



E3 泛素连接酶接头蛋白 SPOP 抑制子宫内膜癌研究的进展*

庄慧^{1,2)**} 林子涵^{1,2)**} 林婷^{1,2)**} 曹心怡^{1,2)} 金晓锋^{1,2)***}

(¹) 宁波大学医学院生物化学与分子生物学系, 宁波 315211; (²) 浙江省病理生理学技术研究重点实验室, 宁波 315211)

摘要 子宫内膜癌 (endometrial cancer, EC) 是最常见的妇科恶性肿瘤, 其发病率逐年上升. 近年来, 随着靶向治疗在临床上的广泛应用, 探索与研究新靶点成为实现子宫内膜癌精准治疗的重要一环. 越来越多的研究发现, E3 泛素连接酶斑点型锌指结构蛋白 (speckle-type POZ protein, SPOP) 对子宫内膜癌的发生发展起到了重要的抑制作用. 本文将介绍泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) SPOP 的结构、功能, 探讨调控和影响 SPOP 的因素以及 SPOP 在子宫内膜癌中的突变情况和相关底物. 重点围绕 SPOP 的下游三条信号通路: 雌激素受体 α (estrogen receptor- α , ER α) 介导的信号通路、溴结构域和端外蛋白 (bromodomain and extraterminal protein, BET) 通路及锌指和 BTB 结构域蛋白 3 (zinc finger and BTB domain-containing protein 3, ZBTB3) 通路, 对它们抑制子宫内膜癌发生发展的分子机制进行总结, 以期 SPOP 作为新的子宫内膜癌治疗靶点提供理论基础.

关键词 子宫内膜癌, 泛素化修饰, SPOP, 突变

中图分类号 Q7, R737.33

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0287

1 子宫内膜癌的治疗和研究现状

子宫内膜癌是最常见的妇科恶性肿瘤, 每年确诊新病例近 32 万^[1]. 据统计, 发达国家子宫内膜癌的发病率高于发展中国家, 然而由于医疗水平的差异, 发展中国家子宫内膜癌的死亡率远高于发达国家^[2]. 近年来, 子宫内膜癌的发病率在许多发展中国家呈上升趋势.

子宫内膜癌起源于子宫腔的上皮层^[1, 3], 可分为 I 型和 II 型, 前者以子宫内膜样癌为主, 后者包括透明细胞癌、浆液性癌等. 其中, 浆液性子宫内膜癌患者的死亡率高达 39%, 其临床侵袭能力较强, 治疗效果不佳, 预后较差^[4].

目前对于子宫内膜癌的治疗首选以手术切除为主, 进而根据手术病理分期以及组织学分级的不同辅之以放疗、化疗. 对于雌激素受体和孕激素受体阳性的患者, 也可以考虑用内分泌治疗^[5]. 研究表明, 抗雌激素药物他莫昔芬 (Tamoxifen, TAM) 对雌激素受体阳性的乳腺癌患者治疗具有显著成

效, 但对于子宫内膜癌则疗效不大, 甚至可能导致子宫内膜癌发病率的增加^[6], 而芳香化酶抑制剂、植物雌激素等内分泌治疗手段对子宫内膜癌是否有效仍需要进一步的临床证明. 这些治疗手段对于提高子宫内膜癌患者生存率固然有效, 然而对于子宫内膜样腺癌 III 期及 IV 期患者来说, 传统的手术治疗和放疗化疗辅助治疗并不能提高患者的生存率, 其预后较差^[7]. 浆液性子宫内膜癌是一类非典型的子宫内膜癌, 它产生于子宫内膜萎缩且不对激素敏感, 病因学上将其归类为 II 型子宫内膜癌^[8], 这类子宫内膜癌恶性程度高, 早期易发生转移, 目前其治疗依旧处于探索阶段 (表 1).

近年来, 随着包括泛素-蛋白酶体途径在内的

* 浙江省自然科学基金 (LY20C070001), 浙江省病理生理学技术研究重点实验室校医联合基金 (201901), 国家自然科学基金 (31801165) 和王宽诚基金资助项目.

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0574-87609951, E-mail: jinxiaofeng@nbu.edu.cn

收稿日期: 2020-08-06, 接受日期: 2020-10-23

分子生物学的不断发展，子宫内膜癌的分子靶向治疗逐渐成为了研究热点. 有研究发现，E3 泛素连接酶的接头蛋白 SPOP (Speckle-type POZ protein) 在浆液性子宫内膜癌中发生高频点突变，在子宫内膜

癌其他亚型中也同样发现了 SPOP 的突变^[9]，探讨 SPOP 突变导致子宫内膜癌发生发展的分子机制，从而寻求新的治疗靶点，成为越来越多研究人员的探索方向.

Table 1 Classification and treatment of Endometrial cancer

表1 子宫内膜癌的分型及其治疗手段

分型	组织学类型	治疗手段
I 型	内膜样癌为主	筋膜外全子宫切除+双附件切除（高位切断骨盆漏斗韧带） 盆腔及腹主动脉旁淋巴结切除（至肠系膜下动脉的水平） 腹腔镜辅助下经阴道全子宫切除加腹腔镜下淋巴结切除术 ^[10-11] 术后辅以放疗、化疗、激素治疗
II 型	浆液性癌，透明细胞癌	采用全面、彻底的手术切除原则，尽量使残留灶直径≤1cm 腔内腔外联合放疗 TC方案化疗 ^[12]

2 泛素-蛋白酶体系统 (UPS)

在正常人体中，调控细胞增殖以及活力的蛋白质需要通过及时表达并被准确修饰来维持其正常功能，当这些蛋白质表达或修饰异常时就有可能导致细胞的过度增殖并引发细胞癌变. 因此，为了防止这一现象的发生，这些蛋白质需要通过某一途径被有效地降解. 研究表明，胞内靶蛋白的降解主要通过泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 完成，UPS 是一种存在于所有真核细胞中的多催化细胞质和核蛋白复合物，主要负责非溶酶体途径的蛋白质水解并维持细胞中正常的蛋白质稳态^[13]. 它由泛素 (ubiquitin, Ub)、泛素活化酶 (ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素结合酶 (ubiquitin-conjugating enzyme, E2)、泛素-蛋白连接酶 (ubiquitin-protein ligase, E3)、26S 蛋白酶体和泛素解离酶 (deubiquitinating enzymes, DUBs) 等组成^[14]. 其中，E1 能够水解 ATP，并在自身的活性位点半胱氨酸 (Cys) 和泛素 C 末端 76 位谷氨酸 (Gly76) 之间形成高能硫酯键，从而激活泛素，E2 能够结合泛素，并在 E1 和 E3 之间往返，使三者的功能形成一个整体，E3 具有特异性识别底物的能力，并能够催化泛素分子从 E2 转移到靶蛋白上，使靶蛋白被泛素化 (图1).

研究表明，在肿瘤发生发展过程中，恶性肿瘤细胞中的原癌蛋白表达异常且稳定性增加，而这种现象一般通过两种方式来实现：a. 原癌基因本身发生突变，从而逃逸了蛋白酶体途径的降解；b. UPS

中负责识别并对原癌蛋白进行泛素化修饰的 E3 泛素连接酶发生突变，从而失去了识别原癌蛋白的能力，造成原癌蛋白无法被降解. 原癌蛋白的不断累积则会导致肿瘤细胞增殖及存活能力的增强，并不断推进肿瘤进程^[15]. 也就是说，当 UPS 发生异常时，肿瘤发生的概率大大增加. 有研究数据提到，大约 36.5% 的浆液性肿瘤有变异的染色质重构基因，大约 35% 有突变的泛素连接酶复杂基因，这也进一步说明 UPS 相关基因的突变，特别是 E3 泛素连接酶相关基因的频繁突变是导致恶性子宫内膜癌发生的重要原因之一^[16].

SPOP 作为 Cullin3 (Cul3) 家族 E3 泛素连接酶的接头蛋白，目前已有许多研究证明其突变与子宫内膜癌发生之间的关联. 本文将从 SPOP 蛋白的结构与功能、子宫内膜癌中 SPOP 基因的突变情况、SPOP 突变介导子宫内膜癌发生发展的具体分子机制等方面作一综述.

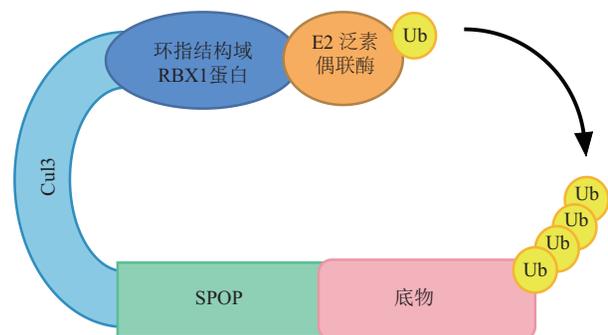


Fig. 1 Components of cul3 E3 ligases
图1 E3泛素连接酶的组成

3 SPOP蛋白的结构与功能

SPOP 蛋白由 374 个氨基酸残基组成, 相对分子质量为 42 ku, 主要结构域包括 N 端的底物结合

结构域 MATH (28~166 位氨基酸残基)、与 Cul3 相互作用的 BTB 结构域 (186~300 位氨基酸残基)、BACK (300~359 位氨基酸残基) 和 C 末端的核定位 (NLS) 序列 (365~374 位氨基酸残基)^[17] (图 2)。

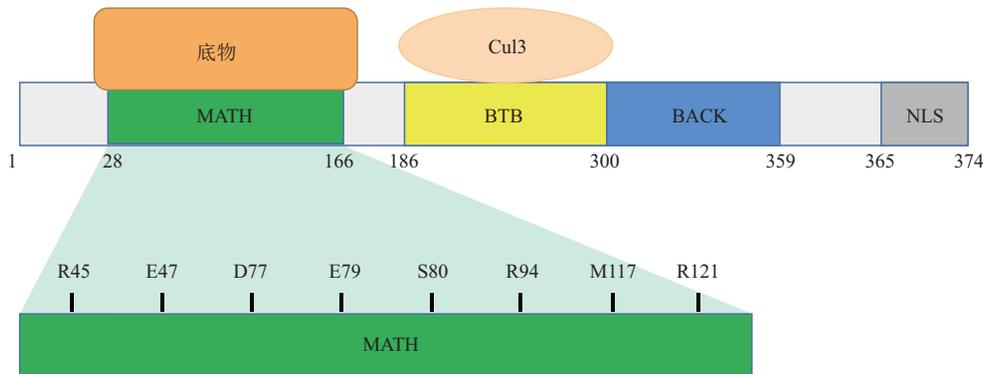


Fig. 2 The diagram of SPOP protein and the distribution of most common mutation in the SPOP gene found in endometrial cancer

图2 SPOP 蛋白的结构以及子宫内膜癌中高频突变位点示意图

MATH 结构域包括两条反向平行的 β 折叠, 底物与其结合在其中一条 β 折叠的表面长浅沟中^[17]. 被 MATH 结构域识别的底物通常具备特异的 SBC 基序 (SPOP-binding consensus motif), 该特异的 SBC 基序需符合 Ω - π -S-S/T-S/T (Ω =非极性氨基酸, π =极性氨基酸, S=丝氨酸, T=苏氨酸)^[18]. MATH 结构域是 SPOP 识别底物的区域, 也是大多数癌症相关的 SPOP 突变位置^[19]. 多项研究发现: SPOP 的底物参与各种基本的细胞功能活动, 如凋亡域相关蛋白 (death domain-associated protein, Daxx) 参与细胞转录、细胞周期和凋亡^[20], Hedgehog 信号转录因子胶质瘤相关癌基因 2 (glioma-associated oncogene 2, Gli2) 和 Gli3^[21]、p160 类固醇受体共激活因子 3 (steroid receptor coactivator-3, SRC-3)^[22] 及雄激素依赖性的转录因子雄激素受体 (androgen receptor, AR) 参与细胞的信号转导^[23], 野生型 ETS 相关基因蛋白 (ETS-associated gene, ERG)^[23]、特异性抑制溴结构域蛋白 (bromodomain and extra-terminal, BET)^[23-26]、内质网应激相关因子 (DNA-damage inducible transcript 3, DDIT3) 在内质网应激时转入细胞核内, 调控凋亡基因的表达, 维持细胞稳态^[27], 雌激素受体 α (estrogen receptor- α , ER α) 是一种核转录因子, 介导雌激素刺激的细胞

增殖在激素反应的癌症^[28-29], 锌指和 BTB 结构域蛋白 3 (zinc finger and BTB domain-containing protein 3, ZBTB3) 调控 Hedgehog 信号途径^[30].

BTB 结构域是一种常见的结构要素, 存在于能和锌指转录因子和 Cul3 底物结合的物质中^[31]. BTB 结构域在 SPOP 中发挥两种作用: 一是使 SPOP 二聚体化, 发挥介导 SPOP 二聚体化的是 BTB 结构域上的 L186、L190、L193 和 I217 四个残基; 二是与 Cul3 相互作用, 进而泛素化修饰底物, 调控底物的蛋白质水平^[18]. BACK 结构域由两部分构成 (3-box 和 C 端的 Kelch), 3-box 的功能是促进 Cul3 和 BTB 结构域的结合及相互作用^[18]. 另外, BACK 结构域介导 SPOP 二聚体之间的聚合, 使之成为线性寡聚物, 该聚合由 BACK 结构域上的残基 Y353 完成^[14] (图 3). 综上所述, BTB 结构域介导 SPOP 成为二聚体, BACK 结构域介导 SPOP 之间连接形成寡聚物, 由于这种特殊的线性寡聚物结构, SPOP 结构域可以募集底物并延长泛素链, 使其灵活变动方向, 从而获得更高的亲和力并和更多的构象选择来介导泛素化。

但是, SPOP 如何聚集到底物并被招募至核体的机制尚不清楚. 近来, 有研究表明相分离 (phase-separated) 对于某些底物的泛素化修饰效率至关重要^[31]. 相分离描述的是一种细胞里不同成

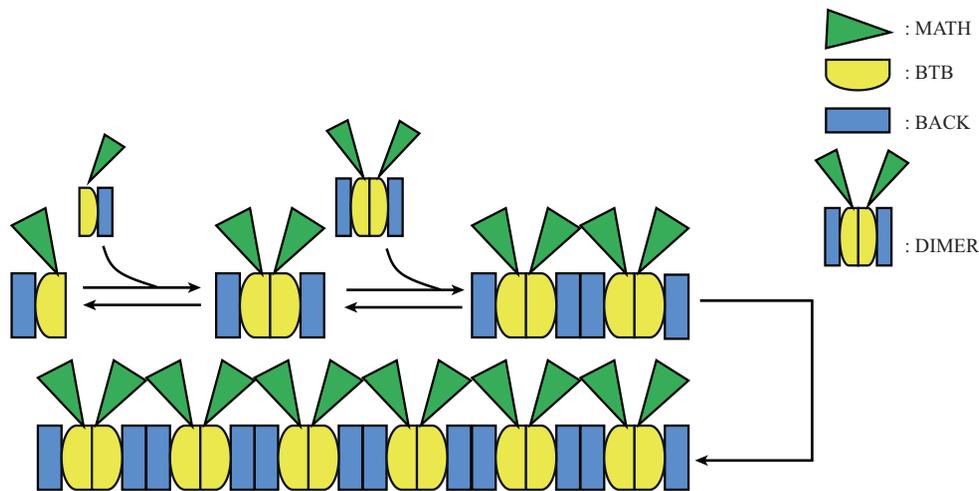


Fig. 3 The oligomer formation process of SPOP

图3 SPOP 形成寡聚物过程示意图

分间相互碰撞、融合形成液滴，从而使一些成分被包裹在液滴内、一些成分被阻隔在液滴外的现象。蛋白质或RNA分子间的物理作用力可以使它们相互分开或聚集。一旦分子达到一定浓度，它们就会发生相分离，相似的成分聚集在一起加速生物学反应，或者隔离无关的分子。目前发现SPOP的相分离和其自身及底物的结构有关。首先，底物和SPOP的相分离是由底物中的多个SBC基序与寡聚化SPOP中的多个MATH结构域相互作用所介导的，底物具有多个SBC基序是介导SPOP相分离的驱动因素。其次，SPOP通过BTB形成二聚体，再通过BACK结构域形成线性寡聚物，这种自我联结的方式能够促进其相分离和与底物共定位，是介导SPOP相分离的必要因素^[31]，后期研究者除了关注集中于MATH结构域的突变外，对于BTB和BACK结构域的突变也需额外关注。

4 调控和影响SPOP的因素

SPOP的功能受多种过程的影响（图4a），SPOP转录受到甲基化SPOP启动子活性的直接调控^[32]，SPOP基因上游167 bp处的DNA甲基化改变转录因子RXRA与SPOP启动子之间的结合亲和力，导致SPOP表达下调，进而导致结直肠癌的发生发展和转移^[32]。

另外，有研究发现，几种微小RNA（microRNAs, miRs）调节SPOP在人类癌症中的

表达。SPOP的表达在结肠、乳腺、宫颈和肝癌细胞等多种癌细胞株内和miR-145水平呈负相关^[33]。miR-145通过靶向SPOP转录本3'非翻译区域（3' untranslated regions, 3' UTR）的保守假定结合位点来降低内源性SPOP水平^[34]。与此相似的是，miR-543则直接靶向SPOP转录本3' UTR，降低SPOP水平，促进胃癌的侵袭迁移^[35]。另一项研究表明，miR-372、miR-373可能通过抑制SPOP增强结直肠癌干细胞的分化能力^[35]。

缺氧诱导因子（hypoxia-inducible factors, HIFs）通过激活下游靶基因的转录，在癌细胞对缺氧应激的反应、维持细胞存活和生长中起着重要作用^[34]。值得注意的是，SPOP是肾透明细胞癌中HIFs的直接转录靶点，缺氧可能导致SPOP在细胞质内的积累，促进SPOP介导的对肿瘤抑制剂的泛素化和降解，诱导肿瘤的发生^[36]。

SPOPL是人体蛋白质中除SPOP外唯一具有MATH-BTB结构域的蛋白质，与SPOP的序列具有85%的相似性，SPOP和SPOPL最显著的差别就是在SPOPL的BACK结构域有一处18个氨基酸的插入，SPOPL同样具有BACK结构域，意味着它也可以和SPOP结合，但是SPOPL的BACK结构域中18个氨基酸组成的保守元件破坏了SPOP原有的寡聚结构，最终形成亲和力较低的CRL3复合体，抑制了SPOP的泛素化功能^[37]。

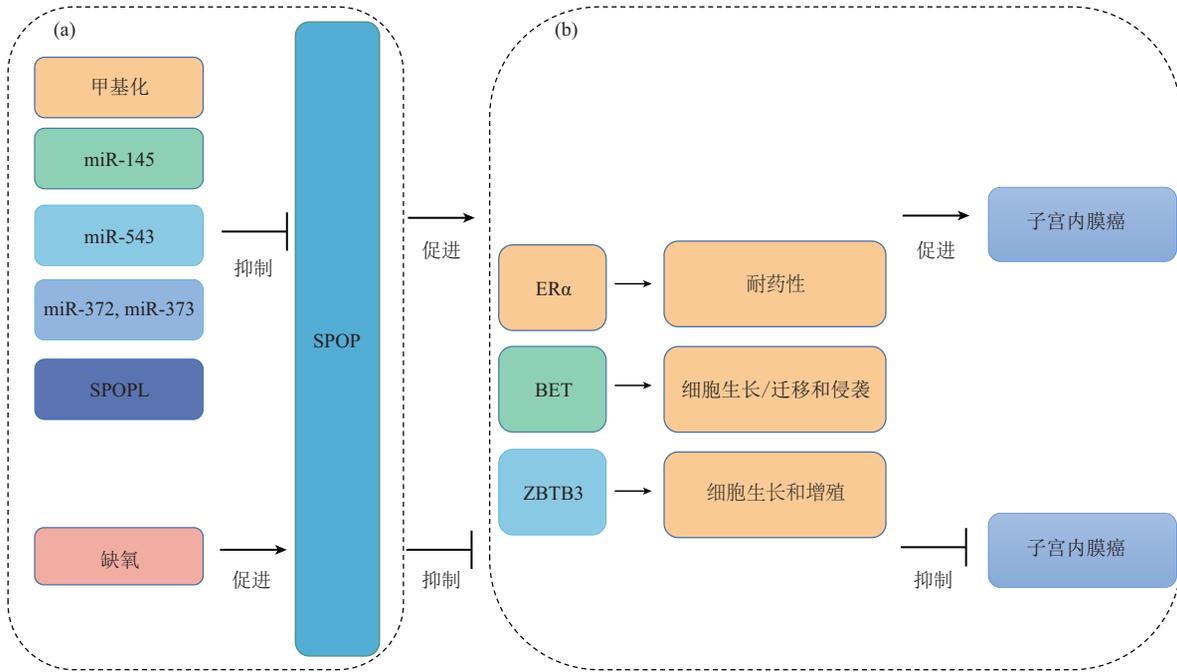


Fig. 4 The pathways of SPOP
图4 SPOP蛋白的调控信号通路示意图
 (a) SPOP的调节; (b) SPOP的下游通路.

5 SPOP 在子宫内膜癌发生发展中的作用

5.1 子宫内膜癌中 SPOP 基因突变的发现、突变率和突变位点

多项研究调查了 SPOP 在子宫内膜癌中的突变情况, 发现 SPOP 在子宫内膜癌中具有较高的突变率, 约 8%~17.9% 的子宫内膜癌具有 SPOP 突变^[38-40] (表 2). 子宫内膜癌中已发现的 SPOP 突变主要集中在与底物结合的 MATH 结构域, 这些突变显著改变了 SPOP 与底物结合的亲和力, 导致 SPOP 介导的泛素化功能失调^[38-40]. 通过研究检测, 得出子宫内膜癌中 SPOP 基因突变位点, 各研究中的子宫内膜癌中 SPOP 高频突变的位点分别为 E47K、R45L、D77Y、M117V、E79K、R121W、R121G、R121Q、Q120E、S80I、S80R、P94A^[38-40].

5.2 SPOP 与 ER α 依赖性通路

雌激素受体 α (estrogen receptor- α , ER α) 是一种重要的核转录因子^[41], 也是雌激素核受体的亚型之一, 属于固醇类激素受体蛋白超家族^[42], 它由 ESR1 基因编码, 介导包括子宫内膜癌在内的雌激素刺激细胞增殖的激素反应性癌症^[41].

Table 2 The mutation of SPOP in endometrial cancer
表2 子宫内膜癌中SPOP的突变

数据来源	突变情况 (突变率%)	突变氨基酸	实验材料
文献[38]	63例中有9例突变 (14.3)	E47K	组织
		M117V	
		R45L	
		D77Y	
		E79K	
		R121W	
文献[39]	28例中有5例突变 (17.9)	R121G	组织
		R121Q	
		Q120E	
		R121G	
		M117V	
文献[40]	75例中有6例突变 (8.0)	S80R	组织
		S80I	
		P94A	
		R121Q	

ER α 对男女生殖系统的发育、分化和正常功能表达有极大的影响, 是调节骨密度、脑功能和胆固醇运动的重要因子^[43]. 研究表明, ER α 主要表达的部位是子宫和垂体. 小鼠模型显示, ER α 基因敲除或突变的小鼠由于缺乏 ER α 导致其卵巢和子宫

功能受损且不能生育, 这进一步说明了ER α 主要作用于子宫和神经内分泌系统中^[44], 并在雌激素正常发挥功能方面有巨大作用.

ER α 的正常结构包含A、B、C、D、E、F几个区域. A/B区存在一个具有配体非依赖性的转录激活区 (ligand independent activation function 1, AF-1), 这一功能区可能通过参与雌激素和受体结合的过程来进一步调控雌激素应答基因的转录; C区即DNA结合域 (DNA binding domain, DBD), 这一区域能够与特定的DNA结合并转录靶基因; 在D区的作用下, DBD和DNA的结合作用更加稳定; E/F区被称为配体结合域 (ligand binding domain, LBD), E区参与了配体结合、受体二聚化等过程, 且具有另一个配体依赖的转录激活区 (ligand dependent activation function 2, AF-2), 这一区域在遇到不同雌激素时通过表现的构象不同来决定对靶基因转录的激活或抑制作用, 而F区的功能则尚不明朗^[42], 有报道称F区可能是转录激活和抗雌激素药物发挥作用的必需结构. 总而言之, 正常表达的ER α 可以与雌激素结合形成二聚体, 从而进一步作用于靶基因上的雌激素应答元件 (estrogen response element, ERE) 来改变基因的转录活性, 即激活或抑制转录^[42, 45].

研究显示, ER α 蛋白在子宫内膜癌、乳腺癌和卵巢癌中高度表达, 被称为癌症药物治疗最成功的分子靶点之一^[41]. 然而, 尽管抗雌激素疗法在雌激素敏感的癌症治疗方面取得了较大成功, 但有超过1/3的乳腺癌无法检测到ER α 蛋白, 这类ER α 阴性的乳腺癌诊断较晚且难以进行靶向治疗^[39], 患者预后较差, 在60%以上的卵巢癌中虽然能够检测到ER α 蛋白水平, 但抗雌激素疗法并不成功^[41]. 而在子宫内膜癌中控制ER α 表达的机制仍不清楚.

近年来, 有研究团队发现SPOP特异性识别ER α 并促进ER α 蛋白的泛素化修饰和蛋白酶体降解, 通过这种信号通路来抑制子宫内膜癌细胞的生长 (图4b). 研究表明, ER α 中多个富含丝氨酸/苏氨酸 (S/T) 的基序是SPOP介导的ER α 降解所必需的, 其中第3个富含S/T的基序发挥了最为关键的作用. SPOP特异性地识别位于ER α AF2结构域上的多个富含S/T的降解决定子, 并通过泛素-蛋白酶体途径来促进ER α 的降解. 富S/T基序突变的ER α , 特别是第3个富S/T基序突变的ER α 不能被SPOP识别, 从而逃脱了SPOP介导的泛素化降解,

并由此促进了子宫内膜癌的发生^[46]. 相应地, 迄今为止发现的所有子宫内膜癌相关的SPOP突变均集中在用于底物识别的MATH结构域, MATH结构域突变的SPOP均失去了与完整ER α 结合并泛素化降解的能力^[47-50] (图5).

此外, 研究人员还发现, 雌激素与ER α 之间的相互作用可以通过信号通路的交互作用 (crosstalk) 引发翻译后的ER α 修饰, 从而促进转录激活和泛素介导的ER α 蛋白水解, 同时具有泛素连接酶的双重作用, 这一新的机制观点无疑对雌激素反应敏感组织的传统定义提出了质疑^[41]. 的确, 实验证明, SPOP参与了雌激素诱导的ER α 泛素化与降解, 稳定过表达的野生型SPOP降低了子宫内膜癌细胞中ER α 靶基因GREB1的雌激素E2依赖性反式激活, 且雌激素增强了SPOP结合并降解完整ER α 的能力, 这种效应依然与S/T基序的介导密不可分^[46]. 对此一种可能的解释是, 雌激素与ER α 结合后改变了其构象, 从而影响其富S/T基序与SPOP的结合和随后的ER α 降解. 而抗雌激素药物虽然也能够引起ER α 的降解^[51-52], 但是这种途径与SPOP无关^[46].

包括子宫内膜癌在内的雌激素敏感型癌症的ER α 蛋白表达水平存在的变异性^[41]使得临床上靶向抗雌激素治疗有许多局限性, 而SPOP介导的ER α 降解型泛素化修饰抑制子宫内膜癌发生的分子机制无疑为临床靶向治疗子宫内膜癌提供了新的理论基础, 打开了新的治疗思路.

5.3 SPOP与BET蛋白通路

溴结构域和端外蛋白 (bromodomain and extraterminal protein, BET) 是溴结构域蛋白的一个亚类. BET家族主要包括BRD2、BRD3、BRD4、BRDT, 其结构域主要有: N端两个串联的溴结构域1 (bromodomain 1, BD1)、溴结构域2 (bromodomain 2, BD2)、端外结构域 (extraterminal, ET) 和C端富含Ser/Glu/Asp (SEED) 的结构域^[52]. BET蛋白在正常细胞内具有“表观遗传阅读器”的作用 (epigenetic reader), 它与组蛋白尾端乙酰化赖氨酸 (KAc) 残基结合, 精准调节染色质结构、基因表达, 从而促进细胞增殖, 是细胞周期进程的必要条件.

然而, BET功能异常会造成细胞生理功能紊乱, 常参与肿瘤的发生, 以及部分神经疾病、炎症的发生, 介导宿主细胞中潜在的病毒感染. 针对肿瘤的发生, 已发现癌细胞中BET蛋白改变方式有

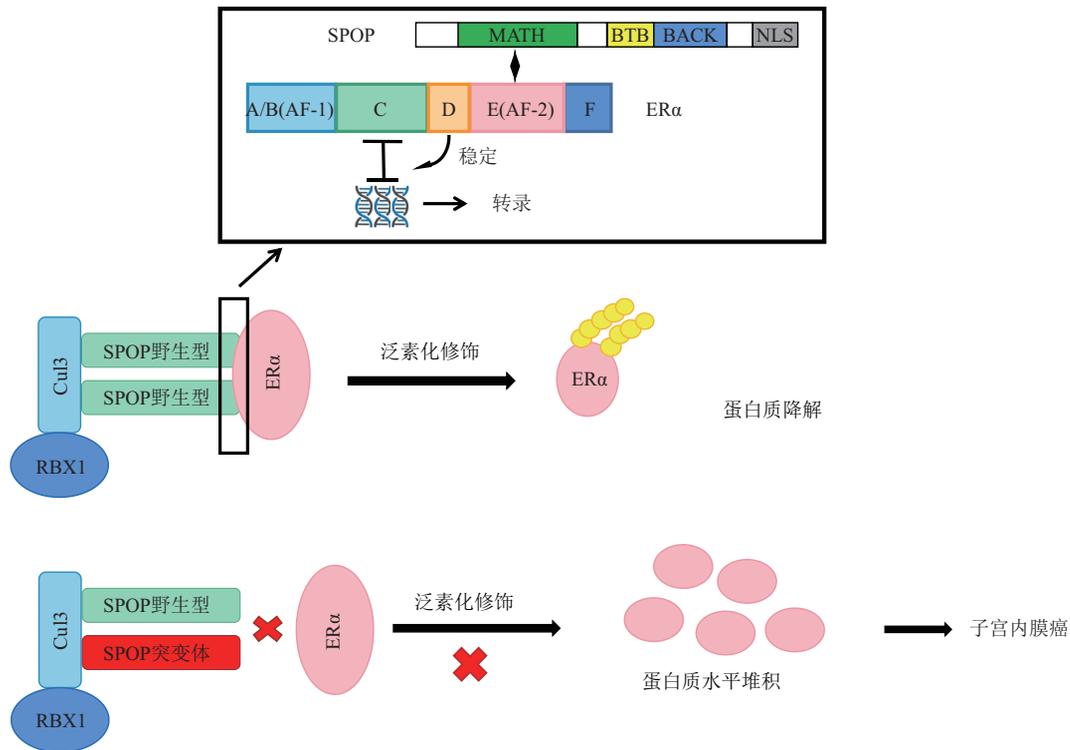


Fig. 5 SPOP – ER α pathway
图5 SPOP 与ER α 依赖性通路示意图

很多种, 如BET蛋白的过度表达和融合, 或者干扰与癌症相关的信号通路和转录程序, 以支持肿瘤的生长和存活^[53]. 例如ER阳性乳腺癌患者BRD2、3和4的高表达与较差的总体生存率相关^[54], 人类胃癌组织中BRD4高表达与无转移胃癌患者生存期缩短相关^[55]. NUT 睾丸癌 (NUT midline carcinoma, NMC) 是BET蛋白融合导致癌变的典型癌症, 其机制为异位融合BET蛋白 (BRD4-NUT或BRD3-NUT) 形成斑点状核病灶, 其中包含高乙酰化染色质域, 通过干扰上皮分化参与癌变^[55]. BET通过调节下游通路致病, 如通过激活c-MYC, 协同激活参与细胞分裂、代谢适应和生存的转录途径, 促进子宫颈癌^[56]、急性淋巴细胞白血病^[57]和前列腺癌^[58]等癌症的发生发展. BET蛋白也参与部分神经疾病的发生, 如青少年肌阵挛性癫痫 (JME), BRD2是该病的一个主要易感位点^[59]. BET能介导细胞内病毒感染, 如BET蛋白与乳头状瘤病毒互作, 将病毒基因组系在宿主有丝分裂染色体上^[55, 60], 使病毒在细胞内扩增.

BET蛋白在肿瘤生长中起着重要的作用, 目

前尚不清楚BET蛋白的致癌性, 但已明确BET蛋白具有癌症依赖性, 一些癌细胞依赖BET蛋白促进肿瘤的生长和生存^[61-62]. 因此, BET可作为肿瘤治疗的靶向位点. 目前已研究出多种针对肿瘤的BET抑制剂, 临床初步实验结果显示, BET抑制剂作用广泛, 毒性相对有限, 是一种人类癌症和其他疾病治疗的全新疗法, 具有很大的发展潜力. BET抑制剂作用的机制大多相同: BET抑制剂与BET蛋白的溴化主链结合, 将其从转录活性位点的乙酰化组蛋白尾中置换出来, 减少下游基因的转录、翻译, 阻碍癌细胞的生长和增殖, 对肿瘤起到抑制作用^[31]. 但是, Janouskova等^[57]发现, 在不同的癌症组织中, BET靶向抑制剂治疗的效果不同, 这对于BET抑制剂后续的研发与应用有着重要意义.

在正常生理情况下, SPOP识别结合BET, 通过泛素化降解途径调节细胞中BET蛋白. 然而, 子宫内膜癌中如SPOP-E47K、-E50K、-E78K等一类功能获得性突变, 可导致BET的调控水平显著变化. 该突变增强SPOP与BET蛋白溴结构域的亲合力, 易与BET蛋白形成Cul3-RBX1泛素E3连接酶

复合体, 蛋白质泛素化降解增强. 因此, 该种特异性 SPOP 突变子宫内膜癌中 BET 蛋白泛素化增强, 降解量增多, 细胞内 BET 蛋白水平降低 (图 4b).

经实验证明, BET 蛋白水平降低, 能导致细胞对 BET 抑制剂敏感. 细胞水平上, 在人类子宫内膜癌细胞系进行 BET 蛋白基因敲除, 细胞对 BET 抑制剂敏感性提高, 吻合先前的结论. 此外, 在建立的雌性裸鼠子宫内膜癌模型进行对照实验, 分别注射 JQ1 和溶剂, 成瘤后取瘤称重, 并做组织学分析, 证实肿瘤特异性 SPOP 突变对 BET 蛋白水平和 BET 抑制剂敏感性产生差异效应^[31]. 因此针对临床医疗, 我们设想一种新的方案: BET 抑制剂联用基因治疗. 在使用 BET 抑制剂的同时, 导入外源功能获得性 SPOP, 进一步地增强癌细胞中 BET 蛋白的泛素化降解, 以降低 BET 蛋白水平, 提高对 BET 抑制剂的敏感性, 协同增强 BET 抑制剂的效用, 以期更好的治愈成果. 但是, BET 抑制剂可能对正常细胞增殖造成影响, 对人类学习和记忆的转录调控产生有害作用, 将这种基于基因突变的治疗方式推广到临床实践仍然任重道远.

5.4 SPOP 与 ZBTB3 蛋白

锌指和 BTB 结构域蛋白 3 (zinc finger and BTB domain-containing protein 3, ZBTB3) 属于转录因子 ZBTB 家族. ZBTB3 结构域主要有结合 DNA 的锌指和抑制转录的 BTB / POZ 域.

ZBTB3 通过控制其靶标的转录来调控多种生物学过程. 一方面, 介导 Nanog 途径以增强胚胎干细胞 (ESC) 的自我更新, 是调控早期胚胎发育不可或缺的因素^[61]. 另一方面, ZBTB3 与癌细胞生长、分化和肿瘤发生息息相关. 其影响细胞抗氧化防御系统, 对癌细胞存活起积极作用, 抑制 ZBTB3 会引起细胞内 ROS 的积累, 从而导致癌细胞凋亡^[29].

目前已明确 ZBTB3 在子宫内膜癌中起到癌基因的作用^[29]. ZBTB3 是 SPOP 的底物, 能与之结合形成 Cul3-SPOP-RBX1 E3 泛素-连接酶复合物, 从而靶向 ZBTB3 进行泛素化降解, 进一步影响其下游基因的转录表达 (图 4b). 子宫内膜癌中, SPOP-E47K、-E50K、-G75R 等特异性突变 SPOP 与 ZBTB3 的亲合力减弱, 失去结合降解 ZBTB3 的能力, 细胞内 ZBTB3 蛋白水平上升, 因而促进子宫内膜癌细胞增殖、迁移和侵袭.

ZBTB3 影响癌细胞生长分化的主要下游基因是 SHH, 该基因介导的 Hedgehog 信号传导途径是

影响各种类型肿瘤发生和维持的重要途径之一^[62]. 研究人员推测 SPOP 可能部分通过 ZBTB3 的积累上调 SHH 表达, 活化 Hedgehog 途径, 进一步促进子宫内膜细胞的增殖、迁移和侵袭^[30]. SHH 的小分子抑制剂 RUSKI-43 可通过特异性抑制 SHH 棕榈酰化, 从而阻断自分泌和旁分泌的 Hedgehog 信号传导, 抑制癌细胞生长. 因此, 抑制 SHH 有望成为新的治疗靶点——针对 SPOP 基因突变的子宫内膜癌.

6 展 望

综上, 在子宫内膜癌中 SPOP 作为 E3 泛素连接酶接头蛋白促进 ER、BET 和 ZBTB3 的降解而发挥抑癌功能. SPOP 在子宫内膜癌的组织中存在高频点突变, 这些突变对 SPOP 的功能存在明显差异. 对于 ER 和 ZBTB3, 这些突变是功能丧失性突变 (loss of function), 抑制与底物的结合能力从而减弱对底物的泛素化降解; 然而对于 BET 蛋白, 这些突变又是功能获得性突变 (gain of function), 提高了野生型 SPOP 对 BET 的泛素化能力. 鉴于 SPOP 在子宫内膜癌中抑癌功能, 临床中可能行之有效的的方法是: 若使用 SHH 抑制剂并转入外源 SPOP 作为子宫内膜癌的治疗方案, 外源野生型 SPOP 通过泛素化降解降低 ZBTB3 蛋白水平, 从而减少 SHH 基因的表达, 间接增强对 SHH 抑制剂的敏感性, 可能将达到更好的治疗效果. 另外, 对于 BET 蛋白水平高的患者, 可以考虑 BET 抑制剂联用 SPOP 功能获得性突变体的基因治疗. 在使用 BET 抑制剂的同时, 导入外源功能获得性 SPOP, 进一步增强癌细胞中 BET 蛋白的泛素化降解, 以降低 BET 蛋白水平, 提高对 BET 抑制剂的敏感性, 协同增强 BET 抑制剂的效用, 以期更好的治疗效果. 但是, 目前对于 SPOP 的研究仍然面临诸多问题和挑战. 例如: 子宫内膜癌患者中, SPOP 突变体到底是如何影响野生型 SPOP 的功能, 其具体的分子机制尚不清楚, 另外, SPOP 在子宫内膜癌中主要受哪些信号通路调控, 这些问题亟待研究和解决.

参 考 文 献

- [1] Amant F, Mirza M, Koskas M, *et al.* Cancer of the corpus uteri. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics* 2018, **143**(Suppl 2):37-50
- [2] Ulrich L. Endometrial cancer, types, prognosis, female hormones and antihormones. *Climacteric*, 2011, **14**(4): 418-425
- [3] Trojano G, Damiani G, Casavola V, *et al.* The role of hysteroscopy in evaluating postmenopausal asymptomatic women with

- thickened endometrium. *Gynecology and Minimally Invasive Therapy*, 2018, **7**(1): 6-9
- [4] O'hara A, Bell D. The genomics and genetics of endometrial cancer. *Advances in Genomics and Genetics*, 2012, **2012**(2): 33-47
- [5] 李小毛, 杨晓辉. 子宫内膜癌的治疗进展. *中国现代手术学杂志*, 2013, **17**(1): 76-79
Li X M, Yang X H. *Chinese Journal of Modern Operative Surgery*, 2013, **17**(1): 76-79
- [6] Swerdlow A, Jones M. Tamoxifen treatment for breast cancer and risk of endometrial cancer: a case-control study. *Journal of the National Cancer Institute*, 2005, **97**(5): 375-384
- [7] 陶霞, 郭燕燕. 子宫内膜癌手术方式的选择与预后. *中国妇产科临床杂志*, 2000, **1**(1): 11-13
Tao X, Guo Y Y. *Chinese Journal of Clinical Obstetrics and Gynecology*, 2000, **1**(1): 11-13
- [8] 周克平. 子宫浆液性癌及其前期病变. *临床与实验病理学杂志*, 2001, **17**(4): 345-347
Zhou K P. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2001, **17**(4): 345-347
- [9] Le Gallo M, O'hara A, Rudd M, *et al.* Exome sequencing of serous endometrial tumors identifies recurrent somatic mutations in chromatin-remodeling and ubiquitin ligase complex genes. *Nature Genetics*, 2012, **44**(12): 1310-1315
- [10] Childers J, Brzechffa P, Hatch K, *et al.* Laparoscopically assisted surgical staging (LASS) of endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, 1993, **51**(1): 33-38
- [11] Childers J, Surwit E. Combined laparoscopic and vaginal surgery for the management of two cases of stage I endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, 1992, **45**(1): 46-51
- [12] Alektiar K, Makker V, Abu-Rustum N, *et al.* Concurrent carboplatin/paclitaxel and intravaginal radiation in surgical stage I-II serous endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, 2009, **112**(1): 142-145
- [13] Coux O, Tanaka K, Goldberg A. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual Review of Biochemistry*, 1996, **65**: 801-847
- [14] 倪晓光, 赵平. 泛素-蛋白酶体途径的组成和功能. *生理科学进展*, 2006, **37**(3): 255-258
Ni X G, Zhao P. *Progress in Physiological Sciences*, 2006, **37**(3): 255-258
- [15] Saldade J, Shiao J, Cazares V, *et al.* The ubiquitin-proteasome system functionally links neuronal Tomosyn-1 to dendritic morphology. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, **293**(7): 2232-2246
- [16] Barbier C E, Baca S C, Lawrence MS, *et al.* Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nature Genetics*, 2012, **44**(6): 685-689
- [17] Marzahn M, Marada S, Lee J, *et al.* Higher-order oligomerization promotes localization of SPOP to liquid nuclear speckles. *The EMBO Journal*, 2016, **35**(12): 1254-1275
- [18] Zhuang M, Calabrese M, Liu J, *et al.* Structures of SPOP-substrate complexes: insights into molecular architectures of BTB-Cul3 ubiquitin ligases. *Molecular Cell*, 2009, **36**(1): 39-50
- [19] Cuneo M, Mittag T. The ubiquitin ligase adaptor SPOP in cancer. *The FEBS Journal*, 2019, **286**(20): 3946-3958
- [20] Kwon J, La M, Oh K, *et al.* BTB domain-containing speckle-type POZ protein (SPOP) serves as an adaptor of Daxx for ubiquitination by Cul3-based ubiquitin ligase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, **281**(18): 12664-12672
- [21] Zhang Q, Shi Q, Chen Y, *et al.* Multiple Ser/Thr-rich degrons mediate the degradation of Ci/Gli by the Cul3-HIB/SPOP E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(50): 21191-21196
- [22] Geng C, He B, Xu L, *et al.* Prostate cancer-associated mutations in speckle-type POZ protein (SPOP) regulate steroid receptor coactivator 3 protein turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(17): 6997-7002
- [23] An J, Wang C, Deng Y, *et al.* Destruction of full-length androgen receptor by wild-type SPOP, but not prostate-cancer-associated mutants. *Cell Reports*, 2014, **6**(4): 657-669
- [24] Dai X, Gan W, Li X, *et al.* Prostate cancer-associated SPOP mutations confer resistance to BET inhibitors through stabilization of BRD4. *Nature Medicine*, 2017, **23**(9): 1063-1071
- [25] Fennell K A, Dawson M A. SPOP tips the balance of BETs in cancer. *Nature Medicine*. 2017; **23**(9): 1014-1015
- [26] Janouskova H, El Tekle G, Bellini E, *et al.* Opposing effects of cancer-type-specific SPOP mutants on BET protein degradation and sensitivity to BET inhibitors. *Nature Medicine*. 2017; **23**(9): 1046-1054
- [27] Zhang P, Wang D, Zhao Y, *et al.* Intrinsic BET inhibitor resistance in SPOP-mutated prostate cancer is mediated by BET protein stabilization and AKT-mTORC1 activation. *Nature Medicine*, 2017, **23**(9): 1055-1062
- [28] Zhang P, Gao K, Tang Y, *et al.* Destruction of DDIT3/CHOP protein by wild-type SPOP but not prostate cancer-associated mutants. *Human Mutation*, 2014, **35**(9): 1142-1151
- [29] Jin X, Wang J, Li Q, *et al.* SPOP targets oncogenic protein ZBTB3 for destruction to suppress endometrial cancer. *Am J Cancer Res*. 2019, **9**(12): 2797-2812
- [30] Janouskova H, El Tekle G, Bellini E, *et al.* Opposing effects of cancer-type-specific SPOP mutants on BET protein degradation and sensitivity to BET inhibitors. *Nature Medicine*, 2017, **23**(9): 1046-1054
- [31] Zhi X, Tao J, Zhang L, *et al.* Silencing speckle-type POZ protein by promoter hypermethylation decreases cell apoptosis through upregulating Hedgehog signaling pathway in colorectal cancer. *Cell Death & Disease*, 2016, **7**(12): e2569
- [32] Huang C, Chen H, Lin W, *et al.* Differential expression of speckled POZ protein, SPOP: putative regulation by miR-145. *Journal of Biosciences*, 2014, **39**(3): 401-413
- [33] Xu J, Wang F, Wang X, *et al.* miRNA-543 promotes cell migration and invasion by targeting SPOP in gastric cancer. *Oncotargets and Therapy*, 2018, **11**: 5075-5082
- [34] Li G, Ci W, Karmakar S, *et al.* SPOP promotes tumorigenesis by

- acting as a key regulatory hub in kidney cancer. *Cancer Cell*, 2014, **25**(4): 455-468
- [35] Lagory E, Giaccia A. The ever-expanding role of HIF in tumour and stromal biology. *Nature Cell Biology*, 2016, **18**(4): 356-365
- [36] Errington W, Khan M, Bueler S, *et al.* Adaptor protein self-assembly drives the control of a cullin-RING ubiquitin ligase. *Structure*, 2012, **20**(7): 1141-1153
- [37] Le Gallo M, Rudd M, Urick M, *et al.* Somatic mutation profiles of clear cell endometrial tumors revealed by whole exome and targeted gene sequencing. *Cancer*, 2017, **123**(17): 3261-3268
- [38] Delair D, Burke K, Selenica P, *et al.* The genetic landscape of endometrial clear cell carcinomas. *The Journal of Pathology*, 2017, **243**(2): 230-241
- [39] Le Gallo M, O'Hara A J, Rudd M L, *et al.* Exome sequencing of serous endometrial tumors identifies recurrent somatic mutations in chromatin-remodeling and ubiquitin ligase complex genes. *Nat Genet*, 2012, **44**(12): 1310-1315
- [40] Zhou W, Slingerland J. Links between oestrogen receptor activation and proteolysis: relevance to hormone-regulated cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2014, **14**(1): 26-38
- [41] 梅春霞, 张吉强. 雌激素受体. *生命的化学*, 2010, **30**(4): 590-594
Mei CX, Zhang JQ. *Chemistry of Life*, 2010, **30**(4): 590-594
- [42] Koos R. Minireview: Putting physiology back into estrogens' mechanism of action. *Endocrinology*, 2011, **152**(12): 4481-4488
- [43] Hamilton K, Hewitt S, Arao Y, *et al.* Estrogen hormone biology. *Current Topics in Developmental Biology*, 2017, **125**: 109-146
- [44] Musgrove E, Sutherland R. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2009, **9**(9): 631-643
- [45] Zhang P, Gao K, Jin X, *et al.* Endometrial cancer-associated mutants of SPOP are defective in regulating estrogen receptor- α protein turnover. *Cell Death & Disease*, 2015, **6**(3): e1687
- [46] Kandoth C, Schultz N, Cherniack A, *et al.* Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*, 2013, **497**(7447): 67-73
- [47] Zhao S, Choi M, Overton J, *et al.* Landscape of somatic single-nucleotide and copy-number mutations in uterine serous carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(8): 2916-2921
- [48] Kuhn E, Wu RC, Guan B, *et al.* Identification of molecular pathway aberrations in uterine serous carcinoma by genome-wide analyses. *J Natl Cancer Inst*, 2012, **104**(19): 1503-1513
- [49] Yang CY, Qin C, Bai L, Wang S. Small-molecule PROTAC degraders of the bromodomain and extra terminal (BET) proteins - a review. *Drug Discov Today Technol*, 2019, **31**: 43-51
- [50] Bechter O, Schöffski P. Make your best BET: the emerging role of BET inhibitor treatment in malignant tumors. *Pharmacol Ther*, 2020, **208**: 107479
- [51] Murakami S, Li R, Nagari A, *et al.* Distinct roles for BET family members in estrogen receptor α enhancer function and gene regulation in breast cancer cells. *Molecular Cancer Research*, 2019, **17**(12): 2356-2368
- [52] Qin Z, Wang T, Su S, *et al.* BRD4 promotes gastric cancer progression and metastasis through acetylation-dependent stabilization of snail. *Cancer Research*, 2019, **79**(19): 4869-4881
- [53] Bonazzoli E, Bellone S, Zammataro L, *et al.* Derangements in HUWE1/c-MYC pathway confer sensitivity to the BET bromodomain inhibitor GS-626510 in uterine cervical carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 2020, **158**(3): 769-775
- [54] Zhang M, Liu S, Huang W, *et al.* Bromodomains and extra-terminal (BET) inhibitor JQ1 suppresses proliferation of acute lymphocytic leukemia by inhibiting c-Myc-mediated glycolysis. *Medical Science Monitor*, 2020, **26**: e923411
- [55] Yu J, Zhou P, Du W, *et al.* Metabolically stable diphenylamine derivatives suppress androgen receptor and BET protein in prostate cancer. *Biochemical Pharmacology*, 2020, **177**: e113946
- [56] Pal D, Evgrafov O, Tabares P, *et al.* BRD2 (RING3) is a probable major susceptibility gene for common juvenile myoclonic epilepsy. *American Journal of Human Genetics*, 2003, **73**(2): 261-270
- [57] Janouskova H, El Tekle G, Bellini E, *et al.* Opposing effects of cancer-type-specific SPOP mutants on BET protein degradation and sensitivity to BET inhibitors. *Nat Med*, 2017, **23**(9): 1046-1054
- [58] Shi J, Vakoc C. The mechanisms behind the therapeutic activity of BET bromodomain inhibition. *Molecular Cell*, 2014, **54**(5): 728-736
- [59] Jung M, Gelato KA, Fernández-Montalván A, *et al.* Targeting BET bromodomains for cancer treatment. *Epigenomics*, 2015, **7**(3): 487-501
- [60] Ye B, Liu B, Yang L, *et al.* LncKdm2b controls self-renewal of embryonic stem cells *via* activating expression of transcription factor. *The EMBO Journal*, 2018, **37**(8): e97174
- [61] Lim J. Zinc finger and BTB domain-containing protein 3 is essential for the growth of cancer cells. *BMB Reports*, 2014, **47**(7): 405-410
- [62] Kreisingerová K, Ondrušová U, Horák P, *et al.* Importance of aberrantly activated Hedgehog/Gli pathway in tumour progression. *Klin Onkol*, 2020, **33**(3): 177-183

Research Progress on The SPOP's Negative Role in The Development of Endometrial Cancer*

ZHUANG Hui^{1,2)**}, LIN Zi-Han^{1,2)**}, LIN Ting^{1,2)**}, CAO Xin-Yi^{1,2)}, JIN Xiao-Feng^{1,2)***}

¹⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, China;

²⁾Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pathophysiology, Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Endometrial cancer(EC) is the most common tumors in women, with the rate of incidence and mortality has been greatly increased recently. With the wide application of targeted therapy in clinic, exploring new targets has been the most critical link in the accurate treatment of endometrial carcinoma. More and more studies have found that the E3 ubiquitin ligase adaptor speckle-type POZ protein (SPOP) plays an important role in the development of EC. In this review, we analysed recent research articles in this field and focused on the current research status of EC and ubiquitin-proteasome system(UPS) , the structure and function of SPOP, factors influencing and regulating SPOP and the mutations and substrates of SPOP in EC. Moreover, we summarized the molecular role of SPOP on repressing EC mostly in three key signal pathways: estrogen receptor- α (ER α) - mediated signaling pathway, bromodomain and extraterminal protein(BET) pathway and zinc finger and BTB domain-containing protein 3(ZBTB3) pathway. We look forward to SPOP as the new molecular targeted therapy for EC.

Key words endometrial cancer, ubiquitination, SPOP, mutation

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0287

* This work was supported by grants from the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY20C070001) , School Medical Joint Fund of Zhejiang Key Laboratory of Pathophysiology and Technology (201901) , The National Natural Science Foundation of China (31801165) and K.C. Wong Magna Fund in Ningbo University.

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-574-87609951, E-mail: jinxiaofeng@nbu.edu.cn

Received: August 6, 2020 Accepted: October 23, 2020