维普资讯 http://www.cqvip.com

视网膜母细胞瘤患者和双亲染色体不稳定性观察

生物学教研室 彭惠民

第一医院眼科 郑燕林 汤鼎华

提 要 本文对15例视网膜母细胞瘤（RB）患者，24例患者双亲以及正常对照16人的姊妹染色单体交换（SCE）率、微核（MN）率的观察表明，患者自发、丝裂霉素C（MMC）诱发的SCE率和MN率均与对照有显著差异。本实验为RB患者存在体细胞染色体不稳定性提供了证据，同时讨论了染色体不稳定性与RB发生的关系

关键词 视网膜母细胞瘤；染色体；姊妹染色单体交换；微核

视网膜母细胞瘤（RB）是较常见的婴幼儿眼部恶性肿瘤，国内外进行了大量研究。Gallie等[1]将癌基因理论和二次突变论相结合，提出RB的发生是由于体细胞13q14位点rb隐性基因纯合化或半合化的结果。这一论点已被广泛接受。但为何RB患者幼小年纪就实现了rb基因的纯合化或半合化，目前尚不清楚。本实验分析了RB患者及双亲外周血淋巴细胞自发、丝裂霉素C（MMC）诱发姊妹染色单体交换（SCE）率和微核（MN）率，并探讨了染色体不稳定性与RB发生的关系。报道如下。

材料和方法

1. 实验对象

RB患者15例（男11，女4），年龄1～39岁，其中12例已作眼球摘除，停止化疗10年以上，3例尚未手术及化疗。RB双亲24人（男13，女11），年龄20～53岁。正常对照16人（男10，女6），年龄2.5～55岁。双亲和对照均无肿瘤及化学致畸物和射线接触史。

2. 实验方法

每例受试者采血1.5ml，分别接种于4瓶含小牛血清（华西牌）1.5ml、PHA（白云山制药厂）

that the malpighian bodies in the spleen of 36th week fetus was formed, it had produced certain cellular immunity function. The IgA (388mg/dl), IgM (34mg/dl) and IgD (118.1 U/ml) in the spleen of 38th week fetus was similar to the amount in serum of adult, it had produced certain humoral immunity function. The spleen size of 38th week fetus served the purpose of transplantation. Therefore, the fetal spleen of 38 weeks age was appropriate for transplantation

KEY WORDS Fetal spleen; Immunity function; Transplantation

维普资讯 http://www.cqvip.com

1mg、RPMI1640培养液（美国、GIBC）3.6ml的培养液中，并按以下步骤处理。

（1） SCE标本制备

用2瓶培养物，其中一瓶加入MMC（终浓度为0.04μg/ml）。两瓶同时培养24h后加入5-溴尿嘧啶脱氧核苷（Brdu，终浓度12μg/ml），避光培养至72h，收获前2h加入秋水仙素（终浓度0.03μg/ml），常规法制片及分化染色。

（2） MN标本制备

用2瓶培养物，其中一瓶加入MMC（终浓度为0.1μg/ml）。培养72h收获细胞，离心后用0.075M氯化钾溶液低渗5min，3:1甲醇、冰醋酸固定2次，滴片时轻吹气，使细胞散开，室温下干燥（不用火烤），Giemsa染色。

3. 显微观察

每例分别观察统计自发、MMC诱发的SCE率和MN率，观察计数分别按本室常规方法[2]和王天宇标准[3]。

结　果

RB患者自发SCE数/细胞为6.94±0.46，与双亲组6.55±0.12无显著差别（P>0.05），但二者与对照组的5.38±0.25差异均极显著（P<0.01，P<0.01）。

MMC诱发的SCE数/细胞，RB患者为42.85±1.63，与双亲组38.38±0.90有显著差别（P<0.025），而患者和双亲与对照组的29.81±1.43的差异都极显著（P<0.001，P<0.001）。

患者的自发微核细胞率（‰）为6.13±0.60，与双亲组6.50±0.48无明显差别（P>0.50），但二者与对照组的4.69±0.35差异均显著（P<0.05，P<0.01）。

MMC诱发的微核细胞率（‰），患者为122.20±13.05，与双亲组84.42±5.13和对照组78.94±5.00的差异都极为显著（P<0.005，P<0.005）。双亲与对照无显著差别（P>0.25）（表1、2）。

讨　论

姊妹染色单体交换是DNA复制产物在两条染色单体之间的同源位点上的交换，它表示DNA复制损伤后的修复能力，是反映染色体早期损伤的灵敏指标。一般认为微核由染色体的断片或有丝分裂中延迟的单个或1组染色体形成，其频率可反映染色体断裂

表1 RB患者、双亲及对照自发和诱发SCE率比较

组别	对象	例数	细胞数	SCE数/细胞	t值	P值
自发	患者	15	450	6.94±0.46	t患者—对照3.00	P<0.01
	双亲	24	720	6.55±0.12	t患者—双亲0.84	P>0.05
	对照	15	450	5.38±0.25	t双亲—对照3.45	P<0.01
诱发	患者	15	450	42.85±1.63	t患者—对照5.98	P<0.001
	双亲	20	600	38.38±0.90	t患者—双亲2.49	P<0.025
	对照	15	450	29.81±1.43	t双亲—对照5.29	P<0.001

表2 RB患者、双亲及对照自发和诱发MN率比较

组别	对象	例数	细胞数	MN细胞率(‰)	t值	P值
自发	患者	15	15,000	6.13±0.60	t患者—对照2.18	P<0.05
	双亲	24	24,000	6.50±0.48	t患者—双亲0.51	P>0.50
	对照	16	16,000	4.69±0.35	t双亲—对照2.83	P<0.01
诱发	患者	15	15,000	122.20±13.05	t患者—对照3.28	P<0.005
	双亲	24	24,000	84.42±5.13	t患者—双亲3.11	P<0.005
	对照	16	16,000	78.94±5.00	t双亲—对照0.73	P>0.25

维普资讯 http://www.cqvip.com

和纺锤丝损伤程度。毛新等[4]认为 SCE 和MN是体现个体染色体不稳定性的较好指标。本文对照自发SCE率为5.38±0.25，与吴旻[5]、许嘉[6]报道的5.74、5.59相近。对照自发的MN率为4.69‰，与Jacky[7]用普通培养基测得的4‰接近。RB患者自发SCE率和MN率均明显高于对照，当使用染色体断裂剂MMC后，患者与对照的差异变得更为显著，提示RB患者染色体不稳定性较高和纺锤丝可能有一定损伤。Brogger[8]认为MMC通过与DNA双链结合成交联复合物，使修复过程中的DNA链断端错误重接，并干扰DNA包裹过程。本实验表明MMC能使正常人与RB患者的SCE率和MN率成倍增加，但患者增高幅度明显大于正常人，说明RB患者对致断剂的作用更为敏感。因此，外界环境中存在的各种诱因使之易发生突变或染色体断裂。

有人[9]应用RFLP技术，测知RB患者体细胞在13q14位点为杂合状态，而在肿瘤细胞为纯合状态，推测rb基因的纯合化或半合化是RB发生的根源。一般认为纯合化的途径包括不分离—再复制、有丝分裂交换、13q14缺失、基因失活或基因突变；半合化的途径为不分离—丢失[10]。本文RB患者染色体不稳定性较高，可能较容易发生上述纯合化途径中的交换、缺失和基因突变等事件，MN率高提示在有丝分裂中可能有纺锤丝的损伤，这又是通过不分离实现半合化途径的基础。因此，RB患者染色体不稳定性较高和染色体不分离，是其在幼小年龄就罹患肿瘤的根本原因。这也有助于理解RB患者为何易患第二肿瘤。

Hsu等[11]认为染色体不稳定性具有一定的遗传基础，并有家族倾向。本实验RB患者双亲自发的SCE率和MN率均与患者无显著差别，而与对照差异显著；在MMC诱导下，患者与正常人的差距拉大，双亲SCE率和MN率介于患者与对照之间，与患者的差异均显著，而与对照相比，SCE率差别也极明显。这一现象表明RB患者双亲亦具有一定程度的染色体不稳定性，提示RB患者的染色体不稳定性可能由双亲传递而来。是否这种不稳定性超过一定的阈值，将可能实现rb基因的纯合或半合，进而引起RB发生，需要进一步研究。过去已经认识到，在RB发生的“二次突变”中，有的第一次突变可能发生于双亲的配子形成过程。本文双亲染色体稳定性较差，提示某些双亲可能已是Rb基因的杂合体，对此问题的进一步研究将会有利于RB的遗传咨询工作。

本文用SCE率和MN率反映染色体的不稳定性，在MMC的诱发实验中，SCE表现更为敏感，其中双亲组和患者组更突出。这与MMC的作用机制相吻合。同时提示，用多项指标反映染色体不稳定性，优于单一指标的观察。对高风险人群如RB患者同胞或其他疑为RB患者的人，可应用多项细胞遗传学指标进行染色体不稳定性试验，以助于RB的早期诊断和治疗。

参考文献

[1] Gallie BL, et al. Ophthalmology 1984; 91:666

[2] 彭惠民，等. 重庆医科大学学报 1986; 11(2): 78

[3] 王天宇，等. 南京医学院学报 1981; 1(2): 14

[4] 毛 新，张思仲. 遗传与疾病 1987; 4(2): 100

[5] 吴 旻，等. 实验生物学报 1979; 12(1): 31

[6] 许 嘉，等. 细胞生物学杂志 1984; 6(2), 70

[7] Jacky B, et al. Science 1983; 220:69

[8] Brogger A, et al. Chromosoma (Berl) 1972; 38: 95

[9] Dryja TP, et al. N Engl J Med 1984; 310: 550

[10] 林向鸿，等. 眼科学报 1987增刊(1): 6

[11] Hsu TC, et al. Cancer Genet Cytogenet 1985; 17: 307

维普资讯 http://www.cqvip.com

纤维胆道镜经T管窦道取石的体会

第二医院外科 潘正清 郑 明 刘长安

我院自1986年3月至1988年10月共作术后经T管窦道纤维胆道镜检查50例，胆道镜取石66次，成功48例，失败2例。报道如下：

临床资料

取石方法及途径：胆道镜取石时间安排在T管引流术后第四周后进行[1]，因此时T管周围已形成牢固的纤维管道。镜端插入部分先在3‰洗必太溶液中浸泡30min，拔出T管，消毒后铺无菌单，从窦道口缓慢放入镜端，同时适当注入生理盐水(每1000ml水中加入庆大霉素8万u)，依次观察了解胆管内有无炎症，纤维素及脓块等，如有残石，蛔虫，狭窄，肿瘤等病变应确定所在部位，特别观察总胆管下端开口大小及有无病变。若疑有新生物，则钳取活检，若有结石则进行取石，若为细小结石或泥沙样结石，纤维素和脓块，则用生理盐水冲入肠道内。取净结石后经窦道置入乳胶管接胆瓶引流2天后行胆道逆行造影，证实无遗留结石2～3天后拔管。若造影后仍有结石残存，则在3天后拔除乳胶管，经窦道再行第二次取石。若因第一次无法取净结石，则口服利胆药物或胆管内滴注溶石液一疗程(10天)后，再经窦道取石，如此可反复多次进行。

结 果

50例在行纤维胆道镜检查前均经T管胆道造影，其中除5例报告为总胆管内可疑结石，经胆道镜检查无结石外，其余造影结果基本上与胆道镜所见相吻合，其中检查残留

THE STUDY ON CHROMOSOME INSTABILITY OF THE PATIENTS WITH RETINOBLASTONA AND THE PARENTS

Peng Huimin et al

(Department of Biology)

The frequencies of sister chromatid exchange (SCE) and micronucleus (MN) of peripheral blood lymphocytes were determined in 15 patients with RB, their 24 parents and 16 normal controls. The results showed that the spontaneous, MMC induced SCE and MN rates in patients were significantly higher than those in controls. Therefore, the results provided some positive evidence for chromosome instability in RB patients. The relationship between chromosome instability and the origin of RB was also discussed

KEY WORDS Retinoblastoma; Chromosome; Sister chromatid exchange; Micronucleus