

整合素与肠上皮细胞凋亡

贾震易, 秦环龙

贾震易, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院外科 上海市 200233
国家自然科学基金资助课题, No. 30271286
上海市科委启明星跟踪计划基金, No. 02QMB1406
项目负责人: 秦环龙, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六
人民医院外科. jiaqc@online.sh.cn
电话: 021-64361349
收稿日期: 2004-02-15 接受日期: 2004-03-24

摘要

整合素是一类重要的黏附分子受体. 他介导着细胞与细胞外基质以及细胞间的黏附, 并参与细胞的多种生理功能和病理变化. 近来一些研究显示, 整合素IEC凋亡关系密切, 但其机制尚不清楚. 钙离子、cAMP、Bcl家族、死亡受体家族及Caspase家族可能在整合素介导的肠上皮细胞凋亡中起着重要作用.

贾震易, 秦环龙. 整合素与肠上皮细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2004;12(6): 1419-1421

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1419.asp>

0 引言

整合素是一类重要的黏附分子受体, 他广泛分布在各类细胞表面, 介导着细胞与细胞外基质、细胞间的黏附. 整合素还可作为介导信号传递的膜分子, 通过独特的信号转导途径, 参与细胞的多种生理功能和病理变化. 近来一些研究显示, 整合素与肠上皮细胞(IEC)凋亡关系密切, 其在肠上皮细胞屏障功能中的作用亦日益受到重视, 现就这方面的研究进展综述如下.

1 基本概念

整合素分布在大多数体细胞的表面, 是一类重要的黏附分子受体. 结构上是由 α 和 β 亚基以非共价键结合而形成的跨膜异二聚体糖蛋白. 至今已发现17种 α 亚基和8种 β 亚基^[1]. α 亚基与 β 亚基组合可形成20种不同的整合素, 按 β 亚基不同可将整合素家族成员分为8组. 所有 α 和 β 亚基均有较长的胞外区、跨膜区和短的胞内区组成(只有 β_4 亚基有较长的胞内区). α 亚基胞外区含有几个阳离子结合区, 而 β 亚基的胞外区含有几个胱氨酸重复序列, 胞内区比 α 亚基稍长, 功能上通过结合锚定蛋白把整合素与细胞骨架联系起来^[2].

整合素的大部分配体是细胞外基质成分, 如纤维连接蛋白(Fn)、胶原蛋白(Col)和层粘连蛋白(Ln)等, 个别的还能与可溶性配体如纤维蛋白原和一些细胞表面分子结合, 从而介导细胞与细胞外基质以及细胞间的黏附, 并通过信号传递介导胞内反应. 不同的 α 亚基和

β 亚基的组合构成配体结合的特异性, 其主要的识别位点是配体的精-甘-天冬氨酸3肽(RGD结构)^[1].

整合素作为一个信号传递分子介导细胞内外双向的信号传递. 由于其 β 链连接于细胞骨架, 故被推测为信号传递的关键, 而 α 链则负责与基质的特异性黏附. 此外整合素还介导细胞间的信号传递. 目前认为整合素信号传递有以下几个途径: (1)[Ca²⁺]_i升高及钙激活蛋白酶的作用; (2)影响cAMP水平及细胞骨架的改变等; (3)局部黏附激酶(FAK)和其他酪氨酸激酶所致的酪氨酸磷酸化; (4)G-蛋白途径; (5)影响白介素产物.

2 整合素在肠上皮细胞上的表达及其功能

同大多数体细胞一样, 在IEC表面也分布着多种整合素受体. 主要包括与层粘连蛋白结合的 $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 4\beta 4$ 和 $\alpha 6\beta 4$, 与纤维连接蛋白结合的 $\alpha 5\beta 1$ 等. 不同整合素在IEC的分布亦有不同, 如 $\alpha 2\beta 1$ 分布于隐窝处, $\alpha 3\beta 1$ 分布于绒毛底部, $\alpha 5\beta 1$ 位于隐窝及绒毛的底部, $\alpha 7\beta 1$ 则局限在隐窝顶部及绒毛底部, 而 $\alpha 6\beta 4$ 则均一地分布于整个IEC表面^[3-4].

整合素通过与基质蛋白结合将IEC与基底膜黏附在一起, 并对IEC的生长、增生、分化、迁移等细胞活动产生重要影响. 不同的整合素参与细胞活动的调节功能也不尽相同. 如 $\alpha 2\beta 1$ 参与调节细胞分化、细胞迁移及肠腺的发生; $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ 参与调节细胞增生; 而 $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ 则参与细胞分化的调控. 近年来随着研究的深入, 人们发现整合素还与IEC的凋亡密切相关^[4-5].

大多数体细胞需要黏附于基质方能生长, 称为锚着依赖性细胞, 如果这类细胞从其黏附的基质处脱落即会激活细胞的自杀性程序, 并可从形态学和生化特征上证实为凋亡. 这种由于细胞与基底膜分离引起的凋亡亦称为“anoikis”^[6]. 对于IEC而言, 他也是锚着依赖性细胞, 他的存活同样需要依附于基质蛋白. Grossmann et al^[7]研究证实一旦IEC与基底膜分离, 3h后就有90%以上的细胞发生凋亡. 整合素是介导细胞与基底膜黏附的桥梁, IEC依靠整合素黏附于基底膜以维持细胞的生存. 一旦整合素受体受到封闭或破坏, 就可引起IEC与基底膜分离, 导致细胞凋亡; 相反, 如果增加IEC表面某些整合素受体的表达, 却可以提高细胞的抗凋亡能力. 如Strater et al^[8]用结肠上皮细胞株证实抗整合素 $\beta 1$ 的单抗可以阻止细胞与底部基质的黏附, 并诱发了细胞凋亡. 而Lee et al^[9]以小鼠小肠细胞为模型, 发现增加细胞表面整合素 $\alpha 5\beta 1$ 表达可以提高细胞的抗凋亡能力. 由此看来, 整合素(可

能只是某些亚型)在 IEC 凋亡中起着重要作用。

3 整合素介导肠上皮细胞凋亡的机制

3.1 Ca^{2+} /cAMP 离子钙是细胞内重要的第二信使,参与细胞代谢及功能的调节。研究表明,钙与细胞凋亡关系密切,主要表现为细胞内钙超载可以诱发凋亡,而阻止细胞内钙离子浓度升高可以抑制凋亡。这一现象最早在胸腺细胞中被揭示,随后在淋巴细胞、骨髓细胞、心肌细胞及神经细胞中也得到证实^[10-11]。细胞内钙超载诱发凋亡的机制尚不完全明确,现在认为主要有两条途径,一是通过激活下游钙依赖的凋亡相关激酶(如钙蛋白酶、钙调磷酸酶及核酸内切酶)诱发凋亡;另一条则是通过改变线粒体膜的通透性来实现的,胞质 Ca^{2+} 增高可使线粒体通透性转换孔(PTP)开放促使细胞色素 C 释放,后者与 Apaf-1 及 caspase9 酶原结合形成凋亡复合体,从而诱发了细胞凋亡^[12]。最近,在我们的一项实验中发现,钙与 IEC 凋亡也密切相关。我们取胎鼠的 IEC 作培养,研究缺氧所致 IEC 凋亡与钙的关系。发现使用钙通道阻滞剂(维拉帕米)可以降低缺氧所致的 IEC 凋亡比率,同时还能阻止整合素受体极性分布的改变。由此提示缺氧后胞内钙超载可能是导致 IEC 凋亡的重要离子信号,其机制可能与钙超载诱导的整合素受体表达及极性改变有关。cAMP 也是细胞内重要的第二信使,对调控细胞多种功能和增生有重要作用。近来 Nishihara et al^[13] 一项研究表明 cAMP 有抑制 IEC 凋亡的作用。其机制主要与增加凋亡抑制蛋白 c-IAP2 的表达有关。同时还有研究证实整合素 $\beta 1$ 与基底膜黏附后可以刺激 cAMP 的产生^[14]。因此 cAMP 可能也是整合素介导 IEC 凋亡的机制之一。

3.2 Bcl 家族 Bcl-2 家族基因和蛋白是调控细胞凋亡的重要因子。他分为抗凋亡和促凋亡两类,前者有 Bcl-2, Bcl-w, Bcl- X_L 等,后者包括 Bax, Bak 等。Bcl-2 家族主要通过线粒体途径影响细胞凋亡。如 Bcl-2 等可以通过维护线粒体膜的稳定,阻止其释放死亡因子发挥抗凋亡作用,而 Bax, Bak 等则可使线粒体释放细胞色素 C, Apaf-1, 促进凋亡复合体的形成,从而导致细胞凋亡^[15]。有研究表明,整合素与细胞外基质的结合情况可影响 Bcl-2 家族蛋白的表达及其功能,并调节细胞凋亡。如 Matter et al^[16] 发现整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 或 $\alpha v \beta 3$ 与配基结合后可以增加 Bcl-2 的表达; de la Fuente et al^[17] 发现整合素 $\alpha 4 \beta 1$ 与配基结合也可以增加 Bcl-2 表达,而 Gilmore et al^[18] 将乳腺上皮细胞与基底膜分开,发现 Bax 从胞质转入线粒体并暴露其 BH3 区域,促使线粒体释放细胞色素 C, Apaf-1 及 caspase9, 形成凋亡复合体,诱发凋亡。已知 IEC 发源于隐窝处的干细胞,经过细胞增生、分化和不断迁移,3-5 d 后到达绒毛顶端或肠腔表面,并在此处脱落、凋亡。有研究显示, Bcl 家族成员在 IEC 不同部位的表达不尽相同。抗凋亡蛋白 Bcl-2 在隐窝处含量最多,越靠近绒毛顶端或肠腔表面,其含量越少。而促凋亡蛋白 Bak 却被证实绒毛顶端含量最丰富^[19-20]。

可见, Bcl 家族这种呈梯度分布的特点对保证肠上皮的增生、脱落和凋亡意义重大。有趣的是,还有一些研究报道 IEC 与基底膜的黏附能力也呈梯度分布,即从隐窝底部至绒毛顶端逐渐下降^[21]。因此可能正是由于整合素受体表达或功能逐渐变化,形成了 IEC 的黏附力及 Bcl 家族的分布特点,并最终导致了细胞脱落、凋亡。此外, Rosen et al^[22] 研究发现 IEC 与基底膜分离后还能使 Bcl- X_L 的表达减少,从而促使细胞发生凋亡。由此可见, Bcl 家族表达及功能发生变化可能是整合素介导 IEC 凋亡的重要机制。

3.3 PI-3k/Akt 与 Ras/MAPK 通路 Bcl-2 家族蛋白的表达及其功能的调节是通过整合素介导的细胞信号传导实现的。整合素与基底膜黏附后可以激活粘着斑激酶(FAK), FAK 的激活被认为是各类细胞生存所必需的。活化的 FAK 不仅协助生长因子受体进行信号传导,而且可以直接激活丝裂素激活蛋白激酶(Ras/MAPK)通路及磷酸酰肌醇-3(PI-3k)通路。通过增加细胞内抗凋亡因子表达,抑制促凋亡因子的作用,阻止细胞凋亡。一旦整合素改变导致细胞与基底膜分离, FAK 及下游的信号通路就无法激活,从而诱发细胞凋亡^[23]。PI-3k 是一种脂类激酶。他与 FAK 结合后,在 Ras 的参与下被激活。活化的 PI-3k 可以进一步激活下游的蛋白激酶 B(即 PKB)成员 Akt。Akt 通过磷酸化 Bad, Bak 抑制其功能,并通过激活核转录因子(NF κ B)等机制促进 Bcl-2 的表达。此外还通过激活磷酸化下游的其他一系列底物(包括 caspase9, FKHR 等)和抑制细胞色素 C 释放等途径发挥抗凋亡作用。Lee et al^[9] 以小鼠 IEC 为模型研究发现,使用 PI-3K 及 Akt 抑制剂,可使整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 失去抗凋亡作用。由此说明某些整合素正是通过 PI-3k/Akt 通路实现其抗凋亡能力的。Ras/MAPK 通路的激活可以使下游的 Raf, MEK, ERK 等激酶活化。他们还可以使 Bax, Bak 磷酸化,后者一旦离开线粒体并与 14-3-3 蛋白结合就失去活性,从而抑制了细胞凋亡^[23]。目前这条通路的作用在 IEC 中也得到证实^[24]。

3.4 死亡受体家族 死亡受体家族是从属 TNFR/NGF-R 超家族的一个亚家族。TNFR/NGF-R 超家族都具有特征性的 2-5 个富含半胱氨酸的细胞外重复序列。死亡受体具有细胞内死亡域(DD),这一区域是转导细胞凋亡信号所必需的。目前已知死亡受体亚家族有 6 个,其中 Fas 和 TNFR1 是研究较为清楚的两个。死亡受体通过相对应的天然配体而活化。这些配体与其受体相对应形成死亡配体系统,称为 TNF 家族。死亡受体的配体多为 II 型跨膜蛋白,对应 Fas 和 TNFR1 的配体分别是死亡受体配基(FasL)和 TNF- α 。Aoudjit et al^[25] 研究发现在 T 淋巴细胞中整合素 $\alpha 2 \beta 1$ 与其配基的结合可以抑制 FasL 的表达。他们还报道在内皮细胞中整合素与细胞外基质的黏附可以保证细胞骨架的完整,一旦减少死亡受体(Fas)及其配基(FasL)的表达及活动就可抑制细胞凋亡^[26]。Frisch et al^[27] 报道破坏整合素与细胞外基质的黏附,可以使细胞骨架中的肌动蛋白构型改变,诱发 Fas 聚集、诱导死亡信

号复合物(DISC)形成, 从而导致细胞凋亡. Rosen et al 证实 IEC 与基底膜的分离也可以导致 FasL 增加, 触发细胞凋亡, 其机制与 P38 MAPK 通路的激活及 Bcl-X_L 的表达下降有关, 但整合素在其中发挥的作用尚不清楚.

3.5 Caspase 家族 不论是线粒体介导的凋亡途径还是死亡受体介导的凋亡途径, 都要通过激活 Caspase 家族产生凋亡效应. Caspase 是一个日益增大的半胱氨酸蛋白酶家族. 目前已发现 14 种以上 Caspase 家族成员, 命名为 Caspase1-14. 其中大多都参与凋亡有关的生理性或病理过程. 参与诱导细胞凋亡的 Caspase 可分为两大类, 一类是启动酶, 包括 Caspase2, 8, 9, 10; 另一类为效应酶, 包括 Caspase3, 6, 7. Caspase 通过级联反应依次激活, 一般启动酶在先, 效应酶在后, 但根据不同的凋亡诱因可有不同的激活顺序. 效应酶通过降解 DNA、裂解抗凋亡蛋白和裂解细胞骨架蛋白等一系列作用诱导细胞凋亡. 目前, Caspase 家族与整合素介导的 IEC 凋亡的关系知之甚少. Grossmann et al [7] 的实验发现 IEC 与基底膜分离后, 15 min 内启动酶 Caspase2, 9 即被激活, 以后效应酶 Caspase7, 3, 6 依次激活. Caspase8 也在大约 45-60 min 内激活. 但该实验未对整合素做进一步研究. 最近 Levy et al [32] 的一项研究发现丁酸 (NaBT) 可以使 Caco-2 细胞表面整合素 $\beta 1$ 的表达下降, 导致细胞从基底膜脱落并发生凋亡. 同时还发现经 NaBT 处理后 90 min, Caco-2 细胞内即可检测到 Caspase3 的活动, 由此提示整合素 $\beta 1$ 的表达减少可能与 Caspase3 激活密切相关, 并因此导致了 Caco-2 细胞凋亡.

总之, IEC 凋亡是肠黏膜自我更新所必需的, 他保证了肠道结构和功能的完整. IEC 凋亡的研究对肠屏障功能障碍、毒素和细菌易位的治疗均有重要的临床意义. 目前整合素受体含量、整合素受体分布与极性变化及整合素其他信号传导途径如钙离子及其通道、cAMP 等与 IEC 凋亡之间的分子机制尚不明确, 还有待更深入的研究.

4 参考文献

- Kumar CC. Signaling by integrin receptors. *Oncogene* 1998; 17:1365-1373
- de Melker AA, Sonnenberg A. Integrin: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *Bioessays* 1999; 21:499-509
- Beaulieu JF. Integrins and human intestinal cell functions. *Front Biosci* 1999; 4:D310-D321
- Beaulieu JF. Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human small intestine. *J Cell Sci* 1992; 102(Pt 3):427-436
- Basora N, Vachon PH, Herring-Gillam FE, Perreault N, Beaulieu JF. Relation between integrin $\alpha 7\beta 1$ expression in human intestinal cells and enterocytic differentiation. *Gastroenterology* 1997; 113:1510-1521
- Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994; 124: 619-626
- Grossmann J, Walther K, Artinger M, Kiessling S, Schölmerich J. Apoptotic signaling during initiation of detachment-induced apoptosis ("Anoikis") of primary human intestinal epithelial cells. *Cell Growth Differ* 2001; 12:147-155
- Strater J, Wedding U, Barth TF, Koretz K, Elsing C, Moller P. Rapid onset of apoptosis in vitro follows disruption of beta 1-integrin/matrix interactions in human colonic crypt cells. *Gastroenterology* 1996; 110:1776-1784
- Lee JW, Juliano RL. $\alpha 5\beta 1$ integrin protects intestinal epithelial cells from apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 2000; 11:1973-1987
- Manion MK, Su Z, Villain M, Blalock JE. A new type of Ca²⁺ channel blocker that targets Ca²⁺ sensors and prevents Ca²⁺-mediated apoptosis. *FASEB J* 2000; 14:1297-1306
- Chen SJ, Bradley ME, Lee TC. Chemical hypoxia triggers apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes: modulation by calcium-regulated proteases and protein kinases. *Mol Cell Biochem* 1998; 178:141-149
- Szalai G, Krishnamurthy R, Hajnoczky G. Apoptosis driven by IP3-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J* 1999; 18:6349-6354
- Nishihara H, Kizaka-kondoh S, Insel PA, Eckmann L. Inhibition of apoptosis in normal and transformed intestinal epithelial cells by cAMP through induction of inhibitor of apoptosis protein (IAP)-2. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100:8921-8926
- Whittard JD, Akiyama SK. Positive regulation of cell-cell and cell-substrate adhesion by protein kinase A. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 18):3265-3272
- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281:1322-1326
- Matter ML, Ruoslahti E. A signaling pathway from the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha (v)\beta 3$ integrins that elevates bcl-2 transcription. *J Biol Chem* 2001; 276:27757-27763
- de la Fuente MT, Casanova B, Garcia-Gila M, Silva A, Garcia-Pardo A. Fibronectin interaction with $\alpha 4\beta 1$ integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax. *Leukemia* 1999; 13:266-267
- Gilmore AP, Metcalfe AD, Romer LH, Streuli CH. Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J Cell Biol* 2000; 149:431-446
- Merritt AJ, Potten CS, Watson AJ, Yoh DY, Nakayama K, Nakayama K, Hickman JA. Differential expression of Bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J Cell Sci* 1995; 108(Pt 6):2261-2271
- Moss SF, Agarwal B, Arber N, Guan RJ, Krajewska M, Krajewski S, Reed JC, Holt PR. Increased intestinal Bak expression results in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 223:199-203
- Gauthier R, Harnois C, Drolet JF, Reed JF, Vézina A, Vachon PH. Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280:C1540-C1554
- Rosen K, Coll ML, Li A, Filmus J. Transforming growth Factor- α prevents detachment-induced inhibition of c-Src kinase activity, Bcl-XL Down-regulation, and apoptosis of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276:37273-37279
- Stupack DG, Cheresch DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 19):3729-3738
- Waetzig GH, Seeger D, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S. p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF α -signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2002; 168:5342-51
- Aoudjit F, Vuori K. Engagement of the $\alpha 2\beta 1$ integrin inhibits Fas ligand expression and activation-induced cell death in T cells in a focal adhesion kinase-dependent manner. *Blood* 2000; 95:2044-2051
- Aoudjit F, Vuori K. Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis. *J Cell Biol* 2001; 152:633-643
- Frisch SM. Evidence for a function of death-receptor-related, death-domain-containing proteins in anoikis. *Curr Biol* 1999; 9: 1047-1049