

# 医学参考报

## 放射医学与防护频道

### Radiological Medicine and Protection

Number 02

#### 执行主编介绍



刘强 研究员

医学博士，研究员，博士生导师，现任中国医学科学院放射医学研究所辐射损伤效应研究室主任。主要从事放射生物学研究工作，主持国家和省部级项目20余项。发表SCI和核心期刊论文100余篇。获省部级科技奖二、三等奖11项，被授予“天津市五一劳动奖章”、亚洲辐射研究协会“优秀青年科学家”奖、中国毒理学会全国优秀青年科技奖、第十二届天津市青年科技奖提名奖、北京协和医学院优秀教师。兼任中华预防医学会放射卫生专业委员会委员、青年专业委员会副主任委员，国家卫计委放射卫生标准委员会委员；中华医学会中华放射医学与防护学会分会委员，中国毒理学会放射毒理专业委员会委员，天津市预防医学会理事，天津市职业病鉴定专家库专家等。

#### 导读

Fus1 基因敲除鼠中的细胞氧化应激反应介导的辐射敏感性

2版

MicroRNA-381增强食管鳞癌细胞的辐射敏感性

3版

端粒在个体化放疗中预测肿瘤病人个体辐射敏感性的作用

4版

甲基溴瑞他汀E辐射增敏作用机制及靶向给药研究

5版

PKM2基因敲降增强非小细胞肺癌辐射敏感性

6版

辐射损伤细胞周期与DNA修复之间的关系

7版

H<sub>2</sub>S与肿瘤增殖和辐射敏感性

8版

## 线粒体在电离辐射旁效应中的作用

复旦大学放射医学研究所 付佳美

自从1992年Nagasawa等发现辐射旁效应(radiation induced bystander effect, RIBE)现象至今,RIBE作为一种非靶向效应已成为放射生物学及辐射防护领域的研究热点。通过受照射细胞与未受照射细胞共培养、受照射细胞条件培养液处理未受照射细胞、微束单细胞定点照射等实验方法,已证实RIBE可以使得细胞产生与电离辐射相似的生物学终点,包括姊妹染色体互换、微核形成、细胞转化、细胞凋亡、细胞死亡、基因突变、基因组不稳定性等。RIBE的存在对于辐射致癌、辐射防护、放射治疗等有重要意义,尤其是在肿瘤放疗引发的正常组织损伤和二次癌症、宇航员受到低剂量高LET粒子辐射的危险评价等方面,RIBE所带来的潜在致癌风险性已引起一些国际组织如联合国原子辐射效应科学委员会(UNSCEAR)、国际辐射防护委员会(ICRP)的高度重视。RIBE的发生包括两个过程,受照射细胞产生一系列旁效应信号,通过细胞之间的液体介质、细胞间隙通讯(GJIC)等进行传播并对周围未受照射细胞产生旁效应。受照射细胞核DNA的直接损伤并不是引起RIBE的必要条件,细胞质受到单粒子的精确辐射后同样可以诱导旁效应的产生。我们近来的研究表明,细胞质中线粒体所释放的细胞色素c是引起辐射旁效应的重要因素之一。线粒体是细胞能量代谢的重要场所,在细胞凋亡、衰老与自噬中起到很关键的作用,在介导和调控RIBE的发生中扮演重要角色。

### 1 辐射旁效应引起线粒体基因结构的改变

直接或间接的辐射暴露会导致组织细胞氧化应激、线粒体结构和功能损伤,无论受照射细胞或旁细胞,均表现线粒体质量或线粒体DNA(mtDNA)含量的增加,以此来补偿线粒体功能。mtDNA的突变频率比核DNA(nDNA)高10~20倍之多。如低剂量 $\gamma$ -射线照射细胞后,受照射细胞与旁照细胞均表现mtDNA4881片段高频缺失,并且D-Loop区为热点突变区域。应用随机突变捕获分析技术发现,经2Gy<sup>60</sup>Co射线照射的细胞的条件培养液处理后的旁细胞,线粒体随机突变率增加,其中GC→TA突变最为丰富,并伴随有线粒体膜电位下降,还表现出基因不稳定现象,如端粒缺失和分裂染色体桥的形成,均与细胞线粒体功能异常有关,其中线粒体膜电位降低致ROS升高起到关键作用,并且这种损伤是可以通过提高线粒体抗氧化功能得以挽救的。因此,线粒体基因组特定的突变或者损伤很可能成为RIBE和许多应激效应的灵敏标记物。

### 2 辐射旁效应引起线粒体氧化还原水平的改变

电离辐射可使细胞产生大量自由基致机体氧化应激,引发细胞内一系列氧化还原反应,事实上,许多数据证实辐射旁效应的发生与自由基有关。

研究表明,线粒体依赖的氧化还原途径参与RIBE的早期过程。线粒体依赖的ROS不仅对于受照射细胞信号因子的产生有重要作用,在旁细胞对信号响应中也起到关键作用,并且参与诱导旁细胞DNA损伤、基因突变及细胞存活下降等过程。受辐射靶细胞钙离子流和ROS可以诱导长效因子的产生,引起旁细胞损伤反应,且这一过程是膜系统依赖性的。最近也有研究发现,未受照射旁细胞可以营救辐射对受照射细胞产生的损伤,降低其微核形成和凋亡率,并且与ROS水平密切相关。

线粒体作为细胞内自由基的重要来源,不仅产生大量的ROS,而且可能诱发大量活性氮(RNS)的生成。尽管是否存在线粒体NOS(mtNOS)一直存在争议,但是细胞色素C氧化酶作为NO<sub>2</sub><sup>-</sup>还原剂诱导NO生成途径已经在多种动植物体系中得

以验证,而条件培养液处理的旁细胞损伤机制可能是由于钙离子依赖的线粒体mtNOS的激活诱导大量NO生成的原因。我们已经知道,NO作为重要的旁效应信号分子可传递辐射损伤效应。线粒体诱导NO的生成会成为一种恶性循环,上调的NO会抑制氧化呼吸链细胞色素氧化酶活性,导致ROS形成,ROS又会影响Ca<sup>2+</sup>浓度,Ca<sup>2+</sup>进一步上调NO,最终导致大量NO/ONOO——毒性分子的释放,这种反馈调节体系将产生更多的自由基,自由基与蛋白和DNA等生命物质相互作用造成损伤,对细胞产生长期影响。

为了追踪氧化应激中ROS/RNS的时间响应,有实验观察到,线粒体依赖的ROS可能持续产生,引起旁细胞DNA双链断裂(DSB),最终造成染色体损伤和细胞死亡等继发事件。但对于不同的细胞系,这种线粒体依赖的ROS属于早期还是晚期应答可能存在差异。ROS可以造成生物大分子损伤,包括mtDNA和nDNA基因损伤与表达变化,并可能使得细胞在照射后持续处于氧化应激状态,将持续影响细胞及其后代,成为基因不稳定的重要因素。

### 3 线粒体能量代谢在辐射旁效应中的作用

线粒体是真核生物氧化代谢的部位。葡萄糖的氧化分解过程分为糖酵解、三羧酸循环(TAC)和OXPHOS。OXPHOS是释放代谢能的主要环节。研究表明,直接照射或者条件培养液处理的旁细胞均表现出mtDNA编码蛋白的合成能力下降,并且受照细胞在旁效应信号刺激后表现为OXPHOS相关酶类活性下降,尤其是酶复合物IV下降最为明显。应用线粒体NADH脱氢酶与ATP合酶相关基因突变细胞的研究表明,相对于ATP合成正常的细胞,ATP合成酶基因突变的细胞既不能产生旁效应信号也不能对正常细胞释放的旁效应信号做出响应,提示线粒体能量代谢中ATP合成对于辐射旁效应的发生是至关重要的。

线粒体还是脂肪酸链延长的重要场所。研究发现,在小鼠头颅辐射暴露后,小鼠未受照射肝细胞蛋白表达水平长期受到影响,应用质谱分析发现其线粒体中大量酶类发生变化,包括催化脂肪酸碳链的延长的乙酰辅酶A酰基转移酶、乙酰辅酶A脱氢酶等,脂肪酸碳链的延长对于能量储存、脂类合成、细胞膜复合物的维持及细胞功能稳定等是很重要的,RIBE中线粒体损伤的持续存在会对机体产生长远影响。

### 4 线粒体在辐射旁效应诱发细胞凋亡中的作用

线粒体含有许多与细胞凋亡密切相关的物质,如细胞色素C(Cyt-c)、凋亡诱导因子(AIF)、Ca<sup>2+</sup>和ROS等。研究发现,受照射上皮细胞条件培养液可导致旁细胞克隆形成率下降,其主要机制是细胞凋亡所引发的细胞延迟性死亡。另外,还观测到旁细胞Ca<sup>2+</sup>流的快速变化、线粒体膜电位下降和ROS上调,提示凋亡信号通路对于诱导旁效应的发生很重要。

细胞损伤后,线粒体膜通透性发生变化,Cyt-c从线粒体释放后与细胞凋亡激活因子1(Apaf-1)结合,并活化Caspase 9前体,进而激活Caspase 3,引发Caspases级联反应,诱发细胞凋亡。Bcl-2家族在细胞凋亡的线粒体途径中起重要调控作用,其主要途径是通过操控大量线粒体

下转第4版 ▶

终校	排版设计	年 月 日	经营监管部	年 月 日
	编辑出版	年 月 日	总编室	年 月 日

## Fus1 基因敲除鼠中的细胞氧化应激反应介导的辐射敏感性

【据《Cell Death and Disease》2015年1月报道】题: Fus1 基因敲除鼠中的细胞氧化应激反应介导的辐射敏感性 (作者 EM Yazlovitskaya 等)

Fus1 基因可调节胃肠上皮细胞对电离辐射 (IR) 的敏感性, Fus1 的表达水平还可预测个体对辐射毒性易感性。全身照射后, Fus1 KO 小鼠肠隐窝上皮细胞出现死亡和再生减慢的现象。ROS 是 Fus1 KO 小鼠线粒体功能障碍的主要特征。推测在 Fus1 KO 的组织中, 氧化应激可能增加辐射敏感性, 影响隐窝再生。美国范德比尔特大学医学院医学系的 EM Yazlovitskaya 等采用氧化应激反应抑制剂吡哆胺 (PM) 及超氧化物清除剂 Tempol, 探索氧化损伤信号在 Fus1 KO 细胞辐射敏感性中的作用。

### 1 PM 可提高辐射后 Fus1 KO 小鼠的生存期并改善其肠隐窝再生能力

全身照射后, Fus1 KO 小鼠的存活率显著低于野生型 (WT) 小鼠, 而 PM 预处理后, Fus1 KO 小鼠存活率显著上升。

小肠损伤是引起 Fus1 KO 小鼠照射后死亡的主要原因, PM 治疗后 Fus1 KO 小鼠小肠隐窝再生功能显著改善 (图 1)。照射前后给予 PM 都使得 IR 后的 Fus1 KO 细胞恢复到正常 DNA 合成速率。

### 2 PM 改善 Fus1 KO 细胞的抗氧化反应

Fus1 KO 细胞的抗氧化应答蛋白 (Cyto-C、SOD2 和 STAT3) 较 WT 细胞低。经 PM 处理后再照射, Fus1 KO 细胞中该类蛋白的水平显著增

加。PM 处理后使 Fus1 KO 细胞 STAT3 磷酸化水平明显恢复, 使细胞免受氧化损伤。经 PM 处理的 Fus1 KO 细胞再进行 IR,  $\gamma$ H2AX 的反应表现出与 WT 细胞更为相近的状态。

### 3 Tempol 对 WT 细胞和 Fus1 KO 上皮细胞的 DNA 合成的影响

氧化反应抑制剂 Tempol 预处理后再照射, 抑制了 Fus1 KO 细胞和 WT 细胞因照射导致的细胞快速分裂, 表现出类似 PM 的抗辐射作用。

综上所述, 许多癌症患者正常组织中低水平的 Fus1 使其对放疗更为敏感。因此, 血液或组织中的 Fus1 水平可能对 IR 的易感性提供指导。通过 PM 或其它抗氧化化合物对易感人群加以干预, 可以作为癌症放疗过程中正常组织的保护剂。

(王津吟 刘强 报道)

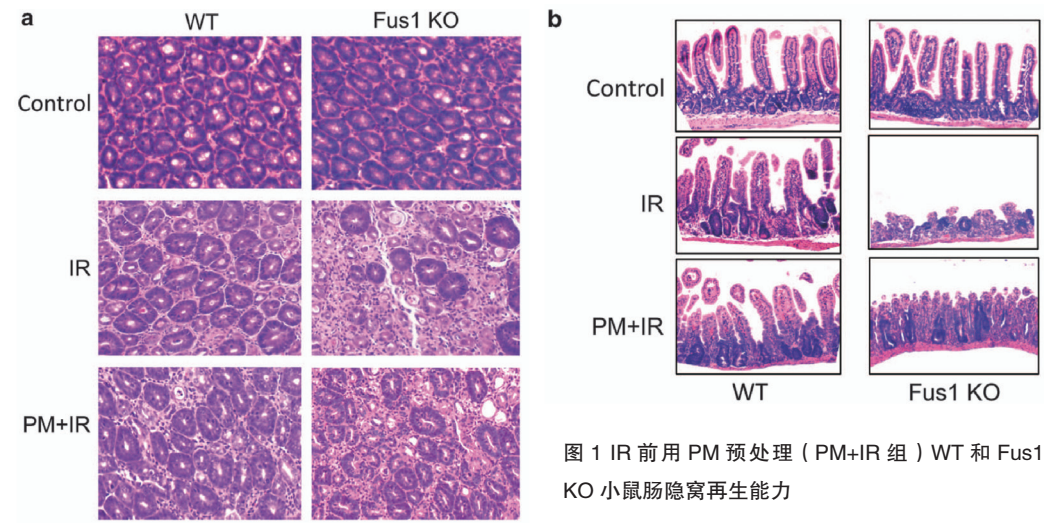


图 1 IR 前用 PM 预处理 (PM+IR 组) WT 和 Fus1 KO 小鼠肠隐窝再生能力

## Reg I $\alpha$ 激活 c-Jun 通过 MARK 通路提高鳞状食管癌细胞的辐射敏感性

【据《Tumor Biol》2015年2月报道】题: Reg I  $\alpha$  激活 c-Jun 通过 MARK 通路提高鳞状食管癌细胞的辐射敏感性 (作者 Akiyuki W 等)

可靠的辐射敏感标志物和关键调控分子成为放射食管癌治疗发展的重要方向。研究显示 REG I 在细胞迁移和癌变中发挥重要调控作用。MAPK 通路在细胞分化和凋亡等中有着重要影响, 包括三个重要调控蛋白: c-jun 氨基末端蛋白酶 (JNK)、Erk 和 p38 蛋白。日本秋田大学医学研究生院外科的 Akiyuki W 等探讨了 REG I  $\alpha$  是否通过 MAPK 发挥辐射增敏作用。

采用食管癌鳞状细胞系 TE-5 和 TE-9 的 Reg I  $\alpha$  的转染, 构建出过表达 Reg I  $\alpha$

的 TE-5 细胞, 而 TE-9 转染后表现出较弱的 Reg I  $\alpha$  表达差异。Western blot 分析发现 c-Jun、JNK、ERK 在 Reg I  $\alpha$  转染后的细胞中表现出明显的相关关系 (图 1)。同样, c-Jun mRNAs 水平在 TE-5 Reg I  $\alpha$

转染细胞中的表达显著增强, 而在 TE-9 Reg I  $\alpha$  转染细胞系表达水平较低 (图 1)。

在临床病理样本的研究中, 作者也发现 Reg I  $\alpha$  改变了磷酸化 c-Jun 的表达, 在 5 个 Reg I  $\alpha$  高水平的阳性组织样

本中, 3 个表现出 c-Jun 磷酸化现象 (图 2a)。在 5 个 Reg I  $\alpha$  表达水平较低的患者组织样本发现均未有磷酸化 c-Jun 的阳性表现。Reg I  $\alpha$  高表达表现出 c-Jun 磷酸化的显著相关性。

作者采用 MTS 分析的方

法对 Reg I  $\alpha$  转染的辐射敏感性进行分析, 相比对照组发现 Reg I  $\alpha$  转染后的 TE-5 和 TE-9 均表现为对射线的敏感性。

从临床病理和体外细胞实验中, 均发现 Reg I  $\alpha$  的过表达对辐射敏感性增强的现象。作者对 c-Jun、JNK 和 ERK 进行了分析, 表现出可能的调控关系, JNK 蛋白可能会被射线等外界因素刺激激活, 通过调控特定的转录因子如 c-Jun 上调促凋亡相关基因。结合现有的报道, Reg I  $\alpha$  激活 c-Jun 发挥了辐射增敏作用, 本研究结果表明其在鳞状食管癌细胞中发挥作用可能是由于 c-Jun 通过 JNK 或 ERK 通路激活发挥作用。

(王宏 刘强 报道)

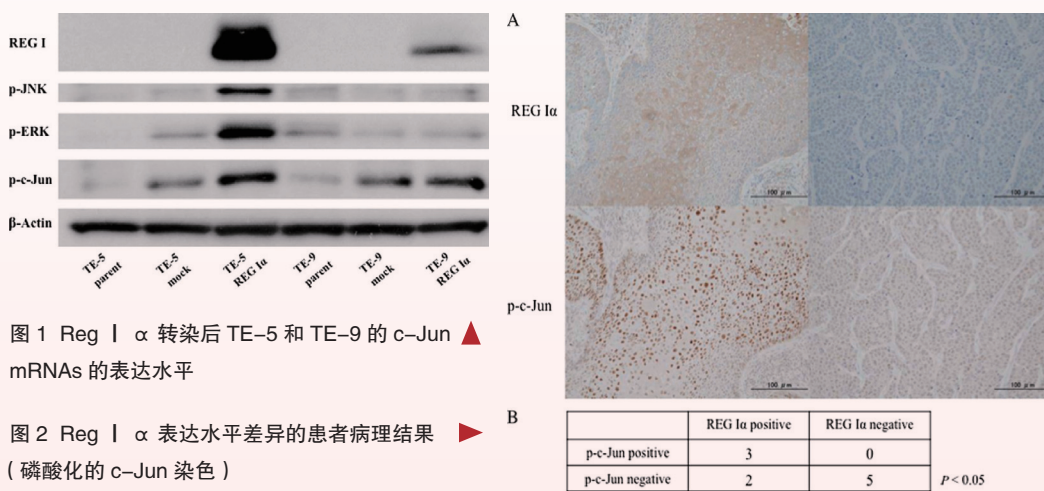


图 1 Reg I  $\alpha$  转染后 TE-5 和 TE-9 的 c-Jun mRNA 的表达水平

图 2 Reg I  $\alpha$  表达水平差异的患者病理结果 (磷酸化的 c-Jun 染色)

医学参考报		放射医学与防护频道							
理事长兼总编辑: 巴德年 副理事长: 曹雪涛等 理事会秘书长: 周赞	社长: 魏海明 副社长: 吕春雷 副社长: 周赞	名誉主编: 吴祖泽 主编: 马力文 副主编: 姜恩海 常务编委: 陈英 郭亦超 江其生 金顺子 刘芬菊 吕慧敏 李君利 刘强 李蓉 刘英 陆毅 刘玉龙 吕玉民 冉新泽 尚兵 问清华 万玲 朱国英 张淑兰 编委: 崔凤梅 陈红红 陈肖华 崔勇 高林峰 何玲 鞠永健 刘福东 梁莉 刘丽宏 凌光华 马庆录 任福利 吴锦海 邹家龙 乌丽娅 王墨培 王善强 肖德涛 谢萍 邢志伟 姚波 余长林 杨文峰	杨业鹏 尹在哲 赵超英 张继勉 张玉松 张照辉 专家委员会主任委员: 尉可道 专家委员会副主任委员: 贾廷珍 委员: 白光 龚守良 龚治芬 李开宝 施仲齐 童建 王桂林 王洪复 王继先 王文学 周湘艳	编辑部主任: 张照辉 编辑部副主任: 郭亦超 陆毅 编辑: 王墨培 肖宇 曹宝山 岳瑶 学术发展部主任: 梁莉 学术发展部副主任: 刘丽宏 刘强					
社址: 北京宣武区红莲南路30号4层B0403 邮编: 100055 总机: 010-63265066									

## MicroRNA-381 增强食管鳞癌细胞的辐射敏感性

【据《American Journal of Cancer Research》2015年1月1日报道】题: MicroRNA-381 增强食管鳞状细胞癌的辐射敏感性(作者 Suna Zhou 等)

食道癌(ES)是导致癌症患者死亡的主要原因之一,其5年存活率小于20%。在东亚,特别是中国的食道癌病人当中,95%的食道癌主要表现为腺癌和鳞状细胞癌(ESCC)。现阶段,放射治疗被认为是食管鳞状细胞癌有效的、成熟的治疗措施。由于鳞癌细胞内在的特点而产生的辐射抵抗,可以导致病人产生更具侵袭性的复发癌。因而,深入了解食管鳞状细胞癌的辐射敏感性或辐射抵抗的分子机制,可以提高放射治疗对癌细胞的杀伤效率,降低癌症的复发风险。

已有的研究中业已证实辐射抵抗和基因表达异常之间的相关性,并把这些基因作为潜在的癌症治疗靶。然而,由于癌症的发生、发展是多信号调节共同作用的结果,通常直接

改变某单一基因并不足以影响癌细胞的辐射敏感性。如今,一种小的非编码RNA分子,miRNAs(microRNAs),由于其具有同时调节多个癌基因通路进而影响辐射反应的潜在能力,正变成一个新兴的和有前景的癌症辐射抵抗研究的课题。miRNAs通过完全或部分与靶mRNAs结合,以阻止mRNAs的转录或导致mRNAs的降解,进而抑制各种功能蛋白质的表达。已有的证据揭示,miRNAs

的差异性表达与很多人类疾病(包括癌症)有关。依据不同的潜在靶基因,miRNAs可以通过与癌基因和抗癌基因结合行使调节癌细胞的一些生物行为,如转移、侵袭、新生血管形成和化疗抗性等表现。另外,有的miRNAs还与病人的生存周期和癌症的辐射抗性有关。但与腺癌和鳞癌的辐射抗性相关的miRNAs表达情况却知之甚少,而且,这些miRNAs的潜在功能和作用机制也不甚明了。

因此,西安第四军医大学唐都医院放疗科的Suna Zhou等拟确证腺癌和鳞状细胞癌的辐射抵抗与miRNAs之关系。

本研究通过对原发食管癌、原位复发食管癌、转移食管癌等组织和细胞进行系列的细胞和基因水平的检测及功能分析,发现miRNA-381在辐射抗性组织和细胞中表达下调。增强miRNA-381的表达可提高腺癌和鳞癌的辐射敏感性,促进癌细胞的非侵袭性表

现(降低癌细胞增殖和迁移能力)。相反,抑制腺癌和鳞癌中miRNA-381的表达可增强辐射抗性和侵袭性表型的产生。进一步在移植瘤中观察到,miRNA-381过表达可降低肿瘤的生长和肿瘤组织对放射治疗的抗性。

因此,通过本项研究,揭示了癌细胞miRNA-381的表达水平可能是食道癌细胞辐射敏感性的一个关键决定因素。

(杨福军报道)

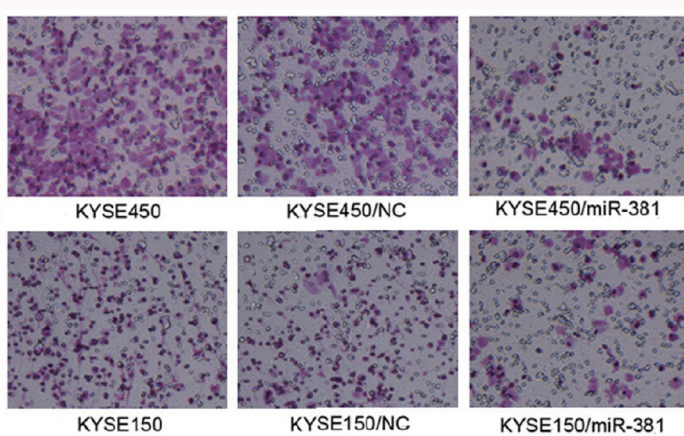


图1 miRNA-381在辐射抵抗的KYSE450和KYSE150食管鳞状癌细胞过表达,使ESCC的侵袭力降低

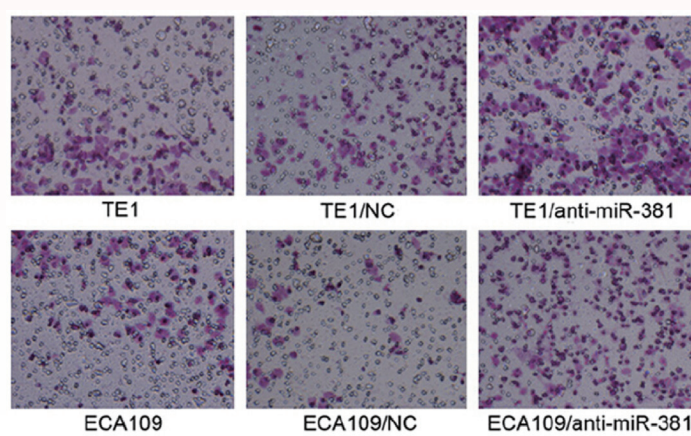


图2 在辐射敏感的TE1和ECA109细胞,miRNA-381抑制导致TE1和ECA109细胞的增殖和迁移能力增强,侵袭力增加

## MicroRNA 145 有助于提高宫颈癌细胞的放射敏感性

【据《FEBS Letters》2015年2月报道】题: MicroRNA 145 有助于提高宫颈癌细胞的放射敏感性(作者 Chen Ye 等)

小分子核糖核酸(miRNA)是一类小的非编码RNA,可以通过降解mRNA或抑制目标mRNA的翻译来调节基因的表达。越来越多的miRNA被证实参与了人类恶性肿瘤的发生与发展,将可能成为新型的肿瘤诊断和预测标志。

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤。文献已报导宫颈癌中存在多种充当癌基因(如miR-182, miR-205)和抑癌基因(如miR-7, miR-214)的miRNA。

第二军医大学上海长征医院妇产科的Chen Ye等首先观察了宫颈癌中miRNA的变化,选取5对宫颈癌组织做基因芯片,结果显示有4个miRNA上调,8个miRNA下调,其中miR-145的变化最显著。

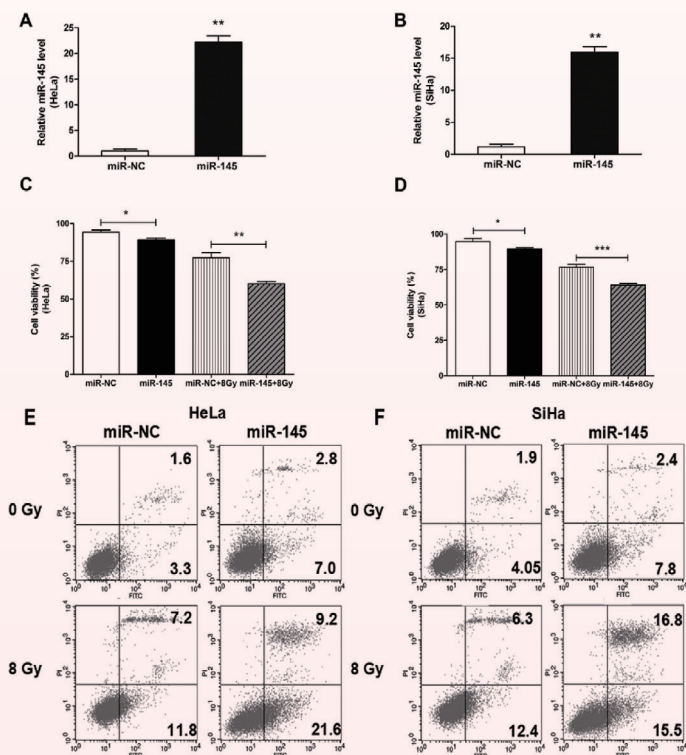
随后选择42对宫颈癌组织标本,观察miR-145表达与临床病理特征的关系。结果见表1。miR-145低表达在中低分化、瘤体较大和分期晚的宫颈癌组织中出现的比例较高。

芯片和生物信息学分析结果表明,HLTF是宫颈癌细胞中miR-145的直接作用靶点;

表1 42例宫颈癌患者miR-145表达水平及临床特征

特征	miR-145 expression level		Chi-square	P value
	Low	High		
病例数	21	21		
年龄 <45: ≥45	9:12	11:10	0.382	0.537
肿瘤大小 <4: ≥4	6:15	14:7	6.109	0.013
FIGO分期, I B: II A: II B	4:9:8	12:5:4	6.476	0.039
分化程度 高:中:低	3:10:8	11:4:6	7.429	0.024
SCC-Ag, ng/ml, <1.5: ≥1.5	7:14	12:9	2.403	0.121
淋巴结转移,是/否	8:13	11:10	0.865	0.352
治疗前血红蛋白数, g/L <90: 90-110: >110	7:8:6	5:9:7	0.469	0.791

P < 0.05 为具有显著性差异



文献报道,HLTF是一种肿瘤抑制基因,HLTF通过增强肿瘤细胞的DNA修复能力参与了肿瘤的辐射抗性机制。因此,本项目就miR-145与宫颈癌放射敏感性的关系进行研究。结果发现,辐射可诱导宫颈癌细胞系中miR-145的高表达;miR-145过表达可显著增强辐射诱导的细胞存活率下降和细胞凋亡;

体内实验也显示,heLa细胞荷瘤鼠单独照射组的瘤体生长速度明显快于miR-145模拟

物联合照射组,而且越高剂量的miR-145模拟物,对瘤体的抑制作用越强。因此,体内实验也证实miR-145有助于增强宫颈癌的辐射敏感性。

因此,本文结果提示,miR-145低表达同宫颈癌临床病理特征的严重程度相关,可能参与了宫颈癌的辐射增敏效应。表明miR-145可能成为一个重要的具有宫颈癌诊断价值的标志物,及新型的辐射增敏药物的靶点。(杜利清报道)

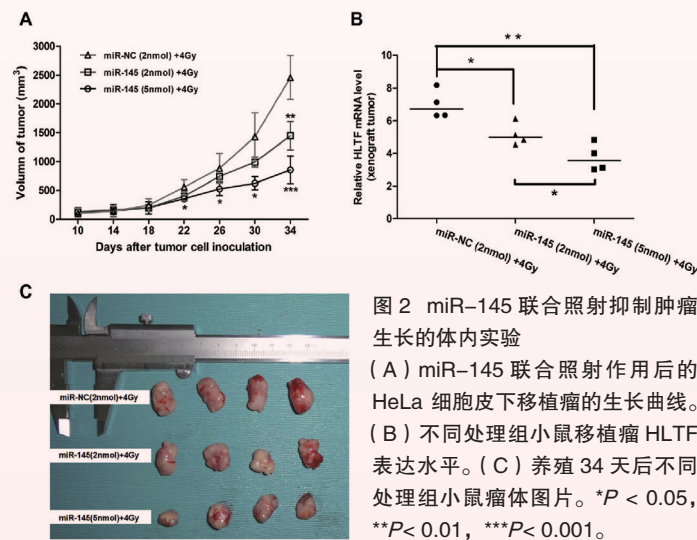


图2 miR-145联合照射抑制肿瘤生长的体内实验 (A) miR-145联合照射作用后的HeLa细胞皮下移植瘤的生长曲线。(B)不同处理组小鼠移植瘤HLTF表达水平。(C)养殖34天后不同处理组小鼠瘤体图片。\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001。

图1 miR-145增加宫颈癌细胞的辐射敏感性 (A和B) miR-145模拟物作用于HeLa和SiHa细胞48小时后,miR-145的表达水平。(C和D) miR-145模拟物作用24小时后,经0 Gy或8 Gy <sup>60</sup>Co射线照射后24小时,细胞存活率变化和(E和F)细胞凋亡率的变化。\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001。

## 端粒在个体化放疗中预测肿瘤病人个体辐射敏感性的作用

【据《Cancer Treatment Reviews》2015年2月报道】题: 端粒在个体化放疗中预测肿瘤病人个体辐射敏感性的作用(作者 C é line Mirjolel 等)

端粒位于真核生物染色体的末端, 由形成 TTAGGG 模式的特异核苷酸序列的多重复序列组成, 见图1。端粒重复结合因子2 (TRF2)、与 shelterin 复合物中的其它蛋白结合的 shelterin 蛋白 (TRF1)、端粒保护子 (Pot1)、三氨基肽酶 (TPP1)、阻遏物活化剂蛋白1 (Rap1) 和 TRF1 交互作用核蛋白2 (Tin2) 覆盖在端粒上, 从而保护染色体免受末端到末端融合, 保持基因组稳定性。像 shelterin 复合物一样, 大量的已知 DNA 修复蛋白, 例如 Ku、MRN 复合物和 ATM 都参与端粒的维持。有假说认为 shelterin 复合物形成 t 环结构, 使端粒不能参与非同源末端连接修复途径。由于电离辐射导致

的端粒 DNA 损伤会引起染色体不稳定性, 因此, 端粒成为电离辐射暴露的可靠标志物以预测肿瘤的辐射敏感性。缩短的端粒对放疗较敏感, 这可以部分解释肿瘤细胞死亡的差异和肿瘤个体间对放疗敏感性的差异。

针对端粒长度缩短和 / 或

端粒稳定性的药理干预能够增加肿瘤细胞放疗的有效性和安全性。端粒的长度和功能取决于 shelterin 复合物, 复合物中的蛋白对放疗疗效产生重要影响。例如 TPP1 被认为是端粒稳态的调节子, 其高表达与放疗抵抗性显著有关; 相反, TPP1 缺失导致的端粒缩短会增

加细胞的辐射敏感性。CST 复合物中的 CTC1 蛋白是重要的端粒维持因子, 由 siRNA 诱导的 CTC1 下调会引起端粒缩短和提高人黑色素瘤细胞系的辐射敏感性。综合考虑, TPP1 和 CTC1 有可能成为预测辐射敏感性的标志物。最近离体研究发现, 端粒长度和 POT1 基础表达水平与人胶质母细胞瘤细胞系和人胶质母细胞瘤活检物对光子照射的抵抗性有显著关联。这一结果提示, 检测肿瘤活检物中的 POT1 表达水平和端粒长度可以确定对放疗抵抗性的肿瘤病人。

端粒长度可以被用来确定对放疗较敏感的肿瘤病人或者确定放疗后有严重副作用的高风险病人。为减少电离辐射的副作用, 在开始任何治疗前预测正常细胞对放疗的耐受性是很重要的。对评估肿瘤辐射敏感性的肿瘤样本和外周血单核

细胞或正常体细胞这样的正常细胞进行端粒分析, 有助于临床医师做出正确的放疗决策。Sharma 等研究发现, 相比没有明显疾病或并发症的具有 9.7kb 的端粒人群, 放疗诱导的患继发性肿瘤的肿瘤病人的明显特征是具有 6.6kb 缩短的端粒。应进行前瞻性临床试验, 来确定是否预先处理的外周血细胞的端粒长度可以成为预测放疗耐受性的指标。

综上所述, 法国 Centre Georges-François Leclerc 放射肿瘤学部的 C é line Mirjolel 等端粒在肿瘤的启动、发展和对现有肿瘤放疗方案的选择起着非常关键的作用。由于端粒比其它基因组对放疗更敏感, 因此端粒将成为预测肿瘤病人辐射敏感性的有前景的生物标志物。在个性化医学时代中, 有可能根据端粒的长度进行个体化放疗。(王芹报道)

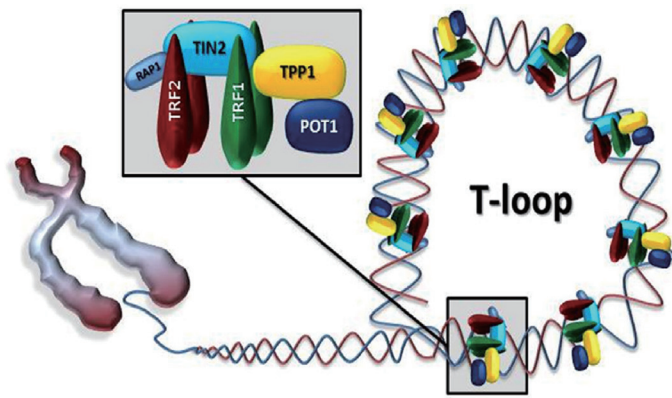


图1 端粒结构的部分图示。端粒位于真核生物染色体的末端。端粒形成 t 环以避免被双链断裂识别。t 环由 6 个蛋白形成的复合物来维持 (TRF1 - 2、Pot1、TPP1、Rap1 和 Tin2)。

## 降低端粒重复结合因子 2 表达提高肿瘤的辐射敏感性

【据《J Cancer Res Clin Oncol》2015年1月报道】题: 降低端粒重复结合因子 2 表达提高肿瘤的辐射敏感性, 而与端粒酶活性无关(作者 Xiaoxi Yang 等)

放疗是肿瘤的主要治疗手段。但是接受放疗的肿瘤病人可能由于具有辐射抵抗性而导致肿瘤局部复发或远处转移。因此, 有必要建立对肿瘤细胞辐射敏感的靶向分子治疗来预测肿瘤的辐射抗性。端粒长度被认为是实用的预测肿瘤辐射敏感性的指标。端粒重复结合因子 2 (TRF2) 保护端粒免受末端到末端融合, 从而保持基因组稳定性。目前还没有报道

TRF2 降低是否能通过调节端粒体内平衡而提高端粒酶阳性细胞和端粒选择性延长 (ALT) 细胞的辐射敏感性。

武汉大学中南医院放射和医学肿瘤学系的 Xiaoxi Yang 等将端粒酶阳性细胞系人肺癌 A549 细胞和 ALT 细胞人骨肉瘤 U2OS 细胞系以 2.0Gy/min 平均剂量率进行 X 线照射, 照射总剂量为 64Gy。实验发现, A549R 和 U2OSR 细胞中的 TRF2 蛋白表达分别呈 2.8 倍和 3.8 倍增加, 显著高于 A549 和 U2OS 细胞。A549R 和 U2OSR 细胞的 D0、Dq 和 SF2 放射生物学参数明显低于 A549 和 U2OS 细

胞。结果表明, 建立了 A549R 和 U2OSR 两个辐射抗性细胞系。

本实验采用 siRNA 方法阻断细胞中 TRF2 表达。研究发现, 与阴性对照组相比, A549-siTRF2 和 U2OSR-siTRF2 细胞中 TRF2 蛋白表达分别下降 45% 和 78%。表明 siRNA-TRF2 能有效下调 TRF2 的蛋

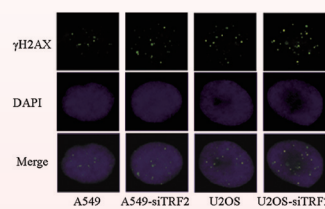
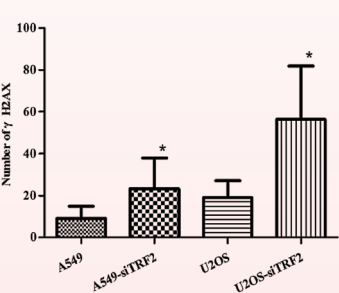


图1 TRF2 表达下调后, 细胞中的  $\gamma$ -H2AX 焦点明显增加

白水平。siRNA-TRF2 组 D0、Dq 和 SF2 放射生物学参数显著低于对照组。结果表明, 下调 TRF2 表达水平能增加 A549 和 U2OS 细胞的辐射敏感性。

从图1可见, 下调 TRF2 表达明显缩短 A549 和 U2OS 细胞端粒的长度; TRF2 表达降低的 A549 细胞, 其端粒酶活性也受到



抑制。实验对 TRF2 表达下调细胞中的  $\gamma$ -H2AX 焦点进行了检测。结果发现, 与 A549 (9.16 ± 0.81) 和 U2OS (19.08 ± 1.13) 细胞相比, A549-siTRF2 (23.32 ± 2.07) 和 U2OSR-siTRF2 (56.34 ± 3.61) 细胞的  $\gamma$ -H2AX 焦点显著增加 (图1)。

本研究得出结论: 降低 TRF2 表达水平因增加 DNA 损伤而导致端粒酶阳性细胞和 ALT 细胞对辐射较敏感。TRF2 是 A549 和 U2OS 细胞的辐射抗性蛋白, TRF2 可能成为端粒酶阳性细胞和 ALT 细胞放疗辐射敏感性的靶标。

(王芹报道)

### ◀ 上接第 1 版

膜间隙蛋白的释放, 包括上述的 Cyt-c。应用条件培养液转移和单粒子微束定点照射的方法, 均观察到旁细胞线粒体变化和 bcl-2 及 Cyt-c 表达上调, 进而引发细胞凋亡, 并且条件培养液导致的旁细胞线粒体质量和 bcl-2 表达变化呈现剂量依赖。Cyt-c 缺失的鼠胚胎成纤维细胞不仅在辐射损伤旁信号的产生上弱于 Cyt-c 正常细胞, 而且丧失了对 Cyt-c 正常和缺失细胞的辐射损伤旁信号的响应。研究发现, 在三株不同 p53 状态的肝癌细胞系 (野生型、突变型和缺失型) 中, 只有 p53 野生型细胞受照后能导致旁细胞微核形成率明显上升, 其中 p53 依赖的 Cyt-c 释放在其中发挥重要作用, Cyt-c 通过调控 iNOS 依赖的 NO 生成, 产生辐射旁效应的损伤效应。

辐射旁效应涉及到受照射靶细胞和未受照射旁细胞之间的相互作用, 受到辐射种类、细胞类型、基因型、效应指标和实验条件等诸多因素影响, 对其具体的发生机制还有许多不解之处。尽管大量报道主要涉及 RIBE 的损伤效应, 但是 RIBE 也存在保护性效应, 即未受照射细胞可能产生某些保护信号因子, 降低受照细胞的辐射损伤。

### 5 结语

关于线粒体在 RIBE 中的作用的研究已逐渐深入, 但仍有很多问题亟待解决, 如电离辐射直接作用和 RIBE 引起的线粒体突变的类型与热点是否一致呢? RIBE 中线粒体基因组及功能变化与哪些疾病具有相关性? 作为辐射旁效应的亚细胞器水平的靶点之一, 它是通过怎样的分子机制释放哪些旁效应信号, 又通过怎样的信号传导通路来应答旁效应信号的呢? 线粒体是否能够独立应答 RIBE, 还是要依赖于细胞核发挥作用? 上述大量研究都是线粒体的短期观察结果, 那么这种线粒体结构功能变化是否能够持续存在, 进一步导致细胞转化呢? 不同 LET 射线辐照诱发的旁效应作用下, 线粒体基因变化有何异同呢? 弄清楚这些问题, 对进一步揭示 RIBE 与线粒体的关系, 对于提高放疗疗效、提高辐射防护水平等均具有重要意义。

## 甲基澳瑞他汀 E 辐射增敏作用机制及靶向给药研究

【据《Cancer Research》2015年2月报道】题:甲基澳瑞他汀 E 对肿瘤的辐射增敏作用机制及靶向给药(作者 Buckel L 等)

细胞处于不同的细胞周期时对 IR 的敏感性不同, G2/M 期对 IR 最敏感。甲基澳瑞他汀 E (Monomethyl auristatin E, MMAE) 通过抑制微管蛋白的多聚化来阻断细胞的有丝分裂。因而, 美国加州大学放射医学与应用科学的 Buckel L 等提出了 MMAE 作为辐射增敏剂的假设, 研究了 MMAE 的辐射增敏作用以及在小鼠中靶向递送 MMAE 的肿瘤治疗效果。

首先作者测试了 MMAE 阻断肿瘤细胞 HCT-116 和 PANC-1 于 G2/M 期的能力, 发现 5nM MMAE 就能使 50% 的 HCT-116 细胞停滞在 G2/M 期, 对于 PANC-1 细胞 2nM MMAE 处理即可。此外, 比较了 MMAE 和紫杉醇的细胞毒性。对 MMAE 和紫杉醇的 IC<sub>50</sub> 值, HCT-116 细胞分别为 1.7nM 和 10.0nM; PANC-1 细胞分别为 0.6nM 和 15.1nM; 一种传代次数有限的人胰腺癌细胞系 779E 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 5.6nM 和 52.0nM, 说明 MMAE 的细胞毒性明显强于紫杉醇。接下来的彗星实验结果显示,

细胞接受 IR 照射前用 MMAE 处理 24 小时, 会导致细胞中的 DNA 双链断裂明显增加, 说明 MMAE 能增强 IR 对 DNA 的损伤。采用克隆形成实验检测了 MMAE 对 HCT-116 和 PANC-1 细胞的辐射敏感性的影响。如

图 1 所示, 用 5nM MMAE 处理 HCT-116 细胞, 或者用 2nM MMAE 处理 PANC-1 细胞过夜, 然后细胞接受 0~8Gy 的照射后, 细胞的存活率均显著下降, 说明 MMAE 能有效增强细胞对辐射的敏感性。

为了将 MMAE 直接递送到肿瘤部位, 作者采用了可活化细胞穿膜肽 (ACPP) 技术, 将 MMAE 与载体 ACPP-cRGD 相连。HCT-116 或 PANC-1 肿瘤细胞异种移植到裸鼠两条后腿处, 成瘤后 IR 仅照射裸鼠的

右后腿。对 HCT-116 成瘤鼠起始采用 6Gy 照射, 接下来的两天减为 3Gy, 前两次照射后 6 小时给裸鼠静脉注射 ACPP-cRGD-MMAE (7.5nmol/天)。结果显示(图 2A), 与不处理的对照组肿瘤相比, 单纯注射 ACPP-cRGD-MMAE 而不接受 IR 照射组的肿瘤生长有些许延迟; 只接受照射组的肿瘤开始几天生长抑制严重, 但是到第 10 天之后肿瘤生长又有所恢复; 而 IR 照射和 ACPP-cRGD-MMAE 相结合组的肿瘤生长则受到了持续的抑制。在 PANC-1 成瘤鼠中, 作者还比较了没有连接 ACPP 载体的 MMAE 的抑瘤效果(见图 2B)。在起始时和第一天下午给裸鼠静脉注射 MMAE 或 ACPP-cRGD-MMAE (6nmol/天), 第一天上午和第二天 3Gy 照射裸鼠, 发现尽管 MMAE 和 IR 联合治疗也能有效抑制肿瘤生长, 但是效果却没有 ACPP-cRGD-MMAE 和 IR 联合治疗好。

总之, 本研究不仅证实了 MMAE 可以作为一种有效的辐射增敏药, 更重要的是探索了一条将辐射增敏药与 ACPP 载体相连, 从而使 MMAE 定位在肿瘤处发挥辐射增敏作用的新治疗途径。(徐畅报道)

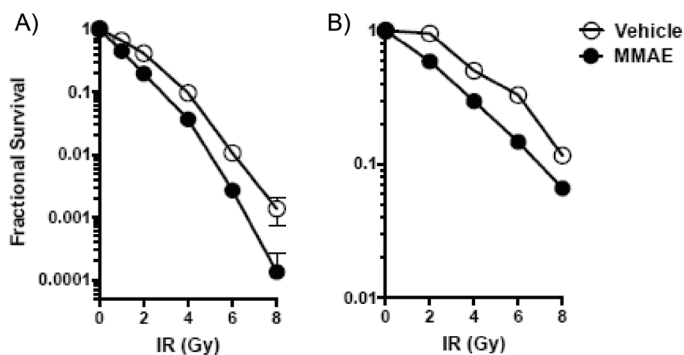


图 1 在克隆形成实验中 MMAE 显著降低受照肿瘤细胞的存活率。A) HCT-116 细胞用 5nM MMAE 处理并接受不同剂量的 IR 照射后的存活分数 (Fractional Survival); B) PANC-1 细胞用 2nM MMAE 处理并接受不同剂量的 IR 照射后的存活分数。

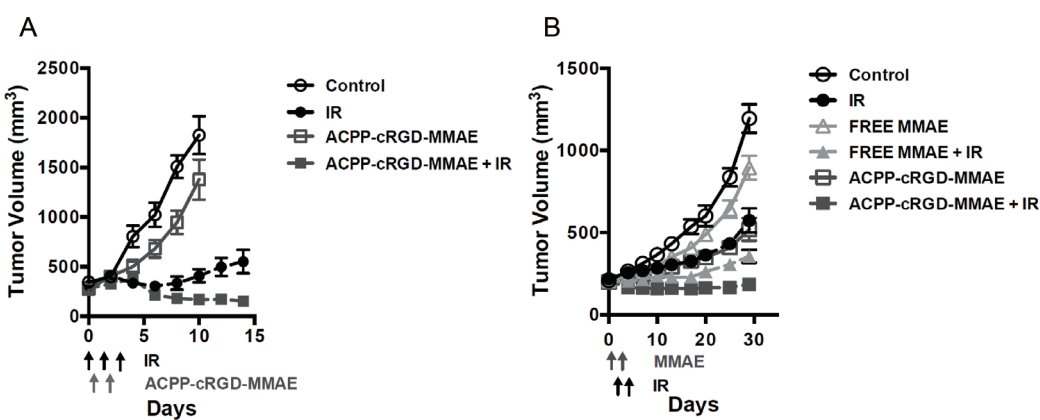


图 2 ACPP-cRGD-MMAE 与 IR 联合使用显著抑制肿瘤生长。将 HCT-116 或 PANC-1 肿瘤细胞异种移植到裸鼠成瘤, 然后采用静脉注射 MMAE 或 ACPP-cRGD-MMAE 和 / 或 IR 照射(如图中所注)的方式治疗。A) 在 HCT-116 成瘤鼠中, 不同治疗方法下的肿瘤体积 (Tumor Volume); B) 在 PANC-1 成瘤鼠中, 不同治疗方法下的肿瘤体积。

## 凋亡抑制蛋白拮抗剂 Debio 1143 提高细胞辐射敏感性

【据《American Journal of Cancer Research》2014年11月报道】题:在体外非小细胞肺癌细胞中多种凋亡抑制蛋白的拮抗剂 Debio 1143 激活细胞凋亡并提高细胞的辐射敏感性(作者 Liu N 等)

促进细胞凋亡是提高肿瘤细胞辐射敏感性的一种方法。凋亡抑制蛋白 cIAP1、cIAP2 和 XIAP 在许多癌症中高表达, 导致放疗效果不佳。Smac 是凋亡抑制蛋白拮抗剂。Smac 类似物将有望成为新的治疗药物。Debio 1143 是一种具有口服活性的 Smac 类似物, 能作用于 cIAP1、cIAP2 和 XIAP。天津医科大学天津肿瘤医院放射肿瘤治疗科的 Liu N 等研究了 D1143 提高非小细胞肺癌细胞对放疗的敏感性。

研究者首先测试了 D1143 对非小细胞肺癌细胞 HCC193 和 H460 生存能力的影响, 发现 HCC193 细胞对 D1143 比较敏感 (IC<sub>50</sub>=1 μM), 而 H460

细胞对 D1143 则不敏感。免疫印迹实验显示, D1143 处理 HCC193 和 H460 细胞, 能引起细胞内 cIAP1 水平显著下降, 同时 XIAP 水平也有一定程度的下降; 并且会出现剪切

的 caspase-3 和 caspase-8 条带, 说明 D1143 诱导 HCC193 和 H460 细胞凋亡是通过促进凋亡抑制蛋白的降解来实现的。接下来, 进一步发现 D1143 诱导的细胞凋亡在 HCC193 细胞

中是通过激活外在途径实现的, 因为 D1143 处理的 HCC193 细胞分泌肿瘤坏死因子 TNF-α。最后, 采用克隆形成实验检测了 D1143 对 HCC193 和 H460 细胞的辐射敏感性的影响。如

图 1A 所示, 用 2.5 μM D1143 处理 HCC193 细胞 24 小时, 会使照射后的 HCC193 细胞的存活率显著下降(剂量增强比 DER 值为 2.19, P=0.001)。而单独使用 D1143 或 TNF-α 处理 H460 细胞, 对照射后的 H460 细胞的存活率没有显著影响(见图 1B), 但是对 H460 细胞联合使用这两种药物则能显著提高其辐射敏感性(剂量增强比 DER 值为 1.92, P=0.026)。

起初人们认为 Smac 类似物是通过促进 caspase-3、-8 和 -9 的激活来促进细胞凋亡的, 而后的研究证明, 当单纯使用 Smac 类似物时, 其促凋亡的特性主要是通过自动泛素化和降解 cIAPs、解除抑制 RIPK3 和诱导 TNF-α 分泌来实现的。本研究证实了 Smac 类似物 D1143 在细胞中的辐射增敏作用, 为在动物模型中或临床上使用 D1143 来治疗肺癌提供了转化研究基础。

(徐畅报道)

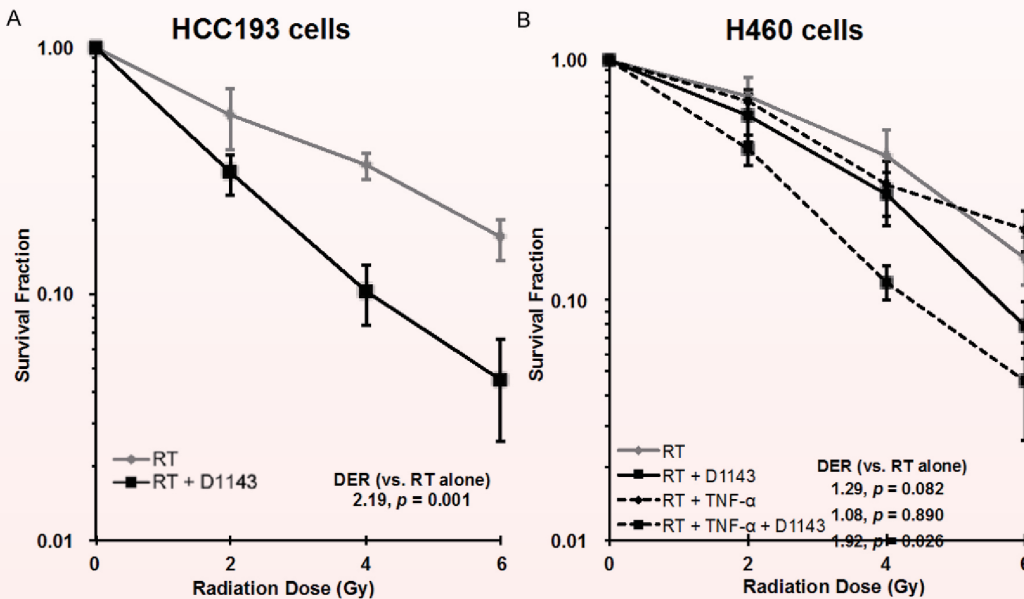


图 1 D1143 显著提高肺癌细胞 HCC193 和 H460 的辐射敏感性。A. 在克隆形成实验中, D1143 处理 HCC193 细胞使其剂量增强比 (DER) 明显改变; B. D1143 或 TNF-α 单独处理 H460 细胞, 均不能明显改变其 DER, 但两者联合使用则引起生存曲线显著变化。

## PKM2 基因敲降增强非小细胞肺癌辐射敏感性

【据《Cell Biochem Biophys》2015年2月报道】题: PKM2 基因敲降增强非小细胞肺癌辐射敏感性(作者 S Wang 等)

肿瘤治疗中细胞代谢与辐射抗性有关。正常细胞与其癌变细胞的代谢属性不同, 癌细胞的扩散增殖依赖于有氧糖酵解、脂肪酸氧化和谷氨酰胺的代谢。癌细胞中另一个重要的代谢变化因素为温伯格效应, 即癌细胞中糖酵解速率异常增加, 仅一小部分葡萄糖发生氧化磷酸化, 表明糖酵解为肿瘤细胞代谢提供能量的, 而线粒体氧化磷酸化作用明显降低。丙酮酸激酶同工酶 M2 (PKM2) 是肿瘤细胞中有氧糖酵解的关键调节酶之一, 是肿瘤治疗的潜在靶点。山东省肿瘤医院和研究所放射肿瘤学科的 S Wang 等主要研究非小细胞肺癌细胞中 PKM2 的沉默对电离辐射的应答作用。

非小细胞肺癌细胞 A549 和 H460 的形态为类椭圆形, 接受 12 个月低剂量电离辐射后, 其存活细胞的形态变为纺锤形。为了检测其辐射抗性, 分别对亲代和新形成的细胞系给予 5Gy 照射, 继续培养一周左右。显微镜观察结果显示亲代细胞的存活率仅 20% 左右, 而新形成的细胞系存活率较高。MTS 结果显示, 与亲代细胞相比, 低剂量处理的细胞的 OD 值显著增加, 表明该细胞具有辐射抗性。

细胞辐射抗性的变化可能是细胞代谢的变化引起的, 而肿瘤细胞最重要的代谢改变为温伯格效应, PKM2 是其中重要的代谢酶。蛋白印记结果显

示两种辐射抗性细胞中 PKM2 含量显著增加, A549 中含量更高。而 PKM2 表达水平与辐射抗性之间的具体作用机制, 采用 PKM2 基因沉默的方法进行

了研究, 结果显示 PKM2 的沉默降低了辐射抗性细胞系的抗辐射能力。MTS 结果表明, 与辐射抗性细胞相比, PKM2 沉默细胞死亡率更高。

PKM2 引起的细胞死亡和辐射敏感性可能有多种原因。原位末端标记法对细胞凋亡率变化的检测结果显示, 与辐射抗性细胞相比, PKM2 的沉默

引起细胞凋亡率增加(图 1A)。为了解诱导细胞凋亡的主要原因, 笔者对组蛋白 H2AX ( $\gamma$ -H2AX)、PARP 切割条带、GRP78 和 CHOP 进行蛋白分析。在细胞凋亡中  $\gamma$ -H2AX 对 DNA 断裂至关重要; PARP 的切割条带是细胞凋亡的一个重要标记; 内质网应激导致 GRP78 和 CHOP 的增加。结果显示沉默 PKM2 基因引起上述被检测蛋白表达量增加(图 1B), 表明沉默 PKM2 基因能够通过线粒体应激诱导细胞凋亡。

最后, 将辐射抗性细胞系 A549 和 H460 细胞以及 PKM2 沉默的细胞系分别植入裸鼠体内建立动物模型, 给予 8 周放射治疗, 进行体内研究。结果显示辐射抗性细胞系的肿瘤继续生长, 而 PKM2 基因沉默有效的阻止了肿瘤的生长(图 2)。体内体外研究结果一致, 表明 PKM2 基因沉默能够增强辐射抗性细胞的辐射敏感性。

辐射抗性肺癌细胞系中 PKM2 表达上调, 沉默 PKM2 基因能够恢复其辐射敏感性。有研究显示 PKM2 表达量的改变与肿瘤细胞的辐射抗性相关。丙酮酸激酶(PK)是糖酵解途径的最后一个限速酶, 催化磷酸烯醇丙酮酸和 ADP 转化为丙酮酸和三磷酸腺苷。PKM2 在肿瘤细胞中表达量很高, 对肿瘤生长和癌症代谢至关重要。关于肿瘤细胞辐射抗性的有效数据仍存在争议。总之本研究结果表明辐射抗性肺癌可能与 PKM2 的上调有关, PKM2 可能成为非小细胞肺癌治疗的潜在靶点, 有效改善放射治疗的效果。

(林凯丽 刘强 报道)

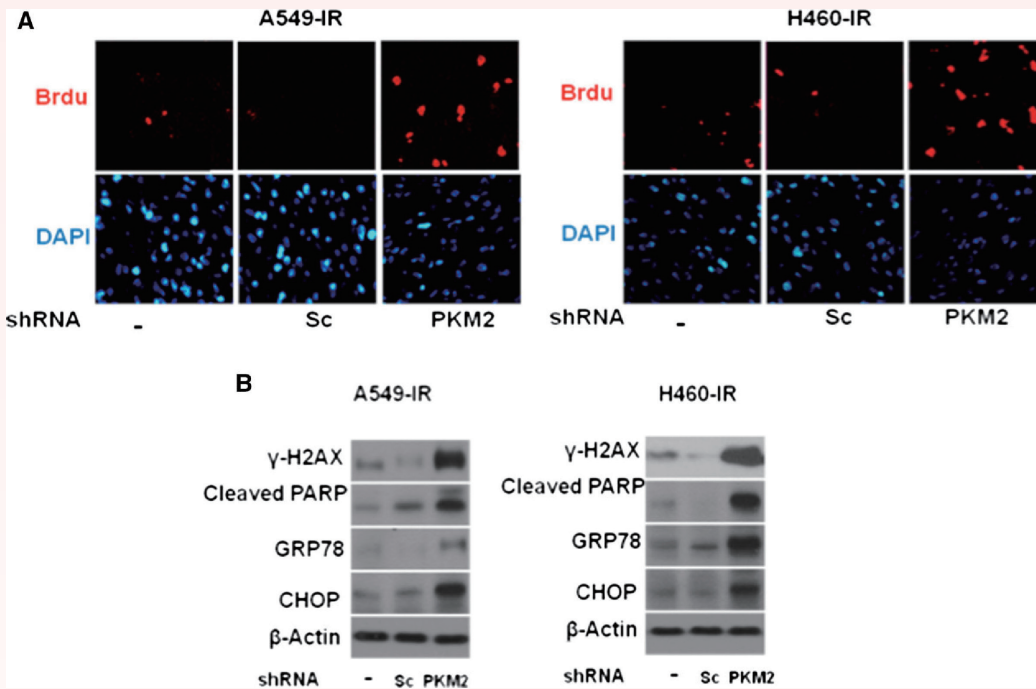


图 1 PKM2 沉默增加细胞凋亡和内质网应激。A 原位末端标记法检测细胞凋亡, 红色标签代表原位末端标记阳性结果, DAPI 染色代表细胞。B 蛋白印记检测凋亡和内质网应激

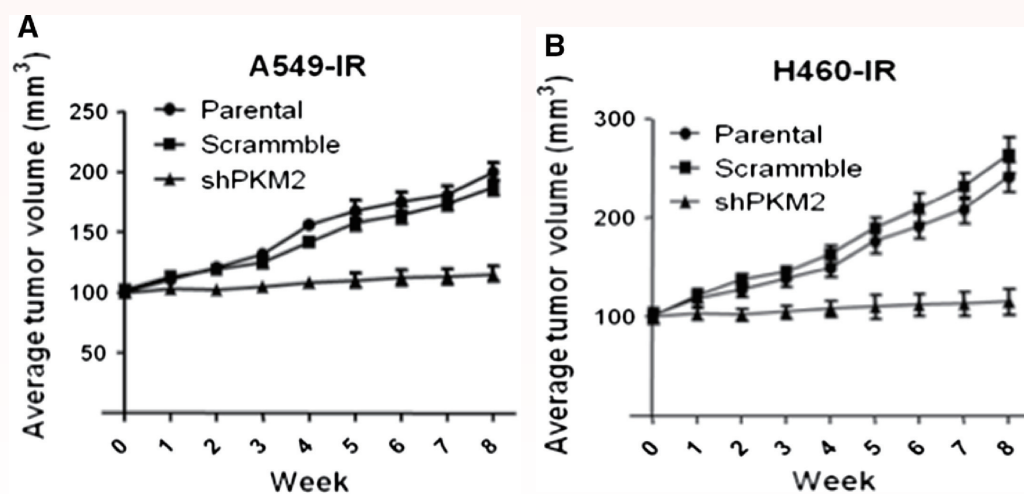


图 2 PKM2 沉默抑制 A549 细胞和 H460 细胞的异体移植模型。A: PKM2 沉默的 A549 细胞异体移植模型接受标准放射治疗后, 8 周内监测肿瘤的生长情况。B: PKM2 沉默的 H460 细胞异体移植模型接受标准放射治疗后, 8 周内监测肿瘤的生长情况。

## 生存素基因沉默增强喉鳞状细胞癌辐射敏感性并抑制其侵袭

【据《Cell Biochem Biophys》2015年2月报道】题: 生存素基因沉默增强喉鳞状细胞癌辐射敏感性并抑制其侵袭(作者 J Hu 等)

放射治疗是喉鳞状细胞癌(LSCC)的重要治疗方法之一, 但是部分早期喉癌患者表现出辐射抗性, 其中约有 5%~10% 的患者从癌症一期转化为二期, 治疗失败。因此, 武汉大学人民医院的 J Hu 等开展了寻找新的方法提高喉癌辐射敏感性, 降低正常组织的辐射损伤的研究。

生存素是一类最小的细胞

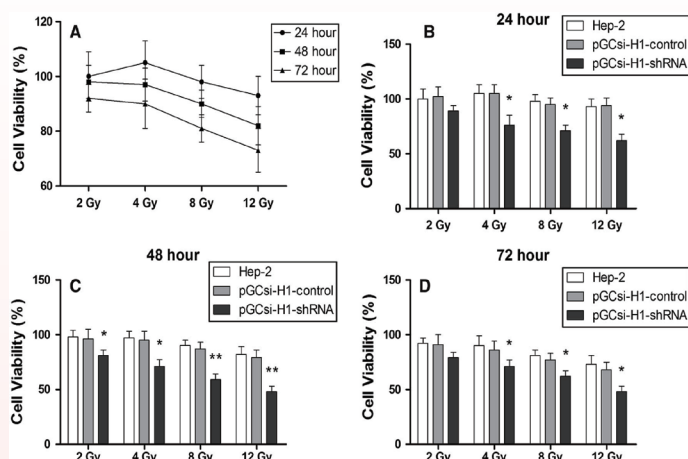


图 1 生存素沉默对 Hep-2 细胞生长和辐射诱导的生长抑制效应的影响。A: MTT 检测转染后 24、48、72h 内的细胞生长曲线。B/C/D: MTT 检测不同时间点的细胞增殖情况

凋亡抑制因子, 由单一基因编码, 分子量为 16.5KD, 定位于 17q25 染色体上(距端粒的距离约占全长的 3% 左右), 其凋亡抑制区域能够抑制线粒体凋亡途径。另一方面, 生存素的表达发生在细胞周期 G2/M 期, 促进细胞快速分裂, 可能对细胞分裂具有调控作用。生存素在睾丸、胸腺和胎盘组织以及胎儿发育过程中表达量较高, 而在正常人的其他组织中表达量极低。当组织发生癌变, 生存素含量升高, 进而削弱放疗效果, 但是其在 LCSS 中的作用尚不明确。因此, 生存素的

过表达可能与 LSCC 辐射抗性呈正相关。采用 shRNA 干扰的方法评估生存素对 LSCC 辐射抗性的影响。

### 1 生存素 shRNA 沉默提高 Hep-2 细胞的辐射敏感性

MTS 结果显示 Hep-2 细胞增殖具有辐射时间和剂量依赖性。2Gy 照射后 72h 细胞的增殖不受影响; 4Gy 照射后 72h 细胞的增殖受到不显著影响; 8Gy 照射后 48h 细胞增殖能力显著下降; 12Gy 照射后任一时间内细胞增殖能力均下降(如图 1 所示)。与对照组相比,

下转第 7 版 ▶

## 辐射损伤细胞周期与 DNA 修复之间的关系

【据《DNA Repair》2015年2月报道】题:细胞周期依赖的辐射敏感性与DNA修复通路的连接:基于局部、姐妹染色单体构象依赖的NHEJ与HR之间的转换模型(作者Hufnagl A等)

细胞周期和细胞辐射敏感性之间的联系一直是近年的热门话题。以往的研究多集中在细胞周期与细胞凋亡和坏死的联系来描述细胞周期的影响。然而,细胞周期的重新分配在近来基于模型的研究中有了更详细的探讨,即使在假设的机制基础上,也并不能有很清晰的理论机制来预测细胞辐射敏感性的变化。

辐射损伤后细胞周期和DNA修复之间关系的认识在近年来有了新的改变。更容易出错的非同源末端连接(NHEJ)是增殖状态细胞的主要修复方式,高保真的同源重组(HR)仅发生在S期和G2期。德国Department of Biophysics Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung(GSI)的Hufnagl A等以这两种方式为主要修复途径和基本假说来模型化预测细胞死亡的几率。模型分类的概念是基于染色体结构中2Mbp大小的大环(giant loops)结构DNA损伤片段为基础,一个环的双链断裂数目为分类标准,分为单个双链断裂片段为iDSB(isolated DSB)两个或多个为簇群DNA双链碎片cDSB(clustered DSB)。按照修

复模式(HE或NHEJ)也就是原位复制与否又将iDSB分为两个亚类。作为对比,cDSB引起的细胞死亡率被假定不受细胞周期影响,基于这些基本的假定和复制进程的简单描述,该模型允许精确的复制周期依赖辐射敏感性,为了描述cDSB死亡率高于iDSB,引入两个损伤系数, $\epsilon_c$ ,  $\epsilon_i$ , 且 $\epsilon_c \gg \epsilon_i$ 每个染色质环上iDSB数量记为

$n_i$ , cDSB数量记为 $n_c$ , 细胞生存率的模型方程就可以写作:

$$s = e^{-(n_i \epsilon_i + n_c \epsilon_c)} (\epsilon_c \gg \epsilon_i)$$

从公式上可以看出,这些参数的数值变化很好的反映了我们提出的理论描述,生存率受到总的DSB数量的影响,而cDSB的数量对生存率影响较为显著。参考相关研究,我们同时也将X-ray和 $\gamma$ -ray剂量对

DSB数量的关系引用到本模型中:

$$\alpha_{DSB} = 30 \text{ DSB per Gy per cell}$$

假定一个基因组的大小 $S_G = 6 \times 10^9$  bp 一个对细胞存活率产生影响的DNA损伤环的大小为 $S_L = 2 \text{ Mbp}$ , 则 $N_L = S_G / S_L = 3000$  giant loops, 每个染色质环上可预测的DSB为 $Y_{loop} = \alpha_{DSB} / N_L = 0.01 \text{ Gy}^{-1}$ , 我们将每个环包含0个DSB的记为

$n_0$ , 即可推导出:

$$n_0 = N_L e^{-Y_{loop} D}$$

$$n_i = N_L (Y_{loop} D) \times e^{-Y_{loop} D}$$

$$n_c = N_L - n_0 - n_i$$

按照上述提出的理论假设,S期的高保真HR修复对损伤系数 $\epsilon_c$ 较G1期有较大的影响,将S期和G1期的损伤系数记为 $\epsilon_{i,1}$ 和 $\epsilon_{i,2}$ 可描述为: $\epsilon_{i,2} \ll \epsilon_{i,1}$ 。在细胞周期中, $\epsilon_i$ 系数确实会受到周期变化的影响,造成 $\epsilon_{i,2}$ 和 $\epsilon_{i,1}$ 之间的转化。如图1。

另一方面,从细胞的群体密度分布考虑,细胞的周期在一段时间内同步质量的分布为高斯分布,这里用 $\sigma_{sync}$ 来描述同步时间, $\sigma_{sync} = 1 \text{ h}$ 大约68%的细胞属于同一个周期窗口。在以上理论上,我们选择三种细胞系模型,分别为野生型细胞系,NHEJ缺陷型和HR缺陷型,对相同剂量2Gy辐射下三种细胞随周期时间变化的存活率模拟。这个对DNA损伤进行分类基础上建立的数学模型,结合了不同修复方式的影响因素,给出不同损伤程度的相对存活率,能够准确估测周期循环依赖的辐射损伤细胞生存率。模型中的相对参数均源自于对正常细胞的G1和S期的特征描述,但其仍然能够很好地用于在周期变化敏感的HR缺陷和NHEJ缺陷细胞中,因此,该数学模型具有更广泛的实用性。

(王宏 刘强 报道)

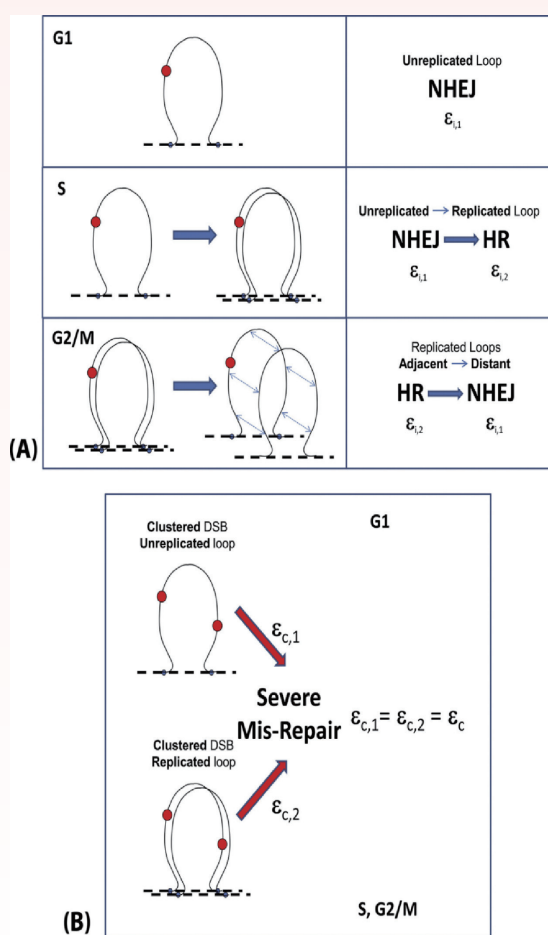


图1 双链断裂辐射损伤系数 $\epsilon$ 在各细胞周期改变中的变化

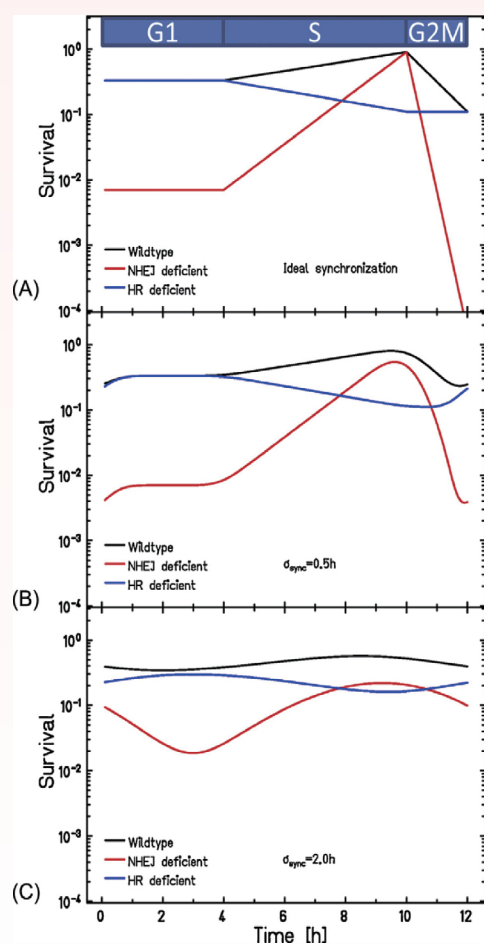


图2 细胞周期与修复途径相互影响最终的细胞生存率

### 上接第6版

4、8、12Gy照射后,48h内转染细胞的增殖和生存能力均显著降低(2Gy剂量组除外)。

### 2 生存素 shRNA 沉默对 Hep-2 细胞周期和凋亡的影响

对8Gy照射后24h的结果进行分析,研究生存素基因沉默对细胞周期的影响。结果如图2所示,与单纯沉默细胞(未照射)相比,照射后24h细胞增殖停留在G2/M期。与亲代对照组相比,沉默组细胞增殖停留在G1期( $P > 0.05$ )。shRNA沉默组照射后,其G2期的辐射累积效应被抵销( $P < 0.01$ )。而电离辐射对空载对照和亲代对照均没有影响。生长素 shRNA 沉默组中凋亡细胞增加;对其进行照射

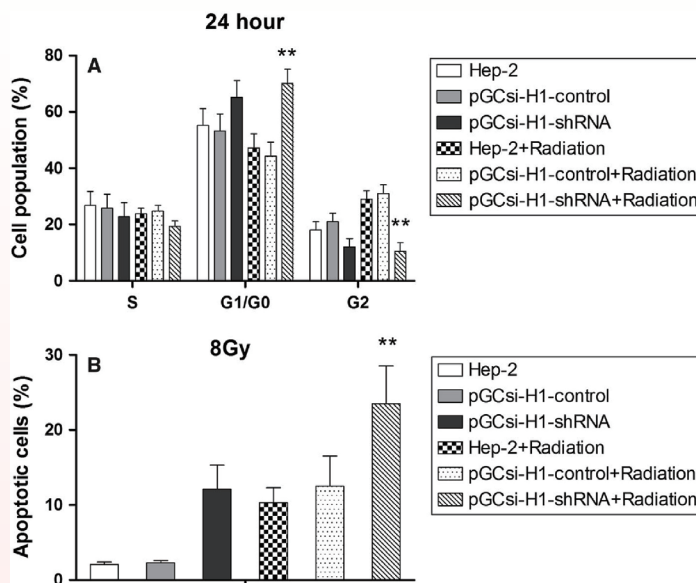


图2 Hep-2细胞中生存素沉默对细胞周期分布和细胞凋亡的影响。A: 荧光辅助细胞筛选分析法检测细胞周期分布,shRNA转染的Hep-2细胞G0/G1期停留增多,G2期减少。B: 荧光辅助细胞筛选分析法检测细胞周期凋亡

后凋亡更加严重。总之,生长素 shRNA 沉默能够阻断其辐射敏感细胞周期,诱导凋亡。

### 3 体内实验研究电离辐射增强生长素 shRNA 沉默对肿瘤的抑制作用

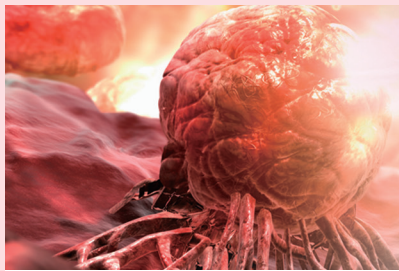
体内研究显示,与单纯生存素基因沉默Hep-2异体移植小鼠相比,20天内电离辐射的荷瘤小鼠肿瘤生长受到显著抑制。体内研究表明LSCC异体移植小鼠受到电离辐射后,细胞增殖能力受到抑制。

生存素在细胞凋亡和分裂过程发挥重要作用,参与多个肿瘤调控信号通路,是肿瘤治疗的潜在靶点。靶向生存素的治疗可能阻断血管生成和肿瘤生长,降低肿瘤辐射抵抗性。尽管生存素不是细胞表面蛋白,

没有内在酶活性,但是其表达和作用可能成为多种癌症治疗的靶点。

生存素疫苗在人类恶性肿瘤的治疗中已经取得较大功效,其靶向治疗目前正处于临床试验评估阶段,其中包括1/2期急性髓系白血病患者、非小细胞肺癌、前列腺癌、乳腺癌、肾细胞癌和恶性黑色素瘤等,但在LSCC中的应用有限。生存素基因沉默具有高特异性,能够抑制靶基因的表达,可能增强LSCC的辐射敏感性,成为LSCC治疗的一个重要方法。尽管生存素是LSCC的有效治疗靶点,是其辐射敏感性的重要位点,但是还需要更多临床前和临床研究对其治疗效果进行评价。

(林凯丽 刘强 报道)



## H<sub>2</sub>S 与肿瘤增殖和辐射敏感性



【据《Mutation Research》2014年5-6月报道】题:H<sub>2</sub>S/CSE信号体系对肝癌细胞的恶性增殖起促进作用(作者Pan Y等)

H<sub>2</sub>S作为一种内源性气体信号分子在心血管系统、免疫系统以及神经系统中的生理学作用已有诸多报道。多种肝癌细胞中的CSE表达要远远高于其在正常肝细胞中的表达,且H<sub>2</sub>S/CSE信号体系对肝癌细胞的恶性增殖起促进作用。采用siRNA技术或CSE的专一性抑制剂PPG可显著降低HepG2细胞的恶性增殖,并可显著增加内源性ROS的生成并大幅降低线粒体膜电位,增加了DNA损伤和细胞凋亡。进一步研究发现,细胞凋亡的增加与抑癌基因P53的激活有关,且抑制H<sub>2</sub>S合成后凋亡相关蛋白bax/bcl-2的表达比例以及促凋亡蛋白JNK的活性均显著增加,推测这种改变是H<sub>2</sub>S/CSE途径调节肝癌细胞恶性增殖的重要原因之一。该研究结果为肝癌的临床治疗提供了新的思路。

更重要的是,抑制内源性H<sub>2</sub>S的合成后,肝癌HepG2细胞放射敏感性增加,缺氧状态下HepG2细胞的辐射致死也得到增强。机制研究表明肝癌细胞放射敏感性的增加是由于抑制H<sub>2</sub>S/CSE体系后激活线粒体凋亡通路,并通过抑制ERK通路的激活阻断了EGF/EGFR通路的信号传导。

除肝癌外,H<sub>2</sub>S与其它癌

症的发生发展也具有密切关系。CBS在多例大肠癌组织中的表达均明显高于癌旁组织,使得癌组织中H<sub>2</sub>S的合成远远高于癌旁组织;而通过敲低CBS基因、降低大肠癌细胞中H<sub>2</sub>S的合成,可以显著抑制癌细胞的增殖、迁移和侵袭。动物实验也证明,沉默CBS表达后,大肠癌异种移植瘤的生长和转移都得到明显抑制。卵巢癌中也发现H<sub>2</sub>S的合成明显高于正常组织,且与肿瘤发展和耐药性相关,沉默CBS后卵巢癌细胞的增殖和转移得到抑制,对化疗药的敏感性也明显增高。

上世纪八十年代,科学家发现在鼠、牛及人的大脑中存在有较高浓度的H<sub>2</sub>S,首次证明生物体内内源性H<sub>2</sub>S的存在。1996年Abe和Kimura发现生理剂量的H<sub>2</sub>S可以作为神经递质参与海马长时程增强,由此掀起了H<sub>2</sub>S研究的热潮。H<sub>2</sub>S信号体系在体内发挥着广泛的生物学效应,在多个系统及多种疾病的发生发展中起着重要的生理和病理作用。

作为一种内源性气体信号分子,H<sub>2</sub>S在心血管系统、免疫系统以及神经系统发挥重要的生理功能。H<sub>2</sub>S具有舒张血管、降低血压的生理功能,H<sub>2</sub>S可通过开放细胞膜上的ATP敏感钾通道,通过膜电位超级化和抑制钙内流以调节心血管细胞的舒张效应,H<sub>2</sub>S内生酶CSE缺失的小鼠会产生高血压

症,这从动物水平阐明H<sub>2</sub>S调节血管压力的作用。

H<sub>2</sub>S与炎症反应密切相关,H<sub>2</sub>S可以有效抑制源于嗜中性细胞的次氯酸引起的组织伤害,还可以干扰次氯酸引起的培养神经母细胞瘤细胞组织的伤害,抑制次氯酸调节的细胞毒性、细胞内蛋白质氧化和脂过氧化反应。体内注射H<sub>2</sub>S则可以减轻气道发炎和气道重塑,血浆中和肺组织中的H<sub>2</sub>S浓度水平与呼吸流速峰值呈正相关,与BALF中嗜酸性粒细胞和中性粒细胞浓度呈负相关。研究证明H<sub>2</sub>S一般是通过激活KATP通道来调节减轻炎症或者组织损害的。

H<sub>2</sub>S对中枢神经系统还具有调控作用。内源性H<sub>2</sub>S对学习及记忆有重要的调节功能。H<sub>2</sub>S作为一种气体介质,在细胞间传递时不需要任何介质,因此具有一种迅速的活化机制。脑内源性H<sub>2</sub>S可以选择性地提高N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体调节的神经系统反应,促进诱导海马区长时程增强,这种增强在CBS基因敲除鼠中被减弱。H<sub>2</sub>S和NMDA受体的相互作用可能与cAMP依赖蛋白激酶旁路的激活有关,但其可能并非通过单一信号转导途径起作用。

此外,H<sub>2</sub>S的体内浓度水平还与多种疾病相关,如肝硬化、心脏病、糖尿病及一系列神经系统疾病等。如CSE在肝

星状细胞内表达,而在肝窦内皮细胞内不表达;星状细胞的活化会下调CSE mRNA的水平,导致内源性H<sub>2</sub>S合成的减少,从而抑制I、III型胶原的合成,这在肝硬化和门静脉高压症的形成过程中发挥重要作用。糖尿病模型小鼠的胰腺和肝脏的H<sub>2</sub>S浓度均高于正常小鼠,肝脏内CSE和CBS的mRNA水平也有所增加,提示糖尿病患者的H<sub>2</sub>S生物合成受到扰乱,H<sub>2</sub>S与糖尿病发病存在一定关系。

H<sub>2</sub>S对辐射生物学效应也具有显著影响。电离辐射会导致机体产生大量活性氧自由基,这是辐射导致机体伤害的主要原因。H<sub>2</sub>S能增加细胞DNA修复蛋白Ku70和Ku80的表达,上调细胞色素C,抑制线粒体呼吸链,使细胞氧自由基生成减少,同时还可增加NADPH/NADP+比例,提高机体抗氧化能力,清除过氧化氢和超氧阴离子,拮抗过氧化亚硝酸介导的损伤。这提示我们,作为人体本身就存在的气体信号系统,H<sub>2</sub>S有可能在机体抵抗辐射损伤中发挥重要作用。

最近复旦大学放射医学研究所的Pan Y等的研究发现,H<sub>2</sub>S可降低正常肝细胞的辐射敏感性,而内源性H<sub>2</sub>S合成酶CSE抑制剂PPG可显著增强肝细胞的辐射损伤。 $\gamma$ -射线辐射可增强CSE mRNA及其蛋白表达,促使细胞释放H<sub>2</sub>S和ROS;外源性NaHS在显著

降低胞内ROS的同时,亦可抑制辐射诱导的p-P53表达、NF- $\kappa$ B活性、以及凋亡蛋白Bcl-2/Bax等。有趣的是,研究发现H<sub>2</sub>S还可反向调控辐射旁效应,即受辐射HepG2细胞所诱导的旁效应受到外源性NaHS的抑制、但因PPG/AOAA的作用而增强,同时,受辐射细胞所产生的条件培养液通过抑制旁细胞内源性H<sub>2</sub>S合成酶的表达而产生旁效应损伤。

概而言之,H<sub>2</sub>S的生理功能已得到公认,对这种气体信号分子的研究也成为热点,更重要的是,H<sub>2</sub>S信号途径极有可能在肿瘤进程以及放疗后肿瘤细胞生物学行为的改变中发挥着重要的调控作用,那么是否可将H<sub>2</sub>S信号体系作为靶点,通过药物或基因手段使肿瘤细胞内的H<sub>2</sub>S合成和代谢回到正常水平,一方面抑制肿瘤细胞的恶性增殖,另一方面则可有效的增加肿瘤细胞的辐射敏感性,从而达到更好的治疗效果。

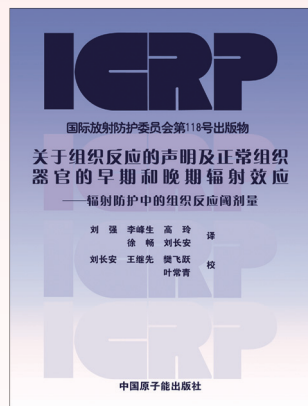
(复旦大学放射医学研究所  
潘燕报道)



### 《放射医学与防护名词》已经发布

2014年全国科学技术名词审定委员会公布了《放射医学与防护名词》一书,内容包括总论,放射物理学,放射化学,电离辐射剂量学,放射防护,医用放射防护,放射生物学,放射毒理学,核武器损伤,核与辐射突发事件医学应急,放射性疾病诊断、治疗与健康监护,放射流行病学,法规与条约13部分,共2526条,每条名词都给出了定义或注释。这些名词是科研、教学、生产、经营以及新闻出版等部门应遵照使用的放射医学与防护规范名词。

(梁莉报道)



### ICRP第118号出版物中文版《关于组织反应的声明及正常组织器官的早期和晚期辐射效应——辐射防护中的组织反应阈剂量》已出版发行

ICRP第118号出版物中文版《关于组织反应的声明及正常组织器官的早期和晚期辐射效应——辐射防护中的组织反应阈剂量》已于2014年底由原子能出版社出版。

该书第一部分编入了ICRP2011年4月发布的“关于组织反应的声明”。第二部分从组织/器官的辐射反应、正常组织反应的修饰和组织/器官与辐射敏感性相关的剂量阈值等四个方面详细阐述了电离辐射生物作用机制的最新进展,同时给出了各器官和组织剂量更新的依据和理由。特别对电离辐射致心血管疾病和眼晶状体损伤诱发放射性白内障的剂量-效应关系做了系统评估。该书还总结了缓解和加剧辐射组织反应的药物,包括抗氧化剂、自由基清除剂、抗炎药、细胞因子等,便于辐射防护和辐射增敏工作实践中参考和应用。该书对放射性疾病诊断标准的制修订有重要的参考价值。

(刘强报道)

终校	排版设计	年 月 日	经营监管部	年 月 日
	编辑出版	年 月 日	总编室	年 月 日