

# 程序性细胞死亡与肿瘤

中国医学科学院基础医学研究所 夏 红 章静波综述

早在本世纪 60 代,人们即注意到了细胞自发生死亡与消失的现象,但对其研究并未象对待细胞增殖、坏死那样给予足够的重视。随着研究的深入,人们观察到一些在生理上、进化上及经理化物质诱导后所发生的不同于坏死的细胞死亡现象。它们表现为细胞收缩、染色质浓缩,细胞破裂为膜被小体,被邻近细胞吞噬。因此,并不象坏死那样引起局部炎症反应。Wyllie 等首先将这种死亡命名为细胞凋亡(apoptosis)或程序性细胞死亡(Programmed cell death)以区别于坏死。细胞凋亡是调节细胞数目及生命活动的一个积极主动过程,它似乎在许多组织更新、胚胎发育、各种组织或器官的生理进化、或萎缩以及肿瘤组织中广泛存在。本文将简述程序性细胞死亡与肿瘤的关系。

## 程序性细胞死亡的基本概念及特征

与细胞分裂作用相反,程序性细胞死亡是细胞发生的积极死亡过程,是正常细胞的自然死亡,与坏死有本质的区别。后者主要由于细胞损伤引起的急性病理性死亡,表现为细胞肿胀溶解,并诱发炎症反应等。

一、程序性细胞死亡的形态特征:1972 年,Kerr 等最早系统地描述了程序性细胞死亡的形态学特征,并将凋亡细胞形态学改变严格的划分为两个阶段,即核固缩、细胞膜起泡、细胞破裂,凋亡小体的形成等和凋亡小体被邻近细胞吞噬并降解两个阶段:进行凋亡的细胞初期可见染色质浓缩及细胞紧密连接消失。一种  $\text{Ca}^{++}-\text{Mg}^{++}$  依赖性核酸内切酶被激活将 DNA 降解为含一个或几个核小体的寡聚体长的片段,电泳图谱呈阶梯样改变。胞质浓缩致使细胞骨架及细胞间紧密连接的破坏。核周出现中间丝的浓缩(condensation),细胞膜表面起泡(blebbing)。进一步发展为细胞破碎,出现凋亡小体(apoptotic bodies),即由细胞膜包被的细胞碎片或细胞器,如完整的线粒体、溶酶体等。程序性细胞死亡的末期期为邻近正常细胞或巨噬细胞将凋亡小体吞噬,随后被溶酶体降解。

二、程序性细胞死亡的生化事件:几乎在任何系统程序性细胞死亡中均出现内源性  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$  依

赖性核酸内切酶的激活,这种核酸内切酶可被  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$  离子激活,亦能被  $\text{Zn}^{++}$  离子所抑制。在某些细胞如裸鼠胸腺皮质细胞中即有此酶的存在,在另一些细胞中可在程序性细胞死亡前被诱导。它可将 DNA 在核小体间酶解,使 DNA 断裂为 180—200bp 或其倍数的片段。该酶激活的同时,其它一些基因的表达也是必须的,如谷胱甘肽转移酶基因在细胞凋亡过程中表达增强,其表达产物和中间丝角蛋白成份与细胞骨架及其它蛋白的交叉连接有关。TRPM-2 基因在激素依赖性组织中撤除激素后表达水平增高。二者在凋亡过程的作用还不十分清楚。但似乎它们在细胞凋亡过程中是必须的。另外,激素依赖性组织中细胞凋亡还与其它一些酶活性升高有关,如组织蛋白酶 D (Cathepsin D)、组织型纤维蛋白溶酶原激活剂(tissue type plasminogen activator)以及细胞骨架降解有关的酶及胶原酶等。野生型  $\text{P}^{53}$  ( $\text{wtP}^{53}$ ) 基因编码的蛋白在细胞分化及凋亡过程中起重要作用,将  $\text{P}^{53}$  基因转移至  $\text{M}_1$  细胞后,细胞存活率很快下降,发生细胞凋亡。但值得提出的并非所有的细胞凋亡过程均需蛋白合成的。

## 生理过程中的细胞凋亡

细胞凋亡在许多生理过程中必不可少。它存在于广泛的生物过程中。在胚胎的发育过程中,管腔结构的形成,肢芽塑形的发育(remodeling),指(趾)间隙细胞的丢失,门遗传性器官退化(phyle genetic vestige)等过程中均有细胞凋亡的发生,且细胞消亡与胚胎发育的阶段及部位有关;动物的变态的过程与细胞程序性死亡也有关系,如蝌蚪尾部发生的甲状腺素依赖性的退化,昆虫肌肉的变态等;在免疫系统成熟的过程中,携带 T 细胞自身抗原受体(TCR)的 T 细胞在发育成熟过程中在自身抗原和主要组织相容性复合体成份反应下,  $\text{CD}4^{+}$  和  $\text{CD}8^{+}$  的前体胸腺细胞呈克隆性丢失。对转基因小鼠的研究亦提示克隆性丢失发生在  $\text{CD}4^{+}$  和  $\text{CD}8^{+}$  发育阶段。细胞凋亡在生理上的一个重要作用是确保身体某一特定部分的体积成份不超过生理上需要。如骨髓来源细胞,红系干细胞,生发中心 B 细胞等均通过细胞凋亡来维持组织的生理需要。在许多正常组

织中可发现凋亡小体存在,如人分泌期的子宫内膜,新生鼠的肾上腺皮质、非肿瘤组织或器官萎缩等。许多信号刺激,均可诱导细胞发生凋亡,糖皮质激素可诱导成熟胸腺细胞凋亡,肿瘤坏死因子(TNF)在某些细胞中亦有诱导细胞凋亡的作用。细胞也可因无信号而死亡,当胸腺 T 淋巴细胞在缺乏 IL-2 时,造血前体细胞(hemopoietic precursors)缺乏集落刺激因子时均可出现特征性细胞凋亡性死亡。这亦提示至少在某些类型细胞中存在某种生理机制阻止细胞凋亡的发生。

### 程序性细胞死亡与肿瘤

一、程序性细胞死亡与肿瘤:早在本世纪 60 年代,人们已经注意到在肿瘤的生长中有细胞自发性的死亡,并将之称为“收缩性坏死”(shrinkage necrosis),它有别于肿瘤缺乏血供(乏氧状态)而引起的坏死。Wyllie 等发现凋亡小体存在于他们所研究的所有肿瘤中,且常常数量很多。表明肿瘤细胞发生凋亡往往是很常见的现象。有鉴于此,有人认为肿瘤不是由于细胞生长增殖快而是由于凋亡细胞数目减少所致。

在正常情况下,细胞凋亡是在体内复杂的信号调节下进行的。当这些信号出现异常时,如编码参与信号传导的某些物质的基因突变,导致本应凋亡的细胞“非法”存活,使得这些细胞具有明显的生长优势。当再有另外的遗传损伤,如控制细胞增殖的基因突变时,就很可能产生一个高度恶性状态。而且,实验表明,许多肿瘤促进剂是通过抑制细胞凋亡而起作用的,实验发现分化中的白血病细胞所发生的细胞凋亡可以被造血因子如 IL-3 及肿瘤促进剂 TPA (12-O-tetra-decanoyl-phorbol-13-acetate) 所挽救,而非促瘤 TPA 则无此作用。程序性死亡抑制剂很可能为肿瘤促进剂或有肿瘤促进的功能。尼古丁可抑制多种刺激诱导的细胞凋亡,提示其有促进肿瘤的作用。许多证据均提示在肿瘤的形成过程中细胞凋亡受抑制起了一定的作用。肿瘤的转移能力也与细胞凋亡率下降有关,胞溶性谷丙转氨酶可催化蛋白交联  $\epsilon$  (谷酰基)-赖氨酸 [protein crosslink- $\epsilon$ -(glutamyl)-lysine] 的形成,而后者又是凋亡小体膜的主要成分。研究发现肿瘤的转移能力与胞溶性谷丙转氨酶的活力成反比。谷丙转氨酶催化能力下降,伴随着凋亡小体的形成减少,肿瘤转移能力因而增加。

二、细胞凋亡与癌基因、及抑癌基因:在肿瘤形成的多步骤中,某些基因的过度表达而导致细胞的选择优势,这种基因称为癌基因。同样,某些基因的

功能失活导致肿瘤的发生、发展,则称该基因为抑癌基因。依据目前已有的资料表明,癌基因与抑癌基因与细胞凋亡有一定的联系。基于这种认识,研究者们在这方面作了很多探索,到目前为止,已有有力的证据表明癌基因与抑癌基因均可影响细胞进入细胞凋亡。如 C-myc, bcl-2, P<sup>53</sup>, ras 等。随着研究的深入,将会发现更多的与细胞凋亡有关的癌基因与抑癌基因。

目前了解比较深入、较为公认的是 bcl-2 基因与细胞凋亡的关系。最初发现 bcl-2 基因为原癌基因,其表达产物在线粒体内膜,它是由于染色体易位 t(14;18) 使得该基因与免疫球蛋白重链位点并列,导致 bcl-2 基因的连续过度表达。滤泡淋巴瘤即为 bcl-2 的持续高表达的一个典型例子。bcl-2 是候选癌基因之一,在转基因动物中,发现大量处于非增殖状态的小 B 淋巴细胞,经过较长潜伏期后,可产生大细胞恶性淋巴瘤。这亦提示细胞恶性转化还需要其他损伤。有证据表明,许多进行性淋巴瘤还有一连续激活的重排了的 C-myc 基因的表达,二者相互作用的结果使得恶性淋巴瘤迅速发展。因此 bcl-2 的一个作用为增加细胞寿命,从而增加了肿瘤发生的机会。

在 bcl-2 及细胞凋亡的研究中发现, bcl-2 的表达有抑制细胞凋亡的作用。IL-3 依赖性淋巴母或骨髓样细胞系在缺乏淋巴因子时,很快会出现核质浓缩,阶梯样 DNA 图谱等特征性凋亡性死亡。但经逆转录病毒将 bcl-2 转入淋巴细胞后,在缺乏 IL-3 培养基中细胞仍存活而不发生凋亡,且处于细胞周期 G<sub>0</sub> 期,直到有其它致癌性遗传损伤如 C-myc 被激活时,才可导致肿瘤的产生。因此, bcl-2 在这里似对这些细胞提供生存信号,延长其寿命。

bcl-2 的连续表达可对抗许多因素诱导的细胞凋亡。如具有高表达 bcl-2 的细胞系可阻止地塞米松诱导的细胞凋亡。而具有 bcl-2 低表达的细胞系在地塞米松作用下很快表现为特征性凋亡。再如, bcl-2 蛋白还可抑制鬼臼乙叉甙诱导的程序性细胞死亡,并作用于拓扑异构酶-Ⅰ引起的 DNA 断裂至其修复之间的过程中。此外,在通常情况下,不表达 bcl-2 细胞在某些刺激下可诱导表达,如生发中心 B 细胞检测不到 bcl-2 的表达,但在阻止细胞进入细胞凋亡的不同处理作用下,发现 bcl-2 蛋白含量增加。但并不是所有程序性死亡都可用 bcl-2 阻止的,可能还存在独立于 bcl-2 的其它引起细胞凋亡的途径。

另外, EBV 病毒与许多肿瘤尤其 Burkitt 淋巴瘤有密切关系, 受 EBV 感染的 B 细胞细胞凋亡受阻, 寿命大大延长。EBV 病毒的基因产物中有一种 LMP 的蛋白(潜在膜蛋白), 可诱导 bcl-2 在 B 细胞中的表达, 这些进一步提示我们细胞凋亡, bcl-2 在肿瘤发生中起重要作用。

人类许多肿瘤均与癌基因 C-myc 有关。C-myc 的表达即可促进细胞增殖又可促使细胞凋亡。这种相互对立的作用依赖于关键性生长因子的存在与否。体外培养的不死性成纤维细胞有 C-myc 高表达。当血清生长因子作用下, 不断地增殖, 当 C-myc 表达下降或不表达及撤除血清生长因子条件下, 细胞处于生长抑制状态, 但在连续表达 C-myc 的细胞中, 撤除血清生长因子后不发生生长阻滞, 一些细胞继续增殖, 有些细胞仍进行 DNA 复制。但有相当多数细胞进入凋亡状态。另外, 一些阻断细胞增殖周期的处理, 如亮氨酸缺乏, 胸苷诱导 S 期阻滞等, 当 C-myc 有较高表达时, 均可诱导细胞凋亡。因此, C-myc 与关键性生长因子对细胞生长增殖死亡可归纳为以下三种状态: 当 C-myc 不表达, 生长因子对细胞生长抑制; 当 C-myc 表达, 生长因子亦存在时, 表现为细胞大量分裂增殖; 当 C-myc 表达, 关键性生长因子缺乏时, 表现为细胞进入细胞凋亡状态。所以 C-myc 的高表达在诱导某些细胞程序性死亡中是必要的。对人 HL-60 及人结肠癌细胞系中研究亦发现, 具有较高 C-myc 表达的 Colo320 细胞在鬼臼乙叉甙及其衍生物 VM-26 诱导作用下可发生凋亡, 而 C-myc 不表达的 HT-29 肿瘤细胞不能在鬼臼乙叉甙及 VM-26 诱导下进行细胞凋亡。

通过对体外培养细胞研究推测, 细胞中存在一个过度性“高度更替期”(high turnover state), 处于此期的细胞极易进入凋亡。某些原癌基因可使细胞由“高度更替期”进入增殖状态, 对抗细胞凋亡的诱导。

另外, 突变 ras 癌基因的表达与许多生长因子有相似的作用, 均可抑制凋亡的发生。而且携带激活 Ha-ras 癌基因的肿瘤, 表现出很低的凋亡率, 及较高的侵袭性。

肿瘤抑制基因可提供抗增殖信号, 以对抗癌基因产生的生长刺激信号。野生型 P<sup>53</sup> 蛋白即有抗肿瘤作用, 多使细胞阻滞于 G<sub>1</sub> 期。P<sup>53</sup> 失活是在人类肿瘤中发生最高的遗传事件之一。抑癌基因 P<sup>53</sup> 与癌基因在凋亡中有相反的作用, 前者可诱导易感染细胞进入凋亡状态。为研究 P<sup>53</sup> 与细胞凋亡的关系, 建立了

Clone-6 温度敏感株, 通过改变温度 wtP<sup>53</sup> 被启动, 细胞存活率迅速下降, 表现出凋亡特征, 提示 wtP<sup>53</sup> 很可能在未转化的 M<sub>1</sub> 前体细胞中调节这些细胞凋亡。P<sup>53</sup> 功能的丧失在白血病的形成中也起重要作用。wtP<sup>53</sup> 的抑制作用在癌基因转化细胞中要大于非癌基因转化细胞, 很可能由于随恶性增高。P<sup>53</sup> 抗增殖作用域值下降。另外, 细胞 P<sup>53</sup> 损伤剂如 UV 或一射线作用下也可提高 P<sup>53</sup> 表达水平, 引起细胞生长阻滞或启动细胞凋亡。不同刺激可激活一共同的细胞凋亡途径, 腺病毒 E1A 基因可使成纤维细胞对离子照射, 5-氟尿嘧啶, 鬼臼乙叉甙和阿霉素易于进入凋亡状态, 但均同时伴随 P<sup>53</sup> 抑癌基因的表达。但在 P<sup>53</sup> 阴性 M1 clone 6 细胞中在适宜刺激下, 如在缺乏血清时亦可诱发细胞凋亡, 提示存在不依赖 wtP<sup>53</sup> 的凋亡途径。

### 肿瘤中细胞凋亡的诱导

有人认为在肿瘤中细胞发生凋亡率下降, 但在许多刺激下肿瘤细胞可被诱导发生凋亡, 如许多抗癌药物及非抗癌药物均可诱导肿瘤细胞凋亡。

一、烷化剂诱导的细胞凋亡: 烷化剂是一类具有活泼的烷化集团, 能与细胞中 DNA 或蛋白质分子中的氨基、巯基、羟基等起作用的抗肿瘤药物。在它作用下可使 DNA 交叉连接或断裂, 造成 DNA 结构和功能的损害。将氮芥作用于 Burkitt 淋巴瘤细胞系 JLP119, 造成肿瘤细胞 S 期延长。当细胞周期接近正常时, JLP119 细胞 DNA 降解出现特征性凋亡片段, 这提示 DNA 损伤与细胞凋亡存在一定的关系。在烷化剂苯丁氮芥 3mM 浓度作用下人白血病细胞 HL-60 亦有类似改变。

二、抗代谢物诱导肿瘤细胞凋亡: 抗代谢物如氮甲嘌呤, 5-氟尿嘧啶, 阿糖胞苷等, 也可诱导肿瘤细胞凋亡。胞嘧啶、阿糖胞苷(Ara-c)处理人白血病细胞 U-937, 细胞克隆形成能力大大下降, DNA 降解为寡聚核苷酸片段, 发生肿瘤细胞凋亡。抗叶酸氮甲嘌呤亦可诱导小鼠白血病细胞系 L1210 细胞程序性死亡。嘌呤可增强氮甲嘌呤的毒性作用, 它可使 dATP 水平升高, 刺激核酸内切酶切割 DNA 的作用。Thymidylate 合成抑制剂可导致 dUTP 错误掺入 DNA, 从而诱导双链断裂, 发生细胞凋亡。羟基脲亦有类似作用。

三、激素类药物对细胞凋亡的作用: 糖皮质激素可诱导许多细胞凋亡, 如诱导前-B-白血病细胞细胞系 697 细胞凋亡。某些癌细胞分裂增殖是激素依赖性的。对雄性激素反应性 PC-82 人前列腺癌异体移

植雄性裸鼠,在去势后两周,肿瘤体积缩小 50%。同时伴随着细胞生长增殖受抑制及细胞凋亡发生,转化生长因子  $\beta$  及凋亡相关基因 TRPM-2 (testerone repressed prostatic message 2) 表达增强。对抗雌性激素作用的三苯氧胺可诱导雌性激素受体的乳腺癌细胞凋亡。在体内撤除雌性激素可导致相似的作用。

此外,其它抗癌药如拓扑酶-1 抑制剂、VM-26 (鬼臼塞吩-26) 和鬼臼乙叉- (etoposide), 植物类抗癌药如顺铂, 以及其它诸因素如 TGF- $\beta_1$ 、乙醇、 $H_2O_2$ 、紫外线、 $\gamma$ -射线均可诱导某些肿瘤细胞凋亡。

结束语:以往对癌基因与抗癌基因的研究多集中在其对细胞生长、增殖方面的影响。近年来人们发现,许多癌基因及抗癌基因与程序性死亡有密切

的联系。对细胞凋亡的研究将会发现更多的调控细胞凋亡的基因,甚至可发现更多的癌基因或抑癌基因,同时对肿瘤的形成、发展以及转移的认识将会更加深入。对肿瘤细胞中凋亡诱导的研究、调节细胞凋亡的产物及凋亡相关基因的探讨对于我们对肿瘤的治疗及其机制的研究很有帮助,对癌基因的认识将会更深入。正如我们现在所发现 C-myc 癌基因不但有促进细胞增殖的作用,亦有促使细胞凋亡作用,其它癌基因也许在某些情况下可促进凋亡的进行,而一些抑癌基因或许会抑制凋亡的发生。对这些方面的研究将会为肿瘤的基础研究及治疗开辟出一条新的途径。(本参考文献 50 篇从略)

## 长春地辛致神经反射性麻痹性肠梗阻 1 例报告

江苏省肿瘤防治研究所内科 冯继锋 唐桂棟 翁丽丽

长春地辛(VDS)的神经毒性反应多为轻度的末梢神经炎、乏力、肌痛等,超剂量单次应用或累积剂量可引起严重的神经毒性反应。单次常规剂量 VDS 致初治病人神经反射性麻痹性肠梗阻尚未见报道,我们最近遇见一例,现报告如下。

患者,女性,53 岁(病案号 106249),因右乳浸润性导管癌 N 期,右乳单纯性切除术后一月于 1993 年 7 月 24 日收入。化疗前无特殊主诉。体检:一般可,全身浅淋巴结未及,心肺无阳性发现,腹平软无压痛,肝脾未及,腹水征(-),四肢活动自如,神经系统检查无异常。实验室检查:三大常规、肝肾功及血生化正常。X 线胸片示左肺有一  $3 \times 3.5 \text{cm}^2$  转移灶,腹部 B 超(-)。

1993 年 8 月 6 日患者接受 CTX0.6g、MTX20mg、5-Fu 1.0g 及 VDS5mg 静脉化疗。化疗后第四天出现手指末梢麻木感及乏力,深腱反射减低。第五天诉腹胀不适,排气排便减少。第九天腹胀加重伴恶心,欲吐,肛门无排气、排便,查体:全腹对称性膨隆,腹软局部有压痛无反跳痛,肠鸣音减弱(1-2 次/分)甚至消失,X 线腹透见肠腔积气、无积液,血钾  $3.1 \text{mmol/L}$ 。诊为神经反射性麻痹性肠

梗阻。经禁食、胃肠减压、腹部热敷、新斯的明 1mg 肌注每日二次及补液补钾处理,腹胀、腹痛逐渐减轻。第十五天出现肛门排气、排便,肠鸣音逐渐恢复正常。第二十天复查血钾  $5.0 \text{mmol/L}$ ,但手指末梢麻木感及乏力持续至第二十四天才消失。

讨论 本例化疗后出现麻痹性肠梗阻考虑为长春地辛所致,因为:(一)患者系初治病人,既往无神经系统及消化道疾病史,亦无长服抗癌药或其他药物史;(二)四种抗癌药物中,5-Fu、CTX 无神经系统毒副反应,MTX 在鞘内注射时才偶见神经毒性反应,而 VDS 系致神经毒性反应的主要药物之一;(三)在后来不含 VDS 的第二、三次化疗后患者未再出现任何神经毒性反应。说明 VDS 是该例麻痹性肠梗阻的主要原因。

从避免骨髓抑制及神经毒性作用的角度来看,单次  $3 \text{mg/m}^2$  VDS 是安全可耐受的,当使用剂量过大或总量较大(连续应用)时,可以出现感觉异常(肢端麻木、肌痛等)、深腱反射减低等,但不影响生理功能。本例在常规单次  $3 \text{mg/m}^2$  初次使用即出现严重的神经毒性反应,提示存在个体差异,临床应用 VDS 应密切观察,注意鉴别、尽早发现,及时处理。