

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<sup>[1]</sup>,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<sup>[2]</sup>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<sup>[3]</sup>。

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

制其应用。而动植物细胞的凋亡过程虽然有一些差异,但其形态学特征基本相似<sup>[4,5]</sup>,凋亡细胞形态学特征的透射电镜观察即超微结构检查仍是确定细胞凋亡经典且最可靠的方法<sup>[1,5]</sup>,因而对细胞凋亡过程中超微结构变化的研究具有十分重要的意义。

## 一、凋亡细胞细胞核的变化

一般认为在细胞凋亡过程中细胞核的变化为最明显和最重要的部分,其主要特征表现为:细胞核凝集(condensation),染色质固缩、边缘化(margination),DNA裂解(fragmentation),进而核膜破裂,凝集的染色质散布到细胞浆内<sup>[6,7]</sup>。

细胞凋亡早期首先出现的是常染色质的超微结构特征消失,缺乏弥漫分布形式,核染色质分离及浓缩,凝聚成块状,类似异染色质结构,但其电子密度比异染色质要高得多,在电镜下表现出染色质积聚成界限清楚的致密块,紧靠核膜<sup>[8,9]</sup>。这种改变首先出现在核仁上部,逐渐延伸至整个核内,成块的染色质发生迁移,靠近核膜并向核的一端集中,被称为“成帽现象”。在核的一端形成新月形的高度致密的染色质帽,核缩小,核染色质边集于核膜下,进而向外发芽或裂解。与其他细胞比较肝细胞凋亡的成帽现象不太明显,染色质边集不明显<sup>[10]</sup>。染色质改变的同时,核基质也出现一些改变,核糖核蛋白(包括染色质周纤维、染色质周颗粒、染色质间颗粒等)由原来均匀的颗粒状凝集成大小不等的异染色质样的纤维块状物<sup>[11]</sup>,同时染色质趋边化的双层核膜开始降解而使界限变得模糊,双层膜间隙增宽,核周间隙增大,间隙不均匀,有的核膜发生皱缩<sup>[12]</sup>。在细胞核的整个变化过程中,核仁消失又是其中最早的变化之一,甚至发生在核染色质变化之前<sup>[10]</sup>。以上都是凋亡早期细胞核的改变。

凋亡中期染色质致密,均质无结构,呈颗粒、块状分布在核膜内侧或核孔之间的异染色质区,核固缩,形成不规则团块或呈黑洞状,核膜不完整或消失<sup>[12,13]</sup>。

随着凋亡的发展,细胞核染色质明显浓缩,这些凝聚成的浓缩的块状结构在核边缘形成新月状、八字形、花瓣状、环形等,也可中聚在核中央或整个核固缩成无膜包裹的圆球状高电子密度结构<sup>[14]</sup>,接着,核DNA在核小体连接处断裂成核小体片段,细胞核浓缩的染色质开始分裂,呈串珠状<sup>[13]</sup>,凝聚的染色质散布到细胞胞浆内,最后与细胞质成分包围

在一起形成“凋亡小体”(apoptotic body)<sup>[15,16]</sup>。

凋亡细胞细胞核的这种变化从形态学上反映了细胞核在凋亡过程中的核心作用,而在凋亡过程中不同细胞细胞核的形态学变化并不完全相同,其原因可能是凋亡细胞的功能状态不同以及所处的分化阶段不同所致<sup>[17]</sup>。

## 二、凋亡细胞细胞质的变化

细胞凋亡作为一种迅速发生的不引起周围细胞损伤的细胞死亡过程<sup>[18]</sup>,其发生与形态学改变均明显不同于细胞坏死(necrosis)<sup>[19,20]</sup>。1980年,Wyllie<sup>[9]</sup>等对细胞死亡进行了新的分类,把病理因素作用使细胞膜失去完整性导致的细胞溶解称为坏死,生理或病理条件下基因控制的细胞死亡称为凋亡。坏死主要表现为细胞肿胀、崩解,不形成凋亡小体,细胞内容物溢出散在于细胞之间,引起邻近组织的炎症反应,细胞膜和细胞器破坏发生早,DNA裂解发生于细胞崩溃之后<sup>[18,21]</sup>,这些变化与下述凋亡过程中细胞形态学特征的改变明显不同。

### 1. 细胞质基质的变化

电镜下见大多数凋亡细胞胞质空泡化十分显著<sup>[22]</sup>,胞浆浓缩,细胞质电子密度大,呈深色<sup>[23]</sup>,胞质内细胞器密集<sup>[24]</sup>,细胞质减少,细胞器结构模糊不清<sup>[14]</sup>,且细胞器结构破坏明显<sup>[10]</sup>,细胞体积小,细胞质内细胞器数目明显减少或消失<sup>[25]</sup>。

### 2. 线粒体的变化

在细胞凋亡过程中,线粒体外形变圆,膨胀、减少或消失,在线粒体腔内有细颗粒状物质。植物线粒体在细胞内往往集中分布,其内形成许多小空腔,并且线粒体嵴的轮廓较为模糊<sup>[23]</sup>,动物线粒体空泡或出现絮状物,线粒体外膜仍保存,但嵴断裂、溶解及脱基粒,排列紊乱,空化明显<sup>[10]</sup>。而另外一些研究则显示了不同的结果,如线粒体增殖<sup>[26]</sup>,其结构完整、清晰等<sup>[24]</sup>。

至于上述不同研究所报道的细胞在凋亡过程中线粒体数目变化的两种相反结果,苏金为等<sup>[5]</sup>的相关研究可对这种矛盾做初步解释。在细胞发生凋亡时,线粒体个数增加并向核靠拢是其变化初期的显著特点,还常见线粒体一端与核接触,一端连接内陷的质膜,说明此时线粒体数目增多是与核进行物质与信息交流的需要,在与核接触交流后,许多线粒体中出现中央空泡或基质囊泡化,逐渐衰亡,于是线粒体数目开始减少直至消失。

### 3. 内质网的变化

很多研究表明在细胞凋亡的过程中,都可见粗面内质网扩张,肿胀成囊泡状,同心圆平行板层状排列,有的囊泡与凹陷的细胞膜融合<sup>[10]</sup>。因此内质网扩张是凋亡细胞的突出表现之一<sup>[44]</sup>。在内质网扩张的同时,粗面内质网大量增殖,结构松散,其表面部分核糖体脱落,胞质内核糖体聚集<sup>[12]</sup>。

通过对小鼠肾脏发育中细胞凋亡的研究可看出线粒体变化与内质网改变的关系<sup>[14]</sup>。内质网扩张一般可在凋亡细胞中见到,部分具有内质网扩张的凋亡细胞线粒体结构近正常状态,然而,部分内质网扩张的凋亡细胞,特别是固缩成无膜包裹圆球状浓缩核的凋亡细胞中线粒体改变较大,如肿胀、嵴变形等,严重者空泡化,即内质网扩张可以伴有线粒体的改变,也可没有线粒体的变化,这说明内质网的扩张发生在线粒体变化之前。

### 4. 其他细胞器的变化

除了线粒体和内质网的结构变化外,内囊体膜皱缩弯曲,高尔基体的扁平囊数目减少,高尔基小泡增多<sup>[23]</sup>,有的细胞溶酶体等大量增殖,溶酶体破裂,但未释放溶酶体酶至组织间隙<sup>[10]</sup>,有的细胞膜内侧可见聚集的微丝,有的细胞内可见中心体。植物细胞表现出质体变长或一分为二,基粒数减少<sup>[23]</sup>。

关于凋亡过程中最先发生变化的细胞结构以及由此推测出的究竟哪些结构在细胞凋亡时起先导和启动作用的问题,研究结果尚不一致。有的研究发现,线粒体的形态改变更早于核染色质的形态变化,细胞核染色质在凋亡中晚期才出现浓缩、边集、降解,此时,线粒体数量明显减少,线粒体嵴也减少,有的已呈空泡状,提示线粒体在细胞凋亡的过程中可能发挥着先导或启动作用<sup>[24]</sup>,另一些研究表明:在细胞凋亡过程中,细胞核的改变较为明显,其变化是凋亡最早的变化,凋亡细胞细胞器的变化发生迟,而且不明显。吴波等<sup>[10]</sup>在对肝细胞凋亡的超微结构进行观察后提出:凋亡早期,即染色质发生凝聚、边集、“成帽”的时候,肝细胞胞浆内细胞器的变化非常轻微,仅表现为肝细胞胞浆内糖原颗粒减少或消失,线粒体轻度肿胀,部分线粒体基质内出现高电子密度的块状物,线粒体双层膜间隙不均匀,内质网轻度扩张。到凋亡晚期,尽管细胞器形态也发生明显的变化,但细胞器膜性结构完整,没有溶酶体内容物释放,没有细胞自我溶解现象,细胞器随着凋亡小体的形成而分布至各凋亡小体内。而最近在对植物细胞程序性死亡的研究中发现,液泡对凋亡细胞组分的

有序降解起关键作用。在植物细胞的液泡化过程中,细胞质基质和一些细胞器被液泡所吞噬,此时的细胞器结构完整。当液泡膜破裂、细胞质基质消失之后,细胞器才逐步解体<sup>[22]</sup>。而细胞核的变化出现较晚,是最后消亡的结构<sup>[5]</sup>。因此在细胞凋亡的过程中,究竟哪一部分的形态结构最先开始变化,哪一部分在细胞凋亡过程中发挥着先导和启动作用,还有待进一步的观察并对其生理生化机制进行进一步的研究。

## 三、凋亡细胞细胞膜的变化

细胞膜在细胞凋亡过程中最主要的特征变化是:胞膜出现卷折,细胞裂解形成凋亡小体<sup>[1,9]</sup>。

在形成凋亡小体的过程中,凋亡细胞与邻近细胞脱离<sup>[10]</sup>,细胞膜皱缩,胞体缩小,早期微绒毛变细,中期微绒毛脱落减少<sup>[13]</sup>,部分与邻近细胞脱离失去微绒毛,并出现不规则的伪足样细胞突起<sup>[12,25]</sup>。凋亡晚期,细胞膜表面凹凸不平,出现单个或多个圆球状突起的泡状结构,称之为“胞浆出芽现象”(“出芽”budding),以后细胞膜出现深的皱褶,这些不规则的突起与胞体间连接变窄,逐渐将细胞自行分割为多个内含物包裹在膜组织中不外泄的细胞凋亡小体,内有线粒体和游离核糖体等细胞器,有的含核碎片<sup>[27]</sup>。

植物的凋亡细胞中除出现一些由膜所包围的,内含核与细胞器碎片的凋亡小体外,凋亡细胞内在靠近细胞膜的附近形成许多膜泡结构,这些结构由内质网包裹着一些囊泡形成,或者由细胞质膜包裹许多小泡形成<sup>[23]</sup>。

有学者应用电镜观察实验动物或培养的癌细胞进一步研究细胞凋亡,只见到癌细胞单个性死亡,有时也可见被吞噬,但极少数见到凋亡小体的形成<sup>[28]</sup>。

在细胞发生凋亡的同时,其邻近细胞也发生一些相应的形态学变化。邻近细胞与凋亡细胞相邻的细胞膜上的细胞连接结构消失,如桥粒减少或消失<sup>[1]</sup>,细胞间连接疏松,间隙增宽<sup>[25]</sup>,并且相邻细胞具备了识别与吞噬凋亡细胞的能力,即在凋亡细胞周围一些未凋亡的细胞内可见大量的吞噬体,内含核样物质和变性的细胞器,可能是凋亡小体被未凋亡细胞吞噬并降解、消化的结果<sup>[13]</sup>。如肾脏细胞凋亡后,其聚集的染色体碎片被吞噬后降解为电子密度较低的均质絮状物,可以被上皮细胞所吞噬,也可

以被降解、崩溃后随尿液排出<sup>[29]</sup>。

#### 四、结束语

Keer 等<sup>[2]</sup>在 1972 年首先描述了动物细胞凋亡的形态学特点,后来对动植物细胞凋亡的进一步研究均表明其形态特征与 Keer 等早年对凋亡细胞的描述相似<sup>[26,30]</sup>,细胞核膜的肿胀、解体,核仁裂解,核内染色质的分解及凝聚并沿细胞核周边分布,细胞核的固缩,细胞器(内质网、高尔基体、线粒体、质体、液泡)膜结构的变化、集中分布以及凋亡小体的形成,都是作为细胞凋亡的亚显微结构特征。不同生物细胞凋亡的形态学改变特别是超微结构特征所具有的这种相似性,使我们能从形态学上检测细胞是否发生凋亡。

当然,不同细胞在细胞凋亡过程中所体现的形态特征虽然已证实基本相似,但我们在前面也提到不同学者对不同生物细胞凋亡超微结构的观察结果还存在一些差异,特别对凋亡过程中线粒体形态结构变化的观察还有较大差别,因此还需要对其进行进一步的比较观察,建立系统的形态学变化标准,使超微结构的变化特征能真正成为鉴定细胞凋亡的有力而且可靠的依据。

#### 参 考 文 献

- [1] Kerr JFR, et al., 1994, *Cancer*, 73:2013-2016.  
 [2] Kerr JF, et al., 1972, *Br J Cancer*, 26:239-257.  
 [3] Pennell RI, Lamb C, 1997, *Plant cell*, 9:1157-1168.

- [4] Jones A, 2000, *Trands Plant Sci*, 5:225-230.  
 [5] 苏金为等, 2002, *植物生理与分子生物学学报*, 28(4): 292-298.  
 [6] Bleecker AB, Patterson SE, 1997, *Plant Cell*, 9:1169-1179.  
 [7] Ecker JR, 1995, *Science*, 268:667-675.  
 [8] Moon WS, et al., 2000, *Yonsei Med J*, 41(2):195.  
 [9] Wyllie AH, et al., 1980, *Int Rev Cytol*, 68:251-306.  
 [10] 吴波等, 2000, *电子显微学报*, 19(6):792-798.  
 [11] Biggiogera M, et al., 1997, *Histochem Cell Biol.*, 107: 331-336.  
 [12] 韦长元等, 2000, *中华肝脏病杂志*, 8(2):89-90.  
 [13] 梁卫江等, 1997, *第一军医大学学报*, 17(4):339.  
 [14] 郭敏等, 2001, *锦州医学院学报*, 22(2):1-3.  
 [15] Darzynkiewicz Z, et al., 1997, *Cytometry*, 27:1-20.  
 [16] Wang H, et al., 1996, *Plant cell*, 8:375-391.  
 [17] Le PT, et al., 1995, *J Immunol*, 154:4371.  
 [18] Bursch W, et al., 1992, *TIPS*, 13:245.  
 [19] Duvall E, Wyllie AH, 1986, *Immunol Today*, 7:115.  
 [20] Cummings MC, et al., 1987, *Am J Surg. Pathol.*, 21(1):88-101.  
 [21] Gunawardena AHLAN, et al., 2001, *Planta*, 212:205-214.  
 [22] Li D-H, et al., 2003, *Acta Bot Sin*, 45(1):53-63.  
 [23] 祝建等, 2001, *同济大学学报*, 22(5):10-13.  
 [24] 周鹤同等, 2001, *实用癌症杂志*, 16(3):236-239.  
 [25] 乐美兆等, 2001, *电子显微学报*, 20(6):735-738.  
 [26] Eric L, et al., 1999, *Curr Opin Plant Biol*, 2:502-507.  
 [27] 姜泊, *细胞凋亡基础与临床*[M], 北京:人民军医出版社, 1999, 9.  
 [28] Wang XW, et al., 1995, *Cancer Res.*, 55:6012-6016.  
 [29] Camp V, Martin P, 1996, *Anatomy and Embryology*, 194(4):341.  
 [30] Li WC, et al., 1995, *J Cell Biol*, 130:169-181.

## 激光扫描共聚焦显微镜在细胞间隙连接研究中的应用

周逢海\* 宋波 金锡御

(第三军医大学西南医院全军泌尿中心 重庆 400038)

**摘 要** 激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)是当今世界上最先进的分子细胞生物学分析仪器之一。旨就 LSCM 在细胞间隙连接蛋白的定位、定量、分布及细胞间分子迁移、胞间通讯等方面的应用进行综述,并对其在 GJIC 的研究进行展望。

激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)是近代生物医学图像分析仪器最重要的发展之一,它是在荧光成像基础上加装激光扫描装置,利用计算机进行图像处理,使用紫外线或可见光激发荧光探针,从而得到细胞内部微细结构的荧

光图像,在亚细胞水平上观察诸如细胞内  $Ca^{2+}$ 、pH 值、膜电位、细胞间通讯等生理信号及细胞形态的变化,已成为形态学、分子细胞生物学、神经科学、药理

\* 通讯作者。E-mail: zhoufengh@163.com