

电离辐射对线粒体损伤的研究进展

张宇睿 徐文清

300192 天津, 中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室

通信作者: 徐文清, Email: xuwenqing@irm-cams.ac.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2016.02.014

【摘要】 细胞核中的 DNA 被认为是电离辐射的首要靶点, 其损伤效应备受关注。近年来随着研究的不断深入, 发现线粒体也是电离辐射的重要靶点。线粒体作为人体唯一含有编码 DNA 的细胞器, 受到电离辐射后发生氧化应激不仅影响细胞的正常功能, 甚至导致细胞凋亡。笔者通过现有的研究数据总结了受到电离辐射后线粒体功能和形态的变化, 从而为辐射防护提供新的思路。

【关键词】 辐射, 电离; 线粒体; 氧化性应激

基金项目: 国家自然科学基金 (81273005); 天津市应用基础与前沿技术研究重点项目 (14JCZDJC36400); 中国医学科学院放射医学研究所发展基金(SF1528)

Damages of ionizing radiation on mitochondria Zhang Yurui, Xu Wenqing

Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Xu Wenqing, Email: xuwenqing@irm-cams.ac.cn

【Abstract】 The radiobiology hypothesis is widely accepted by people that damage to the nuclear DNA is the main cause for the effects of radiation. However, some studies shown that the extranuclear radiation effects are also very important, especially for mitochondria which contains the coding DNA and important proteins. Mitochondria plays a very important role in oxidative stress and cell death after irradiation. Some experiments present the effects of ionizing radiation on the mitochondria. Here, we discussed the ionizing radiation how to influence the mitochondria. And authors summary some available research data that specific protection of mitochondria could reduce damage to healthy cells exposed to ionizing radiation.

【Key words】 Radiation, ionizing; Mitochondria; Oxidative stress

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81273005); Natural Science Foundation of Tianjin (14JCZDJC36400); Research Fund of Institute of Radiation, Chinese Academy of Medical Sciences(SF1528)

近年来, 由于放疗技术和核能的发展, 人们越来越多地关注电离辐射对生物体造成的各种影响。长久以来, 人们一直认为电离辐射损伤的主要靶点是细胞核中的 DNA, 然而近年来有报道, 电离辐射有直接效应和间接效应, 间接效应中的活性氧损伤学说认为电离辐射具有靶标不确定性, 只评价细胞核中的 DNA 损伤已经显得不够全面。电离辐射后基因表达的异常以及染色体组的不稳定性等辐射间接造成的遗传效应^[1], 使辐射生物学面临新的挑战。

有报道指出电离辐射除了导致细胞损伤效应,

还会导致细胞器受到损伤^[2]。线粒体是受到损伤的重要细胞器, 因为在细胞质中线粒体占据整个细胞容积的 30% 之多, 其中含有的 DNA 和相关的酶与细胞 ATP 合成、有氧呼吸等生命活动息息相关。更值得注意的是, 线粒体是人体唯一有 DNA 存在的细胞器, 这使研究者对电离辐射导致的线粒体 DNA 的各种损伤(如双链的断裂、碱基的错配以及片段的丢失)引起重视。虽然这些损伤在细胞核也会发生, 但是由于线粒体 DNA 缺乏组蛋白保护, 其损伤比细胞核 DNA 更严重, 因此线粒体是除细

胞核以外电离辐射损伤的重要靶点。

电离辐射对线粒体的功能产生影响,使线粒体有氧呼吸链遭到破坏,线粒体处于氧化应激状态,最终激活线粒体凋亡通路使细胞凋亡^[3]。同时,辐射会导致编码有氧呼吸链蛋白的DNA发生损伤,影响有氧呼吸中ATP的产生,对细胞的存活构成威胁^[4]。可以看出,线粒体是辐射损伤并诱导凋亡的首要靶标。即便线粒体在电离辐射损伤中有如此重要的地位,但仍不能完全取代现有的细胞辐射损伤评价模型的评价指标,现有的评价指标依旧集中在细胞核及其遗传物质上。

由于对电离辐射所致线粒体损伤效应的研究远远少于对细胞核的研究,因此,本文概括了一些受到电离辐射后线粒体的应答,并把线粒体对细胞整体应激反应的重要性做了一些归纳。

1 电离辐射对线粒体DNA的影响

细胞中的遗传物质主要集中在细胞核中的DNA,但在细胞内除了细胞核,一些细胞器中也存在DNA,线粒体就是其中之一。线粒体中的DNA包含13个基因,分别编码氧化呼吸链中的催化酶复合物(复合物I、II、III和IV)、催化ATP合成的相关酶并参与调控细胞中的某些信号通路,从而参与细胞的新陈代谢^[5]。因此,线粒体DNA发生突变势必会导致各种疾病,如线粒体功能混乱性疾病、癌症以及慢性疾病。

1.1 线粒体DNA比细胞核DNA更容易受到损伤

首先,线粒体DNA比细胞核DNA具有更多的共价修饰;其次,研究人员发现线粒体DNA更容易受到氧化损伤并且修复能力非常差^[6]。因此,线粒体DNA是一个重要的活性氧靶标,当细胞受到电离辐射时,线粒体DNA比细胞核DNA更容易受到损伤。

从大鼠肝脏中分离出线粒体后直接使用 γ 射线照射,发现每单位质量的线粒体DNA中8-羟基脱氧鸟苷酸的含量是细胞核DNA的6倍^[7]。虽然线粒体DNA在细胞中占有非常小的比例,但所有线粒体DNA几乎都编码相关的蛋白。细胞核DNA虽然数量庞大,但其中编码基因只占1%。当线粒体DNA编码基因受到损伤时,生物效应更加容易凸显出来。除此以外,线粒体中的DNA没有组蛋白结合和有效的修复机制,使其更容易受到损伤^[8]。

1.2 线粒体DNA缺失

当细胞损伤、衰老或者处于病理状态时,线粒体DNA容易发生从8470 bp到13446 bp^[9]的缺失,这个常见的线粒体DNA缺失被称作“ Δ mtDNA4977删除”或者“常见缺失”^[10]。

实验发现,人成纤维细胞系常见缺失水平为照射剂量0.1~10 Gy,照后72 h缺失显著增加,同时还发现在剂量为0.05 Gy时人成纤维细胞系非常敏感^[11]。但是,常见缺失和照射剂量之间并没有表现出线性关系。照射后96 h,照射剂量0.005 Gy比5 Gy的细胞表现出更高频率的常见缺失^[12]。

纤维细胞系在受到0.1 Gy和2 Gy照射后,线粒体DNA的常见缺失在第7天开始出现,2 Gy照射后的纤维细胞系在14 d时常见缺失达到1.8倍,一直持续到第63天,该结果在低剂量0.1 Gy照射后也是一致的^[11]。

1.3 线粒体DNA复制数目改变

在受到照射的肌肉和神经细胞中发现,线粒体DNA复制的数目增加,而且在受到电离辐射的哺乳动物体内其他组织和体外细胞中也出现了这种现象^[13]。

体外研究发现,5 Gy γ 射线照射后的HPV-G细胞线粒体DNA的复制数目明显增加^[14]。不同的细胞系在遭受电离辐射以后,线粒体DNA复制数目都有所增加,只是增加的程度不一样而已^[15]。

小鼠在受到3 Gy γ 射线照射后,在其脑和脾脏等组织中也发现了线粒体DNA复制数目增加,并且受到 γ 射线照射后,在小鼠小肠和骨髓中也发现了线粒体DNA复制数目增加的现象^[16]。在受到10 Gy X射线照射后1~72 h内,小鼠的肝脏、骨骼肌和大脑的线粒体DNA复制数目均有增加。在人体细胞中也发现了同样的结果,Wen等^[17]研究发现,当患者接受全身射线治疗时(4.5 Gy或者9 Gy的X射线),其细胞中的线粒体DNA复制数目平均增加两倍。

受照后线粒体DNA复制数目增加的益处目前还没有统一的定论,但普遍认为可能是DNA-蛋白复合物为了保护线粒体DNA免受活性氧的损害或替补受损的线粒体DNA。

2 电离辐射对线粒体中清除活性氧系统的影响

在正常的生理条件下,线粒体在进行有氧呼吸

时,呼吸链上的电子传递体会漏掉一些电子从而产生活性超氧阴离子,而超氧阴离子正是所有活性氧的最初形式^[18]。当细胞受到辐射时,线粒体是活性氧产生的主要部位,活性氧水平急剧升高,使线粒体持续处于氧化应激状态。因此,辐射诱导线粒体产生的氧化应激是辐射研究领域的一个重要内容。

2.1 对超氧化物歧化酶的活性影响

超氧化物歧化酶是生物体内一种强效清除活性氧自由基的生物蛋白,它可以将产生的活性氧自由基转化成活性较弱的过氧化氢,进而降解为无毒的其他小分子化合物。线粒体中的超氧化物歧化酶主要是锰超氧化物歧化酶,当用 7.7 Gy 的 X 射线照射小鼠心脏后,测试发现其只诱导线粒体中的锰超氧化物歧化酶的表达水平上升,对细胞质中的其他两种类型的超氧化物歧化酶没有影响^[19]。与此同时,人胚胎肝成纤维细胞随着照射剂量和照射时间的增加细胞中线粒体的锰超氧化物歧化酶表达增加^[20]。以上结果表明,受到照射后,线粒体对调节应答和细胞中的锰超氧化物歧化酶的表达有着重要的作用。

2.2 对线粒体有氧呼吸的影响

众所周知,线粒体是有氧呼吸的主要场所,其合成的 ATP 维持着细胞中的各种生命活动,尤其是在心脏、骨骼肌和大脑等耗能多的组织器官中线粒体更是必不可少。然而辐射产生的活性氧自由基会对线粒体有氧呼吸链的蛋白造成一定的损伤,从而降低氧化磷酸化的效率,对细胞产生抑制甚至造成细胞凋亡。

2.3 呼吸链电子传递体复合物的变化

单独给予牛心脏细胞中的线粒体 50 Gy 的 γ 射线照射,发现呼吸链中的复合物 I 和 III 的活性受到显著的抑制^[21]。同样,对 C57BL/6N 小鼠心脏细胞中线粒体照射 2 Gy X 射线后 4 周发现,复合物 I 活性只有 32%,复合物 III 活性只有 13%,并且伴随着活性氧水平的升高^[22]。随后有研究者发现,不同细胞系的线粒体受到照射后,一定时间内都会出现不同程度地线粒体呼吸链复合物的活性降低。结果表明,呼吸链电子传递体复合物和 ATP 合成系统会直接受到电离辐射的损伤^[23]。

3 电离辐射对线粒体和细胞核的整体影响

3.1 线粒体之间的损伤放大效应

除了受到电离辐射的线粒体会产生一些氧化应

激反应之外,线粒体之间还有一些信号通路可以互相传递,从而放大辐射损伤效应。

细胞在受到辐射后,活性氧水平会显著升高。受到辐射损伤的线粒体会改变通透性,将这一损伤通过 Ca^{2+} 传递给邻近的线粒体,然后导致活性氧水平的整体升高。因此, Ca^{2+} 作为传递信使,放大这一损伤信号,活性氧水平成倍地升高^[24]。

3.2 线粒体和细胞核的损伤放大效应

线粒体状态的改变会激活线粒体和细胞核之间的反向调节通路,将线粒体的损伤传递给细胞核。

Hela 细胞的细胞质被照射 3 h 后,就可以在细胞核中检测到一个 DNA 损伤标志物-53BP1 (p53-binding protein 1) 病灶水平的升高,53BP1 在细胞核被激活的 5 min 后即可检测到。血浆中的电离辐射效应通过一个必要的通路对细胞核产生影响^[25]。

3.3 电离辐射对线粒体的长期影响

当线粒体受到电离辐射损伤时,线粒体长期处于氧化应激状态并对线粒体造成永久的损伤。在线粒体损伤水平,辐射敏感的人成纤维细胞系受到 0.1~2 Gy 的 γ 射线照射后,线粒体 DNA 的常见缺失在 14 d 达到第一个峰值,在照射后 49 d 达到第二个峰值然后一直持续到 63 d 时,并且这种损伤是永久、持续的,被称为“辐射诱导线粒体基因组不稳定^[11]”。基因组不稳定和过氧化氢引起的持续的氧化应激有密切关系。并且,遗传物质的不稳定复制增强了呼吸链酶复合体 II 的活性,增加了细胞的耗氧量。

电离损伤长期地损害线粒体,并导致线粒体内活性氧的持续产生,并且这种活性氧作为一种信号会影响邻近的线粒体,甚至是细胞核,从而产生大规模的长期损伤。

4 结论和展望

通过以上举例论述,我们可以看出电离辐射对线粒体的损伤很严重并且是长期的大规模损伤,而且这种损伤会遗传给子代细胞,尤其是线粒体 DNA 的常见缺失。

线粒体受到电离辐射后处于氧化应激状态,这种氧化应激会促进线粒体功能的改变。当线粒体 DNA 损伤后,与有氧呼吸相关的蛋白活性下降,氧化呼吸会受到一定的抑制,与此同时会不断地产生大量的活性超氧阴离子,不断刺激线粒体氧化应

激,并且将这种损伤的信号传导给周围的线粒体,造成级联损伤反应,进而激活线粒体与细胞核的信号通路,使细胞核也处于氧化应激状态,最后自由基的水平居高不下,对线粒体和细胞核的遗传物质DNA造成二次损伤。

线粒体DNA没有组蛋白的保护且基本不具备修复能力,当受到外界的电离辐射时,常见缺失发生的频率升高,并且会遗传给子代。对于大规模的线粒体DNA损伤,线粒体通过增加DNA的复制数目间接地弥补损伤DNA的数量,维持线粒体DNA的正常功能,而这种应激形式的挽救会导致线粒体内与有氧呼吸和ATP合成相关的蛋白表达升高,线粒体相关蛋白表达增多又会干扰正常的有氧呼吸,从而使活性氧的水平升高,导致线粒体和细胞核的长期损伤。

希望本文能为电离辐射损伤模型评价提供指导,线粒体作为电离辐射损伤的重要靶点,保护其不被损伤对维持细胞正常的生命活动有着重要的意义,而细胞核和线粒体之间的相互影响也说明我们只保护其中之一并不能解决电离损伤导致的细胞损伤的问题,维持二者都处在正常状态,细胞才能使正常生理功能。

利益冲突 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展,不涉及任何利益冲突。

作者贡献声明 张宇睿负责文献查询和论文撰写,徐文清负责论文的修改和论文的审阅。

参 考 文 献

- [1] Caputo F, Vegliante R, Ghibelli L. Redox modulation of the DNA damage response[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(10): 1292–1306. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.07.022.
- [2] Hu B, Grabham P, Nie J, et al. Intrachromosomal changes and genomic instability in site-specific microbeam-irradiated and bystander human-hamster hybrid cells[J]. *Radiat Res*, 2012, 177(1): 25–34.
- [3] Kobashigawa S, Kashino G, Suzuki K, et al. Ionizing radiation-induced cell death is partly caused by increase of mitochondrial reactive Oxygen species in normal human fibroblast cells[J]. *Radiat Res*, 2015, 183(4): 455–464. DOI: 10.1667/RR13772.1.
- [4] Kulkarni R, Marples B, Balasubramanian M, et al. Mitochondrial gene expression changes in normal and mitochondrial mutant cells after exposure to ionizing radiation[J]. *Radiat Res*, 2010, 173(5): 635–644. DOI: 10.1667/RR1737.1.
- [5] Azzam EL, Jay-Gerin JP, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury[J]. *Cancer Lett*, 2012, 327(1/2): 48–60. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.12.012.
- [6] Chien L, Chen WK, Liu ST, et al. Low-dose ionizing radiation induces mitochondrial fusion and increases expression of mitochondrial complexes I and III in hippocampal neurons[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 30628–30639. DOI: 10.18632/oncotarget.5790.
- [7] Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(17): 6465–6467.
- [8] 周鑫,王振华,张红. 电离辐射引起的线粒体DNA损伤及突变研究进展[J]. *原子核物理评论*, 2012, 29(4): 399–405
Zhou X, Wang ZH, Zhang H. Current Study on Ionizing Radiation-induced Mitochondrial DNA Damage and Mutations[J]. *Nucl Phys Rev*, 2012, 29(4): 399–405.
- [9] Chen T, He J, Shen L, et al. The mitochondrial DNA 4, 977-bp deletion and its implication in copy number alteration in colorectal cancer[J]. *BMC Med Genet*, 2011, 13: 8. DOI: 10.1186/1471-2350-12-8.
- [10] 封江彬,陆雪,陈德清,等. 巢式PCR分析电离辐射诱导人外周血线粒体DNA4977bp缺失[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2004, 24(6): 533–536.
Feng JB, Lu X, Chen DQ, et al. Detection the human mitochondrial DNA 4977 bp ⁶⁰Co γ -rays in vivo by nest-PCR[J]. *Chin J Radiol Med Prot*, 2004, 24(6): 533–536.
- [11] Schilling-Tóth B, Sándor N, Kis E, et al. Analysis of the common deletions in the mitochondrial DNA is a sensitive biomarker detecting direct and non-targeted cellular effects of low dose ionizing radiation[J]. *Mutat Res*, 2011, 716(1/2): 33–39. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.07.018.
- [12] Murphy JE, Nugent S, Seymour C, et al. Mitochondrial DNA point mutations and a novel deletion induced by direct low-LET radiation and by medium from irradiated cells[J]. *Mutat Res*, 2005, 585(1/2): 127–136. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2005.04.011.
- [13] Zhang SB, Zhang M, Cao Y, et al. Delayed effects of radiation on mitochondrial DNA in radiation-sensitive organs[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 737: 139–145. DOI: 10.1007/978-1-4614-1566-4_21.
- [14] Zhou X, Li N, Wang Y, et al. Effects of X-irradiation on mitochondrial DNA damage and its supercoiling formation change[J]. *Mitochondrion*, 2011, 11(6): 886–892. DOI: 10.1016/j.mito.2011.07.005.
- [15] Wang L, Kuwahara Y, Li L, et al. Analysis of common deletion (CD) and a novel deletion of mitochondrial DNA induced by ionizing radiation[J]. *Int J Radiat Biol*, 2007, 83(7): 433–442. DOI: 10.1080/09553000701370878.
- [16] Malakhova L, Bezlepkin VG, Antipova V, et al. The increase in mitochondrial DNA copy number in the tissues of gamma-irradiated mice[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2005, 10(4): 721–732.
- [17] Wen Q, Hu Y, Ji F, et al. Mitochondrial DNA alterations of peripheral lymphocytes in acute lymphoblastic leukemia patients undergo-

- ing total body irradiation therapy[J]. *Radiat Oncol*, 2011, 6: 133–140. DOI: 10.1186/1748-717X-6-133.
- [18] 张俊伶, 薛晓蕾, 李源, 等. 富氢水对电离辐射引起胸腺细胞损伤的影响[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2015, 39(5): 358–362. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2005.05.011
Zhang JL, Xue XL, Li Y, et al. Effects of hydrogen-rich water on radiation-induced thymus injury[J]. *Int J Radiat Med Nucl Med*, 2015, 39(5): 358–362.
- [19] Oberley LW, St Clair DK, Aitor AP, et al. Increase in Manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after X-irradiation[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1987, 254(1): 69–80.
- [20] Hirai F, Motoori S, Kakinuma S, et al. Mitochondrial signal lacking Manganese superoxide dismutase failed to prevent cell death by re-oxygenation following hypoxia in a human pancreatic cancer cell line, KP4[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2004, 6(3): 523–535. DOI: 10.1089/152308604773934288.
- [21] Pearce LL, Epperly MW, Greenberger JS, et al. Identification of respiratory complexes I and III as mitochondrial sites of damage following exposure to ionizing radiation and nitric oxide[J]. *Nitric Oxide*, 2001, 5(2): 128–136. DOI: 10.1006/niox.2001.0338.
- [22] Barjaktarovic Z, Schmaltz D, Shyla A, et al. Radiation-induced signaling results in mitochondrial impairment in mouse heart at 4 weeks after exposure to X-rays[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(12): 27811[2016-01-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3234240/pdf/pone.0027811.pdf>. DOI: 10.1371/journal.pone.0027811.
- [23] Nugent S, Mothersill CE, Seymour C, et al. Altered mitochondrial function and genome frequency post exposure to gamma-radiation and bystander factors[J]. *Int J Radiat Biol*, 2010, 86(10): 829–841. DOI: 10.3109/09553002.2010.486019.
- [24] Li Q, Su D, O'Rourke B, et al. Mitochondria-derived ROS bursts disturb Ca²⁺ cycling and induce abnormal automaticity in Guinea pig cardiomyocytes: a theoretical study[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(6): H623–H636. DOI: 10.1152/ajpheart.00493.2014.
- [25] Laurent A, Blasi F. Differential DNA damage signalling and apoptotic threshold correlate with mouse epiblast-specific hypersensitivity to radiation[J]. *Development*, 2015, 142(21): 3675–3685. DOI: 10.1242/dev.125708.

(收稿日期: 2016-01-06)

(上接第 148 页)

- [18] Sadeghi R, Asadi M, Treglia G, et al. Axillary concordance between superficial and deep sentinel node mapping material injections in breast cancer patients: systematic review and meta-analysis of the literature[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 144(2): 213–222. DOI: 10.1007/s10549-014-2866-1.
- [19] 贺青卿, 姜军, 杨新华, 等. 乳腺癌淋巴引流途径的临床研究[J]. *中华乳腺病杂志: 电子版*, 2008, 2(2): 140–148. DOI: 10.3969/j.issn.1674-0807.2008.02.004.
He QQ, Jiang J, Yang XH, et al. Clinical study on lymphatic drainage patterns of breast cancer[J]. *Chin J Breast Dis (Electronic Version)*, 2008, 2(2): 140–148.
- [20] Madsen E, Gobardhan P, Bongers V, et al. The impact on post-surgical treatment of sentinel lymph node biopsy of internal mammary lymph nodes in patients with breast cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(4): 1486–1492. DOI: 10.1245/s10434-006-9230-6.
- [21] Sun X, Liu JJ, Wang YS, et al. Roles of preoperative lymphoscintigraphy for sentinel lymph node biopsy in breast cancer patients[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2010, 40(8): 722–725. DOI: 10.1093/jjco/hyq052.
- [22] Giammarile F, Alazraki N, Aarsvold JN, et al. The EANM and SNMMI practice guideline for lymphoscintigraphy and sentinel node localization in breast cancer[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2013, 40(12): 1932–1947. DOI: 10.1007/s00259-013-2544-2.

(收稿日期: 2016-01-04)