

细胞凋亡

—检测原理、方法和技術

Cell Apoptosis—The Detecting Principles, Methods and Technologies

黄汉昌 / 著



 吉林大学出版社

细胞凋亡

—检测原理、方法和技术

黄汉昌 / 著

图书在版编目(CIP)数据

细胞凋亡：检测原理、方法和技术/黄汉昌著. —
长春：吉林大学出版社，2017. 4

ISBN 978-7-5677-9768-0

I. ①细… II. ①黄… III. ①细胞—死亡—研究
IV. ①Q255

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 111935 号

书 名 细胞凋亡：检测原理、方法和技术
XIBAO DIAOWANG : JIANCE YUANLI, FANGFA HE JISHU

作 者 黄汉昌 著
策划编辑 孟亚黎
责任编辑 孟亚黎
责任校对 樊俊恒
装帧设计 马静静
出版发行 吉林大学出版社
社 址 长春市朝阳区明德路 501 号
邮政编码 130021
发行电话 0431—89580028/29/21
网 址 <http://www.jlup.com.cn>
电子邮箱 jlup@mail.jlu.edu.cn
印 刷 三河市天润建兴印务有限公司
开 本 787×1092 1/16
印 张 14
字 数 181 千字
版 次 2018 年 1 月 第 1 版
印 次 2018 年 1 月 第 1 次
书 号 ISBN 978-7-5677-9768-0
定 价 48.00 元

前 言

细胞是构成生命有机体的基本单位,绝大部分的生化反应都是在细胞内进行的。为维持机体自身的完整性及保持体内微环境的稳定性,多细胞生物必须具有调控自身细胞增殖和死亡的能力。细胞死亡的诱导、发展、调控与人类健康和疾病发展密切相关,近年来对细胞死亡调控的研究已成为生命科学的研究热点之一。细胞凋亡是细胞程序性死亡的一种方式,内源或外源性的凋亡诱导因素通过多种途径引起细胞凋亡的发生,细胞在凋亡过程中发生一系列的凋亡标志性事件。

本书首先从细胞凋亡形态特征、发生途径、凋亡进程及信号调控等角度阐释细胞凋亡的细胞、分子生物学本质;其次从细胞凋亡检测分析的角度,多侧面地介绍了细胞凋亡的检测原理、方法和技术。

本书兼备基本原理和实验技术,可供细胞生物学、分子生物学、基础医学等领域的高年级本科生、研究生和其他研究人员阅读参考。

生命科学领域研究日新月异,研究方法、实验仪器设备也不断提高,本书对细胞凋亡研究及相关检测分析方法的最新进展难免有遗漏之处,另外由于时间仓促和水平有限,书中也难免存在错误之处,恳请读者指正。本书的出版得到了国家自然科学基金面上项目(31471587)的支持,在此表示衷心的感谢。

作者
2017年3月

目 录

第一章 绪 论	1
第一节 细胞坏死	2
第二节 细胞程序性死亡	4
第三节 细胞凋亡	5
第四节 细胞凋亡的生理学意义	10
第五节 细胞凋亡异常与疾病发生	11
第二章 细胞凋亡的进程	12
第一节 细胞凋亡进程概述	12
第二节 细胞凋亡早期	14
第三节 细胞凋亡晚期	16
第四节 凋亡细胞的吞噬	17
第三章 细胞凋亡的形态发生及事件	20
第一节 细胞形态的变化	20
第二节 细胞核的变化	23
第三节 细胞膜早期分子变化	27
第四节 线粒体膜电位变化	29
第五节 自由基代谢异常	34
第四章 细胞凋亡的发生途径	42
第一节 外源性凋亡途径	43
第二节 细胞凋亡线粒体途径	46
第三节 细胞凋亡内质网应激途径	50
第五章 细胞凋亡的信号调控	55
第一节 调控细胞凋亡的主要基因及因子	55

▶ 细胞凋亡: 检测原理、方法和技术

第二节	信息传递与细胞凋亡	71
第三节	胞内 Ca^{2+} 与细胞凋亡	81
第四节	Caspases 酶与细胞凋亡	89
第六章	细胞凋亡的研究方法概述	96
第一节	凋亡和坏死的区分	97
第二节	细胞凋亡的定性和定量检测方法	97
第三节	样品来源与检测方法选择	97
第四节	不同阶段细胞凋亡的检测	98
第七章	凋亡细胞样品制作	102
第一节	病理组织	102
第二节	离体组织分离	109
第三节	原代细胞培养	112
第四节	传代细胞培养	113
第八章	细胞凋亡的形态学观察	116
第一节	检测原理	116
第二节	实验方案	121
第九章	胞内活性氧检测方法和技术	130
第一节	检测原理	130
第二节	实验方案	131
第十章	线粒体膜电位检测方法和技术	135
第一节	检测原理	135
第二节	实验方案	137
第十一章	细胞色素 C 释放检测方法和技术	142
第一节	检测原理	142
第二节	实验方案	143
第十二章	Caspases 酶活性检测方法和技术	149
第一节	检测原理	149
第二节	实验方案	154
第十三章	活细胞内游离 Ca^{2+} 检测方法和技术	160
第一节	检测原理	160

第二节 实验方案.....	168
第十四章 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡原理和 方法.....	174
第一节 检测原理.....	174
第二节 实验方案.....	176
第十五章 DNA 损伤分析方法和技术	181
第一节 检测原理.....	181
第二节 实验方案.....	187
参考文献	204

第一章 绪 论

细胞是生物体基本的结构和功能单位,目前已经知道除病毒之外的所有生物均由细胞组成,但病毒生命活动也必须在细胞中才能体现。多细胞生物的生存依赖于各种细胞类型的分化和功能协调。一旦发育过程完成,生物体的生存则依赖于这些细胞的维持和再生。

多细胞生物为维持其自身的完整性及保持机体内环境的稳定,必须具有调控自身细胞增殖和死亡之间平衡的能力,细胞数目的控制是细胞生殖和细胞死亡二者平衡的结果。细胞增殖和死亡之间的平衡由机体内一系列复杂的调控系统来完成,也即生长因子诱导的细胞生长信号和生长抑制因子诱导的细胞死亡信号之间的选择来控制。长期以来,生命科学研究的重点是细胞增殖、活细胞的功能及其调控。近年来对细胞死亡调控的研究已成为热点,细胞死亡的诱导、发展及调控与人类健康和疾病有着密切的关系。

细胞死亡是生物界普遍存在的现象,不同于机体的死亡,正常组织中,每天都有许多细胞发生死亡。细胞的死亡形式多种多样,在分子生物学兴起以前,细胞死亡的分类主要基于形态学,自20世纪50年代分子生物学兴起后,在细胞死亡分子机制方面的研究取得了长足的进步,对细胞死亡的分子生物学研究使得死亡的分类更加科学化。但是,由于认识的局限性,细胞死亡分类的现状是形态和机制并存。

细胞死亡有多种方式,根据死亡细胞形态学上的差异,可将细胞死亡方式分为细胞坏死和程序性死亡(Programmed Cell

Death, PCD)。细胞坏死是细胞受到环境因素的影响时,细胞的被动死亡过程;程序性死亡是为维持机体内环境的稳定,细胞发生主动的自我消亡过程,此过程需要消耗能量。

第一节 细胞坏死

细胞坏死是细胞在受到环境中的物理(如高温、辐射)、化学(如强酸、强碱、有毒物质)或者生物因素(如缺氧、病原体感染)刺激时所发生的细胞被动死亡。

细胞坏死在形态学主要表现为胞膜的破坏、细胞及细胞器水肿(胞浆泡化)。坏死细胞的形态改变主要是由蛋白酶降解和蛋白质变性两种病理过程引起的,在细胞水平上,坏死细胞的主要特征有:

(1)溶酶体、线粒体、内质网等细胞器肿胀崩解。

(2)结构脂滴游离、空泡化。

(3)随着嗜碱性核蛋白的降解,细胞质呈现强嗜酸性,原有的微细结构消失。

(4)细胞核发生固缩或断裂,后期染色质 DNA 随机性降解。

(5)胞膜通透性增加,胞内水泡不断增大,细胞结构消失,细胞肿胀直至最后破裂。

(6)细胞破裂有内容物流出,引起周围组织的炎症反应。

细胞死亡后,细胞内容物及前炎症因子释放,趋化炎症细胞浸润引起炎症,以去除有害因素及坏死细胞并进行组织重建;在组织愈合过程中常伴随组织器官的纤维化,形成瘢痕。细胞坏死是一种“不安全”的细胞死亡方式,往往会导致细胞内的质膜破裂,细胞自溶,引发组织急性炎症(如心肌缺血坏死可能导致急性心肌炎症)。

引起细胞发生坏死的因素很多,如病原体、电离辐射、组织缺血缺氧等。细菌毒素除直接引起细胞坏死外,还可通过免疫反应

(如补体)激活自然杀伤细胞和巨噬细胞或释放细胞因子引起细胞坏死。在病理条件下,如组织缺血、缺氧等,细胞不适当地分泌细胞因子(如 NO 和 ROS 等)也容易引起细胞坏死。

按发生的时间急剧程度,细胞坏死可分为急性坏死和慢性坏死。生物体由于遇到突然的损伤引起,如车祸对人体组织的伤害,引起细胞结构的破坏出现严重的坏死性反应而死亡。在多数情况下,坏死性细胞死亡是一种急性的、不可逆的和被动的过程,具有代谢功能丢失和细胞完整性遭到破坏的特点。慢性坏死是缓慢发生的死亡过程,与其他细胞死亡的类型有一定的关系,例如细胞凋亡与细胞坏死可以互相转换。在细胞毒性物质作用下,当含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspases)活性被抑制导致细胞凋亡受阻时,细胞发生坏死。有研究报道,受体相互作用蛋白 3(Receptor Interacting Protein Kinase-3, RIP3)就是一个控制细胞凋亡或坏死的生物学开关, RIP3 蛋白的表达量是控制细胞凋亡或细胞坏死的关键;如果 RIP3 表达量高细胞则走向坏死路径, RIP3 表达量低细胞则走向凋亡路径。细胞能量代谢的调节也会影响细胞选择不同的死亡方式。

在认识的早期,细胞坏死被认为是非程序性细胞死亡的形式,但随着细胞生物学及分子生物学研究的深入,发现有些细胞坏死也具有诱导因子和调控靶点,能由细胞信号通路介导,其中肿瘤坏死因子 α (Tumor Necrosis Factor Alpha, $TNF\alpha$)是目前研究最多的细胞程序性坏死诱导因子。 $TNF\alpha$ 是一种多效的细胞因子,既能在低水平时活化细胞内的存活信号通路,也能作为死亡配体来激活死亡受体凋亡信号通路,从而诱导细胞凋亡。受体相互作用蛋白 1(Receptor Interacting Protein Kinase-1, RIP1)的抑制剂特异性(Necrostatin-1)能够抑制 Fas/ $TNFR$ 引起的坏死,但对凋亡没有抑制作用,这种死亡方式被称为坏死性凋亡(Necroptosis)。坏死性凋亡死亡方式在缺血性脑损伤的小鼠模型中扮演了重要角色。因此,细胞程序性坏死可能是在细胞凋亡被抑制的情况下发生的细胞死亡方式。

目前研究比较清楚的程序性细胞坏死信号主要由肿瘤坏死因子受体(Tumor Necrosis Factor Receptor, TNFR)家族以及 Toll 样受体(Toll-like Receptor, TLR)家族启动的,并通过与受体蛋白互作的两个蛋白激酶 RIP1/RIP3 传递死亡信号,RIP3 的特异性底物蛋白 MLKL(Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein)被募集并磷酸化,磷酸化的 MLKL 作为细胞死亡的执行者,最终导致坏死的发生。坏死的细胞向周围释放其内容物,这些内容物可刺激周围细胞发生炎症反应,激活机体免疫应答。

第二节 细胞程序性死亡

程序性细胞死亡,即细胞在一定的生理或病理条件下,遵循特定的程序,结束自身生命的过程。程序性细胞死亡是受基因控制的一种细胞死亡方式,是生物体在漫长进化过程中逐步建立起来的“自杀机制”。

早期的细胞死亡研究主要是基于形态学的,主要是基于细胞核和细胞膜在细胞死亡过程中的变化。基于形态学的分类,通常将程序性细胞死亡大致分为细胞凋亡(Apoptosis)、凋亡样程序性细胞死亡和坏死样程序性细胞死亡。目前仍在广泛应用的克拉克(Clarke)细胞死亡分类也是基于形态学的,克拉克分类将程序性细胞死亡分为Ⅰ类、Ⅱ类和Ⅲ类。Ⅰ类程序性细胞死亡是细胞凋亡,这类死亡一般没有溶酶体的参与,且死后会被吞噬细胞所吞噬。Ⅱ类程序性细胞死亡是自吞噬性程序性死亡,其主要的形态学特征是自吞噬泡的形成,自吞噬泡和溶酶体融合后被消化,细胞残骸被吞噬细胞吞噬。Ⅲ类程序性细胞死亡是坏死样程序性细胞死亡,其主要的形态学特征是各种细胞器的肿胀、胞膜的破坏等,这类细胞死亡没有溶酶体的参与,细胞器的肿胀表现比较明显,而且死亡后会被吞噬细胞吞噬。

随着细胞生物学与分子生物学的发展,很多细胞死亡的方式

机制也逐渐被揭示开来,基于死亡机制可以将程序性细胞死亡分为两大类:含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)依赖的程序性细胞死亡和 Caspase 非依赖的程序性细胞死亡。前者是典型的细胞凋亡(Apoptosis),后者包括自吞噬性程序性细胞死亡(Autophagic Cell Death)、类凋亡(Paraptosis)、细胞有丝分裂灾难(Mitotic Catastrophe)、胀亡(Oncosis)等。

典型的细胞程序性死亡形态学特征主要表现为:细胞膜完整、没有前炎症因子等细胞内容物的释放,因而不会引起炎症反应。诱发细胞程序性死亡的因素很多,包括体外因素,如射线、药物和病毒感染等;体内因素,如肿瘤、自身免疫病和退行性病变等。

表 1-1 形态学分类与机制分类的关系

基于机制的分类	基于细胞形态学改变的分类	克拉克分类
凋亡	凋亡,凋亡样程序性细胞死亡	I 型
自吞噬性程序性细胞死亡	凋亡样程序性细胞死亡	II 型
类凋亡	坏死样程序性细胞死亡	III 型
细胞有丝分裂灾难	凋亡	I 型
胀亡	坏死样程序性细胞死亡	III 型

第三节 细胞凋亡

细胞凋亡(Apoptosis)是细胞程序性死亡的一种方式,机体细胞在发育过程中或在某些因素作用下,通过细胞内基因及其产物的调控而发生的一种程序性细胞死亡。细胞凋亡涉及一系列基因的激活、表达以及调控作用。细胞发生凋亡时,就像树叶或花的自然凋落一样,对于这种生物学观察,借用古希腊语“Apoptosis”来表示,意思是像树叶或花的自然凋落,细胞到了一定时期会像树叶那样自然死亡。

在形态学上,细胞凋亡主要的表现特征有:①细胞浆浓缩、细胞体积缩小,核糖体、线粒体等聚集;②染色质逐渐凝聚、分块、成新月状附于核膜周边,细胞核固缩呈均一的致密物,进而断裂为大小不一的片段;③胞膜不断出芽、脱落形成由胞膜包裹的多个凋亡小体(Apoptotic Bodies);④凋亡小体被具有吞噬功能的细胞如巨噬细胞、上皮细胞等吞噬、降解;⑤凋亡发生过程中,溶酶体和细胞膜保持完整,细胞内容物不释放出来,不引起炎症反应。

一、凋亡与坏死的区别

虽然细胞凋亡与坏死最终均导致细胞的死亡,但它们的发生机理、过程与表现却有很大差别,见图 1-1 和表 1-2。

坏死是细胞受到强烈理化或生物因素作用引起细胞无序变化的死亡过程。表现为细胞胀大,胞膜破裂,细胞内容物外溢,核变化较慢,DNA 降解不充分,引起局部严重的炎症反应。

凋亡是细胞对环境的生理性、病理性刺激信号,环境条件的变化或缓和性损伤产生由细胞基因控制的应答有序变化的死亡过程。

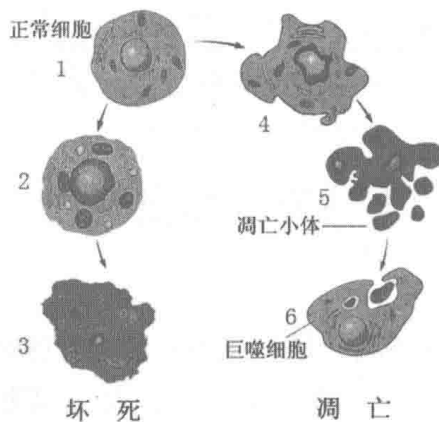


图 1-1 坏死与凋亡的对比

细胞坏死:细胞和细胞器肿胀、核染色质边集;细胞膜、细胞器膜和核膜破裂、崩解、自溶。

细胞凋亡:细胞和细胞器皱缩,胞质致密,核染色质边集;胞质分叶状突起并形成多个凋亡小体,并与胞体分离;邻近巨噬细

胞等包裹、吞噬凋亡小体。

另外,胞内 ATP 水平可能也与细胞死亡方式相关,有研究发现,正常增殖生长的细胞内 ADP : ATP 比值 < 0.11 ,发生凋亡的细胞内 ADP : ATP 比值为 $0.11 \sim 1.0$,而热休克诱导的坏死细胞内 ADP : ATP 比值超过 15.0 。

表 1-2 细胞凋亡与坏死的区别

	凋亡	坏死
发生机制	基因调控的程序化 (Programmed) 细胞死亡,主动进行(自杀性)	意外事故性 (Accident) 细胞死亡,被动进行(他杀性)
诱导因素	生理性或轻微病理性刺激因子诱导发生,如生长因子缺乏	病理性刺激因子诱导发生,如缺氧、感染、中毒
死亡范围	多为散在的单个细胞	多为聚集的大片细胞
形态特征	细胞固缩,核染色质边集,细胞膜及各细胞器膜完整,膜可发泡成芽,形成凋亡小体	细胞肿胀,核染色质絮状或边集,细胞膜及各细胞器膜溶解破坏,溶酶体酶释放,细胞自溶
生化特征	耗能的主动过程,有新蛋白合成, DNA 早期规律降解为 $180 \sim 200\text{bp}$ 片段,琼脂凝胶电泳呈特征性梯带状	不耗能的被动过程,无新蛋白合成, DNA 降解不规律,片段大小不一,琼脂凝胶电泳不呈梯带状
周围反应	不引起周围组织炎症反应和修复再生,但凋亡小体可被邻近细胞吞噬	引起周围组织炎症反应和修复再生

二、细胞凋亡过程

在受到凋亡诱导因素刺激后,细胞启动凋亡信号,通过信号转导等方式传递细胞凋亡信息、执行细胞凋亡的程序,最后凋亡的细胞被吞噬和分解、完成细胞凋亡过程。

细胞凋亡的过程大致可分为以下几个阶段:接受凋亡信号→凋亡调控分子间的相互作用→蛋白水解酶的活化→进入连续反应过程→细胞被吞噬。

细胞凋亡的启动是细胞在感受到相应的信号刺激后胞内一系列控制开关的开启或关闭,不同的外界因素启动凋亡的方式不同,所引起的信号转导也不相同。目前比较清楚的通路主要有:①细胞凋亡的膜受体通路:各种外界因素是细胞凋亡的启动剂,它们可以通过信号传递系统传递凋亡信号,引起细胞凋亡;②细胞色素 C 释放和 Caspases 激活的生物化学途径;③内质网应激- Ca^{2+} 释放途径。

在大多数组织中,细胞生存依赖于邻近细胞或细胞外基质的生存信息的不断刺激,如果把细胞培养在缺少外源性生存因子环境中,细胞则走向凋亡。除了缺乏细胞生长因子能抑制凋亡的发生外,有很多因素能影响细胞凋亡的进行。表 1-3 中列举了一些细胞凋亡诱导因素诱导剂。

表 1-3 细胞凋亡抑制诱导剂

生理性诱导剂	与伤害有关的诱导因素	毒素
TNF 家族	热激	放线菌酮
Fas 配体	肿瘤抑制基因	布雷菲德菌素 A
转化生长因子	杀伤 T 细胞	离子载体[如缬氨霉素、离子霉素、羰基-氰-对-三氟甲氧基苯肼(FCCP)]
神经递质	氧化	DNA 拓扑异构酶抑制剂(如喜树碱)
谷氨酸转氨酶	自由基	秋水仙碱
休眠素	脱氮	顺铂
N-甲基-D-天冬氨酸	X-射线	衣霉素
生长抑制剂	紫外线	地塞米松
Ca^{2+}	缺氧	毒胡萝卜素
糖皮质激素	缺血	雷公藤甲素

三、细胞凋亡研究历程

(一) 凋亡概念的形成

1965年澳大利亚科学家 John Kerr 发现,结扎鼠门静脉后,电镜观察到肝实质组织中存在一些散在的显然不同于细胞坏死的死亡细胞,这些死亡细胞的溶酶体并未被破坏,细胞体积收缩、染色质凝集,从其周围的组织中脱落并被吞噬,机体无炎症反应,其称这种细胞死亡方式为“Shrinkage Necrosis”。1972年 John Kerr 等首次采用希腊语“Apoptosis”提出了细胞凋亡的概念,宣告了对细胞凋亡的真正探索的开始。在此之前,关于胚胎发育生物学、免疫系统的研究,肝细胞死亡的研究为这一概念的提出奠定了基础。

(二) 细胞凋亡的形态学及生物化学研究阶段

(1) 利用光镜和电镜对形态学特征进行了详细的研究。

(2) 染色体 DNA 的降解:细胞凋亡的一个显著特征就是细胞染色质的 DNA 降解。

(3) RNA/蛋白质大分子的合成。

(4) 钙离子变化,细胞内钙离子浓度的升高是细胞发生凋亡的一个重要条件。

(5) 内源性核酸内切酶:细胞发生凋亡需要这种核酸内切酶参与。

(三) 细胞凋亡的分子生物学研究阶段

(1) 与细胞凋亡的相关基因及调控。

(2) 细胞凋亡的信号转导。

(四) 细胞凋亡的临床应用基础研究阶段

细胞凋亡研究的生命力在于最终能够有利于疾病机制的阐

明、新疗法的探索及应用。

第四节 细胞凋亡的生理学意义

细胞凋亡是细胞的一种基本生物学现象，在多细胞生物去除不需要的或异常的细胞中起着必要的作用，它在生物体的进化、内环境的稳定以及多个系统的发育中起着重要的作用。细胞凋亡对胚胎发育及形态发生(Morphogenesis)、组织内正常细胞群的稳定、机体的防御和免疫反应、疾病或中毒时引起的细胞损伤、老化、肿瘤的发生进展起着重要作用，并具有潜在的治疗意义，至今仍是生物医学研究的热点。

细胞凋亡是维持人体正常生理过程和功能所必需的，其具有重要的生物学作用，主要表现在以下几方面：

(1) 确保正常生长发育：清除生长发育过程中的多余细胞或老化细胞，这种细胞大多在发育早期阶段死亡，例如，人胚胎肢芽发育过程中的指(趾)间组织通过细胞凋亡机制而被逐渐消除，形成指(趾)间隙。

(2) 维持机体内环境稳定：细胞凋亡参与了正常成年组织细胞更新(如上皮组织、血细胞的更新，衰老细胞的清除)、生理器官的内分泌调控(如子宫产后复原，月经期子宫内膜的脱落)以及对受损不能修复的细胞或突变细胞的清除等重要生理过程。

(3) 发挥积极的防御功能：当机体受到病原微生物感染时，宿主细胞发生主动凋亡。机体以牺牲自身个别细胞来清除外来物，保持自身整体的稳定，起到宿主防御作用。

总的来说，细胞凋亡与生命体的生长发育、机体防疫、损伤和衰老细胞的清除，以及癌细胞的防止发生和扩散有着密切的关系，是细胞的一种基本生物学现象。另外，细胞凋亡不仅是一种特殊的细胞死亡类型，而且具有重要的生物学意义及复杂的分子生物学机制。