

肿瘤病人皮肤成纤维细胞离体培养 及放射敏感性测定

朱涵能 刘元霞 冯 炎⁽¹⁾ 史剑慧 程文英

(上海医科大学放射医学研究所 上海 200032)

⁽¹⁾(上海医科大学肿瘤医院放疗科 上海 200032)

摘要 试图通过对肿瘤病人皮肤成纤维细胞的离体培养和集落形成实验,检测正常皮肤组织的放射敏感性,为探索正常组织的辐射耐受性提供理论依据。运用组织贴块法体外培养肿瘤病人皮肤成纤维细胞;采用¹³⁷Cs γ 射线,不同剂量照射,以克隆形成法测定细胞的放射敏感性。结果表明,肿瘤病人皮肤成纤维细胞通过体外培养能够增殖传代,不同肿瘤病人皮肤成纤维细胞的放射敏感性存在明显的个体差异。

关键词 皮肤成纤维细胞,体外培养,放射敏感性

肿瘤放射治疗剂量的增加和疗效有一定关系,但常受到所在正常组织辐射耐受性的限制。由于个体皮肤组织放射敏感性的差异,某一确定辐射治疗剂量的照射,容易造成敏感病人受照周围正常皮肤组织的损伤,引起副作用。本实验通过离体培养肿瘤病人皮肤成纤维细胞,以细胞存活曲线实验测定辐射敏感性,以了解病人个体差异。

1 材 料 和 方 法

1.1 成纤维细胞原代培养

皮肤活检标本由上海医科大学肿瘤医院提供,为未经放疗及其它治疗的腹部皮肤。肿瘤病人年龄分布为 29~70 岁,平均 60 岁。活检皮肤标本在 6h 之内用 HBSS 液清洗,除去皮下组织与表皮,留真皮层。在含 25% 新生小牛血清 RPMI 1640 培养液中浸泡 2min 后,剪碎接种于培养瓶底部,37°C CO₂ 培养箱中培养 14d,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2 成纤维细胞存活曲线

取指数生长期的第 3 代成纤维细胞,消化,计数,按辐射剂量大小,分别接种适量细胞于 6cm² 培养皿,每组 4 份,照射 0、1、2、4、6Gy,置 37°C 5% CO₂ 培养箱中培养 14d 后倾去培养液,用无水乙醇龙胆紫液固定染色,计数细胞数大于等于 50 的克隆数。以每次实验的 0Gy 组计算克隆形成率 PE, PE = 形成克隆数 / 接种的细胞数;细胞存活率, SF = 受照后克隆数 / 接种细胞数 \times 克隆形成率; $D_q = D_0 \ln N$ 所得细胞存活数据用 Sigma Plot⁴¹ 软件处理,式中 D_q 与 D_0 是表达细胞放射敏感性的主要参数, D_q 表示剂量存活曲线的肩区, D_0 表示细胞存活曲线斜率的倒数, N 表示外推值,照射源为上海医科大学放射医学研究所¹³⁷Cs 源,为 Cammacell-40 型,中心最大剂量率为 1.12Gy/min。

国家卫生部科学基金资助课题 (编号:96-1-159)

收稿日期:初稿 1998-11-12, 修回 1999-03-08

1.3 数据处理

χ^2 检验统计学差别, 变异系数 $CV = s/\bar{x} \times 100\%$ 计算, 其中 s 为标准差, \bar{x} 为平均数。

2 结果

对 13 例肿瘤病人活检标本所得的皮肤成纤维细胞进行放射敏感性的实验研究, 实验所得的各例细胞存活曲线参数如下表。

Tab. 1 Survival curve parameter of human normal skin fibroblast

Number	PE/%	SF ₂	N	D _q /Gy	D ₀ /Gy
1	21.5	0.19	1.49	0.39	0.97
2	20.5	0.18	5.55	1.03	0.60
3	62.0	0.30	4.91	1.19	0.75
4	17.0	0.31	1.16	0.23	1.56
5	36.5	0.19	1.50	0.40	0.99
6	14.5	0.29	1.32	0.33	1.20
7	29.4	0.18	1.31	0.28	1.02
8	31.0	0.13	1.33	0.25	0.87
9	26.8	0.22	1.28	0.29	1.17
10	24.3	0.13	1.20	0.16	0.90
11	26.3	0.37	1.91	0.85	1.31
12	23.0	0.21	2.14	0.68	0.89
13	11.0	0.16	1.82	0.30	0.50
Average	26.37	0.24	2.07	0.49	0.98
Standard Deviation	12.70	0.08	1.44	0.34	0.29
CV/%	48.16	31.25	69.57	69.39	29.59

上表结果表明, 13 例人皮肤成纤维细胞的细胞克隆形成率(PE)为 11%~62%, 平均为 26.37%, 变异系数为 48.16%。SF₂ 是指 2Gy¹³⁷Cs γ 射线照射后的存活分数, 是反映细胞对射线敏感性的重要指标之一。结果显示, 13 例人体皮肤成纤维细胞的 SF₂ 值从 0.13~0.37, 平均为 0.24, 变异系数为 31.25%, 说明个体之间的差异较大; 外推值 N 是由曲线的直线部分延长与纵轴相交点的值, 表中所示 N 值均为游移不定, 而且不是整数。D_q 可表示亚致死损伤修复能力, 表中 D_q 值数据不同, 表明各细胞株的辐射损伤修复能力具有差异; D₀ 也表示细胞的放射敏感性, 最低为 0.50Gy, 最高为 1.56Gy, 其平均为 0.98Gy, 也同样说明在 13 例试验标本中, 各被试对象所表现的放射敏感性差别较大。因此, 本试验结果表明: 不同病人的成纤维细胞的放射敏感性不同, 各个体间存在着显著性的差异, 为临床设计不同的放射治疗方案提供实验依据。

3 讨论

Dahlberg^[1]等研究表明肿瘤细胞的内在放射敏感性与宿主的遗传因素相关, 宿主正常细胞的内在放射敏感性可在一定程度上反映宿主肿瘤细胞的放射敏感性。肿瘤病人的皮肤成纤维细胞是研究宿主肿瘤细胞放射敏感性的理想标本, 具有取样方便、方法简单、费用少的优点。

Burnet^[2]的工作表明人成纤维细胞具有较宽的辐射敏感性范围, 其离体培养的细胞辐射敏感性

与正常在体组织反应具有良好的相关性。Geara^[3]和 Begg^[4]的研究表明成纤维细胞的 F₂ 与皮肤、骨组织与粘膜组织的后期效应有显著联系。Johanson^[5]于 1994 年研究人皮肤成纤维细胞的辐射敏感性与皮下纤维变性的临床表现两者之间存在着正相关。

为此,本研究采用了组织块接种法对 13 例肿瘤病人的皮肤成纤维细胞进行了原代体外培养,并运用克隆形成法进行放射存活曲线参数分析。从细胞培养方法来看,能够培养传代,可用于评估放射敏感性等研究。细胞存活曲线是表达辐射吸收剂量与‘存活’细胞数之间的定量关系,存活细胞的增殖能力随辐射剂量增高呈指数性降低,从表中可见,13 例病人皮肤成纤维细胞的存活曲线参数,各个体间存在着显著性的差异,如上述存活曲线参数制成曲线,都表现为肩区和随后的直线两部分,与大多数哺乳动物离体细胞实验相仿^[6,7]。本结果文献^[3~5]的报道相一致。研究表明,不同肿瘤病人的反映成纤维细胞辐射敏感性不同,体外培养成纤维细胞的辐射存活曲线参数分析,可在一定程度上反映宿主正常组织的放射敏感性,如能改进技术,缩短细胞原代培养时间^[8],通过皮肤成纤维细胞敏感性检测,对预测病人辐射敏感性有一定参考价值。

参 考 文 献

- 1 Dahberc W C, Little J B, Fletcher J A *et al.* *Int J Radiat Biol*, 1993, **63**(2):191~198
- 2 Burnet N G, Nyman J, Turesson I *et al.* *The Lancet*, 1992, **339**:1570~1571
- 3 Geara F B, Yarnold J. *INT J Radiat Oncol Biol Phys*, 1993, **27**:1173~1179
- 4 Begg A C, Russel N S, Lebesque J V. *Int J Radiat Biol*, 1993, **64**(4):393~405
- 5 Johanson J, Bentzen S M, Overgard J *et al.* *Int J Radiate Biol*, 1994, **66**(4):407~412
- 6 Hall E J. *Radiobiology for the radiologist* 21-26, Harper and Row Publishers Inc. USA 1978
- 7 HU Qiyue, Hill R P. *Radiation Research*, 1996, **146**:636~645
- 8 Eric Duchaud Ridet A, Stoppe-Lyonnet D *et al.* *Cancer Research*, 1996, **56**:1400~1404

CULTURE OF CANCER PATIENT'S SKIN TISSURE FIBROBLAST AND RADIOSENSITIVITY ASSAY

ZHU Hanneng LIU Yuanxia FANG Yan⁽¹⁾ SHI Jianhui CHENG Wenying

Shanghai Institute of Radiation Medicine, Shanghai 200032

⁽¹⁾*(Cancer Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)*

ABSTRACT In order to test the radiosensitivity of normal skin tissue, we cultured cancer patient's skin tissue fibroblast, Surviving fraction experiment was employed to provide data for understanding of the different radiosensitivity among the cancer patients, Method: cancer patient's skin tissue fibroblast were cultured in vitro by the way of tissue attachment, cells were irradiated by graded doses of γ -ray, cell dose response experiment was used to test the radiosensitivity of cell. Result: Cancer patient's skin fibroblast could be propagated and passaged by the method of culture in vitro. Radiosensitivity are different among the various cancer patient's skin tissue fibroblasts.

KEYWORDS Skin tissue fibroblast, Culture in vitro, Radiosensitivity