

## ·综述与编译·

# 辐射与细胞凋亡及其基因调控

中国医学科学院放射医学研究所(天津,300192) 李雨民 孙元明 综述  
北京放射医学研究所(北京,100850) 夏寿萱 审校

**摘要:**细胞凋亡是一种具有特征性形态和生化改变的细胞死亡过程。这些改变是一系列基因的程序性作用而引起生化联级反应(Biochemical Cascade Reaction)的结果。本文就辐射及其它因素引起的细胞凋亡有关生物分子和基因做一讨论。

**关键词:**细胞凋亡 基因调控 辐射

### 1 细胞凋亡与程序性死亡

细胞凋亡(Apoptosis)一词源于希腊文,意为树叶或花瓣的凋落。近年来,此词与程序性细胞死亡(PCD)在文献上的使用有些混乱,而他们在实际意义上是各有区别的。程序性细胞死亡是一个功能性的概念,用以形容多细胞机体某些正常部分的细胞死亡。而细胞凋亡则具有描述性概念,首先由 Kerr<sup>[1]</sup>及其同事们用来描述具有一系列特征的形态学变化的细胞死亡过程。细胞凋亡的早期表现为缩皱成球形,失去与周围组织的连接,微管消失;染色质浓缩成新月状并凝集,进一步被分割为凋亡小体,最终被吞噬细胞吞噬。这一过程是完全不同于细胞坏死的。在很多情况下,细胞凋亡即可认为是 PCD,但是 PCD 并不是所有形式的细胞凋亡。例如具有所有形态学和生物化学特征变化的细胞凋亡可由物理刺激,如辐射,或细胞毒性药物引起,但这肯定不是程序性的,它只是表明细胞对周围环境变化的反应。因此,在使用细胞凋亡和 PCD 时应予注意,避免不应有的混淆。表 1 列出 PCD、Apoptosis 和细胞坏死的异同<sup>[2]</sup>。

### 2 辐射与细胞凋亡实验研究的概述

细胞凋亡现象一经发现即引起放射生物

学家的重视,这是因为在肿瘤治疗中辐射是一种有效治疗手段<sup>[3]</sup>,同时,因为短时间的辐射即可发生细胞凋亡的过程而有利于其机理的研究。但是这种机制无论在剂量上和细胞种类上都具有很大的差异。

Meyn 等人报告了 15 种不同的在体鼠肿瘤组织在接受 0, 2.5, 10, 25Gy 照射后 3~6 小时细胞凋亡的发生情况<sup>[4]</sup>。结果表明,三种乳腺癌、一种卵巢癌和淋巴瘤经 25Gy 照射后,10%~50%的细胞凋亡,而其他 5 种肉瘤(FSA、NFSA、SA-NH、SA-118、SA-4020)、三种鳞癌、一种肝肉瘤(HCA-I)和一种乳腺癌几乎不产生细胞凋亡。说明细胞凋亡反应无论在单一肿瘤样品内还是在不同肿瘤之间都存在异质性,其原因可能为基因调控的差异。

Arends 和 Wyllie (1990) 及 William (1991) 提出细胞凋亡的两级反应机制:准备和触发。细胞凋亡是一系列分子和生化因子调控的结果。在准备阶段,细胞首先合成一些关键的蛋白质(如钙镁依赖的核酸酶),然后细胞凋亡再被某一适当的刺激(如辐射触发),细胞凋亡即开始。淋巴细胞的辐射凋亡效应一直受到学者们的重视。细胞凋亡现象发现者之一 Wyllie 就做了很多有关研究,他曾发现糖皮质激素类处理的淋巴细胞凋亡现象<sup>[5]</sup>。人体外周单核细胞、B 细胞和 T 细胞

表1 PCD、Apoptosis 和细胞坏死的特征

特征	PCD	Apoptosis	坏死
形态	细胞皱缩、裂解	同 PCD	细胞分解
膜的完整性	保持到最后	同 PCD	早期破坏
线粒体	常见特异的自溶性起伏	未见变化	肿胀, Ca <sup>2+</sup> 进入
染色质	浓缩	在核边界浓缩	核固缩 (Pyknosis)
自吞噬现象	经常可见	无	无
潜伏期	几小时	几分钟到几小时	无
蛋白质合成	死亡可被放射菌素 D 和环己胺抑制	死亡有时可被放射菌素 D 和环己胺抑制	抗菌素无作用
来源	胚胎发育	去除生长因子及各种刺激	毒素, 缺氧, pH 剧烈变化
核的生化改变	无 DNA 梯状谱	有 DNA 梯状谱	DNA 弥散性降解
胞质生化改变	溶酶体酶升高	无溶酶体酶升高	溶酶体破裂, 无合成

经<sup>60</sup>Co 照射 5~10Gy, 24 小时后即发现有 70%~80% 细胞凋亡<sup>[6]</sup>。人急性 T 细胞白血病细胞 Molt-4 经很低剂量(4~6Gy)照射, 16 小时后即发现细胞凋亡, 细胞相对数量即使经 32 小时培养也未增加, 而对照已增加近四倍<sup>[7]</sup>。

一些辐射敏感细胞低剂量照射后或其他细胞经高剂量照射后发生死亡称为间期死亡, 因为细胞在死亡前未进入分裂期。有些学者认为, 这种细胞死亡最常见的形式就是细胞凋亡。这包括有: T 细胞白血病细胞<sup>[7]</sup>、胸腺细胞<sup>[8]</sup>、小肠细胞<sup>[9]</sup>、新生儿肾细胞、唾液腺和泪腺的浆液腺细胞以及前述的一些鼠肿瘤细胞<sup>[4]</sup>。生长的细胞在相对低剂量的照射后即可发生死亡, 是由于不正常的有丝分裂, 也称作细胞丝裂死亡。如有较高辐射抗性的 L5178y 细胞(一种鼠白血病细胞)受照 6~10Gy 后, 细胞死亡是由于有丝分裂异常, 作者认为, 其死亡形式也是细胞凋亡<sup>[10]</sup>。

Klassen 认为, Apoptosis 是一个需要基因表达、蛋白质合成和能量的主动过程, 照射剂量超过 10Gy 足以破坏基因转录或直接破坏膜的完整性, 使细胞不能维持膜内外的离子梯度, 从而 Apoptosis 的回路不能被启动。高剂量照射致死细胞发生的细胞坏死是一个被动过程, 不具备 Apoptosis 时的特征变化。

在一同系细胞群体中, 细胞死亡动力学是细胞死亡形式的函数, 触发细胞凋亡的剂量远远低于造成细胞快速死亡的坏死所需的剂量。

### 3 细胞凋亡的启动与早期信号

在发育过程中, 广泛见到的细胞凋亡, 通常是由有关的生长因子调节的, 在神经元细胞和造血细胞发育中, 如撤除了生长因子就会发生细胞凋亡<sup>[11]</sup>。在成长的细胞中, 当撤除所依赖的激素、细胞因子和生长因子时发生细胞凋亡。Tsujimoto<sup>[12]</sup>总结了一些非生理因素引起的细胞凋亡, 其中包括: 辐射、热休克、叠氮化物、氟氧脲嘧啶、过氧化物、氧自由基和乙醇等。这些非生理因素和生理因素, 均可被癌基因 Bcl-2 阻断, 所以目前可认为其机制是相同的, 即这两类因素一定是激活了同一细胞死亡通路。

非生理因素能启动细胞凋亡的解释是细胞利他性死亡<sup>[13,14]</sup>。例如一个细胞感染了病毒使其代谢有变化, 则启动细胞凋亡, 阻止病毒复制而播散到其他细胞中, 从而不再威胁宿主的生命。已经证实一些病毒如分子量为 19 000 腺病毒蛋白(E1B)和人乳头状瘤病毒蛋白(E6)中均携带抗细胞凋亡基因, 破坏或抑制 p53 抑癌基因, 控制细胞由于 DNA

损伤的死亡。EB病毒在感染细胞内诱发 bcl-2 表达并编码 bcl-2 同源物以抑制细胞凋亡。一些药物包括一些重要的抗癌药物可扰乱细胞代谢,如同细胞受到病毒的攻击使其凋亡。

如同很多其他细胞活动一样,在细胞凋亡初期  $Ca^{2+}$  起一个关键作用,研究表明,各种引起细胞凋亡的因素均可使胞内  $Ca^{2+}$  增加<sup>[15]</sup>,人为地降低胞外  $Ca^{2+}$  水平,细胞凋亡会减少或延迟;而  $Ca^{2+}$  通透剂如 A23187 则是一种强的细胞凋亡促进剂。 $Ca^{2+}$  作用至少有两个:激活切断核小体的内切酶和组织转谷氨酰胺酶。一般认为  $Zn^{2+}$  可在很多系统内阻断细胞凋亡,因为  $Zn^{2+}$  是正常内切酶的抑制剂。

尽管细胞凋亡的形态学变化已十分清楚,但没有一个可靠的生化指标定量描述细胞凋亡。以 DNA 琼脂糖电泳可显示核小体 DNA 裂解(约 180bp),只是一个定性指标——DNA 梯谱。这是因为内切酶选择性切开核小体连接处,产生大小不一的片段所致<sup>[16]</sup>。已有一些特异的内切酶从不同组织被提取,如从糖皮质激素处理的胸腺细胞核提取的 NUC-18、从 CEM-C7 细胞中提取的不依赖于  $Ca^{2+}$  的 DNase 以及前列腺细胞凋亡时的 DNase I(分子量为 32 000~37 000)、广泛存在的 DNase I 和 DNase II 等。各种不同的刺激可引起多种细胞发生凋亡,这些酶可能是多种信号联合作用后使 DNA 梯产生的最终信号。

在细胞凋亡时可从组织中提出一种称为转谷氨酰胺酶,此酶催化蛋白质中  $\epsilon$ ( $\gamma$ -谷氨酰)赖氨酸的交联,可能参与凋亡小体的生成。但并不是所有的细胞凋亡都发现此酶的活化<sup>[17]</sup>。另有报告说,在糖皮质激素引发的淋巴细胞凋亡时钙调蛋白(calmodulin)的 mRNA 早期升高,而且胸腺细胞凋亡对钙调蛋白的拮抗物敏感,有关这方面的证据在不断地增加<sup>[17]</sup>。

#### 4 细胞凋亡的基因调控

已知有一些基因参与控制细胞凋亡如 bcl-2<sup>[18]</sup>、c-myc<sup>[19]</sup>、p53<sup>[20]</sup> 和一系列从线虫体内发现的基因(ced-3、ced-4、ced-9)<sup>[21]</sup>等。

基因 c-myc 产物一般认为是一个转录因子,促进细胞增生,它具有明显的促进增殖和死亡的双向作用。前述细胞凋亡启动原因之一即当培养基中去除生长因子时,可发生细胞凋亡,其机制就是启动了 c-myc 蛋白的表达,此时细胞并不停止活动而是走向凋亡。但仍有一些例子,当 c-myc 低下时,有细胞凋亡发生<sup>[22]</sup>。

野生型 p53 的作用具有抑癌作用,它编码一个潜在的转录因子,一些细胞自杀要有它的参加,而突变型 p53 则不能使细胞凋亡。和 c-myc 一样,p53 不是细胞凋亡所必须的,但是 DNA 损伤导致的细胞凋亡,必须要有 p53 的参加<sup>[20]</sup>。p53 使损伤的细胞停留在 G<sub>1</sub> 期,以便使 DNA 损伤修复后再进入 M 期,如损伤不能修复,则启动细胞凋亡。人乳头状病毒(HPV)可通过一个病毒蛋白 E6 作用于 p53,使其失去功能。

基因 bcl-2 的过度表达抑制细胞凋亡,可在很多种细胞中发现,包括在培养物中去除生长因子的造血细胞和神经元细胞。bcl-2 并不刺激细胞增生而是促进未进入细胞周期的细胞存活。Bcl-2 的活性被一个与其同源的 21 000 的蛋白质 Bax 调节。Bax 以二聚体形式存在于细胞中,它也可与 Bcl-2 结合成异二聚体,而使 Bcl-2 失去活性,所以 Bax 和 Bcl-2 的比例改变可调节 Bcl-2 的作用<sup>[23]</sup>。

在研究一种线虫的发育生物学时,发现有 131 个细胞会发生程序性死亡,并且有 14 个在细胞死亡的各个阶段起作用的基因被克隆出来。其中有两个基因 ced-3、ced-4 在整个过程都有启动和执行的功能,它们的突变形式在线虫发育时几乎都不会使细胞发生死亡。ced-3 基因编码一种含 503 个氨基酸的

蛋白质,其含有一段约100个氨基酸的富丝氨酸区,而非富丝氨酸区则与人的IL-1 $\beta$ 转化酶(Interleukin-1 $\beta$ -Converting Enzyme, ICE)相似。这种酶的作用是将无活性的IL-1 $\beta$ 前体(分子量为31 000~33 000)切下一段后,使其成为有活性的分子量为17 500的IL-1 $\beta$ 。比较Ced-3和ICE的整个氨基酸序列,发现两者间有28%是相同的,而且在115个氨基酸区域内(Ced-3的246-360,ICE的164-278)有43%是相同的,这个区域含有酶活性部位的五个氨基酸(谷-丙-胱-精-甘)。

将ICE基因转染于鼠成纤维细胞,能引起细胞凋亡,而各种突变型ICE,即酶活性消失,则不能使然。同时ICE的作用可被Bcl-2抑制。牛痘病毒基因(CrmA)可抑制ICE的活性,因此CrmA也是细胞凋亡的抑制物<sup>[24]</sup>。

基因ced-4编码一个549个氨基酸的蛋白质,其中两个区域钙调蛋白的钙结合区相似,提示细胞凋亡和钙离子的关系<sup>[25]</sup>。

基因ced-9和bcl-2有23%的同源性,而功能上的相似性却远远超过了序列的相似性。研究证明,线虫的细胞凋亡时,突变型ced-9不能阻抑凋亡的发生,此时可用bcl-2的转染来代替ced-9的作用<sup>[26]</sup>。

至此,细胞凋亡的调控可归纳如下:

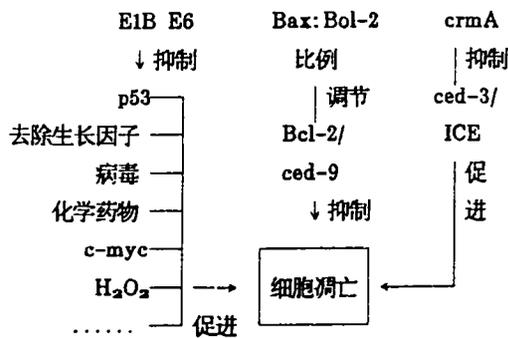


图1 细胞凋亡的基因调控

参 考 文 献

1 Kerr JFR et al. Br J Cancer, 1972;26:239-257

2 Tomei LD and Cope FO. "Apoptosis, the molecular basis of cell death", New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1991:50

3 Kerr JFR et al. In "Radiation biology in cancer research". (Men RE) New York: Ranen Press, 1980:367

4 Meyn RE et al. Int J Radiat Biol, 1993;5: 583-591

5 Wyllie AH. Nature, 1980;284:555-556

6 Delic J et al. Mol Cell Biol, 1993;13(8):4875-4883

7 Akagi Y et al. Int J Radiat Biol, 1993;64(1):47-56

8 Klassen NV et al. Int J Radiat Biol, 1993;64(5): 571-581

9 Potten CS et al. Int J Radiat Biol, 1994;65(1): 71-78

10 Tauchi H et al. Int J Radiat Biol, 1994;65(4): 449-455

11 Raff MC. Nature, 1992;356:397-400

12 Tsujimoto Y. Oncogene, 1989;4:1331-1336

13 Scheffner M et al. Cell, 1993;75:495-505

14 White E et al. Mol Cell Biol, 1992;12:2570-2580

15 Bellomo G et al. Cancer Res, 1992;52:1342-1346

16 Peitsch MC et al. Trends cell Biol, 1994;4:37-41

17 Martin SJ et al. Trends Biochem Sci, 1994;19: 26-30

18 Eisaku K et al. Jpn J Cancer Res, 1994;85:260-265

19 Evan G et al. Cell, 1992;69:119-128

20 Mothersill et al. Radiat Res, 1994;138:93-98

21 Barinaga M. Science, 1994;263:754-756

22 Alnemri ES et al. Cancer Res, 1992;52:491-495

23 Yin XM et al. Nature, 1994;369:321-323

24 Gagliardini V et al. Science, 1994;263:826-828

25 Yuan J et al. Cell, 1993;75:641-652

26 Hengartner MO et al. Nature, 1994;369:318-320

(收稿日期:1994-12-12)