

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.19.010

文章编号: 1005-8982(2019)19-0058-04

综述

Bad 蛋白磷酸化和剪切修饰对神经胶质瘤 细胞凋亡的调控作用*

林洪, 王文浩

(联勤保障部队第909医院暨厦门大学附属东南医院 神经外科 / 无锡联保中心
创伤神经外科中心, 福建 漳州 363000)

摘要: Bcl-2 相关死亡启动子同源基因编码蛋白 Bad 是线粒体凋亡通路的开关蛋白。药物处理和各种内源性信号通过改变其特殊位点的磷酸化状态和对其生化构型进行剪切修饰, 实现对神经胶质瘤细胞内促凋亡或促生存信号通路的下游调控。Bad 还可介导细胞周期蛋白的促凋亡作用, 使之与细胞周期阻滞保持一致。Bad 不仅是抗胶质瘤药物的作用焦点, 也是其基因治疗的理想候选物。

关键词: Bad; p53; Bcl-2; Caspase; 神经胶质瘤; 凋亡

中图分类号: R730.2

文献标识码: A

Phosphorylation and cleavage-modification of Bad on the regulation of cellular apoptosis in glioma cells*

Hong Lin, Wen-hao Wang

[Department of Neurosurgery, the 909th Hospital of Joint Logistics Support Force, Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, (Center of Traumatic Neurosurgery in Wuxi Joint Logistics Support Center), Zhangzhou, Fujian 363000, China]

Abstract: B-cell leukemia/lymphoma-2-associated death promoter homolog (Bad) is a switchable protein of the mitochondria apoptotic pathway. Drug treatment and multiple endogenous signals usually change its phosphorylation status in several specific sites and modify its biological configuration by cleaving into truncated forms so as to accomplish a down-stream regulation of pro-apoptotic or pro-survival signaling pathways in glioma cells. Bad can also mediate the pro-apoptotic effects of cyclins to ensure a consistency of the apoptotic procedures and the cell cycle arrest. Bad protein has been recognized as an important therapeutic target for various anti-glioma drugs and an ideal candidate for gene therapy.

Keywords: Bad protein, human; genes, p53; genes, Bcl-2; Caspases; glioma; apoptosis

神经胶质瘤是最常见的原发性中枢神经系统肿瘤, 其发生发展源自细胞增殖和 / 或凋亡的失衡, 增加凋亡比重是放化疗治疗神经胶质瘤的重要机制^[1-2]。B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 家族各亚型蛋白广泛参与胶质瘤细胞内生存 / 凋亡信号的转导调控。

Bcl-2 相关死亡启动子同源基因 Bad 编码蛋白是其中一类仅含保守性结构域的亚型, 磷酸化和剪切修饰是其各种生化活性的重要基础。总结各种药物处理和内源性信号是如何通过调控 Bad 蛋白来实现对神经胶质瘤细胞内促凋亡或促生存信号通路的下游调控, 有助

收稿日期: 2018-12-14

* 基金项目: 福建省自然科学基金 (No: 2015J05119)

[通信作者] 王文浩, E-mail: wenhao_wang0712@126.com; Tel: 13605007900

于加深对神经胶质瘤细胞内线粒体凋亡通路的信号转导的理解, 为寻找、设计、验证相关靶向药物治疗提供理论基础。

磷酸化的 Bad (p-Bad) 与 14-3-3 形成异二聚体, 作为其伴侣分子定位于细胞浆; 而非磷酸化 Bad 则通过结合含穿膜结构域的其他 Bcl-2 家族蛋白并形成异二聚体接近线粒体膜而发挥促凋亡作用。Bad 在人体内呈组织特异性分布, 在脑内尤其是内侧基底节区、下丘脑和海马区表达最高。生理组织中的 Bad 总蛋白只包含非磷酸化 Bad 这一种成分, 可发挥正常的促凋亡作用。但在肿瘤的发生、发展过程中 Bad 蛋白表达呈升高趋势, 由于各种生长因子信号途径激活, 起凋亡抑制作用的 p-Bad 成分也在增加^[3-5]。有研究报道在恶性胶质瘤 U251、U87、U138 细胞株和神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株中 p-Bad 的表达升高^[6]。

1 Bad 调控神经胶质瘤细胞凋亡的一般机制

Bad 能接受多种上游生存和 / 或凋亡信号并调控其转导, 其生化功能与其磷酸化状态息息相关^[7-9]。生存信号占主导时, Bad 呈磷酸化状态与胞浆中 14-3-3 稳定结合。生存信号撤除或是接受上游凋亡信号后, Bad 迅速去磷酸化并从 Bad-14-3-3 聚合物中解离。游离的非磷酸化 Bad 强烈干扰 Bcl-xL-Bax 聚合物的稳定性, 将 Bax 从中置换出来而形成 Bad-Bcl-xL 聚合物。解离后的 Bax 结合成同源二聚体作用于线粒体外膜形成跨膜小孔甚至大孔径的线粒体通透性改变孔道, 从而导致线粒体膜电位的变化和 Cyt_c、AIF 的外流, 诱导凋亡事件的发生。对小脑颗粒神经元凋亡的研究还发现, 单一的 Bad 去磷酸化并不足以触发凋亡机制, 还需要抑制蛋白合成这一平行机制共同发挥作用。

2 Bad 在神经胶质瘤中的磷酸化调节

2.1 Bad 磷酸化的一般机制

Bad 组成性序列中不同氨基酸位点的磷酸化状态的改变对 Bad 生化活性的影响也不尽相同^[10-12]。p-Bad 的去磷酸化是很多药物 (NH₄Cl、Raf 抑制剂 BAY 43-9006、FLT3 抑制剂 CEP-701、阿霉素) 抑制生存信号途径和启动细胞凋亡的重要步骤, 并且这一改变早于 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白的表达降低和促凋亡蛋白的表达升高, 而在这一过程中 Bad 总蛋白表达水平不变或增加。此外, p-Bad 还可通过提高线粒体释放 Cyt_c 的阈值抑制凋亡, 由此可见 p-Bad 并不仅以失活的形式被动地对凋亡产生影响, 也可通过主动的方式来发

挥抑制凋亡的作用即提高 Cyt_c 从线粒体释放的阈值。

2.2 神经胶质瘤细胞内各磷酸化位点的协同机制

Bad 磷酸化失控是神经胶质瘤细胞发生的部分原因。c-Src 的激活会上调 PKC ϵ 的表达, PKC ϵ 的表达加强 Bad S112、136、155 磷酸化, 从而增加神经胶质瘤细胞的增殖活性^[10]。胶质瘤细胞内非磷酸化状态的 Bad 可在各种促生存信号如 PIM-2 激酶、p90 (RSK) 作用下磷酸化, 从而抑制乃至逆转凋亡的发生发展。Bad 的磷酸化对于各条生存信号通路都是关键性的。没有哪条促生存信号通路的活化能够拯救 Bad 磷酸化位点变异的胶质瘤细胞。另一方面, RNA 干扰条件下, Bad 总体表达受到阻滞的胶质瘤细胞则对凋亡信号敏感性降低。Bad S112 和 S136 的磷酸化可以由 IL-3、GM-CSF、PDGF、NGF 或 IGF 刺激促成, 在非毒性条件下甚至 TNF 也能完成这种磷酸化。磷酸化 S112 需要肾上腺素能 α 受体和 β 受体的同时激活, 而磷酸化 S155 只需 β 受体的激活。S112 有效磷酸化还需要活性 PKA 的参与, S155 磷酸化可以增强 S112 磷酸化。可磷酸化位点的点变异则会取消 Bad 的磷酸化潜质, 从而增强 Bad 蛋白的凋亡诱导能力。IGF-1 受体能保护细胞免受各种凋亡刺激的诱导, 其抗凋亡作用基于募集 MAPK 亚家族 Akt/PKB 和 ERK 的作用。IGF-1 处理后的细胞 Bax/Bcl-2 比值降低, 增加 Bad S112 和 S136 的磷酸化。p21- 激活蛋白激酶可在 S338 和 S339 位点磷酸化激活 Raf-1, 后者在磷酸化 Bad S112 位点的同时将 Bad 从 Bad-Bcl-2 聚合物中替换出来, 促使细胞向存活方向发展。但也有研究认为, Bad 的磷酸化也不总是促使细胞向生存方向转化, JNK 可通过磷酸化 S128 来推动凋亡, Bad 蛋白 S128 的磷酸化通过抑制 S136 已磷酸化的 Bad 蛋白与 14-3-3 蛋白的联系, 促成 Bad 的寡聚化而特异性地激活 Bad 蛋白。尽管如此, 该研究也同时提出 JNK 可能并不是 Bad S128 的激酶, JNK 信号激活后的 S128 位点的磷酸化状态可能与 Bad 促凋亡活性无关, 这一观点尚需要更多的实验研究予以证实^[13]。

BH3 结构域内 S155 位点常被生存信号磷酸化, 它的磷酸化改变对 Bad/Bcl-xL 的阻断作用相对 S112 和 136 位点而言是直接的。磷酸化导致 Bad 以 G (i) alpha 依赖性的方式从 Bad/Bcl-xL 聚合物中解离^[14]。目前的研究对 S155 的磷酸化是否独立于 S136 位点的磷酸化意见不一。与 Bcl-xL 结合的 Bad 其 S136 被磷酸化以后构象发生改变, 使得 S155 磷酸化成为可能,

但是 S155 并没有已知的 14-3-3 结合序列, 实际上, S155 位点的变异并不影响 Bad 蛋白和 14-3-3 蛋白的结合, 影响 Bad 与 Bcl-xL 的结合。在酵母和哺乳动物细胞中 S136 的磷酸化对维持 Bad 蛋白和 14-3-3 的联系是至关重要的, 而 S112 位点的磷酸化则看似可有可无, 因为该位点的变异并不影响 Bad 蛋白和 14-3-3 的结合。14-3-3 与 S136 的亲合力比 S112 要高得多, S112 位点变异导致的细胞凋亡可以由增强表达的 14-3-3 完全补救。

2.3 细胞毒性药物对神经元及胶质瘤细胞内 Bad 磷酸化的影响

NDGA 和 BFA 孵育神经元 60 ~ 90 min 后即表现出 p-Bad 去磷酸化, 而 Bcl-2 蛋白的表达则需孵育 2 ~ 3 h 后才降低。大鼠暂时性全脑缺血和创伤性脊髓损伤后神经元的凋亡与 p-Bad 去磷酸化水平呈正相关, p-Bad 表达水平在脊髓损伤 30 min 后即降低并持续长达 1 h。大麻素 WIN 55212-2 与胶质瘤细胞共孵育可导致 p-Bad 水平的下调但 Bad 总蛋白量并无变化; 而醋酸亚砷与胶质瘤细胞共孵育则上调 Bad 总蛋白表达。PPARc 激动剂诱导胶质瘤细胞凋亡过程中发生 Bax 和 Bad 蛋白表达水平的一过性上调。

神经钙调蛋白磷酸酶 (protein-phosphatase 2B, PP2B) 也是 Bad 蛋白的重要调控因子, 在脑内大量分布, 能在 Ca^{2+} 低于 10 nmol/L 时保持适当的磷酸酶活性, 一旦发生细胞内钙超载, p-Bad 可被 PP2B 去磷酸化。氰化物通过类似的机制将 p-Bad 去磷酸化, 并使其自细胞浆持续转运至线粒体外膜。PP2B 的去磷酸化作用可能基于以下 3 点: ①直接去磷酸化; ②通过活化 PPI 将 Bad 去磷酸化; ③ PP2B 诱导脑内 cAMP 依赖性 PKA II 型调控单元的去磷酸化, 从而使之活性降低, 导致 Bad S155 位点的去磷酸化。事实上, S112 位点的磷酸化是 EGFR/MEK/ERK/MAPK 依赖性, 而 S136 位点的磷酸化是 PI3K/Akt 依赖的。2 位点中的任意一个去磷酸化都将促使 Bad 与 14-3-3 分离, 但只有 2 位点均发生去磷酸化而同时抑制 2 条生存信号通路才能导致 Bad 从与 14-3-3 的聚合物中释放出来并诱导凋亡的发生。

3 Bad 的剪切修饰调节

3.1 Bad 蛋白的常见剪切位点

药物处理或撤除生存信号发生凋亡的细胞其 Bad 和 Bax 之类的 Bcl-2 蛋白可通过 Caspase 依赖性剪切生成具有更强促凋亡能力的截短型蛋白^[15]。反义 Smad3

的表达可以阻滞 Caspase 依赖性的 Bad 剪切进程, 表明该进程为 Smad3 依赖性。Caspase 蛋白可在 Asp56 和 Asp61 位点裂解 Bad, Caspase-3 和 Caspase-7 在 Asp61 发挥裂解作用。人 Bad 敏感的 Caspase 切割位点在相当于鼠 Bad Asp56、Asp71 的 Asp4、Asp29。不同的死亡刺激信号促使不同的 Caspase 蛋白通过不同的作用位点剪切 Bad, 但尽管 Caspase 剪切可以加强人 Bad 的促凋亡活性, 人 Bad 的剪切并非其促凋亡作用所必需的。Caspase-3 通过 Asp-61 而不是 Asp56 切割 Bad 蛋白, 而 Caspase-7 则只能切割鼠 Bad 蛋白而不能切割人 Bad^[16]。任何机制导致单纯 Bad N- 端的缺失并不总是足以激活其促凋亡活性, 表明 N- 端的作用是保证促死亡功能不被激活, 而不是一个直接的抗死亡域。

3.2 Bad 剪切修饰与磷酸化调节的相互关系

撤除 IL-3 4 ~ 6 h 后的鼠骨髓前体 32Dcl3 细胞, 其促凋亡蛋白 Bad 自 N- 端被裂解成 26 和 15 kD 的 tBadL (truncated Bad large, tBadL) 和 tBadS (truncated Bad small, tBadS)。内源性和增强表达的 tBadL 可以抑制神经元和其他细胞的死亡, 但 Caspases 还可以通过裁减 tBadL 成类似于 tBadS 的促凋亡片断来进一步发挥促凋亡活性。tBadS 仅存在于线粒体, 这可能是由于细胞浆中 tBadS 具有高效的膜定位能力或者这种剪切发生在线粒体外膜, 这也与 Caspase 在线粒体的亚细胞定位、激活是一致的。tBadS 其 S112、S136、S155 很少被磷酸化, 这样就不能与 14-3-3 蛋白发生有效反应。这种低磷酸化可被强化的 PP2B 所修复。tBadS 核心的 BH3 作用域得以暴露, 这样与 Bcl-xL 亲合力更强, 从而具有更强的促凋亡能力, 并且由 Bad 与 Caspase 蛋白组成的正反馈循环又进一步放大这种凋亡诱导能力。此外, Caspase 也能剪切 Bcl-2 和 Bcl-xL。有意思的是, 虽然后两种蛋白一般被视作促生存信号蛋白, 但是在 Caspase 剪切后将导致 Cytc 的释放而成为促凋亡信号蛋白。与之不同的是, Bax 蛋白在被 Caspase 剪切成 18 kD 的片断之后, 发挥更强的促凋亡作用。

4 Bad 在沟通神经胶质瘤细胞周期信号和凋亡 / 生存信号中的作用

Bcl-2 蛋白家族如 Bad 除了在众所周知的凋亡调控能力外还能影响细胞周期进程。细胞周期进程异常可能触发线粒体途径的激活, 改变 Bcl-2 家族和促凋亡蛋白的平衡, 推动凋亡的形成和发展^[13]。表达于未

发育成熟的大鼠小脑颗粒神经元的细胞周期调控蛋白激酶 *cdc2* 能介导颗粒神经元的凋亡, 阻断其神经活性。*cdc2* 磷酸化 Bad 蛋白 S128 位点, 抑制 S136 磷酸化 Bad 与 14-3-3 的相互联系, 拮抗生存因子对 Bad 促凋亡活性的抑制, 从而介导颗粒神经元的凋亡。

p53 与 Bad 蛋白的相互关系复杂。一方面, p53 可以锚定于 Bad 基因起始密码子上游, 参与控制 *Bad* 基因的转录和活化; 另一方面, Bad 蛋白又可以通过与 p53 蛋白的结合, 抑制其进核后对 *Bad* 基因的转录调控。此外, 在线粒体上形成的 Bad/p53 复合物还可以通过诱导 Bad 蛋白的活化和寡聚化促进细胞凋亡^[17]。

5 Bad 的研究展望

Bad 蛋白在线粒体凋亡途径中发挥关键性的作用。内源性和外源性凋亡信号和药物处理信号都由 Bad 整理并转呈至线粒体外膜, 藉此触发 Caspase 依赖性凋亡进程。在神经胶质瘤的发生、发展过程中, 普遍存在着 Bad 和 p-Bad 的增量表达。很多放化疗处理都可以降低 p-Bad 表达或使之去磷酸化失活, 剪切 Bad 形成 tBad 以增强神经胶质瘤细胞的凋亡。外源性导入表达的 Bad 也能较好地融入凋亡调控机制, 促进神经胶质瘤细胞的凋亡发生。处于凋亡网络中枢的 Bad 是靶向治疗理想的候选物, 围绕 Bad 开展的神经胶质瘤药物研究和基因治疗有望取得创造性的进展。

参 考 文 献:

- [1] WANG L, LIU Y, ZHAO X, et al. Knockdown of STAT3 reduces the level of survivin and promotes the apoptosis of U87MG glioma cells[J]. Chinese Journal of Cellular & Molecular Immunology, 2016, 32(6): 789-792.
- [2] LI W, QIAN C, WANG L, et al. Association of BCL2-938C>A genetic polymorphism with glioma risk in Chinese Han population[J]. Tumor Biol, 2014, 35(3): 2259-2264.
- [3] GE X, PAN M H, WANG L, et al. Hypoxia-mediated mitochondria apoptosis inhibition induces temozolomide treatment resistance through miR-26a/Bad/Bax axis[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(11): 1128.
- [4] THANGARAJAN S, RAMACHANDRAN S, KRISHNAMURTHY P. Chrysin exerts neuroprotective effects against 3-Nitropropionic acid induced behavioral despair-Mitochondrial dysfunction and striatal apoptosis via upregulating Bcl-2 gene and downregulating Bax-Bad genes in male wistar rats[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84: 514-525.
- [5] CARTRON P F, LOUSSOUARN D, CAMPONE M, et al. Prognostic impact of the expression/phosphorylation of the BH3-only proteins of the BCL-2 family in glioblastoma multiforme[J]. Cell Death Dism, 2012, 15(3): e421.
- [6] PAREJA F, MACLEOD D, SHU C, et al. PI3K and Bcl-2 inhibition primes glioblastoma cells to apoptosis through downregulation of Mcl-1 and Phospho-BAD[J]. Mol Cancer Res, 2014, 12(7): 987-1001.
- [7] RUIZ R, JAHID S, HARRIS M. The RhoJ-BAD signaling network an achilles' heel for BRAF mutant melanomas[J]. PLoS Genetics, 2017, 13(7): e1006913.
- [8] SUN W, AI T, GAO Y, et al. Expression and prognostic relevance of MET and phospho-BAD in non-small cell lung cancer[J]. Onco Targets Ther, 2013, 6: 1315-1323.
- [9] PANDEY V, WANG B, MOHAN C D, et al. Discovery of a small-molecule inhibitor of specific serine residue BAD phosphorylation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(44): E10505-10514.
- [10] YANG L, YUAN X, WANG J, et al. Radiosensitization of human glioma cells by tamoxifen is associated with the inhibition of PKC- ι activity in vitro[J]. Oncol Lett, 2015, 10(1): 473-478.
- [11] ZHUANG R J, MA J, SHI X, et al. Cold-inducible protein RBM3 protects UV irradiation-induced apoptosis in neuroblastoma cells by affecting p38 and JNK pathways and Bcl2 family proteins[J]. J Mol Neurosci, 2017, 63(2): 142-151.
- [12] LIANG J, XIE Q, LI P, et al. Mitochondrial estrogen receptor β inhibits cell apoptosis via interaction with Bad in a ligand-independent manner[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 401(1/2): 71-86.
- [13] BUI N L, PANDEY V, ZHU T, et al. Bad phosphorylation as a target of inhibition in oncology[J]. Cancer Lett, 2018, 415: 177-186.
- [14] ZHANG P, HUANG C R, WANG W, et al. Harmine hydrochloride triggers G2 phase arrest and apoptosis in MGC-803 cells and SMMC-7721 cells by upregulating p21, activating caspase-8/Bid, and downregulating ERK/Bad pathway[J]. Phytother Res, 2016, 30(1): 31-40.
- [15] HAFEEZ S, UROOJ M, SALEEM S, et al. BAD, a proapoptotic protein, escapes ERK/RSK phosphorylation in deguelin and siRNA-treated HeLa cells[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0145780.
- [16] WANG K, LIU D, ZHANG Y, et al. SAD-A, a downstream mediator of GLP-1 signaling, promotes the phosphorylation of Bad S155 to regulate in vitro β -cell functions[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.12.063.
- [17] WEI Y, YU S, ZHANG Y, et al. NDRG2 promotes adriamycin sensitivity through a Bad/p53 complex at the mitochondria in breast cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(17): 29038-29047.

(王荣兵 编辑)