

放射诱导旁观者效应研究进展及临床意义

康亚辉 王忠明

【摘要】 本文回顾分析了放射诱导旁观者效应(RIBE)近年来体内外实验研究进展。体外实验分析表明 RIBE 的产生与放射性类型、氧化新陈代谢及细胞缝隙连接细胞间通讯密切相关;体内实验分析表明 RIBE 产生与远位放射效应所致的炎症应答、放射源改变等。临床放疗治疗过程中,直接受照射细胞和旁观者细胞 DNA 损伤效应是有差异的,并且 RIBE 在精确放疗过程中比常规放疗体现更为明显。

【关键词】 旁观者效应; 放射疗法; 放射诱导

Research progress of radiation induced bystander effect and clinical significance KANG Ya-hui, WANG Zhong-ming. Department of Radiotherapy, Lianyungang NO. 2 Hospital, Lianyungang 222000, China
Corresponding author: WANG Zhong-ming, Email: wzm1291@tom.com

【Abstract】 This article reviewed the research progress of radiation induced bystander effect (RIBE) experiments *in vivo* and *in vitro* in recent years. *In vitro* experiments showed that the RIBE was closely related with radioactive type, oxidative metabolism and gap junction intercellular communication; *in vivo* experiments showed that RIBE caused by the inflammatory response, radioactive source change, etc. In the clinical course of radiation therapy, DNA damage is different between directly irradiated cells and bystander cells, and RIBE in accurate radiation therapy reflected more obvious than conventional radiotherapy.

【Key words】 Bystander effect; Radiotherapy; Radiation induced

近 20 几年来,放射诱导旁观者效应(radiation-induced bystander effect, RIBE)成为放射生物学的一个研究热点,国内外均有相关方面的研究,放射诱导的旁观者效应的存在得到明确地肯定。笔者对放射诱导旁观者效应的机制及临床意义做一概述。

旁观者效应(bystander effect, BSE)是指细胞受到外界作用后,能将作用表现传递给没有直接受到外界作用的细胞;其中 RIBE 主要有细胞死亡,基因突变,染色体不稳定等未受到照射的正常细胞和照射细胞发生相似的生物学改变。未受到照射的细胞和照射细胞有共同生存且相互作用的环境,该环境可以是同一机体的内环境,也可以是共同生长繁殖的体外培养环境。很早前学者们就有足够的证据证明该效应的存在,近年来随着研究的深入,逐渐阐明了该效应一部分分子生物机制。虽然大多数报道 RIBE 为体外研究,但部分文献显示它也可以发生在体内^[1],体外和体内相比,前者缺乏内环境和免疫应答等条件,体内实验能更好地说明该效应作用,特别是辐射致癌。有报道称低剂量辐射易引发癌症的发生,尤其高线性能量传递中的低剂量,如房间里的氡气或宇宙射线所诱导的生物损害^[2]。事实证明 10%~14% 的美国肺癌患者曾接触过氡气或 α 粒子射线^[3],因此 RIBE 的存在使人们对低剂量电离辐射暴露的风险评估引起重视。

一、体外实验研究

目前 RIBE 体外实验研究主要有三个方面:(1)放射线类型的影响;(2)氧化新陈代谢的效应;(3)细胞缝隙连接细胞间通讯的作用。

1. 放射线类型:旁观者效应在致密电离辐射(高 LET 射线,如 α 粒子)和稀疏电离辐射(低 LET 射线,如 γ 和 X 射线)中都有所发现。Nagasawa 等^[4]用 α 粒子辐照中国仓鼠卵巢(CHO)细胞时发现,在仅有 1% 的细胞核直接受到单个 α 粒子的作用时,也有 30% 的细胞呈现出姊妹染色体交换(SCE)。 α 粒子作为一种高线性能量传递源,对哺乳动物细胞有着复杂的生物学效应,特别是 α 粒子在 100 keV/ μm 时相对生物效应达到最大值。常用 α 离子体外实验为:(1)照射某一类细胞,然后培养并观察其他类型细胞的变化;(2)极低剂量照射所有细胞,然后滤除照射细胞只留培养基,将其他未照射细胞转移至该培养基,观察后者细胞反应。动物实验中,将照射的某种动物处死后,其骨髓移植到其同种异性动物体内,检测后者淋巴细胞染色体改变;(3)利用两种染色不同细胞群,一种细胞群 A 染色后照射,随后与另一种染色颜色不同的细胞群 B 混合培养,观察细胞群 B 的变化。研究人员通过以上不同的实验方法分别从细胞形态学变化,胞核变化,染色体变化等不同角度得出同一个结论,即受到放射损伤的细胞会将损伤传递给同一环境中其他细胞。研究进一步说明是由于 α 离子放射损伤的细胞分泌了某种可溶性因子,通过旁分泌作用影响其他细胞,该因子可能为低温稳定高温不稳定,能诱使正常细胞出现姐妹染色体互换的某种蛋白质。在低能量的 α 粒子实验中,Zhou 等^[5]通过用人鼠杂交细胞和可以阻挡低能量的 α 粒子的聚酯薄膜实验表

明, 旁分泌的因子可能为 TGF- β 1 或 IL-8。

有学者使用非离子射线紫外线 (UV) 研究 RIBE 发现, 非离子射线对细胞也具有旁观者效应, 且该效应与细胞密度密切相关^[6]。Nishiura 等^[7]使用长波 UV (UVA) 照射小鼠 B16 细胞研究旁观者效应作用时, 得出 UVA 诱导黑素原生成原因是由于旁观者效应的存在, 线粒体内钙离子活跃引发胞内氧化作用的增强所致。王菊芳等^[8]通过使用重离子碳辐照中国仓鼠 V79 细胞的条件培养基研究未照射细胞的旁观者效应, 发现重离子也可以通过条件培养基对未受照射细胞产生旁观者效应, 但与低 LET 的 γ 射线所致旁观者效应的产生机制是否一样还不清楚。

2. 氧化新陈代谢: 机体正常细胞生存依赖氧化剂, 正常稳态为氧化和抗氧化的平衡状态, 破坏此平衡则导致氧化应激状态, 形成病理生理状态。氧化剂主要为机体内源性活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS), 其产生来源是氧化新陈代谢。目前认为 ROS 是导致 RIBE 的前提条件, 过氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 对其有明显的抑制作用。辐射可通过裂解水形成活性氧自由基, 引起碱基及脱氧核糖损伤。自由基杀伤肿瘤细胞与损伤正常组织细胞的副作用构成了“同心圆作用”, 并与“细胞旁观者效应”密切相关。氧化剂通过作用模拟或影响信号转导中间物质作用于正常细胞, 氧化机体内的蛋白质, 脂肪, 核苷酸等物质, 改变氧化还原状态或 ROS 水平可影响多数基因应激反应, 改变细胞的生长率, 诱导特定基因的表达以及调节离子通道的活性。此外, ROS 还与激活旁观者细胞的信号通路有关。暴露于低剂量 α 粒子的融合细胞培养基代谢过程中产生的过氧化阴离子和过氧化氢, 可以参与调节旁观者细胞 p53 和丝裂原活化蛋白激酶通路的诱导强度蛋白的表达及活性。活化 SOD 和过氧化氢酶能抑制这些效应, 也能抑制旁观者细胞氧化还原转录因子 (如 NF- κ b、AP-1、ATF-2) 的激活。海春旭等^[9]使用 ⁶⁰Co 辐照肿瘤细胞对未照射细胞的研究中加入抗氧化剂, 明显缓解 ⁶⁰Co- γ 射线照射所致旁观者效应。此外, 氢氧根在放射导致细胞突变中也扮演着重要角色, 使用氢氧根清除剂的细胞, 放射后细胞突变率明显降低。氢氧根对 DNA 的损伤范围超过在其短暂的寿命中扩散范围, 可能原因有氢氧根与其他氧化根产生级联反应。加入氢氧根清除剂实验表明, 氢氧根不是旁观者细胞发生基因突变的诱导因素。氮氧化物 (nitric oxide, NO) 则为生物信号和细胞调节剂, 并不直接参与氧化应激反应, 而是通过降低细胞内谷胱甘肽的水平和形成氧中间物参与氧化应激。Khan 等^[10]在研究鼠肺不同区域放射造成放射性损伤形成的旁观者效应时指出, ROS 和 NO 可间接导致 DNA 损伤及临近组织的旁观者效应。陆颖等^[11]使用人与中国仓鼠杂交细胞研究受照射细胞的培养液对未受照射细胞存活率的影响, 发现二甲基亚砷 (DMSO) 能明显提高细胞的存活率, 但随着时间的延长, 其作用越来越不明显, 12 h 后几乎没有作用。这不仅证实活性氧自由基在诱发旁观者效应中的作用, 还提示旁观者效应的作用与时间有密切的关系。NF- κ b 对许多信号的基因是一个重要的转录因子, 包括环氧合酶 2 (COX-2), 药物抑制 I κ B 激酶 (IKK) /NF- κ b 后有效降低了旁观者效应, 所以 NF- κ b 很可能参与了旁观者反应。直接照射和旁观者作用

的成纤维细胞实验, 抑制 NF- κ b 活动也有效地抑制了 COX-2 及诱生型 NO 合酶 (iNOS) 的表达。Zhou 等^[12]通过使用哥伦比亚大学设计的带电粒子束联同一个带盘, 发现 COX-2 在旁观者效应中信号级联重要的作用, 实验抑制细胞外信号相关激酶磷酸化进而抑制旁观者响应, 证实了促蛋白激酶信号级联在旁观者效应中的重要作用, 表明 COX-2 相关通路 (MAPK) 是调节细胞的炎症反应, 决定了旁观者现象的信号链。Hei^[13]也同样证实 COX-2 在旁观者效应中起了极其重要的作用。此外, TNF- α 及 IL-1 β 也直接影响 COX-2 的表达。

3. 细胞间隙连接细胞间通讯: 细胞间隙连接细胞间通讯 (gap junction intercellular communication, GJIC) 是细胞间相对稳定的结构联系。缝隙连接由细胞间连接蛋白 (Connexin, Cx) 组成的管道, 其连接蛋白又称为连接子, 其直径约为 2.0 nm, 可使不超过 1 kDa 的分子通过, 是 GJIC 的通道, 接合素 43 是缝隙连接主要的蛋白质成分。目前发现并克隆的连接蛋白基因有 12 种, 并且发现有些基因具有抑制癌基因作用^[14]。把穿过细胞间隙连接的能力不同的大鼠上皮细胞等位基因暴露于 α 粒子下照射, 并使用原位免疫印迹观察 p21^{waf1} 的表达发现, 在 GJIC 丰富的培养基中旁观者细胞可以诱导 p21^{waf1} 的表达, 这说明了损伤信号是通过 GJIC 从放射细胞传递给旁观者细胞的。如果把 GJIC 不足的培养基暴露于低流量 α 粒子下照射, 仅被放射的细胞会上调 p21^{waf1} 的表达。Zhou 等^[15]通过细胞转染把显性负性结构转到连接子蛋白 43 会有效减弱 GJIC 的功能, 然后利用 α 粒子微线束照射诱导突变实验以会消除旁观者细胞突变, 而当连接子蛋白 43 异位过度表达时会增加旁观者细胞突变。当放射细胞的培养基用 GJIC 抑制剂 (例如林丹、六氯萘等) 预处理时, 旁观者效应的表达便会受到抑制。Bishayee 等^[16]用 H-脱氧胸腺嘧啶标记旁观者细胞, 利用林丹可明显减弱旁观者细胞的细胞毒性反应。研究发现, 旁观者效应只发生在存在 GJIC 的细胞间, 如 HeLa 细胞则不发生旁观者效应, 若将 Cx26 基因导入 HeLa 细胞并使其表达, 则发生旁观者效应^[17]。据此也可以推断出缝隙连接可能是旁观者效应的存在细胞类型依赖性的原因。尽管 GJIC 在旁观者效应中作用的已经有直接证据, 但是通过 GJIC 传递的因子相关特性还不清楚, 通过已知的特定类型的缝隙连接基因研究可能会鉴定这些因子的特性。

二、体内实验研究

和体外实验相比, 放射效应下细胞间所传递的物质与体内实验不同, 组织微环境产生的体内信号反应很可能在非靶向效应中起到作用^[18]。尽管体内实验的研究不多, 但体内实验更能够阐明机体远位旁观者效应机制, 解答可能对人们健康的影响。低剂量 (<0.2 Gy) 放射风险中旁观者效应占据了主导地位, 旁观者效应研究中低剂量诱发哺乳动物类癌症发生逐渐热门起来, 不仅包括环境和职业暴露方面, 还有临床剂量、组织剂量分布及整体剂量水平。

20 世纪 90 年代中期, Nagarkatti 等^[19]将小鼠暴露于可吸入氡气中, 以此探究氡气对淋巴器官中 T 淋巴细胞的数目和功能影响, 研究发现胸腺、周围淋巴结、肺相关淋巴结等和正常相比, 吸入氡气后总淋巴细胞数目明显减少, 其中 T 淋巴细胞数

目增加而非 T 淋巴细胞减少, 氦气导致脾脏和外周淋巴结 T 细胞和 B 细胞处于分裂增殖状态, 这说明氦气对免疫系统具有间接作用。大鼠实验表明^[20]吸入氦气后会增加骨髓细胞姊妹染色单体交换, 这说明存在一种诱导姊妹染色单体交换的可溶性因子从肺运到其他远端部位, 说明受照射的靶器官生成了某种诱变剂影响到了整个机体, 导致姊妹染色单体交换率增加。Khan 等^[10]报道了⁶⁰Co γ 射线 10Gy 照射肺底, 在已屏蔽的肺尖部位肺细胞发现微核形成增加, 然而给鼠肺注射过氧化物歧化酶后微核数目则明显减少, 说明与放射导致的炎性细胞因子如肿瘤坏死因子、IL-1 等产生的氧自由基有关, 致使未照射区域内 DNA 间接损伤。这种远位效应也在肿瘤患者治疗中发现, 如肺癌的局部放疗和乳腺癌的保守治疗中发生的放射性肺炎^[21], 尤其严格行单侧肺放疗而后却成为双侧肺炎, Geaeme 等^[22]认为是 T 细胞介导了炎性应答。Xue 等^[23]开展了裸鼠皮下植瘤实验, 研究标记 ¹²⁵I Udr 的肿瘤细胞对与之临近未标记的肿瘤细胞的损伤效应, 当裸鼠注入混合了标记和未标记的人结肠癌细胞 LS174T, 肿瘤的生长要明显比仅注射未标记细胞的慢, 说明体内旁观者效应发生与放射性核素衰退密切相关。在局部照射研究中, Koturbash 等^[24]报道了在小鼠经放射后, 在挡铅的皮肤中发生了 DNA 诱导损伤和 Rad51 蛋白水平的升高, 推测表观遗传学调节(如失调的 miRNA)可能与这种远位放射效应相关。

三、临床意义

放射治疗是肿瘤治疗的重要方式, 为提高肿瘤细胞的杀伤和更好保护正常组织, 减少次级癌症的发生, 研究 RIBE 对临床的影响是很有必要的。通常放射治疗成败的临床标准取决于几个关键因素: DNA 损伤的再修复, 细胞周期的再分布, 细胞的再增殖, 乏氧肿瘤区域的再氧化^[25]。迄今未探索到新治疗方法原因主要是受到这些因素的影响。已经有证据表明直接受照射细胞和旁观者细胞 DNA 损伤效应是有差异的。细胞靶向基因治疗可将凋亡信号传递给相邻的肿瘤细胞, 旁观者细胞的参与能够提高基因治疗的疗效。采用适当的形式, RIBE 或许能提供新型临床治疗方法^[26]。Little 等^[27]通过在同源终点连接(NHEJ) DNA 修复通路的基因敲除大鼠细胞实验研究发现, NHEJ 与旁观者效应中染色体畸变相关。细胞 G₀/G₁ 期照射极低量 α 粒子, 在修复缺陷型细胞株旁观者细胞有更高的畸变率, 这表明在直接受照射细胞和旁观者细胞中可能有不同的 DNA 损伤效应, 这或许应用在将来的治疗上。细胞周期中体现了不同程度的放射抵抗, 细胞在 S 期末期比 G₂/M 期抵抗更明显^[28]。可以肯定的是, 癌干细胞存在 G₀ 期, 并且其细胞周期缓慢, 可能更耐受常规化疗, 因为其细胞周期为沉默状态, 有很强的 DNA 修复活力且抑制凋亡^[29]。分割放射能够促进癌干细胞从其“存储地”释放, 增加不同周期细胞比例^[30], 增加放射敏感性。早期患癌的患者, 接受放疗后可能会有次级癌症发生和生活质量下降^[31]。尽管放射治疗外照射已有长足进展, 特别是三维适形放射治疗到调强放射治疗(IMRT)或螺旋断层放射治疗, 这些方法目的都是通过不同角度多重照射束最大限度提高肿瘤受照剂量和最小限度地减少正常组织受照剂量, 可也正是这样, 导致了更多体积的正常组织暴露于低剂量照射范围, RIBE 会比常规放疗体现更明显^[32]。

综上所述, 大量的体外实验和为数不多的体内实验都未能完全阐明 RIBE, 还需要对放射剂量和放射特性更深入研究, 体内实验不明确的地方还需要深入的探讨, 比如信号的传导通路, 这些信号如何导致器官肿瘤发生, 不同组织远位传播信号有哪些, 这些信号在 DNA 修复中扮演的什么样角色, 分子信号的性质, 和对公众、放射工作者、病人的风险探究等。

参 考 文 献

- [1] Watson GE, Lorimore SA, Macdonald DA, et al. Chromosomal instability in unirradiated cells induced *in vivo* by a Bystander effect of radiation. *Cancer Res*, 2000, 60: 5608-5611.
- [2] Goodhead DT, Thacker J, Cox R. Effects of radiations of different qualities on cells: molecular mechanisms of damage and repair. *Int J Radiat Biol*, 1993, 63: 543-556.
- [3] Risk of ionizing radiation exposure to children: a subject review. American Academy of Pediatrics. Committee on Environmental Health. *Pediatrics*, 1998, 101: 717-719.
- [4] Nagasawa H, Little JB. Bystander effect for chromosomal aberrations induced in wide -type and repair deficient CHO cells by low fluences of alpha particles. *Mut Res*, 2002, 508: 121-129.
- [5] Zhou H, Suzuki M, Geard CR, et al. Effects of irradiated medium with or without cells on Bystander cell responses. *Mutat Res*, 2002, 499: 135-141.
- [6] 黄丹, 杨长永, 陶德定, 等. 紫外线诱导的 Molt-4 细胞旁观者效应的研究. *华中科技大学学报: 医学版*, 2008, 37: 336-338.
- [7] Nishiura H, Kumagai J. The Bystander Effect is a Novel Mechanism of UVA-Induced Melanogenesis. *Photochem Photobiol*, 2012, 88: 389-397.
- [8] 王菊芳, 李文建, 周光明, 等. 碳离子辐照哺乳动物细胞引起的旁观者效应. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2004, 22: 303-306.
- [9] 海春旭, 刘瑞, 秦绪军, 等. 肿瘤放疗自由基损伤副作用修复的新构想及研究基础. *中国现代实用医学杂志*, 2004, 3: 43-47.
- [10] Khan MA, Van Dyk J, Yeung IW, et al. Partial volume rat lung irradiation; assessment of early DNA damage indifferent lung regions and effect of radical scavengers. *Radiother Oncol*, 2003, 66: 95-102.
- [11] 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: 69-72.
- [12] Zhou H, Ivanov VN, Gillespie J, et al. Mechanism of radiation-induced Bystander effect: Role of the cyclooxygenase-2 signaling pathway, 2005, 102: 14641-14646.
- [13] Hei TK. Cyclooxygenase-2 as a Signaling Molecule in Radiation-Induced Bystander Effect, 2006, 45: 455-460.
- [14] Mesnil M, Krutovskikh V, Piccoli C. Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin species specificity. *Cancer Res*, 1995, 55: 629-639.
- [15] Zhou H, Randers Pehrson G, Waldren CA, et al. Induction of a by-stander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97: 2099-2104.
- [16] Bishayee A, Hill HZ, Stein D, et al. Free radical-initiated and gap junction-mediated Bystander effect due to nonuniform distribution of incorporated radioactivity in a three-dimensional tissue culture model. *Radiat Res*, 2001, 155: 335-344.
- [17] Mesnil M, Piccoli C, Yamasaki H. A tumor suppressor gene, Cx26, also mediates the Bystander effect in HeLa cells. *Cancer Res*, 1997, 57: 2929-2932.
- [18] Wright EG. Microenvironmental and genetic factors in haemopoietic radiation responses. *International Journal of Radiation Biology*, 2007, 83: 813-818.
- [19] Nagarkatti M, Nagarkatti PS, Brooks A. Effect of radon on the immune system: alterations in the cellularity and functions of T cells in lymphoid

- organs of mouse. *J Toxicol Environ Health*, 1996, 47: 535-552.
- [20] Report of health and environmental effects of increased coal utilization by the Committee on Health and Environmental Effects of Increased Coal Utilization. *Environ Health Perspect*, 1980, 36: 135-153.
- [21] Arbetter KR, Prakash UB, Tazelaar HD, et al. Radiation-induced pneumonitis in the "nonirradiated" lung. *Mayo Clin Proc*, 1999, 74: 27-36.
- [22] Graeme WM, Pharm B, Samuel NB. Radiation and the lung: a reevaluation of the mechanisms mediating pulmonary injury. *International Journal of Radiation Oncology Biolog*, 1995, 31: 361-369.
- [23] Xue LY, Butler NJ, Makrigiorgos GM, et al. Bystander effect produced by radiolabeled tumor cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 13765-13770.
- [24] Koturbash I, Rugo RE, Hendricks CA, et al. Irradiation induces DNA damage and modulates epigenetic effector s in distant bystander tissue *in vivo*. *Oncogene*, 2006, 25: 4267-4275.
- [25] Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, et al. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Research*, 1996, 56: 941-943.
- [26] Lumniczky K, Sáfrány G. Cancer gene therapy: combination with radiation therapy and the role of bystander cell killing in the anti-tumor effect. *Pathol Oncol Res*, 2006, 12: 118-124.
- [27] Little JB, Nagasawa H, Li GC, et al. Involvement of the nonhomologous end joining DNA repair pathway in the bystander effect for chromosomal aberrations. *Radiat Res*, 2003, 159: 262-267.
- [28] Pajonk F, Vlashi E, McBride WH. Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited. *Stem Cells*, 2010, 28: 639-648.
- [29] Park CY, Tseng D, Weissman IL. Cancer stem cell-directed therapies: recent data from the laboratory and clinic. *Mol Ther*, 2009, 17: 219-230.
- [30] Vlashi E, Kim K, Lagadec C, et al. *In vivo* imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101: 350-359.
- [31] Robison LL, Armstrong GT, Boice JD, et al. The Childhood Cancer Survivor Study: a National Cancer Institute-supported resource for outcome and intervention research. *J Clin Oncol*, 2009, 27: 2308-2318.
- [32] Prise KM, O'Sullivan JM. Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9: 351-360.

(收稿日期: 2013-10-15)

(本文编辑: 吴莹)

康亚辉, 王忠明. 放射诱导旁观者效应研究进展及临床意义 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7 (22): 10329-10332.

