

· 综述与编译 ·

肿瘤细胞死亡调控及其信号转导^①

中国医学科学院 放射医学研究所(天津,300192) 李雨民 李玉坤^②综述 穆传杰审校
中国协和医科大学

摘要: 肿瘤细胞的存活与死亡平衡是肿瘤研究和临床治疗的关键问题。本文就细胞死亡机制和有关的两个信号转导系统(NF- κ B, MAPK)中一些分子的作用及其两者之间的关系进行了综述,也为进一步改善肿瘤的有效治疗提供理论基础。

关键词: 凋亡蛋白酶 κ 结合核因子 B 丝裂原激活蛋白酶家族

一般来说,细胞死亡都是细胞内发生了有顺序的、立体形式的受控级联反应的结果,因而被称为程序性细胞死亡或细胞凋亡。在肿瘤的治疗及实验研究中发现,尽管辐射、化学疗法和肿瘤坏死因子(TNF)可以杀伤肿瘤细胞,但是这些手段均能使细胞产生抗性。正如一些学者所怀疑的那样,辐射、TNF及化疗药物开启了被作用的肿瘤细胞进入细胞自杀程序的同时也激活了另一关键分子 κ 结合核因子B(NF- κ B),它启动基因转录,产生新的蛋白,阻断导致细胞凋亡的回路,从而在细胞内部建立起一个“精细的存活与死亡的平衡”(delicate life-death balance)。细胞存活与死亡的另一平衡是由丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)信号转导系统执行的;辐射、化学疗法、TNF和其他环境刺激都会启动这个信号转导系统。这些发现使肿瘤治疗有了新的希望,因为干扰肿瘤细胞这一保护机制,就会使其对放化疗和TNF更敏感。

1 细胞死亡的启动及凋亡蛋白酶家族

细胞凋亡的发生是一系列称为凋亡蛋白酶(caspases/ICE)家族成员的作用,它们的活性部位含半胱氨酸,于底物天冬氨酸部位产生特异水解。至今,已发现的凋亡蛋白酶家

族成员有十个以上,如ICE为caspase-1, TCH-1为caspase-2, YAMA/CPP32为caspase-3等等,它们在转染宿主细胞后均能引发细胞凋亡并都被牛痘病毒CrmA蛋白或一种四肽化合物(YVAD)抑制^[1]。

ICE是1994年发现的哺乳动物凋亡蛋白酶。最初,人们只发现ICE的功能是将无活性的IL- β 水解,产生一个有生理活性的片段;但是细胞凋亡并不是它对IL- β 作用的结果,因为能持续分泌IL- β 的细胞并不凋亡,而无IL- β 的细胞亦可凋亡,说明凋亡细胞中存在另外的酶作用底物,其蛋白水解物是细胞凋亡的关键物质。多聚ADP核糖聚合酶(PARP)是一种核蛋白,其功能与DNA修复、基因组的维护和整合性,及对环境刺激应力变化反应有关。已证明,caspase-3将PARP水解成为24ku(kD)和89ku两个片段。在很多形成凋亡的细胞中,均可发现PARP这一片段,因而,PARP是凋亡蛋白酶底物之一^[2]。

凋亡蛋白酶的其他底物在不断地发现:

① 由于凋亡蛋白酶本身含有天冬氨酸,因此所有的凋亡蛋白酶都可以把自己作为底物水解。最近已得到证实,Fas(CD95/Apo1)受体的胞内死亡区在结合与其匹配分子FADD

① 国家自然科学基金(39770668)资助

② 天津医科大学总医院内分泌科博士研究生(天津,300052)

(Fas-associated death domain)的相应区后, 凋亡蛋白酶-8(FLICE/Mach-1)因和 FADD 具有同种亲合作用而加入结合。由于所有的凋亡蛋白酶都可以把自己作为底物水解, 在此结合之后, 单链多肽凋亡蛋白酶-8酶原被水解成为具有活性的二聚体, 从而激活下游凋亡蛋白酶, 放大了细胞凋亡信号^[3]。②已有报告, 凋亡蛋白酶-3切开与 DNase相连的抑制酶, 使前者激活, 入核后水解 DNA^[4], 产生电泳梯形。③凋亡蛋白酶-3切断肌凝蛋白, 后者是一种在正常情况下结合肌动蛋白丝, 保持细胞形状的蛋白。用凋亡蛋白酶-3切断的肌凝蛋白片段注入细胞, 细胞就会失去其形状, 发生细胞凋亡样变化^[5]。切断的肌凝蛋白可能是细胞凋亡发生期间形态变化的生理效应物。④抑制细胞凋亡的 Bcl-2蛋白也是凋亡蛋白酶-3的底物, 水解后成为 Bax样细胞凋亡效应蛋白^[6]。

目前一致的看法为, 任何一凋亡蛋白酶的激活, 会引起其他凋亡蛋白酶原激活的级联反应, 发生一系列蛋白水解而产生细胞凋亡。前不久, 发现了凋亡蛋白激活因子-1(Apaf-1), 它和线粒体内的细胞色素 C结合, 可激活凋亡蛋白酶-9, 接着使凋亡蛋白酶-3激活^[7]。

2 辐射 TNFR1/Fas和环境刺激诱发细胞凋亡的信号转导^[8-11]

TNF是具有多种作用的细胞因子, 它通过和膜上两个受体(R1, R2)结合发挥其生物学功能。TNFR1执行主要功能, 包括细胞凋亡。Fas(APO-1/CD95)是细胞膜上的一种受体蛋白, 属 TNFR家族。Fas与其配体或其抗体结合, 即可引发细胞凋亡。凋亡蛋白酶的特异抑制物能抑制 TNFR1/Fas引发的细胞凋亡, 说明此类细胞凋亡的发生要有凋亡蛋白酶参加。

研究表明, 在转导细胞凋亡信号时, Fas

和 TNFR1胞内部分有一相似的约 80个氨基酸必需区域称为死亡区, 如 Fas相关死亡区(FADD), TNFR1相关死亡区(TRADD)及受体相互作用蛋白(RIP), 它们的过度表达都会诱发细胞凋亡, 其中前两者可被 CrmA蛋白抑制。

TNFR1/Fas的死亡区蛋白可激活鞘磷脂酶, 后者能生成第二信使神经酰胺。在射线辐照后及 Fas/FasL TNF α /TNFR1诱发细胞凋亡过程中, 均可发现神经酰胺升高和鞘磷脂降低, 这些变化也均使胞内 MAPK 应力激活蛋白激酶/c-JUN 氨基端蛋白激酶(SAPK/JNK)和 p38系统激活, 导致细胞凋亡。

MAPK系统激活的级联反应实际上是分三步进行的: 首先是 MAPKK激酶(MAPKKK)磷酸化激活 MAPKK, 后者磷酸化后再激活 MAPK, MAPK再去激活一些转录因子, 调控基因表达。根据 MAPK系统激活所需的三肽二磷酸的不同, MAPK系统可分为: ERK(胞外信号调节激酶)、SAPK-JNK和 p38三个亚系统。各亚系统的激活物不同: 对应 ERK的 MEK(MAP或 ERK激酶)的两个同工酶 MEK1和 MEK2; p38由 MAPKK的两个同工酶 MKK3和 MKK4激活; SAPK-JNK由 MKK4激活。各亚系统是各自独立的, 不同的 MAPK信号转导回路。

实验证明, 环境刺激包括辐射、神经酰胺、TNF α 和去除生长因子可导致 p38和 SAPK-JNK两个亚系统激活, 引起细胞凋亡。用 PCR技术, 以丝苏氨酸酶保守区序列作引物, 已获得一个称为 ASK1(细胞凋亡信号转导激酶 1)的分子, 其激酶区和 MAPKKK有相似的序列^[8]。它能选择性地激活 MKK4 MKK3, 从而使 SAPK p38两个信号反应系统激活。在正常情况下, 存活信号回路经 ERK激活, 并抑制 p38 JNK的激活, 细胞存活、增殖、分化。

3 辐射、TNF启动 NF- κ B抑制肿瘤细胞死亡

TNF具有双向作用的第一个线索是,一些阻断蛋白合成的药物使细胞对TNF更敏感。这说明,TNF可能启动一些基因活动,保护肿瘤细胞免于死亡。有关学者怀疑,这些基因可能是被一个转录因子NF- κ B的蛋白启动,证据是:①NF- κ B基因剔除鼠,由于大量肝细胞凋亡,而死于胚胎期;②抑制NF- κ B,可导致免疫系统的B细胞凋亡。虽然这两个事实都有其局限性,不能推而广之结论,但是以后的实验证明了NF- κ B抑制细胞凋亡的确切作用。

NF- κ B通常是由两个蛋白质,50ku(p50)和65ku(p65/RelA)组成的异二聚体,在胞浆内与另一NF- κ B抑制蛋白(I κ B)结合。I κ B分子量为35~37ku,它不仅阻止NF- κ B与DNA结合,也掩盖NF- κ B的核定位信号,同时对已结合在DNA上的NF- κ B也能灭活。TNF与膜上受体结合后,NF- κ B与I κ B脱离,使NF- κ B激活,再启动那些与感染、炎症和应激反应有关的基因。

为扩大对NF- κ B作用的深入了解,一些学者用一个具有超抑制作用的非肿瘤细胞I κ B的突变体转染各种肿瘤细胞,使肿瘤细胞的NF- κ B牢固地与其结合,于是,NF- κ B不起作用,这些肿瘤细胞在辐射和TNF的作用下全部死亡。比较来自NF- κ B基因剔除鼠和正常鼠的成纤维细胞巨噬细胞对辐射和TNF α 作用的反应,发现前者生存力明显下降,而后者不受影响;在p65- /成纤维细胞中重新导入p65,细胞存活增加。这证明了NF- κ B具有阻止细胞凋亡的作用^[13]。电离辐射、化疗药物和TNF均可激活NF- κ B,保护肿瘤细胞,抵抗肿瘤的各种疗法;而抑制NF- κ B,如将细胞转染I κ B质粒,细胞凋亡发生率明显增加^[13~15]。

这些结果解释了肿瘤细胞抵抗细胞凋亡

信号转导的原因,使人们了解NF- κ B的作用机制,并且为进一步改善肿瘤的有效治疗提供了理论基础。一些初期对电离辐射和化疗药物敏感的肿瘤细胞,在治疗过程中也会启动NF- κ B回路,关闭它们的细胞自杀机制,产生抗性。所以,抑制NF- κ B的药物,如在艾滋病临床中使用的一些药物,就可能会在肿瘤治疗中有积极作用。当然,关闭NF- κ B回路,有利于启动肿瘤细胞自杀机制,但是,自杀机制应还有其他回路,不只是NF- κ B的抑制,例如前述MAPK信号系统,就是另一回路。

4 MAKP信号转导系统和NF- κ B激活之间的关系

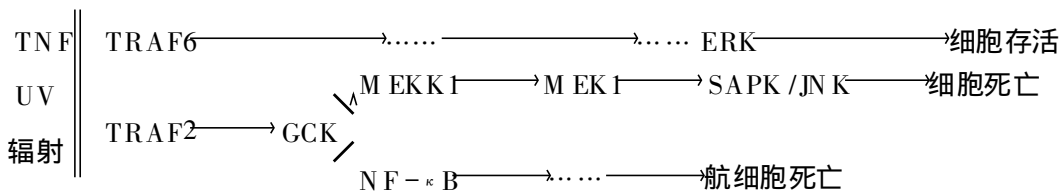
TNF受体TNFR1和TNFR2归属正在扩大的TNF受体超家族,包括Fas/CD95和CD40的成员。相应配体与其受体的结合,就会导致受体的寡聚合化,这将启动受体下游信号回路。前已述及,TNFR1执行TNF包括细胞凋亡等主要功能,而TNFR2则与启动NF- κ B回路有关。1994年Rothe等人分离出两个TNF受体相关蛋白,TRAF1和TRAF2(TNF receptor-associated factors),它们能与TNFR2胞浆内部分结合,形成异二聚体复合物,启动NF- κ B回路。这个蛋白家族的第三个成员TRAF3在同一年发现,也称为CD40结合蛋白,它可与CD40胞浆内部分结合。至1998年,已发现6个TRAF^[16]。

CD40与其配体结合后,胞浆中CD40的尾部和TRAF2 3 5 6相互作用,激活NF- κ B和MAKP的ERK。这些TRAF蛋白质,TRAF3除外,为NF- κ B激活所必需。已有报告,在293细胞系中,TRAF6激活ERK和NF- κ B的活性^[17]。

TNF通过TNFR2激活NF- κ B和SAPK/JNK的关键是要有TRAF2参加,它通过生发中心激酶(GCK)激活MEKK1,再

激活 JNK/SAPK系统^[17]。TNF TPAF2 紫外线、辐射可使 GCK 活性增高。抑制 TRAF2 诱导的 NF-κB 和 SAPK/JNK 活性的 TRAF2 的突变体,也抑制 TNF 诱导的 GCK 的激活。干扰 GCK 表达则阻碍 TRAF2 和 TNF 诱导的 SAPK 激活,但是 NF-κB 不受影响。以上说明 TNF 信号系统的多样性,

可导致 SAPK NF-κB 激活,其作用部位应在 TRAF2 下游,GCK 的上游。不久前,已分离出与编码人 GCK 相似的 cDNA,其内源性编码产物 GCK 样激酶 (GLK),可被紫外线、辐射和 TNF 激活。GLK 在胞内的表达,能激活 JNK,但是不能激活 ERK 和 p38 回路^[18]。其间关系总结如下:



参考文献

<p>1 Golstein P. Science, 1997; 275: 1081</p> <p>2 Nicholson DW et al. Nature, 1995; 376: 37</p> <p>3 Muzio M et al. J Biol Chem, 1998; 273: 2926</p> <p>4 Enari M et al. Nature, 1998; 273</p> <p>5 Kothakota S et al. Science, 1997; 278: 294</p> <p>6 Cheng EHY et al. Science, 1997; 278: 1966</p> <p>7 Barinaga M. Science, 1998; 280: 32</p> <p>8 Xia Z et al. Science, 1995; 270: 1326</p> <p>9 Pronk GJ et al. Science, 1996; 271: 808</p> <p>10 Verheji M et al. Nature, 1996; 380: 75</p>	<p>11 Idhio H et al. Science, 1997; 275: 90</p> <p>12 Beg AA et al. Science, 1996; 274: 782</p> <p>13 Wang CY et al. Science, 1996; 274: 784</p> <p>14 Shao R et al. J Biol Chem, 1997; 272: 32739</p> <p>15 Yamagishi N et al. Int J Radiat Biol, 1997; 72: 157</p> <p>16 Kashiwada M. J Exp Med, 1998; 19: 237</p> <p>17 Shi CS et al. J Biol Chem, 1997; 272: 32102</p> <p>18 Diener K et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1997; 94: 9687</p>
---	---

(收稿日期: 1998-07-15)

T细胞共刺激反应与电离辐射

白求恩医科大学放射生物教研室(长春,130021) 杨英 龚守良综述 李修义审校

摘要:近年来,对 T 细胞的活化及其抗肿瘤机制有了新的突破性认识, T 细胞共刺激反应是激发有效的细胞免疫应答所必需的, B7 分子家族及 CD28/CTLA-4 等共刺激分子在共刺激反应的信号传递过程中起重要作用。本文简要综述共刺激反应信号转导形式, 诱导细胞免疫, 抗肿瘤及与电离辐射的关系等方面的内容。

关键词: T 细胞 B7 共刺激反应 电离辐射

T 细胞作为机体抗肿瘤免疫的重要组成部分, 在荷瘤状态下, T 细胞对肿瘤抗原不能识别, 不能产生有效的免疫应答, 而且肿瘤的进行性生长可抑制机体的免疫功能, 使机体处于免疫抑制状态。近年来研究发现, 肿瘤细胞表面不表达 B7 分子或表达但不能引起有

效的抗肿瘤免疫应答, 这种共刺激信号的缺乏是肿瘤免疫应答低下的关键因素。共刺激分子主要包括 B7、CD28、ICAM-1、HAS、CD40、CD40L 等, 其中以 B7 分子的研究最多^[1]。B7 是一种参与 T 细胞共刺激反应的重要粘附分子, 用 B7 基因转染小鼠肿瘤细胞