

文章编号: 1001-098X(2005)04-0186-04

低剂量率辐射生物效应的研究进展

王济东 王俊杰

摘要 辐射的剂量率能显著影响放射治疗的生物效应,降低剂量率就降低了生物效应。然而,当剂量率降低到一定阈值以下,DNA损伤不能激活细胞的探测器——共济失调毛细血管扩张症突变(ATM)基因以及 ATM 基因介导的损伤修复途径,因而出现细胞高的致死性,即“反剂量率效应”。在持续低剂量率照射下,主要有两条修复途径参与双链断裂(DSB)的修复,即非同源末端连接(NHEJ)修复和同源重组(HR)修复。这些修复系统在亚致死性损伤和产生剂量率效应中起重要作用,如果损伤得以完整和精确的修复,细胞的辐射敏感性就会发生改变;如果损伤不能被修复,则会诱导细胞凋亡。p53 基因在低剂量率辐射引起的细胞周期阻滞和诱导细胞凋亡过程中起关键作用。

关键词 低剂量率辐射;剂量率效应;DNA 修复;凋亡;p53 基因

中图分类号 Q345.2

文献标识码 A

Advances in study of biological effects with low-dose rate irradiation

WANG Ji-dong, WANG Jun-jie

(Department of Oncology, The Third Hospital of Beijing University, Beijing 100083, China)

Abstract The dose rate with which radiation is delivered significantly affects the biological response to radiation and reducing the dose rate decreases the biological effect. However, DNA damage introduced at a reduced rate does not activate the DNA damage sensor ATM and that failure to activate ATM-associated repair pathways contributes to the increased lethality of continuous radiation exposures, which has been termed the “inverse dose rate effect”. Under continuous low dose rate irradiation, there are two major pathways by which DSB's can be repaired, nonhomologous end joining (NHEJ), and homologous recombination(HR), which play an important role in sublethal damage repair and the generation of dose-rate effect. A change in sensitivity is modified if DNA damage can be repaired with high fidelity. The cells will lead to apoptosis if the cell DNA damage is not sufficiently repaired. The p53 gene is a key factor in the radiation-induced the cell cycle arrest and the activation of apoptosis after exposure to low dose-rate irradiation.

Key Words low-dose rate irradiation; dose-rate effect; DNA repair; apoptosis; p53 gene

辐射的剂量率能显著影响放射治疗的生物效应,尤其是非离子射线如 X 射线或 γ 射线。过去通过对低剂量率(low-dose rate, LDR)生物效应的研究已经证实,细胞损伤修复、细胞周期再分布、细胞再增殖对生物效应的影响起重要作用。目前认为,在 LDR 范围内,不同的剂量率照射下细胞的反应会出现不同的结果,因而产生不同的剂量率效应^[1]。在非常低的剂量率下,由于 DNA 损伤不能被探测系统感知和激活,而出现“反剂量率效应”(inverse dose rate effect)。在 LDR 照射下,DNA 损伤修复机制起关键作用,如果损伤修复则辐射敏感性发生改变;如果损伤不能修复,则诱导细胞凋亡导致细胞死亡。

1 反剂量率效应

1.1 反剂量率效应的产生

研究证实,高剂量率(high-dose rate, HDR)照射下的细胞存活曲线都有明显的肩区,随着剂量率的降低和照射时间的延长,越来越多的亚致死性损伤(sublethal damage, SLD)在照射期间得到恢复,肩区也趋于消失。当所有 SLD 都被修复时就达到了极限斜率,继续降低剂量率照射,细胞死亡明显增加,这时存活曲线又变得陡峭起来,产生所谓的“反剂量率效应”。

1.2 产生反剂量率效应的机制

大量研究显示,许多细胞系都存在着反剂量率效应。尽管其产生机制并未完全清楚,但最为公认

的一种假说为反剂量率现象的产生是由于持续照射下引起细胞聚积于细胞周期的 G_2 期,细胞周期不再进展,分裂停滞,即 G_2 期阻滞。由于 G_2 期是对辐射最敏感的周期,结果导致高的细胞致死性。Berrada M等^[2]认为,这种反剂量率效应是在LDR持续照射下,与细胞周期的影响和(或)抑制了辐射损伤修复有密切关系。进而支持了上面的假说。

然而最近有些作者的研究却得出了与以上完全不同的结论,认为反剂量率效应与细胞周期再分布无直接联系,而且细胞周期 G_2 期阻滞并不一定能引起辐射敏感性的增高。Vavrova J等^[3]对不同的剂量率进行研究,用0.6 Gy/min的HDR、3.9 mGy/min的LDR、1.8 mGy/min的亚低剂量率(sub-low-dose rate, SLDR)对人白血病细胞系进行照射,结果显示,在SLDR和LDR照射下,均出现细胞周期 G_2 期阻滞,而仅在SLDR照射下出现反剂量率现象。因此,他们认为,反剂量率与细胞周期 G_2 期阻滞无明显联系。

现已证明,辐射可以引起多种类型DNA损伤,包括单链断裂(single strand breaks, SSB)、双链断裂(double strand breaks, DSB)、碱基损伤和DNA蛋白交叉连接。目前认为,DNA DSB是最重要的损伤,最终可导致细胞死亡、染色体失常以及细胞恶性变。

Collis SJ等^[4]通过研究认为,DNA DSB是最重要的一类损伤,关系到细胞的存活。细胞内存在一种探测机制,对DNA损伤修复起关键作用,他们称之为“细胞雷达”(cellular radar)。当DNA DSB数量达到一定阈值就会被DNA损伤传感器——共济失调毛细血管扩张症突变(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)基因探测到,使之在Ser-1981位点磷酸化,此过程还需要黎吉麦金断裂综合征(Nijmegen breakage syndrome, NBS1)蛋白参与,ATM蛋白激活后可以激活它的下游分子组蛋白H2A变量,使之在Ser-139位点磷酸化,从而启动细胞的修复机制。尽管早期DNA损伤反应机制极其敏感,但当DNA损伤低于一定水平,则不能被“细胞雷达”探测到。因此他们认为,反剂量率是在一定的剂量率阈值以下照射引起的DNA DSB数量不能被修复机制探测到而出现的细胞死亡增高。

Furre T等^[5]用LDR(0.37和0.94)Gy/h ^{60}Co γ 射线对人乳腺癌细胞系T47D进行照射,结果显示,

受照细胞聚积在细胞周期 G_2 期,但细胞辐射敏感性并没改变,也未出现反剂量率现象。这从另一个方面说明反剂量率与 G_2 期阻滞无直接关系。并且推测剂量率可能存在一个阈值,阈值以下出现反剂量率现象,阈值以上则不会出现反剂量率现象。

1.3 反剂量率与辐射超敏感性反应(hyperradiosensitivity, HRS)

HRS是在HDR(一般50~150 Gy/h)、低剂量电离辐射(<0.5 Gy),在单位剂量的细胞杀伤比高剂量时更有效。反剂量率是在一定的剂量率下,随着剂量率的降低反而出现细胞的高致死性。两者是否存在一定的联系以及它们的机制是否相同?许多作者对此进行了大量的研究^[6-8]。

Carlsson J等^[6]为了研究反剂量率与HRS的关系,用LDR(0.05~0.09 Gy/h) ^{32}P 源对不同的细胞系进行照射,其中神经胶质瘤细胞系U373MG无HRS、U118MG有HRS,结肠癌细胞系HT29有HRS,照射一周总剂量达 (11.8 ± 1.5) Gy,结果,U373MG出现细胞周期阻滞,凋亡增加,存活细胞数量明显减少;U118MG出现细胞周期阻滞,但无凋亡增加;HT29既有细胞周期阻滞又有凋亡增加,但比U373MG变化明显减少。他们认为,持续低剂量照射细胞早期效应与HRS无关,因此反剂量率现象可能与HRS无直接关系。

Enns L等^[7]用0.18和22 cGy/min的LDR和不同剂量(0~200 cGy)对不同的细胞系进行照射,得出结论认为,低剂量HRS是与p53基因依赖的凋亡有密切关系,而反剂量率效应是因为DNA损伤传感器不能被激活而引起的。从而推测,HRS与反剂量率可能存在不同的机制。

另有作者^[8]认为,HRS是在剂量 <1 Gy、而反剂量率现象是在剂量率 <30 cGy/h照射时出现相似的高细胞致死性现象,因此认为两者之间可能存在一定的联系。他们还发现,预先给予LDR照射能影响随后的HRS,HRS在LDR和较大剂量照射后降低,但在4h后能恢复。他们认为,这可能与DNA损伤再修复有关,因此HRS与反剂量率现象都是由于DNA损伤及损伤修复机制所介导的,可能存在相同的机制。

总之,反剂量率现象与HRS是否存在联系及是否有相同机制目前尚无定论,对其进一步研究将会加深对辐射生物效应的进一步了解,为临床提供

新的治疗肿瘤的思路。

2 LDR 对辐射敏感性的影响

在 LDR 持续照射下,随着时间的延长, DNA 修复机制在剂量率效应中起重要作用^[3,4]。剂量率降低时,照射时间就会相应延长,细胞损伤修复、细胞周期再分布和细胞再增殖就会在辐射过程中发生,这些反应产生所谓“剂量率效应”:即当剂量率改变时,细胞对射线的敏感性发生相应的改变。这与传统的 HDR 放射治疗完全不同,传统的放射治疗通常在数分钟内完成,照射时间太短则这些过程就不会发生。

损伤修复对剂量率的反应主要取决于 SLD。SLD 可以完全修复或者进一步积累照射剂量变为致死性损伤,SLD 在 LDR 照射过程中或在 HDR 低剂量的分次治疗期间完成修复^[9]。

目前认为,在真核细胞中存在两条主要途径参与 DNA DSB 的修复:即非同源末端连接(nonhomologous end joining, NHEJ)修复和同源重组(homologous recombination, HR)修复。NHEJ 修复由 DNA 依赖的蛋白激酶复合体(DNA-dependent protein kinase compounds, DNA-PKcs)介导完成,该激酶包含 DNA Ku70 蛋白、DNA Ku80 蛋白、催化亚基 DNA-PKcs 和负责 DNA 末端切割后单链连接的连接酶 IV 组成,而 HR 修复则在 rad52 基因群及同系物所组成的复合物的作用下完成^[10,11]。

Castro Kreder N 等^[10]为研究 LDR 照射下 DNA 修复机制,用中国仓鼠细胞系及其不同的突变体(包括 DNA SSB、NHEJ、HR、ATM),通过用 HDR 3.3 Gy/min 及脉冲式 LDR 平均 1 Gy/h 进行照射,研究它们的表现,结果所有亲代细胞系和 SSB 突变体随着剂量率下降发生了辐射敏感性的改变(这种效应在 LDR 4 Gy 以上发生,在 4 Gy 以下并未出现),而其他突变体未发生辐射敏感性的改变。他们分析认为,在 LDR 照射下 DNA SSB 突变体及亲代细胞有正常 SLD 修复,出现剂量率效应;而 DNA DSB 突变体(包括 NHEJ 和 HR 及 ATM)没有 SLD 修复,所以缺乏剂量率效应。因此他们认为, NHEJ、HR 修复途径和 ATM 蛋白在剂量率效应中起重要作用,SSB 修复机制在剂量率效应中不起作用或仅起微弱作用。

Ishizaki K 等^[12]用 HDR 1.8 Gy/min 或持续 LDR 0.3

mGy/min 对处于 G₀ 期的人纤维原细胞系进行照射,分析 p53 蛋白激活即在丝氨酸 15 位点上磷酸化以及组蛋白 H2AX 磷酸化的数量,实验表明, DNA 损伤如 DSB 在持续 LDR 照射期间可以得到充足的修复,并认为 HR 修复主要作用在 S-G₂ 期细胞周期,而 NHEJ 修复作用在整个细胞周期^[13]。

因此, LDR 照射下细胞敏感性的改变主要取决于 NHEJ 和 HR 两条途径精确完整的修复,其中在真核细胞中 NHEJ 修复占主导作用。

3 LDR 辐射诱导细胞凋亡

目前,凋亡被认为是持续 LDR 照射引起细胞死亡的一种主要形式^[14]。细胞对 DNA 损伤的反应一般可分为 3 个阶段:①对损伤 DNA 的感知;②损伤估计阶段;③ DNA 修复或细胞死亡。细胞周期检查点(checkpoint)在损伤反应系统中起关键作用, DNA 损伤后细胞是否走向凋亡与 p53 基因状态有关。在有野生型 p53(wild type p53, wtp53)基因存在的情况下,细胞修复 DNA DSB 的能力下降,倾向于走向凋亡;而在没有 p53 基因的状况下,由于存在细胞周期阻滞,细胞修复辐射损伤的能力提高,相应地提高了辐射抗性。对于这些细胞来说,在 LDR 持续照射下,辐射诱导的细胞周期阻滞,为这些细胞在进入有丝分裂期前提供了 DNA 修复损伤的机会。

P53 基因在细胞 G₁ 期参与检查点的作用^[15],负责检查染色体中 DNA 是否损伤,如发现有缺陷的 DNA,则阻止细胞进入细胞周期,并启动 DNA 修复机制;如果修复失效, p53 基因则启动细胞的凋亡机制。许多研究已经证明, wtp53 具有诱导细胞凋亡的功能, wtp53 诱导凋亡主要是通过对 bcl-2 和 bax 基因表达的调节:下调 bcl-2 基因的表达,上调 bax 基因的表达^[16]。还通过增强促进凋亡基因细胞表面受体 95(CD95, 也称 Apo-1 或 Fas 基因)的表达和诱导氧化反应相关基因表达及降解线粒体成分。

Vavrova J 等^[17]用不同的剂量率对人白血病细胞系 HL-60(p53 缺陷)及 MOLT-4(wtp53)细胞系进行照射,以比较在不同 p53 基因状态下细胞的反应,结果: HDR 作用于整个细胞周期,而 LDR 主要作用于 G₂ 期;对于缺乏 p53 基因的 HL-60 细胞系在 G₂ 期并不是最敏感的细胞周期,反而出现辐射抗

性。因此,他们建议在临床利用剂量率治疗时要考虑两点:①细胞的种类(主要是 p53 基因的状态);② G₂ 期阻滞的时间长度,因为有些细胞在 G₂ 期增加了放射抗性。

Kato F 等^[17]认为,缺乏 p53 基因的细胞 DNA 损伤后存活率明显提高,将会导致突变率增加,最终导致细胞的恶性变。因此他们认为,在 LDR 照射下, p53 基因介导的凋亡与 DNA 组织修复一样,对辐射损伤起到保护作用。

在持续 LDR 照射下,细胞凋亡存在剂量效应。Mirzaie-Joniani H 等^[18]用 LDR (0.072 ± 0.003) Gy/min 和 HDR (0.80 ± 0.032) Gy/min 在不同的剂量下对上皮肿瘤细胞系 Hela Hep2 进行照射,结果显示,在 LDR、2~10 Gy 剂量范围内,细胞存活显著降低,凋亡率明显增高,并且在此范围内, LDR 照射能显著诱导凋亡并能抑制肿瘤生长,剂量率和辐射剂量是诱导凋亡的重要影响因素^[19]。因此,凋亡是机体和细胞受到辐射后的一种自我保护反应,但同时又为临床治疗提供了一个治疗策略。

4 结语

综上所述,在 LDR 下电离辐射的生物效应是相当复杂的,有些效应甚至相互矛盾,其机制仍不清楚。我们现在对 LDR 辐射效应的认识远远没有像 HDR 辐射研究得那样深入,而且许多效应是从 HDR 辐射推导出来的,因此迫切需要对 LDR 辐射效应进行更多更深入的基础研究。随着 LDR 放射治疗肿瘤越来越广泛地应用于临床^[20],如放射性粒子组织间近距离治疗肿瘤和放射免疫治疗,因此 LDR 辐射越来越受到重视,相信对 LDR 辐射生物效应的深入理解及其产生机制的探讨,将会为最终在临床上的合理应用提供理论依据,并为肿瘤治疗提供新的思路和方法。

参 考 文 献

- 1 Sugihara T, Magae J, Wadhwa R, et al. Dose and dose-rate effects of low-dose ionizing radiation on activation of Trp53 in immortalized murine cells [J]. Radiat Res, 2004, 162(3): 296-307.
- 2 Berrada M, Yang Z, Lehnert SM. Sensitization to radiation from an implanted ¹²⁵I source by sustained intratumoral release of chemotherapeutic drugs [J]. Radiat Res, 2004, 162(1): 64-70.
- 3 Vavrova J, Rezacova M, Vokurkova D, et al. Cell cycle alteration, apoptosis and response of leukemic cell lines to gamma radiation with high-and low-dose rate [J]. Physiol Res, 2004, 53(3): 335-342.
- 4 Collis SJ, Schwaninger JM, Ntambi AJ, et al. Evasion of early cellular response mechanisms following low level radiation-induced DNA damage [J]. J Biol Chem, 2004, 279(48): 49624-49632.
- 5 Furre T, Furre EI, Koritzinsky M, et al. Lack of inverse dose-rate effect and binding of the retinoblastoma gene product in the nucleus of human cancer T-47D cells arrested in G2 by ionizing radiation [J]. Int J Radiat Biol, 2004, 79(6): 413-422.
- 6 Carlsson J, Hakansson E, Eriksson V, et al. Early effects of low dose-rate radiation on cultured tumor cells [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2003, 18(4): 663-670.
- 7 Enns L, Bogen KT, Wizniak J, et al. Low-dose radiation hypersensitivity is associated with p53-dependent apoptosis [J]. Mol Cancer Res, 2004, 2(10): 557-566.
- 8 Michell CR, Joiner MC. Effect of subsequent acute-dose irradiation on cell survival in vitro following low dose-rate exposures [J]. Int J Radiat Biol, 2002, 78(11): 981-990.
- 9 Castro Kreder N, Van Bree C, Franken NA, et al. Effects of gemcitabine on cell survival and chromosome aberrations after pulsed low dose-rate irradiation [J]. J Radiat Res, 2004, 45(1): 111-118.
- 10 Castro Kreder N, Ten Cate R, Van Bree C, et al. Cellular response to pulsed low dose-rate irradiation in X-ray sensitive hamster mutant cell lines [J]. J Radiat Res, 2004, 45(3): 385-391.
- 11 Boucher D, Hendo J, Averbeck D. Increased repair of gamma-induced DNA double-strand breaks at lower dose-rate in CHO cells [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2004, 82(2): 125-132.
- 12 Ishizaki K, Hayashi Y, Nakamura H, et al. No induction of p53 phosphorylation and few focus formation of phosphorylated H2AX suggest efficient repair of DNA damage during chronic low-dose-rate irradiation in human cells [J]. J Radiat Res, 2004, 45(4): 521-525.
- 13 Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, et al. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining [J]. Nature Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(9): 712-720.
- 14 Kroger LA, Denardo GL, Gumerlock PH, et al. Apoptosis-related gene and protein expression in human lymphoma xenografts after low dose rate radiation using ⁶⁵Cu-21T-BAT-Lym-1 [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2001, 16(3): 213-225.
- 15 Rich T, Allen RL, Wglie. Defying death after DNA damage [J]. Nature, 2000, 407(6805): 777-783.
- 16 Szostak MJ, Kaur P, Amin P, et al. Apoptosis and Bcl-2 expression in prostate cancer: significance in clinical outcome after brachytherapy [J]. J Urol, 2001, 165(6 Pt1): 2126-2130.
- 17 Kato F, Kakiyama H, Kunugita N, et al. Role of p53 gene in apoptosis repair of genotoxic tissue damage in mice [J]. J Radiat Res, 2002, 43 (suppl): 209-212.
- 18 Mirzaie-Joniani H, Eriksson D, Johansson A, et al. Apoptosis in Hela Hep2 cells is induced by low-dose, low-dose-rate radiation [J]. Radiat Res, 2002, 158(5): 634-640.
- 19 Mirzaie-Joniani H, Eriksson D, Sheikholvaezin A, et al. Apoptosis induced by low-dose and low-dose-rate radiation [J]. Cancer, 2002, 94(4 Suppl): 1210-1214.
- 20 Murtha AD. Review of low-dose-rate radiobiology for Clinicians [J]. Semin Radiat Oncol, 2000, 10(2): 133-138.