

细胞凋亡与肿瘤的发生发展和治疗

厦门大学生命科学学院(厦门361005) 欧阳高亮 李祺福综述 洪水根审校

摘要 细胞凋亡是一种细胞自主生理性死亡,对多细胞动物机体的正常发育和自身稳定具有极其重要的作用,细胞凋亡失衡与许多疾病尤其是与肿瘤的发生发展有关。近几年来,有关细胞凋亡分子机制的研究进展较快,对细胞凋亡在放疗、化疗等肿瘤治疗措施中的作用也有了进一步的认识,并有可能形成一种新的对肿瘤细胞凋亡失衡进行干预的诱导肿瘤细胞凋亡疗法。

关键词 细胞凋亡 肿瘤 肿瘤治疗

细胞凋亡(apoptosis)又称程序性细胞死亡(programmed cell death),是一种不同于细胞坏死的细胞生理性死亡方式。其形态和生化方面的变化主要包括DNA断裂、染色质凝聚、膜结构肿胀、细胞皱缩、凋亡小体形成等。

近年来,有关细胞凋亡分子机制的研究进展很快,表明细胞凋亡是细胞内发生的一序列有序受控的连锁反应,有多种基因蛋白产物参与了细胞凋亡过程,其中包括死亡受体及其配体(Fas与FasL, TNFR1, TNFR2与TNF)、胞浆信号转导蛋白(如TRADD、FADD、RIP、CRADD等)、caspases、bcl-2蛋白家族等。细胞凋亡信号传导的大致过程是细胞整合各种胞内外凋亡信号,通过细胞凋亡信号与其受体形成的复合物经胞浆信号转导蛋白传递至一组细胞凋亡的执行人caspases,再由激活的caspases对其特异性底物进行降解,最终导致细胞凋亡。细胞凋亡信号传导的关键是caspases的激活。启动型和效应型caspases的相继激活,导致凋亡抑制剂失活,并使一些与DNA修复、复制和mRNA拼接有关的蛋白活性降低,破坏核纤层,使染色质凝聚,促使凋亡小体形成^[1,2]。同时,微管、中间纤维等细胞骨架组分以及细胞外基质也与细胞凋亡有关^[3-5]。另外,线粒体及其释放的细胞色素C(Cyt C)在细胞凋亡过程中也起重要作用,凋亡信号可通过破坏线粒体电子传递链,改变其跨膜电位,大量释放caspases的激活剂Cyt C,影响细胞能量代谢并产生大量氧自由基,细胞最终发生凋亡^[6-8]。

细胞凋亡在维持机体自身稳定方面具有重要作用,细胞凋亡严重失衡对机体具有破坏性影响。现已证明,许多疾病尤其是肿瘤的发生发展与细胞凋亡失衡有关。细胞凋亡过多可致老年性痴呆、中风等疾病,凋亡不足可致自身免疫性疾病和肿瘤。目前有关细胞凋亡的详细分子机制已有许多文献报道,本文拟对细

胞凋亡与肿瘤发生发展的关系及其在肿瘤治疗中的作用作一综述。

一、细胞凋亡与肿瘤的发生发展

几乎所有低等和高等动物的细胞均具有细胞凋亡这一功能,细胞凋亡对多细胞动物机体的正常发育和自身稳定起着极其重要的作用。细胞凋亡与细胞增殖、分化均是细胞的基本生命活动,三者密切相关。正常细胞的增殖、分化、凋亡受到一序列复杂基因群的严格调控。细胞增殖、分化、凋亡三者之间的平衡失调与肿瘤的发生发展有关^[9]。

肿瘤的发生发展是一多基因、多步骤、多阶段的复杂过程。细胞凋亡在肿瘤发生发展过程中主要起负调控作用,可以阻遏肿瘤细胞迅速生长。根据目前对细胞凋亡调控机制的认识,可将与细胞凋亡相关的基因大致分为促凋亡基因和抗凋亡基因两大类。当细胞促凋亡基因活性受抑制和(或)抗凋亡基因被激活,使该细胞不能凋亡而长期存活,如再加上癌基因异常高表达和(或)肿瘤抑制基因活性受抑制,最终可能导致细胞癌变和肿瘤形成。目前研究较为深入的与肿瘤发生发展密切相关的凋亡相关基因主要有p53基因、bcl-2基因家族等。

野生型p53基因是通过停止细胞生长和诱导细胞凋亡而发挥其肿瘤抑制者的功能^[9,10]。DNA损伤时,野生型p53基因表达迅速增强,p53蛋白累积并与损伤的DNA形成高度稳定的复合物,DNA复制停止,细胞停滞于G₁期,以使细胞得以修复损伤的DNA,重新进入细胞周期;如果修复失败,p53蛋白则介导细胞发生凋亡。突变型p53基因则无此功能,且抑制细胞凋亡,并与肝癌等多种肿瘤的发生发展有关。

bcl-2基因家族是细胞凋亡的重要调节者^[11,12]。目前已发现至少15个bcl-2蛋白家族成员,根据其其对细胞凋亡作用的功能特点,可将bcl-2蛋白家族分为促

凋亡蛋白家族和抗凋亡蛋白家族,这些 bcl-2 蛋白家族成员之间可形成异二聚体或同二聚体,它们之间的比例影响着细胞对各种凋亡刺激因子的敏感性或抗性,决定 caspases 活化与否,从而最终决定细胞是否进行凋亡^[13]。bax 蛋白属于促凋亡蛋白家族,野生型 p53 基因可对 bax 基因的表达活性进行调节^[14]。bcl-2 蛋白属于抗凋亡蛋白家族,在多种肿瘤中表达。bcl-2 蛋白过表达虽不影响细胞增殖,但可抑制细胞凋亡,从而与肿瘤的发生发展有关。

二、细胞凋亡与肿瘤治疗

目前一般认为,肿瘤的发生发展不仅是细胞增殖失控和细胞分化异常的结果,同时也与肿瘤细胞凋亡失衡有关。因此针对肿瘤细胞凋亡失衡对肿瘤细胞凋亡进行干预性调节就不失为一种肿瘤治疗策略,目前临床上应用的许多肿瘤治疗手段如放疗、化疗、激素治疗、热疗与一些生物疗法的作用机制之一便是引发肿瘤细胞凋亡。因此探讨细胞凋亡在各种肿瘤治疗手段中的作用,不仅有助于对各种肿瘤治疗方法的机制进行深入研究,同时也有助于针对肿瘤细胞凋亡失衡而采取相应措施以提高肿瘤治疗的效果。

(一) 细胞凋亡与肿瘤放疗和化疗

放疗和化疗对肿瘤细胞均有明显的杀伤作用,均是目前肿瘤治疗中常用治疗措施。放疗和化疗治疗肿瘤的机制虽是多方面的,但近年来许多研究表明,放疗和化疗均可引起肿瘤细胞凋亡,并可能是肿瘤细胞死亡的主要方式。

放疗引起细胞凋亡可能涉及 p53、bcl-2、bax 基因的参与。其中 p53 基因在细胞对放疗辐射引起的 DNA 损伤无法修复时,启动细胞凋亡机制将该细胞加以清除。目前认为,放疗引起的细胞凋亡大多数是由 Fas 介导的,Fas 与其配体 FasL 相互作用在放疗损伤的细胞清除中起重要作用,而且 p53、bcl-2、bax 等基因参与了对 Fas 介导的细胞凋亡的调控。

许多抗肿瘤化疗药物如烷化剂、顺铂、氮芥类化合物、DNA 拓扑异构酶抑制剂、干扰微管药物等均可诱导肿瘤细胞凋亡。目前已知化疗敏感性和抗性均与细胞凋亡相关基因 p53、bcl-2 有关^[15]。表达野生型 p53 基因的肿瘤经 γ 射线和阿霉素治疗后消退,但 p53 基因缺失或突变者则对治疗有较强的耐受性。另外,化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡也与线粒体的功能状态有关。化疗药物可通过调节 bcl-2/bax、细胞氧化还原状态、胞质 Ca^{2+} 水平、神经酰胺、双亲性分子来改变线粒体膜完整性,诱发线粒体膜通道开放,膜完整性丧失,Cyt C 核酸内切酶释放入胞浆,从而诱发肿瘤细

胞凋亡^[16]。由于许多抗肿瘤药物主要是通过引起肿瘤细胞凋亡来发挥治疗作用,因此设法诱导肿瘤细胞凋亡,提高细胞死亡/增殖的比值,就成为化疗新目标,而且细胞凋亡程度可作为评估化疗疗效的一项新指标,并有可能成为筛选新抗肿瘤药物的标准之一。

虽然放疗和化疗均可通过诱导肿瘤细胞凋亡来发挥治疗作用,但往往由于耐受细胞群的出现,导致恶性肿瘤复发或浸润转移。研究表明,放疗和化疗均可激活一些肿瘤细胞的转录因子 NF- κ B 的转录,抑制 NF- κ B 的表达可增强肿瘤细胞对各种凋亡诱导的敏感性^[17]。由于肿瘤细胞对放疗、化疗产生耐受与肿瘤细胞凋亡受抑制有着内在的密切联系,因此通过诱导肿瘤细胞凋亡,提高肿瘤细胞对放疗、化疗的敏感性,降低肿瘤细胞对放疗、化疗的耐受性,可望开辟逆转肿瘤治疗耐受新途径。

(二) 细胞凋亡与肿瘤激素治疗和细胞因子治疗

一些激素可诱导某些与激素密切相关的肿瘤细胞发生凋亡。激素敏感型肿瘤细胞经激素及其类似物或拮抗剂处理,可发生细胞凋亡,这是乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌等肿瘤激素治疗的主要机制之一。如促性腺激素在卵巢癌的发生发展及其药物抗性中起重要作用,抗促性腺激素的激素治疗可用于卵巢癌治疗^[18];雌激素拮抗剂多米酚(toremifene)可诱导乳腺癌细胞凋亡,并抑制乳腺癌转移;撤除雄激素,可引起大量的前列腺癌细胞发生凋亡。

细胞因子是机体细胞分泌的调节细胞增殖、分化与死亡的一大类因子,包括 IL、TGF、TNF、IFN、CSF 等。其中大多数细胞因子具有促进细胞增殖和抑制细胞凋亡的作用,但少数细胞因子可诱导肿瘤细胞凋亡,如 TNF α 可引起人类乳腺癌细胞凋亡;TGF- β 1 可诱导人白血病细胞和肝癌细胞凋亡;新近发现的 TNF 超家族成员 TRAIL/APO-2L 对肿瘤细胞具有选择性的诱导凋亡作用,而对正常细胞无毒或毒副作用很小^[19]。由于细胞因子对不同种类的细胞可能具有不同甚至完全相反的效应,而且细胞因子对细胞凋亡的调控也是一个非常复杂的过程,因此选用细胞因子要注意其特异性,以便最大限度地诱导肿瘤细胞凋亡,克服细胞因子治疗引起的全身毒副作用等缺点。

与细胞因子相类似,一些生物制剂也可诱导肿瘤细胞凋亡。如由鸡贫血病毒编码的一种小分子蛋白细胞凋亡素(apoptin),可诱导多种人类肿瘤细胞发生 p53 基因非依赖性细胞凋亡,且 bcl-2 基因可促进这种细胞凋亡。而一般情况下,bcl-2 基因起抑制 p53 基因依赖性细胞凋亡的作用。另外,即使是 bcl-2 基因过表

达, apoptin 也不诱导人正常细胞发生凋亡, 但正常细胞若被病毒转化则易受 apoptin 诱导而发生凋亡。因此 apoptin 是一种极具潜力的抗肿瘤生物制剂^[20]。

(三) 细胞凋亡与肿瘤基因治疗

肿瘤的发生发展与凋亡相关基因表达异常所引起的肿瘤细胞凋亡受阻有关。因此针对肿瘤细胞凋亡受阻, 通过基因转移技术, 将促凋亡基因选择性导入肿瘤细胞以增强肿瘤细胞对凋亡诱导的敏感性, 或将抗凋亡基因导入机体正常细胞以增强正常细胞对放疗、化疗诱导凋亡的抗性的研究是肿瘤基因治疗研究的一个重要方向。

由于野生型 p53 基因在诱导肿瘤细胞凋亡中起十分重要的作用, 而人类恶性肿瘤中至少有 50% 发生 p53 基因突变, 因此野生型 p53 基因在肿瘤基因治疗中倍受重视。研究表明, 应用基因转移技术将野生型 p53 基因导入人类恶性淋巴瘤细胞系中, 不仅可以抑制其增殖, 也可诱导其凋亡。

bcl-2 是一种抗凋亡基因, 能阻止各种刺激因子引起的凋亡发生, 促进细胞存活。将 bcl-2 基因导入患白血病小鼠的骨髓细胞, 可使骨髓细胞 bcl-2 基因表达明显增强, 从而提高骨髓细胞对化疗药物诱导凋亡的耐受性, 减轻化疗所引起的骨髓抑制等毒副作用。

另外, 应用反义技术将反义 DNA 或反义 RNA 导入肿瘤细胞, 可抑制某些抗凋亡基因的表达, 增强肿瘤细胞对化疗药物诱导细胞凋亡的敏感性。如在化疗前将 bcl-2 基因的反义寡聚核苷酸应用于 bcl-2 基因高表达的肿瘤, 如乳腺癌、肺癌、胃癌、白血病等, 可提高肿瘤对化疗的敏感性, 从而增强化疗效果。

(四) 细胞凋亡与肿瘤诱导分化治疗

细胞增殖失控、分化异常和凋亡失衡是肿瘤细胞的基本生物学特征。因此针对肿瘤细胞增殖失控、分化异常和凋亡失衡三者之中任一环节进行肿瘤治疗, 往往会对其它环节造成一定的影响。肿瘤放疗和化疗等细胞毒疗法主要是针对肿瘤细胞的增殖失控而设计的。肿瘤诱导分化治疗则主要是针对肿瘤细胞增殖失控、分化异常, 应用分化诱导剂抑制肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤细胞向成熟阶段分化, 使肿瘤细胞恶性表型得以逆转, 呈现出正常或接近正常的表型与功能特征, 并进行终末分化。诱导分化治疗虽不是针对肿瘤细胞凋亡失衡而进行的, 但以上这些经分化诱导剂处理进行终末分化的肿瘤细胞大多最终也是以细胞凋亡的形式死亡而加以清除。因此从某种意义上说, 肿瘤诱导分化治疗也与细胞凋亡有一定的关系。事实上一些分化

诱导剂也可诱导肿瘤细胞凋亡, 如全反式维甲酸可同时诱导 HL-60 细胞和肝癌细胞的分化和凋亡, 而一些诱导细胞凋亡的药物如 As_2O_3 在低浓度时也可诱导肿瘤细胞分化。

除以上肿瘤治疗方法的机制与诱导肿瘤细胞凋亡有关外, 临床上应用中度高温热疗来杀伤肿瘤细胞也与诱导肿瘤细胞凋亡有关, 而且热疗与抗肿瘤药物、辐射联用可增加杀伤肿瘤细胞的效率。研究表明, 肿瘤等温度敏感组织经 $43^{\circ}C$ 、30 分钟热处理后, 出现广泛的细胞凋亡; 而加热至 $46^{\circ}C$ 或更高温度, 30 分钟则可导致细胞坏死。高温所引起的细胞凋亡不同于其它因素诱导的凋亡, 热休克蛋白(HSP)、活性氧和 Ca^{2+} 均参与了高温诱导的细胞凋亡。

三、展望

细胞凋亡的研究已成为当前生命科学研究热点之一。近年来, 随着细胞凋亡分子调控机制研究的不断深入以及细胞凋亡与肿瘤发生发展关系的进一步阐明, 人们逐渐认识到诱导肿瘤细胞凋亡不仅仅是放疗、化疗、热疗和一些生物疗法抗肿瘤作用的机制之一, 其本身也可以单独作为一种新的肿瘤治疗策略, 并有可能形成一种新的以细胞凋亡信号传导通路中的细胞凋亡相关基因或其蛋白产物为靶点的对肿瘤细胞凋亡失衡进行干预的诱导肿瘤细胞凋亡疗法, 即针对肿瘤细胞凋亡信号传导通路受阻靶点, 通过激发肿瘤细胞促凋亡因素和(或)抑制其抗凋亡因素, 增加肿瘤细胞对凋亡诱导的敏感性, 重新启动肿瘤细胞凋亡的级联反应, 加速肿瘤细胞凋亡, 从而达到肿瘤治疗的目的。同时, 诱导肿瘤细胞凋亡疗法也可与其它肿瘤治疗手段相联用, 针对不同的肿瘤, 将抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞分化和诱导肿瘤细胞凋亡三者结合起来综合考虑, 优化临床治疗方案, 可望提高肿瘤治疗效果。

参考文献

- 1 Thornberry NA, Lazebnik Y. *Science*, 1998; 281(5381): 1312~1316
- 2 Green DR. *Cell*, 1998; 94(6): 695~698
- 3 Wang LG, Liu XM, Kreis W, et al. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1999; 44(5): 355~361
- 4 Prasad S, Soldatenkov VA, Srinivasarao G, et al. *Int J Oncol*, 1999; 14(3): 563~570
- 5 Shi YB, Li Q, Damjanovski S, et al. *Int J Mol Med*, 1998; 2(3): 273~282
- 6 Green DR, Reed JC. *Science*, 1998; 281(5381): 1309~1312
- 7 Mignotte B, Vayssiere JL. *Eur J Biochem*, 1998; 252(1): 1~15
- 8 Decaudin D, Marzo I, Brenner C, et al. *Int J Oncol*, 1998;

基因重组免疫毒素研究进展

苏州医学院附属第二医院(苏州 215004)

苏州医学院神经科学研究所

罗良生综述 黄 强审校

摘要 重组免疫毒素是通过基因工程技术融合载体和毒素弹头而获得的具有特异性细胞毒作用的杂合分子,与第一代免疫毒素相比,具有小分子、产品均一性好、易于大规模制备等优点。本文对目前重组免疫毒素的基础与临床应用研究,特别是在抗肿瘤方面的研究进展作一综述。

关键词 免疫毒素 重组融合蛋白

免疫毒素是具有导向能力的分子(载体)和具有细胞毒性的分子(毒素)偶联而成的具有特异性细胞杀伤能力的杂合分子。早在1906年,德国药物化学家 Ehrlich 就提出导向治疗的概念。当时的设想是将肿瘤特异的抗体与细菌外毒素偶联制备出能特异地杀伤肿瘤的“魔弹”。但是直到20世纪70年代后,随着单克隆抗体技术和生物工程技术的出现和发展,以及一系列高效毒素的筛选和纯化,导向药物,尤其是抗肿瘤导向药物的研究才有了较大的发展。免疫毒素即是导向药物的一种。传统的免疫毒素即第一代免疫毒素是通过化学偶联制备的,这种免疫毒素的稳定性及均一性较差,分子量大,导致其穿透力较弱,对肿瘤特别是实体瘤的疗效较差,同时,较难大规模制备,从而限制了其应用^[1]。随着分子生物学技术的发展,近年来出现了基因重组免疫毒素,即通过基因重组技术融合载体和毒素基因,经表达及纯化制备而得的免疫毒素,能较有效地克服上述缺陷,在抗恶性肿瘤治疗、免疫调节、治疗慢性感染性疾病等方面,显示出美好的应用前景。

一、重组免疫毒素的弹头设计及作用机制

(一) 蛋白毒素

1. 蛋白质合成抑制剂

这类毒素通过进入胞浆抑制蛋白合成而发挥作用,根据其来源可分为两类。

(1) 细菌外毒素: 主要是指绿脓杆菌外毒素(PE)和白喉毒素(DT),这是目前最多用于构建重组免疫毒素弹头的一类蛋白毒素。PE是由绿脓杆菌分泌的一种非常强烈的细菌外毒素,给小白鼠一次静脉注射0.3 μ g后就能使其在24小时内死亡;如果给一个细胞直接注药入胞浆,只需几个分子的PE就可使细胞死亡。这使其成为构建免疫毒素的理想药物^[2]。PE是含613个氨基酸的单链蛋白,分子量为 6.6×10^4 ,该蛋白有3个主要结构域,即Domain iv a(1~252aa),是细胞结合区;Domain ③(253~364aa),是膜转位区;Domain ④ADP核糖基化活性区,为其抑制细胞的蛋白合成所必需。另外,还有位于Domain iv a与Domain ④之间的小区域,去除后并不影响PE的活性。PE的细胞毒作用机制是:Domain iv与细胞表面的受体结合,经胞吞作

12(1): 141~ 152

- 9 Evan G, Littlewood T. *Science*, 1998; 281(5381): 1317~ 1322
 10 King KL, Cidowski JA. *Annu Rev Physiol*, 1998; 60: 601~ 617
 11 Adams JM, Cory S. *Science*, 1998; 281(5381): 1322~ 1326
 12 Chao DT, Korsmeyer SJ. *Annu Rev Immunol*, 1998; 16: 395~ 419
 13 Lea RG, Riley SC, Antipatis C, et al. *Am J Reprod Immunol*, 1999; 42(2): 100~ 109
 14 GomezManzano C, Fueyo J, Alameda F, et al. *Int J Mol Med*, 1999; 3(1): 81~ 85

- 15 Serone L, Horney P. *Melanoma Res*, 1999; 9(1): 51~ 58
 16 Decaudin D, Marzo I, Brenner C, et al. *Int J Oncol*, 1998; 12(1): 141~ 152
 17 Wang CY, Casack JC, Liu R, et al. *Nat Med*, 1999; 5(4): 412~ 417
 18 Konishi I, Kuroda H, Mandai M. *Oncology*, 1999; 57(Supple 2): 45~ 48
 19 Bonavida B, Ng CP, Jazirehi A, et al. *Int J Oncol*, 1999; 15(4): 793~ 802
 20 Notebom MHM. *Apoptosis*, 1999; 4(5): 317~ 319

(收稿: 2000-04-24 修回: 2000-04-17)