

- 4 Enari M et al. Nature, 1998; 391: 43
- 5 Kothakota S et al. Science, 1997; 278: 294
- 6 Cheng EHY et al. Science, 1997; 278: 1966
- 7 Barinaga M. Science, 1998; 280: 32
- 8 Zamzami N et al. Oncogene, 1998; 16: 2265
- 9 Green DR et al. Science, 1998; 281: 1309
- 10 Adams JM et al. Science, 1998; 281: 1322
- 11 Li P et al. Cell, 1997; 91: 497
- 12 Roy N et al. EMBO J, 1997; 16: 6914
- 13 Pan GH et al. J Biol Chem, 1998; 273: 5841
- 14 Ashkenazi A et al. Science, 1998; 281: 1305
- 15 Yeh WC et al. Science, 1998; 279: 1954
- 16 Sheridan LP et al. Science, 1997; 277: 818
- 17 Pan G et al. FEBS Lett, 1998; 424: 41
- 18 Evan C et al. Science, 1998; 281: 1317
- 19 Stone HB et al. Radiat Res, 1998; 150: 134
- 20 Mayo MW et al. Science, 1997; 278: 1812
- 21 Zhan Q et al. Mol Cell Biol, 1998; 18: 2768
- 22 Rathmell WK et al. Cancer Res, 1997; 57: 68

(收稿日期: 1998-11-03)

辐射诱导细胞凋亡的基因调控

北京放射医学研究所(北京, 100850) 苑 宾综述 王宝勤 李雨民* 鞠桂芝** 审校

摘要: p53和 Bcl-2家族在辐射诱导的细胞凋亡中起着中心作用,可调节许多凋亡相关基因的转录与表达,从而调控细胞凋亡;c-myc是一个双向的调控基因,可因细胞生长条件的不同而不同;ICE基因家族蛋白则在调控细胞凋亡过程中使一些有关蛋白底物酶解。这些基因及其它凋亡相关基因并不孤立存在,而是互相联系、互相作用,共同调节细胞的增殖、分化与凋亡。

关键词: 细胞凋亡 基因调控 辐射效应

细胞凋亡(apoptosis)是正常器官发育和组织稳态过程中一种固有的细胞死亡形式,也可由多种因素包括糖皮质激素、高温、一定的化疗药物和电离辐射等诱导产生。辐射作为一种基因毒剂(genotoxic agents),可诱导多种正常组织和肿瘤组织发生凋亡^[1]。由于辐射与人类关系愈益密切,故辐射诱导的细胞凋亡及其分子机理的研究倍受关注。细胞凋亡同细胞的增殖与分化一样,离不开基因的表达与调控,目前发现许多基因参与细胞凋亡的调控,在哺乳动物细胞大致分为三类:一类为促进凋亡;另一类为抑制凋亡;还有一类为双向调控,如 c-myc、Bcl-x_L、Bcl-x_S可翻译出两种蛋白 Bcl-x_L和 Bcl-x_S,前者抑制凋亡,后者促进凋亡。原癌基因和抑癌基因是参与细胞维持自稳平衡(homeostasis)的正负调控信号,共同调节细胞增殖、分化和凋亡^[2]。

本文就以上几种重要基因对辐射诱导细胞凋亡的调控作一概述

1 p53与细胞凋亡

肿瘤抑制基因 p53作为转录因子结合并参与基因表达的调控,在辐射诱导的细胞凋亡中起着中心作用。p53在损伤存活中也起重要作用并因此被誉为“基因警察”(guardian of the genome)^[3]。除了在 DNA合成期以外,其正常表达水平很低,且只有很短的半寿期。DNA受到损伤,p53表达上调,转运至核并与 DNA结合。调节包括 p21/waf1、mdm2和 bax等许多基因的转录^[4]。p53不仅可以活化 p21和 GADD45引起细胞 G₁期阻滞和 DNA修复,还可调节细胞的增殖与凋亡^[2]。对小鼠胸腺细胞的照射实验证实了 p53对某些细胞的凋亡是必需的。具有野生

* 中国医学科学院放射医学研究所(天津, 300192)

** 白求恩医科大学预防医学院(长春, 130021)

型(WT)p53基因的胸腺细胞对辐射非常敏感,不到 1Gy的剂量即可诱导细胞凋亡;然而 p53隐性纯合小鼠即使受到高达 7~20Gy的照射也未诱导其胸腺细胞发生显著的凋亡^[5,6]。这不仅局限于胸腺细胞,p53基因缺陷小鼠在照后其小肠与大肠隐窝细胞也有类似的反应^[7]。这些实验都为辐射诱导某些细胞的凋亡是依赖 p53的情况提供了令人信服的证据,但不依赖 p53的细胞凋亡同样存在。一些无 p53或 M Tp53表达的肿瘤细胞仍可在照射后发生凋亡。凋亡动力学测定显示,带有替换的 W Tp53蛋白功能的细胞可能有延迟而非减少辐射诱导凋亡的倾向^[8]。但是这些观点仍需要在不同的细胞类型中进一步证实。

许多细胞发生的凋亡都是 p53依赖的,它们对 DNA损伤刺激因素如辐射和化疗药物等都有反应。对 p53介导细胞凋亡的作用有一个解释模型,即 DNA的损伤诱导 p53活性增强而导致 p21与 GADD45的转录,结果引起 G₁期阻滞。在阻滞期,细胞可修复其 DNA损伤,然后再进入 S期;如果不能修复其 DNA损伤,将进入凋亡。Wang等人^[9]的研究显示,Bcl-2抑制 p53引发的细胞凋亡但不抑制 G₁期阻滞,表明与 G₁期阻滞和细胞凋亡相应的分子通路是独立的,但 G₁期阻滞对细胞凋亡的发生可能并不必要。另一研究表明,完全缺乏 G₁期关卡功能的剔除 p21基因小鼠仍能发生细胞凋亡,这些小鼠对辐射诱导细胞凋亡的反应仍很敏感^[2]。

虽然已经确证 p53介导的 G₁期阻滞与 DNA修复是通过活化 p21和 GADD45来完成,但依赖 p53的细胞凋亡的确切分子机制还不清楚^[2,8]。一种理论认为,WTp53蛋白活化大量的凋亡促进基因并引发了细胞凋亡通路。根据最近有关人和啮齿类细胞的资料,辐照后依赖 W Tp53的细胞凋亡的决定通路看来不是 p21W AF1/CIP1蛋白通路,而可能与 Bcl-2家族(包括 Bax)密切相关^[8]。部分研究

证实,Bax/Bcl-2这一“变阻器”(reostat)的转换可能是 p53诱导细胞凋亡的机制。Bcl-2家族的蛋白产物可在 p53的下游发挥作用。10Gy照射后 2~5小时,大多数(63%) W Tp53阳性急性淋巴细胞白血病(ALL)细胞系 Bcl-2表达下调和 Bax表达上调,并引起凋亡;反之则不能引起凋亡^[10]。对凋亡有相应耐受性的 M Tp53蛋白表达细胞也观察到了 Bcl-2基因表达水平的增加^[8]。c-myc诱导的细胞凋亡看来也需要野生型 p53的功能^[11]。缺乏视网膜母细胞瘤基因产物(Rb)导致的细胞凋亡也需要 p53存在,如果将 p53的功能剔除,这一现象将不发生^[12]。

与上述理论不同,Caelles等发现在不依赖于新 RNA或蛋白质合成条件下诱发了依赖 W Tp53的细胞凋亡^[13]。他们认为,W Tp53蛋白能通过抑制细胞存活所需的基因或与凋亡过程中参与 DNA降解或修复的有效蛋白部分相互作用而引起细胞凋亡。在描述 p53基因作为照后细胞凋亡的一个介导者的直接作用前,需要进一步研究大量的细胞类型^[8]。

2 Bcl-2与细胞凋亡

在过去的几年里,Bcl-2(B细胞淋巴瘤/白血病-2)家族得到了广泛的研究。Bcl-2家族可以分为两大组:抑制细胞凋亡的有 Bcl-2 Bcl-x_l Mcl-1 Bag-1 Bfl-1 Brag-1 Bcl-w;促进细胞凋亡的有 Bax Bad Bcl-x_s Bak和 Bik^[3]。Bcl-2是一种膜结合蛋白,主要分布于核膜、内质网膜和线粒体外膜。Bcl-2最初是从滤泡性淋巴瘤相关的 t(14;18)染色体易位的断裂点部位克隆到的,在此易位中,Bcl-2从其正常定位(18q21)移动到与位于 14q32的免疫球蛋白重链位并列位置,导致在淋巴瘤细胞中该基因的转录激活及 26ku(kD)的 Bcl-2蛋白的过度表达^[4]。Bcl-2在许多胚胎组织中普遍表达,但在除了 B细胞和小肠隐窝细胞等少数几种之外的成熟组织中

则很少表达。虽然绝大多数正常成熟组织缺乏 Bcl-2 的表达,但为数甚多的恶性肿瘤包括 60% 的滤泡性淋巴瘤、大多数 B 细胞慢性淋巴细胞白血病和乳腺癌均表达 Bcl-2^[2,9]。

Bcl-2 是细胞凋亡的负向调节基因。当它被激活后,可抑制包括辐射、化疗药物、去除血清或生长因子等多种因素诱导的细胞凋亡。但 Bcl-2 不是细胞凋亡的唯一抑制因素,有些组织如肝脏虽不表达 Bcl-2,但仍可调控凋亡,表明存在其它的细胞凋亡抑制基因^[2]。

Bcl-2 表达对增殖干细胞的正常存活是必需的,且能抑制 DNA 损伤引发的细胞凋亡^[14]。

10Gy 照射后, W T_p53 阳性的 ALL 细胞系 Bcl-2 表达降低, Bax 表达增加,并引起细胞凋亡^[10]。Bcl-2 可阻止辐射诱导的胸腺细胞和淋巴细胞凋亡^[1,15],也能阻止 c-myc 引起的细胞凋亡,但却不能中断 c-myc 引起的细胞增殖^[16]。

为了解释 Bcl-2 家族在调控细胞凋亡中的机制,有些学者先后提出了几种模型。一种认为凋亡促进蛋白 Bax 的同源二聚体提供了一个细胞凋亡信号,这可通过凋亡抑制成员与 Bax 形成异源二聚体的竞争性相互作用而被抑制^[17],因而在正常的“健康”细胞中,大部分的凋亡促进蛋白 Bax 应当与凋亡抑制成分如 Bcl-2 或 Bcl-x_L 形成异源二聚体复合物。另一种解释模型是凋亡抑制蛋白提供了一个存活的优势信号,这不依赖于它们与该家族凋亡促进成员的结合^[18]。Korsmeyer 等^[19]提出了一个理论,即某些细胞的凋亡决定于 Bax 同源二聚体的相对数量。Bcl-2 和 Bcl-x_L 与 Bax 结合阻止其同源二聚体的形成并因此抑制细胞凋亡;另一方面, Bad 可取代 Bax 与 Bcl-2 或 Bcl-x_L 结合,从而促进 Bax 形成同源二聚体,因而促进细胞凋亡。这些模型的共同点是以 Bax 的同源或异源二聚体化为中心调控细胞凋亡。最近,有学者提出^[20], Bcl-2 抑制细胞凋亡的作用机制是 Bcl-2 既有作为离子开关功能,又有作为调节

器或锚蛋白的功能,其基础是 Bcl-2/Bcl-x_L 至少在体外具有开关活性,其它家族成员如 Bad 或 Bax 的异二聚体化使 Bcl-2/Bcl-x_L 的开关活性丧失而促进细胞凋亡,因此, Bcl-2/Bax 的比率可能是调节增殖与凋亡的关键。Bcl-2 和 Bcl-x_L 抑制细胞凋亡的部分原因是阻断了细胞色素 C 从线粒体的释放,细胞色素 C 是凋亡蛋白酶 (caspase) 激活的关键因素。

3 c-myc 与细胞凋亡

c-myc 这一原癌基因在多种类型的人癌细胞中表达都下调,业已清楚, c-myc 通过与一个叫 Max 的伙伴蛋白 (partner protein) 异源二聚体化形成一个有活性的复合物,且这一复合物充当转录调节子的角色^[21]。c-myc 的表达启动细胞朝向两个显然相反的通路: 凋亡或增殖。例如,非转化细胞 c-myc 的表达是与有丝分裂刺激剂密切相关并预先需要细胞生长。c-myc 的表达对 G₀ 期成纤维细胞进入细胞周期既必要又充分。相反,持续表达 c-myc 的永生化成纤维细胞 (REFs) 当去除血清时不能出现细胞周期阻滞,而发生细胞凋亡。在表达 c-myc 的淋巴细胞中也发现了相似的结果^[22]。经照射后,转染 c-myc 的永生化的大鼠 REFs 比那些原代 REFs 及 c-myc 加 ras 共转染的 REFs 发生了更显著的凋亡, 10Gy 照射后 48 小时, 50% ~ 60% 的 c-myc 转染细胞发生凋亡。而 c-myc 加 ras 共转染细胞只有 15% ~ 20% 发生凋亡,原代 REFs 仅有 0% ~ 3% 的细胞发生凋亡^[23]。

有几种模型可解释 c-myc 在细胞增殖与凋亡中明显不同的作用。其中,被广为认可的是“双信号”模型^[22],根据这一模型,如果 c-myc 过表达,第二信号如生长因子则必定出现并引发细胞增殖;但当缺乏这样的信号,如去除血清,则引发细胞凋亡。

c-myc 介导的细胞增殖和凋亡功能最初可能是细胞周期特异的,发生在 G₁ 期和早 S

期^[2]。这些结果来源于 *c-myc* 是一早期响应基因,在细胞由 G_0 期过渡到 G_1 期时迅速高表达。然而, *c-myc* 不同于大多数的早期响应基因,它在整个细胞周期中都持续表达,这一发现使研究人员开始关注 *c-myc* 在细胞周期较后期的功能。目前,对于 *c-myc* 诱导细胞凋亡与细胞周期进程的关系还不清楚。有研究表明^[2], *c-myc* 也能诱导 S 期细胞的凋亡,作者据此提出 *c-myc* 诱导的细胞凋亡对于细胞周期是非特异性的。

4 ICE与细胞凋亡

哺乳动物白细胞介素 β 转化酶 (interleukin- β converting enzyme, ICE) 基因定位于人类染色体 11q23, 其 cDNA 全长 1.35 kb, 编码由 404 个氨基酸残基组成的 45kD (kD) 的蛋白。

日益增多的证据表明, ICE 家族蛋白参与了细胞凋亡的调控。这些蛋白包括 ICE-1/ICH-1/NEDD-2/ CPP32/YAMA TX/ICH-2 和 MCH-2, 它们含有共同的 QACRG 五肽, 中间环绕着一个被称为活性位点的 Cys 残基。在多种细胞类型中, 这五种蛋白酶中的任何一种过表达都会导致细胞凋亡^[2]。此外, 转染 ICE 和 CPP32/YAMA 特异的抑制子之一即牛痘病毒 CRMA 可阻止由缺乏细胞因子而引发的细胞凋亡^[25]。当然, ICE 类蛋白在一定条件下诱导细胞凋亡既充分又必要。然而, 它们的作用底物还未确定。已知多种蛋白在细胞凋亡的最初阶段被降解, 这些蛋白包括核层蛋白 B (lamin B), DNA 依赖的蛋白激酶 (DNA-PK), 拓扑异构酶 I 和多聚 (ADP 核糖) 聚合酶 (PARP), 这是一个涉及 DNA 修复的酶。有报道表明^[26], ICE 同源物 CPP32/YAMA 降解 PARP, 并使 DNA-PK 的催化活性降低, 这进一步证明了 ICE 家族成员可能是细胞凋亡的效应器。

5 结束语

综上所述, 在多数细胞类型中, p53 和

Bcl-2 基因家族在辐射诱导的细胞凋亡中起着中心作用, 可调节许多凋亡相关基因的转录与表达, 从而调控细胞凋亡; *c-myc* 是一个双向的调控基因, 可因细胞生长条件的不同而不同; ICE 基因家族蛋白则在调控细胞凋亡过程中使一些有关蛋白底物酶解。上述各类基因及其它凋亡相关基因并不孤立存在, 而是相互联系、相互作用, 共同调节细胞的增殖、分化与凋亡^[8, 10, 11, 16]。但在不同的细胞类型中, 各种基因对辐射诱导凋亡的精确调控机制还需要进一步的研究。

参考文献

- 1 Maity A et al. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1997; 37(3): 639~ 653
- 2 Blank KR et al. *Int J Radiat Biol*, 1997; 71(5): 455~ 466
- 3 Lane DP. *Nature*, 1992; 358: 15~ 16
- 4 Potten CS et al. *Stem Cell*, 1997; 15: 82~ 93
- 5 Clarke AR et al. *Nature*, 1993; 362: 349~ 352
- 6 Lowe SW et al. *Nature*, 1993; 362: 848~ 849
- 7 Merritt A et al. *Cancer Res*, 1994; 54: 614~ 617
- 8 Bristow RG et al. *Radiother Oncol*, 1996; 40: 197~ 223
- 9 Wang Y et al. *Cell Growth Differ*, 1995; 6: 1071~ 1075
- 10 Findley HW et al. *Blood*, 1997; 89(8): 2986~ 2993
- 11 Hermeking H et al. *Nature*, 1994; 265: 2091~ 2093
- 12 Morgenbesser SD et al. *Nature*, 1994; 371: 72~ 74
- 13 Caelles C et al. *Nature*, 1994; 370: 220~ 223
- 14 Merritt AJ et al. *J Cell Sci*, 1995; 108: 2261~ 2271
- 15 Strasser A et al. *Cell*, 1994; 79: 329~ 339
- 16 Lee YJ et al. *J Cell Sci*, 1997; 110: 681~ 686
- 17 Oltavi ZN et al. *Cell*, 1994; 79: 189~ 192
- 18 EH-Y Cheng et al. *Nature*, 1996; 379: 554~ 556
- 19 Korsmeyer SJ et al. *Am Acad Cancer Res*, 1996; 37: 624~ 625
- 20 Reed JC. *Nature*, 1997; 387: 773~ 776
- 21 Amati B et al. *Curr Biol*, 1994; 4: 102~ 108
- 22 Harrington EA et al. *EMBO J*, 1994; 13: 3286~ 3295
- 23 Mckenna WG et al. *Oncogene*, 1996; 12: 237~ 245

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

26 Nicholson DW et al. Nature, 1995; 376 37- 43

25 Gagliadini V et al. Science, 1994; 263 826-

(收稿日期: 1998-09-21)

828

细胞凋亡抑制和肿瘤细胞对放射治疗的耐受

苏州医学院生物技术研究所(苏州, 215007) 施 勤综述 张学光 强亦忠审校

摘 要:临床上利用放疗方法诱导肿瘤细胞凋亡为众多治疗肿瘤的目标之一,但是由于肿瘤细胞可对放射治疗产生耐受而导致疗效下降。本文从基因调控异常、信号转导障碍等方面探讨细胞凋亡抑制与肿瘤耐受放疗的机制。

关键词:肿瘤细胞凋亡 放射治疗 辐射耐受

细胞凋亡,亦称程序性死亡,是指细胞接受外界信号刺激后由基因自行控制发生的有序性自杀死亡过程,并伴有独特的形态特征——凋亡小体的形成和DNA降解片段的产生。它不仅对胚胎发生、个体发育和保持机体稳定等生物学功能至关重要,而且在调控细胞增殖、肿瘤形成和发展中起关键作用。该过程的紊乱将导致发育异常、加速肿瘤的发生和恶化^[1]。在众多治疗肿瘤的方法中,诱导肿瘤细胞凋亡是重要的效应之一。而肿瘤的放射治疗又是肿瘤治疗的一种主要手段,然而并非所有放疗都有效,肿瘤细胞耐受放疗导致肿瘤复发的现象在临床上时有发生。因此了解细胞凋亡抑制和肿瘤耐受放疗的关系及其可能的分子生物学机制,对于提高放疗疗效和延长患者生命意义深远。本文就此做一综述。

1 细胞凋亡抑制与基因调控异常

肿瘤发生时,细胞的原癌基因激活和抑癌基因失活,均可导致细胞生长调控和分化功能紊乱,继而发展为肿瘤细胞。研究表明,诸多癌基因和抑癌基因参与了放射线诱导的细胞凋亡调控,它们通过自身编码的蛋白发挥诱导或抑制作用。

1.1 p53基因

p53基因是迄今发现的与人类肿瘤相关

性最高的基因之一,定位于人17p13.1,长16~20kb,编码393个氨基酸组成的核磷酸蛋白。p53蛋白可转录激活特异序列的下游靶基因,如WAF1/CIP1、GADD45、MDM2、cyclinG、Bax、IGF-BP3等,从而参与细胞周期调控、DNA修复和复制、细胞凋亡等过程,在细胞的生长、分化及死亡三大生物学过程中发挥重要作用。电离辐射致损DNA可激活p53蛋白发挥G₁期细胞阻滞功能,促进DNA修复,诱导未能修复的细胞凋亡。p53基因主要通过调控Bcl-2家族基因与DNA修复有关的基因等多种方式发挥促进细胞凋亡的作用。突变的p53基因则失去促凋亡作用,致肿瘤细胞耐辐射^[2]。许多研究证实,p53基因状态功能与辐射诱发肿瘤细胞凋亡密切相关。高表达正常p53蛋白的肿瘤细胞经辐照后发生凋亡,肿瘤消退;而无表达的肿瘤细胞不呈现凋亡;转染突变p53基因的细胞表现辐射抗性和肿瘤复发^[3]。Chang等在研究头颈部鳞状细胞癌时发现,突变的p53基因可破坏细胞凋亡,减少细胞周期阻滞,提高细胞存活率,由此产生辐射抗性^[4]。然而,也有研究结果提示相反结论。Kyprianou等人^[5]将含突变p53基因的质粒转染人前列腺癌PL-3细胞株,发现转染前后的细胞辐照后表现相同的生物学反应和细胞凋亡率。Safran等人^[6]调查了30例p53基因状态正常或异