

被注射重组腺病毒后,酶活性持续表达 1 a^[14]. 第四,重组腺病毒载体应能特异性地针对和进入特异的组织或器官,并且一旦到达目的细胞,应能安全地整合到染色体的非关键位点上,或者与试图替代的缺陷基因发生同源重组.载体的针对性受病毒嗜性(tropism)的限制,腺病毒是通过受体途径感染宿主细胞的,在某些类型的细胞(如分化的肌细胞)因不具有腺病毒受体,故载体不易将基因转移到这类细胞中去^[17].第五,导入基因应有对血液或细胞代谢物的生理变化起反应的能力,将转基因产物维持在正常的生理浓度水平.例如,在糖尿病的基因治疗中,血糖浓度的升降应可被经基因工程适当处理的胰岛素基因所感知和反应^[3].

参 考 文 献

- 1 侯云德. 分子病毒学, 第1版. 北京: 学苑出版社, 1990; 151~180
- 2 Graham F L, Prevec L. In: Murray E J ed. Methods in molecular biology. New York: The Human Press Inc, 1991; 7: 109~128
- 3 Morgan R A. Annu Rev Biochem, 1993; 62: 191
- 4 Haj-Ahmad Y, Graham F L. J Virol, 1986; 57: 267
- 5 Dewar R L, Natarajan V, Vasudevachari M B *et al.* J Virol, 1989; 63: 129
- 6 McGrory W J, Bautista D S, Graham F L. Virology, 1988; 163: 614
- 7 Rosenfeld M A, Siegfried W, Yoshimura K *et al.* Science, 1991; 252: 431
- 8 Rosenfeld M A, Yoshimura K, Trapnell B C *et al.* Cell, 1992; 68: 143
- 9 Gomez-Foix A M, Coats W S, Baque S *et al.* J Biol

Chem, 1992; 267: 25129

- 10 Kay M A, Landen C N, Rothenberg S R *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91: 2353
- 11 Chen S-H, Shine H D, Goodman J C *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91: 3054
- 12 Deneffe P P. Atherosclerosis, 1994; 109: 178
- 13 Herz J, Gerard R D. Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90: 2812
- 14 Ishibashi S, Brown M S, Goldstein J L *et al.* J Clin Invest, 1993; 92: 883
- 15 Hedrick C C. Atherosclerosis, 1994; 109: 105
- 16 Miller A D. Nature, 1992; 357: 455
- 17 Michael S I, Curiel D T. Gene Therapy, 1994; 1: 223

Adenovirus Vectors and Their Applications in the Studies of Gene Therapy. Jiang Chuancang, Fan Leming (*Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China*).

Abstract The adenovirus vectors have begun to show importance in the researches of gene therapy, and have therefore attracted the attention of public. A fuller description is given on the basic structure of adenovirus genome, the classification and the construction of the adenovirus vectors, the applications of the recombinant adenovirus, as well as their advantages and disadvantages in use of gene therapy.

Key words adenovirus, gene therapy, expressional vector

自由基与细胞凋亡

惠宏襄 赵小宁¹⁾ 金明 王成济 莫简¹⁾

(第四军医大学生物化学教研室, 西安 710032)

摘要 细胞凋亡是指细胞在生理和病理情况下的一种死亡模式, 广泛涉及到肿瘤、衰老和退行性病变等一系列疾病. 最近有实验表明自由基与细胞凋亡有密切的关系. 凋亡细胞内活性氧自由基(ROS)生成

¹⁾第四军医大学化学教研室. 收稿日期: 1994-12-17, 修回日期: 1995-05-08

增加,同时消除 ROS 的能力下降.大多数凋亡障碍的细胞表现出 ROS 分子大量减少,若调节细胞内 ROS 含量,死亡率能随之改变;离子辐射能通过羟自由基引起细胞的凋亡,培养细胞在无血清或撤除生长因子后发生的死亡也大多与细胞内自由基代谢酶如过氧化氢酶等的活性变化有关.提示自由基是参与调节细胞凋亡的重要因素之一.

关键词 细胞凋亡,自由基,基因,肿瘤

生长、分化和死亡是细胞生命活动的正常组成部分.死亡有两种完全不同的形式,当细胞遭受急性和严重损害时,细胞肿大胀裂,胞内液体外溢,导致周围组织发生炎症,称之为坏死;而细胞在正常死亡时,表现为细胞收缩,细胞核成片状,电镜可见细胞膜上有很多的小苞生成,DNA 电泳区带呈梯状,这种方式称为细胞凋亡(apoptosis).细胞凋亡是细胞自身进行的一种死亡方式,近年来对它的研究十分活跃,已经发现了一些与细胞凋亡有关的基因及其作用机理^[1].氧化还原反应是人体内最为广泛和重要的化学反应,自由基尤其是活性氧衍生自由基(oxygen-derived radical)是其重要的反应成分,有较多的资料表明活性氧(reactive oxygen species, ROS)与机体的衰老有密切的关系^[2].而衰老细胞的死亡实质上就是细胞凋亡,搞清其间的相互关系对于抗肿瘤和衰老有重要意义.本文仅就细胞凋亡与自由基关系的最新研究作一综述.

1 细胞凋亡过程与自由基的作用有关

bcl-2 是最先被注意到与细胞凋亡有密切关系的基因之一.造血系统和神经系统起源的肿瘤细胞内一般都有 bcl-2 的表达异常,如在 60% 的 B 淋巴瘤中 bcl-2 有基因转位和高表达^[3],将该基因通过表达载体转入细胞并使之表达能提高细胞对各种致命因素(如射线,生长因子的撤除等)的抵抗力,延长寿命,即它具有抗细胞凋亡的作用^[4],其详细机理尚不清楚,最近有人注意到 bcl-2 与活性氧自由基有密切的关系.Kane 等^[5]观察了使用二乙酰双氯荧光素(dichlorofluorescein diacetate)观察了脂质过氧化反应被阻止时细胞 ROS 的变化.实验结果表明:多数 bcl-2 高表达的细胞伴随有

细胞内 ROS 产生的大量减少,bcl-2 能提高超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)突变的酵母细胞的存活率,尤其是那些缺乏 Mn-SOD 者.SOD1 在神经细胞及含有谷胱甘肽过氧化酶的淋巴母细胞内的过高表达均可阻止这些细胞的凋亡过程^[6].含 ROS 量较多的细胞易于死亡,若调节细胞内 ROS 的含量,则死亡率能随之变化,而当消除 bcl-2 所引起的 ROS 减少时,细胞凋亡抑制现象可被解除,所有这些都说明 bcl-2 可能通过 ROS 而发挥其影响细胞凋亡的作用.

电离辐射是引起细胞凋亡的重要因素之一,在此情况下辐射的靶分子为水分子,导致细胞死亡的主要成分是羟自由基,它能与蛋白质、DNA 和脂质体等反应,引起蛋白质氧化,DNA 链断裂,细胞膜起苞,脂质氧化等,而 DNA 链断裂,细胞膜起苞和脂质氧化正是细胞凋亡的特征.值得注意的是羟自由基可能并不是造成凋亡时 DNA 电泳区带呈梯状的直接原因,但它与凋亡初期 DNA 被切割成 100~300 kb 大小片段的过程有关.离子辐射还能激活细胞的非特异性酪氨酸激酶,此功能可能与一些淋巴细胞的凋亡有关^[7].辐射治疗能刺激 6~14 种蛋白质的酪氨酸磷酸化过程,酪氨酸激酶抑制剂 4,5,7-三羟异黄酮(genistein)能抑制此过程并保护细胞免遭因 DNA 降解而导致的细胞凋亡,而磷酸酶抑制剂钒酸盐(vanadate)则能增加细胞对电离辐射的敏感性.

人 T 细胞系 CCRF-CEM 当在无血清培养基中低密度($<10^8$ /L)培养时易于发生凋亡,而在含血清培养基中高密度($>10^5$ /L)培养时凋亡过程被终止,从此培养基中分离出了一种抗凋亡因子,其分子量 60 000,具有与过氧化氢酶相似的结构和催化酶特性,自动物体内提取

的这种催化酶能替代含血清培养基并阻止这种与细胞密度相关的凋亡过程,这些现象提示,在细胞处于低密度时,CCRF-CEM 培养液中含有丰富的诱导细胞死亡的过氧化氢,细胞中这些物质也许来源于培养基,但更可能是细胞自身产生的^[8].

胚胎囊液 (embryonic blastocoele fluid) 中含有一种可溶性的物质,它能杀死那些具有滋养外胚层形成能力的胚胎癌细胞,但是胚胎癌细胞 P19 对此具有抵抗作用,进一步研究发现该细胞内有丰富的谷胱甘肽,使用谷胱甘肽合成酶的特异性不可逆抑制剂 (buthionine sulfoximine I) 则可提高 P19 对胚胎囊液的敏感性. 这种情况下所发生的细胞死亡即属细胞凋亡. 如用过氧化氢酶预先处理胚胎囊液,然后再将其加入 P19 细胞,则这种凋亡诱导过程可被阻止,胚胎囊中所存在的过氧化氢可能是由多胺氧化酶 (polyamine oxidase) 催化产生的^[9,10]. 如向 PC12 (pheochromocytoma) 细胞培养液中加入神经生长因子 (NGF),能提高细胞内的过氧化氢酶活性,降低 PC12 对外源性过氧化氢的敏感性. 但若加入过氧化氢酶的抑制剂 3-氨基三唑 (3-aminotriazole),则细胞对外源性过氧化氢的敏感性增加,NGF 或血清的撤除都可引起 PC12 细胞的凋亡. NGF 抑制细胞凋亡的作用是通过许多因素完成的,现在尚不清楚这种凋亡抑制作用是否是仅仅与细胞内过氧化氢酶的表达有关^[11]. 抑制 PC12 细胞的 SOD1 表达可同时降低用 NGF 处理和不用 NGF 处理组的存活率,但处理组死亡率较低,死亡细胞呈现凋亡的特征,使用维生素 E 能逆转这种凋亡,使用维生素 E 和 NGF 复合物效果更好^[12].

Etanidazole 亦可引起 EL4 细胞的凋亡,其有效浓度仅需 10 mmol/L. 若用自由基清除剂 (如 TPA, IBMX, TEMPOL) 和维生素 E 处理 24 h,则这种效应可被抑制^[13].

肿瘤坏死因子 (tumour necrosis factor, TNF) 可引起许多肿瘤或非肿瘤细胞的凋亡. 有实验表明 TNF 可诱导细胞内 ROS 的产生,

细胞内表达 MnSOD 能抑制 TNF 所引起的细胞死亡. 一些抗氧化剂 (如抗坏血酸,铁离子螯合剂 desferrioxamine) 能抵抗 TNF 所致的细胞毒作用^[14].

γ 干扰素 (IFN- γ) 刺激巨噬细胞后能引起 ROS 的释放,Preopterin 在细胞内的含量增加,现已发现新蝶呤 (neopterin, 系 pyrazino-pyrimidino 衍生物) 在许多感染性疾病、恶病质及自身免疫性疾病中都有增加. 新蝶呤 (neopterin) 能增加 ROS 在正常 pH 时的生物活性,氧应激 (oxidative stress) 在凋亡中不但能提高 neopterin 的水平,促进巨噬细胞活化并使 ROS 释放增多,而且 neopterin 本身也能增强 ROS 对细胞的作用^[15,16].

2 凋亡细胞中自由基的产生来源

Pierce 等^[9]的工作表明,组织中的过氧化氢系由组织中的多胺氧化酶产生. 有过氧化物存在时,肿瘤坏死因子 (TNF) 发挥作用. 线粒体氧化呼吸链复合物 III 的抑制剂能强化 TNF 介导的对 L929 的细胞毒作用,而复合物 I (NADH 脱氢酶) 和 II (琥珀酸脱氢酶) 的抑制剂则可保护细胞,减轻细胞毒性损害,进而提示超氧阴离子是在电子自泛醌向氧分子传递过程中产生的, TNF 能促进这种电子传递过程,这也许是 TNF 发挥作用的机制之一^[17]. 腺病毒蛋白产物 E1B 和 E3 可抑制 TNF 诱导的细胞凋亡,其中与磷脂酶 A2 参与花生四烯酸代谢有关,很显然细胞内 ROS 的来源很多. 此外,正常细胞内每天能产生达 10^{11} 的 ROS 分子 (如表 1 所示), 其中来源大致可分为以下几方面: a. 细胞进行正常需氧代谢时线粒体呼吸链产生的副产物: $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 和 $HO^{\cdot}$; b. 巨噬细胞吞噬细菌和病毒感染细胞时呼吸爆发的产物: $NO^{\cdot}$, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 和 $Cl^{\cdot}$; c. 脂肪和其他大分子降解时的副产物: H_2O_2 ; d. 细胞色素 P_{450} 系统在发挥其对食物的解毒作用时产生的 ROS. 凋亡细胞内 ROS 的增加也许是由于细胞清除 ROS 能力的下降和抗氧化能力的下降而并非是产生增多所致.

表 1 内源性 ROS 的产生

酶体系	产生的 ROS
线粒体氧化磷酸化	O_2^-
超氧化物歧化酶	H_2O_2
单胺氧化酶	H_2O_2
黄嘌呤氧化酶	O_2^-
中性粒细胞 NADPH 氧化酶	O_2^-
蛋白质表面 Fenton 反应	$HO\cdot$
一氧化氮合酶	$NO\cdot$

3 自由基调节细胞凋亡的机理

如前所述,在细胞凋亡过程中有自由基的参与,但自由基调节细胞凋亡的机理尚不清楚.在某些实验的基础上已提出一些假设^[3].Haecker 等^[18]提出了 bcl-2 和过氧化物可能通过如下三种途径中的一种而发挥作用: a. H_2O_2 和其他凋亡因素直接作用于 Ced-3/ICE (细胞死亡基因 3/白细胞介素 1 β 转换酶) 使之活化引发细胞的凋亡,而 bcl-2/Ced-9 能抑制此过程; b. 各种凋亡因素首先引起 H_2O_2 的生成, H_2O_2 再作用于 Ced-3/ICE 使之活化引发细胞的凋亡,而 bcl-2/Ced-9 通过干扰 H_2O_2 的生成致使凋亡障碍; c. 各种凋亡因素首先作用于 Ced-3/ICE 使之活化,再由它引起 H_2O_2 的生成引发凋亡过程,而 bcl-2/Ced-9 通过干扰 H_2O_2 的生成致使凋亡障碍.上述假设的正确性有待证实.

另有资料表明 bcl-2 能同时抑制细胞的坏死和凋亡,提示两者可能有共同的途径. Lennon 等^[19]发现低浓度的过氧化物能引起细胞的凋亡,而高浓度的过氧化物则引起细胞的坏死.

目前,在越来越多的病理状态下发现了 ROS 并认为其主要是破坏性介质,其生理功能被局限于中性粒细胞对微生物的杀伤作用.但是, NO 已被证实在内皮细胞和神经系统中具有信号传导作用^[20]. 在一些细胞中也已发现了 ROS 对鸟苷酸环化酶和其他信号系统的调节作用^[21], 这些现象提示 ROS (主要包括超氧阴离子和过氧化物) 并非完全是有害的,它可能

在信息功能方面具有重要的价值.

参 考 文 献

- 1 Vaux D L, Weissman I L, Kim K S. Science, 1992; **258**: 1955
- 2 Cutler R G. Am J Clin Nutr, 1991; **53**: 373
- 3 Tsujimoto Y, Finger L, Yunis J. Science, 1984; **226**: 1097
- 4 Nunez G, Loncon L, Hockenbery D. J Immunol, 1990; **144**: 3602
- 5 Kane D J, Sarafian T A, Anton R. Science, 1993; **2612**: 1274
- 6 Hockenbery D, Oltvai Z N, Yin X. Cell, 1993; **89**: 1005
- 7 Uckun F M, Tuel-Ahlgren L, Song C W. Proc Natl Acad Sci USA, 1992; **89**: 9005
- 8 Sandstrom P A, Butke T M. Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 4708
- 9 Pierce G B, Parrchment R E, Lewellyn A L. Differentiation, 1991; **46**: 181
- 10 Griffith O W. J Biol Chem, 1982; **257**: 13704
- 11 Batistatou A, Volonte C, Greene L A. Mol Biol Cell, 1992; **3**: 363
- 12 Troy C M, Shelanski M L. Proc Natl Acad Sci USA, 1994; **91**: 6384
- 13 Palayoor S T, Dump E A, Malaker K. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1994; **29**: 289
- 14 Wong G H, McHugh T, Weber R. Proc Natl Acad Sci USA, 1992; **88**: 4372
- 15 Famularo G, Simone C D. Immunology Today, 1994; **15**: 495
- 16 Fuchs D, Gruber A, Uberall F. Immunology Today, 1994; **15**: 496
- 17 Schulze-Osthoff K, Bakker A V, Vanhaesebroeck B. J Biol Chem, 1991; **267**: 5317
- 18 Haecker G, Vaux D. TIBS, 1994; **19**: 99
- 19 Lennon S V, Martin S J, Cotter T G. Cell Proliferation, 1991; **24**: 203
- 20 Synder S H, Bredt D B. TIBS, 1991; **14**: 60
- 21 Haddox M K. J Biol Chem, 1978; **253**: 3143

Free Radicals and Apoptosis. Hui Hongxiang, Zhao Xiaoning¹⁾, Jin Ming, Wang Chengji, Mo Jian¹⁾ (Department of Biochemistry, Fourth Military Medical University, Xian 710032, China; ¹⁾ Department of Chemistry, Fourth Military Medical University, Xian 710032,

China).

Abstract Apoptosis is a common mode of cell death occurring during development as well as in many pathological conditions, such as in tumor, aged and degenerative diseases. However, some experimental results recently demonstrate that free radicals involve in apoptosis. In apoptosis cells, the reactive oxygen species (ROS) production increases and the ability to metabolize ROS declines. The ROS in most disabled apoptosis cells is lower and the mortality of this kind of cells can be

changed according to the amount of ROS in cells. Irradiation can result in apoptosis damaged by hydroxyl free radical, the apoptosis phenomena in some cells come from withdrawing growth factor and medium may be caused by change of the free radical metabolic enzyme activity, such as peroxide hydrogen enzyme. The research summarized collectively suggest that free radical plays an important role in regulation of apoptosis.

Key words apoptosis, free radical, gene, tumor

TATA box 结合蛋白-DNA 复合物的三维结构

黄雯 王春新

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 TATA box 结合蛋白质 (TBP) 是 RNA 聚合酶 II 转录因子 TFIIID 的组成成分, 它可与 DNA 序列上游区的 TATA box 元件特异地结合. 对 TBP 及 TATA box-TBP 复合物的三维结构进行扼要的介, 探讨其在起始转录过程中所起的作用.

关键词 TBP, TATA box, 三维结构, 转录调控

普遍性转录因子 TFIIID 是参与真核生物聚合酶 II 转录起始的唯一具有位点特异性的普遍性转录因子. 它由 TATA box 结合蛋白 (TBP) 和多个 TBP 联系因子 (TAFs) 组成^[1], 其中 TBP 直接与 TATA 元件结合并可直接与 TFIIA、TFIIB 相互作用. TBP 的三维结构呈高度二重对称性. 两个拓扑学构象等同的结构域 (88~89 个氨基酸) 各由 5 股反向平行的 β 折叠 (S) 和 2 个 α 螺旋 (H) 组成^[2], 形成一个 $3.2 \text{ nm} \times 4.5 \text{ nm} \times 6 \text{ nm}$ 的“分子鞍”的结构. β 折叠构成“分子鞍”的底面, 与 DNA 相互作用; α 螺旋构成“分子鞍”的凸面, 与转录过程中其他蛋白因子相互作用. S_2 和 S_3 , S_2' 和 S_3' 之间的 β 链象“分子鞍”的两个“脚蹬” (stirrup) (图 1)^[2], 其上各有一对苯丙氨酸, 与结合 DNA 有关^[3].

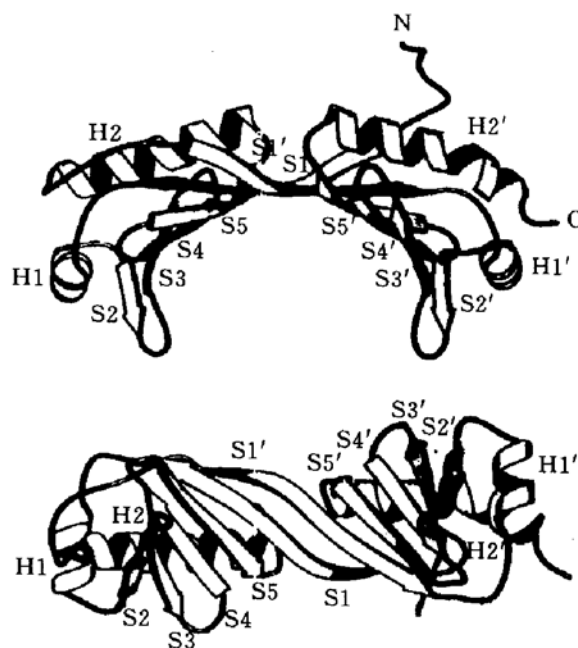


图 1 TBP 的三维结构^[2]

收稿日期: 1994-12-26, 修回日期: 1995-07-12