

用CB微核法预测癌细胞的放射敏感性*

王菊芳¹ 李文建¹ 周光明¹ 何 静¹ 李 强¹ 党秉荣¹ 顾红梅¹ 卫增泉¹ 高清祥²

1 (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

2 (兰州大学 兰州 730000)

摘要 用细胞质分裂阻断微核技术(简称CB微核法)研究了癌细胞的放射敏感性,结果表明:CB微核法可用来预测癌细胞对重离子和 γ 射线的放射敏感性,具有省时且成功率高的特点。细胞受重离子作用后,每双核细胞的微核与剂量的效应关系适合方程 $Y=c+kD^n$ 或 $Y=c+\alpha D+\beta D^2$,受 γ 射线作用后,每双核细胞的微核与剂量的效应关系适合方程 $Y=c+\alpha D$ 。在相同剂量下,重离子效应高于 γ 射线效应。

关键词 CB微核法, 癌细胞, 重离子, γ 射线, 放射敏感性

中图分类号 Q691

癌细胞的放射敏感性通常是以细胞受照后的克隆形成率来预测的。但这种方法所需的时间长,尤其对克隆形成率较低的细胞系,更显得有不足之处。因此,人们也用染色体畸变预测细胞的放射敏感性,微核就是其中一种畸变形式,它主要由不能修复的染色体片段而来。同细胞核一样,微核外面包有两层核膜,具有合成DNA的功能,它可以随着细胞的分裂而分裂,也可能在分裂的过程中丢失^[1]。因此,只有统计细胞受照后经过一个分裂周期形成的微核才能准确反映细胞的放射敏感性。由Fenech等^[2]建立的细胞质分裂阻断微核技术(CB微核法)测微核很好地解决了这个问题,由于细胞松弛素B(CytB)能干扰细胞质的分裂而不影响细胞核的分裂,经CytB处理的细胞经过一个分裂周期后能形成一个细胞具两个核的特殊现象,因此,统计双核细胞的微核可以准确反映细胞的放射敏感性。

我们用这种方法研究了SMMC-7721人肝癌细胞和B₁₆小鼠黑色素瘤细胞经50MeV/u $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束和 γ 射线照射后,平均每双核细胞的微核与剂量的效应关系。

1 材料和方法

1.1 细胞及其培养

实验所用细胞为SMMC-7721人肝癌细胞株和B₁₆小鼠黑色素瘤细胞株,培养基为含10%小牛血清的RPMI-1640(GIBCO)培养液,每2—3d消化传代一次。辐照前一天接种到 $\phi 35\text{mm}$ 的玻璃培养皿中,置5% CO_2 培养箱37℃培养。

1.2 辐照

选取密度适宜的指数生长期细胞,倒掉培养液,用PBS缓冲液洗涤一次,并留少量缓冲液以防细胞干死。在兰州近代物理研究所重离子加速器装置(HIRFL)辐照终端上进行重离子

* 九五国家“攀登计划(B)”项目(950603)

收稿日期:1998-09-16, 修回日期:1999-01-04

辐照, 离子种类为 $50\text{MeV/u } ^{12}\text{C}^{6+}$, 束流经过射程调制器将Bragg峰展宽为 5mm 左右, 细胞位于Bragg峰上, 剂量为 $0, 0.5, 1, 2, 4, 6\text{Gy}$ 。 γ 射线辐照于兰州医学院第一附属医院放射科的 ^{60}Co 源上进行, 剂量为 $0, 1, 2, 4, 6\text{Gy}$ 。

1.3 微核观测

预备实验表明: 用终浓度为 2mg/L 的CytB处理SMMC-7721细胞和B16细胞, 每隔 24h 观察, 于 48h 得到的双核细胞最多, 分别为 45% 和 62% , 72h 后双核细胞数有所下降, 主要是因为此时已有较多的三核细胞, 还有少量的四核细胞。用终浓度为 1mg/L 的CytB处理这两种细胞, 于 48h 分别得到 23% 和 44% 的双核细胞, CytB浓度为 3mg/L 时, 双核细胞没有明显增加。因此, 辐照结束后, 立即给样品加入含 2mg/L CytB的新鲜培养液, 于 37°C 培养, 48h 后用卡诺液固定, Giemsa染色, 显微镜下统计双核细胞的微核数。

2 实验结果

每个剂量点两个样品, 每个样品统计约 800 个双核细胞的微核, 实验结果以平均双核细胞的微核表示, 取两个样品的平均值。

2.1 两种癌细胞对重离子的放射敏感性

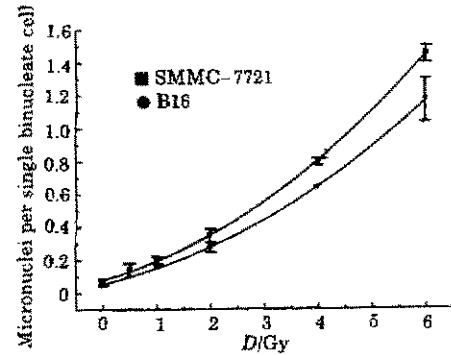


图1 重离子辐照后双核细胞的微核与剂量的效应关系

Fig.1 The dose-response of micronuclei in binucleated cells after irradiation by heavy ions

经重离子照射后, 4Gy 以上时能诱导多数双核细胞产生微核, SMMC-7721细胞较B16细胞敏感性稍高(如图1所示)。两种细胞平均每双核细胞的微核均与剂量有良好的关系, 适合方程 $Y=c+kD^n$ 。其中, c 代表对照样品的自发微核率; n 取决于产生一个微核的平均电子径迹数, 随着LET的增加趋于恒定值; k 反映每个径迹造成的损伤程度, 随着LET的增加而增加。为了便于与 γ 射线比较, 另用常用电离辐射致损伤公式 $Y=c+\alpha D+\beta D^2$ 对实验数据进行拟合, 所得曲线与图1没有明显差异, 由于微核是一种畸变形式, 主要由不能修复的染色体片段而来, 因此, αD 项代表一次击中致畸变, 与剂量有关, βD^2 项代表两次击中致畸变, 与电离密度有

关^[3-5]。表1比较了用公式 $Y=c+kD^n$ 和公式 $Y=c+\alpha D+\beta D^2$ 拟合的结果。

表1 用 $Y=c+kD^n$ 和 $Y=c+\alpha D+\beta D^2$ 拟合每双核细胞的微核与剂量效应关系的比较

Table 1 Comparison of dose-response models for micronuclei per binucleated cells fitted by $Y=c+kD^n$ and $Y=c+\alpha D+\beta D^2$

模式 Model	SMMC7721	B16	模式 Model	SMMC7721	B16
$Y=c+kD^n$			$Y=c+\alpha D+\beta D^2$		
c	0.088	0.087	c	0.081	0.058
k	0.092	0.063	α	0.089	0.073
n	1.489	1.568	β	0.023	0.019
r	0.996	0.965	r	0.999	0.998

2.2 B₁₆小鼠黑色素瘤细胞对重离子和 γ 射线放射敏感性的比较

实验结果表明: γ 射线引起B₁₆双核细胞的微核与剂量的效应关系适合线性模式 $Y=c+\alpha D$, 其中 $c=0.045$, $\alpha=0.057$, $r=0.993$ 。如表1所示, 重离子引起B₁₆双核细胞的微核与剂量的效应关系适合线性平方模式 $Y=c+\alpha D+\beta D^2$, 其中 $c=0.058$, $\alpha=0.073$, $\beta=0.019$, $r=0.998$ 。在相同剂量下, 重离子的微核效应高于 γ 射线的微核效应(如图2所示), 说明B₁₆细胞对低LET的 γ 射线有较高的抗性。

3 讨论

CB微核法解决了培养时微核的再分裂与丢失问题, 使微核计数更精确可靠, 而且无论是整体照射还是离体照射, 其效应是一致的^[6,7], 这些为CB微核法预测癌细胞对重离子和 γ 射线的放射敏感性提供了可靠的理论基础。同时, 由于带微核的细胞丧失了克隆形成能力^[1], 因而对那些不能进行克隆法测定的肿瘤标本仍有可能进行CB微核分析。比起克隆形成法, 它具有省时且成功率高的特点, 有广阔的应用前景。

有关高LET射线诱导的微核报道极少, 文献[8]认为可用公式 $Y=c+kD^n$ 拟合, 我们的结果表明, 50MeV/u $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子诱导的微核与剂量的效应关系可用该公式拟合, 也可用 $Y=c+\alpha D+\beta D^2$ 拟合, 比较之下, 根据 k 和 n 代表的参数, 公式 $Y=c+kD^n$ 可以突出描述重离子致损伤的特点, 但要计算总微核, 则应用公式 $Y=c+\alpha D+\beta D^2$ 更为准确。

在低LET射线作用下, 一次击中致畸变较常见, 如末端缺失片段, 两次击中致畸变很少见, 如双着丝粒和环。重离子在Bragg峰区有较高的LET值, 能产生密集电离, 使两次击中致畸变相对增加, 一次击中致畸变相对减低^[3]。比较重离子和 γ 射线的微核效应, 重离子多出了 βD^2 项, 表明在相同剂量下, 高LET射线的两次击中致畸变比低LET射线明显, 使重离子的生物学效应高于 γ 射线的生物学效应, 这正是重离子在抗癌技术中的优势所在。

参 考 文 献

- 1 Streffer C. Brit J Radiol, 1993, 24:70-73
- 2 Fenech M, Morley A. A Mutat Res, 1985, 147:29-36
- 3 ZHU Renbao, LIU Yong, LUO Zuyu. Radiobiology (in Chinese). Beijing: Science Press, 1987
- 4 PENG Tao, SONG Juzhong, XIE Huaijiang. J Radiat Res Radiat Proces (in Chinese), 1997, 15(1):48-50
- 5 BAI Yushu, ZHANG Xiuxia, GUAN Shurong. J Radiat Res Radiat Proces (in Chinese), 1991, 9(3):182-185
- 6 Yuta Shibamoto, Streffer C, Fuhrmann C, et al. Radiat Res, 1991, 128:293-300

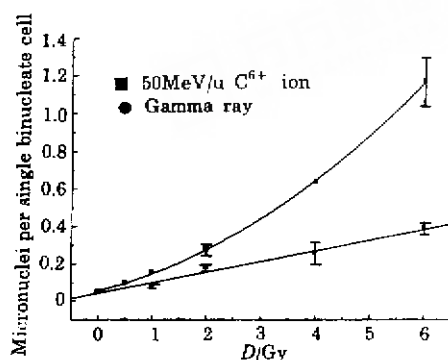


图2 B₁₆双核细胞受照后微核与剂量的效应关系

Fig.2 The dose-response of micronuclei in B₁₆ binucleated cells after irradiation

7 Gantenberg H W, Wuttke K, Streffer C, *et al.* Radiat Res, 1991, 128:276-281

8 Verhaegen F, Vral A. Radiat Res, 1994, 139:208-213

Radiosensitivity of tumor cells predicted by the CB micronucleus assay

WANG Jufang¹ LI Wenjian¹ ZHOU Guangming¹ HE Jing¹ LI Qiang¹
DANG Bingrong¹ XIE Hongmei¹ WEI Zengquan¹ GAO Qingxiang²

1 (Institute of Modern Physics, the Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000)

2 (Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract

Radiosensitivity of tumor cells was studied by the Cytokinesis-Block(CB) micronucleus assay. The results show that radiosensitivity of tumor cells induced by heavy ions and γ -rays can be predicted with CB technique, it has the advantages of time saving and higher possibility of success. The dose response for micronuclei per binucleated cells is given by $Y=c+kD^n$ or $Y=c+\alpha D+\beta D^2$ when treated with heavy ions, and given by $Y=c+\alpha D$ in the case of γ -rays. Under the same dose, effectiveness of heavy ions is stronger than that of γ -rays.

Key words CB micronucleus assay, Tumor cells, Heavy ions, γ -rays,
Radiosensitivity

CLC Q691