

凋亡诱导因子的研究进展

陈 默 潘敏慧 周恩昆 杜 娟 刘 佳 鲁 成*

(西南大学蚕学与生物系统学研究所, 重庆 400716)

摘要 凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)是一类存在于线粒体内外膜间隙的保守的黄素蛋白, 具有双重功能。在细胞正常的生理状态下, 作为线粒体氧化还原酶, 能催化细胞色素 *c*(Cytc)和 NAD 之间的电子传递, 当细胞受到凋亡刺激后, 就从膜间隙释放到细胞质中, 并通过其核定位信号序列(nuclear localization sequence, NLS)进入细胞核内, 引起染色体核周边凝集和 DNA 呈大片段断裂(约 50 kb), 进而引发不依赖于 caspase 的细胞凋亡。AIF 的释放受 Bcl-2 家族蛋白的调控, 同时也受 Hsp70 的抑制, 它还是多聚(ADP 核糖)聚合酶 1[poly(ADP-ribose) polymerase 1, PARP1] 介导的细胞凋亡途径的下游效应物。

关键词 细胞凋亡; 凋亡诱导因子; 线粒体;

凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)是一种在进化上较为保守的黄素蛋白, 具有凋亡诱导的活性, 它在不依赖于 caspase 途径中扮演重要角色。当细胞受到凋亡刺激后, 线粒体外膜完整性破坏而造成线粒体通透性转变孔(mitochondrial permeability transition pores, MPTP)开放, AIF 从膜间隙释放到细胞质中, 并通过其核定位信号序列(nuclear localization sequence, NLS)进入细胞核内, 引起染色质的初步凝集和 DNA 大规模片段化(约 50 kb), 进而引发不依赖于 caspase 的细胞凋亡途径。此外, AIF 是一种双功能蛋白, 具有氧化还原酶的活性, 与线粒体的生理活动有关^[1]。AIF 已成为近年研究的热点, 对其研究进展综述如下。

1 AIF 基因及其编码的蛋白质

1996 年, Susin 等^[2]利用非细胞体系证实了 AIF 是线粒体释放的一种凋亡诱导蛋白, 与细胞色素 *c* (Cytc)一样位于线粒体膜, 死亡信号诱导 AIF 释放。AIF 基因由 16 个外显子组成, 转录 2.5 kb 的 mRNA, 编码约 613 个 aa(图 1A, 图 1B)^[2,3]。小鼠 AIF 基因定位于 X 染色体 A6 区域, 人 AIF 基因在 X 染色体 Xq25-26 区域^[4]。近来在线虫与果蝇中也检索到了具有诱导凋亡功能的 AIF 基因, 分别为 *wah-1* 和 *CG7263*^[5]。果蝇 AIF 基因定位于 2L 染色体 22D1-22D1 区, 线虫 AIF 基因定位于 III 号染色体上。

最近人们还鉴定出 AIF 存在另外三种形式: (I) AIF-Exb(609 aa), 是通过外显子 2b 取代 AIF 的外显子 2 产生的变异体(图 1C, 图 1D)^[3,4]。(II) AIFsh (AIF

short)(274 aa)是由外显子 10~16 编码衍生出来的变异体(图 1E, 图 1F)^[3,6]。(III) AIFsh2 (AIF short 2)(324 aa)通过新发现的外显子 9b 的选择性拼接产生的变异体(图 1G, 图 1H)^[3,7]。AIF-Exb 与 AIF 相似, 在 N 端都含有 MLS, C 端都有 NLS, 在正常生理状态下均位于线粒体^[4]。AIFsh 和 AIFsh2 在生理状态下则分别位于细胞质和线粒体。当细胞受到凋亡诱导后, 只有 AIF-Exb 与 AIF 会向核移位, 导致大规模的 DNA 片段化^[6,7]。AIFsh2 虽然可以从线粒体释放, 但也无法转入核中(缺少 NLS), 因此也不能在体外分离的核中引起染色体的凝集和 DNA 的片段化^[7]。有趣的是, 这些 AIF 形式并非广泛表达的, 比如 AIFsh 在脑部不表达^[6]。关于它们各自的具体功能还有待进一步查明。

AIF cDNA 编码 67 kDa 的前体蛋白, 前体蛋白在胞浆中合成后通过其 N 端线粒体定位序列(mitochondrial localization sequence, MLS)有效的穿入线粒体间隙, 然后水解掉 N 端的 52 个 aa, 形成 62 kDa 的 I 型内膜蛋白分子, 锚定于线粒体内膜, 其 N 端位于基质, C 端位于膜间隙。当受到凋亡刺激后才继续水解掉 N 端的 50 个 aa 从而成为 57 kDa 的成熟 AIF^[8]。鼠 AIF (612 aa)和人 AIF(613 aa)在 aa 序列上具有 92% 的一致性。线虫 *wah-1* 编码 701 个 aa, 与人类 AIF 序列有 37% 的一致性和 54% 的相似性^[9]。AIF 前体有三个结构域(图 2)^[10], 包括约 100 个 aa 的氨基末端

收稿日期: 2007-05-23 接受日期: 2007-07-23

国家自然科学基金(No.30471312)和国家重点基础研究发展规划(973 计划)(No.2005CB121000)资助项目

* 通讯作者。Tel: 023-68250346, Fax: 023-68251128, E-mail: lucheng@swu.edu.cn

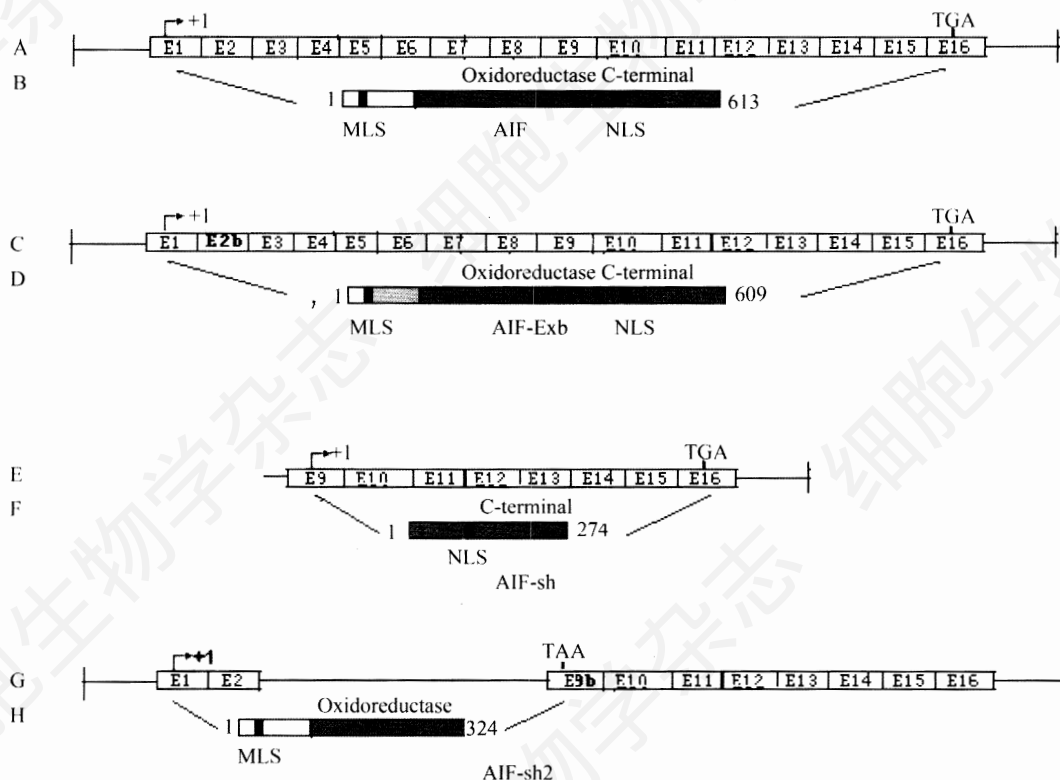


Fig.1 Schematic diagram of splicing of AIF^[3]

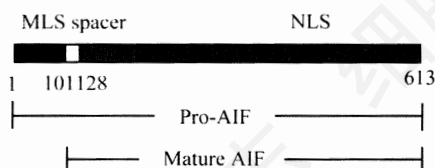


Fig.2 Schematic diagram of construction of AIF^[10]

MLS、27 个 aa 的间隔序列和一个约 485 个 aa 的羧基末端氧化还原酶结构域(包括核定位序列, NLS), 该结构域和其他哺乳动物、非脊椎动物(线虫、果蝇)、植物抗坏血酸还原酶以及细菌 NADH 一氧化还原酶具高度同源性^[11], 这意味着 AIF 在真核细胞中是个保守的基因。

2 AIF 的同源蛋白

AIF 同源线粒体相关死亡诱导者(AIF homologous mitochondria associated inducer of death, AMID)和 p53 应答基因的编码产物(p53 responsive gene 3, PRG3) 均为 AIF 的同源蛋白。与 AIF 相比均不含有 MLS, 但与从细菌到哺乳动物的 AIF 和 NADH 氧化还原酶具有很高的同源性。AMID 基因定位于人类染

色体 10q22.1, PRG3 基因定位于人类染色体 11q12, 编码 40.5 kDa 的蛋白质, 位于胞质溶胶中而不与线粒体相连^[12]。

3 AIF 的生理作用

在正常的细胞, AIF 位于线粒体内外膜之间, 可以籍其 N 末端 FAD 结合区和其氧化还原活性来行使氧化还原酶的功能。从线粒体提取的 AIF 和重组纯化的 AIF 都可以氧化 NADH 和 NADPH, 同时产生超氧自由基 O_2^- ^[13], 人们推测 AIF 可能起到 ROS 清道夫的作用^[14]。研究表明, AIF 氧化还原酶的活性对于维持细胞的正常生理活动是必需的^[14]。在 HQ(Harlequin)小鼠, 由于逆转录病毒的插入导致其 AIF 的表达水平只有正常小鼠的 20%, 这种小鼠对氧化压力的耐受性显著降低, 脑组织切片显示其脑部组织呈退行性病变。Vahsen 等^[15]发现, AIF 参与了线粒体呼吸链复合体 I 的形成。在 HQ 小鼠, 其视网膜和脑组织线粒体的氧化磷酸化作用减弱并发生病变, 同时伴有组成呼吸链复合体 I 的亚单位表达下调。

4 无细胞体系(cell-free system)中 AIF 效应

重组 AIF(Δ AIF1-120)在体外具有一些生化活性。添加到纯化的核中后,会引起局部的周边染色质的浓缩和 DNA 的片段化^[16],与纯化的线粒体接触后,便会引起膜通透性的改变并释放细胞色素 *c* 和其它一些蛋白质到线粒体外^[2]。

在 cell-free 体系中,通过各种方法抑制 AIF Δ 1-120 还原活性,都不会影响其对纯化核的凋亡诱导作用。反之,用硫醇试剂抑制 AIF Δ 1-120 的凋亡功能,也不会影响其 NADH 氧化酶的活性^[3, 13]。这些研究表明, AIF 的凋亡诱导活性与其氧化还原酶活性无关。最近,人们通过线粒体锚定 AIF 的方法将 AIF 的双重功能进行分离,得到同样的结果^[17]。但是在 cell-free 体系中当删除氧化还原酶结构域的某些效应部分(Δ 1-351, Δ 155-612, Δ 538-612),其凋亡潜能也随之消失,这说明至少 AIF 的氧化还原酶结构域中的部分结构对其凋亡功能是重要的^[2]。

5 Hsp70 和 AIF

AIF 在系统演化上是一种古老的蛋白,在早期胚胎形成中控制细胞死亡的第一步。因此推测某些遗传性细胞保护蛋白如热休克蛋白(heat shock protein, Hsp)可能是 AIF 的抑制剂。通过一系列的生化检测发现:不同的 Hsps(Hsp10, Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90)中,只有 Hsp70 是唯一能和 AIF 作用的蛋白质^[18]。以往的研究表明, Hsp70 主要是作用于凋亡促进因子(apoptosis protease activating factor-1, Apaf-1),后来发现 Hsp70 的过量表达能保护 Apaf-1 免遭由撤除血清引起的细胞死亡,暗示 Apaf-1 并不是 Hsp70 细胞保护行为的唯一对象,可能同时存在 Hsp70 对 AIF 的抑制作用。在 cell-free 体系中, Hsp70 可以阻止纯化的细胞核中由 AIF 诱发的染色质凝集。用转染或者显微注射的方法将 AIF 定位到线粒体间隙时,发现那些能过量表达 Hsp70 的细胞就能免遭 AIF 引发的凋亡而受到保护^[18],这种保护效应在核和线粒体水平都能观察到。

6 AIF 诱导凋亡的机制

很多种类的细胞中,一旦细胞受到死亡诱导(与诱导信号种类无关),在线粒体膜通透性改变后, AIF 随即释放转入核,引起染色质的初步凝集和 DNA 大量片段化(约 50 kb),进而引发不依赖于 caspase 的细胞凋亡途径。但关于 AIF 怎样引发染色质凝集和 DNA 片段化仍然是一个谜。有三种可能:第一, AIF

自身含有一些未知的核酸酶活性;第二, AIF 和 DNA 的反应会增加 DNA 对一些核酸酶的敏感性。第三, AIF 可能会招募下游一些核酸酶而诱发局部的染色质溶解。在线虫中, *wah-1* (AIF) 是通过和 CPS-6 (EndoG) 的结合,促进 CPS-6 的核酸酶活性从而导致 DNA 的降解^[6]。

AIF 的促凋亡作用还体现在其自身形成的正反馈机制,即释放入细胞质的 AIF 可以再作用于其他的线粒体,使之通透性增加而进一步促进 AIF 的释放^[2]。同时还能促进细胞色素 *c* 的释放^[19],最终激活 caspase-3,作用于胞质中的细胞骨架蛋白,或作用于细胞核中的 DNA 酶,引起染色质的进一步凝集和 DNA 的寡核小体片段化而引起细胞凋亡。

AIF 还是多聚(ADP 核糖)聚合酶 1[poly(ADP-ribose) polymerase1, PARP1]所诱导的凋亡途径中的一个重要调节分子。PARP1 活化后,可以诱导 AIF 从线粒体释放及向核的转移从而引发凋亡^[20]。我们可以把 AIF 看作是 PARP1 介导的细胞凋亡途径的下游效应物,同时在 PARP1 介导的细胞凋亡途径中,也可以把 PARP1 看作是与 AIF 释放相关的一个因子^[20]。

7 AMID 和 PRG3 的凋亡作用

AMID 和 PRG3 作为人类 AIF 的两种同源蛋白均可直接诱导细胞凋亡。AMID 引发凋亡途径不受 Bcl-2 的过量表达的影响^[10]。而 PRG3 诱导的凋亡途径则受到 P53 的调控,主要是通过线粒体途径即细胞色素 *c*、caspase-9 和 Apaf-1 诱导细胞凋亡^[11]。

8 展望

随着对 AIF 研究的深入,人们对细胞凋亡的认识也不断扩展。近些年对 AIF 的研究有了很大进展,但仍存在一些问题尚未解决:位于线粒体内的 AIF 是否与细胞呼吸有关; AIF 存在变异体有何功能; AIF 引发染色质凝集和 DNA 片段化的确切机制是什么;如何鉴定出与 AIF 相互作用的蛋白质等都有待进一步的研究。此外,近年在一些无脊椎动物中检索到了 AIF 与线虫 *wah-1* 和果蝇 CG7263 类似。虽然对线虫 *wah-1* 介导的凋亡有所研究报道,但在果蝇中 CG7263 如何介导细胞凋亡报道较少。目前,随着家蚕基因组框架图的完成,我们也试图在家蚕中检索到 AIF,研究其凋亡机制来探索家蚕细胞凋亡的路径,并希望通过与线虫、果蝇和哺乳动物的比较更深入的了解 AIF 介导的细胞凋亡。

参考文献(References)

- [1] Porter G *et al. BioEssays*, 2006, **28**: 834
[2] Susin SA *et al. Nature*, 1999, **397**: 441
[3] Krantic S *et al. Prog Neurobiol*, 2007, **81**: 179
[4] Daugas E *et al. FEBS Lett*, 2000, **476**: 118
[5] Lettre G *et al. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, **7**: 97
[6] Delettre C *et al. J Biol Chem*, 2006, **281**: 6413
[7] Delettre C *et al. J Biol Chem*, 2006, **281**: 18507
[8] Otera H *et al. EMBO J*, 2005, **24**: 1375
[9] Wang X *et al. Science*, 2002, **298**: 1587
[10] Lu CX *et al. Acta Biochim Biophys Sin*, 2003, **35**: 881
[11] Lorenzo HK *et al. Cell Death Differ*, 1999, **6**: 516
[12] Ohiro Y *et al. FEBS Lett*, 2002, **524**: 163
[13] Miramar MD *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 1639
[14] Klein JA *et al. Nature*, 2002, **419**: 367
[15] Vahsen N *et al. EMBO J*, 2004, **23**: 4679
[16] Susin SA *et al. J Exp Med*, 2000, **192**: 571
[17] Cheung Ec *et al. EMBO J*, 2006, **25**: 4061
[18] Ravagnan L *et al. Nat Cell Biol*, 2001, **3**: 839
[19] Ferri KF *et al. J Exp Med*, 2000, **192**: 1081
[20] Yu SW *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 18314

Progress in Apoptosis-inducing Factor

Mo Chen, Min-Hui Pan, En-Kun Zhou, Juan Du, Jia Liu, Cheng Lu*

(Institute of Sericulture and Systems Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract Apoptosis-inducing factor (AIF) is a conservative flavoprotein which has the difunctionality located in mitochondrial intermembrane space. It catalyses electron transmit between cytochrome *c* and NAD as mitochondrion oxidoreductase in cell normal physiological state. When death stimuli present, AIF is released from mitochondria to the cytoplasm and then to the nucleus through its nuclear localization sequence (NLS), inducing peripheral chromatin condensation and large-scale fragmentation of DNA (~50 kb), the last initiate caspase-independent pathway. The release of AIF is regulated by Bcl-2 proteins and inhibited by Hsp70. Moreover, AIF is a downstream effector in apoptosis pathway mediated by poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1).

Key words apoptosis; apoptosis-inducing factor; mitochondria

Received: May 23, 2007 Accepted: July 23, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30471312) and the National Basic Research Programs (973 Program) (No.2005CB121000)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68250346, Fax: 86-23-68251128, E-mail: lucheng@swu.edu.cn