

文章编号:1004 - 616X(2000)02 - 0120 - 04

Caspase 与细胞凋亡

郑徽¹ 综述,刘芝萍² 审校

(1. 第二军医大学 学员一旅一大队四队,上海 200433; 2. 第二军医大学 细胞生物学教研室,上海 200433)

摘要:细胞凋亡是细胞生长、发育过程中一个重要的生命现象,而目前发现的一组 caspase 的蛋白酶参与了凋亡的各个时期。其中,死亡受体和线粒体是对外来有害刺激或死亡信号进行加工处理,并决定是否启动凋亡通路的关键部位。本文就死亡受体和线粒体在细胞凋亡中的作用及作用机理等方面的新进展作一综述和介绍。

关键词: caspase; 细胞凋亡

中图分类号:Q255 文献标识码:A

细胞凋亡(apoptosis)又称程序性细胞死亡(programmed cell death, PDC)是一种基因控制的细胞自主性死亡过程,通常需要三十到六十分钟。它是多细胞生物体内的一个重要的生命现象,既出现在个体发育过程中,也出现在正常生理状态或疾病中;既在体内发生,也出现在体外培养物中。细胞凋亡形态学上的变化主要有 DNA 破碎、染色质凝集、细胞皱缩、线粒体肿胀和凋亡小体的形成,而整个过程的结束以凋亡小体被吞噬为标志。以上这些变化的出现有一定顺序,目前认为,细胞内所发生的、与凋亡有关的一系

列有序的级联反应,关键是激活了一组被称为 caspase 的蛋白酶。

在对哺乳动物细胞的凋亡进行研究时,人们发现了一组 ICE(interleukin - 1 convert enzyme,即 caspase - 1)类蛋白,它们是一组半胱氨酸蛋白酶¹,且有以下共同特点:1)和 ICE 有同源性;2)有高度保守的 QACXG(X 为 R、Q 或 G)五肽序列²;3)有发挥酶活性所必须的半胱氨酸;4)特异地裂解天门冬氨酸位点;5)前体蛋白均无活性,均需经蛋白水解后才产生活性;6)转染不同细胞可诱导凋亡。因它们均具

- ineoplastic and antiviral activities of some cyclolignans J. *Planta Med*, 1993, 59(3):246, 249.
- 4 何来英,戴寅,蔡有余,等. 灵芝的防癌、抗癌作用 J. *中国食品卫生杂志*, 1994, 6(3):1 - 3.
- 5 Lei LS, Lin ZB. Effect of Ganoderma polysaccharides interleukin 2 in Mixed Lymphocyte response J. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1992, 27(5):331 - 335.
- [6] Wang HB, Chen WZ, Bao EJ, et al. Effect of Phytolacca acinosa polysaccharides I combined with interleukin - 2 on the cytotoxicity of murine splenocytes against tumor cells J. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1995, 30(6):401 - 407.
- 7 侯芳玉,孙延波,盛学成,等. 松籽壳酸性多糖生物学作用的研究 J. *中草药*, 1995, 26(4):193 - 196.
- 8 Goldman R. Characteristics of the glucan receptor of murine macrophages J. *Exp Cell Res*, 1988, 174:481 - 486.
- 9 West MA. Role of cytokines in leukocyte activation phagocytic cells A. In: Mechanisms of Leukocyte activation C. (eds Grinstein S, Rotstein OD) San Diego, Academic Press, 1990. 145 - 179.
- 10 Chaudry A, McClinton S. Essential fatty acid distribution in the plasma and tissue phospholipids of patients with benign and malignant prostatic disease J. *Br J cancer*, 1991, 61:1157 - 1161.
- 11 余上才,章育正. 牛膝多糖抗肿瘤作用及免疫机制实验研究 J. *中华肿瘤杂志*, 1995, 17(4):275 - 278.
- 12 王洪斌,王劲,郑钦岳,等. 商陆多糖对小鼠淋巴细胞 DNA 多聚酶活性的影响 J. *第二军医大学学报*, 1996, 17(2):150 - 153.
- 13 何来英,戴寅. 灵芝的研究进展 J. *中国食品卫生杂志*, 1997, 9(3):41 - 43.
- 14 章灵华,肖培根. 药用真菌中生物活性多糖的研究进展 J. *中草药*, 1992, 23(2):95 - 99.

收稿日期:1999 - 04 - 20; 修订日期:1999 - 12 - 08

作者简介:郑徽(1979 -),男,安徽省人,临床医学专业,本科学士。

刘芝萍(1963 -),女,湖南省人,副教授,现任第二军医大学细胞生物教研室副主任,致力于肿瘤发生和转移的分子机理研究。

有半胱氨酸和天门冬氨酸裂解位点, Alnemri 将其命名为 caspase, 根据其发现的顺序给予编号, 共有 14 个成员, 其基因用 *casp* 表示, 但它们的作用机制还不是十分清楚。到目前为止, 约有四十多种 caspase 的底物已被确定, 但只有少数已被证明与细胞凋亡有明确的关系³。

1 caspase 的结构特点

caspase 家族有相似的氨基酸序列、结构和底物特异性, 它们均以前体 (procaspase) 的形式被合成表达 (30 - 50kD), 内含 3 个结构域: N - 末端、大亚基 (~ 20kD)、小亚基 (~ 10kD)。被激活时, 它们通过结构域之间的蛋白水解反应, 使大、小亚基结合形成异二聚体从而发挥作用。对于已知其结构的 caspase - 1、- 3 来说, 都能使大、小亚基形成的二聚体再结合形成四聚体, 其中含有两个相对独立的催化位点。每个催化位点处由大、小亚基共同组成³。被激活的 caspase, 能水解重要的细胞内底物, 包括 ADP 多聚核糖核酸酶。最近, 在鼠类 caspase 家族中又发现一个新成员 caspase - 14, 它的 cDNA 能编码含有 257 个氨基酸的蛋白质, 且与其它的 caspase 家族成员十分相似。caspase - 14 也有潜在的激活位点和保守的 QACRG 五肽序列, 但是它缺少 N - 末端的 prodomain 或一个 CARD 结构域 (caspase recruitment domain)⁴, 所以是一个必须依靠起始 caspase 激活的下游 caspase⁵。

2 caspase 的激活

根据 caspase 在凋亡中的作用和 N - 末端的长度, 将其分为两类: 一类为起始型 caspase (initiatorcaspase), 包括 caspase - 8、9、10 等, 具有长的 N - 末端, 能启动凋亡和调节效应型 caspase 的活性; 另一类为效应 caspase (effector caspase), 包括 caspase - 3、6、7 等, 有短的 N - 末端, 是凋亡的终结者。起始 caspase 是通过趋近诱导原理 (induced proximity) 被激活的。死亡受体被死亡信号激活后, 可与连接器 FADD (Fas - associated death domain) 和 caspase - 8 前体结合, 导致在局部形成高浓度的 procaspase - 8, 而 procaspase - 8 通过其自身催化作用活化本身⁶。效应型 caspase 是通过凋亡伴随原理 (apoptotic chaperons) 激活的, 即在死亡信号的诱导下, 由激活的起始 caspase 在局部形成高浓度的起始 caspase, 再水解效应 caspase 酶原, 使效应 caspase 活化。这一过程本身就是

个级联放大反应。

2.1 起始型 caspase 的激活

起始型 caspase 的激活不仅需要凋亡信号还需与各种特异的协同因子结合后, 才能对前体 caspase 进行结构修饰。caspase - 8 前体的激活需要通过它的 DED (death effect domain) 与协同因子 FADD 结合。caspase - 9 前体的激活也需要通过其 CARD 与协同因子 Apaf - 1、cyto C 和 dATP 结合。协同因子是如何激活 caspase 的呢? 虽然 caspase 前体的基因结构还不很清楚, 但是现在基本认为协同因子与 caspase 前体之间有两种可能的相互作用模式: caspase 在细胞中的前体含量很低, 但仍可探测到它的活性, 而且它们都是通过形成二聚体而激活下游 caspase 的。所以有人认为 caspase 是以低浓度的单聚体形式存在于细胞内, 而协同因子能使 caspase 前体之间发生聚集, 从而使分子内的自身水解作用被激活。另外有人认为 caspase 前体在细胞中是以某种构象或复合体的形式来阻止自身水解, 协同因子的参与能直接改变前体的构象或除去复合体中的抑制成分来激活 caspase。

2.2 caspase 激活的调节

caspase 前体与协同因子之间的相互作用也受到其它因素的调节, 有人发现了 FADD - like ICE 抑制蛋白 (FLIPs)^{7、8}。这些蛋白与 caspase - 8 前体有着相似的序列, 但缺乏基本的催化基团。这些蛋白能够和 caspase - 8 竞争地与 FADD 结合, 从而阻止 caspase 的激活。最近又发现了含有 CARD 的蛋白质 ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment), 说明不仅 caspase - 8 有替代物, caspase - 9 也有。

3 caspase 在细胞凋亡中的作用

3.1 灭活阻止细胞凋亡的细胞内物质。最经典的例子就是 $I^{CAD}/DFF45$ 的分裂⁹, $I^{CAD}/DFF45$ 是脱氧核糖核酸酶 (CAD) 的抑制剂, 其中 CAD 能激活 caspase。在没有发生凋亡的细胞中, CAD 通常与 I^{CAD} 结合形成复合体, 呈现出失活状态。凋亡启动后, I^{CAD} 被 caspase 灭活, 留下的 CAD 可自由发挥 DNA 核酸酶的作用。但中间的机理并不象表面上那么简单, 因为在 I^{CAD} 基因缺失时, 所合成的 CAD 并不具有活性, 说明 CAD/ I^{CAD} 复合体是联合翻译的, 并且 I^{CAD} 需要核酸酶的抑制或激活。

3.2 通过对细胞结构的直接酶解而促进凋亡 (如: 核纤层蛋白的破坏)。核纤层蛋白是具有刚性的结构,

它是构成核膜的基础,也参与染色质的构成。它由 Lamins (intermediate filament protein) 头尾聚合而成。在细胞发生凋亡时, Lamins 被 caspase 在单个位点上酶解而崩裂,造成核纤层蛋白的崩溃和染色质的凝集。

3.3 通过对一些细胞骨架调节相关蛋白质的酶解而改变细胞结构,包括凝集素、FAK 和由 P21 激活的激酶 (PAK2),因这些蛋白分解失活,而导致细胞凋亡。

3.4 caspase 发挥作用的起点是其调节区与效应区的分离。例如:它们能灭活或下调一些蛋白质,这些蛋白质参加了 DNA 修复(如 DNA-PKcs)、mRNA 的拼接(如 U1-70K)和 DNA 复制(如复制基因 C)的过程⁶,虽然这些现象与细胞凋亡的联系不甚清楚,但可说明破坏自身的体内平衡和修复能促进细胞崩解。

4 caspase 导致凋亡的机理

caspase 参与细胞凋亡时具有回忆性,它能有计划执行每一步,切断与周围细胞的联系,重组细胞骨架,阻断 DNA 复制和修复等。实验表明, caspase 前体广泛表达于各种细胞内,迅速有效地诱导细胞凋亡,且在神经细胞中存在的时间最长。复杂的蛋白水解系统常由起调节作用的激酶、辅助因子、反馈因子等有次序地共同调控效应型激酶的活性而组成。

那如何启动细胞的凋亡呢?大量的基因分析和生化证据提出了 caspase 的激活是一个级联模式,死亡信号激活了起始型 caspase,然后激活效应型 caspase,促使细胞崩解。然而,死亡受体和线粒体是先对死亡信号进行加工、整合,再激活不同的起始型 caspase 的。

4.1 死亡受体

死亡受体是 TNF 受体超家族的成员,位于细胞膜表面,为 I 型膜蛋白,具有相似的结构:细胞外为半胱氨酸富集区,细胞内为死亡区(DD, death domain)。死亡区虽是死亡受体引起凋亡的结构基础,但有时也能抑制凋亡¹⁰。只有死亡受体与配体形成复合体后才能起作用;死亡配体大多为 I 型膜蛋白,由三个亚基组成,可同时与三个受体形成寡聚体。目前发现的死亡受体和其对应的配体有: CD95/CD95L, TNFR1/TNF, LT(淋巴毒素), DR3/APO3L, DR4/APO2L, DR5/APL2L, 另外还有两个最近发现的死亡受体 NGF(P75 nerve growth factor)和 CAR1(还

未发现其配体)。不同的死亡受体所诱导的凋亡过程在信号传导上极为相似,即受体先与配体形成寡聚体,接着适配子通过 DD 与受体结合,另一方面再通过适配子的 DED 与邻近的 caspase 前体结合,活化 caspase 而诱导凋亡,但不同的受体/配体系统在传递信号时又各有特点^{10、11}。

CD95 是最典型的死亡受体(它也同时被称作 FAS 或 APO-1),它参与人体的重要生理凋亡过程,如:1、免疫反应后所出现的被激活的成熟 T 淋巴细胞数目的减少。2、T 细胞和 NK 细胞对癌细胞和病毒感染的细胞的杀伤作用。3、在一些无免疫反应的特殊部位(如眼睛)清除炎症反应细胞。

CD95 的配体是 CD95L,每个 CD95L 能聚合三个 CD95 分子。通过核磁共振分析结构和突变研究,发现死亡区常易聚集在一起。FADD 是一种适配子蛋白,它常常通过它的死亡区使受体死亡区发生聚合,并通过受体的死亡效应区,与 caspase-8(又称 FLICE/MACH/Mch5)的前体相结合。然后, caspase-8 发生自身裂解而被激活,并继而激活下游的效应型 caspase 如 caspase-9。

TNFR1 和 DR3 的信号传导途径与 CD95 基本相同,独特之处在于它们的适配子蛋白为 TRADD (TNFR-associated death domain),它并不直接与 caspase 前体结合,而是通过另一个适配子蛋白再结合 caspase 前体或活化凋亡的抑制因子,促进或抑制凋亡。此外,DR4 和 DR5 可通过 FADD 的依赖或非依赖途径活化 caspase,但具体机理仍不清楚。在此信号传导通路中发现了两个诱导受体(decoy receptor)DcR1 和 DcR2,它们可竞争性地抑制 DR4、DR5 与其配体的结合,抑制凋亡。

4.2 线粒体

4.2.1 MPT 孔

MPT (mitochondrial permeability transition) 孔^{13、14}是由膜外蛋白(如 ANT)和膜内蛋白(如电压依赖通道;VDAC)组成。当通道开放时,分子量 1.5 KD 分子都能自由通过,使线粒体内膜两侧的离子达到平衡, H⁺ 梯度消失而中断呼吸链。同时高渗透状态的基质发生膨胀,致使无嵴的外膜较有嵴的内膜先破裂。这样,线粒体内外膜间的凋亡诱导蛋白就可以被释放到胞浆中,包括 cyto C、AIF (apoptosis-inducing factor,即一种 DNA 酶)和 procaspase-2、3、9。但是, cyto C 的释放可以不依赖于 MPT 孔的开放,甚至在线粒体内膜保持完整的离子梯度下也能进行。

其中的 procaspase - 2、9 已被证明存在于五个不同的器官(肝、肾、心、脑、脾)和不同的细胞系的线粒体内外膜间¹⁵。最近又有报告提出,细胞 10~90% 的 procaspase - 3 也存在于的线粒体内外膜间¹⁶。它们释放后便通过蛋白水解作用而自身激活。对于它们的激活,目前有几种可能的机制:(1) procaspase 的释放改变了 caspase 激活因子和局部的 caspase 抑制因子之间的平衡,促进了 procaspase - 2、3、9 的激活。(2) procaspase 可能被线粒体外的其它因子激活或者被线粒体外膜表面的蛋白质激活。

除 caspase 之外,线粒体还能释放 AIF¹⁷,它是一种黄素蛋白(~57KD),与细菌的氧化还原酶有同源性。正常情况下它位于线粒体内,在细胞凋亡时被释放到细胞核内,通过折叠而具有活性。折叠后的 AIF 能使染色质凝集、DNA 大范围碎裂、跨膜电位消失和肌浆膜的丝氨酸磷酸化。广谱的 caspase 抑制剂 zVAD - fmk 也不能抑制 AIF 的活性。但是,若在线粒体释放 AIF 之前,就在细胞中注射:zVAD - fmk,抑制细胞内 caspase 的激活,AIF 就不能发挥作用。这说明只有在细胞内 caspase 被激活后,AIF 才能被释放和/或发挥作用。

4.2.2 Bcl - 2 家族在凋亡中的作用

Bcl - 2¹⁸ 位于线粒体外膜、内质网、核膜的外表面,它们可改变质膜对小分子和蛋白质的通透性。然而同属一个家族的 Bcl - X_L,既可以存在于这些质膜的表面又能存在于胞浆中;Bax 却只能存在于胞浆中。Bcl - 2、Bcl - X_L 和 Bax 能在线粒体外膜上形成离子通道,通过控制它的开放而调节 MPT。MPT 提高后,线粒体就可以释放凋亡诱导蛋白,如:cytoC、AIF、procaspases 等。Bcl - 2/Bcl - X_L 能提高膜的稳定性,阻止凋亡蛋白的释放,对细胞的正常功能起到重要的保护作用。例如,Bcl - 2/Bcl - X_L 能直接或间接的阻止 cyto C 的释放。正常情况下 Bcl - X_L 与 Apaf - 1 结合,使 Apaf - 1 不参与激活 procaspase - 9。当细胞受到死亡信号刺激时,Bax 可与 Bcl - X_L 相互作用,去除 Bcl - X_L 对 Apaf - 1 的抑制作用。在 cyto C 被释放后和 ATP 充足时,游离于胞浆中的 Apaf - 1 可通过其 CARD 与 procaspase - 9 结合,使 procaspase - 9 自身水解激活。caspase - 9 随后激活效应型 caspase - 3,caspase - 3 再激活 DFF/CAD(一种 DNA 酶)引起细胞凋亡。

4.2.3 线粒体与 caspase

线粒体与 caspase 都在细胞凋亡中起到了重要作

用,而且它们之间即可互相独立又可互相促进。总的说来有以下三种情况:(1) caspase 直接诱导细胞凋亡,没有线粒体的参与,如 CD95 诱导的凋亡。(2) 线粒体直接诱导细胞凋亡,caspase 不参与。这种情况的发生主要是由于 Bax 或 Bax 类似蛋白(caspase 的抑制因子)的大量表达,抑制 caspase 参与凋亡,使 DNA 发生凝集(而 caspase 会使 DNA 发生降解)和 MPT 提高。(3) 线粒体也能和 caspase 共同参与细胞凋亡。caspase 被死亡信号激活后可不直接诱导凋亡,而是通过它激活的第二信使作用于线粒体再诱导凋亡,像神经酰胺,Ca²⁺, Bcl - 2 的修饰,细胞内氧化还原水平的改变,Bax、Bak 和 c - Myc 的过分表达等。只有这样死亡信号才能够实现级联放大,加快细胞凋亡。比如在线粒体释放的 procaspase - 2、3、9 被激活后,又能激活 caspase - 3、6、7。激活的 caspase - 3、6、7 再作用于 JNK 和 p38 激酶,诱导 MPT 的进一步提高,促进 procaspase - 2、3、9 的释放,使死亡信号得以放大。

5 展望

正常情况下生物体内的细胞增殖和凋亡处于动态平衡,平衡一旦被破坏就可能两种类型的疾病。一种是由于过度凋亡而损伤正常组织,如 AIDS;另外是凋亡受到抑制而导致组织的恶性增生,因此,可以有针对的激活 caspase 或抑制 caspase 来进行治疗。

例如:在神经退行性疾病(如 AD、AP、舞蹈病)、脑卒中、心肌梗死、移植物抗宿主反应和自身免疫紊乱等疾病,通过调节 caspase 的作用来达到治疗的目的,已成为了研究的热点,利用这些小分子来控制目前尚不能根治的疾病在不久的将来一定能成为现实。

治疗癌症是 caspase 研究的另一个重要方向。通过化疗治疗癌症不仅对正常细胞有毒性并且对癌细胞杀伤作用也较弱,而且化疗损伤的癌细胞很可能是通过激活 caspase 来诱发凋亡的。现在一条可能的途径就是直接激活与起始型 caspase 相耦联的死亡受体的复合体。但由于正常细胞上也存在死亡受体,所以如何选择地激活癌细胞上的死亡受体最终诱导癌细胞凋亡是急待解决的主要问题。

因此,对 caspase 的结构、特性及其在凋亡中作用的不断深入了解,将有助于人类对生命奥秘的了解和对肿瘤等疾病的诊断和最终的治疗。

文章编号:1004 - 616X(2000)02 - 0124 - 03

TGF- β 信号系统与癌

单毓娟 综述,吴坤 审校

(哈尔滨医科大学公共卫生学院 黑龙江 哈尔滨 150001)

中图分类号:R318

文献标识码:A

转化生长因子 β s(Transforming growth factor β s, TGF- β s)是一大类调节细胞生长、分化的细胞因子。它通过一系列的级联式反应即 TGF- β s 信号系统来发挥生长抑制、促胞外基质形成、免疫抑制三大主要功能。本文将从 TGF- β s 的活化机制、TGF- β s 受体、TGF- β s 信号蛋白这些组成 TGF- β s 信号系统的重要成分来阐述其与癌的关系。

1 概述:

1.1 TGF- β s 结构

已发现 TGF- β s 有五种异构体,在人体只存在三种:TGF- β 1,2,3。三者结构上具有较高的同源性。通常细胞分泌的 TGF- β s 是无活性的,称为隐性 TGF- β s(Latent TGF- β)。已明确隐性 TGF- β 1 的结构,主要由三个亚单位构成¹:活性 TGF- β 1 (Active TGF- β 1)、原肽或隐性相关肽(Latent-associated peptide, LAP)、隐性 TGF- β 1 结合蛋白(latent TGF- β 1 binding protein, LTBP)。

1.2 TGF- β s 的激活机制

1.2.1 胞浆素酶(Plasmin)激活系统

参考文献:

- Harvey NL, Kumar S. The role of caspases in apoptosis J. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1998, 62:107 - 128.
- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis J. *J Biol Chem*, 1997, 326(Pt1): 1 - 16.
- Thornberry NA, Yuri L. Caspases: Enemies within J. *Science*, 1998, 281(8):1312 - 1316.
- Thome M, Hofmann K, Burns K, et al. Identification of CARDIAC, a RIP-like kinase that associates with caspase-1 J. *Curr Biol*, 1998, 8(15): 885 - 888.
- Ahmad M, Srinivasula SM, Hegde R, et al. Identification and characterization of murine caspase-14, a new member of the caspase family J. *Cancer Res*, 1998, 58(22):5201 - 5205.
- Perter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95-mediated apoptosis J. *Curr Opin Immunol*, 1998, 10(5):545 - 551.
- Tschopp J, Irmeler M, Thome M. Inhibition of fas death signals by FLIPs J. *Curr Opin Immunol*, 1998, 10(5):552 - 558.
- Kataoka T, Schroter M, Hahne M. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation J. *J Immunol*, 1998, 161(8):3936 - 3942.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD J. *Nature*, 1998, 391(6662):43 - 50.
- Schulze OK, Ferrari D, Los M, et al. Apoptosis signaling by death receptors J. *Eur J Biochem*, 1998, 254(3):439 - 459.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation J. *Science*, 1998, 281(5381):1305 - 1308.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis J. *Science*, 1998, 281(5381):1309 - 1312.
- Hirsch T, Susin SA, Marzo I, et al. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis J. *Cell Biol Toxicol*, 1998, 14(2):141 - 145.
- Bradham CA, Qian T, Streetz K, et al. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome C release J. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(11):6353 - 6364.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process J. *J Exp Med*, 1999, 189(18):381 - 391.

收稿日期:1999-06-15;修订日期:1999-10-25

作者简介:单毓娟(1972-),女,辽宁省宽甸县人,助教,硕士,研究方向:食物中抗癌成分分子毒理学。