

Fas介导的细胞凋亡途径

金洪传 综述 余海 审校

(浙江大学医学院肿瘤研究所,浙江 杭州 310009)

中图分类号: Q26 文献标识码: A 文章编号: 1088-9292(1999)05-0237-04

细胞凋亡是一个由细胞内基因编程控制的、主动的细胞消亡过程。虽然细胞凋亡的诱导信号和调控机理错综复杂,但是,细胞固有的凋亡核心程序却是相对保守而又简单的。Fas诱导的细胞凋亡,由于其相对的简洁性而成为凋亡机理研究中的热点,近年来业已取得一些实质性的进展;而且,人们从中得知,细胞凋亡的发生同细胞增殖一样,也可以是信号转导的直接结果,即以细胞膜表面分子事件为起点,通过信号分子间的相互作用,将细胞外死亡信号逐级传递放大,最终活化细胞内凋亡核心程序。

1 Fas介导的细胞凋亡途径

1989年, Frauth和 Yonehara研究小组相继独立发现一种细胞凋亡相关膜表面受体蛋白,并分别命名为 Fas和 Apo-1。随后研究证明 Fas和 Apo-1为同一分子,并在 1993年国际人类白细胞抗原分型会议上被命名为 CD95(为方便起见,本文用 Fas表示)。结构分析表明, Fas属I型膜蛋白,其细胞膜外区域(extracellular region, EXT)同肿瘤坏死因子/神经生长因子受体(tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor, TNF/NGF-R)一样,均含有数个(3个)半胱氨酸富集区,故归为 TNF/NGF-R家族。

目前认为, Fas分子中至少有 3个与凋亡诱导功能密切相关的结构域,分别为 EXT死亡结构域(death domain, DD)和调控区(regulatory region, RR)。虽然 TNF/NGF-R家族成员中 EXT的氨基酸序列是相对保守的,但相互之间并无明显的交叉反应性, Fas的 EXT只能结合抗 Fas抗体或者 FasL(Fas ligand)。Fas分子的细胞内端含有一个由 68个氨基酸组成

的结构域,一旦该区发生缺失、突变或者被显性负调分子阻截失活, Fas的细胞凋亡诱导功能即随之丧失。因此,这个传导死亡信号所必需的结构域被称为 DD。进一步研究则表明, DD本身并不具备效应功能,它只是一个信号分子间相互作用的接合器(adaptor)元件,类似于 SH(Src homology) BH(Bcl-2 homology)等结构域。正因为如此,含有 DD的信号分子相互之间可以形成二聚体^[1,2]。另外, Fas羧基末端由 15个氨基酸组成的 RR,可结合一种 Fas功能相关磷酸酶(Fas-associated phosphatase-1, FAP-1),并由此而抑制 Fas的细胞凋亡诱导作用^[3]。

细胞凋亡的发生是蛋白酶有序级联切割的结果,与该级联切割反应相关的蛋白酶都从属于一个日益扩大的蛋白酶家族,它们大多在天冬氨酸残基后切割靶蛋白,而且其自身氨基酸序列中相对保守的半胱氨酸残基为蛋白酶切割功能所必需。因此,现已被提议命名为半胱天冬酶(caspase)家族^[4]。到目前为止所发现的全部 11种半胱天冬酶均以酶原形式合成。然而,从酶原到酶的转化过程中被降解掉的前结构域(pro-domain)却是长短不一的。一般认为具有较长前结构域者多为调节性蛋白酶,位于级联切割程序的上游,起到启动、传递和放大死亡信号的作用;而前结构域较短者则多为效应性蛋白酶,位于级联切割程序的下游,直接作用于 CAD(caspase activated DNase)等死亡底物,导致细胞发生一系列具有凋亡特征性的生化形态改变。因此,根据在细胞凋亡发生过程中被活化

收稿日期: 1998-12-23 修回日期: 1999-04-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目

作者简介: 金洪传(1974-),男,硕士,从事肿瘤生物治疗研究,现在邵逸夫医院肿瘤科工作。

的时间先后和作用不同,半胱天冬酶家族成员可分成 3 大类,即起始蛋白酶(initiator protease)、放大蛋白酶(amplifier protease)和效应蛋白酶(machinery protease),其代表分别有 caspase-8 (FLICE/MACH1)、caspase-1 (ICE) 和 caspase-3 (YAMA/cpp32 β)^[5,6]。

Fas 信号传导途径与 caspase 级联切割程序的关系近年来正逐渐被阐明。Fas 结合 FasL 或抗 Fas 抗体后,导致 DD 暴露活化,随即结合另一含 DD 的信号蛋白 FADD (Fas-associated DD containing protein),后者的氨基末端含有另一种接合器元件 DED (death effector domain),并可借此与同样含有 DED 的 caspase-8 相结合而活化之,从而启动 caspase 级联切割程序^[7]。

同样从属于 TNF/NGF-R 家族的 TNF-R 也可被其相应配体 TNF α 激活而活化 caspase 级联切割程序,最终诱导凋亡的发生。但 TNF-R 还可上调转录因子 NF κ B 的表达。Fas 途径是否同样也有类似的分叉呢? 这个几年前还无法回答的问题现已有了肯定的答案。Fas 除了结合 FADD 外,还可结合一种未完全定性的蛋白 Daxx。并且 Daxx 与 Fas 的结合同样依赖于 DD,因为 DD 一旦缺失,将同时阻断 Daxx 和 FADD 的活化;稍有不同的是,Daxx 中并无 DD,而且,Daxx 同 Fas 的结合不受 RR 影响^[8]。

由 Fas 募集的 Daxx 被认为同 Fas 诱导的 JNK/SAPK 途径活化相关,因为 Daxx 通过羧基末端结合 FasDD 后,其氨基末端的 effector domain 即可活化 MEKK1,并启动 JNK/SAPK 途径;而且,如果 caspase 活性受抑,JNK/SAPK 途径就不受影响。JNK/SAPK 途径最终可以磷酸化 c-Jun、ATF-2 和 Elk-1 等转录因子,并通过拮抗 NF κ B 和 Bcl-2 对细胞凋亡的抑制作用来下调细胞凋亡的发生阈值。然而,同 P38MAPK 途径一样,JNK/SAPK 途径的活化也不是所有细胞凋亡的诱导所必需的^[8,9]。

Fas 还可激活一种丝/苏氨酸激酶,即 FAST (Fas activated Serine/Threonine kinase)。FAST 同 MAPK 的氨基酸序列有微弱的同源性,不同的是,FAST 由于磷酸化而失

活,一旦发生去磷酸化则被活化并继而磷酸化。TIA-1 后者是一种 RNA 结合蛋白,在接受凋亡诱导信号刺激后,即可由胞核转出,在胞浆中浓聚并特异结合于一些细胞生长所必需的基因转录产物 5' 端非翻译区的“CUU UUC”基序,通过抑制帽结合蛋白 eIF-4E 来阻断靶基因的表达,并同 DNA 的有序降解有一定关系。FAST 活化的具体机制目前尚未清楚,可能同 Fas 诱导神经酰胺 (ceramide) 积聚继而活化 CAPP (ceramide activated phosphatase) 有关^[10]。

2 其他信号分子对 Fas 途径的影响

2.1 Bcl-2

Bcl-2 可以抑制细胞凋亡的发生,这早已为人们所熟知,但其机理一直不太清楚。近年来的一些研究进展开始揭开 Bcl-2 的神秘面纱。几乎所有的 Bcl-2 家族成员 (Bad 除外),都可借助于羧基末端的跨膜结构域而定位于线粒体外膜、核膜或内质网等膜相结构中,在细胞内钙平衡、活性氧代谢以及膜通透性等的调节中发挥重要作用。所有具有抗凋亡活性的 Bcl-2 家族成员均具有 4 个保守的接合器元件 BH1、2、3、4,其中 BH4 同抗凋亡活性密切相关;相反,可促进细胞凋亡的 Bcl-2 家族成员则无 BH4。研究表明,一定浓度的活性 Bcl-2 不仅可以有效地防止细胞色素 C 从线粒体外室向胞浆释放;而且还可以直接结合失活 CED-4 的人类同源物 Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1)。而 Apaf-1 在存在有细胞色素 C 和 dATP (因为 Apaf-1 可能是一种 ATP 酶) 时可结合并活化 caspase-3。因此,通过抑制凋亡体 (apoptosome) 即 CED-3-CED-4-CED-9 复合体的形成来阻断 caspase 级联切割程序,被认为是 Bcl-2 抑制细胞凋亡的主要机制^[11,12]。

Bcl-2 同拮抗物 Bax、Bad 的消长平衡,一直被认为是决定细胞命运的调定点之一。Bcl-2 的翻译后修饰,尤其是磷酸化修饰对其抗凋亡活性的影响,近年来也有了一些深入的研究。结果表明,Bcl-2 可以募集 Raf-1 至线粒体外膜,并以非 Ras 依赖方式活化之,然后,活化的 Raf-1 即可直接或启动非 Erk 相关激酶级联反应来磷酸化 Bad,使之失活并被 14-3-3 结合而

滞留在胞浆某部 14-3-3 是一种广泛存在的细胞内分子伴侣,可以通过能特异识别磷酸化丝氨酸序列的结合口袋来结合并隔绝多种信号分子,如磷酸化 cdc25 磷酸化 Bad 等。失活的 Bad 不能结合 Bcl-2 而降低其有效浓度,因此也就对由 Bcl-2 调控的线粒体外膜疏水性通道形成的干扰作用和对 Bcl-2 抗凋亡活性丧失了拮抗作用,使得细胞的异常存活成为可能。另外, Bcl-2 自身也可被磷酸化而失活,但其相应激酶并非 Raf-1,因为 Bcl-2 结合无激酶活性的 Raf-1 后仍可被磷酸化而失活。目前一般认为,失活 Bcl-2 的激酶很可能同 JNK/SAPK 或 P38MAPK 途径相关^[13,14]。

2.2 c-myc c-myc 是一种具有螺旋-环-螺旋结构的转录因子,同其分子伴侣 Max 相结合后,可诱导处于低浓度生长因子环境中的细胞发生凋亡。c-myc-Max 复合体诱导细胞凋亡的具体机制尚未完全明确,初步认为 c-myc 可以上调靶细胞对 Fas 途径的敏感性而促进细胞凋亡的发生,而定位突变实验结果则进一步表明, c-myc 的促细胞凋亡作用同调节靶基因的转录表达相关。c-myc 诱导鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 的表达被认为同 c-myc 的促凋亡作用关系最为密切,因为如果抑制 ODC 活性,则可有效中和 c-myc 的促凋亡活性;相反,如果异位高表达 ODC,则可替代 c-myc 诱导细胞发生凋亡。ODC 可以通过改变细胞内核苷酸库,并继而上调 Fas 和 FasL 的表达以及 Fas-FasL 之间的相互作用,以促进细胞凋亡的发生。而且 c-myc 可以下调 Saf (suppressor of apoptosis by Fas) 的表达, Saf 则能有效抑制 Fas 信号的传导,其具体机制未明,很可能与 FLIP 相关。另外, c-myc 也能促进 P53 表达,并进而抑制 IGF-1 受体的表达,因此在一定程度上限制了生存信号的有效输入^[15]。

2.3 神经酰胺 在由 FasL 攻击、血清剥夺等生长抑制性信号诱导的细胞应激反应 (如细胞周期停顿、细胞凋亡等) 中,神经酰胺作为第二信使在其中发挥重要作用。神经酰胺与细胞凋亡的关系研究更是近年来的热门课题,因为在 Fas 活化后数小时,细胞内神经酰胺浓度即可上升 3~8 倍;而如果用可渗透入细胞内的神

经酰胺类似物处理细胞,则可部分替代 FasL 的细胞凋亡诱导作用。神经酰胺在细胞内积聚后,可以直接激活靶酶,如 CAPK (ceramide activated protein kinase) 和 PK ζ 等。其中, CAPK 是一种属于 PP2A 家族的蛋白磷酸酶,它的活化可能与 FAST 的活化、细胞内 pH 值调节以及 G₁ 期滞留 (与 Rb 去磷酸化相关) 有关; CAPK 不仅可以作为 KSR (kinase suppressor of Ras) 抑制正性 MAPK 信号转导通路即 Raf/MAPK 途径,而且可能同负性 MAPK 通路即 JNK/SAPK 途径的活化相关。PK ζ 则是一种不典型 PKC,因为它不被 PMA 或 DAG 活化,其活性也不受 Ca²⁺ 影响。细胞内的神经酰胺水平主要取决于其合成酶神经鞘磷脂酶和分解酶神经酰胺酶的活性对比。Fas 活化后可上调神经鞘磷脂酶活性,因此促进神经酰胺合成,具体机制尚待阐明。过表达 CrmA (一种来源于牛痘病毒的 caspase 特异抑制剂) 可减少神经酰胺的合成,表明 Fas 是通过 caspase 来调节神经鞘磷脂酶活性的。但是,究竟是通过 Fas 死亡诱导信号复合体 (death inducing signal complex, DISC) 或者 Daxx,还是由其他尚未发现的信号转导通路来最终执行该功能,尚不得而知^[16,17]。

3 Fas 途径与肿瘤的关系

由 Fas 诱导的细胞凋亡具有一定的生理意义,主要包括以下 3 方面:① 通过清除自身反应性淋巴细胞和活化后淋巴细胞以抑制自身免疫反应,稳定免疫系统;② 是杀伤性淋巴细胞发挥细胞毒作用的主要机制;③ 清除体内的“垃圾”细胞,如衰老细胞、肿瘤细胞以及在某发育阶段时点无存在意义的正常细胞等。由于 Fas 途径异常将导致细胞对凋亡产生一定的抗性,最终形成增生性疾病,因此, Fas 途径与肿瘤发生发展的关系,正越来越为人们所关注,甚至认为 Fas (以及 FasL) 可以归为抑癌基因^[15]。

肿瘤的发生发展是肿瘤细胞由“不成熟”向“成熟”缓慢演进的过程,同时也是一个物竞天择的进化过程。由于 Fas 途径异常而被赋予生存竞争优势的前肿瘤细胞,一旦由于其余基因变异积累而获得无限增殖能力,也就完成了正

常细胞向肿瘤细胞的转变,而且,成熟肿瘤细胞不仅由于对 Fas 途径诱导的凋亡具有抗性,更可以表达 FasL,从而在获得免疫豁免特权的同时,还可以有效地清除局部肿瘤特异性淋巴细胞,使肿瘤细胞在一个相对安全的局部微环境中发展。另外,肿瘤细胞表面的 FasL 可被肿瘤细胞及其周围间质细胞分泌的基质蛋白酶(MMP)降解,生成可溶性 FasL,从而可持续破坏局部间质,为肿瘤细胞浸润扩散创造有利条件^[19]。

Fas 途径发生异常,是细胞恶性转变过程中至关重要的一步。因此,如何恢复 Fas 途径的正常功能,将是日后肿瘤治疗中的新思路。研究表明,一些化疗药物在低剂量下仍可诱导功能性 Fas 在肿瘤细胞膜表面的表达,这些令人鼓舞的发现无疑开辟了肿瘤治疗研究领域的新天地^[20]。

Fas 途径诱导的细胞凋亡模型是凋亡机理研究三大模型中唯一的高等动物模型(其余 2 个为线虫和果蝇系统),也是目前动物机理研究中最常用的一个独特模型。结果显示,高等动物体内细胞凋亡的发生,不仅仅是完全主动的细胞自杀行为,也可以是细胞外信号经信号转导途径活化蛋白酶级联切割程序的结果。相信 Fas 途径诱导的细胞凋亡机理及其在生理或病理过程中的作用的逐渐阐明,将不仅有助于更全面地理解细胞生存和死亡过程,以及人类疾病发生的基本机制,而且将为肿瘤等病症的临床诊治提供更合理的方法。

参 考 文 献

- [1] Itoh N and Nataga S. A novel protein domain required for apoptosis: mutational analysis of human Fas antigen [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(15): 10932- 10937.
- [2] Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ED, et al. NMR structure and mutagenesis of the Fas death domain [J]. *Nature*, 1996, 384(6610): 638- 641.
- [3] Sato T, Inie S, Kitada S, et al. FAP-1: A protein tyrosine phosphatase that associated with Fas [J]. *Science*, 1995, 268(5209): 411- 414.
- [4] Alnemri M, Livingston DJ, Nicholson DW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature [J]. *Cell*, 1996, 87(2): 171- 173.
- [5] Wyllie A. An endonuclease at last [J]. *Nature*, 1998, 391(6662): 20- 21.
- [6] Frater A and Era G. A license to kill [J]. *Cell*, 1996, 85(6): 781- 784.
- [7] Bolidin MP, Goncharov TM, Golstein YV, et al. Involvement of MACH in Fas and TNF receptor-induced cell death [J]. *Cell*, 1996, 85(6): 803- 815.
- [8] Yang X, Far RK, Chang HY, et al. Daxx, a novel Fas-binding protein that activate JNK and apoptosis [J]. *Cell*, 1997, 89(7): 1067- 1078.
- [9] Lenczowski JM, Dominguez L, Eder A, et al. Lack of a role for JNK and AP-1 in Fas-induced apoptosis [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(1): 170- 187.
- [10] Tian Q, Taupin J, Elledge S, et al. FAST phosphorylates TIA-1 during FAS-mediated apoptosis [J]. *J Exp Med*, 1995, 182(3): 865- 874.
- [11] Barinaga M. Death by dozens of cuts [J]. *Science*, 1998, 380(5360): 32- 34.
- [12] Hengartner MO. Death cycle and Swiss army knives [J]. *Nature*, 1998, 391(6666): 441- 442.
- [13] Gajewski TF and Thompson CB. Apoptosis meets signal transduction: elimination of BAD influence [J]. *Cell*, 1996, 87(4): 589- 592.
- [14] Franke TF and Cantlay LC. A bad kinase made good [J]. *Nature*, 1997, 390(6656): 116- 117.
- [15] Green DR. A myc-induced apoptosis pathway surfaces [J]. *Science*, 1997, 278(5341): 1246- 1247.
- [16] Huannun YA and Obeid LM. Ceramide and the eukaryotic stress response [J]. *Bio Sci Trans*, 1997, 25(4): 1171- 1175.
- [17] Dbabo GS. Regulation of the stress response by ceramide [J]. *Bio Sci Trans*, 1997, 25(4): 557- 560.
- [18] Williams N. Tumor cells fight back to beat immune system [J]. *Science*, 1996, 274(5291): 1300- 1302.
- [19] Tanaka M, Suda T, Haze K, et al. Fas ligand in human serum [J]. *Nature Med*, 1996, 2(3): 317- 322.
- [20] Micheau O, Solary E, Hammann A, et al. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to Fas-mediated cytotoxicity [J]. *J Nat Can Ins*, 1997, 89: 783- 789.

责任编辑 黄晓花]