

PUMA 在大肠癌中的作用及临床意义

李春香 姜争 傅松滨

【摘要】 PUMA 具有强大的促凋亡功能,其分子结构、转录机制的深入研究,使其有望成为肿瘤治疗新靶点,现对其特点、结构、分子机制以及在大肠癌中研究进展作一综述。

【关键词】 PUMA; 大肠癌; 基因治疗

Functions of PUMA and its Clinical Significance in Human Colorectal Carcinoma Li Chun-xiang¹, JIANG Zheng², FU Song-bin¹. (¹ College of Basic Medicine, Harbin Medical University, Harbin 150081; ² The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Corresponding author: FU Song-bin. E-mail: fusb@ems. hrbmu. edu. cn

【Abstract】 PUMA has strong functions to prompt apoptosis. A number of studies have been done to describe its molecular structure and transcription mechanism, which make it or serve as a objective target for cancer therapies. This article briefly reviews the progress of its characteristics, structure, molecular mechanism in colorectal cancer.

【Key words】 PUMA; Colorectal carcinoma; Gene therapy

大肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,在西方国家恶性肿瘤发病率中居第 2 位,在我国居第 4 位。目前治疗仍以手术为主,辅以放、化疗。但术后 5 年生存率仅为 50% ~ 55%,且半数以上发生复发和转移。分子生物学技术的发展及对大肠癌分子遗传学研究的深入,使基因治疗成为肿瘤治疗的新手段。p53 基因作为抑癌基因与大肠癌关系密切, PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis) 作为 p53 下游靶基因之一在诱导细胞凋亡中起重要作用,本文就 PUMA 在大肠癌中的作用及其研究意义作一综述。

1 PUMA

2001 年, Yu 和 Nakano 等^[1,2] 分别用基因表达系列分析 (serial analysis of gene expression, SAGE) 和 DNA 微阵列技术 (DNA microarray) 分析 p53 转录靶基因时发现了某种新基因可被 p53 迅速诱导,并且具有强大的促凋亡活性,称其为 PUMA。随后 Han 等^[3] 利用酵母双杂交技术在人淋巴细胞 cDNA 文库中筛选到与线虫中 Eg1-1 类似的促凋亡 BH3 仅有蛋白,命名为 Bbc3 (Bcl-2 binding component 3), 后来经

证实他们 3 人发现的是同一基因 PUMA/Bbc3。

1.1 PUMA 基因特点: 人 PUMA 基因定位于 19q13.3, 其 cDNA 长 1.9 kb。PUMA 由 4 个外显子 (1a 或 1b、2、3 和 4) 组成, 外显子 2 含假定的翻译起始密码子, 外显子 3 中含编码 BH3 的序列。在转录起始位点上游 230 bp、144 bp 处各存在一个 P53 结合位点, 分别称为 BS1、BS2, 其中 BS2 为 P53 主要的应答元件。因为存在选择性拼接, PUMA 有 4 种不同的转录本 (α 、 β 、 γ 、 δ), 当前研究主要集中于 PUMA α 。鼠 PUMA 同源基因与人 PUMA 90% 核苷酸序列一致, 91% 编码蛋白一致。并且两个物种中, PUMA 外显子-内含子结构极为保守, 都是由 4 个外显子组成, 鼠和人的 BS2 位点序列的 20 个核苷酸残基中的 18 个相同。

1.2 PUMA 蛋白结构: 人 PUMA 蛋白由 193 个氨基酸残基的蛋白质, 除 BH3 结构域外不存在其他与已知蛋白同源的区域。PUMA 蛋白定位于线粒体膜上, 检测各种 PUMA 基因结构缺失情况发现 C 端 43 个氨基酸残基是其在线粒体定位和凋亡诱导中所必需的, 而 BH3 结构域仅与凋亡诱导相关^[4]。实验证明仅含 C 端 93 个氨基酸残基的 PUMA 表达物与 PUMA 蛋白在诱导凋亡的水平上接近。

PUMA 属于 Bcl-2 家族中的 BH3 仅有蛋白, 存在一个含有 9 个氨基酸残基 (LRRMADDLN) 的 BH3

作者单位: 150081 哈尔滨, 哈尔滨医科大学基础医学院 (李春香、傅松滨); 150001 哈尔滨, 哈尔滨医科大学第一附属医院 (姜争)

通讯作者: 傅松滨 (E-mail: fusb@ems. hrbmu. edu. cn)

结构域,位于 PUMA 氨基酸序列的 141 ~ 149 位。PUMA 通过 BH3 结构域 α -螺旋与其他 Bcl-2 家族成员表面的 BH1 和 BH2 结构域形成的大沟。这种作用是细胞凋亡过程中必需的^[5]。

2 PUMA 诱导大肠癌细胞凋亡的分子生物学机制

PUMA 以 P53 依赖性和 P53 非依赖性两条通路诱导大肠癌细胞凋亡。

2.1 p53 依赖性途径:DNA 损伤、癌基因激活、低氧和氧化压力等因素均可以激活 p53 基因转录,进而诱导细胞周期停滞和/或细胞凋亡,从而发挥抗肿瘤作用。p21 和 PUMA 分别是 P53 诱导细胞周期停滞和细胞凋亡的关键靶基因^[6]。PUMA 上游启动子序列中含有 P53 结合位点,受到凋亡刺激后 P53 直接与靶位点结合从而促进 PUMA 转录和蛋白表达^[1,3]。

PUMA 蛋白可以通过两种方式发挥其诱导癌细胞凋亡的作用^[7]:一是与线粒体膜上的 Bcl-2/Bcl-XL 结合从而解除其对 Bax/Bak 抑制作用;二是直接和线粒体膜上的 Bax/Bak 作用,使 Bax/Bak 发生构象变化,从胞质转位至线粒体外膜并寡聚化进而形成“通道孔”或改变原有的“膜通道蛋白”。线粒体膜通透性改变致使细胞色素 C 和 Smac/DIABLO 释放,形成包括细胞色素 C、ATP 和 Apaf-1 的凋亡复合物,结合并激活 caspase-9 前体最终触发凋亡执行者 caspase-3、caspase-6、caspase-7,其具体机制,进一步研究证实 PUMA 诱导大肠癌细胞凋亡需要存在完整的 Bax,而与 Bak 无关(见图 1)^[4]。而 Bax 在线粒体膜上构象变化比 Bax 从胞质转位至线粒体膜作用更关键。

2.2 p53 非依赖性途径:PUMA 不同于其他 p53 靶基因的一个特点是其不仅可以通过位于 PUMA 启动子内的 P53 应答元件调节表达,还可以通过 p53 非依赖性途径诱导表达,如糖皮质激素、激酶抑制剂和佛波酯等。研究表明 PUMA^{-/-}鼠中细胞因子缺乏,PUMA 和化疗药物导致细胞凋亡可被显著抑制^[8]。

另外,ASPP (apoptosis stimulating protein of p53) 家族蛋白以及蛋白酶体抑制剂也可以通过 P53 依赖性或非依赖性方式诱导 PUMA 活化从而诱导细胞凋亡^[9,10]。

3 PUMA 的调控及其临床意义

由于肿瘤生长迅速,血管生成相对滞后,致使肿瘤细胞处于缺氧状态。缺氧和新陈代谢异常激活 p53,进而促使下游靶基因如 p21 和 PUMA 表达。p21 活化抑制细胞周期依赖性激酶导致生长停滞;

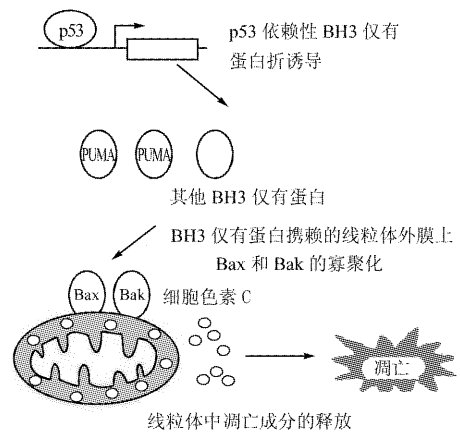


图 1 PUMA 诱导细胞凋亡机制^[11]

Fig. 1 The mechanism of apoptosis induced by PUMA

PUMA 活化则引起 Bax 寡聚化触发线粒体途径凋亡。然而在大肠癌由良性向恶性转化时即癌症晚期 p53 突变,使肿瘤耐受生存环境^[12]。PUMA 基因具有较强稳定性,因此对比 p53,针对 PUMA 进行靶向治疗具有更强的特异性和时效性。

深入研究 PUMA 与其他基因相互作用的机制以及调控 PUMA 表达的 DNA 元件、转录因子及其他无毒性小分子物质可以为其应用于临床奠定理论与实验基础。如能利用无毒性物质激活肿瘤细胞内 PUMA 和/或特异性阻断正常细胞内 PUMA 表达,则有望实现既避免化疗副作用又增强抗肿瘤功能的双重效果。

凋亡和细胞老化是化疗的依据^[13]。如能充分发挥 PUMA 促凋亡作用则可以通过基因疗法达到同样效果。Micheal 等^[14]用 shRNAs 干扰鼠 PUMA 表达发现其可以有效地抑制肿瘤细胞凋亡,但并不损伤 P53 的非凋亡功能。此外,研究显示 PUMA 介导的凋亡具有环境依赖性,并充分表明 PUMA 在 P53 依赖性凋亡途径中不可缺少,为针对 PUMA 进行基因治疗奠定了良好的试验基础。如能进一步明确不同环境下 PUMA 在肿瘤病理进程中的作用,则可以选择特异的靶点促使癌细胞凋亡,达到抑癌目的。

p53 家族成员 p73 与 p53 在某些序列高度同源,尤其在结合 DNA 结构域、氨基酸末端活化结构域及羟基末端寡聚化结构域极为相似^[15]。能够直接激活 PUMA,使其 mRNA 和蛋白水平升高^[16],从而引起 Bax 在线粒体重新定位引发凋亡。近来研究表明 P73 同源异构体、与 p53 之间的相互作用可能在调控 p53 功能及凋亡中发挥重要作用^[17,18]。

组蛋白乙酰转移酶 P300 可以作为几种核蛋白的转录调控物^[19], 当内环境稳定时促使 p53 失活。P300 通过两种机制调控 p53 靶基因转录: 首先, P300 可以使靶基因启动子组蛋白乙酰化^[20]; 其次靶基因启动子序列中乙酰化 p53-DNA 结合更牢固。实验证明 P300 过表达抑制 PUMA 活化从而抑制肿瘤细胞凋亡^[21]。因此采用基因靶向灭活 (gene targeting)、RNAi 等技术选择性灭活 P300 可能促使癌细胞凋亡。

抑癌基因 RB 下游的关键靶点 E2F1 能够通过直接转录机制上调促凋亡 BH3 仅有蛋白 PUMA, PUMA 启动子序列位点上游 8 存在 E2F1 结合位点^[22]。E2F1 通过直接激活 ARF 转录和/或 ARF 非依赖机制激活 P53 进而上调 PUMA 表达^[23]。增加 E2F1 活性上调 PUMA 表达能够使细胞对多种诱导凋亡的刺激敏感, 可以用于增强化疗药物对肿瘤细胞的杀伤性^[24]。

p73、p300、E2F1 分别与 p53 相互作用, 构成 PUMA 上游激活信号网络, 在转录水平调节 PUMA 表达从而控制肿瘤生长。此外, 其他多种生物制剂、药物、小分子物质也可以通过调控 PUMA 表达实现抗肿瘤功能。微管破坏剂 (MDA) 广泛用于临床治疗各种肿瘤, 当其应用于 PUMA 缺失的大肠癌细胞时, Bax 凋亡反应受到抑制, 表明 PUMA 在 MDA 抗肿瘤过程中发挥重要作用^[25]。毒胡萝卜素 (thapsigargin, TG) 介导胞质内质网钙池耗尽触发凋亡, 研究显示 TG 以 P53 非依赖途径上调 PUMA 表达^[26]。

尽管已有研究表明 PUMA 的表达水平变化在大肠癌的发展过程中可能只起微弱作用^[27], 但通过在人类皮肤黑色素瘤中 PUMA 表达的研究, 发现在肿瘤组织中 PUMA 的表达水平可以作为恶病质及 5 年存活率的独立预测指标^[28], 为我们进一步研究 PUMA 表达水平与大肠癌预后的关系拓宽了思路。p53 靶基因的选择性激活是由共同的刺激物来调控的, 单个凋亡基因的诱导有时不足以触发凋亡, 虽然已经证实 PUMA 在 p53 引起的凋亡中不可缺少且可以单独诱导凋亡^[29], 但仍有许多机制尚未清楚, 如一些细胞中 PUMA 活化后不发生凋亡而发生细胞周期停滞? 在发生凋亡的细胞中抑制 p21 活化是否可以增强凋亡反应? PUMA 缺陷是否有自发性肿瘤形成? 目前研究只限于体外试验, 动物建模后是否发生新的变化? 这些都有待于进一步探讨。但相信随着 PUMA 在凋亡中的作用及相关领域研究的日益深

入, 大肠癌治疗定会有突破性进展。

4 展望

目前, 大肠癌的基因治疗已经开始从理论走向实践, 体外和动物实验中均得以证实其有效性, 并且部分进入了临床试验。然而真正实现大肠癌基因治疗的临床应用尚有许多亟待解决的问题, 其中最关键的是基因转移的技术还不够理想, 基因转导的低效性和转导产物抗肿瘤的的低效性成为其用于肿瘤治疗的瓶颈, 当前倾向于寻找某一肿瘤基因特异性启动子来提高基因治疗的特异性, PUMA 的发现及研究恰好适应这种趋势, 相信随着人们对其认识的不断深入和基因技术的日益成熟, 基因治疗定会成为治疗大肠癌的有效手段之一。

参 考 文 献

- 1 Yu J, Zhang L, Huang PM, et al. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*, 2001, 7: 673-682.
- 2 Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 2001, 7: 683-694.
- 3 Han JW, Flemington C, Houghton AB, et al. Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *PNAS*, 2001, 98: 11318-11323.
- 4 Huang DCS, Strasser A. BH3-only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*, 2000, 103: 839-842.
- 5 Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*, 2000, 408: 307-310.
- 6 Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 594-604.
- 7 Letai A, Bassik MC, Walensky LD, et al. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2002, 2: 183-192.
- 8 Bergamaschi D, Samuels Y, Jin B, et al. ASP1 and ASP2: common activators of p53 family members. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 1342-1350.
- 9 Melino G, Bernassola F, Ranalli M, et al. p73 induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax-mitochondrial translocation. *J Biol Chem*, 2004, 279: 8076-8083.
- 10 Yu J, Tivari S, Steiner P, et al. Differential apoptotic response to the proteasome inhibitor Bortezomib in Bax-deficient and p21-deficient colon cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 2003, 2: 694-699.
- 11 Tobiume K. Involvement of Bcl-2 family proteins in p53-induced apoptosis. *J Nippon Med Sch*, 2005, 72: 192-193.
- 12 Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, et al. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, 1990, 50: 7717-7722.
- 13 Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, et al. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*, 2002, 109: 335-346.

(上接 47 页)

- 14 Michael TH, Jack TZ, Zhen Z, *et al.* Suppression of tumorigenesis by the p53 target PUMA. *PNAS*, 2004, 101: 9333-9338.
- 15 Kaghad M, Bonnet H, Yang A, *et al.* Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, 1997, 90: 809-819.
- 16 Simoes-Wust AP, Sigrist B, Belyanskaya L, *et al.* DeltaNp73 antisense activates PUMA and induces apoptosis in neuroblastoma cells. *J Neurooncol*, 2005, 72: 29-34.
- 17 Yang A, Kaghad M, Caput D, *et al.* On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet*, 2002, 18: 90-95.
- 18 Melino G, De Laurenzi V, Vousden KH. p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 605-615.
- 19 Chan HM, La Thanguc NB. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci*, 2001, 114: 2363-2373.
- 20 Espinosa JM, Emerson BM. Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell*, 2001, 8: 57-69.
- 21 Lyer NG, Chin SF, Ozdag H, *et al.* p300 regulates p53-dependent apoptosis after DNA damage in colorectal cancer cells by modulation of PUMA/p21 levels. *PNAS*, 2004, 101: 7386-7391.
- 22 Weinmann AS, Yan PS, Oberley MJ, *et al.* Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. *Gene Dev*, 2002, 16: 235-244.
- 23 Berkovich E, Ginsberg D. ATM is a target for positive regulation by E2F-1. *Oncogene*, 2003, 22: 161-167.
- 24 Hershko T, Ginsberg D. Up-regulation of Bcl-2 Homology3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem*, 2004, 279: 8627-8634.
- 25 Yamaguchi H, Chen JC, Bhalla K, *et al.* Regulation of Bax activation and apoptotic response to microtubule-damaging agents by p53 transcription-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem*, 2004, 279: 39431-39437.
- 26 Luo X, He Q, Huang Y, *et al.* Transcriptional upregulation of PUMA modulates endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis via Bax activation. *Cell Death Differ*, 2005, 12: 1310-1318.
- 27 Jansson A, Arlman G, Sun XF. mRNA and protein expression of PUMA in sporadic colorectal cancer. *Oncol Rep*, 2004, 12: 1245-1249.
- 28 Karst AM, Pai DL, Martinka M, *et al.* PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas. *Oncogene*, 2005, 24: 1111-1116.
- 29 Yu J, Zhang L. No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis. *Cancer Cell*, 2003, 4: 248-249.

(收稿日期:2006-02-22)

(本文编辑:高巍)