

DOI:10.3969/j.issn.1005-202X.2024.06.003

医学放射物理

基于LQ模型的原发性肝癌立体定向放射治疗剂量学实验

万福莺^{1,2}, 周凌宏¹

1. 南方医科大学生物医学工程学院, 广东 广州 510515; 2. 同济大学附属妇产科医院放射治疗科, 上海 200092

【摘要】目的:探讨肝癌立体定向放射治疗(SBRT)的剂量学效应是否符合线性二次(LQ)模型。**方法:**选取体外培养的人肝癌细胞株HepG2和Hep3B,给予生物有效剂量(BED)照射(6、8、10、12、14 Gy)。照射分割方式包括单次照射(模拟SBRT)和分次照射3次、5次(模拟IMRT)。检测辐照后存活分数反应不同分割方式的损伤效应;绘制生存曲线,观察不同分割方式对细胞增殖的影响;辐照后细胞划痕实验,观察不同分割方式对细胞侵袭和迁移能力的影响。**结果:**LQ模型在肝癌SBRT放疗的应用体外验证中出现明显的分离效应。对于HepG2细胞和Hep3B细胞,当 $BED < 12 \text{ Gy}$ ($\alpha/\beta = 10 \text{ Gy}$)时,不同分割方式在损伤效应、增殖能力、侵袭能力上未显示出明显差异,SBRT符合LQ模型;当 $BED \geq 12 \text{ Gy}$ 时,单次分割相对于多次分割,显示出更高的损伤效应,即SBRT损伤效应高于IMRT。**结论:**SBRT在肝癌中适用LQ模型具有一定的剂量区间,超过该区间损伤效应高于LQ模型预测结果。

【关键词】肝癌;线性二次模型;剂量分割;立体定向放射治疗

【中图分类号】R318

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2024)06-0673-05

Experimental study of stereotactic body radiotherapy dosimetry for primary hepatic carcinoma based on LQ model

WAN Fuying^{1,2}, ZHOU Linghong¹

1. School of Biomedical Engineering, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Department of Radiotherapy, Shanghai First Maternity and Infant Hospital, Tongji University, Shanghai 200092, China

Abstract: Objective To investigate whether the dosimetric effects of stereotactic body radiotherapy (SBRT) in hepatic carcinoma conform to the linear-quadratic (LQ) model. **Methods** Human hepatic carcinoma cell lines HepG2 and Hep3B cultured *in vitro* were selected and subjected to biological equivalent dose (BED) irradiation (6, 8, 10, 12, 14 Gy). The fractionation regimens included single-fraction irradiation (simulated SBRT) and 3- or 5-fraction irradiation (simulated IMRT). The surviving fraction after irradiation reflected the damage effects of different fractionation regimens; the effects of different fractionation regimens on cell proliferation were analyzed through survival curves; and cell scratch experiment after irradiation was used to observe the cell invasive and migration abilities after exposure to different fractionation regimens. **Results** Significant separation effect was observed in the *in vitro* validation of the LQ model in SBRT for hepatic carcinoma. For HepG2 cells and Hep3B cells, when $BED < 12 \text{ Gy}$ ($\alpha/\beta = 10 \text{ Gy}$), fractionation regimens did not show significant differences in terms of damage effects, proliferative ability, and invasive ability, indicating SBRT conformed to the LQ model; when $BED \geq 12 \text{ Gy}$, single-fraction had more obvious damage effects as compared with multiple-fraction, indicating that the damage effect in SBRT was more significant than that in IMRT. **Conclusion** The LQ model applies to SBRT for hepatic carcinoma in a certain dose range, beyond which the damage effect is higher than the predicted results of the LQ model.

Keywords: hepatic carcinoma; linear-quadratic model; fractionation regimen; stereotactic body radiotherapy

【收稿日期】2023-12-03

【基金项目】国家自然科学基金(82272131)

【作者简介】万福莺, 硕士, 研究方向: 肿瘤放射物理学, E-mail: 405499520@qq.com

【通信作者】周凌宏, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤放射物理、医学放射成像方法、肿瘤大数据与人工智能医学应用, E-mail: smart@smu.edu.cn

前言

肝细胞癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)是全球癌症相关死亡的第四大原因,肝癌常规治疗手段包括手术治疗、放疗、化疗等,但预后仍较差^[1-2]。HCC发病隐匿,早期无明显的临床表现,多数患者就

诊时已处于晚期^[3]。传统观念认为肝癌辐射敏感性较低,放疗疗效较差,同时受限于胃肠道等危及器官,放疗反应较重,因此肝癌放疗的进展缓慢^[4]。立体定向放射治疗(Stereotactic Body Radiotherapy, SBRT)是一种较新的放射治疗方式,尤其适用于控制腹部和盆腔早期原发性和寡转移癌症^[5]。随着SBRT技术的普及,肝癌放疗疗效得到明显提升,贯彻于HCC治疗全分期^[6]。然而,SBRT尚缺乏统一、公认的评价标准,经典的线性二次(Linear Quadratic, LQ)模型在SBRT剂量学效应评估上存在较大争议^[7-8]。因此,USC和RMR等替代模型及LQL和MLQ等修正模型也被建立起来,然而这些模型并未显示出较LQ模型显著的优越性^[9-12]。本文采用肝癌体外细胞系(HepG2和Hep3B),在不同生物有效剂量(Biological Effective Dose, BED)梯度下,采用不同分割方式,观察肝癌细胞辐射损伤效应、增殖情况及侵袭、迁移能力,为探索LQ模型在SBRT适用性提供临床数据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人肝癌HepG2和Hep3B细胞购于中国科学院细胞库,细胞置于含10%胎牛血清(Vivacell)、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素(Beyotime)的RPMI1640培养基(Hyclone)中,在37℃、体积分数为5% CO₂的恒温培养箱(Thermofisher)中培养。细胞呈贴壁生长,每2 d换液一次。当细胞汇合度达到约80%时,用0.25%胰蛋白酶-EDTA(Gibco)消化传代。

1.2 辐照条件

取对数生长期的细胞接种至T25培养瓶(Corning)内,待细胞汇合度达到约80%时,室温下采用VitalBeam直线加速器(Varian)进行6 MV-X线照射;机架0°时治疗床面源皮距100 cm,培养瓶下垫1.5 cm固体水,照射野40 cm×40 cm,剂量率500 cGy/min,机架角转至180°照射。分别设置BED为6、8、10、12、14 Gy组进行照射,每组分3种分割方式,分别为单次分割、3次分割、5次分割。

1.3 辐射剂量的计算

BED计算公式: $BED=nd(1+d/\alpha/\beta)$,其中 n 为分次数; d 为每次给予的剂量; α/β 为组织特异性常数,肿瘤组织默认值取10。按照BED计算公式计算不同BED分组下不同分割方法单次照射的剂量,结果如表1所示。

1.4 克隆形成实验

对数生长期的HepG2和Hep3B细胞分别进行

表1 不同BED及分次照射方案下的分次剂量(Gy)
Table1 Fractional doses with different BED and fractionation regimens (Gy)

分割方式	BED				
	6 Gy	8 Gy	10 Gy	12 Gy	14 Gy
单次分割	4.22	5.25	6.18	7.04	7.85
3次分割	1.71	2.12	2.64	3.06	3.47
5次分割	1.08	1.40	1.71	2.00	2.28

6 MV-X线辐照,辐射剂量按第1.3小节中所述。电离辐射后,消化细胞并记数。取一定数目的细胞接种于60 mm的培养皿中,置于37℃、5% CO₂培养箱培养10 d,弃掉培养基,后用PBS(Servicebio)小心冲洗两遍,甲醇(Sigma)固定30 min,用3 mL 8% Giemsa(Beyotime)染色30 min,在显微镜下计数克隆数(显微镜下大于50个细胞的集落为一个克隆)。计算克隆形成率(克隆形成率=克隆数/接种细胞数×100%)以及存活分数(Survival Fraction, SF=受照射细胞的克隆形成率/对照组细胞克隆形成率),并绘制生存曲线。

1.5 细胞增殖检测

将对数生长期细胞制成单细胞悬液,取100 μL细胞悬液加于96孔板的孔中(10 000个细胞/孔),每组设置3个复孔,培养24、48、72 h后进行检测,向每孔中加入10 μL CCK-8(Beyotime)溶液。将96孔板在37℃培养箱内孵育1 h,用酶标仪(Thermofisher)测定450 nm处的吸光度值,重复实验3次,取平均值,绘制增殖曲线。

1.6 体外划痕实验

取对数生长期细胞,以10⁶/mL的浓度接种于6孔板中,培养至细胞长满培养皿底。用无菌200 μL枪头在每孔细胞中划出一条等宽直线细痕,制作细胞伤口模型;无菌PBS清洗3次以除去漂浮细胞。此时设为划痕后零时,拍照。继续培养,每隔24 h在显微镜下观察划痕宽度,采并用相机拍照记录。图像使用ImageJ软件处理,以获得0 h培养后(12、24 h)的划痕面积。利用细胞迁移率计算公式[细胞迁移率=(0 h划痕面积-培养后划痕面积)/0 h划痕面积]计算不同分割方式下的细胞迁移率。

1.7 统计学方法

数据采用SPSS20.0统计软件分析,符合正态分布的计量资料用均数±标准差表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析方法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 相同BED在不同分割方式下肝癌细胞辐照后损伤效应和增殖能力

由表2、表3及图1的结果可知,随着照射剂量的增加,不同分割方式下的细胞存活率均呈下降趋势,

即表现为剂量依赖性。在BED处于6~10 Gy时,不同分割方式在损伤效应和增殖能力上未显示出明显差异。当BED≥12 Gy时,不同存活曲线趋于分离,单次分割相对于多次分割显示出更高的损伤效应。由图1可知,当BED≥12 Gy时单次大剂量放疗后细胞增殖能力受到更明显的损害。

表2 HepG2接受不同剂量X射线照射后的存活分数($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Surviving fraction of HepG2 after exposure to different doses of X-rays (Mean±SD)

分割方式	BED				
	6 Gy	8 Gy	10 Gy	12 Gy	14 Gy
单次分割	0.401±0.019	0.315±0.017	0.144±0.010	0.033±0.003	0.001±0.001
3次分割	0.435±0.028	0.348±0.034	0.154±0.016	0.077±0.008	0.003±0.001
5次分割	0.467±0.020	0.323±0.021	0.136±0.010	0.066±0.005	0.004±0.001
P值	0.075	0.401	0.402	0.001	0.001

表3 Hep3B接受不同剂量X射线照射后的存活分数($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Surviving fraction of Hep3B after exposure to different doses of X-rays (Mean±SD)

分割方式	BED				
	6 Gy	8 Gy	10 Gy	12 Gy	14 Gy
单次分割	0.522±0.013	0.451±0.023	0.252±0.016	0.103±0.011	0.001±0.001
3次分割	0.539±0.034	0.438±0.014	0.265±0.010	0.145±0.008	0.003±0.001
5次分割	0.559±0.042	0.419±0.023	0.270±0.015	0.159±0.012	0.005±0.001
P值	0.419	0.957	0.343	0.002	0.001

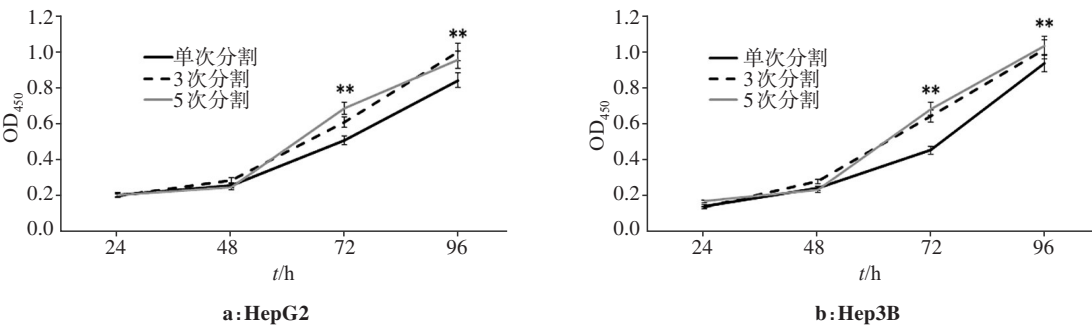


图1 相同BED的情况下,不同分割方式辐照下肝癌细胞的增殖情况(**P<0.01)
Figure 1 Proliferation of hepatic carcinoma cells irradiated by different fractionation regimens with the same BED (**P<0.01)

2.2 相同BED在不同分割方式下肝癌细胞辐照后迁移能力

依据第2.1小节中的结果,当BED≥12 Gy时,单次分割方式造成的细胞损伤效应与其他分割方式产生显著差异。为了探究辐射剂量相同时,不同分割方式是否会对细胞的迁移能力产生不同影响,选择BED=12 Gy进行不同方案照射。由图2、图3的结果

可知,辐照后肝癌细胞的迁移能力显著降低。在24、48 h两个时间点,单次分割照射的两种细胞的迁移能力与其他分割方式照射后产生显著差异(P<0.05)。然而,3次分割和5次分割两种方式照射后细胞迁移能力的改变无显著差异(P>0.05)。以上结果说明当BED=12 Gy时,单次大剂量照射对肝癌细胞的迁移能力产生更大的损伤。

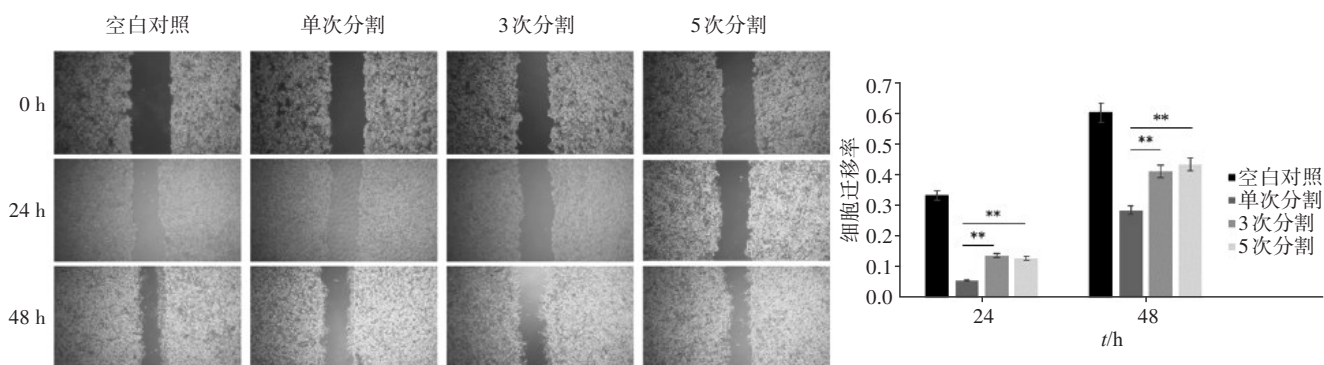


图2 BED为12 Gy时,HepG2接受不同照射方案后的迁移能力(** $P<0.01$)

Figure 2 Migration ability of HepG2 after exposure to different irradiation regimens at a BED of 12 Gy (** $P<0.01$)

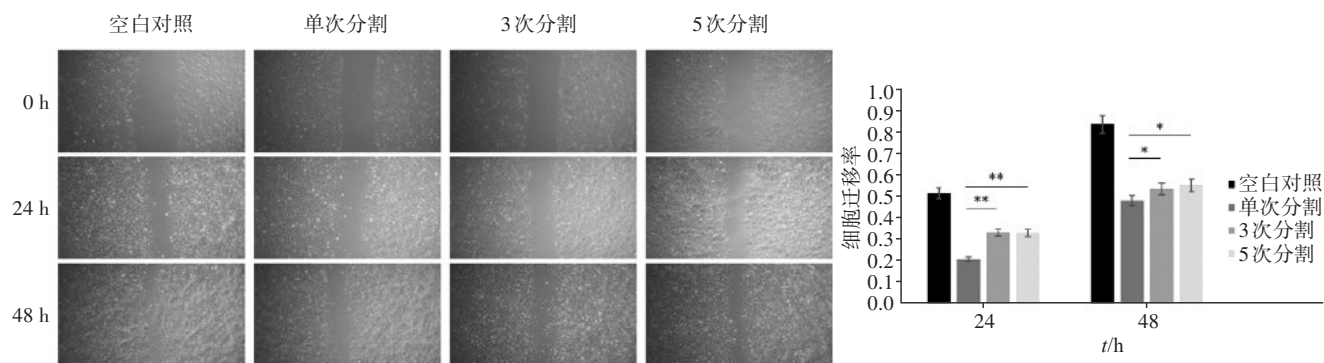


图3 BED为12 Gy时,Hep3B接受不同照射方案后的迁移能力(* $P<0.05$,** $P<0.01$)

Figure 3 Migration ability of Hep3B after exposure to different irradiation regimens at a BED of 12 Gy (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

3 讨论

HCC是一种辐射中度敏感的恶性肿瘤,但是由于放疗产生的邻近器官损伤以及全肝对辐射总量的低耐受导致放疗在HCC治疗中的作用受到制约^[13]。因此使射线能量集中于肿瘤组织,减少周边正常组织器官的受照剂量,成为拓展放疗在肝癌治疗中应用的有效手段。三维适形放疗^[14]、图像引导放疗^[15]、呼吸门控^[16]等一系列提升放疗精度的手段运用于肝癌治疗都取得较好的临床结果。

随着SBRT技术的出现与进步,更少的照射次数、更好的生物学效应、更高的肿瘤区域剂量以及更少的危及器官损害使得肝癌放疗进入新的时代^[17-18]。然而,对于SBRT剂量分割模式的选择仍没有统一的标准,目前已有报告的剂量为24~60 Gy, 3~10次^[19-21]。对于高剂量的照射和低剂量的照射在不同的文献^[22-23]报告中都表现出较好的效果。考虑到局部剂量增高可能带来的危及器官损伤增加以及对肝功能的损害,需要建立一种有效的模型评估SBRT治疗肝癌的最佳分割方式。

传统的辐射剂量学模型是基于LQ模型建立的,

然而LQ模型在SBRT剂量学评估中是否适用仍存在较大争议^[7]。Brown等^[8]认为LQ模型应用于较高剂量(<20 Gy)的辐射生物学效应预测仍具有较高的拟合优度。然而有证据表明当单次剂量高于10 Gy时,辐射会诱发较强的间接杀伤效应,包括血管损伤、肿瘤内皮细胞损伤等^[24]。显然在上述情况下SBRT的生物学效应是被低估了。同时Kelada等^[25]发现缺氧对大分割放疗的杀伤效应影响更为显著,而LQ模型很可能高估了这部分辐射损伤。因此,对于LQ模型是否适用于SBRT以及是否需要探索更好的预测模型应用于SBRT辐射生物学效应的评估,仍需要更多的研究予以论证。

结果表明,在体外实验中,辐射处于低剂量区间(BED为6~10 Gy)时不同分割方式对辐射杀伤效应的影响较小,LQ模型适用于不同分割方式放疗的生物学效应预测。然而当辐射剂量较高(BED≥12 Gy)时,单次大剂量放疗较多次分割放疗产生更高的生物学效应。推测差异效应的产生与单次大剂量放疗造成细胞杀伤机制的差异有关,凋亡以外的细胞死亡方式(包括坏死等)在大剂量放疗中的作用更为显著^[26]。由于本研究局限在细胞学层面,可能不能完

整反映辐射对肿瘤的杀伤效应,SBRT造成的血管损伤、组织乏氧的影响与SBRT的免疫激活效应的影响都被排除或是低估了,因此需要进一步动物实验以验证和完善此项研究的结论。

【参考文献】

- [1] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2019, 380(15): 1450-1462.
- [2] Lin SB, Hoffmann K, Schemmer P. Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review[J]. Liver Cancer, 2012, 1(3/4): 144-158.
- [3] Ganesan P, Kulik LM. Hepatocellular carcinoma: new developments[J]. Clin Liver Dis, 2023, 27(1): 85-102.
- [4] 中国医师协会肝癌专业委员会精确放疗学组, 中国研究型医院学会放射肿瘤学专业委员会肝癌学组, 中国研究型医院学会肿瘤放射生物与多模式诊疗专业委员会, 等. 原发性肝癌放射治疗专家共识(2020年版)[J]. 临床肿瘤学杂志, 2020, 25(10): 935-946. Precise Radiotherapy Study Group, Chinese Society of Liver Cancer, Chinese Medical Doctor Association, Liver Cancer Study Group, Committee of Radiation Oncology, Chinese Research Hospital Association, Committee of Tumor Radiobiology and Multimodal Imaging and Therapy, Chinese Research Hospital Association, et al. Consensus on radiation therapy for primary liver cancer(2020)[J]. Chinese Clinical Oncology, 2020, 25(10): 935-946.
- [5] Benedict SH, Yenice KM, Followill D, et al. Stereotactic body radiation therapy: the report of AAPM task group 101[J]. Med Phys, 2010, 37(8): 4078-4101.
- [6] 王锡林, 刘娟, 曲震. 射波刀治疗原发性肝癌的临床研究进展[J]. 癌症进展, 2020, 18(20): 2061-2064. Wang XL, Liu J, Qu Z. Progress of clinical research on primary liver cancer treated by SBRT[J]. Oncology Progress, 2020, 18(20): 2061-2064.
- [7] Brown JM. The biology of SBRT: LQ or something new?[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2018, 101(4): 964.
- [8] Brown JM, Carlson DJ, Brenner DJ. The tumor radiobiology of SRS and SBRT: are more than the 5 Rs involved?[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2014, 88(2): 254-262.
- [9] Mehta N, King CR, Agazaryan N, et al. Stereotactic body radiation therapy and 3-dimensional conformal radiotherapy for stage I non-small cell lung cancer: a pooled analysis of biological equivalent dose and local control[J]. Pract Radiat Oncol, 2012, 2(4): 288-295.
- [10] Seo Y, Tamari K, Yoshioka Y, et al. Characterization of in vitro radiosensitization in mammalian cells using biomathematical modelling: implications for hypofractionated radiotherapy with a combined modality approach[J]. Br J Radiol, 2016, 89(1062): 20150724.
- [11] Andisheh B, Edgren M, Belkić D, et al. A comparative analysis of radiobiological models for cell surviving fractions at high doses[J]. Technol Cancer Res Treat, 2013, 12(2): 183-192.
- [12] Zhang HL, Zhong HL, Barth RF, et al. Impact of dose size in single fraction spatially fractionated (grid) radiotherapy for melanoma[J]. Med Phys, 2014, 41(2): 021727.
- [13] 姆尼热·阿卜力米提, 谭遥, 伊斯利达尔·阿布力米提. 肝细胞肝癌放射治疗研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(10): 1817-1821. Munire AB, Tan Y, Yisikandaer AB. Advances in radiotherapy for hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Modern Oncology, 2021, 29(10): 1817-1821.
- [14] Pattaranutaporn P, Chansilpa Y, Ieumwananonthachai N, et al. Three-dimensional conformal radiation therapy and periodic irradiation with the deep inspiration breath-hold technique for hepatocellular carcinoma[J]. J Med Assoc Thai, 2001, 84(12): 1692-1700.
- [15] Chen D, Wang RB, Meng XJ, et al. A comparison of liver protection among 3-D conformal radiotherapy, intensity-modulated radiotherapy and RapidArc for hepatocellular carcinoma[J]. Radiat Oncol, 2014, 9: 48.
- [16] Wagman R, Yorke E, Ford E, et al. Respiratory gating for liver tumors: use in dose escalation[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003, 55(3): 659-668.
- [17] Lewis S, Dawson L, Barry A, et al. Stereotactic body radiation therapy for hepatocellular carcinoma: from infancy to ongoing maturity[J]. JHEP Rep, 2022, 4(8): 100498.
- [18] van Dams R, Wu TC, Kishan AU, et al. Ablative radiotherapy for liver tumors using stereotactic MRI-guidance: a prospective phase I trial[J]. Radiother Oncol, 2022, 170: 14-20.
- [19] Andolino DL, Johnson CS, Maluccio M, et al. Stereotactic body radiotherapy for primary hepatocellular carcinoma[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011, 81(4): e447-e453.
- [20] Tse RV, Hawkins M, Lockwood G, et al. Phase I study of individualized stereotactic body radiotherapy for hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(4): 657-664.
- [21] Xu MJ, Feng M. Radiation therapy in HCC: what data exist and what data do we need to incorporate into guidelines?[J]. Semin Liver Dis, 2019, 39(1): 43-52.
- [22] 乐紫好, 刘勇. 体部立体定向放疗的放射生物学研究进展[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2018, 27(9): 864-868. Le ZY, Liu Y. Hotspots of stereotactic body radiotherapy in radiobiology[J]. Chinese Journal of Radiation Oncology, 2018, 27(9): 864-868.
- [23] Goodman KA, Wiegner EA, Maturen KE, et al. Dose-escalation study of single-fraction stereotactic body radiotherapy for liver malignancies[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010, 78(2): 486-493.
- [24] Park HJ, Griffin RJ, Hui S, et al. Radiation-induced vascular damage in tumors: implications of vascular damage in ablative hypofractionated radiotherapy (SBRT and SRS)[J]. Radiat Res, 2012, 177(3): 311-327.
- [25] Kelada OJ, Decker RH, Nath SK, et al. High single doses of radiation may induce elevated levels of hypoxia in early-stage non-small cell lung cancer tumors[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2018, 102(1): 174-183.
- [26] 万晓莉, 兰洁, 陈永顺, 等. 单次大剂量照射对Lewis肺癌移植瘤的放射生物学效应[J]. 四川大学学报(医学版), 2014, 45(2): 179-184. Wan XL, Lan J, Chen YS, et al. The bio-effects of high single-dose radiation on xenografts of Lewis lung carcinoma[J]. Journal of Sichuan University (Medical Sciences), 2014, 45(2): 179-184.

(编辑:陈丽霞)