

编程性细胞死亡的研究现状及展望

宝 福 凯

(昆明医学院免疫学教研室 昆明 650031)

细胞的衰老与死亡在生物体内经常地发生着。细胞衰老是指细胞对环境变化的适应力和维持细胞内环境稳定的能力降低,并以形态结构与生化改变为基础。细胞死亡是细胞生命现象不可逆的终止,判断细胞是否死亡可用形态学的改变作为指标,但更重要的依据是细胞是否具有功能与增殖力,在体外则看其是否能形成集落。细胞死亡目前可大体分为两类:细胞的编程性死亡和细胞的病理性死亡——坏死。

编程性细胞死亡(PCD)是生物体内广泛存在的一种由细胞特定基因控制的以细胞DNA降解为特征,无明显细胞溶解的细胞自杀过程,于1951年在研究动物发育时被发现和命名。PCD在多细胞生物体发育过程中和成年机体新陈代谢中都具有重要作用。PCD可防止人类发生蹼状指(趾),可消除机体内不能识别自己和非己的免疫细胞,防止自身免疫病的发生,控制着某些生物如鳞翅目幼虫、蝌蚪的变态过程。在成年机体中,PCD可消除体内衰老的细胞并代之以新生细胞如皮肤、粘膜细胞的更新、月经周期子宫内膜的脱落与增生、维持组织器官的正常大小。但最近几年的研究表明,PCD与多种疾病如艾滋病、神经退化性疾病、肿瘤、自身免疫性疾病等的发生发展有关,对PCD加以激发和抑制可成为防病治病的一种新策略^[1-3]。

一、PCD的细胞形态学改变

发生PCD的细胞其形态学变化与病理性细胞死亡(坏死)的表现不同。PCD中的细胞

死亡是单个特定细胞的死亡,一般不伴有邻近组织的破坏,没有炎性渗出物,胞质和胞核收缩发生较早,DNA很快发生降解断裂,形成约200 bp的片段,其凝胶电泳呈梯形图谱,与Tc细胞杀死的细胞DNA片段的电泳图一致。细胞器的改变和膜结构的破坏发生较晚,死亡的细胞被邻近细胞很快吞噬而不留痕迹^[4,5]。PCD的另一特征是有新的蛋白如谷氨酰胺转移酶的合成,这被看作PCD的自主性的证据^[6]。细胞坏死是细胞的一种被动死亡过程,与PCD有明显区别,主要表现为细胞肿胀、崩解、释放出内容物,引起邻近组织的炎症反应。细胞膜和细胞器破坏发生早,DNA降解发生于细胞破溃之后^[3,7]。

二、PCD的基因调控

虽然许多研究已证实了PCD存在的广泛性,但对其发生机制和详尽环节仍知之不多。目前对秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, CE)发育中的PCD基因调控研究得较为清楚。研究表明,在胚胎发育期间,体积微小的CE有1090个体细胞,但在发育过程中有131个细胞死亡,因此,一个成熟的CE有959个细胞。CE的细胞死亡是一种典型的PCD。与CE死亡有关的基因共有14个,各自发挥不同功能。其中的nuc-1基因编码一种在细胞死亡后消化其DNA的核酸内切酶。控制CE PCD的基因主要有三个,分别为ced-3、ced-4和ced-9。在缺失ced-3或ced-4的CE突变体中不发生PCD,该突变体可产生多余细胞。ced-9对ced-3和ced-4具有调控作用,可防止PCD的过度发生。当ced-9因突

变而过度表达时可抑制 *ced-3* 和 *ced-4* 的功能,使 PCD 不能发生。*ced-9* 功能不良的 CE 往往在胚胎期即因 PCD 过度而死亡。因此,*ced-9* 是 CE 发育过程中控制生与死的开关^[1,8]。

在哺乳类动物中,目前发现与 PCD 有关的基因共有 3 个即 *bcl-2*、*c-myc* 和 *p⁵³*。*bcl-2* 和 *c-myc* 均为癌基因。*bcl-2* 因其首先发现于人类 B 细胞淋巴瘤而得名,随后发现 *bcl-2* 可调节细胞死亡。将 *bcl-2* 注入转基因小鼠可延长小鼠细胞寿命,原因是 *bcl-2* 能编码一种功能不明的蛋白质^[9]。即使在某些生长因子不存在时,*bcl-2* 也可防止骨髓细胞和淋巴细胞死亡,也可阻止 *c-myc* 介导的细胞死亡。但 *bcl-2* 的表达不能阻止所有类型的生理性细胞死亡,也不能使细胞抵抗 Tc 细胞的杀伤作用^[2]。

ced-9 抑制 CE 的 PCD 的能力与 *bcl-2* 抑制哺乳类动物 PCD 的能力类似。最近的研究表明,人 *bcl-2* 在 CE 中表达也可阻止 CE 中 *ced-3* 和 *ced-4* 介导的细胞死亡^[10]。

bcl-2 的作用并不限于阻止生长因子耗竭的细胞死亡,而且可以保护哺乳类动物细胞抵抗叠氮钠、秋水仙碱、DNA、RNA、蛋白质合成抑制剂、类固醇、射线的作用。由于 *bcl-2* 与 *ced-9* 功能相似,因此,哺乳类动物中也可能存在与 *ced-3*、*ced-4* 功能相似的基因。因此,有些抗癌制剂可能通过激活哺乳类细胞内与 *ced-3* 和 *ced-4* 功能相同的基因而引起肿瘤细胞的 PCD^[2]。

有报道表明,癌基因 *c-myc* 在哺乳类动物的 PCD 中发挥作用。从前有人曾证实,*c-myc* 在许多哺乳类动物肿瘤包括人类乳腺癌、结肠癌、宫颈癌细胞中均处于过度活跃状态。在许多情况下,当细胞在其核内反复复制出过多 *c-myc* 时,就会表现 *c-myc* 高活性。具有高活性 *c-myc* 的细胞可无限制地生长、增殖,更由于 *c-myc* 可编码出能与 DNA 结合的蛋白质,因此,有人假定 *c-myc* 对其他与细胞分裂有关的基因有调节作用。但 Evan 等^[1]证实,

c-myc 在某些情况下可引起 PCD。在实验室培养中,高 *c-myc* 活性的细胞比低 *c-myc* 活性的细胞生长更快,但在丧失营养物质后也死得更快,且具有 PCD 的特征。Evan 等因此认为,*c-myc* 是一把双刃剑:功能正常时维持细胞的正常分裂,如果外环境不适于细胞继续增殖或细胞遗传基因受损,*c-myc* 就诱发细胞死亡。目前认为,*bcl-2* 与 *c-myc* 之间存在相互作用,*bcl-2* 可抵制 *c-myc* 的死亡指令,从而加速细胞增殖,引发肿瘤^[3]。

抑癌基因 *p⁵³* 在 PCD 中起重要作用。放射线或化疗药物引起淋巴细胞 DNA 损伤时,*p⁵³* 蛋白大量增加,同时出现 PCD。研究表明,DNA 损伤引起的 PCD 绝对需要 *p⁵³* 基因产物的存在。而糖皮质激素、钙离子载体和衰老引起的 PCD 却无需 *p⁵³* 蛋白的存在。目前已知,*p⁵³* 基因编码一个转录激活蛋白,其靶基因负责细胞基因组的完整性,DNA 损伤的修复和细胞周期的运行。*p⁵³* 基因产物诱发细胞 PCD 可提供一种防护机制,使 DNA 受损细胞不能存活^[8]。无 *p⁵³* 基因的小鼠胸腺细胞可抵抗射线诱导的 PCD,而有 *p⁵³* 基因的胸腺细胞在小剂量射线即发生 PCD,表明 PCD 在射线诱导的 PCD 中发挥关键作用。Clarke 和 Lowe 等还证明 *p⁵³* 基因数目对 PCD 有影响。只含一个 *p⁵³* 基因的杂合子小鼠细胞对辐射诱导的 PCD 的抵抗力大于含两个 *p⁵³* 基因的纯合子小鼠细胞,而剔除 *p⁵³* 基因的小鼠对 PCD 的抵抗力最强。这种 *p⁵³* 基因的量化效应对某些疾病的诊断和预后判断均有重要意义^[11]。

最近更有人发现 *fas* 癌基因的产物为类似于 TNF 受体和神经生长因子(NGF)受体的跨膜蛋白,细胞被 *fas* 蛋白的抗体交联而诱发凋谢^[12]。*H-ras* 癌基因的超表达可抑制 PCD。*RP-2*、*RP-8* 和 *TRPM-2* 基因在 PCD 的细胞中表达增强,但其确切作用尚不清楚^[13]。

三、PCD 的诱因

PCD 是由细胞基因控制的一种主动死亡

过程,特定基因因种种原因编码自杀性蛋白而致DNA裂解。细胞的存活或死亡处于动物整体的社会控制(social control)之下。细胞的PCD受来自其他细胞的信号所激活或抑制,也受外源性因素的影响^[14]。诱发PCD的内源性与外源性因素都必须通过特定基因而发挥作用。

1. 内源性诱因

愈来愈多的证据表明,大多数动物细胞皆能自我致死,而且这种普遍性的自杀程序能由发自其他细胞的信号所激活或抑制。在PCD发生中生存信号和死亡信号发挥重要作用,生存信号的消失(无信号)或自杀信号的产生或增加均可导致PCD。

动物细胞的PCD可由其他细胞发出的死亡信号(自杀信号)所激活。例如,蝌蚪尾部细胞是由变态期甲状腺分泌的甲状腺素致死的;哺乳类动物胸腺中的淋巴细胞则由肾上腺分泌的皮质激素致死,均具有PCD的典型特征。另外,T淋巴细胞、巨噬细胞所分泌的TNF也可诱使多种细胞发生PCD,Tc细胞也可引起典型的PCD。抗体与细胞表面的Apo-1和Fas蛋白交联也可引起细胞的PCD。若Fas蛋白的基因发生突变,胸腺中针对自身反应的T细胞即存活下来,引起自身免疫反应。

正如细胞增殖需要从其他细胞得到信号一样,细胞为生存也需要接收来自其他细胞的信号,生存信号的消除可致细胞PCD。例如,许多发育中的脊椎动物神经元的生存依赖于与其联接的靶细胞分泌的神经营养因子(NTF),若NTF缺乏可致神经元发生PCD。大鼠腹面前列腺上皮细胞的生存也依赖于睾丸所分泌的睾酮,肾上腺皮质细胞的生存则依赖于垂体分泌的ACTH,降低睾酮或ACTH水平可使相应细胞发生PCD。在非神经内分泌组织中,培养造血干细胞也需要一种或多种CSF如G-CSF、GM-CSF,T细胞则需IL-2,内皮细胞需要EGF、FGF等。只要在培养中除去这些生存信号,相应细胞就会发生典型PCD。Raff等用单个寡树突细胞(oligodendro-

cyte)进行体外培养证明,当培养基中缺乏血清和外源信号分子时,该细胞很快死亡。如果加入其他发育中的细胞分泌的分子时或加入重组血小板衍生生长因子(PDGF)或胰岛素样生长因子(IGF)-1时则可存活数天^[14]。目前认为,这些与PCD有关的信号都是通过白细胞上的相应受体而发挥作用的。最近有研究显示,体内代谢产生的活性氧中间体(ROI)如 O_2^- 、 OH^- 、 H_2O_2 、 $HOCl_2$ 等可诱导PCD,NO本身不是氧自由基,但可与分子氧反应生成 O_3 和 H_2O_2 ,可诱生PCD。而一些抗氧化剂如类胡萝卜素、生育酚、维生素C等可防止PCD的发生^[15]。营养缺乏亦可致PCD。

2. 外源性诱因

研究已充分表明,多种外源性因素包括化学药物、物理因素、生物因素均可诱发细胞的PCD,但不同类型的细胞及细胞发育的不同时期对不同外源性因素的PCD诱导作用有不同的反应。目前已知可引起PCD的药物主要有细胞生长抑制剂,某些激素如皮质激素,促黄体激素释放激素(LHRH)、生长激素抑制激素和抗癌剂如放线菌素D、放线菌酮、顺铂、阿霉素、秋水仙碱等。物理因素有射线、高温等。生物因素包括微生物抗原、毒素、病毒等,其中HIV引起CD4⁺T细胞发生PCD已被视为艾滋病发生的重要原因^[16,17]。

四、异常PCD与人类疾病

PCD异常是某些疾病发病的重要原因。PCD异常包括PCD过度和PCD抑制。下面讨论与异常PCD有关的几种重要疾病。

1. 肿瘤

许多证据表明肿瘤的发生与PCD有关。例如,血液系统最常见肿瘤滤泡状淋巴瘤与染色体异位所致的bcl-2基因激活强烈相关。由于bcl-2可抑制PCD,因此bcl-2激活的细胞克隆得以存活下来。虽然bcl-2基因本身不足以引起细胞恶变,但存活下来的细胞有机会进一步发生基因突变,致使c-myc癌基因等激活,

产生恶性细胞克隆。这种情况已在其淋巴细胞持续表达 *bcl-2* 的转基因小鼠中得到证实^[18-20]。Miyashita 等^[20]把激活的人 *bcl-2* 基因导入小鼠淋巴细胞瘤发现, 转基因的瘤细胞对比正常用量高 100 倍的类固醇药物地塞米松仍有抵抗力, 从而存活下来, 且对长春新碱、氨甲喋呤等也有抵抗力。

另有研究证明, *bcl-2* 的表达可抑制骨髓干细胞、B 细胞和胸腺细胞的 PCD。虽然尚未证实 *bcl-2* 与 T 细胞淋巴瘤之间的关系, 但 *bcl-2* 对 T 细胞的 PCD 可能有影响。在转基因小鼠胸腺细胞中已证实, *bcl-2* 的表达可防止多种信号诱导的 PCD 的发生^[22,23]。

抑癌基因 *p⁵³* 产物失活也导致肿瘤, 其原因是 *p⁵³* 产物失活的细胞不再把生长因子作为防止 PCD 的必要条件。对 PCD 有抑制作用的基因包括 *p⁵³* 基因的失活是肿瘤发生的重要原因。

总之, *bcl-2* 激活可致癌症, 诱发 PCD 的基因失活也致肿瘤发生。控制某一细胞系 PCD 的基因一旦失活, 该细胞系即不能进行正常的 PCD 而存活下来, 进一步发生基因突变而致癌基因激活, 最终发生恶性肿瘤。在人类可能存在着与 *ced-3*、*ced-4* 同源的 PCD 效应基因, 其作用与抑癌基因类似。

2. 艾滋病

HIV 感染者发生艾滋病的原因主要是 CD₄⁺T 细胞、CD₄⁺T 细胞和神经元的功能障碍和数量骤减, 而 PCD 在其中起重要作用。受到 HIV 感染的细胞极度敏感, 在体外受到美洲商陆等丝裂原或依赖 MHC-II 类分子的超抗原刺激时可发生 PCD, 这是一种主动死亡过程, 可被蛋白合成抑制剂或环孢素 A 所抑制。其他多项研究均证明, HIV 感染后的 T 细胞耗竭与 PCD 有密切关系。HIV 诱发 T 细胞 PCD 的机制可能是, CD₄ 分子或 CD₈ 分子与 HIV 的 gp 120 或其抗原抗体复合物结合后, 如果抗原递呈细胞的 MHC-II 类分子与 CD₄⁺ 细胞的 TCR 结合即产生 PCD^[24-26]。

3. 自身免疫性疾病

如果在胚胎发育期, 针对自身组织的 T 细胞不通过 PCD 而死亡, 就可潜伏下来, 在出生后的一定时期攻击自身组织引发自身免疫反应。Nagata 等^[26]已证实了 PCD 异常与系统性红斑狼疮 (SLE) 之间的联系。

4. 其他疾病

有学者认为, 某些神经退化性疾病如早老性痴呆、Parkinson 病的发生与特定的神经细胞亚群过早、过度发生 PCD 有关^[27,28]。PCD 异常是胚胎发育障碍或畸形的重要原因, 可致胎儿流产, 器官、组织缺陷及出现多余赘生物等。

五、展望

PCD 是多细胞生物体重要的生理性机制, 该机制一旦失活可致各种疾病。应该充分利用现代分子生物学技术和基因工程技术进一步深入探讨 PCD 发生的分子机制。在研究 PCD 的基因调控的同时, 应注意细胞间的持续异常信号和外源性诱因对 PCD 的影响。

应着手研究干预异常 PCD 的抗病疗法。应用现代分子生物学技术如反义技术、基因导入技术从调控 PCD 角度探索防治神经退化性疾病、艾滋病和肿瘤的有效措施, 目前已有人在进行多方面尝试。例如, 有人用反义寡核苷酸即反义 DNA 片段阻止 *bcl-2* 激活, 从而增加了癌细胞对抗癌药的敏感性^[1]; 另有人用单克隆抗体诱导出了 B 细胞和 T 细胞的 PCD, 为最终诱导肿瘤细胞发生 PCD 打下了基础^[29]。在肿瘤放疗中理想的结果是引起肿瘤细胞的 PCD 而对正常细胞无影响, 通过探索各种细胞受射线照射后引起 PCD 的选择感受性和敏感性, 可以更有效地致死肿瘤细胞而对正常细胞加以保护。多种不同结构和作用机制的抗癌药物均可引起肿瘤细胞的 PCD 而发挥作用, 其机制是抗癌药扣动了某一共同的扳机, 触动了某种在基因指导下的化学级联反应, 从而发挥共同的结局。应弄清这一“扳机”的本质, 从而为更

有效地化疗打下基础。在防治艾滋病和早发性痴呆方面,通过基因导入疗法以防止细胞的异常PCD也将成为一种有希望的措施。

摘 要

编程性细胞死亡(PCD)是多细胞生物体内广泛存在的一种生理过程,对维持机体的正常发育和内环境稳定起重要作用。但是,这种有益的生理过程也可产生病理作用。本文较详细地叙述了PCD的细胞形态学改变、基因调控、PCD与疾病等方面的研究现状,并对PCD今后研究的重点进行了展望。

参 考 文 献

- [1] 宝福凯, 1993, 广东科技, 9: 2—3.
- [2] Vaux, D. L., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90: 786—789.
- [3] 王亚辉, 1993, 细胞生物学杂志, 15: 145—150.
- [4] Wyllie, A. H., et al., 1981, Histochem., 13: 681—692.
- [5] Russell, J. H. M., et al., 1992, J. Immunol., 125: 1256—1261.
- [6] Knight, R. L., et al., 1993, Eur. J. Cell Biol., 60: 210—216.
- [7] Searle, J., et al., 1982, Path. Annu., 2: 229—259.
- [8] Wyllie, A. H., 1987, Int. Rev. Cytol., 75 (Suppl. 17): 755—785.
- [9] Bissonnette, R. P., et al., 1992, Nature, 359: 552—554.
- [10] Vaux, D. L., et al., 1992, Science, 258: 1955—1957.

(上接封三)

用GBSS配成与Metrazimide相同的浓度,分离效果一样,但价格要便宜得多。

摘 要

改良国外文献方法,用链霉蛋白酶和胶原酶先后原位灌注大鼠肝脏,以11% Metrizamide密度梯度分离肝贮脂细胞获得成功。贮脂细胞得率为 $3-4 \times 10^7$ 个/肝脏,存活率在98%以上,纯度达90—95%,传代培养后纯度在98%以上。

关键词: 贮脂细胞 细胞分离 细胞培养

- [11] 宝福凯, 1994, 生理科学进展, 25: 332.
- [12] Hockenbery, D. M., 1992, Semin. Immunol., 4: 413—420.
- [13] Debbas, M., et al., 1993, Genes. Dev., 7: 546—549.
- [14] Raff, M. C., 1992, Nature, 356: 397—400.
- [15] Buttke, T. M. and Sandstrom P. A., 1994, Immunol Today, 15: 7—10.
- [16] Sellins, K. S. and Cohen J. J., 1991, Radiat. Res., 126: 88—95.
- [17] Ameisen, J. C., 1992, Immunol. Today, 13: 388—390.
- [18] Vaux D. L., et al., 1988, Nature, 335: 440—442.
- [19] Strasser, A., et al., 1990, Nature, 348: 331—334.
- [20] McDonnell, T. J., et al., 1991, Nature, 349: 254—256.
- [21] Miyashita, T., et al., 1992, Cancer Res., 52: 5407—5411.
- [22] Williams G. T., 1991, Cell, 65: 1097—1098.
- [23] Korsmeyer, S. T., 1992, Immunol. Today, 13: 285—287.
- [24] Reyaard, L., et al., 1992, Science, 257: 217—219.
- [25] Gougen, M. L., et al., 1993, Science, 260: 1269—1270.
- [26] Nagato, S., et al., 1992, Nature, 365: 314—317.
- [27] Jenner, P., 1989, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 8: 22—28.
- [28] Kosik, K. S., 1992, Science, 256: 780—783.

参 考 文 献

- [1] Friedman, SL., 1990, Semin in Liver Dis, 10: 20—29.
- [2] Friedman, SL. et al., 1987, Anal Bioche, 161: 207—218.
- [3] Alpini, G. et al., 1994, Hepatology, 20: 494—514.
- [4] Knook DL. et al., 1982, Exp Cell Res, 139: 468—471.
- [5] 徐列明等, 1993, 中西医结合肝病杂志, 3: 16—18.
- [6] 徐列明等, 1992, 中华消化杂志, 12: 112—114.
- [7] Yokoi, Y. et al., 1984, Hepatology, 4: 709—714.
- [8] 和气健二郎, 1994, Mole Med, 31: 154—164.
- [9] Ballardini, G. et al., 1994, Hepatology, 19: 440—446.

(下转134页)