

(Fas)可以与 TRADD 结合,TRADD 是一个分支点,它可以将信号传递给 Fas 抗原作用蛋白 FADD(一种与凋亡有关的蛋白),引起细胞凋亡;也可以通过 TRAF2 激活 NF κ B。TNFR1 和 Fas 与 TRADD 和 FADD 的相互作用是通过其胞浆内的一个叫做“死亡结构域”的基团来实现的。在 P75^{NTR}上对“死亡结构域”的发现使人们认识到 P75^{NTR}也有可能是以相似的方式来实现其作用的。现在,人们用酵母双杂交系统发现了可能的与 P75^{NTR}细胞内区域相关的信号传导蛋白(NRIF),这种新的锌指蛋白与 P75^{NTR}以配基依赖方式结合,而且,它特异性的选择 NGF。

P75^{NTR}与凋亡有关的机理还与一种近年来很受关注的脂质第二信使—神经酰胺有关。神经酰胺是细胞膜上的鞘磷脂在鞘磷脂酶的作用下产生的代谢产物,现已证明它是一种重要的细胞内第二信使,有其独特的信号转导通路。它主要引起两种下游事件:一是通过(?)→MEKK1→SEK1→SAPK/JNK→c-Jun 通路引发细胞凋亡;另一种可以通过 CAPK→Raf-1→MEK→MAPK→CPLA2→AA,引起炎症反应^[13]。Dobrowsky 等发现,NTFs 结合到 T9 胶质瘤细胞或 NIH3T3 细胞的 P75^{NTR}上可以激活鞘磷脂酶,引起神经酰胺增加,最终参与凋亡^[6]。P75^{NTR}还可以在经典的 Ras-MAPK 途径中起作用。在 MAPK 通路中,Grb2 是起重要作用的胞浆内结合蛋白。细胞处于静息态时,P75^{NTR}与 Grb2 的 SH2 区结合,形成磷酸化的

P75^{NTR}和 Grb·SOS 的复合物,定位于胞浆中。在有丝分裂剂的作用下,P75^{NTR}发生去磷酸化,与 Grb2 解离,从而提示 P75^{NTR}在涉及 Grb2 的信号传导通路中为一早期成分^[14]。

以上的研究使人们认识到,P75^{NTR}是独立于其神经营养因子受体 TrKs 的一种分子。将来的工作将致力于发现 P75^{NTR}的更多的内在信号作用,以及它在发育和成熟过程中适当的细胞学和生理学功能。

参 考 文 献

- [1] Bruce D C, Gary R L. 1997, *Neuron*, 18:187-190.
- [2] Chao M V. ,1994, *J. Neurobiol.* ,25:1373-1385.
- [3] Barker P A, Shooter E P, 1994, *Neuron*, 13: 203-215.
- [4] Verdi J M, Birren S J, et al. ,1994, *Neuron*, 12:733-745.
- [5] Dobrowsky R T, Jenkins G M, et al. ,1995, *J. Biol. Chem.* 270:22135-22142.
- [6] Von Bartheld C S, Kinoshita Y, et al. , 1994, *Neuron*. 12:639-654.
- [7] Frade J M, Rodriguez-Tebar A, et al. , 1996, *Nature*, 383:166-168.
- [8] Casaccia-Bonnel P, Carter B D, et al. , 1996, *Nature*, 383:716-719.
- [9] Carter B D, Kaltschmidt C, et al. ,1996, *Science*, 272:542-545.
- [10] Yaar M, Zhai S, et al. ,1997, *J. Clin. Invest.* ,100(9):2333-2340.
- [11] Van der Zee C E M, Ross G M, et al. , 1996, *Science*, 274:1729-1732.
- [12] Baker S J, Reddy E P. 1996, *Oncogene*, 12:1-9.
- [13] Sarah S, David F, et al. ,1996, *Current Opinion in Cell Biology*, 8:159-167.
- [14] Lim Y P, Low B C, et al. ,1997, *J. Biol. Chem.* ,272(47):29892-29898.

高温诱导细胞凋亡的机制

张锦宏

罗深秋

(广州医学院医学遗传学与细胞生物学教研室 广州 510182) (第一军医大学细胞生物学与医学遗传学教研室 广州 510515)

凋亡是细胞的死亡方式之一,主要表现是细胞膜向外突起,细胞体积缩小,染色质浓缩在核膜下,成半月形,DNA 被非随机地降解成小

片段。它是细胞对自身无法修复的损伤的一种有利保护,防止有损伤的细胞进一步增殖而发生癌变^[1]。造成凋亡的原因是多方面的,如辐

射、糖皮质激素、去除生长因子、离子载体等。早在70年代末期,已经发现高温能诱导凋亡。在近十年来,人们已经发现高温既能诱导肿瘤细胞凋亡,如鼠肥大细胞瘤,人急性T淋巴细胞白血病,纤维肉瘤细胞,Burkitt's淋巴瘤细胞^[2,3,4];也能诱导正常细胞凋亡,如中国仓鼠卵细胞,胸腺细胞,外周血淋巴细胞^[3,5]。但还没有找到高温所引起的凋亡的明确机理。研究者只是发现高温引起的凋亡与其他因素(如糖皮质激素,辐射^[3,6])所引起的凋亡,有着很大的不同。其不同点主要表现在三个方面:(1)地塞米松诱导的凋亡可被蛋白质合成抑制剂、mRNA转录抑制剂、蛋白激酶C抑制剂所抑制,但高温诱导的凋亡不被这些抑制剂所抑制,它只被ZnSO₄抑制^[3,7]。当用其它诱导凋亡的因子(如地塞米松、钙离子载体、高温)来进一步处理高温后的细胞时,其凋亡率要比未经高温处理过的细胞要低,这暗示高温诱导的凋亡本身是不依赖蛋白质合成,但它发挥保护作用则需要活跃的蛋白质合成;(2)通过对细胞周期分析发现,高温诱导G₀/G₁期凋亡^[8,9],DNA拓扑异构酶I抑制剂CAM(camptothecin)诱导S期细胞凋亡^[10], γ 射线导致G₂/M期细胞凋亡^[6];(3)蛋白酶抑制剂增加高温诱导的凋亡^[8],但对由地塞米松、TPCK(N-Losyl-L-phenylalaninyl-chloromethylekelone)诱导胸腺细胞的凋亡有抑制作用^[11,12],这可能是由于热诱导的变性蛋白和新生的未折叠的肽有细胞毒性,并导致细胞死亡。当分解变性蛋白质的蛋白酶被抑制时,热诱导的凋亡显著增加^[8]。而由地塞米松诱导的凋亡在用蛋白酶抑制剂处理时,这些蛋白酶抑制剂可能起到类似抗氧化剂的作用,阻止氧自由基对蛋白质的攻击^[13]。目前,一般认为高温诱导的凋亡是跟热休克蛋白(heat shock protein, HSP)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)和Ca²⁺这三方面有关。

一、HSP

HSP是高度保守的一组蛋白,根据分子量

的大小分为四个家族^[14]:HSP90家族(83~90KD)、HSP70家族(~66-78KD)、HSP60家族及小HSP家族(~15-30KD),此外还有分子量~100-110KD而性质不同于上述家族的大分子HSP。一般认为HSP位于胞浆、高尔基体、内质网、核或核仁中,起着伴侣功能,如结合、聚集和分解蛋白。HSP转录激活的增强子被P53调节^[5]。

有资料表明,HSP有抗凋亡作用。Miglioragti等^[7]在胸腺细胞中分别加入地塞米松、钙离子载体和PKC的激活剂TPA,后再用高温处理,发现凋亡完全受到抑制,但加入放线菌酮抑制HSP合成后,则发现这种保护作用消失,这说明高温后产生的HSP70对有毒环境起保护作用。在Ehrlich腹水癌细胞(EAC)中,也发现HSP积累对由饥饿或抗癌剂处理所诱导的凋亡起保护作用^[15]。同时,在EAC细胞中发现高温后除诱导HSP合成,并无其他蛋白合成^[16],且用免疫印迹法没有检测到bcl-2。在不同肿瘤细胞系中檫皮桐诱导的凋亡同HSP70表达下调有关,这从另一方面说明HSP有抑制凋亡作用^[17]。本人在对鼠整体高温39℃处理30分钟,隔1小时后再用37℃处理2小时,结果发现胸腺细胞凋亡率要比未经预39℃处理(只37℃处理2小时)要低(待发表)。目前认为,HSP起到保护作用主要有以下几方面的原因:(1)HSP的主要功能是防止蛋白质聚集,在不同刺激下最早期的细胞损害是骨架蛋白聚集。因此在受激细胞中随着HSP提高,聚集被抑制,从而对那些诱导凋亡的因素起到保护作用^[16];(2)其他细胞骨架组成,如微管和中间丝,被过量HSP维持可能起到抵制凋亡作用。在鼠胸腺瘤细胞和鼠造血细胞中用损害微管的药物可诱导凋亡,而在鼠脑肿瘤细胞中发现HSP70积累对长春新碱诱导的凋亡有抵制作用;(3)HSP可能保护染色质,防止参与凋亡的蛋白酶和核酶攻击,不同的刺激可能诱导细胞内染色质蛋白的解离,而HSP70易位到核时可能起到稳定染色质结构^[15]。经过研究发现,

HSP 本身具有的结构特点是起保护作用的基础^[18]。HSP70 的氨基端形成 ATP 结合区,而羧基端肽结合区是保护细胞的最重要区域,羧基末端的 100 个氨基酸,是 HSP70 家族的多肽序列中同源性最少的区域,因此可能结合未折叠或部分折叠的多肽。这种相互作用能延迟有害的高温变性或主要细胞蛋白质聚集,从而保护细胞免于高温损伤。ATP 结合区使 ATP 结合和水解,虽然缺少 ATP 结合区对于 HSP70 保护细胞是非必需的,但是这个区对于翻译耐受(指热休克反应时热耐受细胞中正常蛋白的翻译不被抑制或抑制程度较轻,也即非 HSPs mRNA 的翻译机器受到保护而发生翻译耐受)和加速 RNA 与蛋白质合成的恢复、对于重新折叠和重新装配被热损害的蛋白质是必要的^[19]。

另有资料表明,HSP 有诱导凋亡作用。近年来研究发现,HSP 不仅表达在细胞里面(胞浆、核等),而且还表达在细胞表面,如淋巴细胞上的 HSP60、HSP70,肿瘤细胞上的 HSP90 和 HSP70,位于受感染的成纤维细胞和感染 HIV 细胞的 HSP70^[5,20,21]。研究表明,表达在细胞表面的 HSP/抗体免疫复合物可被 T 淋巴细胞、单核细胞/巨噬细胞识别,从而诱导凋亡。AIDS 病人的外周血单核细胞的表面 HSP60、HSP70 表达量高,其凋亡率也高^[21]。Ishiyama 等^[20]发现来自 MCD 疾病(multicentric Castleman's disease)的 T 细胞有表面 HSP70 的高表达,凋亡率也高,在热休克后表面 HSP70 表达量、凋亡率都增加;而正常人的 T 细胞不表达 HSP70,凋亡率很低,在热休克后既不显示表面 HSP70 表达,也不增加凋亡率。在热处理的肉瘤细胞中,HSP70 是致免疫的决定因素,它被非 MHC 限制的细胞(如自然杀伤细胞)所识别^[21]。以上证据表明,病毒或细菌感染的细胞凋亡可能构成保护机制,旨在杀死感染的细胞和阻止感染因子的传播;而且,HSP 可能调节病毒和肿瘤细胞抗原的抗原提呈,与 MHC 分子作用直接参与抗原加工。HSP 在抗原提呈上

发挥作用主要有以下几方面证据^[20]:(1)HSP 是能通过细胞膜的伴侣分子,因此能与免疫系统相互作用;(2)HSP70 基因图谱位于 MHC 之中,这暗示它在免疫监督中的作用;(3)已经报道在不同自身免疫条件下有抗 HSP70 的自身抗体的提呈;(4)抗体与 P53 反应依赖于 P53 和 HSP70 的复合体。没有 MHC 限制的 γ/δ T 淋巴细胞也能识别表达在人淋巴瘤细胞表面的 HSP60,这可能是由于表达在细胞表面的 HSP 结合非肽细胞代谢物,从而刺激非 MHC 限制的淋巴细胞免疫反应^[22]。

二、ROS

ROS 是指氧的活性中间体,来源于线粒体氧化磷酸化、微粒体细胞色素 P450 系统和质膜 NAD(P)H 氧化酶。它很容易与大分子反应,从而直接损害大分子或者通过链式反应使自由基从一个分子传递到另外一个,导致对细胞结构的广泛破坏。高温能提高 ROS 的水平^[23]。在肿瘤组织中,高温抗肿瘤效果的一个重要因素是产生 ROS,诱导肿瘤细胞膜和细胞器膜的脂质过氧化。Yoshikawa 等^[24]发现在高温 6 小时后肿瘤组织中脂质过氧化的标记物硫巴比土酸(TBARS)显著增加,而 α -维生素 E 则显著减少,同时产生的 TBARS 可被超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、二甲亚砷歧化酶所抑制。在 44℃—45℃,脑和其他组织加快脂质过氧化作用,同时抗氧化功能减弱,组织中不饱和脂肪酸减少。这些都说明 ROS 介导的脂质过氧化在高温抗肿瘤效果起着重要的作用。在 HIV 感染的 T 细胞中,显示低水平的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶和还原型谷胱甘肽过氧化酶,这种 T 细胞对高温十分敏感,这是由于低水平的抗氧能力导致自由基快速产生,反过来使 T 细胞对凋亡敏感^[23]。

研究发现,那些抗氧化剂,如 GSH、NADH 对抑制凋亡有着很重要的作用。在正常细胞中谷胱甘肽大量以还原型(GSH)存在,只有少量

是氧化型(GSSG)。Beaver等^[25]发现[GSH]_i降低或[GSSG]_i增加成为凋亡的触发点,[GSH]_i下降至少比DNA断裂早1-2小时。用GSH处理能抑制地塞米松诱导的凋亡,用GSSG处理则能诱导胸腺细胞凋亡。而且,在胸腺细胞凋亡过程中GSH含量减少,过氧化物含量明显增加^[13]。花生四烯酸的氧化产物5-羟甘碳四烯酸,可能通过去除胞内GSH来改变胞质中钙平衡,从而诱导凋亡。在哺乳动物细胞中bcl-2基因产物介导线粒体的调节和/或胞内ROS水平。bcl-2位于内质网、核膜和线粒体内膜,它的表达可阻止由于热击诱导的凋亡^[23]。目前,解释bcl-2产物抑制凋亡有以下三个观点^[26]:(1)bcl-2产物能够与线粒体SOD反应而阻止细胞凋亡;(2)bcl-2的表达并不能增加细胞SOD活性,它可能是通过阻断电子传递链中的ROS产生,或者起了活性清除剂的作用而调节氧化还原状态,从而调节细胞凋亡;(3)bcl-2的表达不影响ROS的产生,而是通过阻断膜的脂质过氧化物而阻止了细胞凋亡的发生。

在高温43℃处理U937细胞后,发现NAD下降,原因就在于ROS介导的DNA损害激发聚ADP核糖转移酶的活性和p53的积累^[23,27],ADP核糖对蛋白质的聚合作用导致细胞NAD/NADH的快速去除,ATP贮藏的崩溃。

三、Ca²⁺

高温处理细胞,如HA-1细胞^[28]、昆明小鼠吞噬细胞^[29],立即引起Ca²⁺升高。在HA-1细胞中[Ca²⁺]_i提高是由于磷脂酶C分解磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP₂)后作用于内质网使Ca²⁺顺着浓度梯度流入胞质中,而细胞外的Ca²⁺则在45℃高温处理后过30分钟才进入胞质中。胞外Ca²⁺流入可能与磷脂酸增多有关。它能增加生物膜上Ca²⁺通透性,用磷脂酸(PA)处理HA-1细胞导致Ca²⁺通透性增加^[28]。磷脂酸既有由PIP₂分解的产物二酰基

甘油转化而来,又有由热诱导合成^[30]。当然,Ca²⁺增加还有其他机制,如由于肌浆网Ca²⁺-ATP酶在热击下变性,酶的失活使Ca²⁺不能及时被清除,也导致[Ca²⁺]_i升高^[31]。

研究发现^[28],通过用钙离子载体A23187处理可使细胞对高温敏感,而用Ca²⁺拮抗剂,则能稳定细胞内钙库。用螯合剂EGTA长期去除细胞Ca²⁺能保护中国仓鼠卵细胞和鼠肝细胞瘤免于热损伤^[32]。但是Ca²⁺增加并不是在所有细胞类型都能观察到对热敏感。

细胞内Ca²⁺增加产生了一系列效应:(1)Ca²⁺增加导致了微管的不稳定,从而导致细胞骨架不稳定,使膜出现起泡现象^[33];(2)Ca²⁺活化了磷脂酶A₂、磷脂酶C。磷脂酶A₂使不饱和脂肪酸分解,如花生四烯酸,从而使膜的流动性降低和通透性增大,导致膜功能损伤,同时产生ROS;磷脂酶C分解PIP₂,而PIP₂参与细胞表面微丝固定,且产生的分解产物肌醇三磷酸和二酰基甘油又影响Ca²⁺;(3)Ca²⁺活化了依赖Ca²⁺/Mg²⁺的核酸内切酶,从而使核小体断裂^[33,34];而抑制高温诱导凋亡的ZnSO₄可能就是通过抑制Ca²⁺/Mg²⁺核酸内切酶来起作用^[4,8]。(4)原癌基因,如c-fos,c-jun和c-myc,具有Ca²⁺依赖性,参与热休克反应^[8]。它们激活蛋白激酶,如蛋白激酶C和钙调蛋白激酶。在Burkit淋巴瘤细胞系中高温处理后使c-fos表达增加10倍^[4]。(5)许多HSP,如HSP70、90、110都是结合钙调蛋白的蛋白,因此可以看到Ca²⁺也可能通过HSP起作用^[32]。

综上所述,高温所诱导的凋亡机制错综复杂,它诱导的凋亡不同于其他因素诱导的凋亡。大量研究表明,HSP、ROS和Ca²⁺这三者都参与了高温诱导的凋亡,且这三者之间互相影响,互相促进。

摘 要

高温诱导的凋亡是近几年研究的热点课题,它在临床上和抗癌药物、辐射一起使用能增加杀死肿瘤细胞的效率,但是其诱导凋亡的机

制目前还不是十分清楚。本文通过讨论热休克蛋白、活性氧和 Ca^{2+} 这三者在高温诱导凋亡所起的作用, 试图介绍近年来探讨机制方面的进展。

参 考 文 献

- [1] Payne C. M., 1995, *Ultrastru. Pathol.*, 19: 221-248.
- [2] Cummings M., 1995, *Int. J. Radiation Biol.*, 68(6): 687-692.
- [3] Sellins K. S. et al., 1991, *Radiation Res.*, 126: 88-95.
- [4] Sakaguchi Y. et al., 1995, *Cancer Res.*, 55: 5459-5464.
- [5] Muthoff G. et al., 1995, *Int. J. Cancer*, 61: 272-279.
- [6] Gorczyca et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 3186-3192.
- [7] Migliorati G. et al., 1992, *Cell Immunol.*, 143: 348-356.
- [8] Zhu W. G. et al., 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 225: 924-931.
- [9] Yonezawa M. et al., 1996, *Int. J. Cancer*, 66: 347-351.
- [10] Gong J. et al., 1994, *Anal. Biochem.*, 218: 314-319.
- [11] Zhivotovsky B. et al., 1995, *Exp. Cell Res.*, 221: 404-412.
- [12] Fearnhead H. O. et al., 1995, *Toxicol-Lett.*, 82-83: 135-41.
- [13] 李忌, 郑荣梁, 1997, 细胞生物学杂志, 19(3): 116-119.
- [14] 郭兴中等, 1995, 生理科学进展, 26(3): 263-266.
- [15] Gabai V. L. et al., 1995, *FEBS Lett.*, 375: 21-26.
- [16] Kabakov A. E. et al., 1995, *Exp. Cell Res.*, 17: 15-21.
- [17] Wei Y. Q., 1994, *Cancer Res.*, 54: 4952-4957.
- [18] Li L. et al., 1995, *Exp. Cell Res.*, 217: 406-468.
- [19] Stege G. J. J. et al., 1994, *Exp. Cell Res.*, 214: 279-284.
- [20] Ishiyama T. et al., 1996, *Clin. Exp. Immunol.*, 106: 351-356.
- [21] Poccia F. et al., 1996, *Immunology*, 88: 6-12.
- [22] Kaur I. et al., 1993, *J. Immunol.*, 150: 2046-2055.
- [23] Buttke T. M. et al., 1994, *Immunol. Today*, 15(1): 7-10.
- [24] Yoshikawa T. et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 2326-2329.
- [25] Beaver J. P. et al., 1995, *EJCB*, 68: 47-54.
- [26] 陆怡等, 1996, 生物化学与生物物理进展, 23(2): 118-121.
- [27] Nosseri C. et al., 1994, *Exp. Cell Res.*, 212: 367-373.
- [28] Calderwood S. K. et al., 1988, *Radiation Res.*, 113: 414-425.
- [29] Luo S. Q. et al., 1996, Six Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy, Hong Kong.
- [30] Calderwood S. K. et al., 1987, *J. Cell Physiol.*, 130: 369-376.
- [31] Paleca D. et al., 1988, *Biochem. Biophys. Acta*, 937(1): 23-30.
- [32] Lamarche S. et al., 1985, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 131: 863-876.
- [33] Trump B. F. et al., 1995, *FASEB*, 9: 219-228.
- [34] Sun X. M. et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269(21): 14857-14860.

多种受体参与调控吞噬细胞对凋亡细胞的识别和清除

李美丽 陈泮藻 颜光涛

(解放军总医院基础所生化室 北京 100853)

一、细胞凋亡与清除 凋亡细胞的意义

细胞凋亡是生物界普遍的生命现象, 在形态学方面以胞浆浓缩、核染色质凝聚、细胞膜发

泡、内陷和凋亡小体形成等为特征; 在生化方面以被激活的核酸内切酶在核小体之间降解染色质 DNA, 呈现 DNA-LADDER 的电泳区带图谱为特征^[1,2]。凋亡作为一种组织细胞的生理性清除机制, 在胚胎发生、形态形成、正常细胞的