DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.005
第25卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 19
2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

文章编号:1000-5404(2003)19-1695-03

论著

放射治疗对鼻咽癌病人DNA损伤及 *hprt* 基因突变的初步研究

陈国华[1],孙华明[1],庞学利[2],刘晋祎[1],周紫垣[1],曹 佳[1] (第三军医大学:[1]军事预防医学院卫生毒理学教研室;[2]附属西南医院放射治疗中心,重庆 400038)

提 要:目的 评价放射治疗对鼻咽癌病人造成的遗传学损伤。方法 在病人接受放射治疗累积剂量为0、4、10、28、48 Gy和68 Gy时,取病人外周血淋巴细胞分别进行彗星试验,淋巴细胞DNA的损伤及 *hprt* 基因突变检测。结果 彗星频率随着照射累积剂量的增加而显著增加($P<0.01$),与对照相比,在4 Gy时即达到显著差异($P<0.05$);DNA迁移率仅在48、68 Gy与对照相比差异显著($P<0.001$);*hprt* 基因突变率在10 Gy时与对照相比差异极显著,随着剂量的增加 *hprt* 突变率进一步上升,呈较好的剂量-反应关系。结论 彗星频率和 *hprt* 基因突变分析均是评价鼻咽癌病人放射治疗后遗传学损伤的候选指标。

关键词:鼻咽癌;*hprt* 基因;彗星试验;放射治疗
中图法分类号:R394.2;R739.6;R816.96 文献标识码:A

DNA damage and *hprt* gene mutation in nasopharyngeal cancer patients undergoing radiotherapy

CHEN Guo-hua, SUN Hua-ming, PANG Xue-li, LIU Jin-yi, ZHOU Zi-yuan, CAO Jia (Department of Hygiene Toxicology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To assess the genetic damage induced by radiotherapy in lymphocytes from patients with nasopharyngeal cancer(NPC). Methods Blood samples were collected from patients exposed to radiation at the accumulated dose of 0, 4, 10, 28, 48 Gy and 68 Gy for the comet assay and determination of DNA damage and *hprt* gene mutation, respectively. Results The comet frequency increased significantly in a dose-dependent manner($P<0.01$). Compared with that of the control(0 Gy), the comet frequency increased significantly at the dose of 4 Gy ($P<0.05$). The length of DNA migration only showed significant increase at the accumulated doses of 48 Gy and 68 Gy ($P<0.001$). Mutation frequency of *hprt* gene increased significantly at doses higher than 4 Gy and kept increasing in a dose-effect manner. Conclusion Both comet frequency and mutation frequency of *hprt* gene are candidate indicators to assess the genetic damage in NPC patients receiving radiotherapy.

Key words: nasopharyngeal cancer; *hprt* gene; comet assay; radiotherapy

鼻咽癌是我国常见的一种恶性肿瘤,目前治疗鼻咽癌的主要方法仍然是放射治疗,但关于放射治疗对病人造成的继发性遗传性损伤,国内外报道不多。本研究采用彗星电泳和多核细胞法评价了放射治疗对鼻咽癌病人外周血淋巴细胞DNA和 *hprt* 基因的遗传学损伤,为今后鼻咽癌患者放射治疗和遗传危险度评价提供依据。

基金项目:国家杰出青年基金资助项目(30125037)
作者简介:陈国华(1978-),女,河北省沧洲县人,助理实验师,主要从事分子毒理学和遗传毒理学方面的研究。电话:(023)68752296
通信作者:曹 佳,电话:(023)68752271;E-mail:caojia@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-05-13;修回日期:2003-08-27

1 材料与方法

1.1 病人、放射治疗和标本收集

15例鼻咽癌病人,均来自第三军医大学附属西南医院放疗中心,平均年龄36.11(26~54)岁。病人选择原则:①病理诊断确诊为鼻咽癌病人;②病人无其它慢性疾病;③病人未接受其它药物治疗。当病人接受放射累积剂量为0、4、10、28、48、68 Gy时,收集病人外周血。放射治疗前的标本作为每一例病人自身对照。病人每周放射治疗5次,每周照射剂量为10 Gy。

1.2 试剂和培养基

化学试剂:细胞松胞素B(Cyt-B)购自Sigma公司;植物凝集素PHA-M购自Gibco;6-巯基嘌呤(6-TG)购自Sigma公司。

培养基:RPMI 1640培养基,补充75%(w/v) $NaHCO_3$,200 mmol/L谷氨酰胺,100 U/ml青霉素和链霉素。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 方法

1.3.1 *hprt* 基因突变 参照文献[1, 2]的方法进行。取1 ml静脉血分做两份培养物，一份加入6-TG；一份不加6-TG，培养32 h；然后加细胞松胞素B，培养至72 h，收获细胞，制片，Gimesa染色。光镜下计数1 000个细胞中双核或多核细胞数目。*Hprt*突变率（Variants per 1 000 survivovs）定义为含有6-TG培养组1 000个细胞中多核和双核细胞数与不含6-TG培养组1 000个细胞中多核和双核细胞数的比值[2]。

1.3.2 彗星电泳 彗星试验参照Vijay alaxmi[3]的方法略有改动。简言之，通过离心方法分离2 ml抗凝血中单核细胞，然后包埋到1%的低熔点琼脂糖中，细胞终浓度为10^4个/ml。取75 μl细胞悬液加到预先铺展有100 μl底层琼脂糖胶上；置冰上15 min；然后将片子浸入裂解液4 ℃ 2 h；EB染色，4 ℃电泳并在荧光显微镜下观察结果。测定50个随机选取的彗星头部和整个彗星的长度，迁移长度是整个彗星的长度减去头部的长度。参照文献[4]方法，随机统计200个细胞中彗星（拖尾细胞）频率。

1.3.3 统计学方法 照射组遗传学损伤与对照组之间的差异利用SPSS软件进行方差分析。

2 实验结果

由于取材或者技术方面的原因，本研究仅有9例病人取到了各时相点相应的外周血标本并得到全部实验分析结果。

采用多核细胞法分析了8例病人外周血*hprt*基因突变率。由表1可见，*hprt*基因突变率（Variant frequency，Vf）与累积剂量间呈较好的剂量-反应关系。在10 Gy时，*hprt*基因突变率即与对照相比呈极显著增加（$P<0.01$）；然后随着剂量的进一步增加，*hprt*基因突变保持在一个较高的水平（$P<0.001$）。从0 Gy至28 Gy，Vf值基本呈线型上升。

表1 放疗鼻咽癌病人淋巴细胞*hprt*基因突变率（‰）

Tab 1 The Vf of *hprt* gene mutation in lymphocytes of NPC patients undergoing radiotherapy（‰）

Accumulated dose(Gy)	A	B	C	D	F	G	H	I	$\bar{x}\pm s$
0	0.1054	0.0982	0.1536	0.2257	0.1325	0.3711	0.1186	0.1913	0.175±0.091
4	0.1215	0.1881	0.2045	0.3292	0.1935	0.4564	0.1743	0.3841	0.256±0.118
10	0.1835	0.2930	0.2952	0.3950	0.3504	0.6119	0.2794	0.5702	0.372±0.148 *
28	0.5097	0.6219	0.5342	0.4819	0.4958	0.6479	0.4375	0.6211	0.544±0.077 *
48	0.4051	0.5484	0.4840	0.4453	0.4686	0.6302	0.4304	0.6250	0.502±0.083 *
68	—	0.5488	—	0.4457	—	0.6193	0.4286	0.5990	0.528±0.087 *

A～I：case；*：$P<0.01$ *vs* control

在彗星电泳实验中，我们分析了彗星（拖尾细胞）频率和DNA迁移长度，见表2，3。每200个细胞中彗星频率在照射剂量为4 Gy时，即达到显著上升（$P<0.05$）；随着剂量增加到10 Gy以上，彗星频率上升非常显著（$P<0.001$，表2）。以后随着剂量的增加彗星频率也进一步升高。两者之间呈良好的剂量-反应关系。

在对彗尾长度（DNA迁移度）的检测中发现，DNA迁移长度仅在累积剂量达到48 Gy时，才与对照相比有明显的增加（$P<0.01$，表3）；68 Gy时，DNA迁移长度与对照相比差异极显著（$P<0.01$，表3）。而累积剂量低于48 Gy时，DNA迁移长度与对照组比差异不明显（$P>0.05$，表3）。

表2 放疗鼻咽癌病人淋巴细胞彗星频率（/200 cells）

Tab 2 The comet frequency in lymphocytes of patients undergoing radiotherapy（/200 cells）

Accumulated dose(Gy)	A	B	C	D	E	F	G	H	I	$\bar{x}\pm s$
0	18	18	7	5	23	20	25	10	15	15.67±7.00
4	47	21	17	47	38	27	41	31	47	35.11±11.60 *
10	50	53	29	42	102	90	53	43	55	57.46±23.46 *
28	74	100	56	50	72	67	52	62	49	64.67±16.19 *
48	69	98	82	94	93	81	79	71	69	81.70±11.12 *
68	61	90	—	91	—	—	84	84	65	79.17±12.92 *

A～I：case；*：$P<0.01$ *vs* control

表3 放疗鼻咽癌病人淋巴细胞中DNA迁移长度（$l/\mu m$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 3 The length of migration in lymphocytes of patients undergoing radiotherapy（$l/\mu m$，$\bar{x}\pm s$）

Accumulated dose(Gy)	D	E	F	G	H	$\bar{x}\pm s$
0	48.0±16.9	42.3±20.3	36.0±11.8	53.8±22.2	44.3±19.7	45.0±6.6
4	42.3±16.7	41.3±17.8	64.2±20.6	48.0±22.9	54.0±24.3	49.9±9.4
10	37.5±20.7	78.2±29.7	59.0±18.3	68.8±24.3	74.5±28.7	63.6±16.3
28	42.2±15.7	53.5±17.6	46.5±17.3	64.2±16.4	79.3±39.9	57.0±14.9
48	58.3±16.3	63.3±18.4	67.0±15.6	92.3±32.4	69.8±21.4	70.2±13.2 *
68	—	—	78.8±20.4	78.5±20.6	74.7±18.3	77.2±2.2 *

D～H：case；*：$P<0.01$ *vs* control

3 讨论

放射治疗目前仍为鼻咽癌的主要治疗手段，射线在杀死肿瘤细胞的同时，也会对正常细胞造成遗传损害，因此选择适宜的细胞、分子生物学指标用于评价放疗鼻咽癌病人造成的遗传学损伤和治疗后的遗传危险度，对鼻咽癌病人治疗方案的确定、实施和复查均有重要指导作用。

目前，细胞染色体畸变分析和微核实验已作为常用的生物剂量计而被广泛应用，但在基因和分子水平上寻找新的更敏感的生物剂量仪指标更显重要。*hprt*基因是人的内源性看家基因，具有自发突变率低的优点。*hprt*基因突变分析已广泛用于化合物致突变分析，*hprt*基因突变率的检测，可弥补染色体畸变分析、微核实验等技术的不足[5]。在本研究中，接受放疗的鼻咽癌病人外周血*hprt*基因突变率与对照组相比增加极显著；*hprt*基因突变率与累积剂量间有较好的剂量反应关系（表1），这与文献[1, 6]报道的结果基本一致。而且，小剂量的照射即可诱导*hprt*突变率的显著增加，因此有作者认为，该方法的灵敏度要高于染色体畸变[3]。本研究中*hprt*突变率由0 Gy至28 Gy几乎呈直线上升，并在28 Gy时达到一个高峰，说明*hprt*基因突变分析可作为放疗对病人遗传损伤的方法之一。

体外与体内试验表明低剂量放射线照射能明显导致细胞内DNA断裂[3, 7~9]。在我们的试验中，彗星频率（带彗尾的细胞数）都随着累积剂量的增加而显著增

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

加，并呈较好的剂量-反应关系，但 DNA 迁移长度与对照相比没有明显增加，仅在高剂量时（48 Gy，68 Gy），彗星迁移长度增加显著。我们的实验中由于不能在病人放射治疗后立即检测 DNA 断裂的情况，因此 DNA 的迁移长度有所下降。但是，虽然 DNA 迁移的长度是彗星实验可靠性较高的检测终点，但我们认为彗星频率可作为评价鼻咽癌病人放射治疗后 DNA 断裂的指标。

综上所述，放射治疗对鼻咽癌病人造成了明显的分子遗传学损伤。彗星频率、*hprt* 基因突变是评价损伤的较好指标；但是，二者能否真正用于评价鼻咽癌病人易感性、放射治疗敏感性和评估放射治疗剂量和治疗效果，还需要更大的样本量进一步进行分析。

参考文献：

[1] 赵经涌，劳勤华，徐永忠，等. 放射性核素内照射诱发大鼠外周血淋巴细胞 *hprt* 基因位点突变与染色体畸变的研究[J]. 中华放射医学与防护杂志，2000，20(1)：15－18.

[2] Norman A, Mitchell J C, Iwamoto K S. A sensitive assay for 6-thioguanine-resistant lymphocytes[J]. Mutat Res, 1988, 208(1): 17－19.

[3] Vijayalaxmi R, Tice R, Strauss G H. Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique[J]. Mutat Res, 1997, 271(3): 234－383.

[4] Lin W C, Wei X T, Xue H W, *et al*. Study on DNA strand breaks induced by sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, *in vivo* and *in vitro*[J]. Mutat Res, 2000, 466(2): 187－195.

[5] 邬洪梁，朱 巍，高锦声，等. 辐射诱发人淋巴细胞 *hprt* 基因突变－多核细胞法的方法学探讨与量效关系研究[J]. 中华放射医学与防护杂志，1999，19(2)：128－129.

[6] 段志凯，徐洪兰，陈 英，等. 健康成人放射工作者体细胞 *hprt* 基因位点突变率的检测和比较[J]. 职业医学，1999，26(2)：4－6.

[7] Alapetite C, Thirion P, Rochefordiere A D L, *et al*. Analysis by alkaline comat assay of cancer patients with severe reactions to rad; otherapy: defective rejoining of radio-induced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients[J]. Int J Cancer, 1999, 83(1): 83－90.

[8] Lankinen M H, Vilpo L M, Vilpo J A. UV- and γ-irradiation-induced DNA single-strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes[J]. Mutat Res, 1996, 352(1): 31－38.

[9] 刘胜学，曹 佳，安 辉，等. 用多重 PCR 分析 ^{60}Coγ-射线引起人白血病细胞 *hprt* 基因突变[J]. 中华放射医学与防护杂志，2000，20(4)：225－227.

（编辑 冷怀明）

文章编号：1000-5404(2003)19-1697-01

个案与短篇

原发性输尿管鳞状细胞癌 1 例

A case report of primary squamous cell carcinoma of ureter

鲁维山[1]，李为兵[1]，王 宁[2]（[1] 第三军医大学附属西南医院全军泌尿中心，重庆 400038；[2] 泸州市人民医院外二科，泸州 646000）

原发性输尿管鳞状细胞癌罕见，据文献不完全统计，国内 1982－2002 年仅有 8 例报告，我们收治 1 例并通过输尿管镜早期诊断，现报告如下。

患者女，54 岁，因左侧腰腹部胀痛不适 10 d 入院。伴尿频、尿急、无肉眼血尿。初步诊断：肾绞痛：输尿管结石？予以抗炎、解痉治疗，疼痛不缓解。查体仅见左肾区叩痛。静脉肾盂造影：左肾轻度积水，左输尿管上段轻度扩张。肾图示左上尿路梗阻。CT 检查：左肾体积增大，肾盂明显扩张、积水，肾实质内未见异常密度影。左肾周围脂肪间隙模糊，肾周筋膜增厚，左输尿管中上段增粗，周围组织间隙模糊。急诊在局麻下行输尿管镜检查术，术中于左输尿管中上段见一新生物阻塞管腔，表面毛糙、基底宽未见明显分叶，触之易出血，即取活检送病理检查。病理报告：鳞状细胞癌 2 级。在全麻下行左肾输尿管全切，临床分期 P2。术后病理报告：输尿管上段腔内灰白色肿块，大小 1.0 cm×0.5 cm，肿瘤侵犯至输尿管深肌层，肾门肿块及周围组织为炎性肉芽组织。术后卡介苗膀胱灌注、IL-2 肌注，随访中。

原发性输尿管肿瘤由于缺乏特异性表现，早期诊断较困难，国内文献[1]报道误诊率达 34.6%。目前输尿管癌诊断中有影像学表现的肿瘤多不属早期，静脉肾盂造影检查多数患侧上尿路不显影，能发现输尿管内充盈缺损者为少数[2]。随着腔内技术的发展，输尿管镜检查可确定病变部位，通过活体检查可在术前确定病变性质。输尿管镜可早期发现输尿管肿瘤，减少误诊、漏诊，有利于改善输尿管肿瘤的预后。本例患者始发症状不典型，追问病史无肉眼血尿。静脉肾盂造影、B 超、CT 仅发现左上尿路梗阻、扩张。经输尿管镜检查而明确，得以早期治疗。

输尿管镜检查应在常规检查的基础上应用，输尿管镜检查应用指征：①影像学检查发现上尿路不明原因的充盈缺损或梗阻或上尿路不显影；②尿液细胞学检查发现癌细胞，但不能明确肿瘤的部位；③膀胱镜发现不明原因的单侧性肉眼血尿；④膀胱镜检查发现膀胱肿瘤在输尿管开口位置。

关键词：原发性输尿管鳞状细胞癌；输尿管镜检查
中图法分类号：R737.13 文献标识码：B

参考文献：

[1] 黄永斌，王保先，徐 华. 原发性输尿管癌误诊原因分析[J]. 中华泌尿外科杂志，1992，13(6)：469－470.

[2] 秦卫军，陈宝琦，王 禾. 原发性输尿管癌 36 例的诊断与治疗[J]. 第四军医大学学报，2000，21(4)：464－466.

（编辑 刘洪娥）

作者简介：鲁维山(1976－)，男，甘肃省兰州市人，医师。电话：(023)68754186
收稿日期：2003-03-10；修回日期：2003-07-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net