

微束单细胞照射的研究和发展

Hei, TK ✓

吴李君¹, Tom. K. Hei², 余增亮¹

(1. 中国科学院等离子体物理研究所 离子束生物工程实验室 合肥 230031;

2. 哥伦比亚大学辐射研究中心 纽约 10032)

78-83

0432.1
Q691

摘要:了解低剂量辐射效应等辐射生物学基本问题的关键是研究单一粒子与生物体的相互作用。然而,由于粒子在能量、径迹上的随机分布,这种单一粒子与生物体的相互作用很难在实验室中用常规照射的方法进行。微束的发展,特别是单粒子微束通过将精确数量的粒子准确地射入细胞或细胞的特定位置为回答这些问题提供了一个直接、有用的手段。该文论述了微束的历史,现状和未来发展,以及微束在辐射生物学研究中的应用。

①② **关键词:**微束;单粒子;辐射;生物效应, 辐射装置, 辐射生物学

1 引言

微束是一种能把辐射聚焦或准直到微米水平的装置。作为一种独特的照射方式,它的使用可追溯到很多年以前。早在1912年, Tschachotin 就发展了一种聚焦紫外微束并用此装置研究单一细胞的辐射效应^[1]。在50至60年代,随着人们对微束研究兴趣的增加,科学家们建造了许多不同类型的微束,包括荷电粒子微束、x射线微束、紫外微束和激光微束等,用以研究细胞中可见的辐射生物学效应。近年来,对微束重新升起的兴趣主要得益于两个方面的因素,其一是科学技术的进步,其二是人们对环境中低剂量辐射危害的重视,如氦气和它的子代辐射。目前在世界上建成的微束装置主要有,荷电粒子微束和x射线微束。其中以荷电粒子微束被最广泛地应用。与早期微束装置不同的是,现代微束可准确地将单一或精确数量的粒子射入细胞或细胞不同部位,如细胞核、细胞质或被检测细胞的相邻细胞。这种照射技术使得了解类似于细胞内、细胞间通讯,细胞的损伤修复,特别是回答电离辐射的低剂量效应成为可能。

2 微束研究的意义

2.1 精确估计低剂量辐射效应

微束的使用为精确地估计低剂量辐射对生物体的影响提供了一个有力的手段。辐射防护学研究发现,在人体所受的全部环境辐射中,氦气和其子代发射的 α 粒子占了总辐射量的50%以上^[2]。流行病学的研究已经证明受高剂量氦气辐照的铀矿工人比其他任何组群都具有更高的肺癌发生率^[3~7],可是在根据高剂量资料类推肺癌与低剂量环境氦气危害相关性上

收稿日期:1999-05-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(19875054)

作者简介:吴李君(1963-),副研究员,博士,曾在美国哥伦比亚大学从事单粒子微束生物学研究。

却存在着很大的不确定性。这是因为在低剂量时,细胞所受的多次照射的情况极其稀少,或者说细胞很难经历多于一个 α 粒子的照射。例如,人体所受天然辐射的55%来自氡气,铀矿工人在其平均寿命中其支气管上皮细胞所受的氡的辐射剂量是非常大的,大多数细胞都遭受过多次辐射。与此相反的是,对环境中的居家者来说,在2500个细胞中,大约只有一个细胞每年受过一个 α 粒子照射,而少于 10^7 分之一的细胞受过多于一个 α 粒子照射^[8]。因此,为了能把受高剂量照射的矿工资料应用于估价低剂量环境辐射的危害性,首先必须找出多次照射与单个粒子照射之间的生物效应关系。单粒子微束通过将精确数量的粒子射入细胞克服了常规照射中粒子随机分布的缺点,为确定高低剂量之间的关系建立了一个基础。

2.2 了解细胞的损伤与致死

微束的使用有助于了解有关辐射敏感性的相关问题。对单个细胞,照射细胞核是否致死已争论了30多年。Barendsen等早期研究认为:单个 α 粒子照射细胞是致死的^[9]。此外,基于诱发DNA双键断裂的测量指出,在C3H10T1/2细胞中,几乎100%的细胞在受到一个 α 粒子照射后会被直接作用杀死^[10]。另一方面,基于粒子径迹结构的微剂量学认为,单个 α 粒子对哺乳类上皮细胞的损伤仅占17%^[11]。在损伤有效性方面,Raju的研究认为在相同剂量下, α 粒子完全穿透细胞比停留在细胞里显得更有效^[12],而这一发现与Cole等早期研究结论相反。Cole的研究认为粒子不穿透将更利于粒子对DNA的损伤^[13]。微束的使用可以为了解这些问题提供更直接的手段。

2.3 了解细胞间信息传递

微束的使用将有助于了解细胞信号传导,细胞内、细胞间通信等生物学难题。一般地认为辐射导致的损伤仅仅在粒子照射细胞核时才会发生^[14~17]。然而,不断增加的证据显示细胞中的辐射效应可能并不仅仅局限于粒子的核穿射。Nagasawa和他的合作者发现虽然仅有1%或更少的细胞被 α 粒子射中,却有30%~50%的细胞表现出了姊妹染色体的交换频率^[18]。Deshpancle也发现了相似的情况,他证实 α 粒子能在没有穿过核的情况下诱导姊妹染色体的交换^[19]。此外,Hickman等也报道了P53蛋白在未受照射的细胞中表达^[20],P53蛋白被认为对保持细胞受辐射损伤后的完整性具有至关重要的作用。然而,由于受常规照射中粒子随机分布的影响,这些研究并不能给出存在有核外或细胞外目标的直接证据。微束装置通过将粒子精确地射入细胞的不同部位,或被观察细胞的相邻细胞可以为回答这些问题提供直接手段。

3 早期的微束及其研究

应用微束对单个细胞进行照射已有很长的历史,甚至可以追溯到1912年Tschachotin的紫外微束装置的应用^[1]。50及60年代是微束研究及其应用的一个高潮。在这一时期的工作主要是研究电离辐射对生命体的损伤特性,了解亚细胞结构的功能。随后,随着人们对电离辐射研究的深入,这种技术又被用于确定细胞的哪一部分对辐射最敏感。

3.1 早期微束装置

在这一时期发展起来的微束有紫外聚焦微束^[21]、质子微束^[22]、x射线微束^[23]以及粒子微束^[24~25]。两种方法被用来把束径限制到很小的一点:准直或聚焦。聚焦是通过透镜来完成的。准直的方法是利用准直孔将大部分粒子阻住,仅让极少的粒子通过细小的束孔射向细胞以达到限制束径的功能。由于粒子比较容易散射,在这一时期,聚焦微束被广泛应用。

3.2 早期微束的生物学研究

早期微束的研究主要集中在了解一些显微镜下可见的变化以及辐射敏感性等问题。归纳其范围,主要可分为四个领域:1)调查细胞核受照射时的染色体变化^[1,26,27];2)研究核照射后的有丝分裂延迟^[1];3)研究细胞质受照射时的核效应^[26,28,29];4)直接地比较细胞核与细胞质的辐射敏感性^[25,29,31]。这些研究对当时了解特别位点的照射效应起到了很大的帮助作用。它们指出细胞核是细胞中辐射最敏感的区域,在导致细胞受辐射死亡方面可能有着不同的机理,并且发现细胞间不同部分的信号传导在某些情况下会被诱导出来。

3.3 早期微束的缺陷

早期所有这些系统中的主要缺陷是剂量的投放,即照射的粒子数。在早期微束装置上,剂量是由时间来控制的。因此很难进行低剂量的辐射生物学的研究。此外,早期的微束不能再定位照射过的细胞,而这种再定位是观察后照射效应所必须的,这一效应的出现往往需很多小时才能完成。除了上述技术问题外,还有生物学上的限制。在早期的研究中,所观察的终点大多是一些在结构和细胞分裂能力上可见的变化,这些简单化的生物终点研究并不能给出很多辐射效应方面的信息,并且常常需要大剂量照射才能被观察到。也许正是由于这些缺陷,它们的应用仅持续了十几年。

4 现代微束的发展

近年来在微束上重新开始的兴趣在很大程度上归功于技术上的进步,这些进步包括:粒子的投放,聚焦和探测,图像处理 and 定位,计算机控制以及一些新的生物实验方法。其中,首推的技术进步是对粒子的探测。探测和控制与生物样品相互作用的粒子数是研究低剂量辐射生物效应至关重要的步骤。通过使用不同种类的粒子探测器和快速粒子控制开关,现代微束能精确地将一个(或多个)粒子射入单一的细胞,这就为研究低剂量生物效应提供了一个有用的工具。第二,计算机的使用使得微束在很短的时间内能自动地对数百个细胞进行精确定点照射,而且这些被照射过的细胞可连续地观察其生物反应。因此,现代微束可扩展其生物终点研究到单个粒子所引发的诱变和癌变。第三,许多单细胞实验系统的产生。这些实验系统能被用于在很低剂量下估价辐射的效应。如 Comet 试验^[32]。这种方法可用于测量单个细胞中的 DNA 损伤,其原理是基于细胞受照射后 DNA 超螺旋的松弛,在电场作用下,松弛的 DNA 会从核中迁移开来从而形成一种类似于彗星尾的形状,通过测量彗尾的长短可估算出细胞受损伤的程度。这种方法对低剂量辐射损伤非常敏感。PCC(Premature Chromatin Condensation)方法可用于估价非周期或慢周期细胞被照射后立即出现的染色体损伤。此外,还有测量染色体畸变的 FISH(Fluorescence in Situ Hybridization)试验和细胞中测量染色体片断丢失的微核试验。最后,许多对辐射非常敏感的哺乳动物细胞系的建立,如 A_L 细胞和一些来源于新鲜组织的细胞样品。这些细胞系的生物学研究比用于早期微束研究的植物细胞、原核细胞和来源于低等有机体的细胞能更精确地估价人类对电离辐射的反应。

4.1 现代微束装置

近年来,欧洲、美国和日本已经开始发展或计划建造用于细胞照射的微束,用以了解在常规照射中不能解决的辐射生物学过程。与早期的微束相类似,现代微束也采用聚焦或准直的方式来缩小束流的口径。所不同的是,现代微束采用了许多先进的技术,如可靠的单粒子探测器,精确的细胞定位技术,快速的束流开关以及计算机控制,使得照射更快更精确。目前建成并投入使用的有粒子微束、聚焦 X 射线微束等。其中,三台利用准直方式建造的单粒子微束

装置最具有代表性^[33-35]。

4.1.1 Texas A&M 大学单粒子微束

Texas A&M 大学微束装置采用一个串联的 Van de Graaff 加速器, 它可加速质子、氘核、 He^3 、 He^4 和锂离子。入射束的准直系统由两对正交的刀边口组成, 这种刀边组成的束口被缩小到小于 1 微米。此外, 一个带有 5 微米激光钻孔的铜箔用于限制准直刀边引起的粒子散射。粒子探测由传导闪烁探测器完成, 它位于粒子出口与被照射细胞之间。另一个 7 微米厚的塑料闪烁器被放在准直器的孔上。发射出的质子通过一行指向显微镜物镜的光电倍增器所收集。束流由压电快开关控制, 该开关可计算出每小时多达 500 粒子的速率。尽管该系统也使用计算机进行图像处理, 但在细胞照射上需要一些人为的参与, 因此其照射细胞的速度只能达到每秒 120 个左右。

4.1.2 Gray 实验室单粒子微束^[34]

Gray 实验室使用的加速器是一种单端 4 MeV 加速器, 它可将质子加速到 4.25 MeV, 将 He^3 加速到 8.5 MeV。粒子的准直由一个框架固定的玻璃毛细管完成, 其出口小于 10 微米。探测器被放在准直口上, 它由一个 5~10 μm 的单一硫锌晶体组成, 该晶体和两个可传送光到两 PM 管上光学纤维组合在一起。束的开关通过一个瞬间电子反射器完成。细胞培养皿和最终的准直器能通过计算机进行独立的微定位以达到若干个准直选择。该系统的中心是一个外荧光显微镜和一个同准直器一起的目标准直计算机控制系统, 以便最终地进行目标确认, 准直和资料记录。

4.1.3 哥伦比亚大学微束装置^[35]

哥伦比亚大学微束应用了和上述两台微束不同的原理和方法。Gray 实验室的加速器主要是用于发射空间上精确质子束, 而不是精确的 α 粒子。Texas A&M 大学的微束是建立在与操作者相结合的单个细胞或细胞核的定位, 这就限制了照射速率, 很难超过每小时 120 个照射细胞。与此相反, 哥伦比亚大学的方法是建立在自动定位单一细胞或细胞核, 从而使得照射速率大大提高, 目前可达每小时 2 000 个细胞。因此它可能研究生物终点在 10^{-4} 频率。该系统使用单端 4.2 MeV 的 Van de Graaff 加速器, 它可发射质子、氘核、中子、 He^3 、 He^4 (α 粒子)。准直和抗扩散准直器由三层不锈钢箔组成, 它们将束流精确到 5 μm 的范围。粒子探测器由硅物质组成, 位于照射细胞的上方和显微镜的物镜结合在一起。发射出 α 粒子的 LET 在 90 keV/ μm , 最快速率可达到每秒 100 粒子。计算机控制的程序可自动地定位、照射和重新发现被照射过的细胞。同其它的微束装置相比, 哥伦比亚大学微束装置是目前世界上唯一一台可研究生物终点多于 10^{-4} 频率的装置。

4.2 单粒子微束的生物学研究

建立单粒子微束的最大目的是为了研究低剂量下辐射的生物效应以及高低剂量效应之间的关系。通过使用 Texas A&M 大学的加速器, Neldson 等发现微核的诱导与照射的 α 与粒子数成正相关, 并发现单个 α 粒子核照射可以引起减数分裂的延缓, 而这种时间延缓的长短也与粒子数成正比^[36]。Hei 等利用哥伦比亚大学的微束装置第一次在世界上展示了精确粒子的成活曲线, 他们的研究发现单个 α 粒子核照射仅能造成 20% 的细胞致死率, 并非常惊奇地发现 10% 的细胞在受 8 个 α 粒子核照射后仍能成活^[37]。在随后的实验中, Hei 等又发现单个 α 粒子在 A_L 细胞中可诱发高于对照三倍的诱变率, 并且这种诱变率随着粒子数的增加而增加^[37]。通过精确的单粒子照射 C3H10T1/2 细胞核, 哥伦比亚大学的 Miller 发现, 单个 α 粒子

(90 keV/ μm)可在每个成活细胞中产生频率在 $\sim 5 \times 10^{-5}$ 的恶性转化,这一结果类似于常规照射中等剂量照射的诱导频率^[38]。此外,细胞质照射,细胞通讯的研究也在各实验室开展,相信在不久的将来,这些研究结果将为我们更加深入地了解辐射损伤的本质,特别是低剂量辐射效应及其机理提供精确的数据。

5 微束的未来发展

目前使用的微束,特别是单粒子微束装置,虽已被成功地用于进行辐射生物学研究,但仍存在许多有待改进的地方。首先是粒子的探测系统,哥伦比亚大学的装置将探测器置于细胞的后方,即粒子只有穿过细胞后才能被探测到,这种设计并不能用于探测停止于细胞中粒子的生物效应。Gray 实验室和 Texas A&M 大学装置虽将探测器置于细胞与粒子出口的中间,但这种用光电感应探测粒子技术,限制了粒子照射的速度。其次是目前使用的装置在细胞图像分析上都采用染色的方法,即通过对细胞核进行荧光染色来进行细胞的计算机自动定位。因此有必要发展一种无染色的细胞定位方法以减少细胞的损伤,哥伦比亚大学目前正在进行这种技术的尝试。此外,须要被改进的还有微束的准直系统,使得它可将束径减小到可用于对细胞中特定结构如线粒体进行照射。总而言之,尽管现代微束还存在这样或那样的问题,但和早期的微束相比,已有了很大的发展。这些现代微束的建立使得辐射生物学由定性走向了定量,并使得回答低剂量辐射效应这类辐射生物学的基本问题成为可能。通过今后的不断发展、改进,我们相信它将被成功地用于回答有关细胞通信,损伤修复乃至各细胞器的功能等重要问题。它的研究和发展在理论上和实践上都有重大的意义。

参考文献

- 1 Zirkle R E. *Advances in Biological and Medical Physics*. New York: Academic Press, 1957, 103~146
- 2 UNSCEAR Report. *Ionizing radiation: Sources and biological effects*. New York: United Nations, 1982
- 3 Schuttman W. *Am. J. Ind. Med.*, 1993, 23:355~368
- 4 Greenberg M, et al. *Ann. Occup. Hyg.*, 1993, 37:5~14
- 5 Evens R D, et al. *Nature*, 1981, 290: 99~100
- 6 Samet J M, et al. *New Engl. J. Med.*, 1984
- 7 Lubin J H, et al. *Cancer Causes and Control*, 1994, 5(2):114~128
- 8 Brenner D J. *Microbeam Probes of Cellular radiation Response*. C. R. C. Gray Laboratory, London UK, 1993, 1.3.1~1.3.4.
- 9 Barendsen G W. *International Journal of Radiation Biology*, 1964, 8:453~466
- 10 Watt D E. *Radiat. Protect. Dosi.*, 1989, 27:73~84
- 11 Hei T K, et al. *Proc. Annual Meeting of the Radiation Research Society*, 1996, 43:161
- 12 Raju M R, et al. *Radiation Research*, 1991, 128:204~209
- 13 Cole A, et al. *In Radistion Biology in Cancer Research*. New York: Raven Press, 1980:33~58
- 14 Bird R P, et al. *Radiat. Res.*, 1980, 82:277~289
- 15 Todd P, et al. *Radiat. Res.* 1985, 104:S5~S12
- 16 Roberts C J, et al. *Chemistry & Medicine*. 1987, 52(6):871~882
- 17 Barendsen, G. W.: *Radiat. Prot. Dosim.*, 1990, 31:227~233
- 18 Nagasawa H, et al. *Cancer Research*, 1992, 52:6394~6396
- 19 Deshpande A, et al. *Radiat. Res.*, 1996, 145:260~267
- 20 Huckman A W, et al. *Cancer Res.*, 1994, 54:5797~5800

- 21 Uretz R B, et al. *Science*, 1954, 120:197~199
- 22 Pohlit W. *Strahlentherapie*, 1957, 103:593~597
- 23 Buchholtz C. *Strahlentherapie*, 1967, 134:138~150
- 24 Davis M, et al. *Experimental Cell Research*, 1957, 12:15~34
- 25 Zirkle R E, et al. *Science*, 1953, 117:487~493
- 26 Bloom W. *Reviews of Modern Physics*, 1959, 31:21~29
- 27 Haynes R H, et al. *Radiation Research*, 1960, 12:442
- 28 Brown D Q, et al. *Photochemistry and Photobiology*, 1967, 6:817~828
- 29 Smith C L. *International Review of Cytology*, 1964, 16:133~153
- 30 Errera M, et al. *Experimental Cell research*, 1957, 13:1~10
- 31 Jagger J, et al. *Experimental Cell Research*, 1969, 58:35~54
- 32 Kent C R H, et al. *Int. J. Radio. Biol.*, 1995, 67 :655~660
- 33 Braby L A. *Microbeam Probes of Cellular radiation Response*. C. R. C Gray Laboratory, London UK, 1993, 4.1.1~4.1.2
- 34 Folkard M, et al. *Microbeam Probes of Cellular radiation Response*. C. R. C. Gray Laboratory, London UK, 1993, 4.2.1~4.2.4
- 35 Randers-Pehrson G, et al. *Microbeam Probes of Cellular radiation Response* C. R. C. Gray Laboratory, London UK, 1993, 4.3.1
- 36 Nelson J. M, et al. *Radiation Research*, 1996, 145(5):568~574
- 37 Hei T. K, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1997, 94:3765~3770
- 38 Geard C R, et al. *Microdosimetry: An Interdisciplinary Approach*: Royal Society of Chemistry, 1997. 204

Microbeam; Research and Development

WU Lijun¹, Tom K. Hei², YU Zengliang¹

(1. *Institute of Plasma Physics, Academia Sinica, Hefei 230031*)

(2. *Center for Radiological Research, Columbia University, New York 10032*)

(Manuscript received 26 May, 1999)

Abstract: The key to answering some fundamental radiation biology questions, such as the hazards of ionizing radiation, is the ability to detect each charged particle as it interacts with a cell. However, due to the stochastic nature of energy deposition and the random position of tracks, these effects cannot be stimulated in the laboratory using conventional broad-field exposures. The availability of microbeam, especially the single particle microbeam in the world, whereby individual cells can be irradiated with either a single or an exact number of particles provides a useful tool to address these questions. This report describes the rationale, historical, and nowadays development of microbeam facilities in the world, as well as their biological researches and future development.

Key words: Single particle; Microbeam; Radiation; Biological Effects