

nary arteries in swine[J]. Cardiovasc Radiat Med, 2001, 2(4): 225-230.
10 Mazur W, Ali MN, Khan MM, et al. High dose-rate intracoronary radiation for inhibition of neointimal formation in stented and balloon-injured porcine models of restenosis: Angiographic,

morphometric and histopathologic analyses[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996, 36(4): 777-788.

(收稿日期: 2004-12-04)

文章编号: 1001-098X(2005)01-0040-04

PI3K/Akt 与胶质瘤辐射抗性

薛景 刘芬菊

摘要 恶性脑胶质瘤的术后治疗是患者预后生存期延长的关键, 如何提高肿瘤组织的辐射敏感性, 增强正常组织的辐射抗性是当前肿瘤放射生物学及临床放疗研究的热点。研究资料表明, PI3K/Akt 抗细胞凋亡通路的激活提高了部分细胞的辐射抗性, 特别在表皮细胞受紫外线照射的研究中提示, 辐射产生的活性氧可能是该通路激活的原因之一; 电离辐射可能诱导相关的细胞因子通过激活 PI3K/Akt 通路介导胶质瘤细胞的辐射抗性; PI3K 及其相关酶可能通过 DNA 修复途径发挥抗辐射作用。PI3K/Akt 通路的研究可为放射治疗胶质瘤提供新型的增敏药。

关键词 PI3K/Akt; 胶质瘤; 辐射抗性

中图分类号 R730.55 文献标识码 A

PI3K/Akt and radioresistance of glioma

XUE Jing, LIU Fen-ju

(Radiation Medicine and Public Health School, Soochow University, Soochow 215006, China)

Abstracts The post operation therapy on the malignant cerebral glioma is a key to the life extension of a patient. It is a hotspot in radiobiology of tumor and radiotherapy to study how to enhance the radiosensitivity of the tumor tissues and increase the radioresistance of the normal tissues. It was found that activation of PI3K/Akt pathway, an anti-apoptosis pathway, may result in enhancement of radioresistance of some cell lines. Particularly, in researches of ultraviolet (UV) radiation on epidermic cells. It was found that the reactive oxygen species(ROS) induced by UV may be one of the causes to activate the PI3K/Akt. Induction of relative cytokines by ionizing radiation may mediate radioresistance of glioma through PI3K/Akt. It was also found that PI3K and relative kinase may enhance radioresistance of cells through DNA repair. In a word, researches of PI3K/Akt pathway may provide some new radiosensitizers for radiotherapy of glioma.

Key words PI3K/Akt; glioma; radioresistance

胶质瘤是胶质细胞源性的良、恶性中枢神经系统肿瘤, 包括星形细胞起源的恶性胶质母细胞瘤(malignant glioblastoma, GBM)、星形细胞瘤, 以及少突胶质细胞瘤和室管膜细胞瘤等。其中 GBM 是成人原发性脑肿瘤中最普遍的亚型, 侵袭性高, 经常浸润周围正常的脑组织。尽管有多种治疗技术, 但 GBM 的平均生存时间在近数十年几乎没有延长, 一般在诊断后 6~12 月^[1]。放射治疗是对 GBM

最有效的辅助治疗, 但正常脑组织的耐受剂量不足以杀死 GBM 细胞^[1-2]。因此, 对胶质瘤辐射抗性的研究意义很大。

磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphoinositide3-kinase, PI3K) 是一种重要的细胞信号蛋白, 它是 Ras 蛋白的效应子之一, 可为 Ras 蛋白所活化。PI3K 含有一个相对分子质量为 85 000(p85)的调节亚基和一个相对分子质量为 110 000(p110)的催化亚基, 它催化磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(phosphatidylinositol 4,5-P₂, PtdIns 4,5-P₂)磷酸化生成 PtdIns 3,4,5-P₃。这一反

应的产物能活化 Akt。Akt 又称蛋白激酶 B, 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。活化的 Akt 能使 caspase9 酶原大亚基的第 196 位丝氨酸磷酸化, 使其不能参与具有凋亡执行功能的 caspase3 的活化; 活化的 Akt 还能使 BAD (bcl-xL/bcl-2 associated death promoter)磷酸化, 从而使其失去阻断 Bcl-2 蛋白的功能。因此, PI3K/Akt 是重要的抗细胞凋亡通路^[3]。

1 辐射可能激活 PI3K/Akt 通路

1.1 PI3K/Akt与辐射抗性的关系

关于 PI3K/Akt 与辐射抗性关系的研究多采用 PI3K 的相对特异性抑制剂渥曼青霉素(Wortmannin, WT)和 LY294002, 或者通过表达 PI3K 的负显性亚单位, 使 PI3K 的调节亚基或催化亚基功能失活。Tomita M 等^[4]发现, WT 可以提高体外培养的中国仓鼠细胞 V79 对热和 X 射线的敏感性: 当 WT 的终浓度为 5 μ mol/L 时, 辐射增敏效应最明显, 克隆形成试验和染色排斥试验的数据支持这一结果, 同时多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶测定结果显示 WT 的辐射增敏作用部分是通过提高细胞凋亡来介导。Cataldi A 等^[5]发现, Friend 红白血病 (Friend erythroleukemia) 细胞经 15Gy 电离辐射照射后, PI3K/Akt 通路被激活, 同时提高修复相关酶——DNA 聚合酶 β 的活性, 用 100nmol/L WT 和 100nmol/L LY294002 预培养 60min 后, 该通路被抑制, 细胞的辐射抗性下降。Tachiiri S 等^[6]把缺失型 p85 基因 (Dp 85) 引入黑色素瘤细胞系 G361, 观察引入 Dp85 后细胞对顺铂和紫外线辐射的反应, 与转染空载体的对照细胞相比, 转染 Dp85 后 G361 对顺铂和紫外线的敏感性增加, 该结果提示 PI3K 功能的正常对决定细胞(包括紫外线辐射在内的基因)毒性应激的抗性可能有一定作用。

PI3K/Akt 与肿瘤血管内皮细胞的辐射抗性也有关。Edwards E 等^[7]研究了 WT 和 LY294002 对血管内皮辐射抗性的影响: 肿瘤血管窗和多普勒超声的结果显示二者提高了辐射对肿瘤血管的破坏。

另外, Wickremasinghe RG 等^[8]采用自体血浆培养与胎牛血清培养细胞相比显示, 基础凋亡率下降, 苯丁酸氮芥和辐射所致细胞毒性反应也降低; 自体血浆激活了 Akt, 提高了慢性 B 型淋巴细胞白血病(B-chronic lymphocytic leukemia, B-CLL)细胞对 DNA 损伤诱导细胞凋亡的抗性; 中和抗体实验表

明血浆的保护效应不能用白细胞介素-4、 α 和 γ 干扰素、干细胞源性生长因子 1 解释, 而这些都已证明与体外抑制 B-CLL 细胞凋亡有关; 加入自体血浆后, Akt 被迅速激活, 而用 LY294002 可以阻止血浆的激活效应。继而该研究组^[9]发现: 白蛋白是血浆性保护效应的主要成分, 凝胶过滤层析得到不含白蛋白的全血浆或血清蛋白缺乏症患者的血浆都不能激活 B-CLL 细胞的 Akt, 也不能抑制苯丁酸氮芥诱导的凋亡, 加入白蛋白后, 则恢复了血浆的保护性效应, 荧光活化细胞分离器分析证实了 B-CLL 细胞摄取了白蛋白, 共聚焦显微镜显示白蛋白在细胞内小囊泡内的积聚; 用 LY294002 可逆转血浆白蛋白的作用。可见, PI3K/Akt 通路的激活与 DNA 损伤后细胞的保护性效应有关。

1.2 辐射激活 PI3K/Akt 通路的机制

关于 PI3K/Akt 通路的激活与辐射抗性相关的机制的研究有了一些初步结果。Cataldi A 等^[10]发现, 鼠红白血病(murine erythroleukemia)细胞受 15Gy 的电离辐射照射后, PI3K 亚单位 p85 α 被激活, 并介导了下游蛋白激酶 C θ 的激活, 同时 5-溴-2-脱氧尿苷掺入率提高; 用 WT 处理后, 细胞凋亡增加, 蛋白激酶 C θ 的核易位被抑制, 说明 PI3K/蛋白激酶 C θ 通路可能与辐射抗性有关。Ibuki Y 等^[11]在研究紫外线 B 对 NIH3T3 细胞的作用时发现, 紫外线 B 辐照后, caspase 通路下游的 caspase-3/caspase-7、caspase-8/caspase-6、caspase-9 的活性下降, 而用 WT 处理后, 恢复了 caspase-3/caspase-7 的活性; 紫外线 B 照射后 5min, Akt 被磷酸化。这些结果提示紫外线 B 通过 PI3K/Akt 通路诱导了 caspase 级联上游的一些凋亡抑制因子。Wan YS 等^[12]为进一步确定紫外线能否激活 PI3K/Akt 通路, 在人表皮体内实验中检测了表皮细胞在紫外线照射后不同时间 PI3K、Akt 的活性, 结果 2 倍紫外线 B 的平均最小红斑量照射后 15min 内 PI3K 被激活, 30min 后活性达到最高, 并持续了 4h; 照射后 30min, Akt 被激活, 1h 后活性达到最高; 紫外线也激活了 Akt 下游的 S6K 和 BAD 的磷酸化, S6K 在紫外线照射后 4h 活性达到最高, 紫外线照射后 1hBAD 的磷酸化增加并持续了 4h, Western 印迹法显示紫外线诱导 BAD 在第 112 位丝氨酸磷酸化, 该位点也是 Akt 激活 BAD 的位点, 用表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptors, EGFR)和 PI3K 的抑制剂都

能抑制紫外线诱导的 BAD 的磷酸化, 表明 EGFR 介导了紫外线激活的 PI3K/Akt 通路。进一步的研究发现, 紫外线照射产生的活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 在介导激活 PI3K/Akt 通路中可能起作用。Zhang WS 等^[13] 用紫外线照射体外培养的人角质细胞发现, 细胞中有丝分裂原活化蛋白激酶 (P38) 和 Akt 被激活, 且其磷酸化水平呈时间依赖性变化; 用过氧化氢 (H₂O₂) 也能诱导 P38 和 Akt 的磷酸化, 其水平呈时间依赖性; 而用乙酰半胱氨酸则消除了紫外线诱导的 Akt 的磷酸化, 表明 ROS 与 Akt 的磷酸化有关。有趣的是, 用已知 P38 的抑制剂可以部分抑制紫外线诱导的 Akt 的磷酸化, 进一步的研究表明, 类似肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素-1 β 的细胞因子也可以诱导 Akt 的磷酸化水平呈时间依赖性变化, 用 P38 抑制剂可以抑制白细胞介素- β 诱导的 P38 和 Akt 的磷酸化, 提示紫外线可能通过产生的 ROS 引起相关细胞因子的释放并激活 P38, 继而反馈调节 PI3K/Akt 通路。

另外, Umeda J 等^[14] 研究表明, PI3K/Akt 通路可与 Bcl-x1 (Bcl-2 家族成员之一) 共同配合介导表皮角质细胞对紫外线的抗性。体内实验表明, Bcl-x1 缺失的小鼠表皮用 WT 局部处理后对紫外线 B 高度敏感, 而野生型小鼠表皮同样处理后几乎没有影响。进一步研究显示, 紫外线辐射导致了磷酸化 Akt 在表皮内空间上的再分布——从基底层到基底层以上, 而 Bcl-x1 正常定位于表皮的上层, 提示 Akt 能在空间上配合 Bcl-x1 抵抗紫外线 B 辐射。

2 PI3K/Akt 通路 & 胶质瘤辐射抗性的关系

国外的分子遗传学研究^[15] 表明, GBM 与 EGFR 的基因突变和扩增相关, 国内的相关研究^[16] 结果也类似。但是用抗 EGFR 治疗 GBM 时, 发现仍然存在对辐射抵抗的胶质瘤细胞, 并发现了细胞中胰岛素样生长因子受体-1 的上调, 导致了 PI3K/Akt 通路的持续激活^[17]。Chakravarti A 等^[18] 在研究恶性胶质瘤对联合放、化疗的疗效观察时发现, 体外培养的三种胶质瘤细胞中, EGFR 通过 Ras/PI3K/Akt 通路激活抗凋亡通路是其原因之一; 有趣的是, 结果显示卡氮芥 (抗肿瘤药物/烷化剂) 通过 EGFR/PI3K/Akt 通路抑制了辐射诱导的凋亡, 而辐射也被发现通过几乎同样的通路抑制卡氮芥诱导的凋亡; 用 PI3K 上游的 EGFR、Ras 蛋白的抑制剂都

能消除依次放疗和化疗之间的相互拮抗作用, 而且观察到联合放、化疗后与单独放、化疗相比很大程度上提高了细胞的凋亡, 提示 PI3K/Akt 通路在介导 EGFR 对放、化疗的抗性中发挥关键作用。辐射可能产生某些细胞因子影响 EGFR 或胰岛素样生长因子受体-1 的表达水平来激活 PI3K/Akt 抗凋亡通路, 这可能是细胞的辐射保护效应之一。

目前对 PI3K/Akt 通路 & 辐射诱导胶质瘤细胞凋亡关系的研究报道甚少。神经酰胺可能是辐射诱导细胞凋亡的决定性因子之一^[19,20]。Michae JM 等^[21] 检测了多种细胞在辐射照射后细胞内神经酰胺的水平; 辐射抗性的胶质瘤细胞 MO59K 经 10Gy 照射后 10min 神经酰胺没有积聚, 而同样条件下辐射敏感的 Burkitt 淋巴瘤细胞 BL30A 则提高了 4 倍。Gomez Del 等^[19] 发现, 大麻素类通过激活 PI3K/Akt 通路抑制了神经酰胺诱导的星形胶质细胞凋亡, 并存在剂量效应和时间效应。在某些细胞中, 辐射是否能激活 PI3K/Akt 通路阻止神经酰胺的生成从而表现出辐射抗性, 还有待进一步的研究。

3 WT 对胶质瘤辐射抗性的影响

Kubota N 等^[22] 在研究携带突变型和野生型 p53 基因的胶质瘤细胞对辐射的抗性中发现, 野生型细胞经 6Gy X 射线照射, WT 抑制了 P53 和 CDKN1A (P21 WAF1) 蛋白的积聚; 突变型细胞经 X 射线诱导的 P53 蛋白的积累和 P21 蛋白的表达增加不明显, 加用 WT 后也基本没有变化; 但是, 20 μ mol/L WT 提高了两种细胞对辐射的敏感性。这些结果提示 WT 抑制 P53 蛋白的上调, 但不足以解释 WT 的辐射增敏作用, 即 WT 的辐射增敏作用可能不依赖 P53 蛋白。作者认为, 抑制 PI3K 相关的激酶可能是辐射增敏的新方法。该研究组^[23] 还发现, WT 的辐射增敏作用在 pH 值低的培养条件下效果好。然而, Okaichi 等^[24] 发现, 低剂量的 WT (低于 1 μ mol/L) 降低了人胶质瘤细胞 A172 (携带野生型 p53 基因) 的辐射敏感性, 没有影响 P53 的积聚和 P53 蛋白在第 15 位 Ser 的磷酸化, 然而降低了 P21 蛋白的诱导并提高了生长阻滞和 DNA 损伤基因 45 (growth arrest and DNA damage gene 45, GADD45) 的表达; 而且低剂量的 WT 提高了辐射后 G₁、M 期细胞的比例, 并降低了 G₂/M 期细胞的比例。PI3K 激酶或其他 WT 敏感性酶可能影响 X 射线照

射后细胞周期进程的变化。

4 存在的问题及展望

电离辐射对细胞的作用主要通过两个途径：核DNA损伤和辐射产生的自由基引起的质膜损伤。但是，DNA损伤和自由基作用于细胞的信号通路还没有完全阐明。PI3K/Akt通路是抗细胞凋亡通路，而PI3K或PI3K相关的激酶可能参与DNA的修复过程，两个方面都可能提高细胞的辐射抗性。WT的应用有利于研究PI3K的功能。在胶质瘤辐射抗性的研究中，PI3K/Akt通路的研究可能会为放射治疗脑胶质瘤提供新型的放射增敏药。有关电离辐射对该通路或PI3K及其相关酶活性是否影响及其机制、胶质瘤细胞中PI3K、Akt的存在状态与辐射抗性的关系都有待进一步的探讨。

参 考 文 献

- 1 Castro MG, Cowen R, Williamson IK, et al. Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors[J]. *Pharmac Therapeutics*, 2003, 98(1): 71-108.
- 2 Yount GL, Afshar G, Ries S, et al. Transcriptional activation of TRADD mediates p53-independent radiation-induced apoptosis of glioma cells[J]. *Oncogene*, 2001, 20(22): 2826-2835.
- 3 翟中和, 王喜忠, 丁明孝等. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000, 464.
- 4 Tomita M, Suzuki N, Matsumoto Y, et al. Sensitization by wortmannin of heat- or X-ray induced cell death in cultured Chinese hamster V79 cells[J]. *J Radiat Re*, 2000, 41(2): 93-102.
- 5 Cataldi A, Zauli G, Di Pietro R, et al. Involvement of the pathway phosphatidylinositol-3-kinase/AKT-1 in the establishment of the survival response to ionizing radiation[J]. *Cell Signall*, 2001, 13(5): 369-375.
- 6 Tachiiri S, Sasai K, Oya N, et al. Enhanced cell killing by over-expression of dominant-negative phosphatidylinositol 3-kinase subunit, Deltap85, following genotoxic stresses[J]. *Japan J Cancer Res*, 2000, 91(12): 1314-1318.
- 7 Edwards E, Geng L, Tan J, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(16): 4671-4677.
- 8 Wickremasinghe RG, Ganeshaguru K, Jones DT, et al. Autologous plasma activates Akt/protein kinase B and enhances basal survival and resistance to DNA damage-induced apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia cells[J]. *Br J Haematol*, 2001, 114(3): 608-615.
- 9 Jones DT, Ganeshaguru K, Anderson RJ, et al. Albumin activates the AKT signaling pathway and protects B-chronic lymphocytic leukemia cells from chlorambucil and radiation-induced apoptosis [J]. *Blood*, 2003, 101(8): 3174-3180.
- 10 Cataldi A, Di Pietro R, Centurione L, et al. Engagement of PI-3-kinase mediated protein kinase C zeta activation in protecting Friend cells from ionizing radiation-induced apoptosis[J]. *Int J Oncol*, 2003, 22(1): 129-135.

- 11 Ibuki Y, Goto R. Suppression of apoptosis by UVB irradiation: survival signaling via PI3-kinase/Akt pathway[J]. *Biochem & Biophys Res Commun*, 2000, 279(3): 872-878.
- 12 Wan YS, Wang ZQ, Shao Y, et al. Ultraviolet irradiation activates PI 3-kinase/AKT survival pathway via EGF receptors in human skin in vivo[J]. *Int J Oncol*, 2001, 18(3): 461-466.
- 13 Zhang QS, Maddock DA, Chen JP, et al. Cytokine-induced p38 activation feedback regulates the prolonged activation of AKT cell survival pathway initiated by reactive oxygen species in response to UV irradiation in human keratinocytes[J]. *Int J Oncol*, 2001, 19(5): 1057-1061.
- 14 Umeda J, Sano S, Kogawa K, et al. In vivo cooperation between Bcl-xL and the phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling pathway for the protection of epidermal keratinocytes from apoptosis[J]. *FASEB J*, 2003, 17(6): 610-620.
- 15 Dunn IF, Heese O, Black PM, et al. Growth factors in glioma angiogenesis: FGFs, PDGF, EGF and TGFs[J]. *J Neuro Oncol*, 2000, 50(1-2): 121-137.
- 16 周颖奇, 王智巍, 王承, 等. 中国人胶质瘤中表皮生长因子受体基因的扩增及对患者预后的影响[J]. *中华神经外科杂志*, 2003, 19(1): 26-29.
- 17 Chakravarti A, Loeffler JS, Dyson NJ, et al. Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signaling[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(1): 200-207.
- 18 Chakravarti A, Chakladar A, Delaney MA, et al. The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(15): 4307-4315.
- 19 Gomez Del Pulgar T, De Ceballos ML. Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(39): 36527-36533.
- 20 Alphonse G, Aloy MT, Broquet P, et al. Ceramide induces activation of the mitochondrial/caspases pathway in Jurkat and SCC61 cells sensitive to gamma-radiation but activation of this sequence is defective in radioresistant SQ20B cells[J]. *Int J Radiat Biol*, 2002, 78(9): 821-835.
- 21 Michael JM, Lavin MF, Watters DJ, et al. Resistance to radiation-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells is associated with defective ceramide signaling[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(16): 3600-3605.
- 22 Kubota N, Okada S, Inada T, et al. Wortmannin sensitizes human glioblastoma cell lines carrying mutant and wild type TP53 gene to radiation[J]. *Cancer Letter*, 2000, 161(2): 141-147.
- 23 Okada S, Ono K, Hamada N, et al. A low-pH culture condition enhances the radiosensitizing effect of wortmannin[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 49(4): 1149-1156.
- 24 Okaichi K, Suzuki K, Morita N, et al. Low dose of wortmannin reduces radiosensitivity of human glioblastoma cells through the p53 pathway[J]. *Oncol Report*, 2002, 9(4): 859-862.