

心肌细胞分裂和增殖的研究进展

段海峰 钱令嘉

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所 天津 300350)

一、成熟心肌细胞具有分裂增殖能力的提出及背景

长久以来,机体细胞被分为3种类型:①不稳定细胞(labile cell),这类细胞经常进行细胞周期活动而分裂增殖,如皮肤表皮细胞;②稳定细胞(stable cell),这类细胞正常情况下处于细胞周期之外的G₀期,在一定条件下可进入细胞分裂周期进行分裂和增殖,如肝细胞;③永久性细胞(permanent cell),这类细胞没有分裂和增殖能力,成熟心肌细胞被归于此类。其实,在19世纪中期至20世纪初,人们在对心脏进行大量研究的基础上就已提出:心脏肥大是已有心肌细胞增殖和肥大的结果^[1]。然而,在20世纪20年代,有人对成熟心肌细胞具有分裂增殖能力提出了质疑,认为病理状态下心脏体积的增大纯粹是心肌细胞肥大的结果^[2]。随后对发育期动物的心脏^[3]及超负荷状态下的心脏^[4]进行放射自显影分析的结果支持这种观点,即成熟心肌细胞没有分裂能力。在20年代后很长时间内,由于在肥大的心脏中一直没有观察到有丝分裂现象,以及缺乏生理和病理条件下心肌细胞DNA复制的实验数据,人们就得出这样的结论:成熟心肌细胞不能再进入细胞分裂周期,因而是一种终末分化细胞(terminally differentiated cell),即永久性细胞。

机体细胞包括心肌细胞都含有整套染色体。这提示,在一定的情况下它们能转化成为具有分裂、分化以及增殖能力的细胞。我国学者张颖清^[5]1985年就在理论上指出,哺乳动物的体细胞具有发育潜能性,即发育成新个体的潜在能力。1997年,克隆羊Dolly的诞生,首次

揭示哺乳动物成熟体细胞的细胞核具有发育全能性,在适当的条件下,可以恢复发育状态,甚至发育成为完整的个体。到目前为止,科研工作者已应用核移植技术,成功地克隆了小鼠、兔、羊、牛等多种哺乳动物。正是在这种理论和大量研究成果的启发下,人们开始重新看待和研究心肌细胞的分裂和增殖能力。Kajstura等^[6]于1998年利用共聚焦显微镜研究心肌组织时,首次发现了正常的成熟心肌细胞具有分裂和增殖能力。在正常对照的心脏中,每100万个细胞中有14个细胞处于有丝分裂期,在缺血性心脏病患者的心脏中,处于有丝分裂的细胞数量大约增加了10倍左右,即100万细胞中有152个细胞处在有丝分裂阶段,原发性扩张性心脏病患者则为131个。同在1998年,Anversa和Kajstura^[7]也通过共聚焦显微镜发现了正常心肌组织中有处于有丝分裂期的细胞,并进行了其他一些相关实验,提出成年哺乳动物的心室肌细胞不是终末分化细胞的论点。

二、研究心肌细胞分裂增殖的方法

心肌细胞具有分裂增殖能力的发现,也可以说是研究技术与方法不断改进和提高的结果。目前,用于研究心肌细胞分裂增殖的主要方法,除上面提到的共聚焦显微技术外,还有其他一些生化及分子生物学方法,如研究端粒及端粒酶的变化等。

1. 端粒长度及端粒酶活性的测定

端粒是位于染色体端部的特化部分,其生物学作用是维持染色体的稳定性。端粒在进化上具有高度保守性,在细胞分裂时起计时器的作用。正常体细胞的端粒随细胞分裂而变短,

细胞也随之衰老。端粒酶的作用是在端粒 DNA 复制时,能够对其富含 G-链进行加尾延长,从而保持端粒的长度。此酶仅在细胞复制过程中存在,其活性反映细胞增殖的程度。基于此,Kajstura^[8]等利用测定分离的心肌细胞核染色体的端粒长度,来确定成年心肌细胞是否具有分裂能力。通过对胚胎、新生及出生后 4、12、27 个月的 Fischer 344 大鼠分离心肌细胞核端粒长度的测定,发现在占整个细胞群体 16% 的细胞亚群中,端粒的长度随着大鼠年龄的增长逐渐变短。这说明,从出生到衰老,心脏中有相当比例的心肌细胞不断的进行着分裂,以补偿由于老化而引起的哺乳动物心肌细胞的不断死亡。Leri 等^[9]则通过测定不同年龄阶段的大鼠心肌细胞的端粒酶活性,结果在幼年大鼠、成熟大鼠以及老年大鼠的心室肌细胞,均可检测到端粒酶的活性。从而为心肌细胞具有分裂增殖能力的观点提供了证据。

2. 增殖细胞核抗原标记指数 (PCNA-LI) 测定

增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 是一种 36kD、酸性、非组蛋白类的细胞核多肽,其免疫反应大多局限于增殖的细胞核中,胞浆则很少或没有。它的合成与细胞的增殖周期有关。为了确定在心肌细胞梗塞的超急性和急性期是否有细胞的增殖存在, Ottaviani 等^[10]检测了心肌梗塞发生后几个小时内 PCNA 标记指数 (PCNA labeling index, PCNA-LI),结果虽然在统计学上没有显著差异性,但数据表明 PCNA-LI 在急性期比超急性期要高,比正常对照要高。此方法对我们研究心肌细胞分裂增殖具有一定的启发意义。

3. 差异显示技术

差异显示技术由 Liang 和 Pardee 于 1992 年建立,是一项快速、有力的检测技术。在典型哺乳动物细胞中,估计有 15 000 种不同的 mRNA 表达。在暂时的和细胞特异性情况下, mRNA 表达的差异,决定着细胞的命运和创造了不同的组织器官。分析不同条件下细胞基因

的差异表达,已成为许多实验室探索 and 了解多种生物学过程发生潜在机制的一种重要手段。Cormier 等^[11]用此方法对参与心肌细胞增殖的基因进行了研究,并提供了一系列实验材料和数据,为用此方法开展心肌细胞分裂增殖的研究奠定了基础。

端粒长度、端粒酶活性和增殖细胞核抗原标记指数的测定、共聚焦显微镜技术主要用于心肌细胞分裂的定性分析,差异显示技术主要是用来发现与心肌细胞分裂增殖相关的基因。

三、心肌细胞分裂和增殖的调控因素

通过对胚胎期心脏发育及细胞周期的研究,获得了调控心肌细胞分裂和增殖的蛋白质和细胞因子等方面的实验证据。目前研究表明,参与心肌细胞增殖调控的因素主要有以下几种:

1. 细胞周期控制系统

细胞周期调控系统是一个精密调节的复杂系统。是由一系列相互作用的蛋白质,通过生物化学方法,周期性的操纵诱导和协调细胞内含物的复制和细胞分裂的基本下游过程。细胞周期控制系统主要基于两类蛋白家族:一是 CDKs (Cyclin-dependent protein kinases) 家族,它是诱导细胞周期下游过程丝氨酸/苏氨酸蛋白的磷酸化作用,称催化亚单位。如 CDK1, 2, 3, 4, 5 等。二是细胞周期素 (cyclins) 家族,它专门结合 CDKs,并控制它们对蛋白磷酸化作用的能力,称调节亚单位。另外,还有 CDKs 抑制物 (CKIs),如 P15、P16、P18、P19、P21、P24 和 P27 等蛋白,它们可与 cyclin-CDK 复合物结合而发挥抑制 CDK 的作用。

细胞周期调控系统在心肌细胞分裂增殖中具有重要作用。如研究发现:在心肌细胞发育过程中,p21CIP1 and p27KIP1 表达显著升高;成熟心肌细胞提取液可使新生心肌细胞 CDK2 激酶活性明显升高,而用免疫法去除提取液中 p21CIP1 则可使 CDK2 激酶活性恢复。表明

p21CIP1 和 p27KIP1 在心肌细胞周期阻滞中可能具有重要意义^[12]。Brooks 等^[13]对细胞周期控制系统在心肌细胞增殖和肥大中的作用作了综述。

2. 细胞因子和其他因素

一些细胞因子和蛋白对心肌细胞的增殖调控具有重要意义。目前发现多种细胞因子和蛋白对心肌细胞的增殖可能有诱导和促进作用。这些蛋白和细胞因子包括胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)^[14]、成纤维生长因子-1, 2 (FGF-1, 2)^[15]、神经因子^[16]、polo-样蛋白激酶^[17]、p57Kip2^[18]、Neuregulins^[19]、内皮素-1^[20]等。蛋白质和细胞因子主要是通过作用于细胞周期的不同阶段,而促进心肌细胞的分裂和增殖。

一些激素、细胞基质成份对心肌细胞的增殖分化也具有重要作用,如透明质酸^[21]、1,25 二羧维生素D₃^[22]、儿茶酚胺类激素等。具体作用机制主要表现在两个方面:一是直接促进或参与细胞的分裂,一是通过拮抗抑制细胞分裂增殖的蛋白或因子而实现。如 1,25 二羧维生素 D₃ 作用于从 G₁ 期到 S 期的进展阶段;缓激肽 B₂ 受体激动剂可减弱卡托普利对培养乳鼠心肌细胞增生的抑制作用。

四、心肌细胞分裂和增殖 发现的生物学意义

心肌细胞及神经细胞等“永久性细胞”具有分裂增殖能力的发现,向传统观念提出了挑战。如何解释这些新发现将导致对成熟体细胞发育潜能的重新认识,因而具有重要的理论意义。近年来,干细胞研究倍受重视,并已成为细胞生物学研究领域的一个热点。已经发现在成年个体的多种组织中,都存在具有多种分化潜能的细胞,即“干细胞(stem cell)”。如在神经组织(大脑、周围神经系统)中,就发现有神经系统干细胞(Nervous system stem cell)存在^[23]。这或许是神经细胞具有分裂增殖能力的潜在原因。因此,不能排除在心肌组织中处在分裂增殖状态的细胞是干细胞的可能性。心肌组织中是否

确有“干细胞”存在,目前尚未见这方面的报道,还有待于今后进一步的研究和证实。

就目前而言,心肌细胞具有分裂增殖能力的提出,在理论上为通过促进心肌细胞的分裂,来补偿由于各种疾病或应激原刺激造成的心肌细胞大面积梗塞提供了依据。长期以来,由于受到心肌细胞不能分裂增殖的传统观念影响,人们对心肌梗塞造成的心力衰竭,要么采取保守治疗,如控制心肌细胞的进一步凋亡或坏死,促进瘢痕的形成等;要么采取心脏移植手术,来挽救病人的生命。现在,我们则有可能利用心肌细胞本身具有分裂增殖能力的特点,针对性地采取措施,通过一定的手段来促进心肌细胞本身的分裂和增殖,达到修复病损心肌组织的目的。这也正是心肌细胞具有分裂增殖能力观点提出的临床意义所在。在 1995 年,Oberpriller 等^[24]就发现,刺激可诱导成年两栖动物的心肌细胞发生增殖现象。目前已有不少学者开始了这方面的实验研究,切入点主要是研究胚胎期心脏的发育和心肌细胞分裂周期的调控机制。通过研究,已发现如上所述的许多蛋白和因子参与了心肌细胞的分裂和增殖。但是,目前只知道它们确实与心肌细胞增殖有关,具体作用环节和机制,还有待于进一步的研究和确证。相信在不久的将来,这方面的研究会取得突破性的进展,从而为广大心脏疾病患者、尤其是心肌梗塞患者的彻底康复,奠定理论基础。

摘 要

传统观念认为,心肌细胞是一种终末分化细胞,没有分裂和增殖能力。最近的一些研究则发现心肌细胞具有分裂增殖能力。有多种蛋白和因子参与心肌细胞的分裂和增殖的调控。心肌细胞具有分裂增殖能力的发现具有重要的理论与实际意义。

参 考 文 献

- [1] Wideroe S. 1911, *Virchows Arch Pathol Anat.* 204: 190-196.

- [2] Karsner HT, et al. ,1925, *Am. J. Pathol.* **1**: 351 - 371.
- [3] Petersen RO, et al. ,1965, *Exp. Cell Res.* **40**: 340 - 352.
- [4] Morkin E, et al. ,1968, *Am. J. Physiol.* **215**: 1409 - 1413.
- [5] 张颖清,1985,全息生物学概论,济南:山东大学出版社. 1 - 21.
- [6] Kajstura J, et al. ,1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 8801 - 8805.
- [7] Anversa P, et al. ,1998, *Circ. Res.* **83**: 1 - 14.
- [8] Kajstura J, et al. ,2000, *Am. J. Pathol.* **156**: 813 - 819.
- [9] Leri A, et al. ,2000, *J. Mol. Cell Cardiol.* **32**: 385 - 390.
- [10] Ottaviani G, et al. ,1999, *Eur. J. Histochem.* **43**: 7 - 14.
- [11] Cormier Regard S, et al. ,1997, *Mol. Cell Biochem.* **172**: 111 - 120.
- [12] Poolman RA, et al. ,1998, *Int. J. Cardiol.* **67**: 133 - 142.
- [13] Brooks G, et al. ,1998, *Cardiovasc. Res.* **39**: 301 - 311.
- [14] Reiss K, et al. ,1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 8630 - 8635.
- [15] Heikh F, et al. ,1997, *Mol. Cell Biochem.* **176**: 89 - 97.
- [16] Atkins DL, et al. ,1997, *Pediatr. Res.* **41**: 832 - 841.
- [17] Georgescu SP, et al. ,1997, *J. Mol. Cell Cardiol.* **29**: 929 - 937.
- [18] Kochilas LK, et al. ,1999, *Pediatr. Res.* **45** (5 Pt 1): 635 - 642.
- [19] Zhao YY, et al. ,1998, *J. Biol. Chem.* **273**: 10261 - 10269.
- [20] Inada T, et al. ,1999, *J. Am. Coll. Cardiol.* **33**: 565 - 571.
- [21] Iacono JA, et al. ,1998, *J. Surg. Res.* **76**: 111 - 116.
- [22] O'Connell TD, et al. ,1997, *Am. J. Physiol.* **272** (4 Pt 2): H1751 - 1758.
- [23] Morrison J, et al,1999, *Cell* **96**: 737 - 749.
- [24] Oberpriller JO et al. ,1995, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **752**: 30 - 46.

肽文库在 T 细胞和 B 细胞表位中的应用

高学良 钱 昊

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

王海珍

(上海师范大学生物学系 上海 200234)

肽文库技术是从 20 世纪 80 年代发展起来的一种分子生物学技术。根据构建肽库的方法可分为化学合成肽库和噬菌体肽库两大类。所谓肽文库是指一定长度的随机序列肽的组合, 如一个包含所有 15 个氨基酸长度的肽文库理论上其分子多样性要达到 20^{15} 。当然由于技术上的原因目前分子多样性最多只能达到 $10^8 \sim 10^9$ 。肽文库技术就是用目标分子通过亲和筛选从库中得到与其相结合的肽分子, 测序后得到其编码序列。当前肽文库技术在基础理论研究和实际应用开发中都有着广泛的用途, 例如用于研究大分子间相互作用的分子基础、筛选某些物质的特异性结合肽、寻找酶的抑制剂以及与受体结合的配体等。

化学合成肽库^[1]是利用多种化学合成的方法构建的含有大量不同短肽的肽库。特点是

构成肽库的组分除 L-氨基酸外, 还可以应用 D-氨基酸或 L-与 D-氨基酸的混合物, 合成中还可以引入非天然氨基酸和其他小分子, 大大扩大了肽库的应用范围, 为基础研究和药物筛选提供了强有力的工具。噬菌体肽库技术^[2]是将大量随机合成的肽段与噬菌体外壳蛋白融合表达而展示于噬菌体表面, 从而组成了每个噬菌体表面都表达有一种外源肽段的随机肽文库。通过亲和淘选(panning), 得到与特定靶分子结合的噬菌体肽, 具有快速、有效、操作简便等特点, 大大简化了蛋白质表达的筛选和鉴定。表达肽库的长度也已由最初的 6 肽发展到 12 肽, 甚至 38 肽。

肽文库技术最早是用于筛选单克隆抗体高亲和力的肽段。近年来, 利用肽文库技术对 MHC(主要组织相容性复合体, major histocom-