

文章编号: 1007-4627(2005)02-0229-04

## 特异性抗癌因子——凋亡素\*

魏 巍<sup>1,3</sup>, 苏 旭<sup>2</sup>, 李文建<sup>1</sup>, 刘建香<sup>2</sup>, 张 红<sup>1</sup>

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学研究所, 北京 100088;

3 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘 要:** 凋亡素是一种抗癌因子, 能以非 p53 依赖性途径诱导不同类型人肿瘤细胞的凋亡, 不受 Bcl-2 的抑制作用, 且对正常细胞不起作用。根据凋亡素的肿瘤特异性, 可将其作为一种极具潜力的抗肿瘤生物制剂, 在人体内大量传递给肿瘤细胞, 有选择性地根除肿瘤细胞。论述了凋亡素抗肿瘤细胞的作用机理, 并对其应用现状、前景及进一步研究的主要问题予以简要评述。

**关键词:** 凋亡素; 细胞凋亡; 肿瘤基因治疗

**中图分类号:** Q7; Q691 **文献标识码:** A

### 1 引言

细胞凋亡是机体清除多余、变异或恶化细胞的一种主动、程序化的生理过程。该过程的紊乱与肿瘤的发生密切相关。近年来, 病毒基因产物对细胞的调节作用逐渐引起人们的重视。鸡贫血病毒(CAV)就是一种诱导细胞凋亡的新病毒。凋亡素是 CAV 的 vp3 基因产生的蛋白质, 主要引起鸡淋巴细胞凋亡<sup>[1,2]</sup>。研究发现, 凋亡素由于具有抗肿瘤特异性及诱导肿瘤细胞凋亡时的非 p53 依赖性<sup>[3]</sup>, 可作为一种极具潜力的抗癌基因治疗一些常见癌症。这一诱人的基因治疗策略可能会给肿瘤的基因治疗带来广阔的前景。

### 2 CAV 基因组的结构特性及凋亡素的命名

1979 年 Yuasa 等<sup>[4]</sup>在调查 Marek 流行病时首先分离了 CAV, 它是一种无囊膜的呈二十面体的小病毒, 最近将其归属为 Circoviridae 新病毒类——圆环病毒科<sup>[5]</sup>。CAV 的致病性在于: 在特定细胞内, CAV 诱导自身 DNA 单链修饰效应, 促进 DNA 滚环复制和基因表达, 从而诱导细胞凋亡。Noteborn 等<sup>[1]</sup>于 1991 年首先分析了 CAV 的全部

基因组。分析结果显示, 完整的 CAV 病毒颗粒平均直径约 23.5—25 nm, DNA 为类型独特的环状单链(负链), 含有一个分子量约 50 kD 的主要衣壳多肽。CAV 基因组只产生一个转录子, 可能仅含有一个启动子和一个 poly(A)附加信号。DNA 正链上有 3 个部分重叠的开放阅读框(ORF), 即 vp1, vp2 和 vp3, 分别编码分子量为 516 000, 24 000 和 13 600 的多肽。50 kD 的主要衣壳多肽就是由最大的 vp1 所编码; vp2 为病毒组装过程中所需的一种支架蛋白; vp3 被认为是 CAV 的功能蛋白, 由 121 个氨基酸组成, 具有 2 个富含脯氨酸的序列和 2 个正电荷区, 其 C 端碱性区被认为是细胞核定位信号和 DNA 的结合区域。在纯化的 CAV 颗粒中没有 vp3 蛋白, 而在 CAV 感染的细胞中, vp3 蛋白似乎对病毒的生命周期十分重要。CAV 具有高度保守性, 计算机序列分析显示, 这些 ORF 编码的蛋白质的氨基酸顺序与那些已知的病毒和细胞蛋白质没有任何同源性。

Noteborn 等<sup>[1]</sup>深入研究了 CAV 感染细胞的免疫学特性。利用抗 vp3 蛋白的特异性抗体 MAbs3B1 和 MAbs 85.1, 在几个时间点用免疫组化法染色 CAV 感染的 MDCC-MSB1 细胞, 发现

收稿日期: 2004-10-27; 修改日期: 2004-11-26

\* 基金项目: 科技部重大基础研究前期专项基金资助项目(2003CCB00200); 加速器射线束治疗癌症的若干重要物理问题的研发基金资助项目(103350502)

作者简介: 魏 巍(1980—), 女(汉族), 甘肃兰州人, 研究生, 从事辐照生物学研究; E-mail: smileb340@sina.com

CAV 感染后 24 h, 细胞核内出现与 MAbs85.1 结合的 vp3 蛋白, 呈微弱细颗粒状分布, 感染后 64 h 形成十分明显的聚集体, 并呈现清晰可见的 CAV 诱导的特异性细胞病理效应。利用免疫电镜观察到, 在 CAV 感染的细胞核中, MAbs3B1 与许多电子密度状的凋亡结构紧密结合。显然, 这是 vp3 蛋白在这些凋亡结构中的聚集。Noteborn 等<sup>[6]</sup>构建了仅表达 vp3 基因的 pRSV-vp3 载体用以转染鸡有核 T 淋巴细胞, 发现 48 h 后约 60% 感染细胞的核内有 vp3 细颗粒。在仅表达 vp3 蛋白的一些其它类型鸡细胞中, 也得到同样的结果, 说明仅由 vp3 基因就可诱导细胞凋亡。因此 Noteborn 研究小组<sup>[7]</sup>于 1995 年根据 vp3 蛋白具有诱导细胞凋亡的功能, 将其命名为细胞凋亡素。

### 3 凋亡素的抗肿瘤效应

Noteborn 等<sup>[7]</sup>应用重组缺陷性腺病毒(rAdV)与 CAV 的 vp3 基因片段成功地构建了能产生凋亡素的载体 AdMLPvp3 和对照病毒载体 AdMLPas, 并以 AdCMVlacZ 为对照作为细胞死亡的背景值分别感染原发性鼠肝癌细胞和人肝癌细胞 Hep3b 及 HepG2(不考虑其相应的 p53 功能), 发现产生凋亡素的肝癌细胞约有 70%—80% 死亡, 而表达两种基因的原发性鼠肝细胞的死亡率没有显著差异。初步判定肿瘤细胞或转化细胞对 AdMLPvp3 表达的凋亡素具有很高的敏感性, 而正常细胞则没有作用。这一结论在角质形成细胞、成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、T 细胞、鳞癌细胞(VH10)、骨肉瘤细胞(U20s 和 Saos-2)和人白血病细胞(KG-1, K562, DOHH-2)中也得到了证实。孙大辉等<sup>[8]</sup>在研究凋亡素对骨肉瘤 OS-732 多药耐药株(R-OS-732)细胞的影响时发现凋亡素对 R-OS-732 细胞生长具有抑制作用并导致细胞骨架破坏。

#### 3.1 凋亡素的毒性效应

Pietersen 等<sup>[9]</sup>对 AdMLPvp3 可能存在的毒性效应进行了研究。对健康鼠分别以皮下、腹膜和静脉 3 种不同方式注射  $2 \times 10^9$  pfu (particle forming unit) 的 AdMLPvp3、AdMLPas 或生理盐水, 结果病毒转染组与生理盐水对照组一样对肝细胞无明显损伤, 同时用显微镜观察心、肺、脾、皮肤和睾丸等组织, 也未发现有明显的病理变化。大剂量

AdMLPvp3 转染动物后, 也未观察到明显的毒副作用。

#### 3.2 凋亡素的凋亡效应

目前肿瘤治疗中, 化疗制剂和辐射多是通过野生型 p53 诱导肿瘤细胞凋亡的。虽然其中有些也可以经非 p53 方式诱导, 但大多数肿瘤在其发展中却往往发生 p53 突变, 从而影响治疗的效果, 所以寻求非野生型 p53 依赖的特异性抗癌因子意义重大。Pietersen 等<sup>[9]</sup>分别用酶免疫荧光分析(DAPI)和原位缺口末端标记(TUNEL)分析, 观察 AdMLPvp3 或 AdCMVlacZ 感染的 HepG2 细胞 DNA 链断裂情况和产生凋亡蛋白的细胞数, 证实体外 AdMLPvp3 感染 HepG2 细胞引起的杀伤效应是通过凋亡途径实现的。Zhuang 等<sup>[3]</sup>研究了凋亡素对不同 p53 基因型肿瘤细胞的凋亡诱导效应。对人成骨肉瘤细胞 U20s(p53 野生型)和 Saos-2(p53 不表达型)、人肝癌细胞 Hep3b(p53 缺失型)和人肾杆状瘤病毒 G401(p53 野生型)的转染实验证明, 不论 p53 表达与否, 凋亡素均能诱导这些肿瘤细胞的凋亡。已知 p53 的失活不仅是由于缺失或点突变, 也可由于 DNA 肿瘤病毒蛋白(如 SV40 大 T 抗原或腺病毒蛋白 E1B-55K 蛋白)与之直接结合所致。Zhuang 等<sup>[3]</sup>和 Danen 等<sup>[10]</sup>证明, 在不同人肿瘤细胞中, E1B-55K 或 SV40 大 T 抗原与凋亡素的共同表达不阻止凋亡素诱导的细胞凋亡。从而进一步证明凋亡素诱导的细胞凋亡不需要 p53 介导。此外, Zhuang 等<sup>[11-12]</sup>还发现, 凋亡素诱导的凋亡也不受抑制性凋亡因子 Bcl-2, Bcr-abl 和一种与 Bcl-2 相关的蛋白 BAG-1 生成的影响。

凋亡蛋白在体内产生的效应同样令人关注。Pietersen<sup>[9]</sup>发现, 注射 AdMLPvp3 的小鼠肿瘤和注射生理盐水与 AdMLPas 的相比, 生长明显减慢, 生长率也明显降低。另外, 注射 AdMLPvp3 的肿瘤在显微镜下显示外观苍白, 含囊泡样结构, 组织检查显示其瘤体中血管组织很少, 可能与凋亡素在诱导凋亡的过程中减少了刺激血管产生的因子有关。田俊等<sup>[13]</sup>将构建的真核表达载体 pcDNA-vp3 导入小鼠腹水型肝癌细胞 H22, 接种于 BALB/c 小鼠皮下, 观察 vp3 基因体内抑瘤效应, 结果表明 vp3 基因对肿瘤的生长有一定的抑制作用。在两组实验中, 200  $\mu$ g 裸 DNA 注射组, vp3 基因抑瘤率为

55.77%; 300  $\mu\text{g}$  裸 DNA 注射组, vp3 基因的抑瘤率为 90.15%。由此推断, vp3 基因在体内的抑瘤效应可能存在一定的剂量依赖性。

#### 4 凋亡素的抗肿瘤机制

在凋亡素诱导凋亡的过程中仅涉及凋亡信号转导途径的下游天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)。初步研究未发现凋亡素的氨基酸顺序与介导凋亡的受体或 c-myc 和 p53 等诱导凋亡的癌基因产物的顺序有任何显著同源性, 所以凋亡素具有后者活性的可能性不大。同时计算机分析也没有显示凋亡素与任何一种已知的内切核酸酶有顺序同源性, 从而否定了它充当内切核酸酶的可能性。

免疫分析发现, 在转化细胞和肿瘤细胞中, 在其出现典型的凋亡形态以前, 凋亡素主要以细颗粒状分布在核内, 与染色体和核仁协同定位, 此时细胞尚未受损。随着凋亡素的积累, 细胞 DNA 结构逐渐浓缩和降解, 细胞以凋亡方式死去。而在正常细胞中, 凋亡素主要分布在胞质中, 集中环绕在细胞核周围, 以小颗粒状和大块状分布, 不诱导细胞凋亡。由此看来, 凋亡素对肿瘤细胞的杀伤性似乎与其核定位密切相关。为了研究凋亡素如何在诱导肿瘤细胞凋亡时进行核定位, Danen 等<sup>[14]</sup>首先论证了凋亡素的 C 端含有一个双向核定位信号与两个不同的独立诱导凋亡的区域, 在对这两个区域的研究中均发现核定位和杀伤活性之间有强烈的联系。在利用抑制剂排除了基因再次转录和转染的可能性后, 发现凋亡素自身并没有任何显著的转录抑制活性, 这就提示了凋亡素是通过其它方法发挥其在细胞核中的效应的。为了确定核定位能否足以促使凋亡素杀伤正常细胞和非转化细胞, Danen 等在这些肿瘤细胞中将原始长度的凋亡素与不同的核定位信号结合在一起。然而却发现不论凋亡素的核定位如何, 均不能引起凋亡。这就暗示了核定位本身并不足以赋予凋亡素活性。Leliveld 等<sup>[15]</sup>发现, 在体外凋亡素能与 DNA 共同形成明显的超级结构, 这就解释了为什么凋亡素总是选择 DNA 密集核体的原因。这些超级结构的直径不超过 200 nm, 含有最多 20 个多边凋亡素联合体和不大于 3 kb 的 DNA。此外还发现, 单个凋亡素多聚体有 8 个独立的、非特异性的 DNA 结合位点, 偏向于结合链的末端, 也能联合起来结合更长的 DNA。凋亡素对裸露的、未

修饰的单链、双链 DNA 及 DNA 纤维末端的高亲和性提示, 在体内凋亡素也能捕获超级结构中同样的 DNA。因为这些形式的 DNA 通常存在于有转录活性的、正在复制的和已受损的 DNA 中, 所以凋亡素可通过干扰 DNA 的转录与合成来激发凋亡。

凋亡素的 C 端碱性特征可能是使其与细胞 DNA 结合的主要原因。在 pCMV-tr 转染实验中, 由于 C 端碱性区[细胞核定位信号和(或)DNA 结合区域]被截断, 造成凋亡素缺少一段公认的核定位信号, 因此运入核内的效率下降, 滞留于胞质, 但截断并没有使其诱导凋亡的活性完全丧失, 只是降低了诱发凋亡的比率。

Danen-Van Oorschot 等<sup>[16]</sup>研究了引起哺乳动物细胞凋亡的重要物质 caspase, 使用特异性抗体可检测出表达凋亡素和正在凋亡的细胞中有活性 caspase-3。虽然凋亡素活性不受细胞因子应答修饰体 A(CrmA)的影响, 但由于核形态学的原因, p35 可抑制凋亡素诱导的凋亡。研究发现, 既表达凋亡素又表达 p35 的细胞在核形态学上只有细微的变化。在大多数表达凋亡素的和正在凋亡的细胞中仍存在细胞色素 c, 线粒体也没有被分子探针 CMX-Ros 染色, 这说明线粒体的膜电压下降。实验结果提示, 虽然最终的凋亡事件由 p35 阻断, 但部分影响线粒体的上游凋亡途径已经由凋亡素激活了。总之, 凋亡素是利用细胞凋亡因子诱导凋亡的。虽然不需要激活上游的 caspase, 但激活 caspase-3 和其它下游 caspase 对凋亡素快速诱导凋亡很重要。

#### 5 凋亡素的应用前景及尚待解决的问题

尽管人们通常通过对肿瘤细胞靶向特异性载体、肿瘤特异性表达转基因或局部给予基因转移载体等方法提高对肿瘤治疗的特异性, 但实效不大。凋亡素能特异性诱导肿瘤细胞凋亡在肿瘤治疗中体现了巨大的潜力。体外研究已证明凋亡素能诱导肿瘤细胞但不诱导正常细胞的凋亡, 这预示凋亡素体内治疗的毒性效应将会很低, 机体有较好的耐受性。这使得重复较大剂量转染, 以提高其在体内的浓度, 从而提高治疗效果。肿瘤化疗药物多以 p53 依赖性途径诱导细胞凋亡, 而许多肿瘤在发生过程中丧失了 p53 功能。因此, 通过凋亡素的非 p53 依赖性途径诱导细胞凋亡或许是治疗肿瘤的一种更有

效的手段。此外,凋亡素用于肿瘤治疗的另一优点是其诱导的细胞凋亡不受 Bcl-2 的抑制,这就解决了肿瘤发生过程中伴随的抑制细胞凋亡的 Bcl-2 蛋白高水平表达的问题。对于凋亡素作用机制的深入研究可为研究细胞转化和肿瘤发生机制提供一些分子生物学基础的新认识。就目前的研究结果来看,凋亡素在 CAV 病毒生命周期中的自然功能尚不清楚。为什么 CAV 能诱导细胞凋亡,而其它病毒却抑制细胞凋亡仍是个谜。凋亡素在体外诱导肿瘤细胞而不诱导正常细胞凋亡这一现象,是否暗示着凋

亡素与细胞凋亡敏感性之间存在着某种相关性?凋亡素在细胞凋亡级联反应中与其它细胞因子的相关性如何?这些问题都有待进一步的研究。目前,国内对 CAV 的研究仅限于疫苗研制阶段,对凋亡素凋亡诱导效应的研究正在兴起,所以构建含 vp3 基因的重组体并研究其功能势在必行。将凋亡素应用于肿瘤的基因治疗,或与放射治疗相结合以更有效的发挥和增强该效应,则是今后的研究方向。毋庸置疑的是凋亡素作为一种抗肿瘤生物制剂用于肿瘤治疗,可望开辟一条崭新的抗肿瘤途径。

### 参 考 文 献:

- [1] Noteborn M H, De Boer G F, Van Roozelaar D J, *et al.* Journal of Virology, 1991, **65**: 3 131.
- [2] Noteborn M H, Onno Kranenburg, Alt Zantema, *et al.* Gene, 1992, **118**: 267.
- [3] Zhuang S M, Avi Shvarts, Hans van Ormondt, *et al.* Cancer Research, 1995, **55**: 486.
- [4] Yuasa N, Taniguchi T, Yoshida I. Avian Diseases, 1979, **23**: 366.
- [5] 陆承平. 中国兽医学报, 1996, **16**(1): 94.
- [6] Noteborn M H, TODD D, Verschuereen C A J, *et al.* Journal of Virology, 1994, **68**: 346.
- [7] Noteborn M H, Koch G. Avian Pathol, 1995, **24**: 11.
- [8] 孙大辉, 谷贵山, 金宁一. 2002 International Osteoporosis Conference.
- [9] Pietersen A M, van der Eb M M, Rademaker H J, *et al.* Gene Therapy, 1999, **6**: 882.
- [10] Danen A M, Fischer D F, Grimbergen J M, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94**: 5 843.
- [11] Zhuang S M, James E Landegent, Claudia A J Verschuereen, *et al.* Leukemia, 1995, **9**(suppl 1): 118.
- [12] Zhuang S M, Shvarts A, Jochemsen A G, *et al.* Carcinogenesis, 1995, **16**: 2 939.
- [13] 田俊, 王宇哲, 申志发. 华中科技大学学报(医学版), 2003, **1**: 7.
- [14] Danen-Van Oorschot A A, Zhang Yinghui, Rutger Leliveld S, *et al.* J Biol Chem, 2003, **278**: 27 729.
- [15] Leliveld Sirik R, Remus T Dame, Mieke A Mommaas, *et al.* Nucleic Acids Research, 2003, **31**: 4 805.
- [16] Danen-Van Oorschot A A, Van der Eb A J, Noteborn M H, *et al.* Journal of Virology, 2000, **74** (15): 7 072.

## Specific Anti-tumor Gene——Apoptin<sup>\*</sup>

WEI Wei<sup>1,3</sup>, SU Xu<sup>2</sup>, LI Wen-Jian<sup>1</sup>, LIU Jian-Xiang<sup>2</sup>, ZHANG Hong<sup>1</sup>

(1 Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2 National Institute for Radiological Protection, China CDC, Beijing 100088, China;

3 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** Apoptin is an anti-cancer gene. It can induce p53-independent, Bcl-2-insensitive type of apoptosis in various human tumor cells, and fails to induce programmed cell death in normal cell. Because of having tumor specificity, apoptin can be transferred enough to tumor-cell in vivo, selectly kill the tumor as a potential anti-tumor biological preparation. In this paper, we provide a brief review on the anti-cancer mechanism of apoptin, current status and application prospect, and the main issues in apoptin studies.

**Key words:** apoptin; cell apoptosis; tumor gene therapy

<sup>\*</sup> **Foundation item:** Dedicated Project of National Key Basic Research of Science and Technology Ministry of China(2003CCB00200); Study of Some Important Physical Problems in Cancer Therapy with Accelerator Ray Beams(103350502)