

- [10] Dinkel A, Aicher W, Haas C, et al. Transcription factor Egr-1 activity down-regulates Fas and CD23 expression in B cells[J]. *J Imm-unol*, 1997, 159(6): 2678-2684.
- [11] Li-Weber M, Laur O, Krammer PH. Novel Egr/NF-AT composite sites mediate activation of the CD95 (APO-1/Fas)ligand promoter in response to T cell stimulation [J]. *Eur J Immunol*, 1999, 29(9): 3017-3027.
- [12] Huang RP, Fan Y, de Belle I, et al. Egr-1 inhibits apoptosis during the UV response: correlation of cell survival with Egr-1 phosphorylation[J]. *Cell Death Differ*, 1998, 5(1): 96-106.
- [13] Weichselbaum RR, Hallahan DE, Beckett MA, et al. Gene therapy targeted by radiation preferentially radiosensitizes tumor cells[J]. *Cancer Res*, 1994, 54(16): 4266-4269.
- [14] Weichselbaum RR, Hallahan DE, Sukhatme VP, et al. Gene therapy targeted by ionizing radiation[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1992, 24(3): 565-567.
- [15] Seung LP, Mauceri HJ, Beckett MA, et al. Genetic radiotherapy overcomes tumor resistance to cytotoxic agents [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(23): 5561-5565.
- [16] Kawashita Y, Ohtsuru A, Kaneda Y, et al. Regression of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo by radiosensitizing suicide gene therapy under the inducible and spatial control of radiation[J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(9): 1509-1519.
- [17] Takahashi T, Namiki Y, Ohno T. Induction of the suicide HSV-TK gene by activation of the Egr-1 promoter with radioisotopes[J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(7): 827-833.

文章编号: 1001-098X(2002)02-0079-05

p53在调节细胞周期阻滞和细胞凋亡中的作用及其机制

杜 华

摘要: p53作为抑癌基因,在各种应激情况下(包括电离辐射所致DNA损伤、核苷酸缺失、低氧或癌基因激活)调控细胞周期进程和细胞凋亡过程。本文综述了p53及其下游分子在细胞周期和细胞凋亡中的作用,在此基础上探讨p53在选择细胞周期阻滞和细胞凋亡中的影响因素。

关键词: p53; 细胞周期; 细胞凋亡

中图分类号: Q756 **文献标识码:** A

The regulating mechanism of p53 during cell cycle arrest and apoptosis

DU Hua

(Laboratory of Nuclear Analysis Techniques, Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: p53, acting as a tumour suppressor gene, regulates the system of cell cycle and apoptosis when cells confront a variety of stress including DNA damage responding to ionizing radiation, nucleotide depletion, hypoxia or oncogene activation. In this article, the role and targets of p53 during cell cycle and apoptosis are reviewed. On the basis of it, we question factors of the decision to undergo growth arrest versus apoptosis in response to p53 expression.

Key words: p53; cell cycle; apoptosis

p53是第一个被证实的肿瘤抑制基因,其产物

p53蛋白存在于正常细胞内,但由于半衰期短(20~30 min)且极不稳定,因而在非应激细胞内几乎检测不到^[1,2]。p53参与细胞生长、分化与死亡,与肿瘤的发生、发展密切相关,是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的基因之一。

收稿日期: 2002-02-07

作者简介: 杜华(1976-),女,安徽合肥人,第一军医大学热卫系放射医学教研室(广州,510515)硕士研究生,主要从事放射生物学研究

审校者: 第一军医大学热卫系放射医学教研室 丁振华

1 p53 与细胞周期

细胞周期包括 S 期、M 期两个主要事件及 G₁、G₂ 两个间隔期。细胞对 DNA 损伤作用的反应是激活细胞周期“检查点”(checkpoint)。至少有两个 checkpoint 监测 DNA 损伤: G₁ 期 checkpoint, 决定 G₁/S 期转换; G₂ 期 checkpoint, 决定 G₂/M 期转换。G₁ 期 checkpoint 阻止受损 DNA 进行复制, 而损伤的或不完全复制的 DNA 抑制 G₂ 期 checkpoint 进入有丝分裂。因此, G₁ 期阻滞被认为是 DNA 复制之前为细胞的损伤修复争取时间, 从而避免基因损害遗传给子代细胞; G₂ 期阻滞则可保证细胞有丝分裂过程中遗传物质分配的忠实性。DNA 损伤若被修复, 细胞周期恢复正常; 如果损伤严重, 细胞将经历凋亡。有作者认为, DNA 损伤诱导的 G₁ 期阻滞是一种保护性反应而不支持辐射所致 G₁ 期阻滞提供时间给受损 DNA 进行修复^[1]。

细胞中依赖 p53 的周期阻滞是细胞对刺激的重要反应。G₁ 期阻滞是 p53 表达对辐照后细胞周期 checkpoint 激活主要反应, 它依赖 p53 的状态即野生型 p53。对人纤维母细胞的反应的研究发现, 受辐照的细胞经历了依赖野生型 p53 的 G₁ 期阻滞, 在以后的 G₂ 期中不发生阻滞; 如果受辐照于 G₂ 期的野生型 p53 细胞, 由于越过 G₁ 期, 在以后的 G₁ 期中也不发生阻滞; 而且在这些细胞系中不发生辐射诱导的凋亡。这些结果显示: G₁ 期阻滞优先于随后的 G₂ 期阻滞; 同时, 两个 checkpoint 可能有相关性, 也许通过一个控制系统依据损伤的程度来决定是否去阻止细胞周期进程而进行下一步的修复, p53 可能在这一控制系统中是起决定性的成分。

1.1 p53 诱导 G₁ 期的阻滞

p53^{-/-} 的鼠胚纤维母细胞在受辐照后不发生 G₁ 期阻滞, 证实 DNA 损伤后 p53 在辐射诱导 G₁ 期阻滞中起重要作用。p53 基因突变导致 G₁ 期阻滞丧失, 不利于 DNA 损伤的修复和损伤细胞的去除, 导致基因组的不稳定性, 成为辐射致癌原因之一。

p53 通过调节其下游效应基因 CIP/WAF1、GADD45 和 MDM2 的转录而实现其调节辐射所致 G₁ 期阻滞的功能。这些下游基因都含有 p53 蛋白的共有序列。

CIP1/WAF1 表达的产物为 p21 蛋白。目前认为, p21 的表达是引起 G₁ 期阻滞的直接原因。p21

与周期蛋白 (cyclin) 家族、周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 家族、增殖细胞核抗原 (PCNA, 一种 DNA 复制和核酸切除修复必需的蛋白质) 构成复合物, 抑制复合物中的激酶活性, 引起其底物视网膜肿瘤蛋白 (RB) 的去磷酸化, 阻止转录因子 E2F 释放, 使参与细胞增殖有关蛋白如 cyclin A、cyclin E、PCNA 等不能表达, 阻止细胞从 G₁ 期进入 S 期, 导致 G₁ 期阻滞。

GADD45 的表达产物 Gadd45 可与 PCNA 结合, 从而抑制 DNA 合成, 阻止细胞进入 S 期。

MDM2 是细胞内调节 p53 浓度及活性的重要分子, 其表达产物 Mdm2 为 p53 特异性 E3-泛素蛋白连接酶, 可介导 p53 发生泛素化蛋白水解, 引起 p53 降解^[2]。MDM2 通过“负反馈”限制 G₁ 期阻滞的时间, 使 DNA 损伤修复后的细胞再进入细胞周期。

p53 除了通过以上基因调节 G₁ 期阻滞, 相关研究证实, 野生型 p53 还可通过其他方式参与 G₁ 期向 S 期过渡, 调控介导 G₁ 期阻滞。它与 c-fos、c-jun、RB、PCNA、组织因子 (TFIID) 等效应分子的结合抑制这些基因启动子活性; 它作用于复制蛋白 A (RPA), 抑制 RPA 与单链 DNA 结合, 从而停止起始复制。此外, p53 的增多可直接与 E2F 结合, 封闭其功能位点, 诱导 G₁ 期阻滞。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^[3]。p53 依赖的辐射诱导基因 WIP1 作为 p53 的又一效应分子, 具有蛋白磷酸酶活性, 通过调控其他分子的磷酸化状态在 G₁ 期阻滞中发挥作用。

1.2 p53 诱导 G₂ 期阻滞

近来, p53 在 G₂/M 期转换中的重要性日益受到重视。一些 p53 靶基因被证实诱导了 G₂ 期阻滞。在 p53 调控的 G₂/M 期转换机制中, cdc2 对于进入有丝分裂期是必不可少的, 与 cyclin B1 的结合及通过 CAK (CDK activating kinase) 的磷酸化均可使 cdc2 激活。cdc2 同时被 p53 的三个转录靶分子 p21、14-3-3 δ 、Gadd45 抑制。p21, 控制细胞分裂的开关, 能直接抑制 cdc2; 14-3-3 δ , 与 cdc2 在细胞质中锚定, 不能诱导有丝分裂; Gadd45, 使 cdc2 与 cyclin B1 分离, 而 cdc2 的激活需要结合 cyclin B1。p53 对 cyclin B1 也有抑制作用^[4]。p53 对 cyclin B1 和 cdc2 的抑制使 G₂ 期发生了阻滞。

当然, p53 还可通过其他不影响 cdc2 的靶基因引起 G₂ 期阻滞。B99 和 MCG10 都是通过非依赖

cdc2引起G₂期阻滞。p53的过表达能诱导B99,同时,在DNA损伤情况下可通过依赖p53方式上调B99。B99中的一个区域与微管相关蛋白(MAP4)同源,考虑B99所引起的G₂期阻滞可能是干扰了进入有丝分裂过程所必需的微管重排。B99过表达也能够在p53⁻细胞中诱导G₂/M期阻滞。MCG10只能在表达野生型p53的细胞中诱导G₂/M期阻滞。MCG10与RNA结合蛋白有同源性,而RNA结合蛋白具有基因表达调控的相关功能,其RNA结合区在抑制增殖中起作用,可与RNA结合。此外,topoisomerase II对G₂/M期转换也是非常重要的,但它不直接影响cdc2。Topoisomerase II是调节染色质形态的重要酶,在G₂/M期转换中它使比较有规则的紧束状态的染色质形成高度压缩的有丝分裂染色体。p53对topoisomerase II基因的抑制阻止进入有丝分裂期,加强了G₂期阻滞。以上这些基因都参与细胞G₂期阻滞,但它们所引发的细胞周期阻滞的机制尚不清楚^[9]。

Reprimo,一种新发现的位于细胞质内的糖基化蛋白,在细胞质中占有优势。它通过抑制cdc2活性和cdc2-cyclin B1复合物向细胞核内易位,从而诱导G₂期阻滞。在细胞质中;reprimo的过表达引起的细胞周期的阻滞包含了cdc2的灭活、酪氨酸高度磷酸化,但没有观察到reprimo结合到cyclin B1或cdc2,它的活动机制仍不清。

2 p53与细胞凋亡

细胞凋亡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电离辐射、高温、皮质激素、化疗药物等诱导产生。p53在辐射诱导的凋亡中起着重要作用。对小鼠胸腺细胞的照射实验证实,p53对某些细胞的凋亡是必需的,具有野生型p53基因的胸腺细胞对辐射非常敏感,不到1Gy的剂量即可诱导凋亡;而p53⁻小鼠即使受高达7~20Gy照射,也未诱导其胸腺细胞发生显著的凋亡^[9]。

p53在不同组织中诱导细胞凋亡的机制不尽相同。多项实验提出了与p53依赖介导细胞凋亡的相关结论。实验表明,辐照小鼠的脾、胸腺、成骨细胞可大量表达p53蛋白,但肝细胞未能检测到该蛋白表达;当胸腺、脾细胞发生p53介导的凋亡时,成骨细胞却未发生^[9]。另有证据显示,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,例如p53激活可抑制微管相关蛋白(MAP4)的表达,这种下降作用可被p53抑制剂如腺病毒E1B-19K蛋白等阻断,而MAP4过表达可明显抑制p53诱导的凋亡^[3]。

p53介导细胞凋亡的下游靶分子主要有Bcl-2家族、IGF-BP3(Insulin like growth factor-binding protein-3)、p53诱导基因PIGs(p53 induced genes)三种。IGF-BP3能与IGF-1结合阻止存活信号。PIGs通过基因表达序列分析而被确认,但它们大多数的功能仍不清楚。此外,一些其他p53靶基因如PAG608、p85等也参与了依赖p53的凋亡,但其活动机制仍需阐明^[10]。近来,p53的下游靶分子介导的凋亡机制正被阐明,Bcl-2家族成员Bax和死亡受体Fas/Apo1是最早发现的p53诱导凋亡的介导者,同时两者是p53激活caspase级联的两条主要通路(见图1)。

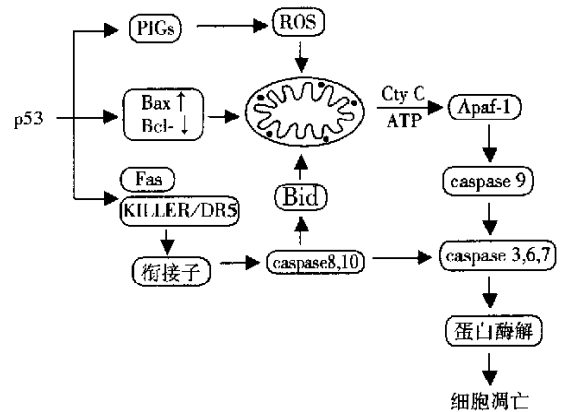


图1 p53介导的凋亡反应模式

2.1 线粒体凋亡通路

p53在Bcl-2家族作用下通过线粒体调控凋亡。Bcl-2家族可以分为两大组:抑制细胞凋亡的有Bcl-2、Bcl-xl、Mcl-1、Bag-1、Bfl-1、Bag-1和Bcl-w;促进细胞凋亡的有Bax、Bad、Bcl-xs、Bak、Bid和Bim。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。电离辐射激活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-xs、Bax、Bcl-2三者和Bcl-xl、Bax、Bad三者分别形成两个凋亡系统:Bcl-2、Bcl-xl通过与Bax形成异

源二聚体抑制凋亡, Bcl-xs、Bad 则通过与 Bcl-2、Bcl-xl 结合置换 Bax, 使 Bax 游离形成同源二聚体启动凋亡。因此, Bcl-2/Bax, Bcl-xl/Bax 的比例决定细胞是否进入凋亡。p53 主要是诱导 Bax 及抑制 Bcl-2, Bax 的诱导和 Bcl-2 的抑制导致线粒体中细胞色素 C(Cyt C)的释放和胞质中 ATP 的释放, 两者一道结合到 Apaf1 后激活 caspase9, 被激活的 caspase9 裂解下游效应蛋白酶 caspase3, 凋亡出现。Bcl-2 和 Bcl-xl 抑制凋亡的部分原因是阻断了 Cyt C 从线粒体的释放, Cyt C 是凋亡蛋白酶 caspase9 激活的关键^[1,9]。

此外还有一种模式, p53 促进氧化应激相关基因表达, 表达产物产生活性氧种 (reactive oxygen species, ROS)等, ROS 导致线粒体释放 Cyt C, 凋亡起始因子最终激活 caspase 导致细胞凋亡。PIGs 基因就是通过 ROS 的产物来诱导凋亡。

2.2 死亡受体凋亡通路

Fas/Apo1 属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族, 是细胞膜上的糖基化穿膜蛋白, 一种细胞表面受体。Fas 诱导细胞凋亡无需细胞核存在, 故无新基因表达, 而是存在细胞质中的含有“死亡效应结构域”的胞内衔接蛋白 FADD 的作用, 从而激活 caspase8, 导致凋亡。另一类 TNFR 家族成员 KILLER/DR5, 它也作为依赖 p53 细胞凋亡的介导体。人类细胞中有四种 TNF 相关诱导凋亡配基(TRAIL), 两个凋亡受体包含了死亡区域: KILLER/DR5 和 DR4; 两个抗凋亡受体为 RRID 和 TRUNDD。其中, 只有 KILLER/DR5 和 DR4 过表达诱导大量凋亡, 激活下游 caspase 级联反应。KILLER/DR5 显示在 p53 表达条件下只出现凋亡而无阻滞^[1]。

p53 诱导死亡配体 Fas/Apo1 和 KILLER/DR5 组成三聚体结合到它们各自的配基, 募集各自的衔接子(如 FADD 等)和起始 caspase8、10 结合到胞质的死亡区。这些起始 caspase 激活的导致下游效应 caspase 的裂解, 开始细胞凋亡的一切活动。起始 caspase 还可直接或间接作用于线粒体, 使凋亡信号放大。如 Bcl-2 家族中的 Bid 可被活化的 caspase8 裂解而获得活性, 易位到线粒体表面诱导 CytC 的释放, 启动凋亡进程。

3 生长阻滞还是细胞凋亡

受到外界的因素刺激后, p53 蛋白被表达的结

果是细胞周期阻滞还是细胞凋亡? 许多因素对此担任着重要角色, 包括不同的细胞类型、细胞因子的存在与否和癌基因的过表达等。

在同样应激反应下, 一些细胞可发生 p53 诱导的凋亡, 而另一些细胞则发生细胞周期阻滞。例如, 在辐照致 DNA 损伤作用下, 正常的二倍体纤维母细胞经历细胞周期阻滞, 而大多淋巴样和髓样细胞系经历凋亡。同样有实验证实, p53 的表达有助于造血细胞类型经历凋亡^[6]。可见, 不同的细胞类型对一个细胞在 DNA 损伤后所选择的生物学效应具有一定影响。

在细胞因子存在与否方面, 研究了依赖细胞因子白介素-3(IL-3)的淋巴样细胞系 DA-1 细胞, 证实功能性 p53 在 IL-3 撤退反应时对有效的凋亡是必要的。p53 在 DNA 损伤或其过表达情况下被激活, 在 IL-3 存在时导致细胞生长阻滞, 而 IL-3 缺失则促进凋亡。因此, IL-3 能控制 p53 的细胞周期阻滞和细胞凋亡的选择。

癌基因的过表达对 p53 介导的凋亡出现二种反应, 一方面是增强 p53 介导凋亡的敏感性, 另一方面可增强对特殊细胞系的 p53 介导凋亡的抗性。细胞内的 c-myc、E2F-1、Ras 或是病毒 E1A 癌基因等能增加 p53 的稳定性。一些研究表明, E1A 的过表达使鼠胚纤维母细胞和正常人二倍体纤维母细胞在 DNA 损伤后能导致 p53 介导的凋亡, 而不是这些细胞在正常情况下由 p53 介导的生长阻滞。所以, 一些癌基因的过表达将平衡偏向凋亡而不是生长阻滞; 但相反的是, 被激活的 c-Raf 或 v-Src 的过表达导致辐照后 G₁ 期阻滞, 而这些细胞系在正常情况下是经历凋亡的。此外, 细胞内 Bcl-2 癌基因的过表达也可显著抑制 p53 介导的凋亡^[11]。

还有一些研究也揭示了影响这一选择的因素。我们知道, 野生型 p53 对于介导细胞周期和细胞凋亡功能是非常重要的, p53 突变时, 其 175 位密码子的氨基酸的改变对细胞周期阻滞和凋亡的选择也有决定性作用, 若是 Cys, 则可维持野生型 p53 功能; 若为 Lys、Pro、Ile 和 Ser, 则只能诱导 G₁ 期阻滞而无凋亡发生; 若为 Tyr、Trp、Asp 和 Phe, 则 G₁ 期阻滞和凋亡均不发生^[10]。

p53 是共济失调性毛细血管扩张症基因突变(ATM)和 DNA 依赖的蛋白激酶(DNA-PK)的重要靶作用物, DNA-PK 和 ATM 有选择地激活 p53 分

别调节细胞周期和凋亡反应^[11,12]。有实验证实, DNA-PK 选择凋亡而不是细胞周期阻滞, ATM 则选择细胞周期而不是凋亡^[13]。

此外, RB 通路对决定 DNA 损伤的生物反应也起重要作用。例如, RB 的灭活导致 DNA 损伤后的 G₁ 期阻滞的丧失以及诱导凋亡的发生, 这可解释为与转录因子 E2F 的释放有关。E2F 的过表达阻止了 p53 介导的凋亡。这样, DNA 损伤反应通过 p53 信号调节 RB 和 E2F, 在决定细胞周期阻滞和凋亡之间的平衡中起主要作用^[14]。

3 结束语

多项研究表明, 很多重要的与细胞周期以及细胞凋亡相关的基因都被 p53 调控。因此, 使人们在分子水平上加深了对生命现象的了解。p53 表达在正常细胞经历的是可逆的细胞周期延长, 而肿瘤细胞则经历不可逆的凋亡, 故促使 p53 高表达对抑癌、防癌、治癌有很大帮助。如何将在分子机制和调控系统等方面的发现转化为有益于维护人类健康和疾病的治疗, 将有待于我们继续深入研究。

参考文献:

[1] Burns TF, El-deiry WS. The p53 pathway and apoptosis[J]. *J Cell Physiol*, 1999, 22(6): 264-269.
[2] Gottlieb E, Oren M. P53 facilitates pRb cleavage in IL-3-deprived cells: novel pro-apoptotic activity of p53 [J].

EMBO, 1998, 17(13): 3587-3596.

- [3] 傅海青. p53 基因状态与辐射诱导的 G₁ 期阻滞[J]. 国外医学·放射医学核医学分册, 1997, 21(3): 133-137.
[4] Pellegata NS, Antoniono RJ, Redpath JL, et al. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: A reevaluation[J]. *Cell Biol*, 1996, 93: 15209-15214.
[5] Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network [J]. *Nature*, 2000, 408: 307-310.
[6] 施勤. p53 基因状态与电离辐射效应[J]. 国外医学·放射医学核医学分册, 1998, 22(4): 181-184.
[7] Taylor WR, Rstark G. Regulation of the G₂/M transition by p53[J]. *Oncogene*, 2001, 20: 1803-1815.
[8] Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, et al. Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G₂ phase[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(30): 22627-22630.
[9] 苑宾. 辐射诱导细胞凋亡的基因调控[J]. 国外医学·放射医学核医学分册, 1998, 22(6): 269-272.
[10] Kevin M, Ryan, Vousden KH. Characterization of structural p53 mutants which show selective defects in apoptosis but not cell-cycle arrest[J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 3692-3698.
[11] 李雨民, 张宇光. 细胞凋亡的研究进展: 回顾 1998[J]. 国外医学·放射医学核医学分册[J], 1998, 22(6): 264-269.
[12] Woo RA, Mclure KG, Lees-Miller SP, et al. DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage[J]. *Nature*, 1998, 394: 700-704.
[13] Wang S, Guo M, Ouyang H, et al. The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase selectively regulates p53-dependent apoptosis but not cell-cycle arrest[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(4): 1584-1588.
[14] Agarwal ML, Taylor WR, Chemov MV, et al. The p53 network [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(1): 1-4.

文章编号: 1001-098X(2002)02-0083-04

微核着丝粒的荧光原位杂交技术在辐射研究中的应用

田素青

摘要: 微核分析因其在遗传毒理学和辐射生物剂量学中的广泛应用而受到人们关注。近年来, 随着分子遗传学及荧光原位杂交(FISH)技术的发展, 人们对微核有了进一步的认识。FISH 技术能用于解释微核的形成机理、功能及微核的超微结构, 并可用于辐射损伤的遗传学评价。

关键词: 微核; 荧光原位杂交技术; 辐射损伤

中图分类号: Q345*2 **文献标识码:** A