

文章编号: 1007-4627(2012)02-0189-07

# C 离子辐照引起细胞分泌旁效应信号因子 浓度随时间的变化

崔大超<sup>1,2,3</sup>, 李强<sup>1,2</sup>, 吴庆丰<sup>1,2</sup>, 刘新国<sup>1,2</sup>, 戴中颖<sup>1,2,3</sup>

(1. 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2. 中国科学院重离子辐射生物医学重点实验室, 甘肃 兰州 730000;

3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 信号因子通常能介导旁效应的发生。利用高 LET C 离子辐照体外培养的人肝癌 QGY-7703 细胞, 检测辐照后不同时刻培养基中信号因子 TGF- $\beta$ 1 和 NO 的浓度, 并通过转移培养基法检测照射后不同时刻转移培养基对人肝 L02 旁细胞存活率和代谢活力的影响, 发现受照射细胞在时间与空间上调控着周围信号因子的浓度, 并且通过信号因子浓度的变化影响旁细胞的各种效应发生。实验为旁效应的解释提供了新的实验数据。

**关键词:** 旁效应; 高 LET 射线; TGF- $\beta$ 1; NO; 信号因子

**中图分类号:** Q691.5

**文献标志码:** A

## 1 引言

旁观者效应(旁效应, Bystander effect)是一种生物体中普遍存在的效应<sup>[1]</sup>。在重离子治癌研究中, 旁效应是重离子辐射对细胞间接损伤以及产生的一系列其它效应的总称。相信随着研究的深入, 其定义与内涵也会更加清晰。在辐射生物学研究领域, 旁效应更为具体的定义是受辐照细胞对周围细胞的影响, 同时也体现为放射治疗过程中受辐照区域细胞对周边或更远距离细胞的影响。从不断增加的相关报道来看, 旁效应是细胞应激反应的综合体现, 有着复杂的调控网络<sup>[2]</sup>。

本文通过研究体外培养肿瘤细胞及正常组织细胞经重离子辐照后短时间内胞外信号因子浓度的改变, 从时间和空间两个方面探讨旁效应的发生机理, 检测胞外旁效应信号因子——生长转化因子 $\beta$ 1 (Transforming growth factor  $\beta$ 1, 简称 TGF- $\beta$ 1)<sup>[3]</sup>与一氧化氮(nitric oxide, 简称 NO)两种性质迥异的细胞产物。其中, TGF- $\beta$ 1 作为蛋白质分子是传统信号转导的代表, 而且在不同调控环境下有着两

种截然相反的作用, 或刺激细胞生长, 或抑制细胞生长; NO 作为一种小分子量细胞产物, 在早期的研究中大多以氧化还原的角色出现。随着研究的深入, NO 在细胞中作为重要的信号分子被再次发现<sup>[4]</sup>。NO 作为无机物小分子有着不同于生物大分子的作用, 通过简单的扩散作用, 可以更快速地诱导细胞内部某些效应的发生。NO 与 TGF- $\beta$ 1 两者均参与了辐照相关旁效应的响应<sup>[5-6]</sup>。本文希望通过独立的实验对旁效应做出更全面的分析。实验中通过检测细胞在辐照后分泌物浓度变化和分泌物对旁细胞的影响两方面实验, 研究了细胞在辐照刺激后培养基中 TGF- $\beta$ 1 和 NO 随时间的变化, 并观测到在 1 h 内不同时间段收集的辐照细胞培养基对旁细胞有显著的差异性影响。此发现在目前流行的旁效应的理论中并未受到重视, 但却可能对旁细胞最终命运有着不可忽视的作用。

## 2 材料与方法

### 2.1 细胞及其培养

实验采用的人肝癌 QGY-7703 细胞(以下简称

收稿日期: 2011-08-09; 修改日期: 2011-09-30

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(973 计划)(2010CB834203); 国家自然科学基金资助项目(10905080, 11075191); 国家自然科学基金重点项目(10835011); 兰州市科技发展计划项目(2008-sr-10, 2009-2-12)

作者简介: 崔大超(1985-), 男, 内蒙古包头人, 在读硕士研究生, 从事生物物理研究; E-mail: cuidachao@impcas.ac.cn

通讯联系人: 李强, E-mail: liqiang@impcas.ac.cn

为 QGY-7703 细胞)购于中国科学院上海细胞库<sup>[7]</sup>, 永生化人肝 L02 细胞(以下简称为 L02 细胞)为实验室长期保存。两种细胞的培养基均为添加 10% 胎牛血清(兰州民海公司)的改良型 RPMI-1640 培养基(赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司), 并于 37℃ 的 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

## 2.2 TGF-β1 与一氧化氮检测

TGF-β1 与一氧化氮检测采用由上海逸峰公司代理的 Rapid-bio 公司(RD)产品: 人转化生长因子 β1 酶联免疫分析试剂盒(Human TGF-β1 ELISA kit), 货号 CK-E10113; 人一氧化氮酶联免疫分析试剂盒(Human nitric oxide ELISA Kit), 货号 CK-E11333。由于待检测物浓度偏低, 并且实验过程中操作时间紧张, 所以在原有操作步骤上做了两点调整: (1) 加样时直接加入 20 μL 不经稀释的样品, 洗板次数由 5 次改为 2 次, 最后使用酶标仪(Thermo Multiskan spectrum)检测。如果背景值过大, 增加一步操作, 就将显色液清空并用吸水纸吸干残留液体, 测量该空白板吸光值并从总吸光值中扣除孔板材料的吸光值。

## 2.3 辐照

辐照实验是在中国科学院近代物理研究所 HIRFL-CSR 的深部肿瘤重离子治疗终端进行的。C 离子束由该终端水平引出进入大气, 经过束流扫描装置, 在治疗室等中心位置处 5 cm×5 cm 区域内照射野均匀性可达 95%<sup>[8]</sup>。为了模拟 C 离子束的肿瘤治疗过程, 实验中用 LET 为 80 keV/μm 的 C 离子照射 QGY-7703 细胞 2 Gy(对应于 Bragg 峰区照射), 采用 LET 为 30 keV/μm C 离子照射 L02 细胞 1 Gy(对应于 C 离子束的坪区照射)。这两种照射方式所需要的照射时间相差无几。

经多次预实验, 采用 96 孔板作为细胞辐照容器。具体为: 96 孔板中选取小于等于 5×5 孔的矩形区域(1×3, 3×3 和 4×5 等), 植入目标细胞, 加入含血清培养基培育(200 μL/well)6~10 h, 使细胞正常贴壁并展开。照射前 30~60 min 弃去旧培养基, 更换为不含血清的培养基 50 μL/well, 降低培养基对细胞分泌物的干扰。

采用辐照前对所有细胞样品同时更换新鲜培养基, 不同时刻辐照但照射后同时收集培养基的策略, 有效地减少了对照组, 并且方便对培养基的后

续处理。以 2.4 节的内容为例, 实验中以第一次辐照为起点, 定为 0 时刻。由于每组样品达到辐照所需剂量所用时间小于等于 5 min, 以 5 min 为限换样。6 组样品开始辐照时间点分别为 0, 5, 10, 15, 20 和 25 min(依次对应 60 min 辐照组到 10 min 辐照组), 等待 10 min, 这时只需每隔 5 min 逆序收集辐照组培养基(从 10 min 辐照组到 60 min 辐照组), 便可以达到压缩收集时间的目的。

## 2.4 QGY-7703 细胞受照后释放信号因子的浓度检测

QGY-7703 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔、3×3 方式分别植入 8 块 96 孔板中, 对其中 6 块孔板按 1.3 节叙述的方式进行辐照, 另外 2 块孔板作为对照。辐照完成后, 等待 10 min 开始收集辐照细胞培养基与两个对照组培养基, 用酶联免疫法(ELISA)分别测定 TGF-β1 和 NO 浓度。对照组分别为不经辐照的植有细胞的孔板和经过与实验组相同的处理方式有培养基但无细胞的孔板。

## 2.5 转移培养基培养旁细胞后的旁细胞克隆存活率检测

QGY-7703 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔、5×4 方式分别植入 8 块 96 孔板中, 对其中 6 块孔板按 2.3 节叙述的方式进行辐照, 另外 2 块孔板作为对照。辐照完成后, 等待 10 min 开始收集辐照细胞培养基与两个对照组培养基, 每 10 孔收集在一个密封管中, 密封保存。30 min 后, 对每管收集液过滤(0.20 μm 滤膜), 将滤液分为 3 份, 每份 50 μL, 剩余液体弃掉。制取新鲜 L02 细胞悬液(500 个每 5 μL), 每份滤液中加入 5 μL 细胞悬液, 在温箱中培养 2 h。从每份滤液中取 10 μL 液体 3 份, 每份单独置于 75 mm 培养皿中, 用 5 mL 添加小牛血清的培养基冲散。置于培养箱中 16 d 后取出, 用 PBS 冲洗一次, 结晶紫溶液染色, 统计细胞数大于 50 个的克隆数。

## 2.6 不同密度下 QGY-7703 细胞与 L02 细胞受照射后释放信号因子的浓度对比

QGY-7703 细胞与 L02 细胞分别以  $1 \times 10^5$  (HD)和  $1 \times 10^4$  个/孔(LD), 3×3 方式分别植入 5 块 96 孔板, 对其中 4 块孔板采用 10, 30, 50 和 70 min 4 个时间点, 并按 2.3 节叙述的方式进行辐照, 另外 1 块孔板作为对照。照射完成后等待 10 min 收集各组培养基, 用酶联免疫法(ELISA)分别测定

每个时间点 TGF- $\beta$ 1 和 NO 的浓度。测定操作时间需用 15 min, 为保证时间点的精确性, 将操作用 15 min 均分到每个时间点。每个时间点递增 5 min, 因此照射后收集培养基的时间点修正为 25(10+5+5+5 min), 40(30+5+5min), 55(50+5 min) 和 70 min。使用酶标仪检测。

## 2.7 转移培养基后旁细胞活力的检测

QGY-7703 细胞与 L02 细胞分别以  $1 \times 10^5$  (HD) 和  $1 \times 10^4$  个/孔(LD),  $5 \times 4$  方式分别植入 5 块 96 孔板。辐照方式与 2.6 节的相同, 但总收集时间仅为 5 min 左右, 忽略时间修正, 时间仍采用 10, 30, 50 和 70 min 4 个时间点。整个照射完成后, 等待 10 min 开始收集辐照细胞培养基与对照组培养基, 同一孔板培养基收集在一个密封管中, 常温保存。30 min 内, 对管中收集液进行过滤(0.20  $\mu$ m 滤膜), 将每一管中的滤液分为 9 份, 每份 100  $\mu$ L。将滤液加入到已植入细胞的 96 孔板(L02 细胞液  $1 \times 10^4$  个/孔), 培养箱孵育 45 h, 弃掉旧培养基, PBS 冲洗一次, 加入 100  $\mu$ L 含 10% CCK-8(碧云天产品)原液的 PBS 溶液<sup>[9]</sup>, 培养箱孵育 30 min 后, 使用酶标仪检测。

## 2.8 数据处理

由于受束流时间的限制, 实验除 2.5 节所述实验外均为一次实验 9 个重复样, 实验结果为 9 个重复样的平均结果。TGF- $\beta$ 1 和 NO 浓度均采用与相对对照组浓度的相对量表示, 相对浓度实验数据的误差采用误差传递处理。2.5 节所述实验为一次实验中采用 3 个重复样, 实验结果为 3 个重复样的平均结果。每组实验中各辐照组与对照组的差异显著性由 T 检验(t-test)得出, 在第 3 章的各图中,  $p < 0.05$  用“\*”表示,  $p < 0.01$  用“\*\*”表示。对 2.5 节所述不同密度下 QGY-7703 细胞和 L02 细胞受 C 离子照射后不同时间释放信号因子 NO 和 TGF- $\beta$ 1 的浓度实验结果, 还进行了不同时间点辐照组实验结果的差异显著性 T 检验, 并引用打分方式, 若 T 检验  $p < 0.05$  则认为两组数据有差异(“\*”), 计为 1 分; 若 T 检验  $p > 0.05$  则认为两组数据无差异(“/”), 计为零分。

# 3 结果与讨论

## 3.1 照射后信号因子随时间的变化及对旁细胞的作用

图 1 给出了 QGY-7703 细胞受 LET 为 80

keV/ $\mu$ m C 离子照射后释放 TGF- $\beta$ 1 和 NO 两种信号因子随时间变化的实验结果。可以看出, 信号因子 TGF- $\beta$ 1 的浓度在辐射后 20 min 时增加最为显著。与对照组相比, 辐照后 20 min 时 TGF- $\beta$ 1 浓度增加约 40%。图 2 给出了转移培养基后旁细胞的克隆存活率实验的结果。将 QGY-7703 细胞受照射后不同时刻培养基转移给 L02 细胞, 20 min 时刻转移培养基使 L02 细胞作为旁细胞的存活率是对照组存活率的 50%左右, 为受照射后各时间点转移培养基实验组中 L02 旁细胞存活率最小的。将各个时间

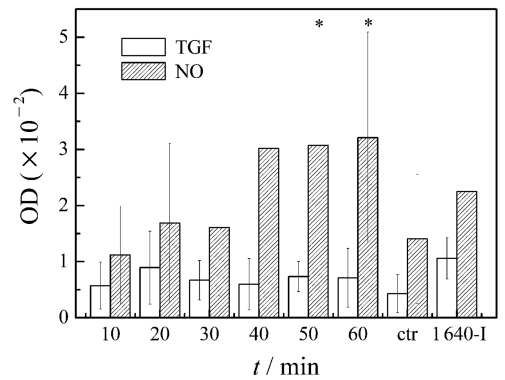


图 1 QGY-7703 细胞经 80 keV/ $\mu$ m C 离子照射后释放 TGF- $\beta$ 1 和 NO 两种信号因子浓度随时间的变化

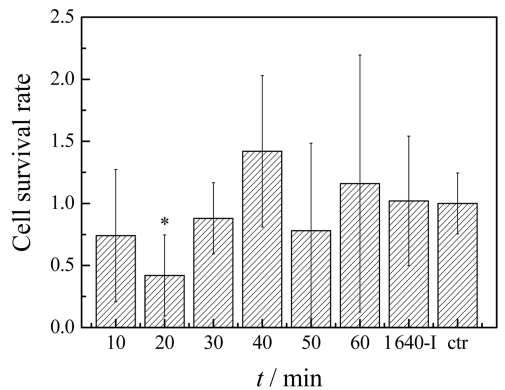


图 2 QGY-7703 细胞经 80 keV/ $\mu$ m C 离子辐照后不同时间转移培养基对 L02 旁细胞存活率的影响

点做出对比, 可以看到, QGY-7703 细胞受照射后释放 TGF- $\beta$ 1 的浓度变化与 L02 细胞的存活率变化两条曲线中峰谷相对。这也与文献[10]中提到的 TGF- $\beta$ 1 对正常组织细胞起抑制作用相吻合。与 QGY-7703 细胞受照射后释放 TGF- $\beta$ 1 浓度的变化相比, QGY-7703 细胞受照射后释放 NO 浓度的变

化要相对复杂。在前 3 个时间点(即 QGY-7703 细胞受照射后 10, 20 和 30 min), NO 浓度与 TGF- $\beta$ 1 浓度的变化趋势一致, 而在随后的时间点中这种一致性消失。

图 1 中经 C 离子辐照后 1 640 培养基(图中 1640-I)对照组中 TGF- $\beta$ 1 浓度的主要贡献来自实验中第一次添加血清的 1 640 培养基。虽然在辐照前更换为无血清的培养基, 但微量残留的血清在没有细胞参与调节的情况下有较高的浓度。当有细胞存在时, 胞外 TGF- $\beta$ 1 浓度会下降并维持到图 1 中细胞对照组的稳定水平。然而, 1 640 培养基对照组中有着较高浓度的 TGF- $\beta$ 1。

由辐照获得的转移培养基并没有导致 L02 旁细胞存活率的显著变化(见图 2, 图中 ctr 组数值为 1, 是各组的对照组), 仅在照射后 20 min 转移培养基会对旁细胞有较明显的抑制作用, 考虑到图 1 中的实验数据存在较大的误差, 表明 NO 与 TGF- $\beta$ 1 并不能独立承担完成调节细胞生长的任务<sup>[11]</sup>。

### 3.2 旁细胞的活力

为了进一步研究受高 LET C 离子照射后, QGY-7703 细胞分泌的信号因子随时间变化对旁细胞的影响, 采用对细胞内氧化还原反应十分敏感的 CCK-8 试剂, 用以检测 L02 旁细胞的活力。该试剂经细胞线粒体内脱氢酶还原后颜色加深, 可以有效检测细胞代谢活性。实验中获得的光密度(optical density, 简称 OD)值由三方面因素决定, 即细胞内线粒体脱氢酶还原率、单孔底面上单位面积细胞数和 CCK-8 试剂加药时间。在转移培养基前, 每孔植入相同的细胞数并同时加药同时检测。这样用细胞内线粒体脱氢酶的效率作为细胞内线粒体工作效率的表征, 并将一次分裂周期内细胞的生长与分裂都归结于初代细胞活力的提升, 细胞的生长停滞与死亡归结于初代细胞活力的降低。最终通过检测 CCK-8 OD 值就可以确定初代细胞的活力。

图 3 给出了 L02 旁细胞利用转移培养基培养近 44 h 后, 经 CCK-8 试剂检测 L02 细胞活力的实验结果。图中各组数据以对照组数据为基准重新校正了 OD 值, 校正后对照组的 OD 值为 0, 其他各组做相应的平移处理。如图所示, 未经辐照的对照组细胞分泌物对旁细胞活力表现为一定的抑制作用。在照射后 30 min 时刻 QGY-7703 细胞分泌的信号

因子对 L02 旁细胞的活力几乎没有影响, 可能是转移培养基中高浓度的 TGF- $\beta$ 1 以及其他细胞因子抑制了细胞的代谢。而辐照后 70 min 时刻的转移培养基, 显著提高了 L02 旁细胞的代谢活力, 高的代谢率使 CCK-8 试剂颜色大幅加深。

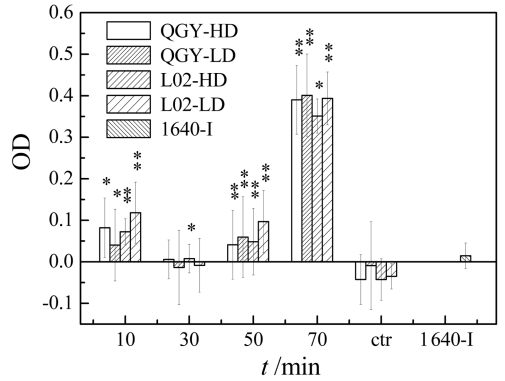


图 3 转移培养基对 L02 旁细胞代谢活力的影响

### 3.3 不同细胞密度下信号因子浓度的变化

为了研究细胞受照射后分泌信号因子浓度随时间的变化是否具有普遍性, 并获取临床治疗剂量下 TGF- $\beta$ 1 和 NO 变化的相关数据, 实验中采用 LET 为 80 和 30 keV/ $\mu$ m 的 C 离子分别辐照了不同密度下的 QGY-7703 细胞(2 Gy)和 L02 细胞(1 Gy)。受辐照细胞释放信号因子 TGF- $\beta$ 1 随时间的变化如图 4 所示。信号因子 TGF- $\beta$ 1 浓度的变化趋势为: (1) 高细胞密度(HD)组与低细胞密度(LD)组相比, HD 组的 TGF- $\beta$ 1 分泌量减少; (2) 随着照射后时间的推移, TGF- $\beta$ 1 分泌量虽然持续波动, 但均有向对照组靠拢的趋势; (3) 80 keV/ $\mu$ m C 离子辐照(2 Gy)的 QGY-7703 细胞与 30 keV/ $\mu$ m C 离子辐照(1Gy)的 L02 细胞相比, QGY-7703 细胞的 TGF- $\beta$ 1 分泌量明显偏少。受辐照细胞释放信号因子 NO 随时间的变化如图 5 所示。由图可以看出: (1) 照射后 25 和 40 min 时间点, 各组 NO 分泌量的变化与 TGF- $\beta$ 1 相近; (2) 照射后 55 和 70 min 时间点各组 NO 分泌量呈现相反的趋势; (3) 所有细胞在不同时间点的分泌量均大于对照组。

产生上述 TGF- $\beta$ 1 与 NO 随时间变化可能的原因如下: TGF- $\beta$ 1 被作为信号因子释放到胞外之前在细胞内被合成与储存, 在释放过程中受到膜上蛋白的调控。而 NO 在细胞内合成, 并以扩散方式自由穿越细胞膜, 仅以前体(如精氨酸等物质)保存在

细胞中。辐照致使 TGF- $\beta$ 1 与 NO 被释放,在释放初期有着相似的变化趋势。随着时间的推移,TGF- $\beta$ 1 很可能由于合成或是细胞膜功能的恢复受到抑制,胞外分泌随机减少,使 TGF- $\beta$ 1 分泌量向对照组靠拢;而 NO 则不受细胞膜的约束,并没有与 TGF- $\beta$ 1 相同的变化趋势。最初一致的变化趋势则可能与膜电位辐照后失衡有关。

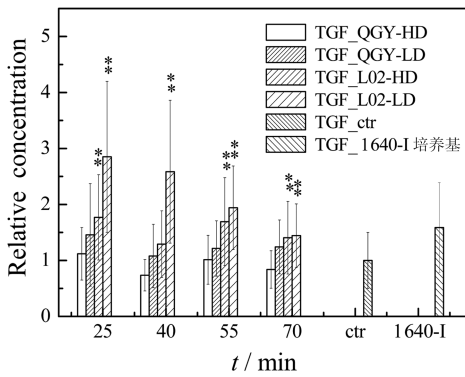


图 4 不同密度 QGY-7703 和 L02 细胞经 C 离子照射后释放 TGF- $\beta$ 1 浓度随时间的变化

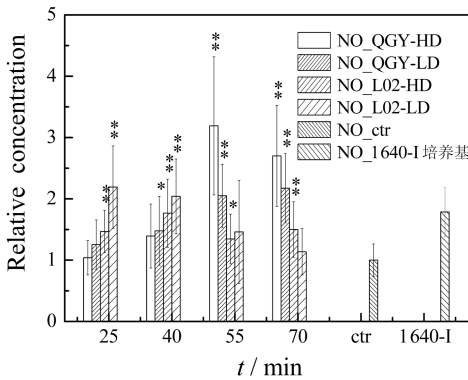


图 5 不同密度 QGY-7703 和 L02 细胞经 C 离子照射后释放 NO 浓度随时间的变化

由于单个粒子与细胞作用的随机性,重离子辐照旁效应的研究与常规射线辐照旁效应的研究相比更依赖于结果的统计。为了明确统计实验结果的可靠性,现做以下数学分析:不同密度下 QGY-7703 细胞和 L02 细胞经 C 离子照射后不同时间释放信号因子 NO 和 TGF- $\beta$ 1 的浓度实验结果的差异显著性分析结果如表 1 所示。其中,以“\*”代表 T 检测  $p < 0.05$ ,“/”代表  $p > 0.05$ ,QH,QL,LH 和 LL 分别表示为 QGY-7703 细胞高密度组、QGY-7703 细胞低密度组、L02 细胞高密度组和 L02 细胞低密度组。在不同时间点可进行 NO 和 TGF- $\beta$ 1 浓度比

较的 48 项中,T 检测  $p < 0.05$  的占 22 项,其中照射后 55 和 70 min 两个时间点辐照组(55 和 70 min)细胞分泌 NO 和 TGF- $\beta$ 1 比较中有较多的  $p > 0.05$ 。这表示表明细胞在受照射后 1 h 左右细胞分泌 NO 和 TGF- $\beta$ 1 的浓度不再显著变化。不考虑照射后 55 和 70 min 两个时间点,其他时间点辐照组 NO 和 TGF- $\beta$ 1 浓度实验数据差异显著性分析的打分结果分别为 40 分和 21 分(打分方式见 2.8 节),表明细胞经 C 离子辐照后短时间内分泌 NO 和 TGF- $\beta$ 1 的浓度变化是较为显著的。使用相邻时间点 25 和 40 min,40 和 55 min 组(除去差异不显著的 55 和 70 min 组)打分(打分方式见 2.8 节),并将同一组细胞不同时间点 NO 和 TGF- $\beta$ 1 的打分结果相加,得到 QGY-7703 细胞高密度组 4 分(满分)、QGY-7703 细胞低密度组 1 分、L02 细胞高密度组 2 分和 L02 细胞低密度组 1 分。可以看到,QGY-7703 细胞高密度组随时间变化显著,但相应的 NO 和 TGF- $\beta$ 1 分泌量总体上在众多辐照组中并不是最多的,这可能与癌细胞独特的分化有关。变化的一致性体现出高密度癌细胞群对外界刺激的响应在细胞群内更为统一,客观上降低了单个细胞调节环境的工作量,减少了癌细胞对能量的需求,有利于癌细胞与正常细胞的竞争。细胞敏感性的提高可能是源于癌细胞通过细胞接触共通信号这种方式,将细胞的集群优势在细胞层次上放大。这些结果也与目前公认的癌细胞所表现出的特性相一致。

表 1 经 C 离子照射后不同时间点细胞分泌 NO 和 TGF- $\beta$ 1 浓度的 T 分布检测对比

不同分泌物	不同对比时间组/min	是否符合 T 分布检测			
		QH	QL	LH	LL
NO	25:40	*	/	/	/
	25:55	*	*	/	*
	25:70	*	*	/	*
	40:55	*	*	*	/
	40:70	*	*	/	*
	55:70	/	/	/	/
TGF- $\beta$ 1	25:40	*	/	*	/
	25:55	/	/	/	*
	25:70	*	/	/	*
	40:55	*	/	/	*
	40:70	/	/	/	*
	55:70	/	/	/	*

## 4 结束语

根据实验结果可以得到以下结论：(1) TGF- $\beta$ 1 分泌量在细胞经高 LET 射线辐照后某一个时间点达到极值，随后呈下降趋势。这意味着细胞可以调控细胞周围环境中分泌物的浓度。以实验为例， $10^5$  个细胞可调控周围 50  $\mu$ L 培养基中 TGF- $\beta$ 1 浓度的上升与下降；(2) 细胞在辐照后不同时刻分泌的信号因子对未辐照旁细胞的作用是不同的，TGF- $\beta$ 1 可能是关键的调控信号因子，但没有独立承担调控的能力；(3) 信号因子的分泌量受到细胞密度的调控；(4) 由 T 检验得到 L02 细胞分泌的 TGF- $\beta$ 1 与 NO 浓度较高，更加明显便于区分，而 QGY-7703 细胞在辐照下两种分泌物较少，这与癌细胞不易被检测，并且容易逃逸组织监控的情况相吻合。

将信号因子比作细胞间通信的信使，那么它所介导的旁效应在时间和空间上有着双重的编码。正如实验结果所指出的，不同时刻得到的转移培养基中 TGF- $\beta$ 1 并没有随时间累积并达到饱和，而是有一个明显的上升下降趋势，从转培养基处理的旁细胞实验结果中也得到了同样的数据支持。以此推断辐照后培养基中其它信号因子的浓度与组分比例也会随时间发生变化，而且受辐照细胞数量的变化也会影响这种变化。如果信号因子在时间和空间上的确双重编码，那么意味着旁细胞命运是由多种因素共同控制的。这种多因素的变化，导致各种微环境的产生，因而出现不同的旁效应。因此，在实验细节不能严格统一的情况下，探讨体外培养细胞实验中旁效应是否存在必然带来分歧与迷茫。

另外，实验中所表现的癌细胞的两种分泌物更

加微量，是否暗示在放射治疗过程中对靶区剂量优化的同时应更加重视对正常组织细胞的保护，在充分利用重离子束倒转深度剂量分布优势杀死靶区癌细胞的同时，必须权衡正常组织受到的坪区剂量损伤。同时，对靶区精确定位提出了进一步的要求，精确的剂量配送直接影响重离子治疗的疗效。正因为如此，迫切需要对旁效应进行更深入的研究，以期使旁效应在放射治疗中有利于疗效的提高，减小由于旁效应而引起的正常组织损伤。

## 参考文献 (References):

- [1] MUNRO J A. *Journal of Radiological Protection*, 2009, **29**: A133.
- [2] DU G H, FISCHER B E, VOSS K, *et al.* *Radiation Research*, 2008, **170**: 316.
- [3] LEIVONEN S K, KAHARI V M. *Int J Cancer*, 2007, **121**: 2119.
- [4] HAN W, WU L, CHEN S, *et al.* *Oncogene*, 2007, **26**: 2330.
- [5] PRISE M K, SULLIVAN M J. *Nat Rev Cancer*, 2009, **9**(5): 351.
- [6] SHAO C, FOLKARD M, PRISE M K. *Oncogene*, 2008, **27**(4): 434.
- [7] WU S M, REN QG, ZHOU M O. *Biophysica Sinica*, 2003, **35**(7): 655.
- [8] LI Q, SIHVER L. *Nucl Instr and Meth B*, 2011, **269**: 664.
- [9] HOU G, XUE L, LU Z M, *et al.* *Cancer Letters*, 2007, **253**: 236.
- [10] SCHULTE-HERMANN R, BURSCH W, LOW-BASELLI A, *et al.* *Cell Biology and Toxicology*, 1997, **13**: 339.
- [11] DING L H, WANG Z Y, YAN J H, *et al.* *The Journal of Clinical Investigation*, 2009, **119**(2): 349.

## Concentration of Signaling Factors Released by Cells Irradiated with Carbon Ions at Different Time Points Post-irradiation

CUI Da-chao<sup>1,2,3</sup>, LI Qiang<sup>1,2</sup>, WU Qing-feng<sup>1,2</sup>, LIU Xin-guo<sup>1,2</sup>, DAI Zhong-ying<sup>1,2,3</sup>

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

2. *Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine of Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

3. *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

**Abstract:** Signaling factors usually play an important role in bystander effect. In this work, human hepatoma QGY-7703 cells in vitro were irradiated with high-LET carbon ions. Concentrations of signaling factors such as TGF- $\beta$ 1 and NO were measured in the media of the irradiated QGY-7703 cells at different time points after irradiation. The conditioned media harvested at various times post-irradiation were transferred to human hepatocyte L02 cells as bystander cells and then the influence of the conditioned media on survival fraction and cell viability of the bystander cells were determined. The results show that the irradiated cells regulate the concentration of the signaling factors released nearby themselves temporally and spatially, and the bystander cells response to the signaling factors differentially according to the concentration change. This work provides new basic data for exploring the bystander effect, especially caused by high-LET radiation.

**Key words:** bystander effect; high-LET radiation; TGF- $\beta$ 1; NO; signaling factor

**Received date:** 9 Aug. 2011; **Revised date:** 30 Sep. 2011

**Foundation item:** National Basic Research Program of China(973 Program)(2010CB834203); National Natural Science Foundation of China(10905080, 11075191); Key Project of National Natural Science Foundation of China(10835011); Science and Technology Development Project of Lanzhou City(2008-sr-10, 2009-2-12)

**Corresponding author:** LI Qiang, E-mail: liqiang@impcas.ac.cn