

ASPP蛋白家族的研究进展

李彦, 姜政

李彦, 姜政, 重庆医科大学附属第一医院消化内科 重庆市 400016
国家自然科学基金资助课题, No.30500234
通讯作者: 姜政, 400016, 重庆市, 重庆医科大学附属第一医院 消化内科. jianggooddoctor@mail.china.com
电话: 023-68891218
收稿日期: 2006-06-17 接受日期: 2006-07-10

摘要

P53凋亡刺激蛋白(apoptosis stimulating protein of P53, ASPP)家族是新近发现的与P53有关的肿瘤抑制基因家族. P53是目前公认的肿瘤抑制基因, 他能诱导细胞周期阻滞或直接诱导细胞凋亡, 但其如何作用这两种不同选择的机制一直不清, 直到ASPP家族的发现, 才使这一问题逐渐明了. ASPP与P53的作用主要是能特异性增强P53的细胞凋亡功能, 而对P53的细胞生长停滞功能则没有影响.

关键词: P53凋亡刺激蛋白; 细胞凋亡; P53

李彦, 姜政. ASPP蛋白家族的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2527-2530

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2527.asp>

0 引言

P53凋亡刺激蛋白(apoptosis stimulating protein of P53, ASPP)是Samuels *et al*^[1]在2001年发现的一种新的肿瘤抑制基因家族, 随后在2003年又宣布发现了ASPP家族的另一个成员iASPP (inhibitory member of the ASPP family)^[2]. 目前, 已经发现了该基因家族的3个成员: ASPP1, ASPP2和iASPP. ASPP1和ASPP2与P53结合后能激活P53的抑癌功能, 而iASPP与P53结合后却是抑制P53的抑癌功能, 这是首次发现功能完全相反的成员共存于同一基因家族的现象. 现对ASPP蛋白家族的结构、功能、与P53及其他蛋白质之间的关系等方面的研究进展进行综述.

1 结构

ASPP家族共有3个成员: ASPP1, ASPP2和iASPP. 其命名源于结构上的共同点^[3,8], 即: 都含有大量谷氨酰基重复(ankyrin repeat), SH3结构

域(SH3 domain), 丰富的锚蛋白结构域(proline-rich domain)的相关蛋白质. 研究证实, ASPP家族成员均通过谷氨酰基重复和SH3结构域与P53发生作用^[4].

关于ASPP家族结构的探索经历了一个较为漫长的过程, 最早发现的是ASPP的不完整片段(53BP2及Bbp^[6]). 早在1994年, Iwabuchi *et al*^[5]通过酵母双杂交技术, 利用P53 DNA结合区域作为诱饵, 结果发现了与P53相互作用的2种蛋白: 53BP2(目前证实的ASPP2的C末端的528个氨基酸)以及与ASPP2无关的BRCA1(53BP1). 1996年, Naumovski *et al*^[6]发现了ASPP2的另一个不完整片段: Bbp(即不包含N末端123个氨基酸的ASPP2片段); 2001及2003年, Samuels *et al*^[1]先后通过实验发现了ASPP的完整结构. ASPP1由PPP1R13B基因编码, 由1090个氨基酸组成, 其功能区域包括pro, ank及SH3. ASPP2由TP53BP2编码, 由1128个氨基酸组成, 其功能区域由pro, ank, SH3和 α -helical组成. ASPP1和ASPP2蛋白在N末端和C末端有很大相似性^[7], 都是MMPM序列开始, 且都从蛋氨酸开始转录. iASPP在人类由PPP1R13L基因编码, 而在线虫中由ape-1基因编码, 他由351个氨基酸组成, 是一个P56A结合蛋白, 其C末端的223个氨基酸与53BP2的C末端有52%相同, iASPP和线虫P53凋亡刺激蛋白家族抑制成员(Ce-iASPP)在C末端有广泛相似性. 而最近Slee *et al*^[8]又发现了1个与iASPP的C端同源, N端更长的iASPP, 由828个氨基酸组成, 故将以前的短iASPP称为iASPP/RIA(因为iASPP曾被鉴定为Rel-associated inhibitor, RIA), 将长iASPP称为iASPP.

2 功能及与P53的关系

2.1 功能 对ASPP家族功能的研究, 最初是从其片段(53BP2和Bbp)开始的, 故得出的结论亦有较大差异. Iwabuchi *et al*^[5]认为, 因为53BP2能与P53的DNA结合区域结合, 故其能通过该结合而阻止P53与DNA结合, 从而抑制P53的促凋亡作用. 而Yang *et al*^[9]将53BP2转染到Hela及Cos-1细

■背景资料

P53凋亡刺激蛋白(ASPP)家族是新近发现的与P53有关的肿瘤抑制基因家族, 能诱导细胞周期阻滞或直接诱导细胞凋亡, 但其作用机制一直不清, 直到ASPP家族的发现, 才使这一问题逐渐明了. ASPP与P53的作用主要是能特异性增强P53的细胞凋亡功能, 而对P53的细胞生长停滞功能则没有影响.

■ 研发前沿

ASPP蛋白与其他蛋白质的关系, 及他们相互作用的具体机制亦是亟待研究的问题。

胞中发现其能导致细胞凋亡, 这与Ao *et al*^[10]的结果相一致, 即当53BP2高水平表达时促进细胞凋亡, 而低水平表达将导致细胞对DNA损伤物质敏感性增强. Naumovski *et al*^[6]将Bbp转染入细胞, 发现其并不能引起细胞凋亡, 但能引起G2/M期阻滞. Iwabuchi *et al*^[11]通过转染实验发现, 53BP2在加强P53应答基因P21的转录的同时, 还增加P53抑制转染了癌基因*ras*和E1A的小鼠胚胎成纤维细胞的转化病灶的形成的能力.

张云 *et al*^[12]利用RT-PCR方法, 测定ASPP2 mRNA在正常人血液单核细胞与人淋巴瘤细胞株Jurkat及成纤维细胞和结肠癌细胞株HT-29的表达水平, 结果发现ASPP2 mRNA在正常人血液单核细胞中的表达水平比淋巴瘤细胞株Jurkat的表达水平高, 而正常人成纤维细胞中ASPP2的表达水平比结肠癌细胞株HT-29低, 表明ASPP2的mRNA表达量是在P53野生型的肿瘤细胞中降低而不是在P53突变型的肿瘤细胞中, 说明ASPP2调节着肿瘤抑制功能. Lossos *et al*^[13]用荧光定量RT-PCR和免疫组化方法对弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)和滤泡性淋巴瘤(follicular center lymphoma, FCL)等进行研究发现, ASPP2表达高的患者存活时间长, 而ASPP2表达低患者存活时间短, 提示ASPP2表达量的高低可能与肿瘤的预后亦有关. Samuels *et al*^[11]对野生型P53乳腺癌的ASPP1和ASPP2的mRNA表达研究发现, 有60%的肿瘤ASPP1表达水平下降, 23%的肿瘤ASPP2表达水平下降, 且在这23%的肿瘤中有90%的ASPP1表达水平下降, 同时通过对Jw2, Tero, Saos-2细胞株研究, 发现ASPP1/ASPP2和P53共表达, 可使转染的肿瘤细胞株50%凋亡, 而ASPP1和ASPP2与E2F1和Bax等肿瘤抑制基因共表达则不能使细胞凋亡增加.

Bergamaschi *et al*^[2]检测了8例野生型P53和ASPP水平正常的乳腺癌患者的iASPP含量, 结果发现7例患者的iASPP都增高, 同时他们还利用RNA干扰或反义RNA技术阻段iASPP表达, 发现能诱导美丽线虫及人类细胞发生依赖P53的凋亡, 这表明新发现的ASPP家族成员对细胞凋亡具有抑制作用, 故将其命名为iASPP. Zhang *et al*^[14]采用半定量RT-PCR方法检测iASPP mRNA在急性白血病(acute leukemia, AL)细胞中的表达, 发现与正常人及CR期AL患者相比, 初发AL细胞存在iASPP高表达, 提示iASPP的高表达可能在部分AL的发生或进展中起一定作

用. Yang *et al*^[9]研究发现, iASPP能与核因子-Kappa B(nuclear factor-Kappa B, NF-κB)的亚单位P65(Re1A)结合, 控制NF-κB的转录活性, 在心脏、胎盘、前列腺等组织中高表达, 在肝脏、睾丸组织和白细胞中低表达.

通过以上一系列研究证实, ASPP蛋白家族与人类肿瘤密切相关. ASPP1及ASPP2通过增强P53与DNA的结合, 促进P53促凋亡基因启动子的活化^[1], 从而特异性增强P53的促细胞凋亡功能, 但对P53的细胞生长停滞功能没有影响, Samuels *et al*^[11]通过体外实验证实了这一点, 在表达ASPP2的U2OS细胞内, 检测P53是选择与抗凋亡基因Bax的启动子结合还是与细胞周期依赖性激酶抑制剂P21的启动子结合, 结果显示P53更易与促凋亡基因Bax的启动子结合. 而iASPP与ASPP1及ASPP2的功能刚好相反, 他能抑制细胞凋亡, 因为iASPP与ASPP1/ASPP2一样, 具有相同的与P53结合的区域, 故其可通过与ASPP1和ASPP2竞争与P53结合, 从而抑制P53的抑癌功能.

2.2 与P53的关系 众所周知, P53蛋白在细胞凋亡过程中起着至关重要的作用. 根据细胞内P53的状态可将肿瘤分为2类, 即野生型P53肿瘤和突变型P53肿瘤. 据多项研究表明, 在50%的肿瘤细胞中存在着P53突变. Vogelstein *et al*^[15]观察发现, 具有遗传性P53基因突变的小鼠在幼年时即自发发生肿瘤, P53的突变区域主要集中在P53的核心区域或DNA结合区, 与ASPP作用区域相一致. Iwabuchi *et al*^[5]在早期的研究中发现, 当P53DNA结合区域的R175H或R273H发生突变后, 53BP2就不能与P53相互作用. 随后Gorina *et al*^[4]又观察到, P53最易发生突变的2个区域(R248W和R273H), 也是P53的DNA结合区域及与ASPP2结合的区域, 尽管Samuels *et al*^[11]通过体外实验发现, ASPP1及ASPP2既能与野生型P53结合, 也能与突变型P53结合, 但突变后的P53已不再能与ASPP蛋白相互作用, 这样, ASPP就不能发挥其增强P53的促凋亡作用而诱导细胞凋亡. 研究者进一步研究发现, 在肿瘤中当介导P53与ASPP2相互作用的一个重要氨基酸残基R181突变成亮氨酸或异亮氨酸, 这些残基就不再能与ASPP1或ASPP2共同作用来增强肿瘤抑制基因Bax的促凋亡作用.

与此同时, 研究者又发现, 仍有大量肿瘤发生于含有未突变P53即野生型P53细胞中, 例如在白血病、乳腺肿瘤以及肝脏的恶性肿瘤中,

P53的突变率小于25%, 此时肿瘤细胞主要通过下调ASPP1及ASPP2的表达量或使iASPP的表达量升高来抑制细胞凋亡. Liu *et al*^[16]发现在含有野生型P53的肿瘤细胞中, ASPP1及ASPP2的mRNA的表达下降, 其下降可能与ASPP的5'非转录区CpG岛的异常高甲基化有关, 但因目前对ASPP的上游调节器的研究尚处于探索之中, 故导致其甲基化的具体机制尚待进一步研究. 此外, 在含有野生型P53的肿瘤细胞中, ASPP蛋白自身是否发生了突变也是值得思考的问题, 尽管Mori *et al*^[17]通过对大量不论是表达野生型还是突变型P53的肿瘤细胞进行观察, 均未发现53BP2存在突变, 但这并不能说明ASPP蛋白自身是否发生了突变.

3 与其他蛋白质的关系

ASPP作为能决定细胞凋亡的重要蛋白, 他们自身是否受到严格的调节亦是科学家们一直探索的问题. 到目前为止, 通过酵母双杂交实验已发现至少6种能与ASPP2发生作用的蛋白质, 即: Bcl-2 (Españel *et al*)^[18], p65/Rel (Helps *et al*)^[19], 蛋白质磷酸酶(Naumovski *et al*)^[6], c-Yes相关蛋白/YAP(Yang *et al*)^[9], 结肠腺瘤样息肉病同系物/APLI (Nakagawa *et al*)^[20]及丙型肝炎病毒(Cao *et al*)^[21]. ASPP2仍然通过其谷氨酸重复和SH3结构域与这些蛋白结合; 同时, 除P53之外的能与ASPP1结合的蛋白质也相继被发现.

3.1 Bcl-2 Bcl-2是一种早已被证实能抑制细胞凋亡, 延长细胞寿命的蛋白质. 它能够抑制P53诱导的细胞凋亡而不影响其对细胞周期的阻滞作用. ASPP2与Bcl-2的结合区域和其与P53的结合区域相同, 即SH3结构域和谷氨酸重复序列, 故P53与Bcl-2不能同时与ASPP2结合, 他们通过竞争与ASPP2结合. 已知Bcl-2能够抑制P53介导的凋亡而不影响其对细胞周期的调节, 其中可能的机制是, ASPP2通过与Bcl-2竞争与P53结合, 使Bcl-2与P53隔离, 抑制Bcl-2, 从而加强了P53介导的促细胞凋亡作用. 但是, Bcl-2还可以通过抑制另一种与P53类似的能导致细胞凋亡的转录因子E2F-1来抑制凋亡, 而研究发现, ASPP并不能影响E2F-1介导的细胞凋亡. 这是否意味着Bcl-2是通过两套不同的机制分别作用于P53和E2F-1从而达到抑制细胞凋亡的作用的, 或者说ASPP1和ASPP2的促进细胞凋亡的作用并不是完全通过抑制Bcl-2来实现的, 而只能说是增强了P53的促凋亡作用^[1]. 总之, ASPP2与Bcl-2

的相互作用的结果及其重要性尚待进一步阐明.

3.2 P65 Yang *et al*^[9]通过实验发现, ASPP2能与NF- κ B的亚单位P65(RelA)发生相互作用. NF- κ B是核因子中重要的一组蛋白质, 包括NF- κ B1(P50), NF- κ B2(P52)和Rel癌蛋白如RelA(P65), RelB(P68)及c-Rel等, 是普遍存在于细胞质中的一种快反应转录因子, 一般以二聚体形式存在. 在静息时他与抑制性 κ B(inhibitory κ B, I κ B)结合而形成一种无活性的三聚体形式, 当细胞受到应激原等外界刺激时, I κ B的丝氨酸残基磷酸化, 并进一步泛素化, I κ B与NF- κ B分离, NF- κ B得以释放出来, 迅速发生核易位, 与相应的序列结合, 从而启动或增强某些基因的转录. 53BP2(即ASPP2的第123-1128个氨基酸)能与P65的中心区域, 包括: 二聚体化功能区, 核定位信号及富含脯氨酸的基序结合, 过表达的P65能导致53BP2过表达从而抑制细胞凋亡, 但53BP2只是ASPP2的一个片段, P65对完整的ASPP1及ASPP2的作用和影响尚待进一步研究.

总之, 癌症是对人类生命威胁最严重的疾病, 全世界科学家多年来一直致力于寻找根除他的有效方法, ASPP的发现又一次证明了抑癌基因的力量, 也大大激发了科学家前进的信心, 但目前对ASPP的研究才刚起步, 对ASPP的调控机制的进一步探讨, 通过抑制iASPP或激活ASPP来提高P53的诱导细胞凋亡的功能, 开发能对ASPP基因产生修复和激活作用的药物, 并将之应用于临床, 将是科学家下一步努力的方向.

4 参考文献

- 1 Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh JK, Zhong S, Campargue I, Naumovski L, Crook T, Lu X. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* 2001; 8: 781-794
- 2 Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil NJ, Trigiante G, Crook T, Hsieh JK, O'Connor DJ, Zhong S, Campargue I, Tomlinson ML, Kuwabara PE, Lu X. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat Genet* 2003; 33: 162-167
- 3 Slee EA, Lu X. The ASPP family: deciding between life and death after DNA damage. *Toxicol Lett* 2003; 139: 81-87
- 4 Gorina S, Pavletich NP. Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science* 1996; 274: 1001-1005
- 5 Iwabuchi K, Bartel PL, Li B, Marraccino R, Fields S. Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6098-6102
- 6 Naumovski L, Cleary ML. The p53-binding protein 53BP2 also interacts with Bcl2 and impedes cell cycle progression at G2/M. *Mol Cell Biol* 1996; 16:

■应用要点
肿瘤的基因治疗已成为继手术、放疗、化疗后发展起来的肿瘤治疗第四大疗法, 在提高恶性肿瘤治疗效果、延长生存时间、降低放疗和化疗副作用方面发挥了重要作用. 而ASPP家族的发现又一次证明了抑癌基因的作用, 但目前对ASPP的研究才刚起步, 对ASPP的调控机制的进一步探讨, 通过抑制iASPP或激活ASPP的手段来提高P53的诱导细胞凋亡的功能, 开发能对ASPP基因产生修复和激活作用的药物, 并将之应用于临床, 将是科学家下一步努力的方向.

■同行评价

本文较全面、细致地介绍了ASPP家族的结构、功能及与肿瘤抑制基因P53的关系的研究进展,使人们对P53诱导细胞凋亡或细胞周期阻滞的分子机制有了更进一步认识,为通过抑制iASPP或激活ASPP来提高P53的诱导细胞凋亡的功能来达到治疗肿瘤的目的提出了新的研究思路。该文对肿瘤治疗研究具有一定指导意义。

- 3884-3892
- 7 Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 2004; 23: 2809-2818
 - 8 Slee EA, Gillotin S, Bergamaschi D, Royer C, Llanos S, Ali S, Jin B, Trigiante G, Lu X. The N-terminus of a novel isoform of human iASPP is required for its cytoplasmic localization. *Oncogene* 2004; 23: 9007-9016
 - 9 Yang JP, Hori M, Takahashi N, Kawabe T, Kato H, Okamoto T. NF-kappaB subunit p65 binds to 53BP2 and inhibits cell death induced by 53BP2. *Oncogene* 1999; 18: 5177-5186
 - 10 Ao Y, Rohde LH, Naumovski L. p53-interacting protein 53BP2 inhibits clonogenic survival and sensitizes cells to doxorubicin but not paclitaxel-induced apoptosis. *Oncogene* 2001; 20: 2720-2725
 - 11 Iwabuchi K, Li B, Massa HF, Trask BJ, Date T, Fields S. Stimulation of p53-mediated transcriptional activation by the p53-binding proteins, 53BP1 and 53BP2. *J Biol Chem* 1998; 273: 26061-26068
 - 12 张云, 刘泽军, 李维, 杨丽华, 顾寿智, 卢欣. 肿瘤细胞中ASPP2 mRNA的表达及意义. 第三军医大学学报 2003; 25: 2103-2105
 - 13 Lossos IS, Natkunam Y, Levy R, Lopez CD. Apoptosis stimulating protein of p53 (ASPP2) expression differs in diffuse large B-cell and follicular center lymphoma: correlation with clinical outcome. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 2309-2317
 - 14 Zhang X, Wang M, Zhou C, Chen S, Wang J. The expression of iASPP in acute leukemias. *Leuk Res* 2005; 29: 179-183
 - 15 Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408: 307-310
 - 16 Liu ZJ, Lu X, Zhang Y, Zhong S, Gu SZ, Zhang XB, Yang X, Xin HM. Downregulated mRNA expression of ASPP and the hypermethylation of the 5'-untranslated region in cancer cell lines retaining wild-type p53. *FEBS Lett* 2005; 579: 1587-1590
 - 17 Mori T, Okamoto H, Takahashi N, Ueda R, Okamoto T. Aberrant overexpression of 53BP2 mRNA in lung cancer cell lines. *FEBS Lett* 2000; 465: 124-128
 - 18 Espanel X, Sudol M. Yes-associated protein and p53-binding protein-2 interact through their WW and SH3 domains. *J Biol Chem* 2001; 276: 14514-14523
 - 19 Helps NR, Barker HM, Elledge SJ, Cohen PT. Protein phosphatase 1 interacts with p53BP2, a protein which binds to the tumour suppressor p53. *FEBS Lett* 1995; 377: 295-300
 - 20 Nakagawa H, Koyama K, Murata Y, Morito M, Akiyama T, Nakamura Y. APCL, a central nervous system-specific homologue of adenomatous polyposis coli tumor suppressor, binds to p53-binding protein 2 and translocates it to the perinucleus. *Cancer Res* 2000; 60: 101-105
 - 21 Cao Y, Hamada T, Matsui T, Date T, Iwabuchi K. Hepatitis C virus core protein interacts with p53-binding protein, 53BP2/Bbp/ASPP2, and inhibits p53-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 788-795

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第六届西太平洋幽门螺旋杆菌会议通知

本刊讯 由泰国Chulalongkorn医院承办的第六届西太平洋幽门螺旋杆菌会议将于2006-11-12/14在泰国曼谷举行,欢迎各国研究幽门螺旋杆菌的学者报名参加。

1 地址

General Secretariat, GI Unit, Department of Medicine, 1873 Prompun Building 1st Floor. Chulalongkorn Hospital, Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330 Thailand

2 联系方式

电话: +662-256-4265; 传真: +662-253-8272, +662-652-4219;

Email: wphc_2006@mail.com; 网址: www.6wphc2006.com; 联系人: Dr. Duangporn Thong-Ngam