

FOXO蛋白的修饰与细胞凋亡和癌变*

李学斌 谢 庄** 石放雄**

(南京农业大学动物科技学院动物繁育系, 南京 210095)

摘要 Fox 蛋白家族是 2000 年才发布统一命名的蛋白质家族. 由于其在生物体内所起的重要作用, 已迅速成为生命科学研究的热点. 目前, 已经发现其家族成员有 100 多种, 其中, FOXO 亚家族在动物细胞的凋亡中起重要作用. 细胞凋亡与动物的长寿、繁殖、代谢、肿瘤发生及免疫有重要关系, 对 Forkhead (Fox) 蛋白分子的命名进行了回顾、对其分类与结构特征进行了总结, 并重点对 FOXO 的化学修饰、活性调节及其在细胞凋亡和肿瘤发生中的作用进行了综述.

关键词 FOXO 蛋白, 化学修饰, 细胞凋亡, 癌变, 信号转导

学科分类号 Q952.6, Q255

生物有机体是一个大的生化反应体系, 在这个反应体系中, 各个分子间存在着复杂的互作, 其中任何一个分子的结构改变或化学修饰都可能会改变生化代谢的平衡和 / 或反应的途径、影响生物体系的化学平衡和 / 或反应方向, 也会影响细胞与细胞之间的化学信号传导, 从而引起生理和病理学变化. 这就是代谢途径与信号传导近几年成为研究热点的原因. 目前, 在日本已经有一个网站(<http://www.genome.jp/kegg/>)重点报道和发布各种分子信号间的关系. 细胞凋亡是真核生物的正常基本事件, 细胞的凋亡不是可有可无的现象. 细胞的凋亡要受到生物体自身的严格调控, 当细胞正常的凋亡过程受到干扰, 细胞便会产生异常, 从而出现特殊表型如秀丽线虫的耐力 (Dauer) 表型、细胞分化停滞甚至产生肿瘤或癌变. 细胞的凋亡要受到细胞内各种分子的调控, Fox 蛋白家族是 2000 年才正式发布统一命名的蛋白质家族^[1], 其中 FOXO 亚家族在动物细胞的正常凋亡和异常癌变中起重要作用, 本文将对 FOXO 的分子命名加以回顾, 对其化学修饰及其在细胞凋亡和癌变中的作用加以综述.

1 Forkhead (Fox) 蛋白的命名、分类与结构特征

Forkhead 转录因子的名称最初来源于 Weigel 及其同事对异常头果蝇突变体的研究^[2]. 在这个果蝇中有一个 Forkhead 叉头基因 (fkh) 的突变, 其导致了果蝇的头部结构异常及前后肠发育缺陷. 不久, Darnell 及其同事在小鼠中又鉴定出肝脏特异性基因表达的激活因子 HNF3 α 、 β 和 γ , 它们在原始内

脏来源的有限器官中表达, 在结构上具有同源性, 可能控制内脏器官来源的发育. 这 3 个基因的发现导致了一个新基因家族的出现, 这个家族与果蝇的叉头基因共同具有一个高度保守的 DNA 结构域, 这个保守序列的共同特征是他们都具有一个大于 100 个氨基酸的 DNA 结合结构域, 即 Forkhead 结构域, 其具有一个螺旋 - 转角 - 螺旋基序, 有 3 个 α 螺旋和 2 个大环形成的翅膀状 (winged) 结构. 由于 Forkhead 蛋白是一种转录因子, 因此其又叫 Forkhead/Winged Helix 转录因子. 此后 10 余年, 关于具有这样保守序列的蛋白质或转录因子不断被发现, 虽然从酵母到人类这个 DNA 结合结构域都是保守的, 但是这些蛋白质的其他结构域例如转录激活或转录抑制结构域是高度分化的. 至 1996 年已经鉴定出了 100 多种 Fox 蛋白, 在具保守序列的同时又表现出高度的多样性. 鉴于对这些蛋白质研究的不断深入、新蛋白质的不断发现及具有 Forkhead 结构域蛋白质数据的快速累积, 1998 年在美国加利福尼亚州的 La Jolla 举行了第一次 Forkhead/Winged Helix 蛋白国际会议, 在这个会议上选举产生了 Forkhead/Winged Helix 命名委员会 (Forkhead/Winged Helix nomenclature committee), 讨论了这些蛋白质的标准化命名, 大会规定用 Fox (Forkhead box) 作为统一的符号来代表

*南京农业大学高层次人才引进基金资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 025-84399912, Fax: 025-84395314, E-mail: fxshi@njau.edu.cn

收稿日期: 2004-12-20, 接受日期: 2005-02-28

Forkhead/Winged Helix 转录因子, 其亚家族用一个字母表示, 亚家族中的每一个蛋白质用一个阿拉伯数字表示, 因此 Fox 蛋白的实际名字是: “Fox+ 亚家族符号 N+ 蛋白质数字符号 X”, 如 Foxd3. 大会规定人 Fox 蛋白的缩写符号的字母全盘大写如 FOXD3, 小鼠仅第一个字母大写如 Foxd3, 其他的脊椎动物第一个字母和亚家族字母大写如 FoxD3, 在其后的小写字母表示的是来源于同一个复制基因的相同的蛋白质如 Foxa4a 和 Foxa4b. 2000 年 Forkhead/Winged Helix 命名委员会发表并公布了 Forkhead/Winged Helix 蛋白的命名结果和用 Clustal W 软件对 Forkhead/Winged 蛋白进行的比对分析与用 PAUP*4.0 软件进行的系统进化分析结果, 现在新的结果也已在网站上公布(<http://www.biology.pomona.edu/fox.html>), 从这些结果可以看出, Forkhead/Winged Helix 蛋白家族共可以分为 17 个亚家族, 其分别被命名为 FoxA ~ Q, 它们表现出高度的多样性^[1].

Fox 蛋白各家族功能多样, 有同有异, 其中很多功能目前尚不清楚^[2]. 在这 17 个亚家族中, FoxO 亚家族主要通过转录调控和信号传导途径在动物的生长发育、细胞分化、代谢、凋亡和免疫等方面起重要作用. 这个亚家族第一个成员 FOXO1 (FKHR) 是作为 Pax3 (或 Pax7) 的伴侣分子在泡状横纹肌肉瘤中被鉴定出来的. 目前已经有 9 种最相关的 FoxO 亚家族成员, 其中在小鼠中有 Foxo1、Foxo3、Foxo4, 在线虫中有 daf16, 在斑马鱼中有 FoxO5, 在果蝇中有 CG3147, 在小鸡中有 FoxO1. EST 数据库的挖掘又发现了另外一些亚家族成员存在于大鼠、奶牛、猪和 lonestar tick 中. 从果蝇、线虫到人类, 在 3 个亚家族成员 (FoxO1、FoxO3 和 FoxO4) Forkhead 结构域的 H3 螺旋前面都有一个唯一的 GDSNS 氨基酸序列, 而在其他的 Fox 相关蛋白中没有这样的序列. 另外, 依据 DNA 结合结构域之外氨基酸序列的相似性, 脊椎动物的 FoxO 亚家族成员又可进一步分为 FoxO1、FoxO3 和 FoxO4^[2]. 由此可见, FoxO 在不同的动物间也具有一定的多样性, 它反映生物间的系统进化关系.

另外, 运用细菌体外表达表明, FoxO 蛋白识别并结合 AAACA 核心核酸序列, 而在体内它的结合特异性可能是来自于 AAAC 的侧翼序列, 这对 FoxO 与启动子的结合及活性的发挥是非常重要的^[2,3].

2 FOXO 活性的调节

FoxO 蛋白是 Forkhead 家族中的一个亚家族, 其在生物体中具有多种重要的功能, 这与其活性调节的多样性密不可分. FoxO 蛋白活性的调节多样性不仅表现在磷酸化、乙酰化的多样性上, 而且也表现在亚细胞定位的多样性上.

2.1 FOXO 蛋白的磷酸化修饰

FoxO 蛋白活性的调节首先表现在多种激酶对其多位点的磷酸化上^[4]. 体内和体外的化学计量法分析表明, 蛋白激酶 PKB 能够调节 FoxO 蛋白的多位点磷酸化, 其中主要的是多丝氨酸和苏氨酸残基 (T1, T2, S1, S2 和 S3), 实验表明, 体内 PKB 诱导的 T1, S1 和 S2 位点磷酸化可以抑制 FOXO 成员的转录活性^[5]. PKB/Akt 在体外磷酸化 FOXO1, FOXO3 和 FOXO4 的 3 个残基, 这 3 个残基相当 FOXO1 的 T24、Ser256 和 Ser319^[6]. 再者, 用激活 PKB/Akt 的生长因子处理细胞可引起 FOXO 在体内的多位点磷酸化, 包括那些在体外被 PKB/Ak 磷酸化的位点. 而 PI-3K 和 PBK/Akt 的显著阴性突变体的表达或是 PI3K 的药理学抑制剂, 都能使体内 FOXO 的磷酸化受到抑制. PKB/Akt 的一个组成型活性突变的表达足以使 FOXO 在体内诱导与在体外同样位点的磷酸化^[7]. 这说明 PI3K 参与了 FOXO 磷酸化的上游调节. 其次, FOXO 活性的调节也表现在其多种磷酸化激活途径上, 除了 PKB/Akt 外, 其他的激酶也可磷酸化 FOXO 因子, 调节 FOXO 功能的不同方面. 研究表明, SGK 可以磷酸化 FOXO3a 的 T32 和 S315 (在 FOXO1 中是 T24 和 S319), 这些位点也是 PKB/Akt 的靶位点^[8]. SGK 与 PKB/Akt 紧密相关并被各种生长和存活因子所激活, SGK 的激活也依赖于 PI3K, 并参与了 PKD-1 的行动^[9]. 这些都表明有众多的 PKB/Akt 和 SGK 作用并磷酸化它们共同的底物. 最后, FOXO 活性的调节也表现在其他保守残基对其磷酸化的影响上. 研究表明, FOXO 成员分子内其他保守的残基对其磷酸化位点的正常磷酸化调节也是必需的. FOXO1 的 Ser329 及 FOXO4 中的 Ser268 在体外可被 DYRK1a 磷酸化^[5]. Ras/Ral 依赖的信号传导可导致 FOXO4 在 Thr447 和 Thr451 位的磷酸化. 突变分析表明, 这些位点对于 FOXO4 的活性是必需的. Ral 的自身激活在 FOXO4 的抑制性方面与 PKB/Akt 协同起作用^[9].

另有研究发现, I κ B 激酶 (IKK) 可不依赖于 Akt 而自然地与 FOXO3a 互作, 并可磷酸化和抑制 FOXO3a, 通过 Ub- 依赖的蛋白酶体通道引起 FOXO3a 的蛋白酶解^[7]. Smad 蛋白也可被 TGF- β 激活, 与 FOXO 形成一个复合物, 开启生长抑制基因 *p21Cip1*^[8].

2.2 FOXO 蛋白的乙酰化修饰

研究表明, 蛋白脱乙酰化酶 p300 是一个线虫和哺乳动物的转录共激活因子^[9], CREB 结合蛋白 (CBP) 可以调节 FOXO4 的活性^[10]. FOXO3 和 FOXO4 都与 p300 和 CBP 互作, 在 H293T 细胞系中, FOXO3 和 FOXO4 都可使 p300 和 CBP 乙酰化^[11-13]. 在原代细胞和培养细胞中 FOXO3 和 SIRT1 都存在互作^[11]. 在体内和体外 SIRT1 都乙酰化 FOXO4^[12]. 乙酰化的 FOXO3 可以被 SIRT1 以 NAD 依赖的方式脱乙酰化^[13]. 用 nicotinamide (一种 SIRT1 抑制剂) 和 trichostatin (TSA) 处理细胞, I 类和 II 类组蛋白的乙酰化都受到了抑制, 这表明两种类型的脱乙酰化酶对 FOXO 的脱乙酰化都起作用^[13]. SIRT1 也脱乙酰化 p300^[14]. 这些结果为 p300 对 FOXOs 的乙酰化作用和 SIRT1 对 FOXOs 的脱乙酰化作用提供了证据^[14].

Brunet 等^[13]报道 FOXO3 在对过氧化氢和热应激反应时其乙酰化作用增强, 但对紫外线没有反应, FOXO3 和乙酰化酶的互作在应激时也有所增加. Motta 等^[11]在 HeLa 细胞中也观察到了 FOXO3 的乙酰化作用对紫外线和其他的应激有反应. Van der Horst 等^[12]观察到了 FOXO4 和乙酰化酶互作增强对过氧化氢有反应. 在氧应激的情况下 SIRT1 与 FOXO3 和 FOXO4 之间的关系得到了增强^[12,13]. 在无应激和有生长因子的情况下 SIRT1 位于核内, FOXO3 位于细胞质内. 在应激的情况下 FOXO3 重新定位到细胞核. 单独细胞核的定位不足以介导 FOXO3 和 SIRT1 的联系, 由于一个组成型的核 FOXO3 的三磷酸位点突变在应激缺乏时不与 SIRT1 互作^[13]. 这些资料表明 FOXO3 某些形式的磷酸化或其他修饰对于 FOXO3 和 SIRT1 之间的互作可能是需要的. 基因敲除小鼠研究表明, 与野生鼠相比 *sirt1*^{-/-} 基因敲除鼠的胚胎成纤维细胞 (MES) FOXO3 明显的乙酰化程度更高, 这表明 SIRT1 在体内影响 FOXO3 的乙酰化^[13], *sirt1*^{-/-} 基因敲除鼠的胚胎干细胞用 FOXO DNA 结合位点 - 荧光酶构体和 FOXO3 转染结果表明, 在胚胎干细胞中 SIRT1 抑制 FOXO3 的活性^[14]. FOXO3 的激活

引起细胞周期停滞, 其在 SIRT1 表达的细胞中得到了增强. 在 *sirt1* 基因敲除的细胞中 FOXO3 过表达引起的细胞停滞消失, 这表明, 内源 SIRT1 可能加强 FOXO 诱导细胞停滞的能力, 可能允许细胞具有更多的时间来修复损伤的 DNA, 并消除氧自由基损害^[13,15]. Brunet 等^[13]在 FOXO3 上鉴定出了 8 个磷酸化位点和 5 个乙酰化位点, 这些位点在应激的情况下被修饰, 这些修饰可能引发了 SIRT1 和 FOXO3 之间的互作. Accili 和 Arden^[16]认为 FOXO 的转录输出是通过一个双重的磷酸化和乙酰化机制而控制的, 这种平衡的中等的改变就可以导致深远的效应.

2.3 FOXO 蛋白的亚细胞定位

蛋白质活性的调节不但表现在多种化学修饰方式上, 而且也表现在亚细胞定位上. 研究表明, FOXO 蛋白的多样性磷酸化也引起了其在亚细胞定位中的多样化. 通过对抑制机制的观测表明, 在 PKB 活性缺乏的情况下 FOXO 主要在细胞核内, 这表明 PKB 介导的磷酸化诱导了 FOXO 蛋白从细胞核到细胞质的重新定位^[5,17]. 我们的研究发现, FoxO1 在正常卵泡颗粒细胞中主要存在于细胞质, 而在闭锁卵泡颗粒细胞中则分布于核^[18]. 在哺乳动物细胞与在美丽线虫中观察相一致, FOXO 成员被 PKB/Akt 的磷酸化引起它们转录活性的抑制^[9], 这是 FOXO 成员在 PKB/Akt 介导的磷酸化作用下从细胞核移向细胞质^[5,17]重新分配 FOXO 成员的结果. PKB/Akt 通道的抑制引起 FOXO 几乎全部在细胞核内, PKB/Akt 的激活导致 FOXO 保留在细胞质, 并引起 FOXO 介导的基因转录的抑制^[18-20]. 目前关于 FOXO 在细胞质和细胞核之间的亚细胞定位是怎样调节的细节还知之甚少. 但可以肯定的是其不仅仅与磷酸化有关. 已有研究证明, FOXO4 具有一个非经典的 NLS 信号围绕着 PKB/Akt 磷酸化位点 Ser193 (对应于 FOXO1 的 S256)^[17], FOXO4 的穿梭是一个 Ran- 和 Crm1- 依赖的机制. 3 个 FOXO 成员都具有一个经典的 NES 序列, FOXO 的核输出对 leptomycin B 的处理都是敏感的, 这表明了一个 aCrm1 依赖的机制^[5,17]. 推测 NES 的删除明显影响 FOXO4 的核输出, 然而, FOXO 与 aCrm1 的结合明显地不受磷酸化影响, 并且这些删除不能阻止 FOXO4 和 aCrm1 的结合^[17]. 这表明 FOXO 的磷酸化、亚细胞定位与其转录活性并不是简单的一对一的关系, 可能还有其他的机制参与了 FOXO 活性的调节. 事实上, 已有研究表明, 一个 14-3-3 蛋白

与 FOXO 成员以磷酸化依赖的形式结合^[5,17], 并含有 NES. 然而, 当 14-3-3 蛋白与其他穿梭蛋白结合时, 这种与 FOXO 的结合可能封闭 NLS^[5,17,21]. 与此相一致, 14-3-3 蛋白在缺乏结合配体的时候定位在核内, 并与核内磷酸化的 FOXO3a 相联合^[9]. 因此 14-3-3 蛋白可能参与了 FOXO 的亚细胞定位.

由此可见, FOXO 因子在其活性调节上是极其灵活与多样化的. 不仅各种分子能够通过相同或不同的途径对 FOXO 的磷酸化位点进行磷酸化, 而且 FOXO 的非磷酸化位点也可影响 FOXO 的磷酸化. FOXO 的磷酸化不仅可通过乙酰化及其与其他蛋白质的相互作用影响其自身活性, 而且也可以通过亚细胞重新定位影响其转录活性, 从而以各种方式灵活地调节细胞的各项生理功能.

3 FOXO 蛋白对凋亡的调节

FOXO 蛋白活性调节的多样性也导致了 FOXO 蛋白通过各种途径调节了细胞的凋亡.

3.1 FOXO 可通过调节基因的表达诱发凋亡

研究表明, 有很多凋亡分子也是由 FOXO 成员诱导的^[9]. 例如, FOXO3 的激活能够刺激 Bim 的表达, Bim 是一个前凋亡 Bcl-2 基因家族成员, 这个家族成员具有一个 BH3 结构域. 缺乏白介素-3 的 BaF3 细胞也导致 Bim 的转录调节, 相似的结果也在 IL-2 依赖的 T 细胞和胎儿肝细胞中缺乏细胞因子时出现^[9]. 在蛋白质和 mRNA 水平 Bim 表达的诱导可以通过在 BaF3 和细胞毒性的 T2 细胞中引入一个活性的 FOXO3 突变而再现这种表达^[9]. 通过结合于 Bcl-6 启动子的特异结合位点, FOXO4 和 FOXO3a 都能够诱导转录抑制因子 Bcl-6 的表达, Bcl-6 又依次负向调节抗凋亡蛋白的 BCL-XL 表达, 这表明 FOXO 因子能够通过 Bcl-6 介导的 BCL-XL 抑制来诱导细胞的凋亡. 在 CCL39 纤维原细胞 Fas 配体的启动子部位也鉴定出了 3 个 FOXO 结合位点^[9]. 启动子分析表明, TRAIL 也包含一个 FOXO 反应元件, 它是一个 FOXO 直接的转录靶点. 在 BaF3 pre-B 细胞中 FOXO3 不能转录激活全长的 Fas 配体启动子, 而在这些细胞中它是一个有力的细胞死亡诱导者. 在 BaF3 细胞, FOXO 诱导的细胞死亡不依赖于细胞受体信号传导, 这与细胞因子衍生物诱导的凋亡非常相似^[9].

对哺乳动物细胞的研究表明^[9], FOXO4, FOXO1 和 FOXO3a 的过量可诱导细胞发育停滞或凋亡. 这些 FOXO 因子通过增加 cyclin 依赖的激酶

抑制因子 p27^{kip1} 产物可引起细胞周期停滞在细胞周期的 G1 阶段. p27^{kip1} 水平的调节被认为主要发生在转录后水平, 通过泛素化介导的降解来进行. 有试验表明, FOXO 成员也可直接调节 kip1 基因的转录^[9]. 最近发现, FOXO 因子也涉及到细胞周期 G2~M 阶段的发育控制. 具有激活的 PI3K 细胞因为 FOXO 蛋白依赖的 cyclin B 和 Polo 样激酶产品的减少而使有丝分裂停滞^[9]. 另有研究表明, 凋亡诱导主要局限于未变形 (转化) 的造血细胞, 一些细胞类型的细胞中 FOXO 成员产物也能通过凋亡而引起细胞死亡, 但这与造血细胞相比在这些细胞中细胞死亡的程度较低^[9]. 这种差别可能仅仅是在动力学上的差别, 细胞周期停滞可能在凋亡之前, 像在一些细胞类型中 p27^{kip1} 所诱导的那样.

3.2 FOXO 可根据不同的细胞内信号诱发凋亡

研究表明, FOXO3 诱导的前凋亡基因 Bim mRNA 的增加不依赖于新的蛋白质合成, Bim mRNA 的增加可直接通过转录而激活. 在支持 Bim 介导的细胞因子依赖性细胞存活方面, 细胞因子的依赖性在 Bim^{-/-}胎儿肝脏培养物中降低^[9]. 另有研究表明, 在引入活性突变的停止细胞中, Bim 并不上调. 在 PTEN 缺失的细胞 (用编码 FOXO1 的腺病毒转导的) 中, Bim 也不在被调控的基因之中^[20]. 这说明很有可能 FOXO 因子依赖于细胞类型而激活不同的基因, FOXO 可能依赖于适当的辅助因子而对细胞起不同的作用, 或者引起凋亡或者不引起凋亡. 另有报道 TRADD 基因的表达也在 FOXO1 的直接转录控制之下^[22]. FOXO1 对 TRADD 的转录诱导在药物诱导细胞凋亡的化学疗法中起重要作用, 就像在人的纤维肉瘤细胞 HT1080 中显著阴性的 TRADD 突变能够衰减药物诱导的凋亡一样^[22]. 然而, 仅仅内源性 FOXO1 的激活对诱导 TRADD 的表达已经足够, 但是它不能够引发在这些研究中所用的细胞系凋亡. 这表明 FOXO1 对 TRADD 的诱导也需要与其他基因产物的合作以引起凋亡.

哺乳动物 SIRT1 对 FOXO3 或 / 和 FOXO4 的去乙酰化, 可以衰减 FOXO 诱导的凋亡, 加强 FOXO 诱导细胞周期的停滞^[14]. FOXO3 也可以诱导凋亡, 在原代培养的小脑神经细胞中也调查了 SIRT1 在 FOXO3 诱导细胞死亡中的作用^[13]. 由于 FOXO3 过表达而增加的细胞凋亡在额外的 SIRT1 存在时得到了减少. 在非神经元细胞, FOXO3 诱导的细胞死亡仅仅在暴露于应激的条件下发生, 例如引起 DNA 损伤的试剂鬼臼乙叉苷和过氧化氢. 在

这种情况下, 增加的 SIRT1 抑制 FOXO3 诱导的凋亡, sirt1 基因敲出的 MEFs 明显地对应激诱导的细胞死亡更敏感. 因此 SIRT1 明显地衰减 FOXO3 诱导的凋亡. 研究表明, SIRT1 对细胞死亡基因的表达具有诱导效应或无作用^[23,24], SIRT1 可以诱导 GADD45 和 MnSOD 基因的表达^[12,13]. 而 SIRT1 对 p27KIP1 基因表达的诱导和抑制都被观察到^[12,13]. 在 U2OS 细胞, SIRT1 也抑制了 FOXO4 诱导的凋亡^[15]. 这些结果表明, SIRT1 在 FOXO3 和 FOXO4 诱导的 p27 表达效应上不同的研究者所得出的结果是不一致的^[11-13].

从上述研究可见, 不同的研究对 FOXO 所诱导的凋亡基因表达结果是有差别的, FOXO 成员可以在不同的细胞环境内诱导不同的基因表达, 从而引起不同的效应. FOXO 对凋亡的影响途径是复杂的、多方面的, 同时其自身也要受到多种途径的调节. 然而, FOXO 影响凋亡的机制目前尚远未清晰, 但可以肯定的说, 通过对 FOXO 分子的操作开发一些药物, 有目的地调控细胞的凋亡是可行的.

4 FOXO 蛋白与癌的发生

4.1 FOXO 参与的染色体易位与癌的发生

在肿瘤的发生上, FOXO 主要参与了染色体的易位. 在白血病中发现 FOXO2 和 FOXO4 都参与了染色体的易位^[25], 在实心中瘤中, t(2;13)和 t(1;13)的易位, 导致在 2q35 位的 PAX3 或 1q31 位 PAX7 的编码区与在 13q14 位的 FOXO1 融合^[26]. 现在有两种模型来解释 FOXO1 在肿瘤发生中的作用. 第一个是: 由于 FoxO1/Pax3 融合蛋白与 Pax3 相比对增加 Pax3 靶基因的表达来说是一个更有力的激活因子. 因此, 有人认为, 肿瘤来自于 FOXO 功能的获得. 然而, 具有 FoxO1/Pax3 的转基因小鼠或具有 FoxO1/Pax3 不同突变的小鼠不会产生肿瘤. 因此, 产生了第二种解释模型, FOXO 功能的丢失是肿瘤发生的关键. 由于癌可被认为是细胞增殖和平衡的扰动, 打乱基因在细胞停滞和凋亡中的作用对细胞的存活和转形有作用^[27]. FOXO 基因在 ARMS 的干扰可以导致一个 FOXO 蛋白的部分丢失, 从而通过改变它的正常作用来促进细胞存活或向癌转化.

4.2 FOXO 的非正常磷酸化与癌的发生

研究表明^[15], 在慢性的骨髓白血病人中, 细胞因子和 BCR/ARL 介导的 TRAIL 抑制是通过 FOXO3a 磷酸化的形式发生的, FOXO3a 是 STI571 诱导的细胞周期停滞的下游效应分子,

FOXO1 的磷酸化明显地与 AML 病人存活期的缩短有关, 这说明磷酸化的 FOXO1 可能对于鉴定 AML 病人是一个有用的预后不良标记. 在对原始乳腺癌中 pAkt 与 FOXO3a 表达关系的调查中发现^[16], 在一些 pAkt 阴性的肿瘤细胞中 FOXO3a 从细胞核中排了出来, 这些肿瘤表现出了 I κ B 激酶 β 的高表达, I κ B 激酶 β 是 NF κ B 炎症通道的一个关键调节因子. 细胞质的 FOXO3a 在许多肿瘤中与 IKK β 或 Akt-p 的表达相关, 得这种肿瘤的病人存活率极低, 研究表明 FOXO3a 是 I κ B 激酶的一个直接靶分子. I κ B 激酶对 FOXO3a 的磷酸化导致 FOXO3a 到细胞质的重新定位. 这同时也伴随着蛋白酶体通道对 FOXO3a 的泛素化作用和降解作用. 即 I κ B 激酶 (IKK)不依赖于 Akt 而自然地作用于磷酸化和抑制 FOXO3a, 并通过 Ub- 依赖的蛋白酶体通道引起 FOXO3a 的蛋白酶解. 更进一步说, 在小鼠中 FOXO3a 的过表达可以无视细胞周期进程、细胞增殖和肿瘤发生中 I κ B 的刺激, 这表明, 在这种情况下 FOXO3a 起一个肿瘤抑制因子的作用, IKK β 的组成型表达促进细胞的繁殖和肿瘤的发生, I κ B 对 FOXO 因子的负向调控是促进细胞生长和肿瘤发生的关键机制.

4.3 FOXO 参与的信号传导与癌的发生

研究表明, 在哺乳动物 FOXO 作为信号传导分子, 存在于 Smad, PI3K 和 FoxG1 3 个重要通道的交汇点. 当 Smad 和 FOXO 结合成复合物时, 生长抑制基因 p21^{Cip1} 便被活化. 这个过程是被 PI3K 负向调控而被 (胚胎) 前脑胞发育因子 FoG1 正向调控的. FoG1 与 FoxO-Smad 结合封闭了 p21^{Cip1} 的表达. 由于 TGF β 功能的丢失往往导致癌的发生, TGF β 在这些细胞抑制反应缺乏的情况下变成了有力的细胞增殖、恶变和转移的有力诱导者. Joan 等认为, FOXO 参与的这个网络活性在终脑的神经上皮和胶质细胞瘤脑瘤细胞的发育过程中对 TGF- β 介导的细胞抑制具有抗性, 这对癌的发生具有重要的意义. 另有研究表明, 成胶质细胞瘤细胞具有增高的 FoxG1 和 PI3K/Akt 活性水平, 这导致了 p21^{Cip1} 的抑制和细胞静止, 从而促进了细胞的存活和增殖, 这正是肿瘤的增殖和扩散的策略^[7].

4.4 抑癌基因的突变与 FOXO 参与癌的发生

研究证明, 有 60%~80%的前列腺癌 PTEN 基因发生基因突变^[28]. 抑癌基因 PTEN 可经由 PI3K/Akt 通道, 通过调节 FOXO 功能的发挥而实现其抑制肿瘤细胞存活的功能. 在 PTEN 缺失的细

胞中 FoxO1 和 FoxO3 是失活的, PTEN 作用的复活通过上调 p27^{kip} 或者使细胞凋亡或者使细胞停滞, 这种作用可以通过 FoxOs 来模拟, 这表明 FoxOs 在 PTEN 的下游, 潜在地作用于细胞周期蛋白 D1 和 D2^[24]. FoxOs 的过表达导致了细胞的凋亡. 因此, 任何一种 PTEN 的减少都可降低 FOXO 的活性, 并以这种方式负向调节 FoxO 的靶基因, 例如 TRAIL 和其他的间接靶基因, 最终促进肿瘤细胞的存活. 在前列腺癌中, 雄激素受体和 FoxO 能形成一个复合物, 这样便削弱了 FoxO1 的 DNA 结合活性, 从而减少它诱导细胞停滞和凋亡的能力, 诱导癌的产生. Whang 等^[28]研究发现, PTEN 作用的丢失经常在人的肿瘤细胞中发生, 并在癌细胞中导致 Akt 的组成型激活. 组成型激活的 Akt 在多种肿瘤细胞中保护细胞不遭受 TRAIL 诱导的细胞凋亡.

另外, 在乳腺癌 FOXO3a 还可以上调 BIM, BIM 是一个 BH3 结构域蛋白, FOXO3a 特异性 siRNA 可有力地抑制细胞的凋亡. 在 paclitaxel 敏感性乳腺癌, paclitaxel 可以上调 FOXO3a, 从而增加 BIM 的表达, 最终减少细胞的存活, 从而对肿瘤反应起作用. 另一方面, 雌激素对 Pak-1 和雌激素受体的激活可以通过诱导磷酸化和核输出, 以 Pak-1 依赖的方式促进细胞的存活^[24].

从上述研究可见, 一些癌的发生与 FOXO 功能之间存在着直接或间接的关系, 通过对 FOXO 与癌发生关系的阐明, 有望研制出一种新型的药物治疗肿瘤疾病. 实际上, 最近已有研究表明, 一些小分子能够调节 FOXO1a, 抑制肿瘤的生长, 因此 FOXO1a 是非常有望作为抗癌靶分子的^[29].

综上所述, 可以看出 FOXO 分子不但是一类重要的转录因子, 而且也是重要的信号传导分子, 它的活性调节灵活多样, 其在细胞的凋亡与肿瘤的发生中起重要作用. 但是目前人们对它的认识尚处于初步阶段, 下一步的重点应该是充分利用现代生物技术, 如: 基因打靶技术、定点突变技术、RNA 干涉技术等研究其在各种模式动物中的作用和功能, 为进一步研究基因药物服务.

致谢 由于篇幅所限, 有些重要的原始研究文献未能列出, 对有关作者表示抱歉, 并以致谢.

参考文献

- 1 Kaestner K H, Knöchel W, Martinez D E. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev*, 2002, **14**(2): 142~146
- 2 Arden K C, Biggs III W H. Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling. *Arch Biochem Biophys*, 2002, **403** (2): 292~298
- 3 Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, *et al.* Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J*, 2000, **349** (Pt 2): 629~634
- 4 Burgering B M T, Kops G J P L. Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem Sci*, 2002, **27** (7): 352~360
- 5 Burgering B M T, Medema R H. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol*, 2003, **73** (6): 1~13
- 6 Brunet A, Park J, Tran H, *et al.* Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol*, 2001, **21** (3): 952~965
- 7 Hu M C T, Lee D F, Xia W, *et al.* I κ B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of Forkhead FOXO3a. *Cell*, 2004, **117** (2): 225~237
- 8 Seoane J, Le H V, Shen L, *et al.* Integration of Smad and Forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell*, 2004, **117** (2): 211~223
- 9 Nasrin N, Ogg S, Cahill C M, *et al.* DAF-16 recruits the CREB-binding protein coactivator complex to the insulin-like growth factor binding protein 1 promoter in HepG2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (19): 10412~10417
- 10 Fukuoka M, Daitoku H, Hatta M, *et al.* Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (FOXO4) by CBP-induced acetylation. *Int J Mol Med*, 2003, **12** (4): 503~508
- 11 Motta M C, Divecha N, Lemieux M, *et al.* Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell*, 2004, **116** (4): 551~563
- 12 van der Horst A, Tertoolen L G, de Vries-Smits L M, *et al.* FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *J Biol Chem*, 2004, **279** (28): 28873~28879
- 13 Brunet A, Sweeney L B, Sturgill J F, *et al.* Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 2004, **303** (5666): 2011~2015
- 14 Giannakou M E, Partridge L. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol*, 2004, **14** (8): 408~412
- 15 Howitz K T, Bitterman K J, Cohen H Y, *et al.* Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 2003, **425** (6954): 191~196
- 16 Accili D, Arden K C. FoxOs at the Crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*, 2004, **117**(4): 421~426

- 17 Brownawell A M, Kops G J, Macara I G, *et al.* Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol Cell Biol*, 2001, **21** (10): 3534~3546
- 18 Shi F, La Polt P S. Relationship between FoxO1 protein levels and follicular development, atresia, and luteinization. *J Endocrinol*, 2003, **179** (2): 195~203
- 19 Brunet A, Kanai F, Stehn J, *et al.* 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol*, 2002, **156** (5): 817~828
- 20 Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, *et al.* A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell*, 2002, **2** (1): 81~91
- 21 Muslin A J, Xing H. 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal*, 2000, **12** (11~12): 703~709
- 22 Rokudai S, Fujita N, Kitahara O, *et al.* Involvement of FKHR-dependent TRADD expression in chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 2002, **22** (24): 8695~8708
- 23 Modur V, Nagarajan R, Evers B M, *et al.* FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression, Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J Biol Chem*, 2002, **277** (49): 47928~47937
- 24 Birkenkamp K U, Coffey P J. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem Soc Trans*, 2003, **31** (Pt 1): 292~297
- 25 So C W, Cleary M L. Common mechanism for oncogenic activation of MLL by forkhead family protein. *Blood*, 2003, **101** (2): 633~639
- 26 Xia S J, Pressey J G, Barr F G. Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer Biol Ther*, 2002, **1** (2): 97~104
- 27 Nakamura N, Ramaswamy S, Vazquez F, *et al.* Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Mol Cell Biol*, 2000, **20** (23): 8969~8982
- 28 Whang Y E, Yuan X J, Liu Y, *et al.* Regulation of sensitivity to TRAIL by the PTEN tumor suppressor. *Vitam Horm*, 2004, **67**: 409~426
- 29 Wang W, El-Deiry W S. Targeting FOXO kills two birds with one stone. *Chem Biol*, 2004, **11** (1): 16~18

Involvement of Forkhead Box Proteins in Apoptosis and Oncogenesis*

LI Xue-Bin, XIE Zhuang**, SHI Fang-Xiong**

(Department of Animal Breeding and Reproduction, College of Animal Science and Technology,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Forkhead box (Fox) proteins are transcriptional factors, designated as the unified symbol for all chordate winged helix/forkhead transcription factors by Forkhead/Winged Helix nomenclature committee, and issued in the year of 2000. To date, over 100 forkhead genes have been identified in organisms ranging from yeast to humans. The importance of FOXO subfamily of Fox proteins in the fields of animal lifespan, reproduction, metabolism, oncogenesis and immunity, the nomenclature and taxonomy of Fox proteins are reviewed. In addition, the molecular structure of Fox proteins and chemical modification and regulation of FOXO subfamily is summarized. Furthermore, the functions of FOXO proteins in apoptosis and oncogenesis are discussed.

Key words FOXO protein, chemical modification, apoptosis, oncogenesis, cell signaling

*This work was supported by The Grant-804002 from Nanjing Agricultural University, Grant-in-Aid for Introduction of the Outstanding Scientist.

**Corresponding author. Tel: 86-25-84399912, Fax: 86-25-84395314, E-mail: fxshi@njau.edu.cn

Received: December 20, 2004 Accepted: February 28, 2005