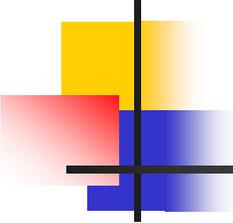


細胞存活曲線

Cell Survival Curves

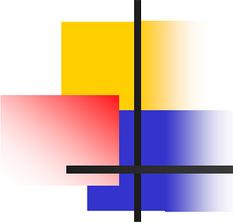
References :

1. Radiobiology for the radiologist. Eric J. Hall Amato J. Giaccia. 藝軒圖書
2. 分子輻射生物學. 洪世凱, 黃正仲. 藝軒圖書



課程大綱

- 繁殖能力
- 體外細胞培養之存活曲線
- 存活曲線圖形
- 細胞殺死的機制
 - 去氧核糖核酸為標的
 - 旁觀者效應
 - 細胞凋亡和有絲分裂死亡
- 各種哺乳細胞的存活曲線
- 存活曲線形狀和細胞死亡機制
- 致癌基因和輻射抗性



課程大綱

- 輻射敏感度的遺傳(基因)控制
- 分次照射的有效存活曲線
- 計算腫瘤細胞殺死量
- 哺乳動物細胞和微生物的輻射敏感度比較
- 相關結論總結

繁殖能力

Reproductive Integrity

- **細胞存活曲線 (cell survival curve)** 描述的是**放射線劑量**和**存活細胞**所佔比例的關係圖。
- 所謂“存活”指的是什麼？細胞存活或細胞死亡，在不同狀況下可能代表不同的意義，所以必須分別定義它。例如，對已分化完全的細胞如神經、肌肉細胞而言，死亡代表著功能的喪失；而對分裂中的細胞如血液中的幹細胞或者腸上皮細胞而言，死亡代表著分裂能力的喪失，又稱之為“**繁殖死亡 (reproductive death)**”，這通常也是體外細胞培養的最終測量點。

體外細胞培養之存活曲線

The *In Vitro* Survival Curve

- 單一細胞生長成肉眼可輕易看見的大細胞群落，是一種簡便證明細胞仍具有完整繁殖能力的方法。
- 在現今的組織培養技術中，我們是可以取下腫瘤或正常組織，將它分為小塊，並用可使細胞膜分解的胰蛋白酶將這些小塊組織分解為單一細胞懸浮液。若將這些細胞種在培養皿上，給予適當的生長基質並維持在攝氏37度的無菌環境，它們即可附著在表面上成長並分裂。

種植效率(plating efficiency, PE)和存活分率(surviving fraction, SF)

- 種植效率指觀察到的群落數和植入盤中的細胞數目之比值。
- PE和SF之計算如下公式：

$$PE = \frac{\text{觀察到的群落數目}}{\text{植入的細胞數目}} \times 100$$

$$\text{存活分率 (surviving fraction, SF)} = \frac{\text{觀察到的群落數目}}{\text{植入的細胞數目} \times (\text{PF}/100)}$$

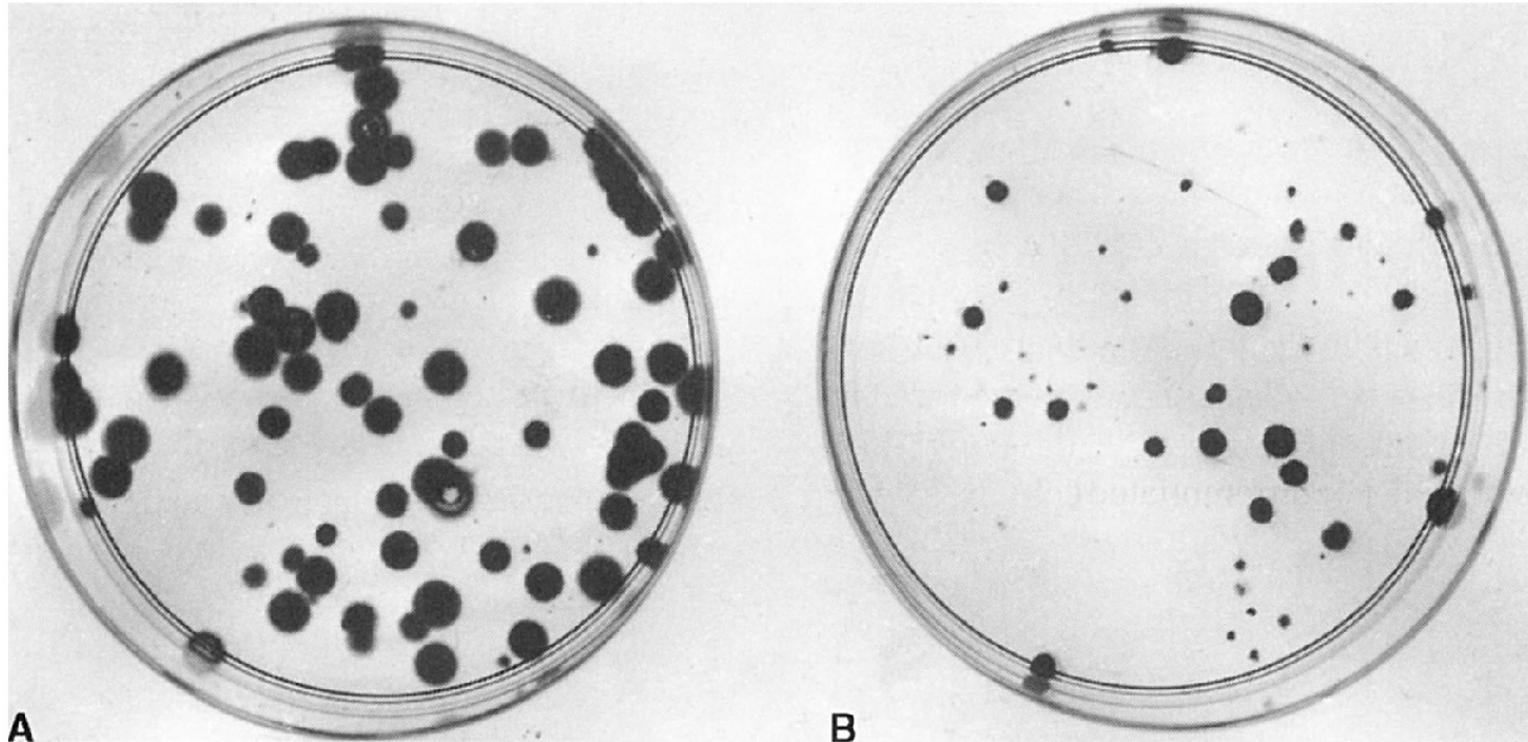


圖 3.1 ● 體外培養中國倉鼠細胞所生長的群落。A：100 個細胞被植入並使其成長七天後再染色，發現共長成 70 個群落，故其種植效率為 70/100，或 70%。B：2000 個細胞植入後接受 8 Gy（即 800 rad）的 X 光照射，最後長成 32 個群落，所以

$$\begin{aligned}
 \text{存活分率 (surviving fraction)} &= \text{觀察到的群落} / [\text{植入細胞數} \times (\text{PE}/100)] \\
 &= 32 / (2,000 \times 0.7) \\
 &= 0.023
 \end{aligned}$$

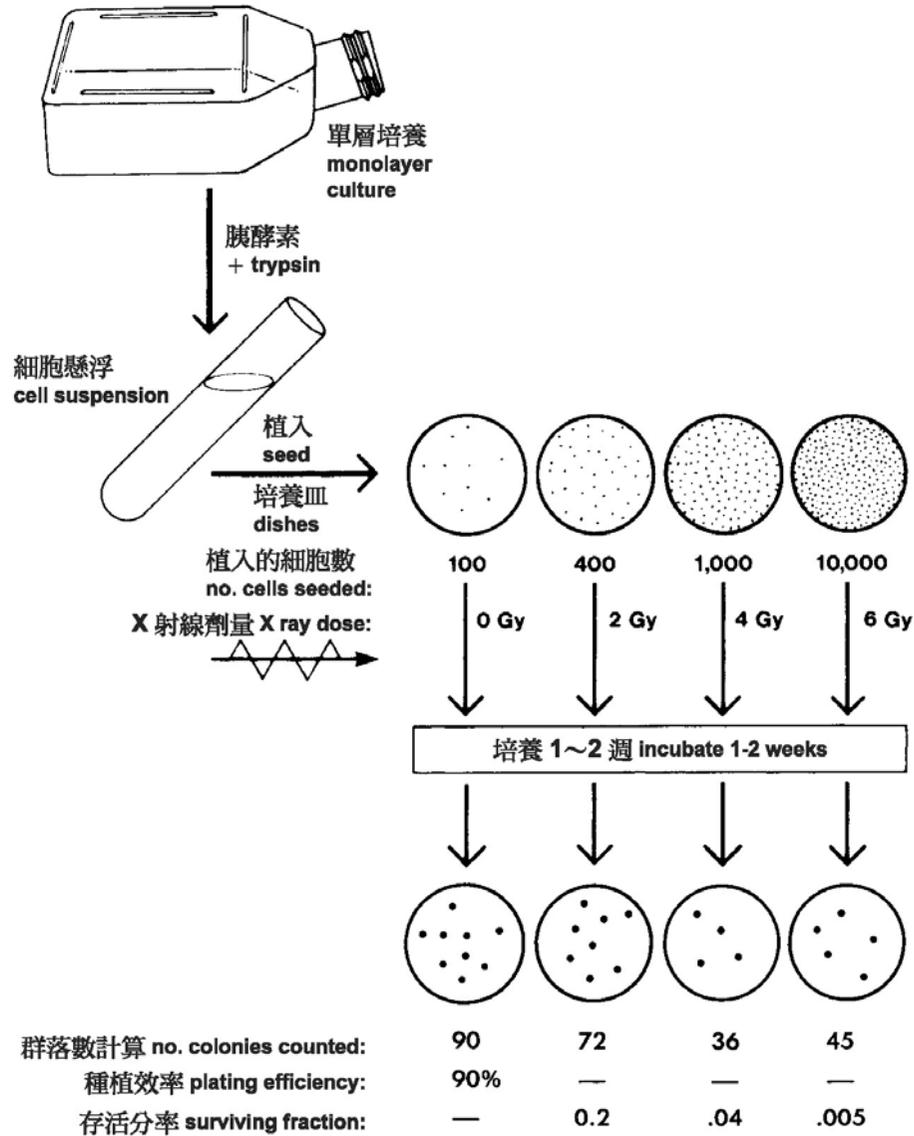


圖 3.2 ● 獲得細胞存活曲線所需的細胞培養技術。利用胰酵素酶將細胞分離成單一細胞懸浮液，並計算細胞濃度。再將已知數目的細胞植入培養皿去接受照射，並培養至巨觀的群落形成。存活分率即為長成的群落數比上植入細胞再除以 PE 校正的數目比值（如：即使沒有照射放射線，並非所有植入的細胞都可以長成群落）。

存活曲線圖形

The Shape of The Survival Curve

- 哺乳動物的存活曲線通常如圖3.3般呈現：
劑量作圖於線性刻度而存活分率作圖於對數刻度。
- 有許多理論可以解釋哺乳動物細胞的存活曲線圖，
在此簡短的描述其中兩個(圖3.3)
 - 「線性平方模式」(linear-quadratic model) (圖3.3A)
 - 「多靶理論」(multitarget model) (圖3.3B)

線性平方模式

Linear-Quadratic Model

- 此模式假設細胞被輻射線殺死是經由兩個途徑，一個和劑量成正比，另一個則和劑量的平方成正比。隨著劑量平方造成細胞不活化的概念，引出雙輻射作用的想法。
- 根據此模式細胞存活曲線可由數學公式表示，即

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

- S代表於劑量D下的存活分率，而 α 和 β 為常數。若殺死細胞的兩途徑，即和劑量成正比者及和劑量平方成正比者恰好相等，則

$$\alpha D = \beta D^2$$

或

$$D = \alpha/\beta$$

多靶理論 The Multitarget Model

- 它將存活曲線圖分為初始斜率(initial slope) D_1 ，最終斜率(final slope) D_0 ，和曲線肩部寬度 D_q 或 n 等的有用參數。初始斜率 D_1 代表了單一殺死事件，而最終斜率 D_0 代表了多次殺死事件。
- 將高劑量區的直線回推至 y 軸上所產生的 n 值，稱為外插數(**extrapolation number**)，代表了存活曲線肩部的寬度。另一個可以表示肩部寬度的參數稱為準閾值劑量(**quasithreshold dose, D_q**)，它是高劑量區的直線回推並和軸原點平行線交接點所代表的劑量，同時也接近輻射線的閾值，即在此劑量下輻射線幾乎沒有作用。但是只要有照射，放射線就不可能沒有作用。因此沒有真正的閾值劑量，實無此值，但是可以用來象徵產生作用之最低劑量值。以上這些參數間的關係如下：

$$\text{Log}_e n = D_q/D_0$$

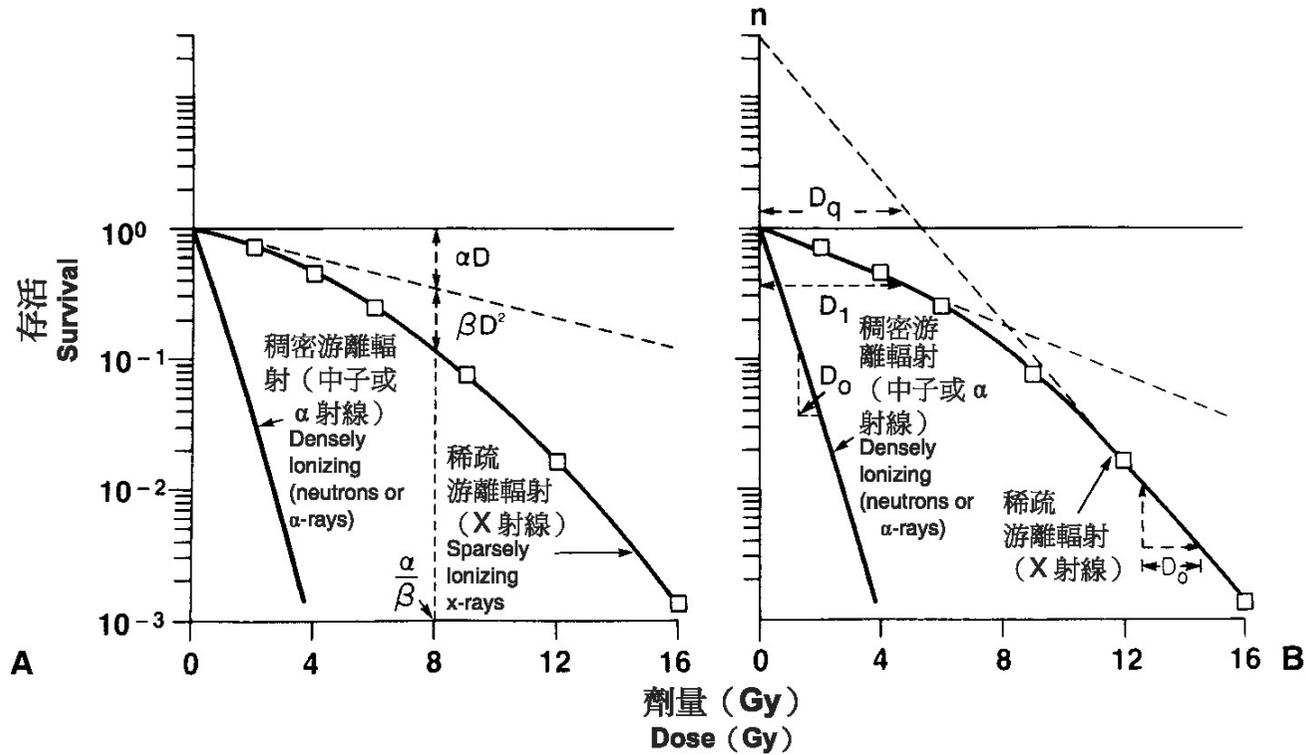


圖 3.3 ● 哺乳動物細胞經輻射線照射後所得的存活曲線。y 軸為存活分率的對數，而 x 軸為劑量。對 α 粒子或低能中子（即稠密游離輻射）而言為自原點發出一一直線，即存活為劑量的指數，存活曲線只有“斜率”一個參數。對 X 或 γ 射線（即稀疏游離輻射）而言，存活曲線包括了一開始的直線，接著彎曲為肩部，到更高劑量區又變為直線。A：線性平方模式。實驗的結果是符合線性-平方模式的，即造成細胞殺死有兩個途徑，一個是和劑量成正比（ αD ），另一個和劑量平方成正比（ βD^2 ）。當直線和二次方的比例相同的劑量，即為 α/β 。在線性-平方模式下曲線持續彎曲，但和實驗中所見初幾個世代的存活為相符合的。B：多靶理論。此曲線包含了起始斜率（ D_1 ），最終斜率（ D_0 ），和代表肩部寬度的 n 或 D_q 等參數。

細胞殺死的機制Mechanisms of Cell Killing

-去氧核糖核酸DNA為標的

- 造成的細胞致死性傷害以染色體，尤其是DNA，為最主要目標，證據顯示輻射線其原因如下：
 1. 細胞DNA會被嵌入之輻射性氙化胸腺嘧啶核苷(thymidine)所殺害。此種輻射線主要是短程的 β 粒子，所以是造成的傷害是極局部性的。
 2. 一些胸腺嘧啶核苷的相似物如鹵化嘧啶會選擇性的嵌入DNA中。若將它放入培養基質中，則會取代胸腺嘧啶核苷而嵌入DNA，造成細胞輻射敏感度增加。反之，若是加入不會嵌入DNA的去氧尿嘧啶核苷則沒有此種作用。
 3. 一些影響細胞死亡的因子，如輻射線種類，氧氣濃度，及劑量率等，也同時會影響染色體的毀損。這是最主要證明輻射線作用在染色體的證據。
 4. 早期的研究顯示病 大小和輻射敏感度有關；近期的研究顯示和核酸體積有更好的相關性。植物廣泛範圍的輻射敏感度已經被認為跟平均細胞分裂間期的染色體體積有關聯，而平均細胞分裂間期的染色體體積定義為細胞核體積和染色體數量的比值。平均染色體體積愈大，輻射敏感度愈強。

細胞殺死的機制-旁觀者效應The Bystander Effect

- 發生於非帶電粒子直接經過的鄰近區域細胞的生物效應，稱之為旁觀者效應(bystander effect)。
- 此種效應最明顯於照射區和非照射區的交界處，約有30%的細胞會死亡；當細胞是以低密度稀疏的植入培養皿以至於細胞間之間隔為數百微米時，旁觀者效應會變很小。在這種情況之下，5到10%的旁觀者細胞被殺死

細胞殺死的機制-細胞凋亡(Apoptotic)和有絲分裂死亡(Mitotic Death)

- 細胞凋亡Apoptosis是一種擁有獨特生化機制和型態變化的細胞死亡模式。當細胞要產生凋亡時，首先會發現它集中起來並和旁邊細胞分開以終止其間的傳遞，接著染色質在核膜上濃縮，核開始斷裂，細胞因細胞質內水分喪失及蛋白質交叉結合而萎縮並聚集，最後細胞裂為大小不同的細胞凋亡體(apoptotic bodies)。而整個過程型態上的特點就在於細胞核內的染色質在細胞核邊緣濃縮成半月型或聚集呈球型的碎片。

細胞殺死的機制

- 輻射線造成的細胞死亡主要為有絲分裂死亡 (mitotic death)

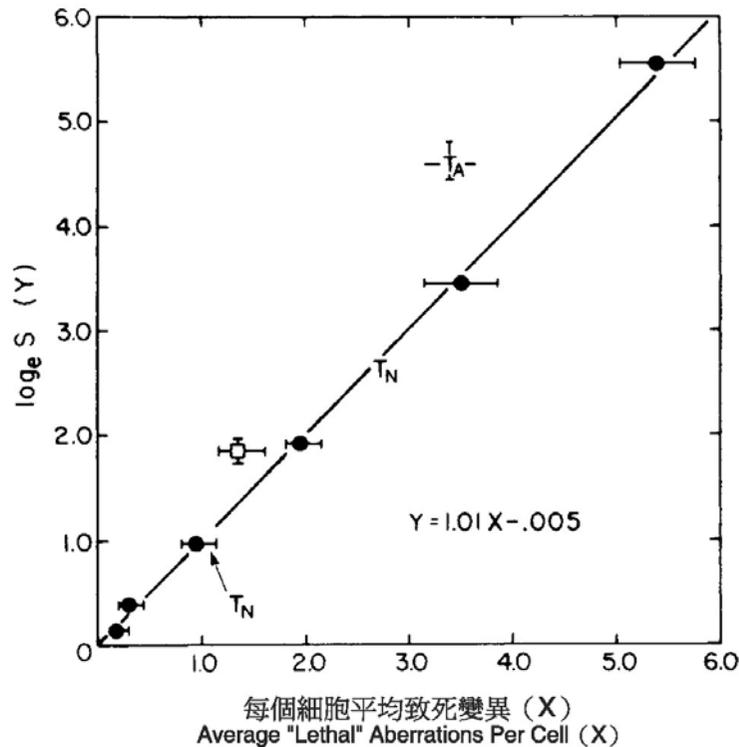


圖 3.4 ● AC 1522 正常人體纖維母細胞曝露於 X 光後其平均致死變異量（即不對稱互換型畸變如 dicentrics 和 rings）和存活分率對數的關係圖。（From Cornforth MN, Bedford JS : A quantitative comparisons of potentially lethal damage repair and the rejoining of inter-phase chromosome breaks in low passage normal human fibroblast. Radiat Res III:385-405, 1987, with permission.）

染色體變異和細胞殺死之間的關係

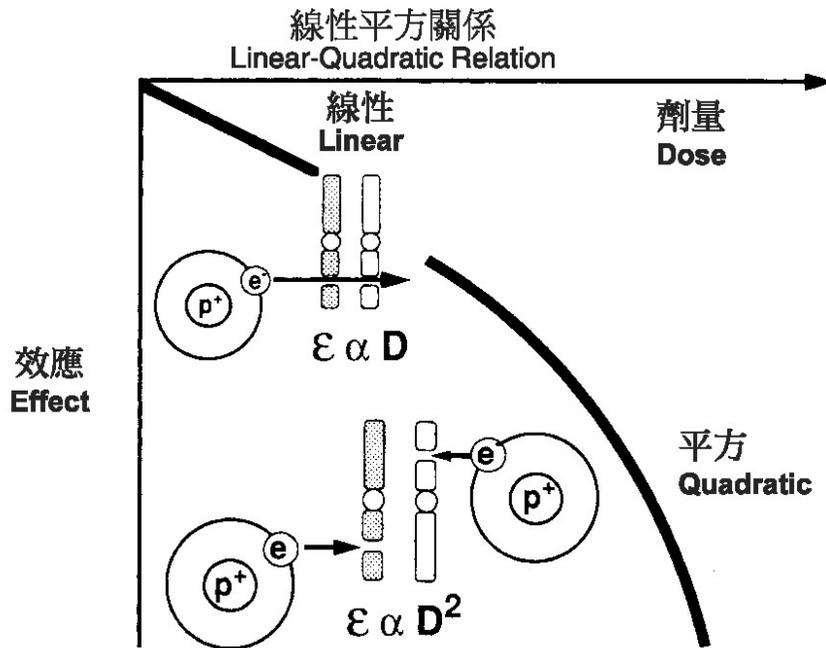


圖 3.5 ● 染色體變異和細胞存活的關係。細胞若形成互換型染色體變異就無法存活並持續分裂。在低劑量時，兩個染色體的斷裂是物質和 X 或 γ 射線作用產生的單一電子造成的。所以斷裂的機會和劑量成正比，構成了直線部分的圖形。在高劑量時，兩個染色體的斷裂源於不同的兩個電子，所以存活和劑量平方呈正比，圖形因而彎曲。

各種哺乳細胞的存活曲線

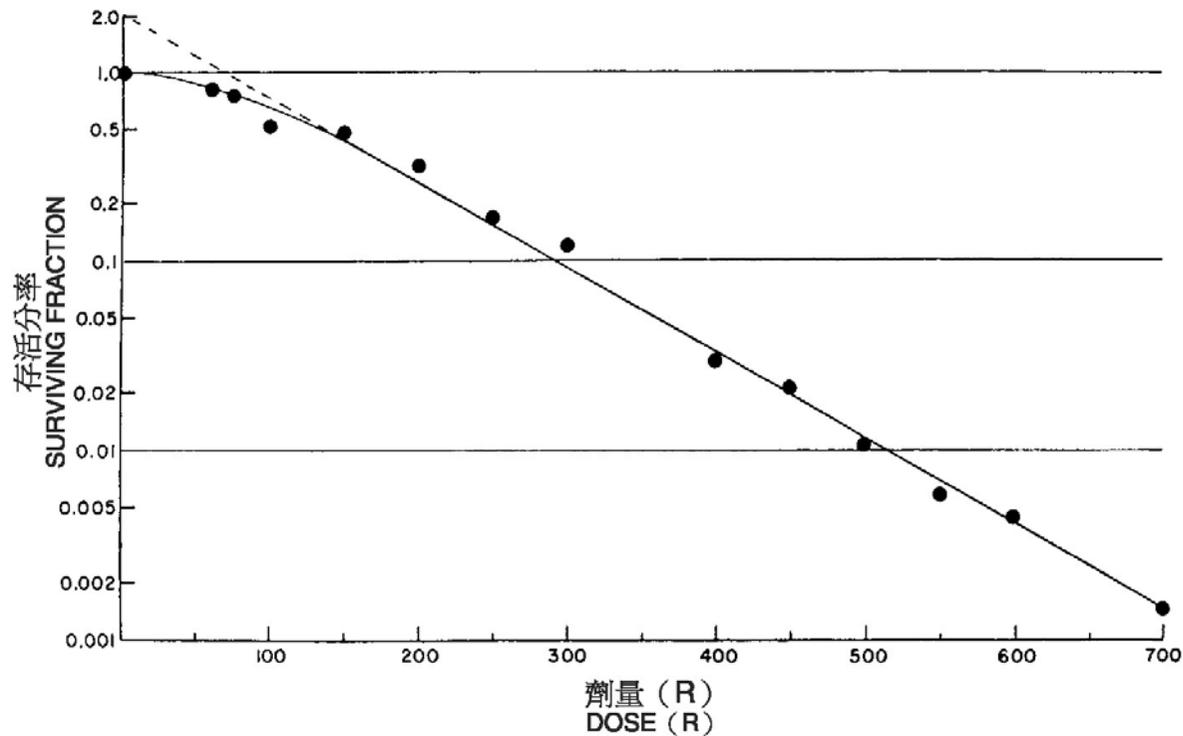


圖 3.6 ● 以 X 射線照射 HeLa 細胞所得的存活曲線圖，肩部小為其特色。(From PuckTT, Markus PI : Action of X-rays on mammalian cell. J Exp med 103:653-666, 1956, with permission.)

各種哺乳細胞的存活曲線

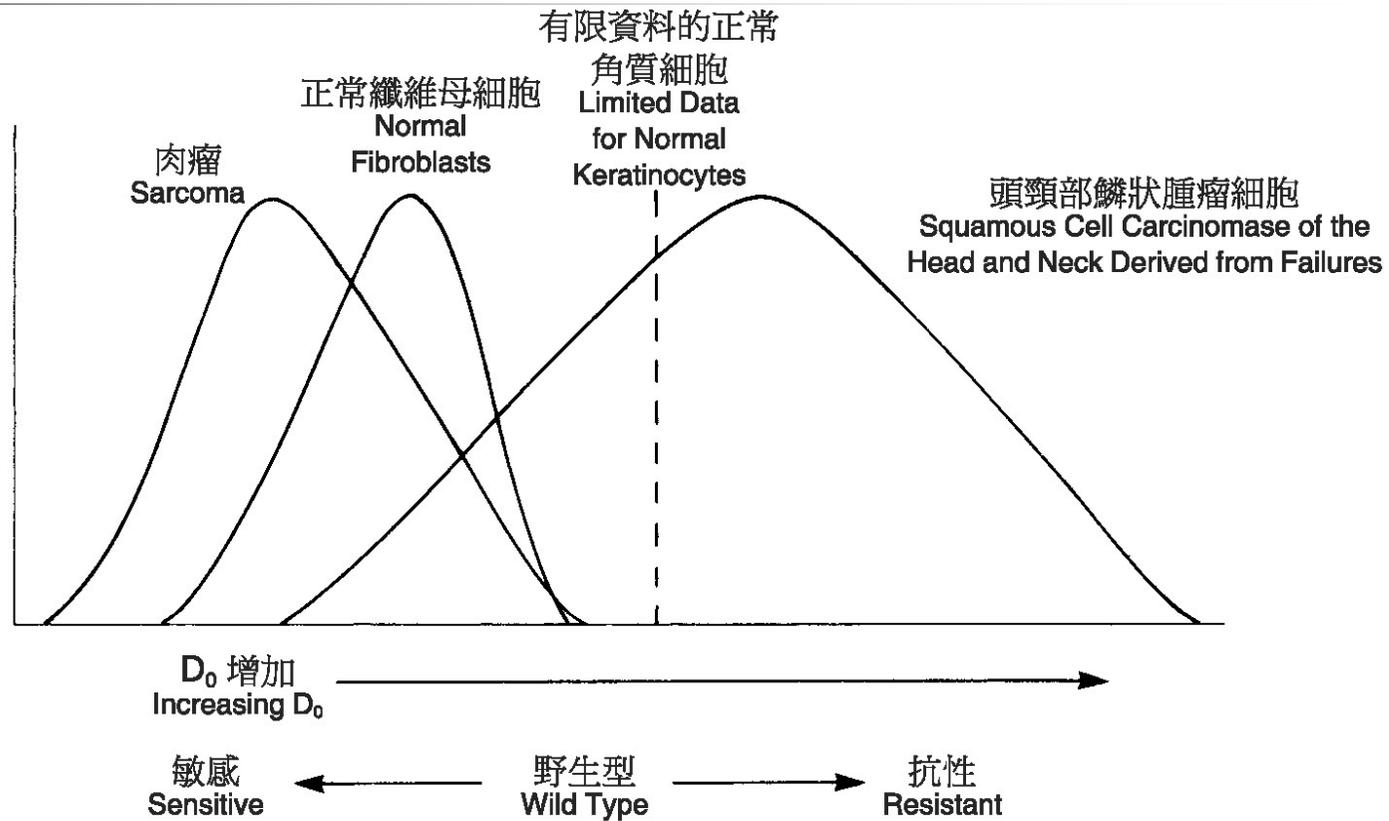


圖 3.7 • 各種體外培養之人類細胞的 D_0 值。可見人類腫瘤細胞的輻射敏感度範圍較大，且部分會和正常人類纖維母細胞重疊。總體而言，鱗狀腫瘤細胞比肉瘤細胞對輻射線不敏感，但其輻射敏感度範圍較大且部分也和肉瘤細胞重疊。（Courtesy of Dr. Ralph Wechselbaum.）

存活曲線形狀和細胞死亡機制

- 哺乳動物細胞對輻射線的敏感度差異是相當大的。

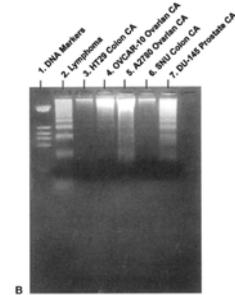
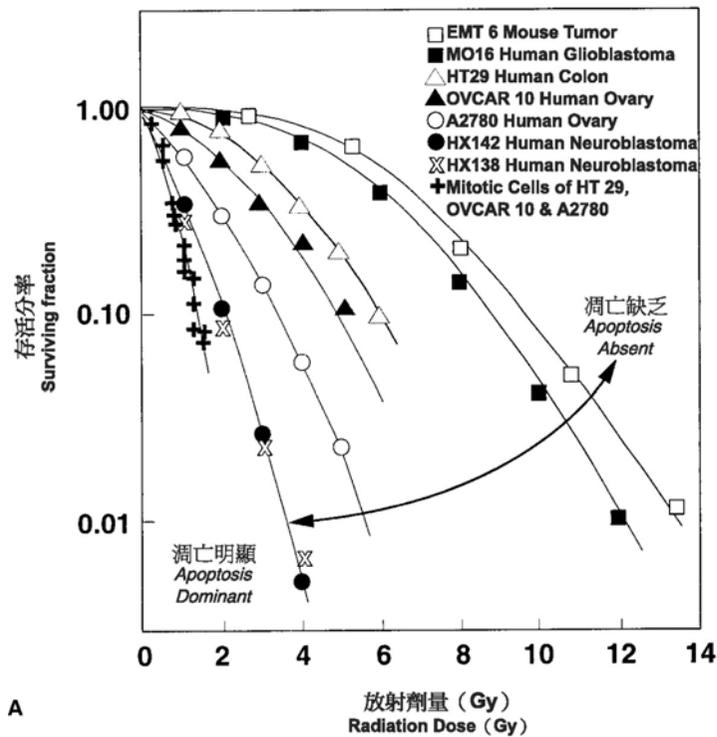
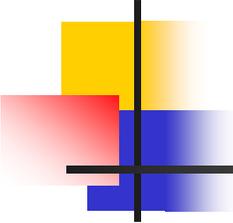


圖 3.8 ● A：人類和啮齒類動物細胞株的存活曲線比較圖。可見對輻射線最不敏感的為老鼠之 EMT6 細胞（注意其肩部大小），而兩個人類神經母細胞株對輻射線最敏感。B：各種不同細胞株經 10 Gy 照射後 18 小時再以 6 V/cm，40 分鐘電泳純化的 DNA。可見其 DNA 階梯化（laddering）-即細胞凋亡（apoptosis）的數量相異。在這種細胞死亡中，雙鏈斷裂發生在染色質單體的接合區，造成 DNA 斷裂成 185 bp 倍數長。而 DNA 階梯化越顯著者輻射敏感度越高。



致癌基因和輻射抗性

- 很多研究顯示若將致癌基因如活化的*ras*，*raf*，或*ras+myc*等轉植入體外培養的細胞中，則會增加其輻射抵抗力。但是，輻射敏感度的改變和輻射線造成的G₂期延遲長度最為相關，而細胞週期分布，雙股DNA斷裂或修復等因素則關連性不高。

輻射敏感度的遺傳(基因)控制

- 對於低等生物如酵母菌和細菌等的修復機制在分子生物學已被廣泛研究。有些例子發現，一個巨大的輻射敏感度變異可源於單一的修復或檢查基因的突變。而在哺乳動物細胞中就較為複雜，要改變其輻射敏感度通常都要有許多基因涉入。
- 如在齧齒目動物的細胞株實驗中，發現大多數輻射敏感度的改變和修復雙股斷裂能力的下降有關。這些基因包括了XRCC5 Ku80，XRCC6 Ku70，和XRCC7。前二者和依賴性激酶活性有關，它們會和雙股斷裂端相接以修復，所以若缺失了則難以完成修復。而XRCC7所製造的蛋白質則在重度聯合免疫缺乏症候的老鼠上有缺失，此種老鼠是對輻射敏感的。

輻射敏感度的遺傳(基因)控制

- 有些病人在放射線治療後呈現嚴重的正常組織反應也存在著特殊的遺傳疾病

表 3.1

對 X 射線敏感的人類遺傳疾病

微血管擴張失調症 Ataia telangiectasia(AT)

基底細胞病樣症候群 Basal cell nevoid syndrome

Cockayne's 症候群 Cockayne's syndrome

Down's 症候群 Down's syndrome

Fanconi's 貧血 Fanconi's anemia

Gardner's 症候群 Gardner's syndrome

Nijmegen 斷裂症候群 Nijmegen breakage syndrome

Usher's 症候群 Usher's syndrome

分次照射的有效存活曲線

- 臨床的放射線治療多採分次的方式，因此要來探討分次治療的有效存活曲線。
- 如果將放射線劑量平均地分散，並在兩次照射間給予充足的時間以完成次致死性傷害的修復，則其有效劑量存活曲線會是劑量的對數函數。
- 存活曲線的肩部不斷地重複，造成有效存活曲線接近一直線。其 D_0 值則定義為可減少細胞存活分率至原本的37%的劑量。
- 例如源於人類的細胞，則平均 D_0 值為3Gy，但在不同的腫瘤細胞間值的差異則可大可小。
- D_{10} 值代表了要殺死細胞的所需劑量。

$$D_{10} = 2.3 \times D_0$$

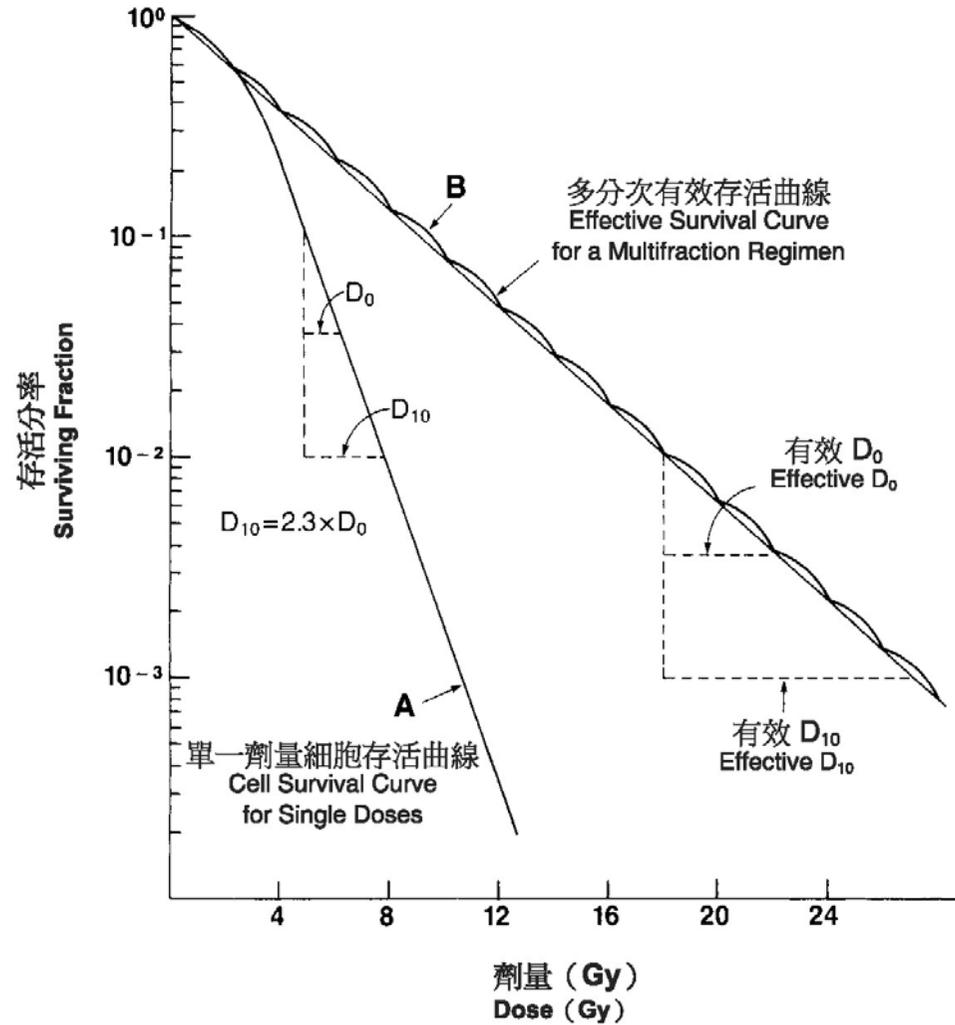


圖 3.9 ● 分次照射的有效存活曲線圖。如果將放射線劑量平均地分散，並在兩次照射間給予充足的時間以完成次致死性傷害的修復，則可見存活曲線的肩部不斷的重複。其有效劑量-存活曲線 (effective dose survival curve) 會是劑量的指數函數，即從原點發出的一直線，其斜率和單次治療劑量 (2Gy 或 200 rad) 有關。而造成 90%細胞死亡的劑量 (D_{10}) 為 $2.3 \times D_0$ 。

計算腫瘤細胞殺死量

問題1

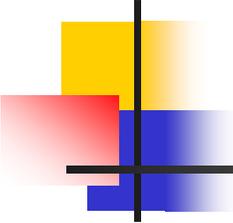
- 1個腫瘤共有 10^9 個可形成群落的細胞。若每日照射劑量為2Gy下之有效存活曲線沒有肩部， D_0 值為3Gy，請問共需要多少劑量才能達到腫瘤治癒率？

答

- 若要將 10^9 個腫瘤細胞減至90%控制率，則需將細胞減數至原來的 10^{-10} 倍。一次可殺死90%細胞的劑量(D_{10})為

$$D_{10} = 2.3 \times D_0 = 2.3 \times 3 = 6.9 \text{ Gy}$$

- 所以減數至 10^{-10} ，即10次照射的總劑量為69Gy



計算腫瘤細胞殺死量

問題2

- 若問題1中的可形成群落細胞在治療中經歷了三次的分裂，則共需要多少劑量才能達到相同的腫瘤控制率？

答

- 三次的分裂會造成細胞數目增加 $2 \times 2 \times 2 = 8$ 倍，所以需要1次 D_{10} 照射才能達到相同控制率。共需的總劑量為 $69 + 6.9 = 75.9$ Gy

計算腫瘤細胞殺死量

問題3

- 一個腫瘤共有 10^9 個細胞，其 D_0 值為2.2 Gy。若接受40 Gy的放射線治療，則還會殘留多少的腫瘤細胞？

答

- 如果 D_0 值為2.2 Gy，則 D_{10} 為

$$D_{10} = 2.3 \times D_0 = 2.3 \times 2.2 = 5\text{Gy}$$

- 給予40 Gy的放射線治療，會使此腫瘤經過 $40/5 = 8$ 次的細胞致死。所以殘餘的細胞為 $10^9 \times 10^{-8} = 10$ 個。

計算腫瘤細胞殺死量

問題4

- 若依據單靶理論，即每一個細胞被擊中的平均次數為1，去照射 10^7 個細胞，則會存活多少細胞？

答

- 造成每一個細胞平均被擊中1次的劑量稱為 D_0 ，即將細胞數減至原本的37%的劑量。所以經過照射後會殘餘

$$10^7 \times \frac{37}{100} = 3.7 \times 10^6 \text{個}$$

哺乳動物細胞和微生物的輻射敏感度比較

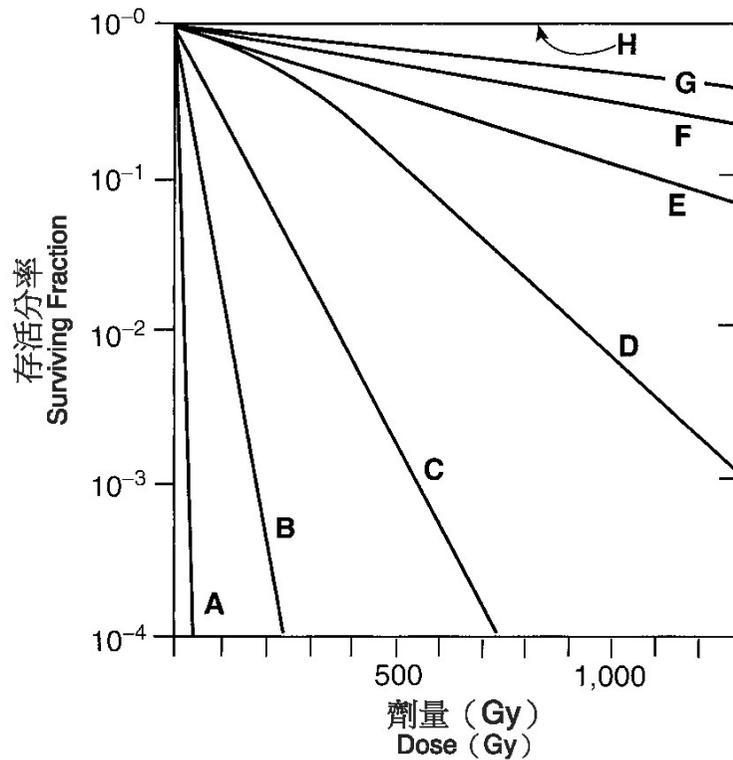


圖 3.10 ● 哺乳動物細胞和各種微生物細胞，包括大腸桿菌 (*Escherichia coli*)，酵母菌，和 *Micrococcus radiodurans* 的存活曲線圖。可見哺乳動物細胞比起其他微生物細胞對輻射線大為敏感，因為哺乳動物細胞有較多的 DNA 作為輻射線的標的，所以造成的傷害較大。A. 哺乳動物細胞；B. *E. coli*；C. *E. coli* B/r；D. yeast；E. phage staph E；F. *B. megatherium*；G. potato virus；H. *Micrococcus radiodurans*。

相關結論總結

- 自腫瘤或是再生組織分離出來的細胞可以在培養皿的實驗室體外環境中成長並形成細胞群落。
- 從正常組織取下來的新鮮植體通常可良好地在培養基中生長數週，之後會逐漸減少和死亡。少數的細胞撐過了這種危機呈現不死亡的狀態，他們就成了細胞株。
- 要稱為一個細胞，應保存著它的生殖能力，讓細胞能夠一直地、無限地繁殖後代下去；也就是說，一個細胞可以繁殖出一個肉眼可見的群落。
- 一個生存下來的細胞保有它的生殖能力的，稱之為 clonogenic(可形成細胞群落的)。
- 種植效率是描述一群細胞植入培養基且未經外來物質影響而形成巨觀群落的比率。公式如下

$$PE = \frac{\text{觀察到的細胞群落數}}{\text{植入培養皿的細胞數目}} \times 100$$

相關結論總結

- 對一些已確立的細胞株而言種植效率可能達到百分之百；而對取自人類細胞的新鮮植體而言，種植效率可能只有百分之一或是更低。
- 細胞存活分率是描述一群細胞聚落在接受某放射劑量後存活之巨觀群落占原有植入數的比率。原有植入數要對種植效率(PE)作修正。公式如下

$$SF = \frac{\text{觀察到的細胞群落數}}{\text{細胞植入數目 (PE/100)}}$$

相關結論總結

- 一個描述細胞存活分率（以保有繁殖能力為基準）及吸收劑量兩者間關係的曲線，稱之為細胞存活曲線。
- 一般來說，細胞分率（y座標）為對數座標系統，吸收劑量（x座標）為一般線性座標。此曲線的形狀是非常重要的。
- 對 α 粒子射線和低能量中子射線（稠密游離輻射）而言，細胞存活曲線在對數—線性座標上為一直線。也就是說，存活率和吸收劑量呈現一個指數關係。
- 對X射線和 γ 射線（稀疏游離輻射）而言，細胞存活曲線在對數-線性座標上為一彎曲線（或稱做具有肩部的彎曲線），其具有一初始斜率，接下來彎曲，於高劑量區成一直線。
- 有許多的理論與數學模型來解釋存活曲線。生物存活之數據不甚準確且各數學模型亦非與實驗數據有明顯不同，各模型理論之差別因此而生。

相關結論總結

- 對一單劑量放射治療而言，細胞存活可以用一個線性平方模式來說明。

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

S代表是細胞在接收放射劑量D下的存活分率，常數 α 和 β 代表著殺死細胞能力裡線性和平方兩者之影響。

- 細胞存活曲線的初始斜率是取決於 α ；而殺死細胞的平方部份則 β ，這造成成了曲線的彎曲和高劑量區的斜率。
- α 和 β 的比率代表著細胞在接受這個劑量時，其殺死細胞的線性和平方部份兩者為均等的。
- 許多強而有力的證據顯示，輻射造成的細胞傷害是源於細胞核，尤其是其中的DNA。細胞膜的傷害也可能是另一個因子。
- 細胞曝露在放射線之後，會有二種死亡。一者稱之為有絲分裂死亡，細胞死亡於將要進行有絲分裂生殖時。另一者稱之為細胞凋亡，是細胞有計劃地自我毀滅。

相關結論總結

- 在有絲分裂生殖時的死亡中，平均每個細胞染色體之致死變異數和細胞死亡有著一對一的正比相關性。而這些染色體變異為不對稱型態的，如雙中結和環狀。
- 細胞的自我毀滅，是個有規則地型態改變。最後會導致DNA碎裂，大約每個片段長為185鹼基對的倍數。這導致了在電泳膠上的DNA規律間隔排列特性。
- 在某些細胞中（例如類淋巴細胞），遭受輻射傷害後的自我毀滅較為顯著。所以其存活分率和接受劑量幾乎是呈指數關係的。也就是說，在劑量存活曲線（對數-線性座標系統）上，它幾乎是呈一直線而且是沒有肩部的。當然，它沒有劑量率效應。
- 在某些細胞中（例如培養基中的CHO及V79細胞），遭受輻射傷害後的有絲分裂生殖是較顯著的。所以其存活分率和接受劑量是呈線性-平方關係的。也就是說在劑量存活曲（對數-線性座標系統）上，它是有肩部的曲線。當然，它有著較大的劑量率效應。

相關結論總結

- 許多細胞群體的死亡均合併著有絲分裂死亡及細胞凋
亡。通常來說，細胞凋亡和輻射敏感度較為相關。如果
細胞凋亡較為顯著，其對放射線的敏感性就較高的。如果
沒有細胞凋亡，那麼此細胞是對放射線具有抗性的。
- 從人類各種腫瘤組織上取下來培養的各種細胞株，對放
射線有著不一樣的敏感度。其廣大的敏感度差異超過從
不同人身上取下的正常細胞。
- 有些證據顯示，在實驗室環境中的細胞株可能因為植入
活化的致癌基因而提升對放射線的抵抗力。但對人類腫
瘤而言，致癌基因在生物中的這種角色仍不明確。
- 已經有些會影響哺乳動物細胞的輻射敏感度基因被找到
了。
- 如果這些基因被破壞，修復後的DNA雙股螺旋損壞常是有
害的。
- 已經發現有一些人類的症候群是和輻射敏感度有關的。
其中微血管擴張失調症是最好的例子。
- 輻射傷害導致死亡的敏感度和易傾向發生癌症，二者常
有相關性。

相關結論總結

- 對每個病人腫瘤細胞的自身輻射敏感度做預測性的試驗，是需要更特殊的實驗方法。這會在第二十三章討論。
- 多次劑量模式下的有效細胞生存曲線幾乎為一直線，也就是在劑量和存活分率生呈現對數關係。這直線為連結起點和每天單次劑量效應產生的存活分率，一直延伸。
- 對終末斜率 D_0 在多次劑量曲線中而言，人類細胞的平均有效值約為 3Gy 。
- 對導致90%細胞殺死需要的劑量 D_{10} 而言，它和 D_0 的關係如下：

$$D_{10} = 2.3 \times D_0$$

- 計算臨床上常使用的多次劑量照射造成的腫瘤細胞死亡，可以利用多次劑量模式下的有效細胞生存曲線的概念。
- 和微生物比如細菌和酵母菌相較，哺乳類動物的細胞有較佳的輻射敏感度。主要可能是有較大的DNA組成內容，可能導致提升放射線傷害中的標的效應。