论著

文章编号:1000-5404(2012)11-1026-05

低剂量超微分割与常规分割放疗对脑胶质瘤细胞的生物学效应比较

陈媛媛[1],汤金梁[1],龙海霞[2],李光辉[2],许建平[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院:病理科[1],肿瘤科[2])

[摘要] **目的** 比较低剂量超微分割放疗与常规分割放疗对脑胶质瘤细胞的作用效果。**方法** 以低剂量率超微分割放疗(每0.2 Gy间隔3 min,剂量率为0.066 7 Gy/min)和常规分割(剂量率4~6 Gy/min)2种方法照射脑胶质瘤GL261细胞,分别在第1、2、3天采用彗星分析和流式细胞分析检测细胞DNA损伤、凋亡、细胞周期分布。**结果** 彗星实验显示低剂量率超微分割放疗可产生与常规分割等效的细胞DNA损伤,2组间各时间点彗星荧光图像的尾部DNA百分含量(tail DNA%)、尾长(tail length)、尾距(tail moment)均数差异无显著性($P>0.05$)。细胞凋亡、存活情况显示超微分割组各时间点的细胞存活率较常规分割组低,差异有显著性($P<0.01$),2组细胞周期分布差异无显著性($P>0.05$)。**结论** 低剂量率超微分割放疗对脑胶质瘤细胞GL261可产生与常规分割等效的DNA损伤,但对细胞的杀伤作用强于常规分割照射。该现象可能与低剂量率超微分割照射胶质瘤细胞后有不同的DNA损伤修复机制有关。

[关键词] 神经胶质瘤;放射治疗剂量;细胞凋亡;DNA损伤

[中图法分类号] R730.23; R730.55; R739.41 [文献标志码] A

Biological effect of ultra-microfractionated *vs* conventional radiotherapy on glioma cells

Chen Yuanyuan[1], Tang Jinliang[1], Long Haixia[2], Li Guanghui[2], Xu Jianping[1] ([1]Department of Pathology, [2]Department of Oncology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To compare the effect of ultra-microfractionated and conventional radiotherapy on glioma cells (GL261 cells). **Methods** GL261 cells underwent ultra-microfractionated radiotherapy at an interval of 3 min for each 0.2 Gy with a dose rate of 0.066 7 Gy/min and conventional radiotherapy at a dose rate of 4 to 6 Gy/min. Distribution of cell DNA damage, apoptosis and cell cycle was detected by comet assay and flow cytometry, respectively, on days 1, 2 and 3 after treatment. **Results** Comet assay showed that ultra-microfractionated and conventional radiotherapy could cause similar DNA damages in GL261 cells. No significant difference was found in comet tail DNA %, tail length and tail moment at different time points between the two groups ($P>0.05$). Flow cytometry showed that the cell survival rate was significantly lower at different time points after ultra-microfractionated radiotherapy than after conventional radiotherapy ($P<0.01$). No significant difference was observed in distribution of cell cycle between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** Ultra-microfractionated and conventional radiotherapy cause similar DNA damages in GL261 cells. However, the killing effect of ultra-microfractionated radiotherapy on GL261 cells is significantly stronger than that of conventional radiotherapy, which may be due to the difference in their DNA repairing mechanism.

[**Key words**] glioma; radiotherapy dosage; apoptosis; DNA damage

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30973074) and the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2009BB5152). Corresponding author:Li Guanghui,Tel:86-23-68774391,E-mail: liguanghui_2000@yahoo.com.cn; Xu Jianping,Tel:86-23-68755641,E-mail:xujianping33@sina.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30973074);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5152)

[通信作者] 李光辉,电话:(023)68774391,E-mail: liguanghui_2000@yahoo.com.cn

许建平,电话:(023)68755641,E-mail: xujianping33@sina.com.cn

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,占颅内肿瘤的40%~60%。通过手术、放疗、化疗、分子靶向治疗等手段的综合治疗,其中位生存时间约为14个月,总体预后差。放疗是恶性胶质瘤的重要治疗手段,是常用于恶性胶质瘤的术后辅助治疗及不能手术患者的主要治疗方法。受制于正常脑组织的重要功能及有限的耐受剂量,术后辅助放疗及未手术者的根治性放疗疗效有限,难以控制肿瘤的复发及局部侵犯。研究显示在多种肿瘤细胞存在低剂量超敏现象。我们对目前的常规剂量分割进行了革新,采用了超微分割放疗技术,该方法是一种基于低剂量超敏反应和亚致死性损伤修复等原理基础上的放疗方法[1-2]。把常规分割的剂量分成若干小份分别间隔一定时间给予。本研究拟通过体外实验比较超微分割放疗与常规分割对脑胶质瘤细胞的作用,试图对临床脑胶质瘤患者的放疗方法选择给予一些启示。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

脑胶质瘤GL261细胞购自中科院上海细胞库;正常熔点琼脂糖和低熔点琼脂糖购自Sigma公司;Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、CCK-8试剂盒购自碧云天公司;放疗设备为成都利尼科公司Accstar-ZXD利尼科直线加速器,射线能量为4 MeV- 电子线。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和处理 将GL261细胞常规培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中贴壁生长,置37 ℃、5% CO_2培养箱中培养,用0.25%胰蛋白酶消化传代。取12瓶对数生长期细胞,分为对照组、超微分割组和常规分割组,每组4瓶细胞,共照射4 d。超微分割组给予0.6 Gy照射,每0.2 Gy间隔3 min,常规分割组给予0.6 Gy电子线一次性照射,在照射开始后的第1、2、3天各组分别取出1瓶细胞,对照组也取出1瓶细胞进行彗星实验、凋亡流式检测和细胞周期检测。

1.2.2 彗星实验

1.2.2.1 细胞悬液制备 把细胞培养液吸出至离心管内,PBS洗涤1次,加入适量的0.25%胰酶消化,室温孵育至可以使细胞吹打下来时,吸除胰酶,加入上述收集的细胞培养液,轻轻吹打细胞后,转移至离心管,1 000×g离心5 min,弃上清,用PBS轻轻重悬并计数调整细胞密度至10^6/ml,放入冰浴中备用。

1.2.2.2 制片 底层胶片:0.8%的NMPA加热融化,浸泡磨砂玻片,自然晾干备用。顶层胶片:细胞悬液60 μl,加入200 μl 37 ℃ 0.7% LMPA,混匀,取适量滴于胶片上,立即盖上盖玻片。固化:4 ℃避光,固化10 min。

1.2.2.3 裂解 玻片浸于新鲜配制并预冷的细胞裂解液中,4 ℃避光1 h。

1.2.2.4 解旋 取出玻片,纸巾吸去玻片上残留的液体,加新鲜配制的电泳缓冲液至高于玻片表面,4 ℃避光,解旋20 min。

1.2.2.5 电泳 调节电压25 V,调整液面高度使电流达到300 mA,放入玻片,避光,电泳20 min。

1.2.2.6 中和漂洗 取出玻片,中和缓冲液浸泡5 min,2~3次,以中和强碱。

1.2.2.7 染色 50 μl EB染色后尽快在荧光显微镜下观察,每组随机取50~100个细胞,用CASP分析软件进行分析。把细胞培养液吸出至一合适离心管内,PBS洗涤贴壁细胞1次,加入适量胰酶细胞消化液。

1.2.3 Annexin V-FITC细胞凋亡检测 ①把细胞培养液吸出至离心管内,PBS洗涤1次,加入适量胰酶细胞消化液,室温孵育至轻轻吹打可以使细胞吹打下来时,吸除胰酶细胞消化液。②加入步骤①收集的细胞培养液,稍混匀,转移到离心管内,1 000×g离心5 min,弃上清,收集细胞,用PBS轻轻重悬细胞并计数。③取5万~10万重悬的细胞,1 000×g离心5 min,弃上清,加入195 μl Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞。④加入5 μl Annexin V-FITC,轻轻混匀。⑤室温(20~25 ℃)避光孵育10 min。⑥1 000×g离心5 min,弃上清,加入190 μl Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞。⑦加入10 μl碘化丙啶染色液,轻轻混匀,流式细胞仪检测。

1.2.4 周期检测 PBS洗涤细胞后加入胰酶消化,1 000 r/min离心5 min,弃上清,收集细胞,用少量PBS轻轻重悬后,滴加到70%预冷乙醇中,吹打均匀,4 ℃固定24 h以上。PBS洗涤去乙醇,1 000 r/min, 5 min,洗2遍,0.5 ml PBS重悬细胞,加入PI和RNaseA至终浓度50 μg/ml,37 ℃温浴30 min,用流式细胞仪测定周期。

1.3 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件,彗星实验结果以$\bar{x} \pm s$表示,采用t检验。Annexin V-FITC细胞凋亡检测结果用χ^2检验。

2 结果

2.1 彗星实验

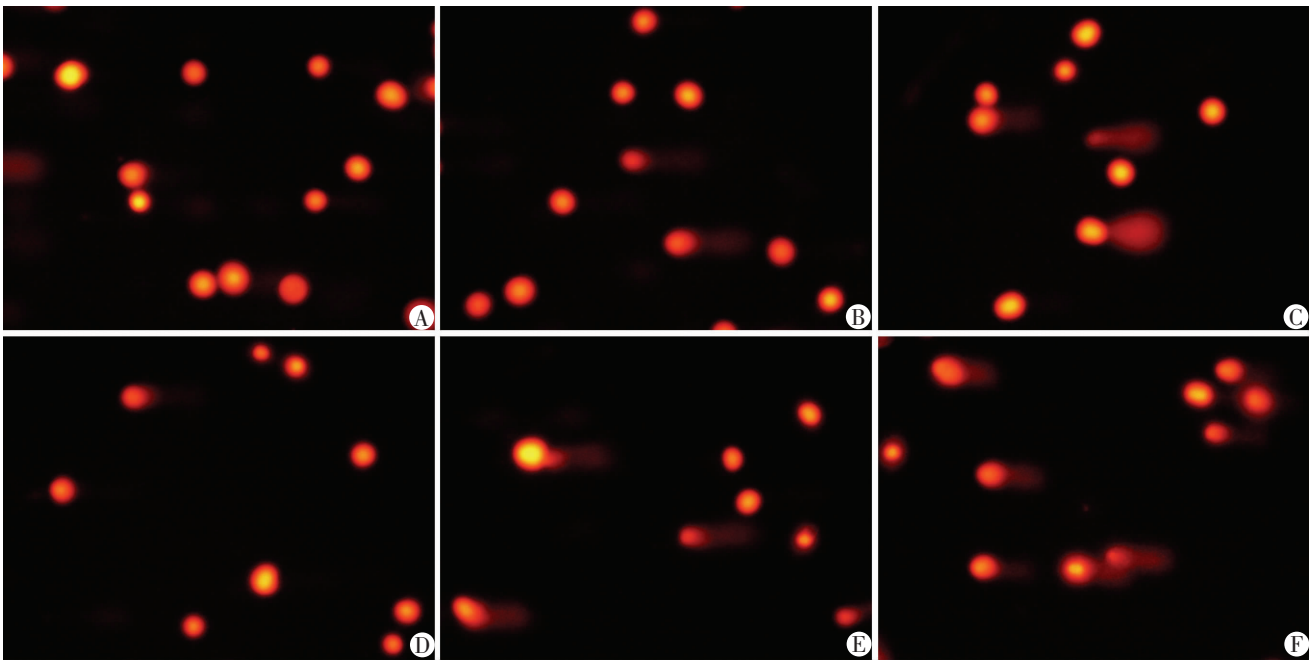
超微分割和常规分割组细胞放疗后DNA碎片均随放疗天数延长而增加,彗星荧光图像尾长(tail length)、尾距(tail moment)随时间迁移依次呈明显的增长趋势。超微分割组与常规分割组比较,彗星荧光图像的尾部DNA百分含量(tail DNA%)、尾长、尾距第1、2、3天差异均无显著性($P>0.05$)。见图1。

2.2 Annexin V-FITC细胞凋亡检测

超微分割组在放疗第1、2、3天细胞存活率分别为72.1%、70.5%和51.3%;常规分割组3 d的细胞存活率分别为80.8%、80.5%和70.0%,2组比较差异有显著性($P<0.01$)。见图2。

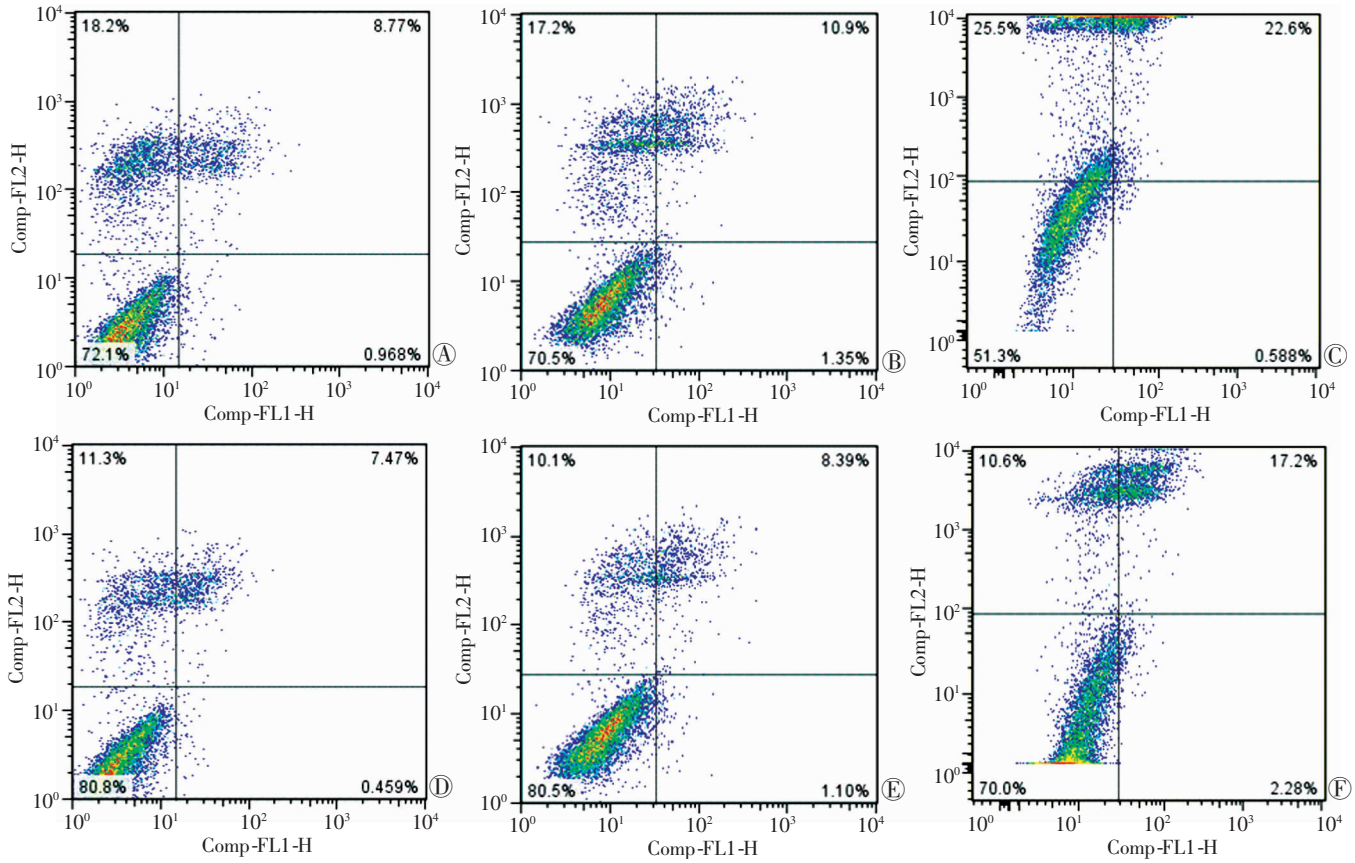
2.3 细胞周期检测

超微分割组与常规分割组相比各时间点细胞周期差异无显著性,见图3。



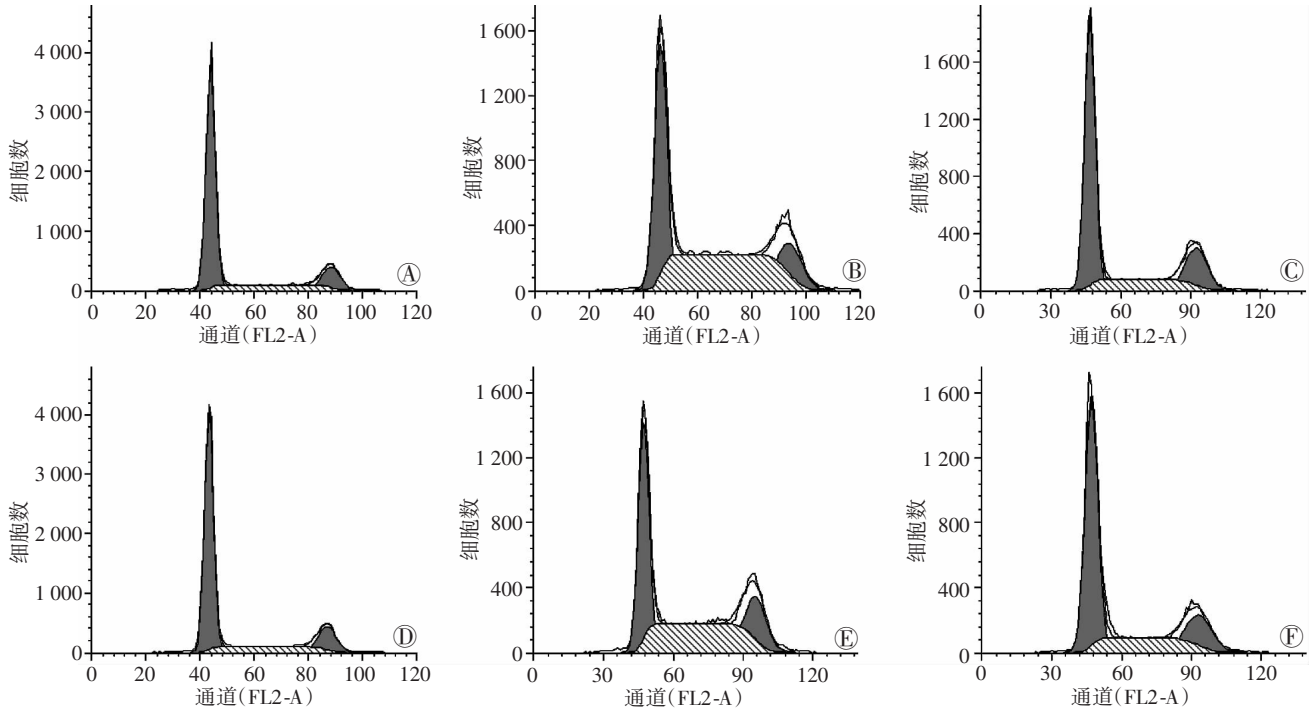
A～C:超微分割组第1、2、3天;D～F:常规分割组第1、2、3天

图1 2组细胞照射后不同时间彗星荧光图像 (×200)



A～C:超微分割组第1、2、3天;D～F:常规分割组第1、2、3天

图2 流式细胞仪检测2组细胞凋亡和存活情况



A～C:超微分割组第1、2、3天;D～F:常规分割组第1、2、3天

图3 流式细胞仪检测2组细胞周期

3 讨论

通过近十年手术、放疗、化疗和分子靶向治疗的进步,恶性胶质瘤中位生存时间也仅从12个月提高到14.6个月,其总体预后差的现状并没有改变。放射治疗是恶性胶质瘤的主要治疗手段之一。新的放疗技术如适形调强放疗和立体定向放射治疗对恶性胶质瘤靶区拥有更好的适形度,允许给予恶性胶质瘤病灶更高的单次剂量和总剂量[3]。然而这两项放疗技术并没有带来恶性胶质瘤患者总生存时间的显著获益[4]。如何进一步提高放疗对恶性胶质瘤的疗效是当前的研究热点之一。有文献报道在多种肿瘤细胞存在一种低剂量超敏现象,即肿瘤细胞在稍高剂量如0.5～1 Gy的低LET射线照射时表现出放射耐受性增高,而在低剂量(0.1～0.5 Gy)照射后表现为高敏感的杀伤效应[5-7]。在放射抗拒的胶质瘤细胞株T98G、HGL21细胞中观察到,在给予低于0.5 Gy以下的剂量照射时,胶质瘤细胞出现较高剂量照射时更高的单位剂量杀伤效应[8-9]。Beauchesne等[10]对31例不能手术的恶性胶质瘤患者采用了每天3次,每次0.75 Gy,间隔4 h的超分割三维适形放疗方式治疗,总照射剂量为67.5 Gy。结果显示患者的无进展生存时间和总生存时间均高于常规分割的三维适形放疗。由此,本研究利用肿瘤细胞的低剂量超敏现象,对目前常用的放疗剂量分割方式进行了改进。将原2 Gy/次的常规分割进一步分为0.2 Gy×10次的超微分割,每个超微分割间间隔3 min,将原4～6 Gy/min高剂量输出的射线调整为0.066 7 Gy/min的低剂量输出。

本研究分组对脑胶质瘤细胞进行超微分割及常规分割放疗2种处理,之后通过彗星分析检测细胞DNA损伤[11-12],结果显示2组细胞DNA各时间点tail DNA%、tail length、tail moment比较无显著差异。说明上述2种照射方式对脑胶质瘤细胞的DNA损伤程度相同。电离辐射作用于细胞的关键靶点在于对细胞DNA的损伤,包括双链断裂损伤、单链断裂损伤和碱基损伤。对低线性传能密度的高能X线、γ线而言,造成细胞DNA损伤的程度与射线的剂量正相关。2组细胞每天给的放疗总剂量相同,引起的细胞损伤程度也应该是等同的。该结果提示相同剂量的低剂量率超微分割照射对胶质瘤细胞DNA的损伤能达到常规高剂量率照射相同的效果。

本研究细胞凋亡、存活情况的流式分析结果显示,超微分割组各时间点的细胞存活率较常规分割组均较低,有显著差异($P<0.01$)。说明低剂量超微分割照射具有对胶质瘤细胞更强的杀伤作用。细胞在放射损伤后的存活与细胞的损伤修复机制相关,其中包括DNA双链断裂损伤修复、单链断裂修复和碱基损伤修复。结合彗星分析和流式分析检测结果,在致损伤程度相同的情况下出现胶质瘤细胞存活有显著差异的现象,考虑与细胞损伤后的修复有

关。结果提示低剂量率超微分割照射组细胞较常规分割组的损伤后修复能力下降。

电离辐射引起的DNA损伤主要有3种类型,即单链断裂(SSB)、双链断裂(DSB)和碱基损伤(BD),其中双链断裂(DSB)是诱发细胞学反应最为复杂、生物学后果最为严重、与恶性肿瘤等关系最为密切的损伤类型,DSB能够激活ATM/ATR,通过磷酸化其下游相关蛋白,调节细胞周期,使损伤的DNA得以修复[13]。本研究细胞周期检测显示2组的细胞周期无显著差异,从侧面提示胶质瘤细胞在两种放疗方式照射后细胞的DNA双链断裂修复相似,其DNA修复的主要差异可能在于胶质瘤细胞在两种放疗方式照射后DNA的单链断裂修复、碱基损伤修复存在差异有关[14]。

根据本研究对低剂量率超微分割照射对胶质瘤细胞的杀伤效应初步观察可知,该种放疗技术可能为胶质瘤的治疗带来一种新的选择。其具体机制及对正常组织的生物学效应还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Hanisch P H, Furre T, Olsen D R, *et al*. Radiobiological responses for two cell lines following continuous low dose-rate (CLDR) and pulsed dose rate (PDR) brachytherapy[J]. Acta Oncol, 2007, 46(5): 602-611.

[2] Enns L, Bogen K T, Wizniak J, *et al*. Low-dose radiation hypersensitivity is associated with p53-dependent apoptosis[J]. Mol Cancer Res, 2004, 2(10): 557-566.

[3] Clarke J, Butowski N, Chang S. Recent advances in therapy for glioblastoma[J]. Arch Neurol, 2010, 67(3): 279-283.

[4] Marcu L G. Altered fractionation in radiotherapy: from radiobiological rationale to therapeutic gain[J]. Cancer Treat Rev, 2010, 36(8): 606-614.

[5] 叶建明, 李金高. 低剂量放射超敏感性及其临床意义[J]. 实用癌症杂志, 2007, 22(6): 671-673.

[6] 欧广飞, 王绿化, 杨伟志. 低剂量超敏感性在分次放射治疗中的意义[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2003, 12(1): 40-45.

[7] Valentini V, Massaccesi M, Balducci M, *et al*. Low-dose hyperradiosensitivity: is there a place for future investigation in clinical settings?[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010, 76(2): 535-539.

[8] Harney J, Short S C, Shah N, *et al*. Low dose hyper-radiosensitivity in metastatic tumors[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 59(4): 1190-1195.

[9] Kreder N C, ten-Cate R, Rodermond H M, *et al*. Cellular response to pulsed low-dose rate irradiation in X-ray sensitive hamster mutant cell lines[J]. J Radiat Res (Tokyo), 2004, 45(3): 385-391.

[10] Beauchesne P, Bernier V, Carnin C, *et al*. Prolonged survival for patients with newly diagnosed, inoperable glioblastoma with 3-times daily ultrafractionated radiation therapy[J]. Neuro Oncol, 2010, 12(6): 595-602.

[11] 肖琳, 王松, 王凡. 应用彗星试验检测细胞DNA损伤的原理与方法[J]. 四川解剖学杂志, 2005, 12(1): 40-42.

[12] Carlsson J, Hakansson E, Eriksson V, *et al*. Early effects of low dose-rate radiation on cultured tumor cells[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2003, 18(4): 663-670.

[13] 盛方军, 曹建平. ATM参与细胞周期调控分子机制的研究进展[J]. 国外医学: 遗传学分册, 2005, 28(2): 69-71, 90.

[14] Sheehan J P, Shaffrey M E, Gupta B, *et al*. Improving the radiosensitivity of radioresistant and hypoxic glioblastoma[J]. Future Oncol, 2010, 6(10): 1591-1601.

(**收稿**:2012-03-08;**修回**:2012-03-13)

(编辑 张 维)

《第三军医大学学报》跃升综合性医药卫生核心期刊表第二位

近日,2011年版《中文核心期刊要目总览》(《总览》)面世,新版《总览》对各学科期刊的被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被重要检索工具收录、基金论文比、WEB下载量等指标进行统计分析,在行加权平均的基础上,进行专家测评,按综合评价结果进行排序。《第三军医大学学报》在239种综合性医药卫生类期刊中脱颖而出,位列第二,位列第一的是《中华医学杂志》。

《中文核心期刊要目总览》由北京大学图书馆于1992年研制出版,每4年出版1次,其评价方法为分学科、多指标综合评价,并将定量和定性评价相结合。其定量评价指标体系包括被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被重要检索工具收录、基金论文比、WEB下载量等;并建立多指标综合评价数学模型进行运算,得到综合评价期刊隶属度,将期刊按隶属度降序排列,得到定量统计的综合评价期刊排序表。《总览》定性评价方法为,选聘各学科评审专家,通过网络进行专家测评。《总览》以定量评价为依据,以专家定性评审为补充,对期刊进行全面、综合、客观的评价,得到了各界人士的认同,成为期刊学术水平和办刊质量的重要评价工具。

《第三军医大学学报》在校部首长、全校科技人员的支持下,在编委会、编辑部的不懈努力下,期刊学术水平稳步提升,编校质量稳定,才得以在激烈的竞争中取得优异成绩,自1992年入选《总览》以来,在综合性医药卫生类期刊的排名逐步攀升,2004年排名第五,2008年位列第三,2011年跃升至第二位。