

[文章编号] 1007-385X(2005)03-

p53 转录非依赖活性诱导细胞凋亡的研究进展

何伟刚 综述; 曹雪涛 审阅 (浙江大学免疫学研究所, 杭州 310031)

[摘 要] p53 主要有两条途径来介导细胞凋亡:通过促进下游促凋亡因子的基因转录来诱导凋亡;通过转录非依赖活性诱导细胞凋亡。研究发现在 p53 转录活性缺失,或者基因转录、蛋白翻译受抑制的情况下,p53 仍然可以诱导细胞凋亡。研究结果提示 p53 的转录非依赖途径在促细胞凋亡中发挥着重要的甚至是关键的作用,所以对转录非依赖活性诱导细胞凋亡途径的深入了解将会对肿瘤治疗有所裨益。

[关键词] p53; 凋亡; 转录非依赖; 肿瘤治疗

[中图分类号] R730.2 [文献标识码] A

抑癌基因 p53 在细胞周期调控、基因组稳定性维持、细胞凋亡以及细胞分化中起着重要作用^[1-2],p53 及其下游调控基因的研究则受到普遍的关注。尤其是 p53、凋亡、肿瘤治疗三者的关系成为大家关注的一焦点。为了进一步提高 p53 基因治疗肿瘤的疗效,迫切需要对 p53 诱导细胞凋亡的机制有更加清楚的认识,因此,p53 和细胞凋亡的机制研究成为该研究领域的-一个前沿热点。在细胞受到各种应激的情况下(如电离辐射所致 DNA 损伤、核苷酸缺失、低氧、癌基因激活),P53 蛋白将启动细胞内凋亡机制。以前大多数研究者认为,P53 的促细胞凋亡作用是通过促进下游目的基因的转录来实现,包括一些促凋亡蛋白和死亡受体如 BAX,NOXA,PUMA,BID,APAF-1,CD95,CR5 等。然而,近年来的一些研究工作表明 P53 也可以通过转录非依赖的途径来促细胞凋亡。

1 p53 转录非依赖活性诱导细胞凋亡

早在 1994 年 Caelle 等^[3]发现即使在 RNA 合成抑制物或蛋白质合成抑制物存在下,p53 仍可诱导细胞凋亡,这表明 p53 的促转录活性在其介导的细胞凋亡过程中并非必不可少。随后的研究也发现 p53 的一些突变体虽然失去和 DNA 发生特异性结合的能力,但仍能诱发某些细胞发生凋亡。Chipuk 等人^[4]构建了一系列 p53 突变体,包括 p53¹⁻¹⁰²(C 端大片段缺失)、p53^{Q25/S26}(转录激活域内某些关键位点突变)、p53^{ΔNLS}(缺乏核定位信号)。这些 p53 突变体都有缺乏转录活化下游基因的能力但可以诱导细胞凋亡。

另一些关于 p53 转录非依赖的促凋亡活性的研究是在细胞核缺失的无细胞体系下进行的。Ding 等人^[5]采用能发生 p53 转录非依赖的细胞凋亡的模型,提取该细胞的胞浆成分(不含细胞核但包含线粒体),发现 P53 蛋白能直接介导 caspase-3 的活化,若用免疫沉淀方法去除 P53 蛋白,caspase-3 则不能活化。与此一致的是,Schuler 等人^[6]在无细胞体系中发现胞浆内活化的 P53 可以导致线粒体内促凋亡分子——细胞色素 C 的释放。这些结果表明 p53 的促凋亡活

性可以不依赖于细胞核的存在。

此外,促进 P53 蛋白在胞浆聚集的研究进一步支持了 P53 转录非依赖的促凋亡活性。Chipuk 等人^[7]发现 E1A 或 Ras 转化的野生型小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)经 UV 刺激后可发生细胞凋亡;即使同时用小麦胚凝集素(一种细胞核转运抑制剂)处理,促使 P53 蛋白聚集在胞浆中,细胞仍可以发生凋亡。令人感兴趣的是,他们发现如果 MEFs 仅表达小鼠 P53 突变体 P53^{Q25/S26}(对应于人的 P53^{Q22/S23}),细胞经 UV 的照射后并不发生凋亡;但如果给这种细胞加上小麦胚凝集素,则即使在无 DNA 损伤的情况下细胞就可以发生凋亡。这些实验证据提示转录功能失活的 P53 只有聚集在胞浆才会有促凋亡的作用,而胞浆中 P53 的水平(无论是野生型还是突变型),将极大地影响到 P53 促凋亡作用。

综上所述,p53 转录非依赖地促细胞凋亡活性是存在的,因此,有关其具体作用机制的研究愈发受到重视。

2 P53 非转录依赖性促细胞凋亡的 3 条途径

2.1 p53 通过诱导细胞膜表面受体 Fas 的增加而介导细胞凋亡

Fas 是细胞膜表面蛋白,属于肿瘤坏死因子受体家族。在某些敏感型细胞中,活化 Fas 信号即能诱导凋亡。研究发现经电离辐射后,细胞中野生型 P53 水平的瞬时增加可进一步提高细胞表面 Fas 受体的数量,说明在射线照射诱导的 Fas 正调控依赖于野生型 P53 的表达上调。Martin 等^[8]报道 p53 介导、Fas 参与的细胞凋亡是属于一个快速反应机制:在人的血管平滑肌细胞中,p53 活化后可迅速增加细胞表面 Fas 受体的数量,从而导致细胞凋亡。这些 Fas 受体是从高尔基复合体内输出到细胞膜表面的,高尔基复合体的破坏可阻断这种 p53 诱导的 Fas 转运,并且抑制后续的细胞凋亡。此外,P53 可以诱导 Fas 受体细胞膜内区域与 FADD 的结合,从而增加细胞对 Fas 配体的敏感性。这些变化与 p53 下游基因的活化无关,是 p53 转录非依赖的促细胞凋亡的途径之一。

2.2 p53 通过线粒体途径来介导凋亡

2.2.1 p53 转位于线粒体是介导转录非依赖性凋亡的首要条件

许多生化证据表明 p53 转录非依赖的促凋亡活性主要是通过线粒体-caspase 途径来实现的。线粒体是凋亡信号整合和传导的重要装置,处于在凋亡触发阶段和执行阶段的交接处。尤其在在源性途径介导的细胞凋亡中,如辐射诱导的 DNA 损伤、缺氧或衰退生长因子等原因引起的细胞凋亡中,线粒体的作用显得更为重要。在不同凋亡刺激下,线粒体外膜的通透性增加,引起线粒体功能障碍和内膜的跨膜电位下降,进而存在于线粒体内的一些促凋亡蛋白被释放出来,包括细胞色素 C、Smac(Diablo)、凋亡诱导因子(AIF)、HtrA2(Omi)和 EndoG。这些蛋白进入细胞质或细胞核,活化一些蛋白酶、核酸酶或中和一些存在于胞浆中的凋亡抑制物,从而诱导凋亡^[9-10]。线粒体外膜的通透性和 Bcl-2 蛋白家族成员密切相关。Bcl-2 蛋白家族成员包括一些促凋亡蛋白如 Bax, Bad, Bim 和 Bid 等和一些抗凋亡的蛋白如 Bcl-2、Bcl-XL 等,前者活化可增加线粒体膜的通透性,后者则维持线粒体膜的稳定性^[9,11],它们相互拮抗并且维持一种稳态。

在线粒体参与 p53 转录非依赖的细胞凋亡中, P53 蛋白的线粒体转位是首要的触发因素。Marchenko 等人^[12]应用几种独立的实验方法证实 P53 的线粒体转位存在于多种人和小鼠的细胞凋亡模型中,包括经典的细胞成分分析、免疫电镜以及免疫荧光分析等。他们还发现这种 P53 转位现象仅存在于 p53 依赖的细胞凋亡中,而在 p53 非依赖的细胞凋亡和 p53 依赖的细胞周期阻滞中未能观察到。P53 的线粒体转位发生于细胞凋亡早期。在喜树碱诱导的 ML-1(髓系白血病细胞系)细胞凋亡中,约在细胞受损后 1 h 左右即可观察到 P53 转位,并持续增强至 6 h,从而引起线粒体膜通透性增加、细胞色素 C 释放和 caspase-9 酶原的激活,进而导致效应 caspase,如 caspase-3, caspase-6, caspase-7 的活化。更直接的证据是在 P53 蛋白的氨基端加上一个线粒体输入引导序列,从而使外源的 P53 蛋白直接定位到线粒体,可导致 3 种 p53 缺失的肿瘤细胞(Saos-2, H1299, HeLa)发生凋亡。体外实验也证实 P53 蛋白可直接导致线粒体的破裂。Mihara 等人^[13]将野生型的 P53 蛋白加入新鲜分离的小鼠肝细胞线粒体中,可观察到在 30 min 内 90% 以上的线粒体释放细胞色素 C,事实上 69% 的细胞色素 C 都是在加入 P53 后 5 min 内释放的。这些数据从不同角度证实了细胞凋亡过程中 P53 蛋白对线粒体的直接作用。

2.2.2 P53 转位后和 Bcl-XL, Bax 蛋白的相互作用

然而, P53 蛋白转位至线粒体后如何诱导线粒体的凋亡变化? 近年来的研究结果初步揭示了 P53 对线粒体作用机理: P53 是通过活化 Bcl-2 蛋白家族成员中促凋亡蛋白来导致线粒体膜通透性增加, P53 蛋白先和 Bcl-XL 结合, 导致游离的 Bax 增多, Bax 发生寡聚化, 从而引起线粒体膜通透性增加以及细胞色素 C 的释放。随后, 细胞色素 C 和 APAF-1 及 caspase-9 前体形成凋亡体复合物, 进一步活化 caspase-3、6、

7, 最终导致凋亡。因此, 从 BAX, APAF-1, caspase-9 基因敲除的小鼠^[8-9]来源的成纤维细胞对 p53 诱导细胞凋亡有抵抗作用。Mihara 等^[13]以辐射处理后的 C57BL/6 小鼠的胸腺细胞作为研究对象, 发现经辐射后胸腺细胞中的 P53 向线粒体转位, 而这种 P53 转位的先决条件是和 Bcl-2, Bcl-XL 形成复合物。但他们认为 P53/Bcl-XL 复合物并不能直接导致线粒体膜通透性的改变, 还需要其他蛋白的协助。因为在 p53 转录非依赖的细胞凋亡模型中若加入过量的 Bcl-XL, 凋亡则不会发生。这说明 P53/Bcl-XL 复合物在 p53 的介导凋亡过程中并非起直接作用, 还需要一个中间媒介来引起线粒体膜通透性的改变, 那就是 Bax 蛋白。实验证明, Bax 蛋白在 Bid、野生型 P53 的作用下, 可以导致脂质体的破裂, 释放出脂质体内标记的右旋糖苷, 脂质体破裂的机制和线粒体破裂极为类似, 所以 Bax 可以以类似机制破裂线粒体。Chipuk 等人^[7]也发现在离体的线粒体中加入纯化的野生型 P53 后, 在 Bax 蛋白存在的条件下, 会引起细胞色素 C 的释放。研究者认为 p53 通过线粒体途径促凋亡的具体过程是: P53 从核内转位于胞浆中, 与 Bcl-XL 发生高亲和力的结合, 并转位至线粒体, 从而使原先和 Bcl-XL 结合的 Bid 蛋白(含有 BH3 结构域的蛋白)游离出来, 并作用于 Bax 蛋白, 引起它们的寡聚化, 然后寡聚化的 Bax 蛋白引起线粒体通透性的改变, 释放出细胞色素 C, 然后导致细胞凋亡。

2.2.3 p53 的不同结构域在转录非依赖性凋亡所起的作用

至于 P53 的哪个结构域在线粒体促凋亡的途径中发挥关键作用, 研究者们存在着很大的分歧。P53 拥有众多结构域, 每个结构域都有各自的主要功能, 有 DNA 结合结构域、脯氨酸富集区域(PP 域)、转录激活结构域(TA 域)、C 末端的四聚体区域(Tet 域)等^[13-14]。Mihara 等^[11]认为 P53 和 Bcl-XL 的结合是通过 P53 的 DNA 结合域形成的, 即通过保守的 P53 核心区(239 - 248 氨基酸残基)。他们认为 P53 的 DNA 结合域具有双重功能的, 不仅为转录活化下游基因所必须, 而且在线粒体途径介导的转录非依赖凋亡方面也起着关键作用。P53 的 DNA 结合域的错义突变将同时导致这 2 条 p53 参与的细胞凋亡信号通路的阻滞, 造成细胞不能发生凋亡, 引起疾病。在一些人类肿瘤细胞中存在着某些 p53 的突变, 已有的研究证实这些突变的 p53 缺乏转录活化下游基因的能力, 从而不能促进凋亡以及抑制肿瘤生长。然而这些突变的 p53 是否还具备活化转录非依赖细胞凋亡途径的能力? 研究者^[13]随机检测了 SKBr3(R175H), T47D(L194F), MDA468(R273H), MDA231(R280K)这 4 种乳腺癌细胞(分别包含不同 4 种 p53 突变), 发现这些细胞中总的 P53 都非常高, 而且在没有凋亡刺激存在的情况下, 突变 P53 都聚集到线粒体, 但通过免疫共沉淀却无法检测出 P53/Bcl-XL 复合物的存在。研究者再将这些突变 p53 转染到 p53 缺失的 H1299 细胞, 发现与野生型 P53 相比, 突变 P53 与 Bcl-XL 的结合能力明显下降, 也不能诱导细胞凋亡。这 4 种突变均发生于 100 ~ 300 位氨基酸之间, 即 P53 的核心保守区, 也是 DNA 结合域。这些结果证实了 DNA 结合域中的突变可能会

影响到 P53 和 Bcl-XL 的结合,从而影响到 p53 转录非依赖的促凋亡活性。

然而,一部分研究者持有不同的观点。Baptiste 等^[15]的研究表明 P53 的脯氨酸富集域(即 PP 域),由 62~91 位氨基酸组成,为 p53 诱导转录非依赖的细胞凋亡所必需。Chipuk 等人也持相同观点,他们证实了若 P53 缺乏 PP 域则无法在 PRIMA-1 作用下诱导细胞凋亡。而 P53 的其他结构域,如 DNA 结合域和羧基域,则对转录非依赖的凋亡影响不大,因为在缺失 DNA 结合域和羧基域而脯氨酸富集域(PP 域)存在的情况下,P53 依然具备促凋亡活性。这种凋亡活性是转录非依赖的,即使在放射菌素 D、环己酰亚胺(基因转录和蛋白翻译的抑制剂)的作用下该活性依然存在。以上结果说明 P53 的脯氨酸富集域与转录非依赖的凋亡密切相关。更深入的证据是,他们认为 P53 和 Bcl-XL 的结合是通过脯氨酸富集域(PP 结构域)来实现的,因为野生型 P53 能够与内源性以及外源性的 Bcl-XL 结合,PP 域突变的 P53 和 Bcl-XL 亲和力和极低,几乎不能与之结合;而 PP 域正常的 P53 和 Bcl-XL 的结合亲和力很高,只有加入极大量的 Bid 或 Bax 才能将 P53 从 Bcl-XL 上置换出来^[16]。因此,他们认为 PP 域才是 p53 转录非依赖促凋亡所必需的。

2.3 p53 通过诱导溶酶体的不稳定来介导凋亡

Yuan 等^[17]发现 p53 可以通过溶酶体-线粒体途径来诱导凋亡。他们把 Val-135 温度敏感的 p53 基因转染到 M1 髓系白血病细胞中,这些细胞在 32℃ 时,p53 作用类似于野生型 p53 可以促使细胞凋亡;而在 37℃ 时 p53 则类似于突变型 p53 不发挥促凋亡作用。研究者通过这一模型来研究 p53 的作用机制。在 32℃ 的条件下,在凋亡早期可以发现溶酶体的破裂,然后出现线粒体膜电位的改变、细胞色素 C 的释放,最终导致 caspase 的活化和细胞凋亡。以前的研究虽然认为溶酶体破裂是凋亡过程中一个普遍现象,但总认为它是发生在凋亡后期。而 Yuan 等人认为溶酶体破裂是凋亡早期的事件,是细胞凋亡的触发因素,而且可以直接或者间接引起线粒体的损伤,从而导致后续的凋亡变化。以往的研究证实白细胞介素 6(IL-6)能够抑制该细胞模型中 p53 介导的细胞凋亡,而且 Yuan 等人发现 IL-6 也能抑制溶酶体破裂,表明 P53 是诱导溶酶体破裂的关键因素。然而关于 p53 是否通过转录非依赖的方式直接接触溶酶体破裂,还缺乏直接的证据,有待于进一步的研究。

3 p53 转录非依赖途径和转录依赖途径相互联合共同诱导细胞凋亡

p53 是通过转录非依赖和转录依赖这两条途径在某种程度上相互合作,共同介导细胞凋亡,两条途径所起的作用强弱与细胞类型、细胞所处的环境、所受到的刺激、细胞本身所处的细胞周期阶段密切相关。就目前证据表明,p53 可能通过转录活化下游基因来提高胞浆内促凋亡因子的水平,为 P53 在胞浆中营造一种更为优化的环境,使 p53 转录非依赖的促凋亡活性得以发挥或者更为有效发挥促凋亡作用。Mi-

hara 和他的同事^[18]在最近的文章中指出,在体内环境下, γ 电离辐射会导致小鼠一些组织如胸腺、脾脏、睾丸、脑损伤,发现这些组织中的细胞内的 P53 以极快的速度转位于线粒体,并引起了 caspase3 的第一波活化,启动非转录依赖的凋亡,然后 p53 转录依赖途径开始发挥作用,活化下游基因 PU-MA, Noxa, Bax, 这些新产生蛋白释放到胞浆中来介导凋亡,可以引起 caspase3 的第二波的活化。所以说 p53 转录非依赖途径是一种迅速、立即反应促凋亡作用,p53 转录依赖途径则是一个后续的更为缓慢的促凋亡过程,两者相辅相成,使 P53 蛋白充分发挥促凋亡活性。

4 展望

近年来肿瘤的 p53 基因治疗的基础研究与临床应用的广泛开展,有关 p53 诱导肿瘤细胞凋亡的研究倍受瞩目^[19-20],而重新激活肿瘤细胞中 p53 介导细胞凋亡是比较常见的肿瘤治疗策略,具体手段包括:导入外源的野生型 p53;使细胞内的突变 P53 重新获得野生型 P53 的功能;直接激活 p53 促细胞凋亡途径中的某几个关键蛋白从而活化途径;其中导入外源的野生型 p53 来抑制肿瘤的基因疗法已经进入临床试验阶段。而将人工合成 P53 某一部分肽段导入细胞也能发挥促凋亡功效,如 C 端肽段能恢复 P53 与 DNA 相结合的能力甚至转录功能,还能通过转录非依赖方式来增加细胞表面 Fas 受体的表达水平。但由于人工合成肽段的复杂性和稳定性以及费用昂贵,并没有进一步应用到临床。最近国外的研究者尝试利用药理学的方法恢复肿瘤细胞中突变 p53 的生理活性从而来诱导肿瘤细胞凋亡,他们利用 PRIMA-1(p53 再激活和凋亡诱导分子)来诱导一种转录非依赖的凋亡,这种凋亡是 Bax 依赖的,凋亡过程中可观察到 Bax 的转位和细胞色素 C 的释放。他们期望这种药理学的 p53 激活剂能够对肿瘤生长能有抑制作用。但也有研究者持有不同意见,他们认为肿瘤生长的抑制和 p53 转录活化功能更为相关,光有 p53 的转录非依赖促凋亡功能不能对肿瘤生长有很强的抑制作用。只有在 p53 完整的情况下,而且是在转录活化功能未受损伤的情况下,才能对肿瘤的生长有明显的抑制作用。总之,深入研究 p53 诱导的细胞凋亡信号转到通路,进一步了解 p53 抑制肿瘤发生发展的可能机制,将有利于我们寻找肿瘤治疗的新策略。

致谢:本文撰写过程中得到陈玮博士的大力帮助,特此致谢。

[参考文献]

- [1] 阎昭,李雯,牛瑞芳,等. Adwtp53 对 p53 状态不同结肠癌细胞生长的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(1): 42-47.
- [2] 闵红波,楼建华,王建文,等. TGF β 1 诱导视网膜母细胞瘤细胞凋亡及对 p53 的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2004, 11(3): 215-216.
- [3] Caelles C, Heimberg A, Karin M, et al. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes[J]. Nature. 1994, 370(6486): 220-223.

- [4] Chipuk J, Maure U, Green DR, *et al.* Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(5): 371-381.
- [5] Ding H, Lin Y, McGill G, *et al.* Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53 [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(49): 38905-38911.
- [6] Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis [J]. *Biochem Soc Trans*, 2001, 29(pt6): 684-688.
- [7] Chipuk J, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, *et al.* Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis [J]. *Science*, 2004, 303(5660): 1010-1014.
- [8] Martin SJ, Finucane DM, Amarante-Mendes GP, *et al.* Phosphatidyserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(46): 28753-28756.
- [9] Xiaodong Wang. The expanding role of mitochondria in apoptosis [J]. *Genes & Development*, 2001, 15(17): 2922-2933.
- [10] Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, *et al.* Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development [J]. *Cell* 1998, 94(6): 727-737
- [11] Kuida K, Haydar T F, Kuan C Y, *et al.* Reduced apoptosis and cytochrome C-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9 [J]. *Cell*, 1998, 94(3): 325-337.
- [12] Marchenko ND, Zaika A, Moll UM, *et al.* Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(21): 16202-12.
- [13] Mihara M, Erster S, Zaika A, *et al.* p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria [J]. *Mol Cell*, 2003, 11(3): 577-590.
- [14] Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, *et al.* The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential [J]. *Nat Genet*. 2003, 33(3): 357-365.
- [15] Baptiste N, Friedlander P, Chen X, *et al.* The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells [J]. *Oncogene*, 2002, 21(1): 9-21.
- [16] Baptiste N, Prives C. p53 in the cytoplasm: A question of overkill? [J] *Cell*, 2004, 116(4): 487-489.
- [17] Yuan XM, Li W, Dalen H, *et al.* Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(9): 6286-6291.
- [18] Erster S, Mihara M, Kim RH, *et al.* *In vivo* mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(15): 6728-6741.
- [19] 刘加军, 伍新尧, 潘祥林, 等. α 干扰素联合阿糖胞苷对白血病 K562 细胞的诱导凋亡作用及其机制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2003, 10(3): 198-201.
- [20] 迟志宏, 张积仁, 李鹏, 等. 常规化疗药物连续刺激对人肺腺癌细胞株表达 erbB2, p53 和 MDR1 的影响 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2004, 11(2): 105 ~ 109

[收稿日期] 2005 - 06 - 10

[修回日期] 2005 - 07 - 16

[本文编辑] 王莹