

食管癌贲门癌患者淋巴细胞染色体对促癌剂 PMA 易感性的观察

孙玉敏 李 琰 张立玮 段建平

河北省肿瘤研究所

近年来,染色体不稳定性与肿瘤发生、发展的关系是肿瘤遗传病因学研究的重要内容之一。国内已有部分作者对胃癌、食管癌、鼻咽癌患者自发和经某些致断剂诱发的染色体畸变、脆性位点⁽¹⁻³⁾进行了研究。佛波醇醛(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)是一种经典的促癌因子(promoter),它对人淋巴细胞^(4,5)鼠上皮细胞⁽⁶⁾又是有效的染色体断裂剂。为探讨促癌剂 PMA 诱发染色体畸变与肿瘤易感性之间的关系,本文就食管、贲门癌患者淋巴细胞自发与 PMA 诱发染色体畸变率(CAR)进行研究,其结果如下。

材料和方法

1. 研究对象

食管癌患者14例,其中男9例、女5例,年龄44~65岁;贲门癌患者14例,男11例、女3例,年龄37~63岁,患者经X线或病理学检查确诊,均为未经化疗和放疗的术前患者,亦无肿瘤家族史。

对照组25例,为石家庄近郊健康农民和志愿献血者,男18例、女7例,年龄37~68岁,无肿瘤病及家族史,近期内无化学致癌及致突变物接触史。

2. 方法

细胞培养采用低叶酸Tc199培养基、低牛清(5%)、高PH(7.4~7.6)、96小时培养方法。患者与正常人均分为 PMA 诱导组与对照组。其中 PMA 诱导组于培养开始即

分别加入 PMA(Sigma), PBS缓冲液稀释)溶液0.1ml。终浓度为 500ng/ml;对照组分别加入0.1mlPBS。收获制片按常规方法进行。

选择分散良好的中期分裂相进行染色体畸变分析,实验组与对照组每例各计数 100 个中期细胞分裂相。观察其染色体数目和结构染色体畸变数据采用卡方检验法进行统计学处理。

结果

自发染色体畸变:由表 1 可见,癌患者与正常对照组(3.44 ± 0.57 ; 2.75 ± 0.54)相比无显著差异($P < 0.05$)。

PMA 诱发染色体畸变:癌患者与正常人诱发组(8.75 ± 0.68 ; 3.80 ± 0.64)相比有极显著差异(见表 1), $P < 0.001$ 。

表 1 癌患者、正常人自发及PMA 诱发 CAR 比较

组 别(例数)	自发CAR% (分析细胞数)	PMA诱发CAR% (分析细胞数)	P
正常人组 (25)	2.75 ± 0.54 (2500)	3.80 ± 0.64 (2500)	< 0.05
癌患者组 (28)	3.44 ± 0.57 (2642)	8.75 ± 0.68 (2455)	< 0.001
P 值	> 0.05	< 0.001	

经 PMA 诱发与自发染色体畸变:正常人两组之间比虽有显著差异($P < 0.05$),而癌患者经PMA诱发CAR与自发 CAR 比差异更为显著($P < 0.001$)。由表 2 所见,正常人

与癌患者各组四倍体细胞数无显著差异；PMA 诱发患者结构染色体畸变中虽出现部

分双着丝点，但不论是自发，还是诱发各组仍以断裂、断片和裂隙为主。

表 2 患者与正常人染色体畸变构成比

组别(例数)	分析 细胞数	四倍体 细胞数	总畸变	结构染色体畸变数 (%)				
				裂隙	单断	双断	断片	双着丝点
正常人对照组(25)	2500	6	69	23 (40.6)	23 (33.3)	11 (15.9)	7 (10.1)	
正常人实验组(25) (500ng/mIPMA)	2500	7	95	36 (35.79)	30 (31.58)	19 (17.89)	10 (10.52)	
癌患者对照组(28)	2642	8	91	34 (37.36)	31 (34.09)	16 (17.58)	10 (10.99)	
癌患者实验组(28) (500ng/mIPMA)	2455	10	215	66 (30.70)	57 (26.51)	47 (21.86)	39 (18.14)	6 (2.79)

五、对9例患者，以不同浓度的 PMA (200ng/ml、500ng/ml) 进行诱变试验，结果表明，随PMA浓度的增加，CAR 值也明显增加(见表3)。

表 3 9例癌患者对不同浓度 PMA 的反应

组别	例数	分析细胞数	结构染色体畸变	CAR %	P值
0 PMA	9	964	26	2.7	
200ng/ml PMA	9	620	32	5.18	<0.05
500ng/ml PMA	9	670	70	10.8	<0.001

讨论

随着肿瘤病因学，细胞遗传学研究的进展，染色体不稳定性与细胞癌变关系越来越受到人们的重视。由于方法学的改进(低叶酸培养基、低血清、延长培养时间)，特别是染色体诱变实验的应用，使某些肿瘤患者潜在的染色体不稳定性得以表达。

研究结果表明，食管、贲门癌患者经 PMA 诱发的 CAR 显著高于未经 PMA 诱发组，亦明显高于正常人诱发组，说明患者对 PMA 最为敏感。

前人报道⁽²⁾，食管癌患者自发的染色体畸变率明显高于正常人，而本文结果，患者与正常人之间CAR无显著差异(P<0.05)，食管癌与贲门癌(各14例)之间亦无显著差异

(P>0.05)。可能与实验条件，受试者遗传背景、年龄等因素有关。

国外一些肿瘤、遗传学家，就 PMA 对鼠诱发皮肤癌⁽⁷⁾及动物细胞⁽⁸⁾、人白细胞^(4,5)诱发染色体畸变进行了研究，PMA 诱发CAR的有效浓度为 10~100ng/ml，而本文PMA 200ng/ml 时患者 CAR 值与对照组比才有明显增高，浓度增加到 500ng/ml 时差异更为显著，除由于种族之间差异、培养条件有差异外，还可能因为他们多采用分离淋巴细胞⁽⁴⁾，而本文以全血为材料可能有关。

PMA 是经典的促癌剂，对促进染色体畸变的机理已有证明，作用于外周血的 PMA 首先刺激白细胞呼吸爆发，释放活性氧，从而产生致畸因子，在致畸因子参与下，间接诱发染色体畸变发生。超氧化物歧化酶(SOD)等抗氧化剂可抑制致畸因子的形成和染色体畸变的发生^(4,9)为此，近就促癌剂 PMA 诱发食管贲门癌患者 CAR 与培养过程中，培养上清液 SOD 水平的变化进行观察(待发表)，发现随培养时间的延长，患者培养上清液中SOD值明显下降，而正常人则维持一定水平。但两组人群均未发现经 PMA 诱发与自发之间的差异。支持了SOD与CAR 无直接关系的论点^(4,5,9)。

(下转第 5 页)

- culture. *Hydrobiologia*. 1985; 123: 205.
11. Bryan GW. The effect of heavy metals (other than Hg) on marine and estuarine organisms. *Proc Roy Soc London*. 1971; 177B: 389.
 12. Fair PH, Sick LV. The role of digestion in the Black Sea bass *Centropristis striata*, on the chemical speciation of organically bound Cd. *Cop Biochem Physiol*. 1984; 79C: 265.
 13. 王永元, 等. 锌-65 从三角褐指藻向紫贻贝传递的初步研究. *生态学报*. 1984; 4(3): 267.
 14. Robinson J, et al. Organochlorine residues in marine organisms. *Nature*. 1967; 214: 1307.
 15. Miramand p, et al. Vanadium transfer in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Biol*. 1980; 56: 281.
 16. Jennings JR, Rainbow PS. Studies on the uptake of cadmium by the crab *Carcinus maenas* in the laboratory. *J. Accumulation from seawater and a food source*. *Mar Biol*. 1979; 50: 131.
 17. 秦松, 林光恒. 化学诱变剂在实验海洋食物链中的流动以及遗传毒性的检测 I. 无机诱变剂镭 (I) 在褐指藻中的吸着与积累. *海洋与湖沼*. 待刊.
 18. 顾宏堪, 刘明星. 物理涂汞电极单池示差反向极谱法在海水分析中的应用. II. 镭的分析. *分析化学*. 1974; 2(3): 179.
 19. Ma T-H. Tradescantia micronuclei (Trad-MCN) test for environment clastogens. In: Kolber AR et al., eds. *In vitro toxicity testing of environmental agents*. New York, Plenum, 1983; 141-214.
 20. Westernhagen H, et al. Fate and effects of cadmium in an experimental marine ecosystem. *Helgol Wiss Meeresunters*. 1978; 31: 471.

(上接第35页)

参考文献

1. 张红恩, 等. 12 例胃癌患者外周血普通染色体脆性位点的观察. *遗传与疾病* 1987; 4(4): 208-210
2. 胡南, 等. 染色体畸变率和食管癌的遗传易感性. *中华医学杂志* 1986; 66(10): 594~596
3. 毛新, 等. 鼻咽癌患者外周血培养细胞染色体对某些致断裂剂的易感性观察. *遗传与疾病* 1988; 5(5): 87~90
4. Emerit I and Cerutti P. Tumor promoter phorbol-12-myristate-13-acetate induces chromosomal damage via indirect action. *Nature* 1981; 293(10): 144-146
5. Emerit I and Cerutti P. Tumor promoter phorbol-12-myristate-13-acetate induces a clastogenic factor in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 79: 7509-7513
6. Dzarlieva R and Fusenig N. Tumor promoter 12--O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate enhances sister chromatid exchanges and numerical and structural chromosome aberrations in primary mouse epidermal cultures. *Cancer Lett*. 1982; 16: 7-17
7. Bouiweil RK. The Function and mechanism of promoter of carcinogenesis. *CRC Crit Rev Toxicol* 1974; 2: 419-43
8. Larry HT, et al. Failure of the phorbol Ester 12-o-Tetradecanoylphorbol-13-acetate to Enhance SCE, Mitotic Segregation, or Expression of Mutations in Chinese Hamster Cells. *Cancer Res* 1988; 40: 3245-51
9. Emerit I, et al. Clastogenic action of tumor promoter phorbol-12-myristate-13-acetate in mixed human leukocyte cultures. *Carcinogenesis* 1983; 4(10): 1313-1316