

文章编号: 1007-4627(2015)01-0105-05

## 碳离子辐射诱导秀丽隐杆线虫生殖细胞凋亡研究

刘家炉, 郭肖颖, 黎青青, 王婷, 卞坡, 吴李君

(中国科学院离子束生物工程学重点实验室,  
中国科学院合肥物质科学研究院技术生物与农业工程研究所, 合肥 230031)

**摘要:** 重离子辐射具有独特的深度剂量分布和较高的相对生物学效应, 被认为是理想的放疗手段。重离子的生物学效应在径迹形成过程中由多个物理参量共同决定, 而这些物理参量和离子入射深度紧密相关, 因此明确离子不同入射深度的生物学效应对重离子肿瘤放疗方案的设计和优化有着重要的理论和应用价值。使用兰州重离子研究装置 HIRFL-CSR 终端的碳离子束作为辐射源, 以活体模式动物线虫作为实验对象, 以线虫生殖细胞的凋亡水平作为生物学检测终点, 研究了 10 和 20 Gy 碳离子辐射在辐射的入口、坪区和峰区的当代生物学效应对后代个体基因组不稳定性的影响。结果表明: 10 和 20 Gy 碳离子辐射在三个不同的辐照区域内均显著增加了辐射当代的线虫生殖腺细胞的凋亡水平, 并表现出一定的辐射区域和辐射剂量依赖性。同时, 辐射诱导的后代个体基因组不稳定性也表现出一定的辐射区域和辐射剂量相关性。

**关键词:** 碳离子辐射; 秀丽隐杆线虫; 生殖细胞凋亡; 基因组不稳定性

**中图分类号:** Q691      **文献标志码:** A      **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.32.01.105

### 1 引言

重离子是指原子序数大于 2 的原子被剥掉或部分剥掉核外电子后的带正电荷的原子核, 重离子通过大型粒子加速器被加速成为重离子射线。作为高线性能量传输 (LET) 的电离辐射, 重离子辐射在靶组织内有明显的能量沉积峰(布拉格峰)和较高的相对生物学效应, 因此, 在对正常组织影响较小的前提下对肿瘤细胞具有很好的杀伤效果<sup>[1-2]</sup>。目前对于癌症的重离子治疗, 虽然其内在机制尚不完全明晰, 但研究表明重离子对于癌症细胞的杀灭与辐射诱导的肿瘤细胞凋亡密切相关<sup>[3-5]</sup>。另外, 重离子的生物学效应在径迹形成过程中由多个物理参量共同决定, 而且这些物理参量随离子入射深度的改变而改变, 因此明确重离子不同入射深度的生物学效应对重离子肿瘤放疗方案的设计和优化有着重要的理论和应用价值。然而到目前为止, 关于重离子辐射生物效应的深度分布的相关实验都是采用离体的细胞实验体系完成的。离体培养的细胞所处的微环境和信号调控机制都和个体内的细胞有很大的不同, 并不能很好地模拟个体对环境胁迫的生物学响应。因此在活体水平上研究重离子辐射的生物效应及其在深度分布上的差异对理解重

离子辐射机理有着更重要的意义。

秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 属于线形动物门、线虫纲动物, 是一种在土壤中自由生活的杆状蠕虫。线虫因其个体小(成虫体长约为 1 mm)、生长周期短、操作简单、易于观察、遗传背景清楚等特点被作为良好的模式生物广泛应用于遗传与发育生物学、行为与神经生物学、衰老与寿命、药物筛选等研究。同时, 秀丽隐杆线虫也被作为一个优良的活体动物模型广泛应用于辐射生物学研究领域, 并且在线虫上已经建立了多个与肿瘤相关的组织研究模型, 其中之一就是生殖细胞凋亡模型<sup>[6]</sup>。线虫的生殖细胞对电离辐射非常敏感, 经常被用来研究辐射诱导的细胞凋亡。在正常生理条件下, 为维持生殖细胞的稳态, 约 50% 的处于有丝分裂的生殖细胞会在发育过程中凋亡, 这一过程称为“生理性细胞凋亡”。环境胁迫能通过与生理性生殖细胞凋亡完全不同的信号转导途径诱导生殖细胞的凋亡, 而电子辐射主要通过 P53 相关的 DNA 损伤诱导的生殖细胞死亡机制来诱导生殖细胞凋亡<sup>[7]</sup>。研究表明在线虫生殖腺细胞内无论是生理性生殖细胞凋亡还是胁迫诱导的生殖细胞凋亡, 它们都是由 ced-9, ced-3 和 ced-4 组成的下游核心凋亡途径介导的<sup>[8-10]</sup>。另外, 线虫的许多基因

收稿日期: 2014-03-22; 修改日期: 2014-04-08

基金项目: 国家自然科学基金大科学装置联合基金(U1332127); 中国科学院近代物理研究所重离子束辐射生物医学重点实验室开放课题

作者简介: 刘家炉(1988-), 男, 安徽肥西人, 硕士, 从事生物物理学研究; E-mail: lmjl1999@163.com

通信作者: 卞坡, E-mail: bianpo@ipp.ac.cn.

和信号转导通路与高等动物, 包括人, 都有很高的同源性, 因此在线虫上获得的研究信息可以直接运用于高等动物。

本研究主要使用兰州重离子研究装置 HIRFL-CSR<sub>e</sub> 终端, 利用线虫体积小特点, 设计特定的实验, 以辐射后生殖细胞凋亡作为生物学检测终点, 研究重离子细胞损伤的当代效应和子代效应(基因组不稳定性), 为重离子更好地应用于肿瘤放疗提供一些理论基础。

## 2 实验材料和方法

### 2.1 线虫的培养和准备

实验所用线虫品系: N2 Bristol 野生型, 购自美国 NIH 资助的国际线虫种质中心(CGC)。线虫培养和同步化处理参照标准程序<sup>[11-12]</sup>。同步化具体过程为: 将怀卵成虫用 M9 洗下至 1.5 mL 的 EP 管, 待线虫沉降后弃上清, 再加 M9 至总体积为 0.7 mL, 依次加入 0.2 mL 体积分数为 20% 次氯酸钠, 0.1 mL 5 mol/L 的 NaOH 后颠倒混匀, 2 ~ 3 min 震荡一次至约 2/3 的虫体裂解后, 5500 r/min 离心 1 min, 弃上清, 用 1 mL M9 离心洗涤 3 次, 转移至含 3 mL M9 的一次性塑料培养皿(直径为 35 mm)中, 20 °C 孵化 24 h。辐照实验前线虫经过同步化处理并培养至 L4 期。

### 2.2 辐照

进行辐照实验时碳离子加速后能量为 350 MeV/u, 理论穿水深度为 205 mm, 最大能量沉积位置为 204 mm(水介质), 束斑大小为 5 cm×5 cm。根据碳离子的能量沉积曲线选择离子辐射的入口(即离子束照射到实验材料时不经过任何遮挡, 直接辐射在实验材料上), 平均能量为 338.4 MeV/u, Trim 程序模拟计算对应 LET 为  $3.702 \times 10^{-3}$  MeV/mm, 碳离子能量沉积的坪区(辐照时用 90 mm 降能片遮挡使实验材料辐射位置落在能量沉积的坪区位置), 平均能量为 241.7 MeV/u, 对应 LET 为:  $5.054 \times 10^{-3}$  MeV/mm, 以及用能量调制器展宽<sup>[13]</sup>后宽度为 5 mm 的峰区(辐照时用 204 mm 降能片遮挡使实验材料辐射位置处于能量沉积的展宽的峰区位置), 平均能量为 44.5 MeV/u, 对应 LET 为  $2.388 \times 10^{-2}$  MeV/mm。降能片的厚度选择由人工输入后系统自动控制, 线虫培养皿直径为 35 mm, 辐照时敞口垂直于束流方向放置, 同步化后培养到 L4 期的线虫置于正对着束流方向的培养基表面接受辐射, 如图 1 所示。辐照剂量为 10 和 20 Gy, 辐射剂量率为 0.35 Gy/min 左右。入口和坪区辐照时 1 Gy 对应的

粒子计数为  $3.18 \times 10^6$ , 峰区辐照时 1 Gy 对应粒子计数为  $1.06 \times 10^6$ 。

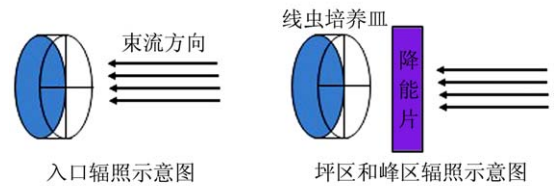


图 1 (在线彩图) 碳离子线虫辐照示意图  
坪区、峰区降能片厚度分别为 90 mm 和 204 mm。

### 2.3 辐射当代线虫生殖腺细胞凋亡检测

对于辐射当代, 在辐射完成后的 6, 12 和 24 h, 进行细胞凋亡的检测。细胞凋亡的测定参照 Kelly 等<sup>[14]</sup>的实验流程。具体过程是将处理后的线虫置于 24 孔板内, 加入 500  $\mu$ L 含 1% 的 OP50 的 M9 溶液, 以 25  $\mu$ g/mL 的吖啶橙染色 1 h, 然后将虫体吸出并置于 35 mm 含有 OP50 的 NGM 培养皿上恢复 40 min, 挑取线虫置于滴加有 30  $\mu$ L 20 mol/L 的  $\text{NaN}_3$  的载玻片中央, 使用奥林巴斯 BX51 荧光显微镜进行观察, 凋亡的细胞呈亮黄色或橙黄色, 未凋亡的细胞呈现均匀的浅绿色<sup>[15]</sup>。

### 2.4 辐射子代线虫生殖细胞凋亡检测

部分辐射当代的线虫辐照后转移到新涂的 OP50 NGM 板上继续培养直至其产卵并在其开始产卵 12 h 后将成虫移除, 待所产卵发育成为成虫后随机挑取一定数量的个体检测生殖腺细胞的凋亡情况, 剩余个体转移至新的涂有 OP50 的 NGM 板上继续培养以待传代和检测。

### 2.5 数据统计

每个辐照实验重复 3 次, 并且每次试验设置了 3 个平行组, 每组平行样品进行凋亡检测的线虫量至少为 25 条, 3 个平行试验结果统计后算得平均值, 3 次辐照实验的平均值以 Turkey 多重比较检验对照和不同辐照能量区域之间的差异, 显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 3 实验结果

### 3.1 重离子辐射诱导当代线虫生殖腺细胞凋亡

10 和 20 Gy 剂量碳离子辐射后, 在 6, 12 和 24 h 时间点分别检测处于不同辐射区域(入口、坪区和峰区)的线虫的生殖细胞凋亡水平。如图 2 所示, 对于 10 Gy 的辐射处理组, 尽管对照组的生殖细胞的凋亡水平随着时间有一个上升的趋势, 但是在这三个时间点之间并没有显著的差异( $P > 0.05$ )。10 Gy 碳离子辐射后, 无论是入口区、坪区和峰区的线虫相对于对照组其生殖细胞

的凋亡水平都有明显的增加。在辐射后的 6 和 12 h，坪区和峰区的线虫生殖腺细胞凋亡水平明显高于入口区的线虫。但是在辐射后的 24 h，入口、坪区和峰区的凋亡水平并没有明显的不同。有趣的是，在辐射入口区和坪区，线虫生殖细胞的凋亡水平随着辐射时间的推移而增加，但是在峰区，辐射后 12 h 凋亡水平就达到了最大值。

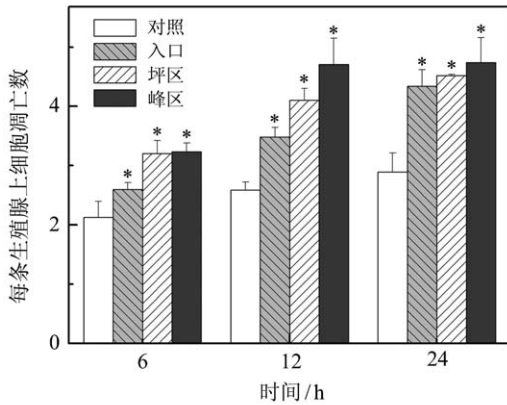


图 2 10 Gy 碳离子辐照后 6, 12, 24 h 测得生殖腺细胞凋亡数  
\* 表示与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

而对于 20 Gy 的碳离子辐射，在辐射后的不同时间点 (6, 12 和 24 h) 处于不同辐射区的线虫其凋亡水平相对于对照组都有明显的增加 ( $P < 0.05$ )，其中峰区辐照后的线虫的生殖细胞凋亡水平最高，如图 3 所示。然而与 10 Gy 辐射不同的是，生殖细胞的凋亡水平并不随着辐射后时间的增加而增加，相反在辐射后的 24 h，生殖细胞的凋亡水平与 6 和 12 h 相比却有下降的趋势。

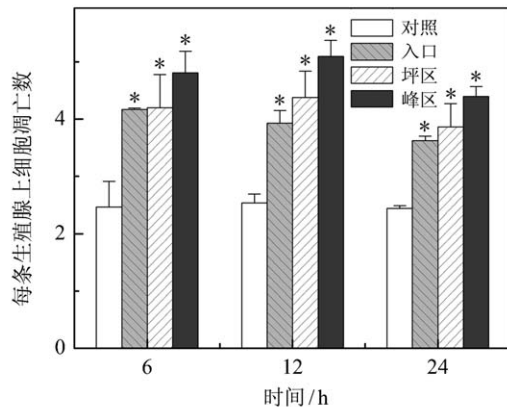


图 3 20 Gy 碳离子辐照后 6, 12, 24 h 测得生殖腺细胞凋亡数  
\* 表示与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 3.2 重离子辐射诱导的基因组不稳定性

研究表明，电离辐射不仅可以引起当代的辐射损伤效应，而且这种损伤也可以通过基因组不稳定性传递到后代<sup>[16]</sup>。因此本研究也检测了辐射后线虫 F1、F3 和 F5 代的生殖细胞凋亡的情况。

实验结果如表 1 所列，对于 10 Gy 碳离子辐射，处于三个辐射区的线虫的 F1、F3 和 F5 子代个体与对照组相比生殖细胞的凋亡水平都有增加的趋势 (F1 代坪区除外)，但只有辐射峰区的线虫其子代生殖细胞凋亡与对照相比有显著的增加。表 2 所列，对于 20 Gy 的碳离子辐射，处于三个辐射区的虫子的 F1、F3 和 F5 子代个体与对照组相比，生殖细胞凋亡水平也都有上升的趋势。但是在 F1 代，只有受到坪区和峰区辐照的线虫的生殖细胞凋亡水平与对照组相比有显著差异。而在 F3 代，

表 1 10 Gy 碳离子辐照线虫诱导子代生殖腺细胞凋亡

代数	辐照能量区域	生殖腺细胞凋亡数目/个
F1	对照组	2.34 ± 0.28
	入口	2.83 ± 0.35
	坪区	2.42 ± 0.63
	峰区	3.18 ± 0.41*
F2	对照组	2.28 ± 0.41
	入口	2.51 ± 0.36
	坪区	2.84 ± 0.08
	峰区	2.98 ± 0.10*
F3	对照组	2.41 ± 0.41
	入口	2.90 ± 0.31
	坪区	3.10 ± 0.37
	峰区	3.63 ± 0.39*

\* 表示与对照组比较有统计高差异。

表 2 20 Gy 碳离子辐照线虫诱导子代生殖腺细胞凋亡

代数	辐照能量区域	生殖腺细胞凋亡数目/个
F1	对照组	2.08 ± 0.08
	入口	2.56 ± 0.48
	坪区	2.54 ± 0.09*
	峰区	2.88 ± 0.47*
F3	对照组	2.14 ± 0.17
	入口	2.84 ± 0.33*
	坪区	2.55 ± 0.27
	峰区	3.04 ± 0.41*
F5	对照组	2.09 ± 0.09
	入口	2.76 ± 0.14*
	坪区	2.80 ± 0.01*
	峰区	2.95 ± 0.06*

子代线虫培养到成虫后测定生殖腺细胞凋亡数目。所有数据均为平均值 ± 标准误， $n \geq 25$ ，\*表示与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

入口和峰区辐照后线虫的生殖细胞凋亡水平与对照组相比有显著的增加。有趣的是,在 F5 代,入口、坪区和峰区辐照后线虫的生殖细胞凋亡水平与对照组相比都有显著的增加。从以上的数据分析可看出,当代线虫受到的辐射剂量、所处的辐射能量沉积区域的不同,对基因组不稳定性都有不同程度的诱导。

#### 4 讨论

本研究主要使用碳离子辐射活体动物线虫,检测辐射当代和辐射后代的生殖细胞凋亡的情况。对于当代,较小剂量的碳离子辐射(10 Gy)对生殖细胞凋亡的诱导有一个明显的时间过程,特别是在入口和坪区,而相对于较大剂量的碳离子辐射(20 Gy),线虫生殖细胞的凋亡水平在第一个检测时间点(辐射后 6 h)就达到了最大的诱导值。这些结果表明活体线虫对不同剂量的碳离子辐射在其当代有着不同的响应。线虫的生殖细胞的成熟要经历有丝分裂、过渡时期和减数分裂这一渐进的过程,而生殖细胞凋亡发生于较为靠后的减数分裂的粗线期。参照线虫生殖细胞的发育过程,对于辐射后 6 h 的凋亡检测,生殖细胞凋亡主要来自处于粗线期本身的细胞损伤,在这些效应细胞中,辐射损伤和辐射剂量应该有一定的正相关性。而对于辐射后 24 h 的检测,在这个时期内,前期的有丝分裂细胞已经进入到粗线期,因此我们检测到的凋亡主要是前期有丝分裂细胞的 DNA 损伤。对于 10 Gy 的碳离子辐射,这些前期细胞对所处的辐射区域(不同的径迹结构)并不敏感,而对于 20 Gy 碳离子辐射,辐射后 24 h 生殖细胞的凋亡水平有下降的趋势,表明大剂量的碳离子辐射可能对前期细胞有丝分裂产生了抑制作用。

有趣的是,碳离子辐射的后代个体也表现出了一定的生殖细胞凋亡水平的增加。对于 10 Gy 的碳离子辐射,只有在辐射的峰区的线虫其后代有生殖细胞凋亡水平增加的现象,而对于 20 Gy 的碳离子辐射,其子代生殖细胞凋亡除了在 F1、F3 和 F5 代的峰区均明显地增加外,其它两个区域(入口和坪区)在 F1、F3 和 F5 代并不稳定。重离子辐射在入口、坪区和峰区不但沉积的辐射剂量不同,而且有不同的径迹结构。研究表明重离子辐射的生物学效应和辐射离子的径迹结构是密切相关的<sup>[17]</sup>。因此,在本研究中,10 和 20 Gy 碳离子辐射在峰区对基因组不稳定性的稳定诱导,可能和峰区沉积的剂量和径迹结构都是密切相关的。另外,对于 20 Gy 的碳离子辐射,处于辐射的入口和坪区的线虫在 F1 和 F3

代生殖细胞的凋亡水平的增加并不稳定,而在 F5 代均有明显地增加,表明辐射损伤通过基因组不稳定性在代间的传递尽管是持续的,但并不是在每一代都有表现。

总体上,本研究使用碳离子辐射活体线虫研究了不同剂量和能量沉积区域对辐射当代和后代线虫生殖腺细胞凋亡的诱导情况,发现 10 和 20 Gy 碳离子辐射在三个不同的辐照区域内均显著增加了辐射当代的线虫生殖腺细胞的凋亡水平,并表现出一定的辐射区域和辐射剂量依赖性。同时,辐射诱导的后代个体基因组不稳定性也表现出一定的辐射区域和辐射剂量相关性。该工作可为重离子辐射放疗和辐射防护提供一定的理论基础。

#### 参考文献:

- [1] MA Lin, ZHOU Guixia, FENG Linchun. High LET (heavy ion and fast neutron) Malignant Tumors Therapeutic Radiology[M]. Beijing: Military Medicine Science Press, 2006: 1. (in Chinese). (马林,周桂霞,冯林春.恶性肿瘤高LET(重离子、快中子)放射治疗学[M].北京:军事医学科学出版社,2006:1.)
- [2] LI Q, KANAI T, KITAGAWA A. Physics in Medicine and Biology, 2003, **48**: 2971.
- [3] TSUJIMOTO Y. Oncogene, 1989, **4**: 1331.
- [4] STAFFER N J, STRUSCHKE M, SAK A, et al. Int J Cancer, 1995, **62**: 58.
- [5] R MEYN E, STEPHENS L C, ANG K K, et al. Int J Radiat Biol, 1993, **64**: 583.
- [6] WEIDHAAS J B, EISENMANN D M, HOLUB J M, et al. PNAS, 2006, **103**: 9946.
- [7] YUAN J, SHAHAM S, LEDOUX S, et al. Cell, 1993, **75**: 641.
- [8] YUAN J, HORVITZ H R. Development, 1992, **116**: 309.
- [9] HENGARTNER M O, HORVITZ H R. Nature, 1994, **369**: 318.
- [10] OKAMURAS, ARAKAWAH, TANAKA T, et al. Mol Cell, 2001, **8**(1): 85.
- [11] BRENNER S. Genetics, 1974, **77**: 71.
- [12] SULSTON J, HODGKIN J. Methods in the Nematode *Caenorhabditis elegans*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988: 587.
- [13] LI Qiang, WEI Zengquang, LI Wenjiang, et al. Chinese Physics C, 1998, **22**(7): 646. (in Chinese) (李强,卫增泉,李文建,等.中国物理C,1998,**22**(7):646.)
- [14] KELLY K O, DERNBURG A F, STANFIELD G M, et al. Genetics, 2000, **156**: 617.
- [15] KASTEN F H. Int Rev Cytol, 1967, **21**: 141.
- [16] KRONENBERG A. Int J Radiat Biol, 1994, **66**(5): 603.
- [17] WANG Ting, LI Fanghua, LIU Qingfang, et al. Mutation Research /Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2012, **737**: 51.

## Effects of Carbon Ion Irradiation on the Germ Cell Apoptosis in *Caenorhabditis Elegans*

LIU Jialu, GUO Xiaoying, LI Qingqing, WANG Ting, BIAN Po, WU Lijun

(Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Institute of Technical Biology and Agricultural Engineering  
Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

**Abstract:** Heavy ion irradiation is a perfect means in radio-therapy due to its special depth dose distribution and high relative biological effects. The biological effects of heavy ion irradiation are determined by some major physical parameters, and vary along the tracks of heavy ions. Therefore, it is very significant for the tumor radio-therapy to investigate the biological effects along whole range of heavy ion radiation. In the present study, *Caenorhabditis elegans*, a model *in vivo*, was irradiated by carbon ion beams from HCRFL-CSRe, The level of germ cell apoptosis of worms was used as a checking endpoint for DNA damage, the effects of carbon irradiation located in the entrance, plateau and peak regions on the genomic instability of the irradiated worm and their progeny were detected. The results showed that the 10 and 20 Gy of carbon ion radiations led to the increased germ cell apoptosis in irradiated worms and these effects depend on the worm location along the range of carbon ions and the irradiation dosage. The results also suggested that heavy ion irradiation induced the up-regulated genomic instability in their progeny, and might be related to both the irradiation dose and the irradiated location.

**Key words:** Carbon ion irradiation; *Caenorhabditis elegans*; Germ cell apoptosis; genomic instability

---

**Received date:** 22 Mar. 2014; **Revised date:** 8 Apr. 2014

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (U1332127); Open Research Program from Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences

**Corresponding author:** BIAN Po, E-mail: bianpo@ipp.ac.cn.

<http://www.npr.ac.cn>