

促凋亡蛋白 NIX 的研究进展*

黄 一, 吴秋平, 陈小波 综述, 闵家新[△] 审校
(第三军医大学新桥医院胸外科, 重庆 400037)

关键词: 促凋亡蛋白质类; 线粒体; 自噬; NIX; 非典型性凋亡; 肺泡细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.02.038

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)02-0182-03

细胞凋亡又称为程序性细胞死亡,是多细胞生物维持生长发育和组织形态所特有的,由多种基因参与表达、精密调控的细胞主动死亡过程。NIX 是近年来发现的隶属于 Bcl-2 家族中的 BH3-only 促凋亡家族成员。虽然具有 Bcl-2 家族特征性的 BH3 域和羧基末端跨膜结构域(TM),也能与 Bcl-2 形成二聚体,但 NIX 的促凋亡活动明显不同于其他 Bcl-2 家族成员,本文通过对 NIX 的促凋亡功能机制以及其在细胞自噬、线粒体自噬、肿瘤及心肌疾病发病机制等方面的研究进展作一综述。

1 NIX 的发现和特征描述

NIX 又称 Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like,是基于与 BNIP3 存在 56% 的同源性,由人胎盘 cDNA 文库中克隆而来。与 BNIP3 类似,NIX 编码产物含有 Bcl-2 的 BH3 和 TM 结构域,属于 BH3-only 促凋亡家族成员,能与 Bcl-2、Bcl-X_L、E1B19K 等蛋白相互作用,促使细胞色素 C 的释放,从而促进细胞凋亡。研究表明,NIX 定位于线粒体,并可以在短暂表达的同时诱导细胞凋亡,Bcl-2 和 Bcl-X_L 在 NIX 诱导的细胞凋亡中起保护作用,NIX 对蛋白酶依赖性降解非常敏感。因此,NIX 和 BNIP3 享有几个共同的主要特征,包括与 Bcl-2 和 Bcl-X_L 的相互作用,通过羧基端跨膜区诱导细胞凋亡,具有与 BNIP3 类似的促凋亡能力。

2 由缺氧诱导的促凋亡蛋白

正常组织中不能检测到 NIX 基因或蛋白。在多种细胞系的体外培养缺氧诱导实验中发现,NIX 启动子含有功能性缺氧反应元件(HRE),是缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)的直接靶基因,在缺氧条件下细胞内 NIX mRNA 水平及 NIX 蛋白水平升高,从而诱导细胞凋亡过程^[1-3]。

早期研究发现,在缺氧条件下,除了一些共知的缺氧调节基因有表达变化之外,NIX mRNA 表达水平也有较明显的升高现象。在缺氧条件下,NIX mRNA 表达水平迅速升高,达正常条件时 5 倍之多。NIX 的表达不但由 HIF-1 α 诱导,也由转录因子早期生长反应因子(EGF2)和 p53 诱导表达^[4-5]。EGF2 是一种肺创伤后高表达的转录因子^[6]。p53 不但与肿瘤抑制相关,现更多的研究集中在其作为转录因子方面。这些研究表明,NIX 在缺氧介导的细胞凋亡的病理进展中有着特殊作用。

3 NIX 诱导的细胞凋亡机制

NIX 诱导细胞凋亡的分子机制目前尚不清楚。多项研究表明,NIX 诱导的细胞凋亡并不是通过单一机制,而是根据细胞类型和实验条件的不同,存在多条通路。关于 NIX 的促凋亡活动,也与 BNIP3 非常相似,尽管它属于 Bcl-2 家族,也能与

Bcl-2 形成二聚体,但是它促凋亡的活性明显不同于 Bcl-2 家族的其它成员。目前认为 NIX 与线粒体膜结合后引起线粒膜通透性孔开放,线粒体内膜跨膜电位($\Delta\Psi_m$)降低,活性氧增加,引起细胞死亡。NIX 诱导细胞凋亡不依赖于 Caspases、细胞色素 C 的释放,而与它跨膜结构域 TM 有关。NIX 引起的细胞死亡发生时间较典型性凋亡晚,一般在缺氧 72 h 后发生,它引起浆膜和线粒体的损伤,引起染色体 DNA 断裂成大分子片段,呈现非典型性凋亡的特点^[7-8]。

NIX 属于典型的 BH3-only 蛋白,但多项研究表明 NIX 并非通过依赖细胞色素 C 和 Caspases 的释放,最终激活 DNA 断裂因子 40(DNA fragmentation factor 40,DEF40)引起染色体 DNA 断裂成小分子片段这一典型的细胞凋亡通路诱导细胞死亡:(1)与典型的 BH3-only 蛋白比较,NIX 诱导细胞凋亡的能力较弱^[9];(2)典型的 BH3-only 蛋白通过细胞色素 C 的释放,不依赖于 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)而引起细胞死亡,而 NIX 诱导细胞凋亡的过程中含有 MPTP 的开放;(3)典型 BH3-only 蛋白的促凋亡活动高度依赖于 BH3 结构域,而 NIX 的促凋亡活动主要由 TM 所决定;(4)与典型的 BH3-only 蛋白诱导的细胞凋亡相比,NIX 诱导的细胞凋亡在形态学上有着明显的不同。并不排除典型细胞凋亡机制参与 NIX 诱导细胞凋亡的可能性,然而,它却难以解释依赖于 MPTP 这一主要途径的存在。

最近的一项研究为 NIX 诱导细胞死亡的第 3 种潜在机制提供了证据^[10]。Bax/ Bak、Bcl-2 对于细胞凋亡有相反作用的影响,至少部分影响内质网/肌质网(ER/SR)的钙池、线粒体的钙摄取和 MPTP^[11-12]。在这项研究中,NIX 的过表达及抑制分别表现为心肌细胞 ER/SR 钙池水平的升高和降低。通过遗传消融去除对 ER/SR 钙吸收泵的抑制,恢复钙池水平,可以逆转因 NIX 缺乏而对由 Gaq 介导的心肌疾病造成的有利影响。此外,定位于内质网的 NIX 可导致线粒体膜的去极化和细胞凋亡。这个机制是否与非心肌细胞有关尚待研究。

4 细胞自噬

NIX 除了参与细胞凋亡以外,另一个有趣的方面是 NIX 的蛋白质生物学特性在细胞自噬中的作用。细胞自噬最初被认为是基于细胞的超微结构特性,特别是包绕细胞质和细胞器的双模结构,被称为自噬体。细胞自噬是有机体内原始的分解代谢程序,是机体一种重要的防御和保护机制。细胞可以通过自噬和溶酶体,消除、降解、消化受损和变性,以及衰、老失去功能的细胞、细胞器和变性蛋白质与核酸等生物大分子,为细胞的重建、再生和修复提供必需原料,实现细胞的再循环和再

* 基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(CSTC,2009BB5322)。

[△] 通讯作者,电话:(023)68755616;E-mail:mjx@163.com。

利用^[13]。

Daido 等^[14]在研究由神经酰胺介导的恶性神经胶质瘤细胞的自噬过程中,首次描述了 BNIP3 在细胞自噬中的作用。在这个过程中,神经酰胺诱导 BNIP3 表达增高,而 BNIP3 造成线粒体除极化和自噬。在另一个缺血再灌注模型中,BNIP3 通过诱导细胞自噬而保护 HL-1 心肌细胞^[15]。同样,缺氧诱导的 BNIP3 表达可导致细胞自噬,但却可保护骨肉瘤细胞免于坏死^[16]。另外,细胞自噬与肌萎缩的发病机制有关,BNIP3 和 NIX 在其中起着正调节的作用,他们在骨骼肌中的表达都可以诱导自噬体的形成^[17]。

因此,BNIP3 和 NIX 具有双重特性,他们既诱导细胞凋亡,也参与诱导细胞自噬。由 BNIP3 和 NIX 诱导的细胞自噬在某些情况下具有保护作用,然后他们又与自噬性细胞凋亡有关。关于后者,目前尚不清楚这种细胞凋亡是由于过度的细胞自噬造成,还是由 BNIP3 或 NIX 诱导的独立的细胞凋亡形式。

5 NIX 与心肌疾病

国外研究发现,Bcl-2 家族成员在心肌疾病的病理生理过程中起着重要作用。不同于 BNIP3 在新生小鼠心肌细胞中由缺氧诱导引起细胞凋亡的过程^[18],NIX 是由与心肌肥大有关的细胞信号所调控的,即心肌细胞中的 Gαq 信号肽和蛋白激酶钙通过结合在 NIX 启动子上的 SP1 位点,对 NIX 产生调控作用。通过近几年的研究,NIX 在心肌细胞凋亡方面的作用已经在体内得到证实,NIX 在心肌细胞中的高度表达可导致致命的新生儿围生期心肌病。然而,对于被去掉羧基端,存在线粒体定位缺陷的 NIX,却可以对 Gαq 高表达的新生儿产生相反的保护作用^[2]。并且,通过对小鼠的研究发现,NIX 缺失可保护由 Gαq 介导的压力负荷型心脏病^[1]。因此在心肌疾病中,BNIP3 和 NIX 介导的细胞凋亡通路是由心肌缺血、缺氧以及心肌肥大所调节的。

6 NIX 与肿瘤

NIX 与缺氧介导的肿瘤细胞凋亡有关。在对缺氧条件下的中国仓鼠卵巢 K1 细胞的减除杂交法(subtractive hybridization)实验证明,缺氧可诱导 NIX mRNA 高表达。此外,NIX 蛋白也被缺氧诱导,并与细胞凋亡有关。NIX 启动子中含有两个 HIF-1α 结合位点,其中涉及编译启动密码子的一 234 位点是缺氧和 HIF-1α 反式激活所必需的。缺氧对于肿瘤是负面的预后指标,因而 NIX 的异常表达与侵袭性疾病有关^[19]。Fei 等^[4]通过对体外培养的肿瘤细胞移植入动物体内模型的研究发现,NIX 被沉默的肿瘤细胞在缺氧条件下生长的速度比含有正常 NIX 的肿瘤细胞快,NIX 在转录中和转录后期由缺氧诱导因子 HIF-1α 和 p53 参与调节,而且 NIX 是 Bcl-2 家族中缺氧条件下惟一表达升高的抑癌基因。p53 是具有代表性的肿瘤抑制基因,在压力条件下(如放射、化疗以及组织缺氧),p53 能正常清除肿瘤,然而组织缺氧也能够诱导 p53 发生突变,失去抗肿瘤的能力。NIX 不像 p53 的其他调控基因(Puma、DRS、Bax 或 p21 基因),在缺氧条件下,仍然有被 p53 诱导激活的可能性。DNA 损伤后,NIX 表达受到 p53 的调控,p53 通过其特异性的 DNA 结合片段,结合到 NIX 基因上,通过激活 NIX 的转录而直接调控 NIX 的表达。同时 NIX 在缺氧环境下反过来介导 p53 依赖的细胞凋亡进程。在肿瘤移植的动物模型中,实验性下调 NIX 的表达,可以加速肿瘤细胞生长。国外文献报道在多种肿瘤细胞系中发现 HIF-1α 诱导 BNIP3、NIX

表达上调。Sowter 等^[3]和 Guo 等^[20]采用原位杂交方法,发现 BNIP3、NIX 在乳腺癌组织中表达上调,且表达见于坏死区周边区域。

这些研究结果表明,缺氧可通过 BNIP3、NIX 等因子对肿瘤细胞的凋亡敏感性进行筛选,不表达或弱表达 BNIP3、NIX 的肿瘤细胞能够耐受缺氧继续生长;高表达 BNIP3、NIX 的肿瘤细胞则发生凋亡,继而坏死。稳定的 NIX 表达可以减缓肿瘤细胞的生长速度。在缺氧条件下,NIX 在各种细胞和组织类型中都有高水平表达,这表明 NIX 可能是在缺氧条件下存在的肿瘤抑制基因,NIX 的表达与肿瘤细胞凋亡有关。

7 NIX 与线粒体自噬的发生机制

最初,最简单的 NIX 依赖的线粒体自噬模型被认为是 NIX 触发线粒体的除极化,从而引起线粒体自噬和清除,这个模型已被大量的研究结果所证实^[21]。另一项研究发现,体外培养超过 16 h 的网织红细胞中,引起线粒体发生除极化的复合物,能够逆转因 NIX 缺失而引起的线粒体清除率降低^[22]。但没有证据能解释,在网织红细胞中,NIX 直接触发线粒体除极化这一过程。目前认为依赖于 NIX 的线粒体除极化时间发生在自噬体的形成与消除之间^[23]。通过对具有自噬缺陷的网织红细胞中线粒体清除率的研究,可能会解决上述问题。

对于 NIX 触发线粒体除极化这一推论,面临的另一个问题在于它不依赖于 Bax 和 Bak^[24]。而值得注意的是,对于能够逆转 NIX 缺失的 ABT-737 是需要 Bax 或 Bak 来诱导线粒体除极化和细胞凋亡^[22],这似乎与 NIX 的机制不同。然而,NIX 可能通过不依赖于 Bax 或 Bak 的其他通路导致线粒体除极化。尽管如此,这仅仅是推测,主要是因为线粒体清除的发生同样不依赖于 MPTP^[24],这种不依赖于 Bax、Bak 和 MPTP 的现象也说明了依赖于 NIX 的线粒体自噬不同于其他任何由 BNIP3 或 NIX 诱导的细胞凋亡机制。

第二种依赖于 NIX 的线粒体自噬模型假设 NIX 具有另一种独立的、不依赖于触发线粒体除极化的能力,称为恢复自噬元件。正如之前讨论过的,使 BNIP3 或 NIX 过度表达可在不同条件下诱导细胞自噬^[14-17,25],这说明诱导细胞自噬可能是这些蛋白的本质特性。NIX 缺失并非广泛地削弱红细胞的自噬能力,而是干扰针对线粒体的自噬体^[22,24]。NIX 可能作为线粒体自噬机制中的一个衔接蛋白和恢复元件而发挥作用,与这个推论相符,初步研究已证实 NIX 直接与微管相关蛋白 LC3 相互作用。

8 结论与展望

综上所述,虽然 NIX 拥有 Bcl-2 家族中的 BH3-only 亚群的一些共同特征,诸如在 BH3 结构域上的同源性,同样定位于线粒体外膜,亦能与 Bcl-2 和 Bcl-X_L 相互作用,但其引起细胞凋亡的机制却与典型的 BH3-only 蛋白完全不同。NIX 诱导细胞凋亡的能力较弱,通过引起线粒体内膜跨膜电位($\Delta\Psi_m$)降低,线粒体膜通透性孔开放,活性氧增加,引起细胞死亡。并且,NIX 的羧基末端跨膜结构域并非 BH3 域,在诱导细胞凋亡过程中扮演了重要的角色。随后的研究证实了 NIX 诱导的非典型性细胞凋亡,而且同时它还诱导了细胞自噬。目前仍不清楚 NIX 诱导的细胞凋亡和细胞自噬的能力是两个相互关联,还是各自独立的功能。正如前文所述,NIX 可能通过线粒体除极化导致细胞凋亡,同时因此而引起细胞自噬;又或者两者可能在发生机制上相互独立,却在功能上相互联系。除肿瘤以及

心肌细胞以外,缺氧条件下 NIX 高表达是否在其他组织(如急性肺损伤等)有同样的诱导非典型细胞凋亡的能力,其促凋亡的具体机制及与在肿瘤、心肌基本方面的作用等一系列问题,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Diwan A, Wansapura J, Syed FM, et al. Nix-mediated apoptosis links myocardial fibrosis, cardiac remodeling, and hypertrophy decompensation[J]. *Circulation*, 2008, 117(3):396-404.
- [2] Yussman MG, Toyokawa T, Odley A, et al. Mitochondrial death protein Nix is induced in cardiac hypertrophy and triggers apoptotic cardiomyopathy[J]. *Nat Med*, 2002, 8(7):725-730.
- [3] Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, et al. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(18):6669-6673.
- [4] Fei P, Wang W, Kim SH, et al. Bnip3L is induced by p53 under hypoxia, and its knockdown promotes tumor growth[J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(6):597-609.
- [5] Unoki M, Nakamura Y. EGR2 induces apoptosis in various cancer cell lines by direct transactivation of BNIP3L and BAK[J]. *Oncogene*, 2003, 22(14):2172-2185.
- [6] Jin Y, Choi AM. Cytoprotection of heme oxygenase-1/carbon monoxide in lung injury[J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2005, 2(3):232-235.
- [7] Zhang J, Ney PA. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy[J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(7):939-946.
- [8] Real PJ, Benito A, Cuevas J, et al. Blockade of epidermal growth factor receptors chemosensitizes breast cancer cells through up-regulation of Bnip3L[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(18):8151-8157.
- [9] Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies[J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(12):1348-1358.
- [10] Diwan A, Matkovich SJ, Yuan Q, et al. Endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk in NIX-mediated murine cell death[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(1):203-212.
- [11] Nutt LK, Gogvadze V, Uthaisang W, et al. Indirect effects of Bax and Bak initiate the mitochondrial alterations that lead to cytochrome C release during arsenic trioxide-induced apoptosis[J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(4):459-467.
- [12] Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, et al. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis[J]. *Science*, 2003, 300(5616):135-139.
- [13] Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating[J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12 Suppl 2:S1542-1552.
- [14] Daido S, Kanzawa T, Yamamoto A, et al. Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(12):4286-4293.
- [15] Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, et al. Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy[J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(1):146-157.
- [16] Tracy K, Dibling BC, Spike BT, et al. BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(17):6229-6242.
- [17] Mammucari C, Milan G, Romanello V, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo[J]. *Cell Metab*, 2007, 6(6):458-471.
- [18] Galvez AS, Brunskill E W, Marreez Y, et al. Distinct pathways regulate proapoptotic Nix and BNip3 in cardiac stress[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(3):1442-1448.
- [19] Burton TR, Gibson SB. The role of Bcl-2 family member BNIP3 in cell death and disease: NIPping at the heels of cell death[J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(4):515-523.
- [20] Guo K, Searfoss G, Krolkowski D, et al. Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3[J]. *Cell Death Differ*, 2001, 8(4):367-376.
- [21] Twig G, Elorza A, Molina AJ, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy[J]. *EMBO J*, 2008, 27(2):433-446.
- [22] Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, et al. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells[J]. *Nature*, 2008, 454(7201):232-235.
- [23] Zhang J, Ney PA. NIX induces mitochondrial autophagy in reticulocytes[J]. *Autophagy*, 2008, 4(3):354-356.
- [24] Schweers RL, Zhang J, Randall MS, et al. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(49):19500-19505.
- [25] Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, et al. Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3[J]. *Oncogene*, 2005, 24(6):980-991.

(收稿日期:2010-03-21 修回日期:2010-07-09)

《重庆医学》——中国科技论文核心期刊, 欢迎投稿, 欢迎订阅!