

细胞周期负调控

刘平湖 童坦君

(北京医科大学生化与分子生物学系 100083)

细胞周期调控的关键是几个不可逆的转换点。细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶家族(cyclin-dependent kinases, CDKs)对这些转换点有重要调节作用^[1,2]。

近来发现在哺乳动物细胞周期调控中存在多种起抑制作用的蛋白质,即CKI(cyclin-dependent kinase inhibitor): p21对多种CDK-cyclin复合物均有抑制作用;p27是在转化生长因子 β (TGF β)引起的生长阻滞及细胞接触抑制中起作用的CKI,与p21同属一家族;p16^{INK4}特异性抑制CDK4-cyclinD复合物活性,其家族另一成员是p15^{INK4B}。此外,酵母中CKI还有FAR1和p40,分别抑制Cdc28-CLN₁和Cdc28-CLB活性(CLN和CLB分别是G1 cyclin和B型cyclin);此外还有PHO81,它抑制PHO85-PHO80活性,后者是与磷酸酶基因表达有关的CDK-cyclin复合物。所以,细胞周期负调控存在三种形式:细胞周期蛋白(cyclin)的降解;CDK磷酸化状态的改变;CDK与CKI的结合^[3]。

一、细胞周期蛋白的降解

细胞周期蛋白是一类可结合并激活CDK的蛋白质,都具有“cyclin盒(cyclin box)”,该区域与CDK的结合、活化有关。

细胞周期蛋白的降解是导致CDK失活的途径之一,但目前无论是在酵母还是高等真核细胞中G1 cyclin的降解机制还不清楚,而对有丝分裂期cyclin降解的机制了解相对较多。这种降解受细胞周期调节,由蛋白酶体(proteasome)介导,依赖遍在蛋白(ubiquitin)。所有cyclin的降解必须先与遍在蛋白结合,而

多聚遍在蛋白链的形成是降解所必需的。A型和B型cyclin都在N-末端含有降解盒(destruction box),该区域如突变可抑制其与遍在蛋白结合,由此不被蛋白酶体(proteasome)降解。cyclin B-Cdc2可促进细胞周期蛋白降解。该激酶复合物如失活可使细胞周期蛋白难以降解。Cyclin A-Cdc2可阻滞细胞周期蛋白降解,在DNA折叠成染色体前防止有丝分裂促进因子(MPF,其催化亚基为CDK)过早失活^[4]。

二、CDK磷酸化状态的改变

CDK活化除需要与细胞周期蛋白结合外,还需要CDK一个保守的苏氨酸残基(人类Cdc2中为Thr161,CDK2中为Thr160)的磷酸化。这种磷酸化可加强与细胞周期蛋白的结合。CDK也可因该Thr残基脱磷酸化而失活,这种作用与磷酸酶有关。在哺乳动物细胞中,Cdc2的磷酸化Thr161可被磷酸酶-1水解而脱磷酸,导致激酶失活。

CDK还可因N-末端两个位点(人Cdc2和CDK2中为Thr14和Tyr15)的磷酸化而被抑制。这种抑制性磷酸化水平与cyclin B水平的升高相平行,使Cdc2-cyclin B保持非活性状态,直到Thr14-Tyr15在G2末期脱磷酸化而激活Cdc2^[4]。

在Cdc2中Tyr15的磷酸化是由Wee1激酶催化的。Wee1是双重特异性蛋白激酶,可作用于丝氨酸/苏氨酸及酪氨酸残基。本身以非磷酸化为活性形式,被Nim1激酶磷酸化后丧失活性。Wee1对Cdc2的活性抑制呈剂

量依赖性^[6]。Thr 14的磷酸化与Tyr 15磷酸化同时发生,但可能是另一种激酶所作用。

三、CDK 抑制物——CKI

1. FAR 1

出芽酵母(*S. cerevisiae*)的单倍体细胞可分泌一种特异的肽类外激素, α -因子。该因子可激活信息传导途径引起基因转录与形态学的改变,以及细胞周期G1期阻滞。Cdc 28激酶是G1/S转换所必需,该酶的失活引起G1期阻滞。实验表明Cdc28活性的丧失是由于结合了一种CKI,即FAR1。FAR1可抑制Cdc 28-CLN 2及Cdc28-CLN1复合物的活性,且呈剂量依赖性。与Cdc 28-CLN2结合力较差的FAR1突变体只有在高浓度下才有抑制作用,说明这种激酶需与FAR1结合才被抑制。FAR 1不影响Cdc28-CLB活性。另一种CKI, p40,可抑制Cdc 28-CLB, FAR 1和p40可能分别是Cdc 28在G1期和有丝分裂期特异的抑制物。

α -因子刺激可激活MAP激酶家族成员FUS 3,使FAR 1磷酸化,磷酸化的FAR 1才可与Cdc 28-CLN2结合并抑制其活性。 α -因子还可刺激FAR1的转录,在细胞周期中FAR 1在G1期水平最高。酵母 α -因子通过激活FAR1而引起CDK活性抑制,因此FAR 1是酵母中将信号传导途径与细胞周期联系起来起来的纽带,是外界信号引起细胞周期阻滞的效应因子^[6]。

2. p40

在最初用免疫沉淀法从粗制细胞提取物中分离芽殖酵母Cdc28时,有一40kd蛋白质(p40)与Cdc 28共沉淀。p40可与Cdc28激酶结合并抑制其活性。动力学分析表明随着p40浓度的增加,该酶促反应的最大反应速度及米氏常数均减小。实验表明p40通过与Cdc28紧密结合妨碍底物接近酶的活性中心^[7]。

在酵母中DNA复制需要B型细胞周期蛋

白(CLB)。CLB 5、CLB 6与Cdc 28的结合与DNA复制的起始有关。p40可与Cdc 28-CLB 5结合并抑制其活性,防止细胞提前进入S期产生复制错误。p40在G1晚期因降解而丧失抑制作用,DNA得以复制。p40不能降解的突变株不能进入S期。与FAR1不同,p40可能是细胞“内在”调节网络的组成部分,保证CDK有序活化^[8]。

3. PHO 81

出芽酵母*S. cerevisiae*中PHO 5基因编码一种酸性磷酸酶。PHO 5基因转录随环境中磷酸根的浓度变化而改变,受转录因子PHO 4调控。处于高磷酸根条件下,PHO4可被PHO 80-PHO85(一种CDK-cyclin复合物)磷酸化,导致PHO5转录抑制;反之,PHO4呈非磷酸化状态,可诱导PHO5转录。在磷酸根饥饿条件下,由于PHO 80-PHO85复合物的失活激活了PHO 4。该复合物的这种失活是由PHO 81介导的。PHO 81通过与PHO 80-PHO85特异结合而起抑制作用。无论环境中磷酸根浓度高低,PHO81均与PHO 80-PHO 85结合,但当磷酸根浓度高时可能存在使PHO 81失活的因素,所以PHO 80-PHO 85可将PHO 4磷酸化,进而阻止PHO5转录。而当培养基缺乏磷酸根时,PHO 81活性恢复,可抑制PHO 80-PHO 85活性,使PHO4处于非磷酸化状态而诱导PHO 5转录。因此PHO 81也是一种CKI,它本身活性可在翻译后水平进行调控,受环境中磷酸根水平影响。

PHO81与哺乳动物CDK4抑制物p16^{INK}结构很相似,都有锚蛋白重复序列(ankyrin repeat),参与蛋白质-蛋白质相互作用,提示锚蛋白重复序列可能是CKI与CDK-cyclin复合物相互作用的一种保守结构域^[9]。

4. p21 家族

(1) p21^{CIP1/WAF1} 在人正常成纤维细胞中,CDK与细胞周期蛋白、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)以及21 kd蛋白质(p21)组成四聚体。

但在转化细胞中, PCNA 与 p21 不与其形成聚合体。如在 CDK 2-cyclin A 中加入 p21, 随着加入量的增多, p21 可与 CDK2-cyclin A 形成三聚体。当 p21 达到一定量时, CDK 2-cyclin A 活性突然被抑制。Cdc2-cyclin B、CDK 2-cyclin E、CDK 4-cyclin D 也同样被 p21 抑制。如上述实验中加入 PCNA 则各激酶活性不受影响。因此, p21 是 CDK-cyclin 广谱抑制物, 对 G1/S 转换中所需 CDK 均有抑制作用, 可抑制哺乳动物细胞过度繁殖。p21 功能丧失可使细胞在负生长信号存在条件下继续增殖, 因而 p21 可能是一种新的肿瘤抑制物^[10,11]。

p21 编码基因为 *cip1* (CDK-interacting protein-1), 也称 *waf1*, 故 p21 又称为 p21^{CIP1/WAF1}。其 mRNA 在人所有组织中均有表达, 且在细胞周期各相中无明显改变^[12]。

目前已知两条途径可诱导 p21, 一是由 DNA 损伤激活的依赖 p53 的途径; 二是当细胞进入 G1 期时由促细胞分裂素激活的不依赖于 p53 的途径。

在依赖 p53 途径中, p21 转录受 p53 诱导。用 γ -射线照射人二倍体成纤维细胞可引起 DNA 损伤, 同时阻碍细胞进入 S 期。这时 cyclin E、cyclin A-CDK 2, cyclin D-CDK 4 活性都被抑制。但照射并不影响细胞周期蛋白与 CDK 结合, 这里 CDK 活性的抑制是由于 p21 的产生。这些反应依赖于 p53, 如无 p53 则 γ -射线照射不诱导 p21 生成以及 CDK 的抑制, 细胞不停滞于 G1 期。DNA 内源性损伤可通过 p53 导致 CDK 2-cyclin E 复合物中 p21 含量增加, 激酶活性下降。因此 p21 是 p53 生长负调控的中介者, 是联系抑癌基因与细胞周期调控的桥梁^[12]。

其次, 在缺乏野生型 p53 的细胞中, 虽然 γ -射线照射不能诱导 p21, 但用血清或血小板源生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、表皮生长因子(EGF)等生长因子刺激仍可诱导 p21 的表达。这种诱导在具有野生

型 p53 的正常成纤维细胞中也存在。p21 在上述刺激 2 小时后可达峰值, 说明它是即刻早期反应基因(immediate-early gene, IEG)。为什么一个生长抑制基因会是 IEG 呢? 因为 p21 只有在达到一定量时才引起生长抑制, 而在 G1 早期, p21 可阻止新合成的 CDK-cyclin 复合物活性, 防止提前进入 S 期^[13]。另外, 在骨骼肌细胞发育过程中, 一种骨骼肌特异转录因子 MyoD 的表达也可刺激 p21 表达, 且不需要 p53 的作用。p21 的这种表达与骨骼肌细胞进入 G₀ 期及细胞分化有关^[14]。

(2) p27^{KIP1} p21 家族另一成员是 p27^{KIP1}。它在 TGF β 引起的 G1 期阻滞及细胞接触抑制中起作用。p27^{KIP1} 是进化高度保守的蛋白质, 人与小鼠同源序列占 90%。p27^{KIP1} 与 p21 具同源性, 其 N-末端 60 个氨基酸残基中 44% 与 p21 相同, 两者 C-末端都有二重核定位信号, 不同于 p21 的是 p27^{KIP1} N 端无锌指结构。

p27^{KIP1} 可与 cyclin E、cyclin A-CDK 2 及 cyclin B-Cdc 2 和 cyclin D-CDK 4 复合物结合并抑制其对底物的磷酸化作用。cyclin E-CDK 2 及 cyclin D-CDK 4 为由 G1 期进入 S 期限速因素, p27^{KIP1} 对它们的抑制作用使细胞不能发生 G1/S 转换, 因而 p27^{KIP1} 过度表达可使细胞停滞于 G1 期。

在增殖细胞及静止细胞中 p27^{KIP1} mRNA 水平相似, TGF β 刺激或细胞接触抑制时其水平也不变, 这说明外界抗增殖信号对 p27^{KIP1} 的调节作用发生于转录后。

p27^{KIP1} 与 p21 结构相似, 因而两者同属 CKI 的同一家族, 但它们也有区别: 介导细胞外信号时, p27^{KIP1} 活性在转录后水平调节, 而 p21 在转录水平调节; 虽则两者均对 G1 细胞周期蛋白的抑制作用强, 对 M 期细胞周期蛋白抑制作用弱, 但 p27^{KIP1} 对 cyclin E-CDK 2 作用较强, 而 p21 对 cyclin A-CDK 2 较有效^[15]。

(3) p28^{ICK} Lovastatin 可使 HeLa 细

胞生长阻滞,此时出现高水平失活的 cyclin E-CDK 2、cyclin A-CDK 2 复合物,说明其中存在 CKI。该 CKI 为 28 kd 热稳定蛋白 p28^{ICK},可能与 p27^{KIP1} 同源,对多种 CDK 复合物有抑制作用。

p28^{ICK} 活性在细胞周期中存在波动,G1 期活性最大。它在增殖细胞 G1 早、中期可通过抑制 CDK 过早活化控制 CDK 的活化时间^[16]。

(4) p16 家族(p16 family) 如前述,正常成纤维细胞中 CDK 4 与 cyclin D、PCNA 和 p21 组成四聚体,但在缺乏活性 Rb 细胞中,CDK 4 单独与 16 kd 蛋白(p16^{INK4})结合。与 p21 不同,p16^{INK4} 在不同组织表达量不同,且在细胞周期各相中水平也不同,S 期达峰值。它有四个锚蛋白重复序列,N 端结构与“cyclin box”有同源性。

p16^{INK4} 特异地结合 CDK 4 形成 1:1 二聚体,它与 CDK4 结合力较其他 CDK 高 30 多倍。p16^{INK4} 可抑制 CDK 4-cyclin D 对 Rb 蛋白的磷酸化作用,但不抑制 CDK2-cyclin D 活性,说明这种对 CDK 的抑制是有特异性的。

正常细胞中 p16^{INK4} 是生长负调节因子,与 cyclin D 竞争结合 CDK 4,两者相对量决定 CDK4 活性,从而调节细胞周期。当细胞中 Rb 被 CDK4 磷酸化而失活时,p16^{INK4} 即与 CDK4 结合而起抑制作用,形成 CDK 4-Rb-p16 负反馈调节环。在缺乏活性 Rb 细胞中,CDK 4 活性不再必需。所以此时 p16^{INK4} 表达量尽管高,也抑制 CDK4 活性,但这种条件下却无负反馈调节效应^[17]。

p15^{INK4B} 是 p16 家族中另一成员。在 TGF β 刺激的真核细胞中,p15^{INK4B} mRNA 在刺激 2 小时后开始增加,6—8 小时达峰值,数量可增加 30 倍,而 p16^{INK4} mRNA 水平则不变,说明 p15^{INK4B} 也是 TGF β 诱导细胞周期阻滞的效应因子之一。p15^{INK4B} 与 p16^{INK4} 同源,前 50 个氨基酸与 p16^{INK4} 有 44% 相同,其后 81 个氨基酸区域有 97% 相同。它也

有四个锚蛋白重复序列,说明该结构特征是 INK 4 家族的保守性。p15^{INK4B} 不与 Cdc2、CDK2、CDK5 结合,而特异结合并抑制 CDK 4、CDK 6 与 cyclin D 复合物活性。所以它是 p16 家族中具有调节功能的成员。

前面提到 TGF β 引起的 G1 阻滞可通过对 p27^{KIP1} 活性的调节,这一调节是在转录后水平进行,而 p15^{INK4B} 介导的 TGF β 作用则发生于转录水平^[18]。

p16^{INK4} 基因定位于染色体 9 p21 区域,这是一个肿瘤敏感区域,实验表明 p16^{INK4} 本身即是抑癌基因产物^[19,20]。这一发现不仅成为联系细胞周期调控与抑癌基因两大领域的纽带,而且是第一个被发现直接作为肿瘤抑制物的细胞周期调节物。p16^{INK4} 较其他抑癌基因有两大优势,一是 p16^{INK4} 在肿瘤中缺失比例较大。家族性黑色素瘤与 p16 关系密切,文献报道在有染色体 9p21 缺失的 9 个家族的 36 个患病成员中 33 人有 p16^{INK4} 突变^[21]。另外,在原发性成神经胶质瘤及其脑转移瘤中都有 p16 缺失。此外在肺癌、乳腺癌、肾癌、膀胱癌等均发现有 p16^{INK4} 缺失,总缺失率可达 40% 以上^[19]。p16^{INK4} 另一优势在于它分子比较小,约较 p53 分子小 4 倍,基因治疗中操作起来简单,所以 p16^{INK4} 可为肿瘤的基因治疗开辟一条新途径。

综上所述,细胞周期负调控可能是不同的抗肿瘤因子作用的共同途径,这一发现可为肿瘤的防治,新型抗肿瘤药物的研制提供广阔的前景。

四、结 语

细胞周期调控是一个复杂的调节网络,包括正、负调控。外界因素对细胞的增殖及抗增殖作用最终都将体现在对细胞周期的影响上。值得令人注意的是抑癌基因与细胞周期负调控的关系,关于这方面的进一步研究可能会导致肿瘤发生分子机制研究上的突破,具有深远的理论意义及实际应用价值。

摘要

调控细胞周期的关键是调节细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK)的活性。细胞周期蛋白可结合并激活 CDK, CDK 活性 还可通过磷酸化作用调节。因此细胞周期负调控包括以下 3 点: ① 细胞周期蛋白降解速度; ② CDK 磷酸化状态; ③ CDK 抑制蛋白(CKI)。酵母中 CKI 包括 FAR 1, p40、PHO81, 哺乳动物 CKI 有 p21 家族(包括 p21、p27)及 p16 家族(包括 p16、p15)。细胞周期负调控与抑癌基因密切相关, 是不同抗肿瘤因子作用的共同途径。

参考文献

- [1] 吕吉宁、左嘉客, 1994, 细胞生物学杂志, 16 (4): 145—150.
- [2] 王瑞虹、薛绍白, 1995, 细胞生物学杂志, 17 (2): 71—75.
- [3] Morgan D O, 1995, *Nature*, 374: 131—134.
- [4] Doree M, Galas S, 1994, *FASEB J.*, 8: 1114—1120.
- [5] McGowan C H, Russell P, 1993, *EMBO J.*, 12: 75—85.
- [6] Peter M, Herskowitz I, 1994, *Science*, 265: 1228—1231.
- [7] Mendenhall M D, 1993, *Science*, 259: 216—219.
- [8] Schwob E, Bohrn T, Mendenhall M D, et al., 1994, *Cell*, 79: 233—244.
- [9] Schneider K R, Smith R L, et al., 1994, *Science*, 266: 122—126.
- [10] Xiong Y, Hannon G J, et al., 1993, *Nature*, 366: 701—704.
- [11] Harper J W, Adami G R, et al., 1993, *Cell*, 75: 805—816.
- [12] Dulic V, Kaufmann W K, et al., 1994, *Cell*, 76: 1013—1023.
- [13] Michieli P, Chedid M, et al., 1994, *Cancer Res.*, 54: 3391—3395.
- [14] Halevy O, Novitch B G, et al., 1995, *Science*, 267: 1018—1021.
- [15] Polyak K, Lee M, et al., 1994, *Cell*, 78: 59—66.
- [16] Hengst L, Dulic V, et al., 1994, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 91: 5291—5295.
- [17] Serrano M, Hannon G J, et al., 1993, *Nature*, 366: 704—707.
- [18] Hannon G J, Beach D, 1994, *Nature*, 371: 257—260.
- [19] Kamb A, Gruis N A, et al., 1994, *Science*, 264: 436—440.
- [20] Nobori T, Miura K, et al., 1994, *Nature*, 368: 753—756.
- [21] Ivinson A J., 1994, *Nature*, 371: 180.

细胞凋亡的信号转导研究进展

傅涛 徐永华

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

在多细胞生物体中, 细胞数量的生物稳态是通过细胞增殖和细胞死亡之间的平衡来维持的。目前认为, 细胞死亡可分为两大类, 一类是由各种突发的, 意外的事件所致的细胞死亡, 即病理性细胞死亡, 形态学上表现为细胞坏死。另一类为生理性细胞死亡, 又称为编程性细胞死亡(programmed cell death), 形态学上表现为细胞凋亡(apoptosis)。细胞凋亡与细胞

的生长、分化一样属于各具特征的细胞学事件或过程, 它们决定着细胞和组织的基本特征和命运。这些过程都受到了来自细胞内和细胞外的诸多信号的调控。来自细胞内部的信号或信息有遗传特性、细胞谱系、发育阶段、细胞周期、代谢状态、DNA 受损与否等之别。特别值得一提的是, 近年来, 以线虫 *C. elegans* 为模型在细胞凋亡的基因调控的研究方面