

# 细胞凋亡的研究

丘振宇, 王亚琴, 许喜林

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510641)

**摘要:** 细胞凋亡是一种进化保守的细胞死亡形式, 在细胞正常的生理状态中具有极其重要的作用。本文综合概述了细胞凋亡的特点、机理及其检测方法。

**关键字:** 细胞凋亡; 特点; 机理; 检测方法

中图分类号: Q255; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)02-0101-04

## The Research of Apoptosis

QIU Zhen-yu, WANG Ya-qin, XU Xi-lin

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

**Abstract:** Apoptosis is a type of cell death with a constancy of evolution, which plays an important role in normal cell metabolism. This article mainly describes the characteristics, mechanism and the detection methods of apoptosis.

**Key words:** Apoptosis; Characteristic; Mechanism; Detection

### 1 细胞凋亡的概念

细胞凋亡的概念是 1972 年英国阿伯丁大学病理学教授 Kerr 等人<sup>[1,2]</sup>首次提出的。细胞凋亡 (Apoptosis, APO) 是指为维持内环境稳定, 由多种基因控制的细胞自主的有序的死亡过程, 所以也常被称为细胞程序死亡 (programmed cell death, PCD)。它不是病理条件下的一种自体损伤现象, 而是一个主动的过程, 涉及一系列基因激活、表达以及调控等作用, 是为更好地适应生存环境而主动争取的一种死亡过程。

#### 1.1 细胞凋亡与坏死的区别

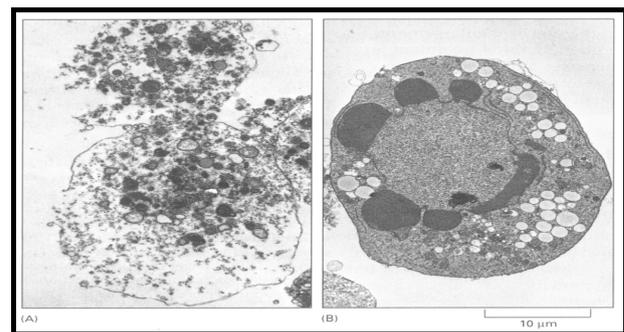
坏死 (Necrosis) 是细胞因受到强烈的理化或生物因素作用而引起细胞的无序变化性死亡过程。它依次表现为细胞胀大、胞膜破裂、细胞内容物外溢、核变化较慢、DNA 降解不充分和引起局部严重的炎症等现象。

细胞凋亡则是细胞对环境的生理性病理刺激信号、环境条件的变化或缓和性损伤而产生的应答有序变化的死亡过程。在此过程中, 细胞质膜先发生反折, 包裹断裂的染色质片段或细胞器, 然后逐渐分离形成众多的可被邻近细胞吞噬的凋亡小体 (Apoptotic Bodies)。整个过程中由于细胞质膜保持了良好的整合性, 内容物不会逸散到胞外环境中, 不引发炎症反应。

收稿日期: 2006-08-20

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (04020059)

作者简介: 丘振宇, 在读硕士, 从事微生物基因工程及生物制药方面的研究。



A 坏死细胞

B 细胞凋亡

图 1 坏死和细胞凋亡的区别

#### 1.2 细胞凋亡的特征

(1) 形态学特征: 首先是细胞表面的特化结构如微绒毛消失; 染色质凝集, 嗜碱性染色增强, 细胞核崩解。此时线粒体仍保持正常形态, 但核糖体逐渐从内质网脱离。最后细胞体积缩小, 一部分细胞质和核碎片由膜包裹成程序死亡小体。它们再由细胞表面出芽脱落, 并被巨噬细胞、上皮细胞吞噬。

(2) 生物化学特征: 一方面, DNA 片断化——核小体间连接 DNA 的部位被降解, 产生寡聚核小体 DNA 片段, 即 180~200 bp 的 DNA 片断; 另一方面, 在细胞凋亡的过程中往往还有新的表达和某些生物大分子的合成作为调控基因。

### 2 细胞凋亡的信号传导途径

细胞凋亡的信号传导途径极其复杂, 但许多细胞凋亡的诱因常通过相同的路径来传导死亡信号, 这些

路径被称为凋亡信号传导的基本通路。Lockshin 通过观察鳞翅目昆虫节间肌肉的正常衰变及变性肌肉的超微结构改变,得出结论:当细胞受到生理性和病理性刺激作用后能触发凋亡起始信号,按一系列精确的反应程序启动自身遗传机制,形成级联放大的信号传导和基因表达;再通过信号传导系统将信号传导至效应器,最终导致生理性死亡<sup>[3]</sup>。在此过程中存在多种传导途径,其中死亡配基(FAS 和 TNF)和细胞内应激(cellular stress)是两条最为重要的传导途径。

### 2.1 FADD Caspase-8 通路

死亡受体(Death Receptor)是能够诱导细胞凋亡的 TNF 超家族的亚型,目前已发现 FAS、TNF-R1、TRAMP、TRAIL-1 和 TRAIL-2 五个家族成员。这些受体同属 I 型膜蛋白,其共同特点是胞外部分富含半胱氨酸残基,胞内部分含有与死亡信号传导相关的死亡区域(death domain)<sup>[4]</sup>。除 TRAMP 外, TNF 死亡受体家族相应的配基已被确定,其结构也具有相似性,皆属 II 型跨膜蛋白;由三个相同的亚单位组成的活性配基与受体结合后促使受体聚合而激活。此外配基也可由金属蛋白酶催化后以可溶性形式存在。受体通过死亡区域直接或间接与细胞内衔接蛋白(adopter protein) FADD 相偶联。FADD 是一种胞浆蛋白, C 端含有死亡区, N 端是一种新的蛋白基序,是死亡信号传导的必需成分,称死亡效应区(death effect domain, DED)<sup>[5]</sup>,当 FADD 与受体结合后,借助于 DED 与 FLICE 偶联形成 DISC(death inducing signaling complex)复合物。FLICE 即 Caspase-8 前体,其 N 端也含有 DED, C 端含有典型 ICE 蛋白酶结构域,裂解后导致 Caspase-8 自我活化,进而激活下游效应 Caspase 诱导细胞凋亡<sup>[6]</sup>。体外研究表明 Caspase-8 能够直接裂解 Caspase-3,4,7,9,10,通过其他 Cas2pase 可间接裂解 Caspase-2,6<sup>[7]</sup>。

### 2.2 Apaf-1 Caspase-9 通路

Zou 等对经 CDNA 克隆并纯化的 Apaf-1 进行研究指出: Apaf-1 是最近在哺乳动物中发现与线虫 CED-4 同源的唯一成员;但结构较 CED-4 复杂,含有 3 个不同的结构域, C 端为 WD40 重复序列,中间是 CED-4 同源序列, N 端为与 Caspase 相同的 CARD 结构域(caspase recruitment domain, CARD),借此与其他含有 CARD 基序的 Caspase 结合。在非凋亡细胞中, CARD 并不暴露,不能与 Caspase 结合。在凋亡早期, Apaf-1 结合 ATP 和从线粒体释放出来的细胞色素 C,导致构型变化暴露 CARD,与 Caspase-9 前体形成四元复合物,最终活化 Caspase-9;同样, Caspase-1 和

Caspase-2 也含有 CARD 结构域,可能也由 A2paf-1 介导激活<sup>[8]</sup>。

Apaf-1 介导细胞凋亡可能是不同细胞毒性损伤(包括放射线照射,化疗药物,细胞因子撤除等)杀伤细胞的主要机理之一。Bcl-2 蛋白家族对其调控具有重要作用, Bcl-2、Bcl-XL 的 BH4 区域和 Apaf-1 的 N 端结合阻止 Caspase-9 活化,不同的细胞内应激信号通过 P53 使 Bax, Bik (Bcl-2 蛋白家族 BH3 成员)表达上调,同 Bcl-2、Bcl-XL 相互作用竞争 Apaf-1 结合位点使之解离,同时形成离子通道释放细胞色素 C 结合 Caspase-9,然后再激活下游 Caspase-3,6,7,裂解底物促使细胞凋亡<sup>[9]</sup>。

## 3 细胞凋亡的调控基因

基因是生物体活动的总指挥,调控细胞的生长与凋亡。细胞凋亡的主动性和程序性以及细胞凋亡时的形态学和生化变化也是一系列基因的激活、表达、调控的结果。细胞凋亡的相关调控基因包括促进细胞凋亡的基因和抑制细胞凋亡的基因两大类<sup>[10]</sup>,它们相互牵制,相互影响,共同影响细胞凋亡。

### 3.1 凋亡促进(apoptosis on)基因

凋亡促进基因包括野生型 P53, ICE, TGFB, Fas, c-myc, Ced-3, Ced-4, Bax 等。其中 Ced-3、Ced-4 是在线虫体内发现的,而 P53、ICE 等存在于哺乳动物中。P53 为肿瘤的抑制基因,分为两型:一型为野生型,可使细胞周期停止在 G1 期,抑制细胞增殖,诱导易感细胞发生凋亡;另一型为具有突变能力的变异型。白介素 1B 转换酶(interlukin1-B-converting enzyme, ICE),与线虫细胞凋亡相关基因 Ced-3 有较高的同源性,具有直接诱导细胞凋亡的作用<sup>[11]</sup>。Fas 为死亡受体, Fas-L 是 T 淋巴细胞产物, Fas 和 Fas-L 结合诱导细胞凋亡。癌基因 c-myc 是调控细胞周期的主要基因。研究表明, c-myc 在哺乳动物的细胞凋亡中发挥作用,它的过度表达既可使细胞周期变短、分裂增加,也可使细胞凋亡,这主要取决于能否获得关键的生长因子。Cleveland<sup>[12]</sup>认为,抑癌因素存在时, c-myc 促进凋亡,而有致癌因素时, c-myc 促进增殖。Bax 为 Bcl-2 基因家族成员,可诱导细胞凋亡<sup>[13]</sup>。

### 3.2 凋亡抑制(apoptosis off)基因

凋亡抑制基因包括 bcl-2, Rb, ced-9, 突变型 P53 等。B 细胞淋巴瘤白血病基因 2 (B cell lymphoma leukemia gene 2, bcl-2) 是细胞凋亡研究中最受重视的原癌基因之一。Yang 等对 bcl-2、细胞色素 C、细胞凋亡三者之间的关系进行研究得出结论: bcl-2 对细

细胞凋亡的调节作用是一个关键因素,它能通过阻止细胞凋亡信号传导系统的最后共同通道而抑制细胞凋亡<sup>[14]</sup>。对哺乳动物能抑制多种细胞类型的细胞凋亡,抑制由多种因素引起的细胞凋亡。突变型 P53 丧失野生型 P53 诱导细胞凋亡的作用,可抑制细胞凋亡。突变型 P53 还可拮抗 c-myc 引起的凋亡敏感性,从而对凋亡起到间接负调控作用<sup>[6]</sup>。

## 4 病毒感染诱导的细胞凋亡

病毒感染导致的细胞凋亡大多数是由病毒编码的蛋白产物直接诱导,也可能由病毒感染机体后,刺激机体细胞产生细胞免疫反应来间接诱导,这种作用可能是通过效应细胞 T 细胞和自然杀伤细胞的功能来完成。

病毒感染细胞后能够利用细胞的生物大分子合成与能量代谢系统来合成病毒蛋白和完成基因组的复制,并装配成成熟的病毒粒子。一些病毒具有能够诱导细胞凋亡的基因,另外一些病毒具有抑制细胞凋亡的基因。还有一些病毒既有诱导细胞凋亡的基因,又有凋亡抑制基因。在病毒感染细胞的过程中,病毒感染是宿主细胞凋亡的刺激和诱导因素,细胞凋亡是病毒感染导致细胞死亡的主要途径,往往会导致严重的疾病。

## 5 细胞凋亡检测方法

### 5.1 细胞形态学观察法

通过光学显微镜、荧光显微镜或电子显微镜,都能不同程度地观察到细胞凋亡的变化。但普通光学显微镜下很难达到满意效果,透射电镜可以观察到凋亡不同时期的细胞结构变化,所以可以对细胞凋亡提供最确切的证据。

### 5.2 免疫学和分子生物学方法

#### 5.2.1 DNA 凝胶电泳

正常活细胞的 DNA 凝胶电泳为一条区带:凋亡细胞由于 DNA 被裂解成单个核小体和寡聚核小体,电泳时呈现特征性的“阶梯状”条带,坏死细胞的 DNA 是被随即破坏的,电泳时出现类似血涂片的连续性改变。这是判断细胞有无发生凋亡的一种简便方法。但该法敏感性较差,检测敏感度为  $10^6$  个细胞/ml 以上,只适用于含有单一细胞成分标本的测定,对组织细胞组成复杂者,不能确定凋亡发生于哪类细胞。

#### 5.2.2 原位杂交或免疫组织化学方法

利用原位杂交、免疫组织化学等实验,检测 Bax、Bcl-2、c-myc、Fas/fasL 等凋亡相关调控基因的表达水

平。此方法适用于冰冻或石蜡包埋的标本,方法相对简便易行,可原位观察目的基因在哪些种类细胞表达及具体分布。

### 5.2.3 免疫印迹 (Immunoblotting) 技术

通过电泳分离细胞核基因组 DNA 或目的蛋白质,然后电印迹 (electroblotting) 转移到硝酸纤维素膜上,用带有放射性标记的 DNA 探针与之杂交或蛋白质特异性抗体共同孵育,利用放射自显影技术或光化学底物进行显色进行观察。

### 5.2.4 原位末端标记法 (In Situ End-Labeling, ISEL)

其基本原理是将渗入到凋亡细胞中的外源性核苷酸在酶的催化下与凋亡细胞因内源性核酸酶激活而产生的单股或双股断链相结合,再通过一定的显示系统使之显示出来。通常有两种方法:一种是 DNA 聚合酶 I 或 Klenow 大片段介导的原位缺口平移 (In Situ Nick Translation, ISNT) 法,另外一种是由末端脱氧核糖核酸转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) 介导的 dUTP 缺口末端标记技术 (TUNEL)。ISNT 是利用 DNA 聚合酶将带有标记物的外源掺入的核苷酸整合到凋亡细胞内断裂的 DNA 3'-羟基末端,通过合适的显示系统,观察是否有核苷酸掺入到 DNA 的断端。TUNEL 法是原位检测细胞凋亡最为敏感、快速、特异的方法,检测原理与 ISNT 相似,所介导的酶是 TdT,该酶能将带有标记物的外源性核苷酸无需 DNA 模板连接到凋亡细胞 DNA 断裂的 3'-羟基末端。

总之,检测细胞凋亡的方法很多,但都有其自身的缺点和局限性。相信随着对细胞凋亡机理认识的更加深入和了解,将会涌现出许多基于全新分析原理、特异性强、自动化程度高、简单快捷的测试方法。

## 参考文献

- [1] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972, 26(4):239-57.
- [2] Searle J, Lawson TA, Abbott PJ, et al. An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *J Pathol*, 1975, 116(3):129-38.
- [3] Lockshin RA, Beaulaton J. Programmed cell death. *Life Sci*, 1974, 15(9):1549-65.
- [4] Brojtsch J, Naughton J, Rolls MM, et al. CAR1, A TNFR-related protein, is a cellular receptor for cytopathic

- avian leucosis-sarcoma viruses and mediates apoptosis. Cell, 1996, 87(5):845-55.
- [5] Barinaga M. Forging a path to cell death. Science, 1996, 273(5276): 735-7.
- [6] 赵永同,朱峰.凋亡的分子机理[J].生命科学, 1996,8(2): 19-23.
- [7] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptor: signaling and modulation. Science, 1998, 281(5381): 1305-8.
- [8] Zou H, Henzel WJ, Liu X, et al. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell, 1997,90(3): 405-13.
- [9] Cain K, Brown DG, Langlais C, et al. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. J Biol Chem, 1999, 274(32): 22686-92.
- [10] Ranganath RM, NagashreeNR. Role of programmed cell death in development. Int Rev Cytol. 2001;202: 159-242.
- [11] Ruemmele FM, Dionne S, Levy E, et al. TNF $\alpha$ -induced IEC-6 cell apoptosis requires activation of ICE caspases whereas complete inhibition of the caspase cascade leads to necrotic cell death. Biochem Biophys Res Commun. 1999, 260(1):159-66.
- [12] Cleveland JL, Ihle JN. Contenders in FasL/TNF death signaling. Cell, 1995; 81(4): 479-82.
- [13] Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, et al. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. Science. 1997, 278 (5345):1966.
- [14] Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science, 1997, 275(5301):1129.
- [15] Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science, 1995, 267(5203):1445.
- [16] 沈羽珩等.真核基因表达调控[M].1997,北京:高等教育出版社,130-49.
- [17] David K et al. Science, 1998, 161: 6338-6346.
- [18] Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, et al. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. J Immunol. 1998, 161(11):6338-46.
- [19] Suarez P, Diaz-Guerra M, Prieto C, et al. Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. J Virol. 1996, 70(5):2876- 82.
- [20] Duan X, Nauwynck HJ, Favoreel HW, et al. Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. J Virol. 1998,72(5):4520-3.
- [21] Krebs J. The role of calcium in apoptosis. Biometals. 1998, 11(4):375-82.

(上接第 108 页)

- [9] 董文彦,张东平,高学敏等.大豆皂甙的免疫增强作用[J].中国粮油学报,2001,16(6):9-11.
- [10] 田晶,卢明春,苏志国等.AB-8 树脂法提取大豆皂苷的研究[J].食品与发酵工业,2000,26 (1) :16-18.
- [11] 用秀琴.天然表面活性剂皂树皂苷的性质及应用[J].杭州食品科技,2003, 71(4):11.
- [12] 王储炎,艾启俊,阚建全等.大豆皂苷的研究进展[J].食品科技,2005, 12 (6) :31-34.
- [13] 刘祥,余倩,裴晓芳等.大豆低聚糖对肠道菌群结构调节的研究[J].中国微生态学杂志,2003,15 (15) :10-12.
- [14] Kantha D. Role of bifidobacteria in nutrition [J]. medicine and technology. 1999,19(10): 1559.
- [15] 熊泽,唐明,邵伟.大豆低聚糖的提取及其对乳酸菌生长影响的研究[J].现代食品科技,2005,21 (4) :25-27.
- [16] 史宣明,赖本丽.大豆低聚糖的精制[J].中国油脂,2005,30 (5) :39-40.
- [17] 徐苇.大豆低聚糖的特性及在食品中的应用[J].中国食品添加剂, 2005, (4) :77-80.
- [18] 胡卫新,王晓磊,张洁.大豆异黄酮提取条件和大豆蛋白质分离工艺研究[J].大豆科学, 2005,24(1):26-29.
- [19] 王康成,蔡军.大豆异黄酮的生物学功能研究进展[J].湖州职业技术学院学报, 2004, (4) : 78-80.
- [20] 姜爱莉,孙丽芹.大豆异黄酮的提取及其性质研究[J].中国食品添加剂,2004, (1) : 93-95.
- [21] 方嘉坚,陈龙.大豆卵磷脂的提纯和表征[J].杭州应用工程技术学院学报,2000,12 (1):24-28.
- [22] 曹栋,裘爱泳.三氧化二铝柱层析法分离大豆磷脂中磷脂酰胆碱的研究[J].中国油脂,2001,26 (6):51-53.
- [23] 肖峰,刘学武,李志义.卵磷脂的提取与应用[J].食品研究与开发,2003,24 (5) :40-42.
- [24] 刘金银.早期断奶仔猪脂肪营养研究进展[J].湖北农业科学, 2000, (4) :59-63.
- [25] 张延坤,刘国忠,张东祥等.大豆膳食纤维制备工艺的研究[J].食品工业, 2006, (2) : 49-51.