

电离辐射诱导旁效应的研究现状

肖瑶 韩玲

【摘要】旁效应是一种电离辐射引起的间接效应,其危险评估受到广泛的重视。随着一些新的先进技术的出现,旁效应机制研究有了新进展,为解释旁效应的发生及调控机制提供了有力的证据。

【关键词】电离辐射;辐射效应;基因表达调控;基因芯片

【中图分类号】Q691.5 【文献标识码】A 【文章编号】1673-4114(2007)05-0303-04

Recent study of ionizing radiation-induced bystander effects

XIAO Yao, HAN Ling

(Department of Radiation Medicine in Navy Medicine Faculty, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】An indirect effect induced by ionizing radiation called bystander effect is being highly concentrated. The new achievement by application of advanced tools provides powerful evidence to explain how bystander effects happen and the regulation mechanism.

【Key words】Ionizing radiation; Radiation effect; Gene expression regulation; Microarray

1 辐射诱发旁效应简介

Nagasawa 等^[1]于 1992 年首先发现低剂量辐射使 1%或更少的细胞被击中后,有 30%~50%的细胞表现出了姊妹染色体交换,在验证中发现这种生物效应既不符合细胞存活曲线,又发生了比估值要大、范围要广的生物学效应,故借用基因疗法中的概念称之为“旁效应”。辐射诱发旁效应的产生原因、分子机制及其临床效应还未被明确的估计和解释,因此对旁效应机制的研究是十分必要的。

2 辐射诱导旁效应的实验验证

研究人员选用 3 种方法对电离辐射诱发旁效应进行实验验证:①在细胞与放射源之间插入网格定比照射细胞,受照射细胞与未受照射细胞共同培养;②利用微束照射装置定位照射细胞;③通过三维细胞模型或实体组织验证。

2.1 定比照射细胞与未照射细胞共同培养

Sokolov 等^[2]使用激光共聚焦显微镜成像分析

DNA 双链断裂(double strand break, DSB)的诱导率,18 h 后测量出共培养细胞 DSB 为正常细胞的 3.7 倍。Hu 等^[3]报道,使细胞群固定区受到 0.5 cGy 和 1cGy 照射后,有 4.6%和 9.2%细胞被击中,DSB 阳性却高达 42.8%和 48.6%,辐射区是对照组的 3 倍,非辐射区是对照组的 2 倍;照射后 2 min 2.5 mm 内外差异有显著性,6 min 后 5 mm 内外差异有显著性。结果提示辐射诱导旁效应的早期进程与时间和空间有一定的关系。

2.2 利用微束照射装置定位照射细胞

哥伦比亚大学已经通过微束研究实验验证了辐射诱导旁效应的存在,Prise 等^[4]发现,旁效应的发生不依赖于辐射的剂量以及受照射的细胞数,即使仅有一个细胞受到一个 α 粒子的击中,也能出现明显的旁效应细胞损伤,而且随着 α 粒子数的增加可迅速达到剂量效应的平台状态。Mitchell 等^[5]通过微束照射细胞密集程度不同的培养液局部,比较发现,细胞密度较高的培养液的致死率明显高于细胞密度较低的培养液,并且前者癌基因的转移率也较高,推论旁效应的信号转导依赖于细胞联接。

2.3 辐射诱导旁效应的三维空间效应

在以往的辐射诱导旁效应研究中,使用培养的单细胞系统而并非真实的多细胞环境,很少有

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10575130)

作者单位:200433 上海,第二军医大学放射医学教研室

通讯作者:韩玲(E-mail: linghan8888@yahoo.com.cn)

在三维的环境或是在真实人体组织系统中。Belyakov 等^[6]为了证明旁效应与健康人体组织的关系,使用三维的正常人皮肤组织模型模拟组织中的信号转导反应,并使用微束定比照射,证明在受照射细胞外距离大于 1 mm 的未受照射细胞与对照比较有明显的改变;实验中选用两种生物终点:微核和细胞凋亡,旁效应细胞微核率平均增加了 1.7 倍,细胞凋亡平均增加了 2.8 倍。这些结果揭示旁效应可能在低剂量辐射效应危害中起重要的作用。Persaud 等^[7]用中国仓鼠卵巢(CHO)细胞用 ³H-脱氧胸苷三磷酸酯标记后和人仓鼠杂交(A₁)细胞以 1:5 比例混合构成一个三维细胞模型,CHO 细胞凋亡后的 DNA 碎片无法通过细胞膜被 A₁ 细胞吸收,因为它们是同源的;CHO 细胞的 β 射线短程自我辐射使邻近的 A₁ 细胞 CD59 (首先发现的诱导旁效应的细胞黏附因子)突变率与对照组比较提高了 14 倍,加入自由基清除剂等处理因素后突变率明显降低。结果表明,三维空间可以发生细胞毒性旁效应,并且旁效应作用的大小与靶区、射线性质有关。

3 旁效应可能的调控机制

目前认为,引起旁效应的主要因素有辐射产生的自由基和细胞间的缝隙联接。有学者认为,辐射诱导的基因组不稳定性涉及氧化还原自身稳定系统的参与, O₂⁻、H₂O₂、O、OH 等辐射诱发的活性氧簇自由基和 NO 作为信号分子触发细胞氧化还原状态发生变化,引起 DNA 损伤和基因表达改变。细胞联接和细胞间通讯因子有很多种,大量实验证明,细胞通讯相关蛋白与辐射诱导旁效应有关,其中细胞连接蛋白 43 (connexin43)和环氧化酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2)与旁效应的关系密切^[4,8,9]。另外有学者通过检测细胞周期蛋白在旁效应细胞中的表达并验证其影响,证明旁效应的发生可能引起细胞周期的变化。

3.1 自由基和细胞通讯对旁效应的影响

为了观察自由基和细胞通讯在辐射效应和旁效应中发挥的作用大小,Shao 等^[10]在实验中使用了自由基清除剂二甲基亚砜和细胞间通讯阻断剂林丹(lindane),结果表明,对直接照射细胞引起的突变率二甲基亚砜较明显,而 lindane 无明显抑制作用;旁效应引起的突变率则正好相反。这些结果

表明,旁效应与自由基和细胞通讯均有联系,与细胞通讯的关系会更大一些。

3.2 细胞通讯相关蛋白和旁效应的关系

connexin43 是一种糖基氧化型细胞连接蛋白,与细胞间缝隙连接相关。其在粒性白细胞表面高度表达,并在腺性肿瘤克隆时过表达,但在正常上皮细胞的克隆中不表达。Azzam 等^[8]对人成纤维细胞 AG1522 的观察,connexin43 的表达是随着 0.16 cGy~10 cGy 范围剂量而上调。Vanslyke 等^[11]用自由基清除剂处理 WM-aB1 细胞,照射后与未处理的细胞中 connexin43 上调一致,去除自由基后 connexin43 仍然上调,提示 connexin43 在诱导旁效应中起作用并且不依赖于自由基的存在。Persaud 等^[7]在 CHO 细胞和 A₁ 细胞实验中也证明了缺失 connexin43 的细胞对减弱旁效应损伤程度与加入二甲基亚砜后基本相同,这些结果表明 connexin43 对诱导旁效应单独的作用。

COX-2 促进细胞分裂素活化蛋白激酶通路。Hei 等^[9]通过加入 COX-2 抑制剂 NS-398 抑制 COX-2 的表达,使旁效应明显减弱。用 NS-398 处理旁效应细胞,通过抑制细胞外的旁效应信号联接激酶磷酸化,从而控制了旁效应信号级联放大。他们用 cDNA 微阵列分析对对照组、旁效应组和照射细胞组被 COX 抑制剂三唑仑处理后进行了比较,结果旁效应细胞中 COX-2 表达比对照组上调了 3 倍。

3.3 旁效应对细胞周期的影响

对辐射越敏感的细胞,代谢越活跃,增殖越快。因此,研究辐射诱导旁效应对细胞周期调节蛋白的影响有重要的意义。Azzam 等^[12]使用芯片技术检测到周期相关蛋白 2、周期蛋白 B1 和 DNA 修复相关蛋白 RAD51 在旁效应细胞中表达变化明显。孙慧等^[13]发现在转染人免疫缺陷病毒 1(human immunodeficiency virus-1, HIV-1) Tat 基因的细胞中,与细胞周期调控相关的基因表达下调,导致 G₂/M 检验点功能紊乱,影响细胞的辐射敏感性。在转染 Tat 的细胞中,细胞周期蛋白 B1 在照射后明显增强, Tat 蛋白可能是其表达增强的原因。在旁效应芯片中也发现数个与 Tat 蛋白及其他 HIV 相关的基因表达变化明显,提示在影响细胞活动周期上旁效应与免疫应答可能有一定的联系。Ponnaiya 等^[14]用芯片检测发现周期蛋白依赖性激酶 1 家族基因

CDKN1A(p21)在旁效应细胞中明显上调。此癌基因参与了细胞凋亡过程,用微束照射后用单细胞逆转录聚合酶链反应实验验证其确是明显上调。有人提出,旁效应细胞可能具有将受到损伤和处于损伤环境周边的细胞从组织中剔除掉,但又不至于影响到组织器官的生理功能的作用。为了证实这一说法, Nagar 等^[15]用染色体不稳定的 CHO 细胞(GM 10115 细胞)培养液培养未受照的 GM 10115 细胞,结果细胞无一存活,这种新的效应叫做死亡诱导效应,提示旁效应具有抑制辐射效应杀死损伤细胞以防止其癌变的作用。Mothersill 等^[16]也证明了,若将旁效应细胞的培养基用于培养照射修复缺失细胞,会降低照射细胞的存活率。

4 旁效应与基因表达调控的关系

辐射诱导旁效应的发生与基因表达调控有着密切的关系,在效应机制研究中,已发现较多基因的表达异常,CD59、connexin43、COX-2 等可作为旁效应发生的标志;细胞周期相关蛋白 2、细胞周期蛋白 B1、DNA 修复相关蛋白 RAD51 和 CDKN1A 被反复验证在旁效应细胞中表达改变。此外,King^[17]发现细胞连接蛋白 32 的缺失导致辐射致癌率增加,可能是因为激活了促分裂原活化蛋白激酶途径。

微阵列芯片技术能够快速检测基因表达情况,通过对照射细胞和旁效应细胞的基因表达的比较,可更深入地了解旁效应信号转导通路。通过芯片检测发现,旁效应的发生涉及到较多基因表达变化,其中细胞周期、信号转导和细胞连接通讯相关基因占很大的部分。龙贤辉等^[18]应用基因芯片技术分析 5 cGy ⁶⁰Co γ 射线照射正常人淋巴瘤细胞 AHH21 后基因转录产物水平变化,显示 connexin43 基因表达上调 2.16 倍;通过对人的腺癌 SW480 细胞基因芯片数据分析,发现 connexin43 的过表达抑制了 DNA 转录结合因子 P65,并证明 connexin43 抑靶基因为 NF- κ B 亚型。Chaudhry 等^[19]对 2 Gy γ 射线照射的人双倍体纤维母细胞株 HFL1 用 Affymetrix HGU133A 芯片检测了旁效应细胞基因表达谱,芯片数据中,上调大于 1 倍的基因有 37 个,没有发现下调基因,其中有 15 个基因是关于细胞连接基因和 11 个功能未知基因,其中表皮调节素、双向调节因子、细胞核受体亚基和早期生长反应基因-1 已被实验验证。

5 问题和展望

上述辐射诱导旁效应的研究从多个角度出发探查这一未知现象的本质,多角度的交叉之处比如时间空间效应、三维环境细胞间相互作用、基因及蛋白表达变化的研究具有重要意义,为解释旁效应产生的原因、分子机制以及其临床效应提供了有力的证据。目前还不能较完整地理解辐射诱导的旁效应现象,其机制仍不清楚,有待突破性的研究和发现。但随着研究的深入和相关因子发现的增多,会形成完整的理论体系,为放射治疗、危险评估、辐射防护等工作提出更好的建议和策略。

参 考 文 献

- 1 Nagasawa H, Little JB. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha particles. *Cancer Res*, 1992, 52(22): 6394-6396.
- 2 Sokolov MV, Smilenov LB, Hall EJ, et al. Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. *Oncogene*, 2005, 24(49): 7257-7265.
- 3 Hu B, Wu L, Han W. The time and spatial effects of bystander response in mammalian cells induced by low dose radiation. *Carcinogenesis*, 2006, 27(2): 245-251.
- 4 Prisc KM, Belyakov OV, Folkard M, et al. Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. *Int J Radiat Biol*, 1998, 74(6): 793-798.
- 5 Mitchell SA, Randers-Pehrson C, Brenner DJ, et al. The bystander response in C3H 10T1/2 cells: the influence of cell-to-cell contact. *Radiat Res*, 2004, 161(4): 397-401.
- 6 Belyakov OV, Mitchell SA, Parikh D, et al. Biological effects in unirradiated human tissue induced by radiation damage up to 1 mm away. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(40): 14203-14208.
- 7 Persaud R, Zhou H, Baker SE, et al. Assessment of low linear energy transfer radiation-induced bystander mutagenesis in a three-dimensional culture model. *Cancer Res*, 2005, 65(21): 9876-9882.
- 8 Azzam EI, de Toledo SM, Little JB, et al. Expression of CONNEXIN43 is highly sensitive to ionizing radiation and other environmental stresses. *Cancer Res*, 2003, 63: 7128-7135.
- 9 Hei TK. Cyclooxygenase-2 as a signaling molecule in radiation-induced bystander effect. *Mol Carcinog*, 2006, 45(6): 455-460.
- 10 Shao C, Furusawa Y, Aoki M, et al. Role of gap junctional intercellular communication in radiation-induced bystander effects in human fibroblasts. *Radiat Res*, 2003, 160(3): 318-323.
- 11 VanSlyke JK, Musil LS. Cytosolic stress reduces degradation of connexin43 internalized from the cell surface and enhances gap junction formation and function. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(11): 5247-5257.

- 12 Azzam EI, de Toledo SM, Gooding T, et al. Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluencies of alpha particles. *Radiat Res*, 1998, 150 (5): 497-504.
- 13 孙慧, 黄越承, 周平坤, 等. HIV-1 Tat 蛋白对细胞周期相关基因表达及辐射细胞周期阻滞的影响. *军事医学科学院院刊*, 2006, 30(2): 101.
- 14 Ponnaiya B, Jenkins-Baker C, Randers-Pherson G, et al. Quantifying a bystander response following microbeam irradiation using single-suppl-cell RT-PCR analyses. *Exp Hematol*, 2007, 35(4): 64-68.
- 15 Nagar S, Smith LE, Morgan WF, et al. Characterization of a novel epigenetic effect of ionizing radiation: the death inducing effect. *Cancer Res*, 2003, 63(2): 324-328.
- 16 Mothersill C, Seymour RJ, Seymour CB, et al. Increased radiosensitivity in cells of two human cell lines treated with bystander medium from irradiated repair-deficient cells. *Radiat Res*, 2006, 165(1): 26-34.
- 17 King TJ, Lampe PD. Mice deficient for the gap junction protein Connexin32 exhibit increased radiation-induced tumorigenesis associated with elevated mitogen-activated protein kinase (p44/Erk1, p42/Erk2) activation. *Carcinogenesis*, 2004, 25(5): 669-680.
- 18 龙贤辉, 徐勤枝, 周平坤, 等. 5 cGy γ 射线照射正常人淋巴瘤细胞基因表达转录谱的变化. *辐射防护*, 2006, 26 (2): 78-83.
- 19 Chaudhry M. Bystander effect: Biological endpoints and microarray analysis. *Mutat Res*, 2006, 597(1-2): 98-112.

(收稿日期: 2007-05-28)

红细胞生成素及其受体与肿瘤组织乏氧的关系及对治疗的影响

郭阳

【摘要】 红细胞生成素及其受体的表达与组织乏氧关系密切。在各种实体肿瘤组织内, 有大量的红细胞生成素及其受体的表达, 其表达与肿瘤细胞对放射治疗和化学药物治疗抗性有关, 并增加肿瘤的局部侵袭能力和转移能力, 临床上, 实体肿瘤患者中约有一半在肿瘤的发展和治疗过程中会出现各种程度的贫血, 在贫血的肿瘤患者中使用红细胞生成素的问题还有待进一步研究。

【关键词】 红细胞生成素; 受体, 红细胞生成素; 细胞低氧

【中图分类号】 Q513.72 【文献标识码】 A 【文章编号】 1673-4114(2007)05-0306-04

Erythropoietin and erythropoietin receptor: relationship to tumor hypoxia and treatment

GUO Yang

(Department of Radiotherapy, Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China)

【Abstract】 The expression of erythropoietin and its receptor is very close related with the hypoxia status in tumor tissues. There are plenty of erythropoietin and erythropoietin receptor in the solid tumors. They are correlative with the resistance to the radiotherapy and chemotherapy. They also promote the invasive and migration. In clinical, there are more than an half of patients with tumor suffering from various extent of anaemia during the process of developing and treating the tumors. It is need to further investigate the use of erythropoietin in tumor patients.

【Key words】 Erythropoietin; Receptor, erythropoietin; Cell hyoxia

乏氧是影响实体肿瘤治疗效果的一个因素, 可引起乏氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) 的堆积, 从而使其下游一系列转录因子的活化。红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 是调控其下游基因产物之一。随着对 EPO 及其受体 (erythropoietin

receptor, EPOR) 的深入研究, 对其在肿瘤治疗中的作用, 特别是在放射治疗的抵抗性方面的作用逐步被认识。

1 EPO

EPO 是一种糖蛋白类细胞生长刺激因子, 生理状况下由肾脏产生。研究表明, EPO 不但可以