

· 综 述 ·

野生型 p53 诱导基因 1 研究进展*

邹瀛波[†]综述,郭伟,蒋耀光[△]审校

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心,重庆 400042)

关键词:野生型 p53 诱导基因 1;p53;凋亡;肿瘤

中图分类号:R730.2;R730.54

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)05-0538-03

p53 基因是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的基因。过去 20 多年来,人们对 p53 基因的认识经历了癌蛋白抗原,癌基因到抑癌基因的 3 个认识转变,现已认识到,引起肿瘤形成或细胞转化的突变型 p53 蛋白是野生型 p53 基因突变的产物,是一种肿瘤促进因子,它可以抑制正常 p53 蛋白的功能,而野生型 p53 基因是一种抑癌基因,它的失活对肿瘤形成起重要作用^[1]。

目前研究已经证实,p53 可以诱导多种基因的表达,然而到目前为止,研究者尚未发现仅影响 p53 依赖凋亡途径的单一基因。在野生型 p53 诱导基因 1(wild-type p53-induced gene 1, WIG-1)被发现之前,研究者猜测 p53 诱导的凋亡可能与一种还未命名的 p53 相关基因的表达有关,同样,p53 在诸如分化和发育过程中的功能可能依赖于这一特殊基因的调节。之后的研究表明 WIG-1 有可能是影响 p53 依赖凋亡途径的调节基因^[2],因此,对于 WIG-1 基因的进一步研究,将有可能为阐明 p53 诱导生理途径的分子机制提供有益的思路和见解。

1 WIG-1 的发现

1995 年,Leone 等^[3]通过对 J3D 小鼠 T 淋巴瘤细胞周期和凋亡进行研究后发现,在温度敏感的结构中表达的野生型 p53(温度敏感 p53 基因)能够诱导 p53 阴性的 J3D 小鼠 T 淋巴瘤细胞出现 G₁ 期停滞和细胞凋亡。p53 通过一段特殊序列与 DNA 结合,并激活带有特殊 p53DNA 基因的转录子,这种特殊的 p53DNA 和它们的启动子结合在一起。p53 的这种由特殊序列激活的功能对于 p53 介导的体外生长抑制作用是至关重要的^[4]。这些发现表明,特殊的 DNA 结合序列及其活性对于 p53 的肿瘤抑制起到了决定性作用。对结果进行进一步分析后发现了一个新的 p53 诱导的基因——WIG-1,其 7.6 kb 的和 2.2 kb 的转录子在温度敏感的 p53 转染的 J3D 细胞中的表达是上调的。细胞经 γ 射线照射后过表达的 NIH3T3 和 p21 可以诱导 WIG-1 的转录。全身 γ 射线照射可以诱导鼠的脑、睾丸、肾、脾和肺组织 WIG-1 表达水平上调,而在未接受 γ 射线照射的脑、睾丸和肾组织中也可检测到 WIG-1 的基础表达^[4]。进一步的研究表明,WIG-1 是一种由 p53 基因诱导表达的锌指蛋白,在其分子中含有 3 个锌指结构,WIG-1 蛋白中的 3 个锌指结构能够与特定蛋白、RNA 及 DNA 结合,人类 WIG-1 与包括小干扰 RNA 和 microRNA 在内的不同类型的双链 RNA 结合后,能够发挥抑制细胞生长的作用^[5]。

另外,有研究者发现,用阿霉素等抗肿瘤药物处理携带野生型 p53 基因的 B 淋巴细胞,在 p53 过表达的同时可以检测到 WIG-1 的表达水平上调^[6]。结果进一步表明 WIG-1 的表达可

以由 p53 诱导,因此,WIG-1 是一个 p53 诱导基因。

目前已发现的 WIG-1 同源体有:啮齿类动物细胞中的 PAG608(p53-activated gene 608,p53 激活基因 608)和哺乳动物细胞中的 ZMAT-3(zinc finger,matrin type 3,锌指基质蛋白 3)。PAG608 在啮齿类动物所有组织中都可以检测到其表达,而在胰腺、脑和肺组织中的表达水平最高^[7]。

2 WIG-1 的结构与定位

WIG-1 定位于细胞核,编码包含 3 个 Cys2his2 型锌指的锌指蛋白,WIG-1 的锌指是由 56~75 个氨基酸连接而成的,定位于人类 3 号染色体长臂的 26.3 区(3q26.3),见图 1^[8]。

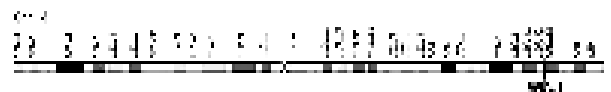


图 1 WIG-1 定位图

WIG-1 在转录水平的选择性拼接可以产生两种转录变体(转录变体 1 及转录变体 2),两种变体序列中仅仅有一个氨基酸不同。相对于转录变体 1,转录变体 2 在 5' 端的非编码区缺少一个片段,在编码区存在一个替代剪接位点,其开放读码框没有 GCA 密码子,编码序列含有 288 个氨基酸。WIG-1 在生物进化过程中高度保守,其锌指蛋白氨基酸序列及结构在人类与鱼类中几乎完全一致^[9]。这些锌指区域类似于早先发现的双链 RNA 结合蛋白,dsRBP-ZFa 和 JAZ。小鼠 WIG-1 与 JAZ 和 dsRBP-ZFa 一样是一个核蛋白,与其具有结构相似性。这种 Cys2his2 型锌指蛋白代表了一大类具有识别特殊 DNA 序列的蛋白,然而,这种蛋白也与单链 RNA、DNA-RNA 杂合体,dsDNA(双链 DNA)和其他蛋白相互作用。同 JAZ 一样,WIG-1 也定位于核内,这与小鼠 WIG-1 蛋白和已观察到的人与大鼠 WIG-1 蛋白在核内与核仁内的定位是一致的。由于 WIG-1 与 dsRNA(双链 RNA)而不是 ssRNA(单链 RNA)相作用,所以 WIG-1 代表了一类与以往发现所不同的 p53 诱导基因^[10]。

3 WIG-1 的功能

3.1 与 dsRNA 的结合活性 目前研究已经证实小鼠 WIG-1 通过其第 1 个锌指区域与 dsRNA 相结合。异常表达 FLAG 标记的鼠 WIG-1 蛋白定位于细胞核,在某些细胞中定位于核仁,而 GFP 标记的鼠 WIG-1 则主要定位于核仁,WIG-1 优先与 dsRNA 结合,而不是 ssRNA 或者 dsDNA,WIG-1 的第 1 个锌指区域对于 dsRNA 结合功能至关重要,而锌指 2 和 3 则不是必需的。在哺乳动物细胞中表达的 WIG-1 蛋白显示出与 dsRNA 的高度亲和性,而在所有 p53 诱导表达的基因中,类似

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30801137)。[†] 第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心在读博士研究生,联系电话:15123009617;E-mail:zybmen@163.com。[△] 通讯作者,E-mail:yaoguangjiangcq@hotmail.com。

WIG-1 的 dsRNA 结合活性是首次发现。这表明 WIG-1 与 JAZ 和 dsRBP-ZFa 等 dsRNA 结合蛋白具有结构相似性,也进一步提示 dsRNA 结合在 p53 依赖的生理反应中可能具有重要作用^[11]。

WIG-1 由野生型 p53 诱导上调表达,是 p53 介导的转录活化的一个直接靶点。已有研究证实其是一个由 p53 直接转录的基因,并且是一个善意的目的基因,WIG-1 的 3 个锌指区域包含在其第 2、第 4 外显子核苷酸序列中,其与 p53 结合的同序列相关。其中的 2 个锌指区域 BM2 和 BM3,与重组 p53 共同形成 DNA 蛋白杂合体^[12]。

WIG-1 的第 1 个锌指区域对于在体外或活体细胞中结合 dsRNA 至关重要。野生型 WIG-1 和 ZF1、ZF2 点突变型 WIG-1 都具有抑制细胞克隆形成能力的作用,证明这两个 ZF 突变对 WIG-1 抑制细胞增殖功能未造成重要的影响,但进一步的研究发现突变型 WIG-1 的复制效率要低于野生型 WIG-1^[11]。

有研究发现,人类 WIG-1 也结合 dsRNA,WIG-1 与活细胞中内生 dsRNA 的互相作用表明这种相互作用是与生理性相关的,但是它的确切机制和作用目前仍不清楚。WIG-1 通过其 N 末端的锌指区域与 50~100 bp 长的 dsRNA 结合,WIG-1 结合的 21 bp 的 dsRNA 与 siRNA 具有结构相似性。这些结构相似性,包括它们独特的锌指分布规律,表明它们的功能是相近的^[5]。

3.2 抑制细胞增殖 WIG-1 分子中锌指区域的发现,提示其可能是一种核苷酸结合蛋白,但目前对其在 p53 依赖的生理反应中所起的作用和机制仍知之甚少。小鼠与大鼠 PAG608 和人的 WIG-1 蛋白具有高度同源性,分别有 97.9% 和 87% 的氨基酸序列相同^[13]。当大鼠 PAG608 在人类肿瘤细胞中过表达时,有较弱的促进凋亡活性。这也提示 WIG-1 可能具有启动细胞凋亡的功能。Issai 等^[14]进行的克隆实验结果表明,人 WIG-1 能够显著抑制食管鳞癌细胞增殖,其抑制率可达 25%~30%。

有研究者认为 WIG-1 可能与 miRNA(microRNA)调节的细胞生长和生存有关,并且具有启动 p53 诱导的细胞生长停滞和(或)诱导凋亡的作用,WIG-1 与特殊的 miRNA 相结合能够增加由 miRNA 和它的 mRNA 形成的有缺陷的小二重区域的稳定性^[11]。

在 WIG-1 启动子中,几个 p53 结合序列的存在反映了由 p53 和其家族成员 p63、p73 介导的是一个相当复杂的转录调节过程。p63、p73 和 p53 一样,能够结合相同的序列并上调目前已知几种 p53 目的基因。p53 以 SP1 或 SP1 相关蛋白作为一个共同因子,目的是达到 p21 和 Bax 启动子的最大活化。在 WIG-1 启动子中富含 GC 的区域也可以提供 SP1 结合位点^[12],这与 p53 作用是非常类似的,但 WIG-1 是否能与 p63 及 p73 相结合进而发挥其功能尚有待进一步研究。

WIG-1 的 mRNA 在脑与睾丸组织中表达水平相似,而在肺、肾、脾脏经过全身 γ 射线照射后表达上调,其中原因有可能是 γ 射线照射能够激活上述组织中 p53 的表达。WIG-1 启动子有两个功能性的 p53 结合位点,使 WIG-1 可能具有 p53 依赖性转录调控功能,这也证明了 WIG-1 是一种善意的 p53 目的基因^[12]。WIG-1 与核糖体 RNA 相结合能干扰核糖体的合成,从而导致蛋白复制的抑制以及生长抑制,并最终导致细胞死亡,因此可能起到抑制肿瘤细胞增殖的作用^[12]。

4 Cys2his2 型锌指蛋白的功能

锌指蛋白是指含有通过结合 Zn^{2+} 稳定的短的可以自我折

叠形成“手指”结构的一类蛋白质,由于其自身的结构特点,可以选择性地结合特异的靶结构,使锌指蛋白在基因的表达调控、细胞分化、胚胎发育等生命过程中发挥重要作用。

根据锌指结构序列和功能的不同将其分为 9 大类,TFⅢA 锌指(Cys2his2),类固醇-甲状腺素受体(Cys8),GAL4 锌指(Cys6),环状锌指(Cys3HisCys4),逆转录病毒粒子(Cys2hisCys),LIM 锌指(Cys2hisCys5),GATA-1 锌指(Cys4),Nup475 锌指(Cys3His),requium 锌指(Cys4HisCys3)。根据锌指蛋白保守结构域的差异,又可以将其分为 C2h2 型(Krüppel 相关型)、C4 型和 C6 型等 3 个类群。根据锌指的空间结构来综合分类,认为每一种锌指都可以在 8 组不同的折叠群中找到相应的归类,其分类为:类 C2h2 锌指、高音谱号锌指、钢卷尺状锌指、箭口膨出状锌指、类 Zn2PCys6 锌指、类 TAZ2 锌指、锌结合短环锌指、金属硫蛋白锌指^[15]。

Cys2his2 型锌指蛋白的功能主要为两个方面:调控基因转录(即与核酸的相互作用)以及锌指蛋白之间的相互作用。Cys2his2 型锌指蛋白能特异性地识别 DNA,主要是由于其 DNA 结合域具有与 DNA 双螺旋互补的特殊表面结构,依靠其指型空间结构伸入到 DNA 双螺旋的大沟内,通过 α 螺旋与 DNA 碱基发生特异性接触^[16]。另外,Cys2his2 型锌指不仅能与 DNA 发生相互作用,也可以识别 RNA,如 TFⅢA 既可以与 5SrDNA 结合,也可以与该基因的转录产物 5SrRNA 结合形成 7S RNP 复合物^[16]。Cys2his2 型锌指蛋白还能与 DNA-RNA 杂交双链分子的特异性结合。转录激活因子 SP1 与 WIG-1 一样同属 Cys2his2 型锌指蛋白,SP1 主要通过调控富含 GC 启动子的基因表达,参与调节细胞功能,如细胞增生、凋亡、分化和肿瘤形成。近年来的研究表明锌指之间可以互相作用,锌指与锌指或锌指蛋白与锌指蛋白通过相互作用,能够识别更多不同的 DNA 或阻止锌指同 DNA 结合,进一步发挥调控基因转录的作用^[17]。

5 小结与展望

以往研究证实,3q25~27 区在包括肺鳞状细胞癌、头颈部鳞癌、宫颈癌、卵巢癌以及前列腺癌等多种人类恶性肿瘤中均存在异常扩增^[5],众多研究者相信在该区域极有可能筛选到可用于肿瘤基因诊断和治疗的候选分子。WIG-1 基因由于具有对细胞生长周期和凋亡的调控作用,加之其定位在 3q25~27 区,使得研究者相信 WIG-1 有可能是潜在的候选肿瘤标志物和基因治疗靶点。由于研究时间短,WIG-1 在恶性肿瘤发生发展中所起的作用及其分子机制还有待进一步研究。随着对 WIG-1 功能及其机制了解的不断深入,有望为 p53 介导的肿瘤抑制途径研究领域带来新的观点和突破。

参考文献:

- [1] Barkic M, Crnomarkovi S, Grabusic K, et al. The p53 tumor suppressor causes congenital malformations in Rpl24-deficient mice and promotes their survival[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(10):2489.
- [2] Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, et al. Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction[J]. *Mol Cell*, 2006, 24(6):841.
- [3] Leone M, Zhai D, Sareth S, et al. Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic bcl-2-family proteins[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(23): 8118.

- [4] Kim E, Deppert W. Transcriptional activities of mutant p53: when mutations are more than a loss[J]. *J Cell Biochem*, 2004, 93(5): 878.
- [5] Cristina MV, Magdalena P, Klas G, et al. The p53-induced WIG-1 protein binds double-stranded RNAs with structural characteristics of siRNAs and miRNAs[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(18): 4401.
- [6] Llorens CM, Daniel IS, Antonio FS, et al. MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells[J]. *Blood*, 2006, 107(10): 4109.
- [7] Garnett KE, Chapman P, Chambers JA, et al. Differential gene expression between Zucker Fatty rats and Zucker Diabetic Fatty rats: a potential role for the immediate-early gene *Egr-1* in regulation of beta cell proliferation[J]. *J Mol Endocrinol*, 2005, 35(1): 13.
- [8] Crown Human Genome Center, Department of Molecular Genetics, the Weizmann Institute of Science. Zinc finger, matrin type 3 [DB/OL]. 1996 (2010-1-11) [2010-2-23]. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=Zmat3>.
- [9] Hellborg F, Wiman KG. The p53-induced WIG-1 zinc finger protein is highly conserved from fish to man[J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(6): 1559.
- [10] Mendez VC, Wilhelm MT, Hellborg F, et al. The p53-induced mouse zinc finger protein WIG-1 binds double-stranded RNA with high affinity[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(9): 1991.
- [11] Xi Y, Edwards JR, Ju J. Investigation of miRNA biology by bioinformatic tools and impact of miRNAs in colorectal cancer-regulatory relationship of c-myc and p53 with miRNAs[J]. *Cancer Inform*, 2007, 31(3): 245.
- [12] Wilhelm MT, Mendez Vidal C, Wiman KG. Identification of functional p53-binding motifs in the mouse wig-1 promoter[J]. *FEBS Lett*, 2002, 524(1): 69.
- [13] Higashi YA, Sanuma MM, Iyazaki I, et al. The p53-activated gene, PAG608, requires a zinc finger domain for nuclear localization and oxidative stress-induced apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(44): 42224.
- [14] Issei I, Yasuhiro Y, Itaru S, et al. Identification of ZASC1 Encoding a Krüppel-like Zinc Finger Protein as a Novel Target for 3q26 Amplification in Esophageal Squamous Cell Carcinomas[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(15): 5691.
- [15] MacPherson S, Larochelle M, Turcotte B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70(3): 583.
- [16] Benjamin L. *Gene VIII* [D]. Oxford: Oxford University Press, 2000: 654.
- [17] O'Farrell TJ, Ghosh P, Dobashi N, et al. Comparison of the effect of mutant and wild-type p53 on global gene expression[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(22): 8199.

(收稿日期: 2009-08-10 修回日期: 2009-09-10)

• 综 述 •

肿瘤干细胞耐药机制及对策

孙芬芬 综述, 叶小群[△] 审校

(南昌大学第二附属医院呼吸科, 江西南昌 330006)

关键词: 肿瘤干细胞; 耐药机制; 对策

中图分类号: R730.53

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)05-0540-03

肿瘤治疗的障碍之一是出现多药耐药 (multidrug resistance, MDR), 多数化疗方案可以消灭大部分肿瘤细胞但始终缺乏从根本上铲除肿瘤的方法。对肿瘤多药耐药发生机制的研究和寻找开发逆转耐药的药物是当前肿瘤化疗研究的重要课题。近年来, 科学家陆续从实验中找到并分离出肿瘤干细胞而提出“肿瘤干细胞假说”, 这一假说为肿瘤治疗开拓了新思路。随着对肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs) 研究的深入, 发现 CSCs 和正常干细胞有很多相似之处, 如同样具有自我更新和分裂增殖能力、耐药、DNA 修复活性和抗凋亡等。其耐药性帮助 CSCs 抵抗化疗药物的毒性作用, 从而为肿瘤增殖和复发留下“种子”。本文就 CSCs 及其耐药机制相关研究进行综述。

1 CSCs 的概念

CSCs 的概念由 Lapidot 等在 1994 年首次提出, 认为在瘤体内存在类似于干细胞功能的一类细胞群体。将这类具有形成

肿瘤能力的细胞群体称为 CSCs。Bonnet 等首先分离出类似正常干细胞的白血病干细胞, 体外培养和动物实验证明其具有成瘤能力。实体瘤干细胞的分离最早是 2003 年 Al-Hajj 等从乳腺癌细胞中分离鉴定出具有干细胞类似生物学特性的细胞群体。采用类似的研究方法, 其他实体瘤 CSCs 也被陆续分离出来。

通过对多药耐药的长期研究, 研究人员已经找到了一群与肿瘤多药耐药相关的蛋白, 其中 ABC 转运蛋白被发现与 CSCs 密切相关。人类多药耐药基因 1 (MDR1 基因) 编码 P-糖蛋白 (P-gp/ABCB1), 其作用是作为各种抗癌药物外排泵。最近研究表明雌激素能下调乳腺癌耐药蛋白 (BCRP/ABCG2) 的表达和多药耐药基因转导 P-gp 的表达水平, 因此调节 P-gp 的表达水平在乳腺癌的治疗中可能是一种有效的策略^[1]。深入理解多药耐药的分子基础和开发临床试剂及治疗策略是防止耐药性发生的关键^[2]。

[△] 第三军医大学新桥医院呼吸科在读博士生。 △ 通讯作者, 电话: (0791)6300507; E-mail: yxq-li@tom.com。