

- 4 Thierry D et al. Int J Radiat Biol 1995; 67: 103  
 5 Zucali JR. Leuk Lymphoma, 1994; 13: 27  
 6 Braunschweiger PG et al. Radiat Res. 1996;

145-150

(收稿日期: 1996-06-03)

## 辐射诱导凋亡与放疗的关系

北京市肿瘤防治研究所(北京, 100034) 孙艳编译 杨天恩\* 审校

**摘要:** 从几方面综述辐射诱导凋亡: 凋亡和有丝分裂相关死亡的定量比较; 辐射诱导凋亡与放疗的关系; 分次放疗期间凋亡敏感细胞中新细胞的补充; 辐射诱导凋亡的调节; 今后需要研究的辐射诱导凋亡问题。

**关键词:** 辐射诱导凋亡 坏死 放疗

### 1 凋亡和有丝分裂相关死亡的定量比较

1996年, Chyle等在研究肌肉浸润型膀胱癌术前放疗与凋亡之间的关系时发现, 临床分期 T3b患者的 AI与放疗反应明显相关, 认为凋亡与放疗反应关系的研究是必要的。

辐射诱导凋亡分为分裂前凋亡和分裂后凋亡。受照射细胞发生凋亡的量与再增殖存活降低的一系列定量和半定量比较研究表明, 在大多数情况下, 引起再增殖完整性丧失的细胞死亡基本模式与有丝分裂相关死亡有关, 而与照射后发生的分裂前或分裂后凋亡关系甚小。

在体、离体系统的凋亡动力学表明, 离体培养的淋巴系 TK6细胞的凋亡百分数在照射后约 20小时达到一个恒定值或坪值。该坪值随剂量增加而增大, 但不随时间延长而下降, 说明在细胞培养中凋亡细胞能存留相当一段时间, 推测坪值可代表凋亡敏感细胞的分數, 并利用该值得到凋亡百分数与剂量的关系图。然而, 对于在体小鼠卵巢瘤, 照射后 4~5小时凋亡细胞百分数达到最高值, 然后

很快下降。这是因为在体时产生的凋亡细胞不断地被邻近的细胞所吞噬, 因此, 凋亡细胞在没有被清除情况下的凋亡绝对量还不十分清楚。但是, 研究者已经把这些峰值作为辐射后凋亡细胞总百分数的估算值, 并指出峰值随剂量的增加而增大。

用“comef”试验检测 TK6人 B淋巴母细胞中辐射诱导的凋亡, 照射后 24~36小时作为时间函数的凋亡百分数达到了坪值, 坪区的凋亡百分数是剂量的函数。照射 10~15Gy后观察到凋亡细胞最多为 90%, 表示群体中 90%的细胞对凋亡敏感。作为对比, 对凋亡抗拒的中国仓鼠卵巢细胞照射 15Gy后仅 3%发生凋亡。尽管该细胞归类为凋亡敏感细胞系, 但在照射后最初的 24~36小时期间内所记录的分裂前凋亡的量, 可以解释一小部分再增殖完整性的丧失。例如, 照射 1.5Gy后, 有 90%的细胞免于凋亡而存活, 仅有 10%的细胞免于再增殖死亡而存活。因此, TK6系细胞杀伤的机制很可能是有丝分裂相关死亡, 很可能是在细胞分裂后引起遗传信息丢失的染色体畸形诱导的。然而, 照射后几天发生的有丝分裂相关死亡也可能是凋亡。另外一种可能性是, 许多非再增殖细胞可

\* 天津医科大学附属医院

能不可逆地阻滞在  $G_2$  期,几天后通过凋亡和或坏死而死亡

辐射后所观察到的分裂前凋亡的量是否能解释再增殖存活的丧失?几乎所有在体、离体细胞凋亡研究的结果都是:不能。该结论对于凋亡很少的细胞肯定是正确的,对于归类为凋亡敏感的细胞通常也是正确的。另外,大部分再增殖存活的丧失发生在有丝分裂活性恢复之后,很可能是典型的有丝分裂相关死亡引起的,带有染色体畸变的细胞分裂并形成带有微核的再增殖子细胞。许多这样的细胞可以分裂数次形成发育不全的克隆,在这些克隆里出现致死性扇区分布。这种致死性扇区分布与细胞死亡和巨细胞形成有关,巨细胞常为多核,可以存留几个小时或几天。细胞死亡可以通过坏死路径或凋亡路径发生。实际上,照射凋亡敏感的小鼠白血病 L5178Y 细胞 2~10Gy 时,有丝分裂相关死亡归因于前面描述的异常细胞,这些异常细胞随后出现的死亡几乎全部是凋亡。

几种体内、体外细胞系统所得到的与再增殖存活有关的辐射诱导凋亡的研究表明,对于给出的发生辐射诱导凋亡的各种细胞类型,所观察到的凋亡细胞百分数小于由再增殖完整性丧失所杀伤细胞的 50%。实际上,如果所有的再增殖完整性丧失都是凋亡引起的,则所有的点都应在或非常接近 10%再增殖存活线上。仅有两个系统(即体外 LY-TH 小鼠 B 细胞淋巴瘤和鼠 T 细胞杂交瘤)用凋亡杀伤可以解释再增殖完整性丧失。对于其他系统,只有在凋亡的总量远远高于在体得到“峰值”或离体得到“坪值”的情况下,凋亡才可能解释再增殖存活丧失。这种可能性需要研究,因为诱导凋亡和清除凋亡的比率之间竞争的结果可以明显地降低在体的“峰值”,离体时产生一个平衡的“准坪值”,该值要低于凋亡细胞无限期存留的情况。同样,不伴凋亡发生的细胞分裂将产生低于发生凋亡或其后代发生凋亡的辐射细胞群体的“准坪

值”。

## 2 辐射诱导凋亡与放疗的关系

对于大部分在体、离体的辐射杀伤,包括那些归类为凋亡敏感的细胞,尽管凋亡杀伤并没有表现为是辐射杀伤的最主要形式,但是,体内自发地和辐射诱导的凋亡可能扮演着一个重要的角色,如涎腺的急性放射性反应细胞凋亡已很好地解释。同样,小鼠肿瘤消除 50% (TCD50)或产生某一生长抑制所需的剂量是与自发凋亡和辐射诱导凋亡的程度明确相关。如照射 25Gy, 3 小时后所观察到的百分凋亡较高的那些肿瘤 20~30Gy 后 TCD50 值减少。所有这些肿瘤在高剂量照射后对凋亡敏感的细胞少于 50%,所以不会观察到 TCD50 和生长抑制有非常大的变化。然而,Stephens 等认为他们在肿瘤中观察到的大部分凋亡都发生在非再增殖细胞中,因此,还不能真正知道发生凋亡的再增殖肿瘤细胞的百分数。但是,肿瘤反应(只对生长抑制有统计意义)与自发凋亡和或辐射诱导凋亡的量之间的明确相关可能表示不同肿瘤在生物学上的不同。几种可能性是:①自发凋亡引起肿瘤中再增殖干细胞比例大幅度降低;②凋亡细胞丢失,氧合增加。这也可能是到达肿瘤细胞营养增加使得潜在致死性损伤修复减少;或③对有丝分裂相关死亡的细胞内在辐射敏感性增加,这种增加与观察到的凋亡增加是相关的。

为了定量凋亡对再增殖存活的影响,导出一系列描述辐射诱导凋亡和有丝分裂相关死亡的细胞存活公式用于说明一定辐射剂量诱导的凋亡和有丝分裂相关死亡。公式中使用的参数和假设如下。

$F_a$ : 凋亡敏感细胞群体分数;

$1-F_a$ : 凋亡抗拒细胞群体分数;

$S_a$ : 免于凋亡的凋亡敏感细胞群体分数;

$AF$ : 发生凋亡的总细胞群体分数;

$AP$ : 发生凋亡的总细胞群体百分数;

$$AF = F_a(1 - S_a) \quad (1)$$

观察  $AF$  与剂量关系,从剂量效应的坪值得到  $F_a$ .

用下面的定义和公式计算与凋亡和有丝分裂死亡都有关系的最终再增殖存活:

$$S = F_a S_a S_m + (1 - F_a) S_m \quad (2)$$

其中,  $S_m$ : 免于有丝分裂相关死亡的总细胞群体分数。包括凋亡抗拒细胞和还没有发生或不会发生凋亡的凋亡敏感细胞。  $S$ : 再增殖的总细胞群体分数。包括免于凋亡和有丝分裂相关死亡的细胞。

公式中第一项是指凋亡敏感细胞免于凋亡和有丝分裂死亡的存活。第二项是指凋亡抗拒细胞免于有丝分裂死亡的存活。由公式 (1) 和公式 (2) 给出:

$$S = (1 - AF) S_m \quad (3)$$

由公式 2

$$S/S_m = F_a S_a + (1 - F_a) \quad (4)$$

该公式表示免于凋亡的存活加上免于有丝分裂相关死亡的存活除以免于有丝分裂相关死亡的存活的比值只依赖  $F_a$  和  $S_a$ 。如果  $S_a$  像所观察到的那样与剂量率无关,那么,  $S/S_m$  的比值也是与剂量率无关的。

因为凋亡敏感细胞存活的剂量反应曲线  $S_a$  通常是线性的,所以  $S_a$  可用:

$$S_a = e^{-\gamma D} \quad (5)$$

对于有丝分裂相关死亡,从线性二次公式得到:

$$S_m = \text{Exp}\{- (\gamma D + \gamma D^2)\} \quad (6)$$

公式中  $\alpha$  与剂量率无关,  $\beta$  则依赖于剂量率和修复。

合并公式 (4)、(5) 和 (6), 得出:

$$S = (F_a e^{-\gamma D} + (1 - F_a) \text{Exp}\{- (\gamma D + \gamma D^2)\}) \quad (7)$$

对于不同的剂量率,一般情况可用含有  $\alpha$ 、 $\beta$  剂量率、半修复时间、辐照疗程的 Dale 公式计算出  $S$  值,用  $S$  代替公式 (7) 中的  $\text{Exp}\{- (\gamma D + \gamma D^2)\}$  进行计算。

模式中只考虑被照射的细胞是否存活并

形成宏观的克隆,而不去定量延迟的细胞死亡,这种延迟死亡发生在细胞分裂形成宏观克隆过程的后期。实际上,当凋亡发生在辐射细胞分裂后最初的几个周期时,非凋亡细胞的分裂会造成  $AF$  和  $F_a$  的估计值的降低。上述的公式也是基于下面的假定:① 凋亡和有丝分裂相关死亡都是独立事件;② 对凋亡的敏感性不影响对有丝分裂相关死亡的敏感性。当被照射细胞发生分裂前或分裂后凋亡而无染色体畸变的情况下,凋亡和有丝分裂相关死亡就是独立的事件;但当细胞发生分裂后凋亡时,不能肯定细胞是否有染色体畸变,它引起的有丝分裂相关的死亡是凋亡而不是坏死,在这种情况下,随着坏死转换成凋亡有丝分裂相关死亡和凋亡将认为是相同致死事件,公式 (4) 不适用。然而,如果对凋亡的敏感性使一些有染色体畸变的在分裂后本来可以存活的细胞死于凋亡,例如含过多同源染色体的非整倍体肿瘤细胞可以发生这种死亡,则有丝分裂相关的凋亡将增加有丝分裂相关的死亡(即降低再增殖存活),在这种情况下,公式 (4) 是适用的。最后,还有一种可能性,某种特殊基因的转染可使辐射诱导凋亡增加,同时使免于有丝分裂相关死亡的存活增加。因此,净效应可能是再增殖存活增加,这就可以解释有人观察到的:将  $c\text{-myc}$  转染到大鼠胚胎细胞 (REC) 引起辐射诱导凋亡的增加和再增殖存活的增加。该例子中,公式 (4) 不适用,因为有和无凋亡时,  $S_m$  值是不同的;即增加对辐射诱导凋亡的敏感性,可能是通过有丝分裂相关死亡转换成有丝分裂相关凋亡,也可能是通过对有丝分裂相关死亡的敏感性降低。坏死转换成凋亡的现象可以解释为什么把  $c\text{-myc}$  转染到大鼠肺成纤维细胞中会引起辐射诱导凋亡的大量增加,同时再增殖存活无任何降低,然而目前已有的数据还不足以得到再增殖存活少量降低这样的结论,而这种降低可能是存在的。

为了估算辐射诱导的凋亡能多大程度地

降低再增殖存活,将上述公式用于在带有癌基因 *myc* 的变异 REC 观察辐射诱导的凋亡。*AP* 在辐射后数小时增加,36~40小时达到坪值。凋亡类型可能是分裂前或分裂后凋亡,或坏死转换成凋亡。照射 20Gy 后 36 小时 *AP* 达到坪值 70%,所以推测  $F_a$  为 0.70。 $S_a$  具有线性剂量反应,且  $D_0$  为 5.4Gy,这个数值对应于公式 (5) 中的  $\gamma = 0.19$ 。 $S_m$  是用参数  $\alpha = 0.137, \beta = 0.03$ , 通过公式 (6) 计算出来的。如果所有凋亡都被阻止并对有丝分裂相关死亡的敏感性无任何影响,那么  $S_m$  表示免于有丝分裂相关死亡的存活。 $S$  是应用公式 (3) 引入 *AF* 观测值和  $S_m$  计算值进行计算的。把  $F_a = 0.72, \alpha = 0.137, \beta = 0.03$  和  $\gamma = 0.19$  代入公式 (7), 可计算出相同的  $S$  对于单次照射,免于凋亡的存活下降的最大幅度小于 0.1 级对数,即对应  $F_a = 0.7, S_a = 0$ 。有凋亡的存活与无凋亡的存活之比通过公式 (4) 求出为 0.3。由凋亡产生的 70% 额外杀伤对于单次高剂量的 TCD50 没有很大的影响。例如,当凋亡发生时, TCD50 可能下降,结果是  $S_m$  几乎增加 0.5 级对数 (1/0.3), 以达到无凋亡时具有相同的总细胞杀伤。

放疗最感兴趣的是临床相关的约 2Gy 剂量照射后的凋亡效应。例如,肿瘤细胞照射 2Gy 后,凋亡杀伤在总细胞杀伤中具有明显的作用,即有凋亡存活是 0.53,而无凋亡的细胞存活是 0.67。另外,照射 2Gy 后存活的差异可引起多次照射后存活 100~1000 倍的差异(假定每次照射后差异相同),例如,20 次照射是  $3.1 \times 10^{-6}$  ( $0.53^{20}$ ) 对  $3.3 \times 10^{-4}$  ( $0.67^{20}$ ), 32 次照射是  $1.5 \times 10^{-9}$  对  $2.7 \times 10^{-6}$ 。这种凋亡带来的额外杀伤可以使杀伤率从无凋亡的 20% 增加到有凋亡的 50%~65%。这种估计值是基于这样的计算: 不同种类肿瘤中细胞存活下降一个对数就可以使杀伤率增加 15%。因此,重要的是每次照射后是不是有新的细胞补充到凋亡敏感组分中。如果无新补充的细胞,分次照射约 12Gy

或 62Gy 后 90% 的凋亡敏感细胞将被清除掉,20 次照射后,有或无凋亡的存活差异很小,即因子为  $0.3(1.0 \times 10^{-4}$  对  $3.3 \times 10^{-4})$ 。

### 3 分次放疗过程中凋亡敏感细胞被新细胞补充

REC-*myc* 细胞体外培养实验提示有新的细胞补充到凋亡细胞组分中。每天一次照射 REC-*myc* 细胞,每次 5Gy,共 4 天,细胞数增加了约两倍,每次照射后 24 小时期间引起的凋亡细胞百分数为:前 3 次是 17%~21%,最后一次是 30%。第 5 天结束时,凋亡为 91%,而单次照射 20Gy 后 36~40 小时观察到的凋亡仅是 70%。凋亡从 70% 增加到 91% 以及分次辐射诱导的凋亡并没有减少提示:有新的细胞补充到凋亡敏感细胞组分中。实际上,将每次照射后 24 小时 *AP* 的观测值和  $S_a = 0.7$  代入公式 (1) 计算  $F_a$ , 得到第一次照射为 0.7,第二次降为 0.56,第三、第四次分别增至 0.7 和 1。但是,认为有新的细胞补充到凋亡敏感细胞组分中的计算可能会被提出质疑,因为在两次照射的 24 小时间隔中凋亡细胞的产生没有完成。实际上,5 天后凋亡百分数的增加可能是由于有丝分裂相关的凋亡造成的,而不是新细胞补充到凋亡敏感组分中。

有人用离体鼠 LY-TH 淋巴瘤和在体卵巢 OCaI 瘤做了相似的实验,表明照射 2.5Gy 后有新的细胞补充到凋亡敏感细胞中。小鼠 OCaI 肿瘤,凋亡敏感细胞  $D_0$  为 4.5Gy,2.5Gy 时  $S_a$  为 0.57,凋亡在辐射后 4~5 小时细胞分裂之前达到最大量,随后 24 小时自发地降至 3% 的基线。用 *AP* 的观测值计算  $F_a$ ,在第二次和第三次照射后  $F_a$  立即从最大值 0.35 降到 0.11,显然是由于有新的细胞补充到凋亡敏感细胞组分中,下一个 24 小时后照射时, $F_a$  增加到 0.20~0.30。如果没有新的细胞补充,四次 2.5Gy 的照射后  $F_a$  会降到 0.02,同时从第二次到第五次

照射 AP 就不会维持在 8%~12% 水平。注意到 8%~12% 值已减去了 3% 的自发水平。有新细胞补充到凋亡敏感细胞中与有丝分裂活性的恢复有关。另外,在体鼠 LY-T 淋巴瘤的凋亡敏感细胞  $D_0$  为 1.9Gy, 2.5Gy 照射时  $S_a = 0.26$ , 照后 4 小时 AP 达到最大值, 随后 24 小时下降到自发水平 10%。注意到 2.5Gy 后 2~4 天, 第二个 2.5Gy 引起的 AP 是 31%~37% (已减去 10% 的自发水平), 表明凋亡敏感细胞群体分数还没有恢复到初始水平 0.69, 但 6~8 天后, 和初始的 6% 相比, AP 已增加到 46%~48%。2.5Gy 后  $F_a$  计算值立刻从初始的 0.69 降至 0.18, 然后第一天增加到 0.45, 第六天增加到 0.65。这种照射后  $F_a$  随时间的延长而增加说明有新的细胞补充到凋亡敏感组分中而不是后期发生的有丝分裂相关的凋亡。任何来自有丝分裂相关死亡的凋亡都不会远远高于自发水平 3%~10%, 因为一般认为辐射后 2~8 天有丝分裂相关死亡处于很低水平。这种低水平有丝分裂相关死亡导致相当低水平的凋亡, 因为体内凋亡细胞在诱导后 3 小时内出现并滞留 10 小时。

实验结果提示, 在辐射明显诱导凋亡的肿瘤中, 每天照射间隔有相当量的新细胞补充到凋亡敏感组分中。对于分次照射来讲, 这种新细胞的补充可通过更多的凋亡来增加对肿瘤细胞的杀伤。对于低剂量率照射, 多于两天比一次高剂量要好。然而, 对于在体、离体不同肿瘤系统, 每天照射后, 辐射诱导凋亡和肿瘤细胞重新补充到凋亡敏感组分中的量还需要进一步研究。

#### 4 辐射诱导凋亡的调节

通过选择性地增加凋亡可能增加某些治疗抗肿瘤的功效。另一方面, 通过选择性地抑制正常组织中凋亡可能降低肿瘤治疗带来的合并症<sup>[2]</sup>。

凋亡调节在离体方面的信息是非常有限

的, 然而对于离体时通过修改不同步骤或路径有效调节凋亡过程有充足的证据。一般这些路径分四部分: 钙离子代谢; 信号转导; 蛋白和信使 RNA 合成和多胺代谢。有人报告, 钙的螯合物抑制糖皮质激素诱导的凋亡, 通过调节细胞内钙水平来调节凋亡, 已有些影响。然而这种解释不是对靶细胞特异的, 所用试剂有全身毒性, 因为钙对于一般的代谢也是重要的。信号转导路径的解释可能更有特异性, 因为针对凋亡细胞有一些可能性, 包括已知的两个路径: 蛋白激酶 A (PKA) 和蛋白激酶 C (PKC)。有实验提示, PKA 路径利于凋亡, 刺激 PKC 为抑制凋亡的作用。所以, 蛋白激酶路径被认为是对外部调节非常敏感的, 在许多实验室成为研究的活跃部分。

淋巴细胞中辐射诱导凋亡的早期报告显示, 凋亡能被蛋白和信使 RNA 合成抑制阻断, 提示凋亡开始前需要有特异蛋白合成, 而这种概念是: 在几种其他细胞系统中检查到这些抑制剂确实对自身诱导凋亡, 所以任何作为凋亡一部分的新蛋白合成需要细胞类型特异性的。然而, 蛋白合成抑制剂能诱导凋亡的事实是与这种可能性是一致的: 这些细胞正常合成的蛋白能抑制由其他方法诱导的凋亡; 阻断该蛋白的作用可能是增加放疗诱导凋亡反应的有益方法。

已知的凋亡可以是依赖多胺的。由于多胺是自然物质, 可代表体内的调节剂。而且多胺合成的抑制剂认为能增加凋亡。这样的抑制剂可被制成抗癌药。探讨这些凋亡调节的药物将是有意义的。

#### 参考文献

- 1 Chyle V et al. Int J Radiat Biol Phys, 1996; 35 (2): 281-287
  - 2 Dewey WC et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1995; 33(4): 781-796
  - 3 Milas L et al. In Vivo, 1994; 8: 665-674
- (收稿日期: 1996-03-05)