

- 56.
- [16] Sha WC. et al. ,1995, *Cell*, **80**:321 - 330.
- [17] Fields ER. et al. ,2000, *J Immunol*, **164**: 4762 - 4767.
- [18] Ammon C. et al. ,2000, *Biochem Biophys Res Commun*, **268**:99 - 105.
- [19] Kanegae Y. et al. ,1998, *Nature*, **392**:611 - 614.
- [20] Bushdid PB. et al. ,1998, *Nature*, **392**:615 - 618.
- [21] Beg AA. et al. ,1996, *Science*, **274**:782 - 784.
- [22] Wang C. et al. ,1996, *Science*, **274**:784 - 787.
- [23] Baichwal VR. et al. ,1997, *Current Biology*, **7**:R94 - R96.
- [24] Dumont A. et al. ,1999, *Oncogene*, **18**:747 - 757.
- [25] Wang C. et al. ,1998, *Science*, **281**:1680 - 1683.
- [26] Gilmore TD. et al. ,1996, *Oncogene*, **13**: 1367 - 1378.
- [27] Bargou RC. et al. ,1996; *Blood*, **87**:4340 - 4347.
- [28] Chen F. et al. ,1997, *Arch. Biochem. Biophys*, **342**: 383 - 388.
- [29] Brand K. et al. ,1996, *J Clin Invest*, **97**: 1715 - 1722.
- [30] Ferrer I. et al. ,1998, *Neuropathol Appl Neurobiol*, **24**:271 - 277.
- [31] Heck S. et al. ,1999, *J Biol Chem*, **274**: 9828 - 9835.
- [32] Calzado MA. et al. ,2000, *Clin Exp Immunol*, **120**: 317 - 323.
- [33] Griesenbach U. et al. ,2000, *Gene Therapy*, **7**:306 - 313.

## 细胞骨架与细胞凋亡及细胞内信息通路的关系

夏伟\* 周建伟

(南京医科大学应用毒理研究所分子毒理研究室 南京 210029)

真核细胞的空间结构由细胞骨架(cytoskeleton)维持,微管(microtubule MT)、微丝或肌动蛋白丝(microfilament or actin filament, AF)以及中间丝(intermediate filament, IF)这三种类型的细胞骨架在结构上相互连接,彼此协同发挥作用,参与细胞内物质运输、细胞运动、信息传递、能量转换、细胞分裂等活动<sup>[1,2]</sup>,细胞骨架的这些功能对胚胎发生、致癌作用和伤口愈合非常重要<sup>[2]</sup>。通常认为,细胞骨架是直接连接细胞表面与细胞核的唯一结构,因此成为细胞外信号和核内基因表达之间的桥梁;近年对细胞凋亡信号传导的研究发现:三种细胞骨架在细胞凋亡过程中变化非常活跃,它们在细胞内的状态直接影响凋亡信号的终点<sup>[3,4]</sup>;表明细胞骨架可能是信号传导的空间调控者和功能性分子。本文对近年来细胞骨架在细胞内信号传导中的作用,特别是在细胞凋亡信息通路中的意义,作一简要综述。

### 一、细胞骨架与细胞内信息通路

细菌体内没有细胞骨架,所以细胞骨架可能是真核细胞进化的关键因素之一。其成份复

杂,结构呈动态变化,并常需多种亚单位蛋白装配组合后才能发挥作用。因此细胞骨架的结构和功能的关系,特别是其在细胞信号传导中的确切作用及其机制至今仍不完全清楚。

#### 1. 微管(MT)

是细胞骨架的主要组成成分,由 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 三种微管蛋白(tubulin)单体聚合形成具有一定机械硬度的管状结构,这三种单体均是鸟苷三磷酸(GTP)结合蛋白。MT在信号传导中发挥关键作用的最初证据来源于对一种抑制果蝇发育基因(Costa12)的研究<sup>[34]</sup>。序列分析发现Costa12与kinesin的重链相似;它与Fused(一种蛋白激酶)和CI(一种转录因子)形成复合体结合于MT上。当与发育有关的有效刺激出现时,MT与该复合物的结合力下降,导致复合体解散,促使释放的CI进入核内发挥功能。Gundersen和Cook总结了MT与信号分子作用的方式,认为主要有以下三种:即隔离与释放作用(sequestering and release)、运送作用(delivery)和支架作用(scaffolding)。

\* 现在南京医科大学附属南京第一医院,210006。

从 MT 的特殊结构来看,至少有四点证据支持它参与了细胞内信号传导:(1)MT 负端(minus ends,靠近细胞核的一端)连接在微管组织中心,正端(plus ends)游离于胞浆中,从而形成细胞的极性结构,并极有可能为信号分子的流动提供导向;(2)tubulin 在 MT 的两端呈不同向、不同速率的聚合和解聚,使 MT 稳定性、长度、极性等呈现动态性变化,这种动态性受细胞内源性物质(PMA、EGF、凝血酶等)和多种外源性物质(LPA、胰岛素、化学诱导剂)影响;细胞有丝分裂期、分化期、细胞毒性 T 细胞与靶细胞结合及内皮细胞向受伤组织周围聚集等生理过程中均发现有微管重组变化,因此 MT 的动态性本身可能就是一种信号,在一种精密机制的调节下,细胞产生应答;(3)有两种动力蛋白(kinesins 和 dyneins)在 MT 上沿一定方向移动,其作用是促使一些特殊的膜结合细胞器定位于细胞内指定位置。近年来的研究显示它们参与 MT 的信号传导;(4)MT 可以形成大约  $1000\text{M}^2$  的蛋白表面,为其他信号分子提供相互作用场所的同时,其本身也可以成为某些蛋白酶的底物。

## 2. 微丝(AF)

是真核细胞中含量最丰富的一种蛋白复合体,由肌动蛋白组成,通常以维管束或网络形式存在于细胞内,呈动态变化。AF 是调节细胞贴壁、伸展和形态的主要结构,在细胞行使多种功能如增殖时发挥重要作用,也是细胞骨架中与凋亡信号分子关系最密切的成员。

外界信号到达膜上,引起细胞的快速反应之一是膜下微丝网络的结构变化,导致细胞形态学和底物粘附力的改变。因此,AF 被认为是该过程信号传导中必经的环节和组成部分;近年来对 AF 的主要调控子——Rho 家族进行了深入的研究,认为它是膜受体与 AF 之间信号传导通路的控制开关<sup>[9,26]</sup>,受体及其相关的信号分子都定位于微丝与膜的连接处。不同的膜受体通过不同的 Rho(Cdc42、Rac、Rho)引起 AF 相应变化,如缓激肽、韩蛙皮素(bombesin)、

溶血磷脂酸与相应的蛇根碱型受体结合后,分别通过 Cdc42、Rac、Rho 激活微丝形成假性伪足、波状边缘和应力纤维;而表皮生长因子、血小板源生长因子以及佛波酯与酪氨酸激酶、PKC 等受体作用后也要通过 Rac 将信号传递给微丝引起波状边缘的出现。

目前对 AF 的上游调控信号以及它与细胞状态的关系的研究较多,但微丝重组后对细胞内其它分子的影响以及是否将信息以某种方式传递给邻近细胞,即关于微丝的下流研究还不多,加强这方面的研究将有助于更好地阐明微丝在细胞内的确切生理功能。

## 3. 中间丝(IF)

IF 单体具有环状结构且较坚韧,使细胞和组织具有机械稳定性。人体内有 50 多种与 IF 相关的基因,这些基因的表达具有组织特异性,有些基因突变可能与某些先天性皮肤病有关。根据氨基酸序列,动物体内的中间丝分为 5 种类型(也有作者将中间丝分为 6 种):细胞角蛋白(keratin)、波形蛋白(vimentin)、结蛋白(desmin)、胶质细胞原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和神经丝蛋白(neurofilament protein),分布于体内功能不同的细胞内;还有一些核内的中间丝构成细胞核的固定形态。

IF 本身是一种信息分子,可能与 DNA 复制和转录有关。在肺癌和神经纤维瘤细胞,凋亡早期即可见细胞角质蛋白和波形蛋白凝聚和降解,并伴有细胞表面磷脂酰丝氨酸的暴露<sup>[4]</sup>;另一种中间丝家族成员核纤层蛋白(lamins),它构成一个网架支撑核内膜结构,同时对染色质有定向和组织作用。已经证明核纤层蛋白是 ICE 的底物,在凋亡中被剪切,并伴随核板的解体;核纤层蛋白的活性是凋亡时核解体所必需的,它的活性除受其特异性的蛋白酶作用外,还与 Bcl-2、P53、PARP 等有关。由于一直没有作用于 IF 的特异性研究用药,对 IF 的了解不如其他细胞骨架那么清楚;近期荷兰 Manon 的研究结果表明,200 $\mu\text{M}$  olomoucine

或  $50\mu\text{mol/L}$  roscovitin 在 MR65 和 CHP212 两种人肿瘤细胞株诱导凋亡后,发现 IF 细胞角质和波形蛋白被降解,而 AF 和 MT 却没有崩解<sup>[11]</sup>,这可能是研究 IF 的较好的药物模型。

## 二、细胞骨架与细胞凋亡过程中信号分子的关系

凋亡细胞的形态变化之一是膜大泡的形成,这是细胞骨架变化的结果。然而,细胞骨架的变化究竟是凋亡中蛋白酶和信号分子激活的结果,还是程序性细胞死亡进程中必需发生的细胞内事件,这一点尚不清楚。现在更多的试验结果偏向于细胞骨架在凋亡信号传导中的积极作用。

### 1. 受体 Ras MAP 激酶级联途径<sup>[8,12,10]</sup>

MAPKs 是一类脯氨酸指导的丝/苏氨酸激酶,通过一系列磷酸化级联反应将细胞外各种刺激信号传入细胞内,是重要的细胞信号分子。

较早致力于研究 MT、MAPKs 和凋亡之间关系的是 Jay Wimalasena 的工作组,他们研究了多种微管干扰剂对多种肿瘤/非肿瘤细胞株的影响,提出 JNKs 活化是细胞对 MT 损伤的应答反应,一条比较完整的信号通路 Ras-Rac-MEKK1-JNKK/SEK1 和 ASK1-JNKK/SEK1 分别/同时作用于下游级酶,最后 c-jun 和其他转录因子的活化引起细胞应激反应或抗凋亡分子 Bcl-2 的失活,使细胞发生凋亡。尽管这条信号传导通路还有许多信号分子有待证实,但他们的基本理论获得实验室的多次重复;尤其是在 MCF-7 细胞中观察药物体外诱导该细胞发生凋亡时,微管变化的程度与 JNK1 的活性成正比,而  $\text{Ca}^{2+}$  是 JNK1 活性呈瞬时升高的上游信号之一。

临床上用于治疗卵巢癌、肺癌和乳腺癌的药物——紫杉酚(Taxol)能紧密结合微管,抑制微管解聚,使分裂期的细胞停止分裂;但这种分裂抑制作用不能完全解释紫杉酚引起的细胞凋亡;体外实验发现紫杉酚诱导人肺癌细胞株

A549 产生细胞因子、白细胞介素-1 和肿瘤坏死因子  $\alpha$ , 并增加 MAPK 等蛋白的酪氨酸磷酸化,从而改变细胞内信号传导事件,引起凋亡<sup>[1]</sup>。另一项有进展的实验是在卵巢癌 BR 细胞株转染 JNK/SAPK 信号途径中 Ras、ASK1、Rac、JNKK 和 JNK 等分子的显性失活突变体(dominant negative mutants),可以抵抗紫杉酚的促凋亡作用,但这种负调控作用只持续了 16 个小时,可能是信号传导发生抑制后的“转向”作用。

### 2. 细胞骨架与 PKC

早在 1992 年, Jaken 就描述了细胞骨架对 PKC 在细胞中的定位有重要作用,微管解聚药秋水仙素和长春新碱等引起 PKC 活化及其下游多种信号的激活;在多种细胞中,PKC 的激活导致与细胞增殖有关的细胞骨架的重组。证明细胞骨架与 PKC 之间存在着结构和功能上的相关性<sup>[3,14]</sup>;细胞骨架起着围栏和支架作用,使多种 PKC 同工酶及其底物在细胞浆内的定位具有区室效应;细胞骨架的三种成份均可成为 PKC 的停靠位点(docking site)<sup>[15]</sup>。PKC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\lambda$  等均可与细胞骨架结合,这种结合对 PKC 同工酶发挥正常功能似乎起重要作用。如用佛波酯(TPA)处理 NIH3T3 细胞后,PKC $\alpha$  从胞浆中进入核内的过程必需保持 MT 和 AF 的结构完整<sup>[16]</sup>。TPA 激活 MCF-7 细胞内的 PKC 可以抑制 p34cdc2 的 Tyr-15 残基去磷酸化作用从而在紫杉酚引起细胞凋亡的信号通路上发挥负调控作用<sup>[17]</sup>;但也有研究认为,细胞骨架重组与 PKC 的活化有因果关系,且在细胞凋亡中所起的作用是同向的<sup>[18]</sup>。事实上,细胞株类型不同、用药剂量差异及参与的 PKC 同工酶种类都会影响凋亡发生的最终结果。

### 3. 微丝与 ICE 相关蛋白

白细胞介素-1 $\beta$  转化酶(ICE)及其相关蛋白构成 ICE 家族,按其发现先后,分别被命名为半胱天冬酶 1-12(cysteinyI aspartate-specific proteinases, caspase1-12)。已确定 ICE 家族是哺乳动物细胞内最重要的凋亡效应分子之一,

caspases 在细胞素加工和细胞分化过程中的作用也已得到初步证实。

去除细胞因子时,微丝聚合多肽 jasplakinolide 对微丝的聚合作用使凋亡细胞增加 2 倍以上<sup>[33]</sup>, caspase 和 Bcl-XL 参与了这一过程。体内和体外实验进一步发现 AF 是 caspases 的底物<sup>[19,20]</sup>, 在 CPP32(caspase3)的作用下,微丝蛋白被剪切成长度为 15 和 31kDa 的片段,绿色荧光蛋白标记后发现这些片段的导入可引起并促进细胞凋亡的形态学变化。凝溶胶蛋白(gelsolin) - 一种肌动蛋白结合蛋白也是 CPP32 的底物,gelsolin 的片段化决定血管平滑肌细胞能否在干扰素  $\gamma$  和肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导下引起凋亡<sup>[21]</sup>。

然而英国的一位作者发现 AF 的剪切点仅位于氨基端的缬氨酸 43 和蛋氨酸 44 之间,这个位点与通常的 ICE 半胱氨酸激酶的酶切序列不同,所以 AF 可能不是 caspases 直接作用底物<sup>[22]</sup>;而且不同细胞株在不同的刺激因子存在时,AF 可能不被降解,甚至能够抵抗降解,尽管在体外 AF 可以很快被 ICE 类蛋白酶解聚<sup>[23,24]</sup>。

最近日本学者在研究 caspases 与 AF 的关系时提出<sup>[25]</sup>, caspases 的生理作用是否存在阈值?以往人们的研究重点都放在 caspases 的活性变化上,Caspases 活性在凋亡细胞中升高了 100 倍以上。近来他们在至少三种细胞中发现了一种也许还未曾研究过的 caspase,其在细胞伸展、贴壁过程中起维持微丝结构完整和发挥功能的作用。

#### 4. 细胞骨架与 Bcl-2 基因

细胞骨架敏感药物可影响 Bcl-2 基因在细胞内的状态。1995 年,Haldar<sup>[27]</sup>首次证实紫杉酚作用于淋巴样细胞引起 Bcl-2 磷酸化,结果是 Bcl-2 功能失活,细胞凋亡,这个磷酸化位点后来被证实是 BCL-2 蛋白的 87/70 丝氨酸<sup>[28]</sup>;在此基础上,Haldar 等研究了多种细胞骨架相关药物和多种肿瘤细胞株,结论是:当具有高有丝分裂指数的肿瘤细胞的微管结构失去稳定性

时,引起 Bcl-2 磷酸化,导致 Bcl-2 与 Bax 结合能力下降,除本身失去抗凋亡能力外也释放了后者的促凋亡活性,这被认为是该类药物引起细胞凋亡的主要机制<sup>[29,31]</sup>。该类实验的意义在于,筛选细胞骨架相关药物作为抗肿瘤药物时,靶细胞 Bcl-2 磷酸化可以作为一项有意义的指标。

MT 和 Bcl-2 以及凋亡之间的紧密联系是肯定的,但哪些蛋白激酶在 Bcl-2 磷酸化的过程发挥作用及其中间信号分子的确定还没有定论。Mikhail<sup>[29,32]</sup>等用免疫沉淀法反复证实了 Raf-1 与 Bcl-2 形成复合物以及作为丝氨酸激酶在 Bcl-2 磷酸化中的作用,但这种作用是间接的,即 MT 损伤 - Raf-1 活化 - Bcl-2 磷酸化的各步骤间都有可能存在其他作用分子,比如 Raf-1 活化就需要经过 RNA 和蛋白质的合成步骤。无论在表达内源性 Bcl-2 的 MCF-7 细胞株,还是经转染外源性 Bcl-2 的细胞株 MDAMB-231,PKA 激活剂和抑制剂的作用结果都说明 Bcl-2 的超磷酸化是通过 cAMP 依赖的蛋白激酶实现的<sup>[31]</sup>,但该实验没有进一步验证微管损伤与 PKA 激活时间上的先后,所以其因果关系尚未确定。

#### 5. 细胞骨架与 $Ca^{2+}$

细胞骨架调节细胞内钙离子浓度的作用已受到广泛关注。Faber 等(1990)认为细胞的坏死和凋亡主要由四种细胞毒性机制调节,其中之一是细胞骨架破坏机制,而细胞内固有游离  $Ca^{2+}$  浓度的持续增加是最后通路。许多研究用药物选择性地使 AF 或 MT 稳定或去稳定,从而产生可用膜片箝检测到的整个细胞或单个离子通道的变化;有研究发现某些情况下 MT 的崩解可增强  $Ca^{2+}$  通道的活性<sup>[23,24]</sup>。AF 不仅调节钙的释放而且它本身可能就是细胞内钙贮存库的一部分<sup>[7]</sup>。MT 也有相似的钙释放作用,这可能与观察到的 MT 去聚合能激活钙依赖的酶如肌浆球蛋白激酶从而导致肌动球蛋白收缩性增加有关<sup>[13,6]</sup>。

#### 6. 细胞骨架与 NF- $\kappa$ Bs

NF- $\kappa$ Bs 是一类结构和功能相关的二聚体复合物,激活免疫调节基因的转录,后者编码细胞表面受体如细胞因子、粘附分子等,因此 NF- $\kappa$ Bs 在细胞凋亡的受体信号传导中发挥重要作用。细胞骨架结构变化可直接活化 NF- $\kappa$ Bs,使后者与 DNA 的结合活性大大提高,从而影响核基因的表达<sup>[35]</sup>。现在认为这种作用主要是由 MT 状态决定并完成的<sup>[5]</sup>。但尚不清楚 MT 解聚与 NF- $\kappa$ Bs 活性升高是否通过 I- $\kappa$ B 还是另有通路,而且也没有确定最终有哪些基因被活化。

### 摘 要

细胞骨架是细胞内最高级的组织者和管理者,根据功能将各种细胞器相对集中在细胞内的某一区域,并通过多种信息通路相互联系,使细胞内部形成一个“城市”,各服务器进行有序的工作。此时,一些信号通过一定的作用模式,如诱导因素通过第二信使系统将信号传入细胞内,最终汇集到公共通道,改变细胞基因表达的类型、水平及其时序性,最后导致生理反应或程序性细胞死亡中特征性生物化学改变,但这种细胞内外的信号-受体-胞内传递-基因转录-应答反应的传递方式并不是一条龙式的单一联系,各条途径之间存在着多方式、多水平的横向联系和交互作用,形成信号传递网络。基于细胞骨架在细胞内的特殊地位和功能,可以相信,通过对细胞骨架及其与细胞内某些分子关系的研究,将有助于深入了解细胞内的信息传递规律,为揭示细胞内分子在体现细胞生物学特性方面的有机联系提供证据。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Keila T. et al. ,1998, *Cancer Res.* ,**58**:3620 - 3626.
- [ 2 ] Varedi M. et al. ,1997, *J Cell Physiol.* ,**172**(2):192 - 199.
- [ 3 ] Karen J T. et al. ,1998, *Oncogene* ,**17**:1223 - 1234.
- [ 4 ] Paul A J. 1998, *Physiol Rev.* ,**78**:763 - 781.
- [ 5 ] Caridad R. et al. ,1995, *J Cell Biology* ,**128**:1111 - 1119.
- [ 6 ] Kolodney M S. et al. ,1995, *Proc Natl Acad. Sci*

(USA). ,**92**:10252 - 10256.

- [ 7 ] Lange K. et al. ,1996, *FEBS Lett.* ,**395**:137 - 142.
- [ 8 ] Wang T Z. et al. ,1998, *J Bio Chem.* ,**273**(9):4928 - 4936.
- [ 9 ] Alan H. 1998, *Science.* ,**279**(23):509 - 514.
- [ 10 ] Spencer G. et al. ,1999, *J Bio Chem.* ,**274**(16):10916 - 10922.
- [ 11 ] Manon V E. et al. ,1997, *Experimental Cell Res.* ,**235**:421 - 430.
- [ 12 ] Shtil A A. et al. ,1999, *Oncogene* ,**18**:377 - 384.
- [ 13 ] Roasania G R. et al. ,1996, *Cell Motil Cytoskeleton.* ,**34**:230 - 245.
- [ 14 ] Gelman I H. et al. ,1998, *Cell Motil Cytoskeleton.* ,**41**:1 - 17.
- [ 15 ] Kiley S C. et al. ,1995, *J Cell Science.* ,**108**:1003 - 1016.
- [ 16 ] Dirk S. et al. ,1996, *J cell science.* ,**109**:2401 - 2406.
- [ 17 ] Shen S C. et al. ,1998, *Cell Growth Differ.* ,**9**(1):23 - 29.
- [ 18 ] Kong Y Y. et al. ,1998, *J Exp Med.* ,**188**(11):2099 - 2111.
- [ 19 ] Mashima T. et al. ,1999, *Oncogene* ,**18**(15):2423 - 2430.
- [ 20 ] Mashima T. et al, 1997, *Oncogene* ,**14**(9):1007 - 1012.
- [ 21 ] Geng Y J. et al. ,1998, *Eur J Cell Biol.* ,**77**(4):294 - 302.
- [ 22 ] Brown S B. et al. ,1997, *Biochem J.* ,**323**(Pt1):233 - 237.
- [ 23 ] Thion L C. et al. ,1996, *FEBS Lett.* ,**393**:13 - 18.
- [ 24 ] Galli A. et al. ,1994, *Biophys J.* ,**67**:2296 - 2304.
- [ 25 ] Watanabe Y. et al. ,1999, *J Cell Physiol.* ,**179**(1):45 - 51.
- [ 26 ] Zigmund S H. et al. ,1996, *Current Opinion in cell Biology.* ,**8**:66 - 73.
- [ 27 ] Haldar S. et al. ,1995, *Proc Natl Acad Sci ( USA)* ,**92**(10):4507 - 4511.
- [ 28 ] Basu A. et al. ,1998, *Int J Oncol.* ,**13**(4):659 - 664.
- [ 29 ] Mikhail V. et al. ,1996, *Cancer Res.* ,**56**:1851 - 1854.
- [ 30 ] Subrata H. et al. ,1997, *Cancer Res.* ,**57**:229 - 233.
- [ 31 ] Rakesh K. et al. ,1998, *Mol and Cell Bio.* ,**18**(6):3509 - 3517.
- [ 32 ] Blagosklonny M V. et al. ,1997, *Cancer Res.* ,**57**:130 - 135.
- [ 33 ] Posey S C. et al. ,1999, *J Biol Chem.* ,**274**(7):4259 - 4266.
- [ 34 ] Gregg G G. et al. ,1999, *Current Opinion in Cell Biology.* ,**11**:81 - 94.
- [ 35 ] Hunter T. et al. ,1992, *Cell* ,**70**:375 - 387.