

文章编号:1001-098X(2004)05-0234-03

# 辐射诱导旁效应研究进展

秦阳华 韩玲

**摘要** 随着人们对低剂量辐射后发生的间接和延迟效应(如突变、基因不稳定性)的重视,以及新的高效工具(如单细胞微束和先进的培养系统)的应用,过去的十几年对辐射诱导旁效应的产生机制有了许多新的认识和发现。辐射诱导旁效应是受基因调控,由细胞间信号传递途径中介产生的。

**关键词** 电离辐射;旁效应;细胞间活性氧;间隙连接;一氧化氮

中图分类号 R730.231.2 文献标识码 A

## Progress of radiation-induced bystander effect

QIN Yang-hua, HAN Ling

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

**Abstract** With the increased awareness of the contribution of indirect and delayed effects (such as mutation, genomic instability) to cellular outcomes after low-dose exposures, and the availability of tools (such as the microbeam and advanced cell culture systems), many new discoveries about radiation-induced bystander effect has been achieved in the past decade. Evidence accumulated has indicated that radiation-induced bystander effect is regulated by special genes, and mediated by intercellular signal transmission pathway.

**Key words** ionizing radiation; bystander response; reactive oxygen species; gap-junction inter-cellular communication; nitric oxide

### 1 概述

辐射诱导旁效应是指未直接受照射的细胞表现出与受照射细胞类似的生物学反应,包括细胞凋亡或延迟死亡、基因不稳定性、突变、基因表达改变、炎症反应、微核形成以及细胞生长异常等。1992年, Nagasawa H 等<sup>[1]</sup>首先报道了极低剂量的高传能线密度(linear energy transfer, LET)射线照射细胞诱发的旁效应,他们发现不到1%的中国仓鼠卵巢细胞被 $\alpha$ 粒子击中,却有30%的细胞表现出了姊妹染色体交换(sister chromatid exchanges, SCE)。

近年来,人们对辐射诱导旁效应的研究越来越感兴趣,这主要是因为人们对低剂量辐射后发生的间接和延迟效应(如突变、基因不稳定性)的重视,以及新的高效工具如单细胞微束和先进的培养系统的应用,使得以前无法研究的终点(如基因

或蛋白表达)成为可能。经过十几年的研究表明,受照细胞主要通过两条通路将损伤信号传递到旁效应细胞:一个是受照细胞分泌各种细胞因子,通过NADPH(还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)/NF- $\kappa$ B(核因子- $\kappa$ B)使得发生旁效应细胞间活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平上升;另一个是受肿瘤抑制基因p53产物调控的依赖间隙连接细胞间通讯(gap-junction intercellular communication, GJIC)的通路。

### 2 ROS和辐射旁效应

ROS是由氧化代谢产生的一些高活性的基团,主要是 $O_2^-$ 和 $H_2O_2$ 。ROS在生物体内有广泛的生物学效应,它参与了辐射诱导旁效应。研究发现,许多可溶性因子传递了损伤信号。

#### 2.1 研究发现的可溶性诱导因子

无细胞含血清的培养基接受低剂量 $\alpha$ 粒子辐射后可引起未受照细胞产生SCE,这种现象可以

作者单位:200433 上海,第二军医大学海医系放射医学教研室

被超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 所抑制, 后继试验表明, 基质来源的因子是短期存活的, 一般认为是血清组份受照射后产生的 ROS<sup>[2]</sup>。

早期的换液实验表明, 基质中存在可长期存活的诱导因子, 能够经受冻融并且具有热不稳定性, 虽然这些诱导因子在细胞内有明确作用, 但对于在细胞外是怎样发挥作用的还不清楚<sup>[2]</sup>。

最近的研究发现, 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 参与诱导了辐射旁效应。NO 具有可渗透性、高反应活性和分子质量小的特点, 是体内常见的生物信号和调节子, 可以降低细胞内谷胱甘肽水平产生氧化应激 (oxidative stress), 与过氧化基团反应形成 ROS。Matsumoto H 等<sup>[3]</sup>用 X 射线照射两种恶性胶质瘤细胞: 含有突变型 p53 基因的 A-172/mp53 和含有野生型 p53 基因的 A-172/wp53, 发现受照射的 A-172/mp53 细胞内存在可诱导 NO 合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 堆积, 而 A-172/wp53 细胞无此现象; 与受照的 A-172/mp53 细胞一起孵育, A-172/wp53 细胞内出现 TP53 蛋白和热休克蛋白 (heat-shock protein72, HSP72) 堆积, 其可被培养基中加入氨基胍 (iNOS 抑制剂) 所抑制; 用俘获受照的 A-172/mp53 细胞的培养液培养 A-172/wp53 细胞也可引起 TP53 蛋白和 HSP72 堆积, 并且可以被 NO 清除剂抑制。Shao C 等<sup>[4]</sup>利用 290MeV/u 的碳束以不同的 LET 和剂量照射人唾液腺肿瘤细胞, 再与未照射的细胞一起培养, 发现未照射的细胞接种效率和增殖得到加强, 并且与 LET 和剂量大小呈正相关。在加入 PTIO (一种 NO 特异的清除剂) 后, 降到对照水平。Wang Z 等<sup>[5]</sup>用腺病毒载体将 iNOS 转染到结直肠癌细胞, 在很低的转染效率 (4%) 下可显著提高辐射诱导的细胞凋亡和肿瘤放射敏感性, 并且可以被 iNOS 抑制剂所抑制。

## 2.2 旁效应细胞内生物反应

利用荧光探针研究表明, 暴露于低剂量的  $\alpha$  粒子后, 被照射细胞和旁效应细胞内有  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  产生, 并且和细胞膜上 NAD(P)H 氧化酶有关,  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  的产生可被 SOD 抑制<sup>[6]</sup>。

通过研究基因表达证实, 人双倍体成纤维细胞受极低剂量的  $\alpha$  粒子照射后引起氧化代谢的上调诱导了旁效应反应。Azzam EI 等<sup>[7]</sup>以 p21<sup>Waf1</sup> 的表达作为研究终点, 接受 0.3cGy  $\alpha$  粒子照射后, 通过原位免疫荧光检测证实, 人双倍体细胞内 p21<sup>Waf1</sup> 表

达得到加强的细胞比实际被  $\alpha$  粒子击中 (2%) 的要多很多。这个结果与平行的 Western 杂交结果一致。活性 SOD 和过氧化氢酶可抑制旁效应细胞内 p21<sup>Waf1</sup> 和上游诱导基因 p53 的表达。由于 DPI (diphenyliodonium, 一种含黄素的氧化酶抑制剂) 可以抑制 p21<sup>Waf1</sup> 和上游诱导基因 p53 的表达, 证实 ROS 来源于含有黄素的氧化酶 [推测是 NAD(P)H 氧化酶]。通过关于人类细胞的研究表明,  $\alpha$  粒子诱发代谢性 ROS 产物可以激活发生旁效应细胞的信号通路。与接受极少  $\alpha$  粒子照射的细胞共培养的细胞, 代谢产生的  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  参与了 p53 途径和 MAPK (促细胞分裂剂激活的蛋白激酶) 途径一些蛋白的表达调节和激活过程。上述效应可以被 SOD 和过氧化氢酶抑制, 同时一些氧化还原敏感的转录因子也被抑制。最近的研究表明, Cu-Zn SOD 异位过量表达可显著抑制旁效应引起的 p21<sup>Waf1</sup> 产生。

研究证实, 许多可溶性调节因子与细胞表面受体结合后可快速激活 NAD(P)H 氧化酶。NAD(P)H 氧化酶可催化  $O_2$  生成  $O_2^-$ , 电子由 NADPH 提供, 产生的  $O_2^-$  可继续与水反应产生  $H_2O_2$ , 生成的 ROS 被释放到细胞内环境中, 可与周围的细胞、蛋白、脂质等相互产生和发挥各种生物反应<sup>[8]</sup>。许多实验证实, DPI 敏感的氧化酶 (可以推测是 NAD(P)H 氧化酶) 参与了辐射诱导的旁效应。

## 3 GJIC 和辐射诱导旁效应

间隙连接存在于几乎所有动物细胞膜上, 由相连细胞膜上两个半通道 (connexon) 组成, 每个半通道又由数个连接蛋白 (connexin) 聚合而成。连接蛋白是一个蛋白超家族, 如 connexin26、connexin37、connexin43, 不同的连接蛋白有不同的电导和渗透性, 决定了间隙连接的渗透性和对通过物质的选择性。

Azzam EI 等<sup>[9]</sup>将汇合的人成纤维细胞 (富含和缺乏 GJIC) 暴露于极低量的  $\alpha$  粒子, 只有 5% 的细胞被  $\alpha$  粒子击中, 发现近 30% 富含 GJIC 的旁效应细胞内 p53/p21<sup>Waf1</sup> 应激诱导信号通路的相关蛋白表达上调, 并有微核 (micronucleus) 形成, 而在缺乏 GJIC 的细胞未观察到上述效应。受照射细胞用间隙连接阻遏剂如林丹、DDT、dieldrin 等预处理可抑制上述旁效应。一对同基因 GJIC 功能不同的大鼠上皮细胞暴露于  $\alpha$  粒子, 通过原位免疫杂交发现只有富含 GJIC 的旁效应细胞出现 p21<sup>Waf1</sup> 表

达, 并且, p21<sup>Waf1</sup> 表达上调的细胞成簇存在也支持损伤信号通过 GJIC 由辐射细胞进入旁效应细胞。相反, 缺乏 GJIC 的细胞受极低剂量的  $\alpha$  粒子照射后, 只有单个孤立的被  $\alpha$  粒子击中的细胞出现 p21<sup>Waf1</sup> 表达上调。通过基因工程证实, 旁效应由 connexin 43 构成的间隙连接介导。

利用微束研究辐射突变的实验进一步证实了 GJIC 在辐射诱导旁效应中的作用。Zhou HN 等<sup>[10]</sup>用  $\alpha$  粒子微束照射中国仓鼠卵巢细胞和人 AL 杂交细胞, 发生基因突变的几率是预期的 3 倍, GJIC 阻遏剂林丹或辛醇可以明显降低突变几率。与此相似, connexin 43 基因不表达的细胞可显著消除旁效应, 而 connexin 43 基因异位过量表达的细胞突变增强<sup>[11]</sup>。

最近的研究表明, 很多人和啮齿动物的细胞在接受 0.16cGy 的  $\alpha$  粒子辐射后就可以显著诱导 connexin 43 基因的表达。 $\alpha$  粒子、 $\gamma$  射线、氧化物包括过氧化氢都可上调 connexin 43 基因的 mRNA 和蛋白水平, 并且可以稳定 connexin 43 蛋白, 诱导 connexin 43 蛋白磷酸化。Connexin 43 蛋白表达增强并发生磷酸化和 GJIC 增强, 提示受照细胞可以和未照细胞进行有效通讯<sup>[12]</sup>。

许多实验证实, GJIC 参与了辐射诱导的旁效应, 不过还不知道通过间隙连接传递的因子是离子、第二信使还是别的小分子物质? 此问题还有待进一步研究。

#### 4 问题和展望

经过近 20 年的研究, 取得了许多有关辐射诱导旁效应机制的研究成果, 然而还有许多问题有待解决。不同细胞株、不同辐射种类, 其旁效应的表现也不同。许多研究表明, ROS 途径和 GJIC 途径好象是两个独立的通路。但是, 有意思的是, 一些研究表明, 这两个通路之间是相互协同的, 如 ROS 激活的激酶 (如细胞膜上的 MAPK 超家族) 参与激活间隙连接蛋白, 而我们已经知道 MAPK 参与了 GJIC 途径介导的旁效应<sup>[13]</sup>。Echetebu CO 等<sup>[14]</sup>发现, connexin 基因启动子部位有  $\alpha$  粒子辐射诱导产生的 ROS 激活的转录因子 AP-1 和 NF- $\kappa$ B 的结合区域。

随着新的研究工具如单粒子微束的应用和对特

定蛋白的研究, 将有可能发现旁效应因子的本质和分子机制, 使我们可以更好地评估低剂量辐射危害和防止辐射远后效应。

#### 参 考 文 献

- 1 Nagasawa H, Little JB. Induction of sister-chromatid exchanges by extremely low doses of alpha particles[J]. *Cancer Res*, 1992, 52(22): 6394-6396.
- 2 Azzam EI, de Toledo SM, Little JB, et al. Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect [J]. *Oncogene*, 2003, 22(45): 7050-7057.
- 3 Matsumoto H, Hayashi S, Hatashita M, et al. Induction of radioresistance by a nitric oxide-mediated bystander effect[J]. *Radiat Res*, 2001, 155(3): 387-396.
- 4 Shao C, Furusawa Y, Aoki M, et al. Nitric oxide-mediated bystander effect induced by heavy-ions in human salivary gland tumour cells[J]. *Int J Radiat Biol*, 2002, 78(9): 837-844.
- 5 Wang Z, Cook T, Alber S, et al. Adenoviral gene transfer of the human inducible nitric oxide synthase gene enhances the radiation response of human colorectal cancer associated with alterations in tumor vascularity[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(4): 1386-1395.
- 6 Narayanan PK, Goodwin EH, Lehnert BE. Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(18): 3963-3971.
- 7 Azzam EI, De Toledo SM, Spitz DR, et al. Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(19): 5436-5442.
- 8 Babior BM. NADPH oxidase[J]. *Curr Opin Immunol*, 2004, 16(1): 42-47.
- 9 Azzam EI, de Toledo SM, Little JB. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to non-irradiated cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(2): 473-478.
- 10 Zhou HN, Randers-Pehrson G, Waldren CA, et al. Induction of a bystander mutagenic effect of alphaparticles in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 2099-2104.
- 11 Zhou HN, Suzuki M, Randers-Pehrson G. 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.
- 12 Azzam EI, de Toledo SM, Little JB. Expression of connexin43 is highly sensitive to ionizing radiation and other environmental stresses[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(21): 7128-7135.
- 13 Lampe PD, Lau AF. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins[J]. *Arch Biochem Biophys*. 2000, 384(2): 205-215.
- 14 Echetebu CO, Ali M, Izbán MG. Localization of regulatory protein binding sites in the proximal region of human myometrial connexin 43 gene[J]. *Mol Hum Reprod*. 1999, 5(8): 757-766.

(收稿日期: 2004-05-08)