

关于小鼠白血病细胞 L7712 对三种 低 LET 射线的辐射敏感性研究

林万敏 马承武 罗祖玉

(复旦大学)

摘要 运用琼脂扩散盒(ADC)培养细胞集落的方法,我们比较了用三种低LET射线——200kV X射线、 ^{60}Co γ 射线和 20MeV 电子束,在两个剂量率(0.35Gy/min 和 1Gy/min)下,照射淋巴型白血病细胞L7712得到的存活曲线。

细胞在615近交系小鼠和昆明种小白鼠腹腔中的扩散盒中均生长良好。每个扩散盒中植入的细胞数,和细胞集落数的关系呈线性,在两组数据中无明显差异。

研究了 200kV X 射线对细胞的辐照效应。剂量率为 0.35Gy/min 时,存活曲线的 $D_0=1.55$ (1.45~1.67) Gy, n 为 0.94(0.88~1.03),相关系数 $r=-0.88$ 。而剂量率在 1.0Gy/min 时, D_0 和 n 分别为 1.39(1.30~1.54) Gy 和 0.90(0.82~1.0), 相关系数 $r=-0.85$ 。受 ^{60}Co γ 射线 (0.35Gy/min) 照射后, D_0 、 n 和 r 分别为 1.76(1.60~1.90) Gy, 0.96(0.87~1.07) 和 -0.82。 ^{60}Co γ 射线和 200kV X 射线相比得到的相对生物学效应(RBE)为 0.88。20MeV 电子束(1.0Gy/min) 照后的存活曲线,其 D_0 和 n 分别为 1.96(1.87~2.07) Gy, 0.99(0.94~1.05), $r=-0.93$ 。与 200kV X 射线相比, RBE 等于 0.71。

关键词 扩散盒; 细胞集落形成效率; 存活曲线; 低 LET 辐照; 剂量率; 相对生物学效应; 平均致死剂量; 外推值 n 。

引 言

本文所引用的琼脂扩散盒方法(Agar Diffusion Chamber, 以下简称 ADC), 是 Gordon^[1] 在造血干细胞的研究中首先应用的。由于 ADC 法为细胞提供了一个与体内环境相近似的生长条件, 培养要求简单, 它已被成功地推广到一些人类肿瘤细胞的研究上^[2~3]。包括直接从病人身上得到的, 以及生长在失去免疫力小鼠体内的人类肿瘤移植瘤。另一方面这一方法以细胞集落为观察指标, 从而可以应用在细胞放射生物学的基础研究上。本文的研究是利用这项技术比较不同射线对细胞的剂量效应曲线。并介绍了用 ADC 法培养小鼠淋巴细胞性白血病细胞的结果, 以及在此基础上进行的用两种剂量率, 三种低 LET 射线 (200kV X 射线、 ^{60}Co γ 射线、及 20MeV 电子束)照射细胞得到的存活曲线。

材 料 和 方 法

1. L7712 细胞*(腹水型)

* L7712 细胞是由上海医药工业研究所药理肿瘤组发现、传代并在 1979 年通过鉴定的。

是在 615 小鼠体内发现和生长的,一种可移植性实验动物白血病模型^[4]。本实验所需的 L7712 细胞,均由上海医药工业研究院供给。接种后 6 天的 615 小鼠,在无菌条件下抽取腹水供用。

2. 材料及试剂的配制

培养基:采用日本 Nissui 199 培养基(Nissui Seiyaku Co. Ltd.),内含 20% 小牛血清,青、链霉素的含量分别为 100 单位/ml 和 100 μ g/ml,用 5% NaHCO₃ 调节 pH 值到 7.0~7.2。

5% 琼脂:由日本琼脂粉(Wako koekei co. Ltd.) 配制,经高温高压消毒备用。

扩散盒:用有机玻璃制成,单面贴微孔滤膜(孔径 0.45 μ),容积为 0.22ml,边缘加样孔直径为 0.9mm,在 80 $^{\circ}$ C 下消毒 24 小时备用。

实验动物(寄主):采用 615 小鼠及昆明种小白鼠,体重 20~22 克,雌雄随机。

3. 实验步骤

先在无菌室内操作。用 199 培养基调整细胞浓度至所需值,然后依照 Gordon 的方法操作。先将细胞悬液在 37 $^{\circ}$ C 水温中预热 3~5 分钟,随即在每 ml 细胞悬液中加入 5% 琼脂,使琼脂的最终浓度为 0.3%。随即抽取 0.2ml 上述琼脂细胞悬液加入到扩散盒中,用石蜡点封加样孔,将扩散盒膜面朝下,放入盛有培养液的培养皿内,并将培养皿放置在冰块上,直至扩散盒埋入小鼠腹腔中。

植盒是在无菌室外进行的,5 天后杀死小鼠,取出扩散盒,揭去微孔滤膜,在低倍镜下计算每个小盒内生成的细胞集落数。根据一般标准,细胞集落包含有 50 个以上的细胞。计算用两种不同动物 615 小鼠和昆明种小白鼠作为寄主时,L7712 细胞的细胞集落形成效率(Clonogenic Efficiency)。细胞集落形成效率等于生成的细胞集落数/植入的细胞数。

为了研究 L7712 细胞对三种低 LET 射线的辐射敏感性,在未加入琼脂前,先对细胞悬液进行照射。X 线辐照是在 Philips 深部治疗机上进行,200kV,10mA,0.5mmCu + 1.0mmAl,剂量率为 0.35Gy/min,和 1Gy/min,剂量从 0 到 2.85Gy。⁶⁰Co γ 射线的剂量率为 0.35Gy/min,剂量从 0 到 3Gy。20MeV 电子束辐照是在上海第一医学院肿瘤医院 YG-25 医用电子感应加速器上进行的,剂量率为 1Gy/min,剂量从 0 到 3.64Gy/min。供照射的细胞浓度为 10000 个/ml。照射后的操作及观察过程同上。以对照组(零剂量)的细胞集落数为 100%,计算经不同剂量的射线处理的细胞集落数的比例作为细胞的存活率。用多靶单击模型在高剂量时的近似公式 $S = e^{-\lambda D}$ 对所得结果进行回归处理。

结 果

1. L7712 细胞在 ADC 内的生长

植入 615 小鼠和昆明种小白鼠腹腔内的扩散盒中的 L7712 细胞均能良好生长。移植后第二天就已可以观察到由少数细胞组成的小细胞集落。植盒后第 5 天,可见到由 50 个至数百个细胞组成的细胞集落。在第 6 天见到的细胞集落数与第 5 天无显著差异。细胞集落有的呈密集状,有的则比较松散。

每个扩散盒中的细胞数分别为 200 个、500 个、1000 个、1500 个及 2000 个时。在两种小鼠腹腔内的扩散盒中生成的细胞集落的数量关系见图 1。

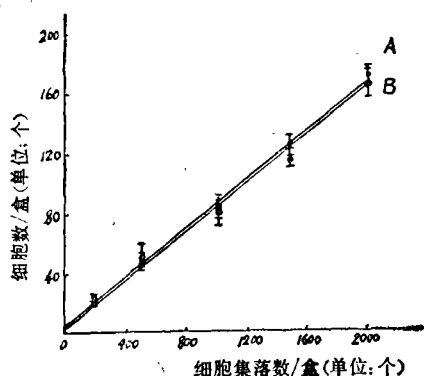


图1 植入两种小鼠体内的扩散盒中的细胞数与形成的细胞集落数的关系
A: 寄主为昆明种小白鼠; B: 寄主为615小鼠。每一实验点动物数为8~17只。

表1 两种小鼠作为寄主对细胞集落数的影响

寄主动物	细胞集落数/盒 ($M \pm SE$)	t 试验结果
615 小鼠	$173.2 \pm 6.1(11)^*$	$P > 0.5$
昆明种小鼠	$167.2 \pm 9.3(10)^*$	

* 动物数

对以上数据的统计处理,表明有如下关系:对615小鼠,回归方程为 $\hat{y} = 0.082X + 2.19$,相关系数 $r = 0.996$,细胞集落形成效率即回归系数,等于0.082。 X 表示植入细胞数, y 表示细胞集落数。

对昆明种小白鼠,回归方程为 $\hat{y} = 0.081X + 4.06$,相关系数 $r = 0.992$,细胞集落形成效率为0.081。

对两条直线的回归系数进行了显著性检验,结果为 $P > 0.5$,说明从包括所有实验数据的整体考虑,两种小鼠作为寄主并无明显差异。

当细胞浓度为2000个/盒时,两种小鼠作为寄主对形成的细胞集落数可能产生的差异也曾进行了显著性检验,具体结果见表1。

结果表明两种小鼠作为寄主并无显著差异。在下面的实验中,我们主要选用了昆明种小白鼠,也兼用了少量的615小鼠,对所得结果不加区分而一起归并处理。

2. 三种低LET射线对L7712细胞的作用

三种低LET射线对L7712细胞的作用见图2和图3。

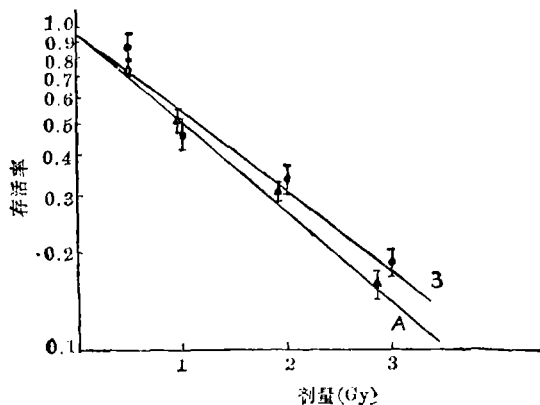


图2 剂量率为0.35Gy/min的200kV X射线和 ^{60}Co γ 射线对L7712细胞的作用
每一实验点取18只小鼠平均值,曲线A和曲线B分别表示X射线和 ^{60}Co γ 射线作用下的存活曲线。

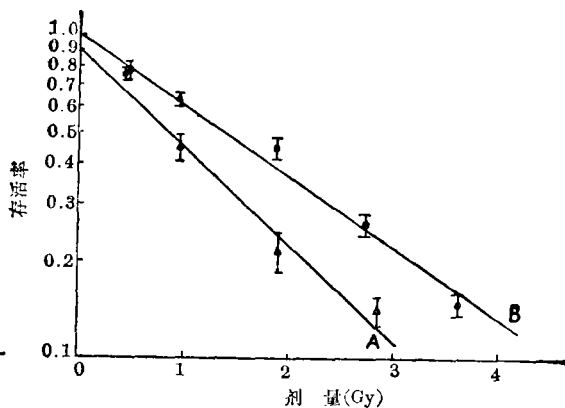


图3 剂量率为1Gy/min的200kV X射线和20MeV电子束对L7712细胞的作用
每一实验点取18只小鼠平均值,曲线A和曲线B分别表示X射线和电子束作用下的存活曲线

200kV X射线作用下的L7712细胞的存活曲线见图2A和图3A。在两种剂量率下,剂量都是0、0.475、0.950、1.900和2.850Gy。回归处理的结果为:剂量率为0.35Gy/min时,相关系数 $r = -0.88$, $n = 0.94$ (0.88—1.03), $D_0 = 1.55$ (1.45—1.67)Gy;剂量率为1Gy/min时, $r = -0.85$, $n = 0.90$ (0.82—1.00); $D_0 = 1.39$ (1.30—1.54)Gy。

剂量率为 0.35Gy/min 的 ^{60}Co γ 射线作用下的 L7712 细胞的存活曲线见图 2B。剂量为 0、0.5、1.0、2.0 和 3.0Gy。回归结果为 $r = -0.82$, $n = 0.96(0.87-1.07)$, $D_0 = 1.76(1.60-1.90)\text{Gy}$ 。

剂量率为 1Gy/min 的 20MeV 电子束作用下的 L7712 细胞的存活曲线见图 3B。剂量为 0、0.455、0.910、1.820、2.730 和 3.640Gy。回归结果为 $r = -0.93$, $n = 0.99(0.94-1.05)$, $D_0 = 1.96(1.87-2.07)\text{Gy}$ 。

^{60}Co γ 射线和 20MeV 电子束对 200kVX 射线的相对生物效应(RBE)。以相同的剂量率进行比较, 则 ^{60}Co γ 射线对 200kVX 线的 RBE 值为 $1.55/1.76 = 0.88$; 20MeV 电子束对 200kVX 线的 RBE 值为 $1.39/1.96 = 0.71$ 。

讨 论

1. L7712细胞的 ADC 培养

在用体外半固体(琼脂或甲基纤维素)及体内 ADC 法培养患白血病的小鼠与人类的骨髓细胞时, 其中的白血病细胞形成细胞集落的能力, 已为人们所注意。Metcalf^[5] 等曾在体外琼脂培养中, 得到过小鼠骨髓单核细胞白血病(myelomonocytic Leukemia) 细胞发展来的细胞集落, 并对它们进行了详细的研究。但是 Duttera^[6] 等用急性淋巴细胞性白血病(ALL) 人的骨髓, 以及 Bull^[7] 等用急性粒细胞性白血病(AML) 人的骨髓, 作体外甲基纤维素培养时, 观察到在这两类白血病人的骨髓中, 只有正常的粒系细胞能形成细胞集落, 而白血病细胞基本上是不能形成细胞集落的。同时, 发现后者对前者的形成有抑制作用。由此作者提出了可以根据在培养物中正常粒细胞集落的数目来判定病人是处于发作期(细胞集落数减少), 还是缓解期(细胞集落数回升到正常水平)。Brown III^[8] 作了类似的实验, 得到了基本同样的结论, 但却又在 AML 病人的骨髓培养物中发现了大量的小细胞集落(Cluster)。作者认为它们是由白血病细胞形成的, 并且设想, 只要加入合适的集落刺激因子(CSF), 它们同样可以形成细胞集落。我们的实验则表明, 小鼠腹水型白血病细胞 L7712 在 ADC 中可以成活和以一定的比例形成细胞集落。这一结果和上述一些作者的差异, 除了可以一般地归结为实验材料和方法的不同外, 似乎可以特别强调这样一个事实, 即 L7712 细胞, 在供体和受体小鼠中都生活在非常相近的腹腔环境中。本文的结果可以与另一些作者的观察有共同之处。比如, Shelton^[9] 等已经证明过小鼠淋巴瘤细胞可以在不加琼脂的扩散盒(DC)中生长。Laerum^[10] 等讨论过恶性细胞在 DC 中的增殖特性。我们的实验也表明, 把 ADC 法推广到其它实验小鼠的腹水型肿瘤细胞的研究上是可以尝试的。

L7712 细胞原为生长在 615 小鼠腹腔内的可移植性白血病细胞, 它在 615 小鼠体内的扩散盒中的生长是不难理解的。然而, 在本实验中若以昆明种小白鼠为寄主, L7712 细胞也能成活, 并有同样的细胞集落形成效率。这可以归结为扩散盒上的膜起了保护作用。关于这一点, Algire^[11] 早在 1957 年就作过总结。另一方面, 本实验得到两个无显著差异的细胞集落形成效率, 说明了在两个不同品种的小鼠体内, 为细胞生长所必需的营养成份及细胞集落刺激因子都处在同一水平上。

用 ADC 法培养人的骨髓细胞^[12] 和肿瘤细胞^[2~3], 寄主需经事先辐照, 但是在培养小鼠骨

髓细胞^[1]时, 寄主不需辐照, 本实验的寄主小鼠是不必事先辐照的。这一事实提示, 寄主是无需照射, 与寄主-供体之间的亲缘关系有联系, 当然这一假设还待进一步证实。

2. 关于L7712细胞的辐射敏感性

L7712细胞在剂量率为0.35Gy/min和1Gy/min的三种低LET射线作用下表现出了相近的辐射敏感性。在所有实验中, 存活曲线都呈现单值线性函数的特性, n 值都近似1, D_0 值也落在一定的范围内, 说明在体外辐照, 体内ADC法培养的条件下, L7712细胞对亚致死损伤的耐受力较差。和文献中一些类似的细胞^[13~14]相比, 可见L7712细胞和大多数一样, 是一种对辐射比较敏感的腹水型肿瘤细胞。

3. 剂量率的影响和RBE值

一般把低剂量率辐照下的损伤称作“慢性”的, 高剂量率辐照作用下的损伤称作“急性”的。一些作者^[21~25]在进行这一类研究时, 把1rad/min以下和数十至一百rad/min分别作为“慢性”和“急性”损伤的剂量率。参照这一标准, 结合实验中得到的存活曲线, 我们认为, 本文的结果应属于“急性”损伤。实验结果还表明, 对L7712细胞, 每分钟几十到一百rad的剂量率并不能引起在生殖死亡上的很大的差异(对两条在不同剂量率的200kV X射线作用下的存活曲线的 D_0 值进行了 t 试验, 结果为 $P>0.25$)。

按本实验所采用的两种剂量率所得到的数据推得 ^{60}Co γ 射线对200kV X射线的RBE为0.78~0.88, 而20MeV电子束对200kV X射线的RBE为0.71~0.79。关于前者, 已有不少报道^[15~18], 由于所用材料和方法的不同, 大致值在0.65~0.95范围内, 我们的结果是符合这一普遍情况的。关于后者, 文献报道相对较少, 其值范围大致在0.75~1.0之间^[19~20], 我们的实验结果可以认为接近于这一区域的下限。

对第二军医大学张明华副教授及宁选同志的技术帮助表示感谢

参 考 文 献

- [1] M. Y. Gordon, *Brit. J. Cancer.*, **30**, 421 (1974).
- [2] L. E. Smith, V. D. Courtenay and M. Y. Gordon, *ibid.*, **34**, 476 (1976).
- [3] P. J. Seiby, I. E. Smith, M. Y. Gordon, E. P. Cronkite and A. L. Corsten, ed., *In Diffusion Chamber Culture*, p.177. Spring Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1980.
- [4] Zhen Sheng, Zhang Yongyi Zhang Haimin, Yang Jinlong and Pan Shipeng, "Topics on cancer chemotherapy", p.235. China Academic Publishers, 1981.
- [5] D. Metcalf, M. A. S. Moore and N. L. Warner, *J. Natl. Cancer Inst.*, **43**, 983 (1969).
- [6] M. J. Duttera, J. M. Bull, J. D. Northup, E. S. Henderson, E. D. Stashick and P. P. Carbone, *Blood.*, **42**, 687 (1973).
- [7] J. M. Bull, M. J. Duttera, E. D. Stashick, J. Northup, E. S. Henderson and P. P. Carbone, *ibid.*, **42**, 679 (1973).
- [8] C. H. Brown II, and P. P. Carbone, *J. Natl. Cancer Inst.*, **46**, 989 (1971).
- [9] E. Shelton, and M. E. Rice, *ibid.*, **21**, 137 (1958).
- [10] O. D. Laerum, A. Gruneisen and M. F. Rajewsky, *Europ. J. Cancer.*, **9**, 533 (1973).
- [11] G. H. Algire, *Fed. Proc.*, **16**, 601 (1957).
- [12] M. Y. Gordon, N. M. Blackett and I. D. C. Douglas, *Brit. J. Haematol.*, **31**, 103 (1975).
- [13] G. F. Whitmore, and J. E. Till, *Ann. Rev. Nucl. Sci.*, **14**, 347 (1964).
- [14] C. J. Roberts and J. C. Asquith, *Int. J. Radiat. Biol.*, **37**, 97 (1980).
- [15] M. J. Corp, E. V. Hulse and A. L. Batchelor, *ibid.*, **25**, 61 (1974).
- [16] J. F. Malone and D. Porter, *ibid.*, **26**, 355 (1974);

- [17] A. L. Batchelor, M. J. Corp and E. V. Hulse, *ibid.*, **24**, 15 (1973).
[18] R. M. Humphrey and W. K. Sinclair, *Radiat. Res.*, **20**, 593 (1963).
[19] Irving Leskowitz, J. G. Van Dyke, J. S. Loughlin, and J. J. Nicuson, *ibid.*, **13**, 445 (1960).
[20] A. Mookerjee, J. G. Van Dyke, and J. S. Loughlin, *ibid.*, **22**, 431 (1961).
[21] R. Born, *Strahlentherapie*, **154**, 650 (1978).
[22] J. B. Mitchell, J. S. Pedford and S. M. Bailey, *Radiat. res.*, **79**, 520 (1979).
[23] R. M. Henekelman, G. K. Y. Lam, R. O. Kornclesnn and C. J. Eaves, *Radiat. Res.*, **84**, 276 (1980).
[24] A. W. T. Konings, *Radiat. res.*, **22**, 282 (1981).
[25] Nakamura, Nori and Shigefumi Okada, *Mutat. Res.*, **83**, 127 (1981).

(1982年12月13日收到)

THE STUDY OF RADIOSENSITIVITY OF MOUSE L7712 LEUKEMIC CELLS IRRADIATED BY THREE KINDS OF LOW LET RADIATIONS

Lin Wanmin Ma Chengwu Luo Zuyu

(Laboratory of Biophysics, Fudan University)

ABSTRACT

Using the agar diffusion chamber (ADC) for colony formation of lymphocytic leukemic cells L7712, we compared the survival curves of the cells irradiated by three kinds of low LET radiations — 200kV x-rays, ^{60}Co gamma rays and 20 MeV electron beam in two rates (0.35Gy/min and 1.0Gy/min).

The cells grew well in ADC both in the peritoneums of 615 inbred mice and Kummung white mice. The relationship between the number of cells implanted to each chamber and the number of colonies formed was shown to be linear. There was no significant difference between the two sets of data.

200kV x-rays irradiation to cells was studied. The survival curve for a dose rate of 0.35Gy/min had a D_0 of 1.55(1.45~1.67)Gy, n of 0.94(0.88~1.03) and correlation coefficient $r = -0.88$; while with a dose rate of 1.0Gy/min they were 1.39(1.30~1.54) Gy, 0.90(0.82~1.0) and -0.85 respectively. The D_0 , n and r for survival curve after ^{60}Co irradiation (0.35Gy/min) were 1.76(1.60~1.90)Gy, 0.96(0.87~1.07) and -0.82 . The RBE of ^{60}Co gamma rays as compared with 200kV x-rays was 0.88. The survival curve for 20MeV electron beam (1.0Gy/min) had a D_0 of 1.96(1.87~2.07)Gy and n of 0.99 (0.94~1.05), $r = -0.93$. Its RBE as compared with 200kV x-rays was 0.71.

KEYWORDS

Agar diffusion chamber; Clonogenic efficiency; Survival curve; Low LET radiation; Dose rate; Relative Biological Effectiveness (RBE); Mean lethal dose (D_0); Extrapolation number (n).