



第十五章 细胞衰老与凋亡

CELL SENESCENCE AND DEATH



<http://www.cella.cn>

第一节 细胞衰老

Aging , Senescence, 指细胞随着年龄增加, 机能和结构退行性变化, 趋向死亡的不可逆现象。

衰老是生命的普遍现象, 发生在生态系统、群落、种群、个体、细胞以及分子等不同层次。



一、人体细胞的动态分类

- 更新组织：如上皮细胞、血细胞。构成更新组织的细胞可分为3类：①干细胞、②过渡细胞、③成熟细胞。
- 稳定组织：可补偿性增生，如：肝、肾细胞。
- 恒久组织：细胞不再分裂，如神经细胞。
- 可耗尽组织：如人类的卵巢实质细胞。



二、细胞衰老的特征

(一) 形态变化

核	增大、染色深、核内有包含物
染色质	凝聚、固缩、碎裂、溶解
质膜	粘度增加、流动性降低
细胞质	色素积聚、空泡形成
线粒体	数目减少、体积增大
高尔基体	碎裂
尼氏体	消失
包含物	糖原减少、脂肪积聚
核膜	内陷



(二) 分子水平的变化

- 1. DNA: 复制与转录受阻, 端粒DNA、mtDNA缺失。
DNA氧化、断裂、缺失和交联, 甲基化程度降低。
- 2. RNA: 含量减少。
- 3. 蛋白质: 合成下降, 发生修饰、交联。
- 4. 酶分子: 物理与化学特征改变, 酶失活。
- 5. 脂类: 不饱和脂肪酸被氧化。

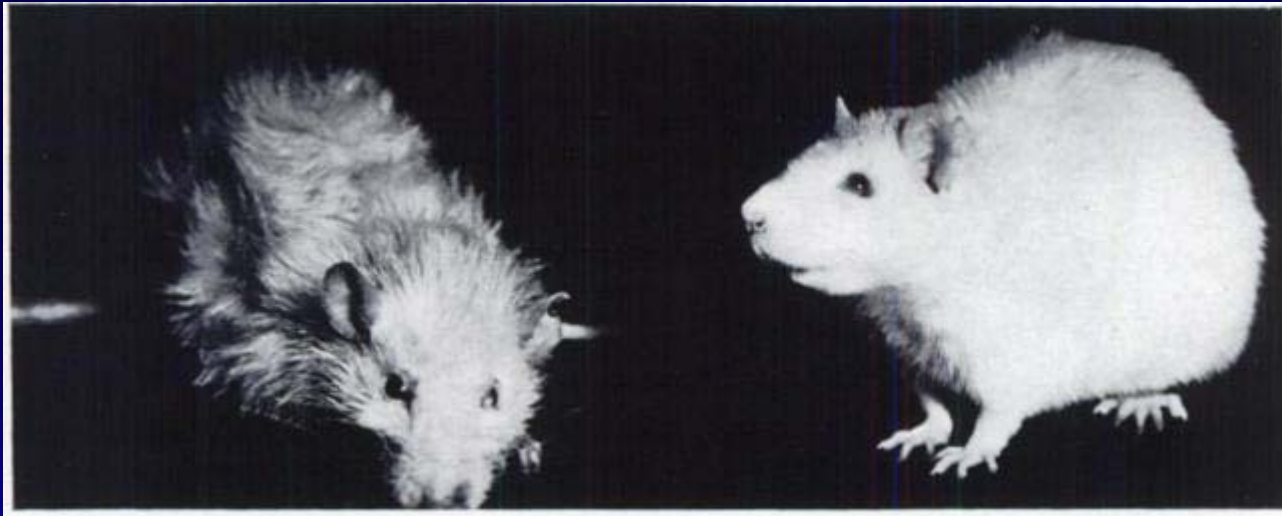


三、细胞衰老的分子机理

- 1. 代谢废物积累：如：脂褐质，老年性痴呆（AD）脑细胞内的 β -淀粉样蛋白。
- 2. 线粒体DNA突变：线粒体自由基浓度高，mtDNA是裸露分子，容易发生突变。
- 脑、心、骨骼肌的氧负荷最大，组织最易衰老。
- caloric restriction能延长大鼠寿命50%-70%。



- Thin rat bury fat rat



- The rats are both 1000 days old, very old for rats. The one on the right was calorie restricted. The one on the left is near death and shows typical signs of old age similar to what happens in humans.
- Image cited from Clive McCay 1939.

3. 自由基学说 (free radical theories)

- 自由基是含不成对电子的原子或基团，具有高度反应活性。包括：氧自由基（如 $\cdot\text{OH}$ ）、氢自由基（ $\cdot\text{H}$ ）、碳自由基、脂自由基等。
- 自由基来源：外源性（如辐射）、内源性。
- 内源性自由基产生于①由线粒体呼吸链电子泄漏产生；②由氧化酶（如MFO）催化底物羟化产生。



- 自由基可引起DNA、蛋白质、脂类氧化、变性和交联，实验表明DNA中OH⁸dG随着年龄而增加。
- 正常细胞内存在清除自由基的防御系统。
 - 酶系统：SOD、CAT、GSH-PX。
 - 非酶系统：维生素E、醌类电子受体
- Orr和Sohal（1994），将SOD基因导入果蝇，其寿命比野生型延长1/3。



4. 程序性衰老 (programmed senescence)

- 生物的生长、发育、衰老和死亡都由基因程序控制的，衰老是某些基因依次开启或关闭的结果。
- 例1. 在小鼠肝中，胚胎早期表达的胞质丙氨酸转氨酶 (cAAT) 为A型，随后停止表达，衰老时则表达B型cAAT
- 例2. 肝脏中的衰老标志蛋白2在老年期表达。



5. 复制性衰老 (replicative senescence)

- 细胞的增殖次数是有限的，称“Hayflick”极限。如人胚成纤维细胞可培养60-70代。
- DNA每复制一次端粒就缩短一段，到一定程度时，则激活DNA损伤检验，细胞凋亡。人的成纤维细胞端粒每年缩短14-18bp。
- 端粒酶可修复端粒，此酶仅在干细胞中表达。



6. 衰老基因学说

- 子女的寿命与双亲的寿命有关；动物都有相当恒定的平均和最高寿命；
- 成人早衰症：约39岁衰老，47岁生命结束；婴幼儿早衰症：1岁衰老，12~18岁生命结束；
 - 早衰症患者体内解旋酶发生突变。
- 衰老时，衰老相关基因（SAG）活跃表达，如 senescent cell derived inhibition of DNA synthesis 。



- Werner's syndrome



A 37 years old patient, Adoue DFP 1997

- Hutchinson-Gilford syndrome



9 year old

8 year old





<http://www.cella.cn>

第二节 细胞坏死与凋亡

细胞死亡并非与机体死亡同步。正常的组织中也发生细胞死亡，它是维持组织机能和形态所必需的。



一、细胞死亡的方式

- (一) 细胞坏死
- 细胞受到环境因素伤害，引起细胞死亡的现象。
- 形态变化的原因：酶性消化、蛋白变性。
- 如消化酶来源于死亡细胞本身的溶酶体，则称为自溶（autolysis）；若来源于浸润坏死组织内白细胞溶酶体，则为异溶（heterolysis）。



- 细胞坏死初期，胞质内线粒体和内质网肿胀、崩解，结构脂滴游离、空泡化，蛋白质颗粒增多，核发生固缩或断裂。
- 随坏死进程，细胞质呈强嗜酸性，苏木精/伊红染色呈均一红色。
- 细胞膜不完整，台盼蓝染色阳性(活细胞不着色)。
- DNA随机降解，细胞内容物流出，引起炎症。

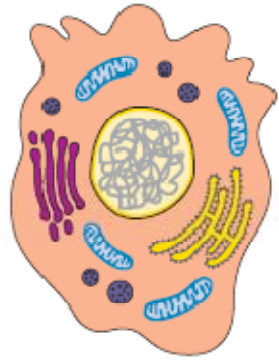


(二) 细胞凋亡

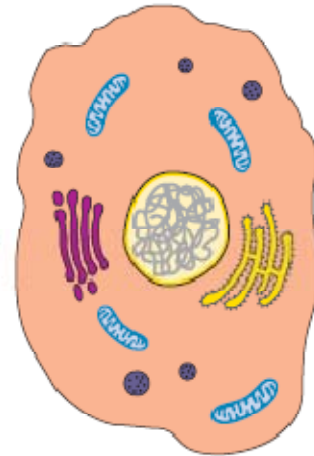
- ①细胞通过出芽的方式形成许多凋亡小体；
- ②凋亡小体内有结构完整的细胞器；
- ③不引起炎症；
- ④线粒体无明显形态变化，溶酶体活性不增加；
- ⑤内切酶活化，DNA有控降解，凝胶电泳图呈梯状；
- ⑥凋亡通常是生理性变化，坏死是病理性变化。



Necrosis



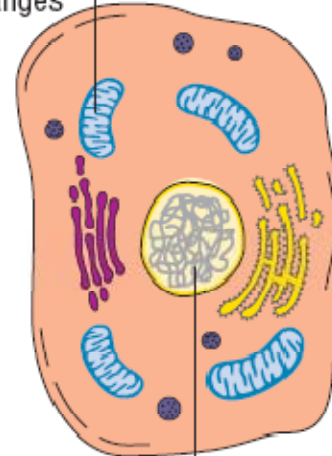
normal



reversible swelling



mitochondrial morphological changes

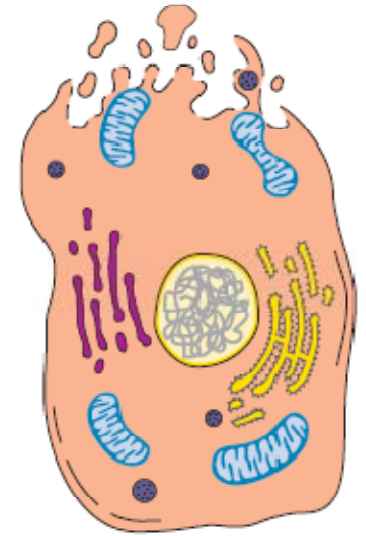


chromatin pattern conserved

irreversible swelling

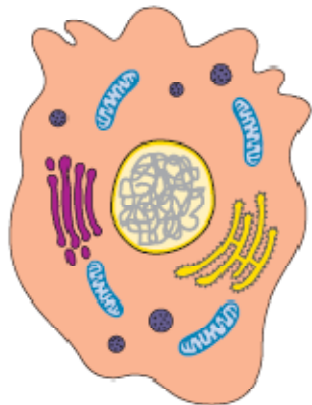


membrane breakdown



disintegration

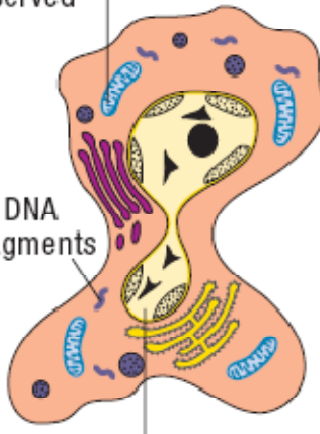
Apoptosis



normal

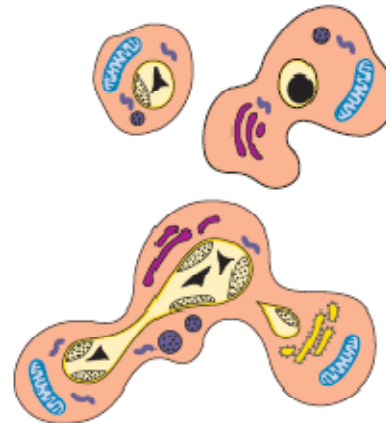


mitochondrial morphology preserved



nuclear changes

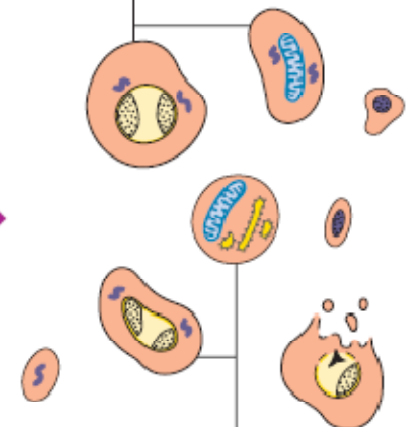
condensation (cell blebbing)



fragmentation



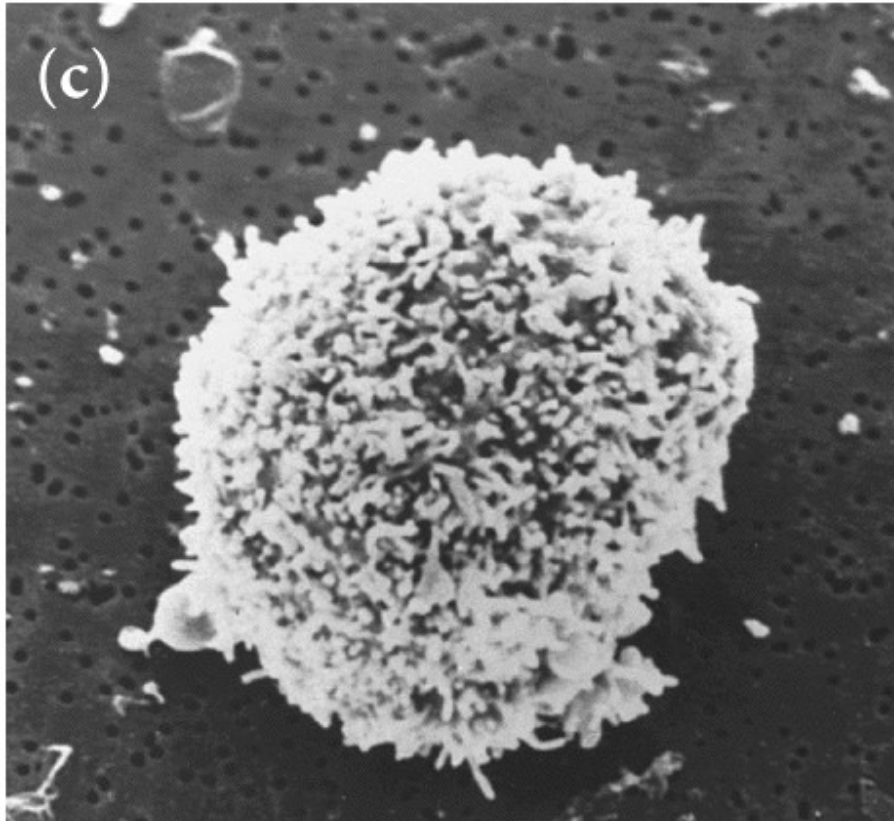
intact membranes



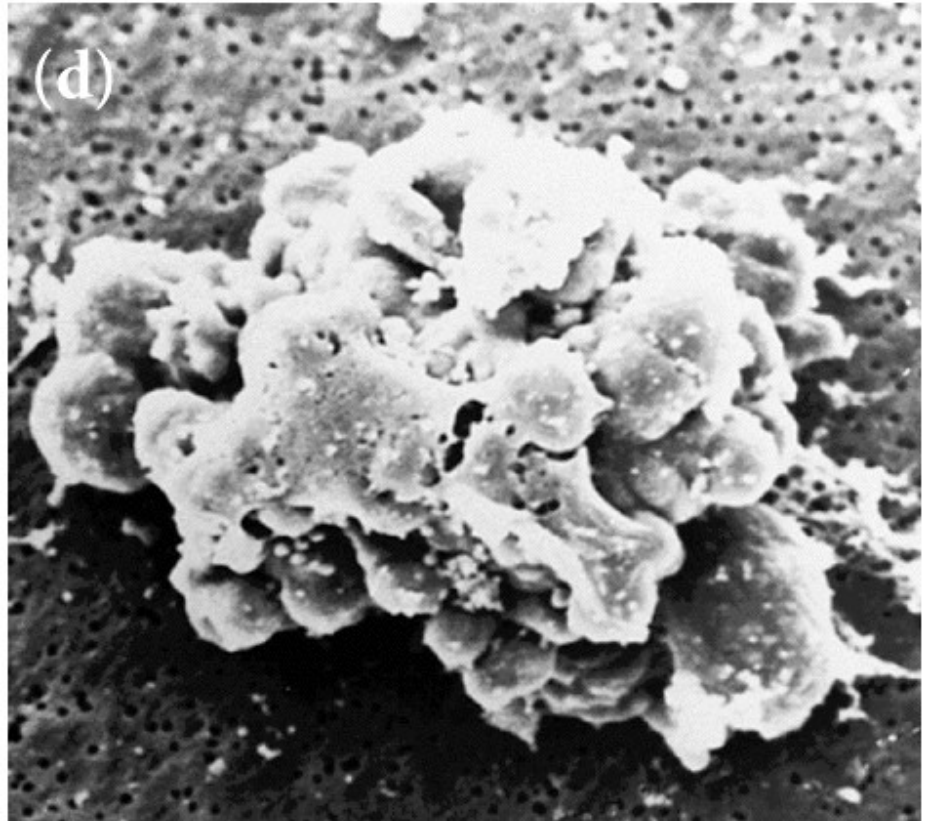
apoptotic bodies

secondary necrosis

正常

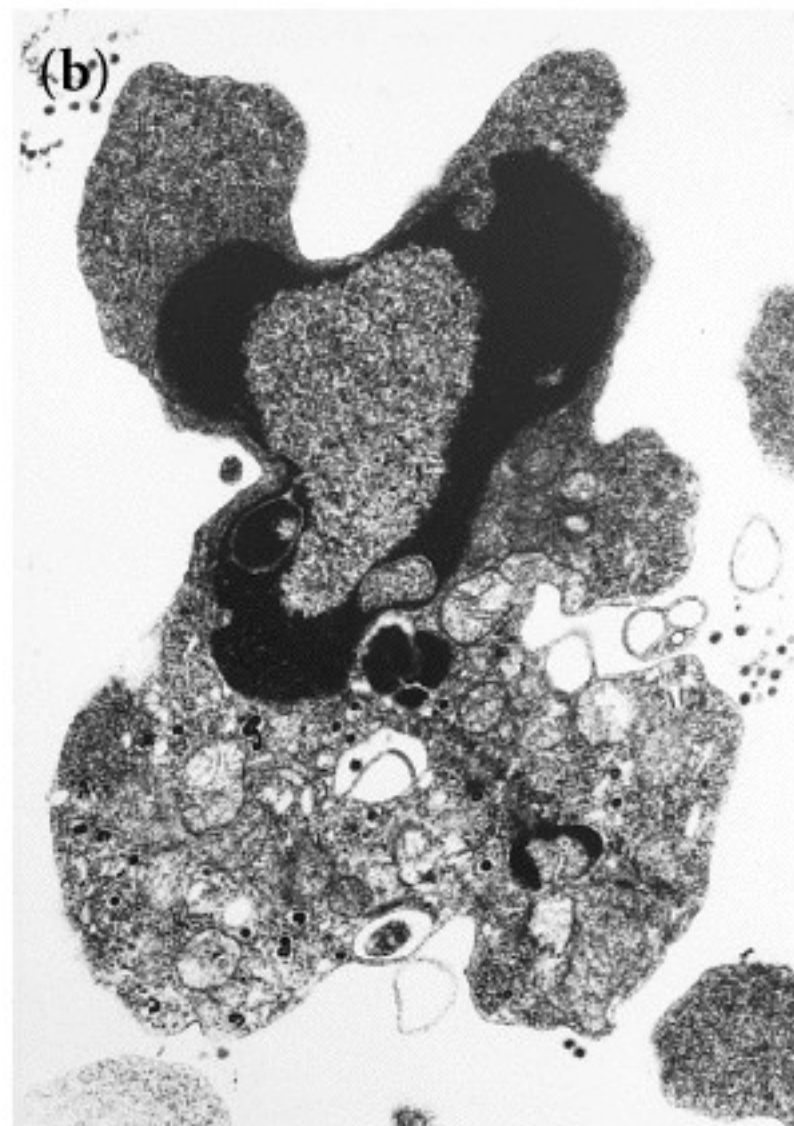
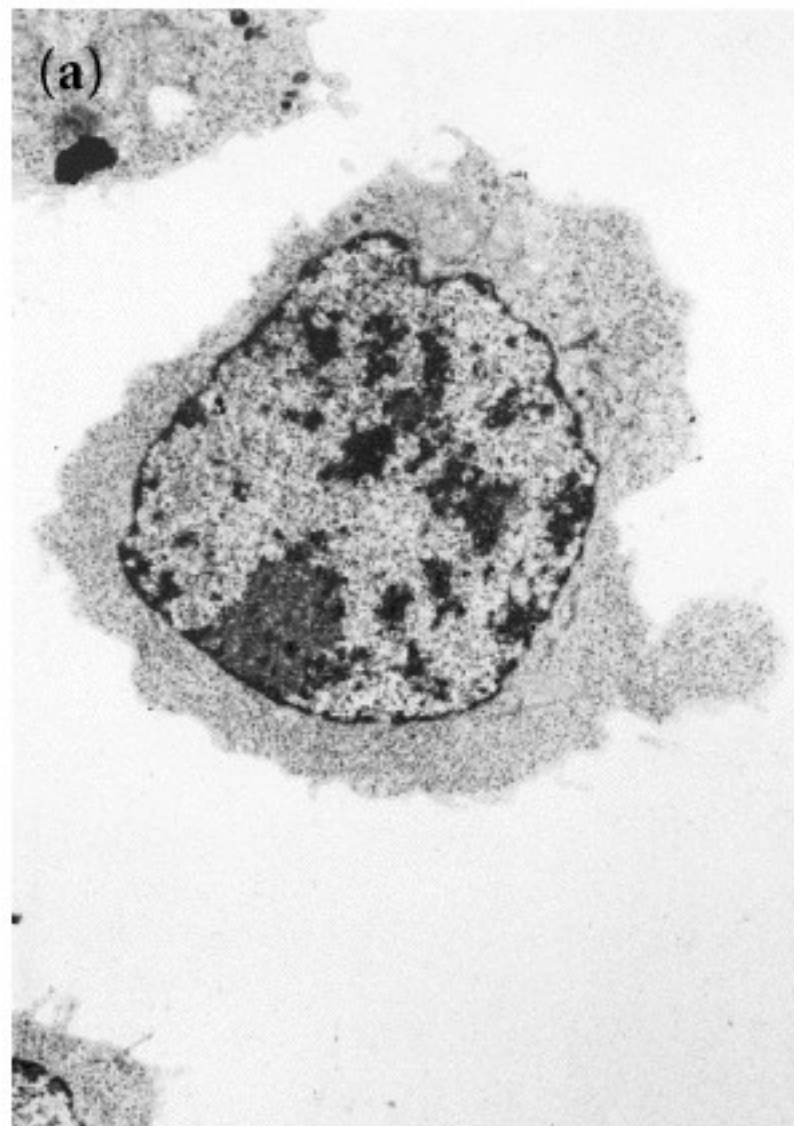


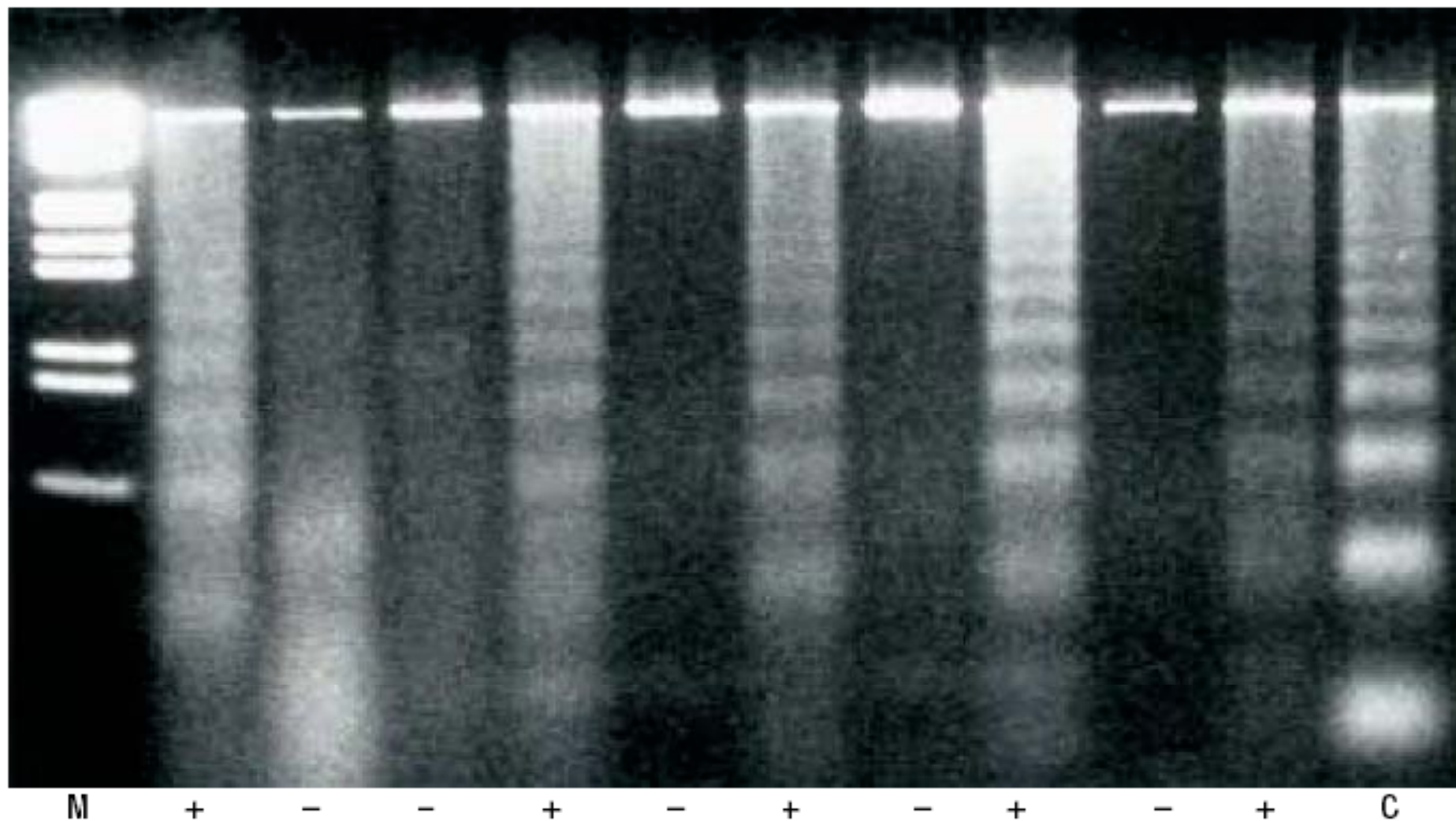
凋亡



正常

凋亡





▲ **Figure 6:** DNA ladder assayed with the Apoptotic DNA Ladder Kit

Lane Identification:

M = Size marker

- = Control cells without camptothecin

+ = Cells treated with camptothecin

C = Positive control from the kit

（三）细胞程序性死亡

- 细胞程序性死亡（PCD）是一种基因指导的细胞自我消亡方式。
- PCD和细胞凋亡的区别在以下方面：
- PCD是功能性概念，凋亡是形态学概念。
- PCD的最终结果是凋亡，但凋亡并非都是程序化的。
- PCD存在于胚胎发育过程中。



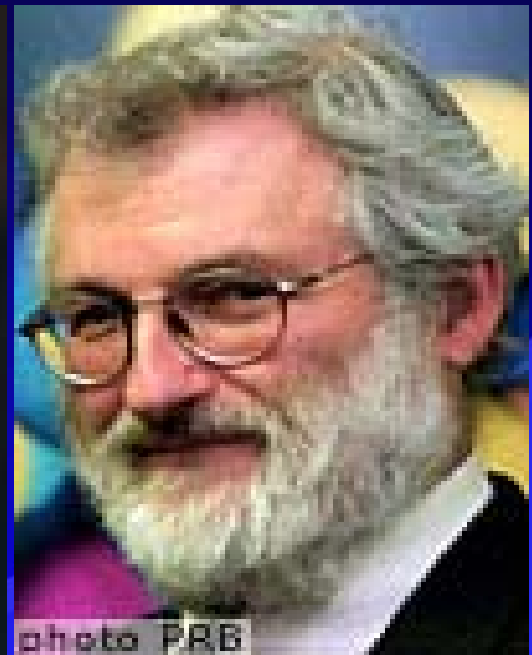
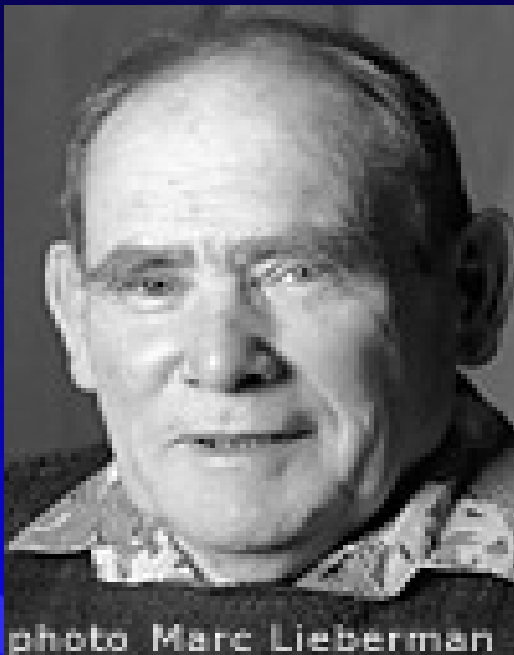
- *C. elegans* 是研究PCD的理想材料（生命周期短，细胞数量少）。
- <http://www.news.wisc.edu>



- *C. elegans*雄虫有1031个体细胞、约1000个生殖细胞。
- 神经系统由302个细胞组成，来自于407个前体细胞，105个细胞发生了PCD。
- 控制线虫PCD的基因有：Ced-3、Ced-4和Ced-9。
 - Ced-3和 Ced-4诱发凋亡；
 - Ced-9抑制Ced-3、Ced-4的作用。



2002年10月7日英国人Sydney、美国人Horvitz和英国人Sulston，因在PCD方面的研究获诺贝尔诺贝尔生理与医学奖。

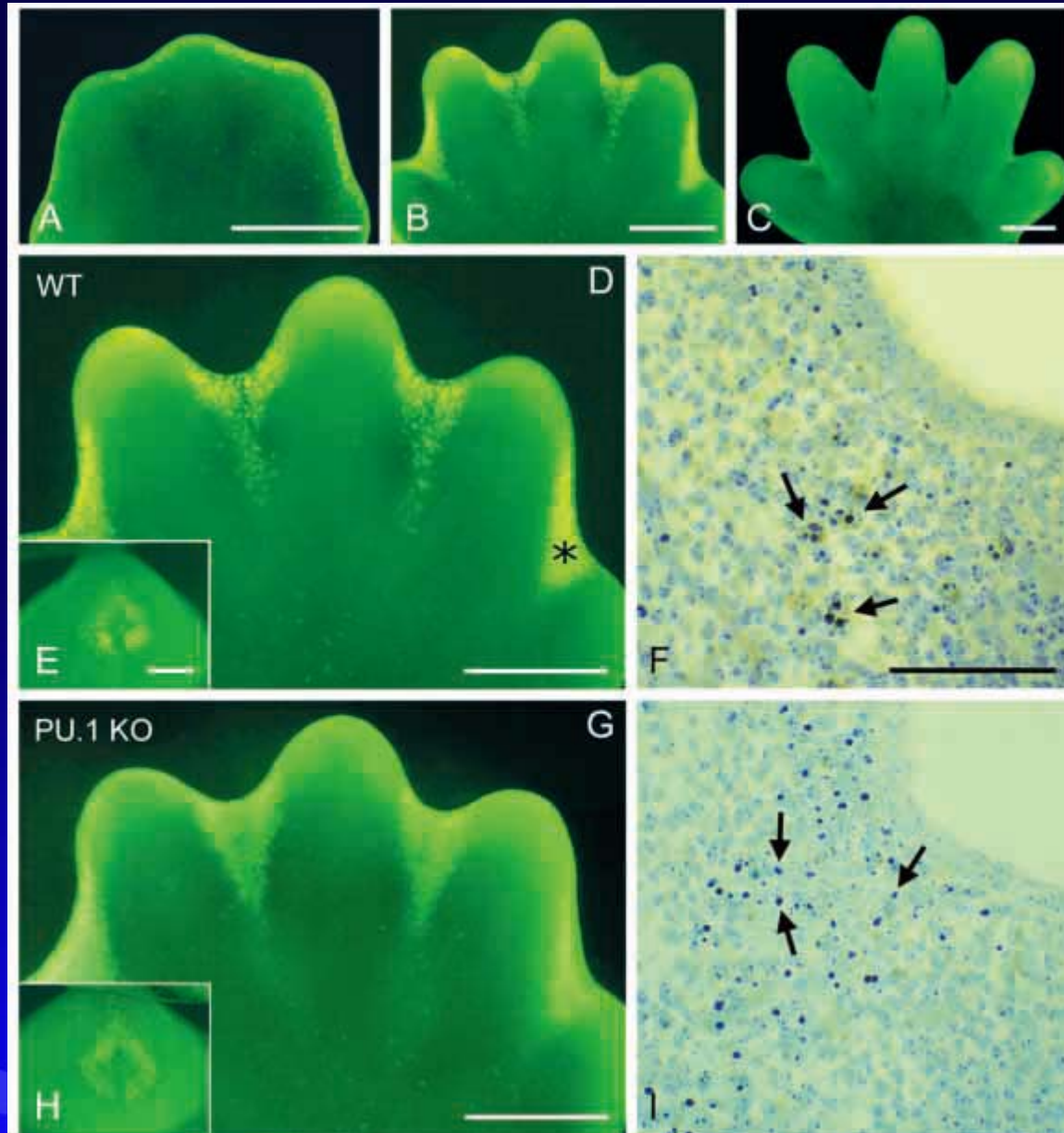


- Sydney Brenner H. Robert Horvitz John E. Sulston

二、细胞凋亡的生理和病理学意义

- (一) 生理学意义
- 1. 生长发育：组织与器官的塑造（趾的分化）；动物变态；皮肤角质形成；
- 2. 免疫细胞分化：克隆选择；
- 3. 防御：清除衰老细胞、DNA损伤的细胞、和被病原体感染的细胞。





- Sculpting the digits in the developing mouse paw by apoptosis (Wood 2000)

(二) 病理学意义

- 1. 病原体侵染；
 - 诱导凋亡——HIV
 - 抑制凋亡——Poxvirus
- 2. 细胞凋亡不足
 - 肿瘤，自身免疫疾病；
- 3. 细胞凋亡过度
 - 神经退行性疾病（AD，帕金森症）、心肌梗塞、再生障碍性贫血、骨组织坏死。



三、细胞凋亡的检测方法

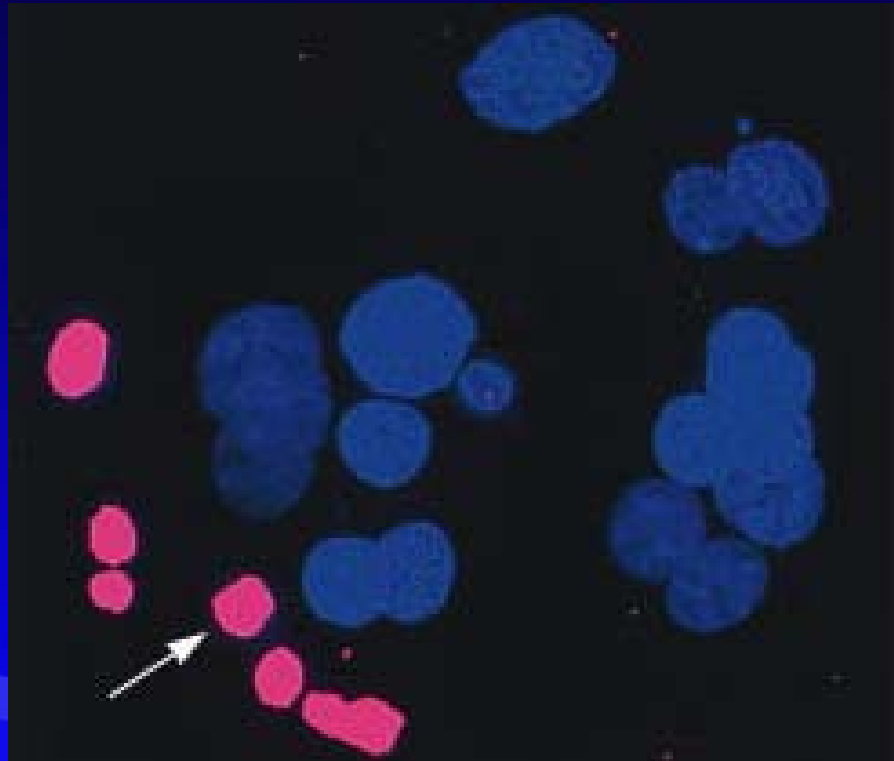
- 1. 形态学，电镜，光镜；
- 2. DNA凝胶电泳——ladder；
- 3. 流式细胞计；
- 4. 核酸内切酶活力检测；
- 5. 免疫学方法；
- 6. Annexin V检测细胞膜外表面PS；
- 7. TUNEL技术。



- 8. 常用检测细胞凋亡的染料：
- 二乙酸荧光素（FDA），绿色荧光，活细胞染色。
- Hoechst 33342或33258，DAPI，吖啶橙（AO），半通透，凋亡和固定后的细胞荧光较强。
- 溴化乙啶（EB）、碘化丙啶（PI）、放线菌素D（7-AAD），不通透，正常和凋亡细胞拒染。
- 可用不同性质的染料对凋亡细胞进行双染色。



- Human embryo at day 4 morula containing 23 nuclei labelled with DAPI (blue), including seven TUNEL-labelled condensed nuclei (pink, arrow) that were excluded from development (Kate Hardy 1999).





<http://www.cella.cn>

第三节 细胞凋亡的分子机理



一、凋亡相关的基因和蛋白

- 与细胞增殖有关的原癌基因和抑癌基都参于对细胞凋亡的调控。
- 研究较多的有ICE、 Apaf-1、 Bcl-2、 Fas/APO-1、 c-myc、 p53、 ATM等。

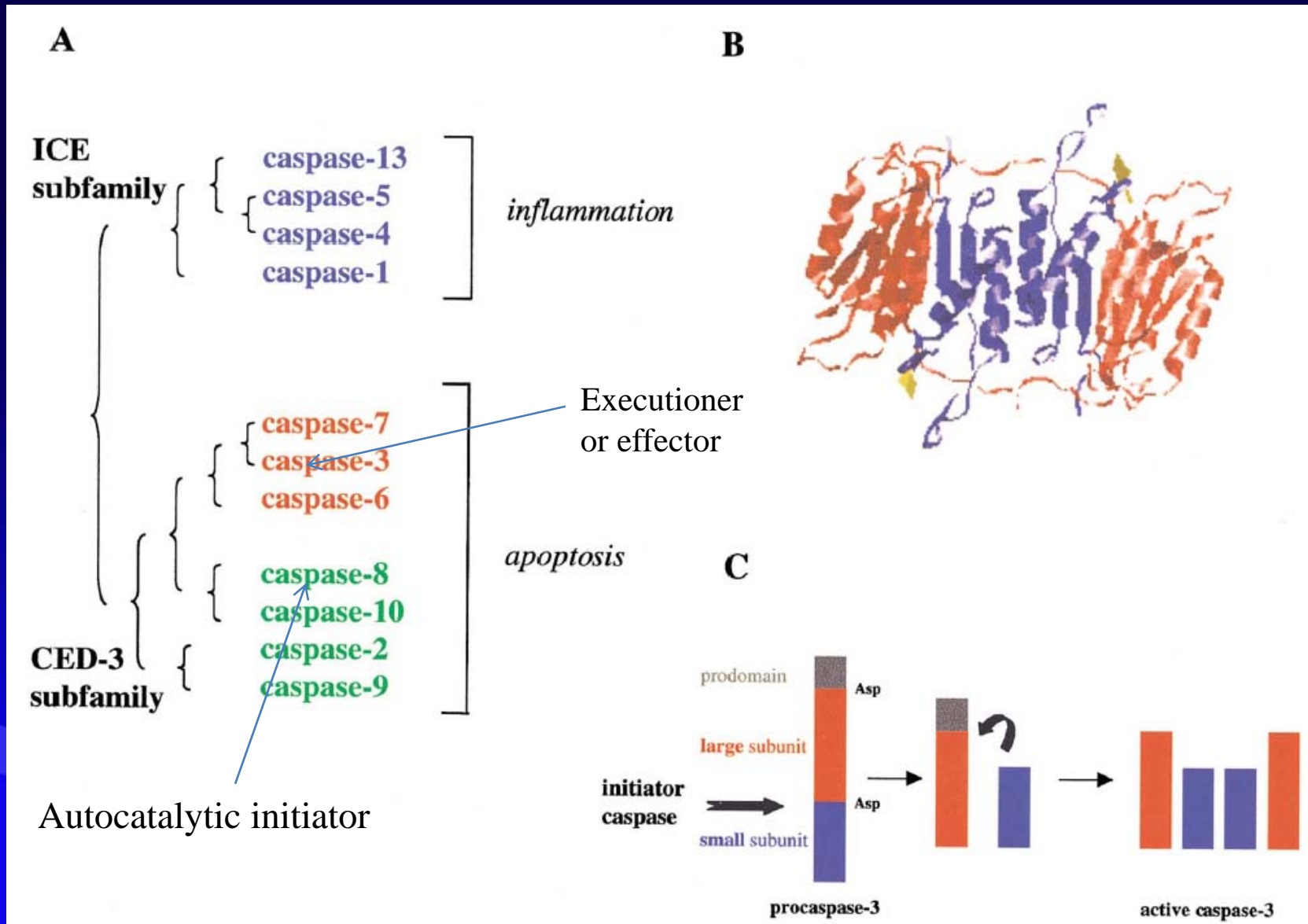


1. Caspase家族

- 相当于线虫的ced-3，是引起凋亡的关键酶。特点：
- ①酶活性依赖于cys残基的亲核性；
- ②总是在asp之后切断底物，故名caspase（cysteine aspartate-specific protease）。
- ③亚基由同一基因编码，前体被切割后产生两个活性亚基，组成的异四聚体。



- Caspase classification (Zimmermann 2001)



2. Apaf-1

- 凋亡酶激活因子-1（apoptotic protease activating factor-1），线虫的同源物为ced-4。
- 作用：参与线粒体凋亡途径，该基因敲除后，小鼠神经细胞过多，脑畸形发育。
- Apaf-1与cyt c、ATP/dATP结合后，召集caspase-9，形成凋亡体（apoptosome），激活caspase-3，启动caspase级联反应。

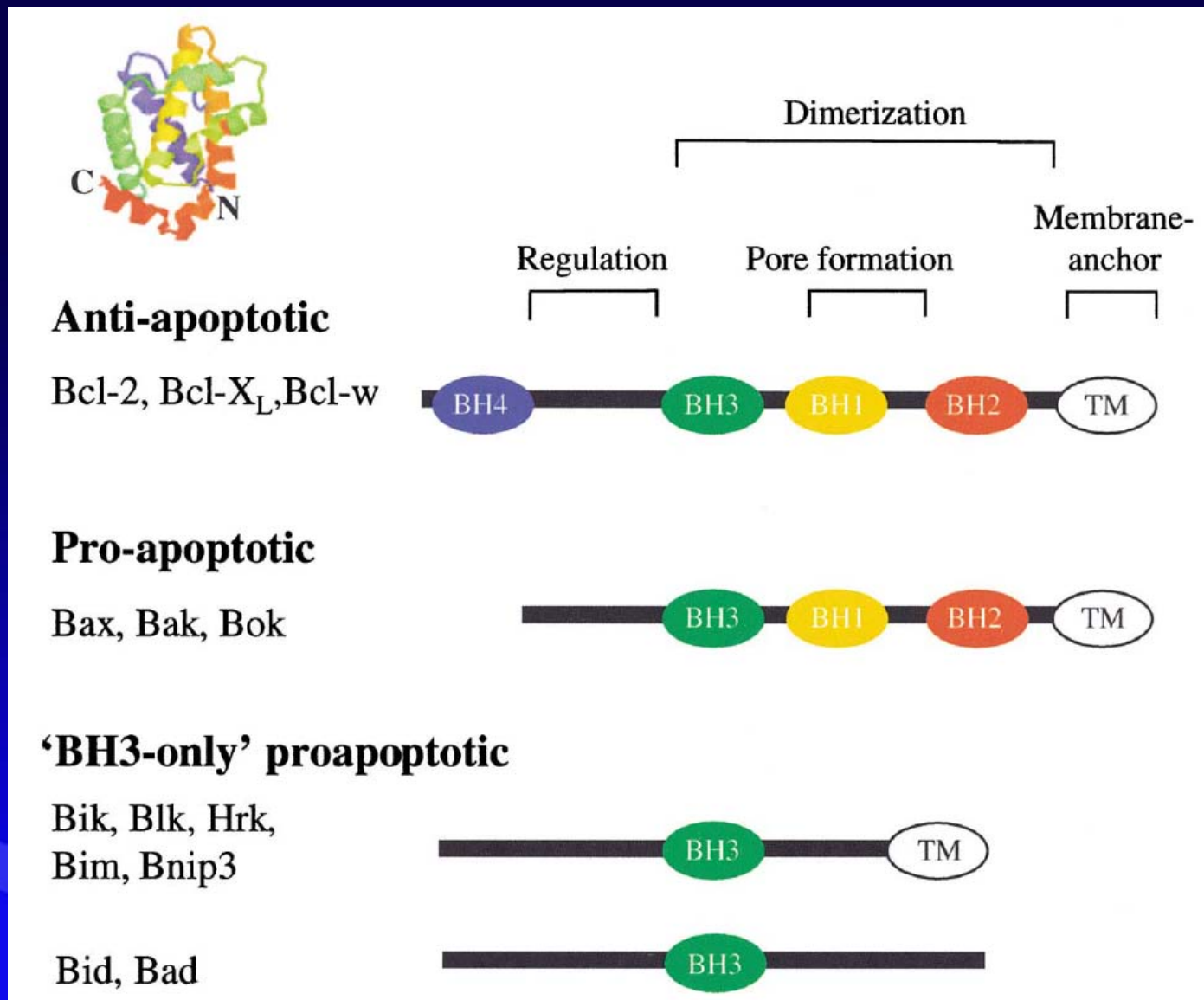


3. bcl-2基因家族

- 含有1-4个Bcl-2同源结构域（BH1-4）。分两类：
抗凋亡基因，如：Bcl-2；促凋亡基因，如：Bax。
- 促凋亡蛋白能引起线粒体外膜通透性改变，导致cyt c释放，引起凋亡。
- bcl-2相当于线虫的ced9。主要定位于线粒体膜、也存在于ER和外核膜，拮抗促凋亡蛋白的功能。



- Bcl-2 gene family (Zimmermann 2001)



4. Fas

- fas 又称作APO-1，属TNF受体家族。
- 1993年人白细胞分型国际会议统一命名为CD95。
- fas基因编码产物为分子量45KD的跨膜蛋白。
- Fas蛋白与Fas配体组成Fas系统，二者的结合激活 caspase。



- 5. P53

- 基因组的守护者。辐射诱导的DNA损伤可通过ATM激活p53，阻断细胞周期，并提高Fas的表达，诱导凋亡。

- 6. Myc

- 转录因子，生长因子存在，Bcl-2基因表达时，促进细胞增殖，反之引起细胞凋亡。

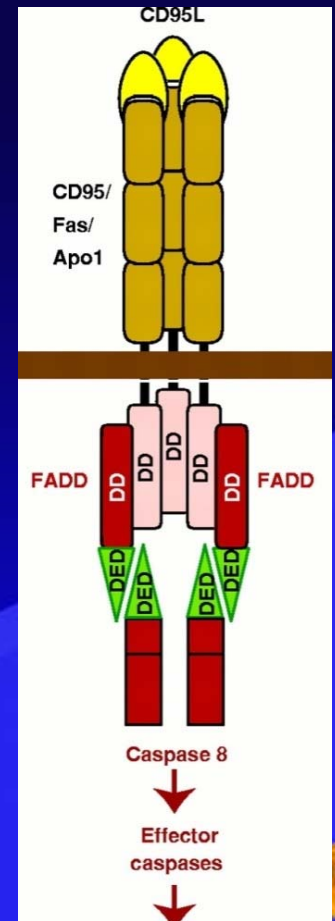
- 7. ATM

- 是DNA损伤检验的重要蛋白激酶，能激活P53。



(二) Fas诱导的细胞凋亡

- Fas与配体结合发生三聚化，通过胞内的DD区（Death domain）与接头蛋白FADD的DD区结合。
- FADD N端通过DED区（death effector domain）与Caspase-8前体结合，Caspase-8通过自剪接激活。



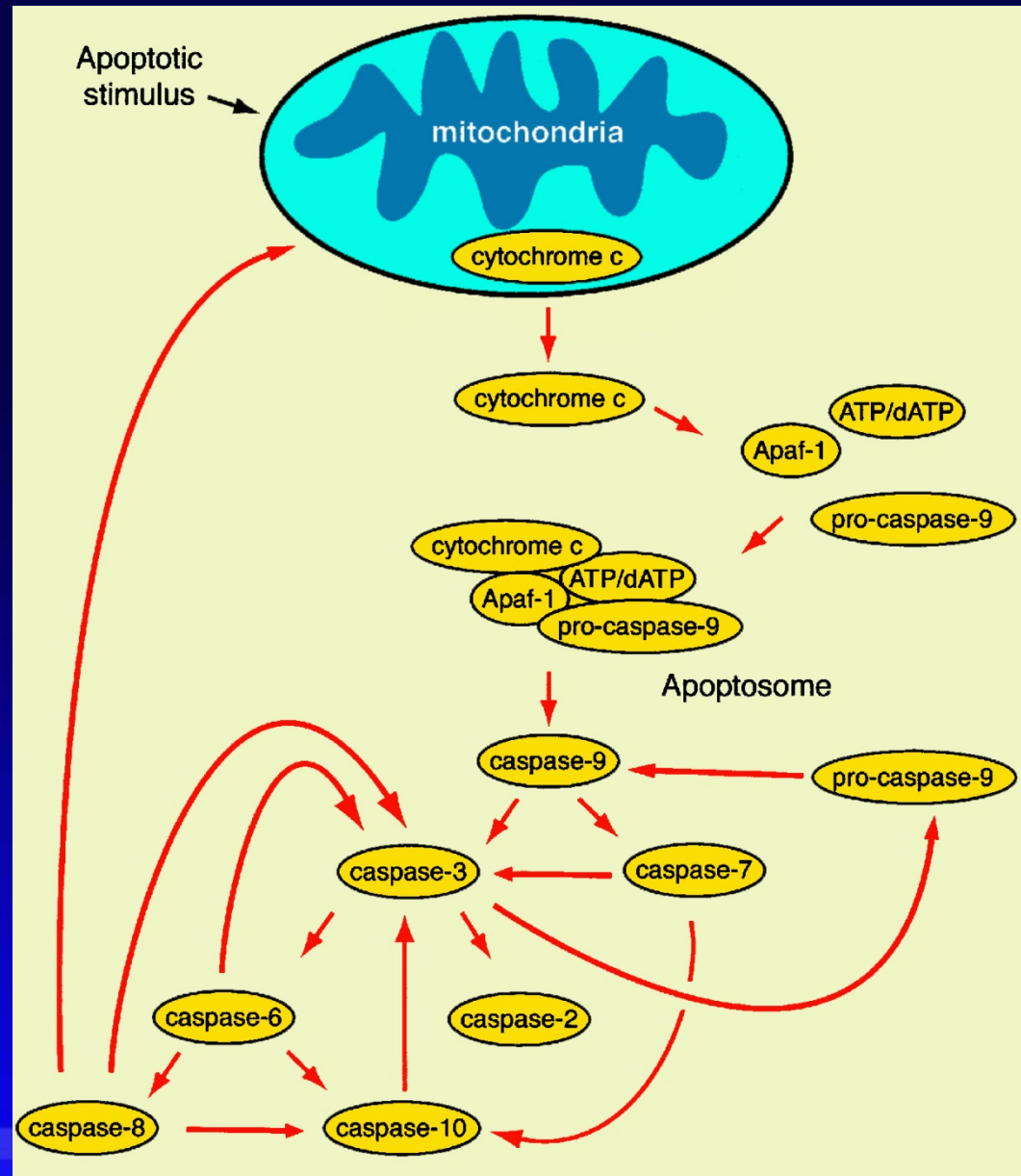
- Caspase-8引起caspase级联反应，激活Caspase-3、6、7。
- Caspase可降解结构蛋白、信号蛋白、转录调控蛋白、周期蛋白等等。
- Caspase还可降解CAD（caspase-activated Dnase）的调节蛋白，释放出CAD，CAD进入细胞核，在核小体连接部位降解DNA。



- 在一型细胞（type I），如胸腺细胞中，caspase-8有足够的活性引起细胞凋亡，高表达Bcl-2不能抑制Fas凋亡途径。
- 在二型细胞（type II），如肝细胞中，Caspase-8活性不足，必须通过线粒体途径放大死亡信号。
- Caspase引起线粒体PT孔打开，跨膜电位下降；
- Cyt c被释放到胞质中、激活Caspase-9，后者再激活Caspase-3，引起级联反应。



- Mitochondria function during cell apoptosis



R. Chris Bleackley and Jeffrey A. Heibein 2001

- Next topic is tumor cell.

