

α 粒子照射诱发细胞存活的旁效应及机理研究

陆颖 杨陟华 曹珍山 樊飞跃 朱茂祥

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

Tom K Hei

(美国哥伦比亚大学放射生物学研究中心 NY 10032)

摘要 以人-中国仓鼠卵巢杂交细胞(A_L细胞)为靶,通过在照射源与受照射细胞间插入网格对细胞进行定比照射,以及用受照射细胞培养液培养未受照射细胞两种方式,检测未受照射细胞存活率变化,研究 α 粒子照射细胞时对未受照射细胞存活的影响。通过观察自由基清除剂二甲基亚砜(DMSO)和细胞间通讯阻断剂 Lindane 对 α 粒子照射诱发的细胞存活旁效应的抑制作用探讨其可能的机理。研究表明, α 粒子照射细胞时的未受照射细胞,以及受 α 粒子照射细胞的培养液培养的未受照射细胞,其存活率均明显低于预期值或正常细胞水平;而 DMSO 和 Lindane 均能明显提高细胞存活率。这提示 α 粒子照射细胞存在旁效应,活性氧和细胞间通讯在 α 粒子诱发细胞存活旁效应中可能起着重要作用。

关键词 α 粒子照射, 细胞存活, 旁效应, 活性氧, 细胞间通讯

中图分类号 Q691.5

近年来,随着对辐射损伤研究的深入,人们发现机体对辐射的反应是群体现象,而不仅是单个细胞对损伤的累积反应。辐射除可损伤直接受照的细胞,还可通过受照射细胞产生一些信号或分泌一些物质引起共同培养的未受照细胞产生同样的损伤效应,即所谓的电离辐射“旁效应”^[1]。“旁效应”(Bystander Effect),也称为“旁观者效应”,即通过细胞接触或细胞间通讯,将接触损伤因素的原始细胞的应答传递给周围并未直接受到损伤因素作用的其它细胞,使之产生与前者相同的应答^[2]。如果这种现象发生在体内,就可以很好地解释极低剂量 α 粒子照射的致癌过程。本实验采用在细胞与放射源之间插入自制网格定比照射细胞,以及用培养过受照射细胞的培养液培养未受照射细胞方法,研究受照射细胞对未受照射细胞存活旁效应的影响,并对其机理进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

25cm²培养瓶、60mm培养皿、1.00mL刻度吸管为 Corning 公司产品;包含单条人类 11 号染色体的人-中国仓鼠卵巢杂交细胞(A_L细胞)由美国哥伦比亚大学放射生物中心 Dr. Hei TK 教授惠赠;DMSO、Lindane 购于 Sigma 公司;F-12 培养液购于 Gibco 公司;胎牛

血清购自北京元亨圣马生物技术研究所; α 粒子照射用玻璃环(Φ 45mm)由本院仪器厂定作;照射网格(Φ 45mm,每 mm²上一个孔,平均孔径 440 \pm 5 μ m,照射比例 15%)为在铝箔纸上用打孔针精确打孔制备;高强度、耐高温的 Mylar 膜(平均厚度 1.93 μ m,密度 1.39 g/cm³)为德国 Kalle Chemile Witsbaden 公司产品; α 粒子照射源(²³⁸Pu 电镀源,活性区直径 50 mm,放射性活度 200 MBq,剂量率为 1.12 Gy/min)购自核工业部 404 厂; α 粒子照射装置由本实验室设计,核工业部 401 厂定制;其余均为市售国产分析纯试剂。

1.2 细胞培养及处理

A_L细胞用含 8%胎牛血清和 25 μ g/mL 庆大霉素的 F12 培养液培养为 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、95%湿度的培养箱中。收集细胞时,用含 0.05%胰酶(Sigma)和 0.02%EDTA-4Na 的 d-Hank's 液消化,并用 d-Hank's 液洗 2—3 次,计数细胞数。按 1 \times 10⁶接种 α 粒子照射皿,24 h 后用 α 粒子照射装置进行照射。DMSO(1%)或 Lindane(40 μ mol/L)在 α 粒子照射前 1—2 h 加入。

1.3 细胞存活分数测定

细胞经 α 粒子(直接或加入网格)照射,或用照射细胞的培养液培养 24 h 后,接种于培养皿中。继续培养 6—7 d 后用 PBS 洗涤 2—3 次,甲醇固定 15 min,

全军十五指令性课题(01L061)资助

第一作者:陆颖,女,1973年10月出生,1998年毕业于华北煤炭医学院,现卫生毒理学硕士研究生,卫生毒理学专业

通讯联系人:朱茂祥

收稿日期:初稿 2002-03-22,修回 2002-04-22

Giemsa 染色 15 min, 冲洗晾干, 在显微镜下计数多于 50 个细胞的克隆数。分别按下式计算细胞接种效率 (PE)、存活分数 (SF)、预期接种效率 (EPE)、以及预期存活分数 (ESF):

$$\begin{aligned} PE(\%) &= 100\% \times (C/N); \quad SF(\%) = 100\% \times (PE_D/PE_0); \\ EPE(\%) &= 100\% \times [N \times p \times PE_D + N \times (1-p) \times PE_0]/N; \\ ESF(\%) &= 100\% \times (EPE/PE_0). \end{aligned}$$

式中, C 为计数的克隆数; N 为接种细胞数; p 为受照射细胞比例(本实验中为 15.47%); PE_D 为受照射细胞接种效率; PE_0 为正常细胞接种效率。

1.4 统计分析

用 SAS 软件系统进行回归和方差分析。

2 实验结果

2.1 α 粒子照射 A_L 细胞的存活曲线

α 粒子照射 A_L 细胞的存活曲线如图 1 所示。从图 1 中可以看出, 经指数模型拟合后, A_L 细胞的存活分数随着 α 粒子照射剂量增大, 呈线性下降趋势, 剂量效应曲线为: $S(\%) = 100e^{-1.3173D}$, 经计算其 $D_{50} = 0.526$ Gy, $D_{37} = 0.755$ Gy。

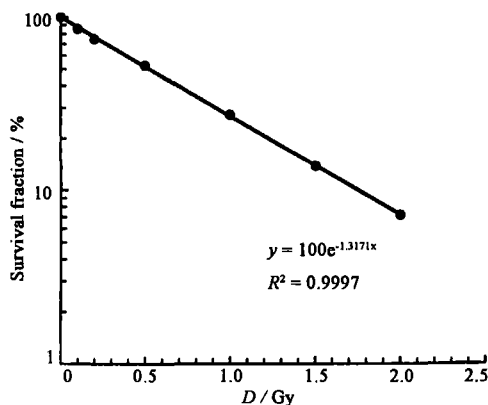


Fig.1 Survival curve of alpha-particle irradiated AL cells.

2.2 α 粒子照射 A_L 细胞的存活旁效应

2.2.1 插入网格定比照射 A_L 细胞 在 α 粒子照射源与受照射细胞间插入网格对细胞进行定比照射, 观察细胞的存活分数, 结果如表 1 所示。从表 1 中可以看出, 与预期存活分数比较, 观察到的实际存活分数明显减少, 其中, 0.5Gy 和 1.0Gy 剂量组有显著性差异。提示 α 粒子照射后, 除直接受到照射的细胞外, 未受到照射的细胞的存活也受到影响, 即存在旁效应。

2.2.2 α 粒子照射细胞的培养液培养未受照 A_L 细胞 用 0.5 Gy α 粒子照射 A_L 细胞, 分别在照射后 0、6、12、24 h 将照射细胞的培养液转移至未受照射的细胞中, 细胞存活分数的测定结果如图 2 所示。从图 2 中

可以看出, 照射细胞的培养液使未受照射细胞的存活分数减少(未转移培养液细胞的存活分数为 100%), 其中早期和晚期转移培养液降低更明显。提示细胞受到 α 粒子照射后, 释放到培养液中的活性物质对未受到照射的细胞发生了作用, 即存在旁效应。

Tab.1 Survival fraction (SF) of alpha-particle irradiated (fixed proportion) A_L cells

Dose /Gy	SF /%	
	Observed	Expected
0	100.00 ± 3.27	100.00
0.2	93.84 ± 2.71	95.35
0.5	68.27 ± 0.71 ⁽²⁾	92.62
1.0	80.76 ± 1.40 ⁽¹⁾	89.92
2.0	83.81 ± 2.46	87.08

$n=15$ (3 × 5), ⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$ vs expected value

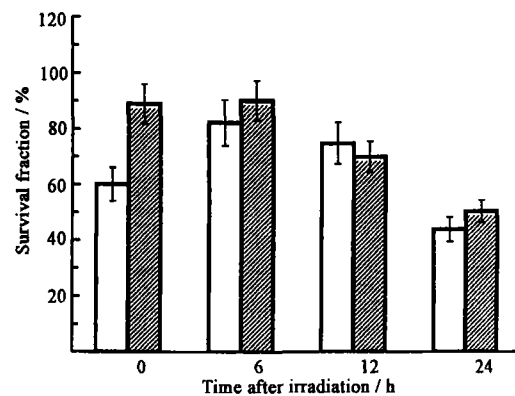


Fig.2 Effect of medium of irradiated cells on the survival of A_L cells and the protective effect of DMSO (shadow).

2.3 活性氧在粒子照射诱发细胞存活旁效应中的作用

2.3.1 DMSO 对插入网格定比照射细胞的存活的影响 在用 0.5Gy α 粒子加网定比照射 A_L 细胞时, 观察 DMSO 对细胞存活的影响, 结果如表 2 所示。从表 2 中可以看出, DMSO 对未受照射的正常 A_L 细胞的存活无影响, 但能明显提高 α 粒子照射细胞的存活分数, 表明 DMSO 一方面可能对 α 粒子照射细胞有保护作用, 另一方面可能抑制 α 粒子照射诱发的旁效应。提示活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 可能是 α 粒子照射诱发细胞存活旁效应的因素之一。

2.3.2 DMSO 对转移照射细胞培养液培养未受照细胞的存活影响 在 0.5Gy α 粒子照射细胞的培养液中加入 DMSO, 观察其对未受照射细胞存活的影响, 结果如图 2 所示。从图 2 中可以看出, DMSO 能明显增加早期转移培养液培养的未受照射细胞的存活分数,

ROS 是 α 粒子照射诱发细胞存活旁效应的因素之一。

2.4 细胞间通讯在粒子照射诱发细胞存活旁效应中的作用

在用 0.5Gy α 粒子加网定比照射 A_L 细胞时, 观察

细胞间通讯阻断剂 Lindane 对细胞存活的影响, 结果如表 2 所示。可以看出, Lindane 对未受照射的正常 A_L 细胞的存活无影响, 但能明显提高 α 粒子照射细胞的存活分数, 提示细胞间通讯在 α 粒子照射诱发细胞存活旁效应中起重要作用。

Tab.2 Inhibitory of DMSO and Lindane on bystander effect induced by alpha-particle irradiation (fixed proportion) of A_L cells

Dose /Gy	SF /%			
	Alpha-particle		Alpha-particle+1% DMSO	Alpha-particle+40 μ M Lindane
	Observed	Expected		
0	100.00 \pm 3.47	100.00	101.66 \pm 2.10	100.92 \pm 2.86
0.5	52.33 \pm 1.39	92.62	95.27 \pm 1.52 ⁽¹⁾	86.05 \pm 2.74 ⁽¹⁾

$n=15(3\times 5)$, ⁽¹⁾ $p<0.001$ vs alpha-particle irradiation

3 讨论

1992 年, Nagasawa 等^[3]最早观察到旁效应存在, 他们发现当只有 1% 的细胞受到 α 粒子照射时, 30—50% 的细胞发生了姐妹染色体互换。此后, 许多研究报道都证实了这一现象^[4-7], 特别是在低剂量照射的生物效应中普遍存在。目前, 研究旁效应的试验模型主要有: (1)用微束照射装置定点定比照射细胞^[8]; (2)在细胞与放射源之间插入网格, 定比照射^[9]; (3)用培养过受照细胞的培养液培养未受照射细胞^[10]。观察到旁效应的生物学效应主要包括细胞死亡^[11]、细胞增殖反应^[12]、细胞凋亡^[13]、基因突变^[14]和基因组不稳定性等^[15]。本研究中, 我们用在细胞与照射源之间插入网格定比照射, 以及用照射细胞的培养液培养未受照射细胞, 观察 α 粒子照射的细胞存活旁效应, 结果显示, 当 15% 的细胞受到 α 粒子照射时, 观察到的细胞存活率明显低于预期值。其中, 0.5 和 1.0Gy 的 α 粒子照射最为显著(见表 1), 提示 α 粒子照射除导致直接受到照射细胞的增殖死亡外, 还使周围未受到照射的细胞出现不同程度的增殖死亡, 即表明 α 粒子照射诱发的细胞增殖死亡存在旁效应。2.0Gy α 粒子照射后的观察值与预期值经统计分析没有差异, 可能是由于 2.0Gy 照射使大部分受照细胞死亡, 导致旁效应消失。用 α 粒子照射后的细胞培养液培养未受照射细胞, 结果使未受照射细胞的存活率明显降低, 而单纯照射没有细胞的培养液没有这种效果^[16], 表明受 α 粒子照射后细胞释放到培养液中的某些活性物质介导了未受照射细胞出现与受照射细胞类似的反应, 即旁效应。实验中还发现, α 粒子照射后不同时间转移

的培养液, 对细胞存活的影响也不同, 早期和晚期的影响较大, 推测早期可能主要是活性氧等短寿命活性物质起作用, 而晚期则可能是一些细胞因子的影响。是否如此还有待进一步研究证实。

关于辐射诱发旁效应的机理, 目前的研究认为主要有两个方面, 一是受照射细胞释放的一些活性物质或信号分子对未受照射细胞发生作用^[17], 二是细胞间通讯连接介导这一过程^[18]。本研究用活性氧清除剂 DMSO 和细胞通讯阻断剂 Lindane 对旁效应产生的可能机制进行了初步探讨, 结果表明, DMSO 对加网定比照射和转移受照射细胞的培养液诱发的细胞增殖死亡的旁效应均有明显的抑制作用(见图 2 和表 2), 虽然加网照射不能排除可能是由于 DMSO 对 α 粒子照射细胞的保护效果, 但转移培养液的实验结果可以充分表明活性氧在介导旁效应的产生中起作用。正如图 2 结果所示, 对照射后早期的转移培养液, DMSO 能明显提高细胞的存活率, 但随着时间的延长作用越来越不明显, 12 h 后几乎没有作用, 这不仅证实活性氧自由基在诱发旁效应中的作用, 而且还提示受照细胞释放的一些长效因子也参与了旁效应的过程。这些长效因子的鉴定及其作用机理也有待进一步研究探索。细胞与细胞间通讯即细胞通过细胞间连接直接进行信息物质的交换, 主要是指缝隙连接细胞间通讯。缝隙连接是相邻质膜间形成的一种能开放和关闭的一种特殊通道, 当其开放时能允许相邻的细胞交换物质信息如代谢产物 Ca^{2+} 、 K^+ 及其它小分子物质通过, 完成组织间及细胞群体内的信号传递, 进而调节控制细胞的增殖分化和代谢功能^[19]。本研究观察到 Lindane 能明显增加加网定比照射细胞的群体存活率, 结果达到接近预期值的水平, 表明 Lindane 抑制了 α 粒子照

射细胞诱发的旁效应,提示缝隙连接细胞间通讯介导了 α 粒子照射诱导的细胞存活旁效应。

参考文献

- 1 Nagasawa H, Little J B. Radiat Res, 1999, **152**(5): 552-557
- 2 Djordjevic B. Bioessays, 2000, **22**(3): 286-290
- 3 Nagasawa H, Little J B. Cancer Res, 1992, **52**(22): 6394-6396
- 4 Zhou H, Gerhard R P, Waldren C A. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97**(5): 2099-2104
- 5 Deshpande A, Goodwin E H, Bailey S M *et al.* Radiat Res, 1996, **145**(3): 260-267
- 6 Vrionis F D, Wu J K, Qi P *et al.* J Neurosurg, 1995, **83**(4): 698-704
- 7 Lehnert B E, Goodwin E H. Cancer Res, 1997, **57**(11): 2164-2171
- 8 Prise K M, Belyakov O V, Folkard M *et al.* Int J Radiat Biol, 1998, **74**(6): 793-798
- 9 Mothersill C, Stamato T D, Perez M L. Br J Cancer, 2000, **82**(10): 1740-1746
- 10 Mothersill C, Seymour C. Int J Radiat Res, 1997, **71**(4): 421-427
- 11 Seymour C B, Mothersill C. Radiat Res, 2000, **153**(5pt 1):508-511
- 12 Lorimore S A, Kadhim M A, Pocock D A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1998, **95**(10): 5730-5733
- 13 Bishayee A, Rao D V, Howell R W. Radiat Res, 1999, **152**(1): 88-97
- 14 Grosovsky A. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, **96**(10): 5346-5347
- 15 Seymour C B, Mothersill C. Radiat Oncol Investig, 1997, **5**(3): 106-110
- 16 Mothersill C, Seymour C B. Radia Res, 1998, **149**(3): 256-262
- 17 Iyer R, Lehnert B E. Cancer Res, 2000, **60**(5): 1290-1298
- 18 Seymour C, Mothersill C. Radiat Res, 1999, **151**(4): 505-506
- 19 Azzam E I, Toledo S M D, Gooding T *et al.* Radiat Res, 1998, **150**(5): 497-504

BYSTANDER EFFECT OF ALPHA-PARTICLE IRRADIATION ON CELL SURVIVAL AND ASSOCIATED MECHANISM

LU Ying YANG Zhihua CAO Zhenshan FAN Feiyue ZHU Maoxiang

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medicine Science, Beijing 100850)

Tom K Hei

(Center for Radiological Research, Columbia University, New York, NY 10032, USA)

ABSTRACT Human-hamster hybrid cells (A_L cells) were used for observing survival bystander effect induced by alpha-particle irradiation through both models: inserting a grid between the radiation source and the sample to irradiate 15% of the cells, and using the medium of the irradiated cells to culture the unirradiated cells. Free radical scavenger DMSO and intercellular communication inhibitor lindane were selected to investigate the potential mechanism of alpha-particle irradiation-induced bystander effect. Results show that the survival fraction of unirradiated cells shielded by the grid or cultured with the medium of the irradiated cells were much lower than expected or normal level. However, DMSO and lindane could obviously increase cell survival fraction. These indicate that alpha-particle irradiation could induce bystander effect, and reactive oxygen species, and intercellular communication might play an important role in the process.

KEYWORDS α -particle irradiation, Cell survival, Bystander effect, Reactive oxygen species, Intercellular communication

CLC Q691.5