

# Bcl2 蛋白质家族

## ——定位与转位

周祖平<sup>1)</sup> 刘树森\*

(中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100080)

**摘要** Bcl2 蛋白质家族的抗凋亡和促凋亡成员, 在线粒体水平上决定细胞的存活或死亡. 在正常细胞中, 这些成员呈现功能适应性的细胞内分布; 抗凋亡成员主要定位于细胞内膜系特别是线粒体外膜上; 但绝大多数促凋亡成员主要分布于细胞浆中. 细胞接受死亡信号后, Bcl2 家族成员本身受到一系列的调节, 如磷酸化、裂解、蛋白质-蛋白质相互作用等, 结果之一是促凋亡成员发生细胞内定位的改变, 从细胞浆转位于线粒体膜上, 并引发线粒体功能异常及其内外膜间致凋亡因子的释放, 最终导致细胞凋亡.

**关键词** Bcl2 蛋白质家族, 定位, 转位, 线粒体

**学科分类号** Q28

细胞凋亡是受到严格调节的细胞死亡方式, 与机体发育、组织自稳定、肿瘤、自免疫疾病和神经退行性疾病的发生密切相关. 近年来细胞凋亡研究的主要进展之一是确定了线粒体在细胞凋亡中的中心地位. 线粒体功能异常特别是其内外膜间致凋亡因子如细胞色素 c (Cyt c)、AIF (apoptosis inducing factor) 以及新近发现的 Smac/DIABLO 等的释放将直接导致细胞凋亡. Bcl2 蛋白质家族是控制线粒体致凋亡因子释放的主要调节因子. 越来越多的证据表明, Bcl2 成员的定位与转位是其参与细胞凋亡调节的一种重要机制.

### 1 Bcl2 蛋白质家族概述

迄今, 已在哺乳类、线虫和病毒中发现了近 20 个 Bcl2 蛋白质家族成员, 按功能可将其划分为抗凋亡 (anti-apoptotic) 和促凋亡成员 (pro-apoptotic) 两大类, 分别起抑制和促进细胞凋亡的作用<sup>[1]</sup>. 前者主要有 Bcl-2、Bcl-x1、Bcl-w、Mcl-1、A1/Bfl-1 及 Boo 等; 后者包括 Bax、Bak、Bok/Mtd、Bcl-xs、以及 Bad、Bid、Bik/Nbk、BNIP3、Hrk/DP95、Bim 和 Blk 等.

Bcl2 蛋白质家族成员间的序列同源性主要体现在 4 个保守的区域, 即 Bcl2 同源结构域 (BH1 ~ BH4). 绝大多数抗凋亡成员含有 4 个 BH 结构域; 促凋亡成员除 Bcl-xs 外则缺乏 BH4 结构域. 其中 Bad、Bid、Bik/Nbk、BNIP3、Hrk/DP95、Bim 和 Blk 等仅含有 BH3 一个结构域, 称“BH3

only”成员. 此外, 多数 Bcl2 成员的 C 端还带有疏水跨膜片段.

Bcl-x1 和 Bid 的三维结构已得到确定. 两者的一级结构存在较大的差异, 但高级结构却基本相仿, 且与白喉毒素和大肠杆菌素 E 及 A1 的膜孔形成结构域 (pore-forming domain) 类似. 与此结构相一致, Bcl2 蛋白质家族中的 Bcl-2、Bcl-x1 和 Bax 等可在人工脂膜中形成离子通道. Bcl-x1 分子中央有 2 个疏水螺旋 ( $\alpha 5$  和  $\alpha 6$ ) 并被 5 个双亲 (amphipathic) 螺旋和一段由 60 个残基组成的柔性环区 (flexible loop) 包围. BH1、BH2 和 BH3 结构域则位于分子的表面并相互靠近形成一条疏水长沟 (cleft). 后者可能是不同成员间的结合位点, 介导同型或异型聚合物的形成.

### 2 Bcl2 蛋白质家族的定位

#### 2.1 抗凋亡成员

Bcl2 和 Bcl-x1 主要定位于线粒体外膜、内质网膜和核膜等<sup>[2,3]</sup>. 但在细胞接受凋亡刺激后, 抗凋亡成员可受到磷酸化和蛋白质水解等修饰的调节. Bcl2 和 Bcl-x1 均可被蛋白激酶 MAPK 家族成员 JNK (c-Jun N-terminal kinase) 磷酸化或经死亡酶 (caspase, CASP) 的催化裂解. 一种看法是这

<sup>1)</sup> 广西师范大学化学与生命科学学院.

\* 通讯联系人.

Tel: 010-62543640, E-mail: liuss@panda.ioz.ac.cn

收稿日期: 2000-12-11, 接受日期: 2001-01-20

类修饰可能是 Bcl-2 和 Bcl-x1 发挥抗凋亡功能所必需, 但另有报道, Bcl-2 经蛋白酶催化裂解后则转变为促凋亡蛋白质分子, 因而可刺激 Cyt c 释放<sup>[4]</sup>.

Bcl-2 和 Bcl-x1 定位于内质网膜和核膜, 可能与某些非线粒体依赖的细胞凋亡或是仅与其他细胞功能有关. 此外, 还发现少部分 Bcl-2 和 Bcl-x1 分布于细胞浆中<sup>[1]</sup>, 其功能及其在细胞凋亡中的去向, 还不清楚.

## 2.2 促凋亡成员

促凋亡成员与抗凋亡成员相反, 对线粒体起损伤功能. 绝大部分促凋亡成员分布于细胞浆中. Bax 是最早发现的促凋亡成员, 有关其细胞内定位的研究也最多. Bax 分子结构中含有类似于抗凋亡成员的疏水 C 端, 然而亚细胞分级和免疫组织化学实验均表明 Bax 在正常细胞中主要定位于细胞浆. 虽然在线粒体上也发现有部分 Bax 存在, 但 Bax 分子并非插入线粒体外膜内而是松散地附着于线粒体表面<sup>[5]</sup>. 对于促凋亡成员中的“BH3 only”蛋白质亚族, 如 Bad、Bid 和 Bim 等均主要存在于细胞浆中.

Bak 是迄今发现的仅有的一个定位于线粒体的促凋亡蛋白质成员<sup>[3]</sup>. 但是, Bak 在正常细胞中并不表现促凋亡活性, 推测可能是在线粒体外膜中的 Bak 与 Bcl-x1 结合而被抑制的结果. 细胞受到凋亡刺激后, Bak 分子 N 端暴露并发生构象变化, Bak 得以与 Bcl-x1 分离<sup>[3]</sup>. 释放出来的 Bak 仍继续留在线粒体外膜内, 并与裂解激活的 Bid 结合, 结果导致 Bak 激活<sup>[3]</sup>或 Bak 寡聚化并形成 Cyt c 的输出通道<sup>[6]</sup>, 从而引起细胞凋亡.

## 3 Bcl-2 蛋白质家族的转位

Bcl-2 家族多数促凋亡成员主要分布于细胞浆中. 在死亡信号诱导下它们从细胞浆转位至线粒体并直接引发线粒体致凋亡因子的释放. 因此, 促凋亡成员的转位是其发挥凋亡调节功能的前提条件, 也是细胞凋亡的关键环节. 部分抗凋亡成员存在于细胞浆中, 迄今尚未见其转位的报道.

### 3.1 Bax

大量研究表明, Bax 须从细胞浆转位至线粒体, 方能发挥在死亡信号诱导的细胞凋亡的功能.

Bax 分子的疏水 C 端在转位中可能发挥膜靶向和膜固定双重功能. 缺失 C 端 21 个氨基酸片段的 Bax, 在正常和凋亡细胞, 均是散布于细胞浆中.

Bax C 端单个氨基酸变异 (Ser 184 → Val 或缺失 Ser 184) 则导致 Bax 分子定向转位于线粒体外膜. 将此突变 C 端与 GFP (green fluorescent protein) 连接后, 在无凋亡刺激下, 也可以使细胞浆 GFP 蛋白定位于线粒体<sup>[7]</sup>. 说明 Bax C 端在转位中起决定性作用: Bax 在正常细胞中不与膜结合, 可能是 N 端与 C 端间的相互作用, 影响其 C 端的结构有关<sup>[7,8]</sup>. 细胞凋亡信号启动后, Bax 构象发生改变, 破坏了 N 端与 C 端间的相互作用, 使 N 端与 C 端暴露, Bax 分子得以插入线粒体膜.

除 C 端外, Bax 结构中的  $\alpha 5 \sim \alpha 6$  的螺旋结构可能也与其转位, 特别是膜插入过程有关. 缺失  $\alpha 5 \sim \alpha 6$  结构的 Bax 丧失其促凋亡活性.  $\alpha 5 \sim \alpha 6$  螺旋结构部分也是 Bcl-2 成员形成离子通道的区域. 因此  $\alpha 5 \sim \alpha 6$  的螺旋结构可能需要经过适当的结构变化, 或暴露才能插入线粒体外膜并形成离子通道<sup>[9]</sup>.

Bax 在细胞浆中为无活性的单体结构, 结合于线粒体膜时则为二聚体或多聚体的活性分子<sup>[10]</sup>. Bax 的寡聚化可能同样是由于其构象改变所致, Bax N 端和 BH3 结构域暴露后可促进其寡聚体的形成<sup>[11]</sup>.

在凋亡细胞中 Bax 的构象发生特异性的改变. 有证据表明 Bcl-2 家族中的几个成员参与 Bax 构象的调节. Bid 起诱导作用, Bcl-2 和 Bcl-x1 则抑制 Bax 的构象改变, 此外 Bax 的转位可能受一种未知细胞质因子的调控<sup>[8,12]</sup>. Lock 实验室证明 Bax 构象改变发生在细胞质中, 并出现于 Bax 转位前, 即 Bax 构象改变是其转位的原因<sup>[2,13]</sup>; Martiou 等认为 Bax 构象改变发生在线粒体外膜表面, 此种构象变化与其插膜有关<sup>[5,11]</sup>. 看来 Bax 转位可能分为两个阶段: a. 从细胞液转位至线粒体外膜; b. 从外膜表面转位到外膜内. 两个阶段中 Bax 都可能发生构象变化并受不同的机制调节.

### 3.2 Bid

Bid 属于“BH3 only”亚族成员, 以弱活性或无活性的前体存在于正常细胞的胞质中. Bid 能够诱导 Cyt c 的释放和细胞凋亡, 但作用机制不清楚. 1998 年, 两位作者同在《Cell》上发表文章证明, 在细胞表面死亡受体 (CD95/Fas/Apo1, TNRF) 介导的凋亡途径中, Bid 可被 Caspase 8 裂解成 15 ku (C 端, tBID, 含 BH3 功能域) 和 11 ku (N 端) 两个片段. 其中 tBID 可从细胞浆转位至线粒体进而诱导细胞凋亡<sup>[14]</sup>. 表明 Bid N 端抑

制其活性及转位。这是首次证明细胞表面死亡受体介导的死亡信号从质膜向线粒体传递，并相继得到其他研究的证实。

然而，细胞表面死亡受体介导的信号途径仅是细胞凋亡途径之一。在紫外线，电离辐射和氧化物等凋亡刺激诱导的非细胞表面死亡受体介导的凋亡途径中，首先激活的是 CASP 9 而非 CASP 8。后来一些研究发现 CASP 9 的下游激活产物，CASP 3 不仅可以反馈激活 CASP 8<sup>[15]</sup>，而且还可以在同一位点 (Asp59) 直接裂解 Bid 并导致其转位<sup>[16]</sup>。由于 CASP 9 的活化依赖于 Cyt c 释放，因此在非细胞表面死亡受体凋亡途径中，Bid 的激活并不参与 Cyt c 早期释放的调节，而是通过形成一条正反馈的信号放大环路即 Cyt c (Apaf1, ATP) → CASP 9 → CASP 3 → (CASP 8) Bid → Cyt c，从而起到加速 Cyt c 释放的作用<sup>[17]</sup>。

由上述可知，多种凋亡刺激诱导的凋亡信号途径均有赖于 Bid 的酶解激活与转位。在某些类型的细胞中，Bid 的酶解可能并非其功能表现所必需。然而，有报道显示，全长序列 Bid 在细胞凋亡中也可发生转位并能与 Bax 结合，诱导后者的构象改变或寡聚化<sup>[5,11]</sup>，全长序列 Bid 与 tBID 相比，其转位效率与生物活性则要低得多<sup>[14]</sup>。由于 Bid 分子缺乏疏水 C 端，tBID 或 Bid 转位至线粒体后是否插入线粒体外膜或以何种机制插入线粒体外膜还不清楚。目前，较为流行的观点是，“BH3 only”成员可能并不直接参与 Cyt c 等线粒体致凋亡因子释放，而是既与抗凋亡成员（如 Bcl-2, Bcl-x1 等）结合以中和其抗凋亡活性<sup>[14]</sup>，又可与促凋亡成员（如 Bax, Bak 等）结合促进凋亡进程<sup>[5,6]</sup>。

### 3.3 Bad 和 Bim

Bad 与 Bim 也同属于“BH3 only”亚族。在正常细胞中两者均与细胞质蛋白结合并以聚合物形式存在于细胞液中。Bad 与 14-3-3 蛋白（与丝氨酸或酪氨酸磷酸化蛋白配体结合的伴侣分子家族成员）结合；Bim 与 dynein 分子马达复合物（dynein motor complex，一种与微管结合的 ATPase 复合物）结合。细胞受到凋亡信号刺激后，两者则从所结合分子脱离并转位于线粒体。Bad 与 Bim 转位至线粒体后主要与 Bcl-2、Bcl-x1 等结合并中和后者的抗凋亡活性。

Bad 的亚细胞定位与转位取决于其磷酸化状态。磷酸化 Bad（失活态）与 14-3-3 蛋白结合；去磷酸化 Bad（活化态）则与 14-3-3 蛋白分离并发生

转位。Bad 分子中含有多个丝氨酸残基（ser112, ser136, ser155）。已发现蛋白激酶（ERK, PKA 和 PKB/Akt 等）可作用于这些位点导致 Bad 磷酸化。近来 Datta 等<sup>[18]</sup>提出了一个 Bad 失活的可能模型：Bad 在细胞内合成后（非磷酸化分子，活化态？）应首先定位于线粒体并与抗凋亡蛋白，Bcl-x1 结合，然后再磷酸化和转位于细胞质中。细胞在凋亡刺激作用下，Bad 则去磷酸化并经历相反的转位过程。催化 Bad 去磷酸化的磷酸酶为 calcineurin。Calcineurin 是一个 Ca<sup>2+</sup> 激活蛋白，因而提高细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度即可引发 Bad 去磷酸化并转位于线粒体<sup>[19]</sup>。

Bim 通过 LC8（dynein 复合物的一个组分）与 dynein 复合物结合。与 Bad 不同，细胞接受凋亡刺激后，Bim 和 LC8 共同从微管结构离开并以二聚体形式转位于线粒体，据认为可能是由于 LC8 与 dynein 复合物间的相互作用被破坏的结果<sup>[20]</sup>。

## 4 结 语

信号蛋白的特异性定位与转位是细胞信号转导中的一种普遍现象，Bcl-2 蛋白质家族作为细胞凋亡重要信号分子，同样存在类似的作用机制。目前仍存在许多至关重要的问题：a. Bcl-2 成员转位上游调控分子的鉴定；b. Bcl-2 成员定向转位于线粒体的机制；c. Bcl-2 成员转位信号途径与其他信号途径的关系。

## 参 考 文 献

- 1 Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch. FEBS Letters, 2000, **466** (1): 6~10
- 2 Murphy K M, Streips U N, Lock R B. Bcl-2 inhibits a Fas-induced conformational change in the Bax N terminus and Bax mitochondrial translocation. J Biol Chem, 2000, **275** (23): 17225~17228
- 3 Griffiths G J, Dubrez L, Morgan C P, et al. Cell Damage induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak *in vivo* precede the onset of apoptosis. J Cell Biol, 1999, **144** (5): 903~914
- 4 Kirsch D G, Doseff A, Chau B N, et al. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. J Biol Chem, 1999, **274** (30): 21155~21161
- 5 Desagher S, Astrid O S, Nicols A, et al. Bid-induced conformational changes of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. J Cell Biol, 1999, **144** (5): 891~901
- 6 Wei M C, Lindsten T, Mootha V K, et al. tBID, a membrane-targeting death ligand, oligomerize BAK to release cytochrome c. Genes Dev, 2000, **14** (16): 2060~2071
- 7 Nochushtan A, Smith C L, Hsu Y T, et al. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. EMBO

- J, 1999, **18** (9): 2330~ 2341
- 8 Goping I S, Gross A. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol*, 1998, **143** (1): 207~ 215
- 9 Nouraini S, Six S, Matsuyama S, *et al.* The putative pore-forming domain of Bax regulates mitochondrial localization and interaction with Bcl-xl. *Mol Cell Biol*, 2000, **20** (5): 1604~ 1615
- 10 Gross A, Jockel J, Wie M C, *et al.* Enforced dimerization of BAX results in the translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J*, 1998, **17** (14): 3878~ 3885
- 11 Eskes R, Desagher S, Antonsson A S, *et al.* Bid induce the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*, 2000, **20** (3): 929~ 935
- 12 Nomura M, Shimizu S, Ito T, *et al.* Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that revolves cytosolic factor regulated by Bcl-2. *Cancer Res*, 1999, **59** (1): 5542~ 5548
- 13 Murphy K M, Ranganathan V, Farnsworth M L, *et al.* Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ*, 2000, **7** (1): 102~ 111
- 14 Li H, Zhu H, Xu C J, *et al.* Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 1998, **94** (4): 491~ 501
- 15 Tang D, Lahti J M, Kidd V J. Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular exection in a caspase-3-dependent manner during staurosporine mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 2000, **275** (13): 9303~ 9307
- 16 Slee E A. Cleavage of BID during UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death Differ*, 2000, **7** (6): 556~ 565
- 17 Zhuang S. p38MAPK mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 2000, **275** (34): 25939~ 25948
- 18 Datta S R, Katsov A, Hu L, *et al.* 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell*, 2000, **6** (1): 41~ 51
- 19 Wang H G. Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*, 1999, **284** (5412): 339~ 343
- 20 Puthalakath H, Huang D C, O'Reilly L A, *et al.* The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell*, 1999, **3** (3): 287~ 296

## Bcl-2 Protein Family: Localization and Translocation

ZHOU Zu-Ping, LIU Shu-Sen\*

(National Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology,  
The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract** Bcl-2 protein family members, including anti-apoptotic and pro-apoptotic members, act on mitochondria controlling the fate of cell between life and death. In healthy cells, Bcl-2 protein family displays specifically cellular location that fit to their functioning: anti-apoptotic members are localized predominantly to the cellular inner membranes, especially the outer mitochondrial membrane, and most of the pro-apoptotic members exist mainly in the cytosol. Following death stimuli, Bcl-2 protein family members can be regulated through mechanisms such as phosphorylation, proteolysis and protein-protein interaction etc, by which one of the main consequences is the shift of the cellular location of proapoptotic members. Translocation of proapoptotic members from cytosol to mitochondria will result in mitochondrial dysfunction and the release of apopogenic factors in the mitochondrial intermembrane space, culminating in apoptosis.

**Key words** Bcl-2 protein family, localization, translocation, mitochondria

\* Corresponding author. Tel: 86-10-62543640, E-mail: liuss@panda.ioz.ac.cn

Received: December 11, 2000 Accepted: January 20, 2001