

- Sci.*, **20**:171-181.
- [26] Murphy MP, 1999, *Biochim Biophys Acta.*, **1411**:401-414.
- [27] Schreck R, et al., 1991, *EMBO J.*, **10**:2247-2258.
- [28] 李忌等, 1997, 自由基生命科学进展, **5**:14-19.
- [29] Tabuchi A, et al., 1994, *FEBS Lett.*, **351**:123-127.
- [30] Lander HM, et al., 1993, *J Immunol.*, **151**:7182-7187.
- [31] Brune B, et al., 1998, *Biochemstry*, **63**:817-825.
- [32] Gopalakrishna R, et al., 1993, *J Biol Chem.*, **268**:27180-27185.
- [33] Messmer UK, et al., 1994, *FEBS Lett.*, **355**:23-26.
- [34] Levine AJ. 1997, *Cell*, **88**:323-331.
- [35] Kaelin WJr. 1998, *Science*, **281**:57-58.
- [36] Messmer UK, et al., 1996, *J Biol Chem.*, **271**:20192-20197.
- [37] Hawkins CJ and Vaux DL. 1994, *Immunol Rev.*, **142**:127-139.
- [38] Genaro AM, et al., 1995, *J Clin Invest.*, **95**:1884-1890.
- [39] Xie K, et al., 1996, *Cancer Immunol Immunother*, **43**:109-115.

Fas/Fas L 凋亡作用机制

郭淑贞 夏宁邵

(厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室 厦门 361005)

机体如何消除识别自身抗原的 T 细胞, 以维持周边血免疫耐受? 如何消除免疫反应后过剩的致敏 T 细胞, 实现免疫下调? 这些免疫调节过程都有细胞表面分子 Fas 及其受体 Fas L 介导的程序性细胞死亡 (Programmed Cell Death, PCD) 的参与^[1]。它们还与多种疾病的发生密切相关, 如系统性红斑狼疮^[2]、丙型肝炎^[3]、艾滋病^[4]。某些病毒即通过诱导产生无活性的 Fas 或 Fas L 来达到复制自我, 逃避宿主免疫防御的目的^[5]。在一些抗癌药物的作用过程中也观察到它们对 Fas/Fas L 的依赖性, 如阿霉素、氮甲蝶呤。分属于 TNF/TNF 受体超家族的 Fas L/Fas 已成为程序性细胞死亡, 亦称细胞凋亡研究中的热点之一。本文仅从 Fas/Fas L 的表达调控, 存在形式, 结合蛋白, 相关蛋白酶等方面来讨论它们诱导细胞凋亡的机制。这对弄清它们在生理、病理条件中的作用, 进一步认识细胞凋亡调控网络有重大意义, 并为相关疾病的诊断治疗提供新方法。

一、Fas/Fas L 的表达及其存在形式

在 Fas 基因启动区序列中没有常见的

TATA、GC 或 CCAAT Boxes, 而于更上游的位置有转录因子 AP-1、Ets 及 NF-IL6 的结合位点。其中 NF-IL6 的结合序列共有六处, 在第一外显子中还另有两处, 由此可以推测 NF-IL6 对 Fas 基因表达有一定调控作用^[6]。已知, 流感病毒感染的 Hela 细胞通过一种双链 RNA 激活的蛋白激酶对 NF-IL6 进行磷酸化修饰, 使其 DNA 结合能力升高, 导致相关基因表达量上升。对 NF-IL6 在其他条件下的作用, 及 AP-1、Ets 的功能还有待认识。Fas 基因启动区还存在两种序列多态性: 一为沉默子中-1377 位 CG-CA, 改变了转录因子 SP-1 的结合位点; 二为增强子中-670 位 GA-GG, 使核转录元件 GAS 的结合位点被破坏^[7]。这无疑也是 Fas 基因表达调控的一部分。

除转录水平外, Fas 还存在 mRNA 剪接水平上的调节。Cascino 等人分离三种 Fas mRNA 变体, 其中 FasTMDel 缺失跨膜区段, Fas-Del2 和 FasDel3 在胞内区缺失, 缺失区段皆为内含子所在位置, 证明这些 mRNA 变体是由 mRNA 前体经选择性剪接形成, 它们的蛋白产物都是可溶性 Fas (sFas), 有一定凋亡抑制作用^[8]。免疫荧光检测发现 FasDel2 和 FasDel3

的产物位于胞外,而 FasTMDel 产物在胞质中,因此它们对凋亡的抑制可能有不同方式。这些 sFas 除了在红斑狼疮等疾病人体内有大量存在外,在正常人体内也能检测到。分析 Fas/sFas mRNA 水平的调节因素对认识体内细胞凋亡的自我调节有重要意义。它们的表达可能有一定的组织和细胞类型特异性。

Fas L 也有膜结合型和可溶型两种形式。但 sFas L 不是由 mRNA 剪接形成,而由 Zn^{2+} 依赖性金属蛋白酶作用于 mFas L 近胞外区,经蛋白水解切割形成^[9]。这一水解方式可避免 Fas L 在 CTL 等细胞表面的聚集而造成不必要的损伤。较早时 Dhein 等人报道,经 CD3 抗体激活的细胞的培养液即可诱导 Fas⁺ 靶细胞的凋亡,即 Fas L 在其中以胞外可溶性因子的形式存在^[10]。但据报道,鼠的 sFas L 无凋亡诱导功能。

二、凋亡作用机制

1. Fas 分子上的结构域

Fas 分子上的凋亡信号传导相关的有四个重要区域:胞外的死亡信号激发域(Activated Domain)和诱导 PCD 的抗 Fas mAb 作用域;胞内的死亡抑制域(Inhibitory Domain)和死亡域(Death Domain)。有关死亡域的研究最多。

死亡信号激发域,位于 Fas N 端的 49 个 aa,是 Fas L 与 Fas 特异性结合部位。各种 sFas 因为保留了这一位点而干扰 Fas L 与 mFas 的结合,起凋亡抑制作用^[11]。已知 Fas L 的 Pro-206、Tyr-218 和 Fas 的 Arg-86 对它们之间的结合至关重要。Tyr-218 的苯环可能与 Fas 形成氢键,还可能在 Fas-Fas L 之间形成盐桥,在 TNF- β 和 TNF- α 与其相应受体结合时也有类似情形。有趣的是,将 Tyr-218 突变为 Phe 后,突变体对人类细胞无毒性却可诱导鼠细胞凋亡,表明不同物种中 Fas 与 Fas L 的结合方式有所不同^[12]。

诱导 PCD 的抗 Fas mAb 作用域,集中于 Fas N 端的 49-153aa 段内。对其研究较少,已

知的仅有 CH-11 结合的线性表位为 126-135aa。

死亡抑制域,于 Fas C 末端的 15 个 aa,切除这一区段可上调 Fas 传导的凋亡信号,已发现它与酪氨酸蛋白激酶——FAP-1 特异性结合^[13]。高水平表达 FAP 使宿主细胞对 Fas 凋亡信号的敏感性降低,缺失催化域的 FAP 则失去这一保护作用。因此,死亡抑制域通过与 FAP-1 的结合,启动酪氨酸磷酸化作用,阻止凋亡的产生;而对 Fas 在免疫反应初期的共刺激信号过程有所帮助^[1]。但 FAP-1 的作用底物还未明确。

2. 死亡域及其结合蛋白

死亡域(death domain, DD),于 Fas C 端靠近死亡抑制域的 60-70aa,是 Fas 和 TNF R-1 间的高度保守区。Fas L 激活 Fas 后,Fas 通过 DD 以蛋白-蛋白作用方式形成三聚体,将死亡信号传入胞内。在 TNF R 家族其他成员的活化过程中也有这一簇集现象,sFas 因缺失 DD 而无法聚集活化。以含有 DD 的 Fas 胞质区段为饵基因,通过酵母双杂交系统及免疫沉淀等方法,从多种 cDNA 文库中检测 Fas 特异性结合蛋白,推动了 Fas 诱导凋亡机制的研究。

最先得到的 Fas 结合蛋白是 FADD^[14],通过其 C 端的 DD 同源区段与 Fas 结合。FADD 过量表达导致宿主细胞凋亡的途径与 Fas 相似;而缺失 N 端 80 个 aa 的 FADD 突变体,虽仍与 Fas 结合,但无法诱导凋亡的产生,反而有抑制作用,表明 FADD 的 N 端有死亡效应结构域(death effector domain, DED)。1996 年发现了含有 DED 结构域的另一蛋白——FLICE (MACH, Mch5)^[15]。FLICE 是 ICE/Ced-3 半胱氨酸蛋白酶家族(Caspases)成员,它们作为细胞凋亡执行者的作用已有大量报道。研究认为,潜伏期 FLICE 酶原 N 端的两个 DED 自我结合,处于封闭状态;当活化的 FADD 通过 DED 与 FLICE 结合时,可改变它的自我封闭状态,释放 C 端活性催化域发挥蛋白酶作用。已证实,FLICE 可自我剪接形成活化肽,并可加工

活化所有已知的 Caspases, 包括 CPP32、Mch3 等^[16]。因而认为 Fas-Fas L 结合后, Fas 聚集而活化, 在胞内通过结合蛋白 FADD 活化以 FLICE 为链首的 Caspases 蛋白酶水解链, 导致死亡底物 PARP、U1-70kDa 等的降解, 形成细胞凋亡特征。这一假设得以普遍接受, 并与 Caspases 家族特异性抑制剂 Crm A 抑制 Fas mAb 诱导凋亡的现象一致^[17]。在随后的研究中发现 FADD 也可以 Mch4 为链首活化 Caspases 蛋白酶水解链。1997 年发现了 I-FLICE (FLAME-1, CLARP, Casper, c-FLIP, CASH, MRIT), 与 Mch5、FLICE 高度同源, 有 DED 结构域但无 Caspase 酶活力^[18], 这是首例天然的催化域钝化的 Caspase, 作为内源性抑制剂调节 Fas/Fas L 凋亡途径。他们可能通过与 FADD 的结合, 阻止 FLICE、Mch4 的活化, 也可能对水解链中下游酶原的活化有所影响。但并非所有的报道都认为它们对凋亡有抑制作用^[19]。

在酵母中检出的另一个含死亡域的 Fas 结合蛋白为 RIP。但进一步的体内实验及 RIP 基因敲除小鼠模型表明 RIP 参与了 TNF-TNFR1 凋亡途径, 与 NF- κ B、JNK 的活化相关, 与 Fas 途径关系不大。1998 年发现了 RIP 的同源物 RICK, N 端具有 Ser/Thr 激酶催化域, C 端具有 CARD 结构域 (Caspase recruitment domain)^[20]。RICK 的过量表达不能诱导明显的凋亡但扩大了 FLICE 的凋亡效应, 使 FLICE 酶活性提高, 与 FLICE 和 FADD 共表达的结果相似。另外发现 RICK 与 CLARP 特异性结合, 认为 RICK 通过 CLARP 与 FADD、FLICE 的结合而介入 Fas 凋亡信号复合物的形成。RICK 的磷酸化底物可能是 Fas 和/或 FADD, 已证实体内 Fas 活化后, FADD 发生 Ser 磷酸化导致 FLICE 的活化加速。另外报道了两种丝氨酸/苏氨酸激酶: 一是 FAST^[21], 在 Jurkat T 细胞中, FAST 在 Fas 交联后 30—60 分钟内即去磷酸化而活化, 并以 TIA 为底物。TIA 是一类核 RNA 结合蛋白, 导致 mRNA 发生剪接方

式的改变。已知的抑制或促进细胞凋亡的 Bcl-2 家族、Caspases 家族中, 都有许多成员可选择性 mRNA 剪接形成活性亚基、无活性亚基或负调控亚基。TIA 可能与这些调节蛋白的 mRNA 结合, 导致促进凋亡的异构体优先形成。有关 TIA 活化可启动凋亡特征性 DNA ladder、核裂解的现象已经证实。二是作为细胞周期调节元件的 CDC2, Fas 反应元件位于 cdc2 基因启动区^[22]。HL-60 经 Fas mAb 作用后, cdc2 mRNA 含量及 CDC2 激酶活力显著上升, 导致组蛋白 H1 激酶迅速活化, 染色体结构变化。

1996 年 Atkinson 等人报道了 Fas 相关的第三种酶——酪氨酸蛋白激酶 p59fyn, 它与死亡域中含 Tyr 的保守序列 YXXL 结合^[23]。尽管尚未发现 YXXL 在凋亡过程中有 Tyr 磷酸化现象, 但认为 p59fyn 与 Fas 特异结合后可能导致 CD3 或其他蛋白复合物的 Tyr 磷酸化, 从而与 CD3 信号传导途径相联, 由于 fyn 基因缺失的 T 细胞仍有一定数量的凋亡, 因而认为也有多种酪氨酸激酶参与 Fas 途径。早在 1994 年就发现体内 Fas 活化后, 1 分钟内就有多种特异性蛋白的酪氨酸磷酸化, 其中 116kDa 蛋白的变化在各类细胞中都有, 而 97kDa、66/69kDa、50kDa、44kDa 蛋白在不同细胞类型中有所变化^[24]。特定的酪氨酸蛋白激酶抑制剂不但阻止了这些蛋白的磷酸化作用也有效抑制了 Fas 凋亡途径, 因而酪氨酸激酶的活化是 Fas 凋亡早期的必要信号之一, 但对相关激酶及其生理性底物还知之不多。另外, 联合上面说的死亡抑制域结合蛋白 FAP-1, 可知有两类不同效应的酪氨酸蛋白激酶, 决定了细胞对 Fas 诱导信号的敏感性不同, 甚至是诱导效应的不同。

除 Fas 死亡域的结合蛋白外, 还有胞质部分的其他部分也可能存在结合蛋白。如 FAF-1, 它没有 DD 同源序列, 但特异结合 Fas 胞质区段, 可能作为凋亡调控中的信号传导分子, 扩大凋亡效应。Kennedy 等构建了一系列 GST-鼠 Fas 胞质区段的融合蛋白, 找到许多新的结合蛋白, 包括一些激酶与 Fas 近膜区段结合, 使

Fas 或 FADD 发生磷酸化^[25]。

从结合蛋白的研究可知, Fas L 激活 Fas 发生寡聚化活化, 进而通过 FADD 和某些激酶性结合蛋白激活相关的 Caspases, 丝/苏氨酸蛋白酶, 酪氨酸蛋白酶形成水解链, 激活某些转录因子使相关基因异常表达, 最终裂解死亡底物造成编程性死亡, 同时通过这些蛋白对死亡过程进行调节。

三、小 结

在 Fas-Fas L 的作用过程中, 有两种蛋白结构域起了重要作用, 即死亡域 DD 和死亡效应结构域 DED。它们主要参与蛋白-蛋白相互识别过程, 形成一系列功能复合物, 使信号得以传递; 或形成调节分子, 抑制或促进信号的传导及效应物的作用。三级结构研究表明 DD 和 DED 皆由六个反向平行的两性 α 螺旋组成, 有相似的整体折叠结构, 这可能与两者在生理功能上的相关性有关。它们各自在进化上的保守性都十分显著。Golstein 等人根据 Fas、TNF-R1 及果蝇 reaper 蛋白之间的同源性对 Fas 这类膜表面死亡受体分子的进化发生提出了假设^[26]。在线虫 Ced-4 和病毒蛋白中也找到了 DED 同源序列, 前者有凋亡促进而后者有凋亡抑制作用^[27,28]。这些不仅表明细胞凋亡的诱导及机制在进化中的保守, 也体现了凋亡过程及调控方式在进化中不断复杂多样化。在一些与凋亡无明显关系的蛋白质中也发现有 DD 同源序列的存在, DD 可能还有其他的生理功能, 使凋亡调控与其他生理事件相联。

在 Fas-Fas L 的过程中还发现有第二信使小分子神经酰胺和钙离子的参与, 线粒体 Cyt C 的释放, Bcl-2 家族成员的调控等。及至今天越来越多的死亡受体 (death receptor) 及其配体的发现, 都需要对 Fas-Fas L 编程性细胞死亡途径作进一步的深入研究, 才能了解其本质。至今, 已有使用腹腔注射 Fas L, 在老鼠体内清除 Fas 表达细胞而不产生肝脏病理性变化的报道。另外发现大多数肿瘤细胞, 因维持超氧化状

态而在生理条件下对 Fas 凋亡信号不敏感^[29], 通过改变肿瘤细胞这一天然的、可诱导的抗性机制, 来达到诱导其凋亡、并予以清除的临床效果, 将成为对多数肿瘤皆有效的一种治疗新方案。

摘 要

Fas (又称 APO-1, CD95) 及其配体 Fas L, 诱导编程性死亡的细胞表面分子, 参与机体免疫调节。本文主要讨论了 Fas/Fas L 相互作用诱导细胞凋亡的可能机制, 包括表达调控, 特异结合蛋白, 蛋白水解链等。

参 考 文 献

- [1] Lynch D. H. et al., 1995, *Immunol. Today*, **16**: 569-573.
- [2] Chang J. et al., 1994, *Science*, **263**: 1759-1762.
- [3] Alderson M. R. et al., 1995, *J. Exp. Med.*, **181**: 71-.
- [4] Mitra D. et al., 1996, *Immunol.*, **87**: 581-585.
- [5] Sieg S. et al., 1996, *J. Virology*, **70**: 8747-8751.
- [6] Wada N. et al., 1995, *J. Biol. Chem.*, **270**: 18007-18012.
- [7] Huang Q. R. et al., 1997, *Mole. Immuno.*, **34**(8-9): 577-582.
- [8] Cascino I. et al., 1995, *J. Immunol.*, **154**: 2706-2713.
- [9] Mariani S. M. et al., 1995, *Eur. J. Immunol.*, **25**: 2303-2307.
- [10] Dhein J. et al., 1995, *Nature*, **373**: 438-441.
- [11] Papoff G. et al., 1996, *J. Immunol.*, **156**: 4622.
- [12] Schneider P. et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**: 18827-18833.
- [13] Sato T. et al., 1995, *Science*, **268**: 411-414.
- [14] Chinnaiyan A. M. et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, **271**: 4961-4965.
- [15] Muzio M. et al., 1996, *Cell*, **85**: 817-827.
- [16] Srinivasula S. M. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 14486-14491.
- [17] Tewari M., Dixit V. M., 1995, *J. Biol. Chem.*, **270**: 3255-3260.
- [18] Srinivasula S. M., et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**: 18542-18545.
- [19] Inohara N., et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 10717-10722.

- [20] Inohara N. , et al. , 1998, *J. Biol. Chem.* , **273**:12296—12300.
- [21] Tian Q. et al. , 1995, *J. Exp. Med.* , **182**:865—874.
- [22] Furukawa Y. et al. , 1996, *J. Biol. Chem.* , **271**:28469—28477.
- [23] Atkinson E. A. et al. , 1996, *J. Biol. Chem.* , **271**:5968—5971.
- [24] Eischen C. M. et al. , 1994, *J. Immunol.* , **153**:1947—1953.
- [25] Kennedy N. J. , and Budd R. C. , 1998, *J. of Immunol.* , **160**:4881—4888.
- [26] Golstein P. et al. , 1995, *Immunol. Rev.* , **146**:45—56.
- [27] Bawer M. K. A. et al. , 1997, *FEBS Letters* , **402**(2-3):256—258.
- [28] Bertin J. , et al. , 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **94**:1172—1176.
- [29] Clement M. -V. , Stamenkovic I. , 1996, *The EMBO J.* , **15**:216—225.

作用于微管的药物介导的细胞周期及凋亡信号通路

袁金辉 谢弘

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

有机体及其组织完整性的维持有赖于增殖、分化和凋亡之间平衡的精细调节,某一阶段的不完全成熟或分化失常或正常的凋亡功能丧失所造成的生长失控均会导致这种平衡的显著变化。因此,可通过激活某一通路使细胞发生周期阻滞,分化或凋亡来控制癌细胞生长。

微管是细胞骨架的重要组成部分,参与了细胞增殖、分化和凋亡的调控。微管由 α 、 β 管蛋白异二聚体自我装配而成并结合有微管相关蛋白和摩托蛋白(motor proteins)。管蛋白的聚合和解聚对微管的动力学进行着最基本的调控。有许多配体能与管蛋白结合从而影响微管的装配。其中以微管为靶的药物是重要的配体,已发现此类药物是有效的抗肿瘤药物。紫杉烷类能与聚合的管蛋白作用并抑制其解聚,而长春花碱类与单聚体的管蛋白结合抑制其聚合。研究表明,这些抗微管药物可促使癌细胞发生周期阻滞及凋亡^[1-4]。如5—9nmol/L的紫杉醇足以使A549人肺癌细胞的有丝分裂期延迟,且退出有丝分裂后可诱导凋亡^[1]。如果以高于9nmol/L的紫杉醇处理A549细胞即可诱导有丝分裂阻滞并使细胞发生异常有丝分裂^[1]。我们以SMMC-7721人肝癌细胞作为实验材料进行的一系列研究表明^[2,3],无论在体外还是体内,紫杉醇均可以使细胞发生显著的G₂/M期阻滞,继之发生凋亡。本文对此类抗微管药物诱

导细胞周期阻滞及凋亡的信号通路作一简要综述。

一、作用于微管的药物介导的细胞周期信号通路

细胞的有丝分裂需要通过激活 cyclin B1-Cdc2 激酶复合物启动,而在有丝分裂过程中亦有蛋白激酶被激活。Ling 等的研究发现,紫杉醇诱导的有丝分裂阻滞伴有 cyclin B1 的积聚及 p34^{cdc2} 的激活^[5]。也有人持不同的看法,认为紫杉醇诱导有丝分裂阻滞使 p21 的表达增高,从而使 p34^{cdc2}/cyclin2 复合物的活性受到抑制^[6],这种矛盾有可能是由实验材料不同所致。相似地,在 nocodazole 诱导的有丝分裂阻滞中 Raf-1 被激活,而且在多个位点如 322, 43 和 259 位残基被高度磷酸化^[7]。另外, p38 MAPK 在 nocodazole 诱导的有丝分裂阻滞过程中亦可被激活^[8]。c-Mos 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,尽管认为它只在减数分裂时才表达,但已证明 c-Mos 蛋白可在体细胞有丝分裂期积聚而且可磷酸化管蛋白,同时介导 MAPK 通路。当 c-Mos 过表达时可引起中期阻滞,在紫杉醇诱导的有丝分裂阻滞过程中已证实有 c-Mos 的激活和表达^[5,9]。有丝分裂不仅与多种丝氨酸/苏氨酸激酶有关,而且与丝氨酸/苏氨酸蛋白磷