

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(Cyt c)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) polymerase1, 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从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(Cyt c)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

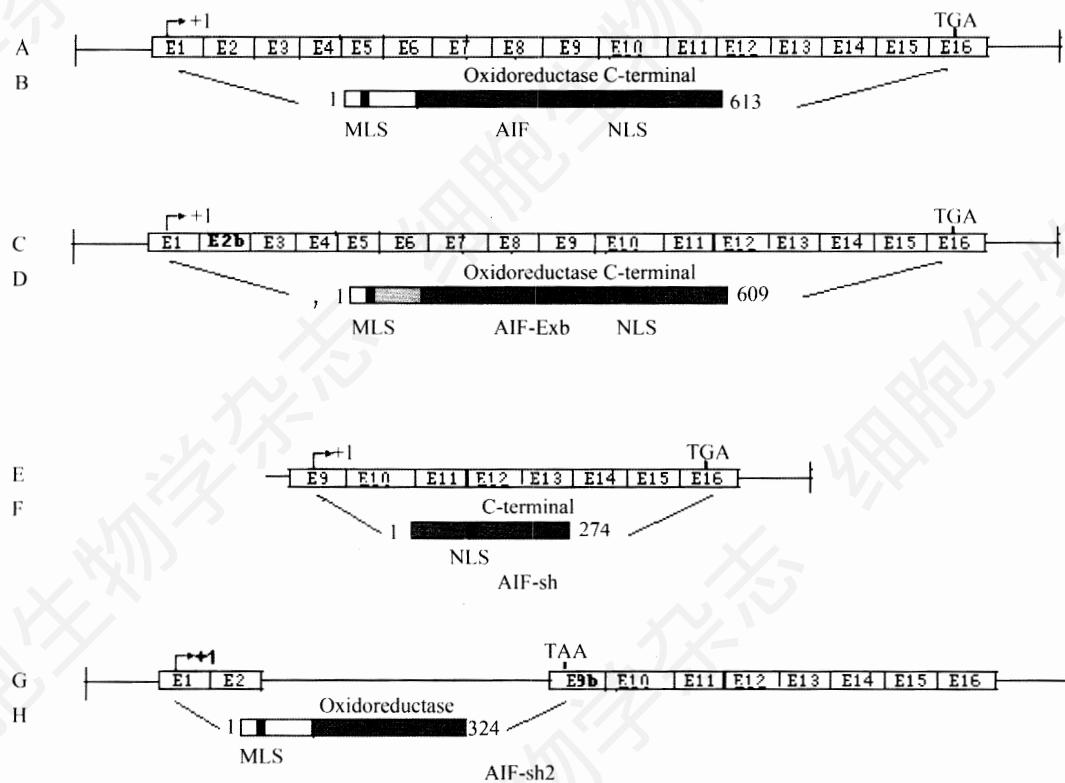


Fig.1 Schematic diagram of splicing of AIF^[3]

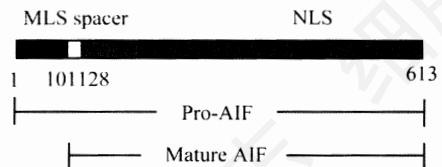


Fig.2 Schematic diagram of construction of AIF^[10]

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O₂⁻^[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^[21]。

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]。这些研究结果表明,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),其凋亡潜能也随即消失,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^[22]。

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片断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