

昆虫杆状病毒细胞凋亡抑制基因

包人月 吴金美 吴小锋^{1*}(江苏科技大学生物技术学院分子生物学实验室, 镇江 212018; ¹浙江大学动物科学学院, 杭州 310029)

摘要 杆状病毒感染过程中, 可能会诱导产生一条导致细胞凋亡的路径, 细胞凋亡是一种程序性细胞死亡。宿主细胞的凋亡可以导致细胞的提前死亡或感染的终止, 因此细胞凋亡可以限制病毒在被感染机体中的扩散或限制感染机体的发病。家蚕的杆状病毒拥有两种对抗细胞凋亡死亡的基因, *p35* 和 *iap* (inhibitor of apoptosis), 它们可能通过阻止病毒感染引起的细胞凋亡或存在于大量生物体内的各种诱导信号引起的细胞凋亡。

关键词 杆状病毒; *p35*; *iap*

细胞凋亡, 亦称程序性细胞死亡^[1], 是指在基因控制下的细胞主动死亡, 由于它在保证多细胞生物的健康生存过程中扮演着关键角色及在病理学研究中的重要作用, 引起了人们对其机制进行广泛而深入的研究。有关杆状病毒诱导的细胞凋亡目前在苜蓿银纹夜蛾多核型多角体病(AcMNPV)中了解的较多, 家蚕单核型多角体病毒(BmNPV)也拥有 *p35* 和 *iap*(inhibitor of apoptosis)。BmNPV 的 *p35*、*iap* 与 AcMNPV 的具有较高的同源性, 特别是 BmNPV 的 *iap* 的功能也是有待于进一步研究的热点。

1 杆状病毒诱导的细胞凋亡

1.1 杆状病毒诱导的细胞凋亡

AcMNPV 是最先被了解的可以诱导和抑制细胞凋亡的杆状病毒, 缺失 *p35* 的 AcMNPV 突变株——vAcAnh 可以诱导 Sf-21 细胞的凋亡。野生型的 AcMNPV 还可以诱导 CF-203 细胞、SL-2(莲纹夜蛾细胞)的凋亡。缺失 *p35* 的 BmNPV 也可诱导 BmN 细胞的凋亡。随后的研究中还发现粉纹夜蛾核型多角体病毒(TnMNPV)和甜菜夜蛾核型多角体病毒(HaSNPV)分别可以诱导斜纹夜蛾细胞的SL-1和粉纹夜蛾细胞 Tn-5B1 发生细胞凋亡。

1.2 AcMNPV 诱导细胞凋亡的可能机制

杆状病毒诱导细胞凋亡的机制仍然有待于阐明, 其中 AcMNPV 诱导细胞凋亡存在以下几种可能的机制。

1.2.1 阻断 RNA 合成 细胞凋亡需要 RNA 及蛋白质的合成, 但在某些情况下对这些合成过程的阻

断却可诱导细胞凋亡的发生, 对 AcMNPV 感染早期引起的宿主 RNA 合成的抑制可能就是细胞凋亡的诱因。这可能是因为一种特异种类 RNA 的合成对抑制细胞凋亡是必须的, 或者是涉及转录过程本身及与之伴随的染色质结构的改变。

1.2.2 病毒 DNA 复制 在 AcMNPV 感染的 Sf-21 细胞中, 一种非正常的 DNA 复制周期也同样可能是触发其细胞凋亡的原因。当病毒 DNA 复制必须基因在 Sf-21 细胞中瞬时表达时, 若不包含 *p35* 则很少能发现新 DNA 合成, 表明细胞凋亡触发了病毒 DNA 合成机制。

1.2.3 可能促进细胞凋亡的病毒基因 另一可能涉及 AcMNPV 诱导细胞凋亡的基因便是 *p10*^[2], 缺失 P10 的突变毒株在感染晚期不能裂解宿主的细胞核。P10 的功能与腺病毒死亡蛋白(ADP)类似, 缺失 ADP 的腺病毒所感染的细胞膜也不能裂解。而单纯 *p10* 在 Sf-21 细胞中的瞬时表达并不出现任何有害的结果, 由于感染细胞或核的裂解要病毒特殊基因产物的存在, 腺病毒和野生型 AcMNPV 所感染的细胞在自然条件下并不呈现细胞凋亡。

2 杆状病毒细胞凋亡抑制基因

杆状病毒在长期进化过程中, 为适应自身的生活环境及繁衍后代的需要, 获得了一些进化上的生长优势, 产生了抑制宿主细胞凋亡的因子, 在细胞

收稿日期: 2006-01-20 接受日期: 2006-06-08

国家自然科学基金资助项目(No.30070579)

*通讯作者。Tel: 0571-86971658, E-mail: wuxiaofeng@zju.edu.cn

水平上对宿主细胞的寿命进行调控，以利于自身生长和繁殖的需要。目前在杆状病毒基因组中已发现两种不同类型的细胞凋亡抑制基因：*p35* 和 *iap*，二者在抑制由核型多角体病毒感染诱导的细胞凋亡过程中起着极其重要的作用^[3]。

2.1 *p35*

p35 是最先发现的抗凋亡基因之一，首次鉴定 *p35* 是在分析与转座元件 TED 相邻区域的序列时^[4]。它也是迄今所知最具广泛抗细胞凋亡活性的基因，具有抑制病毒诱导的细胞凋亡和恢复病毒复制能力的功能。已经证明，它可以抑制线虫 *C. elegans* 和果蝇发育过程中的细胞凋亡，也抑制哺乳动物的神经细胞交感神经元、乳癌细胞、B 淋巴细胞、成神经细胞癌和成纤维细胞的凋亡。

AcMNPV *p35* 编码的蛋白质是由 299 个氨基酸组成，分子量为 34.8 kDa。*p35* 位于 AcMNPV 基因组的 *EcoR*-S 片段，下游是增强子 *hr5*，上游是 94K 蛋白基因，在感染的晚期有着较高水平的表达。*hr5* 可以增强早期启动子的活性，早期 P35(35K 蛋白)的合成对阻止细胞凋亡是必须的。BmNPV P35 与 AcMNPV 的核苷酸组成有 96.1% 的同源性，氨基酸序列有 90% 的同源性。在 BmNPV 中 94K 蛋白几乎完全缺失。海灰翅夜蛾核型多角体病毒(*S. littoralis*)SINPV 的 *Slp49* 和 AcMNPV 的 *p35* 有 48.8% 的同源性^[5]。斜纹夜蛾核型多角体病毒(*S. litura*) SpltMNPV 的 *Spltp49* 与 SINPV 的 P49 和 AcMNPV 的 P35 的氨基酸分别显示了 79% 和 31% 的一致性^[6]。

白介素 1 β 转化酶(interleukin-1 β -converting enzyme, ICE)家族在执行细胞凋亡过程中具有核心地位，它存在于线虫、昆虫和哺乳动物中。已证实 P35 有助于抑制半胱氨酸蛋白酶 ICE 家族的几个成员的活性作用^[7]，在离体条件下纯化的 P35 可有效抑制纯化的哺乳动物 ICE 同源物：ICE 本身，ICH-1、ICH-2、CPP32 以及线虫 ICE 同源物 CED-3 等的活性。研究也表明 P35 倾向于作为一种不可逆转的抑制因子而起作用。

Caspase 属于半胱氨酸蛋白酶家族，它以酶原的形式存在，几处被切断后转变为活化型，从而导致细胞凋亡。P35 通过抑制 caspase 的活性而抑制细胞凋亡，其作用方式是通过阻断 caspase 大亚基的断裂抑制其成熟。P35 与 caspase 结合是首先迅速形成复合物然后通过缓慢的异构变化形成牢固的复合物。*Slp49* 和 *Spltp49* 包含的短序列 TVTDG 彼此很

相似，可以切开致死的 caspases，通过抑制致死的 caspases 来抑制细胞凋亡。*p35* 缺陷型的 AcMNPV 在拥有了 *Slp49* 或者 *Spltp49* 后都可以抑制 Sf-9 的细胞凋亡。

研究发现，其 N 端部分对 P35 功能而言是一个突出的负作用抑制子。当构建一种仅编码 P35 的氨基末端 76 氨基酸的质粒并让它在 Sf-21 细胞中表达，发现 Sf-21 细胞在感染时仍可经历凋亡，尽管在细胞中有全长 P35 的表达。但是全长 P35 很少或没有积累，这表明 P35 的氨基末端某一结构域可能通过与自身或其他蛋白质相互作用而实现稳定整个 P35 的目的^[8]。

对 P35 的最新研究也表明 P35 可有效地抗细胞凋亡及营养胁迫，促进糖蛋白的分泌。另外由于 P35 必须在感染早期合成，故出芽型病毒粒子中也有 P35 存在，但这个现象的意义还不清楚。

2.2 *iap*

2.2.1 杆状病毒 *iap* 自从鉴定了 AcMNPV 中包含一种抗细胞凋亡基因后，vAcAnh 便被用作寻找其他杆状病毒中的抗细胞凋亡基因，因此导致了第二类抗细胞凋亡基因的发现——*iap*^[9]。

已发现多种杆状病毒包含 *iap*，先是用苹果卷叶蛾颗粒体病毒(CpGV)或黄杉毒蛾核型多角体病毒(OpMNPV)与 vAcAnh DNA 共转染 Sf-21 时形成包涵体，导致 Cp-*iap* 和 Op-*iap* 的发现。通过序列同源鉴定又发现 AcMNPV 的 *iap*，Ac-*iap* 无抗细胞凋亡活性。Cp-*iap* 和 Op-*iap* 可以阻止 Sf-21 细胞由于 *p35* 缺陷型 AcMNPV 引起的凋亡。Tn-*iap*，Bm-*iap* 也相继被发现。美国白蛾核型多角体病毒(HycuNPV)中也发现了 *iap* 的 3 个成员：*hycu-iap1*，*hycu-iap2*，*hycu-iap3*^[10]。

2.2.2 IAP 中的模体序列 IAP 中存在两类容易鉴定的模体序列：第一类是锌指结构——环指，发现于 IAP 的 C 末端；第二类是存在于 N 末端的 2~3 个非完全重复序列——杆状病毒 IAP 重复(BIRs)^[11]。实验已证实环指及 BIRs 模体序列均具有结合锌的能力。环指模体序列在 1991 年被首次描述，现已在约 50 种蛋白质中发现它的存在，包括 AcMNPV 的 IE2、PE38、CG30、IAP2 和 Ac-IAP。这些蛋白质参与许多作用，包括参与转录活化和基因组的重组。BIRs 模体序列是在 IAP N 端发现的重复序列，单个 BIR 长约 65 个氨基酸，在其 C 端的 HisXnCys 后存在一保守的 CysXisCys 模体序列(X 为任意氨基

酸), 在已知 BIRs 中存在许多高度保守的残基。对 IAP 功能的研究表明 BIR 结构对 IAP 行使功能起着重要作用。

2.2.3 IAP 抑制细胞凋亡的机制 关于杆状病毒 IAP 抑制细胞凋亡的机制还不是十分明了, 但已发现杆状病毒的感染能激活 Sf-caspase-1 的形成, IAP 则能有效地阻止 caspase-1 前体的激活, 这种 Sf-caspase 在 Sf-21 细胞中以前体形式表达时是没有活性的, 即不能诱导细胞凋亡。因此, IAP 通过阻断 caspase 的形成而抑制细胞凋亡^[12]。最近, 一些科学家提出了一种更加灵活的模型来阐述 IAP 抑制细胞凋亡的机制, 它具有许多 IAP- 诱导物 -caspase 的动力学特征(图 1)^[13]。

这一模型认为, IAP 作为诱导物浓度的指示物, 通过结合到各种诱导物上能感受各种细胞凋亡信号, 这些诱导信号在细胞凋亡引发点碰撞, 激活关键的 caspase。IAP 能结合并抑制可以看作是细胞凋亡诱导物的 caspase 或 caspase 前体。如果诱导物的浓度足以结合所有的 IAP, 并且超过了游离 IAP 的浓度, 那么诱导物将与结合在无活性的 caspase 上的 IAP 竞争, 结果产生了有活性的 caspase。

这一模型将 IAP 放在了细胞凋亡调节中十分关键和重要的位置, 并且明确地避免了将 IAP 简单地认为是细胞凋亡抑制物, 因为许多 IAP 并不是细胞凋亡抑制物。还应该注意, 诱导物简单地结合到 IAP 上对阻止细胞凋亡的抑制并不充分。BIR 核心在阻止细胞凋亡中起着非常重要的作用。BIR 核心保守残基的突变能使 Op-IAP 失活, 但不丧失结合

到果蝇细胞凋亡诱导物 RHG 蛋白——reaper(RPR)、head involution defective (HID)和 GRIM 的能力。至今没有证据表明 BIR 核心对 caspase 的抑制是必需的, 而结合到 IAP 上的细胞凋亡诱导物也许能抑制或增加 BIR 的抗细胞凋亡活性。虽然增加抗细胞凋亡活性似乎不合逻辑, 但它能提高 IAP 作为缓冲物对抗细胞凋亡诱导物的效率。有趣的是, 细胞凋亡诱导物如 RPR 在 IAP 缺失的情况下只有很短的半衰期, 而在 IAP 存在的时候却很稳定。IAP 的这一模型虽然在某些方面能灵活地揭示 IAP 抑制细胞凋亡的机制, 但对于诱导物如何影响 BIR 功能或 caspase 活化的问题仍然不明确。

同时, cIAP-1 或 cIAP-2 与肿瘤坏死因子(TNF)信号转导途径间的互动也为 IAP 抗凋亡的机制提供了线索^[14]。TNF 是一个多功能细胞因子, 能与两个受体(即 TNFR1 和 TNFR2)结合。TNF 与 TNFR1 结合能诱导细胞凋亡、细胞扩增或激活抗病毒转录因子 NF- κ B; TNF 与 TNFR2 结合能否诱导细胞凋亡还不清楚, 但能激活核因子 NF- κ B^[15]。一组与 TNFR2 互作的蛋白质叫做肿瘤坏死因子受体相关因子(TRAFs), TRAFs 之一即 TRAF2, 在 NF- κ B 通过 TRAF2 信号转导中发挥作用。cIAP-1 与 cIAP-2 基因编码的蛋白质在体外或细胞内都能与 TRAF1 或 TRAF2 互作。BIRs 对此互作是重要的条件。根据 cIAP-1 与 cIAP-2 对 TRAF1 及 TRAF2 结合的能力推测 IAP 可通过与 TNF 途径或其他相似信号转导途径的组分互作, 从而阻止细胞凋亡。由于这些信号通路仅在特殊细胞中有活性, 故此假说与并不是所有

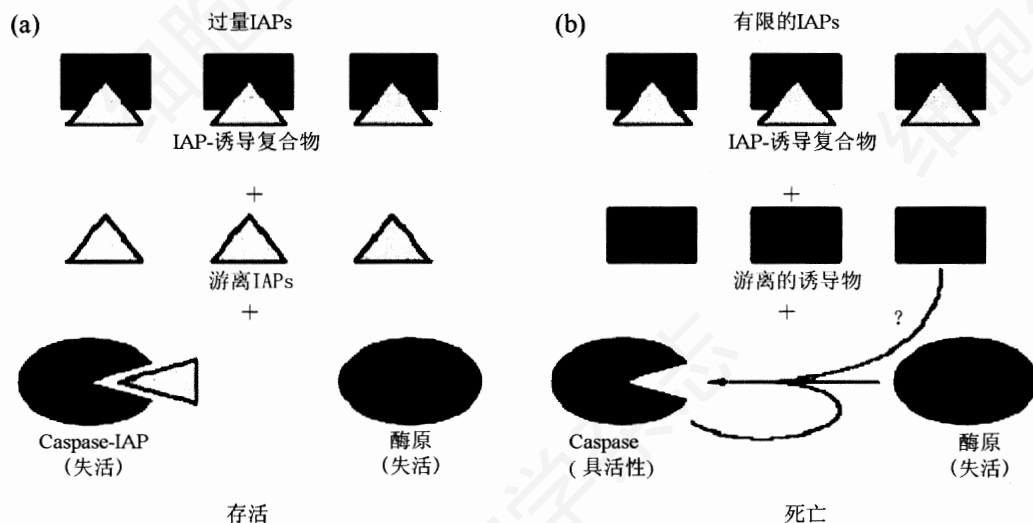


图 1 具有 IAP- 诱导物 -caspase 动力学特征的 IAP 抑制细胞凋亡的模型^[13]

的 IAP 都能抑制细胞凋亡相一致。

另外, 在线粒体介导的凋亡途径中, 从线粒体中释放的细胞色素 *c* 结合 Apaf-1, 释放活化的 caspase-9, 然后 caspase-9 活化 caspase-3, 从而导致蛋白质水解、细胞凋亡。IAP 抑制 caspase-9 和 caspase-3, 使蛋白质水解不能进行, 细胞凋亡不能发生^[16]。

2.2.4 杆状病毒 IAP 在其他物种中的作用^[17] IAP 在动物进化过程中高度保守, 不同来源的 *iap* 在不同物种中的表达也可抑制其细胞凋亡。杆状病毒 *iap* 的同源物最近被证实也存在于昆虫和哺乳动物中。人的 3 种 *iap* 同源物已经被确定: *hiap1/c-iap2* 和 *hiap-2/c-iap1* 位于第 11 号染色体上, 而 *xiap/hILP* 则位于 X 染色体上。哺乳动物 *iap* 同源物 *xiap/hILP* 是一种有力的细胞凋亡抑制物, 它可以阻止哺乳动物细胞中各种信号诱导产生的细胞凋亡; 诱导信号包括免疫血清抽提, 维生素 K 处理以及用病毒感染等。也发现其中 XIAP 的 BIR3 区域对于控制细胞凋亡是关键的^[18]。

另外, 杆状病毒的 Op-IAP 能在哺乳动物细胞中抑制其细胞凋亡, 以及哺乳动物 Bcl-2 能在线虫细胞中阻止其细胞死亡, 这些都为不同种相关生物中细胞凋亡机制的保守性提供了证据^[19]。

哺乳动物细胞 *iap* 和杆状病毒 *iap* 都能阻止哺乳动物细胞中 ICE 诱导的细胞凋亡, 这与我们观察到的杆状病毒 *iap* 不能在昆虫细胞中阻止 ICE 诱导产生的细胞凋亡形成对比。如 Op-IAP 在 S2 细胞中的表达促使了细胞凋亡和它不能直接抑制果蝇的 caspases 的活性都表明了它不直接抑制 caspase^[20]。另外, 在 Sf-9 和 S2 和 Ld652 细胞中都发现感染了 *iap* 缺陷型的桑灯蛾昆虫痘病毒 (AmEPV) 后对细胞毒素的反应加快, caspase-3 类似物的活性也会增加, 而纯化的 AMVIAP 阻止了人类 caspase-9 和 caspase-3 酶在体外的活性^[21]。产生这一差别的原因还不是很清楚, 虽然人们知道昆虫细胞 Sf-21 能在额外蛋白或 RNA 合成缺失的情况下凋亡, 但是哺乳动物从 ICE 到蛋白酶的途径可能更加复杂。Bcl-2 或 bcl-X₁ 同源物在昆虫细胞 Sf-21 和哺乳动物细胞中阻止 ICE 诱导的细胞凋亡也有所差异。

当然并不是所有的 IAP 都有明显的抗凋亡活性。比如, AcNPV 有 IAP 的同源域 Ac-*iap1*, 但不能在 Sf-21 细胞中阻止由放射菌素 D 或 AcMNPV 感染引起的细胞凋亡。在 HycuNPV 感染的 SpIm 细

胞中, Hycu-IAP1, Hycu-IAP2 都不能显示任何的抗凋亡作用, 只有 Hycu-IAP3 对抗细胞凋亡起了关键的作用, 在 Sf-9 细胞中 Hycu-IAP3 也可以抑制由放射菌素 D 引起的细胞凋亡^[10]。不论是 Cp-IAP 的 BIR 还是锌指结构与各自的 Ac-IAP 结构交换都将导致无活性的 Cp-IAP/Ac-IAP。然而, Op-IAP 结构的交换却能产生有活性的 Cp-IAP/Op-IAP。Ac-*iap1* 的去除导致可育病毒的产生, 这种病毒至少可以在两种不同昆虫的细胞中繁殖。此外, 缺乏 *p35* 和 *iap* 的双重突变病毒 AcNPV 的宿主范围与缺失 *p35* 的突变株相同。因此, Ac-*iap* 的功能还不是很清楚, 虽然它在某些昆虫的某些组织中是需要的。AcNPV 还有一个 *iap* 同源基因, 它的序列不保守, 只有一个 BIR 相似结构和一个修饰过的锌指结构。杆状病毒 OpNPV 在其 132 kb 的基因组中共有 4 个 *iap* 同源域, 但其中仅仅一个在用来发现新型 Op-*iap* 的抗凋亡实验中具有功能。

许多 IAP 可能在调节细胞信号转导途径中具有相对较少的功能, 而只有一些 IAP 可能在调节细胞凋亡中具有较大的作用。发现 Op-IAP3 是做为 E3 蛋白连接酶的作用的, 果蝇 HID 的泛素化需要 Op-IAP3 的环指和 BIR2 的结构^[22]。还发现 IAP-IAP 形成的复合物也可以控制细胞凋亡。如 survivin-XIAP 复合物就可以协同抑制细胞凋亡^[23], VIAF 和 Op-IAP 也可以互相作用来调节细胞凋亡^[24]。细胞死亡限制在特定细胞内反映了在组织水平单独的 *iap* 作用的特异性。

参考文献 (References)

- [1] Majno G et al. *Am J Pathol*, 1995, **146**: 3
- [2] 杜昌升等. *病毒学报*, 2003, **19**: 69
- [3] Clem RJ et al. *Mol Cell Biol*, 1994, **14**: 5212
- [4] Kamita SG et al. *J Virol*, 1993, **67**: 455
- [5] Du Q et al. *J Virol*, 1999, **73**: 1278
- [6] Yu M et al. *Virus Genes*, 2005, **31**: 145
- [7] Robertson NM et al. *Cancer Res*, 1997, **57**: 43
- [8] Hershberger PA et al. *J Virol*, 1994, **68**: 3467
- [9] 于威等. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2001, **27**: 244
- [10] Ikeda M et al. *Virology*, 2004, **321**: 359
- [11] Hozak RR et al. *Mol Cell Biol*, 2000, **20**: 1877
- [12] 尚金燕等. *中国蚕业*, 2003, **24**(2): 8
- [13] Miller LK et al. *Trends Cell Biol*, 1999, **9**: 323
- [14] 吕鸿声等. *中国蚕业*, 2003, **24**(4): 4
- [15] Hsu H et al. *Cell*, 1996, **84**: 299
- [16] 刘晓颖等. *生物学杂志*, 2004, **21**(5): 5

- [17] Huang Q *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 1427
[18] Oost TK *et al. J Med Chem*, 2004, **47**: 4417
[19] Hankins CJ *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 13786
[20] Wright CW *et al. Virology*, 2005, **335**: 61
[21] Li Q *et al. J Virol*, 2005, **79**: 2335
[22] Green MC *et al. Virus Res*, 2004, **105**: 89
[23] Dohi T *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 34087
[24] Wilkinson JC *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 51091

The Apoptosis Induced by Insect Baculoviruses

Ren-Yue Bao, Jin-Mei Wu, Xiao-Feng Wu^{1*}

(Laboratory of Molecular Biology, College of Biotechnology, Jiangsu University of Sciences and Technology, Zhenjiang 212018, China; ¹College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract During infection, viruses may provoke a cellular pathway leading to apoptosis, a form of programmed cell death. An apoptotic response by the host cell can result in premature cell death or abortive infection, thereby limiting the spread and/or pathogenesis of infection in the organism. Baculoviruses of silkworm also possess two classes of antiapoptotic genes, *p35* and *iap*, which may block apoptosis induced by virus infection or by a variety of induction signals in a phylogenetically broad range of organisms.

Key words baculovirus; *p35*; *iap*

Received: January 20, 2006 Accepted: June 8, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30070579)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86971658, E-mail: wuxiaofeng@zju.edu.cn