

• 实验研究 Experimental research •

^{125}I 粒子持续低剂量率照射和 ^{60}Co γ 射线高剂量率照射对 H1299 细胞生物学效应的比较研究

赵真真, 王忠敏, 陆 健, 茅爱武, 刘芬菊

【摘要】 目的 探讨 ^{125}I 粒子持续低剂量率(CLDR)内照射和 ^{60}Co γ 射线高剂量率(HDR)外照射对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞株 H1299 的细胞生物学效应。**方法** H1299 细胞处于指数生长期时分别行 ^{125}I 粒子 CLDR 照射和 ^{60}Co γ 射线 HDR 照射;克隆形成实验检测细胞存活分数,流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡率,Western blot 检测 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平。**结果** 随着照射剂量增大, ^{125}I 粒子 CLDR 照射比 ^{60}Co γ 射线 HDR 照射抑制 H1299 细胞增殖效应更明显。照射剂量为 4 Gy 时 ^{125}I 粒子组 H1299 细胞 G2/M 期百分比、细胞凋亡率分别为 $(21.77\pm 0.31)\%$ 、 $(13.79\pm 0.50)\%$;同样照射剂量下, ^{60}Co 照射组 H1299 细胞 G2/M 期百分比仅为 $(18.85\pm 0.99)\%$,细胞凋亡率仅为 $(8.79\pm 0.22)\%$ ($P<0.05$)。 ^{125}I 粒子 CLDR 照射明显上调 Bax 蛋白表达,同时下调 Bcl-2 蛋白表达。**结论** ^{125}I 粒子 CLDR 内照射比 ^{60}Co γ 射线 HDR 外照射抑制 H1299 细胞增殖效应更明显。Bcl-2/Bax 蛋白比失衡在 ^{125}I 粒子 CLDR 照射抗肿瘤效应中可能发挥重要作用。

【关键词】 ^{125}I 粒子持续低剂量率照射; ^{60}Co γ 射线高剂量率照射; 非小细胞肺癌; 凋亡

中图分类号:R734.2 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2015)-08-0702-05

The biological effect of ^{125}I seeds continuous low dose rate irradiation on H1299 cell line: comparison with ^{60}Co γ -ray high dose rate irradiation ZHAO Zhen-zhen, WANG Zhong-min, LU Jian, MAO Ai-wu, LIU Fen-ju. Department of Radiology, Affiliated Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200001, China

Corresponding author: MAO Ai-wu, E-mail: 13701814247@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the biological effect of ^{125}I seeds continuous low dose rate (CLDR) irradiation and ^{60}Co γ -ray high dose rate (HDR) irradiation on H1299 cell line of non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** H1299 cells in exponential growth were separately irradiated with ^{125}I seeds CLDR irradiation and ^{60}Co γ -ray HDR irradiation. The cell survival fraction was inspected with clone formation experiment, the cell cycle and apoptosis rate was determined with flow cytometry, and the expressions of Bax and Bcl-2 proteins were measured by Western blot method. **Results** With the irradiation dose increasing, the anti-proliferation effect of ^{125}I seeds CLDR irradiation on H1299 cells became more remarkable than that of ^{60}Co γ -ray HDR irradiation. When the irradiation dose reached 4 Gy, the G2/M phase percentage and the apoptotic ratio of H1299 cells in ^{125}I seeds CLDR irradiation group were $21.77\pm 0.31\%$ and $13.79\pm 0.50\%$ respectively, which were only $18.85\pm 0.99\%$ and $8.79\pm 0.22\%$ respectively in ^{60}Co γ -ray HDR irradiation group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). In ^{125}I seeds CLDR irradiation group the expression of Bax protein was remarkably up-regulated, while the expression of Bcl-2 protein was down-regulated. **Conclusion** The inhibition effect of ^{125}I seeds CLDR internal irradiation on the proliferation of

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2015.08.013

基金项目:上海市卫生计生委科研项目(20114014)

作者单位:200001 上海交通大学医学院附属仁济医院影像科(赵真真);上海交通大学医学院附属瑞金医院介入科(王忠敏)、卢湾分院放射科(陆 健);上海交通大学医学院附属同仁医院介入科(茅爱武);苏州大学医学部放射医学与防护学院放射生物教研室(刘芬菊)

通信作者:茅爱武 E-mail: 13701814247@163.com

H1299 cells is more obvious than that of ^{60}Co γ -ray HDR irradiation. In ^{125}I seeds CLDR irradiation group, the imbalance of Bcl-2/Bax ratio may play an important role in achieving the antitumor effect. (J Intervent Radiol, 2015, 24: 702-706)

【Key words】 ^{125}I seed continuous low dose rate irradiation; ^{60}Co γ -ray high dose rate irradiation; non-small cell lung cancer; apoptosis

目前美国癌症统计学数据表明,肺癌发病率位居恶性肿瘤第 2 位、死亡率居恶性肿瘤之首^[1],其中非小细胞肺癌(NSCLC)占有所有肺癌的 80%~85%^[2]。除放射治疗、化学治疗外,手术治疗仍是早期 NSCLC 患者治愈的主要手段,但相当一部分 NSCLC 患者确诊时病情已至中晚期,丧失了手术根治切除机会,5 年生存率约为 15%^[3]。对这部分 NSCLC 患者,放射治疗发挥着重要作用。本研究采用 ^{125}I 粒子持续低剂量率(CLDR)内照射和 ^{60}Co γ 射线高剂量率(HDR)外照射方式照射 NSCLC 细胞株,探讨照射后细胞生物学效应之间的差异。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和细胞照射

NSCLC 细胞株 H1299 由苏州大学医学部放射与防护学院放射生物学实验室惠赠,在含有 10% 胎牛血清(FBS)、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 DMEM 高糖完全培养基中培养,在 37℃、5%CO₂ 培养箱中孵育。 ^{125}I 粒子组 BT-125-1 型 ^{125}I 粒子购于上海欣科医药有限公司,采用室内 ^{125}I 粒子照射模型,CLDR 照射初始剂量率为 18.32 cGy/h,照射期间 ^{125}I 粒子模型始终置于细胞培养箱中; ^{60}Co γ 射线组采用苏州大学辐照中心钴源 ^{60}Co γ 射线,HDR 照射初始剂量率为 0.5 Gy/min;空白对照组实验条件与照射组相同。所有实验均在苏州大学医学部放射医学与防护重点实验室完成,并在细胞指数生长期进行;实验组以不同剂量 ^{125}I 粒子和 ^{60}Co γ 射线分别作 CLDR 照射和 HDR 照射,对照组照射剂量为 0 Gy。

1.2 克隆形成实验

取指数生长期 H1299 细胞,经胰酶消化后以不同细胞数接种于 35 mm 培养皿中。接种 24 h 后分别以 0、2、4、6、8 Gy 剂量行 ^{125}I 粒子 CLDR 照射和 ^{60}Co γ 射线 HDR 照射,照射后继续置于培养箱中孵育 10~14 d。然后经甲醇固定、结晶紫染色,计算克隆数。

1.3 流式细胞术检测细胞周期

取指数生长期 H1299 细胞,分别以 0、2、4、6、

8 Gy 剂量行 ^{125}I 粒子 CLDR 照射和 ^{60}Co γ 射线 HDR 照射。照射后将细胞继续置于细胞培养箱中孵育 24 h,经胰酶消化、离心、冰磷酸缓冲液(PBS)清洗,70%乙醇 4℃固定过夜,再次离心、PBS 清洗,加 10 mg/ml RNA 酶、1 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 碘化丙啶(PI)300 U 室温避光染色 15~30 min 后,采用流式细胞术检测照射后细胞周期分布情况。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

H1299 细胞接种 24 h 后,分别以 0、2、4、6、8 Gy 剂量行 ^{125}I 粒子 CLDR 照射和 ^{60}Co γ 射线 HDR 照射。照射后 48 h 按照膜联蛋白(annexin) V-异硫氰酸荧光素(FITC)/PI 双染凋亡试剂盒(南京铂优生物技术有限公司)说明书,依次加入 500 μl 缓冲液重悬细胞、5 μl annexin V-FITC、5 μl PI 室温避光染色 15~30 min,然后用流式细胞术检测照射后细胞凋亡率变化。细胞受到电离辐射损伤后,一旦 DNA 损伤修复失败或不可逆损伤积累到一定程度,将诱导细胞凋亡^[4]。

1.5 Western blot 检测 Bax、Bcl-2 蛋白表达

取指数生长期 H1299 细胞,分别以 0、4、8 Gy 剂量行 ^{125}I 粒子 CLDR 照射和 ^{60}Co γ 射线 HDR 照射。照射后 24 h 胰酶消化、离心、冰 PBS 清洗,蛋白裂解液抽提总蛋白,二辛可酸(BCA)法测定蛋白浓度。制备终体积 20 μl 含 50 μg 蛋白样品,经十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳电转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜(美国 Bio-Rad Laboratories 公司),5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,4℃孵育一抗: β -肌动蛋白(actin)、Bax、Bcl-2(武汉三鹰生物技术有限公司)过夜。用 TBST 洗膜,室温孵育辣根过氧化物酶(HRP)-山羊抗兔 IgG(H+L)、HRP-山羊抗大鼠 IgG(H+L)二抗(中国碧云天生物技术有限公司)1 h,再次洗膜,按比例涂 A、B 发光液,最后用增强化学发光(ECL)技术检测蛋白分子条带。

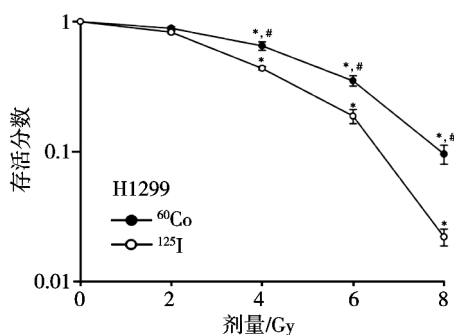
1.6 统计学分析

实验重复 3 次,同时设 3 个平行样,实验结果取均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s_x$)。两组间差异用 t 检验,多组间差异用单因素方差分析(ANOVA)。统计学检验水准 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 克隆细胞存活分数

如图 1 所示, 实验组两种电离辐射照射后 H1299 细胞克隆存活分数均较对照组明显降低 ($P < 0.05$), 4、6、8 Gy 照射时 ^{125}I 粒子组 H1299 细胞克隆存活分数较 ^{60}Co γ 射线组降低更显著 ($P < 0.05$), 但两者差异在照射剂量为 2 Gy 时并不明显。

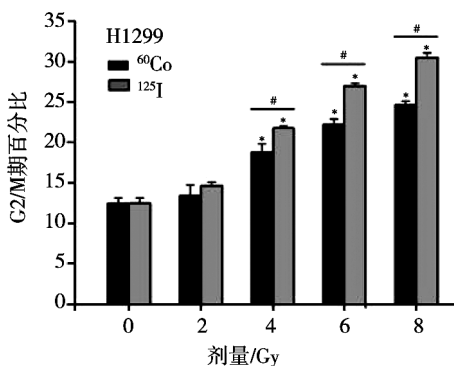


注: 误差线为标准误; ^{125}I 粒子组和 ^{60}Co γ 射线组与对照组 (0 Gy) 相比, $P < 0.05$; # 两种电离辐射间比较, $P < 0.05$

图 1 两种电离辐射照射后 H1299 细胞克隆存活分数

2.2 细胞周期分析

如图 2 所示, 与对照组相比, 实验组两种电离辐射以 4、6、8 Gy 照射时均使 H1299 细胞发生较明显的 G2/M 期阻滞, 但此差异在 2 Gy 时并不显著。 ^{125}I 粒子组比 ^{60}Co γ 射线组 G2/M 期阻滞效应更显著 ($P < 0.05$), 其中 4 Gy 照射时 ^{125}I 粒子组 H1299 细胞 G2/M 期百分比为 $(21.77 \pm 0.31)\%$, 而 ^{60}Co γ 射线组仅为 $(18.85 \pm 0.99)\%$ 。



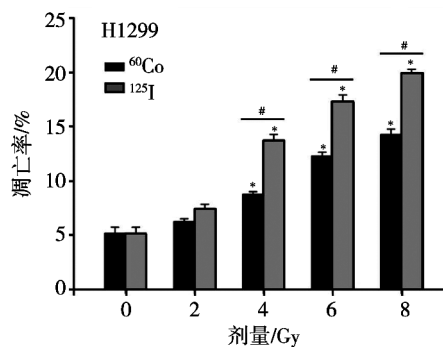
注: 误差线为标准误; ^{125}I 粒子组和 ^{60}Co γ 射线组与对照组 (0 Gy) 相比, $P < 0.05$; # 两种电离辐射间比较, $P < 0.05$

图 2 两种电离辐射照射后 H1299 细胞周期改变

2.3 细胞凋亡分析

如图 3 所示, 与对照组相比, ^{125}I 粒子组和 ^{60}Co γ 射线组在 4、6、8 Gy 照射时均使 H1299 细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$), 但 2 Gy 照射时细胞凋亡率差异

不明显; 相同照射剂量下, ^{125}I 粒子组 H1299 细胞凋亡率较 ^{60}Co γ 射线组更明显 ($P < 0.05$)。4 Gy 照射时 ^{125}I 粒子组和 ^{60}Co γ 射线组 H1299 细胞凋亡率分别为 $(13.79 \pm 0.50)\%$ 和 $(8.79 \pm 0.22)\%$ ($P < 0.05$)。

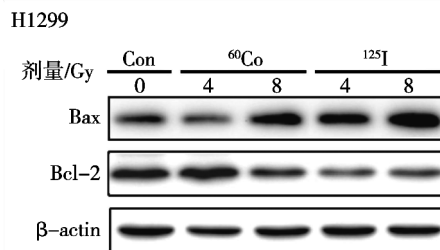


注: 误差线为标准误; ^{125}I 粒子组和 ^{60}Co γ 射线组与对照组 (0 Gy) 相比, $P < 0.05$; # 两种电离辐射间比较, $P < 0.05$

图 3 两种电离辐射照射后 H1299 细胞凋亡率差异

2.4 Bcl-2/Bax 蛋白比失衡

如图 4 所示, 与对照组相比, ^{125}I 粒子组和 ^{60}Co γ 射线组在 4、8 Gy 照射时均使 H1299 细胞中 Bax 蛋白表达明显上调, 同时 Bcl-2 蛋白表达明显下调, 这一效应在 ^{125}I 粒子组更明显。



注: Con: 对照组

图 4 两种电离辐射照射后 Bax、Bcl-2 表达水平

3 讨论

在我国, 肺癌发病率、死亡率均居恶性肿瘤之首。放射治疗在中晚期 NSCLC 综合治疗中占有重要地位。 ^{60}Co γ 射线 HDR 照射作为传统外照射治疗代表, 在多种恶性肿瘤治疗中发挥重要作用, 但由于其疗效与剂量相关, 随着剂量增加, 射线对病灶周围正常组织的损伤也增加, 临床应用时受到一定限制^[5]。近年来, ^{125}I 粒子 CLDR 内照射治疗以操作简单、定位精准、靶区内剂量高、靶区外剂量低等优点, 逐渐应用于局部治疗中晚期恶性肿瘤, 如胰腺癌、肺癌、结肠癌等^[6-9]。 ^{125}I 粒子 CLDR 内照射治疗是通过放射性核素 ^{125}I 在肿瘤组织局部释放出持续、近距离的射线, 最大程度杀伤肿瘤组织, 而正常组织损伤很小。有关 ^{125}I 粒子 CLDR 内照射和 ^{60}Co γ

射线 HDR 外照射作用于 NSCLC 细胞系的生物学效应的比较性研究却鲜见报道,本研究采用两种照射方式照射 NSCLC 细胞株,探讨照射后细胞生物学效应之差异。

相关研究表明,P53 缺失的癌细胞对放疗和化疗较为抵抗,P53 野生型癌细胞对放疗和化疗敏感性较好。Nishizaki 等^[10]研究表明,¹³⁷Cs γ 射线照射后细胞凋亡率为 H460 细胞>A549 细胞>H1299 细胞;重塑 H1299 细胞 P53 功能后,可增强 H1299 细胞对放疗和化疗的敏感性,进而使细胞凋亡率增加。本研究采用 P53 缺失的 NSCLC 细胞株 H1299,结果提示 ¹²⁵I 粒子 CLDR 照射较 ⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射抑制 H1299 细胞增殖的效应更显著,这与 Chen 等^[11]采用 NSCLC 细胞系 A549、小细胞肺癌(SCLC)细胞系 H446、Qu 等^[12]采用 NSCLC 细胞系 A549 所作研究结果的趋势一致。考虑到 ¹²⁵I 粒子照射时程较长及后续细胞状态等因素,本研究并未作野生型 P53 转染及其它 NSCLC 相关实验,但将会在本课题组后续研究中予以完善。

众所周知,细胞 DNA 受到电离辐射损伤时,其周期关卡效应被激活并导致细胞周期阻滞,继而激活 DNA 损伤修复信号通路或启动死亡程序,导致细胞发生不同命运^[13-14]。本研究中,¹²⁵I 粒子 CLDR 照射与 ⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射相比,导致 H1299 细胞发生更明显的 G2/M 期阻滞,这与 Wang 等^[15]、Liao 等^[16]以胰腺癌细胞、前列腺癌细胞作为实验模型的研究结果趋势一致。相关研究表明,同样电离辐射条件下 H1299 细胞发生 G2/M 期阻滞,而 A549 细胞发生 G1 期阻滞,p53 基因缺失的细胞在照射后很少发生 G1 期阻滞^[17]。

细胞凋亡是电离辐射诱导细胞死亡的一种主要机制。在应对电离辐射导致的 DNA 损伤时,细胞为了维持基因组稳定性,将激活多个信号转导通路,其中包括细胞周期关卡效应、DNA 损伤修复通路,一旦损伤修复失败或是不可逆损伤累积到一定程度,细胞凋亡将发生^[4]。本研究表明 ¹²⁵I 粒子 CLDR 照射比 ⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射引起更多 H1299 细胞发生凋亡。

以上实验表明,¹²⁵I 粒子 CLDR 外照射比 ⁶⁰Co γ 射线 HDR 内照射抑制 NSCLC 细胞系增殖的效应更明显。随后我们将着重于从蛋白水平探讨 ¹²⁵I 粒子 CLDR 照射和 ⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射抗增殖效应背后的潜在分子机制。电离辐射诱导凋亡主要经过线粒体依赖的内源性凋亡途径,凋亡进程中涉及一

系列凋亡相关蛋白,如 Bax、Bcl-2 及半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase)-3 等^[18]。相关研究表明,在前列腺癌、肺癌细胞中,¹²⁵I 粒子是通过下调促生长蛋白 Bcl-2 表达并激活 caspase 蛋白家族促使细胞凋亡,从而达到抑制肿瘤细胞生长的作用^[19]。其中 Bcl-2 蛋白主要发挥抑制凋亡、延长细胞存活的作用,肿瘤细胞中过表达 Bcl-2 蛋白多提示肿瘤细胞对治疗不敏感或不理想^[20]。另外,Bcl-2 蛋白家族中与 Bcl-2 蛋白作用相反的另一成员 Bax 蛋白,也称为促凋亡蛋白,主要发挥促进凋亡作用^[5]。通常细胞是否发生凋亡取决于 Bcl-2/Bax 蛋白比^[21]。本实验中,照射剂量为 4、8 Gy 时,¹²⁵I 粒子 CLDR 照射与 ⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射相比明显上调 H1299 细胞促凋亡蛋白 Bax 表达,同时下调促生长蛋白 Bcl-2 表达;这表明 Bcl-2/Bax 蛋白比失衡可能加速 H1299 细胞凋亡发生,但并不排除其它可能存在的机制。

综上所述,¹²⁵I 粒子 CLDR 内照射比 ⁶⁰Co γ 射线 HDR 外照射抑制 H1299 细胞增殖效应更明显,G2/M 期阻滞、Bcl-2/Bax 蛋白比失衡、最终诱导凋亡发生在 ¹²⁵I 粒子 CLDR 照射抗肿瘤效应中可能发挥重要作用。本研究虽仅着重于研究凋亡,但仍为中晚期 NSCLC 患者临床治疗提供了一些理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64: 9-29.
- [2] Fidias P, Novello S. Strategies for prolonged therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2010, 28: 5116-5123.
- [3] Whitehurst AW, Bodemann BO, Cardenas J, et al. Synthetic lethal screen identification of chemosensitizer loci in cancer cells[J]. Nature, 2007, 446: 815-819.
- [4] Sachs RK, Chen AM, Brenner DJ. Review: proximity effects in the production of chromosome aberrations by ionizing radiation [J]. Int J Radiat Biol, 1997, 71: 1-19.
- [5] Karakoyun-Celik O, Yalman D, Bolukbasi Y, et al. Postoperative radiotherapy in the management of resected non-small-cell lung carcinoma: 10 years' experience in a single institute[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010, 76: 433-439.
- [6] Lehnert S, Reniers B, Verhaegen F. Relative biologic effectiveness in terms of tumor response of ¹²⁵I implants compared with ⁶⁰Co gamma rays[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, 63: 224-229.
- [7] 骆红蕾, 喻晓娟, 李 进, 等. ¹²⁵I 粒子植入联合化疗治疗同期放化疗后局部复发的Ⅲ期非小细胞肺癌[J]. 中华核医学与分

- 子影像杂志, 2013, 33: 195-198.
- [8] 陆 健, 郑云峰, 张 欢, 等. CT 导引下植入 ^{125}I 粒子治疗 19 例晚期胰腺癌的疗效观察[J]. 介入放射学杂志, 2010, 19: 550-553.
- [9] 彭晶晶, 谭 勇, 谭 艳, 等. ^{125}I 粒子植入治疗结肠直肠癌肝转移[J]. 介入放射学杂志, 2012, 21: 773-776.
- [10] Nishizaki M, Meyn RE, Levy LB, et al. Synergistic inhibition of human lung cancer cell growth by adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in combination with docetaxel and radiation therapeutics in vitro and in vivo[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7: 2887-2897.
- [11] Chen H, Bao Y, Yu L, et al. Comparison of cellular damage response to low-dose-rate ^{125}I seed irradiation and high-dose-rate gamma irradiation in human lung cancer cells[J]. Brachytherapy, 2012, 11: 149-156.
- [12] Qu A, Wang H, Li J, et al. Biological effects of ^{125}I seeds radiation on A549 lung cancer cells: G2/M arrest and enhanced cell death [J]. Cancer Invest, 2014, 32: 209-217.
- [13] Iliakis G, Wang Y, Guan J, et al. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation[J]. Oncogene, 2003, 22: 5834-5847.
- [14] Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer[J]. Nature, 2004, 432: 316-323.
- [15] Wang J, Wang J, Liao A, et al. The direct biologic effects of radioactive ^{125}I seeds on pancreatic cancer cells PANC-1, at continuous low-dose rates[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2009, 24: 409-416.
- [16] Liao A, Wang J, Wang J, et al. Relative biological effectiveness and cell-killing efficacy of continuous low-dose-rate ^{125}I seeds on prostate carcinoma cells in vitro[J]. Integr Cancer Ther, 2010, 9: 59-65.
- [17] Geyer RK, Nagasawa H, Little JB, et al. Role and regulation of p53 during an ultraviolet radiation-induced G1 cell cycle arrest [J]. Cell Growth Differ, 2000, 11: 149-156.
- [18] Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics[J]. Dev Cell, 2011, 21: 92-101.
- [19] Ma JX, Jin ZD, Si PR, et al. Continuous and low-energy ^{125}I seed irradiation changes DNA methyltransferases expression patterns and inhibits pancreatic cancer tumor growth[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30: 35.
- [20] Groeger AM, Esposito V, De Luca A, et al. Prognostic value of immunohistochemical expression of p53, bax, Bcl-2 and Bcl-xL in resected non-small-cell lung cancers[J]. Histopathology, 2004, 44: 54-63.
- [21] Walensky LD. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of Life and death[J]. Cell Death Differ, 2006, 13: 1339-1350.

(收稿日期:2015-02-16)

(本文编辑:边 伟)