

α 粒子微束定点照射 — 细胞的放射生物学效应及精确性分析

吴李君¹ Tom K. Hei² G Randers-Pehrson², 余增亮¹

¹ (中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程实验室 合肥 230031)

² (哥伦比亚大学辐射研究中心 纽约 10032)

摘要 进行微束试验的关键是能够精确地控制照射的粒子数和将粒子准确地射入受照射位点。该研究通过对哥伦比亚大学单粒子微束装置在精确性、准确性以及各项指标的分析发现该装置可精确地控制照射粒子数, 精确率为 98.4%。同时, 它可将 α 粒子准确地射入受照射位点, 束半径为 3~4 μm , 达到设计 $\pm 4\mu\text{m}$ 的标准。在对细胞特定位点如细胞质照射上, α 粒子击中细胞质至少一个位点的概率为 90%, 在这一过程中的偶然核击中率, 对大多数照射剂量 (≤ 8 个 α 粒子) 均小于 0.8%。应用该微束装置的放射生物学研究发现单个 α 粒子仅导致大约 20% 的致死率, 其存活率曲线类似于用常规照射获得的平均粒子存活曲线。诱变试验首次证实单个 α 粒子在 A_L 细胞的 CD59 基因位点可诱导出比对照高出 3 倍数量的诱变子, 诱变率随粒子数的增加而增加。这一结果不同于常规照射中, 诱变率在高剂量照射后下降的结论。

关键词 微束, 细胞核和细胞质照射, 精确性, 放射生物学效应

中图分类号 Q691.5

单个粒子与生物体相互作用的生物效应, 由于粒子在能量、路径上的随机分布, 很难用常规照射的方法得以实现。中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程实验室正在筹备建立单个 α 粒子微束照射装置, 为深入开展动物、植物细胞的放射生物学研究创造条件。正值美国哥伦比亚大学建立单个 α 粒子微束照射的细胞放射生物学模型之际, 我有幸参加了这一研究工作, 得到了很有意义的结果, 对我国开展有关微束照射研究有重要参考价值。

1 材料和 方法

1.1 装置

4.25MeV 的单粒子微束装置^[1], 用于微束试验和常规照射的 α 粒子的 LET 为 90keV/ μm 。

1.2 材料

A_L 细胞^[2], 微束培养皿^[3], CR39(KODAR 公司), Hocchst 33342 和 Nile Red(Sigma 公司), Dibutyryl Cyclic AMP(Sigma 公司)。

1.3 方法

1.3.1 粒子径迹测定 精确数量的 α 粒子以间隔 50 μm 的距离照射 CR39 膜。被照射过的 CR39 从粒子射入的相反方向用 6NNaOH, 70°C 蚀刻 2h。粒子的径迹在显微镜下被观察和照像。

收稿日期: 初稿 1999-05-01, 修回 1999-07-05

1.3.2 细胞定位及图像分析 A_L 细胞核和细胞质经 50 nmol Hoechst 和 100 ng/mL Nile Red 染色后由图像分析系统进行照射定位分析。

1.3.3 用 Monte Carlo 模型 测算击中设定位点的概率和细胞质照射中偶然性击中细胞核的可能性。

1.3.4 微束照射与常规照射在存活率和诱变率上的比较分析 微束照射中, 精确数量的 α 粒子被直接照射入细胞核的中央; 常规照射中, α 粒子以剂量为单位对细胞进行照射。照射过的细胞被收集、培养, 并进行细胞的存活率和诱变率试验^[2,3]。为了便于比较, 常规照射的照射剂量被转换成粒子数, 根据 A_L 细胞核面积 ($\sim 108 \mu\text{m}^2$) 和 α 粒子的 LET ($90 \text{ keV}/\mu\text{m}$), 计算出约 12.5cGy 相当于一个 α 粒子的照射剂量^[3]。

2 结果

2.1 粒子径迹测试

探测粒子径迹的目的是检验粒子数的精确性和照射位点的束径。图 1 是单个 α 粒子穿过 CR39 膜后在 6 N NaOH、70°C 蚀刻下显现的照射位点。图中位点与位点间的距离是 $50 \mu\text{m}$, 标尺每格代表作 $8 \mu\text{m}$ 。图 1 清楚地表明哥伦比亚大学的单粒子微束装置能非常精确地探测并控制照射粒子数。

图 2 是 20 个 α 粒子穿过 CR39 膜后的束径, 图中标尺每格代表作 $4 \mu\text{m}$, 位点间的距离是 $50 \mu\text{m}$ 。经测量, 受照射位点组成的区域直径大约为 $6 \sim 8 \mu\text{m}$ 。这一束径完全达到该微束装置的设计 $\pm 4 \mu\text{m}$ 的标准。

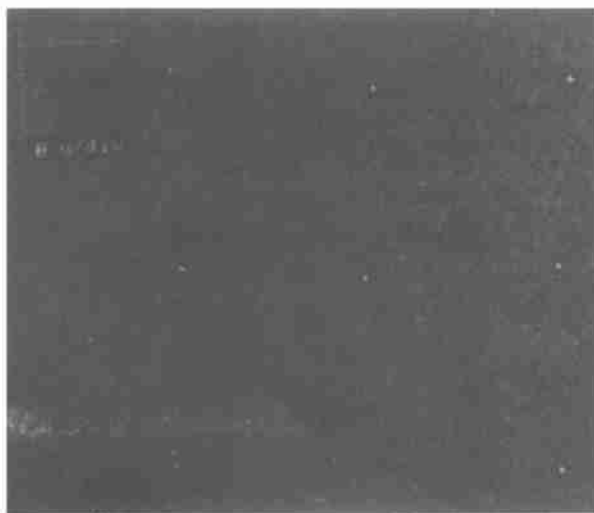


Fig.1 The results, in CR39 track etch plastic, of repeated single irradiations of 1 α particle per point in a 50 μm spacing grid
Scale bars are 8 μm per division

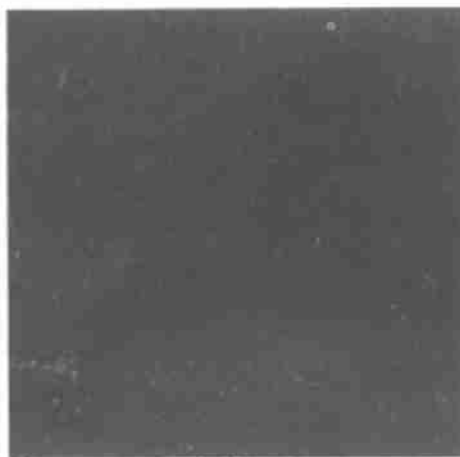


Fig.2 The results, in CR39 track etch plastic, of repeated irradiations of 20 α particles per point in a 50 μm spacing grid
scale bars are 4 μm per division

2.2 细胞定位及图像分析

图 3 是 A_L 细胞在 Hoechst 33342 和 Nile Red 染色下的荧光图, 白色区域是细胞质, 细胞核被圈在白色线内。对细胞核照射, 照射位点被定在细胞核中央 (见核中数字)。对细胞质照射, 照射位点被定在以核长轴为主轴的核末端 $8\mu\text{m}$ 处 (见图中核两端小圈), 设定数量的粒子将一分为二地射入这两个位点。

通过对 250 个细胞进行计算机模拟细胞质照射, 图 4 显示 75.5% 细胞的细胞质可被准确地击中, 14.2% 的细胞两个位点中有一个位点可被击中, 约 10.3% 的细胞由于细胞的形状未能伸开两个位点均未击中。

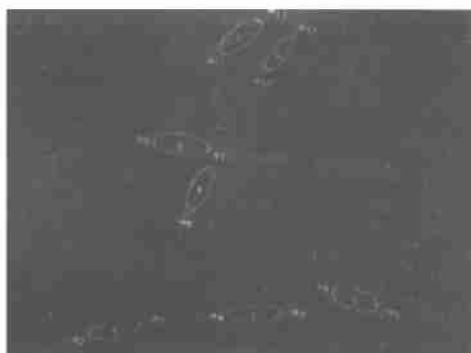


Fig.3 Fluorescent imaging of A_L cells stained with Hoechst 33342 for nucleus and Nile Red for cytoplasm and viewed by the image analysis system under a 40X objective lens

The nucleus of each cell is outlined in white and the image analysis system finds the center of the nucleus for nuclear irradiation. For cytoplasmic irradiation, the image analysis system finds the length of the major axis of each cell to calculate the irradiation positions which are chosen to be $8\mu\text{m}$ away from each end of the nucleus as shown by the small, numbered circles

击中目标的概率是 98.4%, 由于电子开关的时间滞差, 每一千个照射位点中, 大约有 4 个细胞会受到非精确粒子数的照射。

表 1 是细胞质照射中根据 Monte Carlo 模型计算出的粒子击中核的概率。对大多数照射剂量来说, 其概率小于 0.8%, 即每 1,000 个细胞中约有 8 个细胞核被散射的粒子击中。此外, 计算机控制的定位系统将记录下每一个照射过的细胞位点以防重复照射。

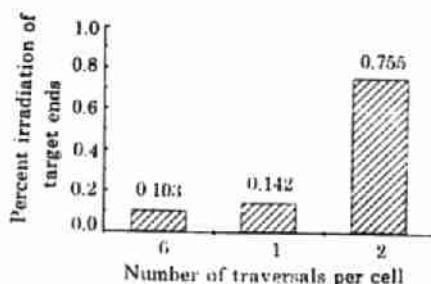


Fig.4 The probability of hitting the cell cytoplasm with the desired number of α particles was 75.5%, 14.2% probability for hitting the target cytoplasm with half the desired number of particles, and 10.3% probability of not hitting the cytoplasm

2.3 Monte Carlo 模型测算

在计算机定位出照射位点后, 细胞在 Monte Carlo 模型下测算粒子击中目标的概率。根据 Monte Carlo 4, 279 个粒子分布图和细胞核以及细胞质的面积, 精确数量粒子

Tab.1 Probability of hitting a nucleus simultaneously in cytoplasmic irradiation⁽¹⁾

Number of particles	Probability/%
2	0.002 or 0.2
4	0.004 or 0.4
8	0.008 or 0.8
16	0.016 or 1.6

⁽¹⁾ Calculation based on Monte Carlo distribution of $\sim 4,000$ particles

2.4 存活率和诱变率

图 5 是常规照射和微束照射细胞核的存活曲线。图中显示单个 α 粒子照射细胞核仅导致 20% 的致死率, $\sim 10\%$ 的细胞在受到 8 个 α 粒子照射细胞核后仍具有形成克隆的能力。这一结果与用常规照射获得的存活曲线非常近似。

图 6 是常规照射与微束照射细胞核的诱变率比较。在低剂量时, 诱变率在两种照射方式间差异不大, 单个 α 粒子或平均单个 α 粒子大约可诱导出高于对照 2~3 倍的突变子。但在高剂量时, 诱变率对常规照射而言, 会出现下降的趋势, 而对微束照射, 诱变率随着粒子数的增加而增加, 例如 8 个 α 粒子照射细胞核的诱变率可达到对照的 8 倍。

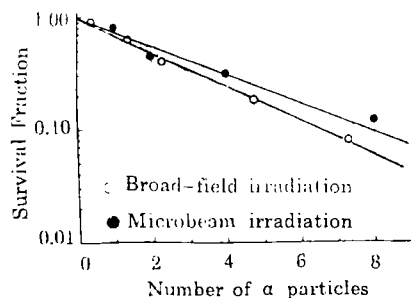


Fig.5 Comparison of the survival fraction of A_L cells either traversed with an exact number of α particles through the nuclei (microbeam irradiation) or from the data obtained using average α particle traversals (broad-field irradiation)

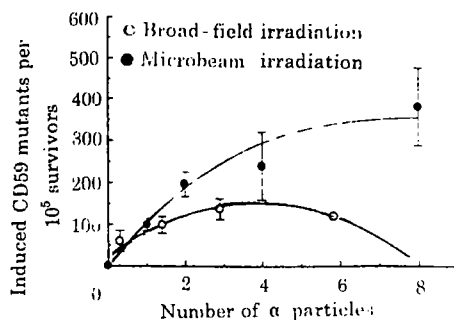


Fig.6 Comparison of the mutation induction at the $CD59^-$ locus of A_L cells irradiated with an exact number of α particles through the nuclei (microbeam irradiation) or from the data obtained using average α particle traversals (broad-field irradiation)

3 讨论

进行微束试验的关键是能够精确地控制照射的粒子数和将粒子准确地射入受照射位点。在哥伦比亚大学单粒子微束装置中, 粒子的控制是通过粒子探测器来完成的。它位于细胞的上方, 4.25 MeV 的能量可保证每个 α 粒子穿过细胞后有足够的能量到达探测器。探测器在探测到规定的粒子数后将通过快速电子开关关闭粒子通道。本试验的结果显示, 在该装置中粒子探测器可灵敏、准确地控制每一个 α 粒子的投射, 不精确性只有 0.4%。在控制粒子照射准确性方面, 现代微束装置多采用准直的技术, 既利用准直孔将大部分粒子阻住, 仅让极少的粒子通过细小的束孔射向细胞以达到限制束径的功能。哥伦比亚大学单粒子微束装置的准直系统由 3 层不锈钢箔组成。下层是 0.5mm 厚准直层, 在其中部有一个 $5\mu\text{m}$ 直径的激光钻孔, 中层是一个 $300\mu\text{m}$ 厚的垫片, 带有一个 $100\mu\text{m}$ 直径的孔。上层是 0.5mm 厚抗扩散层, 在其中部

有一个 $6\mu\text{m}$ 直径的激光孔, 上下两层钢箔的孔被设计为在一条中心线上。抗扩散层的目的是挡住散射的粒子。该准直器的设计目标是在粒子到达被照射目标时其束径为 $\pm 4\mu\text{m}$ 。通过对 20 个 α 粒子的束径计量结果证明粒子可被准确投入设定目标, 受照射区域的束径为 $3\sim 4\mu\text{m}$, 符合设计束准直要求。

作为一种照射工具, 现代微束装置不仅要求能用于细胞核照射去研究常规照射下不能进行的低剂量辐射效应, 同时也可用于细胞特定定位点如对细胞质的照射。一般地认为辐射导致的损伤仅仅在粒子照射细胞核时才能发生。然而, 不断增加的证据显示 α 粒子在组织中的辐射效应可能并不局限于 α 粒子的核照射^[4~6]。单粒子微束的应用为进行细胞质损伤效应研究提供了一个直接手段。进行细胞质效应研究的关键是确保粒子被准确地射入细胞质并最大限度地避免对核的偶然性击中。通过对哥伦比亚大学单粒子微束装置细胞质照射方法的测验, 我们发现约 90% 的细胞的两个受照射位点至少有一个位点可被击中, 照射位点的未击中率为 10.3%。在这一过程中的偶然击中率, 根据 Monte Carlo 模型计算, 对大多数照射剂量 (≤ 8 个 α 粒子) 均小于 0.8%, 即每 1,000 个细胞中约 8 个细胞核在细胞质照射中被击中。这一结果表明哥伦比亚大学单粒子微束装置已具备了进行细胞质照射的条件。

单个 α 粒子照射细胞核是否致死的问题被争论了 30 多年。由 Barendsen 等^[7] 进行的研究认为单个 α 粒子照射细胞核是致死的。此外, 基于诱发 DNA 双链断裂的测量指出, 在 C3H10T1/2 细胞中, 几乎 100% 的细胞在受到单一 α 粒子照射后会被直接地杀死^[8]。在另一方面, 基于粒子路径结构的微计量学认为, 单个粒子在致死损伤方面的可能性在哺乳类上皮细胞中仅有 17%^[9]。这一结论与本实验的直接单粒子照射细胞核结果相近, 即单个 α 粒子仅导致大约 20% 的致死率。更令人感到惊奇的是大约有 10% 的 A_L 细胞在受到 8 个 α 粒子核照射后仍具有形成克隆的能力, 尽管他们带有很高的突变潜力。值得提出的是, 本试验通过精确粒子核照射获得的成活曲线与用常规照射获得的平均粒子存活曲线并没有多大区别, 这显示, 至少在细胞的致死性上, Poisson 分布试验给了一个比较公正的 α 粒子的生物效应估价。基因突变被认为是癌症发生的早期步骤之一。本研究经过精确的单粒子照射细胞核首次证实单个 α 粒子在 A_L 细胞中可诱导出比对照高出 3 倍数量的诱变子, 在 8 个 α 粒子照射细胞核时, 诱变频率达到对照的 8 倍。这一结果与基于 Poisson 分布的常规照射计算出的平均单粒子诱变频率相一致, 但大大高于常规照射在高剂量时的 α 粒子的诱变频率。这种差异产生的原因可能是由于在常规照射中, 由于 Poisson 分布, 许多细胞或者受到少于 8 个 α 粒子的照射因而具有较少的突变, 或受到多于 8 个 α 粒子的照射并随后导致了细胞的死亡。此外, 这种差别也可能是由于在 Poisson 分布的实验中由于辐射诱导的分裂延迟差异造成, 受到少于规定数量粒子照射的细胞, 在规定的表达期间会比受到多于规定数量粒子照射的细胞更频繁地分裂, 从而掩盖了真正的突变频率。因此, 本细胞核照射研究不仅给了一个清晰的从高到低剂量的推断, 对澄清把高剂量所致肺癌危害性资料外推测低剂量环境氡气所致危害中的不确定性因素, 有重要意义。本研究所建立的单个 α 粒子微束定点照射细胞的实验模型, 为进一步单个 α 粒子微束照射亚细胞的效应研究积累了有益的经验。

此外, 用于细胞定位的 Dibutryl Cyclic AMP, Hoechst 33342, Nile Red 在试验应用浓度下, 无论是单独或结合在一起被测试对于细胞的成活、诱变没有影响, 不会增加细胞的辐射敏感性。Dibutryl Cyclic AMP 的目的是为了伸展细胞以利于细胞质照射。

参 考 文 献

- 1 Randers Pherson G. Annual Report of the Center for Radiological Research, 1995, 35-39
- 2 Waldren C A, Jones C, Puck T T. Proc Natl Acad Sci (USA), 1979, 76:1358-1362
- 3 Hei T K, Wu L J, Liu S X, *et al.* Proc Natl Acad Sci (USA), 1997, 94:3765~3770
- 4 Nagasawa H, Little J B. Cancer Res, 1992, 52:6394-6396
- 5 Deshpande A, Goodwin E H, Bailey S M, *et al.* Radiat Res, 1996, 145:260-267
- 6 Hickman A W, Jaramillo R J, Lechner J F, *et al.* Cancer Res, 1994, 54:5797-5800
- 7 Barendsen G W. Int J Radiat Biol, 1964, (8):453-466
- 8 Watt D E. Radiat Protect Dos, 1989, 27:73-84
- 9 Hei T K, Wu L J, Liu S X, *et al.* Proc Annual Meet Radiat Res Soc, 1996, 43:161

TARGETED MICROBEAM IRRADIATION: STUDIES ON THE RADIOLOGICAL EFFECTS AND THE ACCURACY OF α PARTICLE IRRADIATION

WU Lijun¹ Tom K. Hei² G Randers-Pehrson² YU Zengliang¹

¹(*Institute of Plasma Physics, Academia Sinica, Hefei 230031*)

²(*Center for Radiological Research, Columbia University, New York 10032*)

ABSTRACT The key to doing microbeam studies is to precisely control and accurately deliver the counted number of particles to a target position. By studying the Columbia University single particle microbeam, this report shows that it can irradiate the targets with a defined number of α particles, and the collimation of beam size according to the resolution of 20 α particles is $\sim 3\sim 4\mu\text{m}$ which is better than the designed index. Besides, it can be used for cytoplasmic irradiation with a hitting probability nearly 90% and the odds to hitting nucleus during this process is less than 0.8% for most doses. Radiological studies using this facility found that only 20% of irradiated cells were killed by a single α particle, and the dose response curve for nuclear irradiation with exact number of particles was not significantly different from the curve obtained using average particle traversals of broad-field exposure. The mutation data in microbeam studies provide the first demonstration that a single α particle traversal induced mutations in A_L cells at a level 3X greater than the background value, and the mutation yield increased in a dose dependent manner. This results was quite different from the data obtained from broad field exposure which showed that at high doses, the mutation frequencies decreased.

KEYWORDS Microbeam, Nucleus or cytoplasmic irradiation, Accuracy,
Radiological effect

CLC Q691.5