

apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants [J]. *Cancer Res*, 1998, 58: 4940~4946

[18] Cai Z, Bettaieb A, Mahdani NET, et al. Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated

with resistance of human breast carcinoma MCF7 cells to tumor necrosis factor α -mediated cytotoxicity [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 6918~6926.

Ceramide and apoptosis induced by radiation

LI Lin, SHI Jan-hui

(*Institute of Radiation Medicine, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China*)

Abstract Ceramide as an important member of sphingolipid is a second messenger responsible for regulating cellular activities, whose major function is to transmit growth-inhibiting signals including apoptotic. It has been proven by a lot of experimental facts that the changes of the functions at different levels of ceramide signaling pathway directly affect cellular drug sensitivity and radiation sensitivity. In addition, the defective functions of ceramide signaling path in tumor cells may result in the decrease of their drug sensitivity and radiation sensitivity.

Key words ceramide; cellular apoptosis; radiation sensitivity

文章编号: 1001-98X(2000) 02-0089-04

放射抑制再狭窄的细胞及分子机制

仁晓庆

(上海第二医科大学附属仁济医院核医学科, 上海 200001)

摘要: 放射抑制再狭窄的机制是多方面的, 它既可诱导血管平滑肌细胞有丝分裂周期阻滞, 抑制平滑肌细胞分裂及增殖, 又可直接诱导平滑肌细胞凋亡, 还可抑制单核/巨噬细胞及各种生长因子, 阻止再狭窄过程的起始因素。血管内放射导致细胞死亡的主要形式为凋亡, 电离辐射预防再狭窄的主要机制是平滑肌细胞的增殖抑制。

关键词: 电离辐射; 基因调控; 细胞凋亡; 细胞周期阻滞

中图分类号: Q274

文献标识码: A

血管再狭窄是局部血管损伤后的一种修复反应, 是多种细胞因子和生长因子介导的局部血管重建和再塑, 是血管平滑肌细胞迁移、增殖、凋亡及细胞外基质分泌和堆积的结果, 是多种细胞及分子表达共同引起的血管功能与结构的改变^[1]。血管再狭窄严重影响血管成形术后的长期疗效, 因此对再狭窄机制及防治的研究是目前最基本的研究领域。血管内放射治疗预防再狭窄已放射出热情与希望^[2], 许多研究证实了放射预防再狭窄的有效性与可行性^[3, 4]。

1 电离辐射诱导平滑肌细胞周期阻滞, 抑制平滑肌细胞迁移及增殖

临床及实验均证实, 再狭窄过程虽涉及多种因素, 但最重要的原因是由于中膜平滑肌细胞迁移至内膜并迅速增殖所致^[3]。平滑肌细胞在受到机械性刺激及各种细胞因子和生长因子的作用下出现分裂与增殖, 产生细胞外基质, 最终导致内膜增厚及再狭窄的形成。因此, 平滑肌细胞的分裂增殖是再狭窄的关键所在。辐射的重要作用是诱导平滑肌细胞周期阻滞, 损伤平滑肌细胞分裂增殖能力, 从而抑制再狭窄过程中的内膜增生^[4]。

虽然电离辐射抑制平滑肌细胞分裂增殖已得到证实, 但对其抑制增殖的分子基础尚不清楚。有关辐射诱导细胞周期阻滞, 抑制细胞增殖的机制基于对成纤维细胞、上皮细胞及胸腺细胞的作用观察

收稿日期: 1999-03-12

作者简介: 任晓庆 (1963-), 男, 山东菏泽人, 上海第二医科大学附属仁济医院核医学科主治医师, 博士研究生, 主要从事放射抑制再狭窄方面的研究。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970221)

审校者: ① 上海第二医科大学附属仁济医院核医学科 黄定九

② 上海第二医科大学附属仁济医院核医学科 黄钢

Kastan等^[5]首先发现 γ 射线诱导的细胞周期 G_1 期阻滞伴有野生型p53蛋白核内堆积,并且证实p53基因状态(即野生型及突变型)与辐射诱导的 G_1 期阻滞密切相关,从而提示p53蛋白在辐射诱导的细胞周期分裂受抑过程中起重要作用。Linke等^[6]在研究p53基因状态与 γ 射线引起细胞周期改变的关系中发现:p53功能正常的人成纤维细胞和上皮细胞(p53细胞),经辐射后即停滞于 G_0/G_1 期,即使有少数细胞逃脱 G_0/G_1 期进入S期,但仍可被阻滞于随后的周期阶段;而p53功能失活细胞(p53细胞),不管辐射剂量如何,都可逃脱 G_0/G_1 期限滞进入S期,仍存在明显的复制增殖能力,结果证实辐射所引起的细胞周期阻滞是通过p53的表达而实现的。p53蛋白是DNA损伤诱导细胞分裂阻滞的重要生物调节分子^[7]。

p53蛋白诱导细胞周期阻滞是通过其调节下游基因实现的^[8]。当细胞受到电离辐射而致DNA损伤后,p53基因被激活,p53蛋白水平急剧升高,半寿期延长。p53蛋白再与其下游效应基因如CIP1/WAF1 Gadd45及MDM2等靶序列结合,从而激活这些基因的转录,使其mRNA和蛋白水平均升高,进而调节细胞周期进展,抑制细胞分裂增殖。

CIP1/WAF1基因的表达产物为p21蛋白,它是控制细胞分裂的开关。在正常细胞,p21蛋白与增殖细胞核抗原(PCNA)、细胞周期素(cyclin)及细胞周期素依赖蛋白激酶(CDK)以四聚体形式存在,且CDK的活性取决于四聚体中p21蛋白的含量。当p21表达增加时,双分子的p21蛋白结合至cyclin及CDK,抑制CDK活性,使cyclin-CDK不能磷酸化视网膜母细胞瘤基因(Rb),阻碍E2F的释放,使与DNA合成相关基因如胸腺嘧啶核苷激酶(TK)、cyclinA、cyclinE、四氢叶酸还原酶(FH2)、PCNA等基因不能表达,从而阻止DNA合成和细胞分裂,导致细胞 G_1 期阻滞^[9]。此外,p21蛋白还可通过C端区直接结合PCNA,阻止DNA复制,抑制细胞分裂增殖。

Gadd45抑制细胞分裂的机制是其与PCNA结合,抑制DNA复制合成,阻止细胞进入分裂周期^[10];也有人认为Gadd45是通过与p21相互作用来调控细胞周期,从而抑制细胞增殖^[11]。

MDM2最初是作为结合p53蛋白的癌基因产物被发现的。p53蛋白通过结合于MDM2第一内含子区的p53蛋白共有序列而调节MDM2的转录;反

过来,MDM2通过结合p53蛋白的氨基酸末端来阻止p53的转录激活功能,形成负反馈环。因此,认为MDM2的正常功能是限制细胞周期阻滞时间,使DNA损伤修复后的细胞进入细胞周期进行增殖^[12]。

此外,p53蛋白还可通过其他方式调控细胞周期,抑制细胞增殖^[13]。与C-fos、C-jun、Rb、PCNA、TFIID等基因的TATA盒结合,抑制这些基因的启动子活性;抑制复制蛋白A(RPA)与单链DNA结合,阻断起始复制;直接结合E2F,封闭其功能位点,从而抑制DNA前体合成,阻断细胞由 G_1 期过渡到S期,与细胞调控因子CGR11、CGR19共同参与调控细胞周期。

电离辐射引起DNA损伤后,细胞发生分裂阻滞具有重要的生物学意义。一般认为细胞周期阻滞是机体对外界刺激的一种保护性反应。DNA损伤,当然包括电离辐射所致损伤,是生物体经常存在的。当DNA损伤后,细胞发生周期阻滞(多发生于 G_1 期阻滞),细胞分裂受抑或停止,可提供充分的时间来促使受损DNA得以修复,并以凋亡方式除掉DNA受损严重的细胞,从而保证基因组的遗传稳定性。

2 电离辐射诱导血管平滑肌细胞凋亡

电离辐射导致DNA分子损伤,包括碱基的破坏或脱落、嘧啶二聚体的形成、单链或双链断裂、DNA相互交联或与蛋白质交联,严重的DNA损伤可致DNA降解、核裂解及细胞死亡。目前认为,电离辐射诱发的细胞死亡有两种不同形式,一是细胞坏死,这种死亡细胞破碎,细胞器膨胀,细胞内含物外溢,并伴有炎症反应;另一种是细胞凋亡,表现为胞浆浓缩,染色质固缩,胞浆内形成凋亡小体,细胞DNA被核酸酶降解形成180~200bp不同倍数的核酸片段。在细胞凋亡过程中,不会有溶酶体破裂和细胞内含物外溢,不引起炎症反应。凋亡细胞最后形成多个凋亡小体,为临近巨噬细胞所吞噬。这种细胞死亡是有序的,故亦称为程序性细胞死亡。大量研究表明,电离辐射导致的细胞死亡多数为后一类死亡,即细胞凋亡。仅在大剂量电离辐射条件下才可导致细胞坏死性死亡。辐射除能直接引起DNA损伤促使凋亡发生外,还可间接电离水分子,产生过氧化氢等自由基,而自由基则是细胞凋亡的强诱导剂^[4]。

许多实验研究表明,电离辐射可引起机体多种

组织细胞,包括正常细胞及肿瘤细胞的凋亡。最近的实验证实^[15],^[32]能够诱发体外培养平滑肌细胞的凋亡。因此,电离辐射不仅能够抑制平滑肌细胞的分裂增殖,而且能够诱导平滑肌细胞凋亡。电离辐射在预防再狭窄过程中,诱导血管平滑肌细胞凋亡可能是其重要机制。

电离辐射诱导细胞凋亡的机制复杂。Lowe SW等(1993年)在应用电离辐射诱导细胞凋亡的过程中,观察到p53基因表达显著增强。不同剂量的γ射线诱发的细胞凋亡,其表达的p53蛋白水平也相应不同^[16],电离辐射使正常小鼠(p53^{+/+})小肠隐窝细胞p53蛋白含量增加,凋亡比例也增加,而p53^{-/-}小鼠小肠隐窝细胞则表现出对射线的耐受性^[17]。用基因剔除法证实,p53缺失鼠的造血细胞及成纤维细胞对射线耐受性的原因是因为其不能发生细胞凋亡^[18]。上述实验证明,p53基因在辐射诱导的细胞凋亡过程中发挥着关键作用。

Bcl-2/Bax基因在细胞凋亡调节中起重要作用。Bcl-2基因是一种凋亡抑制基因,可以抑制多种因素包括辐射诱导的凋亡,故也称为存活基因;Bax基因则是一种凋亡促进基因,导入Bax基因则可加速细胞凋亡,Bax基因突变可以抑制凋亡。一般认为,Bcl-2/Bax比例决定细胞是否凋亡^[19]。在正常情况下,Bcl-2/Bax保持一定比例,并以Bcl-2/Bax异源二聚体形式存在。当Bcl-2增加时,Bcl-2/Bax比例增加,Bcl-2同源二聚体升高,细胞则趋于存活;而Bax增加,Bcl-2/Bax比例下降,Bax同源二聚体升高,细胞则趋于死亡。电离辐射引起DNA分子损伤,激活的p53蛋白发挥转录子作用,从而激活Bax基因,使Bax mRNA表达和蛋白水平均升高,形成Bax同源二聚体,且降低Bcl-2/Bax比例,从而诱导细胞凋亡。

Fas系统与细胞凋亡也存在明确关系。研究表明,射线照射诱发小鼠胸腺细胞及脾脏T_H1细胞凋亡研究中,Fas表达明显升高的小鼠细胞凋亡率也明显升高。而且首先是Fas表达升高,而后出现细胞明显凋亡,表明了辐射出现Fas介导的细胞凋亡^[20]。Fas系统调节细胞凋亡的机制及过程为^[21]:电离辐射导致DNA损伤,从而激活Fas系统表达;Fas及FasL结合启动凋亡信号并传递,通过神经鞘磷脂酶的活化,使神经鞘磷脂分解,产生神经酰胺,从而激活一系列神经酰胺依赖性蛋白激酶,启动胞内磷酸化过程,最终导致DNA降解及细胞凋亡。

细胞周期阻滞与凋亡有关。当细胞受射线作用后,首先发生细胞周期阻滞,并从阻滞退出的过程中发生凋亡,也可以说细胞凋亡是细胞周期阻滞的结果。CDK2基因编码的p34激酶活化是细胞分裂增殖信号,电离辐射及p53基因的过量表达都可使p34蛋白上的Tyr快速磷酸化而诱发细胞凋亡。C-Myc可诱导细胞凋亡,它首先和Max结合形成异二聚体Myc-Max,再和DNA结合控制诱导凋亡所需要的转录而对凋亡进行调控。电离辐射还可以诱发raf-cym-ras等癌基因的过量表达而导致凋亡失控^[22]。

3 电离辐射抑制巨噬细胞及多种生长因子

血管成型术的早期阶段,由于内皮细胞损伤,胶原暴露,血小板粘附,产生单核细胞趋化因子(MCP),促进单核巨噬细胞的粘附及向内膜下浸润;浸润及活化的巨噬细胞自身合成及分泌多种细胞因子、生长因子及趋化因子,包括血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子β(TGFβ)、肿瘤坏死因子α(TNFα)、白细胞介素-1(IL-1)等。这些因子不但引起局部的炎症反应,更重要的是促使中膜血管平滑肌细胞的内膜下迁移及增殖,启动了再狭窄过程。因此,单核巨噬细胞系统及各种因子是血管成型术后内膜增生过程中的关键因素。

Rubin等^[23]认为,放射抑制再狭窄的机制是电离辐射损伤了单核巨噬细胞及其分泌的多种因子,抑制了再狭窄的启动因素。他们应用球囊导管建立大鼠颈动脉内膜损伤模型,损伤后立即放置¹⁹²I放射源进行血管内放射,应用CD11b Mac-1 anti-PDGFα-Actin免疫组化染色,观察血管壁组织切片中巨噬细胞、PDGF的分布及平滑肌细胞的增殖状态。结果表明,血管内照射后巨噬细胞数量明显减少,PDGF表达减少,血管平滑肌细胞增殖受抑制;但晚期随着巨噬细胞的回复,可再出现内膜肥厚。结果强调了辐射抑制再狭窄的关键是抑制了单核巨噬细胞及其分泌的因子。

参考文献:

- [1] Fajardo LF. The nature of arterial restenosis after angioplasty [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1998, 40: 761~763.
- [2] Van der Giessen WJ, Serruys PW. β-particle-emitting stents radiate enthusiasm in the search for effective prevention of restenosis [J]. *Circulation*, 1996, 94

- 2358~ 2360.
- [3] Verin V, Urban P, Popowski Y, et al. Feasibility of intracoronary β -irradiation to reduce restenosis after balloon angioplasty: a clinical pilot study [J]. *Circulation*, 1997, 95: 1138~ 1144.
- [4] Laird JR, Carter AJ, Kufs WM, et al. Inhibition of neointimal proliferation with low-dose irradiation from a β -particle-emitting stent [J]. *Circulation*, 1996, 93: 529~ 536.
- [5] Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage [J]. *Cancer Res*, 1991, 51: 6304~ 6311.
- [6] Linke SP, Clarkin KC, Wahl GM. p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to γ -irradiation [J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 1171~ 1179.
- [7] Gadbois DM, Crissman HA, Nastasi A, et al. Alterations in the progression of cells through the cell cycle after exposure to alpha particles or gamma rays [J]. *Radiat Res*, 1996, 146: 414~ 424.
- [8] Gadbois DM, Bradbury EM, Lehnert BE. Control of radiation-induced G₁ arrest by cell-substratum interactions [J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 1151~ 1156.
- [9] Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, et al. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G₁ arrest [J]. *Cell*, 1994, 76: 1013~ 1023.
- [10] Smith ML, Chen IT, Zhan Q, et al. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen [J]. *Science*, 1994, 266: 1376~ 1380.
- [11] Kearsey JM, Coates PJ, Prescott AR, et al. Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with P21 cipl [J]. *Oncogene*, 1995, 11: 1675~ 1683.
- [12] Chen CY, Oliner JD, Zhan Q, et al. Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 2684~ 2688.
- [13] Madden SL, Galella EA, Riley D, et al. Induction of cell growth regulatory gene by p53 [J]. *Cancer Res*, 1996, 56: 5384~ 5390.
- [14] Li PF, Dietz R, Harsdorf RV. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 1997, 96: 3602~ 3610.
- [15] Mao JL, Xu YJ, Huang DJ, et al. Experimental study of apoptosis of SMC in vitro by H_2O_2 with balloon catheter [J]. *JSSMU*, 1998, 10: 52~ 55.
- [16] Stephens LC, Ang KK, Schultheiss TE, et al. Apoptosis in irradiated murine tumors [J]. *Radiat Res*, 1991, 127: 308~ 316.
- [17] Merritt AJ, Potten CS, Kemp CJ, et al. The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice [J]. *Cancer Res*, 1994, 54: 614~ 617.
- [18] Wang L, Cui Y, Lord BI, et al. Gamma-ray-induced cell killing and chromosome abnormalities in the bone marrow of p53-deficient mice [J]. *Radiat Res*, 1996, 146: 259~ 266.
- [19] Elizabeth Y, Yang E, Korsmeyer SJ, et al. Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death [J]. *Blood*, 1996, 88: 386~ 401.
- [20] Olive PL, Durand RE. Apoptosis: an indicator of radiosensitivity in vitro? *Int J Radiat Biol*, 1997, 71: 695~ 707.
- [21] Chmura SJ, Nodzenski E, Beckett MA, et al. Loss of ceramide production confers resistance to radiation-induced apoptosis [J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 1270~ 1275.
- [22] Mayo MW, Wang CY, Cogswell PC, et al. Requirement of NF- κ B activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras [J]. *Science*, 1997, 278: 1812~ 1815.
- [23] Rubin P, Williams JP, Riggs PN, et al. Cellular and molecular mechanisms of inhibition of restenosis. part I: role of the macrophage and PDGF [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1998, 40: 929~ 941.

Cellular and Molecular mechanisms of radiation for the inhibition of restenosis

REN Xiao-qing

(Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai, 200001, China)

Abstract The prevention of restenosis by radiation exists a lot of mechanisms, including smooth muscle cells (SMCs) division cycles arrests, inhibition of SMCs proliferation, SMCs apoptosis, inhibition of macrophage/monocyte and cytokines. Apoptosis is a major style of cell death induced by endovascular radiation. The inhibition of SMCs proliferation induced by radiation is a main mechanism for prevention of restenosis.

Key Words radiation; gene regulation; apoptosis; cell cycles arrest