

异质性小鼠乳腺癌细胞的放射反应

程文英

(上海医科大学放射医学研究所, 上海)

Lyle A. Dethlefsen

(美国 Utah 大学医学中心放射科, 盐湖城, 美国)

摘要 本文选取由单个小鼠乳腺癌分出的两种异质性细胞亚群 66 和 67, 研究其生长动力学和对 X 射线的放射反应。实验结果表明: 两细胞株在指数生长期(P)的放射敏感性相同, 但在相对静止期 Q, 细胞的放射敏感性显著高于 P 细胞, 其中 66 Q 细胞比 67 Q 细胞更为敏感。实验还分析了 66 与 67 细胞处于不同生理状态对放射反应的差别与细胞周期分布密切相关, 但与坪区 Q 培养、pH 和细胞密度无关。

关键词 小鼠乳腺癌细胞, 放射反应, 异质性

引言

肿瘤是由增殖状态和遗传构型不同的多种恶性细胞所组成, 肿瘤细胞的这种异质特性是治疗成败的决定因素之一^[1]。同一肿瘤中各亚群细胞在增殖和成熟过程中可以形成多种克隆, 从而具有不同的细胞特性和对放疗及化疗的不同反应; 即使从相同克隆来的细胞, 当外环境影响细胞生理状态时, 它们对抗癌治疗的反应也不同。Wallen 等证实指数生长期的 P 细胞和相对静止期的 Q 细胞, 其放射敏感性可因肿瘤细胞种类或环境的差别而变化^[2]。但目前对放射反应的细胞及分子机理尚不清楚。Dethlefsen 等曾选取同一个小鼠乳腺癌的两个细胞亚群 66 和 67 进行放射反应作用原理研究^[3,4]。本文着重评价两细胞亚群的生长动力学和放射反应, 探讨细胞生长代谢及周期动态分布与放射反应的关系, 为放射治疗和肿瘤放射生物学提供实验依据。

材料和方法

细胞培养 66 和 67 细胞每周换培养液 3 次, 初始培养在含 15% 血清(3% 胎牛血清、6% 水牛血清、6% 马血清)、由 GIBCO 实验室提供的 Waymouth's 完全培养液中, 按 $2 \times 10^4/\text{ml}$ 接种细胞。应用 Hoechst 33258 法及 ^3H 尿嘧啶测试法, 每月做一次支原体污染检查。

接种细胞后, 将生长 2 d 呈指数生长的细胞定为 P 细胞; 不换培养液连续培养 7 d 的称为 Q 细胞。如在 Q 细胞原位移去旧培养液, 换入新鲜的常规完全培养液, 刺激细胞增长, 并在不同时间分别取样进行检查, 如为刺激后 4 h 的标本定为 $\text{St}_{\text{Q-4}}$ 。另外, 在细胞接种后 2 d 移除原来的 P 细胞培养液, 更换只含 0.5% 血清的培养液, 再置孵箱中培养 5 d, 即细胞接种后第 7 d 取材的定为 Sd。Sd 细胞又可按两种方法进行原位刺激: (1) 去除 Sd 培养液, 加入含 15% 血清的完全培养液, 在刺激后培养 4 h 的标本定为 $\text{St}_{\text{Sd-4}}$ 。(2) 保持原来的 Sd 培养液, 另加入血清调整培养液的血清浓度至 15%, 再在不同时间收集标本, 如刺激后 4 h 的标本称 $\text{St}_{\text{AB-4}}$ 。

仅有一组实验, 即在 66 Q 细胞中加入 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 尼克酰胺和 $30 \mu\text{l}$ 1 mol/L NaOH 二次, 间隔 30

min, 再培育 4 h, 为改变其代谢。

细胞生化测定 细胞总蛋白量采用 Peterson 改良法^[5], 总 RNA 量按 Dethlefsen 法^[6]。细胞总蛋白和 RNA 相对含量测定的同时, 也进行流式细胞计(FCM)检测。细胞周期时相分布参照 Ridinger 法^[7], PI 染色, 由 FCM 分析, 通过电子计算机程序求得 DNA 相对量, FCM 型号为 FACS IV。

肿瘤细胞集落形成 细胞在单层培养状态下接受不同剂量的 X 线照射后, 胰酶消化, 按要求将细胞分置于具常规完全培养液的 6 cm² 培皿内, 在 5% CO₂ 温箱中培育 10 d, 用结晶紫染色集落, 解剖镜下计数, 凡 50 个细胞以上的为一集落, 实验所得均值为重复 3—4 次的结果。细胞存活率 = 所计数的集落数/[细胞种植数 × 集落形成率(PE/100)]。

淘式离心 按 Sweigert 方法^[8], 采用 Beckman JE-6 B 淘洗转子, 流速 30 ml/min, 收集富含 G₁ 或 S 期的细胞, 通过 FCM 分析 DNA 相对量, 推算 G₁ 及 S 期细胞的比例。

照射条件 用 Phillips T-250 X 线机照射, 距离 40 cm, 条件为 250 kvP, 15 mA, 3 mmAl, 剂量率 2.5 Gy/min。

结 果

1. 细胞生长动力学

66 和 67 细胞的生长动态如图 1 所示。67 细胞(见图 1 A)在培养 3—3.5 d 呈指数生长, 以后逐渐进入坪区, 5—10 d 内细胞数基本保持稳定。在此期间, 如原位补充营养刺激其生长(St_Q), 2 d 后 Q 细胞呈现轻度增加, 然后出现新的坪段。如在接种后第 2 d 更换 0.5% 血清的培养液(S_d), 则细胞增长明显减缓, 48 h 内迅速转入平台期。此时的细胞密度并不高, 没有达到融合成片的状态, 且 pH 值也和 P 细胞接近约 7.2。但当用 15% 血清的完全培养液替换 S_d 培养时(St_{Sd}), 细胞数再次上升, 4 d 后可增至 Q 细胞坪区水平。若不移除 S_d 培养液, 就在原瓶内加入血清, 使 0.5% 的浓度恢复到 15% 时, 细胞生长趋势基本和 St_{Sd} 相似。

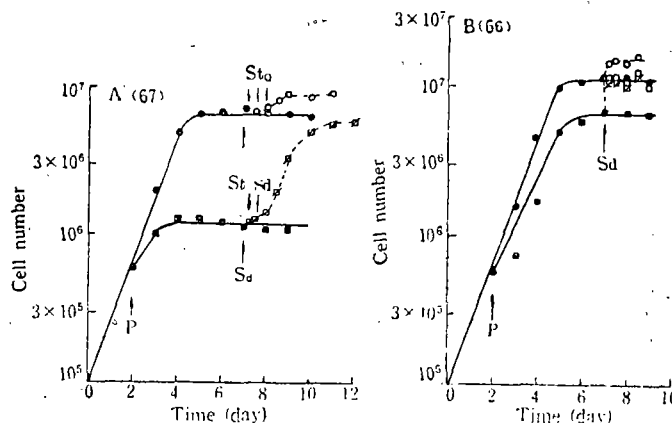


Fig 1. Growth dynamics of the cell cultures.
(A) 67 cells (B) 66 cells

66 细胞的生长动力学(见图 1 B)大致和 67 细胞类同, 但有三点区别: (1) 66 S_d 培养时, 细胞可持续增长 4 d, 而 67 S_d 只维持 2 d。(2) 66 S_d 的坪区和 67 的比较, 更加接近 Q 细胞的融合密度。(3) 以营养物刺激 66 Q 和 S_d , 细胞生长在 6 h 内就可达到新的坪段; 而 67 细胞反应较

Tab 1. FCM and biochemical parameters (means $\pm$ 1 s. e. e.)

Group	St _Q					St _{Sd}			
	P	Q	4 h	14 h	24 h	Sd	4 h	14 h	24 h
66 Cells FCM dist.									
G ₁	39 $\pm$ 8	86 $\pm$ 5	86	82	71	81	74	74	59
S	48 $\pm$ 10	8 $\pm$ 1	10	13	16	15	20	22	31
G ₂ M	13 $\pm$ 6	6 $\pm$ 4	4	5	13	4	6	5	11
DNA(³ H-TdR incorp)	100	3.1	2.6	9.8	11.7	3.4	2.2	11.1	—
RNA									
Content [B/F]*	100	41/53	38/54	45/66	—	—/44	—/85	—/84	—
¹⁴ C-Udr incorp.	100	16	24	30	159	24	21	33	—
Protein									
Content [B/F]	100	56/59	58/63	73/79	—	—/47	—/92	—/95	—
³ H-LEU incorp.	100	36	38	54	42	34	48	84	—
67 Cells FCM dist									
G ₁	42 $\pm$ 4	92 $\pm$ 4	94	86	85	95	92	84	46
S	42 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2	4	9	8	4	3	13	26
G ₂ M	17 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	3	5	6	2	5	3	28
DNA(³ H-TdR incorp)	100	0.5	1.5	8.1	—	0.7	2.6	43	—
RNA									
Content [B/F]	100	33/67	37/74	38/73	—	—/66	—/84	—/134	—
¹⁴ C-Udr incorp.	100	9	41	37	—	12	18	63	—
Protein									
Content [B/F]	100	49/75	54/80	61/84	—	—/66	—/75	—/119	—
³ H-LEU incorp.	100	26	31	36	—	23	45	71	—

* B/F, B-Biochemical, F-flow cytometry.

慢, 此过程需 2—4 d。

2. 细胞 FCM 及生化检测

如表 1 所示, 66 细胞 FCM 的 DNA 相对量在 P 细胞有 39% 处 G₁ 期, 48% 为 S 期, 13% 为 G₂ + M 期; 但 Q 细胞的这种分布分别为 86、8 和 6%。在 St_{Q-4} 和 St_{Q-14}, 即 Q 细胞受刺激后 4 和 14 h, 细胞周期比例和刺激前接近, 但到 St_{Q-24} 时, G₁ 期细胞降低为 71%。当 Sd 培养时, 其细胞各期分布和 Q 细胞相似, 但一旦增加营养受到刺激, 细胞很快由 G₁ 向 S 期转移, 从 St_{Sd-4} 至 St_{Sd-24}, 细胞的 G₁/S 比例可由 74/20 至 59/31。这种细胞向 S 期的动态趋向也通过 ³H-TdR 掺入技术反映出来, 以 P 细胞掺入率 21937 $\pm$ 1915 cpm/10⁵ 细胞作为 100% 对照值, Q 细胞为 3.1%, St_{Q-14} 增至 9.8%, Sd 细胞为 3.4%, St_{Sd-14} 上升至 11.1%。从肿瘤细胞集落形成能力 (PE) 分析, 66 P 细胞为 74% 而 Q 与 Sd 细胞下降为 35 和 40%。当细胞受刺激后 4 h, PE 值立即回升, 向 P 细胞水平发展。为了了解肿瘤细胞代谢状况, 进行了 RNA、蛋白含量及放射性掺入试验。结果表明, Q 和 Sd 细胞的 RNA 量相当于 P 细胞的 41%, ¹⁴C-UdR 掺入率为 16%, 总蛋白为 56%, ³H-亮氨酸为 36%。当刺激 Q 或 Sd 细胞, 这些参数呈现中等程度的提高。

对于 67 细胞, FCM 测得 P 细胞中有 42% 处 G₁ 期, 42% 在 S 期, 17% 在 G₂ + M 期。而 67 细胞的 Q 和 Sd 培养时, G₁ 期占 92% 以上。在受刺激后 24 h, St_{Q-24} 的 G₁ 期细胞降至 85%,

St_{sd-24} 的 G_1 期细胞只占 46%。这些变化和 ^3H-TdR 掺入结果一致。集落形成率测定表明 67 的 Q 和 Sd 细胞, 其 PE 值和 P 细胞相近, 为 65%; 当受刺激后, St_{Q-14} 增至 76%, St_{sd-4} 则达 94%。生化方面 RNA、蛋白含量及放射性掺入检测结果和 66 细胞有类同的趋势。

3. 细胞放射反应

两细胞亚群在 X 线照射后的放射反应见图 2 及表 2。实验表明, 66 细胞受照射后, Q 期的放射敏感性比 P 期为高。Q 细胞受刺激后(St_{Q-4})再接受照射, 放射抗性显著增加, 但尚未完全恢复到 P 细胞水平。Sd 细胞对射线的反应与 Q 细胞相似。如果改变血清浓度刺激其生长, St_{sd} 的存活曲线逐渐向 P 细胞靠拢。另外, 也注意到尼克酰胺碱化处理 (NA/pH) 的影响, 虽然在 Q 细胞, NA/pH 可使放射反应轻度降低, 当更换新鲜完全培养液即 St_{Q-4} 时, 碱化效应并不影响放射敏感性。

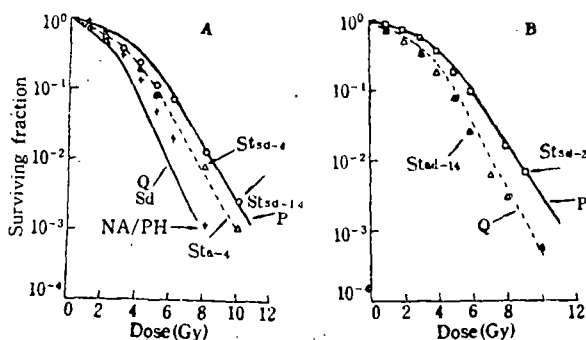


Fig 2. Cell survival curves of 66 and 67 cells irradiated in Various proliferative states.
(A) 66 cells, (B) 67 cells

由 67 细胞的生存曲线结果表明, 67 P 细胞的放射反应和 66 P 细胞相仿, 但 67 Q 细胞仍比其 P 细胞敏感。虽然 67 Sd 细胞放射反应类同 Q 细胞, 当受刺激后, St_Q 和 St_{sd} 到 24 h, 放射敏感性都降低, 但整个过程的变化速度比 66 细胞的缓慢。

为进一步分析细胞周期分布对细胞放射反应的影响, 特将 P 细胞进行淘式离心, 以期获得更加浓集的 G_1 和 S 期细胞。表 3 为淘式处理结果, 其中 [Q] 值来自图 2 和表 2 的 Q 细胞生存曲线, 以便对照比较。在 66 细胞, [Q] 的 G_1 期为 86%, P- G_1 的 G_1 期占 74%, 照射后的 [Q] 就比 P-

Tab 2. Radiation responses

Radiation Parameters	Physiological states							
	St_Q				St_{sd}			
	P	Q	4 h	14 h	Sd	4 h	14 h	24 h
66 cells								
D_0 (Gy)	1.14 ± 0.18	0.90 ± 0.07	1.06 ± 0.10	1.14 ± 0.10	0.96 ± 0.04	1.06 ± 0.05	1.03 ± 0.06	—
D_q (Gy)	3.23	1.61	2.72	2.66	2.00	2.04	2.26	—
67 cells								
D_0 (Gy)	1.12 ± 0.06	0.92 ± 0.07	0.93 ± 0.05	1.04 ± 0.04	1.00 ± 0.07	0.95 ± 0.04	0.99 ± 0.04	1.20 ± 0.13
D_p (Gy)	3.52	2.94	2.34	1.93	2.37	2.59	2.31	2.96

Tab 3. Elutriation Studies

Cell-Cycle Phase Parameter	A syn* P-cells (Control)	G ₁	S	[Q]
69 cells Radiation survival				
4.0 Gy	0.30	0.35	0.64	0.07
6.0 Gy	0.12	0.13	0.14	0.007
8.0 Gy	0.032	0.026	0.051	0.001
FCM dist. (%)				
G ₁	39	74	2	86
S	48	19	81	9
67 cells Radiation survival				
6.0 Gy	0.11	0.044	0.94	0.035
8.0 Gy	0.02	0.006	0.016	0.004
FCM Dist. (%)				
G ₁	52	94	26	92
S	27	3	60	5

* A sample of the synchronous P-cell population used for the elutriation studies which was held on ice (4°C) for the duration of the elutriation (4 h) and then irradiated and plated out along with the elutriated G₁ and S fractions.

G₁ 细胞显示放射敏感。在 67 细胞, 淘式离心的 P-G₁ 和 P-S 细胞经照射后, 前者的放射反应比后者的高出 2 倍以上, 而 [Q] 与 P-G₁ 细胞中的 G₁ 期比例相似, 照射后的存活率也较接近。

讨 论

66 和 67 细胞系小鼠同一乳癌异质性的两个细胞亚群, 这种特点可以表现为细胞本身内在的生理差别, 也可显示细胞对环境变化不同的应激反应。同样, 66 和 67 细胞的异质特性不仅在细胞形态和染色体组型上有所反映, 从本实验的细胞生长动力学和放射反应中也得到证实。66 Q 细胞达到坪区的细胞密度 $11.4 \times 10^6/T-25$ 比 67 Q 的 $7 \times 10^6/T-25$ 为高, 而 66 Q 细胞的集落形成能力 (35%) 比 67 Q 细胞的 (67%) 低。当细胞受环境因素刺激后, 两者的反应速度和强度也不尽相同, 由此可见肿瘤治疗的复杂性。

细胞的放射反应结果表明, 两细胞亚群 P 细胞的放射敏感性相同, 而在相对静止期 Q 细胞的放射敏感性显著高于 P 细胞, 其中 66 Q 细胞比 67 Q 细胞更敏感。

为了阐明放射反应的基本原理, Dethlefsen 等曾研究细胞内源性硫醇, 特别是谷胱甘肽含量、多 ADP 核糖聚合酶活性、DNA 单链或双链断裂后修复能力等因素与放射敏感性的关系, 但上述实验研究结果, 均未找到有关的证据^[3,4,7-9]。

由本实验结果分析, 细胞的密度不是影响细胞放射反应的诱因, 如 Q 和 Sd 培养时, 两者的细胞密度相差甚大, 但照射后其 D₀S 和 D₀S 和 p 细胞相比都有降低, 细胞的放射反应相似。此外, 在有尼克酰胺存在的 66 Q 细胞 (pH ≈ 7.6) 实验中, 观察到 pH 的改变也不是细胞放射反应的决定因素。但细胞周期分布的改变对放射敏感性是有影响的, 如 66 和 67 Q 细胞受刺激后, 其 D₀ 值迅速回升接近 P 细胞水平。事实上, Q 和 Sd 培养使 G₁ 期呈阻滞状态, 它们对射线反应敏

感是与 G_1 期比例增加有关。淘式离心的结果进一步证实细胞周期时相的改变是涉及放射反应的主要因素。Oleinick 等认为, 细胞放射敏感性的不同, 可能是由于 G_1 和 S 期细胞染色质结构差异所引起的^[10]。将实验结果和临床应用相联系, 设法使肿瘤细胞诱导至敏感的细胞周期, 对提高放射治疗效果将是有益的。

参 考 文 献

- [1] G. H. Heppner, *Cancer Res.*, 44, 2259(1984).
- [2] C. A. Wallen and L. A. Dethlefsen, *Cancer Res.*, 45, 3064(1984).
- [3] L. A. Dethlefsen, J. E. Biaglow, V. M. Peck and D. N. Ridinger, *J. Cellul. Physiol.*, 132, 149(1987).
- [4] L. A. Dethlefsen, C. M. Lehman, J. E. Biaglow and V. M. Peck, *Radiat. Res.*, 114, 215(1988).
- [5] G. L. Peterson, *Methods Enzymol.*, 91, 95(1983).
- [6] L. A. Dethlefsen and R. M. Riley, *Cell and Tissue Kinetics*, 6, 3(1973).
- [7] D. N. Ridinger, S. N. Loh, R. L. Wartens and L. A. Dethlefsen, *Radiat. Res.*, 108, 127 (1986).
- [8] S. E. Sweigert, R. Rowley, R. L. Waters and L. A. Dethlefsen, *Radia. Res.*, 116, 228(1988).
- [9] S. E. Sweigert, S. J. Petzold, C. S. Surowy, S. J. Berger, L. A. Dethlefsen and N. A. Berger, *Radiat. Res.*, 105, 219(1986).
- [10] N. L. Oleinick, S-M. Chiu and L. R. Friedman, *Radiat. Res.*, 98, 629(1984).

稿件收到日期: 1989年9月15日

RADIATION-INDUCED RESPONSES IN HETEROGENEOUS MURINE MAMMARY TUMOR CELLS

Cheng Wenying

(Shanghai Institute of Radiation Medicine, Shanghai)

Lyle A. Dethlefsen

(Department of Radiology University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City, U. S. A.)

ABSTRACT The radiation responses of two heterogeneous murine tumor lines in vitro was studied at the time of X-irradiation. The proliferating (P-cells) 66 and 67 cells displayed equal radiosensitivities, however, the quiescent (Q) cells were considerably more radiosensitive than the P-cells, with the 66 Q being more radioresponsive than the 67 Q. A detailed analysis of the metabolic status vs cell-cycle age (i. e., G_1 vs S-phase) indicates that the cell-cycle age was the predominant influencing factor for radiation-induced responses. The data also showed that in the plateau phase Q-cell cultures pH and cell density were not influencing factors.

KEYWORDS Murine mammary tumor cells, Radiation induced responses, Heterogeneity