文章编号: 1007 - 4627(2008)01 - 0072 - 05

# $^{12}$C 和 X 射线辐照人肺癌细胞 H1299 的生物学效应*

苏锋涛[1,2], 李 强[1,#], 金晓东[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**: 用高传能线密度(LET)的$^{12}$C 离子束和低 LET 的 X 射线辐照体外培养的非小细胞肺癌 H1299($p53$ 基因缺失), 研究它们的辐照生物学效应的差异。用克隆形成率法测定了细胞对射线的辐射敏感性; 用 AnnexinV/PI 试剂盒检测了细胞早期凋亡; 用流式细胞仪检测了细胞周期变化。实验结果表明, $^{12}$C 离子束辐照 H1299 细胞的存活率明显低于用 X 射线辐照的; $^{12}$C 离子束引起 H1299 细胞的早期凋亡率明显高于 X 射线辐照引起的, 且持续时间更长; $^{12}$C 离子束引起的 H1299 细胞 $G_2$/M 期的抑制更明显。说明 H1299 细胞对高 LET 的$^{12}$C 离子束的辐射敏感性高于对 X 射线的, 重离子对 $p53$ 基因缺失型肿瘤的治疗可实施较低的照射剂量、较少的照射次数和较长的时间间隔。

**关 键 词**: 传能线密度; 辐射敏感性; 早期凋亡; 细胞周期阻滞; $p53$
**中图分类号**: Q274; Q691 **文献标识码**: A

## 1 引言

重离子束具有倒转的深度剂量分布(Bragg 峰)、高的传能线密度(LET)和高的相对生物学效应(RBE)等特点, 因此, 重离子束应用于肿瘤放射治疗具有传统射线不可比拟的优势[1]。迄今, 美国、德国和日本已经实现了重离子束治癌临床治疗试验研究, 取得非常显著的临床治疗结果, 重离子束对部分肿瘤的局部控制率达到了 100%[2]。我国从 1995 年起开展了重离子束治癌技术的基础研究, 经过 10 多年放射物理、放射生物学、治疗技术和动物实验等方面的研究积累, 目前中国科学院近代物理研究所已经开始了重离子束治疗浅表肿瘤的临床试验研究。

在常规射线肿瘤放疗的实践中, 治疗方案的设计依赖于对肿瘤细胞放射敏感性的预期。目前, 重离子束放疗治疗计划的制定多基于长期在低 LET 的 X 射线治疗中积累的经验: 诸如照射剂量和分次照射时间间隔等。因此, 比较细胞对高 LET 重离子束和低 LET X 射线的辐射敏感性的差异及其相关生物学效应的机理, 从而为制定更为合理的重离子束治疗计划提供基础数据和理论依据。本文通过测定不同剂量$^{12}$C 离子束和 X 射线辐照 H1299 细胞后的细胞存活和不同时间点的细胞周期阻滞及凋亡来研究这两种不同 LET 的射线辐照肿瘤细胞诱导生物学效应的差异以及在此基础上的肿瘤细胞辐射敏感性的差异, 为重离子束治癌提供必要的基础数据。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料及照射条件

人非小细胞肺癌 H1299($p53$ 基因缺失)细胞系为中国科学院近代物理研究所离子生物医学实验室保存。培养基为含 10% 胎牛血清(兰州民海生物工程有限公司)的 RPMI-1640(GIBCO)培养液, PI, RNAase(Sigma), Annexin V-FITC 凋亡探测试剂盒(Apoptosis Detection Kit)购自南京凯基生物科技发展有限公司, 流式细胞仪为美国 BD 公司的 FACS-Calibur。

### 2.2 辐照

(1) 重离子辐照: 重离子辐照在兰州重离子研

* 收稿日期: 2007 - 05 - 22; 修改日期: 2007 - 06 - 16
* 基金项目: 中国科学院"百人计划"资助项目(O506120BR0); 国家高技术研究发展计划资助项目(2006AA02Z499)
作者简介: 苏锋涛(1976—), 男(汉族), 河南开封人, 硕士研究生, 从事辐射生物学研究; E-mail: fengtaosu@impcas.ac.cn
# 通讯联系人: 李 强, E-mail: liqiang@impcas.ac.cn

究装置(HIRFL)的浅层肿瘤治疗终端上进行，$^{12}$C 离子束能量为 83.6 MeV/u，*LET*≈30 keV/μm，吸收剂量率为 3— 4 Gy/min。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，样品照射在室温下进行。克隆存活实验的细胞吸收剂量分别为 1，2，3，4 和 6 Gy；其它实验的细胞吸收剂量分别为 2 和 6 Gy，照射后收集样品的时间点分别为 6，12，24，48 和 72 h。

(2) X 射线照射：用兰州军区兰州总医院放射治疗中心的电子直线加速器(CL2100，Varian)产生的 8 MV 的 X 射线照射，*LET*≈0.2 keV/μm，吸收剂量率为 4 Gy/min，其它同上。

### 2.3　用克隆形成法测定细胞存活率

处于对数生长期的细胞在照射后用胰酶消化，取少量细胞悬液计数并将样品稀释至适当浓度。按不同剂量、不同重复组计算预置细胞数，按预置数(200—50 000 cells/dish)将一定量的细胞悬液接种到 ϕ60 mm 培养皿中，每个剂量点 3 皿重复。放置于 $CO_2$ 培养箱中 37 ℃下培养 8 d，卡诺液固定，Giemsa 染色，统计多于 50 个细胞的集落数。细胞存活率(Survival Fraction，简称 *SF*)按下式计算：$SF(\%)=(S/S_0)\times 100\%$，式中 $S$ 为受照细胞克隆形成率，$S_0$ 为对照细胞克隆形成率。

### 2.4　用流式细胞仪检测辐照后细胞周期的变化

照射后不同时间，胰酶消化收集细胞悬液，离心，PBS(pH7.2)洗涤二次，弃上清，将沉淀悬浮，75% 冰冷乙醇固定，−20 ℃保存待用。已固定的细胞，离心弃上清，沉淀用 500 μl PI 溶液(50 μg/ml)重悬，加 RNAase (1 mg/ml) 1μl，振荡混匀后室温避光染色 30 min，DNA 含量用 FACSCalibur 流式细胞仪测定，Cellquest 软件采集数据，用 Flowjo(Version 5.7.2，Tree Star Inc 公司)软件进行细胞周期分析，每个样本采集 $1\times 10^4$ 个细胞。

### 2.5　用 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡

根据 Annexin V-FITC/PI 双标记试剂盒说明书操作，胰酶消化、离心收集细胞，PBS 重悬细胞，并调整细胞浓度为 $2—5\times 10^5$ cells/ml。取 195 μl 细胞悬液，加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀，加 10 μl 浓度为 20 μg/ml 的 PI，室温避光反应 15 min，用流式细胞仪分析，通过空白对照和选门，每样本收集 20 000个细胞荧光信号，Cellquest 软件采集数据，用 Flowjo 软件进行凋亡百分率分析。

### 2.6　统计学处理

数据分析采用美国 SPSS 10.0 统计软件，相同剂量组，相同取样时间点，$^{12}$C 离子束和 X 射线引起的细胞凋亡率的比较采用 t-检验。

## 3　结　果

### 3.1　细胞存活率

图 1 给出了$^{12}$C 离子束和 X 射线照射 H1299 细胞的剂量存活曲线。结果显示，H1299 细胞经 X 射线和$^{12}$C 离子束辐照后细胞存活率和照射剂量之间存在不同的剂量效应关系，前者的存活曲线上有“肩”区，符合线性平方(LQ)模型的描述，后者的无“肩”区。相同细胞存活率条件下，所需 X 射线的辐照剂量明显大于$^{12}$C离子束的。从表1可知，$^{12}$C

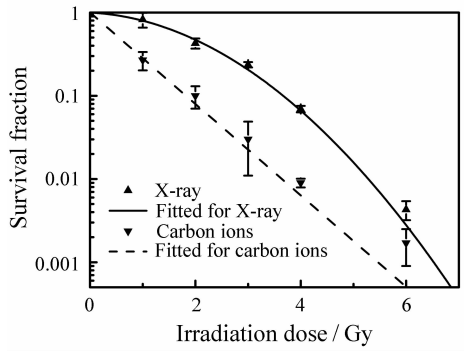


图 1　$^{12}$C 和 X 射线辐照 H1299 细胞后的剂量存活曲线

**表 1　H1299 细胞辐射敏感性参数***

| 射线 | *LET* /(keV/μm$^1$) | α /Gy$^{-1}$ | $D_0^a$ /Gy | $D_{10}$ /Gy | $RBE_{10}$ | 失活截面$^b$ /μm$^2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 8 MV X-rays | 0.2 | 0.074 48 | 2.321 | 3.665 | 1.0 | 0.014 |
| 83.6 MeV $^{12}$C | 30 | 1.264 6 | 0.775 | 1.824 | 2.01 | 6.20 |

* a 平均致死剂量，即为 37% 的致死剂量，$D_0=D_{37}$；b 失活截面，计算公式：$LET\times 0.160\ 2/D_0$。

离子束的 RBE 值明显高于 X 射线的，10% 细胞存活水平下的$^{12}$C 离子束的 RBE 值是 X 射线的 2.01 倍，H1299 细胞对$^{12}$C 离子束的失活截面是 X 射线的 443 倍。这些结果都说明 H1299 细胞对$^{12}$C 离子束的辐射敏感性要明显高于对 X 射线的辐射敏感性。

### 3.2 细胞凋亡

图 2 展示了 0，2 和 6 Gy $^{12}$C 离子束和 X 射线辐照 H1299 细胞后早期凋亡率随照射后培养时间变化的实验结果。可以看到：细胞的早期凋亡率与辐射剂量成正依赖关系，在辐照的 24 h 内，细胞的早期凋亡率达到最大，而后随取样时间的增加，各剂量组的凋亡率逐渐降低。细胞的早期凋亡率与 LET 也成正依赖关系，高 LET $^{12}$C 离子束引起的早期凋亡率要大于同剂量低 LET X 射线。24 h 时，2 Gy $^{12}$C 离子束辐照时的凋亡率是 X 射线辐照时的 3.1 倍，6 Gy $^{12}$C 离子束的凋亡率是 X 射线辐照时的 1.8 倍。统计分析表明，同剂量组的$^{12}$C 离子束在各时间点同对应的 X 射线相比，引起的凋亡率存在极其显著性差异（$**\ p<0.01$）。从图 2 还可看出，高 LET $^{12}$C 离子束引起的凋亡持续时间更长，尤其是在 2 Gy 剂量组，该现象更明显。辐照后 72 h，$^{12}$C 离子束诱导的凋亡率是对照组的 6.4 倍，X 射线诱导的仅为对照组的 1.8 倍。

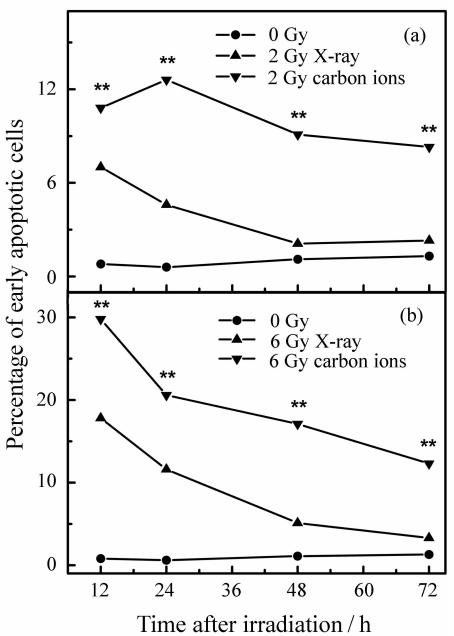


图 2 不同剂量$^{12}C^{6+}$和 X 射线辐照 H1299 细胞后不同时间点的早期凋亡情况（$**\ p<0.01$）

### 3.3 细胞周期变化

图 3 给出了 0，2 和 6 Gy $^{12}$C 离子束和 X 射线辐照 H1299 细胞后不同时间点 $G_1$ 期和 $G_2$/M 期分布的实验结果。从图 3（a）可以看出，辐照后，H1299 细胞 $G_1$ 期的细胞数占细胞总数的百分率显著降低，$G_1$ 期的周期阻滞明显缺失。从时间上看，辐照后 12 h $G_1$ 期的细胞百分率降到最低，在图中呈现一个明显的折点，此后 $G_1$ 期的细胞比例趋于稳定，但仍低于对照组。从辐射剂量上看，$G_1$ 期的细胞比例的降低与辐射剂量成正依赖关系，剂量越高，降低越明显。从 LET 上看，高 LET 的$^{12}$C 离子束引起的 $G_1$ 期阻滞的降低更明显，辐照后 48 h 内，2 Gy $^{12}$C 离子束引起的 $G_1$ 细胞比例的降低和 6 Gy 的 X 射线引起的相当，在某些时间点甚至更低。

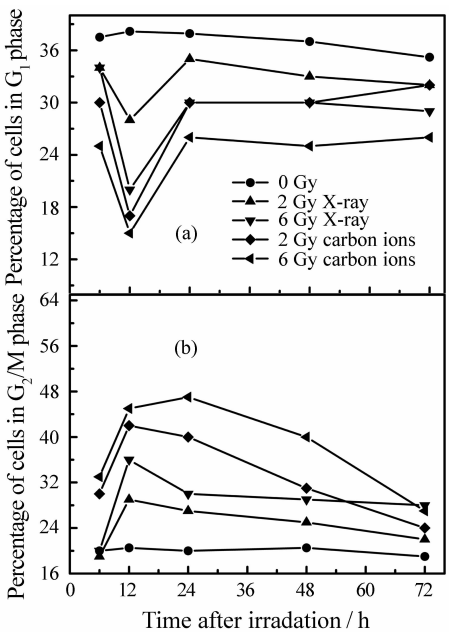


图 3 不同剂量$^{12}C^{6+}$和 X 射线辐照 H1299 细胞后不同时间点 G 期和 $G_2$/M 期的分布情况

从图 3（b）可以看出，辐照后，H1299 细胞发生了明显的 $G_2$/M 期阻滞，$G_2$/M 期细胞的比例明显升高，并与辐照剂量成正相关，X 射线在辐照后 12 h $G_2$/M 的抑制达到最高，此时 2 和 6 Gy 分别为其对照组的 142% 和 176%，$^{12}$C 离子束引起的 $G_2$/M 期抑制，2 Gy 的在辐照后 12 h 达到最大值，为对照组的 205%，6 Gy 的在辐照后 24 h 处达到最大值，为对照组的 235%。辐照后 48 h 内，$^{12}$C 离子束与 X

射线相比较，其对 H1299 细胞的 $G_2$/M 阻滞更显著，持续时间更长，即使在辐照后 48 h 处，其 $G_2$/M 期的阻滞也和 X 射线的 $G_2$/M 阻滞的峰值相近。辐照后 72 h，$^{12}$C 离子束引起的 $G_2$/M 期抑制显著降低，应是细胞对辐照的“崩溃释放”现象。

## 4　讨论

与低 LET 的 X 射线相比，高 LET 的$^{12}$C 离子束辐照 H1299 细胞后，细胞存活率明显低于 X 射线照射的细胞。说明$^{12}$C 离子束与 X 射线相比，能显著提高非小细胞肺癌 H1299 肿瘤细胞的杀伤能力。如表 1 所示，$^{12}$C 离子束的 $D_0$明显低于 X 射线的，$D_0$越小，细胞辐射敏感性越强，$^{12}$C 离子束的 RBE 值和失活截面也明显大于 X 射线的，RBE 值和失活截面也是衡量辐射敏感性的重要参数，其值越大，辐射敏感性越强。表现在图 2 的凋亡上，$^{12}$C 离子束引起的凋亡率明显高于 X 射线的，而且持续的时间更长。表现在图 3 的细胞周期分布上，$^{12}$C 离子束引起的 H1299 细胞 $G_2$/M 期的抑制更明显。这些都证明，高 LET 的$^{12}$C 离子束与低 *LET* 的 X 射线相比，确实具有明显杀伤肿瘤细胞的能力。

依据 Charlton[3] 提供的 LET 与 DNA 单链断裂(SSB)和双链断裂(DSB)的关系可知，X 射线引起的 DNA 链的断裂以单链断裂为主($SSB$: $DSB$ > 9: 1)，$^{12}$C 离子束引起的 DNA 断裂以双链为主($SSB$ : $DSB$ < 1: 56)。它们的主要修复机制、参与的蛋白分子也不尽相同，DNA 的 DSB 的损伤修复主要是由 ATM(ataxia telangiectasia mutated)介导的非同源末端连接(Nonhomologous End Joining，简称 NHEJ)修复和同源重组(Homologous Recombination，简称 HR)修复，而 SSB 的修复主要是由 ATR(ATM-Rad3-related)介导的 HR 修复[4]。其中，DNA 的双链断裂直接破坏了 DNA 结构的完整性，修复难，为非忠实修复，所以 DSB 损伤被认为是最严重的 DNA 损伤类型，该损伤对于细胞来说是致死的，同 X 射线相比，$^{12}$C 离子束引起的 DNA 损伤修复被显著推迟，同时在修复过程中产生更多错误修复[5]。对于低 LET 的 X 射线，其损伤以 SSB 为主，SSB 存在着亚致死损伤修复，表现在图 1 的剂量存活曲线上是有“肩”区，作为高 LET 的$^{12}$C 离子束，其细胞损伤以 DSB 为主，SSB 比例很低，亚致死损伤修复比例很低，因此，其 $\alpha$，$D_0$，$D_{10}$比 X 射线的要低，$RBE_{10}$、失活截面比 X 射线的要高。

本文细胞周期的实验结果显示，H1299 细胞辐射损伤以后，$G_1$期阻滞缺少，大量细胞被阻滞在 $G_2$/M 期。本实验所用的非小细胞肺癌 H1299 细胞是 *p*53 基因缺失。*p*53 基因是细胞 $G_1$期阻滞延迟的关键基因。目前已发现的 $G_1$阻滞存在的 3 条主要信号通路：ATM→P53 途径；ATM→MDM2→P53 途径；ATR→P53 途径[6]，均需要 P53 蛋白的参与，因此，对于 *p*53 基因缺失的 H1299 细胞，辐射损伤后也必然存在 $G_1$期阻滞的缺失。图 3(a)中的实验结果很好地证明了这一点，这和 Iwadate 等[7] 的研究结果相一致。在本实验中，相对于 X 射线，$^{12}$C 离子束引起的 $G_1$期阻滞降低得更明显，这在多篇文献中均有报道，目前尚未有明确解释，可能是因为高 *LET* $^{12}$C 离子束引起的 $G_0$期细胞非凋亡性死亡、启动了 $G_1$期阻滞通路中某些效应蛋白，$G_2$/M 高阻滞引起相对应的 $G_1$期的减少，明确的结论还有待于进一步的研究。本实验中高 LET $^{12}$C 离子束对 H1299 细胞的 $G_2$/M 阻滞更显著，持续时间更长的现象，这和多篇文献已有的高 LET 和低 LET 射线对 $G_2$期的阻滞研究相一致[8]。Matsumura 等[9] 认为，同 X 射线相比，$^{12}$C 离子束辐照肿瘤细胞后，能使 Wee1 蛋白更高地表达。Wee1 蛋白是一种细胞周期调节蛋白，该蛋白通过对 cdc2 的 Tyr-15 和 Thr-14 位点的磷酸化抑制 cdc2/CyclinB 蛋白激酶的活性，阻止细胞进入 M 期[10]。在肿瘤的分次治疗中，$G_2$期的阻止显得尤为重要，因为，$G_2$期的细胞辐射敏感性最强[11]。

射线辐照是引起细胞凋亡的重要理化因子之一。当增值细胞的 DNA 受到射线损害后，细胞不仅启动周期阻滞，为损伤修复争取时间，而且对不能完成修复的细胞，启动细胞凋亡机制，以避免 DNA 损伤进入子代细胞。通过本试验观测发现，细胞的早期凋亡率不仅对辐射剂量成依赖关系，而且对 LET 也成正依赖关系。相对于 X 射线而言，2 Gy $^{12}$C 离子束辐照引起细胞的早期凋亡比例不仅更高，而且早期凋亡比例更稳定、持续时间更长，在辐照后 72 h 处，其凋亡比例与 X 射线辐照时的峰值(12 h)相当，这和 Takahashi 等[12] 的研究结果相一致。究其原因，还是因为高 LET 的$^{12}$C 离子束辐照对细胞 DNA 产生的 DSB 致死损失更多，因而 H1299 细胞的 $G_2$/M 期阻滞更强烈，使更多的不可修复的损伤细胞进入凋亡程序。

与低 LET 的 X 射线相比，高 LET 的 $^{12}$C 离子

束辐照将引起细胞更多的和更密集的致死性靶分子 DNA 的损伤，将启动细胞更强烈的应激机制，在细胞水平上主要表现为辐射敏感性、周期阻滞和细胞凋亡程度不一样。由本实验结果：高 LET 的 $^{12}C$ 离子束对细胞的辐射敏感性更强；高 LET 的 $^{12}C$ 离子束对于 *p*53 基因缺失型肿瘤细胞周期 $G_2/M$ 期阻滞更强烈、持续时间更长；高 LET 的 $^{12}C$ 离子束引起的细胞早期凋亡比率更显著、持续时间更长。可以说明：同低 LET 的 X 射线相比，高 LET 的 $^{12}C$ 离子束更适合于肿瘤的放射治疗，对 *p*53 基因缺失型肿瘤的治疗可实施较低的照射剂量、较少的照射次数和较长的时间间隔。

## 参考文献(References)：


[1] Li Q, Zhou G M, Wang J F, *et al*. Nuclear Science and Techniques, 2002, **13**(4): 259.

[2] Li Q. Acta Laser Biology Sinica, 2003, **2**(5): 386(in Chinese). (李 强. 激光生物学报, 2003, **2**(5): 386.)

[3] Chalton D E. Taylor & Francis, 1988, **53**: 98.

[4] Yosef S. Nature, 2003, **3**: 155.

[5] Okayasu R, Okada M, Okabe A, *et al*. Radiation Research, 2006, **165**(1): 59.

[6] Bartek J, Lukas J. Curr Opin Cell Biol, 2001, **13**: 738.

[7] Iwadate Y, Mizoe J, Osaka Y, *et al*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, **50**(3): 803.

[8] Lüke-Huhle C, Blakely E A, Chang P Y. Radiat Res, 1979, **79**: 97.

[9] Matsumura S, Matsumura T, Ozeki S, *et al*. Cancer Detection and Prevention, 2003, **27**: 222.

[10] Yarden R I, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, *et al*. Nat Genet, 2002, **30**(3): 285.

[11] Sinclair W K. Radiat Res, 1968, **33**: 620.

[12] Takahashi A, Matsumoto H, Yuki K, *et al*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, **60**(2): 591.


# Biological Effects of H1299 Cells Exposed to $^{12}C$ Ion Beam and X-rays*


SU Feng-tao[1,2], LI Qiang[1,#], JIN Xiao-dong[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 provide basic data for heavy-ion cancer therapy, the biological effects of ionizing radiations with different linear energy transfers (LET) on radiosensitivity, cell cycle alteration and cell early apoptosis in H1299 cells were studied. The cell radiosensitivity was assessed by means of the standard colony-forming assay. The experimental results show that the survival fraction of H1299 cells irradiated with the $^{12}C$ ions is evidently lower than that in the case of the X-rays. Moreover, compared with the X-rays the $G_2/M$ phase arrest and delay degree and the early apoptosis percentage in H1299 cells irradiated with the $^{12}C$ ions were more prominent with increasing the radiation dose and repairing time. These results suggested that H1299 cells were more sensitive to $^{12}C$ ion beam than X-rays. Moreover, less dose, few fractionation and longer fractionation interval were applicable to heavy ion therapy for *p*53 null-type tumors.



**Key words**: linear energy transfer; radiosensitivity; early apoptosis; cell cycle arrest; *p*53



* **Receivee date**: 22 May 2007; **Revised date**: 16 Jun. 2007

* **Foundation item**: Century Program of Chinese Academy of Sciences (O506120BR0); National High Technology Research and Development Program of China (2006AA02Z499)



\# **Corresponding author**: Li Qiang, E-mail: liqiang@impcas.ac.cn