

## 射线诱导细胞周期阻滞与肿瘤放射增敏的研究进展

逯敏, 贾妮, 徐凯, 刘宇龙

中图分类号: R811.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2007)02-0251-03

20世纪90年代随着细胞分子生物学和肿瘤分子生物学的一系列突破,人们认识到大多数癌基因与抑癌基因的功能效应最终都参与细胞周期的调控,或者本身就是细胞周期的调控的主要部分,这些基因的突变,导致细胞周期的失控,使细胞增殖过多,凋亡过少。真核细胞对于辐射的反应与细胞周期的时相具有明显的相关性。射线对于肿瘤细胞的杀伤作用主要是损伤肿瘤细胞的DNA,受射线损伤的细胞会停滞于细胞周期的某些时相,对于受损的DNA进行修复,如果修复成功,细胞继续运行并进一步进入下一个周期;否则将通过启动细胞凋亡的方式清除受损伤DNA的肿瘤细胞。细胞周期的完成,依赖于紧密的顺序和强制的次序,这些需要细胞周期检测点(cell cycle checkpoints)来完成,以保证细胞复制的忠实性。目前研究较多的细胞周期检测点主要有G<sub>1</sub>-S期检测点、G<sub>2</sub>-M期检测点,其中G<sub>1</sub>期又称DNA合成前期,位于S期之前,是细胞增殖的关键时相;而G<sub>2</sub>期为DNA合成后期,位于M期之前。检测点(checkpoints)又称关卡,是在细胞周期的暂停中允许编辑和修复遗传信息,并使每个子细胞接受与亲代细胞相同的整套遗传信息,作为一保护机制在肿瘤细胞的生命活动中起着十分重要的作用。细胞周期的运做依赖一共同的核心装置:既周期蛋白/周期蛋白依赖性蛋白激酶、(cyclin/cyclin dependent kinase, CDK)。细胞周期不同时相有不同的cyclin和CDK表达,通过不同cyclin含量的改变调控细胞周期的进程。

### 1 G<sub>1</sub>-S期检测点的调控

传统的认识G<sub>1</sub>-S期检测点主要依赖P53蛋白的表达和cyclinD/cyclinE。当细胞出现DNA损伤时,P53是细胞进

入S期的控制者。如果P53失活,即便细胞周期还能正常进行,细胞也会停止DNA损伤修复,导致凋亡。Su等通过对8例食道癌患者进行近距离放射治疗后,对肿瘤组织P53表达情况进行免疫组化检测,结果表明,所有患者的P53表达均为强阳性,并且与放疗前对比,在肿瘤区出现P53浓聚<sup>[1]</sup>。P53基因被激活,触发下游基因的表达,转录激活一个关键靶蛋白P21(细胞周期依赖激酶相互作用蛋白),P21通过抑制cyclinE/CDK2活性,导致细胞周期的阻滞。有研究表明P21蛋白是通过多种途径进行抑制cyclinE/CDK复合体的活性<sup>[2]</sup>。cyclinD上调可加速细胞周期的进行,使细胞逃避检测点,其与CDK4形成cyclinD/CDK4复合体,轻度磷酸化PRb使组蛋白脱乙酰酶从DNA-CDK4结合体中释放,使某种Rb沉默基因被激活,但其他E2F-Rb调节的基因仍被抑制<sup>[3]</sup>。Kahl等发现在人二倍体成纤维细胞,钙调节蛋白依赖性蛋白激酶I的活性为G<sub>1</sub>进程cyclinD/CDK4复合体激活所必须的<sup>[4]</sup>。cyclinE/CDK2也是G<sub>1</sub>/S期过渡所必须的, cyclinE/CDK2进一步磷酸化Rb成高磷酸化,Rb完全释放E2F转录因子,E2F又进一步激活DNA合成复制的基因,同时激活cyclinE, cyclinE转录又通过磷酸化Rb进一步激活E2F这一正反馈使得限制点不可抑制的进入S期。因此cyclinD与cyclinE对Rb的时序磷酸化,激活E2F是G<sub>1</sub>/S期关键调节机制。但Keenan等发现不需要cyclinD/CDK4, cyclinE/CDK2也能磷酸化Rb激活E2F<sup>[5]</sup>,这可能提示存在不同的信号转导机制。CDKs包括CIP/KIP及NK4两大家族,是G<sub>1</sub>/S期负性调节因子,其作用机制通过与周期蛋白竞争性结合CDK,并使其亚单位催化失活,抑制CDK/cyclins复合物的活性。研究显示NK4抑制剂通过激酶催化裂口变形和干扰ATP结合来抑制CDK4/6-cyclinD复合体<sup>[6]</sup>。另外除了P53及Rb基因是涉及G<sub>1</sub>/S期控制的主要抑癌基因外,还有HNF5/N11基因、E2F基因、P16基因等多种基因、泛素及细胞信号转导系统参与周期的调控。

作者单位: 广东省中医药附属第二临床医学院 广东 广州 5101201  
作者简介: 逯敏(1972~),男,陕西岐山人,主治医师,从事肿瘤适形放射治疗工作。

信号;T<sub>2</sub>WI真腔呈流空低信号,假腔可为高信号或节段性低、高信号并存;电影MR或MRA真腔呈均匀性高信号,假腔为不均匀性混杂信号,稍低于真腔。②内膜片和破口SE序列流空的主动脉腔内见线形或不规则形条状稍高信号,剥离的长条内膜片多数呈弧形突向真腔,冠、矢状位呈螺旋状走向,而电影MR或MRA示内膜片在真假腔间呈条形结构低信号,同时电影MRI有时可显示随心脏的搏动而呈相位运动图像,并且内膜破口可以1个或多个。SE T<sub>1</sub>WI示内膜片中断而不连续,真假腔交通,呈尖角状低信号。③血栓 血栓多位于假腔内,附着于假腔游离壁,新鲜血栓常为不规则的新月形或螺旋形,呈T<sub>1</sub>高、T<sub>2</sub>略高与略低混杂信号,电影MR为低于假腔血流的略低信号影,位于弓降部2例,降主动脉5例,降主动脉+腹主动脉3例。④其他 电影MRI可显示主动脉瓣关闭不全,本组6例,表现为舒张期经主动脉瓣口向左心室束状低信号反流血流,主动脉增宽26例,胸腔积液等。

MR的优点是可任意选择成像层面,成像视野大,不需使用碘对比剂,无放射损伤,诊断准确率高,对疑诊AD病人的MR检查采用多种成像序列,使血管图像质量更高、更直观,基

本上能够确定诊断范围及类型,适于AD诊断,决定治疗方案及随访尤其是术后随访。

### 参考文献:

- [1] Harthell G G. Imaging of aortic aneurysms and dissection. CT and MR[J]. J Thorac Imaging, 2001, 16: 35-38.
- [2] 邹利光, 孙清荣, 梁开运, 马凡氏综合征心血管病变的影像诊断[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(9): 1120-1123.
- [3] 王海平, 李莉, 孙泽民, 等. 主动脉夹层动脉瘤的MRI诊断[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2003, 6(2): 168-169.
- [4] 王照谦, 刘玉清, 张挽时, 等. 主动脉夹层的MRI与综合超声诊断对照研究[J]. 中华放射学杂志, 1997, 31(8): 532-535.
- [5] 罗天友, 吕发金, 李咏梅, 等. 3D DCE MRA对主动脉病变的诊断价值[J]. 重庆医科大学学报, 2003, 28(2): 159-161.

(收稿日期: 2006-01-04)

## 2 G<sub>2</sub>期检测点的调控

G<sub>2</sub>期检测点途径主要是 cyclinA及 cyclinB<sub>1</sub>的上调,抑制 Cdc2( cell division cycle)即(CDK1)活性,使细胞阻滞在 G<sub>2</sub>期。其中 cyclinA/CDK2的结合与 G<sub>2</sub>期事件启动和进行的必要条件。CyclinB<sub>1</sub>/CDK1是 G<sub>2</sub>/M期必需的。电离辐射诱导的 G<sub>2</sub>期阻滞的途径,包含 P53依赖型及 P53基因非依赖型。P53基因依赖型 P53分子分别通过直接或间接的调控 P21、Gadd45(P53基因调控蛋白)和 14-3-3 sigma(是通过结合和分离磷酸化蛋白质,调节细胞活性的蛋白质家族成员),抑制 CyclinB<sub>1</sub>/CDK1的活性,从而阻断细胞进入减数分裂,使细胞停滞在 G<sub>2</sub>时相。也有人认为 P53参与 G<sub>2</sub>期的维持,并不参与 G<sub>2</sub>期的启动,所以非 G<sub>2</sub>期阻滞所必须的。Matsui F等用大剂量射线照射鼠胚胎纤维母细胞,发现野生型 P53细胞中 P53的表达明显高于 P53突变的细胞,但两者的 G<sub>2</sub>期阻滞效应却无明显不同,似乎表明 P53可能不参与 G<sub>2</sub>期阻滞<sup>[7]</sup>,因此有学者认为可能与辐射的剂量、条件、损伤程度和细胞种类的不同有关。P53非依赖型主要指 CHK1/CHK2依赖的信号转导途径,CHK1是 DNA损伤后被激活的一个检查点激酶。在粟酒裂殖的酵母细胞周期调控中,磷酸脂酶 D<sub>12</sub>可使活化的 CHK1去磷酸化,使 CHK1失活,解除 G<sub>2</sub>/M检测点阻滞,恢复细胞周期的进程<sup>[8]</sup>。另外一项研究发现 CHK1-/-的 DT40细胞(鸡的 B细胞淋巴瘤)出现自发性凋亡增强,使细胞增殖缓慢,且对 DNA损伤剂的敏感性增强。将外源性的 CHK1基因转染 CHK1-/-的细胞,经电离辐射处理后,出现细胞周期的阻滞,细胞存活率和增殖活性增加<sup>[9]</sup>。也有研究表明通过反义 RNA阻碍 CHK1的表达,会阻断 DNA损伤引起 G<sub>2</sub>期的阻滞,同时细胞凋亡增加<sup>[10]</sup>。CDK2是 Rad53及 cdc2的同源基因,作为另外一种被 DNA损伤激活的检查点,也参与细胞周期的调控。Atsushi H等<sup>[11]</sup>用基因打靶技术得到 CHK2-/-的鼠胚胎干细胞,发现 X射线照射后并不诱导细胞产生的 G<sub>2</sub>期阻滞。电离辐射损伤后引起的 G<sub>2</sub>期阻滞的信号转导通路间并非完全独立的,之间存在一定的相互作用。Lee SL等<sup>[12]</sup>发现 DNA损伤后,CHK1第 345位丝氨酸的磷酸化有助于 CHK1与 P53、P21、14-3-3 sigma的结合,提示 CHK1与 P53下游的效应分子间存在相互作用。两条途径间存在一个复杂的调控网络。

周期检测点的功能缺陷对引发检测点缺陷反应的射线极为敏感。离体培养的细胞实验也表明处于不同周期时相的细胞敏感性是不同的,总的倾向是处于 G<sub>2</sub>期的细胞是放射最敏感的, G<sub>1</sub>期早期相对敏感,因此寻找靶向破坏细胞周期点的方法,干扰肿瘤细胞的自我修复,促进肿瘤细胞的分化和凋亡,是目前放射治疗的研究热点。近年来大量的研究显示,许多抗癌药物会破坏 G<sub>2</sub>期检测点从而导致肿瘤细胞死亡。在人类所有肿瘤细胞中,50%—60%存在 P53基因突变或功能缺失,而人体正常组织细胞则无 P53基因突变。P53功能缺失的细胞在 DNA受损后,无法启动 G<sub>1</sub>期的关卡作用,这时 G<sub>2</sub>期关卡成为受损细胞有丝分裂前进行 DNA修复最重要的保护机制, G<sub>2</sub>期的阻滞对于这类细胞的存活至关重要<sup>[13]</sup>。咖啡因(caffeine)是一种通过 Cdc25C磷酸化酶来激活 Cdc2的化合物,与射线同时处理细胞后,会导致 G<sub>2</sub>期检测点功能缺陷而引起凋亡。有研究表明,咖啡因、UCN-01可以抑制 CHK1的活性而解除 G<sub>2</sub>/M期的阻滞<sup>[14]</sup>。李晔雄等研究显示己酮可可碱可以增强(E)-(2)-脱氧-氟亚甲基胞苷的放射增敏作用,其可能的机制和 G<sub>2</sub>周期阻滞相关<sup>[15]</sup>。Pike等采用 5种不同的 P53功能缺失的人结肠癌细胞系进行实验,放射引起的 5种细胞的 G<sub>2</sub>期阻滞均被 UCN-01有效去除,但仅最终 2个细胞系显示出放射增敏作用,因此 UCN-01对肿瘤细胞的放射增敏作用可能还存在其他机制<sup>[16]</sup>。研究射线对于 G<sub>1</sub>-S期及 G<sub>2</sub>期检测点及相应肿瘤细胞的凋亡对于进一步寻找有效

增强射线对于肿瘤细胞的杀伤作用的方法有重要意义。

## 参考文献:

- [1] Sur M, Sur H, Cooper K, et al. Preliminary report on the effect of brachytherapy on expression of P53, bcl-2 and apoptosis in squamous cell carcinoma of the oesophagus [J]. S Afr J Surg 2003; 41(1): 14—20.
- [2] Sugihara Magae J, Wadhwa R, et al. Dose and Dose-rate effects of low-dose ionizing radiation on activation of Trp53 in immortalized murine cells [J]. Radiat Res 2004; 162(3): 296—307.
- [3] Ma Y, Yuan J, Huang M, Jove R, Cress WD. Regulation of the cyclin D3 promoter by E2F1 [J]. J Biol Chem, 2003; 278: 16770—16776.
- [4] Kanl CR, Means AR. Regulation of cyclin D1/CDK4 complexes by calcium/calmodulin-dependent protein kinase [J]. J Biol Chem 2004; 279: 15411—15419.
- [5] Keenan SM, Lents NH, Baldassare JJ. Expression of cyclin E renders cyclin D-CDK4 dispensable for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor protein activation of E2F1 and G1-S Phase progression [J]. J Biol Chem 2004; 279: 5387—5396.
- [6] Russo AA, Tong L, Jeffery H, Pavletich NP. Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumor suppressor P16INK4 [J]. Nature 1998; 395: 237—243.
- [7] Matsui F, Tsuchida Y, Keng PC. Effects of P53 mutations on cellular sensitivity to ionizing radiation [J]. Am J Clin Oncol 2001; 24(5): 486—490.
- [8] Chen E, Zen, Kosoy A, Christopoulos H, et al. Resisting Arrest recovery from checkpoint arrest through dephosphorylation of CHK1 by PP1 [J]. Cell Cycle 2004; 3: 529—533.
- [9] George Z, Michael DR, David AR. CHK1-deficient tumor cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects [J]. EMBO J 2003; 22: 713—723.
- [10] Luo Y, Chen Z, Han EK, et al. Blocking CHK1 expression induces apoptosis and abrogates the G2 checkpoint mechanism [J]. Neoplasia 2001; 3(5): 411—419.
- [11] Atsushi H, Kong YY, Shuhei M, et al. DNA damage-induced activation of P53 by the checkpoint kinase CHK2 [J]. Science 2000; 287: 1824—1827.
- [12] Lee SL, Tian Hui, Faje AT, et al. Radiation-induced phosphorylation of CHK1 at S345 is associated with P53-dependent cell cycle arrest pathway [J]. Neoplasia 2002; 4(2): 171—180.
- [13] 惠周光,李晔雄,杨伟志,等. UCN-01去除放射后肿瘤细胞 G<sub>2</sub>期阻滞及其相关机制 [J]. 癌症 2005; 24(1): 1—6.
- [14] Okubo E, Lehman M, Friedrich N. Negative regulation of mitotic promoting factor by the checkpoint kinase CHK1 in simian virus 40 lytic infection [J]. J Virol 2003; 77: 1257—1267.
- [15] 李晔雄, Philippe A, Coucke 己酮可可碱对(E)-(2)-脱氧-氟亚甲基胞苷的放射增敏和细胞周期的影响 [J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2001; 10(3): 200—203.
- [16] Playe LC, Hicks DJ, Qualtrough D, et al. Abrogation of the radiation-induced G2 checkpoint by the staurosporine derivative UCN-01 is associated with radiosensitization in a subset of colorectal tumor cell lines [J]. Br J Cancer 2002; 87(3): 352—358.

(收稿日期: 2006-08-10)