

细胞凋亡研究进展与在运动医学中应用展望

周末艾* (国家体育总局科研所,北京 100061)

摘要 细胞凋亡是有别于细胞坏死的生理性细胞程序化死亡,在形态学和生物化学及细胞的最终归宿等方面凋亡细胞具有与坏死细胞完全不同的特点:细胞皱缩,核染色质凝缩并双丝裂解,细胞膜出芽、形成凋亡小体, DNA 断裂成有规则的“梯带”片段,整个凋亡过程中蛋白质合成和能量供应仍然存在,最后,凋亡细胞被吞噬细胞吞噬。细胞凋亡机制涉及到人类的生长、发育和衰老,更涉及到多种现代疾病的发病机理。在运动医学及运动生理学中开展有关细胞凋亡机制的研究,将为竞技体育和全民健身开拓新的领域和途径。

关键词 细胞凋亡 坏死 运动医学

细胞凋亡(Apoptosis)由 Kerr 等人于1972年首次提出,他们认为这是一种广泛涉及到组织细胞动力学的基本生物学现象。但这个概念当时并未引起注意,在沉默十余年后,学术界终于发现了apoptosis的重要性。自80年代中期起,对apoptosis的研究蓬勃发展起来。目前,所涉及的领域也越来越多。从字面意义而言,apoptosis由两部分组成,一是前缀apo-,派生自希腊文,意为离开,分离(away off, apart),生物学的意义为凋落;ptosis指一个器官或组成部分的脱落,医学上的意义为上眼睑下垂。两者结合起来形成一个全新的概念,用于描述发生于发育、成熟、衰老过程中,对不同有害刺激或疾病中的一种特殊的细胞自杀行为。这些刺激因素包括基本生长因子丧失、病毒攻击或辐射造成的DNA损伤等等。这种细胞自杀行为往往是利他的,不对周围的组织细胞产生副作用。通常而言,细胞凋亡对机体是有利的,也被称为细胞程序化死亡(Programmed cell death),这是完全不同于坏死的一种死亡途径。细胞凋亡广泛存在于包括动物、植物在内的真核生物细胞中。

1 凋亡细胞的形态学和生物化学变化

凋亡细胞具有与坏死细胞截然不同的形态学和生物化学特点。从形态学而言,凋亡细胞有3个最基本而且常见的特点:一是核染色质凝缩、DNA断裂;二是细胞皱缩、细胞器基本维持正常;三是细胞表面出芽、并脱落形成膜包被的凋亡小体。从细胞生物化学而言,细胞在凋亡期间,蛋白质合成仍然进行,特别是一些与凋亡过程相关的基因表达,生成特殊的酶。因此,能量供应在此期间仍然需要。最后,凋亡细胞被巨噬细胞吞噬。

1.1 细胞核变化

在细胞凋亡期间,细胞核出现目前机制尚未明了的染色质凝缩和核被膜降解。在细胞核存在着核纤层蛋白(lamin),这是一种与核内层被膜相联系的中等纤维,形成核的骨架结构,为染色质附着到核被膜提供一个框架结构。凋亡期间核纤层蛋白因水解而解聚,这个过程是不可逆的。有证据表明,胸腺细胞中,糖皮质激素促进先于DNA断裂的核层蛋白B1降解,核层蛋白B结合到称为基质附着区(matrix attachment region)的特殊的DNA特征序列。这些基质附着区在染色质中以2~5万bps间隔规则地分隔。因此,Neamat 等于1995年提出一个假说,认为核层蛋白降解促进DNA大片断形成,这些片段是由于基质附着区松解而提供内切酶通路。

大多数细胞凋亡的生化特征是不同的DNA片段形成,这些片段的大小相当于寡核小体(oligonucleosome)的大小,长度为180-200bps。DNA在核小体之间断裂,生成梯带DNA片段(ladder fragment)。近期的观察也提示凋亡期间也产生大DNA片段(3~5万bps和20~30万bps),但这种大DNA

* 作者简介:周末艾,男,1964年8月出生,博士,助理研究员。

片段在寡核小体存在或不存在的条件下产生。而当上述两种片段独立存在时,大DNA片段就可能不是寡核小体的前体。

作为细胞凋亡特征之一的DNA断裂是内源性Ca⁺⁺和Mg⁺⁺依赖而被Zn抑制的中性内切酶激活的结果。与凋亡有关的可能的候选内切酶有:

DNase I: Ca⁺⁺和Mg⁺⁺依赖,最适pH7.5(pH5.5~9.0),肌动蛋白抑制,其作用位点在核小体连接区内,产物是140~195 bps之片段。DNase I在胞内存在于内质网和高尔基复合体之核周区域,尽管凋亡早期核纤层蛋白溶解而使核被膜破裂,可允许DNase I进入,但是否DNase I真正获得进入核DNA的通路尚不清楚。另外, DNase I需要辅助因子而激活,因为纯化的DNase I不引起梯带DNA,而在培养液中加入血清或核提取物预孵则可引起之。

DNase II: 主要存在于溶酶体内,但也发现于核内,不依赖于Ca⁺⁺、Mg⁺⁺,最适pH5.5(pH3.0~7.0)。纯化的DNase II可使离体中华仓鼠卵巢细胞出现凋亡细胞的梯带5'-OH末断之DNA。但问题是DNase II激活所需的胞内酸化仍未广泛见于凋亡期间。Zn不抑制DNase II活性,但可抑制能激活DNase II的胞内酸化。

Nuc 18: 从凋亡的胸腺细胞核中分离。依赖于糖皮质激素受体,激活受Ca⁺⁺、Mg⁺⁺依赖,由地塞米松诱导,可能以与一种阻遏蛋白结合成复合体形式存在,这种复合体在糖皮质激素处理后分离出Nuc 18。

其它尚有一些可能的内切酶,如Nuc-1、Nuc-40、Nuc-58等。

1.2 细胞质变化

凋亡细胞在形态学上最明显的变化是细胞破裂成凋亡体。已有证据表明微丝和微管等细胞骨架的变化与凋亡小体形成密切相关。用秋水仙素、长春花碱、nocodazole等破坏微管结构的试剂处理,可以诱发细胞凋亡,提示微管的结构破坏是凋亡的最初条件之一;用taxol处理使微管结构稳定,可防止秋水仙素诱发的梯带DNA和凋亡体形成。用破坏微丝结构试剂细胞松弛素B先处理HL-60细胞,然后将细胞暴露在凋亡刺激下,可引起核裂解和DNA断裂,但没有凋亡体生成,提示肌动蛋白微丝是膜破裂的基础。

一类在凋亡过程中积累的酶类是转谷氨酰胺酶(组织型或II型)。该酶存在于胞液中,Ca⁺⁺依赖,催化形成N^ε-(γ-谷氨酰)-赖氨酸异二肽,在蛋白质中形成内谷氨酰胺提供的γ-酰胺与赖氨酸之ε-氨基形成交联,使之能抵抗机械断裂和化学攻击,从而防止胞内有害元素渗出胞外环境,引起炎症反应。可以形成这种交联的蛋白有:肌动蛋白、钙结合蛋白II、纽带子、纤维连接蛋白和其它尚未确定的蛋白。

1.3 细胞膜改变

细胞凋亡期间,存在剧烈的细胞膜变化。凋亡细胞从邻近细胞或从胞外基质中分离开,失去其特殊结构如微绒毛,但暴露出其特别的标记物,如α_vβ₃ Vitronectin、CD36、凝血栓蛋白等。这些标记物被吞噬细胞迅速识别而被除去,避免了细胞成分渗漏出造成炎症。

许多细胞可作为凋亡体的清除者起作用,从而保证凋亡体被迅速清除。许多健康组织,如上皮组织中不具有大量专职的巨噬细胞以吞噬凋亡细胞,所以,其它细胞在必要时也可具有同样的功能,这些细胞被称为“兼职”或“业余”吞噬细胞。

吞噬细胞也可通过凋亡细胞之外层质膜上脂成分的变化识别。通常阴性的磷脂酰丝氨酸暴露在外层膜表面,在激发吞噬反应中起重要作用。近期揭示具有抗炎症和免疫抑制特点的免疫抑制蛋白lipocortin 1在发生于哺乳类退化中的细胞凋亡中被向上调节,专一结合Ca⁺⁺和磷脂酰丝氨酸,还可卷入磷脂酰丝氨酸诱导的吞噬作用。凋亡细胞也要求一种Ca⁺⁺依赖的磷脂蛋白,钙结合蛋白V(annexin V),该蛋白对磷脂酰丝氨酸也有高亲和力。

另外一些含有精-甘-天门冬氨酸(RGD)序列的多肽和蛋白质,如整合蛋白、凝血栓蛋白等也与凋亡体的识别、吞噬有关。

1.4 细胞凋亡与坏死的比较

细胞凋亡与坏死在形态学、生物化学等诸多方面均存在明显的差别:(1)凋亡细胞出现皱缩,但细胞器大多正常,细胞膜完整,后期细胞膜出芽;坏死细胞表现为胞体肿胀,同时细胞器肿胀,细胞膜破裂,形成小泡。(2)凋亡细胞核染色质浓缩,丝状破裂,DNA变化启动早,被内切核酸酶降解成有组织的小片段(180~200bps),在凝胶电泳上表现为梯带DNA片段;坏死细胞核染色质分解,DNA变化较迟,被溶酶体酶类降解为

随机片段。(3)凋亡过程中仍需要一些特定蛋白质的合成,如前面提及的各种相关蛋白,因此,能量供应也是必须的;坏死过程中,蛋白质合成停止,能量供应消失。(4)作为死亡的最后结果,凋亡细胞被巨噬细胞或周围细胞融合,可被再利用;坏死细胞则因胞内物质随细胞破裂而渗漏出,对周围组织细胞产生毒害作用,组织出现炎症反应。

1.5 凋亡之信号

当细胞所处环境变化,如某些激素出现和消失,或者胞内出现的某些相互反应变化而导致细胞启动凋亡程序,但这些外部刺激通常并不直接控制凋亡,仅仅影响决定细胞自杀或存活的信息的一部分,因此,需要一些特殊的信息通路以启动凋亡程序。这些信号传递系统涉及到受体的刺激、蛋白激酶/磷酸酶级联的激活、抑制特别基因转录的第二信使的释放等等。目前,已确认参与了凋亡过程的关键分子包括:

(1)Fas 家族:一些成员促进细胞存活,而另一些成员,特别是能与 TNFR 1 受体相关者则促进凋亡。细胞表面 Fas 积聚(例如,通过 Fas-配基的结合)引起的细胞凋亡在免疫系统的调节中起着重要的作用。

(2)蛋白酪氨酸激酶(PTKs):在许多信号从细胞表面受体传递到核中起着关键的作用。可能是一些具有原有 PTK 活性的生长因子受体,或者缺乏原有激酶活性但在接受配体刺激后可恢复或激活胞内 PTK 的受体。其它一些激酶如丝氨酸/苏氨酸激酶等也可参与细胞凋亡,并在不同的条件下起着不同的作用。

(3)Ras 信号通路:这是一个超级家族,至少有 50 个小 GTPase,它们影响细胞增生、分化、胞内运输和细胞骨架结构。其中,H-K-和 N-Ras 在信号传递过程中起关键作用,它们联系受体和非受体酪氨酸激酶下传到丝氨酸/苏氨酸激酶,包括促分裂原活化蛋白(MAP)激酶;而 Ras 本身则向上转化为肿瘤基因 c-raf-1 编码的蛋白激酶。这条被称为 Ras/Raf/MAP 激酶级联系统的途径能抑制细胞凋亡。

(4)蛋白激酶 C(PKC)和 Ca²⁺:表面受体通过 G 蛋白和 PTK 偶联 Ca²⁺信号途径。G 蛋白和 PTK 水解磷酸肌醇 4,5-二磷酸(PtdInsP₂)产生三磷酸甘油(IP₃)和二脂酰甘油(DG)。IP₃促进 Ca²⁺从内质网中释放,胞内钙浓度上升;DG 激活丝氨酸/苏氨酸激酶和 PKC。

(5)神经酰胺(Ceramide):作为一种第二信使的神经酰胺,由膜鞘脂(sphingolipid),如鞘磷脂(sphingomyelin)水解释放,或在激活蛋白激酶级联系统的过程中释放。神经酰胺抑制白细胞生长而促进其分化,影响蛋白质磷酸化,调节基因转录。白介素-1(IL-1)、干扰素-γ(interferon-γ)和肿瘤坏死因子(TNF-α)等引起凋亡极可能与神经酰胺有关。

(6)cAMP:cAMP 在不同类型细胞中,依所处信号通路不同而对凋亡产生不同的影响。主要通过 cAMP 依赖的蛋白激酶起作用。

(7)氧自由基和氧化紧张:支持和反对氧自由基在凋亡过程中起作用的证据均存在。在支持的证据中,自由基可以作为氧化紧张的结果直接触发细胞凋亡,也可是其它药剂引起凋亡的中间步骤之一。一氧化氮(NO)也是在一些条件下产生凋亡的重要因素,例如,具有神经毒性的过氧化亚硝基(OONO[•]),在低水平时主要是通过细胞凋亡机制引起,而在高剂量情况下则导致细胞坏死。

2 人类疾病中的细胞凋亡

细胞凋亡之所以在近十余年来成为医学、生物学领域中热门话题,是因为它涉及到几乎所有正常细胞机能和大多数现代疾病,如肿瘤、某些心血管疾病、老年病、AIDS 病、神经系统疾病等等。虽然说凋亡本身是一种生理性保护机制,但细胞的生命和死亡的调节却是机体组织能健康存活的中心所在。基因及其产物处于复杂的协作和动态平衡之中。这种平衡调节被打破将导致机能失调和疾病。细胞凋亡被抑制和存活细胞增多是一些肿瘤组织疯狂增长的原因之一;而某些病毒甚至携带自己的抗凋亡基因,以防止被侵入的细胞启动自杀程序;另一方面,凋亡细胞增加可能是 AIDS 病中 CD4⁺ T 细胞过多死亡的原因;而一些神经变性疾病是失去一些细胞或细胞群的结果。虽机理尚不清楚,但极有可能是细胞凋亡的过分表现的结果,如亨廷顿(Huntington's)病为纹状体内的一群神经原丧失,帕金森(Parkinson's)病是基底神经节细胞变性,阿尔茨默(Alzheimer's)病与皮层胆碱能神经原死亡有关,肌萎缩性侧索硬化(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)属皮层和脊髓运动神经原丧失的结果,与运动机能最直接相关的疾病是肌营养不良,目前有关研究表明,缺乏肌肉营养因子(dystrophin)而导致肌肉细胞过分凋亡,该因子是由相关基因编码的、细胞膜辅助的细胞骨架蛋白。

3 细胞凋亡研究在运动医学和运动生理学中应用展望

尽管目前细胞凋亡已成为医学、生物学研究中热门话题,但在运动医学中似乎尚未对此引起足够的重视,而与训练相关的研究更是寥若晨星。我们联机检索从80年代至今由《Medline(美国医学文摘)》收录的关于训练和骨骼肌中**细胞凋亡**的研究的论文仅有十数篇。不过,就在这些为数不多的论文中,亦可发现一些可供研究的苗头。首先,早在90年代初期,即有研究论文表明肌肉在某些条件下可以发生细胞凋亡,其凋亡细胞的形态学特点与一般的凋亡细胞特点一致,与坏死细胞的形态学表现也大相径庭(Fidzianska等,1991)。表现在于:凋亡肌细胞皱缩,每个凋亡的肌细胞转化成致密的凋亡体,最后被周围邻近细胞或巨噬细胞吞噬;而在大片肌肉组织损伤产生细胞坏死,肌肉细胞肿胀,细胞结构破坏而破裂。能引起肌肉细胞凋亡的条件因素有:某些神经源或肌源性肌病,如前面提及的肌萎缩性硬化和肌营养不良等,许多退行性和代谢性肌肉疾病中细胞死亡也并不附带典型的炎症反应,其潜在机理是肌细胞凋亡;某些药物处理,如让新生大鼠服用布比卡因(bupivacaine, BPVC)后,肌细胞发生凋亡的几率大大增加(Fidzianska等,1991)。在另外一些动物实验中,在体和离体的肌肉材料在经历各自不同的刺激后,表现出典型的细胞凋亡的形态学和生物化学及分子生物学特点。Cheng等(1995)的研究表明离体的乳突肌过分伸展超过3h即可引起凋亡的肌细胞急剧增加,Fas表达,活性氧(包括NO)含量增加。Olive等(1995)让新生SD大鼠暴露在 γ 射线中,在照射后6小时,骨骼肌在大量出现凋亡细胞,48小时后减少到接近正常水平,5天后,增生的肌细胞数量明显增加。其次,有报道表明肌纤维具有吞噬凋亡体的能力。在Fidzianska等人(1990)的电镜观察中,来自凋亡肌细胞的凋亡体被邻近正常肌细胞吞噬。

细胞凋亡在运动训练条件下是否也发生?目前尚未有直接于训练人体的组织材料上进行的实验研究报道,仅有寥寥几篇于训练动物上进行细胞凋亡实验的报道。Concordet等人(1993)对两次力竭的Wistar大鼠之胸腺进行细胞凋亡研究,发现无论两次力竭、一次力竭,还是中等强度(相当于一次力竭强度的一半)训练,胸腺细胞之DNA表现出梯带电泳这一典型的凋亡特点。Sandri等(1995)在进行性肌营养不良的mdx小鼠训练模型研究,观察到在轮形笼中、经过一夜自发跑步的对照mdx小鼠和肌营养不良mdx小鼠均出现凋亡的肌肉细胞;不过,在正常小鼠肌肉中凋亡细胞明显低于肌营养不良小鼠。

尽管目前对肌肉,特别是在运动训练情况下,肌肉组织细胞发生凋亡的研究尚寥寥无几,但从上述为数不多的研究中仍可明确肌肉组织亦有细胞凋亡发生这个概念。那么,细胞凋亡的研究在运动医学和运动生理学中又有何实际意义?一方面,运动医学研究中一个非常棘手的问题是如何消除运动性疲劳、减少运动性损伤,使运动员在尽可能少地受到伤害的情况下,尽可能提高比赛成绩。细胞凋亡研究引入运动医学中,为消除运动性疲劳、减少运动性损伤开拓了一条新思路。如运动性疲劳损伤中,机体组织或多或少地存在损伤细胞,这些损伤细胞的出路不外有两条:或修复成正常细胞,或死亡。细胞凋亡的研究则是通过某些方法,使那些损伤严重而最终会死亡的细胞经由凋亡途径而非坏死途径死亡,死亡的细胞不会对周围正常的细胞组织造成进一步伤害,有助于疲劳的消除,损伤组织的修复。此外,对细胞凋亡机制的研究,也为解释运动训练中某些目前尚难以理解的现象,如运动员的成绩无缘无故的下降,而此时并无明显的器质性病变提供新的切入点。其三,由于细胞凋亡更多地涉及到现代疾病,如肿瘤癌症、老年病等,因此,细胞凋亡的研究与运动训练研究相结合,在全民健身运动中具有一定指导意义和实际意义。

4 参考文献

- 1 Bar PR. Apoptosis-The cell's silent exit. Life Science, 1996,59(5/6):369~387
- 2 Bonfoco E, Krainic D, Ankarcrone M, et al. Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1995, 92:7162~7166
- 3 Cheng W, Li B, Kajstura J, et al. Stretch-induced programmed myocyte cell death. J. Clin. Invest., 1995,96(5):2247~2259

(下转第77页)

部所占比例很小。

3.2 假设环节内和环节间均存在能量转换情况下计算所得机械功 W_{wb} 最接近于人体实际做功的情况,由其所得机械效率也更接近于实际效率。

3.3 运动员跑步过程中环节内和环节间是存在能量转换的,且环节间能量转换是主要的,环节内能量转换只占一小部分。

3.4 运动员跑步过程中,身体各环节能量变化规律为:在着地缓冲阶段,躯干和支撑腿能量下降,上肢和摆动腿能量上升,身体总机械能下降;在蹬伸阶段,躯干和支撑腿能量上升,上肢和摆动腿能量下降,身体总机械能上升;在腾空阶段,躯干和身体总能量几乎保持不变,而上肢和支撑腿能量上升,只有摆动腿能量下降。身体总机械能受躯干能量变化影响最大。

3.5 分析跑步过程中运动员身体各环节能量变化曲线,可以对运动员的跑步技术质量作出诊断。

4 参考文献

- 1 严波涛,等. 人体机械功计算方法的实验研究. 西安体育学院学报,1993;1
- 2 戴尔·坎贝尔. 长跑的力学. 武汉体育学院学报,1986;3
- 3 秦正光. 对跑动中肢体机械能确定和分配的分析. 体育教学,1984;1
- 4 严波涛. 人体肌肉工作的运动生物力学测量与评价. 西安体育学院学报,1992;1
- 5 大卫·A·丹蒂,等. 运动生物力学标准化测试(二). 体育情报,1989;5
- 6 李良标,等. 运动生物力学. 北京体育学院出版社
- 7 Keith R. Williams. The relationship between mechanical and physiological energy estimates. *Medicine and Science In Sports and Exercises*, 1985
- 8 Peter R. Cavanagh Roger Kram. The efficiency of human movement—a statement of the problem. *Medicine and Science In Sports and Exercises*, 1985
- 9 Robert S. Adelaar. The practical biomechanics of running. *The American Journal of Sports Medicine*, 1986
- 10 冯敦寿,等. 王秀婷 10000 m 跑全程技术运动生物力学分析. 西安体育学院学报,1996;3

1997 11 25 收稿 责任编辑:蓝光

(上接第 72 页)

- 4 Concordet, J-P, Ferry, A. Physiological programmed cell death in thymocytes is induced by physical stress(exercise). *Am. J. Physiol.*, 1993, 256(Cell Physiol. 31):C626~C629
- 5 Fidzianska A, Goebel HH. Phagocytic capacity of human muscle fibers. *Hum. Pathol.*, 1992, 23(9):1014~1047
- 6 Fidzianska A, Kaminska A. Apoptosis: a Basic pathological reaction of injured neonatal muscle. *Pediatr. Pathol.*, 1991, 11(3):421~429
- 7 Fidzianska A, Goebel HH, Warlo I. Acute infantile spinal muscular atrophy. Muscle apoptosis as a proposed pathogenetic mechanism. *Brain*, 1990, 113(Pt2):433~445
- 8 Fidzianska A, Kaminska A, Glinka Z. Muscle cell death. Ultrastructural differences between muscle cell necrosis and apoptosis. *Neuropathol. Pol.*, 1991, 29(1-2):19~28
- 9 Fimia GM, Gottifredi V, Passanati C, et al. Double-stranded internucleosomal cleavage of apoptotic DNA is dependent on the degree of differentiation in muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271(26):15575~15579
- 10 Hale AJ, Smith CA, Sutherl LC, et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.*, 1996, 236(1):1~26
- 11 Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 1972, 26:239~257
- 12 Neamati N, Fernandez A, Wright S, et al. Degradation of lamun B₁ precedes oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei. *J. Immunol.*, 1995, 154:3788~3795

1998-2 20 收稿 责任编辑:蓝光