

单次大剂量照射对 Lewis 肺癌移植瘤的放射生物学效应*

万晓莉^{1,2}, 兰洁^{1,2}, 陈永顺^{1,2,3}, 薛建新^{1,2}, 王立帅^{1,2}

宋海侠^{1,2,4}, 邓磊^{1,2}, 凌华⁵, 卢铀^{1,2,△}

1. 四川大学华西医院 肿瘤中心 胸部肿瘤科 (成都 610041); 2. 四川大学华西医院 生物治疗国家重点实验室 (成都 610041);
3. 河南省肿瘤医院 放疗科 (郑州 450008); 4. 甘肃省肿瘤医院 放疗科 (兰州 730050);
5. 成都市第三人民医院 放疗科 (成都 610031)

【摘要】 目的 研究同等生物有效剂量 (biological effective dose, BED) 下, 单次大剂量照射对 Lewis 肺癌移植瘤的生物学作用。方法 构建 Lewis 肺癌 C57 小鼠移植瘤模型, 待移植瘤直径达 4~6 mm 时随机分为 3 组: 空白对照组 (0 Gy 组)、单次大剂量组 (12 Gy/1 f/1 d 组) 及常规照射组 (22 Gy/11 f/15 d 组), 后两组 BED 值均为 26.4 Gy。绘制移植瘤生长曲线, 于第 1 次照射后的第 1、3、8、15、21 d 处死荷瘤小鼠, 收集肿瘤组织并采用流式细胞术、免疫荧光等实验技术检测肿瘤细胞的乏氧、损伤及周期的变化。结果 两种剂量分割模式均可抑制小鼠移植瘤的生长, 单次大剂量组肿瘤生长抑制更为明显 ($P < 0.05$)。单次大剂量组首次照射后第 3、8、15 d 乏氧细胞较常规照射组低 ($P < 0.05$), 且其第 1、3 d 磷酸化组蛋白 (γ -H2AX) 阳性肿瘤细胞数高于后者 ($P < 0.05$)。两种剂量分割模式可使 G_0/G_1 期细胞比例减少, G_2/M 期细胞比例增加, 且单次大剂量组 G_2/M 期细胞增加更为明显 ($P < 0.05$)。结论 同等 BED 不同分割模式下, 单次大剂量放射治疗较常规分割放射治疗对肿瘤的生长抑制作用更为显著, 基于线性二次模型 (LQ 模型) 的 BED 可能低估了大分割放疗的生物学效应。

【关键词】 非小细胞肺癌 单次大剂量 Lewis 肺癌移植瘤 大分割放射治疗

The Bio-effects of High Single-dose Radiation on Xenografts of Lewis Lung Carcinoma WAN Xiao-li^{1,2}, LAN Jie^{1,2}, CHEN Yong-shun^{1,2,3}, XUE Jian-xin^{1,2}, WANG Li-shuai^{1,2}, SONG Hai-xia^{1,2,4}, DENG Lei^{1,2}, LING Hua⁵, LU You^{1,2,△}. 1. Department of Thoracic Oncology, Cancer Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Radiation Oncology, He'nan Tumor Hospital, Zhengzhou 450008, China; 4. Department of Radiotherapy, Tumor Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730050, China; 5. Department of Radiotherapy, Chengdu No. 3 People's Hospital, Chengdu 610031, China

△ Corresponding author, E-mail: radyoulu@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the bio-effects of high single-dose radiation on xenografts of Lewis lung carcinoma. **Methods** Female 8-week-old C57 mice bearing 4-6 mm diameter Lewis lung carcinoma tumors in the hind legs were divided into 3 groups, control group (0 Gy), high single-dose group (12 Gy/one fraction/day) and routine radiation group (22 Gy/11 fraction/15 d). The mean biological effective dose (BED) of both radiation groups was 26.4 Gy. Changes in hypoxia, DNA damage and cell cycle of the tumor cells at 1, 3, 8, 15 and 21 d after first irradiation was assessed by immunofluorescence and flow-cytometry and the tumor growth curve was also made. **Results** Compared to the fractionated treatment, the tumor growth was delayed after single dose irradiation. The percent of hypoxic cells after single dose radiation was lower than fractionated irradiation at 3, 8, 15 d after first radiation. The foci of γ -H2AX showed that the single dose caused heavier DNA damages than fractionated irradiation at 1, 3 d after first radiation. The decline of G_0/G_1 percentage and increase of G_2/M percentage of cells was found in both radiation schedules, but the G_2/M percentage after single dose radiation was higher. **Conclusion** In the C57 mice bearing Lewis lung carcinoma, the high single-dose regimen inhibits the tumor growth more than fractionated irradiation. We hypothesized that conversion of high single-dose to BED using the LQ formalism underestimated the *in vivo* effect of hypofractionated radiation.

【Key words】 Non-small cell lung cancer High single-dose Xenograft of Lewis lung carcinoma Hypofractionated radiation therapy

* 国家“重大新药创制”科技重大专项项目 (No. 2011ZX09302-001-01) 和国家自然科学基金面上项目 (No. 81172131) 资助

△ 通讯作者, E-mail: radyoulu@hotmail.com

肺癌发病率高,增长速度快,治疗效果差,是当前病死率最高的恶性肿瘤之一^[1]。非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌总数的75%~80%。研究数据显示,不能手术治疗的早期 NSCLC 患者,接受常规分割放射治疗(conventional fractionated radiation therapy, CFRT)(总剂量 60~70 Gy, 单次剂量 2 Gy, 治疗 30~35 次, 治疗时间 6~7 周)后局控率达 30%~40%, 3 年生存率仅为 20%~35%^[2]。而近年兴起的大分割放射治疗(hypofractionated radiation therapy, HFRT)通过加大单次剂量,减少治疗次数及治疗时间,在早期 NSCLC 中显示出了满意的治疗效果,已有多个临床研究证实其治疗不能手术的早期 NSCLC 患者局控率达到 80%~100%, 3 年总生存率达 43%~83%^[2-6]。但目前 HFRT 治疗模式多依赖于临床疗效观察或相关经验的积累,放疗方案无统一标准,尤其缺乏相关放射生物学的理论支持。本研究旨在比较同等生物有效剂量(BED)下,单次大剂量对 Lewis 肺癌移植瘤的生物学作用,以期为大剂量分割放疗的临床应用提供更多基础理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型建立

C57BL/6 雌性小鼠由重庆医科大学实验动物中心提供,周龄为 6~8 周,在标准无特异病原体(specific pathogen free, SPF)条件下饲养。将体外培养的处于对数生长期的 Lewis 小鼠肺癌细胞株(四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室提供)制备成细胞悬液,接种于 C57BL/6 小鼠右后腿,每只接种细胞数为 1×10^6 ,建立 Lewis 肺癌细胞小鼠移植瘤动物模型。

1.2 实验分组及处理

待小鼠移植瘤直径约 4~6 mm 时进行实验,实验共分成 3 个组,分别为①空白对照组(0 Gy 组, $n=20$),无任何处理组;②单次大剂量组(12 Gy/1 f/1 d 组,模拟临床 HFRT 治疗, $n=20$),12 Gy 照射 1 次,第 1 d 完成;③常规照射组(22 Gy/11 f/15 d 组,模拟临床 CFRT 治疗, $n=20$),照射 5 次/周,1 次/d,2 Gy/次,共 11 次,15 d 完成。单次大剂量组和常规照射组以公式 $BED=nd(1+d/\alpha/\beta)$ 计算同等 BED。其中 n 为分割次数, d 为单次剂量, $\alpha/\beta=10$ Gy。两组 BED 值均为 26.4 Gy。在第 1 次照射后的第 1、3、8、15、21 d 颈椎脱位处死小鼠,

取部分新鲜瘤组织进行流式细胞术检测,其余肿瘤组织剥取后迅速置于液氮中, -80 °C 保存拟行免疫荧光检测;另留一批小鼠,对照组、单次大剂量组及常规照射组各 15、10、15 只,绘制肿瘤生长曲线。

1.3 照射方法

将荷瘤小鼠以 3.5% 水合二醛麻醉后,室温下给予小鼠右后腿皮下瘤局部放射处理。采用 GWXJ80 型钴 60 远距离治疗机,源皮距(SSD)=80 cm,剂量率为 125 cGy/min。

1.4 观察肿瘤生长

隔日使用游标卡尺测量小鼠移植瘤最大直径(a , mm)、横径(b , mm),按公式 $V=ab^2/2$ 计算肿瘤体积(V , mm^3),并绘制肿瘤生长曲线。按照以下公式计算肿瘤生长抑制率:肿瘤生长抑制率(%)=(1-实验组瘤体积/对照组瘤体积) $\times 100\%$ 。

1.5 流式细胞术

采用外源性乏氧标志物 pimonidazole 检测肿瘤组织乏氧细胞比例^[7,8]。腹腔注射 pimonidazole 60 mg/kg 90 min 后处死小鼠,剥取、剪碎、消化新鲜肿瘤组织制备单细胞悬液, FITC 标记的 pimonidazole 单克隆抗体(1:100, Chemicon International) 4 °C 孵育 45 min, 7-AAD (BD pharMingen)染色去除死细胞后上机检测。采用碘化吡啶(PI)染色法检测细胞内 DNA 含量^[9],将细胞周期各时相区分为 G_0/G_1 期、S 期、 G_2/M 期,凋亡细胞可在 G_0/G_1 期前形成亚二倍体峰,因此可同时区分凋亡细胞(PI-AP)。将单细胞悬液予 70% 冰乙醇溶液于 4 °C 静置固定 24 h,加入 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNA 酶于 37 °C 孵育 30 min, 1 mg/mL PI 4 °C 避光孵育 30 min,经流式细胞仪(BD FACS Array, USA)检测分析细胞周期分布及凋亡细胞。

1.6 免疫荧光检测磷酸化组蛋白(γ -H2AX)

射线作用于细胞可导致细胞核内 DNA 双链断裂(DSB),磷酸化的 γ -H2AX 迅速形成并聚集在 DSB 处,由 γ -H2AX 免疫荧光标记射线照射后发生 DNA 损伤或未修复的阳性肿瘤细胞可反映细胞损伤(或)修复的情况。取各组相应时间点的冻存肿瘤组织切片,40 g/L 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗 3 次,每次 10 min,加入鼠抗人 Anti-phospho. Histone H2AX (Ser139) 单克隆抗体 200 μL (1:1 000, Abcam), 4 °C 孵育过夜, PBS 洗涤,加入荧光二抗, DAPI 染核 10 min, 甘油封片, 荧光显微镜下观察细胞核内 γ -H2AX 红色焦点形成情况。将细胞内出现 ≥ 50 个 γ -H2AX 荧光焦点的肿瘤细胞定

义为阳性细胞,400 倍镜下计数各组相应时间点阳性细胞个数,每组至少计数 200 个细胞^[10]。

1.7 统计学方法

应用 GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA)软件进行分析及作图,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同分割模式对 Lewis 肺癌细胞小鼠移植瘤生长体积变化的影响

两种剂量分割模式均可抑制小鼠移植瘤的生长,首次照射后第 11 d,单次大剂量组即表现出生长抑制的趋势,其肿瘤体积与空白对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。首次照射后第 21 d,两照射组的肿瘤体积与空白对照组相比,单次大剂量组、常规照射组肿瘤生长抑制率分别为 (64.36 ± 9.63)%、(35.36 ± 20.49)% ,单次大剂量组肿瘤生长抑制更为明显 ($P < 0.05$),见图 1。

2.2 不同分割模式下 Lewis 肺癌细胞小鼠移植瘤乏氧细胞的变化

结果见表 1。流式细胞术检测显示各组移植瘤乏氧细胞比例有随时间延长而增加的趋势,首次照射后 1、3 d,常规照射组肿瘤乏氧细胞比例高于空白对照组 ($P < 0.05$),且第 1 次照射后 3、8、15 d 常规照射组乏氧细胞比例高于单次大剂量组 ($P < 0.01$)。首次照射后 8、15 d 单次大剂量组乏氧细胞比例低于空白对照组 ($P < 0.05$)。

2.3 不同分割模式下 Lewis 肺癌细胞小鼠移植瘤细胞周期的变化

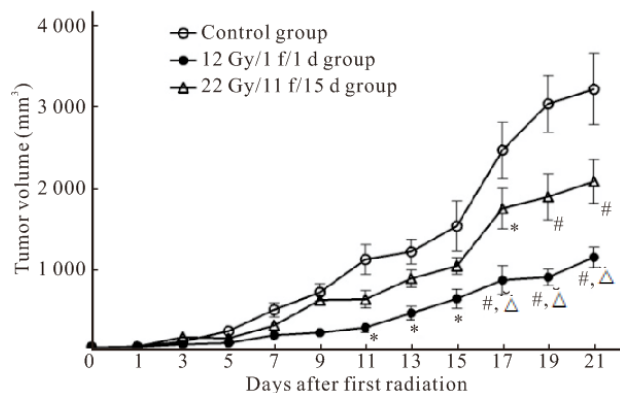


图 1 各组移植瘤生长曲线

Fig 1 The tumor growth curves for different groups

* $P < 0.05$, # $P < 0.001$, vs. control group; $\Delta P < 0.01$, vs. 22 Gy/11f/15 d group

表 1 各组移植瘤乏氧细胞的比例 (%)

Table 1 Percent of hypoxic cells of xenograft tumor (%)

	Control group (n=5)	12 Gy/1 f/1 d group (n=5)	22 Gy/11 f/15 d group (n=5)
1 d	27.28 ± 1.18	30.65 ± 2.72	37.00 ± 5.36*
3 d	35.35 ± 2.90	30.18 ± 5.82	53.03 ± 13.13*·#
8 d	56.68 ± 4.91	45.68 ± 1.24*	63.40 ± 4.93#
15 d	61.55 ± 6.49	49.38 ± 1.64*	63.38 ± 3.19#

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.01$, vs. 12 Gy/1 f/1 d group

结果见表 2。首次照射后 1 d,单次大剂量组 G_2/M 期细胞比例高于空白对照组及常规照射组 ($P < 0.05$)。首次照射后 15 d,常规照射组 G_2/M 期细胞比例较空白对照组更高 ($P < 0.05$)。首次照射后 8、15 d,单次大剂量组 G_2/M 期细胞比例低于常规照射组 ($P < 0.05$)。首次照射后 1、3 d,单次大剂量组 S 期细胞比例低于空白对照组 ($P < 0.05$),首次照射后 15 d,单次大剂量组 S 期细胞比例低于空白对照组及常规照射组 ($P < 0.05$)。首次照射后 1、3 d,单次大剂量组 G_0/G_1 期细胞比例低于空白对照组及常规照射组 ($P < 0.05$)。首次照射后 3、15 d,单次大剂量组凋亡细胞比例高于空白对照组及常规照射组 ($P < 0.05$)。

2.4 不同分割模式下 Lewis 肺癌细胞小鼠移植瘤细胞 DNA 损伤的变化

表 2 各组移植瘤细胞周期变化情况 (%)

Table 2 The change of cell cycle distribution in each group (%)

	Control group (n=5)	12 Gy/1 f/1 d group (n=5)	22 Gy/11 f/15 d group (n=5)
G_2/M			
1 d	9.87 ± 1.26	17.78 ± 2.27*	9.03 ± 1.58 Δ
3 d	10.29 ± 2.00	8.51 ± 1.85	11.27 ± 3.57
8 d	14.92 ± 5.97	13.96 ± 2.67	18.40 ± 4.12 Δ
15 d	9.95 ± 1.68	8.04 ± 1.80	15.31 ± 1.41*· Δ
S			
1 d	9.67 ± 2.21	6.88 ± 0.94*	7.28 ± 0.99
3 d	9.90 ± 1.68	9.83 ± 1.40*	10.12 ± 1.64
8 d	12.82 ± 1.64	10.78 ± 1.43	14.68 ± 2.15
15 d	10.85 ± 1.67	8.85 ± 0.66*	14.25 ± 1.67 Δ
G_0/G_1			
1 d	52.67 ± 4.55	40.09 ± 6.08*	49.89 ± 1.78 Δ
3 d	56.40 ± 3.03	31.17 ± 6.02*	52.13 ± 8.76 Δ
8 d	52.53 ± 4.82	48.09 ± 4.80	50.65 ± 4.49
15 d	57.52 ± 2.04	43.64 ± 3.65	51.45 ± 6.74
Apoptosis			
1 d	24.61 ± 3.22	30.54 ± 11.18	33.26 ± 2.15
3 d	21.55 ± 6.51	52.68 ± 8.77*	25.17 ± 7.03 Δ
8 d	18.09 ± 5.96	25.53 ± 5.09	16.18 ± 7.12
15 d	20.53 ± 3.34	39.38 ± 3.27*	20.76 ± 6.58 Δ

* $P < 0.05$, vs. control group; $\Delta P < 0.05$, vs. 12 Gy/1 f/1 d group

结果见图 2、表 3。随着时间的延长,单次大剂量组 γ -H2AX 阳性肿瘤细胞数呈减少趋势,常规照射组及空白对照组 γ -H2AX 阳性肿瘤细胞数呈增加趋势。单次大剂量组第 1、3、8 d 的 γ -H2AX 阳性肿瘤细胞

数均高于空白对照组 ($P < 0.05$),第 1、3 d γ -H2AX 阳性肿瘤细胞数高于常规照射组 ($P < 0.05$)。常规照射组照射期间的 γ -H2AX 阳性肿瘤细胞数与空白对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

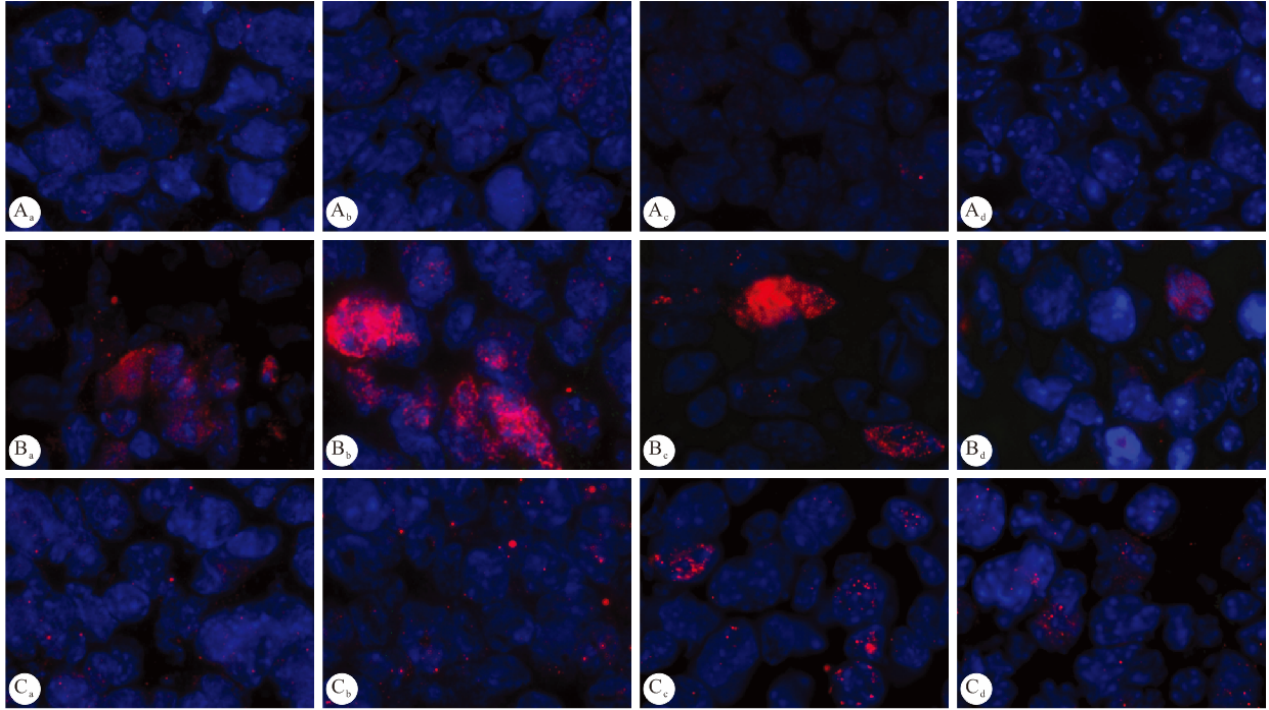


图 2 各组移植瘤细胞 DNA 损伤情况

Fig 2 DNA damage of tumor cells in each group

A: Control group; B: 12 Gy/1 f/1 d group; C: 22 Gy/11 f/15 d; a-d: 1,3,8,15 d, respectively

表 3 各组移植瘤 γ -H2AX 阳性肿瘤细胞数

Table 3 Number of γ -H2AX positive tumor cells of xenograft tumor

	Control group (n=5)	12 Gy/1 f/1 d group (n=5)	22 Gy/11 f/15 d group (n=5)
1 d	1.60±0.89	10.20±5.12*	1.20±0.45 Δ
3 d	2.20±0.84	10.20±1.30*	4.20±2.28 Δ
8 d	2.40±1.67	6.00±2.00*	4.00±2.35
15 d	3.20±1.30	2.60±1.14	5.00±1.22

* $P < 0.05$, vs. control group; Δ $P < 0.05$, vs. 12 Gy/1 f/1 d group

3 讨论

放射治疗是 NSCLC 重要的治疗手段之一^[11,12],CFRT 已沿用了半个多世纪,但疗效并不令人满意。近年来,随着立体定向放疗技术的发展,HFRT 在早期 NSCLC 的治疗中获得了满意的效果,以分次放射剂量高,治疗次数少为特点,其 3 年局部控制率及生存率均优于常规放疗^[13,14]。虽然依据现有临床疗效,推定 HFRT 放射生物学效应与 CFRT 存在差异,但其差异产生的具体机制还不清楚。本研究以线性二次模型(LQ 模型)为基础,设

置 12 Gy/1 f/1 d、22 Gy/11 f/15 d 两种剂量模式照射组,其 BED 均为 26.4 Gy,通过检测乏氧、细胞 DNA 损伤、周期等指标说明单次大剂量与常规放疗内在放射生物学效应存在差异。

在实体肿瘤中普遍存在着细胞乏氧现象^[15],射线照射后,绝大多数放射敏感的有氧细胞会被杀死,存活的大多数是乏氧细胞,其乏氧状态改变反映了肿瘤再氧合的水平^[16]。Carlson 等^[17]通过数学模型说明大分割放疗缩短了治疗时间,可能导致肿瘤细胞不能充分氧合,与常规照射相比细胞杀伤效能降低。但本研究动物实验的结果显示 12 Gy/1 f/1 d 照射后 3、8、15 d 其乏氧细胞的比例较 22 Gy/11 f/15 d 分割照射更低($P < 0.05$)。该结果与其他研究中单次大剂量或分割照射后肿瘤乏氧细胞的变化一致^[18,19]。这可能与放疗造成的细胞死亡增加,肿瘤内部整体代谢减低,以及肿瘤体积生长延迟有关^[20]。由于单次大剂量照射组肿瘤生长受到抑制,其耗氧量相对于常规照射更低,因此肿瘤细胞氧合比例较高,乏氧细胞比例相对降低。此外,本研究组

在对肿瘤血管结构和功能的后续研究中发现, 单次大剂量照射降低微血管密度的同时, 可诱导周细胞覆盖的血管内皮细胞比例增加, 从而改善灌注, 减轻乏氧^[21]。

DNA 是射线诱导细胞死亡的主要靶点, 在 DNA 损伤反应中, 通过显微镜观察 γ -H2AX 焦点的存在, 可以监测受照细胞 DNA 损伤的存在和(或)修复^[22]。本研究中 12 Gy/1 f/1 d 照射后损伤或未修复的细胞比例较 22 Gy/11 f/15 d 更高, 说明前者对于 DNA 的损伤效应更强, 杀灭肿瘤细胞的能力也就更强。正常细胞 DNA 在受到放射线损伤后, 将启动细胞周期检测点, 使细胞停滞于 G₀ 期、S 期、G₂/M 期各个细胞周期检测点, 进行损伤后修复^[23]。在 22 Gy/11 f/15 d 组(15 d)、12 Gy/1 f/1 d 组(1 d)剂量完成后与对照组相比, 均出现了 G₀/G₁ 期细胞比例减少, G₂/M 期细胞比例增加, 表现为 G₂/M 期阻滞, 且 12 Gy/1 f/1 d 组 G₂/M 期细胞阻滞更为明显。12 Gy/1 f/1 d 组与 22 Gy/11 f/15 d 组相比, G₀/G₁ 期肿瘤细胞百分比低, 较多受损细胞未在 G₀/G₁ 期停滞, 未进行 DNA 真实性的检查, 这些受损 DNA 随着细胞周期的进行进入子代细胞内, 细胞无法对损伤进行修复, 从而导致更多的凋亡。而 G₂/M 期细胞阻滞可为受照射细胞进入有丝分裂(即 M 期)前进行 DNA 损伤修复提供一段时间, 从而增加细胞存活的机会。但是由于 12 Gy/1 f/1 d 组较 22 Gy/11 f/15 d 具有更强的 DNA 损伤效应, 可能导致细胞不能通过 G₂/M 检查点, 从而阻止细胞启动有丝分裂, 导致肿瘤的生长延迟^[24]。

LQ 模型^[25,26] 广泛应用于放射生物学和临床放射治疗, 在常规放疗中以 LQ 模型为基础计算 BED 值来比较不同照射方案的生物学效应, 但该模型能否应用于大分割照射方案仍存在争议^[27,28]。在 LQ 模型基础上, Wang 等^[29] 和 Park 等^[30] 分别建立了 gLQ 模型 (generalized LQ formula) 及 USC 模型, 这两种模型均提示 LQ 模型高估了高剂量照射的杀伤效能。也有研究者认为以 $\alpha/\beta=10$ Gy 计算 BED 低估了 HFRT 的生物效能^[31]。但这些模型均未考虑到肿瘤内部环境因素对于疗效的影响, 目前已有研究证明 HFRT 产生的生物学效应不仅仅来源于增加的放疗剂量对肿瘤细胞的杀伤, 大于 8~10 Gy 引起的血管内皮细胞的凋亡可增强放疗的敏感性^[32]。此外, 炎症细胞如巨噬细胞、淋巴细胞等也在 HFRT 造成的损伤中发挥了作用^[33,34]。本研究结果也提示肿瘤细胞乏氧、细胞 DNA 损伤及细胞

周期等因素在不同照射模式下存在差异。

本研究通过对荷瘤小鼠的放射研究显示同等 BED 不同照射模式下, 单次大剂量对于肿瘤的生长抑制作用更为显著, 对于肿瘤细胞的损伤能力更强, 并可通过影响细胞周期的再分布, 引起细胞有丝分裂延迟。本研究结果提示在 LQ 模型的基础上建立的单次大剂量和常规分割照射所产生的生物效应存在差异, 说明使用 LQ 模型不适宜计算大分割放疗的 BED, 且可能低估了其生物学效应。鉴于目前对于大分割生物效应的评价仍存在争议, 尚需更多的基础及临床研究来证实该结论。

参 考 文 献

- 1 Jemal A, Siegel R, Xu J, *et al.* Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 2010;60(5):277-300.
- 2 Timmerman R, Paulus R, Galvin J, *et al.* Stereotactic body radiation therapy for inoperable early stage lung cancer. *JAMA*, 2010;303(11):1070-1076.
- 3 Lo SS, Fakiris AJ, Chang EL, *et al.* Stereotactic body radiation therapy: a novel treatment modality. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010;7(1):44-54.
- 4 Chi A, Liao Z, Nguyen NP, *et al.* Systemic review of the patterns of failure following stereotactic body radiation therapy in early-stage non-small-cell lung cancer: clinical implications. *Radiother Oncol*, 2010;94(1):1-11.
- 5 Fakiris AJ, McGarry RC, Yiannoutsos CT, *et al.* Stereotactic body radiation therapy for early-stage non-small-cell lung carcinoma: four-year results of a prospective phase II study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009;75(3):677-682.
- 6 Chen Y, Guo W, Lu Y, *et al.* Dose-individualized stereotactic body radiotherapy for t1-3n0 non-small cell lung cancer: long-term results and efficacy of adjuvant chemotherapy. *Radiother Oncol*, 2008;88(3):351-358.
- 7 Zips D, Le K, Yaromina A, *et al.* Triple angiokine inhibition, tumour hypoxia and radiation response of fadu human squamous cell carcinomas. *Radiother Oncol*, 2009;92(3):405-410.
- 8 Jankovic B, Aquino-Parsons C, Raleigh JA, *et al.* Comparison between pimonidazole binding, oxygen electrode measurements, and expression of endogenous hypoxia markers in cancer of the uterine cervix. *Cytometry B Clin Cytom*, 2006;70(2):45-55.
- 9 Zhou J, Liu W, Sun L, *et al.* Multiple defects of cell cycle checkpoints in U937-ASPI3K, an U937 cell mutant stably expressing anti-sense ATM gene cDNA. *J Tongji Med Univ*, 2000;20(4):273-276.
- 10 Deng R, Tang J, Ma JG, *et al.* Pkb/akt promotes dsb repair in cancer cells through upregulating mre11 expression following ionizing radiation. *Oncogene*, 2011;30(8):944-955.
- 11 Delaney G, Jacob S, Featherstone C, *et al.* The role of

- radiotherapy in cancer treatment; estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer*, 2005;104(6):1129-1137.
- 12 Delaney G, Barton M, Jacob S, *et al.* A model for decision making for the use of radiotherapy in lung cancer. *Lancet Oncol*, 2003;4(2):120-128.
- 13 Lagerwaard FJ, Haasbeek CJ, Smit EF, *et al.* Outcomes of risk-adapted fractionated stereotactic radiotherapy for stage I non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008;70(3):685-692.
- 14 Brown JM, Koong AC. High-dose single-fraction radiotherapy; exploiting a new biology? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008;71(2):324-325.
- 15 Tatum JL, Kelloff GJ, Gillies RJ, *et al.* Hypoxia; importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. *Int J Radiat Biol*, 2006;82(10):699-757.
- 16 Kallman RF. The phenomenon of reoxygenation and its implications for fractionated radiotherapy. *Radiology*, 1972;105(1):135-142.
- 17 Carlson DJ, Keall PJ, Loo BW Jr, *et al.* Hypofractionation results in reduced tumor cell kill compared to conventional fractionation for tumors with regions of hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011;79(4):1188-1195.
- 18 Chen FH, Chiang CS, Wang CC, *et al.* Radiotherapy decreases vascular density and causes hypoxia with macrophage aggregation in tramp-cl prostate tumors. *Clin Cancer Res*, 2009;15(5):1721-1729.
- 19 Wen QL, Meng MB, Yang B, *et al.* Endostar, a recombinant humanized endostatin, enhances the radioresponse for human nasopharyngeal carcinoma and human lung adenocarcinoma xenografts in mice. *Cancer Sci*, 2009;100(8):1510-1519.
- 20 Kocher M, Treuer H. Reoxygenation of hypoxic cells by tumor shrinkage during irradiation. A computer simulation. *Strahlenther Onkol*, 1995;171(4):219-230.
- 21 Lan J, Wan XL, Deng L, *et al.* Ablative hypofractionated radiotherapy normalizes tumor vasculature in lewis lung carcinoma mice model. *Radiat Res*, 2013;179(4):458-464.
- 22 Rothkamm K, Horn S. Gamma-h2ax as protein biomarker for radiation exposure. *Ann Ist Super Sanita*, 2009;45(3):265-271.
- 23 Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 2004;432(7015):316-323.
- 24 Tobey RA. Different drugs arrest cells at a number of distinct stages in G2. *Nature*, 1975;254(5497):245-247.
- 25 Fowler JF, Stern BE. Dose-rate effects; some theoretical and practical considerations. *Br J Radiol*, 1960;33(390):389-395.
- 26 Radford IR, Hodgson GS, Matthews JP. Critical DNA target size model of ionizing radiation-induced mammalian cell death. *Int J Radiat Biol*, 1988;54(1):63-79.
- 27 Brenner DJ. The linear-quadratic model is an appropriate methodology for determining isoeffective doses at large doses per fraction. *Semin Radiat Oncol*, 2008;18(4):234-239.
- 28 Kirkpatrick JP, Meyer JJ, Marks LB. The linear-quadratic model is inappropriate to model high dose per fraction effects in radiosurgery. *Semin Radiat Oncol*, 2008;18(4):240-243.
- 29 Wang JZ, Huang Z, Lo SS, *et al.* A generalized linear-quadratic model for radiosurgery, stereotactic body radiation therapy, and high-dose rate brachytherapy. *Sci Transl Med*, 2010;2(39):39-48.
- 30 Park C, Papiez L, Zhang S, *et al.* Universal survival curve and single fraction equivalent dose; useful tools in understanding potency of ablative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008;70(3):847-852.
- 31 Stuschke M, Pottgen C. Altered fractionation schemes in radiotherapy. *Front Radiat Ther Oncol*, 2010;42:150-156.
- 32 Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, *et al.* Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science*, 2003;300(5622):1155-1159.
- 33 Szeifert GT, Atteberry DS, Kondziolka D, *et al.* Cerebral metastases pathology after radiosurgery; a multicenter study. *Cancer*, 2006;106(12):2672-2681.
- 34 Lee Y, Auh SL, Wang Y, *et al.* Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8⁺ T cells; changing strategies for cancer treatment. *Blood*, 2009;114(3):589-595.

(2013-08-05 收稿, 2013-11-18 修回)

编辑 余琳