

微小染色体维持蛋白与肿瘤*

王东星^{1,2)} 周军年^{1,2)} 岳文^{1,2)**} 裴雪涛^{1,2)**}

(¹⁾ 军事科学院军事医学研究院野战输血研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850; (²⁾ 华南生物医药研究院, 广州 510005)

摘要 微小染色体维持(minichromosome maintenance, MCM)蛋白质家族是 DNA 复制前复合物的的重要组成部分, 在 DNA 复制启动过程和 DNA 损伤修复中发挥着重要作用. MCM 蛋白质家族成员在转录调节、染色质重塑和检查点应答中也扮演着重要角色. 最近研究发现, MCM 异常可导致恶性肿瘤的发生发展, 在不同肿瘤(前列腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、肝癌、肺癌、胶质母细胞瘤和髓母细胞瘤等)中呈现异常表达并与肿瘤细胞增殖、侵袭、转移能力密切相关, MCM 蛋白有望作为临床上诊断相关恶性肿瘤及提示其预后的生物学标志物. 更为重要的是, MCM 蛋白质复合物晶体结构逐步得到解析, 这不仅有利于阐明其生理和病理作用与调控机制, 亦有助于发现靶向 MCM 的特异性小分子抑制剂, 为新型抗肿瘤药物的研发提供新思路.

关键词 微小染色体维持蛋白, DNA 复制, 肿瘤, 小分子抑制剂

学科分类号 R73, Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0243

1 微小染色体维持(MCM)蛋白的结构与基本功能

微小染色体维持(minichromosome maintenance, MCM)蛋白质家族是从太古代生物到高等真核生物中一直广泛存在、高度保守的蛋白质. 20 世纪 80 年代在筛选酿酒酵母菌突变体的研究中首次发现 MCM 家族, 迄今为止已经有 10 个 MCM 家族成员被发现, 家族成员之间具有高度同源性^[1]. MCM 家族共有 1 个大约由 200 个氨基酸残基组成的高度保守的中央结构域, 该结构域被称为 MCM 盒(MCM box), 包括有 2 个 ATPase 共有基序(motif): 含有活化 P 环的 Walk A 及 Walk B. 不同的 MCM 蛋白之间全部相同区域达 30%, 类似区域达 50%, 在结构上非常类似.

真核细胞中 MCM 蛋白通常以 MCM2~7 六聚体形式发挥生物学功能, 称为 MCM 复合物, 是由 MCM2~7 蛋白以 1:1:1:1:1:1 的比例形成一种异六聚体复合物(MCM2-MCM6-MCM4-MCM7-MCM3-MCM5)(图 1)^[2]. 不同 MCM 亚型之间的结合并不相同, MCM2、4、6、7 蛋白均保留氨基末端的锌指结构, 这种结构有助于蛋白质-蛋白质和

DNA-蛋白质的相互作用. 通常由 MCM4、MCM6、MCM7 紧密结合在一起形成三聚体形成 MCM 的核心, 之后 MCM2 以较弱的亲和力结合到 MCM 核心上, MCM3 和 MCM5 之间先形成二聚体再结合到 MCM 核心上. MCM2~7 装载形成的六聚体复合物构成 DNA 的复制许可复合物, 从而启动 DNA 复制. MCM2~7 的六聚体复合物在 DNA 复制蛋白 Cdc6 和 Cdt1 的帮助下, 以二聚体形式结合在双链 DNA 的复制源上, 组成复制前复合物(pre-replication complex, pre-RC), 此时 MCM2~7 的六聚体复合物的酶活性处于未被激活的状态. 在细胞由 G1 期向 S 期转变的期间, 其 DNA 复制必需蛋白结合到 pre-RC 上, 形成具有解螺旋酶活性的复合物, 开始进行 DNA 复制. 在

* 国家重点研发计划(2017YFA0103100, 2017YFA0103103, 2017YFA0103104), 国家自然科学基金青年科学基金项目(31301199)和广州市健康医疗协同创新重大专项专题(201400000003-1, 201508020257)资助项目.

** 通讯联系人.

裴雪涛. Tel: 010-66932203, E-mail: hcoohboy@163.com

岳文. Tel: 010-66931949, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2018-01-17, 接受日期: 2018-06-13

MCM 六聚体复合物中的 MCM4、MCM6、MCM7 自发形成的三聚体具有有限的 DNA 解旋酶活性, 因而有学者提出 MCM2、MCM5、MCM3 可能对三聚体核心发挥调节作用^[3].

此外, 该家族成员还包括 MCM1、MCM8、MCM9 和 MCM10. MCM1 属于 MADS box 转录因子家族, 与几个辅因子相互作用结合其同源 DNA 序列, 亦被命名为血清效应因子或 c-fos 血清效应结合因子 (serum response element, SRF; c-fos serum response element-binding transcription factor), 受到外界刺激时, 血清中的 SRF 会短暂升高^[4]. MCM2 之前被命名为 CCNL1、BM28、CDCL1, 有报道提示其可能在急性髓性白血病中发挥致病作用^[5]. MCM7 也被称为 CDC47 (cell division cycle 47), 曾因与酵母中 MCM2 高度同源而被认为是 MCM2 进行研究^[5]. MCM8 被认为是独立于 MCM2~7 复合物而发挥 ATP 酶和 DNA 解旋酶活性, 可以促进 DNA 合成. MCM9 是在研究 MCM2~8 过程中发现的, 但它的作用还有待澄清. MCM10 可能有双重作用, 既可以通过 MCM2、6 与 MCM 复合物结合, 也可以直接与染色质结合^[6].

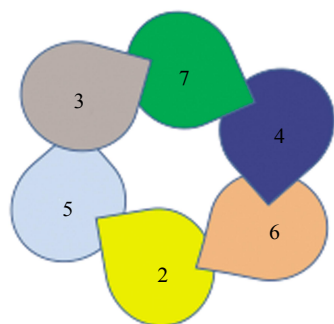


Fig. 1 The binding sequence of MCM complex

图 1 MCM 复合物结合顺序

2 MCM 蛋白的生理功能

2.1 MCM 蛋白与 DNA 复制

如前所述, MCM 蛋白是复制前复合物 (pre-RC) 的一部分, 在真核细胞 DNA 复制起始中发挥重要作用. 在正常细胞中, 精确的染色体复制是通过复制许可系统维持的. 在起始阶段, 有一些蛋白质会识别启动子并与之结合, 该蛋白质统称为“起始识别复合物” (origin recognition complex,

ORC). 一旦复制起始点被 ORC 标记, 另外 2 个分子, 即 CDC6 和 CDT1 将会被招募到该复合体. 紧接着, 组装的 CDC6-ORC 相互作用, 以三磷酸腺苷 (ATP) 供能的方式装载着六聚体 MCM 复合物到复制起始点. ORC-CDC6-CDT1-MCM 复合物被认为是复制前复合物, 复制前复合物与 DNA 结合后, DNA 才有能力进行复制. 此外, 研究发现 MCM 蛋白的 mRNA 水平随着细胞周期变化而改变, MCM 蛋白的表达在 G1/S 转换时达高峰, 当细胞进入 G0 期和分化、衰老时, MCM 表达的水平下降至不能检出, 这确保了 DNA 复制在每次细胞周期中只进行 1 次 (图 2)^[1,6].

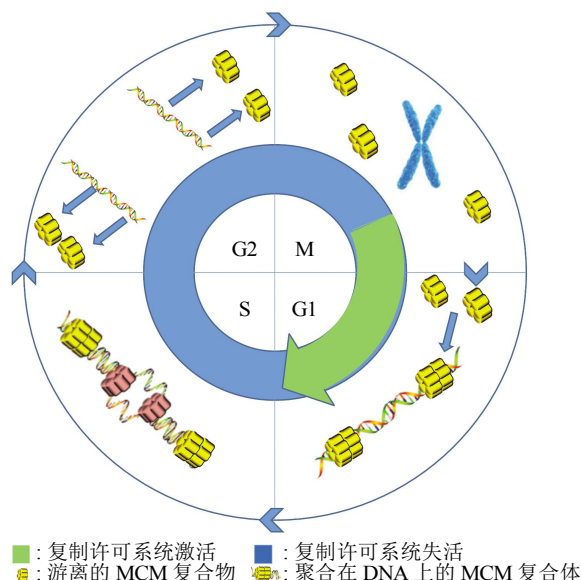


Fig. 2 The mechanism of replicating license system participating in DNA replication

图 2 复制许可系统参与 DNA 复制的作用机制

除此之外, 科学家们还推测 MCM 家族可能不只参与了 DNA 的复制起始, 这种推测建立在以下两个观察: a. MCM 蛋白数量很大, 远远超过潜在的复制起始点所需要的量; b. 多数的 MCM 复合体分散在染色质上, 而不与 DNA 复制位点在同一位点^[7]. 此外, 不同的 MCM 分子分别与许多参与细胞重要功能的蛋白质相互作用, 这些功能蛋白参与转录、染色质重塑、检查点等生理过程^[7], 有些还参与包括在肿瘤发生发展中的病理过程, 提示 MCM 蛋白在多种生理病理过程中扮演重要角色. 另外有研究证实, MCM 复合物在 DNA 损伤后与输入蛋白 7 (importin7), 组蛋白伴侣 ASF1 和色氨酸解旋酶 DNA 结合蛋白 3 (chromodomain helicase

DNA binding protein 3)的相互作用呈动态变化^[6], 这些变化伴随着 MCM 蛋白特异性位点的磷酸化和泛素化的增加, 以及 MCM 复合物与 H2AX 的共定位的增加, 这些蛋白质被证实会募集到 DNA 损伤部位. 这表明 MCM 蛋白参与 DNA 损伤后的染色质重塑^[8].

2.2 MCM 蛋白的相互作用分子

很多分子可以直接和 MCM 复合体结合从而发挥作用, 例如在 DNA 复制起始, MCM 蛋白会与起始识别复合体直接结合以引导复制的继续进行. 此外, MCM 之间也存在相互调节作用, 例如 MCM6 可以与 MCM2、MCM4、MCM7、orc11、orc121、orc141 相互作用, 而 MCM3 可以与 MCM5、MCM7、orc51、orc41 结合^[9]. 此外有研究发现, 在酵母中, MCM7 与 MCM1 形成蛋白质复合物之后可以结合在 MCM7 基因启动子上, 从而对 MCM7 基因的转录进行调控^[10]. Hubbi 等^[11]的研究发现, MCM7 蛋白可直接与低氧环境诱导下细胞内迅速表达的一个关键转录因子 HIF-1(hypoxia inducible factor-1)相互作用, 并负调节 HIF-1 α 活性. MCM7 可促进 HIF-1 α 和 HIF-2 α 降解, 而 MCM3 以依赖天冬酰胺基羟基化的方式抑制 HIF-1 α 反式激活结构域功能. 除此之外, MCM2 和 MCM5 蛋白也可负性调控 HIF-1 的活性. 反之, 细胞内的氧浓度在一定程度上也可调控 MCM2~7 的表达. 有报道提示在内皮细胞和 HCT116 细胞系中, 低氧会同时下调 MCM2~7 的 mRNA 及其蛋白质表达. 除此之外, 也有很多与 MCM 家族成员可单独结合蛋白质分子并发挥重要作用. 研究发现 Rb 蛋白的氨基末端 p107 和 p130 可以与 MCM7 蛋白结合, 并抑制 DNA 复制^[12]. 此外活化蛋白激酶 C 1 也可与 MCM7 直接结合, 敲除 RACK1 后会严重影响 DNA 复制许可活动, 并导致细胞周期进入 S 期的停滞. 另外有研究发现细胞周期蛋白 E/Cdk2 和 B/Cdk1 可以通过磷酸化 MCM7 以调节细胞周期. 另外有报道称活化的上皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor) 可以磷酸化 Lyn, p56Lyn 的 p56 同型, 然后这些同型蛋白质再进一步磷酸化 MCM7, 并增加其与其他 MCM 蛋白的结合, 从而促进 DNA 合成和细胞增殖^[13].

蛋白激酶 A(PKA)- 锚定蛋白 AKAP95 位于细胞核中, 主要与细胞核基质结合. 研究结果表明 AKAP95 在 DNA 复制中的作用是为 MCM2 提供支架. 如果在细胞核中降低一定的 AKAP95 会部分

降低 MCM2 的活性并阻滞 DNA 复制. 此外, 破坏 AKAP95 的 C 末端锌指结构会降低复制起始的效率, 破坏 PKA 结合结构域却不影响 G1 或 S 期细胞核中的 DNA 复制, 而 PKA 抑制剂可以影响复制的起始而非延长期^[14]. STAT1 α 是一种激活干扰素 γ (IFN- γ)的转录因子, MCM5 水平的变化与通过 STAT1 α 调控的 IFN- γ 转录反应的变化相关. Zhang 等^[15]研究发现 STAT1 α 和 MCM5 在体内外均存在相互作用, 并且在体外相互作用需要 Ser727 的磷酸化. 同时还有研究发现组蛋白乙酰化与 DNA 复制中染色质的解聚和 MCM 募集有着密不可分的联系, H4 乙酰化水平与 MCM 载入水平呈正相关^[16]. HBO1 (human acetylase binding to ORC1; 也叫做 KAT7 和 MYST2), 它是一种 H4 乙酰化酶, 其活性会随着细胞周期变化而变化, 在 G1/S 期达到最大, 在体外 HBO1 可乙酰化非组蛋白底物, 包括 Geminin、MCM2 和 Cdc6. 研究证明, HBO1 可以通过 Cdt1 募集到 DNA 复制起始点上并在 MCM 复合物的载入过程发挥着必不可少的作用, 并且其表达量与 MCM 的载入水平呈正相关^[17].

3 MCM 家族和肿瘤

3.1 MCM 蛋白在肿瘤中的异常表达

MCM 蛋白的异常表达, 特别是过表达, 在许多人类癌前病变和癌症中都有显现. 如前列腺癌、结肠癌、脑膜瘤、乳腺癌、成神经管细胞瘤、胃腺癌、宫颈癌、骨肉瘤和食管鳞状细胞癌. MCM 家族成员的异常表达已经成为许多恶性肿瘤的生物学标志物. MCM2 是少突胶质细胞瘤、肾细胞癌、食管鳞状细胞癌、喉癌、乳腺癌、大 B 细胞淋巴瘤、口腔癌、卵巢癌和胃癌的生物学标志. MCM3 是增殖性的甲状腺乳头状癌中的标志物. MCM4 是非小细胞肺癌的增殖标志物. MCM5 是卵巢癌和前列腺癌的预后标志物. 肝细胞癌患者血浆 MCM6 蛋白水平可能是一种新的癌症生物学标志物. MCM7 可能是结直肠癌、小细胞肺癌和口腔鳞状细胞癌潜在生物学标志物. 在黑色素瘤、食管癌和口腔鳞状细胞癌中的研究发现, 从细胞正常增殖、异常增生到恶性增殖, MCM7 表达是逐渐增加的, 这表明高 MCM7 表达与恶性肿瘤的发生和发展有关, 高 MCM7 表达通常提示预后不良. 口腔鳞状细胞癌患者高表达 MCM7, 与生存时间呈负相关. 在前列腺癌患者和成神经管细胞瘤中, 高 MCM7 表达与恶性肿瘤的侵袭和转移相关, 因

此可作为患者的预后判断因素之一。在肺癌患者中的研究表明,与MCM2和Ki-67相比,MCM7在肺癌的预后评估中是更为可靠的独立的预后因素。

3.1.1 肺癌

Toyokawa等^[18]通过对331例非小细胞肺癌切除术后的肺癌组织进行免疫组织化学染色,用MCM7特异性抗体标记后发现,有196例(61.1%)MCM7表达阳性而135例(38.9%)表达阴性,但在正常肺组织中为阴性。通过随访发现MCM7高表达与男性、非腺癌组织形态、出现淋巴转移、肿瘤切除后的5年生存率有着很大的相关性。在细胞实验中,肺癌细胞系的MCM7蛋白质表达水平显著高于正常细胞系。通过siRNA特异性敲低MCM7后,癌症细胞的增殖能力被显著抑制,但对正常细胞系的影响却较小^[18]。此外,MCM6的表达也与非小细胞肺癌总体生存率相关,是患者预后较差的一个重要标志^[19]。

3.1.2 生殖系统肿瘤

在前列腺癌中,大约一半的患者都显示了MCM7基因的扩增,60%的侵袭性前列腺癌高表达MCM7蛋白。Ren等^[20]通过临床观察发现68例高表达MCM7的前列腺癌患者中有52例再次复发,而在57例低表达MCM7患者中只有7例复发。同时他们的研究还发现高表达MCM的癌症往往趋向于低分化。在细胞实验中,Shi等^[21]分别用pENTR-siMCM7和siRNA特异性敲低PC3和Du145细胞系中的MCM7表达后发现,二者都会显著抑制细胞的增殖。但相比较而言,siRNA转染后的第1d可以抑制30%的细胞增殖,但8d后却只有20%;pENTR-siMCM7有着更显著地抑制增殖的作用,转染8d后仍可抑制49%的细胞增殖。在体内实验中他们采用了异种移植前列腺癌的老鼠模型,发现在DU145细胞系用pENTR-siMCM7处理的小鼠肿瘤大小平均下降了2.2倍,同时转移率由正常的31.5%(5/16)下降到12.5%(2/16),而在PC3细胞系肿瘤大小则下降了2.8倍,转移率由25%(4/16)下降到6.25%(1/16)。这些研究表明,扩增或过表达MCM7与肿瘤复发、局部侵袭能力、转移、肿瘤等级和分化程度呈正相关。Dudderidge等^[22]研究发现前列腺癌患者尿液中MCM5表达增加,MCM5蛋白在前列腺癌患者尿液检测中敏感性为82%,特异性为73%~93%。由此推测尿液中MCM5的检测可能会是一种简单、准确和无创的诊断前列腺癌患者的方法^[23]。Majid等^[24]发现,

MCM2在前列腺癌中也存在高表达,但microRNA-1296显著下调;在PC3细胞中,抑制miR-1296会上调MCM2 mRNA和蛋白质,而其过表达则引起MCM2 mRNA和其蛋白质显著降低。因此,通过miRNA特异性下调致癌基因可能是治疗前列腺癌的一种新型治疗方法。此外,MCM2还是前列腺癌预后不良的一个独立标志。

在卵巢癌中通过Kruskal-Wallis检验显示,MCM3表达增加与组织学恶性程度增加存在相关性,MCM3与MCM7表达呈正相关^[25]。此外MCM2和MCM5表达还与肿瘤分期相关^[26]。由于这些相关性,应该考虑MCM蛋白作为卵巢癌增殖标志物的检测。

在子宫内膜癌中,Li等^[27]发现MCM7和Ki-67在肿瘤细胞核中表达最明显,且MCM7和Ki-67表达呈正相关。MCM7表达与组织学分级和患者年龄存在显著相关性,分化良好的癌症和年轻患者的MCM7表达较低。在MCM7高表达的子宫内膜癌患者中观察到他们生存率较低,另外发现MCM7也是子宫内膜癌的独立预后因子。Ki-67表达与组织学分级相关,但与预后无明显相关。因此推测MCM7在评估子宫内膜癌增殖和患者预后方面比Ki-67更为可靠和有临床价值^[27]。Kato等^[28]在正常子宫腺中发现MCM2和MCM3的表达在增殖期明显高于分泌期,与Ki-67表达密切相关。在子宫内膜增生中也发现MCM和Ki-67的表达密切相关。然而,在子宫内膜癌中,MCM2和MCM3的表达显著低于正常增殖性子宫内膜。MCM2与Ki-67的相关性较弱,MCM3与Ki-67表达无明显相关性。这些发现表明MCM2和MCM3的表达直接反映正常和增生性子宫内膜中的细胞增殖。然而在子宫内膜癌中,MCM的表达与细胞增殖之间的相关性与上述存在差异,表明复制许可系统在子宫内膜癌中可能存在异常。

3.1.3 神经系统肿瘤

胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme)是最具侵袭性的恶性肿瘤之一,被认为是人类最常见的中枢神经系统肿瘤。Erkan等^[29]通过将IV级GBM组织中的基因表达谱与正常蛋白质组织相比,发现GBM的MCM家族成员的表达水平有着显著的上调,其中最显著的是MCM7,表达水平大概是正常组的16倍,表达增加的还有MCM2和MCM5蛋白,但MCM3、MCM4、MCM6蛋白表达基本与正常组织相同。另外,将观察到的基因表达谱与

Ⅱ级和Ⅲ级星形细胞瘤样本进行比较,发现失调的MCM蛋白只见于Ⅳ级,这也表明它可以作为GradeⅣ的一个特异性生物学标志物。研究发现,siRNA介导的敲低MCM7的表达后会降低细胞的增殖,与正常相比大约下降50%,并且在异种移植和原位小鼠肿瘤模型中也至少抑制80%的肿瘤生长。因此MCM7可能是GBM的一个新的潜在治疗靶点。

髓母细胞瘤(MB)是儿童中枢神经系统中最常见的恶性肿瘤。Lau等^[30]通过与正常细胞系对比发现,在髓母细胞瘤细胞系中,MCM2、MCM3、MCM5和MCM7的转录水平都显著地提高,而且MCM2和MCM3的转录水平和蛋白质表达都有很高的一致性。临床观察发现MCM3高转录与患者的低生存率相关。在mRNA水平,MCM2和MCM3仍是一致地升高,但MCM4、5、6、7与正常细胞系相比却没有太大差异。在蛋白质表达水平,91.3%(21例)儿童MB和所有的(8例)成人MB都过表达MCM7。但是在结缔组织增生性MB和正常MB中,MCM家族的表达没有区别。通过siRNA敲低MCM2、3、7表达后会显著抑制MB细胞的生长、迁移和侵袭能力,通过siRNA敲低MCM3的表达后会使得细胞阻滞在G1期并降低细胞周期蛋白A的表达。然而敲低MCM2和MCM7却使得细胞阻滞在G2/M期并上调细胞周期蛋白A表达。此外,有最新研究表明,MCM10在MB细胞中也是过度表达的,并且下调MCM10后会抑制细胞增殖,诱导其凋亡^[31]。

3.1.4 消化道肿瘤

在肝癌组织中MCM7是高度表达的,其表达水平与患者年龄、性别、有无门脉癌栓、癌灶个数无关,但与肿瘤分化程度、临床分期、恶性肿瘤大小、侵袭能力、血清AFP水平呈正相关^[32]。免疫组织化学检测表明,可在肝癌中发现MCM7蛋白表达,但在正常和癌旁硬化肝组织中检测不到。特异性沉默MCM7后能够阻断细胞周期,增加细胞凋亡,并显著抑制肝癌细胞的生长。因此,MCM7有可能成为肝癌治疗的潜在靶点^[33]。索拉非尼已被证明可以提高晚期肝癌患者生存率。有资料表明索拉非尼会显著抑制MCM7在肝癌细胞系中的表达。因此,可以推测索拉非尼的辅助治疗可能是MCM7阳性肝癌患者的有价值的治疗策略^[34]。这些研究表明,MCM7对肝癌的发生和发展有着至关重要的作用,但具体机制尚不清楚。另有研究表

明,MCM2的表达与肿瘤的复发、增殖相关,而且还是比Ki-67更敏感的肝细胞增殖标志^[34]。

在食管癌中,Choy等^[35]研究发现MCM4表达与淋巴结转移显著相关(>70%),并且在腺癌组中存活时间较短。此外MCM4和MCM7表达与食管癌和癌前病变中的Ki-67、Bmi1和细胞周期蛋白E表达显著相关。研究者还推测MCM4和MCM7可作为食管病变评估的更敏感的增殖标志物。Keane等^[36]对72例胰胆管癌患者配对检测MCM5和细胞胆汁酸水平,发现MCM5检测恶性肿瘤的灵敏度要高于胆汁酸(55.6% vs 25.0%)。据此推测MCM5可能是比标准细胞胆汁酸水平更敏感的胰胆管恶性肿瘤指标。最近有研究表明,MCM2和拓扑异构酶Ⅱ α 同为人乳头状瘤病毒感染的重要标志,并在肛门癌症中呈高表达^[37]。

3.1.5 其他肿瘤

Rodins等^[38]对56例肾脏肿瘤患者(透明细胞癌36例、颗粒细胞癌7例、肾错构瘤5例、移行细胞癌8例)进行检测,每例患者分别用抗MCM2单抗检测其在癌组织及正常肾组织中的表达,发现癌细胞中MCM2表达较正常肾组织有明显增高。肿瘤细胞分化程度亦与MCM2表达相关,低分化的肿瘤MCM2表达较高。

综上所述,我们将各种恶性肿瘤按器官分类,并罗列出在其中所有呈异常表达的MCM蛋白,归纳成图(图3)。

3.2 MCM蛋白在肿瘤发生发展中的作用机制

通常认为基因组不稳定是癌症发展的必要步骤。MCM2~7复合物的表达水平和活性在保持基因组的稳定性中有着重要作用。然而研究发现MCM低表达(与肿瘤抑制基因一致)和过度表达(与癌基因一致)都与癌症发展相关^[39]。MCM蛋白表达异常的原因仍然不清楚。目前有两种可能的解释:
a. 由于细胞周期依赖性蛋白激酶CDK的失调,使原本可以在S期解离的MCM复合物继续结合,从而导致细胞不断分裂和高表达MCM。在这种情况下,MCM不是直接致癌的,但却使得细胞处于持续增殖状态。
b. 另一种可能性是复制许可系统本身失调的原因,通过诱导DNA非正常复制来提高染色体的不稳定性,从而诱导癌症的发生。此外在酵母的研究中发现MCM突变体增多确实会引起染色体丢失、DNA损伤及基因的重组,而且证实若是减少MCM蛋白表达2倍以上会导致基因组的不稳定。在动物和人体中也发现MCM点突变在肿瘤

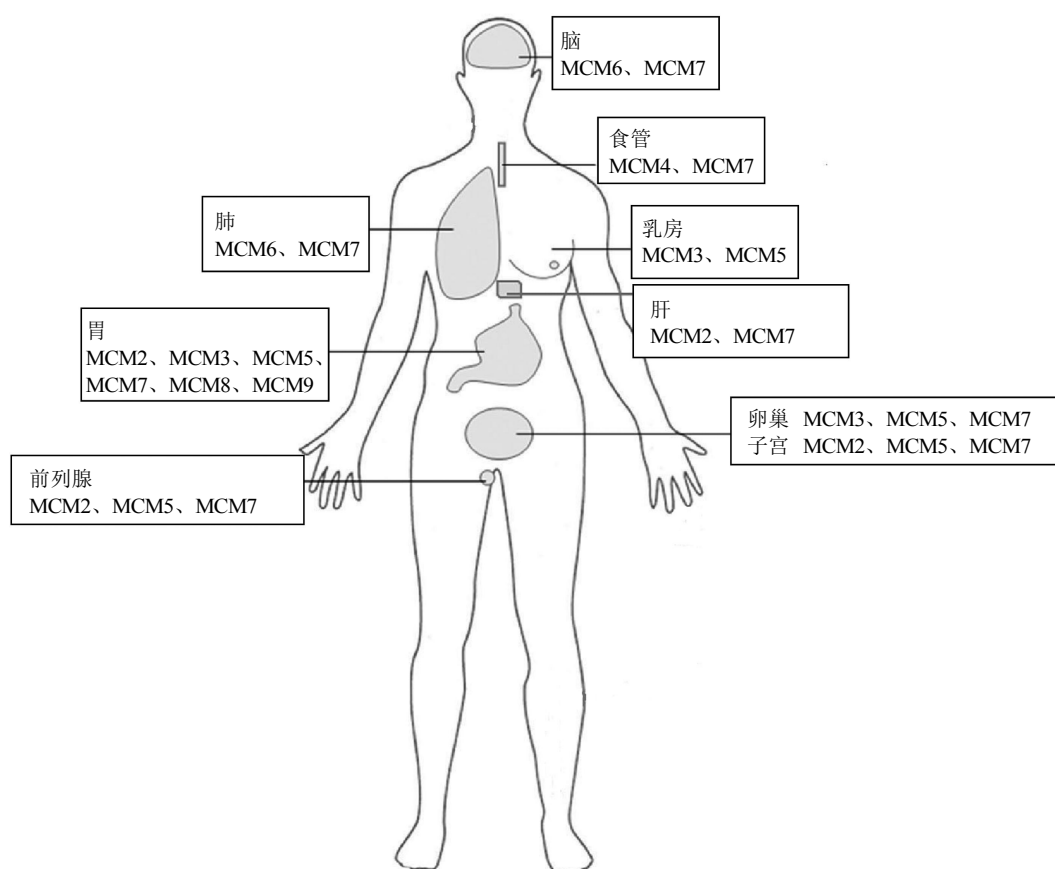


Fig. 3 The distribution of dysregulated MCM protein in tumors^[40]

图3 在肿瘤中失调 MCM 蛋白的分布情况^[40]

中是比较常见的. 这表明 MCM 蛋白确实参与了肿瘤发生, 但其具体机制还不是很明确^[39].

最近的研究表明, MCM7 基因组序列中包含一种可以下调多种抑癌基因(包括 p21、E2F1、BIM 和 pTEN)表达的 miRNA 簇. MCM7 及其嵌入式 miRNA 的致癌潜力已经在体外实验和动物模型中得到了有力的证明, 并似乎参与癌症启动. MCM7 蛋白既可作为致癌信号通路, 如雄激素受体信号, 又或者是肿瘤抑制通路如整合蛋白 α 或视网膜母细胞瘤信号分子的关键靶点^[41].

有研究发现, MCM8 是 DNA 复制许可基因的关键组分, 它可通过细胞周期蛋白依赖性激酶 4 结合细胞周期蛋白 D1 和激活 Rb 蛋白磷酸化. 而细胞周期蛋白 D1 / MCM8 相互作用是癌细胞中 Rb 磷酸化和进入 S 期所必需的. 因此, MCM8 可能在人类癌症发展中起关键作用. 此外, 通过对有关 MCM 蛋白的全基因组拷贝数进行分析, 并对 MCM8 进行鉴定, 发现 17 个人类恶性肿瘤中

含有 MCM8. 同时, 在多种人类恶性肿瘤中也发现 MCM8 过度表达. Rb 的磷酸化与 MCM8 的水平相关. 事实上, 过表达 MCM8 会导致非转化细胞中进入 S 期显著增加, 而 MCM8 的敲低会导致癌细胞的生长停滞. MCM8 的过度表达可能产生两个后果: 通过增加 Rb 分子的磷酸化和失活促进细胞生长, 并促进产生异常染色体重排和突变的 DNA 重组. 因此, MCM8 的异常表达可能是引发致癌过程的根本原因之一^[42].

4 MCM 蛋白结构相关研究进展

4.1 晶体结构

虽然有越来越多的证据表明, MCM 家族在肿瘤的发生发展中扮演了重要的角色, 但由于长期以来研究者一直未能获得真核生物中 MCM2~7 晶体结构, 阻碍了对其进一步的结构、功能研究以及以此作为靶点的新型药物设计. 通过使用低温电子显微镜, Li 等^[6]首次从酵母 G1 染色质中纯化出

MCM2~7 双重六聚体晶体. 晶体结构显示两个单一六聚体通过交错的氨基末端结构域相互作用, 以倾斜和扭曲的方式排列形成一个复杂的中央通道和两个次通道. 主通道主要用来捕获变形的双链 DNA 并形成 DNA 解链的核中心, 而次通道虽然不够双链 DNA 通过, 但却也能与外界 DNA 结

合作用(图 4). 研究为我们提供了 MCM 复合物的细微结构细节以及其发挥功能的可能的分子机制, 这为研究 MCM2~7 复合体对真核生物装配、激活和调控的作用提供一个研究框架, 更为了解 MCM7 在病理过程中所扮演的角色.

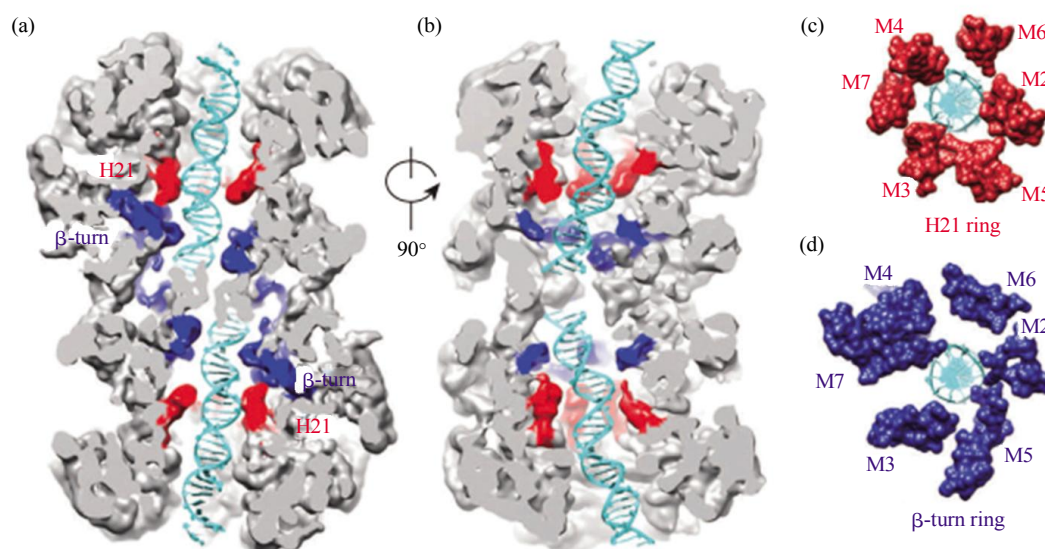


Fig. 4 Crystal structure and three-dimensional space conception of eukaryotic MCM2-7 complex^[2]

图 4 真核 MCM2-7 复合物的晶体结构及三维空间构象^[2]

4.2 针对 MCM 家族的小分子化合物抑制剂

前面提到 MCM 家族在很多肿瘤中均为异常表达, 并且与肿瘤的发生、发展以及患者的预后息息相关. 因此, 针对此家族的特异性小分子化合物抑制剂的研究也随之展开. 鉴于 MCM2~7 的生物化学和遗传学知识, 目前至少有三种不同类型的具有潜在化学治疗作用的小分子抑制剂: a. 酶抑制剂, 例如针对 DNA 解旋酶的小分子抑制剂. 环丙沙星(ciprofloxacin)可靶向 MCM2~7 复合物, 从而阻断体外解旋酶的活性及抑制细胞增殖. 螺旋霉素(heliquinomycin)也可以阻断解旋酶的活性, 并且还会抑制肿瘤细胞的增殖; b. 阻断 MCM 亚基与其他蛋白质分子之间相互作用的抑制剂; c. 调节 MCM 表达水平的分子. 例如韦得醇(widdrol)便可下调 MCM 蛋白的表达, 并会抑制细胞增殖, 阻断 G1 期. 另外, 曲古抑菌素(trichostatin A)可特异性靶向 MCM2 并会下调 MCM2 蛋白的表达^[39]. 最新研究发现, Breviscapine (BVP)可下调前列腺癌中的 MCM7 蛋白, 并通过损伤 DNA 和诱导凋亡来抑制肿瘤细胞的进程^[43].

5 展 望

由于 MCM 家族在 DNA 复制起始与延长以及在肿瘤的发生、发展中的重要作用, 近年来针对此家族的研究也得到了很大的推进, 特别是在 DNA 复制方面, 对于 MCM 复合体参与复制起始的具体机制已经阐明得十分详尽, 其作用也得到了充分肯定. 但在肿瘤方面, 虽然已经证实 MCM 蛋白与许多恶性肿瘤的增殖、侵袭及预后密切相关. 但其具体的作用机制尚不明确. 此外, 虽然很多体外实验证实敲低 MCM 会抑制肿瘤的生长与迁移, 但特异性针对此家族的小分子化合物抑制剂的研究还不够充分, 目前还没有针对此家族的可以临床使用的抗肿瘤药物. 幸运的是, 关于 MCM 家族在真核生物中的晶体结构最近刚被解析出来, 这为今后研究特异性靶向 MCM 家族的药物奠定重要的基础. 未来, MCM 在肿瘤中的作用机制以及针对 MCM 家族的特异靶向性抗肿瘤药物的研发将会是两大新的研究热点.

参 考 文 献

- [1] Das M, Singh S, Pradhan S, *et al.* MCM paradox: abundance of eukaryotic replicative helicases and genomic integrity. *Molecular Biology International*, 2014, **2014**(2014): 1-11
- [2] Li N, Zhai Y, Zhang Y, *et al.* Structure of the eukaryotic MCM complex at 3.8 Å. *Nature*, 2015, **524**(7564): 186-191
- [3] Lee J K, Hurwitz J. Isolation and characterization of various complexes of the minichromosome maintenance proteins of *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(25): 18871-18878
- [4] Norman C, Runswick M, Pollock R, *et al.* Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell*, 1988, **55**(6): 989-1003
- [5] Nakatsuru S, Sudo K, Nakamura Y. Isolation and mapping of a human gene (MCM2) encoding a product homologous to yeast proteins involved in DNA replication. *Cytogenet Cell Genet*, 1995, **68**(3-4): 226-230
- [6] Giaginis C, Vgenopoulou S, Vielh P, *et al.* MCM proteins as diagnostic and prognostic tumor markers in the clinical setting. *Histology and Histopathology*, 2010, **25**(3): 351-370
- [7] Honeycutt K A, Chen Z, Koster M I, *et al.* Deregulated minichromosomal maintenance protein MCM7 contributes to oncogene driven tumorigenesis. *Oncogene*, 2006, **25** (29): 4027-4032
- [8] Drissi R, Dubois M L, Douziech M, *et al.* Quantitative proteomics reveals dynamic interactions of the minichromosome maintenance complex (MCM) in the cellular response to etoposide induced DNA damage. *Mol Cell Proteomics*, 2015, **14**(7): 2002-2013
- [9] Kneissl M, Pütter V, Szalay A A, *et al.* Interaction and assembly of murine pre-replicative complex proteins in yeast and mouse cells. *J Mol Biol*, 2003, **327**(1): 111-128
- [10] Tye B K, Chang V K. Dual functional regulators coordinate DNA replication and gene expression in proliferating cells. *Front Biosci*, 2004, **9**: 2548-2555
- [11] Hubbi ME1, Luo W, Baek J H, *et al.* MCM proteins are negative regulators of hypoxia-inducible factor 1. *Molecular Cell*, 2011, **42**(5): 700-712
- [12] Sterner J M, Dew-Knight S, Musahl C, *et al.* Negative regulation of DNA replication by the retinoblastoma protein is mediated by its association with MCM7. *Molecular and Cellular Biology*, 1998, **18**(5): 2748-2757
- [13] Wei Q, Li J, Liu T, *et al.* Phosphorylation of minichromosome maintenance protein 7 (MCM7) by cyclin/cyclin-dependent kinase affects its function in cell cycle regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288**(27): 19715-19725
- [14] Eide T, Taskén KA, Carlson C, *et al.* Protein kinase A-anchoring protein AKAP95 interacts with MCM2, a regulator of DNA replication. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278** (29): 26750-26756
- [15] Zhang J J, Zhao Y, Chait B T, *et al.* Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1α in IFN-γ-induced transcriptional activation. *Embo J*, 1998, **17**(23): 6963-6971
- [16] Wong P G, Glozak M A, Cao T V, *et al.* Chromatin unfolding by Cdt1 regulates MCM loading *via* opposing functions of HBO1 and HDAC11-geminin. *Cell Cycle*. 2010, **9**(21): 4351-4363
- [17] Miotto B, Struhl K. HBO1 histone acetylase activity is essential for DNA replication licensing and inhibited by geminin. *Mol Cell*, 2010, **37**(1): 57-66
- [18] Toyokawa G, Masuda K, Daigo Y, *et al.* Minichromosome maintenance protein 7 is a potential therapeutic target in human cancer and a novel prognostic marker of non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer*, 2011, **10**(1): 65-76
- [19] Vigouroux C, Casse J M, Battaglia-Hsu S F. Methyl(R217)HuR and MCM6 are inversely correlated and are prognostic markers in non small cell lung carcinoma. *Lung Cancer*, 2015, **89**(2): 189-196
- [20] Ren B, Yu G, Tseng G C, *et al.* MCM7 amplification and overexpression are associated with prostate cancer progression. *Oncogene*, 2006, **25**(7): 1090-1098
- [21] Shi Y K, Yu Y P, Tseng G C, *et al.* Inhibition of prostate cancer growth and metastasis using small interference RNA specific for minichromosome complex maintenance component 7. *Cancer Gene Therapy*, 2010, **17**(10): 694-699
- [22] Dudderidge T J, McCracken S R, Loddo M, *et al.* Mitogenic growth signalling, DNA replication licensing, and survival are linked in prostate cancer. *Br J Cancer*, 2007, **96**(9): 1384-1393
- [23] Dudderidge T J, Kelly J D, Wollenschlaeger A, *et al.* Diagnosis of prostate cancer by detection of minichromosome maintenance 5 protein in urine sediments. *Br J Cancer*, 2010, **103**(5): 701-707
- [24] Majid S, Dar A A, Saini S, *et al.* Regulation of minichromosome maintenance gene family by microRNA-1296 and genistein in prostate cancer. *Cancer Research*, 2010, **70**(7): 2809-2818
- [25] Kobierzycki C, Pula B, Skiba M, *et al.* Comparison of minichromosome maintenance proteins (MCM-3, MCM-7) and metallothioneins (MT-I/II, MT-III) expression in relation to clinicopathological data in ovarian cancer. *Anticancer Res*, 2013, **33**(12): 5375-5383
- [26] Levidou G, Ventouri K, Nonni A, *et al.* Replication protein A in non-early ovarian adenocarcinomas: correlation with MCM-2, MCM-5, Ki-67 index and prognostic significance. *Int J Gynecol Pathol*, 2012, **31**(4): 319-327
- [27] Li S S, Xue W C, Khoo U S, *et al.* Replicative MCM7 protein as a proliferation marker in endometrial carcinoma: a tissue microarray and clinicopathological analysis. *Histopathology*, 2005, **46**(3): 307-313
- [28] Kato K, Toki T, Shimizu M, *et al.* Expression of replication-licensing factors MCM2 and MCM3 in normal, hyperplastic, and carcinomatous endometrium: correlation with expression of Ki-67 and estrogen and progesterone receptors. *Int J Gynecol Pathol*, 2003, **22**(4): 334-340
- [29] Erkan E P, Ströbel T, Lewandrowski G, *et al.* Depletion of minichromosome maintenance protein 7 inhibits glioblastoma multiforme tumor growth *in vivo*. *Oncogene*, 2014, **33** (39): 4778-4785
- [30] Lau K M, Chan Q K, Pang J C, *et al.* Minichromosome maintenance proteins 2, 3 and 7 in medulloblastoma: overexpression and involvement in regulation of cell migration and invasion. *Oncogene*, 2010, **29**(40): 5475-5489
- [31] Senfler D, Erkan E P, Özer E, *et al.* Overexpression of

- minichromosome maintenance protein 10 in medulloblastoma and its clinical implications. *Pediatr Blood Cancer*, 2017, **64**(12) doi: 10.1002/pbc.26670
- [32] Zhou Y M, Zhang X F, Cao L, *et al.* MCM7 expression predicts post-operative prognosis for hepatocellular carcinoma. *Liver International*, 2012, **32**(10): 1505–1509
- [33] Liu J, Tian L, Chen B A, *et al.* Biological effects of lentivirus-mediated silencing of minichromosome maintenance protein 7 with shRNA on the liver cancer MHCC-97H cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, **8**(6): 8433–8441
- [34] Liu F, Yuan J H, Huang J F, *et al.* Long noncoding RNA FTX inhibits hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis by binding MCM2 and miR-374a. *Oncogene*, 2016, **35**(41): 5422–5434
- [35] Choy B, LaLonde A, Que J, *et al.* MCM4 and MCM7, potential novel proliferation markers, significantly correlated with Ki-67, Bmi1, and cyclin E expression in esophageal adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, and precancerous lesions. *Hum Pathol*, 2016, **2016**(57): 126–135
- [36] Keane M G, Bramis K, Pereira S P, *et al.* Systematic review of novel ablative methods in locally advanced pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, **20**(9): 2267–2278
- [37] Scapulatempo-Neto C, Veo C, Fregnani J H T G, *et al.* Characterization of topoisomerase II α and minichromosome maintenance protein 2 expression in anal carcinoma. *Oncol Lett*, 2017, **13**(3): 1891–1898
- [38] Rodins K, Cheale M, Coleman N, *et al.* Minichromosome maintenance protein 2 expression in normal kidney and renal cell carcinomas: relationship to tumor dormancy and potential clinical utility. *Clinical Cancer Research*, 2002, **8**(4): 1075–1081
- [39] Simon N E, Schwacha A. The MCM2-7 replicative helicase: a promising chemotherapeutic target. *Biomed Res Int*, 2014, **2014**: 549719
- [40] Neves H, Kwok H F. In sickness and in health: the many roles of the minichromosome maintenance proteins. *BBA - Reviews on Cancer*, 2017(1868): 295–308
- [41] Luo J H. Oncogenic activity of MCM7 transforming cluster. *World J Clin Oncol*, 2011, **2**(2):120–124
- [42] He D M, Ren B G, Liu S, *et al.* Oncogenic activity of amplified miniature chromosome maintenance 8 in human malignancies. *Oncogene*, 2017, (2017): 1–11
- [43] Guan Y B, Yang D R, Nong S J, *et al.* Brevescapine (BVP) inhibits prostate cancer progression through damaging DNA by minichromosome maintenance protein-7 (MCM-7) modulation. *Biomed Pharmacother*, 2017, **2017**(93): 103–116

Minichromosome Maintenance Protein and Tumor*

WANG Dong-Xing^{1,2)}, ZHOU Jun-Nian^{1,2)}, YUE Wen^{1,2)**}, PEI Xue-Tao^{1,2)**}

⁽¹⁾ Stem Cell and Regenerative Medicine Laboratory, Beijing Institute of Transfusion Medicine, AMMS, Beijing 100850, China;

⁽²⁾ South China Research Center for Stem Cell & Regenerative Medicine, AMMS, Guangzhou 510005, China)

Abstract Minichromosome maintenance (MCM) proteins are key elements that function as a part of the pre-replication complex to initiate DNA replication. Individual MCM proteins also help to regulate transcription, chromatin remodeling and check point responses. Recent studies indicated that MCM expression is abnormal in many tumors (prostate cancer, endometrial cancer, ovarian cancer, liver cancer, lung cancer, glioblastoma, medulloblastoma, *etc.*), and is associated with the abilities of proliferation, invasion, metastasis in tumor. Clinical studies have shown that MCM proteins are indicators of tumor proliferation and poor prognosis, and are also identified as potential targets for new treatments of cancers. With the discovery of the crystal structure of the MCM protein complex, the underlying mechanism of MCMs, especially those in the tumors, will be further elucidated. It will also help to develop novel small specific molecule inhibitors for targeting MCMs.

Key words minichromosome maintenance proteins, DNA replication, genomic instability, tumor, small molecule inhibitors

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0243

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31301199) and Special Projects of Health Care Collaborative Innovation of Guangzhou City (201400000003-1, 201508020257).

**Corresponding author.

YUE Wen. Tel: 86-10-66931949, E-mail: hcoohboy@163.com

PEI Xue-Tao. Tel: 86-10-66932203, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: January 17, 2018 Accepted: June 13, 2018