

丝状真菌的细胞凋亡

厉晓东¹ 卢建平^{1*} 李海娇² 林福呈²

(1. 浙江大学生命科学学院 浙江 杭州 310058)

(2. 浙江大学生物技术研究所 浙江 杭州 310058)

摘要: 凋亡是一种程序性细胞死亡类型, 为多细胞生物发育和维持生命所必需的, 也普遍存在于细菌等原核生物和酵母、丝状真菌等真核生物中。丝状真菌既具有酵母和哺乳动物共有的凋亡同源蛋白, 也具有酵母所不具备的哺乳动物凋亡同源蛋白, 所以其凋亡机制较酵母更为复杂, 而又较哺乳动物简单。凋亡在丝状真菌的发育、繁殖、衰老等过程中具有重要的作用。近年, 丝状真菌作为新的凋亡研究的模式生物被广泛研究, 而且进展迅速。综述丝状真菌的凋亡现象和检测方法, 丝状真菌中凋亡的生物学功能, 丝状真菌凋亡的诱导条件, 以及丝状真菌凋亡相关基因的功能研究进展。

关键词: 凋亡, 丝状真菌, 凋亡基因, 综述

Apoptosis in filamentous fungi

LI Xiao-Dong¹ LU Jian-Ping^{1*} LI Hai-Jiao² LIN Fu-Cheng²

(1. School of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

(2. Institute of Biological Technologies, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

Abstract: Apoptosis is an important type of programmed cell death, which is necessary for the development and growth of higher eukaryotes including bacteria, yeast and filamentous fungi. It has been found that the apoptotic mechanism in filamentous fungi is more complex compared to yeast as they contain several homologs of the mammalian apoptosis-regulated proteins which are not present in the yeast genome. Apoptosis plays important roles in the development, reproduction and aging of filamentous fungi. Today, as new model organisms for apoptotic research, the filamentous fungi have been widely studied. In this paper we reviewed the phenomena, detection methods, functions and induction mechanisms of apoptosis in filamentous fungi.

Keywords: Apoptosis, Filamentous fungi, Apoptotic protein, Review

凋亡是一种程序性细胞死亡类型, 在维持细胞动态平衡、消除受损细胞、应对感染因子、细胞衰

老和分化等过程中具有重要作用^[1]。凋亡广泛存在于动物和植物的发育和生长过程中; 近年发现凋亡

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30971879)

* 通讯作者: Tel: 86-571-86971185; ✉: jplu@zju.edu.cn

收稿日期: 2010-08-30; 接受日期: 2010-11-22

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

也普遍存在于酵母、丝状真菌等真核生物和细菌等原核生物中^[2-4]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和面包酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)培养容易、基因操作简单,是研究凋亡分子机制的良好模式生物^[5]。丝状真菌的基因组、个体形态和生活史比酵母复杂,更接近于多细胞动物,而且许多种类是重要的动植物病原和工业应用菌种,作为新的模式生物越来越受到重视。丝状真菌的凋亡具有重要的生物学意义,丝状真菌的异核体不亲和性(HI)、衰老、杀真菌药物的杀菌作用需要通过凋亡途径实现^[4]。丝状真菌的凋亡现象和凋亡分子机制研究正在迅速、广泛而深入地开展,积累了许多资料,使我们可以初步了解丝状真菌的凋亡机制和功能。本文综述丝状真菌的凋亡研究进展,包括丝状真菌发育、生长和衰老过程中的凋亡现象、凋亡的检测方法、凋亡的生物学意义以及丝状真菌凋亡相关基因的功能研究现状。

1 丝状真菌的凋亡现象及其特点和检测方法

许多研究表明,凋亡经常发生在丝状真菌的细胞衰老、繁殖等过程中^[4,6-7],如:真菌的异核体不亲和性现象^[8]、四子囊锥毛壳菌(*Coniochaeta tetrasperma*)子囊孢子的发育过程^[9]、灰盖鬼伞(*Coprinopsis cinereus*)有性生殖过程中发生的“白帽突变”(White-cap mutant)现象^[10]、菌丝自溶现象(Autolysis)^[11]等都与细胞凋亡有关。有些化学物质可以促使丝状真菌凋亡,如植物鞘氨醇(DHS)和抗菌蛋白 PAF 使构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)凋亡^[12-13]。

在多细胞生物中,细胞凋亡时发生一系列形态上的独特变化,首先是细胞收缩和染色体浓缩,然后是质膜小泡的大量产生和细胞核的裂解,继而凋亡体产生并为吞噬体所吞噬,最后凋亡体被分解,细胞组分全部被重新利用^[14-16]。丝状真菌的凋亡也具有类似于多细胞生物凋亡的形态学和生物化学特点,如活性氧簇(ROS)的累积^[4,17-18],半胱天冬酶(Caspase)的激活^[19],DNA 固缩和裂解^[12],细胞色素

c 从线粒体释放到细胞质、线粒体膜电位的变化以及线粒体结构的改变^[20],细胞膜上的磷脂酰丝氨酸从细胞膜内侧翻到细胞膜外侧等^[21-22]。

为了区别凋亡和其他类型的细胞死亡,在丝状真菌中常采用几种方法联合检测上述凋亡特征。在凋亡的早期细胞都会出现 ROS 的迸发现象^[4],而 ROS 累积可以通过多种氧化敏感的化学物质来检测^[23]。当 ROS 大量存在时,这些化学物质可以改变吸光度或放出荧光,如 ROS 产生时能将二氯二氢荧光素(DCFH-DA)氧化成显示绿色荧光的氧化型二氯荧光素(DCF),且荧光强度与细胞内 ROS 含量成正比。哺乳动物 DNA 在凋亡过程中被核酸内切酶分解后产生特定大小的 DNA 片段,这些片段在琼脂糖电泳中形成 180-200 bp 左右的 DNA 阶梯状断裂(DNA ladder)^[24-25]。烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)细胞凋亡时,断裂的 DNA 片段在电泳后呈拖尾状,没有 DNA ladder 现象^[22]。而构巢曲霉(*A. nidulans*)细胞凋亡时发生所谓“大尺度 DNA 断裂”(Large-scale DNA fragmentation),形成 20 kb 左右 DNA 电泳条带^[12]。DNA 裂解也可以通过 TUNEL 方法鉴别,利用一种末端转移酶在 DNA 片段的 3'端添加荧光标记的 UTP,通过荧光显微镜检测^[12]。真菌凋亡细胞的染色质凝聚、细胞核破裂也可以在荧光染色(碘化丙啶、DAPI 等)后,通过荧光显微镜观察;或者固定、包埋、切片、染色后用透射电子显微镜检测^[21]。Annexin V 是一种重组蛋白,可以特定强效地与磷脂酰丝氨酸发生作用,因而荧光标记的 Annexin V 可以用来检测磷脂酰丝氨酸的外翻^[21-22]。由于丝状真菌具有比较厚的细胞壁,在进行 TUNEL 染色和 Annexin V 染色时首先需要用细胞壁裂解酶破坏细胞壁,或制成原生质体后再检测。使用经人工修饰的 Caspase 底物(如硝基苯胺, p-nitroaniline),当其被 Caspase 裂解时,释放出荧光产物,从而用于检测 Caspase 的活性^[22]。细胞死亡可以用伊文思蓝(Evans blue)染色^[26]、噻唑蓝(MTT)染色或平板计数法^[27]来检测。

2 丝状真菌凋亡的生物学意义

在多细胞生物,凋亡发生在个体发育、生长、

衰老和疾病等阶段。而许多人类疾病的发生,如肿瘤、自身免疫病、神经退行性病变等,与凋亡的紊乱有直接或间接的关系。在丝状真菌中,凋亡与胁迫调节有紧密联系,并与繁殖、衰老以及生命周期的控制等多个方面有关联;而对于病原真菌,凋亡还与其侵染过程以及与宿主的互作有关联。

异己识别是存在于各种生物的一种普遍的现象。在丝状子囊真菌中,异己识别导致的融合菌丝死亡,称为异核体不亲和性^[8,28]。在丝状真菌菌丝的融合过程中,不同遗传背景的菌丝可形成异核体。异核体不亲和位点(Het 位点)决定融合菌丝是否稳定,不稳定的异核体(即异核体不亲和性)菌丝发生快速的细胞死亡过程^[28-29]。融合菌丝死亡时经历一系列与凋亡相关的形态改变,包括菌丝分隔、细胞质液泡化、质膜收缩、脂肪体积累和隔膜小孔的堵塞等^[28-29]。

凋亡与丝状真菌孢子的产生过程相关,包括有性孢子和无性孢子的产生。在一些同宗配合的真菌中,未成熟的子囊含有 8 个子囊孢子。在成熟过程中,4 个子囊孢子死亡,最终产生含 4 个孢子的子囊。对四子囊锥毛壳菌(*C. tetrasperma*)的研究表明在子囊成熟过程中发生孢子死亡,4 个子囊孢子因凋亡而被移除^[9]。担子菌灰盖鬼伞(*C. cinereus*)有性繁殖过程中,具有一种由细胞凋亡引起的“白帽突变”现象,即细胞周期在减数分裂 I 中期停滞而引起特异性的细胞凋亡,或在减数分裂后四分体时期凋亡,但相邻细胞不受影响,子实体继续发育成熟从而具有“白帽”的外观^[10]。

细胞凋亡与丝状真菌的衰老有密切的关系。菌丝衰老过程中,出现自溶现象。而真菌自溶狭义上是指菌丝死亡部分的降解,这种降解伴随着细胞死亡或接着细胞死亡之后发生。自溶的真菌细胞伴随着自噬(Autophagy)和凋亡的特征^[7,30],而且真菌的细胞自噬发生先于自溶发生^[31]。因而广义的真菌自溶包括细胞死亡[凋亡、自噬或坏死(Necrosis)]以及细胞器、细胞质和细胞壁生物大分子的与年龄相关的多层次的有序分解^[32]。ROS 累积是凋亡的一个特征,也是被病原体侵染的宿主反应之一,同时也是细胞衰老的表现之一。真菌凋亡时都会出现 ROS 的

累积^[22]。很多丝状真菌的凋亡基因缺失或过表达都影响菌丝的寿命。如:鹅掌柄孢霉(*Podospora anserina*)的 Metacaspases 基因 *PaMCA1* 和 *PaMCA2*、或 *PaAMID1* 被敲除后,其平均寿命延长;与野生型相比,*PaMCA1* 敲除突变体的原生质体在 H_2O_2 处理后,表现出更高的存活能力^[22]。

稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)是一种引起水稻稻瘟病的病原真菌。附着胞是稻瘟病菌用来侵入水稻叶表的一种特殊细胞,也是稻瘟病菌能否完成侵染循环的关键所在。我们发现在稻瘟病菌附着胞形成过程中也发生了细胞的程序性死亡现象。稻瘟病菌无性孢子常由 3 个细胞组成。萌发时,一般仅 1 个细胞萌发形成 1 个附着胞;另外 2 个细胞在细胞核降解后,细胞内容物迁移进入前 1 个细胞所形成的附着胞内。自噬参与了稻瘟病菌孢子细胞质进入附着胞的迁移过程和附着胞膨压的发生过程,但自噬缺陷突变体的孢子萌发和附着胞形成率并没有变化^[33]。Z-VAD-FMK 是一种 Caspase 的广谱抑制剂,通过使 Caspase 失活而抑制细胞的凋亡。我们发现经过 Z-VAD-FMK 处理的稻瘟病菌孢子显著增加了同时从 2 个细胞或 3 个细胞萌发形成芽管的比率(从对照的 34%到处理组的 66%)。这些现象初步说明,除了自噬外,凋亡也参与了稻瘟病菌的孢子萌发和附着胞形成过程。我们推测:在孢子萌发和附着胞形成过程中,凋亡诱导信号决定孢子的那个细胞死亡(细胞核降解),而死亡细胞的有机成分(细胞核、细胞器等)通过自噬途径分解后进入附着胞。

3 胁迫条件和药物作用下的丝状真菌凋亡

胁迫环境和真菌有毒代谢物能够诱导真菌凋亡,如紫外线、氧化胁迫(H_2O_2 等)、酸性和碱性条件(乙酸等)、高渗透压(高浓度葡萄糖或山梨醇等)、高浓度盐(1.5 mol/L NaCl 等)以及一些特定的化学组分(Cu^{+2} 、 Mn^{+2} 、抗真菌药物和真菌次生代谢产物等)^[4,18,34-35]。如同许多抗肿瘤药物通过促进凋亡而杀死肿瘤细胞或抑制肿瘤的生长,有些抗真菌药物也通过凋亡途径杀死目标真菌,因而丝状真菌凋亡途径蛋白是一个潜在的开发抗真菌药物的作用靶点。

氧化环境的改变可以导致丝状真菌细胞凋亡。

0.1 mmol/L 的 H_2O_2 处理烟曲霉(*A. fumigatus*)原生质体, 可使其表现出许多凋亡的特异性标志, 包括磷脂酰丝氨酸的外翻以及 DNA 的片段化; 而高浓度的 1.8 mmol/L H_2O_2 直接使烟曲霉(*A. fumigatus*)死亡而不显示凋亡特征^[22]。ROS 清除剂可以阻断凋亡过程, 如脯氨酸降低炭疽病菌(*Colletotrichum trifolii*) DARas 突变体的 ROS 水平, 从而阻断凋亡过程, 恢复突变体的正常生长, 而且脯氨酸能够保护真菌抵抗紫外线、盐、热和 H_2O_2 的凋亡诱导作用^[26]。

Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 能够诱导水生丝状真菌(*Varicosporium elodeae*、*Heliscus submersus* 和 *Flagellospora curta*) 细胞凋亡^[36]。凋亡细胞具有典型的 ROS 累积、细胞核形态改变、Caspase 活性增强和 DNA 断裂等特征。凋亡诱导能力与真菌对金属离子胁迫压力的抗性 or 忍耐力有关。 Cu^{2+} 胁迫条件下, *V. elodeae* 的凋亡不依赖于 ROS; 而 Zn^{2+} 胁迫条件下, *F. curta* 的凋亡不依赖于 Caspase。

构巢曲霉(*A. nidulans*) 在静止生长期和自溶期早期遭受碳源供应不足时, 可检测到 DNA 裂解、磷脂酰丝氨酸外翻、细胞核形态改变等凋亡特征^[11]。烟曲霉(*A. fumigatus*) 在静止生长期细胞存活率迅速下降, 也与凋亡有关, 这时期细胞具有磷脂酰丝氨酸外翻、DNA 断裂、Caspase 活性增加等凋亡特征; 而且 Caspase 抑制剂和蛋白合成抑制剂都可以抑制静止生长期菌丝的凋亡^[21]。在真菌生存环境中, 碳源不足是经常发生的胁迫, 凋亡可以被这种胁迫所触发, 从而选择出更适合环境的突变体以保证整个菌落在胁迫环境下的存活。

最近研究表明一些能够杀死真菌的药物和相当多的真菌次生代谢产物事实上是通过诱导凋亡来发挥抗菌作用的。两性霉素 B (AmB) 长期以来作为人类抗真菌感染药物使用, 它通过与质膜上麦角固醇的互作使真菌细胞质膜上形成小孔, 进而破坏细胞完整性, 从而达到抗菌作用。研究表明 AmB 在真菌中能诱导凋亡。用 AmB 处理烟曲霉(*A. fumigatus*) 后, 使用 TUNEL 和 Annexin V 染色方法可以检测到凋亡现象。而当浓度超过 1 mg/L 时, AmB 就主要引起细胞坏死而非凋亡^[22]。番茄素(α -tomatine)能够保

护番茄植株在生长过程中免受细菌、真菌、病毒等的侵害。番茄素可以结合到细胞膜上, 使膜内组分外泄从而杀死细胞。研究发现, 番茄素可以诱导尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) 菌丝凋亡^[37]。番茄素诱导的凋亡仅出现在有氧条件下, 线粒体 F_0F_1 -ATP 合成酶抑制剂、Caspase 抑制剂 D-VAD-FMK 以及蛋白合成抑制剂放线菌酮(Cycloheximide)能够抑制番茄素的作用。番茄素诱发的凋亡细胞具有 DNA 断裂(TUNEL 阳性细胞核)、线粒体膜去极化和 ROS 累积等特征。推测番茄素通过激活酪氨酸激酶和 G 蛋白信号途径, 进而导致胞内 Ca^{2+} 上升和 ROS 迸发。

降胆固醇药物-洛伐他汀(Lovastatin)是一种丝状真菌产生的次生代谢物。洛伐他汀可以诱导总状毛霉(*Mucor racemosus*)、胶孢炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)和灰霉病菌(*Botrytis cinerea*) 凋亡^[38-39]。法呢醇(Farnesol)通过线粒体和 ROS 途径使构巢曲霉(*A. nidulans*) 产生 DNA 凝缩、线粒体降解等凋亡特征^[40]。进一步研究发现法呢醇处理使构巢曲霉(*A. nidulans*) 减少一些参与基因转录、蛋白合成和麦角甾醇合成的基因的 mRNA 丰度, 而增加线粒体蛋白基因的 mRNA 丰度。敲除编码凋亡诱导因子的线粒体氧化还原酶(AifA)后, 突变体对法呢醇更加敏感; 细胞自噬和蛋白激酶 C 也参与法呢醇诱导的凋亡过程^[41]。对于禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)而言, 法呢醇除了诱导凋亡, 还影响大型分生孢子的萌发过程^[42]。同样, 法呢醇也能诱导扩展青霉菌(*Penicillium expansum*) 发生染色质固缩、DNA 裂解、磷脂酰丝氨酸的外翻、胞内 ROS 的累积、Metacaspase 的激活等现象, 但不产生 DNA ladder^[17]。PAF 是扩展青霉菌(*P. expansum*) 分泌的一种抗菌蛋白, PAF 使构巢曲霉(*A. nidulans*) 出现 ROS 累积、DNA 固缩和裂解、线粒体结构的改变、细胞膜上的磷脂酰丝氨酸外翻等凋亡表型^[13]。PAF 的凋亡诱导作用与钙离子的平衡、PKC/MPK 和 cAMP/PKA 信号途径有关^[43-44]。鞘氨醇代谢途径在真菌凋亡调控中具有重要的作用。植物鞘氨醇和 4-羟双氢(神经)鞘氨醇(PHS)诱导构巢曲霉(*A. nidulans*) 发生非 Caspase 依赖性凋亡, 如 DNA 浓缩、大尺度 DNA 断裂、磷脂酰丝氨酸外翻、ROS 累积^[12]。

PHS 也能诱导粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)细胞凋亡,如存活率大大下降、无性孢子萌发异常、DNA 浓缩和片断化、ROS 迸发^[45]。粗糙脉孢菌(*N. crassa*)线粒体呼吸链复合体 I 的基因缺失突变体和 AIF1 基因缺失突变体对 PHS 和 H₂O₂ 具有更强的抗性;线粒体呼吸链复合体 I 的基因缺失突变体在 PHS 处理条件下产生较少的 H₂O₂。而 AMID 基因缺失突变体对 PHS 和 H₂O₂ 更加敏感^[45]。

4 丝状真菌凋亡基因的功能分析

生物信息学研究发现丝状真菌基因组具有 100 多个程序性细胞死亡蛋白,其中有一些蛋白同源于哺乳动物的程序性细胞死亡组分、但在酵母中不存在^[46]。蛋白质合成抑制剂放线菌酮抑制烟曲霉(*A. fumigatus*)凋亡的发生,说明凋亡发生过程需要合成新的蛋白,参与凋亡过程^[22]。但目前为止,只对丝状真菌的少数凋亡基因进行过研究。

线粒体不仅是细胞的能量工厂,还是调节细胞凋亡的重要细胞器。凋亡信号或细胞应急反应引起的线粒体细胞色素 C、凋亡诱导因子(AIF)和核酸内切酶 G (EndoG)的释放,以及线粒体破碎、氧化迸发(Oxidation burst)引起的线粒体膜电位的超极化和衰竭等都能诱导细胞凋亡^[5,20]。线粒体还是细胞内产生 ROS 的主要细胞器,而 ROS 是细胞凋亡的中心调节因子^[47]。

哺乳动物 Bcl-2 蛋白是一种凋亡抑制蛋白,而 Bax 蛋白是一种凋亡促进蛋白。Bcl-2 蛋白调节线粒体的渗透性从而诱导分泌一些促凋亡蛋白,如细胞色素 c, HtrA2/Omi 和 SMAC/Diablo,核酸内切酶 EndoG 和凋亡诱导因子(Aif)等^[4]。丝状真菌中没有发现 Bcl-2 和 Bax 的同源蛋白。把人类 Bcl-2 基因转入胶孢炭疽病菌(*C. gloeosporioides*),表达 Bcl-2 的转化株孢子和菌丝的寿命延长,在液体培养基中生长的菌丝生物量增加,转化株对紫外线、H₂O₂、温度的抗性增加,对植物的致病性增加。而转 Bax 基因的菌丝不能存活,而 Bax 和 Bcl-2 共转化菌株在 Bcl-2 抑制而 Bax 表达的条件下,具有凋亡的特征,如孢子缺少细胞质、不能检测到 DAPI 染色的细胞核,萌发的孢子和芽管出现细胞质液泡化、DNA 片

段化^[38]。这些结果说明 Bcl-2 和 Bax 具有调节丝状真菌凋亡的能力,因而丝状真菌具有与 Bcl-2 和 Bax 蛋白互作的凋亡途径。

Aif1 (凋亡诱导因子)和 Nuc1 (EndoG)是 2 种位于线粒体内膜或基质的 DNA 核酸酶。凋亡发生时,Aif1 和 Nuc1 从线粒体转移到细胞核,降解染色体 DNA,引发凋亡^[48-49]。AMID 是类似 AIF 的具有 NAD(P)H 氧化酶活性的凋亡相关蛋白,与线粒体外膜相关联。粗糙脉孢菌(*N. crassa*) AIF 同源基因的敲除突变体对植物鞘氨醇和 H₂O₂ 的凋亡诱导具有更高的抗性,而 AMID 同源基因的敲除突变体则变得更加敏感^[45]。而构巢曲霉(*A. nidulans*) $\Delta AifA$ 突变体对诱导凋亡的法呢醇和 H₂O₂ 具有更高的敏感性,但 AifA 蛋白在遭受法呢醇诱导凋亡时不转移到细胞核,表明法呢醇诱导凋亡不通过 AIF 途径^[41]。AIF 通过对 DNA 降解的调节直接影响凋亡过程,而 AMID 对于寿命和细胞死亡的影响似乎是间接地通过对呼吸和 ROS 的积累作用完成的^[41]。鹅掌柄孢壳(*P. anserina*) *PaAmid1* 基因(AMID 同源基因)缺失突变体的寿命有一定延长(59%–78%)^[50]。进一步研究发现鹅掌柄孢壳含有位于细胞质的 Aif 的同源蛋白 PaAIF1 和 AMID 的同源蛋白 PaAMID1,以及位于线粒体的 Aif 的同源蛋白 PaAIF2 和 AMID 的同源蛋白 PaAMID2。*PaAif1* 和 *PaAmid1* 基因的敲除突变体的寿命没有延长;而 *PaAif2* 和 *PaAmid2* 基因的敲除突变体寿命延长,而且对 ROS 抗性有很大的提高;*PaAmid2* 基因的敲除突变体交配时,产有性孢子能力减弱^[51]。

人类丝氨酸蛋白酶 HtrA2/Omi 降解某些 IAP 蛋白(凋亡抑制蛋白),阻止 IAP 蛋白的凋亡抑制作用,从而激活 Caspase 活性、促进凋亡。酿酒酵母的 HtrA2/Omi 同源蛋白 Nma111p 位于细胞核,是胁迫条件(高温、H₂O₂)下凋亡必需的^[52]。灰霉菌(*Botrytis cinerea*)同源蛋白被敲除后, $\Delta bcnma$ 突变体表现为孢子萌发延迟,寿命延长,而对氧化胁迫的抗性没有变化^[4]。人类 IAP 蛋白具有 BIR 结构域,而酿酒酵母具有 BIR 结构域的蛋白 Bir1p 是染色体乘客复合体(Chromosomal passenger complex)的组成成分,也具有抗凋亡活性,而 Nma111p 可以抑制 Bir1p 的

活性^[4,53]。灰霉菌中 Bir1p 同源蛋白 BcBir1 过表达后, 生长延长、ROS 累积减少, 对 H₂O₂ 和盐胁迫的敏感性减弱^[4]。

Caspase 蛋白家族作用于凋亡途径的末端。位于细胞质的 Metacaspase 蛋白(Yca1 或 Mca1)是多种外界刺激诱导酵母凋亡所必需的^[54]。酿酒酵母 $\Delta Yca1$ 突变体活性氧累积减少, 对于氧化胁迫具有更高的抗性, 而 YCA1 的过表达对凋亡刺激更加敏感^[55]。丝状真菌一般具有 2 个 Metacaspase 蛋白。烟曲霉 Metacaspase 缺失突变体($\Delta CasA/\Delta CasB$)对氧化胁迫、高盐、乙酸、两性霉素 B、植物鞘胺醇、法呢醇等凋亡诱导条件没有表现出抵抗力^[19]。 $\Delta CasA/\Delta CasB$ 双敲除突变体仍具有 Caspase 活性, 这表明存在其他具有 Caspase 活性蛋白酶。 $\Delta CasA/\Delta CasB$ 双敲除突变体在静止生长期没有出现磷脂酰丝氨酸外翻现象, 但是 $\Delta CasA/\Delta CasB$ 双敲除突变体在内质网胁迫条件下生长受到损伤^[19]。H₂O₂ 和两性霉素 B 诱导烟曲霉的凋亡过程中, Caspase 的活性没有发生显著的变化, Caspase 抑制剂 Z-VAD-fmk 也不能抑制 H₂O₂ 和两性霉素 B 的诱导作用^[22]。鹅掌柄孢壳 *PaMCA1* 和 *PaMCA2* (Metacaspase)敲除突变体都表现为细胞存活时限增加 80%到 148%^[50]。粗糙脉孢菌的异核体不亲和性研究发现: 2 个 Metacaspase 基因都被敲除后, 异核体不亲和性不受影响; 单独敲除 AIF 也不影响异核体不亲和性; 而 ROS 的产生与异核体不亲和性有关^[56]。因此, 丝状真菌中凋亡的 Caspase 途径比较复杂, 除 2 个 Metacaspase 基因外, 还存在其它具有 Caspase 活性的未知蛋白。聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶 [PARP]是 Caspase 的底物蛋白。构巢曲霉(*A. nidulans*)具有 81 kD 大小的 PARP。法呢醇对构巢曲霉杂合体 $\Delta prpA/+$ 的凋亡诱导作用被大大削弱, 可引起 90%双倍体野生型菌丝细胞核固缩的法呢醇只能使不到 20%的构巢曲霉杂合体 $\Delta prpA/+$ 细胞核固缩, 且 PARP 抑制剂烟碱可抑制法呢醇的凋亡诱导作用^[57]。

从这些已研究过的凋亡同源基因可以看到: (1) 丝状真菌凋亡基因功能的研究方法主要是促凋亡基因的敲除和抑凋亡基因的过表达。(2) 研究的凋亡

基因主要为 Caspase 同源基因和核酸酶基因。(3) 这些研究过的凋亡基因, 敲除或过表达后对于凋亡的影响不如在酵母和哺乳动物中同源基因的作用大。

(4) 还没有发现或研究过丝状真菌的外源性途径 (Extrinsic pathway)。在稻瘟病菌基因组中, 我们也发现了 50 多个动物或酵母凋亡蛋白的同源蛋白, 其中包括 Mca1、Mca2、Esp1、Fis1、Aif1、Ndi1、Nuc1、Cdc48、Mmi1、Nma111、Uth1 等重要的凋亡调控蛋白。这些凋亡蛋白在多细胞动植物和酵母的凋亡各种途径的调控中起着关键性的作用。通过基因敲除的方法, 获得了 10 多个凋亡同源基因敲除突变子 (如 *MCA1*、*MCA2*、*FIS1*、*AIF1*、*NUC1*、*MMI1*、*SOD1* 等), 目前正在分析这些基因在稻瘟病菌发育和致病过程中的作用。

5 展望

凋亡是一个比较保守的生理过程, 通过对许多凋亡机制相对简单的模式生物的研究, 有利于揭示和阐明哺乳动物等高等生物的凋亡信号调控机制。酵母作为一种凋亡研究的模式生物, 从凋亡相关基因到凋亡途径都有比较深入的研究^[4]。由于丝状真菌在进化上位于酵母和哺乳动物之间, 其凋亡机制较酵母更为复杂而较哺乳动物简单。对于丝状真菌凋亡的研究, 起步较晚, 发展迅速, 还有许多问题有待解决, 如: 大多数丝状真菌凋亡同源蛋白的功能还不明; 丝状真菌的 Metacaspases 在凋亡中的作用为什么不同于酵母和哺乳动物中同源蛋白的作用? 丝状真菌凋亡的诱导信号和途径是什么? 凋亡在大多数丝状真菌生活史中的功能和意义是什么? 一些丝状真菌是重要的工业菌株, 用来生产有机酸、酶和抗生素等化合物, 那么凋亡对于真菌发酵过程会有怎样的影响? 有些真菌侵害动植物和人类, 如稻瘟病菌 (*M. oryzae*) 侵染多种禾本科作物, 凋亡对于真菌侵入有怎样的影响? 相信随着对丝状真菌凋亡研究的不断深入, 人类对于丝状真菌的凋亡过程及其生物学功能会有更透彻的理解和更清晰的阐明, 促进丝状真菌病害的防治和有益真菌在农业、工业和医学领域的充分利用。

参考文献

- [1] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points[J]. Cell, 2004, 116(2): 205–219.
- [2] Golstein P, Aubry L, Levraud JP. Cell-death alternative model organisms: why and which[J]? Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(10): 798–807.
- [3] Lewis K. Programmed death in bacteria[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(3): 503–514.
- [4] Sharon A, Finkelstein A, Shlezinger N, et al. Fungal apoptosis: function, genes and gene function[J]. FEMS Microbiol Rev, 2009, 33(5): 833–854.
- [5] Fröhlich KU, Fussi H, Ruckenstein C. Yeast apoptosis--from genes to pathways[J]. Semin Cancer Biol, 2007, 17(2): 112–121.
- [6] Ramsdale M. Programmed cell death in pathogenic fungi[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1783(7): 1369–1380.
- [7] Robson GD. Programmed cell death in the *Aspergillus* and other filamentous fungi[J]. Med Mycol, 2006, 44(s1): S109–S114.
- [8] Saupe SJ, Clavé C, Bégueret J. Vegetative incompatibility in filamentous fungi: *Podospora* and *Neurospora* provide some clues[J]. Curr Opin Microbiol, 2000, 3(6): 608–612.
- [9] Raju NB, Perkins DD. Programmed ascospore death in the homothallic ascomycete *Coniochaeta tetraspora*[J]. Fungal Genet Biol, 2000, 30(3): 213–221.
- [10] Lu BC, Gallo N, Kües U. White-cap mutants and meiotic apoptosis in the basidiomycete *Coprinus cinereus*[J]. Fungal Genet Biol, 2003, 39(1): 82–93.
- [11] Emri T, Molnár Z, Pócsi I. The appearances of autolytic and apoptotic markers are concomitant but differently regulated in carbon-starving *Aspergillus nidulans* cultures[J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 251(2): 297–303.
- [12] Cheng JJ, Park TS, Chio LC, et al. Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(1): 163–177.
- [13] Leiter E, Szappanos H, Oberparleiter C, et al. Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(6): 2445–2453.
- [14] Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239–257.
- [15] Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, et al. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages[J]. J Immunol, 2003, 171(9): 4672–4679.
- [16] Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death[J]. Nature, 2000, 407(6805): 784–788.
- [17] Liu P, Luo L, Guo JH, et al. Farnesol induces apoptosis and oxidative stress in the fungal pathogen *Penicillium expansum*[J]. Mycologia, 2010, 102(2): 311–318.
- [18] Phillips AJ, Sudbery I, Ramsdale M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(24): 14327–14332.
- [19] Richie DL, Miley MD, Bhabhra R, et al. The *Aspergillus fumigatus* metacaspases CasA and CasB facilitate growth under conditions of endoplasmic reticulum stress[J]. Mol Microbiol, 2007, 63(2): 591–604.
- [20] Eisenberg T, Büttner S, Kroemer G, et al. The mitochondrial pathway in yeast apoptosis[J]. Apoptosis, 2007, 12(5): 1011–1023.
- [21] Mousavi SAA, Robson GD. Entry into the stationary phase is associated with a rapid loss of viability and an apoptotic-like phenotype in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*[J]. Fungal Genet Biol, 2003, 39(3): 221–229.
- [22] Mousavi SAA, Robson GD. Oxidative and amphotericin B-mediated cell death in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* is associated with an apoptotic-like phenotype[J]. Microbiology, 2004, 150(Pt6): 1937–1945.
- [23] Madeo F, Fröhlich E, Ligr M, et al. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast[J]. J Cell Biol, 1999, 145(4): 757–767.
- [24] Ribeiro GF, Côrte-Real M, Johansson B. Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock[J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(10): 4584–4591.
- [25] De Maria R, Lenti L, Malisan F, et al. Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis[J]. Science, 1997, 277(5332): 1652–1655.
- [26] Chen CB, Dickman MB. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(9): 3459–3464.
- [27] Teparić R, Stuparević I, Mrša V. Increased mortality of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein mutants[J]. Microbiology, 2004, 150(Pt10): 3145–3150.
- [28] Glass NL, Dementhon K. Non-self recognition and programmed cell death in filamentous fungi[J]. Curr Opin Microbiol, 2006, 9(6): 553–558.
- [29] Glass NL, Kaneko I. Fatal attraction: nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi[J]. Eukaryot Cell, 2003, 2(1): 1–8.
- [30] White S, McIntyre M, Berry DR, et al. The autolysis of industrial filamentous fungi[J]. Crit Rev Biotechnol, 2002, 22(1): 1–14.
- [31] Cebollero E, Gonzalez R. Induction of autophagy by second-fermentation yeasts during elaboration of

- sparkling wines[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(6): 4121–4127.
- [32] Emri T, Molnár Z, Szilágyi M, et al. Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2008, 151(2/3): 211–220.
- [33] Lu JP, Liu XH, Feng XX, et al. An autophagy gene, MgATG5, is required for cell differentiation and pathogenesis in *Magnaporthe oryzae*[J]. Curr Genet, 2009, 55(4): 461–473.
- [34] Liang QL, Zhou B. Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways[J]. Mol Biol Cell, 2007, 18(12): 4741–4749.
- [35] Silva RD, Sotoca R, Johansson B, et al. Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Mol Microbiol, 2005, 58(3): 824–834.
- [36] Azevedo MM, Almeida B, Ludovico P, et al. Metal stress induces programmed cell death in aquatic fungi[J]. Aquat Toxicol, 2009, 92(4): 264–270.
- [37] Ito S, Ihara T, Tamura H, et al. α -Tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*[J]. FEBS Lett, 2007, 581(17): 3217–3222.
- [38] Barhoom S, Sharon A. Bcl-2 proteins link programmed cell death with growth and morphogenetic adaptations in the fungal plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Fungal Genet Biol, 2007, 44(1): 32–43.
- [39] Roze LV, Linz JE. Lovastatin triggers an apoptosis-like cell death process in the fungus *Mucor racemosus*[J]. Fungal Genet Biol, 1998, 25(2): 119–133.
- [40] Semighini CP, Hornby JM, Dumitru R, et al. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi[J]. Mol Microbiol, 2006, 59(3): 753–764.
- [41] Savoldi M, Malavazi I, Soriani FM, et al. Farnesol induces the transcriptional accumulation of the *Aspergillus nidulans* Apoptosis-Inducing Factor (AIF)-like mitochondrial oxidoreductase[J]. Mol Microbiol, 2008, 70(1): 44–59.
- [42] Semighini CP, Murray N, Harris SD. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and development by farnesol[J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 279(2): 259–264.
- [43] Binder U, Chu ML, Read ND, et al. The antifungal activity of the *Penicillium chrysogenum* protein PAF disrupts calcium homeostasis in *Neurospora crassa*[J]. Eukaryot Cell, 2010, 9(9): 1374–1382.
- [44] Binder U, Oberparleiter C, Meyer V, et al. The antifungal protein PAF interferes with PKC/MPK and cAMP/PKA signalling of *Aspergillus nidulans*[J]. Mol Microbiol, 2010, 75(2): 294–307.
- [45] Castro A, Lemos C, Falcão A, et al. Increased resistance of complex I mutants to phytosphingosine-induced programmed cell death[J]. J Biol Chem, 2008, 283(28): 19314–19321.
- [46] Fedorova ND, Badger JH, Robson GD, et al. Comparative analysis of programmed cell death pathways in filamentous fungi[J]. BMC Genomics, 2005, 6: 177.
- [47] Perrone GG, Tan SX, Dawes IW. Reactive oxygen species and yeast apoptosis[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1783(7): 1354–1368.
- [48] Parrish JZ, Xue D. Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in *C. elegans*[J]. Mol Cell, 2003, 11(4): 987–996.
- [49] Ye H, Cande C, Stephanou NC, et al. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor[J]. Nat Struct Biol, 2002, 9(9): 680–684.
- [50] Hamann A, Brust D, Osiewacz HD. Deletion of putative apoptosis factors leads to lifespan extension in the fungal ageing model *Podospora anserina*[J]. Mol Microbiol, 2007, 65(4): 948–958.
- [51] Brust D, Hamann A, Osiewacz HD. Deletion of *PaAif2* and *PaAmid2*, two genes encoding mitochondrial AIF-like oxidoreductases of *Podospora anserina*, leads to increased stress tolerance and lifespan extension[J]. Curr Genet, 2010, 56(3): 225–235.
- [52] Belanger KD, Walter D, Henderson TA, et al. Nuclear localisation is crucial for the proapoptotic activity of the HtrA-like serine protease Nma11p[J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt21): 3931–3941.
- [53] Shimogawa MM, Widlund PO, Riffle M, et al. Bir1 is required for the tension checkpoint[J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(3): 915–923.
- [54] Khan MAS, Chock PB, Stadtman ER. Knockout of caspase-like gene, *YCA1*, abrogates apoptosis and elevates oxidized proteins in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(48): 17326–17331.
- [55] Madeo F, Herker E, Maldener C, et al. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast[J]. Mol Cell, 2002, 9(4): 911–917.
- [56] Hutchison E, Brown S, Tian C, et al. Transcriptional profiling and functional analysis of heterokaryon incompatibility in *Neurospora crassa* reveals that reactive oxygen species, but not metacaspases, are associated with programmed cell death[J]. Microbiology, 2009, 155(Pt 12): 3957–3970.
- [57] Semighini CP, Savoldi M, Goldman GH, et al. Functional characterization of the putative *Aspergillus nidulans* poly(ADP-ribose) polymerase homolog PrpA[J]. Genetics, 2006, 173(1): 87–98.