

硼中子俘获治疗癌症的基础性实验研究

蔡明辉^{1,2}, 赵葵^{1,2,3}, 展永², 郭继宇¹, 倪岷楠¹, 隋丽¹, 孔福全¹, 杨明建^{1,2}

(1. 中国原子能科学研究院核物理研究所, 北京 102413; 2. 河北工业大学理学院, 天津 300130;

3. 北京师范大学射线束技术与材料改性教育部重点实验室, 北京 100875)

摘要: 分别利用²⁴¹Am放射源和HI-13串列加速器产生的 α 粒子和⁷Li离子来模拟硼中子俘获治疗中的核反应产物,对DNA水溶液进行辐照,然后利用原子力显微镜(AFM)对DNA碎片进行观测,最后通过大量的统计分析获取DNA碎片长度、DNA形态的实验数据。实验结果表明:DNA碎片的平均长度随剂量的增大逐渐减小;线性和开环的DNA分子所占的比例随着剂量的增大逐渐增多;⁷Li离子比 α 粒子具有更强的相对生物学效应。

关键词: 硼中子俘获治疗; 癌症; 质粒DNA; 原子力显微镜; 辐照

中图分类号: Q691; TN16

文献标识码: A

文章编号: 1000-6931(2006)04-0391-05

Basic Experimental Study on Boron Neutron Capture Therapy

CAI Ming-hui^{1,2}, ZHAO Kui^{1,2,3}, ZHAN Yong², GUO Ji-yu¹, NI Mei-nan¹,
SUI Li¹, KONG Fu-quan¹, YANG Ming-jian^{1,2}

(1. *China Institute of Atomic Energy, P.O. Box 275-10, Beijing 102413, China*; 2. *School of Science, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China*; 3. *Key Laboratory of Beam Technology and Modification of Ministry of Education, Beijing Normal University, Beijing 100875, China*)

Abstract: α particles and ⁷Li ions are produced by radionuclide ²⁴¹Am and the HI-13 tandem accelerator respectively to simulate productions of BNCT (Boron Neutron Capture Therapy). DNA solution is irradiated by the above rays in air firstly, and then the DNA fragments are analyzed by AFM (Atomic Force Microscopy). The software ImageJ is used to measure the length of DNA fragments. Lastly, the experimental data of DNA fragments and DNA configuration are obtained. The results show that the mean length of DNA fragments increase as dose decreases; the fraction of linear and open circle DNA molecules increase as dose decreases; lithium particles cause strong relative biological effects than α particles.

Key words: boron neutron capture therapy; cancer; plasmid DNA; atomic force microscopy; irradiation

自 20 世纪 70 年代以来,我国癌症死亡率一直呈持续增长趋势。目前,癌症死亡率已居我国各类疾病之首,占全部死因的五分之一。癌症治疗是医学上的一大难题,其传统治疗方法有化疗、放疗和外科手术。尽管这些治疗方法对某些癌症取得了一些成功,但对部分恶性肿瘤(如脑胶质瘤和黑色素瘤等),上述治疗方法尚无能为力^[1]。

早在 1936 年, Gordon Locher^[2] 提出硼中子俘获治癌(Boron Neutron Capture Therapy, BNCT)的思想。BNCT 的基本原理是将亲癌含¹⁰B 药物通过口服或注射方法引入体内,并使之选择性地聚集在癌细胞中,然后用中子照射癌症部位,使之与¹⁰B 发生¹⁰B(n, α)⁷Li 核反应,利用由此产生的 α 粒子和⁷Li 离子杀死癌细胞。BNCT 具有其它治癌手段无法比拟的优越性:杀死癌细胞的同时最大限度地保护了正常细胞;穿透性强的中子能够实现深部癌症治疗;是脑胶质瘤的最有效治疗方法;与质子和重离子治癌相比,它的成本更低等^[3]。因此, BNCT 治癌的疗法自提出以来,便吸引了国内外无数科学家投入到这一研究领域^[4-8]。

DNA 是生命信息的载体,辐射生物学和放射医学公认 DNA 是电离辐射的关键靶分子, DNA 单链断裂(SSB)和双链断裂(DSB)是导致细胞死亡、突变的根本原因^[9]。本工作利用²⁴¹Am α 源和加速器产生的 α 粒子和⁷Li 离子模拟 BNCT 中通过核反应产生的出射粒子,以 DNA 为研究对象,然后利用具有纳米级分辨本领的原子力显微镜(AFM)研究 DNA 碎片长度分布、DNA 形态和 DNA 平均长度随剂量的变化关系。

1 实验设备与材料

实验设备与材料包括:中国原子能科学研究院原子高科股份有限公司生产的²⁴¹Am α 箔源,其活度为 6.67×10^6 Bq, 能量为 4.0 ~ 4.5 MeV;北京 HI-13 串列加速器和 Q3D 磁谱仪;上海爱建纳米科技发展有限公司生产的 AJ-III 型原子力显微镜;俄罗斯 MikroMasch 公司的 NSC11 的硅针,其共振频率为 315 kHz, 力常数为 48 N/m;大连生物工程有限公司生产的质粒 DNA PUC19 和 PBR322, 长度分别

为 2 686 和 4 361 bp,均含有 70% 以上的共价闭环,保存在 TE Buffer 溶液环境下。

2 实验方法

2.1 辐照方法

1) α 粒子对 DNA 样品的辐照

取 2 μ L DNA 溶液滴于厚度为 5 μ m 的 Mylar 上,再用 5 μ m 厚的 Mylar 膜覆盖在上面并用密封装置将其密封,以防止 DNA 溶液挥发,然后将 α 源贴于密封装置上对 DNA 溶液进行垂直辐照。 α 粒子到达样品表面的能量有一分布,其中心为 2.3 MeV,相应在水中的传能线密度(LET)值为 149 keV/ μ m。

2) ⁷Li 离子对 DNA 样品的辐照

利用 HI-13 串列加速器加速的 22 MeV ⁷Li 离子轰击 Au 靶,散射的⁷Li 束经 Q3D 磁谱仪散焦,再经 50 μ m 的 Kapton 真空隔离膜后,在大气环境下实现对样品的均匀辐照。与 α 粒子辐照情形类似, DNA 溶液被密封于一个密闭装置中,将其置于辐照窗口进行辐照。⁷Li 离子到达样品表面的能量为 10 MeV,在水中 LET 值平均约为 181 keV/ μ m。

2.2 DNA 的 AFM 样品制备

为对辐照后的 DNA 样品进行 AFM 观测,使用纯云母的 AFM 样品制备方法^[10],用 4 次重蒸水和 MgCl₂ 溶液将辐照过的 DNA 样品配制成 1 mmol MgCl₂ 和 1 ng/ μ L DNA 的混合溶液,然后取 5 μ L 混合溶液滴在新解理的云母表面上,沉积 5 min,再用水冲洗,室温下放置 6 h 后进行 AFM 成像。

2.3 图像获取及数据处理

AFM 以轻敲方式(Tapping mode)在空气中成像,空气环境的相对湿度为 33% ~ 39%,图像采集的扫描速度为 1.5 Hz,像素为 512 \times 512。图 1 示出典型的 DNA 的 AFM 图像。

由图 1 可见,不同剂量下 DNA 分子的形态和长度存在较大的差异。图 1a 示出未辐照 DNA 的图像, DNA 分子以超螺旋和开环的形态存在;图 1b 示出 1 000 Gy α 粒子辐照 DNA 后的 AFM 图像,可以看到, DNA 分子的形态以开环为主,也有线性 DNA 分子出现;当辐照剂量达到 1800 Gy 时, DNA 分子则大部分断

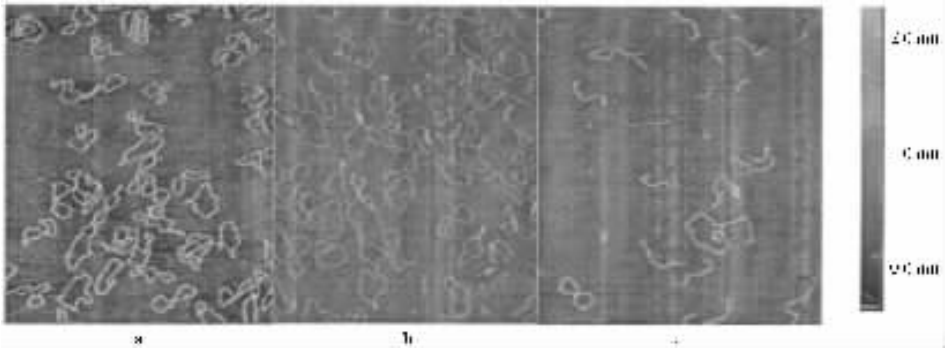


图1 不同剂量 α 粒子辐照DNA后的AFM图像

Fig. 1 AFM images of DNA after irradiating by α particles with different dose

a—0 Gy; b—1 000 Gy; c—1 800 Gy

裂(图1c),以线性形态的DNA分子为主,且出现许多短的DNA碎片。

利用美国卫生研究所(National Institute of Health)的图像处理软件ImageJ对AFM图像进行处理,并测量DNA碎片的长度,通过统计分析得到DNA碎片长度分布、DNA形态、

DNA碎片平均长度随剂量的变化关系。

3 实验结果

3.1 α 粒子辐照后DNA碎片长度分布随剂量的变化

图2示出不同剂量的 α 粒子辐照DNA碎

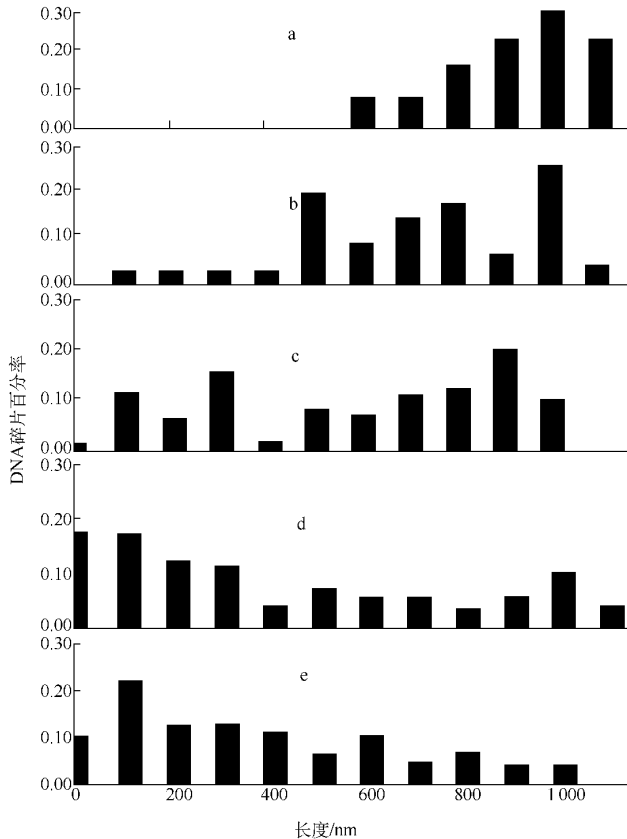


图2 不同剂量 α 粒子辐照后DNA碎片长度分布

Fig. 2 Length distribution of DNA fragments after irradiating by α particles with different dose

a—500 Gy; b—1 000 Gy; c—1 500 Gy; d—1 800 Gy; e—2 000 Gy

片长度分布。从图 2 可见,随着剂量的增大,逐渐出现几百纳米甚至几十纳米长的 DNA 碎片,且短碎片所占的比例随着剂量的增大逐步增大。当剂量达到 2 000 Gy 时,DNA 碎片长度大多分布在 100~600 nm 之间,100 nm 长的 DNA 碎片占到 23% 左右。

3.2 α 粒子辐照后 DNA 碎片平均长度随剂量的变化

对以上的 DNA 碎片长度的统计数据做进一步处理,可得到 DNA 碎片平均长度随剂量的变化(图 3)。实验点的误差包含了系统误差和统计误差。

图 3 中的实线是用二次多项式 $a + bx + cx^2$ 对实验数据进行拟合得到的结果,其中, $a = 1\ 003.369\ 46$, $b = -0.189\ 39$, $c = -0.000\ 06$, $R^2 = 0.983\ 1$ 。可以看到,二次多项式对实验数据拟合得很好,也进一步重复了 Siddiqi 等^[11] 和 Krisch 等^[12] 的实验结果。同时,说明 α 粒子与 X 射线、电子等低 LET 值的射线相比,具有更复杂的电离径迹结构和损伤作用机制。

3.3 α 粒子辐照后 DNA 形态随剂量的变化

通过对 AFM 图像的直观统计,可得到所有 DNA 分子形态随剂量的变化关系(图 4)。

图 4 中,SC 代表超螺旋 DNA,即没有发生 SSB 和 DSB 的 DNA 分子;OC 代表开环,即发生 SSB 的 DNA 分子;L 代表线性,即发生 DSB

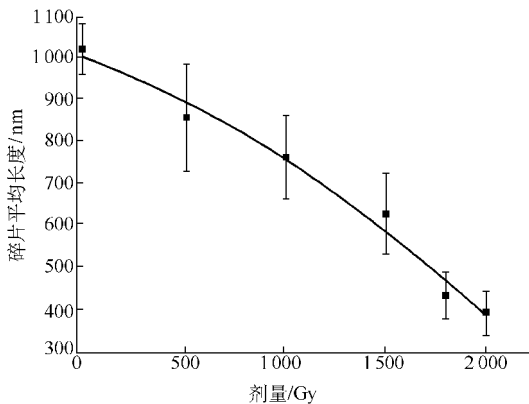


图 3 不同剂量 α 粒子辐照后 DNA 碎片平均长度分布

Fig. 3 Mean length distribution of DNA fragments after irradiating by α particles with different dose

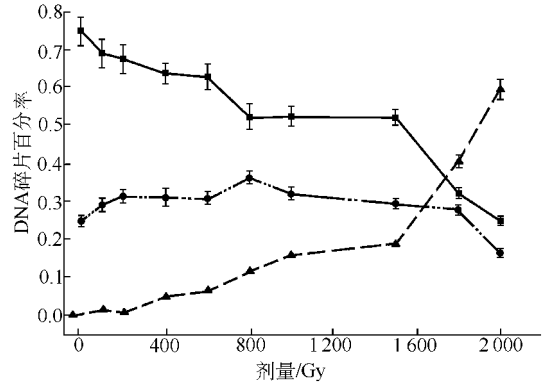


图 4 经不同剂量 α 粒子辐照后 DNA 形态随剂量的变化

Fig. 4 Configuration distribution of DNA after irradiating by α particles with different dose
 ■—SC; ●—OC; ▲—L

的 DNA 分子。从图 4 可见,线性 DNA 分子随着剂量的增大逐渐增多,超螺旋 DNA 分子随剂量增大逐步减少;由于开环 DNA 分子在向线性 DNA 分子转化的同时又有一些超螺旋 DNA 分子转变为开环形态,所以,开环 DNA 分子所占的比例呈现出上下波动的现象。DNA 链断裂情况非常复杂,文献[13-17]先后报道了利用不同的 DNA 和粒子进行 DNA 链断裂方面的研究,但它的产生与机理尚未确切了解。

3.4 ^7Li 离子辐照后 DNA 形态随剂量的变化

对 ^7Li 离子辐照 DNA 后的 AFM 图像进行了处理和统计,图 5 示出 DNA 形态随剂量的变化关系。

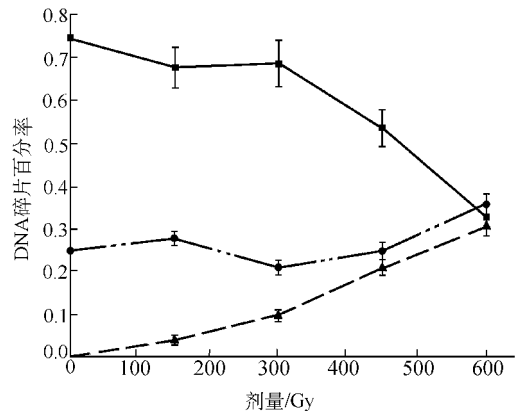


图 5 ^7Li 离子辐照 DNA 后形态随剂量的变化

Fig. 5 Configuration distribution of DNA after irradiating by ^7Li ions with different dose
 ■—SC; ●—OC; ▲—L

从图 4 和图 5 可见,600 Gy 的 ${}^7\text{Li}$ 离子与 1 500 Gy 的 α 粒子对 DNA 造成的损伤十分接近,这再一次验证了高 LET 射线具有高的相对生物学效应(RBE)的结论^[9]。

4 结论

利用 ${}^{241}\text{Am}$ 放射源和加速器产生的 α 粒子和 ${}^7\text{Li}$ 离子模拟在 BNCT 中的核反应产物 α 和 ${}^7\text{Li}$ 对 DNA 进行辐照,并利用 AFM 得到 DNA 碎片长度分布、DNA 形态和 DNA 平均长度随剂量的变化关系。本工作丰富了 BNCT 的基础实验数据,并为它以后的发展提供了一些基本依据。

参考文献:

[1] BARTH R F, SOLOWAY A H, BRUGGER R M, et al. Boron neutron capture therapy of brain tumors: Past history, current status, and future potential[J]. *Cancer Invest*, 1996, 14(6): 534-540.

[2] LOCHER G L. Biological effects and therapeutic possibilities of neutrons[J]. *Am J Roentgenol*, 1936, 36:1-13.

[3] IAEA. Current status of neutron capture therapy: IAEA-TECDOC-1223 [R]. Vienna: IAEA, 2001.

[4] KRUGER P G. Some biological effects of nuclear disintegration products on neoplastic tissues [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 1940, 26: 181-192.

[5] ZAHL P A, COOPER F S, DUNNING J R. Some in vivo effects of localized nuclear disintegration products on a transplantable mouse sarcoma[J]. *Ptoc Natl Acad Sci*, 1940, 26: 589-598.

[6] TOBIAS C A, WEUMOUTH P P, WASSERMAN L R, et al. Some biological effects due to nuclear fission [J]. *Science*, 1948, 107: 115-118.

[7] WILLIAM H. Early history of development of boron neutron capture therapy of tumors [J]. *Journal of Neuro-Oncology*, 1997, 33:19-26.

[8] SNYDER H R, REEDY A J, LENNARZ W J. Aldehyde boronic acids and boronic acid analog of tyrosine[J]. *J Am Chem Sue*, 1958, 80: 835.

[9] 夏寿萱,陈家佩,金瑾珍,等.放射生物学[M].北

京:军事医学科学出版社,1998: 16-17,65.

- [10] 蔡明辉,赵葵,展永,等. AFM 的 DNA 样品制备技术研究[J]. *电子显微学报*, 2006, (1): 76-79. CAI Minghui, ZHAO Kui, ZHAN Yong, et al. The study of the DNA sample for atomic force microscopy[J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2006, (1): 76-79(in Chinese).
- [11] SIDDIQI M A, BOTHE E. Single- and double-strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: Dependence on dose and OH radical scavenger concentration[J]. *Int J Radiat Boil*, 1987, 23:133-150.
- [12] KRISCH R E, FLICK M B, TRUMBORE C N. Radiation chemical mechanisms of single- and double-strand break formation in irradiated SV40 DNA[J]. *Radiat Res*, 1991, 126:251-259.
- [13] PANG D, BERMAN B L, CHASOVSKIKH S, et al. Investigation of neutron-induced damage in DNA by atomic force microscopy: Experimental evidence of clustered DNA lesions[J]. *Radiation Research*, 1998, 50: 612-618.
- [14] BOICHOT S, FROMM M, CUNNIFFE S, et al. Investigation of radiation damage in DNA by using atomic force microscopy[J]. *Radiation Protection Dosimetry*, 2002, 99(1-4): 143-145.
- [15] JONES G D D, MILLIGAN J R, WARD J F, et al. Yield of strand breaks as a function of scavenger concentration and LET for SV40 irradiated with ${}^4\text{He}$ ions[J]. *Radiation Research*, 1993, 136: 190-196.
- [16] 周光明,李文建,王菊芳,等. DNA 和细胞对重离子辐照诱导 DNA 双链断裂的敏感性比较[J]. *安徽农业大学学报*, 2001, 28(3): 331-333. ZHOU Guangming, LI Wenjian, WANG Jufang, et al. The compare of radiation sensitivity between DNA and cell[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2001, 28(3): 331-333(in Chinese).
- [17] 隋丽,赵葵,倪嵴楠,等. ${}^7\text{Li}$ 和 ${}^{12}\text{C}$ 离子致 DNA 链断裂的研究[J]. *高能物理与核物理*, 2004, 28(10): 1 126-1 130. SUI Li, ZHAO Kui, NI Meinan, et al. Study of strand breaks of DNA induced by ${}^7\text{Li}$ and ${}^{12}\text{C}$ ions[J]. *High Energy Physics and Nuclear Physics*, 2004, 28(10): 1 126-1 130(in Chinese).