

# 细胞命运,生死攸关

吴 缅,姚 展

(合肥微尺度物质科学国家实验室,中国科学技术大学生命科学学院肿瘤和细胞凋亡实验室,安徽合肥 230027)

**摘要:**细胞凋亡是指为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主的有序的死亡.它是真核生物所独有的,与细胞坏死不同,它是一种主动过程,涉及一系列基因的激活、表达以及调控.它并不是病理条件下自体损伤的一种现象,而是为更好地适应生存环境而主动发生的一种死亡过程.细胞凋亡作为调控细胞生死的重要方式,在生命体中通常保持在一个平衡状态,不论过量的凋亡还是过少的凋亡都会引发疾病,有时甚至导致机体的死亡,肿瘤就是一个典型的例子.而这种平衡是受到一系列核酸和蛋白严密调控的,其中包括抑凋亡的 IAP 家族分子、促凋亡的 caspase 分子以及具有多种功能的 Bcl-2 家族分子和 p53 分子,甚至包括目前备受关注的非编码 RNA 等.它们通过复杂的细胞信号转导网络,精细地调节着细胞生死的平衡,而对于这些分子参与的调控细节的研究正是我们所关注的问题.揭示其中的机制不仅对于了解细胞的生理行为有重要意义,也将为了解生命的起源以及寻找更为有效的疾病治疗途径提供有价值的线索.

**关键词:**细胞凋亡;半胱氨酸蛋白酶;线粒体;泛素化;凋亡抑制蛋白

**中图分类号:**Q291 **文献标识码:**A

## To die or not to die, for cell that is the question

WU Mian, YAO Zhan

(Hefei National Laboratory for Physical Sciences at Microscale, and Laboratory for Tumor and Apoptosis, School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

**Abstract:** Apoptosis, or the programmed cell death, is employed by eukaryotes to eliminate damaged or unwanted cells to maintain homeostasis. Unlike necrosis, apoptosis is an active, genetically controlled sequence of events which involve the activation, expression and regulation of multiple genes. Apoptosis reflects a strategy of cells to adapt to a changing environment rather than passive self-damage under pathological conditions. Malfunction of apoptosis, either being “too much” or “too little”, has been implicated in various diseases, including tumorigenesis. Due to the critical roles apoptosis play in maintaining tissue homeostasis, pro- and anti-apoptotic signals are carefully balanced within cells. This balance is achieved through the products of a series of apoptosis-related genes, including the anti-apoptotic IAP (inhibitor of apoptosis protein) family, the pro-apoptotic caspase protease family, the p53 tumor

**收稿日期:**2008-06-28; **修回日期:**2008-07-28

**基金项目:**国家自然科学基金(30530200 和 30728003),国家重点基础研究发展(973)计划(2006CB933300 和 2006CB910300)和中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KSCX1-YW-R-57)资助.

**作者简介:**吴缅(通讯作者),博士/教授,中国科学院“百人计划”入选者.1982年毕业于南京师范大学生物学系;1988年毕业于美国哥伦比亚大学并获得分子生物学博士学位,其后在美国哈佛大学从事蛋白激酶调控博士后研究.1991年以来,先后在新加坡国立大学及新加坡南洋理工大学任助理教授和副教授.2000年回国以后,先后主持了国家自然科学基金重点项目及中国科学院知识创新工程重要方向性项目,并参与国家重点基础研究发展(973)计划和中国高技术研究发展(863)计划等重大项目的研究.在国际生物学杂志 EMBO, J. MCB, JBC, MBC 和 Oncogene 等学术期刊上发表了多篇学术论文. E-mail: wumian@ustc.edu.cn



到正反两方面的控制. 细胞凋亡也不例外,它受着促凋亡(pro-apoptosis)和抑凋亡(anti-apoptosis)两类调控分子的操控,而这两类分子间作用的平衡,决定着细胞存亡的命运.

其中 IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) 家族就是一类重要的抑凋亡蛋白,该家族蛋白在许多物种中都广泛存在,参与线粒体凋亡途径(intrinsic apoptotic pathway)的调控,其蛋白水平的升高会阻断细胞凋亡的有效进行,与肿瘤的发生密切相关. 它们往往能通过其特有的一个保守结构域 BIR (baculoviral IAP repeat)的介导,与重要的凋亡执行分子 caspases 相互作用,从而抑制后者的活性,使细胞凋亡不能进行. 某些 IAP 家族的蛋白也不直接作用于 caspases,而是通过对其他促凋亡分子的抑制而间接影响 caspase 的活性,其中一个典型的例子就是我们研究过的 Survivin. 该蛋白分子在胚胎发育成熟后,其表达范围和强度会受到逐渐的抑制,而在肿瘤组织,例如肺癌、结肠癌、乳腺癌、胰腺癌和前列腺癌中,却会异常地高表达. 我们的研究发现:它虽然本身不能直接抑制 caspase 的活性,但是 Survivin 能够通过特异地结合线粒体释放出的促凋亡蛋白分子 Smac/DIABLO,使后者不能再结合游离的 XIAP,因此能促进 XIAP 抑制 caspase 活性,由紫杉醇(天然抗癌药物)引起的细胞凋亡就是通过这一机制得以被有效地抑制<sup>[3]</sup>. 借助生物信息学通过对 Survivin 的结构进行分析并结合实验上的证据提示我们,它的第 53 位的天冬氨酸(Asp)对于 Survivin 和 Smac/DIABLO 的结合起着重要作用,一旦其突变, Survivin 便不能通过结合 Smac/DIABLO 来抑制细胞凋亡,53 位 Asp 突变的 Survivin 能拮抗野生型 Survivin 的功能而表现出促凋亡的活性<sup>[4]</sup>. 这一发现对于认识某些重要的基因突变与疾病发生的分子机制有重要意义. IAP 家族蛋白除了含有保守的 BIR 结构域外,往往还含有能够介导泛素化修饰的 RING(really interesting new gene)结构域,这一特征赋予了这一类蛋白参与调控蛋白质泛素化蛋白酶体途径(ubiquitin-proteasomal degradation pathway)降解的功能,而这一功能被证实在细胞凋亡调控中发挥着重要作用. 比如,我们发现:IAP 家族的另一个成员 Livin,和 Survivin 一样,也作用于 Smac/DIABLO,但 Livin 主要的功能是介导 Smac/DIABLO 的泛素化,从而使后者被 26S 蛋白酶体所识别并降解<sup>[5]</sup>,这一

发现首次阐明了 Livin 的 E3 连接酶活性在细胞凋亡调节机制中的作用.

除了 IAP 家族蛋白外,细胞中还有一类家族蛋白在抑凋亡机制中起重要作用,那就是 Bcl-2 蛋白家族. 这一蛋白家族种类和功能更为复杂,它并不全是抑凋亡蛋白,同时还包括很多促凋亡蛋白,而扮演何种角色,则取决于它们所含 BH(Bcl-2 homology)结构域的不同,通常含有 BH 1-4 结构域的 Bcl-2 家族成员如 Bcl-2、Bcl-XL 和 Mcl-1 等具有抑凋亡的功能,而含有不完整 BH1-4 结构域和仅含有 BH3 结构域(BH3 only)的蛋白如 Bak、Bax、Bik、Bid、Puma 和 Bad 等,则具有促凋亡的功能. 但有趣的是:这一蛋白家族中的成员的调控功能往往是既相辅相成又相互拮抗,比如,Bak 和 Bax 可以通过形成异源聚合体,打开线粒体上的分子通道释放促细胞凋亡因子而促进细胞凋亡,而 Bcl-2 和 Bcl-XL 则能通过抑制这种聚合体的生成而抑制细胞凋亡. 我们的研究也表明了这一关系的普遍存在,Puma 和 Mcl-1 是对细胞凋亡起相反作用的一对蛋白,我们发现它们二者之间也可以发生直接的相互作用,Mcl-1 可以抑制 Puma 的活性,而 Puma 却起着稳定 Mcl-1 的作用<sup>[6]</sup>. 这一机制表明,作用相反的双方可能在凋亡调控中同时发挥作用,而相互牵制依存,无形中呼应了一种“相生相克”的自然规律.

细胞中有一类蛋白能直接引发细胞凋亡,最典型的代表就是 caspase,这些蛋白往往具有蛋白酶的特性,能够特异地在天冬氨酸位点将底物蛋白切割,但这种活性则往往依赖于自身的剪切激活,而依据这种剪切激活机制的不同,caspases 又可以分为上游的起始 caspase (initiate caspase)和下游直接作用于底物的效应 caspase (effector caspase). caspase-8 作为重要的起始 caspase,对下游 caspase 的激活和细胞凋亡的进程都起着关键的作用. 对于 caspase-8 自身剪切激活机制的探索始终是 caspase 研究的焦点. 我们通过对 caspase-8 不同剪接体序列的细致分析,发现在 caspase-8 的一个剪接体 Mch-5 中,参与募集功能的前体结构域(pro-domain)中存在着一个潜在的 caspase-8 识别位点,这一位点的切割能导致激活后的 caspase-8 前体结构域从细胞膜上的 DISC (death-inducing signaling complex)上释放,并分离为两个独立的 DED 结构域,其中 N 端的 DED-A 能在 ERK1/2 的协同下转运至细胞核,与 TOPORS(topoisomerase I binding ring protein)结

合而最终导致 caspase-8 自身的转录激活<sup>[7]</sup>. 这一发现使我们能更加完整地认识 caspase-8 的激活机制, caspase-8 的 DED-A 能激活本身的转录以源源不断地补充在凋亡过程中被切割掉的酶原. 另外, 因为该剪接切割点仅存在于高等灵长类动物(人和猿)中, 所以也说明该机制在生物进化上是比较近代的事件.

细胞中也存在一些蛋白, 它们本身并不直接执行细胞凋亡的任务, 而是通过诱导线粒体释放促细胞凋亡因子, 间接地激活 caspases 触发细胞凋亡, 其中就包括上面提到的 Bcl-2 家族成员和 Smac/DIABLO. 值得一提的是 Bcl-2 家族中的 Bad, 尽管其促细胞凋亡的作用很早就被发现, 但是这一作用所受到的调控机制一直不清楚. 我们从其基因转录水平的调控入手, 成功地鉴定了其受 p53 调控的启动子靶点, 并揭示了 Bad-p53 之间存在一个转录激活/抑制的负反馈 loop 的调节机制. 我们也第一次提出: Bad 可以将 p53 转运到线粒体, 开启 bak-bax 分子开关并诱导细胞凋亡的一条新的作用通路<sup>[8]</sup>. 这一发现揭示了一种 p53 转录非依赖型的新的调节机制. 而对于 Smac/DIABLO, 虽然之前通过对 IAP 家族蛋白的研究, 一系列作用于 Smac/DIABLO 的调节通路被发现, 但是这些调控都发生在蛋白质水平, 而事实上, 在细胞凋亡起始过程中, 对于 Smac/DIABLO 的调控早在基因转录时就已经开始, 而其中起转录作用的一个重要因子就是 E2F1. 通过生物信息学与分子生物学方法相结合, 我们成功地鉴定了 E2F1 在 Smac/DIABLO 基因启动子区的作用靶点, 并证实 E2F1 对 Smac/DIABLO 起转录上调的作用, 细胞水平的研究也表明, 在 E2F1 诱导的细胞凋亡中 Smac/DIABLO 起关键作用<sup>[9]</sup>. 除此以外, 还有一些能够引发细胞凋亡的分子, 它们通过细胞 extrinsic apoptotic pathway 发挥作用. 尽管其导致细胞凋亡的完整途径还不清楚, 但其中的一些作用机制也同样显示出分子调控网络的协调性和复杂性. 一个典型的代表就是 RIP3 因子, 虽然它可以通过多种途径导致细胞凋亡的发生, 但我们发现, 它在亚细胞的定位决定它的功能; 我们不仅成功地鉴定了其一级序列中存在的核定位信号序列 (NLS) 和核输出信号序列 (NES), 同时也证明了其 NES 是通过 CRM1 介导的模式决定 RIP3 的亚细胞定位的, RIP3 在细胞核中发挥凋亡功能<sup>[10]</sup>. 这一研究表明: 核质穿梭对于蛋白在细胞凋亡中的调控作用也

能起到重要作用, 细胞质/细胞核的空间划分, 可能会使细胞凋亡在时空水平调控上有一个重要的补充.

虽然依据促进或者抑制细胞凋亡可以将参与细胞凋亡调控的蛋白区分成两类, 但是在这一复杂的体系里也存在着一些其他的重要的调控分子, 能同时扮演双重角色, 这类分子中很多是转录因子, 它们转录的下游靶蛋白既有促凋亡分子又有抑凋亡分子, 这就使得对于它们的研究更加困难, 但同时也使它们的调控机制更加的微妙和严格. 其中最为重要的蛋白就是 p53, 统计表明: 有近 60% 的肿瘤发生都与该蛋白功能的异常有关, 而这种异常除了基因突变和染色体异常导致的之外, 还有一个重要原因是, 其自身往往可以转录激活一些负反馈因子如 Mdm2 和 Pirh2 等的表达, 这些具有泛素连接酶活性的蛋白可以直接降解 p53, 从而对其功能产生抑制. 而更为复杂的是这类负调控机制本身还存在着一系列微调控 (fine turning) 来决定这一负反馈的平衡点. 基于这种考虑, 我们深入地研究了 Pirh2-p53 负调控 loop 的微调控. 结果表明 Pirh2 的磷酸化水平对于其在细胞内的定位和泛素 p53 的活性有决定作用, 一旦其被 CaMK-2 磷酸化, 它就不能进入细胞核, 在胞质中通过自身泛素化而被降解; 反之, 如果 Pirh2 不被磷酸化, Pirh2 将进入胞核降解 p53. 同时, 我们也发现 Pirh2 的磷酸化水平在肿瘤组织中要远远低于正常组织, 说明这一机制可能与该蛋白抑制细胞凋亡和促进肿瘤生长有重要的关系<sup>[11]</sup>. 目前我们也正尝试依据这一重要信息开发针对 Pirh2 磷酸化水平相关的肿瘤诊断和治疗的新方法. 这项研究也表明: 泛素连接酶的活性很大程度上受到其他翻译后修饰, 例如磷酸化等修饰的调控. 很多研究都显示: 一些与细胞凋亡相关的重要 E3 泛素连接酶的活性调控对于细胞响应凋亡信号有重要意义, 这种调控有时甚至发生在 RNA 的加工水平, 例如 Siah-1, 作为细胞凋亡调控分子, 其促凋亡功能很大程度上取决于其 E3 的活性, 而我们的研究发现, 这一活性可以因为拼接时选择另一种异构体 Siah-S (Siah-1 short) 而被抑制<sup>[12]</sup>, 这一发现对于了解该分子在肿瘤发生中活性的下降有重要意义.

如上所述, 细胞凋亡看似像落叶飘零那样简单, 但事实上却受到如此复杂和严格地调控, 而一旦这种调控机制发生异常, 疾病将随之而来, 如癌症、免疫功能异常、神经退行性疾病等都与细胞凋亡的失

调紧密相关,这也正是我们投身于对其研究的重要原因之一. 如果将细胞凋亡看成是一曲死亡交响乐的话,站在台上参与表演的实际上是那些上面提到的各种参与细胞凋亡调控的分子;而我们研究者就像是台下倾心聆听的观众,我们所做的每一项研究不过是在留意每个美妙的音符之语,并为这些精湛的表演所叹服.

## 2 研究展望

随着人类基因组计划的完成,我们对于细胞凋亡机制的研究也无疑地更深了一步,但是同样也面临更多的挑战. 至今我们仍然不能从基因的差别去简单地描述细胞凋亡发生和调控的途径,因为这些承载细胞行为程序的序列所编码的信息最终是由蛋白质实现的,而在这些功能分子的合成和作用过程中,它们又受到蛋白质本身、RNA 分子以及众多无机小分子的调控. 这些分子相对于处于多层细胞膜体系保护下的 DNA 显然更容易受到外界影响而发生结构上的修饰和改变. 另外,它们也可能通过蛋白质等对 DNA 分子进行修饰,而使细胞的源程序发生改变,细胞凋亡便会出现可延续的异常. 对于这些潜在的可能性和分子机制的探索显然将会成为今后研究的热点. 而针对这些问题,我们也展开了对于蛋白质翻译后修饰以及非编码 RNA 的新功能的深入研究. 除此之外,开辟更为可靠的在生理水平上进一步确定这些凋亡相关生物分子与疾病(癌症等)发生的关系也必将推动具有特异靶向的新型药物的开发. 我们依然相信:在今后的很长一段时间里,传统的生物化学、分子生物学和细胞生物学方法也仍然会发挥重要作用,因为它们能在短时间内对于生物活性分子在细胞凋亡中的潜在功能给出不可缺少的提示.

### 参考文献(References)

[1] Lockshin R A, Williams C M. Programmed cell death I: Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi Silkmoth[J]. *J Insect Physiol*, 1965, 11:123-133.

[2] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. *Br J Cancer*, 1972, 26:239-257.

[3] Song Z, Yao X B, Wu M. Direct interaction between

survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(25): 23 130-23 140.

[4] Song Z, Liu S, Wu M, et al. A single amino acid change (Asp53→Ala53) converts Survivin from anti-apoptotic to pro-apoptotic[J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(3):1 287-1 296.

[5] Ma L, Huang Y, Wu M, et al. Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(12):2 079-2 088.

[6] Mei Y, Du W, Wu M, et al. Puma \* Mcl-1 interaction is not sufficient to prevent rapid degradation of Mcl-1 [J]. *Oncogene*, 2005, 24(48):7 224-7 237.

[7] Yao Zhan, Duan Shanshan, Wu Mian, et al. Death effector domain DEDa, a self-cleaved product of Caspase-8/Mch5, translocates to the nucleus by binding to ERK1/2 and up-regulates procaspase-8 expression via a p53-dependent mechanism[J]. *EMBO J*, 2007, 26:1 068-1 080.

[8] Jiang P, Du W, Wu M, et al. The bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(23):9 071-9 082.

[9] Xie W, Jiang P, Wu M, et al. Novel link between E2F1 and Smac/DIABLO: Proapoptotic Smac/DIABLO is transcriptionally upregulated by E2F1[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(7):2 046-2 055.

[10] Yang Y, Ma J, Wu M, et al. Nucleocytoplasmic shuttling of receptor-interacting protein 3 (RIP3): Identification of novel nuclear export and import signals in RIP3 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(37): 38 820-38 829.

[11] Duan Shanshan, Yao Zhan, Wu Mian, et al. Phosphorylation of Pirh2 by Calmodulin-dependent kinase II impairs its ability to ubiquitinate p53 [J]. *EMBO J*, 2007, 26(13):3 062-3 074.

[12] Mei Yide, Xie Chongwei, Wu Mian, et al. Siah-1Sa novel splice variant of Siah-1 (seven in absentia homolog), counteracts Siah-1-mediated downregulation of  $\beta$ -catenin[J]. *Oncogene*, 2007, 26(43):6 319-6 331.

[13] Song Z Y, Wu M. Identification of a novel nucleolar localization signal and a degradation signal in Survivin-deltaEx3: A potential link between nucleolus and protein degradation [J]. *Oncogene*, 2005, 24(16): 2 723-2 734.