

细胞凋亡中 Ca^{2+} 的分子靶点

敖琳 综述, 曹佳 审校

(第三军医大学预防医学系分子毒理学实验室, 重庆 400038)

摘要: Ca^{2+} 是细胞凋亡中一个重要的信号因子。凋亡时 Ca^{2+} 的靶点涉及蛋白酶、核酸内切酶、转谷氨酰胺酶以及维持质膜磷脂对称性的酶类等。对 Ca^{2+} 的分子靶点的研究有助于阐明细胞凋亡效应期的分子机制。

关键词: 细胞凋亡; 钙稳态; 分子靶点

中图分类号: Q28

文献标识码: A

Ca^{2+} 是哺乳动物细胞最重要的信号因子, 有调控细胞多种生理功能的作用, 包括调节细胞生长、发育及死亡。近来, 在细胞凋亡研究中也发现有 Ca^{2+} 稳态失调的发生。早期的工作显示许多凋亡模型中内源性核酸内切酶的激活为 Ca^{2+} 依赖性, 此后大量的研究发现胞内 Ca^{2+} 稳态失调是细胞凋亡中一个保守的生化事件, 提示 Ca^{2+} 参与了凋亡中的信号转导。 Ca^{2+} 的分子靶点涉及信号转导因子、蛋白酶、核酸内切酶以及维持质膜磷脂对称性的酶类等。本文就 Ca^{2+} 在凋亡中的分子靶点及作用机制作一综述。

1 Ca^{2+} 活化的蛋白酶

多种胞内蛋白水解酶作为凋亡效应期的执行者, 在介导细胞凋亡过程中起关键作用。其中半胱氨-门冬氨酸蛋白酶(caspase)家族是目前凋亡研究的一个焦点, caspase 家族的级联反应是许多细胞凋亡的共同通路, 另一个半胱氨酸家族是广泛存在于各组织的钙激活中性蛋白酶(简称钙蛋白酶, calpain), 通过 Ca^{2+} 激活及自裂解而表现出蛋白水解酶活性。在许多凋亡模型中都发现有 calpain 的过表达及快速激活; 在一些凋亡细胞中, calpain 的特异性抑制剂可阻止凋亡的发生^{1,2}。细胞内的 calpain 以酶原形式存在, 其活性受到严格调控, 其中 Ca^{2+} 的活性调节最为重要。胞内游离 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 提高到一定程度就导致 calpain 的构象变化而表现出蛋白水解酶活性, 足量的 Ca^{2+} 存在条件下也会引起 calpain 的自溶及暴露其活性部位。此外, calpain 的活性还受内源

性抑制剂 calpastatin 的调节。

在 caspase 家族的级联激活中, caspase 3 是级联反应的必经之路, 然而研究发现其活化出现在凋亡晚期, 提示有不同于 caspase 的蛋白酶参与了凋亡效应的执行。大量的研究表明 calpain 是另一类作为凋亡效应分子的蛋白酶, 其作用机制可能涉及: 执行与 caspase 级联反应相似的任务; 与某个 caspase 平行发挥作用; 调节凋亡相关蛋白的功能, 如 p53、PKC、c-jun、c-fos 等; 在凋亡中降解细胞结构及骨架。calpain 的主要作用对象是细胞骨架蛋白。受体蛋白以及蛋白激酶。2 个半胱氨酸蛋白酶家族 caspase 和 calpain 在细胞凋亡中的相互作用也引起了研究者的兴趣。calpain 的内源性抑制剂 calpastatin 是 calpain 的裂解底物。有报道表明在凋亡早期 calpastatin 的高分子量及低分子量形式也能被 caspase 降解, 提示 calpastatin 的灭活是 2 个蛋白酶系统交互作用的结果。caspase 的级联反应不仅激活自身, 而且参与了 calpain 活化³。最近, Chua 报道 calpain 能直接降解 caspase 7、8、9, 导致级联反应中 caspase 3 的活化受到遏制, 因此, calpain 可能在 caspase 级联激活及凋亡中起负性调节因子作用⁴。目前对上述研究结果还不能做出合理的解释, 相信对 2 个半胱氨酸蛋白酶家族的深入研究将有助于揭示凋亡效应的发生机制。

核支架(nuclear scaffold, NS)蛋白酶是另一个在凋亡中被激活的 Ca^{2+} 依赖性蛋白酶。最初发现分离的细胞核中, 层素(lamin)在 Ca^{2+} 作用下的迅速降解

与NS蛋白酶有关。糖皮质激素诱导的胸腺细胞凋亡中也发现 lamin B₁ 的降解是通过 Ca²⁺ 介导的机制,且外源性 Ca²⁺ 能促进其降解。NS蛋白酶抑制剂不仅能阻止胸腺细胞核中 lamin 的降解,还能抑制细胞皱缩、组蛋白 H1 及 DNA 的降解,提示 NS蛋白酶的活化可能与核酸内切酶的活化有关⁵。lamin 是构成核纤层的蛋白质,在核膜内表面对核孔起支架作用,同时对染色质可能有定向和组织作用。lamin 的水解是凋亡中的常见现象,并且可能是凋亡细胞形态学改变的原因之一。caspase 及 NS蛋白酶都能催化其降解,但有报道认为, caspase 对 Ca²⁺ 稳态失调诱导的凋亡中 lamin 的断裂不起作用,而 NS蛋白酶抑制剂在 Fas 抗体介导的凋亡中,只能部分阻止 lamin 的降解^{5,6},提示存在 2 条独立的 lamin 降解途径,分别在不同因素诱导的凋亡中发挥作用。NS蛋白酶主要定位于核区,在胸腺细胞内, bc1-2 基因还可调节其活性。对 NS蛋白酶的分离纯化工作正在进行。

2 Ca²⁺ 激活的核酸内切酶

核酸内切酶的激活导致 DNA 在核小体间的断裂是细胞凋亡中最典型的生化事件,目前对凋亡过程中染色体断裂的机制尚认识不足。Neamati 等认为,特定的染色体相关蛋白,如拓扑异构酶 II, lamin B, histone H 相继被 caspase 和其他蛋白酶水解后,会导致染色体上核酸内切酶作用位点的暴露⁷。核酸内切酶可分为酸性, Mg²⁺ 依赖性和 Ca²⁺、Mg²⁺ 依赖性 3 种,其中 Ca²⁺、Mg²⁺ 依赖性核酸内切酶对凋亡过程中 DNA 片段的形成最为重要,在许多凋亡模型中都能观察到其活性的升高。

对 Ca²⁺、Mg²⁺ 依赖性核酸内切酶的寻找、纯化及克隆工作已陆续开展起来。1991 年, Gaido 等报道了一种低分子量核酸酶 (NUC18), 其活性与凋亡过程中 DNA 降解有关⁸。NUC18 属 Ca²⁺ 依赖性, Zn²⁺ 及 ATA 可抑制其活性而阻止 DNA 断片的形成。纯化后的 NUC18 氨基酸序列与亲环蛋白 (cyclophilin) 家族有惊人的同源性。人类重组亲环蛋白 A、B 均显示出与 NUC18 相同的 Ca²⁺、Mg²⁺ 依赖性核酸内切酶活性。亲环蛋白能降解单链、双链以及超螺旋 DNA, 还能在双链线性 DNA 上产生 3'-OH 末端。

DNA 酶 I (DNase I) 是另一个凋亡过程中激活的 Ca²⁺、Mg²⁺ 依赖性核酸内切酶。将 DNase I 加入分离的细胞核中可观察到核小体片段的产生。在研究

Fisher 344 鼠肌细胞凋亡中发现⁹, 随着年龄增加, 细胞舒张期 Ca²⁺ 浓度的提高, 则 DNase I 活性相应增强 (3.2 倍)。DNase I 广泛存在于各种细胞的粗面内质网、高尔基复合体及分泌小泡内。在凋亡细胞的核周区也发现 DNase I 的存在。凋亡时内质网结构的改变及核变形可能促进核周区 DNase I 的进入, 发挥其内切核酸酶作用。Gactin 是 DNase I 的胞质内抑制物, caspase 对它的降解是 DNase I 活化机制之一。近年的研究已经鉴定并克隆了人类 DNase I 家族的 4 个成员, 包括 DNase I 以及 DNASIL1、DNASIL2、DNASIL3。虽然其表达的组织部位不尽相同, 但 DNASIL 蛋白和 DNase I 具有同样的催化活性、Ca²⁺ 依赖性及 DNA 结合特性。有关人类重组 DNase I 及其变异体在临床中应用的研究也成为凋亡中酶学研究的一个热点问题。

此外, 还有一些其他 Ca²⁺ 依赖性核酸内切酶的报道, 但大多缺乏深入的研究, 如 NP₄₂₋₅₀, NUC70 等。由于复杂的调节机制, 对核酸内切酶的分离鉴定一直受到限制。然而, 核酸内切酶所催化的 DNA 降解在凋亡中有着重要的生理意义。坏死细胞的染色体断裂是局限性的, 其蛋白酶、核酸酶及 DNA 大分子物质的释放将引发一系列的炎症反应和自身免疫反应, 而核酸内切酶的功能对于保持机体在凋亡中的稳态具有重要作用。

3 磷脂酰丝氨酸的暴露及吞噬识别

作为吞噬细胞识别凋亡细胞和凋亡小体的标志, 磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 从质膜内表面的翻转暴露也是一个 Ca²⁺ 依赖性的过程。正常情况下, 磷脂对称分布于质膜上, 磷脂酰胆碱与神经鞘磷脂位于质膜外表面, 磷脂酰乙醇胺及 PS 则局限于质膜内表面。在细胞凋亡的早期, 质膜的脂质对称性丧失, PS 从质膜内表面翻转, 暴露于质膜外表。关于凋亡时 PS 暴露的机制, 目前认为主要与非特异性的磷脂翻转 (flip-flo) 有关¹⁰。研究表明, 非特异的磷脂双分子层转运是一个 Ca²⁺ 依赖性的过程, 提高胞内 Ca²⁺ 浓度 (如用毒胡萝卜素耗竭内质网钙池) 能有效抑制磷脂正常转运, 导致质膜磷脂的重新分布及 PS 的暴露。

PS 的外露是凋亡中的一个早期现象, 其主要功能是作为识别信号启动非炎性的吞噬细胞识别功能。外露的 PS 作为一种潜在的抗原, 诱导抗磷脂抗体的产生, 从而加强凋亡小体及质膜出芽泡的免疫原性,

介导巨噬细胞和周围的正常细胞的识别及吞噬功能。利用 annexin-V 特异性封闭暴露的 PS,可抑制这种识别与吞噬作用产生。此外,暴露于质膜外表的 PS 还参与了一些重要的细胞生理功能,如促进凝血级联反应中酶复合物的形成,作为细胞清除过程中的识别信号以及在细胞融合中发挥作用。在某些肿瘤细胞表面也发现有暴露的 PS,这可能与许多实体瘤组织中巨噬细胞的浸润有关,也提示 PS 的暴露可能作为一种潜在的抗肿瘤治疗手段。

4 组织转谷氨酰胺酶的活化

转谷氨酰胺酶 (transglutaminase, TG) 是一个 Ca^{2+} 依赖性酶家族,能催化蛋白质的酰基转移反应,生成 (-谷氨酰)-赖氨酸或 N,N-双(-谷氨酰)-多胺,在蛋白质内部或蛋白质之间形成共价交联,对蛋白质进行翻译后修饰。组织转谷氨酰胺酶 (tTG) 是一个多功能的 TG 家族胞内成员,其生理功能涉及细胞生长、分化及凋亡等各个方面。在细胞凋亡的研究中发现,tTG 是凋亡中可数的几个受诱导的基因之一,其 mRNA 及蛋白质表达水平在凋亡细胞中显著增强。自发及诱发凋亡率在转染 tTG cDNA 的哺乳动物细胞中明显升高,而在转染 tTG 反义 cDNA 片段的细胞中显著降低。研究表明,tTG 的 mRNA 及蛋白表达水平与 Ca^{2+} 的升高有密切联系,tTG 的激活也需要高水平 Ca^{2+} 的持续存在¹¹。tTG 催化的 Ca^{2+} 依赖性胞内蛋白交联是凋亡过程中的一个重要生化事件,有研究认为 tTG 检测较 DNA 断片分析技术 Tunnel 法能更准确反映出凋亡的发生¹²。

tTG 的 Ca^{2+} 依赖性交联酶活性在凋亡过程中主要参与稳定质膜结构、凋亡小体形成及吞噬作用等。tTG 催化质膜蛋白与细胞内骨架蛋白的交联,能稳定质膜结构,防止内容物外漏引起炎症反应及自身免疫反应。从不同组织中分离的凋亡小体具有很强的抗蛋白水解、抗变性剂和去污剂的能力,这主要归结于凋亡小体表面多肽通过 (-谷氨酰)-赖氨酸的交联产生的稳定结构,这种抗蛋白水解的能力能允许凋亡小体在基质中积累。此外,有研究显示 tTG 和细胞内蛋白酶 (caspase 及 calpain) 在凋亡中具有一些共同的靶蛋白,这些蛋白“裂解-聚合”的生理意义还不明确,有观点认为 tTG 能防止凋亡过程中蛋白裂解产物的释放和作为新抗原引发的自身免疫反应。因此,tTG 催化的蛋白交联反应被认为是凋亡过程中的一

个保护性机制。tTG 是一个多功能的酶,除了催化蛋白交联反应,还能结合和水解 GTP、ATP,作为一个新的 GTP 结合性蛋白激活磷脂酶 C 而发挥信号传导作用。研究表明,GTP 结合蛋白 G_h 的 74 kD 亚基及 50 kD 亚基即是 tTG。因此,近来的观点认为,tTG 不仅是一个凋亡效应分子,而且还是一个复杂的凋亡上游调节因子¹³。

5 结语

Ca^{2+} 作为一个重要的胞内信号转导因子,参与了凋亡过程中一些关键点的调节,然而, Ca^{2+} 是如何在分子水平上发挥这些调节功能的具体机制还不甚明了。今后的研究将致力于 Ca^{2+} 依赖性蛋白酶及核酸内切酶在调节凋亡过程中重要生化事件中的作用,以及 Ca^{2+} 信号系统与凋亡过程中的核心成员 (如 bcl-2 家族、ced 基因家族、caspases 等) 的相互联系。相信这些问题的解决,会有助于对细胞凋亡分子机制的深入认识以及为肿瘤等凋亡相关疾病的治疗提供新的思路。

参考文献:

- 1 Ray SK, Fidan M, Nowak MW, *et al.* Oxidative Stress and Ca^{2+} influx upregulate calpain and induced apoptosis in PC12 cells J. *Brain Res*, 2000, 852(2):324~326.
- 2 Chi XJ, Hiwasa T, Maki M, *et al.* Suppression of okadaic acid-induced apoptosis by overexpression of calpastatin in human UV(r)-1 cells J. *FEBS Lett*, 1999, 459(3):391~394.
- 3 Wang KK, Posmantur R, Nadimappili R, *et al.* Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis J. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 356(2):187~196.
- 4 Chua BT, Guo K, Li P. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases J. *J Biol Chem*, 2000, 275(7):5131~5135.
- 5 Zhivotovsky B, Cahm A, Orrenius S. Two different proteases are involved in the proteolysis of lamin during apoptosis J. *Biochem Biophys Res Comm*. 1997, 233(1):96~101.
- 6 Liu X, Zhou H, Slaughter C, *et al.* DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis J. *Cell*, 1997, 89:175~184.
- 7 Neamati N, Fernandez A, Wright S, *et al.* Degradation of lamin B₁ precedes oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei J. *J Immunol*. 1995, 154:3788~3795.

文章编号:1004 - 616 X(2001)03 - 0199 - 04

综述 ·

抑癌基因 PTEN/ MMAC1 的研究进展

霍 霞¹, 邓世华², 林 锐², 王 冉², 郭仕涛², 许险峰¹ 综述, 石嵩山 审校

(汕头大学医学院, 1. 中心实验室, 2. 97 级影像班, 广东 汕头 515031)

摘要: PTEN/ MMAC1 是位于染色体 10q23. 3 上的抑癌基因, 该基因的突变失活与多种肿瘤的发生发展密切相关, 本文简单概述该基因的研究进展。

关键词: PTEN/ MMAC1 ; 抑癌基因 ; 基因突变

中图分类号: R730. 231⁺. 9 文献标识码: A

肿瘤的发生是一个多因素、多阶段作用的过程, 癌基因的激活与抑癌基因的失活与异常被认为是其中重要的事件。PTEN/ MMAC1 为近年来发现的一种抑癌基因^{1~3}。目前, 已发现有十多种抑癌基因。抑癌基因是正常的细胞基因, 它们具有维持细胞正常生长、诱导细胞程序化死亡等功能。这些基因的突变, 可导致细胞的增殖分化失控, 增加细胞癌变的可能性。现有的实验证实 PTEN/ MMAC1 基因的突变失活与多种肿瘤的发生发展密切相关。PTEN/ MMAC1 在调节细胞的增生和死亡、细胞的转移和粘连等方面均起重要作用⁴。

1 PTEN/ MMAC1 的定位、结构特征与命名

在人类多种肿瘤的发生发展中常存在染色体 10q23 及其附近广泛的片断缺失, 提示染色体 10q23

及其附近可能存在抑癌基因。1997 年 Li 等¹ 和 Steck 等² 几乎同时报道了位于染色体 10q23. 3 上的肿瘤抑制基因即 PTEN¹ 或 MMAC1², 此后多合称为 PTEN/ MMAC1³。该基因位于染色体 10q23. 3 上, 包括 9 个外显子, 长 1 212 bp; 其编码产生的蛋白质 tep1 位于胞质, 由 403 个氨基酸组成, 含有酪蛋白磷酸酶 (protein tyrosine phosphatases, PTP) 序列, 并与细胞骨架蛋白中的张力蛋白 (tensin) 有很大的同源性¹⁻³。由于这一基因蛋白的序列与 PTP 和 tensin 有关, 且基因又定位在染色体 10 上, 因此取名 PTEN¹。Steck 等² 根据该基因在多种肿瘤中有缺失和点突变, 又命名为 MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers)²。此后合称为 PTEN/ MMAC1 基因³。

收稿日期: 2000 - 06 - 08; 修订日期: 2000 - 09 - 30

基金项目: 广东省卫生厅资助课题 (A1999371)

作者简介: 霍 霞 (1961 -), 女, 河南许昌人, 副教授, 博士, 以往主要从事发育生物学的研究。

- | | |
|--|---|
| <p>8 Gaido ML, Cidowski JA. Identification, purification, and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes J. <i>J Biol Chem</i>. 1991, 266:18 580 ~ 18 585.</p> <p>9 Nitahara J A, Cheng W, Liu Y, <i>et al</i>. Intracellular calcium, DNase activity and myocyte apoptosis in aging Fischer 344 rats J. <i>J Mol Cell Cardiol</i>. 1998, 30(3):519 ~ 535.</p> <p>10 Verhoven B, Krahling S, Schlegel RA, <i>et al</i>. Regulation of phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic T lymphocytes J. <i>Cell Death Differ</i>. 1999, 6(3):262 ~ 270.</p> | <p>11 Oliverio S, Amendola A, Rodolfo C, <i>et al</i>. Inhibition of tissue transglutaminase increases cell survival by preventing apoptosis J. <i>J Biol Chem</i>, 1999, 274(48):34 123 ~ 34 128.</p> <p>12 Rittmaster RS, Thomas LN, Wright AS, <i>et al</i>. The utility of tissue transglutaminase as a marker of apoptosis during treatment and progression of prostate cancer J. <i>J Urol</i>, 1999, 162(6):2 165 ~ 2 169.</p> <p>13 Melino G, Piacentini M. Tissue transglutaminase in cell death: a downstream or a multifunctional upstream effector J. <i>FEBS Lett</i>, 1998, 430(1 - 2):59 ~ 63.</p> |
|--|---|