

细胞凋亡的调控机制

邓爱华¹ 曲宁¹ 王言帅² 吴学记¹

(¹厦门大学-新加坡国立大学共建生物医学科学实验室,厦门大学生命科学学院,厦门大学医学院 厦门 361005,²英科创新厦门科技有限公司)

【摘要】 细胞凋亡 (apoptosis), 亦称程序性细胞死亡 (programmed cell death), 是生物体细胞受基因精确调控的主动消亡过程, 是多细胞有机体调控机体发育、维持内环境稳定的重要机制。细胞凋亡涉及到细胞内许多复杂的生化过程, 包含了复杂的调控机制, 有多种分子参与、多重信号转导通路介导其调控。本文结合细胞凋亡调控机制的最新研究进展, 对配体结合死亡受体的机制、bcl-2 家族蛋白的作用、caspase 的活化、抑制以及对抑制的解除在凋亡调控中的重要作用做一综述。

【关键词】 细胞凋亡; 配体; 死亡受体; bcl-2 家族蛋白; caspase

细胞凋亡 (apoptosis) 又称程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD), 是多细胞有机体调控机体发育, 维持内环境稳定的重要机制; 受细胞内源性基因、酶类和信号转导途径的调控。凋亡刺激信号: 如病毒感染、生长因子缺乏、fas/apo-1 配体、TNF- α /TNFR1 等启动凋亡; 凋亡信号的传导由 p53、caspase (cytosolic aspartate-specific proteases)、fas 相关死亡结构域 TRADD 等介导; 细胞凋亡的调控和执行由 bcl-2 蛋白家族, 细胞色素 c 和 caspase 参与; 最终导致内源性核酸酶激活和细胞骨架重组, 细胞结构解体。caspase 是推动细胞凋亡形成的主要因素之一。机体内存在促凋亡因子和抗凋亡因子两类影响细胞凋亡的因子; 促凋亡因子有: bax/bak、smac/DIABLO 等, 抗凋亡因子有 bcl-2、IAPs 等。促凋亡因子和抗凋亡因子共同调节使得细胞凋亡得以程序性进行。

1 细胞内途径和细胞外途径凋亡

在哺乳动物细胞中, 依据细胞凋亡发生的信号转导途径, 将细胞凋亡分为线粒体通路介导的细胞内凋亡途径及死亡受体通路介导的细胞外凋亡途径。分别由胞内、外环境中细胞凋亡刺激因子引发。

DNA 损伤等胞内刺激引起 bcl-2 家族 BH3-only 蛋白的活化, 使促凋亡因子 (proapoptotic factors) 从线粒体膜间隙释放到胞质中^[1]。这个过程由 bax 和 bak 介导并与抗凋亡蛋白 bcl-2 和 bcl-xl 相互作用。线粒体释放的蛋白因子-细胞色素 c, 直接激活 apaf-1, 并且在 dATP 或 ATP 的存在下, 诱导多聚复合物凋亡小体的形成。凋亡小体介导起始 caspase (caspase-9) 的活化, 即: procaspase-9 通过 CARD (caspase activation and recruitment domain) 结构域之间的相互作用聚集并导致自我激活。活化的 caspase-9 再激活效应 caspase (caspase-3, 7), caspase-3、7 酶解强 DNA 水解酶 DFF40/CAD 的抑制蛋白 DFF45/ICAD, 从而释放活性 DFF40/CAD 裂解 DNA。另一种核酸酶 G 也从线粒体中释放出来, 参与 DNA 的降解, 执行细胞凋亡, 导致凋亡细胞解体。同时活化的 caspase 亦受凋亡抑制蛋白 (IAP) 的抑制^[2]。smac/DIABLO 是在细胞凋亡过程中从线粒体释放出来的另一种蛋白质, 与多数凋亡抑制蛋白相互作用, 可以解除凋亡抑制蛋白对 caspase 的抑制作用。

胞外死亡刺激物: 如 fas 配体, 在质膜上合成死亡诱导信号复合物 (death-inducing signaling complex, DISC)^[3]。与受体结合后, 通过一种叫 FADD (fas-associated death domain) 的衔接蛋白 (adaptor) 诱导起始 caspase (procaspase-8 或 10) 聚集, 这种聚集通过在 procaspase-8 和 FADD 中均含有的 DED 结构域 (death effector domain) 的疏水作用实现。procaspase-8 本身具有部分蛋白质水解酶活性, procaspase-8 聚集体已足够通过自身或相

互之间的水解酶切割产生成熟的 caspase-8。与之相似, procaspase-2 可以由接头蛋白 RAIDD 介导通过 CARD 结构域 (caspase activation and recruitment domain) 的相互作用聚集并激活。活化后的起始 caspase 又可激活下游的效应 caspase (caspase-3, 7)。

线粒体起始的内凋亡途径和死亡受体起始的外在凋亡途径通过 caspase-3、7 汇合, 促凋亡成员 bid (bcl-2 家族 BH3-only 蛋白) 是 caspase-8 的底物, bid 裂解后, 其 C 末端片段转移到线粒体的外膜, 诱导前凋亡因子释放^[4]; 因此, bid 连接了细胞内凋亡和细胞外凋亡途径。

2 细胞外凋亡途径起始因子及其识别机制

2.1 死亡受体和死亡配体

死亡受体位于细胞表面, 胞外具 CRDs (cysteine-rich domains) 结构域, 属于肿瘤坏死因子 (TNF) 家族蛋白, 最具代表性的死亡受体包括 TNFR1 (p55 或 CD120a)、fas (apo1 或 CD95)、和 DR3 (apo3 或 wsl1)。死亡受体均含有一个与衔接蛋白 (adapter protein) (如: FADD 和 TRADD) 聚集有关的死亡结构域 (death domain, DD)。

活化的死亡配体如: fas 配体为同三聚体, 可与死亡受体结合而形成寡聚复合物, 导致受体相关的接头分子与其他效应蛋白在质膜上形成复杂的 DISC, 例如, FADD 的死亡效应区 (death effector domain, DED) 与 procaspase-8 的前结构域 (含两个 DED) 相互作用, 使得 procaspase-8 相互靠近并自我激活。

2.2 配体结合死亡受体的机制

死亡配体 (以 TNF- α 和 TNF- β 为例) 的功能取决于它们的三聚体结构。每个单体形成一个 β -折叠, 三个单体聚集在一起形成一个铃状的同三聚体结构。死亡受体 TNFR1 的胞外结构域与配体 TNF- β 结合而活化, 暴露出死亡配体的特异性识别位点。在这个复合物中, 一分子 TNFR1 的四个 CRDs 区垂直聚集在一起形成棒状结构, 每一个 TNFR1 棒状结构域与相邻的两个 TNF- β 相互作用, CDR2 区的突出环 (50s loop) 和 CDR3 区的突出环 (90s loop) 与 TNF- β 的两个不同的区域相互作用, 最终导致受体的胞质区聚合在一起。

3 细胞内凋亡途径起始因子及其识别机制

3.1 bcl-2 家族蛋白

bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡的调控中起着重要作用。已有 20 多种 bcl-2 家族成员被鉴定出来, 它们在氨基酸顺序和功能上具保守性。bcl-2 家族包括促进和抑制细胞凋亡两大类成员。一类是抑制细胞凋亡: 如哺乳动物的 bcl-2、bcl-xl 以及线虫的 CED-9 等。另一类是促进细胞凋亡: 如 bax、bak、bid、bad 等。bax 和 bak 在无凋亡信号时, 分别以无活性的单体形

¹ 通讯作者吴学记 Tel: +86-592-2184395; E-mail: Xuejiwu@hotmail.com

式存在;激活后以孔洞结构的寡聚体形式存在。有研究认为 bax 寡聚物、bak 寡聚物皆可介导线粒体蛋白细胞色素 c 的释放。此外, bcl-2 家族蛋白还包含不同数量的 bcl-2 保守区域 (BH1-BH4), 其中, bcl-2/bcl-xl 亚族包括含有 BH1 到 BH4 四个保守区域, 而 bax/bak 缺少 BH4 区。

3.2 BH3 区的识别

bcl-2 家族中抑制和促进细胞凋亡两类蛋白的比例决定了细胞在受到凋亡信号刺激时是否发生凋亡, 这种比例的变化部分是由于抗凋亡蛋白或促凋亡蛋白竞争性地与凋亡信号蛋白的聚集。哺乳动物抗凋亡蛋白 (bcl-xl) 和促凋亡蛋白 (bak, bad 及 bim) 都可与凋亡信号蛋白结合。同时抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白亦可通过 BH3 区结合, bad 的 bh3 区形成一个两性的 α 螺旋, 与 bcl-xl 表面一个深的疏水槽相互作用, bcl-xl 与 bad 的 BH3 区结合后, 其构像发生改变。与此相似, 线虫的抗凋亡蛋白 CED-9 可与其促凋亡蛋白 EGL-1 的 BH3 区结合。CED-9/EGL-1 复合体与 bcl-xl/bim 复合体的结合部位有相似的结构特点, 尽管 bcl-xl 与 CED-9 的序列相似性很小。对这些蛋白复合物结构的比较分析将有可能揭示出 bcl-2 家族蛋白相互作用的机制^[5]。

4 细胞凋亡的效应 caspase

4.1 起始 caspase (initiator) 和效应 caspase (effector)

在凋亡中起作用的 caspase 可分为两类: 起始 caspase (Initiator) 和效应 (caspase effector)。起始 caspase 包括 8、9、10 等, 负责对凋亡的刺激信号作出反应, 启动细胞的自杀过程; 效应 caspase 包括 3、6、7 等, 是在细胞凋亡过程中的具体执行者, 完成对特定蛋白底物的水解。起始 caspase 的 NH2 末端有一个对其功能十分重要的大于 90 a. a. 的前结构域 (prodomain), 而效应 caspase 的前结构域只含有 20-30 个残基。所有 caspase 在细胞中均以无活性的酶原形式合成, 受到凋亡信号诱导时, 由蛋白酶水解活化而起作用。效应 caspase 被起始 caspase 激活, 而起始 caspase 在凋亡条件下自我激活。

4.2 caspase 的结构特征

所有 caspase 的活性位点均高度保守, 由 5 个突出环: 即一个单体上的 L1、L2、L3、L4 和邻近另一单体上的 L2' 共同组成。L1 和 L4 组成底物结合槽的两个侧面, L3 位于槽的底部, 含有催化残基 Cys 的 L2 位于槽的尾部, 以平衡 cys。这四个环决定了底物的序列特异性, 而邻近单体上的 L2' 则是通过与 L2、L4 相互作用形成环束来稳定活性位点的构像^[6,7]。活化前后, 5 个活性位点环发生了显著的构像变化; 以 caspase-7 为例: 在 caspase-7 酶原中 L2 翻转 180°, 环束构像消失, 形成一种紧密构像。这种构像中不存在底物结合槽, 这也进一步解释了为何酶原无催化活性。

5 凋亡的抑制因子 (inhibitor of apoptosis, IAP)

IAP 蛋白家族通过对 caspase 的负调控来实现对凋亡的抑制^[2]。哺乳动物有 8 种不同的凋亡抑制因子 (IAPs): XIAP、c-IAP1、c-IAP2、ML-IAP/Livin、ILP-2、NAIP、bruce/apollon 和 survivin。caspase-3、7 除了能受 XIAP 的抑制外还能受 c-IAP1、c-IAP2 和 NAIP 的抑制; caspase-9 能与多种 IAPs 结合, 但它主要受 XIAP 的抑制^[2]。IAPs 的突出特征是至少含有一个保守的 Zn²⁺ 结合结构域 BIR (baculoviral IAP repeat); 其结构特征为: 中央三条反向 β 折叠, 外面围绕 4 个 α 螺旋, 同时含有 4 个保守氨基酸残基: 三个 cys 和一个 his, 与 Zn²⁺ 形成配位键^[8]。

大多数的 IAP 包含一个以上的 BIR 结构域, 不同的 BIR 结构域具有不同的功能。XIAP 中 BIR3 能强烈抑制 caspase-9, 而 BIR2 和 BIR1 的连接区主要抑制 caspase-3、7。survivin 只含一

个 BIR 结构域, 以同二聚体形式存在, 在体外不抑制 caspase 的活性。ML-IAP/Livin 被报道既能抑制 caspase-3 又能抑制 caspase-9^[9,10], 但这一结论还没有得到序列分析的支持。

5.1 效应 caspase 的抑制

通过研究 caspase-3 和 7 与 XIAP 的 BIR2 结构域前的抑制性多肽片段结合的结构特征, 揭示了 IAPs 介导的对效应 caspase (caspase-3、7) 的抑制机制^[6]: XIAP 的 BIR2 结构域前的抑制性多肽片段占据 caspase-3、7 的活性位点槽, 阻止底物的进入, XIAP 与 caspase-3、7 的相互作用类似于多肽抑制物 Asp-Glu-Val-Asp。但与共价多肽抑制物相比, XIAP 片段以一种相反的方向占据活性位点槽^[11]。

尽管 XIAP-BIR2 前的肽片段对 caspase-3、7 的抑制起重要作用, 但仅有这个肽片段本身是不够的^[6,11], 它周围还需要适当的 BIR 结构域的存在, 这说明 XIAP-BIR2 与 caspase-3 也有相互作用。

5.2 caspase-9 的抑制

只有加工处理过的 caspase-9 才能被 XIAP-BIR3 抑制, 因其与 BIR3 结合必需的 caspase-9 小亚基的 NH2 末端才被暴露出来^[12]。在没有受抑制的情况下, 加工后的 caspase-9 严格以单体的形式存在; 在受抑制时, XIAP-BIR3 的保守表面槽与 caspase-9 小亚基 N 端四肽相互作用加以识别。BIR3 结构域再通过另一个表面与 caspase-9 形成二聚体从而抑制 caspase-9 活性^[13]。

对 caspase-9/BIR3 的结构和生化分析得出一个重要结论: BIR3 与 caspase-9 的结合是必要的但对其抑制是不够的。对 caspase-9 同二聚化接触面的识别需要 XIAP-BIR3 的四个氨基酸, 而这四个氨基酸在 c-IAP1 和 c-IAP2 中是不保守的^[13]。这就解释了为何 c-IAP1 和 c-IAP2 能与 caspase-9 结合但对其没有抑制作用。

6 促凋亡因子 (proapoptotic factor)

6.1 smac/DIABLO 和 IAPs 结合基本序列 (IAP-Binding Motif)

smac/DIABLO 在细胞质中合成后被转移到线粒体膜间隙。当受到凋亡刺激时, smac 与细胞色素 c 一同释放到细胞质中; 细胞色素 c 直接激活 apaf-1 和 caspase-9, 而 smac 与 IAPs 复合物相互作用, 解除它们对起始 caspase 和效应 caspase 的抑制作用。成熟 smac 是一延长的同二聚体^[14], 在其 N 端含有保守四肽 Ala-Val-Pro-Ile, 它被用以结合到 XIAP-BIR3 的保守表面槽上^[15]。

6.2 smac 介导对 caspase 抑制的解除机制

6.2.1 对 caspase-9 抑制的解除

caspase-9 小亚基的 N 端结构 (Ala-Thr-Pro-Phe) 符合 IAPs 结合的四肽基本序列^[15], 能与 XIAP-BIR3 相互作用。凋亡时, smac 从线粒体释放到胞质中, 并用其与 IAPs 结合的四肽与 XIAP-BIR3 结合而竞争性的取代 caspase-9, 从而解除对 caspase-9 的抑制^[14]。

6.2.2 对效应 caspase 抑制的解除

尽管 smac 四肽独自就能解除对 caspase-9 的抑制^[14], 但是 smac 不能解除 IAPs 对效应 caspase 的抑制作用。原因是负责抑制 caspase-3、7 的多肽片段位于 XIAP-BIR2 结构域之前, 远离保守的四肽结合槽。模型研究显示空间碰撞使得 XIAP 不能同时与 caspase-3 和 smac/DIABLO 结合^[6,16]。smac 同时与 XIAP 的 BIR2 和 BIR3 结合被认为是解除 XIAP 对 caspase-7 的抑制所必需的^[16]。

6.3 caspase-9 的活化

procaspase-9 的活化依赖于凋亡体, 在无凋亡体存在时加

工过的 caspase-9 几乎无活性;只有与凋亡体结合, caspase-9 的催化活性才大大增强。

对于凋亡体激活 caspase-9 的机制有两种模型:诱导接近模型和接近诱导二聚化模型。前者认为当它们被诱导,相互间距离非常靠近时,起始 caspase 会进行自身剪切而活化^[14]。但这种模型模型仅仅描述了一个过程,对起始 caspase 如何激活的机制却没有详述。后者是对前者的补充和完善,认为起始 caspase (caspase-9,8) 因二聚化而活化,它们的二聚化分别因为寡聚复合物凋亡体和 DISC 的存在而变得容易进行^[17]。

6.4 DFF40/CAD 的激活机制

DFF40/CAD 对凋亡过程中染色体 DNA 的降解起着重要作用。在无凋亡信号时,DFF40/CAD 与 DFF45/ICAD 结合形成异二聚体,而呈无活性态。在细胞凋亡时, caspase-3、7 将 DFF45 裂解成三个片段,导致 DFF40 从它的异二聚体中释放出来并二聚化。DFF40 二聚体是强的 DNA 水解酶,能将染色体裂解为核小体片段。

7 展望

尽管在过去数年中对凋亡机制的研究进展非常迅速,但还有许多问题需要进一步的了解。这主要包括以下几点:凋亡的精确发生机制及其不同的信号转导途径的调控,新的凋亡调控相关基因的发现,相关疾病如肿瘤中凋亡分子机制的异常以及这些机制在疾病治疗中的意义等。

参考文献

- 1 Cory S, Adams JM. The bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*,2002,2:647-56.
- 2 Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2002,3:401-10.
- 3 Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet*,1999,33:29-55.
- 4 Li H, Zhu H, Xu CY, et al. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*,1998,94:491-501.
- 5 Nieng Yan, Yigong Shi. Mechanisms of apoptosis through structural biolo-

- gy. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21:35-56.
- 6 Chai JJ, Shiozaki E, Srinivasula SM, et al. Structural basis of caspase-7 inhibitor by XIAP. *Cell*,2001,104:769-80.
- 7 Chai JJ, Wu Q, Shiozaki E, et al. Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding. *Cell*,2001,107:399-407.
- 8 Maier JK, Lahoua Z, Gendron NH, et al. The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7. *J Neurosci*,2002,22:2035-43.
- 9 Ashhab Y, Alian A, Polliack A, et al. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *FEBS Lett*,2001,495:56-60.
- 10 Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem*,2001,276:3238-46.
- 11 Sun C, Cai M, Gunasekera AH, et al. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature*,1999,401:818-22.
- 12 Srinivasula SM, Saleh A, Hedge R, et al. A conserved XIAP interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO mediates opposing effects on caspase activity and apoptosis. *Nature*,2001,409:112-16.
- 13 Shiozaki EN, Chai JJ, Rigotti DJ, et al. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell*,2003,11:519-27.
- 14 Chai JJ, Du CY, Wu JW, et al. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*,2000,406:855-62.
- 15 Liu ZH, Sun C, Olejniczak ET, et al. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature*,2000,408:1004-8.
- 16 Huang YH, Rich RL, Myszka DG, et al. Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac. *J Biol Chem*,2003,278:49517-22.
- 17 Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*,2003,15:725-31.

(2005-09-13 收稿)

(上接第 325 页)

- 10 Lijovic M, Somers G, Frauman AG. KAI1/CD82 protein expression in primary prostate cancer and in BPH associated with cancer. *Cancer Detect Prev*,2002,26:69-77.
- 11 Tagawa K, Arihiro K, Takeshima Y, et al. Down-regulation of the KAI1 messenger RNA expression is not associated with loss of heterozygosity of the KAI1 gene region in lung adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 1999,90:970-976.
- 12 Masahiko H, Ken K, Hideoki Y, et al. KAI1/CD82 expression in non-small cell lung carcinoma is a novel, favorable prognostic factor. *Cancer*, 1998,83:466-474.
- 13 Adachi M, Taki T, Leki Y, et al. Correlation of KAI1/CD82 gene Expression with good prognosis in patient with non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 1996,56:1751-55.
- 14 Miyazaki T, Kato H, Shitara Y, Yoshikawa M, et al. Mutation and expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2000,89:955-62.
- 15 Houle CD, Ding XY, Foley JF, et al. Loss of expression and altered lo-

- calization of KAI1/CD82 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression. *Gynecol Oncol*,2002,86:69-78.
- 16 Son BH, Choi JS, Lee JH. Prognostic values of KAI1 and survivin expression in an infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Pathology*. 2005,37:131-136.
- 17 Schindl M, Bachtary B, Dreier B, et al. Impact of human papillomavirus infection on the expression of the KAI1/CD82 metastasis suppressor protein invasive cervical cancer. *Cancer Lett*,2001,162:261-266.
- 18 Chen Z, Mustafa T, Trojanowicz B, et al. CD82, and CD63 in thyroid cancer. *J Mol Med*. 2004,14:517-527.
- 19 Farhadieh RD, Smee R, Ow K, et al. Down-regulation of KAI1/CD82 protein expression in oral cancer correlates with reduced disease free survival and overall patient survival. *Cancer Lett*. 2004,15,213:91-98.
- 20 Imai Y, Sasaki T, Shinagawa Y et al. Expression of metastasis suppressor gene (KAI1/CD82) in oral squamous cell carcinoma and its clinicopathological significance. *Oral Oncol*.2002,38:557-561.

(2005-08-26 收稿)