

- 18 DeVita R J, Schoen W R, Dolduras G A *et al.* Heterocyclic analogs of the benzolactam nucleus of the non-peptidic growth hormone secretagogue L-692429. *Bioorg & Med Chem Lett*, 1995, **5** (12): 1281~ 1286
- 19 Chu L, Mrozik H, Fisher M H *et al.* Aliphatic replacements of the biphenyl moiety of the non-peptidyl growth hormone secretagogues L-692429 and L-692585. *Bioorg & Med Chem Lett*, 1995, **5** (19): 2245~ 2250
- 20 Patchett A A, Nargund R P, Tata J R *et al.* Design and biological of L-163191 (MK-0677): a potent, orally active growth hormone secretagogue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (15): 7001~ 7005
- 21 Nargund R P, Barakat K J, Cheng K *et al.* Synthesis and biological activities of camphor-based non-peptide growth hormone secretagogues. *Bioorg & Med Chem Lett*, 1996, **6** (11): 1256~ 1270
- 22 Nargund R P, Chen M-H, Johnson D B R *et al.* Peptidomimetic growth hormone secretagogues: synthesis and biological activities of analogs varied at the indole nucleus of the prototypical spiro-piperidine L-162752. *Bioorg & Med Chem Lett*, 1996, **6** (14): 1731~ 1736
- 23 Chen M-H, Steiner M G, Patchett A A *et al.* Analogs of the orally active growth hormone secretagogues L-162752. *Bioorg & Med Chem Lett*, 1996, **6** (18): 2163~ 2168
- 24 Evans B E, Rittle K E, Bock M G. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J Med Chem*, 1988, **31** (12): 2235~ 2246
- 25 Cheng K, Chan W W-S, Butler B *et al.* Evidence for a role of protein kinase-C in His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂-induced growth hormone release from rat primary pituitary cells. *Endocrinology*, 1991, **129** (6): 3337~ 3342
- 26 Sartor O, Bowers C Y, Reynolds G A *et al.* Variables determining the growth hormone response of His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ in the rat. *Endocrinology*, 1985, **117** (4): 1441~ 1447
- 27 Pong S-S, Chaung L-H P, Dean D C *et al.* Identification of a new G-protein linked receptor for growth hormone secretagogues. *Molecular Endocrinology*, 1996, **10** (1): 57~ 61

Growth Hormone Secretagogues and Their Structure-activity Relationship. LIU Liang, LAI Lurhua, LI Chong-xi (*Department of Chemistry, Peking University, Beijing 100871, China*).

Abstract Growth hormone (GH) secretagogues are synthetic oligopeptides and their non-peptide mimetics which act on the pituitary and the hypothalamus to stimulate GH release. Because of their small molecular weight, high potency, oral activity and specific action, GH secretagogues can act as new agents in GH treatment. Active compounds with diverse structure, such as peptides, cyclic peptides, peptide alcohols and non-peptide mimetics have been found. Although the exact mode of action of these agents has not been fully established, they may be mimicking a new endogenous GH-releasing factor in a new pathway for the control of the release of GH.

Key words growth hormone, growth hormone-releasing peptide, growth hormone secretagogues

神经元凋亡的离体模型及其检测技术

张宁媛 朱俐 高静

(南京大学医学院, 南京 210093)

摘要 近年来, 随着细胞凋亡研究的深入, 神经元凋亡与神经退变病的关系愈发引人注目, 已建立多种神经元凋亡的离体模型. 多种因素如营养剥夺、自由基、谷氨酸、低钙及β-淀粉样蛋白等均可诱发神经元凋亡. 凋亡的检测, 可先从酶或蛋白质的变化判断神经元的损伤情况, 再结合形态学观察, 最后通过DNA电泳等确证.

关键词 培养神经元, 凋亡, 离体模型, 检测
学科分类号 Q28

目前认为细胞死亡的形式主要有两种, 一种是坏死 (necrosis), 另一种为细胞凋亡 (apoptosis) 或程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD). 许多证据表明, 神经元 PCD 失调引发的细胞增殖与死亡的平衡障碍与多种神经疾病有关^[1], 如脑老化、阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森氏症、肌萎缩侧索硬化症等. 抑制神经元 PCD 可能是治疗神经退变病的突破口之一. 因此迫切需要建立神经元凋亡的离体模型, 以便于研究某些神经退变病的病理机制、筛选抗神经退变病的有效药物.

1 神经元凋亡的离体模型

神经细胞的凋亡受基因编码控制. PCD 控制基因 *ced-3*、*ced-4* 和 PCD 抑制基因 *bcl-2* 等的作用依赖于细胞内外因素的调节, 如胞内 Ca^{2+} 、氧自由基、兴奋性氨基酸、 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid peptide, β -AP) 等, 同时亦与细胞生长因子、细胞间作用、病毒感染、激素、射线等有关, 这些因素是建立各种凋亡模型的理论依据. 基础研究中常用的有营养剥夺、自由基、谷氨酸及低钙等诱发凋亡的模型, 这些模型建立较为容易, 可从相对单一的角度探讨凋亡及抗凋亡机制; 另一些模型, 则是在临床病理研究的基础上建立的, 如由与 AD 密切相关的 β -AP 诱导的神经元凋亡模型, 这些模型对于研究病理机制及筛选有关药物更具有实际意义.

1.1 营养剥夺模型

在发育早期由于靶生的营养因子有限, 只有足够神经营养素支持的神经元才能存活, 其余则凋亡. 若早期神经营养因子相对缺乏或神经元对营养因子的反应性降低, 则促进凋亡发生^[2]. 营养剥夺模型有下列几种:

1.1.1 血清剥夺模型: 皮层神经元体外培养 7 d 后, 撤去血清 24 h, 神经元胞体皱缩,

DNA 电泳呈现梯带, 且神经元死亡可被蛋白质合成抑制剂环己亚胺 (cycloheximide, CHX) 完全阻止^[3].

1.1.2 神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 剥夺模型: 胎鼠交感神经元体外存在 NGF 条件下培养 7 d 后, 用抗 NGF 抗体作用 24~48 h. 光镜观察, NGF 剥夺 18~24 h, 轴突变细, 30 h 胞体小而黑, 48 h 后只观察到少数光亮的神经元. RNA 合成抑制剂放线菌素 D (actinomycin-D, AMD 0.1 mg/L), CHX (1 mg/L) 及其他蛋白质合成抑制剂均可对抗 NGF 剥夺引起的细胞损伤^[4]. Kew 等^[5]详细研究了 NGF 撤除后细胞凋亡的时效关系.

1.1.3 氧-葡萄糖剥夺模型: 胎鼠皮层细胞体外单层培养 14~16 d 后, 换上不含葡萄糖 (glucose, glu) 的培养液, 同时将细胞放在充有氮气的培养体系内^[6]. 氧-glu 剥夺 45~55 min, 神经元水肿, 继而变性坏死, 且不为 CHX 抑制; 但氧-glu 剥夺 90~100 min, 同时用谷氨酸受体拮抗剂进行处理, 则发现胞体皱缩, 轴突变性进而消散, 这种细胞死亡可以被 CHX 阻断, 因此相对于急性坏死, 凋亡是慢速渐进的死亡过程.

1.2 自由基模型

Ratan 等^[7]采用谷氨酸 (glutamic acid, Glu) 诱导谷胱甘肽衰竭的胎鼠皮层神经元模型显示氧化应激, 研究自由基诱导神经元变性的机制. 也有人用 50 μ mol/L H_2O_2 与 100 μ mol/L $FeSO_4$ 处理培养神经元, 诱发其凋亡.

1.3 Glu 模型

胎鼠大脑皮层神经元体外培养 3 d, 加 1 mmol/L Glu, 24 h 后, 46% 神经元死亡. Glu 处理 12~18 h 之间 DNA 碎片最多, DNA 电泳呈现梯带. Glu 作为一种兴奋性氨基酸, 如何激活核酸内切酶启动凋亡, 还知之甚少,

但现在的论点认为胞内 Ca^{2+} 浓度和蛋白激酶 C 是重要因素. Glu 受体的激动剂 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA), 比 Glu 更易诱发神经元凋亡^[8].

1.4 钙通道阻滞剂模型

Koh 等^[9]用 100 $\mu\text{mol/L}$ 的钙通道阻滞剂 (如维拉帕米) 处理体外培养 14 d 以上的成熟皮层神经元 2 d, 神经元出现明显损伤, 且可被 CHX (1~10 $\mu\text{mol/L}$)、AMD (10 $\mu\text{mol/L}$) 逆转. 神经元在低钙培养基中暴露 2 d, 也可观察到蛋白质合成依赖性的神经元溃变.

1.5 β -AP 模型

β -AP 所致凋亡在 AD 发病中的作用已被公认. 在培养的皮层及海马神经元中加含 42 个氨基酸的 $\beta 1\sim 42$ 和更短片段 $\beta 25\sim 35$ 处理 48 h 后, 可发现凋亡的典型形态学和生化学特性^[10]. Gschwind 等^[11]还发现 β -AP 诱导的凋亡有细胞类型的依赖性.

2 神经元凋亡的检测技术

鉴定上述模型神经元是否发生凋亡, 首先要检测诱发凋亡因素是否损伤了培养神经元, 常用噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 法、B-50 蛋白质免疫活性检测法、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 测定法等. 但上述方法不能区分神经元损伤的类型, 即无法区分坏死与凋亡. 通过光镜、电镜的形态学观察, 可以初步鉴定. 最后由 DNA 电泳、TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 试剂盒检测或流式细胞术可确证凋亡产生与否.

2.1 MTT 法

MTT 比色分析的原理是利用活细胞线粒体脱氢酶将染料 MTT 还原成甲瓩颗粒, 以颗粒溶解后呈现的颜色深浅 (A_{570}) 反映活细胞数量及细胞代谢的活跃程度, 从而分析细胞的损伤情况^[12]. MTT 法安全, 快速, 简便, 酶联免疫检测仪即可测定.

2.2 检测酶或蛋白质的变化

PCD 常伴有组织细胞某些酶或蛋白质表

达的变化. 通过酶组化方法可以检测组织中 SGP2 蛋白、组织蛋白酶 D 或谷氨酰胺转移酶的变化, 但这些方法特异性不强. 最近研究表明细胞表面 Fas 抗原可能为 PCD 较特异标记, 1994 年美国 ONCOR 公司已率先推出辣根酶标记和荧光标记的 ApoTag 试剂盒. B-50 蛋白是神经细胞突触前膜的一种生长发育相关蛋白 (亦命名为 GAP-43), 该蛋白质在神经元生长、发育、损伤修复中均有变化, 被称为中枢神经系统可塑性的标记蛋白^[13]. 本实验室最近的研究表明, 凋亡的神经细胞中 B-50 蛋白免疫活性与凋亡严重程度相关. 乳酸脱氢酶 (LDH) 释出量测定是一种判定神经元变性的经典方法, 主要检测神经细胞膜通透性的变化^[14]. 由于离体情况下缺乏吞噬细胞的及时清除, 凋亡细胞质膜趋于解体, 故测量培养基中 LDH 释放量的变化, 可以连续反映细胞死亡的缓慢变化过程.

2.3 形态学观察

2.3.1 光镜观察: 凋亡的神经细胞比正常神经元小且无突起, 在光镜下可观察到成簇的凋亡小体, 包括一个固缩的核或核碎片. 活体细胞, 可应用甲苯胺蓝、藏红等做细胞学涂片染色.

2.3.2 电镜观察: 在电镜下可观察到凋亡神经细胞典型的形态学特征: a. 失去特异性表面结构和胞间连接, 与周围细胞分离. 扫描电镜下细胞表面起泡 (blebbing). b. 细胞体积缩小, 伴有细胞器密集和细胞形状扭曲, 可见凋亡小体. c. 胞内细胞器完整, 线粒体不肿胀, 内膜不破裂. 滑面内质网扩张, 扩张间隙与细胞表面融合. d. 核内染色质浓缩、不规则地聚集于核膜内侧.

2.3.3 荧光观察: 凋亡的神经细胞用吖啶橙等进行荧光标记, 可观察到荧光极强的凋亡碎片. 羰花青荧光染色可染神经元质膜, 还可在活体或固定的标本上追踪纤维联系. 荧光标记法的关键在于把握好荧光强度. 凋亡细胞的荧光强度比正常细胞高, 但其荧光强度不断减弱, 需快速曝光拍摄. 细胞凋亡开始突然, 且

维持时间很短。神经元凋亡后，若未被立即吞噬，质膜破裂，细胞密度逐渐减低。因此形态学观察必须把握好时机，否则很难观察到凋亡的上述形态学特征。

2.4 DNA 电泳

神经细胞凋亡后，核酸内切酶激活，可降解为 180~200 bp 或其整数倍的小片段，凝胶电泳呈阶梯状，即所谓 DNA 梯带。梯带的出现是鉴定凋亡的最具说服力的证据。除《分子克隆》提到的经典 DNA 电泳方法外，Gong 等^[15]提出一种简单快速的凋亡细胞的 DNA 电泳方法，这种方法无酚、氯仿等常规电泳必需的有毒试剂，且 70% 乙醇中可停留 24~72 h 甚至 4 周。微量 DNA 碎片，Rosl^[16]提出用³²P 标记核苷酸，对凋亡后具有粘性末端的 DNA 片段进行末端标记，通过放射自显影检测梯状条带中的核苷酸片段。Huang 等^[17]认为通过测定 DNA 片段的放射量可推知凋亡程度。

2.5 TUNEL 标记法

1992 年 Gavrieli 提出培养细胞的 TUNEL 标记法。PCD 时，DNA 断裂，用非放射性标记的三磷酸核苷酸接在缺口暴露的 3'-OH 端，通过酶标反应可以定性定位^[18]。1993 年 Wijisman 在 DNA 聚合酶 I 或 Klenow 聚合酶作用下将生物素标记的核苷酸原位掺入 DNA 裂口，再用辣根过氧化物酶标记的抗生物素蛋白抗体作用，经二甲氨基氮苯 (dimethylaminoazobenzene, DAB) 显色可使 PCD 细胞阳性着染。这种方法也可以确证凋亡，特异性较好，但有时有假阳性结果干扰。

2.6 流式细胞术 (Flow Cytometry)

特殊处理的单细胞悬液，用计算机进行多种细胞特性分析，如细胞大小、生长状态、胞膜表面标记、胞浆颗粒状态、DNA 含量、胞内酶含量及细胞周期等。PCD 时，DNA 断裂，流式细胞光度计呈现亚二倍体核型峰的特征。在 DNA 直方图上，PCD 细胞出现二倍体峰 (G1 期细胞减少)，G1 峰左侧出现亚二倍体细胞群的峰型。而坏死时，细胞周期中的细胞均出现不同程度减少，亚二倍体细胞量多少不

等。在光散图谱上，PCD 出现低于正常的前向散射和较高的侧散射，坏死呈现单一的前侧高散射^[19]。该方法每秒钟可分析 1 000 至 10 000 个细胞，可信度高，但由于仪器昂贵，尚未普及。

细胞凋亡现象的发现至今已有 40 余年，但直至近几年其重大理论意义和临床参考价值才被真正认识到。细胞凋亡机制研究中，许多关键之谜尚未解开，故建立的模型仍需进一步验证；凋亡的检测，也还缺乏灵敏简便的特异性指标。随着对神经疾病分子病理机制研究的深入，对凋亡的分子机制及基因调控机制的进一步探讨，凋亡模型的建立和检测将有长足的进展。

参 考 文 献

- 1 赵士福. 细胞凋亡与神经系统疾病. 国外医学神经病学神经外科学分册, 1996, 23 (3): 124~12
- 2 Koike T, Martin D P, Johnson E M. Role of Ca^{2+} channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced by trophic-factor deprivation: Evidence that levels of internal Ca^{2+} determine nerve growth factor dependence of sympathetic ganglion cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86 (16): 6421~6425
- 3 Koh J Y, Gwag B J, Lobner D *et al.* Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. Science, 1995, 268 (28): 573~575
- 4 Martin D P, Schmidt R E, DiStefano P S *et al.* Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. J Cell Bio, 1988, 106 (3): 829~844
- 5 Kew J N C, Smith D W, Sofroniew M V. Nerve growth factor withdrawal induces the apoptotic death of developing septal cholinergic neurons *in vitro*: protection by cyclic AMP analogue and high potassium. Neurosci, 1996, 70 (2): 329~339
- 6 Gwag B J, Lobner D, Koh J Y *et al.* Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation *in vitro*. Neurosci, 1995, 68 (3): 615~619
- 7 Ratan R R, Murphy T H, Baraban J M. Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. J Neurochem, 1994, 62 (1): 376~379
- 8 Kure S, Tominaga T, Yoshimoto T *et al.* Glutamate triggers internucleosomal DNA cleavage in neuronal cells. Biochem Biophys Res Commun, 1991, 179 (1): 39~45
- 9 Koh J Y, Cotman C W. Programmed cell death: its possi-

- ble contribution to neurotoxicity mediated by calcium channel antagonists. *Brain Res*, 1992, **587** (2): 233~ 240
- 10 Loo D T, Copani A, Pike C J *et al.* Apoptosis is induced by β -amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (17): 7951~ 7955
- 11 Gschwind M, Huber G. Apoptotic cell death induced by β -amyloid 1-42 peptide is cell type dependent. *J Neurochem*, 1995, **65** (1): 292~ 300
- 12 Hansen M B, Nielsen S E, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Meth*, 1989, **119** (2): 203~ 210
- 13 Benowitz L I, Perrone-Bizzozero N I, Neve R L *et al.* GAP-43 as a marker for structural plasticity in the mature CNS. *Prog Brain Res*, 1990, **86**: 309~ 320
- 14 Keilhoff G, Wolf G. Comparison of double fluorescence staining and LDH-test for monitoring cell viability *in vitro*. *Neuroreport*, 1993, **5**: 129~ 132
- 15 Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selection procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem*, 1994, **218** (2): 314~ 319
- 16 Rosl F. A simple and rapid method for detection of apoptosis in human cells. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20** (19): 5243 ~ 5244
- 17 Huang P, Plunkett W. A quantitative assay for fragmented DNA in apoptotic cells. *Anal Biochem*, 1992, **207** (1): 163~ 167
- 18 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-sasson S A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear

- DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992, **119** (3): 493~ 501
- 19 Huschtscha L I, Jeitner T M, Andersson C E *et al.* Identification of apoptotic and necrotic human leukemic cell by flow cytometry. *Exp Cell Res*, 1994, **212**: 161~ 165

***In Vitro* Models of Neuronal Apoptosis and the Detective Methods.** ZHANG Ning-yuan, ZHU Li, GAO Jing (*School of Medicine Nanjing University, Nanjing 210093, China*).

Abstract Recently, attention has been focused on the association between neuronal apoptosis and neurodegenerative diseases during the deep-going study of apoptotic cells. Many *in vitro* models of neuronal apoptosis have been developed, such as induced by nutrition deprivation, free radicals, glutamic acid, Ca^{2+} , β -amyloid peptide etc. The detective technology of neuronal apoptosis is composed of testing the changes in enzymes and proteins which reflected neuronal damage, simultaneous morphological observation, and finally DNA electrophoresis etc, which could confirm the apoptosis.

Key words cultured neurons, apoptosis, *in vitro* model, detection

蛋白酶体结构和功能研究进展

彭睿 秦浚川

(南京大学生物化学系, 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

宋晓龄

(美国 Texas 大学西南医学中心)

摘要 蛋白酶体是真核细胞内依赖 ATP 的蛋白质水解途径的重要成分, 负责大多数细胞内蛋白质的降解. 20 S 蛋白酶体有多种肽酶活性, 其活性位点为 Thr. 19 S 复合物与 20 S 蛋白酶体结合成为 26 S 复合物, 能降解泛素化蛋白. 近几年来, 蛋白酶体的分子组成、亚基、生化机理、胞内功能等方面的研究取得了明显进展.

关键词 蛋白酶体, 结构, 功能, 蛋白酶体活化因子

学科分类号 Q71