

Survivin 在细胞分裂中的作用

王建英 兰邹然¹ 于兴华² 李云龙*

(山东师范大学生命科学学院动物抗性重点实验室, 济南 250014;

¹中国海洋大学生命科学与技术学部, 青岛 266003; ²莱阳农学院生命科学院, 青岛 266109)

摘要 Survivin 是凋亡蛋白抑制因子家族的一个新成员, 它主要在细胞周期 G₂/M 期表达, 并有两种不同的亚细胞定位。Survivin 与有丝分裂细胞周期的启动有关, 并在有丝分裂中的中心体装配、纺锤体检验点的监控、胞质分裂等过程中发挥作用。Survivin 在减数分裂中也有一定的作用, 目前研究甚少。Survivin 发挥功能的首要前提是通过主要的有丝分裂激酶 p34cdc2-cyclin B1 使 Thr34 磷酸化, 其表达水平受很多因素的调节。

关键词 Survivin; 有丝分裂; 减数分裂

Survivin 是凋亡蛋白抑制因子(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的一个新成员, 它在人类各种肿瘤组织中广泛地表达, 具有抑制细胞凋亡和调节细胞有丝分裂的双重作用^[1]。它在细胞周期中的特异表达以及与有丝分裂器的密切联系引起了细胞生物学家们的兴趣。然而, 研究人员还没有获得 survivin 调整有丝分裂进程和细胞分裂过程的完整思路, 本文就其在细胞分裂中的作用做一综述。

1 Survivin 结构特点

1.1 Survivin 基因

Survivin 基因位于染色体的 17q25, 长度范围在 75~130 kb, 由 1.9 kb 的 mRNA 转录和编码, 它是细胞周期 G₂/M 期的调节基因。Survivin 基因含有多转录起始点(multiple transcription start sites), 该起始位点是由无 TATA 的启动子和 GC 富集区、2 个细胞周期依赖性因子区(cell cycle-dependent, CDE, GGCGG)和一个细胞周期同源性区域区(cell cycle homology regions, CHR, ATTTGAA)组成。CDE 和 CHR 为 G₁ 期抑制元件, 调节 G₂/M 期调节基因表达的半衰期^[2]。基因转染证实, survivin 基因 ATG 上游约 200 bp 区有调节 survivin 的启动子活性作用。FoxM1 (Forkhead box m1)基因可通过 Skp1-Cullin 1-F-box (SCF)泛素连接酶复合体和 CDK1 蛋白 p21(Cip1)和 p27(Kip1)调节 survivin 的转录^[3]。

1.2 Survivin 蛋白和分布

在哺乳动物细胞中, survivin 是一种有丝分裂纺锤体相关蛋白, 它的结构不同于其他 IAP 家族蛋

白, 它仅含有单一的 BIR 功能区, 没有环指结构, 是一个 142 个氨基酸的蛋白质。X 射线晶体法分析重组形式的全长的 survivin X 晶体结构为 2.58 Å 大小。Survivin 包含 N 端的 Zn²⁺ 结合 BIR 结构域和 65 Å 两性的 C 端 α 螺旋结构。BIR 结构域和 COOH 端 α 螺旋结构都有利于有丝分裂中 survivin 的重新定位, C 末端的螺旋包含可能作为蛋白质之间相互作用的疏水区^[4]。Survivin 的罕见形状和大小表明它可能通过 α 螺旋的延伸起到接头器的作用^[5]。最近发现 survivin 有 2 个剪接变体: survivin-δ Ex3 和 survivin-2B, 前者缺乏外显子 3, 后者保留部分内含子 2 作为隐蔽的外显子, 2 个剪接变体导致相应的蛋白质结构发生显著的变化, 包括 BIR 结构域的改变。通过细胞转染试验证实, survivin-δ Ex3 仍保留抗凋亡特性, 而 survivin-2B 抗凋亡功能显著下降^[6]。Conway 等^[7]在人和鼠的组织内发现了 3 个 survivin 异构体 survivin-140、survivin-121 和 survivin-40, 前两种具有抑制细胞凋亡的作用。3 种异构体均表达于胚胎组织, 而在胸腺和睾丸内只有 survivin-140 的高水平表达。survivin-121 可见于所有分化成熟的组织, survivin-40 在分化成熟的组织内没有表达。

与 IAP 家族的其他蛋白质不同的是, survivin 不但具有抑制细胞凋亡的作用, 而且参与细胞有丝分裂的调节和胞质分裂, 其表达具有周期依赖性, 主要在细胞周期 G₂/M 期表达。Li 等^[8]用细胞分裂阻断

收稿日期: 2005-10-08 接受日期: 2006-04-14

* 通讯作者。Tel: 0531-86182690, Fax: 0531-86185360, E-mail:

li-ly@163.net

剂分别将 HeLa 细胞阻断在 G₁ 期、S 期、G₂/M 期, 检测细胞内源性 survivin mRNA 表达, 发现在 G₁ 期不能检测到 survivin mRNA 表达; 在 S 期细胞 survivin mRNA 表达增加 6.2 倍; 在 G₂/M 期细胞 survivin mRNA 表达上调 40 倍。survivin 基因在细胞周期中表达的周期性与 survivin 基因中的 CDE 和 CHR 有关。

Survivin 表达于胚胎和发育的胎儿组织, 在一定时期的分化的成年组织中则没有表达, 除了在胎盘、胸腺、生殖腺、增殖的子宫内膜和分泌的子宫内膜有微量表达。但是 Northern 杂交分析表明在一些成年组织中有少量的 survivin 表达, 而免疫组化在正常的组织中没有发现有 survivin 的表达。然而, 在大多数肿瘤组织内有 survivin 的表达^[9]。

Survivin 在细胞中的表达具有严格的细胞周期依赖性——G₂/M 期特异性表达。在分裂间期, survivin 与中心体共同定位于胞质; 在有丝分裂前期和中期, survivin 转移到核内与 CENP-B 共同结合在着丝粒上; 在有丝分裂后期, survivin 与赤道板上的纺锤体微管结合; 在末期, 与形成中心体的微管束结合, 分布在两个子细胞的中心体内; 在胞质分裂中是通过肌动蛋白-肌球蛋白收缩环浓缩在中间体上。然后 survivin 发生泛素化而被降解^[10,11]。

关于 survivin 的亚细胞定位有很多争议, 有人称其为微管相关蛋白, 亦有人称其为染色体动粒信使蛋白。Fortugno 等^[12]最近阐明内源性的 survivin 有完全不同的亚细胞定位, 包括微管和动粒。微管和动粒相关的 survivin 可能在有丝分裂中起不同作用。微管相关的 survivin 能调节微管功能, 形成正常的双极结构, 这与剔除小鼠的微管组装缺陷相一致, 所以在细胞分裂过程中能够充当细胞生存的卫士, 而动粒相关的 survivin 可能参与调节中期姐妹染色单体的分离和有丝分裂纺锤体检验点的完整性。Survivin 对凋亡抑制和调节纺锤体动力学和微管完整性的双重作用可能有利于逃避细胞周期阻滞的检验点机制, 促进对微管抑制药物(microtubule-interfering agents, MIA)化疗的抵抗能力^[9,13,14]。

1.3 Survivin 的活化及其表达水平的调节

Survivin 发挥功能的首要前提是通过主要的有丝分裂激酶 p34cdc2-cyclin B1 使 Thr34 的磷酸化^[15]。Survivin Thr34 的磷酸化是细胞分裂中保持细胞活力所必需的。因此, 不能磷酸化的 survivin Thr34 → Ala 表达阻止了内源性的 survivin 磷酸化, 导致各种癌细胞类型的凋亡^[15], 或在体内抑制肿瘤的生长^[16],

说明这一磷酸化步骤可能为抗癌治疗提供合适的靶子^[17]。

Survivin 也是体内 aurora B 的效应物^[18], 在体内有丝分裂中它由 Cdk1:cyclin B 磷酸化。HsSurvivin Thr117 在体外能被 aurora B 磷酸化。在有丝分裂中这一位点突变为 Glu, survivin 就不能与 INCENP 结合和正确定位, 从这些研究结果可以推测这一底物的磷酸化状态可能对 survivin 的功能很重要^[18]。

Survivin 的表达水平受许多因素的调节。已知干细胞因子^[19]、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)^[20]等能上调其表达水平; 内源或外源的 p53^[21]、NO^[22]诱导后, survivin 被负向调节。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)也能够提高 survivin 的表达, EGFR 对 survivin 的上调依赖于 PI-3 激酶信号通路^[23]。p38 MAPK 和 PI3K/Akt 激酶通路也可下调 survivin 的表达水平^[22]。抑制 Hsp90 伴侣功能或破坏 Hsp90-Survivin 复合物会导致 survivin 的蛋白质降解, 出现线粒体依赖的凋亡和细胞周期阻滞等有丝分裂缺陷^[24]。

2 Survivin 在有丝分裂中的作用

Survivin 在脊椎动物细胞的有丝分裂中有重要作用, 如微管的聚合、纺锤体的形成和胞质分裂。细胞的正常分裂离不开 survivin。有缺陷的 survivin 可能引发细胞周期检查点反应, 导致多种中心体缺陷, 异常的多极纺锤体形成或染色体分离错误。如果剔除裂殖酵母、芽殖酵母和线虫胚胎中 survivin 基因的类似物, 会在中心体形成、中期染色体列队, 纺锤体装配、染色体分离和胞质分裂中产生各种各样的缺陷。HeLa 细胞的 survivin RNAi 出现染色体列队、稳定的染色体组装检验点激活和胞质分裂缺陷^[25,26]。细胞分裂的这些缺陷常常伴随着细胞死亡。破坏小鼠胚胎干细胞中的 survivin 等位基因也由于染色体分离问题和不能进行胞质分裂在 4~5 天后导致胚胎死亡^[10]。剔除 survivin 的表型可能是由于阻碍了染色体信使蛋白(CPP)复合物的功能。CPP 是一组在有丝分裂中表现复杂的动态分布的蛋白质。在前期, 它们与染色体轴连在一起, 在中期集中在着丝粒上, 后期从着丝粒转移到有丝分裂纺锤体的中央区域。CPP 复合物提供有丝分裂调节的必要机制。CPP 可能参与染色质的改变(组蛋白 H3 的磷酸化), 着丝粒附着错误的纠正, 纺锤体组

装检验点的特征, 稳定的双极纺锤体的组装和胞质分裂的完成^[27]。迄今为止, 发现的 CPP 有以下几种: INCENP, aurora B, survivin, borealin, CSC-1, Orc6 和 TD-60。至少其中的 3 种蛋白 survivin、aurora B 和 INCENP, 是以复合物的形式起作用^[18]。研究表明, CPP 的突变或抑制能导致分裂缺陷和中期染色体错误排列^[10]。

2.1 Survivin 与细胞周期的启动

Survivin 是一个细胞周期调节基因。Suzuki 等^[28]研究表明: survivin 在 S 期及 G₂/M 期均高表达, survivin 高表达会驱动细胞由 G₁ 期进入 S 期。可见, survivin 还与细胞周期的驱动机制有关。Suzuki 等研究进一步表明: Survivin 竞争性地与 Cdk4/p16^{INK4} 复合物相互作用, 从而取代 p16^{INK4α} 与 Cdk4 形成复合物, 诱导 Cyclin E/Cdk2 的激活。活化的 Cdk4 会导致细胞周期机制的主要制动分子视网膜母细胞瘤 (Rb) 分子的磷酸化。Rb 进入高磷酸化状态后会失去其细胞周期的制动功能, 释放出大量的转录因子, 产生多种细胞周期运行所需的蛋白质。

2.2 Survivin 与中心体的装配

Survivin 对中心体内 p21 完整性的维持是正常的有丝分裂进程所需要的, survivin 在细胞内可能参与中心体的装配。Li 等^[29]发现用反义 survivin cDNA 破坏中心体上的 survivin 装配, 可导致以中心体调节障碍为特征的有丝分裂缺陷和 G₂/M 期 caspase 依赖 p21waf1/cipl(周期依赖蛋白激酶抑制剂)分裂, 形成多级的有丝分裂纺锤体、多核体或多倍体细胞, 这种调节障碍可被外生型 p21 表达修正。

2.3 Survivin 与纺锤体检验点

正确的染色体分离依赖于纺锤体检验点(染色体列队、纺锤体微管的组装和稳定和姐妹染色单体的对等分离)的作用。在细胞有丝分裂纺锤体组装检查点(mitotic spindle assembly checkpoint)机制中发挥重要作用, 在癌细胞中 survivin 的过表达有利于变态细胞克服这一凋亡检查点, 继续畸变过程, 发生有丝分裂。最近的研究表明 survivin 和 aurora B 在纺锤体检验点的监控上起重要的辅助作用。Ark1/survivin 的功能不是 bub1 或 mad3 与动粒发生联系所需要的, 也不是微管的磷酸化所需要的。但是它却是 mad2 与检验点活化功能有关的两个方面——与动粒的结合和与 mad3 形成复合体所需要的^[30]。

Survivin 剔除的细胞以正常的动力学进入有丝分裂, 但是以 BubR1/Mad2 依赖的方式前中期延迟。

而且, 这些细胞在完成染色体集合和姐妹染色单体分离前完成有丝分裂, 说明纺锤体组装检验点没有完全起作用。Survivin 剔除的细胞纺锤体检验点蛋白 BubR1 不能与动粒发生联系。这表明 survivin 不是最初的检验点活化所必需的, 也不是缺乏微管后持续的检验点活化所必需的。但是, 缺乏张力时 BubR1 与动粒的稳定结合和持续的检验点信号需要 survivin^[26]。

2.4 Survivin 与染色体列队

Survivin 是中期染色体列队所必需的。Survivin Lys(63)的泛素化而不是蛋白质降解调节染色体的列队和分离^[31]。Lens 等^[26]研究表明哺乳动物细胞缺乏 survivin 不能排列染色体, 不能征募 aurora B 到动粒上, 从而导致染色体集合缺陷的前中期细胞的积累和多倍体的出现。

2.5 Survivin 与纺锤体微管的组装和稳定

有丝分裂的纺锤体对有丝分裂早期的染色体分离起重要作用, Survivin 是已知的 IAP 家族中唯一与纺锤体微管相关的蛋白质, 它具有监测有丝分裂纺锤体聚集的作用。在有丝分裂初期, survivin 可能是通过其羧基端的卷曲螺旋与组成有丝分裂纺锤体的微管蛋白特异性结合, 使 caspase-3 不能有效地水解微管结构蛋白, 因而维持了纺锤体的完整性, 确保细胞有丝分裂正常进行。如 survivin 发生突变, 则不能与纺锤体的微管结合, 就失去了抗凋亡的作用^[32]。Giodini 等^[14]表明 survivin 在细胞分裂中起控制微管的稳定性和组装正常的有丝分裂纺锤体的作用。这可能有利于检验点的逃避和促进对癌症化学疗法的抵抗能力。微管的延长和稳定主要是由于 CPC 磷酸化染色质上的微管解聚酶 MCAK, 导致其活性的失活^[33]。对纺锤体的稳定性和胞质分裂很重要的内着丝点蛋白(inner kinetochore protein) Ndc10p 在后期的转移需要 survivin^[34]。

Survivin 剔除的视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞在有丝分裂早期对有丝分裂纺锤体没有明显的影响, 这与最近两项关于 HeLa 细胞的研究一致^[25,26]。然而 survivin 缺乏的 RPE 细胞有丝分裂晚期纺锤体中板和中间体微管不存在, 在培养的哺乳动物细胞中以前没有发现这种异常^[35]。

2.6 Survivin 与姐妹染色单体的对等分离

Survivin 和它的类似物在染色体分离和胞质分离中所起的作用还未明确, 但有证据指出, 它对于 Ipl-I/aurora 家族蛋白激酶在有丝分裂染色体和纺锤

体上的正确定位起接头蛋白样的作用^[36]。Yang 等^[35]的研究表明 survivin 对于姐妹染色单体的正确分离是必要的, 它可保持姐妹染色单体的动粒结合, 使成对的姐妹染色体只有单极联系以保证第一次减数分裂的成功完成。Yang 等的结果与 survivin 剔除的人宫颈癌肿瘤细胞(HeLa 细胞)和人骨肉瘤细胞(U2OS 细胞)完全缺乏姐妹染色单体分离显然不同^[25,26]。他们认为其他人报道的染色体行为的更严重的缺陷可能是由于倍数异常或实验中所用的肿瘤细胞的变异。Yang 等^[35]将试验中观察到的后期滞后的染色体归因于 merotelic (一个动粒同时附着在纺锤体的两极), 因为滞后的染色体代表经常在后期的纺锤体赤道附近离开的姐妹染色单体。Aurora-B 激酶, 如它在酵母的同源物 IpI 一样, 通过动摇 merotelic 动粒附着促进双极动粒附着。因为 aurora-B 和 survivin 的动粒定位是相互依赖的, 所以推断 survivin 可确保有丝分裂早期着丝粒上的 CPP 复合物组装必需的动粒的双极定位^[35]。

2.7 Survivin 与胞质分裂

在有丝分裂晚期, survivin 参与微管的去组装和稳定, 以制造哺乳动物细胞胞质分裂的完成所需要的蛋白质^[35]。没有 survivin 参与, 细胞可以启动分裂沟和收缩环, 但不能完成胞质分裂, 从而导致多核细胞的产生。现在一般认为 survivin 剔除细胞的胞质分裂缺陷是由于妨碍了 CPP 复合物的功能^[35]。Chen 等^[37]在软琼脂中抑制 survivin 表达可以促进细胞凋亡和多倍体形成, 同时减少克隆的形成。这些发现表明 survivin 在胞质分裂的后期和凋亡中发挥重要作用。

由于它能促进姐妹染色单体的正确分离和有丝分裂后期微管的组装/稳定, survivin 对正常的人细胞增殖很重要。然而, 该蛋白质并不一定是正常细胞的生存所必需的。在 survivin 不存在的情况下, 人 RPE 和 IMR-90 (human primary lung fibroblasts) 细胞能够生长, 但是经常发生姐妹染色单体错误分离, 在有丝分裂晚期缺乏纺锤体中板和中间体微管^[35]。

3 Survivin 在减数分裂中的作用

现在对 survivin 在减数分裂中的作用研究甚少。Survivin 在芽殖酵母的同源物 BIR1 是有效的减数分裂和孢子形成所需要的^[38]。精子发生过程包括复杂的有丝分裂和减数分裂, 这些过程都需要进行胞质分裂, 推论可能也需要 BIRC-5/survivin 的作

用。Wang 等^[19]分析了大鼠生精循环中 BIRC-5/survivin 的表达。发现在生精循环中 BIRC-5/survivin RNA 和蛋白质的表达呈现规律性。免疫组化和原位杂交发现, 高表达水平发生在较长的精母细胞的减数分裂前期。在中期胞质中的 survivin 急剧下降, 后期又重新出现。有些 BIRC-5/survivin 表达在间隙的睾丸间质细胞。在体外 BIRC-5/survivin 蛋白的水平可由调节生殖细胞和睾丸间质细胞增殖和凋亡的旁分泌——干细胞因子上调。说明 survivin 可能与精子发生有关。目前还没有 survivin 与哺乳动物卵子发生有关的报道。

4 小结

生物科学界对 survivin 在有丝分裂上的作用方面做了大量的研究工作, 也取得了不少新的进展, 但是还有许多工作有待于继续验证, 目前许多科学家正在认真研究, 试图进一步揭示它的神秘功能。而 survivin 在减数分裂中的作用研究存在很多空白之处, 还有许多工作亟待开展, 例如: Survivin 是否与卵子、精子的发生有关; survivin 在卵子、精子发生中是如何起作用的; survivin 是否与哺乳动物精子的凋亡有关等等。弄清上述问题, 有望为节育工作提供理想的方法和有效的途径。另外, survivin 在纺锤体检验点的监控上起重要的作用, 它的独特表达方式正日益引起肿瘤研究人员的重视, 探索新的影响其表达水平的因素, 将为肿瘤发病及治疗研究开辟一片新天地。

参考文献 (References)

- [1] Chiou SK *et al. Med Sci Monit.* 2003, **9**: P125
- [2] Li F *et al. Cancer Res.* 1999, **59**: 3143
- [3] Wang IC *et al. Mol Cell Biol.* 2005, **25**: 10875
- [4] Verdecia MA *et al. Nat Struct Biol.* 2000, **7**: 602
- [5] Chantalat L *et al. Mol Cell.* 2000, **6**: 183
- [6] Mahotka C *et al. Cancer Res.* 1999, **59**: 6097
- [7] Conway EM *et al. Blood.* 2000, **95**: 1435
- [8] Li F *et al. Nature.* 1998, **396**: 580
- [9] Mollinedo F *et al. Apoptosis.* 2003, **8**: 413
- [10] Uren AG *et al. Curr Biol.* 2000, **10**: 1319
- [11] Jiang X *et al. J Cell Biochem.* 2001, **83**: 342
- [12] Fortugno P *et al. J Cell Sci.* 2002, **115**: 575
- [13] Tran J *et al. Proc Natl Acad Sci USA.* 2002, **99**: 4349
- [14] Giodini A *et al. Cancer Res.* 2002, **62**: 2462
- [15] O'Connor DS *et al. Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, **97**: 13103
- [16] Grossman D *et al. Cancer Metastasis Rev.* 2001, **20**: 3
- [17] O'Connor DS *et al. Cancer Cell.* 2002, **2**: 43
- [18] Wheatley SP *et al. J Biol Chem.* 2004, **279**: 5655

- [19] Wang Y *et al.* *Mol Cell Endocrinol*, 2004, **218**: 165
[20] Tran J *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **264**: 781
[21] Hoffman WH *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**:3247
[22] Chao JI *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **279**: 20267
[23] Wang Q *et al.* *Exp Mol Pathol*, 2005, **79**: 100
[24] Fortugno P *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 13791
[25] Carvalho A *et al.* *J Cell Sci*, 2003, **116**: 2987
[26] Lens SM *et al.* *Embo J*, 2003, **22**: 2934
[27] Vagnarelli P *et al.* *Chromosoma*, 2004, **113**: 211
[28] Suzuki A *et al.* *Oncogene*, 2000, **19**: 3225
[29] Li F *et al.* *Nat Cell Biol*, 1999, **1**: 461
[30] Petersen J *et al.* *Curr Biol*, 2003, **13**: 590
[31] Vong QP *et al.* *Science*, 2005, **310**: 1499
[32] 高再荣等。 *临床消化病杂志*, 2003, **15**: 278
[33] Vernos I. *Dev Cell*, 2004, **7**: 145
[34] Bouck DC *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 5408
[35] Yang DW *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 15100
[36] Reed JC. *J Clin Inves*, 2001, **108**: 965
[37] Chen J *et al.* *Neoplasia*, 2000, **2**: 235
[38] Uren AG *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 10170

The Fuction of Survivin in Cell Division

Jian-Ying Wang, Zou-Ran Lan¹, Xing-Hua Yu², Yun-Long Li*

(Key Laboratory of Animal Resistance Research, College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China;

¹Life Sciences and Technology College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

²College of Life Science, Laiyang Agriculture Academy, Qingdao 266109, China)

Abstract Survivin is a new inhibitor of apoptosis (IAP) protein. Survivin, is expressed in the G₂/M phase of the cell cycle in a cycle-regulated manner and it has two different subcellular localization. Survivin initiates cell cycle entry and is required for centrosome assembly, spindle assembly checkpoint surveillance and cytokinesis. Survivin also plays a role in meiosis, but there are only a few reports to date. The survivin activity resulted from the phosphorylation of Thr34 by the mitotic kinase complex p34cdc2-cyclin B1, many factors regulate its expression level.

Key words survivin; mitosis; meiosis

Received: October 8, 2005 Accepted: April 14, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-531-86182690, Fax: 86-531-86185360, E-mail: li-ly@163.net