

- 35 van den Brink EN, Ter Meulen J, Cox F, et al. Molecular and biological characterization of human monoclonal antibodies binding to the spike and nucleocapsid proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*, 2005, 79(3):1635-1644.
- 36 Greenough TC, Babcock GJ, Roberts A, et al. Development and characterization of a severe acute respiratory syndrome-associated

coronavirus-neutralizing human monoclonal antibody that provides effective immunoprophylaxis in mice. *J Infect Dis*, 2005, 191(4): 507-514. Epub 2005 Jan 14.

(2005-01-23 收稿; 2005-03-15 修回)

流感病毒诱导细胞凋亡的研究进展

王欢综述 吴中明 审校

细胞凋亡(apoptosis)是个体发育过程中基因调控下的细胞自杀活动,是多细胞有机体为调控机体发育、维护内环境稳定,由基因编码程序的细胞主动死亡过程。细胞首先接收、识别某些特殊的生理或病理性刺激信号,然后启动细胞特有的基因或基因群,通过 mRNA 转录,合成一组致死效应的蛋白质,从而导致细胞解体、死亡。细胞凋亡是机体对外界刺激进行主动应答的过程,贯穿于机体的整个生命活动过程,包括胚胎的发育、新旧细胞的交替、某些组织的正常退化与萎缩、增生成肿瘤细胞的自发抑制等。凋亡的主要形态学变化特征是细胞核染色质固缩和裂解,染色质密度增高,并聚集在核膜周边呈半月形,核仁裂解,进而胞膜内陷将细胞分割为多个外有膜包裹、内有完整细胞器的小体,称为凋亡小体(apoptotic bodies),多数小体含有核成分。凋亡细胞在核酸酶的作用下,其 DNA 降解成寡核苷酸片段,在琼脂糖凝胶电泳中呈现阶梯状条带图谱,这些条带由不同倍数的 180~200 个碱基对的核苷酸片段组成。在多数情况下,细胞凋亡为自然发生,但也可由一些毒性因子诱发。本文拟就流感病毒诱导细胞凋亡方面的研究作一综述。

流感病毒是急性呼吸道传染病流感的病原体。Takizawa 等^[2]在对其致病机制进行研究时发现,体外培养 MDCK 和 HeLa 细胞在感染人甲型流感病毒之后,细胞出现染色质浓缩、凝聚、凋亡小体形成、提取 DNA 进行电泳呈典型“阶梯状”条带等一系列凋亡特有的变化,故首次提出:流感病毒可以诱导体外培养的细胞发生凋亡。在进一步研究之后,他还指出^[1]:在流感病毒诱导细胞凋亡的过程中, Fas、FasL、PKR 以及病毒的 NS-1 蛋白、NA、PB1-F2 都

起到一定的作用。Mori 等^[3]用甲型流感病毒对小鼠进行鼻腔滴注,出现了呼吸道黏膜细胞和淋巴细胞凋亡的现象,提示流感病毒在体内也能引起细胞凋亡。之后,Hechtfisher^[4]、Price^[5]、Hofmann^[6]等用不同型或亚型或株感染不同细胞(如:淋巴细胞、巨噬细胞、脑细胞等)都观察到凋亡现象。

目前,关于流感病毒诱导细胞凋亡的机制有以下几种看法,认为与其相关的物质有:Fas、caspase、NA、TGF- β 、PKR、NS、PB1-F2 等^[1]。

一、流感病毒诱导 Fas 基因和 FasL 基因表达, Fas 分子 N 端的死亡信号激域(FADD)和 FasL 相结合,引起一系列凋亡反应

Fas(也称为 CD95 或 APO-1)属于肿瘤坏死因子/神经生长因子受体(TNFR/NGFR)超家族,是 I 型跨膜糖蛋白,分子量约为 45KD。膜内 C 端有一个约 80 个氨基酸组成的死亡域(DD),此胞浆死亡域对于将胞外死亡信号传递到胞内,导致细胞凋亡是必需的。FasL 属 TNF 家族成员,是 Fas 的天然配体,为 II 型转运膜蛋白, Fas-FasL 结合后,首先使 Fas 形成能传递信号的活性形式-三聚体,与 Fas 发生反应的蛋白是 FADD(Fas 死亡结构域相关蛋白)此蛋白的 C 末端也有一个 DD,与 Fas 的 DD 同源, Fas 与 FADD 能通过 DD 形成二聚体而相互作用。FADD 末端称为死亡效应结构域(death effector domain,DED),该结构负责将凋亡信号传递至 caspase-8。caspase-8 再通过直接或间接途径裂解和活化 caspase 家族的其他分子,如 caspase-1, 3, 6, 7。caspase 通过对底物降解可转导凋亡信号或直接作为凋亡的效应分子促进细胞骨架降解和 DNA 片段化,凋亡发生。

Takizawa T 等在用流感病毒感染体外培养的 MDCK 和 HeLa 细胞时就发现,在感染的早期阶段可

诱导 Fas 表达于细胞表面,认为 Fas 抗原可以编码一种可能有凋亡作用的分子。1997 年 Matsumura 等^[7]提出流感病毒感染 Hela 细胞后,在凋亡发生以前细胞表面 Fas 以及 FasL 的数量增加,而且加入抗 FasL 的抗体后凋亡可被抑制。继此之后,有较多学者均认为^[8,9,10]流感病毒感染细胞后可以增加 Fas 和 FasL 的表达,当受感染的细胞相互接触时能够诱导凋亡的发生,而且此凋亡作用能被抗 FasL 的抗体所抑制。

二、流感病毒通过其表面的神经氨酸酶(neuraminidase, NA)激活转化生长因子 β (Transforming Growth Factor β , TGF- β),从而诱导感染细胞发生凋亡

在对 TGF- β 最初的研究中, Delarco 及 Todaro^[11]发现,被 Moloney 肿瘤病毒转化的小鼠 3T3 细胞培养上清中有一种多肽,可诱导非肿瘤细胞转化为失去接触抑制、获得具有在软琼脂中生长能力的肿瘤细胞,当时称作肉瘤生长因子(SGF)。由于在其他肿瘤细胞的酸乙醇提取物中也发现有同样的活性,因而又更名为转化生长因子。以后又发现其转化能力是由两种完全不同的多肽共同完成的,它们分别被命名为 TGF- α 和 TGF- β 。TGF- β 不仅参与细胞的生长和细胞的恶性转化,同时还能诱导细胞凋亡。如 Liao JH 等^[12]研究发现:TGF- β 1 能够诱导鼠肝细胞 AML12 发生凋亡,且认为该过程与 p38 基因的表达有关。

在许多病理生理条件下,包括病毒感染时, TGF- β 的数量及活性会增高,如:在马流感病毒感染 MDCK 细胞过程中, TGF- β 1 增加,从而激发 JNK/SAPK 信号途径的开始^[13]。Schultz-Cherry S 等^[14]于 1996 年首次报道,用流感病毒感染小鼠,1 天后具有活性的 TGF- β 水平增高。进一步研究显示,流感病毒的 NA 糖蛋白可以激活潜在的 TGF- β ,从而引起细胞发生凋亡。另外,该细胞凋亡在一定程度上会被 TGF- β 特异性抗体所抑制。2002 年 Morris SJ 等^[15]也报道,由流感病毒引起的凋亡可以被抗神经氨酸酶复合物所抑制,而且流感病毒诱导细胞凋亡的作用会被由 NA 激活的 TGF- β 的抗体所取消。但实验中发现,即使是在药物达到完全抑制 NA 活性的浓度后,仍不能完全抑制凋亡。这就说明,流感病毒诱导细胞凋亡可能通过不止一条途径完成。

三、PKR(double-stranded RNA-activated protein kinase)与细胞凋亡

PKR 是由干扰素诱生的双链 RNA 活化的丝氨

酸/苏氨酸蛋白激酶,它与病毒的发病机制、细胞生长及凋亡有着密切的关系^[16]。Takizawa T 等研究认为流感病毒诱导的细胞凋亡与 PKR 有关^[17]。在流感病毒诱导细胞凋亡的过程中,PKR 能够调控几条重要的细胞信号途径因而具有重要的效应,其中较为重要的一个就是能够增加干扰素的数量及活性^[18]。Ohyama K 等研究提出^[19]:流感病毒感染人子宫颈成纤维细胞 HCF 后主要是通过 β 干扰素的表达而诱导其发生凋亡,而 β 干扰素的表达受到 dsRNA 调节。还有研究表明 PKR 活化可以诱导 TNFR 家族成员包括 Fas 和前凋亡因子 Bax 的表达^[20],且在 PKR 活化过程中,Fas mRNA 表达上调^[21]。故有学者认为:PKR 能够诱导细胞凋亡,并且与 Fas 介导的凋亡过程有关^[16]。至于 PKR 是如何被活化的,目前尚不清楚。

另有学者指出^[21,22]:PKR 诱导的细胞凋亡与 eIF-2 α 的磷酸化及 NF- κ B 有关。

四、NS 与细胞凋亡

流感病毒 NS(nonstructural)基因是其内部基因组中最小的基因片段,它转录成的共线性 mRNA 共编码两种蛋白即 NS1 和 NS2 蛋白。这两种蛋白仅在被流感病毒感染的细胞中发现,而在病毒体中未能发现,所以称为非结构蛋白^[23]。NS1 即非结构蛋白 1,参与调节病毒 RNA 的合成、PremRNA 的运输、剪切及 mRNA 的翻译过程^[24]。有研究表明^[25]:A 型流感病毒 NS 基因的表达可以诱导 MDCK 和 Hela 细胞发生凋亡。Zhironov OP 等^[26]研究发现:对于 MDCK 这种具有干扰素系统的细胞来说,缺乏 NS1 基因的流感病毒(delNS1)诱导细胞凋亡的发生比具有 NS1 基因的流感病毒(WT)更有效更迅速,对于 7 日龄的鸡胚 delNS1 比 WT 更具致死性。然而,用相同量的两种病毒感染缺乏干扰素系统的 Vero 细胞时,凋亡被延迟发生。这就提示:甲型流感病毒的 NS1 蛋白具有干扰素依赖的抗凋亡作用。

五、PB1-F2 与细胞凋亡

甲型流感病毒包含 8 个 RNA 片段,编码 10 种病毒蛋白,而作为第 11 种被称为 PB1-F2 的蛋白是在 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)亚型中被发现的。这种新型的蛋白是由 PB1 基因中的一个可变开放阅读框所编码,含有 87 个氨基酸^[27],主要位于甲型流感病毒感染细胞的线粒体上^[28]

在流感病毒感染宿主细胞时,PB1-F2 的出现可以促进病毒诱导的细胞死亡^[29]。有学者认为 PB1-

F2 引起的细胞死亡与线粒体膜的渗透性及不稳定性有关,从而导致大分子的断裂和凋亡^[30],故认为它是一种能够诱导细胞死亡的线粒体蛋白。

总之,病毒是一种严格的细胞内寄生性微生物,为了产生大量的子代病毒,保持细胞活性是至关重要的。细胞凋亡对于病毒的大量复制显然不利,从这种病毒和细胞之间的相互作用关系来看,可以认为:细胞凋亡是机体应对病毒感染的一种防御方式。关于流感病毒诱导细胞发生凋亡的机制有多种看法,可能是其中某一机制发挥作用,也有可能是几种机制相互协同共同发挥作用而导致的效应。

参 考 文 献

- 1 Takizawa T. Influenza virus infection and apoptosis^[1]. *Nippon Rinsho*, 2003, 61(11): 2001-2005.
- 2 Takizawa T, Matsukawa S, Higuchi, et al. Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells^[1]. *J Gen Virol*, 1993, 74: 2347-2355.
- 3 Mori I, Komatsu T, Takeuchi K, et al. In vivo induction of apoptosis by influenza virus. *J Gen Virol*, 1995, 76(pt11): 2869-2873.
- 4 Hechtfisher A, Marschall M, Helten A, et al. A highly cytopathogenic influenza C virus variant induces apoptosis in cell culture. *J Gen Virol*, 1997, 78(pt6): 1327-1330.
- 5 Price GE, Smith H, Sweet C. Differential induction of cytotoxicity and apoptosis by influenza virus strains of differing virulence. *J Gen Virol*, 1997, 78(pt11): 2821-2829.
- 6 Hofmann P, Sprengel H, Kanfmann A, et al. Susceptibility of mononuclear phagocytes to influenza A virus infection and possible role in the antiviral response. *J Leuc Biol*, 1997, 61(4): 408-414.
- 7 Matsumura M, Nakanishi Y. Mechanism of the induction of apoptosis by influenza virus infection. *Nippon Rinsho*, 1997, 55(10): 2666-2669.
- 8 Fujimoto I, Takizawa T, Ohba Y, et al. Co-expression of Fas and Fas ligand on the surface of influenza virus-infected cells. *Cell Death Differ*, 1998, 5(5): 426-431.
- 9 Colamussi ML, White MR, Crouch E, et al. Influenza A virus accelerates neutrophil apoptosis and markedly potentiates apoptotic effects of bacteria. *Blood*, 1999, 93(7): 2395-2403.
- 10 Nichols, JE, Niles, JA, Roberts, NJ Jr. Human lymphocyte apoptosis after exposure to influenza A virus. *J Virol*. 2001, 75(13): 5921-5929.
- 11 李翠玲. 转化生长因子 β 分子生物学研究进展. 国外医学免疫学分册, 1995, 3: 124-127.
- 12 Liao JH, Chen JS, Chai MQ, et al. The involvement of p38 MAPK in transforming growth factor beta1-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Cell Res*. 2001, 11(2): 89-94.
- 13 Lin C, Zimmer SG, Lu Z, et al. The involvement of a stress-activated pathway in equine influenza virus-mediated apoptosis. *Virology*, 2001, 287(1): 202-13.
- 14 Schultz-Cherry S, Hinshaw VS. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. ^[1] *J Virol*, 1996, 70(12): 8624-8629.
- 15 Morris SJ, Smith H, Sweet C. Exploitation of the Herpes Simplex virus translocating protein VP22 to carry influenza virus proteins into cells for studies of apoptosis: direct confirmation that neuraminidase induces apoptosis and indications that other proteins may have a role. *Arch Virol*, 2002, 147(5): 961-79.
- 16 T. Takizawa, C. Tatematsu, Y. Nakanishi. Double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) fused to green fluorescent protein induces apoptosis of human embryonic kidney cells: possible role in the Fas signaling pathway. *Journal of Biochemistry*, 1999, 125(2): 391-398.
- 17 Takizawa T, Ohashi K, Nakanishi Y. Possible involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in cell death by influenza virus infection. *J Virol*, 1996, 70(11): 8128-8132.
- 18 Lowy RJ. Influenza virus induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms. *Int Rev Immunol*, 2003, 22(5-6): 425-449.
- 19 Ohyama K, Sano T, Toyoda H. Predominant contribution of IFN-beta expression to apoptosis induction in human uterine cervical fibroblast cells by influenza-virus infection. *Biol Pharm Bull*. 2004, 27(11): 1750-1757.
- 20 Siddharth Balachandran, Caryn N. Kim, Wen-Chen Yeh, et al. Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *The EMBO Journal*, 1998, 17: 6888-6902.
- 21 Jesús Gil, José Alcamí, Mariano Esteban. Induction of Apoptosis by Double-Stranded-RNA-Dependent Protein Kinase (PKR) Involves the Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 and NF-B. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19(7): 70270-70306.
- 22 Srivastava, Kumar, Kaufman. Phosphorylation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Mediates Apoptosis in Response to Activation of the Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem*, 1998, 273(4): 2416-2423.
- 23 段炼, 李康生. 甲型流感病毒 NS1 蛋白功能研究进展. 国外医学病毒学分册, 2004, 11(2): 46-49.
- 24 Garcia-Sastre A, Egorov A, Matassov D, et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems^[1] *Virology*, 1998, 252(2): 324-330.
- 25 Schultz-Cherry, Dybdahl-Sissoko, Neumann, et al. Influenza Virus NS1 Protein Induces Apoptosis in Cultured Cells. *Journal of Virology*, 2001, 75(17): 7875-7881.
- 26 Zhirnov OP, Konakova TE, Wolff T. NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J Virol*, 2002, 76(4): 1617-1625.
- 27 GW Chen, CC Yang, KC Tsao, et al. Influenza A virus PB1-F2 gene in recent Taiwanese isolates. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10(4): 630-636.
- 28 Yamada H, Chounan R, Higashi Y, et al. Mitochondrial targeting sequence of the influenza A virus PB1-F2 protein and its function in mitochondria. *FEBS Lett*, 2004, 578(3): 331-336.
- 29 Chen, W., P. A. Calvo, D. Malide, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med*, 2001, 7: 1306-1312.
- 30 A. N. Chanturiya, G. Basa? ez, U. Schubert, et al. PB1-F2, an Influenza A Virus-Encoded Proapoptotic Mitochondrial Protein, Creates Variably Sized Pores in Planar Lipid Membranes. *Journal of Virology*, 2004, 78(12): 6304-6312.

(2003-07-23 收稿; 2003-12-22 修回)