

文章编号: 1007-4627(2017)02-0231-05

## 碳离子辐照对神经胶质瘤干细胞杀伤的研究

孙放<sup>1,2</sup>, 张栩锐<sup>1,2</sup>, 赵旭东<sup>3</sup>, 周光明<sup>1</sup>, 王菊芳<sup>1,†</sup>

(1. 中国科学院近代物理研究所空间辐射生物学实验室, 兰州 730000;

2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理重点实验室, 昆明 650223)

**摘要:** 虽然重离子束治癌已经被证明有着射程精确、入口坪区剂量小、相对生物学效应高等显著优点, 但重离子辐照对肿瘤干细胞所产生的辐射生物学效应特性依旧不明确。本研究使用人源神经胶质瘤干细胞来研究在面对肿瘤干细胞时, 重离子相对于传统 X 射线是否有明显的生物学优势。实验结果证明, 在神经胶质瘤干细胞中, 2 Gy 碳离子造成的 DNA 损伤的修复率比 X 射线造成的损伤修复率要低; MTT 实验则证明经过碳离子辐照的肿瘤干细胞活力要比 X 射线辐照的肿瘤干细胞低得多。综上所述, 面对神经胶质瘤干细胞, 碳离子能更有效地靶向肿瘤干细胞从而相对于传统 X 射线有明显的生物学优势。这些发现对于更好地理解重离子束治癌相关的生物学效应有重要的作用。

**关键词:** 重离子; 辐照; 肿瘤干细胞; 神经胶质瘤

**中图分类号:** Q691      **文献标志码:** A      **DOI:** 10.11804/ NuclPhysRev.34.02.231

### 1 引言

带电重离子束(HI)所拥有的倒转剂量深度分布特性和布拉格峰(Bragg peak)后剂量的急剧下降, 可以使重离子更加精确地投射到肿瘤区域<sup>[1]</sup>。也正因为如此, 肿瘤周围的健康组织接收到的剂量也远低于常规光子放疗, 比如 X 射线。使用重离子放疗, 除了有剂量上的优势, 还有生物学上的优势。已经证实高传能线密度(LET)的碳离子辐射相比于常规的低LET的光子, 拥有更高的相对生物学效应(RBE), 因而在诱导肿瘤细胞DNA损伤、细胞周期阻滞和细胞凋亡上更加有效<sup>[2-4]</sup>。因此碳离子即使在有辐射抗性的肿瘤上仍然具有高致死性(相对于 X 射线来说)<sup>[5-7]</sup>。目前, 碳离子放疗已被批准用于几种特定类型的癌症, 比如黑色素瘤、脊索瘤和神经胶质瘤等<sup>[8]</sup>。

神经胶质瘤是颅内中枢神经系统最常见的原发性肿瘤, 发生于神经外胚层, 约占所有原发颅内肿瘤的 28%, 占恶性肿瘤的 80%<sup>[9, 10]</sup>。神经胶质瘤具有侵袭性生长、复发率高、肿瘤所在位置特殊、手术难以完全切除等特点。目前, 手术、常规放疗、化疗等疗法的疗效总体来说仍不能令人满意。前期手术尽可能切除

肿瘤, 术后常辅以常规放疗和或化疗, 但复发率仍然极高<sup>[11-14]</sup>。

近年来神经胶质瘤干细胞(glioma stem cell)的发现、成功分离并证实其存在是对神经胶质瘤研究的重大突破, 对神经胶质瘤的形成、生长、浸润、转移、复发和治疗敏感性起了决定性作用<sup>[15]</sup>。神经胶质瘤干细胞是肿瘤干细胞(cancer stem cell)的一种, 肿瘤干细胞是存在于实体瘤中少数干细胞样的细胞, 具有无限增殖、自我更新、多向分化的潜能和极高的成瘤性<sup>[16]</sup>。肿瘤干细胞通过维持自我更新、增殖和分化间的平衡来维持肿瘤生长, 表现则为神经胶质瘤的生长、转移速度和侵袭能力。肿瘤干细胞虽然只占神经胶质瘤细胞的极少数, 但它却是神经胶质瘤形成和复发的最根本原因<sup>[17]</sup>。肿瘤干细胞假说认为肿瘤干细胞具有较强的治疗抗性, 可以形成原发肿瘤, 并且在大部分肿瘤被切除后, 仍然可以再次形成肿瘤<sup>[18]</sup>。在肿瘤学研究中, 肿瘤干细胞因为有成为辐射治癌靶向因子的潜力, 所以此方向的研究越来越受到大家的关注<sup>[19]</sup>。

在本文中, 我们使用人源神经胶质瘤干细胞来研究在面对神经胶质瘤肿瘤干细胞时, 重离子相对于传统 X 射线是否有明显的生物学优势。该研究结果也许能为重

收稿日期: 2016-03-21; 修改日期: 2016-05-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31270895, U1232125, 31400723, 11335011)

作者简介: 孙放(1988-), 男, 河南洛阳人, 博士研究生, 从事辐射生物学研究; E-mail: fsun@impcas.ac.cn

† 通信作者: 王菊芳, E-mail: jufangwang@impcas.ac.cn.

离子束治疗神经胶质瘤在未来的应用提供一个有力的支持。

## 2 材料与方法

### 2.1 细胞培养

62#神经胶质瘤干细胞由中国科学院昆明动物研究所的赵旭东研究员赠与。此细胞系由病人脑中的神经胶质瘤组织原代培养而来。

62#神经胶质瘤干细胞使用无血清的DMEM/F12培养基(Gibco, Life Technologies, NY, USA)配合B-27血清类似物(Gibco, Life Technologies, NY, USA)在5%CO<sub>2</sub>的37℃培养箱中培养。另外添加20 ng/mL的上表皮生长因子(EGF, Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA)和20 ng/mL的间形成纤维细胞生长因子(bFGF, Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA)。

消化62#神经胶质瘤干细胞时使用TrpyLE Express重组酶(Gibco, Life Technologies, NY, USA),而不是传统胰酶。在种细胞前,为了使此细胞更好地贴壁,所有的培养皿、培养瓶或培养板要先用Laminin蛋白(Sigma, St.Louis, MO, USA)处理2 h。

### 2.2 X射线辐照

辐照62#神经胶质瘤干细胞时使用的传统X射线由Faxitron公司的RX-650(Faxitron Bioptics, Lincolnshire, IL, USA)X射线机产生。辐照时管电压为60 kVp,管电流为5 mA,室温。剂量计测定的X射线剂量为0.46 Gy/min。62#神经胶质瘤干细胞用X射线分别辐照,1, 2, 3, 4 Gy。

### 2.3 重离子辐照

62#神经胶质瘤干细胞用碳离子分别辐照,1, 2, 3, 4 Gy。碳离子由兰州重离子研究装置(HIRFL)产生。碳离子的初始能量为165 MeV/u,经过计算,射线坪区的LET是17.96 keV/μm,峰区的LET是80 keV/μm。照射细胞时使用碳离子射线坪区进行照射。

### 2.4 53BP1和XRCC1 foci实验

经过辐照的细胞,先使用4%的多聚甲醛固定10 min,然后在-20℃用甲醇浸泡透明5 min,随后用5%的脱脂牛奶封闭1 h,然后使用兔源抗53BP1抗体(Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)或者鼠源抗XRCC1抗体(Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)杂交2 h。结合上的抗体,使用Alexa Fluor 594抗兔抗体(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)或者Alexa Fluor 488

抗鼠抗体(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)进行显色,细胞核使用DAPI(PharMingen, San Jose, CA, USA)进行复染。贴片使用蔡司LSM700共聚焦激光扫描显微镜(Zeiss, Jena, Germany)进行观察和拍照。每个样品最少统计100个细胞,并计算每个细胞的平均foci数量。

### 2.5 MTT实验

收集未经过辐照的对数期细胞,对细胞进行计数并调整细胞悬液浓度,在96孔板每孔加入200 μL细胞悬液,铺板细胞密度为2000个/孔,(边缘孔加200 μL无菌PBS进行保湿)。之后将培养板置于培养箱中直到细胞单层铺满70%孔底,随后对培养板依照剂量梯度进行,1, 2, 3, 4 Gy的碳离子和X射线照射,每组设10个复孔。照射过的培养板继续在培养箱内培养,并在显微镜下观察细胞生长情况。在第24~48 h,对照组细胞将要长满的时候,每孔加入5 mg/mL的MTT溶液,继续培养4 h后终止培养,吸去培养液,每孔加入150 μL的DMSO(同时设立只有DMSO的Blank组),摇床震荡10 min以使结晶物充分溶解。之后使用Infinite m200 pro酶标仪(TECAN, Mannedorf, Switzerland)检测OD490和OD630的值。所有组别使用OD490的值减去OD630的值,并减去用Blank组值校准,最后用Ctrl组结果进行归一。

### 2.6 统计

所有实验均最少独立重复3次。所有数据均用平均值±标准误差来表示。数据相关性分析使用*t*检验来表示,*P*值小于0.05被视为在统计学上有显著差异。

## 3 结果

### 3.1 碳离子产生的DNA损伤的修复率低于X射线产生的DNA损伤的修复率

我们用X射线和碳离子对细胞进行辐照并在不同时间点取样,做了免疫荧光实验,来观察不同辐射对肿瘤干细胞DNA单链损伤和双链损伤的不同效应。从结果可以看出(图1(a)),两种辐射对肿瘤干细胞双链断裂的初始产额上,X射线要远多于碳离子,但随着时间推移,X射线产生双链断裂的修复和碳离子产生的双链断裂的缓慢增加,这种差距越来越小,到6 h碳离子产生的foci数就超过了X射线的foci数。由此我们计算了双链断裂的修复率(图1(b)),碳离子造成的双链断裂的修复率要显著低于X射线造成的双链断裂的修复率。在单链断裂上,辐射对细胞造成的绝对foci产额上(图1(c))依旧是X射线明显超过碳离子,但随时间推移,单链断

裂修复, 这种差距越来越小, 直到 24 h 二者几乎一样。经过计算(图 1(d)), 单链断裂的修复率上, 24 h 的时候

碳离子造成的损伤的修复率要显著低于 X 射线造成的损伤的修复率。

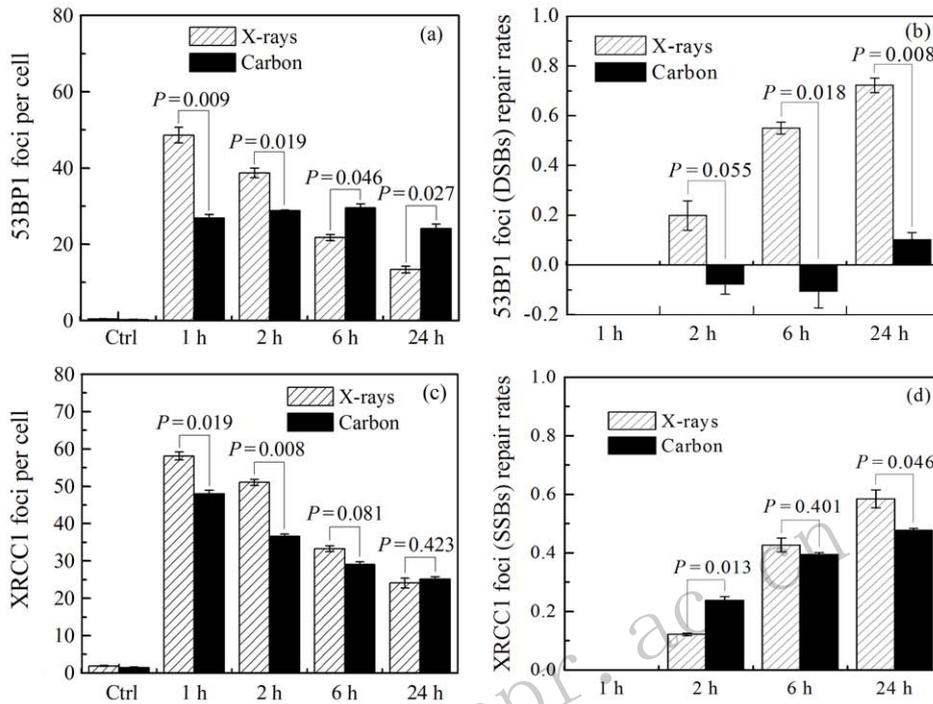


图 1 碳离子产生的DNA损伤的修复率低于X射线产生的DNA损伤的修复率

(a) 为62#神经胶质瘤干细胞被2 Gy 碳离子和X射线照射后在不同时间点的53BP1蛋白结合情况, 用来间接表征DNA双链断裂情况; (b) 为经过计算的DNA双链断裂修复率; (c) 为62#神经胶质瘤干细胞被2 Gy 碳离子和X射线照射后在不同时间点的XRCC1蛋白结合情况, 用来间接表征DNA单链断裂情况; (d) 为经过计算的DNA单链断裂修复率。

### 3.2 重离子相比于X射线更能明显降低肿瘤干细胞活力

在MTT实验中, 我们分别检测了被碳离子和X射线0~4 Gy照射过的神经胶质瘤干细胞的活力, 并绘制成曲线(图2)。从结果来看, 可以发现, 在图中任何剂

量下, 碳离子照射过的神经胶质瘤干细胞的活力都显著比X射线照射过的神经胶质瘤干细胞低。

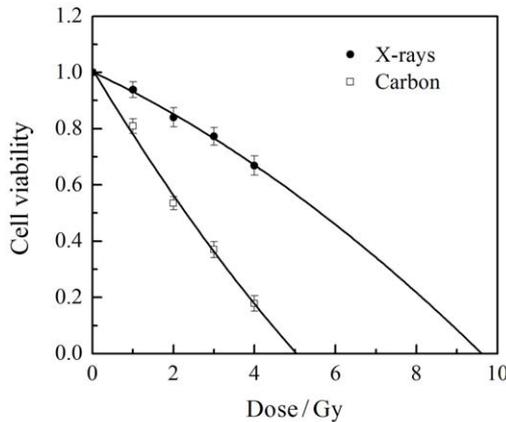


图 2 62#神经胶质瘤干细胞被0~4 Gy的碳离子和X射线照射后的细胞活力情况

## 4 讨论

在本实验中, 对神经胶质瘤干细胞模型分别使用重离子(碳离子)和X射线对两种模型进行了辐照, 发现碳离子对肿瘤干细胞的杀伤明显优于X射线。

实验中体外实验直接使用了神经胶质瘤干细胞作为细胞模型, 相比于使用普通肿瘤细胞并用干细胞表面标志物筛选出来的具有干性的细胞(stem-like cell)<sup>[5, 20-22]</sup>, 更加直接且更具有说服力。

电离辐射可以导致肿瘤干细胞DNA的双链断裂(53BP1 foci 表征)和单链断裂(XRCC1 foci 表征)。相同剂量下, X射线造成的foci初始产值明显高于碳离子造成的foci初始产值, 这是因为X射线机所产生的X射线中的每个光子的平均能量要比一个初始能量为165 MeV/u的带电碳离子低得多, 所以在粒子的绝对通量上, 相同剂量下的X射线就要高得多<sup>[23, 24]</sup>。同时, 在DNA损伤领域的许多研究也证明了单一粒子所

造成的 focus(DNA 损伤位点)可能包含超过一个 DNA 断裂,甚至包含多种 DNA 损伤类型,比如双链断裂、单链断裂和剪辑端粒,与此同时,高 LET 射线也更容易造成 DNA 团簇损伤<sup>[25]</sup>。DNA 损伤的复杂性才是对肿瘤干细胞杀伤的关键,而不仅仅是初始损伤产额。虽然 DNA 损伤的初始产额是 X 射线大于碳离子,但损伤的修复速度上碳离子明显慢于 X 射线,这和之前的一些研究是吻合的<sup>[26]</sup>。DNA 损伤的高残留才是高 LET 射线所拥有相对高的生物学效应的关键。同时在 MTT 实验中也可以看出,碳离子对肿瘤干细胞的活力影响是明显大于 X 射线的,这也和之前的一些研究相吻合<sup>[23, 27]</sup>。

在辐射生物学中,对于不同 LET 的电离辐射对细胞的杀伤效应已经早有研究。对普通肿瘤细胞而言,目前普遍认为电离辐射对其的失活效应先随着 LET 值的增大而增大,在 100 keV/ $\mu\text{m}$  左右达到最大值,如果 LET 值继续增大,电离辐射对细胞的失活效应反而会降低<sup>[28]</sup>。根据辐射生物学中靶学说的观点,电离辐射要杀死细胞必须传递给靶位足够的能量,低 LET 电离辐射的离子径迹上的电离时间被分散,在靶位的发生电离事件的概率小,而高 LET 电离辐射径迹上的电离密度大,靶位电离事件多,对细胞的杀伤也就更强<sup>[29]</sup>。在 LET 高达一个阈值时,多余的靶位电离事件并不能为杀死细胞做出更多的贡献,也就是产生了超杀效应(overkill effect),如果 LET 再继续增大,离子径迹间的空间变小反而不利于电离事件产生,对细胞的杀伤效应反而会下降<sup>[30]</sup>。干细胞的辐射抗性是要高于普通细胞和肿瘤细胞的,根据辐射生物学原理,推测其产生超杀效应的 LET 阈值也应比普通细胞和肿瘤细胞略大,但这一推测还有待具体实验结果的证明。在本实验中使用的碳离子射线坪区的 LET 为 17.96 keV/ $\mu\text{m}$ , X 射线的 LET 往往被认为是在 0.2 ~ 3.5 keV/ $\mu\text{m}$ ,从细胞实验结果也可以看出碳离子对肿瘤干细胞的杀伤明显优于 X 射线,符合辐射生物学规律。

综上所述,根据 62# 神经胶质瘤干细胞模型的实验结果,可以总结为碳离子相比 X 射线能更高效地杀灭神经胶质瘤干细胞。碳离子作为一种新兴的辐射治疗手段,为我们提供了一种相比传统 X 射线更加有效的治癌方式。根据研究结果,我们认为虽然碳离子束治癌花费相对传统 X 射线更高,但因其更好的疗效,值得普及。

#### 参考文献:

- [1] KARGER C P, JAKEL O. *Strahlenther Onkol*, 2007, **183**(6): 295.
- [2] IWADATE Y, MIZOE J, OSAKA Y, *et al.* *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, **50**(3): 803.
- [3] WADA S, KOBAYASHI Y, FUNAYAMA T, *et al.* *J Radiat Res*, 2002, **43**(Suppl)S153.
- [4] KRAMER M, WEYRATHER W K, SCHOLZ M. *Technol Cancer Res Treat*, 2003, **2**(5): 427.
- [5] CUI X, OONISHI K, TSUJII H, *et al.* *Cancer Res*, 2011, **71**(10): 3676.
- [6] OONISHI K, CUI X, HIRAKAWA H, *et al.* *Radiother Oncol*, 2012, **105**(2): 258.
- [7] SUETENS A, MOREELS M, QUINTENS R, *et al.* *Int J Oncol*, 2014, **44**(4): 1056.
- [8] ORECCHIA R, FOSSATI P, ROSSI S. *Tumori*, 2009, **95**(2): 169.
- [9] OMURO A, DEANGELIS L M. *JAMA*, 2013, **310**(17): 1842.
- [10] OSTROM Q T, GITTLEMAN H, FARAH P, *et al.* *Neuro Oncol*, 2013, **15**(Suppl2): 1.
- [11] MARTIN-VILLALBA A, OKUDUCU A F, VON DEIMLING A. *Brain Pathol*, 2008, **18**(3): 455.
- [12] KIM Y H, NOBUSAWA S, MITTELBRONN M, *et al.* *Am J Pathol*, 2010, **177**(6): 2708.
- [13] PAUGH B S, QU C, JONES C, *et al.* *J Clin Oncol*, 2010, **28**(18): 3061.
- [14] WEN P Y, MACDONALD D R, REARDON D A, *et al.* *J Clin Oncol*, 2010, **28**(11): 1963.
- [15] BINELLO E, GERMANO I M. *Cancer Sci*, 2011, **102**(11): 1958.
- [16] REYA T, MORRISON S J, CLARKE M F, *et al.* *Nature*, 2001, **414**(6859): 105.
- [17] BOVENBERG M S, DEGELING M H, TANNOUS B A. *Trends Mol Med*, 2013, **19**(5): 281.
- [18] BAO S, WU Q, MCLENDON R E, *et al.* *Nature*, 2006, **444**(7120): 756.
- [19] BRUNNER T B, KUNZ-SCHUGHART L A, GROSSEGEHLING P, *et al.* *Semin Radiat Oncol*, 2012, **22**(2): 151.
- [20] YU F, YAO H, ZHU P, *et al.* *Cell*, 2007, **131**(6): 1109.
- [21] AL-ASSAR O, MUSCHEL R J, MANTONI T S, *et al.* *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, **75**(4): 1216.
- [22] ZIELSKE S P, SPALDING A C, WICHA M S, *et al.* *Transl Oncol*, 2011, **4**(4): 227.
- [23] HAMADA N, IMAOKA T, MASUNAGA S, *et al.* *J Radiat Res*, 2010, **51**(4): 365.
- [24] ANTONELLI F, CAMPA A, ESPOSITO G, *et al.* *Radiat Res*, 2015, **183**(4): 417.
- [25] ASAITHAMBY A, HU B, CHEN D J. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, **108**(20): 8293.
- [26] OKAYASU R. *Int J Cancer*, 2012, **130**(5): 991.
- [27] EMAMI K, HADA M, LACY S, *et al.* *Advances in Space Research*, 2007, **40**(4): 501.
- [28] BARENDSEN G W, WALTER H M, FOWLER J F, *et al.* *Radiat Res*, 1963, **18**: 106.
- [29] TODD P. *Radiat Res Suppl*, 1967, **7**: 196.
- [30] WEISBROD U, BUCKER H, HORNECK G, *et al.* *Radiat Res*, 1992, **129**(3): 250.

## Study of Carbon-Ion Irradiation Killing Glioma Stem Cells

SUN Fang<sup>1,2</sup>, ZHANG Xurui<sup>1,2</sup>, ZHAO Xudong<sup>3</sup>, ZHOU Guangming<sup>1</sup>, WANG Jufang<sup>1,†</sup>

(1. Gansu Key laboratory of Space Radiobiology & Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine of Chinese Academy of Sciences, Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

**Abstract:** Though heavy-ion therapy has demonstrated significant benefits such as well-defined range, small entrance dose and high relative biological effectiveness, the characteristics of radio-biological effects on cancer stem cells induced by heavy-ion treatment is not completely clear. In this paper, we used human glioma cancer stem cells to investigate whether heavy ions offered a biological advantage, by effectively targeting cancer stem cells, in comparison to conventional X-rays. Our results showed that the repair rate of DNA damage generated by 2 Gy of carbon ions was lower than that generated by X-rays in glioma stem cells. MTT assay showed that the viability of cancer stem cells irradiated by carbon ions was significant lower than that irradiated by X-rays. Taken together, carbon ions showed a biological advantage over X-rays by effectively targeting glioma cancer stem cells. These findings have significant importance in understanding the biological effects related to heavy-ion therapy.

**Key words:** heavy-ion; radiation; cancer stem cell; glioma

<http://www.npr.ac.cn>

---

**Received date:** 21 Mar. 2016; **Revised date:** 17 May 2016

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China(31270895, U1232125, 31400723, 11335011)

† **Corresponding author:** WANG Jufang, E-mail: jufangwang@impcas.ac.cn.