

- [7] Inouye S, et al., 1994, *FEBS Lett*, **341**:277.
- [8] Chattoaj M, et al., 1996, *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**:8362.
- [9] Douglas CP, virginia KE, William WW, et al., 1992, *Gene*, **111**: 229-233.
- [10] Cormack BR, et al., 1996, *Gene*, **173**: 33-38.
- [11] Shen K and Meyer T. 1999, *Science*, **284**: 162-166.
- [12] Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS, et al., 1999, *Science*, **284**: 1811-1816.
- [13] Siegel MS and Isacoff EY., 1997, *Neuron*, **19**: 735-741.
- [14] Doi N and Yanagawa H., 1999, *FEBS Lett*, **453**:305-307.
- [15] Ellenberg J, et al., 1999, *Trends Cell Biol.*, **9**: 52-56.
- [16] Rigler R, et al., 1993, *Eur. Biophys*, **22**: 169-175.
- [17] Baird G S, et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 11241-11246.
- [18] 李侠、章翔, 2000, *癌症*, **19**, 7: 56-58.
- [19] 朱君明、唐镇生、江澄川等. 1999, *中风与神经疾病杂志*, **16**(2): 76-78.
- [20] Xin X, Yu YS, Tsung HC, et al., 1999, *Cell Res*, **9**(3): 201-208.
- [21] Nicola J and Hack. 1995, *Journal of Neuroscience Methods*, **177**-184.
- [22] Moore A, Marecos E, Simonova M, et al., 1998, *Microvas Res.*, **56**(3): 145-153.
- [23] Girotti M, et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 5740-5747.

## PAI 与细胞凋亡

彭黎明 颜存粮

(四川大学华西医院检验科 成都 610041)

细胞凋亡(apoptosis)是机体生长发育、细胞分化和病理状态下细胞自主性死亡的过程。其与胚胎形成、器官退化、肿瘤生长和浸润等有密切关系。研究发现,多种蛋白酶解反应及其调控对于细胞凋亡的命运至关重要,包括白细胞介素 1 $\beta$ 转化酶(ICE)家族蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、纤溶酶原激活物(plasminogen activator,PA)等。尽管 PA 与细胞凋亡的关系还不十分清楚,但纤溶酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor,PAI)作为纤溶酶原激活系统(PAs)的重要调节物,其中 PAI-1 与 PAI-2 是 PAs 主要的特异性抑制物,两者均为丝氨酸蛋白酶抑制物 serpin 家族成员。现将 PAI 与细胞凋亡关系简述如下。

### 一、PAI 参与细胞凋亡抑制

#### 1. PAI-1

在正常生理状态下,PAI-1 可有效抑制纤溶酶原激活物(PA)激活纤溶酶原(PG)成为纤溶酶(PL)的这一过程。同时,尿激酶型纤溶酶原激活物受体(u-PAR)与尿激酶型纤溶酶原激活物(u-PA)形成的复合物(u-PAR-u-PA)也可催化 PL 的形成。PAI-1 是多种肿瘤预后不良因子,在肿瘤细胞迁移过程中起着重要作用。其一方面可调节 u-PAR 依赖的细胞黏附作用而促进肿瘤细胞的浸润,另一方面通过阻碍玻璃连接蛋白(vitronectin,Vn)与其受体  $\alpha_v\beta_3$  结合而抑制整合素和玻璃连接蛋白介导的细胞迁移。Gutierrez 等发现,缺乏 PAI-1 基因的转基因鼠

T241 纤维肉瘤细胞浸润能力下降,生长延缓,凋亡指数增加<sup>[1]</sup>。Kwaan 等用喜树碱(CAM)和鬼臼乙叉甙(VP16)为诱导物,研究 PAI-1 在 PC-3 前列腺癌细胞和 HL-60 人类早幼粒白血病细胞凋亡中的作用发现,加入稳定变异型和野生型 PAI-1 可明显抑制这些细胞凋亡<sup>[2]</sup>。这些结果显示 PAI-1 可能通过抑制细胞凋亡而参与肿瘤生长过程的调节<sup>[1]</sup>。因此,抑制 PAI-1 的活性可能对肿瘤的治疗有很大帮助<sup>[2]</sup>。

PAI-1 抑制细胞凋亡不仅限于肿瘤细胞。PAI-1 还参与抑制人脐静脉内皮细胞株 HUVEC 和人乳腺上皮细胞株 MCF-10A 等非肿瘤细胞凋亡,这类细胞凋亡是生理方式而非药物诱导,提示 PAI-1 的这种功能可能属生理性<sup>[2]</sup>。最近研究还发现,PAI-1 可阻断脂多糖(LPS)激活小神经胶质细胞介导的海马神经细胞凋亡<sup>[3]</sup>;PAI-1 可通过抑制胰岛素样生长因子结合蛋白-5(IGFBP-5)的形成而抑制鼠乳腺腺细胞凋亡<sup>[4]</sup>;血管紧张素-1 受体拮抗剂(ATIRA)诱导老年硬化症缓解,并发现患者肾小管及间质细胞凋亡增加,这可能与 ATIRA 使 PAI-1 表达下降而减弱抑制凋亡的作用有关<sup>[5]</sup>。

由于细胞分泌的 PAI-1 易发生变构而失活,无活性的 PAI-1 没有凋亡抑制作用。PAI-1 特异性单克隆抗体可促使 PAI-1 发生变构并失去抑制纤溶酶原激活物的活性,同时这种抗体能阻断 PAI-1 的凋亡抑制作用。提示只有活性形式的 PAI-1 具有凋亡抑制作用。进一步研究发现,u-PA 与 PAI-1 形成的

复合物 u-PA/PAI-1 不能抑制凋亡。据此认为 PAI-1 的凋亡抑制功能在于 PAI-1 的反应环<sup>[2]</sup>。

PAI-1 抑制细胞凋亡的信号传导途径尚未完全阐明。研究发现 HL-60 和 PC-3 细胞可表达丰富的 u-PAR, u-PA 可与 u-PAR 上结构域-1 结合,却不能抑制凋亡。当使用 500ng/10<sup>6</sup> 细胞的 u-PA 量,凋亡细胞数还略有所增。同时,抗 u-PAR 结构域-1 和结构域-2 抗体也不能阻断 PAI-1 的凋亡抑制作用。因此,PAI-1 抑制细胞凋亡的信号传导与 u-PA 和 u-PAR 无关,而可能通过其他信号传导途径实现<sup>[2]</sup>。

## 2. PAI-2

PAI-2 既是一种 serpin,也是巨噬细胞对内毒素及炎症细胞因子应答的主要产物。PAI-2 可有效抑制 u-PA 及双链组织型纤溶酶原激活物 (tct-PA),对 u-PA 的作用明显强于组织型纤溶酶原激活物 (t-PA),但均弱于 PAI-1 的抑制活性。已经证明 PAI-2 在细胞凋亡中起抑制作用。研究发现,转染 PAI-2 cDNA 的稳定 HeLa 细胞可免遭肿瘤坏死因子 (TNF) 诱导凋亡,而转染反义 PAI-2 cDNA 的细胞仍对 TNF 敏感;不同 HeLa 细胞克隆表达的 PAI-2 水平与其对 TNF 的敏感性呈负相关, TNF 敏感性的减弱并非 TNF 受体减少所致;相反, PAI-2 对紫外线或电离辐射诱导的凋亡不具有抑制作用; PAI-2 的凋亡抑制作用与丝氨酸蛋白酶 u-PA 无关。有人推测细胞内 PAI-2 可能是 TNF 介导炎症过程中的一种重要细胞死亡调节因子,并通过抑制蛋白酶的活性而参与抑制 TNF 诱导的细胞凋亡<sup>[6,7]</sup>。

虽然 PAI-2 参与抵抗 TNF 诱导细胞凋亡的机制尚不清楚,研究表明, PAI-2 可选择性地抑制 Arg-特异的半胱氨酸蛋白酶而参与抑制 TNF 诱导的细胞凋亡。众所周知, ICE 是一种细胞凋亡相关的半胱氨酸蛋白酶。牛痘病毒编码的 serpin 细胞因子调节剂 A (CrmA) 为 ICE 的特异抑制物;而 PAI-2 和 CrmA 在结构上具有高度同一性。但是,由于 PAI-2 在活性亚单位 P<sub>1</sub> 位置为 Arg,而 CrmA 在 P<sub>1</sub> 残基位的氨基酸是 Asp,并且其 P<sub>1</sub>-Asp 为 ICE 的催化机制所必需,因此 PAI-2 不可能代表哺乳动物 CrmA 的同系物。同时发现表达与不表达 PAI-2 的细胞类似,均存在 ICE 样活性,提示 PAI-2 并不能抑制 ICE 样蛋白酶活性。推测细胞内 PAI-2 可能在特定系统中通过抑制一种未知的细胞凋亡蛋白酶,该酶对 PAI-2 作用敏感,从而在抑制 TNF 介导的凋亡及细胞溶解中起重要作用<sup>[7]</sup>。

为了阐明 PAI-2 凋亡抑制的分子机制, Dickin-

son 等研究发现 PAI-2 分子中重要的结构域 C-D 螺旋间区为 PAI-2 抑制 TNF 诱导细胞凋亡所必需。C-D 螺旋间区为 serpin 分子结构中一段含 33 个氨基酸的插入序列,当去掉 C-D 螺旋间区中 23 个氨基酸,构建一种 PAI-2 变异体时发现, HeLa 细胞不能抑制 TNF 诱导的细胞凋亡。同时发现只有细胞内 PAI-2 具有凋亡抑制作用<sup>[8]</sup>。

此外, PAI-2 还能抑制分枝杆菌诱导的巨噬细胞凋亡。吡喹美辛可通过抑制依赖分枝杆菌的 PAI-2 表达而缩短凋亡细胞的存活期,而用粒-单核细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 处理可增强分枝杆菌诱导 PAI-2 mRNA 表达而延长其存活期。而且,当吡喹美辛存在时,加入 PAI-2 足以抑制感染分枝杆菌的巨噬细胞凋亡的发生;当去除吡喹美辛时,外源性 PAI-2 可避免巨噬细胞感染分枝杆菌后在短期内凋亡。这提示分枝杆菌感染的正常巨噬细胞所产生的 PAI-2 可抑制细胞凋亡,巨噬细胞可通过这种机制防止感染扩散<sup>[9]</sup>。

PAI-2 基因与凋亡抑制基因 Bcl-2 同样位于染色体 18q21.3,二者仅相距 600kb。正常情况下, PAI-2 的表达量很低。然而,应用 TNF 和佛波豆蔻乙酯 (PMA) 等可显著地增强 PAI-2 基因的表达。PAI-2 基因是 TNF 最佳反应基因。研究表明, PAI-2 基因转录可通过正负两种调控机制进行<sup>[10,11]</sup>。

## 二、细胞内 PAI-2 的裂解产物与细胞凋亡的关系

### 1. PAI-2 的裂解产物可作为白血病细胞凋亡的标志

Jensen 等证明细胞内 PAI-2 的裂解产物可作为人类早幼粒细胞白血病细胞株 NB<sub>4</sub> 细胞凋亡的标志<sup>[12]</sup>。以 <sup>125</sup>I-u-PA 为探针,利用还原十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和放射自显影技术检测细胞匀浆物中的 PAI-2,检测到的是对 SDS 稳定的 Mr 为 80 000 的 u-PA-PAI-2 复合物。以磷酸酶抑制物 OA (okadaic acid) 和 calyculin A 及蛋白合成抑制物环己酰亚胺 (放线菌酮) 为诱导物,研究 NB<sub>4</sub> 细胞凋亡时 PAI-2 的蛋白裂解产物时,发现在细胞凋亡过程中,检测到的却是较小分子量 (Mr 70 000) 的 u-PA-PAI-2 复合物。由于 <sup>125</sup>I-u-PA 可以从复合物中完整地分离提取,提示这种分子量的变化发生于 PAI-2 部分。这说明 NB<sub>4</sub> 细胞凋亡时存在 PAI-2 的裂解。

### 2. PAI-2 裂解的可能机制

PAI-2 的裂解机制尚不清楚。有人认为,转谷氨酰胺酶的活性与细胞凋亡有关,可能参与催化底物 PAI-2 的裂解作用。但研究发现,对照组和实验组细胞株中该酶的活性均低,用 Northern 杂交法亦未检测到组织中该酶的 mRNA,而且将 NB<sub>4</sub> 细胞与该酶一起培养,PAI-2 的分子量并未减少。因此,认为凋亡过程中的 PAI-2 裂解并非转谷氨酰胺酶的催化作用所致<sup>[12]</sup>。Kaufmann 等发现,聚腺苷二磷酸核糖多聚酶(PARP)之类的蛋白裂解不需要蛋白质的合成,因此,凋亡过程中 PAI-2 的变化可能属蛋白质裂解特性。由于裂解后的 PAI-2 仍具纤溶抑制活性,同时,其与纤溶酶原激活物的结合位点位于分子的 C-端,故裂解多半发生在分子的 N-端,并使 PAI-2 的分子量减少 10 000。

虽已证明凋亡过程中存在 DNA 降解,但直到最近才发现一些大分子蛋白质和 rRNA 特异性裂解。并且已有多种实验证明存在凋亡相关蛋白裂解:①凋亡细胞或其提取物中结合蛋白的染料减少,可反映蛋白合成停止的同时蛋白裂解仍正常进行。②蛋白合成酶抑制物可阻碍细胞凋亡及其 DNA 降解。③ICE 是线虫 *C. elegans* 细胞凋亡基因 *ced-3* 的同系物,该基因的过度表达将导致哺乳动物细胞发生凋亡。然而,在白血病患者骨髓中检测到 PAI-2 的裂解,证实了凋亡相关蛋白酶的特异性裂解<sup>[12]</sup>。虽然体外研究证实细胞内 PAI-2 的裂解产物可作为人早幼粒白血病细胞凋亡的标志,并在白血病骨髓液中检测到 PAI-2 的裂解产物,但是 PAI-2 的特异裂解部位尚不清楚,同时,由于不同蛋白酶的作用,各种类型白血病的情况可能不同。因此,细胞内 PAI-2 的裂解机制和其裂解产物能否用于白血病分类及其治疗效果监测还需进一步证实<sup>[13,14]</sup>。

## 研究工作

# P15<sup>INK4B</sup>高表达对人黑色素瘤细胞 G1/S 进程的阻滞 及与 MAPK 信号相关性之初探\*

刘军 柳惠图\*\* 谭信\*\*\* 高萍

(北京师范大学生命科学学院细胞增殖与调控生物学教育部重点实验室 北京 100875)

愈益增多的研究表明,细胞周期引擎分子抑制因子 CKI(cdk inhibitor)在细胞周期运转的调控中发挥重要作用。P15<sup>INK4B</sup>是 CKI 中 INK4 家族成员之一,它通过抑制 CyclinD-Cdk 的活性,将细胞阻断在 G<sub>1</sub> 期<sup>(1)</sup>。已知有丝分裂原激活蛋白激酶(Mitogen-activated protein Kinase)在介导具有酪氨酸激酶

## 摘要

纤溶酶原激活物(PA)系统是体内重要的蛋白溶解复合物系统,主要参与降解细胞外基质。纤溶酶原激活物抑制剂(PAI),主要有 PAI-1、PAI-2,是纤溶酶原激活物 t-PA 和 u-PA 的有效抑制物。最近研究证明,PAI 与细胞凋亡存在较密切的关系:PAI-1 和 PAI-2 可抑制细胞凋亡的发生;细胞内 PAI-2 的裂解产物可作为细胞凋亡的标志等。

## 参考文献

- [1] Gutierrez, L. S. et al., 2000, *Cancer Res*, 60(20):5839-5847.
- [2] Kwaan, H. C. et al., 2000 *Br J Cancer*, 88(10):1702-1708.
- [3] Flavin, M. P. et al., 2000 *Glia*, 29(4):347-354.
- [4] Tonner, E. et al., 2000, *J Endocrinol*, 167(2):265-273.
- [5] Ma, L. J. et al., 2000, *Kidney Int*, 58(6):2425-2436.
- [6] Bajou, K. et al., 1998, *Nat Med*, 4:923-928.
- [7] Dickinson, J. L. et al., 1995, *J Biol Chem*, 270(46):27894-27904.
- [8] Dickinson, J. L. et al., 1998, *Cell Death Differ*, 5(2):163-171.
- [9] Gan, H. et al., 1995, *J Immunol*, 155(3):1304-1315.
- [10] Dear, A. E. et al., 1996, *Eur J Biochem*, 241(1):93-100.
- [11] Antalis, T. M. et al., 1996, *Blood*, 88(10):3686-3697.
- [12] Jensen, P. H. et al., 1994, *Br J Cancer*, 70(5):834-840.
- [13] Chen, R. H. et al., 1999, *J Biol Chem*, 274(33):23013-23019.
- [14] Shih, W. L. et al., 2000, *J Biol Chem*, 275(33):25858-25864.

本文 2001 年 6 月 22 日收到,2002 年 1 月 16 日接受。

\* 本研究为国家自然科学基金项目(39780041)、北京市自然科学基金项目(7961001)、国家重点基础研究项目(G19999053901)资助。

\*\* 通讯作者。

\*\*\* 现在首都医科大学细胞遗传教研室工作。

致谢:ERK 和 P-ERK 抗体为中科院动物所陈大元教授赠送,谨表谢意。