

鼻咽癌患者外周淋巴细胞姊妹单体 交换的观察

肿瘤研究所癌因室

区宝祥 卓子兰 张于平

在细胞培养液中加入5-溴脱氧尿嘧啶核苷(简称BrdU)后, BrdU可以取代细胞新合成的DNA链上的胸腺嘧啶核苷的位置。在含BrdU的培养液中, 经历两个细胞分裂周期的细胞, 在Giemsa染色后, 可以看到染色体上的两条姊妹染色单体, 一条浅染, 一条深染, 浅染的单体表示其DNA双链上只有一股BrdU。这种一深一浅的两条染色单体称为姊妹染色单体分化现象(简称SCD)。如果在细胞分裂中, 两条姊妹单体曾经发生过交换(简称SCE)的话, 则SCE很容易被观察到, 计数较准确, 方法较简单, 比同位素³H标记的技术有很大的优越性。已利用这一技术并通过计算SCE率来检测各种诱变剂。近年来在一些有发生恶性肿瘤倾向的染色体不稳定性综合征中, 亦发现SCE率增高, 例如在Bloom氏综合征中, 就可见SCE成倍地增加。

鼻咽癌在操广州方言的广东人发病率甚高, 我们曾在检查鼻咽癌病人外周淋巴细胞染色体时, 发现其染色体数目异常或结构的畸变均比健康人为高。1974年在鼻咽癌高发区广东中山县在操广州方言人群中检查151例鼻咽粘膜增生的病人外周淋巴细胞染色体, 见高异倍体的出现率为3.53%, 健康人对照组较低(24例)只有1.31%而鼻咽癌对照组(15例)则最高达5.40%。1978年又在广州地区比较鼻咽癌(50例)与健康人(21例)的外周淋巴细胞染色体的变化, 发现鼻咽癌组的高异倍体高达7.64%, 而健康人组只有1.28%, 与1974年的结果近似, 两次的结果, 鼻咽癌组与健康人组均有统计学上非常显著差异($P < 0.01$)。1978年的观察亦见鼻咽癌组的染色体结构畸变率与健康人的有显著性差异, 鼻咽癌组为2%, 而健康人组只有0.19%^①。

上述的结果表明, 鼻咽癌病人的染色体稳定性可能较低。本文报告SCE率对比的结果。

材料与 方法

一、检查对象:

(一) 实验组: 经病理确诊而未经放射或化学治疗的鼻咽癌病人8例, 男5例, 女3例。

(二) 对照组: 健康输血员10例, 男6例, 女4例。

二、实验方法:

(一) 细胞培养: 每例各取静脉血1毫升, 肝素抗凝, 全血分3分并各加入1%

PHA 0.2 毫升作淋巴细胞培养, 在 37°C 培养 24 小时后, 加入 BrdU (Fluka), 其浓度为每毫升培养液含 10 微克 BrdU, 然后避光再培养 48 小时, 终止培养前 4 小时加入秋水仙素, 其最终浓度为 0.04 微克/毫升培养液, 共培养 72 小时后的细胞经 0.075m 的 KCL 低渗处理, 用 3:1 的甲醇、冰醋酸混合液固定 3 次, 作细胞涂片后, 空气干燥。

(二) SCD 法 染色体玻片标本制备后, 置 37°C 温箱 24 小时, 在 80°~85°C 1M-Na₂HPO₄ 溶液中处理 10 分钟 (不必调 pH, Na₂HPO₄ 溶液的 pH 为 8.3), 从溶液取出后, 在蒸馏水中漂洗两次, 用 2% Giemsa 染色体 30 分钟, 流水冲洗后, 待干作镜下检查。

(三) SCE 计数 在每例标本内选择经历两个分裂周期的中期分裂相, 要求作 SCE 计算的每个细胞均具有染色体 46 条, 在镜下先鉴别 A~G 组, SCE 的计数是以组为单位分组记录的, 除记录交换数目外, 还分别记录交换发生于染色体的那一部位, 记录符号见 (图 1)。

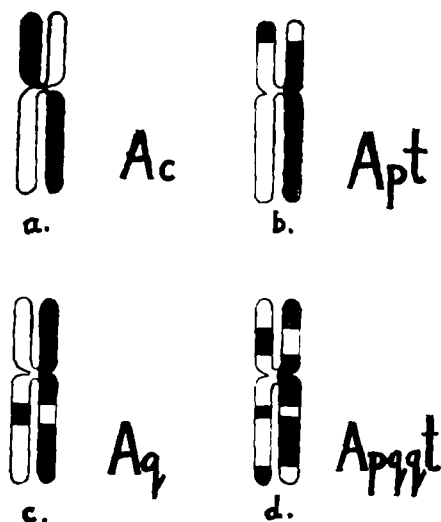


图 1 以 A 组染色体为代表说明, C 是着丝点交换, P 或 Q 为短臂或长臂内交换, T 是末端交换的符号
a. A 组染色体直丝点交换
b. A 组染色体短臂末端交换
c. A 组染色体长臂内交换
d. A 组染色体三处 SCE 位于短臂内交换及长臂内和长臂末端交换

结 果 (见表 1. 2)

表 1 8 例鼻咽癌病人的 SCE 及染色体断裂频率

例 号	中期相数	SCE 数	SCE/中期相	断 裂	断裂/中期相
1	16	158	9.88	235	14.69
3	21	179	8.52	296	14.10
5	14	132	9.43	239	17.07
9	8	76	9.50	146	18.25
11	22	198	9.00	352	16.00
15	10	80	8.00	152	15.20
24	10	85	8.50	153	15.30
30	7	62	8.86	111	15.86
共	108	970	71.69	1684	126.47
每细胞平均数	13.5	8.98	8.96 ± 0.22	15.59	15.81 ± 0.47

8例鼻咽癌共检查了108个细胞(4,968条染色体),发现SCE总数为970,平均每个SCE8.98处(SCE/中期相的平均数为 8.96 ± 0.22),10例健康人共中期相有检查细胞132个(6,072条染色体),SCE总数为774次,平均每个细胞有SCE5.86处(SCE/中期相的平均数为 5.91 ± 0.19),两者之间在统计学上有非常显著性差异($P < 0.01$)。

表2 10名健康人的SCE及染色体断裂频率

例号	中期相数	SCE	SCE/中期相	断裂	断裂/中期相
2	20	180	5.40	176	8.80
4	24	131	5.46	216	9.00
6	6	36	6.00	57	9.50
8	14	79	5.64	117	8.36
10	6	32	5.33	43	7.17
12	11	58	5.27	83	7.55
16	11	66	6.00	89	8.09
19	12	84	7.00	110	9.17
22	10	67	6.70	88	8.80
33	18	113	6.28	157	8.72
共	132	77.4	59.08	1136	85.16
每细胞平均数	13.2	5.86	5.91 ± 0.19	8.61	8.52 ± 0.23

这两组的SCE总数是包括着丝点交换在内的,由于着丝点交换易与染色体着丝点处扭转相混淆,如果我们除去着丝点处交换的计数,只算臂上交换率,则鼻咽癌平均每个细胞的SCE为8.44处,而健康人组为4.45,这两组在统计学上亦有非常显著性差异($P < 0.01$)。

在SCE发生之前,两条姊妹染色体单体必须发生等位断裂,长臂或短臂上的SCE需要有两处断裂才能形成,而靠近末端一处发生断裂,则SCE只见于末端(图1)。按这样计算,则鼻咽癌组平均每个细胞有染色体断裂15.59处(15.81 ± 0.47),而健康人组只有断裂8.61处, (8.52 ± 0.23),两者在统计学上显著性差异($P < 0.01$)。

在鼻咽癌组和健康人组的A~G各组,每条染色体上的SCE频率的平均数与染色体长度均呈正比(表3)。与健康人对比,鼻咽癌组以B、C和A组增加较多,E组次之,D和G组增加较少。

讨 论

本实验的健康人组SCE频率与国内报道颇为接近, 吴旻等检查10例中国男女健康人, 获每细胞SCE平均为 5.74 ± 0.42 , 本实验为 $5.86 (5.91 \pm 0.19)$ 。

表3 A~G组每条染色体上SCE的平均数

组 别	A	B	C	D	E	F	G
鼻咽癌病人	0.41	0.33	0.25	0.13	0.09	0.04	0.01
健康人	0.33	0.16	0.16	0.10	0.03	0.02	0.01
对 比	0.08	0.17	0.09	0.03	0.06	0.02	0

从上述结果看来, 包括或不包括着丝点交换的两种算法所得的SCE总数中, 均见鼻咽癌组与健康人组有统计学上显著性的差异。与健康人比较, 本实验的鼻咽癌病人外周淋巴细胞的SCE频率较高。我们曾发现鼻咽癌病人外周淋巴细胞的染色体畸变率亦比健康人为高, 这些事实说明, 鼻咽癌病人的染色体的稳定性较差。

如果说SCE的部位是随机的话, 那么在A~G各组中, SCE频率的差别, 似无很大意义。

本实验病例不多, 检查分裂中期的细胞数目也较少, 故拟再扩大例数与检查细胞数, 以获得较准确的数据。

SCE是发现肿瘤易感人群的较好方法之一, 应进一步在鼻咽癌高癌家族各成员中进行前瞻性的SCE调查。

小 结

本文对8例鼻咽癌病人与10名健康人的外周淋巴细胞的姊妹染色单体交换(SCE)率作了比较观察。两者的SCE率各为 8.96 ± 0.22 和 5.91 ± 0.19 , 两者之间在统计学上有非常显著性的差异, 可能与鼻咽癌病人染色体稳定性较差有关。

参 考 文 献

- ① 区宝祥 方 熹: 鼻咽癌患者血细胞的染色体研究。中山医学院肿瘤研究所病因研究选编, 32~34页, 1978年12月
- ② 吴旻 王秀琴: 正常人和放射工作人员淋巴细胞在培养条件下姊妹染色单体交换和染色体畸变。实验生物学报 12(1): 31, 1979