摘 要

调控细胞周期的关键是调节细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK)的活性。细胞周期蛋白可结合并激活CDK，CDK活性还可通过磷酸化作用调节。因此细胞周期负调控包括以下3点：① 细胞周期蛋白降解速度；② CDK磷酸化状态；③ CDK抑制蛋白(CKI)。酵母中CKI包括FAR 1，p40、PHO81，哺乳动物CKI有p21家族(包括p21、p27)及p16家族(包括p16、p15)。细胞周期负调控与抑癌基因密切相关，是不同抗肿瘤因子作用的共同途径。

参 考 文 献

[1] 吕吉宁、左嘉客，1994，细胞生物学杂志，16 (4)：145—150。

[2] 王瑞虹、薛绍白，1995，细胞生物学杂志，17 (2)：71—75。

[3] Morgan D O, 1995, *Nature*, 374：131—134.

[4] Doree M, Galas S, 1994, *FASEB J.*, 8：1114—1120.

[5] McGowan C H, Russell P, 1993, *EMBO J.*, 12：75—85.

[6] Peter M, Herskowitz I, 1994, *Science*, 265：1228—1231.

[7] Mendenhall M D, 1993, *Science*, 259：216—219.

[8] Schwob E, Bohrn T, Mendenhall M D, et al., 1994, *Cell*, 79：233—244.

[9] Schneider K R, Smith R L, et al., 1994, *Science*, 266：122—126.

[10] Xiong Y, Hannon G J, et al., 1993, *Nature*, 366：701—704.

[11] Harper J W, Adami G R, et al., 1993, *Cell*, 75：805—816.

[12] Dulic V, Kaufmann W K, et al., 1994, *Cell*, 76：1013—1023.

[13] Michieli P, Chedid M, et al., 1994, *Cancer Res.*, 54：3391—3395.

[14] Halevy O, Novitch B G, et al., 1995, *Science*, 267：1018—1021.

[15] Polyak K, Lee M, et al., 1994, *Cell*, 78：59—66.

[16] Hengst L, Dulic V, et al., 1994, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 91：5291—5295.

[17] Serrano M, Hannon G J, et al., 1993, *Nature*, 366：704—707.

[18] Hannon G J, Beach D, 1994, *Nature*, 371：257—260.

[19] Kamb A, Gruis N A, et al., 1994, *Science*, 264：436—440.

[20] Noborl T, Miura K, et al., 1994, *Nature*, 368：753—756.

[21] Ivinson A J., 1994, *Nature*, 371：180.

细胞凋亡的信号转导研究进展

傅 涛 徐永华

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

在多细胞生物体中，细胞数量的生物稳态是通过细胞增殖和细胞死亡之间的平衡来维持的。目前认为，细胞死亡可分为两大类，一类是由各种突发的，意外的事件所致的细胞死亡，即病理性细胞死亡，形态学上表现为细胞坏死。另一类为生理性细胞死亡，又称为编程性细胞死亡(programmed cell death)，形态学上表现为细胞凋亡(apoptosis)。细胞凋亡与细胞的生长、分化一样属于各具特征的细胞学事件或过程，它们决定着细胞和组织的基本特征和命运。这些过程都受到了来自细胞内和细胞外的诸多信号的调控。来自细胞内部的信号或信息有遗传特性、细胞谱系、发育阶段、细胞周期、代谢状态、DNA受损否等之别。特别值得一提的是，近年来，以线虫C. elegans为模型在细胞凋亡的基因调控的研究方面

取得了重大进展，发现了几个关键的基因，如Ced-3，Ced-4，Ced-9等[1]，进一步地在哺乳动物细胞中也发现了它们的某些同源基因，如bcl-2与Ced-9有同源性，ICE基因与Ced-3有同源性。并且证明，这些同源基因有着类似的功能。另一方面，人们也开始注意到了细胞和细胞之间的信息交流，即来自细胞外的信号对细胞凋亡的调控。这种信息交流的方式，可以是某些细胞通过释放一些可溶性或不溶性物质去影响另外的细胞，也可以是通过细胞与细胞表面的大分子物质的相互作用而传递信号。根据这些信号的作用，分为两类，一类为细胞凋亡的负调控信号，如各种生长因子或细胞因子、细胞外基质、CD40的配体、一些中性氨基酸、性激素等，具有抑制各自的靶细胞在特定条件下凋亡的作用。另一类为细胞凋亡的正调控信号，如肿瘤坏死因子，在相当低的浓度时，可引起其靶细胞的凋亡；转化生长因子β可诱导肝细胞的凋亡；糖皮质对淋巴细胞的作用；某些神经递质，如谷氨酸和多巴胺，对某些神经元的作用等。而关于这些细胞凋亡的正或负调控信号的转导机制的研究，目前正处在一个方兴未艾的阶段[2]。本文将着重对这一领域的研究进展作一个综述。

一、胞内钙离子信号系统与细胞凋亡

胞内钙离子信号系统较早被发现与细胞凋亡的调控有密切关系。80年代初，人们发现在糖皮质激素诱导动物胸腺细胞凋亡的过程中，涉及胞内钙离子的持续上升[3]。虽然钙离子促进细胞凋亡的详细机制尚有待于进一步解明，但人们已经掌握了某些线索。体内和体外的一些实验均证明，使双链DNA在核小体linker部位裂解，从而形成DNA分块(fragmentation)的核酸内切酶是钙离子、镁离子依赖性的。当胞内游离钙上升时，此酶活性升高，其抑制剂可阻断DNA分块和细胞凋亡。另一方面，胞内钙离子的上升也可能通过激活其它的一些依赖钙离子的酶而发挥作用。最近，有实验证据表明，某些钙离子结合蛋白，如钙调素，calbindin-D 28k等在细胞凋亡过程中起着某种调控作用。更有意义的是，线虫中促进编程性细胞死亡的一个基因Ced-4的产物，具有E-F手性结构，提示也可能是一种钙离子结合蛋白。

除了胞浆内游离钙上升(主要来自细胞外钙离子的内流)同细胞凋亡有密切联系以外，最近人们也注意到了不同细胞器内钙离子分布的改变，可能对细胞凋亡起着某种调控作用。bcl-2的作用机制，也可能同其产物可影响胞内钙离子再分布有关[4,5]。另外，使用内质网膜钙泵抑制剂thapsigargin长时间处理某些肿瘤细胞，使其内质网中贮存钙离子持续地排空，可诱导细胞凋亡。也有人认为胞内钙离子的上升，在某些细胞实验系统中，并不是启动细胞凋亡的早期的事件，而是细胞凋亡过程中比较晚期的伴随事件[6]。

二、cAMP/蛋白激酶A信号系统与细胞凋亡

cAMP是重要的第二信使之一，可通过激活腺苷酸环化酶或抑制cAMP磷酸二酯酶的活性而使其胞内浓度升高。cAMP浓度的上升，激活cAMP依赖性的蛋白激酶，即蛋白激酶A，使其靶蛋白上某些丝氨酸和苏氨酸磷酸化，从而影响这些蛋白的生物学功能。目前已发现，在某些细胞中，cAMP是引起细胞凋亡的信号。例如，用cAMP的类似物处理未成熟的胸腺细胞，会导致细胞凋亡[7]；另外，在体外培养的髓样白血病细胞上得到了相似的结果[8]。也有人认为在糖皮质激素诱导淋巴细胞凋亡过程中，首先激活钙离子/钙调素信号系统，然后以钙调素作为腺苷酸环化酶的激活物发挥作用，引起胞内cAMP的上升，蛋白激酶A的激活，进而导致细胞凋亡[2]。但是，也有

一些例外的情形，如在体外培养的交感神经细胞中，cAMP可以抑制由于去除神经生长因子所致细胞凋亡[9]。因此cAMP/蛋白激酶A信号系统对细胞凋亡的影响要根据细胞类型而定。这一现象可能与不同的细胞表达不同的蛋白激酶A亚型有关。欲作出明确的结论，有待于进一步的研究。

三、二酰甘油/蛋白激酶C信号系统与细胞凋亡

作为第二信使的二酰甘油的产生，主要来自磷酯酰肌醇和磷脂酰胆碱的水解。其反应可以由磷酯酶C催化，在某些情况下，也可以由磷酯酶D催化产生磷脂酸，并进一步在磷脂酸脱磷酸酶作用下生成二酰甘油。二酰甘油是蛋白激酶C的一个内源性激活物，而蛋白激酶C则被认为在细胞的许多重要生物学过程中起着重要的调控作用。蛋白激酶C也是一大类丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶。目前已有实验证据提示，蛋白激酶C对细胞凋亡也有一定的调控作用。佛波酯这一外源性的蛋白激酶C激活物被用作工具药，检验蛋白激酶C在细胞凋亡中的作用[10]。人们发现，佛波酯可抑制某些特定条件下的细胞凋亡，如糖皮质激素诱导的胸腺细胞的凋亡，撤去IL-2所致T淋巴细胞的凋亡以及无血清处理引起的成纤维细胞的凋亡等。而同时用蛋白激酶C的抑制剂，如polymixin、H-7和神经鞘氨醇，则可以抵消佛波酯的上述作用。蛋白激酶C调控细胞凋亡的机理尚不清楚，有人认为蛋白激酶C的激活可以导致质膜上Na^+/H^+交换，从而提高细胞内的pH值。已有实验表明，Na^+/H^+交换的上升，可促进细胞增殖，抑制细胞凋亡。另外，蛋白激酶C也有可能通过与其他信号系统如Ras蛋白所介导的信号系统，cAMP/蛋白激酶A信号系统之间的相互影响(cross-talk)而发挥作用。蛋白激酶C的亚型至少有10种，这些同功酶在不同的细胞中，甚至同一种细胞，在不同的生理状态下，其表达可能不同，活化的条件也可能不同。因此，尚有待于应用分子生物学的方法，作进一步的研究，以阐明蛋白激酶C调控细胞凋亡的机理。

四、酪氨酸蛋白激酶所介导的信号系统与细胞凋亡

许多生长因子或细胞因子的信号转导途径是通过直接或间接地激活酪氨酸蛋白激酶进行的，即其受体本身的酪氨酸蛋白激酶被激活，或者受体本身虽然没有酪氨酸蛋白激酶的活性，但这些受体可以同具有酪氨酸蛋白激酶的蛋白，如Src家族蛋白相结合而发挥作用。目前已知酪氨酸蛋白激酶所介导的信号系统对细胞凋亡起着重要的负调控作用。酪氨酸蛋白激酶使其靶蛋白上某些酪氨酸磷酸化，酪氨酸磷酸化部位可以同具有Src-同源区域-2(SH-2区域)结构的蛋白结合，从而把信号往下传递。在细胞信号转导过程中起比较重要作用的具有SH-2区域的蛋白质有Grb 2蛋白、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI-3-kinase)、Ras蛋白、GTP水解酶激活蛋白(Ras·GAP)和磷酯酶Cr等。

Grb 2蛋白有一个SH-2区域和两个SH-3区域，它通过其SH-2区域与某些蛋白(如表皮生长因子受体，血小板衍生生长因子受体)的酪氨酸磷酸化部位结合，通过其SH-3区域与Sos蛋白富含脯氨酸的区域结合，从而形成受体-Grb2-Sos蛋白复合体。Sos蛋白具有激活Ras蛋白的活性，即可以使Ras蛋白由GDP结合形式转变成GTP结合形式，活化的Ras蛋白可激活蛋白质磷酸化的级联反应系统，这一系统包括Raf-1，分裂原激活蛋白激酶激酶(MAPKK)和分裂原激活蛋白激酶(MAPK)。最近的研究表明这条信号转导途径的阻断可诱导某些细胞的凋亡。如在胸腺细胞的负选择过程中，高表达一个Grb2蛋白的同源蛋白，Grb 3-3蛋白，它具有两个完整的SH-3区域，而SH-2区域有缺失，失去了与酪氨酸磷酸化

部位结合的能力，但可以同Grb-2蛋白竞争同Sos蛋白的结合，从而抑制了从细胞膜上受体的激活到Ras蛋白激活的过程，导致细胞凋亡[11]。微注射Grb 3-3蛋白到Swiss 3 T 3成纤维细胞中，也能诱导细胞凋亡。另外，在造血干细胞上证明，IL-3/GM-CSF受体所介导的促进DNA合成和抑制细胞凋亡的信号转导途径是不同的，后者涉及到Ras/Raf-1/MAPKK/MAPK途径[12]。

另一方面，最近在培养的PC-12细胞上的研究证明，神经生长因子所致细胞的分化和抑制细胞的凋亡，均是通过神经生长因子同其酪氨酸激酶型受体(Trk蛋白)结合而发挥作用。其中Ras蛋白所介导的信号转导途径对细胞分化是必需的，但对于抑制细胞凋亡不起作用。而PI-3-kinese所介导的信号转导途径对于诸生长因子，如神经生长因子、表皮生长因子、血小板衍生的生长因子、胰岛素等抑制无血清处理所致细胞凋亡起着重要的作用[13]。

五、Fas蛋白/Fas配体系统和细胞凋亡及其信号转导

Fas蛋白/Fas配体系统是80年代末，90年代初，在有关免疫学研究中被发现的触发细胞凋亡的系统[14]。结构上，Fas蛋白是一个膜蛋白，并归属于肿瘤坏死因子受体/低亲和力神经生长因子受体超家族的成员。作为一个膜受体，Fas蛋白可以同某些T淋巴细胞表面的Fas配体蛋白结合，也可以同抗Fas抗体结合，从而启动细胞凋亡。Fas配体或抗Fas抗体激活Fas蛋白的机制尚不清楚，有人认为，这些刺激物的作用是使Fas蛋白聚集，由单体变成多聚体。分子生物学的研究表明，在Fas蛋白胞内部分近C-末端，含有一段对于诱导细胞凋亡必需的序列，这一序列同肿瘤坏死因子受体1及果蝇的reaper蛋白具有同源性，且功能相似。关于Fas蛋白所介导的细胞凋亡信号的转导机制，目前研究得比较热门，主要有以下一些研究进展：

1．Fas配体和抗Fas抗体能引起某些含有Fas蛋白的细胞或组织中神经鞘磷脂酶活性的快速上升，使神经鞘磷脂分解，产生酰基神经鞘氨醇，后者可作为第二信使激活相应的蛋白激酶，诱导细胞凋亡[14,15]。

2．抗Fas抗体和肿瘤坏死因子可通过激活ICE样的半胱氨酸蛋白酶而诱导细胞凋亡[16]。

3．Fas蛋白激活后，可诱导细胞中某些蛋白激酶的活性，这一观点也受到Fas蛋白可受到PTP-BAS酪氨酸脱磷酸酶的负调控现象的支持[17]。

4．也有实验证明，抗Fas抗体诱导B淋巴细胞凋亡是通过细胞内钙离子信号系统来传递死亡信息的[18]。

除了以上所述的信号系统与细胞凋亡的调控有关以外，有实验提示，一氧化氮，胞内H^+及磷酯酶A_2的产物等所涉及的信号转导系统均可参与细胞凋亡的调控。

另外，为什么同一个胞外的信号分子，在不同的细胞上对细胞凋亡的影响可以强弱不同，甚至起相反的作用。除了靶细胞上受体的表达不同及不同的受体亚型所介导的信号转导途径不同，这种可能性之外，还有一种可能，即细胞内存在着类似于细胞周期的“检查点”(checkpoints)机制，即细胞凋亡的“检查点”机制[19]。假设细胞的信号系统最终要通过对这些“检查点”的调控而发挥作用，可能不同细胞系统中，细胞凋亡的“检查点”及其阈值有差异，从而对细胞外同一信号分子的反应有差异。对于这一假设，有待于更坚实的实验证据的支持。

参考文献

[1] Ellis RE, et al., 1991, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7: 663—698.

[2] Lee S, et al., 1993, *Current Opinion in Cell Biology*, 5: 286—291.
[3] Cohen JJ and Duke RC., 1984, *J. Immunol.*, 132: 38—42.
[4] Lam M, et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91: 6569—6573.
[5] Baffy G, et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 6511—6519.
[6] Lennon SV, et al., 1992, *Clin. Exp. Immunol.*, 87: 465—471.
[7] McConkey DJ, et al., 1990, *J. Immunol.*, 145: 1227—1230.
[8] Larotte M, et al., 1991, *J. Cell Physiol.*, 146: 73—80.
[9] Edwards SN, et al., 1991, *J. Neuro Chem.*, 57: 2140—2143.
[10] Dive C, et al., 1992, *Seminars on Cancer Biology*, 3: 417—427.
[11] Fath I, et al., 1994, *Science*, 264: 971—974.
[12] Kinoshita T, et al., 1995, *EMBO J.*, 14: 266—275.
[13] Yao R and Cooper GM., 1995, *Science*, 267: 2003—2006.
[14] Nagata S and Golstein P., 1995, *Science*, 267: 1449—1456.
[15] Gill BM, et al., 1994, *Immunol. Rev.*, 142: 113—125.
[16] Enari M, et al., 1995, *Nature*, 375: 78—81.
[17] Cleveland JL and Ihle JN., 1995, *Cell*, 81: 479—482.
[18] Oshimi Y and Miyaziki S., 1995, *J. Immunol.*, 154: 599—609.
[19] Oltvai ZN and korsmeyer SJ., 1994, *Cell*, 79: 189—192.

$p16^{INK4}$ 失活与肿瘤的发生

吴 国 祥
（第二军医大学长海医院消化科 上海 200433）

李 伯 良
（中国科学院上海生物化学研究所 200031）

肿瘤的发生是多步骤、多基因事件的结果。癌基因(oncogene)的激活或高表达及肿瘤抑制基因(tumor suppressor gene)的缺失或失活是细胞癌变的分子基础。目前已发现的癌基因已100有余，肿瘤抑制基因也不少于10个[1]。最近克隆了一种新的肿瘤抑制基因 $p16^{INK4}$，其编码产物 p16 是 CDK4 的抑制因子，直接负向调控细胞增殖周期[2]。$p16^{INK4}$ 的缺失或失活与许多肿瘤的形成关系密切[3]。因而，对 $p16^{INK4}$ 结构、功能、失活机制等的研究对癌变机理的阐明和肿瘤的诊治大有裨益。

$p16^{INK4}$ 的结构及转译

人类染色体9号短臂是一“是非”之地，在黑色素瘤、急性白血病、肺癌、神经胶质细胞瘤等都发现有染色体 9 p 21 的缺失[3]，因而人们推测这一区域存在着肿瘤抑制基因。通过对大量癌细胞株谱查及物理图谱、染色体步行、序列分析，终于在染色体 9 p 21 克隆出两个相关基因并分别命名为多瘤抑制基因 (Multiple Tumor Suppressor) 1 (MTS_1)和 2(MTS_2)[1]。由于 MTS_1 和 MTS_2 正好是编码 CDK4 抑制因子 p 16 和 p 15 的基因，因而通常又把 MTS_1 和 MTS_2 分别称为 $p16^{INK4}$ 和 $p15^{INK4B}$。

$p16^{INK4}$ 由三个外显子和两个内含子组成。外显子 1 为 126 bp、外显子 2 为 307 bp，外显子 3 为 11 bp。最近在外显子 1 上游约 20 kb 处发现 268 bp 的外显子 1_β。在 $p16^{INK4}$ 近端存在一与其高度同源的 $p15^{INK4B}$，$p15^{INK4B}$ 由两个外显子组成[4]。

$p16^{INK4}$ 有两种不同的转录方式，分别由启动子(promoter)P_α 和 P_β 调控。P_α 启动的转录物由外显子 1、外显子 2 和外显子 3 组成，翻译的产物即为 CDK4 的抑制因子 p16。P_β 启