

[20] Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. 1997, *Immunol Today*, 18: 44-51.

[21] Tan X, Martin SJ, Green KR, et al. 1997, *J Biol Chem*, 272(15): 9613-9616.

## 染色质凝聚与细胞凋亡

阎蕴力 郑力芬 王美华

(河北医科大学基础所细胞生物室 石家庄 050017)

细胞凋亡是由基因控制的细胞主动死亡方式。现已知体内多种组织的细胞通过凋亡途径实现自身代谢转变;如胚胎细胞、胸腺细胞、T和B淋巴细胞、晶状体细胞、肠上皮、乳腺上皮、前列腺上皮以及成纤维细胞等。细胞凋亡不但在个体发育、免疫细胞的增殖、分化、成熟等生理过程中具有独特的意义,而且对机体自身监测清除突变细胞和肿瘤细胞等方面也有重要的作用。体内自然凋亡途径的紊乱可能导致发育异常和加速肿瘤的发生和恶化。自1972年Kerr从形态学上注意到凋亡现象以来,近年来受到细胞生物学、分子生物学、免疫学、生命科学、临床医学等相关学科的广泛重视。人们从不同的研究角度,探讨细胞凋亡的本质,并且尝试着能进一步在治疗手段上模拟细胞凋亡的过程,提高人类对某些疾病的治疗效果。至今有关凋亡的文献报道很多,涉及面极广,现本文仅就正常情况下染色质凝聚过程,以及细胞凋亡时染色质异常凝聚和DNA断片化方面的研究进展做一梗概介绍。

### 一、正常细胞周期进程中 染色质DNA的凝聚

染色质是由DNA以及约于DNA同等量的碱性蛋白质,即组蛋白(包括H1, H2A, H2B, H3, H4组蛋白),以及少量的非组蛋白酸性蛋白质(约占染色质成分的0.5%—1.5%)和微量的RNA(约占染色质成分的0.05%)构成的复合体。DNA作为染色质的主要功能成分,包括人类在内的哺乳动物细胞核内单倍体DNA量约 $3.2 \times 10^{12}$ g, DNA分子直线长度约1m,

人类的全部遗传信息位于其上的 $3 \times 10^9$ (30亿对)的碱基对(bp)中,编码50 000—100 000个基因。每个基因或基因家族所占碱基对长度不一,如人 $\alpha$ 球蛋白基因家族由约200kb;干扰素基因家族由约5—15kb构成<sup>[1,2]</sup>。

由 $2 \times 30$ 亿个碱基对构成的DNA分子容纳于直径约 $10 \mu\text{m}$ 的体细胞核内,间期( $G_0, G_1$ )细胞核内的染色质主要附着在核基质上,并随着细胞周期由间期向分裂期过渡, DNA逐渐凝聚约10000倍形成中期染色体<sup>[3]</sup>。多年来,通过对染色质形成染色体过程中结构变化和生物化学方面的研究,目前比较一致的观点认为:染色质凝缩大体可分为两个阶段;第一阶段,复制后的DNA双螺旋凝聚成直径约10nm的核小体。核小体由H2A, H2B, H3, H4组蛋白各两个分子构成的八聚体的轴心组蛋白(core histone),外面由至少长约146bp的DNA双分子围绕约两圈,以及连接组蛋白H1(Linker histone H1)共同构成。核小体之间连接DNA(Linker DNA)长约200bp。连接组蛋白H1是一个富含赖氨酸、丝氨酸的碱性蛋白质,它的球形中心部与轴心组蛋白的特定部位结合, H<sub>2</sub>N端和COOH端分别与相临的核小体轴心组蛋白相互衔接,而与连接DNA的接触较为松弛。一般认为基因转录活性较高区域,组蛋白H1含量较少(扩大基因的接触空间)。间期细胞内H1主要分布于核被膜内面,分裂中期主要位于染色体的A(腺嘌呤)-T(胸腺嘧啶)富集区和染色体端粒部位<sup>[4]</sup>。H1与DNA的结合主要是电稳定性的,增加离子强度可以弱化H1与DNA

的结合,甚至使其相互分离,如应用 0.3mol/L NaCl 或 KCl 即可由染色质抽提 H1,而不影响轴心组蛋白与 DNA 的结合<sup>[6]</sup>。

随着细胞周期由间期向分裂期过渡,连接组蛋白 H1 磷酸化使 6—7 个核小体围成一圈,凝聚形成直径约 30nm 的染色质基本纤维<sup>[6,7]</sup>。至此 DNA 分子约凝缩了 50 倍。进入分裂期,随着 p34<sup>cdc2</sup> 与其调节亚基细胞周期蛋白 B 结合后丝氨酸/苏氨酸激酶活性的增加,细胞开始出现核被膜崩解,微管形成等一系列改变。其中 30nm 的染色质纤维进一步完成染色体凝聚的后一阶段,即形成直径约 225—250nm 的染色单体纤维,最后以螺旋状态构成高度致密直径约 700nm 的分裂中期染色单体<sup>[8,9]</sup>。

由于构成染色体的纤维包装紧密,而且缺乏比较贴切的研究技术方面的支持,因此对于直径约 30nm 的染色质如何凝缩成分裂中期染色体方面,至今仍存有争论<sup>[10,11]</sup>。目前,随着染色体研究方法学的进步,特别是分子生物学原位杂交技术在该领域中的应用,最近越来越多的研究表明:直径 30nm 的纤维形成多量的染色质侧环(chromatin loops),每个染色质侧环约含 50—100kb 碱基对(一说为 10—200kb 碱基对),基因编码即定位于其上<sup>[12-15]</sup>。

DNA 拓扑异构酶 I (topo I) 是近年来研究最多的与染色体凝缩和结构有关的核蛋白。哺乳动物细胞内 topo I 可分为两型,分子量 170,000 道尔顿的 topo I $\alpha$  和 180,000 道尔顿的 topo I $\beta$ 。topo I $\alpha$  和 topo I $\beta$  基因分别定位于 17 和 13 号染色体。topo I $\beta$  在细胞内表达水平较低,而且没有细胞周期相关的变化,主要分布于核仁区和核质内。topo I $\alpha$  在增殖细胞核内含量更高,具有明显的细胞周期相关性;G<sub>1</sub> 期细胞内浓度最低,M 期浓度最高<sup>[16]</sup>。

除参与 DNA 的断裂和再连接外,topo I $\alpha$  是一个重要的与细胞核、染色体凝聚及结构有关的蛋白质,并对分裂后期染色单体的正常分离,使细胞遗传成分均等进入两个子细胞等生命活动十分关键。大多数的研究者认为;topo

I $\alpha$  在间期细胞核内主要作用于染色质 DNA 的核基质结合处,在分裂期主要作用于染色质侧环的染色体支架结合区(scaffold/matrix attachment regions, SARs, or MARs),并将其维系于染色体支架。此处 DNA 序列富含 A-T,并高度重复和保守,缺少活性基因,S 期后期复制,进入分裂后较早凝聚<sup>[12,17]</sup>。哺乳动物基因组约含 10 000 个 SARs<sup>[18]</sup>,SAR 除与中期染色体的构成有关外,尚参与完成 DNA 复制、翻译、重组和 DNA 凝缩等细胞生命活动。就所占比例来讲,染色体支架仅占整个染色体成分的约 3%—4%,除 topo I 外,近来的研究发现;Sc I 蛋白、ARBP 蛋白(attachment region binding protein)以及 Mr58000 蛋白、核糖核蛋白(RNP)和 CENP-B、C 蛋白等非组蛋白均可参与染色体的凝缩和染色体支架的构成<sup>[19-23]</sup>。另外,利用非洲爪蟾卵提取物研究表明:XCAP-C、E 多肽蛋白(*Xenopus* chromosome associated polypeptides C、E)亦与中期染色体的形成和构筑有关<sup>[24,25]</sup>。

关于染色质凝聚机制方面的研究,至今仍是生命科学需要探求的一个重点课题。尽管有以上诸多生物活性物质被发现,并认为与染色质或染色体凝聚有关,但对于包括 topo I 在内有关核蛋白的确切存在部位,具体作用以及功能相互协调等方面仍不明了。

## 二、细胞凋亡与细胞周期相关性

近年来,细胞生物学、遗传学和生物化学对细胞周期的综合研究取得了惊人的进展,目前已知有 40 多种基因产物影响着细胞周期。并已确认;p34<sup>cdc2</sup> 与其调节亚基细胞周期蛋白 B 结合后丝氨酸/苏氨酸激酶活性的增加是调控细胞周期运行的关键因素。

对于细胞凋亡来说,尽管诱因可以多种多样,但凋亡一般有相似的形态学特点;核纤层蛋白降解,使染色质由核基质脱落,逐渐瓦解、凝聚。细胞核被膜崩解,然后细胞体积缩小,部分

细胞器、核糖体和核碎片被细胞膜包裹形成凋亡小体,从细胞表面出芽脱落,最后被具有吞噬功能的细胞如巨噬细胞、上皮细胞等吞噬。上述凋亡细胞的某些表现,如核纤层蛋白降解、染色质凝聚、核被膜崩解等表现与细胞的有丝分裂有相似特征,因此提出了“调控细胞周期有丝分裂的生物活性成分与细胞凋亡的发生有关”等问题。对此,研究结果得出了不同的结论;如 Shi 等<sup>[26]</sup>用裂解素-2(fragmentin-2)和破孔蛋白(perforin)诱发细胞凋亡时,发现 p34<sup>cdc2</sup>可随着凋亡出现而活性增高,指出 p34<sup>cdc2</sup>的活化可能是启动细胞凋亡的因素之一。相反,Oberhammer 等<sup>[27]</sup>采用低温诱导 H11-rasR3 细胞,以及 Martin 等<sup>[28]</sup>用裂解素-2、破孔蛋白及多种细胞凋亡诱剂观察 FT-210 细胞(小鼠乳腺癌细胞株)凋亡时均未见有 p34<sup>cdc2</sup>的活化,而且核纤层蛋白的降解方式也与细胞分裂不同。由此认为;就凋亡的启动来说,细胞凋亡并不都需要 p34<sup>cdc2</sup>的活化,但不能排除某些类型的细胞需要这一过程。再者,最近 Abend 等<sup>[29]</sup>采用 X 线诱导 L929 和 HL-60 细胞凋亡时,可见凋亡细胞染色体的端粒有迅速丢失现象,因此,就保持染色体的完整性方面来说,细胞凋亡与细胞分裂的机制差异明显。

另外,细胞周期的具体时相亦与细胞凋亡密切相关。按诱剂剂和细胞的类型的不同,凋亡可发生于细胞周期的不同阶段,如去除神经营养因子的细胞多死于 G<sub>1</sub> 期,淋巴细胞在 X 射线诱导后多影响 G<sub>1</sub> 细胞,而甾类激素诱导的细胞凋亡多发生在 G<sub>0</sub> 期。但大多数诱剂普遍作用于 S 期,导致 DNA 单链或双链断裂,使细胞周期停滞于 G<sub>2</sub> 期并最终导致凋亡。

我们曾应用抗癌药物鬼臼噻吩苷(VM-26)作用于 HeLa 细胞<sup>[30,31]</sup>,经过约一个完整的细胞周期(24h)后,可见有大量细胞停滞于 G<sub>2</sub> 期。应用染色体超前凝聚技术,将分裂期的 CHO 细胞与停滞于 G<sub>2</sub> 期的 HeLa 细胞相融合,在前者的诱导下可见 G<sub>2</sub> 期 HeLa 细胞染色体呈现较严重的断裂,从而表明;VM-26 形成

的 DNA 的断裂使细胞周期停滞的关键。但在实验中我们也注意到;个别细胞可到达分裂中期,尽管存在有较严重的染色体异常。这些细胞以后的去向,是在 M 期内死亡还是进入下一个细胞周期或继续分裂增殖,回答此问题对于基础研究和肿瘤的临床治疗都是非常有意义的。典型的细胞凋亡形态学变化;诸如核纤层蛋白降解、染色质由核基质脱落、凝缩,细胞核被膜崩解等,一般是针对分裂间期细胞而言,因为该期细胞的染色质成分具有完整的核被膜包裹。对于 M 期细胞来说,因其核被膜已经消失,染色质凝聚成染色体,因此以往多认为;该期细胞凋亡需要完成胞质分裂,并重新进入下一个细胞周期再行完成凋亡过程。但最近有研究表明;M 期细胞凋亡也可不经胞质分裂,不进入下一个细胞周期,分裂期染色体可在此期内被粗面内质网分隔包裹形成自噬体,使细胞凋亡<sup>[32]</sup>。

由此可见,细胞凋亡可有多种诱因,可以从不同的周期时相发生,凋亡途径也不止一条。因此,搞清彼此关系,特别是明确凋亡细胞形态变化与生物化学变化之间的联系等方面内容,尚需要进行更广泛和深入的研究。

### 三、染色质凝聚与细胞凋亡

尽管有报道表明不需要细胞核也可导致细胞凋亡<sup>[33]</sup>,但是目前检测细胞凋亡的手段,诸如超微结构、流式细胞术、DNA 断端标记法(Tunel 法)和 DNA 电泳方法等,仍是着重于细胞核的变化,特别是以染色质及 DNA 的改变为最直观的指标。凋亡细胞染色质的凝聚是一种无序的凝聚状态,其中 DNA 的断裂是导致染色质损伤、染色质异常凝聚的主要原因。染色质凝聚是一个耗能过程,需要 ATP 参与,而 DNA 断裂不需 ATP 参与<sup>[34]</sup>。

一般认为;细胞凋亡中 DNA 的降解主要可分为两个步骤:第一步是 DNA 断裂成数十至数百 kp 碱基对不等的大分子 DNA 断片。第二步则是 DNA 在核小体间被切断,降解成为

180—200bp 及其倍数大小的一系列 DNA 断片,经核酸电泳得到明显的 DNA 阶梯为主要特征。目前,较为一致的观点认为:大分子 DNA 断裂即可导致染色质的异常凝聚、是细胞凋亡的关键<sup>[36]</sup>。

染色质凝聚反映了细胞凋亡时普遍存在的生物化学过程;其中包括白介素-1 $\beta$  转换酶家族、需钙蛋白酶、胶原酶、组织蛋白酶 B 和 D 等某些蛋白水解酶活化,以及包括 nuc18、DNsae I DNase I 等内源性核酸内切酶的活化等。近来多数学者倾向于:细胞凋亡时,影响染色质结构的核蛋白水解要早于 DNA 内切酶的活化,被水解的蛋白包括核纤层蛋白 B、Topo I 和 Topo II、组蛋白 H1、p67 蛋白以及 U<sub>1</sub> 小核糖核蛋白和胞影蛋白等。特别是大分子 DNA 断片的形成或可不需要核酸内切酶的直接参与,例如有报道<sup>[36]</sup>表明;Topo I 蛋白水解可同时激活其本身的松解 DNA 作用。由于 Topo I 等 DNA 结合蛋白作用于 DNA 的 MARs 或 SARs 区,因此可导致染色质 DNA 由此区脱落,形成 50kb 左右的大分子 DNA 断片。另外,由于 DNA 大分子断片多反映了整个染色质侧环的断裂,而 MARs 或 SARs 区 DNA 结合蛋白多由非组蛋白酸性蛋白质起着关键的维系作用,因此存在这样一种可能;即细胞凋亡过程中,一系列的因素对构成染色质或染色体的酸性蛋白质的影响要早于对组蛋白等碱性蛋白质的影响,而且或许更为重要。除此之外,细胞类型差别,以及有关的凋亡基因表达不同也是影响 DNA 断裂方式的一个重要因素,如用 VP-16 处理小鼠 T 淋巴细胞,4—6h 后可见大分子 DNA 片段形成,6—8h 后 DNA 由核小体间断裂,16h 后随着细胞的死亡,DNA 的片段最大约 30kb,形成典型的梯形电泳。另外,如用与上述研究相同剂量的 VP-16 处理 NIH3T3 成纤维细胞,16h 后随着细胞几乎全部死亡,在形态学角度虽可见核染色质凝聚,但从 DNA 中的变化方面仅显示有 200—250kb 的 DNA 片段,未见有核小体间断裂和梯形电泳形成<sup>[37]</sup>。近来

也有研究发现;晶状体透明化发育过程中凋亡细胞 DNA 的断片化不明显<sup>[38]</sup>。以上结果表明:细胞凋亡时 DNA 断片化以及典型的梯形电泳的形成仅反映了问题的一个侧面,不应作为判断凋亡的唯一标准。

现在,越来越多的研究者注重观察细胞凋亡早期的变化,这种变化主要以染色质结构异常为主要特征。例如,最近 Ferlini 等<sup>[39,40]</sup>应用流式细胞术研究 X 线诱导外周血淋巴细胞凋亡时发现;与细胞凋亡后期染色质凝聚、凋亡小体的形成和脱落所导致的亚二倍体(hypodiploid)DNA 不同,细胞凋亡早期由于包括组蛋白 H1 在内的某些与染色质构造有关的核蛋白的改变,导致蛋白质与 DNA 的结合松散,使异硫氰酸荧光素(FITC)、7-氨基放线菌素 D (7-AAD)、Apostain 等核酸荧光染料与 DNA 亲和量增加,凋亡细胞表现呈超二倍体(hyperdiploid)DNA 状态。以上研究结果提示:细胞凋亡过程中,于大分子 DNA 断裂、染色质凝聚之前,染色质结构的紊乱是一个发生较早和至关重要的阶段。

综上所述,细胞凋亡是一个复杂的基因调节过程,不同的细胞类型以及细胞周期时相的差别均可影响凋亡的具体表现形式。典型的染色质异常凝聚和 DNA 片断化仅反映了凋亡细胞的生物化学和形态学方面的某些特征。现阶段的研究趋势表明;采用观察细胞凋亡早期变化的检测技术,并结合诸如基因表达、以及关注与染色质凝聚和构筑有关的核蛋白变化等方面的研究,不但对于了解细胞凋亡的机制,而且对于探讨染色质及染色体凝聚机理等方面的问题都具有重要意义。

## 参 考 文 献

- [1] Jarmin, A. and Higgs, D., 1988, *EMBO J.*, 7, 3337—3344.
- [2] Broeker, P. L., 1993, *PhD Thesis, University of Chicago.*
- [3] 池内达郎, 1993, *遗传*, 5, 23—33.
- [4] Breneman, J. W. et al., 1993, *Experi. Cell Res.*, 206, 16—26.

- [5] Loborg, H. and Rundquist, I., 1997, *Cytometry*, **28**: 212-219.
- [6] Ohsumi, K. et al., 1993, *Science*, **262**: 2033-2035.
- [7] Gerdes, M. G. et al., 1994, *J. Cell Biol.*, **2**: 289-304.
- [8] Rattner, J. B., 1992, *Chromosoma*, **101**: 259-264.
- [9] Yan, Y. L., 1993, *La Kromosomo*, **1-70**: 2395-2406.
- [10] 罗艺, 刘凌云, 1996, *遗传学报*, **23**: 351-356.
- [11] 阎蕴力等, 1997, *实验生物学报*, **30**: 213-219.
- [12] Saitoh, N. et al., 1995, *BioEssays*, **17**: 759-766.
- [13] Roberge, M. et al., 1990, *J. Cell Biol.*, **111**: 1753-1762.
- [14] Bickmore, W. A. and Oghene, K., 1996, *Cell*, **84**: 95-104.
- [15] Cook, P. R., 1994, *BioEssays*, **16**: 425-430.
- [16] Warburton, P. E. and Earnshaw, W. C., 1997, *BioEssays*, **19**: 97-99.
- [17] Saitoh, Y. and Laemmli, U. K., 1994, *Cell*, **76**: 609-622.
- [18] Andreassen, P. R. et al., 1997, *J. Cell Biol.*, **13**: 29-43.
- [19] Strissel, P. L. et al., 1996, *Chromosoma*, **105**: 122-133.
- [20] Bickmore, W. A. and Oghene, K., 1996, *Cell*, **84**: 95-104.
- [21] Von Kries, J. P. et al., 1992, *Cell*, **64**: 123-135.
- [22] Vega-Salas, D. E. and Salas, P. J. I., 1996, *Chromosoma*, **105**: 321-331.
- [23] Pluta, A. et al., 1990, *Trends Biochem. Sci.*, **15**: 181-185.
- [24] Hirano, T. and Mitchison, T. J., 1994, *Cell*, **79**: 449-458.
- [25] Hirano, T. et al., 1997, *Cell*, **89**: 511-521.
- [26] Shi, L. et al., 1994, *Science*, **263**: 1143-1145.
- [27] Oberhammer, F. A. et al., 1994, *J. Cell Biol.*, **126**: 827-837.
- [28] Martin, S. J. et al., 1995, *Science*, **269**: 106-107.
- [29] Abend, M. et al., 1996, *Cell Prolif.*, **29**: 101-113.
- [30] 阎蕴力等, 1996, *癌变、畸变、突变*, **8**: 161-164.
- [31] 阎蕴力等, 1998, *癌变、畸变、突变*, **10**: 155-159.
- [32] Sit, K. H. et al., 1996, *Anat. Rec.*, **245**: 1-8.
- [33] Jacobson, M. D. et al., 1994, *EMBO J.*, **13**: 1899-1910.
- [34] Kass, G. E. N. et al., 1996, *Biochem. J.*, **318**: 749-752.
- [35] Cohen, G. M. et al., 1994, *J. Immunol.*, **153**: 507-512.
- [36] Franziska, A. et al., 1994, *J. Cell Biol.*, **126**: 827-837.
- [37] 小高加千子, 1997, *临床免疫*, **29**: 67-75.
- [38] Bassnett, S. and Mataic, D., 1997, *J. Cell Biol.*, **137**: 37-49.
- [39] Ferlini, C. et al., 1996, *Cell Prolif.*, **29**: 427-436.
- [40] Ferlini, C. et al., 1997, *J. Immunol. Methods*, **205**: 95-101.

## 受精 $\text{Ca}^{2+}$ 波动信号

邓满齐

(中国科学院发育生物学研究所 北京 100080)

迄今为止研究的所有动物卵子在受精时都有一个共同的现象,即胞质游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高,从静息状态的 40-100nmol/L 升高至 600-1000nmol/L 水平,并以波的形式从精卵结合点向卵子的其他部位扩展<sup>[1]</sup>。在哺乳类受精诱导的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化表现为有规律的跃升,即

$\text{Ca}^{2+}$  波动或振荡<sup>[2]</sup>。受精诱导的  $\text{Ca}^{2+}$  波动可持续达数小时之久,直至原核形成时才消失<sup>[3]</sup>。小鼠卵受精诱导  $\text{Ca}^{2+}$  波动的特点是:第 1 峰高而宽,峰值达  $617.7 \pm 143.5$  nmol/L,峰宽  $220.1 \pm 43.3$  sec。将第 1 峰放大后可观察到许多锯齿状小峰(图 1)。第 1 峰之后  $\text{Ca}^{2+}$  波动的