

网络出版时间: 2015-11-18 10:12:35 网络出版地址: http://www.cnki.net/KCMS/detail/34.1065.R.20151118.1012.070.html

## 动物活体及人工皮肤组织辐射旁效应研究进展

吴文青\* 杨浩然\* 综述 聂莉莉 审校

**摘要** 辐射旁效应(RIBE)可以被不同类型的电离辐射所诱发。在各种体外培养细胞模型和活体动物及人体中,均检测到RIBE的存在。RIBE导致低剂量辐射的健康风险高于理论预期值,导致放射治疗后照射区域外原发性(辐射诱导)“二次”癌症的发生。相比于二维培养细胞模型,动物模型和人工构建皮肤组织模型中的RIBE更加接近人体内的复杂生长环境,传递表现出很大的不同。该研究主要对活体动物和人工构建皮肤组织的RIBE研究进展进行综述,对于研究RIBE的传递和机制具有重要的意义。

**关键词** 辐射风险;辐射旁效应;活体动物和人工构建皮肤组织

中图分类号 Q 691

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)12-1847-04

辐射旁效应(radiation-induced bystander effect, RIBE)是辐射发生后,受辐射细胞释放出损伤信号,导致未受辐射的细胞表现出类似的生物学现象。RIBE损伤因子的释放和传递主要通过两种方式:释放可溶性信号分子<sup>[1-2]</sup>和细胞间隙连接(gap junction intercellular communication, GJIC)<sup>[3]</sup>介导的细胞间信号转导。目前RIBE主要在二维尺度培养的细胞模型中进行,二维细胞模型作为一个单层、简化的培养系统,细胞在其中的生理状态与响应外界刺激能力均与体内立体、三维的状态存在较大差异。已有的研究<sup>[4]</sup>表明,三维组织模型和动物模型中的旁效应传递与二维培养细胞模型有很大不同。因此发展组织水平甚至个体水平上RIBE研究显得尤为重要。现就RIBE在这两个模型上的研究进展综述如下。

2015-09-08 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1408085QH161)

作者单位:中科院合肥物质科学研究院医学物理与技术中心辐射生物医学研究室,合肥 230031

作者简介:吴文青,女,硕士研究生;

聂莉莉,女,高级工程师,责任作者,E-mail: xiao433@sina.com

\* 对本文具有同等贡献

### 1 基于动物个体水平的旁效应研究

Brooks et al<sup>[5]</sup>首次用 $\alpha$ 粒子照射中国仓鼠肝脏的部分区域,发现肝脏组织所有细胞的染色体畸变率均显著上升,所有细胞面临染色体损伤的风险。此外,移植受照射雄性小鼠的骨髓细胞至未照射雌鼠体内,在雌鼠的造血干细胞后代中观察到染色体不稳定性<sup>[6]</sup>。在经过意外辐射事件<sup>[7]</sup>或高剂量放射治疗<sup>[8]</sup>的情况下,从患者的血浆中发现致染色体断裂的活动。研究<sup>[9-10]</sup>显示啮齿类动物、鱼类等均能观察到RIBE。

**1.1 啮齿类动物在RIBE中的研究** 到目前为止,动物个体水平上的RIBE研究还不够全面,主要采用的模式动物是小鼠和大鼠。

**1.1.1 辐射肺部引起的旁效应研究** Khan et al<sup>[9]</sup>发现利用<sup>60</sup>Co  $\gamma$ 射线20 Gy照射大鼠肺的一部分区域,诱发肺的其它未照射区域产生RIBE。照射30%或70%的肺,肺的未照射区域微核率显著上升。未照射区域的DNA损伤能被超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和N-硝基-L-精氨酸甲酯盐酸盐抑制,表明氧化性自由基(reactive oxygen species, ROS)和一氧化氮(nitric oxide, NO)诱导未照射区域的DNA损伤。SOD类似化合物Eukarion-189能有效地通过抗炎作用保护照射和未照射肺的DNA损伤。Calveley et al<sup>[11]</sup>利用<sup>60</sup>Co  $\gamma$ 射线18 Gy照射大鼠部分肺脏,在肺的未照射区, DNA损伤呈周期性变化,且与免疫功能改变相关。整个肺组织的白介素-1 $\alpha$ 、白介素-1、白介素-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、转化生长因子- $\beta$ 1 mRNA表达水平发生周期性改变和巨噬细胞显著激活。由此表明,照射部分肺脏时引起的RIBE与ROS、NO和免疫功能变化等有关。

**1.1.2 辐射皮肤引起的旁效应研究** Koturbash et al<sup>[12]</sup>用1 Gy X射线照射小鼠皮肤的部分区域,对比全身照射、半身照射小鼠的皮肤,6、96 h后检测

DNA 双链断裂(double strand break, DSB), 发现在 96 h 与对照小鼠比较未有显著性变化, 表明在照射后 96 h, DNA 损伤已得到完全修复; 但在照射后 6 h 全身照射和半身照射的小鼠皮肤中均检测到 DSB 显著增加, 其中半身辐射最显著的区域是距离照射区大于 0.7 cm 的皮肤; 研究中还发现半身照射小鼠在照射 6、96 h 后都能检测到 Rad51 蛋白表达上调, 这也从另一方面证明了在照射后的 96 h 半身照射小鼠的旁区皮肤组织一直在进行 DNA 损伤修复。照射后 6、96 h 在未受照射的皮肤中发现参与转录沉默的 DNA 甲基转移酶 1、甲基 CpG 结合蛋白 2、甲基 CpG 结合结构域蛋白 2 显著增加, 说明表观遗传学因素参与 RIBE 过程。

Mancuso et al<sup>[13]</sup> 发现了旁效应在未照射的组织中诱导肿瘤的发生, 研究采用的小鼠模型是 Ptc1<sup>+/-</sup>, 新生小鼠事先用环状铅护罩罩住头部, X 射线 3 Gy 照射小鼠后半部分皮肤; 结果显示, 与未经过照射的小鼠比较, 半身照射的小鼠形成神经管细胞瘤的概率增加了 39%。经过 GJIC 抑制剂组织纤维蛋白溶酶原激活剂的处理,  $\gamma$ -H2AX (DSB 的一种标记蛋白) 的形成和细胞凋亡率显著下降, 表明 GJIC 参与到旁效应的传递中。虽然相同 X 射线处理不同类型的小鼠, 在未受照射的部分组织均能检测到短期的旁效应, 但是其中只有部分杂合动物的脑部等有致癌性, 说明检测终点依赖于动物的基因型。这就解释了在放射治疗后为什么很多患者的未照射组织短期检测终点呈现各种变化, 而二次癌症的发病率很低。

**1.1.3 辐射脑部引起的旁效应研究** 自从脑部肿瘤成为成年人最常见的癌症后, 脑部放射成为最常见的治疗手段。研究表明脑部局部照射能导致表观遗传学的改变和调节远距离组织如脾脏、睾丸、皮肤等的基因表达。Koturbash et al<sup>[14]</sup> 用 20 Gy X 射线照射大鼠脑部, 照射后 24 h 和 7 个月取脾脏, 发现脾脏发生了显著的表观遗传学变化, 如 DNA 低甲基化、组蛋白甲基化和 DNA 甲基转移酶水平改变、非编码 RNA 分子(miRNAs) 上调等。这些分子水平上的变化甚至能一直维持在照射后 7 个月。局部脑部照射对不同性别的小鼠均能引起不同程度的脾脏 miRNAs 变化, 性别差异导致的变化可能与 Dicer 酶增加的时间点有关, 这通过切除小鼠性腺后 Dicer

酶表达模式与完整小鼠相比有差异所证实。Jan et al<sup>[15]</sup> 也用 20 Gy X 射线照射大鼠脑部, 在未照射的生殖器官如睾丸组织发生明显的 DNA 损伤和 DNA 甲基化的变化。Illytsky et al<sup>[16]</sup> 发现用 0.5 Gy X 射线照射小鼠脑部, 除照射后 6 h 发生皮肤的甲基化改变, 直至 14 d 脾脏都是低甲基化。通过以上研究显示, 对脑部进行照射, 无论剂量大小都可引起部分组织如脾脏、睾丸、皮肤等旁效应的产生, 导致 DNA 和染色体的损伤, 甚至表观遗传学的改变。

**1.1.4 骨髓移植系统中 RIBE 的研究** 骨髓移植系统已被用来研究 RIBE。Watson et al<sup>[6]</sup> 用 0.5 Gy <sup>252</sup>Cf 中子照射雄性小鼠骨髓细胞与未照射骨髓细胞混合移植到雌性小鼠, 随后在 13 个月时间内, 未照射的造血干细胞后代中发现遗传不稳定性如染色体易位和缺失, 在受体小鼠骨髓中也发现了显著的染色体畸变。由此显示 RIBE 也存在于造血系统中。

**1.2 鱼类在 RIBE 中的研究** RIBE 不仅在脊椎动物中被证明, 在鱼类中也有所发现。研究<sup>[10, 17]</sup> 表明用 0.5 Gy X 射线照射斑马鱼, 将未照射的斑马鱼和照射的斑马鱼放在同一容器中 2 h, 未照射的斑马鱼体内细胞死亡增加。提取未照射斑马鱼的皮肤、鳃、脾脏、肾脏、鳍进行细胞培养, 所获培养基能使报告细胞 HPV-G 的克隆存活率显著下降, 其中鳃和鳍提取组的效应最为明显。

Yum et al<sup>[18]</sup> 也证明了斑马鱼的 RIBE。8 个  $\alpha$  粒子照射的斑马鱼胚胎与 8 个未照射的斑马鱼胚胎在琼脂糖平板上共培养, 通过吖啶橙染色发现两种胚胎中都观察到细胞死亡信号明显增加。此发现证明 RIBE 可在斑马鱼胚胎间产生。Choi et al<sup>[19]</sup> 研究  $\alpha$  粒子也证明了上述结论, 并且此旁效应的产生与所用剂量无直接关系; 此外, 还证实释放到水中的分子信号在 RIBE 中起到一定作用。

**1.3 动物个体 RIBE 机制方面的研究** 目前研究<sup>[1, 3]</sup> 显示体外 RIBE 机制研究主要是以下两个方面: 一是受照射细胞释放信号分子如 ROS、NO 等对未受照射细胞发生作用; 二是通过 GJIC 介导或传导这一过程。研究<sup>[20]</sup> 显示部分动物个体内旁效应机制研究也主要通过以上两个方面。照射小鼠部分脾脏能调节 ROS、NO 和炎症因子的变化来诱导未照射肺的 DNA 损伤等<sup>[9]</sup>; 照射小鼠部分皮肤能导致未

照射皮肤发生 DSB 和 DNA 甲基化的变化,且 GJIC 在旁效应的传递中起着重要的作用<sup>[12-13]</sup>; Mancuso et al<sup>[21]</sup> 研究长期辐射效应传递的机制,发现 GJIC 和其主要组成蛋白 connexin43 与小鼠潜在的致癌中枢神经系统的信号传递有关,GJIC 在旁效应信号传递到未照射脑部的过程中起到至关重要的作用。Mancuso et al<sup>[22]</sup> 进一步用辐射敏感性小鼠模型研究 GJIC 和 connexin43 在 RIBE 中的作用,检测未照射区域皮肤的终点如 DNA 损伤和细胞凋亡,说明 GJIC 在 RIBE 信号传递中的重要作用。相关研究<sup>[14-15]</sup> 显示,表观遗传学机制参与到辐射诱发的体内旁效应。照射小鼠或者大鼠脑部能通过中枢系统的传递导致脾脏发生表观遗传学的改变(如低甲基化、DNMT 的变化等)<sup>[14]</sup> 以及细胞增殖、凋亡和 p53 蛋白的变化<sup>[15]</sup>,也能导致睾丸和皮肤的 DNA 损伤和表观遗传学的变化<sup>[16]</sup>;照射斑马鱼的研究<sup>[10,17]</sup> 显示,被照射的斑马鱼能释放分子到水中影响未照射斑马鱼的部分组织发生存活率下降等,而具体的有哪些分子则研究较少<sup>[18-19]</sup>。虽然辐射诱发动物体旁效应研究已取得一定的进展,但其确切的机制尚不完全清楚。

## 2 人工构建皮肤组织模型中的旁效应研究

在动物个体上研究 RIBE 已取得相当多的成果,但是由于动物个体内部环境相对复杂,且有些实验室还不具备动物饲养条件,机制方面的研究还不完善。为了更全面的研究旁效应,有些研究人员采用三维组织模型研究 RIBE,最广泛使用的是人工构建皮肤组织。在人工构建皮肤组织模型中,细胞间信号同样可通过 GJIC<sup>[3]</sup> 和扩散的方式<sup>[23]</sup> 传导。

### 2.1 人工构建皮肤组织中的 RIBE 研究

人工构建皮肤组织是指利用细胞生物学和工程学原理与技术将种子细胞、细胞外基质与适当的支架材料等相结合构建出的皮肤替代物。目前已有商品化的皮肤组织替代物如 Apligraf、EpiDerm、EpiAirway、REF 等。

Belyakov et al<sup>[24]</sup> 首次运用体外人工构建的皮肤组织(EPI-200 和 EFT-300)来研究 RIBE 在组织水平上的传导,利用微束装置,仅照射皮肤组织中 100  $\mu\text{m}$  厚的层,检测此层两侧不同距离处的遗传损伤。结果表明,在该层外侧 1 mm 以内区域的细胞中,凋

亡和微核发生率显著上升(分别为对照组的 2.8、1.7 倍),但随着距离增大,呈下降趋势。Sedelnikova et al<sup>[25]</sup> 利用相同的研究模型,检测到辐射片层 40  $\mu\text{m}$  组织中 DSB 的发生,受辐射层中 DSB 阳性细胞率在辐射 30 min 后达到峰值,而附近(未受照射)片层中 DSB 阳性细胞率于辐射后 12~48 h 达到峰值,48 h 后到第 7 天都呈下降趋势。由此表明照射人工构建皮肤组织,未照射区域的旁效应与距离照射区的远近有关,且会发生凋亡和 DSB 等,DSB 可在一段时间内被修复。

### 2.2 人工构建皮肤组织在 RIBE 机制研究中的应用

由于组织具有更加复杂的生理结构,因此其内在机制也更为复杂<sup>[26-27]</sup>。研究已证实三维组织中 GJIC、ROS、NO、转化生长因子- $\beta$ 1 等因子同样参与了 RIBE 传导。Kovalchuk et al<sup>[28]</sup> 运用 EpiAirway 组织模型研究发现电离辐射诱导旁组织中 miRNA 的表达上调,进一步导致 DNA 低甲基化、周期改变及凋亡率增加。miR-17 家族表达上调导致细胞周期和抑癌基因相关的腺病毒 E2 启动子结合因子 1 和视网膜母细胞瘤基因 1 的水平下调,说明组织旁区的增殖发生变化;miR-29 家族表达水平的上调导致 DNA 甲基转移酶 3a 和髓细胞白血病基因 1 表达水平的下降,影响了 DNA 甲基化和细胞凋亡;miR-16 表达水平的改变导致 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 水平的变化,表明细胞凋亡发生了变化。由此表明部分组织被照射后,NO、转化生长因子- $\beta$ 1 等信号分子的传递,导致旁组织的细胞凋亡、周期调控和表观遗传学都可能发生了变化。

## 3 结语

到目前为止,在体内研究 RIBE 的证据很有限,还需要进一步了解损伤信号是如何传递到旁细胞或旁组织,及如何引起大范围有效的反应,从而评价 RIBE 与辐射有关的癌症风险的不确定性。近年来在 3D 组织和动物中关于 RIBE 的研究越来越多,愈来愈显示其在辐射研究中的重要性。RIBE 是在高低剂量下发生的现象,其实际意义体现在对癌症的危险评价及肿瘤放疗计划的影响。3D 组织和动物模型更接近人体内的复杂生长环境,对于研究 RIBE 的传递和机制具有重要的意义。

## 参考文献

- [1] Zhou H, Ivanov V N, Lien Y C, et al. Mitochondrial function and nuclear factor- $\kappa$ B-mediated signaling in radiation-induced bystander effects [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(7): 2233–40.
- [2] Shao C, Folkard M, Prise K M. Role of TGF- $\beta$ 1 and nitric oxide in the bystander response of irradiated glioma cells [J]. *Oncogene*, 2008, 27(4): 434–40.
- [3] Azzam E I, de Toledo S M, Little J B. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to nonirradiated cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(2): 473–8.
- [4] Persaud R, Zhou H, Baker S E, et al. Assessment of low linear energy transfer radiation-induced bystander mutagenesis in a three-dimensional culture model [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(21): 9876–82.
- [5] Brooks A L, Retherford J C, McClellan R O. Effect of  $^{239}\text{PuO}_2$  particle number and size on the frequency and distribution of chromosome aberrations in the liver of the Chinese hamster [J]. *Radiat Res*, 1974, 59(3): 693–709.
- [6] Watson G E, Lorimore S A, Macdonald D A, et al. Chromosomal instability in unirradiated cells induced *in vivo* by a bystander effect of ionizing radiation [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(20): 5608–11.
- [7] Marozik P, Mothersill C, Seymour C B, et al. Bystander effects induced by serum from survivors of the Chernobyl accident [J]. *Exp Hematol*, 2007, 35(4 Suppl 1): 55–63.
- [8] Hollowell J G Jr, Littlefield L G. Chromosome damage induced by plasma of x-rayed patients: an indirect effect of x-ray [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1968, 129(1): 240–4.
- [9] Khan M A, Hill R P, Van Dyk J. Partial volume rat lung irradiation: an evaluation of early DNA damage [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1998, 40(2): 467–76.
- [10] Mothersill C, Bucking C, Smith R W. Communication of radiation-induced stress or bystander signals between fish *in vivo* [J]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40(21): 6859–64.
- [11] Calveley V L, Jelveh S, Langan A, et al. Genistein can mitigate the effect of radiation on rat lung tissue [J]. *Radiat Res*, 2010, 173(5): 602–11.
- [12] Koturbash I, Rugo R E, Hendricks C A, et al. Irradiation induces DNA damage and modulates epigenetic effectors in distant bystander tissue *in vivo* [J]. *Oncogene*, 2006, 25(31): 4267–75.
- [13] Mancuso M, Pasquali E, Leonardi S, et al. Oncogenic bystander radiation effects in Patched heterozygous mouse cerebellum [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(34): 12445–50.
- [14] Koturbash I, Zemp F J, Kutanzi K, et al. Sex-specific microRNAome deregulation in the shielded bystander spleen of cranially exposed mice [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(11): 1658–67.
- [15] Tammimga J, Koturbash I, Baker M, et al. Paternal cranial irradiation induces distant bystander DNA damage in the germline and leads to epigenetic alterations in the offspring [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(9): 1238–45.
- [16] Ilnytsky Y, Koturbash I, Kovalchuk O. Radiation-induced bystander effects *in vivo* are epigenetically regulated in a tissue-specific manner [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2009, 50(2): 105–13.
- [17] Mothersill C, Smith R W, Agnihotri N, et al. Characterization of a radiation-induced stress response communicated *in vivo* between zebrafish [J]. *Environ Sci Technol*, 2007, 41(9): 3382–7.
- [18] Yum E H, Choi V W, Nikezic D, et al. Alphanparticle-induced bystander effects between zebrafish embryos *in vivo* [J]. *Radiat Meas*, 2009, 44(9–10): 1077–80.
- [19] Choi V W, Cheung A L, Cheng S H, et al. Hormetic effect induced by alpha-particle-induced stress communicated *in vivo* between zebrafish embryos [J]. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(21): 11678–83.
- [20] Wang H, Yu K N, Hou J, et al. Radiation-induced bystander effect: early process and rapid assessment [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(1): 137–44.
- [21] Mancuso M, Pasquali E, Leonardi S, et al. Role of connexin43 and ATP in long-range bystander radiation damage and oncogenesis *in vivo* [J]. *Oncogene*, 2011, 30(45): 4601–8.
- [22] Mancuso M, Leonardi S, Giardullo P, et al. Oncogenic radiation abscopal effects *in vivo*: interrogating mouse skin [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013, 86(5): 993–9.
- [23] Nagar S, Smith L E, Morgan W F. Characterization of a novel epigenetic effect of ionizing radiation: the death inducing effect [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(2): 324–8.
- [24] Belyakov O V, Mitchell S A, Parikh D, et al. Biological effects in unirradiated human tissue induced by radiation damage up to 1 mm away [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(40): 14203–8.
- [25] Sedelnikova O A, Nakamura A, Kovalchuk O, et al. DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(9): 4295–302.
- [26] Hatzi V I, Laskaratou D A, Mavragani I V. Non-targeted radiation effects *in vivo*: a critical glance of the future in radiobiology [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(1): 34–42.
- [27] Azzam E I, de Toledo S M, Little J B. Stress signaling from irradiated to non-irradiated cells [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2004, 4(1): 53–64.
- [28] Kovalchuk O, Zemp F J, Filkowski J N, et al. MicroRNAome changes in bystander three-dimensional human tissue models suggest priming of apoptotic pathways [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(10): 1882–8.