

21

世纪

高等医学院校教材

贺石林
李俊成
秦晓群

主编

临床生理学

 科学出版社

21 世纪高等医学院校教材

(供研究生用)

临床生理学

贺石林 李俊成 秦晓群 主编

科学出版社

2001

内 容 简 介

本书由全国13所医学院校共同编写。全书以阐明生理学理论与临床联系为主要宗旨,分为细胞、血液、心血管、呼吸、消化、代谢与体温、泌尿与排尿、视觉与听觉、神经系统、内分泌、生殖、衰老等,共12章。各章选择与临床密切相关的重要生理学内容与主要进展设节,侧重介绍生理学基础与临床实践相关的内容,资料新颖,内容丰富,写出了深度和广度,为更好应用新知识、防治疾病提供启发和思路。

本书适用于高年级本科生、研究生(含七年制学生)及医师继续教育的教学,也可作为生理学、药理学、病理生理学以及广大医务工作者的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

临床生理学/贺石林,李俊成,秦晓群主编. -北京:科学出版社,2001.9

21世纪高等医学院校教材

ISBN 7-03-009628-2

I. 临… I. ①贺…②李…③秦… II. 生理学-医学院校-教材

IV. R33

中国版本图书馆CIP数据核字(2001)第052511号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2001年9月第 一 版 开本:850×1168 1/16

2001年9月第一次印刷 印张:40

印数:1—4 000

字数:1 031 000

定价:66.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换<环伟>)

编写人员名单

主 编	贺石林	李俊成	秦晓群	
副主 编	文志斌	余承高	管茶香	邬力祥
	高天明	姚运纬	胡 弼	
秘 书	周伏文			
编 委	(按姓名拼音排序)			

高天明	第一军医大学
管茶香	中南大学湘雅医学院
贺石林	中南大学湘雅医学院
胡 弼	南华大学医学院
蒋德昭	中南大学湘雅医学院
柯 庆	南华大学医学院
李楚杰	暨南大学医学院
李东亮	新乡医学院
李俊成	中南大学湘雅医学院
罗自强	中南大学湘雅医学院
刘少金	武汉大学医学院
莫书荣	广西医科大学
倪 江	哈尔滨医科大学
秦晓群	中南大学湘雅医学院
沈行良	海南医学院
魏劲波	武汉大学医学院
文志斌	中南大学湘雅医学院
邬力祥	中南大学湘雅医学院
吴中海	第一军医大学
杨延泽	湖南医学高等专科学校
姚运纬	郑州大学医学院
余承高	华中科技大学同济医学院
章 茜	郑州大学医学院
张自东	华中科技大学同济医学院
周光纪	广东医学院

编 者 (按章节先后排序)

蒋德昭	何 群	李俊成	李晓东	周光纪	高天明	胡 弼
刘少金	彭剑雄	贺石林	程腊梅	黄炜琦	谢兆霞	文志斌
刘发益	张建湘	欧淑其	谢 露	余承高	周伏文	柯 庆
莫书荣	管茶香	连 芳	熊 密	杨君佑	戴 忠	秦晓群
罗自强	岳少杰	冯丹丹	吴中海	邢 莹	许继田	姚运纬
朱进霞	肖鸿美	张自东	王晓春	王学铭	易富贤	王华东
李楚杰	余承高	姜德咏	魏劲波	万曙霞	章 茜	沈行良
张 亮	张桂林	严晓红	韩 丹	王 慧	邬力祥	李东亮
罗学港	李元建	胡祁生	朱 辉	倪 江	金宏波	何美霞
肖献忠	杨延泽	张恺芳	曹诗运	汉建忠	张 辉	

前 言

生理学是研究生物体功能及其活动规律的科学。它是医学的重要基础学科,在引导医学生步入医学领域过程中起着十分重要的作用。临床生理学是生理学的一个重要分支,它以阐明生理学理论与临床的联系为主要宗旨。由于生理学是一门实验性学科,随着生物科学特别是分子生物学技术在医学科研中的广泛应用,生理学有了长足进展,它正在为临床工作不断提供新的思路 and 启迪。因此,适当地了解与临床工作密切的生理学前沿内容,这已是医学发展的必然趋势。为适应形势的发展和适应教学的需要,我们试编写了这本《临床生理学》。

本书主要面向高年级本科生、研究生与进修医师,他们都已系统学过生理学的基本知识,故本书虽然仍以系统设置,但在内容选择上偏重临床医学发展的需要。在编排上,大多数采用先介绍基本原理与进展,然后介绍它们与疾病防治的联系,以及如何评价这些功能,每节之后附有重要参考文献,力图使本书不仅是一本重要高等医学院校的教材,同时也可作为医师继续教育的教材及自学提高的参考书。

参加本书编写的单位有中南大学湘雅医学院、华中科技大学同济医学院、武汉大学医学院、郑州大学医学院、暨南大学医学院、第一军医大学、南华大学医学院、哈尔滨医科大学、广西医科大学、广东医学院、海南医学院、新乡医学院以及湖南医学专科学校等十三所院校。各院校领导对本教材的编写与出版均给予了大力支持;原湖南医科大学教务处和研究生处还特别为本书提供启动基金;科学出版社在组织编写与出版过程中给予了大力支持;湘雅医学院生理教研室周伏文为本书做了大量秘书工作,在此一并致谢。

必须强调指出:由于临床生理学尚处于发展阶段,加之本书作者较多,各节取材角度不一,并且时间仓促,编者水平有限,错误与不妥之处在所难免,我们恳切欢迎使用本教材的师生和广大读者提出意见和批评,以利今后再版时修正与补充。

主 编

2001 年 6 月

目 录

第1章 细胞 (1)	第9节 内皮素..... (227)
第1节 细胞周期的调控..... (1)	第10节 气体信使因子..... (232)
第2节 细胞凋亡..... (7)	第11节 微血管的周细胞..... (246)
第3节 受体生理..... (16)	第12节 冠脉循环及其血流量的测定... (250)
第4节 细胞信号转导系统与临床..... (23)	第4章 呼吸 (256)
第5节 自由基..... (38)	第1节 气道阻力及其调节..... (256)
第6节 转录因子..... (45)	第2节 肺表面活性物质..... (266)
第7节 离子通道..... (51)	第3节 肺内液体交换..... (277)
第8节 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 泵..... (59)	第4节 肺巨噬细胞..... (286)
第9节 兴奋-收缩耦联..... (64)	第5节 肺损伤的修复..... (291)
第10节 黏附分子..... (70)	第6节 节律性呼吸的调控..... (298)
第11节 端粒与端粒酶..... (76)	第5章 消化与吸收 (308)
第2章 血液 (85)	第1节 临床食管生理..... (308)
第1节 血液的流变特性与临床..... (85)	第2节 胃酸分泌的调节..... (316)
第2节 造血干细胞..... (95)	第3节 胃细胞保护..... (326)
第3节 造血微环境..... (102)	第4节 胃肠道激素..... (333)
第4节 粒细胞生成调控..... (109)	第5节 胰腺生理..... (339)
第5节 促红细胞生成素..... (120)	第6节 消化道的动力学基础..... (349)
第6节 血小板生成素..... (125)	第7节 肝脏的生理与代谢..... (358)
第7节 血小板及其功能调控..... (130)	第6章 代谢与体温 (370)
第8节 组织因子途径..... (138)	第1节 增食因子..... (370)
第9节 抗凝系统..... (147)	第2节 瘦素..... (377)
第10节 纤溶系统..... (158)	第3节 体温调节机制..... (384)
第3章 心血管 (169)	第7章 肾脏的功能与排尿 (393)
第1节 窦房结..... (169)	第1节 肾小球功能与系膜细胞..... (393)
第2节 左室功能的评价..... (176)	第2节 肾功能评价的生理学基础..... (398)
第3节 心脏内分泌功能..... (186)	第3节 尿液的浓缩与稀释..... (403)
第4节 离子与心肌..... (192)	第4节 肾脏的内分泌功能..... (411)
第5节 血管内皮细胞..... (199)	第5节 肾脏与酸碱平衡..... (421)
第6节 血管平滑肌..... (210)	第6节 肾脏与水、电解质平衡..... (427)
第7节 动脉血压的调节..... (215)	
第8节 血管紧张素..... (220)	

第7节 输尿管与排尿生理	(436)	第10章 激素和膜磷脂产物	(534)
第8章 视觉与听觉	(442)	第1节 激素间的相互作用	(534)
第1节 视觉电生理检查方法与临床意义	(442)	第2节 垂体类激素	(539)
第2节 听觉与听觉障碍	(449)	第3节 生长激素	(546)
第9章 神经系统	(459)	第4节 胰岛素受体及其异常	(553)
第1节 多巴胺能神经元	(459)	第5节 褪黑激素	(558)
第2节 兴奋性氨基酸	(465)	第6节 肾上腺髓质素	(562)
第3节 抑制性氨基酸	(473)	第7节 膜磷脂代谢物与临床	(567)
第4节 痛觉生理	(480)	第8节 应激生理与临床	(576)
第5节 人体诱发电位	(488)	第11章 生殖	(593)
第6节 神经胶质细胞生理	(498)	第1节 月经周期	(593)
第7节 血脑屏障	(503)	第2节 胎盘生理	(597)
第8节 神经营养因子	(510)	第3节 睾丸生理	(601)
第9节 基底神经节对运动的调控作用	(516)	第12章 衰老	(606)
第10节 降钙素基因相关肽	(521)	第1节 衰老的相关学说	(606)
第11节 学习与记忆的生理学基础	(526)	第2节 妇女更年期生理与更年期综合征	(609)
		第3节 骨质的增龄性改变	(616)
名词索引	(621)		

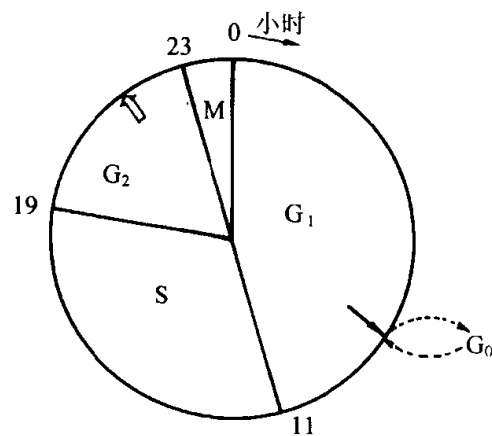
第1章 细 胞

第1节 细胞周期的调控

一、概 述

(一) 细胞周期的概念

细胞周期(cell cycle)是指上一次细胞分裂结束到下一次细胞分裂终结的全过程。细胞周期全过程(图 1-1-1)分为: G_1 期, 即 DNA 合成前的准备时期(pre-DNA-synthetic phase), 在 G_1 期细胞合成大量与 DNA 合成有关的酶; S 期, 即 DNA 合成期(DNA-synthetic phase), 在 S 期的细胞进行 DNA 复制, 每一个染色体复制成两个染色单体, 通常只要 DNA 合成一旦开始, 细胞的增殖过程就会继续下去; G_2 期, 即 DNA 合成后期(post-DNA-synthetic phase), G_2 期是为有丝分裂期做准备的, 能合成进入有丝分裂所需的 RNA 和蛋白质; M 期, 即有丝分裂期, M 期细胞染色体浓缩, 一个细胞分裂成两个。真核细胞增殖的两个关键过程是 DNA 合成和姐妹染色单体及细胞器均等地分配到两个细胞中。



在哺乳动物细胞有丝分裂后的子细胞, 大多数会离开细胞周期进入 G_0 期。 G_0 期细胞即非细胞周期的静息期细胞, 可维持数天、数周, 某些细胞(如晶状体细胞)可终生不再增殖。亦有人认为 G_0 期细胞是停滞于 G_1 期的细胞。在一定的条件下, G_0 期细胞可以再进入细胞周期, 进行细胞分裂, 处于 G_0 期的细胞对辐射和各种药物的敏感性低, 因而是较好的保存状态; 但处于 G_0 期的肿瘤细胞, 由于对辐射和药物不敏感而成为肿瘤复发的原因。

细胞周期及各期的持续时间依细胞的种类及所处状态不同而异: 增殖的人类细胞, 细胞周期总时间约 24 小时, G_1 期约 11 小时, S 期约 8 小时, G_2 期约 4 小时, M 期约 1 小时(图 1-1-1)。大多数细胞 S 期和 M 期持续时间较为恒定。 G_1 期持续时间最长、变异最大, 分化成熟的细胞 G_1 期较长, 胚胎细胞或增殖活跃细胞 G_1 期较短。

(二) 细胞周期中的限制点与关卡

细胞周期由 G_1 期→S 期→ G_2 期→M 期的过程, 需要一些“起始”和“终止”信号对其过程实施调控。目前知道细胞周期的进程是由多层次、多因素调控的复杂过程, 其时相转变过程中涉及的两

个限制点(restriction points)决定细胞是增殖还是进入静止状态。一个限制点在 G_1 晚期,该限制点与 $G_1 \rightarrow S$ 期转变有关。一般认为细胞通过此限制点进入 S 期是受细胞周期蛋白(cyclin)和细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)的调控,CDK 的活性需要与 cyclin 结合,使 CDK 磷酸化,一旦 CDK 被活化进而作用于视网膜母细胞瘤蛋白 (retinoblastoma, Rb),使之磷酸化并释放转录因子 E2F;E2F 脱离 Rb 则启动细胞进入 S 期。 G_1/S 期限限制点还可被至少两大家族的 CDK 抑制蛋白所抑制,使细胞周期的进程停止下来;另外一个限制点是在 G_2/M 期,细胞通过该限制点从 G_2 期进入 M 期受有丝分裂促进因子(mitotic promote factor, MPF)的调控,MPF 的活性与 p34^{cdc2} 的 Tyr-15 和 Thr-161 位点磷酸化有关。前者更为重要。当生长条件不适宜的体内因素(如缺乏生长因子、细胞衰老、细胞凋亡、免疫细胞发育等)或外来因素(如营养缺乏、物理、化学、药物等)对机体细胞基因组 DNA 的完整性有损伤时,细胞不能通过 G_1/S 期的限制点而被阻滞在 G_1 期(G_1 arrest)。此时细胞可能有三种不同的命运:①损伤的 DNA 经修复后,越过限制点继续向前发展完成细胞增殖;②不能对损伤的 DNA 修复,启动凋亡系统及时清除 DNA 受损的细胞;③细胞 G_1/S 限制点调控功能丧失,携带受损 DNA 的细胞不发生 G_1 期阻滞,变异的基因组 DNA 不能被修复或及时清除,从而导致细胞增殖失控,基因组 DNA 经常处于不稳定的变异中,为突变的积累、肿瘤克隆的形成创造契机。

此外,在细胞增殖期中存在许多监控系统,当它探测到基因组损伤时,这些监控系统就会打断细胞周期进程,细胞的这种监控系统称为关卡,又称检查点(checkpoint)。典型的关卡是 DNA 损伤关卡,p53 是 G_1/S 转变中起重要作用的 DNA 损伤的关卡分子。

关卡的重要作用是确保细胞在完成某事件 A 后,才能开始另一事件 B,一旦出现某种应急或损伤时能确保细胞有时间进行修复,关卡对于维持遗传稳定性是很重要的。目前已知在细胞周期中至少有 G_1 、S、 G_2 及 M 关卡,它们能识别 G_1 期或 G_2 期 DNA 的损伤、S 期末复制的 DNA 及 M 期形成的异常纺锤体,触发细胞周期阻滞(图 1-1-2)。

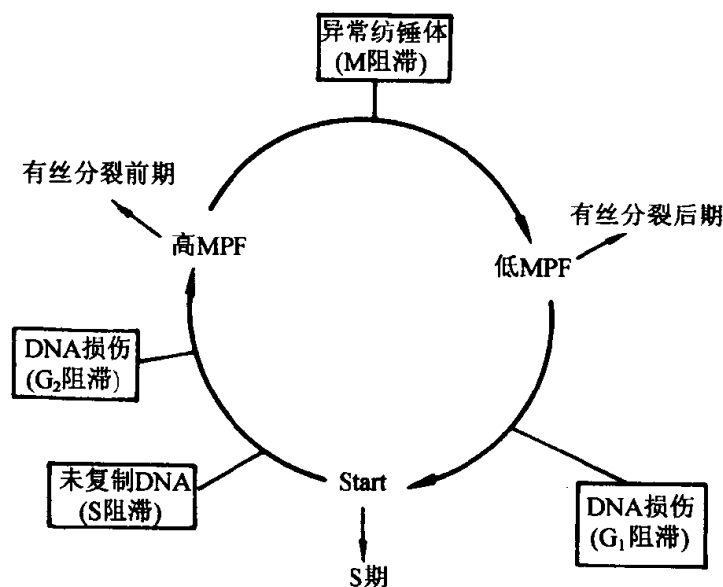


图 1-1-2 关卡在细胞周期调节中的作用

MPF: 有丝分裂促进因子

(引自 Murray A. Hunt T, 1993)

二、细胞周期调控因子及其作用

经典的细胞周期调控研究是在体外培养条件下进行的,常用两类酵母细胞(以出芽方式增殖的 *Saccharomyces Pombe* 和以细胞分离方式增殖的 *S. Cerevisia*)、非洲爪蟾属(*Xenopus*)细胞及哺乳动物细胞来完成。

上述已阐明在细胞周期的进程中涉及两个限制点和四个关卡,凡是涉及并影响这些限制点与关卡的元件均是细胞周期的调控因子,诸如 Cyclin、CDK、CKI、Rb、E2F、p53、p16、p21、TGF-β 等。这些因子大致可归纳为促进与抑制细胞周期进程的因素。以下扼要加以介绍。

(一) 促进细胞周期进程的主要因素

(1) 细胞周期蛋白: 细胞周期蛋白(Cyclins) 已知的 8 个成员是 Cyclin A、B、C、D、E、F、G、H。其中,B 型 Cyclin 又有 B₁ 和 B₂ 亚型;D 型 Cyclin 有 D₁、D₂、D₃ 亚型。图 1-1-3 中所示几种主要细胞周期蛋白分别在细胞周期不同时相呈周期性合成和降解。细胞周期蛋白是作为调节亚基并与相应的催化亚基 CDK 结合形成复合物,对细胞周期的不同时期发挥调节作用。

(2) 细胞周期蛋白依赖性激酶: CDKs 已知的 8 个成员分别命名为 CDK1(常称为 Cdc2)、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7 及 CDK8(表 1-1-1)。CDK 既能与细胞周期蛋白结合促进细胞周期的进程,也能与 CDK 抑制因子结合抑制细胞增殖。当 CDK 与 Cyclin 结合时使 CDKs 分子中 Thr 残基磷酸化及 Tyr 残基去磷酸化,从而使 CDK 具有催化活性。一旦活化的 CDK Thr 残基去磷酸化则 CDK 失活。

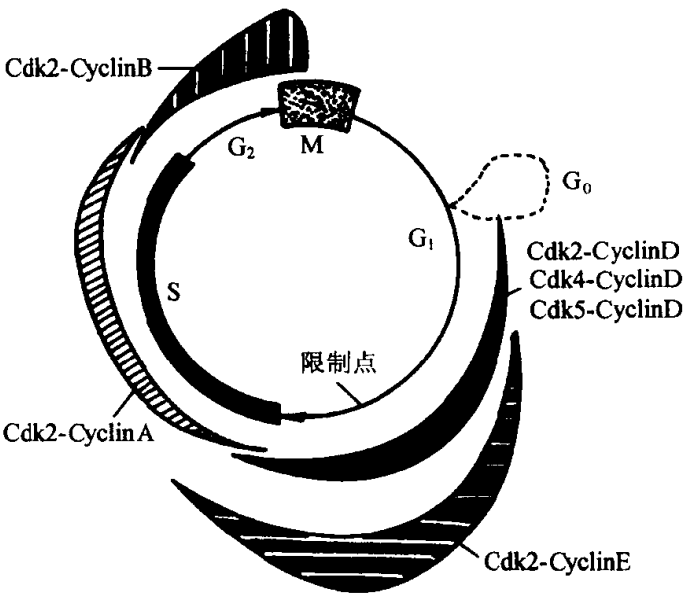


图 1-1-3 哺乳动物细胞周期不同时相各种 Cyclin-CDK 复合物活性的变化。各条带的宽度示激酶活性大小,如 G₁ 期呈现 CDK2-CyclinE 活性,晚 G₁ 期达最大活性,而在早 S 期迅速消失 (引自 Sherr CJ. Cell, 1993,73:1059)

表 1-1-1 哺乳动物细胞的细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)的作用

CDKs	与 CDK 结合的 Cyclins	作用底物	作用的细胞周期时相
CDK2	Cyclin D ₁ 、D ₂ 、D ₃	Rb	G ₁
	Cyclin E		G ₁ →S 转换
	Cyclin A		S
CDK4(或 CDK6)	Cyclin D ₁ 、D ₂ 、D ₃	Rb	G ₁

CDKs	与 CDK 结合的 Cyclins	作用底物	作用的细胞周期时相
CDK5	Cyclin D ₁ 、D ₂ 、D ₃	Rb	G ₁
Cdc2(CDK1)	Cyclin A、B(B ₁ 、B ₂)	Rb	G ₂ →M 转换, 早 M 期
CDK7	Cyclin H	CDK1、4、6	G ₁ 、S、G ₂ 、M
CDK8	CyclinC		

注: CDK3 呈低水平表达, 功能不详; Cyclin F 和 G 已被成功克隆, 但功能不详; 其他 CDKs 及 Cyclins 有待进一步证实。

(3) Rb 与 E2F: Rb 是一种抑瘤基因产物, 是 G₁ 期 Cyclin-CDK 复合物介导磷酸化作用的共同的限速底物, 即是 G₁→S 调控点的中心成分。

E2F(目前发现 E2Fs 家族有 5 个成员, 即 E2F1~5)是一种细胞转录活化因子。许多 DNA 合成基因和细胞生长调控基因(如 c-myc、c-myb、DNA 聚合酶 α 、胸腺嘧啶核苷激酶等)的启动子中都存在 E2F 结合位点; E2F 可直接活化这些基因启动 DNA 合成, 使细胞进入 S 期, 而在 E2F 基因的活化转录功能区内, 有一段 18 个氨基酸残基序列可与去磷酸化的 Rb 结合, E2F 功能区被遮盖, 从而抑制 E2F 的活化转录功能, 使细胞处于 G₁ 期停滞。在 G₁ 期, Cyclin D₁ 与 CDK4 结合, 则激活 CDK4, 活化的 CDK4 可使 Rb 磷酸化, 从而失去对 E2F 的抑制作用, 游离的 E2F 能启动 DNA 合成, 从而解除 Rb 的 G₁ 期停滞作用, 使细胞由 G₁ 期进入 S 期(图 1-1-4)。

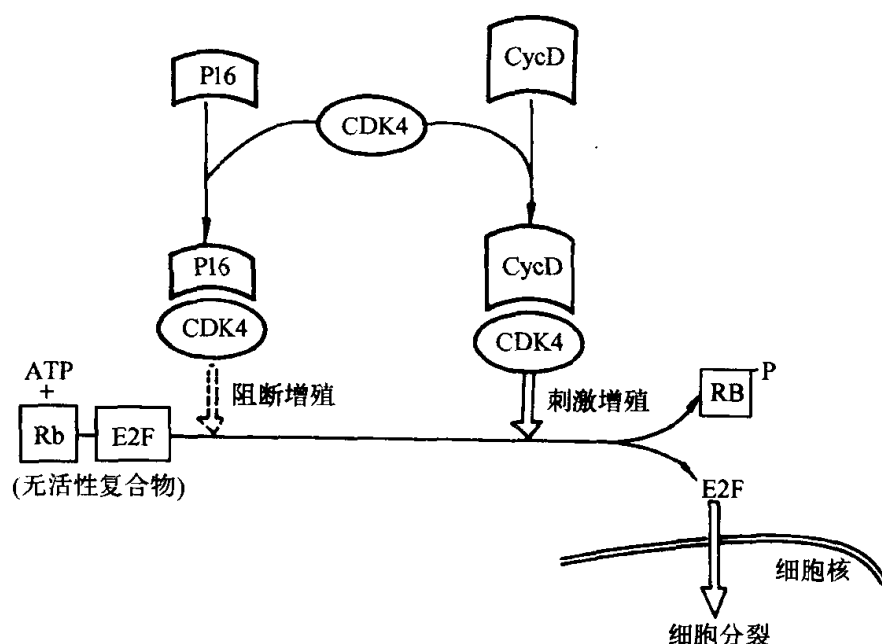


图 1-1-4 刺激和阻止细胞增殖周期示意图
 →变化的方向; ⇨ 刺激作用; ⇨ 阻断作用

此外,增殖细胞核抗原(proliferation cell nuclear antigen, PCNA)是 DNA 聚合酶的辅助因子,能促进 DNA 聚合酶延伸 DNA 的作用,如应用其反义寡脱氧核苷酸阻断 PCNA 的产生,可使正在增殖的成纤维细胞的 DNA 合成和细胞增殖停止。PCNA 在 S 期合成最多,可作为 S 期的标志物。

(二) 抑制细胞周期进程的主要因素

目前所知,CDK 抑制物(Cyclin-dependent kinase inhibitors, CKIs)按其结构特征分为两个家族:① CIP/KIP 家族,包括 P²¹、P²⁷、P⁵⁷、P⁴⁶,在结构上有部分同源性,它们能抑制多种 Cyclin-CDK 复合物;② InK4 家族,包括 P¹⁵、P¹⁶、P¹⁸、P¹⁹,是 CDK4/CDK6 的特异性抑制物。

(1) p15、p16: 作为肿瘤的抑制基因,具有同源性。均位于人染色体 9p21, Cyclin D 类似癌基因,它们特异地竞争与 CDK4、CDK6 结合,阻止 CDK4、CDK6 与 Cyclin D 形成复合物,抑制激酶活性,阻止细胞生长分裂;p16 抑制细胞分裂周期的机制见图 1-1-4。

(2) p21、p27: 具有 40%同源性,它们在 G₁ 期与 Cyclin D/CDK4, Cyclin E/CDK2 复合物结合抑制 CDK 活性,在调节 G₁/S 期过程中发挥重要作用。p21 可以通过 CDK 缺乏时,借助同 DNA 聚合酶 δ 亚基结合,阻断进行性 DNA 复制,但对修复没有影响,因此, p21 对 DNA 损伤反应的作用是双重的,既可以是一种装配因子,也可以作为一种抑制因子,这由 Cyclin/CDK/p21 的化学剂量关系决定。p21 是 p53 下游的靶分子, p21 的启动子有 p53 结合位点。尽管 p21 受其他转录因子调节,但 p21 也是 p53 介导细胞周期停滞所必需。当 DNA 损伤时, p53 被活化,继而 p21 的量也增加,使 Cyclin D、Cyclin E 的配体抑制,阻止细胞进入 S 期。缺乏野生型 p53 表达的细胞,在 DNA 损伤后不能诱导 p21 的转录,使带有损伤的 DNA 得以复制,从而提高了染色体畸变的发生率和遗传的不稳定性。

此外, p107 也是一个有丝分裂负调节因子,从其氨基酸序列表明有丝/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶活性,与 CDK2 结合,使之磷酸化,从而抑制 CDK2 的活性。近年来研究表明, p107 也与转录因子 E2F-4 结合,参与转录调控。

上述诸因素之间互成网络组成多条途径共同控制细胞周期进程。现以 G₁→S 调控点为例加以说明。G₁→S 调控点在酵母细胞称 START,在哺乳动物细胞称限制点(restriction point)。细胞在该点对复杂的细胞内外信号,包括血清中的各类生长因子和分裂原提供的信号以及 DNA 损伤情况进行整合与传递,决定细胞进入分裂程序,或发生凋亡,还是进入静止的 G₀ 期。

值得指出的是,细胞周期的调控与细胞黏附密切相关,研究表明细胞增殖与存活大多需要黏附于细胞外基质如纤连蛋白(Fn)及层连蛋白(Ln)上,若细胞不能黏附,则使细胞周期阻滞,或引起凋亡。细胞黏附于细胞外基质,激活细胞内信号转导途径,促进细胞由 G₁ 期进入 S 期。近来用分子生物学技术研究悬浮状态与黏附状态细胞发现:①细胞黏附可诱导周期蛋白 D₁ 基因的 mRNA 及其蛋白质的表达。②细胞黏附可使 p21 和 p27(为 CKI 的成分)水平降低,从而增强周期蛋白 E-CDK2 复合物的活性。③周期蛋白 A 基因的启动子含有 E2F 的结合位点,其表达使 Rb 磷酸化,释放 E2F,从而诱导 E2F 依赖基因的转录,而正常细胞中周期蛋白 A 表达于周期蛋白 D、E 及 CDK 的表达之后,开始出现于 G₁ 末期。④生长因子需与细胞外基质协同作用促进 Rb 磷酸化,细胞因子诱导 c-myc 和 c-fos 的表达,使细胞由 G₀ 期进入 G₁ 期。⑤细胞黏附于细胞外基质,促进晚 G₁ 期表达组蛋白 H4 和胸腺嘧啶脱氧核苷酸酶,使其从晚 G₁ 期进入 S 期。

三、细胞周期调控与细胞癌变

癌变的发生常因体内一些因素的影响导致细胞周期调控因子的异常表达,使细胞的限制点功能降低,细胞关卡功能失灵,引起细胞异常增殖所致。

(一) Cyclins 表达异常

目前研究较多者为 Cyclin D 和 Cyclin E。Cyclin D 的三个亚型 D_1 、 D_2 、 D_3 , 分别由 11q13 的 CCND1、12p13 的 CCND2 和 6p21 的 CCND3 基因编码,其表达有一定的细胞特异性,有些细胞表达 D_3 ,有些细胞表达 D_1 、 D_2 。目前已知除 D_3 外,某些肿瘤细胞高表达 D_1 、 D_2 ,如在人甲状腺腺癌中观察到甲状腺素基因(PRAD1)与 D_1 融合基因的表达,在 B 细胞淋巴瘤、乳腺癌、食管癌、胃肠癌中有 D_1 的过表达; D_2 在 T 细胞白血病中过表达,在结肠、直肠癌中 CCND2 扩增。另外,在人类乳腺癌细胞系及乳腺癌组织中发现有 Cyclin E 的过表达,有些病例发现有 E 型 Cyclin 蛋白的基因扩增。

(二) CDKs 表达异常

目前认为 CDKs 中 CDK4 与肿瘤发生有密切关系。CDK4 可能在一些细胞中是 TGF- β 介导的靶蛋白,用 TGF- β 处理人角化细胞时,可抑制 CDK4 的 mRNA 表达;在 MVILU 细胞用 TGF- β 处理时,可引起 CDK4 蛋白的减少,但不影响 mRNA 的表达。CDK4 的高表达可使这些细胞对抗 TGF- β 的生长抑制作用;CDK4 水平升高,能中和 p15 的抑制效果。在人类一些肿瘤细胞中已发现 CDK4 和 CDK6 的高表达。

(三) CKIs 表达异常

p16 基因,其突变在人恶性肿瘤中普遍存在,如神经胶质瘤、白血病、黑色素瘤、肺癌、间皮瘤、膀胱癌等,突变率达 30%~80%,主要突变形式有纯合子缺失、插入、点突变、易位等。p15 基因,其氨基酸序列与 p16 相似。研究表明,60%恶性脑肿瘤中有 p16、p15 基因缺失,但未发现基因突变。

p27 与 p21 有 40% 的基因同源性,与 p15 一样,为转化生长因子 β (TGF- β) 的靶分子,参与 TGF- β 介导的 Rb 磷酸化的抑制作用,而导致细胞生长停滞。如 p21、p27 的下降,也可导致肿瘤的发生。

(四) 抑癌基因产物

(1) p53 和 Rb: p53 基因几乎在所有的人类肿瘤细胞中都有异常。p53 蛋白不但具有转录因子活性,诱导 p21 表达,还可使 DNA 受损的细胞停滞于 G_1 期,进行 DNA 修复,或发生凋亡,p53 异常的细胞,损伤的 DNA 可被复制,导致异常染色体和细胞恶性转化。

Rb 基因的突变见于视网膜母细胞瘤、小细胞肺癌、肉瘤和膀胱癌中。Rb 与 p53 不同,它本身没有与特定区域的碱基序列结合,主要与细胞周期中多种蛋白质形成复合物来调节其配体的活性,如与 E2F 形成的复合物,抑制转录因子 E2F 的活性,Rb 在 Cyclin D/CDK 复合物作用下被磷酸化后,释放 E2F 使细胞由 G_1 期进入 S 期。因此可以认为 p53 对 G_1 期的调节位于 Cyclin/CDK 复合物

上游,而 Rb 则位于其下游。

(2) 转化生长因子 β : 人类角化细胞用 TGF- β 治疗可诱导增加近 30 倍的 p15 基因表达。TGF- β_1 可抑制 Cyclin D1 mRNA 和蛋白质的表达,阻断 DNA 合成。TGF- β_1 可通过抑制 CDK4 翻译来使其表达下调。

(五) 泛素(ubiquitin)途径

细胞周期从一个阶段进入下一阶段,必需分解某些 Cyclin,分解 Cyclin 的工作由一类依赖泛素的蛋白水解酶完成。Cyclin 被分解时,首先在一种特定的连接酶作用下,使泛素连接到 Cyclin 分子的特定定位点,然后由依赖泛素的蛋白水解酶作用,将 Cyclin 与泛素一起水解掉。若泛素缺乏或异常,或依赖泛素的蛋白水解酶缺乏,不能及时水解 Cyclin 分子,则可导致肿瘤发生。

(六) 细胞黏附与肿瘤

细胞黏附调控细胞周期与细胞内信号转导有关,如整合素(integrin)是由 α 、 β 亚基组成的细胞跨膜蛋白的膜受体,其 β 亚基的胞内区与细胞骨架蛋白(α 肌动蛋白、踝蛋白、黏着斑蛋白等)相连,而这些骨架蛋白又与细胞膜上的黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)相互作用,使 FAK 磷酸化,产生一系列的调节蛋白,激活有丝分裂原活化的蛋白激酶(MAPK)信号转导通路,促进周期蛋白 D₁ 表达,使细胞从 G₁ 进入 S 期。某些原癌基因的过表达或突变,能持续激活整合素介导的信号转导通路,使细胞转化为非黏附依赖性的肿瘤细胞。

深入研究细胞周期调控与癌变间的关系,不仅有助于揭示肿瘤的发生机制,而且为肿瘤的防治提供一种新的思路。

(本文承陈修、胡有秋教授审校,特此致谢。)

(中南大学湘雅医学院 蒋德昭)

参 考 文 献

- 徐有恒,王绮如主编. 造血生理学和造血细胞检测技术. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997. 1~2
- Coopoe GM. The Cell; A molecular Approach. Washington DC: ASM press. 1997. 561~598
- Fuler GM & Shields D. Molecular Basis of Medical Cell Biology. 1998. 106~123
- Levine AJ. Principles of Cell Regulation. In: Williams Hematology 5th ed. New York: Mcgraw-Hill. 1995. 107~113
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, et al. Molecular Cell Biology. 3rd ed. New York: Scientific American Books, 1995. 1201~1245
- Pagano M. Cell Cycle Control. Results and Problems in Cell Differentiation. Berlin, New York: Springer. 1998. 1~127
- Sielocki TM, Beylan JF, Benfield PA. et al. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors useful Targets in Cell Cyclin Regulation. J. Med Chem. 2000. 43(1):1~18

第2节 细胞凋亡

自 1972 年 Kerr 等人发现一种新的细胞死亡形式,并命名为凋亡(apoptosis)以来,人们对凋亡的研究和认识已有了长足的发展。细胞凋亡的主要特征为细胞皱缩、膜泡状化、染色质浓缩形成小体和 DNA 片段化,这是一个主动的耗能的自杀过程。正常组织和器官在生长发育过程中发生的细

胞凋亡为生理性的细胞凋亡,又称为细胞程序性死亡(programmed cell death)。在病理过程中发生的细胞凋亡称为病理性的细胞凋亡,这有别于病理性的细胞坏死(necrosis),后者伴随着明显的炎症反应和细胞胀溶。在药物治疗过程中发生的细胞凋亡为诱导性的细胞凋亡(induced apoptosis)。总之,细胞凋亡在生理和病理状态下都具有重要的理论和实际意义。

一、研究细胞凋亡的常用方法

(一) 形态学方法

(1) 普通光学显微镜:在普通光镜下,经过染色的凋亡细胞体积皱缩,染色质致密聚集,细胞膜出现鼓泡(blebbing),细胞核碎裂并形成凋亡小体(apoptotic body),或者细胞核偏于核膜一侧形成新月形。但胞膜、线粒体、高尔基体等细胞器的形态仍维持完整。该方法可较直观地观察细胞群中凋亡细胞的形态,并可粗估凋亡细胞的百分率。

(2) 荧光显微镜:用吖啶橙或 Hoechst 33258 等荧光染料对细胞染色,可见凋亡细胞的核或胞质内有浓染致密的颗粒状荧光,甚至出现荧光碎片。该法染色后宜即刻观察,以免荧光碎灭。亦可结合其他染色特定细胞器或特殊化学分子的荧光染料,在荧光显微镜下观察细胞凋亡后被染色部位的变化,并以此来判断细胞的凋亡状况。例如,细胞凋亡的早期信号之一是细胞内钙离子 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的升高。采用荧光指示剂 Quin-2、Indo-2、Fura-2 或 Fura-FF- C_{18} 染色细胞,在荧光显微镜下就能观察到单个细胞内外钙离子浓度的变化和分布,称为钙成像(calcium imaging)。

(3) 透射电子显微镜:该方法观察细胞分辨率高,可清晰地观察到凋亡细胞核和细胞器的亚微结构,边界分明,尤其是对染色质的浓缩观察比较清楚。细胞核裂解为块状,细胞质裂解成质膜包裹的碎片。但细胞质内可见完整的细胞器。

此外,采用与显微镜相连的缩时摄影装置,可拍摄活细胞在诱导凋亡后细胞形态变化的全过程。

(二) 分子生物学方法

(1) DNA 片段电泳:由于在细胞凋亡中激活了 Ca^{2+}/Mg^{2+} 离子依赖性的核酸内切酶,使细胞 DNA 断裂形成 180~200bp 为最小单位的核苷酸单体或寡聚体片段,其电泳谱呈现典型的“梯状带”。常用的电泳方法有以下几种:

琼脂糖凝胶电泳:该法是应用最早的经典方法,简便易行,可检测 ng 级的 DNA。如果用 ^{32}P 标记 DNA 片段的 5' 末端或 3' 末端,检出水平可达到 pg 级,并可进行定量。

脉冲场凝胶电泳:该法可分离凋亡细胞中 50~300kb 的大分子量 DNA 片段,这些片段在凋亡早期便可出现。

单细胞凝胶电泳:电泳谱上出现尾状带,亦称“彗星”。其荧光强度代表 DNA 的量,并与凋亡细胞 DNA 损伤程度相关。这种“彗星”的数量可代表凋亡细胞的数量。

(2) 多聚酶链反应:细胞凋亡受多种基因的调控,其中促进凋亡的基因有 p53、Rb、Fas 和 Myc,而抑制凋亡的基因有 bcl-2。通过多聚酶链反应检测这些基因的表达情况,就能间接了解细胞的凋亡状况。如某些凋亡诱导剂就能使处理后的细胞内 p53 或其他促凋亡基因大量表达。这种基因表达往往出现在呈现凋亡形态之前。该法亦是实验室的常用方法,且多采用逆转录多聚酶链反应

(RT-PCR)。只需将凋亡细胞的 mRNA 分离,经逆转录生成 cDNA,再用 p53 的基因引物扩增 cDNA 片段,在电泳谱上就能观察到一定分子量大小的被扩增的 p53 基因片段。

(三) 免疫组化的方法

细胞凋亡的发生涉及到多种酶的参与,早期细胞凋亡酶学的研究主要围绕核酸内切酶活性的检测。将 ^{32}P 标记的核酸加入凝胶基质内作为底物,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),测定凝胶内底物的减少量就能确定核酸内切酶的活性。近年来发现细胞内的一种天冬半胱酶在细胞凋亡发生过程中扮演着关键角色。采用荧光免疫吸附酶测定 (FISEA) 就能定量测定该酶的活性。此外,在凋亡发生时 DNA 断裂,另一个参与 DNA 修复的重要酶的活性亦表现出来,其名为聚(腺苷二磷酸-核糖)多聚酶 (PARP)。在细胞凋亡早期,PARP 被 caspase-3 裂解为 89kD 和 24kD 二个片段,采用抗 PARP 抗体的蛋白印迹法 (western blotting) 就能检测 PARP 的 89kD 片段以作为凋亡的早期标志物。

(四) 生物物理学方法

(1) 流式细胞仪:该仪器采用先进的光学系统使流过的单个细胞产生散射光。如果细胞被荧光染料染色后就能受激发产生荧光。收集分析多个不同细胞的散射光和荧光,就能检测不同的细胞亚群。检测结果可用二维峰图和二维点图表示,亦可用三维图表示。成活细胞膜内侧磷脂中存在一种磷脂酰丝氨酸成分。当细胞发生凋亡时,该成分便位移于浆膜外暴露于细胞外环境中,这属于凋亡早期细胞膜成分的改变。由于连接素 V (annexin V) 与暴露于膜外的磷脂酰丝氨酸成分具有较高的亲和力,故采用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的连接素 V (FITC-annexin V),染色细胞就能通过流式细胞仪检测到凋亡细胞群及其百分比。此法简便、灵敏、重复性好。随着细胞凋亡的进展,细胞膜的通透性发生改变,荧光染料 YO-PRO-1 可进入凋亡细胞膜染色细胞。若细胞发生凋亡后坏死,荧光染料碘丙啶 (propidium iodide) 则可进入细胞膜染色核酸。同时使用这两种不同颜色的荧光染料染色凋亡细胞,通过流式细胞仪就能区分凋亡细胞、坏死细胞、凋亡后坏死细胞或是活细胞四个细胞亚群。这就是常用的双染色法。此外,还有染色凋亡细胞内染色质凝集的荧光染料 Hoechst 3342 以及检测天冬半胱酶 (caspase-3) 活性的荧光染料 Z-DEVD-R110,后者的原理为 caspase-3 可特异性地裂解底物氨基酸肽链 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD),使原本无荧光的染料 Z-DEVD-R110 中的罗丹明 110 染料显示出荧光而被流式细胞仪检测。新近发现细胞线粒体膜的去极化是发生细胞凋亡的早期事件。荧光染料 JC-9 是一种线粒体膜电位敏感性的指示剂,当膜电位发生去极化改变时,该染料发射出的红绿荧光强度比率亦发生改变,故可借此通过流式细胞仪检测出凋亡细胞群。

(2) 磁共振光谱仪: ^1H -NMR 光谱主要是检测化学基团上的氢质子的磁共振化学位移值,广泛应用于化学物质的结构鉴定。有研究发现,用该法检测凋亡细胞上的甲基和亚甲基中的氢质子化学移位值较未凋亡细胞明显增加,故可用以区别凋亡细胞和非凋亡细胞。该法简便易行,不必破碎细胞,采用 90MHz 以上的磁共振仪即可测定,是一种较新的测定细胞凋亡的方法。

(3) 电化学分析仪:采用特殊的电极系统分析仪,可测试凋亡细胞的电化学行为。结果发现凋亡细胞的电化学伏安指标明显改变,表现为峰电流的下降以及电子转移速率的降低。该法提供了一种检测早期凋亡细胞内氧化还原系统改变的手段。