维普资讯 http://www.cqvip.com

7.Ullrich A,et al.Cell,1990;61:203
8.Chen J.,et al.Chung Hua Ping li Hsueh Tsa Chih,1995:24(1):25
9.Dittadi R.,et al.Br J Cancer,1991;64:741
10 Diez M,et al.Arch－bronconeumol,1994;30(6):282
11.Veale D.,et al.Cancer Res,1989;49:1313
12.Hendler FJ.,et al.J Clin Invest,1984;74:647
13.Cerny T.,et al.Br J Cancer,1986;54:265
14.Pavelic K,et al.Anticancer Res,1993;13:1133
15.Tateishi M,et al.Surg－Oncol,1994;3(2):109
16.Yudoh K,et al.Jpn J Cancer Res,1994;85:63
17.Muler BM.,et al.Cancer Res,1991;51:2192
18.Dean C,et al.Int J Cancer Suppl,1994:8:103
19.Modjtahedi H,et al.Br J Cancer,1996;73(2):228
20.Morishige K,et al.Cancer Res,1991;51:5951

(收稿日期 1998－05－05)

细胞凋亡. 细胞因子. 癌基因

318-322

细胞凋亡及其与细胞因子和癌基因的研究进展

(40)

基础医学院病理生理教研室 段积华*

R730.231.3

中图分类号 R730.231

1972年爱丁堡大学病理学家Kerr JFR和Wyllie AH等首先提出细胞凋亡(Apoptosis)这一概念。它在形态上不同于坏死(Necrosis)[1]细胞凋亡是一组生化、形态特征明确的细胞死亡形式,它是一种形态学概念。细胞接受内、外各种刺激后出现核固缩、染色质浓集、细胞膜皱折,并经出泡形成油滴状小粒,即说明细胞出现了凋亡。多种因素、多个途径均可导致细胞凋亡的发生,但必须强调的是细胞凋亡并非是代谢细胞死亡的途径,而仅仅是众多途径的最终产物[2]。自从90年代开展分子生物学研究以来,人们对细胞凋亡基因调控、基因表达及基因产物活化的研究越来越深入。本文仅对细胞凋亡的特征、概念及其与细胞因子和癌基因的研究进展作一简要的综述。

1 细胞凋亡的特征与概念

1.1 细胞凋亡的特征 1980年Wyllie AH等对细胞凋亡的特征(形态、生化方面)进行了概括[3]。在形态上,细胞凋亡初期表现出细胞与周围组织失去联系,核固缩,染色质浓集,细胞膜表面绒毛消失,并形成大的水泡状物,细胞呈出泡状,最后裂解成许多有膜包裹的颗粒,称为凋亡小体(Apoptosis body)。凋亡小体被周围的细胞和巨噬细胞所吞噬(图1)。生化方面,细胞凋亡的染色质DNA被激活的内源性核酸内切酶切割降解成寡聚核苷酸碎片,其碎片在琼脂凝胶电泳中显示为"梯子状"DNA带纹图谱－Ladder shape。这种特征性表现与坏死完全不同。

1.2 细胞凋亡的概念

1.2.1 细胞凋亡和细胞坏死 细胞凋亡和细胞坏死都有自身特有的形态和生化特征。在形态学方面,细胞坏死最早的变化是细胞膜和细胞器(尤其是线粒体)肿胀,细胞核仅有轻微变化。这些变化则导致细胞器溶解,细胞膜崩溃,细胞内成分漏出至细胞间隙引起炎症反应。这主要是细胞内能量代谢障碍,细胞膜功能破坏,导致选择性的细胞渗透作用丧失,从而出现离子顺浓度梯度转运,细胞内游离Ca^{2+}增多,释放大量蛋白水解酶,继之发生一系列生化反应。而细胞凋亡的启动首先是细胞核固缩、变小,细胞缩小,空泡化,细胞表面绒毛消失,平滑化。这些变化就会引起细胞内的核酸内切酶活化,染色质DNA被降解。细胞凋亡后期,细胞降解成为很多凋亡小体,并释放到组织间隙,被邻近的细胞所吞噬。细胞凋亡过程中细胞膜的完整性始终未受到破坏,依然保持有效的代谢活性,直

*男,1936－10出生,教授

维普资讯 http://www.cqvip.com

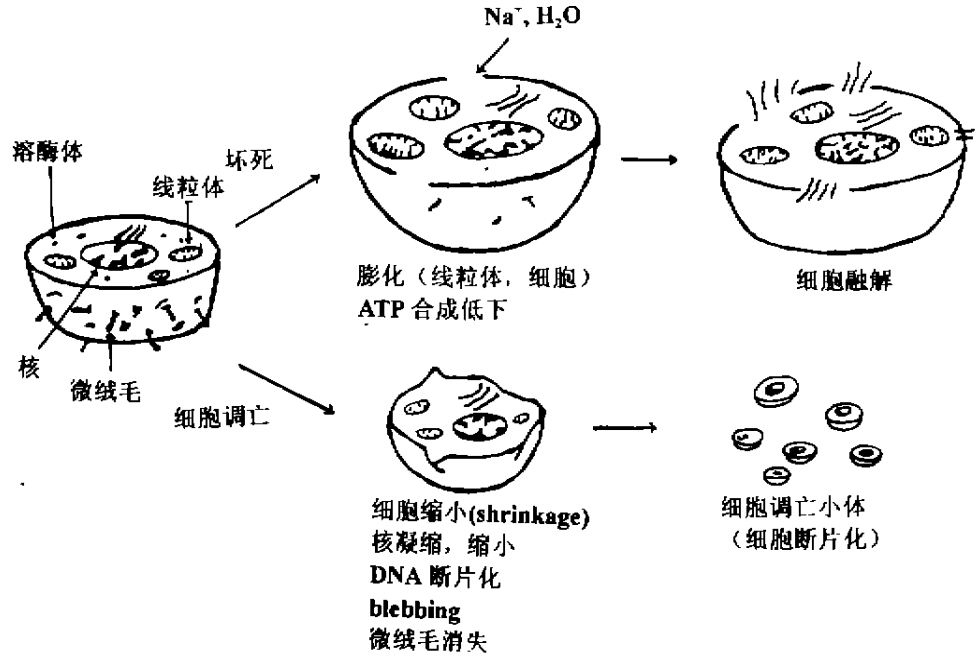


图1 细胞凋亡和坏死的形态特征

至细胞凋亡后期[4]。因为细胞凋亡没有使细胞内溶酶体活化,细胞未出现崩溃,细胞膜、细胞器仍保持其完整性,细胞以出泡形式逐渐丧失水份,形成的凋亡小体因为有膜包裹,不致引起炎症反应。

在生化方面,细胞坏死随着溶酶体酶的释放使DNA链随机降解成长短不等的片段。细胞凋亡则因为核酸内切酶的活化,将DNA降解成寡聚核苷酸碎片而出现规则的"Ladder小体"。

此外,细胞凋亡具有RNA或蛋白质合成功能,细胞坏死则没有。

从以上的这些现象不难看出细胞坏死和细胞凋亡是两种不同的细胞死亡形式,但两者之间又不是完全对立的,在药物实验中它们之间存在着剂量关系。实验证明应用低浓度细胞毒药物可诱导细胞凋亡,超过一定浓度则可转化为细胞坏死,因此有人认为细胞凋亡和细胞坏死是相对的两个概念,但也有学者认为细胞凋亡不仅与细胞坏死有本质上的区别,而且不同与程序性细胞死亡(Programmed cell death,PCD),这种看法正在被人们所接受[6]。

1.2.2 细胞凋亡和程序性细胞死亡 最早发育生物学家发现动物发育过程中存在着细胞程序性死亡,即PCD现象,后来在研究这种现象的过程中又提出了细胞凋亡。自从提出细胞凋亡的概念后,人们一直将它和PCD视为一物,随着研究不断深入,逐渐发现细胞凋亡和程序性细胞死亡是有区别的。

目前认为细胞凋亡具有特征性的形态,行为和生化方面的表现,如细胞皱缩、染色体浓集,核酸内切酶活化等。随着知识不断积累和技术进步逐步认识到很多明显的程序性细胞死亡并未出现这些"诊断性"特征,并非所有的程序性细胞死亡都会出现凋亡小体。同样也并非所有的程序性细胞死亡都会伴随核酸内切酶的活化。于是,Lockshin等将发育过程中没有核酸内切酶活化PCD单独划分为一类,这些事实就说明PCD和细胞凋亡并非同义词[5]。其次,目前研究表明,通过多种途径诱导的细胞凋亡,有的受程序性控制(PCD),有的则为非程序性控制。这就说明细胞凋亡除含PCD方式外还包括非基因调控部分,例

维普资讯 http://www.cqvip.com

如细胞毒T细胞快速杀伤靶细胞过程中,靶细胞内迅速诱导出显著的核酸内切酶活化,而不需要明显的启动基因和合成物质,从而很快产生细胞凋亡的特征性现象,如染色质浓缩等。可见二者并非同一概念。

二者的关系可概括为:①PCD是功能性概念,而细胞凋亡为形态学概念。PCD是说明基因调控细胞死亡这一功能,而细胞凋亡则是多种途径引起的一系列特征性形态、生化变化的综合;②PCD主要由细胞凋亡引起,也可能还有其他机制引发,细胞凋亡既有程序性的,也有非程序部分存在;③PCD仅存在于发育细胞中,而细胞凋亡既可存在于发育中的细胞,也可存在于成体细胞,如肿瘤细胞等。

2 细胞凋亡与细胞因子

细胞因子为糖蛋白,可通过受体作用于靶细胞。在细胞间的相互作用中,细胞因子起着媒介作用。它们调节细胞的增殖与分化,特别是调节造血系统参与免疫反应、炎症反应有关的细胞增殖和分化。细胞因子包括白细胞介素、生长因子、肿瘤坏死因子、红细胞生成素、单核巨噬细胞集落形成刺激因子等。这些细胞因子在细胞凋亡发生过程中具有重要地位,它们可被分为两大类:

2.1 **营养性细胞因子** 观察发现生长因子可使细胞从G0期进入G1期,如果在这一时期去除生长因子,细胞则发生死亡。一些学者对生长因子抑制细胞凋亡的机制进行了深入研究[6],可将这些生长因子分为两类:

2.1.1 白细胞介素类(Interleukins,IL)

2.1.1.1 白细胞介素-2(IL-2):IL-2是T细胞生长因子,它与活化T细胞膜上的IL-2受体结合,引起T细胞增殖。细胞毒性T淋巴细胞系-2(Cytotoxic T lymphocyte line-2,CTLL-2)是对IL-2依赖性的T细胞株,培养液中去除IL-2,CTLL-2细胞则发生细胞凋亡[7]。此外,IL-2还可阻抑人类中性粒细胞发生细胞凋亡[8]。

2.1.1.2 白细胞介素-3(IL-3):IL-3又称集落刺激因子(CSF),IL-3可调节造血干细胞的增殖与分化。在IL-3缺乏情况下,IL-3依赖性骨髓细胞株C-myc基因表达低下,并伴有细胞凋亡。IL-3依赖性小鼠前B细胞在去除IL-3的情况下则发生细胞凋亡[8]。

2.1.1.3 白细胞介素-4(IL-4):IL-4可调节IgE的产生,并与B细胞、T细胞和肥大细胞的增殖与分化有关[7]。有报道表明IL-4可逆转成熟B细胞的细胞凋亡。

2.1.1.4 白细胞介素-5(IL-5):IL-5可抑制成熟的嗜酸性粒细胞凋亡,同时可抑制放线菌酮和放线菌素D所致RNA和蛋白质合成障碍。这提示IL-5所抑制的细胞凋亡伴随着必需蛋白质的合成[7]。

2.1.1.5 白细胞介素-6(IL-6):IL-6可调节造血干细胞的增殖与分化。IL-6还可促进B细胞的分化,并可引起杂交瘤的增殖,诱导肝细胞产生各种急性期蛋白。它与IL-2一样可抑制靶细胞的细胞凋亡[7]。

2.1.1.6 白细胞介素-10(IL-10):IL-10可通过诱导原癌基因bcl-2的表达而抑制脾脏B细胞的自发性死亡[8]。

2.1.2 其它营养性因子

2.1.2.1 促红细胞生成素(EPO):EPO是一种细胞因子,它可调节前红细胞的增殖与分化,从而促进红细胞的生成。其作用机制目前尚不清楚。Perdahl发现贫血患者的前红细胞在无EPO的条件下培养,这些细胞极易发生凋亡[7]。

2.1.2.2 神经营养因子(NTF):NTF可抑制神经细胞凋亡,这是关系到教育乃至胎教的重要环节[9]。

2.1.2.3 神经生长因子(NGF):现已明确NGF可抑制靶神经元细胞的凋亡。幼稚交感神经节细胞在无NGF条件下培养,90%的细胞要发生细胞凋亡[7]。

此外,其它一些抑制细胞凋亡的生长因子,如肝细胞生长因子(HGF)、表皮生长因子(EGF)、白血病抑制因子(LIF)、胰岛素及类胰岛素生长因子(IGFS)、干细胞因子(SCF)、纤维母细胞生长因子等的研究正在不断深入[8]。

2.2 **细胞毒性因子** 细胞毒性因子可诱导不同种类的细胞发生细胞凋亡。它主要包括以下两种因子:

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2.1 肿瘤坏死因子(TNF):TNF可诱发人/鼠白血病杂交瘤细胞株的细胞凋亡,值得注意的是在细胞生长过程中TNF的作用具有多向性。它在细胞凋亡中的作用取决于靶细胞,一方面可保护粒细胞和单核细胞,另一方面又可启动白血病和腺癌细胞株的细胞凋亡[5]。

2.2.2 转化生长因子β1(TGF-β1):TGF-β1涉及肝细胞的细胞凋亡[6]。

细胞因子启动细胞增殖或凋亡的途径日渐明朗。Evans等提出了蛋白激酶C(PKC)信号传递系统[7]:生长因子作用于细胞表面的生长因子受体,通过G蛋白或蛋白质酪氨酸激酶(PTK)将信号传递给磷脂酶C(PLC),使Phosphoidylinositol-4,5-biphophate(P1P2)迅速水解,产生两个产物,一个是1,4,5-三磷酸肌醇(IP3),它可诱导Ca^{2+}从内质网中释放出来,另一个是二酰甘油(DAG)。不管是DAG还是细胞内Ca^{2+}增多均可激活蛋白激酶C(PKC),然后转移到细胞膜,通过一系列下级信号系统而导致细胞凋亡或细胞增殖,其大体途径见图2。

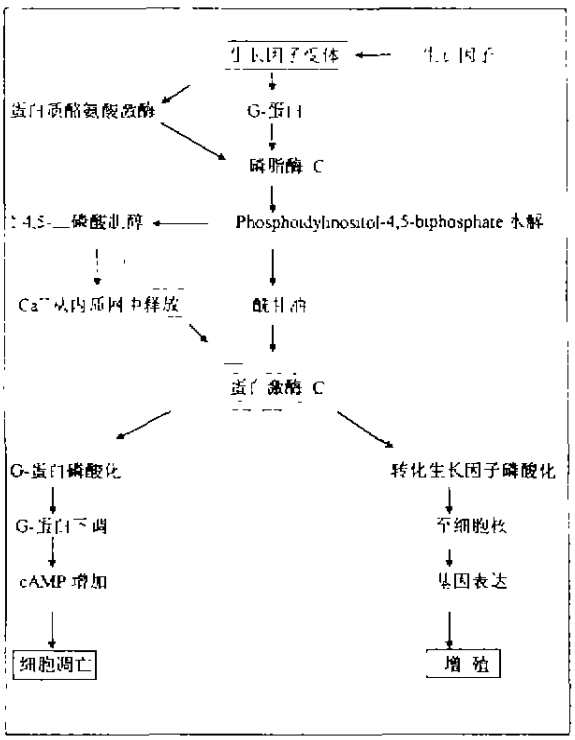


图2 生长因子信号传递途径

3 细胞凋亡与癌基因

目前认为大部分细胞凋亡是受基因调控,类似于分化,是对细胞内外刺激的一种反应。细胞凋亡的调控基因大多为癌基因及抑癌基因(如C-myc、bcl-2、p53等),主要包括以下几类:

3.1 C-myc癌基因 myc家族包括C-myc、N-myc、S-myc、L-myc等[10],其中C-myc在细胞凋亡过程中的机制已基本清楚,Reid等认为C-myc基因表达产物具有二种调节细胞的功能:增殖和凋亡。在正常情况下,C-myc适量表达可使细胞处于正常增殖及凋亡状态,维持细胞内环境平衡,如受到某些刺激因子或信号(如某些生长因子、癌基因等)的作用,这种平衡就会遭到破坏。在整个细胞周期中,C-myc可认为是第一信号,既可导致凋亡也可引起增殖;而某些生长因子可视为第二信号,可抑制C-myc引起的凋亡作用,而使增殖功能增强,驱使细胞进入活跃的分裂状态,如果不存在第二信号(在动物实验中除去某些生长因子),则C-myc仅表现凋亡功能[11]。归纳起来C-myc与细胞的关系可分为三种不同的细胞状态:①生长停滞(C-myc关闭,生长因子缺乏);②细胞增殖(C-myc启动,生长因子存在)③细胞凋亡(C-myc启动,生长因子缺乏)。

3.2 bcl-2癌基因 bcl-2的名称来源于B细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma/leukemia-2,bcl-2)的字首组合。它首先在B细胞相关的恶性肿瘤中发现。在人类滤泡性淋巴瘤中存在染色体易位t(14:18)发生移位率达90%,染色质18q21接合到14q32,这种18q21转录活性区被分离出来,从而激活该基因[12]。与bcl-2相关的蛋白由279个氨基酸组成,存在于线粒体内膜上[13]。

Oltval等分离出一个bcl-2相关基因蛋白,称为Bax,它在结构上与bcl-2有广泛的氨基酸同源性,集中在高度保守区I、II区。在体内Bax形成同源二聚体或与bcl-2形成异源二聚体。Bax与bcl-2功能相关,bcl-2过量表达则细胞存活,而Bax过量表达则引起细胞凋亡[14]。Bax与bcl-2的比值是决定细胞接受刺激信号后存活与否的关键。Bax-bcl-2的关系与细胞凋亡的关系见图3。

维普资讯 http://www.cqvip.com

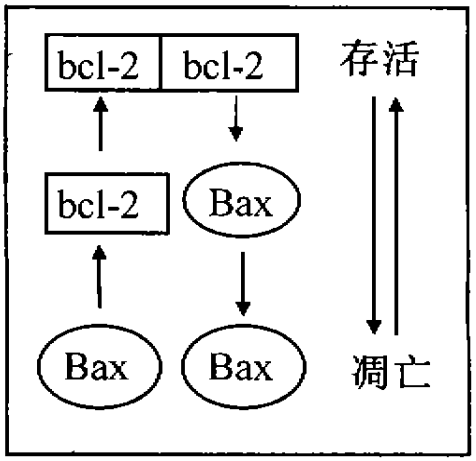


图3 bcl－2,Bax及其与细胞凋亡之间的关系

1993年Boise等[15]分离出另一个bcl－2相关基因,称为bcl－x。由于不同拼接产生两个不同的bcl－x mRNA,大一点的mRNA的蛋白产物,称为bcl－xL,其大小和结构上与bcl－2相似,将其转染IL－3依赖性细胞株,像bcl－2一样可抑制细胞株在IL－3除去后所致的细胞凋亡。第二种mRNA的蛋白产物,称为bcl－xs,它与Bax功能相同,具有抑制bcl－2的作用,导致凋亡的发生。

3.3 P53抑癌基因 P53抑癌基因产物是一种细胞蛋白,在正常细胞中有极少量的表达。它分为野生型和突变型两种。野生型P53对细胞生长和分裂起负调节作用,因而称P53基因为抑癌基因;突变型P53都可以刺激细胞分裂,起癌基因作用。

1991年Yonish－Rouach等首先报道P53基因缺失的鼠骨髓白血病细胞中导入外源性野生型P53可诱导出细胞凋亡,提示野生型P53有抑癌作用。若发生基因突变,其抑瘤功能就会丧失[16]。Lin等发现,将外源性野生型P53通过Ad5CMV－P53导入头颈部鳞状细胞癌细胞株,再将该细胞株移植到裸鼠皮下,2天后发现肿瘤细胞有大量凋亡细胞出现[17]。此外,Bardeesy等检查37例Wilms肿瘤的非恶变区和恶变区,发现有6例P53突变,其中5例限于恶变区,表明P53突变细胞的克隆扩大,细胞凋亡减少,从而促进肿瘤的进展和恶化[18]。野生型P53在细胞凋亡过程中起着重要作用,尤其是在应用放射线或化学药物治疗肿瘤的过程中,可很快激发凋亡过程。缺乏P53表达将导致肿瘤对以上治疗的抵抗力大幅度增加。这表明肿瘤细胞通过某些能够干扰凋亡的基因突变而获得对药物或射线的耐受性。特别是P53基因,在人类大部分肿瘤均存在该基因突变,因此对很多治疗的有效性可能起着决定性作用[19]。

在bcl－2、p53和C－myc之间也存在着一定联系。如果C－myc过度表达可迅速引起细胞凋亡,若有bcl－2联合表达,则可阻止由C－myc引发的细胞凋亡,这主要是这两种基因在细胞转录过程中发挥协同作用的结果。其次,p53亦可与bcl－2在相同细胞上表达,起着相互影响、相互制约的作用。

以上三种癌基因是目前比较肯定的凋亡调控因子,其他如H－ras、C－fos、C－abl等基因的凋亡过程中也起一定作用。

目前已有大量资料证明细胞凋亡调控基因变化与许多疾病的发生有关。随着细胞凋亡调控机制的深入研究,将为人类战胜疑难疾病增添新的途径,也为新药、新疗法的应用提供新的理论依据。

参 考 文 献

1. Kerr JFR, et al.Br J Cancer,1972;26:239
2. Evans VG. Cell Biol Int, 1993;17(5):461
3. Wyllie AH, et al.Int Rev Cytol, 1980;68:251
4. Bergamaschi G, et al. Haematologica, 1994;79:86
5. 曹 炜,等. 日本医学介绍 1995;16(3):137
6. Collins MK, et al. Bioessays, 1994,16(2):133
7. 山村康子,等. 日本医学介绍 1995;16(3):102
8. Parry SL, et al.J Immunol, 1994;152(6):2821
9. 何泽涌,等. 山西医药杂志 1994;23(3):171
10. 口野嘉幸,等. 蛋白质核酸酵素 1993;38(2):123
11. Reid PB, et al. Nature, 1992;359(6395):552
12. John CR. J Cell Biol,1994;124(1－2):1
13. Hockenbery D, et al. Nature, 1990;348(6299):334
14. Oltval ZN, et al. Cell 1993;74(4):609
15. Boise LH, et al. Cell, 1993;74(4):597
16. Yonish－Rouach E, et al. Nature, 1991;352(6333):345
17. Liu TJ, et al. Cancer Res, 1995;55(14):3117
18. Bardeesy N, et al. Cancer Res, 1995;55(2):215
19. Momand J, et al. Cell, 1992;69(7):1237

(收稿日期 1997－10－20)