文章编号:1000-5404(2006)02-0117-04

论著

人骨肉瘤细胞HOS锎-252中子放射敏感性的研究

卿 毅[1],王 东[1,2],李增鹏[2],何 怡[1,3],张沁宏[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]肿瘤中心,[2]病理科,重庆 400042;[3]解放军第44医院肿瘤科,贵阳 550009)

提 要:目的 观察锎-252中子治疗骨肉瘤的效果。**方法** 人骨肉瘤细胞HOS用铱-192γ射线和锎-252中子射线分别以不同的剂量照射,MTT法绘出细胞存活曲线,经典的克隆形成分析测算D_0、D_q和SF_2值,彗星分析法检测照射后细胞的DNA损伤情况。**结果** MTT法、克隆形成分析和彗星分析法3种方法的实验结果均表明HOS细胞对锎-252中子射线更为敏感。由克隆形成分析得到锎-252中子射线和铱-192γ射线照射HOS细胞的D_0值分别是2.80和3.34,D_q值分别是2.66和3.07,SF_2值分别是0.596和0.684。锎-252中子射线和铱-192γ射线以200、500、1 000 cGy 3个剂量照射HOS细胞后,碱性彗星尾力矩分别是(6.664±0.648)、(20.322±1.433)、(33.909±1.245)和(4.760±0.528)、(15.203±1.272)、(27.375±1.315)($P<0.05$)。**结论** 锎-252中子对HOS细胞的杀伤效果优于铱-192γ射线,说明锎-252中子放射治疗骨肉瘤可能是一种具有发展潜力的放射治疗方法。

关键词:骨肿瘤;锎-252中子;放射敏感性
中图法分类号:R730.55;R738.1 **文献标识码**:A

Radiosensitivity of human osteosarcoma cell HOS to ^{252}Cf neutron-ray

QING Yi[1], WANG Dong[1,2], LI Zeng-peng[2], HE Yi[1,3], ZHANG Qin-hong[2] ([1]Cancer Center, [2]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, [3]Department of Oncology, The 44th Hospital of PLA, Guiyang 550009, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of ^{252}Cf neutron-ray in treating human osteosarcoma. **Methods** The human osteosarcoma cell HOS was irradiated with ^{252}Cf neutron-ray and ^{192}Ir-ray at different doses. The cell-survival curve was plotted by the MTT assay. The D_0, D_q and SF_2 values were detected by the clone forming assay, and the primary DNA damage was measured quantitatively by the comet assay. **Results** Almost same results were gained from the above three methods, which showed that HOS cells were more sensitive to ^{252}Cf neutron-ray than ^{192}Ir-ray. After the irradiation of HOS by ^{252}Cf neutron-ray or ^{192}Ir-ray, the D_0 value was 2.80 *vs* 3.34, D_q value was 2.66 *vs* 3.07 and SF_2 value was 0.596 *vs* 0.684. The tail moments at 200, 500 and 1 000 cGy showed significant difference between ^{252}Cf neutron-ray and ^{192}Ir-ray ($P<0.05$). **Conclusion** The killing effect is powerful to the HOS cells by ^{252}Cf neutron-ray. The results indicate that the radiotherapy of osteosarcoma by ^{252}Cf neutron-ray is probably a potential radiotherapeutic method.

Key words: bone tumor; ^{252}Cf neutron; radiosensitivity

骨肉瘤是好发于青少年的骨原发性恶性肿瘤[1]。由于新辅助化疗和辅助放疗的应用,其5年生存率已由20年前的20%提高到50%~65%[2,3]。局部复发和远处转移仍是影响病人预后的主要原因,而放疗在肿瘤局部控制中亦有重要作用[4]。为了克服肿瘤对光子射线的抵抗,自1999年开始我院开展了锎-252中子治疗恶性肿瘤的新技术,并在宫颈癌等肿瘤的治疗中取得了较好效果[5,6]。

彗星分析法(comet assay)是一种微凝胶电泳技术,是以电泳后细胞核DNA的显微镜荧光图像而得名的,用于定量分析和测定DNA损伤[7]。这是一种可以在肉眼水平测量样品中全部单个细胞DNA损伤的方法,能够检测单个细胞DNA链的断裂,根据实验条件的不同又分为碱性和中性两种方法,分别用以检测DNA单链和双链的断裂[8]。由于DNA被广泛认为是放射损伤的决定性的靶,彗星分析法在放射生物和肿

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(2004BB5246)
Supported by the Natural Science Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2004BB5246)
作者简介:卿 毅(1977-),男,四川省资阳市人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤放疗化疗分子机制方面的研究。电话:(023)68757374
通讯作者:王 东,电话:(023)68757706, E-mail: dongwang64@hotmail.com
收稿日期:2005-07-21;**修回日期**:2005-11-04

瘤学领域的研究和应用日趋广泛。

本研究采用彗星分析法，测定、分析锎-252 中子射线和铱-192γ 射线照射后人骨肉瘤细胞 HOS 的初始 DNA 损伤及亚致死损伤修复能力对细胞放射敏感性的影响，并与经典的克隆形成分析方法相结合，观察锎-252 中子射线和铱-192γ 射线对 HOS 细胞的杀伤作用，为临床应用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

①人骨肉瘤细胞 HOS（协和细胞库）；②MEN 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶（HyClone 公司）；③MTT、DMSO（Sigma 公司）；④倒置显微镜（Olympuls 公司）；⑤倒置荧光显微镜（Leica 公司）；⑥DMN-9602 酶标分析仪（北京普朗新技术有限公司）；⑦96 孔细胞培养板、6 孔细胞培养板、5 cm 细胞培养器、细胞培养瓶（Corning 公司）；⑧CO_2 细胞培养箱（Thermo 公司）；⑨KL-HDR-C 型铱-192 后装治疗机（北京科霖众医学技术研究所）；⑩锎-252 中子后装治疗机（深圳双环灵顿科技发展有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人骨肉瘤细胞 HOS，MEM 培养基，含 10% 胎牛血清和 100 U/ml 青霉素和链霉素；置 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养。

1.2.2 细胞照射条件 铱-192 后装治疗机，平均能量为 400 kV 的 γ 射线源，半衰期为 74.2 d，以 45 cGy/min 的相对剂量率，在冰上对指数生长期的细胞进行不同剂量的照射；锎-252 中子后装治疗机，^{252}Cf 中子源平均能量为 2.3 MeV，半衰期为 2.645 年，^{252}Cf 源有效范围为 1.4 mm × 9.0 mm，体积强度为 500 μg，中子发射率为 $2.3\times10^{6}\ s^{-1}\cdot\mu g^{-1}$，γ 射线发射率为 $1.3\times10^{7}\ s^{-1}\cdot\mu g^{-1}$，空气中距离放射源 1 cm 处的中子剂量当量率为 23.4 $mSv\cdot h^{-1}\cdot mg^{-1}$，γ 射线剂量当量率为 1.6 $mGy\cdot h^{-1}\cdot mg^{-1}$，等效生物剂量（$D_{Gy\text{-}eq}$）按［中子相对生物效应（RBE）值 × 中子剂量 + γ 射线 RBE × γ 射线剂量］进行计算，对指数生长期的细胞进行不同剂量的照射。

1.2.3 MTT 法检测细胞存活率 采用不同的剂量点：0、200、400、600、800、1 000 cGy，照射后立即用 PBS 清洗 2 遍，经 0.25% 胰酶消化，制成单细胞悬液，计数后以 2.5×10^{4}/ml 的浓度，每孔 200 μl，加入 96 孔细胞培养板，每组重复 3 孔。置 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养 48 h，每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl，继续培养 4 h 后，弃去培养基，每孔加入 100 μl DMSO，置水平振荡器振摇 15 min 后，上酶标分析仪检测。

1.2.4 克隆形成分析 采用不同的剂量点：0、200、400、600、800、1 000 cGy，照射后立即用 PBS 清洗两遍，经 0.25% 胰酶消化，制成单细胞悬液，根据剂量大小调整照射前接种的细胞数，每个剂量点设 3 个平行样品（5 cm 细胞培养板）。照射后置 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养 10 ~ 14 d，无水乙醇固定、结晶紫染色，作克隆计数（每个克隆不能少于 50 个细胞），根据克隆形成率计算存活分数，最后用单靶多击数学模型［$SF=1-(1-e^{-D/D0})^{N}$］拟合细胞的存活曲线，并比较两种细胞照射 2 Gy 后的平均存活分数 SF_2、细胞的平均致死剂量 D_0 值和准域剂量 D_q 值。D_q 是存活曲线的直线部分向上延伸与通过存活率等于 1 的横轴相交点的剂量；D_0 是在剂量效应曲线的直线部分把存活率从 0.1 降至 0.037 所需的剂量。存活分数的计算公式[9]为：

$$\text{存活分数}=\frac{\text{照射后细胞形成的克隆数}}{\text{接种细胞数}\times\text{未照射细胞克隆形成率}}$$

1.2.5 碱性彗星分析法 指数生长期的 HOS 细胞分别进行 0、200、500、1 000 cGy 不同剂量的冰上照射。照射后立即用 PBS 清洗 2 遍，经 0.25% 胰酶消化，制成单细胞悬液，并稀释成 4×10^{4}/ml，与 0.5% 的低熔点琼脂糖混合后铺胶板；待胶凝固后，将玻片缓缓浸入新鲜配制的细胞溶解液（NaCl 2.5 mmol/L、Na_2EDTA 100 mmol/L、Tris base 1.2 g，调节 pH 至 10，去离子水定容至 890 ml）中，4 ℃过夜；取出玻片，放入水平电泳槽中，倒入新鲜配制的冰冷电泳缓冲应用液（10 mol/L NaOH 30 ml、200 mmol/L EDTA 5.0 ml，定容至 1 000 ml），放置 10 ~ 30 min，使 DNA 解链，然后恒压 20 V，300 mA 电泳 25 min；电泳结束后，取出玻片，置染缸，中和缓冲液浸洗（Tris base 0.4 mol/L，用浓盐酸调节 pH 至 7.5，去离子水定容至 1 000 ml），3 次 ×5 min；呈中性后，晾干玻片，10 ~ 15 μl 溴化乙锭 EB（20 μg/ml）应用液染色；荧光显微镜下观察，拍摄 ×400 照片，然后依 Olive 的方法，采用 Komet 5.5 软件进行彗星分析。分析指标为彗尾力矩（tail moment，TM），即彗星尾部的长度与尾部 DNA 百分数的乘积，通过对 DNA 单链断裂多少的分析来表达照射后细胞的 DNA 损伤程度[10]。

1.3 统计学分析

MTT 法结果用 SPSS 10.0 软件进行配对 t 检验；克隆形成分析结果用 GraphPad Prism 4.0 软件拟合细胞存活曲线；碱性彗星分析法图像分析，彗星尾力矩数据用 SPSS 10.0 软件进行配对 t 检验。

2 结果

2.1 MTT 法实验结果

HOS 细胞受锎-252 中子射线和铱-192γ 射线照射后细胞存活关系见表 1。在相同放射剂量的照射下，锎-252 中子射线比铱-192γ 射线对 HOS 细胞的杀伤作用更强，两者比较有显著性差异（$P<0.05$）。

表 1 HOS 细胞受不同剂量锎-252 中子射线和铱-192γ 射线照射与细胞存活率关系［$(\bar{x}\pm s)$%］

照射方式	照射剂量（cGy）				
	200	400	600	800	1 000
锎-252 中子射线	88.15 ± 1.8	62.95 ± 3.1	33.23 ± 2.2	13.48 ± 3.1	7.73 ± 1.9
铱-192γ 射线	93.39 ± 4.4	72.54 ± 2.9	48.54 ± 4.3	24.16 ± 3.6	14.87 ± 2.9
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.2 克隆形成分析

锎-252 中子射线和铱-192γ 射线照射后，用经典的克隆形成分析法和单靶多击数学模型 $SF=1-(1-e^{-D/D0})^{N}$ 经 GraphPad Prism 4.0 软件拟合 HOS 细胞的剂量效应曲线，见图 1（半对数坐标图）。由此得到锎-252 中子射线和铱-192γ 射线照射

HOS 细胞后,其 D_0 值分别为 2.80 和 3.34,D_q 值分别为 2.66 和 3.07,SF_2 值分别是 0.596 和 0.684。

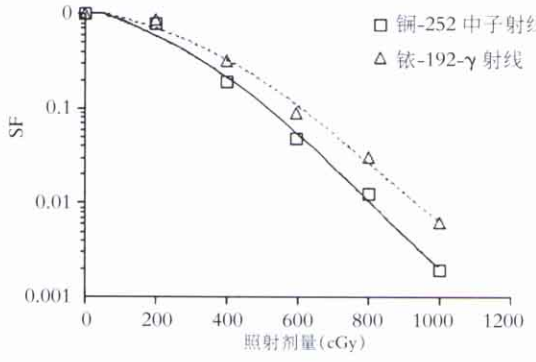


图 1　锎-252 中子射线和铱-192γ 射线照射后 HOS 细胞剂量效应曲线

2.3　碱性彗星分析法

各组彗星图像见图 2,其尾力矩及比较分析结果见表 2。未受照射的对照组 HOS 细胞的尾力矩很小,仅有少量细胞有小的"彗星"形成。锎-252 中子射线和铱-192γ 射线照射 HOS 细胞后,其彗星尾力矩值之间存在显著性差异($P<0.05$)。

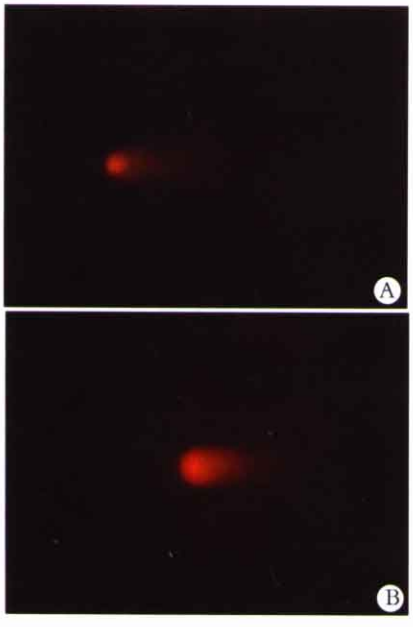


图 2　HOS 细胞经 10 Gy 锎-252 中子射线(A)和铱-192γ 射线(B)照射后的彗星图像　(荧光显微镜×400)

表 2　锎-252 中子射线和铱-192γ 射线照射对 HOS 细胞的 DNA 初始损伤($\bar{x}\pm s$)

照射方式	照射剂量(cGY)			
	0	20	50	1000
锎-252 中子射线	3.499±0.510	6.664±0.648	20.322±1.433	33.909±1.245
铱-192-γ 射线	3.511±0.535	4.760±0.528	15.203±1.272	27.375±1.315
t	−0.071	9.824	12.45	15.454
P	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

3　讨论

放射治疗是恶性肿瘤的主要治疗手段之一,约有 80% 的肿瘤患者都需要接受放射治疗。但由于肿瘤内的乏氧细胞及骨肉瘤、恶性黑色素瘤等肿瘤对常规 X 射线、γ 射线不敏感,在正常组织耐受限度内大块肿瘤及晚期肿瘤效果较差,因此有必要寻找一种新的射线以有效地提高肿瘤局部控制率及患者生存率,最有希望的射线之一就是中子射线,目前主要应用形式为 ^{252}Cf中子后装治疗。

锎-252(Californium-252,^{252}Cf)是一种人工放射性同位素,首先是在 1952 年美国第一次氢弹爆炸的尘埃中发现,并于 1958 年在美国加州大学 Laurence Berkeley 实验室首次人工合成。此后进行了一系列的放射物理、放射生物及临床研究。中子射线属于高直线能量转换(liner energy transfer,LET)射线,具有独特的放射生物学特性,如较高的相对生物效应,对细胞周期依赖性小、氧增强比值低、癌细胞受照射后潜在致死性损伤不容易修复等,因此被认为是一种极具应用前景的放疗方法。

本研究结果显示:克隆形成分析的参数 D_0(平均致死剂量)用于描述直线部分的放射敏感性,D_0 值愈大,细胞对放射愈抗拒;参数 D_q(准域剂量)是一个测量肩宽的参数,反应细胞亚致死损伤修复能力的大小,D_q 值愈小,表明细胞对亚致死损伤修复能力修复能力较弱[9],由表 2 结果说明 HOS 细胞对锎-252 中子射线更为敏感。表 3 数据显示锎-252 中子射线照射后 HOS 细胞的 DNA 单链断裂明显高于铱-192γ 射线照射后 HOS 细胞的单链断裂,说明锎-252 中子射线对 HOS 细胞的 DNA 损伤作用更强,HOS 细胞对锎-252 中子射线更为敏感。通过 MTT 法、克隆形成分析和彗星分析法这 3 种不同的实验方法研究表明,锎-252 中子射线比铱-192γ 射线更能造成 HOS 细胞的 DNA 损伤和断裂,对 HOS 细胞的杀伤作用更强。

本实验中,锎-252 中子射线对 HOS 细胞的杀伤作用明显高于铱-192γ 射线。HOS 细胞对铱-192γ 射线敏感性低,但却对中子射线较为敏感,这可能是由于锎-252 中子射线是高 LET 射线。高 LET 射线为一种密集电离射线,不仅直接破坏 DNA,而且还损伤细胞的其他结构,导致复杂的 DNA 损伤群,这种 DNA 损伤群不仅不易修复并有可能造成错配修复或损伤固定[11,12]。高 LET 的中子射线相对于低 LET 的 γ 射线,其诱导细胞凋亡的相对生物效应是 γ 射线的 3~4 倍,Hendry 等[13]的研究结果已经证实了这一点。高 LET 的中子射线的放射敏感性随细胞周期的时相变化

小[14]，细胞周期处于不同时相，其放射敏感性不同，处于晚S相和G_1相的肿瘤细胞具有放射抗性，而增殖期细胞对放射的敏感性更高，但对于高LET射线，这种抗性的差别并不明显，晚S相和G_1相细胞反而更容易遭受高LET射线的损伤。

综上所述，锎-252中子射线在某些肿瘤的放射治疗上具有一定的优势，尤其是对骨肉瘤、恶性黑色素瘤等光子射线照射抗拒的恶性肿瘤。但它作为一种新兴的放射治疗方式，还需要做更多更进一步的研究，以规范锎-252中子放射治疗，提高其治疗肿瘤的治愈率。

参考文献：

[1] WANG D, LUO M, KELLY M R. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(6): 679-686.

[2] 杨迪生，范顺武，陶惠民，等. 骨肉瘤辅助化疗方案中、远期疗效观察[J]. 中华骨科杂志，2001，20(1)：31-35.

[3] OYA N, KOKUBO M, MIZOWAKI T, *et al*. Definitive intraoperative very high-dose radiotherapy for localized osteosarcoma in the extremities[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, 51(1): 87-93.

[4] DELANEY T F, PARK L, GOLDBERG S I, *et al*. Radiotherapy for local control of osteosarcoma[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, 61(2): 492-498.

[5] 单锦露，雷 新，王 东，等. ^{252}Cf中子腔内后装加盆腔外照射治疗子宫颈癌临床分析[J]. 中华妇产科杂志，2005，40(4)：223-226.

[6] 郑秀惠，陈竹钦，李 力，等. 252锎中子放疗对宫颈癌细胞凋亡及bcl-2、bax的影响[J]. 第三军医大学学报，2005，27(19)：1957-1959.

[7] KONCA K, LANKOFF A, BANASIK A, *et al*. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay[J]. Mutat Res, 2003, 534(1-2), 15-20.

[8] BRAMMER I, ZOLLER M, DIKOMEY E. Relationship between cellular radiosensitivity and DNA damage measured by comet assay in human normal, NBS and AT fibroblast[J]. Int J Radiat Oncol Biol, 2001, 77(9): 929-938.

[9] 沈 瑜，糜福顺. 肿瘤放射生物学[M]. 北京：中国医药科技出版社，2001：60-64.

[10] OLIVE P L. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology[J]. Int J Radiat Biol, 1999, 75(4): 395-405.

[11] POLLER F, BAUCH T, SAUERWEIN W, *et al*. Comet assay study of DNA damage and repair of tumour cells following boron neutron capture irradiation with fast d(14) + Be neutrons[J]. Int J Radiat Biol, 1996, 70(5): 593-602.

[12] PEAK M J, WANG L, HILL C K, *et al*. Comparison of repair of DNA double-strand breaks caused by neutron or gamma radiation in cultured human cells[J]. Int J Radiat Biol, 1991, 60(6): 891-898.

[13] HENDRY J H, POTTEN C S, MERRITT A. Apoptosis induced by high- and low-LET radiations[J]. Radiat Environ Biophys, 1995, 34(1): 59-62.

[14] SCHWARTZ D L, EINCK J, BELLON J, *et al*. Fast neutron radiotherapy for soft tissue and cartilaginous sarcomas at high risk for local recurrence[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, 50(2): 449-456.

（编辑 薛国文）

关于计量单位的使用

在医学领域中几乎时时处处都离不开计量单位。国务院于1984-02-27公布了《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》和《中华人民共和国法定计量单位》。1993-12-27国家技术监督局发布了《量和单位》国家强制标准，全国必须统一采用的计量单位。

我国的法定计量单位包括：①国际单位制的基本单位，如长度(m)、质量(kg)、时间(s)等；②国际单位制的辅助单位；③国际单位制中具有专门名称的导出单位，如频率(Hz)、压力(Pa)、能量(J)；④国家选定的非国际单位制单位，如时间(min、h、d)、转速(r/min)；⑤由以上单位构成的组合形式单位，如速度(m/s)、浓度(mol/L)；⑥由词头和以上单位所构成的倍数和分数单位，如μm、kPa、ml等。在医学写作时必须严格执行国务院的命令和有关的国家标准。

各种单位除在无数值的叙述性文字中和科普读物中可使用中文名称或中文符号外，均应使用符号。单位符号都是正体拉丁和希腊字母，无复数形式，符号后不附加圆点(正常语法各字尾标点符号除外)。来源于人名的单位，例如：Pa、Gy、W等和10^6以上的词头，例如：M、G、T等的首字母大写以外均为小写，容积"升"的符号可用大写(L)也可用小写(l)，一般在单独使用不加词头时用大写。数值与单位符号之间、单位符号与相邻的其他符号(例如：化学元素符号)之间应留半个阿拉伯数字空隙，词头与其所组合的单位符号之间不需空隙。词头不能单独使用，也不能重叠使用(例如："mμm"应为"nm")。

本刊编辑部