

# 碳离子辐照哺乳动物细胞引起的旁观者效应

王菊芳<sup>1,2</sup> 李文建<sup>1</sup> 周光明<sup>1</sup> 赵 静<sup>1,2</sup> 党秉荣<sup>1</sup>  
马秋峰<sup>1,2</sup> 毛丽敏<sup>1</sup> 冯 岩<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

<sup>2</sup> (中国科学院研究生院 北京 100039)

**摘要** 用经过碳离子辐照 V79 细胞的条件培养基 (Irradiated conditioned medium, 简称 ICM) 和与受照射细胞共同培养两种方法, 研究了未受照射细胞的旁观者效应。结果表明, ICM 法可以明显降低未受照射细胞的克隆形成率; 受照射细胞与未受照射细胞共同培养一段时间后, 细胞克隆形成率比假定没有旁观者效应时的预期值低, 细胞微核率和 hprt (次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶) 基因位点突变率与预期值基本相同。推测受照射细胞可能释放出了能对未受照射细胞生长产生毒性的因子, 这种因子对未受照射细胞没有明显的致微核和致突变作用。

**关键词** 旁观者效应, 细胞, 碳离子辐照, 克隆形成率, 微核率, 突变率  
**中图分类号** Q691, R730

近些年来, 越来越多的证据表明: 没有受到射线直接照射的细胞或细胞核可以发生多种损伤效应。Nagasawa 等<sup>[1]</sup>用  $\alpha$  粒子辐照中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞时发现, 在仅有 1% 的细胞核直接受到单个  $\alpha$  粒子的作用时, 也有 30% 的细胞呈现出姊妹染色体交换 (SCE)。不仅如此, 仅通过照射细胞质就可引发细胞核的突变<sup>[2]</sup>。未受到射线直接照射的细胞还可以表现出微核率、转化率的提高, 细胞的凋亡、死亡及延迟出现的基因组不稳定<sup>[3-5]</sup>。这些现象被称作电离辐射诱导的旁观者效应。旁观者效应在致密电离辐射 (高 LET 射线, 如  $\alpha$  粒子) 和稀疏电离辐射 (低 LET 射线, 如  $\gamma$  和 X 射线) 中都有所发现。

研究旁观者效应的方法主要有两种: 一种是用带电粒子微束辐照少量单个细胞, 直接研究周围未受照射细胞的旁观者效应; 另一种是研究受照射细胞的条件培养基 (ICM) 对未受照射细胞的旁观者效应。带电粒子微束装置所需技术复杂, 耗资较高, 目前我国还没有理想的微束装置可以用来研究旁观者效应。因此, 本工作一方面用 ICM 法研究旁观者效应; 另一方面采用将受照射细胞与未受辐照细胞按 1:1 共同培养一定时间后, 选取适当的生物终点, 将假设没有旁观者效应时的预期结果与实验结果相比较的方法, 来探讨受照射细胞是否能对未受照射细胞产生旁观者效应。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞及其培养

实验所用细胞为中国仓鼠肺 V79 细胞, 培养基为 1640 (GIBCO 产品) 培养液, 含 10% 新生小牛血清, 100 单位/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素。每周传代两次, 在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37°C 培养。

碳离子辐照在  $\phi$  35mm 的培养皿中进行。辐照前一天将细胞按  $5 \times 10^4$ /mL 接种到培养皿中。

### 1.2 辐照

重离子辐照于兰州近代物理研究所重离子研究装置 (HIRFL) 辐照终端进行, 离子种类为  $^{12}\text{C}^{6+}$  离子束, 能量为 80 MeV/u。辐照前将培养皿中的培养液倒掉, 加入少量的 pH = 7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 以维持一定的湿度。将 10 个培养皿固定在一个大转盘上, 置于离子束的坪区上一一进行照射。剂量由空气电离室测得, 样品的更换和数据的获取由计算机控制。Mothersill 等<sup>[6]</sup>用条件培养基 (ICM) 法研究经  $\gamma$  射线照射后细胞的旁观者效应时, 所选的剂量为 0.5、2.5 和 5 Gy, 结合我们的预备实验结果, 这里选取碳离子的剂量为 1 Gy, 平均剂量率为 2 Gy/min。

### 1.3 生物终点的检测

辐照结束后, 将细胞样品按以下两种方法分别

国家自然科学基金 (10105012) 资助

第一作者: 王菊芳, 女, 1967 年 10 月出生, 1990 年毕业于兰州大学, 助理研究员, 辐射生物学专业

收稿日期: 初稿 2003-10-29, 修回 2004-03-15

进行处理。

1.3.1 受照射细胞的条件培养基 (ICM) 对未受照射细胞克隆形成率的影响 往 10 个经过照射的培养皿中加入 3mL 新鲜的培养基, 置于 37°C 培养箱中, 分别于 1h 和 2h 各取 5 皿, 收集培养液并经孔径为 0.22 $\mu$ m 的灭菌滤膜过滤, 彻底除去受照射细胞。将该培养液加入 5 个具有 200 个细胞的培养皿中, 培养 7d 后, 用甲醇:冰乙酸=3:1 溶液固定, Giemsa 染色, 统计细胞数大于 50 个的集落数。同时用正常的培养基做一组平行对照。

1.3.2 受照射细胞与未受照射细胞按 1:1 共同培养一段时间后的生物效应 将受照射细胞和未受照射细胞同时消化下来, 计数后按 1:1 混匀, 置于 37°C 培养, 在不同的时间段, 取样品进行不同的处理。与此同时, 将未受照射细胞和经 1Gy 照射的样品单独做同样处理, 以取得无旁观者效应下的预期结果。

(1) 细胞克隆形成率 (Colony formation efficiency, CFE): 受照射细胞与未受照射细胞混合培养 24h, 经消化、计数、稀释等步骤, 将 100 个细胞接种到  $\phi$  60mm 的培养皿中, 培养 7d 后, 固定并染色, 统计细胞数大于 50 个的集落数。共 3 组, 每组 6 皿重复。一般情况下, 细胞的克隆形成率在 10%—30% 之间。

$$CFE = (\text{细胞克隆数} / \text{接种细胞数}) \times 100\%$$

(2) 细胞微核率 (Micronucleus frequency, MF): 将受照射细胞与未受照射细胞混合培养 48h 后, 用甲醇:冰乙酸=3:1 的固定液固定, 吖啶橙染色, PBS 缓冲液封片, 在荧光显微镜下观察并计算 1000 个细胞的微核数, 每个样品 3 皿重复。

$$MF = (\text{微核数} / \text{细胞数}) \times 100\%$$

(3) 细胞 hprt (次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶) 基因位点突变率 (Mutation rate, MR): 将受照射细胞与未受照射细胞混合培养 72h, 以便使发生突变的细胞得到充分的表达, 再将细胞消化下来, 按  $1 \times 10^5$  细胞/皿将细胞接种到 10 个皿中, 加入含 30 $\mu$ mol/L 的 6-巯基鸟嘌呤选择性培养基, 培养 7d 后, 固定并染色, 统计细胞集落数。hprt 基因位点突变频率的计算按下式计算:

$$MR = (\text{筛选集落数} / \text{接种细胞数}) \times 100\%$$

## 2 结果

### 2.1 受照射细胞的条件培养基 (ICM) 对未受照射细胞克隆形成率的影响

经 1Gy 照射的条件培养基能明显抑制未受照射细胞的克隆形成率, 结果如表 1 所示。不仅如此,

未受照射细胞在这种条件培养基中所形成的克隆比正常培养基中形成的克隆在形态上也小很多。分析产生这种现象的原因, 可能是受照射细胞分泌了能对未受照射细胞产生毒性的因子, 并释放到培养基中, 从而抑制了未受照射细胞的生长。Mothersill 等<sup>[7]</sup>的研究发现, 经  $\gamma$  射线辐照的人上皮细胞, 在辐照结束后的 30min—60h 之间收集到的培养基均能明显降低未受照射细胞的存活率, 并推断受照射细胞是通过某种信号传导机制来控制旁观细胞的生死。我们的实验结果表明, 高 LET 的碳离子也可以通过条件培养基对未受照射细胞产生旁观者效应, 但与低 LET 的  $\gamma$  射线所致旁观者效应的产生机制是否一样还不清。

Table 1 Cloning formation efficiencies (%) treated with ICM (Irradiated conditioned medium) and normal medium

| Incubating time | CFE of ICM treatment | CEF of normal medium treatment |
|-----------------|----------------------|--------------------------------|
| 1h              | $3.8 \pm 0.76^{(1)}$ | $31.9 \pm 4.20$                |
| 2h              | $6.7 \pm 0.14^{(1)}$ | $35.6 \pm 10.09$               |

<sup>(1)</sup> Significantly low,  $p < 0.01$ , compared with the results from normal medium

### 2.2 受照射细胞与未受照射细胞按 1:1 共同培养一段时间后的生物效应

将受照射细胞与未受照射细胞按 1:1 混合后共同培养, 分别于 24、48、72h 检测细胞的克隆形成率、微核率和 hprt 基因突变率, 所得的结果如表 2 所示。为了便于比较, 将未受照射细胞和经 1Gy 剂量照射细胞的克隆形成率、微核率、hprt 基因突变率以及由此推算出的没有旁观者效应时的预期值 (预期值由未受照射细胞和经过 1Gy 剂量照射的细胞各占 50% 时的试验结果推算而来) 也列在同一表格中。

Table 2 CEF, MF and hprt MR of the irradiated and non-irradiated cells measured at 24, 48 and 72h after the irradiation

|                     | CEF / %         | MF / %          | hprt MR / $\times 10^{-5}$ |
|---------------------|-----------------|-----------------|----------------------------|
| Control             | $11.8 \pm 0.32$ | $1.15 \pm 0.85$ | $0.43^{(1)}$               |
| 1Gy                 | $5.70 \pm 1.21$ | $3.09 \pm 0.53$ | $3.00^{(1)}$               |
| Expected result     | $8.75 \pm 0.77$ | $2.12 \pm 0.69$ | $1.71^{(1)}$               |
| Experimental result | $7.20 \pm 1.10$ | $2.04 \pm 0.64$ | $1.57^{(1)}$               |

<sup>(1)</sup> The hprt gene mutation experiment was performed for only one time, hence no standard deviation for MR

共同培养细胞的克隆形成率低于假设没有旁观者效应时的预期值的 18%, 受照射细胞对未受照射

细胞的生长表现出一定程度的抑制作用趋势。这种作用没有条件培养基 (ICM) 介导的旁观者效应明显, 除与细胞密度和处理方法不同有关外, 还与辐照后处理的时间间隔较长 (24h) 有密切关系。Mothersill 等<sup>[7]</sup>在研究时间与旁观者效应表达关系时发现: 条件培养基的毒性效应在辐照结束后的前几个小时增加比较明显, 在 3—60h 则比较缓慢。陆颖等用人与中国仓鼠杂交细胞 ( $A_L$ ) 研究受照射细胞的培养液对未受照射细胞存活率的影响<sup>[8]</sup>, 发现对照射后的早期转移培养液, 二甲基亚砷 (DMSO) 能明显提高细胞的存活率, 但随时间的延长, 其作用越来越不明显, 12h 后几乎没有作用。这不仅证实活性氧自由基在诱发旁观者效应中的作用, 还提示旁观者效应的作用与时间有密切的关系。

细胞微核率和 hprt 基因位点的突变率则与没有旁观者效应时的预期值基本相同, 表明能对未受照射细胞生长产生毒性的因子, 对未受照射细胞没有明显的致微核和致突变作用, 不同的生物终点可能有不同机制参与。Zhou 等<sup>[9]</sup>用长有细胞的双层 Mylar 膜实验来研究受照射细胞对未受照射细胞的影响, 当一层 Mylar 膜的细胞受到  $\alpha$  粒子照射后, 另一层没有受到射线照射的 Mylar 膜的细胞在与之共同培养 48h 后, 细胞存活分数有明显的下降, CD59 基因突变率有所增加, 但统计学意义不明显。这一结果显示: 受照射细胞释放到培养基中能对未受照射细胞产生毒性的因子, 对未受照射细胞的突变作用却很小。这与我们的实验结果有类似之处。

### 3 讨论

有关旁观者效应的产生机理, 目前主要有两种学说。一种认为旁观者效应与细胞间的通讯有关, 相邻细胞通过间隙连接 (Gap junction) 可以直接交换小分子来实现代谢偶联或电偶联<sup>[10]</sup>。Bishayee 等<sup>[11]</sup>用 V79 细胞所做的实验表明细胞间隙连接阻断剂六氯化苯 (Lindane) 可以降低旁观者效应, Zhou 等<sup>[12]</sup>通过研究旁观者效应发现, 细胞间的通讯在基因突变中有重要作用, 在细胞间隙连接阻断剂的存在下, 基因突变水平明显降低。另有一些学者发现, 经  $\gamma$  射线照射细胞的条件培养基能使未受照射细胞的存活率明显降低, 细胞凋亡明显增加, 根本不需要受照射细胞与未受照射细胞的直接接触, 这提示旁观者效应的产生可以不依赖于细胞间的间隙连接<sup>[6,7]</sup>, 可能是通过信号传导系统间接控制未受照射细胞, 或者是直接分泌出了能对未受照射细胞产生毒性的因子。有研究发现<sup>[13]</sup>, 转化生长因子- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) 在受照射细胞的培养基中有明显提高。TGF- $\beta 1$  可

以激活细胞膜上的 NADH 氧化酶系统, 释放出  $H_2O_2$  和其它活性氧基团或分子, 引发氧化性损伤。吴李君等<sup>[14]</sup>的研究发现: 用确定数目的  $\alpha$  粒子辐照  $A_L$  的细胞质可以使细胞核的基因突变增加 3 倍, 若用自由基清除剂 DMSO 处理细胞, 可以明显降低细胞核的基因突变。表明, 活性氧在基因突变中有重要作用, 他们还发现  $\alpha$  粒子辐照细胞质可以引起细胞核 DNA 氧化性损伤标记物 8-羟基-脱氧鸟苷的产生。

我们的实验结果比较支持第二种学说, 即旁观者效应可能是通过信号传导系统间接控制未受照射细胞, 或者是受照射细胞直接分泌出了能对未受照射细胞产生毒性的因子。实际上, 有细胞通讯参与的旁观者效应和受照射细胞条件培养基介导的旁观者效应之间的关系并不是相互对立的。这除了与细胞的密度、不同的生物终点等因素有关外, 还与研究所选的细胞类型有关。Mothersill 等<sup>[6]</sup>在研究受照射细胞条件培养基介导的旁观者效应中发现, 细胞间隙连接阻断剂也能影响旁观者效应的表达, 表明细胞通讯也参与了条件培养基介导的旁观者效应。旁观者效应的产生途径在某些情况下可能与一种机制有关, 某些情况下则可能有多种机制同时参与<sup>[15]</sup>。我们准备在下一步的试验中, 将条件培养基做适当的分离处理, 利用不同组分对正常细胞进行毒性效应试验, 以期找出参与旁观者效应的有效成分。

### 参考文献

- 1 Nagasawa H, Little J B. Cancer Res. 1992, **52**(22): 6394-6396
- 2 WU L J, Randers-Pehrson G, Xu A, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, **96**(9): 4959-4964
- 3 Prise K M, Belyakov O V, Folkard M. Int J Radiat Biol, 1998, **74** (6): 793-798
- 4 Belyakov O V, Prise K M, Trott K R. Int J Radiat Biol, 1999, **75**(8): 985-993
- 5 Seymour C B, Mothersill C. Radiat Oncol Invest, 1997, **5**(3): 106-110
- 6 Mothersill C, Seymour C. Radiat Res, 1998, **149**(3): 256-262
- 7 Mothersill C, Seymour C. Int J Radiat Biol, 1997, **71**(4): 421-427
- 8 陆颖, 杨陟华, 曹珍山, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2003, **21**(1): 69-72
- LU Ying, YANG Zhihua, CAO Zhenshan, et al. J Radiat Res Radiat Process, 2003, **21**(1): 69-72
- 9 Zhou H, Suzuki M, Geard C R, et al. Mut Res, 2002,

- 499(2): 135-141
- 10 翟中和, 王喜中, 丁明孝主编. 细胞生物学, 北京: 高等教育出版社, 2000. 124-129  
ZHAH Zhonghe, WANG Xizhong, DING Mingxiao. Cellular Biology, Beijing: Higher Education Press, 2000. 124-129
- 11 Bishayee A, Rao D V, Howell R W. Radiat Res, 1999, **152**(1): 88-97
- 12 Zhou H, Randers-Pehrson G, Waidren C A, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97**(5): 2099-2104
- 13 Lye R, Lehnert B E, Svensson R. Cancer Res, 2000, **60**(5): 1290-1298
- 14 吴李君, 黑国庆, 许安, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2001, **19**(1): 40-45  
WU Lijun, HEI Guoqing, XU An, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2001, **19**(1): 40-45
- 15 Ballarini F, Biaggi M, Ottolenghi A, *et al.* Mutat Res, 2002, **501**(1-2): 1-12

### Bystander effects on mammalian cells induced by carbon ions

WANG Jufang<sup>1,2</sup> LI Wenjian<sup>1</sup> ZHOU Guangming<sup>1</sup> ZHAO Jing<sup>1,2</sup> DANG Bingrong<sup>1</sup>  
MA Qiufeng<sup>1,2</sup> MAO Limin<sup>1</sup> FENG Yan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000)

<sup>2</sup>(Academy of graduate student, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

**ABSTRACT** Bystander effects on unirradiated V79 cells were observed by irradiated conditioned medium (ICM) method and co-cultured with carbon-ion-irradiated V79 cells. The results showed that the colony formation efficiency of unirradiated cells is obviously decreased by ICM. After co-culture with carbon-ion-irradiated cells for some time, the colony formation efficiency of co-cultured cells was lower than expected results assuming no bystander effects. The micronucleus frequency and hprt gene mutation rate was almost the same as expected results. Cytotoxic factor(s), which was effective for cell growth but not for micronucleus and mutation on unirradiated cells, might be released by irradiated cells.

**KEYWORDS** Bystander effects, Cells, Carbon-ion-irradiation, Colony formation efficiency, Micronucleus frequency, Mutation rate

**CLC** Q691, R730