

起了携带这种可诱导 Cre 重组酶和 loxP 化的 lacZ 报告基因的 ES 细胞,后者移植入受体鼠后,通过四倍体胚泡的互补(complementation)产生了可诱导基因剔除的小鼠,这使由目前方法产生条件剔除鼠的周期从 14 个月缩短到 6 个月^[14]。

在多数情况下,哺乳动物细胞对 Cre 重组酶的表达有惊人的耐受性。但一些研究表明 Cre 能够有效作用于哺乳动物基因组的内源性假 loxP 位点。Schmidt 等人^[15]发现在精子细胞表达 Cre 的小鼠是不育的,归因于可能由 Cre 引起的染色体重排,但体细胞没有出现这个问题^[2]。Cre-loxP 技术现已成为成熟的遗传分析工具,它被视为条件基因剔除的首要选择。

参 考 文 献

- [1] Ryding AD, et al., 2001, *J. Endocrinol.*, **171**:1-14.
[2] Rossant J and McMahon A. 1999, *Genes Dev.*, **13**:142

- 145.
[3] Logan M, et al., 2002, *Genesis.*, **33**:77-80.
[4] Lewandoski M, 2001, *Nat Rev Genet.*, **2**:743-755.
[5] Gossen M, Bujard H, et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **89**:5547-5551.
[6] Sawicki JA, et al., 1998, *Biotechniques.*, **25**:868-70, 872-875.
[7] Danielian PS, et al., 1998, *Curr Biol.*, **8**:1323-1326.
[8] Mao X, et al., 1999, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **96**:5037-5042.
[9] Lobe CG, et al., 1999, *Dev Biol.*, **208**:281-292.
[10] Awatramani R, et al., 2001, *Nat Genet.*, **29**:257-259.
[11] Marino S, et al., 2000, *Genes Dev.*, **14**:994-1004.
[12] Gerber HP, et al., 1999, *Development.*, **126**:1149-1159.
[13] Gaussin V, et al., 2002, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **99**:2878-2883.
[14] Seibler J, et al., 2003, *Nucleic Acids Resm.*, **31**:e12.
[15] Schmidt EE, Taylor DS, Prigge JR, et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **97**:13702-13707.

非吞噬细胞 NAD(P)H 氧化酶生成的 活性氧参与基因表达和信号转导

刘 箬* 董静梅** 郑荣梁*,***

(*兰州大学生命科学学院生物物理研究所 兰州 730000 **兰州高等师范专科学校 兰州 730070)

摘 要 以前认为,NAD(P)H 氧化酶仅存在于吞噬细胞,负责吞噬细胞呼吸爆发时产生活性氧(ROS)以杀灭微生物。现在发现正常非吞噬细胞也有 NAD(P)H 氧化酶,称之为类 NAD(P)H 氧化酶。该酶在生长因子和细胞因子的刺激下,介导非吞噬细胞产生胞内或胞外的 ROS,通过此途径产生的 ROS 对细胞增殖、分化和血管形成和缺氧反应等生理过程至关重要。这些新的发现,有力地证明了 ROS 作为细胞“信号分子”和“基因表达开关”的积极作用,改变了过去只把 ROS 看作有害物的误解。

以前认为,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸)氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide(phosphate) oxidase, NAD(P)H oxidase)是一种吞噬细胞的专有酶系,负责呼吸爆发时产生活性氧(Reactive oxygen species, ROS)来杀死入侵的病原微生物。但从上世纪 80 年代中期开始发现,一些非吞噬细胞,如血管内皮细胞、平滑肌细胞等也有 NAD(P)H 氧化酶同系物的表达,称为类 NAD(P)H 氧化酶,该酶在细胞因子和生长因子等配体的刺激下,可以产生胞内或胞外低水平的 ROS,通过此途径产生的胞内 ROS,直接参加细胞增殖、分化、凋亡等正常生理过程的调控,而胞外的 ROS,则参与细胞间通信等

重要功能。一旦阻断胞内 NAD(P)H 氧化酶介导产生 ROS 的途径,细胞将停止分裂、分化甚至死亡^[1]。同时,在一些细胞的亚细胞结构如内质网和核膜上也发现有该酶的表达。对 ROS 新来源和新功能的发现,为 ROS 是胞内的“信号分子”和“基因表达开关”的新观点提供了证据。值得指出的是,该领域的研究在国外开展已有 20 年之久,而国内仅有数篇有关此方面的研究报道。

吞噬细胞胞外膜上结合有 NAD(P)H 氧化酶,

*** 联系人。E-mail:zhengrl@lzu.edu.cn

该酶以 NADPH 和 NADH 两种辅酶作为电子供体,通过跨膜蛋白细胞色素 b_{558} 将 O_2 还原为 $O_2^{\cdot-}$,而 $O_2^{\cdot-}$ 可以将裹入吞噬小泡内的外来微生物杀死。细胞色素 b_{558} 由两个同源二聚体 gp91^{phox} 和 p22^{phox} 所组成,细胞质因子 p47^{phox}、p67^{phox} 和小分子 G 蛋白 rac-2 也参与产生 ROS 的过程(gp 代表糖蛋白,phox 表示吞噬细胞氧化酶成分)^[2]。非吞噬细胞的类 NAD(P)H 氧化酶在构成上和吞噬细胞的 NAD(P)H 氧化酶基本一致,也由 5 个亚基组成,各亚基的氨基酸序列也有很高的同源性,都以 NADP 和 NADPH 作为电子供体。但在功能上,吞噬细胞产生的 ROS 主要用来杀死外来细菌和侵入物,而非吞噬细胞产生的 ROS 则调控细胞增殖和分化等重要生理功能^[3]。

1. 生长因子和细胞因子等配体刺激类 NAD(P)H 氧化酶产生的 ROS

血小板衍生因子(PDGF)和表皮生长因子(EGF)是最早发现的可以引起细胞内生成 H_2O_2 的生长因子。BALB/3T3 细胞在 PDGF 的刺激下,表现出很强的分裂活性和 DNA 合成增加;如果用抗氧化剂清除 H_2O_2 ,则细胞停止分裂^[4]。平滑肌细胞中 PDGF 可以诱导产生 $O_2^{\cdot-}$, $O_2^{\cdot-}$ 又可以诱导核因子 κB (NF- κB)的激活^[5]。肿瘤坏死因子 α (TNF- α)刺激内皮细胞时,细胞内 H_2O_2 增加、NF- κB 激活、细胞内黏附分子基因表达量增加^[6]。而转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)则可诱导大鼠软骨细胞产生细胞外 H_2O_2 ,这些胞外的 H_2O_2 对细胞的分化、胞外骨架体系的形成及细胞间信号转导至关重要。进一步研究发现, H_2O_2 的产生与细胞分裂激活蛋白 P44/42 的激活相偶联,证明 H_2O_2 是通过影响细胞信号转导的某个环节来影响细胞行为的^[7]。迄今为止,发现有 20 种正常细胞,2 种癌细胞,在不同的细胞因子和分裂因子的刺激下,都可以产生 ROS(主要为 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 ,见表 1)^[3]。

探讨配体刺激受体产生 ROS 并引发细胞内生化事件的机理,已成为自由基生物学的热点课题。近年来,在分子水平上对吞噬细胞产生 ROS 机理的阐明,为研究非吞噬细胞配体刺激受体产生 ROS 的机理起到了很好的启发作用。Suh, Y. A 等人于 1999 年首次从正常人血管平滑肌细胞内检测出 nox1 基因,它是吞噬细胞 NAD(P)H 氧化酶催化亚基 gp91^{phox} 的同系物,将 nox1 基因转入 NIH3T3 细胞后,发现 H_2O_2 浓度增加 10 倍之多,细胞表现

出无限增殖等癌变迹象。但将过氧化氢酶和 nox1 基因同时转入时,细胞内 H_2O_2 浓度降低,细胞又恢复正常细胞的特征^[4,8]。随后一些研究者又相继在人和大鼠的内皮细胞、成纤维细胞中检测到了 gp91^{phox}、p22^{phox}、p47^{phox}、p67^{phox} 和 rac-2 等 NAD(P)H 氧化酶功能元件的 mRNA,并且发现,非吞噬细胞中类 NAD(P)H 氧化酶和高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病有密切的关系^[9]。Tadashi, S. 等人于 2001 年发现,在人血小板里也有类 NAD(P)H 样氧化酶的表达。在用吞噬细胞特异性刺激剂佛波脂(TPA)和钙离子载体刺激时产生较高水平的 ROS,而血小板内 ROS 的积聚,可能是高血压的诱因^[10]。但是也有研究显示,当配体刺激受体时,磷脂酶 A_2 、环加氧酶和脂加氧酶也可能介导产生 ROS。例如 Woo, C. H 等人发现 TNF- α 诱导细胞产生 ROS 的过程可以被磷脂酶 A_2 或脂加氧酶的抑制剂所抑制,至少可以证明这两个酶系参与了 ROS 的生成^[11]。尽管配体刺激受体产生 ROS 的酶源并不是很清楚,一些研究也发现类 NAD(P)H 样氧化酶可能不是正常细胞产生 ROS 的唯一酶系,但是在一些非吞噬细胞内确实存在类 NAD(P)H 氧化酶,而且抑制此酶可以降低细胞内 ROS 水平,进而影响到细胞的正常生理活动^[3],这说明在生长因子和细胞因子的刺激下所产生的 ROS,在细胞内担负着重要的信号转导和基因表达调控的功能。

2. 内质网和核膜上类 NAD(P)H 氧化酶产生的 ROS

光面内质网(sER)膜上结合有 P-450 和 b_5 家族细胞色素,用以通过电子传递氧化不饱和脂肪酸和异种生物素,使光面内质网行使对脂溶性药物和其他有害代谢物的解毒功能。在此过程中,将 O_2 还原成 $O_2^{\cdot-}$ 或 H_2O_2 。这种来源的 ROS 对内质网行使蛋白质加工和分泌功能具有一定影响。Bayraktutan, U 等在 2000 年从人血管内皮细胞光面内质网上检测出了 NAD(P)H 氧化酶的主要功能元件 gp91^{phox} 和 p22^{phox} 的同系物^[12]。但是和吞噬细胞不同的是,内皮细胞类 NAD(P)H 氧化酶底物特异性不同(NADH<NADPH),底物结合位点和糖基化位点也不同^[13]。Li, J. M 等发现在没有刺激源存在的情况下,内皮细胞内类 NAD(P)H 氧化酶仍然有较低水平的活性和 ROS,而吞噬细胞只有在病原物、TPA、钙离子载体等刺激剂存在时才可以检测到 NAD(P)H 氧化酶的活性及 ROS。进一步研究发现 gp91^{phox}、p22^{phox}、p67^{phox}、p47^{phox} 的同系物主要存在

表 1 非吞噬细胞 NAD(P)H 氧化酶依赖性产生的活性氧及功能

配 体	ROS	酶 源	细胞或组织	功能(或病理的)影响
TNF- α	$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2	NAD(P)H 氧化酶	成纤维细胞	未知
	$O_2^{\cdot-}$	未知	内皮细胞	未知
	$O_2^{\cdot-}$	NAD(P)H 氧化酶	肾小球细胞	MCP-1, CSF-1 的表达
	H_2O_2	黄素蛋白氧化酶	软骨细胞	有丝分裂
+ IL-1 + IFN- γ	$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2	NAD(P)H 氧化酶	成纤维细胞	未知
	$O_2^{\cdot-}$	未知	内皮细胞	未知
	$O_2^{\cdot-}$	未知	犬心肌细胞	心肌功能障碍
IFN- γ	$O_2^{\cdot-}$	未知	内皮细胞	未知
	H_2O_2	环加氧酶	肝细胞	抗菌功能
PDGF	H_2O_2	未知	BALB/3T3 细胞	细胞生长的感受态因子
	H_2O_2	黄素蛋白氧化酶	平滑肌细胞	有丝分裂, MAPK 激活
	$O_2^{\cdot-}$	未知	NIH/3T3 细胞	NOS 基因表达, PGE ₂ 释放
	$O_2^{\cdot-}$	黄素酶	平滑肌细胞	NF- κ B 依赖性的 MCP-1 诱导
EGF	H_2O_2	未知	皮肤癌	酪氨酸磷酸化, 细胞生长
	H_2O_2	未知	肝细胞	致癌作用
	$O_2^{\cdot-}$	脂加氧酶	PC12	细胞生长
	H_2O_2	未知	大鼠乳腺 CA 细胞	促进癌细胞转移
	H_2O_2	未知	小鼠表皮细胞	P70 ^{src} 激活
HB-EGF	H_2O_2	未知	平滑肌细胞	HB-EGF 自诱导
FGF-2	H_2O_2	黄素蛋白氧化酶	软骨细胞	诱导 c-fos 的表达
	$O_2^{\cdot-}$	未知	肺成纤维细胞	有丝分裂
IGF-1	H_2O_2	质膜氧化酶	3T3 L1-前脂肪细胞	脂肪细胞分化
HGF	H_2O_2	未知	肉瘤细胞	凋亡
TGF- β 1	H_2O_2	未知	小鼠成骨细胞	生长抑制; erg-1 诱导
	H_2O_2	未知	内皮细胞	生长抑制
	H_2O_2	NADH 氧化酶	肺成纤维细胞	未知
	H_2O_2	未知	肝细胞	凋亡
	H_2O_2	未知	肝星形细胞	α (1)原骨胶原、TGF- β 诱导
血管紧张肽 II	$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2	NAD(P)H 氧化酶	平滑肌细胞	细胞增生, p38 激活
	H_2O_2	p22 ^{phox} PLD-依赖的氧化酶	平滑肌细胞	增殖, 增生
5-羟色胺	$O_2^{\cdot-}$	NAD(P)H 氧化酶	平滑肌细胞	ERK 激活, 细胞增殖
舒缓激肽	$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2	环加氧酶	内皮细胞	未知
	$O_2^{\cdot-}$	未知, Ca^{2+} 依赖性的	人角质形成细胞	未知
凝血酶	$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2	NAD(P)H-样酶	内皮细胞	未知
	$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2	NAD(P)H 氧化酶 p47 ^{phox}	平滑肌细胞	生长, p38 激活
内皮素	H_2O_2	未知	心肌细胞	诱导 c-fos
谷氨酸	H_2O_2	未知	大鼠大脑皮质	未知
	$O_2^{\cdot-}$	线粒体, Zn^{2+} 依赖性	神经元	未知
乙酰胆碱	H_2O_2	线粒体	心肌细胞	未知

ROS. 活性氧; TNF- α . α 肿瘤坏死因子; IL. 白细胞介素; IFN- γ . γ 干扰素; PDGF. 血小板衍生因子; EGF. 表皮生长因子; HB-EGF. 肝素结合性表皮生长因子; FGF-2. 成纤维细胞生长因子 2; IGF- I. 胰岛素生长因子; HGF. 肝细胞生长因子; TGF. 转化生长因子; MCP-1. 化学引诱蛋白 1; CSF-1. 集落刺激因子 1; MAPK. 促细胞分裂剂激活性蛋白激酶; NOS. 一氧化氮合酶; PGE₂. 前列腺素 2; NF- κ B. 细胞核因子 κ B; PLD. 磷脂酶 D; erg-1. 早期应答基因 1; ERK. 细胞外信号调节因子。

于核周,免疫共沉淀反应推测类 NAD(P)H 氧化酶主要存在于核骨架上^[14,15]。

3. 细胞内类 NAD(P)H 氧化酶产生的 ROS 参与基因表达和信号转导调控

虽然非吞噬细胞类 NAD(P)H 氧化酶产生的 ROS 在细胞正常生理活动中承担重要功能这一点已为多数学者所公认,但是 ROS 行使信号传导和基因表达调控功能的机理却成为目前自由基生物学的一个难点。近年来,越来越多的证据显示,类 NAD(P)H 氧化酶介导产生的 ROS 参与了 Ca^{2+} 信号通路、丝裂原激活蛋白激酶信号通路 (MAPK)、蛋白激酶 C (PKC) 信号通路和蛋白激酶 B (PKB) 信号通路^[3-5]。甚至有人指出,ROS 可能参与了几乎所有已知的信号转导通路,其作用位点、机理和信号转导本身一样复杂^[3]。但值得指出的是,这些研究结果零碎不全,甚至有互相矛盾的报道,尚未形成完整的、公认的观点。但对一些细胞如小鼠胚胎成纤维细胞、肺成纤维细胞、血管平滑肌细胞中 ROS 参与信号转导的研究,较好地阐明了 ROS 在信号转导中的作用,很有代表性,也为该方面研究奠定了良好的

基础(见图一)^[3,7]。对于 ROS 的作用机理,目前比较成熟的观点认为,ROS 可以通过修饰蛋白质链上关键性的氨基酸残基而改变其结构和功能,研究较多的是 ROS 对半胱氨酸残基的修饰。有的研究认为 ROS 可以使巯基氧化成次磺酸 (-SOH、SO₂H、SO₃H) 或谷胱甘肽衍生物,如果这些改变发生在酶的活性部位,将会直接影响酶的结构和活性。另外,两个或更多的半胱氨酸残基还可以被 ROS 氧化形成二硫键,如 ROS 对细菌中的氧应激蛋白 oxyR 的修饰。PKC 也以同样的方式受到 ROS 的调节^[16]。也有人认为,配体刺激受体产生的 ROS,大多以比较稳定的 H₂O₂ 的形式存在,而 H₂O₂ 是一种水溶性小分子,可渗透质膜,可以快速合成,又可以快速降解,符合分子内信使的全部标准,所以由配体刺激受体产生的 H₂O₂ 很可能作为一种信号分子,将分裂和分化等信号传递到核^[17]。外加的 H₂O₂ 可以引起核转录因子激活蛋白 1 (activator protein-1, AP-1) 和 NF- κ B 的激活^[18-20],这可以间接地证明 H₂O₂ 确实可以像信号分子那样把胞外信号传递到胞内并激活基因的转录。

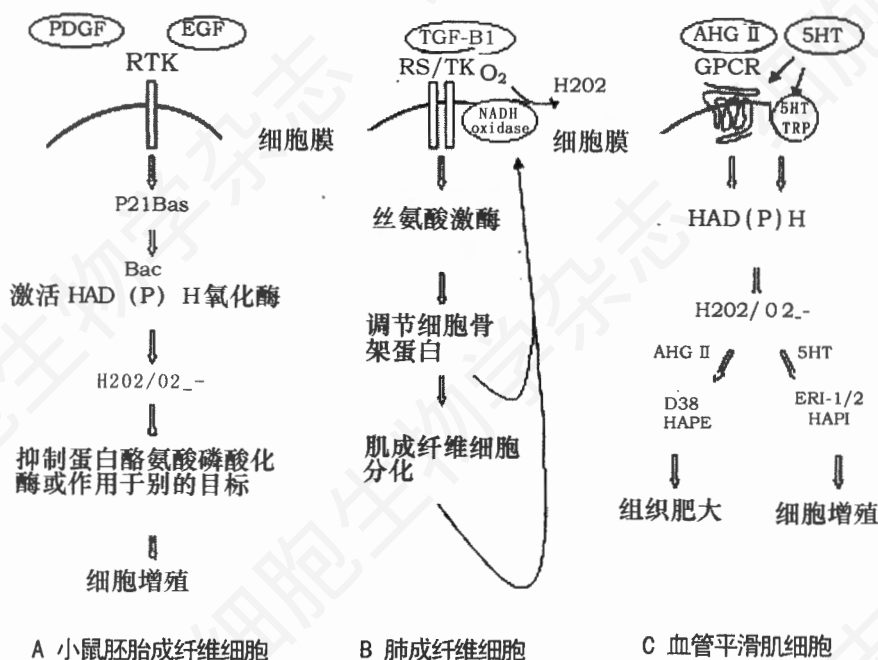


图 1 小鼠胚胎成纤维细胞

A. 肺成纤维细胞; B. 血管平滑肌细胞; C. 中 NAD(P)H 氧化酶依赖性生成的 ROS 可能参与的信号转导途径。
注: RTK——受体酪氨酸激酶; RS/TK——受体丝氨酸/苏氨酸激酶; AN II——血管紧张素 II; 5-HT——5-羟色胺; GPCR——G 蛋白偶联受体; 5-HT TRP——5-羟色胺转运蛋白。

4. 结语

综上所述,细胞因子刺激其受体,并通过类 NAD(P)H 氧化酶产生胞内或胞外的 ROS,ROS 又

作为一种信号分子影响相关基因的表达,进而调控细胞的增殖、分裂等诸多生理活动,但细胞因子配体和 NAD(P)H 之间的联系以及 ROS 参与细胞信号

传导、基因表达调控的机理仍知之甚少。同时,细胞内亚单位如内质网和核膜上也存在类 NAD(P)H 氧化酶,这拓宽了 ROS 生理作用研究的视野,有利于进一步了解正常细胞内 ROS 生成途径、位点及机理。

新的 ROS 生成途径及其生理作用的发现,也使以前一些病理条件下细胞内 ROS 水平的变化容易理解,比如在癌细胞内,ROS 水平普遍升高,很可能就是由于癌细胞自分泌的生长因子不断刺激其受体所致,而过高水平的 ROS 又会通过对信号传导和基因表达调控的影响来改变细胞内某些基因表达水平,进而加剧细胞的恶性分裂。而损伤 DNA 的 ROS,很可能来自于内质网和核膜上 NAD(P)H 样氧化酶,而非来自线粒体或别的途径。

值得指出的是,对于 ROS 在正常细胞内生成新途径的研究,尚处在探索阶段,也只限于几类细胞,另外还有很多相互矛盾的研究结果。对各种细胞进行 ROS 生成途径的研究,最终彻底阐明 ROS 对信号传导和基因表达调控的机制,将对生命科学的发展及对许多疾病病因的认识产生不可低估的影响。

参 考 文 献

- [1] Tammariello, S P. et al., 2000, *J. Neurosci*, **20**:1-5.
 [2] Takuya, Itou. et al., 2001, *Dev Comp Immunol*, **25**:47-53.
 [3] Victor, J T. et al., 2000, *Am J. Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **279**:L1005-1028.
 [4] Rebecca, S A. et al., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **98**:5550-5555.
 [5] Marumo, T S. et al., 1997, *Circulation*, **96**:2361-2367.
 [6] True, A L. et al., 2000, *Am J. Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **279**:L302-1110.
 [7] Yonekura, A. et al., 1999, *Endocr J*, **46**:545-553.
 [8] Suh, Y A. et al., 1999, *Nature*, **401**:79-82.
 [9] Guillermo, Z. et al., 2001, *Hypertension*, **38**:1395-1399.
 [10] Tadashi, S. et al., 2001, *Thromb Res*, **103**:399-409.
 [11] Woo, C H. et al., 2000, *J. Biol Chem*, **275**:32357-32362.
 [12] Bayraktutan, U. et al., 2000, *Arterioscler Thromb Vas Biol*, **20**:1903-1911.
 [13] Li, J M. et al., 2001, *Cardiovas Res*, **52**:477-486.
 [14] Li, J M. et al., 2002, *J. Biol Chem*, **277**:19952-19960.
 [15] Barry H and John M C., 1999, *Free Radicals in Biology and Medicine*. ed. By Gutteridge, pp.27-23, Oxford University Press
 [16] Barrett, W C. et al., 1999, *J. Biol Chem*, **274**:34543-34546.
 [17] Rhee, S G. et al., 2000, *Sci STKE*, 2000:PE1
 [18] Liu, H. et al., 2000, *Mol Cell Biol*, **20**:2198-2208.
 [19] Fetrow, J S. et al., 1999, *ASEB J*, **13**:1866-1874.
 [20] Choi, J. et al., 1997, *Biochem. Pharmacol*, **53**:987-993.

凋亡细胞的超微结构变化*

彭远英** 彭正松 喻可芳

(西华师范大学生物系 南充 637002)

摘 要 细胞凋亡可用多种方法进行检测,但对其形态学特征的透射电镜观察是确定细胞凋亡的最可靠的方法。动植物细胞凋亡的形态学特征基本相似,细胞凋亡过程中突出的超微结构变化为细胞核染色质凝集成团块状或染色质边集,细胞质显著空泡化,凋亡细胞发生碎裂,形成凋亡小体,同时伴有细胞器的改变。

细胞凋亡(apoptosis, APO)是由个体自身基因控制的细胞主动死亡的过程^[1],也称细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD),其研究是从动物开始的。早在 1972 年,希腊科学家 Kerr 等^[2]基于对肝脏细胞的研究提出了细胞凋亡的概念,随着动物细胞凋亡研究的深入,90 年代初,细胞程序性死亡这一概念被引入植物界,植物细胞凋亡的研究开始受到重视^[3]。

细胞凋亡的观察最初是从超微结构开始的,现在已知检测细胞凋亡的其他方法包括光镜染色,流式细胞仪检测, DNA 片段分析以及 3'-端原位染色法等均存在一定的缺陷,易受其他因素的干扰而限

* 四川省教育厅重点科研项目(2000-A46);四川省科技厅杰出青年基金项目资助课题。

** 通讯作者。E-mail:yy.peng@263.net