

# 胱冬肽酶非依赖性的细胞程序性死亡

秦真侠 谷 峰 胡应和\*

(华东师范大学, 教育部脑功能基因组学重点实验室, 上海市脑功能基因组学重点实验室, 上海 200062)

**摘要** 在多细胞有机体的组织内稳态维持和正常发育过程中, 细胞程序性死亡发挥着重要的作用。细胞程序性死亡有多种形式(如细胞凋亡、类细胞凋亡和类坏死等), 其中了解较清楚的是细胞凋亡。一直以来, 胱冬肽酶(caspase)被认为是细胞凋亡发生中关键的一种蛋白酶。但是最近的研究表明, 包括细胞凋亡在内的一些细胞程序性死亡可以以一种不依赖胱冬肽酶的方式发生。细胞程序性死亡与胱冬肽酶之间存在非依赖性关系。

**关键词** 细胞程序性死亡; 胱冬肽酶非依赖性

细胞程序性死亡在多细胞组织的发育和内稳态的维持中发挥重要的作用。细胞程序性死亡异常会引发很多疾病, 如自身免疫性疾病和癌症等。当细胞发生凋亡时, 细胞内发生典型的生化和形态变化。这些变化中最具特征的是胱冬肽酶(caspase)的激活、染色体凝集和细胞表面出现噬菌作用迹象。

胱冬肽酶是细胞凋亡发生过程中发挥主要作用的一类胱氨酸蛋白酶家族。在细胞内这类蛋白酶家族以酶原形式存在, 当这种酶原在内部天冬氨酸位点被剪切时, 前体胱冬肽酶便形成具有生物活性的成熟形式。

有些细胞程序性死亡在胱冬肽酶被阻断的情况下仍能发生<sup>[1,2]</sup>, 这对传统概念中认为胱冬肽酶单独足以引起哺乳动物的细胞程序性死亡无疑构成了一种挑战。此外一些细胞凋亡的修饰形式, 如类细胞凋亡可以在无胱冬肽酶激活的情况下发生<sup>[2-4]</sup>。胱冬肽酶非依赖的细胞死亡形式能够完成典型的细胞凋亡过程<sup>[5]</sup>。本文主要阐述各种细胞程序性死亡形式与胱冬肽酶家族之间的非依赖关系。

## 1 细胞程序性死亡的几种形式

根据细胞程序性死亡时细胞核中所呈现的形态学变化以及与胱冬肽酶蛋白酶家族之间的关系, 可将细胞程序性死亡分为3类: 典型的细胞凋亡、类细胞凋亡、类坏死性细胞程序性死亡。

### 1.1 典型细胞凋亡

此类细胞程序性死亡发生时常伴随着典型的形态变化, 特别是细胞核中染色体凝集, 并呈现球状和新月形。其他典型的特征包括磷脂酰丝氨酸外

翻、胞质收缩、起泡作用和凋亡小体的形成并出现核片段。这种典型的细胞凋亡发生时, 经常观察到胱冬肽酶家族成员, 如胱冬肽酶-3等被激活。当胱冬肽酶的活性或信号被抑制时, 这类细胞程序性死亡就可被阻断。

### 1.2 类细胞凋亡程序性细胞死亡

类细胞凋亡程序性细胞死亡发生时所呈现的染色体凝集与典型细胞凋亡中的染色体凝集相比, 具有较弱的致密性。在膜裂解之前出现具有噬菌作用识别的分子。大多数胱冬肽酶非依赖的细胞凋亡形式都可归为这一类。一些典型的胱冬肽酶依赖的细胞凋亡模型, 如肿瘤坏死因子诱导的MCF7细胞死亡也属于这一类。

### 1.3 类坏死细胞程序性死亡

类坏死细胞程序性死亡发生时并不出现染色体凝集或者染色体聚集成斑点<sup>[6]</sup>。这类细胞程序性死亡包括自我吞噬和流产性的细胞凋亡。自我吞噬性细胞凋亡发生时, 会形成溶酶体来源的细胞质空泡<sup>[7]</sup>。流产性的细胞凋亡过程包括: 首先是由典型的细胞凋亡程序开始, 然后胱冬肽酶激活被阻断, 最后以一种胱冬肽酶非依赖的路径而结束。

## 2 胱冬肽酶非依赖的细胞程序性死亡的发生

已有大量研究显示了细胞程序性死亡可以在无胱冬肽酶激活的情况下发生。在酵母中也发现胱冬

收稿日期: 2004-11-24 接受日期: 2004-12-10

国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(No.2003AA221061)

\* 通讯作者。Tel: 021-62603004, Fax: 021-62601953, E-mail:

yhu@brain.ecnu.edu.cn

胱冬肽酶非依赖性的细胞凋亡。酵母中无 *ced3*、*ced4* 和 *ced9*，而且其基因组中也没有编码胱冬肽酶的序列。但是酵母在外界存在胁迫时仍能发生细胞程序性死亡。这些都说明在无胱冬肽酶存在的情况下，一些生物体内可以发生一种胱冬肽酶非依赖的细胞程序性死亡。

大量研究表明一些细胞器包括线粒体、内质网和溶酶体等的损坏都会引起钙离子升高、活性氧的产生和一些效应蛋白的释放，最后导致胱冬肽酶非依赖的细胞程序性死亡的发生。与典型的细胞凋亡类似，质膜表面的死亡受体或 DNA 损伤都能引起胱冬肽酶非依赖的细胞程序性死亡。这些信号过程在线粒体外膜处被控制。其他的细胞器包括溶酶体和内质网都能感应外界刺激，并且通过激活其他蛋白酶决定细胞的存活<sup>[8,9]</sup>。胱冬肽酶非依赖的细胞程序性死亡也经常依赖蛋白酶，这些蛋白酶包括需钙蛋白酶(calpains)、组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 D、组织蛋白酶 L、granzymes A 和 B 等<sup>[8,10]</sup>。在典型的细胞凋亡中这些蛋白酶经常与胱冬肽酶共同发挥作用，但是一些研究表明这些蛋白酶经常以一种胱冬肽酶非依赖的方式引起细胞程序性死亡。

## 2.1 线粒体途径

线粒体下游的信号通路与典型的细胞凋亡路径相似，所不同的主要是引起线粒体膜渗透(mitochondrial membrane permeabilization, MMP)改变的线粒体上游信号通路。在典型的细胞凋亡既胱冬肽酶依赖性的细胞程序性死亡发生时，线粒体膜渗透性的改变导致细胞色素 *c* 由线粒体释放到细胞质，最后与 ATP、细胞质因子 Apaf-1 以及胱冬肽酶 -9 相互作用。另外一种机制是胱冬肽酶抑制因子如 Smac/DIABLO 或 Omi/HtrA2 (50 kDa) 与胱冬肽酶相互分离时，便能够激活胱冬肽酶。线粒体中还含有其他蛋白质如凋亡诱导因子(AIF)(57 kDa)和(30 kDa)引发胱冬肽酶非依赖性的细胞程序性死亡的发生。其中 AIF、Omi/HtrA2 在胱冬肽酶依赖与非依赖性的细胞程序性死亡中都可发挥作用。可以说，随着外界刺激的不同，线粒体可以为胱冬肽酶依赖与非依赖性的细胞程序性死亡的发生提供所需的成分。以下主要阐述线粒体中的一些成分是如何参与胱冬肽酶非依赖性的细胞程序性死亡的发生。

**2.1.1 凋亡诱导因子** 凋亡诱导因子同细胞色素 *c* 一样是存在于线粒体内膜的一种黄素蛋白。凋亡刺激能够使 AIF 由线粒体释放入细胞核，最后引起

染色体凝集和大片段 DNA (50 kb) 的形成。在隔离核中外源加入 AIF 或将融合的 AIF 显微注入细胞内时，都能够引起这些形态变化。胱冬肽酶的抑制剂对 AIF 的这些作用没有任何影响。这说明 AIF 与胱冬肽酶非依赖性的细胞程序性死亡相关。许多试剂引起的胱冬肽酶非依赖的细胞程序性死亡过程中都出现 AIF 由线粒体释放出来。这些试剂包括双氧水<sup>[11]</sup>、p53<sup>[12]</sup>、UVB<sup>[13]</sup>等。这些研究中细胞死亡显示出细胞凋亡性的形态特征，如细胞凝集、磷脂酰丝胺酸外翻、线粒体膜渗透改变和大片段 DNA 的剪切，而且不能被胱冬肽酶抑制剂所抑制。这些都显示 AIF 是促使胱冬肽酶非依赖性细胞程序性死亡发生的关键效应因子。

最近研究表明 AIF 引发的细胞程序性死亡需要通过它的 DNA 结合区域直接与 DNA 相互作用<sup>[14]</sup>。AIF 由线粒体释放出来的机制还不清楚，是否与细胞色素 *c* 的释放机制一样还有待于进一步阐明。但是已肯定的是 Bcl-2 家族成员调节着 AIF 的释放和随后的胱冬肽酶非依赖的细胞死亡。在很多研究系统中，Bcl-2 的过量表达抑制了线粒体中 AIF 的释放和细胞凋亡。这些系统中的细胞凋亡可以由各种刺激诱导，这些刺激包括 TNF $\alpha$ <sup>[15]</sup>、TRAIL<sup>[16]</sup>、AIF 过量表达<sup>[17]</sup>、星形孢菌素<sup>[18]</sup>。已有研究显示 Bax 在 AIF 的释放过程中发挥作用<sup>[19]</sup>，Bax 的过量表达能够导致 AIF 释放量的增加。总之，Bcl-2 家族成员能够调节 AIF 促细胞凋亡，重点是胱冬肽酶非依赖的细胞死亡。

**2.1.2 核酸内切酶 G** 能够使染色体凝集和 DNA 剪切的寡聚核酸酶，包括胱冬肽酶激活的 DNAase (CAD)，其活性依赖于胱冬肽酶 -3。胱冬肽酶 -3 剪切掉 CAD 的抑制蛋白 ICAD，从而激活 CAD 的酶活性。但是在一些缺少胱冬肽酶 -3 的细胞中，凋亡刺激能够通过胱冬肽酶 -3 以外的蛋白酶剪切 ICAD。在体内和体外及突变分析中都发现 GrB 能以胱冬肽酶非依赖性的方式剪切 ICAD，而且胱冬肽酶 -3 与 GrB 对 ICAD 有着共同的剪切位点<sup>[20]</sup>。但是在 ICAD 剔除的小鼠脑损伤中仍出现寡聚核小体(oligonucleosomal) DNA 片段。这说明还存在其他的核酸酶参与 DNA 剪切。最近的研究表明核酸内切酶 G (endonuclease G, EndoG) 作为一种线粒体内膜上的酶发挥着同样的作用<sup>[21]</sup>。EndoG 参与线粒体内 DNA 的复制、修复和降解。EndoG 的激活不需要剪切，而是需要由线粒体释放入细胞质，最后进入

核内剪切 DNA。EndoG 以一种胱冬肽酶非依赖的形式剪切 DNA<sup>[22]</sup>, 它的释放同样也受 Bcl-2 家族的控制。

**2.1.3 Omi/HtrA2** Omi/HtrA2 是哺乳类中与细菌 HtrA 相似的丝氨酸蛋白酶。哺乳动物中的 Omi 与 endoG、AIF 类似<sup>[23]</sup>, 在正常情况下存在于线粒体中, 而在细胞凋亡刺激下释放入细胞质中发挥促细胞凋亡作用。同样 Omi 的释放也受 Bcl-2 的控制。在毒胡萝卜素处理的人结肠癌细胞中, Bax 构象发生变化并移位, 同时 Omi 和细胞色素 c 也释放出来<sup>[24]</sup>。当缺乏 Bax 时, 毒胡萝卜素不能引起这些蛋白质的释放。这些都说明了 Bax 在线粒体渗透和 Omi 的释放中发挥作用。

Omi 能够作为丝氨酸蛋白酶发挥促细胞凋亡活性, 同时能够拮抗 IAP。Omi 作为 IAP 的抑制剂, 它以类似 Smac/Diablo 的方式诱导胱冬肽酶依赖性的细胞凋亡。同时在哺乳类动物中, 它通过丝氨酸蛋白酶活性诱导胱冬肽酶非依赖的细胞死亡<sup>[23,25]</sup>。胱冬肽酶的抑制剂不能阻止 UV 处理引起的 Omi 释放, 这说明 Omi 的释放不依赖胱冬肽酶。但是 Omi 诱导胱冬肽酶非依赖性的细胞死亡的机制还不是十分清楚。最近发现一种特异的能够抑制 Omi 水解活性的抑制剂<sup>[26]</sup>, 它能够明显减弱 Omi 过表达引起的胱冬肽酶非依赖性细胞死亡。

## 2.2 死亡受体途径

许多研究表明在胱冬肽酶没有被激活时, 受体 Fas 和 TNFR1 刺激可以以一类坏死的方式导致细胞死亡。死亡受体诱导细胞死亡时依赖于 RIP 激酶<sup>[27]</sup>和 ROS 的形成<sup>[28]</sup>。尽管 FADD 在 Fas 诱导的类坏死性细胞程序性死亡发挥必要的作用, 但是它却阻碍 TNFR1 诱导的坏死。FADD 的浓度决定着 TNF 最终引起细胞凋亡还是坏死。

## 2.3 内质网途径

错误折叠蛋白的积累和胞内钙离子释放失控, 都会被内质网感应到, 从而改变线粒体的渗透性, 最后导致细胞凋亡和其他细胞死亡形式的发生<sup>[29]</sup>。同时胞质中钙离子升高会引起(需)钙蛋白酶(calpain)调节的细胞死亡。(需)钙蛋白酶是一种以无活性的形式存在于胞质中的半胱氨酸蛋白酶, 胞质中钙离子升高可以激活这种蛋白酶, 同时它也能被(需)钙蛋白酶抑制蛋白(calpastatin)所抑制。各种能够升高胞内钙离子刺激如放射、鬼臼乙叉苷、神经毒素和离子载体都能够激活(需)钙蛋白酶, 然后这种蛋白酶

参与胱冬肽酶上游或下游的信号通路。即使在没有激活胱冬肽酶的情况下,(需)钙蛋白酶也能够调节类细胞凋亡的细胞程序性死亡。如已处于癌治疗临床试验第 3 阶段的维生素 D 类似物 EB1089 和肿瘤抑制基因 ARH 等, 能够诱导(需)钙蛋白酶依赖的类细胞凋亡而并没有激活胱冬肽酶。

## 2.4 溶酶体途径

溶酶体曾一度被认为仅仅在细胞受到胁迫时通过释放一些非特异的消化酶, 进一步引起细胞自身裂解并损坏临近的细胞。但是溶酶体中的组织蛋白酶特别是组织蛋白酶 B、L 和含天冬氨酰基的组织蛋白酶 D 既参与各种刺激(如 TNFR 家族的死亡受体、B 细胞受体、p53 肿瘤抑制蛋白、喜树碱、胆汁盐、氧化剂和类维生素 A)诱导的胱冬肽酶依赖性细胞程序性死亡, 又参与胱冬肽酶非依赖性的细胞程序性死亡<sup>[30]</sup>。

## 3 小结

对各种细胞死亡的形态和分子机制研究不仅是学术上迫切需要, 而且也影响着神经系统中的组织再生和肿瘤中的免疫反应。随着对各种细胞死亡形式的研究, 人们有可能采取各种不同的措施治疗癌症和神经退变性疾病。典型的细胞凋亡途径作为癌和其他疾病的药靶已引起了广泛的兴趣, 但是仅仅针对这些药靶所开发出的药物却不能用于治疗由于其他细胞死亡形式所导致的疾病。尽管关于胱冬肽酶非依赖性的细胞程序性死亡机制还未阐明清楚, 但是这一细胞程序性死亡途径为杀死肿瘤细胞提供了新的选择。如维生素 D 类似物的治疗已经进入三期临床试验阶段。所以, 需要全面分析各种由细胞程序性死亡异常所导致的疾病发生的机制, 才能开发出有效的治疗药物。

## 参考文献 (References)

- [1] Foghsgaard L et al. *J Cell Biol*, 2001, **153**: 999
- [2] Roberts LR et al. *Cell Biochem Biophys*, 1999, **30**: 71
- [3] Kitanaka C et al. *Cell Death Differ*, 1999, **6**: 508
- [4] Elliott K et al. *Oncogene*, 2000, **19**: 4669
- [5] Hirt UA et al. *J Immunol*, 2000, **164**: 6520
- [6] Sperandio S et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 14376
- [7] Lockshin RA et al. *Curr Opin Cell Biol*, 2002, **14**: 727
- [8] Leist M et al. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, **2**: 589
- [9] Ferri KF et al. *Nat Cell Biol*, 2001, **3**: E255
- [10] Johnson DE et al. *Leukemia*, 2000, **14**: 1695
- [11] Fonfria E et al. *Eur J Neurosci*, 2002, **16**: 2013
- [12] Cregan SP et al. *J Cell Biol*, 2002, **158**: 507

- [13] Murahashi H *et al.* *J Leuko Biol*, 2003, **73**: 399  
[14] Ye H *et al.* *Nat Struct Biol*, 2002, **9**: 680  
[15] Basu A *et al.* *Exp Cell Res*, 2002, **278**: 209  
[16] Fulda S *et al.* *Oncogene*, 2002, **21**: 2283  
[17] Singh R *et al.* *J Endocrinol*, 2003, **176**: 321  
[18] Loeffler M *et al.* *FASEB J*, 2001, **15**: 758  
[19] Daugas E *et al.* *FEBS Lett*, 2000, **476**: 118  
[20] Sharif-Askari E *et al.* *EMBO J*, 2001, **20**: 3101  
[21] Davies AM *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**: 1364  
[22] Li LY *et al.* *Nature*, 2001, **412**: 95  
[23] Hegde R *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 432  
[24] Yamaguchi H *et al.* *Cancer Res*, 2003, **63**: 1483  
[25] Suzuki Y *et al.* *Mol. Cell*, 2001, **8**: 613  
[26] Cilenti L *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 11489  
[27] Holler N *et al.* *Nat Immunol*, 2000, **1**: 489  
[28] Maiani NA *et al.* *Blood*, 2003, **101**: 1987  
[29] Mathiasen IS *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 30738  
[30] Guicciardi ME *et al.* *J Clin Invest*, 2000, **106**: 1127

## Caspase-independent Programmed Cell Death

Zhen-Xia Qin, Feng Gu, Ying-He Hu\*

(Key Laboratory of Brain Functional Genomics, Ministry of Education & Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

**Abstract** Programmed cell death (PCD) plays essential role in the development and maintenance of multicellular organisms. It can be defined into various forms (apoptosis, apoptosis-like PCD and necrosis-like PCD). Apoptosis is expounded relatively clearly among them. It is believed that caspases are crucial executors in all programmed cell death. Recently, however, much evidence indicated that some forms of programmed cell death, including apoptosis, can happen without the involvement of caspases. In this review, we summarized caspase-independent programmed cell death.

**Key words** programmed cell death; caspase-independent

Received: November 24, 2004 Accepted: January 11, 2005

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (No.2003AA221061)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-62603004, Fax: 86-21-62601953, E-mail: yhu@brain.ecnu.edu.cn