

超分割放射对 HeLa S-3 球体的生长 和细胞动力学的效应

何 少 琴

Sang Hie Kim ph.D*, Jae Ho Kim, M. D., ph.D*

(上海医科大学肿瘤医院, 上海)

*(Radiation Biology Laboratory, Memorial Sloan-Kettering
Cancer Center, New York, N.Y., U. S. A.)

提要 临床上应用超分割放射治疗疗效不一, 为了了解超分割放射的生物学特点, 本实验采用 200 μm 直径 HeLa S-3 球体为模型, 从生长、集落形成率和细胞周期变化(用流式细胞计)等方面比较单次放射, 每日一次 2 Gy 常规放射和两组超分割放射对人体肿瘤细胞的增殖和动力学的影响。

结果: 1, 在相同总剂量条件下, 超分割放射比常规放射和单次放射抑制球体生长作用小。2, 球体受放射后由胰酶消化分散成单细胞, 其集落形成率以超分割放射组为高。与第一结果相一致, 提示在五天疗程中细胞有一定修复和再分布发生。3, 细胞周期变化检测表明放射后都有 $G_2 + M$ 期细胞比例增加, 伴以 G_1 和 S 期细胞比例减少。常规放射后 $G_2 + M$ 期细胞比例较为恒定, 而超分割放射后波动大。放射后 RNA 含量无明显变化。

如采用较大直径内含乏氧细胞的球体为模型, 在分割放射期间还可能有再充氧发生, 实验结果可能和本实验差异较大。

关键词 肿瘤多细胞球体; 超分割放射; 细胞动力学。

引 言

近年来临床上对应用低 LET 射线超分割放射治疗恶性肿瘤颇感兴趣。虽然一些临床报道所采用的剂量分割方案不尽相同, 而且与每日一次照射 2 Gy 的常规方案比较疗效也不一^[1~3]。但是从放射生物学观点看, 每日一次以上的放射治疗对提高治疗比率还有一定裨益^[4~6], 因此设计合理的超分割放疗方案是很有必要的。

肿瘤多细胞球体(下称球体, MTS, Multicellular Tumor Spheroid)是一种近年来已较多地用于研究肿瘤特性和辐射、药物、加热等效应的体外模型^[7~11]。这种介于体外单层细胞培养和体内实体肿瘤之间的三维结构实验模型在细胞群组成、组织学结构、增殖能力和代谢方面酷似体内实体肿瘤, 但又具有体外培养周转较快、条件较易掌握等特点。

为了了解超分割放射治疗的基本生物学特性, 并与每日照射一次常规方案相比较, 本文用人体肿瘤细胞的球体模型, 从球体生长率、单细胞集落形成率和细胞动力学变化等方面, 研究不同方式分割放射对人体肿瘤细胞的增殖和胞动力学的影响, 为设计合理的放射治疗方案提供基础资料。

材 料 与 方 法

1. 细胞和球体培养

采用 HeLa S-3 细胞, 培养步骤如前报道^[11~12]。即细胞在含 10% 胎牛血清、100 单位/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 MEM 培养液(Eagle's Minimum Essential Medium)内贴壁生长(用生

长面积 75 cm² 塑料培养瓶), 置 5% CO₂ 孵箱内培养(37℃, 高湿度), 每周经胰酶消化传代二次。球体培养方法和 Yuhas 等报道相仿^[11,13], 即在培养瓶内置入 1% 琼脂培养液(Noble Agar), 待凝结后接种 $5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ / 5 ml 培养液的细胞悬液, 培养 7 ~ 8 天, 大部分球体直径达 200 μm 左右。为观察球体大小的变化, 在目镜内装有网形测距的倒置显微镜下, 用吸管逐一收集 200 μm 的球体, 移植到含 1% 琼脂培养基和 1 ml 培养液的 16 mm 多孔塑料平板内(Linbo Mwlti-well plate), 一个孔内只可置入一个球体以免相互连合, 然后在 37℃ 下 CO₂ 孵箱内培养。每三天在显微镜下测量每个球体两个相互垂直的最大径, 取平均值。每实验组包括 12 个球体, 图内所示数据为二次或二次以上实验结果的平均值。培养期间通常不更换培养液。

2. 放射

在空气室温下用 ¹³⁷Cs 照射(Gam-macell 40, Afomic Energy of Canada, L+d)。剂量率经 Exradon T-1(0.05 ml) TE 电离室和热释光方法测得, 为 1.0 Gy/min。放射方案模拟临床所用:

(1) 单次放射 2、4、6、8、10 Gy

(2) 常规分割放射 2 Gy/次, 每日一次, 1 ~ 5 天

(3) 超分割放射 ① 1.5 Gy/次, 每日二次(间隔 6 小时), 1 ~ 5 天。② 1.0 Gy/次, 每日三次(间隔 4 小时), 1 ~ 5 天。

3. 球体分离

放射后(超分割放射组在每日末次放射后)立即在显微镜下用吸管收集球体, 去除培养液, 加 0.025% 胰酶在 37℃ 下消化 8 min, 用吸管反复吹打即获单细胞悬液。经计数(Coulter Counter B)、稀释, 接种在 60 mm 培养皿内(Petri dishes, Falcon)进行集落形成试验。各剂量点接种 3 个培养皿, 各实验均重复。从 HeLa S-3 球体分离所得单细胞的集落形成率(P. E.)为 50 ~ 80%。生存比率以对照组为 100% 计, 图表内数据以平均值表示。

4. 细胞染色和细胞动力学检测

按 Traganos 等^[14]应用吖啶橙进行 DNA 和 RNA 含量同时染色。即将球体按上述方法分离为单细胞悬液, 离心(500 rpm, 5'), 去掉上清液, 加入 0.5 ml Hanks 平衡液使再呈悬液后, 加

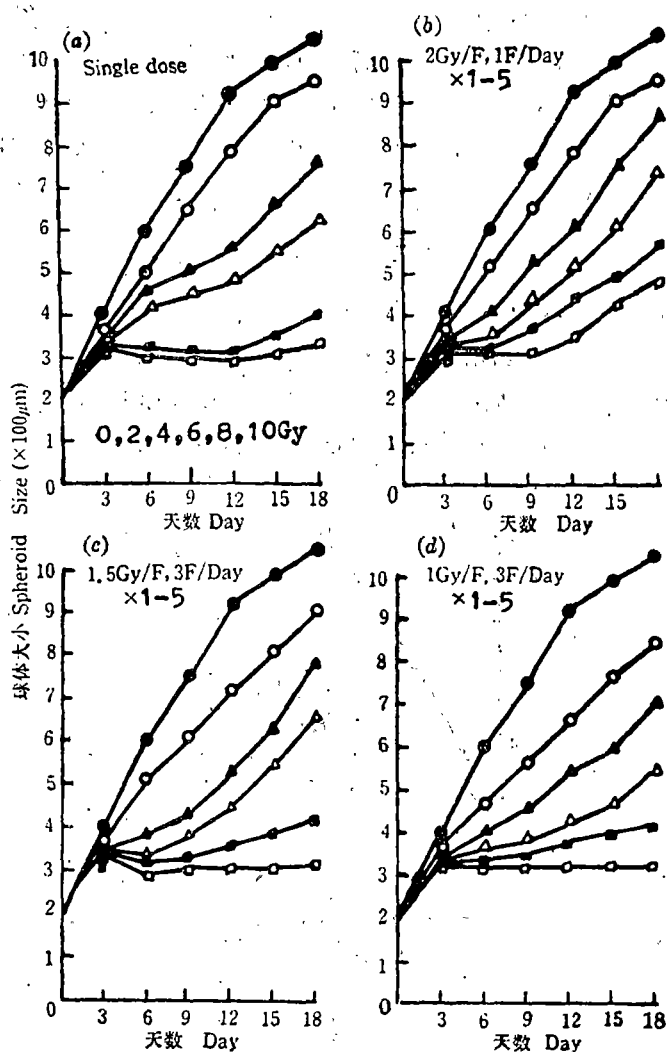


图 1 放射对 HeLa S-3 球体生长的影响

Fig. 1 Radiation effect on HeLa S-3 spheroid growth

—●—0Gy, —○—×1 Day, —▲—×2 Day
—△—×3 Day, —■—×4 Day, —□—×5 Day

入 0.25% 胰酶和 DNase (Sigma, D-4638) 达到 1.0 mg/ml 浓度。置 37℃ 下 30' 后取 0.2 ml 细胞悬液, 加入 0.4 ml 清洁液 (0.08 mol/L HCl, 0.15 mol/L NaCl, 0.1% Triton X-100, Sigma), 30 秒后再加 1.2 ml 吡啶橙 (Polyscience Inc., Warrington, PA, 内含 0.2 mol/L Na_2HPO_4 , 0.1 mol/L 枸橼酸平衡液, 0.15 mol/L 氯化钠, 1 mmol/L Sodium EDTA, 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 吡啶橙, pH 6.0)。所有操作均于室温下进行。除单次放射外, 常规放射和超分割放射组的标本都在次日第一次放射前收集。经上述染色后 10 min 之内即在流式细胞计 FC 200 (Ortho Instrument, Westwood, MA) 上进行 DNA 和 RNA 含量测定。绿色荧光为 DNA, 红色为 RNA。每次受测细胞数都在 5×10^3 以上。细胞碎片或细胞团都除去。流式细胞计连有微计算机 (Nova 1220, Data General Corp., Westboro, MA) 处理各数据。从 DNA 和 RNA 含量分布即可求得细胞群中 G_1 、 S 、 $G_2 + M$ 期细胞百分比。各组实验进行两次或两次以上, 图内为平均值并和实验第一天未经放射组进行对照。

结 果

1. 球体生长

图 1 为 200 μm 直径 HeLa S-3 球体受放射后的生长曲线。未经放射的球体呈指数性生长, 球体最大径倍增时间平均为 3 天。到 15~18 天时球体增大速度减慢, 生长曲线变平, 此时球体直径约 1000~1200 μm 。放射后最初三天球体仍增大, 然后呈现生长延迟。生长延迟的程度随

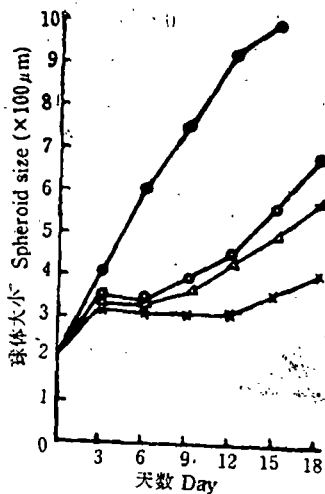


图 2 不同分割放射在总剂量相同时球体生长的比较

● 0 Gy; ○ 1.5 Gy/次, 2次/天 × 3
△ 2 Gy/次/天 × 4; × 单次剂量 8 Gy

Fig. 2 Different fractionated radiation effect on HeLa S-3 spheroid growth under the same total dose,

● 0 Gy; ○ 1.5 Gy/F 2 F/Day × 3;
△ 2 Gy/F/Day × 4; × Single dose 8 Gy

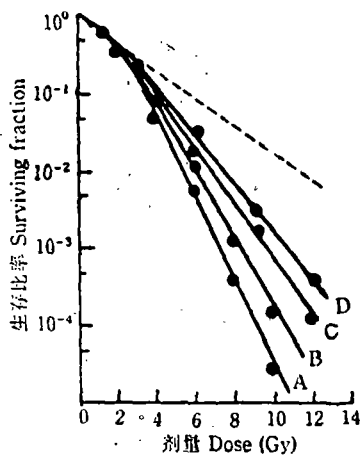


图 3 HeLa S-3 球体放射后单细胞生存曲线

A: 单次测量 B: 2 Gy/次/天 × 1-5
C: 1.5 Gy/次, 2次/天 × 1-5
D: 1 Gy/次, 3次/天 × 1-5
虚线为计算生存曲线 (详见文内)

Fig. 3 Surviving curves of HeLa S-3 cells grown as spheroids after irradiation.

A: Single dose B: 2 Gy/F, 1 F/Day × 1-5
C: 1.5 Gy/F, 2 F/Day × 1-5
D: 1 Gy/F, 3 F/Day × 1-5

Dashed line represents the expected surviving curve (calculated value, see text)

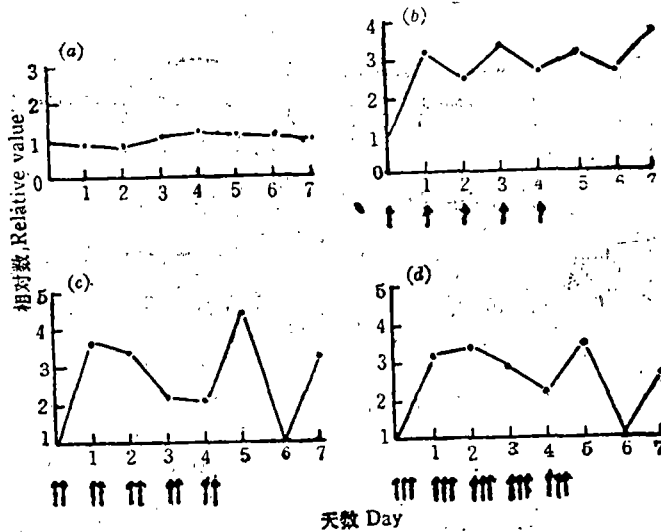


图4 放射后 G_2+M 期细胞相对数动态变化(箭头表示放射时间)

a) 未放射

b) 2 Gy/次/天

c) 1.5 Gy/次 2次/天

d) 1 Gy/次 3次/天

Fig. 4 Kinetic changes of relative values of cells in G_2+M phase after irradiation. arrows represent the time for Irradiation.

a) Control

b) 2 Gy/F/Day

c) 1.5 Gy/F 2 F/Day

d) 1 Gy/F 3 F/Day

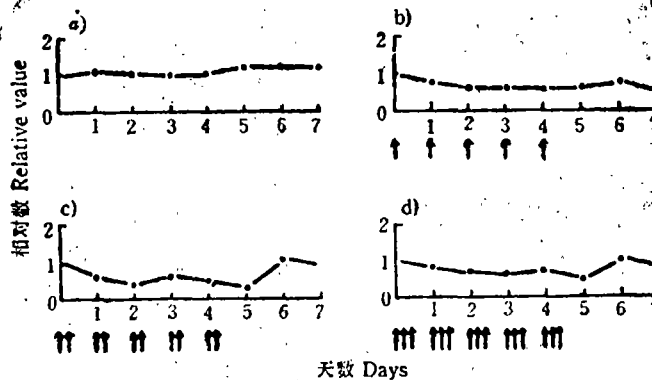


图5 放射后 G_1 期细胞相对数动态变化

a) 未放射

b) 2 Gy/次/天

c) 1.5 Gy/次 2次/天

d) 1 Gy/次 3次/天

Fig. 5 Kinetic changes of relative values of cells in G_1 phase after irradiation.

a) Control

b) 2 Gy/F/Day

c) 1.5 Gy/F 2 F/Day

d) 1 Gy/F 3 F/Day

总剂量增加而变得明显,而且和放射分割方式有关。在总剂量相同条件下,单次放射后球体生长受抑制到回复生长所需要时间,比每日照射 2 Gy 组长,而后者又比超分割放射长(见图 1、2)。而本实验中两组超分割放射引起球体生长抑制的效应相仿。要指出的是单次放射 10 Gy 后球体在 30 天观察期间,即使更换培养液,也维持在恒定大小(未发表资料)。这可能是细胞死亡后细胞外物质的积累使球体结构在宏观上保持不变^[15]。

2. 细胞生存比率

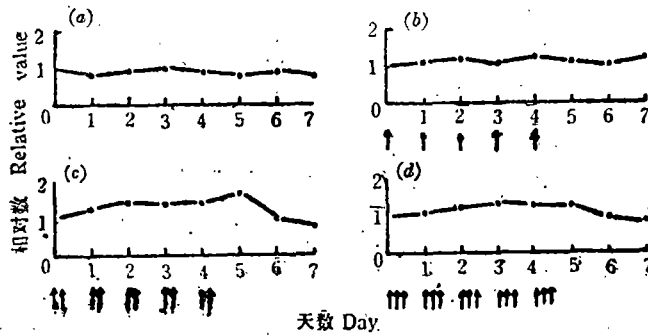


图6 放射后S期细胞相对数动态变化

- a) 未放射 b) 2 Gy/次/天 c) 1.5 Gy/次 2次/天 d) 1 Gy/次 3次/天
 Fig 6. Kinetic changes of relative values of cells in s phase after irradiation.
 a) Control b) 2 Gy/F/Day c) 1.5 Gy/F 2 F/Day d) 1 Gy/F 3F/Day

单次放射组的集落形成试验是放射后立即进行,而分割和超分割放射组在每日末次放射后立即进行。图3为按不同分割放射后从球体分离得单细胞的生存曲线。分割和超分割放射后细胞生存比率都大于单次放射,而且比较本实验所采用两种超分割放射可以看出,虽然每日剂量和总剂量相同,但由于每日照射二次,每次1.5 Gy改为每日照射三次,每次1.0 Gy,生存比率又有增加。各组平均 D_0 值如下:

单次放射 $D_0 = 0.90 \text{ Gy}$

常规分割放射 $D_0 = 1.0 \text{ Gy}$

超分割放射 (1) 每日二次组 $D_0 = 1.2 \text{ Gy}$ (2) 每日三次组 $D_0 = 1.4 \text{ Gy}$

D_0 值随每日分割放射次数增加而增大,提示在5天放射期间,细胞对放射损伤的修复和细胞重新分布有相当影响。

3. 细胞周期时相分布

放射后 $G_2 + M$ 期细胞比例增加是普遍现象。单次放射2 Gy和4 Gy后4小时, $G_2 + M$ 期细胞比例即有上升,到18小时 $G_2 + M$ 期细胞占40%左右,但24小时已开始下降,48小时回到放射前水平。伴随 $G_2 + M$ 期细胞比例增加是 G_1 和S期细胞比例的减少。图4示放射后7天内 $G_2 + M$ 期细胞比例的动态变化。在第一次放射后24小时 $G_2 + M$ 期细胞比例都有增加,但是不论采用每日放射一次或超分割放射,再次放射并不导致 $G_2 + M$ 期细胞比例继续增加。每日放射2 Gy组示 $G_2 + M$ 期细胞比例处于恒定的高水平,而且持续到放射结束后二天。如图5、6所示。 $G_2 + M$ 期细胞比例的增加先是 G_1 期细胞比例减少,继而S期也减少。然而本实验两超分割放射组每日总剂量为3 Gy,放射后 $G_2 + M$ 期细胞比例增加并不明显超过每日2 Gy组,而且在7天观察时间内呈波动变化,在放射后第4天 $G_2 + M$ 期细胞比例从升高水平降到近于放射前水平(这时 G_1 和S期细胞比例已近放射前水平),然而此时放射仍继续进行,第6天时 $G_2 + M$ 期细胞比例又迅速升高,这时已是放射结束后,用苔酚兰检测此时只有5~8%有活力细胞,集落形成试验也提示生存比率较低。本实验各组在放射后细胞的RNA含量和放射前相比较,都没有明显变化。

讨 论

本实验应用不同放射分割都导致HeLa S-3球体生长的延迟或抑制(见图1、2),并显示放

射对球体生长影响大小和放射剂量有关外,更和放射分割方式有关。在相同总剂量条件下比较,单次放射后球体回复生长所需时间,比每日照射 2 Gy 和超分割放射组长,当剂量大于 6 Gy 时更为明显。而每日照射 2 Gy 对球体生长的影响,又比本实验中两超分割放射组明显。实验结果提示当减少分割剂量同时增加分割次数时,细胞对放射损伤的修复能力可能增加。生存比率的结果和球体生长试验结果相一致(见图 3),分割和超分割放射组生存比率都高于单次剂量组。文献曾报道^[16,17]降低放射剂量率后生存比率有增加表明细胞对放射损伤的修复和细胞重新分布。分割放射,尤其超分割放射期间隙也利于细胞对损伤的修复和细胞重新分布^[2,3,6]。本组分割和超分割放射疗程都是五天,从生存比率随总放射剂量增加呈指数关系下降,以及苔酚兰染色表明,在第四天超分割放射组(总剂量 12 Gy)只有 5~8% 有活力细胞,因此再增殖并不起重要作用。同样本实验选用 200 μm 直径 HeLaS-3 球体为模型,其内无相当比例乏氧细胞,因此在分割或超分割放射期间,所谓乏氧细胞再充氧的存在以提高放射线对细胞杀伤的可能也基本不存在。假设影响本实验中细胞对放射后损伤的修复为唯一因素,那么在不考虑时间因素而根据单次放射 1.5 Gy 的生存比率,按单击多靶公式获得如图 3 中虚线所示理论生存曲线,表示放射后细胞都得到修复,然而实际的生存曲线都比理论生存曲线低,这提示在分割和超分割放射过程中,除了细胞对放射损伤有修复外,还存在细胞重新分布而导致更多数量细胞被杀伤的可能性。

和文献报道相一致^[18~20],放射后细胞周期最明显变化是 $G_2 + M$ 期细胞比例的增加。Cao 和 Hieber 等^[19~20]分别报道,用 X 线和 α 粒子引起 $G_2 + M$ 期细胞积累和放射剂量大小一致,而且回复到对照组水平的时间也因剂量而异,剂量高回复慢。本实验中分割和超分割放射后 24 小时, $G_2 + M$ 期细胞比例上升到放射前 3~4 倍,然而继续放射并不导致越来越多 $G_2 + M$ 期细胞的积累。常规分割组 $G_2 + M$ 期细胞比例持续在升高的水平,甚至维持到放射后第二天(见图 4)。而二种超分割放射组 $G_2 + M$ 期细胞比例变化相似,在整个 5 天放射期间波动较大,尤其在第 4 天,细胞周期分布和放射前相仿。至今有关分割和超分割放射后细胞动力学变化的报道不多,也还不明瞭放射期间 $G_2 + M$ 期细胞回复到放射前水平的机制。本实验中第 4 天超分割放射组的总剂量达 12 Gy,可能足以杀死一定量对放射敏感的 $G_2 + M$ 期细胞,同时对已受低剂量放射,即有一定量放射损伤的其他期细胞也有一定杀伤,因此导致细胞动力学变化呈现和未受放射相似。分割和超分割放射后 $G_2 + M$ 期细胞比例的增加先是 G_1 期细胞比例减少,继而 G_1 和 S 期都减少。而放射后 RNA 含量无明显改变和文献报道亦一致^[11,14]。

本实验模拟临床常用放射分割方案进行对人体肿瘤细胞球体生长、生存比率和细胞动力学诸方面影响的观察,为进一步应用较大直径球体(如 400 μm 以上 HeLa S-3 球体)以了解乏氧细胞存在对上述实验结果的影响,和放射期间再充氧作用的地位打下基础,这些对考虑临床放射方案可能还有一定参考价值。

参 考 文 献

- [1] H. K. Awao, M. Barsonm, M. E. Merzabani, S. Omar, S. E. Badawy, S. Ezzat, H. E. Baki, A. Zaki, Am J Clin Oncol, 6,91 (1983).
- [2] H. D. Thames Jr., L. J. Peters, H. R. Withers, G. H. Fletcher, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 9:127 (1983).
- [3] R. R. Meoz, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 10,831 (1984).
- [4] H. R. Withers, Radiology, 114,199 (1975).
- [5] A. E. Howes, J. M. Brown, Int J Radiat Oncol Biol Phys., 5,13 (1979).

- [6] H. R. Withers, *Advances in Radiation Biology*, Vol. 5, pp.241, Acad. Press Inc., New York, (1975).
- [7] R. M. Sutherland, R. E. Durand, *Current Topic in Radiation Research Quarterly*, 11,87 (1976).
- [8] R. M. Sutherland, H. A. Eddy, B. Bareham, K. Reich, D. Vanantwerp, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 5,1225 (1979).
- [9] Y. Samo, D. F. Deen, S. M. Oredsson, L. J. Marton, *Cancer Research*, 44,577 (1984).
- [10] J. M. Yuhas, A. E. Tarleton, J. G. Harman, *Cancer Research*, 38,3539 (1978).
- [11] S. Q. He, S. H. Kim, J. H. Kim, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 11,1137 (1985).
- [12] J. H. Kim, S. H. Kim, E. W. Hahn, *Radiat Research*, 93,416 (1983).
- [13] J. M. Yuhas, A. P. LI, A. O. Martinez, A. J. Badman, *Cancer Research*, 37,3639 (1977).
- [14] F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, t. sharpless, M. R. Melamed, *J Hist-chem. & Cytochem*, 25,46 (1977).
- [15] R. Jostes, Y. Sano, L. Marton, D. Deen, *Proceedings of the 7th International Congress of Radiation Research*, DI-17, Amsterdam, (1983).
- [16] P. Wathe, R. E. Durand, M. T. Kademan, *Int J RapiationRadiat Oncol Biol Phys*, 4:983 (1978).
- [17] J. B. Mitheal, J. S. Bedford, S. M. Bailey, *Research*, 79,520 (1979).
- [18] R. E. Durand, *Radiation Research*, 81,85 (1980).
- [19] S. L. Cao, S. Skog, B. Trubukat, *Acat Radiologica Oncol*, 22,35 (1983).
- [20] L. Hieber, H. P. Beck, C. Lucke-Huhle, *Cytometry*, 2,175 (1981).

(稿件收到日期: 1987 年 1 月 23 日)

EFFECT OF HYPERFRACTIONATED IRRADIATION ON THE GROWTH AND CELL KINETICS OF HeLa S-3 SPHEROIDS

He Shaoqin Sanghie Kim Ph.D.* Jaeho Kim, M. D. Ph. D.*

(Dept. of Radiation Oncology, Cancer Hospital, Shanghai Medical University)

(*Radiation Biology Laboratory, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center)

ABSTRACT Controversy exists about the validity of hyperfractionated radiation inverse of conventional fractionated radiation from clinical trials. It is necessary to design a real advantage of hyperfractionated radiation, compared with the conventional fractionation schedule of radiation treatment. To investigate the basic radiobiological response of hyperfractionated radiation, the 200 μ m HeLa S-3 spheroid were used in this study. The quantitative changes in growth rate, surviving fraction and cell kinetics of spheroids after various dose fraction schedules were compared. The data of growth rate and surviving fraction assays showed that repair and redistribution of cells during the radiation periods are important. Cell kinetics study showed a quite constant pattern of $G_2 + M$ block in the conventional radiation group, but a fluctuated pattern was seen in the hyperfractionated radiation groups. For further mimicking the clinical trail, a larger size of spheroid which have certain hypoxic cells was necessary to being used in experiment.

KEY WORDS Multicellular Tumor Spheroid; Hyperfractionated Radiation; Cell Kinetics