

[文章编号] 1007-385X(2003)03-0232-03

bcl-2, bax 与肿瘤细胞凋亡

杨连君 综述; 曹雪涛, 于益芝 审阅(第二军医大学免疫学研究所, 上海 200433)

[摘要] 在肿瘤发生和发展过程中, 细胞不仅发生了异常增殖, 更重要的是其发生凋亡的能力和倾向降低了。bcl-2 家族在细胞凋亡调控中有重要的作用, 是目前细胞凋亡研究的热点之一。bcl-2 家族分为抑制凋亡和促进凋亡蛋白两大类。bcl-2 和 bax 分别是 Bcl-2 家族中最主要的抑制凋亡和促进凋亡蛋白。在多数肿瘤中, bcl-2 表达水平升高, 而 bax 表达下降。上调 bcl-2 或下调 bax 能抑制多种因素诱导的多种肿瘤细胞凋亡。反之, 下调 bcl-2 或上调 bax 则促进多种肿瘤细胞凋亡。肿瘤的 bcl-2/bax 表达比例与其发生和发展密切相关。作者综述了 bcl-2 和 bax 与肿瘤发生的关系、在肿瘤中的表达情况及其对肿瘤细胞凋亡的调控研究现状, 探讨了存在的问题和对策。

[关键词] 肿瘤; 基因; bcl-2; 细胞凋亡; bax

[中图分类号] R735 [文献标识码] A

* 肿瘤是一种细胞增殖和死亡均发生了异常的疾病。实体肿瘤细胞主要有坏死和凋亡两种死亡形式。目前一般认为, 在恶性肿瘤发生和发展过程中, 细胞凋亡抑制比细胞过度增殖所起的作用更重要。细胞凋亡是有核细胞在凋亡刺激信号作用下通过启动细胞内死亡机制, 经过一系列信号转导途径, 最终发生细胞程序性变性和死亡的过程。细胞凋亡对维持组织器官的正常形态和功能起重要作用。它在机体生长发育和生殖衰老等生理过程中, 以及病毒感染、增殖性疾病和肿瘤发生等病理现象中都有重要作用。细胞凋亡不仅在肿瘤发生和发展中有重要意义, 而且化疗、放疗和生物治疗都是通过诱导凋亡来治疗肿瘤^[1]。随着对细胞凋亡研究不断深入, 发现 Bcl-2 家族是在细胞凋亡中有重要作用的一类蛋白质。bcl-2 家族的表达和调控是影响细胞凋亡的关键因素之一, 在细胞凋亡信号转导途径中发挥重要作用。bcl-2 和 bax 分别是 bcl-2 家族中最有代表性的抑制凋亡和促进凋亡基因, 并且 bax 是 bcl-2 活性的主要调控因子^[2]。bcl-2 和 bax 在肿瘤细胞凋亡中具有重要的调控作用^[3]。

1 Bcl-2 和 bax 概述

目前, 已经发现了 20 多个 bcl-2 同源基因。bcl-2 家族基因广泛分布于从酵母到哺乳动物等各种动物体中。根据其在细胞凋亡调控中的不同作用, Bcl-2 蛋白家族分为两大类: 一类是抗凋亡蛋白, 主要包括 Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/bfl-1, Boo, Ced-9, mbcl-1-x, bhrl1, lmw5-h1 和 Nr-13 等; 另一类是促凋亡蛋白, 主要包括 Bax, Bak, Bok, Bcl-x(s), bik, Bid, Bad, hrk 和 Egl-1 等。Bcl-2 家族成员在其多肽链中都至少含有与 Bcl-2 同源的 4 个保守的螺旋结构域(BH1 ~ BH4)中的一个。Bcl-2 家族的多数抗凋亡蛋白只含有 BH1 和 BH2 2 个结构域, 少数含全部 4 个结构域; 而促凋亡蛋白都含 BH3 结构域, 一般不含 BH4 结构域。线粒体在细胞凋亡中起重要作用。Bcl-2 家族的主要作用位点在线粒体膜上。细胞受到死亡信号刺激后, Bcl-2 家族中的促凋亡蛋白在蛋白酶作

用下发生构像变化, 从细胞浆移位到细胞器膜上, 尤其是线粒体外膜上, 并与细胞器膜上和膜内的抗凋亡蛋白相互作用, 使抗凋亡蛋白丧失对凋亡的抑制作用, 引起细胞器功能丧失和各种促凋亡因子的释放, 最终导致细胞凋亡。

bcl-2 是首先在滤泡性 B 细胞淋巴瘤发现的一个基因, 由染色体[t(14;18)(q32;q21)]易位而激活^[4]。这一易位使 bcl-2 基因与免疫球蛋白(Ig)位点强调控元件结合, 在 Ig H 区增强子作用下, 导致在染色体易位的细胞中 bcl-2 过度表达。Bcl-2 定位于细胞核膜、内质网和线粒体外膜上。在 Bcl-2 蛋白 C 末端有疏水区域, Bcl-2 借此与细胞器膜相连。位于 Bcl-2 N 端的跨膜区在 Bcl-2 抑制细胞凋亡过程中有重要作用。在许多细胞的凋亡中有 bcl-2 表达的下降。过表达 bcl-2 抑制许多因素诱导的多种细胞凋亡。转染反义 bcl-2 基因诱导或促进多种细胞的凋亡。bcl-2 转基因鼠的淋巴和上皮细胞生存时间延长, 并有 T 淋巴瘤产生^[5]。bcl-2 基因敲除鼠的胚胎虽然能发育, 但是几个星期内大部分小鼠死亡, 肾内凋亡细胞增多, 肾单位减少, 发生肾衰^[6]。bcl-2 抗凋亡机制主要是: ① 作为抗氧化剂, 调节细胞氧化还原状态, 阻断氧化作用对细胞组成成分的破坏; ② 影响细胞跨膜转运, 改变钙离子分布, 钙离子激活内源性内切酶和谷氨酰胺转移酶; ③ 抑制有促凋亡作用的细胞色素 C 从线粒体释放到细胞浆; ④ 保护细胞免受核酸酶损害, 抑制 DNA 断裂。Bcl-2 通过 BH3 结构域与同家族的促凋亡分子形成异源二聚体, 维持促凋亡蛋白在细胞内的定位分布。在发生凋亡过程中, Bcl-2 家族的促凋亡蛋白在凋亡相关因子激活下, 易位到线粒体膜上, 破坏线粒体完整性, 释放线粒体内的促凋亡因子, 经过细胞信号转导途径逐步放大, 最终导致凋亡发生。

Bax 是 Bcl-2 家族中研究最广泛的促凋亡蛋白^[7]。Bax 定位于细胞浆, 自身可形成同源二聚体或与 Bcl-2 形成异源

[基金项目] 中国博士后科学基金资助(2002031207)

二聚体。许多细胞凋亡中有 bax 表达升高。转染 bax 不仅能诱导许多细胞自发凋亡,而且促进多种因素诱导的多种细胞凋亡。转染 bax 反义寡核苷酸能延长细胞生存期。bax 基因敲除鼠的生精管结构明显破坏,出现多核巨细胞,缺乏成熟精子^[8]。当细胞内 Bcl-2 较多时,Bcl-2 和 Bax 的异源二聚体增多,凋亡趋势减弱;当细胞内 Bax 较多时,则 Bax 本身形成的同源二聚体占主导,则易于发生凋亡。Bcl-2/Bax 比值对决定细胞是否进入凋亡状态有重要意义。死亡信号能激活 bax,使 Bax 从细胞浆移位到线粒体膜上。Bax 在移位到线粒体膜上后,很快形成同源二聚体,促进凋亡,而 Bcl-2 则在 Bax 诱发凋亡过程中对其功能进行限制。Bax 促进凋亡的机理主要是:① 线粒体渗透性转换、氧化磷酸化和 ATP 的合成功能被破坏;② 细胞氧化还原作用改变;③ 线粒体中的凋亡相关分子 Apaf-1 释放出来,与细胞色素 C 相互作用,激活胱冬肽酶(caspase)信号转导途径。

2 bcl-2 和 bax 与肿瘤的关系研究现状

2.1 bcl-2 和 bax 与肿瘤的发生

转染 bcl-2 不能促进细胞增殖,也没有诱发细胞恶性转化作用,但是它可以在没有生长因子或者神经营养因子存在时通过抑制细胞凋亡而延长细胞存活时间,并且增加细胞染色体发生畸变和病毒感染机会,促进恶变和肿瘤形成。EB 病毒能促进淋巴瘤细胞生长、成瘤和抗凋亡能力,并伴有 bcl-2 表达上调。转染 bcl-2 到 EB 阴性细胞中能使其克隆形成能力和抗凋亡能力增强。然而,单纯 bcl-2 过表达,而 EB 为阴性,并不能产生成瘤作用。同时,转染 bax 使 EB 阳性细胞抗凋亡能力下降。视黄酸受体 α 嵌合蛋白是与早幼粒细胞性白血病关系密切的蛋白质。单纯视黄酸受体 α 基因转基因鼠并没有在早期发生白血病,而是出生后数月才出现白血病。bcl-2 和视黄酸受体 α 基因共转染的转基因鼠出现白血病的时间明显比单纯转视黄酸受体 α 的转基因鼠早得多,并且其发病率也明显提高。bcl-2 还能协同和促进癌基因 ras 和 myc 的作用使细胞恶性转化。过表达癌基因 E1A 和 p53 失活能够使 bax 阳性的幼鼠肾上皮细胞转化,但不能产生恶变。然而,E1A 过表达和 p53 失活并且 bax 缺失的细胞能形成恶性肿瘤。说明 Bax 能在体内外抑制细胞恶性转化。

2.2 bcl-2 和 bax 在肿瘤的表达情况及意义

正常机体组织中,bcl-2 分布比较局限,主要在胚胎早期组织、成熟淋巴细胞、增生活跃的上皮细胞和神经元等部位。在胚胎发生和发育中,Bcl-2 对于保持胚胎细胞生存能力,并使其分化成熟有重要意义。通过检测了 Bcl-2 和 Bax 在 23 例正常肝组织表达情况发现所有标本均为 Bcl-2 阴性,并均可见 Bax 阳性信号。多数结节型非霍奇金淋巴瘤都能可见异位活化的 bcl-2 表达增强。虽然在其它肿瘤中未见到异位的 bcl-2,但是 bcl-2 在乳腺癌、神经母细胞瘤、鼻咽癌、前列腺癌、膀胱癌、肺癌、胃癌和结肠癌等许多肿瘤表达增强。Alsa-bech 等^[9]检测了 Bcl-2 在 371 例乳腺癌表达情况,阳性率高达 79.3%,并且染色强度普遍很强,提示 bcl-2 检测对乳腺

癌,尤其是转移性乳腺癌临床诊断有参考价值。Leahy 等^[10]检测了 Bcl-2 在 102 例结肠癌的表达,阳性率 22%,用 PCR 检测显示由于 bcl-2 重排导致其在结肠癌过度表达,并且其阳性率与肿瘤组织分化程度呈显著负相关,bcl-2 高表达者预后好。Bcl-2 高表达的子宫平滑肌瘤预后也比较好。但是急性髓性白血病骨髓组织的 bcl-2 mRNA 表达越高则其预后反而越差。对 bcl-2 在肾细胞癌的检测阳性率为 34.3%,并与癌细胞的增殖、凋亡指数和其它临床指标未见明显相关性,提示 bcl-2 表达与病理和临床指标的关系在不同肿瘤存在一定差异。Fiorentino 等检测的 Bcl-2 蛋白在肝癌组织阳性率为 20%,bcl-2 mRNA 阳性率却高达 65%,在前列腺癌组织也发现了类似现象,说明肿瘤中存在着 bcl-2 在基因和蛋白水平表达不平衡的现象。Bcl-2 阳性表达与孕激素受体阳性呈明显正相关。说明 bcl-2 阳性肿瘤有低浸润性的生物学行为并具有激素依赖性。

Bax 广泛分布于人体组织和细胞,尤其在肝脏、肾小管、胰岛、胃腺体、心肌、附睾、淋巴结生发中心和神经元等表达水平较高。Bax 在多数肿瘤表达下降。Jordan 等检测的口腔鳞状细胞癌 Bcl-2 阳性率为 60%,Bax 阳性率为 86%,并且组织分化程度越差则 Bcl-2 阳性率越高,而 Bax 阳性率越低。Koshida 等检测了 82 例胃癌,发现 Bcl-2 表达阳性者凋亡指数明显低于 Bcl-2 阴性者,而 Bax 阳性者的凋亡指数明显高于 Bax 阴性者。Sarbia 等^[11]对食管癌的研究显示 Bax 在食管癌的表达明显低于正常食管上皮,并且随着肿瘤分化程度的下降而减低,而 Bcl-2 正好与 Bax 相反。Marx 等^[12]检测了 215 例卵巢癌的 Bcl-2 和 Bax 表达情况,发现 Bcl-2 阳性率为 30%,Bcl-2 阳性者的预后明显好于 Bcl-2 阴性者;Bax 阳性率 47%,Bax 阳性者的预后明显不如 Bax 阴性者。Chia 等检测的结果显示 Bax 在前列腺癌阳性率为 76%,与凋亡指数呈正相关,而与预后呈负相关。对结肠癌的研究显示,Bax 的表达情况与 Bcl-2 相反,并且 Bcl-2 和 Bax 的表达与预后之间均未见明显相关性,说明 Bax 表达与肿瘤的病理和临床指标之间的关系在不同肿瘤存在着一定差异。总之,对 Bcl-2 和 Bax 表达情况的检测对于肿瘤良恶性判断,预后评估和指导临床治疗有一定意义。

2.3 过表达或下调 bcl-2 和 bax 对肿瘤细胞凋亡的影响

转染 bcl-2 能抑制许多因素诱导的多种肿瘤细胞凋亡。转染 bcl-2 明显抑制三尖杉酯碱诱导的白血病细胞凋亡。向肝癌细胞内转染 bcl-2 也能抑制抗 Fas mAb 或 TGF- β 诱导的肝癌细胞凋亡。许多因素诱导肿瘤细胞凋亡的同时伴有 Bax 表达升高,说明 Bax 高表达与肿瘤细胞凋亡密切相关。转染 bax 到肿瘤细胞中能促进许多肿瘤细胞的凋亡。将 bax 导入鳞状细胞癌细胞中,显示转染 bax 的细胞对化疗敏感性明显加强。用基因枪技术将 bax 经皮肤导入小鼠体内,发现能使耐药的鳞状细胞癌生长延缓。分别将 bcl-2 和 bax 转染到白血病细胞中,发现转染 bax 的细胞凋亡率明显增加,并且对化疗的敏感性增强了,而转染 bcl-2 的细胞在相同化疗药物作用后的凋亡率明显减低了。Kagawa 等^[13]发现转染 bax 能

明显抑制肺癌细胞凋亡,而与其是否表达 p53 没有明显的相关性。

对 bcl-2 进行点突变,以缬氨酸或谷氨酸替换 BH1 位点的第 145 位甘氨酸,以缬氨酸替换 BH2 位点的第 155 位色氨酸。结果表达的 Bcl-2 失去了对放射线或糖皮质激素诱导的细胞凋亡的拮抗能力,并且不能与 Bax 形成异源二聚体^[14]。转染 bcl-2 反义寡核苷酸能抑制肿瘤细胞的 Bcl-2 活性,促进多种肿瘤细胞凋亡。Konopleva 等^[15]将 bcl-2 反义寡核苷酸导入白血病细胞中,抑制其 Bcl-2 表达,发现转染后细胞的凋亡率明显减低,并且对多种化疗药物的敏感性升高。因为诱发和促进肿瘤细胞发生凋亡能达到治疗肿瘤的目的,并且同时肿瘤细胞的凋亡状态对抗癌药物的效果也具有重要影响,因而抑制 Bcl-2 表达和促进 Bax 表达在肿瘤治疗方面的应用受到越来越多的关注。对反义 bcl-2 寡核苷酸或其反义表达质粒的体内外抗肿瘤作用已在很多肿瘤中进行了研究,并且有的反义 bcl-2 治疗肿瘤项目已经进入 II 期临床阶段。bax 裸基因注射在体内外都能抑制肺癌生长。bax 也已经在体内外水平广泛地用于卵巢癌、胃癌、前列腺癌、宫颈癌和黑色素瘤等肿瘤的基因治疗研究。

3 小结、存在的问题与展望

综上所述,bcl-2 家族中最重要的两个成员 bcl-2 和 bax 与肿瘤有明显相关性。与一般癌基因和抑癌基因不同的是,Bcl-2 和 Bax 不是通过调节细胞增殖,而是通过调控细胞凋亡来发挥调节肿瘤细胞生长状态的作用。与其起源组织相比,多数肿瘤的 bcl-2 表达升高,而 bax 表达下降。说明 Bax/Bcl-2 比例下调在肿瘤的发生和发展中有一定意义。过表达 bcl-2 或下调 bax 可抑制许多因素诱导的多种肿瘤细胞凋亡,而下调 bcl-2 水平或过表达 bax 能使肿瘤细胞凋亡率升高,并促进多种因素诱导的多种肿瘤细胞凋亡。进一步说明 bcl-2 和 bax 在肿瘤细胞凋亡调控中有重要作用。目前存在的问题主要是:① 虽然在多数结节型非霍奇金淋巴瘤中可见到易位活化的 bcl-2,但是在其它肿瘤未见异位活化的 bcl-2,其原因也就是 bcl-2 和 bax 的活化机制尚不清楚;② Bcl-2 和 Bax 如何作用于特定的肿瘤细胞器并影响其功能也不清楚;③ caspase 家族与细胞凋亡的发生和调控密切相关,是多数细胞凋亡信号转导的共同通路。bcl-2 和 bax 能够通过调节 caspase 活性来调控肿瘤细胞凋亡。bcl-2 家族对 caspase 不依赖的肿瘤细胞凋亡如何调控还不清楚;④ Bcl-2 与 Bax 的结构相似,为何功能却相反? 虽然在多数肿瘤中 bcl-2 和 bax 的表达分别升高或下降,而且过表达 bcl-2 和 bax 分别能抑制和促进肿瘤细胞凋亡,但是在有的肿瘤细胞凋亡中 bcl-2 和 bax 无明显作用甚至作用相反,其机理尚不明确^[16]。bcl-2 家族中促凋亡和抗凋亡蛋白的表达程度并非是决定细胞凋亡发生与否的唯一因素,其翻译后修饰也是调节细胞凋亡的因素之一。需要对 bcl-2 和 bax 的翻译后修饰进行进一步研究。随着对 caspase 家族、死亡受体和配体等细胞凋亡相关分子的研究不断深入,细胞凋亡信号转导通路会越来越明

确,bcl-2 和 bax 的表达及其调控肿瘤细胞凋亡的机理也将会更加清楚。对 bcl-2 和 bax 的相互关系及其在体内外对肿瘤细胞凋亡的调控作用的进一步研究对阐明肿瘤发病机理,指导肿瘤治疗都将会产生重要影响。

[参考文献]

- [1] Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis: Life and death decisions [J]. *Science*, 2003, 299(6504): 214 - 215.
- [2] Rosse T, Olivier R, Monney L, *et al.* Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c [J]. *Nature*, 1998, 391(6666): 496 - 499.
- [3] Guo B, Zhai D, Cabezas E, *et al.* Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation [J]. *Nature*, 2003, 423(6938): 456 - 461.
- [4] Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, *et al.* Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma [J]. *Science*, 1985, 228(4706): 1440 - 1443.
- [5] McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18) [J]. *Nature*, 1991, 349(6306): 254 - 256.
- [6] Sorenson CM, Rogers SA, Korsmeyer SJ, *et al.* Fulminant metanephric apoptosis and abnormal kidney development in bcl-2-deficient mice [J]. *Am J Physiol*, 1995, 268(1 Pt 2): F73 - F81.
- [7] Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death [J]. *Cell*, 1993, 74(4): 609 - 619.
- [8] Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, *et al.* Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death [J]. *Science*, 1995, 270(5233): 96 - 99.
- [9] Alsabeh R, Wilson CS, Ahn CW, *et al.* Expression of bcl-2 by breast cancer: A possible diagnostic application [J]. *Mod Pathol*, 1996, 9(4): 439 - 444.
- [10] Leahy DT, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, *et al.* Bcl-2 protein expression is associated with better prognosis in colorectal cancer [J]. *Histopathology*, 1999, 35(4): 360 - 367.
- [11] Sarbia M, Bittinger F, Grabellus F, *et al.* Expression of Bax, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family, in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 1997, 73(4): 508 - 513.
- [12] Marx D, Binder C, Meden H, *et al.* Differential expression of apoptosis associated genes bax and bcl-2 in ovarian cancer [J]. *Anticancer Res*, 1997, 17(3C): 2233 - 2240.
- [13] Kagawa S, Gu J, Swisher SG, *et al.* Antitumor effect of adenovirus-mediated Bax gene transfer on p53-sensitive and p53-resistant cancer lines [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(5): 1157 - 1161.
- [14] Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax [J]. *Nature*, 1994, 369(6478): 321 - 323.
- [15] Konopleva M, Tari AM, Estrov Z, *et al.* Liposomal Bcl-2 antisense oligonucleotides enhance proliferation, sensitize acute myeloid leukemia to cytosine-arabinside, and induce apoptosis independent of other antiapoptotic proteins [J]. *Blood*, 2000, 95(12): 3929 - 3938.
- [16] Dirsch VM, Stuppner H, Vollmar AM. Helenalin triggers a CD95 death receptor-independent apoptosis that is not affected by overexpression of Bcl-x(L) or Bcl-2 [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(15): 5817 - 5823.

[收稿日期] 2003-04-20

[修回日期] 2003-06-20