

文章编号: 1001-098X(2002)06-0281-04

微束在辐射诱导的旁效应研究中的应用

熊杰, 韩玲

摘要: 辐射诱导的旁效应现象近年来已经引起了越来越多的关注, 它对于目前低剂量辐射效应的研究将产生重大影响。在其研究过程中, 由于电离粒子在能量、径迹上的随机分布, 用常规照射的方法无法提供旁效应的直接证据以及准确的单一粒子与生物体的作用结果。微束的发展, 特别是单粒子微束通过将精确数量的粒子准确地射入细胞或细胞特定位置, 为辐射诱导的旁效应的研究提供了直接有用的手段。为此, 论述了辐射诱导的旁效应现象以及微束在其研究中的应用。

关键词: 微束; 辐射; 旁效应

中图分类号: Q691.5 **文献标识码:** A

The application of microbeam in the research on radiation-induced bystander effects

XIONG Jie, HAN Ling

(Institute of Radiation Medicine, Navy Medicine Faculty, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: There has been more and more attention to the phenomenon known as radiation-induced bystander effects, which will have a tremendous effect on the research in low-dose radiation biological effects. However, due to the stochastic nature of energy deposition and the random position of tracts, direct evidence for bystander effects and exact results of single particle interacts with a cell cannot be provided by using conventional broad-field irradiation. The availability of microbeam, especially the single particle microbeam in the world, whereby individual cells or precise location of cells can be irradiated with either a single or an exact number of particles provides a useful tool for the research on radiation-induced bystander effects. This report describes the radiation-induced bystander effect and the application of microbeam in the research on it.

Key words: microbeam; radiation; bystander effects

1 微束装置简介

微束是一种采用聚焦或准直的方式将辐射束径缩小至微米水平的装置。目前在世界上建成的微束装置主要有荷电粒子微束、X射线微束和激光微束, 其中荷电粒子微束被广泛应用于辐射生物学研究中。现代微束采用了可靠的单粒子探测器, 精确

的细胞定位技术, 快速的束流开关以及计算机控制, 可以准确地将单一或精确数量的粒子射入细胞或细胞不同部位。Texas A&M大学、Gray实验室和哥伦比亚大学的三台利用准直方式建造的单粒子微束装置最具代表性, 其中哥伦比亚大学的微束装置更是目前世界上唯一一台可研究生物终点多于 10^4 频率发生的事件的装置。我国只有中科院等离子体物理研究所正在研制微束装置, 目前尚不能使用。

2 微束在辐射生物学研究中的基本应用

目前现代微束装置在辐射生物学研究中主要应用在精确估计低剂量辐射效应、辐射敏感性的相关问题以及辐射后细胞内信号转导、细胞间通信等方面, 并且已经取得了重大进展。通过使用Texas

收稿日期: 2002-07-12

作者简介: ①熊杰 (1979-), 男, 湖北襄樊人, 第二军医大学海医系放射医学教研室 (上海, 200433) 硕士研究生, 主要从事放射生物学研究。

②韩玲 (1961-), 女, 吉林辑安人, 第二军医大学海医系放射医学教研室副教授, 主要从事放射生物学和实验核医学研究。

审校者: 第二军医大学海医系 蔡建明

A&M大学的加速器, Neldson JM等^[1]发现微核的诱导与照射的 α 粒子数成正相关, 并发现单个 α 粒子核照射可以引起减数分裂的延缓, 而这种时间延缓的长短也与粒子数成正比。Hei TK等^[2]利用哥伦比亚大学微束装置在世界上首次展示了精确粒子的成活曲线, 他们研究显示单个 α 粒子核照射仅能造成20%的细胞致死, 并且非常惊奇地发现10%的细胞在受到8个 α 粒子核照射后仍能存活。随后的实验中, Hei TK等又发现单个 α 粒子在 A_1 细胞中可诱发高于对照三倍的诱变率, 并且这种诱变率随粒子数的增加而增加。通过精确的单粒子照射C3H10T1/2细胞核, 哥伦比亚大学的Miller RC等^[3]发现, 单个 α 粒子(90 keV/ μ m)可在每个成活细胞中产生频率在 $\sim 5 \times 10^{-5}$ 的恶性转化, 这一结果类似于常规照射中等剂量照射的诱导频率。

3 微束在辐射诱导的旁效应研究中的应用

辐射诱导的旁效应(radiation-induced bystander effect)是指未直接接受照射的细胞也表现出与直接接受照射的细胞类似的生物学效应, 包括细胞凋亡或延迟死亡、基因不稳定性、基因突变、基因表达改变、微核化以及细胞生长异常等。这一现象由Nagasawa H等^[4]于1992年首次报道, 他们将细胞暴露于极低剂量的 α 粒子, 并计算使得仅有1%或更少的细胞被 α 粒子击中, 然而却发现30%~50%的细胞表现出了姊妹染色体交换(sister chromatid exchanges, SCE)。这一现象在以后的试验中也得到了证实, Deshpande A等^[5]证实, 在人成纤维细胞中 α 粒子能在没有穿过核的情况下诱导姊妹染色体的交换。

Gray实验室的Belyakov OV等^[6]利用微束装置, 通过对单个细胞的精确定位与检测, 发现在 α 粒子微束照射3d后, 在数量为600~800的细胞群体中, 即使仅有一个细胞的细胞核受到照射, 仍会多出80~100的损伤细胞, 较之对照组的细胞损伤水平增加了2~3倍。这为证实人成纤维细胞在电离辐射后发生了旁效应提供了直接证据。

3.1 旁效应信号的产生

Lehnert BE等^[7]认为, 旁效应的产生是由于照射后细胞培养基中产生了细胞外效应因子, 而该因子很可能主要是活性氧(reactive oxygen species, ROS), 包括过氧化氢和过氧阴离子。进一步研究认为这种细胞外效应因子可分为两种, 一种为短效应

因子, 来源于受照射的细胞培养基(通常含血清), 可能是由脂质过氧化物生成的超氧自由基; 另一种为, 产生依赖于受照射细胞的长效效应因子, 经过加热和冷却试验证实, 该旁效应因子是蛋白质类的, 但其分泌速度(照后30 min)暗示它不是在照射后由受照细胞缓慢分泌, 可能是一个极早信号传递事件, 并且也不可能是一种新合成的蛋白质, 极有可能是某种细胞因子, 例如TNF- α (肿瘤坏死因子 α), 因为它是一种已知具有SCE诱导活性的蛋白质。而Deshpande A等^[5]发现, IL-8(白细胞介素-8)也可能与 α 粒子诱发的旁效应的发生有关。虽然这些蛋白质在细胞内有明确作用, 但其如何导致细胞外作用尚不清楚, 也许有着复杂的信号机制。

Belyakov OV等^[6,8]利用Gray实验室的微束装置对精确数量的细胞在不同剂量电离辐射下的旁效应进行了研究, 他们发现旁效应的发生不依赖于电离辐射的剂量以及受照射的细胞数, 即使实验细胞群中仅有一个细胞受到一个 α 粒子的贯穿, 也能出现明显的旁效应细胞损伤, 而且随着 α 粒子数的增加而迅速达到剂量-效应的平台状态。同时他们还考察了细胞培养基成份对旁效应的影响, 认为旁效应的产生不依赖于细胞培养基, 证实了一个细胞介导的反应参与其中。Zhou H等^[9]用哥伦比亚大学的微束装置也发现当10%的细胞受到 α 粒子照射后, 所发生的旁效应就达到了平台状态。这种近似于“全或无”的效应现象, 表明细胞外效应因子更应当是一种信号分子, 而非细胞毒性因子, 因为后者更可能产生一个线性剂量反应关系而不是一种饱和现象。可以推测, 受照射细胞释放出数量有限的信号分子, 通过一定途径作用于未受照射细胞而使其表现出旁效应。来源于细胞培养基的ROS显然是一种毒性分子, 而非信号分子, 因而不太可能在旁效应起始阶段起重要作用。

3.2 旁效应信号在细胞间的传递

在辐射诱导的旁效应早期研究中, 多数观点认为ROS对于旁效应的发生起重要作用。Gray实验室的Prise KM等^[8]利用 α 粒子微束照射人成纤维细胞核后, 发现旁效应损伤细胞的分布在空间上有一定规律, 主要分布在直接受照细胞周围。由于他们的实验体系中, 受照射细胞均呈亚融合状态, 所以他们排除了细胞间通信, 特别是细胞间隙连接介导的细胞间通信(gap junction intercellular communication,

GJIC)在旁效应发生中的作用,并且支持ROS在旁效应发生中起重要作用。

Gray实验室的Belyakov OV等^[6]在 α 粒子微束照射细胞的试验中发现,尽管细胞密度很低($< 8/\text{mm}^2$),但共聚焦显微成像却显示出在受照射时,部分细胞的细胞质突起可达数百微米(μm),由此他们认为无法排除细胞间通信参与旁效应的发生。

哥伦比亚大学辐照中心的Zhou H等^[9,10]经过一系列微束照射试验后认为,旁效应的发生过程中除羟自由基等介导的氧应激之外,细胞缝隙连接介导的细胞间通信起着更为重要的作用。细胞缝隙连接是相邻脂膜间形成的一种具有开关功能的特殊通道,基于分子大小,它还具有相对的选择性,开放时允许 Ca^{2+} 、 K^+ 、cAMP等分子质量小于1 000的物质通过,阻止蛋白质或核酸通过。Zhou H等在微束照射前分别用无毒剂量的DMSO(二甲基亚砜,一种有效的自由基保护剂)和Lindane(六氯环己烷的 γ -异构体,一种有效的缝隙连接细胞通信阻断剂)预处理受照细胞,结果发现,用DMSO预处理并未对旁效应的程度有明显影响,相反,Lindane则显著抑制了旁效应的发生,仅稍高于对照水平。由于Lindane除可阻断GJIC之外,还可影响细胞内其他结构和功能,包括膜流动性,Zhou H等继续深入研究,通过转染AH1-9细胞,使其缺乏连接蛋白43(connexin 43)或过度表达connexin 43(connexin 43是构成缝隙连接的主要成份),并重复前面的微束照射试验,结果,过度表达connexin 43的AH1-9细胞发生了更严重的旁效应,而connexin 43阴性的AH1-9细胞中却未发生辐射诱导的旁效应。由此证实,GJIC在介导辐射旁效应中起相当重要的作用。

也有不同观点认为,旁效应信号可能通过受体介导或者只是以简单的扩散形式作用至受体细胞,而GJIC只是一种附加机制而非必需。来自Gray实验室的资料显示,微束照射单个角质细胞后,距离很远的细胞也发生了旁效应,而并未通过细胞间的接触^[11]。Albanese J等^[12]则报道了细胞照射后膜小泡的脱落,内含有表达增加的TNFSF6(肿瘤坏死因子配体超家族6)。由于它们小到足以穿过试验中所用的过滤器,因而在受照射细胞培养液中能发现这些膜小泡,由此推测这些膜小泡携带着旁效应信号在细胞间传递,从而使得细胞完成远距离的相互联系与作用。

3.3 旁效应信号在受体细胞中的效应阶段

目前认为,旁效应信号作用于受体细胞后,通过多种不同细胞内信号转导途径而使旁效应表现为不同的形式(多为细胞死亡或基因不稳定性)。研究较多的一条途径是抑癌基因TP53(p53)/CDKN1A [cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, 细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂1A (P21)]介导的DNA损伤反应通路,该信号转导途径可通过降低DNA复制的保真度或增加重组子活性造成细胞的遗传的改变。Iyer R等^[13]认为,旁效应的发生依赖于TP53反应途径,而Seymour C等^[14]则认为,旁效应的发生不依赖于TP53反应途径,他们以用HPV(人乳头状瘤病毒)转染的角质细胞(E6蛋白已使其p53缺失)为受照细胞,同样观察到了显著的辐射旁效应,而在SW48细胞(含野生型p53)中则发生了极强的旁效应,在PC3细胞(含p53突变体)中仅发生了极为微弱的旁效应。对此的解释,可能是野生型p53的存在有助于旁效应信号的细胞内转导,而在p53缺失的情况下,则通过其他替代途径转导旁效应信号。

Iyer R等^[13,15]还发现,受体细胞内线粒体膜NADPH(还原型辅酶II)氧化酶/NF κ B(核转录因子 κ B)途径也参与旁效应的效应阶段中。他们发现发生旁效应的细胞在照射后30 min至2 h内,其胞内会出现持续1~2 min的 Ca^{2+} 高峰,经研究这是由于线粒体上NADPH氧化所致线粒体膜通透性改变的结果。细胞内 Ca^{2+} 信号以及线粒体氧化应激产生的ROS则可能通过下游途径激活NF κ B,使受体细胞以凋亡或基因表达改变的形式而表现出辐射旁效应。

4 问题与展望

尽管目前微束用于辐射诱导的旁效应研究起到了极大帮助,但仍存在许多有待改进的地方。首先是粒子的探测系统,哥伦比亚大学的装置将探测器置于细胞的后方,即粒子只有穿过细胞后才能被探测到,这种设计并不能用于探测停止于细胞中粒子的生物学效应。Gray实验室和Texas A&M大学的装置虽将探测器置于细胞与粒子出口的中间,但这种用光电感应探测粒子技术,限制了粒子照射的速度。其次是所有目前使用的装置在细胞图像分析上都采用染色的方法,即通过对细胞核进行荧光染色来进行细胞的计算机自动定位。因此,有必要发展一种无染色的细胞定位方法以减少细胞损伤,哥伦比亚大学目前正在进行这种技术的尝试。此外还有

微束的准直系统,使其束径的减小可对单个细胞中的特定结构如线粒体进行照射。相信微束装置的不断改进,将有助于回答辐射诱导的旁效应研究,尤其是其发生机制中存有争论的问题,弄清旁效应发生的详细过程,并由此使低剂量辐射效应基本问题上的研究取得重大突破。

参考文献:

- [1] Neldson JM, Brooks AL, Metting NF, et al. Clastogenic effects of defined numbers of 3.2 MeV alpha particles on individual CHO-K1 cells[J]. *Radiat Res*, 1996, 145(5): 568-574.
- [2] Hei TK, Wu LJ, Liu SX, et al. Mutagenic effects of a single and an exact number of alpha particles in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(8): 3765-3770.
- [3] Miller RC, Randers PG, Geard CR, et al. The oncogenic transforming potential of the passage of single alpha particles through mammalian cell nuclei[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(1): 19-22.
- [4] Nagasawa H, Little JB. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles[J]. *Cancer Res*, 1992, 52(22): 6394-6396.
- [5] Deshpande A, Goodwin EH, Bailey SM, et al. Alpha-particle-induced sister chromatid exchange in normal human lung fibroblasts: evidence for an extranuclear target[J]. *Radiat Res*, 1996, 145(3): 260-267.
- [6] Belyakov OV, Malcolmson AM, Folkard M, et al. Direct evidence for a bystander effect of ionizing radiation in primary human fibroblasts[J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(5): 674-679.
- [7] Lehnert BE, Goodwin EH. Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(11): 2164-2171.
- [8] Prise KM, Belyakov OV, Folkard M, et al. Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam[J]. *Int J Radiat Biol*, 1998, 74(6): 793-798.
- [9] Zhou H, Suzuki M, Vannais D, et al. Radiation risk to low fluences of alpha particles may be greater than we thought [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(25): 14410-14415.
- [10] Zhou H, Randers PG, Waldern CA, et al. Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(5): 2099-2104.
- [11] Mothersill C, Seymour C. Radiation-induced bystander effects: past history and future directions [J]. *Radiat Res*, 2001, 155(6): 759-767.
- [12] Albanese J, Dainiak N. Ionizing radiation alters Fas antigen ligand at the cell surface and on exfoliated plasma membrane-derived vesicles: implications for apoptosis and intercellular signaling[J]. *Radiat Res*, 2000, 153(1): 49-61.
- [13] Iyer R, Lehnert BE. Effects of ionizing radiation in targeted and nontargeted cells[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 376(1): 14-25.
- [14] Seymour C, Mothersill C. Relative contribution of bystander and targeted cell killing to the low-dose region of the radiation dose-response curve[J]. *Radiat Res*, 2000, 153(5Pt1): 508-511.
- [15] Lyng FM, Seymour C, Mothersill C. Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis[J]. *Br J Cancer*, 2000, 3(9): 1223-1230.
- (上接第280页)
- nism[J]. *Neoplasia*, 2001, 3(5): 411-419.
- [3] Jackson JR, Roshak A, Winkler JD, et al. An indolocarbazole inhibitor of human checkpoint kinase (Chk1) abrogates cell cycle arrest caused by DNA damage [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(3): 566-572.
- [4] Ding Z, Parchment RE, LoRusso PM, et al. The investigational new drug XK469 induces G(2)-M cell cycle arrest by p53-dependent and -independent pathways[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(11): 3336-3342.
- [5] Hu BC, Wang X, Wang Y, et al. The radioresistance to killing of A1-5 cells derives from activation of the Chk1 pathway[J]. *Biol Chem*, 2001, 276(21): 17693-17698.
- [6] Oe T, Nakajo N, Katsuragi Y, et al. Cytoplasmic occurrence of the Chk1/Cdc25 pathway and regulation of Chk1 in *Xenopus* oocytes[J]. *Dev Biol*, 2001, 229(1): 250-261.
- [7] Atsushi H, Kong YY, Shuhei M, et al. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2 [J]. *Science*, 2000, 287: 1824-1827.
- [8] Robert SW, Shuhei M, Stephen JE, et al. Hus1 acts upstream of chk1 in a mammalian DNA damage response pathway[J]. *Current Biol*, 2002, 12(1): 73-77.
- [9] Matsui F, Tsuchida Y, Keng PC. Effects of p53 mutations on cellular sensitivity to ionizing radiation [J]. *Am J Clin Oncol*, 2001, 24(5): 486-490.
- [10] Taylor WR, Atark GR, Galante J, et al. p130/E2F4 binds to and represses the cdc2 promoter in response to p53[J]. *Biol Chem*, 2001, 276(3): 1998-2006.
- [11] Jin S, Antinore MJ, Lung FD, et al. The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression[J]. *Biol Chem*, 2000, 275(22): 16602-16608.
- [12] Lee SL, Tian Hui, Faje AT, et al. Radiation-induced phosphorylation of Chk1 at S345 is associated with p53-dependent cell cycle arrest pathways[J]. *Neoplasia*, 2002, 4(2): 171-180.
- [13] Gottifredi V, Kami SO, Shieh SS, et al. p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(4): 1066-1076.