

文章编号: 1007-4627(2009)02-0253-06

X 射线诱导的 HeLa 细胞旁效应中 ROS 和 NO 关系研究^{*}

蔡宇伽^{1,2}, 张 红^{1, #}

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 活性氧(ROS)和一氧化氮(NO)是辐射诱导的旁效应信号通路中的两个重要信号分子。实验研究了这两种信号分子在 HeLa 细胞旁效应信号通路中的关系。通过微核实验,发现 X 射线辐照过的 HeLa 细胞及其旁观者细胞微核形成明显增加,而二甲亚砜(DMSO)预处理显著抑制了微核形成。另外还发现,接受条件培养基的旁观者细胞的增殖速率增加,而 DMSO 预处理产生条件培养基的受辐照细胞则使旁观者细胞的增殖速率降低。以上的结果从不同角度证实了 HeLa 细胞存在 X 射线诱导的旁效应,且其可以被 DMSO 预处理所抑制。Western blotting 和 DAF-FM DA 荧光探针检测分别显示出辐照后细胞的诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和 NO 水平均升高,而 DMSO 预处理则降低其水平。因此,可以推测 X 射线诱导的 HeLa 旁效应当中 ROS 是 NO 的上游信号。

关键词: 旁效应; 活性氧; 一氧化氮; 诱导型一氧化氮合酶; X 射线

中图分类号: Q691.5; R811.5

文献标识码: A

1 引言

辐照过的细胞通过释放信号分子,导致未辐照细胞发生相应的生物学反应,这种现象称之为辐射诱导的旁效应。尽管旁效应研究早在半个世纪以前就已经开始,其具体的分子机制仍然有待阐明。旁效应涉及的因素众多,如活性氧(Reactive oxygen species, 简称 ROS)、一氧化氮(Nitric oxide, 简称 NO)、细胞因子、转录因子以及线粒体都参与了旁效应的信号通路^[1-7]。

在 X 射线辐照下,无论是直接辐照细胞,还是旁观者细胞,其 ROS 表达都明显升高,并且这种高水平的 ROS 可以维持 30 h 以上^[8]。有证据表明, NADPH 氧化酶是 α 粒子直接辐照的细胞中 ROS 的主要来源,并且这种 ROS 响应无须直接照射细胞核,也有证据显示 NADPH 氧化酶也参与了 X 射线辐照引发的 ROS 响应^[2, 9-11]。此外, ROS 清除剂,如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, 简称 DMSO)都能够抑制旁效

应,表明 ROS 在旁效应信号通路当中扮演了关键的角色^[8-10, 12]。NO 同样也是辐射诱导的旁效应的重要信号分子。Shao 等人发现,当仅 1% 的细胞的细胞核接受单个 α 粒子照射后,却有 40% 的细胞出现 NO 水平增加^[4]。此外, c-PTIO(NO 清除剂)和 AG(诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase, 简称 iNOS)抑制剂)处理,可以有效地抑制旁效应^[3, 4, 13]。尽管目前已经清楚 ROS 与 NO 都参与了旁效应的信号通路,但是两者之间是否有联系、何种联系、如何联系等仍然有待进一步研究。

本实验以微核和细胞增值速率为指标,证实 HeLa 细胞存在 X 射线诱导的旁效应,其旁效应可被 DMSO 预处理所抑制。另外,通过 Western blotting 和 NO 荧光探针实验,发现无论是 iNOS 表达还是 NO 水平,都能够被 DMSO 预处理所抑制,表明在 X 射线诱导的 HeLa 旁效应当中, ROS 信号在 NO 信号的上游, ROS 对 NO 的调控可能是通过转录因子 NF- κ B 进行的。

* 收稿日期: 2008-12-30; 修改日期: 2009-01-12

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10835011, 10675151); 甘肃省重大科技专项资助项目(0702NKDA045, 0801NKDA001); 兰州市-中国科学院科技攻关资助项目(07-2-07)

作者简介: 蔡宇伽(1981-), 男(汉族), 浙江建德人, 硕士研究生, 从事辐射生物学研究; E-mail: caiyujia@impcas.ac.cn

通讯联系人: 张红, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

2 材料和方法

2.1 细胞培养

HeLa 细胞在 100 ml 的细胞培养瓶中培养, 培养基为 RPMI-1640(GIBCO Invitrogen Cell Culture), 另补充 10% 小牛血清(Lanzhou National HyClone Bioengineering Co. Ltd)。培养条件为 37 °C, 含 5% CO₂ 的潮湿空气。用于辐照和培养基转移实验的细胞提前 12 h 接种到培养瓶或培养皿。

2.2 X 射线辐照和微核实验

HeLa 细胞用甘肃省肿瘤医院 X 射线加速器(北京医疗器械研究所, BJ6B E400)辐照 1 Gy(剂量率 3 Gy/min)。辐照过后, 细胞加细胞松弛素 B(Sigma), 其终浓度为 2 μg/ml, 继续培养 25 h。培养皿中的细胞用甲醇/冰醋酸浓液(9:1 V_{甲醇}/V_{冰醋酸})固定 20 min。风干后, 细胞用吖啶橙染色(Acridine orange, 40 μg/ml in PBS, pH 6.9) 5 min, 在荧光显微镜(Olympus BX-51)下观察, 并记录 1000 个双核细胞中的微核数目。

2.3 培养基转移实验

辐照前 12 h, 细胞接种至培养瓶。辐照前 50 min, 加 DMSO(上海生工生物工程有限公司)。DMSO 在细胞中的存在时间大约 2 h。辐照过后, 用培养基洗细胞一次以清除残余 DMSO, 然后换上正常新鲜培养基。细胞继续培养 24 h 以产生条件培养基(Conditioned medium), 然后收集条件培养基, 经过 0.22 μm 的滤膜过滤后, 转移至未辐照细胞。培养基转移的同时, 添加细胞松弛素 B, 细胞继续培养 25 h 做微核实验。

2.4 细胞增殖分析

ACEA RT-CES System(ACEA Biosciences)是一种微电子的细胞检测系统, 能够记录活细胞数量。对于直接辐照实验, 辐射过后细胞按 1000 个/孔的密度接种至电子检测板; 对于培养基转移实验, 细胞按 1000 个/孔的密度接种至电子检测板, 24 h 后换条件培养基。启动 RT-CES 系统, Cell index(反映被细胞覆盖的电子检测板面积)被系统实时自动记录下来。

2.5 免疫印迹

细胞辐照过后, 用裂解液(50 mmol/l Tris-HCl

(pH 8.0), 150 mmol/l NaCl, 1% Triton X-100, 1 mmol/l Phenylmethylsulfonyl fluoride)提取蛋白。然后以 BCA(Pierce) 法测其蛋白浓度。蛋白等量上样(25 μg), 6.5% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 3.5 h (30 mA), 然后将蛋白转移到硝酸纤维素膜。本实验使用的一抗为单克隆兔抗鼠 iNOS 抗体(Santa Cruz Biotechnology)和多克隆兔抗人 β-Actin(Santa Cruz Biotechnology); 二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(Santa Cruz Biotechnology)。曝光后, 用 Quantity One 分析条带强度。

2.6 NO 水平检测

细胞的 NO 水平用 4-amino-5-methylamino-2', 7'-difluorofluorescein diacetate(DAF-FM DA, Beyotime)检测。DAF-FM DA 可以穿过细胞膜, 进入细胞后可以被细胞内的酯酶催化, 形成不能穿过细胞膜的 DAF-FM。DAF-FM 本身仅有很弱的荧光, 但在和 NO 反应后可以产生强烈荧光, 激发波长为 495 nm, 发射波长为 515 nm。按照 1:1000 比例, 用 DAF-FM DA 稀释液稀释 DAF-FM DA, 使其终浓度为 5 μmol/l。去除细胞培养液, 加入 1 ml 稀释好的 DAF-FM DA。在 37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min。用 PBS(pH 7.4)洗涤细胞 3 次, 以充分去除未进入细胞内的 DAF-FM DA。随机选择 100—200 个细胞, 用荧光显微镜自带的相机拍摄。拍摄时保证所有照片拍摄条件一致, 使细胞的荧光强度具有可比性。荧光强度用图像分析软件 Image-Pro Plus 分析。

2.7 统计分析

本实验采用的统计学方法为 Student's *t* test。*p* 值小于 0.05 认为差异显著。

3 结果

3.1 受辐照细胞及旁观者细胞的微核形成

如图 1(a)所示, 辐照后细胞微核形成与未辐照细胞相比增加了 63.6%, 而与 DMSO 预处理相比, 未预处理的细胞受辐照后微核形成降低 46.3%。此外, 从图 1(b)可以看出, 源自受辐照细胞的条件培养基使旁观者细胞的微核形成显著增加。旁观者细胞的微核形成同样能够被 DMSO 预处理抑制, 表明 ROS 参与了旁效应信号的产生。我们的实验结

果证实了 HeLa 细胞存在旁效应, 并且其旁效应能够被 DMSO 预处理抑制。

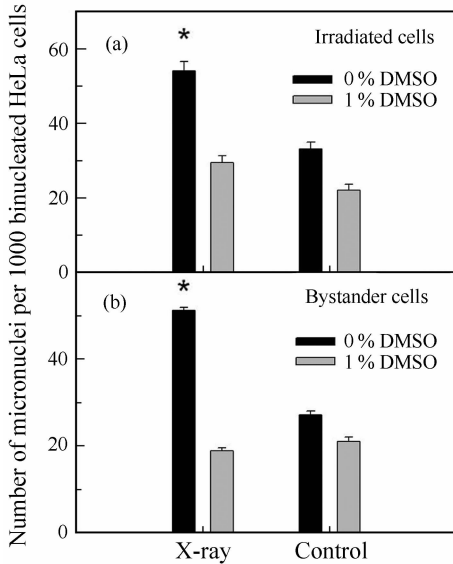


图 1 X 射线辐照的 HeLa 细胞及其旁观者细胞的微核形成以及 DMSO 预处理对微核形成的影响 * 表示 $p < 0.05$ 。

3.2 受辐照及旁观者细胞的增殖

图 2(a)表明在 0—77 h, 受辐照细胞其增殖速率与未辐照细胞相比被抑制了 27.5%, 尽管直接辐

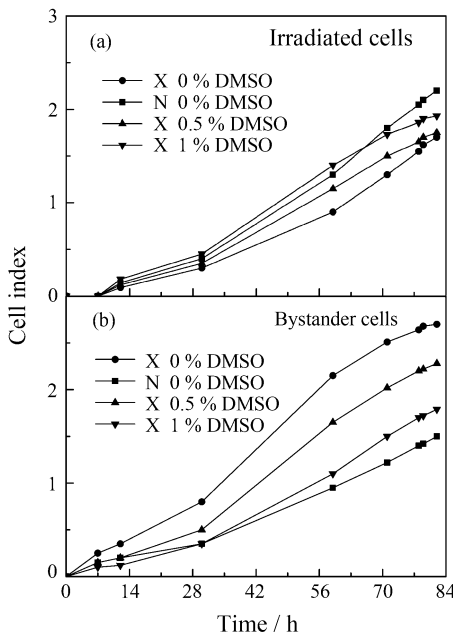


图 2 X 射线辐照的细胞及其旁观者细胞的增殖以及 DMSO 预处理对细胞增殖的影响 X 表示 X 射线辐照, N 表示 X 射线未辐照。

照的细胞其增殖速率在 70—77 h 时有所恢复, 甚至超过了未辐照细胞。0.5% 和 1% 的 DMSO 处理则能缩小两者的差别, 并且 DMSO 预处理的效果与浓度有关: 1% 的 DMSO 比 0.5% 的 DMSO 处理更大程度地恢复了受辐照细胞的增殖速率。另一方面, 如图 2(b)所示, 源自受辐照细胞的条件培养基与源自未辐照细胞的非条件培养基相比, 细胞增殖速率增加了 1 倍。当用 DMSO 处理辐照细胞时, 条件培养基的刺激生长作用明显降低。DMSO 预处理的效果同样与其浓度相关: 浓度越高, 条件培养基的刺激生长作用越小。

3.3 DMSO 预处理降低受辐照细胞的 iNOS 水平

为了确定 ROS 是否能够诱导 iNOS 表达, 我们分别用 0.5% 和 1% 的 DMSO 预处理受辐照细胞, 然后检测细胞 iNOS 表达水平。辐照过后 7 h, 收集细胞, 用 Western blotting 分析其 iNOS 表达水平 (见图 3)。分析表明, 辐照后细胞内的 iNOS

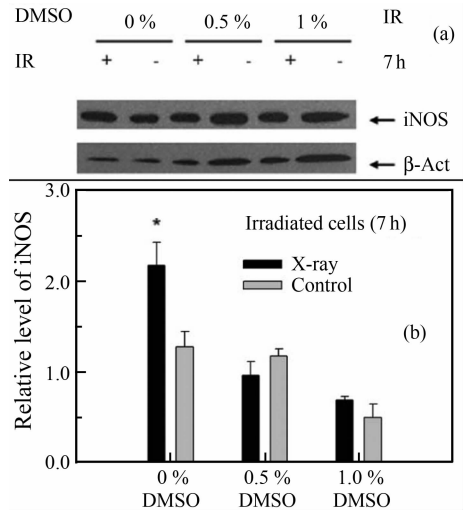


图 3 Western blotting 分析 X 射线辐照及 DMSO 预处理对 HeLa 细胞 iNOS 表达的影响 * 表示 $p < 0.05$ 。

表达水平显著增高, 而 DMSO 预处理则抑制受辐照细胞的 iNOS 水平, 并且 DMSO 的抑制作用同样是浓度依赖的, 即浓度越高其抑制效果越好。

3.4 DMSO 预处理降低受辐照细胞的 NO 水平

为了印证上述 X 射线辐照和 DMSO 预处理对 HeLa 细胞 iNOS 表达的影响, 我们用 DAF-FM DA 荧光探针原位检测辐照后 9 h, 细胞内的 NO 水平。图 4 表明辐照过后细胞内的 NO 相对水平与未

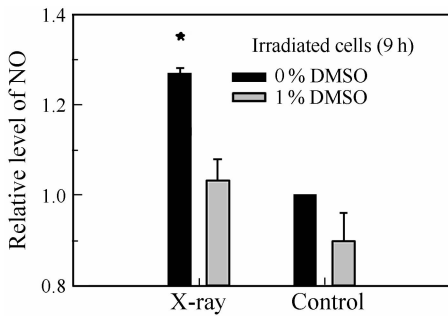


图 4 DAF-FM DA 荧光探针分析 X 射线辐照及 DMSO 预处理对 HeLa 细胞 NO 水平的影响

* 表示 $p < 0.05$ 。

辐照细胞相比显著增加, 此结果与辐照后 iNOS 水平显著增加相吻合。1% 的 DMSO 预处理则显著抑制了受辐照细胞的 NO 水平, 此结果也与 DMSO 预处理抑制受辐照细胞 iNOS 表达相吻合。

4 讨论

辐射对细胞生长的作用似乎是矛盾的。Arnold 等人报道当用人体治疗剂量辐照细胞时, 受辐照细胞及其旁观者细胞增殖受到抑制, 他们指出这种增殖抑制作用是由于辐照过后细胞 TGF- β 1 表达增加^[14]。相反, Iyer 等人报道低剂量的 α 粒子照射能够刺激正常人肺纤维原细胞 (cl) 增殖, 并且受辐照细胞其条件培养基同样能够刺激未辐照细胞生长, 他们同样把这种增殖刺激作用归因于 TGF- β 1 表达增加^[15]。在本实验中, 我们发现 X 射线辐照抑制了接受直接辐照的 HeLa 细胞的增殖, 而 DMSO 预处理能够减轻这种抑制作用。另一方面, 受辐照细胞其条件培养基与未辐照细胞的非条件培养基相比, 能够刺激未辐照细胞的增殖, 而 DMSO 处理减小两者的差别。因此, 辐照对受辐照细胞及其旁观者细胞增殖促进或抑制作用很可能依赖辐照剂量, 即低剂量的辐照促进细胞增殖, 高剂量辐照抑制细胞增殖。也有可能存在某剂量点, 此时受辐照细胞增殖受到抑制, 旁观者细胞增殖却受到刺激, 比如我们的这种情况。但是, 也不能排除细胞种类的影响。这种看似矛盾的辐照对细胞增殖的影响正好与 TGF- β 的双重角色一致: TGF- β 促进还是抑制细胞增殖取决于其浓度、细胞种类以及细胞生长条件^[14, 15]。

早期的研究发现照射细胞质和细胞核对于诱导

受辐照细胞和旁观者细胞的 DNA 损伤效果相同, 表明 DNA 损伤是旁效应的次级事件而非起始事件^[16-18]。Kashino 等人则提供了更为直接的证据, 他们利用野生型 CHO 细胞及其修复缺陷的突变体发现靶细胞 DNA 损伤的起始水平及修复过程对于旁效应信号的释放并不重要^[19, 20]。本实验以及其他研究者的证据表明 DMSO 预处理能够显著抑制受辐照细胞及其旁观者细胞的 DNA 损伤^[21-23]。DMSO 是一种有效的羟自由基清除剂, 辐照前的 DMSO 处理能够清除短寿命的自由基^[24]。考虑到无论对细胞质还是细胞核的照射都会涉及 ROS 的产生以及 ROS 的 DNA 损伤作用^[25, 26], 辐照导致 ROS 的产生很有可能是旁效应的起始事件。本实验发现 DMSO 预处理的受辐照细胞其 iNOS 表达比未经 DMSO 预处理的受辐照细胞低, 但图 3(a) 中 β -Actin 表达不一致。可能的原因有蛋白浓度测量的误差、上样误差、DMSO 对 β -Actin 表达的影响。前两者不影响结果分析, 而后一者会影响结果分析, 因此, 本实验除了检测 iNOS 外, 还用 DAF-FM DA 荧光探针检测了 iNOS 的催化产物 NO 的水平, 以此来排除 DMSO 对 β -Actin 表达的影响。我们的实验发现 DMSO 预处理的受辐照细胞其 NO 水平也比未经 DMSO 预处理的受辐照细胞低, 表明在 X 射线诱导的 HeLa 细胞旁效应当中 ROS 是 NO 的上游信号。Zhou 等人的证据表明 Bay 11-7082 (NF- κ B 抑制剂) 处理能够抑制受辐照的细胞 iNOS 表达^[6]。其他的研究发现 ROS 可以激活 NF- κ B, 而后者可以转录 iNOS 基因引起 NO 水平增高^[27, 28]。旁效应信号通路中, ROS 是否通过 NF- κ B 调控 NO 水平还有待进一步的研究。

参考文献 (References):

- [1] Wu Qingfeng, Li Qiang, Jin Xiaodong. Nuclear Physics Review, 2008, 25(2): 148(in Chinese).
(吴庆丰, 李强, 金晓东. 原子核物理评论, 2008, 25(2): 148.)
- [2] Narayanan P K, Goodwin E H, Lehnert B E. Cancer Res, 1997, 57(18): 3963.
- [3] Shao C, Furusawa Y, Aoki M, et al. Int J Radiat Biol, 2002, 78(9): 837.
- [4] Shao C, Stewart V, Folkard M, et al. Cancer Res, 2003, 63(23): 8437.

- [5] Shao C, Prise K M, Folkard M. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2008, 638 (1—2): 139.
- [6] Zhou H, Ivanov V N, Lien YC, *et al.* *Cancer Res*, 2008, 68 (7): 2233.
- [7] Lyng F M, Seymour C B, Mothersill C. *Biochem Soc Trans*, 2001, 29(Pt 2): 350.
- [8] Yang H, Asaad N, Held K D. *Oncogene*, 2005, 24(12): 2096.
- [9] Azzam E I, de Toledo S M, Spitz D R, *et al.* *Cancer Res*, 2002, 62(19): 5436.
- [10] Little B J, Azzam I E, de Toledo M S, *et al.* *Radiat Prot Dosimetry*, 2002, 99(1—4): 159.
- [11] Liu Q, He X, Liu Y, *et al.* *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 377(3): 775.
- [12] Lyng F M, Maguire P, McClean B, *et al.* *Radiation Research*, 2006, 165(4): 400.
- [13] Matsumoto H, Hayashi S, Hatashita M, *et al.* *Radiation Research*, 2001, 155(3): 387.
- [14] Arnold S F, Tims E, Bluman E M, *et al.* *Radiation Research*, 1999, 152(5): 487.
- [15] Iyer R, Lehnert B E. *Cancer Res*, 2000, 60(5): 1290.
- [16] Tartier L, Gilchrist S, Burdak-Rothkamm S, *et al.* *Cancer Res*, 2007, 67(12): 5872.
- [17] Shao C, Folkard M, Michael B D, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(37): 13495.
- [18] Folkard M, Prise K, Schettino G, *et al.* *Nucl Instr and Meth* 2005, B231(1—4): 189.
- [19] Kashino G, Suzuki K, Matsuda N, *et al.* *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2007, 619(1—2): 134.
- [20] Prise K M, Burdak-Rothkamm S, Folkard M, *et al.* *International Congress Series*, 2007, 1299: 121.
- [21] Shao C, Furusawa Y, Kobayashi Y, *et al.* *FASEB J*, 2003, 17(11): 1422.
- [22] Hu B, Wu L, Han W, *et al.* *Carcinogenesis*, 2006, 27(2): 245.
- [23] Kashino G, Prise K M, Suzuki K, *et al.* *J Radiat Res(Tokyo)*, 2007, 48(4): 327.
- [24] Koyama S, Kodama S, Suzuki K, *et al.* *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1998, 421(1): 45.
- [25] Emerit I. *Free Radic Biol Med*, 1994, 16(1): 99.
- [26] Cooke M S, Evans M D, Dizdaroglu M, *et al.* *FASEB J*, 2003, 17(10): 1195.
- [27] Adecock I M, Brown C R, Kwon O, *et al.* *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994, 199(3): 1518.
- [28] Seifried H E, Anderson D E, Fisher E I, *et al.* *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2007, 18(9): 567.

Relationship of ROS and NO in X-ray Induced Bystander Effects in HeLa Cells^{*}

CAI Yu-jia^{1, 2}, ZHANG Hong^{1, #}

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

2 *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: Accumulating evidence indicates that irradiated cells can release signals which induce a series of biological responses in non-exposed cells. This is known as irradiation-induced bystander effects. Both reactive oxygen species(ROS) and nitric oxide(NO) play important roles in bystander effects. In this study, we determined the relationship of ROS and NO in the signaling pathway of bystander effects. HeLa cells were treated with or without dimethyl sulfoxide(DMSO) before X-ray irradiation, and micronuclei formation as well as cell proliferation rate was detected in both irradiated and bystander cells. In addition, we also detected inducible nitric oxide synthase(iNOS) expression and NO level in irradiated cells using Western blotting and DAF-FM DA fluorescent probe, respectively. Our results showed that micronuclei were in-

* **Received date:** 30 Dec. 2008; **Revised date:** 12 Jan. 2009

* **Foundation item:** National Natural Science Foundation of China(10835011, 10675151); Key Scientific Technology Research Projects of Gansu Province(0702NKDA045, 0801NKDA001); Scientific Technology Research Project of Lanzhou-Chinese Academy of Sciences(07-2-07)

Corresponding author: Zhang Hong, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

duced in irradiated and bystander cells while DMSO treatment significantly suppressed the formation of micronuclei in both of them. We also found that when cells were irradiated their proliferation rate was suppressed while DMSO treatment eliminated this inhibition effect. In contrast, the cells received conditioned medium from irradiated cells proliferated more quickly than the cells received medium from non-irradiated cells while DMSO treatment reduced the difference. Finally, we found that irradiated cells had higher level of iNOS and NO compared to non-irradiated controls, whereas DMSO treatment decreased their levels. These results suggest that ROS is the upstream signal of NO in X-ray induced bystander effects in HeLa cells.

Key words: bystander effect; reactive oxygen species; nitric oxide; inducible nitric oxide synthase; X-ray