

- [13] Stracker TH, Usui T, Petrini JH. Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*, 2009, 8(9): 1047–1054.
- [14] Lee JS, Collins KM, Brown AL, et al. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature*, 2000, 404(6774): 201–204.
- [15] Kurosu T, Takahashi Y, Fukuda T, et al. p38 MAP kinase plays a role in G2 checkpoint activation and inhibits apoptosis of human B cell lymphoma cells treated with etoposide. *Apoptosis*, 2005, 10(5): 1111–1120.
- [16] Kiyokawa H, Ray D. In vivo roles of CDC25 phosphatases: biological insight into the anti-cancer therapeutic targets. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008, 8(8): 832–836.
- [17] Boutros R, Dozier C, Ducommun B. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18(2): 185–191.
- [18] Hosing AS, Kundu ST, Dalal SN. 14-3-3 Gamma is required to enforce both the incomplete S phase and G2 DNA damage checkpoints. *Cell Cycle*, 2008, 7(20): 3171–3179.
- [19] Wang XQ, Zhu YQ, Lui KS, et al. Aberrant Polo-like kinase 1-Cdc25A pathway in metastatic hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21): 6813–6820.
- [20] Lobjois V, Jullien D, Bouché JP, et al. The polo-like kinase 1 regulates CDC25B-dependent mitosis entry. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(3): 462–468.
- [21] Jin J, Ang XL, Ye X, et al. Differential roles for checkpoint kinases in DNA damage-dependent degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *J Biol Chem*, 2008, 283(28): 19322–19328.
- [22] Demidova AR, Aau MY, Zhuang L, et al. Dual regulation of Cdc25A by Chk1 and p53-ATF3 in DNA replication checkpoint control. *J Biol Chem*, 2009, 284(7): 4132–4139.
- [23] Uchida S, Yoshioka K, Kizu R, et al. Stress-activated mitogen-activated protein kinases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 target Cdc25B for degradation. *Cancer Res*, 2009, 69(16): 6438–6444.

(收稿日期: 2009-05-25)

电离辐射诱导旁效应的研究现状

陈凤 涂彧

【摘要】 辐射旁效应是一种电离辐射引起的间接效应。国内外许多研究者应用先进的检测技术和方法证实了旁效应的存在, 并对其机制有了更深入的了解, 旁效应研究也逐渐从单细胞扩展到多细胞, 从离体扩展到整体, 从体外扩展到体内, 为解释旁效应的发生及调控机制提供了有力的证据, 尤其为以后的放射肿瘤临床应用提供科学的依据。

【关键词】 电离辐射; 辐射旁效应; 效应

Bystander effect induced by ionizing radiation and its application

CHEN Feng, TU Yu

(Department of Medical Radioprotection, School of Radiation Medicine and Public Health, Suzhou 215123, China)

【Abstract】 An indirect effect induced by ionizing radiation called bystander effect is being highly concentrated. Many domestic and foreign researchers have verified the existence of bystander effect and have got more understanding of the mechanism with advanced detection techniques and methods. So far, the research about it has expanded from a single cell to multiple cells, from the in vitro to the whole, and has extended to in vivo from in vitro, which provides powerful evidence to explain how bystander effects happen and the regulation mechanism and especially gives scientific evidence to clinical radiation oncology application in the future.

【Key words】 Ionizing radiation; Bystander effect; Radiation effect

辐射旁效应是指通过细胞接触或细胞间通讯

将直接受辐射细胞的应答传递给周围未受辐射的细胞, 后者也表现出与辐射细胞类似的生物学效应, 包括周围正常细胞的致死损伤、细胞凋亡或终末分化、姐妹染色单体互换、染色体畸变、微核、基因

突变、基因不稳定性及肿瘤转化等^[1-2]。近年来,旁效应已成为放射生物界的研究热点,经过多年的努力,其研究范围也从体外研究扩展到体内研究。本文从旁效应的机制、旁效应与细胞种类和细胞环境的关系、旁效应的三维空间效应及体内旁效应等四个方面简要综述其研究现状。

1 电离辐射旁效应的机制

由辐射引起周围正常细胞损伤而产生旁效应的机制还没有定论,根据目前的研究认为主要有两个方面:一是受照射细胞释放的一些活性物质或信号分子对未受照射细胞发生作用;二是通过间隙连接细胞间通讯(gap-junction intercellular communication, GJIC)通路转导。

1.1 辐射旁效应和信号物质

细胞受照后产生活性氧,如超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)和羟自由基(OH)等,进而可与周围的细胞、蛋白、脂质等相互作用,发挥各种生物反应^[3]。Yang等^[4]报道,活性氧清除剂Cu-Zn-超氧化物歧化酶和过氧化氢酶能减少旁细胞中诱导产生的p21waf1基因、 γ -H2AX灶和微核的形成,并推测活氧与p21waf1基因、 γ -H2AX灶和微核的形成有关。研究结果显示,在辐射诱发的细胞增殖死亡旁效应中,活性氧起着重要作用^[5]。

一氧化氮(nitric oxide, NO)具有可渗透性、高反应活性和小分子质量的特点,是体内常见的生物信号和调节因子,对组织细胞具有直接损伤作用,过量的NO可抑制能量合成,影响DNA复制,降低细胞内谷胱甘肽水平,产生氧化应激,与过氧化基团反应形成活性氧,尤其是NO与 O_2 结合或与血红蛋白反应生成过氧亚硝酸根,后者还可继续分解为NO自由基。邵春林等^[6]以氦离子微束装置所产生的精确数量离子定位照射神经胶质瘤细胞T98G细胞核或细胞质发现,即使单个细胞受到氦离子的精确照射,也可引起群体中其他众多细胞的损伤,但当细胞受到NO自由基清除剂(2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide c-PTIO)处理后,细胞微核率减小到本底水平,细胞核和细胞质照射诱导的旁效应被完全抑制,提示NO与旁效应密切相关。

Wang等^[7]用腺病毒载体将诱导型NO合酶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辐射敏感性,并且可以被其抑制剂所抑制。从而从另一个侧面说明NO在辐射诱发的旁效应中起着重要的作用。

1.2 GJIC与旁效应

间隙连接由相连细胞膜上两个半通道组成,每个半通道又由数个连接蛋白聚合而成。其对细胞的生长、分化、增殖、营养代谢及细胞间信号传递等方面具有重要的调控作用。

VanSlyke等^[8]用自由基清除剂处理细胞,照射后与未处理细胞中链接蛋白43(connexin 43, Cx43)的上调一致,去除自由基后Cx43仍然上调,表明Cx43在诱导旁效应中起作用并且不依赖于自由基的存在,提示GJIC在诱导旁效应中起独立的作用。

Azzam等^[9]将富含和缺乏GJIC的两种人成纤维细胞分别暴露于极低量的 α 粒子,当5%的细胞被 α 粒子击中,发现近30%富含GJIC的旁效应细胞内p53和(或)p21信号通路的相关蛋白表达上调,并有微核形成,而在缺乏GJIC的细胞中未观察到上述效应。从而进一步证实GJIC在旁效应中起着重要的作用。

2 旁效应与细胞种类和细胞环境的关系

Vines等^[10]用不同品系的细胞株人乳头状瘤病毒转染的人角质细胞HPV-G、中国仓鼠卵巢细胞CHO-K1和6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏细胞E89照射后取其培养基(条件培养基),建立一个矩阵,再分别培养上述细胞,发现HPV-G细胞和CHO-K1细胞在本细胞系条件培养基中的旁效应显著强于在其他细胞系条件培养基的旁效应,而且它们对E89细胞系条件培养基无反应;而E89细胞则对包括自身品系在内的任何条件培养基都无反应,说明6-磷酸葡萄糖脱氢酶在旁效应中起了关键的作用。因此相对于细胞系响应旁效应信号的能力而言,旁效应大小取决于被照射细胞所产生的信号幅度。

Vines等^[11]用小鼠膀胱样本移植培养直接暴露于 γ 射线或移植于照射后的条件培养基中,探讨试管内多细胞初级组织培养体系的旁效应信号和反应,结果:在条件培养基中观察到了明显的剂量依赖和非剂量依赖的旁效应,0.5 Gy和5 Gy剂量照射后Bcl2表达明显增加,5 Gy时增加达80%;C型髓细胞组织增生具有剂量依赖性,0.5 Gy时增生

39.48%, 5 Gy 时增生 81.28%; 在这两个剂量点, 核碎片也显著增加。这些结果表明, 在多细胞环境下的旁效应是维持组织完整性反应的表现, 也是对体内旁效应研究的一个侧面补充。

3 旁效应的三维空间效应

Belyakov 等^[12] 为了证明旁效应与健康人体组织的关系, 使用三维正常人皮肤组织模型模拟组织中的信号转导反应, 并使用微束定比照射, 证明在受照射细胞外距离大于 1 mm 的未受照射细胞与对照组比较有明显的改变; 试验中选用两种生物终点: 微核和细胞凋亡, 旁效应细胞微核率平均增加了 1.7 倍, 细胞凋亡平均增加了 2.8 倍。这些结果揭示旁效应可能在低剂量辐射危害中起重要作用。

Persaud 等^[13] 用中国仓鼠卵巢细胞以 ³H-脱氧胸苷三磷酸酯标记后与人仓鼠杂交细胞以 1:5 混合, 构成一个三维细胞模型, 中国仓鼠卵巢细胞凋亡后的 DNA 碎片无法通过细胞膜被人仓鼠杂交细胞吸收, 因为它们是同源的; 中国仓鼠卵巢细胞的 ³H 射线短程自我辐射使邻近的人仓鼠杂交细胞 CD59 (首先发现的诱导旁效应的细胞黏附因子) 突变率与对照组比较提高了 14 倍, 加入自由基清除剂等处理因素后突变率明显降低。结果表明, 三维空间可以发生细胞毒性旁效应, 并且旁效应作用的大小与靶区、射线性质有关。

4 体内旁效应

有关体内旁效应的研究与体外研究相比相对较少, 而研究辐射诱发旁效应的目的是应用于临床, 因此体内旁效应的研究非常重要。

4.1 体内旁效应诱导基因组不稳定性

Watson 等^[14] 应用骨髓移植模型通过电离辐射旁效应在体内诱导未照射骨髓细胞染色体不稳定性: 用含有 25% γ 射线的 ²⁵²Cf 中子源照射成年雄性小鼠骨髓细胞 (剂量为 0.5 Gy, 剂量率为 0.04 Gy/min) 后进行克隆细胞遗传学分析, 并立即与未照射骨髓细胞混合, 移植到雌性小鼠体内。在移植后 13 个月内的不同间隔时间发现, 子代未照射造血干细胞染色体不稳定性 (包括染色单体断裂、微小染色体、染色体断片、易位和缺失等) 增加。显然, 电离辐射旁效应在体内诱导基因组不稳定性之间的联系对目前辐射诱导损伤机制, 特别是辐射

诱发恶性肿瘤的复杂机制是一个严峻的挑战。Koturbash 等^[15] 报道, 用两种不同品系的小鼠 (C57BL/6 和 BALB/c) 头部照射后, 导致旁效应器官脾脏的细胞 DNA 损伤水平和 p53 表达增加, 细胞增殖和凋亡水平改变; 排除辐射散射的可能后, 进一步论证了局部照射后引发体内远距离器官旁效应。

4.2 体内诱发旁效应的组织特异性

Ilnytskyy 等^[16] 通过直接照射和辐射诱发远距离旁效应方法观察体内旁效应的组织特异性, 他们用成年雄性小鼠随机分组, 分别予以 0.5 Gy X 射线单次急性照射小鼠全身及全脑, 照射全脑时身体其他部分用 2~3 mm 的医用铅屏蔽保护^[17-19], 以与照射野相同距离的皮肤及脾脏 DNA 去甲基化及 miRNA 变化为生物效应终点观察旁效应。在排除散射引起的效应之后发现, 辐射在旁效应器官皮肤和脾脏中 DNA 甲基化表达变化有统计学意义。脾脏在急性全脑照射后 6 h、96 h 和 14 d 引起显著的 DNA 去甲基化, 而皮肤只有在急性全脑照射后 6 h 变化较显著; 使用反转录-聚合酶链反应检测, 进一步确认急性次全脑照射后旁效应器官脾脏 miR-194 在照射后 6 h、96 h 和 14 d 时持续上调, 而在照射后 6 h 皮肤中没有发现 miRNA 持续变化。

Ilnytskyy 等^[16] 首次报道了分次照射诱发体内旁效应组织特异性。他们用 X 射线 0.1 Gy/d, 连续 5 d 分别予小鼠全身和全脑照射, 全脑照射时余下身体予屏蔽保护, 同样以与照射野相同距离的皮肤及脾脏 DNA 去甲基化及 miRNA 变化为生物效应终点观察旁效应, 发现分次照射在脾脏中诱发显著而持续的旁效应, 而皮肤中则没有, 在脾脏中, miRNA 变化大于皮肤。综上所述, 辐射诱发的体内旁效应为脾脏大于皮肤, 体内旁效应具有组织特异性。

4.3 旁效应与性别的关系

在以往旁效应的研究中多数用雄性动物模型, Koturbash 等^[19] 为突破这种界限, 用 45 d 成年小鼠, 雄性和雌性各半, 用 1 Gy X 射线分别急性照射小鼠全身和全脑, 结果发现, 全脑照射在体内诱发的旁效应具有性别特异性, 在旁效应器官脾脏中, DNA 损伤、DNA 去甲基化、细胞增殖以及凋亡等水平在雄性和雌性小鼠中具有差异性, 而性腺去除后, 这种差异性则显著减少, 说明旁效应与性

别相关。

5 结语

辐射诱导旁效应的研究从多个角度出发探查未知现象的本质,对传统的放射生物学理论提出了重新认识。另外,在放射治疗和放射诊断中,旁效应在正常组织中的响应作用得到了认可,但是考虑到这些数据还存在许多争论以及体内研究的结果太少,还不能解释实践问题,因此期待有关旁效应的研究和发现有突破性的进展。这也要求人们对研究工具不断改进、研究思路不断创新、研究方法不断优化,同时应与其他学科多方面合作。相信辐射旁效应及其机制的深入研究将对危险评价、辐射防护、放射治疗等领域产生影响,并将为辐射防护标准的修订及临床肿瘤放射治疗最优化等提供科学依据。

参 考 文 献

- [1] Morgan WF, Sowa MB. Non-targeted bystander effects induced by ionizing radiation. *Mutat Res*, 2007, 616(1-2): 159-164.
- [2] Morgan WF, Sowa MB. Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(40): 14127-14128.
- [3] Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*, 2004, 16(1): 42-47.
- [4] Yang HY, Asaad N, Held KD. Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts. *Oncogene*, 2005, 24(12): 2096-2103.
- [5] 陆颖, 杨陟华, 曹珍山, 等. α 粒子照射诱发细胞存活的旁效应及机理研究. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2003, 21(1): 69-72.
- [6] 邵春林, Flikord M, Prise KM. 一氧化氮在亚细胞结构精确照射诱导旁效应中的作用. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2007, 25(2): 119-123.
- [7] 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. *Cancer Res*, 2004, 64(4): 1386-1395.
- [8] VanSlyke JK, Musil LS. Cytosolic stress reduces degradation of connexin43 internalized from the cell surface and enhances gap junction formation and function. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(11): 5247-5257.
- [9] Azzam El, 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 nonirradiated cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(2): 473-478.
- [10] Vines AM, Lyng FM, McClean B, et al. Bystander signal production and response are independent processes which are cell line dependent. *Int J Radiat Biol*, 2008, 84(2): 83-90.
- [11] Vines AM, Lyng FM, McClean B, et al. Bystander effect induced changes in apoptosis related proteins and terminal differentiation in in vitro murine bladder cultures. *Int J Radiat Biol*, 2009, 85(1): 48-56.
- [12] Belyakov OV, Mitchell SA, Parikh D, et al. Biological effects in unirradiated human tissue induced by radiation damage up to 1mm away. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(40): 14203-14208.
- [13] Persaud R, Zhou H, Baker SE, et al. Assessment of low linear energy transfer radiation-induced bystander mutagenesis in a three-dimensional culture model. *Cancer Res*, 2005, 65(21): 9876-9882.
- [14] Watson GE, Lorimore SA, Macdonald DA, et al. Chromosomal instability in unirradiated cells induced in vivo by a bystander effect of ionizing radiation. *Cancer Res*, 2000, 60(20): 5608-5611.
- [15] Koturbash I, Loree J, Kutanzi K, et al. In vivo bystander effect: cranial X-irradiation leads to elevated DNA damage, altered cellular proliferation and apoptosis, and increased p53 levels in shielded spleen. *Cell Cycle*, 2008, 7(2): 554-562.
- [16] Ilnytsky Y, Koturbash I, Kovalchuk O. Radiation-induced bystander effects in vivo are epigenetically regulated in a tissue-specific manner. *Environ Mol Mutagen*, 2009, 50(2): 105-113.
- [17] Koturbash I, Boyko A, Rodriguez-Juarez R, et al. Role of epigenetic effectors in maintenance of the long-term persistent bystander effect in spleen in vivo. *Carcinogenesis*, 2007, 28(8): 1831-1838.
- [18] Koturbash I, Loree J, Kutanzi K, et al. In vivo bystander effect: cranial X-irradiation leads to elevated DNA damage, altered cellular proliferation and apoptosis, and increased p53 levels in shielded spleen. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, 70(2): 554-562.
- [19] Koturbash I, Kutanzi K, Hendrickson K, et al. Radiation-induced bystander effects in vivo are sex specific. *Mutat Res*, 2008, 642(1-2): 28-36.

(收稿日期: 2009-08-05)