

NF- κ B 激活的调节机理

陈丹英^① 翟中和^① 舒红兵^{①②*}

(① 北京大学生命科学院, 北京 100871; ② National Jewish Medical and Research Center, Denver, CO 80206, USA.

* 联系人, E-mail: shuh@njc.org)

摘要 NF- κ B 是广泛存在于各种类型细胞中的一种转录因子. 它调节大量与细胞应急反应, 如免疫应答、炎症反应和细胞抗凋亡作用相关的基因的转录. NF- κ B 活化的失调与许多人类病症如类风湿性关节炎、癌症等直接相关, 因此 NF- κ B 激活的调节机制一直是细胞生物学及免疫学领域的研究热点. NF- κ B 通常与抑制因子 I κ Bs 相结合, 以非活性形式存在于细胞质中, 当细胞受到上游刺激因子, 如肿瘤坏死因子、白介素-1、细菌脂多糖等的作用时, I κ B 在激酶复合物 IKK 的作用下被磷酸化, 进而被泛素连接酶复合物 E3RSI κ B/ β -TrCP 识别并泛素化, 然后被 26S 蛋白酶体识别并迅速降解. I κ B 的降解使 NF- κ B 的核定位序列暴露出来, 进入核内起始转录. IKK 的活化是 NF- κ B 激活信号通路中的关键步骤, 同时 NF- κ B 的磷酸化、NF- κ B 前体的降解等也在其中发挥重要作用. 本文重点介绍 NF- κ B 激活调节的经典途径及最新研究进展.

关键词 NF- κ B IKK 泛素 TNF-R1 TLR 细胞凋亡 信号转导

转录因子 NF- κ B(nuclear factor- κ B)于 1986 年被发现, 作为能与免疫球蛋白 κ 轻链基因增强子结合的核因子, 起初被认为仅在 B 淋巴细胞中表达^[1]. 后来人们发现 NF- κ B 几乎在所有类型细胞中都表达. NF- κ B 通常与抑制因子 I κ Bs(inhibit κ B)相结合, 以非活性形式存在于细胞质中; 当细胞面临生存危机, 如机体为防御细菌、病毒或真菌的侵袭而启动免疫反应时, NF- κ B 被激活. NF- κ B 活化的失调与多种人类疾病如类风湿性关节炎, 肿瘤等直接相关, 因此, NF- κ B 激活的分子机理及生理病理效应是过去 10 多年中生物学领域的研究热点. 本文将重点描述 NF- κ B 激活的分子调节机制及生物学意义.

1 NF- κ B 简介

1.1 NF- κ B 蛋白家族

活化的 NF- κ B 是一个二聚体, 由 NF- κ B/Rel 家族成员组成, 具有与靶基因增强子的特定序列(5'-GGGACTTCC-3')结合并促进转录的能力. 已知哺乳动物细胞中 NF- κ B 家族成员有 5 个: NF- κ B1(p50 及其前体 p105), NF- κ B2(p52 及其前体 p100), c-Rel, RelA(p65)和 RelB. 果蝇中 NF- κ B 家族成员包括 Dorsal, Dif 和 Relish. 所有这些成员都含有一个高度保守的由 300 个氨基酸组成的 Rel 同源区 RHR(rel homology region), 其中包含两个类似免疫球蛋白的结构域. RHR 是 NF- κ B 蛋白的功能结构域, 负责形成

二聚体, 与 DNA 以及抑制蛋白 I κ B 结合; RHR 同时还含有核定位序列 NLS(nuclear localization signal), 负责活化的 NF- κ B 进入核内行使功能. NF- κ B 蛋白能形成同源或异源二聚体. 其中 p65:p50 是最早被发现也是存在最广泛的二聚体形式, 因此通常所说的 NF- κ B 指的是 p65:p50 复合体. 含有 p65 的 NF- κ B 二聚体能够激活转录, 而 p50/p50, p52/p52 同源二聚体则抑制靶基因的转录^[2]. 为了更好地了解 NF- κ B 家族成员的生理功能, 研究者们对小鼠中 NF- κ B 的基因位点进行了敲除实验, 结果发现仅有 p65/RelA 是小鼠存活所必需的, 其他的 NF- κ B 家族成员的功能可能能够互补^[3].

1.2 I κ B 蛋白家族

研究证明, 所有的 NF- κ B 复合物均以相似的方式被调节——与抑制因子 I κ B 结合. 当上游信号导致 I κ B 蛋白的磷酸化并降解时, NF- κ B 就被释放出来并向核内迁移, 激活靶基因的转录. I κ B 于 1988 年被发现, 目前其家族成员包括 I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, NF- κ B1 的前体 p105, NF- κ B2 的前体 p100, 以及果蝇的蛋白 Catus. 与 p105 不同, p100 可同时作为 I κ B 家族成员及 RelB 的结合分子, p100 的剪切结果产生活化的 p52:RelB 异源二聚体^[4]. 而 Bcl-3 与其他 I κ B 家族蛋白的作用方式也不同, 它在核内与 p50 或 p52 的同源二聚体结合, 使其功能发生转变: 由转录抑制转变为转录激活^[5].

每个 I κ B 家族成员分子中均含有 6 或 7 个 ankyrin 重复序列, I κ B 分子凭借这些重叠的螺旋结构与 NF- κ B 分子中的 RHR 区域结合, 掩蔽 NF- κ B 的核定位序列 NLS, 使 NF- κ B 滞留在胞质中. I κ Bs 在终止 NF- κ B 活性的过程中也起到重要作用. I κ B α 的转录受到 NF- κ B 的调节, 而新合成的 I κ B α 进入核内与 NF- κ B 结合, 使其从 DNA 上解离下来(NF- κ B 与 I κ B 蛋白的亲合力高于其与 DNA 的亲合力), I κ B α 分子中的核输出序列 NES(nuclear export signal)再促使 NF- κ B 重新回到细胞质中^[7].

I κ B α 是 I κ B 家族中首先被克隆的分子并且研究得最为透彻. 研究者们获得了 I κ B α 和 Bcl-3 缺失的小鼠, 其中 Bcl-3 缺失的小鼠缺乏对某些特异免疫原的应答反应; 而 I κ B α 缺失的小鼠在出生后 7~10 d 即死亡, 出现的各种免疫病症与 NF- κ B 被过量激活的表征一致^[7]. I κ B 家族成员的表达受到 NF- κ B 的调控, 只有 I κ B β 例外: 实验表明 I κ B α -/- 小鼠中的 I κ B β 不能替代 I κ B α 的作用; 但在 I κ B β 基因前加上受 NF- κ B 控制的 I κ B α 的启动子序列之后, I κ B β 就能有效地替补 I κ B α 的作用^[9]. 近来有研究者发现, I κ B β 在胞质中与一种 GTP 结合蛋白 κ B-Ras 结合, 只有当 I κ B β 与 κ B-Ras 解离后才能被磷酸化而发生降解^[9]. I κ B 家族其他成员的生理特性迄今仍不甚明了.

1.3 NF- κ B 的功能及活化因素

NF- κ B 调节大量基因, 特别是与免疫应答和炎症反应相关基因的转录, 包括细胞因子(生长因子)、受体、黏附分子、急性期蛋白、病毒基因、转录因子和调节因子等. 值得注意的是, NF- κ B 可通过诱导干扰素的表达而发挥抗病毒功能^[10]. 但同时有些病毒如人免疫缺陷病毒 HIV-1 和人 T 淋巴细胞病毒 HTLV-1, 经过长期的适应并不诱导干扰素的产生, 而是借助 NF- κ B 激活它们自身基因的表达, 同时刺激人淋巴细胞的增殖, 以便于它们在其中进行复制. 另一方面, 在许多细胞中 NF- κ B 通过诱导某些存活基因的表达而保护细胞不发生凋亡.

NF- κ B 活化的失调与许多人类病症直接相关, 包括各种癌症、神经退行性疾病、毛细血管扩张共济失调症、类风湿性关节炎、哮喘、肠炎以及大量其他炎症; 同时 NF- κ B 在某些造血细胞、上皮细胞和淋巴器官发育过程中发挥重要作用. 近来的研究证明, NF- κ B 家族成员还参与了神经突触的形成和肿瘤的迁移^[10].

NF- κ B 能被各种刺激因子激活, 包括引起炎症反应的肿瘤坏死因子(TNF α , tumor necrosis factor α)、白细胞介素-1(IL-1, interleukin-1)、T 细胞和 B 细胞的有丝分裂原、细菌以及细菌脂多糖 LPS(lipopolysaccharide)、病毒粒子及病毒蛋白、双链 RNA(dsRNA)、刺激免疫的 DNA 序列 ISS-DNA(immunostimulatory DNA)、生理及化学胁迫等^[10]. 这些刺激因子的信号如何在细胞内传递并最终导致 NF- κ B 的活化, 一直吸引着研究者的浓厚兴趣. 由于大多数 NF- κ B 的活化因子也能够激活其他一些与 NF- κ B 没有直接关联的信号通路, 这使得区分信号传递的早期事件中哪些与 NF- κ B 的活化直接相关比较困难. 因此, 仅当各种激活 NF- κ B 信号通路共同的下游机制得以相对阐明后, 研究者们才较快地获得了一些典型激活因子上游信号途径的细节.

2 NF- κ B 活化的分子机制

2.1 NF- κ B 活化机制概述

现在对各种胞外诱导因素如何激活 NF- κ B, 以及它们彼此信号传导途径的交汇点已有相对明确的认识. 典型的炎症刺激因子如 TNF, IL-1 及 LPS 等通常在数分钟内促使 I κ Bs(尤其是 I κ B α)发生降解(图 1). 首先 I κ B α 在激酶复合物 IKK 的作用下被磷酸化, 磷酸化发生在 I κ B α 分子中 Ser32 和 Ser36 两个位点^[11,12]. IKK 复合物由活性亚基 IKK α , IKK β 和调节亚基 IKK γ 组成. 基因敲除实验表明, IKK β 和 IKK γ 是炎症因子激活 NF- κ B 所必需的. 磷酸化后的 I κ B α 被泛素连接酶复合物 SCF(Skp-1/Cul/F-box)家族成员 E3RSI κ B/ β -TrCP 识别^[13], 从而促使 I κ B α 分子中的 Lys21 及 Lys22 泛素化^[14,15], 然后被 26S 蛋白酶体识别并迅速降解. I κ B α 的降解使得 NF- κ B 的核定位序列暴露出来, 进入核内起始转录.

上述被认为是几乎所有 NF- κ B 激活信号通路的共同模式中, NF- κ B 分子从胞质向核内的转移是其关键. 但近来的研究结果表明这不是 NF- κ B 活化的惟一机制. 首先, 研究者发现 NF- κ B : I κ B α 复合物实际上能够在核内/核外来回穿梭^[16~18]; 其次, 尽管 I κ B α 的磷酸化发生在胞质中, 但对其进行识别的泛素连接酶复合物 E3RSI κ B/ β -TrCP 却定位在核内^[19], 由此可推测 I κ B α 被蛋白酶体降解之前的泛素化发生在核内; 研究者还发现, E3RSI κ B/ β -TrCP 的核内定位是由于 huRNP-U 与之结合并占据了 I κ B 的结合位点, 用

huRNP-U 的反义 RNA 作用之后可以导致 I κ B 被持续降解. 至今这一现象的生物学意义还不清楚. 尽管如此, 经典模式对于 NF- κ B : I κ B β 复合物仍然成立. 因为 I κ B β 没有核输出序列 NES^[20,21], 在正常情况下它不能在核内外穿梭. 而大多数细胞中约有一半的 NF- κ B 与 I κ B β 结合.

除此之外, 一些刺激因素, 如缺氧等激活 NF- κ B 时需要 I κ B α 分子中 Tyr42 磷酸化^[22, 23]. 目前还不知道哪一种酪氨酸蛋白激酶行使了这一功能, 推测可能是 Src 家族的成员. 而 Tyr 被磷酸化的 I κ B α 通过与 PI3 激酶的结合从 NF- κ B 上解离下来, 与 26S 蛋白酶体参与的降解途径无关^[23]. Tyr42 在 I κ B 蛋白家族中并不是一个保守位点, 因此这一机制应是 I κ B α 所特有的. 另一个例外是当细胞受到短波长(254 nm)的紫外光照射而激活 NF- κ B 时, I κ B α 虽然通过 26S 蛋白酶体发生降解, 但不由 Ser32, Ser36 或 Tyr42 的磷酸化介导, 其确切机制尚不明^[24, 25]. 相对其他典型的诱导因子如 TNF α , IL-1 或 LPS 的作用, 在上述两种情况下 NF- κ B 的活化效应缓慢而且微弱.

除了经典的由炎症因子诱发的 IKK β -I κ B-p65 : p50 活化途径之外, 近来发现的另一条 NF- κ B 活化途径引起了人们的注意(图 1). p52 : RelB 是细胞中存在的一种 NF- κ B 的异源二聚体形式. 当 p52 前体分子同时也是 I κ B 家族成员的 NF- κ B2/p100 与 RelB 结合时,

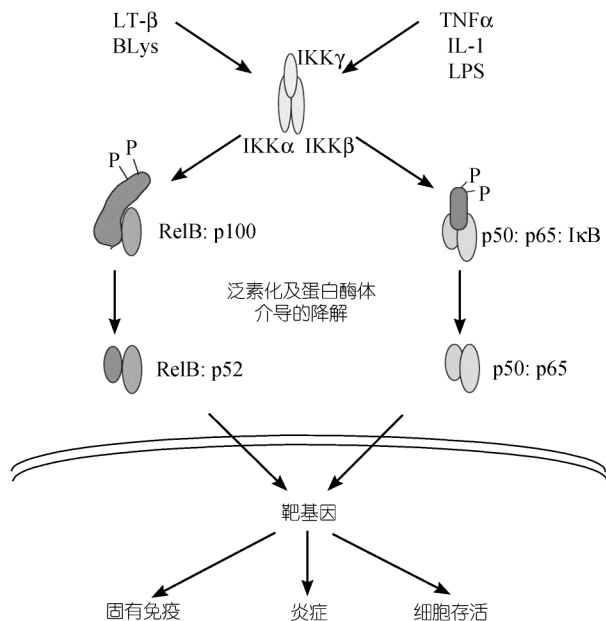


图 1 NF- κ B 信号途径示意图

其中经典途径涉及 IKK β 介导的 I κ B 磷酸化和降解过程; 非经典途径涉及 IKK α 介导的 p100 的磷酸化和降解过程(引自文献[26])

二聚体处于抑制状态; p100 的降解产生了有活性的 p52 : RelB. 与 I κ B α 类似, p100 降解同样需要磷酸化, 基因敲除实验证明引起 p100 磷酸化的是 IKK α , IKK α 可以被上游的蛋白激酶 NIK(NF- κ B inducing kinase)激活. 研究表明, IKK α -p100-p52 : RelB 途径可被淋巴细胞毒素 β 的受体 LT β R 和 TNF 家族成员 TALL-1 的受体 BAFF-R 所诱导.

2.2 NF- κ B 活化的关键因子: I κ B 激酶 IKK

2.2.1 IKK 复合物成分

在炎症因子诱导的经典 NF- κ B 活化途径中, 关键步骤是 I κ B 分子中的 Ser32 及 Ser36 被磷酸化而后降解, 因此相当多的研究者都致力于克隆行使这一功能的蛋白激酶. 1997 年, 研究者们获得了一种能够被细胞因子诱导激活的蛋白激酶, 命名为 IKK(I κ B kinase)^[27, 28], 它能够磷酸化 I κ B α 和 I κ B β 分子中特定的 Ser 残基. 纯化的 IKK 激酶活性主要集中在分子量约 700~900 kD 的蛋白复合物中; 而另一研究组获得了分子量相对较小(300 kD)的纯化产物^[29], 因此推测 IKK 是一个包含多种蛋白成分的复合物. 利用生化纯化、酵母双杂交筛选及遗传功能互补等方法, 研究者们陆续克隆了 IKK 复合物的 3 种成分: IKK α , IKK β 和 IKK γ . IKK α 和 IKK β 分子量分别为 85 kD 及 87 kD. IKK α 和 IKK β 的同源性很高, 都含有 N 端的蛋白激酶结构域和亮氨酸拉链(LZ, leucine zipper)以及螺旋-环-螺旋(HLH, helix-loop-helix)结构. IKK α 和 IKK β 是 IKK 复合物中的催化亚基.

IKK 复合物中的第 3 种成分是分子量为 48 kD 的调节亚基 IKK γ ^[30], 同时也被其他研究者命名为 NEMO(NF- κ B essential modulator)^[31]、IKKAP1(IKK-associated protein 1)^[32]及 FIP-3(14.7 kDa interacting protein)^[33]. 二级结构预测表明 IKK γ 含有大量超螺旋结构, C 端也具有亮氨酸拉链结构. IKK γ 分子 C 末端的 23 个氨基酸与 FIP-2 蛋白有 70% 的同源性^[33]. 因此 IKK γ 能与腺病毒蛋白 AdE3-14.7K 相结合, 这种结合可能是腺病毒蛋白能够抑制 TNF α 诱导的细胞裂解反应的原因之一^[34].

有研究者认为 IKK 复合物还包括其他一些蛋白, 如 I κ B 和 Rel 家族蛋白^[35], 丝裂原相关蛋白 MAP-1(mitogen association protein1)和胞外信号调节激酶 MEKK1(extracellular signal-regulated kinase kinase)^[28], NIK^[36], IKK 相关蛋白 IKAP(IKK association protein)^[35]等. 但这些结果有待进一步实验验证.

证,另外这些蛋白是否在生理状态下存在于 IKK 复合物中亦不确定.最近有报道认为 Cdc37 和 Hsp90 是 IKK 复合物的成分之一^[37],当用 Hsp90 的抑制物处理细胞时,IKK 复合物的分子量减小,并且 TNF α 诱导其活化的效应也丧失了.但 Hsp90 曾被报道与多种激酶包括 RIP(receptor interacting protein)相互作用^[38]. RIP 是 TNF α 激活 NF- κ B 过程中必需的关键性激酶^[39].因此, Hsp90 究竟是 IKK 复合物中的功能性成分,还是仅仅因为与多种激酶相互作用从而影响 TNF α 的信号途径,仍然不清楚.

已知 700~900 kD 的 IKK 复合物中含有大致等量的 IKK α 和 IKK β ,以 IKK α/β 二聚体的形式存在;IKK γ 的含量未知,以二聚体或四聚体的形式存在^[30].

2.2.2 IKK 的激酶活性

IKK α/β 的激酶结构域与其他丝氨酸/苏氨酸激酶相似,ATP 结合位点的序列高度保守,其中 Lys44 突变可导致 IKK α/β 失活^[40,41].过量表达 IKK α/β 的激酶失活突变体,能够抑制 TNF α 诱导的 p65 的核转移以及 NF- κ B 启动转录的活性.实验表明 IKK β +/−细胞与正常细胞相比,IKK 的活性降低了两倍,而 NF- κ B 的活化程度下降了 70%~80%.说明 IKK 的活化是 NF- κ B 激活途径中的限速步骤,只要 IKK 的激酶活性受到稍许减弱就会显著抑制 I κ B 的降解和 NF- κ B 的激活.

IKK 区别于其他激酶的特点,是它的活性亚基具有 LZ 以及 HLH 结构.基因突变的研究证明,IKK α/β 二聚体的形成是由 LZ 区域介导的^[29,40,41],这种二聚化对于 IKK 的激酶活性是必需的.研究者们对 IKK 的活性进行了酶学分析^[32,42],结果表明 I κ B α 的 C 端区域能够降低 IKK 激酶的 K_m 值;用 I κ B α 与 p65 : p50 形成的复合物作为底物时,IKK 的 V_{max} 值增加了.这一结果表明,较之单独存在的 I κ Bs,IKK 更倾向作用于与 NF- κ B 形成复合物的 I κ Bs.由此可以解释新合成的游离的 I κ B 在 IKK 仍具有活性的情况下仍然能够在细胞中积累.

2.2.3 IKK 的激活

NF- κ B 的核转移是其激活过程中的关键步骤,这一过程需要众多蛋白的协同作用,IKK 是其中的关键分子,其活性受到高度调控.研究 IKK 的活性调节对了解 NF- κ B 的功能至关重要.

影响 IKK 活化的首要因素是 IKK 复合物的组装.

基因敲除实验表明,IKK β 和 IKK γ 是大多数刺激因素诱导 NF- κ B 活化所必需的.用细菌或酵母表达系统可以产生有活性的重组 IKK α 和 IKK β 蛋白^[43,41],但在哺乳动物细胞中,它们的活化依赖于与调节亚基 IKK γ 的结合^[44,31].IKK α 和 IKK β 首先借助于分子中的亮氨酸拉链结构域形成二聚体^[28,40,29],再分别通过 C 末端一段短的结构域与 IKK γ 结合^[45,46].实验表明,体外加入这段短肽能够抑制 IKK 复合物的形成,从而阻止其活化. IKK γ 除了在复合物组装过程中发挥关键作用外,还作为调节亚基通过其 C 端的锌指结构域将 IKK 复合物与上游激活蛋白连接起来.一些 IKK 及 NF- κ B 的激活因子如 HTLV-1 病毒的 Tax 蛋白被认为通过与 IKK γ 直接作用而发挥功能^[47].

除了复合物的组装外,IKK 的激活还需要 IKK α 或 IKK β 分子内部环状结构域中保守 Ser 的磷酸化^[4,48,49].实验表明,纯化的 IKK 与蛋白磷酸酯酶 PP2A 共同温育会导致 IKK 失活;HeLa 细胞用 PP2A 的抑制物处理后使得细胞内 IKK 活化^[27].与其他激酶类似,IKK α 和 IKK β 的激酶结构域中含有一段环状结构^[28,48,49],这一区域中的保守位点的磷酸化会引起分子构象的改变,从而导致激酶的活化.如果将 IKK β 分子环状区域中的 Ser177 和 Ser181 置换成 Ala,就会阻碍 IKK 的活化;如果将它们替换成磷酸化效应更强的 Glu,则会导致 IKK 的持续活化. IKK α 分子中的 Ser176 也有类似的作用.

直到现在,对于上游信号导致 IKK 复合物活化的机制仍不十分清楚.既然 IKK 的活化依赖于其分子的磷酸化,研究者们一直试图寻找能磷酸化 IKK 的上游蛋白激酶.已有的报道表明,众多的蛋白激酶在哺乳动物细胞中过量表达时能够激活 IKK,而它们的激酶失活突变体则能够抑制上游信号诱导的 IKK 激活,其中包括蛋白激酶 C(PKC)的各种异构体^[50],MAPKKK 家族成员,NIK^[40,51],AKT/PKB^[52,53],MEKK1^[54,55],MEKK2^[56],COT/TPL-2^[56],TAK1 (TGF β -activated kinase1)^[57,58],NAK/T2K/TBK^[59],MEKK3^[60]等.但其中大部分候选者的功能都不能在基因敲除实验中得到证实.只有 MEKK3 和 PKC θ 例外,有报道表明 MEKK3 是 TNF α 激活 NF- κ B 所需要的,但其作用机制尚不明^[60];而 PKC θ 缺失的小鼠的外周血 T 淋巴细胞不能被抗原激活,原因是细胞内的 NF- κ B 不能活化^[61,62].实验还证明,PKC θ 的激酶活性是其激活 NF- κ B 所需要的.但 PKC θ 不是直接活化

IKK 的激酶,它的作用可能还需要另外两种蛋白的参与。

在磷酸化 IKK 的候选者当中,曾经“呼声最高”的激酶分子是 NIK. NIK 是 MAPKKK 家族成员,由于它能与 TNF 受体结合蛋白 TRAF2(tumor necrosis factor associated factor)结合而被克隆^[63]. 过量表达时, NIK 能显著激活 NF- κ B^[49,64]. NIK 的激酶失活突变体能够抑制绝大多数诱导因子包括 TNF α 引起的 NF- κ B 的激活. 因此 NIK 曾被认为直接参与了 TNF α 及其他刺激因子诱导的 NF- κ B 的活化. 但后来的研究发现 NIK 能与 TRAF 家族的其他成员包括 TRAF3 结合,而后者与 NF- κ B 的活化无关^[65]. 研究还发现,将 TRAF2 分子中与 NIK 结合的部位替换为能够寡聚化的结构域,使之不能与 NIK 结合后,该分子仍能激活 NF- κ B. 酵母双杂交及蛋白免疫沉淀实验证明, NIK 能与 IKK α 特异性结合^[49,40],人们由此推测 NIK 通过直接磷酸化 IKK α 而激活 IKK^[49]. 但基因敲除实验证实 IKK α 并非 TNF α 诱导 IKK 活化所必需^[45,66]. 与这些结果类似,对 NIK 基因敲除小鼠的分析表明, NIK 并不是 TNF α 及 IL-1 激活 IKK 所必需的蛋白^[67].

近期的研究结果为 NIK 的生理功能提供了线索. 研究者发现 IKK α -/-小鼠的表征与 p100-/-小鼠的表征相似: B 细胞介导的免疫反应及 B 细胞的成熟均发生缺陷^[68,69]. 并且 IKK α 缺失的细胞中, p100 不能被剪切为 p52. 进一步实验证明, p100 的成熟过程受到高度调控,并与 NIK 相关^[69,70]. 而 IKK α 的缺失能够阻断 NIK 诱导的 p100 的剪切作用. 以上研究结果表明, IKK α 是 NIK 特异的下游靶基因,当 IKK α 被 NIK 激活后,进一步活化 p100,导致其发生磷酸化依赖性的剪切,生成有活性的 p52: RelB 复合物并进入细胞核促进下游靶基因的表达^[4]. 从已有的实验证据来看,经典的 IKK 复合物可能并未参与 p100 的剪接过程,因为 NIK 诱导的 p100 的剪接作用在 IKK β 和 IKK γ 缺失的情况下并未受到影响^[70]. 所以 p100 的剪接过程可能依赖于另一个非经典的含有 IKK α 和 NIK 的复合物. 现在对于激活 NIK-IKK α -p100 信号途径的细胞因子也有所了解. 其一是 TNF 受体家族成员 LT β -R(lymphotoxin- β -receptor). 使用抗 LT β -R 的激活抗体能够诱导细胞中 p100 发生 IKK α 依赖性的剪切作用,同时 LT β -R 缺失小鼠^[71]的表型与 NIK 突变小鼠 NIK^{aly/aly}^[72]和 NIK-/-小鼠^[67]的表型相似;其二是 BAFF-R (B-cell activating factor-receptor),

BAFF-R 是 B 细胞特异表达的 TNF 家族成员 TALL-1/BAFF^[73,74,75] 的受体之一. 基因敲除实验证明, BAFF-R 在 B 细胞的成熟和淋巴器官的形成过程中起关键作用^[75]. 最近的研究证明, BAFF-R 正是通过 NIK-IKK α 途径发挥作用的^[76].

除了磷酸化 IKK 的蛋白激酶以外,另一些激酶分子被证明参与了 IKK 和 NF- κ B 的激活,但与其激酶活性无关. 其中的代表性分子是 RIP. RIP(receptor interacting protein)是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在酵母双杂交系统筛选 Fas 相互作用分子时被发现^[77]. 其 N 端具有激酶结构域, C 端具有死亡结构域(death domain). 起初认为它是一种新的凋亡诱导分子,后来研究者发现,在哺乳动物细胞中 RIP 未参与 Fas 诱导的细胞凋亡^[78]. Hsu 等人^[79]证实, RIP 是 TNF-R1 信号传导复合物成分之一. 当细胞接受 TNF 信号后, RIP 被特异性地征召到 TNF-R1 信号复合物中,与 TRADD(TNF receptor associated death domain protein)及 TRAF2 结合并激活 IKK,从而导致 NF- κ B 的激活^[80,81]. 基因敲除实验进一步证实, RIP 是 TNF-R1 激活 NF- κ B 信号途径中的必需分子,但其激酶活性与这一功能无关^[39]. 近来有研究表明, TNF α 的刺激会导致 IKK 复合物被招募到 TNF-R1 信号复合物上^[82-84]. Zhang 等人^[84]认为 IKK 通过 IKK γ 与 RIP 的结合被招募到受体复合物中上,而 Devin 则认为是 IKK α 和 IKK β 被 TRAF2 招募到 TNF-R1 受体复合物中,而 RIP 负责活化 IKK. 尽管如此,至今未证实 IKK γ 与 TNF α 和 IL-1 受体复合物中的任何分子能直接结合,而 RIP 的激酶活性也与 IKK 的活化无关,说明 RIP 可能作为接头分子通过与 IKK 或其他活化 IKK 的激酶相结合来发挥作用.

现在发现的 RIP 家族成员有 4 个: RIP, RIP2/RICK, RIP3 和 RIP4/DIK/PKK 它们的激酶结构域具有同源性. 与 RIP 的 C 端死亡结构域不同, RIP2 的 C 端具有 caspase 激活和招募结构域 CARD(caspase activation and recruitment domain)^[85]; 而 RIP4 分子 C 端具有 11 个 ankyrin 重复序列^[86]; RIP2 和 RIP4 均能激活 NF- κ B, 但与 RIP 不同, RIP2 和 RIP4 的功能与其分子的激酶活性相关. RIP3 的 C 端与上述分子没有同源性,但它可以通过 C 端与 RIP 结合,从而抑制 RIP 激活 NF- κ B 的作用^[87,88].

同样具有接头分子功能并参与了 IKK 活化的激酶还有 IL-1 受体作用激酶 IRAK(IL-1 receptor asso-

ciated kinase) 和双链 RNA 依赖性的蛋白激酶 PKR(dsRNA-dependent protein kinase). IRAK 是 IL-1R/TLR(Toll-like receptors)受体信号复合物的成分之一,负责传递 IL-1 激活 IKK 的信号^[89]. 与 RIP 类似, IKK 的活化也不需要 IRAK 的激酶活性; PKR 是双链 RNA、病毒及革兰氏阴性细菌脂多糖(GNLPS)诱导 NF- κ B 激活的必需分子. 研究发现, 其激酶失活突变体同样能够激活 IKK^[90,91], 推测 PKR 通过与 IKK γ 的相互作用来行使功能.

除此之外, 近来研究者们还令人惊讶地发现了泛素蛋白及 MAPKKK 家族成员 TAK1(transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1)在 IKK 激活中的作用^[92,93]. 体外实验中, 接头蛋白 TRAF6 激活 IKK 需要两种因子的加入: TRIKA1 和 TRIKA2. 其中 TRIKA1 包括泛素蛋白 Ubc13 和 Uev1A, TRIKA2 包括 TAK1 和另外两种结合蛋白 TAB1(TAK binding protein 1)和 TAB2. 研究者认为, TRAF6 在 Ubc13 和 Uev1A 的作用下, 发生了非典型的泛素化, 导致 TRAF6 的活化, 然后激活 TAK1 复合物, 再进一步激活 IKK, 从而启动 JNK 和 NF- κ B 信号途径. 以上研究结果提出了泛素蛋白在 NF- κ B 信号途径中可能的新作用, 但由于这些是来自于体外实验的结果, 尚需体内实验进一步证实.

既然 RIP, IRAK1 和 PKR 的激酶活性与 IKK 的活化无关, 那么它们是通过什么途径活化 IKK 的呢? 有一种假说认为, RIP, IRAK1 和 PKR 可能与 IKK α/β 二聚体直接结合, 使它们在高度有序的 IKK 复合物中相互靠近, 从而促进彼此的磷酸化作用, 这样就不需要某种特定的 IKK 激酶通过磷酸化来活化 IKK. 因为除了被上游激酶作用以外, IKK 环状结构的磷酸化激活也可以由 IKK 自身完成^[10]. 当在昆虫细胞和哺乳动物细胞中过量表达时, 即使没有刺激因子存在, IKK β 和 IKK α 也保持很强的激酶活性. 尽管可能存在其他激酶的作用, 但对这一现象最直接的解释是 IKK 能够自身磷酸化而激活. 上游激酶由于数量和亲和力等原因, 仅能磷酸化少量的 IKK 分子, 环状结构的自身磷酸化可以使上游激酶对 IKK 的活化作用迅速放大. 自身激活还提供了这样一种机制, 即在单个的 IKK 复合物中, 单个催化亚基的激活将导致复合物中所有催化亚基的活化. 自身磷酸化在病毒 HTLV-1 蛋白 Tax 激活 IKK 的过程中发挥了关键作用. Tax 不是蛋白激酶, 但它能够促进其他蛋白形成二聚

体. 研究表明 Tax 通过 IKK γ 与 IKK 复合物结合^[90], 它可能将 IKK 的两个活性亚基聚拢从而诱使它们发生自身激活. 一些上游激酶可能也采用与 Tax 类似的机制激活 IKK, 而并非直接磷酸化 IKK 的环状结构域. 尽管如此, 在 IKK 的活化机制完全明确以前, 上述“促使接近”的模式还只能是一种假说.

另一个重要的尚待解决的问题是关于 IKK γ 的确切作用. 一个很吸引人的假设是 IKK γ 直接介导了上游激活因子对 IKK 的作用, 因此研究者们致力于克隆 IKK γ 相互作用的蛋白^[94,95], 而这些蛋白的生理功能有待研究. 另一个关于 IKK γ 的问题是: 是否 IKK γ 本身也受到磷酸化的调节? 尽管有实验证明 IKK γ 在 TNF α 的作用下会发生磷酸化, 但其确切的磷酸化位点和功能还不清楚^[47].

尽管迄今为止的研究结果似乎显示, IKK 是众多 NF- κ B 信号途径的汇集点, 但谨慎起见我们不应排除生理状态下存在若干类似 IKK 的激酶, 对 I κ Bs 的磷酸化及降解发挥作用.

2.2.4 IKK 的失活

IKK 失活的机制还不十分清楚, 但人们知道绝大多数刺激引起的 IKK 活化都是瞬时的. 刺激的程度越强, 反应的时间就越短. IKK 的瞬时激活和失活调节具有很重要的生理意义, 因为 NF- κ B 的持续激活会导致中毒或致死反应, 比如败血性休克或严重的炎症反应. TNF α 作用时, 大多数细胞中的 IKK 活性在 5~15 min 即达到高峰, 而在 30 min 内就降低至峰值的 25%, 在剩下的 90 min 内则缓慢下降^[27,29,48]. 与 IKK 的动力学一致, I κ B α 的降解一般在 15 min 内完成, 60 min 内胞质中的 I κ B α 便又重新积累. 上文中曾提到, IKK 活性的微弱降低即可引起 I κ B α 降解速度和 NF- κ B 活化速度的大大降低, 新合成的 I κ B 能逃脱被降解命运的原因, 大概就在于此时 IKK 的活性大大降低, 而且 IKK 对单纯 I κ B 蛋白的亲合力弱^[41].

在 TNF α 刺激的细胞中, 内源性 IKK 活性的下调可能是由 IKK 分子自身磷酸化引发的. 研究表明, TNF α 处理后, IKK α 及 IKK β 分子的 C 末端都发生了强烈的自身磷酸化^[48]. 将 IKK β 分子 C 端自身磷酸化区域中的 10 个 Ser 位点替换为 Ala, 可使 IKK β 的活化时间延长 4 倍, 相反将 Ser 替换为 Glu, 则极大地缩短了 TNF α 诱导的 IKK 活化时间. 这种抑制作用需要多个位点 Ser 发生磷酸化, 并且 I κ B 分子对 IKK

自身磷酸化具有抑制作用,只有当细胞中的 I κ B 被降解后,IKK 分子 C 端的自身磷酸化才能迅速地进行.上述过程能够作为一种时钟机制来限制 IKK 强烈的持续活化. IKK 分子 C 端的超磷酸化一方面可能导致 HLH 结构域发生构象改变,从而降低 IKK 的激酶活性;另一方面也可能招募大量的磷酸酯酶,使得 IKK 去磷酸化而失活.实验表明,哺乳动物细胞中持续表达的磷酸酯酶在 IKK 活性下调过程中发挥了作用^[27],目前尚不知道是否存在一种诱导表达的磷酸酯酶来下调 IKK 的活性.

2.2.5 IKK 的生理功能

考虑到 IKK α 和 IKK β 之间高度的序列同源性以及两种重组蛋白在体外均能有效地磷酸化 I κ B,起初人们认为这两种激酶在 NF- κ B 的激活过程中具有类似的功能.但关于 IKK α 和 IKK β 的激酶失活突变体的实验表明,IKK α 活性的丧失并不影响 TNF α 或 IL-1 诱导的 IKK 活化,这些结果首次显示了 IKK α 与 IKK β 在功能上的不同.当 IKK α 和 IKK β 基因敲除小鼠建立后,IKK 复合物中这两个催化亚基的功能才得以证实.

IKK α -/-小鼠研究得出的一个主要结论是:IKK α 不是炎症因子诱发 IKK 激活的必需因子.在 IKK α -/-小鼠的胚胎成纤维细胞、原初上皮细胞和肝细胞中,TNF α , IL-1 和 LPS 处理均导致正常的 IKK 活化和 I κ B 的降解^[96].近来研究者们发现,是 IKK α 而非 IKK β 介导了一些刺激因子对 IKK 复合物的激活作用^[97].如在乳房上皮组织和 B 淋巴细胞中,IKK α 突变体的导入使 IKK 复合物对 TNF 家族成员 RANKL(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)和 BAFF 的反应丧失,而对 TNF α , IL-1 和 LPS 的反应正常.

从 IKK α -/-小鼠中得出的另一个主要结论,是 IKK α 在某些组织和器官的发育过程中发挥了关键作用. IKK α -/-小鼠在出生后 4 h 即死亡^[45,68].新生的 IKK α -/-小鼠看起来缺乏四肢,尾巴、耳朵、颅面部发育失常,皮肤光滑紧绷,上皮的形成和构造明显异常.由于基底层细胞的过度增殖,突变小鼠的上皮比正常小鼠加厚了 5~10 倍,并且几乎没有发生分化.正常上皮组织由 4 种类型细胞次序形成,而突变小鼠的整个上皮结构几乎是均一的并且黏性很大,这可能是突变小鼠四肢与身体融合未能伸展出来的原因.由此可见 IKK α 在上皮组织的发育过程中发挥了关键

作用,但这一作用与它的激酶活性及对 NF- κ B 的活化作用无关^[99].研究者们进而发现,IKK α -/-小鼠体内 B 细胞的成熟和抗体的产生受到阻碍,但 T 细胞相关的反应是正常的^[68,69].那么 IKK α 对 B 细胞的特异功能是通过 NF- κ B 实现的吗?研究者发现,IKK α 缺失小鼠的 B 细胞反应表征与 p100-/-小鼠相似^[98,99].而 IKK α 缺失的细胞中 p100 不能正常剪切^[69].已有实验证明,IKK α 的激酶失活突变体能够阻断 NIK 诱导的 p100 的剪切作用^[100].而 p100 的剪接在 IKK β 和 IKK γ 缺乏的情况下并不受到影响^[69].以上研究结果表明,IKK α 负责活化 p100,从而导致其发生磷酸化依赖性的剪切.如上文所述,IKK α 可能的上游活化激酶是 NIK,非经典的 NIK-IKK α -p100/RelB 信号通路与 B 细胞的成熟及抗体的形成相关.最近的研究发现,B 细胞中特异表达的 TNF 受体家族成员 BAFF-R^[75],在 B 细胞的成熟和淋巴器官的组织过程中起关键作用,而 BAFF-R 正是通过 NIK-IKK α 的途径发挥其生理作用的^[76].

IKK β 基因敲除的结果在人们的预料之中.由于大量的肝细胞发生凋亡,IKK β -/-的小鼠胚胎在 12.5~14.5 d 时死亡^[33,101].这一典型的死亡现象与 p65 单缺失及 p65, p50 双缺失的小鼠一致,后两者分别在胚胎 14.5 d^[3]和 12.5 d^[102]时死亡.由于未知的原因,胚胎肝细胞表达大量的 TNF α ,在 NF- κ B 缺失的情况下会引起大量的细胞凋亡.正如研究者们预测,IKK β -/-细胞比正常细胞对 TNF α 诱导的凋亡敏感得多,并且细胞中 IKK 及 NF- κ B 在 TNF α , IL-1, dsRNA 和 ISS-DNA 的刺激下几乎都没有活化作用. IKK β +/-细胞中 IKK β 的表达量下降了 1 倍,导致 IKK 的激酶活性降低了 50%,NF- κ B 的活性则降低了 70%~80%.因此毫无疑问,IKK β 是炎症刺激因子诱导的 NF- κ B 活化不可缺少的蛋白激酶.最近有实验表明,IKK β 缺失的胸腺细胞中,NF- κ B 亦不能被激活,并且对 T 细胞受体诱导的细胞增殖作用反应很弱^[103].

IKK 复合物中 IKK γ 的功能相对明确.研究者通过遗传互补实验已证实,IKK γ 是包括炎症因子在内的众多刺激因素活化 NF- κ B 所必需的,用 TNF α , IL-1, dsDNA, LPS 等处理 IKK γ 缺失的细胞,IKK 和 NF- κ B 均不能被活化^[31].

2.3 泛素依赖性的 I κ B 的降解

以上介绍了 NF- κ B 活化途径的第 1 个共同步骤: I κ Bs 在 IKK 的作用下被磷酸化;紧接着的第 2 个步

骤是磷酸化的 I κ B 分子被泛素降解系统识别并发生降解,产生有活性的 NF- κ B 二聚体。

2.3.1 泛素降解途径

泛素降解系统可能是机体中最为繁忙的蛋白降解系统.这一系统的功能最初被认为是降解老化的、受损坏的、错误折叠或装配的蛋白,但近来的研究发现,这一系统控制着细胞内多种功能性调节蛋白的数量,其中包括细胞周期蛋白、转录因子、细胞生长调节因子及信号转导蛋白等.这一系统的名称来源于一种细胞中广泛存在的小分子量蛋白——泛素,从酵母到人类细胞中都很保守.泛素降解途径由3个步骤组成:(1)一个或几个泛素多肽分子共价连接到蛋白底物上;(2)泛素分子之间彼此连接形成泛素多聚体;(3)泛素标记的蛋白由 26S 蛋白酶复合物降解.整个过程由若干酶分子顺序完成:首先泛素活化酶 E1 将泛素用高能硫酯键连接到自身分子上;再通过转乙酰基反应,泛素链被转移到泛素连接酶 E2 家族成员分子上;第三步是 E2 协同蛋白——泛素连接酶 E3 将泛素链通过可逆的异肽键连接到目标分子的 Lys 残基上,继而活化的泛素分子不断连接到之前的泛素链上形成多聚泛素链,作为蛋白酶体识别的标志^[10].

泛素活化酶 E1 只有一种分子, E2 家族已被证明在酵母、植物和动物细胞中存在多个成员.而 E3 连接酶的功能变化较大,因为 E3 可能通过多种途径促使底物的泛素化. E3 较确定的功能是负责底物的识别,有时候 E3 从 E2 分子上接受到已活化的泛素分子时,先形成一个硫酯键的中间产物,再将泛素分子转移到底物上;而更多的时候, E3 仅仅通过促使两个分子靠近来协助 E2 将泛素分子直接转移到底物上.因此,从功能方面对 E3 可如此定义:一种蛋白分子或蛋白分子的复合体能够直接或间接地与特异性底物结合,促使泛素分子从与酶分子(E2 或 E3)形成的硫酯键中间产物转移到蛋白底物分子中的氨基上.按照这一定义, E3 家族可分为 5 类:(1)E3a/Ubr1, (2) Hect-E3, (3)分裂后期驱动蛋白复合物 APC (Anaphase-Promoting Complex), (4) Skp1-cullin-F-Box (SCF)或 Skp1-cullin-ROC1/Rbx1/Hrt1-F-Box 系统, (5) VCB 复合物(Von Hippel-Lindau-Associated Elongins C 和 B). 特异性识别磷酸化 I κ B α 的 E3 泛素连接酶属于其中的第 4 种类型. SCF 家族是一个多亚基的连接酶系统,包括若干通用亚基及一个识别底物的可变亚基 F-box. 这一系统首先在酵母中被克隆,功能

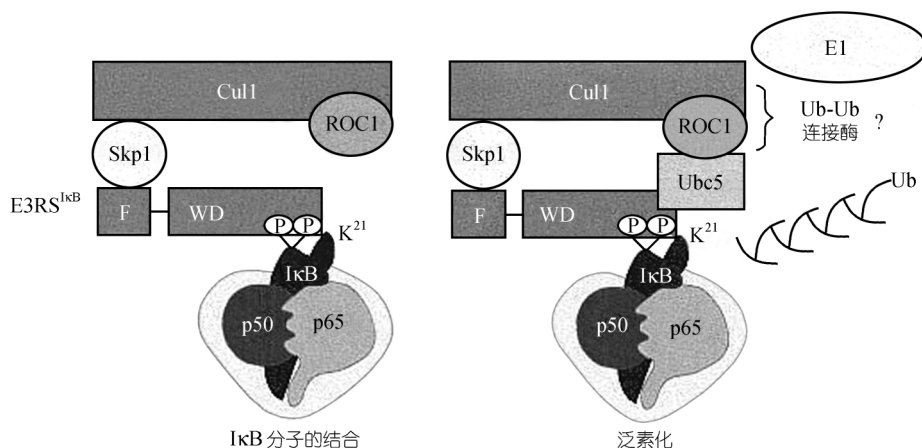
研究表明它们是细胞周期进程所必需的.这一系统的很多底物被识别时有一共同特征:均处于磷酸化状态. SCF 自身没有明显的酶功能,通过 E2 促使底物泛素化.在 SCF 复合物中, Skp1 的作用可能是将 F-box 与复合物的其他成分连接起来;而另外的亚基如 Cullin 及新克隆的 ROC1/Rbx1/Hrt1 则负责招募 E2 分子和蛋白底物.另一亚基 APC2 和 ROC1 有一个共同的结构域,称为 R-box (ring finger, small metal-binding domain). 这一结构域在 E3s 家族某些成员(如 Ubr1 和 Mdm2)中也存在,后两者可能与 p53 结合并介导 p53 进入泛素降解途径.

2.3.2 诱导性的 I κ B 降解

I κ B α 是如何被泛素系统识别的呢?体外实验证明与 NF- κ B 形成复合物的磷酸化的 I κ B α 能被泛素化,而非磷酸化的 I κ B α 则不能. Yaron 等人^[104]用 I κ B α 分子 N 端调节结构域中的肽段证明, Ser32 及 Ser36 两个位点磷酸化的肽段能够有效地竞争性抑制 I κ B α 与 E3 形成复合物,而只有单一位点磷酸化的肽段其抑制效率降低了 20 倍,非磷酸化的肽段则不能起抑制作用,泛素连接位点 Lys 缺失的肽段同样能够有效地发挥抑制作用.这一结果意味着 I κ B α 分子被泛素系统识别的位点不同于泛素连接位点.将 Ser32 及 Ser36 两个位点磷酸化的肽段制备成亲和层析柱,可去除细胞裂解液中 I κ B α 泛素化的活性,而不影响细胞中其他蛋白的泛素化.这些研究结果表明,存在一种特异性的泛素连接酶,能够识别 I κ B α 分子上以磷酸化的 Ser 位点为核心的结构.研究者们运用蛋白纯化及序列测定技术鉴定了人的 pI κ B α 特异性 E3 识别分子: F-box/WD 家族蛋白 β -TrCP. 这一已知分子被重命名为 E3RSI κ B(E3 receptor subunit of I κ B)^[13].

与其他 SCF 复合物类似, E3RSI κ B 没有酶活性,它的功能是引导特异的 E2 泛素连接酶(UBC5)与底物结合.实验表明 E3RSI κ B 与 pI κ B α 的结合位点在其分子中的 WD40 重复区域^[13]. 这一结构域在很多不同的蛋白中存在,已被证明能够结合磷酸化的短肽.而 E3RSI κ B 分子中的 F-box 负责促使 pI κ B α 的泛素化.研究者进而发现 Skp1, Cull 和 ROC1 能与 E3RSI κ B 结合^[105~109],上述分子能够促进 E3RSI κ B 与 Ubc5 的结合作用(图 2).

E3RSI κ B 复合物是不是唯一识别 pI κ B α 的 E3 泛素连接酶呢?现有的研究结果还不能解答这一问题.

图 2 pIkB α -E3 复合物示意图

700 kD 的降解复合物包含 NF- κ B, pIkB α 以及其他未知蛋白(可能是分子伴侣). 它们与特异的 E3 复合物结合; E3 是由 Skp1, Cul1, Roc1/Rbx1/Hrt1 和 F-box 蛋白形成的复合物(SCF), 其中 F-box 蛋白是复合物中的可变成分, 负责识别 pIkB α . 与 pIkB α 结合之后, E3 复合物与特异的 E2 分子 UBC5 和 E1 发生相互作用, 使得 I κ B α 被泛素化, 同时发生泛素-泛素连接, 后一过程是由 Cul1 : Roc1 复合物负责完成的(引自文献[10])

有实验表明, E3RSIkB 是 8 种 F-box 家族蛋白中惟一能与 pIkB α 多肽结合的分子^[108]. 而另一个与 E3RSIkB 有 85% 同源性的蛋白 E3RS2/ β -TrCP2 在体外不能与 pIkB α 结合. 尽管如此, 至今为止大部分的实验结果都来自于生化研究, 还缺乏基因敲除的实验证据. 值得一提的是 I κ B α 降解的两种例外情况: UV 诱导及某些化学药物诱导. 这两个过程既不涉及 IKK 的活化, 也与 I κ B 分子 N 端的 E3 识别序列无关. UV 诱导的 I κ B 的降解能被蛋白酶体的阻断剂抑制^[2,25], 说明蛋白酶体单独或者与泛素途径协同负责 UV 诱导的 I κ B α 的降解.

I κ B 分子中 E3 的识别序列由 6 个氨基酸组成: DS(PO₃)GXXS(PO₃), 这一序列从果蝇到人类都非常保守^[104], 而且也存在其他蛋白分子中, 序列分析的结果表明在数据库中有大约 1250 种蛋白含有 DSGXXS 序列. 但并不是每种蛋白均能在两个 Ser 位点上发生磷酸化, 产生被 E3RSIkB 识别的结构. 有趣的是 IKK 和 E3RSIkB 对 I κ B 分子中 Ser 的亲合力均高于 Thr^[111], 而且 IKK 与 E3RSIkB 位于同一条染色体上(人 10q²⁴), 说明这二者可能在进化上有协同作用. 现在已知有另外两种蛋白能被 E3RSIkB 识别: β -catenin 和 Vpu. Vpu 是 HIV 病毒编码的多肽, 存在于被感染细胞内质网膜上. 它能同时与 CD4 蛋白和 E3RSIkB 结合, 从而促使 CD4 发生降解^[109]. 与 pIkB α 类似, E3RSIkB 与 Vpu 的结合借助于 WD40 结构域, 并且需要 Ser 的磷酸化. 不同的是在这一过程

中, Vpu 不是底物而是起接头分子的作用. CD4 的下调有助于病毒蛋白 gp160 的释放, 促进病毒外壳的成熟; 同时减少了 HIV 受体的数量, 防止病毒过感染. 另一种蛋白 β -catenin 作为 E3RSIkB 的底物已得到大量遗传实验的证明: 在爪蟾和哺乳动物细胞中过量表达 F-box 缺失的 E3RSIkB 能够延长 β -catenin 的寿命. 但在 β -catenin 异常稳定的肿瘤细胞中, 往往是 β -catenin 分子中 E3RSIkB 识别序列旁边的位点发生突变, 并不影响识别序列本身. β -catenin 的异常稳定是直肠癌和黑色素瘤细胞的典型特征, 但至今未发现 E3RSIkB 基因在直肠癌细胞中发生突变, 而 E3RSIkB 基因的异常在神经胶质瘤、前列腺癌和小细胞肺癌中较为多见. 由于 E3RSIkB 的失活会导致 NF- κ B 被抑制, 而 NF- κ B 的活化使细胞免于凋亡, 因此 E3RSIkB 的失活由于不促进肿瘤细胞存活, 可能在肿瘤发生过程中被负选择^[10].

2.4 NF- κ B 前体蛋白 p105 和 p100 的剪切过程

NF- κ B1 和 NF- κ B2 基因都编码比成熟的 p50 和 p52 蛋白大很多的前体蛋白, 至今 p105 和 p100 的剪切过程还不十分清楚. 尽管有研究者认为 p105 的剪切过程是与翻译同步进行的, 但大多数研究者同意 p105 和 p100 的成熟是在翻译后借助于泛素途径进行的. Fan 和 Palombella 等人^[110,111]证明, 体外 p105 的成熟需 ATP 和泛素的参与, 抑制泛素多聚链形成的泛素突变体能够阻断 p105 的剪切. 同样, 蛋白酶体抑制物在细胞中也能阻断 p105 的成熟. 研究证明 p100

的剪切伴随着 p100 的转录及泛素化, 并且有研究者发现 p100 的 C 端与蛋白酶体成分 S9 结合^[111]. 另外一些研究者还用类似的方法获得了参与 p105 和 p100 剪切过程的 E3/E2 复合物^[112, 113]. 尽管负责这一过程的泛素酶的性质尚未明确, 但 NF- κ B 前体的剪切过程需要泛素途径的参与已得到公认.

泛素调节的蛋白降解途径一般都产生小的多肽, 不会产生大的蛋白片段, 因此 p50 和 p52 的产生可能属于例外情况. 这一过程的机制以及所需要的分子结构特征都很不清楚. 实验证明小鼠 p105 前体分子中富含 Glu 的区域 GRR(Glu-rich region)是其剪切所必需的^[114], 将 GRR 序列插入无关蛋白, 能够导致其发生与 p105 类似的部分降解. 而 Orian 等人^[115]证明 GRR 与泛素连接无关, 而是参与了蛋白酶体介导的蛋白降解过程. 研究者总结了 p105 剪切过程的两个不同的模型: 第 1 个模型是 p105 分子先被泛素化, 然后蛋白酶体结合到 p105 分子的 C 端, 当蛋白酶体作用到 GRR 区域时就停止作用, 将成熟的 p50 释放出来. 另 1 个模型是 p105 分子被泛素标记后, 先被某种蛋白酶切成两段, 其中 C 端被蛋白酶体降解, 而 N 端被 GRR 保护而免受蛋白酶体的降解.

实验表明细胞中 p105 的剪切成熟是一个连续的过程, 而 p100 的剪切是受诱导进行的^[100]. 在某些刺激情况下会加速两种前体的剪切过程, 由此产生的效应有: (1) 更新细胞中 p50 和 p52 蛋白库, 促进它们的核输入; (2) 释放细胞质中与前体结合的 NF- κ B 的其他亚基, 促进这些亚基入核. 研究者们推测, 前体的这种剪切加速作用通过分子的磷酸化实现. MAPKKK 家族成员 Cot/TPL-2 被证明与 p105 的 C 端结合并能促进其降解^[116]. 但后来的研究证明 Cot/TPL-2 并不磷酸化 p105, 而是磷酸化 IKK 的上游激活因子^[56]. Heissmeyer 及其同事证实 IKK 能与 p105 作用并且磷酸化其分子 C 端 I κ B 类似结构域^[117]. 实验证明, IKK α 的缺失能够阻断 NIK 诱导的 p100 的剪切作用^[69], IKK α 能够活化 p100, 导致其发生磷酸化依赖性的降解, 生成有活性的 p52 : RelB 复合物^[4].

2.5 I κ B 降解之后 NF- κ B 活性的调节

尽管调控 IKK 介导的 I κ B 磷酸化及降解被认为是调节 NF- κ B 活性的关键步骤, 但 NF- κ B 的活化并不完全依赖于 IKK. 近来的研究结果表明, 核内 NF- κ B 促进转录的能力也受到调节. NF- κ B 蛋白本身的磷酸化也会调节其转录活性. 有报道表明 NF- κ B

在一些刺激因素作用下被磷酸化^[118, 119]. 例如 LPS 刺激导致 p65 分子中 Ser276 被蛋白激酶 A(PKA)磷酸化, 这种磷酸化加强了 NF- κ B 与 DNA 的亲合性以及转录激活子 CBP(cAMP-response-element-binding protein)/p300 在核内的结合作用. 由于大多数 NF- κ B 蛋白在 NLS 上游 25 个氨基酸处具有 PKA (cAMP-dependent protein kinase) 的识别位点 RRXS, 因此推测 PKA 介导的磷酸化可能参与了 NF- κ B 诱导及持续的激活过程^[119].

有相当一部分研究结果认为, p65 的磷酸化对 NF- κ B 的转录活性是必需的. 除了 PKA 以外, 其他蛋白激酶如酪氨酸激酶 II (casein kinase II), PKC ζ , 甚至 IKK 都曾被报道参与这一过程^[120, 121]. 从哺乳动物细胞中纯化的 IKK 能在体外磷酸化 p65, 后来又发现重组 IKK α / β 能磷酸化 p65^[28, 32], 但作用位点不清楚, 而且 IKK 对 p65 的这种作用还未在生理状况下得到证实. 另外, 基因敲除实验证明, GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β)及 TBK/TBK1/NAK 也对 NF- κ B 的转录活性有很大的影响^[122, 123]. 在上述两种激酶缺失的细胞中, 各种刺激因子诱导的 I κ B α 的降解, NF- κ B 的核转移及与 DNA 的结合都是正常的, 但 NF- κ B 不具有转录活性. PKC ζ 的缺失对胚胎成纤维细胞中 NF- κ B 的活性有很大影响^[120]. 研究者进一步检测到了 PKC ζ 与 p65 的结合及磷酸化作用^[124]. 近来发现, PI3K 和 Akt 在 IL-1 的刺激下也能促进 p65 的转录活性^[125], 它们并非直接磷酸化 p65, 而是通过活化 Akt 进而激活 IKK α , IKK α 再磷酸化 p65 分子中的 Ser536. 还有研究者发现, TNF 诱导的 IL-6 的生成需要 ERK 和 p38MAPK 引起的 NF- κ B 的磷酸化作用. 但 p50 和 p65 不是 p38MAPK 的直接底物, p38MAPK 的下游激酶 MSK1 可磷酸化 p65 的 Ser276. 研究者们推测不同的激酶通过磷酸化 p65 和 NF- κ B 家族的其他成员对其转录活性发挥作用. 但现在还不知道如此多不同的激酶对 p65 的转录调控作用是呈线性关系, 最终作用于 p65 的同一位点, 还是作用于不同位点? 如果后一种假说成立, 那么作用于 p65 的不同的激酶是否对应着不同的诱导因素? 而且作为不同激酶的底物, 细胞内 I κ B : NF- κ B 蛋白库是如何划分的呢? 这些问题的解答需要明确各种激酶在 p65 分子上确切的作用位点.

研究发现, p65 磷酸化的关键意义可能在于招募组蛋白乙酰转移酶 HATs(histone acetyltransferases).

已有多报道表明,两种 HATS——CBP/p300 和 p/CAF(CBP associated factor)能够调节 NF- κ B 的活性^[126~129]. 最近的研究发现 p65 还能够与组蛋白去乙酰化酶 HDACs(histone deacetylases)的不同异构体结合^[130~132]. 研究者们推测 p65 的乙酰化调节着它与 I κ B α 的亲合性, NF- κ B 入核后被乙酰化,避免了与 I κ B α 的结合抑制作用,从而发挥转录激活作用;然后在 HDACs 的作用下去乙酰化后与 I κ B α 结合被转运出细胞核,终止转录.

除了上述假说之外,关于磷酸化和乙酰化对 NF- κ B 活性的调节还有另外一种模式. 研究发现,在未刺激细胞的细胞核中存在相当数量的 p50 同源二聚体^[133],过量表达 p50 或加强其与 DNA 之间的结合会降低 NF- κ B 依赖性的基因的转录. 而减弱 p50 与 DNA 的结合作用则能够解除这种抑制. 由于 p50 同源二聚体与 DNA 的亲合性远远低于异源二聚体,不可能因为两者对 DNA 的竞争性结合而产生这种抑制作用. 最近的研究发现, p50 能与组蛋白脱乙酰基酶 HDAC1 结合抑制基因转录,并且其中 p50 是必需的,因为 HDAC 的抑制物 Trichostatin A(TSA)在正常细胞中能够解除 HDAC 的转录抑制作用,上调一系列 NF- κ B 依赖性的基因的表达,但在 p50^{-/-}细胞中却不能产生任何作用^[2]. 研究者因此认为,在刺激因子作用下胞质中 p65:p50 复合物被 PKAc 磷酸化后进入核内,取代 p50:HDAC1 复合物,占据靶基因的启动子序列,启动基因转录.

3 NF- κ B 活化的上游信号转导途径

虽然各种刺激因子激活 NF- κ B 的下游信号途径大致相同,但它们的上游信号传递方式却大相径庭,很多激活因子的上游途径至今仍不明. 其中剖析得相对透彻、被研究者们奉为经典的,是肿瘤坏死因子受体 TNF-R1 介导的 NF- κ B 活化模式,以及与之类似的 TLRs 和 IL-1R 信号转导模式.

3.1 TNF-R1 激活 NF- κ B 的信号转导途径

肿瘤坏死因子 TNF 的抗癌活性在 1 个世纪以前就有描述,到了 1984 年人源的 TNF 才被纯化并得到了其 cDNA 序列. 除了诱发某些肿瘤细胞及正常细胞发生凋亡, TNF 还介导免疫反应并调节免疫功能. 近 10 年来 TNF 信号转导的分子机制被逐渐解析出来^[134,135]. 现在对 TNF 信号网络的建立已经成为其他 TNF 家族蛋白信号传导研究的范例.

TNF 由活化的巨噬细胞产生,是由含 157 个氨基酸的多肽形成的同源四聚体. TNF 信号通过两种细胞表面受体介导: TNF-R1 和 TNF-R2. 其中 TNF-R1 介导了 TNF 大部分生理功能, TNF 与 TNF-R1 结合触发一系列胞内信号级联反应,最终导致两类重要的转录因子 NF- κ B 和 c-Jun 的活化. 当 TNF 三聚体结合到 TNF-R1 的胞外区域时,结合在 TNF-R1 胞内结构域 ICD(intracellular domain)上的抑制蛋白 SODD(silencer of death domain)被释放出来, ICD 被接头蛋白 TRADD(TNF receptor-associated death domain)识别并结合, TRADD 再招募另一个接头蛋白分子 TRAF2(TNF-R1-associated factor 2)和起接头蛋白作用的激酶 RIP 以及含有死亡结构域的蛋白 FADD(Fas-associated death domain). 这些接头分子形成的 TNF-R1 信号复合体进一步招募下游信号分子,启动不同的信号传递链(图 3)^[136]. 其中, caspase8 被 FADD 招募到 TNF-R1 信号复合物中并被活化,随之启动下游的 caspase 级联反应,引起细胞凋亡^[137~143];而 TRAF2 负责招募胞内凋亡抑制因子 cIAP1(inhibit apoptosis protein)和 cIAP2,同时活化 MAPKKK 家族成员如 MEKK1 和 ASK1(apoptosis-stimulated kinase 1),启动激酶级联反应,活化激酶 JNK(c-Jun NH₂-terminal kinase),最终激活由 c-Jun 和 c-fos 组成的转录因子 AP-1^[144,145]. 而 RIP 则负责活化 TNF-R1 的第 3 条重要的效应途径——激活转录因子 NF- κ B^[146]. RIP 通过未知的信号分子激活 IKK 复合物,进而使 I κ B 被磷酸化并发生降解,最终活化 p65:p50. 在 TNF-R1 激活 NF- κ B 过程中, RIP 和 IKK β 被证明是必需分子.

TNF-R1 诱导的这 3 条信号途径彼此关联: 比如 NF- κ B 活性丧失的细胞对 TNF α 诱导的细胞凋亡的敏感性大大增加,而 NF- κ B 的活性增强能够保护细胞免受凋亡; NF- κ B 诱导表达的一些因子能够抑制 TNF 诱导的 JNK 的激活, JNK 的活性在 NF- κ B 缺失情况下被加强并延长.

迄今为止, TNF 信号通路的许多活性分子已被克隆,为抗炎药物的设计和筛选提供了大量的靶标. 但关于这一信号通路仍有许多问题有待解决,比如是哪一种中间因子或激酶介导了 RIP 对 IKK 的活化作用? 是哪一种 MAPKKK 激活了 JNK,并且通过何种途径被招募到 TNF-R1 信号复合物中并如何被活化的? 同时, NF- κ B 的活化、细胞凋亡及 JNK 的活化这

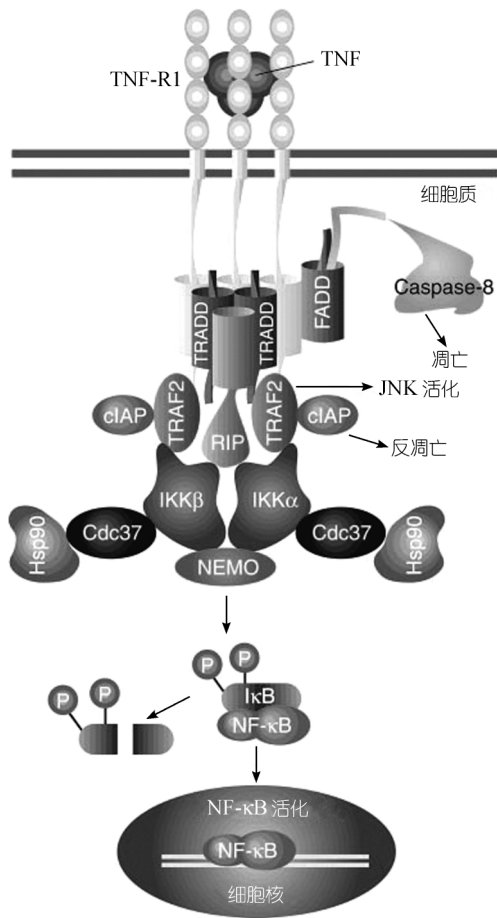


图3 TNF 信号转导途径示意图

TNF 与受体 TNF-R1 结合后导致 SODD 的释放, 接着与接头蛋白 TRADD, TRAF2, RIP 和 FADD 形成信号复合物. 这些接头蛋白再将下游信号途径特异的酶分子, 如 caspase-8 和 IKK β 等招募到受体复合物中, 使得它们活化并触发下游的信号传递, 最终导致细胞凋亡、NF- κ B 的活化和 JNK 的激活(引自文献[139])

3 条途径之间相互制约的分子机制尚不明了. 对以上问题的解答将有助于对 TNF 生理病理效应的分子机理的理解.

3.2 IL-1R/TLR 激活 NF- κ B 的信号转导途径

TLRs 是免疫系统细胞表面表达的一类蛋白, 能够识别特异性微生物病原体分子模式的一类蛋白, 它们参与构筑了机体抵抗细菌和病毒的第一道防线^[147]. TLRs 与 IL-1 受体是同一家族成员, 均具有胞内 TIR 结构域(Toll/interleukin-1R/plant R gene homology domain), 当两类受体接受刺激后, 通过 TIR 结构域触发胞内的信号途径, 最终活化 NF- κ B, 起始相关基因的转录. 当受到特异性的病原体分子模式的刺激后, TLR 家族的不同成员触发了相似的胞内信

号途径, 其中的主要信号分子包括接头蛋白 MyD88, TRAF6 以及 IL-1R 相关激酶 IRAK(图 4). MyD88 分子 C 端具有 TIR 结构域, N 端具有死亡结构域. TIR 结构域负责介导 MyD88 与 TLRs 和 IL-1R 结合, 而死亡结构域负责招募 IRAK1.

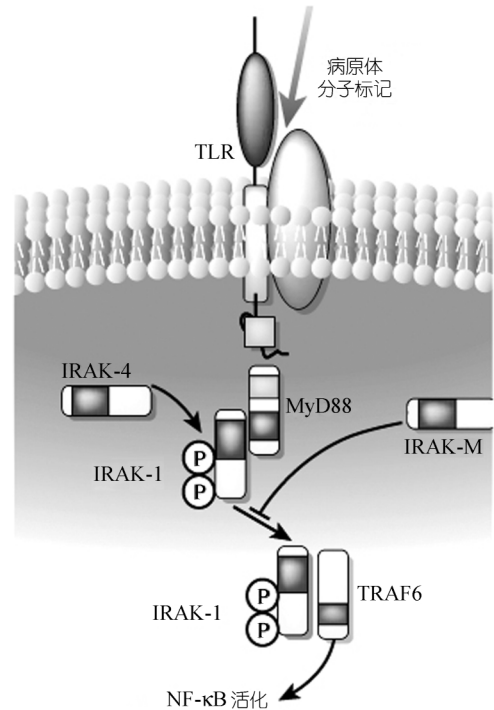


图4 TLRs 介导的信号途径示意图

当 TLRs 识别微生物病原体特有的分子标记后, 与胞内的接头蛋白分子 MyD88 结合, MyD88 进而将 IRAK-1 招募到信号复合物中; IRAK-1 继而发生自身磷酸化并可能在 IRAK-4 的协同作用下被活化. 活化的 IRAK-1 离开 MyD88-TLR 复合物并与 TRAF6 暂时性结合, 进而激活下游的信号途径. IRAK-M 可能通过阻碍 IRAK-1 向 TRAF6 迁移对此信号途径进行负调控(引自文献[152])

当 TLRs 识别特异性微生物病原体分子模式后即与 MyD88 结合, MyD88 将 IRAK-1 招募到 TLRs 信号复合物中, IRAK-1 继而发生自身磷酸化转变为活化状态, 这一过程也同时受到其同源分子 IRAK-4 的促进. 活化的 IRAK-1 旋即离开 TLR-MyD88 信号复合物并暂时与 TRAF6 结合, 进而活化 IKK 复合物, 导致 NF- κ B 的活化, 促进下游细胞因子的产生并诱发炎症. 激酶 IRAKs 的作用与 RIP 类似, 基因敲除的实验证明, IRAK-1 和 IRAK-4 是 TLRs 和 IL-1R 激活 NF- κ B 信号途径的关键分子^[148]. 最近研究发现, IRAK 家族成员 IRAK-M 对 TLR 和 IL-1R 的激活起负调节作用^[149]. 与正常细胞相比, IRAK-M 缺失的细胞对 IL-1 和细菌感染的反应更加强烈. 虽然 IRAK-M

没有激酶活性,但它能够加强 IRAK-1 和 MyD88 之间的结合,从而阻碍了内源性 IRAK-1 和 TRAF6 之间的相互作用.由此作者推测 IRAK-M 使得 IRAK-1 陷于 MyD88-TLR 复合物中而不能与 TRAF6 结合,因此阻碍了下游信号途径.最近还发现一种新的接头蛋白分子 TIRAP(TIR association protein),介导了 TLRs 家族成员信号传递的特异性.基因敲除的实验证明,缺乏 TIRAP 的小鼠完全丧失了 TLR4 诱导的 NF- κ B 激活,但对 TLR5, TLR7 和 TLR9 的反应正常^[150].

TLRs 和 IL-1R 信号途径中有待解决的问题与 TNF-R1 信号途径类似,尚不知道 IRAK1 与 TRAF6 结合后如何激活 IKK,另外对 IRAK-1 如何被调节及其与 IRAK-4 的关系均有待研究.

4 NF- κ B 与细胞凋亡

4.1 NF- κ B 抗凋亡机制

NF- κ B 活化后主要的细胞效应表现为两方面,一方面是促进炎症相关蛋白的表达,另一方面是拮抗细胞凋亡. NF- κ B 是免疫系统中细胞选择性扩增或削减的主要调节因子,对 NF- κ B 缺失小鼠的分析发现, NF- κ B 有抑制凋亡的功能^[151,152]. 它的抗凋亡活性是通过诱导基因表达实现的, NF- κ B 诱导细胞中多种凋亡抑制因子的表达:包括 c-IAPs, casper/c-FLIP, A1(Bfl1), TRAF1 和 TRAF2 等.其中 TRAF1 和 TRAF2 是 NF- κ B 和 JNK 激活途径中的接头蛋白分子,它们的抗凋亡活性可能通过激活 NF- κ B 来实现^[153],其他的分子则在凋亡信号通路的各个环节发挥抑制作用.

c-IAPs 可直接与凋亡执行因子如 caspase-3 或 caspase-7 结合,从而抑制其活性,或者抑制 caspase6 或 caspase9 前体的活化^[154]. c-IAP2 的启动子上有 NF- κ B 的结合位点. NF- κ B 诱导表达的 c-IAP1 和 c-IAP2 与 TRAF1 和 TRAF2 一起,通过抑制 caspase8 来抑制 TNF α 诱导的细胞凋亡^[155,156]. c-IAPs 抑制凋亡的另一种作用方式以 XIAP 为代表(X chromosome-linked IAP)^[157]. XIAP 通过其分子中 BIR (baculoviral IAP repeat)结构域和 N 端的连接区抑制 caspase-3, caspase-7 和 caspase9 前体的活化.

另一个 NF- κ B 调节表达的凋亡抑制因子是 Casper/c-FLIP,它作为 Caspase8 的同源物被克隆^[137,158]. Casper/c-FLIP 具有 2 个死亡执行结构域(DEDs)和 1 个类似 caspase 但无酶活性的结构域.它

能够与 FADD 及 caspase8 前体结合并抑制 caspase8 前体的活化. Casper/c-FLIP 缺失小鼠的胚胎成纤维细胞对 TNF α 和 Fas Ligand 诱导的凋亡非常敏感^[159]. Casper/c-FLIP 同时还与 TRAF2 和 RIP 结合^[137],说明它也可能通过激活 NF- κ B 来抑制凋亡. Casper/c-FLIP 有多种剪切形式,现已证明其中一种较短形式的分子在 TRAIL 诱导的凋亡过程中发挥主要作用^[160].但现在尚需证明在 Casper/c-FLIP 的启动子中是否存在 NF- κ B 的结合位点,以及是哪种 NF- κ B 的二聚体操纵其表达,因为在 *RelA*-/-的细胞中 Casper/c-FLIP 能被 TNF α 诱导表达^[159].

NF- κ B 还能抑制 DNA 损伤引起的通过线粒体途径实现的细胞凋亡,这一效应通过 Bcl-2 家族成员 A1 和 Bcl-X 介导. A1 作为造血细胞特异表达的 Bcl-2 同源物被克隆^[161],它的过量表达抑制 etoposide 及 IL-3 缺失引起的凋亡,并能够部分抑制 TNF α 诱导的凋亡^[162];同时它还能抑制细胞色素 c 的释放及 caspase9 的活化.实验表明 *A1*-/-的小鼠体内,中性粒细胞的凋亡增加^[163]. Bcl-2 家族的另一促凋亡成员 Bax 的表达受到 NF- κ B 的负调控,推测可能在某些持续表达 NF- κ B 的肿瘤细胞的存活中发挥作用.另一个受 NF- κ B 表达调控的凋亡抑制因子 IEX-1L,最早是通过 mRNA 差异显示技术分离辐射早期反应基因时得到的.其过量表达能够抑制 TNF α 及 FasL 诱导的 Jurkat 细胞的凋亡,但其真正的生理作用还有待研究.

NF- κ B 还能够通过抑制促凋亡的信号途径来发挥作用. JNK 可能以某种未知的方式促进 TNF α 诱导的凋亡^[164].在正常细胞中, TNF α 诱导的 JNK 激活是瞬时的,但在 *IKK β* -/-及 *RelA*-/-的细胞中, JNK 的活化时间得以延长,由此推测 NF- κ B 能够诱导 JNK 抑制因子的表达,并且这种抑制因子可能在 NF- κ B 的抗凋亡功能中发挥作用.在 NF- κ B 调控表达的凋亡抑制因子中,只有 XIAP 能够抑制 *RelA*-/-细胞中 JNK 的长久活化^[165],但它可能不是惟一的作用因子.近来在搜索抗 TNF α 诱导的 *RelA*-/-细胞凋亡因子的过程中,发现了 GADD45(growth arrest and DNA-damage inducible 45 β)^[166],它的表达受 NF- κ B 的调节,在 *RelA*-/-细胞中过量表达时能够抑制 TNF α 诱导的细胞凋亡.它同时也能抑制 DNA 损伤引起的细胞凋亡,并且能够降低 *RelA*-/-细胞中 TNF α 诱导的 JNK 活化的持续时间,推测可能通过抑制 JNK 途径的活化来抑制凋亡.

综上所述, NF- κ B 激活表达的靶基因产物, 能够阻断死亡受体或线粒体途径诱发的凋亡. 但至今这些产物中, 还没有哪一个的基因缺失小鼠表现出与 IKK β 和 RelA 缺失小鼠类似症状, 即肝细胞的大量凋亡. 因此它们在 TNF α 诱导的细胞凋亡中的作用还有待研究.

4.2 促凋亡刺激和 NF- κ B 活性的抑制

既然 NF- κ B 能够激活抗凋亡因子的表达, 那么诱导凋亡的刺激因素应可通过某些方式来抑制或终结抗凋亡因子的作用. 事实的确如此, NF- κ B 活化途径上的一些关键蛋白被证明是 caspase 的底物, caspase 对其的切割将终止它们的抗凋亡活性.

在 TNF α 激活 NF- κ B 的途径中, 至少两种蛋白 RIP 和 TRAF2 是 caspase 的底物. RIP 分子中的 Asp32 被 caspase8 切割后产生两个片段 RIPn 和 RIPc, 从而失去激活 IKK 的活性^[121]; 而 RIPc 的过量表达, 能够促进 TNF-R1 与 TRADD 或 FADD 之间的结合, 抑制 NF- κ B 的激活, 从而促进了 TNF α 诱导的细胞凋亡. TRAF2 被招募到 TNF 受体家族成员 CD30 分子上以后, 会被降解为不溶解的细胞成分, 由此提高了细胞对 TNF α 诱导凋亡的敏感性^[167]; 在 TNF-R1 和 Fas 诱导的凋亡过程中, TRAF1 同样在 Asp163 处被 caspase8 切割, 产生的 c 端片段能够抑制 NF- κ B 的激活, 并在 TRAF2 和 TNF-R1 的协同作用下促进 TNF α 及 FasL 诱导的凋亡^[168].

在凋亡过程中被降解的另一个关键因子是 IKK β . IKK 复合物中仅有 IKK β 在 caspase3 类似酶的作用下在 Asp78, Asp214, Asp373 及 Asp546 发生切割并终止其激酶活性^[169]. 同时产生的 IKK β (1~546)片段作为 IKK 的抑制物促进 TNF α 诱导的细胞凋亡. 过量表达不被 caspase 降解的 IKK β 突变体能够阻止 TNF α 诱导的凋亡, 这一结果说明 IKK β 是这一过程中决定细胞生死的关键因素.

泛素降解途径介导的 I κ B α 的降解是 NF- κ B 活化过程中的关键步骤. caspase3 介导的切割使得 I κ B α 分子 N 端调节区(包括 IKK 磷酸化位点)被分离, 从而产生了不能被磷酸化降解的超级稳定的 I κ B α ^[170], 而 I κ B α 被 IKK 磷酸化及 Ser32 和 Ser36 被替换为 Glu 后, 会阻止 caspase 介导的降解^[171]. 因此, I κ B α 同样是生死抉择开关的重要成分之一.

在生长因子缺乏而诱导凋亡的情况下, 细胞中的 p65/RelA 蛋白本身也被几种 caspase 切割, 产生的

C 端片段仍能与 DNA 结合, 但不能起始转录, 成为活性 NF- κ B 的竞争性抑制物^[172].

为了有效地阻断 IKK-NF- κ B 介导的促使细胞存活信号通路, 凋亡细胞中的 caspase 还直接切割并失活 NF- κ B 诱导表达的凋亡抑制蛋白, 如 c-IAP1, XIAP, Bcl-Xl 等^[173].

尽管包括基因敲除在内的大量实验都证明, NF- κ B 具有抑制凋亡的功能, 不过也有少数报道认为 NF- κ B 能够诱导促凋亡分子的产生^[174]. 包括死亡受体 DR4, DR5 和 DR6. 但每当检测到 NF- κ B 诱导表达这些分子时, 同时也会有抗凋亡的分子产生来中和它们的致死作用, 并且关于 NF- κ B 促凋亡的功能还缺乏体内的证据.

5 结语

由于 NF- κ B 活性的失调能引起包括肿瘤和炎症在内的很多人类病症, 因此 NF- κ B 活化途径中的关键因子均可作为药物设计筛选的靶标. 它们不仅对细胞信号转导机制的基础理论研究有重要意义, 而且为免疫及炎症的医学干预提供了机遇.

在涉及 NF- κ B 功能和调节的诸多问题当中, 由于篇幅有限尚未涉及到的有: 相对持续或短暂的 NF- κ B 的活化机制, 调节因子如 κ B-Ras 的作用机制, NF- κ B 在各种不同的肿瘤细胞中持续活化的机制等; 还有不同的 NF- κ B 二聚体如何激活不同的靶基因, 以及在 p65/RelA 激活的因子中哪一个在抗凋亡过程中是最关键的等等. 尽管还存在很多未解决的问题, 但在研究者们不懈努力下, 相信在不久的将来, NF- κ B 尚存的疑团将会被一一破解.

致谢 感谢北京大学生命科学学院佟向军博士, 李联运、查纪坤、苏小琴、黄俊、刘婷、田旻、张琰、李冰峰同学校阅本文. 本工作为国家杰出青年科学基金(批准号: 39925016)、国家“863”计划(批准号: 2001AA221281)、国家重点基础研究发展规划(批准号: G19990539)、国家自然科学基金(批准号: 30100097)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Sen R, Baltimore D. Inducibility of the immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 1986, 47: 921~928
- 2 Zhong H, May M J, Jimi E, et al. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell*, 2002, 9: 625~636
- 3 Beg A A, Sha W C, Bronson R T, et al. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B.

- Nature, 1995, 376: 167~169
- 4 Solan N J, Miyoshi H, Camona E M, et al. RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem*, 2002, 277: 1405~1418
 - 5 Dechend R, Hirano F, Lehmann K, et al. The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF- κ B/Rel and nuclear co-regulators. *Oncogene*, 1999, 18: 3316~3323
 - 6 Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, et al. Nuclear localization of I κ B α promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci*, 1997, 110: 369~378
 - 7 Klement J F, Rice N R, Car B D, et al. I κ B α deficiency results in a sustained NF- κ B response and severe widespread dermatitis in mice. *Mol Cell Biol*, 1996, 16: 2341~2349
 - 8 Cheng J D, Ryseck R P, Attar R M, et al. Functional redundancy of the nuclear factor κ B inhibitors (I κ B α) and (I κ B β). *J Exp Med*, 1998, 188: 1055~1062
 - 9 Fenwick C, Na S Y, Voll R E, et al. A subclass of Ras protein that regulate the degradation of I κ B. *Science*, 2000, 287: 869~873
 - 10 Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: 621~663
 - 11 DiDonato J A, Mercurio F, Rosette C, et al. Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol*, 1996, 16: 1295~1304
 - 12 Traenckner E B, Pahl H L, Henkel T. Phosphorylation of human I κ B on serines 32 and 36 controls I κ B proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J*, 1995, 14: 2876~2883
 - 13 Yaron A, Hatzubai A, Davis M, et al. Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase. *Nature*, 1998, 396: 590~594
 - 14 Chen Z, Hagler J, Palombella V J, et al. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I κ B to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*, 1995, 9: 1586~1597
 - 15 Baldi L, Brown K, Franzoso G, et al. Critical role for lysines 21 and 22 in signal-induced, ubiquitin-mediated proteolysis of I κ B α . *J Biol Chem*, 1996, 271: 376~379
 - 16 Huang T T, Kudo N, Yoshida M, et al. A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B α controls cytoplasmic localization of inactive NF- κ B/I κ B α complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 1014~1019
 - 17 Johnson C, Van Antwerp D, Hope T J. An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of I κ B α . *EMBO J*, 1999, 23: 6682~6693
 - 18 Rodriguez M S, Thompson J, Hay R T, et al. Nuclear retention of I κ B α protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor κ B transcriptional activation. *J Biol Chem*, 1999, 274: 9108~9115
 - 19 Davis M, Hatzubai A, Andersen J S, et al. Pseudosubstrate regulation of the SCF (β -TrCP) ubiquitin ligase by hnRNP-U. *Genes Dev*, 2002, 16: 439~451
 - 20 Malek S, Chen Y, Huxford T, et al. I κ B β , but not I κ B α , functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- κ B dimers by masking both NF- κ B nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem*, 2001, 276: 45225~45235
 - 21 Tam W F, Sen R. I κ B family members function by different mechanisms. *J Biol Chem*, 2001, 276: 7701~7704
 - 22 Imbert V, Rupec R A, Livolsi A, et al. Tyrosine phosphorylation of I κ B α activates NF- κ B without proteolytic degradation of I κ B α . *Cell*, 1996, 86: 787~798
 - 23 Beraud C, Henzel W J, Baeuerle P A. Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF- κ B activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 429~434
 - 24 Bender K, Gottlicher M, Whiteside S, et al. Sequential DNA damage-independent and-dependent activation of NF- κ B by UV. *EMBO J*, 1998, 17: 5170~5181
 - 25 Li N, Karin M. Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF- κ B through two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 13012~13017
 - 26 Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell*, 2002, 109: S81~S96
 - 27 DiDonato J A, Hayakawa M, Rothwarf D M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*, 1997, 388: 548~554
 - 28 Mercurio F, Zhu H, Murray B W, et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science*, 1997, 278: 860~866
 - 29 Zandi E, Rothwarf D M, Delhase M, et al. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF κ B activation. *Cell*, 1997, 91: 243~252
 - 30 Rothwarf D M, Zandi E, Natoli G, et al. IKK γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature*, 1998, 395: 297~300
 - 31 Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, et al. Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell*, 1998, 93: 1231~1240
 - 32 Mercurio F, Murray B W, Shevchenko A, et al. I κ B kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 1526~1538
 - 33 Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, et al. Severe liver degeneration in mice lacking the I κ B kinase 2 gene. *Science*, 1999, 284: 321~325
 - 34 Gooding L R, Sofola I O, Tollefson A E, et al. The adenovirus E3-14.7K protein is a general inhibitor of tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity. *J Immunol*, 1990, 145: 3080~3086
 - 35 Cohen L, Henzel W J, Baeuerle P A. IKAP is a scaffold protein of the I κ B kinase complex. *Nature*, 1998, 395: 292~296
 - 36 Re'gnier C H, Song H Y, Gao X, et al. Identification and characterization of an I κ B kinase. *Cell*, 1997, 90: 373~383
 - 37 Chen G, Cao P, Goeddel D V. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell*, 2002, 9: 401~410
 - 38 Lewis J, Devin A, Miller A, et al. Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor- κ B activation. *J Biol Chem*, 2000, 275: 10519~10526
 - 39 Kelliher M A, Grimm S, Ishida Y, et al. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal. *Immunity*, 1998, 8: 297~303

- 40 Woronicz J D, Gao X, Cao Z, et al. I κ B kinase β , NF- κ B activation and complex formation with I κ B kinase α and NIK. *Science*, 1997, 278: 866~869
- 41 Zandi E, Chen Y, Karin M. Direct phosphorylation of I κ B by IKK α and IKK β : discrimination between free and NF- κ B-bound substrate. *Science*, 1998, 281: 1360~1363
- 42 Burke J R, Miller K R, Wood M K, et al. The multisubunit I κ B kinase complex shows random sequential kinetics and is activated by the C-terminal domain of I κ B α . *J Biol Chem*, 1998, 273: 12041~12046
- 43 Miller B S, Zandi E. Complete reconstitution of human I κ B kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKK γ on the complex activity in the absence of stimulation. *J Biol Chem*, 2001, 276: 36320~36326
- 44 Makris C, Godfrey V L, Krahn-Sentfleben G, et al. Female mice heterozygous for IKK γ /NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia. *Mol Cell*, 2000, 5: 969~979
- 45 Hu Y, Baud V, Delhase M, et al. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of the I κ B kinase. *Science*, 1999, 284: 316~320
- 46 May M J, D'Acquisto F, Madge L A, et al. Selective inhibition of NF- κ B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I κ B kinase complex. *Science*, 2000, 289: 1550~1554
- 47 Carter R S, Geyer B C, Xie M, et al. Persistent activation of NF- κ B by the tax transforming protein involves chronic phosphorylation of I κ B kinase subunits IKK β and IKK γ . *J Biol Chem*, 2001, 276: 24445~24448
- 48 Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, et al. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science*, 1999, 284: 309~313
- 49 Ling L, Cao Z, Goeddel D V. NF- κ B-inducing kinase activates IKK- α by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 3792~3797
- 50 Lallena M J, Diaz-Meco M T, Bren G, et al. Activation of I κ B kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 2180~2188
- 51 Lin X, Mu Y, Cunningham E T Jr, et al. Molecular determinants of NF- κ B inducing kinase action. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 5899~5907
- 52 Romashkova J A, Makarov S S. NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signaling. *Nature*, 1999, 401: 86~90
- 53 Ozes O N, Mayo L D, Gustin J A, et al. NF- κ B activation by tumor necrosis factor requires the AKT serine-threonine kinase. *Nature*, 1999, 401: 82~85
- 54 Nemoto S, DiDonato J A, Lin A. Coordinate regulation of I κ B kinases by mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 and NF- κ B-inducing kinase. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 7336~7343
- 55 Lee F S, Peters R T, Dang L C, et al. MEKK1 activates both I κ B kinase α and I κ B kinase β . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 9319~9324
- 56 Lin X, Cunningham E T Jr, Mu Y, et al. The protooncogene Cot kinase participates in CD3/CD28 induction of NF- κ B acting through the NF- κ B-inducing kinase and I κ B kinases. *Immunity*, 1999, 10: 271~280
- 57 Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, et al. The kinase TAK1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*, 1999, 398: 252~256
- 58 Sakurai H, Miyoshi H, Toriumi W, et al. Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with I κ B kinases to stimulate NF- κ B activation. *J Biol Chem*, 1999, 274: 10641~10648
- 59 Bonnard M, Mirtsos C, Suzuki S, et al. Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF- κ B-dependent gene transcription. *EMBO J*, 2000, 19: 4976~4985
- 60 Yang J, Lin Y, Guo Z, et al. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF- κ B activation. *Nat Immunol*, 2001, 2: 620~624
- 61 Sun Z, Arendt C W, Ellmeier W, et al. PKC- θ is required for TCR-induced NF- κ B activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature*, 2000, 404: 402~407
- 62 Khoshnan A, Bae D, Tindell C A, et al. The physical association of protein kinase C theta with a lipid raft-associated inhibitor of kappa B factor kinase (IKK) complex plays a role in the activation of the NF- κ B cascade by TCR and CD28. *J Immunol*, 2000, 165: 6933~6940
- 63 Malinin N L, Boldin M P, Kovalenko A V, et al. MAP3K-related kinase involved in NF- κ B induction by TNF, CD95, and IL-1. *Nature*, 1997, 385: 540~544
- 64 Song H Y, Re'gnier C H, Kirschning C J, et al. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor- κ B and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 9792~9796
- 65 Baud V, Liu Z G, Bennett B, et al. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an N-terminal effector domain. *Genes Dev*, 1999, 13: 1297~1308
- 66 Takeda K, Takeuchi O, Tsujimura T, et al. Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK α . *Science*, 1999, 284: 313~316
- 67 Yin L, Wu L, Wesche H, et al. Defective lymphotoxin- β receptor-induced NF- κ B transcriptional activity in NIK-deficient mice. *Science*, 2001, 291: 2162~2165
- 68 Kaisho T, Takeda K, Tsujimura T, et al. I κ B kinase α is essential for mature B cell development and function. *J Exp Med*, 2001, 193: 417~426
- 69 Sentfleben U, Cao Y, Xiao G, et al. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science*, 2001, 293: 1495~1499
- 70 Xiao G, Cvijic M E, Fong A, et al. Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF- κ B2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKK α . *EMBO J*, 2001, 20: 6805~6815
- 71 Futterer A, Mink K, Luz A, et al. The lymphotoxin β receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity*, 1998, 9: 59~70
- 72 Fagarasan S, Shinkura R, Kamata T, et al. A lymphoplasia (aly)-type nuclear factor kappa B-inducing kinase (NIK) causes defects in secondary lymphoid tissue chemokine receptor signal-

- ing and homing of peritoneal cells to the gut-associated lymphatic tissue system. *J Exp Med*, 2000, 191: 1477~1486
- 73 Shu H B, Hu W H, Johnson H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is downregulated by mitogens. *J Leukocyte Biology*, 2001, 65: 680~683
- 74 Shu H B, Johnson H. BCMA is a receptor for the TNF family member TALL-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 9156~9161
- 75 Thompson J S, Bixler S A, Qian F, et al. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science*, 2001, 293: 2108~2111
- 76 Claudio E, Brown K, Park S, et al. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF- κ B 2 in maturing B cells. *Nat Immunol*, 2002, 10: 958~965
- 77 Stager B Z, Leder P, Lee T H, et al. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/Apo-1(CD95) in yeast and causes cell death. *Cell*, 1995, 81: 513~523
- 78 Ting A T, Pimentel-Muinos F X, Seed B. RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF- κ B but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J*, 1996, 15: 6189~6196
- 79 Hsu H, Huang J, Shu H B, et al. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*, 1996, 4: 387~396
- 80 Hsu, Shu H B, Pan M G, et al. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor-1 signal transduction pathways. *Cell*, 1996, 84: 299~308
- 81 Tada K, Okazaki T, Sakon S, et al. Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF- κ B activation and protection from cell death. *J Biol Chem*, 2001, 276: 36530~36534
- 82 Devin A, Cook A, Lin Y, et al. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*, 2000, 12: 419~429
- 83 Devin A, Lin Y, Yamaoka S, et al. The α and β subunits of I κ B kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis (TNF) receptor 1 in response to TNF. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 3986~3994
- 84 Zhang S Q, Kovalenko A, Cantarella G, et al. Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKK γ) upon receptor stimulation. *Immunity*, 2000, 12: 301~311
- 85 McCarthy J V, Ni J, Dixit V M. RIP2 is a novel NF- κ B-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem*, 1998, 273: 16968~16975
- 86 Meylan E, Martinon F, Thome M, et al. RIP4(DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family activates NF- κ B and is processed during apoptosis. *EMBO Rep*, 2002, 12: 1201~1208
- 87 Yu P W, Huang B C, Shen M, et al. Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NF- κ B. *Curr Biol*, 1999, 9: 539~542
- 88 Sun X, Lee J, Navas T, et al. RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase. *J Biol Chem*, 2002, 274: 16871~16875
- 89 Kanakaraj P, Schafer P H, Cavender D E, et al. Interleukin (IL)-1 receptor-associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production. *J Exp Med*, 1998, 187: 2073~2079
- 90 Chu Z L, Shin Y A, Yang J M, et al. IKK γ mediates the interaction of cellular I κ B kinases with the tax transforming protein of human T cell leukemia virus type 1. *J Biol Chem*, 1999, 274: 15297 ~ 15300
- 91 Goh K C, Devere M J, Williams B R. The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin. *EMBO J*, 2000, 19: 4292~4297
- 92 Deng L, Wang C, Spencer E, et al. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, 2000, 103: 351~361
- 93 Wang C, Deng L, Hong M, et al. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, 2001, 412: 346~351
- 94 Hong X, Xu L G, Li X, et al. CSN3 interacts with IKK and inhibits TNF- but not IL-1-induced NF- κ B activation. *FEBS Letter*, 2001, 499: 133~136
- 95 Leonardi A, Chariot A, Claudio E, et al. CIKS, a connection to I κ B kinase and stress-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 10494~10499
- 96 Cao Y, Bonizzi G, Seagroves T N, et al. IKK α provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell*, 2001, 107: 763~775
- 97 Hu Y, Baud V, Oga T, et al. IKK α controls formation of the epidermis independently of NF- κ B. *Nature*, 2001, 410: 710~714
- 98 Caamano J H, Rizzo C A, Durham S K, et al. Nuclear factor (NF)- κ B2(p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *J Exp Med*, 1998, 187: 185~196
- 99 Franzoso G, Carlson L, Poljak L, et al. Mice deficient in nuclear factor NF- κ B/p52 present with defects and splenic microarchitecture. *J Exp Med*, 1998, 187: 147~159
- 100 Xiao G, Harhaj E W, Sun S C. NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B2 p100. *Mol Cell*, 2001, 7: 401~409
- 101 Tanaka M, Fuentes ME, Yamaguchi K, et al. Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF- κ B activation in IKK- β -deficient mice. *Immunity*, 1999, 10: 421~429
- 102 Horwitz B H, Scott M L, Cherry S R, et al. Failure of lymphopoiesis after adoptive transfer of NF- κ B-deficient fetal liver cells. *Immunity*, 1997, 6: 765~772
- 103 Senftleben U, Li Z W, Baud V, et al. IKK β is essential for protecting T cells from TNF α -induced apoptosis. *Immunity*, 2001, 14: 217~230
- 104 Yaron A, Gonen H, Alkalay I, et al. Inhibition of NF- κ B cellular function via specific targeting of the I κ B ubiquitin ligase. *EMBO J*, 1997, 16: 6486~6494
- 105 Kroll M, Margottin F, Kohl A, et al. Inducible degradation of I κ B α by the proteasome requires interaction with the F-box protein h-betaTrCP. *J Biol Chem*, 1999, 274: 7941~7945
- 106 Spencer E, Jiang J, Chen Z J. Signal-induced ubiquitination of I κ B α by the F-box protein Slimb/ β -TrCP. *Genes Dev*, 1999, 13: 284~294
- 107 Winston J T, Strack P, Beer-Romero P, et al. The SCF β -TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I κ B α and β -catenin and stimulates I κ B α ubiquitination *in vitro*. *Genes Dev*, 1999, 13:

270~283

- 108 Ohta T, Michel J J, Schottelius A J, et al. ROC1, a homolog of APC1, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol Cell*, 1999, 3: 535~541
- 109 Margottin F, Bour S P, Durand H, et al. A novel human WD protein, h-betaTrCP, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell*, 1998, 1: 565~574
- 110 Fan C M, Maniatis T. Generation of p50 subunit of NF- κ B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature*, 1991, 354: 395~398
- 111 Palombella V J, Rando O J, Goldberg A L, et al. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell*, 1994, 78: 773~785
- 112 Fong A, Sun S C. Genetic evidence for the essential role of beta-transducin repeat-containing protein in the inducible processing of NF- κ B2/p100. *J Biol Chem*, 2002, 277(25): 22111~22114
- 113 Orian A, Whiteside S, Israel A, et al. Ubiquitin-mediated processing of NF- κ B transcriptional activator precursor p105: reconstitution of a cell-free system and identification of the ubiquitin-carrier protein, E2, and a novel ubiquitin-protein ligase, E3, involved in conjugation. *J Biol Chem*, 1995, 270: 21707~21714
- 114 Lin L, Ghosh S. A glycine-rich region in NF- κ B p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol Cell Biol*, 1996, 16: 2248~2254
- 115 Orian A, Schwartz A L, Israel A, et al. Structural motifs involved in ubiquitin-mediated processing of the NF- κ B precursor p105: roles of the glycine-rich region and a downstream ubiquitination domain. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 3664~3673
- 116 Belich M P, Salmeron A, Johnston L H, et al. TPL-2 kinase regulates the proteolysis of the NF- κ B-inhibitory protein NF- κ B1/p105. *Nature*, 1999, 397: 363~368
- 117 Heissmeyer V, Krappman D, Wulczyn F G, et al. NF- κ B p105 is a target for I κ B kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *EMBO J*, 1999, 18: 4766~4778
- 118 Wang D, Baldwin A S Jr. Activation of nuclear factor- κ B-dependent transcription by tumor necrosis factor- α is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J Biol Chem*, 1998, 273: 29411~29416
- 119 Zhong H, Su Y H, Erdjument-Bromage H, et al. The transcriptional activity of NF- κ B is regulated by the I κ B-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell*, 1997, 89: 413~424
- 120 Leitges M, Sanz L, Martin P, et al. Targeted disruption of the PKC ζ gene results in the impairment of the NF- κ B pathway. *Mol Cell*, 2001, 8: 771~780
- 121 Wang D, Westerheide S D, Hanson J L, et al. Tumor necrosis factor α -induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem*, 2000, 275: 32592~32597
- 122 Hoeflich K P, Luo J, Rubie E A, et al. Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature*, 2000, 406: 86~90
- 123 Tojima Y, Fujimoto A, Delhase M, et al. NAK is an I κ B kinase-activating kinase. *Nature*, 2000, 404: 778~782
- 124 Martin P, Duran A, Minguet S, et al. Role of zeta PKC in B-cell signaling and function. *EMBO J*, 2002, 21: 4049~4057
- 125 Madrid L V, Mayo M W, Reuther J Y, et al. Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF- κ B through utilization of the I κ B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem*, 2001, 276: 18934~18940
- 126 Merika M, Williams A J, Chen G, et al. Recruitment of CBP/p300 by the IFN enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell*, 1998, 1: 277~287
- 127 Perkins N D, Felzien L K, Betts J C, et al. Regulation of NF- κ B by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science*, 1997, 275: 523~527
- 128 Sheppard K A, Rose D W, Haque Z K, et al. Transcriptional activation by NF- κ B requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 6367~6378
- 129 Zhong H, Voll R E, Ghosh S. Phosphorylation of NF- κ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell*, 1998, 1: 661~671
- 130 Ashburner B P, Westerheide S D, Baldwin A S. The p65 (RelA) subunit of NF- κ B interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 7065~7077
- 131 Chen L, Fischle W, Verdin E, et al. Duration of nuclear NF- κ B action regulated by reversible acetylation. *Science*, 2001, 293: 1653~1657
- 132 Ito K, Barnes P J, Adcock I M. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 β induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 6891~6903
- 133 Ledebur H C, Parks T P. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF- κ B site and p65 homodimers. *J Biol Chem*, 1995, 270: 933~943
- 134 Chen G, Goeddel D V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 2002, 296: 1634~1635
- 135 查纪坤, 舒红兵. 肿瘤坏死因子信号传导的分子机理. *中国科学, C辑*, 2002, 32(1): 1~12
- 136 Hsu H, Xiong J, Goeddel D V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell*, 1995, 81: 495~504
- 137 Shu H B, Halpins D R, Goeddel D V. Casper is a FADD and Caspase-related Inducer of Apoptosis. *Immunity*, 1997, 6: 751~763
- 138 Tartaglia L A, Ayres T M, Wong G H W, et al. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, 1993, 74: 845~853
- 139 Boldin M P, Goncharov T M, Goltsev Y V, et al. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, 1996, 85: 803~815
- 140 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: 505~512
- 141 Chinnaiyan A M, Tepper C G, Seldin M F, et al. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 1996, 271: 4961~4965
- 142 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/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, 1996, 85: 817~827
- 143 Yeh W C, Pompa J L, McCurrach M E, et al. FADD: essential for embryonic development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*, 1998, 279: 1954~1958
- 144 Rothe M, Wong S C, Henzel W J, et al. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 1994, 78: 681~692
- 145 Reinhard C, Shamon B, Shyamala V, et al. Tumor necrosis factor α induced activation of c-Jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. *EMBO J*, 1997, 16: 1080~1092
- 146 Chen D, Li X, Zhai Z, et al. A novel zinc finger protein interacts with receptor-interacting protein (RIP) and inhibits tumor necrosis factor (TNF)-and IL-1 induced NF- κ B activation. *J Biol Chem*, 2002, 277: 15985~15991
- 147 Mak T W, Yeh W C. A block at the toll gate. *Nature*, 2002, 418: 835~836
- 148 Thomas J A, Allen J L, Tsen M, et al. Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase. *J Immunol*, 1999, 163: 978~984
- 149 Kobayashi K, Lorraine D, Hernandez, J E, et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, 2002, 110: 191~202
- 150 Horng T, Barton G M, Flavell R, et al. The adaptor molecule TRAF2 provides signalling specificity for toll-like receptor. *Nature*, 2002, 420: 329~333
- 151 Beg A A, Baltimore D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF α -induced cell death. *Science*, 1996, 274: 782~784
- 152 Liu Z G, Hu H, Goeddel D V, et al. Dissection of TNF receptor 1 effector function: JNK activation is not linked with apoptosis, while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell*, 1996, 87: 565~576
- 153 Lee S Y, Reichlin A, Santana A, et al. TRAF2 is essential for JNK but not NF- κ B activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity*, 1997, 7: 703~713
- 154 Deveraux Q L, Roy N, Stennicke H R, et al. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome C by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J*, 1998, 17: 2215~2223
- 155 Wang C Y, Mayo M W, Korneluk R G, et al. NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 to suppress caspase-8 activation. *Science*, 1998, 281: 1680~1683
- 156 Liston P, Roy N, Tamai K, et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*, 1996, 379: 349~353
- 157 Deveraux Q L, Leo E, Stennicke H R, et al. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J*, 1999, 18: 5242~5251
- 158 Thome M, Schneider P, Hofmann K, et al. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPS) prevent apoptosis induced by death receptor. *Nature*, 1997, 386: 517~521
- 159 Irmeler M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 1997, 388: 190~195
- 160 Yeh W C, Itie A, Elia A J, et al. Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*, 2000, 12: 633~664
- 161 Lin E Y, Orlofsky A, Berger M S, et al. Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol*, 1993, 151: 1979~1988
- 162 Wang C Y, Guttridge D C, Mayo M W, et al. NF- κ B induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 5923~5929
- 163 Hamasaki A, Sendo F, Nakayama K, et al. Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J Exp Med*, 1998, 188: 1985~1992
- 164 Tournier C, Hess P, Yang D D, et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*, 2000, 288: 870~874
- 165 Tang G, Minemoto Y, Dibling B, et al. Inhibition of JNK activation through NF- κ B target genes. *Nature*, 2001, 414: 313~317
- 166 De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, et al. Induction of gadd45 β by NF- κ B downregulates pro-apoptotic JNK signaling. *Nature*, 2001, 414: 308~313
- 167 Duckett C S, Thompson C B. CD30-dependent degradation of TRAF2: implications of negative regulation of TRAF signaling and the control of cell survival. *Genes Dev*, 1997, 11: 2810~2821
- 168 Leo E, Deveraux Q L, Buchholtz C, et al. TRAF1 is a substrate of caspases activated during TNF- α -induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2001, 276: 8087~8093
- 169 Tang G, Yang J, Minemoto Y, et al. Blocking caspase-3-mediated proteolysis of IKK β suppresses TNF α -induced apoptosis. *Mol Cell*, 2001, 8: 1005~1016
- 170 Reuther J Y, Baldwin A S. Apoptosis promotes a caspase-induced amino-terminal truncation of I κ B α that functions as a stable inhibitor of NF- κ B. *J Biol Chem*, 1999, 274: 20664~20670
- 171 Barkett M, Xue D, Horvitz H R, et al. Phosphorylation of I κ B α inhibits its cleavage by caspase CPP32 *in vitro*. *J Biol Chem*, 1997, 272: 29419~29422
- 172 Levkau B, Scatena M, Giachelli C M, et al. Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated domain-negative NF- κ B loop. *Nature Cell Biol*, 1999, 1: 227~233
- 173 Clem R J, Cheng E H, Karp C L, et al. Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 554~559
- 174 Ravi R, Bedi G C, Engstrom L W, et al. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF- κ B. *Nature Cell Biol*, 2001, 3: 409~416

(2003-06-17 收稿, 2003-07-11 收修稿稿)