

昆虫细胞程序性死亡的研究进展

刘凯于^{1,2}, 邓玉杰¹, 张许平¹, 彭建新^{1,2}, 李毅^{1,2}, 洪华珠^{1,2,*}

(1. 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079; 2. 华中师范大学农药与化学生物学教育部重点实验室, 武汉 430079)

摘要: 在昆虫发育和抵抗病原微生物的入侵过程中, 细胞凋亡与自噬性死亡现象十分常见。昆虫细胞凋亡的研究已经取得了许多的成果, 但是有关细胞自噬程序性死亡的研究还正在深入。昆虫细胞凋亡的信号通路至少有 3 条: 一条类似于线虫细胞的凋亡信号通路, 另一条类似于哺乳动物细胞的凋亡信号通路, 还有一条不依赖于胱天蛋白酶的凋亡信号通路。在昆虫的多种组织细胞中, 细胞凋亡与自噬程序性死亡在信号通路上存在互串(cross-talking), 可以相互促进、抑制或替代。了解昆虫细胞程序性死亡对防治害虫具有一定的意义。

关键词: 昆虫细胞; 细胞凋亡; 自噬程序性死亡; 信号转导途径; 互串

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2008)06-0652-07

Research progress in programmed cell death in insects

LIU Kai-Yu^{1,2}, DENG Yu-Jie¹, ZHANG Xu-Ping¹, PENG Jian-Xin^{1,2}, LI Yi^{1,2}, HONG Hua-Zhu^{1,2,*} (1. College of Life Sciences, Huazhong Normal University, Wuhan 430079, China; 2. Key Laboratory of Pesticide & Chemical Biology, Ministry of Education, Huazhong Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: Cell apoptosis and autophagic cell death are common during insect development and resistance against pathogens. Insect cell apoptosis has been elucidated better than insect cell autophagic death. There are at least three signal transduction pathways in insect cell apoptosis: the first one is similar to nematode apoptosis pathway, the second similar to that used by mammals, and the third independent on caspases. Although insect cell apoptosis is distinguished from insect cell autophagic death, the cross-talking may exist between both. The two types of cell death pathways can promote, inhibit or substitute each other in insect cells. It is of great significance in pest control to understand programmed cell death in insects.

Key words: Insect cell; cell apoptosis; autophagic programmed cell death; signal transduction pathway; cross-talking

哺乳动物细胞死亡类型及其机制的研究, 已经取得了重要的进展。已知有 3 种类型: 凋亡(apoptosis)、自噬性细胞死亡(autophagic cell death)和非溶酶体介导的细胞坏死(necrosis)(Edinger and Thompson, 2004)。有人则将细胞死亡分为 I 型、II 型程序性死亡和细胞坏死三类。

细胞凋亡是指为维持内环境稳定, 由基因控制的细胞自主有序的死亡。它是主动的过程, 涉及一系列基因的激活、表达和调控; 它并不是病理条件下的自体损伤, 而是为更好地适应生存环境而主动争取的一种死亡过程。但是在病理条件下也可以诱导细胞凋亡。现已阐明细胞凋亡信号转导途径的典

型特征是: 依赖于胱天蛋白酶(cysteine aspartic acid-specific protease, caspase)的激活和级联反应, 即位于细胞膜上的死亡受体接受刺激信号后, 通过外在途径(extrinsic)和内在途径(intrinsic, 又称线粒体途径)激活起始胱天蛋白酶(caspase-8 或 caspase-9), 再通过胞内信号分子的级联反应, 最终激活起执行作用的胱天蛋白酶(如 caspase-3 等), 使相关底物降解而引起细胞凋亡。但是也有不依赖于胱天蛋白酶的细胞凋亡。

自噬作用普遍存在于真核细胞中, 它以溶酶体对细胞自身结构进行吞噬和降解, 促使细胞组分再循环。它能清除降解受损伤的细胞结构、衰老的细

基金项目: 国家级大学生创新实验项目(2007); 湖北省自然科学基金项目(2007ABA160); 国家自然科学基金项目(30470073, 30370056)。

作者简介: 刘凯于, 男, 1968 年 11 月生, 湖南湘阴人, 博士, 副教授, 主要从事昆虫分子生物学和害虫防治的研究, E-mail: liukaifu@mail.ccnu.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: hzhong@mail.ccnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2007-12-29; 接受日期 Accepted: 2008-05-20

胞器、以及不再需要的生物大分子等,在抵御病原微生物入侵方面也具有重要的作用。但是,当细胞内的自噬现象特别严重时,会引起细胞死亡,这种死亡方式称为细胞自噬程序性死亡。

迄今至少已鉴定了 31 种参与酵母自噬的特异性基因(autophagic gene, *Atg* 或 *Apg*)。在哺乳动物等生物中也分离鉴定到了许多自噬相关基因,它们大多与酵母自噬相关基因高度同源,表明细胞自噬在进化上是高度保守的。微管相关蛋白轻链 3 (*Map1lc3*)蛋白是第一个在哺乳动物细胞中鉴定的定位在自噬体膜上的蛋白。它在体内同时以两种不同分子量的形式存在。其中 18 kDa 的 *Map1lc3* 蛋白是微管相关蛋白 1 的轻链亚基,称为 LC3- I ;另一种 16 kDa 的 *Map1lc3* 蛋白则是自噬体膜的必须组分,称为 LC3- II 。在哺乳动物细胞中,由 *Atg5-Atg12-Atg16L* 组成的复合物参与了自噬体双层膜结构的形成,LC3- II 的含量或 LC3- II /LC3- I 的比例与自噬泡形成的数量呈正相关。自噬调控蛋白 *Beclin 1* (myosin-like BCL-2 interacting protein, 即 *Atg6*)-III 型磷脂酰肌醇三磷酸酶(Class III PI3K)复合物和分泌相关 *Sec* (secretory genes)蛋白(*Sec12*, *Sec16*, *Sec23/24*)参与自噬体的形成。与此相反,氨基酸、ATP 和激素的感受器雷帕霉素靶标 TOR 激酶以及 G 蛋白亚基 *Gai3* 是细胞自噬活动的负调控因子。

细胞凋亡与自噬程序性死亡在死亡信号通路之间可能存在信号途径的互串或者说交叉,这使得细胞死亡类型及其信号转导通路的研究变得较为复杂。例如,细胞的自噬可能激发凋亡,而凋亡的抑制可引起细胞的自噬程序性死亡(Lockshin and Zakeri, 2004)。

不同细胞死亡类型存在互串或交叉,可从下面 3 点得到证明:(1)同一因子处理可引起同一细胞系群体中的细胞通过不同途径死亡;(2)一种细胞死亡类型通路中相关蛋白基因的重组表达,可引起细胞通过另一种途径死亡;(3)两种或几种死亡类型通路中存在共同的程序性死亡相关蛋白。

近年来,许多学者以果蝇等为实验材料,研究了昆虫细胞程序性死亡,取得了一定的突破(Tittel and Steller, 2000 ; Lee and Baehrecke, 2000 ; Cashio *et al.*, 2005)。本文主要综述昆虫细胞凋亡与自噬程序性死亡研究的新进展,重点讨论研究昆虫细胞凋亡途径中产生的争议以及自噬程序性死亡与细胞凋亡的关系,为昆虫生理学、发育生物学、昆虫病原生物学研究和害虫生物防治等提供参考。

1 昆虫细胞的凋亡

1.1 昆虫细胞凋亡的诱导

病毒感染、紫外线辐射、蛋白质合成抑制剂、损伤 DNA 的试剂、昆虫体内的激素、脂类信号小分子、NO、重金属离子、荧光增白剂、植物源农药和氨基酸饥饿等都可以诱导昆虫细胞的凋亡(Lee and Baehrecke, 2000 ; Xia *et al.*, 2005 ; Xiu *et al.*, 2005)。

有关病毒诱导细胞凋亡的研究比较深入。苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrosis virus, AcMNPV)的出芽型病毒粒子可以诱导离体培养的斜纹夜蛾细胞系 SL-zsu-1 细胞凋亡,但是转染的 AcMNPV DNA 不能;从多角体释放出来的包埋型病毒粒子可以诱导斜纹夜蛾中肠上皮细胞的凋亡,但不能诱导斜纹夜蛾细胞系 SL-zsu-1 细胞的凋亡,这说明在病毒粒子的结构蛋白中,有促进细胞凋亡的蛋白质分子存在(代小江, 1997)。西尼罗河病毒(WNV, Flaviviridae, *Flavivirus*)感染淡色库蚊 *Culex pipiens*, 也能导致中肠上皮细胞凋亡,从而抑制病毒向全身组织细胞扩散(Vaidyanathan and Scott, 2006)。

对生存因子的竞争处于劣势,也可以促发昆虫细胞的凋亡。在果蝇的发育过程中,体细胞相互竞争确定背部结构模式形成的形态发生素 Dpp 蛋白(Decapentaplegic, Dpp)以抑制 *brinker* 基因的表达,从而阻止细胞的凋亡。在竞争过程中,慢速分裂细胞内的 *brinker* 基因上调表达而促发细胞凋亡,导致慢速生长细胞逐渐消失。这可能是昆虫通过调控体内细胞的数目和优化组织的适合度,以此来发挥组织功能的一种策略(Moreno *et al.*, 2002)。

1.2 昆虫细胞凋亡的信号通路

线粒体细胞色素 C 的释放,可诱导除线虫以外的多种生物细胞的凋亡,在昆虫体内可诱导依赖于胱天蛋白酶活性的细胞凋亡。果蝇细胞线粒体的细胞色素 C 可以诱导哺乳动物细胞无细胞体系中胱天蛋白酶原的活化(Dorstyn *et al.*, 2004)。果蝇有两个高度同源的细胞色素 C 基因(*cyt-c-d*, *cyt-c-p*),两者的产物都能参与电子传递和胱天蛋白酶原的活化(Arama *et al.*, 2006)。果蝇细胞内的凋亡蛋白酶活化因子 *Apaf-1* (Apoptosis protease activating factor 1)从基因到蛋白及其功能都有了较详细的研究;参与凋亡体(apoptosome)形成的类胱天蛋白酶-9(caspase-9-

like),也在果蝇细胞内得到了证实;在 Apaf-1 基因突变的果蝇胚胎和幼虫的脑组织中,胱天蛋白酶原不能活化,细胞凋亡率降低,这表明 Caspase-9/Apaf-1/cytochrome-c 介导的细胞凋亡通路在果蝇细胞中确实存在(Kanuka *et al.*, 1999; Lee and Baehrecke *et al.*, 2000)。

在鳞翅目昆虫细胞的凋亡过程中,同样也有细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质基质中,并且在细胞凋亡的早期,线粒体膜的通透性发生改变:采用环孢菌素抑制线粒体外膜上渗透性转换孔(mitochondria permeability transition, MPT)的开放,可以抑制杆状病毒诱导的鳞翅目昆虫细胞的凋亡(Malagoli *et al.*, 2002; Mohan *et al.*, 2003; Xiu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007b)。BCL-2 可以抑制哺乳动物细胞中线粒体 MPT 孔的开放,从而阻止细胞色素 C 从线粒体通过 MPT 孔释放到细胞质基质中,对细胞凋亡具有抑制作用。据 Lin 等(2005)报道,来源于鸡传染性法氏囊病毒 Birnavirus 的 *bcl-2* 基因的表达,可抑制昆虫细胞的凋亡。这些都表明细胞色素 C 可能参与了鳞翅昆虫细胞凋亡。

昆虫细胞内至少还存在另一条细胞凋亡信号转导通路,它不依赖于细胞色素 C 的介导。首先,来源于牛心脏的细胞色素 C,不能诱导果蝇细胞系 S2 无细胞体系胱天蛋白酶原的活化,但却可以使果蝇胚胎裂解物中的胱天蛋白酶原活化(Kanuka *et al.*, 2006);采用 RNAi(RNA interference)技术干扰果蝇细胞系 BG2 中细胞色素 C 两个基因的表达,它不能抑制细胞的凋亡以及 DRONC 和 DRICE 的活化(Dorstyn *et al.*, 2004)。许多因子都能诱导果蝇细胞 S2 的凋亡,凋亡过程中没有细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质中(Dorstyn *et al.*, 2002)。这些都表明在果蝇细胞系 S2 和 BG2 等中,还存在另一条激活细胞凋亡的信号转导途径,这一条途径不依赖于细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质中。其次,果蝇 *DApaf-1* 基因的转录物,通过选择性剪接产生了两种形式的 Apaf-1 蛋白,其中一种是 Apaf-1 型,可参与凋亡体的形成,另一种为 CED-4 型,其参与的细胞凋亡通路不依赖于细胞色素 C 的释放(Kanuka *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1999)。这更进一步明确了果蝇细胞中一条凋亡信号转导途径与线虫的转导途径类似,另一条与哺乳动物的转导途径类似。

过去对细胞色素 C 是否介导果蝇细胞的凋亡存在争议,现在已明确它在昆虫细胞凋亡中具有重要的作用。Dorstyn 等(2004)的实验表明(1)若采用

RNAi 技术干扰细胞色素 C 两个基因的表达,不能抑制果蝇培养细胞 BG2 的凋亡,以及 DRONC 和 DRICE 的活化;(2)采用大肠杆菌重组表达的果蝇细胞色素 C 的两个基因产物,可以活化哺乳动物细胞无细胞体系中的胱天蛋白酶原,但是不能使果蝇细胞系 BG2 裂解物中的胱天蛋白酶原活化。(3)在这两个细胞色素 C 基因突变的果蝇品系中,胱天蛋白酶原仍然可以活化。后来的研究表明,实验所用的果蝇细胞系(S2 或 BG2)内缺乏细胞色素 C 所介导的细胞凋亡通路,但是细胞色素 C 可以介导果蝇胚胎细胞的凋亡和精子的发生(Means *et al.*, 2006; Arama *et al.*, 2006; Kanuka *et al.*, 2006)。在这两个细胞色素 C 基因突变的果蝇品系中,胱天蛋白酶原仍然可以活化的原因可能是细胞色素 C 基因突变后仍能表达出短的不完全产物,该产物仍具有诱导胱天蛋白酶原活化的功能。此外,果蝇细胞内还有另一条不依赖于线粒体通透性改变和细胞色素 C 释放的凋亡信号通路(Tait *et al.*, 2004),可能通过基因突变关闭一条通路的同时,开启了另一条通路。

此外,有实验表明昆虫细胞内还有不依赖于胱天蛋白酶原活化和细胞色素 C 释放的细胞凋亡信号转导通路。广谱胱天蛋白酶抑制剂 zVAD-fmk 不能抑制 Debcl(death executioner Bcl-2 homologue)诱导的果蝇细胞系 S2 细胞的凋亡,但是可以抑制很多其他因子诱导的昆虫细胞凋亡,因此昆虫细胞内还存在不依赖于胱天蛋白酶原的细胞凋亡信号通路(Zimmermann *et al.*, 2002)。果蝇的 reaper 不仅可以抑制细胞凋亡抑制蛋白(IAP)的活性,而且还可以抑制蛋白质的合成,在昆虫细胞和哺乳动物细胞中,它能够诱导不依赖于线粒体通透性改变和细胞色素 C 释放的凋亡信号通路的开启(Tai *et al.*, 2004)。

总之,昆虫细胞有多条凋亡信号通路:(1)依赖于线粒体细胞色素 C 的释放和胱天蛋白酶原活化的凋亡信号通路;(2)不依赖于线粒体细胞色素 C 的释放(类似于线虫的凋亡信号转导通路),但依赖于胱天蛋白酶原活化的凋亡信号通路;(3)不依赖于胱天蛋白酶原活化的凋亡信号通路。

1.3 昆虫细胞凋亡的抑制

昆虫的 BCL-2 家族蛋白和昆虫的 IAPs,都具有抗细胞凋亡的作用(Jäättelä, 1999; Kim *et al.*, 2003)。在昆虫的血淋巴中,有些成分也具有广泛的抗昆虫细胞和哺乳动物细胞凋亡的作用(Kim *et al.*, 2003a, 2003b);病原微生物的产物也往往具有

抗细胞凋亡的作用。目前已经发现多种昆虫杆状病毒的一些结构蛋白具有抗凋亡的作用。

家蚕的杆状病毒至少具有两种抗细胞凋亡的基因-*p35* 和细胞凋亡抑制蛋白基因 *iap* (inhibitor of apoptosis), 它们能阻止病毒感染和各种诱导信号引起的细胞凋亡(包人月等, 2006)。

2 昆虫细胞的自噬程序性死亡

2.1 昆虫细胞自噬的诱导

脂类小分子(如 C2-神经酰胺)、蜕皮激素、雷帕霉素、或去除培养基中的葡萄糖、氨基酸饥饿等都可以诱导昆虫细胞的自噬程序性死亡(Myohara, 2004; Ravikumar *et al.*, 2006)。在昆虫的发育过程中, 细胞自噬程序性死亡与细胞凋亡一样普遍。

Cheng 和 Chiar(1995)报道在保幼激素诱导的太平洋折翅蛾 *Diploptera punctata* 的咽侧体细胞自噬泡形成过程中, 高尔基体、光滑内质网和质膜分别参与了 3 种类型自噬泡的形成, 在与溶酶体融合前, 3 种自噬泡均没有酸性磷酸酶的活性。在烟草天蛾 *Manduca sexta* 化蛹时, 20-羟基蜕皮酮可以诱导附节牵引肌运动神经元细胞发生自噬程序性死亡(Kinch *et al.*, 2003), 死亡时细胞内充满自噬泡、固缩的线粒体和解体的细胞核。采用线粒体 ATP 合成酶抑制剂寡霉素处理舞毒蛾细胞系(Ld)或采用去除葡萄糖的培养基培养斜纹夜蛾细胞系(Sl-zsu-1), 都可以引起细胞内的 ATP 水平下降, 导致细胞发生自噬现象, 严重的自噬将会导致细胞死亡(Tettamanti *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007a)。用不含蛋白质的食物饲喂果蝇, 可以较快诱导果蝇细胞产生自噬现象。在幼虫发育的后期, 蜕皮激素也可以引起果蝇多种组织细胞的自噬程序性死亡(Grewal and Saucedo, 2004)。

2.2 昆虫细胞自噬相关的基因

细胞自噬相关的基因最早在酵母细胞中得到了证实, 从而表明细胞的自噬性死亡是由基因决定的, 因此细胞的自噬性死亡也属于程序性死亡的一种类型。随后, 在哺乳动物细胞中也鉴定出了一系列的自噬相关基因。在酵母中已经鉴定了 31 个 *Atg* 基因, 在果蝇中发现了与酵母 *Atg* 具有同源性的 11 个 *Atg* 基因(Gorski *et al.*, 2003; Klionsky *et al.*, 2003; Grewal and Saucedo, 2004; Cao and Klionsky, 2007)。果蝇细胞的 *Atg1* 基因与蚊虫的同源性超过了 50%。因此, 自噬相关基因在不同种类动物的细胞内具有

高度的保守性。

2.3 昆虫细胞自噬的信号通路

果蝇细胞中雷帕霉素的靶标 TOR 激酶能够调节细胞的生长(Zhang *et al.*, 2000)。PI3K/TOR 激酶信号通路还可以抑制真核细胞的自噬活动(Neufeld, 2003)。阻断 PI3K/TOR 激酶信号通路, 可以诱导昆虫的自噬程序性细胞死亡。果蝇蜕皮激素可以抑制 PI3K/TOR 信号通路从而诱导脂肪体细胞发生自噬现象, 饥饿也可以抑制果蝇 TOR 信号通路, 同样能迅速诱导果蝇细胞发生自噬现象(Rusten *et al.*, 2004; Grewal and Saucedo, 2004)。

2.4 昆虫细胞自噬的生物学意义

采用特异性抑制剂抑制果蝇化蛹过程中细胞的自噬程序性死亡, 发现果蝇不能完成其羽化过程。因此推测细胞的自噬程序性死亡和细胞凋亡都对生物体的正常发育具有十分重要的意义。敲除细胞内的自噬基因(*Atg1* 和 *Atg5*)会导致细胞的体积变小, 生长速率变慢并且死亡率提高。这表明细胞自噬的保护功能比抑制细胞生长的功能更加突出(Scott *et al.*, 2004)。

3 昆虫细胞凋亡与自噬程序性死亡的关系

研究结果表明, 细胞自噬程序性死亡与凋亡之间存在着某种调控机制, 二者可以相互拮抗、促进或替换。

3.1 昆虫细胞自噬可与凋亡同时或先后发生

Gorski 等(2003)系统分析了果蝇幼虫唾液腺细胞在自噬前后的基因差异表达, 鉴定了许多差异表达基因, 发现在果蝇幼虫唾液腺细胞自噬性死亡过程中既有自噬相关基因 *apg5-like*, *apg12-like*, *apg6-like* 的表达, 也有凋亡相关基因(*dronc* 和 *dep-1*)的表达。Zacarin(2007)也报道在蜜蜂化蛹时, 唾液腺要发生组织重建, 死亡的细胞既具有自噬的特征, 又具有凋亡的特征。这些都表明在细胞自噬过程中有凋亡相关的基因表达。

据 Akdemir 等(2006)报道, 在果蝇的组织器官重建过程中, 自噬的发生与凋亡体的形成是平行的事件, 或者自噬发生在凋亡体形成之前, 表明自噬与细胞凋亡具有密切的关系。去除葡萄糖的培养基诱导的细胞, 在自噬后主要通过凋亡途径死亡(Liu *et al.*, 2007a), 抑制线粒体电子传递的寡霉素处理的部分昆虫细胞, 也可通过这条途径死亡(Tettamanti *et al.*, 2006)。Tettamanti 等(2007)还报道, 在烟蚜夜

蛾 *Heliothis virescens* 幼虫化蛹前,中肠上皮细胞发生自噬与凋亡,表明二者间可能存在互串。通过基因工程的方法在果蝇的细胞内高表达 *Atg1* 基因,能诱导果蝇细胞的自噬,自噬细胞的死亡具有典型的凋亡特征(胱天蛋白酶原活化,核小体间 DNA 断裂)(Scott *et al.*, 2007)。Velentzas 等(2007)也报道在果蝇卵子发生时细胞的自噬程序性死亡与凋亡同时存在。

多种因子可以诱导昆虫细胞产生自噬现象,这些细胞的死亡往往伴随有凋亡的特征,由此可见,昆虫细胞的凋亡与自噬程序性死亡具有共同的分子参与,并可能具有部分共同的信号通路。参与酵母和哺乳动物细胞自噬的成分,在自噬的昆虫细胞内也存在。目前已经发现在酵母细胞的自噬过程中,AKT 的失活能同时诱导细胞自噬和细胞凋亡。在昆虫细胞自噬过程中,凋亡相关基因的激活可能具有类似的机制。

3.2 昆虫细胞自噬与 BCL-2 和胱天蛋白酶

Swerdlow 和 Distelhorst(2007)报道抗凋亡蛋白 BCL-2 能调节细胞内钙离子的浓度,而钙离子可以作为细胞凋亡和细胞自噬共同的调节分子,因此 BCL-2 也能在细胞的自噬活动中发挥作用。BCL-2 能抑制哺乳动物细胞和酵母细胞中依赖于 Atg6/Beclin1 的细胞自噬活动,即具有双抑制作用(抑制细胞自噬和细胞凋亡)(Pattingre *et al.*, 2005; Cao and Klionsky, 2007)。但是目前还尚未见 BCL-2 在昆虫细胞自噬作用过程中发挥作用的报道。

在甾类激素诱导的果蝇唾液腺细胞自噬过程中,胱天蛋白酶原被活化,抑制该酶活性的 p35 蛋白可以抑制细胞的死亡(Lee and Baehrecke, 2001; Martin and Baehrecke, 2003)。这是细胞自噬伴随有细胞凋亡特征的重要分子机制。

3.3 昆虫细胞自噬与细胞凋亡可由共同的因子促发

昆虫细胞内 ATP 浓度的下降可促发细胞的自噬。去除培养基中的葡萄糖后可引起斜纹夜蛾细胞系 SI-zsu-1 细胞中的 ATP 水平下降,并伴随有细胞的自噬,自噬细胞主要通过凋亡途径死亡(Liu *et al.*, 2007a)。采用寡霉素抑制线粒体中电子的传递,必然会导致细胞内的 ATP 水平的下降,促使细胞发生自噬,绝大部分死亡的自噬细胞不具有凋亡的典型特征(Tettamanti *et al.*, 2006)。

3.4 细胞自噬程序性死亡与细胞凋亡的相对独立性

在昆虫组织细胞中,有些细胞自噬程序性死亡并不与凋亡同时发生。Müller 等(2004)报道在蛻皮激素诱导烟草天蛾幼虫脂肪体的自噬的过程中,除

了 DNA 断裂的原位末端标记法检测为阳性外,没有检测到任何其他的细胞凋亡的特征(凋亡小体, DNA 梯形条带,类胰蛋白酶-3 活性和细胞核染色质的在核膜附近凝集),表明二者在脂肪体细胞的自噬过程中并没有共同的信号通路。可能是由于在烟草天蛾的脂肪体细胞中缺少参与互串的蛋白成分,或者该细胞凋亡信号通路具有不同于唾液腺细胞凋亡通路的特征,从而导致自噬过程中没有出现凋亡相关的特征。这表明昆虫细胞自噬与凋亡的发生时序,具有组织特异性,也许还与诱导剂有关。据 Ravikumar 等(2006)报道,雷帕霉素(rapamycin)的预处理诱导的自噬,能阻止凋亡诱导剂诱导的果蝇细胞的凋亡。这表明细胞的自噬通路又有别于凋亡的通路。

综上所述,昆虫细胞具有多条死亡信号转导通路。细胞自噬程序性死亡与凋亡的关系比较复杂,二者可以相互促进、替换或拮抗。有关信号通路中的互串现象,将是今后研究的重点。

4 昆虫细胞程序性死亡与害虫防治的关系

Lee 等(2007)报道,参与果蝇细胞自噬的 *Atg1* 基因的表达可以下调 S6 激酶的表达,从而抑制细胞的生长。但是也有相反的报道,抑制自噬后,细胞的体积变小,增殖减慢(Scott *et al.*, 2004),说明自噬对细胞的生长具有双重调节作用。今后有望利用特异性的昆虫细胞自噬诱导或抑制剂控制害虫的生长。昆虫细胞被寄生后是否死亡关系到寄生能否成功。Hurd 和 Carter(2004)报道疟原虫 *Plasmodium yoelii nigeriensis* 侵染蚊虫中肠上皮细胞时能促发细胞的凋亡,凋亡的程度决定疟原虫能否在蚊虫体内寄生成功。疟原虫对斑须按蚊 *Anopheles stephensi* 的寄生还能导致卵巢细胞的凋亡,从而减少蚊虫的产卵量(Hopwood *et al.*, 2001)。因此,如果能够促发疟原虫侵染细胞的凋亡,则可以减少蚊虫的数量,降低疟疾的发病率。

许多杀虫剂(含杀虫微生物)可以引起昆虫细胞的程序性死亡,对杀虫剂的毒力具有一定的影响(Clem and Miller, 1993)。例如,荧光增白剂可以抑制杆状病毒诱导的昆虫细胞凋亡,从而有利于病毒在宿主细胞内增殖,降低半致死剂量(Dougherty *et al.*, 2004)。宿主自身的成分能抵御病原微生物诱导的细胞死亡。Rhee 等(1999)报道家蚕的血淋巴能够抑制昆虫细胞-杆状病毒系统中细胞的凋亡,从而

促进病毒的复制并提高外源基因的表达。后来深入的研究发现,家蚕血淋巴中一种分子量为 30 kDa 的贮藏蛋白能够抵抗由多种因子诱导的昆虫细胞凋亡,该基因已由大肠杆菌实现了重组表达,纯化的表达产物具有较强的抗凋亡的活性,在害虫防治上具有潜在的应用前景(Kim *et al.* , 2003a , 2003b)。可见,抑制杆状病毒诱导的昆虫细胞凋亡,能够提高杆状病毒的杀虫效果。昆虫细胞的程序性死亡对昆虫是一把双刃剑,值得在害虫防治领域中作深入的研究。

5 结语

酵母和哺乳动物细胞程序性死亡的研究成果极大地促进了昆虫细胞程序性死亡的研究,但也存在一些问题。例如,在昆虫细胞凋亡研究中,根据哺乳动物细胞制备的与其细胞死亡研究有关的抗体,存在蛋白质非特异性结合的问题,这增加了昆虫细胞程序性死亡研究的难度。果蝇中只发现了 11 种 *Atg* 基因,而酵母中有 31 种 *Atg* 基因。昆虫细胞内既有类似于线虫的凋亡信号通路,也有类似于哺乳动物细胞的凋亡信号通路。这些都表明昆虫细胞的程序性死亡与其他动物细胞的存在一些差异。此外,昆虫种类繁多,果蝇细胞程序性死亡不可能代表所有昆虫细胞死亡的规律,不同类型细胞的程序性死亡信号通路也存在差异。但是,由于昆虫发育速度快,存在变态过程,在变态过程中伴随有明显的细胞自噬程序性死亡与细胞凋亡,因此采用昆虫及其细胞研究程序性死亡机制仍具有独特的优点,今后还应该在多种昆虫中开展这方面的研究,并可能成为昆虫生理学和发育生物学的研究重点。

参 考 文 献 (References)

Akdemir F , Farkas R , Chen P , Juhasz G , Medved 'ova L , Sass M , Wang L , Wang X , Chittaranjan S , Gorski SM , 2006. Autophagy occurs upstream or parallel to the apoptosome during histolytic cell death. *Dev.* , 133(8) : 1 457 – 1 465.

Arama E , Bader M , Srivastava M , Bergmann A , Steller H , 2006. The two *Drosophila* cytochrome C proteins can function in both respiration and caspase activation. *EMBO J.* , 25(1) : 232 – 243.

Bao R , Wu J , Wu X , 2006. The apoptosis induced by insect baculoviruses. *Chin. J. Cell Biol.* , 28(5) : 676 – 680. [包人月, 吴金美, 吴小锋, 2006. 昆虫杆状病毒细胞凋亡抑制基因. 细胞生物学杂志 , 28(5) : 676 – 680]

Cao Y , Klionsky DJ , 2007. Physiological functions of Atg6/Beclin 1 : a unique autophagy-related protein. *Cell Res.* , 17(10) : 839 – 849.

Cashio P , Lee TV , Bergmann A , 2005. Genetic control of programmed cell

death in *Drosophila melanogaster*. *Semin Cell Dev. Biol.* , 16(2) : 225 – 235.

Cheng HW , Chiang AS , 1995. Autophagy and acid phosphatase activity in the corpora allata of adult mated females of *Diptera punctata*. *Cell Tissue Res.* , 281(1) : 109 – 117.

Clem RJ , Miller LK , 1993. Apoptosis reduces both the *in vitro* replication and the *in vivo* infectivity of a baculovirus. *J. Virol.* , 67(7) : 3 730 – 3 738.

Dai X , 1997. Apoptosis Induced by Baculoviruses and Expression of *Lucilia cuprina* Ecdysteroid Receptor. Ph. D Dissertation , Zhongshan University , Guangzhou. [代小江, 1997. 杆状病毒诱导的细胞凋亡与 *LcEcR* 表达的研究. 广州: 中山大学博士学位论文]

Dorstyn L , Read S , Cakouros D , Huh JR , Hay BA , Kumar S , 2002. The role of cytochrome c in caspase activation in *Drosophila melanogaster* cells. *J. Cell Biol.* , 156 : 1 089 – 1 098.

Dorstyn L , Mills K , Lazebnik Y , Kumar S , 2004. The two cytochrome c species, DC3 and DC4 , are not required for caspase activation and apoptosis in *Drosophila* cells. *J. Cell Biol.* , 167(3) : 405 – 410.

Dougherty E , Narang N , Loeb M , Lynn D , Shapiro M , 2004. Fluorescent brightener inhibits apoptosis in baculovirus-infected gypsy moth larval midgut cells *in vitro*. *Biocontrol Sci. Techn.* , 16(2) : 157 – 168.

Edinger AL , Thompson CB , 2004. Death by design : apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* , 16(6) : 663 – 669.

Gorski SM , Chittaranjan S , Pleasance ED , Freeman JD , Anderson CL , Varhol RJ , Coughlin SM , Zuyderduyn SD , Jones SJ , Marra MA , 2003. A SAGE approach to discovery of genes involved in autophagic cell death. *Curr. Biol.* , 13(4) : 358 – 363.

Grewal SS , Saucedo LJ , 2004. Chewing the fat regulating autophagy in *Drosophila*. *Dev. Cell* , 7(2) : 148 – 150.

Hopwood JA , Ahmed AM , Polwart A , Williams GT , Hurd H , 2001. Malaria-induced apoptosis in mosquito ovaries : a mechanism to control vector egg production. *J. Exp. Biol.* , 204(16) : 2 773 – 2 780.

Hurd H , Carter V , 2004. The role of programmed cell death in plasmodium-mosquito interactions. *Int. J. Parasitol.* , 34(13 – 14) : 1 459 – 1 472.

Jäättelä M , 1999. Escaping cell death : survival proteins in cancer. *Exp. Cell Res.* , 248(1) : 30 – 43.

Kanuka H , Sawamoto K , Inohara N , Matsuno K , Okano H , Miura M , 1999. Control of the cell death pathway by Dapaf-1 , a *Drosophila* Apaf-1/CED-4-related caspase activator. *Mol. Cell* , 4(5) : 757 – 769.

Kim EJ , Park TH , 2003a. Anti-apoptosis engineering. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* , 8 : 76 – 82.

Kim EJ , Park HJ , Park TH , 2003b. Inhibition of apoptosis by recombinant 30K protein originating from silkworm hemolymph. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 308(3) : 523 – 528.

Kinch G , Hoffman KL , Rodrigues EM , Zee MC , Weeks JC , 2003. Steroid-triggered programmed cell death of a motoneuron is autophagic and involves structural changes in mitochondria. *J. Comp. Neurol.* , 457(4) : 384 – 403.

Klionsky DJ , Cregg JM , Dunn Jr WA , Emr SD , Sakai Y , Sandoval IV , Sibirny A , Subraman S , Thumm M , Veenhuis M , Ohsumi Y , 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* , 5

- (4): 539–545.
- Lee C, Baehrecke EH, 2000. Genetic regulation of programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Res.*, 10(3): 193–204.
- Lee CY, Baehrecke EH, 2001. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Dev.*, 28: 1443–1455.
- Lee SB, Kim S, Lee J, Park J, Lee G, Kim Y, Kim JM, Chung J, 2007. ATG1, an autophagy regulator, inhibits cell growth by negatively regulating S6 kinase. *EMBO J.*, 8(4): 360–365.
- Lin J, Zhang C, Suzuki S, 2005. An anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family from marine birnavirus inhibiting apoptosis of insect cells infected with baculovirus. *Virus Genes*, 31(2): 185–193.
- Liu K, Tang Q, Fu C, Peng J, Yang H, Li Y, Hong H, 2007a. Influence of glucose starvation on the pathway of death in insect cell line S1: apoptosis follows autophagy. *Cytotechnol.*, 54(2): 97–105.
- Liu L, Peng J, Liu K, Yang H, Li Y, Hong H, 2007b. Influence of cytochrome c on apoptosis induced by *Anagrapha* (*Syngrapha*) *falcifera* multiple nuclear polyhedrosis virus (A(MNPV)) in insect *Spodoptera litura* cells. *Cell Biol. Int.*, 31(9): 996–1001.
- Lockshin RA, Zakeri Z, 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36(12): 2405–2419.
- Malagoli D, Conte A, Ottaviani E, 2002. Protein kinases mediate nitric oxide-induced apoptosis in the insect cell line IPLB-LdFB. *Cell Mol. Life. Sci.*, 59(5): 894–901.
- Martin DN, Baehrecke EH, 2003. Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Dev.*, 131(2): 275–284.
- Means JC, Muro I, Clem RJ, 2006. Lack of involvement of mitochondrial factors in caspase activation in a *Drosophila* cell-free system. *Cell Death Differ.*, 13: 1222–1234.
- Mohan M, Taneja TK, Sahdev S, Mohareer K, Begum R, Athar R, Sah NK, Hasnain SE, 2003. Antioxidants prevent UV-induced apoptosis by inhibiting mitochondrial cytochrome c release and caspase activation in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells. *Cell Biol. Int.*, 27(6): 483–490.
- Moreno E, Basler K, Morata G, 2002. Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature*, 416: 755–759.
- Müller F, ádori C, Sass M, 2004. Autophagic and apoptotic features during programmed cell death in the fat body of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*). *Eur. J. Cell Biol.*, 83(2): 67–78.
- Myohara M, 2004. Real-time observation of autophagic programmed cell death of *Drosophila* salivary glands *in vitro*. *Dev. Genes Evol.*, 214(2): 99–104.
- Neufeld TP, 2003. Body building: regulation of shape and size by PI3K/TOR signaling during development. *Mech. Dev.*, 120(11): 1283–1296.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B, 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6): 927–939.
- Ravikumar B, Berger Z, Vacher C, O'Kane CJ, Rubinshtein DC, 2006. Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. *Hum. Mol. Genet.*, 15(7): 1209–1216.
- Rhee WJ, Kim EJ, Park TH, 1999. Kinetic effect of silkworm hemolymph on the delayed host cell death in an insect cell-baculovirus system. *Biotechnol. Prog.*, 15: 1028–1032.
- Rusten TE, Lindmo K, Juhász G, Sass M, Seglen PO, Brech A, Stenmark H, 2004. Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev. Cell*, 7(2): 179–192.
- Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP, 2004. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev. Cell*, 7(2): 1448–1450.
- Scott RC, Juhász G, Neufeld TP, 2007. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr. Biol.*, 17(1): 1–11.
- Swerdlow S, Distelhorst CW, 2007. Bcl-2-regulated Calcium signals as common mediators of both apoptosis and autophagy. *Dev. Cell*, 12(2): 178–179.
- Tait SWG, Werner AB, de Vries E, Borsrt J, 2004. Mechanism of action of *Drosophila* Reaper in mammalian cells: Reaper globally inhibits protein synthesis and induces apoptosis independent of mitochondrial permeability. *Cell Death Differ.*, 11: 800–811.
- Tettamanti G, Malagoli D, Marchesini E, Congiu T, Eguileor M, Ottaviani E, 2006. Oligomycin A induces autophagy in the IPLB-LdFB insect cell line. *Cell Tissue Res.*, 326(1): 179–186.
- Tettamanti G, Grimaldi A, Pennacchio F, de Eguileor M, 2007. Lepidopteran larval midgut during prepupal instar: digestion or self-digestion? *Autophagy*, 3(6): 630–631.
- Tittel JN, Steller H, 2000. A comparison of programmed cell death between species. *Genome Biol.*, 1(3): 1–6.
- Vaidyanathan R, Scott TW, 2006. Apoptosis in mosquito midgut epithelia associated with West Nile virus infection. *Apoptosis*, 11(9): 1643–1651.
- Velentzas A, Nezis IP, Stravopodis DJ, Papassideri IS, Margaritis LH, 2007. Mechanisms of programmed cell death during oogenesis in *Drosophila virilis*. *Cell Tissue Res.*, 327(2): 399–414.
- Xia Q, Sun H, Hu X, Shu Y, Gu D, Zhang G, 2005. Apoptosis of *Spodoptera litura* larval hemocytes induced by heavy metal zinc. *Chin. Sci. Bull.*, 50(24): 2856–2860.
- Xiu M, Peng J, Hong H, 2005. Mitochondrial response and calcium ion change in apoptotic insect cells induced by SfaMNPV. *Chin. Sci. Bull.*, 50(12): 1191–1198.
- Zacarin EC, 2007. Autophagy and apoptosis coordinate physiological cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Autophagy*, 3(5): 516–518.
- Zhang H, Stallock JP, Ng JC, Reinhard C, Neufeld TP, 2000. Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev.*, 14(21): 2712–2724.
- Zhou L, Song Z, Tittel J, Steller H, 1999. HAC-1, a *Drosophila* homolog of APAF-1 and CED-4 functions in developmental and radiation-induced apoptosis. *Mol. Cell*, 4(5): 745–755.
- Zimmermann KC, Ricci J, Droin NM, Green DR, 2002. The role of ARK in stress-induced apoptosis in *Drosophila* cells. *J. Cell Biol.*, 156(6): 1077–1087.