

above. The interactions among different adhesion molecules are very complicated. Antibodies directed at adhesion molecules, soluble adhesion molecules, oligopeptides with high affinity for

the binding sides of the adhesion molecules, and some drugs can block the adhesion.

Key words adhesion, leukocyte, endothelial cell, adhesion molecule

Caspase 蛋白酶与细胞凋亡*

童 新 孙志贤

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 自从发现线虫死亡基因 *ced-3* 编码产物与哺乳动物白细胞介素-1 β 转化酶 (ICE) 结构、功能上的相似性以来, 一系列半胱氨酸蛋白酶基因相继被克隆, 并显示出在细胞凋亡执行阶段中的重要功能. 激活的 ICE/CED-3 家族蛋白酶 (因其为 Asp 特异的半胱氨酸蛋白酶, 又被称为 caspase) 能降解细胞中多个底物, 进而引发随后的细胞学事件.

关键词 ICE/CED-3 蛋白酶, caspase, 细胞凋亡

学科分类号 Q28, Q55

细胞凋亡的研究揭示: 凋亡的进程大致要经历引发、执行及最后死亡特征的出现三个阶段. 凋亡的诱因多种多样, 既有外在因素, 更有生理性改变, 而凋亡启动后的生化改变, 则直接涉及凋亡执行基因的激活、调控, 并作用于相应“底物”, 最终导致细胞形态学的特征性变化. 线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 是一种透明的圆形小虫, 在研究其胚胎发育时, 发现构成其胚胎的 1 090 个细胞中有 131 个细胞最终走向凋亡. 目前已克隆出 15 个参与细胞凋亡各阶段的相关基因, 其中 *ced-9* 与哺乳动物 *bcl-2* 高度同源, 抑制凋亡; 而 *ced-3* 则是凋亡发生所必需的, 因而被称之为“死亡基因”. 研究发现: CED-3 蛋白与哺乳动物白细胞介素-1 β 转化酶 (*interlukin-1 β converting enzyme*, ICE) 功能相似, 揭示后者在哺乳动物细胞凋亡中的重要性^[1]. 本文拟对 ICE 及其家族成员在细胞凋亡中作用作一综述.

1 ICE 及其家族成员参与凋亡执行的证据

最初注意到蛋白酶参与细胞的凋亡过程, 是发现细胞毒 T 细胞 (CTL) 颗粒所释放的

Granzyme B (一种特异性切割 Asp-x (x 为任意氨基酸) 肽键的丝氨酸蛋白酶), 能够诱导细胞凋亡. 但更直接的证据还是来自真核细胞中一种半胱氨酸蛋白酶——白细胞介素-1 β 转化酶 (ICE) 的研究. 研究表明: ICE 与诱导线虫凋亡的 *ced-3* 死亡基因具有广泛的结构同源性, 特别是两者活性功能区氨基酸序列 43% 同源, 它是一种蛋白剪切酶, 分子中有最长的 QACXG 保守基元 (motif), Cys²⁸⁵ 为其催化活性所必需^[1]. ICE 能在 Asp-x 位点切割 31 ku 的无活性的前体 IL-1 β 生成 17.5 ku 大小的活性细胞因子 IL-1 β . 随后, Miura 等^[2] 的研究证实: ICE 不仅在结构上, 而且在功能上都类似于 *ced-3*. 因为在 Rat-1 纤维母细胞中过度表达 ICE 能诱发凋亡, 而编码无活性 ICE 突变体转染的细胞则不能发生凋亡. 但这还不足以说明 ICE 参与了细胞凋亡, 因为过量表达蛋白酶 K 等也能诱发细胞凋亡. 其后, 更令人兴奋的研究发现: ICE 的抑制剂——牛

* 国家自然科学基金资助项目 (39770823).

收稿日期: 1997-05-28, 修回日期: 1997-10-20

痘病毒 CrmA 基因转染细胞^[3], 以及 bcl-2 基因的过表达均能抑制 ICE 介导的凋亡发生. 此外, 针对 ICE 催化活性位点所设计的 AG-YVAD-CMK 等四肽衍生物, 同样能抑制 ICE 介导的细胞凋亡^[4]. 据此, 英国伦敦大学细胞死亡学家 Martin 指出: “ICE 的发现不仅进一步证实细胞凋亡是一个高度保守的过程, 而且也提供了一个新的线索, 即蛋白酶可能参与了细胞凋亡.”

研究的深入又提出有力证据支持了这一论断. Kaufmann 等^[5]应用 VP-16 等基因毒剂 (genotoxins) 诱发 HL-60 细胞凋亡, 采用蛋白质印迹和聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP) 的 McAb 检测凋亡产物时发现: 116 ku 大小的 PARP 被特异地切割成 25 ku 和 85 ku 的凋亡片段 (apoptotic fragment), 而此种切割可因蛋白酶抑制剂的存在而不能发生, 凋亡也不会生成. 其后, 许多研究者相继证实, 这是一种被称之为 CPP32, 也称 YAMA, 或 apopain 的 ICE 样蛋白酶在发挥作用.

2 其他 ICE 样蛋白酶

虽然哺乳动物中 ICE 是第一个被证明在细胞凋亡中发挥重要功能的半胱氨酸蛋白酶, 但是越来越多的证据却揭示: 并非 ICE 本身, 而是 ICE 样的蛋白酶类, 即称之为 ICE homologues 的同源蛋白酶在哺乳动物细胞凋亡中发挥着更为重要的作用. 第一, 一些细胞系只有成熟型 IL-1 β 生成, 但并不会导致凋亡; 第二, ICE 基因敲除 (knock out) 的缺陷小鼠, 经射线等刺激后, 仍可发生凋亡反应^[6]; 第三, Lazebnik 等^[7]建立的体外无细胞体系模型实验更有力地揭示: 经诱导的去核细胞抽提物并不能降解前体 IL-1 β , 但却能降解 PARP, 而 ICE 本身并不能降解 PARP. 目前, 已有 10 种以上 ICE homologues 被发现, 因为它们都是半胱氨酸蛋白酶 (cysteine protease), 而且都是在 Asp 后切割肽键, 故现在已被统一命名为 caspase (即切割 Asp 后肽键的半胱氨酸蛋白酶)^[8]. 按其序列相似性, 可分成两个

亚家族, 即: CED-3 亚家族, 包括 CPP32 (caspase-3), ICE-LAP₃ (caspase-7), FLICE (caspase-8) 等; ICE 亚家族, 包括 ICE (caspase-1), ICE_{rel} II (caspase-4), ICE_{rel} III (caspase-5); 它们的过量表达均可诱发细胞凋亡. 其中, 尤以 CPP32 最为引人注目. 它是 1994 年 Fernandez-Alnemri 等^[9]从 Jurkat T 淋巴细胞中克隆出的一种 caspase, 因其编码蛋白分子质量为 32 ku 而命名, 也是迄今发现的 caspase 家族成员中与 ced-3 同源性最高的, 被认为是哺乳动物中 ced-3 的对应者. 这些 caspase 蛋白分子的共同特征是: a. 活性分子均是大亚基 (17 ~ 22 ku) 和小亚基 (10 ~ 12 ku) 组成的四聚体, 但这两类亚基却是由单一的转录本 (transcript) 转译生成无活性的酶原, 其后在 Asp_x 键处被切割而生成; b. 都有相类似的催化部位, 包括一个含有活性位点 Cys 残基的保守的 QACXG 基元和一个含 His 残基 SHG 的基元; c. 具有自身活化和/或活化其他 caspase 的能力^[10].

应该指出, 已发现的 caspase 蛋白酶在组织分布及降解已知底物的功能上彼此有重叠现象, 但不同细胞系中或同一细胞受不同刺激诱发凋亡过程中, 激活的 caspase 可能不尽相同, 相信随着研究的深入, 将会有新的 caspase 被发现.

3 凋亡底物

与发现越来越多的 caspase 参与细胞凋亡相比, 鉴定它们降解的底物显得更加困难, 但这恰是研究细胞凋亡生成机理的另一个热点. ICE 底物包括 IL-1 β 前体 (proIL-1 β), 它自己的酶原 (proICE), 甚至能激活其他的家族成员酶原, 例如 proCPP32. 而 PARP 则是细胞凋亡中第一个被鉴定的由 caspase 降解的参与 DNA 损伤修复酶^[7]. 最初的研究揭示是一种被称之为 prICE 的类 ICE 蛋白酶作用 PARP, 而进一步的研究则表明: 不是 ICE, 而是 CPP32, Mch-2, ICE-LAP3 在发挥切割活性^[11]. 值得注意的是: PARP 降解究竟如何

导致细胞凋亡仍困扰着科学家们,至今尚无定论.一种观点认为剪切使 PARP 具有结合 DNA 的锌指结构的 N 端与 C 端催化区域分离,其正常功能丧失,受 PARP 负调控影响的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖性核酸内切酶活性增高,裂解核小体间 DNA 而引起凋亡.但是 PARP 基因敲除小鼠基本发育正常,并未能诱发凋亡则显示^[12]:不是直接诱导凋亡,而是丧失了其修复功能,致使不能维系基因组的“稳定”,从而间接促使细胞凋亡.与此相一致的是,新近的研究发现:参与 DNA 双链断裂修复的 DNA 依赖的蛋白激酶 (DNA-PK),其催化亚基在细胞凋亡进程中亦被 caspase 蛋白酶剪切,产生 160 ku 片段^[13].此外,组成一种小核核糖蛋白颗粒 U1 的 70 ku 蛋白 (U1-70 ku) 也被 caspase 家族蛋白酶剪切,生成 40 ku 片段^[14].U1 为剪切 mRNA 前体所必需,而修复往往要依赖新蛋白质的参与,即新 mRNA 的合成,间接表明了修复功能丧失导致细胞凋亡.其他 caspase 作用底物还包括:蛋白激酶 C (PKC),固醇调节因子结合蛋白 (SREBP),核纤层蛋白 lamins, actin, Gas2, 以及成视网膜细胞瘤抑癌基因 Rb 蛋白等.总之,这些底物如 PARP 可被不止一种 caspase 剪切;而 caspase 家族成员中,如 ICE, CPP32 也作用于多个底物.发现更多的作用底物,特别是阐明其降解后细胞学事件当是目前研究的重点.

4 Caspase 活性调控及作用机制

如前所述,已发现的 caspase 蛋白酶都以非活性前体形式产生,要经过活化形成 $(\text{P}20 + \text{P}10)_2$ 四聚体才能发挥酶切活性.而在生物体内,目前至少已发现两种不同的 caspase 激活途径:其一,有些 caspase 作为一系列蛋白酶解级联反应中的下游分子,被其他 caspase 或具有相同切割活性的非 caspase 蛋白酶激活.前者如 ICE 活化前体 CPP32, ICE_{rel} II 激活前体 ICE,而后者则如 granzyme B 作用于 CPP32^[15];其二,另有一些 caspase,则通过

胞内中间分子自身激活进而发挥效应.如 Fas 介导的细胞凋亡中, Fas 与其配基结合后,通过 Fas 的死亡区域 (death domain, DD) 结构与胞内适配子 (adapter) 蛋白 FADD 作用,后者又通过死亡效应区域 (death effector domain, DED) 与 caspase-8 酶原相互作用,从而活化 caspase-8^[16].同样, TNF-R 介导的细胞凋亡中也存在类似的激活通路,只不过多了一个 adapter 分子 TRADD,并且它是不依赖于蛋白质合成的.而令人感兴趣的是,在 TNF 刺激下,细胞还存在一个依赖蛋白质合成、抑制凋亡的保护机制,从而形成一个自我调控回路^[17].

Wang 等^[18]的研究还发现: Ich-1 因其 mRNA 剪切方式不同,存在两种不同转录本,即编码 435 个氨基酸产物的 Ich-1L 和编码 312 个氨基酸的 Ich-1S.有趣的是,两者功能截然相反, Ich-1L 诱导细胞凋亡,而 Ich-1S 则抑制细胞凋亡.联系到 bcl-2 家族成员中 bcl-X 也是通过 mRNA 不同剪切,产生大小不等而作用相反的 bcl-X_S、bcl-X_L 以及新近发现 ced-4 基因也存在作用相反的 ced-4_S、ced-4_L 不同转录产物,可以推测这种活性调节方式也是机体在长期进化过程中形成的对凋亡的一种精细的自我平衡机制.新近 Yang 等^[19]的研究还发现: caspase 激活依赖于线粒体上 Cyt c 的释放,而 bcl-2 也是在线粒体通过与 ced-4 作用抑制 caspase 激活,揭示线粒体的代谢活动及结构功能元件在 caspase 激活及凋亡发生中的重要性.

总之,目前的研究均揭示:作为效应分子的 caspase (如 caspase-2, 3, 7),介导了一个共同的细胞凋亡通路,它们降解维持基因组稳定的蛋白质如 PARP、调控细胞周期的蛋白质如 Rb,或是结构蛋白如 Gas2,以及 DNA 片段产生因子 (DFF) 等,导致:阻抑细胞进程;丧失维持基因组稳定及 DNA 损伤修复机制;促使凋亡细胞同周围组织分离;破坏维系细胞形态的结构蛋白,显现凋亡特征等等^[20].

已有的研究事实均表明:真核细胞凋亡执

行程序中有多种蛋白酶所催化的酶解反应及其酶解机制的调控, 对于决定细胞凋亡的命运是至关重要的。这些蛋白酶不仅包括切割 Asp-X 的 caspase, 还涉及其他蛋白酶, 如 Ser 蛋白酶类, 钙依赖的中性蛋白酶 (calpains), 以及由泛素介导的蛋白酶解 (ubiquitin-mediated proteolysis) 反应, 本文论述的研究表明: 正如 CED-3 在线虫凋亡中的重要地位, caspase 在哺乳动物细胞凋亡中亦发挥着同样重要的功能。而新近对线虫的研究进展揭示^[20]: 在这个执行阶段至少涉及四个组成部分, 即 CED-3/caspase、CED-9/Bcl-2、CED-4 和线粒体的参与, 但这些关键元件如何在分子水平上发挥作用有待进一步阐明。

参 考 文 献

- 1 Yuan J, Shaham S, Ledoux S *et al.* The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell*, 1993, **75** (4): 641~ 652
- 2 Miura M, Zhu H, Rotello R *et al.* Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*, 1993, **75** (4): 653~ 660
- 3 Komiyama T, Ray C, Pickup D *et al.* Inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. *J Biol Chem*, 1994, **269** (30): 19331~ 19337
- 4 Los M, Van de Crean M, Penning L C *et al.* Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/Apo-1-mediated apoptosis. *Nature*, 1995, **375** (6526): 81~ 83
- 5 Kaufmann S H, Desnoyers S, Ottaviano Y *et al.* Specific Proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, 1993, **53** (17): 3976~ 3985
- 6 Kuida K, Lipke J A, Ku G *et al.* Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 β -converting enzyme. *Science*, 1995, **267** (5206): 2000~ 2003
- 7 Lazebnik Y A, Kaufmann S H, Desnoyers S *et al.* Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, 1994, **371** (6495): 346~ 347
- 8 Alnemri E S, Livingston D J, Nicholson D W *et al.* Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 1996, **87** (2): 171~ 171
- 9 Fernandes Alnemri T, Litwack G, Alnemri E S. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein *Ced-3* and mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *J Biol Chem*, 1994, **269** (49): 30761~ 30764
- 10 Patel T, Gores G J, Kaufmann S H. The role of proteases during apoptosis. *FASEB*, 1996, **10** (5): 587~ 597
- 11 Nicholson D W, Ali A, Thornberry N A *et al.* Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 1995, **376** (6535): 37~ 43
- 12 Whyte M, Evan G. The last cut is deepest. *Nature*, 1995, **376** (6535): 17~ 18
- 13 Song Q, PLees Miller S, Kumar S *et al.* DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J*, 1996, **15** (13): 3238~ 3246
- 14 Casciola-Rosen L A, Miller D K, Anhalt G J *et al.* Specific cleavage of the 70-Kda protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J Biol Chem*, 1994, **269** (49): 30757~ 30760
- 15 Quan L T, Tewari M, O' Rourke K *et al.* Proteolytic activation of the cell death protease Yama/CPP32 by granzyme B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (5): 1972~ 1976
- 16 Muzio M, Channaiyan A M, Kischkel F C *et al.* FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3 like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, 1996, **85** (6): 817~ 827
- 17 Wallach D. Cell death induction by TNF: a matter of self control. *TIBS*, 1997, **22** (4): 107~ 109
- 18 Wang L, Miura M, Bergeron L *et al.* Ichr-1, an ICE/CED-3 related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell*, 1994, **78** (5): 739~ 750
- 19 Yang J, Liu X, Bhalla K *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of Cytochrome C from mitochondria blocked. *Science*, 1997, **275** (5303): 1129~ 1132
- 20 Nicholson D W, Thornberry N A. Caspases: killer proteases. *TIBS*, 1997, **22** (8): 299~ 306
- 21 Golstein P. Controlling cell death. *Science*, 1997, **275** (5303): 1081~ 1082

Caspase and Apoptosis. TONG Xin, SUN Zhixian (*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Since the discovery of structural and functional similarities between the product of the nematode cell death gene *Ced-3* and mammalian interleukin-1 β -converting enzyme (ICE), an expanding family of cysteine proteases genes have been cloned and shown to play a key role in execution stage of mammalian cell apoptosis. Several substrates are found to be cleaved by the active ICE/CED-3 proteases (because of cysteine protease with aspartates specificity, also called caspase), and subsequent cytological effect is induced.

Key words ICE/CED-3 protease, caspase, apoptosis