

辐射诱导的适应性效应及其分子机制

袁德晓 潘燕 沈波 邵春林

【摘要】 辐射适应性效应是一种生物防御机制,是指低剂量辐射可以增强细胞对随后高剂量照射的抵抗能力,从而降低高辐射引起的各种损伤。目前为止,RAR的分子机制还不清楚,研究主要涉及DNA损伤修复、细胞周期调控、细胞对抗氧化应激系统以及应激反应蛋白,参与细胞信号传递的分子主要包括蛋白激酶C、有丝分裂原激活蛋白激酶、p53蛋白、共济失调性毛细血管扩张突变基因及DNA依赖性蛋白激酶。

【关键词】 辐射效应;低剂量辐射;信号转导

【中图分类号】 Q691.5, R811.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2007)05-0296-04

Radioadaptive response and its molecular mechanism

YUAN De-xiao, PAN Yan, SHEN Bo, SHAO Chun-lin

(The Third Department, Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Radioadaptive response is a biological defense of which low dose ionizing radiation induces cellular resistance to the genotoxic effects of subsequent challenge irradiation. However, so far molecular mechanism of radioadaptive response remains obscure. Research is mainly involved in activation of the intracellular repair system, cell cycle regulation system, antioxidative stress system and stress-response protein. Signaling factors involved in cell response to radiation include protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, p53 tumor suppressor protein, ataxia-telangiectasia mutated, and DNA-dependent protein kinase.

【Key words】 Radiation effect; Low dose radiation; Signaling transduction

过去,人们对低剂量(<0.2 Gy)电离辐射效应的认识主要是从高剂量效应推理而来,然而大量的实验数据结果表明,细胞对低剂量辐射(low dose radiation, LDR)的反应与高剂量相比存在本质的差别,甚至出现截然相反的现象,其中一种就是LDR诱导的适应性效应。

1 辐射适应性效应(radioadaptive response, RAR)

RAR是LDR预先处理能使机体对随后的高剂量照射(high dose radiation, HDR)产生适应,可减轻HDR引起的损伤。1984年,Oliveri等首先发现,用含有3.7 kBq/ml ³H-脱氧胸苷的培养基培养后的人外周血淋巴细胞,经高剂量150 cGy X射线照射后染色体的畸变率比预期值小得多,人们把LDR的这种效应称之为“RAR”。其表现为细胞对随后的HDR所导致的损伤效应减弱,包括染色体损

伤、微核形成率、基因突变率的减少以及细胞存活率的升高。RAR在自然界中广泛存在,对于真核细胞,如人淋巴细胞、中国仓鼠V79细胞、兔淋巴细胞、鼠胚细胞、肝癌细胞、淋巴细胞AHH-1细胞系、T细胞白血病细胞系及人-仓鼠杂交细胞等也存在RAR现象^[1]。RAR的辐射诱导剂量一般在5~200 mGy的范围内,超出此范围,RAR则很难发生。另外,RAR还存在着明显的个体差异,在相同的实验条件下,来自不同个体的同种组织的细胞得到的试验结果存在明显差异,这可能与细胞来源动物的年龄和基因多态性以及细胞所处的状态有关,随着年龄的增加,RAR逐渐减弱^[2];由于细胞的基因型不同,这样对同种刺激作出的反应也会不同^[3]。正因为如此,不同的实验室所得到有关RAR的结果存在很大的差异。

到目前为止,RAR的分子机制还不太清楚。LDR可以引起细胞内氧化还原体系的失衡,从而激活了细胞内信号途径,这些信号途径可以激活机体内的防御体系,使其对随之而来的HDR产生RAR。早期研究表明,对于酵母细胞和果蝇卵母细

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670629);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0365);上海市浦江人才计划(06PJ4012)

作者单位:200032 上海,复旦大学放射医学研究所第三研究室
通讯作者:邵春林(E-mail:clshao@shmu.edu.cn)

胞, DNA 修复系统在 RAR 的产生中起重要作用, 因此 RAR 产生的一个可能的原因就是 LDR 激活了 DNA 修复系统。但是, 辐射信号转导中最重要的信号分子是活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 和 DNA 链断裂, 所以其他机制如抗氧化应急反应体系和应激反应蛋白也可能起重要的作用。

2 RAR 的分子机制

综合近年来的研究表明, 参与 RAR 的分子机制有许多方面, 大致可以分为 4 类: ①DNA 损伤修复系统; ②细胞周期调控系统; ③抗氧化应激防御系统; ④应激反应蛋白。

2.1 DNA 损伤修复系统

LDR 可引起 DNA 链断裂, 因此产生 RAR 的主要分子机制可能是激活了 DNA 损伤修复系统。Raaphorst 等^[4]为了检测 RAR 与 DNA 损伤重组修复的关系, 应用同源重组 (homologous recombination, HR) 修复正常的中国仓鼠卵巢细胞及其突变体 ISF 细胞 (XRCC3 基因突变, HR 修复缺陷细胞) 来研究 HR 修复对 RAR 的影响, 结果表明, HR 修复正常的中国仓鼠卵巢细胞产生了 RAR, 而其突变体 ISF 细胞没有产生 RAR。多聚二磷酸腺苷-核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP) 是一类具有重要生理功能的蛋白酶, PARP 能催化二磷酸腺苷核糖多聚化反应, 该多聚化反应对 DNA 修复和基因稳定性起重要作用。由于 LDR 同样可以引起 DNA 链断裂, PARP 在 RAR 的产生过程中可能起重要作用。研究发现, PARP 的抑制剂 3-氨基苯甲酰胺可以抑制中国仓鼠 V79 细胞 RAR 的发生; 而 LDR 时发生 RAR 的细胞, 其 PARP 水平明显升高。因此, DNA 损伤修复与 RAR 的产生密切相关。

2.2 细胞周期调控

细胞周期调控是决定细胞抗辐射能力的一个重要因素。由电离辐射诱导的 DNA 损伤能使细胞周期产生暂时的阻滞, 以利于一部分 DNA 损伤得到修复; 或者产生不可逆的细胞周期阻滞, 使细胞走向凋亡或坏死。因此, 恰当的细胞周期阻滞会给 DNA 损伤修复提供一定的时间, 从而有利于细胞生存。Seo 等^[5]用低剂量 (1cGy) 的 γ 射线照射纤维肉瘤的热抵抗细胞株后发现, 热抵抗的细胞株处于 G_1 期的细胞数明显升高, 而非热抵抗的细胞株处

于 G_1 期的细胞数无明显变化; 另外他们已经证明纤维肉瘤的热抵抗细胞株可以产生 RAR, 所以 Seo 等认为产生 RAR 与 G_1 阻滞有关。Zhou 等^[6]用 Northern blot 分析能够产生 RAR 现象的人淋巴细胞的 CDC16 基因表达情况, 发现先用低剂量 (2cGy) γ 射线照射产生 RAR 现象的人淋巴瘤细胞后再接受攻击性照射 (4Gy), 其 CDC16 基因下调比对照组迅速。因为 CDC16 蛋白促进细胞从细胞 G_2 期进入 M 期, 当受到攻击性照射后, 发生 RAR 的细胞能更早地发生周期阻滞, 更早地进行 DNA 损伤修复, 从而可以降低攻击性照射造成的 DNA 损伤。

2.3 抗氧化应激能力

Otsuka 等^[7]发现, 用 0.5Gy 的 γ 射线以低剂量率 (1.2 mGy/h) 对小鼠进行全身照射后 23 d, 小鼠体内过氧化氢酶和锰超氧化物歧化酶水平与对照组相比明显升高, 这些酶类主要用于清除机体内的代谢自由基, 从而可以减少 DNA 的损伤。有学者认为 RAR 可以减少 DNA 损伤的固定, 这可能与 RAR 活化体内对抗自由基的酶系统有关^[8]。ROS 在机体内主要由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化还原酶系统产生, ROS 作为信息分子广泛参与细胞功能的调节及相关信息的传递^[9], ROS 的升高可以激活体内的抗氧化应激的酶类。de Toledo 等^[10]模拟人体内的生理环境, 把正常的人成纤维细胞接种于三维构筑的培养板上, 对细胞进行低剂量 (1~10cGy) 照射发现, 尽管 10 cGy 的急性照射细胞的微核形成率升高, 但是 48h 低剂量率的 10 cGy 慢性照射后, 与自发微核率相比细胞的微核率降低; 他们发现细胞内一系列抗氧化物酶 (超氧化物歧化酶、谷胱甘肽转硫酶、谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶等) 的表达均有增加。因而推测, 与 ROS 和自由基清除有关的抗氧化物酶在 LDR 产生的保护性机制中起部分作用。

2.4 细胞应激反应蛋白

近年来, 热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 对电离辐射损伤的保护效应成为一个关注的热点, 细胞内发生应激事件往往会引起 HSPs 的表达。HSPs 可分为两类: 一类是组成性表达型, 它在细胞内持续存在, 起到分子伴侣的作用, 可以保证细胞内新生蛋白翻译后的正确折叠和靶向运输; 另一类是可诱导型, 当细胞受到热刺激、重金属、氧化

应激和辐射时,它们被诱导产生并对细胞产生保护作用。HSPs是一个超家族,它包括20多种蛋白,HSP70是一种可诱导型HSPs,广泛参与各种保护机体和细胞的功能,HSP70基因转染的细胞可以产生低剂量RAR^[1]。Seo等^[2]用低剂量(1cGy)的 γ 射线照射辐射诱导的纤维肉瘤的热抵抗细胞株后,细胞HSP25和HSP70表达升高,并且发生G₁期阻滞。同时又有学者发现,RAR在转染有抗-HSP70基因的细胞系中不能产生^[3]。这些结果均表明HSPs参与了RAR的发生。Park等^[4]认为,HSPs可以诱导蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)的表达,PKC在RAR的产生过程中起重要的作用。

3 RAR的细胞信号转导途径

如果发生RAR,刺激信号首先要被细胞感受系统识别,然后再被传递到细胞固有的反应系统,从而使效应分子将随后辐射导致的潜在危害减弱。这些细胞信号分子主要包括PKC、有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、p53蛋白、共济失调性毛细血管扩张突变(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)基因及DNA依赖性蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK)。

3.1 PKC和MAPK

Sasaki等^[5]研究发现,PKC是细胞信号转导通路的主要组成部分,在LDR诱导适应性反应的过程中起着重要的作用。Gopalakrishna等^[6]又发现,PKC特定结构域受氧化还原系统的调节,所以PKC可以受氧化应激直接激活,并且PKC的活性可以被HSPs加强,而LDR可以诱导HSPs的合成。Szumiel等^[7]对PKC家族的研究发现,用诱导剂量(0.02 Gy)X射线照射培养的小鼠细胞可激活PKC- α 的活性,而攻击剂量(3 Gy)X射线照射则下调PKC的水平;并且发现LDR在激活PKC的同时,p38 MAPK的活性也增加,而PKC和p38 MAPK的活性以及RAR可以被p38 MAPK的特异性抑制剂SB203580和PKC的特异性抑制剂Calphostine所抑制。在生理情况下,p38 MAPK与磷脂酶C- δ 1(phospholipase C- δ 1, PLC- δ 1)可以相互作用,后者可以将磷脂酰肌醇二磷酸水解为二酰甘油,从而进一步激活PKC。如此形成的PLC-PKC-p38 MAPK-PLC反馈调节通路对LDR诱导适应性反应的信号进行转导调节。PKC还可以调节DNA pol- β 和DNA拓

扑异构酶I的活性,而这两种酶参与DNA的损伤修复。由此可见,PKC把参与RAR的各个系统联系起来,从而在RAR产生过程中起关键作用。

3.2 p53蛋白

近来,Okazaki等^[8]发现,p53蛋白是产生RAR的最重要的蛋白分子,发生RAR的细胞其凋亡明显减少,细胞内p53基因及其p53相关基因的表达增加。Schwartz等^[9]用含有野生型p53基因的TK6细胞株及其基因剔除型细胞株NH32来研究p53蛋白在RAR中的作用,发现预先用低剂量(10cGy) γ 射线照射细胞后间隔1~21d再用1~5Gy高剂量 γ 射线照射细胞,TK6细胞株与NH32细胞株相比,细胞存活率升高。对PLC-PKC-p38 MAPK-PLC反馈调节通路下游信号转导的研究发现,p53蛋白在下游信号转导中发挥重要的作用^[10]。攻击性照射激活的胞外信号调控蛋白激酶(extracellular signal-regulated protein kinase, ERK)和p38 MAPK与p53蛋白竞争性结合,分别形成p53-ERK复合体和p53-p38 MAPK复合体^[11]。ERK过量表达会使p53-p38 MAPK复合体解离并减弱p38 MAPK磷酸化p53蛋白的能力,从而降低p53蛋白结合DNA的能力,使DNA损伤修复蛋白的表达受到抑制^[12]。这些结果表明,由PKC-p38 MAPK-PLC转导的信号最终整合于p53蛋白,从而保证了DNA损伤的正确修复,避免了染色体畸变和细胞凋亡的发生。此外,Sasaki等^[13]还得出如下结论:p53在引导辐射导致的双链断裂进入一条适应性的合理的修复通路方面发挥关键作用,而损伤信号则是通过迂回PKC-p38 MAPK-PLC损伤感受通路整合给p53的,这样便使得该种信号不能进入替代的非合理的修复通路或发生凋亡。p53蛋白可以保证DNA修复的忠实性在质粒的重接实验中得到了证实。

3.3 ATM和DNA-PK

p53蛋白在RAR的产生中起重要作用,对于p53上游的调控分子已经发现了许多PK,包括ATM、共济失调性毛细血管扩张及Rad3相关基因(ataxia-telangiectasia and Rad3-related gene, ATR)、DNA-PK和Chk1/Chk2,它们都是激活p53蛋白的PK^[14],其中ATM和DNA-PK在RAR的产生中所起作用已经进行了研究,Sasaki等^[15]发现,ATM基因突变的成纤维细胞也可以发生RAR。这表明,ATM基因在RAR的产生中不起作用;来自严重免疫缺

陷鼠的细胞, 由于其 DNA-PK 发生突变而缺乏双链断裂修复能力, 但这些 DNA-PK 缺陷的细胞仍然可以发生 RAR, 这表明 DNA-PK 对 RAR 的产生也不起重要作用。但 Miura 等^[2]发现, 来自 ATM 和严重免疫缺陷鼠的胶质细胞没有出现 RAR。这可能与细胞来自动物年龄和基因多态性以及细胞所处的状态不同有关。

4 问题与展望

简而言之, 目前对 LDR 适应性效应存在几种学说, 但由于 LDR 诱发的各种表现和时空变化、普遍性与异质性等尚不完全清楚, 故很难仅用一种孤立因素解释, 只能说是机体细胞多个系统协同作用的结果。可以认为, LDR 首先激活跨膜受体或细胞质受体, 诱发激活转录因子诱导出早期基因表达, 包括支持抵抗细胞 (或机体) 损伤的各种成分, 如新蛋白、酶、细胞因子、抗自由基大分子等, 特别是修复蛋白可在 RNA 转录, 具有对辐射保护作用, 或抑制某些特定基因表达来延长细胞周期, 增加修复率, 这两种皆可使 DNA 损伤减轻或恢复, 起到防御适应性的作用。但是, RAR 的具体机制至今还是很不清楚, 大量实验数据表明, p53 在 RAR 的产生过程中起着决定性的作用, 它可以介导细胞进入一条高忠实性的 DNA 损伤修复通路。但是这个修复通路中参与的修复酶和修复方式具体是什么还不清楚。随着分子生物学的不断进步, 一些新技术不断涌现, 特别是近年来出现的蛋白质组学技术的出现, 使得阐明 RAR 的机制成为可能, 我们可以通过蛋白质芯片技术来比较产生 RAR 和没有产生 RAR 的细胞蛋白质表达差异, 来分析 RAR 的产生机制。

参 考 文 献

- 1 Tapio S, Jacob V. Radioadaptive response revisited. *Radiat Environ Biophys*, 2007, 46(1): 1-12.
- 2 Miura Y, Abe K, Urano S, et al. Adaptive response and the influence of ageing: effects of low-dose irradiation on cell growth of cultured glial cells. *Int J Radiat Biol*, 2002, 78(10): 913-921.
- 3 Correa CR, Cheung VC. Genetic variation in radiation-induced expression phenotypes. *Am J Hum Genet*, 2004, 75(5): 885-890.
- 4 Raaphorst GP, Li LF, Yang DP. Evaluation of adaptive responses to cisplatin in normal and mutant cell lines with mutations in recombination repair pathways. *Anticancer Res*, 2006, 26 (2A): 1183-1187.

- 5 Seo HR, Chuang HY, Lee YJ, et al. p27Cip/Kip is involved in hsp25 or inducible hsp70 mediated adaptive response by low dose radiation. *J Radiat Res*, 2006, 47(1): 83-90.
- 6 Zhou PK, Rigaud O. Down-regulation of the human CDC16 gene after exposure to ionizing radiation: a possible role in the radioadaptive response. *Radiat Res*, 2001, 155(1): 43-49.
- 7 Otsuka K, Koana T. Activation of antioxidative enzymes induced by low-dose-rate whole-body gamma irradiation: adaptive response in terms of initial DNA damage. *Radiat Res*, 2006, 166(3): 474-478.
- 8 Szumiel I. Adaptive response: stimulated DNA response or decreased damage fixation?. *Int J Radiat Biol*, 2005, 81(3): 233-241.
- 9 Lehnert BE, Iyer R. Exposure to low-level chemicals and ionizing radiation: reactive oxygen species and cellular pathway. *Hum Exp Toxicol*, 2002, 21(2): 65-69.
- 10 de Toledo SM, Asaad N, Venkatachalam P, et al. Adaptive responses to low-dose/low-dose-rate gamma rays in normal human fibroblasts: the role of growth architecture and oxidative metabolism. *Radiat Res*, 2006, 166(6): 849-857.
- 11 Kang CM, Park KP, Cho CK, et al. Hspa4 (HSP70) is involved in the radioadaptive response: result from mouse splenocytes. *Radiat Res*, 2002, 157(6): 650-655.
- 12 Carette J, Lehnert S, Chow TY. Implication of PBP74/mortalin/GRP75 in the radio-adaptive response. *Int J Radiat Biol*, 2002, 78 (3): 183-190.
- 13 Park SH, Lee SJ, Chung HY, et al. Inducible heat-shock protein 70 is involved in the radioadaptive response. *Radiat Res*, 2000, 153(3): 318-326.
- 14 Sasaki MS, Ejima Y, Tachibana A, et al. DNA damage response pathway in radioadaptive response. *Mutat Res*, 2002, 504(1-2): 101-118.
- 15 Gopalakrishna R, Jaken S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radical Med*, 2000, 28(9): 1349-1361.
- 16 Okazaki R, Ootsuyama A, Norimura T. TP53 and TP53-related genes associated with protection from apoptosis in the radioadaptive response. *Radiat Res*, 2007, 167(1): 51-57.
- 17 Schwartz JL, Jordan R, Slovic J, et al. Induction and loss of a TP53-dependent radioadaptive response in the human lymphoblastoid cell model TK6 and its abrogation by BCL2 over-expression. *Int J Radiat Biol*, 2007, 83(3): 153-159.
- 18 She QB, Chen N, Dong Z. ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 at serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem*, 2000, 275 (27): 20444-20449.
- 19 Andrysik Z, Mactula M, Chramostova K, et al. Activation of ERK1/2 and p38 kinases by polycyclic aromatic hydrocarbons in rat liver epithelial cells is associated with induction of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 211(3): 198-208.
- 20 Reinhardt HC, Aslarian AS, Lees JA, et al. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell*, 2007, 11(2): 175-189.