

1986;32:113
 15 Gilman EA et al. Recent estimates of the risk of childhood cancer following irradiation of the fetus. In: Baverstock KF et al, eds. Low dose Radi-

ation: Biological Bases of Assessment. London: Taylor and Francis, 1989; 334
 16 Bloom AD et al. Lancet, 1968; 2: 10
 (收稿日期: 1994-12-01)

细胞周期与辐射诱发细胞恶性转化的敏感性

北京放射医学研究所(北京, 100850) 孟祥兵综述 叶常青审校

摘要:细胞正常分裂增殖包括有丝分裂期及分裂间期。随着研究的深入,细胞周期调控的研究已与细胞转化和基因表达调控的研究密不可分。本文简要介绍了联系细胞周期调控与基因表达调控,细胞周期调控与细胞转化的几个问题,并阐述了辐射诱发细胞恶性转化的细胞周期敏感性。

关键词:细胞周期调控 细胞转化 周期敏感性 辐射

1 细胞周期及其调控

细胞正常生长分裂的细胞周期包括有丝分裂期及分裂间期,后者又分为G₁期、S期、G₂期,分化终止状态的细胞则处于G₀期。近年来大量的实验证据表明^[1],所有真核细胞周期存在一个共同的调节机制,其中心是周期素及依赖于周期素的蛋白激酶。周期素是一类在细胞周期中含量发生变化的蛋白质,它们在细胞周期的某一时相合成,在细胞周期的另一时相则降解,目前报道的周期素已有12种。依赖于周期素的蛋白激酶(cyclin dependent kinase, CDK)是在细胞周期某时相被活化,催化某些蛋白磷酸化,进而调控细胞周期。p34^{cdc2}是最早报道的该类蛋白,其与周期素B一起调节细胞有丝分裂期的启动^[2], p34^{cdc2}活性还受酪氨酸蛋白激酶如weel, mikl编码产物、酪氨酸蛋白磷酸酶如cdc25, pyp3编码产物的调控。已经克隆的CDK有近10种^[3],而这仅仅是开始,相信会有更多的周期素及CDK被发现。

细胞周期的调控主要在G₁期内的起始位点(start)、G₁/S期、G₂/M期,即细胞周期调控的三环模型,起始位点是决定细胞进入

分化状态或分裂增殖状态的控制点。在G₁起始位点前,细胞生长需要生长刺激因子的存在,而该位点后,即使没有生长刺激因子,细胞也将继续分裂^[4]。G₁/S, G₂/M均有相应的CDK及周期因素的调控,分别决定细胞是否合成DNA和进行有丝分裂。

细胞周期的研究一直是生物化学家和遗传学家的领域,随着研究的深入,细胞周期调控这一基本生命活动规律的研究已与肿瘤生物学中的热点问题如生长因子、癌基因、抑癌基因等联系起来,目前细胞周期调控的研究已与细胞转化和基因表达调控的研究密不可分。

1.1 CDK与周期素的基因表达调控作用

O'Shea报道CDK及周期素在酵母磷酸酶PHO5基因表达调节中起着重要的作用,首次表明CDK及周期素有调节细胞周期以外的作用^[5]。起初的目的是以PHO5基因为模型研究基因表达调控的普遍规律,当时已知PHO2与PHO4可活化PHO5, PHO80与PHO85则抑制PHO5的活化。后来发现,PHO80与PHO85是通过使PHO4磷酸化而抑制PHO5的表达,同时惊奇地发现PHO85与CDC28有50%的相似性,PHO80与周期素

Hcs26, OrfD 有相似性。其它实验室已证明 PHO85 也可与 Hcs26, DrfD 作用。这些发现表明了 CDK (PHO85) 与周期素 PHO80 调节酵母 PHO5 基因表达的作用, 同时也提示 CDK 可能与不同的周期素结合发挥不同的生理功能。这一发现可能预示着存在多种 CDK 与周期素的动物细胞中也存在类似的作用方式。

1.2 CDK 与周期素通过 Rb 调控基因表达

Rb 基因是最早发现抑癌基因, 其表达产物可与许多 DNA 肿瘤病毒癌蛋白如腺病毒 E1a, SV40 T 抗原结合而失活, 进而导致肿瘤^[6], 但其抑癌机理尚不清楚。

有实验表明, Rb 磷酸化随着细胞周期的进程而变化, p34^{cdc2} 催化 Rb 的磷酸化, 暗示 Rb 与细胞周期调控有关, 为了研究 Rb 的抑癌机理, 与 Rb 结合的胞内蛋白成为研究的重点。通过 Rb 亲和层析发现, 至少有 7 种胞内蛋白可与 Rb 作用, 其中包括转录因子 E2F, 这些蛋白与 Rb 的结合位点同病毒癌蛋白与 Rb 的结合位点相同。转录因子 E2F 在腺病毒 E2 启动子有两个结合位点, 几个与细胞增殖有关的基因如 c-fos, c-myc 也有 E2F 结合位点^[7]。

基于以上事实提出了 Rb 作用机理的如下解释^[8]: 处于静止期或 G₁ 期的细胞, 其 Rb 处于脱磷酸化形式并与 E2F 结合, 阻止 E2F 调控的与细胞增殖相关的基因表达; 而处于 G₁/S 期的细胞, 其 Rb 经 p34^{cdc2} 与周期素的催化而磷酸化, 使 Rb 与 E2F 的聚合体解离, 从而使细胞增殖所必需的基因表达。当 Rb 基因突变而不能与 E2F 结合, 或 Rb 与病毒癌蛋白结合而不结合 E2F 时, 则 E2F 可持续作用, 促进大量与细胞增殖相关基因的表达, 进而导致肿瘤的发生。

1.3 细胞周期调控新组分——CDK 抑制因子 (CKIs)

CKIs 是 CDK 的抑制因子, 最早了解的如依赖 cAMP 的蛋白激酶在接合型酵母中,

磷酸化的 Far1 可与 CDC28 结合并使之失活, 引起细胞 G₁ 期阻断, 此 Far1 即为 CKIs^[9]。其它候选的 CKIs 还有酵母 p40 蛋白, 体外实验中可抑制 CDC28 激酶; 人细胞 p16 蛋白可使 CDK4/cyclin 失活; p27 蛋白可使水貂肺上皮 CDK2/cyclin E 失活。

CKIs 可分为两类, 组成型和可诱导型。上述 CKIs 为组成型 CKIs, 可诱导型 CKIs 是细胞在某些因素如电离辐射及可引起染色体损伤的药物作用下诱导产生的。如酵母中 RAD9 基因, 其在 X 射线损伤染色体引起细胞周期阻断中是必需的^[10]。p53 抑癌基因产物调控的 p21 蛋白也是可诱导型 CKIs, 它不是正常细胞生长分裂所必需的, 但它的缺失或突变则可大大增加癌变的几率。目前在许多肿瘤中均发现了 p53 的特异突变。电离辐射或药物引起 DNA 损伤时, 细胞内 p53 的表达也相应增加, 细胞停止进入 S 期, 从而使细胞受损的 DNA 在进行复制前有足够的时间进行修复^[11], 此现象称为 G₁ 期检查点 (G₁ check-point) 阻断。1992~1993 年报道了 p53 引起 G₁ 期阻断的机理^[12-14], p53 作为转录因子调控 WAF1/Cip1 的基因表达, 该基因的表达产物 p21 蛋白可与 CDK/cyclin 结合并使之失活, 从而使细胞阻断在 G₁ 期。p53 蛋白介导的生长抑制包括暂时的和永久的两类: 其一即上述的 G₁ 期暂时阻断, 当 p53 除去时阻断可逆转; 另一种是 p53 参与的永久阻断, 即细胞程序死亡 (apoptosis), 它使因辐射或化疗药物引起 DNA 损伤的细胞死亡^[15,16]。目前, 对细胞受损后有些细胞只出现 G₁ 期暂时阻断, 而有些细胞则发生细胞程序死亡的原因还不清楚。

总之, 细胞周期调控已不再是细胞生物学家和生物化学家所从事的与实际相差极远的基本理论研究, 它已与急待解决的肿瘤生物学的研究密不可分, 涉及细胞周期调控的主要角色 CDK 与周期素还有其它功能, CDK 及周期素还受其它蛋白如酪氨酸蛋白激酶、

酪氨酸蛋白磷酸酶、CKIs 的调控。细胞周期调控某一环节的故障均可能导致细胞更接近于细胞转化的终点。

2 辐射诱发细胞恶性转化的细胞周期敏感性

2.1 实验现象

1982年, Hill 等人研究裂变中子诱发 C3H10T1/2细胞转化, 发现随着剂量率的减小细胞转化率不但没有减小, 反而增加了, 这与⁶⁰Co γ 射线照射诱发细胞转化结果相反^[17], 这一发现预示经常受到低剂量照射的人发生肿瘤的危险性较高。随后, 他们比较了在高剂量率和低剂量率裂变中子、低剂量(< 0. 1Gy)范围作用下诱发细胞转化的情况, 发现低剂量率下转化率是高剂量率下的9倍^[18], 这一现象引起了广泛关注。后来在同样 JANUS 反应堆产生的低剂量率裂变中子作用下, 观察到 SHE 细胞^[19]及人杂交瘤(HeLa \times 皮肤成纤维细胞)^[20]转化率增加的现象。但 Balcer-Kubiczek 等^[21]用 TRIGA 反应堆产生的裂变中子诱发 C3H10T1/2转化, Hieber 等^[22]用²⁴¹Am α 粒子诱发 C3H10T1/2转化却没有发现剂量率影响的恶性转化的增加。而 Redpath 等^[23]报道了用 TRIGA 产生的裂变中子照射人杂交瘤时, 发现剂量率影响细胞转化率的增加。

2.2 生物物理模型

为了解释上述现象, 人们提出了多种生物物理模型, 其中 Rossi和Kellerer模型的要点是: 在细胞周期的某一时相, 细胞转化敏感性很高, 但较小剂量照射后, 转化就饱和了, 只有延长照射时间, 待新的细胞进入转化敏感窗, 才能增加细胞转化率。该模型的主要缺点是: (1)其引出狭窄的敏感窗仅有10分钟; (2)不能解释裂变中子多次短时照射后的结果; (3)没有确定转化敏感窗。1990年, Brenner 和 Hall 提出如将细胞转化敏感时相延长为50~100分钟, 则 Rossi和Kellerer模型可解释以前的许多结果, 并推测转化敏感窗为有

丝分裂期。1991年, Elkind 提出的模型进一步明确了细胞周期转化敏感窗的概念, 其模型的主要特点是: (1)C3H10T1/2细胞周期有一很窄的时相, 包括晚 G₂期、M 期、早 G₁期, 对辐射诱发转化有极高敏感性; (2)在转化敏感窗, 细胞的杀死敏感性也很高; (3)随着照射剂量的增加, 在细胞周期较早时相的细胞会延迟进入转化敏感窗; (4)随着照射剂量的增加, 由于死亡的增加, 位于敏感窗内细胞的转化敏感性并不表现出来。延长低剂量的照射, 由于死亡的细胞少, 细胞周期未阻断, 不断有细胞进入转化敏感窗, 转化率就相应增高^[24]。

用 Elkind 模型可以较好地解释上述实验现象。低剂量照射下, 处于敏感窗的细胞转化率高, 同时由于照射剂量低, 细胞杀死敏感性虽高, 但细胞死亡并不多, 再者由于细胞周期没有阻断, 不断有细胞进入转化敏感窗, 故出现剂量率影响的转化率增高的现象。Hieber 等用²⁴¹Am α 射线诱发细胞转化, 由于 α 粒子射程短, 而处于敏感窗的细胞为贴壁较弱的圆形, 与处于间期较伸展的细胞相比受到的照射较弱, 故没有出现低剂量率下转化率增高的现象。Balcer-Kubiczek 以 TRIGA 反应堆产生的裂变中子诱发细胞转化, 由于实验室与照射源相距很远, 途中细胞由于颠簸而影响细胞周期的进行, 且由于实验操作中如照后换液时处于 M 期的受照细胞丢失, 未观察到低剂量率照射下转化率增高的现象。

2.3 实验证据

Redpath 和 Sun^[23] 以¹³⁷Cs γ 射线作用于人杂交瘤(HeLa \times 人成纤维细胞), 发现在 1Gy 下 G₂期和 M 期细胞转化率比 G₁期及非同步细胞转化率高10~20倍。

Cao 等人^[25]用¹³⁷Cs 的 γ 射线诱发 C3H10T1/2细胞转化, 在低剂量率(2. 07Gy/min)3. 5Gy 剂量照射下, 同步于有丝分裂期的细胞转化率是非同步细胞的6~7倍, 对同

步于细胞周期不同时相细胞辐射诱发的转化率比较表明,有丝分裂期及有丝分裂前至少30分钟是细胞转化敏感窗。

Cao 等^[26]以 50kV 的 X 射线诱发 C3H10T1/2 细胞转化,在 2.5Gy 照射后,同步于 M 期的细胞较 G₁-S 期细胞转化率高 5~6 倍;在 7.0Gy 照射后,M 及早 G₁ 期细胞比 S 期高 3 倍,可见敏感窗细胞饱和的现象,表明了诱发敏感与抗性细胞转化的剂量依赖性。

虽然有大量实验支持 Elkind 的模型,但也有些实验结果与其有出入,如 Watanabe 等^[27]以叙利亚地鼠胚胎细胞辐射诱发转化表明,细胞转化敏感窗在 S 期,而不是 G₂/M 期。Miller^[28]以 X 射线诱发 C3H10T1/2 细胞转化,报道转化率在晚 S 期和 G₂ 期有一峰值。产生这些差异的原因可能是一些技术问题。精确测定细胞周期的辐射敏感性存在以下局限:(1)产生同步化的方法;(2)随着细胞周期的进行,细胞同步性越来越差;(3)对照组细胞成活率较低;(4)终点变化的频率估计。细胞周期同步化是利用分裂期细胞贴壁性差,机械摇动易于脱落,在 0℃ 可富集足量的同步细胞。这种方法产生的细胞同步性好,但产率低。也有在机械摇动富集分裂期细胞前加药物如胸腺嘧啶,以提高分裂期细胞产率,但所用药物必须对细胞转化率没有影响。Watanabe 实验所用 SHE 细胞是多种类型细胞的混和物,随着细胞周期的进行,细胞同步化逐渐失去,从而使所测的转化敏感窗为 S 期。Miller 所测的 S 期为 M 期细胞培养 18 小时后的细胞,此时细胞同步性较差,而且存活力实验表明 S 期细胞存活力低于 M 期,说明其所测 S 期可能是 M 期。

最近,Elkind 组研究 TPA 对同步于细胞周期各时相细胞辐射诱发的促进作用,发现其只促进非敏感窗细胞的转化而不促进敏感窗细胞的转化,产生此现象的原因尚不清楚^[29]。

2.4 机理

目前对辐射诱发细胞恶性转化的细胞周期敏感性的分子机理还不了解。处于辐射敏感窗的晚 G₂,M 期细胞对辐射诱发转化敏感的机理也不清楚,推测其与辐射诱发细胞基因表达的改变,进而影响细胞周期调控的改变有关。有证据表明,辐射后细胞蛋白组成发生明显改变,Boothman^[30]等用 X 射线照射细胞后,发现增加了 8 条多肽。随照射剂量增加,有些蛋白发生翻译后加工(PK C 催化的磷酸化),并发生从胞内向核内的转位。已知受照后早期表达的基因有 fos, jun, egr-1, 甾体类激素受体基因。晚期表达的基因有 TNF- α (肿瘤坏死因子- α), IL-1 (白细胞介素-1), PDGF- α (血小板衍化生成因子- α)。这些基因的表达产物,可能通过某些途径作用于 DNA 损伤修复,也可能引起 G₁ 期阻断(如前面所述的 p53 介导的 G₁ 期阻断),也可能通过 CDK 及周期素促进细胞分裂增殖,进而导致细胞转化。细胞周期不同时相细胞对辐射诱发恶性转化的敏感性不同,可能在于随细胞周期变化的成分不同,而周期素是随细胞周期进程而发生变化的蛋白,故其最可能是辐射直接或间接的作用靶子。

总之,细胞受照射后随受照剂量和剂量率的不同,可能出现以下几种结果:(1)细胞被杀死;(2)由于 DNA 损伤引起细胞周期在 G₁ 期阻断;(3)细胞恶性转化。低剂量率照射后细胞转化增加的现象提示长期受低剂量照射的人员有发生肿瘤的危险。

参 考 文 献

- 1 Cooper JA et al. Cell, 1989; 58: 1009-1011
- 2 Murray AW et al. Sci Am, 1991; 264: 36-63
- 3 Marx J. Science, 1991; 252: 1490
- 4 Saint R et al. Curr Opin Genet Dev, 1992; 2: 614-620
- 5 O'Shea et al. Science, 1994; 263: 1153
- 6 DeCaprio JA et al. Cell, 1988; 54: 275-283
- 7 Robbins PD et al. Nature, 1990; 346: 668-671

8 Wagner S et al. <i>Nature</i> ,1991;352:189-190	21 Balcer K et al. <i>Int J Radiat Biol</i> ,1988;54:531-536
9 Peter M et al. <i>Cell</i> ,1993;73:749-769	22 Hieber et al. <i>Int J Radiat Biol</i> ,1987;52:859-869
10 Weinert TA et al. <i>Science</i> ,1988;241:317-322	23 Redpath et al. <i>Radiat Res</i> ,1990;121:206-211
11 Kastan MB et al. <i>Cell</i> ,1992;71:587-597	24 Elkind MM et al. <i>Int J Radiat Biol</i> ,1991;59:1467-1475
12 Hartwell L et al. <i>Cell</i> ,1992;71:543-546	25 Cao J et al. <i>Int J Radiat Biol</i> ,1992;62:1991-1999
13 El-Deiry WS et al. <i>Cell</i> ,1993;75:817-825	26 Cao J et al. <i>Int J Radiat Biol</i> ,1993;64:83-92
14 Harper JW et al. <i>Cell</i> ,1993;75:805-816	27 Watanabe et al. <i>Carcinogenesis</i> ,1984;1293-1299
15 Yonish-Rouach E et al. <i>Nature</i> ,1991;352:345-347	28 Miller RC et al. <i>Radiat Res</i> ,1992;130:129-133
16 Lowe S et al. <i>Nature</i> ,1993;362:847-849	29 Wells RL et al. <i>Int J Radiat Biol</i> ,1993;64:727-730
17 Hill CK et al. <i>Nature</i> ,1982;298:67-69	30 Boothman DA et al. <i>Cancer Res</i> ,1989;49:2871-2878
18 Hill CK et al. <i>Int J Radiat Biol</i> ,1984;46:11-16	
19 Jones et al. In: <i>Low Dose Radiation</i> (K. F. Baverstook et al eds). Taylor-Francis, London, 1989: 539-546	
20 Redpath et al. <i>Radiat Res</i> ,1991;128:S71-74	

(收稿日期:1994-07-18)

辐射所致细胞周期 G₂期延迟及其分子机制

白求恩医科大学 (长春, 130021) 田生礼 冯彪综述 刘 及审校

摘要:细胞周期 G₂期延迟与调控细胞周期的特定蛋白——细胞周期素(Cyclin)有关,辐射作用后,细胞周期素的转录、表达发生改变,与细胞周期素结合的 p34^{cdc2}磷酸化和脱磷酸化状态也发生变化,从而导致细胞在 G₂期滞留。

关键词:细胞周期调控 细胞周期素 G₂期延迟

辐射对生长的真核细胞的一个普遍效应是导致分裂延迟。但是,最具有特征的仍是细胞周期的 G₂期延迟^[1-2]。对于在 G₂期的这种效应不仅存在于电离辐射,在某些化疗药物或 DNA 损伤剂处理后的细胞中也发现存在这种效应^[3]。有证据表明,辐射所致细胞 G₂期延迟取决于细胞对辐射的敏感性,如啤酒酵母 Rad9 突变细胞株对辐射比正常细胞敏感,照射后不经历 G₂期延迟^[4]。Nagasawa 等证明,来自患有共济失调性毛细血管扩张病人的一些细胞系对辐射高度敏感,照射后也不经历 G₂期延迟。Tolmach 等^[5]证明,咖啡因可以提高细胞对辐射的敏感性,经咖啡因处

理后可降低和消除辐射诱导的 G₂期延迟。相反,通过 H-ras 和 V-myc 原癌基因转录的大鼠胚胎细胞对辐射有很高的抗性,并且与对辐射敏感的双亲细胞相比有一个相当长的 G₂期延迟^[6]。这些资料表明,G₂期延迟与细胞对辐射的反应性有关,这个反应的调节取决于细胞对辐射的相对敏感性。

1 细胞周期调节的物质基础

近几年来对细胞周期的调节研究获得了突破性进展,确定了激发有丝分裂的许多生化环节。通过对酵母和各种卵母细胞的研究发现,被称之为有丝分裂周期素(mitotic cy-