

文章编号：1001-098X(2004)04-0182-03

肿瘤基因-放射治疗的分子机制

朱娴

摘要 由辐射介导的肿瘤基因-放射治疗是近年来提出的新思路，其分子机制为小剂量电离辐射通过多条途径激活一些重要的分子靶点而导致肿瘤细胞凋亡。这是基于 Egr-1 的辐射可诱导特性的一种肿瘤的基因治疗，在肿瘤治疗中有很好的应用前景。

关键词 电离辐射；基因-放射治疗；肿瘤；分子机制

中图分类号 R730.55 文献标识码 A

The molecular mechanism of gene-radiotherapy of tumor

ZHU Xian

(Central-South University Xiang-ya Hospital Nuclear Medicine, Hunan Changsha 410078, China)

Abstract Gene-radiotherapy of tumor is a new method which is induced by ionizing radiation. The molecular mechanism is to activate various molecular target by many ways and induce the apoptosis of tumor cell. It is a gene therapy based on the radiation-inducible property of the Egr-1 gene. It has good application prospect in therapy of tumor.

Key words ionizing radiation; gene-radiotherapy; tumor; molecular mechanism

放射治疗是应用高剂量的电离辐射作用于肿瘤细胞，导致癌细胞坏死，但同时也引发了周边正常组织的炎性反应及骨髓抑制等一系列副反应。肿瘤基因-放射治疗是将可经射线诱导表达并对肿瘤具有杀伤作用的基因转入肿瘤细胞，在实施局部放疗时通过射线诱导细胞凋亡和基因杀伤效应的双重作用杀伤肿瘤；对于不具备辐射诱导特性的基因，采用将可感受辐射刺激的调控序列与之偶联的方法赋予其辐射诱导特性。肿瘤基因-放射治疗为解决长期困扰肿瘤放疗的两个棘手问题——肿瘤的辐射抗性和受照部位正常组织的损伤开辟了新途径。

1 Egr-1 基因与肿瘤基因-放射治疗

Egr-1(early growth response-1)基因属“立早基因”家族，该基因定位于 5q31，mRNA 全长 310bp，编码 543 个氨基酸。Egr-1 基因的启动子序列中含有多个保守的 CC (A/T)_nGG 结构域，这些结构域可感受细胞内外的理化刺激如自由基、电离辐射等，继而诱导基因表达。这些结构域的辐射可诱导特性是 Egr-1 基因的一个重要特点，因而在肿瘤基因治

疗中有很好的应用前景。

Weichselbanm RR 等在 1992 年首先提出了肿瘤基因-放射治疗的新思路，并于 1994 年将 Egr-1 基因的调控序列和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 的 cDNA 相连，经辐射成功地诱导了 TNF 的表达。Egr-1 调控序列后的目的基因包括细胞因子、自杀基因、肿瘤抑制基因及耐药基因，它们在 Egr-1 蛋白转录因子的作用下激活表达，发挥着激活机体抗癌免疫、增强对肿瘤细胞的识别能力、抑制或阻断肿瘤相关基因的异常表达、以及提高肿瘤对药物的敏感性的作用。“自杀基因”是肿瘤药物相关基因的一种，也是目前研究基因治疗中的热点之一，目前研究最多的有单纯疱疹病毒-胸苷激酶 (herpes simplex virus-thymidine kinase, HSV-TK)、胞苷脱氨酶、水痘带状疱疹病毒-胸苷激酶的基因，HSV-TK、水痘带状疱疹病毒-胸苷激酶分别将无毒的更昔洛韦、6-甲氧嘌呤阿拉伯糖核苷磷酸化后转变为有毒物质，胞苷脱氨酶使 5-氟胞嘧啶脱氨成 5-氟尿嘧啶，这些有毒物质在肿瘤细胞内干扰核酸代谢，最终导致肿瘤细胞死亡，并具有独特的“旁观者”效应。Kawashita Y 等^[2] 将 Egr-1 的启动子接在 HSV-TK 基因的上游，用脂质载体转染肝癌

作者单位：410078 长沙，中南大学湘雅医院影像医学与核医学科

细胞,发现辐射后肝癌细胞对更昔洛韦敏感性增加,进而提出了“HSV-TK/更昔洛韦和辐射”的治疗模式。Hsu S 等^[3]利用 CYP4B1(细胞色素 P450 的同工酶)能使前药物 4-IM(4-Ipomeanol)转成毒性的烷基代谢物的原理,建立了 Egr-1-CYP4BI/4-IM 基因-放射治疗系统,成功控制了药物细胞毒性对正常细胞的损害。Scott SD 等^[4]利用增加 Egr-1 基因启动子 CC(A/T)_nGG 结构域的个数,提高了 Egr-1 基因启动子对电离辐射的敏感性。Greco O 等^[5]提出了一种包含于红细胞生成素、磷酸甘油酯酶 1 及血管内皮生长因子基因中的乏氧反应因子与 Egr-1 基因偶联成一种新的综合启动子,能同时接受乏氧及电离辐射的诱导,使目的基因在肿瘤的微环境中更有效地表达,达到治疗的目的。

2 电离辐射与细胞凋亡

小剂量的电离辐射可诱导细胞凋亡,研究电离辐射致细胞凋亡的分子机制对基因-放射治疗选择目的基因及寻找新的分子靶点具有重要的指导意义。

2.1 细胞凋亡

辐射可诱导机体正常细胞或变异了的细胞(如癌细胞)发生凋亡。辐射诱导癌细胞凋亡有如下特点:①易感细胞类型大大多于正常细胞,某些类型的癌细胞有极度敏感性;②在同一单细胞群体中触发凋亡的剂量远远低于引起坏死所需的剂量。放射治疗在诱导肿瘤细胞凋亡的同时诱导核因子-κB(nuclear factor- kappaB, NF-κB)及重要信号转导靶分子的活化,激活了细胞抗凋亡的信号通路,从而抑制放射线诱导正常细胞凋亡,减弱了放射治疗对正常细胞的杀灭作用

2.2 电离辐射调控肿瘤细胞凋亡的分子机制

由辐射诱发的细胞凋亡是一个极为复杂的生物学过程,涉及基因活化、转录、蛋白修饰酶的激活及离子浓度等诸多因素。辐射诱导的细胞凋亡机制现在比较成熟的观点是 p53^[6]、caspase-3 介导及 Egr-1 基因参与的由 TNF-2 介导的辐射致细胞凋亡机制^[7]。

2.2.1 p53 基因及其介导的细胞凋亡机制

p53 基因是一个备受关注和深入研究的肿瘤抑制基因, p53 基因定位于 17p13.1, 含 11 个外显子, 转录 mRNA 长 2.8kb, 是目前发现的与人类肿瘤相关性最高的基因之一。P53 蛋白是核内的一种

磷酸化蛋白质,能与特异的 DNA 序列结合,其生物学功能是在 G₁ 期监视细胞基因的完整性。如果 DNA 遭受损伤,则 P53 蛋白积累,复制停止,以便有足够时间使损伤的 DNA 得以恢复;如果修复失败,则 P53 蛋白通过凋亡机制引发细胞自杀。

Wang S 等^[9]研究表明,在电离辐射介导下 DNA 依赖性蛋白激酶的催化亚基 (DNA-dependent proeikinas catalytic subunit, DNA-PKcs) 在相匹配的 DNA 分子上组装后使 P53 蛋白磷酸化并激活,引起 P53 蛋白介导细胞凋亡。Khanna KK^[11]研究发现,与 P53 蛋白相互作用,使 P53 蛋白近 N 端的第 15 位丝氨酸磷酸化而激活 P53 蛋白,引发 P21 蛋白的增加和细胞周期捕获^[11]。正是 DNA-PKcs 和 ATM 通过不同的 P53 蛋白上游途径,相互补充激活 P53 蛋白,导致细胞周期捕获和凋亡。磷酸化激活后的 P53 蛋白与特异的 DNA 序列(P53 蛋白结合位点)结合,促使下游一系列抑癌基因转录表达,诱导细胞周期 G₁ 期阻断。

2.2.2 Caspase 3 介导的细胞凋亡机制

Caspases 即天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶,被誉为“凋亡步兵”^[12]或凋亡“刽子手”,迄今已发现 14 种 caspases,其中 caspase-3, caspase-6, caspase-7, caspase-8, caspase-9, caspase-10 及 caspase-2, 与凋亡有关;而 caspase-1, caspase-4, caspase-5 主要参与炎症反应和前炎性介质的成熟。Caspases 家族广泛存在于细胞中,主要以酶原的形式存在, caspases 酶原的活化途径有 ① 线粒体途径^[13]: 线粒体内膜释放细胞色素 C 是这一路径激活 caspases 酶原的关键步骤,在 ATP 和 dATP 的参与下细胞色素 C 与凋亡蛋白水解酶活化因子结合,促进凋亡蛋白水解酶活化因子之间相互聚合,并与 caspase-9 前体形成复合体(即凋亡小体),使 caspase-9 激活,然后依次水解下游的同源酶(如 pro-caspase-6, pro- caspase-7 等),最后激活其效应器酶 caspase-3 而导致细胞死亡; ② 死亡受体途径^[14]: 电离辐射导致癌细胞 DNA 断裂引发一系列信使系统的启动,包括 p53 的启动,而 p53 的上调促使下游靶基因中死亡受体 KILLER/DR5 及 CD95/fas 表达增加,死亡受体与其特异配体激活后导致其死亡结构域相互积聚并与转节器分子的死亡结构域相互结合,使死亡受体分子活化,死亡受体与转节器分子结合后导致细胞内 caspases 酶原在局部聚集,转节

器另一端具有与 caspases 酶原分子相似的死亡效应器结构域, 可与之相互串连构成大分子复合物即“凋亡酶体”, 凋亡酶体形成后其分子中的 caspases 酶原(如 pro-caspase-8, caspase-10)的两个线形亚单位相互靠近, 进行自身水解, 成为具有水解活性的蛋白酶, 然后激活 caspases 的瀑布反应, 引起细胞凋亡, 其中激活的 caspase-8 激活 Bcl-2 家族中的 Bid, Bid 具有诱导线粒体释放细胞色素 C 的作用^[15], 两路径相互影响最终激活 caspases, 发挥 caspases 在细胞凋亡中的功能: ① 灭活细胞凋亡发生的抑制剂, 如 caspases 可以裂解阻止细胞凋亡发生的 Bcl-2 蛋白; ② caspases 可直接破坏裂解细胞结构如核纤; ③ caspases 对酶蛋白的调节和效应功能域的裂解。

2.2.3 Egr-1 基因及其参与的由 TNF-2 介导的辐射致细胞凋亡机制

Egr-1 基因的表达产物具有三个 CyG-His₂ 锌指结构, 它与 DNA 序列上富含的 GC 区(CGCCCCGC)结合, 发挥转录调控作用。辐射诱导了 Egr-1 的表达, Egr-1 蛋白结合到下游的 TNF-2 基因的富含 GC 的启动子区域, 促进了 TNF-2 的转录和翻译, 上调的 TNF-2 蛋白作为死亡受体, 启动了细胞的凋亡程序。同时, Egr-1 促进 Rb 与 MDM2 蛋白(一种癌基因蛋白)结合, 竞争 MDM2 蛋白与 P53 蛋白结合, 以免 P53 蛋白失去促凋亡的功能^[15]; 另外, 在放射治疗中, Egr-1 与 P53 蛋白及 MDM2 蛋白结合形成三聚体, 阻止 P53 蛋白的降解。

总之, 电离辐射诱导癌细胞凋亡的进程分为三个时相: 诱导期、效应期、降解期。诱导期: 电离辐射的感应和传递, 使细胞凋亡第二信使在细胞内积聚最终作用于线粒体, 升高线粒体膜通透性。效应期: 对凋亡信号进行处理并启动细胞凋亡, 通过一系列限制机制的调控, 细胞进入不可逆的程序性死亡。最后的降解期: 因 caspases 和核酸酶等水解酶的活化而产生典型的凋亡特征^[16]。

3 问题与展望

对电离辐射诱导的肿瘤基因-放射治疗的基础研究, 尤其是对肿瘤细胞凋亡机制的研究, 为恶性肿瘤的治疗提供了新思路, 但仍面临着载体的稳定性、进一步临床试验验证、理论进一步完善等一系

列问题, 值得我们继续探索。

参 考 文 献

- 1 Wu CM, Huang TH, Xie QD, et al. Expression properties of recombinant pEgr-p16 plasmid in esophageal squamous cell carcinoma induced by ionizing irradiation [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9 (12): 2650-2653.
- 2 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.
- 3 Hsu S, Rainov NG, Quinones A, et al. Combined radiation and cytochrome CYP4B1/4-ipomeanol gene therapy using the EGR-1 promoter [J]. Anticancer Res, 2003, 23(3B): 2723-2728.
- 4 Scott SD, Joiner MC, Marples B, et al. Optimizing radiation responsive gene promoters for radiogenetic cancer therapy [J]. Gene Therapy, 2002, 9(20): 1396-1402.
- 5 Greco O, Marples B, Dachs GU, et al. Novel climeric gene promoters responsive to hypoxia and ionizing radiation [J]. Gene Ther, 2002, 9 (20): 1403-1411.
- 6 Brown KD, Lataxes TA, Shangary S, et al. Ionizing radiation exposure results in up-regulation of Ku70 via a P53/ATM protein-dependent mechanism [J]. J Biol Chem, 2000, 275(9): 6651-6656.
- 7 Mansoor MA, Stephon FS, Kolaparthi V, et al. Ionizing radiation-inducible apoptosis in the absence of P53 link to transcription factor Egr-1 [J]. J Biol Chem, 1997, 272(52): 33056-3306.
- 8 Ye J, Wang S, Leonard SS, et al. Role of reactive oxygen species and P53 in chromium(VI)-induced apoptosis [J]. J Biol Chem, 1999, 274(49): 34974-34980.
- 9 Wang S, Guo M, OuYang HH, et al. The catalytic subunit of DNA dependent protein kinase selectively regulates p53-dependent apoptosis but not cell-cycle arrest [J]. Cell Biol, 2000, 97(4): 1584-1588.
- 10 Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, et al. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction [J]. Nat Genet, 1998, 20(4): 398-400.
- 11 Barlow C, Denney PA, Shigenaga MK, et al. Loss of the ataxic-telangiectasia gene product causes oxidative damage in target organs [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 9915-9919.
- 12 Hengartner MO. Apoptosis: death cycle and swiss army knives [J]. Nature, 1998, 391: 441-442.
- 13 Kuwana T, Smith JJ, Muzio M. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome C [J]. J Biol Chem, 1998, 273(26): 16589-16594.
- 14 Nagata S. Apoptosis by death factor [J]. Cell, 1997, 88: 355-365.
- 15 Das A, Chendil D, Dey S, et al. Ionizing radiation down-regulates p53 protein in primary Egr-1/-mouse embryonic fibroblast cells causing enhanced resistance to apoptosis [J]. J Biol Chem, 2001, 276 (5): 3279-3286.
- 16 赵云. 细胞凋亡的线粒体调控蛋白的研究进展 [J]. 国外医学分子生物学分册, 2002, 24(3): 133-136.

(收稿日期: 2004-04-19)