

X射线对A375细胞凋亡和增殖影响研究

王景阳^{1*}, 郭家齐¹, 瞿 瑛¹, 袁志祥¹, 侯 涛², 朱律韵^{1#}, 邵 彤^{1#}

¹国防科技大学理学院, 湖南 长沙

²中南大学湘雅二医院肿瘤科, 湖南 长沙

收稿日期: 2025年5月8日; 录用日期: 2025年6月4日; 发布日期: 2025年6月12日

摘 要

目的: 本研究旨在探讨X射线对人黑色素瘤细胞A375的放射损伤效应及其分子机制。方法: 采用0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy、10 Gy的X射线梯度辐射A375细胞, 辐射后48小时, 利用CCK-8法检测细胞活性, CFSE标记法检测细胞增殖, Annexin V-FITC/PI双标法检测细胞凋亡, 并确定半数致死剂量(LD50)。采用LD50剂量X射线处理A375细胞, 辐射后培养48小时后, 提取细胞总RNA并进行转录组测序。通过差异基因分析及GO和KEGG富集分析解析分子机制, 并对关键差异基因进行qRT-PCR验证。结果: 与0 Gy组相比, 2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy和10 Gy辐射后48小时, 细胞凋亡率分别为27.02%、41.42%、58.25%、71.73%和82.55%, 增殖率分别为31.57%、25.67%、21.37%、11.13%和7.68%。转录组分析显示, X射线辐射处理组有254个显著差异基因, 其中上调234个, 下调20个。GO和KEGG分析表明, 上调差异基因显著富集于炎症反应、免疫应答及NF- κ B信号通路等凋亡相关功能与通路; 下调差异基因显著富集于细胞周期调控及DNA损伤修复相关通路。qRT-PCR验证结果与转录组数据一致, 进一步证实了实验结果的可靠性。结论: X射线通过激活凋亡信号通路、抑制细胞周期及DNA修复通路调控A375细胞, 该结果为放射治疗提供了一定的理论依据。

关键词

X射线, A375细胞, 凋亡, 增殖, 转录组测序

Investigation of the Impact of X-Ray on Apoptosis and Proliferation in A375 Cells

Jingyang Wang^{1*}, Jiaqi Guo¹, Ying Qu¹, Zhixiang Yuan¹, Tao Hou², Lvyun Zhu^{1#}, Tong Shao^{1#}

¹College of Sciences, National University of Defense Technology, Changsha Hunan

²Department of Oncology, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha Hunan

Received: May 8th, 2025; accepted: Jun. 4th, 2025; published: Jun. 12th, 2025

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 王景阳, 郭家齐, 瞿瑛, 袁志祥, 侯涛, 朱律韵, 邵彤. X射线对A375细胞凋亡和增殖影响研究[J]. 生物过程, 2025, 15(2): 167-176. DOI: 10.12677/bp.2025.152023

Abstract

Objective: This study aims to investigate the radiological damage effects of X-ray irradiation on human melanoma A375 cells and explore the underlying molecular mechanisms. **Methods:** A375 cells were irradiated with X-rays at doses of 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy, and 10 Gy. After 48 hours, cell viability was assessed using the CCK-8 assay, cell proliferation was measured by CFSE labeling, and apoptosis was detected using Annexin V-FITC/PI double staining. The median lethal dose (LD50) was determined. Subsequently, A375 cells were treated with X-rays at the LD50 dose, and total RNA was extracted after 48 hours for transcriptome sequencing. Differential gene expression analysis, along with GO and KEGG enrichment analyses, was performed to elucidate the molecular mechanisms. Key differentially expressed genes were further validated by qRT-PCR. **Results:** Compared to the 0 Gy group, the apoptosis rates at 48 hours post-irradiation with 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy, and 10 Gy were 27.02%, 41.42%, 58.25%, 71.73%, and 82.55%, respectively, while the proliferation rates were 31.57%, 25.67%, 21.37%, 11.13%, and 7.68%, respectively. Transcriptome analysis revealed 254 significantly Differentially expressed genes (DEGs) in the X-ray irradiated groups, including 234 upregulated and 20 downregulated genes. GO and KEGG analyses indicated that the upregulated DEGs were significantly enriched in apoptosis-related functions and pathways, such as inflammatory response, immune response, and the NF- κ B signaling pathway, while the downregulated DEGs were significantly enriched in pathways related to cell cycle regulation and DNA damage repair. The qRT-PCR validation results were consistent with the transcriptome data, further confirming the reliability of the identified DEGs. **Conclusion:** X-ray irradiation exerts its regulatory effects on A375 cells by activating apoptotic signaling pathways while concurrently inhibiting cell cycle progression and DNA repair mechanisms, thereby providing a theoretical foundation for the application of X-ray-based radiotherapy in melanoma treatment.

Keywords

X-Ray, A375 Cell, Apoptosis, Proliferation, Transcriptome Sequencing

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

X 射线是最常见的电离辐射[1], 具有能量高, 穿透性强的特点, 广泛应用于医学影像诊断和肿瘤放射治疗[2]。但 X 射线对正常组织存在显著的损伤效应[3]。皮肤作为人体暴露于辐射的主要屏障组织, 容易受到急性或慢性辐射损伤, 表现为红斑、色素沉着、皮肤老化甚至溃疡[4], 其生物学机制主要涉及 DNA 损伤、细胞周期阻滞、凋亡及炎症反应等[5]。

A375 细胞系是一种来源于人类恶性黑色素瘤的细胞模型[6], 因其与黑色素瘤的高度相关性以及在皮肤损伤研究中的广泛应用而备受关注[7]。该细胞系不仅被广泛用于皮肤相关疾病的基础研究, 还在药物筛选、治疗策略开发及辐射生物学研究中发挥了重要作用。研究表明, A375 细胞在辐射暴露下表现出显著的 DNA 损伤应答机制, 包括对 DNA 双链断裂的高敏感性和修复能力的调控, 这使其成为研究放射生物学效应及探索放射治疗机制的理想模型[8] [9]。此外, A375 细胞在辐射诱导的细胞周期阻滞和凋亡调控中的独特表现, 进一步增强了其在放射治疗研究中的应用价值。

本研究通过 X 射线照射 A375 细胞, 结合细胞增殖与凋亡检测、转录组学分析及 qRT-PCR 验证实

验,系统解析了电离辐射对细胞增殖与凋亡的调控机制。研究发现,X射线通过诱导细胞周期阻滞、抑制DNA修复机制以及激活凋亡相关信号通路(如NF- κ B信号通路),显著调控A375细胞的辐射应答。这些结果为阐明放射性皮肤损伤的分子机制提供了重要依据,同时为开发基于辐射防护或治疗的皮肤损伤防治策略奠定了理论基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

DMEM、PBS、青霉素-链霉素溶液、胰酶细胞消化液(0.25%胰酶,不含EDTA)(美国HyClone公司);胎牛血清(普诺赛生物科技股份有限公司);Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(伊莱瑞特生物科技股份有限公司);CFSE细胞增殖与示踪检测试剂盒、CCK-8试剂、qPCR SYBR Green Master Mix试剂(翌圣生物科技有限公司);T25培养瓶、96孔板(美国Corning公司);RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit试剂、Heracell 150 i CO₂细胞恒温培养箱(美国Thermo公司);FACS Canto II流式细胞检测仪(美国Becton Dickinson公司)。

2.2. 方法

2.2.1. 细胞培养及实验分组

A375细胞株由本实验室保存,用含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素溶液的DMEM培养基在37℃、5%CO₂饱和湿度的条件下培养。在X射线照射前24 h铺板于T25培养瓶,铺板密度为 1.5×10^6 个/瓶。根据照射剂量分为6组,各组照射剂量分别为0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy和10 Gy。

2.2.2. 细胞照射

使用湘雅附二医院肿瘤中心X射线源,照射野 $30 \times 30 \text{ cm}^2$,以500 cGy/min剂量率照射对数生长期的A375细胞。

2.2.3. CCK-8法检测细胞活性

将A375细胞以8000个细胞/孔接种在96孔板中,使用DMEM完全培养基培养24 h后,进行X射线梯度照射,照射后更换培养基,继续孵育。48 h后,更换培养基,向96孔板中加入含10% CCK-8试剂的DMEM培养基,在CO₂培养箱继续孵育2 h,用酶标仪在450 nm处检测光密度值,每次检测均设置空白孔,细胞活性计算:细胞活性(%) = $[A(\text{照射孔}) - A(\text{空白孔})] / [A(\text{对照孔}) - A(\text{空白孔})]$ 。每次实验设置3个复孔。

2.2.4. Annexin V-FITC/PI双标法检测细胞凋亡

X射线照射后培养48 h;消化细胞,300 × g离心5 min,弃上清,收集细胞,PBS洗涤2次,重悬细胞并计数;每个样本取 5×10^5 重悬细胞,300 × g离心5 min,弃上清,加入100 μL稀释的1 × Annexin V Binding Buffer重悬细胞;细胞悬液中加入2.5 μL Annexin V-FITC染色液和2.5 μL的PI染色液;轻柔涡旋混匀后,室温避光孵育15 min;加入400 μL稀释的1 × Annexin V Binding Buffer,混匀样本,流式细胞仪上机检测,每次实验重复3次。

2.2.5. CFSE细胞增殖检测

照射前24 h,消化、离心收集细胞,利用1 × 细胞染色缓冲液重悬细胞,并调整细胞浓度为 5×10^6 个/mL;加入1 mL CFSE工作液(2×),轻轻混匀,室温避光孵育10 min;加入10 mL完全细胞培养基,颠倒数下混匀,1000 × g离心5 min,弃上清;加入10 mL完全细胞培养基,室温避光孵育10 min,1000 × g离心5 min,弃上清,用完全培养基重悬,铺板。

X射线照射后培养48 h;室温避光条件下,消化细胞,500 × g离心5 min,弃上清,收集细胞,PBS

洗涤 1 次，重悬细胞并计数；每个样本取 5×10^5 个重悬细胞， $500 \times g$ 离心 5 min，弃上清，加入 500 μL PBS 重悬细胞，混匀样本，流式细胞仪上机检测。每次实验重复 3 次。

2.2.6. 细胞差异基因分析与富集分析

在 R 4.2.2 软件中，利用 DESeq2 程序包结合 RNA-seq 比对定量获得的 counts 表达矩阵，分析组间差异基因，显著差异基因的筛选阈值为 $\log_2\text{FoldChange}$ 绝对值大于 1，Pvalue 小于 0.05。利用 ggplot2 包绘制所有显著差异基因的火山图。下载 GO 数据库及 KEGG 数据库的最新数据并进行整合，作为后续富集分析的背景文件，利用 clusterProfiler 包结合整理的富集背景文件，对显著差异基因结果进行上下调基因的 GO 及 KEGG 富集分析。

2.2.7. qRT-PCR 检测 mRNA 表达水平

将 RNA 逆转录成 cDNA。在无 RNA 酶管中配制如下体系混合液：Oligo (dT)₁₈ primer 1 μL ，Random Hexamer primer 1 μL ，模板 RNA 2 μL ，无 RNA 酶水 8 μL ， $5\times$ Reaction Buffer 4 μL ，RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μL) 1 μL ，10 mM dNTP Mix 2 μL ，RevertAid M-MuLV RT (200 U/ μL) 1 μL 。上机逆转录，反应条件：42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min，70 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

在 qPCR 管中配制如下反应体系的混合液：qPCR SYBR Green Master Mix (No Rox) 10 μL ，上下游引物各 1 μL ，cDNA 模板 1 μL ，ddH₂O 7 μL ，上机进行扩增反应。反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 5min，1 个循环；95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，40 个循环。每组设置 3 个复孔，数据以 GAPDH 基因为内参进行标准化，采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析基因相对表达水平，引物序列见表 1。

Table 1. Primer sequences for qPCR

表 1. qPCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
GAPDH	F: TCCAAAATCAAGTGGGGCGA
	R: AAATGAGCCCCAGCCTTCTC
IL1A	F: GCGTTTGAGTCAGCAAAGAAGT
	R: CATGGAGTGGGCCATAGCTT
CCL4	F: CCCAGCCAGCTGTGGTATTC
	R: CTCATGGAGAAGCATCCGGG
CXCL10	F: CCACGTGTTGAGATCATTGCT
	R: TGCATCGATTTTGCTCCCCT
CCL3L1	F: TCGAGCCCACATTCCATCAC
	R: CGTGTGAGCAGCAAGTGGT
HMGB2	F: CTCCAATACCCTCGGGTGGG
	R: TCCGCGAAATTGACGGAAGA
RAC3	F: GGGAGATTGGTGGGCTCTG
	R: GGACACCACACGTCTCAACA

2.3. 统计学分析

应用 GraphPad Prism 9.5.1 以及 FlowJo v10.8.1 软件进行统计分析并绘图，每个实验至少重复 3 次，组间比较采用单因素方差分析，实验组与对照组两两比较采用 Dunnett-t 检验，qRT-PCR 验证采用 t 检验，以 $p < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3. 结果与分析

3.1. X 射线剂量依赖性诱导 A375 细胞凋亡并显著抑制细胞增殖

X 射线显著影响 A375 细胞的形态、增殖和死亡。显微镜观察结果如图 1(A)所示，在 0 Gy 组(对照

组)中,细胞形态正常,排列紧密,未见明显损伤。随着辐射剂量的增加,细胞形态逐渐发生变化,在 4 Gy 及以上剂量组,细胞密度逐渐下降,形态破坏加剧,反映出 X 射线对细胞的致死作用逐步增强。CCK-8 细胞活性检测结果如图 1(B),随着 X 射线剂量的增加, A375 细胞的存活率显著下降。2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy 和 10 Gy 组,存活率逐渐降低,10 Gy 组的细胞存活率几乎为零,表明 X 射线对细胞生长具有剂量依赖性抑制作用。

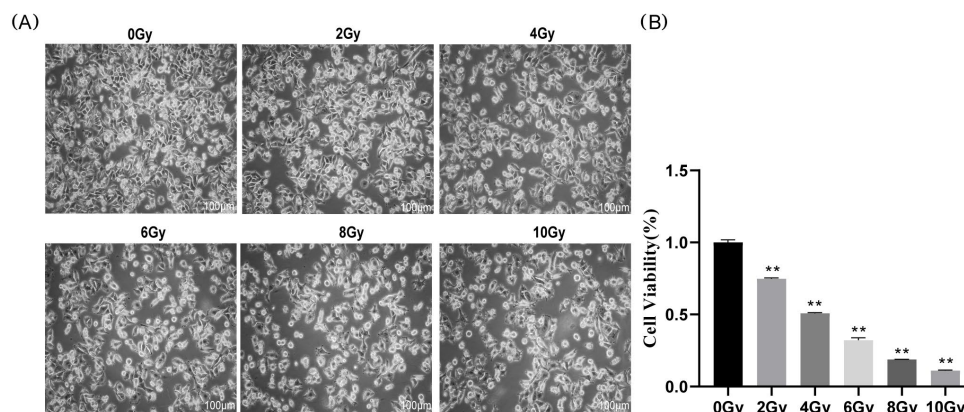


Figure 1. Investigation of the impact of varying X-ray irradiation doses on viability in A375 cells. (A) The morphological changes of A375 cells after 48 hours of different X-ray doses were observed under the microscope; (B) The viability data of A375 cells were detected by CCK-8 method. Statistical significance was determined with $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ when compared to the 0 Gy control group, with a sample size of $n = 3$

图 1. 不同剂量 X 射线对 A375 细胞存活的影响。(A) 显微镜下观察 A375 细胞在不同 X 射线剂量照射 48 小时后的形态变化; (B) CCK-8 法检测 A375 细胞活力数据, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 与 0 Gy 组比较, $n = 3$

CFSE 增殖检测结果与存活率检测结果一致(图 2)。随着 X 射线剂量的增加,细胞的增殖能力受到抑制的效果显著增加。0 Gy 组细胞增殖活跃,而 2 Gy 组的增殖能力有所降低,4 Gy 组的增殖能力显著抑制,6 Gy、8 Gy 和 10 Gy 组的细胞增殖几乎完全抑制。统计结果进一步显示,随着辐射剂量的增加,增殖细胞的数量呈负相关变化,在 10 Gy 组,增殖细胞的频率几乎为零。

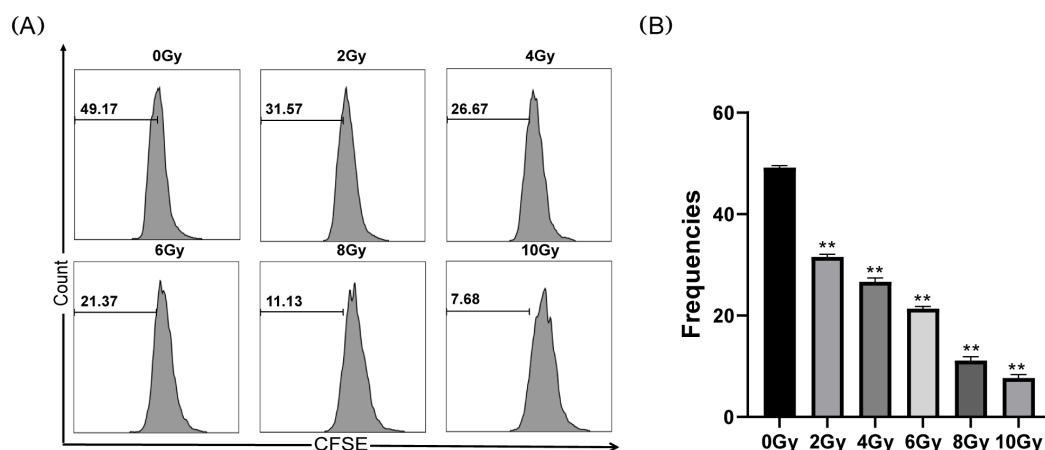


Figure 2. Investigation of the impact of varying X-ray irradiation doses on proliferation in A375 cells. (A) Flow cytometry was used to analyze the cell proliferation of A375 cells after irradiation with different X-ray doses for 48 hours; (B) Cell proliferation ability data. Statistical significance was determined with $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ when compared to the 0 Gy control group, with a sample size of $n = 3$

图 2. 不同剂量 X 射线对 A375 细胞增殖的影响。(A) 流式细胞术分析 A375 细胞在不同 X 射线剂量照射 48 小时后的细胞增殖; (B) 细胞增殖能力数据, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 与 0 Gy 组比较, $n = 3$

进一步的 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测显示(图 3), 随着 X 射线剂量的增加, A375 细胞的凋亡率显著上升。2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy 和 10 Gy 组, 细胞凋亡率逐步增加, 尤其在 10 Gy 组, 细胞凋亡率达到最高值。统计结果表明, X 射线剂量与细胞凋亡率呈正相关, 提示辐射剂量的增加会显著激活细胞凋亡信号。这种剂量依赖性增加的凋亡率进一步验证了 X 射线对细胞造成的损伤, 尤其在高剂量辐射下, 细胞的凋亡率急剧上升。

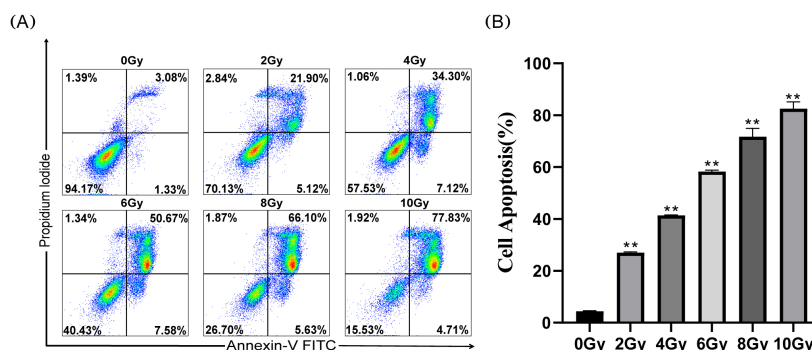


Figure 3. Investigation of the impact of varying X-ray irradiation doses on apoptosis in A375 cells. (A) Flow cytometry was used to analyze the apoptosis of A375 cells after irradiation with different X-ray doses for 48 hours; (B) Apoptosis rate data. Statistical significance was determined with $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ when compared to the 0 Gy control group, with a sample size of $n = 3$

图 3. 不同剂量 X 射线对 A375 细胞凋亡的影响。(A) 流式细胞术分析 A375 细胞在不同 X 射线剂量照射 48 小时后的细胞凋亡; (B) 细胞凋亡率数据, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 与 0 Gy 组比较, $n = 3$

综上所述, X 射线显著影响 A375 细胞的形态、增殖和凋亡, 且 A375 细胞的半数致死剂量约为 4 Gy。该剂量下细胞存活率显著降低, 增殖被明显抑制, 凋亡率大幅上升。随着 X 射线剂量的进一步增加, 细胞的死亡率逐步升高, 10 Gy 组几乎完全抑制了细胞增殖并引发了大量的细胞凋亡。

3.2. X 射线引起 A375 细胞基因表达发生显著变化

为了进一步阐明 X 射线影响 A375 细胞增殖和凋亡的分子机制, 本研究选取 4 Gy 的 X 射线照射后 48 h 的 A375 细胞和未照射的 A375 细胞进行的转录组测序分析。研究结果显示, 照射组细胞基因表达谱发生显著变化, 254 个基因的表达存在显著变化, 其中上调差异基因有 234 个, 下调差异基因有 20 个(图 4)。

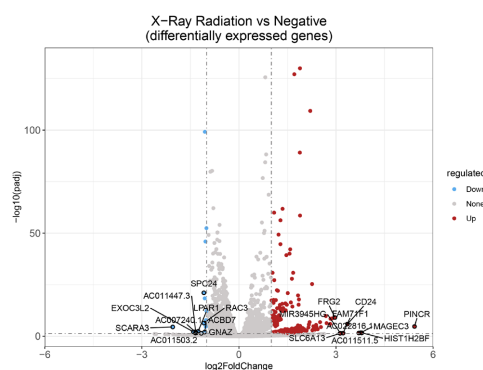


Figure 4. Volcano plot of differentially expressed genes in X-ray irradiated group (4 Gy) and control group (0 Gy) cells. Red markers denote genes that are significantly up-regulated, blue markers indicate genes that are significantly down-regulated, and gray markers represent genes that do not exhibit significant alterations

图 4. X 射线照射组(4 Gy)与对照组(0 Gy)细胞中的差异基因表达火山图。红色点表示显著上调基因, 蓝色点表示显著下调基因, 灰色点表示未显著改变基因

进一步分析显示,显著上调的差异基因包括 AC022816.1、MAGEC3、PINCR、AC011511.5 和 HIST1H2B 等。已有研究表明, PINCR 基因的表达上调对细胞 DNA 损伤修复具有促进作用, PINCR 能够通过促进细胞周期中 G1/S 期阻滞来促进 DNA 的修复[10]。此外,本研究首次发现未知功能基因 AC011511.5 和 AC022816.1 在 X 射线诱导的细胞中特异性高表达。这两个基因此前未被功能注释(AC011511.5 被预测为 lncRNA, AC022816.1 功能信息匮乏),但其在电离辐射后的显著上调提示二者可能作为新型辐射敏感标志物或凋亡调控节点。

下调差异基因主要包括 SCARA3、EXOC3L2、AC011447.3、AC011503.2 和 AC007240.1 等。这些基因可能与抗氧化应答和细胞代谢调控的抑制有关。例如, SCARA3 已知在抑制细胞增殖中发挥重要作用[11]。这表明 X 射线辐射通过诱导上述基因的表达影响了 A375 细胞增殖和凋亡。同时,本研究首次发现未知功能基因 AC011447.3、AC011503.2 和 AC007240.1 在 X 射线诱导的细胞中特异性低表达,提示其可能作为新型辐射响应抑制因子或凋亡负调控节点参与细胞应激反应。

结合上述分析内容,差异表达上调基因通过延缓细胞周期导致细胞增殖能力下降,差异表达下调基因的功能缺失导致氧化损伤累积增加,进一步加剧细胞凋亡。本研究首次发现 X 射线诱导 A375 细胞中 AC011511.5、AC022816.1、AC011447.3、AC011503.2 和 AC007240.1 的表达变化,这些基因可能作为新型辐射敏感标志物或凋亡调控节点,一方面为 X 射线诱导的皮肤损伤研究提供了潜在的新靶点,也拓展了传统以 p53/Bcl-2 家族为核心的辐射响应理论框架,为辐射生物学和肿瘤治疗研究开辟了新的方向。

3.3. X 射线通过免疫应答与 DNA 修复障碍实现对 A375 细胞凋亡与增殖的调控

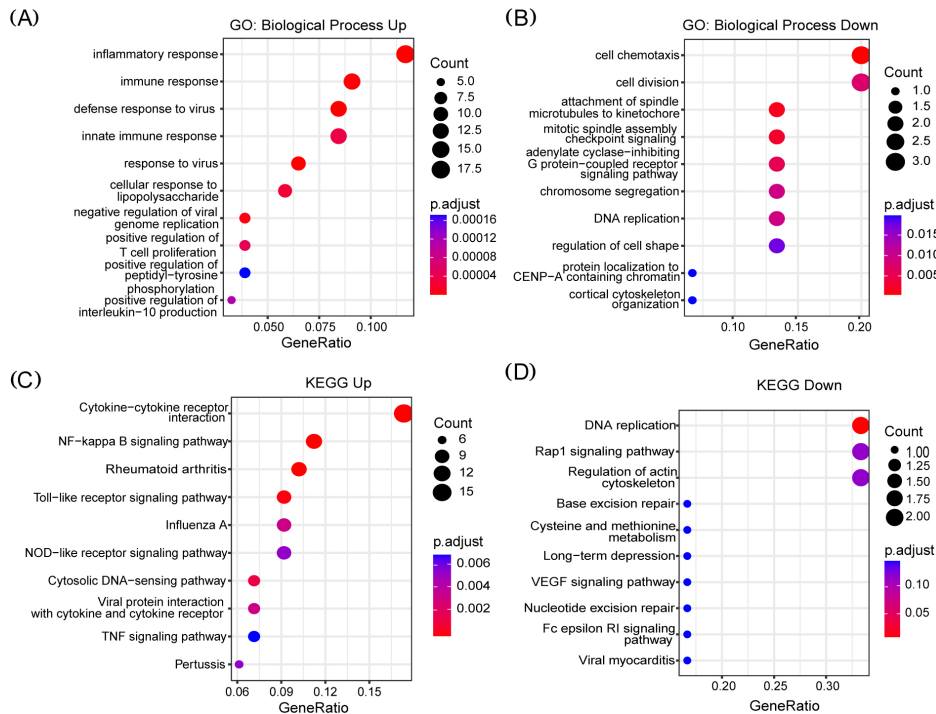


Figure 5. The Gene Ontology Biological Process (GOBP) and KEGG pathway enrichment analyses were conducted on the differentially expressed genes. Panel (A) presents the GOBP analysis results for the up-regulated differentially expressed genes, while Panel (B) displays the GOBP analysis outcomes for the down-regulated differentially expressed genes. Panel (C) illustrates the KEGG pathway analysis of the up-regulated differentially expressed genes, and Panel (D) shows the KEGG pathway analysis of the down-regulated differentially expressed genes

图 5. 差异基因的 GO 生物学过程(GOBP)和 KEGG 通路富集分析结果。(A) 上调差异基因的 GOBP 分析结果; (B) 下调差异基因的 GOBP 分析结果; (C) 上调差异基因的 KEGG 分析结果; (D) 下调差异基因的 KEGG 分析结果

X 射线照射后,上调差异基因显著富集于炎症反应、免疫反应和 NF- κ B 信号通路(图 5(A)和图 5(C))。细胞质 DNA 感应通路的显著富集提示,辐射诱导的 DNA 双链断裂片段可被胞内 DNA 感应机制(如 cGAS-STING 通路)识别[12] [13],进而激活炎症性凋亡信号通路。这一机制可能通过诱导 I 型干扰素(IFN-I)释放和炎症性细胞因子分泌(如 TNF- α),增强细胞凋亡信号并加剧辐射损伤。此外, NF- κ B 是细胞凋亡的重要调节中心,其激活通常具有双重作用:既可促进抗凋亡基因的表达,也可能通过免疫应答信号进一步触发程序性死亡。

下调差异基因主要富集于细胞分裂、染色体分离及 DNA 复制等生物学过程(图 5(B)和图 5(D))。其中,微管-动粒结合和着丝粒蛋白结合相关基因的显著抑制,表明 X 射线可能通过干扰纺锤体动态组装及染色体分离,显著阻滞细胞周期的 G2/M 期。这种周期阻滞是细胞在 DNA 损伤后的保护性应答,以避免基因组损伤被遗传至子代。此外, DNA 修复通路(包括碱基切除修复和核苷酸切除修复)的显著抑制提示, X 射线不仅直接造成 DNA 损伤,还通过抑制修复通路,加剧基因组不稳定性。这种机制可能进一步增强细胞周期的阻滞效应,并最终促使受损细胞进入凋亡程序。

综上, X 射线通过双向调控机制调控 A375 细胞的稳态。X 射线辐射一方面可能通过使胞内 DNA 断裂,核内 DNA 释放至胞外并激活免疫应答相关信号通路,触发了细胞的炎症性凋亡;另一方面, X 射线辐射负向调控细胞周期关键步骤(如纺锤体组装、染色体分离)和 DNA 修复通路,阻断细胞分裂,影响细胞的增殖,这种机制也可能使细胞长期处于应激状态,积累 DNA 损伤,最终进一步促进了细胞凋亡。

此外,本研究基于 GOBP 分析中最显著富集的炎症反应(inflammatory response)通路中的关键基因 IL1A、CCL4、CXCL10 和 CCL3L1 和细胞趋化性(cell chemotaxis)通路中关键基因 HMGB2 和 RAC3 进行 qRT-PCR 验证,结果显示 IL1A、CCL4、CXCL10 和 CCL3L1 的 mRNA 相对表达含量高于对照组,而 HMGB2 和 RAC3 的 mRNA 相对表达含量低于对照组(图 6),实验结果和测序结果相一致。

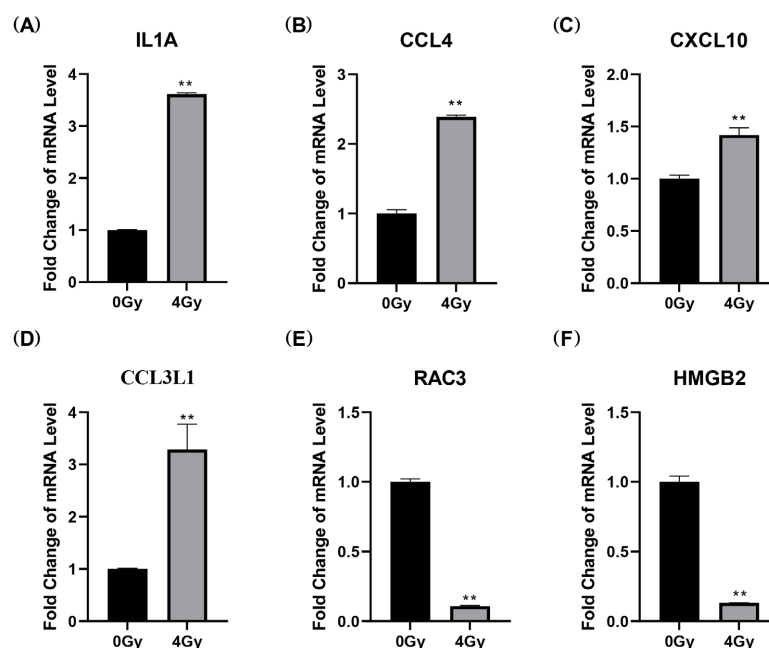


Figure 6. The relative expression levels of mRNA in cells of the X-ray irradiated group (4 Gy) and the control group (0 Gy) were detected via qRT-PCR. GAPDH was employed as the internal reference. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, as compared to the 0 Gy group; $n = 3$

图 6. qRT-PCR 检测 X 射线照射组(4 Gy)与对照组(0 Gy)细胞中 mRNA 相对表达水平,以 GAPDH 为内参, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 与 0 Gy 组比较, $n = 3$

4. 讨论

X 射线在医学影像诊断和肿瘤放射治疗中具有广泛应用,但其对正常组织,尤其是皮肤的损伤效应不可忽视。皮肤作为人体暴露于辐射的主要屏障组织,易受到急性或慢性辐射损伤。研究表明,X 射线诱导的 DNA 损伤及修复障碍在皮肤细胞凋亡与增殖抑制中发挥关键作用[14],而这些分子事件不仅是放射生物学的核心问题,也为探索放射防护及放射敏感性调控提供了重要线索。然而,目前针对不同剂量 X 射线对 A375 细胞的作用表型及分子机制的研究仍存在显著局限性。尽管已有证据表明 X 射线可诱导 A375 细胞发生 DNA 损伤、细胞周期阻滞及程序性细胞死亡[15],但不同剂量辐射对细胞表型(如增殖、凋亡、迁移等)的剂量依赖性效应尚未得到系统性阐明。此外,X 射线辐射后 A375 细胞中免疫信号通路(如 NF- κ B、JAK/STAT 等)与 DNA 损伤修复机制之间的交互作用机制仍未被充分解析,尤其是辐射诱导的免疫微环境重塑如何调控 DNA 损伤修复效率及细胞命运抉择,目前尚缺乏深入的研究。这些未解决的科学问题限制了对 X 射线辐射生物学效应的全面阐释,同时也为未来揭示放射性皮肤损伤的分子机制及开发靶向放射防护策略提供了重要的研究方向。

本研究发现,随着 X 射线剂量的增加,A375 细胞凋亡率显著升高,尤其在 4 Gy 及以上剂量组,凋亡细胞比例大幅增加;与此同时,细胞增殖能力呈现剂量依赖性下降,10 Gy 剂量几乎完全抑制了细胞增殖。这一结果表明,X 射线通过诱导细胞凋亡和抑制细胞增殖达到杀伤细胞的效果,这种剂量依赖性效应是放射治疗的重要机制。A375 细胞的 LD50 为 4 Gy,这一剂量为后续研究放射敏感性调控提供了重要参考。

通过转录组测序分析,4 Gy X 射线照射后,A375 细胞中部分基因表达发生了显著变化。上调差异基因主要富集于炎症反应、免疫应答和凋亡相关通路,而下调差异基因则集中在细胞周期和 DNA 修复相关基因。这些差异基因的表达变化构成了辐射效应的分子基础。GO 和 KEGG 分析进一步阐明了差异基因的生物学功能和信号通路作用。上调基因显著富集于 NF- κ B 信号通路、细胞质 DNA 感应通路及炎症反应等免疫和炎症相关通路,提示辐射通过激活凋亡与炎症清除受损细胞。例如,cGAS-STING 通路的激活可能通过识别 DNA 损伤片段,触发 I 型干扰素和炎症因子释放,加剧细胞凋亡。同时,NF- κ B 信号通路的激活可能通过负反馈机制(如白介素-10 的正调控)维持炎症反应的平衡。下调差异基因显著富集于碱基切除修复、核苷酸切除修复及细胞周期调控等通路,表明辐射通过削弱 DNA 修复能力和阻断细胞周期加剧基因组不稳定性并显著抑制细胞增殖。这种凋亡与增殖抑制的协同作用是辐射效应的重要特征,为靶向干预提供了功能性依据。qRT-PCR 结果显示,上调基因(如 IL1A、CCL4、CXCL10)和下调基因(如 HMGB2、RAC3)的表达水平与转录组数据一致,进一步证实了转录组分析的可靠性。这些差异基因的表达变化不仅揭示了 X 射线辐射的分子机制,也为后续功能研究提供了可靠靶点。

5. 结论

综上所述,本研究揭示了 X 射线对 A375 细胞凋亡与增殖的影响:通过激活凋亡信号诱导细胞凋亡,同时通过抑制增殖与修复能力削弱细胞存活。该机制在放射治疗中具有重要意义,可通过精准调控关键信号通路增强肿瘤细胞对辐射的敏感性。然而,这种机制在正常组织中可能导致不可避免的副作用,如组织损伤和基因组不稳定性增加。因此,未来研究应结合其他皮肤细胞模型或类器官技术,进一步探讨辐射对皮肤组织的整体效应,同时开发能够平衡肿瘤杀伤与正常组织保护的靶向防护策略。例如,通过靶向 NF- κ B 信号通路或增强 DNA 修复能力,可能减轻辐射对正常组织的损伤。此外,结合多学科技术,如基因编辑和类器官培养,可以更全面地评估辐射的生物学效应及其潜在应用价值,为放射治疗和放射防护提供更多科学依据。

基金项目

国家自然科学基金项目(32171429); 湖南省自然科学基金项目(2024JK2117; 2022JJ30672)。

参考文献

- [1] Damilakis, J., Adams, J.E., Guglielmi, G. and Link, T.M. (2010) Radiation Exposure in X-Ray-Based Imaging Techniques Used in Osteoporosis. *European Radiology*, **20**, 2707-2714. <https://doi.org/10.1007/s00330-010-1845-0>
- [2] Kyriakou, I., Sakata, D., Tran, H.N., Perrot, Y., Shin, W., Lampe, N., *et al.* (2021) Review of the Geant4-DNA Simulation Toolkit for Radiobiological Applications at the Cellular and DNA Level. *Cancers*, **14**, Article 35. <https://doi.org/10.3390/cancers14010035>
- [3] Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., *et al.* (2018) Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, **25**, 486-541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- [4] Bostock, S. and Bryan, J. (2016) Radiotherapy-Induced Skin Reactions: Assessment and Management. *British Journal of Nursing*, **25**, S18-S24. <https://doi.org/10.12968/bjon.2016.25.4.s18>
- [5] Zhao, H., Zhuang, Y., Li, R., Liu, Y., Mei, Z., He, Z., *et al.* (2018) Effects of Different Doses of X-Ray Irradiation on Cell Apoptosis, Cell Cycle, DNA Damage Repair and Glycolysis in Hela Cells. *Oncology Letters*, **17**, 42-54. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9566>
- [6] Brunsgaard, E.K., Wu, Y.P. and Grossman, D. (2023) Melanoma in Skin of Color: Part I. Epidemiology and Clinical Presentation. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **89**, 445-456. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2022.04.056>
- [7] Cheng, S., Huang-Liu, R., Sheu, J., Chen, S., Sinchaikul, S. and Tsay, G.J. (2007) Toxicogenomics of A375 Human Malignant Melanoma Cells. *Pharmacogenomics*, **8**, 1017-1036. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.8.1017>
- [8] 康东林, 赵莲君, 任宇, 等. 皮肤黑色素瘤新辅助治疗的研究进展[J]. 中国肿瘤, 2024, 33(12): 1033-1041.
- [9] 刘一帆, 罗星, 宋天慈, 等. 恶性黑色素瘤靶向治疗及其耐药机制研究进展[J]. 昆明医科大学学报, 2025, 46(2): 158-163.
- [10] Chaudhary, R., Gryder, B., Woods, W.S., Subramanian, M., Jones, M.F., Li, X.L., *et al.* (2017) Prosurvival Long Noncoding RNA PINCR Regulates a Subset of P53 Targets in Human Colorectal Cancer Cells by Binding to Matrin 3. *eLife*, **6**, e23244. <https://doi.org/10.7554/elife.23244>
- [11] Kim, J., You, H.J. and Youn, C. (2022) SCARA3 Inhibits Cell Proliferation and EMT through AKT Signaling Pathway in Lung Cancer. *BMC Cancer*, **22**, Article No. 552. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09631-z>
- [12] Adjemian, S., Oltean, T., Martens, S., Wiernicki, B., Goossens, V., Vanden Berghe, T., *et al.* (2020) Ionizing Radiation Results in a Mixture of Cellular Outcomes Including Mitotic Catastrophe, Senescence, Methuosis, and Iron-Dependent Cell Death. *Cell Death & Disease*, **11**, Article No. 1003. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03209-y>
- [13] Huang, R. and Zhou, P. (2020) DNA Damage Response Signaling Pathways and Targets for Radiotherapy Sensitization in Cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **5**, Article No. 60. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0150-x>
- [14] Meimeti, E., Kafanas, A., Pavlou, P., Evangelatou, A., Tsouparelou, P., Kanellopoulos, S., *et al.* (2018) Topical Treatment of Skin Injury Inflicted in Mice by X-Ray Irradiation. *Skin Pharmacology and Physiology*, **31**, 175-183. <https://doi.org/10.1159/000487404>
- [15] Udroui, I. and Sgura, A. (2023) X-Ray and DNA Damage: Limitations of the Dose as a Parameter for *in Vitro* Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article 16643. <https://doi.org/10.3390/ijms242316643>