

# 乏氧条件下X射线诱导 神经胶质母细胞瘤T98G细胞的旁效应

张江虹<sup>1</sup> Kevin M Prise<sup>2</sup> 金一尊<sup>1</sup> 邵春林<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (复旦大学放射医学研究所 上海 200032)

<sup>2</sup> (英国牛津大学Gray Cancer Institute 英国)

**摘要** 采用条件培养基和共培养处理方式,应用微核形成试验研究人神经胶质母细胞瘤 T98G 细胞,在乏氧条件下经 X 射线诱导的旁效应及其发生机制。研究发现,乏氧条件下,X 射线诱导未照射组细胞的微核率与相应的照射剂量之间存在显著的正相关关系;条件培养基方式下自由基抑制剂二甲基亚砷(Dimethyl sulfoxide, DMSO)可显著降低未照射组细胞的微核率;条件培养基处理乏氧或有氧的 T98G 细胞,有氧条件培养基处理乏氧细胞引起的旁效应微核率比其它各组均要显著,而诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthases, iNOS)特异性抑制剂氨基胍(Aminoguanidine, AG)可抑制条件培养基所诱导的旁效应。推测乏氧条件下,受照射的 T98G 细胞所诱导的旁效应与受照射细胞产生的自由基有关,尤其是活性氧自由基和一氧化氮。

**关键词** 乏氧, 辐射旁效应, 微核形成率, 活性氧自由基, 一氧化氮

**中图分类号** R14, R811.5, R815.2, R818.03

乏氧是多数实质性肿瘤微环境的基本特征之一,是肿瘤治疗预后不良,易产生耐受性的原因之一,甚至是肿瘤发生恶性转化和转移的始动因素<sup>[1]</sup>。近年来,越来越多的证据证明:未直接受到照射的细胞可以因相邻的细胞受到照射而表现出多种与直接受照细胞相似的生物学效应,如:DNA点突变、DNA双链断裂、基因不稳定、微核形成、细胞调亡或延迟死亡以及细胞生长异常等<sup>[2-7]</sup>。这种现象被称作辐射诱导的旁效应(Radiation induced bystander effect, RIBE)。对辐射诱导旁效应的报道多集中在有氧条件下。本文用微核形成实验方法研究了乏氧条件下神经胶质瘤细胞T98G细胞的辐射诱导旁效应,并对其发生的机制进行了探索,希望为改善实体肿瘤乏氧区的临床治疗提供实验和理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

细胞松弛素 B (Cytochalasin B, CB)、Hoechst33342、吖啶橙(Acridine orange, AO)、

RPIM1640 培养液、胰蛋白酶、胎牛血清、青霉素/链霉素、二甲基亚砷(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、氨基胍(Aminoguanidine, AG)、HEPES 缓冲液、L-谷氨酰胺(L-Glutamine)、Sodium pyruvate 等均购于 Sigma 公司; PBS 缓冲液购于英国 OXOID 公司;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 细胞及其培养

T98G细胞接种到灭菌的 22 mm×22 mm的玻璃盖玻片上,置于 60 mm的培养皿内,浸泡于含 10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素、2 mmol/L-谷氨酰胺和 1% 丙酮酸钠的RPMI1640 培养基,在 37℃, 5% CO<sub>2</sub>培养箱中。乏氧组细胞生长于INVIVO<sub>2</sub> 400 乏氧培养仓中,培养条件: 37℃, 0.5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94.5% N<sub>2</sub>, 饱和湿度。乏氧照射时培养基不含血清,含 10 mmol/L HEPES 缓冲液。

### 1.3 照射

细胞照射采用 Pantak X 射线装置,能量为 240 kV,剂量率为 0.73 Gy/min。

国家自然科学基金(30670629, 30770644),教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0365);上海市浦江人才计划(06PJ14012)资助

第一作者:张江虹,女,1973年4月出生,2007年于复旦大学获博士学位,助研,放射医学专业

通讯联系人:邵春林, E-mail: clshao@shmu.edu.cn

收稿日期:初稿 2007-06-19,修回 2007-12-28

## 1.4 细胞处理方法

1.4.1 条件培养基 (Condition medium, CM) 制备按 2000 细胞/片接种 T98G 细胞于 22 mm×22 mm 灭菌的盖玻片上, 置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 4 h 后, 加完全培养基, 有氧组继续培养, 乏氧组移入 INVIVO<sub>2</sub> 400 乏氧培养仓中, 37℃, 0.5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94.5% N<sub>2</sub>, 饱和湿度过夜培养, 然后换不含血清但含有 HEPES 缓冲液的培养液。照射前 1 h, 乏氧组细胞放入密封的铝盒, 通含 5% CO<sub>2</sub> 的 N<sub>2</sub>, 并保持在此盒中进行照射, 照射后换成完全培养液继续培养 2 h, 之后收集细胞的条件培养液, 并经 0.20 μm 的过滤器过滤。乏氧组和有氧组抑制试验的细胞在照射后受到 1% DMSO 或 20 μmol/L 氨基胍 (Aminoguanidine, AG) 的处理。

1.4.2 细胞共培养 (Co-culture, CC) X 射线照射后, 取出长有受照射细胞的盖玻片, 移入相应的含未照射细胞盖薄片的培养皿中, 使受照射细胞和未受照射细胞按 1:1 的比例共同培养在一个培养皿中。

1.4.3 细胞分组 (1) X 射线诱导旁效应试验: 旁效应实验分别在乏氧和有氧条件下进行, 采用条件培养基和共培养处理方式, 按照剂量分为 0 Gy、2 Gy 和 5 Gy 剂量组。直接照射效应的剂量选择: 有氧组为: 0、0.5、1、2 Gy; 乏氧组为: 0、1、2 和 3 Gy。(2) 1% DMSO 抑制试验: 实验在乏氧条件下进行, 采用条件培养基和共培养处理方式, 分为非照射组和 5 Gy 照射组, 每组又分为加 DMSO 组和不加 DMSO 组。(3) 氨基胍抑制试验: 实验采用条件培养基处理方式, 分为 4 组: 乏氧条件下收集的条件培养基处理乏氧细胞组 (N<sub>2</sub>→N<sub>2</sub>); 乏氧条件下收集的条件培养基处理有氧细胞组 (N<sub>2</sub>→O<sub>2</sub>); 有氧条件下收集的条件培养基处理有氧细胞组 (O<sub>2</sub>→O<sub>2</sub>); 有氧条件下收集的条件培养基处理乏氧细胞组 (O<sub>2</sub>→N<sub>2</sub>)。每组又分为非照射组和 5 Gy 照射组, 各组内又进一步分为加 AG 组和不加 AG 组。

## 1.5 微核检测

X 射线照射之后, 经过条件培养基或共培养处理的细胞分别在乏氧或有氧条件下培养 24 h 后, 换含有 1 μg/mL 细胞松弛素 B 的培养液继续培养 28 h, PBS 轻轻冲洗细胞, 用甲醇: 乙酸=9:1 的固定液固定, 空气干燥后用含有 10 μg/mL Hoechst 33342 和 10 μg/mL 吖啶橙染色 5 min, 空气干燥, 使用 Mount Medium 封片, 指甲油封住盖玻片四边, 荧光显微镜下计数双核细胞内的微核数, 计算微核形

成率:

微核形成率(%)=(双核细胞中的微核数/计数的双核细胞数)×100%

## 1.6 数据处理

每个剂量组设 3 个平行组, 实验均重复 3 次, 各组数据取平均值±标准差, 应用 SPSS 13.0, 各组间差异采用 *t* 检验, 统计界值为 0.01 或 0.05。

## 2 结果

### 2.1 X 射线照射下 T98G 细胞的直接效应

由图 1 可见, X 射线可以引起 T98G 细胞染色体损伤, 随着照射剂量的增加细胞的微核率迅速升高, 且氧条件下 T98G 细胞的微核率高于乏氧条件细胞微核率, 存在显著的氧效应; 如 2 Gy 时, 有氧与乏氧条件下辐射诱导的微核率之比为 2.4。

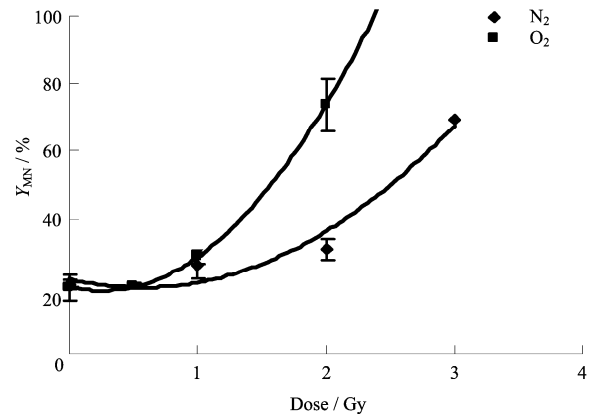


Fig. 1 Yield of MN of X-rays radiated T98G cells under hypoxia and normoxia condition

### 2.2 乏氧和有氧条件下 X 射线照射 T98G 细胞引起的旁效应

由图 2 可见, 无论在有氧或乏氧的条件下, 受照射细胞均能引起未受照射 T98G 细胞微核率的提高 ( $P < 0.05$ ), 存在显著旁效应, 该旁效应与照射剂量存在一定相关性, 但共培养组和条件培养基组二者之间的微核形成率无显著的差异 ( $P > 0.05$ ), 并且在 CC 和 CM 两种处理方式下, 乏氧条件下的细胞微核率与有氧条件下细胞的微核率亦无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 DMSO 对乏氧 T98G 细胞旁效应的影响

由图 3 可见, 乏氧条件下, 无论是共培养处理还是条件培养基处理, 1% 的 DMSO 均可显著降低 5 Gy X 射线照射所诱导的旁效应, 即未受照射细胞

中的微核率有显著降低 ( $P < 0.01$ ), 该结果显示: 乏氧条件下 X 射线照射可以诱发细胞生成活性氧自由基 (ROS), 同时 ROS 还可以调节相应的信号因子的产生, 当它们分泌到培养基中后可通过培养液作用于未受照射的细胞, 促使未受照射的细胞表现出与受照细胞相一致的生物学效应, 而 DMSO 阻断了这一过程。此外, 1% DMSO 处理后旁细胞的微核率并没有降到未受照射之对照组水平, 说明旁效应的产生除了 ROS 自由基以外还存在其他的作用机制。

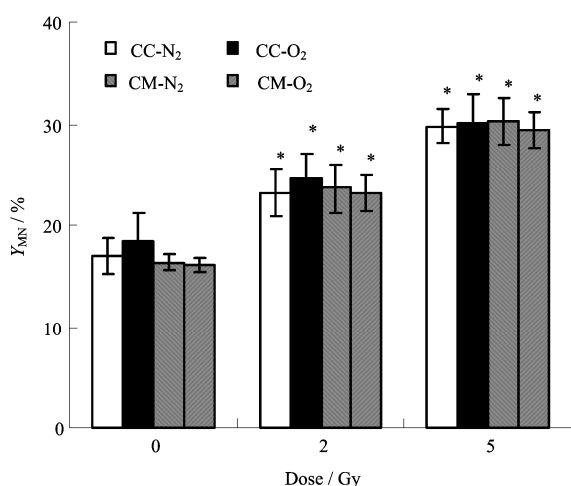


Fig. 2 Bystander MN of T98G cells in hypoxic and normoxic condition (\*  $P < 0.01$ )

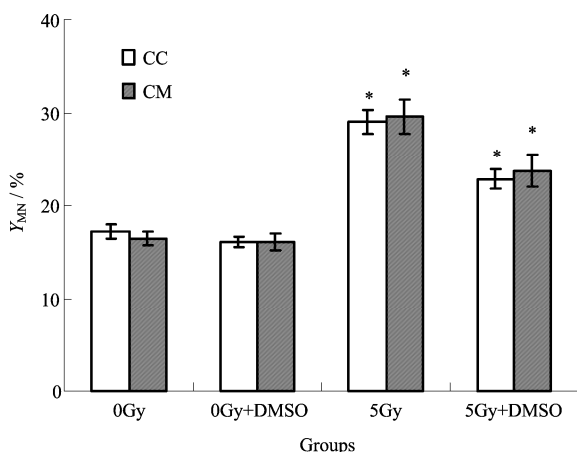


Fig. 3 Effects of 1% DMSO on bystander MN of T98G cells in hypoxic condition (\*  $P < 0.01$ )

#### 2.4 iNOS抑制剂氨基胍对乏氧的T98G细胞微核率的影响

由图 4 可见, 无论是未照射组还是 5 Gy 照射组, 有氧条件下收集的条件培养基处理乏氧细胞组的微核形成率均高于其他三组 ( $P < 0.01$ ), 而其他三组

之间的微核形成率无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 0 Gy 未照射组添加 iNOS 抑制剂氨基胍后, 各组微核率未见有显著性降低 ( $P > 0.05$ ), 而 5 Gy 照射组经氨基胍作用后, 各旁效应细胞的微核形成率均显著降低 ( $P < 0.05$ ), 但有氧条件下收集的条件培养基处理乏氧细胞组的微核形成率降低最为显著 ( $P < 0.01$ ), 且该组的微核率在受氨基胍作用后仍显著高于其他三组 ( $P < 0.05$ )。此外, 5 Gy 组经氨基胍作用后微核率并没有完全降低到未照射组。由此提示: 在辐射诱导的 T98G 细胞旁效应中除 NO 参与之外, 还有其他因素的参与, 考虑是由于细胞在有氧条件下经 X 射线照射后产生了多种自由基, 尤其是活性氧自由基, 以及通过产生 iNOS 促进 NO 的生成, 而 NO 和 ROS 又可以进一步调节相应的信号因子的产生, 当用这种富含活性氧、NO 及受这些自由基调整的信号分子的培养液处理乏氧细胞时, 乏氧细胞的损伤加重, 同时乏氧的细胞再氧合也能加重细胞的损伤。

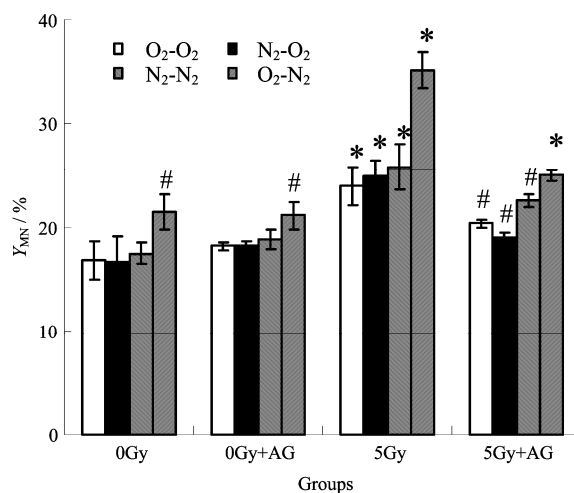


Fig. 4 Effects of aminoguanidine on bystander MN of T98G cells in hypoxic and normoxic condition (#  $P < 0.05$ ; \*  $P < 0.01$ )

### 3 讨论

实体肿瘤的乏氧细胞对放疗及大多数细胞周期特异性化疗药物很不敏感, 因此这部分细胞可逃避放射损伤, 在放疗或化疗结束后重新进入细胞周期或恢复肿瘤干细胞行为, 进而使肿瘤难以局部治愈, 甚至治后复发, 并且复发的肿瘤比原来的肿瘤具有更快的生长速率, 这种加速增殖是肿瘤抵抗放疗、化疗的主要原因。也就是说肿瘤中乏氧细胞亚群的存在可能是放疗、化疗局部治疗失败及治后复发的根源。而氧在辐射产生自由基的过程中扮演重要角

色,细胞含氧状态对放疗杀伤作用有很大影响。放疗中,也有原来乏氧的细胞可能获得再氧合的机会,从而对放疗的敏感性增加,肿瘤细胞损伤加重。因此,人们想尽各种方法减少乏氧细胞数量或增加肿瘤细胞的氧含量。

近年来,随着对辐射诱导的旁效应的深入研究发现:由于辐射诱导旁效应不仅发生在肿瘤细胞之间,在肿瘤细胞和正常细胞之间,甚至在正常细胞之间均有发生,这样不仅使放疗的治疗效应得以放大,还增加了放疗对周围正常组织造成的不良影响,故其在恶性肿瘤的治疗上有着重要的意义,并逐渐成为近年来肿瘤治疗方面的研究热点。但以往的辐射诱导旁效应都是发生在有氧的情况下<sup>[8-12]</sup>,在乏氧条件下的辐射诱导旁观者效应尚未见报导。本文本着乏氧细胞为实体肿瘤所特有这一特征,来研究乏氧条件下辐射诱发未照射组细胞的旁效应,并初步探讨其发生的机制。本研究发现乏氧条件下的人神经胶质瘤T98G细胞存在辐射诱导的旁效应,并且该效应在乏氧条件和有氧条件间无显著性差别。

目前对于辐射诱导旁效应的发生认为主要是通过两种信号因子传播途径:一种认为旁效应的发生与细胞间的通讯有关,相邻细胞可以通过间隙连接(Gap junction)直接交换小分子的信号因子,进而实现代谢偶联或电偶联<sup>[13,14]</sup>。此外,还有一些学者经研究发现,经射线照射细胞的条件培养基能使未受照射的细胞出现与照射细胞相类似的生物学效应,根本不需要受照射细胞与未照射细胞的直接接触,这提示旁效应的产生可以不依赖于细胞间的间隙连接,可能是通过信号传导系统间接控制未照射细胞,或者是直接分泌出了能对未照射细胞产生效应的细胞因子。本试验采用了条件培养基的处理方式,检测到自由基清除剂DMSO的使用能显著降低T98G细胞微核率的产生,显然自由基参与了辐射诱导旁效应的形成,与文献报道的结果相一致<sup>[15]</sup>。另外还发现,在用有氧条件下获得的条件培养基,处理乏氧细胞后,其微核形成率显著提高,而用其处理有氧细胞,或是用乏氧条件下获得的条件培养基处理乏氧或有氧细胞均未发现微核率的升高,探索其原因:一方面被照射的细胞在氧气充足的环境中产生大量的ROS,在ROS的作用下,细胞会因脂质过氧化而产生许多脂自由基,引起生物膜、蛋白质和核酸损伤;另一方面,iNOS抑制剂实验说明照射可以诱导iNOS的表达、NO的产生,高浓度的NO可诱导DNA损伤、微核形成等辐射旁效应。虽说ROS和NO自由基的寿命很短,不能稳定存在于CM中,但ROS

和NO作为信号因子,还可以调节产生新的信号因子,如TGF- $\beta$ 1等重要的辐射旁效应信号因子。因此,有氧条件下收集的培养基富含一些受ROS和NO调节的信号因子,用这样的培养液处理乏氧状态的细胞则加重了乏氧细胞的损伤。除此之外,不能排除还有其他因素或其他因子的参与,这将是今后需深入研究的方向之一。

## 参考文献

- 1 Lee K A, Roth R A, LaPres J J, *et al.* *Pharmacology and Therapeutics*, 2007, **113**(2): 229-246
- 2 Murphy J E J, Nugent S, Seymour C, *et al.* *Mutat Res*, 2005, **585**(1-2): 127-136
- 3 Sokolov M V, Smilenov L B, Hall E J, *et al.* *Oncogene*, 2005, **24**(49): 7257-7265
- 4 Shao C L, Folkard M, Michael B D, *et al.* *Int J Cancer*, 2005, **116**(1): 45-51
- 5 Iyer R, Lehnert B E, Svensson R. *Cancer Res*, 2000, **60**(5): 1290-1298
- 6 Hei T K, Persaud R, Zhou H N, *et al.* *Mutat Res*, 2004, **568**(1): 111-120
- 7 Shao C L, Furusawa Y, Kobayashi Y, *et al.* *Faseb J*, 2003, **17**(11): 1422-1427
- 8 Murphy J E J, Nugent S, Seymour C, *et al.* *Mutat Res*, 2005, **585**(1-2): 127-136
- 9 Shao C L, Stewart V, Folkard M, *et al.* *Cancer Res*, 2003, **12**(1): 8437-8442
- 10 Shao C L, Folkard M, Michael B D, *et al.* *Pnas*, 2004, **101**(37): 13495-13500
- 11 Frank M D D K, Szymkowiak M D B, Hughes C A, *et al.* *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 2006, **135**(5): 736-743
- 12 Howell R W, Bishayee A. *Micron*, 2002, **33**(2): 127-132
- 13 DeVeaux L C, Durtschi L S, Case J G, *et al.* *Mutat Res*, 2006, **597**(1-2): 78-86
- 14 Shao C L, Furusawa Y, Kobayashi Y, *et al.* *Nucl Instrum Meth Phys Res Section B*, 2006, **251**(1): 177-181
- 15 Hu B, Wu L, Han W, *et al.* *Carcinogenesis*, 2006, **27**(2): 245-251

## X-ray radiation induced bystander effects of human glioblastoma T98G cells under hypoxia condition

ZHANG Jianghong<sup>1</sup> PRISE K M<sup>2</sup> JIN Yizun<sup>1</sup> SHAO Chunlin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (Institute of Radiation Medicine, Fudan university, Shanghai 200032, China)

<sup>2</sup> (Gray Cancer Institute, Oxford University, Middlesex HA6 2JR, UK)

**ABSTRACT** Non-irradiated bystander human glioblastoma T98G cells were co-cultured (CC) with irradiated cells or treated with conditioned medium (CM) from irradiated cells under hypoxic condition, then micronucleus (MN) of both irradiated cells and bystander cells were measured for the investigation of radiation induced bystander effect and its mechanism. It has been found that the MN yield ( $Y_{MN}$ ) of non-irradiated bystander T98G cells is obviously enhanced after the cell co-culture, or CM treatment, but this increment is diminished by free radical scavenger, dimethyl sulfoxide (DMSO). When hypoxic or normoxic T98G cells are treated with CM obtained from irradiated cells under either hypoxic or normoxic condition, the biggest bystander response has been observed in the group of hypoxic bystander cells treated with CM from irradiated normoxic cells. However, all of these increments of bystander  $Y_{MN}$  could be eliminated by aminoguanidine, an iNOS inhibitor. Therefore, under hypoxic condition, free radicals, especially reactive oxygen species and nitric oxide, are involved in the bystander response induced by irradiated T98G cells.

**KEYWORDS** Hypoxia, Radiation induced bystander effect, Micronuclei, Reactive oxygen species, NO

**CLC** R14, R811.5, R815.2, R818.03