

损伤时,关键的肿瘤发生和促进事件已经不可逆转,而当肺癌发生需要大量突变时,就有可能早期检测到仅发生部分遗传损伤的细胞,从而实现肺癌极早期的治疗和预防措施。通过对肺癌相关基因的研究,了解它们的生化特性、突变对功能的改变以及在肺癌中作用机理,一方面可以作为诊断肺癌的早期基因或生化标志,另一方面可以设计药物拮抗癌基因产物或替代失活的抑癌基因产物。基因治疗和免疫疗法已经成为新的前景广阔的治疗肺癌的辅助疗法。尽管不同的癌症有着不同的病理生理学表现和治疗方法,但却有着像 Rb、p53 等广谱抑癌基因基本相似的遗传损伤和基因突变,在一种肿瘤类型中的发现可迅速应用于其他肿瘤类型,因此本文所讨论的肺癌临床早期诊断的基因标志预防策略可能具有普遍的应用与参考价值。

参 考 文 献

- 1 Tockman MS. *Semin Respir Crit Care Med*, 1996; 17(4): 335-341
- 2 Minna JD. *Chest*, 1993; 103(4): 449S-456S

- 3 Gupta S et al. *Mol Biol Cell*, 1992; 3: 123-128
- 4 Mitsudomi T et al. *Cancer Res*, 1991; 51: 4999-5002
- 5 Little CD et al. *Nature*, 1983; 306: 194-196
- 6 Weintraub SJ. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996; 15: 150-155
- 7 Knudson AG. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991; 68: 820-828
- 8 Yoichi T. *TIBS*, 1997; 22: 14-17
- 9 Hartwell LH et al. *Science*, 1994; 266: 1821-1828
- 10 Lew DJ et al. *Trends Cell Biol*, 1992; 2: 77-81
- 11 Rusin MR et al. *Int J Cancer*, 1996; 65: 734-739
- 12 Gemma A et al. *Int J Cancer*, 1996; 68: 605-611
- 13 Quelle DE et al. *Genes Dev*, 1993; 7: 1559-1563
- 14 Hall M et al. *Mol Aspects Med*, 1996; 17(3): 220-240
- 15 Wang XW et al. *Genes Dev*, 1996; 10: 1219-1232
- 16 Kappen C. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996; 15: 156-162
- 17 Tiberio C et al. *Int J Cancer*, 1994; 58: 608-615
- 18 Willey JC et al. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996; 14: 262-271

(收稿日期: 1997-09-01)

细胞周期与凋亡

北京放射医学研究所(北京, 100850) 赵卫红综述 陈家佩审校

摘 要: 增殖细胞和凋亡细胞在形态和生化方面有某些相似, 在发生上密切相关。细胞周期 G₁ 停滞和其相关的凋亡依赖于 p53 基因的存在, 是 p53 不同功能的表现; G₂/M 阻滞的快速退出与许多细胞的凋亡有关, 用药物缩短 G₂/M 阻滞可增加凋亡比例。提示将细胞周期阻滞和凋亡结合起来, 有可能开辟肿瘤治疗的新领域。

关键词: 细胞周期 细胞凋亡

细胞对外界刺激的反应是多方面的, 涉及细胞增殖、分化和死亡及其相互间的协调, 以往的研究多是将这些方面分开研究, 近年来研究表明: 阻断细胞增殖周期进程可引起凋亡, 而凋亡也常伴随有生长阻滞, 细胞增殖周期和凋亡密切相关^[1]。本文就细胞周期, 特别是周期阻滞和凋亡的关系作一综述。

1 增殖细胞和凋亡细胞的异同

研究发现, 作为维持组织细胞平衡的两个方面——增殖和死亡, 二者在功能上是对立的, 但在形态和生化方面有一些相似的地方: 从形态上看, 凋亡细胞和正在进行有丝分裂的细胞都缺乏粘附性, 变成圆形, 体积缩

小、染色质凝聚和核纤层分解,差别是增殖细胞形成纺锤体进而分裂成两个细胞,而凋亡细胞是形成凋亡小体,被周围的吞噬细胞所吞噬;从生化方面看,细胞凋亡和有丝分裂都可以被配体与细胞表面受体的结合所触发,在其发生过程中都有细胞周期基因的表达,都依赖于周期素蛋白激酶的活化和核纤层的磷酸化,但增殖细胞的 DNA 进行复制、分离,形成子细胞的染色体,而凋亡细胞的 DNA 发生规律性降解^[1-2]。所以,有些研究者提出,细胞凋亡可能是有丝分裂中止的一种类型,细胞周期调控点(checkpoint)似乎是将细胞增殖和凋亡连在一起的枢纽,是控制细胞增殖和死亡的双向开关。

2 细胞凋亡的周期依赖性

增殖细胞对某些凋亡诱因的敏感性常依赖于细胞周期。Gorczyka等^[3]用流式细胞仪观察了多种化疗药物及理化因素对 HL-60 细胞的凋亡作用,发现喜树碱、足叶乙甙、阿糖胞苷、氨甲喋呤、丝裂霉素等主要诱导 S 期细胞凋亡,5-杂氮胞苷、氮芥及高温偏重引起 G₁ 期细胞凋亡,γ 射线主要诱导 G₂/M 期细胞凋亡,放线菌酮及顺铂的作用无明显周期特异性,表明细胞凋亡是多点启动的,可发生在细胞周期的各个时相,不同理化刺激在不同周期对细胞损害的程度不同,而细胞对损害的修复能力也随周期的不同而不同,这两种力量对比的结果决定了细胞凋亡的周期特异性。

3 细胞周期阻滞与凋亡

多数细胞受照后都会发生周期阻滞,包括 G₁ 停滞、S 蓄积和 G₂/M 阻滞。G₁ 停滞依赖于野生型 p53 基因的存在,在许多细胞中是缺乏的;S 期蓄积只见于较高剂量的照射;而 G₂/M 阻滞几乎见于所有的真核细胞,且与照射剂量的高低无关。

3.1 G₁ 停滞与凋亡

G₁ 停滞与抑癌基因 p53 的表达有关。Donehower 等^[4]用基因敲除 (gene knock out) 的小鼠模型研究发现,敲除 p53 基因的小鼠 (p53^{-/-}) 发育正常,但易患肿瘤,特别是淋巴瘤和肉瘤,由此小鼠来源的纤维母细胞经 2 或 4Gy 照射后不发生 G₁ 停滞,正常鼠 (p53^{+/+}) 来源的纤维母细胞在同样条件照射后发生明显的 G₁ 停滞,而仅有一个完整 p53 基因的小鼠 (p53^{+/-}) 反应适中,表明 G₁ 停滞不是发生在所有的细胞中,它的发生依赖于野生型 p53 基因的存在。毛细血管扩张性共济失调症 (AT) 患者的细胞照射后不出现 p53 蛋白的堆积,也无 G₁ 停滞^[5],支持上述观点。

p53 基因在 DNA 损伤剂引起的凋亡中有重要意义。Merritt 等^[6]报告,8Gy 照射能使正常小鼠的小肠隐窝细胞 p53 蛋白含量增加,凋亡比例也增加,p53^{-/-} 鼠则表现出对射线的耐受性。Wang 等^[7]也用基因敲除的方法观察到,p53 缺失鼠的造血细胞和纤维母细胞对辐射的耐受是因为其不能发生凋亡,从而表明辐射诱导的凋亡也依赖于 p53 的存在。

对 p53 依赖的 G₁ 停滞和凋亡相互关系的研究表明,细胞发生 p53 介导的 G₁ 停滞时,需要 GADD45 和 p21/WAF1/CIP1 的转录,但 p53 介导的凋亡与上述基因的转录及产物的翻译均无关,提示二者之间存在差异^[8]。Guilouf 等^[9]将 p53 基因导入缺失 p53 的小鼠白血病细胞株 M1 中,活化野生型 p53 (M1p53),细胞出现 G₁ 停滞和凋亡,如果同时导入抑制凋亡的 bcl-2 基因 (M1p53/bcl-2),则使细胞 G₁ 停滞明显增强,凋亡延迟发生,18 小时后细胞周期的分布和 M1p53 细胞一致。Lin 等^[10]将 p53 基因导入另一种小鼠白血病细胞株 DP16-1 中,筛选出的克隆 ts5.203 在 p53 活化后出现 G₁ 停滞、凋亡和分化,其中凋亡出现在细胞周期的所有时相,而不仅限于 G₁ 期。在培养体系中加入细

胞因子 (EPO, c-kit ligand, IL-3) 阻断其凋亡和分化, 不影响 G_1 停滞。另外两个克隆 ts15.15 和 tsCB3.4 在 p53 活化后只出现 G_1 停滞, 不出现凋亡, 进一步研究发现, ts15.15 分泌一种类似于 IL-3 的因子, tsCB3.4 分泌一种类似于 EPO 的因子。bc1-2 基因或细胞自分泌的生长因子都能阻断 p53 介导的凋亡, 而不影响其介导的 G_1 停滞, 提示 p53 对 G_1 停滞和细胞凋亡的调控是可以分开的, G_1 停滞和细胞凋亡分属于 p53 的不同功能。

3.2 G_2/M 阻滞与凋亡

辐射对生长的真核细胞最具特征的效应是引起细胞周期的 G_2/M 阻滞, 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。 G_2/M 阻滞的机制不完全清楚。在啤酒酵母中, rad9 基因突变的细胞株照射后不发生 G_2/M 阻滞, 其对辐射敏感性较正常细胞低^[11]。在哺乳动物中, 对细胞周期蛋白 B (cyclin B) 和 p34^{cdc2} 研究较多。Muschel 等^[12]报道, 处于正常增殖周期的 HeLa 细胞进入 G_2/M 期, Cyclin B mRNA 和蛋白水平都急剧升高, 有丝分裂结束时迅速降低。用 X 射线照射同步于 S 期的 HeLa 细胞, 细胞进入 G_2/M 期时, Cyclin B mRNA 和蛋白的表达并未升高, 其表达水平与照射剂量成反比。Maity 等^[13]研究证明, 照射抑制 HeLa 细胞 G_2/M 期 Cyclin B 表达的原因是降低了 Cyclin B mRNA 的稳定性; Cyclin B mRNA 的半寿期在照射组是 2~3 小时, 对照组为 13 小时。另外, 他们还发现, VP-16、CAM、Nitrogen mustard 也是通过延迟 Cyclin B mRNA 和蛋白的表达而引起 G_2/M 阻滞。最近, Kao 等^[14]将人 Cyclin B₁ 基因转染 HeLa 细胞, 照射后诱导 Cyclin B₁ 表达能缩短 G_2/M 阻滞; 用反义寡核苷酸降低 Cyclin B₁ 的表达, 则延长细胞进入有丝分裂时间; 用反义寡核苷酸处理未照射的细胞, 也出现 G_2/M 阻滞。由此看来, Cyclin B₁ 表达的降低可能是 G_2/M 阻滞的重要机制之一。但是, 诱

导 Cyclin B₁ 的表达并不能完全消除射线所致的 G_2/M 阻滞, 提示还有其他因素参与, 如 p34^{cdc2} 的过度磷酸化^[15]。

G_2/M 阻滞和凋亡的关系非常密切。Palayoor 等^[16]观察了 8Gy γ 射线对小鼠淋巴瘤的作用, 发现照射后 24 小时 G_2/M 阻滞达高峰, 而凋亡在照射后 24~48 小时才开始增多, 提示两个过程在时间上的连续性。Guillouf 等^[17]对缺失 p53 基因的小鼠白血病细胞株 M1 的研究中也发现, γ 射线照射后发生的细胞凋亡与从 G_2/M 阻滞的快速退出有关。Palayoor 等^[16]在照射前加入能缩短 G_2/M 阻滞时间的 caffeine、theobromine 或 2-aminopurine, G_2/M 期比率下降, 凋亡比率明显增加; 如果加入延长 G_2/M 阻滞时间的 TPA、DBcAMP、IBMX、3-aminobenzamide, 结果则相反, G_2/M 期比率增加, 凋亡比率下降。由此证明, 细胞受射线作用后, 首先发生 G_2/M 阻滞, 在从阻滞退出的过程中发生凋亡, 凋亡似乎是 G_2/M 阻滞进一步发展的结果。

但是, G_2/M 阻滞和凋亡的关系在不同细胞并不完全一样, 这与细胞对辐射的敏感性有关。Han 等^[18]观察了辐射敏感的 HL-60 细胞和辐射耐受的 HL-60 细胞突变株 HCW-2, 两者受 X 射线照射后均发生 G_2/M 期阻滞, HL-60 细胞在从 G_2/M 期阻滞退出后发生凋亡, 而 HCW-2 细胞未发生凋亡, 又重新回到细胞周期, 但较 HL-60 细胞有更多的染色体畸变; 进一步检测, HCW-2 细胞较 HL-60 细胞表达高水平的 bcl-x1, 而已知 bcl-x1 有抑制凋亡的作用。在非辐射诱导的细胞凋亡研究中有类似的发现, 在慢性粒细胞型白血病中, BCR-ABL 融合基因的表达可抑制化疗药物诱导的细胞凋亡, 其机制与 p53 依赖的 WAF1/CIP1 介导的 G_1 停滞或 DNA 修复无关, 而与延长细胞停滞在 G_2/M 期的时间相关。延长 G_2/M 阻滞时间使细胞有充足的时间在复制的染色体分离前完成

DNA修复,避免了有丝分裂的失败^[19]。

虽然我们对细胞周期和凋亡的关系还不十分清楚,但目前的研究已表明,二者的关系非常密切,特别是凋亡与 G₂/M 阻滞的关系。一方面,用药物延长 G₂/M 的阻滞时间可降低凋亡,使带有 DNA 损伤的细胞进入下一个增殖周期,增加细胞突变的机会,对研究辐射致癌及突变机理的认识有重要意义;另一方面,用药物缩短辐射和 或化疗药物所致的 G₂/M 阻滞,就能增加凋亡,提高临床对肿瘤的放、化疗效果,进而将细胞周期阻滞和凋亡结合起来,有可能开辟肿瘤治疗的新领域。

参 考 文 献

- 1 Rubin LL et al. *Curr Biol*, 1993; 3: 391-394
- 2 King KL et al. *J Cell Biochem*, 1995; 58: 175-180
- 3 Gorkczyka W et al. *Cancer Res*, 1993; 53: 3186-3192
- 4 Donehower LA et al. *Nature*, 1992; 356: 215-221

- 5 Kastan MB et al. *Cell*, 1992; 71: 587-597
- 6 Merritt AJ et al. *Cancer Res*, 1994; 54: 614-617
- 7 Wang L et al. *Radiat Res*, 1996; 146: 259-266
- 8 Kastan MB et al. *Cancer Metastasis Rev*, 1995; 14: 3-11
- 9 Cuillouf C et al. *Blood*, 1995; 85: 2691-2698
- 10 Lin YP et al. *Mol Cell Biol*, 1995; 15: 6045-6054
- 11 Weinert TA et al. *Mol Cell Biol*, 1990; 10: 6554-6564
- 12 Muschel RJ et al. *Cancer Res*, 1993; 53: 1128-1135
- 13 Maity A et al. *Oncogene*, 1996; 13: 1647-1657
- 14 Kao GD et al. *Cancer Res*, 1997; 57: 753-758
- 15 Cohen-Jonathan E et al. *Cancer Res*, 1997; 57: 1364-1370
- 16 Palayoor ST et al. *Radiat Res*, 1995; 144: 235-243B
- 17 Guillouf C et al. *Oncogene*, 1995; 10: 2263-2270
- 18 Han ZY et al. *Mol Cell Biol*, 1995; 15: 5849-5857
- 19 Bedi BA et al. *Blood*, 1995; 86: 1148-1158

(收稿日期: 1998-01-12)

金属硫蛋白的抗电离辐射作用

白求恩医科大学放射生物教研室(长春, 130021) 范才综述 鞠桂芝审核

摘 要:金属硫蛋白(MT)是一类广泛存在于生物界、低分子量、富含半胱氨酸的金属结合蛋白,具有重金属解毒、调节机体应激反应及必需微量元素代谢等功能。本文简要综述 MT 的生物化学和功能特性, MT 清除自由基、抗辐射作用以及辐射诱导 MT 合成的生物学特性的研究进展。

关键词:金属硫蛋白 辐射 自由基

金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是一类细胞内的金属结合蛋白。1957年 Margoshes 和 Vallee 首次从马肾中分离出该蛋白,现发现该蛋白广泛存在于动植物及微生物的组织中。MT 的显著结构特点是分子量低、富含半胱氨酸并对多种金属离子具有很强的亲和力。这一结构特点与其生物学属性有着非常密切的关系。许多物质可诱导机体合成 MT 并能保护细胞免受重金属及自由

基的损伤^[1]。此外, MT 还具有调节机体免疫功能、生长发育以及微量元素如 Zn、Cu 等代谢的重要作用^[2-4]。由于 MT 的独特结构及功能的多样性,其引起了国内外学者的普遍重视,已成为当今生物化学、分子生物学研究的热门课题之一。

1 MT 的生物化学及功能特性

依据 MT 的共同结构特征,将不同来源