

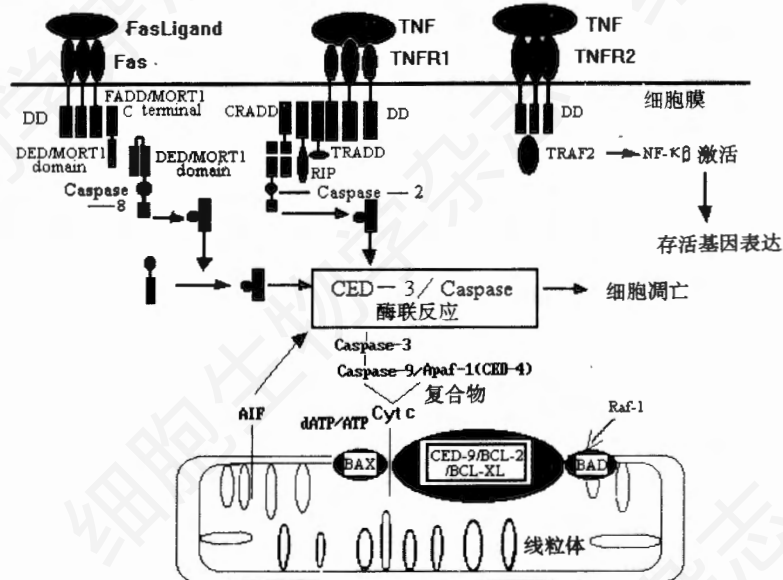
细胞凋亡信号的传递途径及其调控

石熠慧 汤雪明

(上海第二医科大学细胞生物学实验室 上海 200025)

细胞凋亡是不同于细胞坏死的一种细胞死亡方式。在形态上表现为细胞皱缩、染色体边缘化、核碎裂、凋亡小体形成等。目前公认的细胞凋亡指标包括形态学上光镜、电镜观察，DNA 电泳的阶梯状条带，流式细胞术测定亚 G₁ 峰等。但这些关于凋亡的研究仅限于明确是否存在凋亡，而无法解释凋亡的发生机制。近年来，随着分子生物学突飞猛进的发展，关于细胞凋亡分子机制的研究有了很大的突破，尤其是 FasL 和 TNF 诱导的细胞凋亡。这种细胞凋亡可在刺激后 1—2h 内发生，而且去除细胞核后，胞浆的凋亡改变可在无核的情况下发生。

提示细胞凋亡是各种内外因素激活了细胞自身固有的程序，参与细胞凋亡的物质本身存在于细胞浆中，而不需要转录合成这些成分，但在凋亡过程中需要某些基因的改变，蛋白质的合成以激活或抑制此通路中的环节，从而起到调控的作用。近年来的研究证实了这种推测，发现了 4 种能传递凋亡信号的蛋白，利用蛋白质上的一些结构域将信号传导至凋亡的执行人——凋亡蛋白酶，此酶的激活将导致一系列效应，最终引起细胞凋亡（见下图）。本文拟对 FasL 和 TNF 诱导细胞凋亡的通路及调控作一综述。



细胞凋亡信号传递途径及其调控模式图^[1,2]

一、FasL 和 TNF 介导 凋亡信号的传递途径

FasL 和 TNF 同属于 TNF 家族, FasL 的受体 Fas (也命名为 Apo-1, CD 95) 和 TNF 的受体 TNFR (包括 TNFR1、TNFR2) 同属于 TNFR 家族。研究发现 FasL-Fas, TNF-TNFR 结合后, 首先使 Fas 和 TNFR 形成能传递信号的活性形式——三聚体, 并发现 Fas 和 TNFR 胞内段含有一段长约 60-70 个氨基酸序列的片段, 称死亡结构域 (Death Domain DD), 这一结构域与果蝇死亡蛋白 (Reaper) 具有同源性。近年人们运用酵母双杂交系统相继发现了四种同样具有 DD, 且能通过 DD 传递信号的蛋白。

与 Fas 发生反应的蛋白是 Fas 死亡结构域相关蛋白 (Fas-Associated Death Domain, FADD) 或称 MORT1, 此蛋白的 C 末端也有一个 DD, 与 Fas 的 DD 同源, Fas 与 FADD 通过 DD 形成二聚体而相互作用。FADD 的 N 末端称为死亡效应结构域 (death effector domain DED 或称 MORT1 结构域), 该结构负责将凋亡信号传递至一种凋亡蛋白酶——Caspase-8^[3,4]。所谓 Caspases, 是哺乳动物中与 CED-3 同源且具有相同作用的一类半胱氨酸蛋白酶家族, 旧称 ICE 家族 (Interleukin-1 β -converting enzyme, 白细胞介素 1 β 转化酶)。Caspase 中的“C”指的是其半胱氨酸酶活性, “aspase”指特导剪切“ASP-X”肽键的作用。Caspase 家族中某一成员的激活将引起此家族的一系列酶联反应, 激活的 Caspase 作用于不同的底物产生不同的效应, 于是细胞发生凋亡。

TNF-TNFR1 结合后, 随即 TNFR1 死亡结构域相关蛋白 (TNFR1-associated death domain protein, TRADD) 与 TNFR1 发生相互作用。但 TRADD 与 FADD/MORT1 有不同之处: TRADD 没有死亡效应结构域。TRADD 通过两个通路介导细胞凋亡。一方面它可以通过其 DD 与 FADD/MORT1 相连, 从而传递至 Caspase-8^[5]; 另一方面 TRADD 与受体反应蛋

白 (Receptor interacting protein, RIP) 相互作用, 传递信号。RIP 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, C 末端有一个死亡结构域同源区域 DD, N 端具有酶活性, 它可通过 DD 与 TRADD 相互作用, 但其 N 末端并无信号传递作用^[6], 信号传至 RIP 是否尚有接应的蛋白传递信号? 令人欣慰的是, 新近的研究发现了另一种含有 DD 的传递凋亡信号的蛋白——CRADD (Caspase and RIP adaptor with death domain)。其 C 末端通过 DD 与 RIP 相互作用, N 末端具有与 Caspase-2 同源的结构, 从而与另一凋亡蛋白酶 Caspase-2 相互作用^[7]。目前可以明确, FasL-Fas 传导的信号能引起细胞凋亡, 而 TNF 与 TNFR 的结合, 有双重信号传递, 除了介导凋亡信号外, 还介导存活信号。Rothe 等在 1994 年发现一类与 TNF 受体相关的蛋白 TRAF 家族 (TNF receptor-associated factor) 目前已发现了五个成员, 他们都具有一个长约 230 个氨基酸左右的 TRAF 结构域。其中 TRAF2 直接与 TNFR2 相连, 并通过 TRADD、RIP 间接与 TNFR1 相连。TRAF2 继而引起 NF- κ B 激活。近年研究表明, NF- κ B 的激活可引起存活基因的表达, 产生抗凋亡的保护蛋白, 从而阻止细胞凋亡。故 TNF 与 TNFR1、TNFR2 的结合, 通过所涉及蛋白的相互作用, 一方面可以介导凋亡信号, 一方面可以介导存活信号^[8-10]。可见在细胞凋亡的过程中, 存在着精细而复杂的调节, 平衡着存活与凋亡。

二、Caspases 的激活

前述细胞凋亡信号分别传至凋亡蛋白酶 Caspase-8、Caspase-2。Caspase 家族现有十一名成员^[11] (见下表)。每一成员都是以无活性的酶原的形式存在于胞浆中, 激活后被剪切形成活性结构域, 然后再与 Caspase 家族的其他一些成员发生酶联反应, 激活它们的活性, 于是不同的 Caspase 作用于不同的底物。例如 pro-Caspase-1 激活后形成 P20 和 P10 两个结构

域,2个P20和2个P10构成四聚体,形成有活性的Caspase-1,然后或是激活pro-Caspase-3、4,或是作用于底物pro-IL-1 β 。Caspase-8是最近两个小组分别发现的。开始命名为FLICE(FADD-like ICE)蛋白和MACH蛋白(MORT1-associated CED-3homologue),经鉴定为同一物质,并正式命名为Caspase-8。Caspase-8在其N末端含有两个DED/MORT1结构域,与FADD/MORT1的DED/MORT1结构域相互作用,于是细胞凋亡信号传导至Caspase-8^[3,4]。Caspase-2又名Ich-1,因CRADD的N端含有与Caspase-2同源的结构域,故两者相互作用。Caspase-8,Caspase-2接受凋亡信

号后,自身激活成活性形式。已证实,Caspase-8能够激活所有已知的Caspases^[7],至于它下游的Caspase激活顺序,尚未明确。但可以肯定,在不同的细胞类型中,并不是每种Caspase都参与,也就是说Caspase的激活在不同的生物组织中是具有选择性的。而且许多实验结果都表明,Caspase-3在此家族中占有重要地位,它在组织中分布广泛,而且在不同细胞凋亡中都有参与^[12,13]。但对Caspase-2的研究发现,它除了能激活pro-Caspase-2外,不能激活此家族中其他成员,故Caspase-2是否能激活别的未知的Caspase,从而引起酶联反应,或是它将直接作用于底物,还需进一步研究^[7]。

人ICE蛋白酶超家族

蛋白酶	其他命名	底物
caspase-1	ICE	pro-IL1 β ,pro-caspase-3and4
caspase-2	ICH-1	PARP
caspase-3	CPP32,Yama,apopain	PARP,DNA-PK,SRE/BP,rho-GDI
caspase-4	ICErel- I ,TX,ICH-2	
caspase-5	ICErel- II ,TY	
caspase-6	Mch2	Lamin A
caspase-7	Mch3,ICE-LAP3,CMH-1	PARP,pro-caspase-6
caspase-8	FLICE,MACH,Mch5	
caspase-9	ICE-LAP6,Mch6	PARP
caspase-10	Mch4	
caspase-11	ICH-3	

三、Caspases作用底物及其效应

细胞凋亡时形态结构和生化改变是Caspases作用于底物的结果。例如DNA有序降解、核碎片形成、细胞膜磷脂酰丝氨酸(PS)外翻等。故Caspases被认为是细胞凋亡的中心环节和执行者。

目前发现的凋亡相关底物有RARP,Lamin,U1-70KD,Fodrin等。PARP(poly ADP-ribose polymerase,聚腺苷二磷酸核糖多聚酶)与DNA修复,基因完整性有关。新近研究证实,Caspase-3(CPP32)能识别PARP中的

Asp-Glu-Val-Asp(DVED)序列,从而剪切PARP。PARP被剪切后失去正常功能,从而激活受PARP负调控的核酸内切酶活性,最终使核小体间DNA降解,形态学上出现DNA梯状现象。Lamin是构成核片层的蛋白质,位于核膜内表面。Takahashi等发现Caspase-6(MCH2)能识别Val-Glu-Ile-Asp(VEID),裂解Lamin,从而影响核包膜的完整性,这对于染色质凝聚形成凋亡小体起重要作用^[14]。U1-70KD蛋白在剪接前体mRNA中起重要作用,在细胞凋亡过程中,发现70KD的U1-70KD在Asp229-Ala230间被切割成40KD片段,提示有半胱氨酸蛋白酶作用。且用蛋白酶抑制剂后发现,此特

异剪切和细胞凋亡均受到抑制。但目前尚未发现何种 Caspase 在起作用。Fodrin 是细胞骨架的组成成份,在细胞凋亡中发现 240KD 的 Fodrin 先后被切割成 150KD、120KD 片断,使用蛋白酶抑制剂后此切割被抑制。因为 Fodrin 与内质网相关,细胞凋亡后期,内质网扩张成泡状,与细胞膜融合成胞质气泡,Fodrin 的切割可能与此相关,但具体何种蛋白酶作用尚未确定。磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine,PS)位于活细胞膜内侧。在细胞凋亡早期,它能特异外翻,并且能与 annexin-v-FITC 结合从而被识别。现已证明 PS 的外翻依赖于 Caspase 的激活,但具体机制未明确^[15]。复杂的是,在不同生物、不同组织、细胞中 Caspase 各成员的分布不同,作用底物不同。相信在不久的将来,Caspase 成员间相互关系及 Caspase 与特异性底物的作用会渐渐阐明。

四、细胞凋亡的调控

细胞凋亡受各种内外信号的影响和调控,或是抑制或是诱导细胞凋亡。最近,越来越多的资料表明在细胞凋亡过程中,线粒体起了非常重要的作用。首先,调控细胞凋亡的重要物质 Bcl-2 家族主要位于线粒体膜上。Bcl-2 家族各成员对细胞凋亡有激活和抑制不同的作用。Bcl-2 家族是与 CEK-9 同源的哺乳动物蛋白,包括 Bcl-2, Bcl-X1, Bcl-Xs, Bax, Bad, Bag-1, Bak 等。其中 Bcl-2, Bcl-X1, Bax, Bad, Bak 都有具有两个保守区域 BH1, BH2。bcl-x 基因通过不同剪切得到两个转录产物 Bcl-X1, Bcl-Xs, 其中 Bcl-X1 与 Bcl-2 同源且具有相同功能。而 Bcl-XS 则相反。Bcl-2 和 Bax 可以同源二聚体存在, Bcl-2, Bcl-X1 和 Bax, Bad 能形成异源二聚体。早在 93 年就发现 Bcl-2 与 Bax 的比例控制着生存与凋亡。当 Bax 同源二聚体形成,便诱导细胞凋亡,而 Bcl-2 过量时,形成 Bcl-2 同源二聚体和 Bcl-2/Bax 异源二聚体,减少了 Bax 同源二聚体含量,从而抑制了 Bax/

Bax 的促凋亡作用。Bad 也可与 Bcl-2, Bcl-X1 形成异源二聚体,从而阻遏 Bcl-2, Bcl-X1 抑制细胞凋亡的作用。最近研究发现,当 RAF1 激酶使 Bad 磷酸化后, Bad-pi 就不能与 Bcl-2, Bcl-X1 形成二聚体,于是细胞存活^[16]。Bcl-2 家族对细胞调控的机理非常复杂,尚存在许多别的途径,有待于进一步探讨。

另外,最近的研究发现:在细胞凋亡早期,线粒体形态上尚无明显可见变化前,实际上已经产生了一系列功能改变。表现为膜通透性孔道(Permeability transition Pore, PT Pore)开放,膜通透性增高,跨膜电位($\Delta\Psi_m$)下降,并释放出细胞色素 C(Cytochrome C, Cyt C)和凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)至胞浆。

众所周知,Cyt C 参与呼吸链的电子传递,对于能量的合成起着重要的作用。Cyt C 再一次引起人们的注意,是因为现在的研究发现,Cyt C 在细胞凋亡中也扮演了重要角色。诱导细胞凋亡后 1 小时观察,Cyt C 从线粒体膜内释放至胞浆,并激活 Caspase 家族,引起细胞凋亡^[17,18]。Cyt C 激活 Caspase 家族的具体机制主要涉及凋亡蛋白酶激活因子(Apoptotic protease activating factors, Apaf)间的相互作用。Apaf 目前已提纯并命名了三个成员, Apaf-1 对应于线虫的 CED-4, Apaf-2 对应于 Cyt C, Apaf-3 对应于 Caspase-9。研究发现,在 Apaf-2 (Cyt C)和 dATP/ATP 存在的条件下, Apaf-1 (CED-4)和 Apaf-3(Caspase-9)形成复合物,此复合物的形成即激活了 Apaf-3(Caspase-9), Caspase-9 进一步激活 Caspase-3,最终导致细胞凋亡。去除 Apaf-2(Cyt C)或 dATP/ATP 后, Apaf-1(CED-4)和 Apaf-3(Caspase-9)就不能形成复合物,也就不能激活 Caspase-9 及其后续的 Caspase 酶联反应^[19]。故 Cyt C 从线粒体膜内释放至胞浆,严重地挑战了细胞的存活。一方面,线粒体缺乏 Cyt C 将导致能量代谢障碍,细胞趋于坏死;另一方面,细胞色素 C 又促进了细胞凋亡。

AIF也能引起Caspase的激活和细胞凋亡,但使用Caspase抑制剂后发现能阻止AIF的释放,说明AIF的释放需要依赖某些Caspase的激活,一经释放又促进Caspase家族的酶联反应,导致细胞凋亡。Cyt C和AIF的释放能被Bcl-2的过表达所抑制,具体机制未明^[20]。

除了线粒体在调控细胞凋亡中起了重要作用外,其他参与调控的物质还有p53,p35,Rb,c-myc等基因。p53基因在稳定染色体DNA上充当着“分子警察”的角色。当DNA损伤如受到辐射时,p53便转录表达,或是修复DNA,或是诱导该细胞凋亡。p53诱导细胞凋亡的机制表明,p53能结合一段特定序列的DNA并促进转录,而bax基因启动子存在与p53的结合靶序列,故p53直接作用于bax基因,从而使bax含量增高,自身形成同源二聚体,引起细胞凋亡。p35是杆状病毒编码的蛋白,能抑制昆虫、线虫和哺乳动物的细胞凋亡。p35阻断细胞凋亡的机制在于——与ICE/Caspase家族成员(包括Caspase-1,Caspase-2,Caspase-3,Caspase-4)形成p35-ICE/Caspase复合体,从而抑制Caspase的催化活性。Rb基因是最早发现的抑癌基因,其产物为核内磷蛋白——PRb。除有抑癌作用外,还能阻断细胞凋亡。研究发现,在Fas和TNFR介导的细胞凋亡早期,一种或多种Caspase激活,并能在Rb的C末端对其剪切,使其丧失了抑制细胞凋亡的作用,可见Caspase除了执行凋亡外,还作用于存活蛋白,起到某种调控作用^[21]。c-myc蛋白是一种转录调节因子,与细胞的增殖、分化、凋亡有密切关系。当c-myc低水平表达时,细胞生长受抑制;当c-myc高表达且存在血清生长因子时,细胞进入增殖状态;当c-myc高表达但不存在血清生长因子时,发生细胞凋亡。但c-myc参与细胞凋亡的作用机制还未明确。

五、结 语

综上所述,FasL和TNF诱导细胞凋亡的

通路已有了相对完整的解释。凋亡信号通过配基-受体的结合由膜外传至膜内,又由胞浆中参与信号传递的物质中介,到达Caspase家族,此家族的激活最终导致不可逆的细胞凋亡。影响Caspase家族活性的物质起到了调控细胞凋亡的作用。但是在此途径中尚有其他参与的蛋白,这些蛋白之间的相互关系,Caspase作用的具体情况,调控的复杂性以及除此途径外介导凋亡的其他通路都尚有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Shigekazu N,1997,*Cell*,**88**:357.
- [2] Golstein P,1997,*Science*,**275**:1082.
- [3] Boldin JP,Goncharov TM,Goltsev YV, et al.,1996,*Cell*,**85**:803-815.
- [4] Muzio M,Chinnaiyan AM,Kischkel FC, et al.,1996,*Cell*,**85**:817-827.
- [5] Hsu H,Shu HB,Pan MG, et al.,1996b,*Cell*,**84**:299-308.
- [6] Hsu H,Hung J,Shu HB, et al.,1996a,*Immunity*,**4**:387-396.
- [7] Ahmad M,Srinivasula SM,Wang L, et al.,1997,*Cancer Res.*,**57**(4):615-619.
- [8] Amer A,Beg,David B.1996,*Science*,**274**:782-784.
- [9] Wang CY,Mayo MW,Albert S.1996,*Science*,**274**:787-789.
- [10] Daniel J,Antwerp V,Martin SJ, et al.,1996,*Science*,**274**:787-789.
- [11] Alnemri ES,Livingston DJ,Nicholson DW, et al.,1996,*Cell*,**87**:171.
- [12] Pulverino AJ,Patterson SD.1997,*J Biol Chem*,**272**(11):7013-7021.
- [13] Faleiro L,Kobayashi R,Fearnhead H, et al.,1997,*EMBO J*,**16**(9):2271-2281.
- [14] Takahashi A,Alnemri E S,Lazebnik YA, et al.,1996,*Proc Natl Acad Sci USA*,**93**:8395-8400.
- [15] Martin SJ,Finucane DM,Amarante-Mendes G, et al.,1996,*J Biol Chem*,**271**:28753-28756.
- [16] Chinnaiyan AM,O'Rourke K,Lane BR, et al.,1997,*Science*,**275**:1122-1126.
- [17] Yang J,Liu XS,Bhalla K, et al.,1997,*Science*,**275**:1129-1132.
- [18] Kluck RM,Wetzcl EB,Green DR, et al.,1997,*Science*,**275**:1132-1136.
- [19] Li P,Nijhawan D,Budihardjo I, et al.,1997,*Cell*,**91**:479-489.

[20] Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. 1997, *Immunol Today*, 18: 44-51.

[21] Tan X, Martin SJ, Green KR, et al. 1997, *J Biol Chem*, 272(15): 9613-9616.

染色质凝聚与细胞凋亡

阎蕴力 郑力芬 王美华

(河北医科大学基础所细胞生物室 石家庄 050017)

细胞凋亡是由基因控制的细胞主动死亡方式。现已知体内多种组织的细胞通过凋亡途径实现自身代谢转变;如胚胎细胞、胸腺细胞、T和B淋巴细胞、晶状体细胞、肠上皮、乳腺上皮、前列腺上皮以及成纤维细胞等。细胞凋亡不但在个体发育、免疫细胞的增殖、分化、成熟等生理过程中具有独特的意义,而且对机体自身监测清除突变细胞和肿瘤细胞等方面也有重要的作用。体内自然凋亡途径的紊乱可能导致发育异常和加速肿瘤的发生和恶化。自1972年Kerr从形态学上注意到凋亡现象以来,近年来受到细胞生物学、分子生物学、免疫学、生命科学、临床医学等相关学科的广泛重视。人们从不同的研究角度,探讨细胞凋亡的本质,并且尝试着能进一步在治疗手段上模拟细胞凋亡的过程,提高人类对某些疾病的治疗效果。至今有关凋亡的文献报道很多,涉及面极广,现本文仅就正常情况下染色质凝聚过程,以及细胞凋亡时染色质异常凝聚和DNA断片化方面的研究进展做一梗概介绍。

一、正常细胞周期进程中 染色质DNA的凝聚

染色质是由DNA以及约于DNA同等量的碱性蛋白质,即组蛋白(包括H1, H2A, H2B, H3, H4组蛋白),以及少量的非组蛋白酸性蛋白质(约占染色质成分的0.5%-1.5%)和微量的RNA(约占染色质成分的0.05%)构成的复合体。DNA作为染色质的主要功能成分,包括人类在内的哺乳动物细胞核内单倍体DNA量约 3.2×10^{12} g, DNA分子直线长度约1m,

人类的全部遗传信息位于其上的 3×10^9 (30亿对)的碱基对(bp)中,编码50 000-100 000个基因。每个基因或基因家族所占碱基对长度不一,如人 α 球蛋白基因家族由约200kb;人干扰素基因家族约由5-15kb构成^[1,2]。

由 2×30 亿个碱基对构成的DNA分子容纳于直径约 $10 \mu\text{m}$ 的体细胞核内,间期(G_0, G_1)细胞核内的染色质主要附着在核基质上,并随着细胞周期由间期向分裂期过渡, DNA逐渐凝聚约10000倍形成中期染色体^[3]。多年来,通过对染色质形成染色体过程中结构变化和生物化学方面的研究,目前比较一致的观点认为:染色质凝缩大体可分为两个阶段;第一阶段,复制后的DNA双螺旋凝聚成直径约10nm的核小体。核小体由H2A, H2B, H3, H4组蛋白各两个分子构成的八聚体的轴心组蛋白(core histone),外面由至少长约146bp的DNA双分子围绕约两圈,以及连接组蛋白H1(Linker histone H1)共同构成。核小体之间连接DNA(Linker DNA)长约200bp。连接组蛋白H1是一个富含赖氨酸、丝氨酸的碱性蛋白质,它的球形中心部与轴心组蛋白的特定部位结合, H₂N端和COOH端分别与相临的核小体轴心组蛋白相互衔接,而与连接DNA的接触较为松弛。一般认为基因转录活性较高区域,组蛋白H1含量较少(扩大基因的接触空间)。间期细胞内H1主要分布于核被膜内面,分裂中期主要位于染色体的A(腺嘌呤)-T(胸腺嘧啶)富集区和染色体端粒部位^[4]。H1与DNA的结合主要是电稳定性的,增加离子强度可以弱化H1与DNA