

研究程序化细胞死亡的科学方法

张文根*, 张学英

(渭南师范学院化学系, 陕西渭南 714000)

摘要: 运用科学认识论和方法论, 围绕2002年诺贝尔生理医学奖, 讨论了程序化细胞死亡的研究过程及方法特点, 得出了几点重要结论, 对于未来生物学新现象的探索具有积极作用。

关键词: 程序化细胞死亡; 分子机制; 方法特点; 历史启示

中图分类号: Q291 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)03-257-04

2002年诺贝尔生理学或医学奖(简称生理医学奖)授予3位生物学家布雷内(S. Brenner, 1927-, 英国)、苏尔斯顿(J.E. Sulston, 1942-, 英国)和霍维茨(H.R. Horvitz, 1947-, 美国), 以表彰他们发现了“器官发育和程序化细胞死亡的基因规则”^[1]。这项基础成果, 不仅拓宽了人们对生命现象的深刻认识, 为攻克恶性肿瘤等疾病提供了新方法, 而且从认识论和方法论的角度来考察^[2], 3位科学家运用的研究方法, 也为生物学新现象的探索树立了光辉典范。

1 疑难问题: 器官发育过程中一种基本生物学现象

所有动物(包括人类)都是由细胞组成的。每个人都是由受精卵发育而成, 受精卵分裂后形成大量功能不同的细胞, 进而发育成大脑、躯干、四肢等。问题是人类在胚胎阶段是有尾巴的, 为什么成人后却没有了尾巴?

其他一些动物器官在发育过程中也有类似现象, 如蝌蚪转变为青蛙过程中尾部的退缩, 哺乳动物胚胎发育中足间蹼的去除, 果蝇发育过程中胸翅的退化, 某些动物发育过程新旧器官的更替和重演现象等。生理条件下, 许多器官退化过程都与这种现象有关, 包括断奶后乳房静息状态的恢复, 毛发生长中期毛囊的退化, 胸腺中自身反应T细胞的清除, 衰老、突变细胞的清除等。甚至在未经治疗的恶性肿瘤组织及各种器官的生理性萎缩中, 也可观察到这种现象。可见, 器官在发育过程中除了细胞的正常生长外, 还存在着一种尚不明了的细胞死亡现象。一个成年人体内, 每天有上万亿的细胞诞生, 同时也有万亿计的细胞按一定生物规律死亡, 只不过诞生的细胞多, 死亡的细胞少, 所以人体才得以正常发育。

2 分析想象: 程序化细胞死亡的假设

关于细胞的死亡人们早已有所研究。某些感染性病毒、抗体、缺氧、不良刺激等, 都能引起细胞死亡, 这种现象称为细胞的坏死(necrosis)^[3]。坏死的细胞肿胀后破裂, 释放溶酶体酶, 使周围细胞溶解, 胞内物溢出散在细胞之间, 引起炎症反应, DNA裂解不规则。显然, 前述不明确的细胞死亡不属于这种方式。

器官发育是与遗传和进化紧密相关的三大生物学难题之一^[4]。许多器官在发育过程中, 之所以出现退化或生理萎缩现象, 其共同特征是这些细胞似乎按编好了的“程序”进行死亡和清除, 犹如秋天树叶的凋零和花瓣的凋谢, 而且发生过程中也不引起周围细胞损伤, 因此生物学家将这种现象称为“程序化细胞死亡(programmed cell death, PCD)”, 从功能上来区别这种不同于坏死的细胞死亡。1972年, 英国阿伯丁大学病理学教授J.F. Kerr对肝脏细胞进行研究, 从形态学角度将这种现象称为细胞的凋亡(apoptosis, APO), 认为这是一种主动的、程序化的、细胞固有的生物学过程, 是一种在组织动力学方面广泛存在的基本生物学现象^[5]。

1980年, A.H. Wyllie等人对细胞死亡进行了新分类, 把病理因素作用使细胞失去完整性导致的细胞死亡称为坏死, 把生理或病理条件下基因控制的细胞死亡称为凋亡^[6]。1994年, J.F.R. Kerr分析后指出, 细胞凋亡是由个体基因控制的细胞主动死亡的过程, 与细胞程序化死亡没有本质上的区别^[6]。因此, 正因为组成尾巴的细胞按一定生物规律恰当地死亡, 才使人类在出生后没有了尾巴。

3 模型筛选：程序化细胞死亡的实验突破

首先对程序化细胞死亡进行实验观察的生物学家是布雷内。布雷内1927年1月13日生于南非，1951年在威特沃特斯兰大学完成硕士学业，1954年取得牛津大学博士学位，现任职于加利福尼亚伯克利分子科学研究所。20世纪60年代初，他在剑桥医学科学研究所(MRC)分子生物学实验室^[7]，接触到细胞分化和器官发育的课题，但迎接他的第一个难题就是实验模型的选择^[8]。

布雷内意识到，要揭开细胞程序化死亡的规律，必须寻找到一个合适研究对象。如果使用传统无细胞生物(如噬菌体和病毒)或单细胞生物(如细菌和酵母)，因为它们没有细胞的分化，则对研究工作毫无价值；如果选用通常观察的动物，如哺乳类动物那样高级的生物，其细胞数量和种类又太多太复杂，使研究者简直无从下手。

布雷内最终在两个极端之间，寻找到一种既简单又是多细胞的生物——美丽新杆状线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)。这种线虫长约1mm，细胞数量不多，功能简单，生长期短，遍体透明，有利于在显微镜下观察其细胞分裂。而且这种线虫既有细胞谱系的特征，又有程序化细胞死亡的典型特点。他观察后发现，线虫在整个发育期间，从一个受精卵发育到成熟体，共产生1090个细胞，其中131个细胞在发育过程中发生了有规律地生物性死亡，结果使成虫细胞减少为959个^[8]。

这种选择线虫作为生物模型建立的独特研究方法，使得后来的基因分析能够和细胞分化以及器官发育紧密联系起来，并且能够借用显微镜追踪一系列变化过程，从而为细胞凋亡的探索开辟了一条新途径，使*C.elegans*成为生物学家手中定量表述程序化细胞死亡的绝好标本^[8]。1971年，美国著名的“阿尔勃特·拉斯克医学研究奖”授予布雷内，以肯定他发掘出*C.elegans*这样一个重要实验模型。

1974年，布雷内采用乙基甲磺酸在线虫基因中进行研究，诱导出特异性基因突变^[8]。由此，他分析提出一种新思想，认为不同的基因突变可能与特异性基因有关，也可能与器官发育的特异性效应相联系^[8]，从而将基因分析和细胞分裂结合起来，为后来苏尔斯顿和霍维茨的突破研究起到了奠基作用。2000年，布雷内又一次获得“阿尔勃特·拉斯克医学科学特别成就奖”。2002年，美国国立卫生研究院拿出1500万美元资助给布雷内，决定在其研究所成立一个“基因组杰出科研中心”。

4 方法移植：程序化细胞死亡的证明

沿着布雷内的开创性工作，苏尔斯顿继续进行研究。苏尔斯顿生于1942年3月27日，1963年和

1966年分别在剑桥大学获得学士学位和博士学位，1966~1969年在美国圣迭戈的索尔克生物研究中心做博士后，现任英国剑桥的桑格中心主任。

1969年，苏尔斯顿来到MRC分子生物学实验室，成为布雷内在剑桥的首批学生之一^[9]。他借用*C.elegans*实验模型，在改进实验条件和操作方法下，分离线虫的每一个细胞，研究线虫从受精卵到成虫的959个细胞分裂。并借用图谱学方法，于1976年整理出一幅详细图表，说明卵子转变为成虫的全部细胞变化，从而第一次为部分发育的神经系统描绘出了细胞谱系图(cell lineage)^[11]。首次证实这些细胞谱系是不变的，即每一个*C.elegans*细胞是严格按照同样程序进行分裂和分化的^[8]。

此外，他利用细胞谱系图还证实了布雷内的新思想，发现特异性细胞的程序化死亡是正常分化过程的组成部分，许多细胞在线虫发育期间或细胞分化过程中，会发生有规律地“自杀死亡”。不仅如此，他还借用基因方法，对这些细胞在死亡过程中的控制基因进行了分析研究，鉴定出参与程序化细胞死亡的第一个突变基因(*nuc-1*)^[11]。

2000年，苏尔斯顿对*nuc-1*基因进行了比较完整的化学鉴定，认为它是*C.elegans*的DNA酶II的同系物。接着，他又找到由*nuc-1*基因所编码的蛋白质，并证实该蛋白质是降解死亡细胞DNA所必须的生物物质，在程序化细胞死亡过程中，*nuc-1*基因对DNA降解起有中间步骤的作用^[8]。

苏尔斯顿的这些研究成果，不仅证明了程序化细胞死亡的假设，为PCD分子机制的揭示奠定了基础，而且他还是“人类基因组计划”的发起人之一^[9]。1986年，他被选为英国皇家学会会员，并被英王室授予勋爵封号。2000年，他又获得了“乔治·比德尔奖章”，当时世界著名期刊《遗传学》进行了整整两版的报道^[8]。

5 分类探索：PCD分子作用机制的揭示

继布雷内和苏尔斯顿之后，霍维茨鉴定出了真正的“死亡基因”，揭示了其主要特征以及它们在细胞死亡过程中的作用规律。霍维茨生于1947年5月8日，1972年和1974年在哈佛大学分别获得生物学硕士和博士学位，历任美国麻省理工学院助理教授、副教授和教授，现仍在麻省理工学院工作。

霍维茨也是布雷内上世纪70年代在剑桥MRC分子生物学实验室的同事^[7]。与苏尔斯顿采用的方法稍不同，除仍以*C.elegans*为实验模型外，霍维茨借用分类方法和基因分析方法，对线虫中不同类型的控制基因进行了特性研究，大量实验工作的重点主要集中在控制细胞死亡的基因编码程序上。到1986年，他终于找到了控制细胞死亡的关键基因，第一

次鉴定出了两个真正的“死亡基因”，即 *ced-3* 和 *ced-4* (*ced* 表示与 *C.elegans* 细胞凋亡相关的基因)，并证明了这两个基因是细胞死亡的先决条件^[1,8]。

此外，霍维茨还找到了另一类与细胞程序化死亡有关的基因，典型代表如 *ced-9*，其功能正好与 *ced-3*、*ced-4* 基因相反，保护细胞免受 *ced-3* 和 *ced-4* 基因引起的细胞死亡。这两种不同功能的基因在程序化细胞死亡过程中都起着非常重要的作用，尤其是起保护作用的基因，被霍维茨发现了不少。

更为重要的是，霍维茨采用同样方法，在人体内也找到了与 *ced-3* 相似的基因，从而成为演示人类细胞在发育期间以程序化方式死亡的第一人^[9]。这些发现，为霍维茨赢得了许多荣誉，1991年他被选为美国国家科学院院士；1986~2001年接连获得17项各国的科学奖；2001年获得美国“遗传学奖章”，对此《遗传学》杂志也利用整整两版进行了介绍^[8]。霍维茨的工作，使PCD分子作用机制进一步趋于明朗化。

6 纵深研究：细胞凋亡学的建立

三位生物学家的开创性研究，为细胞凋亡学的建立创造了前提条件，后来许多科学家的进一步努力完善了这门新兴学科。分子生物学的飞速发展，使生物学家在人体内找到了许多类似的双向基因，进一步证明了PCD是调节动物细胞数量的一种重要方式。近几年又发现了许多新调控基因，例如 *Bcl-2* 和 *ICE* 就是哺乳类动物两个功能相反的基因^[3]。目前发现的控制基因可分为两类：促进性基因，如 *ced-3*、*ced-4*、*c-Myb*、*c-Myc*、*p53*、*MyD118*、*GADD45*、*ICE*、*Bax* 等；抑制性基因，如 *ced-9*、*Bcl-2*、*Bcl-xL*、*MCL1*、*MyD116* 等，充分证明了细胞在死亡过程中调控途径上的复杂性^[3]。

随着工作的不断深入，人们发现PCD调控基因是一个庞大家族，有促进性基因、抑制性基因和清除性基因，甚至有的基因就存在体内，只不过处在无活性状态。另一方面，像卵泡的闭锁、毛囊的退化、胸腺的萎缩等生理变化，其细胞凋亡过程中多肽或蛋白质因子的表达，同时还受到时空顺序的调控。1997年，A. Butyugov 等人发现C反应蛋白对细胞凋亡也有一定影响^[10]。因此，科学家又提出了凋亡调节的“网络假说”^[3]。

在检测方法上，除了形态学方法外，还出现了电泳、免疫学、流式细胞术和末端转移标记技术等^[3]。通过透射电镜等方法，已弄清了凋亡细胞的生化特征和超微结构变化^[6]。发现凋亡细胞的生化特征主要表现为细胞质空胞化，胞浆浓缩，胞体变小；细胞器结构破坏明显；胞膜出现卷折；DNA断裂成有规则的片段^[11]。细胞凋亡过程中突出的超

微结构变化，细胞核染色质凝集成团块状，细胞质显著空胞化，凋亡细胞碎裂形成凋亡小体，同时伴随有细胞器的改变^[6]。这种超微结构变化，使我们能够从形态学上检测细胞是否发生了凋亡。

近年来在信号转导方面取得进展^[10-14]进一步深化了凋亡作用机制的研究。发现的细胞死亡受体配体系统有：*fas/fasL*、*TNF- α /TNFR*、*TRAIL/DR4* 和 *APO-3L/DR3*。发现 Ca^{2+} 可能是凋亡的启动因素之一，发生凋亡时，可能由于胞浆 Ca^{2+} 浓度增高，置换了细胞核内的 Zn^{2+} ，激活了内切酶导致细胞发生特异性变化，而许多酶都介导参与了 Ca^{2+} 信号通道^[14]。进一步研究表明，*ced-3*、*ced-4*、*ced-9* 也参与了线虫的信号通道，而且PCD信号通道中有些基因在进化过程中是十分保守的，说明它们在线虫中的功能与在人体中的功能一样，其同类物也参与了人体的信号通道^[1]。所以，控制细胞死亡的那些信号通道的紊乱对于医学研究是十分重要的。

应用方面，人们利用PCD解释了许多疑难病的致病原因^[8]。如果体内该死的细胞没有死亡，将导致细胞恶性增长，如突变基因会引起细胞异常分裂从而形成癌症；如果不该死亡的细胞过多死亡，比如受艾滋病病毒攻击淋巴细胞大批死亡，就会破坏人体免疫能力，导致艾滋病发作；如果脑神经调控基因失调，其细胞死亡速度加快，就可能得早老性痴呆症。另一方面，机体以凋亡形式消除那些病变细胞，利用这一特性，人们正在寻找诱导肿瘤细胞死亡的新方法。目前已发现 *BRCA1*、*p53* 是两种非常重要的抑癌基因，*p53* 防御癌症的一条有效途径是在细胞表现异常时就发生自杀性死亡。这些研究，为癌症、艾滋病、早老性痴呆等疑难病的靶向性基因治疗^[15]提供了理论依据。

综上所述，程序化细胞死亡的研究最初从动物开始，上世纪90年代后引入植物界，现已逐渐形成一门独立的生物学分支学——细胞凋亡学。当然，这只是一个基本框架，其内容的完善，如在超微结构变化、分子作用机制、信号转导等方面仍然需要进一步努力。

7 认识规律、方法特点及历史启示

通过以上分析，可得出许多有益的启发。

7.1 生物学新分支学科的创立不同于一般的认识规律

根据科学认识论和方法论，建立独立新体系的一般规律是发现问题、实验观察、提出假设、证明假设、纵深发展、建立体系^[16]。但是，通过考察不难发现，在细胞凋亡学的创立过程中，其探索过程却是发现问题、分析假设、实验观察、证明假设、纵深研究、建立体系。这一点充分说明了

科学认识论和方法论的宏观指导性,同时也充分说明了生物学研究的特殊性。

7.2 模型法是生物学现象研究中实现突破的一种重要方法

当面临程序化细胞死亡这一基本生物学现象时,在实现突破方面,布雷内的高明之处在于他选择了身体透明、功能简单的线虫作为生物模型。这种独特的研究方法,不仅为他获得本年度的诺贝尔生理医学奖奠定了基础,同时也为后来的基因分析带来了极大方便。美国耶鲁大学遗传学家 M. Stem 则从另一角度说明了当年布雷内的聪明才智:“在20世纪60年代的时候就进入这一全新领域需要极大的预见性”^[7]。因此,面对复杂的生物学现象,模型法不失为科研工作实现突破的一种重要方法。

7.3 方法移植和方法联用是解决疑难问题的有效途径

布雷内的独特方法开创了生物学研究的一个新领域,但这种方法并不能解决所有的问题,苏尔斯顿和霍维茨的研究方法也有许多可取之处。除了继续观察线虫之外,苏尔斯顿借用图谱学方法和基因分析方法,霍维茨借用分类方法和基因分析方法,都在这一新领域的不同层次上做出了伟大发现。所以,移植现有的方法,甚至有时采用多种方法的联合运用,也是解决许多生物学问题的有效途径。

7.4 建立独立新体系是生物学研究的最高追求

从方法论的角度来考察,生物学研究的最高目标是什么?这是一个值得重视的问题。20世纪60年代,布雷内以他的远见卓识,对线虫进行显微镜观察,开创了程序化细胞死亡研究的新领域。后来,苏尔斯顿和霍维茨紧跟其后,各自采用不同方法又实现了新突破。再后来,许多科学家靠近前沿,纵深研究,将这一新领域发展成为一门独立的分支学

科。当然,从科学知识的完备性来分析细胞凋亡学,有关PCD调控的许多细节日前仍不十分清楚,但三位科学家的互补性研究工作,已使这一新领域初步具备了独立新体系的雏型,这也是他们能够获得诺贝尔奖的主要原因。可见,“点”和“面”的突破研究固然重要,而能够将点和面连接起来构成的“独立新体系”则更重要。

参 考 文 献

- [1] Press Release: The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2002, <http://www.nobel.se/>
- [2] 刘元亮,姚慧华,寇世琪. 科学认识论和方法论,北京:清华大学出版社,1987.
- [3] 赵永同. 细胞凋亡. 见:李喜先等编. 21世纪100个科学难题,长春:吉林人民出版社,1999:377-392.
- [4] 陈养民. 器官发育和程序化细胞死亡. 宝鸡文理学院学报,2003,1:56-58.
- [5] 龚非力. 医学免疫学,北京:科学出版社,2000:258-271.
- [6] 彭远英,彭正松,喻可芳. 凋亡细胞的超微结构变化. 细胞生物学杂志,2003,5:280-283.
- [7] 吕吉尔. 带你走进诺贝尔工厂. 世界科学,2002,11:2-3.
- [8] 傅杰青. 从程序化细胞死亡想到癌的征服. 自然杂志,2002,6:356-359.
- [9] CHECK E, 吕吉尔. 遗传学巨人分享诺贝尔奖. 世界科学,2002,11:4.
- [10] 陈杭,杨洁. C反应蛋白——天然防御蛋白研究进展. 细胞生物学杂志,2003,5:264-268.
- [11] 姜泊. 细胞凋亡基础与临床,北京:人民军医出版社,1999.
- [12] 何凤田. 程序性死亡的哺乳基因调控. 免疫学杂志,1996,12:71-77.
- [13] ABBAS A K, et al. Cellular and Molecular Immunology, 3rd ed. Philadelphia: W.B.Saunders Co, 1997
- [14] ARNE N, et al. Cellular environments and apoptosis: tissue microenvironments control activated T cell death. Immunology Today, 1997, 18: 72-76.
- [15] 申景平,卢圣栋. 癌症的靶向性基因治疗. 世界科学,2000,1:31.
- [16] 张文根. 现代化学研究方法论,西安:西北大学出版社,2001

Scientific Method of Researching Programmed Cell Death

ZHANG Wen Gen*, ZHANG Xue Ying

(Department of Chemistry, Weinan Teachers College, Weinan 714000, China)

Abstract: The 2002 Nobel Prize in Physiology or Medicine, the history of researching programmed cell death, the methodological characteristic and historical lessons in both epistemology and methodology are discussed. The study is of great importance to the explorations of new fields in biology.

Key words: programmed cell death; molecular regulation; methodological characteristic; historical lessons

*Corresponding author, E-mail: sxwntsg@btamail.net.cn