

·论著·

^{12}C 重离子与 γ 射线对人外周血淋巴细胞 Peng-EBV 增殖、细胞周期及凋亡影响的比较

董娟聪 刘红艳 党旭红 原雅艺 张慧芳 王超 段志凯 左雅慧

【摘要】目的 比较 ^{12}C 重离子与 γ 射线对人外周血淋巴细胞 Peng-EBV 增殖抑制率、细胞周期和凋亡率的影响。**方法** 对 Peng-EBV 细胞分别进行 2.0 Gy 的 ^{12}C 重离子和 γ 射线照射, 通过 MTS 法检测细胞增殖变化, 流式细胞术检测细胞凋亡率和周期分布。**结果** 2.0 Gy 重离子射线和 γ 射线作用后, Peng-EBV 细胞的增殖抑制率均显著升高。与对照组相比, 2.0 Gy 射线照射后 24、48、72 h 细胞增殖抑制率差异有统计学意义 (重离子射线: $t=10.53, 4.11, 37.30, P<0.05$; γ 射线: $t=7.18, 8.26, 26.11, P<0.05$)。 ^{12}C 重离子对细胞的增殖抑制率在照射后 72 h 内呈时间依赖性升高, 而 γ 射线则在照射后 48 h 时增殖抑制率最高, 而后降低。重离子射线照射后 12 h 和 24 h, 细胞凋亡率分别较对照组增加了 7.92 和 13.41 倍 ($t=7.09, 4.13, P<0.05$); 而 γ 射线照射后 12 h 和 24 h, 细胞凋亡率分别为对照组的 2.43 和 5.64 倍 ($t=8.98, 20.52, P<0.05$)。重离子射线照射后 12 h 和 24 h, 细胞 G₂/M 期阻滞程度分别较对照组增加 5.11 和 11.77 倍 ($t=12.06, 100.08, P<0.05$); 而 γ 射线照射后 12 h 和 24 h, 细胞 G₂/M 期阻滞程度分别为对照组的 5.82 和 7.68 倍 ($t=19.35, 10.30, P<0.05$)。**结论** ^{12}C 重离子对人外周血淋巴细胞造成的生物学效应远高于 γ 射线。

【关键词】 重离子; γ 射线; 淋巴细胞; 辐射; 生物效应

Effects of ^{12}C heavy ion and γ ray irradiation in cell growth, cell cycle and apoptosis of human peripheral blood lymphocytes Dong Juancong, Liu Hongyan, Dang Xuhong, Yuan Yayi, Zhang Huifang, Wang Chao, Duan Zhikai, Zuo Yahui. Department of Radiological Medicine, China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, China

Corresponding author: Zuo Yahui, Email: yahuiz@163.com

【Abstract】 Objective To compare the effects of carbon heavy ion and γ ray on cell survival, cell cycle and cell apoptosis. **Methods** Peng-EBV cells were irradiated by carbon heavy ion and X-ray. MTS was used to detect the cell survival. Cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. **Results** The proliferation inhibition rate of Peng-EBV cell was significantly increased after 2.0 Gy heavy ion rays and γ rays. Compared with the control group, the cell proliferation inhibition rate difference was statistically significant after 2.0 Gy rays at 24 h, 48 h, 72 h (heavy rays: $t=10.53, 4.11, 37.30, P<0.05$; γ rays: $t=7.18, 8.26, 26.11, P<0.05$). The cell proliferation inhibition rate showed a time-dependent increase, and reached its peak at 72 h after heavy ion rays, while the cell proliferation inhibition rate after γ ray reached its peak at 48 h, and then decreased. Compared with the control group, the apoptosis rate of Peng-EBV cell increased 7.92 and 13.41 times respectively at 12 h and 24 h after 2.0 Gy heavy ion rays ($t=7.09, 4.13, P<0.05$), while it was 2.43 and 5.64 times after 2.0 Gy γ rays ($t=8.98, 20.52, P<0.05$). Compared with the control group, the G₂/M phase arrest increased 5.11 and 11.77 times respectively at 12 h and 24 h after 2.0 Gy heavy ion rays ($t=12.06, 100.08, P<0.05$), however, it was 5.82 and 7.68 times after 2.0 Gy γ rays ($t=19.35, 10.30, P<0.05$). **Conclusion** ^{12}C heavy ion irradiation shows more stronger biological effects on human peripheral blood lymphocyte than γ ray.

【Key words】 Heavy ions; Gamma rays; Lymphocytes; Radiation; Biological effect

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.05.007

作者单位: 030006 太原, 中国辐射防护研究院放射医学室

通信作者: 左雅慧 (Email: yahuiz@163.com)

随着航天科技和肿瘤放射治疗技术的迅猛发展, 重离子生物效应研究已成为目前关注的热点。

免疫系统作为电离辐射敏感靶器官之一,在受到急性辐射损伤后,机体免疫功能受到抑制,免疫平衡失调,严重影响机体损伤的恢复。众所周知高剂量 X 或 γ 射线照射可以导致机体免疫功能受到严重抑制。最近越来越多的证据表明,重离子射线也会严重影响机体的免疫系统^[1-2]。由于重离子射线属于高传能线密度(linear energy transfer, LET)射线,传统的 X 或 γ 射线属于低 LET 射线。那么两种不同的 LET 射线对免疫系统的影响有何不同?为回答这一问题,本研究选择转化人淋巴细胞 Peng-EBV (Epstein-Barr virus)为研究对象,通过检测相同剂量照射后细胞增殖、凋亡及周期分布的变化,比较¹²C 重离子射线与 γ 射线对淋巴细胞的生物学效应的影响。本问题的阐明将为重离子生物效应研究和不同 LET 射线对免疫系统影响的机制研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Annexin V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶染料细胞凋亡试剂盒和碘化丙啶染料细胞周期试剂盒购自中国南京凯基生物科技发展有限公司,3-(4,5-二甲基吡啶-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑(MTS)一步法细胞活力检测试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.2 细胞系与分组

人外周血淋巴细胞 Peng-EBV 购自中国科学院昆明动物研究所。实验分为:对照组(不作任何照射处理)、2.0 Gy ¹²C 重离子射线照射组和 2.0 Gy γ 射线照射组。

1.3 照射条件

重离子束由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,每个原子核能量为 165 MeV,照射剂量率约为 0.3~0.5 Gy/min,单次吸收剂量为 2.0 Gy; γ 射线采用 ⁶⁰Co 治疗机(GWGP80,中国核动力研究设计院设备制造厂)发出,照射野 10 cm×10 cm,源靶距 80 cm。剂量率为 0.72 mGy/min,单次吸收剂量为 2.0 Gy。

1.4 细胞增殖实验

取对数生长期的细胞,用胰酶消化制备单细胞悬液,接种于 96 孔板中,每孔 100 μ l (约 15 000 个细胞),分别给予 2.0 Gy 的重离子束和 γ 射线照

射。用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定其吸光度(A)值。计算细胞的增殖抑制率,抑制率=(1-实验组 A 值/对照组 A 值)×100%。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

分别取 2.0 Gy 照射后 12、24 h 的细胞,制备成单细胞悬液,用 1×PBS 洗两遍,加入适量的 AnnexinV-异硫氰酸荧光素和碘化丙啶溶液,室温孵育 20 min。采用美国 Beckman Coulter 公司生产的 Cytomics FC500 流式细胞仪进行检测,收取细胞并用 EXP032 软件分析数据,记录凋亡细胞的百分数,每样收集 10 000 细胞,每组设有 3 个平行样。

1.6 流式细胞术检测细胞周期

分别取 2.0 Gy 照射后 12、24 h 的细胞,制备成单细胞悬液,严格按照细胞周期试剂盒说明书进行操作,每个样品设 3 个平行样。细胞周期结果用 Multicycle for windows 32-bit 软件分析 G₀/G₁、S、G₂/M 期细胞含量。

1.7 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 IBM SPSS Statistics V21.0 软件进行统计学分析,组间差异采用 *t* 检验,*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重离子射线和 γ 射线作用后 Peng-EBV 细胞增殖抑制率的时程变化

如图 1 所示,2.0 Gy 重离子射线和 γ 射线作用后, Peng-EBV 细胞的增殖抑制率均显著升高。与对照组相比,2.0 Gy 重离子射线照射后 24、48、72 h 细胞增殖抑制率差异有统计学意义 (*t*=10.53、4.11、37.30, *P*<0.05); 2.0 Gy γ 射线照射

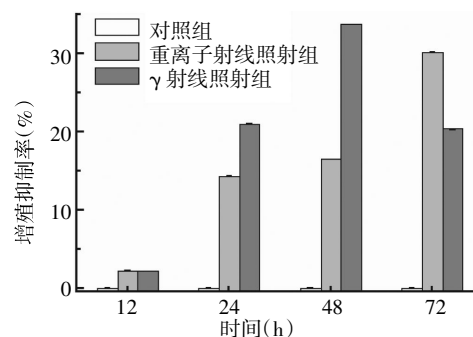


图 1 2.0 Gy 重离子射线和 γ 射线作用后 Peng-EBV 细胞增殖抑制率的变化

Fig.1 The proliferation inhibition rates changes of Peng-EBV cells after 2.0 Gy heavy ion rays and γ rays irradiation

后 24、48、72 h 细胞增殖抑制率差异有统计学意义($t=7.18、8.26、26.11, P<0.05$)。其中 γ 射线对 Peng-EBV 细胞的抑制程度呈时间依赖性增强,并于照射后 48 h 达到最强,而后稍有回落。而重离子射线则在照射后呈时间依赖性持续增强,并于 72 h 达到最高。但在照射后同一时间(24、48 h)时, γ 射线对 Peng-EBV 细胞的抑制程度高于重离子射线。

2.2 重离子射线和 γ 射线作用后 Peng-EBV 细胞凋亡率的时程变化

从图 2 可以看到,两种射线均可以诱导细胞发生显著凋亡,并且凋亡率随照射时间的延长而增高。其中重离子射线照射后 12 和 24 h,细胞凋亡率分别为对照组的 8.92 和 14.41 倍,两者间的差异具有统计学意义($t=7.09、4.13, P<0.05$);而 γ 射线照射后 12 和 24 h,细胞凋亡率分别为对照组的 2.43 和 5.64 倍,两者间的差异同样具有统计学意义($t=8.98、20.52, P<0.05$)。

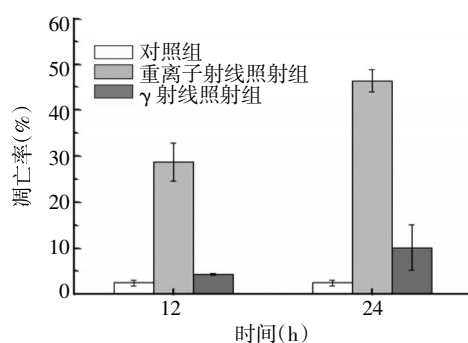


图 2 2.0 Gy 重离子射线和 γ 射线作用后 Peng-EBV 细胞凋亡率的变化

Fig.2 The cell apoptosis rates changes of Peng-EBV cells after 2.0 Gy heavy ion rays and γ rays irradiation

2.3 重离子射线和 γ 射线对 Peng-EBV 细胞周期进程的影响

从表 1 可以看出,重离子束照射后,可以诱导 Peng-EBV 细胞发生显著的 G₂/M 期阻滞,照射后 12 h 发生阻滞的程度较对照组增加约 5.11 倍,两者间的差异具有统计学意义($t=12.06, P<0.05$),而照射 24 h 后细胞发生阻滞的程度较对照组增加 11.77 倍,两者间的差异具有统计学意义($t=100.08, P<0.05$)。同时, γ 射线作用后也可以诱导细胞发生不同程度的 G₂/M 期阻滞,但其阻滞程度明显低于重离子束,照射后 12、24 h 的阻滞程度分别为对照组的 5.82 倍和 7.68 倍,两者间的差异具有统

表 1 2.0 Gy 重离子射线或 γ 射线作用后 Peng-EBV 细胞周期的变化(%, $\bar{x}\pm s$)

Table 1 The cell cycle changes of Peng - EBV after 2.0 Gy heavy ion rays or X rays irradiation(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
对照组	65.11±0.87	31.52±1.67	3.40±0.76
重离子射线照射组			
2.0 Gy-12 h	51.89±2.37	27.33±1.45	20.79±3.82
2.0 Gy-24 h	38.48±0.45	18.10±0.01	43.43±0.46
γ 射线照射组			
2.0 Gy-12 h	65.80±3.77	14.40±2.46	19.80±1.25
2.0 Gy-24 h	62.7±4.78	11.18±1.74	26.12±3.53

计学意义($t=19.35、10.30, P<0.05$)。

3 讨论

本研究采用 ⁶⁰Co γ 射线和 ¹²C 重离子两种具有不同 LET 的射线对人淋巴细胞 Peng-EBV 进行照射,重点观察两种射线对细胞增殖抑制率、凋亡率及周期分布的影响。结果显示,重离子射线和 γ 射线均可以使 Peng-EBV 细胞的增殖受到抑制,但在照射后 72 h 内,重离子束引起的细胞增殖抑制率呈时间依赖性持续升高,而 γ 射线则在照射后 48 h 增殖抑制率达到最高,而后回落。肖凤君等^[9]研究发现,2.0 Gy ¹²C 重离子抑制人外周血分离获得的淋巴细胞增殖,与本研究结果一致。而本研究中两种射线在相同剂量照射后增殖抑制率变化趋势的差异可能与其 LET 不同有关。⁶⁰Co γ 射线属低 LET 射线,低 LET 射线穿过生物体时产生的是稀疏电离,所致损伤比较简单且相对较易修复;而重离子属高 LET 射线,其穿过生物体时产生的是密集电离,所致损伤比较复杂且不易修复^[4],因此随着照射后时间的延长, γ 射线诱导的 DNA 损伤逐渐被修复,从而使射线对细胞的抑制能力减弱。另外汪传高等^[5]研究表明, ¹²C 重离子造成的人外周血淋巴细胞微核率明显高于 ⁶⁰Co γ 射线。因此 ¹²C 重离子对人外周血淋巴细胞持续较高的增殖抑制率也可能与其诱导的细胞微核率较高有关。本实验结果表明在照射后同一时间(24、48 h), γ 射线对淋巴细胞的抑制程度高于重离子射线。这可能与电离事件的饱和机理有关,靶学说观点认为射线要杀死细胞,必须给靶部位以足够的能量,稀疏电离辐射的带电离子径迹上的电离事件被分散在较长的间距中,同一靶部位发生多于一次电离事件几率不

大,随着LET的增加,径迹上的电离密度增大,靶部位发生的电离事件增多,对细胞的杀伤作用也随之增大^[6]。当LET高到一定程度时,致死损伤已经产生,多余的电离事件并不能对杀死细胞作出贡献,而产生超杀效应,造成能量的浪费。如果LET射线剂量再高,离子径迹间的几何空间变小,反而不利于电离事件的发生,而使失活效应降低^[7]。因此本研究结果所示的¹²C重离子在照射后相同时间时对淋巴细胞的增殖抑制率比 γ 射线低,可能与其较高LET产生的超杀效应有关。

众所周知,哺乳动物细胞的生长与增殖依赖于细胞周期的正常运转,细胞周期阻滞的发生会为损伤细胞的修复创造时间,修复成功的细胞周期正常运转,修复失败的细胞则进入凋亡途径。电离辐射作用可改变细胞的周期进程。细胞经过G₁期、S期和G₂/M期3个检查点来控制细胞周期进程。细胞的DNA损伤后将启动一个快速的磷酸化级联反应,通过人共济失调毛细血管扩张症突变基因和人共济失调毛细血管扩张症Rad3相关蛋白的转导,将损伤信号传至检测点激酶1或检测点激酶2,后者调控细胞周期蛋白/细胞周期依赖性蛋白激酶复合物,进而引起细胞周期阻滞^[8]。电离辐射主要引起细胞发生G₁或G₂/M期阻滞^[9]。本研究结果显示,重离子射线与 γ 射线作用后,Peng-EBV细胞G₂/M期检测点被激活,细胞将对损伤进行修复,且随着照射时间的延长阻滞程度增强;从凋亡率可以看出,大部分细胞已经发生凋亡,细胞的修复并没有成功。此外,实验结果表明,¹²C重离子射线造成的G₂/M期阻滞与凋亡率均高于 γ 射线。这可能与不同LET射线对DNA造成损伤的类型及修复程度不同有关,高LET射线造成的损伤以DNA簇损伤且以双链断裂为主,造成的损伤更难修复^[5],因此其诱导的淋巴细胞凋

亡发生率明显高于 γ 射线,提示具有高LET的¹²C重离子射线对人外周血淋巴细胞造成的生物效应远高于 γ 射线。

综上所述,¹²C重离子射线更易损伤人外周血淋巴细胞及免疫系统。而有效防护是重离子射线应用于肿瘤放射治疗及宇航员飞行防护中亟需解决的问题。本研究对重离子肿瘤治疗、宇航员宇宙飞行中受到的辐射损伤研究等具有重要的指导意义。

参 考 文 献

- [1] Chen Y, Chen X, Li Y, et al. Early effects of low dose Carbon ion or x-ray irradiation on peripheral blood lymphocytes of patients with alimentary tract cancer[J]. Dose Response, 2011, 9(3): 356-368.
- [2] 李益民,高力英,王小虎,等.碳离子束放射治疗对恶性肿瘤患者T细胞亚群的影响[J].现代肿瘤医学,2013,21(5): 1115-1117.
- [3] 肖凤君,杨月峰,王华,等.重离子辐射对人外周血T淋巴细胞生物学性能的影响[J].军事医学,2014,38(8): 630-632,637.
- [4] 王菊芳,周光明,李文建,等.不同LET碳离子对哺乳动物细胞的生物学效应[J].中华放射医学与防护杂志,2001,21(5): 325-327.
- [5] 汪传高,杜杰,曾发贵,等.不同LET低剂量辐射诱发人外周血淋巴细胞微核的剂量-效应关系[J].辐射防护,2011,3(4): 229-233.
- [6] 夏寿萱.放射生物学[M].北京:军事医学科学出版社,1998: 16-20.
- [7] Dong C, He M, Ren R, et al. Role of the MAPK pathway in the observed bystander effect in lymphocytes co-cultured with macrophages irradiated with γ -rays or Carbon ions[J]. Life Sci, 2015, 127(15): 19-25.
- [8] 魏巍,李文建,夏景光,等.不同LET辐射对HepG2肝癌细胞的辐射敏感性与周期阻滞的影响[J].核技术,2006,29(9): 679-684.
- [9] Shaltiel IA, Krenning L, Bruinsma W, et al. The same, only different-DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle[J]. J Cell Sci, 2015, 128(4): 607-620.

(收稿日期: 2015-03-16)