

凋亡诱导因子是线粒体内介导核凋亡的最主要蛋白质之一

于翠娟 孟艳玲 王成济 杨安钢*

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032)

摘要 凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 基因定位于 X 染色体上, 其编码产物是一种可直接介导细胞核凋亡的效应分子. 鼠 AIF 前体蛋白在胞浆中合成后, 通过其 N 端的线粒体定位信号 (MLS) 有效地穿入线粒体膜间隙, 然后在 102 位甘氨酸处水解掉 MLS, 其余部分再与黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 结合, 并重新折叠成为具有促凋亡潜能的成熟 AIF 分子, 分子质量为 57 ku. 当凋亡信号刺激时, AIF 分子从线粒体释放到胞浆, 然后转位到细胞核内, 引起染色体核周边凝集和 DNA 呈大片段断裂 (~ 50 kb). 该作用不受广谱 caspases 抑制剂 α -VAD.fmk 的抑制, 也不受 Bcl-2 过量表达的影响. 基因剔除实验表明, AIF 蛋白的促凋亡活性是胚胎小鼠形态发生过程中类胚体成腔所必需的, 而且是 AIF 独立作用的结果, 可以不依赖 caspase 3 的活性. 因此 AIF 介导的细胞凋亡可能代表了独立于 caspase 通路之外的另一条更原始、更保守的凋亡途径.

关键词 凋亡诱导因子, 细胞凋亡, 天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶, 线粒体

学科分类号 Q244

细胞凋亡是所有多细胞生物都具有的一种基本特性, 有其重要的生理意义. 目前普遍认为, 线粒体外膜完整性的破坏造成线粒体通透性增加, 使得平时定位于线粒体膜间隙的蛋白 Cyt c 等释放出来, 与胞浆因子 Apaf-1、ATP 以及 pro-caspase-9 等结合成为“凋亡诱导复合物”, 使 caspase-9 自催化激活, 引起下游效应 caspases (如 caspase-3, 6, 7 等) 的活化, 并进一步激活 CAD (caspase 活化的 DNase), 后者使核内染色体 DNA 降解为寡核苷酸片段. 但是, 在大部分胁迫诱导的哺乳动物凋亡模型中, caspases 的抑制并不能完全阻止细胞凋亡的发生. 近年来发现了一条由线粒体凋亡诱导因子 (AIF) 直接介导核内凋亡发生, 且独立于 caspase 信号通路之外的另一条途径^[1,2]. 本文对 AIF 介导细胞核凋亡的研究做一简要综述.

1 AIF 的发现及分子结构

1996 年, Susin 等发现: 当存在广谱 caspase 抑制剂 α -VAD.fmk 时, 鼠肝细胞线粒体膜间隙组分仍存在有促凋亡活性, 经过对银染的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 条带的蛋白质样品进行胰酶消化、串联质谱分析, 推测出其表达序列标签 (EST) 的序列并进行计算机检索, 最终鉴定出这种活性蛋白质, 并命名为凋亡诱导因子 (AIF).

用鼠 AIF 的全长 cDNA 作探针进行原位杂交, 检测出鼠 AIF 基因定位于 X 染色体的 A6 区, 而人

的 AIF 则位于 X 染色体的 Xq25~26 区 (EMBL Accession No. z81364), 即使在雌性个体也只有一条 X 染色体与 AIF cDNA 探针杂交.

AIF cDNA 编码 67 ku 的前体蛋白, 鼠 AIF (612 个氨基酸) 和人 AIF (613 个氨基酸) 分子具有高度保守性 (整个蛋白质有 92% 的同源性). AIF 前体蛋白具如下几个结构域: 从氨基端起, a. 氨基端 100 个氨基酸长度的线粒体定位信号 (MLS); b. 27 个氨基酸的 Spacer 序列; c. 核定位信号 (NLS); d. 羧基端 485 个氨基酸的氧化还原酶功能域, 这个区域与植物抗坏血酸还原酶及细菌 NADH-氧化还原酶具有高度同源性 (图 1).

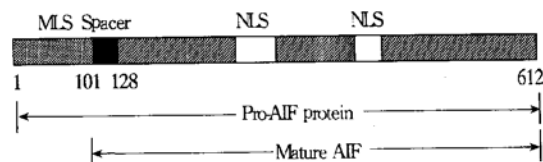


Fig. 1 Schematic diagram of construction of AIF protein

图 1 AIF 蛋白结构示意图

2 AIF 的亚细胞定位及组织分布

体外实验证明, 鼠 AIF mRNA 由基因组 DNA

* 通讯联系人.

Tel: 029-3376598, E-mail: agyang@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2001-10-19, 接受日期: 2001-12-27

编码, 前体蛋白在胞浆中合成后, 通过其 N 端的线粒体定位信号 (MLS) 有效地穿入线粒体膜间隙, 最终在前体蛋白 102 位甘氨酸处水解去除 MLS, 其余部分再与 FAD 基团相结合, 并重新折叠而成为具有凋亡潜能的成熟 AIF 分子, 分子质量为 57 ku^[1]. 用全长 AIF C 端融合表达 GFP 的基因瞬时转染 COS 细胞, 发现 GFP 选择性地定位于线粒体中, 然而, 用去除线粒体定位信号的截短型基因 C 端融合 GFP 的基因 AIF-GFP Δ 1-120 转染细胞, 发现融合蛋白在胞浆内呈弥散分布, 与单独转染 GFP 时的荧光分布情况完全相同^[3]. 与此相似, 未转染细胞用抗 AIF 的抗血清 (抗 AIF 151~200 肽段) 进行免疫荧光染色, 发现内源性 AIF 只存在于线粒体中.

免疫组化分析表明, AIF 在人的肌肉、骨髓、小肠、肝和皮肤等各种组织中都存在, 且定位于细胞富含线粒体的区域. 另外在各种细胞系中都检测到 AIF 蛋白的存在, 如外周血 T-淋巴细胞、CEM、Jurkat 细胞、HeLa 细胞、COS 细胞以及纤维母细胞等. 事实上, 几乎未检测到哪种细胞系或原发瘤中 AIF 蛋白完全缺乏. 因此, AIF 在各种正常组织及各种癌细胞系中均广泛表达.

3 AIF 的凋亡诱导活性

体外实验结果表明, 重组 AIF 分子能引起分离的细胞核中部分 DNA 的丢失、核周染色体凝集和 DNA 断裂大片段 (50 kb) 的生成. 这种作用不依赖于其他胞浆因子的存在, 且是快速的 (在 1 min 内实现). 但重组 AIF 分子并不造成纯化的细胞核中 DNA 断裂成小片段, 也不能切割纯化的质粒 DNA.

显微注射重组 AIF 分子到肝细胞胞浆中, 能引起线粒体跨膜电位的消失和 Cyt c 的释放、染色体的凝集、及细胞膜胞浆面磷脂酰丝氨酸的表面暴露等典型的凋亡现象. 这种变化也是快速的 (在 60~90 min 内完成), 且不受广谱 caspase 抑制剂 α -VAD.fmk 的抑制. 胞浆内一旦已有 AIF 存在时, Bcl2 的过量表达并不抑制其凋亡活性^[4].

重组体 AIF-GFP, AIF-GFP Δ 1-100 基因转染并过表达融合蛋白后, 可见 AIF-GFP 融合蛋白选择性定位于线粒体内. 用蛋白激酶抑制剂 Staurosporin (STS) 诱导凋亡时, 可观察到 AIF-GFP 从线粒体到胞浆再到细胞核内的迁移, 并同时观察到核内染色体凝集等凋亡特征及细胞死亡.

而 AIF-GFP Δ 1-100 的过表达可观察到同样的凋亡标志, 但由于其缺乏线粒体定位信号, 因而只能存在于线粒体外的空间^[3].

那么 AIF 是凋亡发生所必需的吗? 显微注射 AIF 的抗血清到用 STS 处理的 Rat-1 细胞胞浆中, 可阻止 STS 诱导的细胞凋亡; 当共注射过量免疫多肽中和掉抗 AIF 的抗体时, 对 STS 诱导的细胞凋亡解除. 显微注射 AIF 的抗血清到转染有重组 caspase-8 的 Rat-1 细胞中, 并不影响核内凋亡特征的出现. 用同源重组法构建 aif 基因敲除的胚胎干细胞 (aif^{-/-} ES 细胞), 发现 aif^{-/-} ES 细胞对多种凋亡刺激都是敏感的, 但对血清去除时的细胞凋亡有抵抗性^[2], 这说明至少在某些凋亡诱导剂存在时, AIF 是必需且足以介导凋亡发生的. 电镜观察的结果显示, AIF 介导的细胞死亡呈现出典型的凋亡形态特征, 如染色体凝集, 质膜出芽, 凋亡小体形成等. 体外模拟哺乳动物早期胚胎发生过程, 可发现 AIF 蛋白的凋亡活性是小鼠形态发生过程中类胚体成腔所必需的^[2]. AIF 蛋白表达的野生型 ES 细胞, Apaf-1^{-/-}、caspase-9^{-/-} 胚胎干细胞分化时成腔正常, 而 aif 基因敲除, 则 aif^{-/-} 小鼠胚胎死亡. 可见类胚体成腔过程中发生的细胞程序性死亡是 AIF 独立作用的结果, 可以不依赖于 caspase-3 的活性, 也可以与 Apaf-1 和 caspase-9 的作用解偶联. aif 基因缺乏使 aif^{-/-} ES 细胞成腔中的细胞凋亡完全受阻, 是 aif^{-/-} 小鼠胚胎死亡的直接原因.

4 联系线粒体和细胞核凋亡的两条独立通路

如前所述, 重组 AIF 分子注射入分离的细胞核中可引起核内部分 DNA 的丢失、外周染色体凝集和 DNA 断裂大片段 (50 kb) 的生成, 这是核凋亡的早期标志 (stage I)^[4]. 用各种凋亡诱导剂处理 Apaf-1^{-/-}、或 caspase-3^{-/-} 细胞时, 也观察到如上现象. 但与正常对照细胞相比, Apaf-1^{-/-} 或 caspase-3^{-/-} 细胞中没有 DNA 小片段的生成及更进一步的染色体凝集 (stage II). 即使向上述细胞中注射重组 AIF 分子, 其凋亡进程仍只停留于 stage I 阶段. 而注射入活性 caspase-3 或其下游效应分子 CAD, 将使细胞凋亡进入 stage II 阶段而呈现出更进一步的染色体凝集模式. 而且, 注射 CAD 于分离的 HeLa 细胞核也出现 stage II 的染色体凝集模式及生成 DNA 小片段. 在无细胞系统, 同时中和掉 AIF 和 CAD 才能抑制由凋亡细胞胞浆

成分引起的核内 DNA 降解^[5]。如上所述, 联系线粒体和核凋亡的至少有两条平行的通路共存, 一条依赖于 AIF 的线粒体外分布, 并导致大片段 DNA 断裂的产生和初期的外周染色体凝集。另一条依赖于 Cyt c、Apaf-1、caspases 和 CAD 的激活, 从而导致寡核苷酸样 DNA 小片段的生成和更进一步的染色体凝集。

AIF 介导了独立于 caspase 通路之外的另一条凋亡途径, 其凋亡活性是胚胎早期发育成腔所必需的。在所有后生动物中都发现有 AIF 的同源物, 而在植物、真菌或某些单细胞生物中就没有证据说明 caspase 的存在, 但它们都在进行着程序性细胞凋亡。所以有研究者提出, AIF 及 AIF 调节的凋亡, 构成了多细胞生物形态发生所需的一种原始的保守的程序性细胞凋亡途径。但是, 目前对胞浆中直接作用于 AIF 的上游蛋白及核内 AIF 的底物都不确定。而且 AIF 介导该凋亡通路的确切分子机制也不清楚, 这样 AIF 与其他参与染色体凝集和降解因子 (如 caspases、CAD、Acinus、Cyclophilin、Cathepsin B, 及 L-DNase II 等) 的关系层次如何, 以及如何进行信息交流, 仍有待进一步研究。

另外, 可能存在内源性的 AIF 抑制剂, 以阻止偶然情况下部分 AIF 的释放所引起的细胞凋亡, 并限定一个足以引起整个细胞死亡过程的 AIF 水平的阈值。总之参与这条凋亡途径的分子的确定, 及其遗传学、功能特征的阐明, 都将扩展我们对细胞凋亡的分子机理认识。而更引人注意的是, AIF 底物及 AIF 抑制剂的确定, 将导致新一类的细胞毒或细胞保护剂的产生; AIF 独特的作用机理, 也将使其具有更重要的用途。

参 考 文 献

- 1 Susin S A, Lorenao H K, Zamzami N, *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 1999, **397** (6718): 441~446
- 2 Joza N, Susin S A, Daugas E, *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 2001, **410** (6828): 549~554
- 3 Leoffler M, Daugas E, Susin S A, *et al.* Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J*, 2001, **15** (3): 758~767
- 4 Daugas E, Susin S A, Zamzami N, *et al.* Mitochondrial nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J*, 2000, **14** (5): 729~739
- 5 Susin S A, Daugas E, Ravagnan L, *et al.* Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*, 2000, **192** (4): 571~579

AIF is One of the Critical Mitochondrial Proteins to Mediate Nuclear Apoptosis

YU Cu-Juan, MENG Yan-Ling, WANG Cheng-Ji, YANG An-Gang*

(Department of Biochemistry & Molecular Biology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract Apoptosis-inducing factor (AIF), whose gene lies in X-chromosome, is likely an apoptogenic effector protein to mediate nuclear apoptosis directly. Once synthesized in the cytoplasm, the mouse AIF-precursor preprotein can be effectively imported into the mitochondrial intermembrane space through its N-terminal mitochondrial localization sequence (MLS). Then the MLS is cut off at position Gly 102 of the full-length preprotein, and the remains is refolded and bound with FAD group to produce the apoptogenic mature AIF, with a relative molecular mass of 57 ku. When death stimuli present, AIF is released from mitochondria to the cytoplasm and then to the nucleus, inducing peripheral chromatin condensation and large-scale fragmentation of DNA (~50 kb). These effects cannot be prevented either by the presence of wide-spectrum caspase inhibitor z-VAD.fmk or by the overexpression of Bcl-2. The evidences of gene knockout experiments indicate that AIF is essential for the cavitation of embryoid bodies during mouse morphogenesis, and the cavitation can be caused by AIF itself, independent on caspase-3 activity. Therefore, AIF-mediated cell death maybe constitutes a caspases-independent, more ancient and conserved apoptosis pathway.

Key words apoptosis-inducing factor, apoptosis, caspases, mitochondria

* Corresponding author. Tel: 86-29-3376598, E-mail: agyang@fmmu.edu.cn

Received: October 19, 2001 Accepted: December 27, 2001