

# 医学参考报

## 放射医学与防护频道

Radiological Medicine and Protection

Number 01

### 执行主编介绍



**朱国英 研究员**

医学博士，研究员，博士研究生导师。现任复旦大学放射医学研究所放射卫生部主任。主要从事环境因子与辐射骨毒理学、职业照射防护等领域的研究。发表SCI和核心期刊等论文50余篇，获上海市科技进步奖二等奖、上海医学科技奖二等奖、中华预防医学会科学技术奖三等奖等。现任中华医学会放射医学与防护分会委员、中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会委员、上海市核与辐射事故应急委员会专家组成员、上海市职业卫生技术服务质量控制中心专家、上海市卫生监督标准化技术委员会委员等。

### 导读

- 复旦大学单粒子微束细胞照射装置介绍 2版
- 非靶效应在低剂量电离辐射中的作用 3版
- 电离辐射诱发动脉粥样硬化研究取得新进展 5版
- 自噬与乏氧肿瘤细胞辐射抵抗 6版
- DAB2IP基因与肿瘤治疗 7版
- 外泌体在肿瘤侵袭转移中的作用 8版



## 电离辐射旁效应

复旦大学放射医学研究所 邵春林

长期以来，人们一直认为电离辐射直接引起的、未能被细胞正确修复的DNA损伤是导致细胞死亡、突变、转化等一系列生物效应的根本因素。1992年，Nagasawa等在对小鼠卵巢细胞(CHO)的研究中发现，即使只有1%的细胞受到 $\alpha$ 粒子的照射，却可以在其它30%的细胞中引起姐妹染色体交换(SCE)；我们采用 $\alpha$ 粒子微束装置照射细胞群体，发现单个粒子照射即可引起周围成百上千个细胞产生染色体损伤；类似的研究表明，当10%的细胞受到2个 $\alpha$ 粒子照射所引起的致癌转化作用与细胞群体每个细胞受到同样剂量照射所引起的致癌转化作用相当。这些结果均表明，辐射诱导了旁效应的产生。

目前，低剂量辐射的致癌危险度一般是通过核爆数据和职业照射的流行病学资料，根据线性无阈(LNT)理论内推而来，但辐射旁效应致突变、致转化的实验证据显示，辐射致癌危险性曲线在低剂量段向上弯曲。因此，需重新审视环境辐射、人工辐射、医疗诊治等低剂量辐射致癌的危险性，并结合辐射旁效应制定具体防护方案及策略。

航空航天中电离辐射旁效应。据估计，在俄罗斯和平号空间站内，宇航员每 $10^{10}$ 个淋巴细胞所受到的空间辐射剂量为：50铁离子/min、800氧离子/min、 $10^3$ 氮离子/s、 $10^4$ 质子/s。虽然个体剂量很低，但这些低通量宇宙射线所引起的

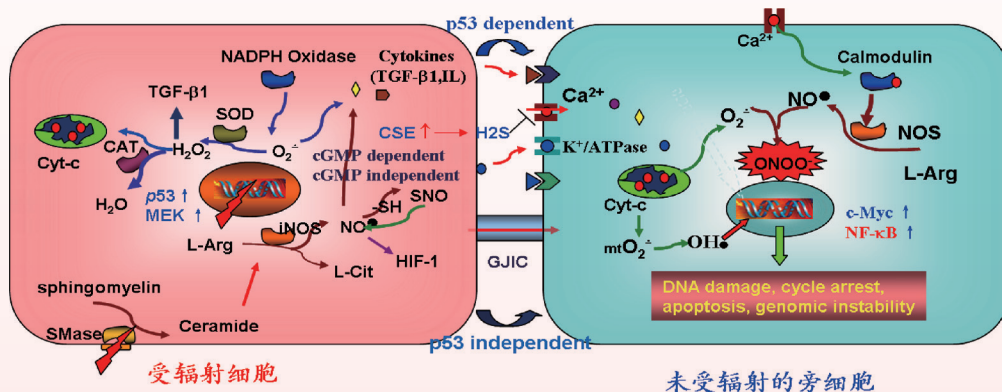
旁效应不容忽视。我们的研究表明，成纤维母细胞群体中的单个细胞受到不同LET的高能Ne离子或Ar离子的照射后，可引起周围成百上千个细胞产生致死性损伤，且该旁效应与LET和细胞受到的辐射剂量无关。Yang等也发现1 GeV铁离子和250 kVp X射线对人成纤维母细胞具有相同程度的辐射旁效应。Kanasugi等发现受到5 keV软X射线和437 keV氮离子照射人纤维母细胞GM05389的条件培养液法均可引起未照射细胞发生染色体突变，并且两种射线所诱导畸变的程度相当，说明电离辐射旁效应并不完全依赖于射线的LET和射线种类。

放射诊疗中的辐射旁效应。众所周知，医疗照射是最大的人工辐射来源。以往的放射诊断及治疗中的防护都是通过屏蔽周围正常组织及危险器官加以实现的，随着三维适形精确放疗(3DCRT)及三维适形调强放射治疗(IMPT)技术的发展，可通过控制照射野形态及治疗机射线束强度使得治疗靶区内部及表面剂量处处相等。但即使是精确放疗，仍可能导致肿瘤附近器官受到低剂量的照射，肿瘤周围未受照射组织和细胞也不可避免地处于辐射旁效应的危险中。例如，采用微束氮离子对T98G神经胶质瘤细胞群体中的小部分进行精确照射，不但增强了近旁未受照射肿瘤细胞的致死性损伤，周围正常细胞也受到显著损伤，而NO和TGF- $\beta$ 1等信号因子在该辐射旁效应中起着重要作用。

电离辐射旁效应可能对放疗疗效具有一定的影响，特别是放疗的远后效应、二次致癌效应等。近年来一种四维放射治疗技术——图像引导放射治疗(IGRT)技术已投入使用。IGRT在三维放疗技术的基础上加入了时间因数的概念，充分考虑了组织在治疗过程中的运动和分次治疗间的位移误差所引起的放疗剂量分布的变化，及其对治疗计划的影响等因素。尽力将放射治疗中对正常组织的辐射损伤和辐射旁效应降到较低水平。

远程辐射旁效应。临床上很早就发现了单侧肺癌照射引起双侧放射性肺炎的案例，可见受电离辐射的细胞或组织不仅可以对其本身产生效应，还可将辐射信号因子通过体液循环系统传递给远处的细胞及组织，引起新的效应。Koturbash1等用1 Gy的X射线照射小鼠身体的一侧，发现另一侧未受照射的部位出现了DNA损伤、Rad51蛋白上调、参与转录沉默的甲基结合蛋白MeCP2和MBD2增高，说明与生长发育和癌症发生息息相关的表观遗传学因素也参与到辐射远位效应的形成过程之中。Mancuso等用X-射线照射Ptc1杂合小鼠新生鼠小脑外的部位，发现可以增高神经管细胞瘤的形成几率，即体内辐射旁效应具有诱发细胞癌变的能力。大量实验证明，单核巨噬细胞系统可以介导辐射远位效应。小鼠肺的一部分受到 $\gamma$ 射线照射1

下转第4版



受辐射细胞

未受辐射的旁细胞

### 专家介绍



**邵春林 博士**

研究员，博士生导师。1989年毕业于四川大学，1992、1995年在中国科学院离子束生物工程重点实验室获硕士和博士学位，1997.8~1998.3于日本京都大学原子炉研究所生命科学部从事COE博士后研究工作，2000.7~2002.8担任日本国立放射医学综合研究所特别研究员，2002.8~2005.8任英国牛津大学Gray肿瘤研究所博士后，2005年8月被复旦大学聘为研究员。

主要开展生物分子DNA和氨基酸的辐射损伤动力学、重离子辐射细胞效应、单粒子微束细胞效应、环境物理化学因素复合生物效应等研究，建立了反映低能离子辐照特性的质能荷效应(EMC)模型，提出了辐射损伤旁效应的级联放大理论和重要靶点；较为系统地研究和发现了多种辐射旁效应调控基因。发表研究论文150余篇，其中70余篇为SCI论文。

为国家自然科学基金委、中组部等多个部委的项目与人才基金评审专家、国家科技部“863”专家库成员，国际空间研究委员会副理事长、中国毒理学会理事、辐射研究与辐射工艺学会副理事长、中华放射医学与防护学会等多个学会的常委或委员、甘肃省重离子医学重点实验室学术委员会主任、兰州重离子加速器国家实验室学术委员会委员。2006年入选教育部新世纪优秀人才支持计划和上海浦江人才计划，2008年入选上海市公共卫生优秀学科带头人。

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

## 复旦大学单粒子微束细胞照射装置介绍

复旦大学现代物理研究所 王旭飞

最近, 复旦大学放射医学研究所和复旦大学现代物理所联合建设的具有国内领先水平的单粒子微束细胞照射装置即将建成, 将为精确照射研究提供尖端技术手段。

上世纪 90 年代, 为克服宽束离子辐照在放射生物学实验中存在的不确定性, 英国 Gray 癌症研究中心首先建成了世界

上第一台单粒子微束装置, 这一新技术很快为放射生物学微观问题的深入研究提供了激动人心的数据和对微电离辐射生物效应等一系列机理的全新理解, 并由此引领了全世界相关实验室加速器放射线微束技术的发展和生物医学应用。目前全世界已建成 30 余台亚细胞放射线微束辐照装置, 其中基

于离子加速器的单粒子微束占大多数。我国目前在复旦大学、中科院合肥物质科学研究所和中科院兰州近代物理研究所建成三台单粒子微束装置, 并已成功应用于生物学实验研究。

单粒子微束的核心技术特点在于: 它能够将加速器离子束斑大小限制在微米量级的细胞或亚细胞尺度, 并且可以精确到单

个粒子剂量向靶细胞的某个特定位置投射。自 20 世纪 90 年代中期研制成功以来, 在环境低剂量暴露的健康影响等辐射生物学实验研究中发挥了重要作用, 揭示了细胞辐照损伤的近旁效应等一系列荷电粒子与细胞相互作用的重要机理, 成为一种可以对单个活态细胞行精确手术的先进实验手段。近年来, 经生物医学、加

速器物理及工程科技人员的努力, 单粒子微束已发展为一种高度精确照射和癌症研究的手段, 由于其亚细胞尺度的精确辐照能力, 在放射生物学领域有力推进了辐射损伤近旁效应、损伤修复, 损伤信号传导及基因不稳定性等一系列基础问题的深入研究, 极大地推进了辐射生物学和癌症治疗等相关基础研究的进展。

### 1 技术原理

单粒子微束是基于离子加速器建造的微米或亚微米离子微束, 结合精确的粒子探测系统、束偏转开关和细胞图像分析与定位系统, 使引出真空外的高分辨率离子微束对空气中单个活态细胞实施精确定量和准确定位的亚细胞照

射, 可对亚细胞尺度电离辐射的微观生物效应开展精确研究。

典型的单粒子微束系统应包括以下基本结构: 1) 基于加速器离子束流获取的微米/亚微米级离子外束; 2) 粒子探测计数与束开关反馈系统; 3) 细胞图像采集与分析系统; 4) 细胞瞄准

定位系统。各系统在计算机控制下自动完成从细胞图像采集分析到逐一定位精确照射的实验流程。定量照射的精确度和亚细胞定位照射的准确性是单粒子微束最关键的性能指标。

典型的单粒子、单细胞照射微束必须满足以下的基本性

能要求: 1) 离子微束的空间分辨率在几个微米(通常  $<10\mu\text{m}$ ) 量级, 可实现针对单细胞乃至亚细胞尺度的定位照射; 2) 离子微束需引出到真空外, 用于针对活态细胞的照射; 3) 微束的离子计数率需控制在合适的水平, 以保证粒子探测系统精确

探测并实现精确个数的单粒子照射; 4) 用于细胞图像采集、识别和定位的细胞图像分析系统; 5) 用于细胞定位照射的高精度瞄准系统; 6) 高分辨率粒子探测系统与快速束流的束开关系统; 7) 适宜受照细胞生长所需温度湿度的辐照实验环境。

### 2 复旦大学单粒子微束

#### (1) 束流传输管道

基于复旦大学  $2 \times 3\text{MV}$  串列加速器 (NEC9SDH-2) (图 1) 建设的束流管道包括 8.6 米水平段和 4.5 米竖直段两个部分。结合束流光学计算和束流调试, 在束流管道末端成功获得  $3\text{mm} \times 3\text{mm}$  的稳定束斑 (3MeV 质子), 通过预准直狭缝调节束斑大小, 最终入射辐照终端的毛细管准直器以引出高品质的离子微束。

#### (2) 准直微束的获取与优化

高品质的离子微束是实现单粒子精确定量和定位照射的基础。微束品质主要在于引出离子的单能性及其空间分辨, 两者对粒子的精确探测和亚细胞照射

的精确性均有直接影响。本装置采用厚壁毛细玻璃管作为微束准直器, 对输送到辐照终端的平行束流进行准直截取, 毛细玻璃管准直器外径  $250\mu\text{m}$ , 内径  $15\mu\text{m}$ , 长度  $0.8\sim 1.0\text{mm}$ , 安装在不锈钢基座内, 并通过定位螺丝进行准直角度的精细调节以引出离子微束。

#### (3) 单粒子辐照系统

采用毛细管准直微束出口安置闪烁体薄膜作为粒子探测的灵敏材料, 在照射过程中微束出口紧贴于上表面贴壁培养了待照射细胞的特制薄膜型细胞盘的下方, 在细胞盘上方安装光电倍增管用于收集微束粒子入射细胞前穿越出口闪烁体薄膜时激发的闪烁光子, 并以

后端电子学处理光电倍增管原始信号并进行单道甄别计数, 在计数到达预定粒子数目时由计算机触发束流开关关断信号, 快速关断束流, 实现对细胞目标精确定量的单粒子照射功能 (图 2)。在这一功能环节的的实现中, 高度精确的单粒子探测是核心环节也是研制工作的主要难点之一, 探测系统的信噪比要求达到尽可能高的水平, 以保证单个粒子触发的脉冲信号的甄别达到接近 100% 的精度。

#### (4) 快速束开关

静电偏转开关采用双极板等值高压通过束流, 单极板快速放电建立高压电场实现快速偏转关断离子束的原理, 采用

自行研制的高压电源, 获得了速度约  $1\mu\text{s}$  的开关关断性能, 足以保证消除了关断动作期间的离子束漏电流, 从而最大可能地消除了单粒子精确探测和照射中由于开关关断速度不足带来的误差因素。

#### (5) 单粒子照射精确的实验测评

采用 CR39 核径迹探测器对毛细管准直微束在单粒子探测器和计算机控制的快速束偏转开关控制下实现的单粒子定量照射

精度进行了定量测评, 结果显示当前微束已实现了高精度定量照射的预期指标, 定量照射精度约在 95% 以上。基于复旦大学串列加速器获得的单粒子辐照性能指标总结为: 典型能量 3MeV (FWHM $<60\text{keV}$ ) 的质子微束, 束径  $\leq 2.2\mu\text{m}$  (半高宽), 微束离子计数率  $1\sim 8000\text{cps}$ , 开关关断速度  $t \leq 1\mu\text{s}$ , 单粒子定量照射精度  $\geq 95\%$ , 微束定位照射误差  $r < 2.2\mu\text{m}$ 。

### 3 基于单粒子微束的生物医学研究

目前放射线微束亚细胞辐照实验主要用于 (1) 亚细胞尺度电离辐射敏感性的非均匀性差异; (2) 单细胞精确照射研究低剂量环境电离辐射的健康效应; (3) 质子-重离子治疗的生物学和微剂量学基础; (4) 空间辐射的生物效应等多

个方面的科学研究。微束亚细胞辐照实验通常涉及的生物学效应终点包括致癌性转化、细胞凋亡、变异和染色体畸变等。

亚细胞微束辐照技术的出现, 使得单个活细胞内部不同位置的定位照射成为可能。而该技术的首次应用即导致重大发现: 利用单粒子微束对哺乳动物细胞内不同位置 (细胞核与细胞质)

的定位照射表明, 细胞核并非细胞内唯一的辐射敏感靶器官, 而细胞质的定位辐照同样可以导致受照细胞产生相当程度的电离辐射损伤, 即在亚细胞尺度的细胞质定位辐照可产生“Bystander 效应”, 从而导致未直接受照的细胞核内 DNA 损伤。这一现象的发现为细胞间通讯的微观机理研究打开了一个全新的热点领域。



图 1 串列静电加速器 (2 × 3MV)

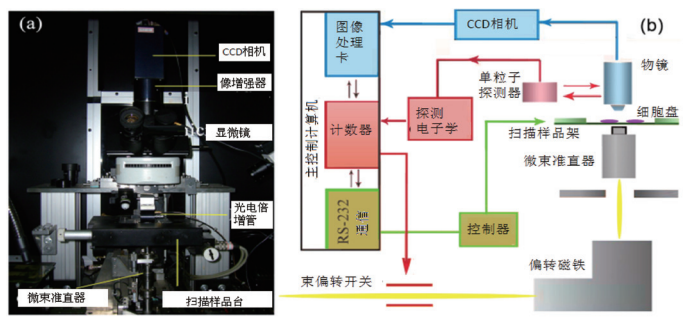


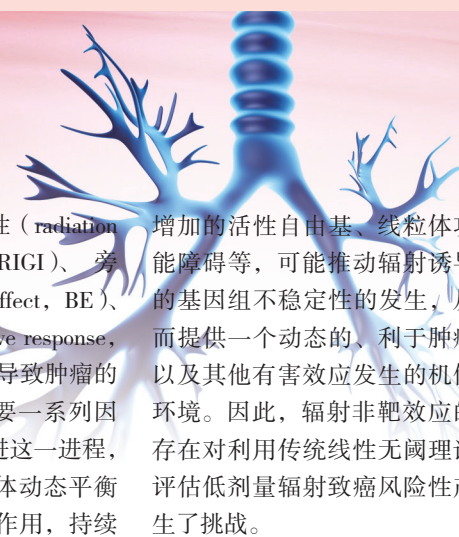
图 2 单粒子微束辐照终端及其计算机控制原理

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  社址: 北京宣武区红莲南路30号4层B0403 邮编: 100055 总机: 010-63265066	社长: 魏海明 副社长: 吕春雷 副社长: 周赞	名誉主编: 吴祖泽 潘自强 主编: 马力文 副主编: 姜恩海 罗庆良 邹跃 刘长安 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 邬家龙 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						

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

# 非靶效应在低剂量电离辐射中的作用

复旦大学放射医学研究所 刘伟利



【据《Biochemical and Biophysical Research Communications》2014年5月报道】题:低剂量α粒子长期照射可通过MAPK/Akt途径增加人支气管上皮细胞恶性转化潜能(作者Liu W等)

人支气管上皮细胞受到25 mGy的α粒子长期照射后,不

仅其本身的增殖、迁移、侵袭等恶性转化能力得到增强,其后代的这些恶性转化能力也得到显著增强,同时发现,ERK、Akt、特别是p38信号通路在其中发挥重要作用。该研究结果为环境氡辐射诱导肺癌发生提供了新的分子机制。

随着我国核技术的广泛应

用,低剂量辐射致癌的风险性日益受到公众的重视。特别是90年代以来人们发现,射线与DNA相互作用并非产生辐射效应的必要条件,细胞不直接吸收电离辐射能量仍可感受到其前代或周围细胞的辐射效应而产生细胞应答,即存在非靶效应(Non Target Effect, NTE),

包括基因组不稳定性(radiation genomic instability, RIGI)、旁效应(bystander effect, BE)、适应性反应(adaptive response, AR)等。辐射可能导致肿瘤的启动,但这往往需要一系列因素的共同作用来促进这一进程,NTE可能在扰乱机体动态平衡方面发挥了很大的作用,持续

增加的活性自由基、线粒体功能障碍等,可能推动辐射诱导的基因组不稳定性发生,从而提供一个动态的、利于肿瘤以及其他有害效应发生的机体环境。因此,辐射非靶效应的存在对利用传统线性无阈理论评估低剂量辐射致癌风险性产生了挑战。

## 1 辐射诱导的基因组不稳定性(RIGI)

RIGI通常是指辐射细胞后代所表现的延迟效应,表现为延迟的染色体畸变、基因突变和生殖细胞死亡等。检测GI的生物终点通常有染色体改变、微核形成、基因突变和扩增、微卫星不稳定性(MIN)等。虽然这些终点之间的联系尚不清楚,但是它们在表达上都具有多样的非克隆性,不符合传统辐射效应模型的预期。

### 1.1 表观遗传的影响

受低剂量与中等剂量辐射的细胞中可观察到GI的发生

率(约10%~20%),远远高于靶效应中的突变率( $<10^{-4}/\text{Gy}$ )。与基因突变不同的是,GI可能是通过诱导基因表达等表观遗传机制实现的。考虑到GI的发生频率很高,又没有证据证明DNA双链断裂参与GI的启动,Baverstock推测GI的发生可能是由于细胞基因表达的改变导致内环境稳态的破坏而引起的。Rugo等发现敲除胚胎干细胞中DNA胞嘧啶甲基化基因DNMT1和DNMT3a,GI的传递被完全抑制,从而证明DNA甲基化在GI传递中的重要作用。真核细胞中,甲基化和

miRNA-短分子可参与调控辐射诱导的GI和BE的基因表达。

### 1.2 剂量依赖偏离线性

RIGI另一个重要特点是不具有传统的剂量依赖性。按照剂量效应理论推测,RIGI发生的频率应该是随着剂量的增加稳步增加。然而实验发现,低剂量时GI的发生随剂量增加而增加,大于1Gy后则缓慢增加至稳定的平台期,某些情况下,高剂量时GI反而降低。因此,当利用高剂量的数据外推低剂量辐射的风险时,很有可能低估其效应。另外,由于延迟的非克隆性损伤后果的

不确定性,使得传统的剂量反应关系可能同样低估了辐射的影响。

### 1.3 体内实验的相关证据

体内实验证实全身受到1Gy或3Gy低LET辐射后,骨髓内会出现CIN。然而0~0.5Gy低LET辐射则不能导致CIN的产生。不同于低LET辐射,低剂量高LET的α粒子辐射无论是体外还是体内实验,都出现了CIN的显著表达。我们知道,低剂量低LET辐射如X-或γ射线,单一的辐射径迹能使受照细胞获得几mGy的能量,而高LET的单个粒子穿过

的细胞可获得0.3~0.5Gy的剂量和持续的损伤,因此高LET导致的损伤比低LET更严重且更复杂。同时,相同剂量下,由于辐射品质的不同会导致受照细胞和非受照的旁细胞比例有显著的差异。因此,明确不同辐射类型及剂量对单个细胞或细胞群的不同生物效应是非常重要的。但哺乳动物细胞照射后并非普遍出现GI,是否产生GI取决于受照细胞的基因型,而且即使是高水平表达GI的个体之间基因型也存在相当大的差异,关于GI的机制还有待进一步更加科学而系统的研究。

## 2 跨代遗传的GI

跨代遗传的GI就是细胞受照后,其未受照的子代细胞中出现的一种持续的突变率增加的现象。为了确认辐射引起的受照“父母”生殖系统的不稳定性是否可以在子代中得以体现,并且影响子代突变率、肿瘤易感性等其他特征,跨代研究因此应运而生。

有研究表明,受照射的雄性小鼠的第一代和第二代子代的多个组织的突变率显著增加,这种跨代遗传的GI会导致染色体畸变,影响编码蛋白的基因以及串联重复的DNA基因座的突变频率。总之,受照雄性小鼠的后代出现的全基因组不稳定性可能在一定程度上可以解释跨代遗传这一效应。另外,跨代遗传效应表明子代进行了非孟德尔分离(F1和F2所有后代都继承了不稳定的表型),这种现象被归因为父系的表现遗传信号传递给了其子代。

目前仅有研究证明父系生殖系统辐射损伤会导致子代基因组不稳定性,但是关于跨代遗传的GI的潜在机制仍然知之甚少,关键问题是仍未能确切了解直接照射的细胞是通过什么信号引发GI的。我们知道电离辐射可以导致细胞的DNA损伤,包括DNA双链与单链断裂、碱基损伤等,因此有研究认为,存在特定的损伤信号引发GI的启动,甚至认为辐射诱导的DNA双链断裂是代表GI的触发机制。为了确立GI是否由DNA损伤中的某种特定损伤所诱导,Dubrova等使用可以导致DNA烷基化和其他类型DNA损伤的多种诱变剂处理父系细胞,结果显示,父系细胞暴露于烷化剂乙基亚硝基脲,以及抗癌药物环磷酰胺,丝裂霉素C和丙卡巴肼后都能出现类似于辐射产生的子代基因组的不稳定性,证明GI并不是由DNA损伤中某种特定的损伤

(如DNA双链断裂)所触发,但可以认为雄性生殖细胞广义的DNA损伤可能触发GI。

研究显示孕妇照射不会产生跨代遗传的GI。特别是雌鼠,无论其出生前还是成年期受到照射都不会使第一代子细胞的胚胎和体细胞组织出现额外的小卫星突变。对于母系不论受照时间,都不会传递GI给后代这一现象,可能是因为早期的受精后事件在某种程度上消除了辐射诱导的表观遗传信号。然而,目前关于此效应的人群研究却有一些不同的结果:切尔诺贝利核事故中的白俄罗斯人出现了额外的小卫星突变,哈萨克斯坦核武器试验的人群中也出现了类似的额外风险;然而,日本原子弹爆炸幸存者的后代或切尔诺贝利事故中不同群体的后代中并没有观察到额外的小型或微卫星的突变。

### 2.1 GI和人类的肿瘤

大量突变事件的累积促发

恶性肿瘤的形成,而非辐射诱导的GI则是其中的一个关键因素。Little认为,CIN不仅与多种疾病的发生相关,也是恶性肿瘤形成的高风险因素。现在普遍认为结直肠癌形成过程中存在CIN和微卫星不稳定性(MIN)2种形式的GI,其中CIN为主要的存在形式。CIN,即细胞相对频繁地获得或失去整条染色体或某条染色体的大部分,导致基因组中染色体数目不平衡或者特定染色体结构的损伤。在人类癌症中,CIN与多种基因的改变相关,其中包括有丝分裂中纺锤体检查点基因hBUB1和hsMAD2,编码参与DNA修复和重组、细胞周期和转录的检查点蛋白的BRCA1和BRCA2基因,以及被认为参与细胞周期G1-S检查点的hCDC4基因。此外,同其他实体肿瘤中发生率相当的是13%的结肠癌中呈现出MIN,这是人类肿瘤细胞系中

普遍存在的一种GI形式。错配修复(MMR)机制通过对错误插入的DNA碱基进行校正以保证复制的保真度,而MMR通路的缺陷会导致整个基因组中重复的短序列频繁的插入或缺失,从而形成所谓的微卫星。

然而,可遗传的GI是否诱发结直肠癌的启动仍然备受争议。Loeb提出,调控GI的基因发生突变对结肠癌形成的早期过程至关重要。因此,随机致癌模型与确定的致癌模型研究,均越来越关注GI在致癌过程中的作用,但是大部分的研究数据未能很好地与流行病学拟合的数据相吻合。Tomlinson和Bodmer认为癌症是一个渐进的发展过程,在结肠癌中观察到的累积的染色体损伤和其他损伤可能是细胞生长优势选择的结果,突变也因此被选择出来并遗传到子代当中。总之,目前还未有明确证据证明GI与结肠癌的发生发展具备严格的相关性。

## 3 辐射诱导的旁效应(RIBE)

体内外实验均证实了RIBE的存在。而RIBE并不符合传统的辐射效应模型。直接照射的细胞触发共济失调-毛细血管扩张突变基因(ATM)介导的信号通路,而旁效应则通过复制叉停滞激发Rad-3相关蛋白激酶(ATR)依赖的信号通路。低剂量辐射产生的旁效应对人

类的健康风险尚不明确,其可能通过引发姐妹染色单体交换、基因突变和转化等方式提高健康风险,也可能通过诱导体内外细胞的程序性死亡以及抑制体内组织的增殖而促进其分化以降低健康风险。然而,一般认为RIBE会导致健康风险增加而不会降低。

### 3.1 修正因子

Mariateresa等运用特定的铅柱体屏蔽Pch1+/-小鼠脑部和身体上部后,给予中高剂量照射,发现脑部有肿瘤形成,证明RIBE可以诱发肿瘤。现有研究证实,并非所有的细胞类型都能产生RIBE,也不是所有的细胞类型都能响应旁效应信号,原因可能是RIBE涉及的因素复杂多样,例如He

等的实验表明只有野生型p53基因的肝癌细胞能够诱导产生RIBE,而p53基因突变型的细胞和p53基因缺失的细胞均不能产生RIBE;同样的,Li等实验证明α粒子引起的RIBE也是受p53及其下游的SCO2调控的。

有研究提取5名健康志愿者的外周血淋巴细胞进行微束

照射,发现只有其中1人的细胞照射后旁细胞损伤中RIGI的水平显著增高,暗示细胞对辐射旁效应信号的响应可能呈现基因型依赖的差异。此外,各种遗传和表观遗传因素,以及对信号的响应时间都会影响RIBE。例如,受照射人上皮细胞的条件培养基,可以在一定

下转第4版

**上接第3版**

范围内降低未受照细胞的存活,而受照射的人成纤维细胞的培养基则无此作用。事实上,检测旁效应时要综合考虑实验系统、生物终点、检测时间、辐射类型与剂量等因素。

已知有多种信号分子确定参与调控靶细胞和旁细胞之间的

通讯,包括受照细胞产生的可传递信号的 ROS、氮氧化物(NOS)以及可通过细胞间隙连接或条件培养液传递给旁细胞的细胞因子等。如直接照射的细胞会通过自分泌/旁分泌机制产生细胞因子和前列腺素 E2,进而激活 NF- $\kappa$ B 依赖的信号通路。旁细胞中 NF- $\kappa$ B 依赖的 IL-8、IL-6、IL-

33、COX-2、TNF- $\alpha$  等的表达对 RIBE 具有重要作用。

**3.2 GI 和 BE 的相互联系**

辐射引起的 BE 和 GI 往往同时发生,且有实验证明 BE 和 GI 是相互联系的。BE 和 GI 在表型上具有很多共同点,如在生物学检验终点均表现为微核形成、突变率增加、诱导染

色体重排,以及氧化应激水平上升等。这些指标的发生率都很高,而且一般不符合传统的剂量效应关系的。受照细胞与未受照细胞都是通过细胞间隙连接通讯(GJIC)或可溶性因子实现细胞间通讯,从而诱发 GI。网格屏蔽实验结果显示:直接照射区域内的大部分细胞

都会死亡,然而无论是否在照射时网格屏蔽,CIN 水平都保持相同,说明表现出 CIN 的大多数细胞并未受到射线照射,因此,上述细胞受到的损伤应该是通过细胞间通讯诱导。另外,共培养和条件培养液也可以在早期的通讯过程中导致 GI 形成。

**4 适应性反应(AR)**

目前 AR 被认为是 NTE 的一个组成部分。即使有研究报道 AR 和 BE 之间具有相关性,但 AR 的表征却很少能与 GI 和 BE 相重叠。而且相当多的研究中没有观察到 AR,甚至出现了反向 AR,即放射增敏。AR 一般需要至少 5 mGy 的预处理剂量,而且预处理剂量的影响很少

能持续超过一天,因此,可以说 AR 与低剂量或低剂量率的风险无关。AR 和低剂量的辐射超敏性有一定的相似处,在体外二者都能增强极低剂量(<0.1Gy)照射下对细胞的杀伤作用。假定体内也存在这样的相关性,组织内适度提升极低剂量对细胞的杀伤力有益于清除受损细胞,然而这对健康究竟有着怎样的影响,依

然不明确。因此,AR 的潜在机制是不太可能与 GI 或 BE 相关的。大部分 AR 相关实验的细胞都受到预处理剂量和攻击剂量的照射,而且一般来说相对较高的剂量都被用作攻击剂量。虽然有部分实验显示旁效应(例如条件培养液处理)可以诱导 AR 的产生,但这并不意味着 AR 是形成 BE 的内因因素。

**6 微束与 NTE**

微束是研究 RIBE 的独特工具,优势在于:(1)带电粒子微束能对单个细胞提供精确的照射剂量,为研究单一辐射径迹的生物效应提供了便利;(2)能对细胞或组织的特定位置进行精确照射,从而阐明细胞或组织的辐射敏感位点;(3)通过细胞或组织定位照射,确定细胞内和细胞间信号转导的作用和方式。基于这些优点,微束越来越广泛地应用于 RIBE 的研究,并且从中认识 RIBE 的潜在机制等。

在医学应用方面,采用微束在动物模型上形成的非均匀剂量照射野,可以帮助我们了解空间调制辐射的生物效应,而常规的宽束装置并不具备此功能。如今,调制辐射普遍应用于放射治

疗,以达到对肿瘤组织进行最大剂量的照射,同时最大程度减小对正常组织的照射剂量。然而,空间调制辐射的生物效应尚不明确。空间调制辐射对细胞的存活和 DNA 损伤反应等生物效应的影响,与均匀辐射存在显著的差异。Mackonis 等设计的空间调制辐射模型发现了影响旁细胞存活的 3 种不同类型的 RIBE,包含传统的旁效应,即受照细胞抑制相邻未受照射细胞的存活率;高剂量或致死剂量照射的细胞能够增强相邻的受照射剂量照射的细胞的存活率;受散射低剂量照射的细胞也能促进周围高剂量照射的细胞的存活。因此,建立动物模型进行微束辐射的效应与机制研究也是十分必要的。

**5 高 LET 辐射与 NTE**

低 LET 和高 LET 辐射诱导 NTE 的情况不净相同。例如分别照射 0-0.5Gy 的  $\alpha$  粒子照射人急性单核白血病细胞 THP-1 后所产生的 TNF- $\alpha$  表达显著高于 X-射线。TNF- $\alpha$  可以激活 NF- $\kappa$ B/COX-2 信号通路而导致旁细胞产生炎症效应,且 COX-2 是公认的 RIBE 的核心调节子。Anzenberg 等亦发现, $\alpha$  粒子或 250 kVp 的 X-射线照射人前列腺癌细胞 DU-145 后出现 LET 依赖型的信号释放差异;另一方面,有报道称,X-射线照射的肿瘤细胞可通过条件培养液介导未照射的人成纤维细胞 AG01522 出现旁效应,而  $\alpha$  粒子却不能产生此效应。

尽管动物模型早已应用于 NTE 研究,但是高 LET 辐射在

NTE 的研究却很少。近年来,质子和重离子精确放疗发展迅速,但临床上质子治疗中研究 RIBE 的还很少。因此,建立动物模型,使用宽束和微束同时研究 NTE,是未来研究的一个重要方向。

**5.1 低 LET 和高 LET 辐射导致的 GI 的区别**

高 LET 与低 LET 导致的 GI 的区别早在二十年前就有报道,对小鼠血红干细胞分别进行不同剂量的  $\alpha$  粒子及 3 Gy X 射线的照射,发现  $\alpha$  粒子的所有剂量均可引起 GI,而 3 Gy X 射线则并不能引起与对照组有显著性差异的 GI 发生。传统意义上,关于高 LET 与低 LET 的不同之处的认知主要集中在不同的射线径迹轨道上,然而,从时间效应上来说两者也存在

很大差别。 $\alpha$  射线等高 LET 轨迹上有着大量的能量沉积,并且能量沉积的时间是在皮秒级别的。反之,在低 LET 辐射的轨道上沉积的能量很小,并且许多轨道需要提供类似的剂量,分布于整个细胞,这就需要更长的时间(通常是秒),而在这段时间内,一些化学反应、生化反应、生物学反应就会同时发生。为了消除时间上的差异而设计出的脉冲 X 线可将能量沉积时间缩短至皮秒级别,但仍然没有 GI 的出现。这说明,能量沉积时间的差异并不是导致高 LET 与低 LET 导致 GI 的主要原因。因此,解释不同 LET 引发 GI 的不同机制,以及不同 LET 所引发的不同的辐射生物效应,是未来研究亟待解决的问题。

**7 未来与展望**

关于 NTE 的未来研究主要在于摆脱传统的 DNA 靶向效应框架的束缚来阐明 NTE 的机制,应集中探索更加复杂的实验系统,而不应是单一的细胞和单一的辐射类型。同时,更多相关的体内模型研究有待进一步发展。对于低剂量辐射诱发癌症的风险评估中的一个关键问题是,在低剂量和高剂量时 DNA 靶向和非靶向效应对整体的相对贡献。同时,应该有

一个明确的评估体系评价低、中和高剂量辐射对遗传敏感性、表观遗传学的改变以及风险的影响。

辐射诱导的非靶效应的机制及相关信号通路亟待进一步阐明,并且应确定所有辐射类型和旁效应参与 GI 启动和延续的机制,特别是 NTE 在低剂量低 LET 和高 LET 中的作用以及对遗传因素的影响。而其中最首要的还是确定这些过程与人类健康风险的相关性。

**上接第1版**

h 后,整个肺组织内巨噬细胞被显著激活,IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1 在 RNA 水平上都发生了改变。另外,T 细胞也在远程辐射旁效应中起着重要作用。Demaria 等将 67NR 乳腺癌细胞分别接种于小鼠身体两部位,并照射其中一个肿瘤靶区,照后给予能促 T 淋巴细胞增殖、分化和成熟的 Flt3-L;10 天后,在联合应用射线与 Flt3-L 组的裸鼠中,未受照射肿瘤也出现损伤及生长迟缓,但该现象并不能发生于 T 细胞缺陷的小鼠,说明 T 细胞在介导体内远位电离辐射效应中也起着重要作用。

远程辐射旁效应给传统的辐射防护带来了新的难度,凭借现有的物理防护措施很难奏效,需要生物防护参与其中。根据放射治疗方法、肿瘤组织类型、转移情况、患者情况等

对远位辐射旁效应进行综合防护及利用,有可能成为未来辐射防护的重点问题之一。

**辐射旁效应分子机制。**大量研究表明,受到辐射损伤的细胞主要通过细胞间隙通讯(GJIC)、细胞间介质途径引起周围未受照射细胞产生生物效应,而 NO、ROS、CO、TGF- $\beta$ 1、COX-2、IGF、IL、Ca<sup>2+</sup> 离子流、Cyt-c 等则为重要的旁效应信号因子。另外,作为一种重要的内源性气体信号分子,H<sub>2</sub>S 则对辐射旁效应具有抑制作用(见图)。

**结语**

虽然辐射旁效应可增强低剂量辐射的危害性,但低剂量辐射还可以产生兴奋性效应和适应性反应,减弱低剂量辐射危险性;同时,这些效应之间还可产生交叉作用。它们均对线性无阈学说提出

了挑战。近年来,Leonard 等建立了一种微剂量模型,将放射剂量效应分为三个区域:初始为旁效应主导区域,随后的适应性主导区域,以及高剂量的直接效应区域,证明辐射旁效应与辐射适应性可以发生于同种细胞,并将此模型应

用于乳腺疾病的放射诊断。对辐射低剂量危害的评估,需充分考虑辐射适应性和辐射旁效应之间的时间与空间关系,建立最优化模型。对实际的防护策略而言,则需采取物理防护和生物防护的联合防护手段。

除细胞核外,细胞质也是重要的辐射靶。如采用氦离子微束对 HeLa 细胞的核和胞质分别进行照射,以 P53 结合蛋白 1(53BP1)荧光聚集法(IRIF)作为 DNA 损伤的指标,发现单个细胞的胞质照射即可引起其本身和附近未受照射细胞 IRIF 明显加强,但线粒体 DNA 缺陷的细胞并未能诱导出这种旁效应,因此,线粒体在细胞质辐射效应中起着主导作用。

在辐射旁效应信号通路方面,我们发现 p53 介导的细胞色素 c 通路是辐射诱导旁效应

产生的重要途径,但有些 p53 缺失的细胞也能诱导旁效应;ATM 可通过磷酸化稳定 p53 蛋白,促使细胞生长停滞或者经线粒体凋亡途径诱导细胞死亡,并调节辐射诱导的旁效应。也有报道,ATM-p53 通路并不直接参与旁效应的起始。ATM 还可通过激活 NF- $\kappa$ B 而快速有效地诱导或上调众多应激基因的表达,如 COX2 和 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-33、TNF $\alpha$ 、TRAIL 等。靶细胞释放的生长因子,如 NF- $\kappa$ B 依赖的 IL-6 通过与 IL6-R 复合物相互作用,激活旁细胞的 JAK2-STAT3 信号通路以及 STAT3 依赖的相关基因,从而将靶细胞的 ATM、NF- $\kappa$ B 因子与旁细胞的 STAT3 因子串联起来,形成新的信号通路。NF- $\kappa$ B 还能与 STAT3 调节相互作用共调节下游因子,诱导 COX2、Bcl-2、Bcl-XL 等一系列与存活和抗凋亡相关基因的表达,抑制细胞凋亡。IL-6、IL-8 以及 TNF $\alpha$  作用于旁细胞细胞膜上相应的受体复合物后,激活旁细胞中的 MAPK 通路,形成持续性的应激反应。另外,外源性的 IGF-1R 与旁细胞的 IGF-1R 受体结合,可激活 PI3K-AKT 通路,增强旁细胞中  $\beta$ -catenin 的稳定性,与 NF- $\kappa$ B、STAT3 共同作用调节 COX2 与诱导型 iNOS,促进细胞大量释放 ROS、NO,引起炎症反应。可见,辐射旁效应信号传导是一个非常复杂的过程,还存在许多未知因素。

# 电离辐射诱发动脉粥样硬化研究取得新进展

复旦大学放射医学研究所 肖林林

【据《Radiation Research》2014年7月报道】题:受辐射U937细胞所释放的炎症因子可通过P38通路导致人脐静脉内皮细胞受损(作者Xiao L等)

据国际辐射研究领域顶级期刊《Radiation Research》2014年第182期报道,复旦大学在辐射诱发动脉粥样硬化病因研究方面有了新的发现,暨受辐

射巨噬细胞所释放的炎症因子可以导致人脐静脉内皮细胞HUVECs受损。该文通过细胞共培养模型发现受照射的U937细胞所释放的一氧化氮(NO)等炎症因子可导致未受照射HUVECs细胞DNA损伤、促进细胞凋亡、降低克隆形成率,iNOS抑制剂或NO清除剂c-PTIO均能够抑制HUVECs旁

细胞的损伤。同时,U937还可诱导HUVECs细胞P38蛋白磷酸化增加、细胞膜表面VCAM-1表达增加、并释放活性MMP-9和MMP-2,增强了该细胞的粘附与迁移能力,p38/MAPK通路在其中发挥了重要作用。

低剂量辐射对于健康危险性的评估一直是人们关注的热点问题,也存在着很多争论。目

前辐射防护系统标准的制定是基于任何剂量的电离辐射都会提高诱发肿瘤的可能性,不存在阈值。最近流行病学调查表明,低剂量和中等剂量辐射可以导致心血管危险,包括动脉粥样硬化,但是否有阈值目前还不清楚。因此,对于低剂量辐射所导致的心血管疾病要进行更加仔细精确的评估。

## 1 临床高剂量辐射对心血管的损伤作用

19世纪早期,人们认为心脏和血管是高分化且有丝分裂不旺盛组织,具有辐射抵抗性。但在60-70年代,临床和实验性的研究表明,心脏能够被治疗性剂量的电离辐射损伤。目前,心脏和血管被认为是放射治疗时重要的、需要限制剂量的器官。

在胸部肿瘤如肺癌、食管癌、纵膈淋巴瘤和乳腺癌接受辐射治疗时,心脏会被照射。心脏损伤严重程度和照射剂量以及受照射面积有关。近年来,随着影像引导、三维适形、呼吸门控、增强放射治疗的应用,在对恶性肿瘤进行放疗时,心脏受照

射剂量已经大大降低。但是,部分心脏区域仍然大于20Gy,而关键性的剂量体积和心脏损伤之间的关系并不清楚。除此之外,产生心脏病的危险取决于病人本身是否有心脏病的危险因素和化疗的心脏毒性。

纵膈肿瘤如霍奇金淋巴瘤和乳腺癌患者放射治疗后存活者的潜在疾病包括冠脉疾病、心包炎、心肌病、瓣膜病及传导障碍。有关霍奇金淋巴瘤的病人研究表明提高了心血管疾病发病率,如冠脉搭桥手术增加了3.2倍;经皮冠脉介入增加了1.6倍;植入的心脏起搏器增加了1.9倍;瓣膜手术增加了9.2倍;心包手术增加了12.9倍;心衰死亡增加

了4.9倍。长期存活的霍奇金淋巴瘤病人最多发的心血管疾病是心肌梗死。据统计,在1960到1991年之间的2,232例霍奇金淋巴瘤病人中,无论是儿童还是成人因为心脏疾病而死亡的人数明显提高,其相对风险为28~37,这些死亡患者接收了42~45 Gy的射线照射。

乳腺癌的辅助性放疗有助于降低乳腺癌患者的死亡率,然而放疗产生的益处被提高的心血管疾病抵消了,特别是辐射治疗10年后这个现象尤为突出。对于早期乳腺癌患者资料的Meta分析证实了一个显著的由非乳腺癌引起的死亡率主要归因于心血管疾病。通过长达

30年的对35,000名乳腺癌患者的研究证实了辐射可导致心脏病。对于患有左乳腺癌、右乳腺癌的妇女进行放疗时,心脏所受剂量分别为6.3Gy、2.7Gy,虽然左侧乳腺癌和右侧乳腺癌的死亡率类似,但是心脏病的发病率左侧乳腺癌患者提高了1.08倍,主要原因为缺血性心脏病、心包炎、瓣膜性心脏病。研究表明,接收过放射治疗的乳腺癌患者提高了缺血性心脏病的几率,每受照1Gy增加了7.4%,并且是没有阈值的。另外,辐射常常诱发放射冠脉损伤,尤其是对于本来就有心脏病和缺血性心脏病的

患者来说。因此,心脏病的危险因素应该从辐射治疗开始或者更早被衡量和管理。

除此之外,非恶性疾病的放射治疗也能提高心脏病的发病率。例如,消化性溃疡患者接收9~18 Sv的辐射治疗后,其心脏受照射剂量0.1~1.9 Gy至1.51Gy,患者冠心病的死亡率提高明显,10年后相对的死亡率提高1.24倍。

## 2 心血管疾病的标志物和放射治疗的关系

人们常用影像学来评估高剂量辐射对于心血管的损伤,例如,非侵袭性检查显示,头颈部受到照射后血管增厚、颈

动脉狭窄。一些患者2.9年前接受放射治疗,其颈动脉内膜增厚和受照射的剂量有关。在霍奇金淋巴瘤幸存者中发现,动脉变得僵化是心血管疾病的标志,这些病人接受放射治疗

时年龄在35~40岁。

临床上用SPECT和PET微血管灌注检查证实,乳腺癌患者的灌注损伤发生在受照射后的6~12个月内。然而,在对32名左侧乳腺癌接收<5Gy照射的妇女

进行检查发现,临床上的灌注损伤没有不同。重要的是,左侧乳腺癌患者接受放射治疗后,其血清中的NT-proBNP浓度大大增加。除此之外,小部分心脏接收大剂量照射的患者,其NT-proBNP

浓度也提高,但是同时用超声心动图检查,心脏的结构和功能没有明显的变化。这些研究表明心肌损伤的微弱变化不能用左室功能的变化来检测,但是可以用循环标志物的变化来衡量。

## 3 低剂量环境和职业辐射引起的心血管疾病

一些证据证实,先前认为是安全的低剂量辐射在照射过的很长一段时间内会提高诱发动脉粥样硬化的发生率。最初的证据是来自原子弹爆炸幸存者的调查分析,数据表明,低剂量辐射导致循环系统疾病增加,在受过急性单次1~2Sv剂量照射40年后,死于心肌梗死的风险大大提高。在0~4Sv范围内,患有心血管系统的疾病概率是

线性无阈值的,患病相对风险分别为:心脏疾病(0.17/Sv),卒中(0.12/Sv)。在受到中等的剂量水平照射(大概0.5~2Gy)时,能够提高卒中和心脏疾病,但是对于低于0.5Gy的照射,患病率没有明显的统计学变化。

在职业照射的放射工作群体中,低剂量辐射和心血管疾病之间有一个潜在的关系。美国1950年代放射工作人员与1960年代的人员相比较,心脏血管疾病的风险提高了,因为1950年代的放射

工作人员受照剂量相对较高。但是英国各个时期的放射工作人员的心血管疾病发病率没有区别。

对于核实从业人员的研究发现,美国15个核动力装置的工作人员中,心血管疾病显著增加,由于心血管疾病而导致的死亡率的相对风险为每Sv 8.78。在英国核燃料公司雇佣的65,000人中,因为缺血性心脏病而死亡,和剂量间有着显著的剂量效应关系,而脑血管疾病与照射剂量无关。但在俄罗斯Mayak核设施

工作的工人中,辐射剂量和心血管疾病的死亡率之间没有显著联系。对俄罗斯处理切尔诺贝利核电站事故工人的检测分析表明,其缺血性心脏病大大提高,脑血管疾病也大大提高。

近来多种回顾性资料报道,低剂量的辐射和晚发的心血管疾病有相关性。特别是英国的健康防护机构证明了大于0.5Sv照射有着显著的循环系统疾病的提高。将所有的方法和低剂量研究放在一起,ERR/Sv

为0.09,虽然值很低,但仍然是一个强有力的证据,证实了辐射和心血管疾病是相关的。

研究表明,辐射会导致循环系统疾病危险度提高:法国的资料为2.5%/Sv;俄罗斯的为8.5%/Sv。辐射诱导的心血管疾病导致的死亡率是辐射诱导的肿瘤导致的死亡率的2倍。对于辐射诱导的非肿瘤性疾病特别是动脉粥样硬化仍然被国际科学组织所重视,尤其是在受到慢性照射的人群中。

## 4 辐射诱发的动脉粥样硬化的生物学机制

辐射诱导的心脏疾病机制目前不清楚,但是部分可能原因是辐射导致的动脉粥样硬化所致。动脉粥样硬化是一个多因素的疾病,与基因和环境因素有关,环境因素包括辐射。对于超过1~2Sv辐射,体内体外实验证实有几个机制和辐射诱导的心血管疾病有关。包括内皮细胞

的受损、炎症、凝血机制、血小板的活性、DNA损伤、老化和细胞死亡。高剂量辐射实验模型和一些人类流行病学数据是相一致的,高剂量辐射加速了动脉粥样硬化的发展,容易形成炎症、血栓,特别一些基因缺陷型小鼠更易形成动脉粥样硬化。

近来,有报道称单个低剂量(25~500mGy)照射ApoE-/-小鼠会导致动脉粥样硬化,且

剂量率的高低对于心血管疾病的发生也有影响。低剂量率(1mGy/min)的低剂量照射在疾病的早期和晚期是保护性的、减慢疾病的发展。相反的,高剂量率(150mGy/min)辐射在疾病的早期产生了保护性和损伤性的两种作用,表明了辐射导致的心血管疾病有多种机制,进而影响结果。另外,p53对辐射诱导的动脉粥样硬化具有调控作用。在疾病发生的早期,

p53功能的降低不影响低剂量率、低剂量辐射对早期动脉粥样硬化的保护作用,但在动脉粥样硬化的晚期阶段,p53功能的降低产生了损伤作用,而不是对p53正常小鼠的保护性作用。这些研究提示了低剂量照射对于动脉粥样硬化的影响机制是多样的,其中p53起着重要作用。而辐射的剂量率在辐射诱导的动脉粥样硬化也是一个很重要的因素,高剂量率

和低剂量率的辐射诱导的动脉粥样硬化在疾病的早晚阶段表现是不同的。

分子检测表明,低剂量辐射(200mGy)对于内皮细胞蛋白表达的影响是显著的,而高剂量率(190mGy/min)辐射比低剂量率(200mGy/min)更能改变蛋白质的表达。通过生物信息学分析辐射信号通路表明,低剂量辐射效应依赖于氧

下转第6版 ▶

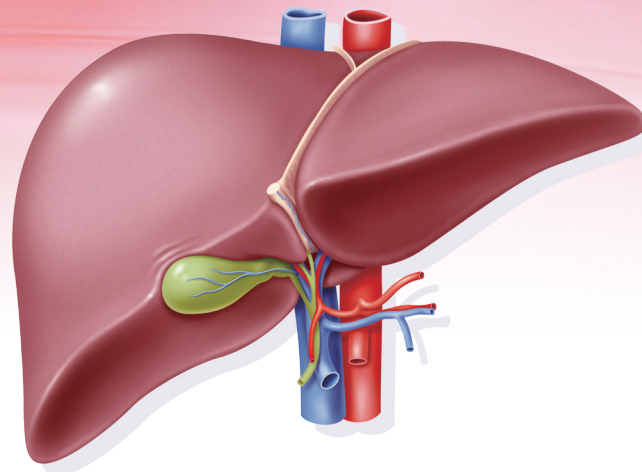
# 自噬与乏氧肿瘤细胞辐射抵抗

复旦大学放射医学研究所 王向东 张江虹

1962年, Ashford 等用电子显微镜首次观察到人肝细胞“自己吃自己”的现象, 提出自噬这一概念, 其作用是降解细胞质中某些受损、变性或衰老的生物大分子及线粒体、过氧化物酶体等细胞器, 维持细胞生存和内环境的稳定。根据细胞内底物运送到溶酶体腔的方式不同, 自噬可分为三种方式: 巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬, 其中巨自噬是细胞自噬的主要类型。

细胞自噬是细胞内物质代谢的重要途径, 是真核

生物中广泛存在的降解/再循环系统的重要组成部分, 自噬参与机体内环境稳态、发育以及多种生理、病理过程, 已成为当前生物学研究的热点。放疗作为恶性肿瘤的重要治疗手段, 其治疗效果与实体肿瘤组织的含氧量密切相关, 自噬在肿瘤发生、发展及治疗中的作用已引起了广泛关注。国内外大量研究表明, 在肿瘤的发生、发展过程中, 细胞自噬水平发生明显变化, 但不同研究人员所获得的结果有所差异, 如自噬水平的变化趋势及其生物学作用不尽相同。



## 1 自噬对肿瘤的抑制作用

Beclin-1 是酵母 Atg6/Vps30 基因在哺乳动物中的同源物, 在自噬形成过程中发挥重要作用: 在卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌及白血病患者中都出现高频率的 beclin-1 等位基因缺失。例如, 在人乳腺癌细胞 MCF-7 中, Beclin-1 蛋白表达几乎检测不到, 而稳定转染 beclin-1 后会促进细胞的自

噬活性, 降低了其成瘤能力; 在人胸腺癌细胞系中, beclin-1 过表达能抑制细胞的生长速度并减少其致癌性。可见, 正常的自噬功能在抑制细胞癌变过程中具有显著作用。目前有关自噬的抑癌机制主要有以下几种观点: 第一, 在正常细胞中, 自噬能够通过清除活性氧自由基抑制癌基因、提高线粒体功能来改善基因组稳定性。第二,

自噬在抑制癌细胞的扩散和转移中起着重要作用。在自噬缺陷的细胞中, 由于氧化应激等因素造成部分肿瘤细胞死亡而引起炎症反应, 容易引起癌细胞的扩散和转移。第三, 过度自噬可诱导肿瘤细胞发生自噬性死亡即 II 型程序性死亡, 这被认为是抑制肿瘤的又一可能机制。总之, 自噬在肿瘤发生的早期阶段起到了积极的作用。

## 3 自噬对受辐射细胞的双重作用

电离辐射可诱导细胞发生自噬反应。由于自噬可以清除电离辐射诱导的受损细胞器及某些生物大分子, 因而被看成是肿瘤细胞的一种辐射耐受机制。比较 MDA-MB-231 和 HBL-100 两株乳腺癌细胞系的辐射敏感性发现, 对辐射抵抗的 MDA-MB-231 细胞在受照后自噬增强, 而自噬抑制剂 3-MA 可以明显抑制电离辐射诱导的自噬。同时, 预先用 3-MA 处理 MDA-MB-231 细胞, 可以明显降低受辐射细胞

的存活率。另一方面, 自噬又可以增加肿瘤细胞的辐射敏感性。有研究发现, 肿瘤细胞辐射抵抗的标志物 OPN 基因被敲除, 或细胞 mTOR 被抑制后, 细胞自噬活性提高并且辐射敏感性显著增强。在抑癌基因 PTEN 敲除的非小细胞肺癌细胞系 HCC827 中, 当辐射诱导的自噬被抑制后, 细胞对辐射产生耐受。

因此, 自噬对受辐射肿瘤细胞起到双重作用, 这可能与肿瘤细胞类型、分化程度、射线类型及作用时间等有关, 其中的分子机制还有待进一步研究。

## 2 自噬对肿瘤的促进作用

肿瘤在进展过程中, 由于恶性增殖致使供血不足, 导致代谢压力过大, 此时, 自噬被诱导增强, 其降解产物可提供能量和营养物质, 使得肿瘤得以继续生长, 甚至能够抵抗外界压力进行侵袭和转移。自噬可以清除某些生物大分子和受损的细胞器来实现肿瘤细胞内环境的稳定。肿瘤细胞在转移过程中可因为与胞外基质或毗邻

细胞脱离接触而诱导特殊细胞程序性死亡, 即失巢凋亡。利用 RNA 干扰技术敲除自噬相关基因可通过抑制失巢肿瘤细胞的凋亡, 从而促进肿瘤的转移。此外, 自噬在肿瘤细胞休眠中也同样扮演着重要的角色。恶性肿瘤细胞通常会受到促增殖信号和促死亡信号的双重调控, 当内外环境剧烈变化如严重营养缺乏而不利于细胞生存时, 强烈的自噬会促使细胞进入

休眠状态而不致死亡, 一旦肿瘤微环境发生改变如重新获得营养时, 细胞便可再次进入增殖状态。

由上可见, 自噬现象在肿瘤的发生、发展过程中发挥着“双刃剑”的作用, 这可能与肿瘤发展的不同阶段和肿瘤组织的不同来源有关。进一步研究和明确自噬在肿瘤发生发展过程中的作用和机制, 对于深入认识自噬在肿瘤治疗中的前景具有重要的意义。

## 5 自噬调节剂在乏氧肿瘤辐射抵抗中的应用前景

乏氧肿瘤细胞的辐射抵抗性极大地影响了放疗疗效和患者的总体预后, 如何增强乏氧肿瘤细胞的辐射敏感性已成为肿瘤放疗研究的一个重要问题。由于自噬在肿瘤细胞的辐射抵抗、辐射增敏以及乏氧耐受中起重要作用, 通过调节自噬活性来提高放疗效果可能成为肿瘤治疗的新途径。研究发现, 由于氯喹可以影响自噬体与溶酶体的融合, 射线照射前数天以氯喹处理乏氧细胞, 可显著增加其对单次亚治疗剂量的辐射敏感性。自噬抑制剂 3-MA 可下调低氧环境中人肺癌细胞的自噬水平, 使细胞增殖活性下降, 提高辐射敏感性。乏氧条件下, 乳腺癌细胞自噬相关基因 Beclin-1、Atg5、Atg7、和

Atg12 的 mRNA 转录增加, 大量自噬体在细胞聚集, 并对辐射产生抵抗, 因此, 通过药物抑制或 siRNA 干扰 Beclin-1, 可引起 DNA 双链断裂修复阻滞、显著提高乳腺癌细胞的辐射敏感性。另外, 小分子物质 STF-62247 可特异性地诱导细胞自噬性死亡, 与射线联合作用可显著增加 VHL 基因缺失的肾细胞癌的辐射敏感性。

综上所述, 自噬可能是维持乏氧肿瘤细胞生存和恶性进展的重要途径之一。通过调控相关信号分子可以有效地杀伤乏氧肿瘤细胞。同时, 自噬活性调节剂能有效地提高乏氧肿瘤细胞的辐射敏感性, 从而增加肿瘤的放射治疗效果。靶向调节乏氧肿瘤细胞自噬活性的药物可能成为肿瘤辐射增敏药物研究的一个新领域。

## 4 自噬与肿瘤乏氧耐受及相关信号通路

肿瘤细胞为了适应乏氧环境, 可产生一系列信号分子来抑制凋亡或改变糖代谢途径以维持生存。乏氧肿瘤细胞往往具有更强的侵袭及转移能力, 对化学药物及电离辐射有着更强的抵抗力。近些年来的研究表明, 自噬也是参与乏氧肿瘤生物学特性改

变的重要因素。随着肿瘤的发展, 乏氧程度加深, 代谢压力剧增, 肿瘤细胞通过增强自噬来维持内环境的稳定以及对营养物质和能量的需求。自噬活性的提高可以使恶性胶质瘤组织对抗肿瘤血管生成治疗造成的乏氧产生耐受, 从而维持肿瘤细胞存活。

乏氧可能通过以下三条信号通路诱导肿瘤细胞产生自

噬: HIF1-BNIP3 信号通路、TSC-mTOR 信号通路、UPR 信号通路。至于哪一种信号通路在乏氧条件下肿瘤细胞自噬中起主导作用, 则受到多种因素的影响, 例如, 在氧浓度为 0.1%~3% 时, 自噬激活通过 HIF1-BNIP3 信号通路, 而在氧浓度低于 0.01% 时, 自噬激活则是通过 LKB-AMPK-TSC 通路。

## 上接第 5 版

化还原电位和活性氧的水平。而蛋白组学和 miRNA 研究表明, 单次剂量 200mGy 照射原代的人冠状动脉内皮细胞会引起 miRNA 和后续蛋白表达改变。有趣的是, miRNAs 能够调节辐射诱导的 DNA 损伤和早衰。辐射诱导的 DNA 损伤和氧化应激会导致 p53/p21 的激活进而抑制了原代人脐静脉内皮细胞增殖, 导致早衰, 这些研

究结果和前述假说相一致。因此, 导致辐射诱导动脉粥样硬化的另一个可能因素是基因不稳定性 and 血管的衰老。

DNA 的损伤被认为是辐射引起细胞损伤的最主要的起始事件, 最终导致癌症的发生和遗传性疾病。最有趣的是, 有大量的数据表明氧化应激导致的 DNA 损伤和端粒功能失调在动脉粥样硬化斑块的发展和并发症有着重要的作用。人动脉

粥样硬化斑块中细胞 DNA 损伤有的非常严重: 如整个或部分染色体的丢失和增加; 或者较轻的损伤: 包括杂合子的丢失、微卫星的不稳定性 (DNA 区域的突变, 进而影响基因表达)、DNA 链的断裂、修饰 (包括氧化) 及聚合。

有研究表明严重缩短的端粒导致了血管细胞的衰老进而有研究证实白细胞的端粒长度可以用来预测心血管疾病和死

亡率。端粒的缩短和 DNA 损伤与 DNA 损伤信号通路关系密切, 会导致细胞周期的阻滞, 引起修复产生、促进修复, 但是如果损伤严重会诱导凋亡的发生。DNA 损伤如果不能修复会导致凋亡或者导致持久的细胞周期阻滞, 导致细胞处于衰老的状态。未修复的 DNA 损伤会导致基因突变, 最终导致细胞功能改变。即 DNA 修复是防护的重要途径, 可以避免

细胞的突变和老化。重要的是, DNA 修复能力降低近来与恶化的血管功能有关, 导致血管僵化、加速实验小鼠的血管老化。除此之外, DNA 修复基因的遗传多态性与血管老化和心肌梗死有关。

总的来说, 这些研究表明辐射会诱导或者加速动脉粥样硬化的基因损伤, 辐射所致的 DNA 基因修复通路的改变对于辐射诱导的心血管疾病有一定影响。

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

# DAB2IP 基因与肿瘤治疗

复旦大学放射医学研究所 章婷婷 孔肇路

DAB2 相互作用蛋白 (DAB2 interaction protein, DAB2IP) 是 Ras-GTP 酶激活蛋白 (Ras-GAP) 家族的新成员, 可介导多种肿瘤相关信号通路, 如 MAPK-ERK、PI3K-Akt、ASK1-JNK 和 GSK-3 $\beta$ - $\beta$ -catenin 等, 影响细胞的增殖、存活和凋亡。DAB2IP 在前列腺癌、乳腺癌、肺癌、肝癌细胞和膀胱癌等多种肿瘤中表达下调, 且与肿瘤的进展密切相关, 可能成为判断肿瘤进展以及治疗预后的重要分子标志物。

## 1 DAB2IP 的命名与发现

2002 年, Chen 等利用酵母双杂交系统鉴定发现: 鼠 DIP1/2 (DAB2 interaction protein) 是一种新的 Ras GTP 酶激活蛋白, 这个新的基因可直接与卵巢癌差异表达基因 2 (differentially expressed in ovarian carcinoma-2, DOC2, 又称 DAB2) 的氨基末端相互作用, 可以抑制许多肿瘤的生长, 因此称为 DAB2 相互作用蛋白 (DAB2 interaction protein, DAB2IP)。研究发现人 DAB2IP 与鼠 DIP1/2 的同源性高达 94.2%, 并且人 DAB2IP 在多种前列腺癌细胞中表达下调或缺失。

## 2 DAB2IP 的结构

DAB2IP 定位于人类染色体 9q33.1-q33.3, 长度约 96 kb, 共有 15 个外显子和 14 个内含子, 含一个开放阅读框, 编码 967 个氨基酸, 分子量为 110 kD。Chen 等分析发现 DAB2IP 编码基因含两个启动子, 分别为 P1 (+229 ~ 981, 位于第一个内含子上) 和 P2 (-598 ~ +44, 位于外显子 1a 5' 端上游区), 由于 5' 上游调控区富含 GC 序列, 而缺乏经典的 TATA 盒, 故理论上 P2 更易甲基化。此外, 还发现正常前列腺上皮细胞的启动子比前列腺癌细胞的更加活跃。通过分析 DAB2IP cDNA 的氨基酸序列, 显示 DAB2IP 包含 4 个结构域: C2 (蛋白激酶 C 保守区域 2, aa 21-110); Ras GAP (GTP 酶激活蛋白, aa 135-438); PR (脯氨酸富含区, aa 727-736); LZ (亮氨酸拉链结构域, aa 842-861)。根据 DAB2IP 的这些序列特征, 可推断其为 Ras-GAP 家族的新成员。

## 3. DAB2IP 介导的肿瘤相关信号通路

DAB2IP 可介导多种肿瘤相关信号通路, 从而影响细胞的增殖、存活和凋亡。2010 年, Min 等探讨了前列腺癌进程中 DAB2IP 在 Ras-ERK 通路中的作用, 发现 DAB2IP 可通过下调

MAPK/ERK 通路来抑制肿瘤的发展。Xie 等发现 DAB2IP 可通过与磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 的结合来抑制其活性, 从而抑制丝-苏氨酸激酶 Akt 的活性, 最终抑制肿瘤细胞的增生和促进其凋亡。另外, Zhang 等研究发现 DAB2IP 可通过其 PERIOD 样结构

域与 TNF 受体结合因子 2 (TRAF2) 的 RING 指形结构域结合, 同时与凋亡信号调节激酶 1 (ASK1) 等形成复合物。紧接着, DAB2IP 可使 ASK1 的 pSer967 处发生去磷酸化, 随后 14-3-3 蛋白从 ASK1 释放, 促进了细胞的凋亡。另一方面, 在正常内皮细胞中,

DAB2IP 可通过其 PERIOD 样结构域与 TRAF2 相互作用来抑制转录因子 NF- $\kappa$ B, 从而抑制肿瘤的进一步发展。在前列腺癌中, DAB2IP 的缺失可以诱导上皮细胞-间质转化 (EMT), DAB2IP 的 C2 结构域可与蛋白磷酸酶 2A (PP2A) 和糖原合成

酶激酶 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) 相互作用, 使 GSK-3 $\beta$  活化, 进而使得  $\beta$ -catenin 转录活性下降, 抑制了 GSK-3 $\beta$ - $\beta$ -catenin 信号通路。而  $\beta$ -catenin 在 EMT 中起到双重作用, 最终使得 DAB2IP 可以诱导间质-上皮细胞转化 (MET), 并且  $\beta$ -catenin 的过表达可逆转 MET。

## 4 DAB2IP 的临床作用

### 4.1 前列腺癌

DAB2IP 在前列腺癌中的表达及其分子机制是目前研究最多的。早在 2002 年, Chen 等发现 DAB2IP 在多种前列腺癌细胞中表达下调。随后的研究发现组蛋白甲基化转移酶 (EZH2) 通过与 DAB2IP 启动子区域的组蛋白脱乙酰基酶 1 (HDAC1) 相互作用来影响 DAB2IP 的基因表达, 推测可能是前列腺癌中 DAB2IP 表达下调的重要机制。该研究进一步发现, 在正常前列腺上皮细胞和前列腺癌细胞中, DAB2IP 启动子区域的 H3-Lys-27 二甲甲基化或三甲甲基化状态与 EZH2 的存在密切相关。

2007 年, Duggan 等进行了两个关于侵袭性前列腺癌的全基因组相关性研究, 第一组数据涉及 498 例侵袭性前列腺癌患者和 494 例对照, 样本来自于在瑞典进行的以人群为基础的病例对照研究; 第二组数据涉及 737 例侵袭性前列腺癌患者和 1,105 例对照, 样本来自于美国肿瘤研究所公开的资料。研究共筛选出 7 个与侵袭性前列腺癌的风险具有显著相关性的单核苷酸多态性 (SNPs) 位点, 并最终确定一个位于 DAB2IP 基因上的 SNP 位点 (rs1571801) 与侵袭性前列腺癌密切相关, 提示 DAB2IP 可能是判断前列腺癌恶性进展与评价治疗预后的特异性分子标志物。

作为前列腺癌常规的治疗手段之一, 放射治疗与 DAB2IP

表达的关系引起了 Kong 等的注意。他们研究了前列腺癌细胞中 DAB2IP 的表达情况与电离辐射 (IR) 之间的关系, 通过对比 DAB2IP 干扰表达的前列腺癌 PC3 细胞 (PC3 shDAB2IP) 与 DAB2IP 正常表达的细胞 (PC3 shVector) 对 IR 的反应, 显示出 PC3 shDAB2IP 对 IR 所致凋亡抵抗力更强, 作用机制与促凋亡蛋白 (如半胱天冬酶 -3、8、9) 表达水平的降低和某些抗凋亡蛋白 (如 Bcl-2 和 STAT3) 表达水平的增高密切相关。可见, 病人 DAB2IP 的表达情况可用于评估其前列腺癌的风险及选择合适的治疗方案。在之后的研究中, Kong 等用抗癌药物环氧聚微管素 B (EpoB) 作用于 PC3 shDAB2IP, 观察该药物对 PC3 shDAB2IP 的放射敏感性的影响, 结果显示 EpoB 可通过促进凋亡的方式增加 PC3 shDAB2IP 的放射敏感性。由此推知, DAB2IP 缺陷的前列腺癌患者, 选用 EpoB 联合 IR 来进行治疗, 可能会提高临床疗效。

### 4.2 乳腺癌

Dote 等在乳腺癌中也观察到了 DAB2IP 启动子区域的异常甲基化。通过对 25 种人乳腺癌细胞、39 例早期乳腺癌手术切除标本 (37 例侵袭性导管癌和 2 例粘液癌) 和 10 例非恶性乳腺组织的分析, 表明 DAB2IP 启动子 m2a 和 m2b 甲基化很可能导致了 DAB2IP 基因表达的下

调, 而 DNA 甲基化转移酶抑制剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷成功恢复了启动子区域甲基化细胞的 DAB2IP 基因表达, 由此判断, 正是启动子区域甲基化抑制了 DAB2IP 基因表达。另外, 研究者还对 DAB2IP 甲基化状态与早期肿瘤患者的临床病理特征之间的关系进行了探讨, 包括年龄、分级、肿瘤大小、淋巴结进展情况、远端转移、组织学、浸润程度及预后等因素, 证实 m2b 区域的甲基化与乳腺癌淋巴结进展情况有关。

### 4.3 肺癌

2005 年, Yano 等在肺癌中也发现了 DAB2IP 启动子区域的异常甲基化。此研究采用的方法与 Dote 在乳腺癌中采用的方法相同, 结果显示启动子区域的异常甲基化抑制了 DAB2IP 基因表达, 且 DAB2IP 的甲基化情况与肺癌的发展阶段相关联。由此可见, DAB2IP 可能是疾病发展阶段的一种标记物, 可用于反映肺癌临床病理上的恶性程度。

2011 年, Yang 等在中国进行了一项关于 DAB2IP 与肺癌关系的研究。由于之前有研究称 DAB2IP 的一个遗传变异与侵袭性前列腺癌的风险增加有关, 故该研究假设 DAB2IP 的一个变异可增加肺癌的遗传易感性。研究中采用病例对照研究来探索 DAB2IP 两个常见的多态性与肺癌风险的关系, 选取了 1,056 例肺癌患者和 1,056

例性别与年龄均匹配的非癌症患者。结果显示携带 97906AC 或 97906AA 变异基因型的人群患肺癌的风险更大, 并且其风险与变异的等位基因数量呈剂量反应关系。其中年龄超过 60 岁, 男性, 不吸烟, 不饮酒, 超重, 一级或二级亲属中有癌症家族史的这类人群, 其风险关系尤为明显, 且携带 97906A 与超重有交互关系。另外, 研究还发现 97906A 等位基因的数量与男性肺癌患者早期诊断年龄呈负相关。

### 4.4 消化系统肿瘤

随后, 研究者在胃肠肿瘤和肝细胞癌 (HCC) 中也发现 DAB2IP 启动子 5' 区域的异常甲基化, 且与基因下调和转录失活有着密切关系。2005 年, Dote 等采用与之前分析乳腺癌相同的方法分析了胃肠肿瘤中 DAB2IP 的甲基化与其表达情况之间的关系。结果显示 DAB2IP 启动子 m2b 区域的甲基化与基因表达下调密切相关。研究还发现, m2a 和 m2b 区域的甲基化状态均与胃部肿瘤位置显著相关, 并且 m2b 区域的甲基化与胃部肿瘤位置的关系更为密切; 而在大肠癌中, m2b 区域甲基化状态与结肠左侧发生的肿瘤有相关性。同时, 研究观察到在胃下三分之一部位和大肠远端易发生 DAB2IP 的甲基化。

2007 年, Qiu 等利用相似的方法发现在 HCC 中 DAB2IP 的表达也被抑制或下调, 并且利用药物治疗可恢复其表达, DAB2IP 的这种再激活与启动子的去甲基

化有密切关系。同样的, 研究还发现 DAB2IP 启动子 m2b 区域甲基化情况与 HCC 的进程有关, 并且与邻近的正常组织相比, 早期肿瘤的启动子甲基化率较高。为了进一步弄清 DAB2IP 表达与 HCC 临床病理特征的关系, Zhang 等运用实时定量 PCR、Western blot、IHC、MTT 及统计学分析方法对 120 例临床石蜡包埋的 HCC 组织样本进行研究。结果显示与正常肝细胞相比, HCC 细胞的 DAB2IP 表达较低, 其表达水平与肿瘤的大小有关, 并且表达水平低的患者其总生存时间也较短。可见, DAB2IP 是评估 HCC 进展的有效标记物, 其表达的下调促进了 HCC 细胞的增生和侵袭, 从而导致了肿瘤的恶性进展。

### 4.5 成神经管细胞瘤

2012 年, Smits 等通过对鼠和人成神经管细胞瘤基因表达的资料进行 Meta 分析, 发现 DAB2IP 可能是一个潜在的成神经管细胞瘤的肿瘤抑制基因。该研究对 108 例符合条件的资料进行生存分析, 原始资料来自于 2 项已经公开的关于成神经管细胞瘤基因表达的回顾性研究。研究发现 DAB2IP 可能是一个促凋亡的肿瘤抑制基因, 并从 RNA 和蛋白水平均证实了在成神经管细胞瘤中 DAB2IP 是下调的。同时 Kaplan-Meier 分析显示出较低的 DAB2IP mRNA 表达水平与预后较差有关, 且多变量 Cox 比例风险分析显示出根据

下转第 8 版 ▶

## 外泌体在肿瘤侵袭转移中的作用

复旦大学放射医学研究所 徐金苹 袁德晓

外泌体是一种在细胞内形成并分泌到细胞外的具有膜结构的小囊泡体,直径约为40~100nm。最新的研究发现,癌细胞比正常细胞分泌更多的外泌体,而且肿瘤细胞间可以通过外泌体的转运,促进癌基因、多种功能性分子(致癌蛋白,细胞因子等)及肿瘤相关microRNAs(如miR-21, miR-92)的相互转移,引起肿瘤微环境的改变和重编程,从而对肿瘤的发生发展、侵袭转移产生影响。而电离辐射等因素亦可以导致肿瘤细胞外泌体的分泌,从而影响肿瘤发展及侵袭转移的发生。

### 1 外泌体的生物合成与功能

外泌体生物合成及分泌的过程复杂而有序。与直接来自胞质膜的微泡不同,外泌体是在细胞内形成的,其生物合成主要包括四个阶段:起始、内吞、多泡体形成、外泌体分泌。胞浆内功能性信号分子,包括功能性mRNAs、蛋白质及miRNAs,以及无功能性或有害的分子会被分装到不同的微泡中,并释放出胞外。外泌体的释放途径大致有三种:依赖

内吞体分选复合物(ESCRT)、非ESCRT依赖内吞体分选复合物、以及溶血双磷脂酸(LBPA)途径。外泌体ESCRT依赖方式起始于内吞体膜表面受体及3-磷酸磷脂酰肌醇的泛素化,继而与ESCRT家族成员识别并特异结合形成复合物,促使内吞体出芽及囊泡的释放。另外,LBPA途径也要依赖ESCRT蛋白的活化。有人提出,外泌体ESCRT非依赖分泌方式受神经酰胺的调节,SMases的抑制会

使外泌体的释放减少。电离辐射、Rab蛋白家族、细胞内外的pH、细胞内钙水平的变化、细胞应激、乏氧等都会影响外泌体的分泌。

外泌体包含丰富的脂质、蛋白质和多种核酸,在细胞通讯中发挥重要作用。目前的研究表明,外泌体介导的信息交流方式主要有以下三种:(1)依赖于膜表面信号分子的信息转运;(2)依赖于膜融合后的内容物释放进行信息转运;(3)

依赖于信号分子的胞外释放进行信息转运。

研究发现,肝细胞癌细胞来源的外泌体可以介导miRNAs的转运。在受体细胞中,miRNAs可以上调细胞因子 $\beta$ -转化生长因子的表达,从而引起TAK1表达量的增多,激活JNK/p38/MAPK及NF- $\kappa$ B信号通路,促进转化的肝癌细胞生长。慢性髓源白血病细胞K562来源的外泌体miR-92a可介导肿瘤细胞-内

皮细胞间通讯,促进人脐静脉血管内皮细胞的迁移和管状结构形成,从而促进血管新生,为肿瘤细胞的侵袭和转移提供可能。此外,外泌体还可以将携带的血管形成前因子,包括VEGF、IL-8等释放到细胞外,通过作用于内皮细胞膜表面受体,激活Wnt通路,促进肿瘤细胞血管形成。外泌体的这些功能,奠定了其影响肿瘤发生发展、侵袭与转移的分子生物学基础。

### 2 外泌体在肿瘤侵袭转移中的作用

肿瘤细胞分泌的外泌体可以通过其所携带生物活性成分对肿瘤微环境及转移前微环境产生影响,从而促进肿瘤的侵袭和转移。

(1)外泌体与肿瘤微环境:有研究发现,前列腺癌及间皮瘤细胞来源的外泌体内含有TGF- $\beta$ ,可直接激活包括SNAIL1/2、Twist和ZEB1/2在内的转录因子,抑制E-钙黏蛋白和ZO-1的表达,促进上皮-间质转化,诱导血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶的表达,促进胞外基质的降解与基质重建,最终导致肿瘤微环境的改变,使其有利于肿瘤的浸润和转移。体外实验已经证实,外泌体中表达的TGF- $\beta$ 可以促使成纤维细胞分化为成肌纤维细胞的表型。而成肌纤维细胞是肿瘤微环境中基质重建蛋白的主要来源,并影响肿瘤血管形成。

(2)外泌体与肿瘤前微环境:肿瘤细胞分泌的外泌体不仅能够影响原位肿瘤生长的微环境,还参与肿瘤转移前微环境的形成。如黑色素瘤细胞的外泌体可以在肿瘤细胞到达靶细胞前,通过募集骨髓源性的造血干细胞形成一个适宜转移瘤细胞生存和增殖的微环境,在形成的潜在转移位点处肿瘤细胞分泌的外泌体可能会释放趋化因子或刺激非肿瘤细胞释放趋化因子来吸引恶性肿瘤细胞聚集。另外,有研究证明,黑色素瘤细胞来源的外泌体会刺激细胞整合素 $\alpha$ v $\beta$ 3、酪氨酸激酶受体 $\beta$ 4的增加,从而促使肿瘤细胞迁移至同侧的前哨淋巴结,形成促肿瘤转移的环境。肿瘤细胞来源的外泌体还可以促进肿瘤细胞与免疫系统的信息交流,通过募集致瘤免疫细胞来调节微环境中的免疫反应,使肿瘤细胞逃避免疫监视,增强对化疗的抵抗性。

### 3 辐射诱导的外泌体在肿瘤细胞侵袭转移中的作用

辐射可以促进肿瘤细胞外泌体的释放。研究发现,不同剂量X射线照射可以增加恶性胶质瘤和星形胶质细胞外泌体的分泌量,辐射诱导的外泌体可以促进信号蛋白TrkA的激活,从而激活参与肿瘤细胞转移的FAK信号通路的一系列信号分子,包括FAK、paxillin及Src等。这些外泌体不仅可以增强受辐射肿瘤细胞的侵袭转移能力,影响肿瘤细胞的辐射敏感性,还可以增强周围未受照射旁细胞的转移与侵袭能

力。受辐射癌细胞可释放外泌体于条件培养液中,通过膜融合的方式快速进入其所作用的旁细胞中,促进旁细胞的增殖与DNA的损伤。含外泌体的条件培养液受到RNA酶处理后,该辐射旁效应现象消失,说明RNA可能是介导辐射旁效应的一种重要信号分子。

Hazawa等提出辐射可以通过介导CD29/CD81复合物的形成来促进外泌体与受体细胞间的粘附。通过荧光蛋白标记法发现, $\gamma$ 射线照射人骨髓基质干细胞后,受体细胞对外泌体的吸收与辐射剂量有关,与受

体细胞的类型无关。而且,辐射诱导的外泌体可以增加受体细胞的动力,促进其增殖和发展。同时,外泌体通过内吞作用而内化的过程是由氧化应激介导的p38 MAPK通路调节的,即辐射诱导的ROS通过促进p38 MAPK的磷酸化进一步促进受体细胞对外泌体的吸收。

由此可见,电离辐射可以影响肿瘤细胞外泌体的分泌和吸收,并通过外泌体介导的细胞间信息传递影响肿瘤细胞的侵袭转移能力。这一研究结果有可能为临床肿瘤治疗提供一种新的治疗策略。

### 4 展望

近年来,对肿瘤来源的外泌体的研究已取得了一定进展,认为它是肿瘤逃避免疫监视和杀伤、促进肿瘤血管形成及侵袭转移的重要调节物质,同时可以影响肿瘤细胞的辐射敏感性。此外,肿瘤来源的外泌体特异性蛋白可以反映肿瘤来源,如膀胱癌、肾

癌、结直肠癌及黑色素瘤等,从而可作为肿瘤生物标记物。因此,从患者体液中提取的外泌体可以有助于临床诊断,包括风险评估,早期发现及早期诊断,甚至可以预测疗效及判断预后等。对肿瘤细胞外泌体分泌机制的了解,可以为肿瘤病人的临床治疗提供新的思路。然而,

该领域仍充满大量挑战,如对外泌体内容物的分装机制、外泌体与靶细胞膜融合的机制等,特别是肿瘤在放疗过程中释放的外泌体的生理功能,对外泌体在肿瘤细胞侵袭转移中的作用进行深入研究,可为外泌体的肿瘤靶向治疗及其与放疗联合应用提供新的理论基础。

### ◀ 上接第7版

DAB2IP的表达水平可以预测疾病的预后。另外,研究还发现DAB2IP与EZH2的表达水平是呈负相关的,主要是由于EZH2诱导的组蛋白三甲基化抑制了DAB2IP的表达。此项研究推测DAB2IP可以促进肿瘤细胞的凋亡,而且DAB2IP可能是辨别患者预后风险高低的一个分子标志物。

#### 4.6 其他疾病

2010年,Gretarsdottir等进行了一个大规模的关于

腹主动脉瘤(AAAs)的全基因组相关研究。研究发现位于人类染色体9q33上的rs7025486[A]与AAAs的风险密切相关,而rs7025486位于DAB2IP上。此项研究还发现,DAB2IP上述的序列变异与早发心肌梗死、外周动脉疾病以及肺栓塞等血管疾病有关,与颅内动脉瘤和缺血性卒中无关,并且发现其与一些常见的风险因子无关,如吸烟、血脂水平、肥胖、2型糖尿病及高血压等。这些都意味着一些动脉疾病间存在着病理生理上的关

系,并且DAB2IP上的一个序列变异可能会影响一些疾病的生化途径。

鉴于以上发现,Harrison等研究了1,386例冠心病(CHD)患者和3,532例对照,证实DAB2IP上的rs7025486[A]与CHD相关联,同时通过对其它研究的原始资料进行Meta分析,也验证了rs7025486[A]与CHD的相关性。此研究还发现rs7025486[A]与传统的冠心病生物标志物(如血脂水平、炎症、端粒长度等)无明显关系。

### 5 DAB2IP对肿瘤放射敏感性的影响

2010年,Kong等率先报道了DAB2IP表达抑制的前列腺癌细胞对射线呈现明显的抗性,其耐受的机制与增强的DNA双链损伤修复能力、有力的G2/M细胞周期检查点和抗凋亡密切相关。近期对膀胱癌开展的研究也证实了抑制DAB2IP

表达,能促进细胞的增殖,迁移,侵袭,造成细胞对射线的耐受。作用机制可能涉及ATM的表达和磷酸化的增加,S期细胞比例的升高以及加快的DNA双链断裂修复过程。抑制ATM的表达可以有效的提高DAB2IP基因沉默的膀胱癌细胞对射线的敏感性。

### 6 展望

综上所述,DAB2IP作为一个新发现的抑癌基因,在肿瘤细胞的增殖、存活和凋亡过程中扮演了重要角色。利用临床肿瘤标本,国内外多个课题组开展了DAB2IP与肿瘤发生发展的

相关性研究,结果提示:DAB2IP有望成为特异性评价某些肿瘤进展和判断治疗预后的重要分子标志物。相信随着研究的不断深入,DAB2IP在肿瘤临床治疗上的作用将得到进一步阐明,为肿瘤的治疗作出贡献。