



BH3分析技术研究进展及其应用*

袁 静¹⁾ 曾 娟¹⁾ 蒋小艳¹⁾ 周艳宏^{2)**} 肖松舒^{1)**}⁽¹⁾ 中南大学湘雅三医院妇科, 长沙 410013; ⁽²⁾ 中南大学基础医学院肿瘤研究所, 长沙 410011

摘要 许多化疗药物发挥作用的重要方式是通过诱导线粒体介导的细胞凋亡. 细胞凋亡在维持正常机体的内环境稳态中有重要作用, 而在肿瘤细胞中, 细胞凋亡的失调成为肿瘤细胞逃避化疗药物杀灭细胞作用的一道屏障. BCL-2家族蛋白在调节线粒体诱导的凋亡中处于中心地位, 因此一项基于BCL-2家族蛋白的检测技术, BH3分析技术应运而生. 该项技术的提出或许能为肿瘤的个性化治疗提供新的思路. 本文重点综述BH3分析技术的原理, 以及在肿瘤化疗药物选择和新型化疗药物开发中的应用.

关键词 BH3分析技术, 肿瘤, 化疗耐药, BCL-2蛋白家族
中图分类号 Q734.2

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0179

在 Douglas Hanahan 和 Robert A Weinberg 两位教授于 2011 年总结的肿瘤十大特征一文中, 提出抵抗细胞凋亡是几乎所有肿瘤共有的能力^[1]. 细胞凋亡在维持正常机体内环境稳态中具有重要作用, 而在肿瘤细胞中, 失调的细胞凋亡信号网络赋予了肿瘤细胞抵抗多种促凋亡信号的能力, 其中包括化疗药物刺激信号.

在细胞凋亡的信号网络中, 目前已被报道的主要有内源性凋亡通路和外源性凋亡通路. 线粒体介导的细胞凋亡通路处于凋亡网络的中心地位, 其对调节胞内环境的平衡至关重要^[2-3]. 通过多种途径逃避凋亡可能是肿瘤细胞抵抗化疗杀伤力的一种重要机制. 大量的研究已经证明, BCL-2 家族蛋白是细胞凋亡网络中极为重要的调节因子, 而且与许多肿瘤的化疗耐药性密切相关^[4]. 靶向 BCL-2 家族蛋白可能成为寻找新的化疗药物的关键^[5-6]. 由于 BCL-2 家族是一个成员众多且相互作用极为复杂的家族^[7-8], 在不同患者中可能表现为不同的突变类型. 如何从众多的化疗药物中筛选出最适合的种类与剂量成为了目前亟待解决的问题.

由此, 有人提出是否能开发一种能够通过检测肿瘤细胞凋亡的倾向性, 即有多大的潜力诱发凋亡, 从而为肿瘤患者筛选出最有效的化疗药物的技术? 随着医学的不断进步, 医学已不再局限于循证

医学领域, 越来越多的人提出精准医学, 强调个性化治疗. 由于肿瘤是一个复杂的突变体, 同一类型的肿瘤可能有不同的突变类型, 因此强调肿瘤的个体化治疗是精准医学的一大进步.

BH3 分析技术 (BH3-profiling) 是一种功能性试验^[9], 其通过检测促凋亡蛋白的释放来确定细胞被诱导发生凋亡的潜能, 或者说为凋亡所做准备的程度. 起初, 这项技术为解决血液系统肿瘤的化疗药物敏感性问题而提出, 因为血液系统肿瘤具有高度的异质性和化疗耐药性^[10]. 这同时也提醒我们, 这项技术也许对普遍解决肿瘤的化疗耐药性有较大帮助. 本文重点讨论 BH3 分析技术的原理以及将其应用于化疗药物筛选与新型化疗药物开发的可能.

1 BCL-2家族

细胞凋亡被认为是维持机体内环境稳态的一种重要调节机制, 因此它受到十分复杂的分子网络的调控, 是一种细胞的程序性死亡^[11]. 大量的实验

* 湖南省自然科学基金 (2018JJ3782), 长沙市科技局项目 (kq1701085, kq1701087) 和中南大学研究生自主探索创新项目 (2018zzts937, 2018zzts952, 2019zzts1055) 资助.

** 通讯联系人.

肖松舒. Tel: 13787412954, E-mail: xiaosquirrel@163.com

周艳宏. Tel: 0731-84805383, E-mail: zhouyanhong@csu.edu.cn

收稿日期: 2019-08-07, 接受日期: 2019-11-18

研究发现,调控细胞凋亡的通路主要有3条:线粒体介导通路、死亡受体通路、内质网通路^[12].此外,许多学者还陆续发现了其他通路,比如颗粒酶B通路^[13].这些通路看似毫无关联,实则相互之间都可以通过BCL-2家族蛋白发生关联(图1).BCL-2家族蛋白是一类原癌基因,最初发现的成员是B细胞淋巴瘤/白血病-2(BCL-2),随后陆续发现了该家族的其他成员,目前至少已发现16个该家族成员^[7-8].所有成员均含有1~4个BCL-2同源域,称为BH结构域,分别标记为BH1~4.根据功能及结构的差异可将其分为3组:第一组为BH3-only蛋白,其结构中只包含一个BH3结构域,主要成员有BID、BIM等.作为凋亡的启动者,在凋亡启动过程中首先被活化,被称为凋亡通路的“哨兵”.第二组为促凋亡蛋白,在BH1~3结构域中保持高度的同源性,主要成员有BAX、BAK等.主要功能是作为凋亡的执行者.第三组为抗凋亡蛋白,其在4个BH结构域上都有同源性,包括BCL-2、BCL-XL等.通过拮抗促凋亡蛋白而发挥

抑制凋亡的作用(表1).各成员之间的相互作用决定了线粒体能否成功诱导细胞发生凋亡,或者说发生凋亡的倾向性有多大^[4, 14-15].生理状态下,促凋亡蛋白,如BAK,通过聚集在线粒体外膜(OMM)形成高分子质量低聚物,在OMM上形成一定孔径的通道,使线粒体外膜通透性发生改变,使得线粒体内外膜间隙中的促凋亡因子,如细胞色素c,释放出来,通过进一步活化胱天蛋白酶(caspase)从而发生一系列不可逆的细胞反应^[14, 16-18].抗凋亡蛋白通过结合促凋亡蛋白,抑制后者发生聚集,从而阻止凋亡启动.总而言之,当凋亡信号刺激细胞,BH3-only蛋白首先活化,通过与抗凋亡蛋白竞争性结合,使促凋亡蛋白游离,进而转移到线粒体外膜,导致线粒体外膜通透性增加,随即诱导细胞凋亡^[19-22].研究发现,许多抗肿瘤药物,比如铂类,都是通过诱导肿瘤细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用,而在多种耐药的肿瘤细胞系中均能检测到BCL-2家族蛋白表达异常^[23].这也为探索肿瘤耐药治疗提供了新的切入点.

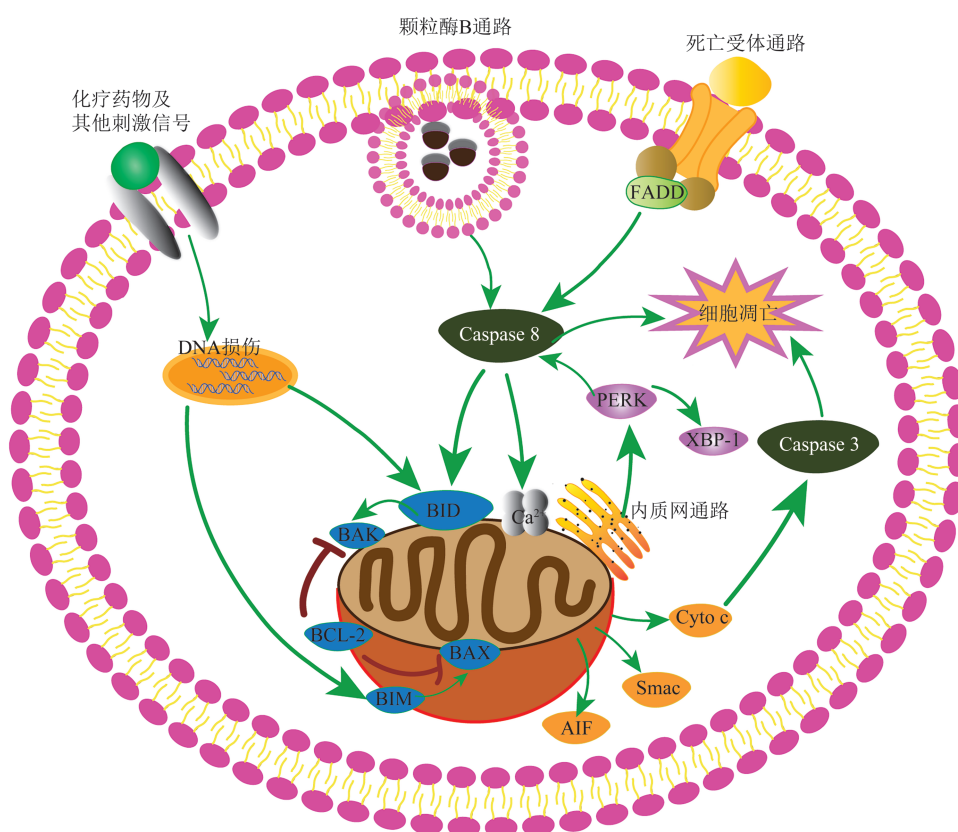


Fig. 1 The central role of BCL-2 family members in apoptotic pathway

图1 BCL-2家族蛋白在凋亡通路中的核心作用

细胞凋亡通路网络主要可分为4条通路,该4条通路可通过BCL-2家族蛋白汇合,因此BCL-2家族蛋白在调节细胞凋亡的信号网络中有重要作用.

Table 1 BCL-2 family members
表1 BCL-2家族蛋白

名称	BH结构域	成员	功能
BH3-only蛋白	BH3	BID、BIM、NOXA、PUMA、BIK、BAD、BMF、HRK	凋亡的启动者, 凋亡启动过程中首先被活化的蛋白.
促凋亡蛋白	BH1、BH2、BH3	BAX、BAK、BOK	凋亡的参与者, 通过聚集在线粒体外膜形成高分子量低聚物, 使线粒体膜通透性发生改变.
抗凋亡蛋白	BH1、BH2、BH3、BH4	BCL-2、BCL-XL、MCL-1、BCL-W、A1/BFL-1	凋亡的拮抗者, 通过结合促凋亡蛋白, 抑制后者发生聚集, 从而阻止凋亡启动.

2 肿瘤细胞耐药与BCL-2家族

随着现代医疗技术的发展, 人均寿命延长, 肿瘤的发病率也随之升高. 由于肿瘤发生隐匿, 导致大多数肿瘤在发现时已是晚期, 化疗药物的应用成为肿瘤治疗的主要途径之一. 然而, 化疗耐药成为了新的难题.

借助不断发展的基因检测技术, 越来越多的研究证实肿瘤是一种多基因疾病, 肿瘤的发生不只受到某一种癌基因的调控, 而是多种基因累积突变而产生的综合效应. 肿瘤是一种异质性极高的疾病, 不同的患者即使是同一种病理类型的肿瘤也可能存在不同的突变基因^[24]. 而目前的治疗方案较为单一, 因此对肿瘤患者治疗效果差异较大. 肿瘤细胞的异质性决定了细胞对化疗药物的敏感性差异, 这就使得个性化选择化疗药物成为一种趋势^[23].

从某种程度上说, 对化疗药物的抵抗就是对细胞凋亡的抵抗, 因此BCL-2家族蛋白在诱导化疗药物发挥作用方面有潜在的决定性作用^[23]. 例如, 有研究发现, 在化疗敏感细胞和耐药细胞中降低BAX的含量将大大减弱卡铂诱导的细胞凋亡, 提示作为促凋亡蛋白的BAX对于化疗药物发挥作用十分重要^[25]. 另有研究发现, 在不同的细胞中, 各BCL-2家族蛋白有不同的表达模式^[26], 即使同为耐药细胞, 其表达谱也不相同. 然而总的来说, 在耐药株中普遍表现为较高的促凋亡蛋白(如BAK、BAX)表达, 但抗凋亡蛋白表达增高更明显. 相比之下, 在化疗敏感的肿瘤细胞中促凋亡蛋白表达低于耐药株, 表现为抗凋亡蛋白的表达水平明显高于促凋亡蛋白^[23]. 这种表达模式说明肿瘤细胞比正常细胞具有更大的凋亡倾向性^[27]. 在急

性淋巴细胞性白血病(ALL)和慢性淋巴细胞性白血病(CLL)中即存在类似的表达模式, 在化疗敏感的细胞中持续表达大量的BCL-2^[28], 提示这种异常的BCL-2家族蛋白表达模式可能是普遍存在于肿瘤细胞中的现象. 值得注意的是, 在这些化疗敏感的癌细胞中同时会表达大量的BH3-only蛋白, 提示BH3-only蛋白的存在对于启动肿瘤细胞凋亡有重要作用, 这也成为研究BH3类似物抗肿瘤作用的理论基础. 例如, 通过将体外合成的BH3类似物ABT-737与卡铂联合处理卵巢癌细胞, 发现ABT-737的加入大大提高了耐药细胞的程序性死亡率^[29].

3 BH3分析技术

BH3分析技术最早由Letai教授提出. Letai等^[9]认识到BCL-2家族蛋白在化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡中的重要作用后, 开发了一种基于BCL-2家族蛋白的分析技术. 在不同的肿瘤细胞中, BCL-2家族成员之间有不同的相互作用关系, 我们可以称之为拥有不同的关系代码. 直接研究具体的“关系代码”显然不是合理的研究方法. 作为诱导细胞凋亡的“哨兵”, BH3-only蛋白可用于判断肿瘤细胞是否已做好凋亡的准备. 换句话说, BH3-only蛋白可以作为一种有效预测凋亡的生物标志物, 这种单一的生物预测标志物弥补了“关系代码”的复杂性带来的研究困难.

3.1 BH3分析技术与BCL-2家族蛋白

如前所述, BCL-2家族蛋白是细胞凋亡的重要调节蛋白, 由于成员较多, 成员之间的相互作用的具体作用机制尚未完全阐明. 一般认为, 在尚未发生凋亡时, 促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白结合形成复合

物,抑制线粒体发生凋亡,当凋亡信号传导到细胞,如化疗药物,BH3-only蛋白作为“哨兵”首先被激活.激活的BH3-only蛋白可与促凋亡蛋白竞争抗凋亡蛋白结合位点,从而释放促凋亡蛋白,如BAX和BAK,这些促凋亡蛋白在线粒体外膜发生聚集,诱导凋亡发生^[20, 30-31].也有研究证明BH3-only蛋白可以直接活化促凋亡蛋白^[22].

除上述机制外,研究发现可能存在另一种抗凋亡蛋白抑制凋亡的机制: BH3-only蛋白可根据作用机制的不同而分为两类,一类作为“激活剂”,如BIM、BID,主要用于激活促凋亡蛋白活性,另一类作为“增敏剂”,如BAD、BIK等,通过竞争性置换作用使促凋亡蛋白与“激活剂”从抗凋亡蛋白的结合位点中释放出来.如果在肿瘤细胞中过量表达抗凋亡蛋白,导致抗凋亡蛋白的结合位点无法被完全占据而有所富余,那么细胞则不太可能发生凋亡^[32].这也就说明了肿瘤细胞的凋亡状态并非取决于某一个分子,而是由许多分子的相互作用之后产生的综合效应.尽管众多分子间的相互作用复杂,但BH3-only蛋白作为凋亡的启动者,成为研究细胞凋亡检测技术的重要切入点.

BH3分析技术巧妙地避开了探讨单个分子的作用,而是站在整体角度检测细胞凋亡的倾向性大小.通过将体外合成的抗凋亡蛋白抑制剂,即来源于BH3结构域的BH3模拟肽如ABT-737,作用于肿瘤细胞,拮抗抗凋亡蛋白,促进促凋亡蛋白释放,从而诱导肿瘤细胞凋亡^[33].ABT-737的应用如同人为地给肿瘤细胞增加一个推力,使肿瘤细胞往凋亡方向进展,而所需推力的大小取决于肿瘤细胞对凋亡倾向性大小.

3.2 技术的原理

大量的研究证明,BCL-2家族蛋白的相互作用决定了线粒体发生凋亡的潜力大小.如果能够检测肿瘤细胞发生凋亡的倾向性,也就可以间接评价肿瘤细胞对抗肿瘤药物的敏感性.而传统的检测凋亡的方法只能检测细胞处于凋亡即将发生或者已发生凋亡的状态,而不能预测细胞是否有发生凋亡的倾向性.

基于此,科学家们开始研究一种可以预测凋亡的方法.BH3分析技术即成为一种重要而创新的方

法.通过将待检测的肿瘤细胞中提取的线粒体暴露于一种促细胞凋亡的BH3模拟肽中,并测量细胞色素c的释放量,以此来确定线粒体外膜通透性发生的程度.其中,BH3模拟肽是一种体外合成的来源于BCL-2家族蛋白BH3结构域的蛋白质,其具有模拟BH3-only蛋白的作用,可以促进细胞发生凋亡.如果线粒体外膜通透性明显增加,则认为该肿瘤细胞线粒体易于介导凋亡发生,也就是该肿瘤细胞易于发生凋亡性死亡^[9].术语“priming”是指线粒体达到凋亡阈值的临界条件,利用BH3分析技术就可以检测特定细胞的线粒体发生凋亡的临界条件,临界条件的大小决定了细胞发生凋亡的难易程度.

BH3分析技术的工作流程可概括为^[9, 34-35]:

a. 用机械破坏和差速离心等方法从细胞中纯化线粒体; b. 制备线粒体悬浮液; c. 在室温条件下暴露于纯化的BH3模拟肽中40 min; d. 用酶联免疫吸附法定量检测细胞色素c的释放; e. 数据分析处理,比较细胞凋亡倾向性(图2).

3.3 动态BH3分析技术

BH3分析技术在实验过程中需要将线粒体从细胞中提取出来.在这个过程中剔除了存在于细胞质中能影响细胞凋亡的其他组分影响,再加上提取足量的线粒体需要相对大量的细胞作为起始材料($10^7 \sim 10^9$ 个细胞),一定程度上增加了技术的局限性以及降低了该技术的临床可操作性与临床应用性.因此,Letai实验室^[36]进一步改良试验技术,基于BH3分析技术的基本思路,对操作流程进行了优化设计,提出了动态BH3分析技术.该项技术省去了提取线粒体的步骤,代之以用低浓度的地高辛处理细胞,这种处理既可提高生物膜通透性又可以保持生物膜的完整性,使体外合成的BH3模拟肽能够进入细胞,并成功与细胞内的线粒体相互作用.JC-1是一种目前广泛用于检测线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 的理想荧光探针,通过检测荧光探针颜色的变化评估线粒体发生凋亡的程度(图2).通过对比分析,显示优化的动态BH3分析技术与原始的BH3分析技术在预测细胞凋亡倾向性方面无明显差异^[37].

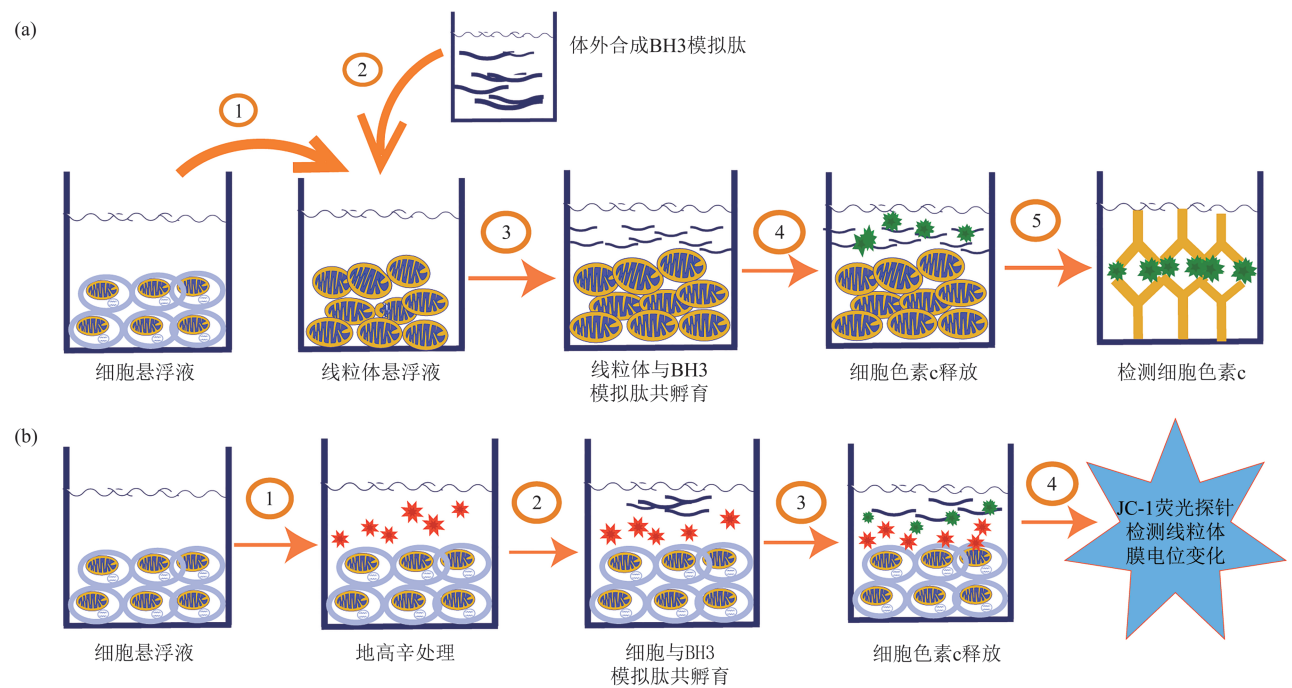


Fig. 2 The basic steps of BH3-profiling and dynamic BH3-profiling assay
图2 BH3分析与动态BH3分析基本实验步骤

(a) BH3分析的基本步骤. 第一步制备细胞悬液, 从细胞中将线粒体分离出来, 制备线粒体悬液, 同时加入体外合成的BH3模拟肽, 线粒体与BH3模拟肽共孵育一段时间后, 细胞色素c将从线粒体内外膜间隙中释放出来, 用酶联免疫吸附测定细胞色素c的水平. (b) 动态BH3分析的基本步骤. 第一步仍是制备细胞悬液, 第二步用地高辛处理细胞, 增加细胞膜通透性, 有利于BH3模拟肽进入细胞, 将BH3模拟肽与细胞共孵育一段时间, 用JC-1荧光探针检测线粒体膜电位的变化.

4 BH3分析技术应用与发展

最初的BH3分析技术主要用于研究血液系统肿瘤, 随着技术的进一步成熟, 研究者们不断拓展技术应用的广度与深度, 逐渐拓展到了其他类型肿瘤的实验研究与临床应用等方面.

4.1 BH3分析技术为临床患者选择最适化疗药物或者最适药物组合

这种功能性试验可用于检测药物毒性, 预测患者对药物的敏感性, 从而筛选出最适合特定患者的药物或者寻找不同药物之间的最佳组合. 类比临床上通过药物敏感性反应筛选最敏感的抗生素, 曾经也有学者提出类似寻找最佳化疗药物的技术. 如将抗肿瘤药物与癌细胞体外或半体外共培养, 但癌细胞的体外培养仍存在许多问题. 随后有学者提出在小鼠体内建立患者来源的异种肿瘤移植模型, 但这种方法耗时相当长, 不利于广泛应用^[38]. 经过一系列研究证明, BH3分析技术有可能打破这种僵局: 有望实现通过快速准确地检测线粒体对抗肿瘤

药物的敏感性, 预测特定患者的肿瘤细胞对某种化疗药物的临床疗效, 从抽血到得出分析结果只需4 h^[39].

癌症有着复杂的分子调控系统, 尤其是对于血液系统肿瘤、生殖系统肿瘤等异质性较高的肿瘤, 其肿瘤突变类型众多, 因此肿瘤病理类型多样, 且化疗耐药率高. 随着越来越多的抗肿瘤药物的发现与应用, 比如靶向药物, 许多药物都能在一定程度上具有逆转化疗耐药性或诱导癌细胞凋亡的能力, 而如何寻找最适合的药物或药物组合成为了一大亟待解决的问题^[40]. 因此, 寻找一种有效的预测性生物标记物对于肿瘤患者的个体化治疗尤为重要.

BH3分析技术实现了准确有效地检测细胞被抗肿瘤药物诱导发生凋亡的潜力. 当用抗肿瘤药物治疗时, 动态BH3分析技术(DBP)在细胞水平检测线粒体介导的凋亡通路的早期变化^[41]. Montero等^[38]应用DBP技术成功预测了多种血液系统恶性肿瘤细胞、非小细胞肺癌细胞、乳腺癌细胞、黑色素瘤细胞、结肠癌细胞等对特定化疗药物

的敏感性,这有助于为患者提供最佳治疗策略.卵巢癌作为具有高度异质性的恶性肿瘤,对不同化疗药物的敏感程度存在较大的差异.DBP可用于预测卵巢癌的化疗敏感性.例如,用DBP技术检测16例原发性卵巢癌样本单细胞悬浮液发生凋亡的程度,结果与卵巢癌对卡铂的敏感性一致,提示DBP可用于预测肿瘤细胞对抗肿瘤药物的敏感性并辅助筛选最有效的药物^[38].也就是说,DBP或BH3分析技术可预测肿瘤患者的化疗敏感性,对未来个体化治疗有重要的指导意义.

4.2 BH3分析技术帮助预测肿瘤患者对化疗药物的预后效果

BH3分析技术可以预测肿瘤患者对某种治疗的临床反应及临床预后^[42].研究发现,肿瘤细胞被BH3肽激活而启动凋亡的难易程度与患者对化疗药物的临床反应呈正相关.凋亡启动越容易,临床预后越好.Ni等^[42]对17例来自多发性骨髓瘤患者的骨髓样本进行动态BH3分析,发现细胞凋亡倾向性较强的患者具有更长无进展生存期.在急性粒细胞白血病和急性淋巴细胞白血病患者中获得了相似的结果,即肿瘤细胞的凋亡倾向性越强,临床预后越好.另外,作者还补充了实体肿瘤研究,对14例卵巢癌患者进行了随访,通过检测了她们的CA125水平以评价她们对化疗的反应性,发现在化疗前检测线粒体表现出较高的凋亡倾向性的患者对化疗有更好的最终效应.可能的解释是凋亡倾向性强的患者对化疗药物敏感性也较高,因此总体临床预后优于凋亡抵抗的患者.

4.3 BH3分析技术辅助肿瘤实验研究

BH3分析技术在肿瘤实验研究中具有重要的应用前景.例如,通过应用BH3分析技术检测癌细胞的凋亡倾向性,通过改变处理条件,研究不同的条件下,线粒体发生凋亡的倾向性,可用于寻找肿瘤细胞抵抗凋亡的分子突变、诱导线粒体凋亡的条件、线粒体凋亡的其他生物标志物、其他有效的抗肿瘤药物等等.例如研究人员通过应用BH3分析技术,发现细胞中的MOM支架蛋白Sab水平与卵巢癌细胞的化学敏感性之间的关系,提示Sab可能成为预测卵巢癌化疗预后的新生物标志物^[43].

5 总结与展望

随着医学的发展,人们开始关注到肿瘤是一种异质性疾病,不同的患者间存在基因表达差异.基于此,肿瘤的个体化治疗成为人们关注的焦点,

BH3分析为肿瘤患者的个体化治疗提供了新的思路:通过BH3分析技术,可用于发现新的化疗药物、为特定患者寻找最佳药物组合,从而制定个体化治疗方案.但是将BH3分析技术应用于肿瘤研究尚处于起步阶段,目前的研究多局限于血液系统恶性肿瘤,且相关研究以细胞水平居多,未来的研究应尽可能拓展到其他肿瘤耐药等方面的研究,逐渐从细胞水平过渡到临床实用阶段.虽然有实验研究证实BH3分析技术可用于预测肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,但其预测患者的临床反应的能力还未得到广泛证实.作为一项新兴技术,BH3分析技术还有更多的可能性等待着人们去探索.

参 考 文 献

- [1] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, **144**(5): 646-674
- [2] Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol*, 2013, **23**(12): 620-633
- [3] Hassan M, Watari H, Abualmaaty A, *et al.* Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*, 2014, **2014**: 150845
- [4] Elkholi R, Renault T T, Serasinghe M N, *et al.* Putting the pieces together: how is the mitochondrial pathway of apoptosis regulated in cancer and chemotherapy?. *Cancer Metab*, 2014, **2**: 16
- [5] Walensky L D. Targeting BAX to drug death directly. *Nat Chem Biol*, 2019, **15**(7): 657-665
- [6] Delbridge A R, Grabow S, Strasser A, *et al.* Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer*, 2016, **16**(2): 99-109
- [7] Chung C. Restoring the switch for cancer cell death: Targeting the apoptosis signaling pathway. *Am J Health Syst Pharm*, 2018, **75**(13): 945-952
- [8] Adams C M, Clark-Garvey S, Porcu P, *et al.* Targeting the Bcl-2 family in B cell lymphoma. *Front Oncol*, 2018, **8**: 636
- [9] Certo M, Del G M V, Nishino M, *et al.* Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*, 2006, **9**(5): 351-365
- [10] Valentin R, Grabow S, Davids M S. The rise of apoptosis: targeting apoptosis in hematologic malignancies. *Blood*, 2018, **132**(12): 1248-1264
- [11] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972, **26**(4): 239-257
- [12] Solano-Galvez S G, Abadi-Chiriti J, Gutierrez-Velez L, *et al.* Apoptosis: activation and inhibition in health and disease. *Med Sci (Basel)*, 2018, **6**(3): e54
- [13] Chiusolo V, Jacquemin G, Yonca B E, *et al.* Granzyme B enters the mitochondria in a Sam50-, Tim22- and mtHsp70-dependent manner to induce apoptosis. *Cell Death Differ*, 2017, **24**(4):

- 747-758
- [14] Estaquier J, Vallette F, Vayssiere J L, *et al.* The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv Exp Med Biol*, 2012, **942**: 157-183
- [15] Martinou J C, Youle R J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell*, 2011, **21**(1): 92-101
- [16] Scorrano L, Oakes S A, Opferman J T, *et al.* BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis. *Science*, 2003, **300**(5616): 135-139
- [17] Smaili S S, Hsu Y T, Youle R J, *et al.* Mitochondria in Ca^{2+} signaling and apoptosis. *J Bioenerg Biomembr*, 2000, **32**(1): 35-46
- [18] Yamaguchi H, Bhalla K, Wang H G. Bax plays a pivotal role in thapsigargin-induced apoptosis of human colon cancer HCT116 cells by controlling Smac/Diablo and Omi/HtrA2 release from mitochondria. *Cancer Res*, 2003, **63**(7): 1483-1489
- [19] Doerflinger M, Glab J A, Puthalakath H. BH3-only proteins: a 20-year stock-take. *FEBS J*, 2015, **282**(6): 1006-1016
- [20] Moldoveanu T, Follis A V, Kriwacki R W, *et al.* Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem Sci*, 2014, **39**(3): 101-111
- [21] Wei M C, Lindsten T, Mootha V K, *et al.* tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*, 2000, **14**(16): 2060-2071
- [22] Kim H, Tu H C, Ren D, *et al.* Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, 2009, **36**(3): 487-499
- [23] Cardenas C, Montagna M K, Pitruzzello M, *et al.* Adipocyte microenvironment promotes Bclxl expression and confers chemoresistance in ovarian cancer cells. *Apoptosis*, 2017, **22**(4): 558-569
- [24] Kurman R J. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Ann Oncol*, 2013, **24 Suppl 10**: x16-x21
- [25] Yang X, Wang J, Zhou Y, *et al.* Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. *Cancer Lett*, 2012, **321**(2): 137-143
- [26] Adams J M, Cory S. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death Differ*, 2018, **25**(1): 27-36
- [27] Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, **20**(3): 175-193
- [28] Del G M V, Brown J R, Certo M, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest*, 2007, **117**(1): 112-121
- [29] Dai Y, Jin S, Li X, *et al.* The involvement of Bcl-2 family proteins in AKT-regulated cell survival in cisplatin resistant epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*, 2017, **8**(1): 1354-1368
- [30] Billard C. BH3 mimetics: status of the field and new developments. *Mol Cancer Ther*, 2013, **12**(9): 1691-1700
- [31] Leibowitz B, Yu J. Mitochondrial signaling in cell death *via* the Bcl-2 family. *Cancer Biol Ther*, 2010, **9**(6): 417-422
- [32] Potter D S, Letai A. To prime, or not to prime: that is the question. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2016, **81**: 131-140
- [33] Yu Y, Xu L, Qi L, *et al.* ABT737 induces mitochondrial pathway apoptosis and mitophagy by regulating DRP1-dependent mitochondrial fission in human ovarian cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 2017, **96**: 22-29
- [34] Letai A, Bassik M C, Walensky L D, *et al.* Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2002, **2**(3): 183-192
- [35] Deng J, Carlson N, Takeyama K, *et al.* BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell*, 2007, **12**(2): 171-185
- [36] Ryan J, Letai A. BH3 profiling in whole cells by fluorimeter or FACS. *Methods*, 2013, **61**(2): 156-164
- [37] Ryan J, Montero J, Rocco J, *et al.* iBH3: simple, fixable BH3 profiling to determine apoptotic priming in primary tissue by flow cytometry. *Biol Chem*, 2016, **397**(7): 671-678
- [38] Montero J, Sarosiek K A, Deangelo J D, *et al.* Drug-induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy. *Cell*, 2015, **160**(5): 977-989
- [39] Del G M V, Letai A. BH3 profiling--measuring integrated function of the mitochondrial apoptotic pathway to predict cell fate decisions. *Cancer Lett*, 2013, **332**(2): 202-205
- [40] Montero J, Letai A. Dynamic BH3 profiling-poking cancer cells with a stick. *Mol Cell Oncol*, 2016, **3**(3): e1040144
- [41] Montero J, Letai A. Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic?. *Cell Death Differ*, 2018, **25**(1): 56-64
- [42] Ni C T, Sarosiek K A, Vo T T, *et al.* Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science*, 2011, **334**(6059): 1129-1133
- [43] Paudel I, Hernandez S M, Portalatin G M, *et al.* Sab concentrations indicate chemotherapeutic susceptibility in ovarian cancer cell lines. *Biochem J*, 2018, **475**(21): 3471-3492

Research Progress and Application of BH3-profiling*

YUAN Jing¹⁾, ZENG Da¹⁾, JIANG Xiao-Yan¹⁾, ZHOU Yan-Hong^{2)**}, XIAO Song-Shu^{1)**}

¹⁾The Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China;

²⁾Cancer Research Institute, Basic School of Medicine, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract Mitochondrial-mediated apoptosis plays an important role for chemotherapeutic drugs in inducing cancer cell death, which also helps maintain homeostasis of the internal environment in normal organisms. In cancer cells, the dysregulation of apoptosis becomes a barrier for cancer cells to escape from the killing effect of chemotherapeutic drugs. In regulating mitochondrial-induced apoptosis, BCL-2 family proteins are of great importance. Therefore, a detection technology based on BCL-2 family proteins, BH3-profiling technology emerged. The proposed technology may provide new ideas for the personalized treatment of cancer. This paper focuses on the principle of BH3-profiling technology, its application in the selection of cancer chemotherapeutic drugs and the development of new chemotherapeutic drugs.

Key words BH3-profiling, tumor, chemoresistance, BCL-2 family proteins

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0179

* This work was supported by grants from Hunan Provincial Natural Science Foundation (2018JJ3782), the Changsha Science and Technology Bureau Project (kq1701085, kq1701087), the Fundamental Research Funds for Central Universities of Central South University (2018zzts937, 2018zzts952, 2019zzts1055).

** Corresponding author.

XIAO Song-Shu. Tel: 13787412954, E-mail: xiaosquirrel@163.com

ZHOU Yan-Hong. Tel: 86-731-84805383, E-mail: zhouyanhong@csu.edu.cn

Received: August 7, 2019 Accepted: November 18, 2019