

半胱天冬酶天然抑制剂与细胞凋亡

孙建义, 井明艳

(浙江大学动物分子营养学教育部重点实验室, 浙江 杭州 310029)

Natural inhibitors of caspases and cell apoptosis

SUN Jian- yi, JING Ming- yan

(The Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition, Ministry of Education, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

【A Review】 The crucial role of cell death in many diseases is obvious and has intense researches to understand the regulation of apoptotic pathways. Caspase activation is central to many of the apoptotic pathways. In recent years, the research on the regulation and activation of caspase has made a great progress. Caspase inhibitors prevent active caspases from committing the cell to irreversible destruction. This review will mainly focus on the characteristics of natural anticaspase inhibitor- IAP, regulation of IAP expression, mechanisms of action of IAP.

[关键词] 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; 细胞凋亡

[KEY WORDS] Caspases; Apoptosis

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

在生物体内, 细胞增殖与细胞凋亡总是处于动态平衡状态, 从而保证了多细胞生物维系其结构稳定和内环境功能平衡及正常生长发育。正常的细胞凋亡可清除体内衰老的、磨损的或已完成功能的细胞, 如胚胎细胞、胸腺细胞等; 并能清除具有潜在危险的畸变细胞, 如自身反应性淋巴细胞、突变细胞、肿瘤细胞等。然而, 体内自然凋亡若发生紊乱, 则可导致发育异常和一些疾病, 如细胞凋亡过低导致的癌症、细胞凋亡过度导致的神经变性紊乱、局部缺血等^[1]。何志巍^[2]认为, 细胞凋亡是细胞在各种死亡信号刺激后发生的一系列瀑布式激活的主动性细胞死亡过程。细胞凋亡与组织和细胞特异性有关, 且受胞外和胞内信号的调控。本文主要综述半胱天冬酶抑制剂的种类、作用机制、调控及其在细胞凋亡中的作用等方面的研究现状。

1 半胱天冬酶简介

1.1 半胱天冬酶的特性 半胱天冬酶是一类天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶, 是特异性最强的蛋白酶之一, 可以识别底物酶切位点的至少 4 个氨基酸残基(P4P3P2P1), 且必须在天冬氨酸残基之后(即

P1 处的 C- 末端位点) 裂解底物。在哺乳动物中已发现 14 种半胱天冬酶, 分子量大约在 32- 55 kD 之间^[3]。除了 caspases- 11 和 caspases- 13, 其它类型的半胱天冬酶都已在人体内发现。正常细胞中此酶以无活性的酶原存在, 当蛋白酶经内部水解将 pro- arm(氨基酸原臂) 切去后, 剩下分子量约为 10- 20 kD 的两个片段(图 1), 这些片段折叠成亚基后形成有活性的四聚体。半胱天冬酶也可经自动水解、寡聚化和颗粒酶 B 及其它类型的半胱天冬酶异源切割而活化。

1.2 半胱天冬酶的分类 根据氨基酸原臂(pro- arm) 长度和底物特异性的不同, 半胱天冬酶可分为以下 3 类: pro- arm 较长的 caspases 称为凋亡起始组(initiator caspases), 如 caspase- 2、caspase- 8、caspase- 9 和 caspase- 10, 当凋亡信号作用于凋亡受体时首先被激活, 诱发细胞凋亡; pro- arm 较短的 caspases 称为凋亡效应组(effector caspases), 如 caspase- 3、caspase- 6、caspase- 7, 即参与凋亡的效应物。另一类 caspases 称为炎症组, 如 caspase- 1、caspase- 4、caspase- 5、caspase- 11、caspase- 14, 其功能是激活能引

起炎症反应的细胞因子,但不一定会导致细胞凋亡^[4]。

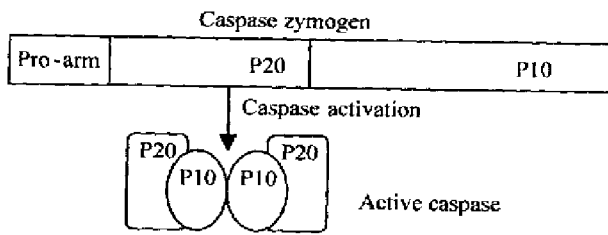


Fig 1 Schematic diagram of caspase activation (from Andrea C. LeBlanc^[5]).

图 1 Caspase 活化示意图

1.3 半胱天冬酶的活化 半胱天冬酶的活化主要有外在途径和内在途径(图 2)。外在途径是胞外凋亡信号与膜上的凋亡受体相结合使 caspase-8 激活,活化的 caspase-8 又激活 caspase-3,诱导凋亡级联反应,最终使细胞死亡,表现为 DNA 降解、染色质凝缩等;内在途径是凋亡信号使细胞核内的基因组和 Bax(B 细胞淋巴瘤 2 相关蛋白 X, Bcl-2-associated protein X) 活化^[6]。细胞凋亡与线粒体有关, Bax 经构象改变形成低聚体移位到线粒体内形成孔,或者是诱导线粒体内已有孔的打开,使线粒体内凋亡因子释放而进一步激活凋亡效应组,促使凋亡级联反应

发生。细胞色素 C 是由线粒体释放的一种凋亡因子,它与凋亡蛋白激活因子 1 即 Apaf-1 (apoptosis protein-activating factor-1) 和 caspase-9 酶原共同形成凋亡体,使 caspase-9 活化,活化的 caspase-9 又使 caspase-3 活化。

在半胱天冬酶活化的过程中,外在途径和内在途径间存在交叉反应,表现为 caspase-8 激活的 tBid 可再次激活 Bax(图 2)。

最新研究报道, Calpains 可以活化与内质网特异相关的 caspase-12。此外,还有一种独立于半胱天冬酶的细胞凋亡途径,即由线粒体释放的凋亡诱导因子 AIF(apoptosis-inducing factor, AIF) 直接作用于细胞核,使 DNA 某些片段缺失而导致 DNA 凝缩^[7]。然而,目前普遍认为细胞凋亡主要是由于半胱天冬酶活化而产生的。

2 凋亡蛋白抑制剂(IAPs)在细胞凋亡中的作用机制及表达调控

半胱天冬酶可被多种天然抑制剂所抑制,目前研究比较清楚的是存在于病毒和哺乳动物中的凋亡蛋白抑制剂(inhibitors of apoptosis protein, IAPs),它在细胞凋亡中起着重要作用,具有抑制半胱天冬酶、保护细胞等生物学功能。

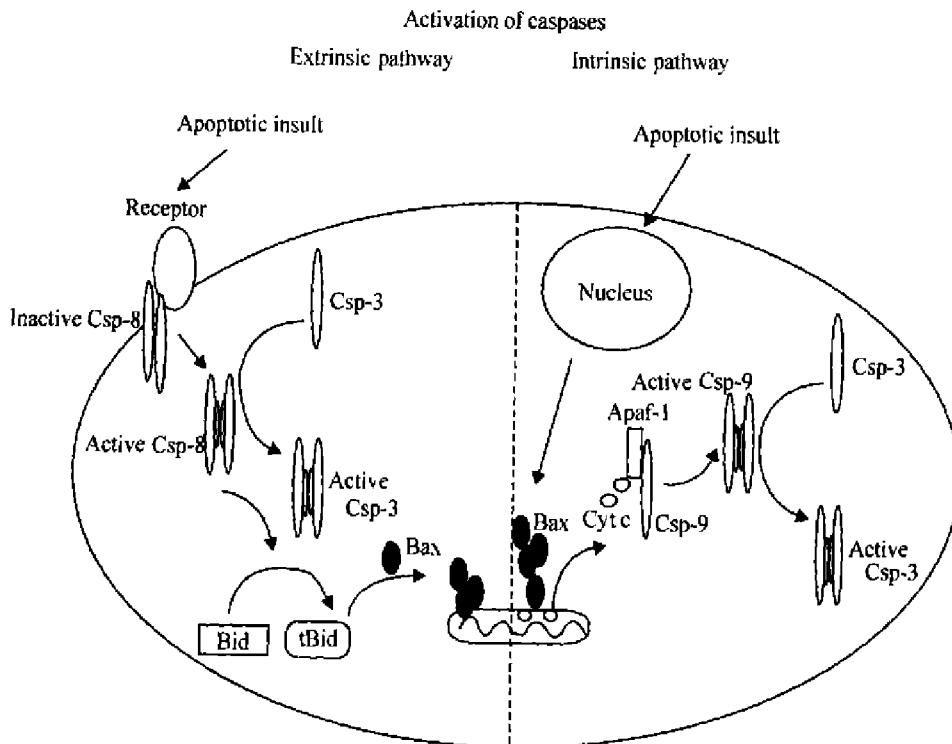


Fig 2 Two pathways of activation of caspases (from Andrea C^[5]).

图 2 Caspases 活化的两种途径

2.1 凋亡蛋白抑制剂的特性 半胱天冬酶可被多种蛋白质抑制,其中凋亡蛋白抑制剂是研究的最为

清楚的一类天然抑制剂^[8],又称为 BIR 包含蛋白(Baculovirus IAP repeat(BIR)-containing proteins), BIR

构成了大约含有 70 个氨基酸的锌指结合域。每个凋亡蛋白抑制剂中约有 1-3 个 BIR 锌指结合域,是其抗凋亡所不可缺少的。然而,并不是所有的凋亡蛋白抑制剂都含有 BIR 域,有的可能含有 RING 域,且同样具有抗凋亡特性。

2.2 凋亡蛋白抑制剂的作用 凋亡蛋白抑制剂最先是在病毒中被发现的,由牛痘病毒产生的细胞因子反应修饰物 A (Crm A),可抑制 caspase-1 和 caspase-8;杆状病毒产生的 P35 可抑制 caspase-1、caspase-3、caspase-6、caspase-7、caspase-8 和 caspase-10;此后发现哺乳动物中也存在着多种不同类型的凋亡蛋白抑制剂,如 XIAP(X 连接型凋亡蛋白抑制剂, X-Linked inhibitor of apoptosis protein)、ILP(白介素结合蛋白, interleukin-binding protein)、NAIP(神经性凋亡抑制蛋白, neuronal apoptosis-inhibitor protein)、cIAP(细胞性凋亡蛋白抑制剂, cellular inhibitor of apoptosis protein)等,且在果蝇和病毒中都有其同源类似物^[9]。然而,哺乳动物中的凋亡蛋白抑制剂仅限于抑制 caspase-3、caspase-7 和 caspase-9 活化。

2.3 凋亡蛋白抑制剂的作用机理 凋亡蛋白抑制剂通过两种独特的机制来抑制半胱天冬酶活性。一是直接作用机制,即与半胱天冬酶直接作用;二是间接作用机制,即通过 RING 域的泛蛋白化和半胱天冬酶的降解抑制细胞凋亡。

①直接作用机制 哺乳动物凋亡蛋白抑制剂的大多数成员,如 XIAP、c-IAP1(细胞性凋亡蛋白抑制剂 1, cellular inhibitor of apoptosis protein-1)、c-IAP2 和 NAIP,都可与半胱天冬酶直接作用而抑制 caspase-3、caspase-7 和 caspase-9 的活化。其中,存在于这些抑制剂中的 BIR3 可抑制 caspase-9,而 BIR1 和 BIR2 结合则可抑制 caspase-3 活化^[10]。对 XIAP 的结构分析表明, BIR 域在凋亡蛋白抑制剂与半胱天冬酶间起连接和稳定作用,而存在于 BIR 间的连接域则可保证凋亡蛋白抑制剂以正确的结构与半胱天冬酶活化位点紧密结合,从而有效抑制底物与半胱天冬酶的结合^[11]。

②间接作用机制(泛蛋白连接酶 E3 激活和蛋白酶调控的半胱天冬酶降解) 某些凋亡蛋白抑制剂如 XIAP、c-IAP1、c-IAP2 等都含有一个 RING 域,此结构普遍存在于泛蛋白连接酶的 C-末端。含有 RING 域的凋亡蛋白抑制剂可借助于本身具有的泛蛋白化特性而使活化的 caspase-3 和 caspase-7 被蛋白酶降解^[12]。Mercer 等^[13]表明, c-IAP2 含有 RING 域,具有泛蛋白-蛋白质连接酶的功能,是独立于 BIR

域的一种凋亡蛋白抑制剂,可通过泛蛋白化抑制 caspase-3 和 caspase-7 活化。此外, XIAP 还可通过泛蛋白蛋白质连接酶 E3 使 caspase-3 泛蛋白化而被降解。

③其它作用机制

(1) TAK1/JNK1 信号转导: 凋亡蛋白抑制剂除可与半胱天冬酶作用,还可与其它物质作用,最终抑制细胞死亡。XIAP、NAIP 等可通过直接结合 JNK1(c-Jun 蛋白氨基末端激酶 1, c-Jun amino terminal kinase 1) 调节因子和 TAK1(转化生长因子 β 活化激酶 1, transforming growth factor-β-activated kinase-1) 而使 JNK1 活化(图 3),从而使肾脏中 T 细胞不会因 TNF-α 或 caspase-3 的诱发而死亡。

(2) 细胞核因子 NF-κB(nuclear factor kappa B) 活化: 全长的 XIAP 可通过促细胞分裂剂激活性蛋白激酶激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAPKKK)和转化生长因子 β 活化激酶 1(TAK1)使 NF-κB 活化,最终可使人血管内皮细胞得到保护。然而,在细胞凋亡反应中,若全长的 XIAP 被天冬半胱酶切割,就不会使 NF-κB 活化,从而丧失了保护细胞存活的功能(图 3)。

(3) 神经元内钙离子平衡的调节: NAIP 内的 BIR3 域与存在于海马回中的神经元特异性钙结合蛋白结合,可抑制 caspase-3 活化,从而使神经元不会因钙诱发而导致死亡^[14]。

2.4 哺乳动物凋亡蛋白抑制剂的调控

①转录水平的调控 应激和生长因子缺乏都可诱导凋亡蛋白抑制剂表达(图 4)。Park 等^[15]小鼠试验表明,缺氧可诱导 IAP-2 启动子中长度约为 200 bp 增强子序列的表达,此序列是 IAP-2 转录所必需的。但若去掉 IAP-2 启动子中本身含有的 4 个缺氧诱导因子-1(HIF-1, hypoxia-inducing factor-1),缺氧也同样可以诱导 IAP-2 的表达。对人体内肺癌细胞 A549 研究表明,缺氧也可诱导 IAP-1 和 XIAP 的表达^[16]。缺氧是通过诱导 NF-κB 而使凋亡蛋白抑制剂的表达增强,这已得到公认。其它因子也可通过诱导 NF-κB 使凋亡蛋白抑制剂的表达增强,如 TNF-α、IFN-α 和 TRAIL(肿瘤坏死因子 α 相关性凋亡诱导配体, tumor necrosis factor-α-related apoptosis-inducing ligand),都可使 XIAP 和 c-IAP2 的表达增强。此外, PMA(12-佛波醇-13-豆蔻酸乙酸盐, phorbol 12-myristate 13-acetate)也可通过 NF-κB 上调 c-IAP1、c-IAP2 和 NAIP 而促进人体 T 细胞白血病细胞系的存活。FAK(黏着斑激酶, focal adhesion kinase)和 GDNF(神经胶质源神经营养因子, glial-derived

neurotrophic factor) 也可通过不同途径来增强凋亡蛋白抑制剂的表达。

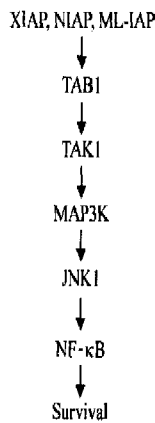


Fig 3 IAPs can increase survival through the NF-κB survival pathway^[5]. TAB1: TAK1-binding protein; MAPK: mitogen-activated protein kinase.

图3 IAPs 通过 NF-κB 途径促进细胞存活

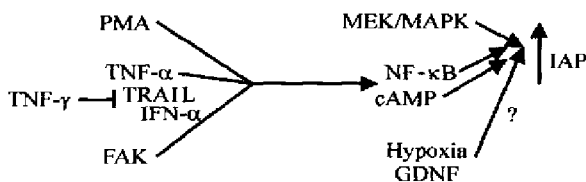


Fig 4 Transcriptional regulation of IAP^[5]. MAPK: mitogen-activated protein kinase.

图4 IAP 转录水平的调控

在凋亡蛋白抑制剂的转录调控中, 不仅 NF-κB 是信号转导中间体, cAMP 和 MEK/MARK 也是两种重要的信号转导途径。cAMP 作用于凋亡蛋白抑制剂启动子内的 CREB (cAMP 应答元件结合蛋白, cAMP-responsive element-binding protein), 可以调控小鼠中 IAP-1 mRNA 的表达, 且与 NF-κB 的活性有关, 若 NF-κB 的活性受到抑制, cAMP 就失去对 IAP-1 的调控功能。然而, 也有某些细胞因子可抑制凋亡蛋白抑制剂的转录, 如 TNF-γ 可抑制 TRAIL 诱导的 IAP-2 的表达(图4)。

②翻译水平的调控 XIAP 启动子内的 IRES(内部核糖体进入部位, internal ribosomal entry site) 残基可调控 XIAP 的翻译。其中, La 自身抗原在此调控过程中是必需的。因为当细胞处于应激条件下, 大多数依赖于 CAP 的蛋白质翻译都不能进行, 而由于 La 自身抗原的存在, IRES 可以使 XIAP mRNA 继续翻译, 从而保证了细胞在应激下能够正常存活^[17]。然而, 研究发现有关凋亡蛋白抑制剂的调控一般都是翻译后调控, 且大多都是负调控。

(1) 泛蛋白连接酶 E3: 凋亡蛋白抑制剂具有的泛蛋

白连接酶活性不仅可使半胱天冬酶降解, 同时还可使其自身水解。如 XIAP 有抗细胞凋亡的作用, 但是在某些特殊情况下, 却可使其本身泛蛋白化, 诱导损伤的线粒体释放 Smac(second mitochondrial activator of caspase, 半胱天冬酶辅助性线粒体激动剂, 此物质可抑制凋亡蛋白抑制剂的活性), 而使其本身被降解, 结果促使细胞死亡。Yang 等^[18] 报道, 胸腺细胞凋亡是由于 c-IAP1 和 XIAP 泛蛋白化而被蛋白酶所降解。与此类似, RING 域不仅有抗细胞凋亡作用, 同时也具有促进细胞凋亡的负效应, 它可使 TRAF2(tumor necrosis factor receptor-associated factor-2, 肿瘤坏死因子受体相关因子 2, 肿瘤坏死因子受体相关因子 2, 是 TNF-α/TNF-RI 途径中的一个抗凋亡中间体) 泛蛋白化而被降解, 结果使 caspase-8 激活而引发细胞凋亡。

(2) Smac/Diablo(IAP 直接结合蛋白) Smac 和 Diablo 是在细胞凋亡过程中由线粒体释放的蛋白质, 具有低的等电点, 且不含有 N-末端, 但当被释放到细胞质内, 就会自动加上一个 N-末端。进入细胞质中的 Smac 和 Diablo 直接与凋亡蛋白抑制剂结合并抑制其活性, 如 c-IAP1、c-IAP2、XIAP、ML-IAP (melanoma inhibitor of apoptosis, 黑色素瘤凋亡抑制剂), 使细胞发生凋亡反应^[19]。Smac 和 Diablo 的 N-末端中含有一个 4 肽, 此肽也存在于半胱天冬酶的 N-末端, 是凋亡蛋白抑制剂的结合位点。因此, Smac 和 Diablo 可以竞争性抑制凋亡蛋白抑制剂与半胱天冬酶结合, 从而导致细胞凋亡^[20]。

综上所述, 由于凋亡信号的作用使线粒体受到破坏, 导致细胞发生双重性损伤, 其一是线粒体释放细胞色素 c 活化细胞凋亡反应途径; 其二是线粒体释放 Smac 和 Diablo 使半胱天冬酶抑制剂明显减少。有研究报道, Smac/Diablo 与细胞色素 c 的释放是同步进行的, 它们在促进细胞凋亡中是同等重要的。但在某些特殊情况下, 其中一个促细胞凋亡途径也有可能占主要地位^[21]。

(3) HtrA2/Omi: 当凋亡信号作用于线粒体时, 线粒体会释放一种蛋白质 HtrA2 (high-temperature requirement serine protease A2, 嗜热性丝氨酸蛋白酶 A2), 此蛋白是由线粒体丝氨酸蛋白酶编码表达的, 也含有类似于 Smac/Diablo 的 N-末端, 可与 XIAP 的 BIR2、BIR3 和 c-IAP 作用, 增强细胞对凋亡信号的敏感性^[22]。其中, 丝氨酸蛋白酶和 N-末端都是 HtrA2 所必需的。研究发现, HtrA2 过度表达会诱导不依赖于半胱天冬酶的细胞凋亡, 使细胞旋转和萎缩, 最终形成凋亡小体^[23]。

(4) XAF-1(XIAP-associated factor-1, X 连接型凋

亡蛋白抑制剂相关因子 1): XAF- 1 是正常组织中表达的一种蛋白质,可在体外或体内直接与 XIAP 结合并抑制其活性;它也可在细胞核内与 XIAP 同时表达,通过 XIAP 亚细胞区域划分而抑制其活性。研究发现,癌细胞中含有高水平的 XAF- 1 mRNA,表明 XAF- 1 与癌症有关^[24]。

3 小结

综上所述,凋亡蛋白抑制剂作为半胱天冬酶的一类天然抑制剂,可抑制细胞异常死亡,从而维系体内的正常代谢,避免了多种疾病的发生。目前,有关细胞凋亡抑制剂的研究还不太深入,许多抑制剂还未被发现,且对已知抑制剂的表达和活性的调控机制等方面的研究也比较肤浅,因此,深入了解半胱天冬酶抑制剂在细胞凋亡中的作用机理和调控模式,将在临床治疗过程中发挥极其重要的意义,如癌症和变性病等,半胱天冬酶抑制剂可作为治疗这些疾病的靶物。

[参 考 文 献]

- [1] 时丽冉. 线粒体与细胞凋亡[J]. 生物学教学, 2002, 27(5): 3.
- [2] 何志巍. Caspases 与细胞凋亡研究进展[J]. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 1999, 19(1): 15- 19.
- [3] Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis[J]. Mol Cell, 2002, 9(3): 459- 470.
- [4] Kidd VJ, Lahti JM, Teitz T. Proteolytic regulation of apoptosis [J]. Cell Dev Biol, 2000, 11(3): 191- 201.
- [5] Andrea CL. Natural cellular inhibitors of caspases[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003, 27(2): 215- 229.
- [6] Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis[J]. Trends Cell Biol, 2000, 10(9): 369- 377.
- [7] Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, et al. Apoptosis- inducing factor(AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis[J]. FEBS Lett, 2000, 476(3): 118- 123.
- [8] Stennicke HR, Ryan CA, Salvesen GS. Reprival from execution: the molecular basis of caspase inhibition[J]. Trends Biochem Sci, 2002, 27(2): 94- 101.
- [9] Wu G, Chai J, Suber TL, et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/ Diablo[J]. Nature, 2000, 408(6812- 6815): 1008- 1012.
- [10] Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, et al. Structural basis of caspase- 7 inhibition by XIAP[J]. Cell, 2001, 104(9): 769- 780.
- [11] Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R. Ubiquitin- protein ligase activity of X- linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase- 3 and enhances its anti- apoptotic effect in Fas- induced cell death[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(15- 16): 8662- 8667.
- [12] Huang H, Joazeiro CA, Bonfoco E, et al. The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin- protein ligase and promotes *in vitro* monoubiquitination of caspases 3 and 7[J]. J Biol Chem, 2000, 275(35): 26661- 26664.
- [13] Mercer EA, Korhonen L, Skoglou Y, et al. NAIP interacts with hippocampin and protects neurons against calcium- induced cell death through caspase- 3- dependent and- independent pathways [J]. EMBO J, 2000, 19(14): 3597- 3607.
- [14] Dong Z, Nishiyama J, Yi X, et al. Gene promoter of apoptosis inhibitory protein IAP2: identification of enhancer elements and activation by severe hypoxia[J]. Biochem J, 2002, 364(2): 413- 421.
- [15] Park SY, Billiar TR, Seol DW. Hypoxia inhibition of apoptosis induced by tumor necrosis factor- related apoptosis- inducing ligand (TRAIL) [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 291(1): 150- 153.
- [16] Holcik M, Thompson CS, Korneluk RG, et al. The hippocampal neurons of neuronal apoptosis inhibitory protein 1 (NAIP1) - deleted mice display increased vulnerability to kainic acid- induced injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(5- 6): 2286- 2290.
- [17] MacFarlane M. Smac agonists blaze the TRAIL to tumor cells [J]. Trends Pharmacol Sci, 2002, 23(11): 501- 502.
- [18] Yang Y, Fang S, Jensen JP, et al. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli[J]. Science, 2000, 288(14- 20): 874- 877.
- [19] Vucic D, Deshayes K, Ackerly H, et al. Smac negatively regulates the anti- apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis(ML- IAP) [J]. J Biol Chem, 2002, 277(14): 12275- 12279.
- [20] Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, et al. A conserved XIAP- interaction motif in caspase- 9 and Smac/ Diablo regulates caspase activity and apoptosis[J]. Nature, 2001, 410(6824- 6827): 112- 116.
- [21] Deng Y, Lin Y, Wu X. TRAIL- induced apoptosis requires Bax- dependent mitochondrial release of Smac/ Diablo [J]. Genes Dev, 2002, 16(1): 33- 45.
- [22] Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, et al. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins [J]. J Biol Chem, 2002, 277(1): 445- 454.
- [23] Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, et al. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death[J]. Mol Cell, 2001, 8(1): 613- 621.
- [24] Fong WG, Liston P, Rajcan- Separovic E, et al. Expression and genetic analysis of XIAP- associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines[J]. Genomics, 2000, 70(1): 113- 122.