

人程序性细胞死亡因子 10 (PDCD10): 不仅与细胞凋亡相关*

马 曦^{1,2)} 赵红珊^{1,2)**} 马大龙^{1,2)}

⁽¹⁾北京大学医学部基础医学院免疫系, 北京 100083;

⁽²⁾北京大学人类疾病基因研究中心, 北京 100083)

摘要 人程序性细胞死亡因子 10 (programmed cell death 10, *PDCD10*) 最初被称为 *TFAR15* (TF-1 cell apoptosis related gene 15), 是在 1999 年运用 cDNA-RDA 技术首先克隆得到的一个新基因, 早期研究提示与凋亡抑制功能相关. 近期国外多项研究证明, *PDCD10* 基因的缺失和突变与颅内海绵状血管瘤(cerebral cavernous malformations, CCM) 的发生密切相关, CCM 的第三个致病基因 CCM3 即为 *PDCD10*. 此外, 其他研究表明, *PDCD10* 受到严格的表达调控, 在多种肿瘤组织中表达明显上调, 提示可能在肿瘤的信号转导通路中起重要作用. 最近通过对 *PDCD10* 相互作用蛋白的分析和研究, 首次证实了 *PDCD10* 可以和 Ste20 激酶家族成员 MST4 相互作用, 增强其激酶活性, 并进而通过对 ERK-MAPK 通路的调控, 促进细胞增殖和转化. 以上研究证明了 *PDCD10* 的多种生物学效应, 并提示其在血管生成和肿瘤中发挥重要作用.

关键词 人程序性细胞死亡因子 10, 相互作用蛋白, MST4, 颅内海绵状血管瘤(CCM)

学科分类号 Q2

人程序性细胞死亡分子 10 (*Homo sapiens* programmed cell death 10, *PDCD10*), 最初被称为 *TFAR15* (TF-1 cell apoptosis related gene 15), 是我室利用 cDNA-RDA (cDNA representational differences analysis) 技术, 从撤除粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 诱导凋亡的人红白血病细胞系 TF-1 中首先克隆得到的一个凋亡相关的新基因^[1], GenBank 的登记号为 AF022358. 后经国际人类基因命名委员会统一命名为 *PDCD10* (programmed cell death 10). 2005 年, 法国的 Bergametti 等^[2]通过对颅内海绵状血管瘤(cerebral cavernous malformations, CCM)家系的高密度微卫星基因型扫描, 证明 *PDCD10* 基因的突变与 CCM 的发生密切相关, 并证明 CCM 的第三个致病基因即为 *PDCD10*, 因而有文献又将其称为 CCM3. 本综述将从以下 7 个方面对 *PDCD10* 的功能及作用机制进行介绍.

1 生物信息学分析

PDCD10 的基因组定位和结构如图 1 所示.

PDCD10 基因定位于 3q26.1, 跨度约为 50 kb, 周围相邻的基因是 *HDR49* 和 *SERPINI1*. 到目前为止, 已经发现 *PDCD10* 的 3 个可变转录本(序列号分别为 NM_007217, NM_145859, NM_145860), 由于它们的差别仅在于 5' 非编码区和非编码外显子, 所以它们都编码相同的 *PDCD10* 蛋白. 如图 1b 所示, *PDCD10* 基因包括 7 个编码外显子(coding exons)和 3 个 5' 非编码外显子(non-coding exons).

该基因的起始密码子 ATG 定位于第 4 外显子. 与其他基因不同的是, 其起始密码子周围有异乎寻常大量的 ATG. 根据基因序列推定的最长 *PDCD10* 开放读码框为 616 bp, 编码蛋白为 212 个氨基酸, 不含色氨酸和半胱氨酸, 意味着该蛋白质在折叠过程中没有二硫键的排列问题. 预测分子质量为 24657.56 u, 等电点(pI)为 8.58. 生物信息学分析表

*国家自然科学基金(30300308)和国家高技术研究发展计划“功能基因组与蛋白质组”重大项目支持课题(863)(2006AA02A305).

** 通讯联系人. Tel: 010-82802846-420, Fax: 010-82801149

E-mail: hongshan@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2007-05-17, 接受日期: 2007-06-07

明 PDCD10 没有信号肽结构 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)^[3], 无穿膜区 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)^[4], 没有任何已知的功能结构域 (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan, <http://elm.eu.org/>, <http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>)^[5~8], 与已知的人类基因没有任何同源性. 其最可能定位于细胞质(30.4%)(<http://psort.nibb>.

ac.jp/form2.html), 后来实验证实细胞内源性的 PDCD10 主要在细胞核周围呈团块状分布^[9]. 此外发现 PDCD10 蛋白有 2 个 N-糖基化位点, 4 个潜在的 PKC 磷酸化位点, 3 个潜在的酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 提示 PDCD10 蛋白可能受修饰或磷酸化调节 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html)^[10].

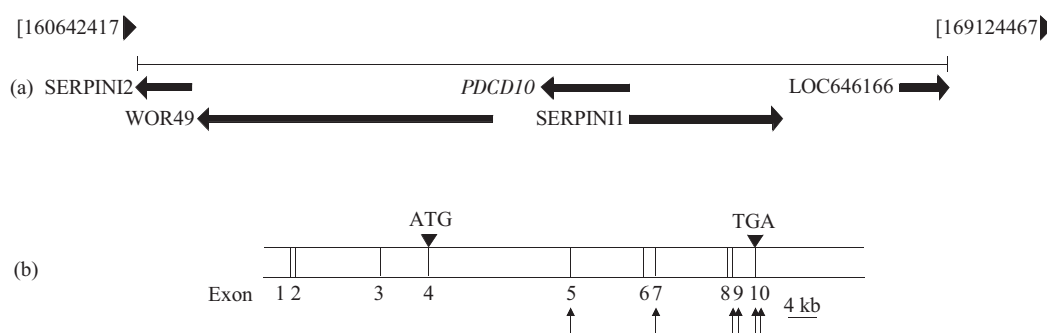


Fig. 1 Genomic location and organization of *PDCD10* ^[3]

图 1 *PDCD10* 的基因组定位和结构 ^[3]

(a) 基因组定位. (b) *PDCD10* 的外显子以竖线标出. 箭头代表 CCM 中的点突变.

同源性分析: 通过对数据库的检索, *PDCD10* 是一个非常古老的基因, 从线虫、果蝇、小鼠生物等均能找到同源物, 而且在进化上高度保守. 例如, 人 *PDCD10* 氨基酸序列与线虫 C14A4.11 有 39% 的同源性, 相似氨基酸达 68%, 其中第 99~190 位氨基酸 47% 相同, 75% 相似, 人 *PDCD10* 的 mRNA 序列和小鼠 *Pdcd10* 有 92.3% 的同源性, 在氨基酸水平上的同源性更是高达 98.6%. 此外, 在蛋白质水平上与其他模式生物也有很高同源性, 如 *zgc85629* (*Danio rerio*, 92% 同源), *CG5073* (*Drosophila melanogaster*, 49% 同源).

生物信息学提示 *PDCD10* 的表达谱非常广泛, 如 GNF SymAtlas 分析显示在绝大部分的组织器官均有表达 (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>)^[11], 并已经为实验验证. Wang 等^[1]在 1999 年报道, 在胎儿肝、肾、脾、肺组织中该基因的表达均为阳性, Bergametti 等^[2]对人体不同组织中 *PDCD10* 的 RNA 印迹分析, 从 RNA 水平证实 *PDCD10* mRNA 在胎盘、肝、肾组织中含量相当高, 除在结肠中表达比较弱以外, 其他组织都有表达. 本室新近从蛋白质水平证明了 *PDCD10* 的广谱表达^[9].

2 *PDCD10* 的早期研究——*PDCD10* 与凋亡的关系

由于该基因最初是从诱导凋亡的肿瘤细胞系中克隆, 在此过程中 mRNA 和蛋白质的水平均有所变化, 提示 *PDCD10* 是一个凋亡应答基因, 所以早期对于该基因的研究集中于凋亡方面. Wang 等^[1]的研究表明, 在特定的细胞系中重组的 *PDCD10* 蛋白可选择性地抑制某些凋亡诱导剂引起的凋亡; 在失神经导致的肌萎缩中 *PDCD10* 表达下调^[12], 而在凋亡诱导剂 muramyl dipeptide (MDP) 处理的兔肾细胞 (RK13) 中表达上调^[13]; 卢绮萍等^[14]在研究肝脏热缺血安全时限时发现, 肝缺血 15~30 min 时, 肝细胞开始凋亡, 同时 *PDCD10* 基因表达上调, 并认为 *PDCD10* 有可能作为影响缺氧缺血性肝损伤严重度的标志基因. Busch 等^[15]2004 年的研究证明, 重组 *PDCD10* 蛋白可以抑制成纤维细胞系 BB-2 在某些凋亡诱导条件下 (如 staurosporine, 放线菌酮, 或 TNF- α 等) 的自然死亡, 以及在磷脂 / Ca^{2+} 依赖的蛋白激酶和蛋白激酶 C 被有效抑制引起的凋亡过程中, *PDCD10* 可以作为早期凋亡的生物标记物. 这

些数据显示, *PDCD10* 可能是一个抗凋亡的基因, 在凋亡途径中起十分重要的作用, 但具体的信号通路以及调控方式需要进一步的研究.

对 *PDCD10* 基因也做过一些其他的相关研究. Kamath等^[16]用 RNAi 的方法对线虫基因组进行功能性系统分析, 发现将人 *PDCD10* 在线虫中的同源类似物 2K896 封闭表达以后, 导致 40% 的胚胎死亡. 在存活的胚胎中, 胚胎后期出现短粗表型, 但到目前为止封闭 2K896 导致这些表型的信号途径和机制仍然有待于研究. 将真皮纤维原细胞经积雪草皂甙 (asiaticoside) 诱导处理后, 通过 DNA 微阵列 (DNA microarray) 分析发现, *PDCD10* 与细胞周期密切相关^[17]. Xu 等^[18]在利用基因芯片对 AIDS 相关的痴呆症患者脑组织, 和三体型痴呆症患者的上皮成纤维细胞的基因表达谱进行研究时发现, 在这 2 类患者中 *PDCD10* 的表达都有明显上调. 但这些工作多采用高通量筛选方式, 缺乏 *PDCD10* 功能的系统性研究.

3 *PDCD10* 在血管发生和 CCM 中的作用

2005 年, 法国的 Bergametti 等^[2]通过对 20 个颅内海绵状血管瘤 (cerebral cavernous malformations, CCM) 家系的高密度微卫星基因型扫描分析, 证明 *CCM3* 基因即为 *PDCD10*. 这一重要实验结果为研究 CCM 的病因学、症状前基因诊断学和基因治疗提供了新思路, 同时也证明 *PDCD10* 是具有重要功能的人类基因, 除参与凋亡调控外, 还可能参与血管生成和构型重建的调控, 为 *PDCD10* 研究提供了新的方向.

CCM 是一种常染色体不完全显性遗传疾病, 有家族性和散发 2 种形式, 发病率约为颅内肿瘤的 0.3%~0.9%, 约占所有脑血管畸形的 5%~16%. 散发病例常常显示为单损伤, 而家族性患者更多的表现为多损伤^[19,20]. 它的特征是无中间脑实质不正常的脑室扩大^[21], 临床表征常为由于点状渗血造成的头疼, 癫痫以及神经功能障碍如动眼神经麻痹、外展神经麻痹等^[19,20]. 还有少数患者表现为闭经、泌乳、多饮多尿等下丘脑及垂体功能障碍.

对确诊常染色体显性遗传的 CCM 病人, 采用连锁分析的方法定位分析, 可以把 CCM 致病基因定位于 7q21.2 (*CCM1*), 7p13 (*CCM2*), 及 3q25.2-q27 (*CCM3*), 它们各占临床病例的 40%、20%和 40%^[22,23]. 值得注意的是, 尽管 CCM 在临床和病理上和脑静脉血管瘤 (cerebral venous

malformation, CVM) 很相像, 但是实验证明它们的致病基因是完全不同的^[24].

其中 *CCM1* 和 *CCM2* 基因均很快克隆成功并得到证实, *CCM1* 编码产物为 KRIT1 蛋白, 能与 KREV/RAR1A 蛋白相互作用, 于血管形态发生过程中在整合素 (integrin) 信号途径里起到关键作用^[25~27], *CCM2* 为 Malcavernin (MGC4607), 它含有一个磷酸酪氨酸结构域并参与渗透压感应^[28]. 近来研究证实, *KRIT1* 和 *MGC4607* 基因存在多种不同类型的突变, 它们分别导致相应基因功能的缺失, 可以独立引起 CCM^[29,30], 也有报道, CCM 家系中存在这 2 个基因功能共同缺失的情况^[31]. 关于这 2 个基因分子机制的研究显示: *CCM1* 和 *CCM2* 存在相互作用并形成一个复合物, 然后通过整合素通路和 P38-MAPK 通路发挥生物学效应^[32].

而关于 *CCM3* 的研究一直没有进展, 仅知道它定位于 3q26-27, 直到 Bergametti 等^[2]证实 *CCM3* 即为 *PDCD10*. 通过对 20 个已经确认没有 *CCM1* 和 *CCM2* 突变的家系进行检查, 有 8 个家系 (40%) 出现 *PDCD10* 的突变, 其中的一个家系为基因的全缺失状态, 而 200 例对照无一例突变.

这一发现迅速受到研究遗传性血管异常的专家们重视, 被多篇杂志综述中引用^[33~37], 同时在不同的实验室对该结果进行了后续研究和验证. 有意思的是, 3 个独立的研究随后报道, 他们在 CCM 家系中检测到的 *PDCD10* 突变率是远远低于 40% 的: Guclu 等^[38]发现了 4 个新的 *PDCD10* 突变, 但其发病率只有 13.1% (8/61); Verlaan 等^[39]随后报道, 在非 *CCM1/CCM2* 家系中检测到的 *PDCD10* 的突变率仅仅有 13.3% (2/15), 由此认为 CCM 病人家系中 *PDCD10* 基因的突变并不常见; 同样, Liquori 等^[40]在非 *CCM1/CCM2* 家系中检测到的突变率为 10.3% (3/29), 而且还发现, 在一个先前确定为 *CCM3* 的家系中, 虽然染色体中存在 3q26-q27 的重组, 但是该重组片段并不包括 *PDCD10*.

结合相关的研究, 对于 *PDCD10* 在 CCM3 家系中低突变频率出现了 2 种解释: 一种解释认为 *CCM1*、*CCM2*、*CCM3* 在临床病例中突变的频率被错误估计, 并在 Liquori 等^[40]最近的研究中得到证实. 对 63 个 CCM 家系进行突变检测和缺失分析, 发现 *CCM1*、*CCM2*、*CCM3* 分别占临床病例的 40%、38%和 6%, 还有 16% 没有发现突变和缺失. 更为关键的是, 研究发现 *CCM2* 家系中主要出现的是 *MGC4607* 基因的缺失 (占总 CCM 的 22.2%), 而

不是突变, 这可能恰好是因为早期研究中没有进行缺失检测, 而使得 20% 的 *CCM2* 被低估.

另一种解释认为, 除了 *PDCD10* 以外, 还有第 4 个 *CCM* 基因存在, 它可能在连锁分析中没有被发现, 或者是因为和已知的 3 个 *CCM* 过于接近而被忽略. 一个间接的证据就是, 上面提到的 Liquori 等研究的病例中还有 16% 没有发现突变和缺失. 此外, 新近 Chen 等^[42]的研究为这种解释提供了某种可能, 该研究表明: 作为 2 个重要的和脑部疾病相关的基因, *PDCD10* 和它下游相邻的 *SERPINI1* 是非同源的基因, 但由于它们的基因序列间仅仅相邻 851 个碱基, 它们的表达调控以一种非对称的, 双向的启动子方式紧密联系, 而且这种调控方式在进化上高度保守. 换句话说, 尽管 *SERPINI1* 和 *PDCD10* 在人体各种组织的表达调控截然不同 (*SERPINI1* 仅在正常脑组织中高表达, 在各种脑瘤中下调, *PDCD10* 在全身组织广泛表达, 而在各种肿瘤中出现表达的异常), 但它们的启动子均位于这 851 个碱基的区域, 同时体外研究发现, 靠近 *PDCD10* 的 175 个碱基是最小的双向启动子, 而靠近 *PDCD10* 的 176~473 碱基包含了至关重要的顺式作用元件, 它对 *PDCD10* 是一个增强子, 而对 *SERPINI1* 是一个强抑制子.

综上所述, *PDCD10* 的功能应不仅仅参与细胞凋亡, 也涉及血管发生和重建, 并可能与 *KRIT1* 和 / 或 *MGC4607* 途径有相互的作用方式.

4 *PDCD10* 在肿瘤发生发展中的作用

如前所述, 早期的研究提示, *PDCD10* 是一个凋亡应答基因; 此外, 多个高通量样本检测和生物信息学分析的数据库显示, *PDCD10* 基因的表达受到严格调控. 如表 1 所示, 相对于正常对照, *PDCD10* 在多种肿瘤组织或肿瘤细胞系中水平呈现明显上调, 如胰腺癌、喉鳞癌、卵巢癌、结直肠癌、口腔癌细胞系 Tu183 等^[43~47], 尤为重要的是, *PDCD10* 在某些对凋亡诱导剂有抵抗作用的肿瘤组织或肿瘤细胞系中表达上调, 如抗顺铂诱导凋亡的转移性结肠癌、斑蝥素诱导的肝癌细胞系 Q-GY27703、 γ 干扰素诱导的肝癌细胞系 HepG2 等等^[48~50], 此外, 研究也报道 *PDCD10* 的表达水平和肿瘤病人的预后高度相关^[46]. 所有这些结果提示: 尽管在多种正常组织中均有该基因的表达, 可是在相对应的癌组织中, 无论是 mRNA 水平还是蛋白

质水平, *PDCD10* 的表达均明显上调, 提示该基因可能在肿瘤的信号转导通路中起到重要的作用, 并进而影响癌症的发生发展.

Table 1 The expression of *PDCD10* in different tumors or tumorous cell lines

表 1 *PDCD10* 在不同肿瘤组织或肿瘤细胞系的表达调控

肿瘤类型	诱导剂	表达水平	文献
胰腺癌	无	上调	[43]
喉鳞癌	无	上调	[44]
卵巢癌	无	上调	[45]
结直肠癌	无	上调	[46]
口腔癌细胞系 Tu183	无	上调	[47]
转移性结肠癌	顺铂	上调	[48]
肝癌细胞系 Q-GY27703	斑蝥素	上调	[49]
肝癌细胞系 HepG2	γ 干扰素	上调	[50]

以上研究表明, *PDCD10* 是一个重要的功能基因, 与人体多种重要疾病的发生发展具有密切的关系, 其中主要是对血管异常和肿瘤的发生发展有重要影响. 至于 *PDCD10* 究竟发挥什么样的生物学效应及其与疾病的关系, 有赖于 *PDCD10* 相互作用蛋白的发现及进一步的分子机制探讨.

5 *PDCD10* 可能的相互作用蛋白分子

通过对数据库的检索 (<http://theoderich.fhb3.mdc-berlin.de:8080/unihi/>, <http://www.hprd.org/>)^[51~53], 目前可以与 *PDCD10* 相互作用蛋白分子见表 2, 包括实验已证明的, 如高通量的质谱分析^[54]、酵母双杂交 CCSB-Y2H^[55] (<http://www.nature.com/nature/journal/v437/n7062/supinfo/nature04209.html>) 和生物信息学预测, 包括 OPHID (<http://ophid.utoronto.ca/ophid/>)、ORTHO (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/PostGenomics/signaltransduction/interactionmap>)、HOMOMINT (http://mint.bio.uniroma2.it/mint-old/search/db_search_generic.php?datatype=protein).

从表 2 可以看出, 经过酵母双杂交筛选出的 *PDCD10* 相互作用蛋白分子, 除了 CHMP5^[56], 其他都是 Ste20 相关激酶家族成员 (包括 MST4、STK24、STK25), 而且在 Ste20 家族系统树中最接近^[57], 即这 3 种蛋白质相似性最高, 提示 Ste20 家族中这 3 种分子 (或许更多) 对 *PDCD10* 的生物学功能具有重要的直接作用.

Table 2 Confirmed and potential interaction protein of PDCD10
表 2 实验和预测的 PDCD10 相互作用蛋白分子

简称	基因全名	数据库	主要生物功能
MST4	Mst3 and SOK1-related kinase	CCSB-Y2H、CoIP	1. 转移酶活性蛋白；2.氨基酸磷酸化后参与信号转导，具有丝 / 苏氨酸激酶、蛋白 - 酪氨酸激酶活性；3.核酸、ATP、镁离子结合；4.定位高尔基复合体，调控凋亡
STK24(MST3)	Serine/threonine kinase 24 (STE20 homolog, yeast)	CCSB-Y2H、Spectrometry、ORTHO	1.转移酶活性蛋白；2.氨基酸磷酸化后参与信号转导，具有丝 / 苏氨酸激酶、蛋白 - 酪氨酸激酶活性；3.核酸结合、ATP 结合
STK25	Serine/threonine kinase 25 (STE20 homolog, yeast)	CCSB-Y2H、ORTHO	1.转移酶活性；2.氨基酸磷酸化后参与信号转导，具有丝 / 苏氨酸激酶活性；3.核酸、ATP、镁离子结合；4.氧应激的应答
CHMP5	SNF7 domain containing 2	Y2H	1.蛋白质转运
MCC	Mutated in colorectal cancers; NM_002387.1	Spectrometry	1.同源二聚体，与钙离子结合；2.作为受体参与信号转导，对细胞周期进行负调控
ITM2A	Integral membrane protein 2A	ORTHO、OPHID	1.整合在细胞膜上
ITM2B	Integral membrane protein 2B	ORTHO、HOMOMINT	1.整合在质膜上，细胞膜分裂；2.神经系统发育；3.听觉的感知
ITM2C	Integral membrane protein 2C	ORTHO	整合在细胞膜上
PAX1	Paired box gene 1	ORTHO	1.定位于细胞核，与 DNA 结合，调控 DNA 依赖的，RNA 聚合酶启动的转录；3.骨骼发育
PAX9	Paired box gene 9	HOMOMINT	1.定位于细胞核，与 DNA 结合，调控 DNA 依赖的转录；3.发育
PSME3	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit	ORTHO	1.定位于胞浆；2.构成蛋白酶活化复合物的活性组分
TBC1D9	TBC1 domain family, member 9	ORTHO	钙离子结合
ENSG00000186896		ORTHO	未知
ENSG00000064747		ORTHO	未知
ENSG00000129524		ORTHO	未知
Hs.548239		ORTHO	未知
Q12920		OPHID	未知

Ste20是一种出芽酵母丝氨酸 / 苏氨酸激酶家族，在酵母、线虫、果蝇及哺乳类中保守存在，现有证据提示，该家族蛋白质作为 MAPK 信号转导通路上游的 MAP4K 分子发挥作用，进而影响细胞的凋亡、增殖、细胞形态及细胞骨架重排^[58]。MAPK 通路是经典的细胞信号转导通路，广泛存在于哺乳类生物细胞中，主要调控细胞的增殖和转化。目前发现的 MAPK 通路主要有 3 种，包括 ERK、JNK 和 p38 通路。

此外，多项研究证明 MST4、STK24、STK25 3种分子在功能上具有密切联系。Preisinger 等^[59]发

现，MST4 和 STK25(也被命名为 YSK1)这 2 种 Ste20 激酶通过高尔基体基质蛋白 GM130 的结合定位于高尔基体。GM130 是一种绞架蛋白，与 GM130 的结合可以使 MST4 和 STK25 被活化，活化的 STK25 磷酸化 14-3-3 ζ 及其他可能与正常细胞迁移有关的下游靶分子，而 MST4 则通过未知途径发挥作用。另一项研究显示，Ste20 激酶家族成员 STK24，在激酶结构域 C 端可能包含一个双向核定位信号(氨基酸残基 278~292)，这段序列在 STK24 和 MST4 之间高度保守，而它们在该激酶家族中同源性最高^[60,61]。所以尽管具体的调节机制尚未阐明，

但它们可能通过激酶的磷酸化和双体化, 调节细胞核质的穿梭转运.

6 PDCD10 与 MST4 的相互作用

我室最近通过酵母双杂交、免疫共沉淀、亚细胞定位, 证实了 PDCD10 与 MST4 存在相互作用. 并通过应用超表达和 RNA 干扰技术、酶活性检测、荧光素酶技术和蛋白质印迹等, 证实了 PDCD10 可以改变 MST4 的激酶活性, 进而通过对 ERK MAPK 信号转导通路的调控, 促进细胞增殖

和转化^[9].

MST4(曾被命名为 MASK)是 Ste20 激酶家族成员, 为 3 个独立的实验室分别克隆到, 其序列和功能结构域如图 2 所示. RNA 印迹分析显示 MST4 广泛表达, 该基因定位于疾病相关基因富集的 Xq26 区域. 有报道提示, 在细胞骨架重排、形态发生、细胞凋亡及其他各种细胞事件中, MST4 通过 MAPK 信号转导通路发挥作用^[62,63]. 并有研究报道 MST4 通过调节 Ras/Raf 非依赖的 ERK 通路影响细胞的生长和转化^[57].

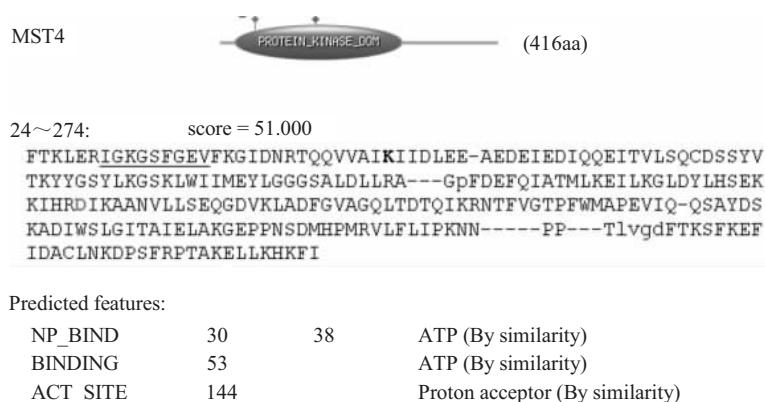


Fig. 2 The sequence and functional domain of MST4 kinase

图 2 MST4 的氨基酸序列和激酶活性功能结构域

<http://ca.expasy.org/cgi-bin/prosite/PSScan.cgi>

多项研究显示 MST4 在肿瘤发生和形成过程中发挥重要作用. Sung 等^[64]发现, MST4 在前列腺肿瘤和前列腺癌细胞系中的表达与肿瘤发生和雄激素受体状态相关, 过表达 MST4 可以导致细胞锚定非依赖生长及肿瘤发生, 这些发现提示在前列腺癌进展过程中 MST4 可调节信号转导. 此外, 从分子遗

传学角度讲, 肿瘤的发生可以归因为人体一系列基因突变的过程. 最近的一项研究对人体肿瘤组织的蛋白激酶基因家族表达差异进行检测和分析. 结果显示: 其中约 120 个左右的基因可以“驱动”体细胞突变, 在肿瘤的发生中发挥作用, MST4 即为其其中之一^[65]. 表 3 为已发现的 MST4 突变.

Table 3 The mutations of MST4

表 3 已发现的 MST4 突变

突变种类	肿瘤类型	cDNA改变	蛋白质改变	突变类型	酶结构域改变
体细胞突变	胃腺癌	444C > G	A418A	无义突变	无
体细胞突变	胃腺癌	106G > T	G36W	错义突变	GxGxxG
生殖细胞突变	乳腺浸润性导管癌	918C > T	S306S	无义突变	无
生殖细胞突变	胃腺癌	26A > G	Q9R	错义突变	无
生殖细胞突变	?	133C > T	R45C	错义突变	RTQQVVAIK

我们通过一系列的实验证明, PDCD10 与 MST4 相互作用可以通过调节 ERK MAPK 通路促

进细胞的增殖和转化, 而抑制 PDCD10 或 MST4 的表达可以降低肿瘤细胞系的增殖能力. 单独过表

达 PDCD10 或 MST4 都可以促进细胞的增殖, 而共同过表达的促增殖作用远远强于单独过表达其中的一个分子. 通过向肿瘤细胞系中转染抑制 PDCD10 或 MST4 表达的 siRNA, 都可以抑制细胞的增殖. PDCD10 和 MST4 的相互作用可以激活 ERK MAPK 通路, 而抑制 PDCD10 或 MST4 表达后则不能激活 ERK MAPK 通路. 另外, 不论是内源性还是过表达的 PDCD10 都可以在体外增加 MST4 的激酶活性, 其中过表达的 PDCD10 的激活作用是对照的 3 倍以上, 而内源性 PDCD10 被抑制时 MST4 的激酶活性略有下降. 这些结果为进一步揭示 PDCD10 与 Ste20 家族成员的相互作用, 以及 PDCD10 生物学效应的分子机制提供了帮助^[9].

7 PDCD10 在血管形成和肿瘤发生中可能的机制

如前所述, 一方面研究发现 PDCD10 在血管异常和肿瘤信号转导中有重要作用. 广为接受的理论认为, 血管异常主要和血管发生和构型重建有关系, 肿瘤则主要与细胞增殖和凋亡调控异常有关. 另一方面我们证实 PDCD10 和 MST4 相互作用, 并通过对 ERK MAPK 信号转导通路的调节促进细胞增殖. 既往研究显示, ERK MAPK 通路参与细胞生长、发育、分裂及细胞间的功能同步等多种生理过程, 以及细胞恶性转化等病理过程. 越来越多的证据表明 ERK-MAPK 通路在人类癌症的发生、发展和致癌行为方面起作用. 此外, 异常激酶磷酸化

在许多疾病作用过程中都扮演了角色, 例如癌症、糖尿病致视网膜病、风湿性关节炎和帕金森氏症等疾病. 所以, PDCD10 对细胞增殖和转化的影响正好为其在血管异常和肿瘤中的作用提供了一种很好的解释. 图 3 总结了可能的 PDCD10 作用机制. CCM1 和 CCM2 存在相互作用, 它们可以通过对 P38 MAPK 通路的调控, 促进细胞粘附和转化, 进而影响血管发生和重建. 而 CCM3 (PDCD10) 与 CCM1/CCM2 截然不同, 它是通过与 MST4 蛋白的相互作用, 特异地调控 ERK MAPK 通路, 促进细胞增殖和转化, 一方面影响血管发生和重建, 另一方面在肿瘤的发生发展中起到重要作用 (MST4-P38 和 JNK 的 “X” 代表不能调控这 2 条信号转导通路).

综上所述, 随着后基因组时代的到来和新的功能研究技术的整合, 关于人 PDCD10 基因的功能研究和与疾病的关系取得了突破性进展, 但仍有很多问题尚未阐明. 未来的研究方向和重点将集中于以下方面:

a. PDCD10 与相互作用蛋白分子网络的验证, 及其生物学效应和相应的分子机制, 如细胞内信号转导、功能 domain 分析等.

b. PDCD10 的表达调控研究和动物实验.

c. PDCD10 与疾病的关系: ①PDCD10 与肿瘤的关系及分子机制, 检测多种肿瘤的组织芯片标本, 确定 PDCD10 可能发挥作用的肿瘤谱, ②PDCD10 在血管发生和重建中的作用, 重点是 PDCD10 的缺失和点突变与 CCM 的关系.

d. PDCD10 的结构生物学研究: PDCD10 作为全新结构的蛋白激酶结合蛋白, 如果能够阐明其空间结构, 将有重要的理论和实用研究价值.

e. PDCD10 的分子靶标和基因工程药物的开发, 重点是: ①对 PDCD10 诱导的 MST4 激酶活性的药物筛选, ②PDCD10 有效的 RNAi 与肿瘤治疗的分子药物设计, ③PDCD10 在血管异常类疾病中可能的基因治疗.

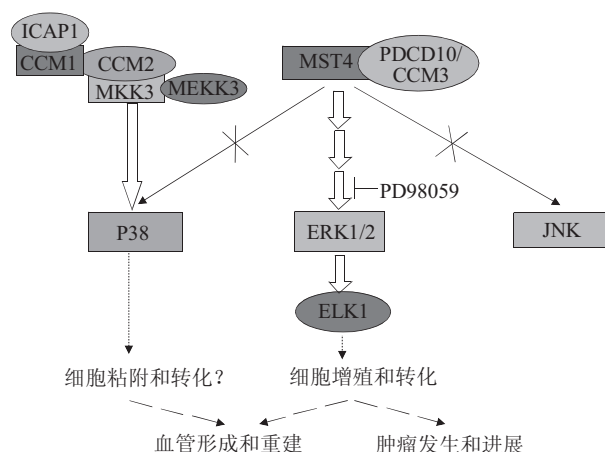


Fig. 3 The imaginable mechanism of the role of PDCD10 in Vascular morphogenesis and/or remodeling, as well as tumorigenesis and cancer progression

图 3 PDCD10 在血管发生和重构, 以及在肿瘤发生发展中生物学效应可能的机制

参考文献

- Wang Y G, Liu H T, Zhang Y M, *et al.* cDNA cloning and expression of an apoptosis-related gene, human TFAR-15 gene. *Science in China series C-life sciences*, 1999, **42** (29): 323~329
- Bergametti F, Denier C, Labauge P, *et al.* Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet*, 2005, **76** (1): 42~51
- Bendtsen J D, Nielsen H, von Heijne G, *et al.* Improved prediction of

- signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 2004, **340** (4): 783~795
- 4 Krogh A, Larsson B, von Heijne G, *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 2001, **305** (3): 567~580
 - 5 Pagni M, Ioannidis V, Cerutti L, *et al.* MyHits: a new interactive resource for protein annotation and domain identification. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32** (Web Server issue): W332~W335
 - 6 Gattiker A, Gasteiger E, Bairoch A. ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning. *Appl Bioinformatics*, 2002, **1** (2): 107~108
 - 7 de Castro E, Sigrist C J, Gattiker A, *et al.* ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34** (Web Server issue): W362~W365
 - 8 Puntervoll P, Linding R, Gemund C, *et al.* ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31** (13): 3625~3630
 - 9 Ma X, Zhao H, Shan J, *et al.* PDCD10 interacts with Ste20-related kinase MST4 to promote cell growth and transformation via modulation of the ERK pathway. *Mol Biol Cell*, 2007, **18** (6): 1965~1978
 - 10 Bairoch A, Bucher P, Hofmann K. The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (1): 217~221
 - 11 Su A I, Cooke M P, Ching K A, *et al.* Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (7): 4465~4470
 - 12 周中, 宋知非. 失神经骨骼肌萎缩的研究进展. *临床骨科杂志*, 2003, **6** (3): 285~288
Zhou Z, Song Z F. *J Clin Orthop*, 2003, **6** (3): 285~288
 - 13 Langford M P, Chen D, Texada D E, *et al.* Apoptotic genes induced by the uveitogenic bacterial cell wall peptidoglycan, muramyl dipeptide. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, **45**: E-Abstract 4003
 - 14 卢绮萍, 曹廷加. 人肝热缺血安全时限的基因芯片分析. *中华肝胆外科杂志*, 2004, **10**: 366~368
Lu Q P, Cao T J. *Chinese J Hepatobiliary Surg*, 2004, **10**: 366~368
 - 15 Busch C R, Heath D D, Hubberstey A. Sensitive genetic biomarkers for determining apoptosis in the brown bull-head. *Gene*, 2004, **329**: 1~10
 - 16 Kamath R S, Fraser A G, Dong Y, *et al.* Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, 2003, **421** (6920): 231~236
 - 17 Lu L, Ying K, Wei S, *et al.* Dermal fibroblast-associated gene induction by asiaticoside shown *in vitro* by DNA microarray analysis. *British Journal of Dermatology*, 2004, **151** (3): 571~578
 - 18 Xu Y, Kulkosky J, Acheampong E, *et al.* HIV-1-mediated apoptosis of neuronal cells: Proximal molecular mechanisms of HIV-1-induced encephalopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (18): 7070~7075
 - 19 Rigamonti D, Hadley M N, Drayer B P, *et al.* Cerebral cavernous malformations: incidence and familial occurrence. *N Engl J Med*, 1988, **319** (6): 343~347
 - 20 Labauge P, Laberge S, Brunereau L, *et al.* Hereditary cerebral cavernous angiomas: clinical and genetic features in 57 French families. *Lancet*, 1998, **352** (9144): 1892~1897
 - 21 Russel D S and Rubinstein L J. *Pathology of Tumors of The Nervous System*. 5th. Baltimore, Williams and Wilkins, 1989. 730~736
 - 22 Dubovsky J, Zabramski J M, Kurth J, *et al.* A gene responsible for cavernous malformations of the brain maps to chromosome 7q. *Hum Mol Genet*, 1995, **4** (3): 453~458
 - 23 Craig H D, Gunel M, Cepeda O, *et al.* Multilocus linkage identifies two new loci for a Mendelian form of stroke, cerebral cavernous malformation, at 7p15-13 and 3q25.2-27. *Hum Mol Genet*, 1998, **7** (12): 1851~1858
 - 24 Guclu B, Ozturk A K, Pricola K L, *et al.* Cerebral venous malformations have distinct genetic origin from cerebral cavernous malformations. *Stroke*, 2005, **36** (11): 2479~2480
 - 25 Zhang J, Clatterbuck R E, Rigamonti D, *et al.* Interaction between krit1 and icap1a infers perturbation of integrin b1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet*, 2001, **10** (25): 2953~2960
 - 26 Zawistowski J S, Serebriiskii I G, Lee M F, *et al.* KRIT1 association with the integrin-binding protein ICAP-1: a new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (CCM1) pathogenesis. *Hum Mol Genet*, 2002, **11** (4): 389~396
 - 27 Whitehead K J, Plummer N W, Adams J, *et al.* CCM1 is required for arterial morphogenesis: implications for the etiology of human cavernous malformations. *Development*, 2004, **131** (6): 1437~1448
 - 28 Uhlik M T, Abell A N, Johnson N L, *et al.* Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat Cell Biol*, 2003, **5** (12): 1104~1110
 - 29 Guarnieri V, Muscarella L A, Amoroso R, *et al.* Identification of two novel mutations and of a novel critical region in the KRIT1 gene. *Neurogenetics*, 2007, **8** (1): 29~37
 - 30 Ortiz L, Costa A F, Bellido M L, *et al.* Study of cerebral cavernous malformation in Spain and Portugal: High prevalence of a 14 bp deletion in exon 5 of MGC4607 (CCM2 gene). *J Neurol*, 2007, **254** (3): 322~326
 - 31 Denier C, Goutagny S, Labauge P, *et al.* Mutations within the MGC4607 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet*, 2004, **74** (2): 326~337
 - 32 Zawistowski J S, Stalheim L, Uhlik M T, *et al.* CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Hum Mol Genet*, 2005, **14** (17): 2521~2531
 - 33 Timur A A, Driscoll D J, Wang Q. Biomedicine and diseases: the Klippel-Trenaunay syndrome, vascular anomalies and vascular morphogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 2005, **62** (13): 1434~1447
 - 34 Wang Q K. Update on the molecular genetics of vascular anomalies. *Lymphat Res Biol*, 2005, **3** (4): 226~233
 - 35 Revencu N, Vikkula M. Cerebral cavernous malformation: new molecular and clinical insights. *J Med Genet*, 2006, **43** (9): 716~721
 - 36 Felbor U, Sure U, Grimm T, *et al.* Genetics of cerebral cavernous angioma. *Zentralbl Neurochir*, 2006, **67** (3): 110~116

- 37 Labauge P, Denier C, Bergametti F, *et al.* Genetics of cavernous angiomas. *Lancet Neurol*, 2007, **6** (3): 237~244
- 38 Guclu B, Ozturk A K, Pricola K L, *et al.* Mutations in apoptosis-related gene, PDCD10, cause cerebral cavernous malformation 3. *Neurosurgery*, 2005, **57** (5): 1008~1013
- 39 Verlaan D J, Roussel J, Laurent S B, *et al.* CCM3 mutations are uncommon in cerebral cavernous malformations. *Neurology*, 2005, **65** (12): 1982~1983
- 40 Liquori C L, Berg M J, Squitieri F, *et al.* Low frequency of PDCD10 mutations in a panel of CCM3 probands: potential for a fourth CCM locus. *Hum Mutat*, 2006, **27** (1): 118
- 41 Liquori C L, Berg M J, Squitieri F, *et al.* Deletions in CCM2 are a common cause of cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet*, 2007, **80** (1): 69~75
- 42 Chen P Y, Chang W S, Chou R H, *et al.* Two non-homologous brain diseases-related genes, SERPINI1 and PDCD10, are tightly linked by an asymmetric bidirectional promoter in an evolutionarily conserved manner. *BMC Mol Biol*, 2007, **8**: 2
- 43 Aguirre A J, Brennan C, Bailey G, *et al.* High-resolution characterization of the pancreatic adenocarcinoma genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (24): 9067~9072
- 44 陈菊祥, 范静平, 应康, 等. 基因表达谱芯片发现 36 条喉鳞癌相关基因. *第二军医大学学报*, 2001, **22** (6): 519~522
Chen J X, Fan J P, Ying K, *et al.* *Chinese Acad J Sec Mil Med Univ*, 2001, **22** (6): 519~522
- 45 Nanjundan M, Nakayama Y, Cheng K W, *et al.* Amplification of MDS1/EVI1 and EVI1, located in the 3q26.2 amplicon, is associated with favorable patient prognosis in ovarian cancer. *Cancer Res*, 2007, **67** (7): 3074~3084
- 46 Cardoso J, Boer J, Morreau H, *et al.* Expression and genomic profiling of colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1775** (1): 103~137
- 47 Gibson S, Shillitoe E J. Analysis of apoptosis-associated genes and pathways in oral cancer cells. *J Oral Pathol Med*, 2006, **35** (3): 146~154
- 48 Huerta S, Harris D M, Jazirehi A, *et al.* Gene expression profile of metastatic colon cancer cells resistant to cisplatin-induced apoptosis. *Int J Oncol*, 2003, **22** (3): 663~670
- 49 胡和平, 张俊平, 应康, 等. 基因芯片技术分析斑蝥素对肝癌细胞细胞毒作用的分子机制. *第二军医大学学报*, 2003, **24** (6): 645~649
Hu H P, Zhang J P, Ying K, *et al.* *Chinese Acad J Sec Mil Med Univ*, 2003, **24** (6): 645~649
- 50 蒋小陵, 杨劲松, 张腾飞, 等. 干扰素 γ 基因转导前后人肝癌细胞 HepG1 表型变化及基因表达图谱差异的研究. *胃肠病学*, 2001, **6** (4): 211~214
Jiang X L, Yang J S, Zhang T F, *et al.* *Chinese J Gastroenterol*, 2001, **6** (4): 211~214
- 51 Chaurasia G, Iqbal Y, Hanig C, *et al.* UniHI: an entry gate to the human protein interactome. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35** (Database issue): D590~D594
- 52 Chaurasia G, Iqbal Y, Hanig C, *et al.* Flexible web-based integration of distributed large-scale human protein interaction maps. *J Integr Bioinformatics*, 2007, **4** (1): 51
- 53 Peri S, Navarro J D, Amanchy R, *et al.* Development of human protein reference database as an initial platform for approaching systems biology in humans. *Genome Res*, 2003, **13** (10): 2363~2371
- 54 Ewing R M, Chu P, Elisma F, *et al.* Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol*, 2007, **3**: 89
- 55 Rual J F, Venkatesan K, Hao T, *et al.* Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*, 2005, **437** (7062): 1173~1178
- 56 Tsang H T, Connell J W, Brown S E, *et al.* A systematic analysis of human CHMP protein interactions: additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex. *Genomics*, 2006, **88** (3): 333~346
- 57 Lin J L, Chen H C, Fang H I, *et al.* MST4, a new Ste20-related kinase that mediates cell growth and transformation via modulating ERK pathway. *Oncogene*, 2001, **20** (45): 6559~6569
- 58 Dan I, Watanabe N M, Kusumi A. The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol*, 2001, **11** (5): 220~230
- 59 Preisinger C, Short B, De Corte V, *et al.* YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3zeta. *J Cell Biol*, 2004, **164** (7): 1009~1020
- 60 Lee W S, Hsu C Y, Wang P L, *et al.* Identification and characterization of the nuclear import and export signals of the mammalian Ste20-like protein kinase 3. *FEBS Lett*, 2004, **572** (1~3): 41~45
- 61 Lu T J, Lai W Y, Huang C Y, *et al.* Inhibition of cell migration by autophosphorylated mammalian sterile 20-like kinase 3 (MST3) involves paxillin and protein-tyrosine phosphatase-PEST. *J Biol Chem*, 2006, **281** (50): 38405~38417
- 62 Qian Z, Lin C, Espinosa R, *et al.* Cloning and characterization of MST4, a novel Ste20-like kinase. *J Biol Chem*, 2001, **276** (25): 22439~22445
- 63 Dan I, Ong S E, Watanabe N M, *et al.* Cloning of MASK, a novel member of the mammalian germinal center kinase III subfamily, with apoptosis-inducing properties. *J Biol Chem*, 2002, **277** (8): 5929~5939
- 64 Sung V, Luo W, Qian D, *et al.* The Ste20 kinase MST4 plays a role in prostate cancer progression. *Cancer Res*, 2003, **63** (12): 3356~3363
- 65 Greenman C, Stephens P, Smith R, *et al.* Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 2007, **446** (7132): 153~158

Programmed Cell Death 10, Beyond an Apoptosis-related Molecule*

MA Xi^{1,2)}, ZHAO Hong-Shan^{1,2)**}, MA Da-Long^{1,2)}

⁽¹⁾Department of Immunology, School of Basic Medicine, Peking University, Beijing 100083, China;

⁽²⁾Human Disease Genomics Center, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract Homo sapiens *PDCD10* (programmed cell death 10, alias, “TF-1 cell apoptosis related gene 15, *TFAR15*”), cloned by means of cDNA-representational differences analysis, had been initially identified associated with cell apoptosis. Recent research suggested mutations within the *PDCD10* gene or deletion were responsible for cerebral cavernous malformations, and *PDCD10* was the third CCM gene. On the other hand, other research demonstrated that PDCD10 was strictly modulated and up regulated in many kinds of tumors, which implicated that PDCD10 participated in tumorous signal transduction. The recent research confirmed that PDCD10 interacts with MST4, a member of Ste20-related kinases, and the interaction promoted cell proliferation and transformation via modulation of the ERK-MARK pathway. In conclusion, all these demonstrate that PDCD10 has many biological effects, which suggests that it is a novel player in vascular morphogenesis and/or remodeling, as well as tumorigenesis and cancer progression.

Key words programmed cell death 10(*PDCD10*), interaction protein, MST4, cerebral cavernous malformations, (CCM)

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30300308) and Hi-Tech Research and Development Program of China (863) (2006AA02A305).

**Corresponding author . Tel: 86-10-82802846 ext 420, Fax: 86-10-82801149, E-mail: hongshan@bjmu.edu.cn

Received: May 17, 2007 Accepted: June 7, 2007