

1469~ 1477

6 Engstrom Y, Kadalayil L, Sun S C *et al.* κ B-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*. J Mol Biol, 1993, **232**: 327~ 333

7 Meister M, Georgel P, Lemaitre G *et al.* Immune gene expression in *Drosophila*. In: Hoffmann J A eds. Perspectives in immunity: the insect host defense. France: Landes Company, 1994: 167~ 182

8 Kapppler C, Meister M, Lagueux M *et al.* Two 17 bp repeats nesting a κ B-related sequence confer inducibility to the dipterecin gene and bind a polypeptide in bacteria-challenged *Drosophila*. EMBO J, 1993, **12**: 1561~ 1568

9 Meister N, Braun A, Kappler C *et al.* Insect immunity. A transgenic analysis in *Drosophila* defines several functional domains in the dipterecin promoter. EMBO J, 1994, **13**: 5959~ 5966

10 Dimarq J L, Hoffmann D, Meister M *et al.* Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene and insect defensin. Eur J Biochem, 1994, **221**: 201~ 209

11 Georgel P, Meister N, Kappler C *et al.* Insect immunity: the dipterecin promoter contains multiple functional regulatory sequences homologous to mammalian acute phase response elements. Biochem Biophys Res Commun, 1993, **197**: 508~ 517

12 Beg A A, Finco T S, Nantermet P V *et al.* Tumor necrosis factor and interleukin 1 lead to phosphorylation and loss of I κ B α : a mechanism for NF- κ B activation. Mol Cell Biol, 1993, **13**: 3301~ 3310

13 Ip Y T, Reach M, Engstrom Y *et al.* Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. Cell, 1993, **75**: 753~ 763

14 Sun S C, Faye I. Cecropia immunoresponsive factor, an insect immunoresponsive factor with DNA-binding properties similar to nuclear-factor κ B. Eur J Biochem, 1992, **204**: 885~ 892

15 Reichhart J M, Georgel P, Meister M *et al.* Expression and nuclear translocation of the rel/NF- κ B-related morphogen dorsal during the immune response of *Drosophila*. C R Acad Sci [III] 1993, **316**: 1218~ 1224

16 Hultmark D. Macrophage differentiation marker MyD88 is a

member of the Toll/ IL-1 receptor family. Biochem Biophys Res Commun, 1994, **199**: 144~ 146

17 Lemaitre B, Meister M, Govind S *et al.* Functional analysis and regulation of nuclear import of Dorsal during the immune response in *Drosophila*. EMBO J, 1995, **14**: 536~ 545

18 Rosetto M, Engstrom Y, Baldari C T *et al.* Signals from the IL-1 receptor homolog, Toll, can activate an immune response in a *Drosophila* hemocyte cell line. Biochem Biophys Res Commun, 1995, **209**: 111~ 116

The Development of Transcription Regulating of Insects Antibacterial Polypeptide. TU Yizeng, CAI Mingyng, QU Xianming (*The Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China*).

Abstract In response to bacteria or trauma, insects produce a battery of antibacterial peptide or polypeptide such as cecropin, dipterecin, attacin and defensin, the synthesis of which are induced in the fat body and secreted into the hemolymph where they act synergistically to kill the invading microorganisms. The insect host defence system shares common basic characteristics of the mammalian acute phase response, especially in the aspect of the coordinating gene expression, where similar *cis*-regulatory and inducible transactivator appear to play major roles.

Key words NF- κ B, dorsal related immunity factor, *drosophila* immunoresponsive factor, *cecropia* immunoresponsive factor

核酸内切酶在细胞凋亡中的作用

邓友平 肖培根

(中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100094)
(中国协和医科大学)

摘要 核酸内切酶在形成细胞凋亡的典型特征——DNA 片段化中, 发挥着直接的重要作用. 介绍了已知的参与细胞凋亡的二价金属离子依赖性和非依赖性核酸内切酶种类, 其中二价金属离子依赖性主要有 nuc18、DNase I、Ca²⁺ / Mg²⁺ 核酸内切酶、Ca²⁺ / Mn²⁺ 核酸内切酶、DNaseV、nuc58 和 nuc40;

二价金属离子非依赖型主要有 DNase II 及类似核酸内切酶。此外, 还初步探讨了核酸内切酶降解染色质 DNA 的过程及其作用机制。

关键词 核酸内切酶, 细胞凋亡, DNA 片段化

细胞凋亡发生在胚胎发育、变态作用、正常组织的衰亡、肿瘤发生、胸腺细胞的选择、生长因子的消除、细胞介导的细胞毒、病毒感染的人类免疫缺陷、肿瘤抑制和离子辐射等^[1]。明了细胞凋亡的分子机制, 能使我们更好地懂得细胞凋亡在控制细胞群体变化中的重要意义, 发展新的防治与细胞凋亡相关疾病的药物。尽管有报道表明不需要细胞核也可导致细胞凋亡^[2], 但是典型的细胞凋亡仍然是以细胞核的变化, 特别是染色质 DNA 的片段化为主要特征^[1, 3]。Wyllie 等^[4]最早研究核酸内切酶的催化活性和染色质 DNA 断裂联系, 后来又发现不少与之有关的核酸内切酶。了解参与细胞凋亡的核酸内切酶的种类及其作用过程, 将有助于我们更好地认识调节细胞凋亡的机制。

1 参与细胞凋亡的核酸内切酶种类

参与细胞凋亡的核酸内切酶可分为二价金属离子依赖性核酸内切酶和二价金属离子非依赖性核酸内切酶。

1.1 二价金属离子依赖性核酸内切酶

二价金属离子依赖性核酸内切酶主要是 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 依赖性核酸内切酶, 有少数为 Mn^{2+} 依赖性核酸内切酶。迄今发现的与细胞凋亡的二价金属离子依赖性核酸内切酶主要有以下几种。

1.1.1 nuc18: 它是 Gaido 等^[5, 6]从糖皮质激素诱导的凋亡的大鼠胸腺细胞核中, 分离纯化出来的一种核酸内切酶, 该酶因其分子质量为 18 ku, 故名 nuc18, 是一种 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 依赖性核酸内切酶, 其适宜的 pH 值为 7.0~8.5。 Ca^{2+} 载体可活化之^[7], Zn^{2+} 、金精三羧酸 (ATA) 和二价金属离子螯合剂能抑制 nuc18 的活性。蛋白质合成抑制剂如放线菌酮能阻止其对 DNA 的降解, 表明该酶是在凋亡过程中

新合成的蛋白。免疫抑制剂环孢素 A 的作用靶蛋白 cyclophilin A 及其家族中的其他成员, 与 nuc18 的氨基酸序列有惊人的相似性。重组的 cyclophilin A、B 和 C, 表现出与 nuc18 相似的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖的生化 and 药理特征。这一发现也提示 cyclophilin 或其类似蛋白可能在淋巴细胞凋亡中发挥着核酸内切酶的作用。

1.1.2 脱氧核糖核酸内切酶 I (DNase I): 很早以前就认为 DNase I 与辐射引起的淋巴细胞的死亡有关^[8]。DNase I 是一种分泌性消化酶, 分子质量为 21 ku, 其降解的 DNA 条带形成 3'-OH 末端, 这一点与细胞凋亡中 DNA 片段化产物末端相同。但是, 一些早先证据显示似乎 DNase I 与细胞凋亡无关^[9], 这些证据主要表现在二方面: a. 该酶的活动主要表现为 10 bp 的 DNA 单条带断裂, 只有在 Mn^{2+} 存在下才表现为双带断裂。b. DNase I 主要分布在腮腺、胰腺、小肠、肾脏、心脏和前列腺等组织器官中, 而在细胞凋亡发生强烈的组织如肝脏、胸腺和脾脏未发现分布。后来发现 DNase I 及其类似核酸内切酶在易发生细胞凋亡的组织中, 如淋巴细胞等也有分布^[10]。因此, 现在大多数学者认为 DNase I 参与细胞凋亡。 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 依赖型 DNase I 的 pH 值为 7.0~8.0; Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 依赖型, 其适宜的 pH 值为 5.5。它的活性能被 Zn^{2+} 、G 动蛋白和 EDTA 所抑制, 不能被 ATA 所抑制^[1, 10]。在细胞内, DNase I 主要位于粗面内质网、高尔基复合体和一些小的分泌性囊泡内, 在细胞凋亡时, DNase I 从细胞质进入到细胞核发挥作用, 因在凋亡早期内质网等细胞器和核膜仍然是完整的, 关于 DNase I 如何从细胞质到细胞核的机制不甚清楚。推测可能是 G 动蛋白的聚合作用可解除 G 动蛋白对 DNase I 的抑制, 使之更容易移近核的周围地区而进入核内^[9], 其更明确的机制还有待深入研究。

1.1.3 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 核酸内切酶: 该酶是 Ribeiro 等^[11]从人类脾脏细胞分离纯化出来的一种 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 依赖的核酸内切酶, 实验表明, 它能把染色质 DNA 切成核小体间的 DNA 片段. 它分布在细胞核内, 分子质量为 27 ku 左右, 适宜的 pH 值为 8.0. 相比 DNase I, 它也能被 Zn^{2+} 所抑制, 不同的是, 它不能被 G 动蛋白抑制, 而能被 ATA 抑制. 对于这个酶的许多活动细节, 诸如是否原先就存在还是在细胞凋亡时新近合成等问题, 都有待继续观察.

1.1.4 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ 核酸内切酶: 它是 Nikonva 等^[12]从大鼠凋亡的胸腺细胞中分离纯化得来, 主要分布在细胞核内, 分子质量为 22 ku, 最佳活性的适宜 pH 值为 6.0~7.5, 所依赖的金属离子为 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} , 或者仅为 Mn^{2+} 的依赖性及其他特点使其成为一个新的参与细胞凋亡的核酸内切酶, 但其作用的许多特点, 如与 Zn^{2+} 、ATA 和 G 动蛋白的关系等还有待研究.

1.1.5 DNase γ : 该酶是 Shiokawa 等^[1]从大鼠胸腺细胞中分离纯化而来. 当时, 他们发现大鼠胸腺细胞核中至少包括三种脱氧核糖核酸内切酶: DNase α 、DNase β 和 DNase γ . 用 γ 射线或地塞米松诱导的凋亡的大鼠胸腺细胞核中, 可保留有明显的 DNase γ 的活性, 但没有 DNase α 和 DNase β 的活性. 用放线菌酮处理能抑制大鼠胸腺细胞凋亡的诱导, 并伴随着 DNase α 和 DNase β 的显著下降, 当解除放线菌酮的抑制后, 胸腺细胞呈现 DNA 片段化等明显的细胞凋亡特征, 而此时仅能观察到 DNase γ 的活性. 纯化的 DNase α 和 β 为二价金属离子非依赖性酸性酶, 分子质量均为 32 ku; 而纯化的 DNase γ 的充分活化需要 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 的存在, 且 Zn^{2+} 和 ATA 能抑制其活动, 其适宜的 pH 值为 7.2, 是中性酶. 在各自适宜的条件下, DNase γ 产生的 DNA 片段末端为 3'-OH/5'-P, DNase α 和 β 则产生 3'-P/5'-OH DNA 片段末端. DNase γ 酶切 DNA 所形成的 3'-OH/5'-P 末端, 正好与 γ 射线或地塞米松

诱导凋亡细胞中 DNA 片段末端相同. 因此, 作者认为可能是 DNase γ 参与了胸腺细胞凋亡时染色质 DNA 片段化的形成. DNase γ 不象 DNase I, G 动蛋白不能抑制其活动, 加之其特有的分子质量和适宜的 pH 值等特点, 表明其是一个参与细胞凋亡的新的二价金属离子依赖性核酸内切酶. 而 DNase α 和 β 是否参与细胞凋亡, 有没有其他的生理功能, 尚不清楚.

1.1.6 nuc58 和 nuc40: 这两种酶是 Deng 等^[13]从 IL-2 依赖的细胞毒性 T 细胞系 CTLL2 核中分离纯化而来. 当消除培养基中的 IL-2 时, CTLL2 细胞发生凋亡, 可观察到 nuc58 和 nuc40 的活性. 因其分子质量为 59 ku 和 40 ku, 故名 nuc58 和 nuc40. 其活性的适宜 pH 值均为 7~8, 但 nuc40 在碱性环境 pH9 时仍有活性. 除去培养基中 IL-2 时, CTLL2 细胞中 nuc58 增加相对较多, nuc40 增加相对较少. nuc58 在细胞质中分布较多, 在核中比较少; nuc40 在细胞质和核中均有分布. nuc58 依赖于 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ; 而 nuc40 仅依赖于 Mg^{2+} , 但 Ca^{2+} 能促进 Mg^{2+} 的活动. Zn^{2+} 能抑制二酶的活性. PKC 的抑制剂能促进这两个酶的活性. 但如果事先转染 bcl-2cDNA, 其促进作用无效, 表明 bcl-2 能抑制二酶活性. 用适宜剂量的放线菌酮不能抑制 nuc58 和 nuc40 的活动, 说明这两个酶不是在细胞凋亡时新合成的酶, 而是原来就以前体形式存在, 在凋亡时临时活化而来.

1.2 二价金属离子非依赖性核酸内切酶

二价金属离子非依赖性核酸内切酶主要是指 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 非依赖性核酸内切酶. Barry 等^[14]从中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞核中分离出来的一种 CHO 酸性核酸内切酶. 该酶所产生的 DNA 片段特征与凋亡的细胞相同. 其分子质量为 38 ku, 适宜的 pH 值为 5.0~5.5. 它的活动不依赖于 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} , 不能被 Zn^{2+} 所抑制, 但能被 ATA 所抑制. 以上这些 CHO 核酸内切酶的特点与 DNase II 十分类似, 因此有人认为 DNase II 可能也参与了细胞凋亡^[9]. 但是 DNase II 似乎并未在细胞凋亡中起

关键作用. 这主要出于以下考虑: a. DNase II 是一个溶酶体酶, 它降解 DNA 时必须从溶酶体转运到细胞核中, 而在细胞凋亡时, 溶酶体仍保持完整. b. DNase II 酶切 DNA 产生 3'-磷酸末端, 但在细胞凋亡时尚不无类似报道. 至少需要额外增加二个酶: 碱性磷酸酶和多核苷酸激酶, 方能使 DNase II 产生 DNA 片段 3'-OH/5'-P 末端, 但至今尚未证实. 然而既然已有类似 DNase II 的核酸内切酶参与细胞凋亡不能排除 DNase II 本身降解 DNA 导致细胞凋亡的可能性. DNase II 适宜的 pH 值、离子的依赖, 对抑制剂的反应和分布的细胞类型等也与 DNase α 和 DNase β ^[1]类似. 如果它们参与细胞

凋亡得到证实, 也将为 DNase II 有可能介入细胞凋亡提供新的佐证.

另一个有可能参与细胞凋亡中 DNA 降解的核酸内切酶, 是 Ferandes 等^[15]从人类白血病细胞和周围血粒细胞中分离出来的. 它的活性不需要 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的存在, Zn²⁺ 能抑制其活动, ATA 不能抑制. 但是关于该酶与细胞凋亡时 DNA 降解的关系, 还需要提供新的直接证据.

已知的已有不少参与细胞凋亡的核酸内切酶, 它们以各自的特点互相区别 (表 1), 相信还会有新的介入细胞凋亡的核酸内切酶的发现.

表 1 已知的参与细胞凋亡的核酸内切酶

核酸内切酶	发现时所在动物组织	分布位置	M_r /ku	适宜 pH	依赖的二价金属离子	抑制剂		
						Zn ²⁺	G 动蛋白	ATA
nuc18	大鼠胸腺	细胞核	18	7.0~ 8.5	Ca ²⁺ / Mg ²⁺	+	n. d	+
DNase I	牛胰腺	细胞质	31	7.0~ 8.0 5.5	Ca ²⁺ / Mg ²⁺ Mg ²⁺ , Mn ²⁺	+	+	-
Ca ²⁺ / Mg ²⁺ 核酸内切酶	人脾脏	细胞核	27	8.0	Ca ²⁺ / Mg ²⁺	+	-	+
Ca ²⁺ / Mn ²⁺ 核酸内切酶	大鼠胸腺	细胞核	22	6.0~ 7.5	Ca ²⁺ / Mg ²⁺	n. d	n. d	n. d
DNase γ	大鼠胸腺	细胞核	33	7.2	Ca ²⁺ / Mg ²⁺	+	-	+
nuc58	CTLL2	细胞质和核	58	7.0~ 8.0	Ca ²⁺ / Mg ²⁺	+	n. d	n. d
nuc40	CTLL2	细胞质和核	40	7.0~ 8.0	Mg ²⁺	+	n. d	n. d
CHO 酸性内切酶	中国仓鼠卵巢	细胞核	38	5.0~ 5.5	无	-	n. d	+

注: “+”表示能抑制,“-”表示不能抑制,“n. d”表示尚未确定.

2 对染色质和 DNA 结构的影响

越来越多的实验表明, 细胞凋亡中核酸内切酶对 DNA 的降解成为典型的梯状 DNA 不是一步完成, 而是一个连续的有步骤的过程. Walker 等^[16]证明细胞凋亡中 DNA 片段化至少包括两个阶段: 第一阶段为 50~ 300 kb DNA 大分子 (HM_r) 片段形成阶段, 此阶段只需要 Mg²⁺ 作用, Zn²⁺ 不能抑制此阶段活动, 不需要蛋白质水解作用. 第二阶段为核小体间梯状 DNA 片段形成阶段, 它需要 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 依赖的核酸内切酶参与, 并需要蛋白质

水解作用. 根据众多实验结果^[17~ 21], 一般认为细胞凋亡中 DNA 的降解分为三个步骤: 第一步是 300 kb 或大于 300 kb 的大分子 DNA 片段的形成, 它们组成六聚体的花环结构. 第二步是进一步降解成 50 kb 左右的 DNA 片段环. 第三步则是形成更小分子的核小体间的梯状 DNA 片段. 鉴于有些凋亡细胞没有第三步梯状 DNA 的出现, 而只有第一、二步 HM_r 片段化过程, 有些学者认为第一、二步是导致细胞凋亡的关键^[16]; 而 Kataoka^[20]用 Ca²⁺ 载体 A23187 诱导的 T 淋巴母细胞白血病细胞系 MolT-4 死亡中发现, 该细胞系表现坏死, 死

亡细胞中有 HM_r DNA 片段的形成, 没有小分子梯状 DNA 出现, 表明 DNA 降解的第一和第二步并非为细胞凋亡所特有, 只有第三步才是细胞凋亡的特征. 看来, 不同的试剂和细胞可能会得出不同的结果, 而判断细胞凋亡不能仅仅依据 DNA 的片段化特征, 还需结合其他形态学的变化来加以鉴别.

关于核酸内切酶在 DNA 降解的各步中如何发挥作用至今尚无明确的答案. Sun^[18]的观察表明 300 kb 以上的大 DNA 片段的形成, 只需要 Mg²⁺, 不需要 Ca²⁺, 但 Ca²⁺ 能促进 Mg²⁺ 的活动; 而第三步梯状 DNA 片段的形成需要 Mg²⁺ 和 Ca²⁺ 同时存在, 显示有不同的核酸内切酶参与了不同步骤的活动, 前二步是 Mg²⁺ 依赖型, 后一步是 Ca²⁺ / Mg²⁺ 依赖型, 这一结论与前文中 Walker^[16] 的观察吻合, Nicotera 等^[22]报道 Ca²⁺ 或 Mg²⁺ 都是以引起大分子 DNA 片段的形成, 而小分子 DNA 片段的形成在有 Ca²⁺ 比无 Ca²⁺ 时快得多, 并且还发现用 Mn²⁺ 代替 Mg²⁺ 也能导致大于 300 kb DNA 片段的形成^[9], 因此, 他们认为大于 300 kb DNA 片段的形成, 对金属离子的需求是没有选择性的. 这一结论与 Sun 等观察结果出入较大, 则可能是实验条件、刺激种类和细胞系的不同所造成, 关于不同的核酸内切酶在 DNA 降解不同阶段的作用有待进一步研究.

一些基因能调节核酸内切酶的活动. 如癌基因 C-myc、H-ras、bcl-2 和 P₅₃ 等都有可能通过调节核酸内切酶的活动而调节细胞凋亡^[9]. 除基因外, 细胞内许多因素也参与了核酸内切酶的调节活动. 细胞内多胺水平的下降与核酸内切酶的活化有关, 丝氨酸蛋白酶能解除束缚 DNA 的蛋白, 使核酸内切酶更易接近 DNA^[23]. Ca²⁺ 等金属离子向细胞内的流动能活化核酸内切酶. 磷酸化酶能使核酸内切酶前体磷酸化而活化^[21], 但总的来看, 细胞内核酸内切酶产生和活化的机制仍所知寥寥.

综上所述, 核酸内切酶在形成细胞凋亡的典型特征: DNA 片段化, 发挥着直接的关键作用, 已知的多种参与细胞凋亡的核酸内切酶

就是最好的证据. 尽管已有众多的参与细胞凋亡的核酸内切酶的存在, 但它们在 DNA 有步骤的降解的哪一步发挥作用, 仍没有肯定的结论. 外部和内部的死亡信号如何调节核酸内切酶的活动, 还有哪些新的核酸内切酶参与细胞凋亡, 核酸内切酶是如何产生和活化的, 怎样通过调节核酸内切酶的活性来防治和细胞凋亡有关的疾病, 这些都有待于进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Shiohawa D, Ohyama H, Yamada T *et al.* Identification of an endonucleases responsible for apoptosis in rat thymocytes. *J Biochem*, 1994, **226**: 23~ 30
- 2 Jacobson M D, Burne J F, Raff M C. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J*, 1994, **13**: 1899~ 1910
- 3 Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972, **26**: 239~ 257
- 4 Wyllie A H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 1980, **284**: 555~ 556
- 5 Gaido M L, Cidlowski J A. Identification, purification, and chracterization of a calciumdependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B. *J Biol Chem*, 1994, **266**: 18580~ 18585
- 6 Montague J W, Gaido M L, Frye C *et al.* A calcium-dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin. Recombinant cyclophilins A, B, C have nuclease activity. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 18877~ 18880
- 7 Nicotera P, Rossi A D. Nuclear Ca²⁺: phisicological regulation and role in apoptosis. *Mol Cell Biochem*, 1994, **135**: 89~ 98
- 8 Swingle K F. Radiation-induced free polydeoxyribonucleotides in lymphoid tissues: A product of the action of neutral deoxyribonuclease (DNase I). *Radiat Res*, 1967, **30**: 81~ 95
- 9 Zhivotovosky B, Nicotera P, Orrenius S *et al.* Role of nucleases in apoptosis. *Int Arch Aller Immunol*, 1994, **105**: 333 ~ 338
- 10 Polzar B, Peitsch M C, Loos R *et al.* Overex-pression of deoxyribonuclease I (DNase I) transfected into COS cells: its distribution during apoptotic cell death. *Eur J Cell Biol*, 1993, **62**: 397~ 405
- 11 Riberiro J M, Carson D A. Ca²⁺ / Mg²⁺ -dependent endonuclease from human spleen: purification, properties, and role in apoptosis. *Biochemistry*, 1993, **32**: 9129~ 9136
- 12 Nikonova L, Beletsky I P, Umansky S R. Properties of some

nuclear nucleases of rat thymocytes and their changes in radiation-induced apoptosis. *Eur J Biochem*, 1993, **215**: 893~ 901

13 Deng G, Podack E R. Deoxyribonuclease induction in apoptotic cytotoxic T lymphocytes. *FASEB J*, 1995, **9**: 665~ 669

14 Barry M A, Eastman A. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch Biochem Biophys*, 1993, **300**: 440~ 450

15 Fernandes R, Cotter T G. Activation of calcium magnesium independent endonuclease in human leukemic cell apoptosis. *Anticancer Res*, 1993, **13**: 1253~ 1260

16 Walker P R, Weaver V M, Lach B *et al*. Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Exp Cell Res*, 1994, **213**: 100~ 106

17 Brown D G, Sun X M, Cohen G M. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 3037~ 3039

18 Sun X M, Cohen G M. Mg^{2+} -dependent cleavage of DNA into kilobase pair fragments is responsible for the initial degradation of DNA in apoptosis. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 14857~ 14860

19 Zhivotovsky B, Cedervall B, Jiang S *et al*. Involvement of Ca^{2+} in the formation of high molecular weight DNA fragments in thymocyte apoptosis. *Biophys Res Commun*, 1994, **202**: 120~ 127

20 Kotaoka A, Kubota M, Wakazono Y *et al*. Association of high molecular weight DNA fragmentation with apoptotic or nonapoptotic cell death induced by calcium ionophore. *FEBS Lett*, 1995, **364**: 264~ 267

21 Sokolova I A, Cowan K H, Schneider E *et al*. Ca^{2+}/Mg^{2+} -dependent endonuclease activation is an early event in VP-16-induced apoptosis of human breast cancer MCF cells *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1266**: 135~ 142

22 Nicotera P, Zhivotovsky B, Orrenius S. Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium*, 1994, **16**: 279~ 288

23 Zhivotovsky B, Wade D, Cahm A *et al*. Formation of 50 kb chromatin fragments in isolated liver nuclei is mediated by protease and endonuclease activation. *FEBS Lett*, 1994, **351**: 150~ 154

Function of Nucleases in Apoptosis. DENG Youping, XIAO Peigen (*Institute of Medicinal Plant, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094, China*).

Abstract Nucleases play a direct and important role in DNA fragmentation which is a hallmark of apoptosis. The nucleases involved in apoptosis are divided into two types: divalent cations dependent nucleases and divalent cations independent nucleases. The divalent cations dependent nucleases mainly include nuc18, DNase I, Ca^{2+}/Mg^{2+} nuclease, Ca^{2+}/Mn^{2+} nuclease, DNaseV, nuc58 and nuc40; The divalent cations independent nucleases mainly include DNase II and DNase II like nucleases. Moreover, the effect of nucleases on chromatin DNA degradation and the mechanism of this process were discussed.

Key words nuclease, apoptosis, DNA fragmentation

DNA 链断裂检测技术的进展*

夏 璐 丘冠英¹⁾

(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

摘要 DNA 链损伤特别是 DNA 双链断裂 (dsb) 的检测方法是研究 DNA 辐射损伤的一个关键因素. 已发展的检测 DNA dsb 的方法很多, 但各种检测法均有其一定的优越性和适用范围, 近年来应用较多并日益受到重视的新方法有原位杂交法, 彗星试验 (单细胞电泳法) 以及高效毛细管电泳法等等.

* 国家自然科学基金资助项目. ¹⁾ 通讯联系人. 收稿日期: 1996-02-14, 修回日期: 1996-06-11