

Bcl-2 蛋白家族与细胞凋亡

朱国萍 姜 阳 徐 冲*

(中国科学技术大学生命科学学院分子生物与细胞生物学系 合肥 230026)

细胞凋亡(apoptosis)又谓程序性死亡(programmed cell death, PCD),是由基因编程调控的细胞主动自杀过程,机体通过凋亡将那些衰老及畸变细胞从体内清除掉。Bcl-2(B-cell lymphoma/leukemia-2)蛋白大家族是调节 PCD 的关键元件,它们受自身基因表达量的高低和蛋白质修饰的调控,如氨基酸的磷酸化^[1]。其主要成员 Bcl-2 是通过抑制半胱天冬蛋白酶 Caspase(又称死亡蛋白酶)激活所需的适配体(adaptor)活性而使细胞生存,但它的过量表达又会引发癌症。因此对 PCD 过程中 Bcl-2 调控机制的阐明,有助于对通过扰乱凋亡途径治疗癌症、自身免疫及退化性疾病的研究^[2]。

一、Bcl-2 的结构及生物学功能

抗凋亡蛋白 Bcl-2 由 239 个氨基酸组成,分子量为 25~26 kD,位于线粒体膜、内质网和核膜等处。Bcl-2 在不同种群的生物中高度保守,总的同源性达 70%。拓朴学研究显示人 Bcl-2 蛋白由 4 个 Bcl-2 同源(BH)结构域、 α -螺旋环(loop)和跨膜锚定区(TM)构成^[3],如图 1。它的整个结构由 7 束 α -螺旋紧密相连,2 个长的疏水中心螺旋($\alpha 5$ 和 $\alpha 6$)环绕着 5 个亲水脂 α -螺旋。BH4($\alpha 1$)是一些 Bcl-2 结合蛋白的结合位点,如蛋白激酶 Raf-1 及钙调素依赖性磷酸酶(Calcineurin)。 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 之间是高度可变环,为其磷酸化所需,可能是负调节区。BH3($\alpha 2$)是家族蛋白二聚化作用中的配体(ligand)结构域。BH1、BH2 与 BH3 结合形成疏水沟(groove),为受体结构域。中心螺旋($\alpha 5$ 和 $\alpha 6$)是 Bcl-2 发挥抗凋亡作用的关键结构,它们可能垂直穿过膜脂双分子层参与离子通道形成。因此 Bcl-2 的膜运输功能可以调节 Ca^{2+} 及蛋白分子的流通量^[4]。在 C-末端是由 18-19 个氨

基酸组成的疏水性肽段及两个带电荷残基,这一特殊结构可将 Bcl-2 锚定在膜上,也是 Bcl-2 阻断 PCD 的必需结构。

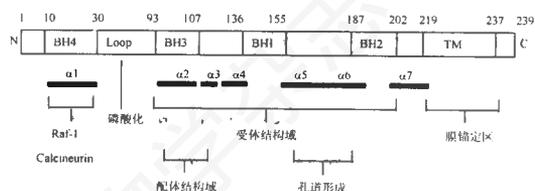


图 1 人 Bcl-2 蛋白的基本结构示意图

Bcl-2 是阻遏细胞凋亡的核心分子,具有许多独立的功能。它阻断 PCD 中早期的一个环节,而此时并未出现细胞凋亡特征,因此 Bcl-2 可能阻断 PCD 过程的一个共同通路。此外 Bcl-2 在转基因动物中的过表达能延缓生长因子或神经营养因子撤除后的细胞死亡,还可防止其他因素诱导的 PCD,如 Bcl-2 可干扰过氧化物产生的脂膜的过氧化作用,从而抑制氧化应激(oxidative stress)诱导的细胞凋亡。最新研究认为 Bcl-2 还具有离子通道形成和适配体或停泊蛋白(docking protein)的功能^[4]。

二、Bcl-2 大家族的分类及其成员

Bcl-2 大家族分为三个亚族:原生存亚族(pro-survival subfamily)即 Bcl-2 亚族,成员有 Bcl-2、Bcl-x_L、KS-Bcl-2、Bcl-w、Mcl-1、BHRF1、NR-13、ORF16、LMW5-HL、Al、EIB-19K 及 CED-9;两个原凋亡亚族(proapoptotic subfamily)是 Bax 和 BH3 亚族。Bax、Bak 及 Bok 属于 Bax 亚族, Bik、Blk、Hrk、BNIP3、Bim、Bad、Bid 及 EGL-1 属 BH3 亚族^[5]。其中 15 种蛋白为哺乳动物(主要是人)所有, NR-13 为鸡类所有,

* 负责人。

线虫 *C. elegans* 中的蛋白有 CED-9 及 EGL-1, 病毒蛋白有 LMW5-HL、BHRF1、ORF-16、KS-Bcl-2 和 EIB-19K。

Bcl-2 大家族的所有成员至少含有一个 Bcl-2 同源结构域 (BH1 - BH4)。Bcl-2 亚族蛋白大都含有 BH1 和 BH2 结构域。Bax 亚族成员由 BH1、BH2、BH3 及 TM 区构成, 最接近 Bcl-2 结构。BH3 亚族只含有 BH3, 因此与其他蛋白不相关连, 只有 Bik 和 Blk 彼此类似。Bcl-2 亚族蛋白的功能是阻遏 PCD。Bax 和 BH3 类蛋白则促进细胞凋亡。生存蛋白与凋亡蛋白能形成二聚体, 它们的相对平衡象一个变阻器决定细胞的生死存亡。由于 BH1、BH2 和 BH3 发生突变会严重影响同源或异源二聚化, 因此认为这些结构域对于 Bcl-2 家族蛋白的二聚化十分必需。在 Bcl-2 家族蛋白中, 死亡激动剂往往优先作用于抗凋亡蛋白, 例如 Bok 优先与 Mcl-1 和 EB(Epstein-Barr) 病毒蛋白 BHRF1 相互作用, 但不与 Bcl-2、Bcl-x_L、Bcl-W 作用^[6]。在 BH3 群体中, Bid 既与 Bax、Bak 也与抗凋亡蛋白作用, 而其他成员仅与生存蛋白作用^[7]。

在 Bcl-2 家族中, 有两种重要的 Bcl-2 相关蛋白。其中之一是 Bcl-x, 由 241 个氨基酸组成, 与 Bcl-2 同源性高达 74%。Bcl-x 因 mRNA 剪接方式不同, 可产生大分子 Bcl-x_L 和小分子 Bcl-x_S。初步的基因转移和表达实验证明, Bcl-x_L 可以代替 Bcl-2 的功能, 抑制 PCD。而 Bcl-x_S 因缺少 BH1 和 BH2, 其功能是促进 PCD。显然剪接加工是 Bcl-x 调节细胞凋亡的关键开关。另一个相关蛋白为 Bax, 由 192 个氨基酸组成, 与 Bcl-2 同源性为 21%。它主要通过 Bcl-2 形成异二聚体, 以使 Bcl-2 灭活, 由此决定具有活性的 Bcl-2 分子数, 实现对 PCD 的调节^[8]。

三、Bcl-2 亚族阻遏 PCD 的机制

线虫和哺乳动物的凋亡途径如图 2。在线虫 *C. elegans* 中, 对 *ced-9*、*ced-4* 及 *ced-3* 基因突变体的遗传学研究表明, CED-9 可以直接或间接抑制 CED-3 的活性。CED-9/4/3 复合物

最初处于失活构象, 通过 CED-9 的 C-末端疏水区锚定在膜上。当受到死亡信号的诱导后, CED-9 与 CED-4/3 物理性分离, CED-4 激活。随后 CED-4 激活 CED-3 酶原, 诱导 PCD。因此 CED-9 可以通过阻止 CED-4 的对 CED-3 酶原激活而使细胞生存。

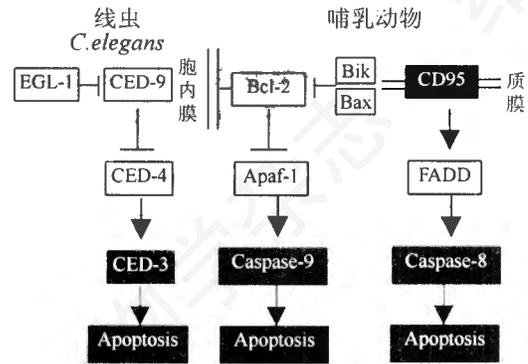


图 2 线虫和哺乳动物细胞中的凋亡途径

在哺乳动物细胞中, Caspase-9 的激活需要细胞凋亡蛋白酶活化因子 (apoptotic protease activating factors, Apafs)、细胞色素 c (Cyt c) 和 dATP 等。从线粒体释放到胞质中的 Cyt c (可能是 Apaf-2) 与 Apaf-1 结合, 通过后者 CARD (caspase recruitment domain) 与 Caspase-9 酶原的 CARD 相互作用。活化的 Caspase-9 再激活级联下游的效应分子 Caspase-3 等。通过效应分子特异性降解聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP)、核纤层蛋白 (lamins)、DNA 依赖的蛋白激酶 (DNA-PK) 及固醇调节元件结合蛋白 (SREBP) 等, 引起染色体凝集。Bcl-2 蛋白通过对其中两个关键步骤的控制阻遏 PCD。Bcl-2 可以阻止 Cyt c 及凋亡诱导因子 AIF (apoptosis-inducing factor) 等从线粒体的释放^[9,10], 并阻止 Cyt c 与 Apaf-1 的结合, 从而抑制 Caspase 的激活^[11]。作为开关的 Bcl-2, 其结构中的 $\alpha 5$ 和 $\alpha 6$ 疏水螺旋, 十分类似细菌毒素的膜插入结构域, 如白喉毒素和大肠杆菌素。而一种大规模的构象改变, 可能导致 Bcl-2 插入脂双分子层及形成离子选择通道^[12], 促进 Cyt c 释放, 并阻止 Bcl-2 与 Apaf-1 的结合。但未插入膜中的剩

余 Bcl-2 仍会中和 Apaf-1,从而遏制 PCD。

在哺乳动物细胞中还存在着另一条凋亡途径。肿瘤坏死因子受体或称死亡受体的 Fas (CD95 或 Apo-1) 可以与 Fas 相关蛋白死亡结构域 (Fas-associated protein death domain, FADD) 结合,复合物再通过 FADD 的 N-端死亡效应结构域 (death effector domain, DED), 绕过 Bcl-2 家族的控制直接激活 Caspase-8, 引起 PCD^[13]。但在某些细胞类型中, Bcl-x_L 拮抗 Fas 诱导的凋亡, 因此 Fas 可能触发其他可变途径^[14]。

四、Bcl-2 家族对细胞凋亡的调控

1. 细胞周期

细胞增殖可以启动 PCD。在一定条件下, Bax 能加速细胞周期进程, 而 Bcl-2 对凋亡的阻遏抑制细胞增殖, 受阻遏的细胞也难以再进入细胞周期。在淋巴细胞中, Bcl-2 造成的生长抑制与阻碍转录因子 NFAT (Nuclear Factor Associate Transcription) 的激活相关。另外对 Fas 信号途径的干扰会抑制细胞增殖, 其中对 FADD 功能的干扰会破坏依赖生长抑制蛋白 P53 的细胞增殖^[15-17]。Bcl-2 家族成员对细胞增殖的作用机理目前未知。

2. Bcl-2 结合蛋白

Bcl-2 或 Bcl-x_L 的结合蛋白也参与 PCD 的调控, 包括 Raf-1、抗病毒蛋白 Pr1、P53 结合蛋白 P53-BP2 及 CED-4、BAG-1、Nip-1、Nip-2、Nip-3 等一些未知功能的蛋白。而 Bax 不与这些蛋白结合, 这是抑制或诱导死亡的家族成员之间的重要区别。

Bcl-2 能引起依赖 Ca²⁺ 的 Calcineurin 从胞质至细胞内膜的重新分配, 并阻止其与磷酸化的转录因子 NF-AT 或其他底物相互作用。而 NF-AT 为某些类型细胞的增殖必需^[18]。目前尚不清楚 Calcineurin 的作用机理, 但也许与 Bcl-2 抑制的细胞增殖及 NFAT 移位至核内有关。Bcl-2 还可刺激 Raf-1 移至线粒体膜, 并与 BAG-1 合作在此处激活 Raf-1。活化的 Raf-1

诱导原凋亡蛋白 Bad 磷酸化, 通过 Bad 与 Bcl-2 或 Bcl-x_L 的二聚化消除细胞保护功能, 从而诱发 PCD。另外, CED-4、Calcineurin、BAG-1、Raf-1、及 Bcl-2 能与 P53-BP2 结合, 由此诠释了 Bcl-2 的过量表达对 P53 从胞质运输至核内的干扰^[3]。

3. 其他家族成员的调节

不同水平上的细胞因子 (cytokines) 可以通过 Bcl-2 家族成员发挥调控功能, 一些原生存基因受其诱导而转录^[19], 如 P53 介导的损伤性反应诱导 *bax* 基因的转录。细胞因子还参与翻译后水平的细胞生存调节。在白细胞介素-3 激发的造血细胞中, 受体信号由磷酸肌醇 3-激酶 (PI3-K) 经丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt 传导至 Bad, Bad 磷酸化后和 Bcl-2 或 Bcl-x_L 分离, 与 14-3-3 蛋白形成复合物退回胞质中, 细胞得以生存。因此磷酸化作用既促进又抑制生存蛋白的活性^[20]。Jun 激酶 (JNK) 能使可变环区中的一些关键残基磷酸化, 如 Ser⁷⁰, 从而激活 Bcl-2 的多重功能^[21]。即使在 Caspase 活化之后, JNK 或 p38 激酶途径的持续畅通, 也能激活 Bcl-2 家族与其底物的相互作用^[22]。

Bcl-x_L 能结合 Apaf-1, 并阻止其激活 Caspase-9 酶原。而死亡信号可以激发 Bax、Bak、Bik 与 Bcl-x_L 二聚化, 从而防止 Bcl-x_L 诱导 PCD。Bax 则能促进线粒体释放 Cyt c 和 dATP。在线虫中, CED-4 可能结合于 BH4 结构域^[23], 其功能类似 Apaf-1^[24], 它对 CED-3 的激活受 CED-9 抑制。EGL-1 可以解除这种抑制作用。EGL-1 是 BH3 亚族中的一员, 它直接抑制 CED-9 的活性, 使 CED-4/3 从三元复合物中释放, 进而 CED-4 激活 CED-3, 导致细胞凋亡^[25,26]。

4. 非依赖 Caspase 的细胞死亡

大部分 Bcl-2 家族蛋白的 BH3 配体区可以相互作用, 该结构域的缺失会消除这种作用, 并延迟 PCD。有趣的是, 在嗜糖啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 细胞中, 缺少 Bcl-

2类蛋白、CED-4及Caspase,但也能被Bax和Bak杀死。这提供了一种早于Caspase作用的死亡形式。甚至当Caspase抑制子存在时,Bax类蛋白的过表达或二聚化,也能引起哺乳动物细胞凋亡^[27]。因此认为Bax及同类蛋白的离子通道活性可能介导非依赖Caspase的死亡,但其机制未知。

五、展 望

关于Bcl-2家族有许多关键的问题尚未解决,如:CED-9/4/3复合物之间是物理性连接,还是需要其他蛋白搭桥?Bax类蛋白的结构与Bcl-2类蛋白有众多相同点,为何又具有相反的功能?BH3亚族迥异的序列,是否意味各成员反应不同的凋亡信号?由于细胞凋亡机制的异常与癌症、艾滋病以及许多遗传病的形成直接相关,如阿尔茨海默症(AD)及Huntington舞蹈病等,因此是目前生物医学研究的热门课题。其中关键元件的分子机制研究仍待进一步突破。

摘 要

Bcl-2蛋白家族是调节PCD的关键元件,它们受自身基因表达量的高低及蛋白质磷酸化的调控。可分为Bcl-2、Bax及BH3三个亚族。Bcl-2类蛋白阻遏PCD,Bax及BH3类蛋白则促进PCD。它们通过形成同源或异源二聚体,以及与胞内蛋白因子的相互作用来调节PCD。对其分子机制的阐明,有助于众多遗传病研究的突破。

参 考 文 献

[1] Raff, M., 1998, *Nature*, **396**:119-122.

- [2] Chao, D T. et al., 1998, *Annu. Rev. Immunol.*, **16**:395-399.
- [3] Reed, J. C., 1997, *Nature*, **387**:773-776.
- [4] Schendel, S. L., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**:5113-5118.
- [5] Adams, J. M. et al., 1998, *Science*, **281**:1322-1326.
- [6] Inohara, N. et al., 1998, *J. Biol. Chem.*, **273**:8705-8710.
- [7] Connor, L. O. et al., 1998, *EMBO J.*, **17**:384-388.
- [8] Jurgensmeier, J. M. et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**:4997-5002.
- [9] Yang, J. et al., 1997, *Science*, **275**:1129-1132.
- [10] Hengartner, M. O., 1998, *Nature*, **391**:441-442.
- [11] Green, D. R. et al., 1998, *Science*, **281**:1309-1312.
- [12] Lam, M. et al., 1998, *J. Biol. Chem.*, **273**:7307-7312.
- [13] Ashkenazi, A. et al., 1998, *Science*, **281**:1305-1308.
- [14] Scaffidi, C. et al., 1998, *EMBO J.*, **17**:1675-1677.
- [15] Zhang, J. et al., 1998, *Nature*, **392**:296-298.
- [16] Zornig, M. et al., 1998, *Curr. Biol.*, **8**:467-471.
- [17] Newton, K. et al., 1998, *EMBO J.*, **17**:706-708.
- [18] Chang, B. S. et al., 1997, *EMBO J.*, **16**:968-972.
- [19] Chao, J. R., 1998, *Mol. Cell Biol.*, **18**:4883-4886.
- [20] Datta, S. R., 1997, *Cell*, **91**:231-237.
- [21] Ling, Y. H. et al., 1998, *J. Biol. Chem.*, **273**:18984-18986.
- [22] Ip, Y. T. et al., 1998, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**:205-209.
- [23] Huang, D. C. S. et al., 1998, *EMBO J.*, **17**:1029-1031.
- [24] Hengartner, M. O., 1997, *Nature*, **388**:714-715.
- [25] Chaudhary, D. et al., 1998, *J. Biol. Chem.*, **273**:17708-17713.
- [26] Conradt, B. et al., 1998, *Cell*, **93**:519-529.
- [27] Gross, A. et al., 1998, *EMBO J.*, **17**:3878-3880.
- [28] Jackson, G. R. et al., 1998, *Neuron*, **21**:633-642.

乙烯与植物离体培养外植体的器官发生

王鸿鹤 黄学林

(中山大学生命科学学院生物系 广州 510275)

乙烯是一种以气态存在的植物激素,几乎所有高等植物的器官、组织和细胞都具有产生