专论与综述

动物细胞凋亡相关基因在植物中的同源性研究进展*

杨 征 蔡陈峻 宋运淳**

（武汉大学生命科学学院发育生物学中心 武汉 430072）

细胞凋亡(apoptosis)是多细胞生物维持自身稳定的一种基本生理机制，即机体通过细胞凋亡消除损伤、衰老与突变的细胞，以维持生理平衡。它是一种主动的、有程序的细胞死亡过程。细胞凋亡在动物中取得的丰硕成果表明，细胞凋亡与胚胎发育、器官的发育与退化、免疫、造血等生理过程有着极其重要的关系，并在肿瘤的发生及治疗中起着重要作用。因而，细胞凋亡的研究日益受到人们的关注，成为当今生物学的研究热点之一。

近年来，随着细胞凋亡研究在植物中的开展，研究者们发现，细胞凋亡在植物的个体生长发育过程中普遍存在。细胞凋亡不但是植物体正常生长发育必不可少的组成部分，而且是植物抵御病原体侵染和逆境胁迫的重要手段。因而，无论是在动物中，还是在植物中，细胞凋亡都是多细胞生物生命活动过程中不可缺少的组成内容，是生物体为了更好地适应生存环境而主动采取的一种死亡过程。

细胞凋亡的主动性和程序性涉及了一系列基因的激活、表达以及调控等的作用。在动物中已分析鉴定到许多细胞凋亡相关基因。于是，人们想知道，植物中是否存在与动物细胞凋亡相关基因同源的基因，如果具有同源性，它们的功能是否与在动物中执行的功能相同。随着研究工作的开展，科学家们利用已知的动物细胞凋亡相关基因对植物进行研究，发现植物中存在着与动物细胞凋亡相关基因的同源基因及蛋白质。科学家们推测，在生物进化过程中，植物既具有与动物相似的细胞凋亡调控机制，也具有其特有的细胞凋亡调控机制，尽管这一调控机制的多样性尚未被完全揭示。本文拟就近年来报道的动物细胞凋亡相关基因在植物中的保守性加以阐述。

一、dad-1

迄今为止，dad-1 是已查明的凋亡相关基因中最为保守的一个基因。1993 年，Nakashima 等研究者首次从仓鼠(hamster)的突变细胞系 tsBN7 中克隆到抑制细胞凋亡的 dad-1(defender against apoptotic cell death)基因[1]，它编码一种疏水蛋白，与人和爪蟾(*Xenopus*)的 dad-1 基因高度同源，同源性大于 90%，并已定位于人的第 14 染色体长臂和小鼠的第 14 染色体[2]。Sugimoto 在线虫(*C. elegans*)中找到了与 dad-1 同源的 Ce-dad-1 基因，该基因与哺乳动物 dad-1 的同源性大于 60%，与水稻(*Oryza sativa*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 cDNA 序列部分同源[3]。当时，研究者们还不知道 dad-1 在植物中是否具有其在动物中的相似功能。1997 年，Gallois 及其同事从拟南芥中克隆到 AtDAD1 基因，该基因在拟南芥所有的组织中都有表达，并在拟南芥基因组 DNA 中有 2 个拷贝。AtDAD1 与人的 dad-1 一样，可以抑制仓鼠 tsBN7 细胞的凋亡[4]。同年，Tanaka 等人

*国家自然科学基金和国家教委博士点基金资助项目。

**联系人。

从水稻(*Oryza sativa* cv. Nipponbare)中也克隆到了与哺乳动物 dad-1 同源的 cDNA,同源性为 77%。水稻 dad-1 基因同样能有效抑制仓鼠 tsBN7 细胞的凋亡[5]。上述结果有力地证明了 dad-1 基因的结构和功能在动物和植物中均具有保守性。

二、ras

ras 是促进细胞增殖,抑制细胞凋亡的原癌基因,与多种肿瘤的发生、发展都有着密切的关系。ras 基因的产物是一类细胞质-膜蛋白,与 GTP 的结合物具有传递细胞内信号的作用。如 c-ras 的终产物 P^{21} 为与细胞膜相联系的 GTP 结合蛋白,具有 GTP 酶活性,对细胞的生长、分化、细胞骨架、蛋白质运输和分泌等功能发生影响。研究者们在玉米、水稻、拟南芥、豌豆等植物中均找到了与 ras 相关的基因。

YPT 蛋白是一种 Ras 相关蛋白。从玉米中分离到 yptm1 和 yptm2 两个 cDNA,它们编码的蛋白质均与 YPT 蛋白家族具有相关性。yptm1 与酵母 ypt1 产物的氨基酸有 70%的相似;yptm2 与小鼠 ypt 产物的氨基酸有 74%的相似;它们与其他 Ras 相关蛋白的相似性则小于 40%。yptm1 和 yptm2 产物的大部分氨基酸残基集中在 GTP/GDP 结合域,并且两个半胱氨酸残基靠近 C 末端,被软脂酰化,这些结构特点是所有 Ras 相关蛋白与膜结合的必需特征,在玉米中同样保守[6]。从水稻中分离克隆到的 rgp1 也是一个与 ras 相关的基因,转移至大肠杆菌中表达的 RGP1 蛋白表现出明显的 GTP 结合蛋白活性,并且这种蛋白与一种裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)的 Ras 相关蛋白 YPT3 非常相似[7]。从拟南芥的 cDNA 文库中分离得到 4 个与哺乳动物 ras 基因具同源性的基因,这些基因的产物 ARA-2,ARA-3,ARA-4 及 ARA-5 的氨基酸均有 4 个保守的区域,在小分子 GTP 结合蛋白中也存在着这种对于 GTP 酶/GTP 结合活性十分重要的区域。同时,这些产物与酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的 ypt 基因产物在氨基酸 45 左右区域高度同源,这一区域被认为是与作用分子相互作用的位点[8]。rho 是菜豌豆中一个与 ras 相关的小分子 GTP 结合蛋白,它与哺乳动物 rho 家族成员有 45%－60%序列同源,与 ras 家族其他成员有 30%一致性[9]。此外,从紫荚豌豆(*Pisum sativum* L.)的 cDNA 文库中分离到一个与 ras 基因家族有同源性的克隆,该克隆的保守序列包括 GTP 结合位点,GDP/GTP 水解区域,以及与膜结合相关的 C-末端的 Cys 残基。其预测的氨基酸序列与两种哺乳动物的基因产物,即 BRL-ras 癌基因和狗的 rab7 基因,具有高度同源性,同源性大于 70%,与到目前为止已鉴定的植物 ras 相关基因产物的同源性小于 40%[10]。

众多事例证明,植物中广泛存在着与癌基因 ras 相关的基因。然而,我们不知道 ras 基因在植物中的功能到底是什么。Hagege 在正常甜菜(sugarbeet)的叶片和愈伤组织中均检测到有爪蟾 c-Ki-ras 基因的转录物存在。其中,愈伤组织中检测到的 RNA 水平是叶片的 2 倍。因而推测 ras 基因可能对体外培养的植物细胞的生长具有调控作用[11]。芽殖酵母 RAS2 基因在烟草叶片新鲜分离的原生质体中的过度表达,能够影响细胞的分裂,即 RAS2 在原生质体中起着"自杀基因"的作用,阻断了细胞的增殖,促进细胞凋亡。当进行瞬时基因表达的测试时发现,RAS2 能阻断氯霉素乙酰转移酶基因的表达,另一个 ras 基因 v-Ha-ras 也具有同样的效果[12]。

三、Rb

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma,Rb)基因是一个重要的肿瘤抑制基因。尽管目前尚无 Rb 基因介导细胞凋亡的直接证据,有研究证明,当细胞缺失该基因时,将引起细胞恶性增殖,使其周围环境中维持细胞存活的因子迅速

耗竭，因而导致细胞凋亡。Rb 基因在细胞周期调控中起着重要作用，其产物存在于整个细胞周期中，可在细胞周期的多个阶段中起作用。动物病毒癌蛋白质通过它们分子中特定的氨基酸序列 Leu-X-Cys-X-Glu(LXCXE)结构与 Rb 蛋白相互作用，从而破坏 Rb 与转录因子 E2F 的结合，使得游离状态的 E2F 能够激活细胞在 S 期所需的某些基因的表达，促使细胞进入 S 期，从而对细胞凋亡起调节作用。

1996 年，Xie 等人发现一种植物双粒病毒组的 RepA 蛋白中具有 LXCXE 结构，由此推测在植物细胞中可能存在 Rb 相关蛋白。随后，他们从玉米中分离到的 ZmRb1 cDNA 克隆证明了这一推测[13]。ZmRb1 编码的蛋白质结构和功能与哺乳动物 Rb 家族的生长调节蛋白极其相似。与动物 DNA 肿瘤病毒一样，双粒病毒需要 S 期环境来进行 DNA 复制，当用编码 ZmRb1 或人的 p130(Rb 家族成员)的质粒转染植物细胞时，双粒病毒 DNA 的复制受到抑制。这一结果说明，ZmRb1 基因可能控制着植物细胞的 G1/S 转换，该基因能与植物中含有 LXCXE 结构的蛋白质(如双粒病毒组的 RepA 蛋白)形成稳定复合物，促使非增殖细胞进入 S 期。由此可以看出，动物和植物在细胞周期的调控上有共同之处。对植物 Rb 蛋白的进一步研究，不仅能帮助我们更好地认识植物细胞的生长调控机制，还能帮助我们去认识动物细胞的生长调控机制。

四、myc

myc 是调控细胞周期的主要基因，能调节细胞增殖和死亡两个截然相反的过程。myc 信号传递系统激活后，如果培养体系中有足够的生长因子持续作用，则细胞增殖并分裂；否则便通过细胞凋亡机制诱导细胞发生死亡。其产物 Myc 蛋白是一种转录因子，它的氨基酸端具有反式激活功能区，羧基端具有基本的螺旋-环-螺旋，亮氨酸拉链(bHLHLZ)功能区的典型结构，可以与 Max(bHLHLZ 蛋白)形成二聚体和与特异的 DNA 序列结合。

Wakarchuk 在衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)基因组文库中得到两个与 myc 有同源性的克隆：gcr-1 和 gcr-4。这两个克隆均含有富含 GC 的 DNA 序列。在果蝇中，富含 GC 的 DNA 序列是发育调控基因的组成部分。这两个克隆是否为功能基因，尚待进一步确证[14]。

玉米中的 Lc 基因是玉米 R 基因家族中的成员，它在具组织特异性的花色素苷的生物合成途径中起调控作用。Lc 基因编码类似于转录激活子的蛋白质，与 L-myc 基因产物和其他调控蛋白具有同源性。它与 myc 一样，具有螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix)DNA 结合功能区[15]。

五、p53

p53 是典型的抑癌基因，作为细胞凋亡的一个重要相关基因受到广泛重视。其生物学活性极为复杂，存在形式有两种：野生型对细胞增殖有抑制作用，突变型可抑制野生型 p53 的功能。哺乳动物细胞中，p53 对 DNA 损伤诱导的细胞周期停滞起主要作用。当细胞 DNA 受到损伤时，p53 蛋白可使细胞停留在 G1 期，阻止细胞进入 DNA 合成期，细胞内的 DNA 修复机制启动，对损伤的 DNA 进行修复。若修复无效，p53 就启动细胞凋亡机制，使这些受到损伤的细胞死亡。一旦 p53 基因突变或失活，细胞失去自身监视机制，使 DNA 有损的细胞继续存在，就有可能形成恶性细胞，故 p53 又被人喻为“基因组卫士”。显然，p53 在介导细胞对 DNA 损伤的应答，并把使细胞生长停滞在 G1 期与决定细胞走向死亡有机地结合起来的过程中起很关键的作用。

然而，植物对 DNA 损伤导致植物细胞停止分裂的机制所知很少。Ball 和 Lane 研究发现，植物与人的增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen，PCNA)一样，含有一个高

度保守的与人的生长抑制因子 $p21^{WAF1}$ 相结合的位点[16]。p21 是 p53 诱导转录的基因产物之一，它与射线诱导的细胞生长停滞有关。$p21^{WAF1}$ 通过与 PCNA 结合，抑制 DNA 复制，使细胞有时间对损伤的 DNA 进行修复，从而维持细胞遗传信息的稳定性。从豌豆中提取的 PCNA，能与人的 $p21^{WAF1}$ 形成稳定的复合物，它们相互作用的特殊位点经鉴定，与人的 PCNA 与 $p21^{WAF1}$ 的结合序列一致。这一结果暗示着植物中可能存在与 P21 相似功能的基因，PCNA 活性的调节可能在植物对 DNA 损伤所起反应中起着重要作用。

六、bcl-2

bcl-2 是细胞凋亡研究中最受重视的癌基因之一。近年来，研究者们发现，bcl-2 对细胞凋亡的调节作用是一个关键的因素，它能通过阻断细胞凋亡信号传递系统的最后共同通道而抑制细胞凋亡。bcl-2 基因能在各种正常细胞的激活和发育过程中表达，而不在成熟的或走向凋亡的细胞中表达。它在哺乳动物中能抑制多种细胞类型（如造血细胞，B 淋巴细胞等）的细胞凋亡，抑制由多种因素（如去除生长因子，喜树碱诱导或射线等）引起的细胞凋亡。从病毒、线虫、鼠到人，均已发现有类似于 bcl-2 的基因，这些基因为维护生物体内的细胞平衡起着重要作用。bcl-2 基因家族的成员均有三个高度保守的区域，该区域与 bcl-2 甘蓝型油菜蛋白质的二聚体的形成密切相关。

Dion 等研究者通过 Western 分析及免疫组织化学的方法，在衣藻（*Chlamydomonas reinhardtii*）、烟草（*Nicotiana tabacum*）、甘蓝型油菜（*Brassica napus*）和玉米中检测到了类 bcl-2 蛋白的存在，该蛋白能与抗 bcl-2 蛋白抗体起免疫反应。更进一步的研究表明，植物中的类 bcl-2 蛋白主要位于植物细胞的线粒体、质体和细胞核中，它在叶片中的含量特别丰富，在老根和花中没有检测到，这可能与这些材料的分生细胞较少有关。在不同种类的多细胞和单细胞植物中，均检测到类 bcl-2 蛋白，且该蛋白在不同植物中的分布类似，说明植物中类 bcl-2 蛋白的存在具有普遍性和广泛性[17]。但是，bcl-2 基因不能抑制由 Ca^{2+} 诱导的玉米培养细胞的凋亡。同样，bcl-X_L 是哺乳动物中克隆到的一个抗细胞凋亡基因，是 bcl-2 家族中的一员，将它转至烟草植株时，发现它虽有表达，但却不能抑制病毒或细菌诱导的细胞凋亡[18]。

此外，Georyieva 等人还发现，在玉米（*Zea May* L.）胚中存在与癌基因 c-myc，n-myc，c-fos，c-jun 和 p53 的产物相关的蛋白，这些蛋白的含量在玉米胚的分化过程中变动，表明它们在玉米胚的分化程序中有特殊的调控功能。玉米中 c-fos 和 c-jun 的相关蛋白可能具有转录激活因子的功能，c-myc、n-myc 及 p53 的相关蛋白可能与 DNA 的复制与生长调控有关[19]。

上述研究表明，植物中的许多基因不但与动物细胞凋亡相关基因具有同源序列，有的甚至具有相似的功能。除了所提及的凋亡相关基因外，尚有其他的凋亡相关基因在植物中具有同源性。这些高度保守的 DNA 和蛋白质在动植物中具有普遍性。大量研究早已证明，控制细胞凋亡的分子机制在动物中是保守的[20,21]。例如，ced-3 和 ced-4 为线虫（*Caenorhabditis elegans*）的自杀基因，能促进线虫细胞凋亡。科学家们以之为根据，经过大量的比较和筛选，寻找到了人类中同等功能的白细胞介素-1β 转换酶（interleukin-1β converting enzyme，ICE）。ICE 是半胱氨酸蛋白酶，它能促进哺乳动物细胞凋亡，将其转移至线虫中，其表达可以诱导线虫细胞的凋亡。尽管 ced-3 与 ICE 之间的氨基酸序列的同源性仅为 28%，但二者活性功能区序列却有 43%的同源性，尤期是催化和结合 Asp 羧基侧链相关氨基酸残基均为一致[22]。线虫中的抑制细胞凋亡基因 ced-9，也在哺乳动物中克隆到了与其同源的一组 bcl-2 家族基因。ced-9 编码 280 个氨基酸组成的蛋白，其氨基酸序列、结构和功能都与 bcl-2 十分相似[23]。除了低等动

物线虫与哺乳动物的某些凋亡相关基因具有保守性外，病毒和凋亡相关基因中也有与哺乳动物相似的，如非洲猪瘟病毒 LMW5-HL 基因和 EB 病毒的 BHRF1 基因均具有使被感染细胞存活时间延长的功能，它们的氨基酸序列就与 bcl-2 有很高的同源性[24,25]。

动物中高度保守的细胞凋亡调控机制是否在植物中同样保守呢？到目前为止，人们对于植物细胞凋亡的产生及其调控仍所知甚少，植物细胞凋亡的分子机制尚在探索之中，现已发现 dad-1 在动物和植物中高度保守，这表明植物与动物中至少有一种调控细胞凋亡的分子途径是相同。ras 基因能影响植物的正常发育，类 rb 基因在植物细胞周期调控上与动物有共同之处，植物中有与 p53 基因相似功能的基因。由此推测，细胞凋亡的调控机制在生物界中可能具有一定程度的保守性。但是，动物中的 bcl-2 基因却不能抑制植物细胞凋亡，又暗示植物中可能有其他的不同于动物的抑制细胞凋亡的途径，细胞凋亡的调控机制具有多样性。

综上所述，对动植物细胞凋亡的同源性进行研究，将为我们进一步了解植物细胞凋亡的分子调控机制提供帮助。对细胞凋亡基因调控的研究，将进一步阐明生命中“死亡”这一重要现象，解释细胞的死亡规律，为动植物的防病和治病提供科学的依据和实用的技术手段。

摘 要

细胞凋亡是由基因调节的主动过程。对动物细胞凋亡相关基因在植物中的同源性的研究发现，dad-1 基因的结构和功能在动物和植物中均具有保守性。动物中的其他细胞凋亡相关基因，如 ras、myc、Rb、p53、bcl-2 等基因，在植物中均有其同源序列，有的在植物中找到了功能相似的基因。细胞凋亡的调控机制在生物进化过程中，不但具有一定程度的保守性，而且在调控机制上具有多样性。

参 考 文 献

[1] Nakashima, T. et al., 1993, *Mol. Cell Bio.*, **13**: 6367－6374.
[2] Apte, S. S., et al., 1995, *FEBS Lett.*, **363**: 304－306.
[3] Sugimoto, A. et al., 1995, *EMBO J.*, **14**: 4434－4441.
[4] Gallois, P., et al., 1997, *Plant J.*, **11**: 1325－1331.
[5] Tanaka, Y., et al., 1997, *Plant Cell Physiol.*, **38**: 379－383.
[6] Palme, K., et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**: 787－791.
[7] Sano, H. and Youssefian, S., 1991, *Mol. Gen. Genet.*, **228**: 227－232.
[8] Anai, T., et al., 1991, *Gene*, **108**: 259－264.
[9] Yang, Z. and Watson, J. C., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**: 8732－8736.
[10] Drew, J. E., et al., 1993, *Plant Mol. Biol.*, **21**: 1195－1199.
[11] Hagege, D., et al., 1992, *J. Plant Physiol.*, **139**: 509－511.
[12] Hilson, P., et al., 1990, *Plant Mol. Biol.*, **14**: 669－685.
[13] Xie, Q., et al., 1996, *EMBO J.*, **15**: 4900－4908.
[14] Wakarchuk, W. W., Mueller, F. W. and Beck, C. F., 1992, *Plant Mol. Biol.*, **18**: 143－146.
[15] Ludwig, S. R., et al., 1989, *Proc, Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**: 7092－7096.
[16] Ball, K. L. and Lane, D. P., 1996, *Eur. J. Biochem.*, **237**: 854－861.
[17] Dion, M., et al., 1997, *Biochem. Cell Biol.*, **75**: 457－460.
[18] Mittler, R., et al., 1996, *Plant Cell*, **8**: 1991－2001.
[19] Georgieva, E. I., Rodas, G. L. and Loidl, P., 1994, *Planta*, **192**: 125－129.
[20] Staller, H., 1995, *Science*, **267**: 1445－1449.
[21] Williams, G. T. and Smith, C. A., 1993, *Cell*, **74**: 777－779.
[22] Yuan, J., et al., 1993, *Cell*, **75**: 641－652.
[23] Hengartner, M. O. and Horvitz, H. R., 1994, *Cell*, **76**: 665－676.
[24] Pearson, G. R., et al., 1987, *Virology*, **160**: 151－161.
[25] Neilan, J. G., et al., 1993, *J. Virol.*, **67**: 4391－4394.