

脉冲式低剂量率照射对食管癌细胞及肺组织的影响

王亮¹, 靳富², 徐珊¹, 杨波¹, 向双³, 杨杰斌³, 张军¹, 牟艳红¹, 罗焕丽², 刘强¹

1. 重庆大学附属三峡医院肿瘤中心, 重庆 404100; 2. 重庆大学附属肿瘤医院放射治疗中心, 重庆 400030; 3. 重庆大学附属三峡医院病理科, 重庆 404100

【摘要】目的:评估脉冲式低剂量率照射(RLDR)对食管癌细胞及小鼠正常肺组织的影响。**方法:**针对人食管癌细胞系EC109和SPF级KM小鼠,进行4种模式照射:常规(CR, 5×2 Gy)、大分割(HR, 2×5 Gy)、PLDR[5×(10×0.2) Gy, 当日每次间隔3 min]、对照组(CG, 0 Gy)。分别于照射前、10 Gy照射后第1、3、5、7天使用CCK-8法检测EC109细胞增殖水平,第4周使用ELISA法检测小鼠血清转化生长因子β1(TGF-β1)水平以及H&E染色观察其肺组织形态。**结果:**EC109照射后第3天起各实验组的相对吸光度、细胞活力显著低于CG($P<0.05$);照射后第5、7天的CR与PLDR的相对吸光度、细胞活力均显著高于HR组($P<0.05$);CR与PLDR之间均无明显差异($P>0.05$)。照射结束后第4周CR、HR小鼠肺组织出现肺泡壁增厚、较多炎细胞浸润,PLDR组小鼠肺组织较正常;且CR与HR小鼠血清TGF-β1水平明显高于CG与PLDR($P<0.05$),PLDR与CG无统计学差异($P>0.05$)。**结论:**与CR、HR相比,PLDR在有效抑制食管癌细胞增殖的同时可显著降低放射性肺损伤。

【关键词】食管癌;脉冲式低剂量率放疗;转化生长因子-β1;放射性肺损伤

【中图分类号】R815.2

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2023)05-0536-04

Effects of pulsed low-dose rate radiotherapy on esophageal cancer cells and lung tissues

WANG Liang¹, JIN Fu², XU Shan¹, YANG Bo¹, XIANG Shuang³, YANG Jiebin³, ZHANG Jun¹, MOU Yanhong¹, LUO Huanli², LIU Qiang¹

1. Cancer Center, Chongqing University Three Gorges Hospital, Chongqing 404100, China; 2. Department of Radiation Oncology, Chongqing University Cancer Hospital, Chongqing 400030, China; 3. Department of Pathology, Chongqing University Three Gorges Hospital, Chongqing 404100, China

Abstract: Objective To evaluate the responses of esophageal cancer cells and normal lung tissues in mice exposed to pulsed low-dose rate radiotherapy (PLDR). **Methods** Human esophageal cancer cell lines EC109 and KM mice (specific pathogen free) in 3 experiment groups were treated with conventional radiotherapy (CR, 5×2 Gy), hypo-fractionated radiotherapy (HR, 2×5 Gy), and PLDR [5×(10×0.2) Gy, with a beam interval of 3 min], respectively, and no radiation was delivered in control group (CG). CCK-8 was used to measure EC109 cell proliferation before irradiation and on days 1, 3, 5 and 7 after 10 Gy irradiation. At the 4th week after 10 Gy irradiation, the serum transforming growth factor-β1 (TGF-β1) level was detected using ELISA, and the lung tissue slices were stained with H&E to observe the morphologic changes. **Results** The relative optical densities and cell viabilities of EC109 cells in experimental groups were significantly lower than those in CG since the 3rd day after irradiation ($P<0.05$); and on days 5 and 7 after irradiation, the relative optical densities and cell viabilities of CR and PLDR groups were significantly higher than those in HR group ($P<0.05$); and there was no significant difference in relative optical densities and cell viabilities between CR and PLDR groups ($P>0.05$). At the 4th week after irradiation, CR and HR results in alveolar wall thickening and more inflammatory cells, but mice exposed to PLDR had normal lung tissues. CG and PLDR groups had similar serum TGF-β1 levels ($P>0.05$), which were lower than both CR and HR groups ($P<0.05$). **Conclusion** Compared with CR and HR, PLDR can significantly reduce radiation-induced lung injury while effectively inhibiting the proliferation of esophageal cancer cells.

Keywords: esophageal cancer; pulsed low-dose rate radiotherapy; transforming growth factor-β1; radiation-induced lung injury

【收稿日期】2022-12-15

【基金项目】重庆市自然科学基金(cstc2019jcyj-msxmX0655);国家自然科学基金(11805025)

【作者简介】王亮, 硕士研究生, 研究实习员, 研究方向: 肿瘤放射物理与放射生物, E-mail: 274890432@qq.com

【通信作者】刘强, 高级工程师, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤放射物理与放射生物, E-mail: sealq123456@163.com

前言

近年来,随着经济社会发展和人口老龄化的加剧,癌症在越来越多的国家已经超过心脑血管疾病成为主要死因,其中,食道癌的发病率和死亡率均位居前列^[1-2]。放疗联合手术、化疗作为食管癌治疗的一种重要手段,其在提高局部控制率、降低远处转移率等方面均表现显著,但是放疗剂量分割方式仍存在一定争议^[3-4]。同时,由于放疗靶区与双肺毗邻,放射性肺损伤(Radiation-Induced Lung Injury, RILI)是食管癌放疗的主要不良反应,是影响放疗剂量分割方式的重要因素^[5]。

前期多项研究发现细胞在<10 cGy射线照射下可表现出辐射超敏感性(Hyper-Radiosensitivity, HRS);当剂量增加到30 cGy以上时,辐射抗性增加,直到1 Gy时,抗性达最大值,且HRS似乎在具有放射抗性的细胞系中更显著^[6-8]。增殖较快的组织如肿瘤对低剂量率也更敏感^[9-10]。脉冲式低剂量率放疗(Pulsed Low-Dose Rate Radiotherapy, PLDR)利用小剂量率诱导肿瘤细胞HRS反应的同时不损伤周围正常组织的原理,将每日的放疗剂量分成若干时间间隔的分次剂量,在保护危及器官的情况下有效治疗病灶^[11]。目前,PLDR技术已在胃癌腹腔转移、复发乳腺癌、复发胶质瘤以及综合性复发肿瘤的放疗中表现出显著的抑制肿瘤生长和保护正常组织的能力^[12-15]。本研究将进一步拓展其在食管癌放疗中的应用,探讨PLDR技术与常规放疗模式相比在食管癌治疗中的作用,为食管癌PLDR提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人食管癌细胞系EC109购于北京协和细胞资源中心;SPF级KM小鼠(雄性,4周龄)购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010,饲养于12 h光照/12 h黑暗环境,环境温度(25±1)℃,相对湿度50%~70%,自由进食饮水;胎牛血清购于Cegrogen Biotech GmbH(Germany);RPMI-1640购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司;青-链霉素双抗购于北京索莱宝科技有限公司;小鼠转化生长因子β1(Transforming Growth Factor-β1, TGF-β1)酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒购于深圳欣博盛生物科技有限公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒、4%多聚甲醛购于北京兰杰柯科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 EC109在完全培养基(RPMI-1640、

10%胎牛血清、1%青-链霉素双抗)中置于37℃、5%CO₂环境下培养,每隔2~3 d传代。

1.2.2 细胞增殖实验 EC109以1 000个/孔的密度接种于96孔板,直线加速器对处于对数生长期的细胞在源轴距100 cm、剂量率400 cGy/min条件下进行6 MV X线照射,孔板表面覆盖1 cm厚补偿膜。剂量分割模式如下:常规分割组(Conventional Radiotherapy, CR;单次剂量2 Gy,1次/d,连续5 d,共10 Gy)、大分割组(Hypo-Fractionated Radiotherapy, HR;单次剂量5 Gy,1次/d,连续2 d,共10 Gy)、PLDR组(以分次剂量0.2 Gy、间隔3 min的10个分次完成单次2 Gy的照射,1次/d,连续5 d,共10 Gy)、对照组(Control Group, CG;仅放在射野下,不出束照射)。每次照射后放回孵箱继续培养,根据细胞状况换液。分别于照射前、10 Gy照射后第1、3、5、7天使用CCK-8法检测细胞增殖水平。

1.2.3 小鼠6 MV X线照射 KM小鼠经1%戊巴比妥钠麻醉后俯卧固定于放置台,直线加速器在6 MV、剂量率400 cGy/min、射野大小2 cm×3 cm、腋中线为等中心平面条件下进行全胸腔高能X线照射(图1),以随机数表法、每组5只按上述分割模式分组。



图1 小鼠照射摆位示意

Figure 1 Position of mice for radiation exposure

1.2.4 血清TGF-β1检测 小鼠于10 Gy照射后第4周经1%戊巴比妥钠麻醉后眼球取血至离心管内静置30 min,4℃、2 000 g离心10 min后取上清,ELISA法检测血清TGF-β1水平。

1.2.5 石蜡切片制备及H&E染色 眼球取血后脱颈处死小鼠取肺组织,4%多聚甲醛固定过夜后制石蜡切片并进行H&E染色。

1.2.6 统计学分析 采用GraphPad Prism 8软件进行统计学分析,定量资料以均数±标准差表示,多组间比较用单或多因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 照射对人食管癌细胞系的抑制作用

CCK-8结果显示自10 Gy照射结束后第3天起,各实验组相对吸光度与CG有明显差异($P<0.05$);照射后第5、7天,CR、PLDR相对吸光度较HR有明显差异($P<0.05$),CR和PLDR组间无统计学差异($P>0.05$)(图2)。

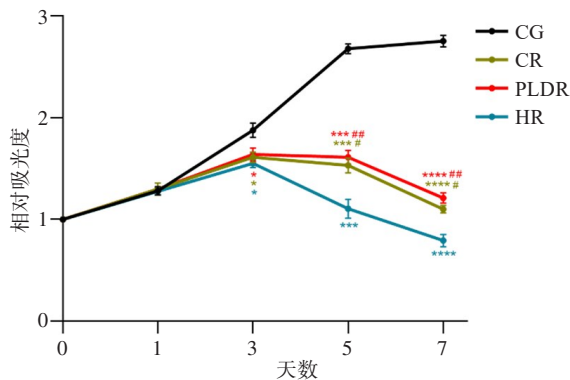


图2 EC109细胞相对吸光度

Figure 2 Relative optical densities of EC109 cells

*表示与CG比较, $P<0.05$;***表示与CG比较, $P<0.0005$;****表示与CG比较, $P<0.0001$;#表示与HR比较, $P<0.05$;##表示与HR比较, $P<0.005$

根据式(1)计算细胞活力:

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{A(\text{实验}) - A(\text{空白})}{A(\text{对照}) - A(\text{空白})} \times 100\% \quad (1)$$

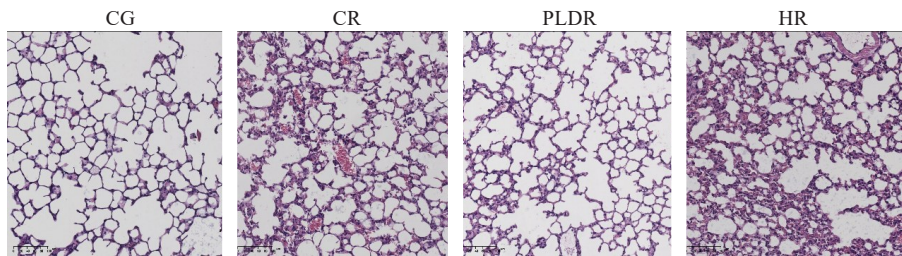


图3 小鼠肺组织病理切片(H&E×200)

Figure 3 Pathological slices of lung tissues in mice (H&E×200)

间无明显差异($P>0.05$)(图4)。在总剂量相同的情况下,PLDR相较于CR和HR造成的肺损伤更小。

3 讨论

2007年,Tomé等^[16]基于一些胶质瘤细胞株表现的低剂量HRS反应提出PLDR模式,该模式采用单次剂量为0.2 Gy的脉冲,脉冲间隔为3 min,平均剂量率低至6.67 cGy/min,研究结果表明PLDR可显著增加肿瘤局部控制率。同时,正常组织在此低剂量区

自10 Gy照射结束后第3天起,各实验组细胞活力与CG有明显差异($P<0.05$);第5天起,CR、PLDR细胞活力较HR组也有明显差异($P<0.05$);CR组和PLDR组间均无明显差异($P>0.05$)(表1)。3种分割模式照射均能对人食管癌细胞系EC109产生较明显的杀伤作用,且PLDR与CR相当。

表1 EC109细胞活力
Table 1 EC109 cell viabilities

天数	CR	PLDR	HR
1	1.01±0.04	1.01±0.05	1.00±0.03
3	0.86±0.04****	0.87±0.04****	0.83±0.04****
5	0.57±0.03****###	0.60±0.02****###	0.41±0.03****
7	0.40±0.01****###	0.44±0.02****###	0.29±0.02****

****表示与CG比较, $P<0.0001$,###表示与HR比较, $P<0.0005$;####表示与HR比较, $P<0.0001$

2.2 照射对小鼠肺组织的影响

H&E染色结果显示CR与HR肺间质充血,肺泡壁增厚,炎细胞浸润较PLDR组明显增多,CG肺泡结构正常(图3)。ELISA结果显示,CG、CR、PLDR、HR小鼠血清TGF- β 1浓度分别为(416.75±99.09)、(803.58±85.12)、(600.50±49.80)、(931.50±42.75) pg/mL。CR与HR小鼠血清TGF- β 1水平明显高于CG组($P<0.0005$)和PLDR组($P<0.05$),CG与PLDR组

间损伤较小,且在低剂量率(0.01~1.00 Gy/min)条件下可加速修复^[17]。Leonard^[18]在大量表现低剂量HRS的细胞系中发现类似的反剂量率效应,这可能与细胞在G2期未能激活ATM通路有关。

PLDR作为一种特殊的放疗模式,其优势已在多种恶性肿瘤的治疗中得到验证。韦笑等^[19]采用25×2 Gy,每天治疗分5次,平均每次照射0.4 Gy,每次照射脉冲间隔5 min的放疗方案,对胃癌肝门部淋巴结转移致阻塞性黄疸的患者进行治疗。该患者治疗结束后淋巴结

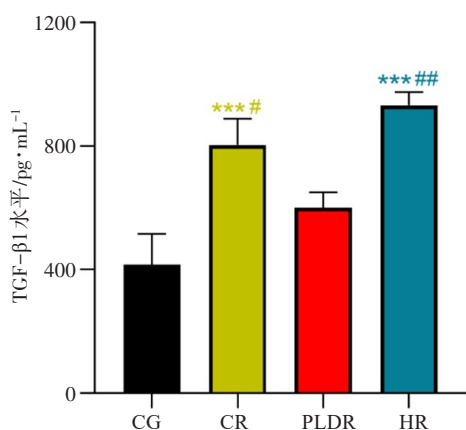


图4 小鼠血清TGF-β1水平

Figure 4 Serum TGF-β1 levels in mice

***表示与CG比较, $P<0.0005$;#表示与PLDR比较, $P<0.05$;##表示与PLDR比较, $P<0.005$

显著缩小,接近完全缓解,期间无消化道出血、穿孔等不良事件发生。Yan等^[20]对22例难治性恶性肿瘤患者采用Tomé等^[16]的方案开展PLDR,包括神经胶质瘤、肺癌、胃癌、胆管癌、结肠直肠癌、膀胱癌等,结果表明PLDR对体能状态评分较低或肿瘤体积较大的患者也能进行有效、安全的治疗。

本研究也采用Tomé等^[16]的方案。根据图2和表1,PLDR对于食管癌细胞具有与常规分割类似的杀伤作用,即10 Gy照射结束后第5天起PLDR组的吸光度、细胞活力与CR相当。但是,二者数值均高于HR,其原因或与3种分割的生物等效剂量(Biological Equivalent Dose, BED)相关,如常规分割BED=12 Gy,而大分割BED=15 Gy。后续的研究将增加剂量分割模式进行深入研究。

RILI是食管癌放疗常见且严重的不良反应,早期主要表现为放射性肺炎,晚期可逐渐演变为放射性肺纤维化,发病机制尚不明确,可能与遗传异质性、氧化应激及多种细胞受损有关^[21]。TGF-β被认为是RILI最重要的细胞因子之一(包括TGF-β的3种亚型),在体内参与炎症浸润、细胞生长、细胞凋亡和分化等过程,其中TGF-β1在上皮-间质转化中起关键作用,与RILI关系最为紧密,可作为其预测因子^[22],文献^[23-25]也证实了这一观点。本研究中,PLDR小鼠肺组织结构改变和血清TGF-β1浓度均小于CR与HR,这证明了PLDR在保护肺组织方面的优势,同时也从侧面反映出TGF-β1水平变化与RILI发生的相互关系。

虽然PLDR在食管癌研究和之前的报道中均表现出有效抑制肿瘤细胞增殖和降低正常组织放射性损伤的优势,但其固有理论不可避免地延长了治疗时间,治疗过程中患者的位置监测、运动管理等都需要进一步深入研究。

【参考文献】

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Zheng RS, Zhang SW, Sun KX, et al. Cancer statistics in China, 2016[J]. J Chin Oncol, 2023, 45: 212-220.
- [3] Walterbos NR, Fiocco M, Neelis KJ, et al. Effectiveness of several external beam radiotherapy schedules for palliation of esophageal cancer[J]. Clin Transl Radiat Oncol, 2019, 17: 24-31.
- [4] Deng W, Lin SH. Advances in radiotherapy for esophageal cancer[J]. Ann Transl Med, 2018, 6: 79.
- [5] Puttanawarut C, Sirirutbunkajorn N, Khachonkham S, et al. Biological dosimetric features for the prediction of radiation pneumonitis in esophageal cancer patients[J]. Radiat Oncol Lond Engl, 2021, 16: 220.
- [6] Wang Q, Chen Y, Chang H, et al. The role and mechanism of ATM-mediated autophagy in the transition from hyper-radiosensitivity to induced radioresistance in lung cancer under low-dose radiation[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 650819.
- [7] Hanson I, Pitman KE, Altanerova U, et al. Low-dose-rate radiation-induced secretion of TGF-β3 together with an activator in small extracellular vesicles modifies low-dose hyper-radiosensitivity through ALK1 binding[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23: 8147.
- [8] Polgár S, Schofield PN, Madas BG. Datasets of *in vitro* clonogenic assays showing low dose hyper-radiosensitivity and induced radioresistance[J]. Sci Data, 2022, 9: 555.
- [9] Joiner MC, Marples B, Lambin P, et al. Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, 49(2): 379-389.
- [10] Harney J, Short SC, Shah N, et al. Low dose hyper-radiosensitivity in metastatic tumors[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 59(4): 1190-1195.
- [11] Ma Charlie CM. Pulsed low dose-rate radiotherapy: radiobiology and dosimetry[J]. Phys Med Biol, 2022, 67(3): 03TR01.
- [12] 王康馨, 杨阳, 刘松, 等. 脉冲式低剂量率放疗治疗胃癌腹腔转移灶回顾性分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(13): 940-945.
- [13] Wang KX, Yang Y, Liu S, et al. Retrospective analysis of pulsed low-dose rate radiotherapy for the abdominal metastasis of gastric cancer[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2019, 26(13): 940-945.
- [14] Richards GM, Tomé WA, Robins HI, et al. Pulsed reduced dose-rate radiotherapy: a novel locoregional retreatment strategy for breast cancer recurrence in the previously irradiated chest wall, axilla, or supraclavicular region[J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 114(2): 307-313.
- [15] Adkison JB, Tomé W, Seo S, et al. Reirradiation of large-volume recurrent glioma with pulsed reduced-dose-rate radiotherapy[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011, 79(3): 835-841.
- [16] Lee CT, Dong Y, Li T, et al. Local control and toxicity of external beam reirradiation with a pulsed low-dose-rate technique[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2018, 100(4): 959-964.
- [17] Tomé WA, Howard SP. On the possible increase in local tumour control probability for gliomas exhibiting low dose hyper-radiosensitivity using a pulsed schedule[J]. Br J Radiol, 2007, 80(949): 32-37.
- [18] Fleet A. Radiobiology for the radiologist: 6th edition[M]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- [19] Leonard BE. Thresholds and transitions for activation of cellular radioprotective mechanisms - correlations between HRS/IRR and the "inverse" dose-rate effect[J]. Int J Radiat Biol, 2007, 83(7): 479-489.
- [20] 韦笑, 杜娟, 杨阳, 等. 脉冲式低剂量率放疗治疗胃癌肝门部淋巴结转移1例[J]. 临床肿瘤学杂志, 2017, 22(7): 670-672.
- [21] Wei X, Du J, Yang Y, et al. Pulse low-dose rate radiotherapy for gastric cancer with hilar lymph node metastasis: a case report[J]. Chinese Clinical Oncology, 2017, 22(7): 670-672.
- [22] Yan J, Yang J, Yang Y, et al. Use of pulsed low-dose rate radiotherapy in refractory malignancies[J]. Transl Oncol, 2018, 11(1): 175-181.
- [23] 应航洁, 陈亚梅, 陈梦圆, 等. 放射性肺损伤发生机制研究进展[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2021, 30(2): 213-216.
- [24] Ying HJ, Chen YM, Chen MY, et al. Research progress on the mechanism of radiation-induced lung injury[J]. Chinese Journal of Radiation Oncology, 2021, 30(2): 213-216.
- [25] Yuan X, Liao Z, Liu Z, et al. Single nucleotide polymorphism at rs1982073:T869C of the TGF-β1 gene is associated with the risk of radiation pneumonitis in patients with non-small-cell lung cancer treated with definitive radiotherapy[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(20): 3370-3378.
- [26] Ying H, Fang M, Hang QQ, et al. Pirfenidone modulates macrophage polarization and ameliorates radiation-induced lung fibrosis by inhibiting the TGF-β1/Smad3 pathway[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(18): 8662-8675.
- [27] Park SH, Kim JY, Kim JM, et al. PM014 attenuates radiation-induced pulmonary fibrosis via regulating NF-κB and TGF-β1/NOX4 pathways[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 16112.
- [28] Zhen S, Qiang R, Lu J, et al. TGF-β1-based CRISPR/Cas9 gene therapy attenuates radiation-induced lung injury[J]. Curr Gene Ther, 2022, 22(1): 59-65.

(编辑:谭斯允)