

# 细胞凋亡的基因调控和抗神经细胞凋亡剂的研究

张均田 段文贞 吴俊芳

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所)

英国科学家于 70 年代早期提出: 正常细胞的死亡是一种主动自杀过程。这一惊人的发现是划时代的, 它吸引全世界科学工作者试图解开细胞自杀死亡之谜, 探索细胞间死亡和增殖是如何维持精确的平衡及其调控的分子机制。近 5 年内这项研究取得飞速发展而且方兴未艾。本文简要介绍细胞凋亡的形态、生化特征, 细胞凋亡的基因调控, 细胞凋亡与疾病的关系和本实验室已完成的几项抗凋亡剂的研究。

## 1 细胞程序性死亡的形态生化特征及其与疾病的关系<sup>[1~5]</sup>

Kerr 等于 1972 年首先提出细胞凋亡概念。此后, 大量研究发现, 为了保持细胞增殖, 分化和死亡之间的平衡, 某些细胞(不需要的细胞或有害的细胞)会按自身程序主动死亡, 此即程序性细胞死亡(PCD)或称凋亡。细胞凋亡与坏死的区别见表 1。

表 1 凋亡细胞与坏死细胞的区别

	凋亡(apoptosis)	坏死(necrosis)
DNA	核小体间断裂形成梯状电泳带	降解为碎片
核	染色质周边分布	核固缩
膜完整性	保持直到晚期	早期即受损
线粒体	正常超微结构	水肿, 钙离子摄入
炎症反应	无	有
表现模式	个别细胞发生	大多细胞受累
细胞体积	缩小	增加(早期)
细胞片断	凋亡小体	碎片

细胞凋亡在形态学和生化改变上的特征, 主要是细胞皱缩, 核染色质聚集成块, 向核周分布, 而后核膜破裂。内质网扩张, 呈泡状与细胞膜融合。线粒体, 溶酶体不破坏。细胞膜完好,

但内陷将细胞分割为多个凋亡小体(apoptotic body)。随后被邻近同源细胞巨噬细胞或小胶质细胞吞噬。最主要的生化改变是 DNA 断裂成不同倍数的 180~200 个碱基对的片段, 在琼脂糖电泳谱上呈梯状, 称为梯状 DNA(DNA ladder)。

正常可分裂的细胞有 3 种发展方向:(1)分化和衰老;(2)无限繁殖, 形成肿瘤;(3)细胞凋亡。

Raff 认为, 有机体中的所有细胞都具有主动自杀的程序。但其他细胞发出信号, 可阻止凋亡发生。特别是在高等动物细胞的增殖和生存需要从其他细胞获得信号, 如果缺乏这些信号, 即使在正常情况下细胞也将产生凋亡自杀。Raff 把从视神经分离得到的少突胶质细胞(oligodendrocytes)置于完全性营养物质的培养液中进行温孵, 1 或 2 d 内都发生凋亡。如果把视神经周围的其他类型细胞同时进行培养, 则少突胶质细胞可以存活(图 1)。同样, 加入视神经所需信号分子, 也可使少突细胞存活。据多方面研究, 所谓信号分子包括多种基因, 细胞因子特别是神经生长因子等。衰老过程中某些基因表达减少或基因突变以及细胞因子生成不足, 可致细胞凋亡数增加。凋亡异常与许多疾病关系密切。如 DNA 突变引起癌症, 如果 PCD 不正常, 突变体不能尽快消除, 细胞堆积起来, 便会促进癌症的发展; AIDS 可认为是 CD4 细胞死亡速率和补充速率失衡造成的; 不正常的淋巴细胞 PCD, 产生自身免疫性疾病; 衰老过程中体细胞数减少是由遗传控制的, 细胞早熟或过度丢失会导致器官功能发生障碍而产生退行性疾病。早老性痴呆病中 PCD 的发

生,可能与脑中  $\beta$ -淀粉样蛋白的沉积有关。 $\beta$ -淀粉样蛋白的沉积可能阻碍了神经元接受突触或邻近胶质细胞产生的营养因子。此外,有研究表明, $\beta$ -淀粉样蛋白在培养的神经元中可诱导凋亡。表达 P75NTR 的细胞对  $\beta$ -淀粉样肽毒性的敏感性增加。老年性痴呆病人的基底前脑胆碱能神经元的选择性易损,至少部分与其 P75NTR 的高表达有关。相反,尽管中脑脑桥区的胆碱能神经核的形态与基底前脑相似,但不表达 P75NTR,因此在病人中这个部位不出现退行性变化。

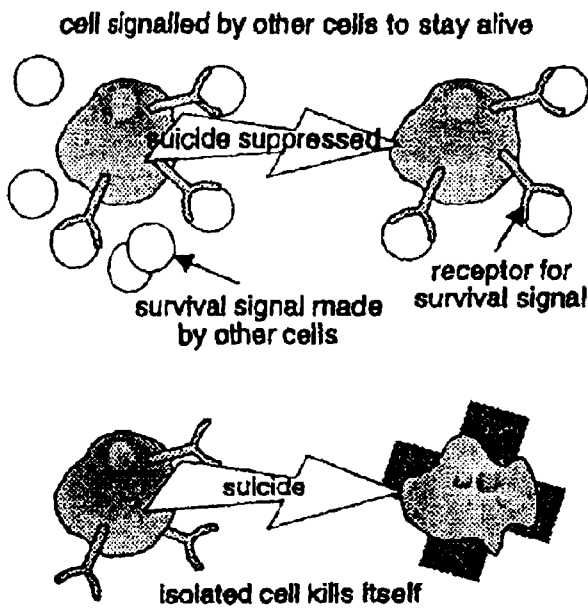


图1 细胞的存活依赖于从其他细胞获得信号.图的上部分说明,细胞上的受体与其他细胞释出的存活信号分子结合,就可以抑制细胞的自杀.下部分表示某种细胞未与其他细胞共存,便按自身程序自杀死亡(Raff MC. *Med Digest*, 1996, 4:184)。

## 2 细胞凋亡的调控<sup>[6~12]</sup>

**2.1 基因调控** 细胞凋亡是受基因编码调控的。从表 2 可见,许多基因参与凋亡的调控。其中, Bcl-X<sub>S</sub>, Bax, Ced-3, Ced-4, TNFR-1, Fas/Apo-1, P75NTR, CrmA, P53, c-jun, c-myc, R-ras 为促凋亡基因; Bcl-2, Bcl-XL, Ced-9, P35 为抗凋亡基因。实验表明,将 Ced-3 或 IL-1 $\beta$  转换酶(ICE)转染到宿主的各种细胞,均导致细胞凋亡。Ced-3 基因缺失或突变则不发生细胞凋亡。由于 Ced-3 与 ICE 的相似性,ICE 家

族的另外四个成员 ICH-1/NEDD-2, CPP32/YAMA, TX/ICH-2 和 MCH-2 也被发现。所有这些家族成员在其假定的活性部位存在一个保守序列即五肽(QACRG),通过选择性切断天冬氨酸残基部位使细胞的许多蛋白质分子(PARP, Lam, in-31,  $\alpha$ -fodrin, 拓扑异构酶,  $\beta$ -肌动蛋白)降解。促细胞凋亡的另一类基因是肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族。该家族目前已发现 12 个成员,其中至少有四个即 TNFR-1, Fas/Apo-1, CD40, P75NTR 在许多情况下介导细胞凋亡。TNFR-1, Fas/Apo-1 和 P75NTR 在胞浆内区域的羧基末端附近有约 60 个氨基酸的同源区,这个区域称为死亡区,是诱导凋亡所必需的。与其他大多数受体不同的是, P75NTR 在未与配基结合前是有活性的。在没有 NGF 结合时,它诱导细胞凋亡,但在 NGF 共存时,这种作用被抑制。

最重要的抗凋亡基因有 bcl-2 和 P35。Tsujiimoto 等于 1984 年首次从滤泡性 B 淋巴瘤中克隆出 bcl-2 基因。bcl-2 基因的过度表达可抑制生血细胞由于撤除 IL-3 而引起的凋亡。后来的广泛研究表明,bcl-2 表达后可抑制神经细胞由于血清和生长因子撤除、钙离子载体、去糖、膜过氧化剂、谷氨酸、 $\beta$ -淀粉样肽等多种因素诱导的凋亡。Bcl-2 主要存在于线粒体膜、核周、内质网膜及其他膜结构中。神经元中 bcl-2 的表达并不改变细胞的分化,也不影响氧消耗,ATP 水平,细胞内钙浓度,营养因子分泌,蛋白质合成和蛋白质磷酸化模式。至今对 bcl-2 的抗凋亡机制尚未弄清。研究较多的另一个抗凋亡基因是 P35。P35 首先在感染 baculovirus 的细胞内发现,后来发现在 HIV 感染的细胞中也有表达。其早期表达可阻止细胞发生自杀。在哺乳动物神经细胞中 P35 的表达可抑制撤除血清、去糖、钙离子载体所诱导的凋亡。P35 和 bcl-2 无结构及分布上的相似性。推测 P35 的抗凋亡机制是通过直接抑制 IL-1 $\beta$  转换酶家族成员半胱氨酸蛋白酶实现的。

**2.2 细胞因子** 在细胞因子中,有些细胞因子诱导 PCD,有些抑制 PCD,且不同的细胞因子

对不同的细胞有不同的作用。与凋亡有关的细胞因子主要有白细胞介素(IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6), 干扰素(INF), 集落刺激因子(CSF), 肿瘤坏死因子(TNF), 转化生长因子(TGF), 神经生长因子(NGF), 脑源性神经营养因子(BDNF)。抗凋亡细胞因子主要有 IL-1, IL-5, NGF, GM-CSF; 促凋亡的细胞因子主要有 TNF, TGF 等。

**2.3 其他有关因素** 甾体类激素、细胞毒、钙离子载体、胞内钙水平升高、抗癌药物(放线菌

素 D、环己酰亚胺、离子辐射、T 细胞抗原受体(TCR)、表皮生长因子受体(EGFR)、活性氧自由基、一氧化氮(NO)等或对 PCD 产生诱导, 或起抑制作用。诱导细胞凋亡的主要因素为糖皮质激素, 在细胞培养中去血清, 去除生长因子或细胞因子、缺氧、去糖、细胞内钙离子水平早期升高、细胞毒、抗癌药物、离子辐射、自由基和 NO 产生过多等; 抑制细胞凋亡的主要因素有血清、佛波醇酯、抗氧化剂、NOS 抑制剂等。

表 2 参与调节神经细胞凋亡的基因作用及功能

调节基因	对凋亡的影响	作用机制	结构及功能
Bcl-2	↓	未知	在 CNS 表达
Bcl-XL	↓	未知	在 CNS 表达
Bcl-Xs	↑	未知	抑制 Bcl-2 的作用
Bax	↑	未知	在 CNS 表达
Ced-9	↓	未知	线虫的抗凋亡蛋白
Ced-3	↑	水解蛋白	天冬氨酸酶
Ced-4	↑	未知	线虫钙结合蛋白
ICE-1/NEDD-2	↑	ICE 家族蛋白酶	使许多蛋白质水解
CPP32/YAMA	↑	ICE 家族蛋白酶	使许多蛋白质水解
TX/ICH-2	↑	ICE 家族蛋白酶	使许多蛋白质水解
MCH-2	↑	ICE 家族蛋白酶	使许多蛋白质水解
Fas 蛋白/Fas 配体系统	↑	同 T 淋巴细胞 Fas 结合及与抗 Fas 的抗体结合	膜蛋白受体
TNFR-1	↑	未知	受体, 抑制凋亡
Fas/Apo-1	↑	未知	受体
p75NTR	↑	未知	受体
p35	↓	ICE 家族抑制剂	病毒蛋白
CrmA	↑	抑制 ICE	病毒蛋白
p53	↑	↑ Bax, ↓ Bcl-2	转录因子
c-jun	↑	未知	氧化还原调节转录因子
c-myc	↑	未知	通过 Bcl-2 阻断凋亡
V-ab1	↑	未知	癌基因
EIA	↑	未知	癌基因
R-ras	↑	未知	结合 Bcl-2

CNS: 中枢神经系统; ↑: 促进; ↓: 抑制。

### 3 人参皂甙 Rg1、黄皮酰胺和 NGF 抗神经元凋亡的研究<sup>[13]</sup>

国外对凋亡的研究偏重于造血细胞、淋巴细胞、肿瘤细胞等和生物体的分化发育过程, 对中枢神经系统研究较少。本研究室以中枢神经系统为研究对象, 观察了人参皂甙 Rg1、黄皮酰胺和 NGF 对神经元凋亡的抑制作用。

**3.1 人参皂甙 Rg1 对大脑皮层神经元凋亡的抑制作用** 取 Wistar 大鼠胎鼠脑皮层细胞, 进行培养, 培养 d 14 换成无血清培养基继续培养 2 d 以诱导细胞凋亡。结果表明, 去血清对照组坏死细胞和凋亡细胞数分别为  $7.2 \pm 1.0\%$  和  $94.9 \pm 3.6\%$ 。Rg1  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  抗凋亡效果最好, 可使坏死细胞和凋亡细胞减少为 2.5

$\pm 0.4\%$  和  $20.4 \pm 0.7\%$ 。正常细胞 DNA 在琼脂糖凝胶电泳显示分子量很大的一条带。去血清后 DNA 降解, 电泳显示清晰的 DNA Ladder, 大小相当于 180 bp 或 180 bp 的整倍数, 提示 DNA 在核小体连接处断裂, 细胞发生凋亡。电泳图显示, 随着 Rg1 浓度增高 ( $0.1 \sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), DNA 条带的亮度减弱, 条带减少, 说明 Rg1 可以抑制 DNA 的断裂, 防止细胞凋亡。以 DPH 标记后的细胞膜荧光偏振度  $P$ , 各向异性  $\gamma$ , 微粘度  $\eta$  可以反映膜脂质区流动性的大小。 $P, \gamma, \eta$  越大, 膜流动性越小。去血清后, 细胞  $P, \gamma, \eta$  值与正常相比均非常显著地增加, 膜流动性显著降低。Rg1  $0.1 \sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  对膜流动性有所增加, 但无显著性意义。将 Rg1 浓度增加至  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $P, \gamma, \eta$  值均显著地降低, 可使膜流动性增加到接近正常细胞水平。此结果与我以前的研究即老年鼠脑皮层细胞膜流动性降低, Rg1 可使之升高的结果相一致。提示凋亡与衰老有某种内在的联系, Rg1 延缓衰老作用与其抗凋亡作用关系密切。

**3.2** (-), (+) 黄皮酰胺对培养的大鼠小脑颗粒细胞凋亡的作用 取新生 8 d 的 Wistar 大鼠的小脑细胞进行培养。培养 24 h 后加入阿糖胞苷抑制非神经细胞的增殖。在体外培养 d 8, 换为低  $\text{K}^+$  ( $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 培养基孵育 24 h 诱导颗粒细胞凋亡。在更换低钾培养基的同时加入药物, 从形态学、凝胶电泳图谱、流式细胞仪分析等方法观察了 (-), (+) 黄皮酰胺对小脑颗粒细胞凋亡的影响。并用 Northern 杂交法分析了药物对颗粒细胞内 bcl-2 表达的影响, 以探索药物作用机理。结果表明: 小脑颗粒细胞在低钾培养基中孵育 24 h 后, 表现出凋亡细胞所具有的特征, 在形态上细胞皱缩, 胞浆泡状突起, 突触减少或消失, (-) 黄皮酰胺  $0.1 \sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  可明显改善细胞的这些变化, 同样浓度的 (+) 黄皮酰胺并不能改善细胞的凋亡性变化。琼脂糖凝胶电泳图上, 低钾培养基处理的颗粒细胞呈现明显的梯状 DNA 条带, 加入 (-) 黄皮酰胺  $0.1 \sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  均明显抑制

DNA 的片段化, 梯状带变浅或消失; 同样浓度的 (+) 黄皮酰胺却没有明显影响。流式细胞仪分析也得到相同的结果, 低钾培养基处理后, 颗粒细胞在 G1 期前出现一个明显的凋亡峰 (Ap 峰), 该峰的大小代表凋亡细胞的多少, 由此可得到凋亡细胞的百分率。模型组凋亡率由正常的 5.1% 增加到 30.5%, (-) 黄皮酰胺  $0.1 \sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  可以剂量依赖性地减少凋亡细胞数分别为 15.3%, 12.1%, 9.9%; 而 (+) 黄皮酰胺却无作用。为进一步探索药物作用的分子机理, 我们观察了颗粒细胞内 bcl-2 表达的变化, 发现在低钾处理后颗粒细胞内 bcl-2 基因的表达明显减弱, (-) 黄皮酰胺  $0.1 \sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  可促进 bcl-2 在小脑颗粒细胞内的表达, (+) 黄皮酰胺在同样浓度对 bcl-2 表达无明显影响。细胞凋亡是一个基因调节控制的过程, 以往实验证明, (-) 黄皮酰胺减少稳态外向钾电流, 引起快速胞内钙增加, 促进钙依赖性和钙非依赖性谷氨酸释放, 激活 PKC, 促进胆碱能神经元的发育, 这些作用可以对抗非去极化性小脑颗粒细胞的凋亡; 另外, (-) 黄皮酰胺促进细胞内抗凋亡基因 bcl-2 的表达是其抗凋亡的分子机制之一。早老性痴呆以及一些衰老性疾病所致的记忆障碍目前认为与神经元的凋亡有关, 黄皮酰胺是我室正在开发研究的一新型促智药 (nootropic drug)。动物实验证实有较强的改善记忆障碍的作用, 目前已分离得到其旋光异构体, 并且发现左右旋体黄皮酰胺作用存在明显差异。本研究为手性黄皮酰胺发展为新一代的促智药提供了分子水平的一些依据。

**3.3** NGF 对缺氧/缺糖和 NMDA 所致的细胞凋亡的抑制作用 中枢神经系统的神经元是非增殖细胞, 只减不增, 细胞受损能否恢复仍无定论。神经元有两种死亡形式, 其中之一的细胞凋亡与许多老年性疾病密切相关, 为使受损的神经元得以修复和阻止细胞凋亡, 现寄希望于神经营养因子。我们在大鼠脑皮层细胞培养中采用缺氧/缺糖和 *N*-甲基-*D*-天门冬氨酸 (NMDA) 诱导细胞凋亡, 观察了神经生长因子的抗凋亡作用。结果表明, NMDA 300

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与细胞作用 20 min 及细胞缺氧/缺糖培养 10 h 可诱导细胞产生凋亡。琼脂糖凝胶电泳呈现典型的梯状 DNA, 细胞经 PI 染色, 应用流式细胞仪检测, 在 G1 峰前出现一个“G1 亚峰”, 凋亡细胞所占比例为 50.2% 及 45.7%, NGF( $50, 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )能使 DNA 梯状电泳条带亮度减弱或消失, 降低凋亡细胞数, 并使细胞超微结构损伤减轻或基本恢复正常。根据我们所做实验, NGF 抑制细胞凋亡的机制主要是提高抗氧酶活性, 稳定 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , 抑制 cNOS 的表达, 降低 NO 释放所致。

本实验室和其他科学家均一致证明 NGF 等神经营养因子可通过多重机制阻止神经细胞凋亡, 但 NGF 的分子量  $2.3 \times 10^{-19} \text{ g}$  (140 kD), 其活性亚单位  $\beta$ -NGF 的分子量也达  $4.3 \times 10^{-20} \text{ g}$  (26 kD), 决难通过血脑屏障。为发挥其促进特异神经的存活、生长、分化等功能, 一方面可从改善药物运输系统和接上载体带入脑内来达到治疗目的, 另一方面可寻找能促进神经营养因子合成和释放的药物以提高神经元的可塑性, 增强脑自身的修复能力和减少细胞凋亡。相比之下, 具有抗凋亡作用的小分子药物具有更大的治疗潜力。人参皂甙 Rg1 可进入中枢, 对胆碱能系统产生十分有益的作用, 如增加 M-胆碱能受体密度, 促进乙酰胆碱的生物合成和释放; 在鸡胚或交感神经节的培养中加入 Rg1 和 NGF, 二者产生协同作用。黄皮酰胺除有抗细胞凋亡作用外, 还具有其他许多重要的生物学活性, 如促进学习记忆和 LTP 的形成, 增加胆碱乙酰转移酶的活性和脑内蛋白质的合成, 尤其是诱导抗凋亡基因 bcl-2 的表达, 有重要的理论和实际应用价值。但 Rg1 和黄皮酰胺抗凋亡的分子机制研究尚有待深入。

## 参 考 文 献

- 1 李君庆, 张均田. 衰老与编程性细胞死亡. 中国药理学通报, 1995, **11**:53
- 2 李君庆, 张均田. 细胞程序性死亡与疾病. 中国药理学杂志, 1996, **31**:198
- 3 Raff MC. Why are your cells waiting to kill themselves? *Med Digest*, 1996, **4**:184
- 4 周明华, 陈思颖, 李美芳, 等. 细胞周期与细胞凋亡. 生理科学进展, 1996, **27**:319
- 5 Wyllie AH, Beattie GJ, Hargreaves AD. Chromatin changes in apoptosis. *Histochem J*, 1981, **3**:681
- 6 Mah SP, Zhong LT, Liu Y, *et al.* The protooncogene bcl-2 inhibits apoptosis in PC12 cells. *J Neurochem*, 1993, **60**:1183
- 7 Bump NJ, Brady K, Chen P, *et al.* Molecular interaction of baculovirus p35 and interleukin-1 $\beta$  converting enzyme (ICE): proposed mechanism for the regulation of an apoptosis pathway. *J Cell Biolchem*, 1995, (suppl 19B):294
- 8 Yuan J, Shaham S, Ledoux S, *et al.* The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Cell*, 1993, **75**:641
- 9 Gagliardini V, Fernandez PA, Lee RKK, *et al.* Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene. *Science*, 1994, **263**:826
- 10 Barrett G, Bartlett P. The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**:6501
- 11 Smith C, Farrah T, Goodwin R. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*, 1994, **76**:959
- 12 Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1 associated protein TRADD signals cell death and NF- $\kappa$ B activation. *Cell*, 1995, **81**:495
- 13 李君庆, 张香阁, 张均田. 人参皂甙 Rg1 抗神经细胞凋亡作用机制的研究. 药理学报, 1997, **32**:406