

综述与编译

抑癌基因 PTEN 的研究进展

韩 杨,程克棣综述 朱 平* 审校

(中国医学科学院/中国协和医科大学药物研究所,卫生部天然药物生物合成重点实验室,北京 100050)

摘要:第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)在多种肿瘤中存在突变。PTEN 基因产物具有蛋白磷酸酶活性和脂质磷酸酶活性,其 C 端可调节 PTEN 在膜上的靶向定位。结合到质膜上的 PTEN 通过催化磷脂酰肌醇 3-*A* 5-三磷酸(phosphatidylinositol 3-*A* 5-triphosphate, PIP₃)的降解来调节细胞内 PIP₃ 水平,对 PKB/Akt 途径进行负调控。在细胞内,PTEN 与许多细胞表面受体相互作用,对一些受体介导的信号转导途径进行负调节,从而调控细胞的增殖、迁移和侵袭。PTEN 也通过与 p53 蛋白结合,调节基因转录,进而对细胞生长或细胞凋亡进行调控。

关键词:PTEN; 抑癌基因; p53; 膜结合

中图分类号:R394.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0971(2006)04-0241-05

生物有机体依靠精密的信号转导系统来调节细胞的生长、分化、生存和死亡。信号转导通路中的任何部分异常都有可能导致细胞的癌变,大部分的癌基因和抑癌基因产物本身就是这些信号转导通路中的组成部分。PTEN 蛋白也称多发性进展期癌症突变蛋白(mutated in multiple advanced cancers, MMAC1)^[2]或 TGF- β 调节的上皮细胞富含的磷酸酶(TGF- β -regulated and epithelial cell enriched phosphatase, TEP1)^[3],是 1997 年分别由 3 个小组发现的第一个既具有抑癌功能,又具有磷酸酶活性的抑癌因子。它通过负调控多种信号转导途径包括 PI3K/Akt 途径、FAK 途径和 MAPK 途径调节细胞生长、增殖、生存及转移。大量

临床研究证明,多种肿瘤细胞存在 PTEN 突变或缺失。PTEN 蛋白不仅能够募集到细胞膜上,行使脂质磷酸酶作用,还能使多种蛋白质磷酸化,干预多条信号转导途径,并能在细胞核中对基因转录进行调控。本文试图就 PTEN 蛋白的膜结合特性和在细胞调控方面与各种细胞受体,以及 p53 的关系作一综述。

1 PTEN 的结构简述

PTEN 是由 Li 等^[1]发现并克隆的,在神经胶质母细胞瘤(20%~44%)^[1-3]和子宫内膜癌(50%)^[4]中发生高频突变或缺失,在前列腺、膀胱、脑、乳房等各种肿瘤中,尤其在晚期恶性肿瘤中存在突变或缺失。

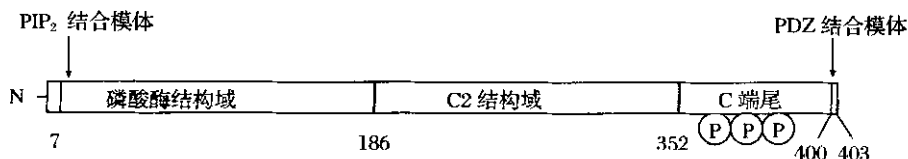


图 1 PTEN 蛋白结构示意图

PTEN 蛋白含有 403 个氨基酸残基,相对分子质量约 50 kD(见图 1),属于蛋白酪氨酸磷酸酶家族成员,是一个双重特异性蛋白磷酸酶。它包括 N 端磷

酸酶结构域、C2 结构域和 C 端尾区。除了具有高度保守的磷酸酶基因家族的催化结构域,其 N 端有一段与细胞张力蛋白(tensin)、辅助蛋白(auxilin)同源的序列,磷酸酶结构域中还含有 PIP₂ 结合模体,对于 PTEN 的膜定位和磷酸酶活性非常重要^[5]。C2 结构域介导 PTEN 结合到质膜上,此种结合是非 Ca²⁺ 依赖的。PTEN 晶体结构显示,磷酸酶结构域与 C2 结构域结合很紧密^[6],构成 PTEN 催化的最小单位。

收稿日期 2006-01-18

作者简介:韩 杨,女,在读硕士研究生,研究方向:药物靶点蛋白基因克隆与表达, Tel 010-63165199, E-mail zwinter29@imm.ac.cn

* 通讯作者:朱 平,男,教授,研究方向:药物靶点蛋白基因克隆与表达, Tel 010-63165197, E-mail zhuping@imm.ac.cn

最近研究表明,单独表达 C2 结构域,也能够抑制细胞迁移^[7]。C 端含有 psd-95/Dlg/ZO-1 同源(PDZ)结构域结合模体和多个磷酸化作用位点,PDZ 结构域结合模体可能利于 PTEN 的定位,以及蛋白质的相互作用,对于选择性识别 PTEN 蛋白调节子非常重要^[8],磷酸化位点受到 CK2 等蛋白激酶的磷酸化后,PTEN 的稳定性得以提高,而活性会下降^[9]。所有已知的脊椎动物 PTEN 蛋白的氨基酸序列高度保守,同源性在 81% ~ 100% 之间,说明 PTEN 在细胞的生命活动中起着重要的作用。

2 PTEN 的膜结合机制

早期研究证明,C2 结构域能促进 PTEN 在细胞膜募集和协助磷酸酶结构域在膜表面正确定位^[10]。然而,C 端尾区在催化功能上和对 PTEN 的调控问题上仍有许多争议。因为删除 C 端对磷酸酶活性影响不大,但却使 PTEN 在细胞内的稳定性降低了^[10,11],推测 C 端可能通过调节 PTEN 的稳定性来调控其在细胞内的活性。Das 等^[12]测定了 PTEN 及单独的 C2 结构域在体内的膜结合参数,结果显示,C2 结构域对膜的亲和力并不足以驱动 PTEN 分子在膜上的募集。也就暗示磷酸酶结构域或 C 端尾(或是二者同时)更直接地参与 PTEN 在膜上的靶向定位。目前,对于 C 端在调节 PTEN 膜定位问题上,主要有两种说法。

2.1 PDZ 结构域结合模体介导形成 PTEN 复合物

有人提出,C 端通过与含有 PDZ 结构域的蛋白质相互作用参与了 PTEN 的膜定位。PDZ 结合模体由 C 端的最后三个氨基酸残基(Thr⁴⁰¹-Lys⁴⁰²-Val⁴⁰³-COOH)构成,与含有 PDZ 结构域的蛋白,如 S-SCAM/MAGI-2, MAGI-3, hDLG, hMAST205 和 MUPP1 结合,在质膜上募集成 PTEN 蛋白复合物^[13],调节 PTEN 在膜上的移位(translocation)^[14,15]。CK2 等激酶能够将 PTEN 蛋白 C 端的 Ser/Thr 残基磷酸化(图 2),引起蛋白分子构象发生变化,掩蔽 PDZ 结合位点^[11],从而抑制 PTEN 在质膜上形成相关复合物^[13-15]。

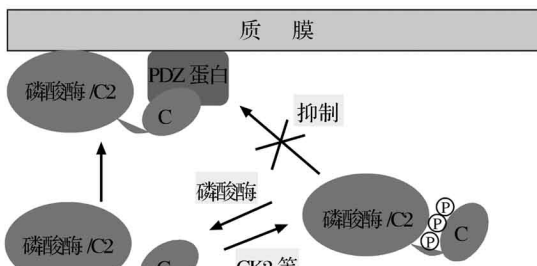


图 2 PDZ 结构域结合模体介导的膜结合示意图

PTEN 蛋白通过与特定的含有 PDZ 结构域的支架蛋白(scaffolding protein)结合,不仅稳定性得以提高^[8],还能促进自身在信号转导过程中的靶向定位,并且,其活性可受到调控分子的调节^[16]。

2.2 静电开关作用

Das 等^[12]采用体内表面细胞质基因组共振技术(surface plasmon resonance)检测,显示 N 端的 PIP₂ 结合模体在与阴离子囊泡结合及在增强 PTEN 活性方面起着重要的作用。此模体在人神经胶质母细胞瘤中的突变会特异性地削弱 PTEN 的结合能力及活性,从而改变细胞的增殖能力^[17]。PTEN 通过 PIP₂ 结合模体与含有 PIP₂ 的囊泡结合,而结合了 PTEN 的 PIP₂ 又能够增强 PTEN 的脂质磷酸酶活性^[18]。近期有数据显示,PTEN 只对定位于酸性质膜上的底物有活性,而对缺少电荷的内质网上的底物是没有活性的^[19]。

Das 等提出了 PTEN 的膜结合与活化机制:C 端尾区的磷酸化/去磷酸化起着静电开关的作用,调控蛋白质在质膜上的移位^[20](图 3)。C 端的磷酸化作用影响 PTEN 在质膜的靶向定位,并不是由于阻碍 PDZ 结构域结合位点,而是干扰 PTEN 的静电膜结合。C 端的去磷酸化,暴露表面阳离子残基,触发了 PTEN 对质膜的靶向性,从而引起对质膜的快速静电结合。一旦 PTEN 结合到质膜上,它就与 PIP₃ 结合,使后者脱磷酸,促进其降解。

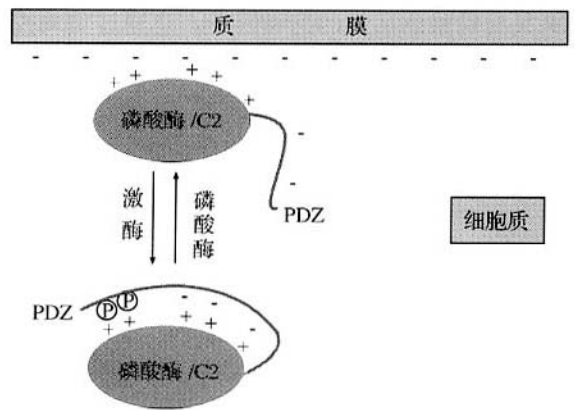


图 3 PTEN 的静电膜结合示意图

3 PTEN 与细胞表面受体

PTEN 通过直接下调 PIP₃ 水平,抑制 Akt 活性,是否诱导细胞产生周期停滞或者诱导肿瘤细胞凋亡是由细胞类型决定的。然而,在正常细胞中,PTEN 的作用还不太清楚。PTEN 能够通过 C2 结构域和 C

端尾与血小板衍生生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)结合,使 PDGFR 上磷酸化的酪氨酸残基脱磷酸,进而使 PDGFR 失活。说明 PTEN 是 PDGFR 的磷酸酶,负调控 PDGFR 酪氨酸激酶活性,抑制 PDGF 诱导的信号转导和相关的细胞增殖^[21]。近期有研究表明,PTEN 能够抑制细胞侵袭,甚至在组成型表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)活性存在时也具有抑制作用,这种抑制并非依赖其脂质磷酸酶活性,而是依赖蛋白磷酸酶活性,部分是通过使 FAK 脱磷酸实现的^[22]。

在盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)细胞中,特异的 G 蛋白偶联受体介导的信号转导产生的 cAMP 能够调节 PTEN 的定位^[23-24],cAMP 受体是否直接结合 PTEN 还不太清楚。哺乳动物细胞中,对 PTEN 的上游调控途径了解很少。在人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)和小鼠胚胎成纤维细胞中,1-磷酸鞘氨醇(sphingosine 1-phosphate, S1P)利用 PTEN 作为媒介,通过与其受体 S1P2R(G 蛋白偶联受体)结合,能够抑制细胞迁

移。研究发现,PTEN 可作为 Rho GTPase 的下游效应子,S1P2R 信号途径能够增强 PTEN 在细胞膜的磷酸酶活性,并且刺激 PTEN 对酪氨酸的去磷酸化作用。表明,G 蛋白偶联受体能够通过 Rho GTPase 依赖途径调节 PTEN 的磷酸酶活性,进而调控细胞的迁移和侵袭^[25]。

野生型 PTEN 在细胞质和细胞核中都有分布,并且在分化细胞和休眠细胞中优先定位于细胞核。研究发现,在人神经胶质细胞瘤 U251MG 细胞中,不需抑制 Akt 信号转导途径,核内的 PTEN 就能够抑制不依赖锚定的生长(anchorage independent growth, AIG)和促进 G₁ 期停滞^[26]。

4 PTEN 对 p53 蛋白的调节

抑癌基因 p53 定位于 17p13.1,其表达产物 p53 蛋白是一种 DNA 结合磷蛋白,半衰期短,丰度低,主要抑制细胞从 G₁ 期进入 S 期,对细胞周期起负调控作用。p53 蛋白在维持细胞正常生长、抑制恶性增殖中起重要作用。

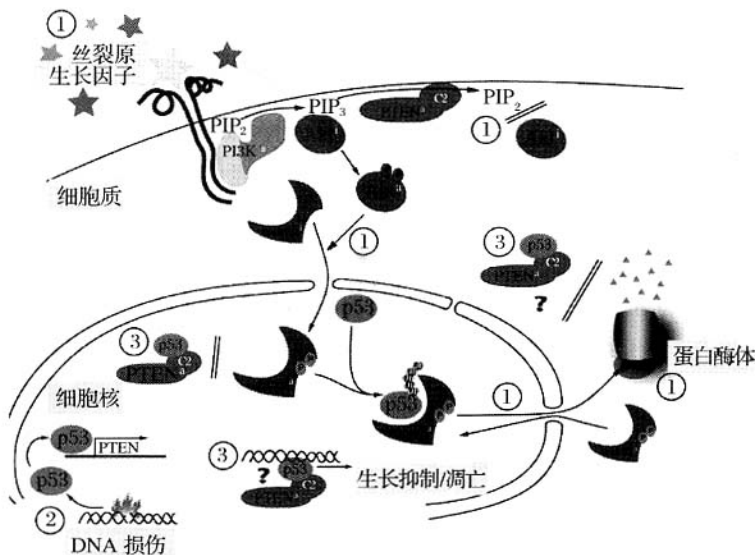


图 4 PTEN 在细胞内的功能及其与 p53 的相互作用示意图

如图 4 所示^[27],当细胞受到丝裂原或生长因子刺激时,激活磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K),磷酸化 PIP₂生成 PIP₃。聚集在质膜表面的 PIP₃ 激活 Akt,进而活化细胞质内的癌基因产物 MDM2(murine double minute 2,图 4,①),磷酸化的 MDM2 转运至细胞核。MDM2 可调节 p53 蛋白水平及活性,一旦核 MDM2 介导泛素结合 p53 形成复合物,即转运至细胞质,通过泛素蛋白酶体途径(ubiquitin-proteasome pathway,

UPP)降解 p53 蛋白(图 4,①)。而募集到细胞膜上的 PTEN 能使 PIP₃ 脱磷酸,将其保持在较低的水平,继而维持了 Akt 的失活状态(图 4,①),抑制 p53 蛋白的降解。在胞质中,PTEN 可与 p53 蛋白形成复合物,抵抗蛋白酶体的降解(图 4,③)。在细胞核内,DNA 的破坏可引起 p53 蛋白剧增,p53 蛋白又结合到 PTEN 启动子上增强 PTEN 转录(图 4,②),核内的 PTEN 与 p53 蛋白结合延长后者的半衰期(图 4,③),

最终导致生长抑制或细胞凋亡^[28]。

在 PTEN 杂合的 ES 细胞和完全缺失 PTEN 的 ES 细胞中 ,p53 蛋白明显减少 ,然而这些细胞中 p53 的 mRNA 水平却与正常细胞相似^[29] ,提示 PTEN 在转录后水平上调节 p53 蛋白。在 PTEN 无义突变型细胞中 ,重新引入野生型和 PTEN 磷酸酶失活突变型基因 ,p53 蛋白水平明显提高。磷酸酶失活的突变型 ,以及单独的 PTEN-C2 结构域 ,都能在不影响 Akt 的条件下增加 p53 蛋白水平 ,说明 PTEN 可以通过磷酸酶活性非依赖的机制 ,对 p53 蛋白进行调节。

PTEN ,p53 ,MDM2 及 Akt 形成调控细胞生长的网络^[30]。可以通过诱导 MDM2 来阻止不正常的细胞凋亡 ,而当细胞损伤或存在突变时 ,p53 能诱导 PTEN 表达 ,PTEN 又能增进 p53 蛋白稳定性 ,促进细胞凋亡。

5 展望

PTEN 作为高度保守的抑癌基因 ,由于具有独特的作用途径 ,并与细胞的生长发育 ,以及与许多肿瘤的形成相关 ,故而倍受关注 ,但目前仍有许多问题有待深入探讨。对于 PTEN 蛋白 N 端、C2 结构域和 C 端尾的结构与功能 ,已经有很多研究。但是 ,有些研究得出不同的结论 ,仍需确证。已经有人提出 PTEN 的膜结合及活化机制 ,但是还需要进一步阐明磷酸化作用是如何在其他位点影响 PTEN 的膜结合的。结合在膜上的 PTEN 又似乎通过负反馈作用机制被迅速降解 ,此机制的细节方面还有待补充。PTEN 与很多细胞表面受体都有相互作用 ,但是 PTEN 具体是怎样调控与被调控的 ,还需深入研究。在 PTEN 与 p53 的关系上 ,还有一些尚未证实的推测 ,比如 ,PTEN 是通过什么机制延长 p53 蛋白的半衰期。另外 ,还要更深入地研究 PTEN 与肿瘤发生的关系 ,以及它与其他抑癌基因的关系。上述问题的解决不仅能够对阐明 PTEN 的抑癌机制有重大意义 ,在临床上更有助于肿瘤的早期诊断和对肿瘤的靶向治疗 ,对于研发新一代抗肿瘤药物也具有重要的指导作用。

参 考 文 献

[1] Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. *Science*, 1997, 275(5308):1943 - 1947.

[2] Steck PA, Pershouse MA, Jzsser SA, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers[J]. *Nat Genet*, 1997,

15(4) 356 - 363.

[3] Li DM, Sun H. TEPI, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(11):2124 - 2129.

[4] Tashiro H, Blazes MS, Wu R, et al. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(18):3935 - 3940.

[5] Iijima M, Huang YE, Luo HR et al. Novel mechanism of PTEN regulation by its phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate binding motif is critical for chemotaxis[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(16):16606 - 16613.

[6] Lee JO, Yang H, Georgescu MM, et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association[J]. *Cell*, 1999, 99(3):323 - 334.

[7] Raftopoulou M, Etienne-Manneville S, Self A, et al. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN[J]. *Science*, 2004, 303(5661):1179 - 1181.

[8] Valiente M, Andres-Pons A, Gomar B, et al. Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(32):28936 - 28943.

[9] Miller SJ, Lou DY, Seldin DC, et al. Direct identification of PTEN phosphorylation sites[J]. *FEBS Letters*, 2002, 528 :145 - 153.

[10] Georgescu MM, Kirsch KH, Kaloudis P, et al. Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(24):7033 - 7038.

[11] Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, et al. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(14):5010 - 5018.

[12] Das S, Dixon JE, Cho W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(13):7491 - 7496.

[13] Vazquez F, Grossman SR, Takahashi Y, et al. Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(52):48627 - 48630.

[14] Maehama T, Okahara F, Kanaho Y. The tumour suppressor PTEN: involvement of a tumour suppressor candidate protein in PTEN turnover[J]. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32(Pt2):343 - 347.

[15] Kotelevets L, van Hengel J, Bruyneel E. Implication of the MAGI-1b/PTEN signalosome in stabilization of adherens junctions and suppression of invasiveness[J]. *FASEB J*, 2005, 19(1):115 - 117.

[16] Subauste MC, Nalbant P, Adamson ED, et al. Vinculin controls PTEN protein level by maintaining the interaction of the adherens junction protein beta-catenin with the scaffolding protein MAGI-2[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(7):5676 - 5681.

[17] Walker SM, Leslie NR, Perera NM, et al. The tumour-suppressor function of PTEN requires an N-terminal lipid-binding motif[J]. *Biochem J*, 2004, 379(Pt2):301 - 307.

[18] Campbell RB, Liu F, Ross AH. Allosteric activation of PTEN phos-

- phatase by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate[J]. *J Biol Chem* , 2003 , 278(36) : 33617 - 33620 .
- [19] Watt SA , Kimber WA , Fleming IN , *et al.* Detection of novel intracellular agonist responsive pools of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate using the TAPP1 pleckstrin homology domain in immunoelectron microscopy[J]. *Biochem J* , 2004 , 377 : 653 - 663 .
- [20] Leslie NR , Downes CP. PTEN function : how normal cells control it and tumour cells lose it[J]. *Biochem J* , 2004 , 383(Pt 1) : 1 - 11 .
- [21] Mahimainathan L , Choudhury GG. Inactivation of platelet-derived growth factor receptor by the tumor suppressor PTEN provides a novel mechanism of action of the phosphatase[J]. *J Biol Chem* , 2004 , 279(15) : 15258 - 15268 .
- [22] Cai XM , Tao BB , Wang LY , *et al.* Protein phosphatase activity of PTEN inhibited the invasion of glioma cells with epidermal growth factor receptor mutation type III expression[J]. *Int J Cancer* , 2005 , 117(6) : 905 - 912 .
- [23] Iijima M , Devreotes P. Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients[J]. *Cell* , 2002 , 109(5) : 599 - 610 .
- [24] Funamoto S , Meili R , Lee S , *et al.* Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis[J]. *Cell* , 2002 , 109(5) : 611 - 623 .
- [25] Sanchez T , Thangada S , Wu MT , *et al.* PTEN as an effector in the signaling of antimigratory G protein-coupled receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2005 , 102(12) : 4312 - 4317 .
- [26] Liu JL , Sheng X , Hortobagyi ZK , *et al.* Nuclear PTEN-mediated growth suppression is independent of Akt down-regulation[J]. *Mol Cell Biol* , 2005 , 25(14) : 6211 - 6224 .
- [27] Trotman LC , Pandolfi PP. PTEN and p53 : who will get the upper hand ?[J]. *Cancer Cell* , 2003 , 3(2) : 97 - 99 .
- [28] Stambolic V , MacPherson D , Sas D , *et al.* Regulation of PTEN transcription by p53[J]. *Mol Cell* , 2001 , 8(2) : 317 - 325 .
- [29] Freeman DJ , Li AG , Wei G , *et al.* PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms[J]. *Cancer Cell* , 2003 , 3(2) : 117 - 130 .
- [30] Mayo LD , Seo YR , Jackson MW , *et al.* Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified[J]. *J Biol Chem* , 2005 , 280(28) : 25953 - 25959 .

药物与临床

精神分裂症用药的选择

精神分裂症是一种严重慢性疾病,患者需要终生药物治疗。病情顽固者不仅需要高效药物(氯氮平),还需要用增效剂。氯氮平对多巴胺的阻断弱于其他抗精神病药物,在使用时常加入一些多巴胺阻断剂来增效,如利培酮。但Honer等的随机对照试验结果却显示利培酮并没有任何增效,反而对患者的记忆力有损坏作用。与此相反,先前的两个企业资助的试验却明确显示利培酮能增效。这3个试验有着重要不同。Honer等使用的是 $2.8 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量的利培酮,其他两个阳性结果试验则使用了相当大的剂量($4.3 \sim 5.1 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$)。另外,两个阳性结果试验选择的精神分裂症患者病情较轻,Honer的试验却集中在病情严重的患者上,但其试验是很谨慎的,并且阴性结果引起人们对顽固精神分裂症患者使用增效剂治疗产生怀疑。

先前的试验也有不一致的结果,大部分的企业基金试验显示第二代的抗精神病药物氯氮平、奥氮平、利培酮和氨磺必利比第一代的药物有效,氯氮平是最有效的第二代抗精神病药物,不过一些第二代抗精神病药物(如喹硫平、沙美特罗和阿立哌唑)的效果并不比安慰剂好。官方试验结果显示奥氮平的效果优于其他第二代和第一代抗精神病药物。在对精神分裂症患者选择治疗方法时,应将药物的副作用和成本作为重要因素进行分析。第二代抗精神病药物氯氮平会使1%的患者产生致命的粒细胞缺乏症,但如果及时采取适当措施可排除死亡危险,许多第一代药物会产生严重的锥体外系副作用引发迟发性运动障碍,氟哌啶醇则引起10%的患者用药初期体重增加,并且不易控制。而第一代药物比第二代药物要便宜得多。不过一个有效的第二代药物氨磺必利,专利保护期不久就要到期了。

精神分裂症的早期诊断和一期治疗非常重要,可避免或者延迟病情的恶化。医生在给患者选择治疗方案时,要像裁缝量体裁衣一样,对患者实行个体治疗,必须对药物治疗效果、抑制病情发展与药物副作用进行综合考虑。