

- Scil.*, 22:388-393.
- [4] Kidd VJ 1998, *Annu. Rev. Physiol.*, 60:533-573.
- [5] Thornberry NA et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272:17907-17911.
- [6] Kamens J. et al., 1995, *J. Biol. Chem.*, 270:15250-15256.
- [7] Fernandes-Alnemri T et al., 1994, *J. Biol. Chem.* 269:30761-30764.
- [8] Fernandes-Alnemri T et al., 1995, *Cancer Res.*, 55:6045-6052.
- [9] Krajewska M et al., 1995, *Cancer Res.*, 57:1605-1613.
- [10] Wang L et al., 1994, *Genes & Dev.*, 8:1613-1625.
- [11] Sprecher CA et al., 1995, *J. Biom. Chem.*, 270:29854-29861.
- [12] Schwatz SM et al., 1998, *Circulation*, 97:227-229.
- [13] Griffin DE et al., 1997, *Annu. Rev. Microbiol.*, 51:565-592.
- [14] Deveraux QL et al., 1997, *Nature*, 388:300-304.
- [15] Thome M et al., 1997, *Nature*, 386:517-521, 388:190-191.
- [16] Margolin N et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272:7223-7228.
- [17] Yang X et al., 1997, *Cell*, 89:1067-1070.
- [18] Zhou L et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:5131-5136.
- [19] Evans EK et al., 1997, *EMBO J.*, 16:7372-7381.
- [20] Wu D et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272:21449-21454.
- [21] Vaux DL et al., 1997, *Cell*, 90:389-390.
- [22] Zou H et al., 1997, *Cell*, 90:405-413.

STATs 与细胞凋亡

王艾琳* 李 坚* 章静波

(中国医学科学院基础医学研究所 北京 100005)

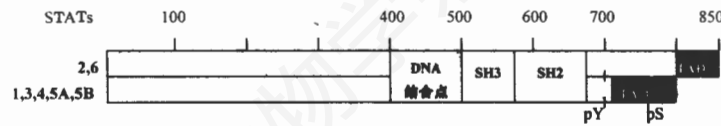
细胞因子(cytokines)是由细胞分泌的一类小分子蛋白质,它们能与其他多种信号分子一起通过触发细胞内各种信号传导途径来调控诸多的细胞生命活动。其中包括生长、分裂、分化、病理过程(尤其是癌变),甚至死亡等。迄今已证明这些途径大多数较复杂,存在多步连续的,甚至是级联式的(cascade)生化反应系统。细胞通过该系统,使细胞外的刺激和细胞内的应答、激活以及细胞凋亡等效应相偶联,从而完成必要的生命活动,但迄今所知的细胞因子仅触发数个中间步骤的某些反应,并通过受体将信号经胞质而转导至核内,使相应基因转录而发挥其生物学效应。这一途径是由受体——酪氨酸激酶(PTK)——信号转导子与转录活化子(signal transducers and activators of transcription, STAT)——靶基因的激活来实现的^[1]。本文简要介绍 STATs 与细胞凋亡(apoptosis)的关系。

一、STATs 家族及其基本特性

象许多膜分子一样,STATs 是通过酪氨酸残基的磷酸化而受到调控的,它们有一个特殊区域即癌基因 Src 同源物 2(SH)₂ 区域,它可与含有磷酸化酪氨酸的其他蛋白质相互作用。此外,它们也如核转录因子一样,有 DNA 结合和转录活化区域。目前在哺乳动物发现的 STAT 包括 STAT₁(α/β P₉₁/P₈₄ 缺 38C 末端残基,含 Ser⁷²⁷)^[2], STAT₂, STAT₃, STAT₄, STAT_{5A}, STAT_{5B}, STAT₆(图 1)。

在小鼠,STAT₁ 和 STAT₄ 基因位于 1 号染色体,(而在人则位于 2 号染色体,即 2q¹²至 2q³³),STAT₃ 和 STAT_{5A}, STAT_{5B}, 基因位于小鼠 11 号染色体(人 12 号染色体即 12q¹³至

*吉林医学院 吉林 132001。



q¹⁴⁻¹), STAT₂ 和 STAT₆ 基因位于小鼠 10 号染色体 (人 17 号染色体, 即 17q¹¹⁻¹ 至 q²²). STAT_{1,3,5A,5B} 的氨基酸长 750—795, STAT_{2,6} 氨基酸长 ~850, 功能区包括^[3]: ① N 端保守区 (con), 它对 STAT 的功能起重要的调节作用, ② DNA 结合区, 位于 400—500 氨基酸之间, 它是决定 STAT 与 DNA 结合的特定定位点的区域, ③ 病毒癌基因 Src 同源区 3 (SH₃), 它位于 500—600 氨基酸之间, ④ 具高度保守性的 Src 同源区 2 (SH₂) 则位于 600—700 氨基酸之间, 可驱使 STAT 与活化受体结合, 诱导蛋白质构象变化, 改变催化活性, 与 JAKS (Janus Protein Kinases) 相互作用而被磷酸化, 促使 STAT 形成二聚体显示出与 DNA 结合的能力^[4], ⑤ 酪氨酸磷酸化位点, 位于 701 位氨基酸, 酪氨酸磷酸化时, STAT 呈活化状态, ⑥ C 端为转录活性功能区。上述 6 方面的功能, 无疑提示 STATs 在细胞生命中的重要作用。

二、STATs 在细胞凋亡中的作用

目前已证明在肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 和干扰素 IFN 诱导的细胞凋亡的多步信号传递中需要有 STATs 的参与。此时的细胞凋亡由蛋白水解酶 (主要是 Ice 家族或 Caspases) 的级联反应所启动, 直至细胞死亡。Kumar 等^[5] 最近证明, 在 STAT₁ 缺乏的细胞中 TNF-α 诱导的细胞凋亡是不典型的。TNF-α 与高度密切联系的受体相结合可在多种细胞中诱导新基因的表达和最终导致细胞凋亡^[6]。为证明 JAKS 或 STATs 在 TNF-α 诱导的凋亡中起作用, 人们用 TNF-α 和放线菌素 D (Actinomycin D, 一种成纤维细胞凋亡的转录抑制剂) 处理^[7] 缺乏

JAK、STATs 或其他 IFN 信号途径成分的突变人成纤维细胞^[8], 作用 18h 后发现缺乏 STAT₁ 的突变细胞 U3A 及 U3X 表现出 NF-κB 依赖的抗凋亡作用^[9], 而亲代细胞 (无缺失蛋白) 2fTGH 和其他突变细胞则发生典型的细胞凋亡 (表 1), 表现有细胞膜起泡 (blebbing) 细胞收缩以及染色质成块并包绕有质膜即凋亡小体 (apoptotic bodies) 的形成, 电泳时有基因组 DNA 梯状带出现等。

表 1 缺乏特异 IFN 信号成分的细胞系经人 TNF-α 和放线菌素 D 处理 18h 后, 以台盼蓝染色检测细胞活力

细胞系	缺失蛋白	存活的细胞 %
2fTGH	无	8
U1A	TYK ₂	9
U2A	P ₄₈	15
U3A	STAT ₁	82
U3X	STAT ₁	84
U4A	JAK ₁	8
U5A	TFNAR ₂	2
U6A	STAT ₂	1
2C4	无	2
G2A	JAK ₂	5

有意义的是, 当在 U3A-R 细胞中经表达载体导入 STAT_{1α} 全长时^[10], 用蛋白免疫斑点分析, 可证明 U3A-R 与亲代细胞 2fTGH 所表达的 STAT_{1α} 相似, 而且对 TNF-α 和放线菌素 D 的反应也相似, 表明 U3A-R 可以使 U3A 细胞抗凋亡性发生逆转, 而且此种凋亡是 STAT_{1α} 依赖性的 (表 2)。

在 2fTGH, U3A, U3A-IRF-1, U3A-R 细胞中, 用特殊探针进行逆转录聚合酶反应 (RT-PCR), 人们检测了 Ice 家族 caspases 和 Fas 基

表2 细胞死亡的诱导依赖于
STAT₁α(实验方法同表1)

细胞系	缺乏蛋白	活细胞%
U3A-IRF-1	STAT ₁	80
U3A-R	无	6
U3A-701	STAT ₁ -WT*	18
U3A-727	STAT ₁ -WT*	68
U3A-SH ₂	STAT ₁ -WT*	15
U3A-P ₈₄	STAT ₁ α	21

* WT 野生型 STAT₁.

因的表达,发现 Ice mRNA 在 U3A 中降低, CPP³² 和 Ich-1 mRNAs 也减少,但 Ice/re/2 Mch₂ 和 Mch₃ mRNA 与 2fTGH 中相似。若将 STAT₁α 重导入 U3A 细胞中则可回复 Ice mRNA 的表达。Fas mRNA 在 2fTGH 和 U3A 细胞中相同,而甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)mRNA 在所有检测细胞中相似。

转录因子-干扰素调节因子(IRF-1)能介导由 DNA 受损而引起的小鼠淋巴细胞凋亡,以及诱导 Ice 基因的表达^[11],从而提示它是最有特征的 STAT₁ 活性基因。在 U3A 细胞中,IRF-1 的表达是缺陷的^[10],因此用 IRF-1 的表达与 2fTGH 细胞中 IRF-1 表达相一致的 U3A-IRF-1 进行研究,人们发现 U3A-IRF-1 与 U3A 细胞在 TNF-α 和放线素 D 处理后有相同的抗凋亡活性。而且在 U3A-IRF-1 细胞中 Ice mRNA 不能回复,此结果提示在凋亡过程中可能还存在有其他调节程序。

在 2fTGH, U3A 和 U3A-R 细胞中,人们对 Ice 家族蛋白进行了分析,发现 Ice、CPP³²、Ich-1 在 U3A 细胞中的量只是 2fTGH 细胞中的 1/10-1/15。在 U3A-R 细胞中此三种蛋白与 2fTGH 相似,很显然,STAT₁α 能介导 Ice 家族成员的表达。

目前关键问题是应当阐明在高效 Ice 家族基因组成的表达中,STAT₁ 的同源二聚体是否为必须的转录因子,或者只需 STAT₁ 单体便能完成这一功能。此外,是否 STAT₁ 单独或是

需要与其他未知蛋白质一起才能共同完成这一功能。是否 STAT₁ 二聚体的形成需 Tyr⁷⁰¹ 磷酸化,并导致单体间交互磷酸酪氨酸-SH₂ 区域的相互作用等问题也未完全阐明^[12-14]。现已知某些生长因子可以激活 STAT₁ 足可以启动 Ice 家族有效表达。在对 Tyr⁷⁰¹ 或 SH₂ 区域突变细胞的研究中,Kumar 等^[5]发现 U3A-701 和 U3A-SH₂ 细胞象 2fTGH 一样,对 TNF-α 和放线菌素 D 诱导的凋亡很敏感,也就是说缺乏 SH₂ 功能区或缺乏酪氨酸-701 的 STAT₁ 突变体几乎与回复凋亡途径的野生型蛋白质有同样的作用。Ich-1 和 CPP³² 蛋白仅在 U3A-701 细胞中与 2fTGH 相一致。可见,U3A-701 细胞和 2fTGH 细胞相似,U3A-SH₂ 和 2fTGH 的 Ich-1 表达相似,但 CPP³² 的表达在 U3A-SH₂ 要比 2fTGH 低很多,其表达量只是后者的 1/3-1/4。因此提示至少有一个基因在 STAT₁ 介导表达中需 SH₂ 区域。另有报道证明,SH₂ 在 SH₂ 本身磷酸化后,象 STATs 的二聚体一样,在识别含细胞因子受体的磷酸化酪氨酸时所必需^[4]。而此类细胞中对 Ice 家族蛋白酶的组成型表达不需 STAT₁ 的二聚体。关于这些观察显然还需要更多的证据。

降低 STAT 凋亡活性的唯一突变是在 C 末端区域丝氨酸-727 处的点突变。STAT₁ 中 Ser⁷²⁷ 在由 IFN-α 激活的 STAT₁ 途径中是必需的。Ser⁷²⁷-Ala⁷²⁷(S727A) 突变体蛋白是在酪氨酸上磷酸化形成二聚体,并与 IFN-γ 活化位点(GAS) 结合,但 IFN-γ 依赖的转录下降 80%^[15],U3A-727 细胞对 TNF-α 和放线菌素 D 诱导的凋亡有抵抗性。尽管 Ich-1 和 CPP³² 在 U3A-727 和 U3A-SH₂ 中的表达相似,但它们的表型不同,表明一个或多个未测得的基因在 U3A-727 中低表达。所以,Ser⁷²⁷ 残基在 STAT₁ 依赖的某些基因的组成表达中起作用。STAT₁α 能恢复在无 STAT₁ 细胞中 IFN-γ 依赖性信号传递,但截短的 STAT₁β[P₈₄]不能恢复,可见,P₈₄和 S⁷²⁷有不同的凋亡情况。STAT₁β 中缺乏 Ser⁷²⁷,所以 STAT₁β 的磷酸化形成二聚

体进入细胞核与 DNA 结合可能是通过促分裂源活化蛋白(MAP)激酶途径完成的^[15]。Ich-1 和 CPP32 的组成型表达不需 STAT₁ 同源二聚体的形成, STAT₁ 可通过与其他蛋白相互作用形成复杂的转化因子。

三、STAT₁ 在细胞凋亡中的作用机制

STAT₁ 在细胞核中的作用可能作为单体而不需要与 DNA 相结合。在此模型中, STAT₁ 是作为辅激活物——即非 DNA 结合转录调节物而起作用的^[16], 通过与 DNA 结合伙伴(DNA-bound partner)的蛋白与蛋白的相互作用, STAT 蛋白被召集到启动子, 支持这一结论的依据是人们已在未刺激的细胞核中检测到非磷酸化的 STAT₁^[17,18]。

IRF-1 是可与 STAT₁ 结合的很好的候选蛋白, 此外 STAT₁ 也可与 P₄₈ (另一 IRF 家族成员) 相互作用, 而且此作用并不需要 STAT₁ 的二聚体^[19], 因此 Ice 的表达由 IRF-1 调节^[15], 表明 Ice 启动子含的 IRF-1 识别位点。

在某些 IFN- γ 诱导的凋亡中, Ice 表达由 IFN- γ 激活^[20], 这种 Ice 基因的转录诱导与酪氨酸磷酸化及 STAT₁ 的 DNA 位点激活相关。在 STAT₁ 重组型和诱导表达中发送下游信号的机制不尽相同, Ice 的 IFN- γ 诱导可能是间接的, 并且通过 IRF-1 表达的增加而介导, 或者是 Ice 启动子区域可能含有 STAT₁ 二聚体结合位点。

可以解释 STAT₁ 在凋亡中的重组作用的其他机制包括: STAT₁ 可能是在细胞浆中以需要 Caspases 的基因表达完全不同的途径来起作用的; 在召集(recruit)磷脂酰肌醇 3-激酶到 IFN- α 受体的过程中, STAT₃ 是作为单体而起衔接子作用的^[21]。但无论是何种机制, STAT₁ 皆作为单体在调节基因表达中起重要作用。

关于 STAT₁ 的什么区域在凋亡中起作用以及 MAP 激酶怎样调节这些活性, 其他基因是怎样由 STATs 重组调节的等问题有待进一步

研究。可以预言, 彻底阐明 STATs 与细胞凋亡的关系及其作用机制, 无疑为揭开诸多细胞生物学现象, 以至某些疾病的发生或生理过程(如衰老、癌症等)开辟了新的途径。

四、Caspases 与细胞凋亡

死亡是生命组成的一部分, 任可一个健康的机体在其生命过程中, 某些细胞是注定要死去的, 这便是细胞凋亡。近年来人们发现一种蛋白质裂解酶(protein-splitting enzymes) Caspases 在细胞凋亡中起作用^[22]。不幸的是在肿瘤细胞中存在有另一种物质可以抵抗 Caspases, 这就是存活蛋白(Survivin)。从存活蛋白的结构看, 它与细胞凋亡抑制因子(Inhibitors of apoptosis, IAPs)的结构十分相似, 而且 IAPs 也可以阻断 Caspases 的作用, 从而阻止细胞发生凋亡。事实上有人已将一种称之为 p35 的 Caspases 抑制剂导入视网膜色素层有缺陷的果蝇体内, 便可阻止视网膜色素层细胞的死亡, 从而避免致盲。这样说来不论在正常细胞或肿瘤细胞中 Caspases 在细胞凋亡中都起着举足轻重的作用。其作用是启动细胞凋亡的级联反应。而迄今对于 Caspases、STAT 以及 Survivin 的关系的研究刚刚兴起, 因此它将成为今后研究的热点之一。

参 考 文 献

- [1] Darnell, J. E., 1997, *Science*, **277**:1630.
- [2] Schinodler, C., X.-Y. Fu, Lmprota, T., 1992, *Acad. Sci U. S. A.*, **89**:7836.
- [3] 邱莲女、马志章, 1998, 《国外医学》分子生物学分册, **1**:20.
- [4] 杨开勇、赵新燕、李昌本等, 1997, 细胞生物学杂志, **3**:19.
- [5] Kumar, A. and Commene, M., 1997, *Science*, **278**:1630.
- [6] Hsu, H. and Huang, J., 1996, *Immunity*, **4**:387.
- [7] Martin, S. J. et al., 1990, *J. Immunol.*, **145**:1859.
- [8] Darnell, J. E. and Kerr, I. M., 1995, *Science*, **264**:1415.
- [9] Baichwal, V. R. and Baeuerle, P. A., 1997,

- Curr Biol*, 7:94.
- [10] Muller, M., 1993, *EMBOJ*, 12:4221.
- [11] Tamura, T. et al., 1995, *Nature*, 376:596.
- [12] Shuai, K. et al., 1993, *Nature*, 366:580.
- [13] Shuai, K. et al., 1994, *Cell*, 76:821.
- [14] Heim, M. H., Kerr, I. M., Stark, G. R., 1995, *Science*, 267:1347.
- [15] Wen, Z., Zhong, Z., Darnell, J. E., 1995, *Cell*, 82:241.
- [16] Guarente, L., 1995, *Trends Biochem Sci*, 20:517.
- [17] Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V. R., et al., 1992, *Science*, 258:1808.
- [18] Sadowski, H. B., Schuai, K., Darnell, J. E. et al., 1993, *Science*, 261:1739.
- [19] Horvath, C. M., Stark, G. R., Kerr, I. M. et al., 1996, *Mol Cell Biol*, 16:6957.
- [20] Chin, Y. E. et al., 1997, *Mol Cell Biol*, 17:5328.
- [21] Pfeffer, L. M. et al., 1997, *Science*, 276:1418.
- [22] Barinaga, M., 1998, *Science*, 280:5360.

水溶性 C₆₀与 C₆₀衍生物的生物学效应研究进展*

杨新林 程福永 朱鹤孙

(北京理工大学材料科学研究中心 北京 100081)

C₆₀是一种由 60 个碳原子组成和稳定的原子簇,是 1996 年 Nobel 化学奖得主 Kroto 等人于 1985 年首先发现的^[1]。它是继金刚石和石墨之后发现的碳元素的第三种同素异形体,由 12 个五边形和 20 个六边形组成的类似英式足球的球笼结构,60 个碳原子位于球体的 60 个顶点,每个碳原子采用 SP² 杂化,以两个单键和一个双键与另三个碳原子共价结合,在球体内外表面形成超共轭大 π 键^[2]。C₆₀不溶于水,在苯、甲苯、己烷、吡啶中有一定的溶解度。

随着 C₆₀合成方法的突破^[3],以及水溶性的 C₆₀制备与新的 C₆₀衍生物的合成方法的不断产生^[4],其生物学效应的研究有了较大的进展。国内一些单位也相继开展了此方面工作。水溶性 C₆₀的生物学效应主要是由光激发产生高量子产额的单线态氧等对生物的影响,其效应表现出广泛性和非选择性的特点。为叙述方便起见,本文从对生物酶活性的抑制、对 DNA 的选择性剪切作用、对细胞生长的影响、C₆₀的作用机理以及应用前景等有关方面对近几年来国内外的研究工作作一评述。

一、对生物酶活性的抑制

最先发现 C₆₀衍生物的生物学效应是它对 HIV-1 型病毒的蛋白酶(HIV-1 protease,

HIVP)的抑制作用。HIVP 是治疗人艾滋病的一个靶酶,其活性部位形状似一个一端开口的圆筒,几乎全由疏水的氨基酸线性排列组成。明显的例外是其中有两个具有催化作用的天冬氨酸。它们可以催化水进攻底物,使底物的肽键断裂。Friedman 等推测,由于疏水性的 C₆₀分子直径同 HIVP 的活性部位的圆筒直径近似,因此 C₆₀及其衍生物和 HIVP 的活性部位之间可能会产生强烈的疏水相互作用,从而抑制 HIVP 的活性。他们利用 DOCK3 程序建立了 C₆₀衍生物和 HIVP 形成的复合物的模型,并通过物理化学分析证实了这一设想。在此基础上他们合成了一种称之为二酰胺基二酸二苯基 C₆₀的水溶性化合物,并测得它对 HIVP 的抑制常数 K_i为 5.3 μ mol/L,为上述理论推导提供了实验依据^[5,6]。随后 Toniolo 等报道一种 C₆₀的多肽衍生物也能抑制 HIVP 的活性^[7]。

除 HIVP 外,C₆₀衍生物也能抑制其他酶的活性。Ando 等发现,在光照条件下,羧酸 C₆₀衍生物对半胱氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶有抑制作用,而对组织蛋白酶 D、酰基-辅酶 A 胆固醇酰基转移酶(acyl-CoA cholesterol acyltrans-

* 国家自然科学基金资助项目(批准号 59702009)。