

脑胶质瘤辐射抗性与逆转问题研究进展

文小倩 刘芬菊

(苏州大学放射医学与公共卫生学院放射生物教研室 苏州 215007)

摘要 胶质瘤是最常见的脑肿瘤,也是辐射抗性较强的肿瘤组织。近年来,对电离辐射诱导细胞凋亡分子机制的重视,探讨胶质瘤细胞的辐射抗性机制,寻找可逆转抗性基因,提高对肿瘤细胞的辐射敏感性,从而提高治疗的效果。本工作就胶质瘤细胞辐射抗性相关的基因、相关的酶、细胞外环境的作用及辐射抗性逆转的几个问题展开了讨论。

关键词 胶质瘤,放射治疗,辐射抗性,逆转基因

中图分类号 R811.5, R392.12, R332

胶质瘤占原发性脑肿瘤的60%以上,由于生长于中枢神经系统,呈浸润性生长,边界不清,外科手术难以完全切除,因此放化疗的辅助治疗则显得尤为重要。对于恶性胶质瘤患者,放疗则成为一种主要的治疗手段。在恶性胶质瘤的治疗过程中,肿瘤对放化疗的抗性不断增加,使疗效受到一定的限制^[1]。因而,关于脑胶质瘤辐射抗性产生机制的研究和如何克服辐射抗性,成为当前肿瘤放疗临床和基础研究中的热点问题。本工作就近些年来关于脑胶质瘤辐射抗性的机制及其逆转问题的相关研究情况进行概述。

1 辐射抗性发生机制的研究

1.1 致辐射抗性发生的相关基因

1.1.1 p53 基因的突变 p53 基因突变是包括胶质瘤在内的人类各种肿瘤中最常见的基因改变之一。P53 蛋白主要有以下三种功能:(1) 调控凋亡,(2) 控制细胞周期和细胞生长,(3) 控制修复和再增殖^[2]。p53 基因突变与 p53 基因突变细胞克隆,以及细胞调控异常,导致肿瘤的发生与发展^[3]。当机体受到电离辐射作用后,受损的 DNA 可通过激活 P53 蛋白使细胞分裂停滞于 G₁ 期,促使 DNA 修复,或者诱导未能修复的细胞凋亡。Bcl-2 家族参与了其中的调控,在依赖 p53 基因介导的细胞凋亡中,诱发凋亡的基因 Bax 借助 BH3 区与抑制凋亡的基因 Bcl-xL 相互作用,形成二聚体,通过调控线粒体理化特性的改变调节细胞凋亡。Bcl-xL 同时还与

Araf-1、ced4/Araf-1 样分子结合,间接调节包括 Caspase 酶家族和细胞色素 C (Cytochrome C) 在内的蛋白酶和核酸酶活性的释放,达到阻止细胞凋亡的目的。p53 基因的状态可通过对 Bcl-xL 与 Bax 的表达及 Bcl-xL / Bax 比率调控,影响细胞对射线的敏感性。这种敏感性的改变与 p53 基因突变数量、位置和类型有关^[4]。当 p53 基因突变失活时,引起 Bcl-2 家族基因调控失衡,凋亡抑制基因 Bcl-xL RNA 水平表达异常升高,导致靶细胞不易诱发细胞凋亡,成为肿瘤细胞耐受放疗的机理之一^[2]。

实验证实^[5],在表达突变抑制型 p53 基因的人脑胶质瘤细胞中以腺病毒转导诱使其过度表达野生型 p53 基因,可以增强恶性胶质瘤细胞的放射敏感性。另一项研究发现^[6],在体外将含有 p53 基因的腺病毒载体导入表达突变型 p53 基因的胶质瘤细胞中,可导致大量的细胞凋亡,体内研究亦得出相似的结论。Bell 等^[7]用表达 p53 基因的腺病毒载体检测其对 U251 人恶性胶质瘤细胞增殖的效应,并进一步观察颅内注射 U251 细胞的裸鼠的生存时间,这种 U251 细胞为感染了不含 p53 基因病毒载体的细胞,结果转染 U251 细胞的生长明显受到抑制。颅内注射感染含 p53 基因病毒载体的 U251 细胞的裸鼠生存期较对照组明显延长。

1.1.2 共济失调毛细血管扩张综合征突变 (Ataxia telangiectasia mutant, ATM) 基因缺陷 共济失调毛细血管扩张综合征 (Ataxia Telangiectasia, AT) 是单基因常染色体隐性遗传病,全世界人群的发病率为

苏州大学发展基金重点项目 (126031) 资助

第一作者:文小倩,女,1979年12月出生,苏州大学放射医学与公共卫生学院放射生物专业在读研究生

通讯联系人:刘芬菊

收稿日期:初稿 2004-07-07,修回 2004-09-06

1:40000—1:100000。该病是由于编码 ATM 的基因缺失所引起的多组织器官的损伤性疾病,ATM 为一种蛋白激酶,是 p53 基因的上游信号分子,其功能缺陷可引起多种临床表现,即 AT 病所具有的进行性小脑退化、高辐射敏感性、免疫缺陷、基因组不稳定、早熟和肿瘤高发病率等特征^[8]。已知 ATM 缺陷细胞显示出在多个细胞周期限制点的缺陷,这些限制点正常情况下使电离辐射所致 DNA 损伤的修复早于染色体复制和分离。培养的 AT 细胞在辐射后不能产生 G₁/S 限制点的阻滞,也就是不能产生对辐射抵抗的 DNA 合成。其结果就是 AT 细胞受照射后产生大量未修复的 DNA 双链断裂。Silke 等^[11]研究了其收集的适应组织培养后的胶质瘤标本,以及几种已经建立的胶质母细胞瘤 (Glioblastoma multiforme,GBM) 细胞株,发现原发胶质瘤细胞 2Gy 照射后,肿瘤细胞的存活分数 (SF₂) 与 ATM 蛋白水平显著相关,但建立的 GBM 细胞株不存在这种相关性。他们还发现 ATM 基因的功能并不依赖于 p53 基因而存在。该研究证实了低传代细胞系其对电离辐射的抗性依赖于 ATM,而建立的细胞株可能在培养的过程中获得了一种适应性,使 ATM 基因产物的功能减弱。他们发现用反义 RNA 减少 ATM 基因的表达,可增加胶质瘤细胞的辐射敏感性。

1.1.3 RAD51 基因 哺乳动物的 RAD51 基因与酵母 RAD51 基因和大肠杆菌 RecA 基因是同源基因。RAD51 基因与 DNA 双链断裂的修复相关,参与 γ 辐射后 DNA 的重组修复和多种 SOS 修复。实验表明:通过反义寡核苷酸阻止 RAD51 基因表达显著地提高了培养的 203G 鼠胶质瘤细胞和 A172 人类胶质瘤细胞的辐射敏感性。在小鼠的小脑延髓池种植胶质瘤细胞,用 RAD51 反义寡核苷酸治疗,其存活时间较未治疗组显著延长 ($p < 0.001$, logrank test);而且将反义寡核苷酸和辐照相结合,比单用辐射治疗胶质瘤小鼠的存活时间显著延长 ($p < 0.0001$, logrank test)。文献^[9]认为,肿瘤抑制基因 p53 通过 RAD51 的介导与同源重组修复过程直接相关。研究发现,人类原发胶质母细胞瘤中含野生型 p53 基因者比包含突变型 p53 基因的胶质瘤更具辐射抗性,预后更差,说明辐射介导的 p53 基因依赖的 G₁ 期细胞阻滞在原发性胶质母细胞瘤中不能正常发挥作用。而 RAD51 在 G₁ 晚期和 S 期的表达水平达到最高值,在 RAD51 基因反义寡核苷酸阻止 DNA 双链断裂修复时联合辐照,可不依赖于 p53 基因的存在减少胶质瘤细胞存活。Ohnishi 等^[10]利用 RAD51 基因的反义寡核苷酸阻止 DNA 双链断裂

的修复,在单独使用或与放疗联合使用治疗患胶质瘤的小鼠时,其存活时间均较对照组有显著延长。

1.1.4 EGFR 基因的扩增 表皮生长因子受体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) 是 v-erbB₁ 原癌基因的产物,此癌基因定位于 7 号染色体上,星瘤中 EGFR 基因在原癌基因改变时最易受影响^[11]。EGFR 在 GBM 中高表达,可达 40%—60%。持续地刺激 EGFR 所介导的信号传导通路,不仅会促进胶质瘤恶性程度的发展,而且可能有利于一次辐射所致基因损伤后的细胞存活。相反,通过分子抗体或者 EGFR 酪氨酸激酶阻滞剂阻断此通路,则导致 G₁ 期的阻滞和细胞凋亡。最近,对头颈部鳞状上皮癌的研究显示,阻断 EGFR 通路可以显著地阻滞细胞从受到的 DNA 损伤刺激中恢复,并可增加肿瘤的辐射敏感性。Stein 等^[12]利用 ZD1839 ('Iressa'),一种选择性的 EGFR 酪氨酸激酶阻滞剂来增敏表达高水平 EGFR 的 U251 GBM 细胞株。在辐照 5Gy 并有 ZD1839 存在的条件下,观察到显著的增敏效应和增加的细胞死亡。

Poppenborg 等^[13]发现,癌基因 ras、胸腺嘧啶激酶、c-myc 基因等与人类肿瘤和哺乳动物细胞的辐射抗性有关。

1.2 与辐射抗性有关的酶

1.2.1 抗氧化酶 细胞中的抗氧化酶是肿瘤细胞辐射抗性产生的一个因素。电离辐射治疗肿瘤,是产生活性氧离子以杀灭肿瘤细胞,如细胞含有高水平的抗氧化酶,则其具有较强的电离辐射抗性。Zhong 等^[14]测量了人类胶质瘤细胞中的 4 种抗氧化酶水平,结果证实人类胶质瘤细胞中的抗氧化酶水平,如 Manganese-containing superoxide dismutase, (MnSOD, 锰超氧化物歧化酶)水平较其它肿瘤细胞为高。

1.2.2 拓扑异构酶 I,II 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶染色质结构的差异可导致细胞辐射敏感性不同。拓扑异构酶、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶等是核骨架中极为重要的组成蛋白,在调节染色质结构中起关键作用。大量研究表明,拓扑异构酶 I 和 II 的抑制剂与射线具有协同作用,以增强对包括胶质瘤在内的人类肿瘤细胞的杀伤能力。聚腺苷二磷酸核糖基化作用在 DNA 的修复中具有重要意义。DNA 链断裂可激活聚腺苷二磷酸核糖聚合酶活性,使拓扑异构酶 I 聚腺苷二磷酸核糖基化,以利于修复损伤的 DNA 分子^[15]。Gross 等^[16]运用拓扑异构酶-I 的阻断剂 Topotecan (Hycamtin®) 和放化疗综合治疗

GBM, 57 位患者经过 6 周治疗均有较好的耐受性, 中位存活期为 15 个月。增加剂量的进一步临床研究已经开展。

1.3 细胞外环境对辐射抗性的影响

1.3.1 细胞间粘附所介导的辐射抗性 (Cell Adhesion-Mediated Radioresistance, CAM-RR) 实验表明, 细胞外基质 (Cell-extracellular matrix, ECM) 的存在, 使细胞对损伤因素如电离辐射的抵抗性增强。整合素 (Integrin) 家族介导细胞与胞外基质的粘附, 电离辐射在很大程度上影响了广泛分布的不同水平 β_1 整合素 (β_1 -integrin) 的信号传导通路。电离辐射使整合素的 β_1 亚型在细胞表面上调, 促使细胞增加与基质蛋白, 如纤维连接蛋白 (Fibronectin, FN) 或者层粘连蛋白 (Laminin) 的粘附, 位于下游的蛋白激酶、粘附素相关激酶、蛋白激酶 B/Akt 和糖原合酶激酶-3 β (Glycogen synthase kinase-3 β) 在依赖基质的条件下, 通过辐照被激活, 这些酶参与了信号扩大调节, 决定了单个细胞的辐射敏感性。细胞粘附所介导的辐射抗性现象, 是由于细胞与单个细胞外基质蛋白或者与细胞外基质生物复合物的粘附, 导致了特殊的关键性的细胞功能调节。细胞通过作为存活因素的整合素 (尤其是 β_1 整合素) 所介导的粘附控制凋亡通路和通过蛋白激酶 B (PKB) 磷酸化作用, 例如 Bad 或 caspase-9 与细胞周期素 D1 蛋白水解的抑制和视网膜母细胞瘤蛋白超磷酸化一样调节细胞周期。Cordes 等^[17]利用 A172 胶质瘤细胞和其它几种人类肿瘤细胞研究证实了以上结论, 同时发现 CAM-RR 与细胞的起源、分化和基因表型均无相关。

1.3.2 乏氧所致辐射抗性的发生 受照射细胞的辐射效应随周围介质中氧浓度的升高而增加。40 多年前, 放射肿瘤学就证实了实体瘤所含乏氧细胞会产生对辐射的抵抗, 治疗过程中如不能充分再氧合, 最终将导致局部治疗的失败。自提出利用生物还原剂标记实体瘤中有活性的乏氧细胞以预测肿瘤的辐射抗性后, Chapman 等^[18]利用核药物来测量肿瘤的乏氧并预测肿瘤的辐射抗性, 并作了前期的临床应用研究。Stuben 等^[19]研究发现, 接种于贫血裸鼠体内的胶质瘤, 较接种于未贫血裸鼠体内的胶质瘤对辐射更具抗性。

2 辐射抗性逆转的研究

2.1 放射治疗中的进展

2.1.1 精确放疗加常规放疗 立体定向放射外科

(SRS)、立体定向放射治疗 (SRT) 和三维适形调强放疗 (3D-CRT, IMRT) 是近年来发展的先进放疗方法。精确放疗可提高靶区剂量, 降低肿瘤周围正常组织的损伤, 这对于保护脑组织是很有益处的。胶质母细胞瘤在 SRS 治疗后出现复发几乎已成为规律, 原因之一可能是根据影像学确定的治疗体积以外的浸润性病变的射线剂量较低。在恶性胶质瘤的综合治疗中, SRS 可作为在初始治疗中的增量照射和复发肿瘤治疗中的追加照射手段。

2.1.2 极度超分割 (Extreme hyperfractionation) 放疗 在有临床意义的剂量范围内, 细胞对低剂量辐照的反应可用数学公式模拟。Dedekamp 等^[20]用计算机模拟研究了富氧和乏氧条件下细胞对低剂量辐照的反应, 以期找到一个分割剂量。此时乏氧的辐射抗性可以减到最小。他们运用的是可诱导修复 (Inducible repair) 变化的线性平方公式, 在得到一系列参数值的理论结果之后, 用已公布的哺乳动物可诱导修复的实验数据验证了所得到的理论结果。其研究发现, 分割治疗每次 0.5Gy 的剂量时存在一个治疗窗 (Therapeutic window), 这时乏氧细胞丧失了辐射抗性, 甚至变得比富氧细胞更为敏感。他们提出, 极度超分割增敏效应的这一特点更易产生于具有高的修复能力和 SF₂ 值高的细胞。

2.1.3 高 LET 射线放疗 在放射治疗过程中, 高 LET 射线较 X 射线在物理方面具有以下优势: 1) 减小氧增强比 (Oxygen enhancement ratio, OER), 更有利于杀灭乏氧细胞, 2) 细胞周期辐射敏感性变化小, 3) 辐射损伤的再修复能力小。高 LET 射线较低 LET 射线有较高的相对生物效应 (Relative biologic effectiveness, RBE), 更有利于杀灭肿瘤细胞。

(1) 重粒子治疗: 低 LET 射线如 X 射线杀灭肿瘤细胞的部分机理是介导凋亡, p53 基因在此过程中起重要作用, p53 基因功能的丧失将导致细胞对 X 射线的治疗产生抗性。而重粒子所导致的细胞死亡并不依赖于 p53 基因。Iwate 等^[21]利用碳粒子束照射培养的四种胶质瘤细胞株验证了以上结论。重粒子能量损失的侧缘较陡, Bragg 峰之后能量下降迅速, 使其能精确地定位放疗剂量, 并保护周围正常组织如脑干、视部下丘等, 与传统的 X 射线放疗相比, 重粒子治疗能增加 15%—30% 的肿瘤剂量。

(2) 中子治疗: 早期的快中子外照射脑肿瘤治疗, 在肿瘤控制率提高的同时, 致死性广泛脑坏死的发生率也有提高, 故其应用受到限制。间质中子治疗始于 20 世纪 80 年代, 后来的 Patchell 等^[22]进

行了手术加 ^{252}Cf 近距离治疗的一期临床试验。其研究起始剂量为900cGy,增至1300cGy后发生2例放射区外脑坏死,因而终止试验,共治疗33例,中位生存时间10.9个月(0.5—63月),与传统治疗相似,总治疗时间缩短(平均29h)是主要益处。

(3) 硼中子俘获治疗(Boron neutron capture therapy, BNCT): BNCT基于硼-10(^{10}B)核反应原理。 ^{10}B 系非放射性核素,其与低能(0.025eV)热中子反应,产生具有高线性能量的 α 粒子(^4He)和锂-7核(^7Li)。此反应产生的 α 粒子能量为2.5MeV,在人体组织中射程约10 μm ,相当于一个胶质瘤细胞的直径,因而BNCT的杀伤作用仅限于摄取 ^{10}B 的细胞及其紧邻的细胞,而正常脑组织未摄取 ^{10}B 的脑细胞则无损害,可高选择性地杀伤目的细胞。临床使用BNCT治疗胶质瘤应具备条件为:1)合成对脑胶质瘤细胞有高选择性亲和力的硼化合物,2)建立专供医学使用的核反应堆。Laramore报道^[23]14例胶质母细胞瘤在术后接受BNCT治疗,其生存时间长于对照组。

2.2 综合治疗

2.2.1 放疗与化疗的综合 放化疗合用的生物学基础是,立体的联合治疗、增敏作用、降低放疗剂量、阻止放疗中肿瘤的再增殖及抗性克隆的产生。放化疗的综合能延长患者的生存期和推迟肿瘤复发的时间,常用的化疗药物有CCNU、BCNU、Mo-CCNU、VM-26、VCR、PCZ等。

2.2.2 放疗与热疗的综合 加热能增加细胞的放射敏感性。热增敏放疗的机理尚不十分清楚,一般认为有以下几个途径:1)S期肿瘤细胞由于谷胱甘肽的合成增加放射线抗性,但对热疗敏感;2)热疗能抑制肿瘤细胞损伤后DNA双链的修复;3)实体瘤中心部分的乏氧癌细胞对放射线不敏感,但对热疗敏感;4)热疗后能增加瘤体内氧分压,从而提高肿瘤细胞对放射线的敏感性;5)反过来,放疗又减少了肿瘤细胞的热耐受,提高了热疗效果。由此可见,热疗联合放疗可选择较低的剂量而达到与单纯放疗相同的疗效,由此降低射线对正常组织的影响,提高患者的生存质量,这对脑胶质瘤患者尤为重要,因为正常脑组织对射线的耐受剂量与胶质瘤细胞的灭活剂量接近。如采用与单纯放疗相同的剂量结合热疗,则能更好地杀灭肿瘤细胞,减少肿瘤复发的可能性^[24]。

3 结论

胶质瘤是最常见的脑肿瘤,目前对胶质瘤的治疗,手术、放疗、化疗、免疫治疗等效果并不理想。尽管对胶质瘤的辐射抗性有了初步的了解,现已证实肿瘤细胞对辐射产生的抗性是由多种因素所造成的,包括基因的改变、细胞产物酶的改变以及细胞外环境的影响等,针对其抗性产生的机制,有了一些相应的逆转措施。但是,许多逆转措施还尚停留于实验研究水平,真正应用于临床仍需要一段时间,需要进行更为深入、更为完善的研究;并且对胶质瘤辐射抗性的机制尚未能完全阐明,以及各种机制之间的联系还有待进一步研究。

参考文献

- 1 Silke T, Ann D, Diana C, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, **50**(2): 511-523
- 2 Dahm-Daphi J, *Strahlenther Onkol*, 2000, **176**(6): 278-856
- 3 Smith M L, Chen I T, Zhan Q, *et al. Science*, 1994, **266**(5189): 1376-1380
- 4 施勤, 张学光, 许志祥, 等. *中华放射医学与防护杂志*, 2001, **21**(6): 428-430
SHI Qing, ZHANG Xueguang, XU Zhixiang, *et al. Chin J Radiol Med Prot*, 2001, **21**(6): 428-430
- 5 Bissonnette R D, Echeverri F, Green D R, *et al. Nature*, 1992, **359**(8): 552-554
- 6 Sandmain A M, Loimas S, Poptani M, *et al. Acta Neurochir(wien)*, 1999, **141**(8): 867-872
- 7 Bell H S, Wharton S B, Learer H A, *et al. J Neurosurg*, 1999, **91**(6): 989-996
- 8 俞英欣, 万琪. *国外医学分子生物学分册*, 2003, **25**(2): 97-99
YU Yingxing, WAN Qi. *Mole Biol Foreign Med Sci*, 2003, **25**(2): 97-99
- 9 Sturzbecher H W, Donzelmann B, Henning W, *et al. Eur Mol Biol Organ J*, 1996, **15**(8): 1992-2002
- 10 Ohnishi T, Taki T, Hiraga S, *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **245**(2): 319-324
- 11 Zhu A, Shaeffer J, Leslie S, *et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1996, **34**(4): 809-815
- 12 Stea B, Falsey R, Kislin K, *et al. Cancer Letters*, 2003, **202**(7): 43-51
- 13 Poppenborg H, Knupfer M M, Preiss R, *et al. Eur J Cancer*, 1999, **35**(7): 1150-1154
- 14 Zhong W, Yan T, Lim R, *et al. Free Radic Biol Med*, 1999, **27**(11/12): 1334-1345

- 15 罗瑛, 孙志贤, 夏寿萱, 中华放射医学与防护杂志, 1996, **16**(4): 232-234
LUO Ying, SUN Zhixian, XIA Shouxuan, Chin J Radiol Med Prot, 1996, **16**(4): 232-234
- 16 Gross M W, Altscher R, Brandter M, *et al.* Strahlenther Onkol, 2001, **177**(12): 656-661
- 17 Cordes N, Meineke V, Strahlenther Onkol. 2003, **179**(5): 337-344
- 18 Chapman J D, Engelhardt E L, Stobbe C C, *et al.* Radiother Oncol, 1998, **46**(9): 229-237
- 19 Stuben G, Thews O, Pottgen C, *et al.* Strahlenther Onkol, 2003, **179**(9): 620-625
- 20 Dedekamp J, Dasu A, Waites A, *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998, **42**(4): 705-709
- 21 Iwadata Y, Mizoe J, Osaka Y, *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, **50**(3): 803-808
- 22 Patchell R A, Yaes R J, Be L, *et al.* Br J Radiol, 1997, **70**(11): 1162-1168
- 23 Laramore G E, Semin Oncol, 1997, **24**(6): 672-685
- 24 周菊英, 涂彧, 俞志英, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2003, **21**(3): 222-224
ZHOU Juying, TU Yu, YU Zhiying, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2003, **21**(3): 222-224

Progresses in studies on radioresistance and its reversion of glioma

WEN Xiaoqian LIU Fenju

(Department of Radiobiology, School of Radiology and Public Health, Soochow University, Suzhou 215007)

ABSTRACT Glioma is the most common neoplasm in brain, which is commonly considered as the tumor tissues with high radioresistance. There have been enhanced research activities in recent years to explore molecular mechanisms of apoptosis induced by ionization radiations, and many researchers have focused their efforts on the radioresistance mechanisms of glioma cells, in an attempt to look for the resistance genes, which could be reverted, to improve radiosensitivity of tumor cells and the therapeutic efficacy. The paper gives a review on progresses of the studies on the gene and enzyme related to the radioresistance of glioma, and the external environment and other issues about reversion of the radioresistance.

KEYWORDS Glioma, Radiotherapy, Radioresistance, Reversion gene

CLC R811.5, R392.12, R332