

胸苷酸合成酶表达调控的分子机制

阎松^{1,2} 牛荣丽¹ CHU Edward³ 林秀坤^{1,3*}¹中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室, 青岛 266071;²中国科学院研究生院, 北京 100039; ³耶鲁大学医学院医学与药理学系, New Haven CT 06520)

摘要 胸苷酸合成酶(thymidylate synthase, TS)是生物体内催化胸苷酸合成所必需的酶,多年来一直作为肿瘤化疗的重要靶酶。对TS基因调控机制的研究表明:基因扩增、转录、翻译和翻译后过程都参与了TS表达的调控。先前的研究表明:TS可与自身的mRNA结合形成TS-mRNA复合物,使mRNA翻译受阻,5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)等抗代谢药物可与TS蛋白结合,结合后的复合物不能与TS mRNA作用,导致体内TS的表达升高,是肿瘤细胞产生抗药性的重要分子机制之一。现对TS基因表达调控研究进展、翻译调控与抗药性产生的分子机制进行综述。

关键词 胸苷酸合成酶; 基因调控; 分子机制; 抗药性

胸苷酸合成酶是一种叶酸依赖性酶,由两个相同的亚基构成,分子量约62 kDa。能催化生物体内的2'-脱氧尿苷-5'-一磷酸(2'-deoxyuridine-5'-monophosphate, dUMP)甲基化形成2'-脱氧胸苷-5'-一磷酸(2'-deoxythymidine-5'-monophosphate, dTMP)^[1],后者进一步在细胞内代谢为脱氧胸苷三磷酸(dTTP),dTTP为DNA合成所必需的前体物质。在快速增殖的细胞中抑制TS活性可使DNA合成受阻,引起细胞死亡,多年来TS一直是肿瘤化学治疗的重要靶点^[2]。研究TS基因表达调控机制,将有助于深入了解化疗药物的抗药性机制,为选择性TS抑制剂的研究提供新的思路,为获得新型抗肿瘤药物打下基础。研究表明TS在基因扩增、转录、翻译和翻译后等多个层次上都存在不同的调控机制,我们的前期工作证实翻译过程是调控TS基因表达的一个很重要的机制。

1 基因扩增

基因扩增是以基因表达增加为特征的机制,体外体内各模式系统中均有人研究了TS基因的扩增现象^[3,4]。这些前期的临床研究中,都观察到具有较高TS酶活性和蛋白质水平的肿瘤细胞对氟尿嘧啶、ZD1694(raltitrexed, Tomudex)等TS抑制剂的敏感性降低,但将基因扩增过程与临床抗药性联系起来的直接证据还很少。Gorlick等^[5]发现部分结肠癌肺转移和肝转移样本中的TS高表达与其基因的低水平扩增(2~3个拷贝)有关,但这一扩增水平在接受和没接受5-氟尿嘧啶(5-FU)早期治疗的肿瘤患者样本中都有发现,所以不能说明TS基因扩增与药物反应率的

相关性。Wang等^[6]通过荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)分析,发现31个经5-FU治疗的结肠癌转移患者样本中,有23%发生了TS基因扩增,而58个未使用5-FU的样本没有扩增,且发生TS基因扩增转移病人的平均存活时间(329天)明显短于未发生扩增的病人(1021天)。因此作者认为TS基因扩增是人体对化疗药物5-FU产生抗性的一种机制,这与文献[7]的研究结果一致。

2 转录调控

对TS表达调节的初期研究主要集中在与细胞周期直接相关的事件中。休止期细胞中,TS酶活性较低,而在细胞增殖阶段,TS表达增加^[8]。这说明在生长刺激和细胞周期过程中,TS表达存在转录水平上的调控。

有人研究了鼠和人TS基因在转录水平调控TS表达所必需的顺式调节元件,发现其启动子不含TATA框,而含有丰富的GC区^[9,10]。小鼠TS基因的5'上游-119至-75对TS表达具有关键作用,人TS基因5'上游具有SP1序列(GAGGCGGA),而SP1的上游含有CACCC调控序列,其核苷酸突变能使TS基因启动子的转录活性降低65%,是人TS启动子活性所必需的序列。

还发现了几种对TS的S期表达很重要的结合因子。转录因子E2F,其共有区序列被认为在调节胸苷酸激酶、核糖核苷酸还原酶、二氢叶酸还原酶和

收稿日期: 2004-09-21 接受日期: 2004-12-07

国家自然科学基金资助项目(No.30472043)

*通讯作者。Tel: 0532-2898916, E-mail: linxiukun@yahoo.com

DNA 聚合酶 α 等几种必需的 S 期特异性基因的表达上起重要作用^[10]。对 E2F 因子的缺失分析表明, 其在人 TS 的 S 期调控中只是一个相对弱的负序列, 因为两个 E2F 位点的突变仅使启动子活性增强一点。临床肿瘤样本分析发现, E2F-1 在人结肠癌细胞中的过度表达可得到高水平的 TS mRNA^[11], 说明 E2F-1 在 TS 正调控中具一定作用。除了 E2F, LSF 转录因子在鼠和人 TS 基因 S 期的表达调控中也扮演了重要角色^[12]。LSF 结合位点定位于 TS 基因的启动子区和内含子序列, 一个与包含 Ets 和 SP1 结合因子的核心启动子区重叠, 其他位于内含子 1 和 5 内及鼠核心启动子区上游(-160/-142)。Powell 等^[12]观察到 LSF 结合位点的突变能使 TS mRNA G₁-S 期的诱导受到抑制, 还发现一个显性失活 LSF 的表达, 能阻止 G₁-S 期 TS 水平增加, 诱导生长过程中鼠和人细胞的凋亡。因而, LSF 是通过调控 TS 基因的表达来影响细胞通过 S 期的进程。

TS 基因 5' 上游包含对 S 期表达很重要的序列, AUG 起始密码子的下游序列对 S 期的特异性表达比较关键。Ke 等^[13]发现 TS mRNA 的表达调控既需要 TS 基因的启动子, 也需要内含子序列, 小鼠 TS 基因的内含子 1、2、5 或 6 都参与由启动子趋动的 TS 基因的表达调控。他们构建了含有不同数目内含子的 TS 基因表达质粒转染小鼠 3T6 细胞, 发现只要内含子能够完成拼接, 几乎所有序列的缺失没有明显降低其表达调控效果, 但当改变拼接信号并阻止拼接时, 就完全失去了 S 期的表达调控能力。说明是内含子拼接行为本身, 而不是内含子序列对 S 期的表达调控极为重要。这些结果表明 S 期小鼠 TS 的表达需要 5' 上游启动子区与外显子/内含子拼接机器间某种形式的通讯联系。还应深入研究内含子供体/受体拼接位点在调控人 TS 基因表达中的作用。

3 翻译调控

翻译调控一般是指在 mRNA 水平不变的情况下, 蛋白质的表达效率发生改变。Belfort 等^[14]提出了 TS 翻译调控的可能性。Takeishi 等^[15]研究人 TS cDNA 序列时, 发现 5' 非翻译区(5'-untranslated region, 5'UTR)存在 1~3 个重复序列的多态性现象, 对 TS mRNA 的二级结构分析表明, 上述重复序列可形成颈环结构。Kawakami 等^[16]证实上述重复序列的数目变化可改变细胞内 TS 表达水平, 具有 3 个重复序列的 TS mRNA 的翻译效率比有 2 个重复序列的高 3~4 倍, 其癌组织内 TS 蛋白表达数量显著升高, 他们进一步的研究发现重复序列内单个碱基的突变可引起细胞内 TS 表达水平的明显变化^[17], 预

示这些串联重复序列可能通过与细胞内其他蛋白质因子的作用在翻译水平上调控 TS 基因表达。

体内、体外及临床研究证实, 氟嘧啶、叶酸类抗肿瘤药物可引起 TS 蛋白质水平的快速升高^[18]。为探讨 TS 蛋白的升高机制, 人们提出了如下几种可能性: 转录水平增加、TS mRNA 稳定性提高、TS mRNA 翻译效率提高及 TS 蛋白质稳定性增加, 对上述几种可能机制人们进行了深入研究。Keyomarsi 等^[19]以 ZD1694 处理人乳腺癌细胞 MCF-7, 发现 TS 水平增加 10~40 倍, 而 mRNA 水平不变。用 5-FU 处理人结肠癌细胞 H630 时, 可引起 TS 蛋白的表达增加 5~6 倍, Northern 杂交实验证实, TS mRNA 的水平在处理前后相同^[20]。这些研究结果表明 TS 基因表达升高是 mRNA 翻译效率提高的结果, 是细胞产生抗药性的原因之一。

我们深入研究了化疗药物引起抗药性的分子机制, 发现在正常生理条件下, TS 蛋白可与自身的 mRNA 结合, 形成 TS-mRNA 复合物, 使 TS mRNA 的翻译受到抑制, 即细胞内 TS 的调控具有反馈抑制现象^[21]; 5-FU 等抗代谢药物可与 TS 蛋白结合, 使 TS 的酶活性受到抑制, 但形成的 TS 蛋白-5-FU 等复合物不能与 TS mRNA 作用, 使上述负反馈调控机制丧失, 引起细胞内 TS mRNA 翻译效率提高, 从而导致细胞内 TS 蛋白量增加, 使肿瘤细胞产生抗药性(图 1)^[22]。我们鉴定了 TS mRNA 分子上能够与 TS 结合的两个位点。一个是 mRNA 分子 5' 端包含起始密码 AUG 的 30 核苷酸序列, 可形成稳定的颈环结构, 突变和缺失分析确定这一结构对 TS 与 RNA 的结合非常重要, 而包含在颈环结构环中的六核苷酸序列 GCCAUG 对 RNA 的识别至关重要^[21]。另一个为 TS 编码区 434~634 区间的 200 个核苷酸序列, 我们以体外翻译、报道基因分析等技术对这一序列进行了进一步研究, 发现结合序列是定位于 TS mRNA 480~550 的 70 个核苷酸序列, 以免疫沉降、RT-PCR 技术测定该序列与 TS 蛋白在细胞内的相互作用, 发现该序列与 TS 蛋白特异性结合, 形成 RNA-蛋白质复合物^[23]。为探讨与 TS 蛋白结合的

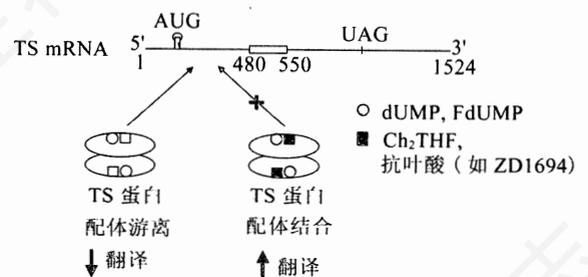


图 1 TS 翻译自调控模型^[22]

顺式元件的结构特点，我们采用RNA体外选择技术，由RNA库中获得了与TS蛋白高度亲和的RNA序列，这一RNA分子可与TS发生极强的相互作用，比野生型TS mRNA的结合能力高了近20倍^[24]。

许多研究证实蛋白质分子的氧化-还原状态可以影响蛋白质-RNA的相互作用。我们的研究表明人重组体TS的结合活性对还原性试剂非常敏感^[25]。当2-巯基乙醇(2-mercaptoethanol, 2-ME)或二硫苏糖醇存在时，TS的RNA结合活性显著提高；反之，用氧化试剂二酰胺处理TS，则会抑制其与RNA的结合。人TS蛋白的催化活性在2-ME存在下明显提高，说明TS上一个共有的氧化还原位点同时具有调控RNA结合的能力。深入研究了不同突变体与TS mRNA的相互作用，将TS蛋白分子上的5个半胱氨酸残基分别突变为丙氨酸，发现一个半胱氨酸(Cys180)的突变可导致TS蛋白与mRNA的结合能力完全丧失，而其他半胱氨酸的突变并不影响TS蛋白的结合特性^[26]。TS上半胱氨酸巯基介导RNA结合的机制仍不明了，但可能与以下几种机制有关：(1)半胱氨酸巯基与TS mRNA尿嘧啶环C-6间形成Michael共价加成物；(2)半胱氨酸残基被占据，由空间位阻机制改变RNA结合；(3)半胱氨酸的巯基处于最大还原态，可使TS蛋白保持一定构象，保证RNA的最优结合。

关于TS上与RNA结合直接相关的重要氨基酸残基的研究也已开始。Voeller等^[27]鉴定了人和大肠杆菌TS蛋白分子上与mRNA结合的区域，并合成了61个17-mer的多肽，以凝胶迁移分析，发现有3种多肽可与TS mRNA结合，对其结构比较发现，这些多肽分子都含有一个精氨酸残基。但与完整的TS蛋白分子相比，其与TS mRNA的结合能力显著降低。还应采用新的技术鉴定与TS mRNA高度亲和的多肽，并通过结晶、X射线衍射等技术，阐明蛋白质与RNA作用的分子机制。

蛋白质因子与mRNA的相互作用是细胞内发生的重要事件。铁离子RNA结合蛋白可以与铁蛋白分子上的顺式元件铁离子响应元件(iron-responsive element, IRE)结合，影响铁蛋白的翻译^[28]；p53及二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)能与自身的mRNA结合，使mRNA的翻译受到抑制^[29]；人或大肠杆菌TS既可与TS mRNA相互作用^[21]，还能与细胞内其他RNA，如p53 mRNA等结合^[30]，使mRNA翻译受阻。鉴定与RNA结合的重要多肽分子，对阐明多肽-RNA的作用规律具有重要意义。

4 翻译后调控

很多证据表明翻译后机制在TS的表达调控过程中具有重要作用。Kitchens等^[31]用氟嘧啶类似物5-氟-2'-脱氧尿嘧啶(5-fluoro-2'-deoxyuridine, FdUrd)处理人结肠癌细胞HCT-15 24 h后，观察到TS酶蛋白增加了2~3倍。RNA酶保护试验显示，TS mRNA水平在药物处理前后没有变化。因同mRNA结合的核糖体数量变化与翻译效率相关，接下来进行了多核糖体分析，发现多核糖体分布模式在处理和对照细胞中是一致的，说明TS mRNA的翻译效率变化不大，推测TS在HCT-15细胞中的表达，是由翻译后水平调控的。为了解酶稳定性在TS诱导中的可能作用，进行了蛋白质半衰期实验，发现没用药物处理时，TS蛋白在HCT-15/200细胞中的半衰期是2.3 h，而在用FdUrd处理后上升了近9倍，达18 h。说明用FdUrd处理后，蛋白质稳定性是TS酶蛋白增高的主要机制之一。

Welsh等^[32]研究了ZD9331(第三代抗叶酸TS抑制剂)对TS表达的影响。用ZD9331处理人类淋巴细胞WIL2 24 h后，TS蛋白质水平最多诱导增加10倍，在去除药物介质中重悬浮4 h，经流式细胞仪检测，发现这一水平降低约25%，表明这是一可逆反应。到去除ZD9331 12 h时，TS表达降到了比未处理细胞低约4倍的水平，并在以后24 h内保持这一水平，说明TS经历了一个蛋白质降解增高的过程。

Schmitz等^[33]的研究也表明翻译后过程在TS的调控中发挥了一定作用。他们观察了与TS mRNA 5'上游顺式元件作用的反义RNA寡核苷酸(oligoribonucleotide, ORN)对人结肠癌细胞PKO的TS基因表达的影响。用反义ORN处理PKO细胞6 h后，Western杂交显示TS水平降低了60%，Northern杂交分析表明TS mRNA水平未受反义处理影响，反义处理后蛋白质半衰期也没有变化，说明是翻译抑制过程介导了反义ORN的作用。但按TS蛋白的半衰期计算，反义ORN处理6 h，TS水平至多只应下降20%~25%，说明反义分子对TS蛋白稳定性的影响不能忽略。因TS是一种RNA结合蛋白，可以认为TS直接与反义ORN本身或TS mRNA结合，ORN复合物导致蛋白质降解途径激活。总之，这些实验说明TS表达部分地是由翻译后水平调控的，可能是通过TS mRNA翻译抑制及涉及TS蛋白质降解影响的翻译后过程的联合作用。

5 小结与展望

涉及TS表达的调节事件是复杂的，不只局限于一种特异的调控机制，可能需要多重调控水平的

相互协同作用。各种证据表明基因扩增、转录、翻译和翻译后过程都影响了细胞内 TS 的水平。对 TS 翻译调控机制的研究,为抑制 TS 的新治疗方法提供了思路:如寻找某种复合物能抑制 TS 酶活性而不影响其 RNA 的结合功能;设计反义分子与 TS mRNA 的顺式元件结合,使 mRNA 翻译受阻;体外筛选与 TS mRNA 高度亲和的多肽,获得选择性的 TS 翻译抑制剂等。对 TS 表达调控机制的深入研究,将为新型抗肿瘤药物的研制开发打下基础。

参考文献 (References)

- [1] Carreras CW *et al. Annu Rev Biochem*, 1995, **64**: 721
- [2] Chu E *et al. Cancer Chemother Pharmacol*, 2003, **52**: S80
- [3] Saga Y *et al. Int J Cancer*, 2003, **106**: 324
- [4] Drake JC *et al. Biochem Pharmacol*, 1996, **51**: 1349
- [5] Gorlick R *et al. J Clin Oncol*, 1998, **16**: 1465
- [6] Wang TL *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 3089
- [7] Wang W *et al. Cancer Res*, 2001, **61**: 5505
- [8] Nakagawa T *et al. Lung Cancer*, 2004, **43**: 145
- [9] Geng Y *et al. Mol Cell Biol*, 1993, **13**: 4894
- [10] Dong S *et al. J Cell Biochem*, 2000, **77**: 50
- [11] Iwamoto M *et al. Cancer Biol Ther*, 2004, **3**: 395
- [12] Powell CM *et al. EMBO J*, 2000, **19**: 4665
- [13] Ke Y *et al. Mol Cell Biol*, 1996, **16**: 376
- [14] Belfort M *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**: 4914
- [15] Takeishi K *et al. Nucleic Acids Res*, 1985, **13**: 2035
- [16] Kawakami K *et al. Clin Cancer Res*, 2001, **7**: 4096
- [17] Kawakami K *et al. Cancer Res*, 2003, **63**: 6004
- [18] Berg RW *et al. Curr Drug Targets*, 2002, **3**: 297
- [19] Keyomarsi K *et al. J Biol Chem*, 1993, **268**: 15142
- [20] Chu E *et al. Mol Pharmacol*, 1993, **43**: 527
- [21] Chu E *et al. Bioessays*, 1996, **18**: 191
- [22] Schmitz JC *et al. Cancer Metastasis Rev*, 2001, **20**: 33
- [23] Lin X *et al. Nucleic Acids Res*, 2000, **28**: 1381
- [24] Lin X *et al. Nucleic Acids Res*, 2000, **28**: 4266
- [25] Chu E *et al. J Biol Chem*, 1994, **269**: 20289
- [26] Lin X *et al. Nucleic Acids Res*, 2003, **31**: 4882
- [27] Voeller DM *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **297**: 24
- [28] Rouault TA. *Blood Cells Mol Dis*, 2002, **29**: 309
- [29] Tai N *et al. Biochem J*, 2004, **378**: 999
- [30] Chu E *et al. Mol Cell Biol*, 1999, **19**: 1582
- [31] Kitchens ME *et al. J Biol Chem*, 1999, **274**: 12544
- [32] Welsh SJ *et al. Clin Cancer Res*, 2000, **6**: 2538
- [33] Schmitz JC *et al. Nucleic Acids Res*, 2001, **29**: 415

Molecular Mechanisms Regulating the Expression of Thymidylate Synthase

Song Yan^{1,2}, Rong-Li Niu¹, Edward Chu³, Xiu-Kun Lin^{1,3*}

¹Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

²Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;

³Department of Medicine and Pharmacology, Yale University School of Medicine, New Haven CT 06520, USA)

Abstract Thymidylate synthase (TS), an essential enzyme for catalyzing the biosynthesis of thymidylate, is a critical therapeutic target in cancer therapy. Previous study indicated that the level of gene amplification, transcription, translation, and posttranslation were all involved in regulating the expression of TS. Studies have shown that TS was able to bind to its own mRNA to form TS protein-TS mRNA complex, and this interaction resulted in translational suppression. When TS is bound by 5-fluorouracil (5-FU) or other antimetabolite, the RNA binding activity of TS is dramatically decreased. The effect of reduced RNA binding activity is relief of translational repression, a process that leads to increased synthesis of new TS protein. Thus, this model provides a rational mechanism for the development of drug resistance in tumor cells. In this paper, the mechanisms regulating the expression of TS gene were reviewed, and the ability of TS to function as a translational regulator and the molecular mechanisms of drug resistance were also presented.

Key words thymidylate synthase; gene regulation; molecular mechanism; drug resistance

Received: September 21, 2004 Accepted: December 7, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30472043)

*Corresponding author. Tel: 86-532-2898916, E-mail: linxiukun@yahoo.com