

来,这些分子的结构和功能在果蝇和脊椎动物中是高度保守的。大量的证据表明,Hh/Shh 刺激的细胞应答不仅仅被 Cubitus interruptus/Gli 所介导,还存在其他的信号转导分子参与 Hh 信号通路的应答,导致其作用的更加多样性。鉴定这些信号通路的相关分子能深入了解 Hh 在动物发育中的作用,并且阐明 Hh 信号转导的机制将有助于研究疾病的发生机理,对于治疗人类疾病有重要意义。

摘 要

Hedgehog 蛋白是在果蝇中首先发现的分泌蛋白,在脊椎动物中一些 Hedgehog 类似物已经被鉴定出来,形成一个 Hedgehog 蛋白家族。Hedgehog 家族与动物发育的许多过程有关,包括与果蝇幼虫体节极性的形成及成虫附肢等器官的形成有关。在脊椎动物胚胎诱导、模式形成和许多不同组织的形态发生中起作用。另外,hedgehog 通路的异常活化可以导致发育异常及基底细胞痣综合征和前脑无裂畸变等一些严重的疾病的发生。

参 考 文 献

- [1] Villavicencio EH et al. ,2000, *Am J Hum Genet.* , **67**: 1047 - 1054.
- [2] Ingham PW. ,1998, *EMBO J.* , **17**:3505 - 3511.
- [3] Matsumoto, H. et al. , 2002, *Dev. Biol.* , **1245**: 280 - 290.
- [4] Pathi, S. et al. ,2001, *Mech Dev.* , **106**:107 - 117.
- [5] Ingham, P. ,2001, *Science* , **294**:1879 - 1881.
- [6] Micchelli CA et al. ,2002, *Development* . **129**:843 - 851.
- [7] Zeng X et al. ,2001, *Nature* , **411**:716 - 720.
- [8] Monnier V et al. ,2002, *BMC Dev Biol.* , **2**:4.
- [9] Mastronardi F et al. ,2000, *Neuroreport* , **11**:581 - 585.
- [10] McCarthy RA et al. ,2002, *J Biol Chem.* 8 (epub ahead of print).
- [11] Gurdon JB and Bourillot PY. ,2001, *Nature* , **413**:797 - 803.
- [12] Ingham PW and McMahon AP. 2001, *Genes Dev.* , **15**: 3059 - 3087.
- [13] Ybot-Gonzalez P et al. ,2002, *Development* , **129**:2507 - 2517.
- [14] Marti, E. and Bovolenta, P. ,2002, *Trends Neurosci.* , **25**: 89 - 96.
- [15] Ruiz I Altaba A et al. ,2002, *Nat Rev Neurosci.* , **3**:24 - 33.
- [16] Mirsky, R. et al. ,2002, *Physiol Paris.* **96**:17 - 24.
- [17] Ohkubo, Y. et al. ,2002, *Neuroscience* , **111**:1 - 17.
- [18] Agarwala, S. et al. ,2001, *Science* , **291**:2147 - 2150.
- [19] Britto J et al. ,2002, *Nat Neurosci.* , **5**:103 - 110.
- [20] Vogan KJ et al. ,2000, *Cell* , **101**:9 - 21.
- [21] Schilling TF et al. ,1999, *Dev. Biol.* , **210**:277 - 287.
- [22] Chiang C et al. ,2000, *Dev. Biol.* , **236**:421 - 435.
- [23] Byrd N et al. ,2002, *Development* , **129**:361 - 372.
- [24] Bhardwaj G et al. ,2001, *Nat Immunol.* , **2**:172 - 180.
- [25] Spinella-Jaegle S et al. ;2001, *J Cell Sci.* , **114**:2085 - 2094.
- [26] Gustafsson MK et al. ,2002, *Genes Dev.* , **16**:114 - 126.
- [27] Chuong CM et al. ,2000, *Cell Mol. Life Sci.* , **57**:1672 - 1681.
- [28] diIorio PJ et al. ,2002, *Dev. Biol.* , **244**:75 - 84.
- [29] Deshpande G et al. ,2001, *Cell* , **106**:759 - 769.
- [30] Hopyan, S. et al. ,2002, *Nat Genet.* **30**:306 - 310.
- [31] Gao, B. et al. ,2001, *Nat Genet.* **28**:386 - 388.
- [32] Umehara, F. et al. ,2002, *Cell Mol Biol.* **48**:187 - 189.
- [33] Pomeroy SL et al. ,2002, *Nature* , **415**:436 - 442.
- [34] Taipale J and Beachy PA. ,2001, *Nature* , **411**:349 - 354.
- [35] Tojo M et al. ,2002, *Br J Dermatol.* , **146**:69 - 73.
- [36] Heussler HS et al. ,2002, *Arch Dis Child.* , **86**:293 - 296.

MITF 与黑素细胞的发育、分化和功能调节

刘 栋* 朱文元

(南京医科大学第一附属医院皮肤科 南京 210029)

MITF(Microphthalmia-associated transcription factor, MITF)是小眼畸形相关转录因子,具有基本-螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链(basic-helix-loop-helix-leucine zipper, bHLHZip)结构^[1]。研究发现 MITF

参与了多种细胞包括色素细胞、肥大细胞、破骨细胞的发育、分化和功能调节,其中尤其在色素细胞中起

* 联系人。E-mail: ruohualiu@yahoo.com.cn

到关键作用^[2]。本文对有关 MITF 研究的最新进展加以综述,重点介绍其在黑素细胞中的作用。

一、MITF:起源和发现

MITF 的发现源于突变小鼠。1942 年 Hertwig 发现一种放射诱导的突变小鼠,其后代表现出小眼畸形(眼裂减小)、早发性耳聋、皮毛和虹膜的色素减退,将其命名为 *microphthalmia*(小眼畸形)(*mi/mi*) 小鼠,突变的基因称为 *mi* 基因^[3]。研究证实耳聋和色素减退是由于皮肤和内耳黑素细胞缺乏所致,小眼畸形则是破骨细胞发育障碍引起。此后又发现了多种 *mi* 等位基因^[4]。1990 年 Hara 等在研究血管加压素启动子的调控时获得一种转基因小鼠 *VGA-9*,表现出小眼畸形和白色皮毛^[5,6]。*VGA-9* 小鼠表型非常类似于 *mi* 小鼠,等位基因研究证实 *VGA-9* 小鼠转基因插入突变恰好发生在 *mi* 位点。1993 和 1994 年, Hodgkinson^[1] 和 Tachibana^[7] 等分别利用 *VGA-9* 小鼠成功克隆出 *microphthalmia* 基因和其人类对应物 MITF 基因。

二、MITF:基因结构和蛋白异构体

小鼠 *mi* 基因定位于第六号染色体,该基因的结构基因由 9 个外显子构成,编码的蛋白称为 *Mitf* 蛋白,*Mitf* 蛋白由 419 个氨基酸残基构成,其中包含 1 个 bHLHZip 结构,该结构为蛋白质功能区^[1]。人类 MITF 基因定位于人类第三条染色体 3P^{14.1} - 3P^{12.3}。MITF 基因的结构也是由 9 个外显子构成,编码的蛋白与 *Mi* 蛋白有 94.4% 的同源性^[7]。根据蛋白氨基端的不同,目前已发现至少 6 个异构体,即 MITF-A、-B、-C、-D、-H 和 -M^[8-11]。其中 MITF-M 由 419 个氨基酸构成,氨基端包含 1 个 M 域,它选择性表达于黑素细胞和黑素瘤细胞;MITF-A 由 520 个氨基酸构成,氨基端包含 1 个 A 域和 B1b 域,与 *Mitf*-M 的羧基端共享相同的序列,它表达于包括视网膜色素上皮(RPE)在内的多种类型的培养细胞,*Mitf*-M 则在胚胎和发育中的鸡眼睛 RPE 表达丰富。各种 MITF 异构体都具有 bHLH-LZ 结构,这是 MITF 的活性部位。它们的氨基端由 MITF 基因的第一外显子编码,第一外显子的不同导致氨基端结构的差异,而且该外显子在不同的启动子控制下,表现出 MITF 各个亚型在不同细胞类型中的优先表达,上述 MITF 亚型是由 MITF 基因可变剪切形成的。目前已从 7 种物种中克隆了 MITF,包括人、小鼠、大鼠、仓鼠、鸡、鹌鹑、斑马鱼等。这些克

隆高度同源,尤其是 MITF 的 bHLHZip 结构、2 个活化区和 MAPK 靶序列(MAPK 在 MITF 的作用位点)。术语中,MITF 指人类蛋白,*Mitf* 指其他物种蛋白,而 MITF 亦为 MITF/*Mitf* 各种异构体的总称。如果没有特别说明,MITF/*Mitf* 指 MITF-M/*Mitf*-M 异构体。

MITF 是一种具有 bHLHZip 转录因子,在已知的 24 个 bHLH 转录因子家族中,有 6 个包含有亮氨酸拉链结构:MYC、Mac、SREBP、AP-4、USF 和 TFE 家族,MITF 在结构上与 TFEC、TFE3、TFEB 最接近,因此可以将其划分入 TFE 家族。MITF 能以同源二聚体或与 TFE3、TFEB、TFEC 形成异源二聚体发挥作用^[12]。MITF 通过其 bHLH-LZ 结构与特异的 DNA 结构相结合,即具有“CATGTG”核心结构的 DAN 区域。HLH-LZ 区介导同源或异源二聚体的形成,MITF 突变导致 HLH-LZ 或 ZIP 区缺失,不能与野生型 MITF 形成二聚体,而野生型蛋白单独不能达到发挥功能的阈水平。MITF 突变亦可以显性负调控的方式发挥作用,即突变型与野生型蛋白形成二聚体,但突变蛋白的作用使二聚体功能丧失^[13]。

三、MITF 突变:Warrdenburg 综合征和 Tietz 综合征

人类 MITF 基因突变引起 Warrdenburg 综合征 2A 型(Warrdenburg Syndrome 2A type, WS2A),这是一种常染色体显性遗传性疾病,表现为皮肤斑驳样色素减退斑、虹膜色素异常、听觉神经性耳聋,是一种典型的听觉-色素综合征^[14]。现已证明上述症状是由于相应部位的黑素细胞缺乏所致。目前,已报道超过 20 种的 MITF 突变等位基因,这些基因编码截短(truncated)或非截短的突变 MITF 蛋白^[15]。前述 *mi* 小鼠正是 WS2 的动物模型。除 WS2A 外,WS 根据临床表现不同还有 3 种类型,但各型均有听力色素症状。其中 WS1/WS3 由 PAX3 突变引起,WS4 由 SOX10/EDN3 突变引起,共转染分析表明,SOX10 协同 PAX3 能强刺激 MITF 的表达,二者能直接与 MITF 基因启动子结合,因此,在 WS 中,这三个基因发生相互作用,以此可解释所有各型 WS 中都出现的听力-色素症状^[16]。

Tietz 综合征是另外一种色素-听觉综合征^[17],表现与 WS2 类似但色素减退更为广泛和严重,此外重度听力丧失是 Tietz 综合征的一个特征,而在

WS2 中只有 77% 的个体有不同程度的听力丧失。基因检测发现,在 Tietz 综合征中 MITF 基因发生框架内突变,导致 MITF 蛋白 Arg217 缺失。在 Tietz 综合征中突变的 MITF 蛋白在体外显示有显性负调控效应(损伤核定位能力),而 WS2 中的 MITF 蛋白没有这种现象。WS2 和 Tietz 综合征都是常染色体显性遗传,症状在杂合子个体更为显著。这些个体有一个野生型 MITF 基因拷贝和一个突变的基因拷贝。在 Tietz 综合征中,可能突变的 MITF 蛋白干扰了正常 MITF 蛋白的功能(显性负调控效应),导致 MITF 蛋白功能丧失,从而导致黑素细胞发育障碍,这可以用来解释该综合征高度的外显性与严重的听力丧失。而在 WS2 中,突变的 MITF 蛋白无显性负调控效应,因此仍存在有功能的 MITF 蛋白,但其剂量不足以实现黑素细胞完全发育,称为单倍体剂量不足(haploinsufficiency)。在 WS2 不同个体症状严重程度的差异可能是由于残留的正常 MITF 蛋白量的不同以及不同个体不同器官黑素细胞发育所需 MITF 蛋白的量不同所致^[13]。

四、MITF 与黑素细胞的发育和分化

在人类和小鼠,MITF/mitf 基因突变表型主要表现为皮肤色素减少、听力损害和虹膜色素异常,这是突变所导致的皮肤、内耳黑素细胞以及眼睛黑素细胞和视网膜色素上皮(RPE)细胞缺乏或功能障碍引起,说明 MITF 在黑素细胞发育、存活中起着重要作用。MITF 具有 bHLHzip 结构,已知多数具有 bHLH 结构的转录因子可参与细胞的分化。Mitf 在黑素细胞和成黑素细胞中表达,VGA9 小鼠 Mitf 突变导致黑素细胞缺乏,因此可以推测 MITF 可能参与了黑素细胞分化。有研究显示^[18],将 MITF 异位表达于 NIH/3T3 细胞,有些细胞发生转化,表现为细胞形态树突化,表达 TRP-1 (tyrosinase related protein 1, 酪氨酸酶相关蛋白 1, TRP-1) 但不含成熟的黑色素颗粒(可能是由于 NIH/3T3 细胞酪氨酸酶基因的突变所致)。在缺失 MITF 同源物 nacre 基因的斑马鱼胚胎中注射入野生型 nacre,发现注射入的 nacre 足以促进色素细胞的发育^[19]。

MITF 是神经嵴细胞定向分化发育成黑素细胞过程中最早发生的标志之一^[20],见于胚胎(embryo, E)9.5-10.5 天,在 Mitf 基因突变小鼠 Mitf^{mi-ew} 胚胎神经嵴,于 E10.5 天可见到 Mitf⁺ 的细胞,但这些细胞不能继续表达成黑素细胞标志 TRP-2 (tyrosinase related protein-2, 酪氨酸酶相关蛋白-2),在

E12.5 天则不能检测到这些细胞。这些细胞可能发生了凋亡或丧失身份(lose identification),向另外一种类型细胞分化。进一步研究发现,Mitf 可调控转录因子 Tbx2, Tbx2 是 T-box 基因家族的一个成员,参与保持细胞的身份, Tbx2 启动子含有一个 Mitf 识别序列, Mitf 可以与之结合并活化 Tbx2 的表达,这说明 Mitf 可通过调节与黑素细胞发育有关的基因而发挥作用^[21]。上述 Mitf(+) 的细胞在培养状态下与野生型细胞类似,可表达酪氨酸激酶受体 C-Kit,但这些细胞后来不能维持 Mitf 的表达和上调 C-Kit 的表达,说明一方面 Mitf 可促进 Mitf⁺/Kit⁺ 的前体向 Mitf⁺/Kit⁺/TRP-2⁺ 的细胞分化,另一方面通过影响 Kit 表达水平影响成黑素细胞的存活^[22]。

鼠胚胎 Mitf 基因原位杂交显示^[20],在胚胎发育早期,神经嵴来源的细胞中有 Mitf 的表达, Mitf 阳性细胞最早见于 24 体节(somite stage)的眼神经上皮层(E9.5 天)。在 29-30 体节, Mitf 表达局限于视网膜色素上皮,在 E16.5 天,视网膜色素上皮以及视杯后仍可见 Mitf 阳性细胞。这些细胞可能来源于神经嵴,将来发育为脉络膜和虹膜色素细胞。在神经嵴, Mitf 阳性细胞最早见于 25~26 体节(E~10 天)的头嵴和迷走神经嵴。随着胚胎的发育, Mitf 阳性的细胞开始增多,这些细胞位于背-侧和腹-中线神经嵴移行通路。例如,在 29-30 体节,听泡和后脑神经上皮的 Mitf 阳性细胞在随后的数天中逐渐增加,并开始和视泡密切联系,最后在 E16.5 于将来发育为纹脉管处堆积。在 E12.5 天神经嵴背-侧通路的 Mitf 阳性细胞进入皮肤上皮, E16.5 天,在真皮表皮可见到这些细胞。总的来说,在胚胎发育过程中, Mitf 阳性细胞数目逐渐增多,继而减少,在出生时消失。而毛囊内的 Mitf 阳性细胞于出生时持续存在。

皮肤黑素细胞来源于神经嵴, MITF 参与了其分化,因此, MITF/Mitf 突变将导致皮肤着色改变。原位杂交证实毛囊是成年小鼠唯一表达 Mitf 的组织。这提示即使是在发育后, Mitf 在毛囊黑素细胞中仍作为转录因子发挥作用。小鼠发育之后,皮肤黑素细胞局限于毛囊,而在人类还主要存在于表皮。MITF 参与了人类表皮黑素细胞分裂和黑素化(即分化)过程,对外界刺激如 UV 做出反应。

五、MITF 与黑素生成的调控

MITF 可调控酪氨酸基因家族的表达,从而参

与黑素生成的调控^[23]。酪氨酸酶基因家族的三个成员:酪氨酸酶(tyrosinase)、酪氨酸酶相关蛋白-1(TRP-1)、酪氨酸酶相关蛋白-2(tyrosinase related protein-2, TRP-2)基因的启动子都含有一个“M box”的结构, M box 的核心结构为“CATGTG”, MITF 可以与该结构结合,从而反式激活相应的基因表达。

MITF 通过与酪氨酸酶基因家族启动子的作用,一方面指导它们在黑素细胞中特异性表达,另一方面参与外界刺激对黑素细胞黑素生成的调控。根据人 tyrosinase 基因缺失和突变分析,发现在 tyrosinase 启动子有三个结构:TDE、M box 和 E box,这三个结构均含有“CATGTG”核心模体,它们对于 tyrosinase 在色素细胞中有效表达是必须的,而在非色素细胞中具有同样结构的启动子仅有微弱表达,进一步研究发现 MITF 能与这些结构结合,刺激启动子的转录活性。MITF 本身也具有细胞特异性,如 MITF-M 仅在黑素细胞和黑素瘤细胞中表达,因此,MITF 在酪氨酸酶的黑素细胞特异性表达中起着关键作用。TRP1 和 TRP2 也具有 M-box 结构,该结构在酪氨酸酶家族高度保守,MITF 可与 TRP-1 基因 M-box 结合而活化其表达,并指导其在黑素细胞中特异性表达。MITF 对 TRP-2 基因表达的作用尚有争议,转基因实验中以 Hela 细胞中共转染人 MITF 和 TRP-2 基因,结果显示 MITF 不能转活化 TRP-2 基因。而在 NIH3T3 细胞中,小鼠 Mitf 能活化人 TRP-2 基因,在 Mitf 缺失(null)小鼠,TRP-2 的表达尚大部分保留。MITF 异位性表达,仅能使结构性表达 TRP-2 的细胞发生向黑素细胞表型的转化。上述结果提示 MITF 可能不是 TRP-2 基因的主要调控因子。

外界刺激如 α 黑素细胞刺激素(α -melanocyte-stimulating hormone, α -MSH), SCF(stem cell factor)等,可通过一系列信号级联途径,如 CAMP 途径、MAPK 途径,刺激 MITF 的表达,或使 MITF 磷酸化而激活或降解,再由 MITF 介导,通过与酪氨酸酶基因家族成员的启动子相应区域作用,调控黑素的生成。

黑素主要分为两类,即黑/棕色的优黑素和红/黄色的褐黑素,皮肤褐/优黑素比例的不同决定了不同的皮肤类型。在红发、白肤的个体褐黑素水平较高,而在黑发、深肤色个体优黑素水平较高。优黑素/褐黑素的比例主要受 α -MSH 和 ASP(agouti signal protein)调控。 α -MSH/MC-1 信号刺激优黑素的生

成,而 ASP 信号刺激褐黑素的生成^[24]。研究发现 ASP 能抑制 α -MSH、毛喉素诱导的优黑素生成,在该过程中,tyrosinase、TRP-1、TRP-2 表达下调。进一步研究表明,ASP 能够抑制 α -MSH 诱导的 MITF 基因的表达以及 MITF 与 tyrosinase 基因启动子 Mbox 的结合,从而导致 tyrosinase 表达下调,最终优黑素生成减少^[25]。

六、MITF 与其他信号分子的相互作用

黑素细胞的发育、分化与黑素的合成调节是一个复杂的过程,其中有多种信号分子参与该过程的调控,构成复杂的信号网络。MITF 作为其中的关键分子,与其他信号分子发生相互作用。

1. MSH

α -MSH 可刺激黑素细胞黑素合成,该过程通过 CAMP 依赖的信号转导途径所介导。 α -MSH 与黑素细胞膜表面的特异性受体 MC-1R(melanocortin 1 receptor)结合后,可激活腺苷酸环化酶,导致胞内 CAMP 水平增高,但之后的过程与经典的 CAMP 途径有所不同,在酪氨酸酶基因 5'侧翼区并未发现 CAMP 反应元件(CAMP responsive element, CRE),这提示 CREB(CRE binding protein)不是直接作用于酪氨酸酶基因启动子。后来发现,MITF 介导了这一过程。MITF 可以同酪氨酸酶启动子的 E-box 和 M-box 的“CATGTG”模体结合,反式激活酪氨酸酶的表达,而在 MITF 基因启动子区域有 CRE 结构,CREB 与 MITF 的 CRE 结合,从而上调其转录活性,激活酪氨酸酶基因的表达^[26]。

2. Steel 因子

Steel 因子在细胞膜上的受体为 c-Kit。小鼠 Steel 因子或其受体的突变所导致的黑素细胞表型异常与 Mitf 突变类似。研究表明 C-Kit 信号途径在黑素细胞胚胎发育中亦起到关键作用,Mitf 与 C-Kit 的任何一个缺失或无功能时,成黑素细胞(melanoblast)仍能发生,但于出现后不久即消失,Kit 基因启动子含有一个 E-box, Mitf 通过此结构可活化 Kit 的转录。同样,在成黑素细胞中,Kit 表达上调有赖于 Mitf 的表达,在黑素细胞中,Kit 信号则可调节 MITF 的活性和稳定性。这提示在黑素细胞中三种突变可能影响了共同的生长分化途径的功能。用 Steel 和 TPA 处理黑素瘤细胞,刺激 c-kit,活化有丝分裂原活化的蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号途径,通过细胞内信号级联反应,可使 MITF 在 Ser73 位发生磷酸化,磷酸化

的 MITF 其核分布以及与 DNA 结合的活性并未发生改变,但可增加核内一种蛋白 P300/CBP 的水平, P300/CBP 作为转录协同因子,反过来可增强 MITF 的转录活性,刺激酪氨酸酶基因的表达,从而增加黑素的合成。最近发现 c-Kit 信号还能触发 MITF 在 Ser409 被 Rsk-1 磷酸化, Rsk-1 是细胞周期调节的 S6 蛋白激酶家族成员之一, MITF 在 Ser409 的磷酸化与 Ser73 不同,该位置的磷酸化使其靶向泛素(ubiquitin)依赖的蛋白水解酶发生降解。因此, c-Kit 信号触发了 MITF 的双重磷酸化过程,使 MITF 活化和降解相偶联,表现为 MITF 的短暂活化和之后的降解^[27,28]。

3. ASP

Agouti 信号蛋白(agouti signal protein, ASP)可降低黑素细胞优黑素合成而促进褐黑素合成。该过程中酪氨酸酶活性抑制, TRP1、TRP2 表达丧失。ASP 可抑制成黑素细胞的分化,减弱 Mitf 的表达及启动子活性,伴随 Mitf 与酪氨酸酶基因 M-box 的结合减少,这提示 Mitf 在成黑素细胞分化和黑素合成中起到关键作用^[25]。

4. WNT

WNT(Wingless in *Drosophila*, Int in mouse) 信号途径是神经嵴定向发育成色素细胞过程中的必须协同因子之一。将 β 链蛋白(β -catenin) mRNA (WNT 信号途径分子成员)显微注射于斑马鱼神经嵴细胞异位性表达,可促进神经嵴细胞分化为色素细胞。而显性负调控形式的 Tcf 和 WNT 可抑制神经嵴细胞向色素细胞的分化。Wnt-1 和 Wnt-3a 为神经嵴前体扩张所需要,参与决定早期发育中神经嵴细胞的命运,定向分裂 Wnt-1 和 Wnt-3a 基因可导致小鼠神经嵴来源的细胞其中包括黑素细胞的缺陷。Wnt-3a 的起始表达可于 E 7.5 天检测到,早于 Mitf,研究表明, Wnt-3a 触发的细胞内信号转导,导致 β -catenin 的积聚, β -catenin 与 LEF-1 结合形成复合物,再与 Mitf 基因启动子的 LEF-1 结合位点相结合,从而激活 Mitf 的表达^[29]。

结 语

MITF 作为色素细胞信号转导途径下游的一个信号分子,介导了多种信号级联过程,在色素细胞发育、分化和功能调节中起到关键性作用,因此它可以作为一个关键性靶位,用于研究各种外界信号包括药物对黑素细胞黑素生成功能的调节,从而为色素障碍性皮肤病提供有效的治疗手段。目前已将

MITF 作为黑素细胞的一种特异性标志用于恶性黑素瘤临床诊断的研究^[30,31]。

摘 要

MITF 是一种具有基本-螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链(basic-helix-loop-helix-leucine zipper, bHLHZ-ip)结构的转录因子,研究证实其在色素细胞的发育、分化和功能调节中发挥关键性作用。MITF 基因突变导致色素细胞的发育缺陷与功能障碍,同时 MITF 与其他信号分子发生复杂的相互作用。深入研究 MITF 对色素细胞发育分化和功能调节的影响对色素细胞生物学的发展具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Hodgkinson, CA. et al., 1993, *Cell*, **74**: 395 - 404.
- [2] Moore, K. J. 1995, *Trends Genet*, **11**: 442 - 448.
- [3] Hertwig, N., 1942, *Abstammungs-Vererbungsl*, **80**: 220 - 246.
- [4] Moore, KJ, 1995, *Trends Genet*, **12**: 344 - 354.
- [5] Hara, Y. et al., 1990, *Mol Brain Res.*, **8**: 319 - 324.
- [6] Tachibana, M. et al., 1992, *Mol. Cell Neurosci*, **3**: 433 - 445.
- [7] Tachibana, M. et al., 1994, *Hum Mol Genet*, **3**: 553 - 557.
- [8] Yasumoto, K. et al., 1998, *Pigment Cell Res.*, **11**: 329 - 336.
- [9] Shibahara S. et al., 1999, *Invest Dermatol Symp Procl*, **4**: 101 - 104.
- [10] Altschmied, J. et al., 2002, *Genetics*, **161**(1): 259 - 267.
- [11] Takeda, K. et al., 2002, *Biochim Biophys Acta*, **20**: 1574 (1): 15 - 23.
- [12] Weilbauecher, KN. et al., 1998, *J. Exp. Med.*, **187**: 775 - 785.
- [13] Nobukuni, Y. et al., 1996, *Am J Hum Genet*, **59**: 76 - 83.
- [14] Liu, XZ. et al., 1995, *Am J Med Genet*, **55**: 95 - 100.
- [15] Tassabehji, M. et al., 1995, *Hum Mol Genet*, **4**: 2131 - 2137.
- [16] Bondurand, N. et al., 2000, *Hum Mol Genet*, **13**: 1907 - 1917.
- [17] Smith, SD et al., 1997, *Am. J. Hum Genet*, **61**(suppl): A347.
- [18] Tachibana, M. et al., 1996, *Nat Genet*, **14**: 50 - 54.
- [19] Lister, JA. et al., 1999, *Development*, **126**: 3757 - 3767.
- [20] Nakayama, A. et al., 1998, *Mech Develop*, **70**: 155 -

- 166.
- [21] Carreira, S. et al., 2000, *J. Biol. Chem.*, **275**(29): 21920-21927.
- [22] Tachibana, M., 1999, *J. Investig Dermatol Symp Proc.*, **4**(2): 126-129.
- [23] Shibahara, S. et al., 1998, *Pigment Cell Res.*, **11**: 329-336.
- [24] Furumura, M. et al., 1996, *Pigment Cell Res.*, **9**: 191-203.
- [25] Aberdam, E. et al., 1998, *J. Biol. Chem.*, **273**: 19560-19565.
- [26] Bertolotto, C. et al., 1998, *Cell Biol.*, **142**: 827-835.
- [27] Hemesath, T.J. et al., 1998, *Nature*, **391**: 298-301.
- [28] Wu, M. et al., 2000, *Genes Dev.*, **14**: 301-312.
- [29] Takeda, K. et al., 2000, *J. Biol. Chem.*, **275**: 14013-14016.
- [30] Selzer E., et al., 2002, *Cancer Res.*, **2**(7): 2098-2103.
- [31] Granter SR, et al., 2002, *Appl Immunohistochem Mol. Morphol.*, **10**(1): 47-51.

细胞增殖寿命的延长研究进展

屈艺* 黄翔** 王正荣*,**** 谢慧琪*** 杨志明***

(* 四川大学基础医学与法医学院分子生物研究室 成都 610041)

(** 四川省人民医院泌尿外科 成都 610072)

(*** 四川大学华西医院修复重建研究室 成都 610041)

细胞具有增殖能力的关键是能顺利通过细胞周期的各个控制点。在体外培养的条件下,细胞会因生长环境的不适宜而触发 p16、p53 等因子表达,从而导致细胞不能顺利通过 G₁→S 限制点而进入休眠(G₀)状态。即使细胞能在体外培养环境下顺利增殖,但随着有丝分裂的进行,染色体端粒的缩短,细胞也必然会进入 M₁ 期(Mortality stage 1)而逐渐凋亡。现在,人们已经找到了一些方法,通过控制细胞周期调控的某一环节及延长细胞端粒长度来逆转细胞衰老与凋亡的命运。现有的这些方法主要采用了基因改造的策略,通过向种子细胞中导入一定的基因而使其能大量地、快速地甚至永久地生长。

一、导入病毒癌基因延长细胞寿命

常用的病毒癌基因包括 SV40 病毒 LT 抗原(SV40-LT)、腺病毒蛋白、人乳头状瘤病毒 E₆、E₇ 蛋白等。

1. SV40 的结构

SV40 是 60 年代初发现分离的猴肾细胞病毒,人为其自然宿主,它由结构蛋白(VP1, VP2, VP3 和两种抗原(LT 和 st)组成^[1]。SV40 病毒早期转录区转化基因(A 基因)编码 LT 和 st 抗原。LT 抗原分子量为 94ku(1Da = 0.9921 u),含 708 个氨基酸,98%定位于细胞核内,具有 ATP 酶和 DNA 解旋酶

活性,使蛋白质丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化、ADP 核糖基化和乙酰基化。LT 抗原还有活化宿主细胞核糖体基因、诱导 DNA 合成、修饰蛋白质合成起始因子等作用。st 抗原的分子量为 17ku,定位于核内及胞质内,能反式激活 RNA 多聚酶 II 和 III 基因的启动子,以及 c-myc 和 c-fos 癌基因转录,使细胞质肌动蛋白缺失和细胞黏附性下降,LT 抗原为细胞转化启动所必需的,对转化起决定作用,而且转化细胞表型的维持必须要 LT 抗原的连续表达。st 抗原对细胞的转化是非必需的,但可起加强作用,两者共同维持转化表型。

2. SV40-LT 延长细胞寿命的机制

LT 延长细胞寿命并使细胞永生化的功能依赖于其与生长抑制因子 pRB 和 p53 的相互作用。衰老细胞积聚较多低磷酸化 pRB 结合 E₂F 是 G₁ 期的关键性抑制点^[2]。LT 抗原通过其 aa101-118 结合位点结合 pRB-E₂F 复合物,该结合位点和 J 区(aa 17-32 和 42-47)的相互作用使 E₂F 从 LT-pRB 的复合体上解离下来^[3]。小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryo fibroblasts, MEF)培养中,涉及在 N-末端(T1-147)这两个序列的研究较多。当编码 aa1-

**** 联系人。

E-mail: Wangzr-76@hotmail.com