

生物膜信号转导与细胞凋亡

辛宏* 颜光涛 陈泮藻

(解放军总医院基础医学研究所生化研究室, 北京 100853)

摘要 胞外信号可经过相应的转导途径传至胞内, 通过激活靶分子而产生细胞效应. 细胞凋亡是受控于生物体精确调节的细胞主动消亡过程, 具有独特而复杂的信号系统. 特异性的胞膜蛋白及膜脂等皆可介导凋亡相关分子的级联激活, 并通过活化凋亡关键调节分子 Caspases 蛋白酶家族, bcl-2 基因家族及线粒体等而影响凋亡的进程.

关键词 凋亡, Caspases 蛋白酶, bcl-2, 线粒体

学科分类号 Q73

大量的胞外刺激信号是通过膜受体的活化而引发相关信使分子的级联激活, 进而传递到细胞内的靶分子而产生相应的生物学效应. 这构成了细胞信号转导这一复杂过程. 细胞凋亡是在进化上高度保守且受控于生物体精确调节的细胞主动消亡过程, 对其胞内信号转导途径的研究正处于探索阶段. 由于对这种新的细胞死亡模式的认识有助于理解诸如胚胎发育、免疫自稳、肿瘤发生等重要的生命现象, 因而相关研究很快成为生命科学中的前沿领域之一. 本文仅就生物膜及其信号转导与细胞凋亡相关的几个方面予以探讨.

1 凋亡时质膜的典型变化——磷脂酰丝氨酸的暴露

高度不均一的磷脂是构成生物膜的重要组成部分, 也是磷脂肌醇信号途径活化及重要脂类信使分子如肌醇三磷酸 (IP3)、二酰基甘油 (DG)、花生四烯酸 (AA) 等产生的来源. 凋亡信号作用于细胞, 可引起胞内 Ca^{2+} 水平升高, 激活 ATP 非依赖型爬行酶 (ATP-independently operating scramblase), 加速膜内磷脂组分的双向运动, 导致膜脂双层不对称性的丧失, 最突出的变化是磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 暴露于质膜的外表面. 此过程一方面提供巨噬细胞及网状内皮系统 (reticuloendothelial system, Res) 的吞噬靶点, 防止炎性内容物释放, 同时成为细胞凋亡的早期事件^[1]. 触发 PS 暴露的始发因子并不明确, Jianguo 等^[2]发现 etoposide 诱导人单核细胞系 THP1 细胞凋亡时, 半胱天冬酶-7 (caspase-7) 的活化先于 PS 暴露, 应用 caspase 抑制剂 α -VAD-fmk 可阻滞此过

程; 同时发现 α -VAD-fmk 可抑制线粒体跨膜电位 $\Delta \Psi_m$ 下降, 但并不影响细胞色素 c (Cyt c) 的释放, 这也提示 Cyt c 的信号位于 PS 暴露的上游. 相关研究仍在探索中.

2 特异胞膜蛋白介导的凋亡通路——死亡受体通路

当细胞失去与外界的联系或内部发生难以修复的损伤则启动凋亡, 使生物体能够自主性地指导个体细胞自我消失, 如淋巴细胞分化过程中的凋亡调控. 在这类有意义的凋亡调节中, 死亡受体介导的凋亡通路发挥了核心作用. 死亡受体是存在于膜表面传导由特定死亡配体介导的凋亡信号的受体, 是 I 型或 II 型膜蛋白. 这些受体可以在与配体结合数秒内激活 Caspases 蛋白酶, 数小时内引起细胞凋亡, 也是目前被认为的一条不涉及基因表达的凋亡通路. 目前已有 Fas、TNFR1、DR3/Wsf-1-1、CAR1、DR4、DR5 等死亡分子受体被确定, 它们属于肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族, 蛋白质结构的共同特点是胞质区含有与介导死亡信号相关的死亡结构域 (death domain, DD)^[3].

2.1 Fas/CD95 信号转导

Fas/CD95 是最典型的死亡受体, 属于 I 型膜蛋白. Fas 配体 (FasL) 以同源三聚体形式存在, 与 Fas 结合后使胞内三个死亡结构域相聚, 再通过与 Fas 相关死亡受体结构域 (Fas associated death domain, FADD) 结合而激活凋亡蛋白酶, 将凋亡

* 通讯联系人.

Tel: 010-62773625, E-mail: xinhuisy@sohu.com

收稿日期: 2000-02-02, 接受日期: 2000-04-18

信号由胞外传至胞内。目前认为 DD 对于受体与配体的结合是必需的,但并不直接传递凋亡信号,必须有下游的中介蛋白如 FADD 的存在才能诱导凋亡。FADD/MORT1 是 1995 年 Chinnaiyan 等^[4]鉴定的含有 DD 结构域的蛋白质,DD 位于肽链 C 端,N 端则含有死亡效应结构域 (death effector domain, DED),FADD 正是通过一端的 DD 与死亡受体偶联,通过另一端的 DED 募集 caspase-8,使后者激活而介导凋亡信号传递^[5],因此 FADD 是极为重要的激活 caspases 蛋白酶的中介分子。

2.2 TNFR1 信号转导

与 Fas 信号途径相似,但 TNFR1 活化后,与之结合的是 TNF 受体相关死亡结构域 (TNF receptor associated death domain, TRADD)。TRADD 不能直接偶联 caspases 家族蛋白,必须再通过 FADD 的作用。TRADD 犹如一个平台,一面通过 DD 的相互作用与 FADD 结合,激活凋亡途径;另一面则可以结合同样含有 DD 的中介分子-受体相互作用蛋白 (receptor interacting protein, RIP),后者再结合 TNFR 相关因子 2 (TNF receptor associated factor 2, TRAF2),TRAF2 信号激活导致 I κ B 磷酸化而引起蛋白质降解,使与之形成复合物而存在于静止细胞内的 NF- κ B 释放,进入核内,活化编码存活因子的基因,从而抑制凋亡^[6]。这一机制可能解释下面的实验现象:在许多细胞系中 Fas 不活化 NF- κ B,但却比能活化 NF- κ B 的 TNFR1 更有效地介导凋亡。

2.3 TRAIL 介导的凋亡信号通路

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 (TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 是 1995 年由 Wiley 小组克隆、命名的一个新的肿瘤坏死因子家族成员,是分子质量为 32.5 ku 的 II 型跨膜糖蛋白^[7]。两年后克隆了第一个 TRAIL 受体 DR4。目前发现的人 TRAIL 受体有 4 种:死亡受体 4, 5 (death receptor, DR4、DR5),假受体或诱骗受体 1, 2 (decoy receptor, DcR1、DcR2)。虽然 TRAIL 诱导凋亡依赖于受体胞内区的 DD,但激活途径并不明确,目前发现的接头分子如 FADD、TRADD、RIP 和 RAIDD 都不能与 DR4 结合,尚不能确定 DR5 是否能与 FADD 结合,但 caspases 的抑制剂 CrmA、 α -VAD-fmk 和 Ac-DEVD-CHO 均能有效地阻止 TRAIL 诱导的细胞凋亡,说明更下游的 caspases 级联激活是必需的,提示 DR4 可能由新的 caspases 分子介导其信号途径^[8]。

TRAIL 诱导凋亡的重要特点是诱导肿瘤细胞凋亡,而正常细胞不敏感。最初推测可能是正常组织不表达或仅在特殊情况下才表达 DR4,肿瘤细胞则高表达。但随后 DcR1 和 DcR2 的发现揭示了一种受体间竞争性抑制配体的细胞凋亡调控机制: DcR1、DcR2 与 DR4、DR5 膜外区高度同源,但无胞内区或无完整的 DD,且在正常组织中广泛表达,肿瘤组织中未见,因此竞争性结合 TRAIL 而使正常组织免受攻击,这也预示着其肿瘤治疗的潜在靶点^[9]。因此对 TRAIL 介导的凋亡信号转导及功能的研究形成了一个新的热点。

3 膜脂相关的凋亡通路

膜脂参与凋亡诱导的最直接证据是神经鞘磷脂循环活化——神经酰胺 (ceramide, CM) 释放。神经鞘磷脂 (SM) 是一种主要分布于哺乳动物细胞膜表面的磷脂,它不仅维护着膜结构的完整性,而且是胞内脂类信使分子产生的源头,在神经鞘磷脂酶 (SMase) 的水解下产生磷脂酰胆碱和神经酰胺,后者能特异性地将表面受体和环境刺激所产生的信号与细胞核偶联,如细胞分化、生长抑制、周期阻滞、DNA 应激损伤等。神经酰胺作为细胞凋亡胞内信号的最初证据是 1993 年 Obeid 等^[10]发现 U937 细胞中加入 α -ceramide 可以产生与 TNF α 诱导细胞凋亡同样的结果,随后相关研究显示 CM 可通过激活 caspases 诱导凋亡,过度表达的 bcl-2 则抑制此过程,同时也发现 CM 与线粒体膜通透性改变密切相关。最近研究发现应激刺激引起某些细胞凋亡过程中伴有 CM 明显上升,细胞可渗透性神经酰胺的加入可产生同样结果,并导致浓度依赖的 SAPK/JNK 激活,包括 MEK1、SEK1、C-Jun 的顺序激活,其他脂类如 DAG、AA 没有此作用。提示应激刺激引起的凋亡能通过 CM 激活 MAPK 通路中的 JNK/SPAK 信号途径来介导^[11]。目前,有关 MAPK 通路在死亡受体介导细胞凋亡中的作用尚有争议;与 caspases 蛋白酶家族的关系也有待于进一步探讨,而在这二条重要途径中都有脂类信使神经酰胺的参与,显示其在细胞凋亡信号转导途径中的作用和机制精细而复杂,远未阐明。

4 凋亡信号转导中的关键调节因子

遗传学研究提示,虽然诱导细胞凋亡的信号各异,但其生化特征及死亡通路在进化中存在高度保守性,此过程一般必须经过凋亡诱导-调控执行-效

应三个阶段。目前,在细胞凋亡的信号调节中被认为有三个关键的调控关卡 (check points): 半胱天冬酶 (Caspases 蛋白酶) 家族、bcl-2 基因家族及线粒体。这些分子的相互作用,对于共同的凋亡调控执行通路有着极其重要的影响。

4.1 半胱天冬酶家族

这是存在于胞浆内,目前被认为与凋亡最为密切相关的一类蛋白酶,属于半胱氨酸蛋白酶家族,也称为 ICE/CED-3 蛋白酶、凋亡蛋白酶或 Caspases 蛋白酶。人们对细胞凋亡相关研究的认识主要来自发育生物学。秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 发育过程的探索对细胞凋亡研究的贡献尤为突出。*C. elegans* 共有 1 090 个体细胞,在发育过程中有 131 个细胞发生程序性死亡,目前至少已鉴定出 14 个基因涉及此过程,称为细胞死亡变异基因 (cell death abnormal, ced),其中最重要的是促进细胞死亡的 ced-3、ced-4 和抑制细胞死亡的 ced-9。1993 年 Yuan 等^[12] 报告人类 IL-1 β 转换酶 (interleukin 1 β -converting enzyme, ICE) 与 *C. elegans* 的 CED-3 高度同源,揭开了 ICE 蛋白酶与凋亡研究的进程,这是细胞凋亡研究中的重大进展。如今至少已发现了 13 个成员,按其发现顺序,统一命名为 caspases 蛋白酶 (caspase-1~13)。这些蛋白质转染组织细胞后均能诱导细胞凋亡,具有相似的氨基酸序列和结构,活性部位含半胱氨酸,在天冬氨酸之后切割底物蛋白。

caspases 在细胞中都是以酶原 (procaspases) 的形式被合成的,前体包括三个结构域: N 端的前结构域,对应于成熟蛋白大亚基 (20 ku) 和小亚基 (10 ku) 的两个结构域。含有长前结构域的 procaspases (-2、-8、-9、-10 等) 称为上游或起始 procaspases,它们是刺激信号最先激活的酶,并且可以激活下游或效应 caspases,即含有短前结构域的 procaspases (如-3、-7、-6 等),后者可直接切割死亡底物,如聚腺苷二磷酸核糖基聚合酶 (PARP)、核纤层蛋白 (lamins)、氨甲酰磷酸合成酶 (CAD)、肌动蛋白 (actin) 而执行凋亡。

虽然 caspases 可以通过相互切割而活化,但最近的生化分析指出, caspases 通过接头蛋白的介导而发生的募集和寡聚化是其激活的一个基本机制。procaspases 前结构域可按其同源性分为两类: procaspase-1、-2、-4、-5、-9 的前结构域称为 caspase 募集结构域 (caspase recruitment domain, CARD); 另外一类 procaspase-8、-10 含有串联的

DED。含有 DED 结构域的接头分子 FADD 可以募集含有同样结构的 procaspase-8 而使之激活,激活的 caspase-8 可以进一步激活效应 caspase-3,切割底物蛋白而引起凋亡。在 procaspase-9 的激活中,主要是接头分子凋亡蛋白活化因子 1 (apoptosis protein activating factor 1, Apaf 1) 与 Cyt c 的相互作用。Apaf 1 是 1997 年发现的与 CED-4 高度同源的蛋白,肽链中段是 CED-4 的同源序列, N 端是 CARD 域, C 端有 Cyt c 的结合部位。凋亡信号通过线粒体传递,引起 Cyt c 释放, Cyt c 结合于 Apaf 1 使之构象改变,暴露 CARD,通过 CARD 募集含同样结构域的 procaspase-9 而使之激活,后者再酶解 procaspase-3,释放出 C 端小肽片段而活化 caspase-3。因此 Apaf 1 是线粒体参与凋亡调节的关键中介因子。虽然有关 caspases 蛋白酶研究的很多问题并不清楚,如哺乳动物细胞内存在众多 caspases 的意义,它们之间的相互作用,特别是对其底物的鉴定等还远未阐明,但 caspases 家族的发现,揭示了凋亡通路中的关键调节点,这一蛋白酶家族不论在决定线虫类还是哺乳类细胞凋亡的生化事件中起关键作用^[13]。

4.2 bcl-2 基因家族及线粒体

bcl-2 家族是凋亡信号调节中最重要的基因家族。自发现 *C. elegans* 的抑调基因 CED-9 与 BCL-2 基因高度同源 (两者氨基酸序列有 24% 相同, 49% 相似),使人们对 BCL-2 在凋亡调节中的作用和地位有了进一步的认识。此家族目前至少已发现 15 个成员,按其功能可分为抗调 (如 bcl-2、bcl-XL 等) 和促调 (bax、bad、bid 等) 两大亚族。

线粒体参与凋亡调控研究的历史并不长。1993 年 Kroemer 等研究证实,多种凋亡因子如 TNF、anti-Fas、谷氨酸等诱导细胞凋亡时,线粒体跨膜电位 $\Delta \psi_m$ 下降; 1994 年 Newmeyer 等发现用线粒体在爪蟾卵细胞胞质中孵育后能产生一种快速诱导细胞凋亡的可溶性蛋白; 1995 年 Wang 等将其纯化并鉴定是细胞色素 c; 1997 年 Kluck、Yang 等^[14] 提出, Cyt c 释放是先于线粒体 $\Delta \psi_m$ 下降和 PTP 的开放。因此,目前认为线粒体是细胞内死亡信号途径的重要感受者与放大者。

BCL-2 对凋亡的调控目前认为主要是通过通过对线粒体相关信号的抑制或激活而起作用。BCL-2 蛋白的亚细胞定位主要是线粒体,它的 C 端作为信号锚 (signal anchor) 序列插入线粒体外膜,胞浆部分可与 BCL-2 家族成员形成不同质和量的同源或

异源二聚体, 抑制或促进细胞凋亡. 过表达 BCL-2、BCL-XL 均可阻止 Cyt c 从线粒体向胞浆流动, 因而抑制其对凋亡的诱导, 这可能与下列因素有关: BCL-2 通过与 Apaf-1 的直接结合而阻止 caspase-9 的激活; BCL-XL 与 Cyt c 直接结合而减少其释放; BCL-2 与线粒体外膜的结合稳定线粒体功能等^[15].

最近有研究表明含有 BH3 (bcl-2 homology) 结构域的死亡促进剂在死亡信号途径中有重要调节作用, BH3 结构域的突变可以破坏这些蛋白质与 BCL-2 的相互作用, 将显著降低它们诱导死亡的能力. 含 BH3 的蛋白质还可通过直接作用来抑制抗凋亡蛋白, 或从 BCL-XL-Apaf-1-Cyt c 复合物中将 BCL-XL 置换出来, 导致 caspases 激活. 另外含 BH3 结构域的蛋白质从胞浆向线粒体的转运已被证实, 哺乳动物中的 Bid 蛋白是 Fas 信号途径中 caspase-8 的一个特定的相邻底物, Bid 不含跨膜区, 定位于胞浆, 被 caspase-8 活化后, Bid 蛋白质从胞浆内转移至线粒体膜上, 介导死亡信号的传递. 其他成员如 Bax 可能是结合 PTP 的复合物, 通过增强线粒体膜的通透性而导致细胞凋亡.

总之, 真核细胞凋亡信号转导途径是极其复杂和精细的调控网络, 涉及众多的信号分子, 除本文中涉及的内容, P53 基因、MAPK 通路、PTK-STAT 途径等在凋亡调控中都有重要地位, 这些关键元件如何在分子水平上相互作用有待于进一步探讨.

参 考 文 献

- 1 Bevers E M, Comfurius P, Dekkers D W, *et al.* Regulatory mechanisms of transmembrane phospholipid distributions and pathophysiological implications of transbilayer lipid scrambling. *Lupus*, 1998, 7 (suppl 2): s126~ 131
- 2 Jianguo Z, Gerald M C. Release of mitochondrial cytochrome c is upstream of caspase activation in chemical-induced apoptosis in human monocytic tumour cells. *Toxicology Letters*, 1998, **102-103**: 121~ 129
- 3 Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S. Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J Immunol*, 1993, **151** (2): 621~ 627
- 4 Chinnaiyan A M, O'Rourke 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
- 5 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
- 6 David W, Mark B, Eugene V, *et al.* Cell death induction by receptors of the TNF family towards a molecular understanding. *FEBS letters*, 1997, **410** (11): 96~ 106
- 7 Wiley S R, Schooley K, Smolak P J, *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995, **3** (6): 673~ 682
- 8 Pan G H, Ni J, Wei Y F, *et al.* An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, 1997, **227** (5327): 815~ 818
- 9 Ashkenazi A, Dixit V W. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, **11** (2): 255~ 260
- 10 Obeid L M, Linardic C M, Karolak L A, *et al.* Programmed cell death induced by ceramide. *Science*, 1993, **259** (5102): 1769~ 1771
- 11 Huq R, Zanke B. Inhibition of apoptotic signaling pathway in cancer cells as a mechanism of chemotherapy resistance. *Cancer Metastasis Rev*, 1998, **17** (2): 233~ 239
- 12 Yuan J Y, 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
- 13 Nicholson D W, Thornberry N A. Caspases: Killer proteases. *TIBS*, 1997, **22** (8): 299~ 306
- 14 Kluck R M, Bossy-Wetzel E, Green D R, *et al.* The release of cytochrome C from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 1997, **275** (21): 1132~ 1136
- 15 Yang J, Liu X, Bhalla K, *et al.* Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked. *Science*, 1997, **257** (21): 1129~ 1130

1 Bevers E M, Comfurius P, Dekkers D W, *et al.* Regulatory mechanisms of transmembrane phospholipid distributions and

Biomembrane Signal Transduction and Apoptosis

XIN Hong, YAN Guang-Tao, CHEN Ban-Zao

(Biochemistry Laboratory of the PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract A variety of extra-cellular signals could activate the target molecules and induce the associated biological effects depended on different signal pathways. Apoptosis, or programmed cell death, is a conservation process essential for normal development and homeostasis of biologist. It's known that a number of factors and pathways can lead to apoptosis. Specific phospholipids and proteins of biomembrane could activate the signal cascades of apoptosis. The interaction of caspases, bcl-2 family and mitochondria play an essential role in regulation of apoptosis.

Key words apoptosis, caspase, bcl-2 gene, mitochondria