

[文章编号] 1007-385X(2005)02-0152-03

## 细胞器相关凋亡途径研究进展

胡洁 综述, 蔡真 审阅(浙江大学医学院附属第一医院血液科、骨髓移植中心, 杭州 310006)

[摘要] 细胞凋亡是一个由基因调节的重要的主动过程。细胞内各组分在这一过程中相互协调, 组成了精细的调控系统。细胞核和线粒体是近年发现与凋亡密切相关的细胞器。进一步的研究发现, 在一定条件下, 内质网、溶酶体, 高尔基体和内涵体等也与凋亡活动有关。

[关键词] 凋亡; 线粒体; 内质网; 溶酶体

[中图分类号] R329.26 [文献标识码] A

细胞是机体基本的结构与功能单位, 为完成严格程序化的代谢过程, 其自身各组分间需要相互协调, 这种协调性也表现在细胞凋亡这一有序的生理过程中。除细胞核外, 线粒体是近年发现与凋亡密切相关的细胞器。进一步的研究发现, 在一定条件下, 内质网、溶酶体, 高尔基体以及内涵体等也与凋亡活动有关。不同的细胞器对凋亡刺激的反应会触发一系列的生化事件的发生, 最后引起细胞凋亡<sup>[1]</sup>。这些细胞器在细胞凋亡中的作用及其机制是目前研究的热点。

### 1 细胞核相关凋亡途径

核 DNA 的损伤反应是目前研究最清楚的凋亡起始途径<sup>[2]</sup>。来自于 PtdIns-3-OH 激酶家族两种酶即 ATM (ataxia telangiectasia mutated) 和 DNA 依赖的蛋白激酶 (DNA-PK) 的发现解决了 DNA 损伤反应和凋亡的关系。紫外线诱导的 DNA 损伤主要是由 ATR (ataxia telangiectasia Rad3 related) 和 ATM 所感受, 同时 DNA 下游损伤诱导激酶 Chk1 (由紫外线激活) 和 Chk2 (由离子辐射激活), 在 p53 的氨基末端存在有磷酸化丝氨酸残基, 后者能自身激活并增强 P53 的交换激活功能, 或者抑制 p53 和 MDM<sub>2</sub> 的交替激活。为了防止 P53 蛋白的降解, P53 蛋白聚集成为转录因子。P53 不但抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 而且更重要的是产生 MMP 诱导的前凋亡蛋白。第一, P53 诱导许多 Bcl-2 家族前凋亡成员的表达, 尤其是 Bax, Noxa29 和 PUMA30。所有这些成员都能够从细胞质易位到外部线粒体膜, 并诱导膜电位下降。P53 还诱导 ROS 蛋白 Peg3 和 Pw1, 与 Bcl-2 家族无关, 促进 Bax 通过一种未知机制向线粒体易位。第二, P53 主要激活线粒体酶的表达, 这种酶可以局部激活活性氧 (ROS), 它可以应用于脯氨酸氧化酶, 在脯氨酸氧化为吡咯啉-5-羧酸盐的过程中激活 ROS。脯氨酸还原酶能转移果糖的电子到酶作用底物 (例如 Cyto-c) 当中, 在酶作用物限制的情况下, 电子可以从这种穿梭系统中漏出并激活过氧化物基团。第三, P53 诱导 p53AIP<sub>1</sub> (一种线粒体基质蛋白) 的表达, 后者的过度表达引起  $\Delta\Psi_m$  的下降, 其机制目前还不清楚<sup>[3]</sup>。另外, P53 促进胞质蛋白 Apaf-1 (凋亡蛋白酶激活因子-1) 的表达。Apaf-1 是

凋亡体的一种主要核心蛋白, 容易使 Cyto-c 诱导的 caspase 激活<sup>[4]</sup>。尽管转录调节很重要, 但是不依赖转录激活的 P53 也能诱导凋亡<sup>[5]</sup>。其机制可能是通过 P53 向线粒体易位并位于线粒体表面和线粒体内部与线粒体 Hsp70 相互作用; 也可能是由 c-Abl 将 MMP 和 DNA 损伤连接起来。c-Abl 是一种酪氨酸激酶, 在一种 ROS 诱导的细胞死亡模式中, 由 ATM 和 DNA-PK 所激活, 并且可以易位到线粒体。

### 2 线粒体相关的凋亡途径

线粒体在促凋亡信号和 caspases 激活之间起着不可替代的作用<sup>[6]</sup>。甚至有人提出线粒体在细胞凋亡中起着决定性的作用<sup>[7]</sup>。实验证明,  $\gamma$  辐射、Ceramide (凋亡信号转导中的重要分子, 介于促凋亡信号和凋亡过程之间)、Fas 与 FasL 结合等均可导致线粒体在电子转移方面功能的紊乱, 从而影响呼吸链, 使 ATP 产量下降。这种能量代谢上的障碍主要发生在细胞凋亡的晚期<sup>[8]</sup>。线粒体在细胞凋亡过程中最重要的一点在于它可释放能够激活 caspases 的蛋白。在无细胞的体系中, 自发的、可以由 Bcl-2 抑制的染色质聚集和 DNA 片段化依赖于线粒体的存在, 进而发现实际上是依赖于 Cyto-c 从线粒体中的释放。从线粒体释放的 Cyto-c 与 Apaf-1, Procaspase 9 结合在一起形成“凋亡体” (Apoptosome), 其结果是 caspase 9 的激活<sup>[9]</sup>。除 Cyto-c 之外, 线粒体还可释放其它介导细胞凋亡的分子如 procaspase 3 和 AIF (apoptosis-inducing factor)。AIF 在体外可作用于 procaspase 3, 并且其本身可能就是一个 caspase。线粒体发生上述改变的机制在于线粒体膜上一种叫 PT 通道 (permeability transition pore) 的形成。促凋亡信号会使 caspases 激活 (某些 caspase 的底物就是位于线粒体膜上的蛋白)、胞浆  $Ca^{2+}$  水平升高、产生神经酰胺。这些改变会直接或间接地引发 PT 通道开放。PT 通道是由线粒体膜蛋白组成的, 定位于内外膜接触点, 并可以无选择性地允许  $\leq 1.5$  kD 分子通过。这个通道的开放会由于线粒体基质内的高渗透压使线粒体内外  $H^+$  梯度消失, 呼吸链脱偶联, 能量产生中断; 还会由于水和溶质的进入使基质肿胀并导致外膜破裂, 释放出包括 Cyto-c 在内的各种活

性蛋白,引起细胞溶解和凋亡。

线粒体在细胞凋亡中的重要性还在于它与 Bcl-2 基因家族之间的关系。实际上,很多 Bcl-2 家族的蛋白如 Bcl-2, Bax, BCL-XL 等都定位于线粒体膜上。而且实验证实, Bcl-2 家族蛋白可以影响 PT 通道开放及 Cyto-c 和 AIF 的释放,并改变线粒体外膜的通透性。如 Bax 一方面可以直接促使线粒体膜内的大小约为 12 kD 的 Cyto-c 在外膜未被破坏的情况下通过某种通道释放至胞浆<sup>[10]</sup>,另一方面,又可以激发 PT 通道的开放,与此相关 Bcl-2 蛋白则起抑制作用。

### 3 内质网相关的凋亡途径

内质网相关细胞凋亡是不同于受体介导或线粒体介导 DNA 损伤的另一种新的细胞凋亡途径。内质网与细胞凋亡相联系表现在两个方面<sup>[11]</sup>:一是内质网对  $Ca^{2+}$  的调控,二是内质网应激反应。内质网是细胞内最重要的蛋白质合成折叠的场所,同时也是细胞内  $Ca^{2+}$  的主要储存库,它含有钙调节分子伴侣(如 calnexin 和 calreticulin),后者在糖基化蛋白质和非糖基化蛋白质的正确折叠中起重要作用;内质网腔内还含有凋亡蛋白(如 caspase-12, Bap31 和 Bcl-2)<sup>[12]</sup>。钙调节分子伴侣凋亡蛋白决定了细胞对内质网应激和凋亡的敏感性。大量实验表明,很多细胞在凋亡早期会出现胞质内  $Ca^{2+}$  浓度迅速持续的升高,这种浓度升高来源于细胞外  $Ca^{2+}$  的内流和胞内钙库(如内质网)的释放。相对高浓度的  $Ca^{2+}$  一方面可以激活胞质中的钙依赖性蛋白酶(如 calpain),另一方面可以作用于线粒体,影响其通透性的改变,进而促进凋亡。位于内质网上的抑凋亡蛋白 Bcl-2 则可以调节内质网腔中的游离  $Ca^{2+}$  浓度,使胞质中的  $Ca^{2+}$  维持在合适的中等浓度水平,从而起到抑制凋亡的作用。内质网内错误折叠蛋白质聚集就会导致内质网分子伴侣基因表达激活,内质网未折叠反应(UPR)机制包括定位于内质网膜上的转录因子 ATF6 激活,内质网膜激酶 IRE1 的聚集并抑制另一个内质网膜激酶 PERK 的表达,进一步使错误折叠蛋白质降解。当未折叠蛋白质过度聚集变成有毒性时就会触发细胞凋亡。信号主要通过 caspase-12 下传。Bap31 可能通过  $Ca^{2+}$  介导内质网和线粒体前凋亡信号交流,从而聚集 caspase-12 和 calnexin。最近有研究表明 caspase-4 也参与内质网应激所引起的细胞凋亡反应<sup>[13]</sup>, caspase-4 也是 caspase-1 家族成员,与 caspase-12 高度同源,主要位于人类内质网中,其作用类似于 caspase-12。

钙蛋白酶 CHOP( C/EB Phomologusprotein )基因也参与内质网应激反应诱导细胞凋亡<sup>[14]</sup>。CHOP 广泛表达在哺乳动物细胞,其编码的蛋白质属于 CCAAT 增强子相连蛋白的转录因子 C/EBP 家族,与各种细胞活动如能量代谢、增殖、分化、凋亡相关。CHOP 阻滞细胞分裂周期可诱导细胞凋亡。正常情况下,CHOP 表达十分低,在内质网应激反应时,其表达显著增加。内质网应激反应时,跨膜蛋白 IRE1 和 ATF6 活化,其胞浆部份进入核内,与 ERSE 保守基序 CCAAT (N9)GCACG 中的 GCACG 相连,CCAAT 被 NFY 占据,启动

CHOP 转录与表达,从而诱导细胞凋亡。

### 4 溶酶体相关的凋亡途径

溶酶体功能是通过它内包的各种水解酶的活动来实现的。近年发现在某些情况下溶酶体酶可以激活 caspases,这提示溶酶体在细胞凋亡中也可能有重要作用<sup>[15]</sup>。在发现溶酶体与细胞凋亡的过程中,对溶酶体特别是其中的 cathepsin 参与凋亡的研究,是继线粒体研究后的一个新的前沿。特异性的细胞凋亡过程如何由包含有非特异性的溶酶体来完成,这是一个尤其值得关注的问题。一种可能是 cathepsin 选择性地从溶酶体转移至胞质,这种转移机制尚不清楚。当用能够引起线粒体 Cyto-c 释放的 atractyloside 处理溶酶体时也可以引起溶酶体中 cathepsinB 的释放,这提示线粒体与溶酶体可能有相似的泄漏机制,当然不能排除溶酶体通过完全不同的方式释放水解酶,有研究显示,在前氧化剂诱导的凋亡中,溶酶体释放 cathepsinD 出现在线粒体释放 Cyto-c 之前,可能是溶酶体神经磷脂酶激活神经酰胺,神经酰胺激活相对分子量为 52 kD 的前 cathepsinD 异构体,后者为具有自身催化作用的蛋白水解酶。另一种可能是溶酶体膜的破裂程度与胁迫因子间存在着某种数量级上的关系,也就是说,当溶酶体受到低强度的胁迫时,就释放有限种类的水解酶到胞质中,参与凋亡;当受到高强度的胁迫时,溶酶体膜破裂,水解酶全部释放,引起细胞坏死。实验证实,当用扰动溶酶体膜的表面活性剂 MSDH 处理细胞时,低浓度的 MSDH 能够引发溶酶体的部分泄漏,进而产生凋亡的形态特征,高浓度的 MSK 则引起细胞很快坏死。

最近有实验表明在 TNF- $\alpha$  诱导的干细胞凋亡中, caspase8 可以引起溶酶体中 cathepsinB 的泄漏,积累在胞质中的 cathepsinB 能够促进线粒体中 Cyto-c 的释放。有胞质存在时 cathepsinB 引起 Cyto-c 释放的效率远大于纯化的 cathepsinB 的效率,提示 cathepsinB 可能激活了胞质中的未知凋亡因子,这种因子会作用于线粒体,引起 Cyto-c 的释放。胞质中的未知因子还有待进一步分离鉴定,但有人猜测 Bcl-2 家族中的 Bid 蛋白可能是其中之一<sup>[10]</sup>,因为有实验表明 Bid 可以被溶酶体中的水解酶酶切为有活性的片段,这些片段能够引起纯化的线粒体中 Cyto-c 的释放,在溶酶体中很可能有多种酶切 Bid 的蛋白因子存在。过量表达的 Bcl-2 蛋白能够阻止溶酶体膜的破裂,进而抑制凋亡,这也说明溶酶体参与凋亡可能与 Bcl-2 家族蛋白有关系。因此,溶酶体与线粒体、cathepsin 以及 Bcl-2 家族蛋白之间似乎存在着某种联系,揭示并证实这种联系将会使我们对细胞凋亡的机制有更深入的了解。

### 5 高尔基体和内涵体相关的凋亡途径

高尔基体膜上富含许多凋亡信号蛋白(如 caspase2),质膜上有多种死亡受体(如 CD95, GD3)。有报道显示, p53 的激活使定位于高尔基体的 CD95 易位到质膜上; GD3 合酶的激活暗示着神经酰胺转变为 GD3 合酶, GD3 合酶可以穿过

线粒体诱导线粒体膜渗透。然而高尔基体作为实际的压力感受器在调节凋亡中的功能仍然不清楚<sup>[16]</sup>。在早期内体中, RhoB( Rho 家族的小 GDP 酶)为一种新的凋亡调节蛋白, 法呢酰基转移酶抑制剂导致法呢基化的 RhoB 同位体的消失, 这和相关膜的分裂联系在一起。这个结果的获得是法呢酰基转移酶抑制剂诱导凋亡的充分必要条件, 但是 RhoB 和凋亡受体的连接机制仍然不清楚。实验证明, caspase 2 在凋亡信号中起着重要的作用。caspase 2 依赖的鼠成纤维细胞对前凋亡药物所诱导的凋亡有抵制作用, 这些药物能诱导 UPR 或其它的分泌胁迫因子, 在人类细胞中由于同样的刺激能表达无分裂能力的 golgin-160 (一种定位与高尔基体的 caspase 2 酶作用底物) 来削弱凋亡<sup>[17]</sup>, 定位于高尔基体的 caspase 2 可能显示 UPR-诱导的刺激除了影响内质网外, 还影响高尔基体, 或者高尔基体和内质网之间的信号转导使这些细胞器中的凋亡信号统一起来。至于 caspase 2 在高尔基复合体中的激活机制仍不清楚, caspase 2 的负性调节是 BRUCE( baculoviral-IAP-repeat- containing ubiquitin-conjugating enzyme ), 它定位于高尔基复合体。果蝇的同种 BRUCE 可以通过前凋亡蛋白 Reaper 和 Grim 抑制细胞凋亡<sup>[18]</sup>, 提示它是一种 IAP, 是定位于高尔基复合体的蛋白的 caspase 分解产物, 在凋亡诱导中有令人感兴趣的潜在价值。定位于核的 golgin-160 和 p115 的小型 caspase 分解片段在核内有修补激活信号转录的潜能或引起凋亡。凋亡体分裂和高尔基体蛋白的再定位把高尔基体胁迫和细胞凋亡反应联系起来。DRs ( death receptors ) 证明高尔基体和凋亡的诱导之间有另一潜在联系。许多实验都证实 DRs 存在于质膜, 有趣的是这些相同的 DRs 却定位于高尔基复合体。DR Fas 向质膜的运输由 GD3 所激活, GD3 是由高尔基体产生的重要的凋亡信号分子。而且, 定位于高尔基体的 caspase 2 似乎是 DRs TNFR-1 和 FasL 引起的凋亡中所必需的。这些发现表明至少在某种细胞中, 对细胞受体的凋亡反应依赖于细胞中高尔基体所调节的膜的运输。

## 6 结 语

细胞凋亡是一个受细胞内源性基因、酶类和信号转导途径调控的瀑布式激活的过程。核 DNA 损伤和质膜死亡受体的结合可引起线粒体膜渗透和(或)直接激活 caspase, 很早就被认为是凋亡触发机制。其它的细胞器, 包括内质网, 溶酶体和高尔基体, 是凋亡信号或损伤感觉的主要作用点。每一种细胞器都拥有传感器可以检测到特异的改变信号, 局部激活信号转导途径以及释放信号以确保器官内的信号交流, 它们之间的关系还需进一步深入研究。

## [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Maag RS, Hicks SW, Machamer CE. Death from within: Apoptosis and the secretory pathway[ J ]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15 ( 4 ): 456-461.

- [ 2 ] Norbury CJ, Zhivotovsky B. DNA damage-induced apoptosis[ J ]. *Oncogene*, 2004, 23( 16 ): 2797-808.
- [ 3 ] Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control[ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331( 3 ): 851-858.
- [ 4 ] Wang X, Yang C, Chai J, *et al.* Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*[ J ]. *Science*, 2002, 298 ( 5598 ): 1587-1592.
- [ 5 ] Haeblerlein SL. Mitochondrial function in apoptotic neuronal cell death[ J ]. *Neurochem Res*, 2004, 29( 3 ): 521-530.
- [ 6 ] Palmer AM, Greengrass PM, Cavalla D. The role of mitochondria in apoptosis[ J ]. *Drug News Perspect*, 2000, 13( 6 ): 378-384.
- [ 7 ] Grusch M, Polgar D, Gfalter S, *et al.* Maintenance of ATP favours apoptosis over necrosis triggered by benzamide riboside[ J ]. *Cell Death Differ*, 2002, 9( 2 ): 169-178.
- [ 8 ] Martinou JC, Desagler S, Antonsson, *et al.* Cytochrome c release from mitochondria: All or nothing[ J ]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2 ( 3 ): E41-E43.
- [ 9 ] Roucou X, Rostovtseva T, Montessit S, *et al.* Bid induces cytochrome c-imermeable bax channels in liposomes[ J ]. *Biochem*, 2002, 363( Pt 3 ): 547-552.
- [ 10 ] Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, *et al.* Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol[ J ]. *J Cell Biol*, 2003, 160( 7 ): 1115-1127.
- [ 11 ] Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, *et al.* Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program[ J ]. *J Biol Chem*, 2001, 276( 8 ): 33869-33874.
- [ 12 ] Groenendyk J, Michalak M. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis[ J ]. *Acta Biochim Pol*, 2005, 52( 6 ): 15-20.
- [ 13 ] Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, *et al.* Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A $\beta$ -induced cell death[ J ]. *J Cell Biol*, 2004, 165( 3 ): 347-356.
- [ 14 ] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress[ J ]. *Cell Death Differ*, 2004, 11( 4 ): 381-389.
- [ 15 ] Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ, *et al.* Lysosomes in cell death [ J ]. *Oncogene*, 2004, 23 ( 16 ): 2881-2890.
- [ 16 ] Morale A, Colell A, Mari M, *et al.* Glycosphingolipids and mitochondria: Role in apoptosis and disease[ J ]. *Glycoconj J*, 2004, 20( 9 ): 579-88.
- [ 17 ] Cha H, Smith BL, Gallo K, *et al.* Phosphorylation of golgin-160 by mixed lineage kinase 3[ J ]. *J Cell Sci*, 2004, 117( Pt 5 ): 751-60.
- [ 18 ] Verwooy SY, Chow V, Su J, *et al.* *Drosophila* Bruce can potently suppress Rpr- and Grim-dependent but not Hid-dependent cell death[ J ]. *Curr Biol*, 2002, 12( 13 ): 1164-1168.

[ 收稿日期 ] 2004 - 12 - 28

[ 修回日期 ] 2005 - 04 - 16

[ 本文编辑 ] 韩 丹