

ASPP 蛋白家族在肿瘤细胞凋亡中的作用

陈燕平(综述)/刘泽军(审校)

(第三军医大学西南医院国际合作实验室,重庆 400038)

【摘要】 p53 凋亡刺激蛋白 (apoptosis stimulating protein of p53, ASPP) 家族是近年来发现的一个新蛋白家族,它包括 3 个成员: ASPP1、ASPP2 和 iASPP。其中 ASPP1 和 ASPP2 能够与 p53 蛋白结合增强该蛋白的促进细胞凋亡的功能,发挥抑制肿瘤的作用,而 iASPP 与 ASPP1 和 ASPP2 的功能截然相反,它能够和 ASPP1 或 ASPP2 竞争性地与 p53 结合,抑制 ASPP1 或 ASPP2 的促进凋亡作用,具有癌基因的功能。三者的结构相似,但功能却完全不同,通过研究三者的关系、促进肿瘤细胞内 ASPP1 或 ASPP2 的高表达以及抑制 iASPP 的表达有可能促进肿瘤细胞的凋亡,成为肿瘤治疗的新靶点。

【关键词】 ASPP 蛋白家族; iASPP; 癌基因; 抑癌基因

中图分类号: Q51; Q255

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)06-0488-03

p53 凋亡刺激蛋白 (apoptosis stimulating protein of p53, ASPP) 是 2001 年发现的一个蛋白质家族^[1], 该家族成员包括 ASPP1、ASPP2 和 iASPP (inhibitory member of the ASPP family) 3 个成员, 此家族成员具有 3 个特征性的结构: 4 个锚蛋白重复序列, SH3 结构域以及富含脯氨酸的结构域。ASPP1 和 ASPP2 分别是由 1090、1128 个氨基酸残基组成, 二者和 p53 结合蛋白 2 (p53 binding protein 2, 53BP2) 高度同源, 且 ASPP1、ASPP2 的氨基端和羧基端部分同源。ASPP1 及 ASPP2 能够和 p53 结合共同调节 p53 蛋白的生物学活性, 促进 DNA 损伤的细胞发生凋亡 (图 1)。

最初认为 iASPP 是由 315 个氨基酸残基组成的蛋白质, 随后的研究显示完整的 iASPP 是由 828 个氨基酸残基组成^[2], 无论是

人的 iASPP 还是线虫的 iASPP 都和 ASPP1、ASPP2 的羧基端 1/2 具有相似的序列结构, iASPP 结合 p53 的大部分氨基酸残基和 ASPP2 一致。iASPP 的 SH3 结构域是和 p53 结合的必需结构, 缺少 SH3 结构域和 (或) 锚蛋白重复序列的截短型 iASPP 均不能和 p53 结合, 也不能抑制 p53 诱导的细胞凋亡。ASPP1、ASPP2 和 iASPP 与 p53 结合域的相似性提示 iASPP 可以同 ASPP1 和 (或) ASPP2 竞争与 p53 结合, 采用抗 p53 抗体免疫印迹检测 p53 和 ³⁵S 蛋氨酸标记的 ASPP1、ASPP2 和 iASPP 体外翻译产物复合物, 结果显示随着掺入 iASPP 的逐渐增加, 和 p53 结合的 ASPP1 和 ASPP2 的量逐渐减少, 提示 iASPP 可竞争性的和 ASPP1、ASPP2 与 p53 结合, 抑制 p53 的促细胞凋亡活性。

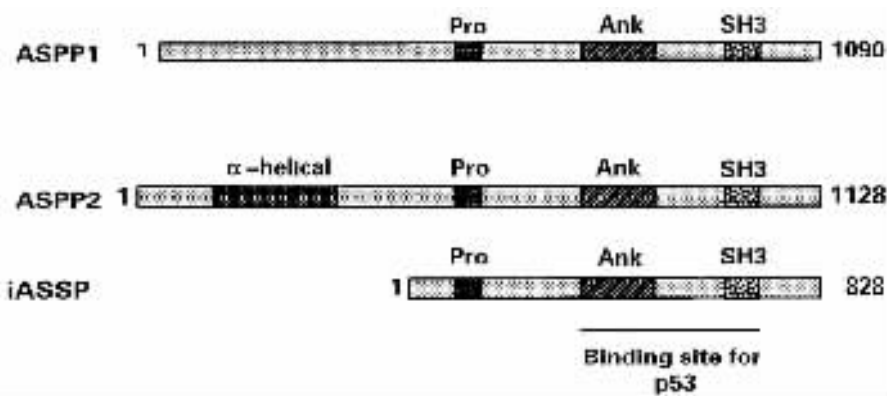


图 1 ASPP 家族结构示意图

1 ASPP 家族的作用机制 (图 2)

1.1 ASPP1 与 ASPP2

ASPP1 和 (或) ASPP2 与 p53 的相互作用主要是能够特异性地增强 p53 的促进细胞凋亡功能, 有研究表明这是通过增强 p53

收稿日期: 2005-07-27; 修订日期: 2005-11-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30470675)

作者简介: 陈燕平 (1973-), 女, 河南省荥阳人, 检验技师, 硕士生, 研究方向: 抑癌基因分子生物学, 表观遗传信号。Tel: 86-23-68771400, E-mail: mushroom@mail.tmmu.com.cn.

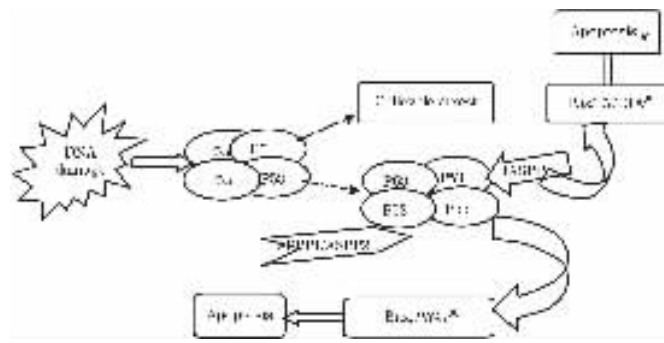


图 2 ASPP1/ASPP2 与 p53 的作用示意图

的促凋亡基因启动子与 DNA 结合从而促进细胞发生凋亡。ASPP1 和 (或) ASPP2 蛋白的发现让人们了解到为什么突变的 p53 仍能与 DNA 结合,而不能发挥它的促进细胞凋亡功能,这是因为突变的 p53 不再能与 ASPP1 和 (或) ASPP2 蛋白结合发挥其功能, DNA 损伤的细胞因而不能发生凋亡。

将 ASPP2 转入 HeLa 和 COS-1 细胞中可显著促进这 2 种细胞发生凋亡^[3];而 A_o 等^[4]的研究结果表明细胞内高表达 ASPP2 可引起细胞凋亡,低水平表达则可以使细胞抵抗 DNA 损伤,免于发生凋亡。此外, ASPP2 还能够促进 p53 抑制转染癌基因 Ras 和 E1A 的大鼠胚胎纤维母细胞形成结节的能力,同时也增加 p53 反应基因 p21 的转录活性^[5]。由此可见 ASPP2 可以和 p53 一起促进肿瘤细胞的凋亡,抑制肿瘤的生长。ASPP1 略短于 ASPP2,二者在氨基端和羧基端存在同源性,在 ASPP1 和 (或) ASPP2 存在时, p53 能够显著促进细胞的凋亡,而不能增加细胞周期在 G1 期的停滞^[1]。用 p53 表达质粒或对照质粒转染 Saos-2 细胞,流式细胞术分析显示转染 p53 后引起 17% 的转染细胞发生凋亡。在 p53^{-/-}的细胞中 ASPP1 或 ASPP2 的表达只引起很少一部分细胞发生凋亡,而共表达 p53 和 ASPP1 或 p53 和 ASPP2 引起 50% 的转染细胞发生凋亡。

ASPP1 和 (或) ASPP2 和 p53 结合的必需氨基酸序列高度同源,而 p53 蛋白在细胞 DNA 损伤后明显增高。在正常生长的 MCF-7 细胞中,分别有 4.1% 和 1.5% 的 p53 与 ASPP1 和 ASPP2 形成复合体,经过 UV 辐射后, p53 和 ASPP2 形成复合体的数量增加了 3.4 倍 (约 5.5% 的 p53 和 ASPP2 形成复合体),而与 ASPP1 结合的 p53 数量没有增加,提示 MCF-7 细胞经过 UV 辐射后 p53-ASPP2 复合体明显增加,并且 ASPP2 在 UV 辐射后能够明显调节 p53 促进细胞凋亡的功能。

采用半定量 RT-PCR 技术对 58 例乳腺癌病人的正常组织或肿瘤组织中 ASPP1 和 ASPP2 的表达水平进行研究^[1],结果显示有 40 例肿瘤组织表达野生型 p53,有 18 例肿瘤组织表达突变型 p53;而且在 40 例表达野生型 p53 的组织中,分别检测到有 24 例肿瘤组织 ASPP1 表达下调,9 例 ASPP2 表达下调,其中 9 例 ASPP2 表达下调的肿瘤组织中有 8 例 ASPP1 表达也下调。而在 18 例表达突变型 p53 的肿瘤组织中,有 3 例 ASPP1 表达下调,2 例 ASPP2 表达下调。进一步证明 ASPP1 和 (或) ASPP2 蛋白家族在人乳腺癌中其重要的抑制功能。

p53-ASPP 复合体可能改变 p53 蛋白的构象,促进 p53 和增强

子 Bax 或 PIG-3 的结合活性。研究表明 ASPP1 和 ASPP2 的 N 端 143 或 123 残基也能够最大限度的刺激 p53 的功能,这也提示 ASPP 通过 N 末端和一些其它的未知细胞蛋白相互作用也可刺激 p53 的活性。

此外, ASPP1 和 (或) ASPP2 也可以通过 p53 的同源类似物 p63 和 p73 途径诱导细胞凋亡的发生^[6]。

1.2 iASPP

iASPP 比 ASPP1 和 ASPP2 稍短,能够抑制 p53 介导的细胞凋亡^[7]。iASPP 抑制 p53 的功能提示 iASPP 在体内是一种癌蛋白, iASPP 的表达可显著增加癌蛋白 Ras、E7 或 E1A 的活性,而 ASPP1 和 (或) ASPP2 主要抑制 Ras 和 E1A 的转化活性。通过 UV 辐射或顺铂处理造成 MCF-7 细胞和 U2OS 细胞的 DNA 损伤 (这两种细胞都表达野生型 p53),转入 iASPP 后观察到 iASPP 的表达增高抑制了 UV 辐射造成的这两种细胞的凋亡,却不能抑制顺铂诱导造成的 Saos-2 细胞的凋亡,因为后者表达突变型的 p53,说明 iASPP 能够特异性抑制野生型 p53 的功能。而且 iASPP 过表达和正常表达水平的 ASPP1 和 (或) ASPP2 之间存在强相关性:8 例表达野生型 p53 的肿瘤组织和正常对照组织相比,存在 iASPP 的过量表达,其中有 7 例表达正常水平的 ASPP1 和 ASPP2。

使用 PPP1R13L (编码 iASPP) 的反义 RNA 处理细胞可使 MCF-7 和 U2OS 细胞的凋亡增加 3~5 倍,因此可以肯定 iASPP 对 p53 是起抑制作用的。

目前国内对 ASPP 家族的功能和作用机理进行了研究,我们实验室最近的研究发现肿瘤细胞中 ASPP1 和 ASPP2 的 mRNA 低表达与 iASPP mRNA 的高表达共存^[8],同时在 ASPP1 和 ASPP2 的 5' 端非编码区发现异常高甲基化现象,提示表观遗传信号的异常可能与 ASPP1 和 ASPP2 在肿瘤细胞中的表达下调有关^[9]。而 Zhang 等^[10]的研究发现 iASPP mRNA 表达水平在急性白血病患者细胞中比正常者和急性白血病完全缓解者高。

2 未来的研究方向

ASPP 家族在序列结构上存在极大的相似性,为什么却表现出不同的生物学功能?三者之间是否存在内在的联系?有无可能 iASPP 是 ASPP1 和 (或) ASPP2 的突变体? ASPP1、ASPP2、iASPP 和 p53 的结合是一种竞争性的关系,细胞是如何决定与三者中的哪一个优先结合?未来的研究还将应用 ASPP1 和 (或) ASPP2 基因缺失小鼠来确定 iASPP 是否对 ASPP1 和 (或) ASPP2 起负性调控作用还是直接抑制 p53 的功能,因为 iASPP 的负性调控以及 ASPP 的正性调控最终将影响 p53 的促凋亡功能进而决定细胞的命运。

从目前的实验结果来看,我们还没有发现 ASPP1 和 ASPP2 存在显著的功能差异,但研究结果显示 p53 与 ASPP2 形成复合体的几率明显多于和 ASPP1 形成复合体,提示 ASPP1 与 ASPP2 之间可能存在功能性上的差异,还需要进一步研究二者之间的差异。ASPP2 的表达水平受应激信号的调节^[11],在 p53 和 ASPP2 之间可能存在一个功能性的自调节环路,是否 ASPP1 也受类似的调节目前正在研究之中。目前已知 p53 的促凋亡功能能够被 ASPP 家族特异性的调节提示我们 通过活化 ASPP1 和 (或) ASPP2 而重新



活化细胞内的野生型 p53 的促凋亡功能,可用于治疗一部分人体肿瘤。此外 ASPP 家族的上游调控基因还未发现 机体是如何调控 ASPP 家族中 3 个成员的产生以及产生的量,目前还是个未知数。是否 ASPP1 和 ASPP2 是通过不同的途径诱导细胞凋亡,也还需要进一步的研究。

p53 突变后不能与 ASPP1 和(或)ASPP2 相互作用增进 Bax 启动子的转录能力,也不能诱导细胞凋亡,有资料显示 ASPP1 与突变型 p53 的结合能力要弱于与野生型 p53 的结合能力,但 ASPP 也是易发生突变和失去调控的目标。通过分析乳腺癌病人肿瘤组织中 ASPP 1 和(或)ASPP2 mRNA 的表达,发现在表达野生型 p53 的肿瘤组织内,ASPP1 的表达下降率约为 60%,ASPP2 表达下降率约为 23%,在 ASPP2 表达下降的组织内 90% 也存在 ASPP1 的表达下降(约占总数的 20%)^[1]。另一项研究表明高表达 ASPP2 的细胞株对 UV 和 X 线辐射更敏感,而那些低表达者相对来说可抵抗 UV 和 X 线辐射^[12]。因此,在无 p53 突变的肿瘤中,由于 ASPP1 和(或)ASPP2 的下调而出现选择优势,抑制 p53 诱导的细胞凋亡。是否在肿瘤发生过程中也存在 ASPP 蛋白的突变尚需进一步的研究。此外 ASPP2 还可以和 p65(RelA), 蛋白磷酸化酶 1, Bcl-2 相互作用^[13],这些蛋白也是通过锚蛋白重复序列和 SH3 结构与 ASPP2 发生相互作用的;而和 ASPP1 相互作用的蛋白,除了 p53 以外还没有发现其他的蛋白。

Bcl-2 能够保护细胞免于在各种凋亡诱导因子的作用下发生凋亡,ASPP2 也能和 Bcl-2 结合,p53 和 Bcl-2 不能同时结合 ASPP2,而是竞争性的与 ASPP2 结合,Bcl-2 能够抑制 p53 依赖的细胞凋亡,但不影响 p53 对细胞周期的抑制,部分原因可能是 ASPP 蛋白抑制 Bcl-2 的功能而诱发细胞凋亡的。

目前对 ASPP 家族的了解尚处在初级阶段,需要进一步研究该蛋白家族的行为和调控此蛋白家族的调节因子,才能揭示 ASPP 家族在整个细胞凋亡网络中的作用。

参考文献:

[1] Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, et al. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53[J]. *Mol Cell*,

2001, 8(4): 781-794.

- [2] Slee EA, Gillotin S, Bergamaschi D, et al. The N-terminus of a novel isoform of human iASPP is required for its cytoplasmic localization[J]. *Oncogene*, 2004, 23(56): 9 007-9 016.
- [3] Yang JP, Hori M, Takahashi N, et al. NF- κ B subunit p65 binds to 53BP2 and inhibits cell death induced by 53BP2[J]. *Oncogene*, 1999, 18(37): 5 177-5 186.
- [4] Ao Y, Rohde LH, Naumovski L. p53-interacting protein 53BP2 inhibits clonogenic survival and sensitizes cells to doxorubicin but not paclitaxel-induced apoptosis[J]. *Oncogene*, 2001, 20(21): 2 720-2 725.
- [5] Iwabuchi K, Li B, Massa HF, et al. Stimulation of p53-mediated transcriptional activation by the p53 binding proteins, 53BP1 and 53BP2 [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(40): 26 061-26 068.
- [6] Bergamaschi D, Samuels Y, Jin B, et al. ASPP1 and ASPP2: Common Activators of p53 Family Members[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(3): 1 341-1 350.
- [7] Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil NJ, et al. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human [J]. *Nat Genet*, 2003, 33(2): 162-167.
- [8] Liu ZJ, Zhang Y, Zhang XB, et al. Abnormal mRNA expression of ASPP members in leukemia cell lines [J]. *Leukemia*, 2004, 18(4): 880.
- [9] Liu ZJ, Lu X, Zhang Y, et al. Downregulated mRNA expression of ASPP and the hypermethylation of the 5'-untranslated region in cancer cell lines retaining wild-type p53 [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(7): 1 587-1 590.
- [10] Zhang X, Wang M, Zhou C, et al. The expression of iASPP in acute leukemias [J]. *Leuk Res*, 2005, 29(2): 179-183.
- [11] Lopez CD, Rohde LH, Perez TD, et al. Proapoptotic p53-interacting protein 53BP2 is induced by UV irradiation but suppressed by p53 [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(21): 8 018-8 025.
- [12] Mori T, Okamoto H, Takahashi N, et al. Aberrant overexpression of 53BP2 mRNA in lung cancer cell lines[J]. *FEBS Lett*, 2000, 465(2-3): 124-128.
- [13] Espanel X, Sudol M. Yes-associated protein and p53-binding protein-2 interact through their WW and SH3 domains [J]. *J Biol Chem*. 2001, 276(17): 14 514-14 523.

《四川肿瘤防治》2007 年征订启事

《四川肿瘤防治》杂志为公开发行的科技期刊,刊号 ISSN 1007-028, CN 51-1487/R。近几年来受到广大读(作)者的欢迎与好评。

本刊主要报道国内外肿瘤防治研究领域的新成果、新进展。开设栏目有肿瘤流行病学、基础研究、肿瘤病理、临床诊治经验、病例报告、综述、讲座、肿瘤护理、国外研究动态等,是各级医疗卫生及科研单位医务工作者具有指导意义和参考价值的学术期刊。

本刊为季刊,大 16 开本。邮政发行,邮发代号 62-142,敬请读者及作者踊跃投稿,欢迎订阅,本刊 2007 年订户,凭邮局订阅存根复印件可免交稿件处理费。每期定价 8.00 元,全年订价 32.00 元。需订阅者请到当地邮局订阅,错过订阅时间可直接向编辑部订阅,款汇至成都市人民南路四段 55 号《四川肿瘤防治》编辑部收,邮编 610041。