

^{12}C 重离子束对人淋巴细胞增殖、周期和凋亡的影响

刘红艳 党旭红 刘建功 张慧芳 原雅艺 王超 左雅慧 段志凯

【摘要】 目的 探讨 ^{12}C 重离子束对人淋巴细胞增殖以及周期、凋亡的影响。方法 ^{12}C 重离子束照射人淋巴细胞 Peng-EBV, 吸收剂量分别为 0(对照组)、0.5、2.0 Gy。照射后用 MTS 法检测细胞增殖活力, 流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡。结果 与对照组相比, 0.5 Gy 照射可以增加细胞增殖活力($t = 2.66 \sim 14.45$, $P < 0.05$), 而 2.0 Gy 照射降低了细胞活力($t = 7.65 \sim 64.45$, $P < 0.05$)。受照射细胞的活力存在一个恢复和下降过程, 受照后 48 h 内, 细胞数量呈增加趋势, 但 72 h 时细胞数量下降。照射后 48 h, 两组细胞 G_2/M 期呈明显上升趋势, 高于对照组($t = 2.01 \sim 99.80$, $P < 0.05$), 且 2.0 Gy 组的周期阻滞较 0.5 Gy 组严重; 照射后 30 d, 细胞周期阻滞恢复到正常水平。照射后 12、24、48 h, 两照射组与对照组相比, 细胞凋亡率差异有统计学意义($t = -3.05 \sim -1.05$, $P < 0.05$), 在照后 24 h 最高, 48 h 明显下降, 30 d 恢复到对照水平。**结论** ^{12}C 离子束辐射影响人淋巴细胞增殖, 诱导人淋巴细胞发生明显的 G_2/M 期阻滞, 并且明显地促进细胞凋亡。

【关键词】 ^{12}C 重离子; 人淋巴细胞; 细胞增殖; 细胞周期; 细胞凋亡

Effects of ^{12}C heavy-ion irradiation on cell growth, cell cycle and apoptosis of human peripheral blood lymphocytes Liu Hongyan, Dang Xuhong, Liu Jianguo, Zhang Hui Fang, Yuan Yayi, Wang Chao, Zuo Yahui, Duan Zhikai. China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, China
Corresponding author: Duan Zhikai, Email: duanzhikai@cirp.org.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects of ^{12}C ions beam exposure on cell growth, cell cycle and apoptosis of lymphocytes. **Methods** Human peripheral blood lymphocytes Peng-EBV were exposed to ^{12}C ions beams with different dose (0, 0.5, 2.0 Gy) at the dose rate of 0.3 - 0.5 Gy/min. The proliferation of Peng-EBV cells was determined by MTS assay. Cell apoptosis and cell cycle were analyzed by flow cytometry. **Results** The cellular proliferation was enhanced by 0.5 Gy irradiation but reduced by 2.0 Gy irradiation. The proliferation of irradiated cells could be recovered at 48 h after irradiation, but decreased at 72 h post irradiation. After 48 h of irradiation, G_2/M cell cycle arrest was caused, especially at 2.0 Gy ($t = 2.01 - 99.80$, $P < 0.05$). At 30 d after irradiation, G_2/M cell cycle arrest was not detected. At 12, 24, 48 h post-irradiation, apoptotic level was enhanced compared with the control ($t = -3.05 - 1.05$, $P < 0.05$). The apoptosis rate had the highest level at 24 h post-irradiation, and then dropped at 48 h post-irradiation and recovered to control at 30 d post-irradiation. **Conclusions** The heavy-ion beam exposure could affect cellular proliferation, increase apoptosis and induce G_2/M phase arrest of lymphocytes.

【Key words】 ^{12}C heavy-ions; Human peripheral blood lymphocytes; Cell proliferation; Cell cycle; Cell apoptosis

重离子对人体的辐射生物学效应研究受到人们的关注, 但对重离子照射后细胞损伤的生物学效应的研究远远少于对电子、X 射线和 γ 射线的研究, 重离子独特的能量沉积过程, 使其产生与其他低 LET 射线不同的生物学效应。如高 LET 辐射在诱

导真核细胞周期的 G_1 、S 和 G_2 期延迟的分子事件上与低 LET 有差异^[1-2]。本实验通过观察重离子辐射对人淋巴细胞的增殖、凋亡和周期的影响, 初步了解重离子辐射对人淋巴细胞的生物效应。

材料与amp;方法

1. 试剂: Annexin V-FITC/PI 染料细胞凋亡试剂盒、PI 染料细胞周期试剂盒(南京凯基生物科技

公司), MTS 法细胞活力检测试剂盒(美国 Promega 公司), RPMI 1640(美国 GIBCO 公司), 胎牛血清(上海依科赛生物制品有限公司), 青、链霉素(南京凯基生物科技公司)。

2. 主要仪器: 酶标仪(美国 Biorad 公司), Cytomics FC500 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司), 生物倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

3. 照射条件: 中国科学院近代物理研究所兰州重离子研究装置辐照终端引出, 能量为 165 MeV/u, 吸收剂量率为 0.3 ~ 0.5 Gy/min, 吸收剂量为 0(对照组)、0.5、2.0 Gy, 源靶距 2.5 cm。

4. 细胞培养: 人淋巴细胞系 Peng-EBV 购于中国科学院昆明动物研究所。采用含 20% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液, 在体积分数为 5% 的 CO₂、37℃、饱和湿度条件下培养细胞。细胞生长到一定数目, 用血细胞计数板计细胞数目。取第 3 ~ 4 代细胞用于实验。传代后培养 24 h 进行照射, 照射前细胞浓度为 1 × 10⁶/ml。

5. MTS 法检测细胞活力: 将状态良好的人淋巴细胞 PEN-EBV 接种于 96 孔培养板中, 接种数量分别为 5 000、10 000、20 000、40 000、80 000、100 000、160 000、200 000/孔, 设 3 个重复样本。按照 MTS 一步法细胞活力检测试剂盒说明书操作。

6. 流式细胞术检测细胞周期: 照射后 4、8、12、16、20、24、48 h, 30 d 分别取受照 0、0.5、2.0 Gy 的细胞, 用流式细胞仪检测细胞周期, 细胞周期结果用 Multicycle 32-bit 软件分析 G₀/G₁、S、G₂/M 期细胞含量。参照细胞周期试剂盒说明书操作, 每个样品设 3 个平行样, 上机检测。

7. 流式细胞术检测细胞凋亡: 照射后 12、24、48 h 和 20、30 d, 分别取受照不同剂量的细胞, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率。采用 Annexin V/PI 法^[2], 区分正常细胞(Annexin - PI -)、损伤细胞(Annexin - PI +)、死细胞(Annexin + PI +)、凋亡细胞(Annexin + PI -)。每个样品设 3 个平行样, 参照凋亡试剂盒说明书操作。

8. 统计学处理: 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用

SPSS 18.0 软件进行统计学分析。重复样本符合正态分布, 符合 *t* 检验要求, 组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. ¹²C 重离子照射对人淋巴细胞活力的影响: 淋巴细胞的 MTS 活性具有剂量依赖性, 即在不同的时间点, 随着辐射剂量的增加, 细胞活力活性下降。与 0 Gy 组相比, 0.5 Gy 组在 12、48、72 h 细胞数量差异有统计学意义(*t* = 2.66 ~ 14.45, *P* < 0.05), 2.0 Gy 组在 24、48、72 h 细胞数量差异有统计学意义(*t* = 7.65 ~ 64.45, *P* < 0.05)。受照细胞在 4 ~ 48 h 内, 随着时间的增加, 细胞活力呈增加趋势, 但在照后 72 h, 细胞数量呈下降趋势, 且小于 48 h 时细胞数量, 见表 1。

2. ¹²C 重离子照射对人淋巴细胞周期的阻滞作用: 人淋巴细胞接受重离子照射后 G₁、S 和 G₂/M 期细胞比例的变化, 如表 2 所示。在 4 ~ 48 h 范围内, 剂量组 G₂/M 期与 0 Gy 组相比较, 差异均有统计学意义(*t* = 2.01 ~ 99.8, *P* < 0.05), 且 2.0 Gy 组 G₁ 细胞明显减少, 与 0 Gy 组比较, 差异均有统计学意义(*t* = 7.81 ~ 69.1, *P* < 0.05); 2.0 Gy 组的 G₂/M 期阻滞明显高于 0.5 Gy, 且在 48 h 达到最高, 约为 0.5 Gy 组的 2 倍。重离子照射后 30 d, G₁、S、G₂/M 期细胞比例, 与 0 Gy 组比较, 差异均无统计学意义, 即 G₂/M 期周期阻滞恢复到正常水平。人淋巴细胞受重离子照射后, G₁ 和 S 期细胞比例呈下降趋势, G₂/M 期呈明显的上升趋势, 且随着剂量的增加, G₂/M 期阻滞增加。

3. ¹²C 重离子照射后人淋巴细胞凋亡率的分析: 流式细胞术分析的结果如表 3。人淋巴细胞受重离子照射后 12、24、48 h 发生凋亡, 与 0 Gy 组比较, 差异均有统计学意义(*t* = -3.05 ~ -1.05, *P* < 0.05)。2.0 Gy 组比 0.5 Gy 组的凋亡率略高, 剂量组细胞凋亡率均在 24 h 达到最高, 48 h 凋亡率明显下降, 随后随时间的延长, 凋亡率呈下降趋势, 30 d 均恢复到对照水平, 即与 0 Gy 组比较, 差异均无统计学意义。

表 1 重离子照射后不同时间点人淋巴细胞活力的变化[吸光度(A), $\bar{x} \pm s$]

剂量(Gy)	样本数	4 h	12 h	24 h	48 h	72 h
0	6	0.50 ± 0.01	0.49 ± 0.02	0.70 ± 0.02	0.76 ± 0.07	0.79 ± 0.02
0.5	6	0.50 ± 0.02	0.52 ± 0.01 ^a	0.75 ± 0.04	0.87 ± 0.04 ^a	0.83 ± 0.06 ^a
2.0	6	0.50 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.60 ± 0.09 ^a	0.63 ± 0.05 ^a	0.55 ± 0.01 ^a

注: ^a与 0 Gy 组细胞比较, *t* = 2.66 ~ 64.45, *P* < 0.05

表 2 各组细胞照射后不同时间细胞周期分布(%, $\bar{x} \pm s$)

剂量(Gy)	照后时间	样本数	G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
0	0 h	4	63.14 ± 0.67	35.03 ± 2.54	1.84 ± 1.07
0.5	4 h	4	58.55 ± 5.61	29.67 ± 3.00	11.79 ± 2.62 ^a
	8 h	4	55.51 ± 3.25	30.41 ± 3.54	14.09 ± 0.29 ^a
	12 h	4	55.27 ± 0.09 ^a	24.80 ± 0.07	19.94 ± 0.16 ^a
	16 h	4	56.30 ± 1.24 ^a	23.36 ± 1.19	20.35 ± 0.06 ^a
	20 h	4	52.74 ± 5.15	24.75 ± 2.50	22.47 ± 2.70 ^a
	24 h	4	57.62 ± 2.50	24.02 ± 2.98 ^a	18.36 ± 4.78 ^a
	48 h	4	56.16 ± 0.61 ^a	20.72 ± 0.84	23.15 ± 1.42 ^a
	30 d	4	63.52 ± 1.45	30.94 ± 4.17	5.55 ± 3.04
2.0	4 h	4	55.72 ± 1.58 ^a	25.31 ± 0.89	18.97 ± 1.73 ^a
	8 h	4	51.89 ± 0.00 ^a	31.75 ± 0.00	16.36 ± 0.00 ^a
	12 h	4	51.89 ± 2.37 ^a	27.33 ± 1.45	20.79 ± 3.82 ^a
	16 h	4	55.37 ± 0.00 ^a	19.18 ± 0.00	25.45 ± 0.00 ^a
	20 h	4	48.80 ± 0.14 ^a	22.37 ± 1.87	28.83 ± 1.72 ^a
	24 h	4	38.48 ± 0.45 ^a	18.10 ± 0.01	43.43 ± 0.46 ^a
	48 h	4	37.58 ± 2.01 ^a	17.38 ± 0.48	45.05 ± 1.53 ^a
	30 d	4	72.28 ± 1.78	15.12 ± 4.07	12.60 ± 2.29

注:^a与 0 Gy 组比较, $t = 2.01 \sim 99.80$, $P < 0.05$

表 3 各组细胞照射后不同时间细胞凋亡率(%, $\bar{x} \pm s$)

剂量(Gy)	样本数	12 h	24 h	48 h	20 d	30 d
0	4	3.22 ± 0.69	3.22 ± 0.69	3.22 ± 0.69	3.22 ± 0.69	3.22 ± 0.69
0.5	4	22.60 ± 3.48 ^a	38.43 ± 11.62 ^a	20.86 ± 1.66 ^a	4.34 ± 1.67	3.22 ± 0.93
2.0	4	28.72 ± 4.08 ^a	46.39 ± 2.37 ^a	15.26 ± 1.01 ^a	6.95 ± 0.55 ^a	2.46 ± 0.56

注:^a与 0 Gy 组比较, $t = -3.05 \sim -1.05$, $P < 0.05$

讨 论

细胞的各种活动,如细胞增殖、分化和凋亡,是相互联系、高度协调的过程。电离辐射可直接损伤细胞膜和 DNA 分子,另外,产生的自由基还可间接破坏细胞的生物学功能。电离辐射能诱发细胞周期阻滞,因细胞种类、细胞周期时相和射线种类不同而出现不同的周期阻滞^[3-4]。本实验结果显示,人淋巴细胞接受¹²C 重离子照射后,发生明显的 G₂/M 期阻滞,在 48 h 时阻滞最大,且存在明显的剂量依赖性。高 LET 照射诱发细胞 G₂/M 期阻滞,与 DNA 双链断裂达到一定的阈值有关,当 DNA 双链断裂 10 ~ 20 个,细胞能快速启动 G₂/M 期检查点^[5]。Wu 等^[6]用 3 Gy 剂量(剂量率 1.35 Gy/min)的⁵⁶Fe 重离子照射大鼠表皮细胞,发现照后 24 h G₂/M 期阻滞约为对照的 6 倍。不同低剂量¹²C 离子辐射小鼠胸腺细胞,发现 G₁、S 期细胞减少,促进 G₂/M 期累积^[7]。G₂ 期阻滞被认为与放射敏感性相关,有研究证实高 LET 比低 LET 辐射可以导致更长的 G₂ 期阻滞^[8-9]。本实验中发现受照 2.0 Gy 的细胞在照后 4 h 发生明显的 G₂/M 期阻滞,与受照 0.5 Gy 的细胞在照后 12 h 的 G₂/M 期阻滞水平相

当,这可能与细胞周期检查点的激活需要 DNA 损伤积累到一定水平有关^[10]。

细胞凋亡可发挥阻止未修复或错误修复的损伤细胞继续增殖的作用^[11]。本实验中,¹²C 重离子照射人淋巴细胞后,凋亡率在 24 h 达到最高,在 48 h 显著下降,可能与周期阻滞诱导的凋亡通路相关,与 Ma 等^[12]的结果一致,他用¹²C 离子束和 X 射线辐照人肝癌 SMMC-7721 细胞,细胞凋亡率在 24 和 48 h 呈增加趋势,细胞周期发生 G₂/M 期阻滞,细胞增殖受抑制。G₂ 期阻滞可能与电离辐射引起 DNA 损伤、微管蛋白、有丝分裂纺锤体的形成和结合有关,细胞发生 G₂ 期周期检查,有利于 DNA 损伤的修复,保证基因组的遗传稳定性。当损伤不能被有效修复时,细胞周期检查点不能通过,则可引起细胞凋亡^[13]。

哺乳动物细胞的生长增殖依赖于细胞周期的正常运行。本实验结果显示,重离子影响人淋巴细胞增殖,0.5 Gy 组细胞增殖活力高于对照组,2.0 Gy 组低于对照组,可能是 0.5 Gy 剂量激活了介导细胞增殖的基因,具体原因有待进一步分析、验证。MTS 结果显示,在 72 h 时,剂量组细胞数量明显下降,可能与受照 48 h 后细胞失去自身检测和修复 DNA 损

伤的能力和调节细胞周期进展和凋亡的能力,发生有丝分裂死亡。

大量的研究表明,细胞生长、周期和细胞凋亡之间相互耦联,主要表现在细胞内许多重要蛋白质的参加,如 p53、c-Myc、Caspase 等^[14-15]。本研究证实¹²C 离子束辐射诱导人淋巴细胞发生明显的G₂/M 期阻滞,促进细胞凋亡,影响人淋巴细胞的增殖。G₂ 期阻滞有利于细胞修复,调控细胞的凋亡和增殖,从而调整重离子辐射细胞效应。对于重离子生物效应的深入研究,可为重离子临床治疗提供基础信息。

参 考 文 献

- [1] 刘建香,苏旭. 重离子辐射生物效应的研究进展[J]. 中华放射医学与防护杂志,2003,23(1):65-67.
- [2] Gridley DS, Pecauc MJ. Genetic background and lymphocyte populations after total-body exposure to iron ion radiation[J]. Int J Radiat Biol, 2011, 87(1):8-23.
- [3] Hwang A, Muschel RJ. Radiation and the G₂ phase of the cell cycle[J]. Radiat Res,1998,150(5 Suppl):S52-S59.
- [4] Durocher D, Jackson SP. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme[J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13(2):225-231.
- [5] Deckbar D, Jeggo PA, Löbrich M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol,2011,46(4):271-283.
- [6] Wu F, Zhang R, Burns FJ. Gene expression and cell cycle arrest in a rat keratinocyte line exposed to ⁵⁶Fe ions [J]. J Radiat Res, 2007,48(2):163-170.
- [7] 赵卫平,张红,王燕玲,等. ¹²C⁶⁺ 离子预辐射对小鼠胸腺脾脏细胞周期进程的影响[J]. 原子核物理评论,2009,26(2):158-162.
- [8] Rödel F, Hoffmann J, Distel L, et al. Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer[J]. Cancer Res,2005,65(11):4881-4888.
- [9] Cheong N, Zeng ZC, Wang Y, et al. Evidence for factors modulating radiation-induced G₂-delay: potential application as radioprotectors[J]. Phys Med,2001,17(Suppl 1):S205-S209.
- [10] 蒋满荣. DNA 损伤对哺乳动物细胞周期和凋亡的影响[D]. 上海:中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,2004.
- [11] Knehr S, Zitzelsberger H, Braselmann H, et al. Analysis for DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations in various triple combinations of human chromosomes using fluorescence in situ hybridization[J]. Int J Radiat Biol, 1994,65(6):683-690.
- [12] Ma J, Ye L, Da M, et al. Heavy ion irradiation increases apoptosis and STAT-3 expression, led to the cells arrested at G₂/M phase in human hepatoma SMMC-7721 cells [J]. Mol Cell Biochem,2009,328(1-2):17-23.
- [13] Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004,59(4):928-942.
- [14] Packham G, Cleveland JL. The role of ornithine decarboxylase in c-Myc-induced apoptosis [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1995,194:283-290.
- [15] Liao DJ, Dickson RB. c-Myc in breast cancer[J]. Endocr Relat Cancer,2000,7(3):143-164.
- (收稿日期:2014-05-20)
- (上接第 102 页)
- [6] Xu N, Cai G, Ye W, et al. Molecular imaging application of radioiodinated anti-EGFR human Fab to EGFR-overexpressing tumor xenografts [J]. Anticancer Res, 2009, 29 (10): 4005-4011.
- [7] 钟锦绣,李亚梅,关晏星. 乳腺癌 HER-2 胞外配体结合区靶点治疗的研究进展 [J]. 中国肿瘤临床,2013,4(17):1076-1079.
- [8] Berezov A, Chen J, Liu Q, et al. Disabling receptor ensembles with rationally designed interface peptidomimetics [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (31): 28330-28339.
- [9] 查林,冯世斌,郑磊,等. 整合素 α_vβ₃ 放射性配体 ^{99m}Tc^m-TP1326 的制备及其正常兔显像研究 [J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(3):235-238.
- [10] Rao PS, Thakur ML, Pallela V, et al. ^{99m}Tc^m labeled VIP analog: evaluation for imaging colorectal cancer [J]. Nucl Med Biol, 2001, 28(4):445-450.
- [11] Fani M, Maecke HR. Radiopharmaceutical development of radiolabelled peptides [J]. Eur J Nucl Med Imaging,2012,39(Suppl 1):S11-S30.
- [12] Laverman P, Sosabowski JK, Boerman OC, et al. Radiolabelled peptides for oncological diagnosis [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging,2012,39(Suppl 1):S78-S92.
- [13] Zhou Y, Kim YS, Lu X, et al. Evaluation of ^{99m}Tc-labeled cyclic RGD dimers: impact of Cyclic RGD peptides and ^{99m}Tc chelates on biological properties [J]. Bioconjug Chem,2012,23(3):586-595.
- (收稿日期:2014-10-06)