

颗粒酶 A 诱导 Caspases 非依赖性细胞死亡

缪家文 李芳秋

(南京军区南京总医院全军医学检验中心, 南京大学医学院临床学院, 南京 210002)

摘要 颗粒酶 A (granzyme A, GzmA), 是存在于细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 和天然杀伤细胞 (NK 细胞) 的细胞毒颗粒中含量最多的一种丝氨酸蛋白酶, 在穿孔素 (perforin) 协同作用下通过颗粒胞吐 (granule exocytosis) 释放进入在杀伤细胞和靶细胞之间形成的免疫突触 (immunological synapse), 然后进入靶细胞的细胞浆, 并在细胞核聚集, 诱导一种 caspases 非依赖性细胞死亡。GzmA 靶向作用于一种与内质网结合的特殊的复合体——SET 复合体, 其包含 3 种 GzmA 底物: 核小体装配蛋白 SET、DNA 结合蛋白 HMG-2、具有碱基切除修复作用的核酸内切酶 Ape1。SET 复合体还含有一种抑癌蛋白 pp32 和一种具有脱氧核糖核酸酶 (DNase) 活性的 NM23-H1。当 GzmA 作用于 SET 复合体时释放出 NM23-H1 并激活其 DNase 活性, 也阻断了 Ape1 对 DNA 损伤的修复作用, 在 DNA 上形成单链的缺刻。这是一种新发现的由 GzmA 诱导的细胞凋亡途径。

关键词 颗粒酶 A; SET 复合体; 细胞死亡

活化的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 和天然杀伤细胞 (NK 细胞) 在清除病毒感染细胞和肿瘤细胞中发挥关键作用。尽管 CTL 和 NK 细胞通过截然不同的机制识别靶细胞, 它们最终都通过两种途径导致细胞死亡, 一种是通过颗粒胞吐释放细胞毒颗粒的内容物; 另一种是通过细胞表面死亡受体, 如肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 家族成员, 包括 FAS (CD95), 其中通过颗粒胞吐释放细胞毒颗粒导致细胞死亡是主要途径^[1,2]。细胞毒颗粒中包含穿孔素、颗粒溶素 (granulysin) 和具有丝氨酸蛋白酶活性的颗粒酶 (granzymes, Gzm) 家族。Gzm 家族有多个成员, 到目前为止, 发现人类至少存在 5 种 Gzm, 包括 GzmA、GzmB、GzmH、GzmM 和 GzmK。5 种 Gzm 之间高度同源, 其中 GzmA 和 GzmB 是 CTL 和 NK 细胞中最重要的 Gzm。CTL 和 NK 细胞识别靶细胞之后, Gzm 在穿孔素协同作用下通过颗粒胞吐释放进入在杀伤细胞和靶细胞之间形成的免疫突触, 然后进入靶细胞的细胞浆, 并在细胞核聚集, 能够独立地或相互协同作用诱导细胞死亡^[3-5]。GzmB 具有天门冬氨酸酶的活性, 能迅速引起靶 DNA 断裂, 作用强于 GzmA。GzmB 能够通过酶切 caspase-3 和 caspase-7 诱导 caspases 依赖的细胞死亡, 也能通过直接酶切 caspases 途径下游关键的底物如 Bid, caspases 激活的 DNase 的抑制物 (ICAD) 等

诱导 caspases 非依赖的细胞死亡^[6,7]。最近研究结果表明, GzmA 通过另外一种独特的 caspases 非依赖性机制诱导细胞死亡, 导致 DNA 形成单链缺刻损伤, 不同于 GzmB 导致的 DNA 双链寡核苷酸片段化。GzmA 在清除病毒感染细胞和肿瘤细胞、自身免疫病、移植排斥反应中的作用越来越受到重视。

1 GzmA 是重要的免疫效应分子

人的 GzmA 基因定位于 5 号染色体上。GzmA 是 CTL 和 NK 细胞的细胞毒颗粒蛋白中含量最多的一种丝氨酸蛋白酶, 是一种重要的免疫效应分子。它在 NK 细胞中为组成性表达, 在原始 T 淋巴细胞受到抗原刺激分化成 CTL 大约 3~5 天后激活表达。与 GzmB 不同, GzmA 在 T 细胞激活后能持续表达^[8]。Gzm 家族中各成员的表达调控尚不清楚 (每种 Gzm 基因可能受不同的方式调控), 但是有证据表明每个杀伤细胞可能只表达 1~2 种 Gzm 蛋白^[9]。

GzmA 基因剔除小鼠的免疫功能并没有受到明显影响, 仍和野生型的小鼠一样能抵抗病毒和肿瘤的侵袭^[10,11]。但是, GzmA 基因剔除小鼠对导致肢畸形的鼠痘病毒和侵袭神经元的疱疹病毒高度易

收稿日期: 2004-05-18 接受日期: 2004-07-23

江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK99157)

* 通讯作者。Tel: 025-85680903, E-mail: njlifq@jlonline.com

感^[12,13]。在 GzmA 基因剔除动物模型中没有发生其他类型的 Gzm 蛋白对鼠痘病毒和疱疹病毒抵抗作用,其原因可能是在天然免疫中对感染起重要作用的大多数NK细胞不能有效的分泌表达 GzmB 和其他诱导细胞死亡的 Gzm 蛋白^[14]。一些能抵抗 caspases 依赖性细胞死亡的细胞,包括过度表达 bcl-2 的细胞,对 GzmA 导致的细胞死亡易感^[2,11]。这些研究结果提示 GzmA 能诱导一种不同于 GzmB 的独特的细胞死亡途径,在免疫保护中起重要作用。由于一些肿瘤细胞和病原体建立了对其他的细胞凋亡途径的逃避机制,这种由 GzmA 诱导的细胞死亡途径在多种细胞凋亡途径中并不是一种冗余的机制,而是提供了一种摧毁肿瘤细胞和病原体的重要的安全机制。

感染鼠痘病毒的 GzmA \times B^{-/-}小鼠与野生型小鼠对比试验发现内源性的 GzmA 和 GzmB 具有杀伤 CTL 和 NK 细胞自身的功能,表明 GzmA 通过干扰病毒复制构成了被病毒感染的免疫细胞自身抵抗病毒感染的首道防线之一^[15]。

GzmA 还通过酶切 IL-1 β 前体和激活巨噬细胞而增强炎症反应,通过激活尿酸酶原而抑制血液凝固,通过酶切作用使凝血酶失活。GzmA 还能降解细胞间质蛋白造成组织损伤和炎性改变^[4]。

2 GzmA 诱导的细胞死亡特征和分子机制

2.1 GzmA 诱导的细胞死亡特征

以前一直认为 GzmA 只能导致一种缓慢的非凋亡方式的细胞死亡,因为在靶细胞死亡至少 16h 后才能检测到少量的 DNA 片段^[16]。实际上在穿孔素协同作用下 GzmA 诱导的细胞死亡是迅速的,在几分钟之内,用铬释放法可以检测到细胞膜的完整性遭到破坏,在显微镜下可以观察到在细胞膜表面出现大量的泡样隆起,并且在几小时之内造成了 DNA 单链缺刻性损伤^[17,18]。这些缺刻形成的 DNA 片段有几千个碱基大小,不能用普通的检测凋亡细胞 DNA 片段的琼脂糖凝胶电泳方法进行测定,也不能用末端脱氧核苷酸转移酶(TDT)进行标记。由于 DNA 片段太大不能很快地从死亡的细胞中释放出来,而且在相同的浓度下, GzmA 比 GzmB 导致的 DNA 损伤程度要小,这就解释了为什么以前认为 GzmA 导致缓慢的 DNA 损伤的原因。但是,通过改进实验方法,用碱性琼脂糖凝胶电泳将 DNA 双链变性为 DNA 单链,用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段进行标记,则

能够检测到 DNA 的缺刻片段^[18]。

GzmA 诱导的细胞死亡也出现了细胞凋亡的其他一些特征事件,包括染色质浓缩、细胞核碎裂、线粒体跨膜电位消失和活性氧(ROS)水平升高。但是与 GzmB 和 caspases 诱导的细胞凋亡不同, GzmA 作用的靶细胞中细胞色素 c 和其他线粒体的凋亡诱导分子,如凋亡诱导因子(AIF)、核酸内切酶 G (endoG)、SMAC/Diablo 或 HtrA2/Omi 并没有释放出来。GzmA 没有激活 caspases,也没有酶切 caspases 下游产物如 Bid 或 ICAD^[19,20]。

2.2 SET 复合体: GzmA 作用的关键靶点

为了鉴定 GzmA 的潜在靶向作用的底物和与 GzmA 相结合的其他蛋白质,将 GzmA 的活性位点 Ser184 突变成 Ala184(S-A GzmA),用 S-A GzmA 亲和层析法,发现了一种 270~420 kDa、与内质网相结合的多蛋白聚体,称为 SET 复合体(SET complex)^[21]。GzmA 靶向作用于 SET 复合体是 GzmA 诱导的细胞死亡途径的关键事件, GzmA 必须伴有少量的细胞质才能在分离的细胞核中产生 DNA 的缺刻损伤,这个必需的细胞质成分被证明就是 SET 复合体^[20]。

到目前为止,大多数 SET 复合体的成分已经被鉴定出来,它们包括:核小体装配蛋白 SET、DNA 结合蛋白 HMG-2、具有碱基切除修复作用的核酸内切酶 Ape1、抑癌蛋白 pp32 和具有脱氧核糖核酸酶(DNase)活性的 NM23-H1^[19-23]。SET 与 NM23-H1 和 HMG-2 紧密结合在一起。SET 复合体结合在内质网上,也能够迁移到细胞核内。组成 SET 复合体的蛋白质成分在细胞中到处存在,高度表达。尽管大部分都出现在 SET 复合体中,它们也存在于细胞基质的其他类型的复合体中。

SET 是一种 ATP 非依赖的核小体装配蛋白(NAP),SET 的 NAP 活性增强了染色质的可亲和性,SET 和它的同源蛋白质能结合转录共刺激因子 CBP/p300 和核心组蛋白(core histones),可能在转录共刺激因子和染色质之间起桥梁作用。HMG-2 是一种 DNA 结合和弯曲蛋白,能够帮助核蛋白高度有序的装配,在 DNA 的复制、转录和重组中起重要作用^[22]。Ape1 是一种与 DNA 结合的多功能蛋白质,其 C 端结构域具有核酸内切酶的活性,能够识别和修复 DNA 损伤中最常见的由氧化作用所造成的 AP 位点 (apurinic/aprimidinic site); N 端结构域具有还原活性,能够通过还原作用激活参与立即早期修复反应(immediate early repair response)的关键的一些原

癌基因如 *fos*、*jun*、*NF-κB* 和 *myb*^[19]。*pp32* 是一种抑癌蛋白，是磷酸脂酶 2A(*pp2A*)的调节性的亚单位并抑制 *pp2A* 的活性，*pp32* 过度表达能够导致细胞周期障碍，其机制不明。*pp32* 也在 *caspases* 介导的细胞凋亡中起作用，*pp32* 促进 *caspase-9* 的激活并增强了下游 *caspase-3* 的激活^[23]。*NM23-H1* 最初是在转移癌中发现的突变或下调的基因，也能够调控血小板衍生生长因子(*PDGF*)的表达。尽管大量的证据表明 *NM23-H1* 与肿瘤发生有关，但其机制尚不清楚。研究 SET 复合体中 *NM23-H1* 的功能可能有助于阐明这个问题^[24]。

SET、HMG-2 和 *Ape1* 是 *GzmA* 生理性的天然底物。它们相应的功能在被 *GzmA* 酶切后遭到破坏。尽管 SET 复合体的一般功能及其进出细胞核的信号分子还不清楚，需要进一步的研究，但是 SET 复合体组成蛋白质的相应功能提示 SET 复合体参与 DNA 转录的激活和 DNA 损伤的修复，与染色质的结构、完整性和基因表达的调控有关。

2.3 *GzmA* 诱导的 DNA 损伤分子机制

SET 复合体中包含 *GzmA* 激活的 DNase(*GAAD*)和它的抑制物(*IGAAD*)，*GAAD* 就是 *NM23-H1*，能产生 DNA 的缺刻，*IGAAD* 就是 SET。当 *GzmA* 进入靶细胞时，可能是由于活性氧水平增高的原因，SET 复合体迅速地(在 5 min 内)进入到细胞核。*GzmA* 酶切作用于 SET，去除了 SET 对 *NM23-H1* 的抑制作用，并激活 *NM23-H1* 的 DNase 活性，在 DNA 形成缺刻，如图 1 所示^[4]。在 *NM23-H1* 过度表达或 SET 基因沉默的试验中，DNA 损伤和细胞死亡明显增加。相反，在 *NM23-H1* 基因沉默或 SET 过度表达的试验中，DNA 损伤和细胞死亡明显减少^[20]。这种 *GzmA* 通过使 DNase 的抑制物失活而激活 DNase 活性的方式与 *caspases* 或 *GzmB* 通过使 *CAD* 的抑制物 *ICAD* 失活而激活 *CAD* 活性的方式相似^[25]。在这两种途径中，细胞质中的 DNase 与特异性抑制物的结合避免了细胞毒颗粒对自身细胞产生不适当的 DNA 损伤。

GzmA 还通过酶切 *Ape1* 从而抑制细胞的损伤修复作用。多种凋亡因子在诱导细胞死亡的同时也激活了细胞的损伤修复机制^[4]。最终，细胞死亡或者存活的命运取决于两种不同力量的相对强度。*GzmA* 酶切 *Ape1* 导致其丧失修复 DNA 损伤的核酸内切酶活性和激活立即早期修复反应的还原活性。实验证明，突变型 *Ape1* 能够修复一些由 *GzmA* 导致的

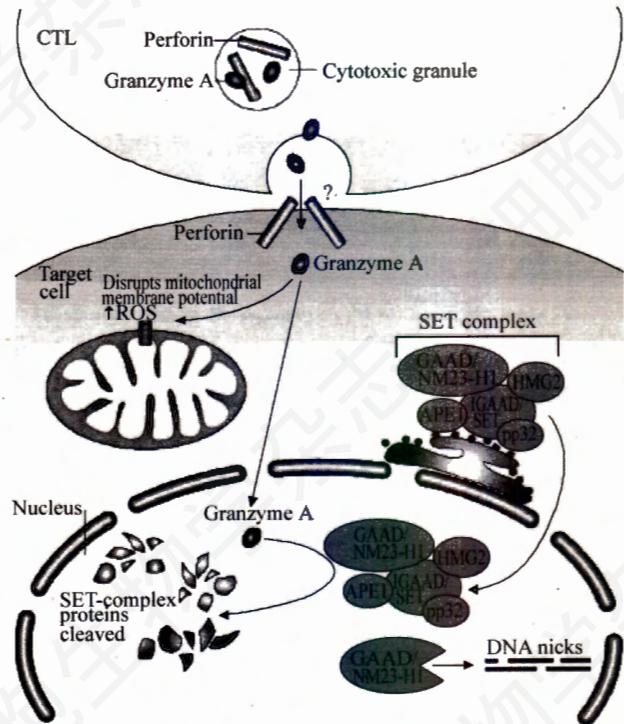


图 1 *GzmA* 诱导 *caspases* 非依赖性细胞死亡示意图^[4]

损伤并能相对地减少细胞的死亡，而用 RNA 干扰的方法诱导的 *Ape1* 基因沉默的细胞则对 *GzmA* 诱导的细胞死亡更加易感^[19]。所以 *GzmA* 作用于 SET 复合体具有两种前凋亡效应：激活了有 DNase 活性的 *NM23-H1*；也阻断了一个重要的细胞 DNA 损伤修复途径。

2.4 核纤层和组蛋白也是 *GzmA* 作用的靶点

GzmA 攻击核膜和染色质的完整性可能有助于 *GzmA* 的 *NM23-H1* 进入细胞核并增强其 DNase 活性。*GzmA* 在穿孔素介导下作用于靶细胞后 20 min 内降解了靶细胞的核纤层^[25]。核纤层是由肌动纤维构成的核膜下的重要的骨架结构，为染色质和核孔复合体提供锚定位点。在细胞分裂和 *caspases* 介导的细胞凋亡中核纤层消失。核纤层降解是 *caspases* 依赖性和非依赖性细胞凋亡的一个共同的特征事件，因此任何方式诱导细胞凋亡可能都需要降解核纤层。

GzmA 也能直接作用于染色质^[26]。它能完全降解将 DNA 锚定在核心组蛋白上的连接组蛋白 H1，H1 的降解使染色质从紧密的螺旋结构转变成舒展的开放结构。与胰蛋白酶降解核心组蛋白上的尾巴进一步展开了染色质一样，*GzmA* 通过蛋白质水解作用从另外一端降解核心组蛋白上的尾巴使染色质更

加暴露出来。GzmA的这种在完整细胞核中的蛋白质水解作用使DNA对外源性的核酸酶更加易感。这不但增强了NM23-H1的DNase活性,也增强了CAD和endoG的DNase活性。这可能有助于解释GzmA和GzmB在导致DNA损伤中的协同作用。

3 小结

GzmA激活了一种caspases非依赖性细胞凋亡途径,其具有独特的底物SET复合体并导致了DNA的单链缺刻的损伤。由GzmA诱导的细胞死亡途径在多种细胞凋亡途径中并不是一种冗余的机制,而是在免疫保护中,特别是在清除能逃避caspases依赖性细胞凋亡的病毒感染细胞和肿瘤细胞中发挥关键作用,其机制正在被研究和阐明,将有助于研究新的抗感染和抗肿瘤的临床治疗方法,并为揭示细胞生存和死亡的生物学机制提供新的研究工具和途径。

参考文献 (References)

- [1] Russell JH *et al. Annu Rev Immunol*, 2002, **20**: 323
- [2] Trapani JA *et al. Nat Rev Immunol*, 2002, **2**: 735
- [3] Nakajima H *et al. J Exp Med*, 1995, **181**: 1037
- [4] Lieberman J. *Nat Rev Immunol*, 2003, **3**: 361
- [5] Sattar R *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **308**: 726
- [6] Yang X *et al. J Biol Chem*, 1998, **273**: 34278
- [7] Andrade F *et al. Immunity*, 1998, **8**: 451
- [8] Clark R *et al. Curr Opin Immunol*, 2003, **15**: 516
- [9] Kelso A *et al. Int Immunol*, 2002, **14**: 605
- [10] Zajac AJ *et al. Virology*, 2003, **305**: 1
- [11] Shresta S *et al. Immunity*, 1999, **10**: 595
- [12] Pereira RA *et al. J Virol*, 2000, **74**: 1029
- [13] Mullbacher A *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 5783
- [14] Sayers TJ *et al. J Immunol*, 2001, **166**: 765
- [15] Regner M *et al. Immunol Cell Biol*, 2004, **82**: 161
- [16] Shi L *et al. J Exp Med*, 1992, **175**: 553
- [17] Beresford PJ *et al. Immunity*, 1999, **10**: 585
- [18] Beresford PJ *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 43285
- [19] Fan Z *et al. Nat Immunol*, 2003, **4**: 145
- [20] Fan Z *et al. Cell*, 2003, **112**: 659
- [21] Beresford PJ *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 9285
- [22] Fan Z *et al. Mol Cell Biol*, 2002, **22**: 2810
- [23] Jiang X *et al. Science*, 2003, **299**: 223
- [24] Lieberman J *et al. Curr Opin Immunol*, 2003, **15**: 553
- [25] Zhang D *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 5746
- [26] Zhang D *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 3683

Granzyme A Induces a Cell Death Pathway Independently of Caspases Activation

Jia-Wen Miao, Fang-Qiu Li*

(Clinical School of Medical College of Nanjing University; Center of Medical Laboratory Sciences of the People's Liberation Army, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002, China)

Abstract Granzyme A, the most abundant serine protease in the cytotoxic granules of cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells, is released into the immunological synapse formed between the killer cell and its target, delivered to the cytosol of target cells via perforin, concentrate in target cell nuclei, and induces caspases-independent cell death. A special target of the granzyme A cell death pathway is an endoplasmic reticulum-associated complex, called the SET complex, which contains three granzyme A substrates, the nucleosome assembly protein SET, the DNA-binding protein HMG-2, and the base excision repair endonuclease Ape1. The SET complex also contains the tumor suppressor protein pp32 and the granzyme A-activated DNase NM23-H1, which is inhibited by SET. Granzyme A cleavage of SET releases the NM23-H1. Cleavage of Ape1 by granzyme A interferes with the ability of the target cell to repair itself. This is a novel cell death pathway initiated by granzyme A.

Key words granzyme A; SET complex; cell death

Received: May 18, 2004 Accepted: July 23, 2004

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No.BK99157)

*Corresponding author. Tel: 86-25-85680903, E-mail: njlifq@jlonline.com