

University, Shanghai 200070, China).

Abstract The gene *zif268* codes for a transcription factor ZIF268. The expression pattern of *zif268* in developing visual cortex is regulated. *zif268* is highly expressed in adult visual cortex which experienced normal visual input. After visual deprivation, the expression level of *zif268* is strongly down-

regulated, while visual stimulation can significantly increase the expression level of *zif268*. The studies concerning the expression pattern of *zif268* offer further insight into the physiological functions of *zif268* in the mammalian visual system.

Key words visual cortex, *zif268*, gene expression, visual development

凋亡调控基因 BCL2 家族研究的新进展

刘陶文¹⁾

(桂林医学院生物工程研究所, 桂林 541004)

摘要 凋亡的调控是细胞生理死亡和肿瘤发生的重要机制. 对各种刺激诱导下细胞凋亡机制的分析有助于深入了解肿瘤细胞生物学及发现新的治疗对策. 凋亡调控基因 BCL2 家族成员可分为凋亡阻遏基因和凋亡促进基因. 这些基因编码的蛋白质分子通过组成和/或影响同二聚体与异二聚体的不同比例而介导其对细胞存活的生物学效应.

关键词 凋亡, BCL2 家族, 机制, BCL2/BAX

学科分类号 Q7

抗凋亡基因 BCL2 家族的发现开辟了新一类癌基因——凋亡调控基因的新纪元^[1]. 不同于一般的癌基因与抑癌基因, 凋亡基因的生物学效应是调控细胞存活期, 而不影响细胞增殖. 已知 BCL2 家族至少包括 10 个成员, 成员之间通过组成同二聚体、异二聚体而促进或抑制凋亡, 从而与肿瘤消长关系密切^[2].

1 BCL2

BCL2 家族的主要代表, 通过多种途径介导凋亡.

1.1 BCL2 的作用需要一完整的膜结构

BCL2 的羧基端为疏水性, 含有一个由 19 个氨基酸伸展成的跨膜结构. 亚细胞组分分析、免疫荧光及共聚焦显微研究显示 BCL2 是一个 26 ku 的胞内膜蛋白, 其分布依细胞类型而定, 在造血细胞表达水平最高, 常位于线粒体、光面内质网及核膜. BCL2 的羧基末端作为信号锚 (signal anchor) 序列插入线粒体外膜, 其胞浆多肽部分对蛋白酶敏感. 缺乏信号锚序列的 BCL2 抗凋亡功能不完全, 但仍可与 BAX 结合成异二聚体. BCL2 功能的发挥依赖于其在亚细胞膜的定位. BCL2 氨基末端的大部分暴露于胞浆, 借此可与胞浆蛋白或其他同时锚定在线粒体的 BCL2 样分子相互作用. BCL2 可阻

遏因缺乏线粒体 DNA 而不能携带电子传递的细胞凋亡, 从而提示 BCL2 的功能并不需要一个完整的电子传递/氧化磷酸化链^[3].

1.2 BCL2 能抑制氧化剂诱导的凋亡

内质网、线粒体外膜及核膜是活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生部位. 而 BCL2 也正存在于这些部位, 这促使人们探讨 BCL2 与 ROS 在细胞凋亡中的作用关系, 进而观察到 BCL2 能抗 H₂O₂、t-丁基或甲萘醌 (menadione) 对细胞凋亡的诱导. 在低浓度时, 这些氧化物主要是通过凋亡途径杀死细胞. 此外, BCL2 可拮抗某些降低胞内还原型谷胱甘肽含量的制剂诱发的凋亡^[4]. 上述结果提示 ROS 可能涉及能被 BCL2 阻遏的细胞凋亡途径. 近来研究反映抗氧化剂损伤为 BCL2 抗凋亡的原理之一, 但在此途径中 BCL2 是直接或间接作用仍未知.

1.3 BCL2 影响细胞内钙内流

观察 BCL2 功能的另一方面是其存在于内质网, 而后者与胞内钙自稳的调节有关. Ca²⁺ 影响凋亡, 因为某些核小体 DNA 的降解为钙依赖性,

¹⁾ 现工作单位: 广西壮族自治区第二人民医院肿瘤血液学研究所, 桂林 541002.

收稿日期: 1998-01-02, 修回日期: 1998-06-08

且 Ca^{2+} 通道激活剂可诱导淋巴细胞凋亡。尽管胞内 Ca^{2+} 总量的改变并不与凋亡的诱导一致, 但可出现胞内 Ca^{2+} 的重新分布。观察钙泵抑制对凋亡的影响, 人们发现凋亡与 Ca^{2+} 流从内质网进入胞质有关, 且 BCL2 能阻断这种钙流^[5]。胞内 Ca^{2+} 贮存的流动性可能仅为复杂凋亡程序的环节之一, 尚未明确 BCL2 是直接还是间接影响钙自稳。

大量资料显示 BCL2 可延长细胞存活期, 抑制各种因素, 包括物理、化学、生物因素等对细胞凋亡的诱导。BCL2 的超常表达与肿瘤的发生发展有关。但是, BCL2 并不能阻抑所有细胞的凋亡。鉴于 BCL2 能够阻抑由如此多不同信号及细胞内途径造成的凋亡, 据此推测 BCL2 在凋亡途径中的作用必定在许多信号汇集后某个环节。因此, 理论上细胞凋亡的下游途径可能不止一个。尽管 BCL2 阻遏凋亡的确切机制未明, 业已了解其阻抑增殖期细胞的凋亡, 延长非增殖期细胞的存活时间^[6]。

2 BAX

BAX 是重要的异二聚体伴分子, 促进细胞凋亡。BAX 因与 BCL2 蛋白共同免疫沉淀而被鉴定, 是 21 ku 蛋白, 含一类似于存在 BCL2 的疏水性羧基末端, 与 BCL2 共存于线粒体。BAX 在组织中广泛表达, 包括在细胞正常成熟过程中发生死亡的许多部位。BAX 与 BCL2 的同源区主要丛集在两个保守区 BH1 和 BH2, 但 BAX 中 BH2 的一个外显子接合点 (exon juncture) 是保守的。BAX 与 BCL2 构成异二聚体, 而 BAX 自身组成同二聚体。BCL2 蛋白中 BH1 和 BH2 的定点突变 (site-directed mutagenesis) 提示该结构域对结合 BAX 的重要性。当 BCL2 与 BAX 的结合点断裂 (disrupted), 则 BCL2 对细胞的保护性消失, 说明 BCL2 必须结合 BAX 才能发挥其作用。较能说明问题的实验是, 当 BH1 的单个氨基酸如甘氨酸 (Gly145) 被丙氨酸 (Ala) 或谷氨酸 (Glu) 取代及 BH2 的色氨酸 (Trp188) 被 Ala 替换时, BCL2 与 BAX 的结合点完全消失, 这时 BCL2 的死亡阻遏效应不复存在^[7]。BCL2 与 BAX 蛋白量的比率决定异二聚体 (BCL2/BAX) 与同二聚体 (BAX/BAX) 的比值, 这对决定细胞凋亡的易感性起关键作用。一般而言, BCL2 的过度表达与 BAX 形成异二聚体而阻抑凋亡。然而, BCL2 与 BAX 的比值依细胞系的发育阶段而异。BCL2/BAX 比值的高低是判断恶性肿瘤耐药、复发的有用指标^[8]。

3 BCL-X

BCL-X 类似于 BCL2, 但有不同的细胞系特异性。BCL-X 是以 BCL2 为探针, 采用低严紧型杂交所克隆的, 与 BCL2 有 44% 的氨基酸同源。BCL-X 基因有两种不同的剪接方式, BCL-X_L 编码 233 个氨基酸, 并含高度保守的 BH1 和 BH2 结构域; 而 BCL-X_s 缺乏含 BH1 和 BH2 结构域的 63 个氨基酸的伸展部分。BCL-X_L 含一个疏水性羧基末端的跨膜结构, 且其作用及亚细胞分布类似于 BCL2^[9]。在哺乳动物细胞, BCL-X_L 能与 BAX 组成异二聚体, 当前者的单一氨基酸被取代, 则其结合 BAX 的性能消失, 进而消除其对凋亡的阻抑效应^[10]。表达 BCL-X_L 的转基因小鼠 (缺乏 BCL2) 的 T 细胞存活期延长, 提示 BCL-X_L 可取代 BCL2 的遗传特性。BCL-X_s 可分别与 BCL2、BCL-X_L 组成异二聚体^[10]。

尽管 BCL-X_L 与 BCL2 存在相似性, 但两者的性能不完全相同。有些细胞的凋亡可被 BCL-X_L 抑制, 但不受 BCL2 阻遏。外周 T 淋巴细胞的激活导致 BCL-X_L 的快速产生, 但非 BCL2。在成人大脑细胞中, BCL-X_L 的表达显著高于 BCL2。其他试验也提示 BCL2 与 BCL-X_L 的表达方式有别^[11]。因此, 在不同类型细胞中, BCL-X_L 和 BCL2 的特异性作用也许不同。在儿童急性淋巴细胞白血病中, 观察到 BCL-X_L 与 BCL2 的表达与调节作用均有所差别^[12]。

4 MCL-1 和 A1

MCL-1 和 A1 与 BCL2 同源, 均为抗凋亡基因。MCL-1 基因是髓性白血病细胞经佛波醇酯诱导后所克隆, 其与 BCL2 的同源区主要位于羧基末端, 含 BH1 及 BH2 结构域。但 MCL-1 的氨基末端异于 BCL2, 因前者含 2 个 PEST 序列^[13]。A1 基因是造血细胞在粒-巨噬细胞集落刺激因子和脂多糖诱导下产生的早期反应基因^[14]。在酵母双杂交系统中, MCL-1 和 A1 分别与 BAX 强烈结合^[10], 提示存在 MCL-1/BAX 和 A1/BAX 异二聚体的可能性。早期资料未发现动物细胞中 MCL-1 与 BAX 的免疫共沉淀, 但新近报道在造血细胞中 MCL-1 与 BAX 相互作用而抑制细胞凋亡^[15]。

5 BAK

BAK 基因是新发现的细胞凋亡促进因子。

BAK (BCL2 homologous antagonist/killer) 是通过与 E1B-19K 蛋白相互作用或经聚合酶链反应产物克隆 (PCR 克隆) 所发现^[16]. 作为 BCL2 家族成员之一, BAK 含 BH1 和 BH2 结构域, 其功能类似于 BAX; 拮抗 BCL2、BCL-X_L 及 E1B-19K 的抗凋亡效应^[17]. 但有一个实验例外, 在经 EB 病毒转染的原始淋巴样细胞系 WL-L2 中, 当撤除血清并用甲萘醌处理后, BAK 延长该细胞系的存活期^[17]. 这显示 BAK 蛋白的作用与其他凋亡蛋白的前后依赖性. 与同 BCL2 组成二聚体相比, BAK 与 BCL-X_L 构成异二聚体的能力更强^[16].

6 BCL2 同源区存在于 DNA 病毒蛋白

在与 DNA 病毒蛋白的同源性方面, BCL2 家族基因的保守作用是显著的. 除腺病毒 E1B-19K 基因外, EB 病毒的 BHRF1 基因在一些潜伏性感染和细胞裂解的早期表达, 其 BH1 和 BH2 结构域与 BCL2 有同源性. 非洲猪热病毒编码的一个同源基因 LMW5-HL 在单核吞噬细胞受感染的早期表达^[18]. 这些病毒同源物的作用也许是维持宿主细胞处于感染状态的功能.

7 BAD

BAD 是 BCL2/BAX、BCL-X_L/BAX 异二聚体的负调节基因. BAD 是 BCL2/BCL-X_L 相关死亡促进因子, 作为 BCL2、BCL-X_L 异二聚体伴分子而促进细胞凋亡^[19]. 但在凋亡途径中, 其作用异于其他具有 BH1 和 BH2 结构域的 BCL2 家族成员. BAD 缺乏典型的羧基端跨膜结构, 提示其并非一完整膜蛋白. 与同 BCL2 作用相比, BAD 与 BCL-X_L 的结合更强. BAD 以浓度依赖性方式替换 BCL-X_L/BAX、BCL2/BAX 异二聚体中的 BAX, 使 BAX 游离而促进细胞凋亡. 当一细胞系的所有细胞内异二聚体 (BCL-X_L/BAX 和 BCL2/BAX) 的含量 $\geq 50\%$ 时, 则细胞耐凋亡; 而当细胞内 BAX 同二聚体 $> 80\%$ 时且在适当信号诱导下则细胞出现凋亡^[19]. 这表明 BAD 通过调节 BAX 同二聚体与异二聚体量的比值而介导凋亡. 客观上, 尚未明确调控细胞死亡的胞内环境激活因素是 BAX 同聚体还是异二聚体 (BCL-X_L/BAX 和 BCL2/BAX). 也许上述两种二聚体均被激活, 其比值才是启动凋亡的关键环节. 这些提示细胞凋亡的影响因子 BCL2 和 BCL-X_L 本身受蛋白质-蛋白质相互作用所调节.

8 BAG-1

另一个正调节 (positively modulate) BCL2 抗凋亡的蛋白是 BAG-1^[20]. 体外实验显示 BAG-1 与 BCL2 存在相互作用. 但是, BAG-1 并非 BCL2 家族成员的同源物, 其所含的一个泛醌样结构提示其作用机制也许是与影响蛋白质的稳定性有关. 有趣的是, BAG-1 和 BCL2 的共表达保护 Jurkat T 细胞免受抗 Fas 抗体和细胞毒 T 细胞的杀伤, 说明如果有适当的调节蛋白存在时, BCL2 可阻遏非 BCL2 依赖性的凋亡信号.

9 CED-9

CED-9 是与 BCL2 同源的抗凋亡基因. CED-9 是对秀丽线虫 (*C. elegance*) 的体细胞作遗传学研究鉴定的凋亡调节基因. CED-9 与 BCL2 在结构和功能上有显著的同源性, 两者的氨基酸序列有 24% 相同和 49% 相似, 均含疏水性结构、羧基末端信号锚 (signal anchor) 序列及高度保守的 BH1 和 BH2 结构域, 但 CED-9 的 BH2 中存在保守的外显子接合点 (conserved exon junction). 功能上, BCL2 转基因能阻抑秀丽线虫的一些细胞死亡, 并通过部分替换 CED-9 而抗 CED 突变体的生态性死亡^[21, 22]. 有趣的是, Gly145 Glu 突变体, 于 BCL2 是功能丧失; 而性突变于 CED-9 则是功能获得 (gain of function) 性突变. 此结果肯定了 BH1 结构域的重要性, 同时提示进化上存在差异. CED-9 和 BCL2 两者序列和功能的保守性说明细胞死亡的遗传途径普遍存在于多细胞有机体.

10 结 语

如上所述, BCL2 家族包括凋亡阻遏基因和凋亡促进基因. 分子间通过组成不同质、量的二聚体而调控细胞凋亡. 各种伴分子间结合具有选择性, 其结合力量存在严格的等级差异. 而且, BCL2 家族成员又与其他凋亡调控分子相互关联, 构成一异常复杂的调控网络, 有机地影响凋亡信号传导.

参 考 文 献

- 1 Korsmeyer S J. BCL2 initiate a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*, 1992, **80** (4): 879~ 886
- 2 Hannun Y A. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*, 1997, **89** (6): 1845~ 1853
- 3 Jacobson M D, Burne J F, King M P, *et al.* BCL-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature*, 1993, **361** (6410): 365~ 369

- 4 Kane D J, Sarafian T A, Anton R, *et al.* BCL-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*, 1993, **262** (5137): 1274~ 1277
- 5 Baffy G, Miyashita T, Williamson J R, *et al.* Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem*, 1993, **268** (9): 6511~ 6519
- 6 Hale A J, Smith C A, Sutheland L C, *et al.* Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem*, 1996, **236** (1): 1~ 26
- 7 Yin X-M, Oltvai Z N, Korsmeyer S J. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 1994, **369** (6478): 321~ 323
- 8 Pepper C, Bentley P, Hoy T. Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Brit J Haematol*, 1996, **95** (3): 513~ 517
- 9 Gonzalez-Garcia M, Perez-Ballesteros R, Ding L, *et al.* bcl-X_L is the major bcl-X mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development*, 1994, **120** (10): 3033~ 3042
- 10 Sedlak T W, Oltvai Z N, Yang E, *et al.* Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (17): 7834~ 7838
- 11 Boise L H, Minn A J, Noel P J, *et al.* CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of BCL-X_L. *Immunity*, 1995, **3** (1): 87~ 98
- 12 Findly H W, Gu L, Yeager A M, *et al.* Expression and regulation of bcl-2, bcl-X_L, and bax correlate with P53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1997, **89** (8): 2986~ 2993
- 13 Kozopas K M, Yang T, Buchan H L, *et al.* MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (8): 3516~ 3520
- 14 Lin E Y, Orloffsky A, Berger M S, *et al.* Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol*, 1993, **151** (4): 1979~ 1988
- 15 Zhou P, Qian L, Kozopas K M, *et al.* Mcl-1, a bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood*, 1997, **89** (2): 630~ 643
- 16 Farrow S N, White J H M, Martinou I, *et al.* Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature*, 1995, **374** (6524): 731~ 733
- 17 Kiefer M C, Brauer M J, Powers V C, *et al.* Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature*, 1995, **374** (6524): 736~ 739
- 18 Neilan J G, Lu Z, Afonso C L, *et al.* An African swine fever virus gene with similarity to the proto-oncogene bcl-2 and the Epstein-Barr virus gene BHRF 1. *J Virol*, 1993, **67** (7): 4391~ 4394
- 19 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): 285~ 291
- 20 Takayama S, Sato T, Krajewski S, *et al.* Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2 binding protein with anti-cell death activity. *Cell*, 1995, **80** (2): 279~ 284
- 21 Hengartner M O, Horvitz H R. C. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell*, 1994, **76** (4): 665~ 676
- 22 Vaux D L, Weissman I L, Kim S K. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science*, 1992, **258** (5090): 1955~ 1957

Recent Advances in Apoptotic Modulating Gene BCL2 Family. LIU Tao-Wen (*Institute of Bioengineering, Guilin Medical College, Guilin 541004, China*).

Abstract The regulation of apoptosis is an essential mechanism for physiological cell death and tumorigenesis. The analysis of the genetic mechanisms responsible for susceptibility to or protection from apoptosis stimuli not only enables us to gain insight into tumor cell biology, but may also prove useful in the development of new therapeutic strategies. Among the proteins coded by the genes of BCL2 family, BCL2, BCL-X_L, MCL-1, CED-9, BAG-1, E1B-194 and A1 act as death repressors, whereas BAX, BAK, BCL-X_s and BAD promote cell death. These different functions were shown to be mediated by homodimerization/heterodimerization of the various family members. Therefore a critical balance between molecules above may determine the fate of cells in response to apoptosis-inducing conditions.

Key words apoptosis, BCL2 family, mechanism, BCL2/BAX

蛋白质 C 端(异)硫氰酸法序列测定反应机理及进展*

莫碧兰 李 江 梁宋平

(湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081)

摘要 蛋白质 C 端测序是蛋白质化学与分子生物学中一门有重要意义的技术, 由 Schlack 和 Kumpf 于 1926 年提出的(异)硫氰酸法在该领域发展迅速并占主导地位。对(异)硫氰酸法的反应机理, 最新进展以及标准乙内

* 国家自然科学基金资助项目 (39570156)。 收稿日期: 1998-01-15, 修回日期: 1998-04-20