

碱性“彗星”法检测肺癌放射敏感性初步研究

吕纪马, 王绿化, 杨伟志, 张晓华, 王冕荣, 阎洁

(中国医学科学院北京协和医科大学肿瘤医院, 北京, 100021)

摘要:目的 采用碱性彗星法检测肺癌标本的初始 DNA 单链断裂, 探讨碱性彗星法用于预测临床肺癌的放射敏感性的可行性。方法 对 2002 年 4 月~2003 年 8 月在本院经纤维支气管镜取样并为病理证实的 150 例肺癌标本采用碱性彗星法检测初始 DNA 单链断裂, 以经本底校正的平均尾力矩(RTM)和平均中位尾力矩(mRTM)为评价指标, 采用 SPSS 10.0 统计软件包以单因素方差分析法比较不同病理类型平均校正尾力矩差异, 并分析影响结果的相关因素。结果 纤维支气管镜取样, 多数样品细胞数较少, 样品质量对结果影响较大, 35% 样品中位 $RTM \leq 1.0$, 无显著性差异, 全组平均校正尾力矩在不同病理类型中的分布均未显示出与临床一致的趋势, 在细胞数小于 100 的样品中可见小细胞大于非小细胞的趋势, 全组平均中位校正尾力矩尤其在 RTM > 1.0 的样本中, 显示与临床放射反应一致分布趋势, 但样本小, 结果无统计学差异。结论 碱性彗星法可初步显示不同病理类型肺癌细胞间的放射敏感性差异, 样品质量对结果影响较大, 分析方法有待改进完善。

关键词: 彗星分析法; 肺癌; 预测试验; 放射治疗

中图分类号: R 734.2 文献标识码: A 文章编号: 1672-235X(2005)09-0063-04

PRELIMINARY RESULTS OF RADIOSENSITIVITY DETECTED BY ALKALINE COMET ASSAY IN LUNG CANCER PATIENTS

LV Ji-ma, WANG Lu-hua, YANG Wei-zhi, ZHANG Xiao-hua,
WANG Mian-rong, YAN Jie

(Tumour Hospital of Peking Union Medical University, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021)

ABSTRACT: **Objective** To evaluate the value of alkaline comet assay for predicting clinical radio-sensitivity of lung cancer patients. **Methods** The biopsy samples from 150 lung cancer patients by fibrous bronchial endoscopy were tested by alkaline comet assay from April, 2002 to August, 2003. The adjusted median tail moment (mRTM) and adjusted mean median tail moment (RTM) were used as the endpoints. SPSS 10.0 software was used to analyse the difference in the mRTM and RTM among different pathologic types by ANOVA. Factors influencing the result were also analysed. **Results** There were more samples with less cells scored due to biopsy by fibrous bronchial endoscopy. The quality of the samples has a great influence on the results. Thirty five percent of the samples with $mRTM \leq 1.0$ are recognized as unreasonable results. The results derived from the samples with number of cells less than 100 show a tend of RTM in small cell lung carcinoma greater than that in non-small cell lung carcinoma. There was the same distribution trend of the RTM among three pathologic types as that of the clinic irradiation response for all samples especially for the samples with $RTM > 1.0$, but do not reach the statistic discrepancy due to a less sample size. **Conclusions** The preliminary results from alkaline comet assay may reveal the difference in radiosensitivity among three different pathologic types. The quality of samples influences greatly on reliability of the results and the assay should be improved further.

KEY WORDS: comet assay; lung cancer; predictive test; radiotherapy

放射治疗是肺癌主要治疗手段之一,在放射治疗的临床实践中发现:不同病理类型的肺癌的放射敏感性不同,一般认为小细胞肺癌较腺癌、鳞癌和大细胞癌敏感,即使病理类型相同者也有个体差异。为实现肿瘤放射治疗的个体化,必须有肿瘤放射敏感性的相关参数,在不同水平进行肿瘤放射敏感性预测一直是放射生物学研究热点^[2-8]。实验研究^[9-14]证明放射线对细胞的杀伤效应是通过直接或间接作用引起细胞 DNA 链断裂来实现的。“彗星”分析法(Comet Assay),也称为单细胞凝胶电泳法(single cell gel electrophoresis assay, SCGE),通过荧光显微镜直接定量地检测单个细胞的 DNA 损伤,具有需要细胞数少的优势和灵敏、稳定、简便和快速的优点^[15]。临床前研究结果^[16-21]表明这是一种有潜力的快速检测肿瘤放射敏感性的方法,本研究旨在探讨通过碱性彗星法测量细胞初始 DNA 单链断裂用于临床检测肺癌放射敏感性的可行性。

1 材料与方 法

1.1 临床资料

2002 年 4 月~2003 年 8 月在本院腔镜室共取材 373 例,最后诊断肺癌 354 例,对其中有病理资料的 158 例全部患者在治疗前进行病理组织活检:用 1% 地卡因局麻后,在纤维支气管镜下直视下咬取肿瘤组织,标本分为两部分:部分置入福尔马林中固定送病理检查,部分置于 4℃ 预冷的 1640 培养液中送实验室做“彗星”分析。

1.2 “彗星”分析法的基本实验步骤

以 Oliver 彗星分析法为基础,经中国医学科学院肿瘤研究所放射生物研究室杨伟志课题组优化和标准化后的碱性“彗星”分析法进行 DNA 单链断裂分析。用预冷生理盐水冲洗肺癌活检标本,并用眼科剪剪碎成肉糜状,在 37℃ 消化 30 min 后过滤制成单细胞悬液,分装入 1.5 mL 容积的 Eppendorf 管。将对照管放入冰箱 4℃ 冷藏,照射管插入等效蜡块中以 6MV-X(250 cGy/min)行 5 Gy 冰上照射。照射后将对照管和照射管中的细胞悬液进行离心(3 000 转/min, 10 min),弃去上清液,在沉淀中加入 0.3~0.5 mL 预冷生理盐水并吹匀。各取对照管和照射管的细胞悬液 0.25 mL 与 0.75 mL 1% 低熔点琼脂糖混匀,铺于预冷的载玻片上制成胶板。将胶板浸入碱性裂解液

(500 mL 去离子水 + 29.2 g NaCl + 0.5 g N-lau + 3.0 mL 2.5N NaOH)在 4℃ 冰箱内裂解 50 min;电泳前以电泳液(500 mL 去离子水 + 0.58 g EDTA + 3.6 mL 2.5 N NaOH)漂洗 20 min × 3 次,置于电压 0.36 V/cm 电泳槽电泳 20 min;电泳后用去离子水漂洗 20 min,再用 2.5 g/mL 的 PI 染液避光染色;Olympus-大恒系统随机采集图像;以 Lucia G Version 4.61 软件测量图像的校正尾力矩。

1.3 检测指标

检测指标为尾力矩(tailmoment, TM),其定义为彗星尾部长长度与尾部 DNA 百分含量的乘积。本研究分别检测中位校正尾力矩 $mRTM_5 = mTM_5 / mTM_0$ 和平均校正尾力矩 $RTM_5 = TM_5 / TM_0$ (5 Gy 照射尾力矩除以未照射尾力矩)。

1.4 统计分析

采用 SPSS 10.0 统计软件:单因素方差分析法,比较不同病理类型组的平均中位尾力矩和平均校正尾力矩差异。

2 结 果

2.1 纤维支气管镜下取活检样品的细胞数量对彗星分析结果的影响

表 1 显示腔镜活检标本所含的细胞数的分布。纤维支气管镜下获得的活检标本所含的细胞数多少不等,在分析的样品中最多的细胞数可达 150 个,最少 4 个,中位数 100 个,多数样品所含细胞数较少,76% 的样品细胞数 > 50 个,67% 的样品细胞数 ≥ 100 个,其中鳞癌样品细胞数较多(82% > 50 个,76% ≥ 100 个)。

表 2 显示纤维支气管镜活检样品细胞数对彗星分析结果的影响。全组数据分析:平均中位校正尾力矩和平均校正尾力矩在不同病理类型中的

表 1 纤维支气管镜活检样品的细胞数

病理类型	全组	≥100	< 100	≤50
鳞癌	72	55	17	13
腺癌	33	19	14	9
小细胞癌	45	27	18	14

分布均未显示出与临床一致的趋势;平均校正尾力矩仅在细胞数小于 100 的样品中和平均中位校正尾力矩在细胞数大于 50 样品中可见小细胞大于非小细胞的趋势。

2.2 不同中位校正尾力矩组的彗星分析结果

中位校正尾力矩值分布趋势是:小细胞癌 > 鳞癌 > 腺癌,差异在中位校正尾力矩值大于 1 组

表 2 不同细胞数的平均中位校正尾力矩

病理类型	全组	细胞数 ≥ 100	细胞数 < 100	细胞数 ≤ 50
鳞癌	2.31 ± 0.38	2.16 ± 0.26	2.80 ± 1.38	3.38 ± 1.79
	(1.35 ± 0.12)	(1.24 ± 0.12)	(1.21 ± 0.35)	(1.31 ± 0.46)
腺癌	1.95 ± 0.38	2.24 ± 0.59	1.55 ± 0.40	1.60 ± 0.46
	(1.53 ± 0.25)	(1.59 ± 0.35)	(1.44 ± 0.37)	(1.54 ± 0.57)
小细胞癌	2.99 ± 0.64	3.07 ± 0.74	2.87 ± 1.17	3.32 ± 1.49
	(1.35 ± 0.18)	(1.24 ± 0.16)	(1.52 ± 0.38)	(1.64 ± 0.48)

更明显;平均校正尾力矩值在中位校正尾力矩值小于等于 1 组小细胞大于非小细胞,见表 3。

表 3 不同中位校正尾力矩值的平均中位校正尾力矩

中位 RTM	鳞癌	腺癌	小细胞癌
中位 RTM > 1	3.10 ± 0.520 (1.47 ± 0.170) (49 例)	2.84 ± 0.54 (1.95 ± 0.38) (20 例)	4.40 ± 0.930 (1.45 ± 0.200) (28 例)
中位 RTM ≤ 1	0.61 ± 0.059 (0.75 ± 0.053) (23 例)	0.58 ± 0.07 (0.88 ± 0.09) (13 例)	0.66 ± 0.052 (1.12 ± 0.340) (17 例)

3 讨论

相关实验结果显示^[18,19]:肺癌细胞具有显著的生物学异质性和内在放射敏感性差异,不同病理类型的肺癌放射敏感性不同,临床总体的印象是小细胞肺癌较鳞癌和腺癌敏感,但相互有重叠,相同病理类型者间有个体差异。临床前研究结果^[1~5]表明彗星分析是一种有潜力的快速检测肿瘤放射敏感性的方法,需要标本细胞数少和能检测单细胞的放射损伤是彗星分析的优点,但肿瘤活检标本都不同程度的混杂非肿瘤组织细胞而且肺癌组织是异质性细胞群体并常伴有变性、坏死,取材标本的质量及随机评价的彗星个数会影响结果的代表性。West 等分析子宫颈鳞癌的活检肿瘤标本发现肿瘤细胞仅占其中的 45%,其他为不同比例的炎性细胞;Monecf MAL^[8]认为需评价的彗星个数应能在具体实验条件下充分代表检测细胞群体的最小值为宜,可通过随机对图像不同部位的分析确定,但从对校正尾力矩随不同细胞数变化结果分析,与细胞系分析仅考虑肿瘤异质性而单纯要求较多的细胞数不同,临床研究取材标本的质量对结果影响更甚。本研究采用纤维支气管镜下活检,标本较小,标本的中位彗星数为 100 个(4~150 个),中央腔内外生型的鳞癌细胞数较多,可分析的细胞数少,未能确定合理的需检彗星个数,考虑到肿瘤异质性,取 100 个细胞为分

析个数,但明显少于肿瘤细胞系放射敏感性分析中的至少 150 个。尽管鳞癌和小细胞癌样品细胞数较多,平均校正尾力矩仅在细胞数小于 100 的样品中和平均中位校正尾力矩在细胞数大于 50 样品中可见小细胞大于非小细胞的趋势,其中腺癌两指标差异较小,鳞癌和小细胞癌样品的混杂细胞效应明显,不同病理类型的平均中位校正尾力矩受混杂细胞影响相对较小,用于放射敏感性定性分析更敏感。Olive 等^[7]检测头颈部淋巴结转移性鳞癌同一肿瘤不同部位的两次活检标本,其结果无显著差异,但分析标本均取自体表 3 cm 以上肿瘤,并在分析前用单克隆抗体分离炎性细胞,仍有 25% 的标本有严重的退变(退变细胞/细胞总数 > 20%),本研究 12% 标本有严重的退变,其中腺癌较多,这与取材和细胞离体后其他环境因素损伤有关。彗星分析显示 35% 中位校正尾力矩值 ≤ 1.0,与预期的结果不符且与彗星个数和病理类型无关,可能因为肺癌活检细胞数量少,在照射后先将细胞悬液离心 10 min,再进行铺胶,从而导致肺癌样品进入裂解液的时间延迟 20 min 左右,DNA 初始损伤随时间的延长,发生亚致死性损伤的修复,使尾力矩 TM 值变小,从而影响 RTM 值;部分肺癌细胞受其他混杂因素致本底 DNA 损伤大和修复快有关^[1],经本底校正可减小混杂因素致本底 DNA 损伤大对结果可靠性的影响^[5];在中位校正尾力矩值 > 1 时,平均中位校正尾力矩值分布趋势为:小细胞癌 > 鳞癌 > 腺癌,这与从临床获得的肺癌放射反应性印象一致。目前实验条件下,平均中位校正尾力矩均值在不同病理类型间无显著差异,除与上述取材和实验方法的局限性有关外,还可能与彗星分析无法识别 DNA 损伤类型和修复的正确性有关。Bergqvist 等^[9]用碱性彗星法分析 4 种不同肺癌细胞系的放射敏感性后认为,要反映肺癌细胞系放射敏感性差异应结合修复能力等更全面的检测。

初步结果显示 :不同病理类型肺癌细胞间的平均中位较正尾力矩均值趋势与临床印象 ,尚需改进取材方法和建立标本质量评价标准 ,更适宜的实验条件和质量控制 ,及从样本中分离出足够具有代表性细胞。应合理调控减少实验所致的额外 DNA 损伤 ,可采用阴性内对照监控实验条件 ; Hartmann 等总结 2001 年德国的第四届国际彗星分析工作会议内容 ,对在体(in vivo)碱性彗星分析的实验参数提出推荐标准。总之 ,碱性彗星分析法经进一步完善后 ,有望进行肺癌个体敏感性的检测。

参考文献

[1] Twardella D , Chang-Claude J Studies on radiosensitivity from an epidemiological point of view-overview of methods and results Radiotherapy and Oncology , 2002 , 62 : 249 .
 [2] Eastham A M , Atkinson J , West C M . Relationships between clonogenic cell survival , DNA damage and chromosomal radiosensitivity in nine human cervix carcinoma cell lines[J] . Int J Radiat Biol , 2001 , 77(3) : 295 .
 [3] Roos W P , Binder A , Bohm L . Determination of the primary DNA damage and residual DNA damage remaining after 12 hours of repair in eleven cell lines at low doses of irradiation[J] . Int J Radiat Biol , 2000 , 76(11) : 1493 .
 [4] 张军宁 . DNA 链断裂检测技术预测肿瘤放射敏感性的现状[J] . 国外医学肿瘤学分册 , 2000 , 27(4) : 228 .
 [5] 高远红 , 杨伟志 , 阎 洁 , 等 . “ 彗星 ” 分析法检测人癌裸鼠移植瘤的放射敏感性[J] . 中华放射肿瘤学杂志 , 2004 , 13 : 48 .
 [6] 高远红 , 杨伟志 , 阎 洁 , 等 . “ 彗星 ” 分析法检测人癌体外培养细胞的放射敏感性[J] . 中华肿瘤学杂志 , 2004 , 26 : 217 .
 [7] McKeown S R , Robson T , Price M E , et al . Potential use of the alkaline comet assay as a predictor of bladder tumour response to radation Br J Cancer , 2003 , 89(12) : 2264 .
 [8] Moneef M A L , Swherwood B T , Bowman K J , et al . Measurement using the alkaline comet assay predict bladder cancer cell ra-

diosensitivity Br J Cancer , 2003 , 89(12) : 2271 .
 [9] Dunne A L , Price M E , Mothersill C , et al . Relationship between clonogenic radiosensitivity radiation - induce apoptosis and DNA damage/repair in human colon cancer cells Br J Cancer , 2003 , 89 Br J Cancer89(12) : 2277 .
 [10] Bacova G , Hunakova L E , Chorvath M , et al . Radiation-induced DNA damage and repair evaluated with ‘ comet assay ’ in human ovarian carcinoma cell lines with different radiosensitivities[J] . Neoplasma , 2000 , 47(6) : 367 .
 [11] Klaude M , Eriksson S , Nygren J , et al . The comet assay : mechanisms and technical considerations Mutat. Res , 1996 , 363 : 89 .
 [12] Olive P L , Wlodek D , Durand R E , et al . Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis . Exp Cell Res , 1992 , 198 : 259 .
 [13] Hellman B , Vaghef H , Bostrom B , et al . The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay Mutation Research , 1995 , 336 : 123 .
 [14] West C M . Intrinsic radiosensitivity as a predictor of patient response to radiotherapy . Br J Radiol , 1995 , 68 : 827 .
 [15] Olive P L , Durand R E , Jackson S M , et al . The comet assay in clinical practice Acta Oncologica , 1999 , 38(7) : 839 .
 [16] Hughes C M , Lewis S E M . McKelvey-Martin VJ Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay , Mutat. Res , 1997 , 374 : 261 .
 [17] Schmezer P , Rupprecht T , Tisch M , et al . Comet assay-Application to human epithelial cells from the upper aerodigestive tract . Mutat. Res , 1997 , 379(1s) : 127 .
 [18] Fertil B , Malaise E P . Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors : analysis of 101 published survival curves Int. J. Radiation oncology Biol. Phys , 1985 , 11(9) : 1699 .
 [19] Salazar O M , Rubin P , Brown J C , et al . Predictors of radiation response in lung cancer Cancer , 1976 , 37 : 2636 .
 [20] Bergvist M , Brattstrom D , Stalberg M , et al . Evaluation of radiation-induced DNA damage and DNA repair in human lung cancer cell lines with different radiosensitivity using alkaline and neutral single cell gel electrophoresis , Cancer Letter , 1998 , 133 : 9 .
 [21] Boeck M D , Touil N , Visscher G D , et al . Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis Mutat. Res , 2000 , 469 : 181 .

启 事

《实用临床医药杂志》开展继续医学教育项目的通知

1. 参加对象 :全国各级医院各类专业技术人员、护理人员。
 2. 学习形式 :结合《实用临床医药杂志》的专题内容 ,学员在认真学习“ 专题 ” 论文、论著以及当期研究论文的基础上 ,将每期的考试试题 [临床医学专业技术人员的教材为《实用临床医药杂志(综合版)》6 期 ,护理人员为《实用临床医药杂志(护理版)》6 期] ,答案寄至《实用临床医药杂志》编辑部继续医学教育部。学习结束、考试合格者 ,将授予省级继续医学教育 I 类学分 12 分。
 3. 报名方法 :参加者可向所在医院的科教处或护理部报名 ,也可直接向《实用临床医药杂志》编辑部继续医学教育部报名。
 4. 收费标准 :每位学员收费共计 90 元。请参加的学员在报名时将学习费用连同报名表一同寄(汇)至《实用临床医药杂志》编辑部。
- 编辑部地址 :江苏省扬州市淮海路 11 号 电话 :0514 - 7978917 邮政编码 :225001