

· 综述 ·

# Fas 相关死亡结构域蛋白介导的肝细胞凋亡在肝脏疾病中的作用

葛海燕 甄真

Fas 相关死亡结构域蛋白(Fas associated death domain protein, FADD)作为中枢性的衔接蛋白,可与死亡受体结合招募胱冬肽酶-8,启动级联反应,裂解产生死亡片段,最终导致细胞崩解。FADD 通路被认为是细胞膜死亡受体包括 Fas (APO-1/CD95/FasL receptor)、肿瘤坏死因子受体 1(tumor necrosis factor receptor type 1, TNFR-1)、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)等参与细胞凋亡的主要通路,而 FADD 在该通路中起关键调节作用。本文将从 FADD 的结构和功能入手,对 FADD 所介导的肝细胞凋亡及相关多种肝脏疾病加以综述。

## 一、FADD 的结构与分布

1995 年,Chinnaiyan 等用酵母双杂交技术发现一种能与 Fas 胞内区相互作用,连接 Fas 和 Fas-FD5 而诱导细胞凋亡的蛋白,其中包含一个与 Fas 和 TNFR-1 死亡结构域同源的结构域,故命名为 Fas 相关死亡结构域蛋白,又称为受体介导的毒性介质(mediator of receptor-induced toxicity, MORT1)。FADD 是胞浆内衔接蛋白,具有两个结构域,即羧基端的死亡结构域(death domain, DD)可联接 Fas 的死亡区域,接受凋亡信号;氨基端的死亡效应结构域(death effected domain, DED)能寡聚化并激活胱冬肽酶-8 前体,形成死亡诱导信号复合体(death-inducing signaling complex, DISC),下传凋亡信号。FADD 在成人和胎儿的各种组织中均有分布,而且在不同器官及同一器官的不同发展阶段而有不同表达。

## 二、FADD 的生物学功能

1. FADD 与细胞凋亡:TNFR1 和 Fas 将 FADD 作为共同的下游信号传递体,介导细胞的凋亡。当靶细胞膜上的 Fas 与其配体 FasL 结合后发生三聚体化,活化的 Fas 诱导含死亡域(DD)的接头蛋白 FADD 聚合,与 Fas 结合的 FADD 通过其死亡效应区域蛋白 DED 募集含 DED 的胱冬肽酶-8(FADD 样白细胞介素-1 $\beta$  转换酶, FLICE/MACH1/Mch5),通过其死亡区域蛋白相互连接,形成 DISC。活化的胱冬肽酶-8 从复合体中释放进而激活下游的效应胱冬肽酶或 Bcl-2 作用区域(Bcl-2 interacting domain, Bid)导致细胞死亡。与 Fas 不同,当 TNF- $\alpha$  与 TNFR1 结合后,TRADD(TNF-R1 相关死亡域蛋白)首先被招募到 TNFR1 信号复合体上,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2010.04.017

基金项目:中国肝炎防治基金会人工肝及血液净化科技攻关基金资助(2006ALBP3)

作者单位:050051 石家庄市,河北医科大学第三医院感染科

通讯作者:甄真,Email:prozhenzhen@163.com

通过其聚集的死亡结构域与 FADD 的死亡结构域结合,转导凋亡信号。

2. FADD 与细胞增殖:近来发现,FADD 除了诱发细胞凋亡外还在胚胎发生、细胞周期控制和淋巴细胞增殖中发挥重要作用。Imtiyaz 等<sup>[1]</sup>意外发现 FADD 死亡区域突变体 R117Q 不与 Fas 连接介导凋亡,同时也破坏了小鼠胚胎的发育;而另一个 FADD 死亡区域突变体 V121N,保留了与 Fas 连接和介导凋亡的能力,但也不能支持小鼠胚胎发育,而且淋巴细胞的增殖反应也受损伤。该研究揭示 FADD 可能是一个分子调节转换器,调节两种不同的信号通路凋亡和增殖,而且在胚胎发生和淋巴细胞的发展增殖中发挥重要作用。

另外,发现 FADD 可维持泌乳期乳房分泌腺泡细胞的存活,调节骨骼肌的分化<sup>[2,3]</sup>。Ramos-Miguel 等<sup>[4]</sup>认为人前额皮质磷酸化 Ser194 FADD 的增加与总 FADD 的降低,与吸毒者的成瘾性相关。

### 三、FADD 在各种肝脏疾病中的表达及其临床意义

肝细胞膜表面富含 Fas、TNF-R1、TRAIL-R1 和 TRAIL-R2 受体,肝星状细胞可表达 Fas 和 TRAIL,这些受体的表达参与了肝脏细胞凋亡。而通过 FADD 抑制蛋白或敲除 FADD 基因后可阻碍这些受体诱导的信号复合体中 FADD 与胱冬肽酶-8 的结合,进而阻止细胞凋亡的发生,表明 FADD 参与的凋亡通路等多种肝脏疾病的发生相关。

1. 原发性肝癌:诱导癌细胞的凋亡是治疗肝细胞癌的经典疗法。最近从植物中提取的一种新的可食用的三萜烯类成分羽扇豆醇,可以特异性引起原发性肝细胞癌 SMMC 7721 细胞株死亡受体 3(DR3) mRNA 和蛋白表达降低,在 Fas mRNA 和蛋白表达缺失的情况下仍能明显提升 FADD mRNA 的表达,促进肝癌细胞的凋亡<sup>[5]</sup>。Liu 等<sup>[6]</sup>从乳牛肝菌中提取的 Suillin 可诱导 Fas 和 FADD 蛋白的表达和细胞色素 C 的释放,通过死亡受体和线粒体两条通路作用于人肝癌细胞(HepG2、Hep3B 和 SK-Hep-1 细胞),致使癌细胞凋亡。另有研究表明,通过在体内及体外稳定转染 FADD 基因增强 FADD 蛋白的表达,可以增强 5-氟尿嘧啶抑制肿瘤生长的作用<sup>[7]</sup>。Fas 介导的经典凋亡通路与 FADD、胱冬肽酶-8 形成的凋亡诱导信号复合体是普遍存在的。然而,有些抗肿瘤药物如丝裂霉素 C、星形孢菌素等引起的凋亡反应,胱冬肽酶-8 可在 FADD 相关信号复合体缺失的情况下激活,导致细胞凋亡。Kim 等<sup>[8]</sup>从人参中提取出人参皂苷 Rk1 作用于体外培养的肝癌 HepG2 细胞,发现伴随着胱冬肽酶-8、胱冬肽酶-3 的增加,FADD 表达却明显减少,说明 Rk1 抗肿瘤作用是不依赖 FADD 的细胞凋亡途径的。

2. 暴发性肝衰竭:Ryo 等<sup>[9]</sup>分别从暴发性肝衰竭(fulminant hepatic failure, FHF)患者的肝组织、淋巴细胞及血清中检测到高表达的 Fas、FasL,指出 Fas 诱导的凋亡可能是 FHF 的诱发器。Rutherford 等<sup>[10]</sup>发现 FHF 患者血清中 Fas、TNF- $\alpha$ 、IL-6 等凋亡相关因子表达急剧上升。印度学者的一项研究<sup>[11]</sup>也表明 sFasL 和 TNF- $\alpha$  高表达与 FHF 相关,并指出观测这些因子表达变化趋势能有效预测死亡和选择肝移植的时间。另有学者发现<sup>[12]</sup> TNF- $\alpha$ 、TNFR1 介导的肝细胞凋亡参与

了 FHF 发病机制,认为 FADD 可作为活体内阻止 FHF 肝细胞异常死亡的靶分子。可见,无论 FADD 直接与 Fas 结合或通过 TRADD 间接与 TNF- $\alpha$  受体 TNFR-1 衔接所形成的死亡诱导信号复合体(DISC)在 FHF 发生、发展中都起着关键作用。

3. 病毒性肝炎:研究发现,HBV X 蛋白(HBx)参与了信号转导和肝细胞凋亡。用紫外线照射诱导 HBx 蛋白高表达的 HepG2-X 细胞与正常肝细胞相比,有较高的凋亡率,然而当 FADD 显性负性突变体蛋白出现在 HepG2-X 细胞时,则紫外线不能诱导肝细胞凋亡。进一步检测到 HBx 蛋白可转录活化 FasL 启动因子,表明 HBx 蛋白是通过转录激活 Fas 基因而引起肝细胞凋亡<sup>[13]</sup>。Bortolami 等<sup>[14]</sup>研究发现,从病毒性肝炎进展到肝硬化,患者 Fas、FasL 及 IL-1 $\beta$  mRNA 和用 TUNEL 法检测的凋亡指数呈进展性增加,而从肝硬化向肝癌发展时其表达却明显降低。Pianko 等<sup>[15]</sup>指出 Fas/FasL 在 HCV 导致的肝细胞凋亡中起主要作用,提示 Fas/FADD 通路是导致病毒性肝炎患者肝细胞凋亡的主要通路。

4. 胆汁淤积性肝损伤:是由于胆汁在组织和肝细胞内大量堆积引起的肝脏疾病,而疏水性胆汁酸诱导的凋亡被认为是促成胆汁淤积性疾病肝损伤的原因。细胞体外培养发现,毒性胆汁盐通过 Fas 和 TRAIL 依赖途径引起肝细胞凋亡,胆汁淤积可通过依赖配体 FasL 和不依赖配体 FasL 机制导致 Fas 活化。Faubion 等<sup>[16]</sup>在活体和体外实验中研究发现肝细胞暴露于毒性胆汁酸(如甘氨酸鹅脱氧胆酸)导致不依赖配体 FasL 的 Fas 寡聚化招募 FADD,激活胱冬肽酶-8 及下游蛋白酶,引起细胞损伤。Rust 等<sup>[17]</sup>研究发现甘氨酸鹅脱氧胆酸(GCDCA)可以在 Fas 缺失的 Hep3B-Ntcp 和 HuH7-Ntcp 瘤细胞中诱导凋亡,但在 FADD 缺失的 HepG2-Ntcp 细胞,GCDCA 诱导的凋亡率降低 50%,TNF- $\alpha$  诱导的凋亡率降低 90%,这说明在死亡受体缺失情况下,GCDCA 可能通过线粒体补偿途径诱导肝细胞凋亡,进一步发现胱冬肽酶-6 可能在胆汁酸诱导的凋亡通路中扮演了重要的调控角色。

5. 酒精性肝损伤:酒精性肝损伤的发病机制目前尚不十分清楚,死亡受体导致的肝细胞凋亡在酒精性肝损伤中具有重要意义。Tagami 等<sup>[18]</sup>用免疫印迹试验检测 19 例酒精性肝炎患者的新鲜冰冻血清,发现 Fas 和 FasL 的表达较存在单纯酒精性肝病而无炎症的患者明显升高,而且肝脏中 FADD 表达与 FasL 表达呈正相关,表明 Fas 介导的凋亡可能在酒精性肝炎中发挥重要作用。另发现严重的酒精性肝炎患者 TNF- $\alpha$  基因的表达也是增加的。而 TNF- $\alpha$  诱导的肝细胞毒性是由 TNFR-1 介导的<sup>[19]</sup>。Fas、TNFR-1 两受体均与 FADD 衔接,继而激活下游的凋亡因子引起肝细胞凋亡。

6. 非酒精性脂肪性肝炎:在与非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)相关的发病机制中,外部死亡受体通路和内部线粒体凋亡通路逐渐被发现和研究。Feldstein 等<sup>[20]</sup>通过对非酒精性脂肪性肝炎及单纯脂肪变性、酒精性肝炎和正常肝脏对照研究发现,NASH 组患者肝组织凋亡较其他组明显增高,而且凋亡相关因子胱冬肽酶-3 和胱冬肽酶-7 表达增加,肝细胞凋亡与肝脏纤维化和肝脏炎症活动性相关,与正常对照组相比 Fas 受体在 NASH 患者的肝组织



中大量表达。Ribeiro 等<sup>[21]</sup>发现 NASH 患者肝组织中 TNF-R1 也明显表达。LPS 通过上调 TNF- $\alpha$  表达诱导 NASH 小鼠模型中肝细胞凋亡<sup>[22]</sup>。实验研究发现, NASH 模型中凋亡与 p53 活化和 TRAIL 受体表达相关<sup>[23]</sup>。可见, Fas、TNF- $\alpha$ 、TNF-R1 和 TRAIL 等均参与 NASH 凋亡,而 FADD 以死亡受体胞浆衔接蛋白的角色参与 NASH 的发病机制。

7. 肝硬化:Canbay 等<sup>[24]</sup>将 pan-caspase 抑制剂 IDN-6556 用于胆管结扎的小鼠,发现其可减弱肝细胞凋亡、炎症、纤维化程度,降低肝星状细胞的活性,表明肝细胞凋亡启动肝纤维化和损伤。后敲除 Fas 基因,发现肝细胞凋亡和肝纤维化程度较野生型小鼠明显减少,表明抑制 FAS/FADD 通路介导的凋亡可能对抗肝脏纤维化<sup>[25]</sup>。

#### 四、问题与展望

FADD 作为细胞凋亡信号传递的连接蛋白,介导多种死亡受体诱导的细胞凋亡信号转导,通过对其通路在肝脏疾病中作用机制的阐明,为将来从药理学和基因学角度治疗肝脏疾病提供新观点。现阶段对 FADD 的研究已经从作为单一的凋亡衔接蛋白转向作为促进细胞增殖、存活及细胞分化因子,但其发挥增殖作用的具体机制及凋亡与增殖的关系尚未明确, FADD 是否为细胞凋亡和存活的转换器尚有待进一步研究。

#### 参 考 文 献

- 1 Imtiyaz HZ, Zhou X, Zhang H, et al. The death domain of FADD is essential for embryogenesis, lymphocyte development, and proliferation. *J Biol Chem*, 2009, 284(15):9917-9926.
- 2 Shackleton M, O'Reilly LA, Sutherland KD, et al. Impaired lactation in mice expressing dominant-negative FADD in mammary epithelium. *Dev Dyn*, 2009, 238(4):1010-1016.
- 3 Freer-Prokop M, O'Flaherty J, Ross JA, et al. Non-canonical role for the TRAIL receptor DR5/FADD/caspase pathway in the regulation of MyoD expression and skeletal myoblast differentiation. *Differentiation*, 2009, 78(4):205-212.
- 4 Ramos-Miguel A, Garcia-Fuster MJ, Callado LF, et al. Phosphorylation of FADD (Fas-associated death domain protein) at serine 194 is increased in the prefrontal cortex of opiate abusers: relation to mitogen activated protein kinase, phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa, and Akt signaling pathways involved in neuroplasticity. *Neuroscience*, 2009, 161(1):23-38.
- 5 Zhang L, Zhang Y, Yang X, et al. Lupeol, a dietary triterpene, inhibited growth, and induced apoptosis through down-regulation of DR3 in SMMC7721 cells. *Cancer Invest*, 2009, 27(2):163-170.
- 6 Liu FY, Luo KW, Yu ZM, et al. Suillin from the mushroom *Suillus placidus* as potent apoptosis inducer in human hepatoma HepG2 cells. *Chem Biol Interact*, 2009, 181(2):168-174.
- 7 Yin A, Jiang Y, Zhang X, et al. Overexpression of FADD enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal adenocarcinoma cells. *Med Oncol*, 2010, 27(2):397-405.
- 8 Kim YJ, Kwon HC, Ko H, et al. Anti-tumor activity of the ginsenoside Rk1 in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(5):826-830.
- 9 Ryo K, Kamogawa Y, Ikeda I, et al. Significance of Fas antigen-mediated apoptosis in human fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol*, 2000, 95(8):2047-2055.
- 10 Rutherford AE, Hynan LS, Borges CB, et al. Serum apoptosis markers in acute liver failure: a pilot study. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007, 5(12):1477-1483.
- 11 Singhal S, Chakravarty A, Das BC, et al. Tumour necrosis factor-alpha and soluble Fas ligand as biomarkers in non-acetaminophen-induced acute liver failure. *Biomarkers*, 2009, 14(5):347-353.
- 12 Streetz K, Leifeld L, Grundmann D, et al. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepat-

- ic failure. *Gastroenterology*, 2000, 119(2):446-460.
- 13 Kim SY, Kim JK, Kim HJ, et al. Hepatitis B virus X protein sensitizes UV-induced apoptosis by transcriptional transactivation of Fas ligand gene expression. *IUBMB Life*, 2005, 57(9):651-658.
- 14 Bortolami M, Kotsafti A, Cardin R, et al. Fas/FasL system, IL-1 $\beta$  expression and apoptosis in chronic HBV and HCV liver disease. *J Viral Hepat*, 2008, 15(7):515-522.
- 15 Pianko S, Patella S, Ostapowicz G, et al. Fas-mediated hepatocyte apoptosis is increased by hepatitis C virus infection and alcohol consumption, and may be associated with hepatic fibrosis: mechanisms of liver cell injury in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat*, 2001, 8(6):406-413.
- 16 Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, et al. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest*, 1999, 103(1):137-145.
- 17 Rust C, Wild N, Bernt C, et al. Bile acid-induced apoptosis in hepatocytes is caspase-6-dependent. *J Biol Chem*, 2009, 284(5):2908-2916.
- 18 Tagami A, Ohnishi H, Moriwaki H, et al. Fas-mediated apoptosis in acute alcoholic hepatitis. *Hepatogastroenterology*, 2003, 50(50):443-448.
- 19 Colmenero J, Bataller R, Sancho-Bru P, et al. Hepatic expression of candidate genes in patients with alcoholic hepatitis: correlation with disease severity. *Gastroenterology*, 2007, 132(2):687-697.
- 20 Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 2003, 125(2):437-443.
- 21 Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Sola S, et al. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol*, 2004, 99(9):1708-1717.
- 22 Kudo H, Takahara T, Yata Y, et al. Lipopolysaccharide triggered TNF-alpha-induced hepatocyte apoptosis in a murine non-alcoholic steatohepatitis model. *J Hepatol*, 2009, 51(1):168-175.
- 23 Farrell GC, Larter CZ, Hou JY, et al. Apoptosis in experimental NASH is associated with p53 activation and TRAIL receptor expression. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(3):443-452.
- 24 Canbay A, Feldstein A, Baskin-Bey E, et al. The caspase inhibitor IDN-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 308(3):1191-1196.
- 25 Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, et al. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology*, 2002, 123(4):1323-1330.

(收稿日期:2010-03-04)

(本文编辑:孙荣华)

葛海燕,甄真. Fas 相关死亡结构域蛋白介导的肝细胞凋亡在肝脏疾病中的作用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2010, 4(4):455-459.