

· 专家共识 ·

双着丝粒染色体半自动化分析估算 辐射生物剂量专家共识

中国核学会核应急医学分会, 中华医学会放射医学与防护学分会,
中华预防医学会放射卫生专业委员会, 中国辐射防护学会核与辐射应急分会

摘 要:双着丝粒染色体(dicentric chromosome, dic)半自动化分析估算生物剂量已在国际上推广应用 10 余年, 技术成熟度高, 且国际原子能机构(IAEA)出版的技术报告和国际标准化组织发布的技术标准已推荐该方法估算剂量。但国内尚未有相关技术规范 and 标准。专家组结合国内 30 余年基于 dic 人工和半自动化分析估算生物剂量的实践经验, 从 dic 半自动化分析原理、主要技术内容、影响因素分析和实用举例等方面给出 dic 半自动化分析估算生物剂量的技术共识, 其主要技术内容与现有 GB/T 28236 国家标准相比, 具有明显提升生物剂量估算效率, 降低对专业人员技术熟练程度要求, 更有利于推广应用等优势。而且 dic 半自动化分析与人工分析一样, 可用于急性均匀、局部、迁延性照射和延迟采样等不同辐射暴露场景下的受照剂量估算与重建。dic 半自动化分析估算生物剂量的推广应用, 可解决目前国内生物剂量估算很难满足发生大规模核与辐射事故受照人员众多时的医学应急响应临床分类诊断需要的“瓶颈”, 为进一步制定相关国家及行业标准提供技术支撑。

关键词:电离辐射; 双着丝粒染色体; 半自动化分析; 生物剂量估算; 专家共识

中图分类号: R144.1; TL73

文献标识码: A

在发生核与辐射事故时快速、高通量开展分类诊断和及时治疗对减轻患者放射损伤甚至挽救患者生命至关重要, 而生物剂量估算在及时发现并确认外照射急性放射损伤和临床早期分类诊断过程中起着不可或缺的重要作用^[1]。外周血淋巴细胞染色体畸变特别是双着丝粒染色体(dicentric chromosome, dic)指标作为国际学界公认的辐射生物剂量估算的“金标准”, 已广泛应用于包括 1986 年前苏联切尔诺贝利核电站事故、2011 年日本福岛核电站事故以及国内外一系列辐射事故受照人员的生物剂量估算, 为这些受照者的诊断和治疗提供了准确的生物剂量资料^[2]。

国际上国际原子能机构(IAEA)于 2011 年出

版的技术报告^[3]和国际标准化组织(ISO)发布的技术标准^[4]已推荐利用 dic 半自动化分析估算剂量。目前国内生物剂量的估算仍然主要采用国家标准 GB/T 28236—2011《染色体畸变估算生物剂量方法》^[5]推荐的方法估算剂量, 需要进行全人工分析。该方法需要人工在显微镜下分析计数 dic 和着丝粒环(ring, r), 并以每细胞 dic+r 数估算生物剂量, 不但费时费力、效率低, 而且还需要经验丰富的染色体畸变分析专业技术人员。一名有经验的技术人员人工分析 150 个细胞的染色体畸变至少需要 3 h, 而利用高通量染色体自动化扫描系统自动化检测 dic 只需要 20 min, 再进行人工复核便可很容易识别出真阳性 dic 并剔除假阳性 dic

收稿日期: 2024-03-12

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20230553); 中国医学科学院放射医学研究所辐射生物剂量与生物标志物联合实验室项目(JSQTHKT20200901664); 2022 年度国家自然科学基金联合基金(核技术创新联合基金)项目(U2267220); 2021 年度国家社会科学基金(21BGL300); 中核医疗 2021 年度“核医科技创新”重点项目(ZHYLZD2021001); 2021 年度中国宝原科研基金支持项目(270001); 放射医学与辐射防护国家重点实验室内部协作课题(GZN1202201); 2021 年度苏州市临床重点病种诊疗技术专项项目(LCZX202105); 苏州大学附属第二医院学科建设托举工程(核技术医学应用创新团队)项目(XKTJ-HTD2021001)。

通信作者:吕玉民, E-mail: lu_yumin63@126.com; 刘青杰, E-mail: liuqingjie@nirp.chinaacde.cn; 刘玉龙, E-mail: yulongliu2002@126.com

(平均 2 min),从而较为快速准确地估算剂量^[6]。在此背景下,dic 半自动化分析不但可以大大提高生物剂量估算的效率,还更有利于推广应用,凸显优势。

目前自动化检测 dic 的关键设备高通量染色体自动扫描系统已在全国职业病防治和核工业系统普遍配置,为开展快速、高通量估算生物剂量提供了基本条件。但国内尚未有相关技术规范和标准,结合国内和主要执笔者单位 30 余年基于 dic 人工和半自动化分析估算生物剂量的实践经验,提出一项明确的双着丝粒染色体半自动化分析估算生物剂量的专家共识,解决目前国内生物剂量估算的“瓶颈”问题,满足发生大规模核与辐射事故受照人员众多时的医学应急响应临床分类诊断需要,为进一步制定相关标准提供技术支撑,意义重大。

1 dic 半自动化分析估算生物剂量的原理和适用范围

早在 20 世纪 80 年代,国际上就开始尝试开发染色体畸变自动化分析系统。随后,一些商业化的中期相扫描与核型分析软件系统面市,并已经在许多细胞遗传学实验室中得到很好的应用。其工作原理和主要流程:首先中期细胞扫描仪对染色体标本进行自动化扫描;第二步将扫描检测到的中期分裂相以数字化高分辨率中期相图像格式自动捕获;然后,对中期分裂相图像进行详细分析,以确定正常的染色体和候选的 dic。所谓半自动化分析,就是自动化检测到的候选 dic 必须由有一定经验的技术人员确认,但这比人工在显微镜下分析 dic 简便、高效得多^[2-3]。系统检测到并标注的候选 dic 很容易被区分确认,如图 1a 显示的是真阳性 dic,对于大多数假阳性的 dic(如人为因素、重叠染色体)也很容易被排除,见图 1b^[7]。最后以每细胞 dic 数为指标建立剂量-效应曲线,实现了基于 dic 自动化分析的生物剂量估算半自动化,可用于发生大规模核与辐射事故时的生物剂量估算和临床分类诊断。

本共识给出了电离辐射诱发人外周血淋巴细胞染色体畸变分析中的微量全血培养、标本制备、dic 半自动化分析,以及用其建立剂量-效应曲线和估算生物剂量的方法等,适用于一次比较均匀

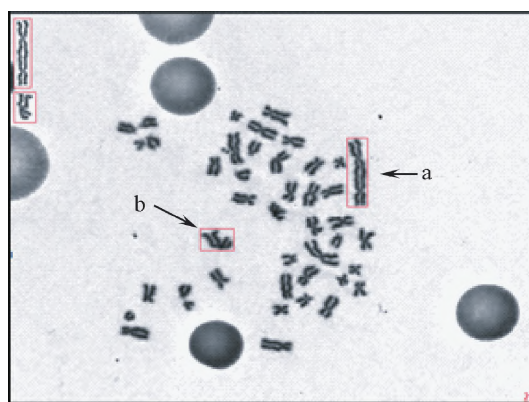


图 1 软件自动分析的双着丝粒染色体

Fig. 1 Automatic analysis of dic using DCScore software

的全身外照射核与辐射事故受照人员的生物剂量估算,也适用于一次比较均匀的全身外照射复合烧伤受照人员的生物剂量估算。不适用于长期低剂量累积照射和内照射的生物剂量估算。

2 dic 半自动化分析估算生物剂量的主要技术共识

2.1 主要仪器设备和试剂配制

2.1.1 常规仪器

包括用于接种细胞的超净工作台,用于培养细胞的恒温培养箱,用于分离细胞的大容量普通水平式离心机,用于分析染色体畸变的光学显微镜(带坐标刻度),用于低渗细胞的水浴箱,用于储存实验试剂具备 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件的冰箱,用于静脉血保存($18\sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$)的定制保存运输箱等。

2.1.2 自动化仪器

可实现自动化中期相寻找、高倍图像采集和 dic 自动化分析的高通量染色体自动化扫描系统;用于收获中期相细胞的自动化细胞收获仪;用于染色体标本制备的自动化制片/滴片机;用于染色体标本染色的自动化染片机。

2.1.3 试剂配制

RPMI-1640 培养基、低渗液、固定液、磷酸盐缓冲液和吉姆萨(Giemsa)染液的配制参照 GBZ/T 248 标准^[8]推荐的方法,其中培养基可购买有产品注册号的市售产品。

2.2 外周静脉血的采集、保存和运输

拟合剂量-效应曲线时,采血样前须获取志愿者的知情同意。2~4 名健康成年人,非放射工作

者,男女各半,年龄在 18~60 岁,无烟酒嗜好,半年内无急慢性疾病史、无射线和化学毒物接触史,近一个月内无病毒感染史。用真空肝素钠或肝素锂采血管,每人抽取静脉血 20 mL,颠倒混匀,用于离体照射和剂量-效应曲线的拟合。

估算生物剂量时,采集静脉血约 4~5 mL,肝素抗凝,颠倒混匀,静脉血保存和运输最佳温度是 18~24 ℃,24 h 内送达实验室为宜。

2.3 照射条件和微量全血培养

2.3.1 离体照射条件

必须提供可靠、明确的照射样品的物理剂量,在室温下进行照射。受照样品应与照射源保持一定的距离以达到均匀照射的目的。有条件的实验室应建立包括不同射线类型(如 X 射线、 γ 射线、中子)、不同剂量率的剂量-效应标准曲线;对于低传能线密度(linear energy transfer, LET)辐射,剂量范围选择 0.1~5.0 Gy,剂量率介于 0.2~1.0 Gy/min 之间,选择不少于 8 个剂量点;对于高 LET 辐射,剂量范围选择 0.01~3.0 Gy,以不少于 7 个剂量点为宜;照射后在 (37±0.5)℃ 恒温水浴箱中孵育修复 2 h。

2.3.2 微量全血培养

取照射后的静脉血 0.3~0.5 mL 加入到 5 mL 含植物血凝素和 20% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,培养开始加入终浓度为 0.015~0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 秋水酰胺或秋水仙素,在培养容器上编号并注明培养开始时间和日期,轻轻摇匀, (37±0.5)℃ 恒温培养 48~52 h 收获细胞。当初估剂量大于 5 Gy 时,可分批培养,将培养时间延长至 56~72 h,以克服因大剂量照射而诱发的细胞分裂周期阻滞、可供分析细胞数比较少的问题^[9-10]。

2.4 染色体标本的制备

2.4.1 人工制备

人工制备染色体标本的质量受专业人员技术熟练程度和实验室温、湿度等的影响较大,有条件的实验室配备自动化制片设备为宜,以确保制备出的染色体标本的稳定性和质量。

2.4.1.1 低渗

终止培养后用吸管轻轻抽去培养瓶中的上清液,每瓶加入 8 mL 37 ℃ 预温的 0.075 mol/L KCl,将细胞团块充分吹打后移至 10 mL 的尖底玻璃离心管中,放入 37 ℃ 恒温水浴箱(锅)中低渗 20~

30 min。

2.4.1.2 预固定和固定

取出低渗完毕的离心管,每管加入 5~10 滴新配制的固定液(甲醇:冰醋酸=3:1),用吸管吹打混匀,水平离心机中 200~250 g 离心 8~10 min。取出离心管,用吸管吸去上清液,沿管壁每离心管中加入 8 mL 固定液,用吸管快速吹打细胞团块,常温下固定 20~30 min,在水平离心机中 200~250 g 离心 8~10 min,再重复固定 1~2 次。

2.4.1.3 制片

取出离心管,吸去上清液,根据细胞团块的大小每离心管中加入 3~5 滴固定液以调节细胞浓度。然后以一定高度(10~30 cm)将细胞悬液滴在经 37 ℃ 水浴预热或在 4 ℃ 冰箱预冷的洁净载玻片上,每张玻片滴 2~3 滴,自然空气干燥。

2.4.1.4 编号和染色

对每一张染色体标本片进行编号,并按照编号做好记录。将用 pH 6.8 的磷酸缓冲液配制的 10% Giemsa 染液均匀涂于染色体标本片上或置于染缸中,室温下染色 8~10 min,以一定倾角(约 45°)用自来水轻轻冲洗,洗掉染液后置于玻片架上室温自然晾干。

2.4.2 自动化制备

配备有自动化细胞收获仪、自动化制片/滴片机和自动化染片机的实验室,可按照生产商提供的操作指南自动化制备染色体标本。自动化制备出的染色体标本相比人工有一定优势,如自动化细胞收获仪制备的细胞悬液细胞丢失少、质量稳定,且不需要经验积累;自动化制片机滴片较为均匀、不受温湿度影响,制备的标本质量稳定,亦不需要经验积累等。

2.5 dic 的半自动化分析

2.5.1 分析方法

按照生产商提供的高通量染色体自动化扫描系统操作指南对制备出的染色体标本片进行全玻片自动化中期相寻找及高倍图像采集,对采集到的高倍图像使用相应的 DCScore 软件进行 dic 自动化分析,对软件检测到的所有 dic 由人工根据经验确认,剔除假阳性 dic 后,再导出软件给出经过人工确认的 dic 数和分析细胞数。

2.5.2 分析计数的细胞数要求

每例样本应分析计数的细胞数 $n = (1-p) \times$

96.04/ p , 其中 p 为每细胞 dic 数, p 可在计数分析一定数量的细胞后求得。

2.6 剂量-效应曲线的拟合

2.6.1 人工拟合

对 X 或 γ 射线诱导的 dic 与受照射剂量之间的剂量-效应关系以拟合二次多项式为宜, $Y = C + \alpha D + \beta D^2$, 其中 Y 为每细胞 dic 数, D 为照射剂量 (Gy), C 为本底畸变率, α 为线性系数, β 为线性平方系数。利用已知的 Y 和 D 值计算出公式中的各项回归系数, 拟合出相应的回归方程式 (剂量-效应曲线), 同时计算出回归系数显著性检验的 P 值和检验拟合度的相关性系数 R^2 值。

2.6.2 软件拟合

按照得到国际学界公认的免费专业剂量-曲线刻度与剂量估算软件 CABAS 指南^[11], 将半自动化分析得到的每细胞 dic 数和对应的照射剂量, 分别输入至该软件, 拟合出相应的剂量-效应曲线, 其公式亦为 $Y = C + \alpha D + \beta D^2$, 同时软件还给出了回归系数显著性检验的 P 值和检验拟合度的相关性系数 R^2 值。

2.7 剂量估算

2.7.1 每细胞 dic 数和 95% 置信限的计算

dic 符合泊松分布, 计算出每细胞 dic 数 p 、每细胞 dic 数的标准误 S_p 和每细胞 dic 数的 95% 置信限 95% CI:

$$p = \frac{x}{n} \quad (1)$$

$$S_p = \frac{\sqrt{x}}{n} \quad (2)$$

$$95\% CI = p \pm 1.96 S_p \quad (3)$$

式中, p 为每细胞 dic 数, x 为半自动化检测到的 dic 数, n 为自动化分析的细胞数, S_p 为每细胞 dic 数的标准误, 95% CI 为 95% 置信限。

2.7.2 估算受照剂量

将所要估算剂量的标本中得到的每细胞 dic 及 95% 置信限的上、下限分别代入已建立的剂量-效应标准曲线, 估算出受照剂量, 并出具剂量估算报告。事故受照人员生物剂量估算示例参见下文 2.10 节。

2.8 质量控制要求

2.8.1 进行染色体畸变分析的实验室应有 2 名 (含) 以上专业技术人员, 掌握电离辐射生物效应

和细胞遗传学基础知识, 能识别包括 dic 在内的各类型染色体畸变。

2.8.2 染色体标本应有唯一性编号, 标本分析完毕后, 应置于玻片盒内长期保存, 并做好记录。

2.8.3 实验室应定期参加国家或省市组织的实验室间比对。

2.8.4 实验室化学和生物安全符合国家法律法规和标准的要求。

2.9 dic 半自动化分析估算剂量的注意事项

2.9.1 dic 半自动化分析比较准确估算剂量的范围是 0.25~5.0 Gy 之间。

2.9.2 事故后应尽早取血, 不宜超过 8 周。

2.9.3 培养条件、制片方法和染色体畸变的判断标准应与建立剂量-效应曲线时相同。

2.9.4 对估算剂量的个体, 至少应自动化分析 500 个中期相细胞或自动化检测到 100 个 dic。

以应急为目的进行分类诊断时, 自动化分析 150 个细胞或计数 30 个 dic 估算的剂量可以满足早期分类诊断的需要, 而且估算剂量的误差在 1 Gy 内^[12]。

2.9.5 应选择与事故条件接近, 通过本实验室 dic 自动化分析系统或软件拟合的刻度曲线进行剂量估算, 在曲线剂量范围内应用, 一般不得外推。

2.9.6 估算剂量时, 除给出平均值以外, 同时给出剂量范围的 95% 置信限。在计算 95% 置信限时, 可以忽略回归方程式中由于不确定性的 dic 率的标准误, 只计算 dic 率的标准误即可。

2.10 dic 半自动化分析估算生物剂量技术共识的应用示例

某人受⁶⁰Co γ 射线一次全身照射, 照后 48 h 内取血, 采用微量全血培养法制备染色体标本, 自动化分析 500 个中期相细胞, 半自动化检测出 dic 184 个, 估算其生物剂量。

将分析细胞数 (500) 和检测得到的 dic 数 (184) 分别代入 2.7.1 节公式 (1)、(2) 和 (3), 计算出的每细胞 dic 数为 0.368 0, 标准误 S_p 为 0.027 1, 每细胞 dic 数的 95% 置信限为 0.314 9~0.421 1。

选择河南省辐射生物与流行病学医学重点实验室 (以下简称“省重点实验室”) 所建立的⁶⁰Co γ 射线照射离体人外周血建立的 dic 半自动化分析

的剂量-效应曲线(该曲线的剂量范围为 0.5~5.0 Gy,剂量率为 0.27 Gy/min):

$$Y = 0.0001954 + 0.044228D + 0.024628D^2 \quad (4)$$

式中, Y 为每细胞 dic 数, D 为剂量(Gy)。

将 0.368 0、0.314 9 和 0.421 1 分别代入公式(4)中的 Y 项,解方程后求出平均剂量为 3.07 Gy,95%置信限下限为 2.79 Gy、上限为 3.33 Gy。

亦可以将分析细胞数(500)、检测得到的 dic 数(184)和公式(4)的各项回归系数输入到剂量估算软件 CABAS 中,估算的平均剂量为 3.07 Gy,95%置信限下限为 2.80 Gy、上限为 3.35 Gy。

3 影响 dic 半自动化分析估算生物剂量的主要因素

自从 2009 年法国学者 Vaurijoux 等^[13]首次报道借助图像分析系统半自动化检测 dic 估算达喀尔辐射事故受照者的生物剂量以来,国内外的学者利用高通量染色体自动化扫描分析系统分析 dic,并刻度基于每细胞 dic 数的剂量-效应曲线,系统研究了 dic 半自动化分析估算生物剂量的影响因素和将其应用于发生大规模核与辐射事故时快速、高通量剂量估算的可行性。

3.1 不同实验条件设置对 dic 半自动化分析构建剂量曲线的影响

在 MULTIBIDOSE EU FP7 [The European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007—2013)] 计划项目支持下,Romm 等^[6]报道了 6 家欧盟生物剂量实验室建立了基于半自动化 dic 分析的剂量-效应曲线,并分析了不同实验条件对剂量曲线的影响。在这 6 家实验室中有 2 家实验室用收获前 2~3 h 加秋水酰胺的淋巴细胞培养方法,用荧光加 Giemsa 染色制备染色体标本;另 4 家实验室是在收获前 24 h 加秋水酰胺,用 Giemsa 染色制备标本。dic 自动化分析软件(DCScore V. 3.6.7)分类器的参数分别按照法国辐射防护与核设施研究院(Institut de Radioprotection et de Surete' Nucle'aire, IRSN)和德国联邦辐射防护局(Bundesamt fuer Strahlenschutz, Bfs)推荐的方法设置。这 6 家实验室采用 3 种不同的分类器参数(IRSN-Class、Bsf-Class 和 Bsf-First-Class)检测 dic,构建了 9 条 γ 射线离体照射的剂量-效应曲线。统计分析显示,建立的这些剂量-效应曲线间没有

统计学差异,所以可以将 9 条曲线合并为一条总的曲线(Pooled;图 2)。表明不同实验室间、加秋水酰胺的时间以及采用不同的分类器参数对构建剂量-效应曲线没有明显影响。总之,这种半自动化的 dic 计数方法是应对大规模核事故时快速和高通量的分类潜在受照者的有用工具,而且参加该项研究的 6 家实验室所得实验结果具有可比性,说明可通过建立实验室间的网络进行快速剂量估算,以提高核与辐射医学应急响应能力。

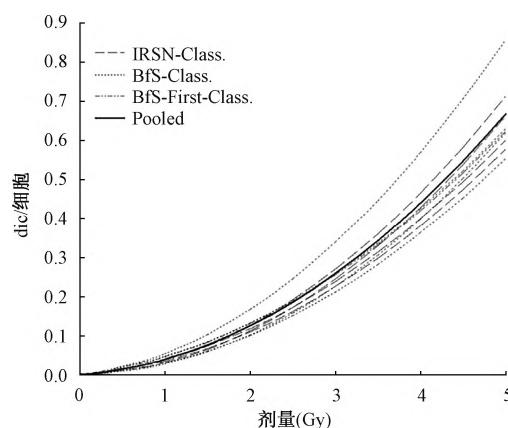


图 2 6 家实验室基于半自动化 dic 分析建立的 9 条 γ 射线剂量-效应曲线^[6]

Fig. 2 Nine established gamma ray dose effect curves of semi-automatic dicentric analysis using three different classifiers for dicentric detection in 6 laboratories^[6]

3.2 自动化分析检测到的 dic 假阳性率与照射剂量的关系分析

上述跨实验室的研究还对 dic 假阳性率与照射剂量进行了分析^[6],发现随着照射剂量的升高,每细胞 dic 数升高,真阳性 dic 的比率亦升高,也就是说剂量越低,dic 的假阳性率越高,如在照射剂量低于 0.5 Gy 时 dic 假阳性率在 90% 以上,而大于 2 Gy 条件下 dic 假阳性率不超过 20%。采用不同的 DCScore 软件分类器参数设置对检测到 dic 真阳性率没有影响,无论是采用德国的 Bsf-Class 还是法国的 IRSN-Class 分类器参数,检测到的真阳性率无明显统计学差异。

“省重点实验室”在对 dic 假阳性率与照射剂量的关系分析中得到类似结果,DCScore 软件自动化检测到的 dic 假阳性率有随照射剂量的增加而降低的趋势(99.67%~4.18%),且照射剂量大于 2 Gy 和 3 Gy 时,假阳性率分别小于 30% 与 20%

(图 3)。这些研究结果再次说明,当受照剂量大于 2 Gy 时,基于 dic 自动化分析估算的剂量用于临床分类诊断是可行的^[14]。

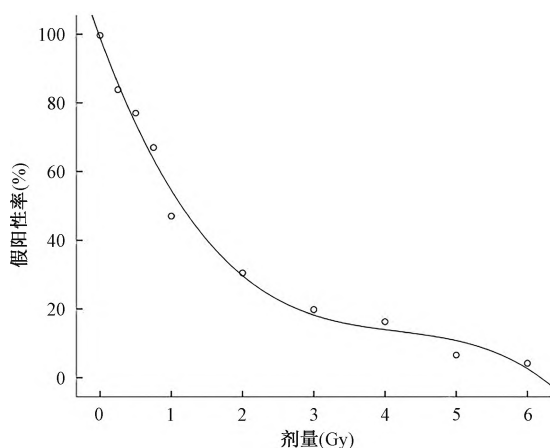


图 3 自动化分析 dic 假阳性率与照射剂量的关系^[14]

Fig. 3 Relation of false positive rate of dic detected by DCScore and radiation doses^[14]

3.3 dic 半自动化和人工分析用时比较

国外有报道显示,半自动化分析可明显提高人工分析的工作效率。如人工分析 50 个核型和自动化分析计数 150 个核型可以对受照者或怀疑受照者进行初步分类诊断,但熟练和有经验的专

业技术人员计数 50 个核型至少需要 60 min,自动化分析计数 150 个核型仅需 20 min,且人工确认 dic 平均只需 2 min,自动化分析可将人工分析的工作效率提高 30 倍^[6]。

“省重点实验室”用 Metafer 4 系统采集 200 个高倍图像,分别用 DCScore 和 Ikaros 软件进行 dic 半自动化和人工分析,比较两种计数方法所用时间(见表 1)^[14]。由于两种分析均需要借助染色体扫描系统进行全玻片自动化中期相捕获及高倍图像采集,所需时间同为 25 min。对系统采集的 200 个高倍图像平均按 150 个图像可供人工分析,依据每个图像包含 dic 数(0~n 个)不同,“省重点实验室”分析 1 个图像所用时间一般在 0.5~1.5 min 之间,每个图像平均按 1 min 计算,人工分析平均需要用时 150 min,而自动化分析和候选 dic 的人工确认只需要用时 3 min,人工分析所用时间是半自动化分析的 6.25 倍。同时,根据自动化分析所得候选 dic 的多少,对其人工确认用时在 1~3 min 之间,平均为 2 min,所以半自动化分析可将人工工作效率提高 75 倍。因此,相较于人工分析,dic 半自动化分析使剂量估算效率和人工工作效率两方面均得到明显提高。

表 1 dic 半自动化和人工分析所需时间

Tab. 1 Time required for dic semi-automatic and manual analyses

dic 半自动化分析流程	所需时间 (min)	dic 人工分析流程	所需时间 (min)
中期相自动化扫描	5	中期相自动化扫描	5
高倍图像采集 200 细胞	20	高倍图像采集 200 细胞	20
dic 自动化分析	1	人工分析 150 个高倍图像	150(1 min/图像)
候选 dic 的人工确认	2	—	—
总 计	28		175

3.4 自动化分析需计数的细胞数

为了解 dic 半自动化分析在核与辐射应急响应分类诊断中应计数的细胞数,法国学者 Gruel 等^[15]在一次应急演练中模拟了不同辐射场景的 50 例受害者,模拟的全身照射外周血样品的照射剂量为 0~4.7 Gy,模拟的局部照射是将照射与未照射血液样品按照不同的比例混合,然后进行 dic 自动化检测和估算剂量。结果显示,在 34 个模拟全身照射的血液样品中,有 32 个样品从第一张染色体标本上自动化检测 300~400 个细胞估算的剂量与照射剂量基本一致,可以给出较为可靠的分

类诊断,但对于局部照射,只在较高的照射剂量点(3.7 Gy)才能做出较为正确的分类。此外,无论是模拟的全身或是局部照射,每增加一张分析的标本,均可对分类做出校正。所以,以自动化检测 300~400 个细胞估算剂量进行初步分类诊断是可行的。对于最终的剂量估算需要自动化分析的细胞数则主要取决于初始估计剂量以及物理剂量和受照者临床症状等的信息。该文作者建议,剂量大于 1 Gy 时应自动化分析 1 500 个细胞,剂量较低或怀疑受到局部照射时分析细胞数应增加到 3 000 个。

美国学者 Ryan 等^[16]关于 dic 自动化分析估算剂量在辐射应急响应分类诊断中应计数的细胞数研究中,通过调整 Metafer 系统中中期捕获算法和提高 DCScore 软件自动化检测 dic 的灵敏度,在不需人工干预去除假阳性 dic 的情况下,自动化检测 150 个左右的细胞估算的剂量就能较好的区分出照射剂量为 0.5~3.0 Gy 的模拟 X 或 γ 射线照射,认为 dic 自动化分析可有效的应用于发生大规模核与辐射事故时快速的临床分类诊断。笔者的研究得到类似结果,当照射剂量大于 2 Gy 时,自动化检测 100~200 个细胞估算的剂量可用于临床分类诊断。据文献报道,以分类诊断为目的人工计数 50 个细胞与自动化分析 150 个细胞的分类效率是类似的^[12]。因此,当大规模人群受到照射且以分类诊断为目的时,自动化分析 150 个细胞可用于事故受照者早期快速的临床分类诊断。

4 dic 半自动化分析估算生物剂量的应用实践

4.1 非洲达喀尔辐射事故受照者的生物剂量估算

法国学者 Vaurijoux 等^[13]首次在国际上将基于 dic 半自动化分析构建的剂量曲线,应用于达喀尔(Dakar)¹⁹²Ir 源辐射事故受照者的生物剂量估算。他们利用实验室留存的 46 例受照者的染色体标本片进行了 dic 半自动化分析,将 dic 半自动化分析和早先 dic 人工分析得到的 46 例事故受照者的每细胞 dic 数,分别代入人工分析方程式 $Y_{MS} = (0.0013 \pm 0.0010) + (0.0491 \pm 0.0100)D + (0.0452 \pm 0.0077)D^2$ 和半自动化分析方程式 $Y_{ADS} = (0.0008 \pm 0.0004) + (0.0070 \pm 0.0026)D + (0.0217 \pm 0.0016)D^2$ 估算剂量。结果显示,人工计数 50 个细胞与计数 500 个细胞估算的剂量两者分类受照者造成的误差达到 50%,而人工计数 500 个细胞与半自动化分析 500 个以上细胞估算的剂量两者分类受照者造成的误差仅为 4.35%。而且半自动化分析比人工分析要快 20 倍,如每位分析者半自动化分析 1 000 个细胞与用人工分析 50 个细胞所用时间一样。所以,用 dic 自动化分析软件半自动化检测 dic 估算剂量可以代替常规的人工分析估算剂量,而且与人工分析相比,自动化分析速度更快、估算剂量更准确,是发生大规模

核与辐射事故时较为理想的生物剂量估算方法。

4.2 dic 半自动化分析用于不同辐射场景估算剂量的可行性

电离辐射诱发的 dic 率为泊松分布,可以准确估算急性均匀照射场景下的受照剂量,但也可以根据 dic 的分布情况和一些数学模型如 Dolphin's 模型估算局部和迁延性照射辐射暴露场景下的受照剂量。由于半自动化分析检出的 dic 率属于泊松分布,是否也可以用于不同辐射场景条件下的剂量估算?为此,来自欧盟的学者 Romm 等^[17]利用 6 家网络实验室已建立的基于 dic 半自动化分析构建的剂量曲线,采集 33 例健康人的血液样品用 ⁶⁰Co γ 射线离体照射,分别模拟急性全身、局部和迁延性照射 3 种辐射暴露场景,每个暴露场景分别选用 3 个不同的照射剂量。照射后的血液样品双盲编号后运送到参加该项研究的不同实验室。每个实验室按照各自实验室的标准方法培养与制片,标本片用半自动化分析系统计数 dic,每例样品计数 300 个中期细胞,将半自动化分析得到的每细胞 dic 数代入前期基于 dic 半自动化分析构建的剂量-效应曲线估算剂量。结果显示在模拟的均匀照射条件下,所有实验室均能将 0、0.5、2.0 和 4.0 Gy 剂量点区分开,而且在大多数样品中估算的剂量与实际照射剂量的误差在 ± 0.5 Gy 范围内;在模拟的迁延性照射条件下,所有实验室均能将 1.0、2.0 和 4.0 Gy 剂量点区分开,大多数样品中估算的剂量与实际照射剂量的误差亦在 ± 0.5 Gy 范围内;在模拟的局部照射条件下,所有实验室均能将 2.0、4.0 和 6.0 Gy 剂量点区分开,仅在几个样品中估算的剂量与实际照射剂量的误差在 ± 0.5 Gy 范围内,这可通过增加自动化检测细胞数来降低误差率。

该项由 6 家国际实验室参加的研究结果提示,dic 半自动化检测方法与人工分析一样,亦有用于受不同辐射场景照射后较为准确地对受照者进行分类的潜能。在发生大规模核与辐射事故时,该方法是对受照人群进行高通量筛查分类的有用工具。

4.3 dic 半自动化分析估算剂量用于临床分类诊断的可行性

鉴于 dic 自动化分析检出的 dic 真阳性率与照射剂量呈正相关,“省重点实验室”探讨了利用

自动化或半自动分析检出的 dic 率估算剂量用于临床分类诊断可行性^[14]。利用 DCScore 软件(德国 CARL ZEISS 公司)半自动化分析 dic,拟合基于每细胞 dic 的剂量-效应曲线,并用“省重点实验室”参加全国生物剂量估算比对的 12 份考核样品(0.7~4.5 Gy)估算剂量进行验证。将自动化分析检测到的 12 份考核样品人工确认前后的每细胞 dic 数,代入基于 γ 射线照射的 dic 半自动化分析构建的回归方程 $Y = 0.024\ 628\ D^2 + 0.044\ 228\ D + 0.000\ 195\ 4$ 估算剂量。结果显示 dic 人工确认前,照射剂量大于 2 Gy 时估算的剂量与实际照射剂量的相对偏差均 $\leq 20.48\%$,大于 3 Gy 时估算剂量的相对偏差均 $\leq 11.11\%$;dic 人工确认后估算的剂量与实际照射剂量的相对偏差均 $\leq 10\%$,接近于真实照射剂量。而且除 0.7 Gy 外,照射剂量为 1.4、1.7、1.9 Gy 用 dic 自动化分析估算的剂量分别为 1.97、2.33 和 2.44 Gy,分别可分类为轻度、中度偏轻骨髓型放射病。因此,dic 自动化分析用于轻度、中度和重度骨髓型急性放射病的初步分类是可行的。这表明 dic 半自动化分析可以用于核与辐射事故受照者的剂量估算和临床分类诊断,特别是在发生大规模核与辐射事故,受照人员较多时,可用人工确认前检测的 dic 数估算剂量,对受照者区分出不同的受照剂量区间,做出更快速的初步分类诊断。

4.4 延迟采样和局部照射受照者的生物剂量估算

在生物剂量估算实践中,大多数是照后短时间内因及时发现事故而进行生物剂量估算,但也有一些事故在照后几个月或更长时间,患者因健康出现问题就医时通过染色体畸变分析估算剂量才被发现,此类案例因采血延迟、非稳定性染色体畸变丢失而造成估算剂量偏低。因此,IAEA 推荐可用不同数学模型对受照者进行回顾性生物剂量的重建,修正因延迟采血而造成的估算剂量误差^[3]。

“省重点实验室”利用 dic 人工和半自动化分析估算剂量确诊了一例介入术后 7 个月疑似因 X 射线介入手术致背部皮肤大面积放射性皮肤损伤的患者,并依据 dic 的分布重建了该患者的生物剂量^[18]。术后 203 d 采集患者肝素抗凝静脉血进行微量全血培养,采用国际学界公认的免费生物剂

量估算软件 CABAS,利用“省重点实验室”基于 dic 半自动化与人工分析、dic+r 人工分析构建⁶⁰Co γ 射线离体照射人外周血的剂量-效应曲线及 GB/T 28236—2011 标准^[5]推荐曲线,估算患者的受照剂量、泊松分布 u 检验值和身体受照份额等。结果显示患者术后 7 个月,基于每细胞 dic 或 dic+r 估算的一次全身等效吸收剂量在 0.68~0.95 Gy 之间,dic 半自动化分析估算的剂量低于 dic 或 dic+r 人工分析估算剂量,包括国家标准推荐曲线在内的 3 条不同剂量率的人工分析曲线估算的剂量非常接近,半自动化与人工分析估算剂量的相对偏差为 27%~28%,均表明该患者受到过量照射或为轻度骨髓型急性放射病。泊松分布 u 检验和身体受照份额的估算结果显示的 u 值均大于 11.961, σ^2/y 均大于 1.00,dic 或 dic+r 不符合泊松分布,为过离散分布,患者受到局部不均匀照射,身体受照份额为 37.02%。可见 dic 半自动化分析对于局部照射估算剂量以及对于事故受照者临床分类诊断都是可行的,有推广应用价值。此外,利用 IAEA 推荐的 Dolphin's 模型来修正因延迟采血而造成的估算剂量误差方面,dic 半自动化和人工分析估算的该患者剂量分别为 2.15 Gy (CI , 1.98~2.32 Gy) 和 2.48 Gy (CI , 2.33~2.64 Gy),估算的剂量相当于照后短时间内的全身平均吸收剂量,2 种分析方法重建的剂量基本一致,说明 dic 半自动化分析亦可重建和修正因延迟采血而造成的估算剂量误差。

5 结论和展望

dic 半自动化分析估算生物剂量已在国际上推广应用 10 余年,技术成熟度高,不但能明显提升生物剂量估算的效率,还降低了对专业人员技术熟练程度的门槛要求,更有利于推广应用。相比而言,我国 dic 半自动化分析估算生物剂量起步较晚,但进展迅速。本专家共识从 dic 半自动化分析原理、主要技术内容、影响因素分析和应用实践等方面给出了 dic 半自动化分析估算生物剂量的技术共识,其主要技术内容与现有 GB/T 28236 国家标准^[5]相比有一定特色和优势。一是引入了染色体标本的自动化制备技术,不需要专业人员制备标本的经验积累,能确保制备出的标本质量稳定可靠,提高生物剂量估算的成功率;二是 dic 半

自动化分析不但能明显提高检测效率,还由于降低了专业人员识别畸变的技术要求,可更好推广应用;三是引入了软件拟合曲线和估算剂量,省去了复杂的计算过程。通过对影响因素的分析和实用举例可见,dic 半自动化分析与人工分析一样,除可用于急性均匀照射估算剂量外,同样可用于局部、迁延性照射和延迟采样等辐射暴露场景下的受照剂量估算与重建,而且在一定照射剂量范围内,自动化而非人工干预检测 dic 估算的剂量用于临床分类诊断是可行的。因此,dic 半自动化分析估算生物剂量,完全可以代替常规的人工分析估算剂量,而且与人工分析相比,半自动化分析速度更快、估算剂量更准确,是发生大规模核与辐射事故时较为理想的生物剂量估算方法。

展望未来,为了有效应对大规模核与辐射事故,生物剂量估算应该满足自动化、快速和高通量

的要求,且需要与临床指标、物理剂量估算相互佐证。具体操作层面,国际上已有较为成熟的实践,通过建立全流程细胞遗传指标的全自动化分析技术,明显提高了生物剂量估算的通量和效率^[19]。但国内有关高通量估算生物剂量的研究相对滞后,目前仅建立了 dic 半自动化分析估算生物剂量方法。利用人工智能技术自动化检测 dic 等指标,研发出从细胞接种、收获、制片/滴片、图像采集和遗传指标分析全流程自动化的高通量生物剂量估算平台,是未来提升国内生物剂量估算效率和通量的主要目标,也是国内同行值得关注和重点研发的发展方向,以便更好地为我国核与辐射事业的发展保驾护航。

利益冲突:所有作者宣称没有任何利益冲突,未接受任何不当利益。

参考文献:

- [1] HAN L, GAO Y, WANG P, et al. Cytogenetic biodosimetry for radiation accidents in China [J]. Radiat Med Prot, 2020, 1(3): 133-139.
- [2] 王平, 韩林, 李杰, 等. 双着丝粒染色体分析在核与辐射事故应急生物剂量估算中的应用与进展[J]. 辐射防护通讯, 2020, 40(Z1): 97-102.
WANG P, HAN L, LI J, et al. Application of dicentric chromosome analysis in nuclear/radiation emergency and its progress [J]. Radiat Prot Bulletin, 2020, 40(Z1): 97-102.
- [3] International Atomic Energy Agency. Cytogenetic dosimetry: Application in preparedness for and response to radiation emergencies[R]. Vienna: IAEA, 2011.
- [4] International Organization for Standardization. Radiation protection—Performance criteria for laboratories performing initial cytogenetic dose assessment of mass casualties in radiological or nuclear emergencies—General principles and application to dicentric assay:ISO 21243[S]. ISO, Geneva, 2022.
- [5] 中华人民共和国卫生部 中国国家标准化管理委员会. 染色体畸变估算生物剂量方法:GB/T 28236—2011 [S]. 北京:中国标准出版社, 2012.
- [6] Romm H, Ainsbury E, Barnard S, et al. Automatic scoring of dicentric chromosomes as a tool in large scale radiation accidents [J]. Mutat Res, 2013, 756(1-2):174-183.
- [7] 戴宏, 刘玉龙, 冯骏超, 等. 双着丝粒染色体自动分析生物剂量估算研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2017, 37(3):182-186.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 放射工作人员职业健康检查外周血淋巴细胞染色体畸变检测与评价:GBZ 248—2014 [S]. 北京:中国标准出版社, 2014.
- [9] 陈英, 骆亿生, 曹珍山, 等. 特大剂量 γ 射线照射的染色体畸变剂量效应曲线[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2006, 24(4): 241-244.
- [10] 陈英, 杜杰, 张学清, 等. 太原“4.11”钴源事故受照者生物剂量估算及照后一年细胞遗传学随访[J]. 辐射防护, 2010, 30(4): 201-207.
CHEN Y, DU J, ZHANG X Q, et al. Biological dose estimation in victims of Taiyuan “4.11” cobalt source accident and cytogenetic follow-up observation after one year [J]. Radiat Prot, 2010, 30(4): 201-207.
- [11] Deperas J, Szluinska M, Deperas-Kaminska M, et al. CABAS: a freely available PC program for fitting calibration curves

- in chromosome aberration dosimetry[J]. Radiat Prot Dosim, 2007, 124(2): 115-123.
- [12] Endesfelder D, Oestreicher U, Bucher M, et al. RENE Inter-Laboratory Comparison 2021: The Dicentric Chromosome Assay[J]. Radiat Res, 2023, 199(6): 556-570.
- [13] Vaurijoux A, Gruel G, Pouzoulet F, et al. Strategy for population triage based on dicentric analysis[J]. Radiat Res, 2009, 171(5): 541-548.
- [14] 韩林, 陆雪, 李杰, 等. 双着丝粒体半自动与人工分析估算生物剂量的比较研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2020, 40(11): 826-831.
- HAN L, LU X, LI J, et al. Study on the comparison of semi-automatic and manual dicentric detection for biological dosimetry [J]. Chin J Radiol Med Prot, 2020, 40(11): 826-831.
- [15] Gruel G, Gregoire E, Lecas S, et al. Biological Dosimetry by automated dicentric scoring in a simulated emergency [J]. Radiat Res, 2013, 179(5): 557-569.
- [16] Ryan T L, Escalona M B, Smith T L, et al. Optimization and validation of automated dicentric chromosome analysis for radiological/nuclear triage application [J]. Mutat Res, 2019, 847: 503087.
- [17] Romm H, Ainsbury E, Barnard S, et al. Validation of semi-automatic scoring of dicentric chromosomes after simulation of three different irradiation scenarios [J]. Health Phys, 2014, 106(6): 764-771.
- [18] 韩林, 张冰洁, 王平, 等. 一起介入治疗意外照射导致背部大面积放射性皮肤损伤患者的生物剂量估算[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2021, 41(12): 886-891.
- HAN L, ZHANG B J, WANG P, et al. Biodosimetry estimation of a case of large area back skin injury caused by accidental irradiation in interventional procedure [J]. Chin J Radiol Med Prot, 2021, 41(12): 886-891.
- [19] 吕玉民, 刘玉龙, 沈军生, 等. 大规模核与辐射事故受照人员生物剂量估算的应对策略[J]. 辐射防护通讯, 2022, 42(4-5): 69-73.
- LYU Y M, LIU Y L, SHEN J S, et al. Strategy of biological dosimetry for those exposed to large-scale nuclear/radiological incidents [J]. Radiat Prot Bulletin, 2022, 42(4-5): 69-73.

附件1: 专家共识编写组名单

吕玉民 河南省第三人民医院(河南省职业病医院)河南省辐射生物与流行病学医学重点实验室

刘玉龙 核工业总医院(苏州大学附属第二医院)

刘青杰 国家卫生健康委核事故医学应急中心 中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所

吴迪 河南省第三人民医院(河南省职业病医院)河南省辐射生物与流行病学医学重点实验室

韩林 河南省第三人民医院(河南省职业病医院)河南省辐射生物与流行病学医学重点实验室

冯骏超 核工业总医院(苏州大学附属第二医院)

赵骅 国家卫生健康委核事故医学应急中心 中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所

王平 河南省第三人民医院(河南省职业病医院)河南省辐射生物与流行病学医学重点实验室

高宇 河南省第三人民医院(河南省职业病医院)河南省辐射生物与流行病学医学重点实验室

李杰 河南省第三人民医院(河南省职业病医院)河南省辐射生物与流行病学医学重点实验室

赵风玲 河南省第三人民医院(河南省职业病医院)河南省辐射生物与流行病学医学重点实验室

程晓军 河南省第三人民医院(河南省职业病医院)河南省辐射生物与流行病学医学重点实验室

马楠 核工业总医院(苏州大学附属第二医院)

刘畅 核工业总医院(苏州大学附属第二医院)

张睿凤 中国辐射防护研究院

蔡恬静 国家卫生健康委核事故医学应急中心 中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所

贺再清 核工业四一六医院

周媛媛 江苏省疾病预防控制中心

赵娜 广东省职业病防治院

刘秋英 广东省职业病防治院

时宇花 广西壮族自治区职业病防治研究院

马 娅 山东第一医科大学(山东省医学科学院)预防医学科学学院(放射医学研究所)

何俊秋 北京市化工职业病防治院

杜春迎 吉林省职业病防治院

张冰洁 新乡市职业病防治研究所

附件 2:专家共识指导组名单

孙全富 国家卫生健康委核事故医学应急中心 中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所 研究员
首席专家

刘 强 国家卫生健康委核事故医学应急中心第一临床部 中国医学科学院放射医学研究所 研究员

曹建平 苏州大学苏州医学院放射医学与防护学院 教授

梁 莉 国家卫生健康委核事故医学应急中心第二临床部 北京大学第三医院 主任医师

江其生 火箭军特色医学中心 主任医师

Expert consensus on radiation biodosimetry by semi-automatic analysis of dicentric chromosome

Nuclear Emergency Medicine Branch of Chinese Nuclear Society,
Chinese Society of Radiological Medicine and Protection of Chinese Medical Association,
Radiological Health Professional Committee of Chinese Preventive Medicine Association,
Nuclear and Radiation Emergency Response Branch of China Society of Radiation Protection

Abstract: Over the past ten years, semi-automatic analysis of dicentric chromosome (dic) has been widely used for estimating radiation biological dose internationally due to its technical maturity. However, there are still no relevant technical specifications and standards in China, although both technical reports published by the IAEA and technical standards published by the International Organization for Standardization have recommended this method for dose estimation. The present technical consensus of biological dose estimation was established from the aspects of the dic semi-automatic analysis principle, main technical content, factor analysis, and application examples, based on more than 30 years of practical experience for dic manual and semi-automatic analysis at home and abroad. Compared with the existing national standard GB/T 28236, it could significantly improve the efficiency of biological dose estimation, and could also reduce the requirements for technical proficiency of professionals, thus could be better promoted and applied. Similar to manual analysis, dic semi-automatic analysis could be used to estimate and reconstruct the exposed dose under different radiation exposure scenarios including acute uniform, local, extensional irradiation, and delayed sampling. Considering the inefficiency of current domestic dose estimation which cannot meet the needs of clinical classification and diagnosis for large-scale nuclear and radiation accidents that have a large number of exposed people, the promotion and application of dic semi-automatic analysis might solve these bottleneck problems and provide technical support for further development of relevant national standard.

Key words: ionizing radiation; dicentric chromosome; semi-automatic analysis; biodosimetry; expert consensus