

H1299 旁效应细胞对 X-射线辐射的 适应性与 TGF- β 1 通路相关

蒋友芹 田文倩 尹晓明 王敬东 杨红英

(苏州大学医学部放射医学与防护学院/放射医学及交叉学科研究院 苏州 215123)

摘要 本研究探索辐射诱导人非小细胞肺癌 H1299 旁效应细胞的适应性反应及 TGF- β 1 通路在其中的作用。采用培养液转移法得到辐射诱导的旁效应细胞,用克隆形成实验检测旁效应细胞受照射后的适应性反应,用 Western Blotting 检测旁效应细胞中 SOD2 的表达变化。结果发现:用条件培养液培养 H1299 旁效应细胞,并不影响细胞的克隆存活率;但是细胞经 1 h 和 18 h 未照射条件培养液培养后再接受 2 Gy 的 X-射线照射,其细胞存活率较培养于新鲜培养液的细胞受照后的存活率分别增加了 12%和 38%,经 1 h 和 18 h 照射条件培养液培养后的细胞再接受 2 Gy 的 X-射线照射,其细胞存活率在此基础上又分别增加了 10%;当在照前用 TGF- β 1 抑制剂 SB431542 处理信号细胞后,旁效应细胞的适应性反应不再发生;而将 SB431542 直接加入条件培养液中,并未影响 1 h 条件培养液诱导的适应性,但是用含有 SB431542 的 18 h 未照射和照射条件培养液培养过的旁效应细胞经 2 Gy 照射后,其克隆存活率较未加 SB431542 组分别降低了 28%和 18%,18 h 未照射和照射条件培养液组间差异却增大至 24%;旁效应细胞经照射条件培养液培养 3 h 或 5 h 后其 SOD2 表达下降。以上结果表明经条件培养液培养后旁效应细胞对 X-射线照射产生了适应性反应,照射条件培养液与未照射条件培养液相比,进一步增加了这种适应性,并且 TGF- β 1 信号通路对该适应性有重要调控作用,而 SOD2 可能未参与这个过程。

关键词 电离辐射旁效应, 适应性, TGF- β 1 信号通路, SOD2, 肺癌细胞

中图分类号 Q691, TL71

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2014.rj.32.030205

传统放射生物学中的标靶理论认为细胞只有受到直接电离辐射,才会产生生物学效应。然而,近几十年来关于电离辐射诱导旁效应和适应性等现象的研究结果严重质疑了该理论的准确性。旁效应是指受照射细胞传递信号给未受照射细胞,从而使未受照射细胞发生一系列诸如基因表达改变^[1-2]、基因突变^[3-4]、DNA 损伤^[5-6]、细胞死亡^[1,7]及恶性转化^[8]等的生物学改变。目前为止,大量体外^[1,8]、体内^[9]证据证实了辐射诱导旁效应的存在。传统的适应性描述的是当细胞先用一个小剂量照射后,再接受大剂量照射时变得具有抗性的现象,这个现象在体内外均曾被观察到^[10-11]。

近年来有证据显示电离辐射诱导的旁效应和适

应性之间可能存在关联^[12]。辐射诱导的旁效应细胞在受到大剂量照射时与适应性现象中的细胞预先受过小剂量照射一样变得具有抗性^[13]。相反地,预先给予旁效应细胞一个低剂量照射可使旁效应不再出现^[14]。然而这样的关联并非具有普适性。例如,研究发现辐射诱导的 H460 和 A549 旁效应细胞的辐射敏感性反而增加了^[15]。这些看似矛盾的结果表明深入研究旁效应和适应性之间的关系将有助于对这些现象分子机制的理解。

研究显示转化生长因子 β 1(TGF- β 1)可能在辐射诱导旁效应现象中发挥着重要的调控作用^[16-17]。加入 TGF- β 1 抑制剂之后, T98G 细胞辐射诱导旁效应现象(微核形成和细胞存活能力)消失了^[16-17],

基金资助: 国家自然科学基金(31270898, 11335011)、江苏省教育厅省属高校自然科学研究重大项目(12KJA310005)和江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)资助

第一作者: 蒋友芹, 女, 1988 年 11 月出生, 2011 年毕业于苏州大学医学部放射医学专业, 现为苏州大学医学部放射医学与防护学院在读硕士研究生, E-mail: jyq654336870@163.com

通讯作者: 杨红英, 博士, 教授, E-mail: yanghongying@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2014-03-26; 修回 2014-04-22

提示受照射细胞释放出的 TGF- β 1 信号因子可能作用于旁效应细胞,诱导旁效应细胞产生自由基,从而导致 DNA 损伤^[16]。但是 TGF- β 1 是否也在适应性中发挥重要作用却鲜有报道。另外,锰超氧化物歧化酶(SOD2)被发现参与了传统适应性反应的发生^[18]。因此本研究以 H1299 人非小细胞肺癌细胞为研究对象,研究辐射诱导的旁效应细胞是否存在适应性的现象,并探讨 TGF- β 1 信号通路和 SOD2 在此过程中可能发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

人非小细胞肺癌细胞 H1299 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库;胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;RPMI1640 培养基、丙酮酸钠、二甲基亚砷(Dimethyl sulfoxide, DMSO)和 TGF- β R1 抑制剂(SB431542)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;HEPES 缓冲液购自中国南京旋光科技有限公司;青霉素-链霉素-胰酶消化液和抗辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)购自中国碧云天生物技术研究所;抗 SOD2 小鼠单克隆抗体购自美国 BD 公司;化学发光剂(ECL)购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和辐照

H1299 细胞以适当比例接种于含有 10%胎牛血清、2.5 g·L⁻¹ 葡萄糖、1 mmol·L⁻¹ 丙酮酸钠、100 U·mL⁻¹ 青霉素、100 μ g·mL⁻¹ 链霉素及 1 mmol·L⁻¹ HEPES (pH 7.2)的 RPMI1640 培养液中,放置于 37 °C、含 5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,隔天换液。

细胞在 20 °C 下采用美国 RAD SOURCE RS2000 X-射线机进行照射,能量为 160 kVp,距离为 40 cm,剂量率为 1.16 Gy·min⁻¹。用来提取照射条件培养液的细胞吸收剂量为 5 Gy,用来研究辐射适应性的吸收剂量为 2 Gy。

1.2.2 条件培养液的提取

本文采用培养液转移法获得经培养液介导的辐射诱导旁效应细胞。取 100–120 万个细胞接种于 100 mm 的培养皿中,培养 24 h 后,更换新鲜的培养液并用 X-射线照射,剂量为 5 Gy。继续培养 1 h 或 18 h 后,收集培养液并用无菌过滤器(Φ 0.22 μ m)过

滤以去除细胞碎片。为方便起见,在本文中提供旁效应信号的照射细胞被称为信号细胞,接收条件培养液处理的未照射细胞被称为旁效应细胞。照射后 1 h 和 18 h 收集的条件培养液分别被称为 1 h 照射条件培养液(1 h RCM)和 18 h 照射条件培养液(18 h RCM)。相对应的未照射组被称为未照射条件培养液(1 h SCM 和 18 h SCM)。另外,采用新鲜培养液作为空白对照(Control)。

1.2.3 克隆形成实验

取对数生长期的细胞制成单细胞悬液接种于 60 mm 的培养皿中,每皿分别接种 100 个细胞,每个处理组设 3 个平行样。24 h 后,去除原培养液,分别更换为新鲜培养液、1 h RCM、1 h SCM、18 h RCM 或 18 h SCM,继续培养 13 d 之后,弃培养液,用 PBS 快速洗 3 遍,甲醇固定 15 min、亚甲基蓝染色 30 min,用清水将培养皿洗净晾干。于显微镜下计数含 50 个细胞以上的细胞集落。克隆形成率和细胞克隆存活率按如下公式计算:克隆形成率(%) = (克隆数/接种细胞数)×100%;细胞克隆存活率 = 处理组克隆形成率/对照组克隆形成率。

1.2.4 Western Blotting 检测旁效应细胞的 SOD2 表达水平

旁效应细胞经过 1 h RCM、1 h SCM、18 h RCM 或 18 h SCM 培养 3 h 或 5 h 后,用预冷的 PBS 溶液冲洗 3 遍,加入适量细胞裂解液(0.1%曲拉通 X-100、10 mmol·L⁻¹ Tris (pH 7.4)、10%甘油、150 mmol·L⁻¹ 氯化钠、5 mmol·L⁻¹ EDTA、1 mmol·L⁻¹ 原钒酸钠、1 mmol·L⁻¹ 苯甲基磺酰氟(PMSF)和 0.1%蛋白酶抑制剂),在 4 °C 裂解 30 min 后,13000×g 4 °C 离心 10 min,取上清,并用 Bradford 蛋白定量方法测定蛋白浓度。取适量样品并加入 1/4 体积的 5×SDS-PAGE 上样缓冲液,95 °C 加热 5 min 使蛋白变性。然后用 12%的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白(200 V, 30–60 min)。等到蛋白分离完成后,将蛋白转膜至 PVDF 膜(100 mA, 2 h)。膜用含 5%脱脂奶粉的 TBST(100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl/pH7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween-20)进行非特异性封闭。加入抗 SOD2 小鼠单克隆抗体 4 °C 孵育过夜,膜用 TBST 溶液清洗 3 遍,加入二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)室温孵育 45 min。膜用 TBST 清洗 3 遍,加入化学发光剂(ECL),用多功能激光扫描成像系统(美国 Amersham 公司 Typhoon 9410)进行曝光成像。

1.2.5 统计学方法

所有数据都是至少 3 次独立实验的平均,并用均数加减标准误差表示 ($\bar{x} \pm s$)。采用 Origin 8.0 软件的 Student's T 检验进行组与组间的比较分析, $p < 0.05$ 被认为两组间的差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各条件培养液对旁效应细胞的克隆存活率无影响

本研究采用培养液转移的方法,检测了 X-射线诱导 H1299 旁效应细胞的克隆形成能力的改变情况。如图 1 所示,与正常对照组相比,1 h 和 18 h 收集的未照射条件培养液并未改变旁效应细胞的克隆形成能力,且这两个时间点收集的照射条件培养液也未改变旁效应细胞的克隆存活率,提示 X-射线不能诱导经培养液介导的 H1299 旁效应细胞克隆能力的改变。

2.2 H1299 旁效应细胞对 X-射线照射出现适应性

本研究探讨了用照射和未照射条件培养液培养的 H1299 旁效应细胞,经 2 Gy 的 X-射线照射后,其细胞克隆存活率的改变情况。如图 2a 所示,与未受照射细胞相比,H1299 细胞直接接受 2 Gy 照射后其克隆存活率降低了 14% ($p < 0.01$);但如果细胞先在培养过未受照射 H1299 细胞的条件培养液(1 h SCM)中培养 24 h 后再接受照射,其克隆存活率与未受照射细胞相比只降低了 4% ($p = 0.085$),与直接照射细胞相比却增加了 12% ($p < 0.01$);而细胞如果先

在培养过受照 H1299 细胞的照射条件培养液(1 h RCM)中培养 24 h 后再接受照射,其克隆存活率竟超过了未受照射细胞,增加了约 5% ($p = 0.068$),与直接照射细胞相比增加了 22% ($p = 0.012$)。并且,用长时间培养过未受照和受照 H1299 细胞的条件培养液(18 h SCM 和 18 h RCM)培养后再接受照射,细胞的克隆存活率进一步增加,与未受照射细胞相比,分别增加了 20% 和 31%,比直接照射细胞分别增加了 38% 和 52% (图 2b)。有意思的是,无论照后 1 h 还是 18 h 收集的条件培养液,RCM 培养过的细胞与 SCM 培养过的细胞相比,其受照后克隆存活率都约高 10%。这些结果提示 H1299 旁效应细胞经未照射条件培养液培养后出现了对辐射的适应性,而照射条件培养液进一步增加了这种适应性,并且该适应性的大小与收集条件培养液的时间有关。

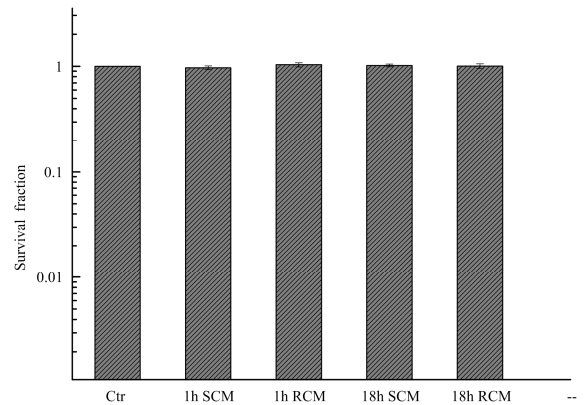


图 1 H1299 旁效应细胞经条件培养液(1 h SCM、1 h RCM、18 h SCM 或 18 h RCM)培养后的克隆存活率

Fig.1 The clonogenic cell survival of H1299 unirradiated bystander cells cultured in SCM or RCM harvested at 1 h or 18h post-irradiation

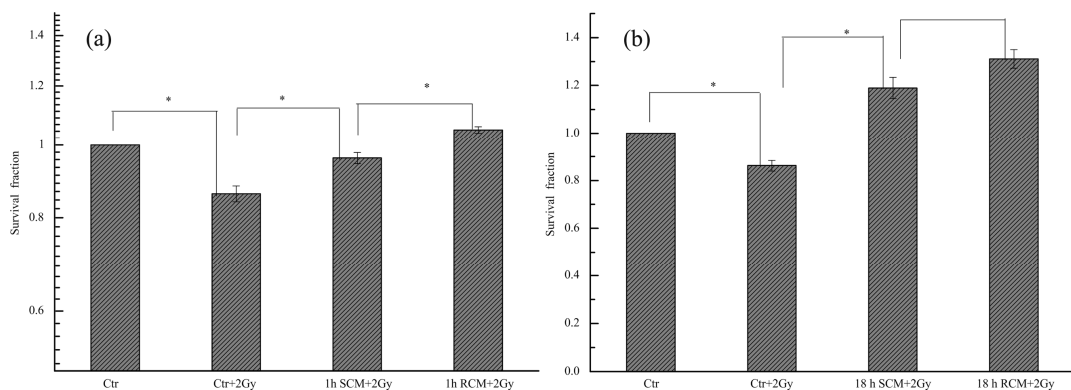


图 2 接受不同处理的 H1299 细胞受照后的克隆存活能力: (a) 1 h 条件培养液培养 24 h 后加照 2 Gy; (b) 18 h 条件培养液培养 24 h 后加照 2 Gy(*代表两组相比, $p < 0.05$)

Fig.2 The survival fraction of H1299 bystander cells irradiated with 2 Gy X-rays after cultured in 1 h conditioned medium (a) or 18 h conditioned medium (b) for 24 h (* $p < 0.05$ vs. relative controls)

2.3 H1299 旁效应细胞的辐射适应性与 TGF- β 1 信号通路相关

为了探讨 TGF- β 1 信号通路是否参与了辐射诱导 H1299 旁效应细胞的辐射适应性,我们在照射前用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β R1 抑制剂(SB431542)预处理信号细胞 1 h 或收集条件培养液后直接将 SB431542 加入到条件培养液中,然后用与上述相同的方法培养旁效应细胞,观察 SB431542 对辐射诱导 H1299 旁效应细胞辐射适应性的影响。 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 SB431542 对 H1299 细胞的短期增殖和长期克隆形成均无显著影响,SB431542 联合 2 Gy 照射与单独照射相比,也未造成克隆形成率的显著降低(未发表数据)。图 3 显示,当信号细胞在照前用 SB431542 预处理 1 h 后,1 h SCM 培养过的旁效应细胞经 2 Gy 照射,其克隆存活率比直接照射组低 7% ($p=0.34$),比未加 SB431542 组降低了 20% ($p=0.02$);1 h RCM 培养过的旁效应细胞经 2 Gy 照射,其克隆存活率比直接照射组低 11% ($p=0.03$),比未加 SB431542 组降低了 32% ($p<0.01$)。SCM 组与 RCM 组间无显著性差异;而用 18 h SCM 和 18 h RCM 培养过的旁效应细胞经照射,其克隆率与直接照射组之间无统计学差异,却比未加 SB431542 组分别降低了 19% 和 30%,并且 SCM 组和 RCM 组间也没有显著差异。这些结果显示当用 SB431542 抑制了信号细胞中的 TGF- β 1 通路后,条件培养液诱导 H1299 旁效应细胞的辐射适应性消失了。另一方面,当 SB431542 直接加到条件培养液中后,1 h 条件培养液培养过的 H1299 旁效应细胞经 2 Gy 照射后,其克隆率仍较直接照射组高,与未加 SB431542 组无显著差异,并且 SCM 和 RCM 组间仍有 13% 的差异,显示用 SB431542 抑制旁效应细胞自身的 TGF- β 1 通路并不影响 1 h 条件培养液诱导旁效应细胞的辐射适应性;然而,用含有 SB431542 的 18 h SCM 和 18 h RCM 培养过的 H1299 旁效应细胞经 2 Gy 照射后,其克隆存活率较未加 SB431542 组分别降低了 28% 和 18%,18 h SCM 组甚至降至直接照射组水平,但是 18 h SCM 组和 18 h RCM 组间差异增大至 24%,提示用 SB431542 抑制旁效应细胞自身的 TGF- β 1 通路消除了未照射条件培养液诱导旁效应细胞的辐射适应性,但却增加了照射条件培养液和未照射条件培养液之间的差异。所有这些结果表明信号细胞和旁效应细胞中的 TGF- β 1 信号通路对 H1299 旁效应细

胞的辐射适应性有着重要的调控作用。

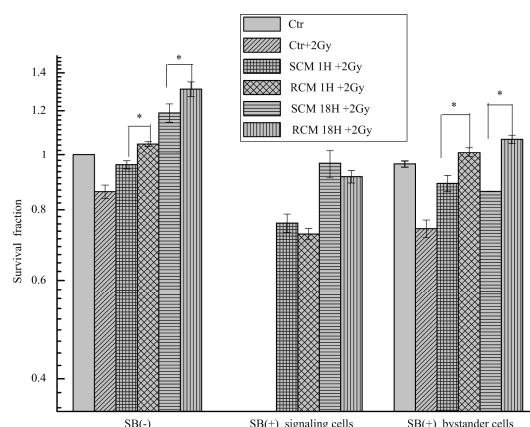


图 3 TGF- β R1 抑制剂(SB431542)对 X-射线诱导 H1299 旁效应细胞辐射适应性的影响 (*代表两组相比, $p<0.05$)

Fig.3 The effects of SB431542 on the radiation adaptive response in bystander cells after cultured in conditioned medium harvested at 1 h and 18 h post-irradiation (* $p<0.05$ vs. relative controls)

2.4 照射条件培养液诱导旁效应细胞 SOD2 表达水平下降

我们通过 western blotting 检测了各条件培养液培养旁效应细胞 3 h 和 5 h 后细胞中 SOD2 的表达情况。如图 4 所示,1 h RCM 培养 3 h 和 5 h 后, H1299 旁效应细胞 SOD2 的表达水平均降低了;18 h RCM 培养 3 h 后, H1299 旁效应细胞 SOD2 表达水平没有明显改变,但是培养 5 h 后, H1299 旁效应细胞 SOD2 表达水平发生了明显的下降。

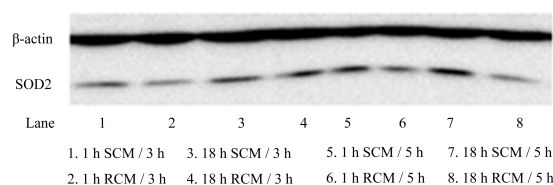


图 4 采用 Western Blotting 检测各条件培养液培养 3 h 和 5 h 后, H1299 旁效应细胞中 SOD2 表达水平改变情况

Fig.4 The alterations of SOD2 expression in bystander cells cultured in conditioned medium harvested at different times post-irradiation for 3 h and 5 h, respectively, which was determined by Western Blotting

3 讨论

本研究证实虽然 X-射线不能影响 H1299 旁效应细胞的克隆存活能力,却可以降低旁效应细胞的辐射敏感性,即旁效应细胞出现了辐射适应性。具体表现为与未照射培养液和未处理细胞相比,在照射后 1 h 或 18 h 收集的照射条件培养液均不能改变

H1299 旁效应细胞的克隆存活率(图 1)。然而有趣的是,旁效应细胞经未照射条件培养液培养后加照 2 Gy,其克隆存活率竟比单独照射组的高(图 2),提示未照射条件培养液可在 H1299 细胞中诱导适应性反应,换句话说,H1299 细胞自身就可释放某种信号因子给接收细胞使其产生辐射抗性;旁效应细胞经照射条件培养液培养后加照 2 Gy,其克隆存活率不仅较单独照射组高,并且显著高于未照射条件培养液组(图 2),表明 X-射线诱导的 H1299 旁效应细胞出现了适应性反应,也即是 X-射线诱导受照细胞产生信号因子,从而使旁效应细胞的辐射敏感性降低。这与文献[15]报道的结果不一致,该研究显示与接受未照射培养液处理后加照 2 Gy 的细胞相比,H460 和 A549 细胞在接受其照射条件培养液处理后加照 2 Gy,其克隆存活率显著降低,即旁效应细胞未发生适应性反应。巧合的是 H460 细胞和 A549 细胞刚好都具有野生型的 tp53,而 H1299 细胞的 tp53 是突变型的。tp53 是否在辐射诱导旁效应细胞的适应性中发挥某种作用需要进一步研究。这些结果与传统的适应性反应不相同,有研究发现传统的适应性反应发生在野生型 tp53 的细胞中,而不发生在突变型 tp53 的细胞中^[20]。这些提示旁效应细胞的辐射适应性与传统的辐射适应性可能不同。另外令人惊讶的是,旁效应细胞接受 2 Gy 的 X-射线照射后,其克隆形成率居然大于未处理细胞。研究发现,H1299 细胞含有 81.3%的 CD44 阳性细胞,而这些细胞同时表达多能性和间质转换的标志物,具有干细胞的自我更新和分化潜能的特点,成瘤效率较 CD44 阴性细胞高,对顺铂具有抗性,并且长期的顺铂处理将导致 CD44+细胞的比例增加到 96.2%^[21];另一方面,2 Gy 的 γ -射线照射可以促进异质非干细胞肿瘤细胞群中肿瘤干细胞的形成^[22]。因此我们推测所观察到的克隆形成率增加的原因可能是在此条件下,2 Gy 的 X-射线照射增加了旁效应 H1299 细胞中 CD44 阳性细胞的数目。该推测需要进一步的验证。

我们已有的数据证实 X-射线在 H1299 细胞中诱导的旁效应产生过程中,受照信号细胞和旁效应细胞的 TGF- β 1 信号通路都被激活,并且对旁效应的各个终点(DNA 损伤、ROS 水平及细胞增殖等)的产生发挥着关键的调控作用(未发表数据)。本研究显示 TGF- β 1 信号通路对辐射诱导旁效应细胞的适应性反应起着复杂的作用。当信号细胞的 TGF- β 1

信号通路被抑制后,条件培养液诱导的适应性不再产生,辐射诱导旁效应细胞的适应性也消失了。这些结果表明信号细胞中的 TGF- β 1 信号通路对旁效应细胞适应性反应的发生起着非常关键的作用。这些结果提示所观察到的适应性反应的确是由旁效应介导的,所以一旦通过抑制信号细胞的 TGF- β 1 通路来抑制旁效应后,旁效应细胞的适应性就不再发生了。另一方面,当旁效应细胞的 TGF- β 1 通路被抑制后,1 h 收集的条件培养液诱导的适应性仍然存在,而 18 h 收集的条件培养液诱导的适应性都降低了,但照射条件培养液与未照射条件培养液之间的差异却增大了,提示旁效应细胞的 TGF- β 1 通路在不同时间点提取的条件培养液诱导的适应性反应中发挥的作用不相同,并且可能还有别的关键通路参与了旁效应细胞适应性反应这一过程。这些结果提示旁效应细胞的适应性与传统适应性可能源于不同的机制,因为研究发现传统适应性的发生与 TGF- β 无关^[23]。

表明辐射诱导旁效应细胞的适应性与传统的适应性不同的另一个证据是旁效应细胞中 SOD2 的表达。在传统适应性反应中,低剂量电离辐射预处理细胞后导致 SOD2 表达上升^[18],从而介导了适应性的发生;但本研究发现旁效应细胞经照射条件培养液培养 3 h 或 5 h 后,其胞内 SOD2 表达水平却下降了。我们已有的数据显示 1 h RCM 可以引起 H1299 旁效应细胞的 miR-21 表达增加,18 h RCM 却导致 H1299 旁效应细胞 miR-21 表达下降(未发表数据)。而 miR-21 可以通过 TNF- α 间接调控 SOD2^[19]。因此 miR-21 表达的变化可能是本研究观察到的 SOD2 表达下降的一个主要原因。但 1 h RCM 和 18 h RCM 引起 H1299 旁效应细胞中 miR-21 不同的改变,却都引起了 SOD2 表达的降低,其中一个可能的解释是因为检测时间点的不同导致的,另一个可能的解释是 SOD2 还有别的调控机制。这些结果提示,SOD2 可能未参与辐射诱导旁效应细胞适应性反应的发生,但这一结论还需要进一步的直接证据。

总之,本研究证实了电离辐射诱导的旁效应和适应性之间存在关联。伴随着 H1299 旁效应细胞中 SOD2 表达水平的下降,X-射线诱导的 H1299 旁效应细胞受照后发生了适应性反应;并且该适应性的发生依赖于信号细胞中的 TGF- β 1 信号通路,而旁效应细胞中的 TGF- β 1 信号通路发挥的作用比较复

杂,与照后收集条件培养液的时间有关。研究结果还显示电离辐射诱导的旁效应信号可作为一个类似小剂量照射的传统适应性中的诱导剂,但辐射诱导旁效应细胞的适应性却不同于传统适应性,表现为SOD2和TGF- β 1信号通路在两种现象中的调控作用不同。

参考文献

- 1 Yang H, Asaad N, Held K D. Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray irradiated normal human fibroblasts [J]. *Oncogene*, 2005, **24**(12): 2096-2103.
- 2 Azzam E I, De Toledo S M, Spitz D R, *et al.* Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures [J]. *Cancer Research*, 2002, **62**(19): 5436-5442.
- 3 Nagasawa H, Huo L, Little J B. Increased bystander mutagenic effect in DNA double-strand break repair-deficient mammalian cells [J]. *International Journal of Radiation Biology*, 2003, **79**(1): 35-41.
- 4 Zhou H, Randers-Pehrson G, Waldren C A, *et al.* Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, **97**(5): 2099-2104.
- 5 Azzam E I, De Toledo S M, Little J B. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to nonirradiated cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, **98**(2): 473-478.
- 6 Little J B. Genomic instability and bystander effects: a historical perspective [J]. *Oncogene*, 2003, **22**(45): 6978-6987.
- 7 Lyng F M, Seymour C B, Mothersill C E. Initiation of apoptosis in cells exposed to medium from the progeny of irradiated cells: a possible mechanism for bystander induced genomic instability [J]. *Radiation Research*, 2002, **157**(4): 365-370.
- 8 Sawant S G, Randers-Pehrson G, Geard C R, *et al.* The bystander effect in radiation oncogenesis: I. transformation in C3H 10T cells *in vitro* can be initiated in the unirradiated neighbors of irradiated cells [J]. *Radiation Research*, 2001, **155**(3): 397-401.
- 9 Jain M R, Li M, Chen W, *et al.* *In vivo* space radiation-induced non-targeted responses: late effects on molecular signaling in mitochondria [J]. *Current Molecular Pharmacology*, 2011, **4**(2): 106-114.
- 10 Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science*, 1984, **223**(4636): 594-597.
- 11 Wolff S. Is radiation all bad? The search for adaptation [J]. *Radiation Research*, 1992, **131**(2): 117-123.
- 12 Zhou H, Randers-Pehrson G, Waldren C A, *et al.* Radiation-induced bystander effect and adaptive response in mammalian cells [J]. *Advances in Space Research*, 2004, **34**(6): 1368-1372.
- 13 Maguire P, Mothersill C, McClean B, *et al.* Modulation of radiation responses by pre-exposure to irradiated cell conditioned medium [J]. *Radiation Research*, 2007, **167**(4): 485-492.
- 14 Zhou H, Randers-Pehrson G, Geard C R, *et al.* Interaction between radiation-induced adaptive response and bystander mutagenesis in mammalian cells [J]. *Radiation Research*, 2003, **160**(5): 512-516.
- 15 Shareef M M, Cui N, Burikhanov R, *et al.* Role of tumor necrosis factor- α and TRAIL in high-dose radiation-induced bystander signaling in lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Research*, 2007, **67**(24): 11811-11820.
- 16 Shao C, Folkard M, Prise K M. Role of TGF- β 1 and nitric oxide in the bystander response of irradiated glioma cells [J]. *Oncogene*, 2008, **27**(4): 434-440.
- 17 Gow M D, Seymour C B, Ryan L A, *et al.* Induction of bystander response in human glioma cells using high-energy electrons: a role for TGF- β 1 [J]. *Radiation Research*, 2010, **173**(6): 769-778.
- 18 Guo G, Yan-Sanders Y, Lyn-Cook B D, *et al.* Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, **23**(7): 2362-2378.
- 19 Zhang X, Ng W L, Wang P, *et al.* MicroRNA-21 Modulates the Levels of Reactive Oxygen Species by Targeting SOD3 and TNF α [J]. *Cancer Research*, 2012, **72**(18): 4707-4713.
- 20 Takahashi A, Su X, Suzuki H, *et al.* p53-dependent adaptive responses in human cells exposed to space radiations [J]. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2010, **78**(4): 1171-1176.
- 21 Leung E L, Fiscus R R, Tung J W, *et al.* Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem

- cell-like properties [J]. PLoS One, 2010, 5(11): e14062.
- 22 Ghisolfi L, Keates A C, Hu X, *et al.* Ionizing Radiation Induces Stemness in Cancer Cells [J]. PLoS ONE, 2012, 7(8): e43628.
- 23 Dieriks B, De Vos W, Baatout S, *et al.* Repeated exposure of human fibroblasts to ionizing radiation reveals an adaptive response that is not mediated by interleukin-6 or TGF- β [J]. Mutation Research, 2011, 715(1-2): 19-24.

The adaptive response to X-ray irradiation in H1299 bystander cells is associated with TGF- β 1 pathway

JIANG Youqin TIAN Wenqian YIN Xiaoming WANG Jingdong YANG Hongying

(School of Radiation Medicine and Protection, Medical College of Soochow University/School for Radiological and Interdisciplinary Sciences (RAD-X), Soochow University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT The aim is to investigate the adaptive response in radiation-induced bystander H1299 non-small cell lung cancer cells and the potential roles TGF- β 1 pathway plays in the response. Medium transfer method was used to obtain radiation-induced bystander cells; clonogenic assay was used to observe the adaptive response in bystander cells after irradiation; Western Blotting was used to detect the alteration of SOD2 expression in bystander cells. The data show that the conditioned medium collected from both unirradiated and irradiated cells did not cause any change in the clonogenic cell survival of bystander cells. However, when bystander cells were irradiated with 2 Gy of X-rays after being cultured in 1 h or 18 h non-radiation conditioned medium, its clonogenic cell survival was 12% or 38% greater than that cultured in fresh medium. The clonogenic cell survival of cells irradiated with 2 Gy of X-rays after culture in 1 h or 18 h radiation conditioned medium was 10% greater than that cultured in relative non-radiation conditioned medium. Furthermore, when the signaling cells were pretreated with a TGF- β 1 inhibitor, SB431542, the adaptive response in bystander cells no longer occurred. But adding SB431542 into the conditioned medium caused more complex consequence. On one hand, it did not affect the adaptive response in bystander cells cultured in the conditioned medium harvested 1 h post irradiation; on the other hand, while it decreased the adaptive response in bystander cells cultured in the non-radiation or radiation conditioned medium harvested 18 h post irradiation by 28% or 18% compared with that without SB431542, it increased the difference of the levels of adaptive response in bystander cells between cultured in radiation conditioned and in non-radiation conditioned medium from 10% to 24%. Moreover, the expression of SOD2 of bystander cells decreased after culture in radiation-conditioned medium for 3 h and 5 h compared with that cultured in non-radiation-conditioned medium. The results suggested that the conditioned medium from unirradiated cells induced an adaptive response to X-irradiation in bystander cells, and that from irradiated cells caused a greater adaptive response. TGF- β 1 pathway played an important mediating role in the occurrence of the response, but SOD2 was not involved.

KEYWORDS Radiation-induced bystander effects, Adaptive response, TGF- β 1 signaling pathway, SOD2, Lung cancer cells

CLC Q691, TL71