

# 快中子诱发 U251 神经胶质瘤细胞的生物效应研究

杨 磊, 王 潇, 孔福全, 隋 丽,  
崔素珍, 郑洁莹, 马南茹, 赵 葵

(中国原子能科学研究院, 北京 102413)

**[摘要]** 目的:以 14 MeV 快中子照射体外培养的 U251(人脑胶质瘤)细胞,研究快中子诱发 U251 的相关生物效应;方法:快中子照射 U251 细胞,吸收剂量分别为 1、3、5、7 Gy,辐照后检测细胞的存活率、调亡率、生长曲线以及周期变化等相关指标;结果:随着吸收剂量的增加,细胞存活率下降,调亡率上升,呈良好的剂量-效应关系。照射后 24 h,细胞生长曲线无明显变化;照射后 48 h,细胞增殖速度明显变缓;结论:快中子为高 LET 射线,与相关文献报道的  $\gamma$  射线相比,快中子具有较高的相对生物效应。

**[关键词]** 快中子;U251 细胞;生物效应;剂量效应曲线

**[中图分类号]** R811.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-1742(2012)08-0091-05

## 1 前言

肿瘤是一种常见多发病,对人类健康威胁很大,其中恶性肿瘤的死亡率相当高,因此,如何有效地治疗肿瘤是摆在我们面前的一项重要任务。恶性肿瘤的病因和临床表现非常复杂,现主要采用外科手术、射线辐照和中西药物等手段进行治疗。射线辐照曾经只用光子射线,随着电子加速器及其他技术的发展,疗效虽有所改善,但其生物效应总不如高 LET 射线,这些射线中,以快中子治癌的研究发展速度较快。

中子是能够释放出直接电离粒子或引起核变化的非带电粒子。在与组织物质作用过程中产生带电粒子,有一定能量的次级带电粒子能够引起电离和激发,从而使机体组织受到损伤<sup>[1]</sup>。中子属于高传能线密度(linear energy transfer, LET)辐射,它对 DNA 的损伤比同剂量的  $\gamma$  射线更“有效”<sup>[2]</sup>,其细胞遗传学效应敏感。世界第一届快中子放疗基本理论与实际应用会议于 1970 年在荷兰召开,至今已开

过多次中子治癌国际专业会议,专家们对中子治癌的疗效是肯定的<sup>[3]</sup>。1975 年至 1983 年 4 月,日本对 1 016 例癌症患者进行了快中子治疗,以前用光子射线难治的一些癌症,如喉头癌、班氏肺癌、骨肉瘤和恶性黑色素瘤等,现已取得较好的疗效。美国费米实验室从 1976 年开始用快中子治癌的临床研究,10 年中共治疗了 1 400 名患者,对唾液腺癌和恶性黑色素瘤的局部控制率比光子射线分别高 1 倍和 2 倍左右。可是后来,美国放射治疗肿瘤学组织(RTOG)对 307 例不能手术的头颈部鳞癌进行快中子临床随机研究,结果认为,在局部控制率等指标与光子组无统计学意义的差别<sup>[4]</sup>。这表明快中子放疗并不是对所有癌症都有优越性的。另外,几个研究单位对同一癌症患者采用快中子放疗的效果不一致,原因是多方面的,它包括放疗设备性能的差异、发射物理学参数条件的差异和对有关放射生物学因素掌握程度的不同等。

用快中子代替光子射线治疗,物理效应基本相似,但其生物效应则优于光子射线:如相对生物效应

**[收稿日期]** 2012-05-18

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(11079054)

**[作者简介]** 杨 磊(1985—),男,山东文登市人,硕士研究生,研究方向为辐射生物学;E-mail:yang\_lei@ciae.ac.cn

高,即杀灭相同细胞,快中子所需的吸收剂量比光子小;氧增比小,说明快中子对缺氧细胞杀灭能力强;另外,在细胞增殖过程中,光子对相对静止期细胞不敏感,而快中子则无此限制<sup>[5]</sup>。本实验以 14 MeV 快中子照射体外培养的 U251(人脑胶质瘤)细胞,研究快中子辐照诱发 U251 细胞的相关生物效应。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

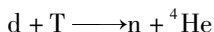
实验中所用细胞系为人脑胶质瘤(U251)细胞系,购自北京协和细胞中心(Cell Resource Center); MEM(Eagle's minimum essential medium)培养基购自迈晨科技公司; Annexin V - FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自凯基生物公司。

### 2.2 细胞培养

U251 细胞在含 10% 胎牛血清(杭州四季青公司)、 $1 \times 10^5$  U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 MEM 培养基中,置于 37 °C 的 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,保持饱和湿度。

### 2.3 辐照条件及中子剂量测定

用中国原子能科学研究院自行设计的高压倍加器所产生的中子束照射所有细胞样本。所用的反应为:



反应产生 14 MeV 中子。

实验组设 1、3、5、7 Gy 共 4 个剂量点,另设置对照组,除不接受照射外,其他条件与实验组相同。

以记录伴随  $\alpha$  粒子的方法检测中子,再算出细胞样本的吸收剂量。

### 2.4 成克隆方法检测细胞存活率

通过测量受不同辐射剂量照射后,有增殖能力的细胞的集落形成能力,即存活率随剂量的变化所绘制出的剂量 - 效应曲线,称之为细胞存活曲线<sup>[6]</sup>。

U251 细胞接受不同剂量的快中子辐照后,用 0.25% 胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞,把细胞悬浮在培养基中备用。将细胞悬液作梯度倍数稀释,以适当的细胞密度接种于培养皿中,并轻轻转动,使细胞分散均匀。置 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的环境下,静置培养。当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃去上清液,用 PBS 小心浸洗 2 次。加入 1:3 醋酸/甲醇 5 mL,固定 15 min。然后去固定液,加适量 Giemsa 染色液染 10 ~ 30 min,之后用流

水缓慢洗去染色液,空气干燥。将培养皿倒置并叠加一张带网格的透明胶片,用肉眼直接计数克隆,最后计算克隆形成率:

$$\text{克隆形成率} = \frac{\text{某一剂量照射后形成的集落数}}{\text{接种的单个细胞数} \times \text{PE}} \quad (1)$$

式(1)中,PE 为未照射时形成的集落数除以接种的单个细胞数。

### 2.5 MTT 方法测定细胞生长曲线

MTT 比色法,是一种检测细胞存活和生长的方法。该方法已广泛用于一些生物活性因子的活性检测、大规模的抗肿瘤药物筛选、细胞毒性试验以及肿瘤放射敏感性测定等。

U251 细胞接受不同剂量的快中子辐照后,用 0.25% 胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞,以适当的细胞密度接种于 96 孔板中。在辐照后的 24、48、72 h 加入 MTT 溶液,继续孵育 4 h 后,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加 150  $\mu$ L 的 DMSO,脱色摇床振荡 10 min,使结晶物充分融解。选择 490 nm(570 nm)波长,在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值,记录结果,以时间为横坐标,吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

### 2.6 细胞凋亡率检测

U251 细胞接受不同剂量快中子辐照后 24 h,用不含 EDTA 的胰酶消化收集所有细胞,按 Annexin V - 异硫氰酸荧光素(fluo - rescein isothiocyanate, FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)荧光染色试剂盒(北京凯基公司)操作说明染色后,进行流式细胞仪检测。具体步骤如下:收集所有细胞后,用 PBS 洗涤细胞两次,收集 1 至  $5 \times 10^5$  个细胞;加入 500  $\mu$ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞;加入 5  $\mu$ L 的 Annexin V - FITC 混匀后,加入 5  $\mu$ L 的 Propidium Iodide,混匀;室温、避光。孵育 5 ~ 15 min,并在 1 h 内进行流式细胞仪检测。

## 3 实验结果和讨论

### 3.1 细胞存活率的剂量效应曲线

U251 细胞在接受不同剂量辐照后,其存活曲线分别见图 1 和图 2。

随着 U251 细胞吸收剂量的增加,存活率急剧下降。存活曲线可模拟为辐射剂量的指数函数,符合单击单靶模型。与低 LET 射线相比,快中子的细胞生存曲线基本没有亚致死性损伤修复的肩区,而是近似直线。

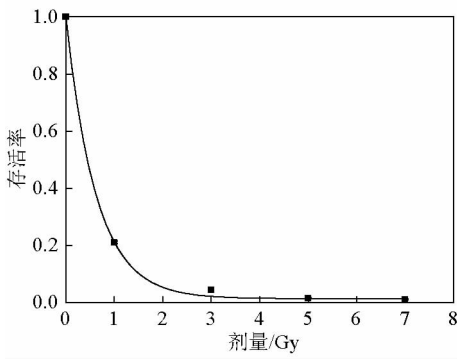


图1 U251 细胞存活曲线

Fig.1 U251 cell survival curves

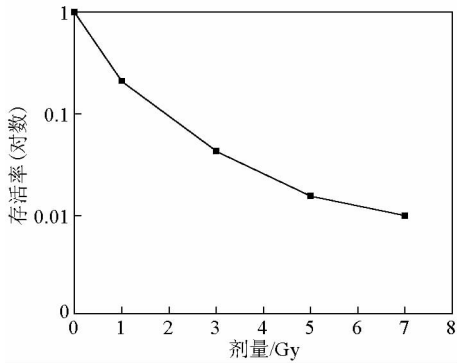


图2 U251 细胞存活曲线对数图

Fig.2 U251 cell survival curves logarithm figure

### 3.2 快中子辐射对 U251 细胞增殖的抑制

从细胞生长曲线的改变(见图3)可见快中子辐射对 U251 细胞的增殖抑制和杀伤作用。细胞接受 1 Gy, 3 Gy 剂量照射后 48 h 内, 并没有出现明显的增殖抑制。至 72 h, 快中子对细胞的增殖抑制作用逐渐体现出来, 随着细胞吸收剂量的增大, 射线对细胞的杀伤作用逐渐增强, 表现为 OD 值的逐渐下降。但与低剂量(1 Gy 和 3 Gy)辐照相比, 吸收剂量为 5 Gy 和 7 Gy 时, 细胞增殖能力的变化并无显著性差异。

### 3.3 快中子诱发的 U251 细胞凋亡

从流式细胞仪检测的结果可以看出, 快中子辐照可以诱发 U251 细胞的凋亡, 结果见图4, 图5。

图4为 U251 细胞接受 3 Gy 剂量照射后 24 h 的流式细胞仪检测结果。由图4可见, 凋亡细胞中多数已进入晚期凋亡继发性坏死的阶段(第2象限), 有部分细胞处于早期凋亡阶段(第4象限), 并有少量坏死细胞(第1象限)。总的凋亡细胞数为第2, 第4象限细胞数目之和。

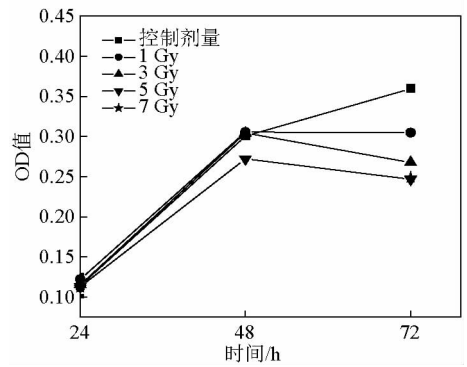
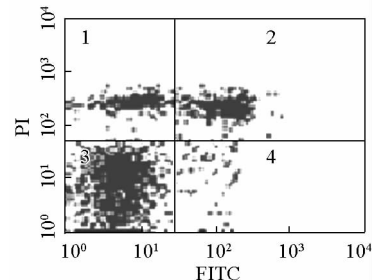


图3 U251 细胞在辐照后 72 h 内的生长曲线

Fig.3 U251 cell growth curve within 72 h after the irradiation



注: PI为一种DNA染料, FITC为异硫氰酸荧光素

图4 流式细胞仪检测细胞凋亡结果

Fig.4 Cell apoptosis results measured by flow cytometry

U251 细胞接受不同剂量快中子辐照 24 h 后(见图5), 随着细胞吸收剂量的增大, 凋亡率增高, 且主要为晚期继发性坏死阶段的凋亡细胞。

### 3.4 讨论

中子本身并不会引起物质电离, 但在生物体内会因核反应而引起反冲质子或  $\alpha$  粒子, 这些都是高 LET 射线, 因此中子也属于高 LET 射线。高 LET 的射线对细胞的杀伤效应更大。

#### 3.4.1 RBE 值

相对生物效应(relative biological effectiveness, RBE)指与 250 kV X 线相比较, 在相等生物效应的基础上, 所需的 250 kV X 线和待测定的(如中子)射线的剂量之比。对快中子而言, RBE 值不是固定不变的, 影响因素很多, 主要是随着分次剂量的降低, RBE 值增高。在细胞存活曲线上, 若以单次照射后产生的细胞存活率 0.01 为参考点, 所对应的所需中子剂量为 6.6 Gy, X 线为 10 Gy, 则 RBE 值 =

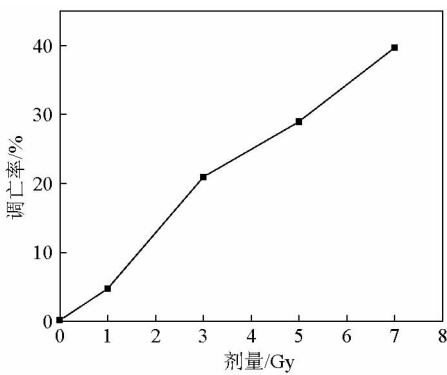


图5 辐照 24 h 后流式细胞术测得的 U251 细胞凋亡率

Fig.5 U251 cell apoptosis rate measured by flow cytometry 24 h after irradiation

10 Gy/6.6 Gy = 1.5; 同样的若以细胞存活率 0.6 为参考点, 则所需的快中子与 X 线剂量分别为 1 Gy 和 3 Gy, RBE 值为 3 Gy/1 Gy = 3。快中子的细胞生存曲线基本没有低 LET 射线亚致死性损伤修复的肩区, 而是近似直线。RBE 值在肩区剂量范围内即低剂量区是最高, 分次照射实际上就是肩区部分低剂量的重复照射, 故小剂量照射时的 RBE 值较单次大剂量照射高。

高沛永等<sup>[7]</sup> 研究核爆炸瞬时辐射诱发人血染色体畸变的剂量效应特点, 并与<sup>60</sup>Co  $\gamma$  线进行比较。结果表明: 中子诱发畸变的 RBE 一般大于 3, 且随着受照剂量的降低有增高的现象。

据现代放射生物学的观点, 按增值的速度和照射后损伤表达的潜伏期长短, 可把正常组织区分为早期或急性反应组织和后期反应组织, 它们的 RBE 也不同。在低 LET 射线的照射后的细胞存活曲线中, 后期反应组织肩区较早期反应组织肩区更弯曲。虽然 RBE 值均随分次剂量降低而增加, 但增加的速度在后期反应组织中更快, 以致形成在高剂量区其 RBE 值较早期反应低, 在低剂量区域即临床相关剂量区域较早期反应组织高<sup>[8]</sup>。

### 3.4.2 对细胞辐射敏感性的影响

在低 LET 射线照射时, 不同的组织和肿瘤细胞的辐射敏感性有很大差别, 表现在细胞存活率的斜率不一样即  $D_0$  值有较大的差异, 但在应用快中子等高 LET 射线治疗时, 其辐射敏感性差异显著缩小。

### 3.4.3 对肿瘤的 OER 值的影响

几乎所有的恶性肿瘤都是乏氧细胞, 它们对射

线较为抵抗。氧增强比 (oxygen enhancement ratio, OER) 即是在达到同样生物效应时, 乏氧细胞和富氧细胞所需的剂量之比。低 LET 射线单次照射的 OER 值在 3.0 左右。快中子照射时, 乏氧细胞和富氧细胞的放射敏感性差异减小, OER 值降为 1.6 左右。因而对肿瘤而言, 获得了  $3.0:1.6 = 1.9$  的治疗增益。

与所有高 LET 射线一样, 快中子射线在体内电离作用主要是对 DNA 分子链的直接作用, 引起 DNA 链的断裂, 而低 LET 射线则以间接作用为主, 即通过对水的电离产生活跃的自由基, 后者与生物大分子结合, 作用于 DNA 链, 该过程必须有氧的存在才能使损伤固定, 这也就是低 LET 射线对氧的依赖作用远大于高 LET 射线的原因。

### 3.4.4 对亚致死性损伤和潜在致死性损伤修复的影响

分次照射中亚致死性损伤和潜在致死性损伤修复是影响低 LET 射线照射生物效应的重要因素。现在已经证实, LET 值的增加会导致损伤修复能力的减少, 这也是为什么每次照射剂量变小时, 快中子的 RBE 值会逐渐增加的原因之一。根据上述关系, 可以知道只有在低 LET 射线照射时, 肿瘤组织的修复能力大于周围正常组织的修复能力时, 那么快中子照射会得到较好的疗效。

另外, 当快中子照射时, 由于损伤修复明显减少甚至消失掉, 其等效剂量与分次剂量的关系不像低 LET 射线那样密切。换言之, 分次剂量的降低不再能有效地保护后期反应组织, 而同时, 它带来另一方面的意义, 即适当地增大分次剂量, 减少照射次数, 缩短疗程, 得以克服肿瘤干细胞加速再增殖。这一点对增殖快的肿瘤尤为重要。

### 3.4.5 对细胞周期时相辐射敏感性差异的影响

低 LET 照射时, 不同细胞周期的放射敏感性差异很大, 最敏感的是 G2/M 期, 最不敏感的是 S 期后期, 通过细胞周期的重新分布, 使不敏感时相细胞有机会进入敏感时相而在下一次照射中被杀灭。这已成为分割照射的生物学基础之一。在高 LET 射线照射时, 细胞周期时相敏感性差异明显缩小, 但由于细胞周期再分布及正常组织也存在放射敏感性的差异, 因而快中子治疗会带来多大的益处尚不清楚。

因而, 从上面的分析中可看到, 亚致死性损伤及修复、乏氧、细胞周期等影响低 LET 射线生物效应的因素在高 LET 射线照射时的作用不那么明显。

在不同的组织之间,快中子产生的是一种较低 LET 射线简单、均一的生物效应,RBE 值的变化是由于低 LET 照射时生物效应的复杂性引起的<sup>[9]</sup>。

## 4 结语

快中子治癌是核科学技术在医学领域的应用研究,是核粒子束流应用于肿瘤放射治疗的前沿研究重要课题之一。这是涉及到放射物理学、放射化学、放射肿瘤学等学科交叉的课题。中子属于高 LET 射线,具有相对生物效应高、氧增比小、一次剂量打击杀死癌细胞较多、癌细胞积累能力及修复亚致死性损伤能力小、对细胞周期的各阶段均起作用、对大多数抗辐射类型的肿瘤有效等优点。

由快中子诱导的 U251 细胞剂量 - 存活曲线可看出,快中子对细胞杀伤较大,存活曲线可模拟为辐射剂量的指数函数,符合单击单靶模型,且基本没有亚致死性损伤修复的肩区。

有研究表明,U251 细胞的倍增时间约为 18 h。48 h 内,低剂量的快中子辐照对细胞的增殖抑制并不明显,72 h 内抑制作用显著,体现出周期阻滞作用。

细胞凋亡是细胞在病理或生理状态下、启动了细胞内部的死亡程序而引起的一种主动死亡过程。细胞凋亡与肿瘤的发生、发展和转归密切相关。以

往的研究表明:γ 射线杀死细胞的一个途径是激活细胞的凋亡机制,本实验的结果表明,快中子同样可以诱发 U251 细胞的凋亡,且与 γ 射线相比,凋亡率高,表现出较高的相对生物学效应。

## 参考文献

- [1] 潘自强,程建平. 电离辐射防护和辐射源安全[M]. 北京:原子能出版社,2007.
- [2] Tsoulou E, Kalfas CA, Sideris EG. Conformational properties of DNA after exposure to gamma rays and neutrons[J]. Radiation Research, 2005,163(1):90-97.
- [3] 郑秀惠. 中子治癌临床进展[J]. 国外医学肿瘤学分册,2001,28(5):336-339.
- [4] Schwartz DL, Einck J, Bellon J, et al. Fast neutron radiotherapy for soft tissue and cartilaginous sarcomas at high risk for local recurrence[J]. Int J Radiat Oncol BiolPhys, 2001,50(2):449-456.
- [5] 洪忠梯. 加速器在快中子治癌中的应用[J]. 核物理动态,1992,9(4):27-32.
- [6] 刘树铮,鞠桂枝,李修义,等. 医学放射生物学(修订版)[M]. 北京:原子能出版社,2006.
- [7] 高沛永,刘秀林,杨捷. 核爆炸瞬时辐射诱发人血染色体畸变的剂量效应观察[J]. 遗传,1980,2(5):6-9.
- [8] 纪刚. 中子辐射的微剂量学实验研究[J]. 国外医学-放射医学核医学分册,2000,24(1):28-31.
- [9] 陈佳艺,冯炎. 现代快中子临床应用的生物学机理[J]. 中国肿瘤,1997,6(3):13-14.

## A biological effectiveness study on U251 induced by fast neutrons

Yang Lei, Wang Xiao, Kong Fuquan, Sui Li,  
Cui Suzhen, Zheng Jieying, Ma Nanru, Zhao Kui  
(China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China)

[Abstract] Objective: U251 cells were exposed to fast neutrons of 14 MeV energy, and dose-response relationships were derived; Methods: cell samples were exposed to fast neutrons. Radiation doses were 1 Gy, 3 Gy, 5 Gy and 7 Gy respectively. The cell survival, apoptotic rate and proliferation were tested after irradiation; Result: with the growth of the radiation dose, cell survival was declined, and apoptotic rate was promoted; the speed of the cell proliferation, which was observed 48 h after irradiation, was slowed down obviously; Conclusion: compared to γ ray, fast neutrons have higher relative biological effectiveness.

[Key words] fast neutron; U251 cell; biological effectiveness; dose-response curve