

## 。 综述与编译。

# Fas系统与辐射所致细胞凋亡

第二军医大学全军临床免疫中心(上海,200433) 吴 玮综述 孔宪涛 杨如俊审校

**摘要:** Fas系统在辐射所致的细胞凋亡中起重要作用,其作用过程可能是: DNA损伤激活 Fas系统的表达; Fas与 FasL结合启动凋亡信号并传递: 通过神经鞘磷脂酶的活化,产生神经酰胺,激活一系列蛋白激酶,启动胞内磷酸化过程,导致 DNA降解和细胞凋亡,癌基因参与正负调控,使 Fas系统在生理和病理活动中起调节作用。

**关键词:** Fas受体 细胞凋亡 辐射损伤

Fas FasL是一对细胞膜表面分子, Fas与 FasL结合可引起 Fas<sup>+</sup>细胞出现细胞凋亡。

细胞凋亡有一系列形态学变化,早期表现为细胞皱缩,染色体浓缩成新月状并凝聚,进一步被分割为凋亡小体,最终被邻近细胞吞噬清除。 Fas是细胞凋亡的信号分子,目前认为, Fas受体激活后,细胞呈现出凋亡或增殖两种相反的效应,可能与不同细胞类型 Fas信号的传递及凋亡控制基因的活化或抑制有关。 Fas系统在保持细胞群体数量的稳定、消除转化细胞以及免疫耐受的形成等生理活动中起调节作用。

## 1 Fas受体和它的配体

Fas APO-1和 CD95为同一分子,属 TNFR/NGFR家族成员, Fas基因定位于人染色体 10q24.1,定位于小鼠第 19号染色体,其编码产物为分子量 3×1000u(D)的跨膜蛋白,由胞外区(157个氨基酸)、穿膜区(17个氨基酸)及胞浆区(145个氨基酸)组成。 Fas胞浆区存在一个信号传递区及信号传递抑制区<sup>[1]</sup>,胞浆区的一段 60~70个氨基酸序列与 TNFR胞浆区高度同源,并介导细胞死亡,称之为死亡域(death domain) 该片段也存在于低亲和力 NGFR胞浆区。 Fas较广泛地分布于多种类型的细胞,包括胸腺细

胞、外周活化 T或 B淋巴细胞、NK细胞、单核细胞、成纤维细胞、内皮细胞、上皮细胞、肝胆管细胞、卵巢细胞、子宫内膜细胞及皮肤组织细胞等,某些组织细胞经体外培养(如骨髓的 CD34<sup>+</sup>细胞)<sup>[2]</sup>或活化后可诱导表达 Fas

Fas介导的凋亡过程是 Fas受体与非天然抗体 anti-APO-1或天然配体(FasL)结合的结果。 FasL已从杀伤淋巴细胞 DNA克隆成功, FasL为 TNF相关(包括 TNF $\alpha$ 、LT $\alpha$ 、CD27L、CD30L及 CD40L)的 II型跨膜蛋白, N端无信号序列,分子中有一疏水区; C端定位于胞外区,约 150个氨基酸,与 TNF家族成员高度同源。 鼠 FasL定位于第一号染色体,鼠、人 FasL蛋白分子的同源性达 76.9%,大鼠 FasL也克隆成功。 FasL主要表达于活化 T淋巴细胞,正常情况下鼠睾丸可高表达 FasL mRNA,其次小肠、肾和肺。 PWA ConA加 IL-2可诱导鼠脾细胞和胸腺细胞少量表达 FasL。

Fas FasL以膜分子或可溶性分子存在,信号途径受细胞内外许多因子的调控。 Fas FasL及相关调控因子组成 Fas系统,发挥正常生物学功能,尤其在免疫系统的发育、分化和成熟以及保持其功能稳定性方面发挥重要作用。

## 2 Fas受体参与调节细胞凋亡

随着 Fas系统参与细胞凋亡事件的逐步

被认识,近年来 Fas是细胞凋亡领域研究热点之一,阐明 Fas受体在细胞凋亡中的作用,有助于揭示 Fas基因在生理和病理条件下的功能。lpr和 gld为 MRL品系两种基因突变株小鼠,体内 Fas和 FasL表达缺陷,可引起自身反应性 T细胞的蓄积和自身抗体的产生,导致出现系统性红斑狼疮等自身免疫病。lpr和 gld的应用,为 Fas受体功能的研究提供了很好的动物模型。虽然 Fas受体不是细胞凋亡过程中的必须物质,但它在辐射损伤和其它 DNA损伤剂诱导的凋亡中起重要作用。体内外实验都证实,射线可上调细胞内 Fas表达,且表达呈剂量依赖性<sup>[2~5]</sup>, Levensky实验表明<sup>[6]</sup>,射线照射人的角化细胞后,首先检测到 Fas mRNA的表达,后来检测到 Fas蛋白的表达,进而检测到 FasL mRNA和蛋白的表达。我们的实验显示:γ射线照射后小鼠脾脏 T B淋巴细胞 Fas表达升高,之后细胞出现明显的凋亡,表明辐射后淋巴细胞发生了 Fas介导的凋亡<sup>[7]</sup>。Reap等<sup>[8]</sup>用人用 B6(正常鼠型)和 lpr小鼠观察射线照射后胸腺细胞及脾脏 T B细胞凋亡,结果发现 1.5Gy γ射线照射后两者均发生了凋亡,但凋亡率有明显差异: B6鼠为 73%,而 lpr鼠为 25%; lpr鼠的 Thy1 CD4 CD8和 IgM阳性细胞群的细胞凋亡率也比 B6鼠的低,CD4和 CD8胸腺细胞由于 Fas表达水平低,所以两者的凋亡率无差异;同时显示 B6鼠在 γ射线照射后 Fas表达明显升高,这种途径介导的凋亡可被 Fas-Fc融合蛋白抑制,表明 Fas与 FasL相互作用在辐射引起的细胞损伤的清除中起重要作用。辐射所致 DNA损伤引发的细胞凋亡,一般认为在受照后几小时内即出现凋亡高峰,近来在辐射介导细胞凋亡的体外研究中发现,某些细胞株可发生延迟凋亡,其大多发生在细胞受照后几天内<sup>[9]</sup>。我们的实验<sup>[7]</sup>发现,小鼠受 2Gy 4Gy和 6Gy γ射线在体照射,脾脏细胞照后 4~ 8小时出现明显的细胞凋亡峰,7~ 10天出现

再次凋亡峰。我们认为第二次凋亡峰(或称延迟凋亡)的产生,可能与脾脏细胞的不均质性(脾脏细胞包含有多种细胞类型及亚群)造成其对辐射的敏感性不同,对 DNA损伤的耐受性也不同有关。有学者认为,延迟凋亡是染色体损伤的结果,与细胞周期和基因调控密切相关。我们同时发现,三个剂量组中两次凋亡的最高峰值出现在 4Gy组,且凋亡峰的出现是在 Fas高表达之后,说明 Fas的表达与两次凋亡的发生均相关,且不是剂量依赖性的,是适当剂量介导 Fas的表达,进而诱导细胞凋亡。值得提出的是,对延迟凋亡的进一步认识,提示细胞凋亡应重视两方面的研究:快速凋亡和延迟凋亡即虽进入细胞周期但不能再增殖的细胞的凋亡。这很有可能改变一些肿瘤治疗方法的疗效评价及放射病损伤程度的评估。

业已证明 IFN $\gamma$ 、TNF和 IL-2等均能诱导 Fas的表达,而它们在增加辐射敏感性和保护辐射所致的凋亡方面均有报道<sup>[2,10]</sup>,说明 Fas的表达在细胞凋亡和增殖方面作用的两重性,详细机制待进一步探讨。

### 3 Fas受体调节凋亡的机制

细胞凋亡的信号传递途径涉及到细胞内 Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>的变化,蛋白激酶的变化,RNA蛋白质的合成和基因表达的改变等。这些激活途径最终导致细胞核固缩,DNA因核酸内切酶的激活被切割成非随机的寡核苷酸片段,可检测到大小约 180~200bp的 DNA片段。大量研究结果表明,Fas受体在凋亡事件中起传递信号的作用。Fas-FasL介导细胞凋亡必须具备以下 3个条件:①细胞表达足够密度的 Fas受体;②高密度的可溶性或膜分子 Fas与 FasL结合并以多聚体形式连接;③细胞关闭抗凋亡程序而成为凋亡敏感细胞。其最重要的是 Fas蛋白交联构型的发生,只有这样,细胞凋亡的信号才能进一步传递,并且这种细胞凋亡可发

生,在无核细胞。因此,Fas蛋白诱导的细胞凋亡信号传递过程与其它细胞凋亡信号传导过程存在着明显的差异<sup>[11]</sup>。用 Cytochalasin B 消除细胞核后,Fas单抗仍能导致细胞凋亡,表明 Fas介导的细胞凋亡不需要核的参与以及 DNA片段化,用 Staurosporin 诱导细胞凋亡的实验,也得出相似的结果<sup>[12]</sup>。实验还证明<sup>[13]</sup>白血病 HL-60细胞受照射后可发生细胞凋亡,但照后立即抽提 DNA并没有发现 DNA片段化形成,说明 DNA片段化并非射线直接所为,其中部分是由于射线致 DNA损伤而激活了 Fas的表达,从而引起了 Fas介导的凋亡,可见细胞核的死亡是细胞质死亡的“下游”事件。

有关 Fas介导凋亡的下一级信号,近来进行了颇有意义的研究,认为神经酰胺很可能是凋亡启动的一个共同的第二信使,在凋亡信号传递中起主要作用。Chmura等报道<sup>[14]</sup>细胞和组织中基因剔除神经鞘磷脂的鼠及神经鞘磷脂产物神经酰胺丢失,可对抗射线诱导的凋亡,而外源性神经酰胺可恢复细胞对射线诱导凋亡的应答,提示 Fas与 FasL结合,通过神经鞘磷脂酶的活化,使神经鞘磷脂分解,产生神经酰胺,从而激活一系列神经酰胺依赖性蛋白激酶,启动了胞内磷酸化过程,最终导致 DNA降解,细胞凋亡。实验还发现,增加鞘氨醇激酶的活性可抑制射线诱导的凋亡,鞘氨醇的磷酸化是神经酰胺的另一脂质代谢途径,提示神经酰胺代谢途径可使细胞发生分化、增殖和凋亡的两种结果,这些阻断途径的进一步发现将为肿瘤治疗开辟新思路。

目前认为环境应力(包括:热休克,UV、X及 $\gamma$ 射线等)均可引起靶细胞凋亡,这种凋亡大多数是 Fas介导的,而蛋白磷酸化是应力诱导凋亡过程中的共同途径,该途径对地塞米松诱导的细胞凋亡是非依赖性的。应力诱导凋亡需要应力激活蛋白(stressactivated protein, SAP)激酶的联级激活,从而将它们

的特异性底物的丝氨酸或苏氨酸残基磷酸化<sup>[16-21]</sup>,研究表明,丝氨酸或苏氨酸蛋白激酶是神经酰胺的下游信号传递的靶分子,参与中间信号的传递。丝氨酸或苏氨酸蛋白激酶通过激活三磷酸肌醇和甘油二酯使胞内 $Ca^{2+}$ 浓度升高<sup>[22]</sup>,直接激活 $Ca^{2+}$ /Mg<sup>2+</sup>依赖性内源性核酸酶,导致染色体固缩及 DNA断裂;激活谷氨酰胺转移酶使胞浆蛋白质发生交联,细胞骨架改变;使生长阻滞 DNA损伤基因(GADD)激活,导致细胞生长停滞。

大多认为,Bcl-2 p53等癌基因参与了 Fas介导的细胞凋亡的调控。Bcl-2的过度表达可抑制细胞凋亡。Strasser等认为<sup>[23]</sup>,在辐射诱导的 Fas介导的细胞凋亡中,Fas信号并不能下调 Bcl-2 Bax和 Bcl-x<sub>s</sub>。有学者认为纯化的 Bcl-2蛋白可部分阻断 UV通过 Fas介导的凋亡;Bag-1是 Bcl-2结合蛋白基因,是一种新的抗细胞凋亡基因,Bcl-2在辐射中保护凋亡的作用是 Bcl-2和 Bag-1的复合途径介导的;Lpr和 Bcl-2蛋白超表达鼠可抵抗射线诱导的小鼠脾脏 B细胞凋亡,Lpr比 Bcl-2抑制凋亡的能力更强<sup>[25-26]</sup>。P53基因表达的改变,在一定程度上决定了凋亡的发生,辐射诱导凋亡时 Fas作为 P53的靶基因,P53蛋白可上调 Fas在细胞的表达,进而介导靶细胞凋亡;但 Fas的表达并不是 P53介导凋亡所必需物质<sup>[4]</sup>。c-fos rel raf c-myc和 c-myb等癌基因均与细胞凋亡有关,这些癌基因与辐射通过 Fas介导细胞凋亡之间的关系尚未见报道,有待进一步研究。

Fas介导细胞凋亡中一些胞浆蛋白酶在凋亡信号传递中扮演极其重要的角色,FADD(Fas associated deathdomain)与 Fas“死亡区域”结合,维持细胞稳定,抑制凋亡,不同的是 FADD的 N端有一“死亡区”,如果过度表达,可导致凋亡。Rehemtulla的研究发现,哺乳类细胞暴露于 UV射线,发生 Fas介导的凋亡,表现为 Fas途径的激活和 FADD/MORT1产物的聚集,该途径可被

FADD的缺失所阻断<sup>[27]</sup>。

ICE(IL- $\beta$  转化酶)是一种半胱氨酸蛋白酶,与其家族成员 CPP3 $\beta$  等一样,在细胞凋亡中起中心杀手的作用。研究表明,Fas与FasL结合可迅速引发ICE的蛋白水解活性。ICE的过度表达能增强射线通过Fas介导的凋亡,当ICE抑制剂CrmA存在时可阻断上述射线通过Fas介导凋亡的途径<sup>[28]</sup>。射线作用后,p53缺乏鼠的胸腺细胞,保留Fas或TCL诱导的CPP3 $\beta$ 介导的凋亡敏感性;p53依赖的CPP3 $\beta$ 的激活,在DNA损伤时诱导的细胞凋亡,对Fas系统是非依赖的<sup>[29]</sup>,提示CPP3 $\beta$ 是p53或Fas系统介导凋亡的共同途径。

综上所述,Fas系统触发的“死亡信号”的传递是极其复杂的,受多种因素的调控。那么,生理情况下当DNA损伤、突变时,是否启动Fas系统清除损伤细胞?由于Fas系统启动后出现凋亡和增殖两种相反的效应,是否Fas系统也能启动修复酶?其精确机制尚待进一步探讨。

#### 4 结束语

研究表明:Fas系统在许多细胞的凋亡中起极其重要的作用,Fas系统的研究正日新月异,阐明Fas及FasL在细胞凋亡,特别是射线致凋亡中的表达和信号传递及调控的机制,可从不同途径干预Fas介导的凋亡,从而为预防、治疗放射病和深入研究肿瘤的放射治疗开辟新领域。

#### 参 考 文 献

1 Trauth BC et al. Science, 1989; 245: 3012

- 2 Nagatuj K et al. Nippon Rinsho, 1996; 54: 1790
- 3 Kuida K et al. Science, 1995; 267: 2000
- 4 Reinke V et al. Oncogene, 1997; 15: 1527
- 5 Baiocchi RA et al. Blood, 1997; 90: 1737
- 6 Leverkus M et al. Exp Cell Res, 1997; 232: 255
- 7 吴 玮 等.中华放射医学与防护杂志, 1997; 17: 305
- 8 Reap EA et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1997; 94: 5750
- 9 Olive PL et al. Int J Radiat Biol, 1997; 71: 695
- 10 吴 玮 等.中华放射医学与防护杂志, 1998; 18: 102
- 11 Nagata S et al. Science, 1995; 267: 1449
- 12 Schulze-Osthoff K et al. J Cell Biol, 1994; 127: 15
- 13 Martin SJ et al. Int J Radiat Biol, 1991; 59: 1001
- 14 Chmura SJ et al. Cancer Res, 1997; 57: 1270
- 15 Eischen CM et al. Blood, 1997; 90: 935
- 16 Chen Y et al. J Exp Med, 1996; 271: 631
- 17 Kyriakis J et al. Nature(Lond.), 1994; 369: 156
- 18 Kyriakis J et al. Bioessays, 1996; 18: 567
- 19 Verheij M et al. Nature(Lond.) 1996; 380: 75
- 20 Mathias S et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88: 10009
- 21 Utz PJ et al. J Exp Med, 1997; 185: 843
- 22 Oshimi Y et al. J Immunol, 1995; 154: 599
- 23 Strasser A et al. EMBO J, 1995; 14: 6136
- 24 Martin SJ et al. EMBO J, 1995; 14: 5191
- 25 Takayama S et al. Cell, 1995; 80: 279
- 26 Alvarado C et al. Rev Invest Clin, 1997; 49: 171
- 27 Rehemtulla A et al. J Biol Chem, 1997; 272: 25783
- 28 Aragane Y et al. J Cell Biol, 1998; 140: 171
- 29 Fuchs EJ et al. Cancer Res, 1997; 57: 2550

(收稿日期: 1998-04-25)