

- chem.*, 175: 541—547.
- [7] Gearing, D. P. et al., 1987, *EMBO, J.*, 6: 3995—4002.
- [8] Gough, N. M. et al., 1988, *PNAS*, 85: 2623—2627.
- [9] Gough, N. M., 1992, *Growth Factor*, 7: 175—179.
- [10] Hilton, D. J. and Gough, N. M., 1991, *J. Cell. Biochem.*, 46: 21—26.
- [11] Gearing, D. P., 1991, *Ann. NY. Acad. Sci.*, 628: 9—18.
- [12] Metcalf, D., 1992, *Growth Factor*, 7: 169—173.
- [13] Smith, A. G. et al., 1992, *Dev. Biol.*, 151: 339—351.
- [14] Abe, E. et al., 1986, *PNAS*, 83: 5958—5962.
- [15] Baumann, H. and G. G. Wong, 1989, *J. Immunol.*, 143: 1163—1167.
- [16] Yamamori, T. et al., 1989, *Science*, 246: 1412—1416.
- [17] Austin, L. et al., 1991, *J. Neurol. Sci.*, 101: 193—197.
- [18] Mori, M. et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160: 1085—1092.
- [19] Metcalf, D. et al., 1989, *PNAS*, 86: 5948—5952.
- [20] Metcalf, D. et al., 1990, *Blood*, 76: 50—56.
- [21] Stewart, C. L. et al., 1992, *Nature*, 359: 76—79.
- [22] Hilton, D. J. et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 10238—10247.
- [23] Nicola, N. A., 1991, *Cell*, 67: 1—4.
- [24] Gearing, D. P., 1991, *EMBO, J.*, 10: 2839—2848.
- [25] Gearing, D. P., 1992, *New Biologist*, 4: 61—65.

p 53 与 细胞 周 期 调 控

方 敏 薛绍白

(北京师范大学生物系 100875)

p 53 蛋白首先在 SV-40 转染的小鼠细胞中发现, 继之在不同类型的转化细胞系中也被检测到^[1]。进一步研究证明它还存在于正常细胞和组织中, 但与转化细胞相比其含量要低得多^[2]。

1988 年 Levine 和 Oren 等报道了第一个被鉴定的 p 53 突变型 p 53 Vall 35^[3]。以后, 人们在转化细胞中检测到各种类型的 p 53 突变型。为了有效地研究 p 53 蛋白, 已发展了很多识别 p 53 蛋白的单克隆抗体, 其中有的具有种属特异性, 有的则识别某一类突变型 p 53 蛋白。图 1 显示了小鼠 p 53 蛋白抗原决定簇的分布。目前已对 p 53 的失活机理提出了相对完善的模型(图 2), 对 p 53 的生物学功能虽还存在很多疑问, 但 p 53 对细胞周期的调控则已成为 p 53 生物学功能中的一个核心问题。

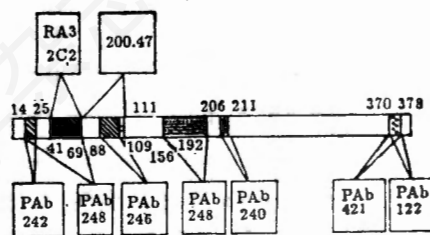


图 1 小鼠 p 53 的抗原决定簇图谱 (引自 Montenarh, M., 1992, *Critical Reviews in Oncogenesis*, 3:237)

一、p 53 蛋白——细胞周期的监控因子

1. p 53 参与细胞周期调控

1980 年 Milner 等首先报道伴刀豆球蛋白 A (Con A) 刺激胸腺淋巴细胞增殖后, p 53 基

因被诱导表达,而在静止细胞群体中该基因的表达水平很低,这提示 p 53 可能与细胞周期的启动有关^[4]。在诱导后由 G₀ 进入 G₁ 期的胸腺细胞中 p 53 蛋白可被一种抗 p 53 单抗 PAb 421 识别,而在静止细胞中则被另一种抗 p 53 单抗 PAb 248 识别,提示细胞内可能存在构象不同的 p 53 蛋白。构象的变化可能是实现其功能的结构基础之一^[5]。将特异的抗 p 53 单抗显微注射到已被诱导进入周期的静止细胞中,结果这些细胞不能由 G₁ 进入 S 期;注射同样的抗体对细胞从 M 期跨入 G₁ 期无明显作用;抗体必需在 Con A 刺激后 12 小时前注射才有上述效应,12 小时后注射同种抗体对细胞周期没有影响。这说明 p 53 对 G₀/G₁→S 期的过渡是十分重要的^[6]。

此外,Deppert 等在异亮氨酸饥饿导致生长阻滞的细胞中也观察到 p 53 表达下降。他们采用正常 3T3 细胞和甲基胆蒎转化的 Meth-A 细胞作对比研究,两个细胞系获得了一致的结果。p 53 的表达先于 DNA 的合成,注射抗 p 53 单抗 PAb 246 和 PAb421 都可阻止细胞进入 S 期^[7]。用构建的反义 p 53 质粒分别转染上述两种细胞,也均导致细胞增殖的停滞^[8]。

Maro 等利用异硫氰基荧光素标记的抗 p 53 单抗 PAb 1801 及碘化丙啶(PI)联染细胞,依靠流式细胞术来研究 p 53 与细胞周期的相关性,却获得了与以上不同的结果:促分裂素刺激的胸腺细胞中 p 53 蛋白含量随着细胞周期行进从 G₁→S→G₂M 期有依次升高的趋势;而在非增殖细胞群体中 p 53 蛋白含量很低。该实验用作对照的转化细胞则含有较正常细胞高得多的 p 53 蛋白,但 p 53 蛋白在周期中分布的趋势是相同的^[9]。

2. p 53 的细胞增殖负调控作用

自发现野生型 p 53(p 53 WT)的抑癌基因本质之后,对 p 53 与细胞周期的关系进行了更为详细的研究。由于突变型 p 53(p 53 MT)基因可以使高表达 ras 基因的 REF 52 细胞从

周期停滞状态释放,重新进入周期,而 p 53 WT 则没有这种作用,因此提出 p 53 WT 具有增殖负调控作用^[10]。随后很多实验结果支持了这种观点。与以前的结果相反,现在普遍认为人为地在生长阻滞的细胞中表达外源 p 53 WT 可以阻止细胞生长因子刺激 G₁/G₀ 期细胞进入 S 期。在此过程中还伴随着增殖相关核抗原(PCNA)的下降调节^[11]。已知 PCNA 是 DNA 聚合酶 δ 的辅助因子,可见 p 53 与胞内 DNA 合成的关系。在 SV-40 转染的小鼠细胞中,野生型 p 53 蛋白通过与 SV-40 大 T 抗原结合,使后者不能与 DNA 聚合酶 α 结合,致使 DNA 复制受到阻碍。

Oren 研究小组利用 ras 和 p 53 Vall 35 共转染 REF 细胞,建立了研究 p 53 和细胞周期的相关性的一套模型。p 53 Vall 35 是一个温度敏感突变型,在 37.5°C 表达突变型 p 53 蛋白,而在 32.5°C 则表达野生型 p 53 蛋白。从所筛出的几株高表达 p 53 克隆中观察到克隆 112 和 C₁₂ 在允许温度下(32.5°C)阻滞在 G₀/G₁ 期,克隆 26 在允许温度下阻滞在 S 期,而这些克隆在限制温度下(37.5°C)均能完成细胞周期。因此他们也认为 p 53 具有增殖负调控作用,但不同的是他们认为 p 53 可逆地在细胞周期行进中的多个位点上阻滞周期运行^[12]。

关于 p 53 与细胞周期调控存在以下几种观点:第一种观点认为 p 53 WT 具有增殖负调控作用,其控制点在 G₀/G₁→S,第二种观点也认为 p 53 具有增殖负调控作用,但 p 53 对周期进行多位点控制;第三种则认为随细胞周期的行进,p 53 蛋白含量也随之增加。

二、p 53 调控细胞周期的机制

1. p 53 构象变化与细胞周期调控

p 53 对细胞周期的调控可能与其构象变化有关^[5]。虽然也有相反的报道^[13],但 Montanach 等的工作表明胞内至少存在可以被不同抗 p 53 单抗所识别的三种不同形式的 p 53 蛋白:PAb 246 沉淀细胞裂解液后,上清液中仍可

用 PAb 1602 检测到 p 53 蛋白, 第二次沉淀物的上清液中又可用 PAb 421 检测到第三种类型的 p 53 蛋白。

p 53 蛋白在细胞内的分布与其对细胞周期的调控可能有关^[14]。用温度敏感突变型 p 53 基因转染 REF 细胞获得的细胞模型, 在允许温度下增殖停滞, p 53 蛋白位于核中; 而在限制温度下 p 53 蛋白主要分布于细胞质, 此时细胞处于增殖状态。

2. p 53 蛋白磷酸化与细胞周期调控

大多数学者认为 p 53 蛋白在 G₀/G₁ 期处于非磷酸化状态, 在 S 期则以磷酸化形式存在。只有非磷酸化的 p 53 才具有增殖负调控作用。

已证明 P⁶⁰-cdc 2 和 cyclin-cdc 2 可磷酸化 p 53 蛋白, 其位点是 Ser-315(人)或 Ser-312(鼠)^[15]。p 53 蛋白也是酪蛋白激酶 II 的底物, 其磷酸化位点是 Ser-389^[16]。除此之外还有其他几种激酶可使 p 53 蛋白磷酸化。p 53 蛋白 Ser-312、Ser-389、Ser-37、Ser-310 以及 Ser-7、9、12 和 23 的一个或多个位点都可被种类各异的激酶磷酸化。虽然 p 53 蛋白的磷酸化具有周期依赖性, 但关于 p 53 蛋白不同程度磷酸化对其生物学功能的影响还所知甚少。在 SV-40 转化的细胞中, Ser-312 位点的磷酸化水平较非转化细胞提高两倍^[17], 温敏 SV-40 病毒转染的细胞在限制温度下, p 53 蛋白 Ser-389 位的磷酸化水平增加^[18]。然而使用不同的细胞系统, 无论是原代培养细胞、无限增殖细胞或转化细胞中都没有发现相同位点 p 53 蛋白磷酸化水平的变化^[19]。将 Ser-312 突变成 Ala 或 Asp 后 p 53 蛋白仍可被 PAb 246 识别并可与 SV-40 大 T 抗原结合, 甚至也不影响 p 53 蛋白抑制 SV-40 DNA 复制的活性^[20]。基于以上研究以及激酶可与 p 53 蛋白一同被纯化的事实, 有人认为 p 53 蛋白具有较其本身磷酸化更为重要的功能, 它可以将一些功能重要又没有核停泊信号的激酶带到核内的作用位点上去。

3. p 53 蛋白与 DNA 相互作用

p 53 蛋白与 DNA 的相互作用也与周期调控有关。p 53 蛋白可与 DNA 复制起点附近的一段长度为 33 bp 的 DNA 序列特异结合, 该序列已被克隆, 其中含有两个 TGCCT 重复序列, 这种结合可能与调控 DNA 复制启动有关^[21]。

除了可以与复制子起点附近的 DNA 序列结合外, p 53 蛋白还可与某些基因的启动子区域结合, 调控这些基因的表达(见图 2)。p 53 蛋白的转录激活序列位于其 N 端 20—42 密码子之间, 其前 73 个氨基酸序列的转录激活作用强于完整的 p 53 蛋白。可以推测, p 53 蛋白的其他部分都可能以某种方式对前 40 个氨基酸序列的生物学活性进行调节。这种功能调节极有可能依赖于 p 53 的结合蛋白。

在人类基因组中已发现很多基因的启动子区含有特异的 p 53 蛋白结合位点。对这些基因中 p 53 蛋白结合序列的比较研究指出: 它包括两个 10 bp 的重复序列 5'-pupupuC(A/T)(A/T)Gpypypy-3'。一个该序列不足以使 p 53 蛋白结合, 当这两个重复序列间隔 13 个碱基对以上时 p 53 蛋白也无法结合。p 53 蛋白结合位点有明显的对称结构, 四个 5'-(A/T)Gpypypy-3' 位于相对应的位置上, 提示 p 53 是以四聚体的方式与 DNA 结合的^[22]。

p 53 蛋白与启动子区的 p 53 蛋白结合位点结合后即可增强某些基因的表达, 也可对某些基因表达进行下降调节。人和小鼠的野生型 p 53 蛋白可以抑制 c-fos、 β -actin 和 c-jun 基因的启动子活性。有趣的是 p 53 蛋白本身可以抑制 p 53 基因表达^[23]。突变型 p 53 蛋白则不能与 p 53 结合序列结合调控基因表达(见图 2)。p 53 蛋白可以特异地与复制起点 DNA 序列及某些基因启动子区域的 p 53 结合序列结合的事实, 说明 p 53 以双重形式参与了细胞周期调控。

综合大量的研究报道, 目前对抑癌基因调控细胞周期的分子机制已有比较明确的认识。很多 DNA 合成相关酶基因的上游调控区都含有 DNA 结合蛋白 E₂F 的结合位点。E₂F 同这

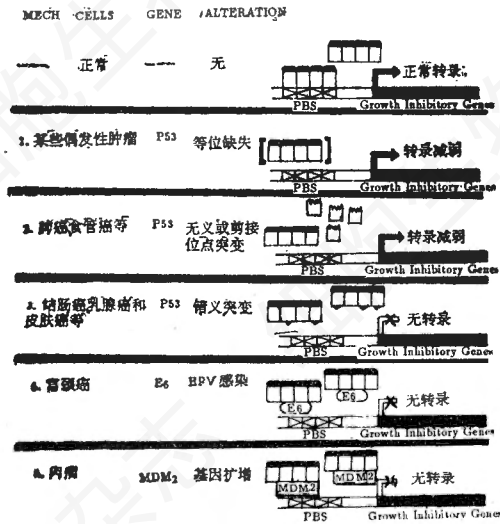


图2 p53失活机理 (PBS: p53 Binding Site. 引自 Vogelstein, W., Cell, 70:525)

些基因的增强子序列结合后可与转录因子发生相互作用从而增强转录。而 p53 蛋白、Rb 蛋白可与 E_2F 结合而封闭 E_2F 的功能位点, 使之即使结合在增强子区域也无法同转录因子相互协同, DNA 复制相关酶不能高效转录。但当 CDK 2-cyclin 等与 p53、Rb 蛋白结合后, 由于前者有激酶活性, 使 p53、Rb 蛋白磷酸化而导致其失活, 从而活化 E_2F , 使之发挥增强转录的功能, 于是一系列 DNA 合成相关酶被合成, 启动 DNA 复制^[24,25]。该假说的一个证据是: 计算机分析指出 Rb 蛋白中两个结构域中的一个与 TF II D 一段序列高度相似, 另一个与 TF II B 一段序列高度相似, 由此推测 Rb 蛋白可能代替 TF II D 和 TF II B 与 E_2F 结合, 从而封闭 E_2F 使细胞阻滞在 G_1/S 边界。但 p53 蛋白是否也依赖相同的机制封闭 E_2F 还不太清楚。

参 考 文 献

[1] Chang, C. et al., J. 1979, Virol., 31:

- 463—471.
- [2] Thomes, R. et al., 1983, *Virology*, 131: 502—517.
- [3] Eliyahu, D. et al., 1988, *Oncogene*, 3: 313—321.
- [4] Milner, J., 1980, *Cell Biol. Int. Rep.*, 4: 663—667.
- [5] Milner, J., 1984, *Nature*, 310: 143—145.
- [6] Mercer, W. E. et al., 1984, *Mol. Cell Biol.*, 14: 276—281
- [7] Deppert, W. et al., 1990, *Oncogene*, 5: 1701—1706.
- [8] Shohat, O., et al., 1987, *Oncogene*, 1: 277—383.
- [9] Danova, M. et al., 1990, *Leukemia*, 14: 417—422.
- [10] Hichs, G. G. et al., 1991, *Mol. Cell Biol.*, 11: 1344—1352.
- [11] Mercer, W. E. et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88: 1958—1962.
- [12] Michalovitz, D. et al., 1990, *Cell*, 62: 671—680.
- [13] Mosner, J. and Deppert, W., 1992, *Oncogene*, 7: 661—666.
- [14] Ginsberg, D. et al., 1991, *Mol. Cell Biol.*, 11: 582—583.
- [15] Bischoff, R. J. et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87, 4760—4770.
- [16] Meek, W. D. et al., 1990, *EMBO. J.*, 9: 3253—3260.
- [17] Meek, W. D. et al., 1988, *Mol. Cell Biol.*, 8: 461—465.
- [18] Anderson, C. W. et al., 1986, *Cancer Cells*, 4: 395—404.
- [19] Patschinsky, T. and Deppert, W., 1990, *Oncogene*, 5: 1071—1076.
- [20] Meek, D. W. and Eckhart, W., 1990, *J. Virol.*, 64: 1734—1744.
- [21] Fields, S. and Jay, S. K., 1990, *Science*, 249: 1046—1049.
- [22] Steager, J. et al., 1992, *Mol. Carcinog.*, 5: 102—106.
- [23] Ginsberg, D. et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88: 9979—9983.
- [24] Berridge, J. M., 1993, *Nature*, 361: 315—325.
- [25] Shirodkar, S. et al., 1992, *Cell*, 68: 157—166.