

·放射生物学·

脑胶质瘤 SHG-44 细胞株照射后子代辐射敏感性

李超 李莉 许昌韶 周菊英 徐晓婷 俞志英

【摘要】目的 探讨脑胶质瘤 SHG-44 细胞株照射子代生长特性及辐射敏感性变化。**方法** 培养人脑胶质瘤 SHG-44 细胞株照射后的存活子代细胞,测定其群体倍增时间,并进行集落形成实验和流式细胞仪检测,分析其辐射敏感性和细胞周期变化。**结果** SHG-44 细胞群体倍增时间为(22.78±2.61)h, SHG-44 细胞经 6 MV X 射线 10 Gy 照射后存活子代 SHG-44-10 细胞群体倍增时间为(30.46±2.73)h ($F=7.878, P<0.05$)。SHG-44 细胞和 SHG-44-10 细胞再次 2 Gy 照射后的存活分数分别为 70.8%、80.6%。与 SHG-44 细胞相比, SHG-44-10 细胞在 G₂M 期比例减少, S 期比例增多。**结论** SHG-44 细胞照射后存活子代细胞增殖延缓,辐射敏感性下降。

【关键词】 神经胶质瘤; 肿瘤细胞, 培养的; 辐射耐受性; 细胞周期

Radiosensitivity of filial generation from irradiated human glioma cell line SHG-44

LI Chao¹, LI Li², XU Chang-shao¹, ZHOU Ju-ying², XU Xiao-ting², YU Zhi-ying²

(1. Department of Radiation, Suzhou Kowloon Hospital, Shanghai Jiaotong University Medical School, Suzhou 215021, China; 2. Department of Radiation, The First Hospital Affiliated to Soochow University, Suzhou 215006, China)

【Abstract】Objective To investigate the radiosensitivity and growth features of the progeny of irradiated human glioma cell line SHG-44. **Methods** The SHG-44 cells were irradiated with 6 MV X ray and the progeny of the cells were cultured. The population doubling time (PDT) was detected pre-and post-irradiation. The radiosensitivity of the progeny of irradiated human glioma cell line SHG-44 was measured by clone forming assay. The cell cycle distribution was analysed by flow cytometry. **Results** The PDT of SHG-44 cells before irradiation was (22.78±2.61) h. The PDT of irradiated SHG-44 cells at dose of 10 Gy were (30.46±2.73) h ($F=7.878, P<0.05$). The surviving fraction of SHG-44 cell was 70.8%, SHG-44-10 cell was 80.6%. SHG-44 cells showed significant G₂M phase decrease and S phase arrest after irradiation. **Conclusion** Growth delay and declined radiosensitivity are confirmed in the progeny of irradiated SHG-44 cells.

【Key words】 Glioma; Tumor cells, cultured; Radiation tolerance; Cell cycle

恶性脑胶质瘤呈侵袭性生长,手术难以全切,放疗是重要辅助治疗手段,但总的疗效并不令人满意,患者的平均生存时间不超过1年,高度恶性者5年生存率低于5%,其中大部分是因为肿瘤的复发。本实验通过研究体外脑胶质瘤 SHG-44 细胞株照射后子代再次照射后的辐射敏感性,试图了解复发性脑胶质瘤的放射生物学特性。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人脑胶质瘤 SHG-44 细胞株由苏州大学附属一

院脑研室惠赠,碘化丙啶试剂盒为 COULTER CORPORATION,电子直线加速器为德国 SIMENS KD-2 型,流式细胞仪为 COULTER CORPORATION EPICS-XL 型。

1.2 细胞培养

细胞用 RPMI-1640 培养基在 37 ℃、含 5% CO₂、饱和湿度的培养箱内连续培养,2~3 d 换液一次,0.25% 胰蛋白酶常规消化传代,取对数生长期细胞进行实验研究。

1.3 照射方法

西门子直线加速器 6 MV X 射线垂直照射,剂量率为 2 Gy/min,机架旋转 180°,照射时贴壁细胞表面加 1.5 cm 组织等效填充物,源皮距 100 cm,照射野 10 cm×10 cm。

作者单位: 1. 215021, 上海交通大学医学院苏州九龙医院放疗科(李超, 许昌韶); 2. 215006, 苏州大学附属第一医院放疗科(李莉, 周菊英, 徐晓婷, 俞志英)

通讯作者: 李莉 (E-mail: lili371626077@sohu.com)

1.4 细胞群体倍增时间

未照射的脑胶质瘤 SHG-44 细胞第 15 代的子代细胞列为 SHG-44 组, 经 2 Gy、6 Gy、10 Gy 照射后存活细胞传代第 15 代的子代细胞分别为 SHG-44-2 组、SHG-44-6 组和 SHG-44-10 组。取各组对数生长期细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞后, 取 1×10^5 个细胞接种于直径 6 cm 培养皿中, 分别培养 48 h、72 h、96 h、120 h、144 h 消化, 计数。实验重复 3 次, 取均数, 绘制细胞指数生长曲线, 计算细胞群体倍增时间。

1.5 集落形成试验

取 SHG-44 组和 SHG-44-10 组对数生长期细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞并调整各组细胞至合适的比例后加入六孔板中, 以直线加速器 6 MV X 射线, 按 0 Gy、1 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy 六个不同剂量点进行垂直照射, 每个剂量点设三个平行样本。

处理后置于 37 °C、含 5% CO₂、饱和湿度的培养箱内培养 12~14 d。用磷酸缓冲液清洗培养皿两遍, 用 1% 结晶紫乙醇溶液染色 20 min, 自来水冲洗后晾干。计数大于 50 个细胞的集落数。

绘制存活曲线并计算相关参数: 细胞平均致死剂量 (mean lethal dose, D₀), 外推计数 (extrapolation number), 2 Gy 照射时的存活分数 (surviving fraction, SF₂), 准阈剂量 (quasithreshold dose, D_q)。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

取 SHG-44 组和 SHG-44-10 组对数生长期细胞接种于 50 ml 培养瓶 (细胞数为 1×10^6 /瓶) 中, 分别照射 8 Gy, 列为 SHG-44 照射组和 SHG-44-10 再照射组 (后者增加 0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy 剂量点), 各组分别于处理后 12 h、24 h、48 h 收集细胞。每个剂量点设三个平行样本。

按常规消化、离心、收获培养瓶中的贴壁及悬浮细胞, 磷酸缓冲液洗涤后, 加入 70% 乙醇 (无水乙醇+磷酸缓冲液配制), 制成单细胞悬液, 4 °C 保存过夜。离心去除乙醇, 磷酸缓冲液洗两次, 加入 200 μl RNaseA, 37 °C 水浴 30 min, 加入碘化丙啶染色液 100 μl/ml, 4 °C 避光放置 30 min。用流式细胞仪检测细胞周期。

1.7 统计方法

采用 SPSS10.0 统计软件包进行数据处理, 细胞群体倍增时间用均数±标准差表示, F 检验进行

方差分析, P<0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量照射的 SHG-44 子代细胞群体倍增时间

各组细胞的生长曲线如图 1 所示。SHG-44-2 组细胞倍增时间为 (26.29±1.83) h, SHG-44-6 组为 (28.07±2.99) h, SHG-44-10 组为 (30.46±2.73) h, 三者有差异, 但无统计学意义; 而 SHG-44 细胞组细胞倍增时间为 (22.78±2.61) h, 与其他各组比较有显著性差异 (F=7.878, P<0.01)。鉴于 SHG-44-2 组、SHG-44-6 组、SHG-44-10 组的细胞倍增时间无统计学差异, 以下实验单独取 SHG-44-10 组作比较。

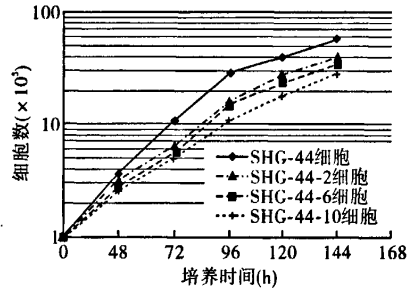


图 1 不同剂量照射的 SHG-44 子代细胞的细胞生长曲线

2.2 SHG-44 组细胞及 SHG-44-10 组细胞的辐射敏感性变化

SHG-44 组细胞克隆形成率为 26.5%, SHG-44-10 组细胞克隆形成率为 15.5%。两组的存活曲线见图 2, 两组的 D₀ 值, N 值, SF₂ 及 D_q 值见表 1, 结果表明: SHG-44-10 组辐射敏感性低于 SHG-44 细胞组。

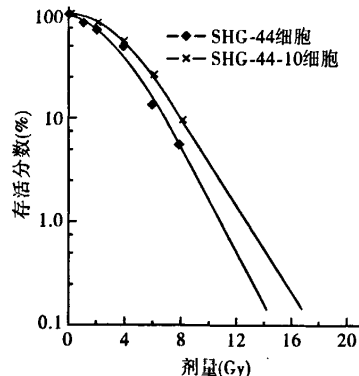


图 2 SHG-44 细胞和 SHG-44-10 细胞的存活曲线

表1 细胞存活曲线参数

	D ₀ (Gy)	SF ₂ (%)	D _q (Gy)	N
SHG-44组	1.68	70.8	3.22	5.47
SHG-44-10组	2.03	80.6	3.45	6.82

2.3 细胞周期变化

送检流式细胞仪检查的各组不同时间细胞周期分析结果见表2。与SHG-44组相比,SHG-44-10

表2 SHG-44和SHG-44-10细胞再次照射后不同时间细胞周期时相细胞数的变化(%)

时间(h)	SHG-44组			SHG-44照射组			SHG-44-10组			SHG-44-10照射组		
	G ₁	G ₂ /M	S	G ₁	G ₂ /M	S	G ₁	G ₂ /M	S	G ₁	G ₂ /M	S
12	61.7	19.7	18.5	29.2	56.5	14.3	44.1	17.8	38.0	25.3	40.1	34.6
24	52.9	17.4	29.7	63.7	15.0	21.4	39.4	13.5	47.1	50.5	19.2	30.3
48	61.5	17.1	21.4	39.0	16.6	44.4	55.3	14.1	30.6	46.0	11.9	42.1

表3 SHG-44-10细胞再次不同剂量照射后各细胞周期时相细胞数的变化(%)

照射剂量(Gy)	SHG-44-10细胞		
	G ₁	G ₂ /M	S
2	58.3	7.7	34.0
4	44.1	17.8	38.0
6	36.2	29.3	34.5
8	25.3	40.1	34.6

3 讨论

脑胶质瘤发病率占全部肿瘤的1%~3%,占神经系统原发性肿瘤的60%以上^[1]。外科手术难以彻底清除,放射治疗是脑胶质瘤综合治疗的主要手段^[2]。但由于恶性脑胶质瘤存在①弥漫浸润性生长导致难以准确定位^[3-4];②形态上的不一致和病理取材的局限性,致使不能全面估计其预后及敏感性;③多数脑胶质瘤对射线不敏感,且脑组织属晚反应正常组织,其所要求的肿瘤杀灭剂量往往与正常组织耐受量相接近,极大地影响了临床脑胶质瘤放疗的效果,因此,胶质瘤复发患者较多。

脑胶质瘤复发患者再次进行放疗的效果往往不佳^[5],其中正常组织的耐受性是值得注意的问题,但复发肿瘤本身的辐射敏感性也是影响临床疗效的重要因素。Kropacova等^[6]在研究中发现,雄性大鼠受3 Gy γ射线照射后第一代和第二代肝DNA和RNA数量的变化存在着基因组放射性损害的部分传递。但细胞基因组的不稳定性是否会导致其存活子代的辐射敏感性的变化呢?Khmelevskii^[7]认为,原发肿瘤的放射治疗并没有影响复发肿瘤的辐射敏感性,但可以加快肿瘤生长速度和转移速度;而

组细胞在G₂/M期减少,在S期增多。两组细胞再次行8 Gy照射后12 h G₂/M期细胞均明显高于未照射组;照射后24 h SHG-44-10组G₂/M期细胞迅速下降到未照射组相同水平。

6MV X射线照射后12 h,SHG-44-10细胞G₂期阻滞,表现为2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy X射线照射后,G₂/M期细胞明显增多,并呈剂量依赖性(表3)。

Pelevina等^[8]用Hela细胞和中国仓鼠细胞为研究对象,发现细胞照射后存活子代的辐射敏感性增高。然而更多的学者认为,细胞受射线或其他的DNA损伤剂作用后,其子代会产生抗性,即适应性反应^[9]。不同的实验得到的结论之所以不同,可能是由于各实验所采用的辐射剂量和辐射敏感性的评价方法各异所致。

姜桔红等^[10]研究发现,鼻咽癌细胞系CNE-2Z的克隆H5具有淋巴道转移倾向,其照射存活子代体外倍增时间比未受照肿瘤长。本实验结果表明,SHG-44细胞经2、6、10 Gy照射后其子代细胞生长延缓,细胞倍增时间分别为(26.29±1.83)h、(28.07±2.99)h和(30.46±2.73)h,且有随照射剂量增加,子代细胞增殖周期呈逐渐延长的趋势。

本实验结果中,SHG-44子代细胞受照后的D₀值、SF₂、N值、D_q值相应大于未照射组,说明受照后SHG-44子代细胞的辐射敏感性明显降低。有关受照后存活子代的辐射敏感性降低的机制目前存在两种假设:一种认为同一细胞群存在着辐射敏感性不同的亚群,照射选择性地杀灭了敏感亚群,存活的子代是放射抗拒的亚群,因此辐射敏感性降低;另一种假设认为细胞群受照射后存活子代细胞的亚结构发生了变化,即射线诱导细胞产生了针对DNA损伤的更强的修复能力,因此,面对再次射线作用时表现为抗性增加,敏感性下降。本实验结果提示照射子代细胞G₂/M期减少、S期增多,这一点显然支持第二种假设,受照射后存活的SHG-44子代细胞克隆源性细胞减少,克隆形成率降低,倍增时间延长,指数生长期细胞进入较辐射敏感的

G₂期比例降低,因此照射后存活的子代细胞与原代细胞比较其辐射敏感性下降;另一方面,照射后存活的子代细胞再次照射后,S期明显减少,G₂/M期阻滞,导致有丝分裂延迟,使细胞经有丝分裂进入G₀/G₁期的细胞呈剂量依赖性减少,说明子代细胞再次受照后仍能表现出一定的辐射敏感性。

总之,对于肿瘤二次放疗的敏感性,不仅受正常组织的影响,肿瘤细胞本身的辐射敏感性变化也很重要。本实验结果提示,胶质瘤SHG-44细胞照射子代细胞辐射敏感性下降。随着精确放疗的临床普及,用三维适形调强放疗对复发性肿瘤进行再次照射,可对鼻咽癌、脑瘤以及肺癌等取得较满意的疗效,同时也可降低并发症的发生^[11-14]。另外,照射后存活的子代细胞再次照射后S期明显减少,G₂/M期阻滞,选择应用周期特异性化疗药物^[15-17]以及其他辐射增敏剂也可以提高其疗效^[18-20]。

参 考 文 献

[1] Garcia DM, Marks JE, Latifi HR, et al. Childhood cerebellar astrocytomas: is there a role for postoperative irradiation?[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1990, 18(4): 815-818.
 [2] 陈智,李旭,张宇,等. 脑恶性胶质瘤 82 例放射治疗疗效分析[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2006, 26(4): 410-410.
 [3] 梅国顺,杜建新. 脑恶性胶质瘤的局部治疗现状[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2007, 4(6): 379-381.
 [4] Eytüpoglu IY, Hahnen E, Buslei R, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) has potent anti-glioma properties in vitro, ex vivo and in vivo [J]. J Neurochem, 2005, 93(4): 992-999.
 [5] Nicholas A, Butowski, Patricia K, et al. Diagnosis and treatment of recurrent high-grade astrocytoma [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(8): 1273-1280.
 [6] Kropacova K, Slovinska L, Misurova E. Cytogenetic changes in the liver of progeny of irradiated male rats[J]. J Radia Res, 2002,43(2): 125-133.
 [7] Khmelevskii EV. Radiotherapy for recurrent breast cancer [J]. Voprosy Onkologii, 2000, 46(2):167-171.
 [8] Pelevina II, Gotlib VIa, Kudriashova OV, et al. Properties of progeny of irradiated cells [J]. Tsitologiya, 1998, 40(5): 467-477.
 [9] 刘树铮. 适应性反应[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2000, 20(6): 373-377.

[10] 姜桔红,王捷,余忠华,等. 照射存活后代的鼻咽癌细胞株放射生物学特性研究[J]. 实用癌症杂志, 2002, 26(4): 566-568.
 [11] Graf R, Hildebrandt B, Tilly W, et al. Dose-escalated conformal radiotherapy of glioblastomas—results of a retrospective comparison applying radiation doses of 60 and 70 Gy [J]. Onkologie, 2005, 28 (6-7): 325-330.
 [12] Ulm AJ 3rd, Friedman WA, Bradshaw P, et al. Radiosurgery in the treatment of malignant gliomas: the University of Florida experience [J]. Neurosurgery, 2005, 57(3): 512-517.
 [13] Cardinale R, Won M, Choucair A, et al. A phase II trial of accelerated radiotherapy using weekly stereotactic conformal boost for supratentorial glioblastoma multiform: RTOG 0023 [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 65(5): 1422-1428.
 [14] Graf R, Hildebrandt B, Tilly W, et al. Dose-escalated conformal radiotherapy of glioblastomas- results of a retrospective comparison applying radiation doses of 60 and 70 Gy [J]. Onkologie, 2005, 28 (6-7): 325-330.
 [15] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma[J]. N Engl J Med, 2005, 352(10): 987-996.
 [16] Intergroup radiation therapy oncology group trial 9402, Cairncross G, Berkey B, et al. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402 [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(18): 2707-2714.
 [17] van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improve progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trial [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(18): 2715-2722.
 [18] Anai S, Tanaka M, Shiverick KT, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 correlates with resistance to radiation in human prostate adenocarcinoma cells [J]. J Urol, 2007, 177 (5): 1913 - 1917.
 [19] Nakano Y, Kuroda E, Kito T, et al. Induction of macrophagic prostaglandin E2 synthesis by glioma cells [J]. J Neurosurg, 2006, 104(4): 574-582.
 [20] Reardon DA, Quinn JA, Vredenburgh J, et al. Phase II trial of irinotecan plus celecoxib in adults with recurrent malignant glioma [J]. Cancer, 2005, 103(2): 329-338.

(收稿日期: 2007-11-21)