

文章编号: 1007-4627(2007)01-0072-04

碳离子辐照对人肺癌细胞 A549 细胞周期进程的影响^{*}

王燕玲^{1,2}, 张 红¹, 李 宁¹, 郝冀芳¹, 赵卫平^{1,2}

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 选取对数生长期人肺癌细胞 A549 接受 0—6.0 Gy 碳离子照射, 用克隆形成法检测细胞的存活率; 并于照射后 12 和 24 h 收集细胞, 用流式细胞术检测细胞周期各时相的细胞百分比, 观察不同剂量碳离子辐照对 A549 细胞周期进程的影响。结果显示: 0—6.0 Gy 碳离子照射后细胞存活率显著下降; 照射后 12 h 细胞发生 G0/G1 期阻滞, 而照射后 24 h, 1.0 Gy 照射组细胞在 G0/G1 期阻滞, 2.0—6.0 Gy 照射组细胞在 G2/M 期阻滞。上述结果表明, 在 A549 细胞接受碳离子照射后的 12 和 24 h 内, 1.0 Gy 照射可持续激活细胞 G1 期检查点, 而 2.0—6.0 Gy 碳离子照射后其细胞周期进程是随时间变化的。

关键词: 碳离子辐照; 人肺癌细胞 A549; 细胞周期; 细胞周期检查点

中图分类号: Q274; Q691 **文献标识码:** A

1 引言

放射治疗是治疗恶性肿瘤的重要手段之一, 射线之所以能广泛用于肿瘤治疗, 是因为电离辐射能有效杀伤肿瘤细胞。同时, 电离辐射能通过引起各种细胞周期阻滞来抑制细胞的增生, 能使细胞滞留在 G1, S 或 G2 期不能进入有丝分裂。正是由于这种细胞周期阻滞的自我保护机制, 使肿瘤细胞可逃避射线杀伤并导致放射性抗拒, 严重影响恶性肿瘤放疗效果。为了提高治疗效果, 放疗的同时常常联合使用其它药物。目前人们正在寻找和设计靶向细胞周期检查点的抗癌药物, 其目的就是为了破坏细胞周期检查点, 促进肿瘤细胞的分化和凋亡^[1]。

重离子是一种致密的电离辐射, 与传统的 X 射线和 γ 射线相比, 具有高的传能线密度(LET)、能量沉积密集、局部剂量大和相对生物学效应高等特点^[2, 3]。因此, 重离子辐照对肿瘤细胞周期的影响有别于传统 X 射线和 γ 射线的影响。本文研究了 A549 细胞经碳离子照射后的细胞周期阻滞, 分析了不同剂量的碳离子辐照后在不同时间点 A549 细胞周期变化情况, 为碳离子辐照联合药物治疗过程中细胞周期靶向药物的选择和用药时间的选择提供

基础数据。

2 材料与方法

2.1 实验材料及照射条件

人肺癌细胞 A549 培养于含 10% 胎牛血清(兰州民海生物工程有限公司)RPMI-1640(GIBCO)培养液中。

取对数生长期的 A549 细胞接种到直径 35 mm 的培养皿中(1×10^5 cell/plate), 置 5% CO₂、37 °C 培养过夜后进行照射。重离子辐照是在兰州重离子研究装置(HIRFL)辐照终端进行的, 束流为¹²C⁶⁺离子束, 能量为 831.28 MeV, LET 为 35.5 keV/ μ m, 吸收剂量率 2 Gy/min, 细胞吸收剂量分别是 0, 1.0, 2.0, 4.0 和 6.0 Gy。用空气电离室监测剂量, 样品更换和剂量的数据获取由计算机控制。所有样品照射都在室温下进行。

2.2 克隆形成法测定细胞存活率

辐照后用胰酶将贴壁细胞消化下来, 取少量细胞悬液计数, 并将样品稀释至适当浓度。按不同剂

* 收稿日期: 2006 - 09 - 01; 修改日期: 2006 - 12 - 22

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10675151); 甘肃省科技攻关计划资助项目(2GS052-A43-008-2)

作者简介: 王燕玲(1979-), 女(汉族), 甘肃兰州人, 博士研究生, 从事辐照生物学研究; E-mail: wyl@impcas.ac.cn

量和不同重复组计算预置细胞数，按预置数(200—30 000 cell/plate) 将一定量的细胞悬液接种到直径 60 mm 的培养皿中，每个剂量点 3 皿重复。在饱和湿度、5%CO₂ 和 37 °C 下培养 9 d 后，用亚甲基兰染色，统计多于 50 个细胞的集落数。绘制存活曲线。

2.3 流式细胞术检测受照后细胞周期变化

照射后，分别在 12 和 24 h 收集细胞，离心弃上清，用 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次，弃上清，将沉淀悬起，加入 70% 的乙醇振荡混匀后在 -20 °C 固定 30 min，离心弃上清，将沉淀悬起，加入 100 μl 的 PI 染料(含 20 μg/ml PI, 0.2 mg/ml RNaseA, 0.1% (v/v) Triton-100)，振荡混匀后室温避光染色 30 min 后，用 FACSCalibur 流式细胞分析仪分析(激发波长为 488 nm)。

3 结果

3.1 细胞存活率

图 1 显示了碳离子束照射后 A549 细胞的存活分数。细胞存活分数(SF)可按以下公式计算： $SF(\%) = (S_x/S_0) \times 100\%$ ，式中 S_x 为受照细胞克隆形成率， S_0 为对照细胞克隆形成率。绘制细胞的剂量-存活曲线，并进行线性平方模型的拟合。从图中可见，照射后各剂量组细胞存活分数显著下降，A549 细胞的剂量-存活曲线符合线性平方模

型，是不带“肩”的剂量-存活曲线。

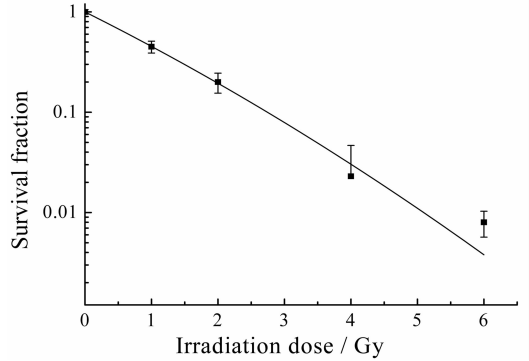


图 1 不同剂量的碳离子辐照 A549 细胞后的存活分数

3.2 细胞周期变化

图 2(a)显示了 A549 细胞经不同剂量碳离子束照射后 12 h 的细胞周期变化情况。由图可见，与未照射组比较，1.0, 2.0, 4.0 和 6.0 Gy 碳离子束照射后 A549 细胞 G₀/G₁ 期细胞百分数均显著上升 (p (统计显著性水平) <0.01)，S 期细胞百分数显著下降 ($p<0.01$)，而 G₂/M 期细胞百分数变化不大 ($p>0.05$)。说明在碳离子照射后 12 h 细胞发生 G₀/G₁ 期阻滞。另外还发现，1.0 Gy 照射组 G₀/G₁ 期细胞上升百分数显著高于 2.0 Gy 照射组 ($p<0.01$)，与 4.0 和 6.0 Gy 水平相当 ($p>0.05$)，同时其 S 期细胞下降百分数也显著高于 2.0 Gy 照射组 ($p<0.01$)。

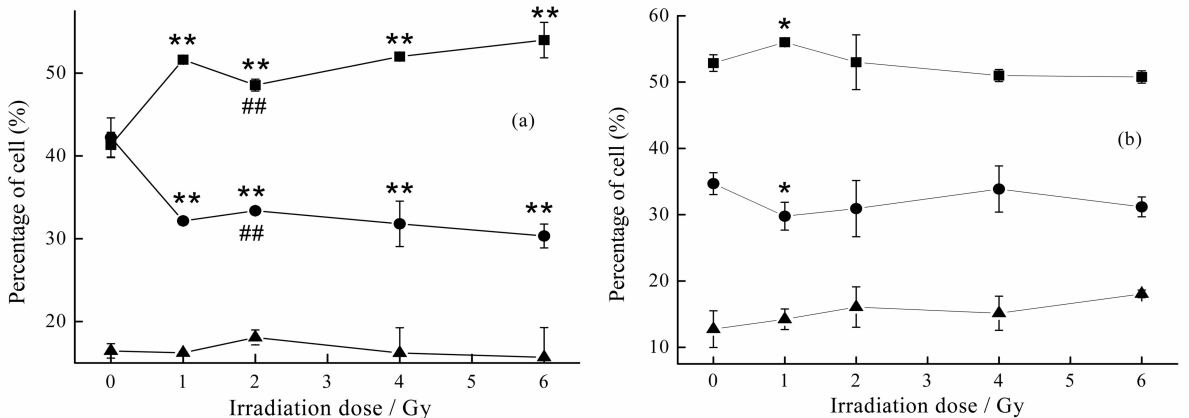


图 2 不同剂量的碳离子辐照后 12 h (a) 和 24 h (b) A549 细胞周期各时相细胞百分数的变化

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs 0 Gy, ## $p<0.01$ vs 1 Gy; ■ 为 G₀/G₁, ● 为 S, ▲ 为 G₂/M。

图 2(b)显示了 A549 细胞经不同剂量碳离子束辐照后 24 h 的细胞周期变化情况。从图中可见，与

未照射组比较，1.0 Gy 碳离子束辐照后细胞 G₀/G₁ 期细胞百分数显著升高 ($p<0.05$)，S 期细胞百

分数显著下降 ($p < 0.05$), G2/M 期细胞百分数略有升高, 表明 1.0 Gy 照射后 24 h 主要引发细胞 G0/G1 期阻滞。但 2.0, 4.0 和 6.0 Gy 碳离子束辐照后细胞 G0/G1 期细胞百分数逐渐下降, S 期细胞百分数变化不大, G2/M 期细胞百分数逐渐升高, 表明 2.0, 4.0 和 6.0 Gy 碳离子束辐照后 24 h 引发细胞在 G2/M 期阻滞。

4 讨论

目前认为, 细胞经射线照射后会通过多种途径来维持基因组的完整性, 绝大多数与细胞周期检查点相关^[4, 5]。机体细胞周期检查点能够发现放射线导致的 DNA 损伤或突变, 并将受损细胞阻滞在相应的检查点处。细胞通过 G0/G1 期、S 期和 G2/M 期 3 个检查点来控制细胞周期进程。G1 期阻滞和 S 期延迟, 一方面对损伤的 DNA 进行修复, 另一方面对不能修复的损伤细胞诱导凋亡, 以降低基因组不稳定性、减少细胞突变及癌变。有丝分裂的结果是将复制的染色体同等地分到两个细胞中, 而 G2/M 期检查点则负责给即将进入有丝分裂的细胞进行 DNA 修复留出一定的时间, G2/M 期阻滞可以保证有丝分裂分配的忠实性。本实验结果显示, A549 细胞经碳离子束辐照后 12 h, 各剂量组细胞均发生 G0/G1 期阻滞, 而在受照后 24 h, 1.0 Gy 组细胞主要在 G0/G1 期阻滞, 而 2.0, 4.0 和 6.0 Gy 细胞在 G2/M 期阻滞。以上结果表明: (1) A549 细胞经 2.0—6.0 Gy 碳离子照射后 12—24 h 内细胞周期进程发生了变化。分析原因可能是 1.0 Gy 照射引起的 DNA 损伤数量较少, 程度较轻, G1 期检查点可通过修复将损伤清除。而 2.0—6.0 Gy 照射组引起的损伤细胞数量增多, 程度加深, 在 G1 期检查点有部分损伤细胞得以修复, 还有部分损伤细胞脱离 G1 期检查点进入周期循环中, 但在细胞周期第二道防线 G2 期检查点处再次被捕获, 为 DNA 损伤修复赢得最后的时间, 以确保细胞的生存; (2) 1.0 Gy 照射可持续激活细胞 G1 期检查点。图 2 显示在照射后 12 h, 1.0 Gy 照射组 G0/G1 期细胞上升百分数显著高于 2.0 Gy 照射组 ($p < 0.01$), 与 4.0 和 6.0 Gy 水平相当 ($p > 0.05$), 同时其 S 期细胞下降百分数也显著高于 2.0 Gy 照射组 ($p < 0.01$)。在照射后 24 h, 1.0 Gy 照射组依然保持这种变化趋势, 而 2.0—6.0 Gy 组的细胞周期

进程已发生改变, 这表明 G1 期检查点对 1.0 Gy 照射剂量较敏感。

电离辐射一方面可以引起肿瘤细胞的坏死和凋亡, 另一方面又可改变细胞的周期进程^[6], 导致细胞周期出现 G1, G2 或 S 期阻滞, 因此人们正在寻找和设计靶向细胞周期检查点的抗癌药物, 其目的就是破坏细胞周期检查点, 促进肿瘤细胞的分化和凋亡。例如, 咖啡因是 ATM 激酶的抑制剂, 照射以前给予一定浓度的咖啡因可以破坏细胞 G2/M 期检查点, 使损伤的 DNA 无法完全修复, 细胞带着受损的 DNA 提前进入增殖周期, 结果启动了凋亡程序, 导致肿瘤细胞的凋亡^[7]。UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) 是一种非特异性的蛋白激酶抑制剂, 也能去除 G2 期阻滞, 导致细胞凋亡增加, 增加放疗的杀伤效果^[8, 9]。放疗联合药物治疗可以提高肿瘤临床治疗效果, 而针对细胞周期检查点和用药时间的选择是这种联合治疗的关键。处于细胞周期不同时相的肿瘤细胞对药物的敏感程度不同, 不同药物所作用的细胞周期时相亦不同, 即存在周期特异性。因此, 研究电离辐射作用后肿瘤细胞的细胞周期变化, 不但具有重要的生物学意义, 而且对放疗后实施化疗过程中有目的的选择化疗药物具有重要的实际意义。本文论述了人肺癌细胞 A549 经碳离子照射后的细胞周期阻滞, 并分析了不同剂量碳离子辐射后在不同时间点 A549 细胞周期变化情况, 为碳离子辐射联合药物治疗过程中细胞周期靶向药物的选择和用药时间的选择提供了基础数据。

参考文献 (References):

- [1] Yao Li. Foreign Medical Sciences (Section of Radiation Medicine and Nuclear Medicine), 2002, **28**: 33 (in Chinese). (姚莉. 国外医学(放射医学核医学分册), 2002, **28**: 33.)
- [2] Li Wenjian. Nuclear Physics Review, 2005, **22**(1): 39 (in Chinese). (李文建. 原子核物理评论, 2005, **22**(1): 39.)
- [3] Dang Bingrong, Wei Zengquan, Li Wenjian, *et al.* Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection, 2001, **21**: 255 (in Chinese). (党秉荣, 卫增泉, 李文建等. 中华放射医学与防护杂志, 2001, **21**: 255.)
- [4] Hartwell L H, Kastan K B. Science, 1994, **266**: 1 821.

- [5] Dai Jinming, Lin Ruxian, Wang Shengqi. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 2005, **23**: 262 (in Chinese).
(代金明, 林汝仙, 王升启. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2005, **23**: 262.)
- [6] Teyssier F, Bay J O, Dionet C, *et al.* *Bull Cancer*, 1999, **86**: 345.
- [7] Sarkaria J N, Busby E C, Tibbetts R S, *et al.* *Cancer Res*, 1999, **59**: 4 375.
- [8] Tenzer A, Pruschy M. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2003, **3**: 35.
- [9] Swanton C. *The Lancet Oncology*, 2004, **5**: 27.

Effects of Cell-cycle Progression of A549 Cells Induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ Ion Irradiation^{*}

WANG Yan-ling^{1,2, 1)}, ZHANG Hong¹, LI Ning¹, HAO Ji-fang¹, ZHAO Wei-ping^{1, 2}

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China*;

2 *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: To investigate the effects of cell-cycle progression of A549 cell induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion irradiation at different doses, the survival fractions of the A549 cells were determined by colony-forming assay; cell cycles were analyzed by FACS at 12 h or 24 h after irradiation. The results showed that the percentage of survival in the A549 cells decreased with irradiation doses. Compared with control group, the percentage of the cells in G0/G1 phase significantly increased at 12 h after irradiation with different doses of $^{12}\text{C}^{6+}$ ions. However, at 24 h after irradiation the percentage of the cells in G0/G1 phase significantly increased with 1.0 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ ions, while the cells showed increasing percentage in G2/M phase with 2.0, 4.0 or 6.0 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ ions. The results suggested that G1 cell cycle checkpoint was activated in 12—24 h after irradiation with 1.0 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ ions, but after irradiation with 2.0—6.0 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ ions, the cell-cycle progression of the A549 cells changed with time.

Key words: $^{12}\text{C}^{6+}$ ion irradiation; A549 cell; cell cycle; cell cycle checkpoint

* **Received date:** 1 Sep. 2006; **Revised date:** 22 Dec. 2006

* **Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (10675151); Gansu Science and Technology Foundation (2GS052-A43-008-2)

1) E-mail: wyl@impcas.ac.cn