

细胞凋亡中的 Caspase 家族

朱国萍 程 阳 廖 军 徐 冲¹⁾

(中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230026)

摘要 保守的 Asp 特异性半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) 家族是哺乳动物细胞中程序性死亡 (PCD) 的介导者和执行者。原凋亡信号首先活化不同的 Caspase 起始因子, 再由起始因子激活级联下游的 Caspase 效应分子, 最终由效应分子特异地水解细胞中的一系列底物而导致细胞解体。Caspase 家族是整个 PCD 过程的关键元件, 它们通过与众多蛋白质 (激活因子或抑制因子) 的相互作用来调控细胞的生死存亡。

关键词 Caspase, 起始因子, 效应分子, 激活因子, 抑制因子, 细胞凋亡

学科分类号 Q28, Q55

细胞凋亡 (apoptosis) 是机体生长、分化、发育和病理过程中由基因编码调控的细胞主动自杀过程, 又谓程序性死亡 (programmed cell death, PCD)。机体通过凋亡将那些衰老、畸变和能导致疾病的细胞清除。哺乳动物细胞中的 PCD 由 Asp 特异性半胱氨酸蛋白酶 (aspartate-specific cysteinyl proteinase, Caspase 或 Casp) 家族介导。活化的 Caspase 触发酶级联效应, 最终引起染色体 DNA 的降解及细胞的解体^[1]。在人类细胞中, Caspase 的超表达和激活均引起细胞凋亡, 因此又称死亡蛋白酶。Caspase 能通过与细胞内众多蛋白质因子的相互作用实现对 PCD 过程的调节。

1 Caspase 的结构及其生物学特性

Caspase 最初表达为蛋白酶原 (pro-Caspase), 分子质量为 30~50 ku, 基本结构包括: N 端结构域、一个大亚基 (20 ku) 和一个小亚基 (10 ku), 如图 1^[2]。大、小亚基形成异二聚体。Casp-1 和 Casp-3 的晶体结构显示, 两个异二聚体再聚合成活性四聚体, 其上含有两个独立行使功能的催化位点。在每个催化结构中, 紧密相连的大、小亚基均提供与底物结合及催化所需的氨基酸。Caspase 酶原的两个结构特征对其激活很重要: N 端结构域的序列和长度高度可变 (23~216 个残基不等), 参与酶功能的激活调节; 另外, 所有结构域都由酶原上的相同位点切割而来, 说明 Caspase 可能自发激活或通过相似的特异性酶级联反应。

Caspase 酶原在 Asp-X 键处被切割形成四聚体活性蛋白酶, 其有效催化至少需要 N 端的 4 个氨基酸识别切割位点, Caspase 优先识别底物的四肽

基元各不相同, 与它们迥异的生物学功能一致^[3]。包含四肽序列的蛋白质也并非都被切割, 可能四聚体结构单元影响到识别过程。Caspase 可以既专一又高效 ($K_{cat}/K_m > 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 地特异性水解一系列蛋白质底物, 并导致蛋白质功能的丧失或改变。

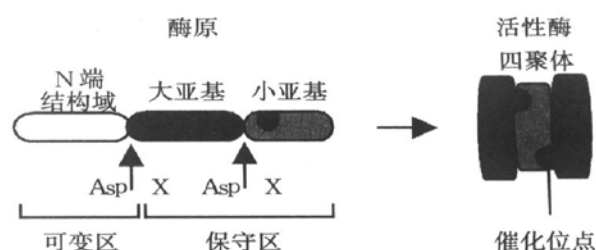


图 1 Caspase 的基本结构及活性形式

2 Caspase 家族及其分类

白细胞介素-1 β 转化酶 (interleukin-1 β converting enzyme, ICE 或 Casp-1) 是 Caspase 家族的第一位成员, 由其前体水解而来, 由 2 个大亚基和 2 个小亚基构成。现已确定有 13 种 Caspase 参与细胞凋亡和炎症反应, 见表 1^[2~4]。其中 2 种鼠类同系物 Casp-11 和 Casp-12 尚未在人类细胞中发现。根据序列同源性及其他生化性质的分析, 将 Caspase 试验性地分成 ICE 类、CPP32 类和 ICH-1 类三个亚族。Casp-1 识别 Tyr-Val-Ala-Asp (YVAD) 序列。Casp-3 识别 Asp-Glu-Val-Ala-Asp (DEVD) 序列, 并水解聚 (ADP-核糖) 聚合酶

¹⁾ 通讯联系人, 中国科学技术大学生命科学学院分子生物与细胞生物学系。

Tel: (0551) 3606354, E-mail: xcg@ustc.edu.cn

收稿日期: 1999-03-09, 修回日期: 1999-08-02

(PARP). Casp-6 识别 Val-Glu-Ile-Asp (VEID) 序列及切割核纤层蛋白 (lamins). Caspase 作用的其他死亡底物还包括 DNA 依赖的蛋白激酶 (DNA-PK)、固醇调节元件结合蛋白 (SREBP)、肌动蛋白 (actin) 及胞影蛋白 (fodrin) 等. Wang 等^[5]的

最新研究发现, 在 Casp-11 突变体小鼠中, 脂多糖刺激后的 IL-1 α 和 IL-1 β 产物受阻. 细胞中的 Casp-11 酶原能与 ICE 酶原相互作用, 且 Casp-11 的过量表达影响 ICE 的激活. 由此认为 Casp-11 是 ICE 复合物的成分之一, 并为 ICE 激活所必需.

表 1 人类细胞中的 Caspase 蛋白酶家族

蛋白酶	别称	识别序列	底物	功能
Casp-1	ICE	YVAD	pro-IL-1 β , pro-Casp-3, pro-Casp-4	炎症
Casp-4	ICErel II, TX, ICH-2			
Casp-5	ICE rel III, TY			
Casp-2	ICH-1		PARP	
Casp-3	CPP32, Yama, apopain	DEVD	PARP, DNA-PK, SREBP, rho-GDI	效应分子
Casp-6	Mch2	VEID	lamin A	效应分子
Casp-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1		PARP, pro-Casp-6	效应分子
Casp-8	FLICE, MACH, Mch5			起始因子
Casp-9	ICE-LAP6, Mch6		PARP	起始因子
Casp-10	Mch4			

3 细胞色素 c 的释放与 Caspase 的激活

在 PCD 中, 直接水解底物并导致细胞解体的是 Caspase 效应分子 (effector), 参与上游事件调节的 Caspase 为凋亡起始因子 (initiators). 大量的遗传证据都支持激活 Caspase 效应分子的级联模型. 活化 Caspase 的蛋白酶 (caspase activating proteases, CAPs) 先激活起始因子, 再由活化的起始因子激活级联下游的效应分子, 最后 Caspase 效应分子水解一系列底物, 造成细胞生化性质的改变而进入死亡共同通路. 因此不同的死亡信号却能导致相同的细胞凋亡现象^[2].

在哺乳动物细胞中, Caspase 的活化主要是指 Casp-8^[6]和 Casp-9 酶原的激活途径. 这两种起始因子的激活都需要结合特异的辅助因子 (cofactors). 尤其 Casp-9 酶原的激活机制更为复杂, 需要细胞凋亡蛋白酶活化因子 (apoptotic protease activating factors, Apafs)、细胞色素 c (Cyt c) 和 dATP. Cyt c (Apaf-2) 与 Apaf-1 结合, 通过后者的 CARD (caspase recruitment domain) 与 Casp-9 酶原的 CARD 相互作用 (图 2)^[7]. 活化的 Casp-9 再激活下游的 Caspase 效应分子, 通过降解 PARP 和 lamins 等引起染色体断裂、细胞凋亡^[8].

当 Ca²⁺ 过量、凋亡蛋白 Bax、氧化剂及神经

酰胺 (ceramide, CM) 等刺激线粒体外膜上的受体, 使其处于开放状态时, 水和溶质进入线粒体基质, 渗透压的不平衡引起基质肿胀, 使得外膜断裂, 释放出 CAPs, 包括 Cyt c、凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor, AIF) 和线粒体内的 Caspase. Cyt c 从线粒体内膜释放到胞质中另一途径, 是膜通道的开放并不伴随细胞器的膨胀^[9]. 线粒体中的 Casp-3 酶原也被释放到胞质中, 它可能参与一些初生细胞的凋亡, 但其释放前是否被激活还不清楚^[10].

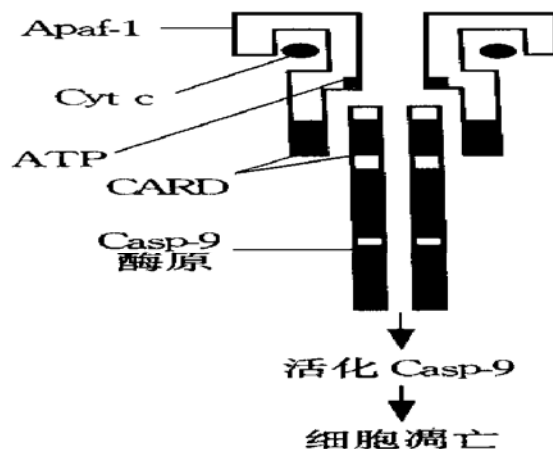


图 2 Casp-9 的激活模型

Cyt c 一旦释放, 细胞将会通过快速的凋亡机

制或缓慢的坏死过程死亡. Cyt c 释放的结果依赖于细胞类型. 如果 Cyt c 过量, 则 Caspase 能被激活. 足量的 Cyt c 仍可停泊在与 Cyt b-c1 高亲和的结合位点上, Cyt c 氧化酶也能维持电子传递. 在氧的消耗和 ATP 量保持不变的同时, Caspase 与其作用底物解离, 诱发 PCD. 在另些细胞中, 大量内源性 Caspase 抑制因子使释放的 Cyt c 不能诱导依赖 Caspase 的凋亡, 但 Cyt c 从线粒体释放完后, 会造成电子传递链断裂, 氧自由基的产生和 ATP 量的下降, 从而驱动细胞坏死. Caspase 抑制因子并不阻止 UV 辐射、酶抑制剂 staurosporin 及 Bax 过表达诱导的 Cyt c 释放^[11]. Fas 触发的 Cyt c 释放则主要受 Casp-8 抑制, 但有时通过 Casp-8 对下游 Caspase 激活效应的放大, 也会引起 Cyt c 的释放^[12].

4 Caspase 诱发细胞凋亡的机理

PCD 包括 DNA 片段化、染色质凝集、膜呈泡状、细胞内陷分解为由膜包被的凋亡小体 (apoptotic bodies) 等, 整个过程有 30~60 min. 此间 Caspase 运用不同的战略极有效地水解维持细胞基本结构和功能的蛋白质, 而杀死细胞.

首先 Caspase 可以直接拆卸细胞结构. 例如它们破坏支持核膜和使染色质组织化的刚性结构——核板 (nuclear lamina). 核板由核纤层蛋白 lamins 头尾聚合形成. 在凋亡过程中, Caspase 特异性切割 lamins, 引起核板倒塌、DNA 降解. 另外 Caspase 可通过水解使细胞骨架调节蛋白的催化和调节结构域分离, 从而丧失调节功能. 例如完整的 gelsolin (731 aa) 依赖 Ca^{2+} 分割 actin 聚合物. Casp-3 可将 gelsolin 水解成 39 ku 的 N 端和 41 ku 的 C 端凋亡片段. 具有活性的 N 端片段可以迅速以不依赖 Ca^{2+} 的方式解聚 actin, 使细胞骨架倒塌, 并激活下游的 Caspase, 导致核裂解, 诱发细胞凋亡^[13].

Caspase 还能通过灭活 PCD 抑制因子杀死细胞. 如小鼠淋巴细胞中受 Caspase 激活的 DNase (caspase-activated deoxyribonuclease, CAD) 及其抑制因子 (ICAD). CAD 由 343 个氨基酸组成, 携有核定位信号. 如图 3^[14], 在 COS 细胞或无细胞体系中表达时, 功能类似分子伴侣 (chaperone) 的 ICAD 与 CAD 新生肽链结合, 使其正确折叠, 同时抑制 CAD 的 DNase 活性和核定位信号, 使 CAD 位于胞质中. 当凋亡信号激活 Caspase 后, Casp-3 水解 ICAD, 释放的 CAD 进入核内, 发挥 DNase

活性降解染色体 DNA, 导致细胞解体.

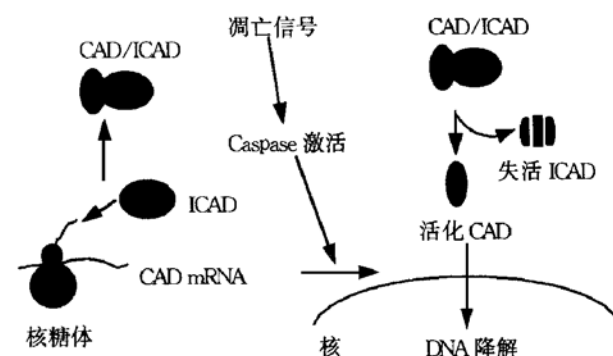


图 3 活化的 Caspase 水解 ICAD, 激活 CAD, 诱发 PCD

5 Caspase 对细胞凋亡的调节

Caspase 酶原在活细胞中不断表达 (在神经元中能存活一生), 但 PCD 也能迅速被诱导, 这说明 Caspase 的调节作用十分精妙有效. 复杂的水解系统一般包括调节蛋白酶、辅因子、反馈环以及控制效应蛋白酶活性和功能的开关.

Caspase 主要受其激活因子和抑制因子的调节. 一个凋亡信号往往能引发辅因子、Caspase 起始因子及抑制因子三条途径的调控: a. 在辅因子激活过程中, Bax 促进 Cyt c 的释放, 而 Bcl-2 则阻止 Cyt c 的释放^[15]. Bcl-2 通过与 Apaf-1 的相互作用, 阻止 Cyt c 对 Caspase 的激活, 延迟细胞凋亡. 但当 Bcl-2 与 Bax 形成异二聚体时, 则又启动死亡周期^[16]; b. 调控 Caspase 起始因子与辅因子的相互作用也能实现对 PCD 的调节. 例如 FLIPs (FADD-like ICE inhibitory proteins) 与 Casp-8 酶原的序列类似, 但缺乏关键的催化残基. FLIPs 与 Casp-8 酶原竞争辅因子 FADD, 抑制起始因子 Casp-8 的激活, 从而阻止下游 Caspase 的活化^[8]. 决定辅因子选择 Caspase 酶原还是落入圈套的因素目前尚未知. c. 细胞凋亡抑制因子 (inhibitors of apoptosis, IAPs) 家族则是通过抑制 Caspase 效应分子的活性来阻止凋亡的^[17]. 从昆虫到人类, IAPs 家族十分保守. 人 IAP 的过量表达可以阻遏由各种刺激诱导的细胞死亡. 人 X 染色体连接的 IAP (XIAP) 直接抑制死亡蛋白酶效应分子 Casp-3 和 Casp-7 的活化, 而延迟 PCD. 因此 IAPs 可能是反馈环中的负调节子^[18].

另外有 2 种病毒蛋白也抑制 Caspase 的活性. 它们是由牛痘病毒编码的细胞因子应答调节物 A (cytokine response modifier A, CrmA) 和 Baculovirus 编码的 p35 蛋白. Casp-3 酶原 (32 ku) 可

被 Casp-1 切割成 17 ku 和 12 ku 两个亚基, 其活性亚基能水解 PARP 为 25 ku 和 85 ku 的凋亡片段, CrmA 抑制这些水解反应. p35 则同等地抑制 Casp-3 和 Casp-1 的活性^[4]. Davidson 等^[19]发现, 眼特异性表达的细胞存活蛋白 p35 抑制的细胞凋亡, 可以阻止 *Drosophila* 突变体因视网膜退化引起的视觉消失, 说明抑制 Caspase 的活性可以功能化地挽救细胞.

6 展 望

PCD 的分子生物学机制相当复杂. 正如 CED-3 在线虫凋亡中的重要作用, Caspases 是哺乳动物细胞中 PCD 的关键环节. 如在癌症治疗中, 常规方法多损伤正常细胞, 但通过激活与 Caspase 起始因子相连的死亡受体复合物或 Caspase 则可以选择性诱导癌细胞凋亡. 而在抗药性细胞中, 缺乏激活 Caspase 的信号传递途径, 若化疗药物和癌基因自身的转化能作为凋亡信号, 绕过缺失途径与 Caspase 激活直接耦联, 则也能选择性杀死转化细胞^[20]. 因此对 Caspase 的结构、催化性质及调节功能的研究, 即有助于弄清细胞凋亡机制, 也有助于阐明自身免疫性疾病 (AIDS)、阿尔茨海默症 (AD) 等的致病原理, 并为治疗研究指明方向.

参 考 文 献

- Jacobson M D, Weil M, Raff M C. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 1997, **88** (3): 347~354
- Thornberry N A, Lazebnik Y. Caspase: enemies within. *Science*, 1998, **281** (5381): 1312~1316
- Cohen G M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 1997, **326** (1): 1~16
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997, **88** (3): 355~365
- Wang S Y, Miura M, Jung Y, *et al.* Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell*, 1998, **92** (4): 501~509
- 童新, 孙志贤. Caspase 蛋白酶与细胞凋亡. *生物化学与生物物理进展*, 1998, **25** (5): 418~421
- Tong X, Sun Z X. *Prog Biochem Biophys*, 1998, **25** (5): 418~421
- Adams J M, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 1998, **281** (5381): 1322~1326
- Koseki T, Inohara N, Chen S, *et al.* ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (9): 5156~5160
- Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, **281** (5381): 1309~1312

- Mancini M, Nicholson D W, Roy S, *et al.* The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol*, 1998, **140** (6): 1485~1495
- Jurgensmeier J M, Xie Z H, Deveraux Q, *et al.* Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (9): 4997~5002
- Kuwana T, Smith J J, Muzio M, *et al.* Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem*, 1998, **273** (26): 16589~16594
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, *et al.* Caspase-3 generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, 1997, **278** (5336): 294~298
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, *et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 1998, **391** (6662): 43~50
- Yang J, Liu X S, Bhalla K, *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 1997, **275** (5303): 1129~1132
- Hengartner M O. Death cycle and Swiss army knives. *Nature*, 1998, **391** (6666): 441~442
- Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature*, 1998, **396** (6707): 119~122
- Deveraux Q L, Takahashi R, Salvesen G S, *et al.* X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 1997, **388** (6639): 300~304
- Davidson F F, Steller H. Blocking apoptosis prevents blindness in *Drosophila* retinal degeneration mutants. *Nature*, 1998, **391** (6667): 587~591
- Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*, 1998, **281** (5381): 1317~1321

Caspase Family in Apoptosis. ZHU Guo-Ping, CHENG Yang, LIAO Jun, XU Chong (School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China).

Abstract A conserved family of aspartate-specific cysteinyl protease (Caspase) has been identified as mediators and executors of programmed cell death (PCD) in mammalian cell. Proapoptotic signals culminate in activation of different initiator caspase which, in turn, activate effector caspase through enzyme cascade pathways. Active effectors cleave a set of substrates and result in cellular disassembly. Caspase family is the critical elements in PCD. They regulate cell death or survival by interaction with many proteins (activators or inhibitors).

Key words caspase, initiator, effector, activator, inhibitor, apoptosis