

垂体瘤转化基因 (PTTG) 的研究进展

丛佳综述,汪洪毅审校

关键词: PTTG; 垂体肿瘤; 原癌基因; 肿瘤发生

中图分类号: R736.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)08-0522-03

0 引言

1997 年 LinPei 等^[1] 为了证明垂体肿瘤细胞中 mRNA 有差异性表达, 利用差异显示 PCR、Northern blot、DNA 测序等分子生物学技术发现, 有一条长约 396bp 的 DNA 片段与当时分离出的基因库中已知序列无同源性, 用此片段从垂体瘤细胞中检测到一个长约 1.3kb 的 mRNA 呈高表达, 而在正常垂体细胞中则没有。为进一步描述这个垂体肿瘤 mRNA 的特征, 他们用从大鼠垂体瘤细胞系 GH4 中分离出的 mRNA 构建了一个 cDNA 文库, 用 396bp DNA 片段作探针, 从 cDNA 文库中分离出一条长约 974bp 的 cDNA 克隆, 这个 cDNA 被命名为 PTTG (pituitary tumor transforming gene)。随后, 从人 T 细胞淋巴瘤细胞系 Jurkat 细胞^[2], 人胚胎肝细胞中克隆出了大鼠 PTTG 的相应物^[3], 称为人 PTTG (hPTTG)。更进一步研究证明 hPTTG 是一个至少含有 3 个成员的基因家族^[4,5]。

广泛的研究显示 PTTG 不仅表达在多种肿瘤中, 而且在体内高增殖性的组织中 (如睾丸, 胸腺) 亦有高度的活性, 这提示 PTTG 在肿瘤的发生中有十分重要的作用。

1 PTTG 基因结构、表达及分布

PTTG 基因位于 5 号染色体长臂 5q33.5q 区与多种复发性肿瘤异常有关^[6]。该基因全长超过 10kb, 含有 5 个外显子和 4 个内含子^[3,7]。研究表明^[2,3,7], hPTTG cDNA 序列由 787bp 组成, 含有一个 609bp 的完整阅读框架。通过对 5' 端序列分析发现, 转录起始位点是腺苷残基, 位于起始密码子 ATG 上游 37bp 处, 在 5' 端区还存在一系列调控序列。-126 至 +34 的核苷酸序列具有 PTTG 启动子活性, -706 至 -407 的核苷酸序列中含有增强子元件。hPTTG 基因编码一个含 202 个氨基酸残基, 分子量约为 22kD 的蛋白质, 该蛋白质被分为一个氨基末端的碱性区 (1~101 氨基酸, PI=11.2) 和

一个羧基末端的酸性区 (102~202 氨基酸, PI=3.8)。酸性区富含脯氨酸, 且含有两个能与 SH3 相互作用的脯氨酸区域 (PXXP 区域)。大多数正常成人组织, 如结肠、大脑、肝脏、胰腺、垂体、肾脏、卵巢、末梢血白细胞等, PTTG 只有弱表达甚至检测不到, 而胚胎肝、睾丸、胸腺中有高表达; 在所有被研究的肿瘤细胞 (包括肺癌、乳腺癌、肝癌、白血病、淋巴瘤、结肠癌、垂体肿瘤等) 和肿瘤细胞系 (包括淋巴细胞系、骨髓细胞系、间充质细胞系、上皮细胞系等) 中都有高表达^[2,3,7-10]。采用 Western blot、原位杂交、免疫组织化学等技术进一步研究 PTTG 在细胞内的分布, 发现 PTTG 主要定位于细胞质, 但也有部分定位于细胞核^[2,8,9]。

2 PTTG 的生物学作用

2.1 PTTG 与细胞周期的关系 Ramos-morales^[11] 研究 PTTG 细胞周期中的表达, 将培养在 10% 的血清中的 HeLa 或 Cos 细胞转移至 0.15% 的血清中 3 天以造成细胞缺乏营养, 细胞有丝分裂减少, 然后检测两种标本中 hPTTG 的表达, 发现当细胞有丝分裂时 hPTTG mRNA 的表达明显增高。进一步研究发现 hPTTG 在细胞有丝分裂的 G₁/S 交界期最低, S 期升高。在 G₂/M 交界期最高, G₁ 期又开始降低。同时研究证实, 在细胞有丝分裂时 PTTG 蛋白上的 Ser165 位点被 Cdc2 磷酸化。可见该位点与细胞转化、体内成瘤、bFGF 的分泌至关重要。当 Ser165 被 Ala 替代时或受到 Cdc2 抗体的干扰时, 则 hPTTG 的磷酸化水平下降。这说明 hPTTG 的表达呈细胞周期依赖性, 而阻断 Cdc2 的磷酸化过程则提供抑制 hPTTG 活性的新的靶标。

2.2 PTTG 与雌激素、bFGF 的关系 在培养 GH 细胞的无甾族化合物的培养基中加入乙烯雌酚, PTTG 的表达水平可超过正常水平的 8 倍, 而加入乙烯雌酚的抗体后, 则 PTTG 的表达水平重新下降^[12]。Yin 等^[13] 在后来的研究中发现, 在雌激素的作用下, PTTG mRNA 的表达在 F344 鼠和 Wistar 鼠中表达增加而在 Brown-Normary 和 Donryu 鼠系中无明显表达增加。由此看来雌激素至少在部分

收稿日期: 2004-09-08; 修回日期: 2004-12-16

作者单位: 266003 山东青岛大学医学院附属医院血液内科

上诱发了 PTTG 的成瘤作用。以前已经发现转染 PTTGcDNA 的成纤维细胞可使 bFGF 的生成和分泌增加, Heaney 等^[12]对 PTTG 表达的鼠 GH 细胞连续观察 24 小时, 可以发现 bFGF 的表达水平自始至末提高了 240%, 并且 PTTGmRNA 的最高水平与 bFGF 的最高水平同时出现, 当加入 bFGF 抗体时 PTTGmRNA 的表达水平又下降了, 这样可以认为 PTTG 促使了 bFGF 的产生, bFGF 又诱导了 PTTG 表达, 这些情况表明 PTTG 和 bFGF 之间存在一个正反馈的调节机制。

2.3 PTTG 和 KU-70 的关系 KU-70 是依赖 DNA 并激活 DNA 的丝/苏氨酸激酶的 DNA 结合区的组成部分, 构成一个调节亚单位, Ku 蛋白(由 70 Kda 和 80 Kda 亚单位组成)。这些蛋白参与修复电离辐射导致的损伤和重组(Featherstone and Jackson, 1999)。Hpttg 在体内外都能和 Ku 蛋白作用, 是 DNA - PKcs 的底物(Romero et al., 2001)。这些研究提示 hpttg 可能将 DNA 损伤修复途径和姊妹染色体分离途径联系在一起。

3 PTTG 与肿瘤

PTTG 在多种肿瘤和肿瘤细胞系中高表达, 其促肿瘤发生的可能性解释有以下几个方面:

3.1 PTTG 与细胞转化 由于 PTTG 蛋白质与其他蛋白质没有同源性序列和缺乏明确的功能区, 因此对 PTTG 的功能仍知之甚少。PTTGmRNA 在垂体肿瘤细胞中有过度表达, 推测该蛋白质可能在细胞增殖和转化中发挥作用。用一个含有全部 PTTG 编码区的真核细胞表达载体稳定地转染 NIH3T3 细胞后, 在软琼脂中, 过度表达 PTTG 的 3T3 细胞能形成明显的细胞集落, 而 3T3 亲代细胞和只转染载体的 3T3 细胞则不形成。将过度表达 PTTG 的 3T3 细胞接种裸鼠皮下, 3 周内成瘤, 对照组则不成瘤。上述研究显示 PTTG 在无其他辅助癌基因的参与下即能引起细胞转化^[1, 3]。研究发现, 表达 PTTG 的 3T3 细胞能促进 bFGF 转录和分泌, bFGF 具有促进有丝分裂、血管生成, 调控激素分泌等功能, 在人体其他肿瘤中也有 bFGF 表达增高报道, 推测 PTTG 可能通过 FGF 家族发挥作用^[3, 15]。PTTG 蛋白中 PXXP 区域对 PTTG 介导的细胞转化活性非常重要, 它是 SH3 潜在结合位点, 而 SH3 又是细胞内小 G 蛋白重要的信号转导介质, GDP/GTP 交换因子 SOS、蛋白激酶 JNK、磷脂酰肌醇脱酰酶激酶 3 及 Abl 癌基因产物等几种蛋白质已被证实含有 PXXP 区域且与 SH3 结合。PXXP 区域内的点突变(P163A, P170L, P172A 和

P173L)可导致 PTTG 丧失诱导细胞转化, 肿瘤形成和促进 bFGF 产生能力, 但是仍有 PTTGmRNA 和蛋白质表达^[3], 推测 PTTG 可能通过 SH3 介导的细胞内信号转导途径发挥作用。

3.2 PTTG 基因调控区突变 在多种恶性肿瘤细胞系中, PTTG 编码区未检测到突变, 通过对正常结肠和结肠肿瘤中 PTTG 全部编码区进行序列分析, 也显示其与野生型 PTTG 序列无差别, 但 PTTG 表达水平却明显升高, 因此推测是基因调控区的突变而引起对 PTTG 调控失常, 从而导致 PTTG 高表达, 介导肿瘤细胞转化。在 PTTG5' 端区存在一系列调控序列: 包括 1 个 cAMP 反应元件(CRE)和 1 个 PEA3 结合区, 3 个 SP1/GC 盒结合区序列, 3 个 AP1 和 1 个 AP2 结合序列及 1 个胰岛素反应元件(NFI)序列。PEA3 具有强辅致癌物佛波醇酯的功能。SP1 是一个普遍存在的与 GC 盒序列结合的反式激活子, 并能调控一系列管家基因转录, 在缺乏 TATA 盒启动子的模型中, SP1 已被证实能通过影响一种有活性的转录起始复合物合成来介导转录起始, 因此, SP1 结合位点在调控 PTTG 中发挥着很重要作用。AP1 和 AP2 结合序列暗示 PTTG 基因可能为癌基因替代物。而 IRE 和 NFI 结合序列在 PTTG 表达中的功能还需进一步明确^[3, 10]。

3.3 PTTG 表达蛋白与反式激活作用 在酵母和哺乳动物细胞中, PTTG 表达蛋白与异源性 DNA 结合区融合后, 其酸性羧基末端(123 ~ 202 氨基酸)具有反式激活作用^[2]。Chien 等^[16]利用酵母 2-杂交筛选等技术发现了一种新蛋白质, 称 PTTG 结合因子(PBF), PBFmRNA 在人组织中普遍表达, 无论在体外或体内均特异性地与 PTTG 相互作用, PBF 通过与 PTTG 直接结合, 促进 PTTG 向核内移位及转录活化功能。PTTG 对 bFGF 的转录激活作用也需要 PBF 参与。进一步研究发现, PTTG 蛋白反式激活作用结构域定位于 119 ~ 164 氨基酸之间, MAPK 级联活化能增强 PTTG 蛋白反式激活作用。在体外, MAPK 在 Ser162 将 PTTG 磷酸化, 与 hPTTG 在 Ser165 被 Cdc2 磷酸化相对应, MEK1 (MAPKK)通过 51 ~ 54 氨基酸之间的 SH3 结合位点与 PTTG 直接作用, MAPK 磷酸化及 MEK1 与 PTTG 相互作用不仅能增强 PTTG 反式激活功能, 也能促进 PTTG 表达蛋白移位至核内, PTTG 表达蛋白在转录起始位点附近与 c - myc 结合, 从而激活 c - myc 转录, c - myc 蛋白过度表达可促进细胞转化及多种肿瘤发生。因此, PTTG 也可能通过反式激活作用激活原癌基因, 生长因子等间接致癌^[16, 17]。

3.4 PTTG 蛋白抑制姊妹染色单体分离 在细胞有丝分裂中期,参与染色单体分离的分离子(separin)蛋白 ESP1 由于与安全子蛋白(Securin)结合,其活性受到抑制。PTTG 能编码安全子样蛋白质(EAP1/PTTG),过量的 EAP1/PTTG 与 ESP1 结合后,抑制姊妹染色单体分离,从而破坏细胞分裂,导致染色体不稳定性。推测 PTTG 诱导肿瘤形成是由于姊妹染色单体不能分离,导致非整倍体的形成,进一步发展成为肿瘤^[18,19]。

3.5 PTTG 有诱导细胞凋亡和染色体非整倍体性双重作用 Yu 等^[14] 研究发现表达野生型 p53 的乳腺癌 MCF7 细胞中,PTTG 过度表达能引起细胞凋亡,在表达 PTTG 细胞中,p53 从细胞质被移位至细胞核内,且 p53 过度表达可增强 PTTG 介导的细胞凋亡,而人乳头状瘤病毒 E6 蛋白表达则可抑制 PTTG 诱导的凋亡。在缺乏 p53 的骨肉瘤 MG 63 细胞中,PTTG 也能引起细胞凋亡,并且在表达 PTTG 的 MG 63 细胞中出现了非整倍体细胞,包括巨核细胞和多核细胞的存在。这些结果表明 PTTG 过度表达可引起 p53 依赖性和 p53 非依赖性细胞凋亡,而在 p53 缺乏情况下,PTTG 仍可导致细胞非整倍体形成。PTTG 这种既能导致细胞凋亡,又能引起细胞非整倍体形成的双重作用是独特的,推测可能正是由于这种双重作用,是 PTTG 诱导肿瘤形成的一种可能机制。

4 PTTG 的研究展望

最近的研究显示 PTTG 在肾癌、胆囊癌等多种恶性肿瘤中高表达,并且与其恶性程度密切相关。还有研究显示在转染了反义 PTTG 的肿瘤细胞,其 PTTG 的表达有明显下降,因而 PTTG 可能成为肿瘤基因治疗的新靶点。对 PTTG 基因序列的深入研究,可以进一步针对性的调整其转录活性和表达水平,有助于肿瘤的诊断、预后判断和治疗。在 PTTG 的应用方面,如何建立 PTTG 的准确定量系统及量化各种指标是进一步临床应用 PTTG 作为肿瘤标记物、肿瘤的诊断、判断预后的关键。目前各种成瘤因素的刺激对 PTTG 的表达有什么作用还不清楚,我们可以通过各种方法来检测 PTTG 的表达,尽快建立 PTTG 准确的定量系统,通过体内外试验干预 PTTG 的表达以观测 PTTG 在成瘤过程中具体扮演什么角色,并探讨其作为肿瘤基因治疗靶点的可能性,因此 PTTG 的生物学意义及其与肿瘤的关系方面的研究是将来研究的一个重点。

参考文献:

- [1] Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG) [J]. *Mol Endocrinol*, 1997, 11(4):433-441.
- [2] Dominguez A, Ramos-Morales F, Romero F, et al. Hpttg, a human homologue of rat pttg, is overexpressed in hematopoietic neoplasms. Evidence for a transcriptional activation function of hPTTG[J]. *Oncogene*, 1998, 17(17):2187-2193.
- [3] Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, et al. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG) [J]. *Mol Endocrinol*, 1999, 13(1):156-166.
- [4] Prezant TR, Kadioglu P, Melmed S. An intronless homolog of human proto-oncogene hPTTG is expressed in pituitary tumors: evidence for hPTTG family [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84(3):1149-1152.
- [5] Chen L, Puri R, Lefkowitz EJ, et al. Identification of the human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) family: molecular structure, expression, and chromosomal localization [J]. *Gene*, 2000, 248(1-2):41-50.
- [6] Strausberg RL, Dahl CA, Clausner RD. NEW opportunities for uncovering the molecular basis of cancer [J]. *Nat Genet*, 1997, 15:415-416.
- [7] Kakar SS. Molecular cloning, genomic organization, and identification of the promoter for the human pituitary tumor transforming gene (PTTG) [J]. *Gene*, 1999, 240(2):317-324.
- [8] Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, et al. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84(2):761-767.
- [9] Saez C, Japon MA, Ramos-Morales F, et al. Hpttg is overexpressed in pituitary adenomas and other primary epithelial neoplasias[J]. *Oncogene*, 1999, 18(39):5473-5476.
- [10] Heaney AP, Singson R, McCabe CJ, et al. Expression of pituitary-tumour transforming gene in colorectal tumours [J]. *Lancet*, 2000, 355(9205):716-719.
- [11] Yu R, Ren SG, Horwitz GA, et al. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) regulates placental JEG3 cell division and survival: evidence from live cell imaging[J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 14(8):1137-1146.
- [12] Heaney AP, Horwitz GA, Wang Z, et al. Early involvement of estrogen-induced pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis [J]. *Nat Med*, 1999, 5(11):1317-1321.
- [13] Yin H, Fujimoto N, Maruyama S, et al. Strain difference in regulation of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in estrogen-induced pituitary tumorigenesis in rats[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2001, 92(10):1034-1040.
- [14] Yu R, Heaney AP, Lu W, et al. Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(47):36502-36505.
- [15] McCabe CJ, Gittoes NJ. PTTG—a new pituitary tumour transforming gene[J]. *J Endocrinol*, 1999, 162(2):163-166.
- [16] Chien W, Pei L. A novel binding factor facilitates nuclear translocation and transcriptional activation function of the pituitary tumor-transforming gene product [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(25):19422-19427.
- [17] Pei L. Identification of c-myc as a downstream target for pituitary tumor-transforming gene [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(11):8484-8491.
- [18] Zou H, McGarry TJ, Bernal T, et al. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis[J]. *Science*, 1999, 285(5426):418-422.
- [19] Orr-Weaver TL. Perspectives: cell cycle. The difficulty in separating sisters[J]. *Science*, 1999, 285(5426):344-345.

[编辑:贺文]