

HIV Vpr 蛋白诱导细胞凋亡研究进展^{*}

魏强^{1,2} 王健伟^{2**} 李凡¹ 洪涛²

(1 吉林大学基础医学院 吉林 130021)

(2 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 北京 100052)

摘要 Vpr 蛋白是 HIV 的一个辅助蛋白,可以诱导多种细胞的凋亡。目前的研究表明 Vpr 蛋白引起细胞凋亡主要是通过线粒体途径实现的。Vpr 蛋白通过直接而且特异地与结合在 PTPC 中的 ANT 相互作用,改变线粒体膜通透性,导致凋亡诱导因子(AIF)和细胞色素 C 的释放,激活 Caspase、DNases 等的级联反应,引起核染色质的固缩,最终引起细胞凋亡。

关键词 HIV Vpr 细胞凋亡 线粒体

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)基因组主要由 *gag*、*pol*、*env* 基因组成,此外还包括 6 个辅助性基因:*tat*、*vpr*、*vpu*、*nef*、*rev* 和 *vif*。其中 *vpr* 编码一含 96 个氨基酸、分子量大约为 14kDa 的蛋白。*Vpr* 在 HIV-1、HIV-2 及 SIV 中高度保守,包括 3 个结构域:1~42 位氨基酸之间的第一结构域、43~82 位氨基酸之间的第二结构域和 77~96 位氨基酸之间的第三结构域。第一结构域表现为低聚体化结构域,其中 16~34 位氨基酸之间形成一个两歧性 α -螺旋结构。在第二结构域中,71~82 位氨基酸之间包含一个 HS/FRIG 功能域。60~81 位氨基酸之间是一亮氨酸/异亮氨酸丰富区。此外在这一部分中,还包含一个 75~76 位之间的保守多肽和一个在 46~74 位氨基酸之间的 α -螺旋功能域。在第三结构域中,C 端的 77~96 位氨基酸中含有 7 个精氨酸残基的高电荷结构。

大量研究表明,HIV 感染宿主细胞后,Vpr 与细胞内多种蛋白相互作用,对病毒复制、宿主细胞周期及分化表现出一系列的生物学功能。Vpr 蛋白在 HIV 引起的细胞凋亡中发挥着重要作用,Vpr 可引起分裂细胞,包括肿瘤细胞发生凋亡。由此可见,Vpr 诱导细胞凋亡机制的阐明不仅对 HIV 的致病机制会有更深入的了解,而且由于 Vpr 诱导肿瘤细胞凋亡而将其用于抗肿瘤研究也有重要意义。

目前对 Vpr 诱导各种细胞凋亡机制的阐明不尽相同,现将 Vpr 蛋白诱导被感染细胞发生细胞凋亡机制的研究进展作一综述。

1 细胞凋亡概述

细胞凋亡(apoptosis)也称为程序性细胞死亡,是多细胞生物体的重要自身稳定机制之一。主要表现为:细胞核染色质浓缩、染色体 DNA 断裂、细胞膜形成泡状突起。凋亡细胞的染色体 DNA 被蛋白酶在核小体处切断,形成约 180bp 或其整数倍长度的 DNA 片段,在电泳时形成特征性的梯形电泳条带。细胞凋亡是一个主动的、信号依赖的过程,受到很多基因的调控。

目前发现启动凋亡的途径主要有 2 种:细胞膜受体途径和线粒体途径。

在凋亡程序的启动及执行过程中,Caspase (cysteinyl aspartate-specific proteases) 蛋白酶家族起着非常重要的作用。Caspase 分为启动型和执行型,前者接受死亡信号、启动凋亡或激活下游的分子,形成 Caspase 级联反应;后者则降解细胞骨架、蛋白质、核酸等,产生细胞皱缩,膜出泡,DNA 断裂等凋亡特征现象。Caspase 3 在细胞凋亡过程中起着不可替代的作用。Caspase 3 最主要的底物是多聚(ADP-核糖)聚合酶[poly(ADP-ribose) polymerase, PARP],在发生细胞凋亡时,116kDa 的 PARP 在 Asp216-Gly217 之间被 Caspase 3 剪切成为 31kDa 和 85kDa 2 个片段,使 PARP 中与 DNA 结合的 2 个锌指样结构与羧基端的催化区域分离,导致受 PARP

收稿日期:2003-06-04 修回日期:2003-07-07

^{*} 国家自然科学基金资助项目(3000761748)

^{**} 通讯作者,电子信箱:wangjw28@vip.sina.com

负调控影响的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖性核酸内切酶的活性增高,裂解核小体间的 DNA,引起细胞的凋亡。

2 Vpr 诱导细胞凋亡机制

2.1 Vpr 蛋白与线粒体的相互作用

线粒体是真核细胞的重要细胞器,位于线粒体内膜与外膜接触位点的通透性转变孔道 (mitochondrial permeability transition pore, MPT) 的开放和关闭产生的线粒体膜电位的改变在细胞凋亡中是至关重要的。Jacotot 等发现,合成的全长 96 个氨基酸的 Vpr 与其 C-端部分 Vpr52-96 都可引起线粒体膜电位的丢失,而 Vpr N-端部分 Vpr1-51 却不能。进一步将 Vpr52-96 中的 2 个亮氨酸残基由丙氨酸置换后, Vpr52-96 的诱导凋亡功能没有改变,然而如果将位于 2 个 H(S/F) RIG 功能域中的或 2 个功能域之间的精氨酸 (R73A、R77A、R80A) 置换后, Vpr52-96 的诱导细胞凋亡功能明显降低。Vpr 作用于 Jurkat 细胞后,引起线粒体膜电位的丢失,以及接下来的对过氧化物阴离子增加和细胞核的凋亡的影响,可以被 PTPC 抑制子 CsA 和 BA 以及过量表达的 Bcl-2 蛋白所阻断。相反 Caspase 抑制子 Z-VAD-fmk 却不能阻止线粒体膜电位的耗散^[1]。

那么, Vpr 蛋白是如何直接作用于线粒体而引起凋亡的呢? 一些实验证实, Vpr 蛋白可以作用于细胞核^[2]、胞浆膜^[3] 以及线粒体^[4], 但 Jacotot 的结果表明 Vpr 蛋白作用于线粒体时才表现出其诱导凋亡功能。进一步研究 Vpr 蛋白作用于线粒体何处而引起细胞凋亡的过程中, Jacotot 等将纯化的线粒体与生物素标记的 Vpr52-96 共同作用后, 通过免疫印迹发现了外膜的电压依赖的阴离子通道 (voltage-dependent anion channel, VDAC) 和内膜的腺嘌呤核苷转位蛋白 (adenine nucleotide translocator, ANT) 是与 Vpr52-96 相结合的蛋白, 如果线粒体中先加入 BA, 实验的最后就不能看到 VDAC 和 ANT。另外 Jacotot 的实验结果进一步证实, 在 Vpr 对线粒体凋亡作用过程中, VDAC 的特异性抑制剂 PA10 可以完全消除 Vpr 的作用, ANT 配体 BA 只能部分地影响 Vpr 的作用, 而 CsA 却起不到任何的作用。由此他们认为, Vpr 是通过 VADC 跨过线粒体外膜, 进入到内膜而与 ANT 相互作用。Bcl-2 可以阻止 Vpr 结合到 ANT 上, 但 Bcl-2 影响不到 Vpr 与 ANT 的结合, 这有可能是 Vpr 在线粒体上除了 ANT 外还有一个作用位点。BA 对 Vpr 的影响可能是 BA 修

饰通透转运孔复合物 (permeability transition pore complex, PTPC) 使 Vpr 进入线粒体内部减少而引起的, 而不是与 Vpr 竞争结合 ANT 造成的。他们提出, Vpr 对线粒体膜稳定性的影响是通过 4 个步骤完成: 首先 Vpr 通过 VADC 跨过线粒体外膜, 通过外膜后, Vpr52-96 与 ANT104-116 相互作用, 两者的结合造成 ANT 转变成非特异的孔道, 导致内膜通透性的改变, 内膜通透性改变造成线粒体基底膜膨胀, 而最终导致线粒体外膜的破溃, 释放出线粒体内部蛋白, 引起细胞凋亡^[5]。

Roumier 等的实验也证实了 Vpr 与 ANT 的直接作用, 但他们的观点与 Jacotot 并不相同。Roumier 等将合成 Vpr52-96 多肽作用于野生型的鼠胚胎干细胞、缺失 Apaf-1 基因的鼠胚胎干细胞、缺失 caspase 9 的鼠胚胎干细胞以及经同源重组而失去 AIF 作用的鼠胚胎干细胞后, 细胞均出现了线粒体膜电位耗损、膜稳定性的丧失以及 ROS (reaction oxygen specie, ROS) 水平的升高。而且 Vpr 的作用呈现剂量效应性。加入 Z-VAD-fmk 以及敲除 AIF 都不能影响到 Vpr 的细胞毒性作用。同时, 存在于线粒体膜上的具有抑制线粒体膜通透性 (mitochondrial membrane permeabilization, MMP) 特性的 Bcl-2 和 vMIA 均可阻断由 Vpr 引起的细胞凋亡。vMIA 或称 UL37 是由 CMV 编码的细胞凋亡病毒源性线粒体抑制子 (viral mitochondrial inhibitor of apoptosis, vMIA), 它特异性地与 ANT 相互作用, 而不与 VDAC 作用。但他们没有发现 Vpr 作用于鼠胚胎干细胞后 Caspase 3 的激活, Vpr 作用于 Hela 细胞后虽然出现了明显的细胞死亡, 但也没有观察到 Caspase 3 的激活。由此他们认为, HIV Vpr 蛋白诱导细胞凋亡是通过非依赖-Caspase 的线粒体途径而进行的。Vpr 通过与 ANT 相互作用而对 MMP 产生的诱导性作用是 Vpr 引起细胞凋亡的一个关键步骤, 而由此与 MMP 相关的生物能量释放的“灾难”, 足以引起细胞的死亡, 在此过程中就无须代谢水解酶的参与^[6]。

2.2 Vpr 蛋白对 Caspase 蛋白的激活

Stewart 等在表达有 Vpr 蛋白的细胞中加入广谱的 Caspase 家族抑制剂 Boc-D-FMK 后显著地降低了由 Vpr 蛋白引起的细胞凋亡^[7]。在表达 Vpr 蛋白的细胞中共表达杆状病毒 P35 蛋白或牛痘病毒 CrmA 后, 细胞的凋亡比例明显下降; 在表达 Vpr 蛋白的细胞中加入合成的 Caspase 抑制剂 Z-VAD-fmk

后,细胞凋亡比例也明显下降^[8]。这些结果表明,Vpr蛋白诱导细胞凋亡可能是通过Caspase的激活介导的。Muthumani等在对表达HIV Vpr的重组腺病毒AdCMV-vpr感染外周淋巴细胞和T细胞引起凋亡的研究过程中发现,Vpr蛋白引起的外周淋巴细胞和T细胞凋亡是通过Caspase 9激活途径而非Caspase 8途径,最终激活Caspase 3而引起细胞的凋亡。他们在AdCMV-vpr感染的细胞中加入抗CD95抗体后,细胞凋亡并未受到抑制;在AdCMV-vpr感染Fas/FADD缺失的细胞系SW480后,AdCMV-vpr同样引起SW480细胞的凋亡,提示Caspase 8未参与Vpr蛋白引起的凋亡。相反AdCMV-vpr感染细胞后,引起细胞内线粒体膜电位的改变,同时检测到细胞色素C、Caspase 9、Caspase 3的表达^[9]。在建立的CD4启动子/增强子转录vpr基因的转基因动物模型中,转基因动物的淋巴器官和外周血液中的T淋巴细胞大量凋亡。研究表明Bcl-x、Bax和Caspase-1参与了细胞凋亡过程,Fas/Fas-L系统没有参与其中^[10]。

Patel等报道在Vpr蛋白引起神经细胞凋亡的过程中,Caspase 8参与了细胞凋亡过程。他们将由麦芽糖结合蛋白融合表达系统表达的Vpr蛋白作用于成熟的人神经细胞和未分化的人畸胎样瘤细胞系NT2后,经Annexin V法和TUNEL法检测,细胞出现凋亡而且凋亡呈现Vpr蛋白剂量依赖性。通过Caspase活性检测,Caspase 8参与细胞凋亡过程^[11]。Vpr蛋白可以通过形成离子通道直接对神经细胞产生毒性导致细胞死亡^[12,4]。由此他们认为Vpr蛋白可能通过其低聚体化的结构域与细胞上的受体样结构相互作用后,使Fas、Fas相关死亡结构域和Caspase 8形成复合蛋白,激活Caspase 8,激活的Caspase 8再激活其下游的效应Caspase 3,而引起细胞的凋亡。

2.3 Vpr蛋白与NF B的相互作用

还有一种关于Vpr诱导细胞凋亡机制认为,Vpr蛋白作为糖皮质激素(GCs)的相似物,可通过结合于GC受体复合物,上调NF B抑制子IB基因的转录,抑制NF B介导的基因转录,调节细胞的凋亡和增殖,而产生其对细胞的作用^[13,14]。Vpr蛋白和GC作用人外周淋巴细胞(PBMCs)和横纹肌肉瘤(RD)后,两者表现出相似的对细胞凋亡作用。将表达Vpr蛋白的质粒与NF B驱动转录报告基因的质粒同时转染PBMCs和RD后,报告基因转录水

平受到抑制,且表现为对Vpr剂量依赖关系。同时发现细胞内的IB转录水平升高,这些结果表明,Vpr通过提高IB的转录而抑制NF B活性,达到诱导细胞凋亡的作用^[15]。

2.4 Bcl-2和P53蛋白的可能作用

Bcl-2作为抗凋亡基因和P53蛋白作为肿瘤抑制因子在细胞凋亡过程中起一定的作用,但对Bcl-2、P53在Vpr诱导细胞凋亡过程中的作用,学者们的观点也不相同。Shostak等^[8]和Muthumani等^[16]的实验证实,在表达有正常P53蛋白、突变P53蛋白以及缺陷P53蛋白的细胞中,Vpr蛋白都能够引起细胞凋亡。Chang等在共表达Vpr和Bcl-2蛋白的细胞实验中发现,共表达有Bcl-2蛋白的细胞中细胞凋亡明显减弱^[17]。Jacotot等在对合成的Vpr多肽对体外分离的线粒体引起的膜变化中发现,加入重组Bcl-2蛋白后阻断了由Vpr蛋白引起的线粒体基底肿胀和线粒体膜通透性的改变^[1]。然而Muthumani等将AdCMV-vpr感染各种Bcl-2蛋白高水平表达的细胞,均引起了细胞的凋亡。他们认为,通过高效表达载体腺病毒感染细胞后,不论细胞内Bcl-2蛋白的表达水平高低,大量的Vpr蛋白直接作用于线粒体上的结合位点,通过线粒体途径而诱导细胞的凋亡^[16]。

3 小结

HIV感染人体后可因HIV直接感染CD4细胞而造成CD4细胞的死亡,虽然对HIV造成CD4细胞死亡的机制还存在着很大的争议,但目前认为HIV引起的CD4细胞凋亡是其中一个重要因素。凋亡是细胞抵御病毒感染的一个重要机制,因此在感染的早期阶段,很多病毒往往编码一些蛋白质阻断细胞的凋亡过程。但另一方面,病毒通过引起细胞凋亡而达到逃避免疫反应和促进其播散的目的^[18,19]。HIV病毒作为逆转录病毒,其基因组整合至宿主基因组中,HIV引起被感染细胞凋亡后可限制宿主因对p24而产生的病毒免疫反应,从而促进病毒的持续存在^[7]。

对于Vpr导致细胞凋亡的机理研究目前还在进展之中。除Patel等对Vpr蛋白诱导神经细胞凋亡作用研究时,认为它是通过受体途径激活Caspase 8而产生细胞凋亡外,多数的学者认为Vpr蛋白是通过线粒体途径而导致细胞凋亡的。Caspase在Vpr蛋白引起细胞凋亡中的作用,学者

们存在不同的意见。一种观点认为,Vpr 蛋白通过直接而且特异地与结合在 PTPC 中的 ANT 相互作用,改变线粒体膜通透性,导致凋亡诱导因子(AIF)和细胞色素 C 的释放,激活 Caspase、DNases 等的级联反应,引起核染色质的固缩,最终引起细胞的凋亡。另一种观点认为,Vpr 是通过非 Caspase 依赖性线粒体途径而导致细胞死亡的^[20]。Korsmeyer 等在研究 Bax 诱导白血病细胞系 Jurkat 凋亡时,最早提出 Bax 诱导的细胞死亡可能不需要 Caspase 的参与,他们发现 Bax 作用后的细胞没有出现 DNA 断裂,而是线粒体膜电位的下降、ROS 水平升高,以及 DNA 固缩、出现胞浆内空泡等现象。但这些变化是否直接参与了细胞死亡还是作为其他死亡因素而同时出现,还不清楚^[20]。Roumier 等认为的 Vpr 非依赖 Caspase 而引起的细胞死亡存在一些凋亡的特点,如细胞核致密性的变化和染色质固缩,但这可能只是一种非凋亡性的细胞死亡的表现^[6]。

将表达 Vpr 蛋白的重组非复制型腺病毒感染肝癌细胞,研究 Vpr 对肝癌细胞作用时发现(未发表数据)Bax 蛋白表达明显升高、Caspase3 蛋白表达未见明显变化,在这些结果的基础上,我们将更深入地从细胞形态学和生物化学等方面的改变阐明 Vpr 对细胞作用的机制。

参考文献

- [1] Jacotot E, Ravagnan L, Loeffler M, et al. HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med*, 2000, 191: 33 ~ 46
- [2] Cullen B R. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell*, 1998, 93: 685 ~ 692
- [3] Piller S C, Jans P, Gage P W, et al. Extracellular HIV-1 virus protein R causes a large inward current and cell death in cultured hippocampal neurons: implications for AIDS pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 4595 ~ 4600
- [4] Macreadie I G, Thorburn D R, Kirby D M, et al. HIV-1 protein Vpr causes gross mitochondrial dysfunction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 1997, 410: 145 ~ 149
- [5] Jacotot E, Ferri K F, Hamel C, et al. Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2. *J Exp Med*, 2001, 193: 509 ~ 519
- [6] Roumier T, Vieira H L, Castedo M, et al. The C-terminal moiety of HIV-1 Vpr induces cell death via a caspase-independent mitochondrial pathway. *Cell Death Differ*, 2002, 9: 1212 ~ 1219
- [7] Stewart S A, Poon B, Song J Y, et al. Human immunodeficiency virus type 1 vpr induces apoptosis through caspase activation. *J Virol*, 2000, 74: 3105 ~ 3111
- [8] Shostak L D, Ludlow J, Fisk J, et al. Roles of p53 and caspases in the induction of cell cycle arrest and apoptosis by HIV-1 vpr. *Exp Cell Res*, 1999, 251: 156 ~ 165
- [9] Muthumani K, Hwang D S, Desai B M, et al. HIV-1 Vpr induces apoptosis through caspase 9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem*, 2002, 277: 37820 ~ 37831
- [10] Yasuda J, Miyao T, Kamata M, et al. T cell apoptosis causes peripheral T cell depletion in mice transgenic for the HIV-1 vpr gene. *Virology*, 2001, 285: 181 ~ 192
- [11] Patel C A, Mukhtar M, Pomerantz R J. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis in human neuronal cells. *J Virol*, 2000, 74: 9717 ~ 9726
- [12] Levy D N, Refaeli Y, Weiner D B. Extracellular Vpr protein increases cellular permissiveness to human immunodeficiency virus replication and reactivates virus from latency. *J Virol*, 1995, 69: 1243 ~ 1252
- [13] Wang Cui Yu, Marty W, Albert S, et al. TNF α and cancer therapy-induced apoptosis: Potentiation by inhibition of NF κ B. *Science*, 1996, 274: 784 ~ 787
- [14] Refaeli Y, Levy D N, Weiner D B. The glucocorticoid receptor type II complex is a target of the HIV-1 vpr gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92: 3621 ~ 3625
- [15] Mahalingam S, Ramalingam R, Kudchodkar S, et al. HIV-1 Vpr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor kappa B. *Nat Med*, 1997, 3: 1117 ~ 1123
- [16] Muthumani K, Zhang D, Hwang D S, et al. Adenovirus encoding HIV-1 Vpr activates caspase 9 and induces apoptotic cell death in both p53 positive and negative human tumor cell lines. *Oncogene*, 2002, 21: 4613 ~ 4625
- [17] Chang L J, Chen C H, Urlacher V, et al. Differential apoptosis effects of primate lentiviral Vpr and Vpx in mammalian cells. *J Biomed Sci*, 2000, 7: 322 ~ 333
- [18] Roulston A, Marcellus R C, Branton P E. Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol*, 1999, 53: 577 ~ 628
- [19] Gudgeon M L. Apoptosis as an HIV Strategy to escape immune attack. *Nature Rev Immunol*, 2003, 3: 392 ~ 404
- [20] Xiang J, Chao D T, Korsmeyer S J. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93: 14559 ~ 14563

Recent Advance in Apoptosis Induced by HIV Vpr

Wei Qiang¹ Wang Jianwei² Li Fan¹ Hong Tao²

(1 Medical School of Jilin University Jilin 130021)

(2 Institute of Virus Disease Control and Prevention, Chinese Center of Disease Control and Prevention Beijing 100052)

Abstract Viral protein R (Vpr), a non-structure accessory protein encoded by HIV-1, can induce apoptosis in a variety of cells. Recent advances indicate that Vpr trigger mitochondrial membrane permeabilization (MMP) via a specific interaction with the adenine nucleotide translocator (ANT) in the permeability transition pore complex (PTPC), thereby a composite ion channel shapes within the inner mitochondrial membrane whose opening results in the dissipation of the mitochondrial transmembrane potential (ψ_m), followed by permeabilization of the outer mitochondrial membrane with consequent release of the soluble intermembrane protein, including apoptosis inducing factor (AIF), cytochrome c and the proteins activate DNase and Caspases to initiate the process of apoptosis.

Key words HIV Vpr Apoptosis Mitochondrial

欢迎订阅 2004 年《中国生化药物杂志》

《中国生化药物杂志》是由全国生化制药情报中心站主办、编辑出版的技术性刊物,是我国生化制药行业唯一的专业性期刊。读者为生化制药工作者、科技人员、医药卫生人员。主要内容有:生化药物新品种、新工艺、新技术、新设备的研究;生化药物的毒理、药理、药分和药动学;生化药物的临床研究;生化药物剂型的研制、药物稳定性的研究及对药物性能、作用、用途和不良反应的评价等。同时,广告、市场信息、企业单位专栏及新药之窗等栏目也将为广大客户提供最快捷的服务。

《中国生化药物杂志》系中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),《中国科学引文数据库》、《中国药学文摘》、《中国生物学文摘》、《美国化学文摘》来源期刊,同时被《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。并已进入中国期刊方阵“双效”期刊行列。本刊已被国家认定为发布处方药广告的宣传媒体。

本刊为双月刊,国内外公开发行,大 16 开,从 2004 年起每期页码由原来的 54 页增至 64 页,每期定价 10.00 元。国内邮发代号:28-233,国外发行代号:BM-4561。如错过邮局订阅时间,请与本部联系邮购,全年 70 元(含邮费)。地址:南京市草场门大街 111 号,邮编:210036,电话、传真:025-6228442。