

一氧化氮在亚细胞结构精确照射诱导旁效应中的作用

邵春林¹ FOLKARD Melvyn² PRISE Kevin M²

¹ (复旦大学放射医学研究所 上海 200032)

² (Gray Cancer Institute, P. O. Box 100, Mount Vernon Hospital, Northwood, Middlesex, HA6 2JR, UK)

摘要 研究了肿瘤细胞的亚结构在荷能离子照射下所诱导的旁效应及其信号分子。以氦离子微束装置所产生的精确数量离子定位照射神经胶质瘤细胞 T98G 细胞核或细胞质,检测细胞染色体损伤和胞内一氧化氮(Nitric Oxide, NO)自由基的产额,探索 NO 清除剂对它们的影响,并以(Diethylamine nitric oxide, DEANO)研究 NO 的细胞效应。结果表明,无论是细胞核照射还是细胞质照射,只要 1 个细胞受到 1 个离子的照射,就可通过损伤的级联放大形成辐射旁效应,引起周围数十个细胞的损伤。对比核、质照射的生物效应,细胞核照射比细胞质照射具有更加显著的直接作用,但这两种照射所诱导的旁效应程度却相当。而 NO 自由基清除剂 c-PTIO (2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide)可抑制旁效应的产生。NO 分子探针 DAF-FM (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate)原位检测表明,即使只有 1%的细胞核或细胞质受到单离子照射,具有 NO 阴性表达的细胞百分数增加了 30%,使 NO 引起的细胞荧光密度增加 15%。DEANO 实验表明,NO 可引起细胞微核的产生。因此,NO 是亚细胞结构照射引起旁效应的一个重要信号因子。

关键词 微离子束,亚细胞照射,旁效应,信号因子,一氧化氮

中图分类号 Q691.5, R811.5

放射治疗的传统理论基础认为,荷能射线与细胞核相互作用所引起的 DNA 损伤是电离辐射诱导各种生物效应的根本原因。然而,近来人们发现受照射细胞可引起其周围未受照射细胞的遗传性损伤,形成辐射旁效应(Bystander effect)^[1]。研究表明,辐射旁效应还可引起细胞死亡^[2,3]、基因突变^[4-6]、基因不稳定性^[7,8]、功能和信号基因表达^[9]、肿瘤转化等^[10,11]多种变化。这些发现突破了传统观念,也使人们认识到,环境低剂量辐射的致癌危险性可能远高于线性无阈模型的预测^[12]。另一方面,肿瘤细胞的辐射旁效应可引起未受照射肿瘤细胞及其周围正常细胞的致死损伤^[13,14],提示旁效应在可能增加放疗疗效的同时,还可能增加放疗的远后效应,这些效应已越来越受到重视^[15]。要有效地利用和控制辐射旁效应,须深入了解其信号传导等分子机制。现已发现活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS)^[16]、一氧化氮(Nitric Oxide, NO)自由基^[17]、肿瘤生长因子 TGF- β 1^[18]、钙离子流^[19,20]等几种旁效应信号因子。但总的说来,对辐射诱导旁效应机理的了解还非常有限。

单离子微束照射技术是近年来一个发明,为

辐射旁效应的研究提供了强有力的工具,它不仅可在亚细胞水平上以精确数量的粒子进行照射,而且可随机选择细胞群体或组织中的部分细胞进行照射^[21,22]。一些国家已开始探索微束肿瘤显微手术技术,因此,研究微束照射肿瘤细胞引起的旁效应显得更有必要性。

本工作利用精确数量的氦离子定位照射神经胶质瘤细胞的核和质,比较了它们辐射效应的差异,获得了细胞质照射诱导旁效应的直接实验证据,并发现 NO 信使分子对旁效应的产生和发展具有重要作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和处理

人神经胶质瘤细胞 T98G 在 37°C 条件下培养于含 10%胎牛血清、0.1%丙酮酸钠、2mmol/L 谷氨酰胺、100U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中。微束照射前 1d,将约 1200 个处于对数生长期的细胞接种于 Mylar 膜培养皿的中心区域(直径约为 5mm),该区域预先已经过

Cancer Research UK、国家自然科学基金(30670629)、上海市浦江人才计划(06PJ14012)资助

第一作者:邵春林,男,1966年6月出生,1995年毕业于中国科学院等离子体物理研究所获博士学位,研究员,博导

收稿日期:初稿 2006-11-23,修回 2006-12-26

0.8 $\mu\text{g/mL}$ Cell-Tak (Collaborative biomedical products) 处理, 以使细胞快速贴壁。细胞贴壁后, 加 2mL 培养液于皿中继续培养。

1.2 微束照射

采用 Gray cancer institute 的微束装置所产生的氦离子 ($^3\text{He}^{2+}$, 3.5MeV, 100keV/ μm) 进行细胞照射。该装置的构成如图 1 所示。通过该装置, 可以将单个离子准确地照射于细胞核或细胞质。在细胞识别能力大于 99% 的条件下, 照射粒子的定位偏差小于 2 μm ^[22], 并且可以通过随即选择照射细胞群落中的部分或全部细胞。

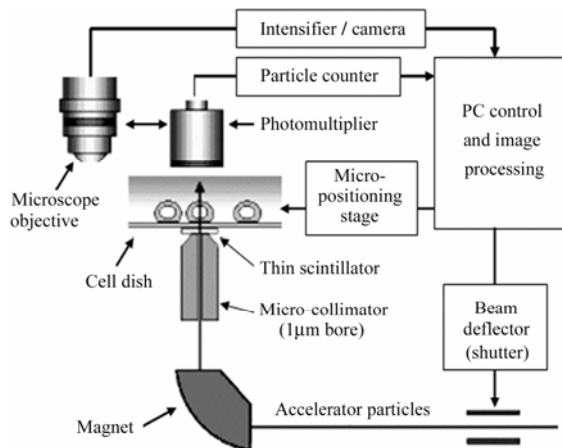


Fig.1 The sketch of the gray cancer institute microbeam system

为进行细胞识别, 须对细胞荧光染色。细胞核照射前 1h, 以 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 的 Hoechst 33342 进行染色 (见图 2A); 细胞质照射, 则以 0.1 $\mu\text{g/mL}$ Nile red 染色 10min (见图 2B)。细胞照射后继续培养 1—24h, 检测微核和 NO 的产生。其中部分细胞在照射期间和照射后以 20 $\mu\text{mol/L}$ NO 自由基清除剂 c-PTIO 进行处理, 以探索 NO 在细胞核和细胞质照射诱导旁效应中的作用。

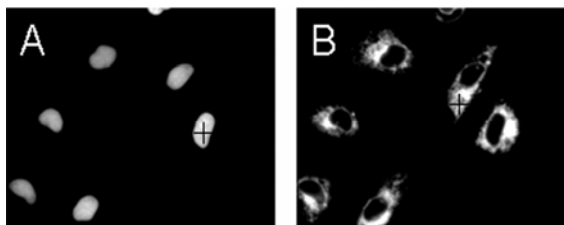


Fig.2 Images ($\times 400$) of cell nuclear A and cytoplasm B where cells were stained with Hoechst 33342 and Nile red, respectively

1.3 DEANO 处理细胞

DEANO 是一种良好的 NO 供体, 水解后释放

活性 NO 自由基分子。为探索 NO 对 T98G 的损伤效应, 接种 2×10^5 细胞/孔于 T6 培养板中, 待细胞充分贴壁后, 以不同浓度的 DEANO 处理 24h, 进行微核检测。

1.4 微核检测

以改良的细胞动力学阻滞法检测细胞微核。经过照射或 DEANO 处理的细胞以 1 $\mu\text{g/mL}$ 细胞松弛素-B 处理 26h, 以甲醇/冰醋酸 (体积比为 9:1) 原位固定、凉干。以 10 $\mu\text{g/mL}$ 吖啶橙、10 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33342 染色, 荧光显微镜镜检。微核率 Y_{MN} 以双核细胞中的微核数与双核细胞数的比例计算。检测表明, T98G 细胞微核率的本底水平为 0.139, 辐射诱导的细胞微核产率分别以测量值和相对产率 (测量值与本底产率之比) 表示。

1.5 一氧化氮原位检测

以 DAF-FM 分子探针原位检测胞内 NO 表达。DAF-FM 本身不产生荧光, 在与 NO 及其氧化衍生物反应后可产生高荧光产物苯并三唑。细胞以 3.5 $\mu\text{mol/L}$ DAF-FM 处理 45min 后, 以磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) 洗去多余探针, 使得探针分子完全脱脂化。以带有 3CCD 彩色照相机的荧光显微镜随机采集 100—200 个细胞的图像, 以 Photoshop 软件分析细胞的荧光密度, 以未受照射样品为对照, 获得胞内 NO 的相对水平。

1.6 统计分析

所有测试均进行 3 次以上, 实验结果以平均值 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 Student's *t*-test 检测样品间的差异, 并以 $p < 0.05$ 为显著差异条件。

2 实验结果

2.1 细胞核、细胞质照射效应

T98G 细胞受到高传能线密度 (Linear energy transfer, LET) 的氦离子照射后会产生染色体损伤, 其中无法修复的染色体片断在细胞分裂后可形成微核。图 3 表明, 细胞核照射所引起的微核率随受照射细胞百分数和照射剂量而增加, 细胞质照射同样可引起染色体的损伤、导致微核的生成。100% 细胞照射时的情况表明, 细胞质照射所引起的微核率远低于细胞核照射所诱导的微核率, 说明细胞核的辐射敏感性远高于细胞质。有趣的是, 即使只有 1% 细胞的细胞质受到照射, 它所诱导的微核率可与 100% 细胞的细胞质受到照射时的微核率相当, 且与

照射剂量无关。这说明,一些未受到离子直接作用的细胞也感受到了细胞质照射的作用,产生了细胞损伤,说明细胞质照射可诱导旁效应。

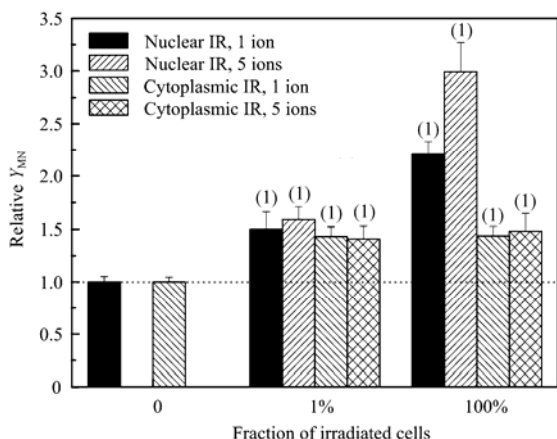


Fig.3 Relative yield of MN in T98G population where 1% or 100% of cells were irradiated through nuclear and cytoplasm with one helium ion or five helium ions, respectively. ⁽¹⁾ $p < 0.05$ compared with nonirradiated control

根据图3结果计算发现,当1%的细胞的细胞核或细胞质受到照射后,细胞微核率远远高于假设无旁效应时的预期值。由100%细胞受到照射时的相对微核率(R)推算,当1%细胞受到照射时之相对微核率的理论值约为 $0.99 + 1\%R$ 。以单离子照射为例,1%细胞核照射引起的相对微核率的预测值约为1.02。但由图3可见,细胞核照射或细胞质照射所诱导的微核产率均远高于此预计值,说明一些未受照射的细胞因旁效应而产生了微核,这将在下面的实验中得到进一步证实。

2.2 可被 c-PTIO 抑制的单细胞照射效应

实验发现,即使单个细胞受到氦离子的精确照射,也可引起群体中其它众多细胞的损伤。图4给

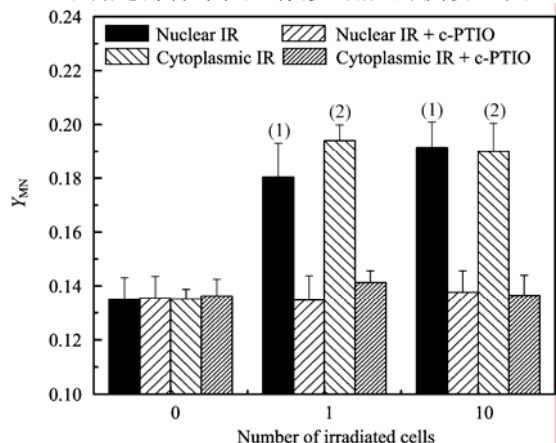


Fig.4 Microbeam irradiation induced MN in T98G population. 1 or 10 cells in the population were individually irradiated through nuclear or cytoplasm with five helium ions. In some experiments, cells were treated with c-PTIO during and after irradiation. ⁽¹⁾ and ⁽²⁾ $p < 0.05$ compared with nonirradiated control

出了1个或10个细胞的细胞核受到照射后1h和细胞质受到照射后24h细胞群体的微核率,它们均显著大于未受照射细胞的微核率,平均高0.05左右。根据此值推算,单细胞照射条件下,细胞群体中约有额外的60个细胞在形成双核的过程中产生了微核,说明多个未受照射细胞发生了损伤。该结果为亚细胞结构的电离辐射可以诱导旁效应提供了直接的实验证据。

但当细胞受到NO自由基清除剂c-PTIO的处理后,细胞微核率减小到本底水平,细胞核和细胞质照射诱导的旁效应被完全抑制,提示NO与该旁效应密切相关。

2.3 辐射诱导旁效应的信号因子

为获得NO在旁效应中作用的进一步证据,我们比较了微束离子精确照射前后细胞内NO水平的变化。发现当1%的细胞核或细胞质受到1个离子的照射后,具有较高NO表达水平的细胞份额从未受照射前的25%—35%增加到55%—75%,30%的未受照射细胞的NO水平提高,使整个细胞样品的NO荧光密度平均增加15%左右(见图5)。细胞受c-PTIO的处理后,胞内NO浓度降低至对照水平,这与图4所示结果相一致,说明NO是辐射诱导旁效应的信号分子之一。

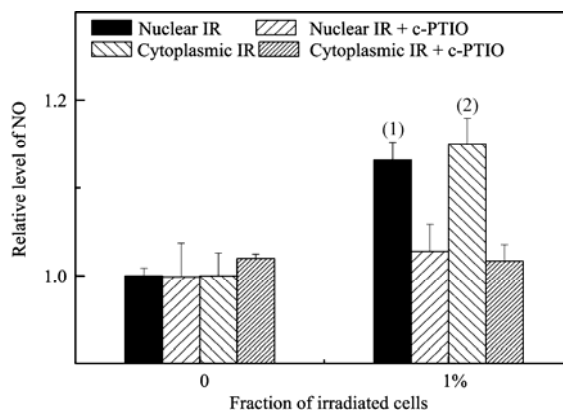


Fig.5 Relative levels of intracellular NO in T98G population. 1% of cells were individually irradiated through nuclear or cytoplasm with one helium ion. In some experiments, cells were treated with c-PTIO during and after irradiation. ⁽¹⁾ and ⁽²⁾ $p < 0.05$ compared with nonirradiated controls

为检测NO是否能够引起细胞损伤,我们以DEANO处理T98G细胞24h。结果表明,较低浓度的DEANO即可引起微核的产生,且微核率随着NO浓度的增大而迅速增大大致一饱和值(见图6),这是由于高浓度的NO可以抑制细胞增殖^[23]、从而抑制细胞核的分裂和微核的产生。

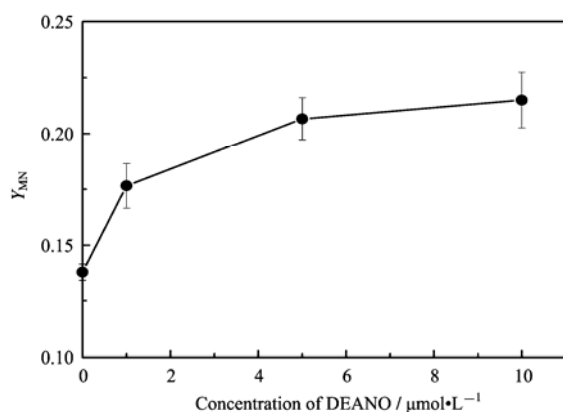


Fig.6 Dose response of DEANO induced MN in T98G cells

3 讨论

本研究结果表明,细胞核照射或细胞质照射不仅可导致受照细胞损伤,还可引起近旁的未受照射细胞的损伤,获得了细胞质照射诱导旁效应的直接实验证据,从亚细胞水平上证明细胞质不仅是电离辐射直接效应重要的靶、也是辐射旁效应重要的靶。就离子照射直接生物效应而言(即 100%细胞受到照射时),细胞核照射引起的 DNA 损伤具有明显的剂量效应,而细胞质照射引起的 DNA 损伤则与剂量无显著相关性,说明前者是由高能离子沉积的能量与 DNA 相互作用的结果,而后者则可能是由辐照诱导的信号因子所引起,是一种生化效应或间接效应。

以 c-PTIO 处理细胞可以抑制辐射旁效应的结果说明,NO 第二信使分子在亚细胞结构辐射诱导的旁效应过程中起重要作用。事实上,当 1%的细胞核或细胞质受到照射后,可使约 30%细胞中的 NO 表达得到提高,这与 Nagasawa 等^[5]报道的照射 1%细胞可使得 30%细胞染色体损伤的结果高度一致。作为细胞信号分子,NO 可由受到辐射激活的 iNOS 促使精氨酸分解后产生。人们发现,具有突变型 p53 基因的 T98G 细胞在受到重离子照射后,其 iNOS 水平显著增强^[24]。NO 的氧化衍生物——过亚硝酸自由基(ONOO⁻)与 DNA 分子反应后,可引起 DNA 链的断裂和细胞微核的产生,这正如图 6 所示。需指出的是,这里我们不能排除 NO 下游的活性分子同样可具有旁效应信号因子的作用,如位于 NO 信使分子下游的 TGF- β 1^[25],它是辐射引起纤维原细胞旁效应的信号因子之一^[18]。

当细胞群体中的 1%或少至一个细胞受到照射时,细胞质照射和细胞核照射均可引起众多未受照射细胞的损伤,且它们所诱导的旁效应在程度上相当。这里存在一个细胞损伤的放大过程:当细胞群

体中的少数几个细胞受到照射损伤后,可释放活性细胞因子,这些活性因子通过自由扩散等途径作用到相邻的细胞上,并诱导这些细胞产生生物效应,进一步释放更多的细胞信号因子,引起更多的细胞损伤;经过信号因子的级联放大,原来少数几个细胞的损伤在群体中得到放大。另一方面,由于细胞核受细胞质所包围,当细胞核受到照射时,细胞质不可避免地同时也受到照射,也就是说,上述所指的细胞核照射实际上是细胞核和细胞质照射之和,但它却与细胞质照射具有同等程度的旁效应,这就引伸出一个问题:旁效应是否仅是一种细胞质照射效应,而与细胞核中 DNA 的辐射损伤无关?这还需要人们进一步的思考与研究。

参考文献

- 1 Nagasawa H, Little J B. *Cancer Res*, 1992, **52**(22): 6394-6396
- 2 Mothersill C, Seymour C. *Int J Radiat Biol*, 1997, **72**(5): 597-606
- 3 Yang H, Asaad N, Held K D. *Oncogene*, 2005, **24**(12): 2096-2103
- 4 Little J B. *Carcinogenesis*, 2000, **21**(3): 397-404
- 5 Nagasawa H, Little J B. *Radiat Res*, 1999, **152**(5): 552-557
- 6 Zhou H, Randers-Pehrson G, Waldren C A, *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**(5): 2099-2104
- 7 Bowler D A, Moore S R, Macdonald D A, *et al.* *Mutat Res*, 2006, **597**(1-2): 50-61
- 8 Morgan W F, Hartmann A, Limoli C L, *et al.* *Mutat Res*, 2002, **504**(1-2): 91-100
- 9 Azzam E I, de Toledo SM, Little J B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, **98**(2): 473-478
- 10 Lewis D A, Mayhugh B M, Qin Y, *et al.* *Radiat Res*, 2001, **156**(3): 251-258
- 11 Ko M, Lao X Y, Kapadia R, *et al.* *Mutat Res*, 2006, **597**(1-2): 11-17
- 12 Brenner D J, Sachs R K. *Int J Radiat Biol*, 2002, **78**(7): 593-604
- 13 Shao C, Aoki M, Furusawa Y. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2004, **45**(1): 97-103
- 14 Xue L Y, Butler N J, Makrigiorgos G M, *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99**(21): 13765-13770
- 15 Mothersill C, Seymour C B. *J Nucl Med*, 2006, **47**(6): 899-900
- 16 Azzam E I, De Toledo SM, Spitz D R, *et al.* *Cancer Res*, 2002, **62**(19): 5436-5442

- 17 Matsumoto H, Hayashi S, Hatashita M, *et al.* Radiat Res, 2001, **155**(4): 387-396
- 18 Iyer R, Lehnert B E. Cancer Res, 2000, **60**(5): 1290-1298
- 19 Lyng F M, Seymour C B, Mothersill C. Radiat Res, 2002, **157**(4): 365-370
- 20 Shao C, Lyng F M, Folkard M, *et al.* Radiat Res, 2006, **166**(3): 479-487
- 21 Folkard M, Vojnovic B, Hollis K J, *et al.* Int J Radiat Biol, 1997, **72**(4): 387-395
- 22 Folkard M, Vojnovic B, Prise K M, *et al.* Int J Radiat Biol, 1997, **72**(4): 375-385
- 23 Shao C, Furusawa Y, Aoki M. Nitric Oxide, 2003, **8**(1): 83-88
- 24 Matsumoto H, Hayashi S, Hatashita M, *et al.* Int J Radiat Biol, 2000, **76**(12): 1649-1657
- 25 Vodovotz Y, Chesler L, Chong H, *et al.* Cancer Res, 1999, **59**(9): 2142-2149

Role of nitric oxide in targeted-subcellular organelles induced bystander effect

SHAO Chunlin¹ FOLKARD Melvyn² PRISE Kevin M²

¹ (Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032)

² (Gray Cancer Institute, P. O. Box 100, Mount Vernon Hospital, Northwood, Middlesex, HA6 2JR, UK)

ABSTRACT The work is to investigate the bystander effect and related signaling factor induced by targeted irradiation on tumor cells. Human glioblastoma T98G cells were irradiated with a precise number of helium microbeam ions, which targeted to either nuclear or cytoplasm. Chromosome damage and intracellular NO level were assayed. Influence of a NO free radical scavenger on these radiation responses was measured. Using DEANO, the cellular effect of NO was also studied. It was found that even only one cell with a population was targeted with one particle through either nuclear or cytoplasm, additional cellular damage was induced in other 10s cells through a signaling amplification pathway and related bystander response. Although cell damage induced directly by nuclear irradiation was greater than that induced by cytoplasmic irradiation, bystander responses induced by these two kinds of irradiation were similar. When a fraction of cells were individually irradiated by helium ions, the yield of micronuclei was obviously higher than that assuming no bystander effect. However, these targeted irradiation induced bystander response were inhibited by c-PTIO, a scavenger of nitric oxide (NO) free radical. Detected with a NO molecular probe DAF-AM, it was observed that when only 1% of cells were irradiated either through nuclear or cytoplasm, the percentage of NO-positive cells increased by about 30% so that the NO-related fluorescence intensity increased by 15%. Moreover, micronuclei were induced indeed in T98G cells treated with a NO donor. These indicate that NO is a bystander signaling factor for both nuclear irradiation and cytoplasmic irradiation.

KEYWORDS Microbeam, Subcellular irradiation, Bystander response, Signaling factor, Nitric oxide

CLC Q691.5, R811.5