DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.004
第25卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 19
1692 2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)19-1692-03

放射治疗对鼻咽癌患者遗传细胞学损伤的初步研究

孙华明[1],陈国华[1],庞学利[2],曹 佳[1],周紫垣[1],刘晋祎[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患者遗传细胞学的损伤。方法 对15例病例在累积照射剂量为0、4、10、28、48、68 Gy时采取口腔粘膜上皮脱落细胞和外周血,分别用微核试验检测方法及染色体畸变方法检测鼻咽癌放疗患者口腔粘膜上皮脱落细胞、外周血淋巴细胞微核率和染色体畸变率。结果 鼻咽癌患者接受放射治疗后,双核淋巴细胞微核细胞数在累积照射剂量为4 Gy时就表现为明显上升($P<0.01$),口腔粘膜上皮脱落细胞微核细胞数在累积照射剂量达到28 Gy时才表现出明显上升趋势($P<0.05$),而未分化淋巴细胞微核数与未照射前相比没有明显差异($P>0.05$)。外周血淋巴细胞染色体畸变率在10 Gy时明显上升($P<0.01$)。结论 放射治疗对鼻咽癌患者细胞有显著性遗传损伤作用。胞质分裂阻滞微核检测法和染色体畸变法是评价鼻咽癌患者遗传学损伤较为敏感的指标,而口腔粘膜上皮脱落细胞微核试验方法最简单,具有较大的应用潜力。

关键词:放射治疗;鼻咽癌;微核;染色体;畸变
中图法分类号:R394.2;R739.6;R816.96 文献标识码:A

Cellular genetic damages in nasopharyngeal cancer patients undergoing radiotherapy

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

Abstract: Objective To evaluate the genetic damages induced by radiotherapy in nasopharyngeal cancer (NPC) patients. Methods Micronucleus test (MNT) and chromosome aberration test (CA) were both employed to detect the genetic damages of buccal mucosa desquamated cells and peripheral blood cells from 15 NPC patients undergoing radiotherapy at the accumulated dose of 0, 4, 10, 28, 48 Gy and 60 Gy, respectively. Results After radiotherapy, the count of micronucleated binucleated cells in peripheral lymphocytes rose significantly at the dose of 4 Gy ($P<0.01$), but that of micronucleated cells in buccal mucosa desquamated cells did not rise until cumulative dose came to 28 Gy ($P<0.05$). No significant difference in the number of micronuclei was found in undifferentiated lymphocytes before and after radiation ($P>0.05$). Chromosome aberration rate in peripheral lymphocytes increased significantly at the dose of 10 Gy ($P<0.01$). Conclusion Radiotherapy can cause markedly genetic damages in NPC patients. Cytokinesis-block applicability micronucleus test (CB-MNT) and chromosome aberration test are sensitive methods for the evaluation of genetic damages in NPC patients. However, MNT of the buccal mucosa desquamated cells is the simplest method with bright future of application.

Key words: radiotherapy; nasopharyngeal cancer; micronucleus; chromosome; aberration

采用简单的方法检测细胞、分子遗传学损伤在遗传危险度评价方面具有重要的价值[1]。通过体内、体外不同方法来测试放射治疗导致的遗传学损伤,将有助于评价放射治疗的危险性[2,3]。放射治疗是鼻咽癌患者的主要治疗方法,但放射治疗对病人具有严重的副作用和遗传损伤,放射治疗对鼻咽癌病人造成遗传损伤评价目前国内外报道还不太多。本研究采用口腔粘膜上皮脱落细胞微核试验方法(Buccal mucosa cell micronucleus test, BMC-MNT)、未分化淋巴细胞微核试验方法(Undifferentiated lymphocyte micronucleus test, UL-MNT)、胞质分裂阻滞微核检测法(Cytokinesis block micronucleus test, CB-MNT)和外周血淋巴细胞染色体畸变(Chromosome aberration, CA)法检测放射治疗对鼻咽癌病人造成的遗传学损伤,并对不同方法学的敏感性和可行性进行了初步比较。

1 材料与方法

1.1 病人、放射治疗及标本收集

15例鼻咽癌病人,均来自第三军医大学附属西南医院放疗

基金项目:国家杰出青年基金资助项目(30125037)
作者简介:孙华明(1972-),女,重庆市人,实验师,主要从事遗传和分子毒理学方面的研究,发表论文14篇。电话:(023)68752275
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:2003-09-18

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

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;④ 病人每周放射治疗 5 次, 每次局部照射剂量为 2 Gy。当病人接受放射累积照射剂量为 0、4、10、28、48、68 Gy 时, 收集病人的口腔粘膜上皮脱落细胞和外周血。0 Gy 剂量组作为每一例病人自身对照。

1.2　试剂和培养基

①RPMI1640 培养基(Gibco 公司);②胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司;③秋水仙碱购自 Sigma 公司;④植物血凝素(PHA-M)购自 Sigma 公司;⑤松胞素 B(Cyt-B)购自 Sigma 公司;⑥吖啶橙购自 Fulaka 公司。

1.3　方法

1.3.1　口腔粘膜上皮脱落细胞微核试验(BMC-MNT)　BMC-MNT 标准方法参照曹佳等[4]的方法; 微核细胞评价标准参照文献[5], 取口腔上皮脱落细胞涂片, 固定后用吖啶橙染色镜检。每例计数 1 000 个细胞中的微核细胞数, 所有标本采取双盲法由同一个人员统计。

1.3.2　未分化淋巴细胞微核试验(UL-MNT)　UL-MNT 详细方法参照薛开先等[4]的方法, 统计方法同 BMC-MNT。

1.3.3　胞质分裂阻滞微核检测法(CB-MNT)　参照文献[1, 4, 5] 进行, 取抗凝静脉血 0.5 ml 于 4.5 ml 含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 培养至 32 h 时加入终浓度为 6 μg/ml 松胞素 B(Cyt-B), 72 h 收获细胞, 常规低渗、滴片, 每例计数 500 个双核细胞中的微核细胞数。

1.3.4　染色体畸变试验(CA)　参照文献[6] 进行, 取抗凝静脉血 0.5 ml 于 4.5 ml 含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 收获细胞前 6～8 h 加入终浓度为 0.02 μg/ml 秋水仙碱, Giemsa 染色, 每例计数 100 个完整的分裂中期相细胞, 记录染色体数目异常、染色体单体畸变和染色体畸变类型。

1.3.5　统计学方法　放射治疗对病人遗传学损伤与剂量之间的关系、照射组与对照组之间的差异比较均采用 SPSS 软件进行方差分析。

2　结果

随机选取作为研究对象的 15 例鼻咽癌病人, 由于在不同时间点取材时部分病人不配合和技术方面的原因, 实际仅有 9 例病人取到所有时间点相应的口腔粘摸上皮脱落细胞和外周血, 见表 1。

2.1　口腔粘膜上皮脱落细胞微核试验

结果见表 1。在累积照射剂量高于 28 Gy 时, 微核细胞数与未放疗前相比有显著上升($P<0.05$), 累积剂量低于 28 Gy 时, 微核细胞数增加不明显($P>0.05$)。

2.2　未分化淋巴细胞微核试验

结果见表 1。未分化淋巴细胞微核细胞数在放射治疗后有一定增加, 但与放疗前相比差异不显著($P>0.05$)。尽管在 48 Gy 和 68 Gy 时微核细胞数比放疗前增加了 2 倍(4.48‰、4.4‰、2.22‰), 但差异不显著($P>0.05$)。

2.3　胞质分裂阻滞微核试验

结果见表 1。双核淋巴细胞中微核细胞的比例随着放射治疗过程累积剂量的增加呈线性增加。在 4 Gy 时, 与放疗前相比, 放疗后微核细胞的比例上升极显著(21.88 *vs* 5.00, $P<0.001$), 当累积剂量 68 Gy 时, 微核细胞数比放疗前增加了 16 倍(80.17 *vs* 5.00, $P<0.001$)。

2.4　染色体畸变试验

结果见表 1, 放疗后染色体畸变畸变率随剂量的增高有较明显的增高趋势。在累积剂量为 10 Gy 时, 染色体畸变畸变率放疗前相比相差显著($P<0.01$), 但当累积剂量达到 68 Gy 时, 染色体畸变畸变率低于 48 Gy, 但仍明显高于放疗前。染色体畸变畸变类型主要以断片为主, 并出现了双着丝粒体、易位环和微小体等其他畸变类型。

表 1　鼻咽癌患者放疗前后染色体畸变率和细胞微核率的比较(‰, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Comparison of chromosomal aberration rates and micronucleated cell rates in buccal mucosa cells and lymphocytes of patients before and after radiotherapy(‰, $\bar{x}\pm s$)

Cumulated dose (Gy)	CA/100 (CA-S△)	MN-BMC/1000 (BMC-MNT)	MN-UL/1000 (UL-MNT)	MN-BC/500 (CB-MNT)
0	2.2±1.30	2.25±1.83	2.22±1.72	5.00±1.41
4	6.6±2.30	4.11±3.37	3.67±1.87	21.88±5.49**
10	10.5±3.87**	6.38±1.85	1.50±2.27	48.63±10.91**
28	17.5±3.32**	7.67±3.00*	3.89±3.02	64.88±11.19**
48	20.6±1.53**	8.75±5.60**	4.78±4.38	75.13±8.17**
68	15±1.00**	7.60±4.34*	4.40±2.61	80.17±8.59**

*: $P<0.05$, **: $P<0.001$ *vs* before radiotherapy; △: CA-S: Chromosome analysis; MN: Micronucleus; BC: Binucleated cells

3　讨论

从本次实验研究中可以看出, 鼻咽癌病人接受放射治疗后, 病人口腔粘摸上皮脱落细胞微核数、淋巴细胞微核数和染色体畸变数目均有不同程度增加, 提示放射治疗对鼻咽癌患者有肯定的遗传损伤作用。

CB-MNT 广泛用于检测放射线诱导的染色体损伤, 其微核细胞率是衡量肿瘤病人放射敏感性和治疗结果的较好的指标[1, 3, 7～9]。我们发现双核微核细胞数目改变与累积剂量呈较好的剂量－反应关系, 该结果与其他作者对许多肿瘤的观察结果相似[1, 3 8, 9], 并且在累积剂量为 4 Gy 时, 双核细胞微核数目比放疗前增加了 4 倍。可见, CB-MNT 方法敏感性高, 是评价放射治疗鼻咽癌病人淋巴细胞中遗传损伤的较好指标。

BMC-MNT 主要用于评价致癌物、致畸物及致突变物诱导口腔上皮脱落细胞发生的遗传损伤[5, 10, 11]。本研究中, 放射治疗后口腔上皮脱落细胞微核数与累积剂量呈较好的剂量反应关系, 我们的结果与其他研究放射线对口腔细胞的损伤结果相符[5, 10]。在累积剂量为 10 Gy 时, 口腔粘摸脱落细胞微核数是放疗前的 2 倍(6.28‰ *vs* 2.22‰)。由于 BMC-MNT 比其他检测方法更简单、方便, 同时取材也无创伤并且可以反复取材, 因此, 尽管口

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

腔粘摸脱落细胞微核比例低于双核淋巴细胞,但它仍是评价遗传损伤的较好方法。然而,需要进一步利用该法检测鼻咽癌病人放射治疗后口腔粘摸脱落细胞微核的变化情况,以确定其敏感性和可行性。

对于未分化淋巴细胞中微核数目,虽然放疗前后没有明显改变,应该强调的是,UL-MNT 和 BMC-MNT 一样操作简单、方便,但其敏感性大大低于其他方法。因此,该方法不能满足临床监测遗传损伤的要求。

鼻咽癌患者常伴有染色体畸变率、脆性部位、SCE 频率[10,11] 染色体放疗后鼻咽癌病人染色体畸变率明显高于放疗前,其畸变类型放疗前后虽大致相似,但放疗后的畸变类型表现为断片、双着丝粒等二次击中畸变的大量增加,说明放射线对细胞染色体有明显的损伤作用,这与周建影等[6] 报道的一致。

综上所述,放射治疗能明显诱发鼻咽癌患者口腔粘膜上皮脱落细胞和外周血淋巴细胞染色体畸变。CB-MNT 和染色体畸变试验是评价遗传学损伤较为敏感的指标,但是 CB-MNT 更简单、可靠和敏感性高等特点,易于普及推广应用。BMC-MNT 不仅具有方法简单、取材方便、工作量小等特点,而且具有良好的剂量-反应关系,因此是最有潜力的指标之一。但是 BMC-MNT 和 CB-MNT 所反映的染色体损伤能否用于评估鼻咽癌病人的放射治疗剂量和治疗效果,还需要进行深入的研究。

参考文献:

[1] Fenech M, Denham J, Francis W, *et al*. Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy[J]. Int J Radiat Biol, 1990, 57(2): 373—383.

[2] Vijayalaxmi, Tice R R, Strauss G H. Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique[J]. Mutat Res, 1992, 271(3): 243—252.

[3] Lee T K, O'Breen K F, Naves J L, *et al*. Micronuclei in lymphocytes of prostate cancer patients undergoing radiation therapy[J]. Mutat Res, 2000, 469(1): 63—70.

[4] 曹 佳, 林 真, 余争平. 微核试验原理、方法及其在人群监测和毒性评价中的应用[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000. 69—100.

[5] Tolbert P E, Shy C M, Allen J W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development[J]. Mutat Res, 1992, 271(1): 69—77.

[6] 周剑影, 段莹莹, 李应辉, 等. 局部放射治疗对肿瘤患者外周血淋巴细胞染色体的影响[J]. 苏州医学院学报, 1994, 14(5): 359.

[7] Widel M, Jedus S, Owczarek S, *et al*. The increment of micronucleus frequency in cervical carcinoma during irradiation *in vivo* and its prognostic value for tumor radiocurability[J]. Br J Cancer, 1999, 80(10): 1599—1607.

[8] Jageia G C, Jayakrishnan A, Fernandes D, *et al*. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment[J]. Mutat Res, 2001, 491(1—2): 9—16.

[9] Slonina D, Klimek M, Szpytma T, *et al*. Comparison of the radiosensitivity of normal-tissue cells with normal-tissue reactions after radiotherapy[J]. Int J Radiat Biol, 2000, 76(9): 1255—1264.

[10] Burgaz S, Karahalil B, Bayrak P, *et al*. Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics[J]. Mutat Res, 1999, 439(1): 97—104.

[11] Kassie F, Darroudi F, Kundr M, *et al*. Khat (catha edulis) consumption causes genotoxic effects in humans[J]. Int J Cancer, 2001, 92(3): 329—332.

(编辑 汪勤俭)

(上接 1691 页)

3 讨论

产后出血是产科严重的并发症之一,是孕妇死亡的首要原因。在全国产妇死因调查中,产后出血引起的产妇死亡占 49.9%[1]。因此,积极防治产后出血是降低产妇死亡的重要措施。产后出血中宫缩乏力是主要原因,大多数产妇对催产素敏感,子宫收缩好,出血少;但少数产妇对催产素不敏感引起宫缩乏力而导致产后出血。因次,针对这些对催产素不敏感的产妇,我们必须选择一种有效的宫缩剂来增强子宫收缩,尽量减少产妇的分娩并发症。

前列腺素系子宫兴奋剂,能选择性直接兴奋子宫平滑肌,增强子宫收缩力及收缩频率,迅速引起子宫强直性收缩,压迫子宫肌层血管而止血[2]。前列腺素 E_1 具有生理活性的内源性激素,半衰期短(1~3 min),起效快,无明显副作用,停止输入 5 min 内恢复到基础血药浓度[3]。因此,在第三产程中,发现子宫收缩乏力,产后出血超过 400 ml,有产后出血的倾向时,除常规用催产素 20 U 静脉推注、按摩子宫,立即将勃乐斯 100 μg 稀释于 6%右旋糖酐注射液或 0.9%氯化钠注射液静脉滴注,开始速度可每分钟 30 滴,2~3 min 后子宫变硬呈球形,出血明显减少。勃乐斯直接静脉用药,快速有效地引起子宫收缩,减少产后出血,值得临床推广、应用。

关键词: 产后出血; 前列腺素 E_1

中图法分类号: R977.6; R714.461 文献标识码: B

参考文献:

[1] 乐 杰. 产科质量与母婴安全[J]. 中华妇产科杂志, 1996, 31(3): 131.

[2] 徐淑云. 临床用药指南[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1989. 726—730.

[3] Cox J W, Andreadie N A, Bone R C, *et al*. Pulmonary extraction and pharmacodynetice of prostlaglandin E_1 during continuous intravenous in usion in patlient with adult respiratory distress syndrome[J]. Am Rev Respir Dis, 1993, 135(1): 6—9.

(编辑 刘洪娥)

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