

辐射致癌研究中细胞核及AgNORs 形态计量学改变的意义

樊飞跃 曹珍山 杨素霞 李 煜

周淑珍 涂开成 刘国廉

(北京放射医学研究所 北京 100850)

摘要 应用形态计量学手段,对电离辐射体外诱发人胚肺细胞恶性转化过程中,细胞核内 AgNORs 颗粒数量、大小及细胞核部分形态计量学参数,随辐射剂量改变的规律进行了研究。接受 0.25~5 Gy ^{60}Co γ 照射后第五代的人胚肺细胞核内 AgNORs 颗粒数量明显增加($P<0.05$),而且随着照射剂量的加大呈现逐渐增加的变化的趋势;AgNORs 颗粒面积、周长、等效直径等形态计量学参数亦发生明显改变。这些研究结果表明,辐射诱发细胞恶性转化过程中,细胞核内 AgNORs 颗粒数量的改变,可望用于定量地研究辐射体外诱发细胞恶性转化的剂量效应关系,做为观察细胞恶性转化程度的指标。

关键词 γ 辐射, AgNORs, 形态计量学

电离辐射是诱发人类肿瘤生成的主要物理因素,辐射在体外诱发细胞的恶性转化亦得到了证实^[1,2]。但是在辐射诱发细胞发生恶性转化的过程中,细胞内核仁组成区相关嗜银蛋白(argyrophilic proteins associated nucleolar organizer regions, AgNORs)颗粒数量及大小等形态计量学参数随辐射剂量改变的规律却知之甚少。AgNORs 作为肿瘤细胞核仁增生状态的标志,其在细胞核内的数量、大小和分布,反映了细胞的增生活性及其潜在恶性^[3]。随着对 AgNORs 研究和认识的不断深入,AgNORs 已被用于鉴别细胞良性和恶性及细胞恶性程度的界定中^[4]。本研究应用组织化学和形态计量学的手段,对 γ 辐射在体外诱发人胚肺细胞恶性转化过程中,细胞核内 AgNORs 颗粒数量、大小及胞核部分形态计量学参数的改变进行了研究,以期阐明辐射致癌过程中细胞核内 AgNORs 形态计量学的变化规律和特点。

1 材料与 方法

1.1 细胞培养与样品制备

人胚肺细胞为本实验室建立的 HEL-9402 细胞系。37℃、5% CO_2 条件下,贴壁培养于含 20% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基中。 ^{60}Co γ 射线细胞照射剂量率为 2.44 Gy min^{-1} 。单次照射,剂量分组分别为 0.25、0.5、1、3 Gy 和 5 Gy。取照射后第五代的细胞接种于内置盖玻片的 ϕ 35 mm 平皿内, 2×10^4 细胞/皿,每剂量点 4 个平行样品,37℃、5% CO_2 中培养 48 h,取出盖玻片制样。

1.2 细胞 AgNORs 染色

取出载有细胞的盖玻片,用 D-Hanks 液漂洗两次, Carnoy 氏固定液固定 12 min,用蒸馏水冲洗,1 mol/L HCl 酸化,双蒸水漂洗。银胶染色液 32℃避光染色 30 min,4% 硫代硫酸钠 5 min。

收稿日期:初稿 1995-11-23,修回 1996-02-02

60℃下烤干,阿拉伯树胶封片,H.E.染色做为 AgNORs 染色的对照。

1.3 数据收集及处理

选用 MIAS-300 型图象分析系统,随机选择测定视场,每剂量点测量 85~133 个细胞核。主要分析参数有: AgNORs 颗粒数、面积、等效直径周长、细胞核等效直径、细胞核面积等。数据经方差分析进行显著性检验。计算机自动挑选系统进行统计回归分析。

2 结 果

2.1 不同剂量 γ 辐照后 AgNORs 颗粒计数的变化

接受 0.25~5 Gy 作用后第五代的人胚肺细胞,细胞核内 AgNORs 颗粒计数明显增加(见表 1),与对照组比较差别显著($p < 0.01$)。

Tab 1. Change of AgNORs count of HEL-9402 irradiated by γ -ray

Dose/Gy	Cell number	AgNORs count/cell
0.00	87	1.41±0.26
0.25	110	2.09±0.31
0.50	85	1.93±0.21
1.00	133	2.42±0.21
3.00	128	2.79±0.27
5.00	140	2.44±0.44

经统计回归分析,其剂量效应关系满足如下指数方程:

$$Y = 1.63 + 0.81 X - 0.13 X^2$$

式中 Y 为 AgNORs 颗粒计数(/细胞核), X 为剂量(Gy)。

在 γ 辐射剂量为 0~3 Gy 范围内 AgNORs 颗粒计数/细胞核随辐射剂量的增加而逐渐增加,当剂量增加到 5 Gy 时,AgNORs 颗粒计数/细胞核较之 3 Gy 剂量组略有下降,但是下降幅度在统计学上无显著性意义($p > 0.05$)。

2.2 不同剂量 γ 辐照后 AgNORs 形态计量学参数的改变

经不同剂量 ^{60}Co γ 射线作用后,各剂量组细胞核内 AgNORs 颗粒、等效直径、周长、面积形态计量学参数亦发生改变,其变化显著地小于对照组($p < 0.05$),说明 AgNORs 平均颗粒面积明显变小(见表 2)。

Tab 2. Changes of some morphometric parameters of AgNORs

Dose/Gy	Number of cell	Equivalent diameter/ μm	Perimeter/ μm	Area/ μm^2
0.00	87	3.92±1.30	14.32±6.27	13.43±9.26
0.25	110	2.98±1.41	11.94±7.46	8.51±8.26
0.50	85	3.26±1.27	11.62±5.62	9.61±7.20
1.00	133	3.03±1.34	11.43±6.50	8.62±7.70
3.00	128	2.96±1.32	11.68±7.38	8.24±7.65
5.00	140	2.92±1.30	11.22±7.12	8.06±7.05

从表 3 的结果可以看到 AgNORs 颗粒面积/胞核面积在受照射后表现为明显增高($p < 0.05$),而 AgNORs 颗粒面积/胞核数的比值在各受照射剂量组与对照组之间未见显著性改变($p > 0.05$)

Tab 3. Changes of ratios of AgNORs area to nucul area and AgNORs area to cell number

Dose/Gy	Number of cell	AgNORs area/nucul area	AgNORs area/cell number
0.00	87	0.08±0.01	19.66±4.04
0.25	110	0.10±0.02	18.82±4.53
0.50	85	0.10±0.01	18.59±2.53
1.00	133	0.12±0.02	21.71±5.21
3.00	128	0.11±0.02	22.28±3.63
5.00	140	0.11±0.02	20.24±4.18

2.8 不同剂量 γ 辐照后细胞核的变化

表 4 列出了接受不同剂量后细胞核部分形态计量学参数的变化。测定结果表明, 受照射后细胞核等效直径、细胞核面积明显变小($p<0.05$)。

Tab 4. Changes of equivalent diameter and area of cell nucli

Dose/Gy	Number of cell	Equivalent diameter/ μm	Nucli area/ μm^2
0.00	87	16.91±3.46	230.03±106.05
0.25	110	15.36±3.69	197.35± 96.84
0.50	85	14.94±2.64	179.56± 63.45
1.00	133	14.70±2.65	176.23± 65.14
3.00	128	15.67±3.15	200.64± 79.42
5.00	140	15.44±2.60	192.93± 67.33

3 讨 论

应用定量实验手段, 研究电离辐射体外诱发细胞恶性转化, 对于阐明辐射致癌的剂量效应变化规律, 及电离辐射致癌危险度估算具有重要意义。细胞核中 AgNORs 的变化无论在临床或实验研究中, 均显示了它在肿瘤细胞良性和恶性判定及肿瘤分级中的实际应用价值^[5,9]。本实验中观察到, 人胚肺细胞接受 γ 照射后, 随着照射剂量的增加, 单位细胞核内 AgNORs 颗粒计数在 0~3 Gy 剂量范围内逐渐增加, 表明细胞的增生活性及潜在的恶性随辐射剂量的增加而增加。当剂量增加到 5 Gy 时, 单位细胞核内 AgNORs 颗粒计数略有下降($p>0.05$), 这可能是由于在大剂量照射情况下, 细胞的辐射致死性效应高于亚致死性效应所致。单位细胞核内 AgNORs 颗粒计数与剂量的量效关系, 经计算机拟合回归方程, 满足二项指数方程, 拟合曲线的复相关系数 $r=1$, 表明其剂量效应改变具有一定的规律性。曾经在 X 射线诱发大鼠肺成纤维细胞恶性转化实验中观察到, 细胞转化率随受照射剂量改变的量效变化关系, 当照射剂量小于 3 Gy 时, 细胞转化率随剂量的增高而增加, 当照射剂量增加到 5 Gy 时细胞转化率下降^[7]。其变化规律与本实验中所观察到的 AgNORs 颗粒计数随剂量变化的规律基本一致。因此, AgNORs 颗粒计数这种剂量效应关系规律性的变化可能成为在体外定量地研究辐射诱发细胞恶性转化的一个定量分析指标。

对于 AgNORs 颗粒测定参数及其相应结果的分析一直存在着争议, 传统和普遍的观点认为, AgNORs 颗粒计数在临床和实验中可以作为细胞恶性程度的判定指标^[8,9]。而有些学者则认为, AgNORs 颗粒大小、面积等形态计量学参数的测定较之颗粒计数能更好地反映 AgNORs 颗粒的变化^[5,10]。本实验对 AgNORs 部分形态计量学参数进行测量的结果表明, 经不同剂量照射后, 人胚肺细胞 AgNORs 颗粒面积与细胞核面积的比值明显升高, 但是这种升高现象是由于细胞核

面积在受照射后明显变小所引起的相对性的改变, 因此不具有实际分析价值。承认 AgNORs 颗粒面积是反映 AgNORs 颗粒变化较好指标的学者一般认为, 单位细胞核内 AgNORs 颗粒面积 (AgNORs 颗粒面积/细胞核) 较之单个 AgNORs 颗粒形态计量学改变更有意义^[11,12]。本实验中, 受照射后细胞 AgNORs 颗粒等效直径、周长及单个颗粒的平均面积显著性地小于对照组, 而 AgNORs 颗粒计数呈现增强性改变, 两者的增强和减小形成了相互消抵的因素, 结果使得单位细胞核内 AgNORs 颗粒总面积未发生显著性的改变。

这些研究结果表明, 电离辐射诱发细胞恶性转化过程中, 细胞核内 AgNORs 颗粒数量的改变, 在进一步深入研究基础上, 可望用于定量地研究辐射体外诱发细胞恶性转化的剂量效应关系, 做为观察细胞恶性转化程度的指标。

参 考 文 献

- 1 Martin S G, Miller R C, Randers-Pehrson G et al. Proceeding of International Symposium of Radiation and Chemical Carcinogen-induced Cell Transformation, 1993, 12, Michigan, U S A
- 2 刘国廉, 普琳, 关贵民等. 中华放射医学与防护杂志, 1992, 12(2): 83
- 3 Anonymous, Lancet 1987, 1: 1413
- 4 Charpin C, Bonnier P, Piana L et al. Pathol. Res. Pract., 1992, 188: 1009
- 5 Derenzini M, Pession A, Farabegoli F et al. Virchow Arch (Cell Pathol), 1988, 54: 334
- 6 Ofner D, Riedmann B, Maier H et al. J. Pathol., 1995, 175: 441
- 7 刘国廉, 普琳, 杨素霞等. 中华放射医学与防护杂志, 1992, 12(3): 155
- 8 Egan R, Crocker J. Br. J. Cancer, 1992, 65: 1
- 9 Lipponen P K J, Eskelinen M J, Nordling S. Br. J. Cancer, 1991, 64: 1139
- 10 Charpin C, Bonnier P, Piana L et al. Pathol. Res. Pract., 1992, 188: 1009
- 11 Ruschoff J, Bittinger A, Neumann K et al. Pathol. Res. Pract., 1990, 186: 85
- 12 Lipponen P. J. Pathol., 1993, 171: 279

IMPLICATION OF MORPHOMETRIC CHANGES OF AgNORs IN NEOPLASTIC TRANSFORMATION INDUCED BY γ -IRRADIATION

Fan Feiyue Cao Zhenshan Yang Suxia Li Yu Zhou Shuzhen
Tu Kaicheng Liu Guolian
(Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

ABSTRACT AgNORs (argyrophilic proteins associated nucleolar organizer regions) has been used to identify whether the cells are malignant or not in the cancer research. It was studied by means of morphometerology, in this report, that changes of AgNORs counting and some morphometric parameters of human embryo lung cell line (HEL-9402) appeared significantly after the HEL-9402 was irradiated by ^{60}Co γ -ray. The change character of AgNORs number showed a tendency of increasing gradually with increase of irradiation doses. The implication of changes of AgNORs' area, perimeter and equivalent diameter is not sure although they changed obviously, because they were influenced by the changes of cell nuclei. In conclusion, AgNORs counting may be used to study the relationship between effects and doses during cell neoplastic transformation induced by radiation and expected to become a parameter of identifying malignant degree of transformed cells.

KEYWORDS γ -irradiation, AgNORs, Morphometerology