

转化相关蛋白——p53

钟伟民 曹华

(中国协和医科大学, 北京)

提 要

p53 是一种细胞蛋白, 在许多种转化细胞、肿瘤细胞甚至一些正常细胞中, 其含量显著增高。它是一种磷蛋白, 能与病毒编码的某些蛋白形成复合物, 并具有抗原性。它的基因位于第 11 对(小鼠)和第 17 对(人)染色体上。这一蛋白与细胞转化、肿瘤发生发展、以及正常细胞生长都密切相关。有人把 p53 归入了癌基因家族中 myc 等核蛋白类。

由正常细胞转化为恶性肿瘤细胞涉及一系列的细胞变化, 其中最初的步骤之一是静止的细胞癌基因激活导致不受正常控制机制调节的细胞蛋白过度生成。p53 就是这样一种蛋白。它还具有调节细胞增殖的作用。

1979 年 Lane 和 DeLeo 等人首先分别在肿瘤病毒和肿瘤特异性移植抗原 (TSTA) 的研究中证实有 p53 存在, 至今已在许多来源于人和多种动物的不同类型的转化细胞中发现有高水平的 p53 蛋白。这些细胞包括由猴肾病毒 40(SV40)、多瘤病毒、腺病毒、Abelson 鼠白血病病毒 (Ab-MuLV) 和化学致癌物转化的细胞, 以及一些人类肿瘤细胞株等。在某些非转化细胞, 如一些正常细胞以及胚胎组织中, 也发现有这一蛋白存在。

一、p53 蛋白的性质

1. p53 是细胞编码的蛋白, 并与病毒编码的一些蛋白形成复合物。

因为 p53 存在于化学致癌物转化的细胞和某些正常的非转化细胞中, 毫无疑问它是细胞编码的。但是, 它和病毒编码的蛋白, 如 SV40 的大 T 抗原、腺病毒的 E1b58K 抗原等, 通过非共价键形成寡聚复合物, 其稳定性因细胞种类甚至是病毒种类的不同而异。在 SV40 转化的

小鼠细胞中这一复合物是稳定的, 而且绝大多数的 p53 与大 T 复合; 而在 SV40 感染的猴非容许细胞中, 这一复合物是疏松的, 只有极小部分的 p53 和大 T 复合; 人类细胞中的情况介于这两者之间。这种稳定性的差异, 可能是因不同种的 p53 分子结构上的微小差异导致了对大 T 的不同亲和力造成的。这种差异性表现在种间或种内的不同细胞, 甚至同一细胞中 p53 在凝胶电泳中的迁移率不同, 在用蛋氨酸标记的胰蛋白酶水解后的肽谱不同。

这里有三点值得一提。首先, p53 和这些病毒编码的蛋白在结构上没有任何的共同性, 但两者之间的亲和力是存在的, 因为在体外的条件下把这两种蛋白放在一起, 它们形成稳定的复合物。其次, 在其它的转化细胞, 如 Ab-MuLV 和化学致癌物等转化的细胞和非转化细胞中, 并没有类似的复合物。第三, 在某些 SV40 转化的大鼠和小鼠细胞, p53 还至少和两种主要热休克蛋白 (HSP), 即 HSP₉₀ 和 HSP₇₀ 形成特异的复合物^[1]。

2. p53 是具有抗原性的磷蛋白。

虽然 p53 是细胞编码的, 但某些情况下它可以诱导抗其自身的抗体产生。例如, 携有同源的 Ab-MuLV 诱发的肿瘤之小鼠, 在其肿瘤发展晚期的血清中有抗 p53 抗体, 而健康人的

对照血清中则没有。p53 这种抗原性的出现可能是由于它自身蛋白质的过度产生破坏了机体的免疫耐受性,也可能是因为肿瘤细胞中的 p53 蛋白和正常人的在结构上有细微的差异。p53 这种在一定条件下的抗原性为制备 p53 单克隆抗体创造了条件,这些抗体的制备又大大促进了 p53 的研究。

除了胸腺细胞和某些其它正常细胞外,p53 都是磷蛋白。在体内的条件下,其磷酸化主要发生在丝氨酸残基上,但也有在苏氨酸残基上的。在 SV40 转化的 3T3 细胞中,这个 390 个氨基酸的蛋白上共有 4 个磷酸化位点,其中 Ser 312 和 Ser389 这两个位点在人和鼠的细胞中都存在。前者与磷酸形成单酯键,后者可与 RNA 呈共价结合,其磷酸化程度依赖于细胞中大 T 抗原的功能。因而有人推测 p53 的磷酸化与它和大 T 抗原形成复合物的功能有关,所涉及的可能是羧基端的碱性区域^[2]。

3. 转化细胞中的 p53 含量高于非转化细胞,正进行快速分裂细胞中的高于静止细胞。

总的说来,即使在转化细胞中,p53 的含量也是相当低的,约占细胞总蛋白的 1—100ppm。在正常细胞中发现的 p53,其大小及与抗 p53 单克隆抗体的结合力与在转化细胞中的一样,但其数量差异较大。例如,在小鼠 3T3 细胞中可测到低水平的 p53,但在 SV40 感染或转化 22 小时后,其水平增加 25—50 倍,并在这一水平上持续 30 小时。有人用一方法在正常的纤维母细胞和上皮细胞中没有测到 p53,但在恶性肿瘤的人类细胞株中测到了它们。

分裂旺盛的正常胸腺细胞中 p53 的水平高于其它的正常细胞。12—14 天胚胎初级培养细胞中 p53 的含量最高,16 天中的明显下降。F₉ 胚胎癌细胞由视黄醛诱导分化后 p53 水平也大为下降^[3]。

上述几点均表明,转化细胞和正进行快速分裂细胞中 p53 的含量较高。在鼠类妊娠中期胚胎初级培养细胞中,其 p53 约为 SV40 转化的小鼠纤维母细胞中含量的 1/3—1/2,与 F₉ 小鼠胚胎癌细胞中的含量一样。例外的情况

是,有些转化细胞,如 HeLa 肿瘤细胞株和 Ab-MuLV 转化的 L12 细胞中没有 p53。

基于上述原因,有人把 p53 看作是一种胚胎蛋白,它在成人分化好的细胞中被抑制了。

关于细胞中 p53 水平的调节问题。有两种理论:一是转录后水平上的调节,另一个是转录水平上的调节。

有人发现,非转化的正常细胞和转化细胞中,p53 的合成速率相差无几。但在非转化的正常细胞(如 NIH3T3)中 p53 是不稳定的,它们很快被降解,半衰期大约是 20—60 分钟。在 SV40 转化的细胞中,这一蛋白的半衰期大大延长,超过 20 小时,这可能是由于 SV40 大 T 抗原等与 p53 的复合。据此,人们提出了以下看法,即细胞中 p53 水平的调节是通过这种蛋白稳定性的改变,即转录后水平上的调节实现的。

但是,F₉ 胚胎癌细胞和它们分化后的子代细胞中 p53 的半衰期大致相同,约为 3.5 小时,而那些分化后的细胞中,具有翻译能力的 p53mRNA 水平低于 F₉ 细胞,相差 6—10 倍。另外,静止的非转化的 3T3 细胞(纤维母细胞)受刺激后进入细胞周期伴有 p53mRNA 水平增加,这一增加最早见于刺激后的 6—7 小时,在进入 S 期前增加 10—20 倍。这些结果表明,细胞 p53 水平的调节也可以通过 mRNA 的变化,即转录水平上的调节来实现。

总之,可能在不同的细胞株中有不同的机制,或者两种机制同时存在。如 F₉ 胚胎癌细胞受亚胺环己酮刺激后分化为内皮细胞。转录水平上的调节发生在 F₉ 细胞分化的早期,约第 1 天内,而转录后水平上的调节发生在后期(2—3 天后)。

4. 转化细胞中的 p53 主要位于细胞核内,非转化细胞中的主要位于细胞浆内。

这种分布最典型见于各种纤维母细胞中。这种分布可能使转化细胞中的蛋白可以直接通过与核中因素结合而增加其稳定性,导致其积累。因为通过 DNA 酶降解和高盐来稀释染色质而留下核基质,p53 与染色质一起被移走。但这种分布也有例外。在 Ab-MuLV 转化的

淋巴细胞, p53 主要是在胞浆中, 而且只要用表面活化剂 Triton-X100 轻微处理后, 大部分的 p53 被释放出来。

用免疫细胞化学的方法发现核内的 p53 主要位于染色质周围或之间的 RNP 丝上, 而这些 RNP 结构含有 HnRNA^[4]。

二、p53 蛋白的基因

1. p53 基因的染色体定位和结构。

目前已知, 小鼠的 p53 基因位于第 11 对染色体上^[5]。小鼠的 p53 基因有二个。一个是没有内含子的膺基因, 它没有 p53 特异性序列的 5' 部分, 不能编码多肽, 可能是插入到基因组中去的 p53 mRNA 的 cDNA 拷贝。另一个是真正编码 p53 的基因组 DNA。这两个基因有几个长的序列是相同的, 基因组 DNA 的这些序列邻接有拮接受体和供体的共感序列, 而且终止密码的下游有一多腺苷酸化信号^[6]。功能基因至少含有 11 个外含子和 10 个内含子, 第一个内含子长约 6.1kb, 整个基因长约 16kb 以上^[7]。

人的 p53 基因位于第 17 对染色体的短臂 (17p13) 上^[8], 长约 20kb。含有 11 个外含子, 在第一和第二外含子间有一长约 10kb 的内含子。人的 p53 基因只有一个。

人 p53 基因和小鼠 p53 的功能基因在排列上是相似的, 但是在拮接型上有一差别, 即前者第二外含子 5' 端邻接的受体位置改变了, 这一改变导致了人的 5' 不翻译区内多了 19 个核苷酸^[9]。另外, 人 p53 基因的第二个 ATG 与小鼠的第二个 ATG (第 4 个密码) 相对应。因而, 人 p53 蛋白比小鼠的要长 (前者为 393 个氨基酸), 因为与第 4 个密码对应的区域多了六个密码。

在编码区, 两个基因的 DNA 序列有 81% 的同源性, 同源性的保守性在整个分子上不是均匀分布的。5' 区高, 3' 区低。它们的 5' 末端都含有一不编码的外含子, 所含的都是 5' 不翻译序列。这一外含子在 p53mRNA 5' 末端附近含有一个有广泛双对称性的区域, 该区域在不

同的种之间有高度的保守性。在 p53mRNA 帽子上游的一个 225bp 的 DNA 序列具有明显的启动子活性, 但它没有任何可识别的 TATA 或 CAAT 盒。在小鼠中, 这一序列的上游约 120bp 没有类似的活性, 它可能是转录负控制因子。另外, 有证据表明, 人和小鼠的 p53mRNA 在它们的 5' 不翻译区有相似结构^[9,10]。

2. p53 基因表达的调控

p53 转录水平上的调节涉及 p53 基因表达的调控, p53 基因或是被激活或是失活。目前已知, p53 基因的重排在这方面起了很大的作用。在体外的实验中, p53 基因可以通过突变被激活, 这种突变用 Southern 印迹技术是探测不到的^[11]。另一方面, 在不表达 p53 的由 Ab-MuLV 转化的 L₁₂ 细胞株中, 其 p53 基因含有正常 p53 基因的外含子和主要的内含子, 但是由于在 5' 不编码区内插入了一个外源性的 DNA 片段 (很可能是来自 Moloney 鼠白血病病毒 (Mo-MuLV) 的 DNA), 因而它不能产生正常的 p53 特异性 mRNA, 也就没有正常 p53 的表达^[12]。在由不同株的 Friend 白血病病毒转化的各种红白血病细胞株中, 那些不表达 p53 的细胞株, 也是由于 p53 基因的重排^[13]。

当然, 基因重排并非是调控 p53 基因的唯一机制。这方面的实验还有待深入研究。

三、p53 蛋白的作用

1. p53 蛋白在细胞转化中的作用

p53 蛋白在许多转化细胞中有高水平的表达, 这是 p53 与转化相关的直接证据。目前已有不少实验证明 p53 在细胞转化中起作用。

一些不同种的近亲繁殖小鼠, 它们处于早期临界前期的细胞中, 在没有任何转化剂存在时, 内源性的 p53 含量因种而异。这些 p53 含量高的细胞在传代过程中, 其 p53 含量并不因 SV40 的转化而增高, 但 p53 含量高的细胞更容易被转化^[14]。p53 和已激活的 Ha-ras 癌基因可以协同转化正常大鼠的纤维母细胞, 而只用 p53 或已激活的 Ha-ras 基因则不能^[15,16]。用表达 p53 的载体转染细胞, 可以使正常的寿命

有限的细胞株变成永久细胞株, 这些细胞株对 Ha-ras 癌基因的转化作用相对敏感。而细胞寿命的无限性是细胞转化过程中必须出现的、特征性的细胞行为改变之一^[17]。

2. p53 在肿瘤发生及发展中的作用

上述那些有 p53 参与转化的细胞都具有致肿瘤作用^[14-17], 并且在不少人类肿瘤细胞株中发现 p53 含量增高, 这是 p53 与肿瘤相关的最明确的例子。另外, p53 对于肿瘤细胞表现出全部的转化表现型是不可缺少的, 有这些表现型的细胞在同源的小鼠中引起致死性的肿瘤。而在由 Friend 白血病病毒转化的红白血病细胞株中, 其 p53 含量高, 其致肿瘤作用亦强^[13]。已建立的细胞或永久细胞株中 p53 的过度产生, 虽然不引起形态的改变, 却赋予这些细胞明显的致肿瘤潜能, 并且这些细胞的致肿瘤效率与 p53 过度生成的程度有关^[18,19]。

3. p53 对于正常细胞生长的调节

由于 p53 在进行快速分裂细胞中的含量高于静止细胞, 很自然就会想到它对正常细胞生长的调节作用。目前已知, p53 在细胞由 G₀ 期进入 S 期的过程中起作用, 而在由 M 期进入 S 期的过程中不起作用。处于 G₀ 期的小鼠 T 淋巴细胞在用伴刀豆球蛋白 A 刺激后 DNA 合成大大增加, 而在 DNA 合成之前先合成的是 p53, 并持续到进入 S 期, 还涉及新 mRNA 的合成。p53 合成时间与细胞离开 G₀ 进入 S 期的时间相吻合。用 10% 的胎牛血清刺激 3T3 细胞进入 S 期, 如果在 4 小时内把抗 p53 抗体微注射到细胞核内, 则其 DNA 合成大大降低, 这些细胞不能进入 S 期。这一阻断作用与细胞中 RNA 聚集的减少有关^[20]。静止的 3T3 纤维母细胞在 G₁ 晚期的 DNA 合成之前有一 p53 合成和稳态水平的升高, 这一升高与进入 S 期无关, 在胎牛血清刺激后的 0—4 小时内, p53 水平较低。综合起来看, p53 可能在整个 G₁ 期都起作用, 或在 G₀/G₁ 和 G₁/S 期的转化过程中都是重要的。

这种调节作用也反映在细胞由未分化状态向分化状态转化过程中 p53 含量的减少, 以及

p53 在不同胚龄细胞株中含量上的差异^[3]。因而可能这些蛋白在胚胎发育中也是起作用的。

4. p53 还可能其它的作用。例如, 有人发现 p53 具有蛋白激酶的作用。被磷酸化的氨基酸是丝氨酸和苏氨酸, 在有 Mn²⁺ 而不是 Ca²⁺ 作为二价阳离子的情况下其作用最强。

我们已从性质、基因和作用等方面综述了转化相关蛋白 p53。基于上述, 并把它们与已知的癌基因及其转化蛋白相比较, 有人把 p53 归入癌基因家族中 myc 等核蛋白类。认识这一蛋白是很有意义的。它不仅有助于弄清肿瘤发生发展的机理, 而且对于从分子水平上弄清直至控制细胞周期也有十分重要的意义, 另外, 它作为一种肿瘤抗原, 有可能作为细胞转化和癌症的标志, 从而对人类肿瘤的诊断将有重要的意义。

本文承蒙中国协和医科大学基础部的王德修教授审阅, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Orit Pinhasi-Kimhi, et al.: *Nature*, **320**, 13, 1986.
- [2] Samad, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 897, 1986.
- [3] Dony, C. et al.: *Nature*, **317**: 636, 1985.
- [4] Caron deFromentel, C. et al.: *Exp. Cell. Res.*, **164**, 35, 1986.
- [5] Rotter, V. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 383, 1984.
- [6] Benchimol, S. et al.: *Cancer Cells*, **2**, 383, 1984.
- [7] Bienz, B. et al.: *EMBO J.*, **3**, 2179, 1984.
- [8] Isobe, M. et al.: *Nature*, **320**, 84, 1986.
- [9] Lamb, P. & Crawford, L.: *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 1379, 1986.
- [10] Bienz-Tadmor, B. et al.: *EMBO J.*, **4**, 3209, 1985.
- [11] Jenkins, J. R. et al.: *Nature*, **317**, 816, 1985.
- [12] Wolf, D. & Rotter, V.: *Cancer Cells*, **2**, 403, 1984.
- [13] Mowat, M. et al.: *Nature*, **314**, 633, 1985.
- [14] Chen, S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **80**, 5670, 1983.
- [15] Eliyahu, D. et al.: *Nature*, **312**, 646, 1984.
- [16] Parada, L. F. et al.: *Nature*, **312**, 649, 1984.
- [17] Jenkins, J. R.: *Nature*, **312**, 651, 1984.
- [18] Eliyahu, D. et al.: *Nature*, **316**, 158, 1985.
- [19] Kelekar, A. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 7, 1986.
- [20] Mercer, W. E. et al.: *Cancer Cells*, **2**, 377, 1984.

[本文于 1986 年 11 月 10 日收到]