

编程性细胞死亡及研究方法

·张亚历 姜 泊 周殿元

(第一军医大学南方医院消化中心 广州 510515)

在生物组织中,单个细胞受其内在基因编程的调节,通过主动的生化过程而自杀死亡的现象,称编程性细胞死亡(PCD, Programmed Cell Death, Apoptosis)^[1]。PCD细胞单个散在分布。早期的形态学改变为染色质固缩,常聚集于核膜呈境界分明的颗粒块状或新月形小体,细胞质浓缩。继后胞核和细胞外形皱折,核裂解成质膜包绕的碎片,细胞膜突出形成质膜小泡(即细胞“出泡 blebbing”现象),脱落后形成 PCD 小体,其内可保留完整的细胞器和致密的染色质。组织中的 PCD 小体可很快被巨噬细胞或邻近细胞摄取消化,因此不出现明显的炎细胞浸出,炎症反应轻微。一般认为细胞 PCD 小体的形成,约数分钟就可完成,因此在组织切片上不易观察出泡现象,但被吞噬的 PCD 小体可在细胞内滞留数小时^[2]。

上述 PCD 的形态学特征与坏死有明显的区别,后者极少为单个散在细胞死亡,常是某一区域内的一群细胞或一块组织受累。坏死早期可发生核固缩,但染色质分布无规律,边界不清,没有膜被核碎片的出现。坏死后期核可溶解消失,细胞质肿胀明显,细胞器常有结构破坏。

1980年Wyllie等在用糖皮质激素诱发的胸腺细胞死亡研究中首先发现,细胞出现PCD时核小体之间的连接部双股螺旋断裂形成多个180—200 bp的寡核苷酸碎片,在含溴化乙锭的琼脂糖凝胶电泳上呈典型的“梯状”条带^[3],这一过程是由激活的钙离子依赖的核酸内切酶介导的。而坏死时,常常是由细胞损伤因子引起的DNA无规律的断裂,伴组蛋白降解,在琼脂糖凝胶电泳上呈模糊的弥散膜状条带。虽

然最近一些作者发现PCD时不一定发生DNA的断裂^[4],但目前认为琼脂糖凝胶电泳时核DNA的梯状条带为PCD的特征性变化。PCD观察方法包括:

1. 形态学方法

(1) 活体细胞,可应用甲苯胺蓝、藏红等作细胞学涂片染色。也可用Hoescht 33342或吖啶橙等进行荧光观察。我们的方法中常将吖啶橙配成100 μg/ml的贮存液浓度。用时取约95 μl的细胞悬液加5 μl的吖啶橙贮存液混匀后作细胞点片,加盖玻片后直接在荧光显微镜下观察,PCD碎片十分清楚。

(2) 组织切片染色,是最常用的简便方法,电子显微镜观察比单纯的光学显微镜观察可靠,以环氧树脂包埋超薄切片较为理想。通过Bouins液固定组织进行Feulgen染色等可使光镜下PCD细胞固缩染色质的染色深度增加^[5]。根据坏死细胞有RNA降解,而PCD时mRNA增加的特点,Moffit最近提出了甲基绿-派诺宁染色区分细胞PCD与坏死的方法^[6]。此外,由于PCD时常伴有组织细胞某些酶学或蛋白表达的变化,因此一些作者提出通过酶组化方法检测组织中SGP2蛋白^[7]、组织蛋白酶D^[8]或谷氨酰胺转移酶^[9]以反应细胞PCD情况,但是这些方法并不特异,一些组织出现PCD时并不一定会有这些标记物的变化。最近研究发现细胞表面Fas抗原可能为细胞PCD较特异标记^[10],利用抗人Fas单抗,1994年美国ONCOR公司率先推出了辣根酶标记和荧光标记的ApoTag试剂盒,这可能会为PCD的研究提供较大的方便,但其应用性研究论文尚未见报道。

2. 琼脂糖凝胶电泳法

(1) 常规经典方法^[8] 培养或单细胞悬液用细胞裂解液消化细胞按常规法提取DNA后,置于含溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳,细胞出现PCD时呈典型的“梯状”条带,而坏死时,呈模糊的弥散膜状条带。我们的具体方法是将约 10^7 细胞离心洗涤后,沉淀加500 μ l细胞核裂解液(1 mg/ml蛋白酶K溶液含pH 8.0的10 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA和0.4% SDS)重悬细胞(37 $^{\circ}$ C, 12—24 hr, 不时振摇),加入0.5 ml酚和0.5 ml氯仿异戊醇液抽提(振摇30秒,6000 rpm,5 min)。取上清加入80 μ l的3 mol/L醋酸钠和2.5 ml冷冻纯乙醇(倒转试管混合),液氮5 min, 12000 rpm离心沉淀DNA。70%乙醇洗一次后,抽干,溶入2 ml TE缓冲液中,加入25 μ l RNase, 37 $^{\circ}$ C, 1 h。同法用等体积酚氯仿抽提,乙醇沉淀,抽干。置含溴化乙锭的1.8%琼脂糖电泳,观察。最近Gong等提出的一种PCD细胞选择性DNA提取方法,将细胞经70%酒精预固定后直接进行DNA提取和细胞裂解,可大大简化PCD琼脂糖凝胶电泳操作步骤^[11]。

(2) Klenow聚合酶末端标记法^[12] 1992年Rosl利用PCD细胞在核酸内切酶的作用下产生具有粘性末端的DNA片段,可被Klenow聚合酶补平的原理,采用³²P标记的核苷酸对纯化的DNA通过简单的末端标记和放射自显影,便可检测梯状条带中核苷酸片段。该法一天内可出结果,尤其适合微量核苷酸碎片的检出。

(3) DNA碎片定量观测法^[13] 1992年Huang和Plunkett等报道了可以定量检测pg水平PCD细胞核小体间DNA碎片的方法。细胞消化裂解后,抽提并纯化细胞DNA,用碱性磷酸酶将DNA末端脱磷酸后,在T4多核苷酸激酶的作用下将5'末端用³²P标记,琼脂糖凝胶电泳后,通过测定DNA带的放射量推

知PCD程度。该法比单纯溴化乙锭染色琼脂糖凝胶电泳的敏感性要高2000倍。

3. 流式细胞测量法

PCD时,DNA断裂,在流式细胞光度计上呈现亚二倍体核型峰的特征,为与坏死的细胞区分,1994年Huschtscha等应用碘化Propidium染色及细胞光散射的特点提出了检测PCD并使之与坏死相区别的方法^[14]。在DNA直方图上,PCD细胞出现二倍体峰(G1细胞)的减少,G1峰左侧出现亚二倍体细胞群的峰型。而坏死时,细胞周期中的细胞均出现不同程度的减少,亚二倍体细胞量多少不等。在光散图谱上,PCD出现低于正常的前向散射和较高的侧散射,坏死时则呈单一的前、侧高散射。如果样本中即有凋亡细胞也有死亡细胞,则在光散图谱上出现PCD和坏死两种特征性峰型,该法尤其适合用于研究抗癌药物诱导细胞死亡机制。

4. 石蜡切片原位末端标记法

1993年由Wijsman等首先报道^[15],石蜡包埋的切片组织用蛋白酶消化后在DNA聚合酶I或Klenow聚合酶的作用下将生物素标记的核苷酸原位掺入DNA裂口,再用辣根酶标的抗生物素蛋白抗体作用后,经DAB显色可使PCD细胞呈阳性着染。由于阳性反应的坏死细胞有DNA的降解,在形态上与PCD细胞明显不同,故在光镜下容易区分。应用这一方法,可对常规制备的病理学标本进行PCD细胞的形态和计量观察。

参 考 文 献

- [1] Carson, D. A. et al., 1993, *Lancet*, 341: 1251—1254.
- [2] Bursch, W. et al., 1990, *Carcinogenesis*, 11: 847—853.
- [3] Wyllie, A. H. et al., 1980, *Nature*, 284: 555—556.
- [4] Ormerod, M. G. et al., 1994, *Exp. Cell Res.*, 211: 231—237.
- [5] Goldberg, M. T. et al., 1990, *Arch. Toxicol.*, 64: 116—119.
- [6] Moffitt, P. 1994, *Cell Biol.*, 18: 677—679.

- [7] Buttyan, R. et al., 1989, *Mol. Cell Biol.*, 9: 3473—3481.
- [8] Sensibar, J. A. et al., 1990, *Prostate*, 16: 263—269.
- [9] Fesus, L. et al., 1991, *Eur. J. Cell Biol.*, 56: 170—177.
- [10] Wyllie, A. H., 1993, *Br. J. Cancer*, 67: 205—208.
- [11] Gong, J. et al., 1994, *Anal. Biochem.*, 218: 314—318.
- [12] Rosl, F., 1992, *Nucleic Acid Res.*, 20: 5243—5244.
- [13] Huang, P. and Plunkett, W., 1992, *Anal. Biochem.*, 207: 163—169.
- [14] Huschtscha, L. I. et al., 1994, *Exp. Cell Res.*, 212: 161—172.
- [15] Wijsman, J. H. et al., 1993, *J. Histochem.*, 7—11.

植物钙调素结合蛋白(CaMBPs)的研究概况

唐军 郭毅 孙大业

(河北师范大学生物系 石家庄 050016)

钙调素结合蛋白(CaMBPs),从广义上说是能指能和钙调素(CaM)结合的所有蛋白,包括已经确定了其活性直接受钙调素控制的各种酶类(比如PDE、Ca²⁺-ATPase、蛋白激酶等),以及在体外或体内条件下能和钙调素结合,但功能性质都有待深入探讨的各种未知蛋白;从狭义上说,钙调素结合蛋白仅指那些能和钙调素结合的未知蛋白质。本文将讨论广义的植物钙调素结合蛋白。

一、钙调素结合蛋白研究的意义

CaMBPs是Ca²⁺、CaM信号传递通路中的一个重要组成部分,是CaM直接结合和作用的靶蛋白,因此研究CaMBPs有助于探明Ca²⁺、CaM调控某些生理活动的分子机制。它的研究还可将Ca²⁺、CaM途径从其他Ca²⁺信号途径中甄别出来,并且有利于了解CaM的多种作用途径,如现已发现一些CaMBPs,它们和CaM的结合不依赖Ca²⁺,暗示着CaM可能具有不依赖于Ca²⁺的其他功能;另外,在动物中已发现许多CaMBPs,同时又是PKA或PKC的靶蛋白,从信号系统的全局来看,这些

CaMBPs处在各信号通路之间的枢纽位置,因此搞清CaMBPs的性质尤其是它可能存在的磷酸化性质,对理清胞内信号通路间错杂的脉络有重要的意义。

二、钙调素结合蛋白的研究方法

CaM亲和层析和CaM gel overlay是目前在CaMBPs研究中最基本与常见的方法。其中CaM gel overlay法主要用于检测CaMBPs的有无,以及研究在环境刺激下或发育等动态过程中CaMBPs的变化情况,包括它们和CaM结合能力的变化情况;CaM亲和层析法则通常和CaM gel overlay联用,用于某种CaMBP的酶活性检测以及某些CaMBPs的纯化及部分纯化。除了这两种基本的方法外,还可根据实际研究的需要,选用其他方法,如若以膜CaMBPs为研究对象,可使用一些双功能试剂,将CaM探针和膜上CaMBPs偶联起来,再进行SDS-PAGE分析,这样可防止膜上CaMBPs解离下来时发生的构象变化影响它与CaM结合能力;若想进行CaMBPs的定位,可用荧光或其他标记的CaM做探测工具,使用某种