

Abstract V-ATPase is present in every known eukaryotic cell and plays a vital role. The study on the structure, function, assembly and the regulation of V-ATPase has achieved much progress recently. All the core subunits of V-ATPase have now been sequenced and most of their functions have been

assigned to some extent. Membrane biochemistry and molecular biology studies discovered that the gene expression and the activity of V-ATPase are regulated in various ways.

Key words V-ATPase, structure, regulation

TNF 受体家族介导的细胞凋亡信号转导*

萨其拉 刘孟珉 贺福初

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 肿瘤坏死因子 (TNF) 家族是一类多功能的细胞因子, 具有诱导细胞凋亡、抗病毒、免疫调节等多种生物学活性。其中一些成员可以通过和细胞膜上相应受体 (即 TNF 受体家族成员) 结合, 启动细胞内的凋亡机制, 而诱导细胞凋亡。一些蛋白质 (如 TRADD、FADD、RIP、RAIDD 等) 参与这些信号传递过程。越来越多的 TNF 家族成员、TNF 受体以及与细胞凋亡相关的 Caspase 蛋白酶家族成员被人们发现。

关键词 TNF, 细胞凋亡, 信号转导

学科分类号 Q26

细胞凋亡 (apoptosis) 或程序性死亡 (programmed cell death) 是自然发生的细胞死亡过程, 受基因调控, 在多细胞动物的发育过程中起重要作用。细胞凋亡的形态学特征是细胞核和细胞质发生浓缩, 染色质发生断裂。许多分子能够诱导细胞凋亡, 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 是其中的一种。TNF 是一类主要由激活的巨噬细胞产生的细胞因子, 能够通过激活 Caspase 蛋白酶、转录因子 NF- κ B、有丝分裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等途径, 实现其细胞毒性、抗病毒、免疫调节及转录调节等多种生物学活性。本文着重介绍 TNF 诱导细胞凋亡的信号转导途径。

1 TNF 配体家族

到目前为止, 发现的 TNF 家族成员有: TNF- α 、LT- α 、LT- β 、FasL、CD40L、CD30L、CD27L、4-1BBL、OX40L、以及 TRAIL、TRANCE 等。这些蛋白质为 II 型膜蛋白, C 端 (胞外区) 之间具有很高的同源性, 胞内区各不相同。其中 TRAIL、TRANCE 为最近克隆。

TRAIL 又称 Apo-2L, 与 Fas/Apo1 很相似, 含有 281 个氨基酸, C 端也可以形成三聚体。TRAIL 的胞外区能够介导淋巴细胞和多种肿瘤细

胞系凋亡^[1,2]。

TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) 是 1997 年由 Wong 等克隆, 由 316 个氨基酸组成, 分子质量 35 ku。其细胞外区和 TRAIL、FasL 及 TNF 相似。TRANCE 受 T 细胞及 Ca²⁺ 调节的转录因子的调控, 在淋巴器官的 T 细胞中表达水平最高。人的 TRANCE 基因定位于 13q14 上。TRANCE 的胞外区能够诱导 T 细胞中 c-Jun N 端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 途径的激活, 而不能激活 B 细胞中的 JNK, 表明 TRANCE 在 T 细胞依赖的免疫反应中起作用^[3]。

2 TNF 受体超家族

TNF 配体家族的成员是通过与细胞膜上的相应受体结合, 激活受体, 而启动细胞内诱导细胞凋亡机制的。目前发现的 TNF 受体家族成员有: TNFR1、TNFR2、Fas、CD40、NGF-R、CD30、TNF-RP、PV-T2、PV-A53R、4-1BB、OX40、CD27、DR3、CAR1、DR4、DR5、TRID 等。除了个别成员外, TNF 受体超家族的成员都属 I 型膜蛋白, 由 4 个部分组成: 信号肽、富含半胱氨酸

* 国家自然科学基金重点项目 (39730270) 和国家自然科学基金面上项目 (39800026) 资助。

收稿日期: 1998-05-18, 修回日期: 1998-08-03

的胞外区、跨膜区及胞内区。这些受体中 TNFR1、Fas、NGFR、DR3、CAR1、DR4 包含有死亡结构域 (death domain, DD)。

DR3 (death receptor 3) 是一个含有死亡结构域的细胞因子受体^[4]，主要分布在富含淋巴细胞的组织和器官中，如外周血、胸腺、脾、结肠、小肠，表现出诱导细胞凋亡及激活转录因子 NF- κ B 两种生物学活性。它和 TRADD、TRAF2、FADD、RIP 和 FLICE 等都能够结合，并通过它们转导信号。DR3 很可能在调节淋巴细胞的稳定方面发挥作用。

DR4 是 TRAIL 的受体^[5]。它由 468 个氨基酸残基组成，N 端具有信号肽，胞外区含有两个半胱氨酸丰富的伪重复区，胞内区含有死亡结构域。DR4 不能和 TRADD、FADD、RIP 相互作用，表明 TRAIL-DR4 是通过其他的途径转导凋亡信号的。

DR5 也是 TRAIL 的受体^[6,7]，含有 411 个氨基酸残基，N 端是信号肽，胞外区也含有两个半胱氨酸丰富的重复区，C 端是死亡结构域。DR5 和 DR4 具有很高的同源性。它在 MCF7 细胞及 HeLa 细胞中过表达能够诱导这些细胞凋亡。DR5 诱导的凋亡作用可被 Caspase 蛋白酶的抑制剂 CrmA 和 α -VAD-fmk 所抑制。DR5 不能和 FADD 及 TRADD 相互作用，因此，它也是通过其他的途径传递信号的。

TRID (TRAIL receptor without an intracellular domain)，亦称 DcR1 (decoy receptor 1)，也是 TRAIL 的受体^[6,7]，分布在人的很多正常组织，如心脏、肺、肝、肾、骨髓、脾、胎盘中，而在多数癌细胞中则不存在。它具有保护正常组织免受 TRAIL 介导的细胞凋亡作用。TRID 由 259 个氨基酸残基组成，其显著的结构特点是没有胞内区，而只有信号肽、含有两个半胱氨酸丰富的重复区的胞外区及跨膜区，所以它和配体结合后，不转导信号。胞外区和 DR4、DR5 分别有 69% 和 52% 的氨基酸相同。

CAR1^[8] 是鸟类造血细胞组织增生症病毒 (ALV) 受体，其胞外区也含有两个半胱氨酸丰富的伪重复区，胞内区是死亡结构域。该受体激活后能够诱导鸟类细胞凋亡。

3 TNF 受体结合蛋白

3.1 TRADD (TNFR1 associated death domain protein)

Hsu 等^[9] 利用酵母双杂交系统 (yeast two-

hybrid system)，用 TNFR1 的死亡结构域作为引诱蛋白克隆了 TRADD。TRADD 分子质量 34 ku，含有 312 个氨基酸，C 端具有死亡结构域，通过它可以和 TNFR1 特异性地结合。TRADD 在多种细胞中过表达可以导致细胞凋亡以及激活转录因子 NF- κ B。TRADD 的诱导细胞凋亡作用可被 ICE 蛋白酶的特异性抑制剂 CrmA 所抑制，而其激活转录因子的作用则不受 CrmA 影响。

3.2 FADD (Fas associated death domain protein)

FADD^[10,11] 又称 MORT-1，是由两个研究小组利用酵母双杂交系统同时克隆的。它含有 208 个氨基酸，分子质量 23 ku，C 端含有一个死亡结构域，通过它可以和 Fas/Apo1 结合。N 端含有一个新的结构域，称为 MORT 结构域或死亡效应结构域 (death effector domain, DED)，通过它可以和 ICE/CED3 蛋白酶家族的新成员——MACH/FLICE (Caspase 8) 相结合，从而诱导细胞凋亡。研究表明，MORT 结构域具有转导细胞凋亡信号的作用，它在细胞中单独表达即可诱导细胞凋亡。FADD 在细胞中过表达也能够引起细胞凋亡。所有这些研究表明 FADD 具有向下转导 Fas 及 TNF1 两个受体的细胞凋亡信号的作用。最近研究还发现，FADD 除了具有转导凋亡信号的作用外，在胚胎发育过程中也可能发挥作用^[12]。

3.3 RIP (receptor interacting protein)

RIP^[13] 是分子质量 74 ku 的蛋白质。它和 Fas 及 TNFR1 两个受体都能够结合。其 C 端是死亡结构域，N 端和蛋白激酶具有同源性。RIP 在细胞中的过表达也可以引起细胞凋亡。

3.4 Daxx

Daxx 是 1997 年由 Yang 等^[14] 克隆的分子质量为 81 ku、含有 739 个氨基酸残基的蛋白质，在体内均能和 Fas 特异性结合。Daxx 在细胞中的过表达产生两种生物学效应：激活 JNK 途径以及诱导细胞凋亡。Daxx 本身没有死亡结构域，但它的 C 端存在能够和 Fas 的死亡结构域相结合的区域。其 N 端具有诱导细胞凋亡及激活 JNK 途径的作用。研究发现，Daxx 和 FADD 是通过和 Fas 的不同区域结合，激活不同的信号转导途径而起作用的。

4 ICE/ CED3 蛋白酶家族

在 Fas 和 TNFR1 诱导的细胞凋亡的信号传递过程中有 ICE/ CED3 蛋白酶的参与。ICE 是线虫发

育过程中细胞凋亡基因 *ced-3* 产物在哺乳动物中的同源体。至今共发现了 10 个 CED-3 和 ICE 的同源体, 1996 年后这些家族成员统称为 Caspase^[15, 16]。

1996 年两个研究小组同时发现了 Caspase 家族的一个新成员, 分别命名为 MACH (MORT-associated CED-3 homolog) 和 FLICE (FADD-like ICE)^[17, 18]。MACH/FLICE 分子质量为 55 ku, N 端有两个 MORT 结构域, C 端含有一个与 ICE 同源的结构域。MACH/FLICE 能够通过 N 端的 MORT 结构域和 FADD 结合。其 C 端的 ICE 结构域在细胞中过表达可以引起细胞凋亡。可见, MACH 是联系 FADD 和 ICE/CED-3 蛋白酶的媒介物。

很久以来一直未在哺乳动物中找到 *ced-4* 的同源体。最近, Zou 等^[19]克隆了 *ced-4* 在哺乳动物中的同源体 Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1)。该蛋白质分子质量为 130 ku, N 端的 85 个氨基酸残基和 *ced-3* 具有很高的同源性, 称为 CARD (Caspase recruitment domain) 结构域。接下来是和 *ced-4* 有很高同源性、含 320 个氨基酸残基的区域。C 端有 12 个 WD 重复。Apaf-1 具有激活 Caspase3 (CPP32) 的作用, 而这一过程又需要其他两个蛋白质因子的参与: 细胞色素 c (Apaf-2)、Apaf-3^[20, 21]。

Apaf-3 是 Li 等^[21]纯化的第三个凋亡蛋白酶激活因子, 蛋白质序列和免疫印迹分析表明, Apaf-3 是 Caspase 家族的成员——Caspase 9 (Mach 6/LAP6)。在细胞色素 c 和 dATP 存在下, Apaf-1 和 Apaf-3 通过各自 N 端的 *ced-3* 同源区相互结合, 激活 Apaf-3, 后者再去激活 Caspase 3, 导致细胞凋亡。

1997 年 Duan 和 Dixit^[22]发现了一种 22 ku、含 200 个氨基酸残基的蛋白质 RAIDD (RIP-associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a death domain), 其 C 端是死亡结构域, 能够通过它结合 RIP, N 端是 Caspase 2 (ICH-1) 和 CED-3 的同源区。

5 TNF 受体诱导细胞凋亡的信号转导途径

到目前为止, 研究得最清楚的是 Fas/Apo1 和 TNFR1 诱导的细胞凋亡途径。

5.1 Fas 诱导的细胞凋亡途径

细胞接受信号后, 三聚体形式的 FasL 和受体 Fas 结合, 激活 Fas。被激活的 Fas 通过死亡结构

域之间的相互作用和 FADD 结合, FADD 又通过它的 MORT 结构域同 MACH/FLICE 结合, 激活 MACH/FLICE 的 ICE/CED3 蛋白酶活性, 后者再去激活其他的 ICE/CED3 蛋白酶。这样, 通过 FasL-Fas/Apo1-FADD-MACH/FLICE-ICE/CED3 的级联系统的凋亡信号转导作用, 最终导致细胞凋亡^[23~25]。

5.2 TNFR1 诱导的细胞凋亡途径

TNFR1 通过死亡结构域和 TRADD 相结合, 随后, TRADD 通过死亡结构域和 FADD 相互作用, 以后的信号传递过程同 Fas^[23]。TRADD 还可以通过死亡结构域结合 RIP, RIP 再通过死亡结构域结合 RAIDD, 后者再去激活 Caspase3^[26]。

在 Fas 和 TNFR1 介导的细胞凋亡过程中还观察到鞘磷脂酶的激活^[24]。鞘磷脂酶具有水解鞘磷脂生成神经酰胺的作用。因此 Fas 和 TNFR1 可能以神经酰胺作为第二信使传递信号。FADD 在细胞中的过表达能够引起神经酰胺浓度的增高, 说明神经酰胺的产生发生于 FADD 的激活之后。神经酰胺的产生还能够被 Caspase 蛋白酶的的特异性抑制剂所抑制, 可见 Fas 诱导的凋亡途径既需要神经酰胺的产生, 又需要 Caspase 蛋白酶的激活。

1997 年 Goillot 等^[27]发现有丝分裂原蛋白激酶 (MAPK) 的两个亚类——JNK 及 ERK 可以传递 Fas 的凋亡信号。他们发现在人神经成纤维细胞瘤细胞系 SHEP 中, Fas 和配体结合可以激活 JNK 及 ERK。抑制 JNK 或 ERK 途径可以抑制 Fas 诱导的细胞凋亡。ICE 蛋白酶抑制剂不能抑制 Fas 诱导的 JNK 的激活, 而 Bcl-2 能够抑制 JNK 的激活。因此, Fas 除了通过 ICE 蛋白酶诱导细胞凋亡外, 还可以通过 JNK 途径发挥作用。

总之, Fas 及 TNFR1 诱导细胞凋亡的信号传递过程是很复杂的, 中间仍有许多问题未搞清楚。也许存在着不止一条途径, 这些途径之间可能存在着某种联系。也可能不同细胞或同一细胞不同的发育时期凋亡信号的传递过程也不相同。

参 考 文 献

- 1 Wiley S R, Schooley K, Smolak P, *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995, 3 (6): 673~682
- 2 Pitti R M, Marsters S A, Ruppert S, *et al.* Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*, 1996, 271 (22): 12687~12690
- 3 Wong B R, Rho J, Arron J, *et al.* TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun

- N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem*, 1997, **272** (40): 25190~ 25194
- 4 Chinnaiyan A M, O' Pourke K, Yu G L, *et al.* Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science*, 1996, **274** (5289): 990~ 992
 - 5 Pan G, O' Pourke K, Chinnaiyan A M, *et al.* The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, 1997, **276** (5309): 111~ 113
 - 6 Pan G, Ni J, Wei Y F, *et al.* An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, 1997, **277** (5327): 815~ 817
 - 7 Sheridan J P, Marsters S A, Pitti R M, *et al.* Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*, 1997, **277** (5327): 818~ 821
 - 8 Brojatsch J, Naughton J, Rolls M M, *et al.* CAR1, a TNFR-related protein, is a cellular receptor for cytopathic avian leukosis-sarcoma viruses and mediates apoptosis. *Cell*, 1996, **87** (5): 845~ 855
 - 9 Hsu H, Xiong J, Goeddel D V. The TNF receptor1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell*, 1995, **81** (4): 495~ 504
 - 10 Chinnaiyan A M, O' Pourke K, Tewari M, *et al.* FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, 1995, **81** (4): 505~ 512
 - 11 Boldin M P, Varfolomeev E E, Pancer Z, *et al.* A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem*, 1995, **270** (14): 7795~ 7798
 - 12 Yeh W C, Pompa J L, McCurrach M E, *et al.* FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*, 1998, **279** (5358): 1954~ 1957
 - 13 Stanger B Z, Leder P, Lee T H, *et al.* RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell*, 1995, **81** (4): 513~ 523
 - 14 Yang X L, Khosravi-Far R, Chang H Y, *et al.* Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*, 1997, **89** (7): 1067~ 1076
 - 15 Alnemri E S, Livingston D J, Nicholson D W, *et al.* Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 1996, **87** (2): 171
 - 16 Selvesen G S, Dixit V M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 1997, **91** (4): 443~ 446
 - 17 Boldin M P, Goncharov T M, Goltsev Y V, *et al.* Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, 1996, **85** (6): 803~ 815
 - 18 Muzio M, Chinnaiyan A M, Kischkel F C, *et al.* FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO1) death inducing signaling complex. *Cell*, 1996, **85** (6): 817~ 827
 - 19 Zou H, Henzel W J, Liu X, *et al.* Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of Caspase-3. *Cell*, 1997, **90** (3): 405~ 413
 - 20 Reed J C. cytochrome C: can't live with it —can't live without it. *Cell*, 1997, **91** (5): 559~ 562
 - 21 Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, *et al.* cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/ Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997, **91** (4): 479~ 489
 - 22 Duan H, Dixit V M. RAIDD is a new 'death' adapter molecule. *Nature*, 1997, **385** (6611): 86~ 88
 - 23 Wallach D. Suicide by order: some open questions about the cell-killing activities of the TNF ligand and receptor family. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 1996, **7** (3): 211~ 221
 - 24 Depraetere V, Golstein P. Fas and other cell death signaling pathways. *Seminars in Immunology*, 1997, **9** (1): 93~ 107
 - 25 Chinnaiyan A M, Dixit V M. Portrait of an executioner: the molecular mechanism of Fas/APO-1-induced apoptosis. *Seminars in Immunology*, 1997, **9** (1): 69~ 76
 - 26 Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997, **88** (3): 355~ 365
 - 27 Goillot E, Raingeaud J, Ranger A, *et al.* Mitogen-activated protein kinase mediated Fas apoptotic signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (7): 3302~ 3307

The Signal Transduction of TNF Receptor Family Induced Apoptosis. Satschra, LIU Meng-Min, HE Fu-Chu (*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract The tumor necrosis factor (TNF) family is a group of cytokines with multiple biological activities, including cytotoxicity, anti-viral activity, immunoregulatory activities and so on. The members of the TNF family induce apoptosis by binding to their specific receptors on target cells and initiate mechanism of apoptosis in the cells. Some proteins like TRADD, FADD, RIP, TAIDD are found to participate in these signal transduction pathways. More and more novel TNF ligands, TNF receptors and caspase family members have been found.

Key words TNF receptor, apoptosis, signal transduction