

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0069-03

## 嵌合性启动子 HRE. CArG 的构建及对肝癌细胞乏氧和射线应答的调控

郑爱青<sup>1,2</sup>, 宋现让<sup>1</sup>, 于金明<sup>3</sup>, 王兴武<sup>1</sup>, 魏玲<sup>1</sup>(1. 山东省肿瘤医院基础研究中心, 济南 250117; 2. 天津医科大学, 天津 300070; 3. 山东省肿瘤医院放疗科, 济南 250117)

实体瘤中乏氧区的存在是影响放疗效果最主要的因素之一<sup>[1]</sup>。在一个基因启动子内利用乏氧和射线应答元件联合, 限制治疗基因仅在乏氧和/或受照组织激活, 可提高治疗比率。该文研究目的是构建包含 HREs 和 CArG 元件的乏氧-辐射嵌合性基因启动子, 并观察乏氧及照射时该启动子诱导增强的绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)在 BEL7402 肝癌细胞中的表达变化。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

大肠杆菌 JM109、肝癌细胞株 BEL7402 为本实验室冻存; pcDNA3.1(-), PBI-EGFP, pcDNA3.1. EGFP 质粒为本实验室保存。限制性内切酶购自 Promega 或 Takara 公司; 质粒抽提试剂盒购自上海生工; Lipofectamine 购自 Invitrogen 公司; 流式细胞仪为美国 BD 公司的 FACS Calibur; CO<sub>2</sub> 培养箱为 Heraeus 公司的 HERA CELL240; 乏氧培养箱为美国 RSBiotech 公司的 Galaxy R CO<sub>2</sub> 培养箱。

#### 1.2 互补的单链寡脱氧核糖核酸的合成

每个启动子由 2 条互补的单链寡脱氧核糖核酸(single-stranded oligodeoxy-ribonucleotide, ODN)构成, 均由上海生工合成。MiniCMV(49 bp): 5'-GTA CCG TAG GCG TGT ACG GTG GGA GGC CTA TAT AAG CAG AGC CTC GAG A-3' 和 5'-AGC TTC TCG AGG CTC TGC TTA TAT AGG CCT CCC ACC GTA CAC GCC TAC G-3', 两端含 Acc65 I 和 Hind III 酶切位点, 并引入一 Xho I 位点。HREs 由两段互补的 ODNs 构成: HRE1 和 HRE2, HRE1(79 bp): 5'-AAT TGC CAC AGT GCA TAC GTG GGC TCC AAC AGG TCC ACA GTG CAT ACG TGG GCT CCA ACA GGT CCA CAG TGC ATA CGT G-3' 和 5'-GCC CAC GTA TGC ACT GTG GAC CTG TTG GAG CCC ACG TAT GCA CTG TGG ACC TGT TGG AGC CCA CGT ATG CAC TGT GGC-3'; HRE2(73 bp): 5'-GGC TCC AAC AGG TCC ACA GTG CAT ACG TGG GCT CCA ACA GGT CCA CAG TGC ATA CGT GGC CTC CAA CAG GTG-3' 和 5'-GAT CCA CCT GTT GGA GCC CAC

GTA TGC ACT GTG GAC CTG TTG GAG CCC ACG TAT GCA CTG TGG ACC TGT TGG A-3'。CArG(80 bp) 为 5'-GAT CCC CTT ATT TGG GCA CCT TAT TTG GCT GCC ATA TTA GGT TCC CTT ATT TGG GCA CCT TAT TTG GCT GCC ATA TTA GG-3' 和 5'-GTA CCC TAA TAT GGC AGC CAA ATA AGG TGC CCA AAT AAG GGA ACC TAA TAT GGC AGC CAA ATA AGG TGC CCA AAT AAG GG-3', 两端含 BamH I 和 Acc65 I 酶切位点。将 ODNs 用 T4PNK 磷酸化后, 每对互补的 ODNs 在 PCR 仪中 95℃, 5 min, 室温 30 min, 发生退火反应, 产生 miniCMV, HRE1, HRE2 和 CArG 双链 DNA 片段; 将 HRE1 和 HRE2 用 T4 DNA 连接酶连接, 产生的 DNA 片段命名为 HRE(两端含 Mfe I 和 BamH I 酶切位点)。

#### 1.3 pDNA. HRE, pDNA. CArG 和 pDNA. HRE. CArG 质粒的构建

用 Nru I/EcoR V 酶切 pcDNA3.1, 去掉 CMV 启动子, 自连后产生的质粒用 Acc65 I/Hind III 双酶切, 电泳后回收 5.4 kb 载体片段, 与 miniCMV 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 JM109, 扩增转化菌, 少量抽提质粒 DNA, 构建的质粒命名为 pDNA, 包含下列多克隆位点: Mfe I EcoR I -BamH I -Acc65 I -Kpn I -Xho I -Hind III -Afl II -BGH polyA。

将 pDNA 分别用 Mfe I/BamH I, BamH I/Acc65 I 双酶切, 回收的目的片段, 分别与 HRE 和 CArG 连接, 构建 pDNA. HRE 和 pDNA. CArG 质粒。pDNA. HRE 用 BamH I/Acc65 I 酶切后与 CArG 连接, 构建 pDNA. HRE. CArG 质粒。

#### 1.4 pDNA. EGFP, pDNA. HRE. EGFP, pDNA. CArG. EGFP 和 pDNA. HRE. CArG. EGFP 质粒的构建

EGFP 自 PBI-EGFP 质粒中用 PCR 扩增。EGFP 上游引物: 5'-GAT CTC GAG CGG ATG GTG AGC AAG GGC-3', 5' 端含 Xho I 位点, 下游引物: 5'-GGC CTT AAG TTC TTA CTT GTA CAG CTC GTC-3', 5' 端含 Hind III 位点。PCR 扩增后回收 750 bp 的 PCR 产物, Xho I/Hind III 双酶切后, 分别与经同样酶切的 pDNA, pD-

NA. HRE, pDNA. CArG 和 pDNA. HRE. CArG 连接, 构建 pDNA. EGFP, pDNA. HRE. EGFP, pDNA. CArG. EGFP 和 pDNA. HRE. CArG. EGFP 质粒。所构建的质粒均经上海生工测序证实。

### 1.5 细胞转染后乏氧及照射处理

将 BEL7402 细胞按  $2 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔板中。按操作说明用 Lipofectamine 分别将 pcDNA3.1. EGFP, pDNA. EGFP, pDNA. HRE. EGFP, pDNA. CArG. EGFP 和 pDNA. HRE. CArG. EGFP 质粒转染细胞, 转染 24 h 后细胞行乏氧及照射处理。分组包括乏氧/常氧组 (37°C, 5% CO<sub>2</sub> 温箱中孵育), 照射/假照射组, 乏氧照射/常氧假照射组, 每组设 3 个复孔。乏氧处理时, 细胞转染后 24 h, 将 6 孔板周围密封, 放入乏氧培养箱中 (0.1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 和 N<sub>2</sub> 平衡气中) 37°C 孵育 24 h; 射线照射时, 用 Varian 2100C 直线加速器照射, 6MV X 线, 每次 5 Gy; 乏氧照射时, 6 孔板密封乏氧 24 h 后照射。

### 1.2.6 基因表达分析

细胞乏氧及照射后 24 h, 胰酶消化, 计数, 加 PBS 液 1 000 r/min 离心 5 min, 用 PBS 重悬细胞, 300 目尼

龙网过滤后用流式细胞仪检测 EGFP 荧光表达变化。用转染 pDNA. EGFP 细胞的荧光表达作为阴性对照, 如果转染其他质粒细胞与转染 pDNA. EGFP 的对照细胞相比, 荧光增强即认为阳性。

乏氧及射线处理后 EGFP 表达变化(倍) =

$$\frac{\text{乏氧及射线处理组中 EGFP 阳性表达细胞}(\%)}{\text{相同质粒转染的常氧及假照射组 EGFP 阳性表达细胞}(\%)}$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 合成启动子的构建

用 Mfe I/BamH I, BamH I/Acc65 I, BamH I/Acc65 I 分别酶切 pDNA. HRE, pDNA. CArG, pDNA. HRE. CArG 质粒, 可得到约 150 bp, 80 bp 和 80 bp 的片段, 用 Xho I/Hind III 分别酶切 pDNA. EGFP, pDNA. HRE. EGFP, pDNA. CArG. EGFP 和 pDNA. HRE. CArG. EGFP 质粒, 均得到一 750 bp 的片段, 证实合成启动子载体构建成功并经测序证实。

### 2.2 转染细胞乏氧及照射后 EGFP 表达变化

以转染 pDNA. EGFP 的细胞 EGFP 表达作为阴性对照, 各组转染细胞 EGFP 表达水平见表 1。

表 1 BEL7402 细胞转染后在不同处理条件下 EGFP 表达水平(%)

质粒	常氧	乏氧	假照射	照射	常氧/假照射	乏氧/照射
pDNA. HRE. EGFP	1.22 ± 0.2	3.53 ± 0.21	1.37 ± 0.06	3.26 ± 0.12	1.27 ± 0.13	4.03 ± 0.14
pDNA. CArG. EGFP	1.17 ± 0.03	1.91 ± 0.15	1.31 ± 0.15	3.49 ± 0.25	1.09 ± 0.01	2.61 ± 1.30
pDNA. HRE. CArG. EGFP	1.22 ± 0.02	3.53 ± 0.21	1.37 ± 0.06	3.26 ± 0.12	1.27 ± 0.13	4.03 ± 0.14
pcDNA3.1. EGFP	7.34 ± 0.06	7.34 ± 0.06	9.41 ± 0.09	10.28 ± 0.31	6.81 ± 0.14	7.39 ± 0.29

转染细胞乏氧 24 h 后, 与常氧对照组相比, pDNA. HRE. EGFP, pDNA. CArG. EGFP, pDNA. HRE. CArG. EGFP 和 pcDNA3.1. EGFP 组荧光表达分别增强  $2.5 \pm 0.9$ ,  $1.7 \pm 0.5$ ,  $2.9 \pm 0.4$  和  $1.0 \pm 0.2$  倍, 乏氧后 pDNA. HRE. EGFP 和 pDNA. HRE. CArG. EGFP 组 EGFP 表达变化与 pcDNA3.1. EGFP 组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 照射组与假照射组相比, pDNA. HRE. EGFP, pDNA. CArG. EGFP, pDNA. HRE. CArG. EGFP 和 pcDNA3.1. EGFP 组荧光表达分别增强  $1.9 \pm 0.7$ ,  $2.7 \pm 0.5$ ,  $2.4 \pm 0.6$  和  $1.1 \pm 0.3$  倍, 照射后 pDNA. CArG. EGFP 和 pDNA. HRE. CArG. EGFP 组 EGFP 表达变化与 pcDNA3.1. EGFP 组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 乏氧照射组与常氧假照射组比较, pDNA. HRE. EGFP, pDNA. CArG. EGFP, pDNA. HRE. CArG. EGFP 和 pcDNA3.1. EGFP 组荧光强度分别增强  $2.6 \pm 0.7$ ,  $2.4 \pm$

$0.6$ ,  $3.2 \pm 0.6$  和  $1.1 \pm 0.4$  倍, 乏氧照射后 pDNA. HRE. EGFP, pDNA. CArG. EGFP, pDNA. HRE. CArG. EGFP 组 EGFP 表达变化与 pcDNA3.1. EGFP 组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。细胞转染 pcDNA3.1. EGFP 后, 乏氧组 EGFP 表达较常氧对照组轻度下降 ( $7.34 \pm 0.06$  对  $7.34 \pm 0.06$ ), 照射和乏氧照射组与各自对照组比较 EGFP 表达无明显改变 ( $P > 0.05$ )。

周围正常组织对放射线的耐受性限制了放疗剂量, 影响了肿瘤治疗效果。射线应答启动子 Egr-1 已经广泛用于肿瘤的放射-基因治疗, 其内 10 bp 序列的 CArG 元件是射线应答基序, 以 CArG 元件为基础的合成基因启动子具有特异性辐射诱导特性<sup>[2]</sup>。Scott 等<sup>[3]</sup>用 CArG 元件作为射线应答启动子诱导 EGFP 在肿瘤细胞中表达, 显示包含不同数目 CArG 元件的启动子对射线的应答不同, 这对临床上获得治疗基因的

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2005 )01-0071-03

## Stathmin 蛋白的研究进展

吴 冰 综述; 张立潮, 张惠中 审阅 ( 第四军医大学唐都医院中心实验室, 西安 710038 )

[ 摘 要 ] Stathmin 蛋白由于其特有的微管解聚活性, 在细胞的增殖和分化及肿瘤发生中有十分重要的作用。抑制 Stathmin 蛋白的表达已经成为肿瘤基因治疗的新的靶点, 并且已经证实 Stathmin 蛋白能够影响某些作用于微管的化疗药物的疗效, 对于指导临床用药有一定的意义。Stathmin 蛋白还能够促进神经系统的发育, 因此受到更多的关注。

[ 关键词 ] Stathmin; 神经系统; 肿瘤; 细胞周期

[ 中图分类号 ] R730.59 [ 文献标识码 ] A

Stathmin 蛋白是近年来发现的在细胞的增殖和分化中十分重要的可溶性蛋白质, 其家族成员包括 Stathmin, SCG10, SCLIP 和 RB3。SCG10, SCLIP 和 RB3 都与 Stathmin 蛋白在碳末端有高度的同源性, 称为 Stathmin 样结构域。各种 Stathmin 样结构域都具有共同的碳末端螺旋并具有共同的属

性, 仅在活性上稍有差异。Stathmin 蛋白最初从牛大脑中提纯, 位于核周体。其磷酸化作用调节细胞的增殖及分化, 对于细胞外信号起一个中继站的作用, 故命名为 Stathmin, 来自于希腊语 stathmos ( relay )<sup>[1]</sup>。后在其他哺乳动物、爬行动物、两栖类及一些鸟类中发现了 Stathmin 家族成员。

高表达水平是很重要的。

实体瘤中乏氧细胞的存在是导致放疗失败的原因之一, 用包含乏氧应答启动子载体调控治疗基因表达可克服这一不利因素。Greco O 等<sup>[4]</sup>用包含来自 Epo, PGK1 和 VEGF 基因的 HREs, 与 CArG 元件构建嵌合性启动子调节基因表达。这些双增强子在单用乏氧及照射时均发挥作用, 并在肿瘤细胞内选择性调控 EGFP 表达, 与辣根过氧化物酶( horseradish peroxidase, HRP )联合, 在乏氧及照射时选择性增敏表达 HRP 的细胞, 在前体药物 IAA 存在时, 能大大增强自杀基因对肿瘤的杀伤性。提示在肿瘤微环境内, 嵌合性启动子在解决放疗中乏氧问题的基因治疗策略中, 可望有效调节治疗基因表达。

我们构建的 HRE. CArG 嵌合性启动子载体, 包含来自 VEGF 基因的 5 个 HRE, 及来自 Egr-1 基因的 5 个 CArG, 邻近一个包含基本转录启动装置 TATA 盒的基础启动子( miniCMV ), miniCMV 能确保基因在照射结束后仍在肿瘤内继续表达, 在载体 pDNA 中合成启动子置于 EGFP 编码序列的上游。经酶切鉴定和测序证实, 序列正确, 常氧时基础表达水平低, 乏氧和照射后能使 EGFP 表达上调, 同时也观察到只包含 HRE 的启动子载体除对乏氧应答外, 也对照射应答, 只包含 CArG 的启动子载体除对照射产生应答外, 也对乏氧应答。包含 CMV 的 pcDNA3.1EGFP 对乏氧及照射也有

轻微应答。

总之, 该文结果显示包含 HRE 和 CArG 元件的嵌合性启动子可作为基因增强子对乏氧和照射应答, 使治疗基因局限于肿瘤内选择性表达, 降低周围正常组织损伤, 从而提高治疗比率。我们正在利用 HRE. CArG 嵌合性启动子调控自杀基因 HSVtk 表达, 进行肝癌的放疗增敏研究, 为进一步提高肝癌的放疗效果提供依据。

[ 关键词 ] 放射治疗; 基因治疗; 肝癌

[ 中图分类号 ] R730.43 [ 文献标识码 ] A

### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Greco O, Marples B, Joiner MC, *et al.* How to overcome ( and exploit ) tumor hypoxia for targeted gene therapy[ J ]. *J Cell Physiol*, 2003, 197( 3 ): 312-325.
- [ 2 ] Ahmed MM. Regulation of radiation-induced apoptosis by early growth response-1 gene in solid tumors[ J ]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2004: 43-52.
- [ 3 ] Scott SD, Joiner MC, Marples B. Optimizing radiation-responsive gene promoters for radiogenetic cancer therapy[ J ]. *Gene Ther*, 2002, 9( 20 ): 1396-1402.
- [ 4 ] Greco O, Marples B, Dachs GU, *et al.* Novel chimeric gene promoters responsive to hypoxia and ionizing radiation[ J ]. *Gene Ther*, 2002, 9: 1403-1411.

[ 收稿日期 ] 2004 - 08 - 02

[ 修回日期 ] 2004 - 09 - 14

[ 本文编辑 ] 王莹, 韩丹

Stathmin 蛋白由 149 个氨基酸组成,分子量 19 kD, pH 5.5 ~ 6.2。有两个不同的亚型  $\alpha/\beta$ , 其肽链 16, 25, 38 及 63 位点分别为 4 个丝氨酸 (Ser-16, Ser-25, Ser-38, Ser-63)<sup>[2]</sup>, 是该蛋白的磷酸化部位并与其功能发挥有重要关系。细胞内、外有多种细胞因子、癌基因及抑癌基因表达产物通过直接、间接与 Stathmin 蛋白作用或通过改变其表达水平引起细胞生物学行为改变。Johnsen<sup>[3]</sup> 研究表明 P53 能够通过以下方面负调控 Stathmin 蛋白表达: 1. P53 介导的细胞生长抑制与 Stathmin 蛋白表达下调有关。2. 报告基因测定显示 P53 能够抑制 Stathmin 启动子的活性。另有文献报道<sup>[4]</sup> Stathmin 蛋白与肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、热休克蛋白 (Hsp70)、钙结合蛋白 (S100A4) 及 CD45、转录因子 E2F 及抗癌蛋白 RB 等因子有着直接或间接的关系。虽然该基因的发现距今已有 10 余年,但直到近 5 年来随着科学界对细胞骨架 (尤其是微管蛋白、微管及纺锤体) 在细胞分裂增殖中的作用不断深入认识,才真正揭开 Stathmin 蛋白作为细胞信号转导分子在细胞分化、组织再生、修复及发育中尤其是恶性肿瘤发生、发展及决定表型上的重要作用及意义。

### 1 Stathmin 在神经系统中的作用

Stathmin 蛋白在神经系统中高表达,对于神经系统的发育及神经节的形成十分重要。Stathmin 蛋白和 SCG10 都表达于单独的神经元,但其分布又各有不同。Stathmin 蛋白广泛分布于神经系统中,主要分布于细胞体,而 SCG10 主要分布于树突和轴突的高尔基体中,它们的功能是相互补充的。Cheon<sup>[4]</sup> 使用二维电泳的方法发现在阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease) 和唐氏综合症 (Down syndrome) 患者额叶和颞叶皮质中 Stathmin 蛋白的水平与正常对照相比显著降低,而在胎儿唐氏综合症和正常对照中 Stathmin 蛋白水平没有显著差异。表明降低 Stathmin 蛋白的水平与神经节的形成有关,但与胎儿唐氏综合症的脑发育不全无关。Mori 等<sup>[6]</sup> 也报告了随着老化 Stathmin 蛋白的减少, Alzheimer's disease 发病率也随着增加。为了调查人大脑老化的机制,尸检提取老年和年轻人的大脑中的蛋白,使用二维凝胶电泳分析,老年人大脑中 Stathmin 蛋白的数量减少,证实了 Stathmin 蛋白与大脑老化有关<sup>[7]</sup>。Leman 等<sup>[8]</sup> 也报告 Stathmin 蛋白有缺陷的老鼠有严重的外周和中枢神经系统轴突损伤,电生理学检查显示运动神经传导速度减慢,这表明 Stathmin 蛋白在神经系统中具有极其重要的作用。

### 2 Stathmin 蛋白与肿瘤发生

近年来因 Stathmin 蛋白在多种恶性肿瘤中高表达吸引了更多的关注,目前已经证实的肿瘤细胞系有白血病、淋巴瘤、神经系统胶质瘤、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌及消化系统恶性肿瘤等。已有研究表明,Stathmin 基因及其表达产物是一个极具吸引力的恶性肿瘤生物治疗新靶点。通过应用反义核酸、单克隆抗体、核酶、Stathmin 蛋白抑制剂及丝氨

酸位点突变体等方法封闭该基因表达均证实,抑制其表达可使细胞受阻于 G2/M 期。体外实验证明:抑制 Stathmin 基因表达能消除白血病细胞表型的改变。体内实验也发现:抑制 Stathmin 蛋白能防止白血病的发生<sup>[8]</sup>。Stathmin 蛋白表达对于维持和转变白血病细胞表达至关重要。但没有证据表明其与恶性转变过程直接相关,也许 Stathmin 蛋白高表达只反映了肿瘤增殖活性的增加,而且有实验证明高表达的 Stathmin 蛋白对于肿瘤高增值率至关重要<sup>[9]</sup>。范熙明等<sup>[10]</sup> 应用 RT-PCR 方法首次在成骨肉瘤细胞中检测到 Stathmin 基因高表达,在此基础上利用反义核酸技术抑制其表达。Stathmin 基因活性被封闭后, SOSP-9607 细胞的增殖出现障碍,说明 Stathmin 基因在维持 SOSP-9607 细胞的生长中起十分重要的作用。随着更加有效的基因沉默技术的应用及靶向性转录技术的发展,抑制 Stathmin 基因在恶性细胞的表达将具有很重要意义的治疗前景。

### 3 Stathmin 与微管作用化疗药物的关系

微管蛋白,以二聚体的形式存在,是真核生物细胞内重要的细胞骨架。微管动力学的调节由细胞内多种蛋白的参与, Stathmin 蛋白的下游作用靶点是对细胞分裂起关键作用的微管蛋白、微管及纺锤体等细胞器<sup>[12]</sup>, 通过调节微管系统的动力学平衡达到控制细胞周期的作用,并以此改变细胞的生物学行为。现已证实: Stathmin 蛋白具有解聚微管的作用,当其表达增加时,减少微管的聚合,使纺锤体无法形成;当其表达减少时,增加微管聚合,抑制微管解聚而抑制细胞分裂。Stathmin 蛋白的稳定性对于细胞内环境的稳定性十分重要,研究表明通过反义核酸技术抑制 Stathmin 蛋白表达可使 k562 细胞生长抑制,细胞生长停滞于 G2/M 期<sup>[13]</sup>。

其次, Stathmin 蛋白的磷酸化水平在有丝分裂期高于细胞间期, Ser-16, Ser-25, Ser-38, Ser-63 分别由 cdc2 蛋白激酶, 丝裂活化蛋白激酶 (MAPK), 钙调蛋白依赖的蛋白激酶 (CaMK) 和 cAMP 依赖的蛋白激酶 (PKA) 4 种激酶催化, 当 4 个位点完全磷酸化后, Stathmin 蛋白活性完全丧失, 细胞进入有丝分裂, 形成纺锤体。当 Stathmin 蛋白通过冈田酸 (okadaic acid) 去磷酸化后, 活性升高, 退出有丝分裂, 进入一个新的细胞周期<sup>[13]</sup>。Stathmin 蛋白磷酸化对于 G2/M 期转型至关重要, 缺乏任何一个色氨酸的突变体将导致 G2 向 M 期转型停止及多倍体的形成。

Stathmin 蛋白在细胞分裂中的重要作用总结如下: 有丝分裂间期, Stathmin 蛋白处于非磷酸化状态, 促进微管解聚。有丝分裂早期, Stathmin 蛋白磷酸化, 有丝分裂纺锤体形成。有丝分裂后期, Stathmin 蛋白去磷酸化, 有丝分裂纺锤体解聚, 退出有丝分裂。到下一个分裂间期, 微管重新聚合, 当进入有丝分裂重新解聚。

Stathmin 蛋白促进微管不稳定的因素目前尚不清楚。第一种假说: Stathmin 蛋白能增加微管亚单位发生缺失的频率 (catastrophes)<sup>[15]</sup>。但 Curmi 等<sup>[16]</sup> 证实 Stathmin 蛋白能减慢微管伸长但并不直接作用于微管末端促进微管

亚单位发生缺失,因此产生第二种假说: Stathmin 蛋白作为一种微管分离蛋白,通过与两分子  $\alpha/\beta$  二聚体形成 T2S 复合体使微管不稳定。另外 Stathmin 蛋白也作用于 GTP-微管蛋白复合物,刺激 GTP 的水解,从微管的生长端促进 GTP-微管蛋白复合物的分离。这种分歧由 Howell 等<sup>[17]</sup>解决,即证实通过切断 Stathmin 蛋白的 N 末端或 C 末端,发现 Stathmin 蛋白有两种不同的活性,而不同的区域促进两种不同的活性,在不同的 PH 值条件下适应两种模式, N 末端具有破坏微管的活性;而 C 末端则具有微管分离活性。但最新研究表明:不支持 Stathmin 蛋白是一种 PH 敏感蛋白质。因此 Stathmin 蛋白的作用机制还有待进一步考证<sup>[18]</sup>。

紫杉醇和长春碱是常用的两种化疗药物,紫杉醇能够增加微管的稳定性,长春碱能够降低微管的稳定性。两种药物都能够通过影响微管的动力学,使细胞的有丝分裂停止从而诱导凋亡。

通过对几种肺癌细胞的研究表明:微管的聚合状态能够影响其与化疗药物的结合。增加微管的聚合状态能够增加紫杉醇与微管的结合,减少长春碱与微管的结合。Stathmin 蛋白过表达能够降低微管的聚合作用,因而显著的减少紫杉醇与微管的结合,增加长春碱与微管的结合<sup>[18]</sup>。

Stathmin 蛋白过表达能够降低癌细胞对紫杉醇的敏感性,而对长春碱的影响较小。对于不作用于微管的化疗药物如阿霉素和喜树碱没有任何影响。Iancu 等<sup>[20]</sup>发现抑制 Stathmin 蛋白表达能够增加癌细胞对紫杉醇的敏感性,降低癌细胞对长春碱的敏感性。范熙明等<sup>[11]</sup>利用 Stathmin 基因反义核酸与紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 合用后的细胞生长抑制率较单独应用反义核酸有明显提高,说明 Stathmin 反义核酸与 PTX 有协同抗肿瘤效应。

荧光激活的细胞分选法和有丝分裂指数测定发现 Stathmin 蛋白过表达的细胞多进入 G2 期后不能进入 M 期。Stathmin 蛋白通过减少进入有丝分裂的细胞数降低长春碱的细胞毒性作用。这些数据显示: Stathmin 蛋白能够通过以下两个方面影响抗微管化疗药物(1)改变化疗药物与微管的结合;(2)作用于 G2 期与 M 期的边界。对这些机制的了解能够更好的指导化疗药物的使用。Stathmin 蛋白与该类化疗药物的作用点为同一通路(微管系统)的不同位点,在恶性肿瘤的生物治疗中与作用于微管的化疗药物联合应用可能有良好前景。

## [参考文献]

[1] Schubart UK, Alago W Jr, Danoff A. Properties of p19, a novel cAMP-dependent protein kinase substrate protein purified from bovine brain[J]. J Biol Chem, 1987, 262(24): 11871-11877.

[2] Chang CL, Hora N, Huberman N, et al. Oncoprotein 18 levels and phosphorylation mediate megakaryocyte polyploidization in human erythroleukemia cells[J]. Proteomics, 2001, 1(11): 1415-1423.

[3] Johnsen JI, Aurelio ON, Kwaja Z, et al. p53-mediated negative regulation of Stathmin/Op18 expression is associated with G(2)/M cell-cycle arrest[J]. Int J Cancer, 2000, 88(5): 685-691.

[4] Manceau V, Gavet O, Curmi P, et al. Stathmin interaction with HSP70 family proteins[J]. Electrophoresis, 1999, 20(2): 409-417.

[5] Cheon MS, Fountoulakis M, Cairns NJ, et al. Decreased protein levels of stathmin in adult brains with down syndrome and Alzheimer's disease[J]. J Neural Transm Suppl, 2001, (61): 281-288.

[6] Mori N, Morii H. SCG10-related neuronal growth-associated proteins in neural development, plasticity, degeneration, and aging[J]. J Neurosci Res, 2002, 70(3): 264-273.

[7] Chen W, Ji J, Xu X, et al. Proteomic comparison between human young and old brains by two-dimensional gel electrophoresis and identification of proteins[J]. Int J Dev Neurosci, 2003, 21(4): 209-216.

[8] Liedtke W, Leman EE, Fyffe RE, et al. Stathmin-deficient mice develop an age-dependent axonopathy of the central and peripheral nervous systems[J]. Am J Pathol, 2002, 160(2): 469-480.

[9] Jeha S, Luo XN, Beran M, et al. Antisense RNA inhibition of phosphoprotein p18 expression abrogates the transformed phenotype of leukemic cells[J]. Cancer Res, 1996, 56(6): 1445-1450.

[10] Mistry SJ, Atweh GF. Stathmin expression in immortalized and oncogene transformed cells[J]. Anticancer Res, 1999, 19(1A): 573-577.

[11] 范熙明, 张惠中, 张明华, 等. Stathmin 基因反义核酸对人骨肉瘤细胞系的生长抑制作用[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(5): 469-471.

[12] Walczak CE. Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins[J]. Curr Opin Cell Biol, 2000, 12(1): 52-56.

[13] Luo XN, Mookerjee B, Ferrari A, et al. Regulation of phosphoprotein p18 in leukemic cells. Cell cycle regulated phosphorylation by p34cdc2 kinase[J]. J Biol Chem, 1994, 269(14): 10312-10318.

[14] Mistry SJ, Atweh GF. Stathmin inhibition enhances okadaic acid-induced mitotic arrest: A potential role for Stathmin in mitotic exit[J]. J Biol Chem, 2001, 276(33): 31209-31215.

[15] Belmont L, Deacon HW, Mitchison TJ. Catastrophic revelations about Op18/Stathmin[J]. Trends Biochem Sci, 1996, 21(6): 197-198.

[16] Jourdain L, Curmi P, Sobel A, et al. Stathmin: A tubulin-sequestering protein which forms a ternary T2S complex with two tubulin molecules[J]. Biochem, 1997, 36(36): 10817-10821.

[17] Howell B, Larsson N, Gullberg M, et al. Dissociation of the tubulin-sequestering and microtubule catastrophe-promoting activities of oncoprotein 18/Stathmin[J]. Mol Biol Cell, 1999, 10(1): 105-118.

[18] Honnappa S, Cutting B, Jahnke W, et al. Thermodynamics of the Op18/Stathmin-tubulin interaction[J]. J Biol Chem, 2003, 278(40): 38926-38934.

[19] Alli E, Bash-Babula J, Yang JM, et al. Effect of Stathmin on the sensitivity to antimicrotubule drugs in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2002, 62(23): 6864-6869.

[20] Iancu C, Mistry SJ, Arkin S, et al. Effects of Stathmin inhibition on the mitotic spindle[J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 5): 909-916.

[收稿日期] 2004-07-05

[修回日期] 2004-10-20

[本文编辑] 韩丹, 王莹