

· 专题综述 ·

P53 基因在肿瘤治疗中的应用

徐朝阳, 谭石慈, 邢达

(华南师范大学激光生命科学研究所 中国广东 广州 510631)

摘 要:近年来研究表明, P53 基因是一个抑癌基因。同时, P53 还是一个重要的转录因子, 它在细胞周期调控, 抑制细胞生长, 诱导肿瘤细胞凋亡等方面起着至关重要的作用。P53 的结构功能和性质有了较全面的认识, 但其作用机理仍不清楚。本文主要就 P53 在肿瘤治疗中的作用机理的现状作一简要概述。

关键词: P53; 肿瘤治疗; 绿色荧光蛋白; 激光共焦显微镜

中图分类号: R73 - 36⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7146(2001)01-0071-05

Studying the Application of P53 Gene in Tumor Therapy

XU Chao - yang, TAN Shi - ci, XING Da

(Laser life science institute South china normal university Guangzhou 510631 Guangdong, China)

Abstract: More and more research indicate that P53 is a sequence-specific transcription factor, whose transcriptional targets induce growth arrest and apoptosis. So most scholars agree that P53 is a tumor suppressor gene. This paper mainly introduce the structure, function and action mechanism of the P53 gene.

Key words: P53; tumor therapy; GFP; LSCM

自从发现 P53 基因以来, 由于其在细胞周期调控, 抑制细胞生长, 诱导肿瘤细胞凋亡, 肿瘤治疗等方面的重要作用, 人们对 P53 基因的研究热情一直不减, 人们对 P53 的结构, 功能及其作用机理有了进一步的了解。

1 P53 的结构和性质

P53 基因位于人类 17 号染色体短臂上 (17P13), 大约长 2 万个碱基。P53 基因是一条 53KD 的由 393 个氨基酸组成的富含磷酸基的核蛋白 (因此命名为 P53)。P53 有 11 个外显子, 其 5 个决定野生型 P53 蛋白正常功能的进化保守区段分别位于 1、4、5、7 和 8 外显子上。由图 1 可知, P53 基因上包含有 2 个 DNA 结合区段、2 个 SV40 large tumor antigen 结合位点、一个核定位信息 (nuclear localization signal)、一个寡聚化区段 (oligomerization domain)、几个磷酸化位点 (phosphorylation site) 等。

从整体上, P53 可以分为三部分: P53 的 N 端 (1 ~ 43 氨基酸) 是转录活化区, 能与一系列的蛋白结构 (如 mdm2, TAF40, TAF60) 而调节 P53 的转录功能; P53 中部是 DNA 结合区, 能直接与 DNA 结合; P53 C 一端能调节 P53 与 DNA 结合的能力, 其本身还能非特异性地与 DNA 以及损伤后 DNA 直接结合。^[1]

2 P53 的功能及其作用机制

大部分学者认为^[2] P53 的主要功能之一是抑制细胞生长, 诱导细胞凋亡。在正常细胞里 P53 的表达量很低, 因此它不足以使细胞停止生长或死亡。然而当细胞受到某种损伤如 DNA 损伤或缺氧后, P53 蛋白量的表达急剧升高。P53 通过调控其下游基因如 P21wafi/cip 1 促使细胞停止在 G₁ 期, 让受损的细胞有足够的时间修复或发生凋亡。提示 P53 是一个重要的抑癌基因, P53 功能丧失是许多肿瘤发

收稿日期: 2000-10-02

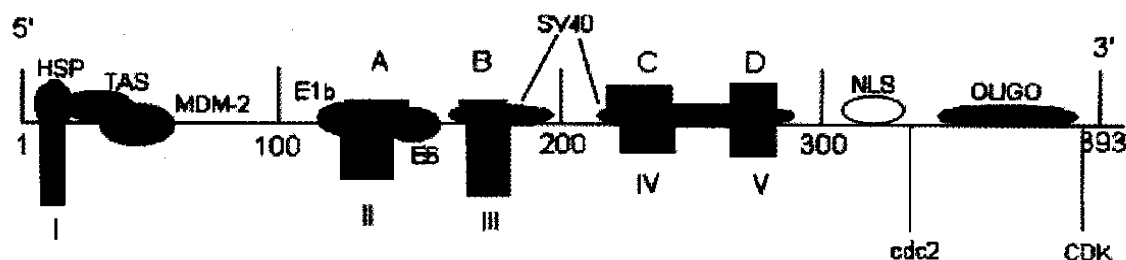


Fig. 1: Structural features of the P53 tumor suppressor gene.

The transcription activation site (TAS), heat shock protein binding site (HSP), SV40 large T antigen binding sites (SV40), adenovirus E1b and papillomavirus E6 binding sites, cellular Mdm2 binding site, nuclear localization signal (NLS), oligomerization domain (OLIGO) and phosphorylation sites (cdc2 and CDK). The five evolutionarily conserved domains are labeled HCD I-V and the hot spot regions are HSR A-D.

图 1: 肿瘤抑制基因 P53 的结构图。

包括转录活化位点 (TAS)、热激蛋白结合位点 (HSP)、SV40 大 T 抗原结合位点 (SV40)、腺病毒 E1b 和乳头瘤病毒 E6 结合位点、Mdm2 结合位点、核定位信息 (NLS)、寡聚化区域 (OLIGO)、磷酸化位点、5 个保守区域用 HCD I~V 表示, 突变热点区域用 HSR A~D 表示。

生的重要原因之一。据报导^[3], 在大约 200 多种不同的肿瘤中, 有 50% 的肿瘤带有 P53 基因突变。研究表明^[4,13], P53 基因的点突变大多数发生在 P53 蛋白中部的 4 个突变热点上 (见图 1, A~D), 使 P53 失去其与 DNA 结合的能力, 从而丧失其转录活化功能。

用转基因小鼠实验模型^[5], 近年来先后证实野生型 P53 基因注射后能引起头颈部肿瘤、前列腺癌、子宫颈癌及恶性黑色素瘤的消退, 而肿瘤的消长状况与细胞凋亡率密切相关, 这与野生型 P53 通过诱导细胞凋亡而抑制肿瘤发生的观点完全吻合。同时, 在另一些实验中发现了不同的现象^[6], 紫外线照射引起表皮细胞聚集大量突变的 P53 基因, 继而诱导皮肤癌的体内转基因小鼠模型表明: 照射过的表皮细胞与正常小鼠的凋亡代谢动态趋势相一致。因此, 许多学者根据凋亡细胞中是否有变性 P53 蛋白将肿瘤分为 P53 基因依赖型及非 P53 基因依赖型。

现在越来越多实验表明 P53 是以一个转录因子的身分来发挥其众多的重要作用的。DNA 的复制与修复, 细胞生长周期调控及诱导凋亡都是非常复杂的生理现象, P53 不可能单独完成如此艰巨的任务。从生物的整体论和系统论来看, P53 也应该是与其它组分互相协调共同完成各项生理活动。

许多实验表明^[7], P53 在不同条件和状态下表现出不同的功能, 甚至表现出相反的功能提示 P53 的作用过程及作用机理的复杂性。一些学者对 P53 结构的研究表明: P53 蛋白分子存在许多功能团, 在

不同的条件和状态下, 不同的功能团能与不同的物质结合或相互作用, 从而使 P53 的质或量发生改变而表征出不同的功能, 进而调控与细胞生长或凋亡密切相关的一些靶基因转录水平。分子量为 19KD 的 Gadd45 是最早发现的 P53 信号链下游基因之一。体内外实验皆表明^[9], P53 诱导的 Gadd45 能明显延长单核型白血病细胞、大肠癌细胞的细胞生长周期。P21 蛋白由 Cip 1 基因编码, 也是早期报导的 P53 转录作用的靶基因之一。它能抑制细胞周期素依赖的蛋白激酶活性从而延长细胞周期, 具有抑制肿瘤细胞生长的活性。当然 P21 蛋白的调控还有其它途径 (Makri D. 等称之为非 P53 依赖途径)。P53 在 bcl-2 蛋白家族依赖的细胞凋亡/存活通路中具有重要作用, 它可直接下调 Bcl-2 基因的表达, 在转录水平激活 Bax 的表达, 影响凋亡。^[10]

Martin Bennett 等人研究表明^[10], P53 诱导凋亡可通过转录激活依赖机制及非转录激活依赖机制。这暗示着诱导生长抑制或凋亡时 P53 在结构和功能上有区别。同时, 他们还发现, 通过使细胞质死亡受体 (death receptor) 在细胞表面重新分布, P53 的活化能调节细胞对凋亡的敏感性。P53 功能缺失的肿瘤细胞能逃避由 P53 转录靶目标和 FasL 诱导的凋亡。死亡受体的分子间隔离可引起细胞对凋亡的抵抗, 及对肿瘤化学疗法药物的敏感性下降。相反, 基于死亡受体在细胞表面重新分布的疗法能通过内源配体促进凋亡。

另据报道, 在人类平滑肌细胞中, 激活 P53 可使

CD95 受体表达增加,促进凋亡。P53 还可以诱导 CD95 与 FADD 结合,致敏 CD95 诱导的细胞凋亡途径,表明 P53 介导的细胞凋亡是通过 CD95 传导信号的。

近期研究表明^[14],P53 不但参与了细胞 G₁ 期调控点的调控,还参与了 G₂/M 调控点的调控。当用抑制纺锤体形成的药物处理细胞后,细胞周期停滞在 G₂ 期;而野生型 P53 不存在的情况下,这些细胞又重新开始 DNA 复制,使细胞内染色体数目增加。提示 P53 可能参与 G₂/M 转换调控,防止细胞增殖。

3 以 GFP 为报告基因,活体状态下利用 LSCM 初探 P53 功能及其作用机理

Knippschild U 等人^[11]利用 LSCM 观察发现,GFP-CKI delta 和 GFP-CKI epsilon (delta and epsilon isoforms of casein kinase I 简称 CKI delta 和 CKI epsilon,CKI delta 和 CKI epsilon 分别接上 GFP 后为 GFP-CKI delta 和 GFP-CKI epsilon)融合蛋白的过量表达导致 P53 N 末端的过度磷酸化。CKI delta 和 CKI epsilon 与 P53NK(P53-N-terminus-tergeted protein kinase)一样特异催化 P53 磷酸化。磷酸化的 P53 是 P53 具有功能时的状态。提示 CKI delta、CKI epsilon 和 P53NK 都能通过改变 P53 磷酸化状态和程度从而调控 P53 的功能。

He P,Tang Z 等人^[12]用 PEGFP-N1 和 PEGFP-P53 分别转染 MHCC97 细胞系(一种 P53 突变的人类高代谢肝癌细胞系)并利用 LSCM 观察发现,用 PEGFP-N1 转染成功的 MHCC97 细胞,绿色荧光散布整个细胞,而用 PEGFP-P53 转染成功的 MHCC97 细胞,绿色荧光集中于细胞核。提示肿瘤抑制因子 P53 功能作用场所是在细胞核里。只有移位于核内的 P53 才能发挥作用,诱导 P21/CIP1/WAF1、mdm2、GAAD45、cyclin、Bax、IGF-BP3 的表达。

在人类肿瘤中,除了最常见的突变导致 P53 功能缺失外,野生型 P53 蛋白的细胞质湮灭(cytoplasmic sequestration)也能使野生型 P53 不能发挥功能。分析显示,人类胸癌细胞中除了突变使 P53 功能缺陷外,有 37% 的胸癌细胞的胞质含有野生型 P53(胞核中没有野生型 P53 蛋白)。表明细胞质湮灭机制是通过排除 P53 于核外而抑制 P53 功能。另据报导,野生型 P53 的细胞质湮灭也发生在成神经细胞瘤(neuroblastoma)、结肠癌细胞中。

Shur-Hsin Liang 等人^[11]用绿色荧光蛋白作为报告子分析 P53 的亚细胞定位。他们利用含有 P53-GFP 的质粒转染 MCF-7 胸癌细胞和 RKO 结肠癌细胞(这两个细胞系含有野生型 P53 并能容忍外源 P53 的表达)。利用激光共聚焦显微镜观察到:在大部分细胞中,P53 仅位于细胞核或同时位于胞核和胞质中(Fig2B. a, b);有一小部分细胞 P53 仅位于胞质中。然而,Lys-305 突变为 Ala 时导致 P53 的细胞质湮灭(cytoplasmic sequestration),而且 Lys-305 被 Ala、Asn、Gu、Thr 替代后,观察到了 P53 被排除在胞外(Fig2B. e)。这表明 Lys-305 在涉及 P53 核定位事件中起着特殊的作用。

Shur-Hsin Liang 等人^[11]用绿色荧光蛋白作为报告子对远离主要的 NLS 的 Lys-305 突变 P53 (P53 K305N) C 末端的一系列删除试验(Fig2A)发现 P53 K305N356~393(删去 C 末端 356~393 号氨基酸的 Lys-305 突变的 P53)定位于细胞质,而 P53 K305N351-393 失去细胞质湮灭的能力并散布于胞质和胞核中(Fig2B. f, g)。同时,他们还发现删除任一 326-350 间氨基酸就完全废除了 P53 K305N 的细胞质湮灭(Fig2B. h)。这表明 P53 中 326~355 间的氨基酸对于 Lys-305 突变的 P53 细胞质湮灭(cytoplasmic sequestration)是必需的。

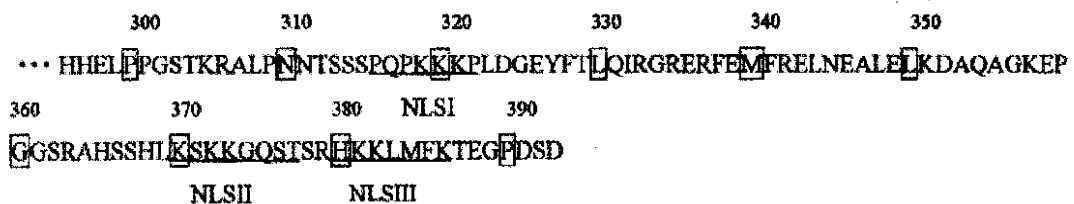


Fig. 2 A. , The C-terminal amino acid sequences of the human P53 protein. The nuclear localization signals(NLS) are underlined.

图 2A,人 P53 蛋白 C 末端氨基酸序列。下画线表示核定位信息(NLS)。

Lys-305 不但影响 P53 的细胞定位,而且和 CSD (cytoplasmic sequestration domain,位于 P53C 末端 326

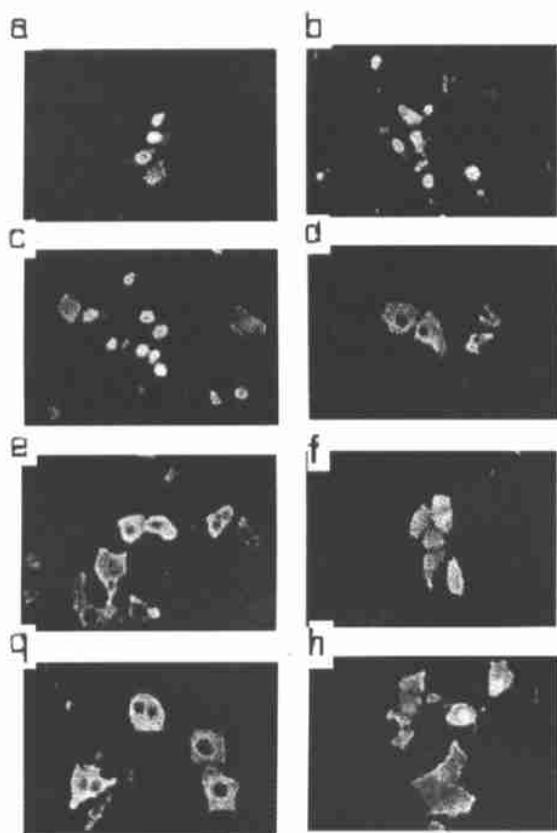


Fig. 2B. Alternations in the subcellular localization of mutated P53 proteins. Fluorescent pictures showing different subcellular localization between wild-type and mutated P53/GFP fusion proteins using LSCM.

Distribution of wild-type P53/GFP in MCF-7 and RKO cells is shown in (a) and (b), respectively. MCF-7 cells were transfected with the fusions including P531-300 (c), P531-305 (d), P53 K305N (e), P53 K305N356-393 (f), P53 K305N351-393 (g) and P53 K305N326-335 (h). The fluorescence was examined at 48 h after transfection.

图 2 B. 突变型 P53 蛋白的亚细胞定位。

用 LSCM 观测到的荧光图像显示,野生型和突变型 P53-GFP 融合蛋白的亚细胞定位不同。a 和 b 分别表示野生型 P53/GFP 在 MCF-7 和 RKO 细胞中的分布。不同的突变型 P53 (P531-300 (c), P531-305 (d), P53 K305N (e), P53 K305N356-393 (f), P53 K305N351-393 (g) 和 P53 K305N326-335 (h) 与 GFP 融合蛋白在 MCF-7 细胞中的表达。

~355) 相互作用。只有在 Lys-305 突变的情况下, CSD 才能发挥作用。Lys-305 虽然不是 P53 蛋白的 5 个保守区域,但它也是一个非常保守的位点(从人到 Xenopus 的 Lys-305 都是保守的)。研究表明,与 P53 亚细胞定位直接相关的是 NLS (nuclear localization

signals. 位于 P53 C 末端)。特别是 NLSI,它是 P53 进入胞核的最重要的作用因子。核蛋白入核受体——入核蛋白(importin)将结合于 P53 的 NLSI 位点。因此,NLSI 必须易于接近 importin 以便核蛋白转移的进行。Lys-305 正好位于易于帮助 importin 结合到 NLSI 上的位点,Lys-305 的突变对 P53 的入核有着负面影响。同时,Lys-305 影响 CSD 的状态,没有 Lys-305,CSD 就会严重地掩盖 NLSI 的功能。

4 P53 在肿瘤研究和治疗中的应用现状和前景

现已发现人类肿瘤有一半以上伴随着 P53 蛋白功能的缺失,引起 P53 蛋白功能的缺失主要是由 P53 基因的错义突变、无义突变、缺失或 P53 蛋白三维结构的破坏^[1]。近年来,许多实验证明野生型 P53 基因导入肝癌,头颈部肿瘤,前列腺癌,子宫颈癌和恶性黑色素瘤等肿瘤后能引起肿瘤的消退,细胞凋亡率上升,提示野生型 P53 基因对 P53 基因依赖型肿瘤有治疗作用^[5]。P53 基因对 P53 基因依赖型肿瘤的治疗有着诱人的前景。不过,外源 P53 基因在治疗中对正常组织细胞有负作用。有研究表明^[1],P53 在癌症治疗中的作用不局限于杀死肿瘤细胞。在鼠中,P53 基因在许多正常组织中(包括淋巴和造血组织,肠上皮细胞,睾丸等)都有高效表达,而这些组织正是在用 P53 进行抗癌治疗中被损坏的组织,射线照射后,在敏感组织中迅速出现 P53 依赖型凋亡。相对于野生型 P53 小鼠,P53 缺陷的小鼠能存活于更高剂量的射线中。这表明,P53 中抗癌治疗中毒性副作用的决定因素。

References

- [1] Shun - Hsin Liang, David Hong, and Michael F, et al. Cooperation of a Single Lysine Mutation and a C-terminal Domain in the Cytoplasmic Sequestration of the P53 Protein[J]. J Biol Chem, 1998, 273(31):19817~19821.
- [2] Kastan M. B, Onyekwere O, Sidransky D et al. Participation of P53 protein in the cellular response to DNA damage[J]. Cancer Res, 1991, (51):6304~6311.
- [3] Oren M. P53, the ultimate tumor suppresser gene [J]. FASEB J. 1992(6) 3469.
- [4] Lane D P. P53, guardian of the genome[J]. Nature, 1992;358:15~16.
- [5] Liu T J, El Nagger A K, J, et al. Apoptosis induction mediated by wild type P53 abenoviral gene transfer in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. Cancer Res, 1995, 55:3117.
- [6] Li G, Manning A M, Hanlon K A, et al. Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumor cell lines in a P53 independent

- dent pathway implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large bowel cancer [J]. *Int. J. Cancer*, 1993, 55:498.
- [7] Midgley C A, Owens B, et al. Coupling between gamma irradiation, P53 induction and the apoptotic response depends upon cell type in vivo [J]. *J. of Cell Science*, 1995, 108:1843.
- [8] Makri D, Schuly W A, et al. WAF1/p21 regulates proliferation, but does not mediate p53-dependent apoptosis in urothelial carcinoma cell lines. [J]. *Int. J. Oncol.* 1998, 12(3):621.
- [9] Smith M L, Chen I T, Zhan Q M, et al. Interaction of the p53 up-regulate protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen [J]. *Science*, 1994, 266:1376.
- [10] Martin Bennett, Kirsty Macdonald, Shiu - Wan Chan, et al. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis *Science*, 1998, 282(5387):290.
- [11] Knippschild U, Milne DM, Campbell LE, et al. P53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1 delta in response to topoisomerase-directed drugs [J]. *Oncogene* 1997 Oct 2; 15(14):1727~1736.
- [12] He P, Tang Z, Ye S, Liu B. The expression and localization of wild-type p53-GFP fused gene on human high metastasis hepatocellular carcinoma cell line [J]. *Chung Hua Kan Tsang Ping Tsa Chih* 2000 Apr 20; 8(2):105~107.
- [13] Paxel G, Komarov, Elena A. Komarova, et al. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy [J]. *Science*, 1999, 9; 285(5434):1733~1737.
- [14] F. Bunz, A. Dutriaux, C. Lengauer, et al. Requirement for p53 and p21 to Sustain G₂ arrest after DNA damage [J]. *Science*. Volume 282, pp. 1497~1501



作者简介

徐朝阳:男,1976.1.13。1995~1999年华南师范大学生物系学士;1999.9至今攻读华南师范大学激光生命科学研究所硕士学位,师从谭石慈副教授和邢达教授。

Biography

XU Chao - yang: male, born in 1976, got the Bachelor degree from South China Normal University in 1999. Now he is studying for Master degree in institute of laser life science of the same university. Tutor is professor TAN Shi - ci and professor XING Da.

E-mail: XUCY@scnu.edu.cn