

# 非典型E2F转录因子对细胞周期的调控及其功能

漆倩荣 杨增明\*

(汕头大学生物系, 汕头 515063)

**摘要** E2F家族转录因子是细胞周期调控网络中的重要环节之一,对细胞的增殖、分化和凋亡进行调节,并参与多种生理和病理过程。近年来,关于哺乳动物中E2F转录因子的生物学作用研究取得了很大进展,并鉴定出两个非典型的E2F家族成员:E2F7和E2F8。与典型的E2F转录因子相比,非典型E2F蛋白结构中含有两个相同的DNA结合域,对靶基因转录的调控不依赖于二聚化蛋白。非典型E2F蛋白进入细胞核后,通过与经典的E2F靶基因启动子结合,发挥转录抑制作用并调节细胞周期的进程,从而对细胞的大小、多倍化、增殖、分化和凋亡进行调控。随着基因敲除模型的建立和完善,使得进一步研究非典型E2F转录因子在不同组织或器官中的生物学作用成为可能。非典型E2F在胚胎发育、血管发生及造血系统中均发挥重要作用。另外,肿瘤细胞中典型E2F和非典型E2F的表达比例发生改变,说明非典型E2F成员还参与肿瘤的发生发展。该文综述了近年来关于非典型E2F转录因子的表达、调节及其生理病理作用的研究进展。

**关键词** E2F 转录因子; 多倍化; 增殖; 凋亡

## Atypical E2F Transcription Factors Contributed to Cell Cycle Regulation

Qi Qianrong, Yang Zengming\*

(Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China)

**Abstract** E2F transcription factors are important elements in cell cycle regulatory network that regulate cell proliferation, differentiation and apoptosis, consequently involved in many physiological and pathological processes. The biological function of E2Fs has been widely investigated in mammals. The recent identified atypical E2F family members of E2F7 and E2F8 in mammals develop a new insight of cellular E2Fs function. Compared to the typical E2Fs, atypical E2F proteins have the duplication of DNA-binding domain and regulate gene expression independent of dimerization partner protein. Nuclear localized atypical E2F proteins act as transcription inhibitory factors on typical E2F-driven target genes and modulate cell cycle progression, and play a crucial role in cell size determination, polyploidization, cell proliferation, differentiation and apoptosis. The establishment and improvement of knockout mice model make it possible for us to study the physiological function of atypical E2Fs in specific tissues and organs. Atypical E2Fs function in regulating embryonic development, angiogenesis and hematopoiesis. In addition, change of the expression levels of typical E2Fs and atypical E2Fs correlates with tumorigenesis in humans. This review summarized the latest advances in the studies on expression, regulation and function of atypical E2F transcription factors in physiological and pathological processes.

**Key words** E2F transcription factors; polyploidization; proliferation; apoptosis

收稿日期: 2014-02-12 接受日期: 2014-03-19

\*通讯作者: Tel: 020-85282010, E-mail: zmyang@scau.edu.cn

Received: February 12, 2014 Accepted: March 19, 2014

\*Corresponding author: Tel: +86-20-85282010, E-mail: zmyang@scau.edu.cn

网络出版时间: 2014-07-01 15:42 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0036.html>

E2F家族蛋白作为一类重要的转录因子,普遍存在于高等真核生物中,包括哺乳动物、蠕虫、果蝇和植物等,在进化上具有保守性<sup>[1-4]</sup>。在哺乳动物中,已经鉴定出六个典型的E2F转录因子,其蛋白结构主要包括二聚化结构域(dimerization domain)和高度保守的DNA结合域(DNA-binding domain, DBD)。E2F蛋白通过二聚化结构域与二聚化(dimerization partner, DP)蛋白形成异源二聚体,从而使E2F/DP能够进入细胞核并获得与特异性DNA序列结合的能力<sup>[5]</sup>; DBD能够与特异性的DNA序列结合,对靶基因的转录进行调节<sup>[6]</sup>。典型E2F转录因子对细胞增殖相关基因的转录调节与视网膜母细胞瘤(retinal blastoma, RB)家族蛋白紧密相关, RB蛋白通过与E2F蛋白的反式激活结构域结合,抑制E2F分子的转录活性<sup>[7]</sup>。根据E2F蛋白对基因转录的调节作用,将其分为转录激活型(E2F1-E2F3)和转录抑制型(E2F4-E2F6)。激活型E2F转录因子主要调控细胞周期过程中的G<sub>1</sub>-S期转换,使细胞进入S期<sup>[8]</sup>。E2F4和E2F5通过募集囊蛋白(pocket proteins)以及组蛋白修饰酶,抑制E2F靶基因的表达<sup>[9-10]</sup>。E2F6蛋白结构中缺乏与RB蛋白结合的反式激活结构域,因此其转录抑制作用不依赖于RB蛋白<sup>[11]</sup>。E2F1<sup>-/-</sup>E2F2<sup>-/-</sup>E2F3<sup>-/-</sup>三敲除(E2F<sup>1-3</sup>-TKO)小鼠的胚胎成纤维细胞不能进入S期及进行有丝分裂,并且E2F靶基因表达明显下调<sup>[12]</sup>。但后来的研究发现, E2F<sup>1-3</sup>-TKO的小鼠胚胎干细胞、胚胎和小肠细胞表现为正常的细胞分裂过程。正在分化的细胞中, RB蛋白与E2F1-E2F3结合从而抑制

E2F靶基因的表达,并使细胞退出细胞周期。分化细胞中RB蛋白失活后,则使E2F1-E2F3从转录抑制因子转变为转录激活因子,从而促进靶基因的表达和细胞分裂过程,说明E2F分子的转录激活或抑制作用取决于细胞的增殖或分化状态,从而调控各种细胞的增殖及分化过程<sup>[13]</sup>。

近年来通过基因组分析,在哺乳动物、果蝇和植物中均发现了一类新的E2F转录因子,根据其特殊的结构特点,定义为非典型E2F转录因子<sup>[14-15]</sup>。哺乳动物中已鉴定出两个非典型E2F转录因子(E2F7和E2F8)(图1)。与典型的E2F蛋白相比,非典型E2F蛋白在结构、功能和作用机制上有着明显的差异<sup>[16-17]</sup>。目前对小鼠敲除模型及人类肿瘤的研究,已经确定非典型E2F转录因子参与了哺乳动物胚胎发育、细胞增殖、分化、凋亡以及肿瘤发生等过程。本文对近年来关于非典型E2F转录因子在哺乳动物中的生理及病理作用进行了综述。

## 1 非典型E2F转录因子的结构特点

在对拟南芥基因组进行测定时,发现还存在一类与典型E2F分子结构不同的E2F转录因子,并命名为DP-E2F-Like(包括DEL1、DEL2及DEL3)<sup>[18-19]</sup>。在筛选人类和小鼠中E2F调节的靶基因时,也发现了不同于典型E2F家族成员的转录因子,并命名为E2F7,其蛋白结构与拟南芥中鉴定的DEL蛋白相似<sup>[17]</sup>。后来又鉴定出另一个非典型E2F家族成员并命名为E2F8。E2F8的结构与E2F7相似,并且E2F7和

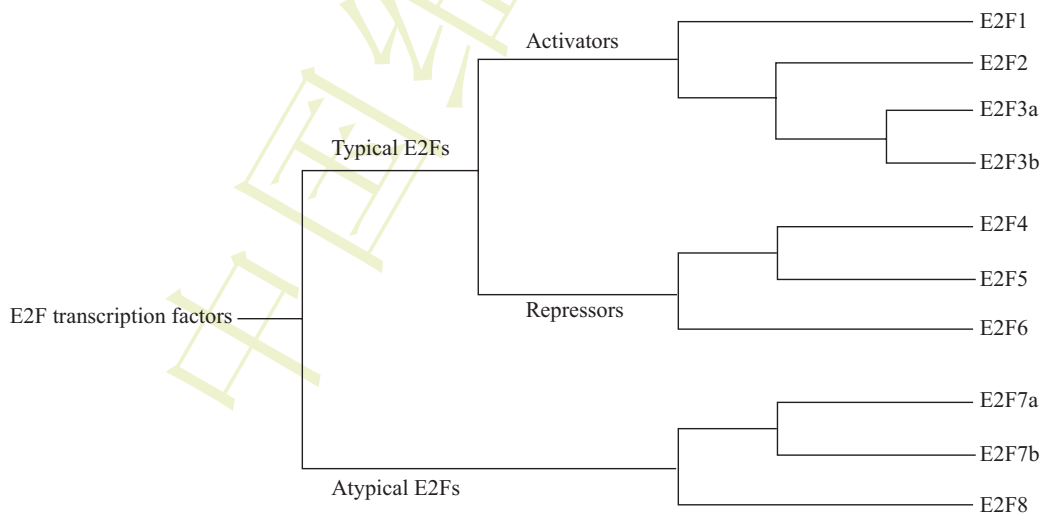


图1 哺乳动物E2F家族转录因子进化分支图谱

Fig.1 Phylogenetic tree of mammalian E2F family

E2F8可能以协同作用的方式共同参与细胞增殖的调控过程<sup>[16,20]</sup>。

在蛋白结构上, 典型的E2F家族分子中含有一个高度保守的DBD和一个二聚化结构域, 而非典型E2F蛋白的结构特点是具有两个DBD<sup>[21-23]</sup>。另外, E2F1-E2F5的蛋白结构中还含有能够与RB蛋白结合的保守性反式激活结构域, 而E2F6-E2F8蛋白中不存在这种结构。非典型E2F蛋白第二个DBD中也含有DNA结合区域与二聚化结构域。为验证非典型E2F蛋白是否能与DP蛋白形成二聚体, 在细胞中同时过表达带有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的DP蛋白(DP-GFP)和E2F1, 可在细胞核内观察到DP-GFP的信号, 说明E2F1与DP蛋白结合后进入细胞核发挥转录调节作用。然而同时过表达DP-GFP和E2F7发现, DP-GFP信号仍位于细胞质中, 说明非典型E2F蛋白进入细胞核并不需要与DP结合<sup>[22]</sup>。通过对E2F7和E2F8立体结构的分析, 证实其蛋白中两个DBD的空间位置与E2F/DP二聚体中DBD和二聚化蛋白之间的位置相似。推测非典型E2F蛋白的第二个DBD在结构上可能与E2F/DP二聚体形成的DNA结合表面相似, 可替代二聚化蛋白促进E2F7和E2F8与特异性DNA序列结合<sup>[15]</sup>。但从进

化的角度, 目前尚未确定非典型E2F是由典型的E2F基因复制而来, 或是由于非典型的E2F发生DBD丢失而形成典型E2F蛋白(图2)。

尽管含有两个DBD, 但非典型E2F基因敲除后可导致典型E2F靶基因的上调, 说明非典型E2F蛋白主要作为转录抑制因子。E2F7和E2F8可竞争性地与激活型E2F的靶基因结合, 从而抑制典型E2F分子的转录激活作用<sup>[24]</sup>。另外, 非典型E2F分子中缺乏与RB蛋白结合的反式激活结构域, 因此非典型E2F蛋白的转录活性不依赖RB信号通路<sup>[25]</sup>。通过构建GFP报告载体证实E2F7和E2F8蛋白主要定位在细胞核。所有的E2F家族蛋白中均含有核定位序列(nuclear localization signal), 然而典型E2F蛋白只在N端含有一个核定位序列, 而非典型的E2F蛋白在C端含有一个双向的核定位序列, 但这种结构上的差异在功能上的意义尚不明确<sup>[16,26]</sup>。在人细胞中, E2F7和E2F8可形成同源或异源二聚体, 其中以E2F7同源二聚体形式为主, 其次是E2F7/E2F8异源二聚体, 最后是E2F8同源二聚体。E2F7<sup>+/-</sup>E2F8<sup>-/-</sup>敲除鼠(可形成E2F7同源二聚体)表现为正常表型, 而E2F7<sup>-/-</sup>E2F8<sup>+/-</sup>小鼠(只存在E2F8同源二聚体)在出生后存在发育缺陷<sup>[27]</sup>。E2F7和E2F8二聚体的形成依赖蛋白分子中

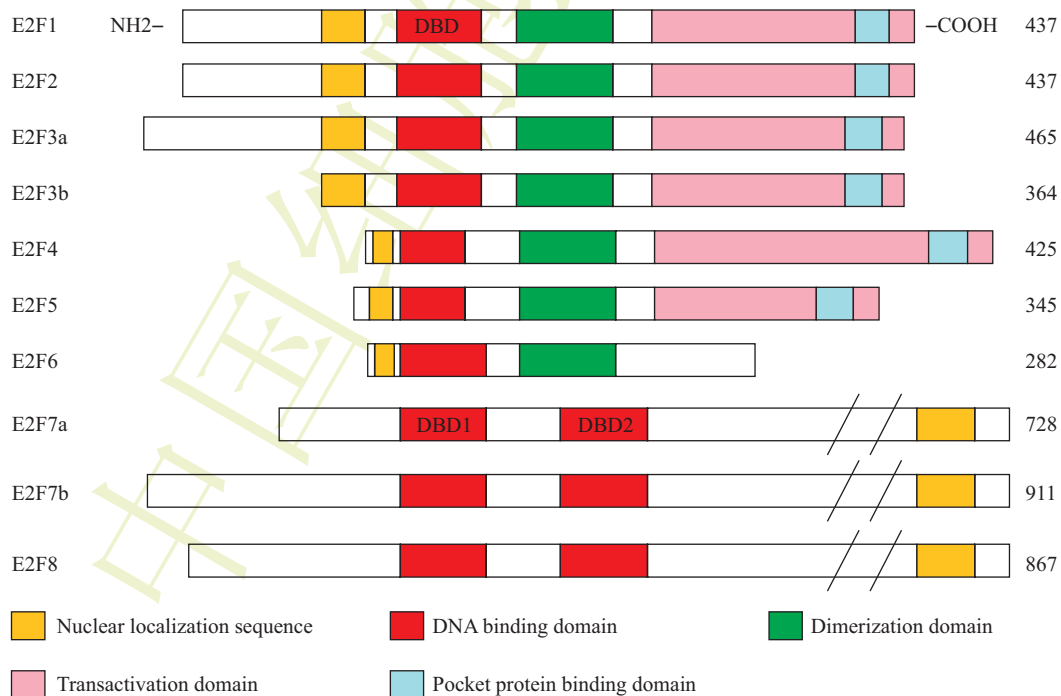


图2 哺乳动物E2F家族蛋白结构示意图

Fig.2 The protein structure of mammalian E2F family



DBD结构的完整性, E2F7和E2F8分子中任意一个DBD的结构发生突变, 都可导致与靶基因的结合发生故障<sup>[28]</sup>。

## 2 非典型E2F转录因子的转录调节

激活型E2F转录因子的表达受细胞周期的影响, 主要在G<sub>1</sub>~S期转换时高表达, 而典型的抑制型E2F分子在整个细胞周期中表达不变。非典型E2F基因的表达具有细胞周期依赖性, E2F7和E2F8的转录在G<sub>1</sub>~S期转换时被激活, E2F7和E2F8的mRNA水平在S~G<sub>2</sub>期达到高峰<sup>[29]</sup>。作为典型E2F蛋白的靶基因, 非典型E2F基因的表达主要受RB/E2F/DP信号通路的调节。在HeLaS3细胞中, 抑制RB-E2F信号通路可上调E2F7和E2F8的表达。另外, 非典型E2F启动子上含有E2F结合位点, 染色质免疫共沉淀(ChIP)结果显示, E2F1/3/4/7可结合在E2F7和E2F8的启动子上<sup>[17,20]</sup>。哺乳动物中E2F7和E2F8的表达模式相似, 在小鼠胚胎发育过程中, E2F7和E2F8在妊娠中期的胚胎和胎盘中高表达; 小鼠成年之后, 主要在皮肤和胸腺中高表达, 其次是脾脏、小肠和睾丸。因此, 哺乳动物中非典型E2F基因主要在增殖性组织中表达<sup>[27]</sup>。尽管E2F7和E2F8是作为E2F1的靶基因发现的, 但E2F7和E2F8也可结合在E2F1的启动子上, 对E2F1的转录进行调控。作为E2F7和E2F8的靶基因, E2F1在细胞周期中的表达与E2F7和E2F8的表达呈互补模式, E2F7和E2F8同时敲除可改变E2F1在细胞周期中的表达模式<sup>[27]</sup>。因此, 在E2F转录因子调控网络中, 典型E2F与非典型E2F的转录调节存在复杂的反馈系统, 主要受到细胞周期进程的调控。

## 3 非典型E2F转录因子的生物学功能

### 3.1 非典型E2F转录因子对细胞有丝分裂周期的调控

E2F家族转录因子主要参与调节细胞周期相关基因的表达, 对细胞增殖、凋亡、分化和DNA修复进行调控。典型的E2F蛋白主要调节与DNA复制、合成相关基因的表达, 参与细胞周期中G<sub>1</sub>~S期和G<sub>2</sub>~M期的转换过程, 从而促进细胞周期的进程<sup>[30]</sup>。非典型E2F分子主要在增殖性组织中表达, 可能与典型E2F分子一起参与细胞周期的调控, 尤其是细胞增殖过程。例如, E2F7在S期的中期和末期高表达, 并结合在G<sub>1</sub>~S期相关基因的启动子上, 抑制基因的

转录。染色体免疫共沉淀测序(ChIP-seq)分析发现, E2F7识别的特异性DNA序列为TTC CCG CC, 与典型E2F识别位点相似。E2F7可结合到89个靶基因的启动子上行使转录抑制调节, 其中大部分的基因为激活型E2F蛋白的靶基因, 并参与了DNA复制和修复过程。另外, 在G<sub>0</sub>~G<sub>1</sub>~S期诱导E2F7的表达可将细胞阻滞在S期, 并造成DNA损伤。然而在G<sub>2</sub>~M期诱导E2F7表达对细胞周期进程不会造成影响。因此, E2F7在细胞周期中的作用可能是抑制G<sub>1</sub>~S期相关基因的表达, 从而使细胞离开S期<sup>[31]</sup>。E2F7和E2F8功能缺失可导致滋养层巨细胞的DNA复制过程异常。通过基因表达谱和ChIP分析显示, 大部分E2F7和E2F8的直接靶基因在功能上参与了细胞周期的调控, 尤其是G<sub>1</sub>~S转换时期的DNA复制过程<sup>[15]</sup>。以上结果说明, 典型与非典型E2F转录因子共同参与了正常细胞的有丝分裂过程。

### 3.2 非典型E2F转录因子对细胞核内复制周期的调控

有丝分裂普遍存在于哺乳动物的发育过程, 是产生体细胞的主要机制, 但在发育过程中, 部分增殖细胞将退出细胞周期并分化成为特化细胞而发挥特殊的功能<sup>[32]</sup>。细胞退出有丝分裂周期常伴随着细胞周期的改变, 其中包括核内复制周期。核内复制周期的特征是细胞只在S期和G期之间转换, 而不进入分裂期, 经过多次基因组复制过程, 细胞内DNA含量显著上升, 产生多倍体细胞。最初在植物中观察到核内复制的过程, 后来在多细胞动物中也证实存在核内复制。在哺乳动物中, 核内复制通常发生于一些特定的组织或器官中, 形成多倍体细胞, 例如胎盘、肝脏和巨核细胞<sup>[33]</sup>。核内复制的生理作用目前尚不明确。在植物中, 核内复制可能是决定细胞大小的主要机制<sup>[34]</sup>。核内复制周期可能是为了满足细胞代谢需求的增加, 并参与细胞对DNA应激的耐受过程。由于发生核内复制的细胞含有更多的基因拷贝数, 因此能够更好地抵抗有害突变和凋亡, 促进遗传多样性及肿瘤发生等过程<sup>[35-36]</sup>。

所有的哺乳动物在发育和衰老的过程中均会发生程序性多倍化, 滋养层巨细胞(trophoblast giant cell, TGC)是发育过程中最早进行核内周期及形成多倍体的细胞。TGC开始形成于第4.5 d的胚胎时期, 通过连续的DNA复制, 而不进行细胞核分裂或胞质分裂, 其基因组含量可达到1 000 C以上<sup>[37]</sup>。由于E2F

家族转录因子是调节细胞周期的主要因素, 更多的研究关注了E2F基因在哺乳动物核内周期中的生理作用。小鼠胎盘TGC中E2F1和E2F2的mRNA在整个胎盘发育阶段表达较低, 但E2F3在第8.5~13.5 d的胎盘表达较高, 在胎盘发育过程中, E2F7和E2F8在TGC中均有表达, 并且E2F7和E2F8蛋白定位在部分TGC的细胞核中。最近通过条件性敲除模型, 对典型的激活型E2F转录因子和非典型E2F转录在哺乳动物细胞多倍化过程的作用进行了研究。在TGC中将典型的激活型E2F(E2F1-E2F3)敲除后(E2F<sup>1-3</sup>TKO), 表现为多倍体细胞比例增加。而将两个非典型E2F基因同时敲除后(E2F7<sup>-/-</sup>E2F8<sup>-/-</sup>), 则表现为多倍体细胞比例下降, 并且E2F7<sup>-/-</sup>E2F8<sup>-/-</sup> TGC的DNA含量不会超过64C。与正常组织相比, E2F7<sup>-/-</sup>E2F8<sup>-/-</sup>组织中上调的基因明显多于下调的基因, 说明E2F7和E2F8对靶基因的转录主要起抑制作用。另外, E2F7和E2F8表达缺失可导致G<sub>2</sub>~M期(*cyclin A2*)和M期(*cyclin B1*)特异性表达的基因上调, 并且大部分TGC表现为分裂中期或分裂后期<sup>[38]</sup>。

啮齿类动物的肝脏细胞在断奶后即启动多倍化过程, 多倍体肝细胞的比例随着年龄的增长而增加<sup>[39]</sup>。在肝细胞中, E2F1和E2F2的表达在胚胎发育阶段较高, 出生后逐渐下降, E2F3在出生后表达逐渐下降, 断奶后不表达。而E2F7和E2F8在断奶之后即开始表达。与TCG相似, 在肝细胞中将E2F1特异性敲除(E2F1<sup>-/-</sup>)后, 表现为多核肝细胞比例增加, 而同时将E2F7和E2F8特异性敲除(E2F7<sup>-/-</sup>E2F8<sup>-/-</sup>)则呈现相反的表现。检测发现, E2F7和E2F8表达缺失可使典型E2F靶基因的表达增加, 促进细胞的有丝分裂和增殖过程, 从而抑制了肝细胞的多倍化过程<sup>[38]</sup>。另外, 同时敲除E2F1可恢复E2F7<sup>-/-</sup>E2F8<sup>-/-</sup>小鼠肝细胞中多倍体细胞的比例<sup>[38,40]</sup>。尽管目前关于多倍体细胞的生物优势尚不明确, 肝细胞中特异敲除E2F7及E2F8的小鼠在肝功能、肝细胞再生等方面与正常小鼠无明显差异, 但非典型E2F蛋白参与了哺乳动物细胞的多倍化过程(图3)。

### 3.3 非典型E2F转录因子在细胞增殖、分化和凋亡中的作用

E2F7和E2F8作为E2F1的靶基因, 同时也可调节E2F1的转录, 发挥转录抑制作用, 说明E2F家族分子中存在负反馈调节。在G<sub>1</sub>~S期转换时, E2F1可激活E2F7和E2F8的表达, 然后在S~G<sub>2</sub>期转换时E2F7

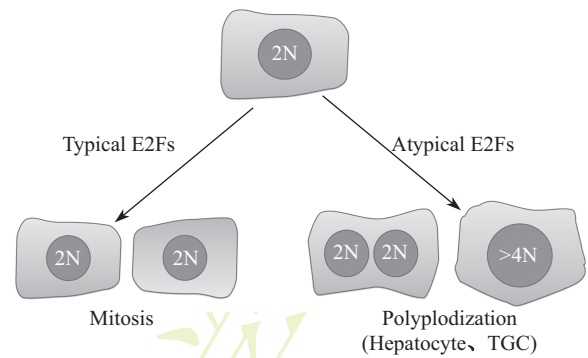


图3 E2F转录因子对细胞周期转换的调控

Fig.3 The regulation of E2F family on cell cycle alternation

和E2F8可抑制E2F1的表达, 从而控制E2F1在细胞周期中的活性。E2F7<sup>-/-</sup>E2F8<sup>-/-</sup>小鼠胚胎在第11.5 d死亡, 检测发现E2F7<sup>-/-</sup>E2F8<sup>-/-</sup>胚胎并不存在增殖障碍, 但第10.5 d的胚胎表现为广泛的细胞凋亡。另外, E2F7<sup>-/-</sup>E2F8<sup>-/-</sup>胚胎中E2F1、p53和其他应激相关基因的表达上调, 同时敲除E2F1或p53可减少凋亡细胞的数量, 说明E2F7和E2F8在胚胎发育过程中可抑制E2F1或p53介导的凋亡信号通路, 起抗凋亡的作用<sup>[27]</sup>。用DNA损伤试剂处理各种肿瘤细胞及小鼠胚胎成纤维细胞, 可诱导E2F7和E2F8蛋白的表达, 并且在E2F1启动子上可检测到E2F7和E2F8的募集。过表达E2F7和E2F8可抑制E2F1的表达, 而E2F7和E2F8表达缺失或降低使E2F1在G<sub>2</sub>期持续高表达, 导致细胞对凋亡信号更加敏感, 抵抗损伤的能力下降。除直接抑制E2F1的表达之外, E2F7和E2F8还可竞争性地结合E2F1的靶基因, 抑制早期凋亡反应<sup>[28]</sup>。以上结果说明, 在DNA损伤/E2F1介导的细胞凋亡过程中, E2F7和E2F8是调节E2F1活性的关键因素, 并能够防止细胞凋亡。

在角质细胞中, 典型E2F蛋白功能被抑制是启动鳞状细胞分化的关键步骤。皮肤组织中, E2F7选择性高表达于增殖能力较强的角质细胞中, 并且可以拮抗E2F1诱导的增殖和凋亡作用。尽管E2F7在角质细胞中主要起抗增殖和促分化的作用, 但E2F7并不能拮抗E2F1诱导的分化抑制作用, 说明E2F7在角质细胞中通过抑制E2F1通路来调节细胞增殖, 但E2F7诱导的细胞分化并不依赖于E2F1。另外, 在体外培养的角质细胞中, 细胞的增殖、分化和凋亡依赖于E2F1和E2F7的相对比例。因此, E2F7和E2F1参与了角质细胞的增殖和分化过程<sup>[41]</sup>。



### 3.4 非典型E2F转录因子在胎盘发育中的作用

E2F7和E2F8在胎盘中的表达明显高于胚胎组织,且胎盘中E2F8的表达与糖原滋养层细胞(glycogen trophoblast cells)的增殖有关。另外,E2F7和E2F8蛋白主要定位在胎盘迷路滋养层细胞(labyrinth trophoblasts, LT)、海绵体状滋养层细胞(spongiotrophoblasts, ST)和TGC中。与正常小鼠相比, $E2F7^{-/-}E2F8^{-/-}$ 小鼠胎盘组织的体积明显减少,形态学上表现为滋养层细胞聚集成簇,不能有效侵入母体蜕膜组织;血管网形成缺陷,胎儿组织血管附近很少观察到母体来源的血窦。TGC和ST中DNA复制和有丝分裂标志分子表达增加,并且ST中凋亡细胞比例明显上升,说明E2F7和E2F8参与了小鼠胎盘的发育过程。为确定E2F7和E2F8调节胎盘发育的作用机制,已建立了小鼠不同胚外滋养层细胞E2F7和E2F8同时敲除的模型,发现单独敲除ST或TGC中的E2F7和E2F8,以及ST和TGC中同时敲除E2F7和E2F8,对小鼠各个时期的胎盘发育及分娩无任何影响;但若将整个胎盘组织中的E2F7和E2F8敲除(包括滋养层前体细胞, trophoblast progenitor cells),则表现为明显的胎盘发育障碍和血管形成缺陷,并导致胚胎死亡,说明在胎盘组织中,主要是滋养层前体细胞中表达的E2F7和E2F8对胎盘发育进行调节。基因表达谱分析结果显示,典型的激活型E2F3a转录因子是拮抗E2F7和E2F8功能的关键分子。同时敲除E2F3a可纠正 $E2F7^{-/-}E2F8^{-/-}$ 小鼠胎盘中基因的表达模式,恢复正常的胎盘发育,并能使E2F7和E2F8表达缺失的胚胎存活至分娩<sup>[42]</sup>。因此,典型E2F与非典型E2F分子的转录调控网络与胎盘的发育及胚胎的存活能力紧密相关。

### 3.5 非典型E2F转录因子在血管发生中的作用

E2F7和E2F8作为新的E2F家族成员,对E2F靶基因主要起转录抑制作用。 $E2F7^{-/-}E2F8^{-/-}$ 小鼠胚胎表现为广泛的细胞凋亡及严重的血管形成缺陷。同时敲除p53或E2F1可挽救细胞凋亡过程,但仍存在血管发育障碍,说明E2F7和E2F8可能通过其他方式参与了血管生成的调节,并是胚胎发育时期血管生成的关键因素<sup>[27]</sup>。血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)可激活血管内皮细胞上的VEGF受体FLK1和KDR,从而促进内皮细胞的增殖。VEGFA敲除小鼠表现为胚胎致死和严重的血管缺陷,说明VEGFA是血管生成过程中的关

键因子<sup>[43]</sup>。 $E2F7^{-/-}E2F8^{-/-}$ 小鼠中VEGFA表达明显下降。与传统的转录抑制作用不同,E2F7和E2F8可激活VEGFA的表达。实验证实,E2F7和E2F8可直接结合在VEGFA的启动子上,并不依赖于典型的E2F结合元件,而是直接通过与缺氧诱导因子1(hypoxia inducible factor 1, HIF1)形成转录复合物并结合在VEGFA的启动子上,激活VEGFA的转录,从而促进血管生成<sup>[44]</sup>(图4)。

### 3.6 非典型E2F转录因子在造血系统中的作用

RB除了作为经典的肿瘤抑制因子之外,还参与调节造血作用,包括红细胞生成过程。RB敲除( $RB^{-/-}$ )小鼠表现为轻度的贫血和外周血出现大量未成熟的有核红细胞<sup>[45]</sup>。造血干细胞中RB特异性敲除小鼠表现为轻度贫血、中度脾肿大、脾脏中有核红细胞比例增加、骨髓增生和B淋巴细胞增殖受到抑制<sup>[46-47]</sup>。另外,红系细胞特异性敲除模型证实,RB可使细胞退出细胞周期并参与线粒体的生物合成来促进红细胞生成<sup>[48]</sup>。在静止期细胞,RB蛋白通过与E2F蛋白中的反式激活结构域结合,从而抑制E2F对S期相关基因的转录激活作用<sup>[7]</sup>。非典型E2F成员可通过与HIF形成复合体而与RB蛋白发生相互作用,共同参与造血系统的功能调节<sup>[49]</sup>,其中E2F8表达缺失可加重 $RB^{-/-}$ 小鼠的贫血症状。 $RB^{-/-}E2F8^{-/-}$ 小鼠造血干细胞表现为红细胞生成明显不足以及轻度的溶血症状,尽管造血系统仍进行细胞再生和红细胞生成过程,但仍出现严重的贫血症状。然而,将与E2F8具有相似生物学功能的E2F7敲除后,却不会加重 $RB^{-/-}$ 小鼠的贫血症状,说明在造血系统中,非典型E2F转录因子中只有E2F8与RB蛋白相互作用,确保正常的红细胞生成,可能的作用机制是促进红系细胞的终末分化(图4)。另外,E2F8还可能参与维持红系细胞膜的完整性,从而防止发生溶血<sup>[50]</sup>。

### 3.7 非典型E2F转录因子在肿瘤发生中的作用

在人体中,部分E2F分子在多种肿瘤细胞中表达下调,而E2F蛋白对靶基因转录的激活或抑制作用,以及对细胞增殖和凋亡的调控取决于细胞类型<sup>[13]</sup>。癌基因激活诱导的细胞衰老是一种抵抗异常增殖的程序性应激反应,可作为一种保护机制来抑制细胞发生不可调控的增殖而导致肿瘤形成。肿瘤抑制因子p53和RB蛋白信号通路可调节细胞进行自发性癌基因诱导的细胞衰老程序,p53/RB信号通路异常可促进致癌性转变。p53能够与特异性的DNA序列结

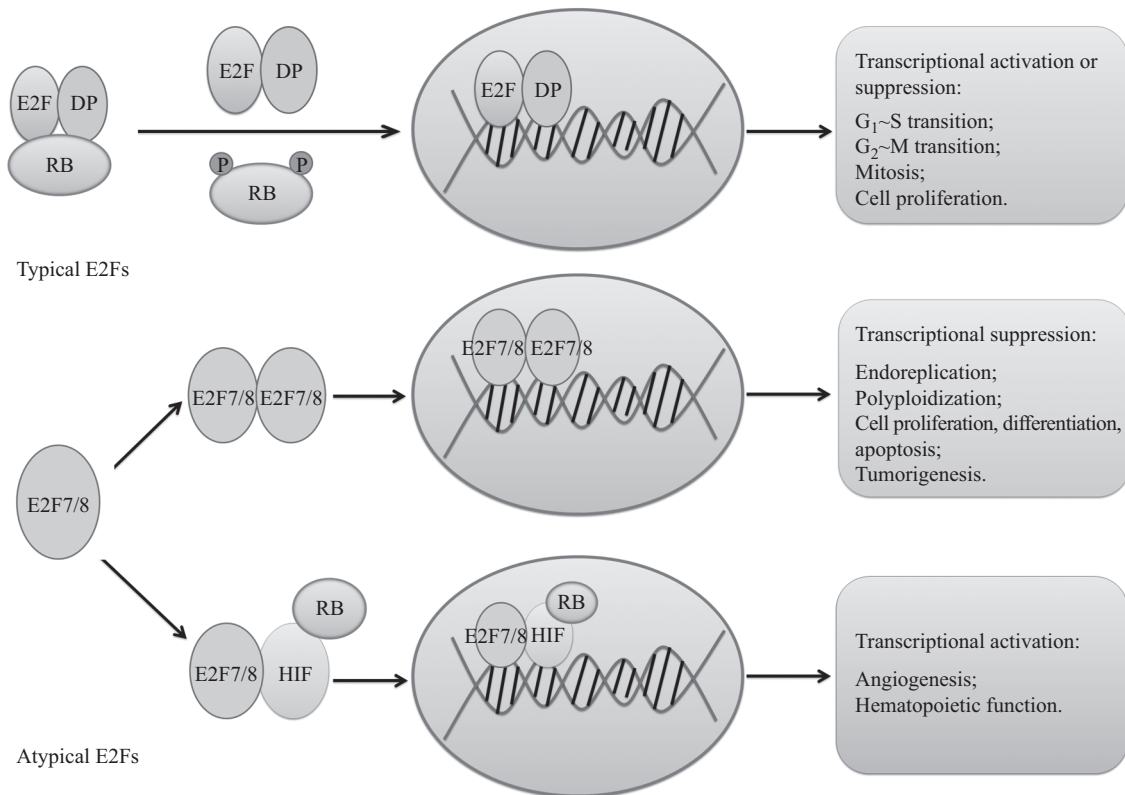


图4 E2F转录因子的转录调节作用

Fig.4 The transcriptional regulatory function of E2F family

合,从而诱导细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂p21的表达,p21通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)的活性,使得RB蛋白不能被磷酸化,从而抑制E2F对靶基因的转录激活作用。另一方面,RB蛋白还可通过改变染色体的结构来抑制增殖相关基因的表达,p53/RB信号通路激活能够促进细胞衰老过程<sup>[51]</sup>。在细胞衰老过程中,E2F7的表达逐渐增加,并且在E2F7的启动子上检测到p53蛋白的募集,说明p53可调节E2F7的转录活性。E2F7被激活后,可与典型的E2F靶基因结合,并与RB蛋白共同作用使细胞进入静止期。另外,RB蛋白表达缺失时,E2F7的表达可代偿性增加,并抑制与细胞有丝分裂相关的靶基因的表达,说明E2F7可能参与了p53/RB介导的细胞衰老过程,从而抑制细胞发生致癌性转变<sup>[52]</sup>。

在人肝细胞癌中,E2F1和E2F3的表达均上调<sup>[53-54]</sup>。E2F1通过抑制c-Myc介导的凋亡过程,从而在肝癌细胞中起关键的抗凋亡作用<sup>[55]</sup>。另外,在肝癌细胞中E2F8的表达也明显上调。E2F8表达的异常增加可促进细胞增殖、集落形成以及肿瘤发生等过程。可能机制是E2F8通过促进cyclin D1的表达,使S期细

胞比例增加,从而促进肝癌的发生过程。在Huh-7、Focus、Hep3B和YY-8103等人肝癌细胞系中,降低E2F8的表达可抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[56]</sup>。另外,在皮肤鳞状细胞癌组织中,E2F1和E2F7的表达均上调,抑制鳞状细胞癌中E2F7的表达使癌细胞对紫外线和阿霉素诱导的细胞凋亡更加敏感<sup>[41]</sup>。因此,非典型E2F转录因子可能也参与了部分肿瘤的发生过程,并可作为肝癌、皮肤鳞状细胞癌等肿瘤新的药物治疗靶点。

#### 4 结语与展望

非典型E2F转录因子作为E2F家族中重要的进化分支,自发现以来一直是细胞周期、胚胎发育、肿瘤发生等领域的研究热点。非典型E2F蛋白结构的特殊性赋予其新的生物学功能,E2F7和E2F8在E2F调控网络中发挥抑制型转录因子的作用,但也可对部分靶基因起转录激活作用。最近通过各种小鼠敲除模型证实,哺乳动物的胚胎发育、细胞多倍化、血管发生和造血过程等依赖于非典型E2F转录因子的存在,而且E2F7和E2F8也参与部分肿瘤的发生过程。尽管E2F7和E2F8在结构和功能上相似,且

具有协同效应,但在不同的组织或细胞中可能具有特异的生理或病理功能。例如,E2F7/RB通路主要参与癌基因诱导的细胞衰老过程,而E2F8/RB通路则对红细胞生成和溶血进行调控。然而,目前关于典型与非典型E2F转录因子在进化上的生理意义、非典型E2F如何抑制靶基因的转录以及靶基因的特异性、非典型E2F对哺乳动物TGC和肝细胞多倍化的调控机制以及促进和抑制肿瘤发生的作用机制都尚未研究清楚。因此,需要进一步对E2F调控网络机制进行研究,从而更好地阐述非典型E2F基因的生理意义。

### 参考文献 (References)

- 1 Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(1): 11-20.
- 2 Kirienko NV, Fay DS. Transcriptome profiling of the *C. elegans* Rb ortholog reveals diverse developmental roles. *Dev Biol* 2007; 305(2): 674-84.
- 3 Milet C, Rincheval-Arnold A, Mignotte B, Guenal I. The *Drosophila* retinoblastoma protein induces apoptosis in proliferating but not in post-mitotic cells. *Cell Cycle* 2010; 9(1): 97-103.
- 4 Weimer AK, Nowack MK, Bouyer D, Zhao X, Harashima H, Naseer S, et al. Retinoblastoma related1 regulates asymmetric cell divisions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2012; 24(10): 4083-95.
- 5 Korenjak M, Anderssen E, Ramaswamy S, Whetstone JR, Dyson NJ. RBF binding to both canonical E2F targets and noncanonical targets depends on functional dE2F/dDP complexes. *Mol Cell Biol* 2012; 32(21): 4375-87.
- 6 Dick FA, Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14(5): 297-306.
- 7 Burke JR, Liban TJ, Restrepo T, Lee HW, Rubin SM. Multiple Mechanisms for E2F binding inhibition by phosphorylation of the retinoblastoma protein C-terminal domain. *J Mol Biol* 2014; 426(1): 245-55.
- 8 Nevins JR. E2F: A link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 1992; 258(5081): 424-9.
- 9 Beshiri ML, Holmes KB, Richter WF, Hess S, Islam AB, Yan Q, et al. Coordinated repression of cell cycle genes by KDM5A and E2F4 during differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(45): 18499-504.
- 10 Kolupaeva V, Basilico C. Overexpression of cyclin E/CDK2 complexes overcomes FGF-induced cell cycle arrest in the presence of hypophosphorylated Rb proteins. *Cell Cycle* 2012; 11(13): 2557-66.
- 11 Westendorp B, Major JL, Nader M, Salih M, Leenen FH, Tuana BS. The E2F6 repressor activates gene expression in myocardium resulting in dilated cardiomyopathy. *FASEB J* 2012; 26(6): 2569-79.
- 12 Wu L, Timmers C, Maiti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT, et al. The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* 2001; 414(6862): 457-62.
- 13 Chong JL, Wenzel PL, Saenz-Robles MT, Nair V, Ferrey A, Hagan JP, et al. E2f1-3 switch from activators in progenitor cells to repressors in differentiating cells. *Nature* 2009; 462(7275): 930-4.
- 14 Vlieghe K, Boudolf V, Beemster GT, Maes S, Magyar Z, Atanassova A, et al. The DP-E2F-like gene DEL1 controls the endo-cycle in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 2005; 15(1): 59-63.
- 15 Lammens T, Li J, Leone G, de Veylder L. Atypical E2Fs: New players in the E2F transcription factor family. *Trends Cell Biol* 2009; 19(3): 111-8.
- 16 Maiti B, Li J, de Bruin A, Gordon F, Timmers C, Opavsky R, et al. Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem* 2005; 280(18): 18211-20.
- 17 Di Stefano L, Jensen MR, Helin K. E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO J* 2003; 22(23): 6289-98.
- 18 Morkel M, Wenkel J, Bannister AJ, Kouzarides T, Hagemeyer C. An E2F-like repressor of transcription. *Nature* 1997; 390(6660): 567-8.
- 19 Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000; 408(6814): 796-815.
- 20 Christensen J, Cloos P, Toftegaard U, Klinkenberg D, Bracken AP, Trinh E, et al. Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(17): 5458-70.
- 21 de Bruin A, Maiti B, Jakoi L, Timmers C, Buerki R, Leone G. Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem* 2003; 278(43): 42041-9.
- 22 Logan N, Delavaine L, Graham A, Reilly C, Wilson J, Brummelkamp TR, et al. E2F-7: A distinctive E2F family member with an unusual organization of DNA-binding domains. *Oncogene* 2004; 23(30): 5138-50.
- 23 Logan N, Graham A, Zhao X, Fisher R, Maiti B, Leone G, et al. E2F-8: An E2F family member with a similar organization of DNA-binding domains to E2F-7. *Oncogene* 2005; 24(31): 5000-4.
- 24 Cohen M, Vecsler M, Liberzon A, Noach M, Zlotorynski E, Tzur A. Unbiased transcriptome signature of *in vivo* cell proliferation reveals pro- and antiproliferative gene networks. *Cell Cycle* 2013; 12(18): 2992-3000.
- 25 Weijts BG, van Impel A, Schulte-Merker S, de Bruin A. Atypical E2fs Control Lymphangiogenesis through Transcriptional Regulation of Ccbe1 and Flt4. *PLoS One* 2013; 8(9): e73693.
- 26 Apostolova MD, Ivanova IA, Dagnino C, D' Souza SJ, Dagnino L. Active nuclear import and export pathways regulate E2F-5 subcellular localization. *J Biol Chem* 2002; 277(37): 34471-9.
- 27 Li J, Ran C, Li E, Gordon F, Comstock G, Siddiqui H, et al. Synergistic function of E2F7 and E2F8 is essential for cell survival and embryonic development. *Dev Cell* 2008; 14(1): 62-75.
- 28 Zalmas LP, Zhao X, Graham AL, Fisher R, Reilly C, Coutts AS, et al. DNA-damage response control of E2F7 and E2F8. *EMBO Rep* 2008; 9(3): 252-9.
- 29 Talluri S, Dick FA. Regulation of transcription and chromatin structure by pRB: Here, there and everywhere. *Cell Cycle* 2012; 11(17): 3189-98.



- 30 Polager S, Ginsberg D. E2F-at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol* 2008; 18(11): 528-35.
- 31 Westendorp B, Mokry M, Groot Koerkamp MJ, Holstege FC, Cuppen E, de Bruin A. E2F7 represses a network of oscillating cell cycle genes to control S-phase progression. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(8): 3511-23.
- 32 Shyh-Chang N, Daley GQ, Cantley LC. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* 2013; 140(12): 2535-47.
- 33 Fox DT, Duronio RJ. Endoreplication and polyploidy: Insights into development and disease. *Development* 2013; 140(1): 3-12.
- 34 Sawin KE. Cell cycle: Cell division brought down to size. *Nature* 2009; 459(7248): 782-3.
- 35 Pandit SK, Westendorp B, de Bruin A. Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. *Trends Cell Biol* 2013; 23(11): 556-66.
- 36 Duncan AW, Taylor MH, Hickey RD, Hanlon Newell AE, Lenzi ML, Olson SB, *et al.* The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature* 2010; 467(7316): 707-10.
- 37 Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, *et al.* Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 2003; 114(4): 431-43.
- 38 Pandit SK, Westendorp B, Nantasanti S, van Liere E, Tooten PC, Cornelissen PW, *et al.* E2F8 is essential for polyploidization in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 2012; 14(11): 1181-91.
- 39 Gentric G, Desdouets C, Celton-Morizur S. Hepatocytes polyploidization and cell cycle control in liver physiopathology. *Int J Hepatol* 2012; 2012: 282430.
- 40 Chen HZ, Ouseph MM, Li J, Pecot T, Chokshi V, Kent L, *et al.* Canonical and atypical E2Fs regulate the mammalian endocycle. *Nat Cell Biol* 2012; 14(11): 1192-202.
- 41 Endo-Munoz L, Dahler A, Teakle N, Rickwood D, Hazar-Rethinam M, Abdul-Jabbar I, *et al.* E2F7 can regulate proliferation, differentiation, and apoptotic responses in human keratinocytes: Implications for cutaneous squamous cell carcinoma formation. *Cancer Res* 2009; 69(5): 1800-8.
- 42 Ouseph MM, Li J, Chen HZ, Pecot T, Wenzel P, Thompson JC, *et al.* Atypical E2F repressors and activators coordinate placental development. *Dev Cell* 2012; 22(4): 849-62.
- 43 Goodsell DS. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells* 2003; 21(1): 118-9.
- 44 Weijts BG, Bakker WJ, Cornelissen PW, Liang KH, Schaftenaar FH, Westendorp B, *et al.* E2F7 and E2F8 promote angiogenesis through transcriptional activation of VEGFA in cooperation with HIF1. *EMBO J* 2012; 31(19): 3871-84.
- 45 Lee EY, Chang CY, Hu N, Wang YC, Lai CC, Herrup K, *et al.* Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 1992; 359(6393): 288-94.
- 46 Walkley CR, Sankaran VG, Orkin SH. Rb and hematopoiesis: Stem cells to anemia. *Cell Div* 2008; 3: 13.
- 47 Iavarone A, King ER, Dai XM, Leone G, Stanley ER, Lasorella A. Retinoblastoma promotes definitive erythropoiesis by repressing Id2 in fetal liver macrophages. *Nature* 2004; 432(7020): 1040-5.
- 48 Walkley CR, Shea JM, Sims NA, Purton LE, Orkin SH. Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell* 2007; 129(6): 1081-95.
- 49 Bakker WJ, Weijts BG, Westendorp B, de Bruin A. HIF proteins connect the RB-E2F factors to angiogenesis. *Transcription* 2013; 4(2): 62-6.
- 50 Hu T, Ghazaryan S, Sy C, Wiedmeyer C, Chang V, Wu L. Concomitant inactivation of Rb and E2f8 in hematopoietic stem cells synergizes to induce severe anemia. *Blood* 2012; 119(19): 4532-42.
- 51 Braumuller H, Wieder T, Brenner E, Assmann S, Hahn M, Alkhaled M, *et al.* T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* 2013; 494(7437): 361-5.
- 52 Aksoy O, Chicas A, Zeng T, Zhao Z, McCurrach M, Wang X, *et al.* The atypical E2F family member E2F7 couples the p53 and RB pathways during cellular senescence. *Genes Dev* 2012; 26(14): 1546-57.
- 53 Huang Y, Tai AW, Tong S, Lok AS. HBV core promoter mutations promote cellular proliferation through E2F1-mediated up-regulation of S-phase kinase-associated protein 2 transcription. *J Hepatol* 2013; 58(6): 1068-73.
- 54 Liu L, Liu Y, Liu J, Zhai X, Wen J, Xie K, *et al.* Genetic variants in pseudogene E2F3P1 confer risk for HBV-related hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *J Biomed Res* 2013; 27(3): 215-9.
- 55 Ladu S, Calvisi DF, Conner EA, Farina M, Factor VM, Thorgerisson SS. E2F1 inhibits c-Myc-driven apoptosis via PI3CA/Akt/mTOR and COX-2 in a mouse model of human liver cancer. *Gastroenterology* 2008; 135(4): 1322-32.
- 56 Deng Q, Wang Q, Zong WY, Zheng DL, Wen YX, Wang KS, *et al.* E2F8 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulating cell proliferation. *Cancer Res* 2010; 70(2): 782-91.