

倪祖梅

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

端粒酶是一种能将真核生物染色体末端 DNA——端粒 DNA 加以延伸的酶。是一种核酸蛋白质复合物。真核 DNA 是线性 DNA,复制时,由於模板 DNA 起始端为 RNA 引物先占据,新生链随之延伸;引物 RNA 脱落后,其空缺处的模板 DNA 无法再度复制成双链,因此,每复制一次末端 DNA 就缩短若干个端粒重复序列;即是真核细胞分裂中的“末端复制问题”。能补救末端 DNA 不随复制而递减以维持端粒长度平衡的最关键角色之一即是端粒酶。它含有互补于端粒 DNA 的 RNA 模板,又含有具逆转录活性的酶蛋白等结构。端粒酶在试管内能连接在单链端粒 DNA 上,在活细胞内它又能连接在端粒 DNA-蛋白质复合物上将端粒 DNA 延伸。端粒酶活性被发现最先在四膜虫等纤毛原生动物的核中,后在高等动物如人、鼠。凡是端粒酶活性强的细胞其端粒的长度能维持一定平衡;因无端粒缩短的限制而使细胞具有永生性。反之测不到端粒酶活性的细胞多数于端粒长度递减到一定程度即不能再进入分裂周期,停止繁殖并趋向病态随之死亡^[1]。端粒酶还能修补已断裂染色体的末端,维护基因组的遗传稳定性,与细胞的增殖转化都有密切的关系^[2]。近年来对这些方面的研究非常活跃,对它的深入认识无论在基础理论或是在开发应用均有重要的意义。

端粒酶的功能

最早被发现是对端粒的延伸作用(见图 1)。在纤毛原生动物四膜虫、游仆虫和 *Oxytricha* 中端粒酶活性都很高且无论在试管内或活体中对引物 DNA 的延长作用都是连续

性的。在酵母中端粒酶成分之一是 Est2 蛋白,在其缺失突变体 Est1 Δ 细胞中,其端粒随细胞分裂次数的增加而不断缩短,且大多数这种细胞在分裂多次后最终趋于死亡。若它们再与野生型杂交,则又可维持端粒的长度。爪蟾、小鼠、人的各种细胞内端粒酶的表达和活性的存在与否决定着端粒长度延长、平衡或缩短。端粒酶另一功能是修复断裂的染色体末端。当断裂染色体末端有富 G、T DNA 存在时,即使没有完整的端粒重复序列存在,它也能被端粒酶作为引物 DNA 并为之延伸端粒序列。曾发现在一例地中海贫血患者,染色体断裂发生在 α 珠蛋白基因上游 90kb 处,末端并无 d(TTAGGG)_n 即被端粒酶修复;断端的修复未影响减数分裂时姐妹染色体的完整分离。因修复断端免遭外切酶对染色体 DNA 的更多切割,端粒酶在某种意义上也维护了基因组的稳定性。

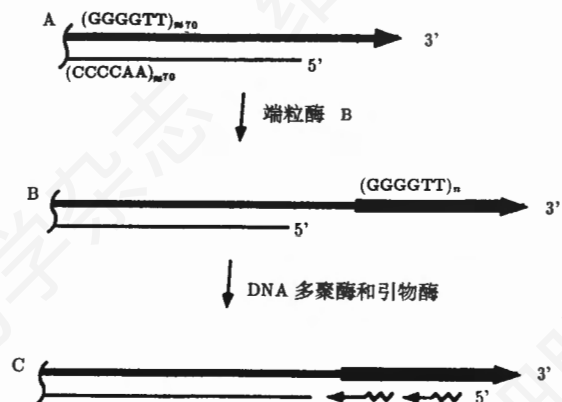


图 1 端粒酶延长端粒的功能

- (A) 四膜虫端粒在富 G 链上有突出于 3' 端的 12—16 个寡核苷酸单链。
- (B) 由 5' 到 3' 方向由端粒酶作用重新延长该 T₂G₄ 链。
- (C) 按沿用的滞后复制 C₁A₂ 逐个填满 T₂G₄ 互补空档,结果造成端粒的延长。

最近的工作还证明,在嗜热四膜虫的小核内,端粒酶有影响姐妹染色体分离的作用。改变端粒酶模板 RNA 后,四膜虫小核的姐妹染色体的端粒便相互融合不能分离^[3]。这样细胞周期遭到严重阻断,同时细胞胀大,逐渐死亡,整个细胞种群倍增速率减慢。

端粒酶 RNA 部分的结构

In vitro 试验中,当在含端粒酶基质中加入另一物种的端粒 DNA 引物时,在合适的条件下该引物得以延伸;延伸链的序列并不相同于引物链而是相同于该端粒酶母体的端粒 DNA 序列。例如曾将一种酵母的端粒 DNA 序列引入四膜虫中,其延伸的序列不是如酵母的 d(GGGT)_n 而是如同四膜虫的 d(TTGGGG)_n^[4];反之亦然。这提示延伸链的模板藏于端粒酶中。因此人们在研究端粒酶结构时,首先是对这个核酸蛋白质复合物的核酸部分,其一级、二级结构,有否包含模板有关序列,及其信号区和核酸与其结合蛋白质结构的关系。

最早分析的四膜虫 RNA 其链长有 160 个 nt,以后是游仆虫链长 192nt 及 Oxytricha 链长 190nt,比较这些物种的 RNA 链极少同源性,相互之间没有交叉杂交,但是它们都有各自端粒 DNA 的互补模板区,其长度为一个全长端粒重复序列,和其 5' 及 3' 各有二、三个残余核苷酸,例如在四膜虫是 r(CAACCCCAA) 游仆虫是 r(CAAAACCCCAAAA)。但是比较他们的二级结构却非常有趣,因为它们的折叠形式非常相似,有四处发卡结构形成四个小的和一个大的环形单链区。端粒 DNA 的模板 RNA 即位于此区内^[5]。有的酵母端粒酶 RNA 链长 1.3Knt,模板区 17nt;小鼠的长 500nt,模板区 8 个 nt;人的长 550nt,模板区 11nt。小鼠和人的端粒酶 RNA 只有 58% 同源性;而它们其他的细胞内诸小 RNA 都有很高的同源性,一般在 78%—100%。

对端粒 RNA,还研究了在模板区的核苷酸(nt)中究竟那几个是信号区?如四膜虫 9 个

nt 中究竟那 6 个 nt 是为延伸端粒重复序列 DNA 提供信息的?探测的方法有三种即端粒酶延伸端粒 DNA 的停顿形式,端粒酶 RNA 互补寡核苷酸法和端粒 RNA 基因的突变分析。端粒 DNA 延伸的停顿模式是指每延伸一个端粒重复序列 DNA,这序列的模板 RNA 就已被占满,需要模板 DNA 与互补的端粒 DNA 脱离并移位,空出的模板 RNA 再作下一个重复序列 DNA 合成之用,每一次移位延伸的过程后有一个停顿,停顿处的核苷酸是每次一样的,周而复始,这种过程即停顿形式与连续加工的交替。以四膜虫为例(见图 2)作为引物的端粒 DNA 3' 的 TT 与模板区 RNA 3' 的 AA 互补,随即进行第一个端粒 DNA 重复序列的延伸直到 TTGGGG 时停顿,二条链相对移位到下一个 TTGGGG。由此图可找出真正的端粒 DNA 信号区是 CAACCC。其次用各种 RNA 模板的反义寡核苷酸与端粒酶共同温育,它们会按各自的序列杂交于模板 RNA 的不同区位。当加入一系列完全与模板区 RNA 互补的寡核苷酸时,其杂交的结果完全中断了端粒 DNA 的延伸。当加入另一列寡核苷酸其序列可杂交在紧邻于信号 RNA 3' 区者,则它可作为引物,延伸的端粒 DNA 即从此处开始到完成一个端粒 DNA 重复序列。在突变实验中,先克隆出端粒酶 RNA 的基因,在其模板区制造点突变。在四膜虫 in vivo 的实验中,曾制造了 3 种突变基因即:44G(即第 44 个核苷酸 T 变 G),48T(即第 48 个核苷酸 C 变 T)49+C(即在第 49 个核苷酸后加入一个 C)。在 44G 和 49+T 两个突变体中延伸的端粒 DNA 序列是 GGGGTG 和 GGGGGTT,在 48T 突变时则端粒 DNA 停止延伸,此现象被解释为这一模板不能为细胞接受进行正常的端粒 DNA 延伸,细胞因此由病致死。在人中突变 C 的模板 RNA 是从 CUAACCCUA 改变为 CCAACCCCA,突变 A 则变为 CAAACCCAA,它们合成的端粒 DNA 分别是 TTGGGG 和 TTTGGG^[5],而不是 TTAGGG,

从以上所述也可以推出真正的信号 RNA 模板核苷酸在人是 TTAGGG, 在试管内也做了类似的实验, 得到模板序列是一致的。此外, 在人和小鼠中, 人的模板区有 11 个^[5], 小鼠只有 9 个 RNA 残基^[4], 而它们的端粒^[4], DNA 重复序列都是 d(TTAGGG)_n。在活体内人基因组每复制一次端粒 DNA 可被端粒酶连续延伸多个重复序列, 而小鼠每次只能加长一个

TTAGGG。被解释为人的 RNA 模板区长于小鼠的, 它们在 AAUCCC 两侧都有可互补于端粒 DNA 的锚位, 小鼠则只有在一侧有一个锚位, 这样在遇到停顿移位时人的则因有两个锚位两条原来互补的链不易互相脱开, 故能继续延伸下一个重复序列, 小鼠的则因只有一个锚位两条链易於脱开, 故不能再继续复制下一个重复序列。

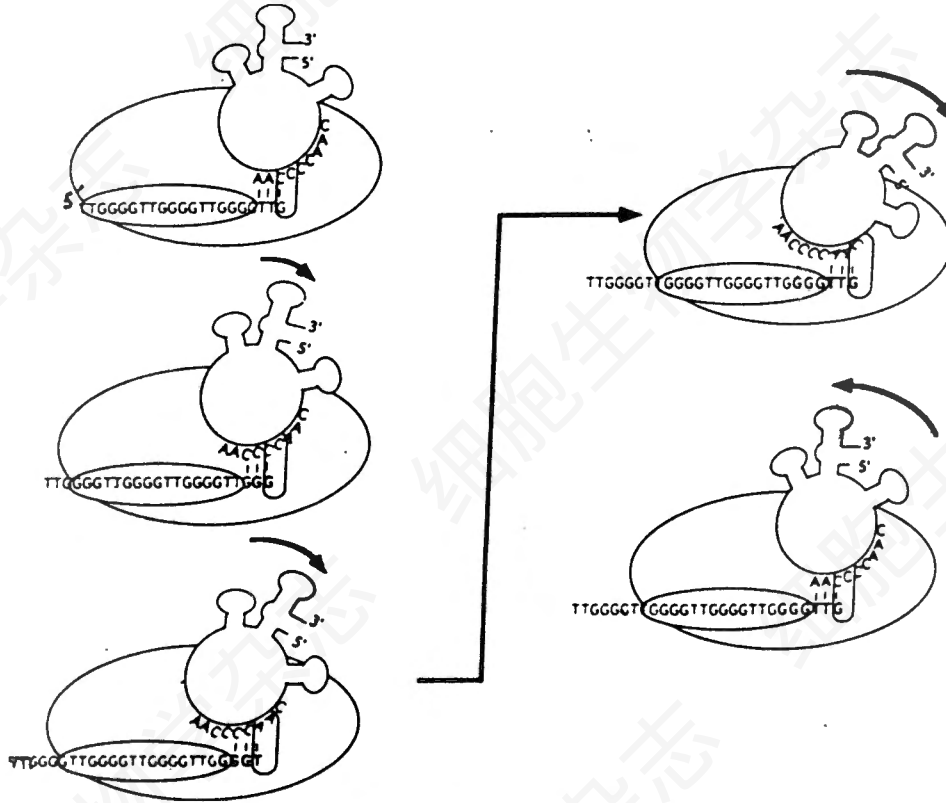


图 2 四膜虫端粒 DNA 重新复制模式图

端粒酶蛋白质的结构

在四膜虫中首先分离出两种蛋白质 p80 和 p95, 并且也已克隆了它们的基因, 但是并不明白它们行使功能的分子机制, 也不知道那一部分是该酶起聚合触媒作用的; 特别是这些蛋白质的氨基酸排列与任何聚合酶的没有任何同源性, 因此很难说它属于那一种聚合酶。最近, 在游扑虫里新发现了一个 p123^[6]用 SDS 电泳

测定的分子量和从其克隆的基因之编码蛋白质推算出来的分子量十分接近分别是 120 和 122.36KD。这蛋白质内有 6 个区段的多肽序列与酵母 Est2 蛋白质的 6 个区段同源, 也和逆转录酶内的 6 个功能性区段同源(见图 3)。而在酵母内 Est2 蛋白是端粒酶的一部分。因此推测与逆转录酶有 6 个区段同源的游扑虫 p123 与酵母 Est2 蛋白质是端粒酶起酶促作用的部分, 也推测端粒酶属于逆转录酶的一种。游扑虫的 p123 与四膜虫的 p80 和 p95 究竟是什么关系?

因不是同一物种,很难得到结论。端粒酶蛋白质究竟有几种,那些是酶促部分,那些是与端粒结合蛋白起联系作用,均还有待更多的工作。根据已有的资料最近有人拟出了一个端粒酶结构模式图(见图4)。

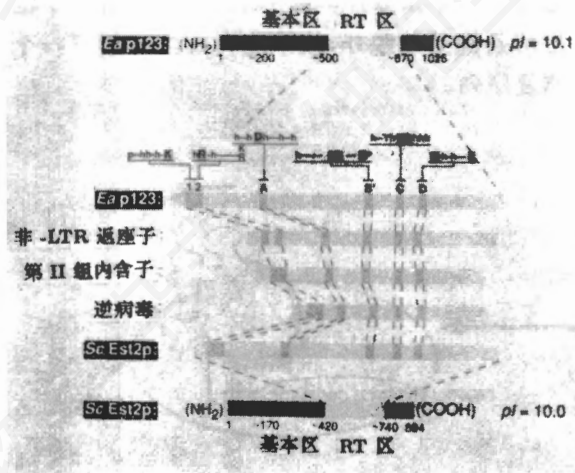


图3 p123和Est2p与逆转录酶及其他逆转录酶(RT)区的比较图

示 p123, Est2p 与逆转录酶蛋白质的同源区段(以深灰色长方块表示,同源方块用虚线相连),这些区段的序列是用以确断每一个逆转录酶家族的(引自 Lingner J et al, 1997, Science, 276:562)。

端粒酶活性的测定问题

探测细胞内端粒酶活性需要有灵敏准确的测定方法^[6]。在早年做此测定,需要大量组织或细胞为材料,相当费事的酶部分纯化,以及放射自显影所需的长久的时间;以上这些不仅限制了在一些物种和组织细胞内——如人的原代肿瘤活检——测定的开展,而且不够准确。1994年 Kim 等^[7]用去污剂溶解法代替原有的冻溶法,可从很少的细胞内获得更纯的端粒酶提取物,又利用 PCR 放大新复制的端粒延伸序列,名为端粒重复放大测定法 TRAP (Telomere Repeat Amplification Protocol assay)不但简便且较旧法灵敏万倍,对端粒酶研究促进很大。短时间内已在各种动植物的各种细胞(正常培养细胞及转化细胞),组织细胞,良性及恶性肿瘤

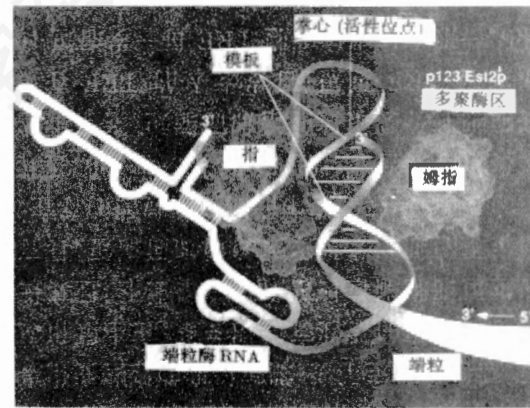


图4 端粒酶结构模式图

(引自 J. Lingner et al, 1997, Science, 276:566)

等进行了测定,一些原来无法测定或/及测定不出的细胞及组织都可被测出。例如,在人原先只能在生殖系睾丸及卵巢内测得,其他体细胞组织测不出。近来已在末梢血,淋巴细胞,骨髓细胞,表皮细胞,小肠隐窝细胞内测到低水平的端粒酶活性。但是端粒酶活性的测定仍存在问题,首先是有 RNA 依赖的引物延伸的污染如另外一些逆转录酶的存在,其次是在粗提取物中有端粒酶的非特异抑制因子,三是酶合成产物量对酶、引物及核苷酸浓度的非线性依赖。四是延伸作用的连续性决定于方法的变动,如加入各个底物内端粒重复序列的数目等。因此现有的测定方法对从有些物种获得的端粒酶纯度的可靠性和对酶活性的定量都不是完全可靠的,所以在测定方法上还要从增加此酶的纯度提高此酶的特异性等着手改进。

端粒酶活性测定的另一问题是 *in vitro* 和 *in vivo* 之间的关系, *in vitro* 引物是高浓度、单链核苷酸,而 *in vivo* 是天然染色体的末端;许多 *in vitro* 可以用作为引物的 DNA 序列在 *in vivo* 时并不能促进端粒的延伸。事实上在人的活细胞内端粒酶的 DNA 序列特异性是对结合于端粒蛋白质的 DNA 序列的特异性,它更甚于对单独端粒引物 DNA 的特异性。在体外纤毛虫 *Oxytricha* 的端粒酶也能延伸一个结合于端粒蛋白质的端粒引物 DNA。这些结果都启示活体内端粒酶识别的是既含 DNA 又含蛋白

质的染色体底物,故端粒酶与端粒重复序列结合蛋白质的相互作用仍是将来需要开发的研究课题。

端粒、端粒酶和细胞的复制 老化及其永生性的关系

这问题和端粒长度,长度的动态有极密切的关系。对于端粒 DNA 的长度的定量测定是沿用末端限制性片段(Terminal restriction Fragment, TRF)法。TRF 除了含有典型的端粒重复序列外,还含有亚端粒区 DNA,两者的长度不仅在同一细胞的不同染色体而且在不同细胞的同一染色体内均不相同。因此,当在 Southern blot 时,端粒重复序列探针的杂交带是一片弥漫,只从平均值计算出 TRF 长度。各种细胞 TRF 的长度变化也很多,在有的细胞内随细胞分裂次数的递增而缩短,有的由于细胞分裂导致缩短的长度却因有不断延伸而维持稳定。有的每缩短一次就得到相应长度重复序列的补充,有的每次补充性延伸的序列不止几个甚至连续多个,因此对端粒 DNA 的衡量指标除了长度,还有长度的动态变化,包括长度缩短、延伸和稳定不变。端粒长度的这些变化事实上与端粒酶的活性有密切关系。在小鼠和人类的生殖细胞端粒长度有 15Kb 上下,且其长度稳定不随细胞分裂次数的增加而缩短,具有永生的表型,从其细胞中能测得端粒酶的存在。在人类的体细胞中一般 TRF 为 5—11kb,且其长度随细胞分裂次数的增加而缩短。老年供体的体细胞 TRF 更短,百岁老人的 TRF 在 5—8kb。一般在体内体细胞 TRF 每一岁缩短 10—50bp,在体外细胞群体数每增加一倍则 TRF 缩短 30—200bp。在这些细胞内一般都测不到端粒酶活性。有人根据以上的事实提出了端粒假说^[8],认为细胞分裂中的“末端复制问题”是细胞复制老化的根源。细胞复制的老化是末端复制问题缺乏补偿机制的结果,而细胞的永生性化则是由于末端复制问题得到了端粒酶延伸末端 DNA 的补偿机制。假说认为在没有端粒酶

时,端粒的缩短是正常体细胞复制老化的有丝分裂钟;细胞分裂的次数是为逐渐失去的端粒序列数所注定的,当端粒缩短到一个临界长度时(Checkpoint),就有信号指令细胞退出细胞周期(M₁),这些细胞如用病毒 DNA 如 SV₄₀Ti 抗原转化,它们就能绕过 M₁期,此种细胞继续分裂,端粒长度也继续降低直到危机期(M₂);此时大多数的细胞就会死亡,可能是因为染色体丢失了完整性;但是其中有极少数细胞出现了端粒酶活性,得以维持稳定的端粒长度,虽然它们的端粒长度已相当的短,但它们却得以绕过危机获得了无限复制的潜能而幸存(见图 5)。所以端粒长度的稳定性是和永生表型高度相关的,而前者依赖端粒酶的存在。许多肿瘤衍化的组织和转化细胞都在不断细胞分裂中维持稳定而短的 TRF,而在永生的性腺组织细胞中端粒的长度却稳定且很长。但是以上的情况也有例外,如几个最近的报告指出有些肿瘤细胞的永生性细胞具有的 TRF 可以大到 >20kb;也有一些永生性细胞株内测不出端粒酶活性,但所有这些细胞株 TRF 都要大于 50kb 甚至

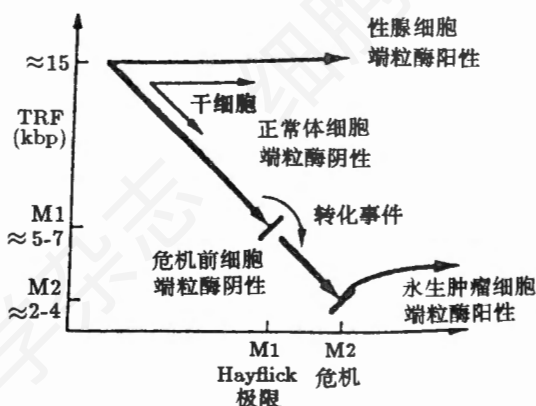


图 5 细胞老化及永生化的端粒假说

在性腺细胞系端粒酶是有活性的,维持长且稳定的端粒;但是在多数正常体细胞内因细胞分裂而丧失端粒长度。在 M₁(Hayflick 极限)一个或多个染色体端粒丢失到临界点时即有指令使细胞周期不可逆地遭抑制。在具体的干细胞内端粒酶活性和端粒长度是不可测知的,转化事件可能使体细胞绕过 M₁但它们并不能被激活端粒酶。当大多数细胞的端粒短至临界点,细胞种群即进入危机(M₂);而其中少数被激活了端粒酶的幸存细胞克隆绕过 M₂,稳定了染色体末端长度,并获得了无限生长的潜能。

到 150kb,故而可能另外还存在着产生超长端粒 DNA 的机制,以其超级长度来维持其不死的表现型。

此外,前述在四膜虫及其端粒酶 RNA 某种突变时导致老化表现型,和已发现在 HeLa 细胞中导入端粒酶模板的反义 DNA 后细胞于 20 次分裂后死亡等事实,也都说明端粒酶与细胞生长及死亡的关系。已知小鼠体细胞较人更高频率地测出端粒酶活性,以及小鼠培养细胞常能不经转化即出现永生细胞株,并出现端粒

酶的重新表达,也有助于解释小鼠活体对恶性性肿瘤的易感性。最近已有可能产生端粒酶基因 knock-out 小鼠以检测无端粒酶表达对复制潜能的影响和在活体模型动物中癌发病率的影响。

端粒酶与临床肿瘤及老年病

各种肿瘤细胞的端粒长度分散性很大。各类恶性肿瘤细胞中的端粒酶活性分布也不同(见表1)在神经母细胞瘤和胃癌,端粒酶活性高

表 1 人细胞及组织中的端粒酶活性

来 源	阳性数/测试数
正常组织	
性腺(卵巢/睾丸)	4/4
体组织	0/50
其它正常组织	
乳腺 0/8	0/20
腹水 0/8	
肝 0/4	
良性及恶性前期组织	
A组 (≥50%阳性)	
前列腺 Pin3	6/10 (60%)
胃癌	
乳腺纤维腺瘤	
肝炎	25/46 (54%)
肝硬化	
B组 (≥15%阳性)	
BPH	
小肠息肉	7/76 (9%)
非增生性星状细胞	
良性蛛网膜瘤	
C组 (阳性 0%)	
结肠多发息肉	
结肠腺瘤	
神经节神经瘤	0/134 (0%)
伸肌瘤	
各种乳腺疾患	
恶性组织	
A组 (≥90%阳性)	
神经母细胞瘤、结肠、皮肤、乳腺、子宫、卵巢	350/374 (93.6%)
B组 (80%—89%阳性)	
肺、前列腺、胃、肝	247/296 (83.4%)
C组 (<80%阳性)	
脑、肾、血癌	161/225 (71.6%)
相邻组织	
D组 (>30%阳性)	
邻近于头、颈肿瘤	8/22 (36%)
Wilm's 瘤附近	
E组 (<15%阳性)	
邻近于:前列腺癌	11/220 (5%)
乳腺癌	
肺癌	
胃癌	
F组 (阴性)	
邻近于:胃癌	0/68 (0%)
神经母细胞瘤	

的患者生存率低于活性低的或不能测知者。特别在一种神经母细胞瘤中细胞端粒酶活性的缺乏与端粒的缩短和自发的癌消退密切相关。既然在大部分恶性肿瘤细胞存在端粒酶活性,而不表达端粒酶或抑制了端粒酶活性的肿瘤或永生细胞会趋于死亡,故此用端粒酶抑制剂治疗恶性肿瘤则似乎是顺理成章的事^[9]。近来肿瘤药物家已经制造并试用这一类药物。这种疗法副作用应不会太大,至少要远小于一般化学治疗。用端粒酶抑制剂早期治疗能预防肿瘤的转移;在手术后用低剂量端粒酶抑制剂长期治疗也可预防转移癌的出现。高灵敏度酶活性测定方法可在手术治疗肿瘤前作组织穿刺测酶活性以为手术方案的参考。在诊断方面:除了用端粒酶活性诊断恶性肿瘤以外,还可作为临床预后的指微,也可用以从人群中筛选出早期肿瘤,也可追踪肿瘤患者有无转移癌发生的可能;也可推测手术切除以后癌复发的可能性。

基于端粒酶与复制老化,细胞增殖有密切的关联^[10],它在治疗一些与老年有关的病也是大有希望的,在活体内的老化细胞可能就是老年疾病中出现的细胞退化性变的原因。in vivo 或 ex vivo 激活端粒酶的表达以延长正常体细胞的端粒长度,或不断减慢端粒的缩短,以增加细胞的复制寿命,延缓老化细胞的产生以延缓老年病的发生,也不是没有可能的。

结 语

在被发现的 10 年多来,端粒酶的研究工作进展相当迅速。在端粒酶的 RNA 部分进行了从四膜虫、酵母到人和鼠的端粒酶基因克隆,突变,端粒 RNA 模板反义寡核苷酸等研究,但是还存在许多重要的问题有待解决。就酶的性质而言,由其以 RNA 为模板聚合 DNA 链的作用看来,它属于逆转录酶的一种;但由其某些生化性质看来,又更像是一种 RNA 聚合酶。近几年来较多学者的意见倾向于后者,这问题的解决基于酶的蛋白质部分结构和功能的深入了

解。

端粒酶活性的测定方法在灵敏性上已有很大进步,但在特异性上还有不少问题需要解决。试管内与活体中端粒酶活性测定中的一些关系问题也有待深入研究。

关于端粒酶是怎样调节端粒长度的?在活体内是依靠调节端粒酶加工的连续性,还是依靠端粒酶与端粒 DNA 结合蛋白质的亲和性等其他因素?调节端粒酶活性的又有哪些因素?人的体细胞组织一般不存在,而小鼠的有些体细胞和永生细胞却存在端粒酶活性,是由于一种特异的端粒酶抑制剂的作用还是由于转录作用的激活决定端粒酶的存在?人干细胞的增殖,永生细胞的生长是否都需要端粒酶?解决以上这些问题将有助于细胞增殖、老化和永生等基础理论问题的研究以及开发有力的抗端粒酶抑制剂以治疗恶性肿瘤,以及老年病等应用课题。可见端粒酶的研究还在方兴未艾之际,不久的将来还会有更重要的发现。

摘 要

端粒酶能延伸将染色体末端因线性复制而致短缺的端粒 DNA,因它有逆转录酶的作用,含有与端粒 DNA 富 GT 单链互补的 RNA 作为延伸的模板。高等动物如小鼠、人中,端粒酶活性存在于生殖细胞、永生培养细胞及恶性肿瘤等细胞,它们均具永生性;而很少在一般体细胞内测知,后者因端粒逐代缩短而最终死亡。它还能修复染色体断端,维持基因组的遗传稳定性,与细胞的生存、生长与寿命密切相关。其特性被利用以开发恶性肿瘤的诊治,及对老年病病因的探索。

参 考 文 献

- [1] Chiu, C. P., et al., 1997, *J. Exp. Biol. and Med.*, 214:99-106.
- [2] Geider, C. W., 1994, *Curr Opin Genet Dev.*, 4:203-211.
- [3] Hawley, R. S., 1997, *Science*, 275:1441

- 1443.
- [4] Blasco, M. A. et al., 1995, *Science*, **269**: 1267-1270.
- [5] Feng, J., et al., 1995, *Science*, **269**:1236-1241.
- [6] Linger, J., et al., 1995, *Science*, **276**:561-566.
- [7] Kim, N. W., et al., 1994, *Science*, **266**: 2011-2015.
- [8] Shay, J. W., et al., 1996, *Curr. Opin in Oncology*, **8**:66-71.
- [9] Quiet, C. A., et al., 1995, *J Clin Oncol.*, **12**:1144-1151.
- [10] Von Zglinick, T., et al., 1995, *Exp Cell Res.*, **220**:186-193.

CPP32 研究进展

姚 潇 叶棋浓* 袁仕取

(陕西师范大学生命科学院 西安 710062 *军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

凋亡 (Apoptosis), 或称编程性细胞死亡 (Programmed Cell Death, PCD), 在胚胎发育、免疫系统形成、内环境稳定等方面起重要作用。PCD 是一种由基因控制的自主性细胞死亡过程, 它的发生受激素、神经、免疫等因素的调控, 其分子机制极为复杂。在 PCD 分子生物学的研究中, 许多蛋白酶尤其是许多蛋白酶同源物的发现, 使蛋白酶在细胞凋亡中的重要作用越来越为人们所关注。目前发现的一类并成为研究热点的是 ICE (Interleukin-1 β Converting enzyme) 家族蛋白酶^[1]。该家族蛋白酶属于天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶 (aspartate specific cysteine protease, ASCP), 围绕活性中心位点半胱氨酸的氨基酸残基是保守的, 都为 QACRG 五肽, 分子内都含有分子量约为 20kD (P20) 和 10kD (P10) 两个亚单位。这两个亚单位是这些酶发挥生物学活性所必需的, 五肽序列在 P20 亚单位中。目前发现的 ICE 家族成员包括: ICE, Nedd2, CPP32, Mch2, Mch3, Mch4, Mch5, Mch6, CAP, TX, ICERE1-III 等, 它们与所有凋亡细胞的死亡有关^[2]。其中 CPP32 (cysteine protease P32) 在凋亡过程中起着非常关键的作用, 对其研究也越来越多。

一、CPP32 的发现及其特征

1994 年 Fernander-Alnemri 等^[3] 利用 RT-PCR 技术, 从人 T 淋巴细胞文库中筛选到

了 CPP32 基因 (又叫 Yama, apopain), 分为 CPP32 α 和 CPP32 β ; 同样, Tewari 等^[4] 从人脐静脉内皮细胞文库中筛选到了 CPP32 β 。CPP32 α 与 CPP32 β 的可读框均由 831 个核苷酸组成, 编码 277 个氨基酸, 分子量约为 32kD。它们在第 395 和 794 位的核苷酸不同, 第 395 位核苷酸的不同不改变所编码的氨基酸, 而第 794 位核苷酸的不同使编码氨基酸由天冬氨酸 (CPP32 α) 变成了谷氨酸 (CPP32 β), 但两者功能相同。人 CPP32 基因定位于染色体 4q33-q35.1 处^[5]。CPP32 在免疫细胞、脑和胚胎起源的细胞中高水平表达。Juan 等^[6] 克隆得到了鼠 CPP32 β 基因, 它在脾中高水平表达, 在脑、肺、肝、肾等中表达水平较低。鼠 CPP32 β 基因组 DNA 长约 20kb, 包括 7 个外显子和 6 个内含子, 定位于鼠 8 号染色体中间区域。

二、激活 CPP32 的蛋白酶

正常情况下, 胞质中 CPP32 以无活性的分子量约为 32kD 的 CPP32 酶原 (pro-CPP32) 存在, 只有当细胞进行凋亡时才变为有活性的 CPP32。激活是一个产生 P20/P10 杂二聚体的蛋白水解事件。

到目前为止, 发现激活 CPP32 的蛋白酶有

本文承蒙军事医学科学院生物工程研究所苏国富研究员审阅, 特表谢意。