

文章编号: 1001-098X(2002)06-0271-04

· 放射医学 ·

细胞凋亡与辐射免疫损伤研究进展

崔玉芳, 丁彦青, 杜雪梅

摘要: 免疫系统对电离辐射极度敏感。近年来研究表明, 细胞凋亡在辐射诱发的免疫损伤中起着重要作用。从辐射所致免疫系统损伤和细胞凋亡的特点、凋亡的基因调控以及研究辐射与凋亡的临床意义等方面, 简述了细胞凋亡在辐射所致免疫损伤中的作用的研究进展。

关键词: 细胞凋亡; 辐射; 免疫损伤

中图分类号: Q345+2, Q756 **文献标识码:** A

Progress in the study of apoptosis in radiation-induced immune system injury

CUI Yu-fang, DING Yan-qing, DU Xue-mei

(Department of Immunology, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: The immune system is extremely sensitive to ionizing radiation. Recently, it has been shown that the apoptosis plays an important role in radiation-induced immune system injury. In this article, we reviewed briefly the latest progress in this field, including the characteristics of radiation-induced immune system injury and apoptosis, gene regulation of apoptosis and the clinical significance to study radiation and apoptosis.

Key words: apoptosis; irradiation; immune system injury

细胞凋亡是一种重要的生命现象, 除生理状态外, 凋亡可由多种因素引起, 辐射是最常见的一种。免疫系统和淋巴细胞对电离辐射极度敏感, 极易出现凋亡。然而, 对辐射所致免疫系统损伤和淋巴细胞凋亡的研究, 近些年才引起人们普遍关注。辐射后, 淋巴细胞数量的大量减少造成了免疫功能的抑制, 这也是急性放射病易感染的重要因素之一。近年来, 随着分子生物学技术的迅速发展和引入, 使该领域的研究得到了较快发展, 现就其最

新进展作一简述。

1 免疫系统和淋巴细胞辐射损伤特点

已知电离辐射能引起免疫系统和淋巴细胞的严重损伤。Harrington NP等^[1]研究了1~7 Gy射线照射对小鼠脾单核细胞群的损伤效应, 发现电离辐射能引起脾T、B淋巴细胞迅速减少, 对丝裂原反应能力明显降低。也有报道辐射能引起胸腺免疫功能长期低下和内分泌功能失调。近几年有学者系统观察了γ射线所致淋巴组织损伤的病理机制, 结果证实, 辐射所致免疫系统损伤具有两个显著特点: (1) 早期损伤严重。表现在低剂量照射后即可引起淋巴器官的明显损伤, 如2 Gy照后4 h, 小鼠免疫器官即出现水肿出血, 淋巴细胞数量明显减少, 同时外周血淋巴细胞迅速下降; 6 Gy照后3 d淋巴器官损伤更为严重, 仅残留少部分淋巴细胞, 同时外周血淋巴细胞仅为对照值的24%^[2]; (2) 后期恢复缓慢。如6 Gy照射后3~4周, 虽然淋巴组织的组织学结构基本恢复, 然而淋巴细胞数量仍明显低于对照水平, 特别

收稿日期: 2002-07-22

作者简介: ①崔玉芳 (1953-), 男, 河南南乐人, 军事医学科学院放射医学研究所 (北京, 100850) 研究员, 主要从事免疫学和病理学研究。

②丁彦青 (1950-), 男, 河南驻马店人, 第一军医大学病理学教研室 (广州, 510515) 主任、教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤转移机制的研究。

③杜雪梅 (1971-), 女, 安徽芜湖人, 军事医学科学院放射医学研究所助理研究员, 主要从事免疫学和病理学研究。

审校者: 军事医学科学院放射医学研究所 毛秉智

是外周血淋巴细胞一直维持在较低水平, 照后28 d, 仅为对照值的35%^[2]。对 γ 射线照射小鼠一年的观察结果表明, 其免疫组织和外周血淋巴细胞凋亡率仍高于正常, T淋巴细胞免疫功能仍未完全恢复。而上海6·25事故病人免疫指标异常和免疫功能低下可持续数年。还发现, 经不同剂量 γ 射线照射后, 在引起小鼠胸腺、脾脏和淋巴结免疫组织严重损伤的同时, 淋巴组织以及外周血淋巴细胞出现大量凋亡^[2-4], 对JURKAT(人T淋巴细胞白血病细胞)凋亡规律的研究也证实, 淋巴细胞凋亡是急性照射后淋巴细胞数量急剧减少的主要原因之一。由于免疫组织严重受损和淋巴细胞量和质的改变, 因而导致机体免疫功能明显降低。

2 辐射所致细胞凋亡的特征

细胞凋亡是细胞针对所处环境的某些特定因素而产生的一种应答, 电离辐射是诱发细胞凋亡的重要因素之一。电离辐射诱发的细胞凋亡与其他诱因引起的细胞凋亡相似。然而电离辐射所致的细胞凋亡, 其细胞膜结构与功能、膜通透性与染色质形态结构变化更突出。在受照1 h后, 染色质改变的细胞从10%增加到40%, 4 h后, 50%的细胞已见不到染色质的基本形态学结构了。此外, 从发生时相上看, 辐射所致细胞凋亡的生理控制大致可分为三个阶段: (1) 引发性刺激: 并非所有受辐射的细胞都要经历细胞凋亡, 有可能最初的刺激是通过作用于细胞表面的受体或者其他分子, 进而作用于DNA以及其他非核靶标; (2) 滞后阶段的调节: 在辐射和细胞凋亡发生之间存在一个滞后阶段, 不同的细胞之间这种滞后阶段长短不一, 该阶段有DNA修复、基因的表达、蛋白质的合成以及效应蛋白的激活, 例如bcl-2、p53等均可能影响细胞凋亡的进展以及细胞对辐射刺激的敏感性^[3,4]; (3) 死亡反应: 辐射诱发的细胞凋亡, 在经历了滞后阶段后, 还要发生一系列特征性生物形态学的改变以及生物化学变化, 最后死亡而被吞噬。辐射诱发细胞凋亡在受照后立即抽提DNA并没有发现DNA片段的形成, 这也说明DNA片段的形成并不是辐射所直接诱导的DNA损伤。而Fuchs EJ等^[5]的研究证实, 辐射诱发细胞凋亡同样是激活caspase-3途径。某些细胞凋亡的发生有赖于蛋白质或RNA的合成。在辐射诱导人淋巴细胞凋亡的实验中, 发现辐射诱发细胞凋亡不需

要蛋白质的从头合成, 而是借助已有蛋白质的激活或修饰, 诸如磷酸化或脱磷酸化来实现的。

3 细胞凋亡的基因调控

已知细胞凋亡是由基因介导的一种细胞主动自杀的死亡方式。目前对线虫细胞凋亡的基因调控研究得比较清楚, 因为在线虫发育过程中131个细胞是通过凋亡死亡的, 控制线虫凋亡的基因有ced-3, ced-4和ced-9。现已克隆了与ced-3同源的哺乳动物一组基因(caspase家族), 以及与ced-9的同源基因(bcl-2家族)。另外, 许多与细胞增殖和癌变有关的原癌基因和抑癌基因都参与了对细胞凋亡的调控。最近的研究表明, 免疫组织淋巴细胞在凋亡过程中, 受到某些癌基因、抑癌基因和蛋白的调控。

3.1 caspase家族

研究显示, 在线虫模型中, 当线虫胚胎发育期也就是细胞凋亡发生最频繁时, ced-3大量表达, 而ced-3蛋白与哺乳动物ICE(白细胞介素-1 β 转化酶)功能相似, 提示ICE在哺乳动物凋亡中的重要性^[6]。ICE与诱导线虫凋亡的ced-3死亡基因具有广泛的结构同源性, 两者活性功能区氨基酸序列有43%同源。用ICE的抑制剂牛痘病毒CrmA基因转染细胞以及bcl-2基因的过表达能够抑制ICE介导的凋亡发生, 证实ICE确实参与了细胞凋亡。caspase-9^{-/-}胚胎干细胞及胚胎成纤维细胞对一些凋亡刺激包括紫外线及 γ 射线具抵抗性^[7], 而caspase-9^{-/-}胸腺细胞对地塞米松以及 γ 射线诱导的凋亡也具有抵抗性, 但对紫外线或抗CD95诱导的凋亡却极敏感。caspase-9及caspase-3在不同的凋亡环境中的需要是有差别的。随后的一系列实验证实并非ICE本身, 而是ICE样的蛋白酶类在哺乳动物凋亡中发挥着更重要的作用^[7]。

3.2 bcl-2家族

(1) bcl-2基因: bcl-2是从滤泡性B淋巴细胞瘤中克隆出的一种癌基因。已知bcl-2基因是目前发现的抗凋亡作用最强的基因之一, 其调控凋亡的机制除形成Bcl-2/Bcl-2同源二聚体或与Bax形成Bcl-2/Bax异源二聚体抑制细胞凋亡外, 目前还证实它可抑制H₂O₂诱导的细胞凋亡, 其调控细胞凋亡的机制与线粒体途径密切相关。研究发现, 当免疫组织和外周血淋巴细胞凋亡率呈剂量依赖性增加时, 淋巴细胞bcl-2基因和蛋白则呈持续下降趋势, 甚至几乎无阳

性表达。照后24 h, 胸腺、脾脏和淋巴结3种免疫组织的Bcl-2阳性淋巴细胞数约下降至对照值的36%~46%, 外周血下降至对照值的21%^[2]。如上所述, bcl-2是一种较强的凋亡抑制基因, 能够抑制或阻断多种因素引起的细胞凋亡。很显然, 大剂量照射后, 它的抗凋亡作用受到抑制甚至失去了抑制细胞凋亡的作用, 结果使大量细胞出现凋亡。照射后无论是bcl-2 mRNA的转录还是其蛋白的表达均呈现出下降趋势, 证实bcl-2基因在转录和翻译水平上都受到抑制^[9]。

(2)bcl-X_L基因: bcl-X_L是bcl-2基因家族的一个主要成员, 在凋亡调节通路上起着重要调控作用。目前已经明确, 同bcl-2一样, bcl-X_L能够抑制多种因素引起的细胞凋亡^[9]。研究发现, 6~12 Gy不同剂量照射后, 随着凋亡率的增加, bcl-X_L表达呈现剂量依赖性的降低, 这种剂量效应关系比bcl-2更为明显。6 Gy照射后6 h, 小鼠胸腺、脾脏和淋巴结免疫组织Bcl-X_L蛋白表达即明显下降, 于照后1 d分别降低至对照值的27%、43%和45%, 显示了该基因在淋巴细胞凋亡调控中的重要作用。

(3)bax基因: 该基因编码的Bax蛋白, 虽然为bcl-2的相关蛋白, 然而其作用与Bcl-2相反, 具有促进细胞凋亡的作用。研究证实, Bcl-2和Bax可以分别形成Bcl-2/Bcl-2和Bax/Bax同源二聚体, 二者之间也能形成Bax/Bcl-2异源二聚体。Bcl-2/Bax比例对决定细胞命运起着关键作用。当Bax同源二聚体形成时, 便诱导细胞凋亡; 随着Bcl-2表达量上升, 越来越多的Bax二聚体分开, 与Bcl-2形成更稳定的Bcl-2/Bax异源二聚体以及Bcl-2/Bcl-2同源二聚体时, 则中和了Bax二聚体诱导细胞凋亡的作用。应用核酸分子原位杂交和免疫组化检测结果表明, 6~12 Gy γ 射线照射后一定时间, 小鼠免疫组织淋巴细胞凋亡率呈剂量依赖性增加, 而此时bax基因和蛋白也呈现出相同变化趋势, 照射后Bax蛋白阳性淋巴细胞数持续增加, 在淋巴组织和外周血分别于照后1~3 d和7 d达到高峰, 与淋巴细胞凋亡率呈现出较好的相应关系。对Bax蛋白的定量分析也证实, Bax在辐射诱导的淋巴细胞凋亡调控中起重要的促进作用^[2]。

3.3 p53基因

p53是继Rb(视网膜母细胞瘤基因)后发现的又一个肿瘤抑制基因。该基因能对复杂的DNA损伤系

统进行调控, 与细胞凋亡有密切关系。在研究辐射诱导的不同p53基因状态小鼠骨髓细胞的凋亡时发现, 在一定照射剂量范围内, 野生型(p53^{+/+})小鼠发生凋亡的频度与照射剂量显示出正相关, 且明显高于杂合型(p53^{+/+})和纯合型(p53^{-/-})小鼠^[3]。近期研究发现, 照射后随着凋亡率的增加, 免疫组织淋巴细胞p53基因和蛋白在一定照射剂量范围内显示出剂量依赖性的增加, 表明在辐射诱导的淋巴细胞凋亡调控中p53基因起着重要的促进作用。

4 研究辐射与凋亡的临床意义

研究凋亡的最终目的是要归于实际应用中, 迄今, 凋亡与各种临床疾病关系的研究已受到广泛重视。

4.1 细胞凋亡与肿瘤

在肿瘤的发生发展过程中, 细胞凋亡机制的失调导致了肿瘤的癌变、发展、转移及带瘤宿主的死亡。未经治疗的恶性肿瘤也会发生细胞凋亡, 但发生凋亡的原因各不相同。最近人们从细胞凋亡及其调控的研究中得到启示, 即试图从细胞凋亡的角度开辟一条治疗和预防恶性肿瘤的新途径。人们发现在实验性肝癌形成过程中, 早期癌变细胞比正常肝细胞有较高的凋亡倾向, 即以细胞凋亡方式对抗细胞增殖的速率, 使肿瘤缓慢增长; 在肿瘤促进阶段, 促癌剂如苯巴比妥可抑制癌前病灶组织细胞的凋亡, 从而导致病灶的迅速生长和肿瘤发展; 当停用促癌剂后, 癌前病灶又出现活跃的细胞凋亡。以上研究结果提示, 无论是在肿瘤发生的起始阶段, 还是促进阶段, 都有可能采取相应措施进行积极有效的治疗, 并有可能使其逆转。在肿瘤发生和发展过程中, 可以通过破坏细胞增殖与细胞凋亡之间的动态平衡达到治疗目的, 如可应用切除内分泌腺或给予激素拮抗物来诱导激素依赖性肿瘤细胞凋亡, 从而促进肿瘤减小甚至消退。此外, 向人乳腺癌细胞系MGG7培养体系中添加抗雌激素药物tamoxifen可引起肿瘤细胞的迅速凋亡和DNA合成障碍。另外, 在抗体介导的抗肿瘤作用中, 凋亡也具有重要意义。

4.2 细胞凋亡与基因治疗

研究细胞凋亡及其调控机制, 一个很重要的目的就是能够采用基因转移战略, 将目的基因导入靶细胞中进行有效治疗, 如将促进细胞凋亡的p53基

因导入恶性肿瘤细胞内,可以促使肿瘤细胞迅速凋亡或提高癌细胞对抗肿瘤药物或放射疗法的敏感性。在这一方面,新发现的p16的cDNA片段较小,仅为p53基因的1/4,便于操作,迄今发现p16基因似乎只针对CDK4(细胞周期蛋白依赖性激酶-4),能使研究者容易选择一种很特异的治疗靶,针对细胞的“刹车机制”,而获得较好的疗效。另外,艾滋病病人Th细胞的减少(是艾滋病患者发病和死亡的重要原因)是通过细胞凋亡途径死亡的,因而有人设想,将抑制细胞凋亡的重要基因bcl-2转入到细胞内而达到治疗目的。在设计细胞自杀机制治疗肿瘤时有人提出,将一种介导凋亡的细胞膜蛋白(Fas/Apo-1)的编码基因导入到细胞内进行表达,以Fas抗体处理后则可清除这类转导的细胞,从而达到治疗目的。

4.3 细胞凋亡与辐射防护

射线可引起细胞凋亡,在对肿瘤病人进行放疗过程中,需要尽可能多地保护正常细胞少受射线造成的损害。Ushakova T等^[10]用抗氧化食谱修正辐射诱导的小鼠脾细胞凋亡的基因表达。在致死剂量照射前45d,小鼠被饲以含有抗氧化剂和微量元素的饮食,于照后不同时间,观察了TRPM-2(PCD的一种抑制物)、Bcl-2、超氧化物歧化酶及过氧化氢酶基因的表达。结果显示,抗氧化食谱能保护辐射诱导的小鼠脾细胞的凋亡。而Lee SE等^[11]检测了四物汤和四君子汤这两付传统的用于补血和补气的汤剂对射线的保护效应,证实四物汤中的当归和白芍药具有明显的辐射防护效应,尤其这类中药都是天然产品,无毒且副作用小,无疑为辐射损伤的防护提供了一个新的思路。

总之,细胞凋亡作为一种生命现象,与细胞生长和增殖一样,将会受到更广泛的关注。因而,随着细胞凋亡及其调控机制研究的不断深入,无论对于揭示免疫损伤和某些肿瘤的发生机制,进而应用于临床防治,还是利用基因转移技术,选择特异性

的治疗靶,有针对性地进行抗凋亡损伤的有效治疗,均具有重要指导意义。相信在不久的将来,能够从细胞凋亡的角度为临床免疫损伤及其他疾病的防治提供一条崭新的途径。

参考文献:

- [1] Harrington NP, Chambers KA, Ross WM, et al. Radiation damage and immune suppression in splenic mononuclear cell populations[J]. Clin Exp Immunol, 1997, 107: 417-424.
- [2] Cui YF, Gao YB, Yang H, et al. Apoptosis of circulating lymphocytes induced by whole body γ -irradiation and its mechanism[J]. JEPTO, 1999, 18(3): 185-189.
- [3] Cui YF, Zhou PK, Lord BI, et al. P53-dependent and independent apoptosis induced by ionizing radiation in murine bone marrow cells[J]. Chin Sci Bull, 1997, 42(2): 155-158.
- [4] Cui YF, Gao YB, Peng RY, et al. Apoptosis of peripheral lymphocyte in dog induced by shock-vibration injury and its mechanism[J]. JEPTO, 1999, 19(3): 133-137.
- [5] Fuchs EJ, McKenna KA, Bedi A. P53-dependent DNA damage-induced apoptosis requires Fas/Apo-1 independent activation of CPP32[J]. Cancer Res, 1997, 57: 2550-2555.
- [6] Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature[J]. Cell, 1996, 87: 171-177.
- [7] Hakem R, Hakem A, Duncan GS, et al. Differential requirement for caspase 9 in apoptosis pathways in vivo [J]. Cell, 1998, 94: 3339-3352.
- [8] Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death[J]. Cancer Res (suppl), 1999, 59: 1693-1700.
- [9] Minn AH, Rudin CM, Boise LH, et al. Bcl-X_L regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and-independent mechanisms[J]. EMBO J, 1999, 18(3): 632-643.
- [10] Ushakova T, Melkonyan H, Konova L, et al. Modification of gene expression by dietary antioxidants in radiation-induced apoptosis of mice splenocytes [J]. Free Radic Biol Med, 1999, 26: 887-891.
- [11] Lee SE, Yang TA. Radiation protective effects of two traditional Chinese medicine prescriptions si-wu-tang and si-jun-zi-tang[J]. Am J Chin Med, 1999, 27: 387-396.