

Tspan4 介导的迁移体在 肺癌细胞重离子辐射效应中的作用

马丽娟^{1,2} 黄雅丽³ 吴庆丰^{1,2} 杜亚蓉^{1,2} 王菊芳^{1,2}

¹ (中国科学院近代物理研究所 甘肃省空间辐射生物学重点实验室 兰州 730000)

² (中国科学院大学 北京 101408)

³ (西北师范大学生命科学学院 兰州 730000)

摘要 迁移体在调控肿瘤微环境(Tumor microenvironment, TME)、介导肿瘤转移及影响肿瘤治疗预后等方面发挥着关键作用。本研究以肺癌 A549 细胞为模型, 探讨了 Tspan4 介导的迁移体在重离子辐射效应中的作用机制。实验采用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束(80 MeV/u, LET 30 keV/ μm)进行辐照处理, 分析其对迁移体形成的影响, 并进一步通过迁移体定量分析、伤口愈合实验、Transwell 迁移实验、蛋白免疫印迹、克隆形成实验、 γH2AX foci 检测及凋亡分析等方法系统评估了辐射效应。实验结果表明, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束可显著抑制 A549 细胞迁移能力(伤口愈合距离减少 33%)和迁移体的形成($p < 0.001$)。而 Tspan4 敲除进一步协同增强这些效应: 迁移相关蛋白 ITGA5 和 MMP9 表达下调, 克隆形成能力显著降低, γH2AX foci 形成率增加至 2.3 倍, 凋亡率升至对照组的 4.74 倍($p < 0.001$)。这一研究表明, Tspan4 缺失通过干扰迁移体依赖的细胞间通讯, 抑制肿瘤微环境重塑, 从而增强 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对 DNA 损伤修复的干扰和凋亡诱导, 为靶向“迁移体联合重离子放疗”提供了新的理论依据。

关键词 迁移体, 肺癌, 重离子, 辐射效应

中图分类号 R815.6

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2025-0060

CSTR: 32195.14.j.JRRRP.1000-3436.2025-0060

引用该文:

马丽娟, 黄雅丽, 吴庆丰, 等. Tspan4 介导的迁移体在肺癌细胞重离子辐射效应中的作用[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2025, 43(6): 060301. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2025-0060.

MA Lijuan, HUANG Yali, WU Qingfeng, *et al.* Role of Tspan4-mediated migrasomes in the heavy ion radiation effects on lung cancer cells[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2025, 43(6): 060301. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2025-0060.



基金资助: 兰州市城关区科技计划项目(2024-11-4)和国家自然科学基金项目(12175289)

第一作者: 马丽娟, 女, 2000 年 3 月出生, 2022 年获得西北师范大学学士学位, 目前为中国科学院近代物理研究所博士研究生

通信作者: 杜亚蓉, 副研究员, E-mail: duyrlive@impcas.ac.cn; 王菊芳, 研究员, E-mail: jufangwang@impcas.ac.cn

收稿日期: 初稿 2025-07-16; 修回 2025-08-19

Supported by Science and Technology Research Project of Chengguan District, Lanzhou City (2024-11-4) and National Natural Science Foundation of China (12175289)

First author: MA Lijuan (female) was born in March 2000, and obtained her bachelor's degree from Northwest Normal University in 2022. Now she is a doctoral student at the Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences

Corresponding author: DU Yarong, associate professor, E-mail: duyrlive@impcas.ac.cn; WANG Jufang, professor, E-mail: jufangwang@impcas.ac.cn

Received 16 July 2025; accepted 19 August 2025

Role of Tspan4-mediated migrasomes in the heavy ion radiation effects on lung cancer cells

MA Lijuan^{1,2} HUANG Yali³ WU Qingfeng^{1,2} DU Yarong^{1,2} WANG Jufang^{1,2}

¹(Key Laboratory of Space Radiobiology of Gansu Province, Institute of Modern Physics,

Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

²(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China)

³(College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT Migrasomes play a crucial role in regulating the tumor microenvironment (TME), mediating tumor metastasis, and influencing the prognosis of tumor therapy. In this study, lung cancer A549 cells were used as a model to explore the mechanism of Tspan4-mediated migrasomes in the effects of heavy ion radiation. The experiment employed $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams (80 MeV/u, LET 30 keV/ μm) for irradiation treatment to analyze the effect on migrasome formation. Furthermore, methods including migrasome quantitative analysis, wound healing assay, Transwell migration assay, Western blotting, colony formation assay, γH2AX foci detection, and apoptosis analysis were used to systematically evaluate the radiation effects. The experimental results showed that $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams significantly inhibited the migration ability of A549 cells (with a 33% reduction in wound healing distance) and the formation of migrasomes ($p < 0.001$). Moreover, Tspan4 knockout further synergistically enhanced these effects: the expression levels of migration-related proteins ITGA5 and MMP9 were downregulated, the colony formation ability was significantly reduced, the formation rate of γH2AX foci increased by 2.3 times, and the apoptosis rate rose to 4.74 times that of the control group ($p < 0.001$). This study indicates that Tspan4 knockout enhances the interference of $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams with DNA damage repair and the induction of apoptosis by disrupting migrasome-dependent intercellular communication and inhibiting tumor microenvironment remodeling. It provides a new theoretical basis for the targeted strategy of "migrasome combined with heavy ion radiotherapy."

KEYWORDS Migrasome, Lung cancer, Heavy ion, Radiation effect

CLC R815.6

肺癌作为一个全球性的健康问题，一直以来备受科研人员的关注。根据 IARC 发布的《Global Cancer Observatory》(GLOBOCAN) 2022 年报告，肺癌新发病例达 248 万例，占全球癌症发病总数的 12.4%；死亡病例 180 万例，占癌症总死亡数的 18.7%，其疾病负担持续位居所有癌种首位^[1]。流行病学研究显示，其 5 年净生存率中位值为 15.9%，但晚期患者这一数值普遍较低^[2]。这种严峻的生存现状与肺癌的辐射敏感性较低、局部复发率高和高转移倾向等密切相关。大部分继发肿瘤均由一群具有转移能力的癌细胞脱离原发肿瘤，沿着血管方向溢出，进一步诱发肿瘤成功转移。因此，肿瘤细胞具备侵袭性和迁移能力，是其实现转移过程的前提和核心特征^[3-4]。

迁移体(Migrasomes)是近年来新发现的介导细胞间信号传导的新型细胞器，是细胞在定向迁移的过程中，细胞尾部产生收缩纤维丝(Retraction fibers, RFs)，在 RFs 的末端或交叉部位产生直径为

0.5~3.0 μm 的单层膜包裹的“石榴”状结构^[5]。主要由 Tetraspanin(TSPAN)家族蛋白(特别是 Tspan4)富集形成。其形成依赖于细胞黏附、膜张力及与整合素的互作，是细胞间信息与物质传递的新型路径。从迁移体发生的形态学分析，迁移体形成后借助 RFs 附着在细胞上长达数小时，作为局部胞吐位点，分泌细胞因子和趋化因子等物质，并进一步被运输至迁移体内部。随着迁移体完全脱离细胞成为细胞外囊泡，这些囊泡可能有两种命运：第一，囊泡破裂，将其内容物释放到细胞外空间；第二，被其他细胞吞噬，从而将内容物转移到吞噬细胞^[6]。因此，迁移体在脱落后仍持续承载着细胞间物质传递的功能，参与 TME 的重塑，进而调控肿瘤的转移或复发，对肿瘤治疗的预后产生深远影响^[7-9]。研究表明，TSPAN 家族基因过度表达可增强迁移体的形成，其中 Tspan4 是一种关键的迁移体膜蛋白，是诱导细胞迁移最有效的 TSPAN 家族之一^[10]，能够驱动迁移体形成。因此，

Tspan4被广泛用作迁移体的标记蛋白^[11]。

临床实践证明,重离子放疗(如 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束)因其高线性能量传递(Linear energy transfer, LET)、精准剂量沉积、低散射特性及优异的辐射生物学特性,逐渐成为恶性肿瘤治疗的重要手段^[12-13],尤其在提高肿瘤控制率和降低癌旁组织损伤方面展现出独特优势^[14-15]。重离子放疗还可通过调节肿瘤细胞微环境、肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)的促瘤活性,以及影响肿瘤细胞代谢状态,从而在多层面对肿瘤的生长与转移过程^[16-18],然而,迁移体是否调控肺癌重离子辐射生物效应,以及肿瘤的侵袭迁移水平,目前尚无相关研究报道。

因此,本研究以肺癌A549细胞为模型,聚焦迁移体在肺癌 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐射效应中的作用,为重离子放疗的优化及靶向迁移体的联合治疗策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

非小细胞肺癌A549细胞系购自上海细胞库;DMEM/F12基础培养基、0.25%胰蛋白酶溶液(含EDTA)和双抗均购自美国Gibco公司;胎牛血清购自兰州荣晔生物科技有限责任公司。

Wheat Germ Agglutinin(WGA)荧光染料,美国赛默飞世尔科技公司;YF®488-Annexin V/RedNucleus II细胞凋亡试剂盒,中国百赛生物技术股份有限公司。

抗体TSPAN4,美国Novus公司;抗体 γH2AX ,英国Abcam公司;抗体GAPDH、MMP9,武汉三鹰生物技术;辣根酶标记山羊抗兔IgG二级抗体,北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

Amnis FlowSight流式细胞仪(英国Luminex);LSM700激光共聚焦显微镜(德国蔡司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞辐照处理

$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束由兰州重离子加速器装置(Heavy ion research facility in Lanzhou, HIRFL)提供,能量为80 MeV/u, LET为30 keV/mm,剂量率为2 Gy/min。

1.3.2 迁移体拍摄

将细胞接种至10 $\mu\text{g/mL}$ 粘连蛋白预包被的共聚焦皿,待其贴壁后进行辐照处理。戊二醛:培养基=1:1预固定5 min,戊二醛再固定2 h, PBS清洗3次, WGA室温染色20 min, PBS清洗3次,在激光共聚焦显微镜下进行迁移体拍摄。

1.3.3 伤口愈合实验

贴壁细胞经无血清饥饿处理24 h后进行辐照处理,随后用枪头划痕制造伤口, PBS洗涤以去除漂浮细胞,加入新鲜基础培养基,分别在0 h和24 h拍摄图像,测量划痕创面宽度,分析伤口愈合能力。

1.3.4 迁移实验

将无血清饥饿处理24 h的A549细胞进行辐照处理,胰酶消化制备单细胞悬液($5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$),取100 mL加入Transwell上室,向Transwell下室加600 mL含10% FBS的完全培养基。培养24 h后,用4%多聚甲醛固定20 min, 0.5%结晶紫染液染色15 min,使用棉签去除小室内侧非侵入细胞,随机选取5个不同视野显微镜下拍照,统计分析迁移细胞数。

1.3.5 蛋白免疫印迹

使用RIPA缓冲液裂解细胞提取蛋白,样品经BCA法定量后在SDS上样缓冲液中煮沸变性;在SDS-PAGE凝胶中蛋白分离;蛋白分离后转印至PVDF膜上;使用MMP、ITG5、Tspan4和GAPDH等特异性抗体4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,再使用HRP标记的二抗室温孵育1 h, PBST洗涤去除未结合抗体,通过ECL显影法检测蛋白表达情况。

1.3.6 克隆形成实验

对处于对数生长期的细胞进行0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射,将其制备成单细胞悬液接种于60 mm培养皿中,置于培养箱中培养12 d,弃去培养基,4%多聚甲醛固定20 min, 0.5%结晶紫染色15 min,待干燥后统计细胞数大于50的集落。

1.3.7 γH2AX foci实验

对细胞进行0 Gy、1 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射后继续培养0.5 h,用4%多聚甲醛固定20 min, PBS清洗3次。0.5% Triton X-100冰上处理10 min, 5%山羊血清封闭1 h后用 γH2AX 特异性抗体室温孵育3 h, PBS漂洗去除未结合抗体,使用荧光二抗室温避光孵育1 h, PBS漂洗完成后晾干, DAPI复染

后在荧光显微镜下拍照, 统计分析 Foci 形成率。

1.3.8 细胞微核实验

将处于对数生长期的细胞进行 0 Gy、1 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射, 37 °C、5% CO_2 培养 48 h 后, 使用 Garnoy 固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定 20 min, PBS 洗 3 次, 晾干后使用 0.01% 吖啶橙染液染色, 封片拍照。

1.3.9 细胞凋亡检测

将细胞进行 0 Gy、2 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射后继续培养 48 h, 随后收集单细胞悬液, 采用 YF®488-Annexin V/RedNucleus II 细胞凋亡试剂盒进行染色处理, 并使用 Amnis FlowSight 流式细胞仪进行检测, 最终通过 FlowJo 软件进行凋亡细胞比例分析。

1.3.10 数据统计分析

本研究数据均以“平均数±标准误差(SEM)”表示, 均进行 3 次独立重复实验。多组间均数比较采用 Two-Way ANOVA 双因素方差分析, 两组间均数比较采用 Students'T-test 法和 Mann-Whitney U-test 法。* $p < 0.05$ 和[#] $p < 0.05$, 为统计有显著性差异; ** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 和[#] $p < 0.01$ 、^{###} $p < 0.001$ 为统

计有极显著性差异。数据分析和绘图使用 GraphPad Prism 10 统计分析软件。

2 结果

2.1 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对 A549 细胞迁移能力和迁移体形成的影响

为了探究 A549 细胞对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束的响应, 通过伤口愈合实验对 A549 细胞迁移能力进行测定。结果如图 1 所示, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束处理后显著抑制细胞的迁移能力(图 1(a)、(b))。为进一步探究 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对迁移体形成的影响, 在预先铺有粘连蛋白的培养皿中接种细胞, 待 6 h 后细胞完全贴壁进行辐照处理, 将照射时刻设为 0 h, 辐照后 6 h 固定细胞, 使用迁移体标记染料 WGA-Alexa Fluor 594 进行标记, 统计分析 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对迁移体形成的影响。实验结果表明, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子射线照射 6 h 后, 迁移体形成数量较对照组显著减少(图 1(c)、(d))。以上实验结果表明, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束显著抑制 A549 细胞迁移能力及其迁移体的形成水平。

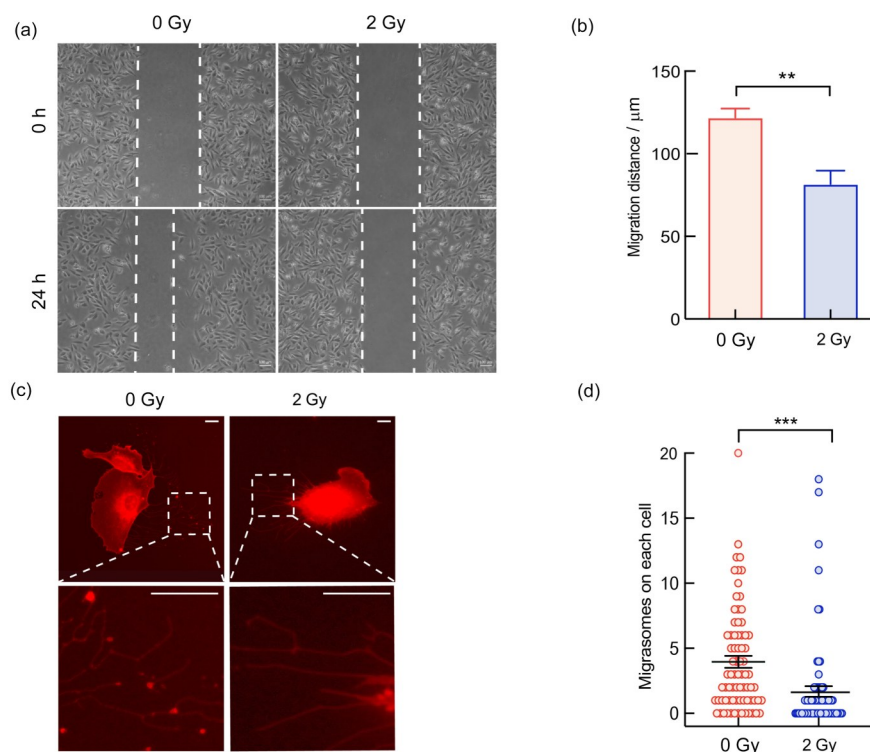


图1 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对 A549 细胞迁移能力和迁移体形成的影响: (a) 辐照对 A549 细胞迁移能力的影响, 比例尺为 100 μm; (b) 对图(a)中细胞迁移距离的定量分析; (c) 辐照对 A549 细胞上迁移体数量的影响, 比例尺为 10 μm; (d) 对图(c)中单细胞中迁移体数量的定量分析; *表示各组组间的显著性差异, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

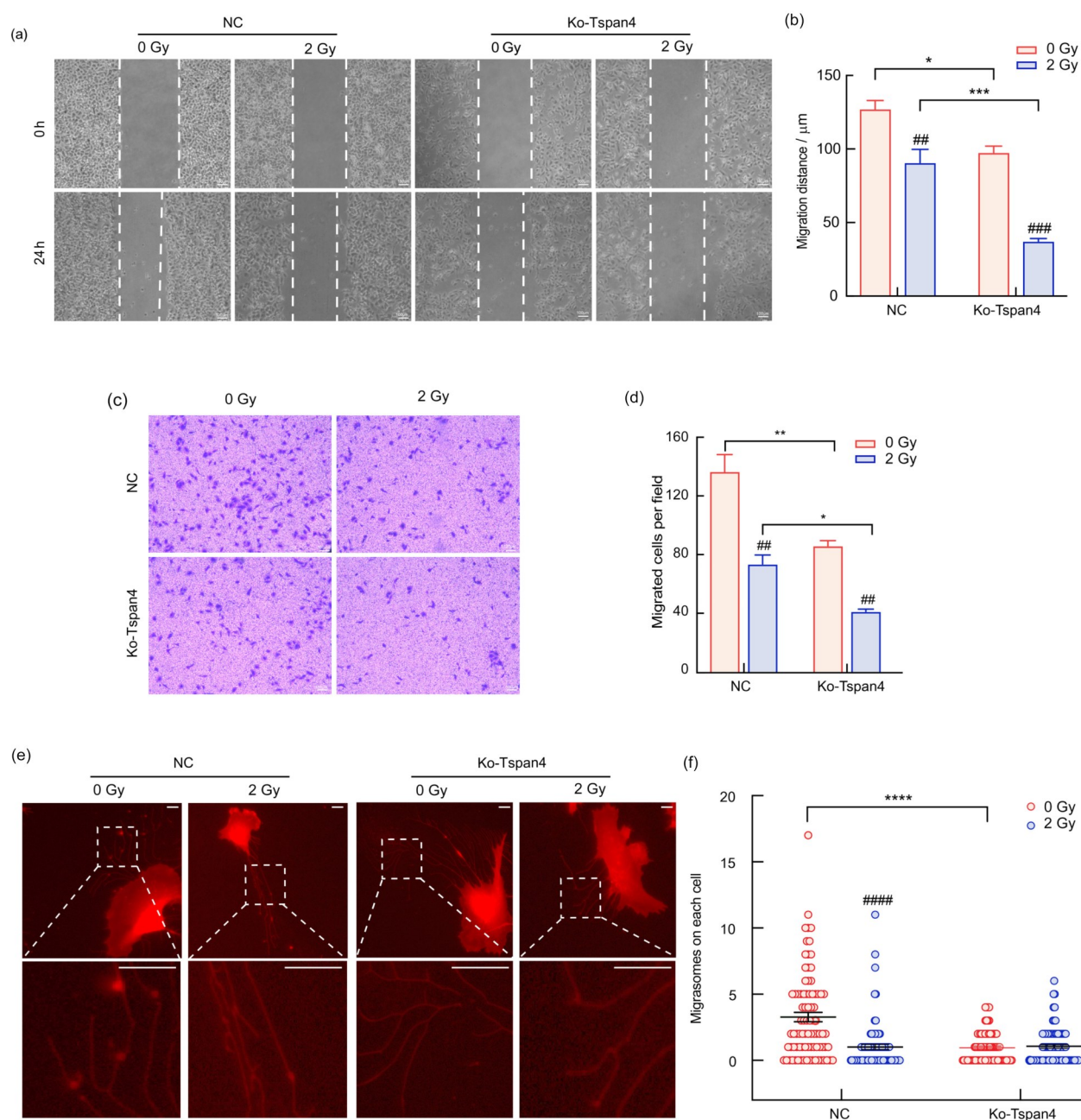
Fig.1 Effect of $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beam on the migration ability and migrasome formation of A549 cells: (a) effect of irradiation on the migratory capacity of A549 cells, scale bar, 100 μm; (b) quantitative analysis of the migration distance from (a); (c) effect of irradiation on migrasome formation in A549 cells, scale bar, 10 μm; (d) quantification of the number of migrasomes per single cell from (c); inter-group significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

2.2 Tspan4 蛋白缺失对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射后 A549 细胞迁移能力和迁移体形成能力的影响

为进一步验证 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对 A549 细胞迁移能力的抑制作用是否与其迁移体形成能力相关, 采用本实验室已构建的 Tspan4 稳定敲除的 A549 细胞株^[19], 通过伤口愈合、Transwell 迁移实验发现, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对细胞迁移能力具有明显的抑制作用, 且在 Tspan4 缺失的条件下, 这种抑制效应被进一步增强(图 2(a)~(d))。通过激光共聚焦显微镜验证 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对细胞迁移体形成的影响, 与对照组相比, Tspan4 缺失显著抑制细胞上迁移体的形成,

$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射后 NC 组细胞迁移体形成减少, 而对 Tspan4 缺失组影响不显著(图 2(e)、(f))。通过蛋白免疫印迹实验进一步验证 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对细胞迁移相关蛋白 ITGA5 和 MMP9 的表达有明显的抑制作用, 且在 Tspan4 缺失的条件下, 这种抑制效应进一步显著增强(图 2(g)、(h))。

综上所述, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束可以显著抑制细胞迁移能力以及迁移体的形成能力, 迁移体标志蛋白 Tspan4 缺失可进一步增强 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对细胞迁移能力的抑制作用, 但对迁移体的形成能力的抑制并不显著。



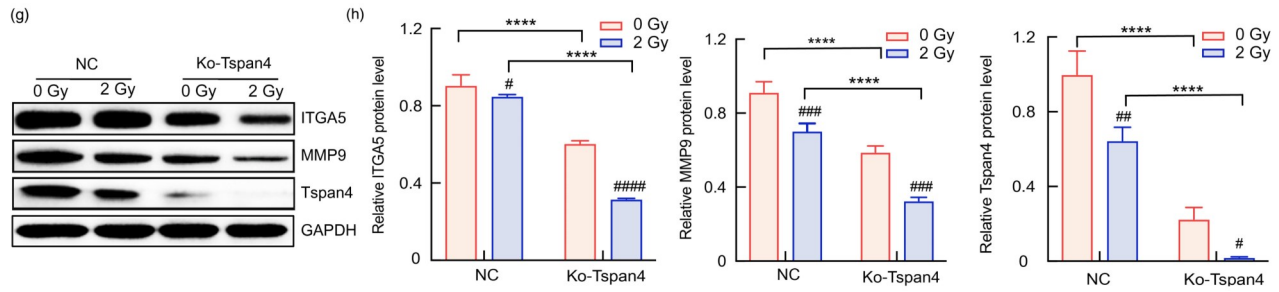


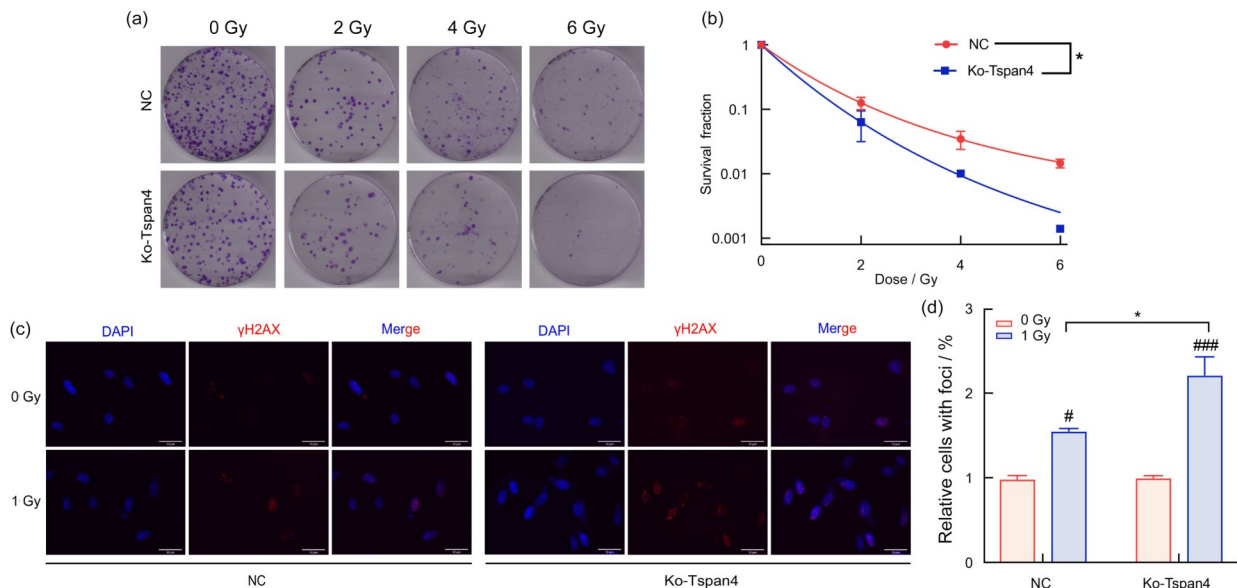
图2 Tspan4 蛋白缺失对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射后 A549 细胞迁移能力的影响: (a, c) Tspan4 缺失对辐照后 A549 细胞迁移能力的影响, 比例尺为 100 μm ; (b, d) 对图(a, c)中细胞迁移距离及迁移细胞数的定量分析; (e) 敲除 Tspan4 蛋白对 A549 细胞上的迁移体数量的影响, 比例尺为 10 μm ; (f) 对图(e)中单细胞中迁移体数量的定量分析; (g) Tspan4 缺失对辐照后 A549 细胞迁移相关蛋白的影响; (h) 对图(g)中蛋白表达的定量分析; *表示各组组间的显著性差异, $p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$; #表示各组组内的显著性差异, $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$, $^{\#\#\#}p < 0.001$ (彩色见网络版)

Fig.2 Effect of Tspan4 knockout on the migration ability of A549 cells after $^{12}\text{C}^{6+}$ ion irradiation: (a, c) effect of Tspan4 knockout on the migratory capacity of irradiated A549 cells, scale bar, 100 μm ; (b, d) quantification of migration distance and the number of migrating cells from (a, c); (e) effect of Tspan4 knockout on migrasome formation in A549 cells, scale bar, 10 μm ; (f) quantification analysis of the number of migrasomes per single cell from (e); (g) effect of Tspan4 knockout on migration-related proteins in irradiated A549 cells; (h) quantitative analysis of protein levels from (g); inter-group significance: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$; intra-group significance: $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$, $^{\#\#\#}p < 0.001$ (color online)

2.3 Tspan4 蛋白缺失对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照后 A549 细胞辐射敏感性的影响

为进一步探究 Tspan4 缺失对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照后 A549 细胞辐射敏感性的影响, 通过克隆形成实验、 γH2AX foci 实验、微核实验及细胞凋亡实验等进行测定。结果如图 3 所示, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照抑制 NC 组细胞克隆形成能力, 而在 Tspan4 敲除细胞中, 这一抑制作用进一步增强(图 3(a)、(b))。通过检测 γH2AX foci 形成率反映 DNA 损伤情况, 在 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照后 0.5 h 时, NC 组 foci 形成率显著升高, 而在 Tspan4 敲除细胞中, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束处理进一步促进了 foci 形成率的增加(图 3(c)、(d))。微核

实验结果表明, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照后 NC 组微核发生率显著升高, 而在 Tspan4 敲除细胞中, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束处理进一步加剧了细胞微核发生率, 表明其对基因组不稳定性的影响更加显著(图 3(e))。以上结果表明, Tspan4 缺失可增强细胞对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束的辐射敏感性。为进一步探讨其增强辐射敏感性的分子机制, 采用 488-Annexin V/RedNucleus II 双染技术检测辐照后 48 h 细胞的凋亡水平。实验结果表明, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射后 NC 组细胞凋亡率上升为空白对照组的 3.38 倍, 而在 Tspan4 敲除细胞中, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束处理细胞的凋亡率上升为空白对照组的 4.74 倍(图 3(f)、(g))。表明 Tspan4 缺失进一步促进辐照引起的细胞凋亡水平上升。



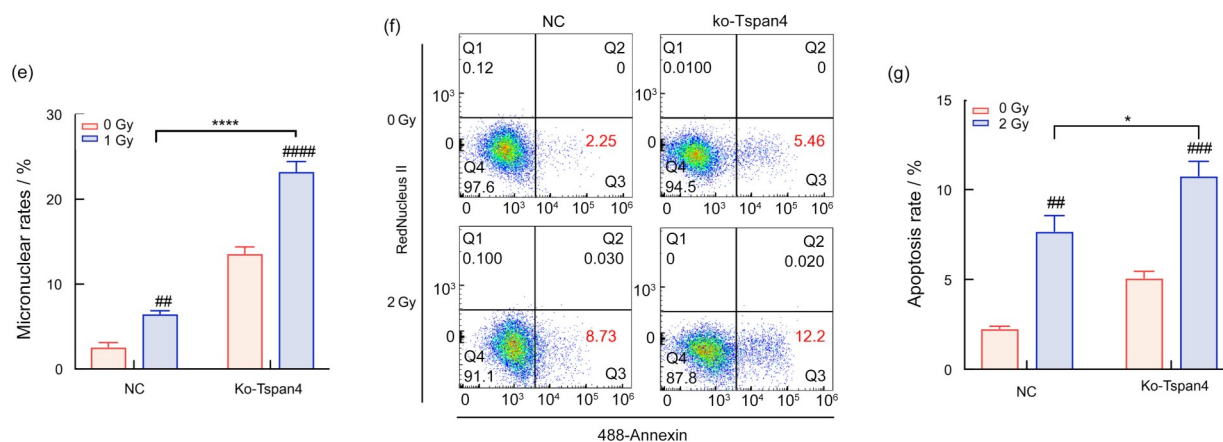


图3 Tspan4蛋白缺失对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射后A549细胞辐射敏感性的影响:(a)Tspan4缺失对辐照后A549细胞克隆形成能力的影响;(b)对图(a)中对细胞克隆的定量分析;(c)Tspan4缺失对辐照后A549细胞foci形成率的影响,比例尺为30 μm ;(d)对图(c)中foci形成率的定量分析;(e)Tspan4缺失对辐照后A549细胞微核率影响的定量分析;(f)Tspan4缺失对辐照后A549细胞凋亡率的影响;(g)对图(f)中细胞凋亡率的定量分析;用*表述各组组间的显著性差异,* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$;用#表述各组组内的显著性差异,# $p<0.05$,## $p<0.01$,### $p<0.001$ (彩色见网络版)

Fig.3 Effect of Tspan4 knockout on the radiosensitivity of A549 cells after $^{12}\text{C}^{6+}$ ion irradiation: (a) effect of Tspan4 knockout on the clonogenic survival of irradiated A549 cells; (b) quantification of colony formation from (a); (c) effect of Tspan4 knockout on foci formation rate in irradiated A549 cells, scale bar, 30 μm ; (d) quantitative analysis of the foci formation rate from (c); (e) quantitative analysis of the effect of Tspan4 knockout on micronucleus incidence in irradiated A549 cells; (f) impact of Tspan4 knockout on apoptosis in irradiated A549 cells; (g) quantitative analysis of the apoptotic rate from (f); inter-group significance: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; intra-group significance: # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ (color online)

3 讨论

肺癌的远端转移显著加剧了治疗的难度,严重影响患者的预后。研究表明,约80%的非小细胞肺癌死亡病例主要归因于病灶转移,而非原发肿瘤本身^[20]。作为肺癌综合治疗的重要组成部分,放射治疗在控制局部病灶方面发挥着关键作用。重离子放疗因其独特的物理学和生物学优势,在近年来引起广泛关注。由此可见,重离子放疗必将在我国肿瘤治疗领域发挥越来越重要的作用。相较于常规射线,重离子放射治疗展现出更为显著的综合生物学效应。值得关注的是,重离子辐射不仅在局部控制方面具有优势^[21],还表现出抑制肿瘤转移的潜力。通过破坏影响细胞运动和侵袭能力的分子通路,重离子辐射可有效抑制肿瘤细胞的迁移行为,进而限制其形成转移灶的能力^[22-23]。张天意等^[24]发现,碳离子可通过诱发线粒体损伤抑制细胞增殖,提示重离子辐射对肺癌细胞的作用涉及多条信号通路及细胞器功能改变,这为探究重离子辐射影响肿瘤细胞迁移的机制提供了潜在关联。以上多层次的生物学作用为高转移风险肿瘤的精准治疗提供了新的策略。

因此,本研究聚焦于迁移体在重离子辐射效应中的作用,特别是 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对细胞迁移及

迁移体形成的影响。实验结果显示, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束可显著抑制A549细胞迁移能力及迁移体形成。进一步研究发现,Tspan4缺失可协同增强 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对肺癌细胞的抑制效应:在细胞迁移方面,Tspan4敲除显著强化了 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对伤口愈合和Transwell迁移的抑制作用,且这种协同作用同样体现在ITGA5和MMP9的表达下调中;在辐射敏感性方面,Tspan4缺失显著增强了 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对肺癌细胞克隆形成的抑制,加剧了辐照诱导的 γH2AX foci形成和微核发生率,并使经 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束处理后的肺癌细胞凋亡率达空白对照组的4.74倍,表明Tspan4缺失可促进辐照诱导的细胞凋亡。综合以上实验数据,我们推测Tspan4缺失提高肿瘤细胞放射敏感性的分子机制如图4所示, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照或敲除迁移体标志蛋白Tspan4均可抑制细胞的迁移及迁移体的形成,同时增加不易修复的DNA损伤和细胞凋亡发生率,抑制细胞正常功能,它们协同作用可进一步增强这一现象。这一结论提示 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照或Tspan4缺失抑制细胞的迁移,影响迁移体的发生,进一步抑制迁移体内包含诸多内容物的释放,势必减少细胞间的通讯和交流,并调控肿瘤微环境。因此,我们推测迁移体可能参与DNA损伤修复信号传递过程,试图通过损伤修复作用促使细胞维持正常功能。

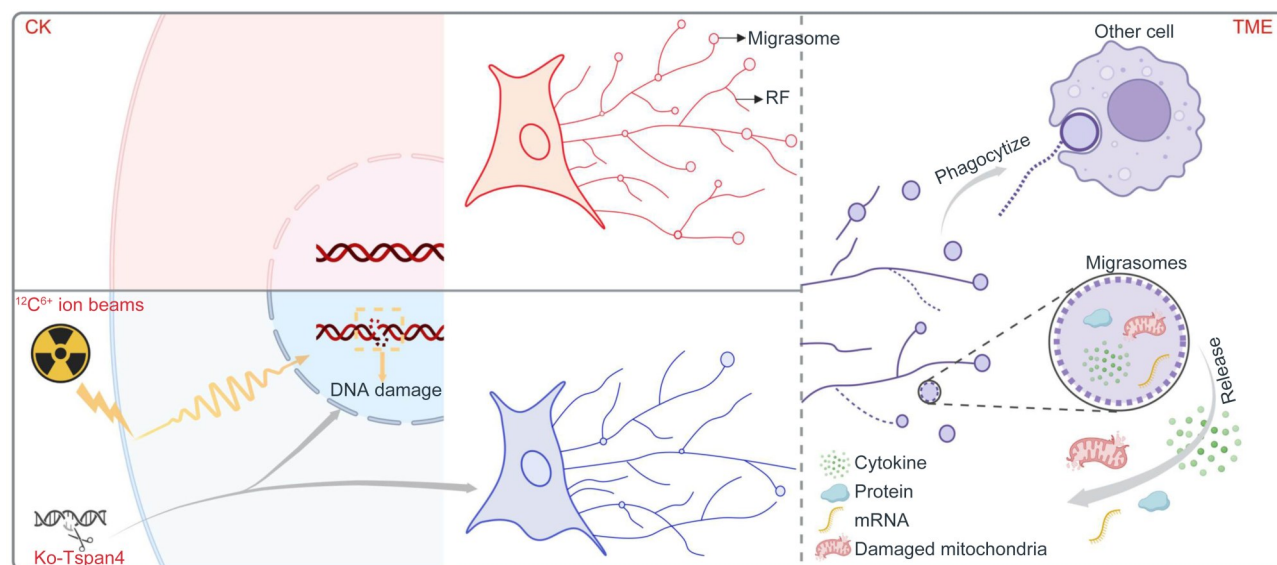


图4 迁移体在肺癌重离子辐射效应中的作用机制
Fig.4 Mechanism of the role of migrasomes in the effects of heavy-ion radiation on lung cancer

综上所述,本研究不仅揭示了 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对细胞迁移和迁移体形成的影响,还阐明了Tspan4在这一过程中的关键作用,为理解重离子辐射效应提供了新的视角和理论基础。本研究结果为进一步优化重离子放疗及探索新型联合治疗策略提供了理论依据。后续将围绕迁移体在放射治疗中的具体分子机制深入探索,以期为肿瘤治疗带来更多突破。

作者贡献声明 马丽娟负责实验设计、数据采集与分析、论文撰写;黄雅丽负责迁移体定量分析、统计学处理;吴庆丰负责辐照实验技术支持;杜亚蓉负责实验设计指导、数据分析指导与论文修改;王菊芳负责课题整体设计、经费支持与论文终审。所有作者均已阅读并同意最终文本。

参考文献

- 1 Bray F, Laversanne M, Sung H, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2024, **74**(3): 229-263. DOI: 10.3322/caac.21834.
- 2 Allemani C, Matsuda T, Carlo V D, *et al.* Global surveillance of trends in cancer survival 2000 – 14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries[J]. The Lancet, 2018, **391**(10125): 1023-1075. DOI: 10.1016/

S0140-6736(17)33326-3.

- 3 Dos Anjos Pultz B, Andrés Cordero da Luz F, Socorro Faria S, *et al.* The multifaceted role of extracellular vesicles in metastasis: priming the soil for seeding[J]. International Journal of Cancer, 2017, **140**(11): 2397-2407. DOI: 10.1002/ijc.30595.
- 4 Tang D Y, Liu S S, Shen H, *et al.* Extracellular vesicles promote the formation of pre-metastasis niche in gastric cancer[J]. Frontiers in Immunology, 2022, **13**: 813015. DOI: 10.3389/fimmu.2022.813015.
- 5 Ma L, Li Y, Peng J Y, *et al.* Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration[J]. Cell Research, 2015, **25**(1): 24-38. DOI: 10.1038/cr.2014.135.
- 6 Jiang Y Y, Liu X, Ye J X, *et al.* Migrasomes, a new mode of intercellular communication[J]. Cell Communication and Signaling, 2023, **21**(1): 105. DOI: 10.1186/s12964-023-01121-4.
- 7 Morrison S J, Scadden D T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells[J]. Nature, 2014, **505**(7483): 327-334. DOI: 10.1038/nature12984.
- 8 Méndez-Ferrer S, Michurina T V, Ferraro F, *et al.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche[J]. Nature, 2010, **466**(7308): 829-834. DOI: 10.1038/nature09262.
- 9 Deniz I A, Karbanová J, Wobus M, *et al.* Mesenchymal stromal cell-associated migrasomes: a new source of chemoattractant for cells of hematopoietic origin[J]. Cell Communication and Signaling, 2023, **21**(1): 36. DOI:

- 10.1186/s12964-022-01028-6.
- 10 Yu S B, Yu L. Migrasome biogenesis and functions[J]. The FEBS Journal, 2022, **289**(22): 7246-7254. DOI: 10.1111/febs.16183.
- 11 Huang Y W, Zucker B, Zhang S J, *et al.* Migrasome formation is mediated by assembly of micron-scale tetraspanin macrodomains[J]. Nature Cell Biology, 2019, **21**(8): 991-1002. DOI: 10.1038/s41556-019-0367-5.
- 12 Shiba S, Okamoto M, Shibuya K, *et al.* Safety and efficacy of re-irradiation with carbon-ion radiotherapy for pelvic recurrence of rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy: a retrospective analysis[J]. In Vivo, 2022, **36**(5): 2473-2480. DOI: 10.21873/in vivo.12983.
- 13 Rieken S, Habermehl D, Wuerth L, *et al.* Carbon ion irradiation inhibits glioma cell migration through downregulation of integrin expression[J]. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics, 2012, **83**(1): 394-399. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2011.06.2004.
- 14 Goetze K, Scholz M, Taucher-Scholz G, *et al.* The impact of conventional and heavy ion irradiation on tumor cell migration *in vitro*[J]. International Journal of Radiation Biology, 2007, **83**(11/12): 889-896. DOI: 10.1080/09553000701753826.
- 15 张秋宁, 杨震, 陈新年, 等. 重离子辐照对肺腺癌 A549 细胞的影响及其机制研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2015, **33**(3): 030202. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2015.rj.33.030202.
ZHANG Qiuning, YANG Zhen, CHEN Xinnian, *et al.* Effects of heavy ion irradiation on lung adenocarcinoma A549 cell and its related mechanism[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2015, **33**(3): 030202. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2015.rj.33.030202.
- 16 Jin X D, Li F F, Zheng X G, *et al.* Carbon ions induce autophagy effectively through stimulating the unfolded protein response and subsequent inhibiting Akt phosphorylation in tumor cells[J]. Scientific Reports, 2015, **5**: 13815. DOI: 10.1038/srep13815.
- 17 Liu Y, Liu Y Y, Sun C, *et al.* Carbon ion radiation inhibits glioma and endothelial cell migration induced by secreted VEGF[J]. PLoS One, 2014, **9**(6): e98448. DOI: 10.1371/journal.pone.0098448.
- 18 Sato K, Nitta N, Aoki I, *et al.* Repeated photon and C-ion irradiations *in vivo* have different impact on alteration of tumor characteristics[J]. Scientific Reports, 2018, **8**(1): 1458. DOI: 10.1038/s41598-018-19422-x.
- 19 刘雁, 杜亚蓉, 孙坤. 基于 CRISPR/Cas9 基因编辑系统构建敲除 TSPAN4 基因的非小细胞肺癌细胞系[J]. 中国细胞生物学学报, 2023, **45**(2): 203-212. DOI: 10.11844/cjcb.2023.02.0003.
LIU Yan, DU Yarong, SUN Kun. Construction of a TSPAN4-knockout non-small cell lung cancer cell line using the CRISPR/Cas9 gene editing system[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2023, **45**(2): 203-212. DOI: 10.11844/cjcb.2023.02.0003.
- 20 Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death[J]. Nature Reviews Cancer, 2006, **6**(6): 449-458. DOI: 10.1038/nrc1886.
- 21 Anzai M, Yamamoto N, Hayashi K, *et al.* Safety and efficacy of carbon-ion radiotherapy alone for stage III non-small cell lung cancer[J]. Anticancer Research, 2020, **40**(1): 379-386. DOI: 10.21873/anticancer.13963.
- 22 Akino Y, Teshima T, Kihara A, *et al.* Carbon-ion beam irradiation effectively suppresses migration and invasion of human non-small-cell lung cancer cells[J]. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics, 2009, **75**(2): 475-481. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2008.12.090.
- 23 Ogata T, Teshima T, Inaoka M, *et al.* Carbon ion irradiation suppresses metastatic potential of human non-small cell lung cancer A549 cells through the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling pathway[J]. Journal of Radiation Research, 2011, **52**(3): 374-379. DOI: 10.1269/jrr.10102.
- 24 张天意, 杨鹏飞, 王菊芳, 等. 碳离子诱发线粒体损伤抑制非小细胞肺癌细胞增殖机理[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2024, **42**(4): 040301. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2024-0013.
ZHANG Tianyi, YANG Pengfei, WANG Jufang, *et al.* Carbon ions inhibit non-small cell lung cancer cell proliferation by inducing mitochondrial damage[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2024, **42**(4): 040301. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2024-0013.