

ARF——一种新的抑癌因子的研究进展*

彭丽霞 张 伟 何大澄 柳惠图**

(北京师范大学生命科学学院, 教育部细胞增殖与调控生物学重点实验室, 北京 100875)

摘要 *INK4a/ARF* 基因位于人染色体 9p21, 是人类肿瘤中最常见的基因失活位点之一. *INK4a/ARF* 基因有两套各自独立的启动子, 通过可变阅读框, 能够编码两种蛋白质: $p16^{INK4a}$ 和 $p14^{ARF}$ (*ARF* 在鼠细胞中为 $p19^{ARF}$). $p16$ 作为 CDK4/6 的抑制因子, 能够阻断 pRb 磷酸化, 将细胞周期阻断在 G1 期; 而 *ARF* 可结合原癌蛋白 MDM2, 稳定 p53, 将细胞周期阻断在 G1 期和 G2/M 转换期, 或诱导细胞凋亡. 因此 *ARF* 蛋白和 $p16$ 一样也是一种肿瘤抑制因子.

关键词 *ARF*/p53, 细胞周期阻断, 凋亡

学科分类号 Q291

人染色体 9p21~23 位点存在多种癌基因和抑癌基因. 这些基因的变异常导致细胞周期失控, 细胞的异常增殖, 从而诱发肿瘤的形成. 其中抑癌基因 *INK4a/ARF* (亦称为 *CDKN2A*) 由于其独特的细胞调控作用, 受到广泛的关注, 是目前细胞周期调控因子的研究热点之一.

CDKN2A (cyclin dependent kinase N2A) 位点有两套各自独立的启动子, 通过可变阅读框, 编码两种不同的转录产物: α 转录产物 $p16$ 和 β 转录产物 *ARF*^[1]. $p16$ 由 *INK4a* (inhibitor of Cdk4) 基因编码, 包含 156 个氨基酸. $p16^{INK4a}$ 基因位于人染色体 9p21, 全长为 8.5 kb, 由 3 个外显子组成. 外显子 1 α 为 126 bp, 外显子 2 为 307 bp, 外显子 3 为 11 bp. *CDKN2A* 包含的重叠基因 *ARF* (可变阅读框, alternative reading frame) 编码蛋白 $p14^{ARF}$ (人) / $p19^{ARF}$ (鼠). *ARF* 基因也是由 3 个外显子 (1 β , 2, 3) 组成, 外显子 1 β 位于外显子 1 α 的上游, 相距大约 15~20 kb (图 1).

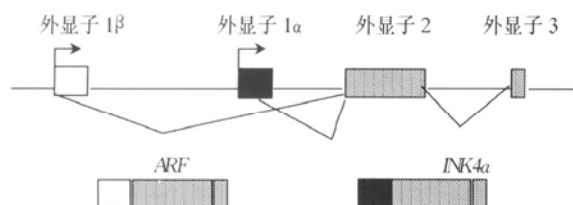


Fig. 1 The *INK4a/ARF* gene locus

图 1 *INK4a/ARF* 基因位点

虽然 *ARF* 与 *INK4a* 共用外显子 2 和 3, 但由于它们有各自独立的启动子, 阅读不同的编码框,

因此它们的蛋白质产物没有氨基酸序列的同源性. $p19^{ARF}$ (鼠) 的外显子 1 β 编码 64 个氨基酸, 外显子 2 编码 105 个氨基酸. 而 $p14^{ARF}$ (人) 的外显子 2 编码蛋白的氨基酸少, 因此 $p14^{ARF}$ 蛋白的分子质量较低.

研究表明, *ARF* 和 $p16^{INK4a}$ 一样也是一种肿瘤抑制基因. 但与 $p16^{INK4a}$ 不同的是, *ARF* 能够和 p53 负调节因子 MDM2 (murine double minute 2) 结合, 稳定并激活 p53, 从而诱导细胞周期的阻断与凋亡, 抑制肿瘤的生长.

1 *ARF* 的失活与肿瘤

当小鼠 *INK4a/ARF* 基因外显子 2 或外显子 1 β 缺失时, 小鼠有明显的肿瘤形成倾向. 最常见的肿瘤为肉瘤, 其次为淋巴瘤和一些中枢神经系统的肿瘤. 如大约 80% 的 *E μ -Myc* 转基因小鼠淋巴瘤中 *ARF* 基因缺失或突变. 另外在许多人类肿瘤细胞中, 如白血病细胞、肺癌细胞、皮肤癌细胞、黑色素瘤细胞, 也发现 $p14^{ARF}$ 基因失活. 目前对于人类肿瘤 *ARF* 的失活机制已研究得比较清楚, 主要有以下三种形式^[2].

a. 两个等位基因纯合缺失或一个等位基因缺失, 另一个基因发生突变. 而纯合缺失是主要的失活方式, 在人类肿瘤细胞中达 14%. 缺失一般发生在整个 *INK4a/ARF* 位点, 常常会导致邻近的

* 国家重点基础研究资助项目 (G1999053901).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62209699, E-mail: liuhuitu@bnu.edu.cn

收稿日期: 2002-04-16, 接受日期: 2002-06-05

p15^{INK4b} 基因失活。

b. 启动子甲基化沉默。最近报道在人类结肠癌中, *ARF* 启动子甲基化与 *INK 4a* 启动子甲基化不相关。在非小细胞肺癌中, *INK 4a* 甲基化比例高达 41%, 然而没有检测到 *ARF* 位点甲基化。

c. 内部基因突变。这种失活机制非常少见, 在人类肿瘤细胞中占 5%。突变点通常发生在外显子 2, 直接影响 *p16* 和 *ARF* 蛋白的氨基酸序列。也有一部分发生在外显子 1a, 只影响 *p16* 编码区。目前还没有检测到关于外显子 1b 的突变。

ARF 位点的失活, 常常导致 *ARF* 肿瘤抑制功能的丧失, 诱发肿瘤的形成。因此 *ARF* 与肿瘤的形成十分相关, 它参与细胞的增殖, 生长, 凋亡。如 Abelson 鼠白血病病毒 (Ab-mlv) 介导转化的前 B 细胞中, *p19^{ARF}* 表达时, *Tp53* 表达突变的转化子表现凋亡症状。而在 *ARF* 缺失以及 *p53* 缺失的鼠前 B 细胞中不表现凋亡特征^[3]。

另外在复制衰老的细胞中, 也发现 *ARF* 蛋白的积累, 说明 *ARF* 的过表达与 *p16* 一样, 也可诱导细胞进入衰老。而且越来越多的研究表明在某些特定的组织或是细胞株中, *ARF* 蛋白的抑瘤作用较 *p16* 更明显。如鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryo fibroblasts, MEFs) 中 *p16* 的失活对于细胞增殖或 G1 期细胞的检验点影响不是很强烈, *p16* 基因突变时, MEFs 细胞的增殖率同野生型相比没有很大改变, 小鼠肿瘤形成倾向也不明显, 生长龄为 17 个月的小鼠肿瘤形成率为 16.7%。MEFs 细胞的衰老也主要是通过 *ARF/p53* 通路或者是不依赖 *p16* 的 *pRb* 途径, 当 *ARF* 基因纯合子缺失时, MEFs 细胞衰老比率很低^[4, 5]。

2 *ARF* 基因的表达调控

绝大多数正常组织中, *ARF* 的表达水平非常低。如鼠中, 只有一些成体组织通过 RT-PCR 的方法, 才能检测到 *ARF* 的表达。但是在异常促有丝分裂信号 (也包括一些原癌蛋白过表达信号) 的

刺激下 *ARF* 基因被激活, 表达水平升高 (图 2)。

原癌基因 *Ras* 过表达能激活 *ARF* 基因的表达。Ras 调节 Raf/MEK/ERK 激酶通路激活 CDK/cyclin 激酶, 从而磷酸化成视网膜细胞瘤蛋白 (retinoblastoma protein, pRB), 释放 E2F-1。E2F-1 与 *ARF* 启动子上的结合位点结合, 刺激 *ARF* 表达, 抑制 MDM2 的活性, 上调 *p53* 的水平。*MDM2* 基因有 2 个启动子: 上游组成型启动子 P1, 与 *p53* 活性无关; 内部启动子 P2, 与 *p53* 活性直接相关。Ras/Raf/MEK/MAP 还可以通过激活结合在 P2 启动子 AP-1 和 Ets 元件上的转录因子, 诱导 *MDM2* 大量表达, 从而使 *p53* 水平下调。因此在 Ras 的刺激下, 细胞中 *p53* 的水平通过两种调节互相平衡^[6]。

转录因子激活蛋白-1 (activating protein 1, AP-1) 包括三个亚类: Jun, Fos, ATF。AP-1 尤其是 Jun 亚类能调节 *ARF* 的表达水平, 其中 JunB 能够上调 *ARF* 表达水平^[7]。有报道表明 Myc, E1A, v-Abl 能激活 *ARF* 的表达。DMP1 (a cyclin D-binding Myb-like protein) 也具有调节 *ARF* 表达的功能。DMP1 首先作为 cyclinD2 互作蛋白而被分离出来。DMP1 能结合并反式激活 *ARF* 的启动子, 上调 *ARF* 蛋白的水平, 通过 *p53* 作用, 激发了凋亡反应或细胞周期的阻断。在 DMP1 缺失的鼠成纤维细胞中, 不管是 Ras 还是复制衰老的信号刺激都不能诱导 *ARF* 的表达^[8]。

ARF/p53 通路的相关基因缺失或突变时会导致该通路的下调。如 *p53/ARF* 通路在 *ARF* 和 *p53* 缺失或 MDM2 过表达时下调。

最近有研究表明原癌基因 *Bmi-1* 与 *ARF/p53* 通路的下调有关。*Bmi-1* 属于染色体沉默子 Polycomb 家庭成员, 位于染色体 10p13。当过表达时, 会抑制 *INK 4a/ARF* 启动子的活性。*Bmi-1* 不仅能下调 *INK 4a/ARF* 基因的活性, 还能与原癌基因如 *c-Myc* 作用抑制肿瘤形成^[9]。在鼠淋巴瘤细胞中, *Bmi-1* 与 *c-Myc* 协同作用, 作为 *INK 4a/ARF* 位点转录抑制子, 参与细胞周期和衰老的调节。Jacqueline 实验发现 *Bmi-1* 纯合子缺失的淋巴细胞凋亡水平升高, 而在 *ARF* 缺失或 MDM2 过表达时得到缓解。在 *Eμ-Myc* 鼠中, *Bmi-1* 杂合子缺失, *c-Myc* 表达增强, 诱导细胞凋亡, 淋巴瘤形成率下降^[10]。

螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix, HLH) 转录调节蛋白 Id1 通过 HLH 区域可以抑制 *p16^{INK4a}* 启

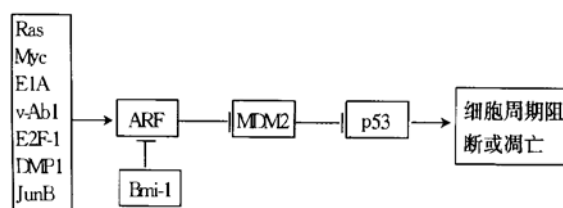


Fig. 2 The regulation factors of ARF

图 2 *ARF* 的调节因子

动子的活性,但不能抑制 *ARF* 启动子的活性^[11].

另外在 *ARF*/p53 与 p16/pRb 两个调节通路之间也存在多水平的通讯. 细胞周期的调控因子互相作用, 形成一个错综复杂的调控网络. 例如当 pRb 失活时, p53 被激活. p21^{Cip1} 的表达又被 p53 转录性的激活, p21^{Cip1} 抑制 CDK2/A-E 激酶的活性, 影响 pRb 磷酸化的水平. 磷酸化的 pRb 释放 E2F-1, E2F-1 能诱导 *ARF* 的表达.

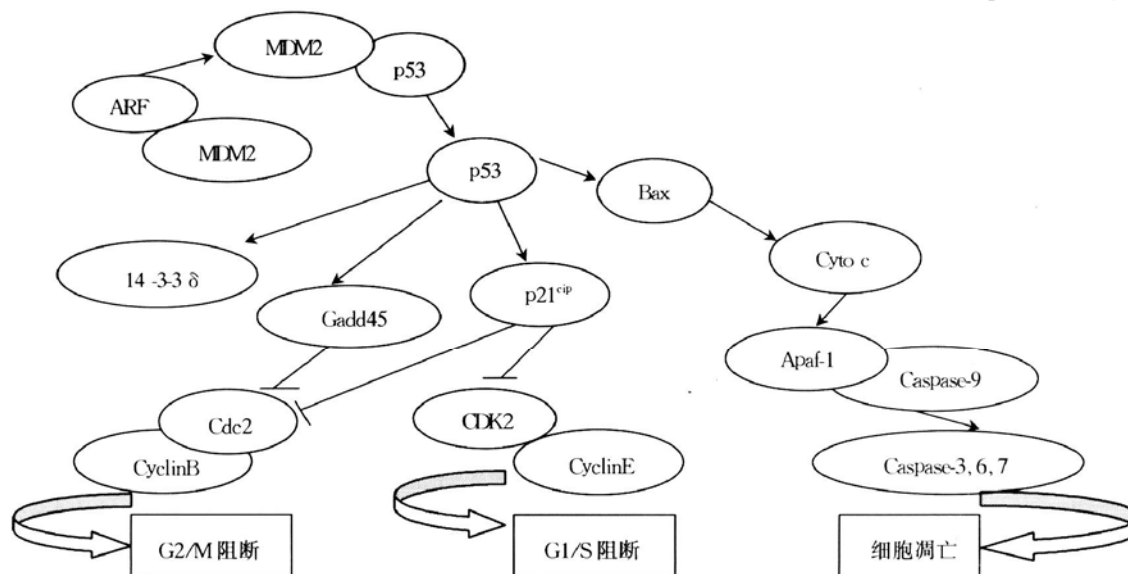


Fig. 3 The *ARF*/p53 pathway

图3 *ARF*/p53 调节通路

p53 激活 p21^{Cip1} 及生长阻断和 DNA 损伤诱导 (growth arrest and DNA damage inducible, *Gadd45*) 基因的转录. *Gadd45* 与 p21^{Cip1}, 增殖细胞核抗原 (proliferation cell nuclear antigen, PCNA) 结合, 抑制细胞的增殖, 将细胞周期阻断在 G1 期和 G2/M 期.

正常情况下, 细胞中 *ARF*, MDM2 和 p53 水平很低. *ARF* 存在于核仁中, p53 与 MDM2 主要存在于核质中. MDM2 是一种多功能的原癌蛋白, 能够结合在 p53 四聚体转录活性区域, 抑制 p53 相关基因的表达. 它主要通过三种途径负调节 p53^[13]: a. 干扰 p53 反式激活靶基因的能力; b. 具有泛素连接酶的作用, 泛素化 p53, 使 p53 降解; c. 使 p53 从细胞核转运到细胞质, 在蛋白体 (proteasomes) 中降解.

ARF 能拮抗 MDM2 上述的所有功能. 当 *ARF* 被诱导或过表达时, *ARF* 蛋白在核质中捕获 MDM2, 将之导入核仁, 阻止 MDM2 的转运作用, 使 p53 在核质中积累. Rizos^[14] 发现将人黑色素瘤

3 *ARF* 对细胞周期的调控作用

细胞中 p14^{ARF} 和 p19^{ARF} 基因过表达时, 会将细胞周期阻断在 G1 期与 G2/M 期. 不少文献报道 *ARF* 的细胞周期阻断作用依赖肿瘤抑制因子 p53. 当 p53 被病毒原癌蛋白中和或 p53 显性突变失活时, *ARF* 失去其抑制作用^[12]. p53 具有序列特异性转录因子的功能, *ARF* 能激发 p53 反应 (图 3).

细胞中 *INK4a/ARF* 基因的外显子 1 β 中插入 16 bp 的碱基, p14^{ARF} 基因插入失活, 突变后的 p14^{ARF} 被限定在细胞质中, 不能稳定 p53, p53 失去抑制肿瘤生长的功能. 最近发现 *ARF* 能与 DNA 复制蛋白 A (RPA32) 结合. 当 *ARF* 过表达或 p53 基因缺失时, *ARF* 与 RPA32 结合加强, 使 DNA 合成速率下降, 引起细胞周期 S 期的阻滞^[15].

ARF 蛋白最保守的区域在 N 端, 由 exon1 β 编码, 是 *ARF* 蛋白与 MDM2 的结合区. 鼠 p19^{ARF} 的 N 端也和 p53 有很低的亲和力, 因此在鼠细胞中不仅存在 *ARF*-MDM2 二元复合物, 还可能存在 *ARF*-MDM2-p53 三元复合物. 关于人 p14^{ARF} 与 p53 的结合还未见报道, 可见 *ARF* 拮抗 MDM2 的功能, 主要是依赖于 *ARF*-MDM2 二元复合物^[16].

鼠 p19^{ARF} 的 N 端 62 个氨基酸序列还与 MDM2 在核仁中定位, 诱导细胞周期阻断有关. 其中 26 ~ 37 氨基酸范围内的短肽对于 MDM2 在核仁中定位十分重要. 而人 p14^{ARF} 与 MDM2 定位有关的是

N 端 83~ 100 个氨基酸的短肽。

p19^{ARF} (氨基酸 26~ 37) 与 p14^{ARF} (氨基酸 83~ 100) 与其他核仁蛋白一样富含精氨酸特征序列。如果这些序列缺失, 不能诱导 p53 在核质中积累。而且 N 端短肽片段和完整的 ARF 蛋白一样, 能够诱导凋亡和细胞周期的阻断。

4 ARF 与细胞凋亡

哺乳动物细胞的凋亡通路主要有两种: 一种是细胞表面死亡受体介导的细胞凋亡, 另一种是以线粒体为核心的细胞凋亡通路。ARF/p53 介导的细胞凋亡主要依靠第二种凋亡通路。ARF 与 MDM2 结合, p53 水平升高, p53 激活 Bax, 导致线粒体释放细胞色素 c (Cyto c)。Procaspase-9 被 Apaf-1 活化, 活化的 caspase-9 激活下游激酶 caspase-3, caspase-6, caspase-7, 诱导细胞的凋亡 (图 2)。Christine 等报道 ARF/p53 能介导 Myc 诱导的凋亡反应, 抑制 *E μ -Myc* 转基因小鼠的淋巴瘤的形成。而 Bax 也具有相同的作用, Bax 缺失的前 B 细胞能抵制凋亡作用, 加速淋巴瘤的形成。但是 Bax 抑瘤作用依赖 p53 而和 ARF 无关。Bax 的缺失并不影响 *E μ -Myc* 转基因小鼠淋巴瘤中 ARF 的缺失频率, 也不改变 ARF 缺失的小鼠肿瘤形成率。这说明 *E μ -Myc* 转基因小鼠淋巴瘤中 Bax 与 ARF 不在同一个调控通路上或者说 Bax 与 ARF 虽然在同一个调控通路, 但 Bax 与 ARF 没有相互作用^[9]。新近发现哺乳动物中 IAP 的抑制剂 Smac (second mitochondria-derived activator of caspase), 或 DIABLO (direct IAP-binding protein with low PI) 能够与 IAPs (XIAP, ϵ -IAP-1, ϵ -IAP2 和 Survivin) 结合, 并活化 caspase-9, 还能诱导 procaspase-3 的水解, 促进成熟的 caspase-3 的酶活性。Smac/DIABLO 是正常的线粒体蛋白, 在凋亡时释放到胞质, 与 Cyto c 的释放极为相似。但 p53 或 ARF 是否与 Smac 相互作用还未见报道。

虽然 ARF 和 p53 在同一条调节通路, 也有报道 p53 介导的凋亡不依赖 ARF。如 γ 射线 (gamma irradiation) 诱导的细胞凋亡是 p53 途径, 但是在 ARF 缺失的细胞中也有发生^[17]。另外 Tsai 等^[18]报道在 *Rb* 纯合子缺失的鼠胚胎中 p53 介导的凋亡不依赖 ARF, 但是需要 E2F-1, E2F-3 和 Id2 的调节作用。也有相同的报道^[19], 在转基因的小鼠脑肿瘤模型中, pRb 通路失活, p19^{ARF} 基因的缺失对 p53 诱导的凋亡和肿瘤抑制作用没有影响。

5 结 语

目前对 *INK4a/ARF* 基因的研究虽然取得了很大的进展, 但是还存在一些尚待解决的问题。如: 对 ARF 基因表达调控还不是十分清楚; 除了 p53 调节通路外, ARF 是否还存在其他的调节通路? 有报道表明蛋白磷酸酶 1 催化亚基的调节亚基 spinophilin/neurabin II 能特异与 ARF 相互作用调控细胞周期。说明 ARF 与 spinophilin 可能有部分交叉通路^[20]。此外人们对 ARF 的研究多集中于对 p19^{ARF} 的研究, 而对 p14^{ARF} 的研究还只是起步阶段。因此进一步研究 ARF 基因的调控功能, 无疑对肿瘤发生, 发展以及治疗上会提供新的思路和线索。

参 考 文 献

- 1 Stott F J, Bates S, James M C, *et al.* The alternative product from the human CDKN2A locus, p14^{ARF}, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J*, 1998, **17** (17): 5001~ 5014
- 2 Serrano M. The *INK4a/ARF* locus in the murine tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 2000, **21** (5): 865~ 869
- 3 Radfar A, Unnikrishnan I, Lee H W, *et al.* p19 (ARF) induces p53-dependent apoptosis during abson virus-mediated pre-B cell transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (22): 13194 ~ 13199
- 4 Krimpenfort P, Quon K C, Mooi W J, *et al.* Loss of p16 confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature*, 2001, **413** (6851): 83~ 86
- 5 Sharpless N E, Bardeesy N, Lee K-H, *et al.* Loss of p16INK4a with relation of p19ARF predisposes mice to tumorigenesis. *Nature*, 2001, **413** (6851): 86~ 91
- 6 Ries S, Biederer C, Woods D, *et al.* Opposing effects of Ras on p53: transcription activation of MDM2 and induction of p19^{ARF}. *Cell*, 2000, **103** (2): 321~ 330
- 7 Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 2001, **20** (19): 2390~ 2400
- 8 Inoue K, Roessel M F, Sherr C J. Induction of ARF tumor suppressor gene expression and cycle arrest by transcription factor DMP1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (7): 3993~ 3998
- 9 Eischen C M, Roussel M F, Korsyey S J, *et al.* Bax loss impairs Myc-induced apoptosis and circumvents the selection of p53 mutation during Myc-mediated lymphomagenesis. *Mol Cell Biol*, 2001, **21** (22): 7653~ 7662
- 10 Jacobs J J L, Scheijen B, Voncken J W, *et al.* Bmi-1 collaborates with c-myc in tumorigenesis by inhibiting c-myc-induced apoptosis via *INK4a/ARF*. *Genes & Development*, 1999, **13** (20): 2678~ 2690
- 11 Alani R, Young A Z, Shifflett C B. Id1 regulation of cellular senescence through transcriptional repression of p16/INK4a. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (14): 7812~ 7816
- 12 Pomerant J, Schreiber Agus N, Liégeois N J, *et al.* The *INK4a* tumor suppressor gene product, p19^{ARF}, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*, 1998, **92** (6): 713~ 723

- 13 Sherr C J, Weber J D. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Deve*, 2000, **10** (1): 94~ 99
- 14 Rizos H, Puig S, Badenas C, *et al.* A melanoma-associated germline mutation in exon 1b inactivates p14^{ARF}. *Oncogene*, 2001, **20** (39): 5543~ 5547
- 15 Yarbrough Wg, Bessho M, Zanation A, *et al.* Human tumor suppressor ARF impedes S-phase Progression independent of p53. *Cancer Res*, 2002, **62** (4): 1171~ 1177
- 16 Zhang Y P, Xiong Y, Yarbrough W G, *et al.* ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the RB and p53 tumor suppression pathways. *Cell*, 1998, **92** (6): 725~ 734
- 17 Kamijo T, Zindy F, Roussel M F, *et al.* Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19^{ARF}. *Cell*, 1997, **91** (5): 649~ 659
- 18 Tsai K T, Macpherson D, Rubinson D A, *et al.* ARF is not required for apoptosis in Rb mutant mouse embryos. *Curr Biol*, 2002, **12** (2): 59~ 63
- 19 Tolbert D, Lu X, Yin C, *et al.* p19 (ARF) is dispensable for oncogenic stress-induced p53-mediated apoptosis and tumor suppression *in vivo*. *Mol Cell Biol*, 2002, **22** (1): 370~ 377
- 20 Vivo M, Calogero R A, Sansone F, *et al.* The human tumor suppressor arf interacts with spinophilin/neurabin II, a type protein phosphatase-binding protein. *J Biol Chem*, 2001, **276** (17): 14161~ 142619

Progress in The Tumor Suppressor, ARF*

PENG Li-Xia, ZHANG Wei, HE Da-Cheng, LIU Hu-Tu**

(Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology of Ministry of Education, College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract The *INK4a/ARF* gene locus on human chromosome 9p21, is one of the most frequent targets of inactivating mutations in the human tumors. Containing two different promoters, *INK4a/ARF* can encode two distinct proteins in alternative reading frames, p16^{INK4a} and p14^{ARF} (the mouse homologues is called p19^{ARF}). p16 is a recognized tumor suppressor that induces a G1 cell cycle arrest by inhibiting the phosphorylation of pRb by CDK4/6. While ARF inhibits oncoprotein MDM2, resulting in the stabilization of p53. These activities of ARF promote p53-mediated G1 and G2/M cell cycle arrests or apoptosis. So just like p16, the ARF protein also acts as a tumor suppressor.

Key words ARF/p53, cell cycle arrest, apoptosis

* This work was supported by a grant from The National Basic Research Programs of China (G1999053901).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62209699, E-mail: liuhuitu@bnu.edu.cn

Received: April 16, 2002 Accepted: June 5, 2002