

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

常的非小细胞肺癌患者,发现他们之间对放疗敏感性无显著差异。这揭示了射线诱导肿瘤细胞凋亡的机制中存在着与 p53 基因无关的途径。

1.2 Bcl-2 基因家族

Bcl-2 基因家族成员按其细胞凋亡的作用不同分为促进基因和抑制基因,它们通过相互作用正向或反向调节细胞凋亡。当调控发生紊乱时,抑制基因上调,促进基因表达下降,则引发细胞凋亡抑制,肿瘤形成,细胞抗放疗、化疗^[7]。Bcl-2 基因为非何杰金氏 B 细胞滤泡状淋巴瘤中参与 (14; 18) (q32; q21) 转位至 18q21 的 DNA 片段,它编码一个分子量为 26ku(kD)的细胞内膜整合蛋白 (p26-Bcl-2),临床上某些血液肿瘤和恶性实体瘤均有较高频度表达,且恶性程度与表达水平相关。它可阻止或明显降低射线、自由基和抗癌药物引起的细胞凋亡,因此放、化疗时易产生耐受,缓解率降低,患者生存期短^[8]。恶性度 III/IV 级的神经胶质瘤中 p26-Bcl-2 表达量高于 I/II 级,除了本身抑制作用外,还阻止了 Fas/FasL 介导的凋亡,导致耐受^[9]。Bax 与 Bcl-2 有 21% 的同源性,它与 Bcl-2 或 Bcl-x_L 形成异源二聚体,阻止细胞凋亡;自身形成同源二聚体促进凋亡。因此细胞内 Bcl-2、Bcl-x_L 和 Bax 的量决定了细胞对凋亡信号的易感性。目前研究表明,Bax 是 p53 诱导凋亡途径的下游分子,但只参与了 50% 依赖 p53 调控的凋亡。经放疗后的肿瘤细胞表现为 Bcl-2 表达水平下调,Bax 水平上升,且这种效应依赖 p53 基因状态。Bcl-x 与 Bcl-2 同源为 44%,编码两个不同的 Bcl-x_m RNA,由此翻译两个不同作用的蛋白,Bcl-x_L (241 个氨基酸组成)和 Bcl-x_s (178 个氨基酸组成)。Bcl-x_L 蛋白大小与 p26-Bcl-2 差不多,功能亦相似;Bcl-x_s 蛋白通过与 p26-Bcl-2 竞争相同底物或调节因子而抑制 Bcl-2 的作用,促进细胞凋亡。p53 基因失活可引起 Bcl-2 家族基因调控失衡。Zhan 等在研究电离辐射引起

细胞 Bcl-x_L 表达变化过程中发现,γ 辐射可引起 p53 蛋白功能正常的多株人癌细胞 Bcl-x_L 表达水平增高,且与辐照剂量呈正比;而 p53 蛋白功能异常的细胞株则失去这种剂量线性关系,且其未经辐射细胞的 Bcl-x_L 表达基线水平大大高于正常细胞。同时发现 Bcl-x_L 高基线水平的细胞不易诱发凋亡,而低基线水平细胞容易发生凋亡^[10]。HCW-2 为 p53 缺失的 HL-60 骨髓母白血病变异细胞,具抗辐射能力,照射使其 Bax 和 Bcl-x_L 表达水平同时升高。将 BHRF1 基因转入鼻咽癌细胞株 CNE2 中,γ 射线照射后,通过抑制增殖细胞核抗原的表达发生生物学改变,表现为癌细胞周期重新分布,辐射敏感性下降,生存能力增强^[11]。这进一步表明,Bcl-2 基因家族成员之间调控紊乱是导致肿瘤耐放疗的又一机制。

1.3 c-myc 基因

原癌基因 c-myc 参与细胞的增殖、转化及细胞凋亡的诱导和促进过程,此效应有赖于细胞类型和刺激作用。c-myc 蛋白通过与 DNA 核甘酸顺序结合,与 c-myc 配体 Max 形成异二聚体,再与转录起始因子结合,控制细胞周期蛋白表达,参与细胞周期调节。在正常时 c-myc 蛋白适量表达以维持细胞的增殖,在外来信号改变或细胞内遗传基因受损时就过量表达,从而阻断细胞周期诱导凋亡的发生,并且其诱导和促进凋亡作用可因 Bcl-2 或突变型 p53 的表达而受到抑制,这说明在肿瘤发生过程中需要 c-myc 与 p53 或 Bcl-2 的相互作用^[12]。正常人的尿道上皮细胞经 0.1~5Gy 一系列剂量的 γ 射线照射后培养 14 天,检测其 Bcl-2、p53、c-myc 的蛋白表达,结果发现细胞高表达 c-myc,不表达或低表达 Bcl-2 时,细胞对辐射敏感;反之则抗辐射,这其中的 p53 表达水平起着关键作用。在膀胱粘膜的正常细胞与肿瘤细胞中,也证实放疗效果与 Bcl-2/c-myc 比例密切相关^[13]。因此,可考虑将肿瘤细胞中 Bcl-2/c-

myc比例作为放疗疗效观察和预后的指征。

此外,其它癌基因和抑癌基因的表达产物也通过各自的作用机制参与细胞凋亡抑制,导致放疗耐受。慢性髓性白血病细胞株 K562bcr/abl表达产物可使细胞耐受 γ 射线, Bedi^[14]采用 bcr/abl反义寡核苷酸处理,增加了它们对放疗的敏感性。Rb可通过抑制转录因子 E2F的功能从而抑制细胞由 G₁期向 S期转变,防止凋亡发生。Ishii等^[15]则用 Rb反义寡核苷酸处理高表达 Rb基因产物的非何杰金氏淋巴瘤细胞株 THS-SPL 1,成功地逆转了此细胞株对放疗的耐受。有报告证明,多药耐药基因(MDR1)及其编码的细胞膜糖蛋白(GP)表达量增加,也是导致肿瘤产生放疗抗性的原因之一^[16]。

2 细胞凋亡抑制与信号转导障碍

细胞凋亡为高度精密调节,除涉及不同基因的表达及调控外,还需要信号转导系统的正负调节,并通过一系列级联反应步骤实现。细胞质内 Ca²⁺离子浓度增加, cAMP累积、蛋白激酶激活、酪氨酸蛋白激酶激活和神经酰胺产生一系列信号,在多种模型中调节细胞凋亡,这些信号在不同细胞中的调节作用不同。放射线诱导细胞凋亡与其它诱导因素一样,通过多种信号转导路径最终激活依赖 Ca²⁺/Mg²⁺的 DNA核酸内切酶,先产生 DNA单链断裂(SSB),接着双链断裂(DSB),出现凋亡小体,在琼脂糖凝胶电泳时呈现 DN A“云梯”(ladder)带型。因此,信号转导通路障碍将引起细胞凋亡抑制,肿瘤放疗失败。

在特定的外界刺激因子作用下,鞘磷脂酶被激活,鞘磷脂从细胞膜上解离下来,产生胞内神经酰胺。神经酰胺作为第二调节信使,在细胞和分子水平上具有多种靶目标,参与 Fas和 Fas配体介导的凋亡或激活相应的蛋白激酶(CAPK),使与微管蛋白相连的蛋白激酶磷酸化,引起 Raf或 Ras蛋白磷酸化,

磷酸化的 Raf或 Ras蛋白又继续磷酸化 p26-Bcl-2,使细胞丧失生存能力^[17]。Michael发现 Burkitt's淋巴瘤 BL30A细胞株对放射极为敏感,经 10Gy辐照 10分钟后,神经酰胺表达量即较先前增加 4倍,中等敏感的 HL60细胞株增加 2.5倍,而不敏感细胞株(BL30K BL29 BL36)则不表达。将 HL30A事先经氟波脂处理,使之丧失产生神经酰胺的能力,则产生辐射抗性^[18]。上述结果证实了神经酰胺参与诱导凋亡的生化调控途径障碍与细胞凋亡抑制有关。

c-Jun氨基末端激酶(JNK)的活性在紫外线诱导的小细胞肺癌凋亡中起重要作用,它使与谷胱甘肽转移酶结合的谷胱甘肽-c-Jun聚合蛋白氨基末端磷酸化,从而启动 c-Jun介导的细胞凋亡信号转导系统。改变 JNK结构或 JNK变性失活都将显著增加小细胞肺癌对紫外线的辐射耐受^[19]。转录因子核因子 NF-kB可保护细胞免受射线诱导的凋亡,用 NF-kB抑制剂阻断其通路,细胞凋亡增加^[20]。

此外,细胞内在特性也影响肿瘤细胞对放疗的敏感性。Allan认为,放疗是否容易诱发肿瘤细胞凋亡,与肿瘤细胞所处的细胞周期密切相关。对细胞周期的研究发现,凋亡主要发生在 S期,因此射线和细胞毒药物均不能使大多数成熟细胞死亡^[21]。研究还发现放射反应与细胞自发性凋亡本底有关。淋巴细胞在受到 X射线照射后,其胞质中的 Ca²⁺浓度升高,但脾细胞胞质中的 Ca²⁺浓度却不升高;大鼠胸腺细胞 X射线照射后 Ca²⁺浓度上升是短暂的,发生于辐照以后的 2小时之内,此时染色质的片段化已经非常明显,但 Ca²⁺浓度很快会恢复到正常水平。临床上某些放疗敏感肿瘤如淋巴瘤、鼻咽癌等常具有较高本底水平,推测这种自发性凋亡水平是由细胞内各种基因调控以及不同信号转导途径综合作用的结果,从而决定细胞本身对放疗的敏感程度^[22]。也许还有一种可能,即细

胞内存在着类似于细胞周期的关卡机制,细胞凋亡的调控信号转导系统最终要通过对关卡的调控发挥作用。各种不同细胞系的细胞凋亡关卡及其阈值有差异,因此对细胞外同一信号分子的反应也就不同,导致肿瘤细胞对放疗或敏感或耐受^[23]。

显而易见,诱导细胞凋亡的调控机制是多方面的,许多问题亟待解决。随着对肿瘤和肿瘤耐放疗的分子生物学机理逐渐深入的探讨和了解,同时采用包括免疫治疗、基因治疗在内的多种肿瘤治疗手段的综合运用,对于提高临床肿瘤放射治疗的效果及肿瘤患者的预后具有十分重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Frankfurt QS et al. *Int J Cancer*, 1994; 59: 217
- 2 Arndt J. *Cell*, 1997; 88: 323
- 3 Lowe SW et al. *Science*, 1994; 266: 807
- 4 Chang EH et al. *Arch Otolaryngol Head Neck*

- Surg*, 1997; 123: 507
 - 5 Kyprianou N et al. *Anticancer Res*, 1998; 18 (2A): 897
 - 6 Safran H et al. *Cancer*, 1996; 78: 1203
 - 7 Yang E et al. *Blood*, 1996; 88: 386
 - 8 Reed JC et al. *Semin Hematol*, 1997; 34: 9
 - 9 Weller M et al. *J Clin Invest*, 1996; 95: 2633
 - 10 Zhan Q et al. *Oncogene*, 1996; 13: 2287
 - 11 黄 海等. *中华肿瘤杂志*, 1998; 20: 245
 - 12 Hermeking H et al. *Science*, 1994; 265: 2091
 - 13 Mothersill C et al. *Radiat Res*, 1997; 147: 156
 - 14 Bedi A et al. *Blood*, 1995; 86: 1148
 - 15 Ishii H et al. *Am J Hematol*, 1997; 55: 46
 - 16 Su IJ et al. *Br J Hematol*, 1993; 85: 826
 - 17 Blagosklonny MV et al. *Cancer Res*, 1996; 56: 1851
 - 18 Michael JM et al. *Cancer Res*, 1997; 57: 3600
 - 19 Butterfield L et al. *J Biol Chem*, 1997; 272: 10110
 - 20 Wan CY et al. *Science*, 1996; 274: 784
 - 21 Allan DJ et al. *Int J Radiat Biol*, 1992; 62: 145
 - 22 Russell J et al. *Cancer Res*, 1995; 55: 4915
 - 23 Oltvai ZN et al. *Cell*, 1994; 79: 189
- (收稿日期: 1998-10-13)

基因组不稳定性与辐射致癌的分子机理

中国医学科学院 放射医学研究所(天津, 300192) 穆传杰 周继文综述 王继先审核
中国协和医科大学

摘 要: 简要论述辐射诱发基因组不稳定性的形成及癌变的基本过程,影响基因组不稳定性及癌变的主要分子机制,如 DNA 修复机制、细胞周期进程调控机制、抑癌基因及原癌基因突变与基因组不稳定性形成及癌变的关系。

关键词: 基因组不稳定性 辐射致癌

基因组稳定性保证细胞过程的平衡及遗传的连续性。当自发或诱发细胞 DNA 突变或基因组不稳定性时,正常细胞过程失去平衡,并导致严重的生物学后果。目前认为,能使细胞获得高于正常情况下积累的稳定性突变的任何一种状态均称为基因组不稳定性,既可表现在基因水平上,也可表现在染色体或细胞水平上,最终使细胞内稳定性突变不断积累而导致癌变。因此,基因组不稳定性

是癌变过程的早期阶段,而癌症则是基因组不稳定性延续的表型表现。

1 基因组不稳定性的形成及癌变的基本过程^[1-2]

当正常细胞受照射时,电离辐射的能量沉积在基因组 DNA 上,形成局部多部位损伤,产生多种类型的 DNA 损伤,包括单链和双链断裂、碱基及核糖的损伤,此外由于自由