

3.2 展望

基因免疫作为一种免疫手段,有许多问题需要解决与澄清,离广泛的临床应用还有一段距离.但是,基因免疫研究的初步成果充分显示,这种免疫方式作为一种治疗手段,至少对某些类型的免疫相关疾病来说,其前景是毋庸置疑的;基因免疫作为一种基础研究的手段,其重要性也是不可低估的.

参 考 文 献

- 1 Ulmer J B, Donnelly J J, Parker S E *et al.* Science, 1993; **259**: 1745
- 2 Wolff J A, Malone R W, Williams P *et al.* Science, 1990; **247**: 1465
- 3 Sikes M L, O'Malley B W Jr, Finegold M J *et al.* Hum Gene Ther, 1994; **5**: 837
- 4 Davis H L, Demeneix B A. Hum Gene Ther, 1993; **4**: 733
- 5 Pecorino L T, Lo D C. Curr Biol, 1992; **2**: 30
- 6 Tang D C, De Vit M, Johnston S A. Nature, 1992; **356**: 152
- 7 Fyran E F, Webster R G, Fuller D H *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 11478
- 8 Davis H L, Michel M-L, Whalen R G. Hum Mol Genet, 1993; **2**: 1847
- 9 Davis H L, Whalen R G, Demeneix B A. Hum Gene Ther, 1993; **4**: 151
- 10 Raz E, Carson D A, Parker S E *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994; **91**: 9519
- 11 Eisenbraun M D, Fuller D H, Haynes J R. DNA Cell Biol, 1993; **12**: 791
- 12 Takahashi H, Fujimoto J, Hanada S *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1995; **92**: 1470
- 13 Michel M-L, Davis H L, Schleef M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1995; **92**: 5307
- 14 Geissler E K, Wang J, Fechner J J *et al.* J Immunol, 1994; **152**: 413
- 15 Plautz G E, Yang Z Y, Wu B Y *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 4645
- 16 Milich D R, McLachan A, Chisari F V *et al.* J Immunol, 1986; **137**: 315
- 17 Davis H L, Michel M-L, Mancini M *et al.* In: Girard M eds. Retroviruses of human AIDS and related animal diseases. Paris: Eighth "Cent-Gardes" Colloquium, 1993: 329
- 18 Cox G J, Zamb T J, Babiuk L A. J Virol, 1993; **67**: 5664
- 19 Wang B, Boyer J, Srikantan V *et al.* DNA Cell Biol, 1993; **12**: 799
- 20 Wang B, Boyer J, Srikantan V *et al.* Virology, 1995; **211**: 102

A New Approach for Evoking an Immune Response: Gene Immunization. Lei Zhangheng, Pan Xinghua, Fu Jiliang (*Open Laboratory of Medical Molecular Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China*).

Abstract A new approach for evoking an immune response: gene immunization becomes more and more interesting for many researchers. Gene immunization is to introduce purified plasmid DNA which contains protein coding sequences and the necessary expressing regulatory elements into certain tissues of animals, in order to evoke the immune response to the proteins coded by the plasmid. The basic methods, achievements and problems of this new field are described here.

Key words gene immunization, plasmic DNA, gene transfer

细胞程序性死亡的判定方法

李德玲 王会信 周廷冲

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 细胞程序性死亡有别于一般意义上的死亡——坏死, 所以对其判定显得格外重要. 国内外目前常从细胞形态、细胞膜完整性、DNA 及某些重要生化指标等方面进行判定.

关键词 程序性死亡, 凋亡小体, 琥珀酸脱氢酶, 谷氨酰胺转移酶

程序性死亡 (programed cell death, PCD) 或称凋亡 (apoptosis, AP), 是细胞的一种自杀过程, 它主要表现在细胞萎缩、核固缩、染色质凝集^[1]、细胞形成“凋亡小体”和“凋亡小体”被吞噬等^[2,3]。由于死亡细胞被吞噬, 所以不引起炎症和损伤。细胞坏死则主要表现在细胞肿胀, 浆膜破裂, 细胞内容物流到细胞外, 激活趋化因子, 引起炎症反应等^[4]。

目前鉴别 PCD 的方法很多, 主要集中在细胞形态改变、DNA 片段化及一些主要生化指标的改变等方面。

1 反映细胞形态改变的方法

1.1 细胞染色

PCD 细胞所发生的一系列形态改变, 如体积缩小、核固缩和染色质凝集而细胞膜是完整的, 都可以通过细胞染色明显地观察到。

1.1.1 胞浆和胞核同时染色: 对胞浆、胞核同时染色, 如 Giemsa、丫啶橙 (AO)^[5] 染色, 可显示出细胞整体变化。Giemsa 染色主要基于细胞浆与细胞核 pH 值不同, 使二者染出的颜色不同; AO 染色则主要依据 AO 可同时与细胞核 DNA 及细胞浆 RNA 结合, 而结合后细胞核与细胞质呈现不同颜色。

1.1.2 单纯细胞核染色: 使用一些仅与细胞核 DNA 染色的物质, 如 Hoechst 33342^[6], 碘化丙啶 (propidium iodide, PI)^[7] 等可单纯显示出 PCD 中细胞核的变化。图 1b 可见固缩而片段化的核。

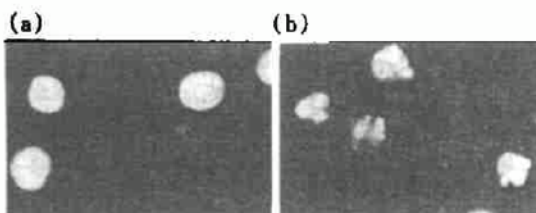


图 1 三尖杉酯碱 (HT) 处理 HL-60 细胞核形态变化

(a) 正常的 HL-60 细胞; (b) HL-60 细胞 5 mg/L HT 作用 2 h, Hoechst 染色^[6]。

1.2 电镜观察

电镜可观察细胞的超微结构。它可以同时反应细胞膜的完整性、细胞浆中细胞器的改变、细胞核及染色质的改变、“凋亡小体”的形成等^[8]。由图 2 可反映出 PCD 细胞 (b) 比正常细胞 (a) 体积缩小, 核改变成新月形, 而细胞膜完整。

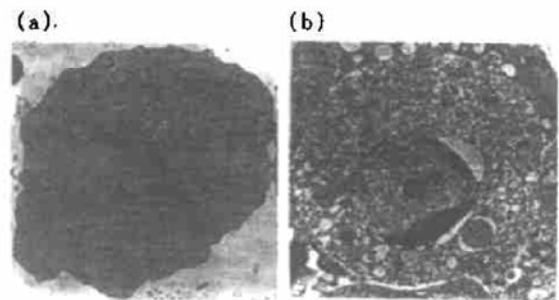


图 2 电镜下细胞结构的改变

(a) 正常的 HL-60 细胞; (b) HL-60 细胞 50 mg/L 顺铂作用 8 h。

2 反映细胞膜完整性的方法

细胞膜完整与否, 是区分 PCD 与坏死的重要指标之一。可用染料, 如台盼蓝进行染色; 如果细胞膜破裂, 染料进入细胞, 细胞变蓝, 即为坏死; 反之, 细胞不染色, 细胞膜完整, 即为正常或 PCD 细胞^[5]。另外, 电镜也可以准确明了地展示细胞膜的完整性。

3 反映 DNA 片段化的方法

3.1 DNA 电泳

有些 PCD 细胞, 染色体出现核小体间有规律的断裂, 通过 DNA 电泳, 可观察到梯形条带 (ladder shape) 的形成^[6] (图 3)。对于单个凋亡细胞 DNA 的变化, 可用微凝胶电泳观察到: 正常细胞 DNA 几乎无移动, 而 PCD 细胞 DNA 则泳动成水滴或彗星状^[9]。

3.2 片段化 DNA 的定量

某些细胞在某种因素诱导下虽产生 PCD, 但 DNA 片段化不明显或所占比例很少, 电泳不容易观察到。在这种情况下, 对片段化

DNA 进行定量, 可以反映出 PCD 细胞的 DNA 改变. 其方法原理为: 细胞在低张缓冲液作用下进行高速离心, 上清中含酶解的低分子质量 DNA, 沉淀中含高分子质量 DNA, 分别用二苯胺试剂溶解、比色法定量, 可以计算出片段化 DNA 所占百分比^[10,11].



图3 细胞总 DNA 电泳结果^[6]
1: HL-60 细胞 0.2 mg/L 喜树碱作用 2 h;
2: 正常的 HL-60 细胞.

3.3 原位末端标记法

对于一些固定切片, 可将 PCD 细胞中断裂的 DNA 链进行末端标记, 再用免疫组化的手段显示出来^[12].

3.4 流式细胞术

细胞固定、PI 染色后, 流式细胞仪可反映出不同 DNA 含量细胞所占比例. 在 PCD 细胞 DNA 发生片段化时, 在正常细胞 DNA G1 期峰前面可见增加一个峰, 该峰为 PCD 细胞特有的 AP 峰^[6] (图 4).

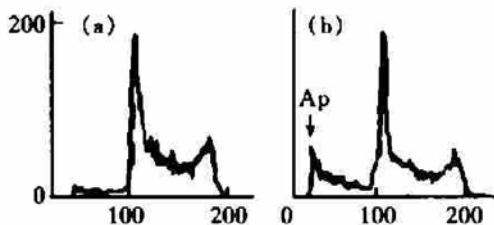


图4 流式细胞仪显示的 AP 峰^[6]
HT (0.20 mg/L) 处理 HL-60 细胞 (a) 1.5 h; (b) 2.5 h 的 DNA 直方图. 横坐标代表相对 DNA 含量, 纵坐标代表细胞数.

4 重要生化指标的改变

4.1 琥珀酸脱氢酶活性

琥珀酸脱氢酶是线粒体中的一种酶, 它可

将细胞吞食的染料噻唑蓝 (MTT) 转变成蓝黑色物质. 通过观察这种蓝黑色物质的有无, 可以判定线粒体功能存在与否. 线粒体是细胞的能量供应场所, 其功能的丧失意味着细胞生命的结束^[13,14]. 当然, 这一指标要结合细胞膜的完整性来区分是坏死还是程序性死亡.

4.2 谷氨酰胺转移酶活性

谷氨酰胺转移酶是一类催化 Ca^{2+} 依赖的酰基转移反应的酶类. 它是以肽链谷氨酰胺残基 γ -碳酰基作为供体, 以化合物的氨基作为受体底物, 反应导致肽链间的稳定交联而使蛋白质聚合. 这种聚合非常稳定, 可对抗多种化合物的作用. 正在步入程序死亡的细胞, 一般谷氨酰胺转移酶活性升高, 而坏死细胞无变化. 认为与形成凋亡小体内去污剂不溶的蛋白质交联网有关^[15,16].

目前, 人们对于程序死亡的认识还很有限, 以上只是汇集了近些年一些常用的 PCD 判定指标. 至于哪些方法更特异, 还难于定论. 细胞形态方面改变的指标更与 PCD 的描述相符, 其他一些指标多是后来研究发现的, 有些指标如 DNA 片段化、谷氨酰胺转移酶活性升高等在某些 PCD 细胞中尚未见到. 随着人们对程序死亡认识的深入, 去粗取精, 去伪存真, 可能会找到更好的判定方法.

参 考 文 献

- 1 Lockshin R A, Beaulaton J. *Histochem J*, 1981; 13: 659
- 2 Savill J S, Wyllie A H, Henson I E *et al.* *J Clin Invest*, 1989; 83: 865
- 3 Savill J, Fadok V, Henson P *et al.* *Immunol Today*, 1993; 14: 131
- 4 Duvall E, Wyllie A H. *Immunol Today*, 1986; 7: 115
- 5 鄂 征. 组织培养技术, 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 202~204
- 6 方 敏, 张洪卿, 薛绍白等. *科学通报*, 1994; 39: 1125
- 7 Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci M C *et al.* *J Immun Methods*, 1991; 139: 271
- 8 Matsubara K, Kubota M, Adachi S *et al.* *Exp Cell Res*, 1994; 210: 19
- 9 耿勇志, 山田武. *生物化学与生物物理进展*, 1993; 20:

217

- 10 Higuchi M, Aggarwal B. FEBS Lett, 1993; **331**: 252
 11 Roy C, Brown D L, Little J E *et al.* Exp Cell Res, 1992; **200**: 417
 12 Ansari B, Coates P J, Greenstein B D *et al.* J Pathol, 1993; **170**: 1
 13 Jacobson M D, Fburne J, Raff M C. EMBO J, 1994; **13**: 1899
 14 Osmak M, Eljuga D. Res Exp Med, 1993; **193**: 389
 15 Fesus L, Thomazy V, Falus A. FEBS Lett, 1987; **224**: 104
 16 Fesus L, Thomazy V, Autuori F *et al.* FEBS Lett, 1989; **245**: 150

Methods for Detecting Programmed Cell Death.

Li Deling, Wang Huixin, Zhou Tingchong

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China).

Abstract Programmed cell death (PCD) is different from ordinary death, necrosis. It is very important to determine which kind of death is PCD. The PCD detecting methods were reviewed in the following aspects: cell morphologic features, membrane integrity, DNA and other biochemical changes.

Key words programmed cell death, apoptotic body, succinate dehydrogenase, transglutaminase

一种新的平滑肌调控蛋白 Calponin

唐大椿 向继洲¹⁾ 鲁文彤

(同济医科大学医学分子生物学研究室, 武汉 430030)

摘要 Calponin 为一种平滑肌特有的调控蛋白, 分子克隆的证据表明, 它具有两种亚型, α 型和 β 型分别由 292 和 252 个氨基酸组成。它能与肌动蛋白结合, 抑制肌球蛋白 ATP 酶活性和平滑肌收缩。其与肌动蛋白结合域有 38 个氨基酸残基 (第 145~182 位), 丝氨酸 175 在调宁蛋白与肌动蛋白的相互作用中起重要作用, 它还能与钙调蛋白结合, 呈钙依赖性, 其结构域在第 52~144 位残基。调宁蛋白的机能受磷酸化与脱磷酸化的调节。

关键词 调宁蛋白, 收缩蛋白, 平滑肌

平滑肌收缩的细胞内信号传导包括肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, MLCK) 和蛋白激酶 (protein kinase C, PKC) 两条途径。MLCK 使肌球蛋白轻链上丝氨酸 19 磷酸化, PKC 使调宁蛋白 (calponin) 和 caldesmon 磷酸化, 导致肌球蛋白 ATP 酶 (简称 ATP 酶) 活性增加, 平滑肌收缩, 反之, 当肌球蛋白轻链、调宁蛋白和 caldesmon 脱磷酸化, ATP 酶活性下降, 肌肉松弛^[1,2]。由此可见, 调宁蛋白参与平滑肌收缩的调控, 现就调宁蛋白的生化性质、机能特性及结构与功能的关系等问题, 作一简要综述。

1 调宁蛋白的生化性质

1.1 分布

一般认为, 调宁蛋白几乎存在于所有哺乳动物和人的各种平滑肌组织内。Takahashi 等^[3]首先从鸡沙囊平滑肌组织提纯调宁蛋白, 以后, 人们从血管、胃、子宫、输尿管、膀胱和输精管等平滑肌组织内纯化出调宁蛋白, 它在平滑肌组织内的含量与原肌球蛋白 tropomyosin 相似, 是肌动蛋白 actin 含量的 1/7^[4-7]。

¹⁾同济医科大学药理学教研室。

收稿日期: 1995-10-05, 修回日期: 1995-12-04