

细胞凋亡分子机制的研究进展

曾耀英

(暨南大学组织移植与免疫专业实验室,广州 510632)

[摘要] 细胞凋亡(apoptosis),又称程序性细胞死亡(programmed cell death),是一种进化保守和遗传决定的细胞自杀,其性质为生理性。在多细胞动物,凋亡对正常机体的发育和自身稳定起着极其重要的作用。现已发现,有许多疾病的发生和发展与凋亡机制异常有关。细胞凋亡为生物医学领域中最热门的课题之一。在过去5年里对细胞凋亡的分子机制的研究取得了突破性进展。现已证明,多种基因产物参与了细胞凋亡过程,其中包括肿瘤坏死因子受体(TNFR)基因超家族的产物死亡受体(death receptors)、连接蛋白(adapters)、天门冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspases)和 Bcl-2 家族调节蛋白(Bcl-2 protein family regulators)等。目前对每组蛋白的成员的化学特性、基本功能和它们的上游和下游的相互作用分子等均有了较清楚的了解。这些结果为发展以凋亡机制相关蛋白为靶分子的治疗性细胞凋亡干预手段奠定了基础。

[关键词] 细胞凋亡,半胱氨酸蛋白酶,死亡受体,Bcl-2 家族,线粒体

细胞凋亡,又称程序性细胞死亡,是一种有别于坏死(necrosis)的细胞死亡形式。坏死是以细胞膜损害为起点,常伴有死亡细胞内容物释放而发生炎症,其性质为病理性细胞死亡;凋亡则以细胞内 caspase 激活为起点,死亡细胞的内容物由功能完整的细胞膜包裹形成凋亡小体(apoptotic bodies)而被体内其他细胞吞噬,通常无死亡细胞内容物疏漏而不伴有炎症,其性质为生理性细胞死亡,又称细胞自杀。凋亡对多细胞动物正常机体的发育和自身稳定起着极其重要的作用。现已证明,有许多疾病与凋亡机制异常有关。细胞凋亡的分子机理已成为生物医学领域中最热门的课题之一。在过去5年里,直接与细胞凋亡相关的论文多达2万多篇,其中有相当大比例为凋亡分子机制的研究。无疑,这些研究将会导致新的治疗手段的产生。

1 细胞凋亡是由进化保守和遗传决定的复杂分子过程^[1-3]

在细胞凋亡过程中,细胞内出现一系列生化变化,其结果为细胞核 DNA 断裂、染色质固缩、胞泡形成,最后产生凋亡小体而被体内其他细胞吞噬。以

上细胞凋亡形态学变化在不同种系、同种不同个体和同一个体的不同组织表现明显相似性,提示这一过程由一些进化保守的分子介导。现已证明,细胞凋亡为遗传决定的复杂分子过程。有关基础知识来源于秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*,简称“线虫”)发育过程中细胞凋亡的遗传研究。有3个基因的产物决定线虫发育过程中的细胞凋亡: CED-3 和 CED-4 促进细胞凋亡,而 CED-9 抑制细胞凋亡。在人类已找到它们的类同物,分别为: caspase 9、Apaf-1 和 Bcl-2。显然,人类细胞凋亡的遗传控制就更加复杂了。如图1所示,细胞凋亡包括3个基本时相,即启动相、效应相和清除相,而每个时相又包含由若干分子事件参与的过程。在启动相,涉及几类启动细胞内凋亡机制的凋亡信号的产生及其传递,其中包括 TNFR 家族死亡受体的活化、DNA 损伤的应激信号的产生、存活信号的产生、DNA 损伤导致 p53 的活化和 Bcl-2 家族蛋白对凋亡信号的调节以及颗粒酶和穿孔素释放等分子过程;在效应相,涉及细胞凋亡中心环节 caspase 的活化和线粒体通透性改变;在清除相,涉及 caspase 对死亡底物的酶解、染色体 DNA 片段化以及吞噬细胞对凋亡小体的吞噬。图2显示细

细胞凋亡的信息通路,其中涉及多组蛋白分子。目前已知的 caspase 至少有 13 种,而其底物至少有 40 多种,Bcl-2 家族调节蛋白已知有 3 类 23 种,可见参与凋亡分子之多。显然,这些分子并不是以孤立的形式发挥作用,而以相互促进相互制约的形式组成一个完整的细胞凋亡机制网络系统,这就是细胞凋亡过程的复杂性。在某种意义上来说,这个系统是相当高效的,一旦启动就在 30—60 min 内完成整个细胞凋亡过程。

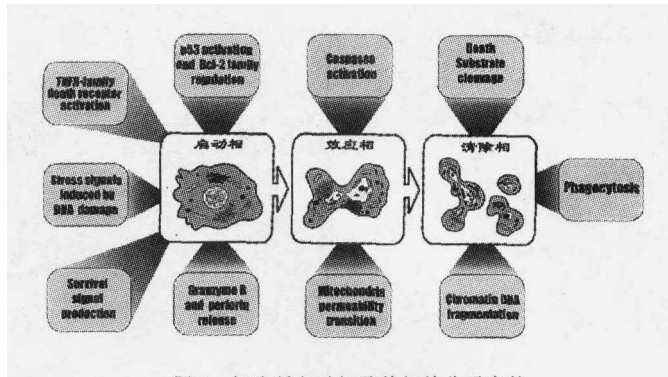


图 1 细胞凋亡时相及其相关分子事件

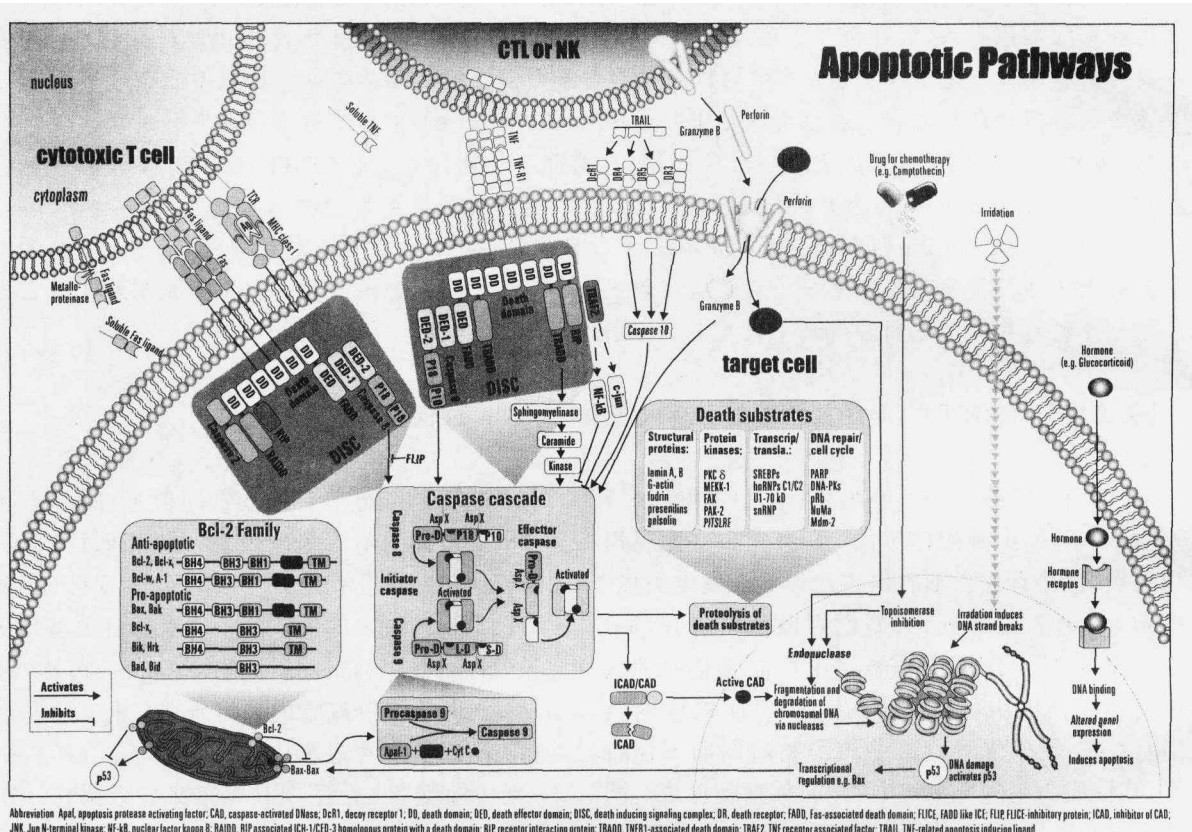


图 2 细胞凋亡信息传递通路

2 Caspase 活化是导致细胞凋亡的中心环节^[2,3]

Caspase 家族是直接导致凋亡细胞解体的蛋白酶系统,在细胞凋亡机制网络中居中心地位。“Caspase”的第一个字母“C”表示半胱氨酸(cystein),后面的“-ase”为“酶”的后缀,中间的“-asp-”表示天门冬氨酸(aspartic acid),整个词的含义为:具有在天门冬氨酸后进行酶切特性的半胱氨酸蛋白酶。第一个 Caspase 基因是在人类 cDNA 文库查找线虫的 ced-3 基因时发现的,它就是 ICE (interleukin-1 β -converting enzyme 的缩写)的基因。从线虫到人类均发现 caspase,这说明它进化的保守性。现已在哺乳动物发现 13 种 caspase,分别命名为 caspase-1...caspase-13,

其中 caspase-11 和 caspase-12 为小鼠的同源物,人类的对应物尚未找到。图 3 显示各个 caspase 家族成员的同源性和功能。不同的 caspase 有功能差别,有些可导致细胞凋亡,有些可诱发炎症反应,导致细胞凋亡的 caspase 又可分为启动者(initiator) caspase 和效应者(effector) caspase,前者居于 caspase 级联反应(caspase cascade)的上游,通过其酶切作用激活下游的 caspase,而效应者 caspase 直接酶解细胞的结构蛋白和功能蛋白,与细胞解体直接相关。Caspase 具有与其他蛋白酶所具有特性:(1)介导的酶解反应是不可逆的;(2)以低活性的酶前体形式合成;(3)有活性的蛋白酶可激活其酶前体;(4)酶抑制剂控制酶活性的阈值;(5)酶解反应具有高特异性。各种 caspase 之间具有相似的氨基酸顺序、二级结构和底物特异

性。酶前体(30~50 kD)包含3个亚单位:氨基末端区段、大亚单位(~20 kD)和小亚单位(~10 kD)。酶活化过程包括区段间的酶切以及大、小亚单位组成四聚体(图2)。酶前体有2个结构特点在其活化过程中起关键作用:(1)各种 caspase 的氨基末端区段之间在氨基酸顺序和长度有明显的差异,从而为各种 caspase 的前体通过不同机制活化提供结构基础;(2)3个亚单位之间有2个可供 caspase 酶切的位点,从而提供自发激活或在级联反应中被其他 caspase 激活的条件。在各种蛋白酶中, caspase 是绝对要求底物的酶切点上有天门冬氨酸的蛋白酶,而且要求底物氨基末端起码有4个氨基酸,后面那个为天门冬氨酸(D),酶切口就在天门冬氨酸的后面,而且每种 caspase 对4肽的识别又有差别,这是 caspase 的氨基酸顺序特异性。表1列出一些已知 caspase 底物的识别位点和被酶切后的可能产生的影响。此外,并非所有包含适合4肽识别位点的底物都能被酶解, Caspase 对底物的构象也有很严格的选择,这就是 caspase 的底物构象特异性。

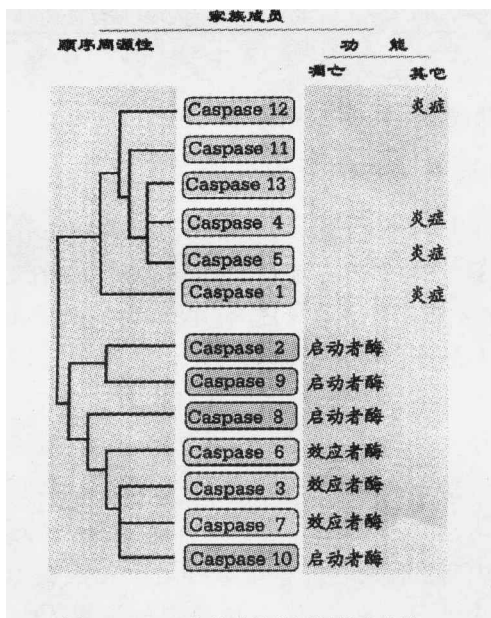


图3 Caspase 家族成员的同源性和功能

关于 caspase 激活的机制,近年来也有了较深入的了解。在图2可以看到现今关于 caspase 被激活的级联反应和调节模型。该模型指出, Caspase 可分为启动者 caspase 和效应者 caspase 两类,促凋亡信号引发启动者 caspase 的活化,后者再激活效应者 caspase,继而导致大量被称为死亡底物(death substrates)酶解,从而产生一系列导致细胞凋亡的生化变化和形态学改变。启动者 caspase 激活的机理是

研究热点之一。目前能够被接受的为“紧密接触”(proximity)或“寡聚体形成”(oligomerization)观点。支持这一观点的证据有:(1) caspase 的前体具有可检测的活性;(2) caspase 的活化要有二聚体形成;(3)人工过量表达 caspase 前体可导致 caspase 活化。这一观点认为, caspase 以低浓度的单聚体形式存在于细胞内,促凋亡信息提供一个辅助因子(cofactor)把2个或多个 caspase 前体拉到一起,产生“紧密接触”并形成寡聚体,从而产生分子间的自发酶解而激活。

Caspase 活化后又如何使细胞解体?目前尚未透彻了解。Caspase 大致通过3种机制解体细胞:(1)酶解灭活凋亡抑制物;(2)酶解细胞的结构蛋白;(3)酶解分离具有酶活性的蛋白分子的调节区和催化区使其失活。图2和表1所列的死亡底物都是通过上述机制而导致细胞解体的。以下举些例子加以说明。一个比较清楚的例子是 ICAD 的酶解失活。细胞内存在一种名叫 CAD (caspase-activated deoxyribonuclease)与 DNA 片段化有关的核酸酶,在非凋亡状态, CAD 与其抑制物 ICAD 形成无活性的复合体。细胞出现凋亡时,活化的 caspase 使 ICAD 酶解而失活, CAD 从复合体游离出来而活化, CAD 使染色体 DNA 酶解产生以 180 bp 为倍数长度的 DNA 片段,这就是细胞凋亡时出现梯级 DNA 电泳图的原因。另一个例子是 caspase 对核膜薄层蛋白(lamin)的酶解。Lamin 分子首尾相连形成多聚体衬于核膜内层参与染色质的有序布局的形成。Caspase 酶解 lamin 使细胞凋亡时出现染色质聚集现象。

“哪里有蛋白酶,哪里就有酶的抑制剂”是酶学的名句。现有证据表明,这句话对于 caspase 来说同样适用。现已发现3类病毒基因编码的 caspase 抑制剂: CrmA、p35 和 IAP。IAP 是目前唯一在哺乳动物找到类同物的 caspase 抑制剂。抑制剂在 caspase 的调节中起着重要的作用,这些作用包括:(1)设立有活性酶的阈值(解体细胞有活性的 caspase 的最低浓度);(2)预防 caspase 的意外或自发激活;(3)确定 caspase 活性在细胞内的空间分布。

3 TNFR 家族死亡受体及其连接蛋白是细胞外指令性凋亡信号的接受者和传递者^[4-6]

在正常的情况下,细胞凋亡机制受到来自细胞环境的生存信号和细胞内的细胞完整感受器信号的监管,一旦细胞失去与其生存环境的接触或经历不可补救的细胞内在损伤,细胞的凋亡机制便启动。在细胞同时受到相互矛盾的分裂和停止分裂的信号

时也可启动凋亡机制。哺乳动物还进化一套使机体能够主动指令其体内每一个细胞进行自毁的机制,这一机制被称“指令性”凋亡(instructive apoptosis)机制。这一机制对免疫系统功能的发挥尤其重要。死亡受体及其连接蛋白是细胞外指令性凋亡信号的接受和传递者。死亡受体属于肿瘤坏死因子(TNF)受体基因家族。这类膜蛋白在结构上有一个特征,即都具有数个富含半胱氨酸的结构相似的胞外功能区和一个同源的胞内功能区,后者称作“死亡功能区”(death domain)。目前结构和功能比较清楚的死亡受

体有:Fas(又称 CD95, Apo1)和 TNFR1(又称 p55 或 CD120a)。了解比较多的还有 DR3、DR4 和 DR5。以上受体的配体均为 TNF 基因家族,其配体对为 FasL 结合 Fas;TNF 或淋巴毒素结合 TNFR1;Apo3 结合 DR3;Apo2 结合 DR4 或 DR5。Fas 和 FasL 在以下 3 种情况下的细胞凋亡中起着重要作用:(1)在免疫反应终末阶段从外周清除成熟的活化的 T 细胞;(2)介导细胞毒 T 细胞或 NK 细胞对感染了病毒的细胞或肿瘤细胞的杀伤;(3)在免疫赦免区(如眼前房)介导对炎症细胞的杀伤。

表 1 部分死亡底物的 caspase 识别和酶切位点及其酶切后对细胞的破坏作用

中文名称	英文名称	识别及酶切点	对细胞的破坏作用
	Gelsolin	GeI-DQTD ³⁵² G-solin	介导细胞膜和形态学的损伤
P ²¹ 相关激酶	P ²¹ -associated kinase, PAK-2	PA-EVD ²¹² G-K-2	介导细胞膜和形态学的损伤
Caspase 活化 DNA 酶抑制物	Inhibitor of caspase-activated DNase, ICAD-L	IC-DEPD ¹¹⁷ -AD-L IC-DEPD ²²⁴ -AD-S	与 DNA 片段化相关
δ-蛋白激酶	δ-Protein kinase C, δ-PKC	PKC-DMQD ³³⁰ N-δ	干扰细胞周期
Rb 蛋白	Rb tumor suppressor, Rb	Retino-DEAD ⁸⁸⁶ G-blastoma	干扰细胞周期
焦点粘附激酶	Focal adhesion kinase	F-VSWD ⁷⁰⁴ S-AK F-DQTD ⁷⁷² S-AK	使细胞丧失粘附能力
丝裂原活化蛋白激酶之激酶	MAP kinase kinase-1, MEKK-1	ME-DTVD ⁸⁷⁴ G-KK-1	使细胞丧失粘附能力
DNA 依赖性蛋白激酶	DNA-dependent protein kinase, DNA-PK	DNA-DEVD ²⁷¹² N-PK	干扰 DNA 修复机制
多聚 ADP 核糖聚合酶	Poly-ADP-ribose polymerase	PA-DEVD ²¹³ G-RP	干扰 DNA 修复机制

和 TNF 家族其他成员一样,FasL 是同三聚体分子,每个 FasL 三聚体分子结合 3 个 Fas 分子,因而 FasL-Fas 的结合导致死亡受体的胞内的死亡功能区的聚集(图 2)。一个名叫 FADD(Fas-associated death domain)的连接蛋白通过其自身的死亡功能区与受体死亡功能区结合,FADD 的“死亡效应者功能区”(death effector domain,简称 DED)与 caspase-8 的 DED 连接,从而在局部聚集大量的 caspase-8 前体分子。随后 caspase-8 通过上述的“紧密接触”或“寡聚体形成”的模式激活,活化的 caspase-8 再激活下游的效应者 caspase 前体,从而完成“指令性”凋亡信息传递。与 Fas 相比,TNFR1 的信息传递较复杂些,通过 FADD 激活 caspase-8 的机制与 Fas 类同,而 TNFR1 还通过连接蛋白复合体 TRADD-RIP-TRAF2 激活 NF-κB 和 JNK 信息传递途径而抑制凋亡。此外,TNFR1 还通过激活鞘磷脂酶(sphingomyelinase)产生第二信使分子神经酰胺(ceramide)而活化 caspase。死亡受体 DR3、DR4 和 DR5 的连接蛋白尚不明了,它们的靶酶可能是 caspase-10。值得强调的是,有一类胞外结构与 DR4 和 DR5 相似的“圈套受体”(decoy receptor,简称 DcR)参与对 DR4 和 DR5 信息传递的调节,这是由于“圈套受体”无胞内死亡功能区。

4 抑癌蛋白 p53 是细胞 DNA 损伤的感受器和细胞内凋亡信号的传递者^[7,8]

在 DNA 损伤时,对于单细胞生物的生存来说,DNA 修复是唯一的选择,对多细胞动物的生存来说,DNA 修复只是选择之一。很显然,多细胞动物还可以通过使受损细胞停止生长或发生凋亡来保障个体的生存。那么,细胞如何觉察到 DNA 受损?应该作出什么样的反应?是 DNA 修复、停止生长还是凋亡?这是细胞凋亡领域的研究热点之一。现有的证据表明,抑癌蛋白 p53 是细胞 DNA 损伤的感受器和细胞内凋亡信号的传递者。哺乳动物细胞 DNA 损伤反应涉及一套激酶,其中典型例子为 ATM(运动失调性毛细血管扩张症突变蛋白)和 DNA 依赖性蛋白激酶(DNA-PK)。这 2 种激酶能发动各种形式的 DNA 受损反应,其中包括细胞周期检查点的活化和细胞生长停止、DNA 修复以及细胞凋亡。这 2 类激酶的关键性靶分子为抑癌蛋白 p53。在正常情况下,p53 与 Mdm-2 结合而无活性,DNA 受损使 p53 或 Mdm-2 发生磷酸化,而使 p53 从 p53-Mdm-2 复合体中游离出来成为有活性的和稳定的 p53。在人类肿瘤无功能 p53 的频率很高,这说明 p53 是防止突变

体细胞扩增的关键性蛋白。p53 是通过停止细胞生长和诱导细胞凋亡而发挥其肿瘤抑制者的功能。它是一种顺序特异性的转录因子。现已清楚 p53 通过转录依赖性和非转录依赖性 2 种机制诱导细胞凋亡,机制的采用取决于细胞类型和凋亡刺激种类。Bax 等促凋亡蛋白是 p53 的转录靶分子,也就是说 p53 可以通过增加促凋亡蛋白的转录而诱导凋亡的。在非转录依赖性的机制中,p53 可能通过使被收押在细胞浆高尔基体内的死亡受体(Fas 等)重新回到细胞膜表面的机制诱导细胞凋亡。在某种意义上,p53 增加细胞对凋亡刺激的敏感性,而某些肿瘤细胞对凋亡诱导的抵抗和对化学治疗不敏感的特性可能与其 p53 的功能失活有关。显然,这些知识对肿瘤治疗新技术的研究和治疗方案的制定具有指导意义。

5 线粒体功能状态及细胞色素 C 释放决定细胞的死亡形式:凋亡或坏死^[9,10]

大量的实验证据表明,线粒体功能状态不但在细胞的生与死的控制中起着关键性作用,而且在细胞的死亡模式中也起决定性作用。图 4 为线粒体的功能状态对细胞死亡形式影响的示意图。Bax、氧化物、钙离子过载、活化的 caspase 和神经酰胺等各种细胞凋亡刺激均可导致线粒体的功能及通透性发生改变,从而导致细胞色素 C(cytochrome c, 简称 cyto

c)的释放。一旦出现线粒体 cyto c 的释放,几乎可以肯定细胞要死亡。假如凋亡刺激仅仅导致线粒体外膜的通道开发而膜的结构尚完整,通过通道而释放到细胞浆的 cyto c 与 Apaf-1 结合,后者在 dATP 存在的情况下再与 caspase-9 前体结合而激活 caspase-9。活化的 caspase-9 激发 caspase 的级联反应,从而使细胞发生凋亡。假如凋亡刺激导致渗透压发生明显的改变,从而引起线粒体内间质空间扩大,乃至整个线粒体出现肿胀而使外膜破裂,cyto c 大量释放,直接影响线粒体呼吸链的电子传递和能量代谢,ATP 生成明显减少和氧自由基大量产生,最终细胞发生慢性坏死。

6 Bcl-2 蛋白家族是细胞凋亡的关键性调节者^[11,12]

Bcl-2 是在人滤泡性淋巴瘤因染色体转位而活化的基因,偶然发现它能使细胞因子依赖的造血细胞在缺少细胞因子的条件下存活,从而开辟了 Bcl-2 家族的结构和功能的研究。目前已鉴定的 Bcl-2 家族成员在哺乳类有 15 个,在病毒有 5 个。所有的 Bcl-2 家族成员在结构上至少有一个 Bcl-2 同源功能区(Bcl-2 homology domains, 简称 BH)。BH 为保守的基序(motif),一共有 4 个,分别为 BH1、BH2、BH3 和 BH4。根据结构和功能特点 Bcl-2 家族被分为 3 个亚家族(图 5)。根据对细胞凋亡的影响,可分为 2 类:抗凋亡 Bcl-2 家族成员和促凋亡 Bcl-2 家族成员。在抗凋亡 Bcl-2 家族成员中,几乎都含 BH1 和 BH2,与 Bcl-2 结构最相近的成员还包含 4 个 BH。在促凋亡的 2 个亚家族中,Bax 亚家族与 Bcl-2 的结构相似,包含 BH1、BH2 和 BH3,其成员包括 Bax、Bak 和 Bok;至于 BH3 亚家族成员的结构,除了中间的 BH3 结构相同外,它们之间无共同之处。总的来看,Bcl-2 家族的功能为:(1)发现和登记各种细胞内的损伤;(2)评价由其他细胞发出的正负信号;(3)整合相互竞争和相互矛盾的信号;(4)发出决定细胞命运的生存或凋亡的指令。这就是“Bcl-2 蛋白家族是细胞凋亡的关键性调节者”的含义。Bcl-2 蛋白家族调节功能实施的机理已有不少研究,普遍认为:(1)通过成员之间或与 caspase 活化相关的共因子(cofactor)形成二聚体,从而调节 caspase 前体的活化;(2)在线粒体膜上形成由多聚体组成的孔,控制线粒体内 caspase 激活物的释放。图 6 显示机理(1)的可能细节。图 6(a)为 Bcl-2 家族成员 Bcl-X_L 与一条 BH3 肽结合的示意图,图中 Bcl-X_L 分子中几个 α 螺旋构成

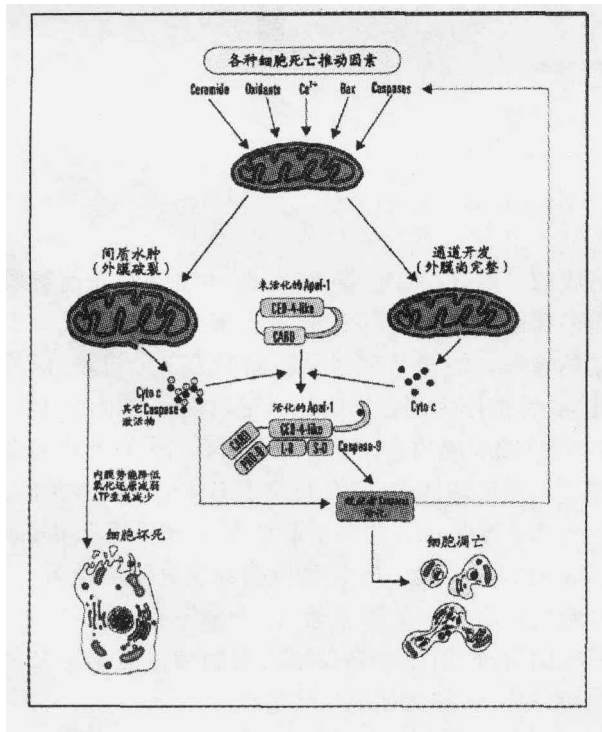


图 4 线粒体的功能状态对细胞死亡形式的影响

一个可以与其他成员结合形成二聚体的凹槽 (groove), 而凹槽已与 Bak(72-87) 的 16 肽结合。图 6 (b) 显示 Bcl-2 家族对 Apaf-1 的调节模型。Bcl-X_L 与 Apaf-1 结合而阻止后者与 caspase 前体结合, 从而抑制 caspase 前体的活化。假如一个死亡信号导致一个 BH3 亚家族的成员 Bik (也可以是 BH3 亚家族的

其他成员或 Bax 亚家族的成员) 与 Bcl-X_L 结合, 那么 Apaf-1 便可以从 Bcl-X_L 和 Apaf-1 所形成的二聚体中游离出来, 也就是说凋亡信号通过 Bcl-2 家族促凋亡成员解除了 Bcl-2 家族抗凋亡成员对 Apaf-1 的中和作用, 从而导致 caspase 的活化。

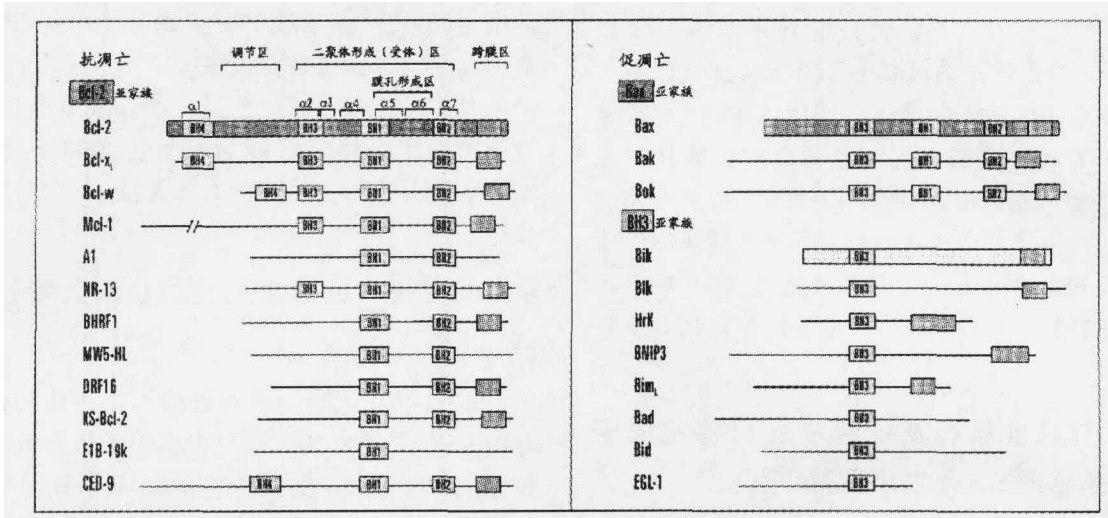


图 5 Bcl-2 家族及其亚家族

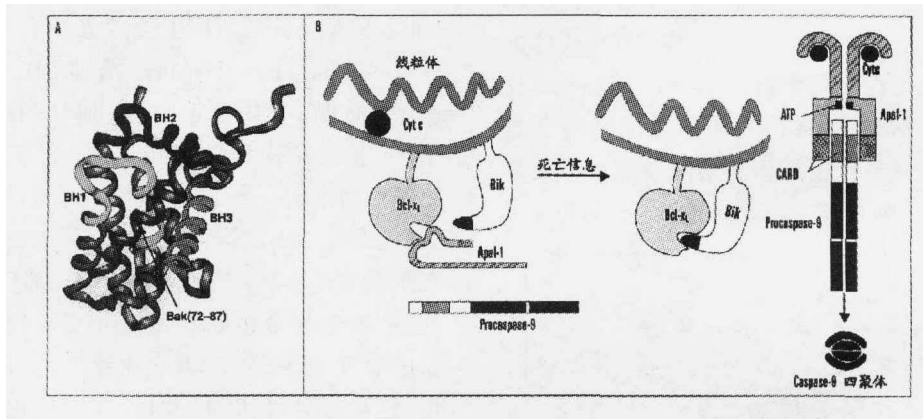


图 6 (a) Bcl-x_L 与 BH₃ 肽结合; (b) Bcl-2 蛋白家族对 Apaf-1 的调节机制

7 磷脂酰丝氨酸等分子参与凋亡小体的吞噬和清除

实验观察发现, 很多类型的细胞在凋亡开始时, 原先位于细胞膜内层表面的一种称为磷脂酰丝氨酸 (phosphatidyl serine, 简称 PS) 的膜磷脂转位到细胞膜的外层表面, 这过程称作 PS 外化 (externalization)。Annexin V 检测细胞凋亡正是基于以上发现而设计的。PS 一旦出现于细胞膜外层表面就很容易与 Annexin V 结合而被标记, 因为 Annexin V 对 PS 具有很高的亲和性。在细胞凋亡时, PS 的外化要早于细胞核的变化, 在诱导凋亡后的 1 h 后, PS 就将转移到细

胞膜的外层表面。根据 PS 外化动力学及先前对磷脂酰胆碱转运的研究结果, 有人推测 PS 外化是一主动的过程。PS 外化的意义目前尚不十分清楚, 但外化的 PS 能作为凋亡细胞的标记以供巨噬细胞识别, PS 在巨噬细胞的表面受体为 CD14。PS 的外化是非凋亡刺激依赖性的, 它参与凋亡小体的吞噬和清除。参与凋亡小体的吞噬和清除的其他分子还有 thrombospondin (简称 TSP), 它是巨噬细胞分泌的糖蛋白, 细胞凋亡时 TSP 基序暴露, 巨噬细胞有与 TSP 结合的粘附分子, 因而 TSP 在凋亡细胞和巨噬细胞之间起桥梁作用, 从而加速吞噬过程。

8 细胞凋亡失调(凋亡过多或凋亡不足)与疾病的发生和发展^[13-16]

如前所述,细胞凋亡是一种生理性死亡,是机体的保护机制,但有时它也显示其破坏性的一面。细胞凋亡失调会导致各种疾病。表2列出一些在发生和发展过程中与细胞凋亡不足或过多相关的疾病。这里只选其中一些例子加以说明。由HIV感染所引起的艾滋病有一个最大特征是随着病情的发展CD4⁺T细胞数进行性减少。目前认为,CD4⁺T细胞减少的最主要原因是凋亡。尽管导致CD4⁺T细胞凋亡的确切机理尚不十分清楚,但有一点是可以肯定的:通过可溶性HIV的糖蛋白gp120与CD4分子结合,通过直接或间接(上调Fas)信息途径启动未感染HIV的CD4⁺T细胞的凋亡机制。长期以来,人们对脑中中风后缺血区周边的神经细胞逐渐死亡感到不解。直至近几年才比较肯定缺血区周边神经细胞的死亡与凋亡相关。其证据主要来自脑血管截流动物模型,包括:(1)缺血区周边神经细胞显示凋亡样形态学变化和DNA断裂;(2)缺血区周边神经组织caspase活性升高;(3)抗凋亡剂或caspase抑制剂的实验性治疗能明显减少缺血损伤范围。关于神经退行性变疾病的代表阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease,简称AD)与凋亡的关系是近年来的热门课题和争论的焦点。有的学者认为该病的神经细胞死亡形式为细胞凋亡,其依据为:受累细胞有DNA断裂;一种名叫 β amyloid(简称A β 的毒蛋白,AD发病特征性蛋白,可译成“淀粉样蛋白”)在体外能诱导神经细胞凋亡;presenilins(一类蛋白,AD患者有家族性基因突变,可译成“早老性蛋白”)突变基因使其转染细胞易于凋亡。尽管尚有相当有力的反面意见,以下假说似乎颇合逻辑:A β 诱导患者的神经细胞凋亡,而presenilins突变引起更多的A β 表达,尤其是A β 更有害的形式A β 42的表达。由于目前尚缺乏AD的动物模型以及对细胞凋亡的定义尚无一致的认识,这方面的争论还要持续一段时间。肿瘤的发生和发展与细胞凋亡失调关系是显而易见的,在机理上可归纳为:(1)Bcl-2等抗凋亡蛋白高表达,提高了细胞凋亡的阈值;(2)p53突变而无法感受和传递凋亡信息,当细胞损伤时无发生凋亡;(3)病毒凋亡抑制基因插入而阻断细胞凋亡机制;(4)表达FasL诱导针对肿瘤抗原的淋巴细胞凋亡,从而使肿瘤细胞逃脱免疫系统的攻击。自身免疫疾病与细胞凋亡失调的关系,可分为2个方面:(1)自身反应T细胞因凋亡

障碍而积聚,从而发生免疫细胞对自身靶细胞的攻击,如系统性红斑性狼疮(简称SLE)等;(2)免疫攻击导致功能细胞凋亡过多而丧失相应的生理功能,如I型糖尿病等。

表2 与细胞凋亡不足或过多相关的疾病

细胞凋亡不足	细胞凋亡过多
肿瘤(肿瘤细胞)	肿瘤(肿瘤抗原相关淋巴细胞)
滤泡性淋巴瘤	黑色素细胞瘤
P ⁵³ 突变相关的癌	肿瘤
激素依赖性癌	结肠癌
乳腺癌	
卵巢癌	
前列腺癌	
自身疫病(自身反应淋巴细胞)	自身免疫病(免疫靶细胞)
系统性红斑狼疮	胰岛素依赖型糖尿病
免疫介导的肾小球肾炎	桥本氏甲状腺炎
突眼性甲状腺病	多发性硬化病
	神经退行性变性疾病
	Wilson病
	肝功能衰竭
	慢性中性粒细胞减少症
	再生障碍性贫血
	髓性发育不良综合征
	溃疡性结肠炎

9 细胞凋亡干预是一种发展中的疾病治疗手段^[1-3,13]

既然有很多疾病的发生和发展与细胞凋亡失调相关,那么对某些疾病进行治疗性细胞凋亡干预是合逻辑的。人们正在试图通过抑制凋亡来治疗神经退行性变疾病、缺血再灌注损伤、移植物抗宿主病(GVHD)和自身免疫病等难治性疾病。如前所述,caspase的活化是导致细胞凋亡的中心环节,所以caspase抑制剂的研制就成了这领域的大热门,尤其是对小分子的caspase抑制剂的研制。蛋白酶抑制剂在治疗高血压病(血管紧张素转换酶抑制剂)和艾滋病(逆转录酶抑制剂)所取得的成功经验,无疑给正在从事这方面研究的科学家们很大鼓舞。Caspase抑制剂包括肽类和非肽类、可逆性和不可逆性。这方面的研究目前已取得一定进展。此外,以下问题尚需探讨:(1)caspase是否有组织特异性;(2)能否研制出组织特异性的药物运载系统;(3)对神经退行性变疾病等慢性病实行长期的抗凋亡治疗是否有导致肿瘤和自身免疫病发生的危险;(4)如何使药物进入细胞内而发挥对caspase的抑制作用。

治疗性细胞凋亡干预的研究另一个研究热点是肿瘤治疗。目前肿瘤化疗治疗2个最大的问题为药物对正常细胞具有毒性作用和肿瘤细胞对药物产生

抗性。问题的根本在于,无论是化学治疗或放射治疗都不是直接杀死细胞,而只是损伤细胞,通过后者所产生的信息诱导细胞凋亡。肿瘤细胞常常因为p53突变和Bcl-2过高表达而产生治疗抗性。科学家们正在试图绕过肿瘤细胞凋亡信息传递障碍环节,直接激活caspase-9或caspase-8,从而启动细胞凋亡的级联反应,从而达到治疗的目的。想像往往比实际要简单得多,要把细胞凋亡干预发展成为一种临床治疗手段似乎还有很长一段路要走。

参 考 文 献

- [1] Peter M E, Heufflder A E, Hengartner M O. Advances in apoptosis research. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**:12736—12737.
- [2] Thornberry N A, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*, 1998, **281**: 1312—1316.
- [3] Kidd V J. Proteolytic activity that mediate apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 1998, **60**:533—573.
- [4] Ashkenazi A, Dixit V M. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*, 1998, **281**: 1305—1308.
- [5] Chang H Y, Yang X, Baltimore D. Dissecting Fas signaling with an altered-specificity death-domain mutant: Requirement of FADD binding for apoptosis but not Jun N-terminal kinase activation. *PNAS*, 1999, **96**: 1252—1256.
- [6] Kolesnick R N. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 1998, **60**:643—665.
- [7] Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*, 1998, **281**: 1317—1322.
- [8] King K L, Cidlowski J A. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 1998, **60**:601—617.
- [9] Green G R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, **281**: 1309—1312.
- [10] Kroemer G, Dallaporta B, Resche - Rigon M. The mitochondrial death/life regulation in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 1998, **60**:619—642.
- [11] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science*, 1998, **281**: 1322—1326.
- [12] Chao D T, Korsmeyer S J. Bcl-2 Family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 1998, **16**:395—419.
- [13] Rudin C M, Thompson C B. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu. Rev. Med.*, 1997, **48**:267—281.
- [14] Barinaga M. Stroke-damaged neurons may commit cellular suicide. *Science*, 1998, **281**:302—1303.
- [15] Marcia M. Is apoptosis key in Alzheimer's disease? *Science*, 1998, **281**: 1303—1304.
- [16] Walter J, Schindzielorz Alice, Grünberg, J and Haass C. Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retards progression of apoptosis. *PNAS*, 1999, **96**: 1391—1396.

ADVANCES ON RESEARCH OF MOLECULAR MECHANISMS IN APOPTOSIS

Zeng Yaoying

(Specialized Laboratory for Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract Apoptosis, also known as programmed cell death, is an evolutionarily conserved and genetically controlled cell suicide. Apoptosis plays important roles both in development and in homeostasis of metazoans, and it was attracted great interests from researches. Many diseases have been found related to the defect of apoptotic programs. A breakthrough has been made in understanding of molecular mechanisms of apoptosis during the past 5 years. It has been found that several groups of gene products are involved in apoptotic mechanisms, including death receptors belonging to TNFR gene superfamily, caspases and Bcl-2 protein family regulators. The biochemical characteristics and basic function of the members of each group of proteins as well as their upstream and downstream interactive proteins have been defined clearly. All the findings will form the basis for developing therapeutic intervention of apoptosis targeting to the composed proteins of apoptotic pathways.

Key Words apoptosis, caspase, death receptor, Bcl-2 protein family, mitochondria