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **70** (1997) 467–470.

- [155] BASSON, J.K., HANEKOM, A.P., COETZEE, F.C., LLOYD, D.C., Health Physics Evaluation of an Accident Involving Acute Overexposure to a Radiography Source, Rep. PEL-279, Pelindaba, South Africa (1981).
- [156] STEPHAN, G., HADNAGY, W., HAMMERMAIER, C., IMHOF, U., Biologically and physically recorded doses after an accidental exposure to ^{60}Co γ -rays, *Health Phys.* **44** (1983) 409–411.
- [157] ISHIHARA, T., et al., Chromosome aberrations in persons accidentally exposed to ^{192}Ir gamma rays, *J. Radiat. Res.* **14** (1973) 328–335.
- [158] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, The Radiological Accident in Istanbul, IAEA, Vienna (2000).
- [159] TURAI, I., GÜNALP, B., LLOYD, D., COSSET, J.M., “Medical aspects of the radiological accident in Istanbul”, (Proc. 8th WHO/REMPAN Conf., NRPB), Oxford (2000).
- [160] LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., PROSSER, J.S., Accidental intake of tritiated water: a report of two cases, *Radiat. Prot. Dosim.* **15** (1986) 191–196. [161] PINKEL, D., STRAUME, T., GRAY, J.W., Cytogenetic analysis using quantitative high-sensitivity fluorescence hybridisation, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **83** (1986) 2934–2938. [162] GREULICH, K.M., et al., Rapid detection of radiation-induced chromosomal aberrations in lymphocytes and hematopoietic progenitor cells by mFISH, *Mutat. Res.* **452** (2000) 73–81.
- [163] MANTI, L., et al., Rearrangements in human chromosome 1 visualized by arm-specific probes in the progeny of blood lymphocytes exposed to iron ions, *Adv. Space Res.* **39** (2007) 1066–1069.
- [164] CHUDOBA, I., et al., High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes, *Cytogenet. Cell Genet.* **84** (1999) 156–160.
- [165] HORSTMANN, M., DURANTE, M., JOHANNES, C., OBE, G., Chromosomal intrachanges induced by swift iron ions, *Adv. Space Res.* (2005) **35** 276–279.
- [166] BRENNER, D.J., et al., Biomarkers specific to densely-ionising (high LET) radiations, *Radiat. Prot. Dosim.* **97** (2001) 69–73.
- [167] DARROUDI, F., et al., A new tool to characterize primary cervical carcinomas: to assess hall-marks and stage specificity, *Cancer Lett.* **287** (2010) 67–74.
- [168] PRIEUR, M., et al., Acquired chromosome rearrangements in human lymphocytes: effect of ageing, *Human Genet.* **79** (1988) 147–150.
- [169] DARROUDI, F., Use of FISH translocations analyses for retrospective biological dosimetry: how stable are stable chromosome aberrations?, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 101–109.
- [170] LUCAS, J.N., et al., Rapid translocation frequency analysis in human decades after exposure to ionizing radiation, *Int. J. Radiat. Biol.* **62** (1992) 53–63.

- [171] TAWN, E.J., The non-random occurrence of exchanges involving chromosomes 7 and 14 in human lymphocytes: a prospective study of control individuals, *Mutat. Res.* **199** (1988) 215–220.
- [172] KODAMA, Y., et al., Estimation of minimal size of translocated chromosome segments detectable by fluorescence in situ hybridisation, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 35–39.
- [173] SAVAGE, J.R., TUCKER, J.D., Nomenclature systems for FISH-painted chromosome aberrations, *Mutat. Res.* **366** (1996) 153–161.
- [174] LINDHOLM, C., EDWARDS A.A., Long-term persistence of translocations in stable lymphocytes from victims of a radiological accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **80** (2004) 559–566.
- [175] TUCKER, J.D., et al., PAINT: A proposed nomenclature for structural aberrations detected by whole chromosome painting, *Mutat. Res.* **347** (1995) 21–24.
- [176] SAVAGE, J.R.K., SIMPSON, P., On the scoring of FISH painted chromosome exchange aberrations, *Mutat. Res.* **307** (1994) 345–353.
- [177] SAVAGE, J.R.K., SIMPSON, P., FISH ‘painting’ patterns resulting from complex exchanges, *Mutat. Res.* **312** (1994) 51–60.
- [178] KNEHR, S., ZITZELSBERGER, H., BAUCHINGER, M., FISH-based analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using different nomenclature systems, *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (1998) 135–141.
- [179] NATARAJAN, A.T., VYAS, R.C., DARROUDI, F., VERMEULEN, S., Frequencies of x-ray induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by in situ hybridization using chromosome-specific DNA libraries, *Int. J. Radiat. Biol.* **61** (1992) 199–203.
- [180] SIMPSON, P.J., SAVAGE, J.R.K., Dose–response curves for simple and complex chromosome aberrations induced by X-rays and detected using fluorescence in situ hybridisation, *Int. J. Radiat. Biol.* **69** (1996) 429–436.
- [181] SIMPSON, P.J., PAPWORTH, D.G., SAVAGE, J.R., X-ray-induced simple, pseudosimple and complex exchanges involving two distinctly painted chromosomes, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 11–18.
- [182] CORNFORTH, M.N., Analyzing radiation-induced complex chromosome rearrangements by combinatorial painting, *Radiat. Res.* **155** (2001) 643–659.
- [183] LUCAS, J.N., DENG, W., Views on issues in radiation biodosimetry based on chromosome translocations measured by FISH, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 77–86.
- [184] KNEHR, S., ZITZELSBERGER, H., BRASELMANN, H., NAHRSTEDT, U., BAUCHINGER, M., Chromosome analysis by fluorescence in situ hybridization: further indications for a non-DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations, *Int. J. Radiat. Biol.* **70** (1996) 385–392.

- [185] BARQUINERO, J.F., KNEHR, S., BRASELMANN, H., FIGELI, M., BAUCHINGER, M., DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization painting of all chromosomes of a human female karyotype, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 315–323.
- [186] CIGARRAN, S., et al., Relationship between the DNA content of human chromosomes and their involvement in radiation-induced structural aberrations analysed by painting, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 449–455.
- [187] WU, H., DURANTE, M., LUCAS, J.N., Relationship between radiation- induced aberrations in individual chromosomes and their DNA content: effects of interaction distance, *Int. J. Radiat. Biol.* **77** (2001) 781–786.
- [188] CORNFORTH, M.N., et al., Chromosomes are predominantly located randomly with respect to each other in interphase human cells, *J. Cell. Biol.* **159** (2002) 237–244.
- [189] WHITEHOUSE, et al., Translocation yields in peripheral blood lymphocytes from control populations, *Int. J. Radiat. Biol.* **81** (2005) 139–145.
- [190] PRESSL, S., EDWARDS, A. STEPHAN, G., The influence of age, sex and smoking habits on the background level of FISH-detected translocations, *Mutat. Res.* **442** (1999) 89–95.
- [191] RAMSEY, M.J., et al., The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutat. Res.* **338** (1995) 95–106.
- [192] BADR, F.M., HUSSAIN, F.H., Chromosomal aberrations in chronic male alcoholics, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **6** (1982) 122–129.
- [193] BURIM, R.V., et al., Clastogenic effect of ethanol in chronic and abstinent alcoholics, *Mutat. Res.* **560** (2004) 187–198.
- [194] BOTHWELL, A.M., WHITEHOUSE, C.A., TAWN, E.J., The application of FISH for chromosome aberration analysis in relation to radiation exposure, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 7–14.
- [195] TAWN, E.J., CARTMELL, C.L., The effect of smoking on the frequencies of asymmetrical and symmetrical chromosome exchanges in human lymphocytes, *Mutat. Res.* **224** (1989) 151–156.
- [196] VAN DIEMEN, P.C.M., MAASDAM, D., VERMEULEN, S., DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., Influence of smoking habits on the frequencies of structural and numerical chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes using the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique, *Mutagenesis* **10** (1995) 487–495.
- [197] TUCKER, J.D., et al., Multi-endpoint biological monitoring of phosphine workers, *Mutat. Res.* **536** (2003) 7–14.

- [198] MAENG, S.H., et al., Chromosome aberration and lipid peroxidation in chromium-exposed workers, *Biomarkers* **9** (2004) 418–434.
- [199] BESKID, O., et al., Chromosomal aberrations by fluorescence in situ hybridization (FISH) — Biomarker of exposure to carcinogenic PAHs, *Mutat. Res.* **620** (2007) 62–70.
- [200] PLUTH, J.M., RAMSEY, M.J., TUCKER, J.D., Role of maternal exposures and newborn genotypes on newborn chromosome aberration frequencies, *Mutat. Res.* **465** (2000) 101–111.
- [201] STEENLAND, K., et al., Thyroid hormones and cytogenetic outcomes in backpack sprayers using ethylenebis (dithiocarbamate) (EBDC) fungicides in Mexico, *Environ. Hlth Perspect.* **105** (1997) 1126–1130.
- [202] KIM Y. K., et al., Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms, *Pharmacogenetics* **14** (2004) 453–463.
- [203] SMITH, M. T., et al., Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene, *Cancer Res.* **58** (1998) 2176–2181.
- [204] ZHANG, L., et al., Aberrations in chromosomes associated with lymphoma and therapy-related leukemia in benzene-exposed workers, *Environ. Mol. Mutagen.* **48** (2007) 467–474.
- [205] BESKID, O., DUSEK, Z., SOLANKSY, I., SRAM, R.J., The effects of exposure to different clastogens on the pattern of chromosomal aberrations detected by FISH whole chromosome painting in occupationally exposed individuals, *Mutat. Res.* **594** (2006) 20–29.
- [206] SRAM R.J., et al., Environmental exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons-The interpretation of cytogenetic analysis by FISH, *Toxicol. Lett.* **172** (2007) 12–20.
- [207] DOHERTY, A.T., et al., Increased chromosome translocations and aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients having revision arthroplasty of the hip, *J. Bone Joint Surg.* **83** (2001) 1075–1081.
- [208] DULOUT, F.N., et al., Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes from native Andean women and children from northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water, *Mutat. Res.* **370** (1996) 151–158.
- [209] NATARAJAN, A. T., et al., ¹³⁷Cs-induced chromosome aberrations analyzed by fluorescence in situ hybridization: eight years follow up of the Goiânia radiation accident victims, *Mutat. Res.* **400** (1998) 299–312.
- [210] SAKAMOTO-HOJO, E.T., NATARAJAN, A.T., CURADO, M.P., Chromosome translocations in lymphocytes from individuals exposed to ¹³⁷Cs 7.5 years after the accident in Goiânia (Brazil), *Radiat. Prot. Dosim.* **86** (1999) 25–32.

- [211] BAUCHINGER, M., et al., Collaborative exercise on the use of FISH chromosome painting for retrospective biodosimetry of Mayak nuclear- industrial personnel, *Int. J. Radiat. Biol.* **77** (2001) 259–267.
- [212] SALASSIDIS, K., et al., Chromosome painting in highly irradiated Chernobyl victims: a follow-up study to evaluate the stability of symmetrical translocations and the influence of clonal aberrations for retrospective dose estimation, *Int. J. Radiat. Biol.* **68** (1995) 257–262.
- [213] LINDHOLM, C., TEKKELE, M., VEIDEBAUM, T., ILUS, T. SALOMAA, S., Persistence of translocations after accidental exposure to ionizing radiation, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 565–571.
- [214] LINDHOLM, C., et al., Intercomparison of translocation and dicentric frequencies between laboratories in a follow-up of the radiological accident in Estonia, *Int. J. Radiat. Biol.* **78** (2002) 883–890.
- [215] DURAN, A., et al., Suitability of FISH painting techniques for the detection of partial-body irradiations for biological dosimetry, *Radiat. Res.* **157** (2002) 461–468.
- [216] GUERRERO-CARBAJAL, Y.C., MOQUET, J.E., EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., The persistence of FISH translocations for retrospective biological dosimetry after simulated whole or partial body irradiation, *Radiat. Prot. Dosim.* **76** (1998) 159–168.
- [217] SEVAN'KAEV, A.V., et al., A cytogenetic follow-up of some highly irradiated victims of the Chernobyl accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **113** (2005) 152–161.
- [218] LINDHOLM, C., SALOMAA, S., Dose assessment of past accidental or chronic exposure using FISH chromosome painting, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 21–25.
- [219] MULLER, I., et al., Time-course of radiation-induced chromosomal aberrations in tumor patients after radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **63** (2005) 1214–1220.
- [220] XUNCLA, M., et al., Cytogenetic damage induced by radiotherapy. Evaluation of protection by amifostine and analysis of chromosome aberrations persistence, *Int. J. Radiat. Biol.* **84** (2008) 243–251.
- [221] SCHMIDBERGER, H., et al., Reciprocal translocations in patients with testicular seminoma before and after radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **50** (2001) 857–864.
- [222] GEBHART, E., NEUBAUER, S., SCHMITT, G., BIRKENHAKKE, S. and DUNST, J., Use of a three-colour chromosome in situ suppression technique for the detection of past radiation exposure, *Radiat. Res.* **145** (1996) 47–52.
- [223] PALA, F.S., MOQUET, J.E., EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., *In vitro* transmission of chromosomal aberrations through mitosis in human lymphocytes, *Mutat. Res.* **474** (2001) 139–146.

- [224] GARDNER, S.N., TUCKER, J. D., The cellular lethality of radiation-induced chromosome translocations in human lymphocytes, *Radiat. Res.* **157** (2002) 539–552.
- [225] HANDE, M.P., NATARAJAN, A.T., Induction and persistence of cytogenetic damage in mouse splenocytes following whole-body X irradiation analysed by fluorescence in situ hybridization. IV. Dose response, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 441–448.
- [226] XIAO, Y., DARROUDI, F., GRIGOROVA, M., NATARAJAN, A.T., Induction and persistence of chromosomal exchanges in mouse bone marrow cells following whole-body exposure to X-rays, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 1119–1128.
- [227] ROMM, H., STEPHAN, G., Dose dependency of FISH-detected translocations in stable and unstable cells after Cs gamma irradiation of human lymphocytes *in vitro*, *Cytogenet. Genome Res.* **104** (2004) 162–167.
- [228] RODRIGUEZ, P., et al., Analysis of translocations in stable cells and their implications in retrospective biological dosimetry, *Radiat. Res.* **162** (2004) 31–38.
- [229] BAUCHINGER, M., SCHMID, E., ZITZELBERGER, H., BRASELMANN, H., AHRSTEDT, U., Radiation-induced chromosomal aberrations analyzed by two colour fluorescence in situ hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe, *Int. J. Radiat. Biol.* **64** (1993) 179–84.
- [230] FERNANDEZ, J. L., et al., X-ray biological dosimetry performed by selective painting of human chromosomes 1 and 2, *Int. J. Radiat. Biol.* **67** (1995) 295–302.
- [231] FINNON, P., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., Fluorescence in situ hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry, *Int. J. Radiat. Biol.* (1995) **68** 429–435.
- [232] HSIEH, W.A., et al., Alpha coefficient of dose-response for chromosome translocations measured by FISH in human lymphocytes exposed to chronic ⁶⁰Co gamma rays at body temperature, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 435–439.
- [233] DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., Application of FISH chromosome painting assay for dose reconstruction: State of the art and current views, *Radiat. Prot. Dosim.* **88** (2000) 51–58.
- [234] SALISSIDIS, K., SCHMID, E., PETER, R.U., BRASELMANN, H., BAUCHINGER, M., Dicentric and translocation analysis for retrospective dose estimation in humans exposed to ionising radiation during the Chernobyl power plant accident, *Mutat. Res.* **311** (1994) 39–48.
- [235] LLOYD, D.C., et al., “Retrospective dosimetry by chromosomal analysis”, *The Radiological Consequences of the Chernobyl Accident (Proc. Mtg Minsk, 1996)*, Rep. Eur 16544 EN, (1996) 965–973.
- [236] SNIGIRYOVA, G., BRASELMANN, H., SALASSIDIS, K., SHEVCHENKO, V., BAUCHINGER, M., Retrospective biodosimetry of Chernobyl clean-up workers

- using chromosome painting and conventional chromosome analysis, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 119–127.
- [237] DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., “Biological dosimetric studies in the Chernobyl radiation accident, on populations living in the contaminated areas (Gomel regions) and in Estonian clean-up workers, using FISH technique”, *The Radiological Consequences of the Chernobyl Accident (Proc. Mtg Minsk, 1996)* Eur 16544 EN, (1996) 1067–1072.
 - [238] SALISSIDIS, K., et al., Analysis of symmetrical translocations for retrospective biodosimetry in radiation workers of the Mayak nuclear-industrial complex (Southern Urals) using FISH-chromosome painting, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1999) 431–439.
 - [239] BAUCHINGER, M., et al., FISH-based analysis of stable translocations in a Techa river population, *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (1998) 605–612.
 - [240] TUCKER, J.D., et al., Biological dosimetry of radiation workers at the Sellafield nuclear facility, *Radiat. Res.* **148** (1997) 216–226.
 - [241] NAKAMURA, N., MIYAZAWA, C., SAWADA, S., AKIYAMA, M., AWA, A.A., A close correlation between spin resonance (ESR) dosimetry from tooth enamel and cytogenetic dosimetry from lymphocytes of Hiroshima atomic-bomb survivors, *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (1998) 619–627.
 - [242] LLOYD, D.C., MOQUET, J.E., ORAM, S., EDWARDS, A.A., LUCAS, J.N., Accidental intake of tritiated water: A cytogenetic follow-up case on translocation stability and dose reconstruction, *Int. J. Radiat. Biol.* **73** (1998) 543–547.
 - [243] RAMALHO, A.T., NASCIMENTO, A.C.H., NATARAJAN, A.T., Dose assessments by cytogenetic analysis in the Goiânia (Brazil) radiation accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **25** (1988) 97–100.
 - [244] STRAUME, T., et al., Novel biodosimetry methods applied to victims of the Goiânia accident, *Health Phys.* **60** (1991) 71–76.
 - [245] STEPHAN, G., PRESSL, S., Chromosome aberrations in human lymphocytes analysed by fluorescence in situ hybridization after *in vitro* irradiation, and in radiation workers, 11 years after an accidental radiation exposure, *Int. J. Radiat. Biol.* **71** (1997) 293–299.
 - [246] LINDHOLM, C., et al., Biodosimetry after accidental radiation exposure by conventional chromosome analysis and FISH, *Int. J. Radiat. Biol.* **70** (1996) 647–656.
 - [247] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, *The Radiological Accident in Lilo*, IAEA, Vienna (2000).
 - [248] ROY, L., et al., Study of the tools available in biological dosimetry to estimate the dose in cases of accidental complex overexposure to ionizing radiation: the Lilo accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **82** (2006) 39–48.

- [249] DARROUDI, F., et al., Detection of total and partial body irradiation in a monkey model: a comparative study of chromosomal aberration, micronuclei and premature chromosome condensation assays, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 207-215.
- [250] PRASANNA, P.G.S., KOLANKO, C.J., GERSTENBERG, H.M., BLAKELY, W.F., Premature chromosome condensation assay for biodosimetry: Studies with fission neutrons, *Health Phys.* **72** (1997) 594-600.
- [251] TERZOUDI, G.I., PANTELIS G.E., Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualization after exposure to ionizing radiation, *Radiat. Prot. Dosim.* **122** (2006) 513-520.
- [252] DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., "Premature chromosome condensation, a novel method for biological dosimetry", *High Levels of Natural Radiation (Proc. 10th Int. Congr. Vienna, 1993)*, IAEA, Vienna (1993) 479-485.
- [253] KANDA, R., MINAMIHISAMATSU, M., HAYATA, I., Dynamic analysis of chromosome aberrations in three victims of the Tokai-mura criticality accident, *Int. J. Radiat. Biol.* **78** (2002) 857-862.
- [254] HAYATA, I., KANDA, R., MINAMIHISAMATSU, M., FURUKAWA, A., SASAKI, M.S., Cytogenetical dose estimation for 3 severely exposed cases in the JCO criticality accident in Tokai-mura, *J. Radiat. Res.* **42** Suppl. (2001) S149- S155.
- [255] ISHIGURE, N., ENDO, A., YAMAGUCHI, Y., KAWACHI, K., Calculation of the absorbed dose for the overexposed patients at the JCO criticality accident in Tokai-mura, *J. Rad. Res.* **42** Suppl. (2000) S137-S148.
- [256] BAUCHINGER, M., BRASELMANN, H., "Use of micronuclei in biological dosimetry of absorbed radiation dose", *Chromosome Aberrations — Basic and Applied Aspects*, Springer-Verlag, Berlin (1989) 202-211.
- [257] KOTELES, G.J., The human lymphocyte micronucleus assay. A review on its applicabilities in occupational and environmental medicine, *Centr. Europ. J. Occup. Environ. Med.* **2** (1996) 12-30.
- [258] FENECH, M., The *in vitro* micronucleus technique, *Mutat. Res.* **455** (2000) 81-95.
- [259] FENECH, M., PEREPETSKAYA, G., MIKHALEVICH, L., A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations — Experiences from the Chernobyl catastrophe, *Environ. Mol. Mutagen.* **30** (1997) 112-118.
- [260] MIKHALEVICH, L.S., et al., Radiation effects in lymphocytes of children living in a Chernobyl contaminated region of Belarus, *Int. J. Radiat. Biol.* **76** (2000) 1377-1385.
- [261] FUCIC, A., et al., Genomic damage in children accidentally exposed to ionizing radiation: A review of the literature, *Mutat. Res.* **658** (2008) 111-123.
- [262] KIRSCH-VOLDERS, M., FENECH, M., Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive

- cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes, *Mutagenesis* **16** (2001) 51–58.
- [263] ROSEFORT, C., FAUTH, E., ZANKL, H., Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay, *Mutagenesis* **19** (2004) 277–284.
 - [264] NORPPA, H., RENZI, L., LINDHOLM, C., Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-block human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization, *Mutagenesis* **8** (1993) 519–525.
 - [265] HUBER, R., et al., Detection of centromeres in vinblastine- and radiation-induced micronuclei of human lymphocytes using FISH with an alpha satellite pancentromeric DNA probe, *Environ. Mol. Mutagen.* **27** (1996) 105–109.
 - [266] THIERENS, H., et al., Scoring of different cytogenetic endpoints after *in vitro* low dose γ -exposure: interlaboratory comparison for biomonitoring of radiological workers, *Int. J. Radiat. Biol.* **75** (1999) 23–34.
 - [267] PALA, F.S., et al., The effects of micronuclei with whole chromosomes on biological dose estimation, *Turk. J. Biol.* **32** (2008) 283–290.
 - [268] MUELLER, W.U., RODE, A., The micronucleus assay in human lymphocytes after high radiation doses (5-15 Gy), *Mutat. Res.* **502** (2002) 47–51.
 - [269] ABRAMSSON-ZETTERBERG, L., ZETTERBERG, G., BERGQVIST, M., GRAWE, J., Human cytogenetic biomonitoring using flow-cytometric analysis of micronuclei in transferring-positive immature peripheral blood reticulocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* **36** (2000) 22–31.
 - [270] STOPPER, H., et al., Pilot study for comparison of reticulocyte-micronuclei with lymphocyte-micronuclei in human biomonitoring, *Toxicol. Lett.* **156** (2005) 351–360.
 - [271] GRAWE, J., Evaluation of the reticulocyte micronucleus assay in patients treated with radioiodine for thyroid cancer, *Mutat. Res.* **583** (2005) 12–25.
 - [272] VRAL, A., Micronuclei induced by fast neutrons versus ^{60}Co γ -rays in human peripheral blood lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* **65** (1994) 321–328.
 - [273] VERHAEGEN, F., VRAL, A., Sensitivity of micronucleus induction in human lymphocytes to low LET radiation qualities: RBE and correlation of RBE and LET, *Radiat. Res.* **139** (1994) 208–213.
 - [274] WUTTKE, K., MULLER, W.U., STREFFER, C., The sensitivity of the *in vitro* cytokinesis-block micronucleus assay in lymphocytes for different and combined radiation qualities, *Strahlentherapie Onkol.* **174** (1998) 262–268.
 - [275] GERSEY, B., et al., Micronuclei induction in human fibroblasts exposed *in vitro* to Los Alamos high-energy neutrons, *Adv. Space Res.* **40** (2007) 1754–1757. [276] FENECH, M., AITKEN, C., RINALDI, J., Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults, *Carcinogenesis* **19** (1998) 1163–1171.

- [277] FENECH, M., HOLLAND, N., CHANG, W.P., ZEIGER, E., BONASSI, S., The HUMN Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans, *Mutat. Res.* **428** (1999) 271–283.
- [278] THIERENS, H., VRAL, A., DE RIDDER, L., A cytogenetic study of radiological workers: effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency, *Mutat. Res.* **360** (1996) 75–82.
- [279] THIERENS, H., et al., Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus-centromere assay, *Mutagenesis* **15** (2000) 245–249.
- [280] THIERENS, H., et al., A cytogenetic study of nuclear power plant workers using the micronucleus-centromere assay, *Mutat. Res.* **445** (1999) 105–111.
- [281] CATALAN, J., et al., Age-dependent inclusion of sex chromosomes in lymphocyte micronuclei of man, *Am. J. Hum. Genet.* **63** (1998) 1464–1472.
- [282] CARERE, A., ANTOCCIA, A., CIMINI, D., et al., Analysis of chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-block lymphocytes of 24 male subjects, *Mutagenesis* **14** (1999) 491–496.
- [283] THIERENS, H., VRAL, A., DERIDDER, L., Biological dosimetry using the micronucleus assay for lymphocytes: interindividual differences in dose-response, *Hlth Phys.* **61** (1991) 623–630.
- [284] EASTMOND, D.A., TUCKER, J.D., Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-block human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.* **13** (1989) 34–43.
- [285] LEE, T.K., et al., Micronuclei in lymphocytes of prostate cancer patients undergoing radiation therapy, *Mutat. Res.* **469** (2000) 63–70.
- [286] THIERENS, H., VRAL, A., VAN EIJKEREN, M., SPELEMAN, F., DE RIDDER, L., Micronucleus induction in peripheral blood lymphocytes of patients under radiotherapy treatment for cervical cancer or Hodgkin's disease, *Int. J. Radiat. Biol.*, **67** (1995) 529–539.
- [287] SILVA-BARBOSA, I., PEREIRA-MAGNATA, S., AMARAL, A., SOTERO, G., MELO, H.C., Dose assessment by quantification of chromosome aberrations and micronuclei in peripheral blood lymphocytes from patients exposed to gamma radiation, *Genet. Mol. Biol.* **28** (2005) 452–457.
- [288] LE ROUX, J., SLABBERT, J., SMIT, B., BLEKKENHORST, G., Assessment of the micronucleus assay as a biological dosimeter using cytokinesis-block lymphocytes from cancer patients receiving fractionated partial-body radiotherapy, *Strahlenther. Onkol.* **174** (1998) 75–81.
- [289] IARMARCOVAI, G., et al., Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis, *Mutat. Res.* **659** (2008) 274–283.

- [290] MONSIEURS, M., et al., Patient dosimetry after ¹³¹I lipiodol therapy, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **30** (2003) 554–561.
- [291] LIVINGSTON, G.K., FOSTER, A.E., ELSON, H.R., Effect of in vivo exposure to iodine-131 on the frequency and persistence of micronuclei in human lymphocytes, *J. Toxicol. Environ. Hlth* **40** (1993) 367–375.
- [292] FENECH, M., et al., Micronuclei in cytokinesis-block lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy, *Int. J. Radiat. Biol.* **57** (1990) 373–383.
- [293] DIAS, F.L., et al., Cytogenetic analysis in lymphocytes from workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **23** (2007) 228–233.
- [294] SARI-MINODIER, I., et al., Cytogenetic monitoring by use of the micronucleus assay among hospital workers exposed to low doses of ionizing radiation, *Mutat. Res.* **629** (2007) 111–121.
- [295] THIERENS, H., et al., Micronucleus assay reveals no radiation effects among nuclear power plant workers, *Hlth Phys.* **83** (2002) 178–182.
- [296] VAGLENOV, A., et al., Cytogenetic monitoring of workers from a nuclear power plant, *Centr. Eur. J. Occupation. Environ. Med.* **3** (1997) 40–47.
- [297] LIVINGSTON, G.K., et al., Radiobiological evaluation of immigrants from the vicinity of Chernobyl, *Int. J. Radiat. Biol.* **72** (1997) 703–713.
- [298] TANAKA, K., et al., Unstable-type chromosome aberrations in lymphocytes from individuals living near Semipalatinsk Test Site, *J. Radiat. Res.* **47** (2006) Suppl. A159–A164.
- [299] THIERENS, H., et al., Cytogenetic biodosimetry of an accidental exposure of a radiological worker using multiple assays, *Radiat. Prot. Dosim.* **113** (2005) 408–414.
- [300] MARTIN, P.R., BERDYCHEVSKI, R.E., SUBRAMANIAN, U., BLAKELY, W.F., PRASANNA, P.G.S., Sample tracking in an automated cytogenetic biodosimetry laboratory for radiation mass casualties, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 1119–1124.
- [301] FRIEDMAN, L.I., SEVERNS, M.L., Application of robotics in blood banking, *Vox Sang* **51** Suppl. 1 (1986) S57–S62.
- [302] HANSON, K.L., CARTWRIGHT, C.P., Evaluation of an automated liquid- handling system (Tecan Genesis RSP 100) in the Abbott LCx assay for *Chlamydia trachomatis*, *J. Clin. Microbiol.* **39** (2001) 1975–1977.
- [303] DENG, W., TSAO, S.W., LUCAS, J.N., LEUNG, C.S., CHANG, A.L., A new method for improving metaphase chromosome spreading, *Cytometry* **51** (2003) 46–51.
- [304] WEBER, J., SCHEID, W., TRAUT, H., Time saving in biological dosimetry by using the automatic metaphase finder, *Metafer2. Mutat. Res.* **272** (1992) 31–34.

- [305] LLOYD, D.C., “Advances in cytogenetic dosimetry”, The Medical Basis of Radiation Accident Preparedness II: Clinical Experience and Follow Ups since 1979, (RICKS, R. E., FRY, S. S. E., Eds), Elsevier, New York, NY (1990) 479-487.
- [306] FINNON, P., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., An assessment of the metaphase finding capability of the Cytoscan 110, *Mutation Res.* **164** (1986) 101–108.
- [307] LLOYD, D.C., “Automated aberration scoring: the requirements of an end-user”, *Automation of Cytogenetics* (LUNDSTEEN, C., PIPER, J., Eds), Springer- Verlag, Heidelberg (1989). 9–17.
- [308] LORCH, T., WITTLER, C., STEPHAN, G., BILLE, J., “An automated chromosome aberration scoring system”, *Automation of Cytogenetics* (LUNDSTEEN, C., PIPER, J., Eds), Springer- Verlag, Heidelberg (1989) 19–30.
- [309] FINNON, P., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., “Progress in automatic dicentric hunting”, *Chromosome Alterations, Origin and Significance* (OBE, G., NATARAJAN, A.T., Eds), Springer-Verlag, Heidelberg (1994) 192–202.
- [310] STEPHAN, G., “Automatische Analyse dizentrischer Chromosomen”, *Methodische Fragen beim Human Population Monitoring in der Zytogenetik* (ARNDT, D., OBE, G., Eds), MMV Verlag, München (1996).
- [311] VAURIJOUX, A., et al., Strategy for Population Triage Based on Dicentric Analysis, *Radiat. Res.* **171** (2009) 541–548.
- [312] CASTELAIN, P., et al., Automated detection of cytochalasin-B blocked binucleated lymphocytes for scoring micronuclei, *Mutagenesis* **8** (1993) 285–293.
- [313] VERHAEGEN, F., et al., Scoring of radiation-induced micronuclei in cytokinesis- block human lymphocytes by automated image analysis, *Cytometry* **17** (1994) 119–127.
- [314] SCHUNK, C., et al., New developments in automated cytogenetic imaging: unattended scoring of dicentric chromosomes, micronuclei, single cell gel electrophoresis, and fluorescence signals, *Cytogenet. Genome Res.* **104** (2004) 383–389.
- [315] VARGA, D., et al., An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis, *Mutagenesis* **19** (2004) 391–397.
- [316] DECORDER, I., et al., Automated image analysis of cytokinesis-block micronuclei: an adapted protocol and a validated scoring procedure for biomonitoring, *Mutagenesis* **24** (2009) 85–93.
- [317] KORTHOF, K., CAROTHERS, A.D., Test of performance of four semi- automatic metaphase-finding and karyotyping systems, *Clin. Gen.* **40** (1991) 441-451.
- [318] VROLIK, J., SLOOS, W.C., DARROUDI, F., NATARAJAN, A.T., TANKE, H.J., A system for fluorescence metaphase finding and scoring of chromosomal translocations visualized by in situ hybridisation, *Int. J. Radiat. Biol.* **66** (1994) 287–295.
- [319] WU, Q., SNELLINGS, J., AMORY, L., SUETENS, P., OOSTERIJNCK, A., “Model-based contour analysis in a chromosome segmentation system”, *Automation of Cytogenetics*, Springer, Heidelberg (1989) 217–229.

- [320] PIPER, J., et al., Automated fluorescence metaphase finder speeds translocation scoring in FISH painted chromosomes, *Cytometry* **16** (1994) 7–16.
- [321] MASCIO, L.N., et al., Advances in the automated detection of metaphase chromosomes labelled with fluorescence dyes, *Cytometry* **33** (1998) 10–18.
- [322] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Generic procedures for medical response during a nuclear or radiological emergency, *EPR-MEDICAL* IAEA, Vienna (2005).
- [323] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Manual for first responders to a radiological emergency, *EPR-FIRST RESPONDERS*, IAEA, Vienna (2006).
- [324] NATIONAL COUNCIL OF RADIATION PROTECTION AND MEASUREMENTS , Key elements of preparing emergency responders for nuclear and radiological terrorism, Commentary No. 19, Bethesda, MD (2005).
- [325] WASELENKO, J.K., et al., Medical management of the acute radiation syndrome: Recommendations of the Strategic National Stockpile Working Group, *Ann. Intern. Med.* **140** (2004) 1037–1051.
- [326] ALEXANDER, G.A., et al., BiodosEPR-2006 Meeting: Acute dosimetry consensus committee recommendations on biodosimetry applications in events involving uses of radiation by terrorists and radiation accidents, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 972–996.
- [327] FLYNN, D.F., GOANS, R.E., Nuclear terrorism: triage and medical management of radiation and combined-injury casualties, *Surg. Clin. N. Am.* **86** (2006) 601–636.
- [328] BLAKELY, W.F., WALTER, C.A., PRASANNA, P.G.S., Early-response biological dosimetry—recommended countermeasure enhancements for mass casualty radiological incidents and terrorism, *Hlth Phys.* **89** (2005) 494–504.
- [329] BLAKELY, W.F., Early Biodosimetry Response: Recommendations for Mass-Casualty Radiation Accidents and Terrorism (Refresher Course for the 12th International Congress of the International Radiation Protection Association, Buenos Aires, 19–24 October 2008), http://www.irpa12.org.ar/PDF/RC/RC_12_fullpaper.pdf
- [330] MURATA, H., AKASHI, M., The report of the criticality accident in a uranium conversion test plant in Tokai-mura, NIRS-M-154, National Institute of Radiation Sciences, Japan (2002).
- [331] US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Radiation Event Medical Management, <http://www.remm.nlm.gov/>
- [332] LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., MOQUET, J.E., GUERRERO-CARBAJAL, Y.C., The role of cytogenetics in early triage of radiation casualties, *Appl. Radiat. Isot.* **52** (2000) 1107–1112.
- [333] VOISIN, P., et al., The cytogenetic dosimetry of recent accidental overexposure, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)* **47** (2001) 557–564.
- [334] FLEGAL, F.N., DEVANTIER, Y., MCNAMEE, J.P., WILKINS, R.C., QuickScan dicentric chromosome analysis for radiation biodosimetry, *Hlth Phys.* **98** (2010) 276–281.

- [335] LINDHOLM, C., et al., Premature chromosome condensation (PCC) assay for dose assessment in mass casualty accidents, *Radiat. Res.* **173** (2010) 71–78.
- [336] McNAMEE, J.P., FLEGAL, F.N., BOULAY GREENE, H., MARRO, L., WILKINS R.C., Validation of the Cytokinesis-Block Micronucleus (CBMN) assay for use as a triage biological dosimetry tool, *Radiat. Prot. Dosim.* **135** (2009) 232–242.
- [337] YOSHIDA, M.A., et al., The Chromosome Network for biodosimetry in Japan, *Radiat. Meas.* **42** (2007) 1125–1127.
- [338] MILLER, S. M., et al., Canadian Cytogenetic Emergency Network (CEN) for biological dosimetry following radiological/nuclear accidents, *Int. J. Radiat. Biol.* **83** (2007) 471–477.
- [339] WOJCIK, A., LLOYD, D., ROMM, H., ROY, L., Biological dosimetry for triage of casualties in a large-scale radiological emergency: Capacity of the EU member states, *Radiat. Prot. Dosim.* **138** (2010) 397–401.
- [340] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, RANET Assistance Action Plan – Arrangements for Providing International Assistance and Sample of Assistance Action Plan, IAEA, Vienna, Austria, 2006.
- [341] BLAKELY, W.F., et al., WHO 1st consultation on the development of a global biodosimetry laboratories network for radiation emergencies (BioDoseNet), *Radiat. Res.* **171** (2009) 127–39.
- [342] SEVAN'KAEV, A.V., Results of cytogenetic studies of the consequences of the Chernobyl accident, *Radiat. Biol. Radioecol.* **40** (2000) 589–595.
- [343] MAZNIK, N.A., VINNIKOV, V.A., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., Chromosomal dosimetry for some groups of evacuees from Prypiat and Ukrainian liquidators, *Radiat. Prot. Dosim.* **74** (1997) 5–11.
- [344] SHEVCHENKO, V.A., SNIGIRYOVA, G.P., “Cytogenetic effects of the action of ionizing radiations on human population”, *Research Activities about the Radiological Consequences of the Chernobyl NPS Accident and Social Activities to Assist the Sufferers by the Accident* (IMANAKA, T., Ed.), Research Reactor Institute, Kyoto University (1998) 203–215.
- [345] SEVAN'KAEV, A.V., et al., A survey of chromosomal aberrations in lymphocytes of Chernobyl liquidators, *Radiat. Prot. Dosim.* **58** (1995) 85–91.
- [346] MAZNIK, N.A., VINNIKOV, V.A., The retrospective cytogenetic dosimetry using the results of conventional chromosomal analysis in Chernobyl clean-up workers, *Radiat. Biol. Radioecol.* **45** (2005) 700–708.
- [347] SEVAN'KAEV, A.V., et al., Novel data set for retrospective biodosimetry using both conventional and FISH chromosome analysis after high accidental overexposure, *Appl. Radiat. Isot.* **52** (2000) 1149–1152.
- [348] EDWARDS, A., et al., Biological estimates of dose to inhabitants of Belarus and Ukraine following the Chernobyl accident, *Radiat. Prot. Dosim.* **111** (2004) 211–219.

- [349] KOKSAL, G., PALA, F.S., DALCI, D.O., *In vitro* dose-response curve for chromosome aberrations induced in human lymphocytes by ^{60}Co gamma- radiation, *Mutat. Res.* **329** (1995) 57–61.
- [350] RAMALHO, A.T., NASCIMENTO, A.C., The fate of chromosomal aberrations in ^{137}Cs -exposed individuals in the Goiânia radiation accident, *Health Phys.* **60** (1991) 67–70.
- [351] SASAKI, M.S., HAYATA, I., KAMADA, N., KODAMA, Y., KODAMA, S., Chromosome aberration analysis in persons exposed to low-level radiation from the JCO criticality accident in Tokai-mura, *J. Radiat. Res.* **42** Suppl. (2001) S107-S116.
- [352] JINARATANA, V., *The Radiological Accident in Thailand*, Parthenon Publishing, (2002) 283–301.
- [353] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, *The Radiological Accident in Nueva Aldea*, IAEA, Vienna (2009).
- [354] BERTHO, J.M., ROY, L., A rapid multiparametric method for victim triage in cases of accidental protracted irradiation or delayed analysis, *Br. J. Rad.* **82** (2009) 764–770.
- [355] WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Biorisk Management: Laboratory Biosecurity Guidance*, WHO, Geneva (2006).
- [356] WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Laboratory Biosafety Manual*, 3rd edn, WHO, Geneva (2004).
- [357] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, *Safety Glossary, Terminology Used in Nuclear Safety and Radiation Protection*, IAEA, Vienna (2007).

附件 I

双着丝粒检测

对于世界范围的实验室在淋巴细胞培养过程中普遍使用的各种材料和方法已经给予介绍和讨论，可能没有任何两个实验室采用的技术方法完全相同。本附件将详细分步介绍一种可靠的方法，可能对一些实验室有所帮助。

I-1. 淋巴细胞培养

I-1.1. 材料

- (1) 肝素抗凝全血。
- (2) PHA，市售。假如是冻干品，用无菌分析级水重新溶解。
- (3) Eagle 最低基本培养基（MEM），市售；10 倍浓度或粉末备用。用无菌分析级水配制成工作浓度。根据厂家说明书添加 L-谷氨酰胺。用无菌 NaHCO_3 调节 pH 值。
 - (i) 可以从浓缩液制备抗生素添加到培养基中，每 100 mL 培养基中加入 1 mL 生理盐水溶解的抗生素储存液。储存液含有 100 IU/mL 氨苄青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸链霉素，冻存。
- (4) 溴脱氧尿苷（BrdU）。每 100 mL 培养基中加入 1 mL 储存液。储存液配制：6.4 mg 的 BrdU 溶解在 10 mL 培养基中，滤膜过滤。终浓度为 15 μM 。储存液 4℃ 避光可保存 1 个月，-20℃ 可保存数月。
- (5) 热灭活（56℃，30 min）的胎牛血清，市售，冻存。
- (6) 秋水仙素：用无菌生理盐水配制成 10 $\mu\text{g/mL}$ 的储存液，4℃ 可保存 6 个月。
- (7) 无菌培养管。有多种选择，如玻璃细菌培养瓶、一次性塑料瓶，体积 10~20 mL。
- (8) 培养应该在柔和灯光下二级微生物安全柜中进行。可用一次性无菌吸管或枪头转移培养管的液体。如果血样需要通过皮下注射器针头，可用大口（19 号）针头慢慢推出，尽量减小对细胞的损伤。

I-1.2. 方法

- (1) 在培养瓶中加入 0.3 mL 肝素抗凝血。
- (2) 加入 4 mL 含有抗生素和 BrdU 的培养液。

- (3) 加入 0.1 mL 重配的 PHA。
- (4) 加入 0.5 mL 胎牛血清。
- (5) 盖上瓶盖。
- (6) 轻轻摇晃混匀瓶内液体。
- (7) 在 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，避光培养 45 h。
- (8) 加入 50 μL 秋水仙素储存液，轻轻摇匀。
- (9) 放回培养箱继续培养 3 h。

I-2. 固定和制片

I-2.1. 方法

- (1) 将培养物转移到离心管中。
- (2) 200 g 离心 10 min (把 g 转换为 rev/min, $g = r\omega^2/981$, 其中 r 为离心半径, 单位 cm, $\omega = (2\pi \times \text{rev/min})/60$)。
- (3) 吸去上清, 用 5~10 mL 0.075 M 的 KCl 溶液将沉淀物重新混匀。
- (4) 在室温下放置 15~20 min。
- (5) 再 200 g 离心 10 min。
- (6) 去除上清, 用 5~10 mL 新鲜配制的固定液 (甲醇: 冰醋酸 = 3:1) 混合细胞。必须缓慢加入固定液, 但要保持不断有力的搅动, 使用漩涡混合器较为理想, 可以避免细胞底部形成固块。另一个办法是在加入固定液之前用一个乳胶球在巴斯德管上轻轻混合底层细胞。
- (7) 再次离心。
- (8) 去除上清, 再加入 5~10 mL 固定液混合细胞。
- (9) 再次离心。
- (10) 去除上清, 再加入 5~10 mL 固定液混合细胞。
- (11) 再次离心。
- (12) 去除所有仅剩的 0.25 mL 上清液, 打匀细胞。
- (13) 将细胞悬液吸到巴斯德管内。

- (14) 取一个事先保存在冰箱里的清洁、脱脂的玻片，轻轻吹去玻片上的霜。
- (15) 在至少 10 cm 的高度将 1~2 滴细胞悬液滴在玻片上。
- (16) 每份培养物至少制备 2 张相同的样片。
- (17) 将玻片放到电炉上方微热烤干。

I-3. 染色

I-3.1. 材料

- (1) Hoechst 33258 染料。用 pH = 6.8 的磷酸盐缓冲液将 1000 倍的浓缩储存液配制成 50 $\mu\text{g/mL}$ ，4℃避光保存。
- (2) 吉姆萨染料。
- (3) 磷酸盐缓冲液，pH = 6.8，用市售药片；配置。
- (4) 2 × SSC（氯化钠和枸橼酸钠）：17.53 g 氯化钠，8.82 g 枸橼酸钠，蒸馏水加至 1 L。
- (5) 二甲苯和 DPX 封片剂。
- (6) 一个紫外灯（> 310 nm）或荧光长条灯。

I-3.2. 方法

片子制好后，在开始 FPG 染色前在室温下放置几天（可达 5 天），而常规吉姆萨染色可以在玻片干燥后立即开始。也可以选择 37℃条件下使玻片干燥后，次日进行 FPG 染色。

荧光加吉姆萨染色（FPG）

- (1) 将大约 10 滴 Hoechst 染液（将储存液稀释到 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ）滴到玻片上，盖上盖玻片。
- (2) 将玻片放在一张铝箔纸上，在紫外灯下方照射 0.5 h。
- (3) 小心移去盖玻片。
- (4) 用 pH = 6.8 的缓冲液清洗。
- (5) 在 60℃的 2×SSC 液中放 20~30 min。
- (6) 用蒸馏水清洗。

- (7) 将玻片在 5~10%的吉姆萨染液（PH = 6.8 缓冲液配制）中放 3 min。
- (8) 用缓冲液简单淋洗。
- (9) 用蒸馏水简单淋洗。
- (10) 空气干燥。
- (11) 干净后，盖玻片封片。

常规吉姆萨染色

- (1) 将玻片在 2%的吉姆萨染液（PH = 6.8 缓冲液配制）中放 5 min。
- (2) 缓冲液清洗。
- (3) 蒸馏水简单淋洗。
- (4) 空气干燥。
- (5) 干净后，盖玻片封片。

附件 II

FISH 法易位检测

这里给出的方法是用直接和间接标记的（市售）探针，以不同颜色涂染三对染色体，所有着丝粒用第四种颜色涂染，剩余染色体进行复染。厂家提供了操作指南，读者可以结合以下方法阅读。

II-1.1. 预处理

室温下将玻片在 PBS 中清洗 5 min，然后依次在 70%、90%和 100%的乙醇中梯度脱水，每次 2~5 min，空气晾干。

II-1.2. RNase和胃蛋白酶处理

将 445 μL 水、50 μL 20 \times SSC 液和 5 μL RNase A（10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）混合均匀（混合液可以提前配置， -20°C 保存备用）。每张玻片滴 100 μL RNase A，盖上盖玻片。置于湿盒中在 37°C 孵育 60 min。

在室温下用 2 \times SSC 液清洗 3 次，每次 5 min，第一次清洗时移去盖玻片。之后，在室温下用 PBS 清洗 5 min。对于胃蛋白酶处理（0.005%的胃蛋白酶溶解在 10 mM HCl 中），提前制备含有 50 μL （10%）胃蛋白酶、99 mL 水和 1 mL 1N HCl 的混合液，在 -20°C 保存备用。用时先将混合液置于 37°C 水浴中预热，每张玻片加 100 μL ，作用 1~2 min。在室温下用 PBS 清洗 5 min。

将玻片用 50 mM 的 MgCl_2 -PBS 溶液（5 mL MgCl_2 和 95 mL PBS）在室温下清洗 5 min，然后用含 1%甲醛的 MgCl_2 -PBS 溶液在室温下清洗 10 min，再用 PBS 在室温下淋洗 5 min。依次分别在 70%、90%、100%的乙醇中脱水处理 2~5 min，在室温下干燥。

II-1.3. 染色体涂染探针结合泛着丝粒探针的FISH步骤

使用前将染色体涂染探针置于 42°C 加热并摇匀，在含有杂交液的 Eppendorf 管中加入足量的每条染色体探针，摇匀后离心。

(a) 变性

将探针置于 65°C 水浴中孵育 10 min 进行变性，接着置于冰上 2~3 min，再转移至 37°C 水浴中孵育 60 min。

当染色体涂染探针与泛着丝粒探针（CP）结合使用时，在探针竞争性结合前先将 CP 和杂交液在 37°C 预热 30 min，然后在 85°C 水浴中孵育 10 min 进行变性，立即置于冰上 2~3 min。

使用三色 FISH 与泛着丝粒探针时，每张玻片要用 18~20 μL 杂交液（即三种浓缩的涂染探针各 3 μL ，加 1.6 μL 适当的缓冲液，再加 2~3 μL 浓缩的 CP）。

以 1、4、8 号三对染色体涂染为例：1 号染色体用生物素、4 号染色体用生物素或 FITC（异硫氰酸荧光素）、8 号染色体用 FITC 和 CP FITC 标记，结果分别显示红色、黄色、绿色和绿色的颜色信号。

(b) 预杂交

在探针竞争结束前大约 30 min 开始玻片的预杂交。每张玻片加溶解在 $2 \times \text{SSC}$ 和 50 mM PBS 溶液中的 70%甲酰胺 100 μL ，覆盖盖玻片（350 μL 去离子的 100%甲酰胺（ -20°C 保存）、50 μL 0.5M PBS（ -20°C 保存）、及 50 μL $20 \times \text{SSC}$ 液）。甲酰胺应在使用前不久去离子。

将玻片置于 70°C 加热板上 2.5 min 变性，在室温下依次置于梯度乙醇（ -20°C 保存）中脱水：70%乙醇作用 5 min；90%和 100%乙醇分别作用 2~5 min，空气干燥。

(c) 杂交

将全部染色体涂染探针和 CP 在一个 Eppendorf 管中混匀，离心几秒钟，每张玻片加 20 μL 探针混合液，盖玻片覆盖，用胶水封片后气干。然后将玻片置于 42°C 湿盒内孵育过夜，这段时间可延长至 2 天。

检测：

- (1) 准备含 0.05%吐温 20 的 $4 \times \text{SSC}$ 清洗液（WS）。
- (2) 用 WS 将封闭蛋白（BP）稀释至 15%（v/v）浓度。
- (3) 用稀释的 BP 稀释抗体如下：
 - 3.1.1 第一层 B3（1:500），德克萨斯红抗生物素蛋白；
 - 3.1.2 第二层 B4（1:250），生物素化山羊抗生物素蛋白；
 - 3.1.3 F1（1:200），兔抗 FITC；
 - 3.1.4 第三层 B3（1:500）F2~FITC，山羊抗兔 IgG；
 - 3.1.5 F2（1:100）。
- (4) 在室温下避光孵育 10 min，11 000 g 微型离心机离心 10 min，取上清液使用。
- (5) 将以下试剂预热到 42°C ：
 - i) 清洗液；

- ii) 适量 $2 \times \text{SSC}$ 液;
 - iii) 50%甲酰胺 ($2 \times \text{SSC}$ 配制);
 - iv) $0.1\% \times \text{SSC}$ 液。
- (6) 在预热的 $2 \times \text{SSC}$ 罐子里小心移去盖玻片。
- (7) 在下列预热的溶液中清洗玻片:
- i) 清洗液;
 - ii) 适量 $2 \times \text{SSC}$ 液;
 - iii) 50%甲酰胺 ($2 \times \text{SSC}$ 配制)。
- (8) 每张载玻片加 $100 \mu\text{L}$ 稀释的封闭蛋白, 盖玻片覆盖, 在 37°C 湿盒中孵育 15~20 min。
- (9) 用 0.05%吐温 20 ($4 \times \text{SSC}$ 配制) 在 42°C 清洗玻片 2~5 min。
- (10) 在每张玻片上滴加 $100 \mu\text{L}$ 第一层抗体, 盖玻片覆盖。将载玻片置于 37°C 湿盒中孵育 20~30 min。
- (11) 42°C 条件下用 0.05%吐温 20 ($4 \times \text{SSC}$ 配制) 清洗 3 次, 每次 5 min。
- (12) 在每张玻片上滴加 $100 \mu\text{L}$ 第二层抗体, 盖玻片覆盖。将玻片置于 37°C 湿盒中孵育 20~30 min。
- (13) 在 42°C 下, 0.05%吐温 20 ($4 \times \text{SSC}$ 配制) 清洗 3 次, 每次 5 min。
- (14) 在每张玻片上滴加 $100 \mu\text{L}$ 第三层抗体, 盖玻片覆盖。将玻片置于 37°C 湿盒中孵育 20~30 min。
- (15) 在 42°C 下用 0.05%吐温 20 ($4 \times \text{SSC}$ 配制) 清洗 3 次, 每次 5 min。
- (16) 重复步骤 11~14。
- (17) 在室温下将玻片依次置于 70%、90%、100%的乙醇中梯度脱水, 各 2~5 min。
- (18) 在室温下干燥。
- (19) 每张玻片加 $25 \mu\text{L}$ DAPI ($0.15\mu\text{g}/\text{ml}$ 于 Vectashield 封固剂中) 进行复染, 盖玻片覆盖。

如果所有探针信号不是足够亮, 可以在步骤 14 后再插入一轮第二和第三层抗体处理。另一种情况是, 若只有一种颜色信号较弱, 可以重复步骤 B3/清洗/B4 处理后, 德克萨斯红染色; 或重复 F1/清洗/F2 处理后 FITC 染色。

附件 III

早熟染色体凝聚 (PCC)

III-1. 有丝分裂细胞融合法 PCC

在聚乙二醇 (PEG) 作用下, 人类外周血单核细胞与分裂期的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞发生融合。细胞融合仅 1 h, 外周血单核细胞发生染色质凝聚, 之后核膜迅速溶解, 染色质进一步凝聚成为 46 ($2n = 46$) 条单体形状的染色体。

III-1.1. 人外周血淋巴细胞的分离

为了从抗凝全血中分离淋巴细胞, 可以采用 LeucoPREP 或 Ficoll-Hypaque 细胞分离管进行分离。

A. LeucoPREP 管分离

LeucoPREP 管系列产品内含一种分离液, 如 Ficoll-Hypaque, 能将低浓度的单核细胞和血小板从抗凝全血的其他成分中分离出来。将血液加入分离管的凝胶层上, 按特定的离心力和离心时间进行离心, 可以将单核细胞和血小板分离出来。随后通过清洗和离心减少血小板的量, 得到的一定数量的单核细胞, 可用于 PCC。

- (1) 将 LeucoPREP 管 (10 mL) 在室温 ($18\sim 25^{\circ}\text{C}$) 下竖立保存。
- (2) 静脉取血, 置于肝素抗凝管内。
- (3) 肝素抗凝血应在取血后 2 h 内进行分离。
- (4) 每个 LeucoPREP 管加入未经稀释的血样 8~10 mL, 然后在室温下 400~600 g 离心 15 min。
- (5) 离心后, 单核细胞和血小板刚好在血浆层下形成一层松散的白膜。尽量吸掉上层血浆而不损失细胞。用巴斯德吸管将细胞转移至 10 mL 带帽的锥形离心管中。
- (6) 轻轻混悬细胞沉淀。加入 10 mL F10 培养基, 颠倒离心管 3~4 次混匀细胞, 100 g 离心 10 min。
- (7) 重复步骤(5)一次。

B. Ficoll-Hypaque 梯度分离

Ficoll-Paque 是浓度为 1.077 ± 0.001 g/mL 的水溶液, 每 100 mL 含 5.7 g 水溶性蔗糖 400, 9 g 泛影酸钠钙二钠 EDTA。

- (1) 静脉取血, 置于肝素抗凝管内。

- (2) 用等体积的平衡盐溶液稀释血样。
- (3) 取 5 mL 稀释血样一滴，滴加在 3 mL Ficoll-Hypaque 上面，勿混合。
- (4) 管子在 8~10℃ 下 400 g 离心 30 min。
- (5) 收集中间层的淋巴细胞，用 5 mL F-10 培养基加 5% 胎牛血清洗三次，每次 100 g 离心 10 min。

分离的淋巴细胞可以立即接用于 PCC 实验，也可以冻存，为将来使用。

III-1.2. 冻存分离的淋巴细胞

在用 F10 洗涤离心二次后，轻轻混悬细胞沉淀，按 1:1 配制 F10 + 40% 胎牛血清 (FCS)：40% FCS + 20% DMSO 的细胞混悬液。将细胞悬液移至 1.5 mL 安瓿瓶中，使每瓶含有 8×10^6 个分离的淋巴细胞。冻存淋巴细胞最好使用能够逐级降温的设备，最后将安瓿瓶冻存在 -110℃ 或液氮中。

III-1.3. 复苏分离的淋巴细胞

从冰箱（或液氮）中取出冻存淋巴细胞的安瓿瓶，直接置于 37℃ 水浴中解冻。细胞稍微融化后，把所有的细胞悬液转移至 10 mL 离心管中。缓慢逐滴（约 30 分钟）加入 10 mL 冷的 RPMI (4℃) + 40% FCS，然后 100 g 离心 10 min。加入 5 mL 含 5% FCS 的 RPMI，重新混匀细胞球，得到的单核淋巴细胞可用于 PCC 实验。

III-1.4. 收集及制备分裂期中国仓鼠卵巢细胞

用含有完全培养基（含 15% 新生牛血清、100 IU/mL 抗生素及 100 μg/mL 链霉素的 F10 培养基）的圆形或长形培养瓶（750 mL）培养中国仓鼠卵巢（CHO）细胞。细胞培养至指数生长期时加入 0.1 μg/mL 的秋水仙素，4~5 h 后可按标准的选择性分离（振荡脱落）步骤收获分裂细胞。CHO 细胞也可以在加有 BrdU（终浓度为 5 μM）的完全培养基中生长两个以上细胞周期（约 32 h）。获得的有丝分裂期的 CHO 细胞在 FPG 染色后全部被分染呈浅色。这样，淋巴细胞 PCC 与有丝分裂期的 CHO 细胞能够很好地加以区分。

(1) 冻存分裂期 CHO 细胞

有丝分裂期的 CHO 细胞既可以制备后立即用于融合，也可以从含 8% DMSO 的完全培养基的冻存中复苏后使用。将细胞分装在小安瓿瓶中（每个安瓿瓶 1.5 mL，约含 2.5×10^6 个细胞），在 -110℃ 保存。

(2) 复苏分裂期 CHO 细胞

从冰箱中取出冻存的有丝分裂期 CHO 细胞安瓿瓶，置于 37℃ 水浴中融化，然后把细胞悬液转移至离心管中，加入 10 mL 培养液，100 g 离心 10 min。弃上清，加入 5 mL 培养液，冰浴备用。

III-1.5. 制备聚乙二醇（PEG）溶液

在 10 mL 的圆底小离心管中加入 400 mg PEG（M.W.1450，Sigma，40% w/v），再加入 600 μ L Hank's 平衡盐溶液（HBSS）或磷酸缓冲液（PBS）或 F10 培养液，将离心管置于 37℃ 水浴中 15 min。可先在烤箱内将 PEG 融化，然后再与 HBSS 或 PBS 或 F10 混合。

III-1.6. 细胞融合

- (1) 用 5 mL HBSS 或 F10 将间期淋巴细胞和分裂期 CHO 细胞分别清洗 1 次。100 g 离心 5 min, 弃上清。在含 10 mL F10 培养液的圆底培养管中，将间期淋巴细胞与分裂期 CHO 细胞按 5:1 的比例混合，100 g 离心 5 min（离心速度过高可能致细胞块过于结实）。
- (2) 弃上清，将试管倒置。在试管架上把管子倒置在滤纸上，将残留的液体吸掉。
- (3) 若底部沉淀物上面有气泡形成，用巴斯德吸管吸出气泡。
- (4) 用 200 μ L 微量加样器取 0.15 mL PEG 直接加入细胞沉淀中，于试管架上静置 1.5 min。每 30 s 轻摇试管一次，共摇 3 次。这时沉淀物应从试管底部分离，在 PEG 溶液中形成较大的细胞簇。
- (5) 用 3 min 以上时间非常缓慢地加入 1.5~2 mL F10 培养液或 PBS（每分钟 0.5 mL），轻敲试管使细胞悬液混匀。
- (6) 100 g 离心 5 min。
- (7) 将上清完全倒净，加入 0.5 mL 含 15% 胎牛血清的 F10 培养液。加入 50 μ L 终浓度为 1 μ g/mL 的秋水仙胺，轻敲试管形成小细胞团，然后在 37℃ 下孵育 1 h。这时的细胞融合和 PCC 诱导就完成了。

III-1.7. 固定步骤

- (1) 每管加入 7~8 mL 预热的低渗液（KCl，5.6 g/L），在 37℃ 下孵育 10 分钟。
- (2) 100 g 离心 5 min。
- (3) 弃掉多余的上清，留下 0.5 mL 上清液。加入 5 mL 甲醇：冰醋酸（3:1）固定细胞。

- (4) 100 g 离心 5 min。
- (5) 重复步骤 3~4，二次以上。
- (6) 最后一次离心后，弃多余上清，留大约 0.3 mL 固定液，轻敲试管打开细胞团块，再加入 0.5~1 mL 固定液。

III-1.8. 制片

用拉长的巴斯德滴管将细胞悬液滴在清洁的玻璃片上，在红外灯下观察 Newton 环的变化，轻轻吹开细胞。

III-1.9. 染色步骤

若分裂期 CHO 细胞没有预先用 BrdU 标记，玻片可以用 3% 的吉姆萨水合溶液 (Gurr Improved R660) 直接染色 5 min。

若分裂期 CHO 细胞预先已经用 BrdU 标记，可以按 FPG 法进行染色 (第 9.3 节)。最后，用蒸馏水冲洗玻片，晾干，用 24 × 60 mm 盖玻片覆盖。但是，要附加说明的是，第 11.2.1.6 节中介绍的染色法并不是经常首选的方法，而简单的吉姆萨染色就足够了。

对于 PCCs 的 C 显带 (用于双着丝粒分析)，先将新鲜制备的玻片用 1N HCl 处理 5 min，然后再用 0.2N HCl 漂洗 5 分钟。用纸巾吸干玻片上残留的液体，用 5% Ba(OH)₂ 溶液在室温下处理 3 min。接着重新用 0.2N HCl 漂洗 5 min。之后，将玻片置于 60℃ 的 2×SSC 中孵育 30 min。用 Gurr's 缓冲液 (pH = 6.8) 清洗后，再用 6% 吉姆萨染色 30 min。最后，用自来水冲洗玻片，晾干后盖上盖玻片。注意这种方法与第 9.3.3 节中介绍的方法略有不同，但二者都可行。

对于检测染色体易位，可用全染色体特异性探针结合泛着丝粒探针，按中期细胞相同的步骤进行操作 (参见附件 II 和图 37)。然后可以同时检测双着丝粒和染色体易位。

III-2. 化学诱导法 PCC

III-2.1 使用分离淋巴细胞的处理过程

- (1) 取 3 mL 抗凝全血，加入 LeukoPREP 或 Ficol-Hypque 管中。
- (2) 在室温下 700 g 离心 15 min。
- (3) 在 15 mL 试管中加入 5 mL 含 20% 胎牛血清的细胞培养液，将分离的淋巴细胞移至试管中进行清洗。
- (4) 在 4℃ 下，200~400 g 离心 10 min。

- (5) 用 6 mL 含 20%胎牛血清及 PHA 的培养液重新混匀淋巴细胞。
- (6) 在 37℃ 孵育 47 h (另一可选步骤为培养至 24 h 时加入 40 ng/mL 的秋水仙胺)。
- (7) 在培养液中加入终浓度为 50 nM 的 calyculin A, 在 37℃ 下孵育 1 h。
- (8) 准备预热 (37℃) 的 0.075 M KCl 低渗液。
- (9) 200~400 g 离心 5~10 min, 弃上清。
- (10) 将 2 mL 0.075 M KCl 加入细胞沉淀中, 混匀, 在 37℃ 孵育 20 min。
- (11) 加入 30 μ l 甲醇/冰醋酸固定液 (3:1), 轻弹管壁。
- (12) 在室温下, 200~400g 离心 5~10 min。
- (13) 弃上清后加入 1.8 mL 甲醇: 醋酸, 移至 2 mL 管内。
- (14) -20℃ 保存, 备用。

III-2.2. 使用全血的处理过程

- (1) 将 0.75 mL 肝素钠抗凝全血加入 15 mL 试管内。
- (2) 添加含 20%胎牛血清及 PHA 的培养液, 至 10 mL 总体积。
- (3) 在 37℃ 孵育 47 h (另一可选步骤为培养至 24 h 时加入 40 ng/mL 的秋水仙胺)。
- (4) 在培养液中加入终浓度为 30 nM 的 calyculinA, 在 37℃ 孵育 1 h。
- (5) 在室温下, 200~400g 离心 5~10 min。
- (6) 弃上清后加入 5 mL 0.075 M 的 KCl, 在 37℃ 孵育 25 min。
- (7) 加入 30 μ l 甲醇: 醋酸, 轻弹混匀。
- (8) 在室温下, 200~400g 离心 5~10 min。
- (9) 加 2 mL 3:1 的甲醇: 醋酸。
- (10) 重复步骤 8 和 9, 直至沉淀物干净。
- (11) 将细胞悬液移至 2 mL 试管中。
- (12) -20℃ 保存试管, 备用。

附件 IV

胞质分裂阻断微核检测

简单的标准操作步骤如下所述。还有其他包括更多操作步骤和使用分离淋巴细胞培养的方法[1]，但就常规生物剂量学的目的而言，全血培养就足够了。

IV-1. 标准的胞质分裂阻断微核操作步骤

- (1) 用肝素锂抗凝剂采集血样。
- (2) 典型的方法是将 0.5 mL 全血加入 4.5 mL 含 10~15% 灭活胎牛血清、L-谷氨酰胺及抗生素的 RPMI-1640 培养基中。培养物中加入 100 μ l 的植物血球凝集素（即 PHA-M, Sigma, 25 mg/25mL 水），终浓度为 20 μ g/mL。
- (3) 将血样加入组织培养瓶内，在 37°C 含 5% CO₂ 的潮湿空气中培养。
- (4) PHA 刺激 24 h 后，加入 20 μ l Cyt-B，终浓度为 6 μ g/mL。这个浓度是促进全血中双核细胞积累的最佳浓度。由于 Cyt-B 难溶于水，所以用 DMSO 预先配制 Cyt-B 储存液（5 mg Cyt-B 溶于 3.3 mL DMSO 中）。等量分装后在 -20°C 保存备用。
- (5) PHA 刺激后 68~72 h 终止培养。所选择的收获时间以双核细胞的数量最大化、单核及多核细胞数量最小化为准。
- (6) 细胞在 180 g 轻轻离心 10 min，弃去上层培养液。
- (7) 细胞经 7 mL 4°C 预冷的 0.075 M 的 KCl 低渗处理，裂解红细胞，立即 180 g 离心 10 min。
- (8) 弃上清，加入 5 mL 新配制的甲醇：冰醋酸（10:1）固定液。固定液用林格氏液（4.5 g NaCl, 0.21 g KCl, 0.12 g CaCl₂，溶于 500 mL H₂O 中）按 1:1 稀释。加入固定液同时混匀细胞，防止细胞团块形成。再次 180 g 离心 10 min。
- (9) 用新配制的甲醇：冰醋酸（10:1）固定液清洗细胞 2~3 次，这时不含林格氏液，直到细胞悬液变干净。
- (10) 吸出上清液，留高于细胞沉淀 1 cm 左右（视沉淀多少而定）的液体。轻轻混匀细胞，取悬液滴在洁净的玻片上，晾干。
- (11) 用光学显微镜分析细胞，可以用含 2~6% 吉姆萨染液（即 Giemsa's Azur-Eosin-Methylene blue solution, Merck）的 HEPES 缓冲液（0.03 M, pH 6.5）避光染色 10~20 min，然后用蒸馏水快速冲洗，晾干。用荧光显微镜分析时，可选用吖啶橙（10 μ g/mL 的磷酸盐缓冲液，pH = 6.9）染色 2~3 s。

IV-2. 微核-着丝粒染色步骤

分析微核中的着丝粒时，需要使用商用泛着丝粒 FISH 探针。也可以通过 PCR 扩增制备泛着丝粒探针（正义链引物：5'-GAA GCT TAA CTC ACA GAG TTG AA-3'；反义链引物：5'-GCT GCA GAT CAC AAA GAA GTT TC-3'）[2]。

以下是商用探针的原位杂交步骤：

- (1) 按上述标准的 CBMN 操作步骤制片（至步骤 10）。
- (2) 将玻片依次置于 70%、90%、100% 系列乙醇中脱水处理，每次 2 min，晾干。
- (3) 玻片变性：
 - (i) 将染色质玻片置于 70% 甲酰胺（2 × SSC 配制）中，在 70°C 下变性 2 min；
 - (ii) 将玻片浸在冰冷的 70% 乙醇中，经 70%、90%、100% 乙醇依次脱水，晃动 5 min。
- (4) 使用前探针变性：
 - (i) 将探针置于 37°C，加热 5 min；
 - (ii) 将探针置于 85°C，变性 10 min（每张玻片 10 μl 探针）；
 - (iii) 用漩涡器快速旋转混合。
 - (iv) 立即置于冰上避光保存。
- (5) 杂交：
 - (i) 每张玻片加 10 μl 探针，盖玻片覆盖后用胶水封口；
 - (ii) 置于湿盒中避光，在 37°C 杂交过夜。
- (6) 杂交后清洗：
 - (i) 除去封口胶，将载玻片短暂浸泡在 50% 甲酰胺中，抖掉盖玻片；
 - (ii) 将玻片在 37°C 的 2 × SSC 液中清洗。
 - (iii) 将玻片用 50% 甲酰胺在 37°C 下清洗两次，每次 5 min。
 - (iv) 将玻片在 37°C 的 2 × SSC 中清洗 5 min。
 - (v) 用吐温清洗液（0.05% 2 × SSC）在 37°C 清洗 5 min。
 - (vi) 滴一滴 DAPI/抗褪色剂于盖玻片上，覆盖标本。
- (7) 玻片可在室温下避光保存，或立即在荧光显微镜下计数。

IV-3. 单独的淋巴细胞胞质分裂阻断微核细胞学（CBMN Cyt）测定法

CBMN Cyt 检测的详细操作步骤近期已经发表[1]。用 CBMN Cyt 法计数不同细胞类型的综合图像记录参见 Fenech 等[3]。

IV-4. CBMN 测定中核分裂指数（NDI）的计算误差

在第 12.4.3 节中给出的 NDI 计算公式及方差（对于 MN 测定）如下：

$$NDI = \frac{M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4}{N} \quad (IV-1)$$

$$\text{var}(NDI) = \sum_{i=1}^4 M_i^2 \text{var}(M_i) + 2 \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^4 M_i M_j \text{cov}(M_i, M_j) \quad (IV-2)$$

以表 IV-1 为例，说明 NDI 及方差的计算过程。

表 IV-1. 微核的分布

含有 1~4 个微核的细胞数目					
N	1	2	3	4	NDI
500	169±111.878	239±124.758	48±43.392	44±40.128	1.934

表 IV-1 给出总数 500 个细胞中含有 1、2、3 或 4 个微核的细胞数目。根据上述公式（IV-1）进行计算 NDI：

$$NDI = (169 + 2 \times 239 + 3 \times 48 + 4 \times 44) / 500 = 1.934$$

每个值的方差用二项式方程（IV-3）计算：

$$\text{Var}(M_i) = N(M_i / N)(1 - (M_i / N)) \quad (IV-3)$$

所以对于 M_1 ：

$$\text{var}(M_1) = 500 (169 / 500) (1 - (169 / 500)) = 111.878$$

注：此处给出的所有数字均由 Microsoft Excel 软件计算获得，每个值校正到小数点前的最大值。但为了方便，本书中给出的数据保留到小数点后三位数，所以用计算器计算给出数据时结果可能会有小的差异。

为了计算 $\text{var}(NDI)$ ，必须首先计算 M_i 的每个值的平方乘以它的方差所得的和：

$$\sum_{i=1}^4 M_i^2 \text{var}(M_i) \quad (IV-4)$$

但是，由于只有得到 $M = 1、2、3、4$ 的细胞总数才能正确计算协方差，故用下列 M' 代替方程式中的 M ：

表 IV-2. 计算 M_i' 及 $VAR(M_i')$ 值

方程 (IV-2) 的 M_i' 值				
N	1	2	3	4
967	169±139.464	478±241.719	144±122.556	176±143.967

M 值经重新计算得： $M_1' = 1 \times 169$ ； $M_2' = 2 \times 239$ ； $M_3' = 3 \times 48$ ； $M_4' = 4 \times 44$ 。 n 值为这些值之和，计算如下：

$$N = (169 + 2 \times 239 + 3 \times 48 + 4 \times 44) = 967$$

方差值按照方程 (IV-3) 重新计算，但利用新的 M_i' 及 n 值，例如：

$$Var(M_2') = 967 \times (478/967) \times (1 - (478/500)) = 241.719$$

表 IV-2 中的 M_i 和 $var(M_i)$ 值可以用来计算 $var(NDI)$ 的第一部分，由方程 (IV-4) 给出：

$$\begin{aligned} & \sum_{i=1}^4 M_i'^2 \cdot var(M_i') \\ &= M_1'^2 \times var(M_1') + M_2'^2 \times var(M_2') + M_3'^2 \times var(M_3') + M_4'^2 \times var(M_4') \\ &= (169^2 \times 139.464) + (478^2 \times 241.719) + (144^2 \times 122.556) + (176^2 \times 143.967) \\ &= 66212947.630 \end{aligned}$$

然后，根据方程 (IV-1)，必须找到每组数据的协方差。用以下公式计算：

$$Cov(M_i', M_j') = -np_i p_j \quad (IV-5)$$

上式中， p_i 和 p_j 为双核细胞中观察到每个微核数的概率，因此 M_1 到 M_4 的概率计算如下：

$$P_1 = 169/967 = 0.175$$

$$P_2 = (2 \times 239)/967 = 0.494$$

$$P_3 = (3 \times 48)/967 = 0.149$$

$$P_4 = (4 \times 44)/967 = 0.182$$

因此， M_1' 和 M_2' 的协方差按方程 (IV-5) 计算：

$$cov(M_1', M_2') = -967 \times 0.175 \times 0.494 = -83.539$$

用类似的方法计算每组 M_i' ， M_j' 的协方差：

$$cov(M_1', M_3') = -967 \times 0.175 \times 0.149 = -25.166$$

$$cov(M_1', M_4') = -967 \times 0.175 \times 0.182 = -30.759$$

$$\begin{aligned}\text{cov}(M_2', M_3') &= -967 \times 0.494 \times 0.149 = -71.181 \\ \text{cov}(M_2', M_4') &= -967 \times 0.494 \times 0.182 = -86.999 \\ \text{cov}(M_3', M_4') &= -967 \times 0.149 \times 0.182 = -26.209\end{aligned}$$

接着，计算方程（IV-2）中第二部分的每个组成。例如 $i = 1, j = 2$ 时：

$$M_1' M_2' \text{cov}(M_1', M_2') = 169 \times 478 \times (-83.539) = -6\,748\,429.704$$

同样，从 $i=1$ 到 4； $j = i+1$ 到 4 的总和为：

$$\begin{aligned}M_1' M_3' \text{cov}(M_1', M_3') &= 169 \times 144 \times (-25.166) = -612\,451.806 \\ M_1' M_4' \text{cov}(M_1', M_4') &= 169 \times 176 \times (-30.759) = -914\,897.142 \\ M_2' M_3' \text{cov}(M_2', M_4') &= 478 \times 144 \times (-71.181) = -4\,899\,528.670 \\ M_2' M_4' \text{cov}(M_2', M_4') &= 478 \times 176 \times (-86.999) = -7\,319\,049.001 \\ M_3' M_4' \text{cov}(M_3', M_4') &= 144 \times 176 \times (-26.209) = -664\,238.196\end{aligned}$$

一旦每项数据都计算出来后，将方程（IV-2）第二部分的全部数据相加得到总和为 -21 158 594.519。按照方程（IV-2），NDI 的方差为：

$$\text{var}(\text{NDI}) = 66\,212\,947.630 + 2 \times (-21\,158\,594.519) = 23\,895\,758.592$$

为了将方差转化为标准误的归一值，用 NDI 值表示，用以下方程：

$$SE(\text{NDI}) = \frac{\sqrt{\text{var}(\text{NDI})}}{n} \bigg/ \frac{1}{\sqrt{n}} = \frac{\sqrt{\text{var}(\text{NDI})}}{n^{3/2}} \quad (\text{IV-6})$$

利用上述计算值，给出标准误：

$$SE(\text{NDI}) = (23\,895\,758.592^{1/2}) / 967^{3/2} = 0.163$$

因此，用表 IV-1 中给出的数据计算得到 NDI 值为 1.934 ± 0.163 。

附件 V

有丝分裂指数的确定标准

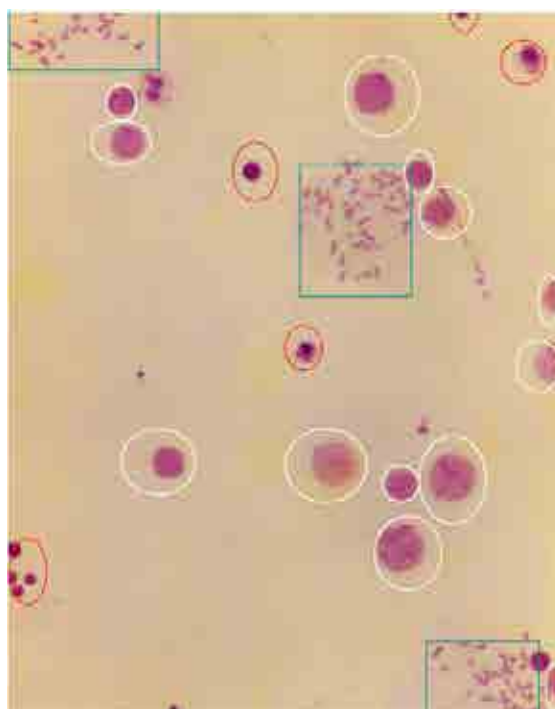
双着丝粒分析中确定有丝分裂指数的方法是：

- 排除分叶细胞核、未分裂细胞（小核）、已经死亡或正在死亡的细胞及微核。
- 计数有丝分裂细胞及刺激转化细胞（核较大的转化细胞）的核数目，通过公式（V-1）计算刺激细胞的有丝分裂指数。

根据被刺激细胞的核大小排列，在受刺激的小细胞核和未受刺激的细胞核之间人为建立一个分割。“中期分裂相”应该包括分裂前期和分裂后期。

$$\text{有丝分裂指数} = \frac{(\# \text{中期分裂相}) \times 100}{\# \text{中期分裂相} + \text{转化细胞}} \quad (\text{V-1})$$

图 V-1 中，有丝分裂指数为 $(3 / (3 + 12)) \times 100 = 20\%$ ，但是对于完整的有丝分裂指数分析，典型计数要求 500 个细胞。



图V-1. 典型的淋巴细胞培养样片低倍放大视图。白色圈住的是要计数的转化细胞胞核，红色圈住的是不计数的细胞，方框围住的是中期分裂相。

附件 VI

统计分析

本出版物在前面，主要是在第八章和第九章中，介绍了应用统计学方法分析和解释细胞遗传学生物剂量数据的计算举例。可供选择的统计学教科书很多，有些专门针对生物学和生物医学的应用，因此，本出版物并不详尽地讲述统计学。但本附件简单介绍在细胞遗传生物剂量学方面常常遇到的分布。本附件第三部分给出了剂量-效应曲线拟合的软件程序。

VI-1. 细胞遗传学的基本统计方法

VI-1.1. 标准误和标准差

一组数据的标准差（SD）只表示这组数与其均值的平均离散度（距离）。它表示数据组的数值分散程度有多大。

均数的标准误（SEM）用于测量样本均数可能与实际总体均数的偏离程度。SEM 是统计学中反映抽样误差的度量。SEM 可以定量评价已知实际总体均数的准确性。SEM 随样本量的增大而减小，因为大样本均数比小样本均数更接近于实际的总体均数。

VI-1.2. p 值

假设数据点是一次独立事件结果，p 值就是得到给定数据点极端值的概率。例如，设定一个原假设，即两个总体均值相同，p 值为 0.03，表示如果原假设为真，观察的差异与测量差异相同的概率为 3%。来自相同总体的随机样本会导致在 97% 的实验中差异比测量的小，在 3% 的实验中差异比测量值要大。

统计检验中，若 p 大于显著性水平（常取 0.05），则数据没有明显偏离预期模型，因而不能拒绝原假设。需要特别注意的是，在上述情况中不能得出原假设为真的结论，要么“拒绝原假设”（ $p < 0.05$ ），要么“原假设不是显著性不为真”（ $p \geq 0.05$ ）。

多样本间比较时，p 值必须按后述方法修正：对大量独立的原假设 N 而言，得到一个或多个低于阈值的 p 值， $t = 0.05$ ，概率是 $100(1.00 - 0.95^N)$ 。要确保真实的原假设被错误拒绝的总体风险 ≤ 0.05 所需要阈值是 $1.00 - 0.95^{(1/N)}$ 。

VI-1.3. χ^2 检验

卡方检验（离均差或离均差的平方和（Pearson χ^2 ））用于评估正态分布结果的各部分之间是否具有统计学显著性差异。 χ^2 检验中，p 值（及相关的自由度）表示所得结果抽样误差的概率。通常把显著性标准设为 95%，表示一组正态分布数据中，预期的抽样误差只有 5%。

卡方齐性检验通过比较大量测量结果，对观察事件的相对频率服从卡方分布的无效假设进行检验。在细胞遗传学中，卡方齐性检验用于多组数据之间的差异检验。例如通过观察计数细胞中双着丝粒的数目，以此确定数据组内不同总体的数量。

一般说来，只有当样本容量大于~5 时卡方检验才是可靠的。对于小样本来说，Yates 校正法可以用来减小将数据近似成卡方分布而引起的误差。校正后能有效减小卡方统计量，因此增大了相应的 p 值。但是，校正法的适用条件并非恒定不变，且校正因素可能太多，因此建议谨慎应用。

在对两样本进行比较的特殊情况下，数据期望服从二项式分布。在此情况下，用二项式分布的正态近似值来计算 χ^2 ，是对一个自由度进行卡方检验。二项式版本的卡方检验可用于比较一组观察的计数和期望的计数，例如一个未受照的对照血样中的与一个受照射的血样中的双着丝粒数目的比较。

VI-1.4. t 检验

t 检验是一种统计学假设检验，如果统计量 t 服从 t 分布，则原假设为真。t 检验适用于因总体标准差不确定而不能作为正态分布处理的小样本。考虑到 t 检验受到随机抽样的影响，必须包含样本数的信息。在细胞遗传学中，t 检验常被用来检测两组泊松分布数据间差异的统计学意义，通过比较均值来判断两组数据是否来自同一总体。同样， p 值用于判定样本间差异是否具有统计学意义，通常设置显著性水平为 95%或 0.05。

t 检验有多种不同的形式，分别适用于不同的情况。配对 t 检验用于直接相关的样本的分析。如两名计数人员计数同一组样片得到的双着丝粒数目。配对 t 检验中两样本容量（如计数的细胞数）必须始终相等。非配对比较的 t 检验用于独立样本的数据分析，如两名不同的计数人员计数两组不同的样片得到的双着丝粒数目。在此情况下，样本容量可以相同，也可以不同。t 检验可以是单侧也可以是双侧。单侧检验用于判断一个样本是否显著大于另一样本，双侧检验用于判断两组数据间任一方向的差异是否具有显著意义，如样本 1 是否大于或小于样本 2。

VI-1.5. F 检验

F 分布是一种连续概率分布，相当于两组卡方分布之比。基于该分布的 F 检验可以用来比较数据，看它们是否来自同一分布。F 检验或 z 检验可用于检测极大似然法拟合曲线产生的系数是否具有统计学意义。当证据表明不能满足拟合时（例如通过 χ^2 检验），应该用 t 检验来检验系数的统计学意义。t 检验是对均值进行比较，与此相反，F 检验是对数据组的方差进行比较。F 检验最常用于方差的检验分析。

VI-1.6. 方差分析

方差分析涉及到检验均值相等的一些方法的汇总。方差分析用 F 分布来检验独立的、正态分布的、具有方差齐性的三组以上数据之间的，或重复测量的数据之间的差

异。方差分析可以通过比较不同因素水平的变量均值，来评价一个或多个因素的重要性。

每个因素的 p 值表示组间方差大于组内方差的概率。 p 值可以认为是随机抽样导致的均值远离实验观察值的概率。

在细胞遗传学中，方差分析可用于需要比较三组以上数据、或两个以上因素的任何情况。例如，可以用来检验辐射剂量水平和分次剂量的复合效应，或辐射照射与化学暴露的复合效应。关于方差分析的教科书数量多，种类广，但大多数市售数据处理软件包能进行方差分析，统计学教材可以提供更多的指导。

尽管原则上方差分析是一个参数分析方法，通常只用于正态分布数据，但是细胞遗传学最常遇到的数据类型（如泊松分布）近似正态分布，足以保证进行方差分析。另一种就是大量的非参数分析方法，介绍如下。

VI-1.7. 非参数检验

在数据不能满足正态分布的情况下，就要用非参数检验。Wilcoxon 检验是一种与配对 t 检验相似的非参数检验方法，可用于比较一组或两组数据。Wilcoxon 检验是一种符号排列检验，要求按重复间隔测量数据。检验统计寻找的是总体中位数。对于独立样本，可以应用 Mann Whitney 检验。这是 t 检验的非参数检验法，用于检验两组未配对数据是否来自于相同分布。对于多组数据的比较，Kruskal Wallis 检验是 Mann Whitney 检验的一种延伸，类似于方差分析。

VI-2. 统计分布

有几种形式和类型的分布可用来模拟事件发生的概率。分布类型的选择对数据的准确分析十分重要，在细胞遗传学数据估算中已经提出并使用了几种模型。下面讨论几种最常用的模型及其在辐射细胞遗传学中的应用。

VI-2.1. 泊松分布

泊松分布是一种离散型概率分布，表示罕见的机事件发生的概率。泊松分布是细胞遗传学数据分析中最广泛认可和最常使用的分布类型。染色体畸变的数据通常在数量上非常小，Edwards 等人证明，染色体畸变更真实地服从泊松分布，而不是正态分布[4]。Merkle 证实，服从泊松分布的拟合度检验，包括本出版物中讨论的 χ^2 检验、方差分析和 u -检验，已被证明是适合于细胞遗传学数据分析的，特别是在大样本容量情况下[5]。对于曲线拟合，已经证明回归分析适用于泊松分布数据。导致的极大似然形式[6]和（或）加权最小平方[7]拟合，现在被最普遍地应用于建立双着丝粒或微核等染色体畸变剂量刻度曲线。

VI-2.2. 二项分布

二项分布是一种离散型概率分布，用于描述一系列独立实验中成功结果数的概率，每个只有两种可能结果之一。在每一种情况下，若结果 1 的概率为 p ，则结果 2 的概率为 $1-p$ 。细胞遗传学中，用二项分布模拟一组数据的最好例子是计数损伤细胞的数目，其中两种可能结果是细胞要么损伤，要么完好。实际上，二项分布还经常用来计算损伤细胞的标准误。

VI-2.3. 混合泊松分布模型

Sasaki[8]提出了一种分析染色体畸变数据的方法，试图解决不均一性导致的平均剂量估算不当的问题。细胞群是由多个细胞亚群的混合体组成，每个细胞亚群受到不同剂量照射，引起不同数目的损伤。因此细胞中染色体损伤的分布可以表现为一种混合泊松分布，将其展开可得到一个剂量分布模型。这个模型被证实对于模拟数据或真实数据的线性平方剂量效应能提供足够的拟合。

VI-2.4. 负二项分布

像泊松分布一样，负二项分布也是离散型概率分布，但是负二项分布还有另外一个参数用于表示过离散分布。当过离散参数趋近 0 时，负二项分布接近于泊松分布[9]。已有一些学者用负二项分布代替泊松分布，例如在 2008 年一项对航天员的染色体易位率的研究中[10]。

VI-2.5. 奈曼 A 型分布

奈曼分布最早由 Neyman 于 1939 年提出，他用这种新的分布法来检验两个方差不同的样本均值之间的差异。这种方法与其它标准检验方法如 z 检验和 t 检验不同，例如， z 检验和 t 检验是基于正态分布的数据，分别具有已知或未知的总体标准差，还要求方差如果不同必须相近。奈曼 A 型分布随样本量的增加趋近于广义泊松分布[11]。2008 年 Morand 等人发表了一篇技术报告，介绍 NETA 计算程序可用于计算奈曼 A 型分布事件的 95% 置信限[12]。Morand 及其同事发现，用奈曼分布计算得到的置信限比用传统的泊松分布法（用于小样本容量（细胞数））计算到的要小[12]。

VI-2.6. 其它分布

β 分布定义为一组连续概率分布，定义在 0—1 区间，由两个形状参数确定，通常称为 α 和 β 。对于多个（两个以上）参数，Dirichlet 分布是 β 分布的一种扩展形式。Stiratelli 等[13]对于化学诱导染色体损伤的泊松分布与二项分布和 β -二项、负二项及相关二项的分布进行了比较。与 Poisson 分布和简单二项分布明显不同的是，这些模型都不依赖于细胞反应的独立性。作者发现，所有基于 β 分布的模型都较泊松分布和二项分布模型显示出更好的拟合（用 χ^2 检验）。 β -二项分布模型对作者给出的数据提供了最好的拟合[13]。

对数正态分布由 Aitchison 和 Shen 于 1980 年正式提出。二维正态分布的逻辑转换可以在简单的二维正态分布基础上产生一个对数正态分布。当基础病例分类不明确时（如染色体畸变数据），可以用这种分布进行统计学诊断。作者对其应用给予举例说明，如复合概率数据的直接统计学描述和分析，以及在多项式和偶然性列表数据分析 [14] 中作为 Dirichlet 共轭先验类的替代。

VI-3. 拟合剂量效应曲线的程序

有关曲线拟合软件的介绍见第 8.3 节。本附件给出了一个使用软件 R-based 工具的实例，用于表 4 中 ^{60}Co 数据的拟合。尽管 CABAS 和“剂量估算”可用作现成的软件包，但 R 程序需要数学专业人员来编写。需要的程序已经（由 H. Braselmann）编写完成，全部展现在框 1 中，未在别处发表。

该程序由四部分组成。第一部分用于输入观察数据，如剂量、畸变数目、计数的细胞数及分布指数（disp）等。这个指数有两种选择：或者把每个剂量点作为恒定的值，或者把每个剂量视为独立的值。在实例中恒定值用 1.0，另一种选择是用表 4 给出的单个 σ^2/y 值。（注意程序中所有以#号开头的行只是信息提示而不运行）。接下来部分是输入最理想的条件：i) δ 相关系数，推荐用 1 或者也可以估算这一系数；ii) 必要的权重；iii) 希望拟合的函数。对这一点，线性拟合输入“1”，线性平方输入“lq”。剩余两部分只需要程序的研发者加以修改。若要将数据拟合成线性剂量效应函数，则必须用表 4 中的 ^3He 数据来输入（见框 1 下方），之后程序与框 1 显示的相同。

要运行该程序，需要从互网站下载 R 程序（第 8.3 节），用本出版物的 PDF 版本，将框 1 中的程序直接复制粘贴到 Word 处理软件中。取代 ^{60}Co 实例数据输入自己的数据，选择预定选项“1”或“lq”，使用屏幕上的 R 程序，将编程贴到符号>后面。

输出结果显示于框 2，其中 x0、x1 和 x2 分别是方程（2）的系数 C、 α 和 β ，及相应的标准误。z 值是对每个系数各自概率（Pr）的显著性检验。同时给出的还有每个系数的方差和协方差。请注意这些系数的值与表 5 所示的相同，相应的方差和协方差值见第 9.7.3 节。R 程序输出结果也以曲线图方式展示了数据点和拟合的曲线（图 VI-I）。

框 1. 举例说明 ^{60}Co 数据的曲线拟合程序

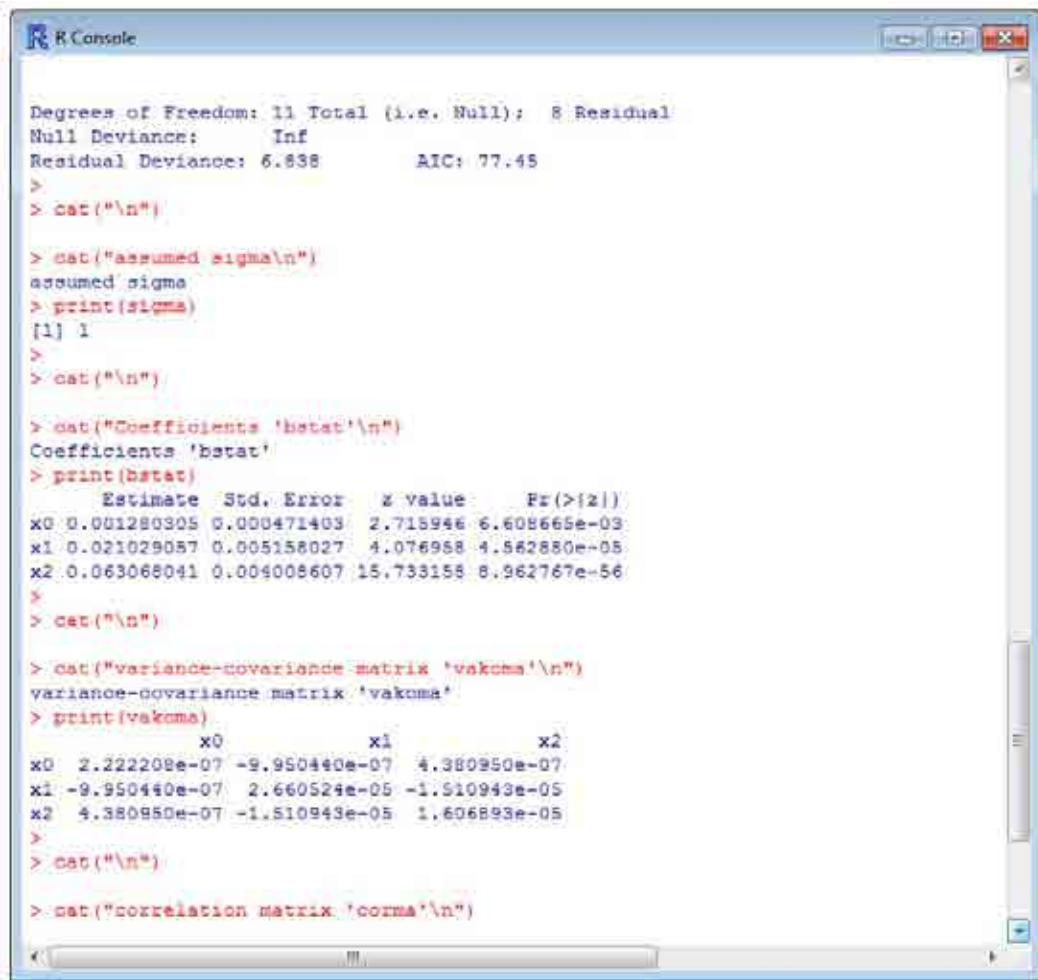
```
## latest changes: H. Braselmann, 2010, April 9th
##      Helmholtz Zentrum München, Department of Radiation Cytogenetics, Germany
## contact details: braselm@helmholtz-muenchen.de
## user part: data
# cobalt-60 gamma (86)
dose<-c(0.0,1,0.25,0.5,0.75,1,1.5,2,3,4,5)
ab<-c(8.14,22,55,100,109,100,103,108,103,107)
cells<-c(5000,5002,2008,2002,1832,1168,562,332,193,103,59)
disp<- 1.0
#disp<- c(1.0,1.0,1.08,0.97,1.03,1.0,1.06,1.14,0.83,0.88,1.15)
## user part: option settings
sigma<- 1      # regression sigma 1 or
#sigma<- NULL  # NULL (regression sigma estimated)
wt<- 1/disp     # weight setting, required!
model<- "lq"
#model<- "l"
# "l"      for linear or "lq" for linear quadratic
# a background value (c) is fitted in both options
#####
## execution part: changes recommended only for developers of the script ##
#####
if (length(disp)==1) disp<- rep(disp,length(dose))
kurvendaten<- data.frame(dose,ab,cells,disp)
print(kurvdaten)
x0<-cells
x1<-cells*dose
x2<-cells*dose*dose
modelldaten<-list(x0,x1,x2,ab)
if (length(wt)==1) wt<- rep(wt,length(dose))
if (model=="lq" & sigma==1)
  result<-glm(ab ~ -1 + x0+x1+x2,family=poisson(link="identity"), weights=wt, data=modelldaten)
if (model=="lq" & is.null(sigma))
  result<-glm(ab ~ -1 + x0+x1+x2,family=quasipoisson(link="identity"), weights=wt, data=modelldaten)
if (model=="l" & sigma==1)
  result<-glm(ab ~ -1 + x0+x1,family=poisson(link="identity"), weights=wt, data=modelldaten)
if (model=="l" & is.null(sigma))
  result<-glm(ab ~ -1 + x0+x1,family=quasipoisson(link="identity"), weights=wt, data=modelldaten)
smry<-summary(result,correlation=TRUE)
#smry$coefficients
#smry$correlation
corma<-smry$correlation
bstat<-smry$coefficients
seb<-bstat[,2]
vakoma<-corma*outer(seb,seb)
vakoma<-vcov(result)
#####
## output of results ##
#####
cat("\n")
cat("Result of curve fit 'result'\n")
cat("-----\n")
print(result)
cat("\n")
cat("assumed sigma\n")
print(sigma)
cat("\n")
cat("Coefficients 'bstat'\n")
print(bstat)
cat("\n")
cat("variance-covariance matrix 'vakoma'\n")
print(vakoma)
cat("\n")
cat("correlation matrix 'corma'\n")
print(corma)
```

```
par(lwd=2)
plot(dose, ab/cells)
if (model=="lq") curve(bstat[1,1]+bstat[2,1]*x+bstat[3,1]*x*x,0,max(dose), add=TRUE)
if (model=="l") curve(bstat[1,1]+bstat[2,1]*x,0,max(dose), add=TRUE)
```

The input data for fitting ^3He data to the linear model.

```
# 20 MeV helium  $\alpha$ -particles (87)
dose<-c(0,0.051,0.104,0.511,1.01,1.536,2.05,2.526,3.029)
ab<-c(3,19,27,199,108,96,120,148,108)
cells<-c(2000,900,1029,1136,304,142,137,144,98)
disp<- 1.19
sigma<- NULL
wt<- 1/disp
model<- "l"
```

框 2 ^{60}Co 数据的拟合结果



```
R Console

Degrees of Freedom: 11 Total (i.e. Null): 8 Residual
Null Deviance:      Inf
Residual Deviance: 6.638      AIC: 77.45
>
> cat("\n")
> cat("assumed sigma\n")
assumed sigma
> print(sigma)
[1] 1
>
> cat("\n")
> cat("Coefficients 'bstat'\n")
Coefficients 'bstat'
> print(bstat)
      Estimate Std. Error  z value    Pr(>|z|)
x0 0.001280305 0.000471403  2.715946 6.608665e-03
x1 0.021029057 0.005158027  4.076958 4.862880e-05
x2 0.063068041 0.004008607 15.733158 8.962767e-56
>
> cat("\n")
> cat("variance-covariance matrix 'vakoma'\n")
variance-covariance matrix 'vakoma'
> print(vakoma)
      x0      x1      x2
x0 2.222208e-07 -9.950440e-07 4.380950e-07
x1 -9.950440e-07 2.660524e-05 -1.510943e-05
x2 4.380950e-07 -1.510943e-05 1.606893e-05
>
> cat("\n")
> cat("correlation matrix 'corma'\n")
```

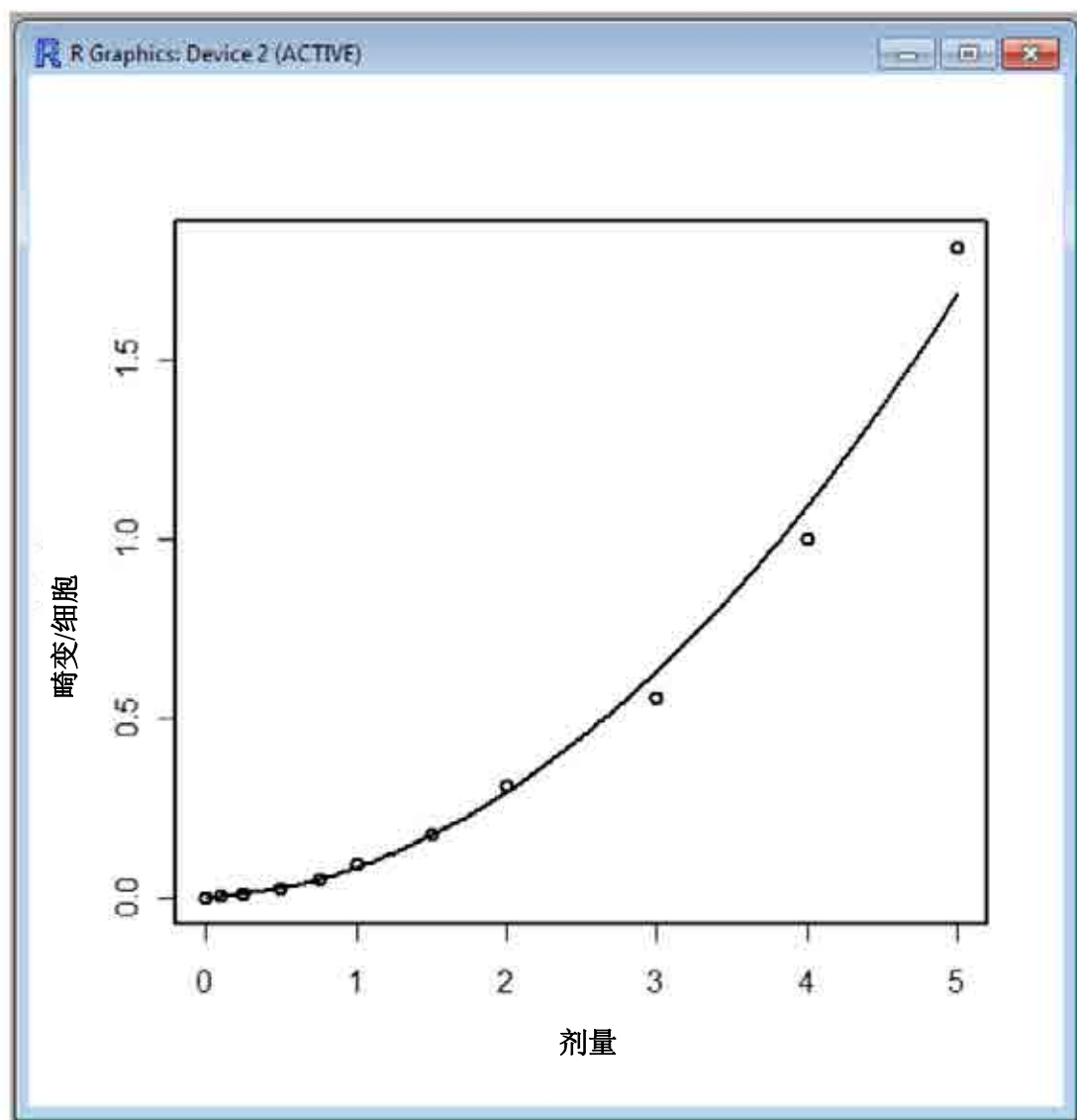


图 VI-I. ^{60}Co 数据曲线图：显示观察的数据点和拟合的线性平方曲线。

附 件 VII

实验室间质量保证比对演练实例

本附件提供一个在 14 个生物剂量学实验室之间进行国际比对的实例。比对演练包括血样接受 0.75 Gy 和 2.5 Gy 的 ^{60}Co γ 射线离体照射后中期细胞样本的制备和分析。要求参与比对的实验室分析 50 或 100 个细胞（分类诊断模式），常规计数 500 个细胞或达到 100 个双着丝粒时终止计数，然后报告双着丝粒率和估算的剂量。对于这次实验室间的比对，用 ISO 5725-5 与 ISO 13528:2005 标准[15、16]描述的稳健统计法（A 和 S 算法）对各实验室的绩效及演练的可重复性进行评估。

这里介绍的实例只是实验室间比对结果的一部分，是 0.75 Gy 照射后 500 个细胞的分析结果。详见文献[17]。

用 z 检验来判定实验室的绩效：

$$z = \frac{(x_i - x_{ref})}{\sqrt{(s^*)^2 + u_x^2}} \quad (\text{VII-1})$$

z 检验考虑的是每个实验室报告的双着丝粒观察值，或参照双着丝粒率或各自实验室预先制备的剂量-效应曲线 (x_i) 估算的剂量值。对于畸变率分析， x_{ref} 是一个认可值（用算法 A 获得的稳健平均值， x^* ），对于剂量估算分析， x_{ref} 代表授与的物理剂量。 z 检验也考虑了通过算法 A 得到稳健标准差 (s^*)，以及认可值或参考值的标准不确定性 (μ_x)。估计畸变率时， μ_x 的计算如下：

$$u_{ref} = 1.25s^* / \sqrt{p} \quad (\text{VII-2})$$

式中， p 代表比对的参与实验室数。

关于剂量估算，授与血样的实际剂量的物理测量值的不确定性用 μ_x 表示，按照方程 VII-3 的标准，可忽略不计。在剂量估算方面， μ_x 是授与的物理剂量的不确定性，根据以下方程，在每次分析中 μ_x 可忽略不计：

$$0.96 \leq \frac{s^*}{\sqrt{(s^*)^2 + u_x^2}} \leq 1 \quad (\text{VII-3})$$

为了评估实验室的绩效，适用以下标准：

$ z \leq 2$	满意
$2 < z < 3$	有问题
$ z \geq 3$	不满意

对于双着丝粒率，各实验室的 z 值如图 VII-1 所示。这里，稳健平均值 x_{ref} 是 0.05， s^* 是 0.01。所有 z 值均落在 -1.66~1.21 之间。根据接受标准，均为“满意”。

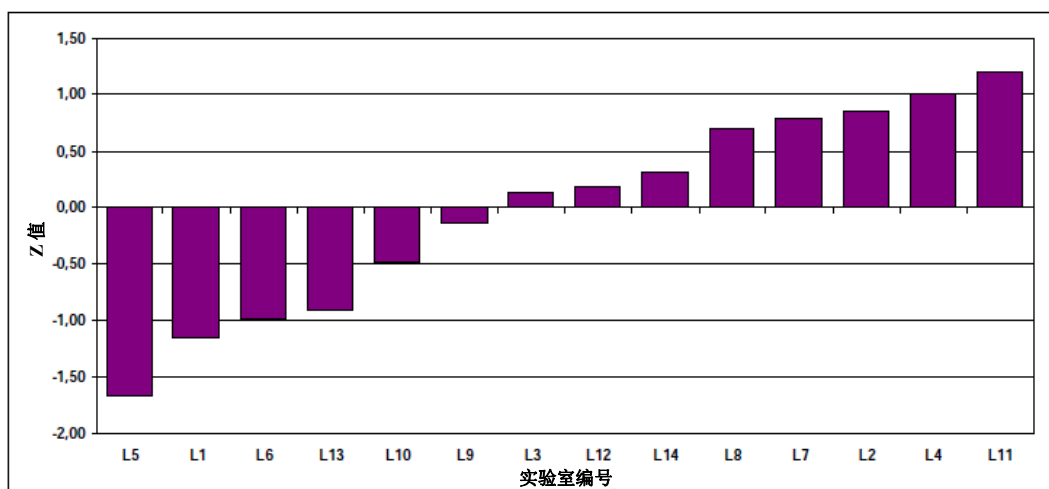


图 VII-1. 各参与实验室双着丝粒率的 Z 值。

图 VII-2 示出各实验室报告的剂量估算值及 95%置信区间。水平实线代表授与的物理剂量，虚线表示 $1.96 s^*$ 置信区间。结果显示，只有 L11 实验室报告的估算剂量为 0.98 Gy， z 值 (2.12) 为“有问题”。

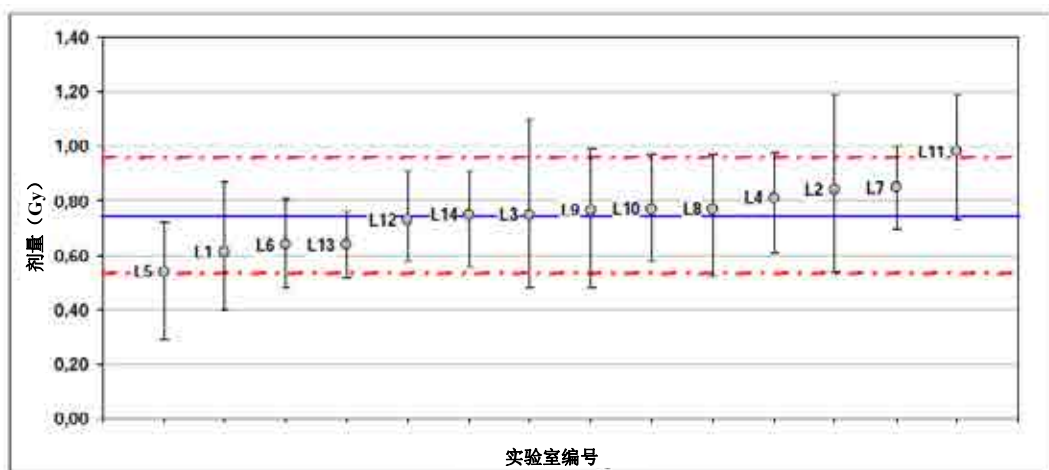


图 VII-2. 各参与实验室的估算剂量。

比对演练的重复性用可重复性标准差 (S_R) 来评价:

$$S_R = \sqrt{(s^*)^2 + S_r^2(1 - 1/n)} \quad (\text{VII-4})$$

这个公式用算法 A 得到的稳健标准差 (s^*) 考虑实验室之间的变异程度, 用算法 S 得到的可重复性标准差 S_r 考虑实验室内的变异程度。在公式 VII-4 中, n 代表对每个参与实验室进行的重复测量次数, 在这次演练中为 2。在分析 500 个 0.75 Gy 照射的细胞后, 双着丝粒率的 S_R 值为 0.013, 剂量的 S_R 值为 0.116。为了比较双着丝粒和剂量这两个测量值的可重复性, 引入变异系数 (CV)。

CV 表示结果的整体离散程度, 计算为 S_R/x^* 的比。本例中得到双着丝粒率的 CV 值为 24.4%, 剂量的 CV 值为 15.6%。这个结果表明, 剂量估算的可重复性比双着丝粒率的好。

未来相同实验室之间的比对将确定是否能够改进实验的可重复性。若不能, 则获得的数值将被视为与方法的随机误差有关的变异性而被接受。

附件参考文献

- [1] FENECH, M., Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 1084–1104.
- [2] WEIER, H.G., et al., Two colour hybridization with high complexity chromosome-specific probes and a degenerate alpha satellite probe DNA allows unambiguous discrimination between symmetrical and asymmetrical translocations, *Chromosoma* 100 (1991) 371–376.
- [3] FENECH, M., et al., HUMN project: detailed description of the scoring criteria 4686 for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte 4687 cultures, *Mutat. Res.* 534 (2003) 65–75.
- [4] EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., PURROT, R.J., Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution, *Radiat. Environ. Biophys.* 16 (1979) 89–100.
- [5] MERKLE, W., Poisson goodness-of-fit tests for radiation-induced chromosome aberrations, *Int. J. Radiat. Biol.* 40 (1981) 685–692.
- [6] FROME, E.L., DUFRAIN, R.J., Maximum likelihood estimation for cytogenetic doseresponse curves, *Biometrics* 42 (1986) 73–84.
- [7] PAPWORTH, D.G., SAVAGE, J.R.K., “Curve fitting by maximum likelihood”, *Radiation-Induced Chromosomal Aberrations in Tradescantia: Dose Response Curves*, *Radiat. Bot.* 15 (1975) 87–140.
- [8] SASAKI, M.S., Chromosomal biodosimetry by unfolding a mixed Poisson distribution: a generalized model, *Int. J. Radiat. Biol.* 79 (2003) 83–97.
- [9] BRAME, R. S., and GROER, P. G., Bayesian methods for chromosome dosimetry following a criticality accident. *Radiat. Prot. Dosim.* 104 (2003) 61–63.
- [10] YONG, L.C., et al., Increased frequency of chromosome translocations in airline pilots with long-term flying experience, *Occ. Environ. Med.* 66 (2008) 56–62.
- [11] NEYMAN, J., On a new class of “contagious” distribution, applicable in entomology and bacteriology, *Am. Math. Stat.* 10 (1939) 35–55.
- [12] MORAND, J., et al., Confidence limits for Neyman type A-distributed events, *Radiat. Prot. Dosim.* 128 (2008) 437–443.
- [13] STIRATELLI, R.G., MCCARTHY, K.L., SCRIBNER, H.E., Parametric approaches to the analysis of in vivo cytogenetics studies, *Environ. Mutagen.* 7 Suppl. 4 (1985) S43–S54.

- [14] AITCHISON, J., SHEN, S.M., Logistic-normal distributions: some properties and uses, *Biometrika* 67 (1980) 261–272.
- [15] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, “Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method”, International Standard. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results, ISO 5725-5, ISO, Geneva (1998).
- [16] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, International Standard. Statistical Methods for Use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons, ISO 13528, ISO, Geneva (2005).
- [17] DI GIORGIO, M., BARQUINERO, J.F., VALLERGA, M.B., RADL, A., TAJA, M.R., SEOANE, A., DE LUCA, J., STUCK OLIVEIRA, M., VALDIVIA, P., GARCIA LIMA, O., LAMADRID, A., GONZALEZ MESA, J., ROMERO AGUILERA, I., MANDINA CARDOSO, T., GUERRERO CARBAJAL, Y.C., ARCEO MALDONADO, C., ESPINOZA, M.E., MARTINEZ-LOPEZ, W., MENDEZ-ACUÑA, L., DI TOMASO, M., ROY, L., LINDHOLM, C., ROMM, H., GÜÇLÜ, I., LLOYD, D.C., Biological dosimetry intercomparison exercise: an evaluation through triage and routine mode results by robust methods. *Radiation Research* (2011, in press).

缩 写 词 表

ace	acentric fragment	无着丝粒断片
AFRRI	Armed Forces Radiobiology Research Institute	美军放射生物研究所
ANOVA	analysis of variance	方差分析
ARS	acute radiation syndrome	急性放射综合征
AS	abasic sites	碱基位点
ATP	adenosine triphosphate	三磷酸腺苷
BD	Base damage	碱基损伤
BER	Base excision repair	碱基切除修复
BN	binucleated	双核
BrdU	bromodeoxyuridine	溴脱氧尿嘧啶核苷
BSS	Basic Safety Standards	基本安全标准
CABAS	Chromosomal aberration calculation software	染色体畸变计算软件
CBMN	Cytokinesis-block micronucleus assay	胞质分裂阻断微核检测
CBMN Cyt	Cytokinesis-block micronucleus cytome assay	胞质分裂阻断微核细胞学检测
CCD	Charge-coupled device	电耦设备
CHO	Chinese hamster ovary	中国仓鼠卵巢
CP	Cetromeric probe	着丝粒探针
CRP	Co-ordinated Research Programme	协调研究项目
Cyt-B	Cytochalasin-B	细胞松弛素 B
DAPI	4',6'diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
DCA	Dicentric chromosome assay	双着丝粒染色体检测
df	Degrees of freedom	自由度
dic	Dicentric chromosome	双着丝粒染色体
DMSO	dimethylsulphoxide	二甲基亚砷
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DPC	DNA-protein cross-links	DNA 蛋白交联
DSB	Double strand break	双链断裂
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid	乙二胺四乙酸
ESR	Electron spin resonance	电子自旋共振
FISH	Fluorescence in situ hybridization	荧光原位杂交
FPG	Fluorescence plus Giemsa	荧光加姬姆萨染色
HBSS	Hank's balanced salt solution	Hank's 平衡盐液
HIV	Human immunodeficiency virus	人类免疫缺陷病毒

HPBL	Human peripheral blood lymphocytes	人外周血淋巴细胞
HRR	Homologous recombination repair	同源重组修复
HUMN	Human micronucleus	人类微核
IAEA	International Atomic Energy Agency	国际原子能机构
ICRP	International Commission on Radiological Protection	国际放射防护委员会
ICRU	International Commission on Radiation Unites and Measurements	国际辐射单位与测量委员会
IND	Improvised nuclear devices	简易核装置
IRSN	Institute de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (France)	辐射防护和核安全研究所 (法国)
ISO	International Organization for Standardisation	国际标准化组织
IU	International unit	国际单位
LCL	Lower confidence limit	置信下限
LET	Linear energy transfer	传能线密度
LIMS	Laboratory information management system	实验室信息管理系统
M1, M2	First, second, in vitro division metaphase	体外第 1 次、第 2 次，分裂中期
MDS	Multiple damage sites	多损伤位点
MEM	Minimum essential medium	最低必需培养基
mFISH	Multicolour fluorescence in situ hybridization	多色荧光原位杂交
MN	Micronucleus(micronuclei)	微核
MNCM ^{-ve/+ve}	Micronucleus centromere negative/positive cell	微核着丝粒阴性/阳性细胞
NBUD	Nuclear bud	核芽
NDI	Nuclear division index	核分裂指数
NHEJ	Non-homologous end-joining	非同源末端连接
NER	Nucleotide excision repair	核酸切除修复
NIRS	National Institute of Radiological Sciences (Japan)	国立放射线综合医学研究所 (日本)
NPB	Nucleoplasmic bridge	核质桥
NPP	Nuclear power plant	核电厂
OA	Okadic acid	冈田酸
PAINT	Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology	畸变识别和术语命名方案
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液

PCC	Premature chromosome condensation	早熟染色体凝聚
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
PHA	Phytohaemagglutinin	植物血球凝集素
QA	Quality assurance	质量保证
QC	Quality control	质量控制
RBE	Relative biological effectiveness	相对生物效能
RDD	Radiological dispersal device	放射性弥散装置
REAC/TS	Radiation Emergency Assistance Center/Training Site (USA)	辐射应急救援中心/培训 基地（美国）
RED	Radiological exposure devices	放射性照射装置
RICA	Rapid interphase chromosome assay	间期细胞快速染色体检测
RNase	ribonuclease	核糖核酸酶（RNA 酶）
SD	Standard deviation	标准差
SE	Standard error	标准误
SEM	Standard error of the mean	均数标准误
SI	International System of Units	国际单位制
SSB	Single strand break	单链断裂
SSBR	Single strand break repair	单链断裂修复
SSC	Saline sodium citrate	柠檬酸钠
TLD	Thermoluminescence dosimeter	热释光剂量计
UCL	Upper confidence limit	置信上限
UN	United Nations	联合国
UV	ultraviolet	紫外线
WHO	World Health Organization	世界卫生组织

定 义³

吸收剂量 (absorbed dose (**D**)) * 基本剂量学量 D , 定义为:

$$D = \frac{d\overline{\varepsilon}}{dm}$$

式中,

$d\overline{\varepsilon}$ 表示电离辐射授与某一体积元内物质的平均能量, dm 表示该体积元内物质的质量。

- 能量可以按任何给定义的体积平均, 平均剂量等于授与该体积的总能量除以该体积的质量。
- 吸收剂量定义在一个点上; 对于某组织或器官中的平均剂量, 见器官剂量。
- 单位: 戈瑞 (Gy), 等于 1 J/kg (曾用单位: 拉德, rad)。

事故 (accident) * 从防护或安全的观点来看, 后果或潜在后果不容忽视的任何意外事件, 包括操作失误、设备故障及其它意外等。

临界事故 (criticality accident) 涉及临界反应的事故。

- 典型的核燃料设施内。

无着丝粒体 (acentric (ace)) 没有着丝粒的、大小不同的染色体末端或中间的断片。通常独立于双着丝粒、三着丝粒或着丝粒环畸变而形成的无着丝粒称作额外无着丝粒体。

α 辐射 (alpha radiation) 某些放射性核素在核衰变时发射的粒子辐射。 α 粒子由两个中子和两个质子组成, 与氦原子核相同。 α 粒子容易被几厘米厚的空气所吸收, 因此其主要危害来自摄入体内的 α 核素。

非整倍体诱变剂 (aneugen) 一种间接诱变剂, 能影响细胞分裂和有丝分裂期的纺锤体形成, 导致整条染色体的减少或增加, 形成非整倍体。

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis) 影响脊柱和骨盆髋髌关节的慢性关节炎。数十年前, 曾采用大面积离体照射来治疗这些患者的脊柱炎。

抗凝剂 (anticoagulant) 一种防止血液凝固的药物。

³ 本定义适用于本出版物的用途。标注星号的内容引自参考文献[357]。

本底畸变率/水平/值 (background frequency/level/value) 在一般人群中记录到的染色体畸变或微核发生率 (或数目)。

贝可 (becquerel (Bq)) * 放射性活度的国际单位, 等于每秒钟一次核转变。

- 取代非国际制单位居里 (Ci), $1 \text{ Bq} \approx 27 \text{ pCi}$ ($2.7 \times 10^{-11} \text{ Ci}$), $1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$ 。

β 辐射 (beta radiation) 粒子辐射, 包括某些放射性核素在核衰变时释放出的带正电荷或负电荷的电子。 β 粒子在空气中的穿透力是几厘米到几米, 在软组织或塑料中仅有几毫米到几厘米。

偏差 (bias) 结果或推测结果与真实情况或过程的偏离。

双核 (binucleated) 具有两个细胞核。双核细胞发生于核分裂末期, 可以用胞质分裂阻断抑制剂如松胞素 B 来积累。在胞质分裂阻断微核检测中, 检测微核及核质桥均计数双核细胞。

生物剂量学 (biological dosimetry/biodosimetry) 用生物标志物验证辐射照射并估算吸收剂量。

生物效应 (biological effects) 对生命物质、有机体、组织或细胞可能产生的后果范围, 与暴露于外部因素如电离辐射而引起的细胞损伤的类型和程度有关。

生物标志物 (biomarker) 正常生物学或病理学过程的一个指标。在生物剂量学领域, 他们被用于区别辐射诱发的生物损伤与其他因素导致的损伤。

Bragg-Gray 空腔理论 (Bragg-Gray cavity theory) 把介质中的充气空腔内产生的电离与对周围介质吸收能量联系起来。在染色体畸变形成上, 应用这一理论的意义是, 由于细胞核十分小, 以致吸收的所有能量只是由穿过核的电子所造成, 因此次级粒子可以被忽略。

5-溴脱氧尿嘧啶 (5-Bromodeoxyuridine (BrdU)) 胸腺嘧啶的类似物, 在胸腺嘧啶 6'端的甲基团被溴取代。BrdU 在生物剂量学中用来判别标记的新合成 DNA, 以识别已经历不止一次有丝分裂的细胞。

白衣膜 (buffy coat) 抗凝血样离心后得到的含有大部分白细胞的细胞层。

刻度曲线 (calibration curve) 在生物剂量学中, 是对已知剂量血样离体照射后得到的剂量-效应关系的一种图形或数学描述。该曲线通过内插法来确定潜在受照个体的吸收剂量。

C-显带 (C-banding) 见“染色体分带”。

着丝粒 (centromere) 染色体的主缢痕区，在有丝分裂过程及染色单体对连接时可以看到。

监管链 (chain-of-custody) 从血样的采集、接收、最终处理，跟踪样品的处理和保存，完整记录血样的过程。

带电粒子平衡 (charged particle equilibrium) 离开给定体积的每一种类型的带电粒子数与进入其中的带电粒子数相等时即为带电粒子电平衡。

染色体分带 (chromosome banding) 一种用于染色体差别染色的技术，最常用的是吉姆萨染色。依靠这种方法，可以使对染色体某些区域，如着丝粒 (C-显带) 或染色体臂的特征图形 (G-显带) 的选择性染色可视化。每对染色体特有的深浅带图形可用来识别染色体并评价其结构。

断裂剂 (clastogen) 造成染色体 DNA 断裂的物理或化学因素，可以导致染色体重排，如在分裂中期观察到的染色体畸变。

DNA 集簇性损伤 (clustered DNA lesions) 电离辐射引起同一分子在 20 个碱基以内出现两个以上的 DNA 损伤位点。

秋水仙素/秋水仙胺 (colchicine/Colcemid) 细胞分裂过程中抑制纺锤体形成的生物碱化合物。可通过阻止细胞进入分裂后期来收集大量的中期细胞。秋水仙胺是植物来源的秋水仙素的天然合成类似物。

复杂重排 (complex rearrangement) 指两条以上染色体发生三处以上断裂的畸变，是密电离辐射或大剂量疏电离辐射诱发的特征。

置信区间 (confidence interval) 根据选择的分布 (如泊松分布) 对某个感兴趣的变量 (如：速率) 确定的区间估算值，使得该区间具有包含变量真值的特定概率。这样，置信区间 (用置信上限和下限来表述) 用以表示估算值的可信度。区间内是否可能包含参数是由置信水平或置信系数决定的，提高理想的置信水平可扩大置信区间的范围。

混淆 (confound) 在一项研究中，其他变量 (混淆因素，如年龄、吸烟) 对某个主要变量 (如电离辐射照射) 与效应研究 (如诱发的畸变) 之间的相关关系造成干扰。若不考虑这些混淆因素，可能会得出实际并不存在的相关性或使真实的关系变得模糊。

不纯泊松分布法 (contaminated poisson method) 着丝粒环及双着丝粒染色体畸变率的一种数学分析方法，用于疑似局部照射时的剂量估算。这种方法通过考虑双着丝粒在所有计数细胞中的分布进行剂量估算，并给出机体受照体积的附加信息。参见 Qdr 方法。

放射性污染 (contamination) * 物体表面的、或固体、液体和气体（包括人体）中的放射性物质，或导致放射性物质在这些部位出现的过程。

对照组 (control group) 暴露于与受照个体尽可能相同条件的一组细胞、动物或受试人员，所不同的是待研究的效应是不受管理的。

协方差 (covariance) 用于测量两个（或更多）非独立数据集间变化的相关性，换言之，各数据集是如何相互变化的。协方差有可能是正数，也可能是负数，表示各数据集间的正或负的线性关系。如果数据是独立的，那么协方差为 0。

曲线参数协方差 (covariance of curve parameters) 参数 (C 、 α 、 β) 不会单独偏离其理想的真值（见标准差、方差），但是会整体偏向某一特定量的相关数，因为它们是由相同数据集同时计算的。因此，与单独用方差计算相比，像公式 (7) 一样的结合计算会使误差减小。方差和协方差也能用于一致关系的计算（协方差除以两个方差乘积的平方根，即协方差除以标准差的乘积）。

曲线拟合 (curve fitting) 确认一个方程是否与一系列数据点很好地符合，可能有许多另外的约束，其中包括用每个数据点的可信度（通过各点的标准误来确定）或限制其符合某个测量本底值来权重方程的适合度。

松胞素 B (cytochalasin B) 一种源于真菌的天然化合物，具有抑制哺乳动物和人类细胞胞质分裂的独特性质，用于胞质分裂阻断微核检测。

细胞遗传学 (cytogenetics) 遗传学的一门分支，主要研究染色体。

胞质分裂阻断微核细胞检测 (cytokinesis-block micronucleus cytome assay (CBMN Cyt)) CBMN Cyt 是较 CBMN 更为先进的一种检测方法，包含对更大范围的染色体损伤生物指标（双核细胞中的微核、核质桥、核芽等）以及细胞死亡（坏死和凋亡细胞）及细胞生长抑制（基于单核、双核及多核细胞比例的核分裂指数）的检测。在此体系中，微核及核质桥是被证实的、用于电离辐射照射生物剂量学检测的最好生物标志物。

密电离辐射/高 LET 辐射 (densely-ionizing/high-LET radiation) 沿其径迹在密集的相互作用中沉积能量的辐射（如 α 粒子与中子），这种空间分布反映在相对生物效能上。参见“传能线密度，LET”。

探测限 (detection limit) 用给定的生物剂量学标志物的最低发生率表示的剂量，高于本底发生率，置信水平通常为 95%。

确定性效应 (deterministic effect) 辐射的一种健康效应，一般存在剂量阈值，超过阈值时效应的严重程度随剂量的增加而增大。假如效应是致死性的或严重威胁生

命的、或引起持久性损伤而降低生存质量的，这种效应称为“严重确定性效应”。

双着丝粒体 (dicentric (dic)) 两条断裂的染色体错误修复，形成有两个着丝粒的畸变染色体。

二倍体 (diploid) 物种体细胞内特定数目的染色体；在人类为 46 条染色体（22 对常染色体和两条性染色体）。

脱氧核糖核酸 (DNA) (deoxyribonucleic acid (DNA)) 染色体内包含的分子，编码的基因决定着机体的结构和功能，并将遗传信息从亲代传递给子代。

剂量率 (dose rate) 能量从辐射转移至靶的速率；每单位时间授与的剂量。尽管原则上剂量率可以用任意时间单位来定义（如：年剂量在技术上是一种剂量率），但通常所用术语剂量率的时间单位很短，如：剂量/秒或剂量/小时。

辐射剂量计 (dosimeter, radiation) 测量电离辐射照射的物理装置。

双链断裂 (double strand break (DSB)) DNA 损伤类型，指 DNA 双股螺旋结构中的两条链在相同位点或邻近位点的磷酸二酯键被切断而导致的 DNA 完全断裂。

电子自旋共振/电子顺磁共振 (electron spin resonance (ESR) /electron paramagnetic resonance) 研究有一个或多个未配对电子的化学种态的一门技术，如有机和无机自由基或具有一个转换金属离子的无机复合物。该技术可以作为辐射剂量计。

应急 (emergency) * 一种必须快速行动的非常规情况，首先是缓减对人身健康和安
全、生活质量、财产或环境的有害或不良后果。包括核与放射应急和常规应急，
如火灾、危险化学品泄漏、风暴或地震等。应急包括授权采取快速行动以减小可
觉察危害、核或放射应急后果的情况。由于下述原因而存在或察觉存在危害时启
动应急：

(a) 链式核反应或链式反应产物衰变释放能量；

(b) 辐射照射。

- (a)和(b)条分别表示核应急和放射应急，但这并不是严格的区分。
- 在某些情况下，如果并不需要明确区分危害的性质（如国家辐射应急计划），可以用辐射应急来代表，在本质上意义是相同的。

酶 (enzyme) 对其它物质的化学反应产生催化作用的一种蛋白质分子，在反应过程中自身结构不被破坏或改变。

流行病学 (epidemiology) 研究特定人群健康相关状态和事件的分布和决定因素，并将该研究用于健康问题的管理。

照射 (exposure) * 被辐照的行为或条件。

照射不应作为剂量的同义词，剂量是照射效应的一种度量。

- 根据照射的性质和持续时间（见“照射情况”），或根据照射源、受照人群，和受照环境，可将照射分为不同类型（见“照射类型”）。

外照射 (external exposure) 来自体外源的辐射照射。

- 相对于内照射。

内照射 (internal exposure) 来自体内源的辐射照射。

- 相对于外照射。

照射情况 (exposure situations) *

急性照射 (acute exposure) 短时间内受到的照射。通常用于指持续时间足够短的照射，产生的剂量可作为瞬时剂量来处理（例如小于 1 h）。

慢性照射 (chronic exposure) 持续一定时间的照射。“慢性”只是形容照射的持续时间，并不意味着涉及的剂量有多大。通常用来描述环境中长寿命放射性核素引起的持续多年的照射。国际放射防护委员会用“长期照射”代表“慢性照射”，这两个名词都是相对于急性照射而言的。

假阴性 (false negative) 个体实际上受到影响而显示未受影响的检测结果；即受影响的个体显示阴性的测试结果。

假阳性 (false positive) 个体实际上未受影响而显示受到影响的检测结果；即在未受影响的个体中显示阳性检测结果。

快中子 (fast neutrons) 能量超出某给定水平的中子，通常约为 1 MeV。

第一响应者 (first responders) 在应急现场作出响应的第一批应急服务人员。

裂变中子 (fission neutrons) * 自由中子，通常产生于核裂变反应过程。核反应中一个原子的重核分裂为两个大小近似相等的部分（更轻元素的核），伴随释放较大的能量。

荧光原位杂交 (fluorescent in situ hybridization (FISH)) 通过荧光标记的 DNA 探针附着在变性的染色体 DNA 分子上，用来识别特异性染色体或染色体区域的一种技术。

间期 FISH (interphase FISH) 直接将探针引入间期细胞内，可以看到染色质结构域水平的变化。

中期 FISH (metaphase FISH) 将探针引入分裂中期的染色体内，可以看到染色体畸变。

FISH 技术 (FISH techniques):

多色 FISH (multicolour FISH (mFISH)) mFISH 利用“全染色体涂染”DNA 探针，这些探针对人类每条染色体用唯一结合的荧光颜色来标记。

pq-mFISH (pq-mFISH) mFISH 的一种变体，用以区分每条染色体的臂。

荧光染料 (fluorochrome) 当适当激发时能发出荧光的分子。用于 FISH 细胞遗传学中对特定染色体区域的标记。

γ 辐射 (gamma radiation) 由核或者粒子衰变或湮没事件发出的高频（波长非常短）电磁辐射（光子）。 γ 射线对组织的穿透力大于 β 或 α 粒子的，但是传能线密度较低。必须用重材料如铅或混凝土才能屏蔽 γ 辐射。

G-显带 (G-banding) 见“染色体分带”。

基因毒 (genotoxin) 引起遗传物质损伤或突变的任何化学因素或物理因素。

G-函数 (G-function) 一个时间相关因子，用于修正线性平方剂量效应关系的剂量平方项系数，以计及迁延照射的效应。

戈瑞 (Gy) (gray (Gy)) * 比释动能 K 和吸收剂量的国际制单位，相当于 1 J/kg。取代拉德 (rad)，1 Gy = 100 rad。

造血 (haematopoiesis) 血细胞成分的形成过程。

半衰期 ($T_{1/2}$) (half-life ($T_{1/2}$)) *

(1) 对一种放射性核素而言，其放射性活度衰减需要一定的时间，即在放射性衰减过程中其放射活度减至原来一半所需要的时间。

- 在需要与下述 (2) 条中介绍的其它类型的半衰期加以区别时，应当使用术语“放射性半衰期”。
- 半衰期与衰减常数 λ 有关，计算公式如下：

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$$

(2) 特定场所中特定物质（如放射性核素）的量，由于任何特定过程或由于服从类似的放射性衰变指数规律的过程减少至一半所花费的时间。

生物半排期 biological half-life 一种物质在身体的某个特定组织、器官或局部（或任何其它特定的动植物）中作为生物过程质量减少一半所花费的时间。

有效半衰期 (T_{eff}) effective half-life (T_{eff}) 放射性核素在某一特定部位完成所有相关过程后，其放射活度减少至原来一半所花费的时间。

$$\frac{1}{T_{\text{eff}}} = \sum_i \frac{1}{T_i}$$

式中： T_i 是过程 i 的半衰期。

放射性半衰期 (radioactive half-life) 放射性核素在放射衰变过程中活度减少至一半所需要的时间。

- 术语“物理半衰期”也用于这一概念。

半寿期 (half-time) 指某一参数降至其原值的 50% 所需要的时间。对于生物剂量学应用而言，该术语用于描述外周血淋巴细胞转化所需要的时间。

差染染色体 (harlequin chromosome) 细胞经两个周期复制在 BrdU 掺入后呈现差别标记和染色的染色体，在适当染色后，姊妹染色单体其中一条呈深色，另一条呈浅色。

摄入 (incorporation) 放射性核素通过吸入、食入或经完整或损伤皮肤进入体内的过程。

插入 (insertion) 一条染色体的无着丝粒片段插入另一条染色体的臂内形成的染色体异常。

比对演练 (inter-comparison exercise) 用于质量保证和质量控制的一个步骤。在生物剂量学领域，实验室之间通过交换样品材料进行比对分析。

间期 (interphase) 细胞周期介于两次有丝分裂之间的一段时期。细胞消耗的大部分时间都在此期间，这时的主要功能是为细胞分裂做准备。

倒位 (inversion) 一种染色体的重排，染色体断片从一端倒转到另一端，并在同一断裂点重新插入该染色体而形成。根据插入断片是否包含着丝粒分为臂间倒位和臂内倒位。

离体 (*in vitro*) 在试管内进行观察或操作。

活体 (*in vivo*) 在活生物体内进行观察或操作。

电离 (ionization) 指一个或多个轨道电子脱离原子或分子，转变成带电荷状态（离子）的物理过程。这个过程会导致局部释放大量能量，每一电离事件释放的能量接近 33 eV，足以破坏牢固的化学键。

同位素 (isotope) 质子数 (原子序数相同但原子核数不同) 和电子数相同但中子数不同的同一化学元素的原子。同位素的化学性质相同但核特性不同。

核型 (karyotype) 按照标准分类法将一个细胞中每对同源染色体按大小、着丝粒位置和染色体带型进行系统的排列。

空气比释动能 (kerma, air (kinetic energy released per unit mass)) * 量 K 定义为:

$$K = \frac{dE_{tr}}{dm}$$

式中:

dE_{tr} 是质量为 dm 的物质中由不带电电离粒子释放的所有带电电离粒子的初始动能之和。

- 单位: 戈瑞 (Gy)。
- 最初是“物质中释放动能”的缩写, 但现在已被接受为一个词。

白细胞 (leukocyte) 所有类型白细胞的总称 (如淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、浆细胞和单核细胞)。

传能线密度 (LET) (L_Δ) (linear energy transfer (LET) (L_Δ)) * 一般定义为:

$$L_\Delta = \left(\frac{dE}{d\ell} \right)_\Delta$$

式中:

dE 是在穿行距离 $d\ell$ 中损失的能量,

Δ 是任何一次单一碰撞中能量传递的上界。

- 表示能量作为距离的函数是如何从辐射转移到被照射物体的。高 LET 指能量沉集在很短的距离内。
- L_∞ ($\Delta=\infty$) 在定义品质因子数时表示“非定限传能线密度”。
- L_Δ 也可以叫做“定限线碰撞阻止本领”。

线性模型 (linear model) 用于描述辐射生物效应的常见数学模型, 其中效应 Y 是剂量 D 的线性函数:

$$Y = \alpha D$$

线性平方模型 (linear quadratic model) 用于描述辐射生物效应的常见数学模型，其中效应 Y 是剂量 D 的线性平方函数：

$$Y = \alpha D + \beta D^2.$$

淋巴细胞 (lymphocyte) 主要在血液、淋巴及形成机体免疫细胞和免疫前体细胞的淋巴组织中发现的一类白细胞。

Meta-分析 (meta-analysis) 按照特定的课题将相似、独立的调查结果按特定参数进行合并、总结与评价的研究。

分裂中期 (metaphase) 真核细胞周期中的有丝分裂阶段，此时的染色体长度浓缩为最短，并在进入两个子细胞之前排列在细胞中部。

微核 (micronucleus (MN)) 微核是在具有染色体损伤的细胞中发现的细胞核之外的小核。经典的微核是由分裂后期滞后的整条染色体或无着丝粒断片形成。微核的直径一般为单核或双多核细胞中主核的 $1/16 \sim 1/3$ 。微核与主核的结构和染色相同。

有丝分裂原 (mitogen) 诱导细胞增殖的试剂。

有丝分裂 (mitosis) 细胞分裂过程的一部分，此过程中真核细胞将它的染色体等分至两个子细胞中。

有丝分裂指数 (mitotic index) 在一个给定时刻处于有丝分裂期的细胞百分比。

致突变剂 (mutagen) 任何能导致 DNA 分子碱基序列或机体染色体水平遗传性突变的化学或物理因素。

突变 (mutation) 一个基因由原来的自然状态发生的任何改变，这种改变可以引起疾病，也可以是有益的、正常变异。

中子辐射 (neutron radiation) 中子是原子核的成分之一，是不带电的中性粒子。中子是在核裂变过程中释放的，具有很强的穿透力。

核芽 (nuclear bud) 通过很细的核质连接附着于细胞核的微核样小体，属于核的异常。

核分裂指数 (nuclear division index (NDI)) 是细胞周期平均速度的一项测量指标，由到达每一个连续分裂阶段的某一细胞群中的相对细胞数得到，正常情况到第四次分裂。

核质桥 (nucleoplasmic bridge (NPB)) 在分裂后期因双着丝粒染色体或染色单体的着丝粒被拉向细胞两极而形成。在 CBMN 检测中，因为胞质分裂受阻，妨碍了分裂后期已形成的核质桥的断裂，因此可以看到带有 NPB 的双核细胞。

核小体 (nucleosome) 在染色体内部真核细胞染色质的组装过程中，这些构造形成基本的复制单元。

核素 (nuclide) 以质子数（原子序数）和核质量数为特征的原子类型。

概率比 (odds ratio) 两个概率之比，计算显示为零剂量与疑似剂量（如佩章剂量计）或物理测量剂量比的可能性。

光激发剂量计 (OSL dosimeter (optically stimulated luminescence)) 用于测量电离辐射照射的一类物理剂量计。

PAINT（畸变的识别及命名方案）(PAINT (Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology)) 用于 FISH 分析中描述染色体畸变的术语。

泛着丝粒探针 (pan-centromeric probe) 标记每条染色体的着丝粒区域的 DNA 探针。

体模 (phantom) 与机体组织大致一样吸收和散射 γ 及 X 射线的一种装置。（例如：用于建立剂量-效应刻度曲线所需要的剂量学测量或血样照射）。

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction (PCR)) 利用 DNA 聚合酶对一个 DNA 序列通过重复复制进行酶式扩增的过程。

Qdr 法 (Qdr method) 着丝粒环和双着丝粒染色体畸变率的一种数学分析方法，用于疑似局部照射的剂量估算。这种方法估算剂量只考虑受损细胞中的双着丝粒和环的分布。见不纯泊松分布法。

Qpcc 法 (Qpcc method) 与上述 Qdr 法相同的一种数学分析法，依据的是早熟凝集染色体断片的分布。

相对生物效能 (RBE) * (relative biological effectiveness (RBE)) 不同辐射类型诱发某一特定健康效应的相对表示，表示为两种不同辐射类型产生相同程度的规定生物学终点所需吸收剂量的反比。

着丝粒环/无着丝粒环 (ring, centric/acentric) 由一条染色体的两处断裂后重新连接形成的带或不带着丝粒的环状染色体畸变。

伦琴 (R) (röntgen (R)) * 照射量单位， $1\text{ R}=2.58\times 10^{-4}\text{ C/kg}$

- 已被国际制单位 C/kg 所取代。

服务实验室 (service laboratory) 本书中代表一种专门从事生物剂量检测的实验室。

希沃特 (Sv) (sievert(Sv)) * 剂量当量和有效剂量的国际制单位，等于 1 J/kg 。

统计显著性 (significance, statistical) 如果一个特定的实验或研究结果明显偏离了预期结果，则说有统计显著性。统计显著性是对真实程度的一个预测，即除了只是偶然性以外的其它因素所致。一般，当误差概率小于 5% 时，观察结果与预期结果之间的偏差被认为是具有显著意义的。

单链断裂 (single strand break (SSB)) DNA 损伤类型，指 DNA 双螺旋中仅有一条链被打断。

疏电离辐射/低 LET 电离辐射 (sparsely-ionizing/low-LET ionizing radiation) 见“密电离辐射/高 LET 电离辐射”及“传能线密度”。

稳定性畸变 (stable aberration) 在有丝分裂过程中未丢失遗传物质的染色体之间或染色体内的非致死性染色体重排或互换。

稳定性细胞 (stable cell) 不含非稳定性畸变的细胞。这些细胞可以完全未受损伤或者仅包含稳定型的畸变。

标准差 (standard deviation (SD)) 对一个总体的测量样本中变数的一个定量度量，表示一组数据中数值的分散程度有多大。对近似正态分布的数据而言，曲线参数的标准差表示检测结果与真值间的差异可能有多大，可以理想地认为这个值是由一个大群体的刻度捐赠者（或实验）的大量细胞为基础的平均值给出的。参见“协方差”。

均数的标准误 (standard error of the mean (SEM)) 在一个近似正态分布的样本检测中，对变量总数的一个定量测量指标，表示样本均数可能偏离总体的真实均数有多大，以此来准确地定量总体的真实均数。

辐射随机效应 (stochastic effect (of radiation)) 辐射诱发的一种健康效应，辐射剂量越大，效应发生的几率越大，而严重程度（假如发生）与剂量无关。随机性效应可以表现为躯体效应或遗传效应，通常没有剂量阈值。如辐射诱发甲状腺癌和白血病。

同步化 (synchronization) 当用于细胞培养时，是指人为控制细胞使其进入细胞周期的相同阶段的过程。

端粒 (telomere) 每条染色体臂的末端都含有重复串联的 TTAGGG 序列，可以防止染色体融合或双着丝粒形成。随着 DNA 每个周期的复制，端粒序列可以丢失或在序列上发生微缺失。

热释光剂量计 (TLD dosimeter (thermoluminescent)) 用于测量电离辐射照射的物理剂量计类型。

易位 (translocation) 一种染色体改变，其中一条染色体或染色体断片与另一条染色体或染色体断片发生连接或互换，在减数分裂时形成同时分离的杂合体。

相互易位（双向或完全易位）（reciprocal translocation (2-way or complete translocation)） 两条独立的染色体末端部位发生互换。

非相互易位（单向或不完全易位）（non-reciprocal translocation (1-way or incomplete translocation)） 仅一条染色体断片的易位，不发生互换。

分类诊断（triage） 根据病情的严重程度选择优先救治患者的过程。细胞遗传学分类诊断是利用生物剂量检测结果来支持医学判断。

三着丝粒体（tricentric） 由三条断裂染色体连接形成的带有三个着丝粒的畸变染色体。计数时三着丝粒染色体相当于两个双着丝粒体，并且伴随两个无着丝粒断片。

氚化水（tritiated water） 水的一种形式，其中通常的氢原子被氢的放射性同位素氚所取代。

非稳定性畸变（unstable aberration） 对细胞本身或其子代可以是致死性的一种染色体重排，因为其在有丝分裂过程中会导致遗传物质的缺失或不平衡传递。

非稳定性细胞（unstable cell） 带有双着丝粒、环或无着丝粒断片等非稳定性畸变的细胞。

方差（variance） 在统计学上用来度量测量值偏离中心值的距离，计算为标准差的平方。

X 辐射（X-radiation） 由原子核外轨道电子或加速产生的韧致辐射所释放的短波电磁辐射（光子）。其波长比紫外线的短，但比 γ 射线的长。必须用铅等重物质才能屏蔽 X 射线。

起草和审订人员名单

Ainsbury, E.	健康保护署（英国）
Barquinero, J.F.	巴塞罗那自治大学（西班牙）
Beinke, C.	联邦国防军放射生物学研究所（德国）
Blakely, W.F.	武装部队放射生物学研究所（美利坚合众国）
Brasemann, H.	黑尔姆霍兹中心（德国）
Buglova, E.	国际原子能机构（原子能机构）
Carr, Z.	世界卫生组织（世卫组织）
Di Giorgio, M.	核管理局（阿根廷）
Fenech, M.	联邦科学和工业研究组织（澳大利亚）
Garcia Lima, O.	卫生与辐射防护中心（古巴）
Kodama, Y.	放射线影响研究所（日本）
Lindholm, C.	辐射和核安全管理局（芬兰）
Livingston, G.	橡树岭联合大学（美利坚合众国）
Lloyd, D.C.	顾问（英国）
Maznyk, N.A.	国家科学院医学放射学研究所（乌克兰）
Prasanna, P.G.S.	国立卫生研究所（美利坚合众国）
Previsani, N.	世界卫生组织（世卫组织）
Romm, H.	联邦辐射防护办公室（德国）
Roy, L.	辐射防护和核安全研究所（法国）
Voisin, P.J.	辐射防护和核安全研究所（法国）
Vral, A.	根特大学（比利时）
Wilkins, R.C.	加拿大卫生部（加拿大）
Yoshida, M.	弘前大学（日本）

向反馈意见致谢

Azizova, T.	南乌拉尔生物物理学研究所（俄罗斯联邦）
Barrios, L.	巴塞罗纳自治大学（西班牙）
Bognár, G.	国家放射生物学和辐射卫生学研究所（匈牙利）
Darroudi, F.	莱顿大学医学中心（荷兰）
Devantier, Y,	乔克河实验室（加拿大）
Espinoza Zevallos, M.	秘鲁核能研究所（秘鲁）
Guerrero Carbajal, Y.C.	国家核研究所（墨西哥）
Güçlü, I.	切科米斯核研究和培训中心（土耳其）
Hayata, I.	顾问（日本）
Martínez-López , W.	克莱门特·埃斯塔布尔生物学研究所（乌拉圭）
Natarajan, A.T.	图沙大学（意大利）
Oliveira, M.	辐射防护和剂量学研究所（巴西）
Palitti, F.	图沙大学（意大利）
Pantelias, G.	“德谟克利特”国家科学研究中心放射性同位素和放射诊断术研究所（希腊）
Sasaki, M.S.	京都大学（日本）
Sotnik, N.	南乌拉尔生物物理学研究所（俄罗斯联邦）
Turai, I.	国家放射生物学和辐射卫生学研究所（匈牙利）
Valdivia Pottstock, P.	智利核能委员会（智利）
Vozilova, A.	乌拉尔放射医学研究中心（俄罗斯联邦）
Wilkinson, D.	加拿大国防研究发展局（加拿大）

