

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 187—1999

淋巴细胞微核估算受照剂量方法

Method of peripheral lymphocyte micronucleus
assay for estimating doses exposed

1999-12-09 发布

2000-05-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布



前 言

本标准是为了进一步解决在辐射事故时早期剂量的估算问题。借鉴国内外有关实验资料和临床实践经验,结合我国实际情况编制而成。

本标准主要包括在外照射事故条件下,用外周血淋巴细胞微核估算受照剂量的方法。

本标准从 2000 年 5 月 1 日起实施。

本标准附录 A 是提示的附录。

本标准由卫生部卫生法制与监督司提出。

本标准起草单位:卫生部工业卫生实验所、军事医学科学院 307 医院。

本标准主要起草人:白玉书、蒋本荣。

本标准由卫生部委托中国医学科学院放射医学研究所负责解释。

中华人民共和国卫生行业标准

淋巴细胞微核估算受照剂量方法

WS/T 187—1999

Method of peripheral lymphocyte micronucleus
assay for estimating doses exposed

1 范围

本标准给出了电离辐射诱发人外周血淋巴细胞微核的剂量-效应曲线的建立和用其估算生物剂量的方法。

本标准适用于急性外照射事故受照人员的剂量估算。

本标准不适用于分次照射、长期小剂量照射和内照射的生物剂量估算。

2 定义

本标准采用下列定义。

2.1 生物剂量计 biological dosimeter

用以估算受照剂量的生物体系,该生物体系受到照射后的反应与受照剂量之间存在着某种定量关系,从而可用来推定受照剂量。

2.2 剂量-效应曲线 dose-response curve

某种物质或生物体系受到照射后的反应与受照剂量之间存在着某种定量关系,可用适当的数学模式表述,所制备出相应的刻度曲线。可用其估算受照剂量。

2.3 微核 micronucleus

由细胞分裂后期滞后的染色体断片、一个或多个染色体组成的小体。可作为剂量估算的指标。

2.4 胞质分裂阻断微核法 cytokinesis-block micronucleus method (CB 微核法)

在培养的淋巴细胞完成第一次有丝分裂前,向培养体系中加入松胞素-B,所见到的双核淋巴细胞(双核 CB 细胞)就是第一次有丝分裂(M_1)细胞。观察双核 CB 细胞中微核的方法即 CB 微核法。

注:本标准所用外周血淋巴细胞微核分析方法限于 CB 微核法。

2.5 松胞素-B cytochalasin-B, Cyt-B

一种霉菌代谢产物,从培养黑蛛网状长蠕孢的过滤物中得到的结晶粉,在 0℃ 以下避光、干燥储存,易溶于二甲基亚砜,在培养体系中适宜的浓度可以抑制细胞运动和胞质分裂,而不影响胞核分裂,浓度过高可引起胞膜破裂。

2.6 微核细胞 micronucleus cell

胞质中含有微核的双核淋巴细胞。

3 剂量-效应曲线的建立方法

3.1 照射条件和培养方法

3.1.1 必须提供可靠的、明确的物理剂量。受照标本应与照射源保持一定的距离以达到均匀照射的目的。在 0.1~5.0 Gy 的剂量范围内,剂量率最好大于 0.3 Gy/min,小于 1.0 Gy/min,至少要选择 8 个剂量点。

3.1.2 选择 2~3 名成年健康人血样,在 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 条件下进行离体照射,照后在上述温度下放置 100 min 左右,然后采用 CB 微核法培养、制片,得到可供分析的双核 CB 细胞。

3.2 计数分析技术

3.2.1 微核的判断标准

微核是游离于胞质中,与主核完全分开(如有重叠或相切,必须看到各自的完整核膜),呈圆形或椭圆形,结构与主核相同,着色与主核一致或略浅,不折光,大小为主核三分之一以下的小核。

3.2.2 计数和分析

盲法阅片。观察双核 CB 细胞,如发现微核,应记下显微镜坐标,以备审核或照相。一个完整的记录应标明标本号、显微镜号、观察者、制样和观察日期、分析细胞数、微核细胞和微核数,以千分数(‰)表示。

3.2.3 分析细胞数

按式(1)计算各剂量点应分析的细胞数。

$$n = \frac{(1 - p) \times 96.04}{p} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中: p ——微核细胞率, p 可在计数到一定数量的细胞后求得;

n ——应分析的细胞数。

3.3 剂量-效应曲线的拟合

3.3.1 根据下列四种数学模式进行曲线拟合

a) 线性模式

$$f(D) = a_1 + b_1 D \quad \text{即 } y = a + bD \quad \dots\dots\dots (2)$$

b) 二次方程模式

$$f(D) = a_2 + c_2 D^2 \quad \text{即 } y = a + cD^2 \quad \dots\dots\dots (3)$$

c) 二次多项式模式

$$f(D) = a_3 + b_3 D + c_3 D^2 \quad \text{即 } y = a + bD + cD^2 \quad \dots\dots\dots (4)$$

d) 幂函数模式

$$f(D) = a_4 + b_4 D^n \quad \text{当 } a_4 = 0 \text{ 时 } y = kD^n \quad \dots\dots\dots (5)$$

式中: y ——微核细胞率或微核率,‰;

D ——照射剂量, Gy;

a ——本底率;

b, c ——回归系数;

k ——常数;

n ——幂次。

3.3.2 剂量-效应曲线回归方程式的拟合步骤:

首先将所得数据在算术格纸上作散点图,然后根据不同图像决定采用的数学模式:

a) 在算术格纸上散点图呈直线趋势的可采用 $y = a + bD$ 模式。

b) 在算术格纸上散点图呈曲线趋势,而在双对数纸上呈直线的,可采用 $y = kD^n$ 模式。

c) 在算术及双对数格纸上散点图都不能直线化,而呈抛物线形式,可采用 $y = a + bD + cD^2$ 模式。

d) 当 $y = kD^n$ 中 $n=2$, 或 $y = a + bD + cD^2$ 中的 $bD=0$ 时,可采用 $y = a + cD^2$ 模式。

可以通过解方程式方法或用微机计算回归系数。应检验回归系数的显著性和曲线的拟合度。估算剂量多以微核率作为指标,对低 LET 辐射,多适于拟合二次多项式($y = a + bD + cD^2$)。而高 LET 辐射多适于直线方程式($y = a + bD$)。

4 CBMN 法估算受照剂量的原则

- 4.1 用 CB 微核法比较准确估算剂量的范围为 0.25~5.0 Gy。
- 4.2 事故发生后应尽早取血检查,最好在 3 天内取样,最迟不超过一个月。
- 4.3 培养条件、制片方法和微核分析判断标准应与建立刻度曲线时相同。对被估算剂量的个体,至少应分析 500 个以上双核淋巴细胞。
- 4.4 有条件的实验室应建立包括不同辐射类型,不同剂量率(低 LET 辐射)的剂量-效应曲线。应选择和事故条件接近的刻度曲线进行剂量估算,只能在曲线剂量范围内应用,不得外推。
- 4.5 估算剂量时,除给出平均值外,同时给出剂量范围的 95%可信限。在计算 95%可信限时,可忽略回归方程中由于不确定性的微核产率的标准误,只计算观察细胞微核率的标准误即可。



附录 A

(提示的附录)

正确使用本标准的说明

A1 用微核估算比较均匀的 X 射线、 γ 射线和中子的过量照射比较准确。本标准也适用于过量外照射复合烧伤的病例。对不均匀和局部照射准确性较差,一般只能给出近似于全身均匀照射时的吸收剂量。

A2 制备剂量-效应曲线时,对供血者的要求是:不患有急慢性疾病、非放射性工作者、半年内无射线和化学毒物接触史、近 1 个月内无病毒感染、不吸烟、不嗜酒。

A3 CB 微核法关键是在培养的淋巴细胞完成第 1 次有丝分裂前,向培养体系中加松胞素-B,这样所见到的双核淋巴细胞,为第一次有丝分裂细胞,具体方法如下:

a) 培养液组成:80% RPMI 1640 液(或其他培养基),20% 新生牛血清,青、链霉素各 100 u/mL,用碳酸氢钠(NaHCO_3)调 pH 至 6.8~7.2,分装后冰冻备用。

b) 采血和培养:采用微量全血法,将 0.3 mL 肝素化全血加入盛有 4 mL 培养基的培养瓶内,加入适量 PHA,混匀后在 $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 条件下培养,到 40 h 加松胞素-B,事先将其溶于二甲基亚砜中,配成 2 mg/mL 的储藏液, -20°C 冻存,用前融化,生理盐水稀释,最终浓度为 6 $\mu\text{g/mL}$,继续培养(避光)到 72 h 收获。

c) 低渗、固定、制片和染色:终止培养后,首先除去上清液,然后加入 4 mL 0.075 mol/L 氯化钾(KCl)低渗液,混匀后立即加新配的固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)4 mL,再混匀后以 1 000 r/min 离心 10 min,然后去上清,再重复固定一次,沉淀物滴片,Giemsa 染色。

A4 制备剂量-效应曲线时,分析细胞数的计算公式是根据微核细胞率符合二项式分布,若已知微核细胞率和允许误差,就可以根据二项式分布 95% 可信限公式求出应计数的细胞数,生物学实验一般允许误差采用 15%,这需要计数相当大的细胞数,目前多采用 20% 的允许误差,见式(A1)、(A2)、(A3):

$$\text{微核细胞率 95\% 可信限} = p \pm 1.96 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} \quad \dots\dots\dots (\text{A1})$$

$$\text{令} \quad 1.96 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} = p \times 20\% \quad \dots\dots\dots (\text{A2})$$

$$\text{则} \quad n = \frac{(1-p) \times 96.04}{p} \quad \dots\dots\dots (\text{A3})$$

式中: p ——微核细胞率;

n ——观察细胞数。

在建立剂量-效应曲线时计数细胞数应尽可能满足统计学要求,但由于微核的本底值较低,如果对照(正常)剂量点难以满足统计学要求时,至少应分析 10,000 个双核 CB 细胞。

A5 微核的统计量及统计参数的计算

a) 微核细胞率,属二项式分布,以千分率表示,计算公式如式(A4):

$$p(\%) = \frac{x}{n} \times 1000\% \quad \dots\dots\dots (\text{A4})$$

式中: p ——微核细胞率;

x ——含微核的细胞数;

n ——观察细胞数。

其标准误差按式(A5)计算:

$$S_p = \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} \quad \dots\dots\dots (\text{A5})$$

式中: S_p ——标准误;

p ——微核细胞率;

n ——观察细胞数。

总体率可信限公式如式(A6)和(A7)所示:

$$\text{总体率 95\% 的可信限} = p \pm 1.96S_p \quad \dots\dots\dots (A6)$$

$$\text{总体率 99\% 的可信限} = p \pm 2.58S_p \quad \dots\dots\dots (A7)$$

b) 微核率, 属泊松分布, 以千分数表示, 计算如式(A8)所示:

$$p(\%) = \frac{x}{n} \times 1\,000\% \quad \dots\dots\dots (A8)$$

式中: p ——每千个双核 CB 细胞微核数;

x ——微核数;

n ——观察细胞数。

其标准误计算见式(A9):

$$S_p = \frac{\sqrt{x}}{n} \quad \dots\dots\dots (A9)$$

式中: S_p ——标准误;

x ——微核数;

n ——观察细胞数。

总体率可信限公式见(A6)和(A7):

A6 应用举例

某人受 $^{60}\text{Co}\gamma$ 线一次全身照射, 照后第 10 天取血, 分析 800 个双核淋巴细胞, 有微核 514 个, 其剂量估算如式(A10)和(A11)所示:

a)

$$p = \frac{x}{n} \times 1\,000\% = \frac{514}{800} \times 1\,000\% = 642.5\% \quad \dots\dots\dots (A10)$$

$$S_p = \frac{\sqrt{x}}{n} = \frac{\sqrt{514}}{800} = 0.0283 = 28.3\% \quad \dots\dots\dots (A11)$$

b) 微核率的 95%可信限为 $p \pm 1.96S_p$, 代入数据如式(A12)和(A13)所示。

$$642.5\% + 1.96 \times 28.3\% = 697.968\% \quad \dots\dots\dots (A12)$$

$$642.5\% - 1.96 \times 28.3\% = 587.032\% \quad \dots\dots\dots (A13)$$

c) 选用数学模式

选择本实验室所建立的 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射离体人血建立的 CB 微核法的剂量效应曲线:

$Y = 17.9119 + 33.3838D + 42.8809D^2$, 该公式的剂量范围为 0.1~5.0 Gy, 剂量率为 0.38 Gy/min, Y 为微核率(%), D 为剂量(Gy)。

$P=Y$, 将 642.5%、697.968% 和 587.032% 分别代入 Y 项, 解方程后求出平均剂量为 3.45 Gy, 上限为 3.61 Gy, 下限为 3.27 Gy, 估算的剂量为 3.45(3.27~3.61)Gy。