

两种新的凋亡诱发蛋白的聚合作用及其 对细胞凋亡的调控*

刘青珍 甘 淼 齐义鹏** 李凌云 齐 兵

(武汉大学病毒研究所, 武汉 430072)

摘要 *Asy* (apoptosis /saibousi Yutsudo) 是日本 Yutsudo 小组于 1999 年发现的一个新的人类细胞凋亡诱发基因. 2000 年齐兵等人通过酵母双杂交系统从人肺细胞系(W1-38) cDNA 文库中克隆出一个能与 *ASY* 蛋白相互作用的蛋白的新基因 *hap* (homologue of *asy* protein). 已经证明 *ASY* 能在酵母细胞和哺乳动物细胞中形成同源二聚体, *ASY* 与 *HAP* 能在酵母细胞中形成异源二聚体, *ASY* 和 *HAP* 均能诱发肿瘤细胞 *Saos2* 和 *CGL4* 凋亡. 通过酵母双杂交系统证明 *HAP* 能在酵母细胞中形成同源二聚体; 通过交叉免疫沉淀证明 *HAP* 与 *ASY* 能在人类细胞中形成异源二聚体. 通过 *AnnexinV*, *TUNEL*, *DNA Ladder* 和流式细胞计数等检测凋亡的技术, 对 *asy*, *hap* 单独转染或共转染的人类正常细胞或肿瘤细胞的凋亡进行定性或定量检测, 证明 *ASY* 和 *HAP* 不仅诱发人类肿瘤细胞凋亡, 而且能诱发人类正常细胞凋亡, 并且证明由 *ASY* 与 *HAP* 形成的异源二聚体可降低由 *ASY* 和 *HAP* 各自形成的同源二聚体诱发细胞凋亡的活性, 揭示 *ASY* 与 *HAP* 形成同源或异源二聚体是调控人类细胞凋亡的重要机制.

关键词 *asy* 基因 *hap* 基因 细胞凋亡 同源或异源二聚体

细胞凋亡或程序性细胞死亡是 Kerr 等人^[1]首次发现的, Cleary 等人^[2]克隆了 *bcl-2* 的 cDNA, 从此在人和哺乳动物细胞中发现了许多细胞凋亡相关基因. 研究最多、最清楚的是包括 23 个基因的 *bcl-2* 家族^[3~5], 由 14 个成员组成的 *Caspase* 家族^[6~8]以及 *TNF* 家族^[9,10].

随着对细胞凋亡研究的深入, 人们认识到细胞凋亡在多细胞生物体发育、组织平衡等多种生理过程中起重要作用, 细胞凋亡的失控与肿瘤和自身免疫疾病的发生密切相关. 因此, 近几年来, 对细胞凋亡调控的研究愈来愈引起人们的关注. 现在普遍认为蛋白因子与 DNA 或 RNA 以及蛋白因子间的相互作用广泛存在于生物体内. 没有生物大分子间的聚合就不可能有多种生化反应, 生命也将会停止, 这种聚合现象在细胞凋亡途径中更为普遍. 现代研究指出, 死亡因子 *TNF* 和 *FasL* 与死亡受体 *TNFR* 和 *Fas* 的异源聚合打开了细胞凋亡 *Fas* 途径的大门^[9,10], 而 *Bcl-2* 家族成员对细胞凋亡诱发/抑制的调控主要靠家族成员间的同源聚合或异源聚合^[11]. 鉴于 *BCL-2* 抑制凋亡, *BAX* 诱发凋亡, 许多学者认为细胞内 *BCL-2* 和 *BAX* 同源聚合和异源聚合的比率是决定细胞生死存亡的一个重要开关^[12]. 在 *caspase* 由无活性的酶原加工成有活性的

2002-01-26 收稿, 2002-07-29 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号:39880031)高技术新探索资助项目、国家自然科学基金(批准号:30170455)资助项目和武汉市科学技术委员会晨光计划(批准号:20005004024)资助项目

** 联系人, E-mail: qiyipeng@whu.edu.cn

酶分子的过程中上游 caspase8 与衔接分子 FADD 聚合, caspase9 与另一衔接分子 Apaf1 结合, 只有这种异源聚合才能促使 caspase 形成异源二聚体, 再由两个异源二聚体结合成有活性的异源四聚体而激活下游 caspase3, 诱发细胞凋亡^[13,14].

asy(apoptosis/saibousi Yutsudo)是日本 Yutsudo 小组^[15]于 1999 年发现的一个新的人类细胞凋亡诱发基因. 齐兵等人^[16]通过酵母双杂交系统从人肺细胞系(W1-38)cDNA 文库中克隆出一个能与 ASY 相互作用的蛋白新基因 *hap*(homologue of *asy* protein, 以前报道称为 *asyip*, 并详细研究了 *hap* 的结构、转录和功能. HAP 与 ASY 一样都具有诱发肿瘤细胞系 Saos2 和 CGL4 凋亡的功能, 已经证明在酵母细胞中, HAP 与 ASY 能形成异源二聚体, ASY 在酵母和哺乳动物细胞中能形成同源二聚体, 但 HAP 是否也能自我互相作用形成同源二聚体以及是否能与 ASY 相互作用形成异源二聚体, 这种同源或异源聚合对它们诱发细胞凋亡的功能有什么影响? 都还不得而知. 由于 *asy* 和 *hap* 是两个新的凋亡诱发基因, 因此本文是有关 *hap* 基因深入研究的报道.

1 材料和方法

1.1 细胞、质粒和试剂

人宫颈癌细胞 HeLa 和猴肾细胞 Vero 由董长垣教授(武汉大学医学院)馈赠, 人胚肺二倍体传代细胞由龚镇奎研究员(湖北省医学科学院病毒研究所)赠送, 以上 3 种细胞均在 DMEM 培养液中(含 8%小牛血清)于 37℃培养. 表达质粒 pIRES·EGFP 由李小锋博士(以色列 Weizmann 研究所)赠送. 质粒 pAsy 和 *hap* 全长 cDNA 由齐兵博士^[16]构建. 质粒 pCFasy 由 Yutsudo 博士(日本, 大阪大学)赠送. ApoAlertTM, AnnexinV Apoptosis Detection Kit 和碘化丙啶(PI)购于 Clontech 公司, 原位细胞死亡测定 Kit(In situ Cell Death Detection Kit), Fluorescein 购自 Roche 公司. Lipofectin 及 LipofectinAMINETM 购自 Life Technologies 公司. 酵母双杂交系统试剂盒(含质粒 pGBT9, pGAD424, pGBTLAM5' 和酵母菌 HF7C)购自 Clontech 公司.

1.2 克隆和转化

按常规程序用 *hap* cDNA 的限制性酶切片段亚克隆到质粒 pGBT9, pGAD424 和 pHM6 中, *asy* 基因片段插入 pIRES·EGFP 的多克隆位点, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性重组质粒.

1.3 酵母双杂交系统

以融合表达质粒 pGBT/*hap* 和 pGAD/*hap* 共转化酵母菌 HF7C, 并同时以 pGBT9, pGBTLAM5' 为对照. 转化菌落在 SD/-Trp-Leu 平板和 SD/-Trp-Leu-His(含 3 mmol/L 的 3-AT)营养缺陷型平板上划线培养, 7 ~ 10 d 后挑选可能的阳性菌落进行半乳糖苷酶活力滤膜试验. 酵母双杂交系统操作根据 Clontech 公司 MATCHMAKER GAL4 双杂交用户操作手册进行.

1.4 细胞转染

用质粒 pE/*asy* 和 pHM/*hap* 分别转染或共转染 HeLa 细胞、Vero 细胞和人胚肺二倍体细胞 (5×10^5), 共转染时两种质粒各取 1 μ g, 单独转染时两种质粒分别与 1 μ g pBSK 混合后转染, 转染程序按 LIPOFECTIN^R Reagent 或 LIPOFECTIN AMINETM2000 Reagent 的操作手册进行.

1.5 交叉免疫沉淀试验

取融合表达质粒 pCFasy 和 pHM/*hap* DNA 1 μ g 同 Lipofectin 单独转染或共转染 CGL1 细胞, 19 h 后收集细胞并在 NP40 缓冲液中温和裂解, 分别用单克隆抗体 anti-Flag 或 anti-HA 和

偶联有 A/G PLUS 蛋白的琼脂糖沉淀出表达蛋白,再用 anti-Flag 或 anti-HA 和 ECL Western 显色试剂进行免疫沉淀物 Western blot 的测定.

1.6 细胞凋亡的流式细胞计数检测

取单独转染或共转染细胞,经 70%乙醇固定过夜,胰酶消化,离心收集细胞,用柠檬酸缓冲液 37℃保温 3 min. 所得样品分别经两种方法染色 30 min,即 PI 染色或 PI 及 AnnexinV 共染色. 再用流式细胞计数仪检测凋亡峰或计数,每个样品至少检测 10^4 个细胞(激发波 488 nm,检测波 > 620 nm),详见流式细胞计数仪操作手册、AnnexinV 和 PI 试剂盒说明书.

1.7 细胞凋亡的 TUNEL 试验

取单独转染或共转染 48 h 的细胞于玻板上,经 4%多聚甲醛固定 20 min,用 0.1% TritonX-100, 0.01% 柠檬酸钠冰浴 2 min, 风干,加入 TUNEL 试剂反应混合物,37℃保温 60 min,以激发波 450 ~ 500 nm,检测波 515 ~ 565 nm 在倒置荧光显微镜下观察凋亡,操作按原位细胞死亡试剂盒说明书进行.

1.8 DNA ladder 试验

取单独转染或共转染 48 h 的细胞,于 37℃用裂解缓冲液裂解细胞 6 h,加入 NaCl 至终浓度 1.5 mol/L, $12000 \times g$ 离心,上清液用等体积无水乙醇沉淀,溶于 TE/RNase 缓冲液中,琼脂糖凝胶电泳观察.

2 结果

2.1 表达载体的构建和鉴定

将 *hap* 基因全长 cDNA(1.1 kb)的 *Nco* I /*Spe* I 片段平端化后,分别插入表达载体 pGBT9 和 pGAD424 的 *Sma* I 位点,使 *hap* 基因与 pGBT9 的 gal4-DNA 结合区(DBD)和 pGAD424 的 gal4 激活区(AD)融合并保持同框,构建成表达载体 pGBT/*hap* 和 pGAD/*hap*. 在酵母乙醇脱氢酶基因启动子(PADH1)控制下,前者能表达 Gal4-DBD/HAP 融合蛋白,后者能表达 Gal4-AD/HAP 融合蛋白,同时,将 *hap* 基因的平端化片段经中间质粒 pBluescript II SK,使其成为 *Eco* R I /*Not* I 片段,再亚克隆到质粒 pHM6 的 MCS 中,使其与 9 个氨基酸的标签 HA 融合并处于 HCMV 的早期基因强启动子(PHCMV)控制之下构建成重组表达载体 pHM/*hap*, 而真核表达质粒 pE/*asy* 则是从 pAsy 切下 *asy* 基因插入质粒 pIRES-EGFP 的 MCS 中构建而成. 含有 *hap* 和 *asy* 的表达质粒经酶切证明均能释放一条 1.1 kb 的片段(结果未显示),序列分析证明了 *hap* 与 DBD 或 AD 或 HA 的正确融合,保持了同框(结果未公布). 本文构建的 4 个表达载体及 Yutsudo 博士赠送的表达质粒 pCFasy 的结构示于图 1.

2.2 HAP 蛋白的同源聚合作用

Yutsudo 等人^[15]已经证明 ASY 能自我相互作用. 鉴于 HAP 是 ASY 的相互作用蛋白,氨基酸序列有很高的同源性^[16],估计 HAP 也应能自我相互作用形成同源二聚体. 本文用 pGBT/*hap* 和 pGAD/*hap* 共转化酵母菌后分别表达了融合蛋白 Gal4-DBD/HAP 和 Gal4-AD/HAP, 如果 HAP 能自我相互作用,则必定将 DBD 和 AD 拉拢,消除了其空间位阻,DBD 结合在上游 UAS 上,便于 AD 激活下游基因的表达,因而转化菌不仅能够在营养缺陷型平板 SD/-Trp-Leu 上生长,也能在 SD/-Trp-Leu-His 平板上生长. 实验结果证明 pGBT/*hap* 和 pGAD/*hap* 共转化酵母

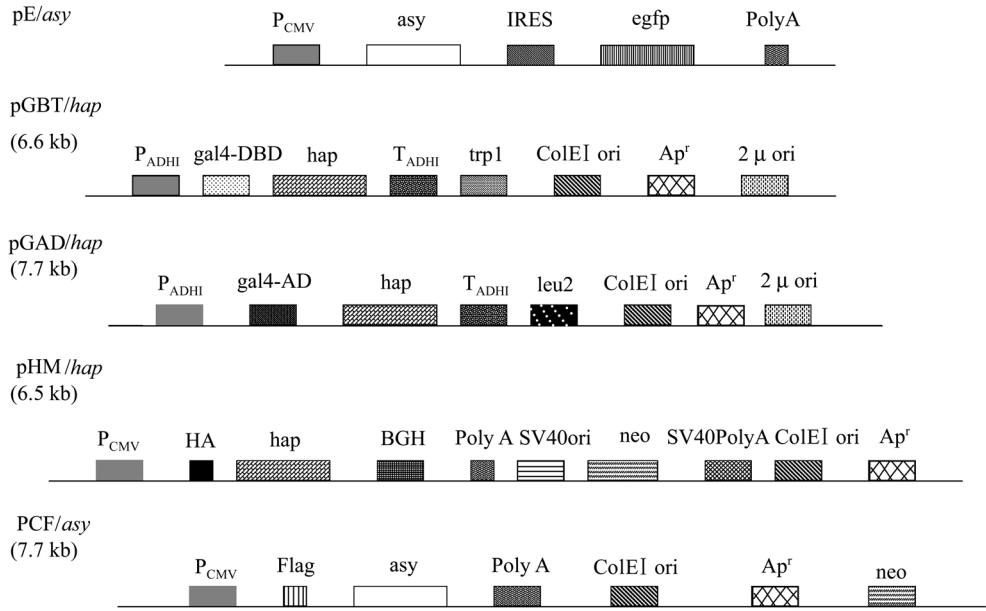


图 1 几种真核表达载体的结构

P_{CMV} 示 CMV 早期启动子; IRES 示核糖体进入位点; egfp 示强化的绿色荧光蛋白基因; P_{ADHI} 示酵母乙醇脱氢酶基因启动子; gal4-DBD 示酵母 gal4 基因的 DNA 结合区; T_{ADHI} 示酵母乙醇脱氢酶基因终止子; trp1 示色氨酸基因; ColE I ori 示质粒 ColE I 复制起始点; Ap^r 示氨苄青霉素抗性基因; 2 μ ori 示酵母 2 μ 质粒复制起始点; gal4-AD 示酵母 gal4 基因激活区; leu2 示亮氨酸基因; HA 示 9 个氨基酸的标签编码序列; BGH 示牛生长激素终止子; neo 示新霉素抗性基因; Flag 示 11 个氨基酸的标签编码序列

菌能够在 SD/-Trp-Leu 和 SD/-Trp-Leu-His 平板上生长(图 2(a)), 在缺失 Trp 和 Leu 的培养基上生长是这两个质粒本身含有 *trp1* 和 *leu2* 基因所具有的特性, 而在缺失 His 的培养基上生长, 表明 DBD 和 AD 激活了受体菌 HF7C 染色体基因组上 *his* 基因的表达, 4 种阴性对照(pGBT9+pGAD424, pGBT9, pGAD424 和 pGAD/hap+pGBTLAM5')没有表达 *his* 基因的能力, 在缺失 His 培养基上不能生长. 另外, β-半乳糖苷酶活性试验也显示, 表达 Gal4-DBD/HAP 和 Gal4-AD/

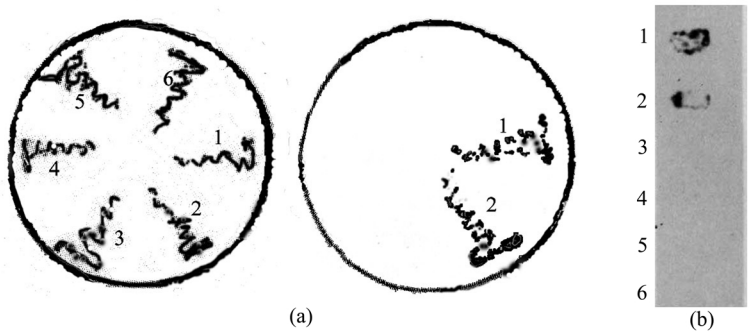


图 2 HAP 蛋白的自我相互作用

(a) 共转化酵母菌在两种选择培养基上的生长. 左为缺失 Trp 和 Leu 但补充 His 的 SD 培养基, 右为缺失 Trp, Leu 和 His 的 SD 培养基. (b) 共转化酵母菌的β-半乳糖苷酶活性膜法试验. 1 和 2 示 pGBT/hap 与 pGAD/hap 共转化; 3 示 pGBT9 与 pGAD424 共转化; 4 示 pGAD424 转化; 5 示 pGBT9 转化; 6 示 pGAD/hap 与 pGBTLAM5' 共转化

HAP 的酵母菌在 X-gal 作用下显示明显的蓝色 (图 2(b)), 也证明 DBD/AD 结合到 UAS 上, 激活 *gal4* 启动子, 驱动了下游 *lacZ* 基因的表达. 两种试验结果均证明了 HAP 能自我相互作用, 形成同源二聚体, 而亲本质粒 pGBT9 和 pGAD424 的共转化酵母菌, 以及用对照蛋白 LaminC 作诱饵构建的质粒 pGBTLAM5' 与 pGAD/*hap* 的共转化酵母菌虽然能在双缺平板(-Trp-Leu)上生长, 但不能在三缺平板(-Trp-Leu-His)上生长, β -半乳糖苷酶活性试验也显阴性.

2.3 HAP 蛋白与 ASY 蛋白的异源聚合作用

为了证明 ASY 与 HAP 在人细胞中也能相互作用, 构建了两种真核表达载体, 其中 pHM/*hap* 的 *hap* 基因 5' 端与 HA 同源融合, pCFasy 的 *asy* 基因 5' 端与 Flag 同源融合, 将两种质粒单独转染和共转染杂交瘤细胞 CGL1, 19 h 后提取总蛋白, 分别用单抗(anti- HA 或

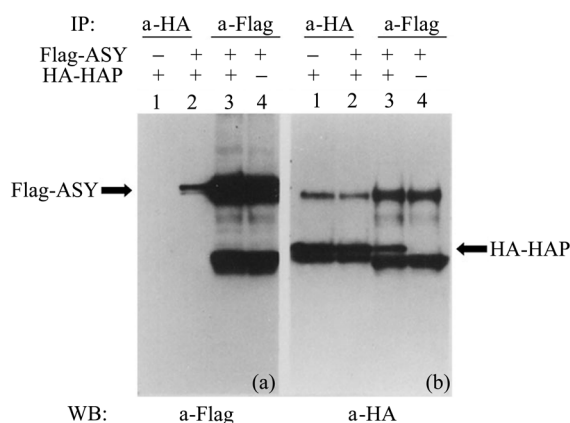


图 3 HAP 蛋白和 ASY 蛋白在哺乳细胞中的交叉免疫沉淀试验

IP 示免疫共沉淀; WB 示 Western blot; a-HA 示抗 HA 单克隆抗体; a-Flag 示抗 Flag 单克隆抗体

2.4 HAP 及其与 ASY 的聚合作用对肿瘤细胞凋亡的调控

以重组表达载体 pE/*asy* 和 pHM/*hap* 分别转染及共转染肿瘤细胞 HeLa 和 Vero. 被转染的 HeLa 细胞培养至 24 h, 在荧光倒置显微镜下观察, 由于凋亡细胞的磷脂酰丝氨酸倒转从胞质到胞膜外, 在 AnnexinV 作用下细胞外被染成绿色, 胞内为红色(图版 I, 附本刊后, 下同). 两种表达载体单独转染时均能诱发 HeLa 细胞凋亡(图版 I -1, 2), 但 ASY 诱发细胞凋亡的效率高于 HAP, 两者共转染时的凋亡效率低于它们单独转染的效率(图版 I -3), 流式细胞计数仪测定时, 用相同量的质粒, 在相同的转染条件下两种蛋白的表达量大致相等, 结果精确显示, pE/*asy* 和 pHM/*hap* 单独转染诱发 HeLa 细胞凋亡的效率分别为 60.26%(图 4(a))和 58.38%(图 4(b)). 共转染时的凋亡率下降到 31.88% (图 4(c)), 比它们单独转染的凋亡率低 89%和 83.1%, 根据以前的报道^[16], ASY 和 HAP 在单独转染肿瘤细胞时形成同源二聚体, 有效地诱发了肿瘤细胞凋亡, 而第 2.3 小节的结果显示它们共转染时必定形成异源二聚体, 因而推论 ASY 与 HAP 之间形成异源二聚体是降低同源二聚体的凋亡诱发功能的原因.

用 Vero 细胞进一步证实了用 HeLa 细胞所得的结果, pE/*asy* 和 pHM/*hap* 单独转染, 其凋亡率分别为 16.12%和 15.50%, 而共转染的 Vero 细胞则仅有 10.12%的凋亡率, 基本上降低到未转染 Vero 细胞(对照)8.80%的本底水平(图 5). Ladder 实验结果再次证明了 Vero 细胞的凋亡

anti-Flag)免疫沉淀, 电泳后, 以两种单抗作探针进行 Western blot, 交叉免疫沉淀结果证明在 pCFasy (pHM/*hap*)单独转染的细胞总蛋白中 ASY(HAP)能被 anti-Flag (anti-HA)沉淀下来, 并被 anti- Flag (anti-HA)检测到(图 3(a)中的 4 和(b)中的 1), 而不能被 anti-HA (anti-Flag)检测到(图 3(b)中的 4 和(a)中的 1). 而在 pCFasy 和 pHM/*hap* 共转染的细胞中, ASY(HAP)可与 HAP(ASY)一起被 anti-HA (anti-Flag)沉淀下来, 并分别被 anti-Flag(anti-HA)和 anti-HA (anti-Flag)检测到(图 3(a)中的 2 和 3 和(b)中的 2 和 3), 试验的结论是: HAP 与 ASY 两种蛋白也能在人细胞中形成异源二聚体.

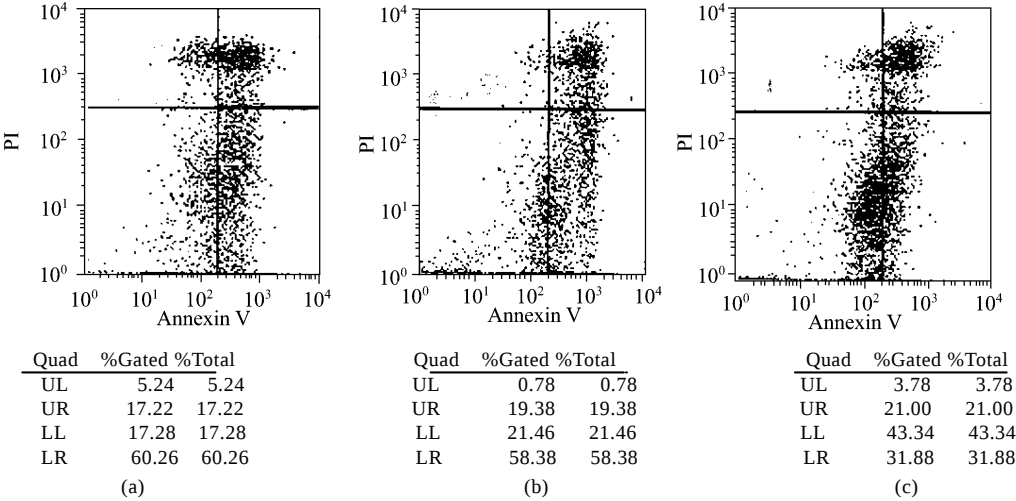


图 4 流式细胞计数仪检测重组表达载体 pE/asy 和 pHM/hap 单独转染和共转染诱发 HeLa 细胞凋亡的效率

(a) pE/asy 转染. (b) pHM/hap 转染. (c) pE/asy 和 pHM/hap 共转染. UL(第 1 象限)无统计意义; UR(第 2 象限)示坏死细胞; LL(第 3 象限)示正常细胞; LR(第 4 象限)示凋亡细胞

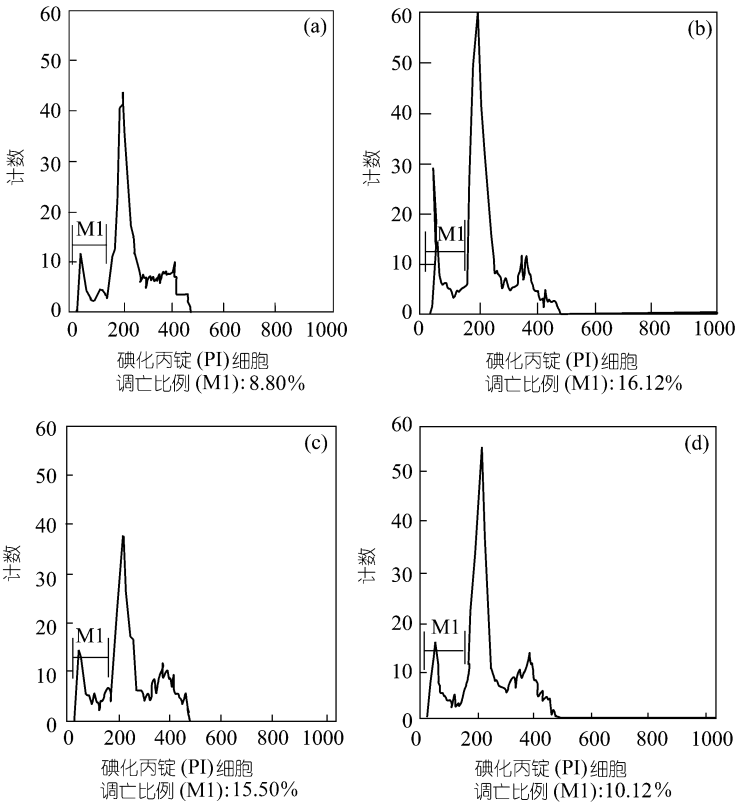


图 5 流式细胞技术仪检测重组表达载体 pE/asy 和 pHM/hap 单独转染和共转染诱发 Vero 细胞凋亡率

(a) 对照细胞本底水平的凋亡效率. (b) pE/asy 转染. (c) pHM/hap 转染. (d) pE/asy 和 pHM/hap 共转染

(图 6). 可以看出, Vero 细胞对 ASY 和 HAP 的凋亡诱发没有 HeLa 细胞敏感, 但其对 ASY, HAP 聚合作用对诱发细胞凋亡的调控趋势仍与 HeLa 细胞一致.

2.5 HAP 及其与 ASY 的聚合作用对正常细胞凋亡的调控

为了证明 HAP 和 ASY 在同源聚合或异源聚合时对细胞凋亡调控的普遍性, 我们还用正常细胞(人胚肺二倍体传代细胞)进行了同样的试验. 质粒转染或共转染正常细胞 24 和 48 h 后, 分别用末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)和荧光标记的核苷酸(称为 TUNEL 试验)检测细胞染色体 DNA 的 3' 末端. 凋亡细胞由于染色体 DNA 片段化, 暴露出 3' 末端, 因此在荧光显微镜下能清楚看到荧光信号(图版 I -4 ~ 6), 从图版 I -4~6 可见 pE/asy 与 pHM/hap 共转染的细胞比它们单独转染细胞的凋亡效率低, 未转染的对照细胞没有看到荧光信号, 结果再次证明 HAP 与 ASY 的异源聚合降低了它们在同源聚合时的凋亡诱发功能.

3 讨论

asy 和 hap 是一对新发现的人细胞凋亡诱发基因^[15~17]. hap 基因全长 2537 bp, 由基因的 5' 端起始转录产生两个转录本(1.8 和 2.7 kb), 在人的多种组织中均有组成型表达^[16]. hap 基因定位在人的 17 号染色体短臂上(结果未公布), 而其基因产物则同 ASY 一样定位在内质网膜上. HAP 与 ASY 都能抑制人骨髓瘤细胞系 Soas 和杂交瘤细胞系 CGL1 的生长, 诱发细胞凋亡. 在酵母细胞中 ASY 能自我相互作用并能同 HAP 相互作用^[15,16]. 本文证明 HAP 也具有自我相互作用的能力. 鉴于酵母双杂交系统中 Gal4-DBD 和 AD 是 1 : 1 结合, 从而激发下游报道基因的表达, 因而在 HAP 的自我相互作用中也一定是按 1 : 1 比例结合的同源二聚体. 同理, 在以 ASY 为诱饵蛋白钓出 hap 基因的酵母双杂交系统中, HAP 和 ASY 必定也能形成异源二聚体, 我们以 Flag 和 HA 为标签, 通过交叉免疫沉淀试验证明了这两种蛋白在人细胞中同样能相互作用, 估计这种相互作用也是以异源二聚体的形式存在.

生物大分子间的相互作用在体内一系列生化反应中普遍存在, 典型的例子是 RNA POL II 除与启动子 DNA 结合外还需要与数种转录因子相互缔合, 才能驱动基因转录. 在细胞凋亡过程中这种蛋白质间的聚合作用更为普遍. 如 BAX/BCL-2(或 BCL-XL)的比率是决定细胞死亡(凋亡诱发)还是生存(凋亡抑制)的关键. 线虫的凋亡诱发蛋白 CED4 与线粒体膜上的 BCL-XL 形成异源二聚体抑制凋亡, 当 BAX 与 BCL-XL 结合使 CED4 释放进入细胞质中时, CED4 诱发

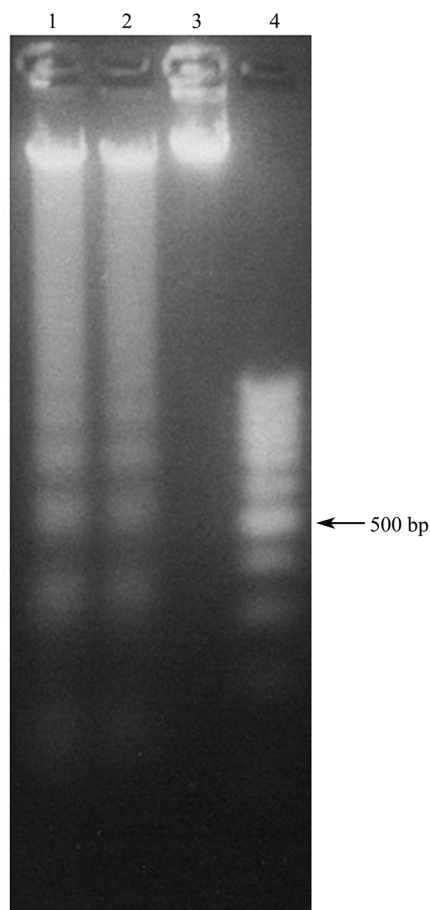


图 6 Ladder 试验检测 ASY 和 HAP 蛋白诱发 Vero 细胞的凋亡

1 示 pE/asy 转染 Vero 细胞; 2 示 pHM/hap 转染 Vero 细胞; 3 示 Vero 细胞对照; 4 示 Marker: Gene Ruler DNA Ladder(100 bp)

了细胞凋亡^[18]。此外, 在众多的蛋白因子聚合作用对凋亡调控的机制中不乏同源聚合体诱发细胞凋亡(如 Apaf1 和 Fas)^[19], 异源聚合体抑制细胞凋亡的例子, 如凋亡执行酶 CAD(caspase 活化的 DNase) 的抑制剂 ICAD 与 CAD 结合形成的异源二聚体抑制了 CAD 的凋亡诱发功能^[20,21]。

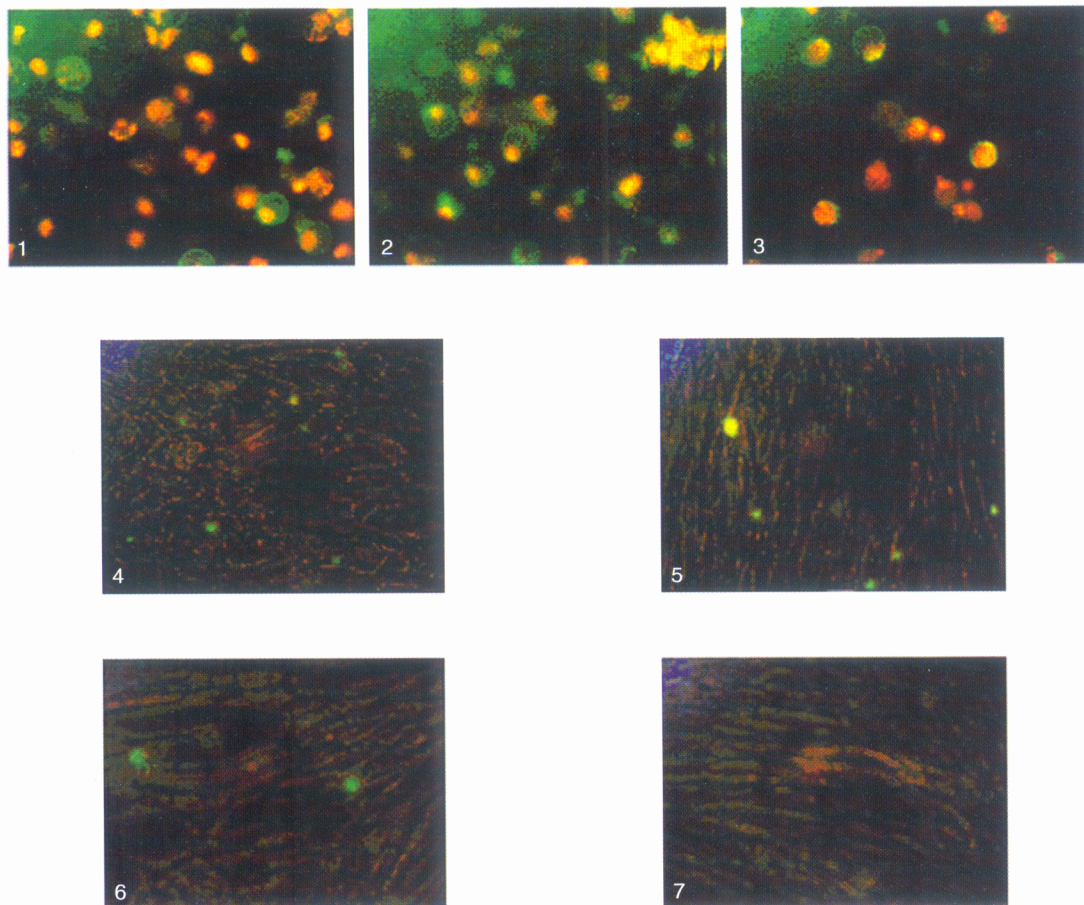
HAP 同源二聚体和与 ASY 的异源二聚体是否对这两种蛋白的凋亡诱发功能具有调控作用? 本文用 3 种细胞 4 种检测方法清楚地证明了这种调控作用。当 HAP 和 ASY 在肿瘤细胞(HeLa 和 Vero)和正常细胞(人胚肺二倍体细胞)中单独表达以同源二聚体形式存在时, 则产生较高的细胞凋亡率, 特别是 HeLa 细胞更为敏感, 死亡率分别达 60.26%和 58.38%, 而当 HAP 与 ASY 共表达形成异源二聚体时, 凋亡率下降 89%和 83.1%。Vero 细胞虽然对 HAP 和 ASY 的凋亡诱发不如 HeLa 细胞敏感, 但这种调控规律十分明显, 异源二聚体对 Vero 细胞凋亡的抑制作用使 Vero 细胞的凋亡达到了本底水平。用正常细胞所得结果虽无定量资料, 但同样趋势也非常清楚。

从以上分析我们认为: HAP 和 ASY 对肿瘤细胞和正常细胞的凋亡诱发功能受它们同源聚合和异源聚合的调控。同源二聚体诱发细胞凋亡, 而异源二聚体抑制细胞凋亡。我们假设 ASY 与 HAP 之间的比率是这类凋亡机制的控制开关, 当 ASY 的表达量超过 HAP 时, 表现出细胞凋亡; 当它们的表达量达到平衡时则抑制了细胞凋亡。鉴于这两种蛋白均定位在内质网膜上, 因此它们的凋亡信号传导途径可能与已知的 3 条途径不同, 而是与 Ca^{2+} 释放和 caspase12 有关的一类新途径^[22], 有关 *hap* 基因的调控功能区和信号传导的研究将陆续报道。

参 考 文 献

- 1 Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972, 26(4): 239 ~ 257
- 2 Cleary M L, Smith S D, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell*, 1986, 47(1): 19 ~ 28
- 3 Korsmeyer S J. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res*, 1999, 59(7 Suppl): 1693s ~ 1700s
- 4 Chao D T, Korsmeyer S J. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16: 395 ~ 419
- 5 Admas J M, Cory S. The Bcl-2 Protein family: Arbiters of cell survival. *Science*, 1998, 281: 1322 ~ 1326
- 6 Yuan J, Shaham S, Ledoux S, et al. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 1993, 75(4): 641 ~ 652
- 7 Cerretti D P, Kozlosky C J, Mosley B, et al. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*, 1992, 256(5053): 97 ~ 100
- 8 Nicholson D W, Thornberry N A. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22(8): 299 ~ 306
- 9 Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997, 88(3): 355 ~ 365
- 10 Ashkenazi A, Dixit V M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998, 281(5381): 1305~1308
- 11 Hannun Y A. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*, 1997, 89(6): 1845 ~ 1853
- 12 Korsmeyer S J, Shutter J R, Veis D J, et al. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol*, 1993, 4(6): 327 ~ 332
- 13 Imai Y, Kimura T, Murakami A, et al. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature*, 1999, 398(6730): 777 ~ 785

- 14 Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev*, 1999, 13(24): 3179 ~ 3184
- 15 Qin Li, Bing Qi, Kiyomasa Oka, et al. Link of a new type of apoptosis-inducing gene *ASY/Nogo-B* to human cancer. *Oncogene*, 2001, 20: 3929 ~ 3936
- 16 齐 兵, 齐义鹏, M. Yutsudo, 等. 用酵母双杂交系统分离一个新的人类细胞凋亡诱发基因. *中国科学, C 辑*, 2000, 30(2): 113 ~ 122
- 17 齐义鹏, 齐 兵, 刘青珍. 一类新的细胞凋亡诱发基因. *科学通报*, 2000, 45(23): 2465 ~ 2468
- 18 Golstein P. Controlling cell death. *Science*, 1997, 275: 1081~1082
- 19 Adrain C, Slee E A, Harte M T, et al. Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem*, 1999, 274(30): 20855~20860
- 20 Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 1998, 391(6662): 43 ~ 50
- 21 Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 1998, 391(6662): 96 ~ 99
- 22 Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 2000, 403(6765): 98 ~ 103



重组表达载体 pE/asy 和 pHM/hap 诱发 HeLa 细胞凋亡(1~3)及其单独转染和共转染人胚肺二倍体传代细胞诱发凋亡(4~7)

1 和 4 示 pE/asy 转染; 2 和 5 示 pHM/hap 转染; 3 和 6 示 pE/asy 和 pHM/hap 共转染; 7 示未转染细胞对照。凋亡细胞由于 Annexin V 染色, 细胞外呈绿色, 细胞内为红色