

in mammalian cells [J]. *Cancer Res*, 1999, 59 (23): 5922-5926.

- [ 7 ] Xu A, Zhou H, Yu DZ, et al. Mechanisms of the genotoxicity of crocidolite asbestos in mammalian cells: implication from mutation patterns induced by reactive oxygen species [J]. *Environ Health Perspect*, 2002, 110(10): 1003-1008.
- [ 8 ] Kessel M, Liu SX, Xu A, et al. Arsenic induces oxidative DNA damage in mammalian cells[J]. *Mol Cell Biochem* 2002, 234(1-2): 301-308.
- [ 9 ] Wu LJ, Randers-pehrson G, Xu A, et al. Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96(9): 4959-4964.
- [10] Kraemer SM, Vannais DB, Kronenberg A, et al. Gamma-ray

mutagenesis studies in a new human-hamster hybrid, AL-CD59(+/-), which has two human chromosomes 11 but is hemizygous for the CD59 gene [J]. *Radiat Res*, 2001, 156 (1):10-19.

- [11] Kraemer SM, Kronenberg A, Ueno A, et al. Measuring the spectrum of mutation induced by nitrogen ions and protons in the human-hamster hybrid cell line ALC [J]. *Radiat Res*, 2000, 153(6): 743-751.
- [12] Vannais D, Drabek R, Gustafson D, et al. Analysis of mutant quantity and quality in human-hamster hybrid AL and AL-179 cells exposed to <sup>137</sup>Cs-gamma or HZE-Fe ions [J]. *Adv Space Res*, 1998, 22(4): 579-585.

(收稿日期:2000-09-12)

文章编号: 1001-098X(2004)01-0033-04

## 辐射损伤与细胞周期

姚莉

**摘要** 辐射后的细胞可能发生恶性转化,可能死亡,另有一些细胞对辐射却产生适应性或抗性,最终长期存活下来。近年来研究发现,此差异与辐射对细胞周期的影响密切相关。辐射可阻断细胞周期活动及延长细胞周期,其中G<sub>1</sub>期、S期和G<sub>2</sub>/M期等细胞周期检查点(checkpoint)起决定作用,它们分别通过不同的信号途径对辐射所致的损伤进行调控,产生不同的辐射生物学效应。对该领域的深入研究不仅为进一步阐释辐射致癌提供一定的理论依据,而且为临床放疗增敏剂的研制提供新的思路。

**关键词** 辐射;细胞周期;调控;检查点

中图分类号 Q253, R811.5 文献标识码 A

### Radiation injury and cell cycle

YAO Li

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

**Abstract** Some may be malignant transformation, some may die immediately, and the other may be alive which produce radioadaptive responses and radioresistance. Recently, it has been reported that there is close relationship between cell cycle alterations and different injury effects caused by radiation. Cell cycle may be arrested and delayed by irradiation in which G<sub>1</sub>-phase, S-phase and G<sub>2</sub>/M-phase checkpoints may play a major role. Therefore different signal transduction pathways and moleculars are involved in the checkpoints responses. Furthermore, studies on the cell cycle checkpoints responses to radiation are quite important in radiation biology, because it could not only provide the theoretical basis for the elucidation of cancer caused by radiation, but also gain further insight into investigation and developing radiosensitive drugs for clinical radiotherapy.

**Key words** radiation; cell cycle; regulation; checkpoints

近年来研究证实,辐射可引起细胞发生恶性转

化,可能死亡,另有一些细胞对辐射却产生适应性或抗性,最终长期存活下来。此差异与辐射对细胞周期的影响密切相关,其中细胞周期检查点

(checkpoint) 起决定作用, 它们分别通过不同的信号途径对辐射所致的损伤进行调控, 产生不同的辐射生物学效应。

细胞周期检查点调控中有两个重要的蛋白激酶分子——ATM(ataxia telangiectasia mutated)和 ATR(ATM-Rad3-related), 它们是辐射损伤监控网络中重要的信号分子, 能及早感知损伤, 并迅速激活其下游反应元件, 引发不同信号途径, 这些途径既相互独立又相互关联, 构成一个复杂的信息网络, 监控和调节辐射细胞学反应的全过程<sup>[1,2]</sup>。本文重点介绍辐射损伤对细胞周期阻滞效应的分子机制, 简要阐述辐射所致的细胞周期阻滞效应紊乱可能引发的癌变, 简介该领域研究在临床放疗增敏剂研发中的应用前景。

## 1 辐射诱导细胞 G<sub>1</sub> 期阻滞及其调控机制

辐射诱导细胞周期改变中发现较早的是 G<sub>1</sub> 期阻滞。有学者早在 1968 年就报道 X 射线能引起 G<sub>1</sub> 期阻滞, 随后相继有不同辐射种类、不同照射剂量及时间、不同受照细胞的相关报道进一步证实了这一现象。有研究者发现, 4Gy 照射同步化的早、中期 C3H 小鼠成纤维细胞可发生 G<sub>1</sub> 期阻滞<sup>[3]</sup>。受 1~10Gy 照射的同步化的 CHO (中国仓鼠卵巢细胞) 野生型(K-1)及对辐射敏感的突变型(xrs-5)出现 G<sub>1</sub> 期阻滞, 而且辐射敏感的突变型 (xrs-5)CHO 发生 P53 蛋白积聚<sup>[4]</sup>。

G<sub>1</sub> 期阻滞如何实现呢? 目前公认 G<sub>1</sub> 期阻滞中的核心调控分子为 P53。研究发现, 受电离辐射和非电离辐射(如紫外线)辐照后, 细胞内有 P53 积聚, 而且其含量的增加与细胞 DNA 复制合成下降密切相关<sup>[5,6]</sup>; P53 功能缺陷的细胞受照后 G<sub>1</sub>/S 时相转换不再受阻延, 提示 P53 在 G<sub>1</sub>/S 期检查点起关键作用。P53 可能通过上调 P21 从而抑制细胞周期素依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK), 阻止 S 期启动<sup>[7]</sup>。

目前研究显示, 参与 G<sub>1</sub> 期阻滞的主要途径有三条。(1)ATM→P53 途径。ATM 首先感知辐射损伤信号, ATM 激酶活化, 直接磷酸化 P53 的 Ser<sup>15</sup> (丝氨酸 15 位点), 激活下游反应元件, 阻滞 G<sub>1</sub> 向 S 期的转换<sup>[8]</sup>。(2)ATM→MDM2(murine double minute-2)→P53 途径。ATM 磷酸化 MDM2 的 Ser<sup>395</sup>, 降低 MDM2 对 P53 的解聚作用, 促进 P53

聚集, 维持 P53 长时间处于较高水平<sup>[9]</sup>。另外, ATM 还可以活化 CHK2 激酶, 使 P53 的 Ser<sup>20</sup> 磷酸化, 免受 MDM2 的解聚, 以保持 P53 稳定。(3)ATR→P53 途径。近年发现, 辐射损伤可激活 ATR 激酶, 磷酸化 P53 的 Ser<sup>15</sup>, 可能直接或间接通过 CHK1 激酶影响 G<sub>1</sub> 期阻滞。尽管有人认为 ATR 并不能激活 P53, 但 ATR 在 G<sub>1</sub> 期检查点调控中的协调作用是不容置疑的<sup>[10]</sup>。

## 2 辐射诱导细胞 S 期延迟及其调控机制

研究 AT 细胞 (ATM 缺陷) 辐射反应时发现, AT 细胞能够抵抗辐射而进行 DNA 合成。S 期检查点功能正常的细胞在有 DNA 损伤时, DNA 的合成将减慢, 以便赢得时间充分修复损伤, 而 AT 细胞却可以继续 DNA 合成, 并且还可沿用损伤的 DNA 迅速复制, 这一现象说明 ATM 在辐射介导的 S 期检查点调控中起主要作用, 是 S 期检查点的主开关分子, 它可激活不同的下游分子, 沿不同途径延迟 S 期的启动<sup>[11,12]</sup>。(1)ATM→CHK2(checkpoint kinase)→CDC25A (cell division cycle gene) 通路。目前认为, ATM 可以活化 CHK2, 使其下游靶分子 CDC25A 激活, CDC25A 使 CDK2(CDK2 是 S 期启动和推进的重要分子引擎)的 Tyr<sup>15</sup> 去磷酸化, 下调 CDK2 活性, 阻止 S 期开启。(2)ATM→NBS1(nijmegen breakage syndrome) 通路。NBS1 基因是一类与人类染色体不稳有关的基因, 研究中发现, NBS1 突变的细胞受到电离辐射后表现出与 AT 细胞非常相似的辐射抗性, 于是推测 NBS1 可能在 S 期检查点中发挥重要作用。有实验进一步证实, NBS1 是 ATM 的一个直接底物, 而且 NBS1 是与 MRE11 (meiotic recombination gene) 和 RAD50 (从酵母细胞中克隆出多种 DNA 修复基因) 构成复合物存在的, 该复合物在体外有核酶活性, 具有修复断裂的 DNA 双链的功能<sup>[13,14]</sup>。以上结果说明, 确实有 ATM→NBS1 通路存在, 但其下游分子尚待研究证实。(3)ATM→NBS1/SMC1(structure maintenance of chromosomes) 通路。最近研究认为, ATM 可以磷酸化 SMC1 的 Ser<sup>957</sup> 和 Ser<sup>966</sup>, 参与 ATM→NBS1 通路对 S 期检查点的调控<sup>[15]</sup>。这一结果在电离辐射和紫外线照射中均得到了验证, 同时观察到 SMC1 的存在有赖于 ATM/NBS1, 是 ATM/NBS1 的下游效应分子。

### 3 辐射诱导细胞 G<sub>2</sub>/M 期阻滞及其调控机制

M 期为进行 DNA 拷贝分配和细胞分裂的时期。G<sub>2</sub>/M 期检查点可以防止染色体的错误分离, G<sub>2</sub> 期阻滞能对断裂的 DNA 双链以重组方式进行修复, 确保细胞染色体组的完整性和稳定性, 减少突变的发生。

有资料表明, 辐射所致的 G<sub>2</sub> 期阻滞比 G<sub>1</sub> 期阻滞更为普遍。Metting NF 等<sup>[16]</sup>发现, 2 Gy X 射线及 2 Gy α 粒子均可诱导细胞 G<sub>2</sub> 期阻滞。Hain J 等<sup>[17]</sup>证明, UV-B 和 γ 射线对 CDK1(调控 G<sub>2</sub> 期转换)均有抑制作用, γ 射线主要导致暂时的 G<sub>2</sub> 期阻滞。

细胞正常通过 G<sub>2</sub>/M 期时需要 CDC2 与 CyclinB 构成复合体, 复合体中 CDC2 必须进行 N 末端 Tyr<sup>14</sup> 和 Tyr<sup>15</sup> 脱磷酸化, 脱磷酸化的 CDC2 才具有活性并与 CyclinB1 构成有活性的复合体。任何影响 CDC2 与 CyclinB1 的因素都将干扰 G<sub>2</sub>/M 期的正常转换。许多研究表明, CDC25C 是 G<sub>2</sub>/M 期检查点调控中的一个重要的下游靶分子, CDC25C 与 14-3-3α 结合可以抑制 CDC25C 入核与 CDC2 作用, 引起 G<sub>2</sub>/M 期阻滞。ATM 和 ATR 是 G<sub>2</sub>/M 期检查点的两个关键信号分子, 既能感应信号又能转导信号, 信号分别经两个转导途径控制 G<sub>2</sub>/M 期进程。(1)ATR→CHK1→CDC25C 通路。该通路已经在对人类体细胞 ATR 剔除模型的研究中得到了证实, ATR 剔除的细胞受到电离辐射后, 细胞可以携带损伤的 DNA 不经修复直接进入 M 期, 提示 ATR 在 G<sub>2</sub>/M 期阻滞中起作用<sup>[18]</sup>。而 ATR 的直接靶点是 CHK1, CHK1 磷酸化 CDC25C Ser<sup>216</sup>, 使 CDC25C 在核外与 14-3-3α 结合, 阻断 CDC2 分子引擎, 发生 G<sub>2</sub> 期阻滞。(2)ATM→CHK2→CDC25C 通路。除 ATR 外, ATM 可能开启另一条 G<sub>2</sub>/M 期检查通路。以 AT 细胞为例, 尽管其 ATR 通路功能正常, 但 AT 细胞仍然可以不受阻拦进入 M 期, 推测 ATM 参与 G<sub>2</sub>/M 期阻滞<sup>[19]</sup>。ATM 在 DNA 损伤或复制受阻时能使 CHK2 Thr<sup>68</sup> 磷酸化, 而 CHK2 又使 CDC25 磷酸酯酶磷酸化, 最终将细胞周期中止在 G<sub>2</sub> 期。另外, CHK2 的激活可能还存在 ATM/ATR 非依赖性途径。

### 4 辐射诱导细胞周期改变的生物学意义

迄今为止, 辐射诱导细胞周期不同时相阻滞的

生物学意义尚未完全阐明。有学者认为, 这是机体的一种保护性反应, 目的在于确保基因组的遗传稳定性。G<sub>1</sub> 期阻滞和 S 期延迟, 一方面对损伤的 DNA 进行修复, 另一方面对不能修复的损伤细胞诱导凋亡, 以降低基因组不稳定性、减少细胞突变及癌变; G<sub>2</sub>/M 期阻滞可以保证有丝分裂分配的忠实性。

但是, 并非所有辐射后的细胞都能通过细胞周期延迟以产生保护。当它们没有足够时间进行修复时, DNA 复制将产生染色体断裂和(或)重排, 最终导致基因扩增、延迟的突变, 基因组不稳定性, 出现细胞恶性转化, 发生肿瘤。例如, 当 G<sub>1</sub> 期主要调控分子 P53 出现异常时, 受照细胞难以完成 G<sub>1</sub> 期阻滞而呈现肿瘤。Jiang W 等<sup>[20]</sup>对 P53 阳性及阴性大鼠进行 UV 照射(光谱在 250nm~400nm), 每周照射 3 次, 共 30 周, 研究结果发现, P53 阴性大鼠的胸腺、脾淋巴瘤发生率明显高于 P53 阳性大鼠。随后, Schwartz JL 等<sup>[21]</sup>在体外采用淋巴母细胞进一步验证了 P53 在 G<sub>1</sub> 期阻滞中的重要作用。由此可以推测, 无 G<sub>1</sub> 期阻滞的细胞将带有更多的损伤 DNA, 从而导致该细胞基因组的不稳定性, 增加了癌变的危险度。

另一方面, 正是由于这种细胞周期阻滞的自我保护机制, 使肿瘤细胞可以逃避放射性杀伤, 导致放射抗拒, 严重影响到恶性肿瘤放疗效果。如何去除阻滞以提高肿瘤辐射敏感性已是当前放疗研究的焦点之一。国内外已经有许多研究者致力于研发抗肿瘤新药, 其药物作用机制即为消除细胞周期阻滞。美国已将此类药物作为放射治疗增敏剂引入临床 I 期实验阶段。目前最常用的有两大类: 咖啡因类, 如咖啡因、己酮可可碱(pentoxifylline, PTX); Stau-rosporine 类, 如 UCN-01(7-hydroxystaurosporine)等。照射以前给予一定浓度的咖啡因, 可以使细胞出现 AT 样表型, 破坏 G<sub>2</sub>/M 期检查点, 缩短 G<sub>2</sub>/M 期阻滞时间, 使损伤的 DNA 在染色体分离前不能得到完全修复, 细胞带着受损的 DNA 提前进入增殖周期, 结果启动了凋亡程序, 导致肿瘤细胞的凋亡<sup>[22]</sup>。UCN-01 是一种选择性蛋白激酶 C 的抑制剂, 能够去除 G<sub>2</sub> 期阻滞, 导致细胞凋亡增加, 降低细胞存活率, 增加放疗的杀伤效果<sup>[23]</sup>。现今, 此类型放疗增敏剂已经在临床上显现出良好的应用前景。

## 5 结语

尽管有关辐射诱导细胞周期改变的研究取得了长足进展,但由于细胞周期调控系统本身的精细、复杂,信号通路的相互联结、网络化,实际上,我们对本领域的认识还十分有限。目前仍有诸多问题亟待解决,如:究竟有哪些通路参与各期检查点的调控?其中的开关分子及下游反应元件有哪些?这些通路又是如何联系的?电离辐射与非电离辐射的调控是否存在差异等。可以肯定,对上述问题的进一步研究将会为深入阐明辐射细胞生物学、制定辐射防护措施及提高放射治疗的敏感性提供新思路和新策略。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Foray N, Marot D, Gabriel A, et al. A subset of ATM-and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein[J]. *EMBO J*, 2003, 22(11): 2860-2871.
- [ 2 ] Zhang Y, Ma WY, Kaji A, et al. Requirement of ATM in UVA-induced signaling and apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(5): 3124-3131.
- [ 3 ] Syljuasen RG, Krolewski B, Little JB. Molecular events in radiation transformation[J]. *Radiat Res*, 2001, 155(1 Pt 2): 215-221.
- [ 4 ] Matsui Y, Tsuchida Y, Keng PC. Effects of p53 mutations on cellular sensitivity to ionizing radiation[J]. *Am J Clin Oncol*, 2001, 24(5): 486-490.
- [ 5 ] DeSimone JN, Bengtsson U, Wang X, et al. Complexity of the mechanisms of initiation and maintenance of DNA damage-induced G2-phase arrest and subsequent G1-phase arrest: TP53-dependent and TP53-independent roles [J]. *Radiat Res*, 2003, 159(1): 72-85.
- [ 6 ] Wieler S, Gagne JP, Vaziri H, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a positive regulator of the p53-mediated G1 arrest response following ionizing radiation [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(21): 18914-18921.
- [ 7 ] Xie G, Habbersett RC, Jia Y, et al. Requirements for p53 and the ATM gene product in the regulation of G1/S and S phase checkpoints[J]. *Oncogene*, 1998, 16(6): 721-736.
- [ 8 ] Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53[J]. *Science*, 1998, 281(5383): 1677-1679.
- [ 9 ] Maya R, Balass M, Kim ST, et al. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(9): 1067-1077.
- [ 10 ] Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, et al. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53 [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(2):152-157.
- [ 11 ] Zhou XY, Wang X, Wang H, et al. Ku affects the ATM-dependent S phase checkpoint following ionizing radiation[J]. *Oncogene*, 2002, 21(41): 6377-6381.
- [ 12 ] Wang X, Li GC, Iliakis G, et al. Ku affects the CHK1-dependent G(2) checkpoint after ionizing radiation[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(21): 6031-6034.
- [ 13 ] Paull TT. New glimpses of an old machine [J]. *Cell*, 2001, 107(5): 563-565.
- [ 14 ] Paull TT, Gellert M. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(10): 1276-1288.
- [ 15 ] Lim DS, Kim ST, Xu B, et al. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway [J]. *Nature*, 2000, 404(6778): 613-617.
- [ 16 ] Metting NF, Little JB. Transient failure to dephosphorylate the cdc2-cyclin B1 complex accompanies radiation-induced G2-phase arrest in HeLa cells [J]. *Radiat Res*, 1995, 143(3): 286-292.
- [ 17 ] Hain J, Weller EM, Jung T, et al. Effects of ionizing-and UV B-radiation on proteins controlling cell cycle progression in human cells: comparison of the MCF-7 adenocarcinoma and the SCL-2 squamous cell carcinoma cell line [J]. *Int J Radiat Biol*, 1996, 70(3): 261-271.
- [ 18 ] Cortez D, Guntuku S, Qin J, et al. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling [J]. *Science*, 2001, 294(5547): 1713-1716.
- [ 19 ] Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(17): 2177-2196.
- [ 20 ] Jiang W, Ananthaswamy HN, Muller HK, et al. UV irradiation augments lymphoid malignancies in mice with one functional copy of wild-type p53[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(17): 9790-9795.
- [ 21 ] Schwartz JL, Jordan R, Evans HH, et al. The TP53 dependence of radiation-induced chromosome instability in human lymphoblastoid cells [J]. *Radiat Res*, 2003, 159(6): 730-736.
- [ 22 ] Sarkaria JN, Busby EC, Tibbetts RS, et al. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(17): 4375-4382.
- [ 23 ] Tenzer A, Pruschy M. Potentiation of DNA-damage-induced cytotoxicity by G2 checkpoint abrogators[J]. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, 2003, 3(1): 35-46.