

p53基因状态与电离辐射效应

苏州医学院免疫研究室(苏州, 215007) 施勤综述 张学光 强亦忠审核

摘要: 抑癌基因 p53在细胞周期调控、DNA 修复和复制、细胞分化、基因组的稳定以及细胞凋亡过程中起着重要作用。本文就 p53诱导细胞周期 G₁期阻滞和细胞凋亡两大生物功能与电离辐射效应作一概述。

关键词: p53基因状态 电离辐射效应 G₁期阻滞 细胞凋亡

人的 p53基因定位于 17p13.1, 长 16~20kb, 分子量为 50 000u(D), 是由编码 393个氨基酸组成的核磷酸蛋白(P53蛋白)。它参与细胞生长、分化及死亡三大生物学过程, 与肿瘤的发生、发展密切相关^[1,2], 是迄今发现的与人类肿瘤相关性最高的基因之一。最近的研究提示 p53基因功能状态在电离辐射诱发肿瘤过程中处于举足轻重的地位, 因此成为肿瘤病因学、放射生物学研究的热点。

1 p53基因状态与辐射诱导的细胞周期 G₁期阻滞

早在 1984年就发现, 紫外光可通过一个翻译后的稳定机制诱导细胞内野生型 p53蛋白的增多^[3]; Kastan等亦发现, γ射线诱导的细胞周期 G₁期阻滞伴有野生型 P53蛋白核内堆积^[4]。这提示 P53蛋白在辐射诱导的 G₁期阻滞中起作用。近几年更多的研究证实, P53蛋白是 DNA 损伤(电离辐射、肿瘤化疗药物等所致)时诱导 G₁期阻滞的重要生物调节分子^[5]。Linke等在研究 p53基因状态与 γ辐射引起染色体结构改变相关性中发现, 具 p53正常功能(p53⁺)的人成纤维细胞和上皮细胞经辐照后停滞于 G₀/G₁期, 而且与辐射剂量有关, 虽然有细胞逃脱 G₀/G₁期进入 S期, 但仍可被阻滞于随后的周期阶段, 最终的转归是细胞凋亡; 相反, p53功能失活(p53⁻)的细胞不管辐射剂量如何都可逃脱 G₀/G₁期阻滞进入 S期, 其细胞死亡数量明显下降, 复制活力远比 p53⁺高得多, 如果将辐照后的

p53⁻、p53⁺细胞人为阻滞于 G₀/G₁期, 二者的生成率和复制力相同。上述结果证实了辐照后的 p53⁺通过发挥 G₁期阻滞作用, 允许细胞有额外的时间修复受损的 DNA, 同时也证实了 p53⁺通过清除 DNA 受损细胞来维持基因组的稳定^[6]。

当细胞受到电离辐射致 DNA 损伤时, 作为转录子的 P53蛋白的表达量会急剧升高, 半衰期延长, 与其他蛋白结合力和转录活性增加, 其增高水平与 DNA 受损程度呈正相关, 但增高幅度和活性动力学因辐射损伤类型而异。细胞通过不同的功能和蛋白识别不同类型 DNA 损伤, 相应采取不同酶系统进行修复。P53蛋白通过与下游基因如 GADD45、CIP1/WAF1/SDI1、MDM2等的靶序列结合从而激活这些基因转录, 使其 mRNA 和蛋白表达水平均增高, 调节细胞周期进展, 促使受损 DNA 修复, 其效应与野生型 p53直接相关。CIP1/WAF1/SDI1基因位于染色体 6p12.2, 表达产物分子量为 21 000u 的 P21蛋白, 是控制细胞分裂的开关。当 P21含量增多时, 双分子 P21结合至细胞周期素(cyclin)和细胞周期素依赖蛋白激酶(cdk), 使 cyclin-cdk不能磷酸化 Rb, 阻碍 E2F的释放, 使与 DNA 合成的相关基因如 TK、cyclinA、cyclinE、FH2(四氢叶酸还原酶)、PCNA(增殖细胞核抗原)等不能表达, 细胞不能进入 S期而停滞于 G₁期, 失去分裂能力。单分子 P21则无此抑制作用。此外, P21通过 C 端区直接结合 PCNA, 制止 DNA 复制, 但不

影响 DNA 修复。GADD (growth arrest DNA damage) 45 基因产物与 PCNA 结合, 抑制 DNA 合成。它和 P21 蛋白单独或相互作用共同控制细胞周期^[17-9]。人的 MDM2 (murine double minute) 位于人 12q, 其蛋白产物为一癌蛋白, 通过与 p53 转录活性区结合下调 p53 转录活性, 形成负反馈, 缩短 G₁ 期阻滞时间, 使 DNA 损伤修复后的细胞进入下一细胞周期阶段。在小鼠胸腺内皮转化细胞 Vh1 系中存在野生型 P53 蛋白高表达, 但电离辐射并不引发 G₁ 期阻滞或凋亡, 可能与 MDM2 和 p53 结合抑制其转录活性有关。因此, 推测在一些肿瘤细胞中 p53 驱动的 MDM2 负反馈作用足以抵消 P53 蛋白引起的细胞阻滞和凋亡^[1, 10]。

此外, 相关研究证实野生型 p53 蛋白还可通过其它方式参与 G₁ 向 S 期过渡调控, 介导 G₁ 期阻滞^[11]。它与 c-fos, c-jun, Rb, PCNA, TFIIID 等基因的 TATA 盒结合, 抑制这些基因的启动子活性; 作用复制蛋白 A (RPA), 抑制 RPA 与单链 DNA 结合, 从而停止起始复制; 很多 DNA 合成相关酶基因的上游调控区都含有 DNA 结合蛋白 E2F 的结合位点, 转录因子 E2F 可激活这些基因表达, 加速 DNA 前体的合成, 促进细胞由 G₁ 期过渡到 S 期。人们发现, E2F-1 与野生型 p53 共同表达时, 可克服 p53 介导的细胞生长受抑作用, 同时诱导凋亡^[12]。当 p53 蛋白增多时直接与 E2F 结合, 封闭其功能位点, 诱导 G₁ 期阻滞。最近, Madden 等运用不同的 RT-PCR 在野生型 p53 温度敏感性小鼠胚胎成纤维细胞中分离到阻碍细胞生长的细胞生长调控因子 CGR11 和 CGR19, 也能与 P53 蛋白共同参与细胞周期调控^[13]。

野生型 P53 蛋白通过多种作用方式协同将 DNA 受损细胞阻滞于 G₁ 期, 与其参与转录和 DNA 修复相关, 为细胞的一种保护性反应。辐射导致 DNA 受损, P53 蛋白产生信号刺激 DNA 修复, 直到 DNA 修复完成;

如果 DNA 得不到有效修复或畸形修复, p53 就诱导细胞凋亡。已经证实, 如果 p53 基因缺失或突变 (电离辐射作为一种物理致癌因子本身就可引起 p53 基因突变和重排) 导致辐射诱导的 G₁ 期阻滞丧失, 细胞的保护校正机制失调或障碍, 细胞带着受损的 DNA 进入 S 期继续复制, 出现时空偏差并以较高的速度发生, 结果是细胞转化癌变。切尔诺贝利核电站核事故污染区与无放射性接触区的病例资料相比, 由辐射引发的儿童甲状腺癌发病率明显增高, 同时伴有 p53 基因突变增多, 多数表现为缺失性突变, 不同于化学致癌的常见点突变, 从而证实 p53 基因状态在辐射诱发肿瘤中起重要作用^[14]。

2 p53 基因状态与辐射诱导的凋亡

缺乏 p53 基因的胸腺细胞对放射线不敏感, 但却保留了用糖皮质激素处理可致凋亡的正常反应。用不同剂量的 γ 射线照射小鼠卵巢细胞, 凋亡数量是未照射组的 5~6 倍, 此时 P53 蛋白表达量增加^[15]。这表明, p53 基因在放射线诱导细胞凋亡过程中发挥着关键作用。

p53 基因状态与细胞对电离辐射的生物敏感性密切相关。p53 基因处于正常状态时, 同一个体不同组织细胞的辐射敏感性不尽相同。当辐照小鼠的脾、胸腺、成骨细胞时可大量表达 P53 蛋白, 但其肝细胞未能检测到该蛋白的表达; 当胸腺和脾细胞发生由 p53 介导的凋亡时, 成骨细胞并未发生^[16]。上述结果表明, 在不同的组织中, p53 诱导细胞凋亡发挥抗癌作用的机制不尽相同。

p53 基因状态的改变可致细胞对电离辐射的生物敏感性改变, 降低辐射敏感性, 表现为细胞耐受性增强, 存活指数增加。只含有一个 p53 基因的杂合子 (p53⁺/-) 小鼠胸腺细胞对辐射诱导的凋亡抵抗力大于含有两个 p53 基因纯合子 (p53⁺/+) 小鼠胸腺细胞, 而剔除 p53 基因 (p53⁻/-) 小鼠胸腺细胞对凋亡的抗

性最强。同样结果也可见于 γ 射线照射后的小鼠骨髓细胞,用 6Gy 照射,4小时后 $p53^-/+$ 细胞的凋亡数是 $p53^-/-$ 细胞的3倍^[17]。研究证实,野生型 $p53$ 基因可通过转录或非转录等多途径诱导细胞凋亡,其具体作用途径与细胞类型和所处微环境有关,因此基因状态的改变致辐射敏感性变化的可能机制也是多方面的。

2.1 Bcl-2基因家族调控紊乱

$p53$ 蛋白可通过Bcl-2家族调控凋亡。电离辐射激活的 $p53$ 蛋白发挥转录因子的作用,从而激活众多靶基因中的Bax,使Bax的mRNA和蛋白表达均升高,形成Bax-Bax同源二聚体,诱导具有凋亡倾向的细胞死亡。Bcl-x_s Bax Bcl-2三者和Bcl-x_l Bax Bad三者分别形成两个凋亡调控系统。Bcl-2 Bcl-x_l通过与Bax形成异源二聚体抑制凋亡,Bcl-x_s Bad通过与Bcl-2 Bcl-x_l结合置换Bax,使Bax游离,形成同源二聚体启动凋亡^[18]。因此,Bcl-2/Bax Bcl-x_l/Bax的比例决定细胞是否进入凋亡。 $p53$ 基因失活可引起Bcl-2家族基因调控失衡。Zhan等^[7]在研究电离辐射引起细胞Bcl-x_l表达变化过程中发现, $p53$ 基因失活的细胞株Bcl-x_l基线水平高于 $p53$ 基因功能正常的细胞株Bcl-x_l基线水平,且高基线水平不易诱发细胞凋亡而低基线水平可发生细胞凋亡。

2.2 细胞G₁期阻滞动力学改变

$p53$ 基因介导的细胞凋亡除Bcl-2基因家族外,还与其它基因有关。Yin等^[19]最新研究工作表明,Bax的表达依赖于 $p53$ 基因的存在,诱导依赖 $p53$ 作用凋亡的发生;但只有50% $p53$ 依赖的凋亡需Bax基因参与,另50%则由其它效应分子参与。Carmann等^[20]在一株生长因子依赖性的造血系统肿瘤细胞株中发现,当存在生长因子时,电离辐射可使该株细胞停留在G₁期,但一旦撤除该生长因子,可导致细胞凋亡。经研究提示,这一细胞株与Bcl-2 Bax基因表达水平无关,但却与

GADD45及P21基因表达水平相关。 $p53$ 基因失活引起细胞G₁期阻滞动力学改变,失去正常的G₁期阻滞反应而不发生凋亡,导致辐射敏感性下降。

2.3 DNA复制能力增强

$p53$ 基因参与DNA的修复,通过严格控制与DNA修复有关的基因表达,在核酸切除修复(nuclear excision repair,NER)和重组修复过程中发挥作用。一些NER的成份如转移因子TFIIH的组成成份中具有解旋酶活性的切除修复交叉互补酶2(XPD/ER-CC2)和3(XPB/ERCC3)被 $p53$ 蛋白结合失去其解旋活性,借此参与了 $p53$ 介导的凋亡^[21]。在辐射小鼠组织细胞中检测到的六氧烷基鸟嘌呤DNA烷基转移酶的表达也与野生型 $p53$ 蛋白有关,且依赖 $p53$ 基因数量^[22]。当 $p53$ 基因状态改变时,受其严格控制的DNA修复酶的活性增强,合成增多,致使DNA受损细胞复制能力增强,因此细胞辐射耐受性提高。

2.4 细胞增殖信号传递阻碍

$p53$ 基因可控制某些参与细胞增殖信号传递的蛋白表达,籍此调控细胞凋亡。一个受 $p53$ 基因转录具有生长调节作用的基因是类胰岛素生长因子结合蛋白3(IGF-BP3),IGF-BP3与IGF结合封闭它与受体结合,从而阻断IGF有丝分裂信号传递通路,促进凋亡。 $p53$ 还可通过Fas蛋白介导凋亡,但还需进一步证实^[1]。已知cdk2基因编码的p34激酶活化是细胞分裂的增殖信号,电离辐射本身和 $p53$ 基因的过量表达都可使P34蛋白上的Tyr快速磷酸化,过早激活,诱发细胞凋亡^[23]。最近的证据显示,是 $p53$ 的转录抑制活性而不是它的转录激活活性影响细胞凋亡。随着 $p53$ 蛋白激活可抑制微管相关蛋白4(MAP4)的表达,这种下降作用可被 $p53$ 抑制剂如腺病毒EB-19K蛋白和WTL蛋白阻断,而MAP4的过量表达可明显抑制 $p53$ 诱导的凋亡,产生负调控效应^[24]。

此外, p53可与癌基因和生长因子协同调节细胞凋亡。c-myc 基因能诱导细胞凋亡, 现在认为唯有 p53基因缺失时才能发挥其凋亡作用。电离辐射可致 raf, c-myc, ras等癌基因过量表达引起凋亡调控失调, 内源性辐射敏感性下降, 如在 U2OS 细胞中 wt1的过量表达抑制了由紫外线激活 p53诱导的凋亡, 存活指数提高^[1]。Blandino等发现缺乏 IL-3的 32D 细胞可因导入野生型 p53基因诱导凋亡, 加入 IL-3后可解除凋亡, 提示 p53基因可能通过调节微环境的细胞因子进而调节细胞凋亡^[25]。

3 结束语

p53基因产物作为一个基因警卫 (guard gene), 通过它的转录途径和非转录途径即直接的蛋白-蛋白信号传递发挥作用, 负责维持细胞基因完整性、损伤 DNA 修复和细胞周期的正常运行。由于 p53基因状态的改变使得细胞周期调控系统和细胞凋亡调控系统紊乱, 导致 DNA 受损细胞不能得到及时修复或清除, 成为诱发肿瘤机理之一。随着核能的开发利用和肿瘤放射治疗的开展, 研究 p53基因功能状态差异对探讨辐射损伤、辐射危害评价、辐射致癌的早期筛选和分子流行病学调查均有着极其重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Arno H J. Cell 1997; 88: 323
- 2 Soussi T et al. Immunol Today, 1996; 17: 354
- 3 Maltzman W et al. Mol Cell Biol 1984; 4: 1689
- 4 Kanstam M B et al. Cancer Res, 1994; 54: 6304
- 5 Gadbois DM et al. Radiat Res, 1996; 164: 414
- 6 Linke SP et al. Cancer Res, 1997; 57: 1173
- 7 Zhan Q et al. Oncogene, 1995; 11: 1675
- 8 Dulic V et al. Cell 1994; 76: 1013
- 9 Kearsey M et al. Oncogene 1995; 11: 1675
- 10 Blaydes JP et al. Oncogene 1997; 15: 1859
- 11 王瑞虹等. 细胞生物学杂志, 1995; 17(2): 71
- 12 Wu X et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91: 3602
- 13 Madden SL et al. Cancer Res 1996; 56: 5384
- 14 Hilbrandt S et al. Int Radiat Biol 1996; 89: 39
- 15 Stephens LC et al. Radiat Res 1994; 127: 308
- 16 Madly CA et al. J Cell Sci 1995; 108: 1843
- 17 Cui YE et al. J Environ Pathol Toxicol Oncol 1995; 14: 159
- 18 Elizabeth Y et al. Blood, 1996; 88: 386
- 19 Yin CY et al. Nature, 1997; 385: 637
- 20 Carman CE et al. Genes Dev 1995; 9: 600
- 21 Chen ZP et al. Submitted for publication, Cancer Res 1997
- 22 Rafferty JA et al. Oncogene 1996; 13: 693
- 23 Shi L et al. Science, 1994; 263: 1143
- 24 Murphy M et al. Genes Dev, 1996; 23: 2971
- 25 Blandino C et al. Oncogene, 1995; 10: 731

(收稿日期: 1998-04-15)

辐射损伤及其致癌效应

北京放射医学研究所 (北京, 100850) 李 钧综述 郑文忠 王功鹏审校

摘 要: 辐射致癌是人类接受低剂量照射引起的唯一可以得到确认的致死性健康危害。本文从物理学角度简述了辐射致细胞损伤的机理, 并在此基础上探讨了辐射的致癌效应, 提出了今后应该开展的工作。

关键词: 电离辐射 靶理论 辐射致癌

由于核能与辐射的应用在人类生活中占有特殊的地位, 加上辐射致癌可以得到比其

它原因致癌更可靠的资料, 因此, 虽然辐射在人类全部癌症病因中的作用不像化学致癌物