

Bcl-2 基因的研究进展

吴 静, 路 红, 薛群基

吴静, 薛群基, 中国科学院兰州化学物理研究所 甘肃省兰州市 730000
路红, 兰州医学院第一附属医院消化科 甘肃省兰州市 730000
项目负责人: 吴静, 730000, 甘肃省兰州市, 中国科学院兰州化学物理研究所. wujing36@163.com
电话: 0931-8625200-6872
收稿日期: 2004-06-16 接受日期: 2004-07-22

摘要

Bcl-2 作为一种重要的凋亡调控基因, 他不仅能够抑制细胞凋亡, 延长细胞寿命, 而且参与细胞增生的调控, 他可以调控细胞由 G₀ 期向 S 期转换的时间, 其过表达可以延长静止细胞的细胞周期进程, 但不影响细胞的生长. 据研究显示, Bcl-2 的磷酸化亦能影响细胞周期进程, 此外, Bcl-2 在肿瘤的形成及肿瘤多药耐药的形成中也起着重要的作用. 因此通过对 Bcl-2 基因不断深入的研究, 可为肿瘤治疗提供新的思路和启示.

吴静, 路红, 薛群基. Bcl-2 基因的研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(9):2171-2173
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2171.asp>

0 引言

Bcl-2 基因是 Bcl-2 基因家族的一个重要成员, 该基因首先在小鼠 B 细胞淋巴瘤中被发现, 故称 Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2). 以往对于 Bcl-2 基因的研究主要集中在他们对于整个细胞凋亡过程的调控, 但近年来人们发现, Bcl-2 基因及其蛋白有着更为广泛的作用, 他们的过表达及其磷酸化也参与细胞增生的调控, 并且在肿瘤的形成和肿瘤的多药耐药中起着至关重要的作用, 因此, 本文就 Bcl-2 基因目前的研究进展作一综述.

1 Bcl-2 基因的生物学特性

Bcl-2 基因家族是目前最受重视的调控细胞凋亡的基因家族之一, 现已发现的 Bcl-2 基因家族的系列成员包括抑制细胞凋亡的 Bcl-2, *bcl-xl*, *bcl-w*, *A1*, *Mcl-1*, *Bfl-1* 等; 促进细胞凋亡的 *Bcl-xs*, *bax*, *bad*, *bak*, *bim*, *Hrk* 等. 虽然该家族内各成员在不同组织中表达各不相同, 但他们在结构上有共同之处: 一是在碳端有一疏水跨膜结构域(TM), 决定蛋白的亚细胞定位, 二是他们含有 4 个保守的 BH 结构域(BH1-BH4), 其中 BH1 和 BH2 为他们所共有, 参与 Bcl-2 家族成员的二聚化; BH3 结构域是 Bcl-2 家族成员促凋亡活性不可缺少的^[1]; 实验证实, 缺乏 BH4 或含突变 BH4 的 Bcl-2 突变体均不能阻止细胞凋亡^[2], 因此认为 BH4 结构域是

Bcl-2 家族成员抗凋亡活性所必需的.

Bcl-2 基因是 Bcl-2 基因家族的一个重要成员, 该基因首先在小鼠 B 细胞淋巴瘤中被发现, 故称 Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2). Bcl-2 基因位于 18q²¹, 其分子结构中含有 3 个外显子和 1 个内含子, 第 I 个外显子不翻译, 第 II, III 外显子被 225 kb 的内含子隔开, 为蛋白编码区, 在 3' 端和 5' 端分别有 5.3 kb、1.4 kb 两个非翻译片段, 其中 3' 端非翻译区对 Bcl-2 的表达起调节作用. Bcl-2 基因与线虫的 CED-9 基因有 23% 的同源性, 他编码一个含 229 个氨基酸、分子质量为 26 ku 的膜蛋白. 在许多胚胎组织中可见 Bcl-2 蛋白的广泛表达, 但在成体组织中 Bcl-2 似乎更多地存在于迅速分裂和分化的细胞中. 在成熟的细胞或处于被消除阶段的细胞中, Bcl-2 表达下降. Bcl-2 蛋白主要定位于线粒体膜、内质网膜、核膜上, 具有离子通道和停靠蛋白的双重作用, 在其 C 端附近有含 19 个疏水氨基酸的区域, 突变研究发现这一区域对 Bcl-2 生化功能的发挥起着重要的作用, 他可以嵌入到膜中, 将 Bcl-2 固定在膜上. Bcl-2 蛋白的高表达主要与特异性的 t(14;18)(q24;q21) 染色体易位有关.

2 Bcl-2 与细胞凋亡

Bcl-2 基因是一重要的凋亡抑制基因, 转基因动物和基因转染实验表明, Bcl-2 基因及其表达蛋白可以抑制多种组织细胞凋亡, 延长细胞寿命, 而且他能抑制多种因素如: 质膜过氧化、电离辐射、血清及生长因子缺乏等引起的细胞凋亡, 故也称为“存活基因”. 他主要通过自身二聚或与 Bax 等蛋白形成异二聚体来发挥其调控细胞凋亡的功能, Bax-Bcl-2 异二聚体可以抵消 Bcl-2-Bcl-2 同二聚体的抑凋亡作用, 而发挥促凋亡的功能^[3]. Bcl-2 蛋白与膜的结合对于其发挥功能是及其重要的, 实验表明, 失去膜定位能力的 Bcl-2 蛋白其抗凋亡能力明显减弱, 且不同亚细胞定位的 Bcl-2 蛋白在不同类型细胞中可能参与不同的细胞凋亡途径. 线粒体膜上的 Bcl-2 至少在三个水平发挥抑制凋亡的功能: (1) Bcl-2 能改变线粒体疏基的氧化还原状态来控制其膜电位从而调控细胞凋亡; (2) Bcl-2 蛋白可以阻止 bax/bak 的寡聚化, 从而抑制线粒体细胞色素 C⁴和 / 或 AIF(凋亡介导因子)等重要蛋白的释放, 提高细胞的生存能力; (3) Bcl-2 可以通过阻止 caspase 的活化如: caspase-2, 在线粒体细胞色素 C 释放的上游发挥其抗凋亡的作用^[5-6]. 有研究发现这种作用主要通过 CED-4 来实现, Bcl-2 通过和 CED-9 直接作用, 可以抑制 CED-3/ CED-4 复合体中 CED-4 的寡聚

作用,从而阻止 caspase 的活化^[7].最初认为 Bcl-2 能将凋亡蛋白前体 Apaf-1 定位至线粒体膜上,发挥抑制凋亡的作用,但之后有报道否定了这种相互作用^[8].

Bcl-2 抑制细胞的凋亡中 Ca^{2+} 起了很重要的作用,在细胞凋亡过程中 DNA 的消化需要相关的 Ca^{2+} 依赖性核酸内切酶的参与,而内质网膜上的 Bcl-2 蛋白可以阻断 Ca^{2+} 从内质网释出,使依赖 Ca^{2+} 的核酸内切酶活性降低,从而阻断细胞凋亡. Bcl-2 蛋白还可能作用于线粒体与核孔复合体上的信号分子,控制细胞信号转导,延长细胞生存.此外, Bcl-2 蛋白可能通过调节转录因子 NF- κ B 来发挥其抗氧化作用或抑制氧化自由基的产生,抑制细胞凋亡^[9-10].近来 SiRNA 研究显示^[11-12], Bcl-2 基因的沉默可以诱导 P53 依赖的凋亡途径的活化.经体外多细胞系研究显示,在结肠癌中 Bcl-2 的沉默能普遍诱导 P53 依赖的凋亡发生,且在 Bcl-2/P53 凋亡途径中, Bax 和 caspase-2 是必需的中介者.据此推测在生理情况下, Bcl-2 可能抑制 P53 的凋亡前体的功能,在一些应激因素的作用下, P53 的活化潜能将被诱导.已证实活化和稳定状态的 P53 可以改变 Bcl-2 的表达率,从而诱导凋亡的发生^[12].

3 Bcl-2 在细胞增生中的作用

虽然 Bcl-2 蛋白及他的类似蛋白在凋亡的调控中起重要的作用,但在细胞系和转基因动物中他们的过表达揭示了他们也参与细胞增生的调控^[13-14]. Bcl-2 突变的功能分析亦显示, Bcl-2 家族成员的细胞周期调控功能在某种程度上是与其凋亡调控功能相独立的.

3.1 Bcl-2 的过表达对细胞周期的影响 Bcl-2 与细胞周期调控之间的联系最早的推测,即是 Bcl-2 高表达的细胞能够幸免于生长因子缺乏所诱导的细胞凋亡而处于静止状态.随后证实, IL-3 缺乏的情况下,在鼠的骨髓瘤细胞 BAF3 中, Bcl-2 的过表达不仅可以延迟凋亡的发生,而且可以诱导细胞周期 G1 期的快速捕获,在给予 IL-3 之后,这些细胞可重新进入细胞周期.转基因实验发现,在体外用丝裂原刺激, Bcl-2 转基因老鼠其胸腺细胞的转化比同胎的对照组慢,表达 Bcl-2 转基因的 B、T 细胞进入细胞周期比对照组的淋巴细胞慢^[14-15].与 Bcl-2 过表达的 T 细胞相比, Bcl-2 缺乏的 T 细胞其细胞周期进程明显加快^[16].据此推测, Bcl-2 的水平可能调控细胞由 G0 期向 S 期转换的时间,他的过表达可以延迟静止细胞的细胞周期进程,但不影响细胞的生长,在适宜的条件下,他仍然可以增生. Bcl-2 和他的家族内的其他成员如: Bcl-x1, Bcl-w, ML-1 及 BHRF-1 等共同发挥抗增生的作用.经 bax 转基因鼠证实,促凋亡成员 Bax 和抑凋亡成员 Bcl-2 或 Bcl-x1 的过表达以相反的方式影响细胞周期,且体外实验显示, Bax 能抵消 Bcl-2 的抗增生作用^[17].

3.2 Bcl-2 的磷酸化对细胞周期的影响 Bcl-2 蛋白能在多个位点通过磷酸化进行转录后修饰,但是磷酸化的

功能仍不清楚.一些实验提示, Bcl-2 的磷酸化可以影响细胞周期进程.如在 Okadaic acid 处理的 HL-60 细胞中,蛋白在他的非结构环内,即第 56 位苏氨酸处被 CDK1 磷酸化^[18],研究表明,第 56 位苏氨酸的磷酸化和细胞周期中 G2/M 期的细胞积聚相关,且他能使 M 期向 G0/G1 期的转换延迟.第 56 位苏氨酸突变为丙氨酸 (Bcl-2, T56A) 可以抵消 Bcl-2 的细胞周期抑制作用,而不影响他的抗凋亡作用^[18].用微管损害剂如帕尼特西处理细胞,在 G2/M 期捕获的细胞中也发生 Bcl-2 的磷酸化^[19].磷酸化位点主要在 Bcl-2 的非结构环内,即第 70 位色氨酸、第 87 位色氨酸和第 69 位苏氨酸残基处,其中第 70 位色氨酸是主要的磷酸化位点^[20]. Yamamoto *et al*^[19] 的研究表明, ASK1/JNK 通路是 Bcl-2 在 G2/M 期发生磷酸化的主要通路. Vantieghem *et al*^[21] 进一步证实, Bcl-2 的磷酸化能够选择性的被 CDK 抑制剂 roscovitine 抑制, CDK1 的过表达可以增强其磷酸化.

4 Bcl-2 基因与肿瘤

4.1 肿瘤形成 人体中各组织细胞数目的维持是由细胞增生与死亡之间的平衡来实现的,如果细胞增生速度加快或 / 和死亡速度减慢,均可引起体内细胞异常增多,导致肿瘤的发生.已证实程序性细胞死亡的抑制是肿瘤形成过程中最关键的一步, Bcl-2 基因作为一种重要的凋亡抑制基因,打破了细胞的自稳平衡机制,使得受损或突变细胞不能得到及时的清除,并在增生基因和生长抑制基因的协同作用下,发展为肿瘤.在鼠骨髓细胞中,通过逆转录病毒介导 Bcl-2 蛋白过表达,分析显示,仅有 Bcl-2 的过表达不能导致肿瘤的形成.体外实验表明,当去除了 IL-3 的作用之后, IL-3 依赖性的淋巴细胞和骨髓细胞便逐渐转向凋亡;而将 Bcl-2cDNA 导入细胞中之后,这一凋亡现象便被抑制了.由此可见, Bcl-2 通过抑制凋亡而使细胞寿命延长,细胞堆积,在肿瘤发生中起始起作用.转化实验发现, Bcl-2 基因本身并没有很强的癌基因活性,但他发生点突变之后,其活性明显增强,促进肿瘤的发展^[22].进一步研究显示^[23],伴有易位 Bcl-2 基因的体细胞突变可使滤泡淋巴瘤转化为弥漫性的大细胞淋巴瘤.最新研究表明, Bcl-2 可以和血管内皮生长因子 (VEGF) 等相互作用从而影响肿瘤的血管生成,促进肿瘤的形成和发展^[24-25]. Bcl-2 作为癌基因提出最初是在淋巴瘤,其后的研究表明,许多人类肿瘤中均有 Bcl-2 的高表达,如肝癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌、胃癌、非何杰金淋巴瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌等^[26-28],目前认为 Bcl-2 的高表达,不是某一肿瘤的特征,而是反映了肿瘤细胞的一种增生状态.

4.2 肿瘤的多药耐药 Bcl-2 蛋白阻止细胞凋亡,不仅与许多肿瘤的形成有关,而且在肿瘤化疗耐药的形成中起重要的作用,实验表明, Bcl-2 过量表达可使细胞更有效的耐受化疗药物,这些化疗药物包括:地塞米松、阿糖胞苷、氨甲喋呤、环磷酰胺、阿霉素、足叶乙甙 (VP-16)、

喜树碱、氮芥、5-氟尿嘧啶、米托蒽醌、顺铂、长春新碱和一些维甲酸类化合物等。Bcl-2 蛋白水平升高引起的肿瘤细胞药物耐受不同于一般的化学耐受, 主要不同点有: (1) Bcl-2 蛋白不能阻止药物在细胞内堆积; (2) Bcl-2 蛋白不改变药物诱导时 DNA 的损伤程度或细胞对损伤 DNA 的修复率; (3) Bcl-2 蛋白对核苷酸池或细胞周期率不产生影响。但有实验表明, 当 Bcl-2 蛋白表达水平升高时, 抗癌药物仍能诱导某些肿瘤细胞周期阻滞, 只是与对照组细胞相比, 这些细胞还不能产生典型的凋亡, 或表现出死亡率明显降低。临床观察证实, Bcl-2 阳性率高的白血病患者化疗后, 完全缓解率低(< 20%), 而 Bcl-2 阳性率低的患者化疗后完全缓解率高(> 85%)。Julien *et al* 分别将基于 Bcl-2 基因的反义寡核苷酸和非反义寡核苷酸在体外转染进入神经胶质瘤细胞, 发现反义 Bcl-2 寡核苷酸处理的细胞 Bcl-2 蛋白的表达明显下降, 对化疗药物的敏感性明显增强。另外, 肿瘤患者在接受化疗或放疗之后, 肿瘤细胞中 Bcl-2 蛋白的表达量大大升高, 这进一步说明 Bcl-2 蛋白与肿瘤化疗耐药的密切关系。Pepper *et al* 研究了 Bcl-2/Bax 比值与慢性淋巴细胞性白血病对化疗药物敏感性的关系, 发现 Bcl-2/Bax 显著影响慢性淋巴细胞性白血病对化疗药物的敏感程度, 当 Bcl-2/Bax 比值增高时, 表现为对化疗药物耐药; 比值下降时, 则对化疗敏感。推测 Bcl-2/Bax 比值可作为预测肿瘤患者是否存在耐药性的一项指标。由于肿瘤多药耐药的机制极其复杂, 因此 Bcl-2 蛋白并非和各种抗肿瘤药物的耐药都有关, 如他不能抑制依赖 IL-2 和 IL-6 的细胞株的凋亡以及经 Thy-1 途径诱导的 T 细胞的凋亡等。

当前, Bcl-2 基因的研究越来越受到人们的关注, 已经从免疫组化等组织细胞形态学的观察, 发展到原位杂交、PCR、流式细胞仪等分子生物学水平。迄今, Bcl-2 基因蛋白表达的调控机制及其临床意义还很不明确, 因此从基因转录水平对 Bcl-2 基因作用进一步深入研究是十分必要的。随着对 Bcl-2 基因与凋亡、细胞增生、肿瘤形成及多药耐药调控的更为清晰的认识, 运用基因工程的方法, 可设计出调节该基因的抗癌新药, 加强其诱导凋亡及调控增生的作用, 以增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 为肿瘤治疗提供新的思路和启示。

5 参考文献

- Coultas L, Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* 2003;13:115-123
- Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 2003;39:615-647
- Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* 1998;16:2265-2282
- Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:437-444
- Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 2003;7:249-257
- Sprick MR, Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644:125-132
- Cory S, Adams JM. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;2:647-656
- Conus S, Rosse T, Borner C. Failure of Bcl-2 family members to interact with Apaf-1 in normal and apoptotic cells. *Cell Death Differ* 2000;7:947-954
- Haddad JJ. On the antioxidant mechanisms of Bcl-2: a retrospective of NF-kappaB signaling and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:355-363
- Chen GG, Liang NC, Lee JF, Chan UP, Wang SH, Leung BC, Leung KL. Over-expression of Bcl-2 against Pteris semipinnata L-induced apoptosis of human colon cancer cells via a NF-kappa B-related pathway. *Apoptosis* 2004;9:619-627
- Jiang M, Milner J. Bcl-2 constitutively suppresses p53-dependent apoptosis in colorectal cancer cells. *Genes Dev* 2003;17:832-837
- Godefroy N, Bouleau S, Gruel G, Renaud F, Rincheval V, Mignotte B, Tronik-Le Roux D, Vayssiere JL. Transcriptional repression by p53 promotes a Bcl-2-insensitive and mitochondria-independent pathway of apoptosis. *Nucleic Acids Res* 2004;32:4480-4490
- Xu AH, Chen HS, Sun BC, Xiang XR, Chu YF, Zhai F, Jia LC. Therapeutic mechanism of ginkgo biloba exocarp polysaccharides on gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2424-2427
- Bonnefoy-Berard N, Aouacheria A, Verschelde C, Quemeneur L, Marcais A, Marvel J. Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644:159-168
- O'Reilly LA, Harris AW, Strasser A. Bcl-2 transgene expression promotes survival and reduces proliferation of CD3-CD4-CD8-T cell progenitors. *Int Immunol* 1997;9:1291-1301
- Droin NM, Green DR. Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644:179-188
- Sorenson CM. Bcl-2 family members and disease. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644:169-177
- Furukawa Y, Iwase S, Kikuchi J, Terui Y, Nakamura M, Yamada H, Kano Y, Matsuda M. Phosphorylation of Bcl-2 protein by CDK1 kinase during G2/M phases and its role in cell cycle regulation. *J Biol Chem* 2000;275:21661-21667
- Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G2/M. *Mol Cell Biol* 1999;19:8469-8478
- Srivastava RK, Mi QS, Hardwick JM, Longo DL. Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3775-3780
- Vantieghe A, Xu Y, Assefa Z, Piette J, Vandenheede JR, Merlevede W, De Witte PA, Agostinis P. Phosphorylation of Bcl-2 in G2/M phase-arrested cells following photodynamic therapy with hypericin involves a CDK1-mediated signal and delays the onset of apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:37718-37731
- Kirkin V, Joos S, Zornig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644:229-249
- Matolcsy A, Warnke RA, Knowles DM. Somatic mutations of the translocated Bcl-2 gene are associated with morphologic transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma. *Ann Oncol* 1997;8(Suppl 2):119-122
- Mazurek A, Pierzynski P, Niklinska W, Chyczewski L, Laudanski T. Angiogenesis and Bcl-2 protein expression in patients with endometrial carcinoma. *Neoplasia* 2002;49:149-154
- Dias S, Shmelkov SV, Lam G, Rafii S. VEGF165 promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition. *Blood* 2002;99:2532-2540
- Wang XW, Xie H. Presence of Fas and Bcl-2 proteins in BEL-7404 human hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 1998;4:540-543
- Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH. Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and C-myc in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:403-406
- Li SM, Yao SK, Yamamura N, Nakamura T. Expression of Bcl-2 and Bax in extrahepatic biliary tract carcinoma and dysplasia. *World J Gastroenterol* 2003;9:2579-2582