

肿瘤多细胞球体在放射治疗基础研究 中的应用和意义*

何少琴 刘泰福

(上海第一医学院肿瘤医院)

摘要 自70年代以来,肿瘤多细胞球体模型已被广泛应用于肿瘤研究中,用这种体外模型可以研究实体肿瘤的特性和抗肿瘤治疗,尤其是放射治疗的效应。本文结合作者在应用这种球体模型实验中的体会,对它在放射基础研究中应用和意义进行了综合性介绍。肿瘤多细胞球体在组织学和生长特性方面和实体肿瘤相似,例如随着体积增长有乏氧细胞和或坏死区存在,生长比率降低。

本文介绍了应用这种模型时多种观察指标,包括在肿瘤研究中评定放射效应的技术。例如体积变化、组织学、细胞存活、细胞活力、细胞丢失和细胞动力学等。肿瘤多细胞球体内细胞之间的密切联系具有累积和修复放射损伤的能力。表现为对放射的抗性比单层细胞高。在某种程度上肿瘤多细胞球体是一种介于体内和体外单层细胞之间的简单、周期短、而又经济的实验模型。

关键词 肿瘤多细胞球体;生长比率;生存比率;细胞活力;细胞丢失;“接触抑制”;细胞动力学。

体内实体肿瘤细胞对放射或药物等的效应可能还受到宿主的免疫系统、全身条件、局部微环境等的影响。虽然体内肿瘤也可进一步做细胞生存试验,但是影响试验因素较多,操作也麻烦。相反的,体外单细胞培养比较简单,然而实验结果常常还不宜直接用于体内。自70年代初由Sutherland等^[1~2]在含有磁棒的特殊旋转瓶(Spinner Flask)内培养中国地鼠V₇₉细胞球体成功以来,尤其在yuhas^[3]用比较简单的琼脂基(Agar base)培养法后,这一介于单细胞和体内实体肿瘤之间的三面体接触的实验模型已在国外广泛应用于肿瘤研究中。除了进行肿瘤特殊性研究外也用于研究如放射、化疗药物、加热、超声等效应,尤其是对放射效应研究较多。

肿瘤多细胞球体(Multicellular Tumor Spheroid; MTS,下简称球体)是由许多肿瘤细胞聚集一起形成的球形物。球体被用来模拟体内实体肿瘤主要在于它们在组织学和细胞增殖方面很相似。球体经磷酸缓冲液,福尔马林固定、脱水、石蜡包埋、切片和H.E.染色后^[2],在光学或电子显微镜下可以观察到球体的结构和同类体内肿瘤相仿,外层的细胞排列较规则、紧密,内层则较不规则和松散。球体细胞之间常有的突起状联结(contact junction)见图1,是单层细胞所缺少的。目前还不完全清楚这种电子密度低于细胞膜的联结的真正功能。除了起细胞之间连接作用和交换细胞代谢物外,可能具有“接触抑制”作用(“Contact Inhibition”),和球体对一些如放射、化疗药物等引起损伤的修复有关^[4,5]

实体肿瘤生长速度超过血供应时,细胞之间的营养、代谢、氧供应等微环境有了变化,在半径大于150 μm 肿瘤中间可以出现乏氧细胞和/或中心坏死区^[2]。组织学方法和 C^{14} 标记(碳¹⁴——硝基咪唑),不但证明球体在一定大小以上时有乏氧细胞和坏死区存在,还可以进行乏氧细胞的定

* 文内未加注明者,均为作者在美国 Sloan-Kettering 癌肿中心进行实验所得资料

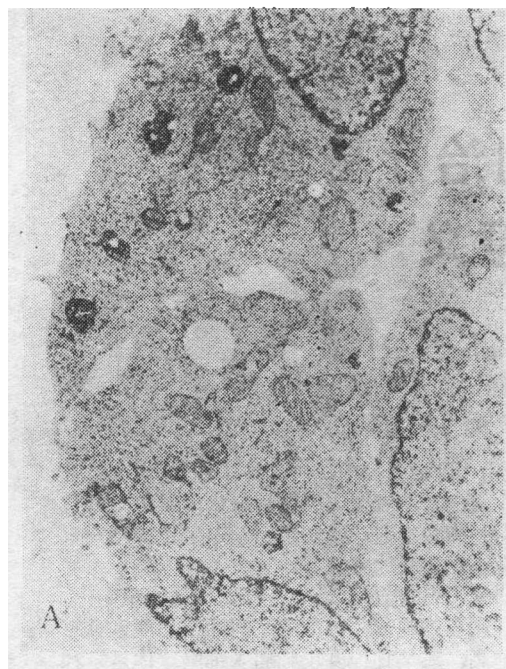


图1 电镜下 HeLa S-3 7天球体外层细胞之间突起伏联结(放大2400倍)

Fig. 1 Photomicrographic Section through outer layer of 7-day spheroid of HeLa S-3 cells, demonstrating contact junctions among cells (Mag 2400)

量。例如 $500\sim 600\mu\text{mV}_{70}$ 球体中有 $5\sim 7\%$ 乏氧细胞^[6]。在显微镜下计500个以上细胞中有丝分裂细胞数,可以算出分裂指数(MI)^[2],和体内实体肿瘤相似,随着球体增大,分裂指数和生长比率(Growth Fraction)都降低。

球体培养成功要包括球体形成和至少长到 $500\mu\text{m}$ 以上两方面。培养方法有三种:特殊旋转瓶、琼脂基(Agar Gel, 也可以用琼脂糖 Agarose)和特殊的表面很光滑的塑料瓶,以前两种为常用。目的都是防止细胞贴壁生长使细胞相互聚集成球状。基本培养条件同单细胞培养。迄今已有多种肿瘤细胞和一些正常细胞可以形成球体,但不一定能同时用特殊旋转瓶法或琼脂基法培养成功。能形成球体的细胞有如 C_3HBA 、Hela、中国地鼠 V_{70} 、EMT₆ 肉瘤、纤维肉瘤、黑色素瘤、胶质瘤、甲状腺瘤、肺癌、神经母细胞瘤、淋巴瘤、3T3 等等^[3,4,7,8]。各种球体形成、生长速度、出现乏氧细胞和坏死区的时间不尽相同。例如 V_{70} 球体要 $5\sim 6$ 天达到 $200\mu\text{m}$, HeLa S-3 则需 $7\sim 10$ 天;并分别在 $360\mu\text{m}$ 和 $500\mu\text{m}$ 以上有坏死区出现,而胶质瘤 118 MG 球体在 $700\mu\text{m}$ 时也无坏死区^[4,9,10]。

下面将从生长率、生存比率、细胞动力学等常用生物学研究项目介绍球体在放射研究中的意义和应用。

1. 生长率(Growth rate)

根据实验的需要,在有网形测微计接目镜的显微镜下,可以直接测量球体的大小。以琼脂基培养的球体为例,在显微镜下用吸管逐一把一定大小的球体移植到铺有 $2\sim 3\text{mm}$ 厚 $0.5\sim 1.0\%$ 琼脂基和 1ml 培养液的多孔塑料板内,每一孔只置一个球体,以免相互粘连融合。定期测定每一个球体两个相互垂直的最大径,从一组球体平均最大直径或算出体积($V = \frac{4}{3}\pi(a,b)^{3/2}$),就可以得到球体的生长曲线。如果观察时间长,宜每周更换培养液一次。由于选择大小一致的球体还是容易掌握的,一组的球体的生长即使在治疗后差异性也比较小,加上球体在组织学和细胞增殖方面和体内肿瘤相似,比单细胞更完整,因此球体生长情况更能反映和接近体内肿瘤。

球体开始呈指数关系生长,一定时间后进入相对密度生长期(平台期)。如图2所示,HeLa S-3 球体从 $200\mu\text{m}$ 长到 $400\mu\text{m}$ 平均为3天,约3周后进入平台期,球体达到 $1000\sim 1200\mu\text{m}$ 大。照射后3天内球体继续增大,以后才呈现和照射剂量有关的生长减慢或停顿,但一旦恢复生长后,其生长曲线形状和未照射的相仿,这些和体内肿瘤很相似。从球体生长曲线可以获得球体大小(或体积)的倍增时间,或找出“治疗”的剂量(照射后2周球体不恢复生长可称为“治疗”)。值得指出的是,一定剂量如图2所示,单次照射 1000rad 后,球体生长虽受到抑制,组织学检查也显示细胞之间不如治疗前紧密,但在长达30天观察期间球体大小一直稳定。这可能和 Jostes 等指出的一样^[11],放射引起一些细胞死亡后,细胞外某些物质保持了球体结构的完整性。

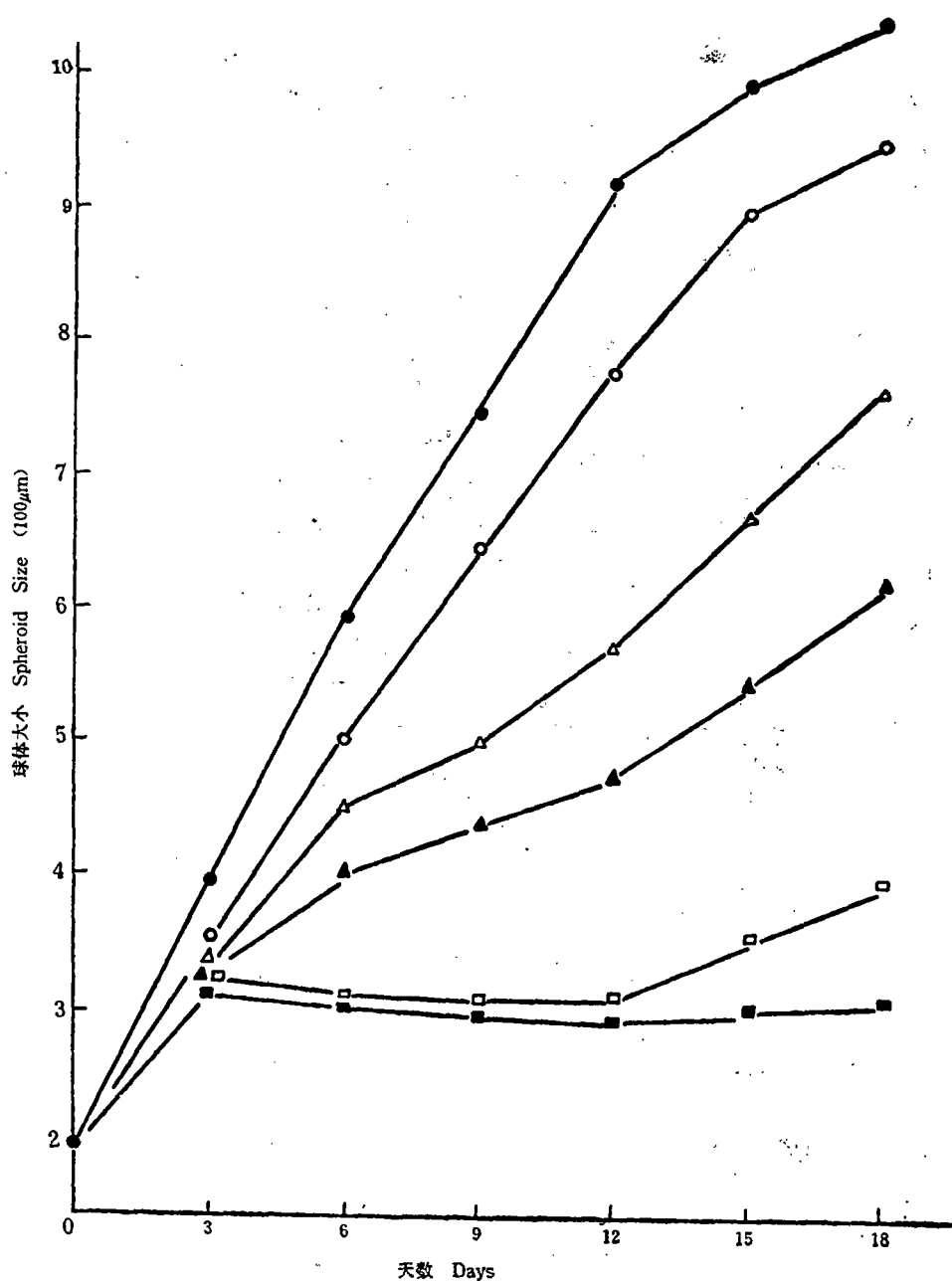


图 2 单次铯¹³⁷放射对 HeLa S-3 球体生长的影响

Fig. 2 HeLa S-3 Spheroid growth after Single dose irradiation of ^{137}Cs

• 0 rad, ○ 200 rad, △ 400 rad ▲ 600 rad, □ 800 rad ■ 1000 rad

2. 生存比率(Surviving Frdction)

去掉培养液后球体经磷酸缓冲液清洗一次,用 0.25%胰酶在 37℃下消化 8~10 分钟,再用吸管用力吹打,反复多次,球体被分散成单细胞。经计数、稀释,可以进行集落形成试验。培养条件同单层细胞。待集落形成后可计算生存比率。

通常球体在照射(或化疗药物、加热、超声波等)后显示比指数生长期单层细胞抗性大,表现为生存曲线的肩区和 D_0 增加。球体对放射的抗性和它本身单层细胞放射敏感性有关外,常随球体长大而增加。图三表示不同大小球体和单层 $V_{79-171b}$ 细胞在单次 ^{60}Co 照射后生存比率的差别^[4]。但是 Durand^[6]又进一步指出,这种球体对放射的抗性从球体 $300\text{ }\mu\text{m}$ 到 $600\text{ }\mu\text{m}$ 时有增加,然而 $800-1230\text{ }\mu\text{m}$ 时抗性反比 $600\text{ }\mu\text{m}$ 时小。这可能是在很大球体中有较多的坏死碎片,它们的毒性减少了球体外层有活力细胞层(Viable rim)的厚度,渗透的改善减少了球体内乏氧细胞的比例或者削弱了细胞的增殖能力。

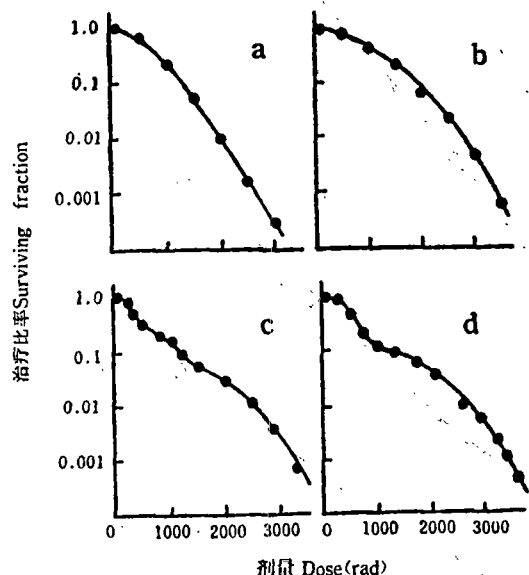


图3 单层 $V_{79-171b}$ 细胞和不同大小球体在单次放射后生存曲线
Fig. 3 Surviving curves of $V_{79-171b}$ cells grown as single cells or different sizes of spheroids after single dose irradiation (Sutherland and Duran's data)^[4]

a: single cells 单细胞 b: $30 \pm 6\text{ }\mu\text{m}$ MTS
c: $306 \pm 6\text{ }\mu\text{m}$ MTS d: $402 \pm 7\text{ }\mu\text{m}$ MTS

时,分割照射和超分割照射的生存比率都比单次照射高^[14]。

Sutherland 和 Durand^[16], Duran 和 Olive^[16]作分段照射后也获得相似的结果,提示球体有一定修复亚致死性损伤和潜在性致死性损伤的能力。

3. 细胞数/球体, 细胞丢失 (cell number/spheroid, cell lose)

取一定数同样大小球体,经胰酶消化后计细胞数,可以求出每个球体的细胞数。图四所示 HeLa S-3 球体大小和球体的细胞数的线性关系,球体中细胞数的倍增时间为 1.5 天(单层细胞 18~22 小时),而球体大小倍增时间为 3 天。放射后(见图二)球体一度继续增大,但这时球体内细胞数却低于治疗前(作者未发表资料)。观察球体内细胞数的变化可能比球体大小的改变更能反映放射效应,同时也提示要考虑生长比率、细胞丢失以及其他可能因素的影响。

除了参照 Steel 公式计算细胞丢失外(细胞丢失 $\phi = 1 - \frac{T}{T_0}$)^[17],至今还没有理想的直接检测细胞丢失量方法。作者曾试收集球体外散在的细胞计数细胞丢失量,但这不能反映球体内已溶解

球体和单层细胞对放射敏感性的差异除了是培养液渗透、营养、乏氧细胞的存在因素外,细胞动力学分布和球体细胞之间紧密联结可能具有“接触抑制”作用,积累了细胞对放射损伤的修复能力。Dertinger^[12]用数学公式计算接触效应 e (contact effect, 为球体生存比率和单层细胞生存比率的比值)来比较各种球体的放射敏感性。 e 值在 HeLa 细胞为 1.17、中国地鼠 V_{79} 为 1.28、小鼠 3T3 为 1.60、大鼠 BICR/MIR-K 为 1.95。 e 值除了和细胞本身有关外,也随球体增大而升高。

收集球体时往往也包括一些散在的细胞或细胞团在内,其中至少包括一些在球体形成之前已失去增殖能力的单个细胞和在球体生长过程中(尤其在分割放散,疗程比较长时)从球体表面脱落下来又具有增殖能力的细胞。这两方面都可能影响生存比率的大小。但是如果用不同大小尼龙网筛选球体,减少非球体物的收集^[13],是否适合于生存比率的观察可能还需要进一步研究。

球体在单次照射后不容易表现出对放射损伤的修复。作者用 7 天 HeLa S-3 球体比较在相同总剂量

或分解成碎片的细胞情况。Wathen^[13]资料介绍中国地鼠 V₇₉-171 b 9~11 天的球体经单次照射 1000 rad 后细胞丢失 15% 左右, 16~18 天的球体放射后细胞丢失约 19%。由于细胞丢失和体内肿瘤的转移、种植有关, 因此用球体来研究细胞的丢失是有一定意义的。

4. 细胞活力, 细胞动力学 (cell viability, Cell Cycle Kinetics)

用 0.5—1.0% 台酚蓝 (台酚蓝: 细胞液 = 1:2) 或非啉溴红 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 染色从球体分离出的细胞, 在显微镜下计活细胞和死细胞数, 算出活细胞百分比。作者用 7 天 HeLa S-3 球体实验, 未经照射球体活细胞率为 80% 左右。这除了因收集球体时同时也收集部分单细胞中有一部分可能已死亡, 球体内也可能有一些死细胞存在之外, 胰酶消化和吸管吹打的损伤都可能影响细胞活力检查的结果。照射后细胞活力下降, 并和放射量有关。

球体培养液内加入 H^3 -胸腺嘧啶达到最终浓度 1.25 mci/ml, 在 37°C 孵箱内置 48 小时, 切片后作连续 3 周的放射自显影, 可以获得细胞动力学分布情况^[2], 近年来流式细胞光度计 (Flow cytometry) 的应用使这方面的研究工作更为完善。从球体分离出的单细胞, 用特殊染色 (Triton-x-100 和碘化丙啉, propidium Iodine, 或吖啶橙, Acridine Orange), 每一个细胞经过流式细胞光度计激光对 DNA 和/或 RNA 量的检测, 再通过一系列放大器和计算机处理可以直接获得细胞动力学分布资料^[9,14,18]。

与单层细胞相比, 球体中有较多 G_1 期和较少 G_2 和 M 期细胞。例如 200 μm HeLa S-3 球体中, G_1 期 54%, S 期 40%, G_2 和 M 期 6%, 而指数生长期单层细胞 G_1 期 45%, S 期 39%, G_2 和 M 期 16%^[9]。用控制球体胰酶消化的时间, 可以分别收集球体各层的细胞, 进一步作细胞动力学检测。Freyer, Durdn, Dertiger 等资料表明^[12,18~20], 球体外层的 G_1 期细胞比内层少, 而 S 期, G_2 和 M 期比内层多, 因此认为这些细胞动力学分布的差异是影响其放射敏感性因素之一。但是近来 Duran 报道表明^[21] EMT₆/R。球体内层近中心坏死区虽有较多 G_1 期细胞, 但其放射敏感性比预计的高, 因而提出除了 G_1 期比例之外, 还有其他目前还不清楚的因素影响放射敏感度。

从细胞动力学检测可以研究球体本身和照射后生长比率以及细胞动力学变化 ($\text{G.F.} = \mu \text{LI} \frac{\text{T}_c}{\text{T}_s}$, μ 为常数 1.01)^[20]。作者曾比较单次照射和分割照射对 7 天 HeLa S-3 球体细胞动力学变化^[14], 单次照射 200 rad 后 24 小时, G_2 和 M 期细胞增加, 为治疗前 3 倍, 48 小时后又回复到照射前水平。作分割照射, 200 rad/天 $\times$ 5, G_2 和 M 期细胞并不随着治疗的继续而进一步增加, 在整个放射期间甚至照射结束后 2 天内, G_2 和 M 期数一直比较恒定。

除上面介绍外, 球体还用于研究 RBE (π^- 介子, 重离子)^[22,23], OER^[24], 放射损伤的修复^[14,18], 放射增敏前^[9,25] 等多方面。近十多年来国外采用球体模型在放射研究中逐渐增多。

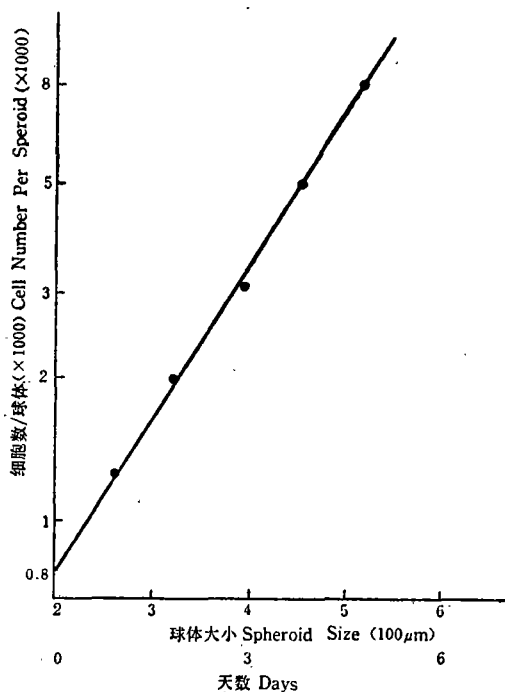


图 4 HeLa S-3 球体中细胞数和球体大小的关系

Fig. 4 Cell Number Per Spheroid as a function of spheroid size

1983年第七届国际放射研究会上(Amsterdam),就有八篇报道是用球体为实验模型的。虽然球体不能完全代替内肿瘤,但不失为一种经济、方便、周转快、又比较容易掌握实验条件均一性的实验模型。

参 考 文 献

- [1] W. R. Inch, J. A. McCredie, R. M. Sutherland, *Growth*, 34: 271-282, (1970).
- [2] R. M. Sutherland, J. A. McCredie, W. R. Inch, *J. Natl. Cancer Inst.* 46: 113-120, (1971).
- [3] J. M. Yuhas, A. P. Li, A. O. Martinez, A. J. Ladman, *Cancer Res.*, 37: 3639-3643, (1977).
- [4] R. M. Sutherland, R. E. Durand, *Current Topics in Radiation Research Quarterly*, 11: 87-137, (1976).
- [5] T. Sasaki, M. Yamamoto, T. Yamaguchi, S. Sugiyama, *Cancer Res.*, 44: 345-351, (1984).
- [6] R. E. Durand, *Radiat. Res.*, 81: 85-99, (1980).
- [7] M. Haji-Karim, J. Carlsson, *Cancer Res.*, 38: 1457-1464, (1978).
- [8] J. Carlsson, K. Nilsson, B. Westermark, J. Ponten, C. Sundstrom, E. Larsson, J. Bergh, S. Pahlman, C. Busch, V. P. Collins, *Int. J. Cancer*, 31: 523-533, (1983).
- [9] S. Q. He, S. H. Kim, J. H. Kim, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, in press
- [10] H. L. Mohammed, *Cancer Res.*, 38: 1457-1464, (1978).
- [11] R. Jostes, Y. Sano, L. Marton, D. Deen, *Proceedings of the seventh International Congress of Radiation Research*, DI-17, Amsterdam, (1983).
- [12] H. Dertinger, C. Lücke-Huhle, *Int. J. Radiat. Biol.* 28: 255-265, (1975).
- [13] P. Wathen, R. E. Durand, M. T. Kademian, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 4: 983-986, (1978).
- [14] S. Q. He, S. H. Kim, J. H. Kim, A. A. Alfieri, *Proceedings of the 32nd Annual Meeting of Radiation Research*, Fe-9, Florida, U. S. A., (1984).
- [15] R. M. Sutherland, R. E. Durand, *Int. J. Radiat. Biol., phys.*, 23: 235-246, (1973).
- [16] R. E. Durand, P. L. Olive, *Advances in Radiat. Biol.*, 9: 75-99, (1981).
- [17] G. G. Steel, *Cell Tissue Kinet.*, 1: 193, (1968).
- [18] J. Freyer, R. M. Sutherland, *Cancer Res.* 40: 3965-3968, (1980).
- [19] H. Dertinger, D. Hülser, *Radiat. Environ. Biophys.*, 19: 101-107, (1981).
- [20] R. E. Durand, *Cell Tissue Kinet.*, 9: 403-412, (1976).
- [21] R. E. Durand, *Proceedings of the Seventh International Congress of Radiation Research*, DI-07, Amsterdam, (1983).
- [22] M. M. Kilgerman, S. Wilson, Y. Tanaka, J. Burmester, R. Hogstrom, J. M. Yuhas, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 7: 923-927, (1981).
- [23] A. Rodrigueq, E. L. Alpan, *Radiat. Res.*, 85: 24-37, (1981).
- [24] A. J. Franko, R. M. Sutherland, *Radiat. Res.*, 79: 454-467, (1979).
- [25] M. J. Dorie, J. M. Brown, R. F. Kallman, *Proceedings of the Seventh International Congress of Radiation Research*, D 2-06, Adsterdam, 1983.

(1984年10月19日收到)

THE USE AND IMPLICATIONS OF MULTICELLULAR TUMOR SPHEROIDS IN RADIATION RESEARCH

He Shaoqin, Liu Taifu

(Cancer Hospital, Shanghai First Medical College)

ABSTRACT The system of Multicellular Tumor Spheroids (MTS) as an additional in vitro model, has been broadly used in cancer research since the 70's to study the characteristics of solid tumors and the effects of anti-cancer agents, particularly of radiation. This paper reviews and evaluates the method according to the authors' experience in using MTS in experiments. MTS simulates conditions found in those solid tumors which have similar histological structures, such as the existence of hypoxic and/or necrotic areas and the manifestation of a decrease of growth fraction as they increase in size.

Various assays with samples in detail have been developed and adopted in MTS experiments including many of the techniques used in tumor biology to determine the dose response of tumors to radiation such as volume change, cell survival, cell viability, histology, cell loss, and cell cycle kinetics. Cells in MTS grown in close contact had an enhanced capability to accumulate and repair the damages induced by treatment, representing a higher resistance to treatment than monolayer cells. To certain extent the MTS system, being biologically somewhere between in vivo and conventional in vitro monolayer cells, is an attractive model due to its low expense high turnover speed and convenience for use.

KEY WORDS Multicellular tumor spheroid; Growth fraction; surviving fraction; cell viability; cell Loss; "contact inhibition"; cell kinetics.

会议简讯

中国科学院辐射技术研究与开发工作讨论会在苏州召开

1985年3月26日至30日,中国科学院数学部和化学学部在苏州西山联合召开了《中国科学院辐射技术研究与开发工作讨论会》。参加会议的有该院数学部、化学学部和生物学部所属17个有关单位的代表50多名,核工业部北京原子能研究所也应邀参加了会议,检阅了中科院近几年来有关辐射技术研究与开发工作的情况。

会议收到论文和工作报告五十余篇。有关专家在会上提出了七个综合性报告,《辐射研究与工艺、辐射装置与剂量测量、辐射技术在交叉学科方面的应用等方面,综合评述了国内外的发展趋势。十五个工作报告介绍了各单位开展辐射技术研究与开发工作的情况。会议期间还分三个专题组着重深入讨论了食品的辐照保藏,新材料研究和辐射装置与剂量测量等问题。

与会代表高度评价了中科院二十多年来,特别是1980年以来在辐射技术应用和基础研究工作中所取得的成就,指出该院已初步形成了一此辐射研究基地,成长了一支专业基本配套的科技队伍,并为科学研究、军工任务和国民经济各部门提供了许多重要的研究成果。近年来,在中央关于科学技术要面向经济建设的方针指导下,该院积极创造条件、有选择地加强了开发工作。在辐射杀虫灭菌、食品的辐射保鲜贮藏,材料的辐射改性以及辐射

(下接第24页)