

WT 1——与发育有关的肿瘤抑制基因

刘佳佳 徐永华

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

肾母细胞瘤(或称 Wilms' 瘤, 简称 WT) 是一种较为常见的儿科实体瘤, 发病率约为 1/10,000^[1], 散发性和家族性两种肿瘤类型。该肿瘤发生于肾脏, 肿瘤细胞类型既包括未分化或芽基细胞, 又包括基质及上皮成分。这几种细胞的相对比例有个体差异, 有的显示出组织学亚型^[2]。流行病学和遗传学分析揭示 WT 的发生与肿瘤抑制基因的失活有关。与视网膜母细胞瘤(RB)类似, WT 在具有对该疾病明显易感性的个体中能双侧发生, 这就使 Knudson 和 Strong 提出一个肿瘤发生模型, 认为在肿瘤发生中有两个限速步骤, 有肿瘤发生倾向的个体其干细胞系中早已存在一个遗传

的基因突变, 由于体细胞中发生第二次突变, 从而导致肿瘤的发生^[3]。对 WT 的细胞遗传学及分子遗传学研究将 WT 中失活的遗传位点之一定位于 11 号染色体短臂 13 区, 并从该区域分离到第一个 WT 易感基因——WT 1^[4-8]。WT 1 编码一个锌指结构的转录因子, 表达具有组织特异性和时序性。WT 1 表达的主要区域是肾脏及泌尿生殖系统部分细胞类型, 并且肾脏中 WT 1 只在胚胎发育一定时期内表达^[9]。需要对 WT 1 的功能进行研究以揭示该基因在正常个体发育及肿瘤发生中的作用。(见表 1)

表 1 WT 1 肿瘤抑制基因主要性质一览(引自 "Rausher III FJ, 1993, The FASEB Journal 7, 896—903".)

位点: 染色体 11 p 13	
大小: ~50 kb(全基因)	
结构: 10 个外显子, 2 个剪接片段	
mRNA: ~3.5 kb	
表达的主要区域*:	胚胎: 肾脏(紧密后肾芽基和足细胞) 间皮内壁(所有器官) 生殖嵴间皮 脾脏 脑(腮后区) 脊髓(腹角运动神经元)
	成年: 肾脏(小球上皮) 卵巢 睾丸(Sertoli 细胞) 子宫(蜕膜细胞)
蛋白质产物: 52—54 kDa, 核蛋白	
结构域: 4 个 Cys 2-His 2 锌指, 富含谷氨酰胺-脯氨酸-甘氨酸的转录调节功能域	
相互作用的蛋白质: p 53	
DNA 结合位点: EGR 通用顺序: 5'-GGAGCGGGGCG-3'	
靶基因: IGF-II	
	IGF-II 受体
	Egr-1
	Pax-2
	PDGF-A
	CSF-1
	TGF-β 1

* 胚胎和成年表达的主要区域为由人类、大鼠和小鼠获得的数据总结。

Knudson 模型

通过对儿科三大肿瘤(视网膜母细胞瘤, 肾母细胞瘤, 神经母细胞瘤)的流行病学分析, Knudson 等人用基于罕见事件的泊松分布数学模型研究儿童肿瘤单侧对双侧的发生比例, 由此推算出肿瘤发生所需的遗传变化的次数^[3]。Knudson 模型认为具有双侧肿瘤的患儿已带有一个干细胞系的突变, 因此只需再发生一个遗传变化就可导致肿瘤(两步两击理论)。无 WT 遗传易感性的儿童需要两次独立的体细胞突变, 所以发生单侧肿瘤, 而且发病年龄较晚。Knudson 模型最初是在 RB 中得到证实。对 RB 易感性的家族传递与 13 号染色体长臂 4 区有关, 在家族性和散发性肿瘤中都发现有该位点 DNA 丢失, 即第二次打击。第一击为导致失活的突变, 而第二击为带有正常等位基因的正常染色体片段丢失。由该位点分离到 RB 基因, 该基因失活导致视网膜母细胞瘤的发生。对 WT 发生的遗传学研究结果却表明 WT 具有一定的遗传学复杂性, WT 1 基因与 WT 相关性和 RB 的情况有很大区别。

WT 1 基因的分离

WT 双侧发生的比例约占总数的 10%, 但已报道的家族性 WT 还不到 1%^[1], 这与 RB 相对较高的易感性家族传递比例不同, 说明对这一类型肿瘤而言主要是个体新发生的干细胞突变导致了双侧肿瘤发生。在极罕见的病例中, 具有明显 WT 易发性的个体同时表现出特殊的先天异常。早期观察发现 WT 发生与先天性无虹膜之间有遗传连锁现象, 提示两个相关基因有可能连锁。尤为重要的发现是一种先天性基因综合征——WAGR 综合征(WT, 无虹膜, 泌尿生殖系统畸形, 智力低下)与 11 号染色体短臂 13 区的染色体丢失有关^[5]。

寻找 11 P 13 上的 WT 基因的工作始于对该区域遗传连锁图的构建。在一位患者的肿瘤细胞中有两条 11 号染色体短臂 13 区的不等缺

失, 但又有部分重叠, 重叠区长约 350 kb。研究者分离到一个位于该区域的基因组 DNA 克隆, 在人和鼠之间能进行种间杂交, 说明可能是一个保守的转录单位。随后获得了现被称为 WT 1 基因的转录本^[7]。另一实验室的工作人员利用染色体跳跃文库分离了具有存在于转录单位 5' 端的稀有内切酶位点的区域, 也得到了 WT 1 基因^[8]。

WT 1 的基因结构, 表达

特点及蛋白质产物

WT 1 基因长约 50 kb, 编码大约 3 kb 长的 mRNA。WT 1 编码的蛋白质为核蛋白^[10], 其结构特征提示 WT 1 可能具有转录调节功能。WT 1 共 10 个外显子, 外显子 7、8、9、10 各编码一个半胱氨酸-组氨酸类型的锌指结构^[11], 与早期生长反应基因 EGR 1、EGR 2 有 61% 同源性(见图 1)。WT 1 编码产物的氨基端富含脯氨酸和谷氨酰胺残基, 也符合转录因子的特征^[7]。WT 1 蛋白质分子量为 52—54 kDa, 视不同剪接事件而定。在 mRNA 前体中有两个剪接片段, 剪接片段 I 长 51bp, 编码共 17 个氨基酸残基的肽段, 富含丝氨酸和苏氨酸残基; 剪接片段 II 仅 9 bp, 编码 3 个氨基酸(赖氨酸-苏氨酸-丝氨酸, (KTS))。剪接片段 I 位于脯氨酸富含区和第一个锌指之间, 由外显子 5 单独编码, 剪接片段 II 则位于第三和第四个锌指之间, 在外显子 9 末端(见图 2)。在所有表达 WT 1 的细胞中, WT 1 mRNA 有四种类型, 反映了剪接片段的存在与否^[12, 13]。占优势的类型是两个剪接片段都存在的类型(>60%), 而两者均无的转录本最少。这四种 mRNA 的相对比例在表达 WT 1 的人类和小鼠组织中, 在胚胎肾和成年肾中都是恒定的, 说明每种剪接产物对 WT 1 基因功能的正常发挥都有贡献^[12]。

迄今研究得最清楚的肿瘤抑制基因为 RB, 在各种分裂的组织细胞中广泛表达。WT 1 的

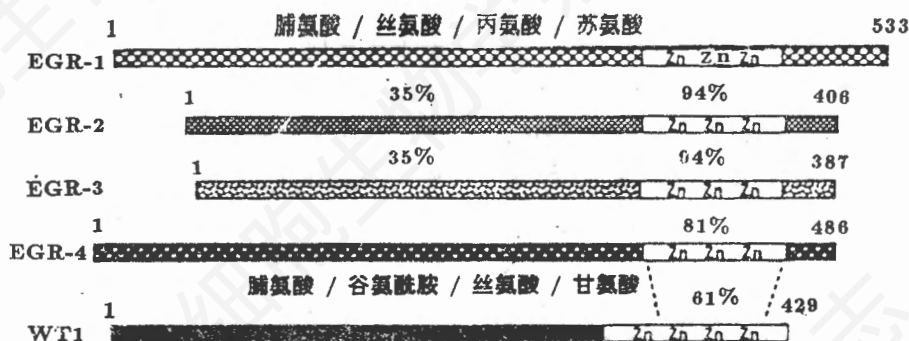


图 1 转录因子 EGR 家族的结构同源性(引自 "Madden SL and Rausher III FJ, 1993, Annals New York Academy of Sciences 75—82".)

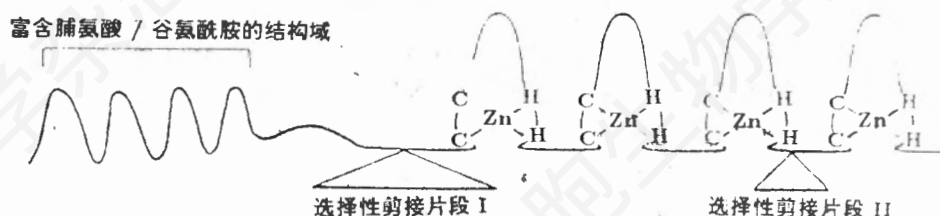


图 2 WT1 基因产物结构(引自 "Haber DA and Buckler AJ, 1992, The New Biologist 4, 97—106".)

表达却有高度的组织特异性及时序性, 呈现出一种发育调控模式。人类 WT1 基因表达限于胚胎肾的紧密间充质、肾小管和肾小球上皮, 以及中肾小球和肿瘤中靠近这些结构的组织。WT1 表达的主要区域还有生殖嵴、胚胎生殖腺和间皮, 均为中胚层起源^[14]。在小鼠和狒狒中, WT1 mRNA 可在肾脏、脾脏、生殖腺及子宫中检测到^[7,9,15], 而大鼠 WT1 在中枢神经系统(脊髓、大脑)中也有表达^[16]。在肾脏中 WT1 表达的发育调控最为明显。在怀孕第八天的小鼠胚胎中 WT1 就有可检测水平的表达, 急剧上升至第十七天为最高, 出生后的第三天就迅速降至成年的低水平^[15] (见图 3)。在雄性生殖腺中 WT1 mRNA 仅发现于 Sertoli 细胞, 卵巢中表达限于卵泡的内表面上皮细胞。在这些组织中 WT1 表达于胚胎发育期持续升高, 成年后仍维持高水平^[9], 说明 WT1 在肾脏和生殖系统发育中可能有不同的调控模式。目前认为 WT1 在肾脏发育中的作用是终止后肾干细胞分裂, 启动上皮细胞分化。

WT1 基因在 WT 中失活

大多数 WT 中 WT1 表达水平很高, 与肿瘤发生的可能组织来源胚胎肾一致。少数病例中发现有 WT1 的大片段缺失或重排, 但更常见的是基因内部导致失活的小区域缺失。例如在一例散发性 WT 中, 两个 WT1 等位基因之一有 25 bp 的缺失, 位于一个外显子/内含子连接区。mRNA 前体由于剪接信号丧失而发生剪接错误, 生成的转录本缺少外显子 8 (编码锌指 3)。该突变前仍保留有开放读码框架, 因此编码一个可能有功能的蛋白质。这提示了一种可能性, 就是改变了的 WT1 基因产物可能抑制野生型等位基因的正常功能, 称为反式显性或显性抑制效应^[17]。如果体外功能研究能证实这一机制, 那么仅一次突变就足以使 WT1 功能失活(见图 4)。

目前已发现的 WT1 的失活可分为以下几种类型:

1. 锌指结构域的单点突变使单个氨基酸

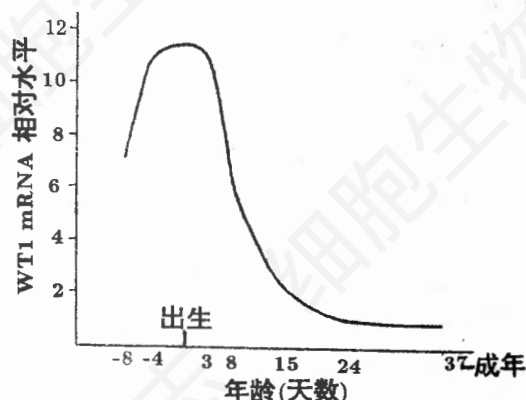


图3 肾脏中WT1表达图式(引自“Haber DA and Bucler AJ, 1992, The New Biologist 4, 97—106”.)

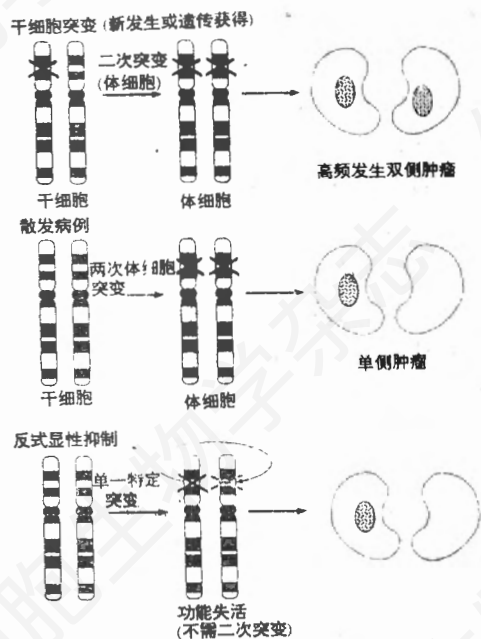


图4 WT1失活导致Wilms'瘤发生(引自“Hober DA and Buckler AJ, 1992, The New Biologist 4, 97—106”.)

残基发生改变,从而影响了锌指与DNA结合的活性^[18]。

2. 转录调节效应区的点突变使单个氨基酸残基发生改变,使WT1由转录抑制转变为转录激活因子^[19]。

3. 点突变生成终止密码,从而导致翻译

提前终止,生成无功能蛋白产物^[20]。

4. 位于剪接信号区的单点突变或小片段缺失使mRNA剪接发生错误,造成部分结构丢失,如前所述的第三个锌指缺失^[17]。

5. 移框突变导致锌指结构域缺失^[21]。

在有WT表现的一类综合征(Denys-Drash syndrome)中WT1有突变热点,位于外显子8、9内^[22],但在其余WT中则无明显规律。积累的数据表明仅10%,WT有WT1点突变^[18],但这一数字可能过低,因为不少分析仅限于外显子区域而未包括5'调控区、3'非翻译区和内含子部分。另外,WT发生可能涉及多个遗传位点。Beckwith-Wiedemann综合征(巨舌、内脏膨大、脐疝、低血糖)对儿科肿瘤如WT、肾皮质癌、肝母细胞瘤有易感性,该病征的遗传学位点为11p15,有趣的是IGF-II基因也位于11p15。目前有一肾母细胞瘤细胞株G401,将11号染色体片段转入该细胞观察有无逆转恶性状态的作用,结果仅11p15能抑制恶性生长。因此11p15上可能存在另一个WT基因^[23]。家族性WT的遗传位点既非11p13也非11p15,至今仍未定位^[24-26]。

最近报道在一例成人间皮瘤中有纯合的WT1点突变。体外实验证明这一突变(273位密码子A→G,位于转录调控效应区)使WT的功能由转录抑制变为转录激活。间皮瘤由腹膜内表面衍生而来,发育史上与肾脏同属中胚层起源。原位杂交结果表明WT1在小鼠胚胎中胚层起源的许多支持结构中有高水平表达,如心包腔、腹膜、胸膜等体腔内壁。由此看来,WT1在正常发育中的作用不仅限于肾脏及泌尿生殖系统部分细胞,而延及中胚层衍生的不同结构,WT1基因失活与成人肿瘤也有关系^[27]。

WT1的功能研究

实验证明,锌指区没有KTS插入的WT1蛋白质能与EGR(早期生长反应)基因识别序

列(核心序列 CGCCCCCGC) 特异性结合, 而有 KTS 的 WT 1 蛋白质则不能与之结合^[28]。体外实验还发现当 WT 1 (KTS) 与靶基因如 IGF-Ⅱ^[29]、PDGF A 链^[30] 及 CSF-1^[31] 基因启动子区域的 EGR 位点结合时, 可发挥转录抑制作用。Wang ZY 等进一步发现, PDGF A 链转录起始位点 3' 端存在第二个 WT 1 (-KTS) 结合位点, 序列为 TCCTCCTCCTC-CTCTCC。WT 1 转录抑制作用需要 5'/EGR/WT 1 位点和 3' 位点同时存在。当单独与 5' 或 3' 位点结合时, WT 1 则抑制转录。在另外五个与生长有关的基因 Ki-ras、EGFR (表皮生长因子受体)、Insulin-R (胰岛素受体)、myc、TGF-β₃ 启动子中发现有类似 WT 1 的 TCC 重复顺序结合位点的顺序, 凝胶阻抑实验表明这些序列都能与 WT 1 结合, 暗示 WT 1 具有调控多种生长相关基因的能力^[32]。

另外, 研究发现 WT 1 锌指区中 KTS 的存在增大了第三和第四个锌指之间的间隔, 从而使蛋白质识别 DNA 的特性有所改变, 识别的核心序列与 WT 1 (-KTS) 相同, 但序列长度增加^[33]。

对 WT 1 5' 转录调节效应区进行缺失分析发现, 该区分为三个亚单位或元件, 由氨基酸残基 84~179 组成的结构域具有转录抑制作用, 由外显子 5 编码的剪接片段 II 也有转录抑制作用, 而这两者之间为转录激活效应区。只有当三者同时存在时, WT 1 蛋白质才表现为转录抑制子; 两个转录抑制区缺少一个, WT 1 就发挥转录激活效应^[34]。因此剪接片段 I 的存在与否决定了 WT 1 效应区的调控性质, WT 1 结构的这一巧妙安排使之能实现对转录的精细调控。

WT 1 蛋白质在细胞中和其他蛋白质有相互作用。据报道 WT 1 与 p53 的相互作用能改变这两个转录因子反式调控各自靶基因的能力。野生型 p53 抑制 WT 1 对 EGR 1 位点下游基因的转录激活作用, 而 WT 1 对 p53 的协作效应则表现为增强 p53 反式激活肌肉肌

酸激酶启动子的能力^[35]。此外, Haber 等人发现锌指 3 缺如的突变型 WT 1 能与 EIA 癌蛋白协同转化婴儿肾细胞^[36]。

待阐明的问题

WT 1 在几种中胚层起源的组织中都有表达, 而且在几种恶性肿瘤中, 包括急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、卵巢上皮癌、子宫内膜瘤及输卵管癌中都有 WT 1 mRNA 表达^[37,38]。在这些起源于中胚层的细胞类型和组织的恶性肿瘤中, 是否肿瘤的发生和发展与 WT 1 的功能异常有关? 一种可能是本应“沉默”的 WT 1 基因被上游基因激活, 从而异常调节细胞的生长分化; 另一种可能是 WT 1 因缺失或点突变而失活, 不能行使正常的转录调节功能。既然 WT 1 编码归于 EGR 家族的锌指类转录因子, 所作用的靶基因在不同细胞类型中不同, 以此达到对发育和分化精细调节的作用, 那么广泛分析 WT 1 在除 WT 外的其他中胚层起源的恶性肿瘤中的变化, 应有助于对 WT 1 功能的认识。

体外试验证明 WT 1 对 IGF-Ⅱ、PDGF A 链及 CSF-1 的转录有抑制作用。WT 1 作为肿瘤抑制基因, 功能可能是抑制某些正调控细胞生长的基因的表达。一些在细胞分裂生长过程中传递正调控信号的因子如生长因子、生长因子受体都是肿瘤抑制基因的候选靶基因。就 WT 1 而言, 那些与胚胎发育有关(中胚层分化)而且其转录调控区有 WT 1 识别位点的基因很可能就是 WT 1 的下游靶基因。

WT 1 明显受到发育调控, 尤其是在肾脏发育中, 出生前后有一个表达的开/关转换, 说明必有上游调节基因的存在。有人对 WT 1 上游区进行分析^[39], 发现 WT 1 启动子无 TATA box 和 CCAAT 结构域, GC 含量高达 71%。在 32 bp 长度内有 4 个转录起始位点, 而转录因子 Sp 1 的结合位点有 11 个。计算机数据分析发现在 WT 1 启动子内还有几个 WT 1 /EGR、Pax-8 及 GAGA 类似的转录因子的潜

在识别位点。在一些无 TATA box 的管家基因和原癌基因启动子中发现有多个 Sp1 结合位点。Sp1 基因在生血细胞、胚胎细胞及精细胞中表达水平最高,说明 Sp1 水平升高与分化过程有关。WT1 启动子中 Sp1 结合位点较多,可能 Sp1 是泌尿生殖系统中诱导 WT1 表达的因子之一。

在 WT1 启动子中有两个相互重叠的 EGR/WT1 和 Sp1 结合位点。不同调控因子结合位点的相互重叠是对基因表达进行调节的方式之一,调控因子的相对含量变化能影响启动子的转录活性。

WT1 启动子内有 WT1/EGR-1 位点,另外 WT1+KTS 能与 WT1 转录起始位点 5' 区域内一些序列相结合,这些序列都不包含能被 WT1-KTS 识别的 EGR-1 位点^[40],这些发现都为研究 WT1 自身的表达调控提供了线索。

WT1 的一个重要特点是基因的选择性剪接。对四种产物的功能研究以及对选择性剪接的调控机制的研究,将有助于阐明真核生物发育的基因调节机理。

结 语

WT1 是迄今发现的为数不多的与发育有关的肿瘤抑制基因之一。利用基因打靶技术将突变型 WT1 基因导入小鼠胚胎干细胞,结果阻断了肾脏和生殖腺正常发育,并且导致间皮、心脏和肺的异常发育^[40]。肿瘤发生与发育失控有关,因此对这一类基因的功能研究有助于阐明肿瘤发生及发育调控的分子机制。WT1 的上游调控基因及下游靶基因可能就是除 WT1 以外的 Wilms' 瘤基因。

考 参 文 献

- [1] Matsunaga ME, 1981, *Hum. Genet.*, 57: 231—246.
- [2] Beckwith JB et al., 1990, *Pediatr. Pathol.*, 10: 1—36.
- [3] Knudson AG and Strong LC, 1972, *J. Natl Cancer Inst.*, 48, 313—324.
- [4] Riccardi VM et al., 1978, *Pediatrics*, 61: 604—610.
- [5] Franke, U. et al., 1979, *Cytogenet. Cell Genet.*, 24: 185—192.
- [6] Rose EA et al., 1990, *Cell*, 60: 495—508.
- [7] Call KM et al., 1990, *Cell*, 60: 509—520.
- [8] Gessler M, et al., 1990, *Nature*, 343: 774—778.
- [9] Pelletier J et al., 1991, *Genes & Development*, 5: 1345—1356.
- [10] Morris JF, et al., 1991, *Oncogene*, 6: 2339—2348.
- [11] Gessler M. et al., 1992, *Genomics*, 12: 807—813.
- [12] Haber DA et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9618—9622.
- [13] Brenner B et al., 1992, *Oncogene*, 7: 1431—1433.
- [14] Pritchard-Jones K et al., 1990, *Nature*, 346: 194—197.
- [15] Buckler AJ et al., 1991, *Mol. Cell Biol.*, 11: 1707—1712.
- [16] Sharma PM et al., 1992, *Cancer Res.*, 52: 6407—6412.
- [17] Haber DA et al., 1990, *Cell*, 61: 1257—1269.
- [18] Little MH et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4791—4795.
- [19] Park S et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 4757—4760.
- [20] Pelletier J et al., 1991, *Nature*, 253: 431—434.
- [21] Brown KW et al., 1992, *Oncogene*, 7: 763—768.
- [22] Pelletier J et al., 1991, *Cell*, 67: 437—447.
- [23] Dowdy SF et al., 1991, *Science*, 254: 293—295.
- [24] Grundy P. et al., 1988, *Nature*, 336: 374—376.
- [25] Huff V et al., 1988, *Nature*, 336: 377—378.
- [26] Schwartz CE, et al., 1991, *Genomics*, 10: 927—930.
- [27] Park S. et al., 1993, *Nature Genetics*, 4: 415—420.
- [28] Rauscher III FJ et al., 1990, *Science*, 250: 1259—1262.
- [29] Drummond AI et al., 1992, *Science*,

- 257: 674—678.
- [30] Wang ZY¹ et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 21999—22002.
- [31] Harrington MA, et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 21271—21275.
- [32] Wang ZY² et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8896—8900.
- [33] Wang ZY³ et al., in press.
- [34] Wang ZY⁴ et al., in press.
- [35] Maheswaran S et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5100—5104.
- [36] Haber DA et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 6010—6014.
- [37] Miwa H et al., 1992, *Leukemia*, 6: 405—409.
- [38] Bruening W. et al, 1993, *Cancer Invest.*, in press.
- [39] Hofmann W et al., 1993, *Onco gene*, 8: 3123—3132.
- [40] Campbell CE et al., 1994, *Oncogene*, 9: 583—595.

发育调控基因的多次性表达和作用

邓武民 赵德标

(中国科学院上海细胞生物学研究所、中国科学院
上海生命科学联合开放实验室 200031)

在遗传学家、分子生物学家与胚胎学家携起手来,共同研究发育生物学的基本问题后,人们对于发育的遗传控制的认识有了长足的进步。80年代在果蝇(*Drosophila melanogaster*)中取得的一系列进展,如控制前后体节形成的一套完整基因系统的发现,同源异形突变(如双胸突变)基因的克隆,同源盒基因被证实从线虫到人类的发育控制中均起重要作用,等等^[1-4],使人们对于发育过程的基因控制有了这样的认识轮廓:每一种具体的发育过程都是由阶段性表达的发育调控基因组成的层次网络,在不同的水平上进行控制,指导细胞的运动、分裂和分化等等,从而使一系列发育事件按程序不断展开。

发育调控基因在形态建成过程中主要起指导作用而不是形态的构造者,它们都有特定的表达时间、表达部位和表达量,每一种参数的改变,都有可能致发育异常。现在已经发现的发育调控基因就其蛋白质功能特征可以归为以下几大类:1. 转录调节因子,2. 膜结合受体及配体系统,3. 信号传递系统,4. 物质转

移和定位系统,众多类型的这些基因参与发育调控,通过转录调节,细胞间相互作用,表达产物的不均一分布等等,使得控制方式多种多样。这些基因不但其产物形式丰富多彩,其表达情况也多种多样,千差万别,有的参与不同的发育过程控制,有的仅限于单一过程调节。发育调控基因表达的多样性是否存在一定的规律性?这种规律性能否反映生物体发育控制所采用的一些基本原则?本文将通过对发育调控基因在发育过程中的各种表达方式的描述,对这些问题进行探讨,并就其可能的生物学意义进行讨论。

一、阶段性表达的发育调控 基因逐级控制发育 过程的进行

果蝇以其良好的遗传学背景和操作性获得了发育生物学家的青睐,近年来许多发育生物

庄孝德教授曾对本文提出宝贵的意见,特表谢意。