

FOXO 转录因子调控哺乳动物的细胞周期和凋亡

周振琪 王 恬 石放雄*

(南京农业大学动物科学技术学院, 南京 210095)

摘要 细胞周期和细胞凋亡是哺乳动物细胞生命活动的两大关键事件。FOXO 在哺乳动物的细胞分化、增殖、生长、衰老等生命活动中发挥着重要的调控作用, 并且参与细胞周期和凋亡的调控, 是细胞生死的开关, 因此FOXO已成为肿瘤、癌症科学研究的热点之一。在机体细胞中, FOXO 受到上游信号分子PI3K/PKB、Ras等的激活或抑制从而调节下游信号分子FasL、Bim、p27^{kip1}、cyclin G2、cyclin B、p130、GADD45等, 并与其他细胞周期调控因子形成复杂的信号网络, 调节哺乳动物细胞周期的进程和凋亡事件。

关键词 FOXO; 细胞周期; 细胞凋亡.

Forkhead box (Fox)转录因子的名称最初来自 Weigel 等^[1]对异常头果蝇突变体的研究。之后的研究发现叉头基因都有着—个高度保守的DNA结构域, 即 Forkhead 结构域, 包含螺旋-转角-螺旋模体, 3个 α 螺旋和2个大环形成的翅膀状(winged)结构。2000年国际命名委员会规定Fox为统一的符号来代表Forkhead box, 亚家族用—个字母表示, 亚家族中的—个蛋白质用—个阿拉伯数字表示, 因此Fox实际名字是: Fox+ 亚家族符号 N+ 蛋白质数字符号 X^[2]。哺乳动物中, FOXO 家族的主要成员有 FOXO1 (FKHR), FOXO3a (FKHRL1)和FOXO4 (AFX), 以及新近发现的 FOXO6^[3]。FOXO6 与其他三个 FOXO 蛋白—样有着高度的保守性, 只是缺少C端的PKB磷酸化位点^[4]。

许多研究表明Fox转录因子的O亚家族(subfamily O of forkhead transcription factors, FOXO)在细胞周期进程的调控和程序化死亡中起重要作用^[5]。FOXO 在细胞质内合成后在—无外界信号的激活下其NLS模体与importin(IMP)结合并进入细胞核内, DBD(DNA结合模体)与DNA结合诱导细胞的死亡; 而在PKB的激活下FOXO会发生T1、S1、S2位点的磷酸化与14-3-3蛋白结合从而穿出细胞核, 细胞存活^[6]。在生物体众多信号网络中, PI3K/PKB/FOXO对哺乳动物细胞周期和凋亡有着重要的作用, 同时FOXO的活性还受到Ras、TGF- β 等信号的调控(图1)。

1 FOXO调控细胞凋亡的信号通路

1.1 FOXO 调控的细胞凋亡途径——FasL, Bim 通路

FOXO1 如果发生突变就不能被磷酸化, 随后诱导多种细胞中发生凋亡^[7], 而如果FOXO与DNA结合的区域发生突变就会削弱FOXO1诱导的细胞凋亡的作用。因此, FOXO能够调控细胞凋亡。

Le-Niculescu 等^[8]对FOXO调控细胞凋亡的具体信号通路的研究表明, FOXO3a能与FasL基因启动子内的位点结合, 然后诱导由FasL启动子引起的基因表达。FasL产生后会结合细胞生存受体Fas, 产生—系列凋亡的级联效应, 而用可溶性的Fas处理细胞, 能使FOXO3a磷酸化位点突变而抑制其细胞凋亡。PKB促进生存的—条通路就是磷酸化细胞质内FOXO, 阻止其诱导的关键的死亡因子转录。

Bcl-2家族中存在促凋亡和抗凋亡成员。其中的—个成员Bim的BH3区域可与促细胞生存的Bcl-2分子结合而抑制其功能, 引起细胞的凋亡^[9]。FOXO3a可直接诱导Bim的表达和转录, 从而调节细胞内的死亡途径^[10]。

2 FOXO对细胞周期的信号通路调控

2.1 FOXO对CDKI的调控

2.1.1 依赖p27^{kip1}的信号通路 p27^{kip1}是依赖cyclin的激酶4(CDK4)的抑制剂, 能结合cyclin E-CDK2复合物和cyclin A-CDK2复合物, 并抑制其活性, 从而对细胞周期G₁期的转变起调节作用^[11]。最近的研究

收稿日期: 2006-06-26 接受日期: 2006-12-18

国家自然科学基金(No.30571335)和教育部留学归国人员科研启动基金资助项目

* 通讯作者。Tel: 025-84399112, Fax: 025-84395314, E-mail:

fxshi@njau.edu.cn

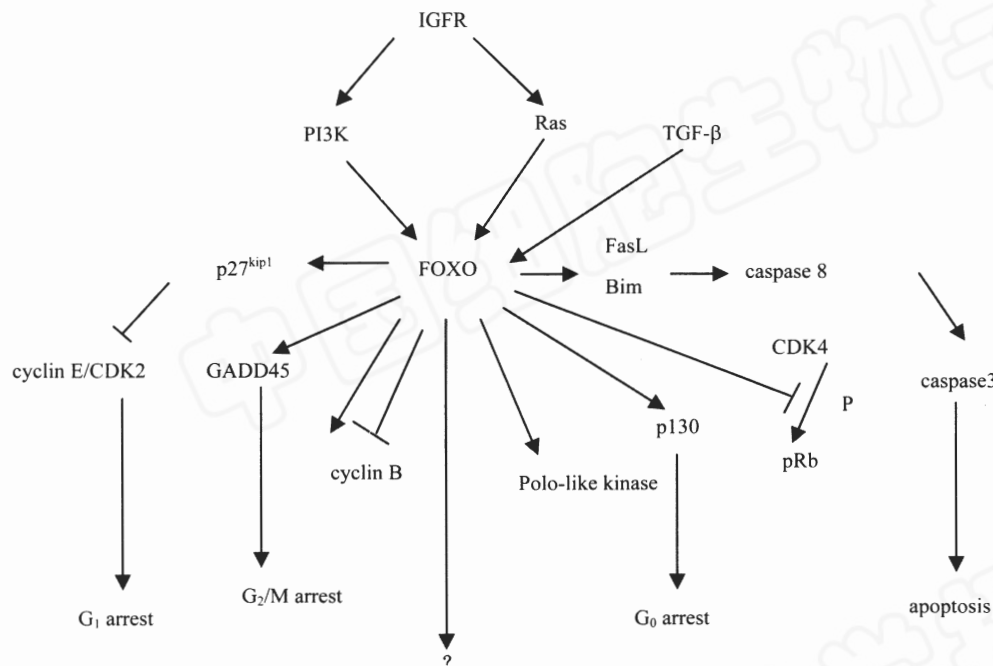


图1 FOXO 调控细胞周期和死亡的信号^[8,11,18,22,25,26,28,33]

FOXO 受到上游信号分子 PI3K/PKB、Ras、TGF- β 的调控发生磷酸化，而 FOXO 参与调控众多的下游底物。FOXO 通过 FasL 调节由死亡受体调控的凋亡，通过 Bim 调控细胞内的凋亡途径，FOXO 促进 p27^{kip1} 的表达而抑制 cyclin E/CDK2 复合物从而抑制细胞周期的进程，诱导依赖 CDK4 的 pRb 的磷酸化，进而对细胞周期进行调控，并且也会促进 p130 的表达使细胞停滞在 G₀ 期。FOXO 直接激活促进 GADD45 的表达使细胞停滞在 G₂/M 调控点，并且促进和抑制 cyclin B 的表达并对 Polo 样激酶(PLK)也有影响。另外，还存在受到 FOXO 调控的其他下游底物而影响细胞周期的进程还有待进一步研究。

还发现 p27^{kip1} 能结合至 MCM7(一种 DNA 复制蛋白)，抑制 DNA 的复制，从而阻止细胞周期的 S 期^[12]。

FOXO 对 p27^{kip1} 有着直接的调控作用。FOXO 可通过 cyclin D 和 p27^{kip1} 来调控细胞周期^[13,14]。早期的研究表明，FOXO 能够使细胞停留在细胞周期的 G₁ 期，这种作用并不依赖于 pRb，而是依赖于细胞周期的抑制子 p27^{kip1}^[15]，FOXO4 能够通过促进 p27^{kip1} 的转录和表达来抑制 CDK 的活性^[16]。而最近的研究表明，PI3K 调控 FOXO3a 和 c-Myc 进而影响 p27^{kip1} 的表达，PI3K/PKB 的活性上升会抑制 FOXO3a 的活性，但会增强 c-Myc 的活性；低活性的 FOXO3a 能够降低对 p27^{kip1} 水平的促进作用，高活性的 c-Myc 能够增强对 p27^{kip1} 水平的抑制从而促进细胞的增殖。Fukuoka 等^[13]的研究发现，PI3K 下游底物 PKB 能够通过磷酸化途径而降低 FOXO4 的活性，从而增强 p27^{kip1} 的转录活性。

2.1.2 非依赖 p27^{kip1} 的信号通路 PI3K/PKB 通过 FOXO4 对 cyclin E/CDK2 复合物的调控主要通过 p27^{kip1} 通路^[14]，但可能存在非依赖 p27^{kip1} 的信号通路抑制细胞周期于 G₁-S 期^[16]。小鼠胚胎成纤维细胞上的实验发现 p27^{kip1} 的非依赖机制在 FOXO 因子抗增殖的

作用中起着重要的作用^[17]。FOXO 会使细胞阻止于 G₁ 期，并增加 p27^{kip1} 的水平^[18]；但在 p27^{kip1}^{-/-} 上发现 FOXO 仍有抗细胞增殖的能力^[16]。从 G₁ 到 S 期转化受到 cyclin D/CDK4/6 和 cyclin E/CDK2 的调控。正常情况下，在 G₁ 期的早期，CDK4/6 和 CDK2 的活性较低，主要的原因是缺乏相关的 cyclin。随后，在 G₁ 期的中后期，cyclin D 的水平上升，从而激活 cyclin D/CDK4/6 复合物的活性，促进细胞周期进入 S 期^[18]。这一通路不依赖于 p27^{kip1} 的功能。Tang 等^[19]在对 cyclin D1/D2 和 FOXO 的研究中发现另一个转录抑制蛋白(可能是 bcl-6)也受 FOXO4a 的调控，从而抑制 cyclin D2 的表达，促进 cyclin D1 的表达^[17]。这可能是非依赖 p27^{kip1} 的另外一部分信号通路。

2.2 FOXO 对 cyclin 的调控

2.2.1 调控 cyclin G2 G 型 cyclin 有 3 种：G1、G2 和 I，三者都在终端分化的细胞中表达。cyclin G2 是一种非传统的 cyclin，能阻止细胞周期的进程。过表达的 G 型 cyclin 是能够诱导细胞周期的停滞^[20]。有实验表明，cyclin G2 的 mRNA 在 G₀ 期表达活性增强^[21]，在进入细胞周期进程的细胞数量减少。用无

血清培养基培养的细胞, 18~20 h 之后, 大部分(90%)位于 G_0/G_1 期, 而 FOXO 在 G_0 期位于细胞核内^[22,23]。可以推断 FOXO 与 cyclin G2 在细胞周期的 G_0 期有着密切的联系。

在检测 cyclin G2 上游调控子的研究中发现: cyclin G2 mRNA 的下调需要 PI3K 的刺激, cyclin G2 的启动子有 FOXO 的结合模体, 失活的 FOXO 会引起 cyclin G2 的 mRNA 水平降低, 然而有活性的 FOXO 会直接结合 cyclin G2 启动子增加 cyclin G2 的表达^[24], 从而验证了 PI3K/PKB/FOXO/cyclin G2 这条信号通路。

2.2.2 调控 cyclin B 和 PLK cyclin B 是细胞有丝分裂的正调节因子, 它在细胞的分化增殖中起到重要作用。在对酵母的研究发现, FOXO 能够控制 CLB2 基因簇, 而调控 cyclin B 的表达^[25,26]。Cyclin B 表达的缺失会影响细胞周期末期, 并能使细胞退出 M 期。有研究发现 FOXO 还能调控 cyclin B 的合成和降解^[22]。

PLK 是纺锤体微管和有丝分裂染色体的连接位点, 可调节纺锤体检验点的活性。哺乳动物 PLK 的表达还能调节肿瘤的发生^[27]。人和鼠的 cyclin B 和 PLK 启动子有着与 FOXO 结合位点相似的模体^[28]。FOXO3a 对 cyclin B、PLK 的蛋白质和 mRNA 水平有调节作用^[22]。

2.3 FOXO 调控的其他 cyclin

2.3.1 p130 FOXO4 和 FOXO3a 同样可以直接控制 p130 DNA 转录并且上调 p130 的表达。p130 的变化在 PI3K/PKB/FOXO 调控的细胞周期阻滞中起着关键作用。在 G_0 和 G_1 期转换时发现 PI3K 有短暂而快速的增加, 而进入 G_1 期 2~3 h 后降低; PI3K 的第 2 次峰值出现在 G_1 后期^[22], 但随后 PI3K/PKB 的活性便检测不到。FOXO 在 G_0 期激活, 在 G_1 期失活, 并且在 G_2 期出现第 2 次峰值。 G_2 期末有活性的 PI3K 以及有活性的 FOXO 是细胞周期终止的关键步骤。Han 等^[29]发现, p130 在 G_0 期表达水平较高, 但在其他时期很低。可见, FOXO 能通过调控 p27^{kip1} 和 p130 的表达而使细胞维持在静止期^[16]。FOXO 能够结合 p130 的调控序列^[24], 增加 p130 的 mRNA 和蛋白质水平, p130 水平的增加使细胞进入 G_0 期^[30]。在 G_0 期, p130 磷酸化的水平具有从高到低的变化趋势, 低磷酸化的 p130 维持细胞停滞在 G_0 期。

2.3.2 GADD45 FOXO 同样还能够对细胞的氧化应激产生应答而保护细胞^[31]。生长阻滞以及 DNA 损坏诱导蛋白 45(GADD45)会抑制 Cdc2 激酶而使细

胞停滞在 G_2 -M 期^[32], 而 FOXO4 和 FOXO3a 都能通过结合模体直接激活 GADD45 启动子^[31], 研究还表明此 FOXO 结合模体对 GADD45 启动子的激活非常重要^[33]。因此在氧化应激后, FOXO 会使 GADD45 的蛋白质以及 mRNA 的水平上升, 并使细胞周期停滞在 G_2 期。哺乳动物中, SIRT1 对 FOXO 的抗应激和长寿功能也起着重要作用, 可能与 GADD45 存在互作^[34]。近年研究发现由抗衰老基因 klotho 编码的单次跨膜蛋白克洛托, 可能通过脱落细胞外构域进入血液, 与高亲和的受体结合, 引发下游信号的传播。Yamamoto 等^[35]证实克洛托可以抑制 FOXO 的磷酸化, 促进 FOXO 的入核作用, 启动 SOD 等抗氧化相关蛋白基因的表达, 发挥抗衰老作用。但这与 GADD45 是否存在互作有待研究。

2.4 FOXO 与其他调节细胞周期通路和细胞凋亡的蛋白质

2.4.1 NF- κ B 哺乳动物中 NF- κ B 是 Rel 蛋白家族的成员。NF- κ B 受到上游 IKK 的激活后与 I κ B 分离并移位至细胞核内调控基因的表达。NF- κ B 对细胞周期的调控主要表现在调控 G_1/S 和 G_2/M 调控点及其相关激酶的活性。NF- κ B 会直接或间接地与 cyclin D1 结合, 从而影响下游的 Rb 蛋白来调控细胞周期的进程。FoxO3a 会通过抑制 NF- κ B 的活性影响下游的信号通路^[36]。

2.4.2 p53 p53 是一种重要的肿瘤抑制基因, 可调控多种基因的表达, 从而阻滞细胞周期, 促进细胞的凋亡。机体受到 DNA 损伤、紫外线照射、应激、癌基因异常表达等刺激后, p53 与 FOXO 都能下调 p21^{cip1}、GADD45、14-3-3 等下游蛋白从而调控细胞周期^[37]。有报道 p53 与 FOXO 有着交互的作用^[38,39]。p53 家族与 FOXO 家族有很多相似之处, 两者都能被磷酸化和乙酰化, 并调控许多相同的基因。Motta 等^[37]认为在 PTEN^{-/-} 肿瘤细胞中 p53 和 FOXO3a 有着相互的联系。Singh 等^[40]提出在一些肿瘤细胞中, p53 会非依赖于第 10 号染色体的同源丢失性磷酸酶-张力蛋白基因(PTEN), 通过编码 PI3K 的 p110 α 亚基(PI3KCA)调控细胞的生存, 并且同时影响 FOXO。血清和糖皮质激素蛋白激酶 1(SGK1)也是 p53 下游的底物, 过表达的 SGK1 能够通过磷酸化而阻止 FOXO3a 的活性从而抑制细胞的凋亡。可以断定, p53 与 FOXO 都将成为治疗癌症的靶位点。但是现在仍存在一些需要解决的问题如: DNA 损坏后依赖 p53 的成员会抑制 FOXO3a, 当 FOXO 激活后是否存

在从 FOXO 到 p53 的负反馈途径仍需进一步的研究。

3 小结

综上所述,细胞周期是一个精密调控的复杂的事件。虽然已经明确了 FOXO 可以调控众多的下游底物并能够与其他的许多信号分子相互作用^[41,42],从而影响细胞周期的进程,进而调节细胞的分化、增殖、凋亡。然而,如何应用这些研究成果来对肿瘤和癌症细胞周期进程以及细胞凋亡的调控,需要进一步研究。目前,p53 和 NF- κ B 等其他控制细胞周期的信号分子对 FOXO 的正负反馈作用的信号网络、p130 在各细胞周期中与 FOXO 调控的相互关系以及 FOXO 在调控细胞周期和凋亡信号通路中新蛋白质的发现值得进一步探讨。另外,目前很多研究工作仅局限在对培养细胞的研究,而一些对 FOXO 产生影响的抗癌化学药物以及中草药在组织器官及模型动物上的作用还有待进一步探索。

参考文献(References)

- [1] Weigel D *et al.* *Cell*, 1989, **57**: 645
- [2] 李学斌等. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32**: 600
- [3] Jacobs FM *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 33959
- [4] Hoekman MF *et al.* *Gene Expr Patterns*, 2006, **6**: 134
- [5] 李学斌等. *中国临床康复*, 2006, **10**: 158
- [6] Burgering BM *et al.* *Trends Biochem Sci*, 2002, **27**: 352
- [7] Hosaka T *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 2975
- [8] Le-Niculescu H *et al.* *Mol Cell Biol*, 1999, **19**: 751
- [9] Ramjaun AR *et al.* *Oncogene*, 2007, **26**: 970
- [10] Obexer P *et al.* *Cell Death Differ*, 2007, **14**: 534
- [11] Greider C *et al.* *Oncogene*, 2002, **21**: 7765
- [12] Nallamshetty S *et al.* *FEBS Lett*, 2005, **579**: 6529
- [13] Fukuoka M *et al.* *Int J Mol Med*, 2003, **12**: 503
- [14] Kuiperij HB *et al.* *Oncogene*, 2005, **24**: 2087
- [15] Abid MR *et al.* *J Biol Chem*, 2005, **280**: 29864
- [16] Yang H *et al.* *Oncogene*, 2005, **24**: 1924
- [17] Schmidt M *et al.* *Mol Cell Biol*, 2002, **22**: 7842
- [18] Zacharek SJ *et al.* *Cancer Res*, 2005, **65**: 11354
- [19] Tang TT *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 14255
- [20] Bennin DA *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 27449
- [21] Martinez-Gac L *et al.* *Mol Cell Biol*, 2004, **24**: 2181
- [22] Alvarez B *et al.* *Nature*, 2001, **413**: 744
- [23] Kops GJ *et al.* *Mol Cell Biol*, 2002, **22**: 2025
- [24] Chen J *et al.* *J Immunol*, 2006, **176**: 2711
- [25] Pic A *et al.* *EMBO J*, 2000, **19**: 3750
- [26] Zhu G *et al.* *Nature*, 2000, **406**: 90
- [27] Smith P *et al.* *Cell Cycle*, 2006, **5**: 1262
- [28] Brunet A *et al.* *Cell*, 1999, **96**: 857
- [29] Han SY *et al.* *Biol Pharm Bull*, 2000, **23**: 420
- [30] Chen J *et al.* *J Immunol*, 2006, **176**: 2711
- [31] Kobayashi Y *et al.* *Int J Mol Med*, 2005, **16**: 237
- [32] Li X *et al.* *Cell Mol Life Sci*, 2005, **62**: 894
- [33] Furukawa-Hibi Y *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 26729
- [34] Brunet A *et al.* *Science*, 2004, **303**: 2011
- [35] Yamamoto M *et al.* *J Biol Chem*, 2005, **280**: 38029
- [36] Lin L *et al.* *Immunity*, 2004, **21**: 203
- [37] Motta MC *et al.* *Cell*, 2004, **116**: 551
- [38] You H *et al.* *Cell Cycle*, 2005, **4**: 37
- [39] Kyoung Kim H *et al.* *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2005, **60**: 4
- [40] Singh B *et al.* *Genes Dev*, 2002, **16**: 984
- [41] Huang H *et al.* *Future Oncol*, 2006, **2**: 83
- [42] Li X *et al.* *Zoolog Sci*, 2005, **22**: 1339

Mediation of the Cell Cycle and Apoptosis by FOXO Transcriptional Factors in Mammals

Zhen-Qi Zhou, Tian Wang, Fang-Xiong Shi*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Cell cycle and apoptosis are two crucial events in the mammalian cell. FOXO plays a critical role in cell proliferation, growth, reproduction, and aging in mammals. FOXO induces the cell proliferation and controls the cell cycle, is a switch between survive and death of cells. Recent years, lots of researchers are engaging in FOXO on tumor and cancer. Some signal pathways including PI3K/PKB, Ras regulate the FOXO, FOXO in turn regulate the signal molecular downstreams, such as, FasL, Bim, p27^{kip1}, cyclin G2, cyclin B, p130 and GADD45. FOXO and other cell cycle regulators join as a complex network of cell signals and then control the progress of cell cycle.

Key words FOXO; cell cycle; apoptosis

Received: June 26, 2006 Accepted: December 18, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30571335) and Grant-in-Aid for Initial Funding for Returned Scholars from the Ministry of Education of China

* Correspondence author. Tel: 86-25-84399112, Fax: 86-25-84395314, E-mail: fxshi@njau.edu.cn