

国家自然科学基金项目（31060240）、江西省人才计划项目（天然药物创新院士工作站）和江西省对外科技合作重大项目（20151BDH80020）特别资助

生物体细胞凋亡与 免疫反应机制

邹一平 陈 刚 韩成云◎著



科学技术文献出版社
SCIENTIFIC AND TECHNICAL DOCUMENTATION PRESS

国家自然科学基金项目（31060240）、江西省人才计划项目（天然药物创新院士工作站）和江西省对外科技合作重大项目（20151BDH80020）特别资助

生物体细胞凋亡与免疫反应机制

邹一平 陈 刚 韩成云 著



科学技术文献出版社
SCIENTIFIC AND TECHNICAL DOCUMENTATION PRESS

· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

生物体细胞凋亡与免疫反应机制 / 邹一平, 陈刚, 韩成云著. —北京: 科学技术文献出版社, 2017. 12

ISBN 978-7-5189-1105-9

I. ①生… II. ①邹… ②陈… ③韩… III. ①动物—细胞生物学—研究 ②植物—细胞生物学—研究 IV. ① Q952 ② Q942

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 046946 号

生物体细胞凋亡与免疫反应机制

策划编辑: 崔灵菲 责任编辑: 王瑞瑞 责任校对: 文 浩 责任出版: 张志平

出 版 者	科学技术文献出版社
地 址	北京市复兴路15号 邮编 100038
编 务 部	(010) 58882938, 58882087 (传真)
发 行 部	(010) 58882868, 58882874 (传真)
邮 购 部	(010) 58882873
官 方 网 址	www.stdp.com.cn
发 行 者	科学技术文献出版社发行 全国各地新华书店经销
印 刷 者	北京教图印刷有限公司
版 次	2017 年 12 月第 1 版 2017 年 12 月第 1 次印刷
开 本	850 × 1168 1/32
字 数	165千
印 张	7 彩插 2 面
书 号	ISBN 978-7-5189-1105-9
定 价	36.00元



版权所有 违法必究

购买本社图书, 凡字迹不清、缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责调换

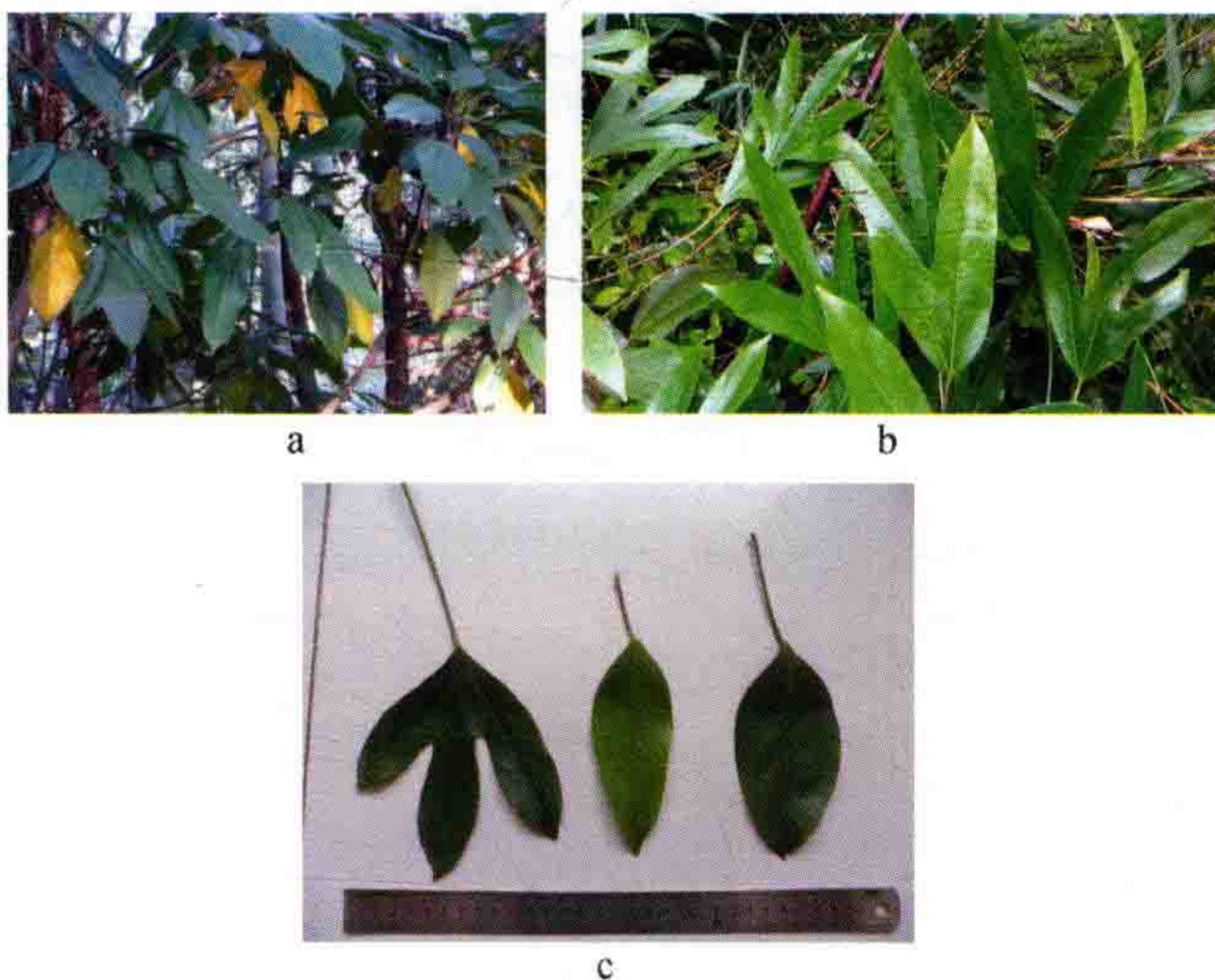


图 3.1 树参的样本采集

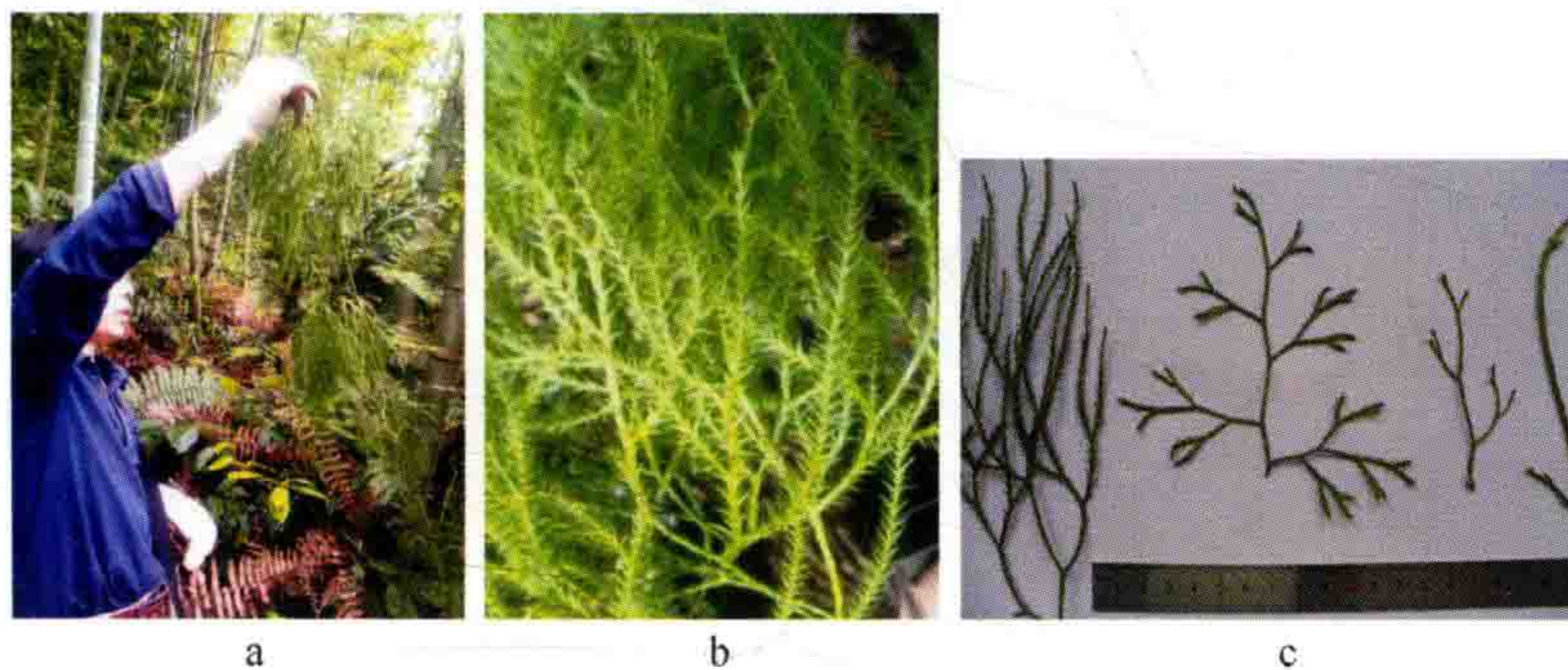


图 3.2 藤石松的样本采集

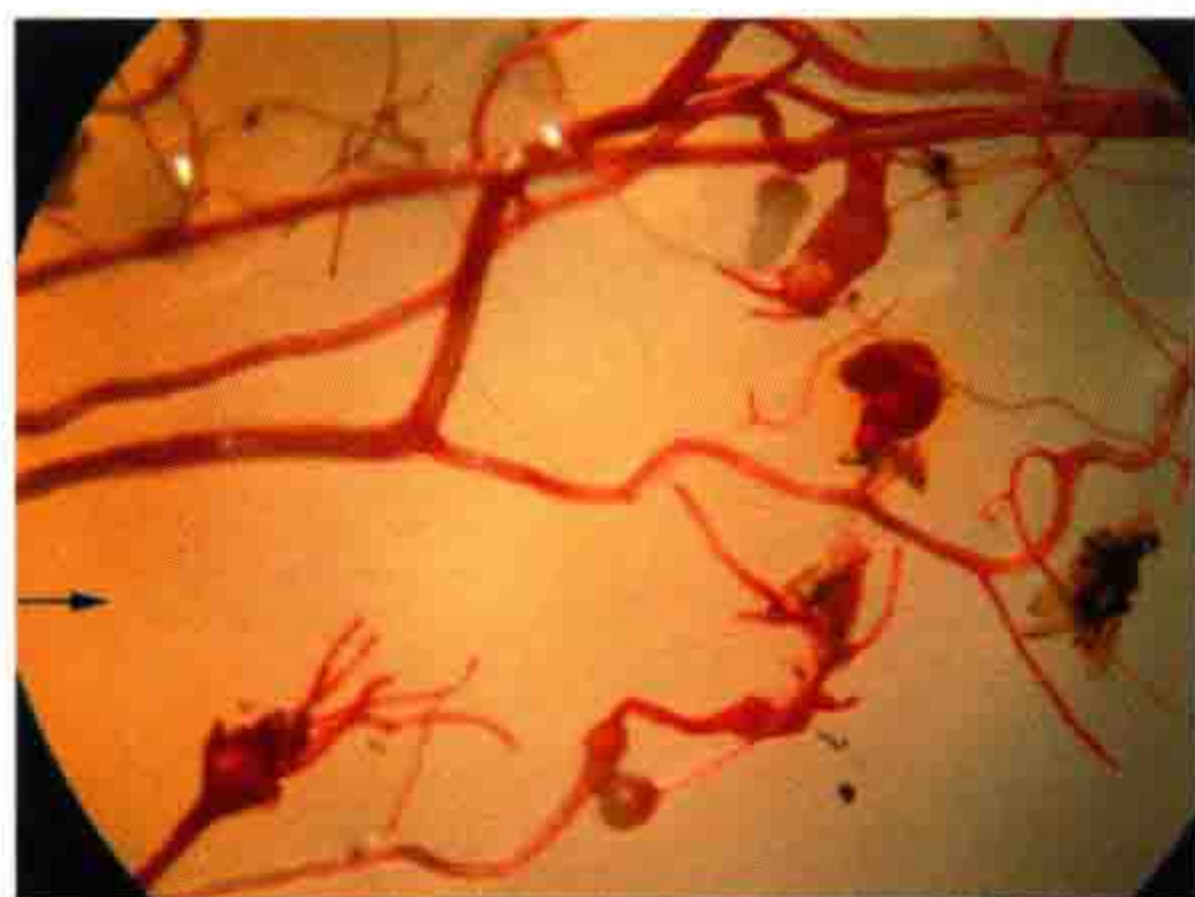


图 5.11 野生型 (WT) 拟南芥接种爪哇根结线虫
90 d 后的结果，用酸性复红染色处理
箭头所示为根结线虫



a



b

图 5.12 转基因拟南芥接种爪哇根结线虫
90 d 后的结果，用酸性复红染色处理

前 言

在生命世界里，从分子到细胞，从细胞到个体，从个体到群体，从微观到宏观，每个层次既有质的区别，又有相互依存、相互制约的联系，但遵循着一定的规律。细胞凋亡 (apoptosis) 是细胞内在的决定生物体发展和组织平衡的一个重要机制，如果这个受到严密调控的细胞机制发生功能障碍或失去控制将导致许多病理性改变。因此，细胞凋亡现象是生命体适应环境而生存的一种重要机制，它体现了大自然铁定法则的完美与和谐。生物体细胞凋亡与免疫反应的密切作用，是生物长期进化的结果，深入认识对细胞凋亡及其免疫反应的调控机制，将为人类在生物医药和农业等的进一步研究与应用提供理论基础。

本书主要围绕生物体细胞免疫和细胞凋亡的相关理论及其实际应用展开，共分 6 章论述。第一章为免疫相关理论，汇集国内外最新相关研究成果，包括先天性和适应性两种类型的免疫应答反应，免疫模式识别理论，由模式识别受体介导的细胞天然免疫机制，细胞因子对机体免疫应答的调控，中药对免疫调节理论和实际应用等；第二章为细胞凋亡相关理论，阐述了细胞凋亡的发现和发展，细胞凋亡的过程及其生物化学变化与通路，caspase 效应分子机制，细胞凋亡与免

疫学的关系,天然药物对细胞凋亡的作用,微RNA对细胞凋亡的调控等;第三章为中药对机体免疫与细胞凋亡调控的实践应用,列举了中药对免疫调节与细胞凋亡调控的案例,重点描述了树参和藤石松提取物对类风湿性关节炎的药效及免疫调节内容;第四章为单子叶植物细胞凋亡与过敏性免疫反应,Toll受体蛋白在果蝇中可激活抗真菌免疫反应,秀丽新小杆线虫的细胞凋亡调控基因 *ced-3/ced-4* 编码的 CED-3/CED-4 蛋白质结构域和植物抗病基因编码的蛋白质结构域有相似之处,动物参与免疫反应的蛋白与植物 R 蛋白具有同源性,以单子叶水稻为代表进行转线虫细胞凋亡基因诱导表达,验证其细胞凋亡与抗病过敏性免疫反应的作用机制;第五章为双子叶植物细胞凋亡与过敏性免疫反应,以双子叶植物拟南芥为代表,和第四章的研究方法类同,采用爪哇根结线虫侵染诱导转基因拟南芥根表皮细胞凋亡基因的表达和过敏性反应(HR),证明双子叶拟南芥根系表皮细胞在受到根结线虫侵染时,激活了在侵染点附近的细胞凋亡与过敏性反应相关程序,证明细胞凋亡与过敏性的抗病性免疫反应关联发生;第六章为肿瘤细胞凋亡与免疫反应,重点论述中草药的活性微RNA对肿瘤细胞凋亡的调控作用及其免疫反应机制,以藤石松的两个微RNA对结肠肿瘤细胞凋亡的突出正向调控作用,并且举例说明植物和中草药活性微RNA的跨界调控机制,发挥其药理药效。

本书第四章和第五章内容是在华南农业大学廖金铃教授的指导下完成的,在此表示诚挚的感谢!撰写过程中,硕士研究生刘智凯为第三章、李佳双为第六章提供了部分研究图

表资料，在此表示感谢！

本书内容由邹一平教授主持的获资助项目国家自然科学基金项目“转线虫凋亡基因水稻表达 CED-3/CED-4 激发过敏性反应的分子机理”（31060240）、江西省人才计划项目（天然药物创新院士工作站）和江西省对外科技合作重大项目“江西珍稀中药树参的活性成分研究及产业化开发”（20151BDH80020）的研究成果构成，在此特别表示感谢！

目 录

第一章 免疫学相关研究.....	1
1.1 免疫系统的基本功能	5
1.2 免疫应答的种类特点及其理论	7
1.2.1 免疫应答的类型：天然和获得性免疫应答	8
1.2.2 免疫应答反应理论	8
1.3 免疫模式识别理论	9
1.4 可诱导的细胞天然免疫机制.....	11
1.5 对免疫系统的全面认识.....	12
1.5.1 对 T 细胞抗原受体的基因克隆.....	13
1.5.2 免疫遗传学和 MHC 限制性的发现	13
1.5.3 细胞因子及其受体.....	14
1.5.4 免疫受体信号转导的研究.....	14
1.6 细胞因子的免疫学功能.....	15
1.6.1 调控免疫细胞在中枢免疫器官的发育与分化.....	15
1.6.2 调控免疫细胞在外周免疫器官的发育分化和 活化功能	16
1.6.3 调控机体的免疫应答.....	16
1.7 中药免疫调节理论与实践应用.....	18
1.8 微 RNA 对免疫的调控作用	21
参考文献	23

第二章 细胞凋亡相关研究	28
2.1 细胞凋亡的发现与发展	28
2.2 细胞凋亡的发生过程与形态学变化	30
2.3 细胞凋亡的生物化学变化	30
2.4 细胞凋亡的过程及其通路	31
2.5 细胞凋亡的 caspase 效应分子机制	33
2.5.1 caspase 活化机制	33
2.5.2 caspase 效应机制	34
2.5.3 细胞凋亡的抑制分子	36
2.6 细胞凋亡与免疫学关系	38
2.7 细胞凋亡与临床医学	39
2.8 秀丽新小杆线虫与细胞凋亡研究	40
2.9 中药材对细胞凋亡的作用研究	42
2.10 微 RNA 对细胞凋亡的调控作用	44
参考文献	45
第三章 中药免疫调节与细胞凋亡的关系	51
3.1 中药免疫调节与细胞凋亡研究进展	51
3.2 中药免疫制剂	56
3.2.1 单方制剂	56
3.2.2 复方制剂	58
3.3 治疗类风湿性关节炎的中药材品种	59
3.3.1 树参	59
3.3.2 藤石松	61
3.3.3 雷公藤	62
3.3.4 类风湿性关节炎大鼠模型类型	64
3.4 树参和藤石松水提液对 RA 作用机制的研究	65

3.4.1	实验材料	65
3.4.2	实验方法	66
3.4.3	实验结果	69
3.4.4	实验总结与讨论	70
3.4.5	研究展望	71
参考文献		72
第四章 单子叶植物细胞凋亡与过敏性免疫反应		77
4.1	引言	77
4.2	材料与方法	81
4.2.1	材料	81
4.2.2	培养基和常用试剂的配制	82
4.2.3	秀丽新小杆线虫饲养	84
4.2.4	常规分子生物学	84
4.2.5	PCR 产物回收纯化	89
4.2.6	回收产物的 TA 克隆	90
4.2.7	单菌落 PCR 筛选阳性克隆	92
4.2.8	测序	93
4.2.9	序列分析	93
4.3	结果与分析	93
4.3.1	<i>C. elegans</i> 的培养	93
4.3.2	<i>C. elegans</i> 基因组 DNA 和总 RNA 的 提取纯化	94
4.3.3	目的基因 <i>ced-3/ced-4</i> 的 ORF 序列 扩增结果	94
4.3.4	<i>ced-3/ced-4</i> 基因的 cDNA-3/cDNA-4 序列的扩增结果	95
4.3.5	PCR 产物的 TA 克隆	96

4.3.6	<i>ced-3/ced-4</i> 基因的测序与分析	97
4.3.7	诱导型植物表达载体的构建	99
4.3.8	诱导型表达载体的转化	103
4.4	小结	112
	参考文献	114
第五章 双子叶植物细胞凋亡与过敏性免疫反应		118
5.1	引言	118
5.2	材料与方法	121
5.2.1	材料	121
5.2.2	农杆菌感受态细胞的制备	122
5.2.3	电激法转化农杆菌	122
5.2.4	质粒 DNA 的提取	123
5.2.5	农杆菌转化子及载体质粒在农杆菌中的 稳定性分析	123
5.2.6	拟南芥栽培与农杆菌介导的转化	123
5.2.7	外源目的基因的 PCR 检测	128
5.2.8	报告基因 <i>GUS</i> 的检测分析	128
5.2.9	拟南芥根组织表皮细胞凋亡的组织化学鉴定 ...	129
5.2.10	病情评价	130
5.2.11	统计分析	130
5.2.12	植物组织内线虫的染色	131
5.3	结果与分析	133
5.3.1	转化质粒在农杆菌中的稳定性鉴定	133
5.3.2	拟南芥的农杆菌转化和抗性筛选	133
5.3.3	目的基因的 PCR 检测	135
5.3.4	T ₁ 代转基因苗根系的 <i>GUS</i> 活性检测评价	136
5.3.5	转基因植株的表型检测	136

5.3.6 T_1 代转基因拟南芥基质苗对根结线虫的抗性	138
5.4 小结	139
参考文献	140
第六章 肿瘤细胞凋亡与免疫反应	142
6.1 引言	142
6.1.1 肿瘤微环境中的免疫细胞	142
6.1.2 结直肠癌的现状	143
6.1.3 microRNA 简介	144
6.1.4 microRNA 与肿瘤	146
6.1.5 藤石松中 miRNA 的潜在药用价值	148
6.2 microRNA 的筛选	150
6.2.1 实验所使用软件	150
6.2.2 实验方法	150
6.2.3 实验结果与分析	151
6.3 miRNA 转染结直肠癌细胞及效率检测	152
6.3.1 实验试剂与仪器	152
6.3.2 实验方法	155
6.3.3 RT-PCR 检测细胞转染的有效性	164
6.4 结直肠癌细胞增殖检测	165
6.4.1 实验试剂与仪器	165
6.4.2 实验方法	167
6.4.3 实验数据处理方法	167
6.4.4 miR-192-5p、miR-30a-5p 对结直肠癌 细胞增殖的影响	168
6.5 结直肠癌细胞凋亡检测	169
6.5.1 实验试剂与仪器	169
6.5.2 实验方法	172

6.5.3	实验数据处理方法	174
6.5.4	miR-192-5p、miR-30a-5p 对结直肠癌 细胞凋亡的影响	174
6.6	小结	179
	参考文献	180
	附录	187
附录 A	缩写表	187
附录 B	中英文缩略表	192
附录 C	缩略语表	194
附录 D	秀丽新小杆线虫细胞凋亡基因序列信息	195
附录 E	实验方法	199

第一章 免疫学相关研究

免疫系统由细胞、组织及其可溶性产物组成，其正常功能会发生免疫反应，在此过程中免疫系统将识别、攻击并破坏对人体健康产生威胁的外来物质。

1796 年，英国医师 Edward Jenner 在实验过程中，观察发现牛痘预防天花的感染，从而催生了免疫学科的诞生，他的实验应用是人类第一次驾驭免疫应答的典范，但当时观察到的免疫应答，其细胞分子机制并不清楚。后来多次证实曾在瘟疫流行中患过某种传染病而康复的人，对这种疾病的再次感染具有抵抗力，称其为“免疫”（immunity）。在 Jenner 生活的时代，传染性疾病的原因并不知道，并且当时尚未出现微生物传染疾病的学说。

1884 年，Robert Koch 发现并提出微生物传染疾病的理论，揭示肉眼看不见的微生物在流行传染疾病中的特殊作用，他第一次把导致人类疾病的病原体微生物鉴定出来，并制定病原物鉴定与验证的科学准则，这就是医学界和动植物病原物鉴定长期应用的著名“柯氏法则”。其后，Louis Pasteur 将 Jenner 预防天花的免疫技术用来防治各种动物疾病，他通过接种在实验室培养的减毒（弱毒株）病原体，保护机体不为外界或自然界产生的病原体攻击侵染。Pasteur 创造了“vaccination”（接种疫苗，种痘）这个名词（源于拉丁文“*vaccinus*”），意思来源于牛，并以此纪念 Jenner 的工作，Pasteur 和其他研究者的工作促进了免疫学作为一个独立学科发展。由于病原体不断进化，从而逃避或阻断免疫防御，因此免疫系统必须不断地改变，才能保持其有效性。这

是一个长期的赛跑，谁将成为更成功的机制？是机体的免疫监视还是病毒的入侵与感染策略？今天，现代免疫学的核心可以这样定义“研究介导免疫的细胞或组织，以及与其功能相关的基因或蛋白质等参与的反应机制”。

免疫学科历经世事沧桑经久不衰，依靠全世界的免疫科学工作者不断发展繁荣，为人类做出了巨大贡献。这些免疫学发展历程中的重大突破和进步，以对免疫学的重大发现（表 1.1）及由于免疫学的突出工作而获得诺贝尔奖的免疫学家（表 1.2）进行详细介绍（Tak W Mak et al.，2012）。

表 1.1 免疫学发现和发展的里程碑

时间	里程碑
1798 年	种痘预防天花
1880—1899 年	减毒疫苗 免疫防御吞噬理论 补体
1900—1919 年	ABO 血型 过敏毒素 调理作用
1920—1929 年	基于 BCG 的结合疫苗 白喉细菌毒素疫苗 迟发型超敏反应
1930—1939 年	小鼠组织相容性抗原 鉴定抗体为 γ 球蛋白家族亚群（免疫球蛋白）
1940—1949 年	疫苗佐剂（弗氏佐剂） 移植免疫 浆细胞产生抗体

续表

时间	里程碑
1950—1959 年	淋巴细胞 耐受 抗体蛋白结构和功能 抗体形成的克隆选择学说
1960—1969 年	胸腺在免疫中的作用 造血干细胞 淋巴因子（细胞因子） B 细胞/T 细胞协同 辅助 T 细胞亚群 免疫球蛋白分子的一级结构
1970—1979 年	免疫球蛋白超变区 通过杂交瘤产生单克隆抗体 免疫球蛋白基因重组产生抗体多样性 免疫反应性与组织相容性抗原基因的关系 免疫应答的主要组织相容性抗原基因的关系 免疫应答的主要组织相容性抗原限制性 外源性抗原的处理递呈 补体级联反应中的攻膜复合物 NK 细胞 药物介导的免疫抑制（环孢素 A）
1980—1989 年	宣布在世界范围内消灭天花 从 AIDS 患者体内分离 HIV 克隆 T 细胞受体基因 淋巴细胞迁移 共受体（CD4 和 CD8）在 T 细胞活化中的作用 内源性抗原加工处理 T 辅助细胞的 Th1/Th2 亚群 MHC 分子的晶体结构