

研究简报

低剂量率下高线性能量转移碳离子束辐照
人类唾液腺细胞的存活效应*李 强^{1)**} Y. FURUSAWA²⁾ M. KANAZAWA²⁾ M. AOKI²⁾ E. URAKABE²⁾ S. SATO²⁾⁽¹⁾中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000; ⁽²⁾日本国立放射线医学综合研究所, 千叶 263-8555, 日本)

摘要 利用日本千叶重离子医用加速器 HIMAC 提供的碳离子束, 对人类唾液腺细胞 (HSG) 在剂量率为 0.5 Gy/h 的低剂量率条件下进行了辐照, 运用标准的克隆形成法得到了 3 种不同剂量平均线性能量转移(LET)碳离子束辐照 HSG 细胞的剂量存活效应. 与先前 HSG 细胞在治癌剂量率 (1~5 Gy/min) 下对相近剂量平均 LET 碳离子束辐照的剂量存活效应数据相比, HSG 细胞对高 LET 碳离子束辐射表现出明显的剂量率效应. 在相同条件下得到碳离子束对 HSG 细胞的相对生物学效应(RBE), 利用 ^{60}Co - γ 射线在剂量率为 0.5 Gy/h 的条件下辐照了 HSG 细胞, 得到该细胞系对低 LET 射线响应的剂量存活效应. 与先前在治癌剂量率下得到的 RBE 值相比, 低剂量率条件下得到的 RBE 值总体减小. 由实验发现的剂量率效应及低剂量率条件下 RBE 值的减小, 表明由高 LET 碳离子束造成的辐射损伤在低剂量率条件下也存在着显著的修复效应. 据此, 对辐射造成细胞致死的原因进行了探讨.

关键词 碳离子束, 剂量率, 高 LET, 剂量存活效应, 损伤修复

学科分类号 Q691

重离子束生物学效应的研究已成为放射生物学研究领域中最活跃的前沿之一^[1-4], 不仅是因为这方面研究具有重要的理论意义, 而且其研究成果具有重要的应用价值. 重离子束表现出的倒转能量沉积特性和高的相对生物学效应, 使得重离子束成为癌症治疗的有力武器^[5,6]. 另一方面, 重离子是太空辐射场的重要组成部分之一^[5,7], 成为载人航天飞行的一种重要危害因素, 因此对重离子束生物学效应的研究, 又可为宇航员太空辐射防护提供重要的科学依据. 本工作利用日本国立放射线医学综合研究所(NIRS)的重离子医用加速器 HIMAC 提供的碳离子束, 研究了低剂量率条件下人类唾液腺细胞(HSG)对高 LET (linear energy transfer, 线性能量转移)射线的辐照存活效应. 作为对照, 我们也测量了急性及低剂量率时低 LET ^{60}Co - γ 射线辐照 HSG 细胞的剂量存活效应. 本文报道了这一实验研究. 由实验结果我们发现了 HSG 细胞对高 LET 碳离子束辐射表现出的剂量率效应, 并对形成剂量率效应的机制进行了初步的探讨. 同时, 本实验结果为发展和检验重离子束辐照生物组织导致生物学效应的生物物理模型提供了非常有用的基础数据.

1 材料与方法

1.1 细胞培养及细胞样品的准备

实验采用的是人类唾液腺细胞 (HSG), 购自日本国立健康科学研究所细胞库, 它是一种源于人类唾液腺的癌细胞^[8]. HSG 细胞接种在有 E-MEM 培养基(M5650, Sigma 公司)的培养瓶中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 培养基含 10%胎牛血清及 100 mg/L 链霉素和 100 U/ml 青霉素. 在该条件下, HSG 细胞的倍增时间约为 22~24 h. 碳离子束辐照样品制备: 收集坪区生长细胞, 并悬浮于新鲜培养基中. 实验前一天, 将约 4×10^5 个细胞接种于直径 25 mm、厚度 0.1 mm 的圆形薄膜 (Thermanox, Falcon 产品) 中心区域, 过夜, 使细胞贴附. ^{60}Co - γ 射线照射样品制备: 照射前一天将 HSG 细胞以两种浓度(3×10^5 / 瓶和 5×10^5 / 瓶) 分别接种于 25 cm² 的培养瓶(NUNC 产品)中. 照前更换

*中国科学院百人计划项目和国家自然科学基金项目(10205021)联合资助.

** 通讯联系人.Tel: 0931-4969316, Fax: 0931-496920

E-mail: liqiang@impcas.ac.cn

收稿日期: 2005-03-22, 接受日期: 2005-05-31

新鲜培养基,并在培养瓶中进行照射.

1.2 照射

碳离子束辐照实验是在 HIMAC 的次级束流线照射室进行的. HIMAC 同步加速器提供了 430MeV/u¹²C 束流,由次级束流线照射装置上的点扫描磁铁将束流横向扩展成为直径 20 mm 均匀性好于 95%的照射野.细胞样品置于特制的细胞照射容器^[9]中固定,加入含血清的培养基后密封,调节细胞样品在照射容器中距束流入射窗的深度,来改变碳离子束照射细胞时的剂量平均 LET 值.位于不同深度细胞样品处碳离子束的剂量平均 LET 值,由 NIRS 重离子束治癌广泛使用的束流模型 HIBRAC^[10]来计算得到.照射时调节束流的流强,使细胞样品处的剂量率为 0.5 Gy/h.在细胞照射容器束流入射窗的上游,用一个薄的塑料闪烁体探测器(NE102, 1 mm 水等效厚度)来监测入射离子数,从而控制照射剂量.

γ 射线对细胞样品的照射是在 NIRS 的 ⁶⁰Co 治疗机上完成的.调节细胞样品距 ⁶⁰Co 源的距离,使得照射时细胞样品处的剂量率为 0.5 Gy/h,与碳离子束照射时的剂量率一致.电离室(PTW N30001-2060)与静电计(Keithley 6517A)配合进行照射剂量的测量,包括碳离子束在内的所有细胞样品的照射均是在室温下进行的.

1.3 照射后细胞处理

照射后的细胞样品用 PBS 缓冲液清洗两遍,于 37℃ 胰酶消化 3 min,然后添加 0.5 ml 新鲜培养基将细胞悬起.利用细胞及粒子计数器(Z1, Coulter)测量细胞浓度,并用培养基将细胞悬液稀释到适当的浓度,然后每培养皿(60 mm, Falcon 产品)接种约有 100 个存活的细胞,置培养箱中培养 13 天,取出,用 10%福尔马林液固定,1%亚甲基蓝染色,统计每集落大于 50 个细胞的集落数(克隆形成法)作为存活数,每个剂量共接种 3 皿.

1.4 存活数据分析及 RBE 的获得

利用 Origin7.0 软件(OriginLab 公司,美国)按普遍接受的哺乳动物细胞辐照剂量效应线性平方(LQ)模型,对测量得到的细胞存活数据进行拟合,给出细胞存活曲线线性项和平方项系数 α 和 β ,由此得到存活曲线上 10%存活水平对应的所需照射剂量,这样利用 10%存活水平下 γ 射线所需照射剂量(D_γ)与碳离子束所需照射剂量(D)的比值得到对应剂量平均 LET 碳离子束的相对生物学效应(RBE),即:

$$RBE = D_\gamma / D \quad (1)$$

可见辐射的 RBE 值与参考辐射的选择,所考虑的生物学效应终点和效应的水平等因素有关,并且 RBE 在放射治疗及辐射防护中具有重要的应用价值.

2 结 果

图 1 展示了实验测量得到的 ⁶⁰Co- γ 射线在急性(0.5 Gy/min)和低剂量率(0.5 Gy/h)条件下照射时 HSG 细胞的剂量存活效应.线性平方模型对实验数据的拟合参数在急性照射条件下为: $\alpha=0.1833 \pm 0.0162$, $\beta=0.0262 \pm 0.0046$;在低剂量率条件照射下为: $\alpha=0.0890 \pm 0.0311$, $\beta=0.0305 \pm 0.0093$.反映实验测量数据与模型拟合差别大小的 χ^2 值在上述两种照射条件下分别为 0.002 和 0.013,可见线性平方模型对实验测量数据可以进行很好的拟合.同时,可以看到 HSG 细胞对低 LET γ 射线的照射表现出明显的剂量率效应,10%存活水平时在急性及低剂量率条件下对应的照射剂量分别为(6.51 $\pm$ 0.42) Gy 和(7.35 $\pm$ 1.03) Gy.

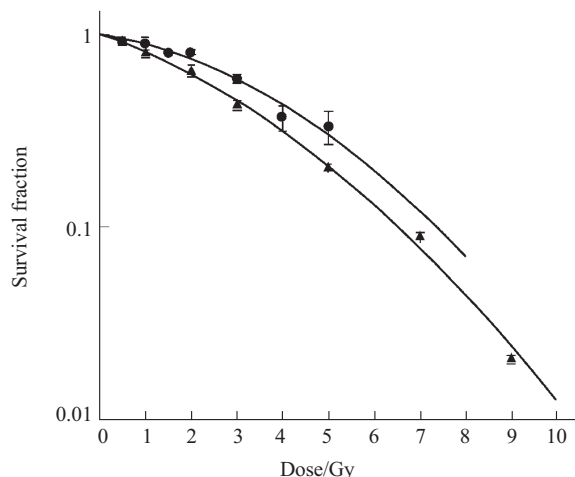


Fig.1 The dose-surviving effects of HSG cells irradiated with acute (0.5 Gy/min) and low-dose-rate (0.5 Gy/h) ⁶⁰Co γ -rays

▲—▲: acute (0.5 Gy/min); ●—●: LDR (0.5 Gy/h).

图 2、图 3 和图 4 分别是剂量平均 LET 为 49.6 keV/ μ m、86.1 keV/ μ m 和 116.1 keV/ μ m 碳离子束照射 HSG 细胞的剂量存活效应.这些图中,包括了先前 NIRS 在治癌剂量率(1~5 Gy/min)条件下得到的与本实验剂量平均 LET 相近的碳离子束照射 HSG 细胞的存活效应,需说明的是本文仅给出了治癌剂量率条件下最终的拟合曲线而未标出具体的

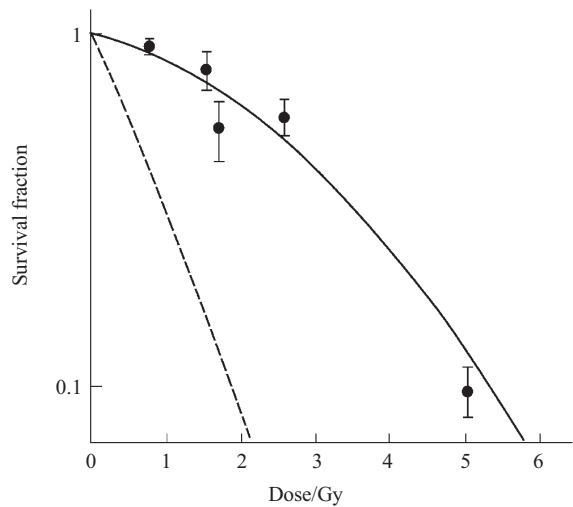


Fig.2 The dose-surviving effect of HSG cells exposed to the carbon ion beam with dose-averaged LET of 49.6 keV/μm at the low dose rate (LDR)

●—●: 49.6 keV/μm at LDR; — — — : 50.0 keV/μm at TDR.

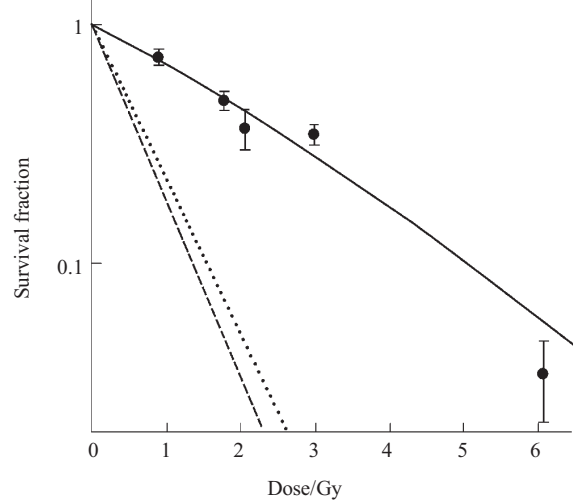


Fig.3 The dose-surviving effect of HSG cells after exposure to the carbon ion beam with dose-averaged LET of 86.1 keV/μm at the low dose rate (LDR)

●—●: 86.1 keV/μm at LDR; — — — : 88.0 keV/μm at TDR; ····: 80.6 keV/μm at TDR.

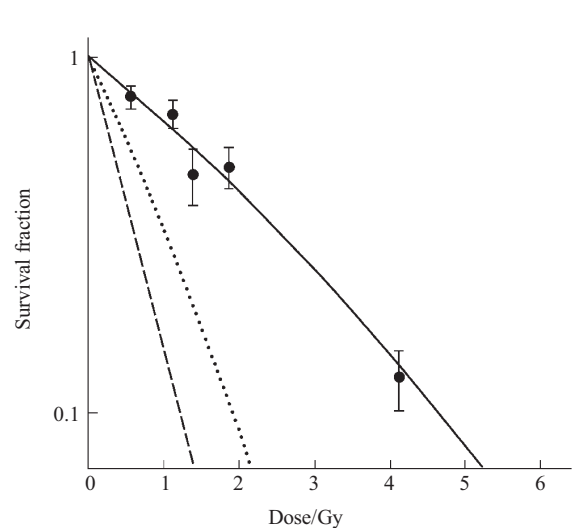


Fig.4 The dose-surviving effect of HSG cells exposed to the carbon ion beam with dose-averaged LET of 116.1keV/μm at the low dose rate (LDR)

●—●: 116.1 keV/μm at LDR; — — — : 137.0 keV/μm at TDR; ····: 91.3 keV/μm at TDR.

实验测量数据，治癌剂量率条件下的实验测量数据引自文献[2]. 本次实验数据的拟合参数及反映测量数据与模型拟合之间差别的 χ^2 值见表 1. 与先前在治癌剂量率条件下得到的数据相比，可以看到 HSG 细胞对高 LET 的碳离子束辐照也表现出明显的剂量率效应，但随剂量平均 LET 的增大，剂量率效应在减小.

以与碳离子束辐射同样低剂量率的 γ 射线作参考辐射，本文给出了三种剂量平均 LET 碳离子束在 10%存活水平下的 RBE 值，如图 5 所示. 为比较，将先前 NIRS 在治癌剂量率下得到的不同剂量平均 LET 碳离子束的 RBE 值^[2]也一同展示在图 5 中，明显看到在低剂量率时 RBE 值总体减小.

Table 1 Fitted parameters for the surviving data of HSG cells irradiated with the carbon ion beams at the low dose rate				
Dose-averaged LET /(keV•μm ⁻¹)	α /Gy ⁻¹	β /Gy ⁻²	D _{10%}	χ ²
49.6	0.1150±0.0974	0.0594±0.0417	5.33±1.73	0.045
86.1	0.3759±0.0681	0.0154±0.0277	5.07±1.49	0.012
116.1	0.3960±0.0798	0.0211±0.0389	4.66±1.56	0.018

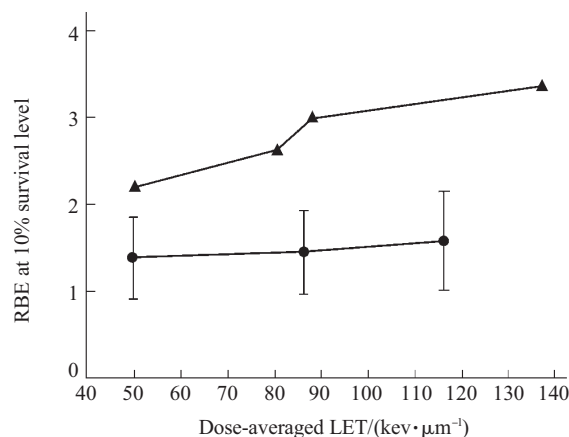


Fig.5 RBE values of carbon ion beams obtained at low and therapeutic dose rates

●—●: 0.5 Gy/h; ▲—▲: 1~5 Gy/min.

3 讨 论

由本实验得到的剂量率效应, 即降低照射剂量率从而带来细胞存活率的提高, 以及低剂量率条件下 RBE 值的总体变小都意味着低剂量率照射期间必然伴随着辐射损伤的修复. 低 LET 辐射如 ^{60}Co - γ 射线属于稀疏电离辐射, 主要在细胞中造成亚致死损伤(通常是指一个孤立的 DNA 分子双链断裂(double strand break, DSB)^[10]), 亚致死损伤较易得到细胞修复机制的修复. 迄今为止已发现真核生物至少有三种途径修复 DSB, 即: 同源重组, 非同源末端加入和互接重复末端加入^[11,12], 哺乳动物细胞中以非同源末端加入修复 DSB 为主要修复途径. 在急性照射条件下, 很短的照射时间内不同的亚致死损伤有较大的几率相互作用而形成致死损伤, 从而导致细胞死亡; 在低剂量率条件下达到相同的照射剂量所需的照射时间较长, 照射期间不同时刻导致的细胞亚致死损伤很大程度上能被细胞所修复, 较少发生细胞亚致死损伤之间的相互作用而导致形成致死损伤, 从而细胞的存活率提高. 因此, HSG 细胞对低剂量率 γ 射线照射的存活响应表现出明显的剂量率效应是很容易理解的. 从实验拟合数据看, 在平方项系数 β 变化不大的情况下, 低剂量率下的线性项系数 α 显著减小. 然而本实验得到的高 LET 碳离子束辐照的存活效应结果, 却与通常的认识即哺乳动物细胞对致密电离辐射高 LET 射线没有剂量率效应响应, 有很大的不同. 例如, Yang 等^[13]在研究重离子束在低剂量率下的哺乳动物细胞辐照效应时, 并没有发现细胞响应的剂量率效应.

但这与他们研究时采用的离子种类为 ^{40}Ar 和 ^{56}Fe 有关, 它们的 LET 值比本文所用 ^{12}C 离子束的 LET 值更大. 当照射剂量较小时(小于 10Gy), 离子束对生物组织的作用主要为单径迹效应^[14,15], 根据 Simmons 和 Watt^[14]建立的单个带电粒子径迹对哺乳动物细胞损伤统一模型的预测, 哺乳动物细胞在 37%存活水平下对离子束的剂量率效应不会大于 1%. 而本实验结果表明 HSG 细胞在 37%存活水平下的剂量率效应决不会小于 1%, 故我们的实验结果并不支持该统一模型的预测. 因而, 本文认为该模型仍需要进一步发展与完善. 离子单径迹对细胞的作用主要导致 DSB, 即亚致死损伤, 当降低离子束的剂量率时, 也就降低了不同亚致死损伤之间相互作用形成致死损伤的几率. 这样, 本文实验结果揭示的 HSG 细胞对高 LET 碳离子束辐射的剂量率效应也就得到合理的解释. 在治癌剂量率时哺乳动物细胞对碳离子束诱导 DSB 的重接修复效应已经在实验上得以发现^[16]. 因此, 从本文得到的 HSG 细胞对低剂量率高 LET 射线碳离子束辐射表现出的剂量率效应结果, 可以推断不同 DSB 的相互作用, 如两个近邻 DSB 之间的交换修复^[17,18]等, 是导致细胞辐射致死的重要原因.

总之, 本文揭示了一个重要的实验现象, 即哺乳动物细胞对高 LET 射线也表现出明显的剂量率效应, 这对我们认识辐射导致细胞致死的本质原因, 这一放射生物学研究中的最基本问题有很大的帮助. 而且, 本文的实验结果, 为发展和检验描述辐射对生物组织作用的生物物理模型提供了很好的基础数据.

参 考 文 献

- 1 Blakely E A, Hronenberg A. Heavy-ion radiobiology: new approaches to delineate mechanisms underlying enhanced biological effectiveness. *Radiation Research*, 1998, **150** (5): S126~S145
- 2 Furusawa Y, Fukutsu K, Aoki M, *et al.* Inactivation of aerobic and hypoxic cells from three different cell lines by accelerated ^3He -, ^{12}C - and ^{20}Ne -ion beams. *Radiation Research*, 2000, **154** (5): 485~496
- 3 Persson L M, Edgren M R, Stenerloew B, *et al.* Relative biological effectiveness of boron ions on human melanoma cells. *International Journal of Radiation Biology*, 2002, **78** (8): 743~748
- 4 Hofman-Huether H, Scholz M, Rave-Fraenk M, *et al.* Induction of reproductive cell death and chromosome aberrations in radioresistant tumour cells by carbon ions. *International Journal of Radiation Biology*, 2004, **80** (6): 423~435
- 5 Kraft G. Radiobiological effects of very heavy ions: inactivation, induction of chromosome aberrations and strand breaks. *Nuclear Science and Application*, 1987, **3** (1): 1~28

- 6 Li Q, Zhou G M, Wang J F, *et al.* Killing effect of Chinese hamster V79 cells exposed to accelerated carbon ions and RBE determination. *Nuclear Science and Techniques*, 2002, **13** (4): 259~263
- 7 Stoll U, Schmidt A, Schneider E, *et al.* Killing and mutation of Chinese hamster V79 cells exposed to accelerated oxygen and neon ions. *Radiation Research*, 1995, **142** (3): 288~294
- 8 Shirasuna K, Watatani K, Sugiyama M, *et al.* Isolation and characterization of different clones including myoepithelial-like variants from a clonal neoplastic epithelial duct cell line of human salivary gland origin. *Cancer Research*, 1986, **46** (3): 1418~1426
- 9 Ando K, Furusawa Y, Suzuki M, *et al.* Relative biological effectiveness of the 250MeV proton beams at the National Cancer Hospital East. *Journal of Radiation Research*, 2001, **42** (1): 79~89
- 10 Bedford J S. Sublethal damage, potentially lethal damage, and chromosomal aberrations in mammalian cells exposed to ionizing radiations. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 1991, **21** (6): 1457~1469
- 11 Jeggo P A. Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiation Research*, 1998, **150** (5): S80~S91
- 12 Thacker J. Repair of ionizing radiation damage in mammalian cells: alternative pathway and their fidelity. *C R Acad Sci III*, 1999, **322** (2-3): 103~108
- 13 Yang T C, Craise L M, Mei M T, *et al.* Dose protraction studies with low- and high-LET radiations on neoplastic cell transformation *in vitro*. *Advances in Space Research*, 1986, **6** (11): 137~147
- 14 Simmons J A, Watt D E. Radiation protection dosimetry: A radical reappraisal. Madison (Wisconsin): Medical Physics Publishing, 1999. 46~55
- 15 Barendsen G W. RBE-LET relationships for different types of lethal radiation damage in mammalian cells: comparison with DNA dsb and an interpretation of differences in radiosensitivity. *International Journal of Radiation Biology*, 1994, **66** (5): 433~436
- 16 Heilmann J, Taucher-Scholz G, Haberer T, *et al.* Measurement of intracellular DNA double-strand break induction and rejoining along the track of carbon and neon particle beams in water. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 1996, **34** (3): 599~608
- 17 Barendsen G W. Mechanisms of cell reproductive death and shapes of radiation dose-survival curves of mammalian cells. *International Journal of Radiation Biology*, 1990, **57** (4): 885~896
- 18 Barendsen G W. LET dependence of linear and quadratic terms in dose-response relationships for cellular damage: correlations with the dimensions and structures of biological targets. *Radiation Protection Dosimetry*, 1990, **31** (1-4): 235~239

The Clonogenic Surviving Effect of Human Salivary Gland Cells Exposed to High-linear Energy Transfer Carbon Ion Beams at Low Dose Rate*

LI Qiang^{1)**}, Y. FURUSAWA²⁾, M. KANAZAWA²⁾, M AOKI²⁾, E URAKABE²⁾, S SATO²⁾

¹⁾*Institute of Modern Physics, The Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

²⁾*National Institute of Radiological Sciences, Chiba 263-8555, Japan)*

Abstract Human salivary gland cells (HSG) were irradiated with carbon ion beams supplied by the Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba (HIMAC), Japan at a low dose rate of 0.5 Gy/h. Clonogenic survival effects of HSG cells after exposure to carbon beams with three different dose-averaged LETs were obtained by means of standard colony-forming assay. Compared to the previous surviving data acquired for carbon beams with similar dose-averaged LETs at therapeutic dose rates (1~5 Gy/min), HSG cells show an obvious dose-rate sparing effect. To derive relative biological effectiveness (RBE) of the carbon beams for HSG cells under the same dose-rate condition, the dose surviving effect of HSG cells irradiated with ⁶⁰Co γ -rays was measured as well at the dose rate of 0.5 Gy/h. The RBE values obtained at the low dose rate are totally reduced in contrast with those determined at the preceding therapeutic dose rates. The dose-rate sparing effect and the reduction in RBE at the low dose rate imply that the radiation-induced damage by high-LET carbon ion beams at low dose rates could be repaired to a great extent. Based on the important findings, the essential reason of cell lethality by radiation was discussed.

Key words carbon ion beam, dose rate, high linear energy transfer(LET), dose surviving effect, damage repair

*Jointly supported by The Century Program of The Chinese Academy of Sciences and The Natural Sciences Foundation of China (10205021).

**Corresponding author . Tel: 86-931-4969316, Fax: 86-931-4969201, E-mail: liqiang@impcas.ac.cn

Received: March 22, 2005 Accepted: May 31, 2005