

文章编号: 1004-0374(2012)04-0328-06

凋亡相关斑点样蛋白的研究进展

孙龙华, 安利国, 杨桂文*

(山东师范大学生命科学学院, 山东省动物抗性生物学重点实验室, 济南 250014)

摘要: 凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 是一种含有 N 端热蛋白样结构域和 C 端胱天氨酸募集结构域的接头分子。ASC 可以通过它含有的同源蛋白互作结构域 PYD 和 CARD 的寡聚化来募集上下游与其含有同源结构域的其他蛋白, 从而参与多条信号转导途径, 在炎症反应、肿瘤发生、细胞凋亡和 NF- κ B 信号通路的调节方面发挥重要的生物学作用。

关键词: ASC; 炎症反应; 肿瘤; 细胞凋亡; NF- κ B

中图分类号: Q51; R73 **文献标志码:** A

Research advances in the apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

SUN Long-Hua, AN Li-Guo, YANG Gui-Wen*

(Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Resistance Biology, College of Life Sciences, Shandong Normal University, Ji'nan 250014, China)

Abstract: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) is an adaptor protein that has a bipartite domain structure, an N-terminal pyrin domain (PYD) and a C-terminal caspase recruitment domain (CARD). Recent researches demonstrate that ASC plays an important role in many signal pathways by its protein-protein interaction domains PYD and CARD, such as inflammations, tumor occurrences, apoptosis and the regulation of NF- κ B.

Key words: ASC; inflammation; tumor; apoptosis; NF- κ B

1 凋亡相关斑点样蛋白的发现

凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 是 1999 年由日本衰老研究中心的 Masumoto 等^[1] 在白血病细胞 HL-60 的细胞质中发现的一种相对分子质量为 22 000 的蛋白。当用视黄酸诱导时, 这种蛋白在细胞核的周围聚集并成点状分布。进一步研究发现, 一些凋亡诱导剂都能使这种蛋白寡聚化并成点状分布。

2 ASC 的结构特点

ASC 属于死亡结构域折叠超家族 (the death domain fold superfamily, DDF) 成员。该家族蛋白是一组含有蛋白质相互作用结构域的蛋白^[2-3]。现已发现的蛋白质相互作用结构域分为四类, 即死亡结构

域 (death domain, DD)、死亡操纵结构域 (death effector domain, DED)、热蛋白样结构域 (pyrin domain, PYD) 和胱天氨酸募集结构域 (caspase recruitment domain, CARD)^[4]。研究表明, 该家族蛋白可以通过自身的寡聚化募集并激活与其含有同源结构域的其他蛋白, 并参与多条信号通路, 通过炎症反应和细胞凋亡来调节细胞存活或死亡的平衡^[5-6]。

ASC 含有的两个保守的结构域分别为 PYD 结构域和 CARD 结构域, 两个结构域都具有保守的疏

收稿日期: 2011-12-26; 修回日期: 2012-01-11

基金项目: 山东省自然科学基金重大项目 (ZR2011-HZ004); 山东省高等学校科技计划项目 (J10LC21)

*通信作者: E-mail: yanggw@sdnu.edu.cn; Tel: 0531-86180143

水性氨基酸, 并且每个结构域都含有六个保守的 α -螺旋 (图 1)^[3]。ASC 通过六 α -螺旋结构实现自身的寡聚化, 从而可以募集并激活一些与其含有同源结构域的其他蛋白, 并在炎症反应和细胞凋亡等信号通路中发挥重要的生物学作用^[3]。

Sun 等^[7] 研究发现, *asc* 基因在低等脊椎动物硬骨鱼中的内含子数目是不一样的。但是随着物种进化, *asc* 基因出现了内含子丢失现象, 到哺乳动物时内含子的数目渐趋稳定, 基因结构也变得保守 (图 2)。

3 ASC的功能

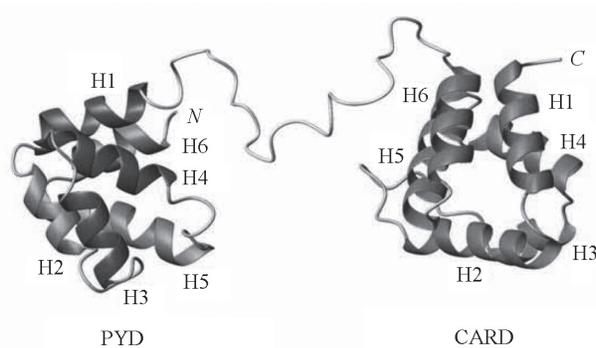
3.1 ASC在炎症反应方面的作用

3.1.1 ASC在炎症复合体中的作用

ASC 是炎症复合体 (inflammasome) 中重要的接头分子蛋白。ASC 含有的 PYD 结构域和 CARD 结构域通过自身的寡聚化来募集上游的受体蛋白和下游的炎症相关蛋白, 从而形成一个稳定的蛋白

复合物, 即炎症复合体。近年来, 炎症复合体作为天然免疫的研究平台, 越来越受关注, 它是一类由胞内受体、ASC 衔接蛋白和炎症相关的 caspase(胱天蛋白酶) 组成的相对分子质量超过 700 000 的多蛋白复合物, 在天然免疫中发挥重要作用^[8]。现已证明的炎症复合体大致分四类: NLRP-1 炎症复合体、NLRP-3 炎症复合体、NLRC-4 (即 IPAF) 炎症复合体和 AIM2 炎症复合体。其中, NLRP-3 炎症复合体和 AIM2 炎症复合体的构成必须有 ASC 的参与 (图 3)。而 NLRP-1 炎症复合体和 NLRC-4 炎症复合体的组成过程中, ASC 并不是必需的^[9]。

NLRP-1 是最早研究的炎症复合体。NLRP-1 在人中只有一种结构形式, 而在鼠科动物中 NLRP-1 有三种亚型分别是 NLRP-1a、b 和 c。其中只有 NLRP-1a 同人的 NLRP-1 作用相同, 而 NLRP-1b 和 NLRP-1c 则缺少 PYD 结构域功能^[10]。在人的 NLRP-1 炎症复合体构成中, ASC 可以通过它含有的 PYD 结构域同 NLRP-1 的 PYD 结合, 然后通过



“H”表示 α 螺旋, “N”表示N端, “C”表示C端

图1 ASC空间结构模式图^[3]

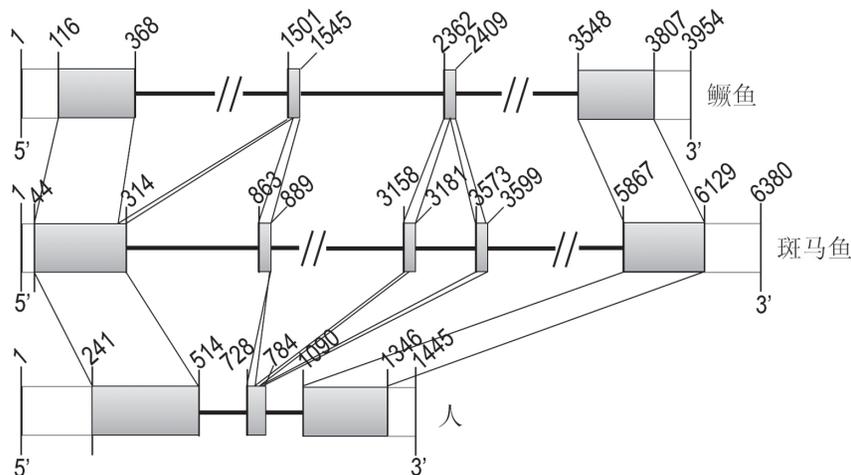
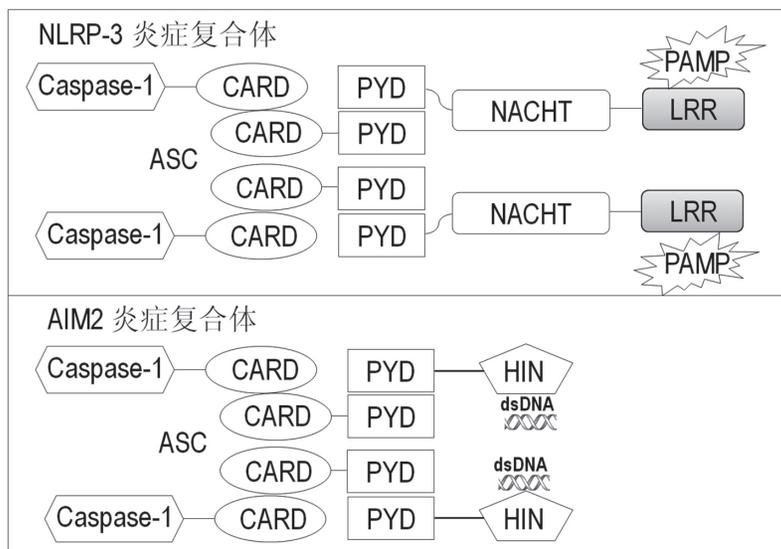


图2 *asc*基因进化模式图^[7]



NLRP-3炎症复合体的刺激信号一般为胞内感染的细菌,如李氏杆菌(*Listeria monocytogenes*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等,而AIM2炎症复合体的刺激信号为特异的胞内双链DNA。当细菌或病毒感染细胞时,所分泌释放的毒性物质、LPS(脂多糖)或者双链DNA等病原相关分子模式(PAMPs)胞内的受体结合通过ASC的寡聚化作用募集并激活下游caspase-1分子,活化的caspase-1剪切IL-1 β 前体,并释放有活性的炎性细胞因子。

图3 ASC参与的NLRP-3和AIM2炎症复合体的构成

CARD结构域募集caspase-1前体并进一步剪切IL-1 β 前体形成有活性的IL-1 β 。同样在小鼠中NLRP-1a类炎症复合体的构成也是类似的。但是另外两种亚型NLRP-1b、NLRP-1c类炎症复合体的构成则不需要ASC的参与。它们可利用自身含有的CARD结构域直接募集caspase-1前体从而发挥炎症作用^[11-12]。

NLRP-3可识别多种病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),近年来的资料证实,LPS、类脂A、脂磷壁酸、脂蛋白等对caspase-1的激活均依赖于NLRP-3。用LPS刺激C3H/HeN小鼠诱发炎症反应,结果显示,LPS刺激3~48 h后,小鼠眼部组织NLRP-3、ASC、caspase-1、IL-1 β 及IL-18等含量明显增加,表明ASC可能参与构成NLRP-3炎症复合体,并参与了LPS诱导的眼部炎症反应^[13]。

NLRC-4炎症复合体可以被大多数的革兰氏阴性细菌激活,它能特异性地识别鼠伤寒沙门氏菌(*Sotyphimurium*)的鞭毛蛋白。有研究发现,当用鼠伤寒沙门氏菌感染小鼠巨噬细胞时,在细胞培养液中可以检测到大量的IL-1 β ,并且caspase-1和ASC蛋白的表达量也大大增加。说明ASC在NLRC-4炎症复合体中有重要作用^[14]。但是,另有研究发现NLRC-4可以利用自身含有的CARD结构域直接募

集caspase-1前体,并激活下游一系列的炎症反应^[15]。由此可见,在NLRC-4类炎症复合体的构成中ASC并不是必需的。

AIM2是2009年发现的一种新型的胞内受体,它能够特异性地识别胞质中的双链DNA。Fernandes-Alnemri等^[16]研究发现,外源性的双链DNA刺激HEK293T细胞时,AIM2可以通过自身的PYD结构域同ASC蛋白结合,并进一步活化caspase-1前体,释放有活性的IL-1 β 。说明ASC参与了AIM2介导的炎症反应途径。

3.1.2 ASC介导的病毒对炎症复合体的调控作用

在病毒活化的炎症复合体中,病毒分泌物可以通过ASC对炎症复合体的活性进行调节。有实验证明,黏液瘤病毒(*Myxoma virus*)编码的一个含有PYD结构域的蛋白M13L可与ASC相互作用,从而抑制caspase-1的激活,阻止炎症反应的发生^[17]。由此得出,病原体可以通过自身编码的蛋白与炎症复合体上的ASC产生竞争性抑制,从而调控宿主的抗病毒天然免疫途径。

3.1.3 ASC在获得性免疫中的作用

以前关于ASC在炎症反应中的作用方面的研究主要集中在天然免疫方面,但是近年来的研究表明ASC在获得性免疫方面也具有重要作用。在胶原诱导的小鼠关节炎模型中,经外观观察和免疫组

化观察发现, 同野生型小鼠相比, ASC 缺失型小鼠的炎症症状明显减弱, 并且在胶原刺激后, 在 ASC 缺失的小鼠中没有检测到大量胶原特异性抗体的产生。而在同样的刺激下, 在 NLRP-3 和 caspase-1 缺失的小鼠中并没有出现上述现象^[18]。进一步的机制研究发现, 在抗原递呈细胞中, ASC 可以通过介导依赖于 Dock-2 的 Rac 蛋白的激活和肌动蛋白的寡聚来调控抗原递呈细胞的递呈作用。在 ASC 缺失型小鼠中, 由于抗原递呈细胞的递呈作用丧失从而导致了抗原特异性的淋巴细胞未被激活, 因此减少了抗原特异性抗体的产生, 同时相应的炎症反应也有所减弱^[19]。Shaw 等^[20]有类似的发现, 他们在诱导的小鼠脑脊髓炎模型中发现, 在 ASC 缺失型小鼠中脑脊髓炎的症状同野生型相比有所缓解。而在 NLRP-3 和 caspase-1 缺失的小鼠中, 这种症状并没有得到缓解。后来的机制研究发现, 在 ASC 缺失的小鼠中监测不到 MOG(小鼠脑脊髓炎诱导剂)特异性的 T 淋巴细胞的产生。另外, 研究发现, 当用含有佐剂 MF-59 的灭活 H5N1 型禽流感疫苗接种缺失 ASC 的小鼠时, 发现缺失型小鼠体内产生的抗 H5 的抗体量与野生型相比大大减少, 而这种现象在 NLRP-3 和 caspase-1 缺失的小鼠中并没有出现^[21]。

由此可见, ASC 有独立于炎症复合体之外的另一个作用, 即在细胞免疫和体液免疫等获得性免疫反应中抑制抗原特异性淋巴细胞的活化, 从而减少特异性抗体及相关炎症因子的产生, 并减轻炎症反应的症状。

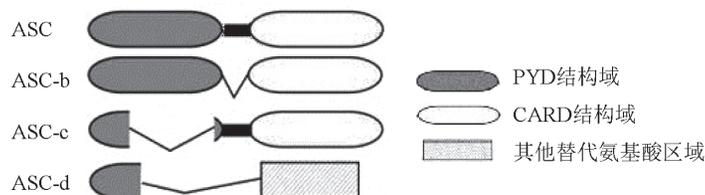
3.1.4 ASC亚型在炎症反应中的作用

在未活化的单核巨噬细胞中, ASC 表达于细胞核, 而当单核巨噬细胞受病原体感染后, ASC 快速进入胞浆参与炎症复合体的组装^[22]。一些单独含有 PYD 或 CARD 结构域的蛋白, 如 pyrin(热蛋白)和一些 NLR(NOD like receptor) 家族成员, 它们在

特殊外界条件刺激下也可以激活炎症复合体并引发相应的炎症反应^[23]。因此, 人们猜测 ASC 是否在结构域不完整的情况下也能在炎症复合体通路中发挥作用。2010 年, Bryan 等^[24]研究发现, 在用细菌 RNA 或者是灭活的革兰氏阴性细菌处理体外培养的巨噬细胞时, 通过 western blot 检测到四种不同相对分子质量的 ASC 蛋白。这说明 ASC 蛋白在由细胞核向细胞质转移的过程中发生剪切或重组, 产生了三种不同的亚型, 分别命名为 ASC-b、ASC-c 和 ASC-d(图 4)^[24]。功能方面的研究表明, 只有 ASC、ASC-b 和 ASC-c 可以与 NLRP-3 结合构成炎症复合体, 激活下游的 caspase-1, 并诱导 IL-1 β 等炎症因子的释放, 表明 CARD 结构域的完整是 ASC 发挥作用的重要保证。

3.2 ASC在肿瘤发生和细胞凋亡中的作用

2003 年, Guan 等^[25]发现, 在早期的肿瘤组织中 *asc* 基因会因甲基化而被沉默。研究证实, *asc* 基因的甲基化沉默是普遍存在于癌症发生时期的特异性事件^[26]。由于 *asc* 基因在癌症发生时会被沉默, 从而导致了肿瘤细胞的大量扩增。因此人们猜想 ASC 可能在细胞凋亡过程中发挥作用。2003 年, Masumoto 等^[27]在 HEK293T 细胞中大量表达 ASC, 导致依赖于 caspase 的细胞凋亡的发生(图 5)。当用反义核酸抑制 *asc* 基因表达时, 凋亡现象有所减弱。这说明, ASC 在 caspase 诱导的细胞凋亡过程中发挥重要作用。2004 年, Ohtsuka 等^[28]通过实验证实, 线粒体引起的凋亡途径通过 p53-Bax 网络系统进行, 而 ASC 在此凋亡中起重要作用。在细胞凋亡过程中, ASC 与 Bax 作用, 使 Bax 定位到线粒体, 诱导细胞色素 C 的释放, 同时伴随线粒体膜电位的显著降低, 进而导致 caspase-9、caspase-2 和 caspase-3 的激活并诱导细胞凋亡的发生。然而, 当用 siRNA 阻断内源性 *asc* 基因的表达时, 由于



ASC-b 只含有两个结构域而缺失了中间 93~111 位置的氨基酸; ASC-c 的 PYD 结构域缺失了 26~85 位置的氨基酸; ASC-d 缺失了 36~93 位置的部分 PYD 结构域的氨基酸和 111~195 位置的全部 CARD 结构域的氨基酸, 取而代之的是 69 个不相关的其他氨基酸。

图4 ASC亚型结构模式图^[24]

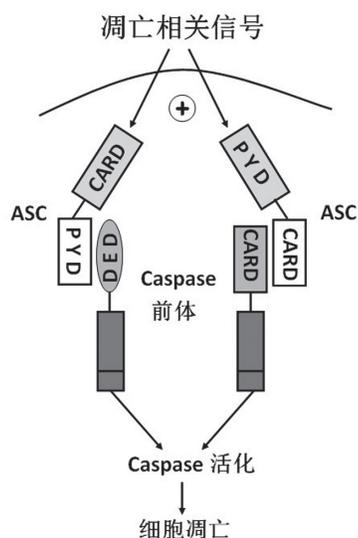


图5 ASC介导的caspase细胞凋亡途径

Bax 不能准确地定位到线粒体上，从而抑制了凋亡的进行。

3.3 ASC对NF- κ B信号通路的调控作用

NF- κ B 是一种转录因子，一些和炎症相关的刺激因子可以激活 NF- κ B，从而激活下游一系列信号反应^[29]。由于一些含有 PYD 或 CARD 结构域的蛋白都参与激活 NF- κ B 信号通路^[30]，因此，我们猜测 ASC 对此通路也有调控作用。

然而，ASC 在 NF- κ B 信号通路中的调控作用是存在争议的。起初的研究表明，用 ASC 瞬时转染小鼠的巨噬细胞，然后用 LPS 或 TNF- α (肿瘤坏死因子 α) 刺激，发现 NF- κ B 活性与野生型相比并没有变化。后来研究发现，ASC 在 HEK293T 细胞的瞬时转染实验中与 NLRP-3 共同作用并激活 NF- κ B 的活性，这种激活作用需要 ASC 和其他一些 PAAD 家族 (热蛋白家族) 蛋白的过度表达^[31]。但是，Stehlik 等^[32]发现，ASC 不是与所有的 PAAD 家族蛋白都共同作用以诱导 NF- κ B 的活性。在瞬时大量表达 ASC 时，ASC 可以抑制 TNF- α 、LPS 和 IL-1 β 等促炎症因子刺激下的 NF- κ B 的活性。这一抑制作用的机制是，ASC 上的 PYD 结构域与 IKK (NF- κ B 抑制因子 I κ -B 激酶) 复合物相互作用，并导致其磷酸化，从而激活 I κ -B 的活性，继而抑制 NF- κ B 的活性。另一方面，像 NLRP-3 这样的含有 PYD 结构域的蛋白，通过结合核苷酸的 NACHT 结构域而自身寡聚，使 ASC 成为桥连 IKK 复合物的连接因子，使 IKK 通过可诱导的接触机制产生激酶活性，从而抑制 NF- κ B 的活化^[33]。

由此可以看出，ASC 最终的作用是活化还是抑制 NF- κ B，可能依赖于 ASC 与参与反应的其他 PAAD 家族蛋白的比率、细胞的内容物，以及将转导途径引向 IKK 复合物的刺激物，但是目前作用机制还不清楚。

4 总结

综上所述，ASC 参与多条信号转导途径，在炎症反应、细胞凋亡及肿瘤发生等方面起着举足轻重的作用。随着对 ASC 的深入研究，将进一步揭示其在肿瘤发生和天然免疫方面的作用机理，为今后治疗炎症疾病和癌症提供新的治疗靶点，对开发新型治疗药物具有深远意义。

[参考文献]

- [1] Masumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, et al. ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem*, 1999, 274(48): 33835-8
- [2] Weber CH, Vincenz C. The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(8): 475-81
- [3] Park HH, Lo YC, Lin SC, et al. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 561-86
- [4] Kohl A, Grutter MG. Fire and death: the pyrin domain joins the death-domain superfamily. *C R Biol*, 2004, 327(12): 1077-86
- [5] Lahm A, Paradisi A, Green DR, et al. Death fold domain interaction in apoptosis. *Cell Death Differ*, 2003, 10(1): 10-12
- [6] Werts C, Girardin SE, Philpott DJ. TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad. *Cell Death Differ*, 2006, 13(5): 798-815
- [7] Sun Y, Wang J, Lao H, et al. Molecular cloning and expression analysis of the ASC gene from mandarin fish and its regulation of NF- κ B activation. *Dev Comp Immunol*, 2008, 32(4): 391-9
- [8] Petrilli V, Papin S, Tschopp J. The inflammasome. *Curr Biol*, 2005, 15(15): R581
- [9] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*, 2010, 140(6): 821-32
- [10] Boyden ED, Dietrich WF. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet*, 2006, 38(2): 240-4
- [11] Faustin B, Lartigue L, Bruey JM, et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell*, 2007, 25(5): 713-24
- [12] Hsu LC, Ali SR, Mcgillivray S, et al. A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1 β secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(22): 7803-8

- [13] Gonzalez-Benitez JF, Juarez-Verdayes MA, Rodriguez-Martinez S, et al. The NALP3/Cryopyrin-inflammasome complex is expressed in LPS-induced ocular inflammation. *Mediators Inflamm*, 2008, 2008: 614345
- [14] Mariathasan S, Newton K, Monack DM, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*, 2004, 430(6996): 213-8
- [15] Suzuki T, Franchi L, Toma C, et al. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in Shigella-infected macrophages. *PLoS Pathog*, 2007, 3(8): e111
- [16] Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, et al. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*, 2009, 458(7237): 509-13
- [17] Johnston JB, Barrett JW, Nazarian SH, et al. A poxvirus-encoded pyrin domain protein interacts with ASC-1 to inhibit host inflammatory and apoptotic responses to infection. *Immunity*, 2005, 23(6): 587-98
- [18] Ippagunta SK, Brand DD, Luo J, et al. Inflammasome-independent role of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) in T cell priming is critical for collagen-induced arthritis. *J Biol Chem*, 2010, 285(16): 12454-62
- [19] Ippagunta SK, Malireddi RK, Shaw PJ, et al. The inflammasome adaptor ASC regulates the function of adaptive immune cells by controlling Dock2-mediated Rac activation and actin polymerization. *Nat Immunol*, 2011, 12(10): 1010-6
- [20] Shaw PJ, Lukens JR, Burns S, et al. Cutting edge: critical role for PYCARD/ASC in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 2010, 184(9): 4610-4
- [21] Ellebedy AH, Lupfer C, Ghoneim HE, et al. Inflammasome-independent role of the apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) in the adjuvant effect of MF59. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(7): 2927-32
- [22] Bryan NB, Dorfleutner A, Rojanasakul Y, et al. Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain. *J Immunol*, 2009, 182(5): 3173-82
- [23] Stehlik C, Dorfleutner A. COPs and POPs: modulators of inflammasome activity. *J Immunol*, 2007, 179(12): 7993-8
- [24] Bryan NB, Dorfleutner A, Kramer SJ, et al. Differential splicing of the apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) regulates inflammasomes. *J Inflamm (Lond)*, 2010, 7: 23
- [25] Guan X, Sagara J, Yokoyama T, et al. ASC/TMS1, a caspase-1 activating adaptor, is downregulated by aberrant methylation in human melanoma. *Int J Cancer*, 2003, 107(2): 202-8
- [26] Terasawa K, Sagae S, Toyota M, et al. Epigenetic inactivation of TMS1/ASC in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(6): 2000-6
- [27] Masumoto J, Zhou W, Chen FF, et al. Caspy, a zebrafish caspase, activated by ASC oligomerization is required for pharyngeal arch development. *J Biol Chem*, 2003, 278(6): 4268-76
- [28] Ohtsuka T, Ryu H, Minamishima YA, et al. ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(2): 121-8
- [29] Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16: 225-60
- [30] Bertin J, Nir WJ, Fischer CM, et al. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF- κ B. *J Biol Chem*, 1999, 274(19): 12955-8
- [31] Ogura Y, Inohara N, Benito A, et al. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- κ B. *J Biol Chem*, 2001, 276(7): 4812-8
- [32] Stehlik C, Fiorentino L, Dorfleutner A, et al. The PAAD/PYRIN-family protein ASC is a dual regulator of a conserved step in nuclear factor κ B activation pathways. *J Exp Med*, 2002, 196(12): 1605-15
- [33] Koonin EV, Aravind L. The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25(5): 223-4