

的缺陷可能是肿瘤发生的原因,80%的人类肿瘤的MGMT活性却很高,这可能是肿瘤细胞为适应环境而引起MGMT基因表达水平提高,那么,在肿瘤发生过程中,MGMT基因表达变化机理是什么?对这些调控机制的了解显然为了解肿瘤耐药性形成的分子机制并为克服耐药性提供理论基础。

利用遗传工程技术调节MGMT基因的表达,防止基因突变、细胞癌变或提高化疗效果,是一个很有吸引力的研究方向,但有很多技术问题有待解决:如何以简单而高效的方法把外源基因导入每一个靶细胞?如何提高基因表达载体的表达效率,安全性和表达的稳定性?在人体这么一个复杂的体系内,如何使基因表达能够按预想的方向发展等等?这些困难目前尚难以解决。相信,随着对MGMT表达调控机制研究的不断深入及基因治疗方法的突破,用生物技术方法调节MGMT基因表达、造福人类的愿望最终是能够实现的。

参 考 文 献

- [1] Tano, K., et al., 1990, *Proc. Natl Acad Sci. USA.*, 87: 686—690.
- [2] Nakatsu, Y., et al., 1993, *Mutat Res.*, 293: 119—132.
- [3] Saget, BM. And Walker, GC., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91:9730—9734.
- [4] Fritz, G., et al., 1991, *Mol. Cell. Biol.*, 11: 4660—4668.
- [5] Fornace, AJ Jr., et al., 1990, *Cancer Res.*, 15: 7908—7911.
- [6] Kroes, RA. and Erickson LC., 1995, *Carcinogenesis*, 16: 2255—2257.
- [7] Costall, JF., et al., 1994, *Mol. Cell Biol.*, 14: 6515—6521.
- [8] Qian, X., et al., 1995, *Carcinogenesis*, 16: 1385—1390.
- [9] Peiper RO., et al., 1991, *Cancer commun.*, 3: 241—253.
- [10] Wani, G., et al., 1992, *Carcinogenesis*, 13: 463.
- [11] Ling-ling C., et al., 1992, *Carcinogenesis*, 13: 837.
- [12] Harris, LC., et al., 1996, *Carcinogenesis*, 17: 219—224.
- [13] Imai Y., et al., 1995, *Carcinogenesis*, 16: 2441—2445.
- [14] Zaidi, NH., et al., 1995, *Carcinogenesis*, 16: 451—456.
- [15] Zaidi, NH., et al., 1995, *Carcinogenesis*, 16: 1047—1053.
- [16] Yang, J, et al., 1995, *Carcinogenesis*, 16: 2271—2274.
- [17] 杨军,章扬培,1996,国外医学:遗传学分册,641—44.
- [18] Potter, P M., et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 1731—1534.
- [19] Citti L., et al., 1994, *Anticancer Res.*, 14: 2667—72.
- [20] Allay J A., et al., 1995, *Blood*, 11: 3342—3351.

活性氧诱导细胞凋亡

李 忌 郑荣梁

(兰州大学生物系 730000)

细胞凋亡(apoptosis)又称为程序性细胞死亡(programmed cell death),是细胞主动的衰老和死亡方式,与病理情况下的细胞被动坏死(necrosis)不同,凋亡的细胞周围没有炎症反应,因为细胞凋亡过程中细胞内的细胞器不发生裂解,细胞内容物不外漏,而是通过启动特定的

基因,使原来完整的细胞膜向外皱缩形成凋亡小体(apoptotic body),巨噬细胞或邻近的细胞可吞噬这些凋亡小体进入体循环^[1,2]。细胞凋亡的主要形态学特征是:细胞膜出现囊泡,细胞体积缩小,细胞核固缩,DNA被非随机地降解成小片段^[3,4]。目前认为细胞凋亡是体

内细胞的一个生理性调节机制,它与有丝分裂功能相反,是调节细胞群体减少,这不仅对胚胎发生、器官发育、变态作用及保持机体自稳态等过程至关重要,而且在控制细胞增殖和分化、肿瘤的发生和生长中起重要作用。

导致细胞凋亡的原因成为广泛关注的课题,迄今已发现许多因素都可诱导细胞发生凋亡,如:封闭细胞表面受体、提高细胞内 Ca^{2+} 浓度、络合细胞内的 Zn^{2+} 、辐射、抑制拓扑异构酶 II、氧化胁迫(Oxidative stress)、去除生长因子及用糖皮质激素处理等^[5,6]。总之,细胞内环境遭到破坏,就可能引起凋亡现象发生。虽然目前只能从形态学上确定细胞凋亡现象的存在,究其生化机制还不十分明确,但是已有多方面的研究结果指出凋亡与活性氧有着极其密切的关系。

一、外源性活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)

诱导细胞凋亡

活性氧(ROS)或一些可以产生氧自由基的化合物如醌类化合物,直接作用细胞可打破细胞内环境的稳定,即:细胞内 Ca^{2+} 浓度升高、能量缺失、谷胱甘肽被氧化及NADPH、蛋白巯基和脂质的氧化等^[7]。细胞坏死(necrosis)是细胞代谢平衡遭到彻底破坏的结果,凋亡和坏死是细胞死亡的两条不同途径,人们早就知道炎症、坏死与活性氧有关,而忽略了凋亡也与活性氧有关。近年来,大量研究证实在特定条件下低水平的氧自由基能诱导细胞凋亡,而不是导致细胞坏死。于是,有人提出氧自由基可能是细胞凋亡过程中起关键作用的中间体^[8]。

最为典型的例子就是Lennon等用低浓度的 H_2O_2 可诱导HL-60细胞发生凋亡,而当浓度继续升高时,便会引起大量细胞坏死^[9];可以产生氧自由基的2,4-二甲氧基-1,4-萘醌(DMNQ)随着浓度的升高会分别诱导RINm5

F胰岛瘤细胞增殖—凋亡—坏死^[10];氧化的低密度脂蛋白能诱导淋巴细胞发生凋亡^[11];一定浓度的叔丁基过氧化物(t-BuOOH)可诱导神经细胞发生凋亡^[12];脂质过氧化物15-过氧化二十碳四烯酸(15-HPETE)和13-过氧化十二碳二烯酸(13-HPODE)诱导A3.01T细胞发生凋亡^[13];而且,当今研究得最为活跃的过氧化亚硝基自由基(ONOO[·])在一定条件下也诱发鼠胸腺细胞发生凋亡^[14]。我们研究发现外源性的羟自由基([·]OH)可诱发肝癌细胞发生凋亡(待发表)。

二、抗氧化剂可阻止细胞发生凋亡

抗氧化剂可阻止多种因素诱导的细胞凋亡^[15],也就是说,不只限于阻止氧自由基诱导的细胞凋亡,对那些由受体和生长因子介导的细胞凋亡同样有抑制作用。研究发现抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)对由肿瘤坏死因子(TNF- α)诱导的细胞凋亡有抑制作用^[16];巯基还原剂可阻止由抗FAS抗体/FAS抗原诱导的细胞凋亡^[17];最近,又有人发现细胞内的二氢硫辛酸可阻止由甲基脱氢皮质醇诱导的胸腺细胞的凋亡^[18]。以上研究结果反证了细胞凋亡过程中氧自由基起着重要作用。

近年来,对Bcl-2蛋白的研究更加证实了氧自由基在细胞凋亡中所起的作用。最初发现Bcl-2基因为原癌基因,由于染色体易位,使得该基因与免疫球蛋白重链位点并列,导致Bcl-2基因连续表达^[19];Bcl-2蛋白位于线粒体内膜、核周膜及内质网上^[20]。转基因细胞株试验结果表明:Bcl-2蛋白对不同因素引起的细胞凋亡均有抑制作用^[21];而且提出Bcl-2可能通过减少活性氧的产生来阻止细胞的死亡^[22]。Lam等研究发现Bcl-2对细胞内 Ca^{2+} 平衡的维持有着重要作用^[23],而 Ca^{2+} 水平的变化与活性氧的产生有着密切相关性^[24];最近,有人用自由基自旋捕集剂也可阻止胸腺细

胞发生凋亡^[26]，自旋捕集剂DMPO和TEMPO也是一种抗氧化剂，它们可防止胸腺细胞出现皱缩，抑制DNA片断化，而且，在胸腺细胞凋亡过程中还原性谷胱甘肽含量明显减少，而过氧化物含量显著增加^[26]。由此看出，细胞的内源性活性氧在细胞凋亡过程中同样有着很重要的作用，因此，活性氧产生的部位及其作用的靶分子受到研究者们关注。

三、细胞凋亡过程中氧自由基产生的部位

线粒体内的氧化磷酸化过程是真核细胞内活性氧产生的主要位点^[27]。用TNF- α 作用于几种不同的细胞均可引起它们线粒体活性氧生成量的增加^[28]。虽然，细胞内具有很有效的抗氧化防御系统，但用TNF- α 作用较长时间后，仍然会诱导大量细胞发生凋亡^[29]，巯基还原剂对这种细胞凋亡有抑制作用^[30]。于是，有人提出线粒体产生的活性氧在细胞凋亡过程中可能起一种信号传递物质的作用，因为线粒体内Mn-SOD基因的过量表达也有抑制TNF- α 毒性的作用^[31]，而且可延长经过辐射或DNA交联药物处理的细胞寿命^[32]。所以，由线粒体产生的活性氧自由基可能对细胞凋亡的发生有调节作用。

但是，线粒体产生的活性氧并不是对所有的细胞凋亡都起作用，因为由糖皮质激素诱导胸腺细胞凋亡的过程中，线粒体DNA并没有受到损伤^[33]，而大量研究证实线粒体DNA对氧自由基很敏感，极易被活性氧损伤^[34]，这表明在此类细胞凋亡过程中，线粒体不是产生活性氧自由基的部位。而且，有人研究发现去除线粒体的成纤维细胞与正常成纤维细胞在同等条件下发生凋亡的速率几乎是一样的^[35]。因此，我们认为在细胞凋亡过程中发挥重要作用的活性氧自由基也可能来自非线粒体组织，即由Ca²⁺依赖性的磷脂酶A₂所激发的花生四烯酸代谢途径和黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶途径及

精氨酸—NO合成酶途径可能是产生氧自由基的主要途径。因为，用反义寡核苷酸抑制细胞CuZn-SOD基因的表达，使得细胞质内CuZn-SOD活性降低，活性氧自由基含量上升，促进了细胞凋亡^[36]；N-乙酰半胱氨酸(NAC)对此类细胞凋亡表现抑制效应^[36]。我们推测半衰期相对较长的超氧阴离子(O₂⁻)可能是诱导细胞凋亡的主要活性氧自由基；另外，我们应该注意到线粒体的主要功能是为细胞活动提供ATP的“能量加工厂”，细胞凋亡是一受基因调控的主动过程，需消耗能量，氧化磷酸化的抗偶联剂二硝基苯酚(DNP)就可抑制抗癌药Etoposide诱导的细胞凋亡^[37]，因此，我们认为去除线粒体的成纤维细胞之所以能维持较高水平的凋亡率，是因为细胞外含有丙酮酸，细胞可通过糖酵解途径获得ATP，提供细胞凋亡所需的能量。

四、细胞凋亡过程中活性氧作用的靶点

细胞内产生的氧自由基可通过不同的途径诱导细胞发生凋亡，既可直接损伤DNA，诱导细胞凋亡，例如辐射诱导淋巴细胞的凋亡^[38]，也可攻击蛋白质，导致许多蛋白质尤其具有酶活性蛋白质功能的丧失，从而诱导细胞发生凋亡，已有人发现蛋白酶抑制剂对胸腺细胞凋亡有抑制作用^[39]；这些蛋白酶抑制剂可能起到类似抗氧化剂的作用，阻止氧自由基对蛋白质的攻击。而且，蛋白质被活性氧自由基氧化后，还可能影响核基因的转录，激活细胞凋亡途径，已发现几种与DNA结合的转录因子都含有半胱氨酸残基^[40]，如果半胱氨酸的巯基被氧化，将导致它们与DNA结合的能力大大降低，相反，氧自由基却可通过增强对转录因子激活物(NF κ B)的抑制蛋白(I κ B)的解离，激活NF κ B与DNA的结合活性，进一步激活NF κ B相关的转录因子^[41]，即活性氧可能通过影响基因转录，改变细胞的表型特征，

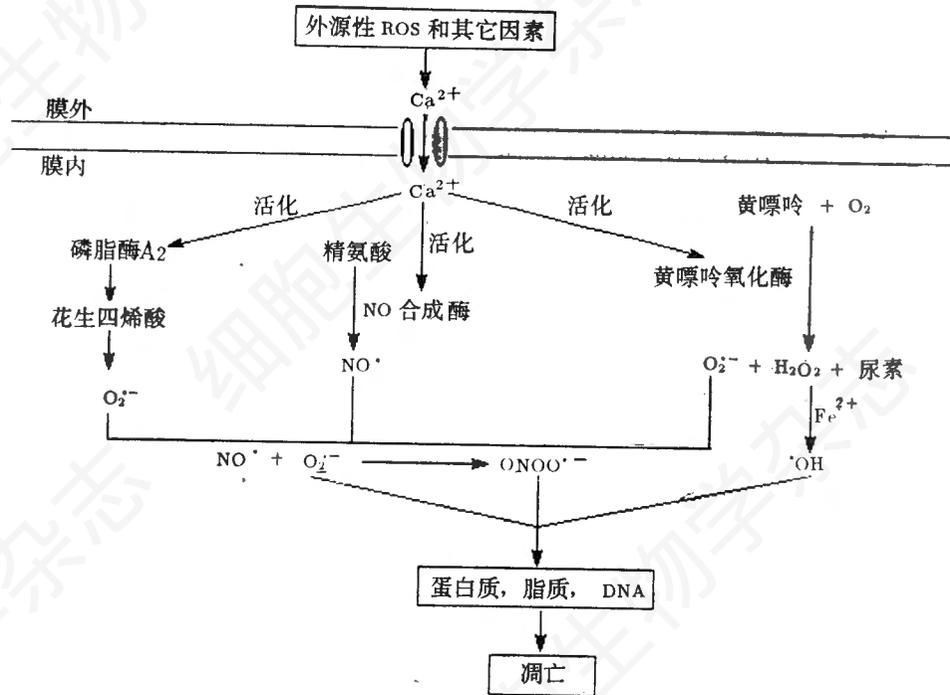


图 1 活性氧诱导细胞凋亡

诱导细胞发生凋亡，另外，活性氧还可能作用于细胞膜，诱发脂质过氧化，从而影响细胞的信号传递系统，激发有关的调控基因，导致细胞凋亡。

综上所述，目前大量的研究多表明，活性氧参与细胞凋亡过程(图 1)，一定浓度的氧自由基可直接诱导细胞发生凋亡，而抗氧化剂包括细胞内的巯基还原剂、SOD 及 Bcl-2 不仅可阻止由氧自由基诱导的细胞凋亡，而且对其它因素诱导的细胞凋亡也表现抑制效应。其实，其它诱导因素也可能是间接地通过活性氧起诱导作用的，例如糖皮质激素和拓扑异构酶 II 抑制剂等有可能激发细胞内氧自由基的产生。细胞内产生氧自由基的部位不只一个，不同环境条件下激发的部位不同，最终导致细胞内氧化还原状态的失衡，影响正常的基因表达和蛋白修饰功能，引发细胞凋亡。

摘 要

细胞凋亡是细胞主动的衰老和死亡方式。

细胞凋亡过程极其复杂，其生化机制还不十分清楚。用活性氧如 H_2O_2 、 $ONOO^{\cdot}$ 及脂质过氧化物等可直接诱导某些细胞发生凋亡，抗氧化剂对细胞凋亡有抑制作用。细胞内产生活性氧的部位主要是线粒体电子传递链、黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶途径、磷脂酶 A_2 激活的花生四烯酸代谢途径及精氨酸-NO 合成酶途径。外源性活性氧或通过内源性活性氧的生成，导致细胞内氧化还原状态的失衡，诱导某些基因的表达，引起凋亡。

参 考 文 献

- [1] Stellar, H., 1995, *Science*, 267: 1445—1449.
- [2] Kerr, J. F. R. et al., 1994, In *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, ed. by Celis, J. E., pp. 319—329. Academic Press, San Diego.
- [3] 宝福凯, 1995, 细胞生物学杂志, 17(3): 122—126.
- [4] 张亚历等, 1995, 细胞生物学杂志, 17(3): 127—129.
- [5] Surh, C. D. and J. Sprent, 1994, *Na-*

- ture, 372: 100—103.
- [6] Collins, M.K.L. and A. R. L. Rivas, 1993, *Trends Biochem. Sci.*, 18: 307—309.
- [7] Orrenius, S., 1993, In *Free Radicals, From Basic Science to Medicine*, ed. by Poli, G. et al., pp. 47—64, Birkhauser Verlag, Basel.
- [8] Buttke, T. M. and P. A. Sandstrom, 1994, *Immunol. Today*, 15: 7—10.
- [9] Lennon, S. V. et al., 1991, *Cell Prolif.*, 24: 203—214.
- [10] Dypbubt, J. M., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269: 30553—30560.
- [11] Escargueil-Blang, I. et al., 1994, *FA-SEB J.*, 8: 1075—1080.
- [12] Mukherjee, S. K. et al., 1995, *Brain Res. Bulletin*, 38: 595—604.
- [13] Sandstrom, P. A. et al., 1995, *FEBS Letters*, 365: 66—70.
- [14] Salgo, M. G. et al., 1995, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 215: 1111—1118.
- [15] Ramakrishnan, N. and G. N. Catravas, 1992, *J. Immunol.*, 148: 1817—1821.
- [16] Mayer, M. and M. Noble, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7496—7500.
- [17] Matsuda, M. et al., 1991, *J. Immunol.*, 147: 3837—3841.
- [18] Bustamante, J. et al., 1995, *Free Rad. Biol. & Med.*, 19: 339—347.
- [19] Korsmeyer, S. J., 1992, *Blood*, 80: 879—886.
- [20] Hockenbery, D. et al., 1990, *Nature*, 348: 334—336.
- [21] Hemet, T. et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 1456—1460.
- [22] Kane, D. J. et al., 1993, *Science*, 262: 1274—1277.
- [23] Lam, M. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 6569—6573.
- [24] Elliott, S. J. et al., 1992, *Free Rad. Biol. & Med.*, 13: 635—650.
- [25] Walfe, J. T. et al., 1994, *FEBS Lett.*, 352: 58—62.
- [26] Slater, A. F. G. et al., 1995, *Biochem. J.*, 306: 771—778.
- [27] Slater, A. F. G. et al., 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1271: 59—62.
- [28] Hennes, T. et al., 1993, *Biochem. J.*, 289: 587—592.
- [29] Bellomo, G. et al., 1992, *Cancer Res.*, 52: 1342—1346.
- [30] Sandstrom, P. A. et al., 1994, *J. Leukoc. Biol.*, 55: 221—226.
- [31] Wong, G. H. W. and D. V. Goeddel, 1988, *Science*, 242: 941—944.
- [32] Hirose, K. et al., 1993, *FASEB J.*, 7: 361—368.
- [33] Murgia, M. et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 10939—10941.
- [34] Richter, C. et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 6465—6467.
- [35] Jacobson, M. D. et al., 1993, *Nature*, 361: 365—369.
- [36] Rathstein, J. D. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 4155—4159.
- [37] Kaufmann, S. H. et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 3976—3985.
- [38] Zhivotovsky, B. et al., 1993, *Exp. Cell Res.*, 207: 163—170.
- [39] Weaver, V. M. et al., 1993, *Biochem. Cell Biol.*, 71: 488—500.
- [40] Abate, C. et al., 1990, *Science*, 249: 1157—1161.
- [41] Brown, K. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2532—2536.

流式细胞术在细胞凋亡研究中的应用

胡庆柳 丁振华

(第一军医大学基础部放射医学教研室 广州 510515)

细胞凋亡(apoptosis)也称为细胞程序性死亡(programmed cell death)、细胞编程死亡,早期称为细胞间期死亡。细胞凋亡与细胞的另

一种死亡方式——坏死(necrosis)有着本质的区别。从形态上看,凋亡细胞会出现胞核及胞浆的浓缩,随后是染色质的断裂,凋亡小体的形