

# 细胞周期调控与细胞抗辐射能力

代金明 林汝仙 王升启  
(北京放射医学研究所 北京 100850)

**摘要** 电离辐射作用后的细胞能够启动多种信号通路,用于维持基因组的完整性。其中细胞周期调控是决定细胞抗辐射能力的一个重要因素。由电离辐射诱导的DNA损伤能最终使细胞周期产生暂时的阻滞,以利于一部分DNA损伤得到修复;或者产生不可逆的细胞周期阻滞,使细胞走向凋亡或坏死。因此,恰当的细胞周期阻滞会给DNA损伤修复提供一定的时间,从而有利于细胞生存。对该领域的深入研究,将会为研制辐射增敏剂和辐射防护剂提供一种新的思路。

**关键词** 电离辐射,细胞周期,抗辐射能力,检查点

**中图分类号** Q253, R811.5

放射治疗是癌症治疗的强有力方法之一,它应用于多种恶性肿瘤的治疗,约有70%左右的恶性肿瘤需要放疗。放疗在肿瘤治疗过程中起着不容忽视的作用,它的疗效已被临床实践所证实。射线之所以能广泛用于肿瘤治疗,是因为电离辐射能有效杀伤肿瘤细胞。然而研究表明,不同肿瘤细胞对射线的抵抗能力并不相同,黑素瘤和胶质纤维瘤对射线的抵抗能力差,而淋巴瘤即使在低剂量时就呈现高的敏感性。肿瘤的抗辐射能力是多种因素共同作用的结果,但不可否认的是,不同组织特定基因表达的差异(p53、p21和ATM等突变的情况),也势必会影响细胞的抗辐射能力<sup>[1,2]</sup>。另外,放疗不仅能杀伤肿瘤细胞,同时亦能杀死正常组织细胞。因此辐射增敏和防护成为辐射研究领域的焦点之一。

随着研究的不断深入,人们认识到电离辐射可以激活多个信号传导通路和基因的表达,其中许多基因和信号通路参与了细胞DNA的损伤、细胞周期改变和细胞凋亡。一般而言,辐射所诱导的基因反应,按其出现的时间早晚,可分为早期反应基因和晚期反应基因。早期反应基因在照后数小时内被诱导,这些基因原由生长因子刺激而表达,它们编码转录因子,如Jun、Fos、EGR1和NF- $\kappa$ B,结合于DNA的特殊部位,促进或抑制基因转录,导致特异的生物学效应。晚期反应基因则在照后稍长时间被诱导,它们编码细胞因子和生长因子,这些生物活性肽类通过自分泌或旁分泌途径,刺激或诱发

放射病变的修复或增强X线对细胞的杀伤,或在引起纤维化和血管破坏中起作用。另有一些晚期反应基因,如IL-1、TNF- $\alpha$ 、bFGF、蛋白激酶C(Protein Kinase C, PKC)等,能参与放射保护效应,引起放射抵抗或耐受性(Radiation resistance, RR)。目前研究表明,细胞周期调控是影响RR的一个重要细胞反应,它可发生在G<sub>1</sub>/S期和G<sub>2</sub>/M期控制点处,使细胞有额外时间激活为修复DNA损伤所需要的蛋白质。在M期假如有未修复的DNA损伤,几乎不可避免是致死性的;而在S期前未修复的DNA破坏可导致非常高频率的突变,最终可导致癌变。因此在DNA损伤被修复之前恰当的细胞周期阻滞对细胞生存是有利的生存机制,也就是说,细胞周期的调控与细胞抗辐射能力存在密切关系。本工作就细胞周期与细胞抗辐射能力的相关进展作一综述。

## 1 辐射诱导的细胞死亡与细胞周期的关系

电离辐射能通过直接或间接的方式诱导被照射细胞内的DNA断裂。随着照射剂量的增加,细胞周期阻滞、异常的有丝分裂以及细胞死亡将会出现。Radford和Murphy<sup>[3,4]</sup>发现,电离辐射照射后,小鼠淋巴细胞和骨髓细胞DNA双链断裂,直接导致细胞快速死亡,同时也能诱导延迟的间期死亡和有丝分裂死亡。他们将细胞死亡的形式分为:(1)快速的间期死亡——即细胞照射后就快速死亡;(2)延

军事医学科学院基金(sg010)资助

第一作者:代金明,男,1976年3月出生,2003年在山东农业大学获理学硕士学位,现在军事医学科学院攻读博士学位,药物分析专业

通讯联系人:王升启

收稿日期:初稿 2005-04-26,修回 2005-06-16

迟的间期死亡——细胞死亡发生在  $G_2$  期阻滞后；3) 有丝分裂死亡——细胞在死亡前已进行了一到两次有丝分裂。最近, Endlich 等<sup>[5]</sup>进一步分析了各种不同的死亡形式, 发现细胞死亡的形式与其所受的照射剂量有很大关系。随着剂量的增加, 快速间期死亡的细胞逐渐增多(照射后 5—6h), 延迟间期死亡和有丝分裂死亡的细胞减少。

毫无疑问, 细胞的辐射损伤主要体现在 DNA 损伤上, 包括碱基和戊糖的损伤、DNA 单链和双链断裂、DNA-蛋白质和 DNA-DNA 交联破坏。其中, DNA 双链断裂是细胞致死的主要原因。为维持基因组的完整性, 在长期的进化过程中, 生物体针对辐射所导致的 DNA 断裂发展了相应机制。若 DNA 损伤程度之大使 DNA 修复系统无法将其快速修复时, 某些因子就被激活而导致细胞周期阻滞, 以赢得时间来修复断裂的 DNA。若 DNA 断裂的程度较小, DNA 修复系统能将其快速修复, 则一般无需细胞周期阻滞。一般而言, 当无法修复的 DNA 损伤累积到一定程度, 凋亡相关基因将被激活, 并诱导凋亡。

## 2 细胞周期检查点与电离辐射

ATM 是蛋白激酶家族中的一类, 包括 ATR 和 FRAP 激酶。电离辐射能迅速激活细胞内的 ATM, ATM 则作为传递信号的早期因子激活其下游基因。关于 DNA 损伤激活 ATM 的机制, 尚知之甚少。最初, 人们认为 DNA 双链断裂能直接或间接地激活 ATM。但近来 Bakkenist 等<sup>[6]</sup>认为, ATM 的激活可能由分子自身磷酸化而致的染色质结构变化和 ATM 二聚体解聚引起。一旦 ATM 解聚, ATM 便可磷酸化众多的下游基因, 如 p53、MDM2、Chk2、NBS1、RAD9 和 BRCA1。

人们早就确定, 肿瘤抑制基因 p53 在维持基因组完整性中起着重要作用, 并发现, 当细胞遭受电离辐射和 UV 时, 其能在细胞中聚集。而 p53 基因突变的细胞受电离辐射照射则无  $G_1$  期阻滞, 表明 p53 基因在  $G_1$ /S 期转换中担负着重要作用<sup>[7]</sup>。细胞受电离辐射照射后, ATM 能磷酸化 P53 蛋白的丝氨酸 15/20, 磷酸化后的 P53 蛋白抑制了其 MDM2 的结合, 从而稳定了 P53 蛋白, 并延长其半衰期。另外, 激活的 ATM 也能磷酸化 MDM2, MDM2 的磷酸化则抑制了其 P53 蛋白的结合, 同样也可以稳定 P53 蛋白<sup>[8]</sup>。文献<sup>[9]</sup>报道, 稳定的 P53, 作为重要的细胞周期检查点 (Checkpoint) 效应因子, 能促进 P21/CIP1/WAF1 的表达, 而 P21/CIP1/WAF1 则能通过抑制 CDK2 的活性阻止细胞进入 S 期。为

分析辐射敏感细胞系 NCI-H446 和辐射抗性细胞系 A549 对电离辐射的敏感性差异, 我们实验室制备了辐射相关基因芯片, 以分析两种细胞系照射后基因表达差异。结果发现, 电离辐射照射后 6h, A549 细胞和 NCI-H446 细胞中 p53 mRNA 水平分别上升了 1.54 倍和 1.24 倍, 这说明, 电离辐射不仅能稳定 P53 蛋白还能够提高 p53 基因的转录。为了验证野生型 p53 基因上调对于细胞存活所担负的功能, 我们设计了针对 p53 mRNA 的反义寡核苷酸。研究发现转染靶向 p53 的反义能够有效的抑制 p53 基因的表达, 并发现转染后的细胞  $G_1$  期阻滞程度明显降低, 而 S 期细胞增加。这进一步说明, p53 基因在维持  $G_1$  期细胞周期检查点中担负着重要功能。同时我们还发现抑制 p53 基因表达后的 MCF-7 细胞辐射抗性下降了, 表明电离辐射照射后细胞内野生型 p53 基因表达的迅速增加, 可能对细胞起到一定的保护作用, 而其保护作用可能是通过诱导细胞发生  $G_1$  期阻滞有关<sup>[10]</sup>。

基因组的复制是在 S 期进行的, 因此 S 期的细胞周期检查相当重要。由于外来因素而产生的停止的复制叉 (Replication fork), 错渗入的碱基以及 DNA 损伤, 都能阻碍 DNA 的复制进程。而 S 期的修复或许是细胞防止由 DNA 损伤所导致突变的最后一道防线。一般而言, 进入 S 期的 DNA 如果还不能得到有效的修复, 那么细胞就很有可能发生突变, 导致基因组的不稳定性产生。迄今为止的报道中, 如 ATM—CHK2-CDC25A, ATM-NBS1 和 ATM-NBS1/SMC1 等信号通路, 都在 S 期检查中担负着重要作用<sup>[11]</sup>。

有丝分裂的结果是将复制的染色体同等地分向两个细胞, 而  $G_2$ /M 期的周期检, 则负责给即将进入有丝分裂的细胞进行 DNA 修复留出一定的时间, 以尽可能地减少子代内由于 DNA 复制过程中所出现的碱基错配、突变以及缺失等错误。另外, 子代细胞中轻微的 DNA 损伤也可在此后的  $G_1$  期和 S 期得到一定的修复, 以此防止突变的发生。这至少可部分说明, 为何  $G_2$  期产生的有些 DNA 损伤可躲避  $G_2$  期检查而导致  $G_1$  期和 S 期的细胞阻滞<sup>[12]</sup>。众多研究认为, CDC25C 是调控  $G_2$ /M 期检查的重要分子。 $G_2$  期到 M 期的转换需 CDC25C 磷酸酯酶活性的激活, CDC25C 能将 CDC2 的 Try14 和 Tyr15 脱磷酸化, 进一步脱磷酸化的 CDC2 能激活 CDC2/cyclin B 复合体, 使细胞进入 M 期。后续研究表明, CHK1, ATR 的一个下游靶分子, 能够使 CDC25C 的 Ser16 磷酸化, 从而导致 CDC25C 能够摆脱 14-3-3 $\sigma$  的抑制作用<sup>[13]</sup>。最近, 通过基因敲除

技术证明, ATR-CHK1-CDC25C 信号传递途径在  $G_2/M$  期的检查中担负着重要的作用<sup>[14]</sup>。同样, ATM 对  $G_2/M$  期细胞周期的检查也起重要作用。CHK2, ATM 的原初作用分子, 能磷酸化 CDC25C。ATM-CHK2-CDC25C 同样对  $G_2/M$  期细胞周期调控起重要作用。针对 Chk2, 我们设计了反义寡核苷酸, 用来抑制 Chk2 的表达, 以验证 Chk2 对细胞辐射抗性的影响。结果发现转染了靶向 Chk2 反义寡核苷酸后的细胞, Chk2 mRNA 水平明显下调, 与此同时也伴随着 MCF-7 细胞辐射抗性的下降。通过流式细胞仪技术进一步发现转染 Chk2 反义的细胞  $G_2$  期细胞阻滞被打断, 并且我们也由此推断 CHK2 信号通路的激活对细胞能起到一定的防护作用。

### 3 处于不同细胞周期的细胞对辐射抗性的差异

如上所述, 细胞周期阻滞能够通过延长 DNA 修复时间来决定细胞对辐射的敏感性。除此之外, 人们还发现处于不同细胞周期的细胞的辐射抗性也不同。最初, 人们发现同样的中国仓鼠细胞对辐射的敏感性取决于其所处的细胞周期<sup>[15]</sup>。对多数细胞而言, M 期和  $G_2$  期的细胞对辐射较敏感, 而  $G_1$  期次之, S 期的细胞对辐射最不敏感。最近, Short 等<sup>[16]</sup>发现 T98 和 U373 细胞在  $G_2$  期时即能对低剂量照射敏感, 相对而言, 处在  $G_1$  和 S 期的细胞则对辐射不敏感。关于处于不同细胞周期的细胞辐射抗性差异的机制, 还不甚清楚。对此开展了一些饶有兴味的研究, 并大致设想导致不同周期细胞辐射抗性差异可能与 DNA 损伤的生成量、辐射防护因子以及 DNA 修复水平在细胞的不同周期存在差异有关<sup>[17, 18]</sup>。

### 4 细胞周期与放疗增敏和辐射防护

现已确知, 电离辐射能通过引起各种细胞周期阻滞来抑制细胞的增生, 能使细胞滞留在  $G_1$ 、S, 或  $G_2$  期不能进入有丝分裂<sup>[19, 20]</sup>。正是由于这种细胞周期阻滞的自我保护机制, 使肿瘤细胞可逃避射线杀伤并导致放射性抗拒, 严重影响恶性肿瘤放疗效果。如何去除阻滞以提高肿瘤辐射敏感性, 是当前放疗研究的热点之一。国内外已有许多研究者致力于研发抗肿瘤新药, 其药物作用机制为打断肿瘤的细胞周期阻滞。目前最常用的有两大类, 即咖啡因类, 如咖啡因、己酮可可碱 (Pentoxifylline, PTX) 等; 以及 Stau-rospori 类, 如 UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) 等。咖啡因是 ATM 激酶

的抑制剂, 照射以前给予一定浓度的咖啡因可以使细胞出现 AT 样表型, 破坏  $G_2/M$  期检查点, 缩短  $G_2/M$  期阻滞时间, 使损伤的 DNA 在染色体分离前无法完全修复, 细胞带着受损的 DNA 提前进入增殖周期, 结果启动了凋亡程序, 导致肿瘤细胞的凋亡。UCN-01 是选择性蛋白激酶 C 的抑制剂, 能影响细胞周期的多个位点, 包括通过抑制 CDK 来清除  $G_1$  期阻滞; 通过抑制 CHK1 打断  $G_2$  期阻滞。使用 UCN-01 增加了放疗的杀伤效果。另外, I 期临床实验表明, UCN-01 能和血浆蛋白紧密结合, 从而导致其较长的半衰期, 故应恰当改变其用药方式。最近, 研究发现 Chk1 激酶抑制剂 CEP-3891 能有效地打断由 Chk1 诱导的  $G_2$  和 S 期的细胞阻滞, 同时发现, 约 64% 的细胞在 6 Gy 照射后 24 h 出现核断裂现象<sup>[21]</sup>。另外, 我们实验室发现针对 P53 和 Chk2 的反义寡核苷酸能明显提高 MCF-7 细胞的辐射敏感性。值得注意的是, 当在照射前同时将 P53 和 Chk2 的反义寡核苷酸转染 MCF-7 细胞, 使每种反义寡核苷酸的终浓度为  $0.4 \mu\text{mol/L}$  时, 其增敏效果比单个使用更明显。该结果给我们一定的启示, 即利用联合用药的方式同时阻断  $G_1$  期和  $G_2$  期的细胞周期检查, 可能是一个非常有效的放疗增敏策略。

如上所述, 肿瘤细胞可以通过诱导细胞周期阻滞来提高其辐射抗性, 相反若打断其细胞周期阻滞还能降低其辐射抗性。由此, 或许可通过调控正常组织细胞的细胞周期达到辐射防护的目的。正常组织细胞遭受电离辐射照射时, 可通过细胞周期调控, 减缓细胞进入 M 期的速度, 给 DNA 修复留下一定的时间进行 DNA 损伤修复。当然, 细胞周期阻滞可能仅起到给 DNA 修复提供必需的时间, 因此还需 DNA 修复系统的参与才能提高细胞的抗辐射能力。另外, 由于处于不同细胞周期的细胞其辐射抗性有显著差异 ( $G_1$  期和 S 期较强,  $G_2$  期次之), 因此在放疗前, 可将细胞周期阻断在  $G_1$  期和 S 期, 从而提高正常组织细胞抵抗电离辐射的能力。研究发现, P21 能通过下调核蛋白 ICBP90 的表达诱导  $G_1$  期的细胞周期阻滞<sup>[22]</sup>, 因此可通过反义技术抑制 ICBP90 表达的方式来调控细胞  $G_1$  期阻滞。通过诱导照射后细胞较长时间地停留在  $G_1$  期, 会给 DNA 修复赢得一定时间, 从而利于细胞继续存活。当然, 通过调控细胞周期来提高正常组织的辐射抵抗能力现仅是笔者的一個设想, 是否切实可行, 尚待进一步研究。

### 5 存在的问题

细胞周期调控是错综复杂的, 是由一个或数个

相互联结、网络化的信号通路所实现。该领域的研究虽已取得长足进展，但仍有诸多问题亟待解决。在电离辐射照射下，细胞周期调控系统与 DNA 修复系统是一种怎样的关系，细胞周期的阻滞能否直接或间接激活 DNA 修复系统？由于细胞周期可依据 DNA 损伤的程度出现短暂的阻滞，或出现永久性的（不可逆的）阻滞并导致细胞凋亡，那么是哪个关键分子或信号通路在此担负着识别 DNA 损伤程度的功能呢？对上述问题的进一步研究，将会极大地推动辐射分子生物学的发展，并为未来辐射防护和增敏剂的研究提供新思路和新策略。

## 参考文献

- 1 Bohnke A, Westphal F, Schmidt A, *et al.* *Int J Radiat Biol*, 2004, **80**(1): 53-63
- 2 Becker-Catania S G, Chen G, Hwang M J, *et al.* *Mol Genet Metab*, 2000, **70**(2): 122-133
- 3 Radford I R, Murphy T K. *Int J Radiat Biol*, 1994, **65**(2): 229-239
- 4 Radford I R, Murphy T K, Radley J M, *et al.* *Int J Radiat Biol*, 1994, **65**(2): 217-227
- 5 Endlich R, Radford I R, Forrester H B, *et al.* *Radiat Res*, 2000, **153**(1): 36-48
- 6 Bakkenist C J, Kastan M B. *Nature*, 2003, **421**(6933): 499-506
- 7 Lu X, Lane X P. *Cell*, 1993, **75**(4): 765-778
- 8 Goldberg Z, Vogt Sionov R, Berger M, *et al.* *EMBO J*, 2002, **21**(14): 3715-3727
- 9 Ko L J, Prives C. *Genes Dev*, 1996, **10**(9): 1054-1072
- 10 Guo W F, Lin R X, Huang J, *et al.* *Radiation Research*, 2005, **164**: 27-35
- 11 Qin J, Li L. *Radiation Research*, 2003, **159**: 139-148
- 12 Akkari Y M, Bateman R L, Reifsteck C A, *et al.* *Mol Cell Biol*, 2000, **20**(21): 8283-8289
- 13 O'Connell M J, Walworth N C, Carr A M. *Trends Cell Biol*, 2000, **10**(7): 296-303
- 14 Cortez D, Guntukuj S, Oin J, *et al.* *Science*, 2001, **294**(5547): 1713-1716
- 15 Sinclair W, Morton R. *Radiat Res*, 1966, **29**(3): 450-474
- 16 Short S C, Woodcock M, Marples B, *et al.* *Int J Radiat Biol*, 2003, **79**(2): 99-105
- 17 Iliakis G, Nüsse M. *Radiation Research*, 1983, **95**: 87-107
- 18 Joiner M C, Marples B, Iambin P, *et al.* *International journal of radiation oncology, Biology, Physics*, 2001, **49**: 379-389
- 19 Wilson G D. *Cancer Metastasis Rev*, 2004, **23**(3-4): 209-225
- 20 Iliakis G, Wang Y, Guan J, *et al.* *Oncogene*, 2003, **22**(37): 5834-5847
- 21 Syljuasen R G, Sorensen C S, Nylandsted J, *et al.* *Cancer Res*, 2004, **64**(24): 9035-9040
- 22 Arima Y, Hirota T, Bronner C, *et al.* *Genes to cells*, 2004, **9**(2): 131-142

## Cell cycle modulation and radiation resistance

DAI Jinming LIN Ruxian WANG Shengqi

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

**ABSTRACT** Multiple pathways are involved in maintaining genetic integrity of cell after exposure to ionizing radiations. Among them, cell cycle modulation is the most important factor of radiosensitivity. DNA-strand breaks induced by the radiations can ultimately activate either temporary checkpoint that permit time for DNA damage repair or irreversible cell cycle arrest that results in cell death. The proper cell cycle arrest can offer time for DNA repair, and the modulated mechanisms therefore may be of help for cell survival in response to ionizing radiations. Further investigations in these fields will inevitably offer a new strategy for developing radiosensitive and radioprotective drugs.

**KEYWORDS** Ionizing radiations, Cell cycle, Radiosensitivity, Radiation resistance

**CLC** Q253, R811.5