

- 7 Hruszkewycz A M. Biochem Biophys Res Commun, 1988; **153**: 191
- 8 Fraga C G, Tappel A L. Biochem J, 1988; **252**: 893
- 9 Inouye S. FEBS Lett, 1984; **172**: 231
- 10 刘晓麒, 曹恩华. 生物物理学报, 1993; **9** (3): 493
- 11 Fujimoto K, Neff W E, Frankel E N. Biochim Biophys Acta, 1984; **795**: 100
- 12 Hruszkewycz A M, Bergtold D S. Mutat Res, 1990; **244**: 123
- 13 Park J W, Floyd R A. Free Rad Biol Med, 1992; **12**: 245
- 14 Reid T M, Loeb L A. Cancer Res, 1992; **52**: 1082
- 15 Wood M L, Dizdaroglu M, Gajewski E *et al.* Biochemistry, 1990; **29**: 7024
- 16 Cheng K C, Cahill D S, Kasai H *et al.* J Biol Chem, 1992; **267**: 166
- 17 Yoshida L S, Miyazawa T, Hatayama I *et al.* Free Radic Biol Med, 1993; **14**: 191
- 18 Ramesh G, Das U N, Koratkar R *et al.* Nutrition, 1992; **8**: 343
- 19 Hartwig A, Klyschnasko H, Schlepegrell R *et al.* Carcinogenesis, 1993; **14**: 107
- 20 Koizumi T, Li Z G, Tatzumoto H. Toxicology Letters, 1992; **63**: 211

细胞凋亡 (Apoptosis) 与癌基因

阎水忠 赵晓航 吴 旻

(中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

摘要 细胞凋亡是细胞衰老、死亡过程的主要形式。最近研究发现有多种癌基因与抑癌基因参与细胞凋亡过程。因此目前认为癌基因与抑癌基因不仅控制细胞增殖、分化, 而且调节细胞凋亡。细胞凋亡受阻或缺陷可能是肿瘤发生的基础之一。

关键词 细胞凋亡 (apoptosis), bcl-2 基因, c-myc 基因, p53 基因

细胞凋亡 (apoptosis) 也称为程序性细胞死亡 (programmed cell death), 是细胞衰老、死亡过程的主要形式。与病理情况下的细胞坏死不同, 凋亡的细胞周围没有炎症反应, 并且凋亡过程受细胞内外环境因素的影响。它的主要特点包括: 染色体凝缩、胞浆出现大泡、DNA 断裂成 180—200bp 大小的片段以及形成凋亡小体 (apoptotic body)。目前认为细胞凋亡是体内细胞的一个生理性调节机制, 它参与调节体内细胞的数目 (包括未成熟的原始细胞数目)。最近研究发现某些肿瘤细胞可以通过人为地触发细胞凋亡而被清除, 后来又发现包括许多治疗肿瘤的细胞毒性药物以及 X 射线、 γ 射线照射引起的细胞死亡也是通过细胞凋亡实现的^[1]。因此人们认为某些肿瘤的发生与其细胞凋亡缺陷或受阻有关, 这不仅是肿瘤细胞逃脱细胞数目的生理性控制的基础, 而且也可能成为抵抗机体自然防御与临床治疗的基础。由

此可知了解触发或加快肿瘤细胞凋亡的因素对肿瘤的防治有很重要的意义。

目前研究认为细胞凋亡的触发是一个级联式 (cascade) 基因表达的结果, 有许多基因参与这一过程, 其中包括多种癌基因与抑癌基因。本文就这方面的研究近况作一简介。

1 bcl-2 癌基因的表达抑制细胞凋亡

bcl-2 基因是于 1984 年 Tsujimoto 等从滤泡性淋巴瘤细胞淋巴瘤中分离出来的一种癌基因, 该肿瘤有 14 号染色体与 18 号染色体易位, t (14; 18) (q32; q21)。18 号染色体上的 bcl-2 易位到 14 号染色体上, 与免疫球蛋白重链基因串联形成融合基因, 从而使 bcl-2 基因在 B 细胞内异常表达, 这种异常表达在淋巴瘤中起着重要的作用。1988 年 Vaux 等^[2]将 bcl-

2 基因转入骨髓原始细胞使其在细胞内高表达, 结果导致肿瘤的发生, 并发现这些细胞的生存期明显延长, 而细胞的增殖率未见明显增加. 后来 McDonnell 等^[3]在 bcl-2 转基因鼠内也发现同样的结果, 说明 bcl-2 的高表达可以抑制细胞的死亡. 1990 年 Williams 等^[4]证实骨髓原始细胞的正常死亡是通过细胞凋亡而实现的. 另外, 有人用 EB 病毒感染细胞后可使细胞发生永生化或生存期延长, 后来的研究发现这一现象是由于 EB 病毒促使 bcl-2 表达的结果^[5]. 因此目前认为 bcl-2 是一种新的类型癌基因, 它不影响细胞的增殖, 而是作为细胞凋亡的一个潜在抑制剂调节细胞的死亡. 最近研究证实^[6]bcl-2 不仅在淋巴细胞系统表达, 而且在一些非淋巴系统组织 (如受激素调节的腺体、再生较快的组织、分裂后的神经细胞等) 也有表达. 并且发现 bcl-2 的表达可抑制或阻断许多因素引起的细胞凋亡^[7]. 有人用免疫组织化学的方法研究证实 bcl-2 表达的是一个分子量为 25 000 的膜结合蛋白, 位于线粒体内膜上. 推测 bcl-2 可能是通过改变线粒体的功能起作用的, 并且认为线粒体参与细胞凋亡^[8]. 但是也有人发现 bcl-2 蛋白位于核膜和胞浆内质网上^[9]. 最近, 为了证实 bcl-2 基因是否通过线粒体起作用, Jacobson 等^[10]用一种缺乏线粒体 DNA 的突变细胞研究发现, 它同样可以发生细胞凋亡, 并且能被 bcl-2 的表达抑制, 这说明无论是细胞凋亡还是 bcl-2 的抑制作用均不依赖于线粒体的呼吸作用. 并证实 bcl-2 表达的蛋白质, 在细胞内不仅位于线粒体内膜而且也结合于核膜和胞浆内质网. 但 bcl-2 如何参与细胞凋亡仍需要进一步的研究.

2 c-myc 癌基因与细胞凋亡

c-myc 癌基因与许多肿瘤有关, 在多种人类肿瘤细胞中发现有 c-myc 的扩增与高表达. 它不仅能促进细胞的增殖和恶性转化, 而且可以抑制细胞的分化. 最近研究发现^[11]c-myc 癌基因还参与细胞的凋亡过程, 在某些因素引起细胞增殖停滞时, c-myc 基因的持续性表达可

促进细胞凋亡, 同时发现细胞凋亡的程度与细胞内 Myc 蛋白的活性及其表达水平有关, 并且证实 Myc 蛋白诱导细胞凋亡的功能区与促进细胞转化、自身调节以及抑制细胞分化的功能区在同一结构域. Y. Shi 等^[12]用 c-myc 反义寡聚核苷酸作用于 T 淋巴细胞杂交瘤细胞, 结果发现肿瘤细胞的生存期延长. 另外 Bissonnette 等^[13]证实 c-myc 基因诱导的细胞凋亡可以被 bcl-2 抑制. 这些都提示 c-myc 基因在细胞凋亡过程中起着重要的作用, 是细胞凋亡的一个潜在的诱导剂 (inducer). 值得提出的是为什么 c-myc 基因同时具有促进细胞转化、增殖与促进细胞凋亡这两种截然相反的过程? 目前认为^[11]由于 Myc 蛋白中促进细胞凋亡的活性区、转化区以及自身调节区是同一区域, 它的表达只提供一个启动细胞的增殖与转化或细胞凋亡的信号, 只有在第二个生长信号刺激后才能抑制细胞凋亡, 促进细胞进入增殖状态, 若没有第二信号的作用则进入细胞凋亡过程. 有趣的是最近 1990 年我室冯骆等利用维甲酸 (retinoic acid) 在体外作用于人食管癌 EC8712 细胞系时发现早期反应是细胞 c-myc 基因表达明显下降, 然后出现终末分化与凋亡. 并且分离到一个具有抑制细胞恶性生长, 促进其衰老活性的 cDNA 片段, 命名为 RA538^[14]. 最近我们研究发现维甲酸在人食管癌 EC109 细胞系细胞内也有同样作用, 并发现维甲酸可以诱发细胞凋亡 (待发表资料). 此外, 我室赵晓航等用逆转录病毒载体 pA-BD9 携带一个 1.53kb 的 c-myc 反义 RNA 片段导入 c-myc 基因高表达的人食管癌 EC8712 细胞系, 发现在抑制细胞生长的同时, 还可诱导分化和凋亡, 相反在胎儿与成人食管粘膜上皮原代培养细胞 (c-myc 表达水平很低) 中, 则没有类似效应 (待发表资料). 1992 年 Evan 等^[11]发现以不同方式在细胞周期的不同阶段急剧降低鼠细胞中 Myc 蛋白的水平会诱导细胞凋亡, 在低血清培养条件下培养表达不同水平 Myc 蛋白的细胞亚克隆, 发现 Myc 蛋白的含量越高对低血清培养越敏感, 出现细胞凋亡早, 程

度也严重. 低血清培养中有丝分裂因子减少, 可使细胞的 c-myc 表达降低. 因此, 我们设想急剧降低 c-myc 水平对 c-myc 高表达的肿瘤细胞来说是致命性的, 而对 c-myc 表达量很低的正常细胞则不产生明显的影响. 由此看来 Myc 蛋白调节细胞的增殖、转化及凋亡的详细机理可能要比以上的解释复杂得多, 还需要深入的研究. 但可以确信 c-myc 癌基因在决定细胞生命的各个阶段, 即增殖、停滞、分化与死亡过程中起着重要的作用.

3 抑癌基因 p53 与细胞凋亡

目前研究认为, 抑癌基因可以发出抗细胞增殖的信号来拮抗癌基因产生和传递生长刺激信号, 这一过程可能是通过细胞的可逆性或不可逆性的生长停滞来实现的, 不可逆性的生长停滞可以导致细胞的衰老、终末分化或细胞凋亡. 因此可以认为某些抑癌基因参与细胞凋亡的过程. 最近研究发现野生型 p53 基因是其中之一.

目前对 p53 基因在癌变过程中的作用研究较深入. 实验证明 p53 基因失活可促使人类多种肿瘤的发生, p53 蛋白有潜在的抗细胞增殖作用, 可使细胞增殖停滞在 G1 期. 1991 年 E. Yonish-Rouach 等^[15]用电转移方法将一种温度敏感型的 p53 突变体导入骨髓瘤细胞系 M1 细胞中, 使其稳定表达. 结果发现在 32.5℃ 时野生型 p53 表达的转化克隆发生凋亡; 而在 37℃ 时突变体 p53 表达则不发生. 此外这种野生型介导的细胞凋亡可以被一种能诱导 M1 细胞分化的诱导剂 IL-6 明显抑制; 还发现在无血清培养的条件下 IL-6 没有此种功能. 后来又发现经癌基因转化的细胞对野生型 p53 作用的敏感性远比非转化的细胞高的多. 用 UV, γ 射线及其它抗肿瘤因子作用肿瘤细胞后使细胞 DNA 受损, 发现细胞内 p53 基因表达增加, 正常 p53 蛋白的稳定性也增强. 因此认为 p53 在细胞生长过程中可能作为一种分子感受器 (molecular sensor) 以一种“分子警察” (molecular policeman) 的身份监视细胞内

DNA 的状态, 如果细胞 DNA 受损 p53 蛋白水平就增高, 以中止增殖, 使受损细胞获得修复 DNA 的时间; 如果细胞 DNA 受损无法修复, 则 p53 蛋白持续增高, 引起细胞凋亡; 当 p53 发生突变时, 突变的 p53 蛋白不能引起细胞增殖的停滞或凋亡, 细胞内受损或错配的 DNA 就不能被修复或清除, 从而导致体内突变细胞增多, 成为生长失控癌细胞的前身^[16].

综上所述, 有许多证据可以说明癌基因与抑癌基因可能在控制细胞生存与死亡中起着很重要的作用, 同时说明细胞凋亡的缺陷或受阻可能是肿瘤发生的基础之一. 值得注意的是以往肿瘤研究的重点主要集中于如何控制细胞的增殖, 目前有一些研究证据使我们确信细胞凋亡的研究也应受到相应的重视. 对细胞凋亡及其调控的深入认识, 可以帮助我们弄清肿瘤发生的机理, 为肿瘤的防治提供新的线索.

参 考 文 献

- 1 Williams G T. *Cell*, 1991; **65**: 1097
- 2 Vaux D L, Cory S, Adams J *et al.* *Nature*, 1988; **335**: 440
- 3 Williams G T, Smith C A, Spooncer E *et al.* *Nature*, 1990; **343**: 76
- 4 McDonnell D T, Korsmeyer S J. *Cell*, 1989; **57**: 79
- 5 Gregory C D, Dive C, Henderson S *et al.* *Nature*, 1991; **349**: 612
- 6 Hockenbery D. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res*, 1992; **33**: A585
- 7 Levine B, Qi Huang, Tohn T *et al.* *Nature*, 1993; **361**: 739
- 8 Hockenbery D M, Zutter M, Hickey W *et al.* *Nature*, 1990; **348**: 334
- 9 Alnemri E S, Robertson N M, Fernandes T F *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**: 7295
- 10 Jacobson M D, Burne J F, King M P *et al.* *Nature*, 1993; **361**: 365
- 11 Evant G I, Wyllie A H, Glibert C S *et al.* *Cell*, 1992; **69**: 119
- 12 Shi Y, Glynn J M, Guilbert C J *et al.* *Science*, 1991; **257**: 212
- 13 Bissonnette R P, Echeverri F, Mahboubi A *et al.* *Nature*, 1992; **359**: 552
- 14 冯 璐, 王秀琴, 吴 旻等. *中华医学杂志*, 1990; **4**: 228
- 15 Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotern J *et al.* *Nature*, 1991; **352**: 345
- 16 Lane D P, Vojtesek B, Midgley C *et al.* *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res*, 1992; **33**: A596

8-hydroxyguanine. fluorescence products. lipid. DNA

Apoptosis and Oncogenes. Yan Shuizhong, Zhao Xiaohang, Wu Min. (*National Lab of Molecular Oncology, Cancer Institute Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 222

Apoptosis, programmed cell death, is a natural form of cell death characterized by active participated of a cell in the process leading to its own decrepit and death. Recently studies suggested that apoptosis is a result from a set of discrete cellular events that are regulated by a cascade gene expression. Oncogenes and tumor suppressor genes are involved in this regulation. Apoptosis is closely related to cancer. Failure and bolckage of apoptosis in tumor cells could therefore be the fundamental importance in contributing not only to the evasion of physiological countrols on cell numbers, but also to the resistance both to natural defenses and to clinical therapy.

Key words apoptosis, bcl-2 gene, c-myc gene, p53 gene

Construction of a Novel Human TNF Expression Plasmid and its High Expression in *E. Coli*. He Xiaolong, Chang Jinli, Cai Wucheng, Yu Hong, Lu Qun, Zhao Shouyuan, Wang Chenghai, Lin Baocheng, Zhu Henian. (*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 225

On the basis of analysis of TNF structure and the relationship between structure and function, a novel TNF coding sequence was synthesized by PCR technique and inserted into an

expression plasmid. By temperature induction the transformed *E. Coli* with the novel TNF expression plasmid produced high yield of novel TNF, whose cytotoxic activity to L929 cell was 10^3 higher than recombinant human TNF.

Key words tumor necrosis factor, polymerase chain reaction, gene mutagenesis

Activation of N-ras Gene is Associated With γ -Radiation-Induced Transformation of Rat Embryo Cells. Chen Changhu, Yao Kaitai, C. C. LING. (*Cancer Research Institute of Hunan Medical University, Changsha 410078*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 228

A cosmid library, constructed from DNA of the γ -radiation-transformed REC: myc cell line, designated REC: myc: Y33, was transfected into NIH/3T3 cells, yielding foci. Another round transfection of DNA from the first round focus into fresh NIH/3T3 cells produced second round foci. An active N-ras gene which originated from rat REC: myc: Y33 cells was detected in the NIH/3T3 secondary transformants. With PCR and direct DNA sequencing techniques, rat N-ras gene was found activated in the REC: myc: Y33 cells by CAA $\rightarrow$ CGA point mutation at codon 61, but not in the REC: myc cells. Also rat N-ras gene was identified as a point mutated gene in the NIH/3T3 transformants, and the endogenous N-ras gene in the NIH/3T3 recipient cells remains normal. What was found to be more interesting is that five out of six γ -radiation transformed REC: myc cell lines bear the same point mutation (CAA $\rightarrow$ CGA) indicating association of γ -radiation-induced transformation with point mutation in the N-ras gene.

Key words γ -radiation, transformation of rat embryo cells, activation of N-ras gene