

Apoptin

——一种特异性地促进肿瘤细胞凋亡的蛋白质

陶冶 张靖溥*

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

摘要 鸡贫血病毒 (CAV) 的 vp3 基因编码的一种小蛋白质 apoptin, 可以通过独立于 p53 作用途径的、不被 Bcl-2 过量表达所抑制的方式, 诱导肿瘤细胞或转化细胞凋亡, 而对正常细胞不发挥作用. Apoptin 的这些特征使其可能成为一种有效的抗肿瘤药物, apoptin 诱导细胞凋亡的独特方式对于研究细胞转化机制和细胞凋亡途径也很有启发.

关键词 鸡贫血病毒, apoptin, 细胞凋亡, p53, Bcl-2

学科分类号 Q28

细胞凋亡 (apoptosis) 或细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 是多细胞生命过程中的重要内容. 在正常情况下, 凋亡是机体正常的发育分化和生理过程的保证, 当凋亡发生异常时, 会导致发育和组织器官功能异常、癌变发生以及自身性免疫疾病等现象. 由于凋亡与肿瘤发生密切相关, 所以对于凋亡, 人们除了研究其机理, 还力图将其应用于肿瘤的治疗; 除了开发已知的促凋亡基因外, 还积极寻找新的促凋亡基因. Apoptin 是来自鸡贫血病毒 (chicken anemia virus, CAV) 的一种小蛋白质. 近年来的研究发现, 它可以特异性地诱导人类多种肿瘤细胞和转化细胞的凋亡, 但并不作用于正常细胞, 这使得对 apoptin 及其基因 vp3 的应用可能成为治疗肿瘤的有效途径.

本文拟就 apoptin 的来源、结构特点、诱导凋亡的研究现状及潜在的应用价值作一概述.

1 鸡贫血病毒

鸡贫血病毒 (CAV) 首先发现于日本 (1979 年)^[1]. 它能感染幼鸡, 引起严重的贫血、胸腺萎缩、低血细胞比容值及体重下降^[2]. 此后, 在其他国家也分离到了 CAV^[3,4], 我国于 1996 年分离鉴定了 CAV^[2]. CAV 病毒颗粒很小, 直径只有 23 ~ 25 nm, 其基因组是一个环状单链 DNA 分子, 长约 2 300 nt^[5,6], 为负链; 从其双链复制中间体转录出一个多腺苷酸化多顺反子的 mRNA, 有三个部分重叠的主要阅读框, 编码 51.6, 24.0 和 13.6 ku 的三个多肽^[7], 分别称为 VP1、VP2、

VP3.

CAV 的病理效应主要是破坏骨髓中的成红细胞和胸腺皮质细胞^[8], CAV 是通过诱导细胞凋亡的方式破坏靶细胞的^[9]. 细胞凋亡可通过一些特征鉴定出来, 如: 电镜观察凋亡细胞会发现染色质先在核膜附近聚集, 然后形成包含核物质的凋亡小体, 最后这些凋亡小体被邻近未发生凋亡的细胞吸收. 生化分析显示, 当细胞发生凋亡时, 基因组 DNA 将发生片段化, 形成寡核苷酸序列梯^[10]. 用电镜和生化方法分析 CAV 感染的活体和离体培养细胞, 发现被感染细胞中出现凋亡小体样的结构、基因组 DNA 片段化形成寡核苷酸序列梯, 这些结果表明 CAV 引起的感染细胞的死亡为细胞凋亡^[9]. CAV 的这种诱导细胞凋亡的能力并非其特有的, 人获得性免疫缺陷病毒 (HIV-1)^[11]、腺病毒 (Ad)^[12]、人细小病毒 B19^[13] 等也有诱导感染细胞凋亡的能力.

对 CAV 诱导细胞凋亡机制的研究表明, CAV 的 vp3 基因编码的小蛋白质 VP3 诱导了这一过程^[14]. 因为 VP3 这种小蛋白质具有诱导凋亡的能力, 所以改称其为 apoptin^[15].

2 诱导肿瘤细胞凋亡的蛋白 apoptin

Apoptin 是一个含 121 个氨基酸的蛋白质, 它包含两段富含脯氨酸的序列和两个带正电的区

* 通讯联系人.

Tel: 010-62551218, E-mail: cqjp@public.east.net.cn

收稿日期: 2000-10-13, 接受日期: 2001-01-04

域^[7]. 在纯化的病毒颗粒中并没有 apoptin 存在, 用免疫分析和 DNA 分析证实 apoptin 是在被 CAV 感染的细胞中表达的^[6]. 体外免疫标记实验显示: 在感染的早期, apoptin 定位于细胞核染色质上; 在感染后期, apoptin 结合在发生凝缩的细胞核结构上 (此结构被称为凋亡小体). 构建 vp3 基因的表达载体瞬时转染转化了的鸡胸腺细胞株 MDCC-MSB1, 可观察到与 CAV 诱导的细胞凋亡相似的过程, 说明只表达 apoptin 就可以诱导细胞的凋亡^[14].

Apoptin 是怎样诱导细胞凋亡的呢? 一般来说, 凋亡可由多种病毒和非病毒的外界刺激引发, 各种因素引发凋亡后汇聚到一个共同的胞内信号通路, 导致内切酶的激活^[16]. 然而, apoptin 的氨基酸序列与调控凋亡的受体没有任何明显的同源性, 与诱导凋亡的 C-myc、P₅₃ 等癌基因的产物也不具备明显的同源性. Apoptin 也不可能是作为一种内切酶而起作用的, 因为 apoptin 与已知的内切酶也无任何同源性^[14]. Zhuang 等^[15] 用瞬时转染的方法使 apoptin 在含野生型、突变型 P₅₃ 基因及不含 P₅₃ 基因的三种人骨肉瘤 Saos-2 细胞中表达, 结果都诱导出现了凋亡, 说明 apoptin 诱导凋亡是独立于 p₅₃ 的^[15]. p₅₃ 介导的细胞凋亡可以被原癌基因 Bcl-2 的过量表达所抑制^[17], 而 apoptin 在高水平表达 Bcl-2 的人 DoHH-2 恶性 B 细胞及 EBV 转化的 JOB-0 B 细胞中仍可诱导凋亡^[18], 并且 Bcl-2 的过量表达还可刺激 apoptin 在骨肉瘤来源的 Saos-2 细胞中诱导凋亡^[19]. Apoptin 在表达凋亡抑制基因 BCR-ABL 的人白血病来源的 K562 细胞中, 也可诱导细胞凋亡^[18]. 所以, apoptin 诱导细胞凋亡有着其独特的途径. 目前对于 apoptin 诱导细胞凋亡的途径还有待研究, 但可以肯定它是在细胞凋亡信号传导通路的非常下游的位点起作用. 对于 apoptin 诱导细胞凋亡的机制, 有两种推测: 一种认为 apoptin 是通过破坏染色体超螺旋结构而引发凋亡, 因为 apoptin 分子很小且具有相当大的碱性, 这使它有可能与染色质结构中的组蛋白和/或非组蛋白相互作用, 从而出现在染色质结构中, 其较高的脯氨酸含量将导致超螺旋结构的破坏, 最终这些染色质结构的改变引起了基因组 DNA 片段化和染色质凝缩^[14]. 这种现象在鼠阉割后腹面前列腺细胞发生的凋亡中曾被观察到^[20]. 另一推测认为, apoptin 可能直接与组蛋白 H1 作用, 替代 H1 与染色质 DNA 结合, 从而使内切酶可以消化核内

DNA^[14]. Arends 等^[21] 就曾观察到凋亡过程中有寡核苷酸失去组蛋白 H1 这种现象. 这两种推测是否正确或者还有其他机制存在需要进一步地研究.

Apoptin 促进细胞凋亡的作用并非发生于所有种类的细胞. 体外培养的细胞瞬时转染 vp3 基因表达载体后, 用免疫荧光方法进行分析, 发现在人正常二倍体细胞如: 淋巴细胞、表皮细胞、内皮细胞和平滑肌细胞中 apoptin 不能诱导凋亡, 而在转化了的正常细胞如: 转化了的人前额成纤维细胞株 VH10 和人角膜细胞株 HaCaT 中 apoptin 可以诱导凋亡^[22]. 这些实验结果以及前面提到的 apoptin 可在人骨肉瘤细胞 Saos-2^[19]、DoHH-2 恶性 B 细胞及转化了的 JOB-0 B 细胞中诱导凋亡^[18] 的实验结果说明, apoptin 可在除 CAV 天然宿主细胞以外的细胞中诱导凋亡, 并且这些细胞都是肿瘤细胞或转化了的细胞, 在正常细胞中 apoptin 则不发挥凋亡作用. Apoptin 可能是第一个发现的特异性地在肿瘤或转化细胞中诱导凋亡的蛋白质, 虽然细小病毒的结构蛋白 NS1 也可以优先诱导增生性细胞的裂解, 但它是否通过细胞凋亡方式起作用尚不清楚^[23]. 关于 apoptin 诱导凋亡的细胞类型选择性的原因, 就已有实验结果表明, 这与 apoptin 在细胞中的定位有关: 在正常细胞中, apoptin 定位于细胞质; 在肿瘤及转化细胞中, apoptin 定位于细胞核^[22]. Apoptin 定位于细胞核上与其诱导细胞凋亡密切相关^[22]. Apoptin 含有两个核定位序列 (nuclear location sequence, NLS), 这两个核定位序列对于 apoptin 定位于细胞核上很重要, 截短的 apoptin 因缺少一个核定位序列而大部分定位于细胞质, 使得其诱导凋亡的能力大大下降^[14]. 对 apoptin 的进一步研究发现, 它还包含一个核输出序列 (nuclear export sequence, NES)^[22]. 我们对 apoptin 在不同种类细胞中定位不同的机制做如下推测: 在肿瘤或转化细胞中, apoptin 凭借其两个 NLS 进入细胞核, 进入核内后, 其部分序列与染色质结构结合, 这部分序列中包含 NES 位点, 使得 apoptin 聚集在核内不再从核输出; 在正常细胞中 apoptin 与细胞骨架部分或其他细胞结构因子结合, 使 apoptin 滞留在细胞质中, 无法进入细胞核 (图 1). 所以, 正常细胞和肿瘤/转化细胞中所含的结构因子或细胞骨架体系的不同导致了 apoptin 的定位不同. 我们通过实验已经证实了 apoptin 在肿瘤细胞中的核定位 (陶冶, 张靖溥. 生物化学与生物物理进展, 已接受), 接下来我们将研究正常

和肿瘤细胞的细胞骨架体系与 apoptin 的结合。

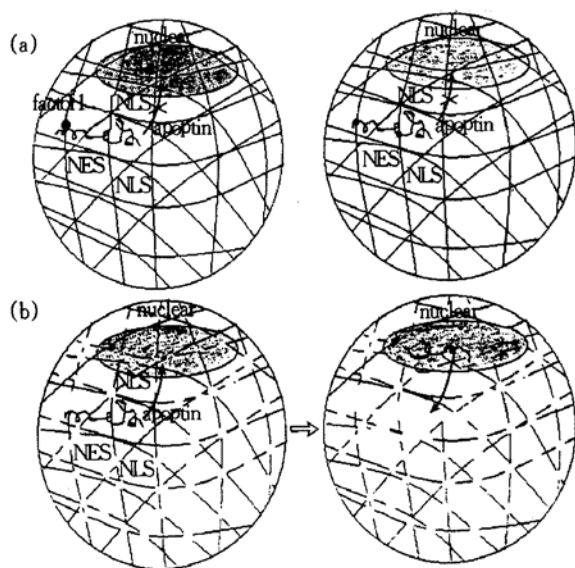


Fig. 1 The mechanisms of apoptin's localization in normal cells (a) and tumorigenic cells (b) (supposed)

图 1 Apoptin 在正常细胞和肿瘤细胞中定位的机制 (推测)

(a) 正常细胞; (b) 肿瘤细胞。

3 Apoptin 与肿瘤诊治

Apoptin 有希望成为一种有效的抗肿瘤药物。首先, apoptin 可选择性地诱导肿瘤细胞和转化细胞的凋亡, 而不诱导正常细胞的凋亡。如果作为抗肿瘤药物, 它的毒性将比其他缺乏细胞选择性的化疗和放疗手段低。其次, apoptin 不依赖于 p53 发挥作用, 并且其作用不被 Bcl-2 过量表达所抑制, 这使它优于一些通过诱导凋亡来发挥作用的化疗和放疗手段。因为, 一些化疗药物是通过激活 p53 途径来诱导凋亡的, 但在许多肿瘤细胞中 P53 基因发生突变, 使这些药物无法发挥作用; 而 apoptin 诱导凋亡是独立于 p53 的, 所以 p53 发生突变的细胞中仍可诱导凋亡。在一些肿瘤细胞中, Bcl-2、BCR-ABL 等原癌基因过量表达, 抑制细胞凋亡的发生, 使很多药物及放疗手段失效, 但 apoptin 不受影响, 照常发挥其诱导细胞凋亡的作用。

用人肝癌细胞活体致瘤裸鼠, 再用表达 vp3 基因的重组腺病毒处理裸鼠, 结果裸鼠体内肿瘤增长速度降低; 毒性实验表明, 实验裸鼠体内无明显异常^[23]。另外, 转染 vp3 基因的正常细胞可连续传代, 始终未发现任何异常毒理作用^[23]。这些结果表明 apoptin 用于肿瘤治疗可能是安全有效的。

Apoptin 能特异性地定位于肿瘤细胞和转化细

胞核上, 诱导细胞凋亡, 这一性质可用于检测癌前病变。Apoptin 甚至可检测出癌前更早期的易于癌变的细胞 (这些细胞含有肿瘤抑制基因等与肿瘤发生有关基因的突变), 例如: 在紫外光 (UV) 照射过的正常细胞和易于癌变的细胞中, 表达 vp3 基因可使易于癌变的细胞发生凋亡, apoptin 在其中的定位由 UV 照射前存在于细胞质中转移到定位于细胞核上^[24], 以此特点就可把易于癌变的细胞检测出来。

4 Apoptin 与细胞凋亡途径及细胞转化机制

Apoptin 可以成为阐明细胞转化机制的一种工具。因为, apoptin 只能诱导肿瘤细胞和转化细胞的凋亡, 而不能诱导正常二倍体细胞凋亡, 这表明转化细胞与正常细胞之间存在着对 apoptin 发挥凋亡作用有不同影响的信号传达途径、基因表达或特殊因子等, 所以, 对 apoptin 作用机理的研究可以成为揭示细胞转化机制的一种途径。

由于 apoptin 诱导细胞凋亡有其独特的途径, 对 apoptin 的研究将揭示这一途径, 再将其与其他细胞凋亡信号传导途径相联系, 则有助于揭示细胞凋亡的本质。

鸡贫血病毒的小蛋白 apoptin 由于可以特异性地诱导肿瘤或转化细胞凋亡, 而引起人们的研究兴趣; 对于它的研究将有助于揭示细胞发生转化的机制、细胞凋亡的途径; 开发它的应用将用于早期癌症的诊断、肿瘤的治疗等方面。目前对于 apoptin 的进一步研究将为作为治疗肿瘤的药物提供更多的理论依据, 将编码 apoptin 的 vp3 基因用于实验动物的基因治疗, 可为将来在医药领域应用提供实践经验。随着研究的深入, apoptin 的作用前景将会更加清楚。

参 考 文 献

- 1 Yuasa N, Tanniguchi T, Yoshida I. Isolation and some properties of an agent inducing anemia in chicks. *Avian Dis.* 1979, **23** (2): 366~ 385
- 2 Zhou W-P, Shen B, Yang B, *et al.* Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in China. *Avian Dis.* 1997, **41** (2): 361~ 364
- 3 Bulow V V. Infectious anemia. In: Calnek B W, Barnes H J, Beard C W, eds. *Diseases of Poultry*, 9th. Iowa State University Press, Ames. 1991. 690~ 699
- 4 McNulty M S. Chicken anemia agent. A review. *Avian Pathol.* 1991, **20** (1): 187~ 203
- 5 Gelderblom H, Kling S, Lurz R, *et al.* Morphological characterization of chicken anemia agent (CAA). *Arch Virol.* 1989, **109** (1~ 2): 118~ 120

- 6 Todd D, Creelan J L, Mackie D P, *et al.* Purification and biochemical characterization of chicken anemia agent. *J Gen Virol*, 1990, **71** (4): 819~ 823
- 7 Noteborn M H M, De Boer G F, van Roozelaar D J, *et al.* Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contain all elements for the infectious replication cycle. *J Virol*, 1991, **65** (6): 3131~ 3139
- 8 Jeurissen S H M, Pol J M A, de Boer G F. Transient depletion of cortical thymocytes induced by chicken anemia agent. *Thymus*, 1989, **14** (1~ 3): 115~ 123
- 9 Jeurissen S H M, Wagenaar F, Pol A J, *et al.* Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after *in vivo* infection and of cell lines after *in vitro* infection. *J Virol*, 1992, **66** (12): 7383 ~ 7388
- 10 Fawthrop D J, Boobis A R, Davies D S. Mechanisms of cell death. *Arch Toxicol*, 1991, **65** (6): 437~ 444
- 11 Li C J, Friedman D J, Wang C, *et al.* Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science*, 1995, **268** (5209): 429~ 431
- 12 Teodoro J G, Shore G C, Branton P E. Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both P53-dependent and P53-independent mechanisms. *Oncogene*, 1995, **11** (3): 467~ 474
- 13 Morey A L, Ferguson D J, Fleming K A. Ultrastructural features of fetal erythroid precursors infected with parvovirus B19 *in vitro*: evidence of cell death by apoptosis. *J Pathol*, 1993, **169** (2): 213~ 220
- 14 Noteborn M H M, Todd D, Verschuere C A J, *et al.* A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J Virol*, 1994, **68** (1): 346~ 351
- 15 Zhuang S-M, Shvarts A, van Ormondt H, *et al.* Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces P53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res*, 1995, **55** (3): 486~ 489
- 16 Martz E, Howell D M. CTL: virus control cells first and cytolytic cells second? *Immunol Today*, 1989, **10** (3): 79~ 86
- 17 Reed J C. Double identity for protein of the Bcl-2 family. *Nature*, 1997, **387** (6635): 773~ 776
- 18 Zhuang S-M, Landegent J E, Verschuere C A J, *et al.* Apoptin, a protein encoded by chicken anemia virus, induces cell death in various human hematologic malignant cells *in vitro*. *Leukemia*, 1995, **9** (S1): 118~ 120
- 19 Daner Van Oorschot A A M, Den Hollander A, Takayama S, *et al.* BAG-1 inhibits P53-induced but not apoptin-induced apoptosis. *Apoptosis*, 1997, **2** (1): 395~ 402
- 20 Kyprianou N, Isaacs J T. Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology*, 1988, **122** (2): 552~ 662
- 21 Arends M J, Morris R G, Wyllie A H. Apoptosis: the role of the endonucleases. *Am J pathol*, 1990, **136** (3): 593~ 608
- 22 Daner Van Oorschot A A M, Fisher D F, Grimbergen J M, *et al.* Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not normal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (11): 5843~ 5847
- 23 Noteborn M H M, Zhang Y-H, Alex J Van der Eb. Apoptin specifically causes apoptosis in tumor cells and after UV-treatment in untransformed cells from cancer prone individuals: A review. *Mutation Res*, 1998, **400** (1~ 2): 447~ 455
- 24 Zhang Y-H, Peter J A, Alex J Van der Eb, *et al.* The viral protein apoptin induces apoptosis in UV-c irradiated cells from individuals with various hereditary cancer prone syndromes. *Cancer Res*, 1999, **59** (12): 3010~ 3015

Apoptin: A Protein Which can Specifically Induce Apoptosis in Tumorigenic Cells

TAO Ye, ZHANG Jing-Pu*

(Institute of Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Chicken anemia virus vp3 gene encodes a small protein—Apoptin. It can induce apoptosis in tumorigenic or transformed cells but not in normal cells through a way that is independent of p53 reaction and can not be suppressed by the excessive expression of Bcl-2. All these facts make apoptin a potential antitumor agent. The unique way of apoptin inducing apoptosis is also useful to the study of the mechanisms of cell transformation and pathways of apoptosis.

Key words chicken anemia virus, apoptin, P53, Bcl-2

* Corresponding author. Tel: 86-10-62551218, E-mail: cqjp@public.east.net.cn

Received: October 13, 2000 Accepted: January 4, 2001