

^{125}I 粒子和 ^{60}Co γ 射线照射对 A549 及 BEAS-2B 细胞生物学效应的影响

赵真真 茅爱武 王忠敏 刘芬菊 曹燕 贾一平

【摘要】 目的 探讨 ^{125}I 粒子和 ^{60}Co γ 射线对非小细胞肺癌 (NSCLC) A549 细胞和正常支气管上皮 BEAS-2B 细胞生物学效应的影响。方法 A549、BEAS-2B 细胞均行 ^{125}I 粒子和 ^{60}Co γ 射线不同剂量照射; 集落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 检测凋亡相关蛋白的表达水平。结果 A549 细胞在 4、6、8 Gy 照射时, ^{125}I 粒子组细胞克隆存活分数较 ^{60}Co 组降低更明显 ($t = 6.06, 9.42, 4.90, P < 0.05$)。A549 细胞在 4 Gy 时, G_1 期细胞比例 ^{125}I 粒子组为 $70.67\% \pm 1.49\%$, ^{60}Co 组为 $59.59\% \pm 0.71\%$ ($t = 10.77, P < 0.05$); 细胞凋亡率 ^{125}I 粒子组为 $18.09\% \pm 0.73\%$, ^{60}Co 组为 $9.81\% \pm 0.16\%$ ($t = 19.40, P < 0.05$)。 ^{125}I 粒子照射明显上调 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白的表达, 同时下调 Bcl-2 蛋白的表达。但不同射线同一剂量或相同射线不同剂量下, BEAS-2B 细胞的凋亡率及凋亡相关蛋白的表达无明显变化。结论 ^{125}I 粒子持续低剂量率照射较 ^{60}Co γ 射线高剂量率照射抑制 A549 细胞增殖的效应更明显。Bcl-2/Bax 蛋白比失衡, 最终致 Caspase-3 蛋白的活化在 ^{125}I 粒子持续低剂量率照射抑制肿瘤细胞增殖的效应中可能发挥重要的作用。

【关键词】 ^{125}I 粒子; 低剂量率; ^{60}Co ; 高剂量率; 非小细胞肺癌; 细胞凋亡

The biological effects of ^{125}I seeds and ^{60}Co γ -rays on A549 and BEAS-2B cells Zhao Zhenzhen*, Mao Aiwu, Wang Zhongmin, Liu Fenju, Cao Yan, Jia Yiping. * Department of Radiology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200001, China

Corresponding author: Wang Zhongmin, Department of Radiology, Ruijin Hospital Luwan Branch, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200020, China, Email: wzm0722@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the biological effects of ^{125}I seeds and ^{60}Co γ -rays on the non-small cell lung cancer cells A549 and the normal bronchial epithelium cells BEAS-2B. **Methods** A549 and BEAS-2B cells were irradiated with ^{125}I seeds and ^{60}Co γ -rays. The survival fraction was detected by colony formation assay. The cell cycle and cell apoptotic ratio were detected by flow cytometry. The expression of cell apoptotic related proteins was examined by western blot. **Results** After irradiation with different doses, the survival of A549 cells irradiated with ^{125}I seeds was lower than that irradiated with γ -rays ($t = 6.06, 9.42, 4.90, P < 0.05$). After irradiation with 4 Gy of ^{125}I seeds and ^{60}Co γ -rays, the G_1 phase percentages of A549 cells were $70.67\% \pm 1.49\%$ and $59.59\% \pm 0.71\%$ ($t = 10.77, P < 0.05$), and the apoptotic ratios of A549 cells were $18.09\% \pm 0.73\%$ and $9.81\% \pm 0.16\%$ ($t = 19.40, P < 0.05$), respectively. ^{125}I seeds irradiation remarkably up-regulated the expressions of Bax and cleaved Caspase-3 proteins, down-regulated the expression of Bcl-2 proteins compared with ^{60}Co γ -rays irradiation on A549 cells. However, the apoptotic ratio and the expressions of apoptosis-related proteins in BEAS-2B cells had little difference between two types of radiation. **Conclusions** The anti-proliferative effect of ^{125}I seeds irradiation on A549 cell is more remarkably than that of ^{60}Co γ -rays. The imbalance of Bcl-2/Bax ratio and the eventually activation of Caspase-3 proteins may play an important role in the anti-proliferative effect induced by the continuous low dose radiation of ^{125}I -seeds.

【Key words】 ^{125}I seeds; Low dose rate; ^{60}Co ; High dose rate; Non-small cell lung cancer; Cell apoptosis

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2015.08.004

基金项目: 上海市卫计委科研项目(20114014); 中国博士后科学基金(2015T80489)

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); 东南大学医学院, 上海交通大学医学院附属瑞金医院卢湾分院(王忠敏); 上海交通大学医学院附属同仁医院介入科(茅爱武、曹燕、贾一平); 苏州大学医学部放射医学与防护学院(刘芬菊)

通信作者: 王忠敏, Email: wzm0722@hotmail.com

近年来,¹²⁵I 粒子持续低剂量率 (CLDR) 内照射治疗以其操作简单、定位精准、靶区内剂量高靶区外剂量低等优点逐渐应用于中晚期恶性肿瘤的局部治疗^[1-2],而传统的外照射治疗,如⁶⁰Co γ 射线高剂量率 (HDR) 照射局部,因其对周围正常组织的损伤较严重,一定程度上限制了它的临床应用。研究表明,¹²⁵I 粒子组织间植入治疗能有效抑制小鼠 Lewis 肿瘤生长^[3]。另有研究表明,放射性¹²⁵I 粒子植入对犬的各组织有不同程度损伤,但这种损伤可以通过自身的修复能力修复,临床应用是安全的^[4]。本研究采用非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞 A549、正常支气管上皮细胞 BEAS-2B,探讨两种照射方式对 NSCLC 细胞生物学效应影响的差异。

材料与方 法

1. 细胞培养:肺腺癌细胞系 A549、正常支气管上皮细胞 BEAS-2B 均由苏州大学放射生物学实验室刘芬菊教授惠赠,本研究所有实验均在苏州大学放射医学与防护学院省重点实验室完成。细胞在含有 10% FBS [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]、100 U/ml 青霉素、100 g/ml 链霉素 (上海碧云天生物技术有限公司) 的 DMEM [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司] 高糖培养基中培养,并置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育。

2. 细胞照射:本实验采用 Gray 实验室¹²⁵I 粒子照射模型^[5-6],该模型由聚苯乙烯材料制成,分上下两层,上层为细胞培养板,下层为¹²⁵I 粒子板,整个照射模型外形如抽屉式结构。¹²⁵I 粒子板为 6 个直径 35 mm 的圆环,每个圆环上等距离排列着 14 个凹槽、一一对应可放置 14 枚¹²⁵I 粒子,共可装载 84 枚粒子。上层细胞培养板可放置 6 个直径 35 mm 的细胞培养皿。细胞培养平面的吸收剂量以及不同照射剂量所需的照射时间通过测量和计算得出^[5]。¹²⁵I 粒子照射达到指定剂量所需时间计算公式为: $D_c = D_0(1.44T_{1/2})(1 - e^{-0.693t/T_{1/2}})$,式中, D_c 为经过 t 时间照射后的累积剂量, cGy; D_0 为放射性¹²⁵I 粒子的初始剂量率, cGy/h; $T_{1/2}$ 为¹²⁵I 粒子半衰期。本实验采用的 BT-125-1 ¹²⁵I 粒子购于上海欣科医药有限公司, $T_{1/2}$ 为 60.1 d, 单颗粒子的平均活度为 2.5 mCi (1 Ci = 3.7×10^{10} Bq), 细胞培养平面的初始剂量率为 18.32 cGy/h, 吸收剂量为 2、4、6、8 Gy 时的照射时间分别为 10.97、22、33.08、44.23 h。CLDR 照射期间,¹²⁵I 粒子模型一直置于

四周有透气孔的铅盒内,同时放置于细胞培养箱中,在满足细胞生长所需的 CO₂、水分进出铅盒的同时也防止放射线泄漏。

⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射采用苏州大学辐照中心 GWXJ80 型钴-60 远距离治疗机 (中国核动力研究设计院设备制造厂), 输出能量分别为 1.17 MeV 和 1.33 MeV 的两种光子, 平均能量为 1.25 MeV^[7], 照射源距细胞培养平面约 0.8 m, 细胞培养平面的初始剂量率为 0.5 Gy/min, 吸收剂量为 2、4、6、8 Gy 时照射时间分别为 4、8、12、16 min。所有实验均在细胞指数生长期进行, 分别行不同剂量的¹²⁵I 粒子 CLDR 照射和⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射, 对照组照射剂量为 0 Gy, 其他实验条件与照射组相同, 所有实验重复 3 次, 同时设 3 个平行样。

3. 克隆存活实验: 指数生长期的 A549 和 BEAS-2B 细胞经胰酶消化后, 以不同的细胞数接种于 35 mm 培养皿中。接种 24 h 后分别行¹²⁵I 粒子 CLDR 照射和⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射, 吸收剂量为 0、2、4、6、8 Gy, 细胞照射后继续置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育, 直至克隆形成, 约 10~14 d。然后经甲醇固定、结晶紫染色, 计算克隆数。

4. 流式细胞仪检测细胞周期: A549 和 BEAS-2B 细胞分别行 0、2、4、6、8 Gy ¹²⁵I 粒子 CLDR 照射和⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射。照射后 24 h, 细胞经胰酶消化, 离心半径 16 cm, 1 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清液, 冰 PBS 清洗 1~2 次, 70% 乙醇 4℃ 固定过夜, 再次离心 (条件同前次), 弃固定液, 冰 PBS 清洗 1~2 次后加 10 mg/ml RNA 酶及 300 μ l 500 μ g/ml PI, 室温避光染色 15~30 min, 行流式细胞仪检测。

5. 流式细胞仪检测细胞凋亡: A549 和 BEAS-2B 细胞分别行 0、2、4、8 Gy ¹²⁵I 粒子 CLDR 照射和⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射。照射后 48 h 按照 Annexin V-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 μ l 缓冲液重悬细胞, 5 μ l Annexin V-FITC, 5 μ l PI, 室温避光染色 15~30 min 后行流式细胞仪检测。

6. 蛋白印迹实验: A549 和 BEAS-2B 细胞分别行 0、4、8 Gy ¹²⁵I 粒子 CLDR 照射和⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射。照射后 24 h, 胰酶消化、离心 (条件同方法 4)、冰 PBS 清洗, 裂解缓冲液 (上海碧云天生物技术有限公司)、1 mmol/L PMSF (上海碧云天生物技术有限公司)、1 片蛋白磷酸酶抑制剂/10 ml 裂解缓冲液 (德国罗氏公司) 配成的蛋白裂解液抽提总蛋

白,BCA 法测定白浓度。制备终体积 20 μl 含有 50 μg 蛋白的蛋白样品,经 SDS-PAGE 电泳,依次电转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗: β -肌动蛋白,Caspase-3,Bax, Bcl-2(武汉三鹰生物技术有限公司)过夜。继而 TBST 洗膜,室温孵育辣根过氧化物酶-山羊抗兔 IgG (H+L)(上海碧云天生物技术有限公司),辣根过氧化物酶-山羊抗大鼠 IgG 二抗 1 h,TBST 洗膜,等比例涂 A、B 发光液最后行 ECL 发光系统检测蛋白分子条带。

7. 统计学处理:实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行分析,两组间差异比较用 t 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 克隆存活实验:如表 1 所示,A549 细胞在 ^{125}I 粒子 CLDR 照射和 ^{60}Co γ 射线 HDR 照射后,克隆存活分数较对照组明显降低 ($F = 262.1、254.2, P < 0.05$)。而 A549 细胞在 4、6、8 Gy 照射时, ^{125}I 粒子 CLDR 照射细胞克隆存活分数较 ^{60}Co γ 射线 HDR 照射低 ($t = 6.06、9.42、4.90, P < 0.05$),吸收剂量为 2 Gy 时两种电离辐射所致克隆存活分数之间差异无统计学意义。BEAS-2B 细胞在 ^{125}I 粒子 CLDR 照射和 ^{60}Co γ 射线 HDR 照射后,克隆存活分数较对照组明显降低 ($F = 225.2、249.9, P < 0.05$),但在同样照射条件下,两种电离辐射所致克隆存活分数之间差异无统计学意义。

表 1 A549、BEAS-2B 细胞在不同剂量 ^{125}I 粒子和 ^{60}Co γ 射线照射后克隆存活分数的差异 ($\bar{x} \pm s$)

| 细胞系 | 剂量 (Gy) | 样本数 | ^{125}I | ^{60}Co | t 值 | P 值 |
|---------|---------|-----|------------------|------------------|-------|-------|
| A549 | 0 | 3 | 1.00 \pm 0.00 | 1.00 \pm 0.00 | - | - |
| | 2 | 3 | 0.76 \pm 0.11 | 0.85 \pm 0.05 | 1.28 | 0.330 |
| | 4 | 3 | 0.19 \pm 0.04 | 0.47 \pm 0.05 | 6.06 | 0.026 |
| | 6 | 3 | 0.06 \pm 0.01 | 0.29 \pm 0.05 | 9.42 | 0.011 |
| | 8 | 3 | 0.01 \pm 0.01 | 0.07 \pm 0.03 | 4.90 | 0.039 |
| BEAS-2B | 0 | 3 | 1.00 \pm 0.00 | 1.00 \pm 0.00 | - | - |
| | 2 | 3 | 0.85 \pm 0.04 | 0.90 \pm 0.02 | 3.21 | 0.085 |
| | 4 | 3 | 0.58 \pm 0.04 | 0.61 \pm 0.03 | 1.80 | 0.214 |
| | 6 | 3 | 0.39 \pm 0.05 | 0.41 \pm 0.04 | 1.73 | 0.225 |
| | 8 | 3 | 0.20 \pm 0.04 | 0.21 \pm 0.05 | 0.33 | 0.774 |

注:“-”为无数据

2. 细胞周期分析:如表 2 所示,A549 细胞在 4、8 Gy 的 ^{125}I 粒子 CLDR 照射和 ^{60}Co γ 射线 HDR 照射后较对照组出现明显的 G_1 期阻滞 ($F = 163.8、39.0, P < 0.05$),并且 ^{125}I 粒子 CLDR 照射比 ^{60}Co γ

射线 HDR 照射导致 G_1 期阻滞效应更明显 ($t = 10.77、4.64, P < 0.05$),吸收剂量为 2 Gy 时细胞周期阻滞的差异并不明显。如表 3 所示,BEAS-2B 细胞在 ^{125}I 粒子 CLDR 照射和 ^{60}Co γ 射线 HDR 照射后均出现 G_2/M 期阻滞,但细胞周期阻滞的程度差异无统计学意义(表 3)。

表 2 A549 细胞在不同剂量 ^{125}I 粒子与 ^{60}Co γ 射线照射后 G_1 期细胞比例变化 ($\%, \bar{x} \pm s$)

| 剂量 (Gy) | 样本数 | ^{125}I | ^{60}Co |
|---------|-----|------------------|-------------------------------|
| 0 | 3 | 50.42 \pm 3.52 | 47.93 \pm 3.70 |
| 2 | 3 | 53.95 \pm 2.06 | 52.51 \pm 3.63 |
| 4 | 3 | 70.67 \pm 1.49 | 59.59 \pm 0.71 ^a |
| 8 | 3 | 80.29 \pm 2.65 | 70.72 \pm 1.21 ^a |

注:与同剂量 ^{125}I 比较, $t = 10.77、4.64, P < 0.05$

表 3 BEAS-2B 细胞在不同剂量 ^{125}I 粒子与 ^{60}Co γ 射线照射后 G_2/M 期细胞比例变化 ($\%, \bar{x} \pm s$)

| 剂量 (Gy) | 样本数 | ^{125}I | ^{60}Co |
|---------|-----|------------------|------------------|
| 0 | 3 | 12.03 \pm 1.01 | 11.19 \pm 1.09 |
| 2 | 3 | 12.66 \pm 1.35 | 12.60 \pm 1.85 |
| 4 | 3 | 16.86 \pm 0.51 | 15.58 \pm 0.83 |
| 8 | 3 | 22.81 \pm 2.65 | 21.14 \pm 1.16 |

3. 细胞凋亡分析:如表 4 所示,A549 细胞在 4 和 8 Gy ^{125}I 粒子 CLDR 照射和 ^{60}Co γ 射线 HDR 照射后细胞凋亡率较对照组明显升高 ($F = 149.9、217.3, P < 0.05$),2 Gy 照射时细胞凋亡率的差异无统计学意义。然而在同样的照射剂量下, ^{125}I 粒子 CLDR 照射所致 A549 细胞凋亡率较 ^{60}Co γ 射线 HDR 照射更高 ($t = 19.40、7.73, P < 0.05$)。但 BEAS-2B 细胞在两种辐射源照射后,细胞凋亡率之间差异无统计学意义。同时可以看出在 ^{125}I 粒子 CLDR 照射和 ^{60}Co γ 射线 HDR 照射后,A549 细胞凋亡率明显高于 BEAS-2B 细胞 ($t = 19.09、8.78、18.64、13.18, P < 0.05$)。

表 4 A549、BEAS-2B 细胞在 ^{125}I 粒子照射和 ^{60}Co γ 射线照射后凋亡率的差异 ($\%, \bar{x} \pm s$)

| 细胞系 | 剂量 (Gy) | 样本数 | ^{125}I | ^{60}Co |
|---------|---------|-----|------------------------------|-------------------------------|
| A549 | 0 | 3 | 6.06 \pm 0.76 | 6.00 \pm 0.65 |
| | 2 | 3 | 6.63 \pm 0.30 | 6.54 \pm 0.11 |
| | 4 | 3 | 18.09 \pm 0.73 | 9.81 \pm 0.16 ^a |
| | 8 | 3 | 25.53 \pm 1.72 | 16.55 \pm 1.04 ^b |
| BEAS-2B | 0 | 3 | 5.98 \pm 0.98 | 5.65 \pm 0.70 |
| | 2 | 3 | 6.48 \pm 0.26 | 6.25 \pm 0.29 |
| | 4 | 3 | 7.26 \pm 0.28 ^a | 7.07 \pm 0.39 ^c |
| | 8 | 3 | 8.69 \pm 0.30 ^b | 8.38 \pm 0.37 ^d |

注:与 A549 细胞同剂量 ^{125}I 比较,^a $t = 19.09、19.40, P < 0.05$; ^b $t = 18.64、7.73, P < 0.05$;与 A549 细胞同剂量 ^{60}Co γ 射线比较,^c $t = 8.78, P < 0.05$; ^d $t = 13.18, P < 0.05$

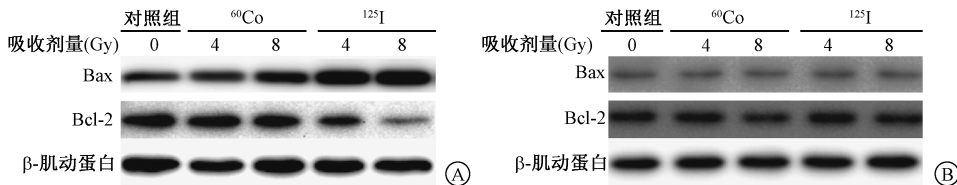


图 1 A549、BEAS-2B 细胞在¹²⁵I 粒子照射和⁶⁰Co γ 射线照射后 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平 A. A549 细胞;B. BEAS-2B 细胞

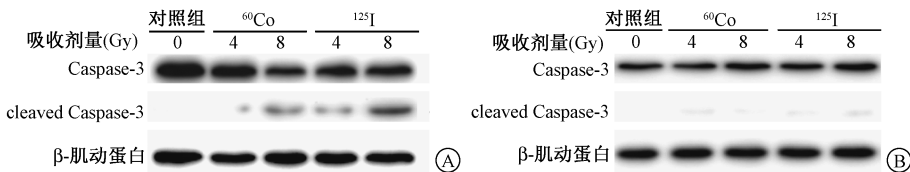


图 2 A549、BEAS-2B 细胞在¹²⁵I 粒子照射和⁶⁰Co γ 射线照射后 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平 A. A549 细胞;B. BEAS-2B 细胞

4. Bcl-2/Bax 蛋白比的失衡:如图 1A 所示, A549 细胞在 4、8 Gy 照射时与对照组相比 Bax 蛋白的表达明显上调,同时, Bcl-2 蛋白的表达明显下调。并且图 1A 提示 Bax 蛋白表达上调、Bcl-2 蛋白表达下调这一效应在¹²⁵I 粒子 CLDR 照射后更明显。但图 1B 提示同样的照射条件下, BEAS-2B 细胞 Bcl-2、Bax 蛋白的表达均没有发生明显的变化(图 1B)。

5. Caspase-3 蛋白的激活:如图 2A 所示, A549 细胞在 4、8 Gy 的¹²⁵I 粒子 CLDR 照射和⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射后 cleaved Caspase-3 蛋白的表达水平较对照组明显上调。此外,在同样的照射条件下¹²⁵I 粒子 CLDR 照射后 cleaved Caspase-3 蛋白的表达水平明显高于⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射。但在 BEAS-2B 细胞中,与对照组相比两种辐射源照射后 cleaved Caspase-3 蛋白的表达水平均没有明显的变化(图 2B)。

讨 论

¹²⁵I 粒子 CLDR 内照射治疗作为手术以及外照射治疗的备选或补充治疗措施,已逐渐应用于部分中晚期恶性肿瘤非手术患者的局部治疗^[2]。本研究选用 NSCLC 中肺癌细胞系 A549 以及正常支气管上皮细胞系 BEAS-2B 探讨两种照射方式对 NSCLC 细胞生物学效应影响的差异。

研究表明,¹²⁵I 粒子 CLDR 照射比⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射抑制 A549 细胞增殖的效应更明显,这一趋势和其他研究结果是一致的^[8]。同时正如 Nishizaki 等^[9]研究中所表明,相对于 NSCLC 细胞 A549 而言,正常 BEAS-2B 细胞对两种电离辐射均表现出了一定的辐射抗拒。

众所周知,在 DNA 受到电离辐射损伤时,周期关卡效应会导致细胞周期阻滞,继而激活 DNA 损伤修复信号通路或启动死亡程序,从而导致细胞发生不同的命运^[10]。本研究中,与⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射相比¹²⁵I 粒子 CLDR 照射导致 A549 细胞发生更明显的 G₁ 期阻滞,并与 Wang 等^[11]、Liao 等^[12]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。但 Wang 等^[11]的研究表明,在初始剂量率为 2.77 cGy/h、吸收剂量为 4 Gy 时 A549 细胞发生生长时程的 G₂/M 期阻滞,而本研究中¹²⁵I 粒子初始剂量率为 18.32 cGy/h,同样的照射剂量下 A549 细胞发生明显的 G₁ 期阻滞。初始剂量率、细胞状态等一系列因素的影响,可能是导致此差异的部分原因,但由于各方面的限制没有对该差异背后具体的机制进行深入的研究。同样的照射条件下, BEAS-2B 细胞表现为 G₂/M 阻滞,尽管两种电离辐射照射后细胞周期阻滞的程度并无明显差异。

当细胞受到电离辐射损伤时,尤其是 DNA 双链断裂损伤时, DNA 损伤感受器毛细血管扩张性共济失调突变基因(ataxia telangiectasia-mutated, ATM)会在短时间内通过自身磷酸化方式激活,继而引起组蛋白 H2AX 以及 DNA 依赖蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK)等一些 DNA 损伤修复相关的信号通路被激活。一旦 DNA DSB 损伤修复失败或者是不可逆的损伤累积到一定程度,细胞将会发生凋亡或死亡^[7]。其中 Bcl-2 蛋白主要发挥抑制凋亡、延长细胞存活的作用,在 NSCLC 患者中 Bcl-2 蛋白过表达者对治疗多不敏感或者不理想^[13]。Bax 与 Bcl-2 蛋白作用相反,主要发挥促进凋亡的作用^[4]。通常 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白二者之

间的比率决定了细胞是否发生凋亡^[14]。凋亡过程中 Caspase-3 蛋白是最重要的凋亡执行分子,通常 Caspase-3 蛋白的活化,即 cleaved Caspase-3 蛋白的出现标志着凋亡事件的发生^[15]。本研究表明,在 A549 细胞中,¹²⁵I 粒子 CLDR 照射比⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射导致更多的 A549 细胞发生凋亡,明显上调 Bax 蛋白和 cleaved Caspase-3 蛋白的表达,下调 Bcl-2 蛋白的表达,表明 Bcl-2 蛋白与 Bax 蛋白比率的失衡可能促进 A549 细胞凋亡的发生。通常认为随着剂量率的降低,照射时间逐渐延长,细胞杀伤作用也会逐渐减弱,但针对本研究中¹²⁵I 粒子 CLDR 照射比⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射导致更多的 A549 细胞发生凋亡这一结果可以用反剂量率效应和低剂量率高放射敏感性来解释,即当剂量率 < 1 Gy/h 时,随着剂量率的降低细胞的放射敏感性会逐渐升高^[16-17]。Wéra 等^[16] 和 Collis 等^[18] 的研究表明,反剂量率效应可能是由于低剂量率和低剂量照射时不能或不能有效的激活 ATM,其下游的组蛋白 H2AX 和 DNA PK 等 DNA 损伤修复相关蛋白也不能被有效激活,最终导致 Bcl-2 蛋白与 Bax 蛋白比率的失衡以及 Caspase-3 蛋白的激活,从而表现为低剂量率或低剂量照射后细胞凋亡率的增加。然而, BEAS-2B 在两种电离辐射照射后均产生细胞克隆存活分数轻微的降低、明显的 G₂/M 期阻滞,但凋亡率没有发生明显变化,与 A549 细胞相比 BEAS-2B 细胞表现出了一定的辐射抗拒,这与其他学者的研究结果相符^[9]。

¹²⁵I 粒子 CLDR 照射比⁶⁰Co γ 射线 HDR 照射抑制 A549 细胞增殖的效应更明显,与 A549 细胞相比, BEAS-2B 细胞对两种电离辐射表现出了一定的辐射抗拒。Bcl-2/Bax 蛋白比率的失衡、最终致 Caspase-3 蛋白的活化在¹²⁵I 粒子 CLDR 照射抑制肿瘤细胞增殖的效应中可能发挥重要的作用。但鉴于各方面的限制,本研究仅仅着重于研究凋亡,而没有更深入的研究 DNA 损伤修复以及细胞周期关卡效应。尽管如此,本研究仍为中晚期 NSCLC 患者的临床治疗提供了一些实验依据。

参 考 文 献

[1] 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(1):224-249.

[2] Wang ZM, Lu J, Liu T, et al. CT-guided interstitial brachytherapy of inoperable non-small cell lung cancer[J]. Lung

Cancer, 2011, 74(2):253-257.

[3] 陈志国. ¹²⁵I 粒子近距离植入与常规放射治疗对小鼠肺癌移植瘤作用的实验研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2007.

[4] 戚良晨,韩振国,杨斌,等. 放射性¹²⁵I 粒子植入对犬正常支气管、食管、肺动脉、肺静脉和肺泡结构的影响及安全性[J]. 吉林大学学报(医学版),2008,34(5):821-824.

[5] Aird EG, Folkard M, Mayes CR, et al. A purpose-built iodine-125 irradiation plaque for low dose rate low energy irradiation of cell lines *in vitro*[J]. Br J Radiol, 2001, 74(877):56-61.

[6] 王济东,王俊杰,赵勇,等. 放射性¹²⁵I 粒子持续低剂量率照射胰腺癌细胞株 PANC-1 相对生物学效应的研究[J]. 中华放射医学与防护杂志,2008,28(3):252-255.

[7] 苗利,李新民. 钴-60 治疗机射野剂量的测量分析[J]. 苏州大学学报(医学版),2012,32(2):170-173.

[8] Qu A, Wang H, Li J, et al. Biological effects of ¹²⁵I seeds radiation on A549 lung cancer cells: G₂/M arrest and enhanced cell death[J]. Cancer Invest, 2014, 32(6):209-217.

[9] 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(9):2887-2897.

[10] Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer[J]. Nature, 2004, 432(7015):316-323.

[11] Wang J, Wang J, Liao A, et al. The direct biologic effects of radioactive ¹²⁵I seeds on pancreatic cancer cell PANC-1, at continuous low-dose rates [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2009, 24(4):409-416.

[12] Liao A, Wang J, Zhuang H, et al. Relative biological effectiveness and cell-killing efficacy of continuous low-dose-rate ¹²⁵I seeds on prostate carcinoma cells *in vitro*[J]. Integr Cancer Ther, 2010,9(1):59-65.

[13] Groeger AM, Esposito V, De Luca A, et al. Prognostic value of immunohistochemical expression of p53, BAX, Bcl-2 and BclxL in resected non-small-cell lung cancers [J]. Histopathology, 2004, 44(1): 54-63.

[14] Walensky LD. Bcl-2 in the cross hairs: tipping the balance of life and death[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(8):1339-1350.

[15] Odonkor CA, Achilefu S. Modulation of effect or caspase cleavage determines response of breast and lung tumor cell lines to chemotherapy[J]. Cancer Invest, 2009, 27(4):417-429

[16] Wéra AC, Borlon C, Nuttens VE, et al. Comparison of the clonogenic survival of A549 non-small cell lung adenocarcinoma cells after irradiation with low-dose-rate beta particles and high-dose-rate X-rays [J]. Int J Radiat Biol,2012, 88(3):253-257.

[17] Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the radiologist [M]. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

[18] Collis SJ, Schwanning JM, Ntambi AJ, et al. Evasion of early cellular response mechanisms following low level radiation-induced DNA damage [J]. J Biol Chem,2004, 279(48): 49624-49632.