

[文章编号] 1007-385X(2005)04-0303-03

P53-mdm2 相互作用与肿瘤治疗策略

宋丽萍¹综述; 邱曙东²审阅(1. 西安交通大学第一医院放疗科, 西安 710061; 2. 西安交通大学医学院解剖与组织胚胎学系, 西安 710061)

[摘要] mdm2 是 P53 肿瘤抑制功能的主要调节者, 两者之间存在自动调节的负反馈环, mdm2 可通过与 P53 结合促进其降解。由诸多因素造成的 mdm2-p53 相互关系失衡所带来的直接后果就是导致 p53 的失活而引起肿瘤的发生。已证明有 3 种翻译后修饰: 磷酸化、寡聚化及与其它蛋白的结合影响着 mdm2、P53 蛋白复合物的形成。干扰两者的结合, 使 P53 发挥转录活性是抗肿瘤的关键。mdm2 和 P53 蛋白相互作用抑制剂的研究是抗肿瘤治疗的一个新靶点, 有广阔的应用前景。

[关键词] P53; mdm2; 肿瘤治疗

[中图分类号] Q55; R730.59 [文献标识码] A

在肿瘤癌基因和抑癌基因的研究中, 最受关注的是大部分肿瘤的发生和发展同 P53 的变异和缺欠相关。近年来研究阐明, 肿瘤细胞不仅存在 P53 的变异和缺失, 而且也具有其细胞内降解代谢的改变。仅补充野生型 P53 在许多肿瘤的治疗中效果有限, 而使用相关的生物活性肽干扰 P53 的细胞内过程, 可以使变异的 P53 恢复抗肿瘤生长的生物活性并能延长和增强 P53 诱导肿瘤细胞凋亡的作用。mdm2 在细胞内调节 p53 浓度及活性中起关键作用, 两者构成负反馈环路, 调节 p53 的稳定性。应急情况下, 对 p53、mdm2 的翻译后调节、亚细胞再分布、抑制 mdm2 活性、直接抑制 mdm2 转录等, 促使 p53 快速积聚, 防止细胞异常生长和恶性转化。由诸多因素造成的 mdm2-p53 相互关系失衡所带来的直接后果就是导致 p53 的失活而引起肿瘤的发生。因此如能将 p53 从被 mdm2 的抑制中释放出来或阻断 mdm2 与其它基础转录因子的相互作用以恢复 p53 的正常功能, 即可抑制癌细胞的发生或发展。

1 p53-mdm2 负反馈环路调节 p53 的稳定性

人类 P53 蛋白由 393 个氨基酸组成, 有氨基(N)端酸性转录激活区、中央核心 DNA 结合区、寡聚区和羧基端(C)4 个主要功能区。前 3 个结构区决定了 P53 识别、转录活化靶基因的功能。P53 的 C 末端 360~393 位点的氨基酸与其磷酸化、乙酰化从而发挥生物功能有关。

P53 的负调控因子 mdm2 癌基因(鼠双微体基因, *murine double minute 2*, 在人的同源基因为 *hdm2*), 位于 12q13-14, 长 2 372 bp, 有 2 个启动子, P1 在编码基因的上游, P2 在第一个内含子中, 由 p53 通过其附近的两个 p53 结合位点进行控制。mdm2 表达的 p90 蛋白为核蛋白, 有 491 个氨基酸, 相对分子质量 9×10^4 , 有 3 个保守区域, 分 4 个功能区: 1 区, N 端约 100 个氨基酸残基, 是与 p53 结合的部位, 也可能直接结合到细胞基因启动子上激活基因。该区还有核定位序列(NLS)和核输出信号(NES); 2 区, 为高度酸性区域, 可与核

糖体蛋白 L5, L11 及 5SrRNA 结合; 3 区, 含有一个锌指结构, 能结合到基因并激活基因, 使细胞由 G1 期进入 S 期; 4 区, 有一个环指结构, 可介导蛋白质-蛋白质的相互作用, 也能与 DNA 或 RNA 起作用, 参与细胞调控, 促进细胞增殖。

p53、mdm2 两者之间存在一个自动调节的负反馈环, 彼此相互进行精细的调节^[1]。mdm2 是 p53 的转录靶基因, p53 诱导 mdm2 的表达, mdm2 可通过与 p53 结合形成 mdm2-p53 复合物, 使 p53 泛素化, 被蛋白酶降解; mdm2 也对 p53 的转录活性有直接抑制作用, 高水平的 mdm2 基因产物可使 p53 失活。p53 在细胞内低浓度又可减少 mdm2 基因转录, 将 p53-mdm2 负反馈环路关闭, 使 p53 回到维持正常功能状态的水平。应急情况下, 对 p53、mdm2 的翻译后调节、亚细胞再分布、抑制 mdm2 活性、直接抑制 mdm2 转录, 促使 p53 快速积聚, 防止细胞异常生长和恶性转化^[2-3]。

mdm2 和 p53 之间相互作用位点已通过不同的途径得到阐明^[4]。通过 p53 基因的部分缺失和突变, 发现 mdm2 结合在 p53N 端转录激活功能区, 其结合位点序列为 T18FSDLW23(p53)。对 p53 的 N 端 11 个氨基酸和 mdm2 的 N 端 109 个氨基酸片段形成的复合物晶体进行 X 衍射分析显示: mdm2-p53 结合界面表面积为 $14.98(\text{nm})^2$, 二者之间结合力主要为疏水作用。mdm2 疏水裂隙界面上排列有 14 个芳香性和疏水性氨基酸($\alpha 2$ 螺旋上的 Met50, Leu54, Leu57, Gly58, Ile61, Met62, 中部 β 折叠上的 Tyr67, His73, Val75, Phe19, Val93, $\alpha 2'$ 螺旋上的 His 96, Ile99, Tyr100), p53 的疏水面与 mdm2 的 $\alpha 2$ 螺旋结合, 另一侧则与 mdm2 的 β 折叠相接近, 使 Phe19, Trp23 和 Leu26 深深嵌入 mdm2 的疏水裂隙中。Phe19 和 Trp23 与 mdm2 的 Ile61 和 Gly58 之间以范德华力相互吸引, Leu26 则与 mdm2 相近的 β 折叠以范德华力相互作用, 同时结合界面还有两处分子间氢键连接。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30471942); 陕西省科技攻关项目(2004k11-G3)

2 p53-mdm2 相互作用的调节

目前为止已证明有 3 种翻译后修饰:磷酸化、寡聚化及与其它蛋白的结合影响着 mdm2、p53 蛋白复合物的形成^[5-6]。mdm2 上有一个自然形成的槽,容纳 p53 蛋白的 15~29 位氨基酸残基。P53 蛋白在这个槽内形成 α 螺旋,该 α 螺旋有 3 个潜在的蛋白磷酸化位点 Ser15、Thr18、Ser20,它们磷酸化后可破坏与 mdm2 的连接。P53 蛋白体外构象研究表明,P53 蛋白在 Ser15 和 Ser37 位的磷酸化改变了 P53 蛋白的四级构象。在非磷酸化状态下,P53 蛋白的 mdm2 结合结构域能够接受 1 个 2β 转角结构,该结构很容易转化为 α 螺旋,可能增加了 P53 蛋白与 mdm2 结合的稳定性,Ser15 或 Ser20 的磷酸化可能降低了这个 2β 转角结构的稳定性,使 P53 蛋白不易与 mdm2 结合^[7]。mdm2 的磷酸化也可调控 mdm2、P53 蛋白复合物的形成。体外实验表明 mdm2 在 Ser17 位上被 DNA-PK 磷酸化,抑制了 mdm2、P53 蛋白复合物的形成。mdm2 在 Ser166、Ser186 位上被 Akt 磷酸化,阻断信号传导或抑制 mdm2 核输出,增加 P53 转录活性^[8]。

P53 蛋白寡聚化是 mdm2 与 P53 蛋白结合及 mdm2 介导的 P53 蛋白降解所必需的。P53 蛋白在溶液中自然形成一个四聚体,被激活后以序列依赖性方式与 DNA 结合,比以单体形式与 DNA 结合更有效。P53 蛋白寡聚化可能使 N 末端形成一个稳定构象,增加对 mdm2 的亲合力。

pARF 是有效的肿瘤抑制因子,人为 p14ARF,小鼠的同源物为 p19ARF,体内 ARF、mdm2 和 p53 相互作用有其结构基础,mdm2 与 p14ARF 的相互作用依赖于 mdm2 的羧基端部分与 ARF 的氨基端部分,mdm2 又以氨基端与 p53 结合,p14ARF 能与 mdm2 和 p53 形成三联复合物。在静息状态,p14ARF 位于核仁,mdm2 和 p53 处于核质穿梭过程,主要位于核基质。当某些癌基因活化,p14ARF 表达增高,其 N 端与 mdm2 结合,p53 不能被运输进入胞浆降解,导致 p53 的稳定性增加。还可能通过干扰 mdm2 触发的 p53 多泛素化功能而实现^[9]。此外多种病毒蛋白可通过与 p53 结合,影响 p53 活性和功能的发挥。目前已知能与 p53 结合的 DNA 肿瘤病毒蛋白有腺病毒 E1B、EBNA5、HPV-16、SV40T 和 HbxAg 等,病毒蛋白大多参与 p53 降解并灭活其正常生物学功能。

3 mdm2-p53 相互作用的干扰及药物研究

mdm2 和 P53 蛋白相互作用抑制剂的研究是当前肿瘤治疗研究中的一个热点。Lane 等 1997 年发现 mdm2 与 p53 结合部位的小肽结合能诱导细胞周期阻滞。Wasylyk 等 1999 年研究了类似 p53 的两个 mdm2 结合肽,其与 mdm2 的亲合力大 100 倍,在 Wtp53 存在的细胞系能诱导细胞周期阻滞和凋亡。Chene 等^[10]根据 mdm2-P53 晶体复合物的结构合成了一个与 mdm2 有良好亲和性的八肽 Ac-Phe-Met-Aib-Pmp-(6-Cl)Trp-Glu-Ac3c-Leu-NH₂,而且该八肽无须进一步修饰就能穿入细胞,在细胞中具有活性,能激活表达野生型 p53 蛋白的肿瘤细胞中 p53 蛋白的活性。Bougeret 等^[11]用 VP16

的转录激活结构域取代 p53 的 N 端,用“亮氨酸拉链”取代 C 端,这种嵌合型肿瘤抑制子(CST-1)能激活 p53 下游基因的转录,且不与 mdm2 结合,对多种肿瘤细胞系和裸鼠体内肿瘤的生长有抑制作用。Lin 等^[12]利用基因重组技术得到 p53 的变种——p53 14/19,也因不与 mdm2 结合而不被降解,可行使其抗癌功能。Duncan 等^[13]通过对 53 万种微生物提取物筛选发现,真菌 *Fusarium* SP. 代谢产物 chlorofusin 是分子量为 1363 的环肽,其对 mdm2-p53 之间的相互作用有明显拮抗效应,可恢复 P53 的正常功能。他们利用 NMR 得到了 chlorofusin 的基本骨架(药效团)结构和构型,并提供了生物合成此环肽的途径与方法。Evans 等^[14]将 mdm2 的结合结构域、核定位信号区和酸性区切除,得到的 mdm2-ALT1 可与全长 mdm2 结合,阻断 mdm2 与 p53 的结合及对 p53 的降解,提高了 p53 转录活性。近年来研究发现 mdm2 与 p53N 端的 13-27 位氨基酸(15 肽)结合能抑制 p53 降解,对肿瘤具有细胞毒作用,对正常细胞毒性很小^[15]。

Galatin 等^[16]利用 HINT (hydropathic interaction) 程序对已报道的活性多肽及 Wtp53 进行 QSAR 分析,得到设计非肽小分子的一些结构信息。Stoll 等^[17]根据 mdm2-p53 复合物晶体结构,并结合计算机辅助药物设计出以查尔酮为基本骨架的化合物,并通过多维核磁共振谱的变化确定这类化合物与 mdm2 的结合。生化实验亦显示,其中部分化合物能有效地阻断 mdm2-p53 蛋白复合物的形成,将 p53 释放出来,使其行使正常功能。最近非肽小分子 nutlins 1,2,3 体内外研究表明,能干扰 p53-mdm2 的相互作用发挥抗肿瘤作用,转染骨肉瘤 SJSA-1 的裸鼠 200 mg/kg,每日 2 次,连用 3 周,肿瘤完全消失,但与 mdm2 反义寡核苷酸比较,对 p53 突变细胞系的细胞毒作用较小^[18]。其它与 mdm2 结合的小分子 CP-31398 及 PRIMA-1 目前尚限于体外研究。

总之,目前已报道的针对 mdm2-p53 之间相互作用而发现或设计得到的化合物大致可分为三类:1)多肽及其类似物;2)利用基因工程对 Wt-p53 进行结构改造,使新产生的 p53 不与 mdm2 结合;3)非肽小分子干扰 p53-mdm2 的相互作用。虽然目前的研究报道还只停留在实验阶段,但是 mdm2-p53 相互作用作为一个新的、有希望的抗癌靶点,将会在抗癌领域发挥更大的作用,增强人类最终攻克癌症的信心。

[参考文献]

- [1] Lahav G, Rosenfeld N, Sigal A, et al. Dynamics of the p53-mdm2 feedback loop in individual cells[J]. Nat Genet, 2004, 36(2): 147-150.
- [2] Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein[J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13(3): 332-337.
- [3] Ashcroft M, Taya Y, Vousden KH. Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(9): 3224-3233.
- [4] Kussie PH, Gorina S, Marechal V, et al. Structure of the mdm2

- oncprotein bound to p53 tumour suppressor transactivation domain [J]. *Science*, 1996, 274(5289): 948-953.
- [5] Vousden KH. Activation of p53 tumor suppressor protein[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1602(1): 47-59.
- [6] Brooks CL, Gu W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15(2): 164-171.
- [7] Brooks CL, Gu W. Dynamics in the p53-mdm2 ubiquitination pathway[J]. *Cell Cycle*, 2004, 3(7): 895-899.
- [8] Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of mdm2 from the cytoplasm to the nucleus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(20): 11598-11603.
- [9] Ries S, Biederer C, Woods D, *et al.* Opposing effects of Ras on p53: Transcriptional activation of mdm2 and induction of p19 (ARF) [J]. *Cell*, 2000, 103(2): 321-330.
- [10] Chene P, Fuchs J, Bohn J, *et al.* A small synthetic peptide, which inhibits p53-hdm2 interaction, stimulates the p53 pathway in tumour cell lines[J]. *J Mol Biol*, 2000, 299(1): 245-253.
- [11] Bougeret C, Virone-Oddos A, Adeline E, *et al.* Cancer gene therapy mediated by CTS1, a p53 derivative: Advantage over wild-type p53 in growth inhibition of human tumors overexpressing mdm2 [J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(5): 789-798.
- [12] Lin J, Jin X, Page C, *et al.* A modified p53 overcomes mdm2-mediated oncogenic transformation: A potential cancer therapeutic agent[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(20): 5895-5901.
- [13] Duncan SJ, Gruschow S, Willismas DH, *et al.* Isolation and structure elucidation of chlorofusin, a novel p53-mdm2 antagonist from a fusarium sp[J]. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(4): 554-560.
- [14] Evans SC, Viswanathan M, Grier JD, *et al.* An alternatively spliced HDM2 product increases p53 activity by inhibiting HDM2 [J]. *Oncogene*, 2001, 20(30): 4041-4049.
- [15] Do TN, Rosal RV, Drew L, *et al.* Preferential induction of necrosis in human breast cancer cells by a p53 peptide derived from the mdm2 binding site[J]. *Oncogene*, 2003, 22(10): 1431-1444.
- [16] Galatin PS, Abraham DJ. QSAR: Hydropathic analysis of inhibitors of p53-mdm2 interaction[J]. *Proteins*, 2001, 45(3): 169-175.
- [17] Stoll R, Renner C, Hansen S, *et al.* Chalcone derivatives antagonize interaction between the human oncoprotein mdm2 and p53 [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(2): 336-344.
- [18] Vassilev LT, Vu BT, Graves B, *et al.* *in vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of mdm2 [J]. *Science*, 2004, 303(5659): 844-848.

[收稿日期] 2005 - 05 - 08

[修回日期] 2005 - 10 - 28

[本文编辑] 韩丹

《世界科学技术——中医药现代化》杂志 2006 年征订启事

《世界科学技术——中医药现代化》是在科技部农村与社会发展司、国家中医药管理局科教司、中科院生命科学与生物技术局等部门支持下,面向海内外发行的国家级刊物。2005 年 6 月,被科技部评为“中国科技核心期刊”。

主要栏目有专论、药学前沿、中医药现代化、人体系统数字化、知识产权运用与保护、产经研究、综述、博士论坛、高技术应用、基础研究、思路与方法、工业工程技术、争鸣园地、药物分析与鉴定、药物生产技术与学术进展与动态、市场评述与展望、科研管理、药材生产与基地建设等。本刊的目标读者是从事中医药工作的决策、管理人员、专家学者、教学及科研人员、企业管理和技术人员。

本刊为双月刊,刊号:CN11-1733/N,ISSN1003-1898,邮刊代号:2-534,每期 24 元,全年 144 元。

地址:北京海淀区中关村东路 55 号 中科院基础园思源楼 532 室

电话:010-62616352

传真:010-62652762

E-mail: wst@mail.casipm.ac.cn

联系人:刘萍

订阅方式:邮购汇款:北京 8712 信箱 世界科学技术杂志社

邮编:100080

银行汇款:开户银行:中国农业银行北京科院南路支行

户名:世界科学技术杂志社

帐号:250101040004668