

## BNIP3在消化道肿瘤中的研究进展\*

张洪典 陈传贵 综述 于振涛 审校

**摘要** 细胞凋亡紊乱在消化道肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用。BNIP3作为Bcl-2蛋白家族中BH3-only亚家族的成员之一,具有BH3结构域和TM跨膜结构区,属于线粒体促凋亡蛋白。BNIP3可通过Caspase非依赖性线粒体凋亡途径诱导细胞死亡,还可以介导自噬性细胞死亡,其表达受缺氧及其他因素的影响。BNIP3在肿瘤中的表达具有组织特异性,在乳腺癌、肺癌和宫颈癌等肿瘤中BNIP3高表达,而在胰腺癌、胃癌和结直肠癌中BNIP3则表达沉默。BNIP3在肿瘤中的表达缺失可导致肿瘤细胞耐受缺氧,对放疗产生抵抗。全面了解BNIP3在各种肿瘤中的表达谱,可能使BNIP3成为临床指导肿瘤治疗及判断肿瘤预后的新靶标。

**关键词** BNIP3 消化道肿瘤 缺氧 甲基化 耐药

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20121527

### Research advancement on BNIP3 in gastrointestinal cancer

Hongdian ZHANG, Chuangui CHEN, Zhentao YU

Correspondence to: Zhentao YU; E-mail address: yuzhtao@hotmail.com

Department of Esophageal Cancer, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center of Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin, Tianjin 300060, China

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81071981)

**Abstract** Apoptosis disorders have an important function in the development of gastrointestinal cancer. BNIP3 is a member of the BH3-only subfamily of the bcl-2 family, which contains a BH3 domain and a transmembrane domain, and belongs to the mitochondrial pro-apoptotic proteins. BNIP3 induces cell death via the caspase-independent mitochondrial apoptotic pathway and mediates autophagic cell death. BNIP3 expression is regulated by hypoxia and other factors. BNIP3 expression in tumors exhibits tissue specificity; BNIP3 is highly expressed in some tumors, including breast, lung, and cervical tumors. In pancreatic, gastric, and colorectal cancers, BNIP3 is epigenetically silenced. The absence of BNIP3 in the tumors can cause tumor cells to tolerate hypoxia and may be associated with chemotherapy and radiotherapy resistance. A comprehensive understanding of the spectrum of BNIP3 expression in a various tumors is necessary to use BNIP3 as a marker in clinical applications to treat tumors and as a new target in tumor prognosis.

**Keywords:** BNIP3, gastrointestinal cancer, hypoxia, methylation, resistance

Bcl-2腺病毒E1B 19 kDa相关蛋白3(Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3, BNIP3)即属于缺氧诱导的线粒体促凋亡蛋白,为机体正常生长发育和新陈代谢所必需<sup>[1]</sup>。近年来BNIP3已成为肿瘤基础性研究方面一个新的热点,针对BNIP3基因的靶向治疗,将成为肿瘤治疗方面的研究新思路和方向。本文就BNIP3在消化道肿瘤中的研究现状做一综述。

#### 1 BNIP3的概述

BNIP3是一种能与腺病毒E1B19kDa相互作用的促凋亡线粒体蛋白,人的BNIP3基因全长1 535 bp,可编码194个氨基酸,可以形成同源二聚体或与Bcl-2家族其他成员形成异源二聚体。BNIP3编码产物含有凋亡效应结构域(BH3)和跨膜结构区(TM),

属于BH3-only亚族成员。BNIP3可通过BH3结构域与抗凋亡蛋白形成异二聚体,抑制后者的抗凋亡功能,从而介导细胞死亡;C末端TM区也具有同源二聚化,是发挥线粒体定位和细胞凋亡所必需的<sup>[2]</sup>,BNIP3还含有大量的PEST序列,使其可被胞浆内的蛋白酶迅速降解,以调节其细胞内含量。

BNIP3诱导细胞死亡与线粒体功能障碍、细胞膜去极化、线粒体通透性转运孔的开放和氧自由基的产生有关,但与通常的线粒体凋亡途径不同,BNIP3诱导细胞死亡不依赖于Caspase酶的激活、线粒体细胞色素c的释放、凋亡诱导因子(AIF)的核转位及线粒体黄素蛋白的参与,属于II型程序性细胞死亡。其介导的非Caspase依赖性促凋亡作用可以被MPTP抑制剂环孢素A和BNIP3反义核苷酸完全阻断<sup>[3]</sup>。

作者单位:天津市肿瘤医院食管肿瘤科,国家肿瘤临床研究中心,天津市肿瘤防治重点实验室(天津市300060)

\*本文课题受国家自然科学基金项目(编号:81071981)资助

通信作者:于振涛 yuzhtao@hotmail.com

BNIP3的BH3结构域还可与抗凋亡蛋白Bcl-2和Bcl-xl形成异二聚体,变构激活促凋亡蛋白Bax和Bak,从而发挥促凋亡作用<sup>[4]</sup>。

除细胞凋亡外,BNIP3还可诱导自噬。缺氧时BNIP3的过表达可通过肿瘤细胞的自噬保护促进肿瘤细胞适应此环境并促进肿瘤的生存和进展,然而过渡上调的自噬也可以引起自噬性细胞死亡<sup>[4]</sup>,Wilkinson等<sup>[5]</sup>报道生长因子信号可通过HIF-1依赖性途径使这一效应增强。最近一项在肝癌中的研究表明Hedgehog抑制剂可以抑制肿瘤细胞自噬,这与BNIP3介导的从Beclin-1-Bcl-2复合体中释放自噬诱导剂Beclin-1有关<sup>[6]</sup>。

## 2 BNIP3的表达调控

### 2.1 缺氧及缺氧诱导因子-1与BNIP3的表达

在实体肿瘤中普遍存在乏氧现象,乏氧或类似乏氧可促进正常组织和肿瘤组织中BNIP3的表达,诱导细胞凋亡,这已在来源于人上皮细胞、癌细胞、巨噬细胞、内皮细胞中得到证实。缺氧诱导因子HIF-1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)是缺氧时诱导BNIP3表达的主要调节者,正常氧浓度下,HIF-1 $\alpha$ 被降解,反之在低氧条件下稳定表达<sup>[7]</sup>。缺氧对BNIP3的调节主要发生在转录水平,BNIP3启动子区域包含两个低氧反应元件(hypoxia-responsive element, HRE),HIF-1 $\alpha$ 在缺氧条件下可与HRE2紧密结合,刺激BNIP3的表达<sup>[8]</sup>。HIF-1对BNIP3的表达调控是由其特异性的 $\alpha$ 亚基决定的,与HIF-1 $\alpha$ 相反,HIF-2 $\alpha$ 则负性调节BNIP3的表达<sup>[9]</sup>。

缺氧诱导BNIP3的表达也参与了促肿瘤活性,缺氧早期诱导的BNIP3表达可以选择缺氧区内的抗凋亡肿瘤细胞进行克隆,使其在以后阶段具有更高的侵袭性表型;缺氧还可诱导生长因子和葡萄糖转运蛋白的表达,使其与BNIP3共同促进肿瘤的活性。

### 2.2 其他因素与BNIP3的表达

除缺氧外,锌指蛋白PAGL2能以HIF-1 $\alpha$ 非依赖的方式特异性识别BNIP3启动子序列中的HRE,转录上调BNIP3的表达。胸苷磷酸化酶(thymidine-phosphorylase)和其降解产物2-脱氧右旋核糖(2-deoxy-d-ribose)可使BNIP3的表达下调,促进肿瘤进展。miR-145可通过与BNIP3的3'-非编码区结合在转录后环节负性调节BNIP3的表达,同时上调凋亡诱导因子(AIF)的表达<sup>[10]</sup>。在NF- $\kappa$ B表达升高的胰腺癌细胞中灭活NF- $\kappa$ B可使BNIP3的表达升高2.3倍。最新研究发现无论在常氧或乏氧环境下,P53均可抑制BNIP3的表达,降低缺氧诱导的细胞死亡<sup>[11]</sup>。

## 3 BNIP3在消化系统肿瘤中的表达及其调控机制

BNIP3在不同肿瘤中的表达具有组织特异性,在

几乎所有的胰腺癌、胃癌、结直肠癌及血液系统肿瘤中,BNIP3表达降低,而在乳腺癌、非小细胞肺癌、脑胶质瘤、前列腺癌等肿瘤中BNIP3表达升高。BNIP3的表达缺失可导致肿瘤的发生以及肿瘤细胞耐受缺氧,BNIP3的过表达又可促进肿瘤细胞的生存和肿瘤进展。

Abe等<sup>[12]</sup>发现在几乎所有的胰腺癌组织和50%的胰腺癌细胞系中未检测到BNIP3的表达;Ishida等<sup>[13]</sup>亦发现在8个胰腺癌细胞系中仅PANC-1细胞的BNIP3 mRNA的表达与正常胰腺癌的表达水平相似,其余均低水平表达。BNIP3在胰腺癌中低水平表达的原因是转录起始位点CpG岛发生了甲基化,在表达缺失的细胞系中运用甲基化酶抑制剂5-氮杂脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxyeytidine)可以恢复缺氧下BNIP3的表达,逆转抗缺氧引起的细胞死亡<sup>[12]</sup>。最近研究发现S100A2和S100A4能抑制外源性BNIP3启动子活性,S100A4的过表达可能是BNIP3在BNIP3启动子非甲基化细胞系中低表达的原因<sup>[14-15]</sup>。

Murai等<sup>[15]</sup>在66%的结直肠癌和49%的胃癌中检测到BNIP3表达缺失,主要原因也是由于该基因的甲基化,使用5-aza-dc处理不表达BNIP3的细胞株,可恢复低氧增强BNIP3 mRNA表达的能力(HT29除外);研究还发现组蛋白脱乙酰化也在DNA甲基化介导的BNIP3表达缺失中起作用,联合应用组蛋白去乙酰化酶抑制剂TSA与5-aza-dc处理无BNIP3表达的细胞中较单独应用两者对提高BNIP3表达效果好<sup>[15-16]</sup>。

## 4 BNIP3表达与消化道肿瘤的耐药

肿瘤细胞中BNIP3的表达沉默使细胞凋亡减少,降低了化疗药物的细胞毒性,可能成为耐药的潜在机制之一。胰腺癌中BNIP3的低表达可致胰腺癌细胞对化疗药物5-FU和吉西他滨的敏感性降低,间接导致了患者的不良预后,而联合应用细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂P276-00和吉西他滨可使BNIP3蛋白的表达增高而逆转细胞耐药<sup>[13,17]</sup>。邓茜等<sup>[18]</sup>在抗奥沙利铂的结肠癌细胞株中发现,5-aza-dc可通过抑制DNMT活性来上调BNIP3的表达,并协同抑制P糖蛋白和多药耐药相关蛋白的表达,从而逆转肿瘤细胞对化疗药物的抵抗性。从基因组范围筛选导致S-1/CPT-11联合治疗结直肠癌产生抵抗的甲基化沉默基因时,BNIP3是被选定的基因之一,并且BNIP3低甲基化患者的无病生存时间明显长于BNIP3高甲基化患者<sup>[19]</sup>。显然,BNIP3异常表达是胃肠癌发生过程中的重要事件,BNIP3的低表达是肿瘤产生耐药的重要机制。

## 5 BNIP3表达和消化道肿瘤的治疗和预后

BNIP3促细胞凋亡作用对抑制恶性肿瘤的发生、

发展和预后判断提供了崭新的思路和方向,针对BNIP3缺失的基因治疗将成为肿瘤治疗的有效途径。由于DNA甲基化和组蛋白脱乙酰基使其表达沉默,用相应的抑制剂恢复其表达可促进肿瘤细胞凋亡,延缓肿瘤进展,小剂量的BNIP3甲基化抑制剂联合伊利替康较单独应用两者能明显抑制肿瘤生长<sup>[13]</sup>。一种来源于豆类种子的凝集素-刀豆蛋白A能够诱导BNIP3介导的自噬而发挥强大的抗肝癌作用<sup>[20]</sup>。热休克蛋白27和BNIP3的表达上调可增加光动力疗法(PDT)中肿瘤细胞对紫外线的敏感性而发挥抗结肠癌细胞的能力。因此,BNIP3有可能成为治疗肿瘤的新靶标,针对BNIP3基因实行靶向分子治疗和化学联合治疗,在癌症治疗上有较好的应用前景。

关于BNIP3表达与消化道肿瘤患者预后的研究,Sugita等<sup>[16]</sup>检测80例胃癌患者组织中BNIP3的甲基化状态并对患者预后进行评估,发现BNIP3的甲基化明显增加了对化疗药物的抵抗,降低了患者的总生存时间。王银铃等<sup>[21]</sup>发现检测胃癌患者腹腔冲洗游离细胞BNIP3的甲基化可作为早期预测患者腹膜微转移和评估疾病进展的辅助诊断指标之一。在胰腺癌中,多数文献报道BNIP3的低表达与患者不良预后有关,高表达患者的生存时间明显长于低表达患者,而Sugita<sup>[16]</sup>则报道了4例BNIP3阴性表达但具有较长生存期的患者,因此,BNIP3的表达沉默对不同肿瘤的影响大小具有组织特异性,还需进一步研究。

## 6 展望

BNIP3主要是通过线粒体途径诱导细胞凋亡和介导自噬性细胞死亡,在多种消化肿瘤的进展中扮演重要角色。缺氧、DNA甲基化及其他因素可以导致BNIP3的异常表达,BNIP3的表达沉默对肿瘤的进展、转移和预后具有不利影响,恢复BNIP3的表达可以诱导肿瘤细胞凋亡延缓肿瘤进展。因此以BNIP3为靶点的基因治疗可能成为肿瘤治疗研究新思路,BNIP3能否作为肿瘤分级和判断预后的新指标,有待进一步研究。

### 参考文献

- 1 Wu SY, Lan SH, Cheng DE, et al. Ras-related tumorigenesis is suppressed by BNIP3-mediated autophagy through inhibition of cell proliferation[J]. *Neoplasia*, 2011, 13(12):1171-1182.
- 2 Quinsay MN, Lee Y, Rikka S, et al. Bnip3 mediates permeabilization of mitochondria and release of cytochrome c via a novel mechanism[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(6):1146-1156.
- 3 Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(10):2570-2581.
- 4 Kubli DA, Ycaza JE, Gustafsson AB. Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak[J]. *Biochem J*, 2007, 405(3):407-415.
- 5 Wilkinson S, Ryan KM. Growth factor signaling permits hypoxia-induced autophagy by a HIF1alpha-dependent, BNIP3/3L-independent transcriptional program in human cancer cells[J]. *Autophagy*, 2009, 5(7):1068-1069.
- 6 Wang Y, Han C, Lu L, et al. Hedgehog signaling pathway regulates autophagy in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Hepatology*, 2013, 58(3):995-1010.
- 7 胡珊珊,张洪典,陈传贵,等.BNIP3 HIF-1 $\alpha$ 在食管鳞癌中的表达及其临床病理意义[J].*中国肿瘤临床*,2013,40(9):517-520.
- 8 Majumdar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2):294-309.
- 9 Menrad H, Werno C, Schmid T, et al. Roles of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) versus HIF-2alpha in the survival of hepatocellular tumor spheroids[J]. *Hepatology*, 2010, 51(6):2183-2192.
- 10 Chen X, Gong J, Zeng H, et al. MicroRNA145 targets BNIP3 and suppresses prostate cancer progression[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7):2728-2738.
- 11 Feng X, Liu X, Zhang W, et al. p53 directly suppresses BNIP3 expression to protect against hypoxia-induced cell death[J]. *EMBO J*, 2011, 30(16):3397-3415.
- 12 Abe T, Toyota M, Suzuki H, et al. Upregulation of BNIP3 by 5-aza-2'-deoxycytidine sensitizes pancreatic cancer cells to hypoxia-mediated cell death[J]. *J Gastroenterol*, 2005, 40(5):504-510.
- 13 Ishida M, Sunamura M, Furukawa T, et al. Elucidation of the relationship of BNIP3 expression to gemcitabine chemosensitivity and prognosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(34):4593-4597.
- 14 Mahon PC, Baril P, Bhakta V, et al. S100A4 contributes to the suppression of BNIP3 expression, chemoresistance, and inhibition of apoptosis in pancreatic cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(14):6786-6795.
- 15 Murai M, Toyota M, Suzuki H, et al. Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3):1021-1027.
- 16 Sugita H, Iida S, Inokuchi M, et al. Methylation of BNIP3 and DAPK indicates lower response to chemotherapy and poor prognosis in gastric cancer[J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(2):513-518.
- 17 Rathos MJ, Joshi K, Khanwalkar H, et al. Molecular evidence for increased antitumor activity of gemcitabine in combination with a cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00 in pancreatic cancers[J]. *J Transl Med*, 2012, 10:161.
- 18 邓茜,李志平,黄春梅,等.去甲基化药物逆转结肠癌细胞株sw620/L-OHP耐药性的作用及机理研究[J].*四川大学学报:医学版*,2010, 41(6):975-979.
- 19 Hiraki M, Kitajima Y, Nakafusa Y, et al. CpG island methylation of BNIP3 predicts resistance against S-1/CPT-11 combined therapy in colorectal cancer patients[J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(1):191-197.
- 20 Li WW, Yu JY, Xu HL, et al. Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 414(2):282-286.
- 21 王银铃,王亿龙,王齐晖,等.腹腔冲洗液BNIP3基因甲基化与胃癌患者腹膜微转移及疾病的相关性研究[J].*中国医科大学学报*,2012,41(10):934-936.

(2012-10-17收稿)(2013-06-04修回)

(本文编辑:周晓颖)