

医学科学新进展之一

张凤民 姜晓峰 刘建宇 主编

细胞凋亡 实验技术

Experimental Technique For Apoptosis

哈尔滨出版社

前 言

细胞凋亡 (Apoptosis) 是一种由细胞自身的基因所控制的一种细胞自杀现象, 近年来受到广泛重视。它与生物机体的胚胎发育、肿瘤形成与防治、微生物感染症、神经系统变性疾病、免疫系统的建立与自身免疫病的发生, 以及多种相关疾患的发生密切相关。研究细胞凋亡的现象并阐明其机制, 可望从新的视角或途径, 针对生物个体或生命现象进行探讨, 将有助于解释生命的形成与延续的过程、相应疾患的发生机理以及开发出防治相应疾病的手段或方法等。

《细胞凋亡实验技术》是编者在长期的研究工作的基础上, 总结、归纳和编写的一本简明、实用的研究细胞凋亡的实验手册。包括研究细胞凋亡常用的实验技术和方法, 如细胞凋亡的形态学观察、DNA 断片化的检测、凋亡细胞构成成份的分析、凋亡相关基因、相关酶类的检测方法以及细胞凋亡的 FACS 检测和细胞周期分析法等, 同时对与细胞凋亡有关的 NO 、 Ca^{2+} 的检测方法和细胞凋亡的控制法进行了介绍。在本书编写过程中, 我们力求简单明了、方便实用, 以保证从事细胞凋亡研究的科技工作者、医学生、研究生在实验过程中直接使用。

由于本书的编写时间仓促, 修改时间不足, 加之编者的水平有限, 可能会有一些不足之处, 请广大读者给予批评指正。

编 者

1999. 2

目 录

第一章 细胞凋亡概述	1
第一节 细胞凋亡的概念.....	1
第二节 细胞凋亡形成的分子机制.....	8
第三节 细胞凋亡的生化基础.....	15
第二章 细胞凋亡实验技术的应用领域	20
第一节 细胞凋亡与癌症.....	20
第二节 细胞凋亡与自身免疫性疾病.....	22
第三节 细胞凋亡与微生物感染症.....	24
第四节 细胞凋亡与心脏疾患.....	27
第五节 细胞凋亡与神经变性疾病.....	32
第六节 细胞凋亡与其它内科疾病.....	33
第七节 细胞凋亡与发育.....	37
第三章 细胞凋亡的形态学检查法	40
第一节 细胞凋亡的光学显微镜观察法.....	40
第二节 细胞凋亡的电子显微镜观察法.....	53
第三节 细胞死的判定法.....	63

第四章 细胞凋亡的 DNA 断片化分析法	67
第一节 DNA 断片的琼脂糖凝胶电泳法.....	67
第二节 定量 DNA 断片的离心分离法.....	79
第三节 组织中 DNA 断片化的检出.....	81
第四节 DNA 末端标记法.....	84
第五节 凋亡细胞的微凝胶电泳法.....	91
第五章 凋亡细胞的构成成份分析法	95
第一节 蛋白质的分析法.....	95
第二节 糖链的分析.....	108
第六章 细胞凋亡的 FACS 分析法	122
第一节 细胞膜表面抗原的分析.....	125
第二节 细胞膜表面糖链的分析.....	126
第三节 HL-60 细胞表面 MHC-I 的变化.....	130
第四节 巨噬细胞吞噬凋亡细胞的形态学变化.....	132
第七章 细胞凋亡的细胞周期分析法	137
第一节 同步培养法.....	137
第二节 细胞周期的 FACS 分析法.....	143
第八章 细胞凋亡相关基因的检出法	147

第一节 从悬浮培养细胞中提取 RNA	148
第二节 mRNA 的纯化法 (Oligo-dT 乳胶法)	153
第三节 RNA 印迹杂交法	156
第四节 RT-PCR 技术	170
第五节 与细胞凋亡相关的基因	179
第九章 细胞凋亡相关酶类检测法	182
第一节 DNA 核酸内切酶	182
第二节 蛋白酶	191
第三节 转谷氨酰胺酶	194
第四节 聚 (ADP-核糖) 代谢酶	196
第五节 NAD ⁺ 代谢酶	214
第六节 蛋白激酶 C	225
第七节 腺苷酸环化酶	237
第八节 拓扑异构酶	242
第十章 凋亡细胞中 NO 的测定	246
第一节 细胞凋亡中 NO 的作用	246
第二节 细胞凋亡中 NO 的测定方法	248
第十一章 凋亡细胞中 Ca⁺⁺的测定法	273

第一节 细胞凋亡中 Ca^{++} 的作用·····	273
第二节 凋亡细胞中 Ca^{++} 的测定法·····	274
第十二章 细胞凋亡的控制法·····	281
第一节 细胞凋亡的诱导法·····	281
第二节 细胞凋亡的抑制法·····	297

第一章 细胞凋亡概述

细胞凋亡 (Apoptosis) 是近年发展起来的涉及到生命科学许多学科的一个新的研究领域。简言之细胞凋亡就是细胞死亡的一种形式, 是细胞停止延续和生长的过程, 但细胞凋亡是由细胞本身所具有的自死装置来决定的, 能够使多细胞生物得以维持其复杂的生命过程的一种特殊的细胞死。

细胞凋亡通过比较特殊的机制, 可以在“死”的过程中重新捕捉“生”的结果, 是细胞凋亡科学中极其重要的新的认识。可以说, 细胞凋亡科学就是在“死”的科学基础上所获得的“生”的科学。

第一节 细胞凋亡的概念

多细胞生物的细胞能自动死亡。可以说这种细胞死亡的自杀的现象, 就是细胞凋亡。细胞凋亡是由细胞自身基因控制的细胞死亡, 具有比较高度的控制机制, 这种机制是多细胞生物在长期的进化过程中为保护和延续生命而获得的。细胞凋亡也可以称为是以生命延续为目的的一种细胞自然消灭机制。

一. 细胞凋亡的发现

细胞凋亡 (Apoptosis) 的概念是在 1972 年由病理学家 Kerr、Wyllie 和 Currie 等提出来的。近年, 逐渐被人们所认识并受到广泛重视。通常情况下, 细胞死亡仅是细胞的崩溃现象,

用坏死(Necrosis)来表示。Kerr 等人在用电子显微镜观察和研究趋向死亡的细胞时，发现了一种与坏死之间具有本质上不同的细胞死亡过程。即与细胞坏死过程中的细胞膨胀、崩溃等明显不同，而表现为细胞缩小、细胞核固缩进而细胞核碎裂、形成凋亡小体并被吞噬的过程（图 1-1）。最初这种形式的细胞死亡被称为缩小坏死(Shrinkage Necrosis)，并且认为这种形式的细胞死亡与细胞分裂相似，是被细胞本身高度控制的一种主动细胞死亡的过程。所以在细胞凋亡的命名时采用了与细胞分裂(mitosis)相类似的英文名称 apoptosis。apoptosis 是由 apo (off, 离开) 和 ptosis (falling, 落下) 结合而组成的一个合成词，表示枯叶或花瓣凋零、脱落的样子。意指细胞凋亡过程中的细胞死亡的形式。

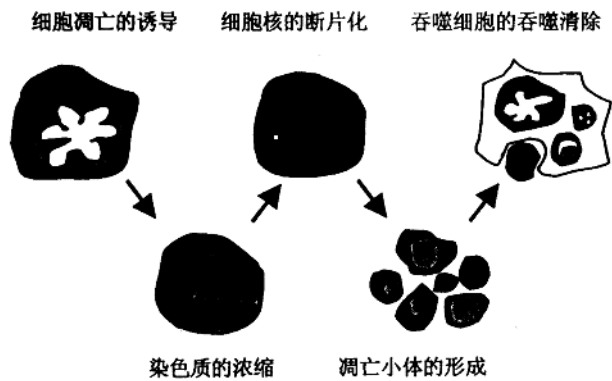


图 1-1 细胞凋亡中的细胞形态学变化过程

细胞凋亡是以细胞核的变化为中心，以其所引起的一系列形态学变化为特征的一种细胞死亡的过程。并且，细胞基因组

DNA 的核酸单位断片化也是一个显著特征（图 1-2），在细胞凋亡研究中被广泛应用。

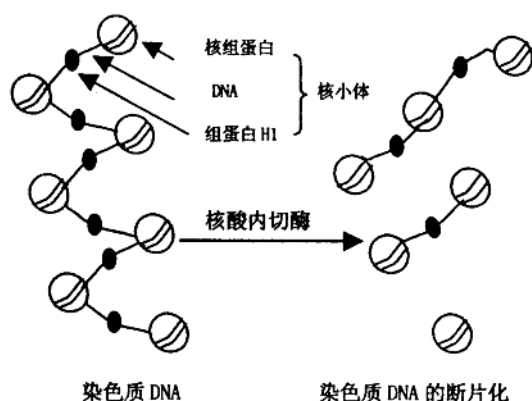


图 1-2 细胞凋亡中的染色体 DNA 的断片化

现在已经清楚，凋亡细胞染色质 DNA 的断片化主要是由于细胞内的 Ca^{++} 、 Mg^{++} 依赖性核酸内切酶活化之后，作用和降解细胞染色体 DNA 形成 180~200bp 大小的核小体单位及其双体或多聚体而形成的。把断片化的 DNA 进行核酸电泳，可以见到细胞凋亡所特有的“梯状带”。

二. 细胞凋亡的现象

构成多细胞生物的细胞，不仅可以通过细胞分裂过程完成细胞的增殖、分化，同时也具有主动死亡的能力（图 1-3）。它与由过度刺激所致的被动的细胞崩溃坏死不同，是一种为了维持

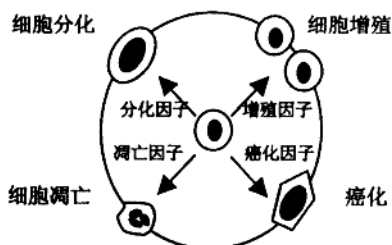


图 1-3 细胞的自主演化方式

生物个体的生命，在生物个体中由细胞本身的基因所控制的不断发生的细胞自动死亡的过程。但这种细胞的自动死亡并不是表示

表 1-1 细胞凋亡所涉及的生理学和病理学现象

生理学现象

胚胎发育	胚胎的形成，神经系统的形成等
正常细胞的更替	血细胞、表皮细胞或上皮细胞的更替等
神经系统	神经营养因子缺乏所致的神经细胞死亡等
内分泌系统	激素等造成的胸腺细胞的死亡等
免疫系统	自身免疫细胞的死亡等

病理学现象

放射线	放射线等造成的胸腺细胞死亡等
病毒感染	HIV 或流感病毒感染所致的细胞死亡等
肿瘤	肿瘤组织内部的肿瘤细胞的死亡等
药物或毒素	抗肿瘤药或细菌毒素所致的细胞死亡等
热	温热疗法等所致的肿瘤细胞死亡等

细胞本身具有“自由”死亡的能力。细胞作为多细胞生物的组成基础，在与外界的信息交换过程中，可以顺应环境的变化而发生自然死亡。细胞凋亡同细胞增殖、分化乃至癌变一样都受细胞本身基因的控制。

通常，肉眼可见的细胞凋亡，只能在生物的胚胎发生期间身体成形时才能见到。例如，蝌蚪变成青蛙时尾巴消失，幼虫变成蝴蝶时担负蠕动的肌肉消失等，都是由细胞凋亡引起的。细胞凋亡不仅发生在生物的胚胎期，在成熟的生物个体中，对正常的细胞的交替、神经系统的和内分泌系统的稳定、免疫系统的多样性和特异性的形成等过程中担负着重要的作用（表 1-1）。

三. 细胞凋亡的特征

用扫描电子显微镜观察细胞凋亡时，可见细胞表面的微绒毛消失、细胞表面平滑以及约 70% 的细胞体积缩小。用透射电子显微镜进行观察，可见到细胞核内染色体的网状结构消失和染色质浓缩，染色体浓缩多在细胞核的核膜周边存在，呈半月状。细胞核浓缩之后，随即出现染色质 DNA 的断片化，并被细胞膜包裹而形成细胞凋亡小体(apoptotic body)。最后，细胞凋亡小体可被相邻的吞噬细胞等吞噬而被排除。

作为细胞凋亡的生化学特征是细胞核染色质 DNA 的断片化以及细胞内 Ca^{2+} 浓度的上升。其中，最显著的特征是细胞核染色质 DNA 核体单位发生断片化，这种 DNA 断片化是细胞凋亡的形态学特征中细胞核染色质浓缩和细胞染色质 DNA 断片化的基础。

细胞染色体 DNA 的断片化形成过程中，一般是先形成 50~200kb 的大断片，然后再形成细胞核核小体单位（约 180bp）的

片断化。另外，核小体的单倍体或二倍体等短的 DNA 断片可以随着细胞凋亡的形成时间而成比例地增加，但并不能完全形成单倍体的断片。

表 1-2 细胞凋亡与细胞坏死的区别

细胞凋亡	细胞坏死
诱因 包括生理性的和病理性的 如：激素水平的异常 生长因子的缺乏 细胞毒 T 细胞的作用 HIV 感染、放射线和 温热及抗癌药作用等	病理性的或非生理性的 如：烧伤、缺血、中毒 病毒的杀细胞感染 放射线的照射作用 补体的攻击作用 药物的过量使用等
过程 细胞体积的缩小 细胞表面微绒毛消失 核小体单位的 DNA 断片化 细胞染色质的浓缩 细胞的碎裂等	线粒体和溶酶体的膨胀 离子传递系统的破坏 DNA 的随机分解 细胞的膨胀与溶解 细胞内容物的漏出等
特征 受基因控制的细胞死亡 主动的自死过程 在组织内散在地发生 短时间内迅速地完成	不受基因控制的细胞死亡 被动的溶解过程 在组织内广泛地发生 长时间内逐渐地完成

在细胞凋亡的形成过程中，凋亡细胞的细胞核可以发生显著的变化，但细胞质中存在的细胞器，通常不发生变化而保持正常状态。在组织内细胞凋亡是以散发状态形成的，并且可以在数小时内迅速地完成。该过程可被 RNA 或蛋白质的合成阻断剂等抑

制。另外，细胞凋亡形成时细胞通常形成凋亡小体，因细胞内容物包裹在细胞膜中而不能漏出，故不能产生炎症，邻近的组织细胞可以不受影响而保持正常的状态，在吞噬细胞的作用下只有凋亡的细胞被清除。然而，细胞坏死的情况则与此不同，由于坏死的细胞发生溶解后，大量细胞内容物的流出，可吸引白细胞的趋化和浸润。因此，通常可引起邻近组织细胞发生炎症反应。所以说细胞凋亡与细胞坏死是两种完全不同的细胞死亡的方式（表1-2）。

细胞凋亡的诱因包括有生物学的诱因（如激素、病毒和细菌感染、细胞因子的作用以及生长因子的缺乏等）和理化学的诱因（放射线、温热以及药物、毒素的作用等）。在这些诱因的作用下，细胞可以在自身基因的控制下识别和接受相应的信号、启动细胞内的自死装置而发生细胞凋亡。由于引起细胞坏死的某些诱因同样也可以引起细胞凋亡，所以单纯根据作用诱因的不同是难以准确地判定细胞死亡的方式的。除了作用诱因之外，细胞死亡的方式还受诱因作用的强度和被作用细胞的状态等影响。但是，有一个显著的区别就是，细胞凋亡受细胞基因的控制，而细胞坏死不受细胞基因的控制和影响。

四. 细胞凋亡的生物学意义

细胞凋亡涉及到每个生物个体的从受精、发育成熟、直到老化等的所有生命活动和生命现象。当细胞凋亡的机制发生异常时，可以造成某些生物个体发生畸形、肿瘤和免疫缺陷等各种疾病（表1-3）。

可以认为，细胞凋亡具有两方面的生物学功能，（1）具有在胚胎发育过程中或成熟个体中，除去机体内不需要细胞的控制

功能；(2) 具有在机体细胞发生自然变异或受损而形成成为异常细胞时，处理和排除该异常细胞的防御功能。

表 1-3 细胞凋亡在机体生命活动中的功能

	受 精	发育成熟	老 化
正常功能	调控 胚胎形成 神经发育 防御 癌细胞清除	内分泌系统的稳定 免疫系统的发育 病毒感染细胞清除	正常细胞的更替 神经系统的稳定
异常功能	抑制 畸形 亢进 神经变性疾患	自身免疫病 免疫缺陷	肿瘤 组织萎缩

细胞凋亡在本质上是一种自身消除机制，通过该机制来控制多细胞生物或排除发生了基因型(genotype)变异的细胞，以保持种的存续的可能。尽管，细胞具有修复损伤（包括基因水平的损伤）的能力，但这种修复损伤的能力对生物个体本身生存乃至生物种的保存来说，带有一定的危险性，而排除那些损伤的细胞对生物个体以及生物的种系延续来说更为安全。

因此，如果说细胞凋亡是一种细胞的死亡方式，倒不如说是多细胞生物在其进化过程中，为维持生物个体的生存和保存物种而主动排除不需要细胞和异常细胞的一种机体的调控和防御方式或策略。任何种类的生物细胞都具有自动死亡的机制，通过细胞凋亡来保障生物个体的生存是保存生物种的最适宜的方法。

第二节 细胞凋亡形成的分子机制

目前，有关细胞凋亡的分子机制尚未完全明了，通常可把细胞凋亡的形成过程分为3个阶段（图1-4）。

第1阶段是各种细胞凋亡相关信号作用相应细胞并诱导细胞凋亡的诱导阶段；第2阶段是细胞接受了相关的细胞凋亡信号并启动细胞凋亡开关的启动阶段，此后即可进入不可逆的细胞凋亡的形成阶段；第3阶段是启动了细胞凋亡开关的细胞出现相应的细胞凋亡的变化而形成细胞凋亡的形成阶段。

对于细胞凋亡的诱导阶段和启动阶段来说，可以因为细胞凋亡相关信号的种类以及被作用细胞的种类和状态的不同而表现出多种多样的形式；但是，在细胞凋亡进入了形成阶段以后，则所有的细胞均表现出几乎完全相同的变化形式，即出现以细胞的

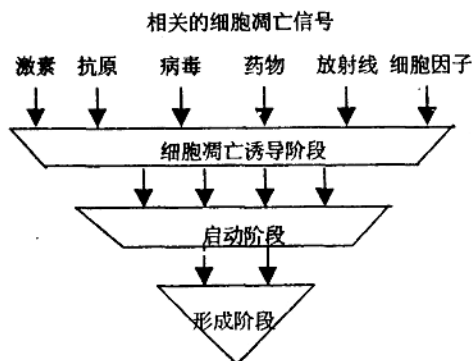


图 1-4 细胞凋亡的形成过程

缩小、细胞核染色质浓缩、DNA 断片化以及凋亡小体形成等为中心的细胞凋亡的共有现象。可以认为，在细胞凋亡形成过程中，

不同的细胞凋亡相关信号作用细胞，诱导和启动细胞凋亡开关之后，可归结为一个共有的细胞凋亡形成过程。

一. 细胞凋亡形成的诱导机制

通常，细胞凋亡相关信号中的第一级信号多数是通过细胞膜上的特异受体向细胞传达死亡信息的。例如，TNF 和 Fas 配体等就可以通过各自的特异受体直接向细胞内传达细胞凋亡的信息。这种细胞凋亡的第一级信号通过相应的受体传递到相应的细胞内以后，可能是通过相应细胞所具有的 T 细胞受体系统、蛋白激酶系统、Ca²⁺通道以及 G 蛋白系统等信号系统来完成细胞内信息传递的。

作为细胞凋亡的外在诱因，包括有生理学诱因（如糖皮质激素、病毒感染以及细胞增殖与分化过程中所必需的细胞因子或生长因子等的缺乏等）和非生理学诱因（如放射线、温热、抗癌药、病毒和细菌感染以及毒素的作用等）。

然而，作为细胞凋亡的内在诱因主要是指被作用细胞的状态（增殖状态 / 分化状态）的差异，包括细胞内 Ca²⁺的浓度以及核酸代谢、氨基酸代谢、能量代谢和 NAD⁺-聚(ADP-核糖)代谢等系统的变化。不同的宿主细胞的条件，可以影响细胞凋亡的形成。

细胞凋亡是在各种各样的内在和外在诱因的作用下，通过极其复杂的信号传递和调控机制而完成的。如糖皮质激素可以通过抑制白细胞介素 2 (IL-2) 的产生，来诱导胸腺细胞的细胞凋亡；γ 射线照射细胞引起 DNA 断片化，与其激活核酸内切酶的作用有关；病毒感染细胞发生细胞凋亡的机制比较复杂，一方面宿主细胞的分化状态等可以影响细胞凋亡的形成，另一方面病毒所

形成的蛋白质有的可以抑制细胞凋亡的发生，有的可以促进细胞凋亡的发生，当病毒与宿主细胞相互作用，达到一定状态时可以形成细胞凋亡。

细胞接受细胞凋亡诱导因素作用后，可接受和传递细胞凋亡的信号。其信号传递系统主要包括有（1）T 细胞受体通路：是胸腺细胞成熟、克隆选择和激活的过程中发生细胞凋亡的信号传递通路，与免疫应答、免疫耐受以及自身免疫病的发生等关系密切；（2）蛋白激酶 C 通路：蛋白激酶 C 具有多种同功酶，可以在佛波酯等激活剂作用下活化，而发挥诱导细胞凋亡的活性，并且蛋白激酶 C 通路可以作为多种细胞细胞凋亡传递信号的一个共同通路；（3）G 结合蛋白通路：是亲核性诱导因素诱导细胞发生细胞凋亡的信号传递通路，该通路发挥信号传递作用与细胞内 ras 等癌基因活化、激活 cAMP 等机制有关；（4）Ca²⁺通路：是一种涉及到糖皮质激素、Ca²⁺诱导物、T 细胞受体等多种细胞凋亡诱导剂的信号传递的途径。Ca²⁺作为信号传递介质可以活化核酸内切酶而引起细胞凋亡，并且放线菌酮等可以通过抑制 Ca²⁺的作用而抑制细胞凋亡；（5）Apo-1/Fas 通路：当相应的细胞表面不能表达出正常的 Apo-1/Fas 抗原，可以阻止相应的细胞凋亡信号的传递，而发生细胞凋亡。

二. 细胞凋亡形成的启动机制

研究表明，许多可以启动细胞凋亡形成的决定性基因，就是肿瘤相关基因（包括癌基因和抑癌基因等）。这些肿瘤相关基因及其产物直接参与细胞凋亡的形成，在分子水平上对细胞凋亡的形成进行调控。