

Beijing 100850, China).

Abstract DNA dependent protein kinase (DNA-PK) is a DNA ends binding protein composed of Ku protein and DNA-PKcs. Ku protein can bind directly to DNA ends, which will stimulate DNA-PK catalytic subunit. DNA-PK is a very important

cellular factor which plays important role in the multiple cellular processes such as DNA repair, gene recombination, DNA replication and transcription.

Key words DNA dependent protein kinase, Ku, DNA-PKcs, DNA repair

bcl-x 基因及其对细胞凋亡的调节

陈扬超 周克元

(广东医学院医用生物化学研究所, 湛江 524023)

摘要 bcl-x 是 bcl-2 家族中的重要成员, 由于不同的剪接产生 Bcl-X_L、Bcl-X_S、Bcl-X_V 三种同源蛋白. Bcl-X_L、Bcl-X_V 抑制凋亡, Bcl-X_S 促进凋亡. bcl-x 在细胞发育、维持机体平衡、肿瘤发生和预后中起作用. Bcl-X 通过与 Bcl-2、Bax、Bad 等相互作用而实现对凋亡的调控.

关键词 bcl-x 基因, Bcl-X 蛋白, 细胞凋亡, 调节

学科分类号 Q753

细胞凋亡受许多基因调节, 其中包括多种癌基因和抑癌基因如 *c-myc*、*bcl-2*、*p53*、*fas* 等. 其中 *bcl-2* 是与细胞凋亡关系最为密切, 被研究得最深入者之一. *bcl-2* 的表达产物位于线粒体内膜、核膜及内质网膜, 在人体多种肿瘤中高表达, 可抑制多种因素诱导的细胞凋亡^[1]. 进一步研究发现: *bcl-2* 是一个多基因家族, 包括多个成员. *bcl-x* 是近年发现的 *bcl-2* 家族成员之一^[2].

1 bcl-x 基因的克隆

1993 年 Boise^[2] 以鼠 *bcl-2* cDNA 为探针, 在鸡淋巴细胞 cDNA 文库中筛选到一个克隆, 命名为 *bcl-x*. 经 DNA 印迹等一系列实验证实其为一与 *bcl-2* 显著不同的新基因. 随后用鸡 *bcl-x* cDNA 作探针, 筛选到人 *bcl-x* cDNA. 由于不同的剪接产生两种大小不同的 mRNAs: *bcl-x_L* (long form) 和 *bcl-x_s* (short form). *bcl-x_L* 类似于 *bcl-2*, 能抑制细胞凋亡, 奇怪的是, *bcl-x_s* 却能促进细胞凋亡.

2 bcl-x 基因组结构和 Bcl-x 蛋白质结构

鼠 *bcl-x* 基因位于 2 号染色体约 89 cM 处, 包含 3 个外显子, 外显子 I 不翻译. 剪接反应导致外显子 II 和外显子 III 连接构成 *bcl-x_L* 的编码区. 主要转录起始点位于外显子 I 上游一 GC 富含区, 外显

子 I 上游有多个 SP1 (stimulating protein 1) 结合特征结构 (motif). 在翻译起始密码上游 57 bp 处有一启动子. 这一结构与 *bcl-2* 极为相似, 提示 *bcl-x* 与 *bcl-2* 可能来源于同一祖先或是由基因重复产生. 在外显子 II 内 375 位选择性的剪接, 产生 *bcl-x_s* mRNA. 与 *bcl-x_L* 相比, *bcl-x_s* mRNA 缺少外显子 II 3' 端的 189 bp, 但二者都具有外显子 III 的序列^[3].

bcl-x_L 编码 241 个氨基酸, *bcl-x_s* 编码 178 个氨基酸, 与 Bcl-X_L 相比, 缺失的 63 个氨基酸均位于 Bcl-2 家族的高度同源区: BH1 (Bcl-2 homology 1) 和 BH2 (Bcl-2 homology 2) 内. 该区也是 Bcl-2 家族的高度保守区. Bcl-X_L 与 Bcl-2 氨基酸序列同源性为 43%^[2], 但 Bcl-X_L 与 Bcl-2 的 BH1 和 BH2 区同源性高达 73%. 由于缺少 BH1 和 BH2 区, 使得 Bcl-X_S 功能与 Bcl-2 和 Bcl-X_L 相反, 表明该区在 Bcl-2 和 Bcl-X_L 抑制细胞凋亡中有重要作用. 最近又分离到 Bcl-x 的又一同源蛋白 Bcl-X_V 其功能与 Bcl-X_L 相似, 抑制细胞凋亡^[4].

3 bcl-x 的转录与表达

免疫组化结果表明^[5], *bcl-x* 在许多组织细胞

中表达: a. 外周和中枢神经元; b. 胸腺皮质细胞、淋巴细胞和浆细胞; c. 骨髓造血细胞; d. 生殖细胞; e. 许多上皮细胞. 在成体脑组织中, 可检测到 $bcl-x_L$ mRNA^[2], 与 $bcl-2$ 在中枢神经系统大多数神经元中低的表达形成对比, 提示 $bcl-x_L$ 可能参与成体神经细胞维持减数分裂后长期生存. 鼠视网膜细胞特异性表达 $bcl-x_L$, 其 mRNA 量至少比 $bcl-2$ 高 16 倍^[6], 说明在成熟视网膜中 $bcl-x_L$ 是 $bcl-2$ 家族中的主要成员.

$bcl-x_s$ 主要在未成熟 $CD4^+ CD8^+$ 胸腺细胞中表达, 在单阳胸腺细胞和成熟的外周血 T 淋巴细胞中不表达^[2]. $CD4^+ CD8^+$ 胸腺细胞是胸腺阴、阳性选择作用最重要的细胞群, 也是凋亡最活跃的细胞群. 很可能正是由于 $bcl-x_s$ 促进凋亡的功能使双阳细胞适者生存, 发育为单阳成熟 T 细胞, 不适者淘汰、死亡.

4 $Bcl-x$ 与细胞凋亡

$Bcl-X_L$ 与 $Bcl-2$ 功能类似, 抑制细胞凋亡. 高表达 $Bcl-X_L$ 的 NB 细胞能抵抗顺铂诱导的凋亡^[7]. 更有趣的是, 免疫抑制剂 CsA、FK506、纳巴霉素诱导 WEHI-231 细胞凋亡被转染的 $bcl-x_L$ 抑制, 但不被 $bcl-2$ 抑制^[8], 表明 $bcl-x_L$ 通过不依赖于 $bcl-2$ 的方式抑制细胞凋亡. 共转染实验发现, $bcl-x_L$ 能抑制 p53 介导的细胞凋亡^[9].

$bcl-x_L$ 转基因鼠的角质细胞比野生型角质细胞经 Vp16 处理后生存时间延长, 并能显著增强皮肤对紫外辐射的抵抗力, 而 $bcl-x_s$ 的作用正好与 $bcl-x_L$ 相反^[10].

$bcl-x_s$ 能促进多种细胞凋亡, MCF-7 细胞转染 $bcl-x_s$ 后, 对 Vp16 和紫杉醇诱导凋亡的敏感性分别增加 4 和 9 倍^[11]. 动物实验证实, 对裸鼠 MCF-7 细胞衍生的实体瘤内直接注射 $bcl-x_s$ 重组腺病毒 4 次后, 肿瘤体积缩小 50%^[12]. $bcl-x_s$ 重组腺病毒能显著诱导 NB 细胞凋亡^[13], 更令人鼓舞的是: 混有肿瘤细胞的骨髓造血细胞经 $bcl-x_s$ 重组腺病毒处理后, 只选择性地诱导肿瘤细胞凋亡, 造血细胞不受影响, 能重建辐射诱导免疫缺陷小鼠的骨髓造血^[14], 表明 $bcl-x_s$ 重组腺病毒可作为骨髓净化的有力武器. 还有实验证实: $bcl-x_s$ 能诱导红系分化和促进 $ara-C$ 诱导 K562 细胞的分化和凋亡^[15].

5 $bcl-x$ 与肿瘤

$bcl-x$ 在各种恶性淋巴瘤中普遍表达, 以 $bcl-x_L$

转录子为主^[16]. 由于 $bcl-x_L$ 能抑制细胞凋亡, 它可能参与了淋巴瘤形成的一些途径. 在卡波氏肉瘤^[17]、乳腺癌细胞^[11]、大部分 NB 细胞中^[7], $bcl-x_L$ 均高表达. 乳腺癌细胞、NB 细胞中的 $bcl-x_L$ 高表达与这些细胞对化疗药物的耐受有关. 最近发现 $bcl-x_s$ 与 $bcl-x_L$ 之比与急性粒细胞白血病预后有关, $bcl-x_s/bcl-x_L$ 高的患者, 预后好; $bcl-x_s/bcl-x_L$ 低的患者, 预后差^[18].

6 $Bcl-x$ 调节细胞凋亡的分子机制

$Bcl-x$ 调节细胞凋亡的精确机制并不十分清楚. 酵母双杂交实验表明^[19], $Bcl-X_S$ 、 $Bcl-2$ 和 Bax 组成一个凋亡调控系统: a. 当 Bax-Bax 同源二聚体形成, 诱导细胞凋亡; b. 随 $Bcl-2$ 表达量增加, Bax-Bax 解聚, 与 $Bcl-2$ 形成更稳定的 Bax- $bcl-2$ 异源二聚体, 中和 Bax 诱导细胞凋亡的作用; c. 当 $Bcl-X_S$ 存在时, 优先与 $Bcl-2$ 形成异源二聚体, 使游离的 Bax 形成同源二聚体, 诱导凋亡. 三种二聚体稳定性大小为 $Bcl-X_S-Bcl-2 > Bcl-2-Bax > Bax-Bax$. 这一模型或许可以解释 $Bcl-2$ 并不抑制某些因素诱导的凋亡. 1995 年发现: $Bcl-X_L$ 与 Bax 结合, 阻止其同源二聚体形成, 抑制细胞凋亡, Bad 与 $Bcl-X_L$ 形成更为稳定的异源二聚体, 中和其抑制凋亡的能力^[20]. 这一模型与上述模型极相似, 共同点是 Bax 最终导致凋亡, $Bcl-2$ 和 $Bcl-X_L$ 通过与 Bax 结合抑制凋亡; $Bcl-X_S$ 和 Bad 通过与 $Bcl-2$ 和 $Bcl-X_L$ 结合, 置换 Bax 启动细胞凋亡.

也有实验证实, 细胞色素 c 能特异性地与 $Bcl-X_L$ 而不是 $Bcl-X_S$ 结合^[21], 细胞色素 c 在细胞凋亡诱导过程中从线粒体释放出来, 参与细胞凋亡的级联过程, $Bcl-X_L$ 与其结合后^[21], 防止其在细胞质中堆积, 从而抑制辐射诱导的细胞凋亡. $Bcl-X_L$ 的这种功能在与 $Bcl-X_S$ 结合后被中和.

现在看来, $Bcl-x$ 很可能根据不同的诱因以不同的方式参与调节细胞的生存或死亡.

7 小 结

$bcl-x$ 是 $bcl-2$ 家族中的重要成员, 与细胞凋亡关系密切. 特别是 $bcl-x_s$ 对细胞凋亡的促进作用, 为以诱导肿瘤细胞凋亡为基础的基因治疗提供了新思路. 人们对此进行了许多实验, 并取得了积极的效果. 今后与化疗药物合用有可能是提高 $bcl-x_s$ 基因治疗效果的方法. $bcl-x_s$ 重组腺病毒很可能在肿

瘤患者进行自身骨髓移植的骨髓净化中发挥重要作用。人们还可以根据上述凋亡调控模型, 以 Bcl-x 为靶分子寻找新型抗癌药。

参 考 文 献

- 1 Sentman C L, Shutter J R, Hockenbery D, *et al.* bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negativ selection in thymocytes. *Cell*, 1991, **67** (5): 879~ 888
- 2 Boise L H, Gonzalez G M, Postema C E, *et al.* bcl-x, A bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, 1993, **74** (4): 597~ 608
- 3 Grillot D A, Gonzalez G M, Ekhterae D, *et al.* Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse bcl-x gene. *J Immunol*, 1997, **158** (10): 4750 ~ 4757
- 4 Yang X F, Weber G F, Cantor H. A novel Bcl-x isoform connected to the T cell receptor regulates apoptosis in T cells. *Immunity*, 1997, **7** (5): 629~ 639
- 5 Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, *et al.* Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of Bcl-x expression. *Cancer Res*, 1994, **54** (21): 5501~ 5507
- 6 Levin L A, Schlamp C L, Spieldoch R L, *et al.* Identification of the bcl-2 family of genes in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, **38** (12): 2545~ 2553
- 7 Dole M, Jasty R, Cooper M, *et al.* Bcl-X_L is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, 1995, **55** (12): 2576~ 2582
- 8 Gottschalk A R, Boise L H, Thompson C B, *et al.* Identification of immunosuppressant-induced apoptosis in a murine B cell line and its prevention by bcl-x but not bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (15): 7350~ 7354
- 9 Schott A F, Apel I J, Nunez G, *et al.* Bcl-X_L protects cancer cells from p53-mediated apoptosis. *Oncogene*, 1995, **11** (7): 1389~ 1394
- 10 Pena J C, Fuchs E, Thompson C B. Bcl-x expression influences keratinocyte cell survival but not terminal differentiation. *Cell Growth Differ*, 1997, **8** (6): 619~ 629
- 11 Venil N S, Mark W E, Gabriel N, *et al.* Overexpression of Bcl-X_S sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, 1995, **55** (12): 2507~ 2510
- 12 Mark W E, Patrick K M, Venil N S, *et al.* bcl-x_s gene therapy induces apoptosis of human mammary tumors in nude mice. *Cancer Res*, 1996, **56** (9): 1965~ 1969
- 13 Mukund G D, Michael F C, Peter H, *et al.* Bcl-X_S enhances adenoviral vector induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res*, 1996, **56** (24): 5734~ 5740
- 14 Michael F C, Ingrid J A, Mary A B, *et al.* A recombinant bcl-x_s adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (24): 11024~ 11028
- 15 Ray S, Bullock G, Nunez G, *et al.* Enforced expression of Bcl-X_S induces differentiation and sensitizes chronic myelogenous leukemia blast crisis K562 cells to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-mediated differentiation and apoptosis. *Cell Growth Differ*, 1996, **7** (12): 1617~ 1623
- 16 Xerri L, Parc P, Brousset P, *et al.* Predominant expression of the long isoform of Bcl-x in human lymphomas. *Br J Haematol*, 1996, **92** (4): 900~ 906
- 17 Foreman K E, Wrona S T, Boise L H, *et al.* Kaposi's sarcoma tumor cells preferentially express Bcl-X_L. *Am J Pathol*, 1996, **149** (3): 795~ 803
- 18 Deng G, Lane4 C, Kornblau S, *et al.* Ratio of bcl-x_s to bcl-x_L is different in good and poor prognosis subsets of acute myeloid leukemia. *Mol Med*, 1998, **4** (3): 58~ 64
- 19 Sato T, Hanada M, Bodrug S, *et al.* Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (20): 9238~ 9240
- 20 Yang E, Zha J, Jockel J, *et al.* Bad, a heterodimeric partner for Bcl-X_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, 1995, **80** (2): 258~ 291
- 21 Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, *et al.* Role for Bcl-X_L as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (13): 6939~ 6942

bcl-x Gene and Its Regulation on Apoptosis. CHEN Yang-Chao, ZHOU Ke-Yuan (*Institute of Medical Biochemistry, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China*).

Abstract bcl-x gene is an important member of the bcl-2 multigene family. Three isoforms: Bcl-X_L, Bcl-X_S and Bcl-X_V, are generated by alternative splicing. Bcl-X_L and Bcl-X_V inhibit apoptosis. However, Bcl-X_S enhances apoptosis. Bcl-x plays a role in cell development, homeostatic balance, tumorigenesis and prognosis, which regulates apoptosis through interacting with Bcl-2, Bax, Bad and so on.

Key words bcl-x gene, Bcl-X protein, apoptosis, regulation